

DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2023-89-3-14-24>

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УСКОРЕННЫХ ЭЛЕКТРОНОВ НА СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

© **Аркадий Владимирович Браун¹, Ульяна Александровна Близнюк^{2,3}, Полина Юрьевна Борщеговская^{2,3}, Виктория Сергеевна Ипатова³, Олег Юрьевич Хмелевский², Александр Петрович Черняев^{2,3}, Ирина Алексеевна Ананьева¹, Игорь Александрович Родин^{1,4*}**

¹ Химический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3.

² Физический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.

³ Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д. В. Скобельцына, Россия, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.

⁴ Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедра эпидемиологии и доказательной медицины, Россия, 119435, Москва, ул. Б. Пироговская, д. 2, стр. 2; *e-mail: igorrodin@yandex.ru

*Статья поступила 2 ноября 2022 г. Поступила после доработки 2 ноября 2022 г.
Принята к публикации 21 декабря 2022 г.*

Предложен метод количественной оценки влияния дозы ионизирующего излучения на структурные характеристики бычьего сывороточного альбумина (БСА) в водном растворе путем идентификации уникальных пептидов доменных структур белка с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. БСА с начальной концентрацией 500 мг/л в физиологическом растворе облучали пучком ускоренных электронов с максимальной энергией 1 МэВ при среднем токе пучка 1 мкА, средняя мощность дозы составляла 18,5 Гр/с. Поглощенную дозу в объеме образца оценивали с помощью ферросульфатного дозиметра Фрикке. После облучения раствора БСА в дозах 0,3, 0,6, 1, 8 и 20 кГр проводили анализ структурной целостности нативной формы белка и количественную оценку его содержания. Для этого путем центрифугирования отделяли соединения с массой более 30 кДа, затем осуществляли ферментативный гидролиз БСА с добавлением раствора трипсина и повторно отделяли образовавшиеся пептиды с массой более 10 кДа. Полученные образцы анализировали методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения (ВЖЭХ-МС/МС). Далее оценивали содержание неповрежденных молекул белка путем определения концентраций уникальных пептидов, соответствующих каждому из трех доменов, на которые разделялась аминокислотная последовательность БСА. С использованием разработанного подхода установлено изменение естественной конформации исследуемого белка (его денатурация) в водных пробах в результате воздействия ионизирующего излучения в дозах 0,3 – 20 кГр: в среднем у 71 % белковых молекул при дозе облучения до 1 кГр, у 79 % молекул при дозе 4 кГр и 99 – 100 % молекул при дозах 8 и 20 кГр.

Ключевые слова: масс-спектрометрия высокого разрешения; высокоэффективная жидкостная хроматография; ускоренные электроны; радиационная обработка; бычий сывороточный альбумин; пептиды БСА; трипсинолиз белков.

STUDY OF THE EFFECT OF ACCELERATED ELECTRONS ON THE STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF THE BOVINE SERUM ALBUMIN USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY AND HIGH-RESOLUTION TANDEM MASS SPECTROMETRY

© **Arkady V. Brown¹, Ulyana A. Bliznyuk^{2,3}, Polina Yu. Borshchegovskaya^{2,3}, Victoria S. Ipatova³, Oleg Yu. Khmelevsky², Alexander P. Chernyaev^{2,3}, Irina A. Ananyeva¹, Igor A. Rodin^{1,4*}**

- ¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 1-3, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia.
² Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 1-2, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia.
³ Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Russia, 1-2, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia.
⁴ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, 2-2, B. Pirogovskaya ul., Moscow, 119435, Russia;
*e-mail: igorrodin@yandex.ru

Received November 2, 2022. Revised November 2, 2022. Accepted December 21, 2022.

A method for quantification of the dose effect of ionizing radiation on the structural characteristics of bovine serum albumin (BSA) in aqueous solution through identification of unique peptides of protein domain structures using high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry is proposed. BSA with the initial concentration of 500 mg/liter in a physiological solution was exposed to irradiation at a dose rate of 18.5 Gy/sec using an accelerated electron beam with the maximum energy of 1 MeV at an average beam current of 1 μ A. The absorbed dose in the sample volume was estimated using a Fricke (ferrous sulphate) dosimeter. After irradiation of BSA solution at 0.3, 0.6, 1.8, and 20 kGy, we analyzed the structural integrity of the protein native form and then quantified the content. For this, masses more than 30 kDa were removed using centrifugation. Then BSA was subjected to enzymatic hydrolysis with the addition of trypsin solution, and the resulting peptides with a mass of more than 10 kDa were repeatedly removed. The resultant samples were then examined using liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) and high-resolution tandem mass spectrometry (HRMS-MS/MS). The content of intact protein molecules was assessed by determining the concentrations of unique peptides corresponding to each of the three domains into which the amino acid sequence of BSA was divided. Using the developed methodology, a change in the natural conformation of bovine serum albumin (denaturation) in water samples induced by ionizing radiation at a dose ranging from 0.3 to 20 kGy was revealed on average in 71% of protein molecules exposed to doses up to 1 kGy, in 79% of molecules exposed to doses of 4 kGy, and in 99 % to 100% of molecules exposed to doses of 8 and 20 kGy.

Keywords: high resolution tandem mass spectrometry; high performance liquid chromatography; accelerated electrons; radiation processing; bovine serum albumin; BSA peptides; trypsinolysis of proteins.

Введение

Одной из главных задач пищевой промышленности является увеличение сроков хранения продуктов питания при сохранении их питательной ценности и безопасности. В качестве эффективного метода подавления роста патогенных и условно патогенных микроорганизмов и предотвращения порчи продукта без применения химических веществ и повышения температуры применяют обработку продуктов питания ионизирующим излучением: гамма-излучением от радиоактивных источников ^{60}Co и ^{137}Cs , тормозным излучением, генерируемым электронными ускорителями с энергией не более 5 МэВ (7,5 МэВ в США) или электронным излучением с энергией не более 10 МэВ^{1,2}.

Термическая и химическая обработка продуктов питания может повлечь за собой изменение их химического состава и перестройку структуры молекул, например, может измениться пространственная конфигурация молекул белка, что приведет к потере его функциональных свойств и, как следствие, потере питательных качеств обработанных продуктов [1 – 4].

При радиационной обработке происходят разрывы химических связей белковых молекул как за счет взаимодействия с радикалами, образующимися в результате радиолитического распада воды, так и при прямом поглощении энергии излучения. В аминокислотах, формирующих нативную структуру белковых молекул, происходит отщепление или присоединение водорода, карбоксильной группы аминокислот в виде CO_2 и NH_3 , сшивка аминокислот и изменение количественного соотношения между ними. В результате молекулярных процессов возможны распад или агрегация белков и образование новых соединений — полипептидов [5]. Инициаторами многих белковых превращений являются ферменты. Так как большинство ферментов сами являются белками, они также изменяются под воздействием ионизирующего излучения. Следовательно, между процессами разрушения белков и ферментов имеет место конкуренция, которая влияет на конечный химический состав вещества [6, 7]. Выраженность эффектов воздействия ионизирующего излучения в той или иной степени зависит от параметров обработки и от особенностей биологической системы.

В результате, с одной стороны, возможна денатурация белка, а с другой — существуют исследования, указывающие на то, что при разрушении вторичной и третичной структур белка при облучении в дозах 1 – 6 кГр, но сохранении его первичной структуры, улучшается усваивае-

- ¹ ISO 11137-3-2006. Sterilization of health care products Radiation. Part 3: Guidance on dosimetric aspects.
² ISO 14470-2011. Food irradiation — Requirements for the development, validation and routine control of the process of irradiation using ionizing radiation for the treatment of food.

мость макромолекул у людей с различными заболеваниями желудочно-кишечного тракта и другими проблемами с перевариванием пищи [8].

В пищевой промышленности дозы облучения, которые выбирают в соответствии с задачами обработки конкретных продуктов, ограничиваются 7 – 10 кГр [9]. В ряде исследований показано, что воздействие ионизирующего излучения в дозах до 10 кГр позволяет сохранить неизменный аминокислотный состав белков [10]. Так, в работе [8] пучком электронов облучали грибы вешенки в диапазоне доз от 3 до 6 кГр: было показано, что в результате происходили изменения молекулярной структуры белков и наблюдалось их расщепление до первичной структуры.

При воздействии ускоренных электронов в дозах до 12 кГр на мясо говядины в сыром и обработанном (вяленном) виде авторами работ [9, 11] было показано, что белки не разрушались, а только трансформировались путем радиоллиза, при этом значительного изменения состава заменимых и незаменимых аминокислот в течение 10 сут хранения после облучения не происходило [9]. Облучение в дозе 9 кГр приводило к уменьшению количества аминокислот лишь на 3 % [11], а в дозе 12 кГр — на 5 % [5].

В части работ описано исследование выделенных образцов белковых макромолекул. В работе [12] было показано, что воздействие гамма-излучения на молекулярную структуру белка БСА в дозе 5 кГр привело к структурным изменениям в макромолекулах: первичная структура БСА сохранялась неизменной, в то время как вторичная и третичная структуры значительно изменялись, а также происходила агрегация полипептидной цепи без процесса фрагментации. В исследовании [13] наблюдалось изменение конформации яичного альбумина при облучении гамма-источником ^{60}Co в дозах 5, 10, 15, 20 и 25 кГр. При облучении раствора сывороточного белка гамма-излучением в дозах 10 – 25 кГр наблюдалась агрегация сывороточных белков, которая проявлялась увеличением вязкости и мутности раствора. В приведенных исследованиях также была отмечена зависимость вязкости раствора от количества образующихся радикалов, влияющих на распад пептидной связи, при этом в работе [14] показано, что в сухих растворах белков, в частности, овальбумина, радикальные процессы, вызывающие распад пептидных цепей, не развивались.

Существует ряд методик, позволяющих оценить изменения общей концентрации белковых молекул пищевых продуктов, возникающие после их радиационной обработки [15 – 17]. Методом Кьельдаля и методом Дюма оценивают содержание белка по количеству азота в образце, которое определяют методом газовой хромато-

графии. Инфракрасная спектроскопия позволяет оценить содержание белка по поглощению ИК-излучения на характеристической частоте пептидной связи. Концентрацию белка можно оценивать колориметрическими методами, например, по абсорбции красителя, с помощью анионного связывания красителя с основными аминокислотными остатками (гистидин, аргинин и лизин) и N-концом белковой молекулы; абсорбции отдельных ароматических аминокислот (тирозина и триптофана); или по окраске комплекса пептидной связи с ионами меди, который определяют спектроскопически. Способность белков поглощать в ультрафиолетовой области спектра на длинах волн 280 нм и 190 – 220 нм используют для подсчета молекул [18]. Оптические методы, такие как спектроскопия кругового дихроизма (CD), ИК-спектроскопия и спектроскопия КР, позволяют также оценить вторичную и третичную структуры белков [19, 20].

Несмотря на существующие подходы, необходима разработка новых методик оценки структурных изменений белков, подвергшихся радиационному воздействию.

Цель данной работы состояла в исследовании влияния облучения ускоренными электронами на структурные характеристики бычьего сывороточного альбумина в водном растворе с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения.

Экспериментальная часть

Для достижения поставленной цели провели эксперимент по установлению присутствия бычьего сывороточного альбумина в активной (нативной) форме в водном растворе, облученном пучком ускоренных электронов в различных дозах, а также количественно оценили его содержание в контрольных и облученных образцах методом ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС).

Объект исследования. В качестве объекта исследования использовали бычий сывороточный альбумин (BSA фракция V, BioClot), который разводили в физиологическом растворе 0,9 % NaCl в концентрации 500 мг/л. Рабочие, буферные и другие необходимые для анализа структурной целостности белка растворы готовили растворением точных навесок в соответствующих растворителях в день проведения эксперимента.

Выбор БСА как объекта изучения в исследованиях обусловлен тем, что этот белок часто используют в качестве модельного, поскольку он содержит 8 незаменимых аминокислот и составляет 60 % всех белков плазмы крови, присутствует в клеточном пространстве и выполняет целый ряд функций [21]. Структурные характеристики

1 MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA FSQYLQQCPF
 61 DEHVKLVLNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK VASLRETYGD MADCCEKQEP
 121 ERNECFLSHK DDSPDLPLK PDPNTLCDEF KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLYY
 181 ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA
 241 RLSQKFPKAE FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
 301 CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL GSFLYEYSRR
 361 HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECAKDDPH ACYSTVFDKL KHLVDEPQNL IKQNCDDQFEK
 421 LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL
 481 NRLCVLHEKT PVSEKVTCC TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP
 541 DTEKQIKKQT ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
 601 STQTALA

I домен – с 1 по 230 аминокислоту в последовательности,
 II домен – с 231 по 326 аминокислоту в последовательности,
 III домен – с 327 по 607 аминокислоту в последовательности.

■ - Уникальные пептиды БСА, выбранные для идентификации и количественной оценки: FKDLGEEHFK (T35-44), AEFVEVTK (T249-256) и KQ TALVELLK (T548-557).

Рис. 1. Аминокислотная последовательность молекулы бычьего сывороточного альбумина (БСА)

Fig. 1. Amino acid sequence of bovine serum albumin (BSA) molecule

БСА хорошо изучены, он легко доступен, часто используется в иммунодиагностических процедурах [22] и клинической химии [23], входит в состав питательных сред для выращивания клеточных культур [24], а также присутствует в пищевых продуктах, содержащих коровье молоко или мясо. Кроме того, полученные результаты изучения БСА в качестве базовой модели могут быть распространены на другие основные белковые макромолекулы в плазме и тканях [12]. Аминокислотная последовательность молекулы бычьего сывороточного альбумина [25] представлена на рис. 1.

Воздействие ионизирующим излучением и контроль дозы облучения. Облучение образцов проводили с использованием ускорителя электронов непрерывного действия УЭЛР-1-25-Т-001 (НИИЯФ МГУ, Россия) с энергией 1 МэВ при температуре окружающей среды (20 °С). Для каждого сеанса облучения исследуемые образцы БСА объемом 0,5 мл помещали в стерильные пластиковые микроцентрифужные пробирки вместимостью 2 мл (АО «РЗП», Россия), три образца выкладывали на дюралюминиевую пластину согласно схеме, описанной в работе [26]. Средний ток пучка электронов составлял 1 мкА. Для достижения равномерного распределения дозы по всему объему образца вследствие небольшой глубины проникновения низкоэнергетиче-

ских электронов высота раствора не превышала 2 мм.

Дозу D , поглощенную в объеме образца, оценивали ферросульфатным методом дозиметрии (дозиметр Фрикке). Раствор FeSO_4 в объеме 0,5 мл помещали в пробирки, аналогичные экспериментальным, и облучали при тех же условиях, что и образцы с раствором БСА. В ходе каждого сеанса фиксировали время облучения раствора.

В результате радиолитиза воды под действием свободных радикалов, которые взаимодействуют с раствором FeSO_4 , ионы Fe^{2+} окисляются до ионов Fe^{3+} , что приводит к изменению оптической плотности раствора. Концентрацию ионов Fe^{3+} оценивали путем сравнения оптической плотности облученного и необлученного образцов с использованием спектрофотометра на длине волны 304 нм. По изменению оптической плотности, которая зависит от перехода Fe^{2+} в Fe^{3+} при облучении в различных дозах, измеряли поглощенную дозу в исследуемом образце по формуле

$$D = \frac{k \Delta S(\text{Fe}^{3+})}{\rho G(\text{Fe}^{3+}) l \varepsilon}, \quad (1)$$

где $k = 9,65 \cdot 10^6$ — безразмерный коэффициент; $\Delta S = 1/\tau$ — оптическая плотность раствора; $\rho = 1,024 \text{ г/см}^3$ — плотность дозиметрического рас-

твора; $G(\text{Fe}^{3+}) = 15,6$ ион/100 эВ — радиационно-химический выход при воздействии ускоренных электронов с энергией до 10 МэВ; $l = 1$ см — длина оптического пути; $\varepsilon = 2160$ л/моль · см — коэффициент экстинкции ионов Fe^{3+} , характеризующий ослабление интенсивности светового потока, проходящего через раствор [27]. Расчет дозы по измеренным значениям оптической плотности раствора FeSO_4 проводили для диапазона 40 – 400 Гр, который соответствует рабочему диапазону химического раствора.

В результате была построена зависимость дозы, поглощенной ферросульфатным дозиметром, от времени облучения, и по коэффициенту наклона линейного участка кривой была определена мощность дозы, поглощаемая дозиметрическим раствором, которая составила $(18,5 \pm 0,3)$ Гр/с (средний ток пучка 1 мкА). Так как плотность раствора Фрикке (1,024 г/мл) близка к плотности водного раствора БСА (1,005 г/мл), можно считать, что дозы, поглощенные дозиметрическим раствором, совпадают с дозами, поглощенными исследуемыми образцами белка.

В ходе облучения раствора БСА фиксировали время обработки образцов и по времени облучения с учетом значения мощности дозы рассчитывали поглощенную исследуемыми образцами дозу, которая соответствовала значениям 0,3, 0,6, 1, 4, 8 и 20 кГр с погрешностью не более 5 %.

Проведение химического анализа. Для проведения анализа структурной целостности нативной формы белка и количественной оценки его содержания использовали следующие реактивы: муравьиную кислоту 95 % (Sigma-Aldrich, кат. № F0507, США), ацетонитрил (Panreac, Испания), хлорид натрия 99 % (Sigma-Aldrich, кат. № S9888, США), бикарбонат аммония 99 % (Sigma-Aldrich, кат. № A6141, США), деионизованную воду после очистки системой Milli-Q (Millipore, США), стандартный образец БСА фракция V (Bioclot GmbH, партия № 61171334, Германия). В работе использовали высокомолекулярные фильтры (Amicon, № Z677108 и кат. № UFC503024, Millipore, Ирландия) для отделения молекул массой свыше 10 кДа и свыше 30 кДа и набор для проведения ферментативного гидролиза с использованием трипсина SMART Digest Trypsin Kits (Thermo Fisher Scientific, кат. № 60109-101, США).

Идентификацию пептидов и их количественный анализ проводили с использованием аналитической станции, состоящей из жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Германия), оборудованного системой автоматического ввода пробы, с масс-селективным tandemным анализатором высокого разрешения Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos (ThermoFisher Scientific, США) с источником ионов и

ионизацией электрораспылением. Специфические пептиды БСА выделяли с помощью колонки 100 мм × 2,1 мм Zorbax 300 SB-C18 с диаметром зерна сорбента 3,5 мкм (Agilent, США). Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью программных пакетов Xcalibur (ThermoFisher Scientific, США). В работе использовали системы для центрифугирования MPW-352R (MPW Med. Instruments, Польша) и термостатирования для проведения ферментативного гидролиза MAXQ 4450 (Thermo Fisher Scientific, США).

Методика обнаружения специфических пептидов БСА. К 30 мкл водного раствора, содержащего 0,9 % NaCl, добавляли 210 мкл 1 М раствора NH_4HCO_3 и помещали в центрифужный фильтр Amicon 0,5 мл с отсечкой по массам 30 кДа (фильтр предварительно дважды промывали в течение 15 мин с использованием 500 мкл деионизованной воды при частоте вращения 10 000 мин⁻¹). Далее раствор центрифугировали в течение 15 мин при 10 000 мин⁻¹, после чего концентрат белка объемом 50 мкл с фильтра переносили ультрацентрифугированием в течение 3 мин при 1000 мин⁻¹ в чистую пробирку Эппендорфа вместимостью 2 мл. Далее к концентрату белка добавляли 12 мкл 1 М раствора NH_4HCO_3 и 90 мкл буферного раствора из набора для трипсинолиза. Полученную смесь перемешивали и добавляли к ней 3 мкл раствора трипсина с концентрацией 1 мг/мл из того же набора, далее перемешивали на вортексе. Пробы с белком инкубировали в термостате при температуре 70 °С в течение 2 ч и затем повторно перемешивали на вортексе и загружали в центрифужный фильтр Amicon 0,5 мл с отсечкой по массам 10 кДа, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 2000 мин⁻¹. Полученную пробу помещали в микрофлакон для последующего анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.

Для проведения анализа использовали источник ионов с ионизацией электрораспылением в режиме регистрации выбранных ионных реакций положительных ионов. Разрешение масс-анализатора составляло не менее 30 000 отн.ед., погрешность при определении значения m/z не превышала 3 млн⁻¹ отн.ед. Температура переходного капилляра составляла 300 °С, напряжение на распыляющем капилляре — 3500 В, давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов — 420 кПа.

Компоненты исследуемых образцов разделяли в режиме градиентного элюирования, расход подвижной фазы — 0,30 мл/мин, температура термостата колонки — 40 °С. Подвижная фаза А — 0,1 % об. HCOOH в воде, подвижная фаза Б — ацетонитрил. Программа градиентного элюирования: 0 – 3 мин: 95 % А; 3 – 35 мин: 5 –

35 мин: 40 % Б; 35 – 40 мин: 40 – 80 % Б; 40 – 44 мин: 80 % Б; 44 – 50 мин: 95 % А. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл.

Обсуждение результатов

Масс-спектрометрическое детектирование. На первом этапе работы в выбранных условиях ферментативного гидролиза БСА исследовали образующиеся пептиды и выбирали специфические для БСА (см. рис. 1). Для этого брали 30 мкл раствора БСА (500 мкг/мл) и проводили описанную выше процедуру пробоподготовки с использованием трипсина. Метод трипсинолиза основан на селективном гидролизе связи между остатками аминокислот лизина и аргинина, присутствующих в структуре белка. В результате образуется набор уникальных пептидов массой от 500 до 4000 Да. Для выбора специфических аминокислотных последовательностей использовали базы данных строения БСА Swissprot database (UniProt consortium, США), в базе БСА соответствует номеру P02769 [28].

В ходе исследования удалось идентифицировать 8 уникальных для БСА пептидов, характеристики которых представлены в табл. 1.

При изучении влияния излучения на структурные характеристики белка в первую очередь оценивали содержание нативного БСА. Для этого необходимо было убедиться в том, что белок присутствует в активной форме в растворе. Аминокислотная последовательность БСА состоит из 607 аминокислот и состоит из трех доменов (см. рис. 1): I домен — с 1 по 230 аминокислоту в последовательности, II домен — с 231 по 326 и III домен — с 327 по 607 аминокислоту в последовательности [23]. Для идентификации были выбраны три уникальных пептида: FKDLGEEHFK (T35-44), AEFVEVTK (T249-256) и KQTALVELLK (T548-557), которые присут-

ствуют в одном из трех доменов БСА. Так, пептид FKDLGEEHFK находится в положении 35-44 (I домен), пептид AEFVEVTK — в положении 249-256 (II домен) и KQTALVELLK — в положении 548-557 (III домен). Присутствие этих трех маркеров БСА в пробе после процедуры трипсинолиза указывает на то, что образец БСА находится в активной форме. На рис. 1 данные уникальные пептиды БСА, выбранные для идентификации и количественной оценки, выделены зеленым цветом для наглядного представления об их положении в структуре белка.

Следующим этапом работы являлась оптимизация условий детектирования трех выбранных маркеров БСА. Использовали электрораспылительную ионизацию в режиме регистрации положительных ионов, поскольку образующиеся в результате ферментативного гидролиза БСА пептиды в своем составе имеют аминокислотные группы, отвечающие за образование протонированных положительно заряженных молекул в ходе ионизации. Условия масс-спектрометрического детектирования оптимизировали в режиме прямого ввода исходного раствора БСА после стадии ферментативного гидролиза трипсином непосредственно в источник ионов, минуя хроматографическую колонку.

В ходе оптимизации условий детектирования выбранных маркеров БСА было изучено влияние напряжения источника ионизации в диапазоне от 2500 до 4500 В на величину сигнала протонированных молекулярных ионов специфических пептидов БСА. При этом использовали параметры работы масс-спектрометрического детектора, рекомендуемые производителем и прописанные в файле автоматической настройки системы — автотюнинга. Установлено, что при увеличении напряжения источника ионизации с 3500 до 4500 В интенсивность сигнала увеличивается на

Таблица 1. Характеристики уникальных пептидов БСА, присутствующих в модельном водном растворе после трипсинолиза

Table 1. Characteristics of unique BSA peptides present in model aqueous solution after trypsinolysis

Пептид	Точное значение m/z иона прекурсора	Аминокислотная последовательность прекурсора	Выбранные ионные реакции
T35-44	417,2119	FKDLGEEHFK	1) m/z 417,21 $\rightarrow$ m/z 746,3468 2) m/z 417,21 $\rightarrow$ m/z 294,1812
T548-557	571,8608	KQTALVELLK	1) m/z 571,86 $\rightarrow$ m/z 1014,6202 2) m/z 571,86 $\rightarrow$ m/z 886,5608
T549-557	507,8134	QTALVELLK	Не оценивали
T249-256	461,7477	AEFVEVTK	1) m/z 461,75 $\rightarrow$ m/z 722,4084 2) m/z 461,75 $\rightarrow$ m/z 476,2715
T66-75	582,3190	LVNELTEFAK	Не оценивали
T242-248	424,2555	LSQKFPK	Не оценивали
T161-167	464,2504	YLYEIAR	Не оценивали
T236-241	345,1901	AWSVAR	Не оценивали

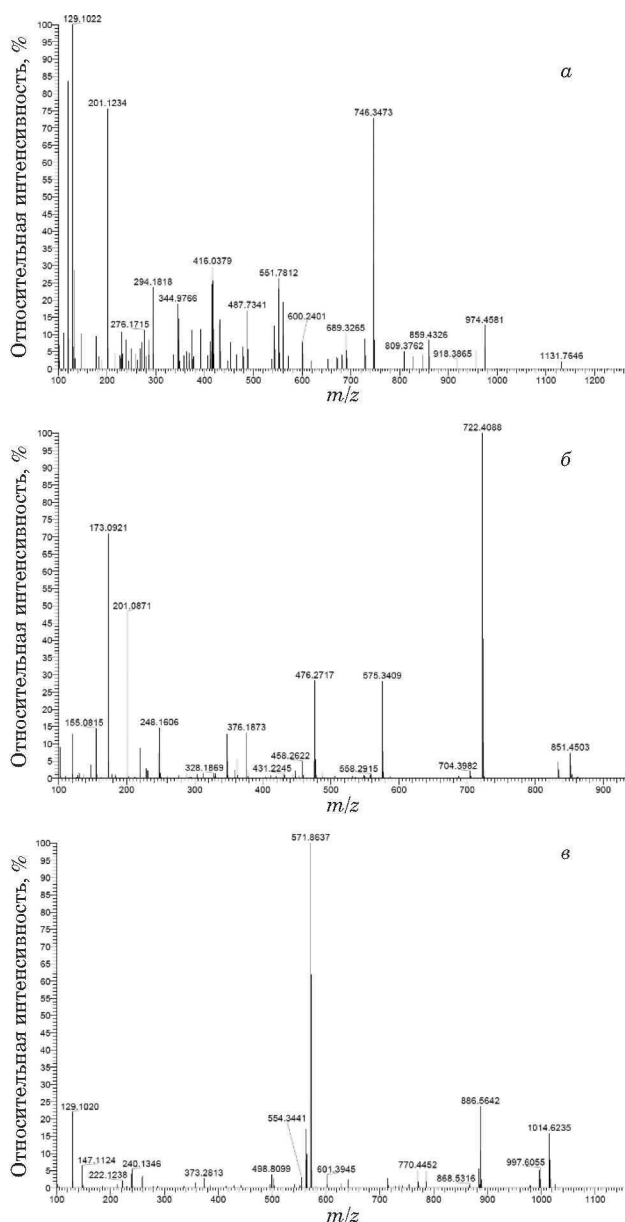


Рис. 2. Масс-спектры фрагментации протонированных молекулярных ионов пептидов, выбранных для обнаружения БСА, после трипсинолиза в режиме регистрации положительно заряженных ионов: *а* — пептид T35-44 (заряд иона прекурсора 3+); *б* — пептид T249-256 (заряд иона прекурсора 2+); *в* — T548-557 (заряд иона прекурсора 2+)

Fig. 2. Fragmentation mass spectra of protonated molecular ion peptides selected for BSA detection after trypsinolysis in the positively charged ion recording mode: *a* — peptide T35-44 (precursor ion 3+ charge); *b* — peptide T249-256 (precursor ion 2+ charge); *c* — T548-557 (precursor ion 2+ charge)

20 – 30 %, однако при этом величина шума возрастает на 50 %, поэтому в качестве оптимального напряжения источника ионизации было выбрано значение 3500 В.

На следующем этапе выбирали пары ионных реакций при определении исследуемых марке-

ров БСА. На рис. 2 представлены масс-спектры фрагментации протонированных молекулярных ионов выбранных пептидов БСА, полученные в режиме высокого разрешения.

Видно, что масс-спектры содержат большое количество сигналов фрагментных ионов, что характерно для фрагментации пептидов, так как все исследуемые пептиды в ходе ионизации образуют многозарядные ионы. Для подтверждения присутствия маркеров БСА применяли две выбранные ионные реакции для каждого пептида, используя ионы-фрагменты с максимальной интенсивностью сигнала в масс-спектре фрагментации. После выбора характерных пар фрагментных ионов исследовали влияние энергии фрагментации на величину аналитического сигнала этих ионов. Установлено, что интенсивность сигналов ионов для выбранных ионных реакций при исследовании пептидов БСА после трипсинолиза максимальна при энергии фрагментации 28 эВ. Характеристики выбранных ионных реакций, используемых для подтверждения присутствия трех уникальных пептидов БСА, представлены в табл. 1. Время сканирования при детектировании ионов для каждой выбранной реакции составило 54 мс.

Хроматографическое разделение и критерии оценки содержания. В методе ВЭЖХ-МС/МС назначение хроматографической системы и требования, предъявляемые к ней, несколько отличаются от таковых в традиционных вариантах ВЭЖХ. Масс-спектрометр высокого разрешения позволяет регистрировать строго специфический параметр каждого определяемого соединения — набор отношений m/z образующихся ионов. При работе в режиме мониторинга выбранных ионных реакций для большинства соединений не возникает необходимости полного хроматографического разделения компонентов смеси, поскольку набор выбранных ионных реакций для каждого соединения специфичен, и влияние сигнала посторонних компонентов на сигнал аналита в этом случае ничтожно мало. Кроме того, подвижная фаза в варианте ВЭЖХ-МС может содержать только летучие компоненты.

Пептиды, образующиеся в результате ферментативного гидролиза БСА, обладают кислотными свойствами, поэтому для увеличения доли незаряженных частиц данных веществ и уменьшения размывания хроматографических пиков использовали подвижную фазу, состоящую из 0,1 %-ного раствора муравьиной кислоты в воде (А) и ацетонитрила. Поскольку использовали режим регистрации положительно заряженных ионов, присутствие муравьиной кислоты в подвижной фазе способствовало увеличению доли положительно заряженных ионов в камере ионизации за счет протонирования аминогрупп пеп-

Таблица 2. Хроматографические параметры разделения уникальных пептидов БСА ($t_0 = 1,1$ мин)**Table 2.** Chromatographic separation parameters for unique BSA peptides ($t_0 = 1.1$ min)

Пептид	t_R , мин	k	N , т.т./м
T35-44	$11,4 \pm 0,2$	9,3	124 000
T249-256	$11,6 \pm 0,2$	9,5	142 000
T548-557	$17,8 \pm 0,2$	15,2	195 000

тидов. Значения времен удерживания t_R , коэффициентов емкости k и эффективности N хроматографической колонки для выбранных аналитов в выбранных условиях разделения представлены в табл. 2.

При оценке содержания БСА в пробе на первом этапе необходимо провести его идентификацию. В качестве критериев установления присутствия БСА в водных пробах после облучения использовали время удерживания и совпадение двух пар выбранных ионных реакций для каждого из уникальных пептидов. Количественную оценку содержания БСА в пробе проводили по площади пика молекулярного иона каждого уникального пептида и по его точному значению m/z (в табл. 1 соответствующее значение m/z иона прекурсора): для пептида T35-44 — m/z 417,2119, для пептида T249-256 — m/z 461,7484, для пептида T548-557 — m/z 571,8612. На рис. 3 представлены хроматограммы стандартного водного раствора БСА (500 мкг/мл), полученные при регистрации точных значений m/z многозарядных молекулярных ионов уникальных пептидов, используемых при количественной оценке.

Предел обнаружения. В выбранных условиях анализировали контрольные водные растворы БСА различных концентраций, не подвергшиеся воздействию электронов, — 1, 2, 5, 10, 100 и 500 мкг/мл. Факт присутствия нативного белка БСА в пробах считали надежно доказанным при обнаружении трех выбранных пептидов БСА (см. табл. 2).

Предел обнаружения рассчитывали при условии соблюдения соотношения интенсивности сигналов маркеров БСА и величины шума $S/N > 5$ для каждого из пептидов. При этом предел обнаружения рассчитывали для каждого пептида в отдельности, поскольку выход ионизации в камере у них разный. Так, аналитический сигнал иона пептида T249-256 более чем в 10 раз превышал сигнал ионов пептидов T35-44 и T548-557 (см. рис. 3). Оказалось, что предел обнаружения БСА при идентификации с использованием пептидов T35-44 и T548-557 ограничен значением 5 мкг/мл, а для пептида T249-256 — 0,5 мкг/мл. Так, если при концентрации БСА в водном растворе в диапазоне 0,5 – 5 мкг/мл в пробе после проведения трипсинолиза удается

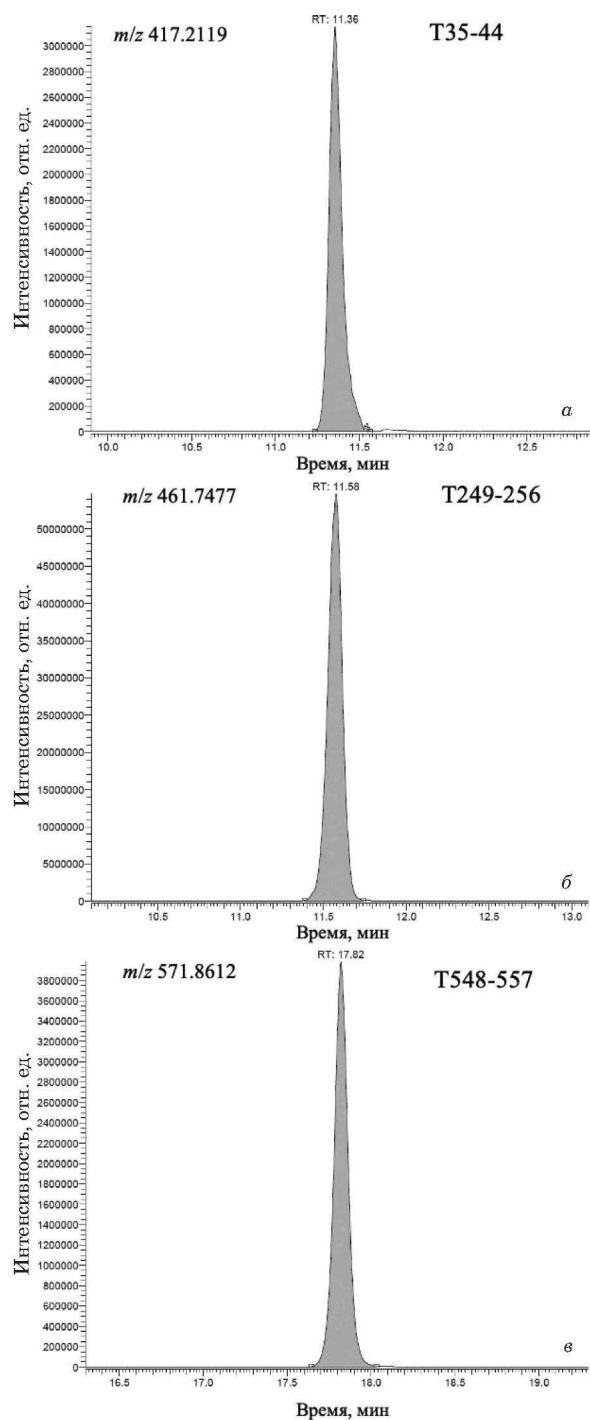


Рис. 3. Хроматограммы образца стандартного раствора БСА с концентрацией 500 мкг/мл, полученные в режиме регистрации точных значений m/z молекулярных многозарядных ионов уникальных пептидов БСА T35-44 (а), T249-256 (б) и T548-557 (в)

Fig. 3. Chromatograms of the sample of a standard BSA solution (500 µg/ml) obtained in the mode of capturing the signal of the exact m/z value of molecular multiply charged ions of the unique BSA peptides T35-44 (a), T249-256 (b), and T548-557 (c)

идентифицировать только один уникальный пептид, то в этом случае можно говорить, что

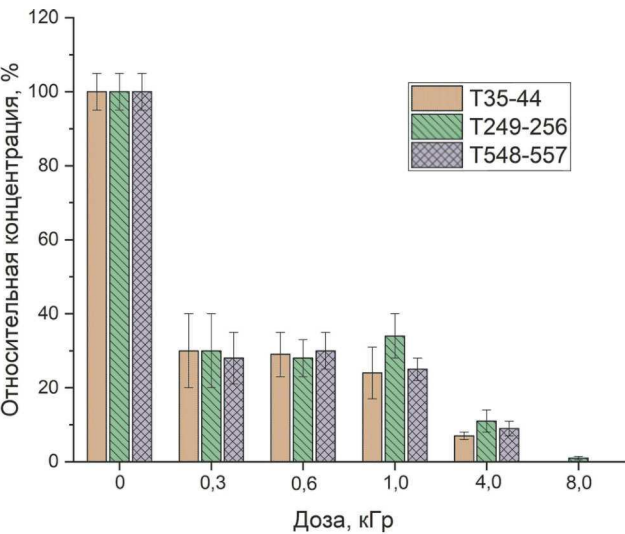


Рис. 4. Диаграмма содержаний идентифицированных уникальных пептидов для доз облучения 0 – 8 кГр при средней мощности дозы 18,5 Гр/с

Fig. 4. Diagram of the relative concentration of identified unique peptides within a dose range of 0 – 8 kGy at an average dose rate of 18.5 Gy/sec

БСА присутствует в пробе, однако факт присутствия условно доказан.

Таким образом, при исследовании водных проб, содержащих БСА, после облучения можно выделить три варианта идентификации уникальных пептидов после проведения трипсинолиза: надежно обнаружен (присутствуют три уникальных пептида), условно обнаружен (присутствует один уникальный пептид T249-256) и не обнаружен (концентрация БСА в пробе менее 0,5 мкг/мл).

Поскольку после облучения возможны денатурация белка с разрывом амидных связей между аминокислотами и образование низкомолекулярных пептидов, на первом этапе пробоподго-

товки растворы проб фильтровали через фильтр Amicon 0,5 мл с отсечкой по массам 30 кДа для того, чтобы избавиться от низкомолекулярных продуктов разложения, которые могут давать ложноположительные результаты в ходе идентификации после трипсинолиза. Далее проводили описанную выше процедуру трипсинолиза и анализировали полученный гидролизат. На первом этапе устанавливали факт присутствия выбранных уникальных пептидов БСА и оценивали содержание БСА по каждому из них. При этом содержание БСА в пробе после облучения нормировали относительно контрольного водного раствора 500 мкг/мл БСА, не подвергнувшегося радиационному облучению. Результаты исследования влияния ускоренных электронов на содержание уникальных пептидов в образцах раствора БСА представлены в табл. 3.

На рис. 4 представлены диаграммы относительных концентраций идентифицированных уникальных пептидов T35-44, T249-256, T548-557 в растворах БСА, облученных в дозах от 0,3 до 8 кГр, а также в контрольных пробах, не подвергавшихся действию излучения.

Из представленных данных видно, что чем больше доза облучения, тем меньше концентрация уникальных пептидов в водном растворе и, следовательно, меньше концентрация нативного (неповрежденного) БСА. При радиационном воздействии в дозе 0,3 кГр наблюдается уменьшение содержания активной формы БСА в водном растворе более чем в 3 раза по сравнению с контрольными образцами. Вероятно, это связано с денатурацией белка в результате разрыва пептидных связей молекулы с образованием низкомолекулярных фрагментов. Такие же результаты наблюдаются при дозах 0,6 и 1 кГр. При дозе 4 кГр происходило уменьшение содержания БСА в пробе в 6 – 7 раз по сравнению с контрольными образцами и в 2 раза по сравнению с образцами,

Таблица 3. Результаты количественной оценки содержания БСА в пробах после облучения электронами (n = 3; P = 0,95)

Table 3. Results of the quantification of BSA content in samples after electron irradiation (n = 3; P = 0.95)

Доза облучения, кГр	Результаты идентификации БСА	$C_{отн}$ (пептид T35-44), %	$C_{отн}$ (пептид T249-256), %	$C_{отн}$ (пептид T548-557), %
0 (контроль)	Надежно обнаружен	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
0,3	Надежно обнаружен	30 ± 10	30 ± 10	28 ± 7
0,6	Надежно обнаружен	29 ± 6	28 ± 5	30 ± 5
1	Надежно обнаружен	24 ± 7	34 ± 6	25 ± 3
4	Надежно обнаружен	7 ± 1	11 ± 3	9 ± 2
8	Условно обнаружен	Не обнаружен	1,0 ± 0,5	Не обнаружен
20	Не обнаружен	Не обнаружен	Не обнаружен	Не обнаружен

Примечание. $C_{отн}(\text{пептид X}) = 100 \% S_{обл}/S_{контр}$ — отношение площади пика иона соответствующего пептида, выбранного для количественной оценки, к площади пика данного пептида в контрольной водной пробе БСА, не подвергавшейся радиационному облучению.

облученными в меньших дозах. При облучении в дозе 8 кГр был идентифицирован только один уникальный пептид T249-256, содержание которого составляло 1 % от контрольного значения, другие пептиды не были обнаружены или их концентрации не были достаточны для определения методом ВЭЖХ-МС/МС. При облучении в дозе 20 кГр ни один из пептидов не был обнаружен.

Заключение

Разработан и апробирован с использованием водных образцов бычьего сывороточного альбумина способ идентификации и количественной оценки содержания активной формы БСА после ферментативного гидролиза трипсином методом ВЭЖХ-МС/МС, который характеризуется высокой чувствительностью (0,5 мкг/мл БСА) и специфичностью при изучении влияния радиационного облучения на структурные характеристики белка. Впервые получены данные о влиянии ускоренных электронов с энергией 1 МэВ на структурные характеристики белка в растворе БСА, облученном при средней мощности 18,5 Гр/с в дозах 0,3, 0,6, 1, 4, 8 и 20 кГр. Данный метод позволил выявить значимое уменьшение содержания нативного белка во всех облученных образцах. С использованием разработанного подхода показано, что при облучении в дозах 0,3, 0,6 и 1 кГр происходит денатурация белка в растворе БСА и содержание активной формы белка уменьшается в три раза по сравнению с контрольными образцами. При облучении в больших дозах наблюдается дальнейшее снижение содержания нативной формы БСА в растворе, а при дозе 20 кГр ни один из уникальных пептидов обнаружен не был.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам отдела электромагнитных процессов и взаимодействия атомных ядер НИИЯФ МГУ им. Д. В. Скобелева В. И. Шведуну и Д. С. Юрову за возможность проведения облучения образцов на ускорителе УЭЛР-1-25-Т-001.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-63-00075.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang Y., Dong L., Zhang J., et al. Adverse Effects of Thermal Food Processing on the Structural, Nutritional, and Biological Properties of Proteins / *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2021. Vol. 12. N 1. P 259 – 286. DOI: 10.1146/annurev-food-062320-012215
2. Orlien V., Rinnan A. Processing Effects on Protein Structure and Physicochemical Properties / *Foods*. 2022. Vol. 11. N 11. P 1607 – 1610. DOI: 10.3390/foods11111607
3. Nowshad F., Islam M. N., Khan M. S. Concentration and formation behavior of naturally occurring formaldehyde in foods / *Agric. Food Secur.* 2018. Vol. 7. N 1. P 17 – 25. DOI: 10.1186/s40066-018-0166-4
4. Rachid C., Barone M. Chemicals in the Food Industry: Toxicological Concerns and Safe Use. 1st Edition. — Switzerland: Springer International Publishing, 2020. — 70 p. DOI: 10.1007/978-3-030-42943-0
5. Тимакова Р. Т. Влияние ионизирующего излучения на биологическую ценность белков говядины / *Пищевая промышленность*. 2020. Т. 5. С. 13 – 18. DOI: 10.24411/0235-2486-2020-10048
6. Rozhko T. V., Nemtseva E. V., Gardt M. V., et al. Enzymatic Responses to Low-Intensity Radiation of Tritium / *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. N 22. P 8464 – 8478. DOI: 10.3390/ijms21228464
7. Adibian M., Mami Y. Effect of Electron-Beam Irradiation on Enzyme Activities in *Agaricus brunneus* / *J. Pure Appl. Microbiol.* 2018. Vol. 12. N 3. P 1435 – 1442. DOI: 10.22207/jpam.12.3.46
8. Дриль А. А., Рождественская Л. Н. Повышение биологической ценности белка и увеличение сроков хранения полуфабриката из ветчины обыкновенной методом электронной стерилизации / *Изв. вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019. Т. 9. № 3. С. 500 – 508. DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-500-508
9. Павлов А. Н., Чиж Т. В., Снегирев А. С. и др. Технологический процесс радиационной обработки пищевой продукции и дозиметрическое обеспечение / *Радиационная гигиена*. 2020. Т. 13. № 4. С. 40 – 50. DOI: 10.21514/1998-426X-2020-13-4-40-50
10. Giroux M., Lacroix M. Nutritional adequacy of irradiated meat — a review / *Food Res. Int.* 1998. Vol. 31. N 4. P 257 – 264. DOI: 10.1016/S0963-9969(98)00092-1
11. Zhao L., Zhang Y., Pan Z., et al. Effect of electron beam irradiation on quality and protein nutrition values of spicy yak jerky / *LWT — Food. Sci. Technol.* 2017. Vol. 87. N 7. P 1 – 7. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.08.062
12. Zarei H., Bahreinipour M., Eskandari K., et al. Spectroscopic study of gamma irradiation effect on the molecular structure of bovine serum albumin / *Vacuum*. 2016. Vol. 136. P 91 – 96. DOI: 10.1016/j.vacuum.2016.11.029
13. Liu G., Liu J., Tu Z., et al. Investigation of conformation change of glycated ovalbumin obtained by Co-60 gamma-ray irradiation under drying treatment / *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 2018. Vol. 47. P 286 – 291. DOI: 10.1016/j.ifset.2018.03.011
14. Liu Y.-F., Oey I., Bremer P., et al. Modifying the Functional Properties of Egg Proteins Using Novel Processing Techniques: A Review / *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2019. Vol. 18. N 4. P 986 – 1002. DOI: 10.1111/1541-4337.12464
15. Antosiewicz J. M., Shugar D. UV — Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications / *Biophys. Rev.* Vol. 8. N 2. P 163 – 177. DOI: 10.1007/s12551-016-0197-7
16. Mihaljev Z., Jaksic S., Balos M. Z., et al. Comparison of the Kjeldahl method, Dumas method and NIR method for total nitrogen determination in meat and meat products / *J. Agroaliment. Proc. Technol.* 2015. Vol. 21. N 4. P 365 – 370.
17. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins / *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. Vol. 1767. N 9. P 1073 – 1110. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004
18. Chang S. K. C., Zhang Y. Protein Analysis / Nielsen S. S. (ed.), *Food Analysis. Food Science Text Series*. — Springer, Cham. 2017. P 315 – 331. DOI: 10.1007/978-3-319-45776-5_18
19. Oshokoya O. O., Roach C. A., Jiji R. D. Quantification of protein secondary structure content by multivariate analysis of deep-ultraviolet resonance Raman and circular dichroism spectroscopies / *Anal. Methods*. 2014. Vol. 6. N 6. P 1691 – 1699. DOI: 10.1039/c3ay42032a
20. Pelton J. T., McLean L. R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure / *Anal. Biochem.* 2000. Vol. 277. N 2. P 167 – 176. DOI: 10.1006/abio.1999.4320
21. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th edition. — The McGraw-Hill Companies, Inc., 2003. — 693 p.

22. **Gonzalez V. D., Gugliotta L. M., Giacomelli C. E., Meira G. R.** Latex of immunodiagnosis for detecting the Chagas disease: II. Chemical coupling of antigen Ag36 onto carboxylated latexes / *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008. Vol. 19. N 2. P. 789 – 795. DOI: 10.1007/s10856-006-0041-x
23. **Doumas B. T., Bayse D. D., Carter R. J., et al.** A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation / *Clin. Chem.* 1981. Vol. 27. N 10. P. 1642 – 1650. DOI: 10.1093/clinchem/27.10.1642
24. **Francis G.** Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications / *Cytotechnology*. 2010. Vol. 62. N 1. P. 1 – 16. DOI: 10.1007/s10616-010-9263-3
25. **Huang B. X., Kim H. Y., Dass C.** Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry / *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004. Vol. 15. N 8. P. 1237 – 1247. DOI: 10.1016/j.jasms.2004.05.004
26. **Bliznyuk U. A., Borchegovskaya P. Yu., Chernyaev A. P., et al.** Dose-rate effect of low-energy electron beam irradiation on bacterial content in chilled turkey / *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2021. Vol. 640. N 3.032006. DOI: 10.1088/1755-1315/640/3/032006
27. **Крот В. И., Голубева Е. Н., Музыка Т. В., Степанова О. Ю.** Химические методы дозиметрии. Ферросульфатный метод дозиметрии (дозиметр Фрике): метод. пособие к лаб. практикуму. — Минск: БГУ, 2011. — 33 с.
28. **Swissprot.** Swiss Institute of Bioinformatics: Geneva, Switzerland. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02769/entry> (дата обращения 17.01.2022).
11. **Zhao L., Zhang Y., Pan Z., et al.** Effect of electron beam irradiation on quality and protein nutrition values of spicy yak jerky / *LWT — Food. Sci. Technol.* 2017. Vol. 87. N 7. P. 1 – 7. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.08.062
12. **Zarei H., Bahreinipour M., Eskandari K., et al.** Spectroscopic study of gamma irradiation effect on the molecular structure of bovine serum albumin / *Vacuum*. 2016. Vol. 136. P. 91 – 96. DOI: 10.1016/j.vacuum.2016.11.029
13. **Liu G., Liu J., Tu Z., et al.** Investigation of conformation change of glycated ovalbumin obtained by Co-60 gamma-ray irradiation under drying treatment / *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 2018. Vol. 47. P. 286 – 291. DOI: 10.1016/j.ifset.2018.03.011
14. **Liu Y.-F., Oey I., Bremer P., et al.** Modifying the Functional Properties of Egg Proteins Using Novel Processing Techniques: A Review / *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2019. Vol. 18. N 4. P. 986 – 1002. DOI: 10.1111/1541-4337.12464
15. **Antosiewicz J. M., Shugar D.** UV — Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications / *Biophys. Rev.* 8. N 2. P. 163 – 177. DOI: 10.1007/s12551-016-0197-7
16. **Mihaljev Z., Jaksic S., Balos M. Z., et al.** Comparison of the Kjeldahl method, Dumas method and NIR method for total nitrogen determination in meat and meat products / *J. Agroaliment. Proc. Technol.* 2015. Vol. 21. N 4. P. 365 – 370.
17. **Barth A.** Infrared spectroscopy of proteins / *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. Vol. 1767. N 9. P. 1073 – 1110. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004
18. **Chang S. K. C., Zhang Y.** Protein Analysis / Nielsen S. S. (ed.), Food Analysis. Food Science Text Series. — Springer, Cham. 2017. P. 315 – 331. DOI: 10.1007/978-3-319-45776-5_18
19. **Oshokoya O. O., Roach C. A., Jiji R. D.** Quantification of protein secondary structure content by multivariate analysis of deep-ultraviolet resonance Raman and circular dichroism spectroscopies / *Anal. Methods*. 2014. Vol. 6. N 6. P. 1691 – 1699. DOI: 10.1039/c3ay42032a
20. **Pelton J. T., McLean L. R.** Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure / *Anal. Biochem.* 2000. Vol. 277. N 2. P. 167 – 176. DOI: 10.1006/abio.1999.4320
21. **Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.** Harper's Illustrated Biochemistry. 26th edition. — The McGraw-Hill Companies, Inc., 2003. — 693 p.
22. **Gonzalez V. D., Gugliotta L. M., Giacomelli C. E., Meira G. R.** Latex of immunodiagnosis for detecting the Chagas disease: II. Chemical coupling of antigen Ag36 onto carboxylated latexes / *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008. Vol. 19. N 2. P. 789 – 795. DOI: 10.1007/s10856-006-0041-x
23. **Doumas B. T., Bayse D. D., Carter R. J., et al.** A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation / *Clin. Chem.* 1981. Vol. 27. N 10. P. 1642 – 1650. DOI: 10.1093/clinchem/27.10.1642
24. **Francis G.** Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications / *Cytotechnology*. 2010. Vol. 62. N 1. P. 1 – 16. DOI: 10.1007/s10616-010-9263-3
25. **Huang B. X., Kim H. Y., Dass C.** Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry / *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004. Vol. 15. N 8. P. 1237 – 1247. DOI: 10.1016/j.jasms.2004.05.004
26. **Bliznyuk U. A., Borchegovskaya P. Yu., Chernyaev A. P., et al.** Dose-rate effect of low-energy electron beam irradiation on bacterial content in chilled turkey / *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2021. Vol. 640. N 3.032006. DOI: 10.1088/1755-1315/640/3/032006
27. **Крот В. И., Голубева Е. Н., Музыка Т. В., Степанова О. Ю.** Chemical methods of dosimetry. Ferrosulfate dosimetry method (Fricke dosimeter): manual for laboratory workshop. — Минск: BSU, 2011. — 33 p. [in Russian].
28. **Swissprot.** Swiss Institute of Bioinformatics: Geneva, Switzerland. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02769/entry> (accessed January 17, 2022).

REFERENCES