

ROZPRAWY NAUKOWE
520

Beata Mikołajczak

**Białka mięśniowe jako wskaźniki jakości mięsa wieprzowego
wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością
oraz mięsa bydła z wadą DFD**

POZNAŃ 2021

BIAŁKA MIĘŚNIOWE JAKO WSKAŹNIKI JAKOŚCI MIĘSA WIEPRZOWEGO WYCHŁADZANEGO ZE ZRÓŻNICOWANĄ SZYBKościĄ ORAZ MIĘSA BYDŁA Z WADĄ DFD

ABSTRAKT

Wprowadzenie. Mięso jest jednym z ważniejszych źródeł białka w diecie człowieka. Jego wysoka wartość odżywcza związana jest z obecnością wszystkich aminokwasów egzogennych i biologicznie aktywnych peptydów. Przemysł mięsny, wychodząc naprzeciw coraz większym wymaganiom konsumentów, podejmuje działania zmierzające do dostarczania na rynek mięsa o doskonałej jakości, charakteryzującego się optymalną wodochłonnością i kruchością. Białka mięśniowe ulegają istotnym zmianom w czasie poubojowej glikolizy. Ich tempo determinowane jest różnymi czynnikami, w tym szczególnie procesem wychładzania oraz występowaniem wady DFD. Podczas pozyskiwania surowca mięsnego o wysokiej, powtarzalnej jakości oraz przy zapewnieniu jego trwałości ważną rolę odgrywa szybkość procesu wychładzania. Natomiast czynniki przedubojowe wywołujące stres – takie jak zmienna temperatura otoczenia czy niedobór glukozy – wskazywane są jako główna przyczyna odchylenia jakościowego DFD.

Przystępując do realizacji niniejszej pracy przyjęto, że białka są odbiciem przemian zachodzących podczas konwersji mięśni w mięso i mogą być potencjalnymi wskaźnikami jego jakości oraz uczestniczą w kształtowaniu wodochłonności i kruchości. Jednakże w literaturze niewiele jest danych na temat zmian białek mięsa wieprzowego będących wynikiem szybkości procesu wychładzania oraz związanych z występowaniem w mięsie bydła odchylenia jakościowego DFD.

Celem pracy była analiza białek mięśniowych jako potencjalnych wskaźników jakości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością oraz mięsa bydła z wadą DFD, ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływania na wodochłonność i kruchość pozyskanego surowca.

Materiał i metody. Badanym materiałem był mięsień najdłuższy klatki piersiowej i łędźwi (LTL) (*m. longissimus thoracis et lumborum*) świń i bydła. Proces wychładzania mięsa wieprzowego odbywał się ze zróżnicowaną szybkością: A – 0,12°C/min, B – 0,15°C/min, C – 0,27°C/min. Wykonano pomiary wartości pH, przewodności elektrycznej, zawartości glikogenu i kwasu mlekowego, wyznaczono ubytki masy w czasie przechowywania i po obróbce termicznej. Ocenie poddano wielkość wycieku wirówkowego oraz siły i pracy cięcia. Białka rozdzielono za pomocą elektroforezy jednokierunkowej w żelach poliakrylamidowych z SDS (SDS-PAGE). Identyfikację wybranych białek mięsa wieprzowego przeprowadzono, wykorzystując metodę Western blot. Mięso bydła o normalnej jakości RFN i z wadą DFD oceniono na podstawie wartości pH, barwy, wodochłonności i kruchości. Białka ekstraktów analizowano z zastosowaniem elektroforezy SDS-PAGE oraz wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS.

Wyniki. Mięso wieprzowe wychładzane ze zróżnicowaną szybkością charakteryzowało się normalnym przebiegiem poubojowej glikolizy. Mięso prób B (0,15°C/min) wyróżniało się najniższą wartością pH we wszystkich terminach analiz i zawartością glikogenu po 2 h oraz najwyższą zawartością kwasu mlekowego (2 h). Wychładzanie z szybkością 0,27°C/min indukowało zjawisko skurczu chłodniczego, które wpłynęło na niższą jakość mięsa wieprzowego, w tym na obniżenie jego wodochłonności i kruchości. Analiza elektroforetyczna

profilu białek mięsa wykazała istotnie większy udział pasma miozyny po 24 h oraz aktywne po 6 dniach w próbach B w porównaniu z próbami C wychładzanymi najszybciej. We frakcji wycieku wirówkowego próby C po 6 dniach przechowywania stwierdzono większy udział dwóch pasm o masie 148–153 kDa (amylo- α -1,6-glukozydaza) oraz ~47 kDa (kinaza kreatyny/kinaza fosfoglicerynianowa). Na podstawie analizy Western blot białek mięsa wykazano istotny wpływ procesu wychładzania na zmiany udziału titiny, miozyny i troponiny-T we wszystkich analizowanych terminach badań. Na udział titiny, troponiny-T i GAPDH we frakcji wycieku wirówkowego istotnie oddziaływała zastosowana szybkość wychładzania mięsa wieprzowego.

Mięso bydła z odchyleniem DFD cechowała istotnie większa wartość pH, ciemniejsza barwa oraz lepsza kruchość i wodochłonność w porównaniu z próbami RFN. Uzyskane wyniki analizy elektroforetycznej pozwalają na rozróżnienie mięsa RFN od DFD na podstawie profilu białkowego. Mięso z wadą DFD w porównaniu z RFN wyróżniało się obecnością pasma o masie 2400 kDa oraz istotnie większym udziałem pasm białek w zakresie 1200–400 kDa oraz ~68 kDa. Analiza, a następnie identyfikacja białek i peptydów ekstraktów z mięsa o zróżnicowanej jakości przy wykorzystaniu spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS umożliwiła wyznaczenie białek jako potencjalnych wskaźników jakości mięsa bydła z wadą DFD.

Wnioski. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że na jakość i profil białek mięsa wieprzowego wpłynął proces wychładzania. Zastosowanie wychładzania prób C z szybkością 0,27°C/min związane było z wystąpieniem zjawiska skurczu chłodniczego. Jego skutkiem było istotne pogorszenie wodochłonności i kruchości mięsa. Uwzględniając pożądane cechy jakościowe mięsa wieprzowego zaleca się stosowanie maksymalnej szybkości jego wychładzania na poziomie 0,15°C/min. W wyjaśnieniu przyczyn skurczu chłodniczego szczególną rolę przypisano łańcuchom ciężkim miozyny (MHC). Obserwowana już po 45' *pm* obecność pasm o masie >250 kDa wskazywała na wzrost usieciowania MHC. Prawdopodobnie wynikał on z oddziaływania z produktami degradacji lub innymi białkami i sprzyjał usztywnieniu struktur włókien mięśniowych. Białka wycieku wirówkowego – takie jak titina T2 i produkty degradacji titiny T1, amylo- α -1,6-glukozydaza, niezidentyfikowane pasmo bezpośrednio nad fosforylaza b, 6-fosfofruktokinaza, kinaza pirogronianowa i dehydrogenaza mleczanowa – mogą być potencjalnymi wskaźnikami w ocenie jakości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością. Białka mięśniowe ocenione na podstawie analizy metodą Western blot titina, łańcuchy ciężkie miozyny, troponina-T i GAPDH podlegały istotnym zmianom pod wpływem procesu wychładzania. Były one wynikiem proteolizy, procesów degradacji i agregacji, które przez zróżnicowane interakcje białko-białko oddziaływały na strukturę cytoszkieletu włókien mięśniowych. Obserwowane zmiany białek wpływały na jakość mięsa wieprzowego, jego wodochłonność i kruchość.

Zastosowanie techniki UHPLC-Q-TOF-MS/MS i analiza z wykorzystaniem wielowymiarowego modelu OPLS-DA pozwoliły na wyznaczenie 12 białek o największym znaczeniu przy różnicowaniu mięsa bydła normalnej jakości (RFN) i z wadą DFD. W grupie potencjalnych białkowych i peptydowych wskaźników jakości mięsa RFN oraz DFD znalazły się między innymi alfa- i beta-enolaza, białko bogate w cysteinę i glicynę, białko 3 domeny PDZ i LIM, 6-fosfofruktokinaza, białka szoku cieplnego beta-1 i beta-6, łańcuch A dehydrogenazy L-mleczanowej, kinaza kreatynowa typu M, mioglobina, fosfatydyloetanolamina wiążąca białko-1 i troponina-T.

Słowa kluczowe: białka, peptydy, jakość mięsa, wychładzanie, wada DFD, elektroforeza SDS-PAGE, Western blot, UHPLC-Q-TOF MS/MS

MUSCLE PROTEINS AS INDICATORS OF THE QUALITY OF PORK COOLED AT DIFFERENT RATES AND BEEF WITH DFD DEFECTS

ABSTRACT

Introduction. Meat is a major source of protein in the human diet. It has a high nutritional value due to the presence of all exogenous amino acids and bioactive peptides. In order to meet consumers' increasing demands the meat industry attempts to provide excellent quality products characterised by optimal water-holding capacity and tenderness. Muscle proteins undergo significant changes during post-slaughter glycolysis. The rate of these changes is determined by various factors, especially by the cooling process and the occurrence of the DFD defect. The rate of the cooling process is a significant factor necessary to obtain meat of high, repeatable quality and to ensure its durability. Pre-slaughter stress factors such as variable ambient temperature and glucose deficiency are indicated as the main causes of the DFD quality defect.

The author of the study assumed that proteins reflect changes occurring during the conversion of muscles into meat, that they may be potential indicators of its quality, and that they determine water-holding capacity and tenderness. There are few scientific publications providing data on changes in pork proteins depending on the rate of the cooling process and the occurrence of the DFD quality defect in beef.

The aim of the study was to analyse muscle proteins as potential quality indicators of pork cooled at various rates and of beef with DFD defects, with a special focus on their influence on the water-holding capacity and tenderness of the meat.

Material and methods. The study was conducted on the longest thoracic and lumbar muscle (*musculus longissimus thoracis et lumborum* – LTL) of pigs and cattle. The pork cooling process was conducted at different rates: A – 0.12°C/min, B – 0.15°C/min, C – 0.27°C/min. The following measurements were made: the pH value, electrical conductivity, glycogen and lactic acid content, the weight loss during storage and after thermal treatment. The size of the centrifugal drip as well as the shear force and work were assessed. One-dimensional electrophoresis was applied to separate proteins in SDS-polyacrylamide gels (SDS-PAGE). Selected pork proteins were identified with the western blot method. The beef of normal RFN quality and with a DFD defect was assessed on the basis of its pH value, colour, water-holding capacity, and tenderness. Extract proteins were analysed with SDS-PAGE electrophoresis and high-resolution tandem mass spectrometry coupled with high performance liquid chromatography UHPLC-Q-TOF-MS/MS.

Results. The pork cooled at different rates was characterised by a normal course of *post mortem* glycolysis. Meat samples B (0.15°C/min) had the lowest pH at all terms of analysis and the lowest content of glycogen after 2 h but the highest content of lactic acid (2 h). The cooling at a rate of 0.27°C/min induced shrinkage, which resulted in a lower quality of pork, manifested by reduced water-holding capacity and tenderness. The electrophoretic analysis of the meat protein profile revealed that samples B had a significantly higher share of the myosin band after 24 h and the actin band after 6 days than in samples C, which were cooled at the fastest rate. After 6 days of storage there was a higher share of two bands with molecular weights of 148-153 kDa (amylo-alpha-1,6-glucosidase) and ~47 kDa (creatine kinase/phosphoglycerate kinase) in the centrifugal drip fraction of sample C. The Western blot analysis of meat proteins showed that the cooling process caused significant changes in the content of titin, myosin, and troponin T at all terms

of analyses. The share of titin, troponin T, and GAPDH in the centrifugal drip fraction was significantly influenced by the pork cooling rate.

The beef with a DFD deviation was characterised by a significantly higher pH, darker colour, better tenderness, and water-holding capacity than the RFN samples. The results of the electrophoretic analysis enabled distinction between the RFN and DFD meat on the basis of the protein profile. In comparison with the RFN meat samples, the meat with the DFD defect was distinguished by the presence of a band with a mass of 2,400 kDa and a significantly higher share of protein bands within the ranges of 1,200-400 kDa and ~68 kDa. The analysis and then the identification of proteins and peptides in the meat extracts of different quality with mass spectrometry coupled with ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC-Q-TOF-MS/MS) enabled the identification of proteins as potential quality indicators of the beef with DFD defects.

Conclusions. The research showed that the quality and profile of pork proteins were influenced by the cooling process. The cooling of samples C at a rate of 0.27°C/min resulted in meat shrink, which significantly deteriorated the water-holding capacity and tenderness of the meat. It is recommended to use the maximum cooling rate of 0.15°C/min to ensure the desirable quality traits of pork. Myosin heavy chains (MHC) are particularly important in explaining the causes of cooler shrink. Bands with a mass greater than 250 kDa, which were observed as early as after 45 minutes *post mortem*, pointed to an increase in the cross-linking of MHC. This effect is most likely to have been caused by the interaction with degradation products or other proteins. It favoured the stiffening of the muscle fibre structures. The centrifugal drip proteins, such as titin T2 and titin T1 degradation products, amylo-alpha-1,6-glucosidase, an unidentified band directly above phosphorylase b, 6-phosphofructokinase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase, may be potential indicators assessing the quality of pork cooled down at different rates. The cooling process caused significant changes in muscle proteins assessed with the western blot analysis, titin, myosin heavy chains, troponin T, and GAPDH. The changes resulted from the proteolysis, degradation, and aggregation processes, which influenced the structure of the cytoskeleton of muscle fibres through various protein-protein interactions. The observed changes in the proteins influenced the quality of pork, its water-holding capacity, and tenderness.

The UHPLC-Q-TOF-MS/MS technique and the analysis based on the multivariate OPLS-DA model enabled the identification of 12 proteins of the greatest significance for the differentiation between normal quality beef (RFN) and beef with the DFD defect. The group of potential protein and peptide indicators of the RFN and DFD meat quality included alpha- and beta-enolase, cysteine- and glycine-rich protein, protein of the third PDZ and LIM domains, 6-phosphofructokinase, heat shock proteins beta-1 and beta-6, L-lactate dehydrogenase A chain, creatine kinase M-type, myoglobin, protein-1-binding phosphatidylethanolamine, and troponin-T.

Keywords: proteins, peptides, meat quality, cooling, DFD defect, SDS-PAGE electrophoresis, Western blot, UHPLC-Q-TOF MS/MS

KOMITET REDAKCYJNY
Jacek Wójtowski (przewodniczący), **Grażyna Czyżak-Runowska**,
Stanisław Grześ, **Ewa Kiryluk-Dryjska**, **Andrzej Mazur**, **Julita Reguła**,
Anna Zbierska, **Anna Zielińska-Krybus**

Redaktor Działu
prof. UPP dr hab. Julita Reguła

Recenzent
prof. dr hab. inż. Joanna Stadnik
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
Poznań 2021, Poland



Książka jest dostępna na licencji Creative Commons – Uznanie autorstwa – Użycie niekomercyjne – Bez utworów zależnych 4.0 Międzynarodowe (CC BY-NC-ND 4.0)

ISSN 1896-1894

ISBN 978-83-7160-997-8

e-ISBN 978-83-67112-71-0

<https://doi.org/10.17306/978-83-67112-71-0>

Redakcja
Paulina Kaczmarek

Skład i łamanie
Donata Latusek

WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO W POZNANIU
ul. Witosza 45, 60-693 Poznań
tel. 61 848 7808, e-mail: wydawnictwo@up.poznan.pl
<https://wydawnictwo.up.poznan.pl/>

Ark. wyd. 12,8.

Wersja elektroniczna dostępna na stronie <https://wydawnictwo.up.poznan.pl/books.html?dostepnosc=open%20access> oraz w serwisie <https://www.ibuk.pl/>

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI	9
1. WSTĘP	11
2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA	13
3. CEL I ZAKRES PRACY	24
4. MATERIAŁ I METODY BADAŃ	28
4.1. Materiał badany	28
4.2. Metody analityczne	29
4.2.1. Wprowadzenie	29
4.2.2. Charakterystyka jakości surowca	30
4.2.3. Analiza elektroforetyczna białek mięśniowych	32
4.2.4. Western blot	33
4.2.5. Tandemowa spektrometria mas sprzężona z chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS	34
4.3. Analiza statystyczna	35
5. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA	37
5.1. Białka mięśniowe jako potencjalne wskaźniki jakości, wodochłonno- ści i kruchości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością	37
5.1.1. Wpływ szybkości procesu wychładzania i czasu przechowy- wania na jakość mięsa wieprzowego	37
5.1.2. Wpływ szybkości procesu wychładzania i czasu przechowy- wania na ubytki masy i wielkość wycieku wirówkowego z mięsa	42
5.1.3. Wpływ szybkości procesu wychładzania i czasu przechowy- wania na wielkość siły i pracy cięcia mięsa	50
5.1.4. Określenie wpływu szybkości wychładzania mięśni wieprzo- wych i czasu przechowywania na zmiany udziału białek na podstawie SDS-PAGE i metody Western blot	54
5.2. Białka mięśniowe jako potencjalne wskaźniki jakości oraz wodoch- łonności i kruchości mięsa bydła RFN i z wadą DFD	89
5.2.1. Wprowadzenie	89
5.2.2. Właściwości mięsa bydła o zróżnicowanej jakości	91
5.2.3. Zmiany udziału białek ekstraktów z mięsa bydła o zróżni- cowanej jakości na podstawie SDS-PAGE	95

5.2.4. Identyfikacja białek i peptydów z wykorzystaniem wysoko- korozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF- -MS/MS	100
6. PODSUMOWANIE	123
7. WNIOSKI	126
LITERATURA	128

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

AP	– fosfataza alkaliczna (ang. alkaline phosphatase)
BSA	– surowicza albumina wołowa (ang. bovine serum albumin)
DFD	– mięso z wadą DFD ciemne, twarde, suche (ang. dark, firm, dry)
GAPDH	– dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
HSP	– białka szoku cieplnego (ang. heat shock protein)
I-P	– immobilon – P, membrana do transferu białek (ang. transfer membrane)
MHC	– łańcuchy ciężkie miozyny (ang. myosin heavy chains)
MLC	– łańcuchy lekkie miozyny (ang. myosin light chains)
MW	– masa cząsteczkowa (ang. molecular weight)
PE	– przewodność elektryczna (ang. electrical conductivity)
pI	– punkt izoelektryczny (ang. isoelectric point)
<i>pm</i>	– po uboju, łac. <i>post mortem</i> (ang. after slaughter)
RFN	– mięso normalnej jakości, czerwone, jędrne, normalne (ang. red, firm, normal)
SB	– bufor do barwienia (ang. staining buffer)
SDS-PAGE	– elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z solą sodową kwasu dodecylosiarkowego (ang. polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate)
TB	– bufor do transferu (ang. transfer buffer)
TBS	– bufor – sól fizjologiczna buforowana trisem (ang. tris buffered saline)
TBST	– bufor – sól fizjologiczna buforowana trisem z Tween 20 (ang. tris buffered saline with Tween 20)
Tn-T	– troponina-T (ang. troponin-T)
VFC	– bardzo szybkie wychładzanie (ang. very fast chilling)
WBC	– zdolność zatrzymywania wody (ang. water binding capacity)
WHC	– zdolność wiązania wody własnej (ang. water holding capacity)
WBSF	– siła cięcia (ang. Warner-Bratzler shear force)

1. WSTĘP

Białka mięsa stanowią przedmiot zainteresowań wielu naukowców, jednak ich szczegółowa identyfikacja, wielokierunkowość zmian, jakim podlegają i mechanizmy reakcji, w których aktywnie uczestniczą, nie są jeszcze dokładnie poznane.

Białka mięśniowe są analizowane w szerokim aspekcie czynników wpływających na ich ekspresję. Do znacznie rzadszych należą badania oceniające wpływ procesu wychładzania na zmiany udziału białek mięśniowych. To zagadnienie było przedmiotem tylko nielicznych doniesień (Pomponio i in., 2018) i w tym zakresie wymaga uzupełnienia. Poubojowe wychładzanie tusz zwierząt rzeźnych poprzedza proces dojrzewania mięsa. Etap ten jest ważnym elementem procesu produkcyjnego, ze względu na fakt istotnego oddziaływania na jakość pozyskanego surowca mięsnego, w tym na wielkość wycieku swobodnego z mięsa oraz jego kruchość. Obecnie tusze świń coraz częściej są wychładzane przy wykorzystaniu tzw. szoku chłodniczego, którego konsekwencją może być zbyt szybkie obniżenie temperatury mięśni, przy stosunkowo wysokiej wartości pH (6,0–6,3) i wystąpienie zjawiska skurczu chłodniczego.

Zmiany białek w czasie dojrzewania mięsa determinowane są przebiegiem procesu glikolizy. Stopień obniżenia pH zależy silnie od ilości glikogenu obecnego w mięśniach przed ubojem. Zwiększona aktywność zwierząt w czasie poprzedzającym ubój zmniejsza rezerwy glikogenu w mięsie i ogranicza zakres poubojowej glikolizy. Skutkuje to większą częstością występowania odchylenia jakościowego typu DFD (ang. dark, firm, dry – ciemne, twarde, suche). Mimo dość obszernych danych związanych z oceną białek mięsa bydła dotychczas nie zwracano uwagi na powiązanie ich występowania z wadą DFD. Główne zainteresowanie było skupione na analizie możliwości wczesnego prognozowania kruchości mięsa wołowego na podstawie profilu jego białek (Picard i in., 2015; Oh i in., 2019; Picard i Gago, 2020).

Obserwacje białek w mięsie o obniżonej jakości (DFD) były przedmiotem nielicznych prac. Są zagadnieniem nie do końca poznanym i wymagają dalszych badań. Pulford i in. (2008) ocenili zmiany białek mięsa w zależności od jego pH. Podobnie jak Lomiwes i in. (2014b), Mahmood i in. (2018), Oh i in. (2019) główną uwagę skierowali oni na białka szoku cieplnego oraz zależność między ich występowaniem a jakością mięsa. Cytowani wyżej autorzy identyfikowali białka wybrane z żelu po elektroforezie dwukierunkowej. W niniejszych badaniach własnych postanowiono zwrócić uwagę na białka, których obecność jest związana nie tylko z pH mięsa, ale konkretnie z występowaniem wady DFD. Zaproponowano również odmienne podejście analityczne, zakładające identyfikację techniką wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS wszystkich białek i peptydów zawartych w eks-

traktach, tzn. z pominięciem rozdziału przy wykorzystaniu elektroforezy. Przemysł mięsny zainteresowany jest przyżyciowym testem dotyczącym analizy określonych białek, na podstawie którego w przyszłości możliwe będzie wyeliminowanie bydła obciążonego występowaniem wady DFD przed ubojem i ograniczenie strat zakładów mięsnych.

Białka odzwierciedlają obraz zmian, jakim podlegają mięśnie w procesie konwersji w mięso podczas dojrzewania poubojowego i zależą od tempa przemian poubojowych determinowanych procesem wychładzania oraz występowaniem odchylenia jakościowego DFD. Celem pracy była analiza białek mięśniowych jako potencjalnych wskaźników jakości, ze szczególnym uwzględnieniem wodochłonności i kruchości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością oraz mięsa bydła z wadą DFD.

2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

Przedmiotem intensywnego zainteresowania wielu ośrodków badawczych jest pozyskanie surowca mięsnego, którego cechy pozwalają na spełnienie oczekiwań zarówno producentów, jak i konsumentów. Ze względu na wysoką wartość odżywczą oraz pożądane właściwości fizykochemiczne i sensoryczne mięso kulinarne o dobrej, powtarzalnej jakości jest poszukiwane przez potencjalnych nabywców. Szeroko rozumiana jakość może być definiowana w bardzo różny sposób. Termin ten najczęściej obejmuje wartość odżywczą, właściwości technologiczne, cechy sensoryczne i aspekty bezpieczeństwa zdrowotnego żywności (Hofmann, 1994; Kauffman, 1996; Olsen, 1997; Przybylski i in., 2016).

Na wartość odżywczą mięsa chudego składają się przede wszystkim zawartość pełnowartościowego białka bogatego w aminokwasy egzogenne, peptydów biologicznie aktywnych, witamin (szczególnie z grupy B), składników mineralnych (głównie potasu, fosforu, siarki, sodu, chloru, żelaza, cynku, jodu, kobaltu, miedzi, manganu i seleniu), a także wysoka strawność i biodostępność składników niezbędnych dla prawidłowego rozwoju organizmu. Sensoryczne atrybuty jakości mięsa definiowane są najczęściej w kategoriach akceptacji konsumenckiej i obejmują przede wszystkim kruchość, zapach, soczystość i smak (Robbins i in., 2003; Grześ i in., 2017; Warner i in., 2017). Oczekiwania konsumentów związane są też z odpowiednim wyglądem: barwą, ilością tłuszczu i obecnością widocznej tkanki łącznej (Brewer i Novakowski, 2008). Kruchość i tekstura odgrywają ważniejszą rolę w przypadku wołowiny, a na wodochłonność – wyznaczaną również na podstawie wielkości wycieku naturalnego soku mięśniowego – zwraca się większą uwagę przy ocenie mięsa wieprzowego. Właściwości technologiczne – takie jak tekstura, struktura, konsystencja, zawartość i związanie wody – wskazywane są jako nadrzędne, szczególnie w przypadku produktów poddawanych obróbce termicznej. Natomiast bezpieczeństwo zdrowotne mięsa określane jest przez obecność mikroorganizmów i toksyn, wartość pH, aktywność wody, potencjał oksydoredukcyjny, dodatki oraz inne zanieczyszczenia.

Białka mięśniowe to interesujące związki, zróżnicowane pod względem budowy i pełnionych funkcji. Dzieli się je na trzy główne grupy – białka miofibrylarne (wśród których wyróżnia się białka kurczliwe, cytoszkieletowe i regulatorowe), białka sarkoplazmatyczne i białka łącznotkankowe (Pospiech i in., 2003b; Pospiech i in., 2011). Ilość konkretnych białek w ramach wymienionych powyżej grup, odmienność ich ekspresji pod wpływem różnych czynników, w tym procesu wychładzania czy stresu przedubojowego powodującego występowanie wady DFD, w dużym stopniu mogą determinować zmiany zachodzące w mięsie podczas chłodniczego przechowywania i wymagają szczególnej uwagi. Wyniki badań wskazują, że postępy w genomice i proteomice oferują możliwość lepszego zrozumienia procesu

konwersji mięśni w mięso i jego wpływu na cechy jakości, tj. pH, barwę ($L^*a^*b^*$) (Di Luca i in., 2011; Picard i in., 2015; Sierra i in., 2012) oraz kruchość i wodochłonność mięsa (Franco i in., 2015; Zeng i in., 2017).

Białka miofibrylarne budzące największe zainteresowanie to przede wszystkim titina, troponina-T, nebulina i desmina, gdyż ulegają one proteolizie podczas poubojowego dojrzewania. Zmiany udziału białek miofibrylarnych wiązano z właściwościami mięsa, tj. wodochłonnością i kruchością (Pospiech i in., 2000; Grześ i in., 2010; Iwanowska i in., 2010a; Zając i in., 2016; Grześ i in., 2017; Zeng i in., 2017). Stopień proteolizy białek miofibrylarnych był często badany jako źródło biomarkerów cech jakości sensorycznej, zwłaszcza tekstury mięsa (Kemp i in., 2010; Ouali i in., 2013; Hopkins i Geesink, 2009; Żelechowska i in., 2012).

Drugą grupę białek obecnych w mięsie stanowią białka sarkoplazmatyczne. W większości są to enzymy glikolityczne, proteolityczne i mioglobina (Marino i in., 2014). Niektóre badania koncentrowały się na analizie powiązań między profilem białek sarkoplazmatycznych a jakością mięsa (Laville i in., 2005; Mikołajczak i in., 2005a; Sierra i in., 2012; Marino i in., 2014; Canto i in., 2015; Gao i in., 2016). Jak stwierdzili Sierra i in. (2012) degradacja lub utlenianie białek sarkoplazmatycznych może dostarczyć użytecznych informacji na temat poubojowego procesu konwersji mięśni w mięso i jego wpływu na jakość.

Wcześniejsze badania z użyciem elektroforezy SDS-PAGE oraz analiza techniką spektrometrii mas wykazały, że sok mięśniowy jest bogatym źródłem białek sarkoplazmatycznych, które są potencjalnymi biomarkerami procesu dojrzewania i cech jakości mięsa, takich jak zdolność do wiązania wody, stabilność barwy, kruchość i wyróżniki sensoryczne (Di Luca i in., 2011, 2013a, 2013b; Sierra i in., 2012; Ouali i in., 2013; Bowker i in., 2014; Marino i in., 2014; Gao i in., 2016; Canto i in., 2015; Picard i in., 2015; Nair i in., 2016). Na podstawie ilości sześciu fragmentów białek strukturalnych i metabolicznych, tj. 4 fragmentów troponiny-T, troponiny-I i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, obecnych w ekstraktach w czasie pierwszych 24 h *pm*, możliwe było przewidywanie kruchości (mierzonej jako maksymalna siła cięcia, ang. Warner-Bratzler shear force, WBSF) po 7 dniach przechowywania mięsa bydła biotypu *Ternera Asturiana* (pochodzącego od ras *Asturiana de los Valles* i *Asturiana de la Montaña*, oznaczonego jako Chronione Oznaczenie Geograficzne) oraz wskazanie biotypów o zróżnicowanym tempie procesu kruszenia (Sierra i in., 2012). Di Luca i in. (2011) analizując białka soku mięśniowego w grupach o zróżnicowanej wartości pH i wielkości ubytku soku mięśniowego (ang. water holding capacity, WHC) wykazali, że białko szoku cieplnego HSP70 może być potencjalnym wskaźnikiem jakości mięsa w warunkach przemysłowych. Bowker i in. (2014) na podstawie wysokiej korelacji kruchości mięsa (WBSF) i białek soku mięśniowego o masie 167 kDa, 97 kDa i 47 kDa wskazali je jako potencjalne biomarkery dojrzewania poubojowego i kruchości wołowiny. Sorapukdee i in. (2013) podali, że wysoka zawartość białek sarkoplazmatycznych w mięsie świń jest skorelowana z mniejszą utratą wody i tłuszczu podczas obróbki cieplnej i jest dodatkowo skorelowana z cechami tekstury, takimi jak żujność, spójność, elastyczność i twardość mięsa. Ouali i in. (2013) oraz Bowker i in. (2014) podali, że niektóre enzymy szlaku glikolitycznego, takie jak fosforylaza b (PHb), kinaza fosforylaza b (PHbK), fosfoglukomutaza (PGM), izomeraza trifosforanowa

(TPI), dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), kinaza fosfoglicerynianowa (PGAK), enolaza (EN), kinaza pirogronianowa (PK) i dehydrogenaza mleczanowa (LDH), mogą być stosowane jako potencjalne markery jakości sensorycznej mięsa, szczególnie w odniesieniu do kruchości. Di Luca i in. (2011, 2013a) wykazali, że niektóre białka sarkoplazmatyczne wycieku wirówkowego mogą być markerami zdolności wiązania wody (~ 68 kDa) i procesu dojrzewania. Jako potencjalne markery wskazano białka o masach ~ 83 kDa, ~ 68 kDa ~ 63 kDa, ~ 42 kDa i ~ 31 kDa. Ponadto zmiany udziału wielu białek sarkoplazmatycznych, w tym beta-enolazy (EN), aldolazy B bisfosforanu fruktozy (ALD), kinazy kreatynowej, GAPDH i dehydrogenazy trójfosforanowej występujących w tkance mięśniowej są wskaźnikami poubojowego dojrzewania mięsa (Di Luca i in., 2013b; Marino i in., 2014).

Wyniki badań eksperymentalnych wskazują również na związek między obecnością niektórych białek sarkoplazmatycznych a stabilnością barwy wołowiny (Canto i in., 2015), (Gao i in., 2016) i mięsa owczego (Nair i in., 2016). Zaliczana do powyższej grupy mioglobina o masie cząsteczkowej 17,8 kDa odgrywa najważniejszą rolę w kształtowaniu barwy mięsa. W świeżym mięsie występuje jako oksymoglobina (OMb) i dezoksymoglobina (DMb) – formy żelazawe, które mogą ulec utlenieniu do stanu żelazowego metmioglobiny (MMb). W mioglobinie część globularna chroni żelazo hemowe przed zewnętrznym utlenianiem (Suman i Joseph, 2013). Bezpośrednie utlenianie żelaza i oksydacyjna modyfikacja globiny może spowodować utlenianie mioglobiny (Yin i in., 2011). Obserwowany wzrost zawartości MMb wskazuje na utlenienie mioglobiny podczas przechowywania. Zwykle w świeżym mięsie MMb może być ponownie zredukowana do DMb i OMb ze względu na istnienie reduktazy metmioglobiny (MRE). Jednak aktywność MRE zmniejsza się, gdy mięso dojrzewa lub jest mrożone (Alonso i in., 2016).

Wyniki badań mięsa loszek (linii Naïma z knurami z linii P76) objętych programem eliminacji genów niekorzystnie wpływających na jakość mięsa (RYR1^T i RN⁻) pokazały, że białka sarkoplazmatyczne występujące w soku mięśniowym (takie jak fosforylaza, fosfofruktokinaza, enolaza, kinaza kreatynowa, aldolaza, mutaza fosfoglicerynianowa) wykazują wysoką korelację z wartością pH, parametrami barwy, cechami sensorycznymi (tj. kruchością i intensywnością zapachu), zawartością glukozy, białka i tłuszczu śródmięśniowego. Powyższe zależności obserwowano w tkance mięśniowej po uboju, a białka mięsa są potencjalnymi wskaźnikami jego dojrzewania (Przybylski i in., 2016). Ponadto na podstawie analizy kanonicznej wskazano grupy kilku białek soku mięśniowego, które mogą być potencjalnymi markerami w ocenie cech jakościowych mięsa, takich jak wartość pH₂₄, parametry barwy (L*a*b*), stężenie glikogenu i kwasu mlekowego (Montowska i in., 2009; Przybylski i in., 2016, Grześ i in., 2017). Według Marino i in. (2014) większe uwalnianie białek miofibrylarnych, takich jak łańcuchy lekkie miozyny, troponina-T i tropomiozyna do frakcji rozpuszczalnej, może wskazywać na bardziej intensywną proteolizę mięsa bydła rasy podolskiej.

Dane literaturowe dotyczące czynników determinujących jakość mięsa są coraz bogatsze. Wskazują one na ważne oddziaływanie uwarunkowań przedubojowych i poubojowych. Zwraca się uwagę na wiek, płeć, masę tuszy, mięsność, poziom tłuszczu śródmięśniowego (Rosenvold i Andersen, 2003; Ngapo i Gariepy, 2008;

Wood in., 2008; Channon i Warner, 2011), dobór genotypów zwierząt, predyspozycje genetyczne – w szczególności związane z mutacjami różnych genów, m.in. RYR1, RN⁻, PRKAG3, kalpastatyny, tłuszczu śródmięśniowego (HFABP), mio-geniny i miostatyny, kinazy pirogronianowej (PKM2) w szlaku glikolizy, GLUT4 – uczestniczącego w transporcie glukozy oraz na ich interakcje. Kolejną grupę stanowią czynniki środowiskowe, obejmujące warunki hodowli i chowu związane ze stosowanym systemem żywienia i doborem składników pasz oraz z transportem, włączając etapy załadunku, rozładunku, jego odległość i warunki klimatyczne podczas obrotu żywcem (Przybylski i in., 2015; Claussen, 2011). Wiele osiągnięć naukowych i technologicznych doprowadziło do poprawy dobrostanu zwierząt, doskonalenia strategii żywienia i wprowadzania innowacji w procesie uboju, w konsekwencji powodując poprawę jakości mięsa oferowanego na rynku (Przybylski i in., 2015). W Polsce, podobnie jak w innych krajach, funkcjonują systemy sprzyjające produkcji wysokiej jakości wieprzowiny PQS (Pork Quality System) czy wołowiny QMP (Quality Meat Program), wspierane przez ustawodawstwo państwa oraz podlegające niezależnej kontroli (Dz. U. z 2015, poz. 349).

Wychładzanie tusz ma na celu zapewnienie bezpieczeństwa żywności i wydłużenie okresu przydatności do spożycia. Zależność między wartością pH i tempem obniżenia temperatury tusz stanowi realnie udokumentowane odzwierciedlenie jakości wieprzowiny (Bertram i in., 2003). Rozpoczęcie wychładzania tusz w możliwie krótkim czasie po wykrwawieniu jest jednym ze sposobów skutecznego obniżenia temperatury, a w konsekwencji wolniejszych zmian wartości pH. Dzięki szybkiemu schładzaniu mięsa można zminimalizować wystąpienie jednocześnie wysokiej temperatury >35°C i niskiej wartości pH <5,8, sprzyjających występowaniu odchyłeń jakościowych. Szybkie obniżenie temperatury mięsa powoduje spowolnienie procesów metabolicznych i tempa spadku pH. Ograniczony zostaje stopień denaturacji mioglobiny i innych białek, następuje poprawa barwy i zdolności zatrzymywania wody przez mięso (van der Wal i in., 1995; Bertram i in., 2003). Stąd wczesne chłodzenie prowadzone z odpowiednią szybkością, w sposób zapewniający optymalne tempo obniżenia temperatury przy jednoczesnym proporcjonalnym spadku wartości pH, ogranicza skurcz włókien i sprzyja uzyskaniu mięsa cechującego się dobrą jakością. Jednocześnie może zapobiec występowaniu mięsa wadliwego typu PSE (ang. pale, soft, exudative), określanego jako blade, miękkie i ciekące. Jednak w przypadku mięsa PSE spowodowanego obecnością genu RYR1 szybkie zmniejszenie temperatury tusz zwykle nie jest wystarczające, aby skutecznie ograniczyć tempo spadku wartości pH mięśni i zapobiec denaturacji białek (Eilert, 1997).

Intensywne obniżanie temperatury mięśni, gdy proces glikolizy nie jest jeszcze zakończony, może prowadzić do skurczu chłodniczego mięśni. Zjawisko to najczęściej zachodzi wówczas, gdy temperatura w mięśniach jest poniżej 10–12°C, a wartość pH utrzymuje się powyżej 6,0–6,3. Powyższe zakresy temperatury i pH zależą od rodzaju włókien mięśniowych, które dominują w analizowanych mięśniach. Przy większej ilości włókien czerwonych prawdopodobieństwo wystąpienia superkontrakcji mięśni jest większe przy wyższych wartościach pH. W mięśniach o dużym udziale włókien białych lub pośrednich wywołanie zjawiska skurczu chłodniczego może być obserwowane w pobliżu temperatur o niższej wartości, tj. 10°C. Problem ten dotyczy nie tylko mięśni bydła i owiec, dla których zjawisko to jest

znane już od dawna, ale także świń, szczególnie o wysokiej mięsności. W tym przypadku warstwa zewnętrzna, którą stanowi przede wszystkim słonina, jest cienka i chroni mięśnie w tuszy przed chłodem w bardzo ograniczonym stopniu.

Zwrócenie uwagi na powyższe zjawisko jest ważne, ponieważ tusze świń bardzo często wychładza się, stosując tzw. szok chłodniczy. Podczas tego zabiegu początkowa temperatura w tunelu wynosi ok. -23°C . Pierwotnie wysoka mięsność była kojarzona z występowaniem wodnistości, której powstawanie można było ograniczyć, stosując szybkie wychładzanie, a nawet zamrażanie. Obecnie postęp w hodowli sprawił, że wyeliminowano świnie o dużej mięsności obarczone genem podatności na stres, a w rezultacie przy zachowaniu dobrostanu zwierząt podczas obrotu okołoubojowego przyspieszona glikoliza jest zjawiskiem rzadkim. Natomiast wykorzystanie ultraszybkiego wychładzania może zwiększać ryzyko pogorszenia jakości i wodochłonności mięsa. Badania na tuszach świń, mieszańców landrace i yorkshire krzyżowanych z rasą duroc (LxY)xD (wolnych od genów podatności na stres) oraz z rasą hampshire (LxY)xH, które były nosicielami genu mięsa kwaśnego (RN⁻), dowiodły, że mięso mieszańców pierwszej grupy wychładzane powoli charakteryzowało się lepszą jakością (Miszczuk, 2009). Częstość występowania mięsa z wyciekami mniejszym niż 6% po 48 godzinach po uboju w grupie (LxY)xD była istotnie większa w porównaniu z mieszańcami (LxY)xH. Wykazano jednak, że szybkie wychładzanie zwiększyło udział tusz o obniżonym wycieku (< 6%) w przypadku świń (LxY)xH z 60% do około 50%, a zwiększyło udział tusz z mięsem o większym wycieku (> 6%) w przypadku genotypu (LxY)xD z 11% do ok. 22%. Doświadczenie to potwierdziło, że dążąc do wyeliminowania wad mięsa i zmniejszenia wycieku soku mięśniowego, przy uwzględnieniu oddziaływania czynników genetycznych negatywnie oddziałujących na jakość, należy ograniczać szybkie wychładzanie (Miszczuk, 2009). Podobne wnioski dotyczące istotnego wpływu temperatury wychładzania poubojowego na powstawanie mięsa PSE u kurcząt i jednocześnie unikania zbyt szybkiego wychładzania mięśni wysunął Barbut (2009).

Szybkość wychładzania wpływa na tempo zmian glikolitycznych w tkance mięśniowej po uboju i w ten sposób oddziałuje na jakość mięsa wieprzowego (Jossell i in., 2003; Zybert i in., 2007; Iwańska i in., 2016; Marino i in., 2013, 2014; Ouali i in., 2013; Picard i in., 2015). Glikogen jest dominującym węglowodanem w mięśniach i głównym paliwem metabolicznym dla beztlenowej glikolizy, która ma miejsce *pm*, gdy mięśnie nie są już zaopatrywane w tlen. Szybkość glikolizy i okres wstąpienia w stan stężenia pośmiertnego jest różny dla poszczególnych gatunków zwierząt i mięśni. Wyniki wielu badań wskazują na oddziaływanie aktywności enzymów glikolitycznych na szybkość glikolizy *pm*. Wpływają one na tempo i zakres metabolizmu poubojowego, w konsekwencji przyczyniając się do kształtowania właściwości mięsa, takich jak barwa, zdolność wiązania wody (WHC), kruchość i wyróżniki sensoryczne, w tym smakowitość. Cechy te determinują również kierunki jego późniejszego przeznaczenia do wykorzystania w produkcji żywności (Pösö i Puolanne, 2005; Huff-Lonergan i in., 2010; Kylä-Puhju i in. 2005; Zhu i in., 2013; Copenhafer i in. 2006; Krischek i in., 2011).

Dane literaturowe wskazują, że proces wychładzania poubojowego tusz wpływa na barwę i wodochłonność mięsa (Huff-Lonergan i in., 2005). Wiadomo, że we wczesnym etapie po uboju wysoka temperatura przy niskiej wartości pH powo-

duże denaturację białek. Zwiększa to rozpraszanie światła w mięśniach (Lawrie, 1998; Swatland, 1993), bezpośrednio przyczyniając się do większej jasności (L^*), a także do mniejszej zdolności zatrzymywania wody. Wyniki badań sugerują, że białka sarkoplazmatyczne mogą być denaturowane i związane z białkami miofibrilarnymi w mięśniach, w których chłodzenie następowało po inkubacji w temp. 40°C przez 4 h. Wykazano, że szybkie schładzanie minimalizowało przemiany białek i poprawiało jakość mięsa. Wyniki badań mięśni brojlerów dowiodły, że denaturacja białek sarkoplazmatycznych może powodować ich koagulację na białkach miofibrilarnych (Zhu i in., 2011), co wpłynęło na interakcję pomiędzy powierzchnią białka a otaczającą fazą wodną, zmniejszając w ten sposób zdolność zatrzymania wody przez mięso (Puolanne i Halonen, 2010). Ponadto stwierdzono, że wysoka temperatura we wczesnym okresie pośmiertnym może mieć wpływ na aktywację kinazy białkowej aktywowanej AMP (AMPK), kluczowego enzymu kontrolującego wczesną poubojową szybkość glikolizy. Zrozumienie powyższych procesów może pomóc w wyjaśnieniu występowania mięśni jasnych, o niskiej wodochłonności (England i in., 2013).

Bertram i in. (2003), wykorzystując NMR (magnetyczny rezonans jądrowy), wykazali, że szybkie wychładzanie poprawia wodochłonność przez zmniejszone gromadzenie się wody pozawłókienkowej (extra-miofibrillar) w mięsie *pm*. Różnice w ilości wody pozawłókienkowej i jej akumulacja w dużym stopniu zależą od czasu, w którym ma miejsce zaburzenie integralności błony komórkowej. Szybkie chłodzenie prawdopodobnie oddziałuje na białka, zmieniając dynamikę przemieszczania się wody w mięśniach, w przestrzeni pozamiofibrilarnej. Tym samym ogranicza to gromadzenie się soku mięśniowego, co również częściowo odzwierciedla mniejsza ilość wycieku wirówkowego z mięśni.

Zarówno w przypadku mięsa wieprzowego, jak i wołowego ważnym wyróżnikiem jego jakości jest kruchość (Moeller i in., 2009; Hocquette i in., 2012). Lepetit i Culioli (1994) zdefiniowali kruchość mięsa jako główny wyróżnik jakości sensorycznej obok soczystości i smaku. Należy ona do właściwości mechanicznych i może być oceniana również na podstawie instrumentalnego pomiaru wartości siły cięcia (WBSF). Długość sarkomerów, zawartość tkanki łącznej i zmiany białek mięśniowych w dużym stopniu wyjaśniają różnice we właściwościach mięsa, w tym jego kruchości. Zróżnicowanie tempa i zasięgu zmian w procesie dojrzewania wiąże się z obniżeniem ilości dostępnej energii oraz zmianą metabolizmu tlenowego na bez-tlenowy, z jednoczesnym wytworzeniem kwasu mlekowego i w rezultacie obniżeniem wartości pH, wzrostem siły jonowej i zmniejszeniem warunków redukujących w komórkach. Powyższe zmiany mają znaczący wpływ na białka mięśniowe, które w czasie przechowywania mięsa ulegają proteolizie, oksydacji i S-nitrozylacji. Mechanizmy biologiczne zaangażowane w strukturalne i biochemiczne zmiany podczas procesu dojrzewania odpowiedzialne za kształtowanie jakości mięsa nie są jeszcze do końca poznane. Szybkość procesu wychładzania może wpływać również na kruchość mięsa. Gdy temperatura tkanki spadnie do ekstremalnie niskiej wartości przed ustaleniem końcowego pH, mięso może cechować niższą kruchość, związana ze zjawiskiem skurczu chłodniczego (Jones i in., 1987; Jeremiah i in., 1992, Iwańska i in., 2017).

Bardzo niska temperatura mięśni ($< 10^{\circ}$) we wczesnym okresie *pm* destabilizuje zdolność siateczki sarkoplazmatycznej – czyli głównego miejsca magazynowania wapnia – do zatrzymywania jonów Ca^{+2} i wywołuje superkontrakcję mięśni. Nadmierny skurcz włókien powoduje wyparcie jonów Ca^{+2} z retikulum sarkoplazmatycznego. Jego efektem jest mięsień zbity i twardy. W ekstremalnych warunkach chłodzenia temperatura mięśni o małej średnicy, umiejscowionych w pobliżu zewnętrznej części tuszy, spada szybciej niż w mięśniach o większej średnicy. Może to również prowadzić do ich skurczu chłodniczego i w rezultacie do większej twardości mięsa.

Warunki wychładzania tusz w Polsce określono w normie PN-A-07005:2006. Podobnie jak w innych krajach Unii Europejskiej podlegają one również kontroli zgodnie z rozporządzeniem (WE) Nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady. Ponadto często stanowią jeden z krytycznych punktów kontroli systemu HACCP. Wymagana temperatura tusz wieprzowych to 4°C po 24 godzinach od uboju, a tusz wołowych i baranich – 7°C przed przystąpieniem do rozbioru (Dz. Urz., L139, 2004).

W praktyce przemysłowej przy schładzaniu tusz powszechnie używane są trzy systemy wychładzania, tj. konwencjonalne – jednostopniowe, z nadmuchem (szybkie, szokowe) – dwustopniowe i natryskowe. W mniejszym stopniu znajduje wykorzystanie chłodzenie kriogeniczne i zanurzeniowe z zastosowaniem solanek chłodzących. W wielu systemach konwencjonalnych stosuje się temperaturę $1\text{--}4^{\circ}\text{C}$, przy prędkości powietrza $0,5\text{--}1$ m/s przez 24 h. Przy chłodzeniu szokowym w pierwszym stopniu stosowane jest powietrze o temperaturze od -10°C do -40°C i prędkości $1\text{--}5$ m/s, przez 1 do 3 h. Drugi stopień stanowi faza dochładzania w powietrzu o temp. ok. 2°C , przy prędkości przepływu $0,2$ m/s i wilgotności 90–95%. W chłodzeniu natryskowym okresowo – np. co 15 min przez 60 s – aplikuje się wodę o temp. $1\text{--}5^{\circ}\text{C}$ w połączeniu z chłodzeniem powietrzem o prędkości $0,5\text{--}1$ m/s w czasie do 10 h (Borzuta, 2006; Savell i in., 2005). Wychładzanie tusz jest kluczowym elementem procesu technologicznego pozyskiwania mięsa (North i Lovatt, 2012). Ze względu na zmienność surowca, jego masę, mięsność związaną ze stopniem otluszczenia i stosowanie różnych sposobów oształamiania prowadzone są badania oceny wpływu procesu wychładzania na jakość otrzymanego surowca oraz jego efektywność. Niektóre badania, uwzględniając wiele czynników zmienności, koncentrują się na stworzeniu matematycznych modeli opisujących proces wychładzania (Hamoen i in., 2013, Vetharanim i in., 2010). Ponadto wiele doniesień literaturowych wskazuje na aspekt ekonomiczny wychładzania – ograniczenie wielkości strat masy tusz związane z lepszą wodochłonnością mięsa przy jednoczesnym uzyskaniu wysokiej jakości surowca mięsnego (Janiszewski i in., 2018; Miszczuk, 2009; van der Wal i in., 1995).

Konwersja mięśni w mięso jest procesem złożonym, obejmującym wiele zmian biochemicznych i fizycznych, w tym jako najważniejsze wymienia się zmiany wartości pH, skurcz poubojowy mięśni i proteolizę białek. W mięsie po wykrwawieniu w wyniku beztlenowej glikolizy jako produkt końcowy tej reakcji gromadzi się kwas mlekowy, dlatego obserwowane jest zmniejszenie wartości pH. Podczas prawidłowego przebiegu glikolizy proces skurczu poubojowego mięśni (*rigor mortis*), dominujący pod względem wizualnym, rozpoczyna się, gdy pomiędzy filamentami

miozyny i aktywny powstają stałe wiązania poprzeczne i formowana jest aktomiozyna. Steżenie poubojowe rozpoczyna się w mięsie normalnej jakości (RFN, ang. red, firm, normal) przy wartości pH 5,7–5,8 (Hannula i Puolanne, 2004). Podczas pierwszej fazy steżenia poubojowego, nazywanej *prerigor*, mięśnie mogą się kurczyć i rozkurczać ze względu na obecność glikogenu, tlenu związanego z mioglobina, a także adenylozotryfosforanu (ATP). Dostępny ATP, wiążąc się w skomplikowanych reakcjach, w których uczestniczą jony Ca^{+2} i Mg^{2+} , pomaga odłączyć aktywną od miozyny, umożliwiając rozluźnienie mięśni. Po pewnym czasie następuje jednak ograniczenie powstawania ATP, co jest sygnałem rozpoczynającej się fazy steżenia poubojowego *rigor mortis* (Aberle i in., 2001). Zwykle przyżyciowe pH w mięśniach z wartości ok. 7,0–7,2 spada po uboju do około 5,3–5,8 (Smulders i in., 1992). W skrajnych przypadkach takie obniżenie pH może zająć zaledwie 1 h. Typowe zmniejszenie wartości pH do wskazanego poziomu dla wieprzowiny występuje w przedziale 6–12 godzin, natomiast w wołowinie ustala się zwykle po 18–40 godzinach (Smulders i in., 1992). W wielu badaniach końcowe pH często stwierdzano w przypadku wieprzowiny po 24 h od uboju (Di Luca i in., 2011; Scheffler i in., 2013; Grześ i in., 2017), a nawet nieco później (Iwańska i in., 2016, 2017). Natomiast w wołowinie wartość ta jest zwykle wyznaczana po 48 h *pm* (Silva i in., 1999; Young i in., 2004a; Mikołajczak i in., 2019).

Podczas poubojowego dojrzewania mięsa białka mięśniowe podlegają działaniu proteaz tworzących różne systemy proteolityczne, do których zgodnie z podziałem ze względu na lokalizację należą kalpajny (endopeptydazy cysteinowe), katepsyny (enzymy lizosomalne), kaspazy, proteasomy i inne proteazy, np. metaloproteazy. Kalpajny to duża rodzina wewnątrzkomórkowych, obojętnych proteaz cysteinowych. Do tej pory zidentyfikowano 14 kalpajny, z których trzy – μ -kalpajna, m-kalpajna i p94 (nCL-1 lub kalpajna 3) – tworzą układ kalpajny mięśni szkieletowych (Goll i in., 2003). Enzymy μ -kalpajna i m-kalpajna są proteazami aktywowanymi jonami wapnia, wymagającymi odpowiednio mikro- i milimolarnego (odpowiednio 3–50 μM i 400–800 μM) steżenia jonów wapnia Ca^{+2} (Goll i in., 2003). Składają się z dwóch podjednostek, tj. katalitycznej o masie cząsteczkowej 80 kDa i regulacyjnej o masie 30 kDa. Podjednostki regulacyjne są takie same w μ -kalpajnie i m-kalpajnie, natomiast podjednostki regulacyjne są specyficzne dla tych enzymów. Kalpajny zlokalizowane są w sarkoplazmie komórek mięśniowych, głównie na linii Z oraz w strefach A i I sarkomeru. Z rodziną enzymów proteolitycznych kalpajny związany jest endogenny inhibitor kalpajny, kalpastatyna (Wendt i in., 2004). Kalpastatyna ma masę 76 kDa i zbudowana jest z pięciu domen. Jest białkiem termostabilnym i wiąże się odwracalnie z μ - i m-kalpajną w obecności jonów Ca^{2+} . Mechanizm działania kalpastatyny polega na hamowaniu proteolitycznej aktywności kalpajny, ale również odbywa się przez zablokowanie miejsca regulatorowego, uniemożliwiając ich wiązanie do błony komórkowej.

Kalpajny uzyskują optimum aktywności w środowisku o pH ok. 7,2–8,2 i w temp. 25°C. Stopień inaktywacji proteolitycznej μ -kalpajny wzrasta wraz z obniżaniem wartości pH (pH < 6,0), a jej aktywność ustaje po 72 h, w przeciwieństwie do stabilnej m-kalpajny (Barbut i in., 2008; Koohmaraie, 1988). Powszechnie przyjmuje się, że proteolityczna aktywność kalpajny przyczynia się do kruszenia mięsa (Koohmaraie i Geesink, 2006; Sentandreu i in., 2002). Uważa się, że μ -kalpajna

odpowiada za proces kruszenia mięsa w początkowej fazie, a m-kalpain i inne proteazy, w tym szczególnie katepsyny, warunkują proteolizę w późniejszym okresie dojrzewania (Geesink i in., 2006; Pomponio i Ertbjerg, 2012; Mohrhauser i in., 2014). Na aktywność kalpain wpływają procesy utleniania, które hamują tempo poubojowej proteolizy białek i ograniczają poprawę kruchości mięsa. Zarówno μ -, jak i m-kalpain są szczególnie podatne na inaktywację ze względu na obecność w centrum aktywnym grupy tiolowej ($-SH^-$) pochodzącej od reszt cysteiny (Lametsch i in., 2008; Lund i in., 2011). Ponadto tworzenie wiązań sieciujących pomiędzy białkami miofibrylarnymi, tj. łańcuchem ciężkim miozyny a titiną, jak również oksydacja enzymów proteolitycznych mogą przyczynić się do zmniejszenia rozpuszczalności białek przez obniżenie zdolności do dysocjacji, co wpływa na zmniejszenie wodochłonności, soczystości oraz kruchości mięsa (Huff-Lonergan i in., 2010; Lund i in., 2011). Katepsyny wykazują aktywność enzymatyczną względem miozyny, aktyny i α -aktyniny (Koochmaraie, 1996). Katepsyna L hydrolizuje białka miofibrylarne takie jak miozyna, aktyna, troponiny T, I, C, nebulina, titina i tropomiozyna, które ulegają degradacji w czasie poubojowego dojrzewania (Mikami i in., 1987).

Proteasom, dawniej zwany kompleksem multikatalitycznej proteazy, należy do enzymów nielizosomalnych występujących w mięśniach, których aktywność zależy od ATP. Może jednak uczestniczyć w procesie poubojowej degradacji białek bez udziału ATP. Zaangażowany jest w wewnątrzkomórkową przemianę białek, poprzez ich degradację oraz rozkład w cytozolu i jądrze (Coux i in., 1996). Proteasom jest białkiem globularnym o stałej sedimentacji 26S (ang. proteasome 26S). Składają się na nie dwie podjednostki, mianowicie struktura wielokatalityczna, rdzenna 20S o masie 700 kDa i aktywności enzymu proteolitycznego oraz dwa regulujące tę aktywność kompleksy 19S (Dahlmann i in., 2001, Zeng i in., 2017). Proteoliza prowadzona przez proteasom polega na degradacji białek sprzężonych z ubikwityną, przy czym reakcję degradacji inicjuje przyłączenie co najmniej czterech reszt ubikwityny do reszt lizyny docelowego substratu. Poliubikwitynowe białka są następnie rozpoznawane przez multikatalityczną proteazę, która usuwa łańcuch ubikwityny i degraduje substrat (Taillandier i in., 2004).

Wiele badań dostarczyło dowodów potwierdzających, że proteasom może przyczynić się do kruszenia mięsa. Taylor i in. (1995b) oraz Robert i in. (1999) odkryli, że proteasom w mięśniach bydła był zdolny do powodowania proteolizy białek miofibryli, w tym nebuliny, miozyny, aktyny i tropomiozyny. Jego aktywność utrzymywała się w okresie przechowywania poubojowego i była oznaczana 7 dni po uboju przy pH na poziomie $< 6,0$ (Lamare i in., 2002). Dodatkowo Dutaud i in. (2006) wykazali specyficzne zmiany strukturalne, w tym zwiększenie szerokości dysków Z, rozciągających się na pasmo I, we włóknach mięśniowych inkubowanych z podjednostką 20S, czego nie można zaobserwować we włóknach poddanych działaniu kalpains lub katepsyny. Podobnie, stosując inhibitor anty-proteasomowy i podejście proteomowe, Houbak i in. (2008) wykazali brak degradacji białek takich jak troponina-T i nebulina, powszechnie obserwowanej podczas poubojowej proteolizy mięśni. Jednak, jak podkreślili Koochmaraie i Geesink (2006), proces degradacji białek miofibrylarnych inkubowanych z podjednostką 20S nie jest taki

sam jak w mięśniach *pm*. Nie wyklucza to jednak udziału proteasomu w procesie poubojowej proteolizy (Houbak i in., 2008).

Wszelkie odchylenia od normalnego przebiegu procesu glikolizy oraz tempa obniżania pH mają wpływ na powstawanie wad jakościowych mięsa wieprzowego i wołowego, powodując obniżenie jego przydatności kulinarnej i przetwórczej, a także akceptowalności konsumenckiej (Scheffler i Gerrard, 2007; Shen i Du, 2015; Przybylski i in., 2016). Ogromne znaczenie dla przebiegu procesów pośmiertnych mają sytuacje stresowe zachodzące przyżyciowo, które negatywnie oddziałują na jakość mięsa. Obserwowane z większą częstotliwością w przypadku bydła niskie stężenie glikogenu, spowodowane stresem przed ubojem, skutkuje bardzo ograniczoną glikolizą i wysokim pH końcowym (> 6,0). Powyższe może doprowadzić do powstania odchylenia jakościowego pozyskanego surowca mięsnego określanego jako DFD (ang. dark, firm, dry – ciemne, twarde, suche). Mięśnie takie cechuje niski poziom ATP, glikogenu i kwasu mlekowego. Brak poubojowego zakwaszenia powoduje, że krótko po uboju mięso ma ciemną barwę, jędrną i twardą konsystencję oraz bardzo dużą wodochłonność. Jest niezmiernie podatne na procesy rozkładu i intensywny rozwój mikroflory gnilnej. Natomiast po obróbce termicznej charakteryzuje się doskonałą kruchością.

Jak dotąd nie udało się skutecznie wyeliminować obecności mięsa DFD ani w Polsce, ani z dużym prawdopodobieństwem na świecie. Jakkolwiek znane są sposoby zapobiegania jego występowaniu, szacuje się, że ponad 10% bydła rzeźnego ubijanego w Polsce dostarcza po uboju mięso z odchyleniem jakościowym DFD. Obecność mięsa DFD powoduje duże straty dla przemysłu. W związku z tym zakłady zainteresowane są korzystaniem z przyżyciowego testu, który pozwoliłby na wyeliminowanie sztuk, z których mięso po uboju może być obarczone wadą DFD. W przypadku odchylenia jakościowego DFD zasadne jest poszukiwanie białka lub grupy białek, których ekspresja w czasie przechowywania odzwierciedlałaby ich poziom oznaczony przed ubojem i pozwoliłaby na prognozowanie jakości mięsa *pm*. Powyższe mogłoby stanowić podstawę przyżyciowego testu wskazującego na stan mięśni, a w konsekwencji na jakość pozyskanego surowca mięsnego. Na jego podstawie możliwe byłoby podjęcie działań zmierzających do ograniczenia częstości występowania wady DFD. W tym zakresie badania wymagają uzupełnienia, dlatego uzasadnione jest podjęcie tego tematu w niniejszej pracy.

Zmiany obserwowane w białkach mięsa z wadą DFD są odpowiedzią komórek na stresory, czyli czynniki wywołujące stres komórkowy, do których zalicza się między innymi temperaturę, niedobór glukozy czy rodniki. Szczególną uwagę zwracają białka szoku cieplnego (HSP) powszechnie nazywane chaperonami – białkami opiekuńczymi. Jest to duża grupa białek o zróżnicowanej masie cząsteczkowej (12–100 kDa), która stanowi jedno z kryteriów ich klasyfikacji (Fink, 1999; Haslbeck i in., 2005). Białka szoku cieplnego pełnią wiele funkcji. Biorą udział w fałdowaniu nowo syntetyzowanych białek, naprawie lub usuwaniu zdenaturowanych polipeptydów i białek, hamowaniu powstawania agregatów denaturowanych białek, regulują aktywność enzymów, uczestniczą w transporcie białek, są aktywatorem ATP (HSP40). Małocząsteczkowe białka szoku cieplnego (sHSP), takie jak HSP20, HSP27 i $\alpha\beta$ -krystalina, odgrywają szczególną rolę w funkcjonowaniu mięśni, ich skurczu, polimeryzacji aktyny, stabilizacji mikrofilamentów oraz cy-

toszkieletu. Rola sHSP w utrzymaniu integralności strukturalnej mięśni w wyniku działania wewnątrzkomórkowego stresu związana jest również ze zmianą wartości pH i znacząco oddziałuje na jakość mięsa. Badania wykazały, że końcowe pH mięsa wpływa na charakter wewnątrzkomórkowej redystrybucji sHSP w mięśni i wraz z pH jest skorelowane z kruchością mięsa (Pulford i in., 2008).

Kompleksowa charakterystyka profilu białek oraz ich szczegółowa identyfikacja stanowią element proteomiki, której metody badawcze są użyteczne w poszukiwaniu markerów jakości mięsa. Badania wskazują na ogromny potencjał proteomiki w określaniu kluczowych białek odpowiedzialnych za jakość, wodochłonność i kruchość mięsa (Marino i in., 2015) oraz jako narzędzia analitycznego wspierającego wysiłki na rzecz odkrycia sekwencji peptydów bioaktywnych czy funkcjonalnych, które mogą stanowić wartość dodaną białek jako składników mięsa (Yu i in., 2015). Oczekuje się, że za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE, metodą Western blot, a także wykorzystując technikę spektrometrii mas sprzężoną z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS pozyska się nowe informacje, które pozwolą na głębszą analizę białek i dalsze wyjaśnienie zależności między ich występowaniem oraz zmianami udziału a wodochłonnością i kruchością jako podstawowymi właściwościami mięsa, istotnymi zarówno z punktu widzenia konsumentów, jak i producentów.

Jak wskazują dane literaturowe, białka sarkoplazmatyczne soku mięśniowego dotychczas najczęściej pozyskiwano w sposób naturalny, podczas przechowywania mięsa, i rozpatrywano w stosunkowo wąskim zakresie masy cząsteczkowej – od ok. 15 kDa do 180 kDa (Żelechowska i in., 2012; Marino i in., 2014; Przybylski i in., 2016). W badaniach prezentowanych w niniejszej pracy analizowano białka frakcji wycieku wirówkowego, w którego skład wchodziły białka sarkoplazmatyczne, jak również miofibrylarne – w tym cytoszkieletowe – w większym zakresie masy cząsteczkowej 10–2400 kDa. Ponadto przyjęto założenie, że równoczesna analiza białek mięsa i frakcji wycieku wirówkowego umożliwi pełniejsze zrozumienie wpływu poubojowego wychładzania wieprzowiny na zmiany ich procentowego udziału oraz pozwoli na wskazanie związku między ich występowaniem a jakością mięsa, ze szczególnym uwzględnieniem jego wodochłonności i kruchości. Obserwacje białek miały również pozwolić na pełniejsze wyjaśnienie procesu wychładzania prowadzącego do wywołania skurczu chłodniczego i w konsekwencji do pogorszenia właściwości mięsa.

Fakt, że nie w pełni wyjaśnione są zmiany białek mięśniowych związane z występowaniem wady DFD, stał się podstawą II etapu zadań realizowanych w niniejszej pracy. Badania proteomiczne ekstraktów pozyskanych z mięsa bydła o zróżnicowanej jakości ukierunkowano na analizę elektroforetyczną SDS-PAGE oraz identyfikację białek i peptydów, wykorzystując technikę spektrometrii mas sprzężoną z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS.

W związku z tym przedmiotem analizy w prezentowanej pracy były białka mięśniowe, które w przyszłości mogłyby stanowić potencjalne markery jakości, w tym szczególnie wodochłonności i kruchości mięsa wieprzowego wychładzanego z różną szybkością oraz mięsa bydła z wadą DFD.

3. CEL I ZAKRES PRACY

Cel pracy

Celem pracy była analiza białek mięśniowych jako potencjalnych wskaźników jakości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością oraz mięsa bydła z wadą DFD, ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływania na wodochłonność i kruchość pozyskanego surowca.

W związku z powyższym sformułowano następujące hipotezy badawcze, które poddano weryfikacji statystycznej.

1. Szybkość procesu wychładzania wpływa na tempo przemian glikolitycznych i może wywoływać zjawisko skurczu chłodniczego, będące przyczyną dużych ubytków masy i gorszej kruchości mięsa wieprzowego w czasie przechowywania chłodniczego.
2. Zmiany udziału białek mięśniowych i białek frakcji wycieku wirówkowego są determinowane procesem poubojowego wychładzania mięsa wieprzowego. Ich analiza umożliwi wyznaczenie białek jako potencjalnych wskaźników jakości mięsa, w tym jego wodochłonności i kruchości.
3. Białka ekstraktów z mięsa bydła normalnej jakości (RFN) i z wadą DFD odzwierciedlają jego cechy jakościowe, w tym wodochłonność i kruchość.
4. Identyfikacja białek i peptydów mięsa bydła normalnej jakości (RFN) i z wadą DFD techniką wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS pozwoli na wskazanie potencjalnych białkowych wskaźników jego jakości, wodochłonności i kruchości.

Zakres pracy

W niniejszej pracy weryfikację powyższych hipotez zaplanowano na podstawie realizacji następujących badań:

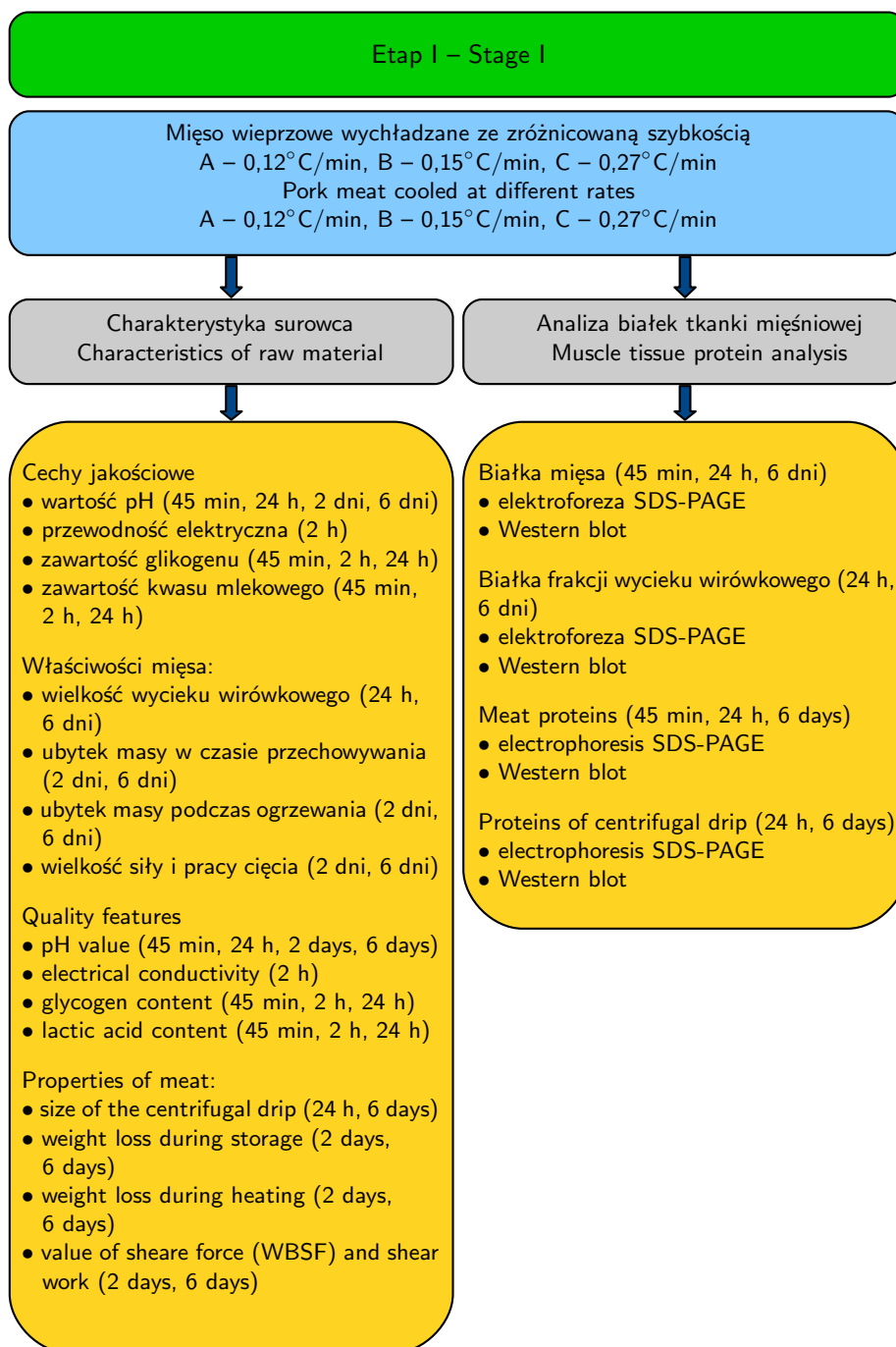
- oceny wskaźników tempa przemian poubojowych określających jakość surowca: wartości pH, przewodności elektrycznej, zawartości glikogenu i kwasu mlekowego oraz wodochłonności i kruchości mięsa wieprzowego wychładzanego z różną szybkością, w warunkach modelowych;
- określenia zmian udziału białek mięśniowych i białek frakcji wycieku wirówkowego na podstawie elektroforezy jednokierunkowej w żelach poliakrylamidowych z SDS (SDS-PAGE) i metodą Western blot oraz wskazanie zależności między zmianami udziału białek a kształtowaniem cech jakościowych mięsa, jego wodochłonności i kruchości;
- oceny wartości pH, barwy, wodochłonności i kruchości mięsa bydła normalnej jakości (RFN) i z wadą DFD;

- analizy udziału białek ekstraktów pozyskanych z mięsa bydła normalnej jakości (RFN) i z wadą DFD przy wykorzystaniu elektroforezy SDS-PAGE oraz wyznaczenia potencjalnych białek jako wskaźników jakości mięsa;
- analizy techniką wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS i identyfikacji białek ekstraktów pochodzących z mięsa bydła normalnej jakości (RFN) i z wadą DFD celem wskazania potencjalnych białkowych i peptydowych wskaźników jakości mięsa.

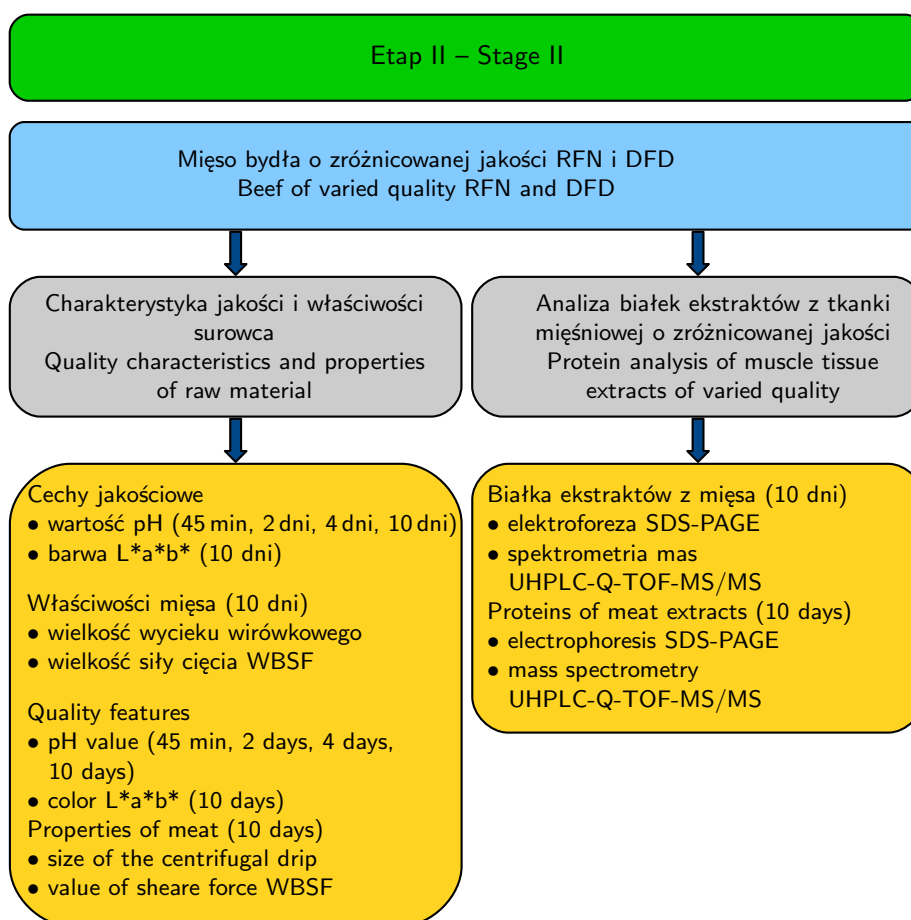
Badania realizowano w dwóch etapach:

- **etap I** – białka mięśniowe jako potencjalne wskaźniki jakości oraz wodochłonności i kruchości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością;
- **etap II** – białka mięśniowe jako potencjalne wskaźniki jakości oraz wodochłonności i kruchości mięsa bydła RFN i z wadą DFD.

Układ realizowanych zadań badawczych oraz zakres przeprowadzonych analiz w zaplanowanych kolejnych etapach badań zaprezentowano na rysunkach 1 i 2.



Rys. 1. Schemat pierwszego etapu badań
Fig. 1. Schematic plan of first stage of experiments



Rys. 2. Schemat drugiego etapu badań

Fig. 2. Schematic plan of second stage of experiments

4. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

4.1. Materiał badany

Etap I. Badania pierwszego etapu doświadczenia przeprowadzono na mięśni najdłuższym klatki piersiowej i lędźwi (LTL) (*m. longissimus thoracis et lumborum*) świń krzyżówek rasy wbp×pbz z knurami rasy pbz, wybranych losowo, pochodzących od jednego dostawcy, utrzymywanych i karmionych w takich samych warunkach. Zwierzęta poddano ubojowi w standardowych warunkach rzeźni. Wszystkie tusze były klasyfikowane w systemie EUROP zgodnie z obowiązującymi przepisami. Mięśność tusz mieściła się w przedziale 51–56,6%, przy średniej masie tuszy 88 kg.

Badania przedstawione w niniejszej pracy – w zakresie doboru szybkości wychładzania, jak również dotyczące kruchości i wodochłonności mięsa wieprzowego – poprzedzone były badaniami wstępnymi. Na ich podstawie wykazano istotność statystyczną wpływu efektu zastosowanej szybkości wychładzania na wodochłonność i kruchość mięsa. Mięśnie pochodzące z pięciu wyselekcjonowanych tusz wieprzowych podzielono na trzy części, rozpoczynając od części piersiowej. Każdą część poddano wychładzaniu: A – w tuszy, B – w woreczku foliowym z zamknięciem strunowym, C – w woreczku foliowym z zamknięciem strunowym obłożonym lodem. Kontrolę zmian temperatury podczas procesu wychładzania monitorowano przez 24 godziny po uboju. Pomiar temperatury prowadzono przez umieszczenie czujników w centrum geometrycznym surowca. Wychładzanie prób B i C przeprowadzono w chłodni przemysłowej w takich samych warunkach jak w przypadku półtuszy wieprzowych próby kontrolnej A. Proces schładzania odbywał się ze zróżnicowaną szybkością: A – 0,12°C/min, B – 0,15°C/min, C – 0,27°C/min. W zakładach mięsnych wykonano pomiary wartości pH (po 45 min i 24 h) oraz przewodności elektrycznej (po 2 h). Ponadto przygotowano i przechowywano na lodzie próbki rozdrobnionych mięśni przeznaczone do oznaczenia zawartości glikogenu i kwasu mlekowego (po 45 min i 2 h). Natomiast próby do analizy białek mięsa pobrane 45 min po uboju zabezpieczono przez bezpośrednie zanurzenie w ciekłym azocie.

Następnego dnia po zakończeniu wychładzania ponownie wykonano pomiar wartości pH, pobrano surowiec i przewieziono go do laboratorium. Wyznaczono zawartość glikogenu i kwasu mlekowego oraz wielkość wycieku wirówkowego. Mięso podzielono na porcje, zapakowano próżniowo i przechowywano w warunkach chłodniczych zgodnie z przyjętymi terminami badań. Po 2 i 6 dniach wyznaczono ubytki masy w czasie przechowywania i po obróbce termicznej oraz wyznaczono wielkość siły i pracy cięcia (rys. 1).

W każdym z analizowanych terminów badań mięso do wykonania analizy porównawczej udziału jego białek rozdrabniano, pakowano w folię aluminiową i zamrażano w temp. -80°C . Białka mięsa rozdzielono za pomocą elektroforezy jednokierunkowej w żelach poliakrylamidowych z SDS (SDS-PAGE) z surowca pobranego po 45 min, 24 h i 6 dniach przechowywania. Natomiast zmiany udziału białek frakcji wycieku wirówkowego pozyskanego z surowca wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością analizowano po 24 h i 6 dniach. Identyfikację wybranych białek – titiny, łańcuchów ciężkich miozyny (MHC), troponiny-T (Tn-T) i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) – zarówno w mięsie, jak i w wycieku wirówkowym wykonano metodą immunologiczną z użyciem techniki Western blot (rys. 1).

Etap II. W drugim etapie badań materiał badany stanowił mięsień najdłuższy klatki piersiowej i lędźwi (LTL) (*m. longissimus thoracis et lumborum*) pozyskany z byczków rasy holsztyno-fryzyjskiej, odmiany czarno-białej, o średniej masie 378 kg (rys. 2). Klasyfikację jakościową mięsa wykonano na linii produkcyjnej zakładów mięsnych na podstawie wyników pomiaru wartości pH po 2 dniach *pm*. Do badań pobrano surowiec pochodzący w sumie z 10 tusz zwierząt rzeźnych, w dwóch grupach po pięć sztuk, różniących się jakością. Do analizy przeznaczono mięso normalnej jakości (RFN) o wartości pH $< 5,9$ i mięso z odchyleniem jakościowym DFD o pH $> 6,1$. Porcje surowca o masie ok. 1,5 kg pakowano próżniowo i przechowywano przez 10 dni w warunkach chłodniczych. W tym terminie wykonano ocenę cech jakościowych, takich jak wartość pH i parametry barwy $L^*a^*b^*$, wodochłonność i kruchość mięsa o zróżnicowanej jakości.

Zasięg występowania odchylenia DFD obserwowany na podstawie wielkości wycieku wirówkowego często wykazuje bardzo duże zróżnicowanie. W przypadku surowego, wychłodzonego mięsa z wadą DFD nie zawsze możliwe jest pozyskanie wycieku wirówkowego, stąd postanowiono zastosować proces ekstrakcji białek. Ekstrakcja pozwoliła na otrzymanie frakcji białek, która była przedmiotem badań w niniejszej pracy. W celu pozyskania frakcji białek sarkoplazmatycznych po 10 dniach przechowywania rozdrobniony surowiec poddano ekstrakcji buforem rigor o małej sile jonowej (Joo i in., 1999). Białka ekstraktów analizowano z zastosowaniem elektroforezy w żelach poliakrylamidowych z SDS (SDS-PAGE) oraz przy wykorzystaniu wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS (rys. 2).

4.2. Metody analityczne

4.2.1. Wprowadzenie

Po upływie założonych okresów przechowywania w warunkach chłodniczych próbki poddano badaniom laboratoryjnym. Przedmiotem badań mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością były: pomiary wartości pH, przewodności elektrycznej, wyznaczenie ilości glikogenu i kwasu mlekowego, ubytków masy w czasie przechowywania i ogrzewania, wielkości wycieku wirówkowego oraz siły

cięcia. Ponadto wykonano analizę elektroforetyczną (SDS-PAGE) białek mięśniowych i białek frakcji wycieku wirówkowego. Wybrane białka zidentyfikowano metodą Western blot.

Natomiast w przypadku mięsa bydła o normalnej jakości RFN i z wadą DFD wykonano pomiary wartości pH, barwy, wielkości wycieku wirówkowego oraz siły cięcia. Białka ekstraktów pozyskane z mięsa bydła o zróżnicowanej jakości rozdzielono elektroforetycznie jak również przeprowadzono analizę i ich identyfikację wykorzystując wysokorozdzielczą tandemową spektrometrię mas sprzężoną z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS.

4.2.2. Charakterystyka jakości surowca

Pomiar wartości pH przeprowadzono za pomocą pH-metru przenośnego typu Handylab 2 wyposażonego w elektrodę zespoloną typu Schott L68880 (PN-ISO 2917, 2001), po 45 min, 24 h, 2 i 6 dniach w mięśni najdłuższym grzbietu świni oraz po 45 min, 2, 4 i 10 dniach w przypadku bydła. Pomiar wartości pH wykonano na wysokości ostatniego kręgu piersiowego lewej półtuszy. W kolejnych terminach badań pomiar wartości pH odbywał się w porcjach mięśni przeznaczonych do analiz.

Pomiar przewodności elektrycznej (PE) przeprowadzono przy użyciu konduktometru LF-Star (Ingenieurbüro Matthäus, Noblitz, Germany) w mięśni najdłuższym grzbietu na wysokości ostatniego kręgu piersiowego, w tym samym miejscu, w którym przeprowadzono pomiar wartości pH. Oznaczenie wykonano po upływie 2 h od uboju (Blicharski i in., 1995).

Stężenie glikogenu i kwasu mlekowego oznaczono metodą enzymatyczną opisaną przez Dalrymple i Hamma (1973) oraz Bergmeyer (1974). Próbki mięśni (45 min, 2 h, 24 h po uboju) po rozdrobnieniu umieszczono w probówkach z 10 ml 0,6 M HClO₄ i natychmiast homogenizowano (Ultra-Turrax, IKA). Do enzymatycznego oznaczenia ilości glikogenu pobrano 0,5 ml homogenatu i poddano go hydrolizie z amyloglukozydazą. Równolegle z wyznaczeniem obecności glikogenu w mięsie oznaczono stężenie kwasu mlekowego. Pozyskany z homogenatu supernatant odwirowywano przez 15 min przy 4000 × g w temp. 4°C (Sigma 3K30). Następnie dodano dinukleotydu nikotynoamidadeninowego (NAD) i buforu z dehydrogenazą mleczanową (LDH). Zawartość glikogenu i kwasu mlekowego określono spektrofotometrycznie, przez pomiar absorpcji przy długości fali $\lambda = 340$ nm (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech). Wyniki wyrażono w mikromolach na gram pobranej tkanki.

Ocena parametrów barwy mięsa metodą odbiciową polegała na wykorzystaniu stosowanego obecnie układu CIE LAB, który umożliwia oznaczenie: jasności barwy (L*), udziału barwy czerwonej (dla wartości dodatnich) lub zielonej (a*), żółtej lub niebieskiej (b*) (Boakye i Mittal, 1996; Hunt i in., 1999; Acton i in., 2000; Houben i in., 2000). Do pomiaru używano spektrofotometru typu Spectro-pen. Przed pomiarem aparat kalibrowano, uwzględniając tzw. wzorzec bieli. Z każdej próbki wykonano bezpośredni pomiar na powierzchni przekroju poprzecznego mięśnia plastrów o grubości 1 cm, w pięciu różnych miejscach (Kłossowska i Olkiewicz, 2000).

Wyznaczanie ubytków masy tkanki mięśniowej w czasie przechowywania. Wycięte przeznaczone do badań mięśnie dzielono na porcje i ważono zarówno przed zabiegiem pakowania, jak i po upływie czasu składowania chłodniczego w wyznaczonych terminach analiz. Po okresie przechowywania i wyciągnięciu mięsa z opakowania oraz osuszeniu ręcznikiem papierowym z różnicy masy próbek przed składowaniem i po rozpakowaniu obliczono ubytki masy.

Wyznaczanie ubytków masy podczas obróbki termicznej mięsa. Plastry mięsa o grubości ok. 25 mm pozbawione otaczającego tłuszczu i tkanki łącznej ważono i pakowano w folię aluminiową. Całość ogrzewano w piecu konwekcyjno-parowym SCC 61E firmy Rational (w powietrzu o temperaturze 160°C, przy 75% udziale pary wodnej) do osiągnięcia w centrum geometrycznym próbki temperatury 72°C. Pomiaru temperatury w plastrze dokonano za pomocą czujnika stanowiącego wyposażenie pieca. Po ogrzaniu plastry natychmiast wyciągano z pieca, a po upływie 30 min ponownie ważono. Ubytki w czasie obróbki termicznej obliczono z różnicy masy prób przed zabiegiem ogrzewania i po nim (Mikołajczak i in., 2019).

Oznaczenie wielkości wycieku wirówkowego – wodochłonności mięsa metodą wirówkową polegało na umieszczeniu naważki 6 g rozdrobnionego mięsa w probówkach wirówkowych. Następnie próbki wirowano na wirówce typu Sigma 3K30, w temperaturze 2°C, przez 20 min przy obrotach $11\ 000 \times g$ (Honikel, 1987). Po odwirowaniu supernatant zlewano, probówkę odwracano do góry dnem i po upływie 30 min ponownie ważono. Wielkość wycieku wyznaczono z różnicy mas mięsa przed wirowaniem i po jego zakończeniu, a ilość wyrażono w procentach. Uzyskany wyciek wirówkowy zabezpieczano w probówkach typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -80°C . Otrzymany w powyższy sposób supernatant stanowił frakcję białek wycieku wirówkowego, którą poddano dalszym badaniom. Białka wycieku wirówkowego stanowiły przedmiot analizy proteomicznej, wykorzystującej elektroforezę w żelach poliakrylamidowych z SDS i metodę Western blot.

Wyznaczenie wielkości siły cięcia – pomiar kruchości mięsa wykonano na teksturometrze TA.XT Plus (Stable Micro Systems, UK), przy użyciu przystawki Warnera-Bratzlera (Mikołajczak i in., 2019). Próby do badań instrumentalnych poddano obróbce termicznej zgodnie z opisem podanym w punkcie dotyczącym wyznaczenia ubytków masy w czasie ogrzewania. Po schłodzeniu plastrów do temperatury pokojowej (ok. 30 min) przygotowano z nich 6–8 prostopadłościanów o przekroju 10×10 mm i długości nie mniejszej niż 30 mm, zwracając uwagę na równoległy układ włókien mięśniowych. Próby poddano działaniu siły tnącej, tak aby przebieg włókien był prostopadły do płaszczyzny cięcia. Szczegółowe parametry pracy teksturometru w trakcie testu cięcia przedstawiały się następująco: zakres głowicy do 500 N, prędkość przesuwu noża przed testem cięcia 60 mm/min, prędkość przesuwu noża w czasie testu cięcia 100 mm/min, prędkość przesuwu noża po teście cięcia 600 mm/min, odległość noża od podstawki 30 mm, przy sile docelowej (trigger force) 0,04903 N. Siłę cięcia wyrażono w N/cm^2 , podczas tego samego pomiaru próbki wyznaczono również pracę cięcia ($\text{N} \times \text{mm}$).

4.2.3. Analiza elektroforetyczna białek mięśniowych

Elektroforeza jednokierunkowa w żelu poliakrylamidowym z SDS (SDS-PAGE)

Analizę elektroforetyczną białek tkanki mięśniowej przeprowadzono w 15% żelach poliakrylamidowych z SDS i dodatkiem 8M mocznika (Pospiech i in., 2003c). Cechą szczególną tych żeli była możliwość obserwacji białek w bardzo szerokim zakresie masy cząsteczkowej – od ok. 10 kDa do ponad 3000 kDa. W przypadku wieprzowiny wykonano analizę zmian udziału białek mięsa i frakcji wycieku wirówkowego. Miała ona na celu szczegółową charakterystykę ich udziału procentowego w zależności od zróżnicowanej szybkości procesu wychładzania i czasu przechowywania. Analiza elektroforetyczna nie została poprzedzona frakcjonowaniem białek ze względu na fakt, że przedmiotem badań metodą SDS-PAGE, jak i Western blot były również białka cytoszkieletowe. Wysokocząsteczkowe białka cytoszkieletowe, w tym przede wszystkim natywna titina, w wyniku procesu ekstrakcji często są bezpowrotnie tracone. Pominięcie etapu ekstrakcji jest procedurą przyjętą i znaną. Zastosowanie tego typu rozwiązania pozwalało przede wszystkim na skrócenie czasu trwania przygotowania prób do badań. Przemiany degradacyjne białek można było ocenić, porównując rozdziały białek mięsa i wycieku wirówkowego. Zmiany białek mięsa spowodowane proteolizą i uwalnianiem ze struktur włókna mięśniowego znajdowały wyraźne odbicie we frakcji wycieku. Przy ocenie białek mięsa bydła normalnej jakości i z wadą DFD, ze względu na bardzo ograniczoną ilość pozyskanego wycieku wirówkowego, zastosowano proces ekstrakcji buforem o niskiej sile jonowej. Rozdział wykonano w układzie pionowym na aparacie SE 250 (Hoefer Scientific Instruments). Źródłem napięcia był zasilacz prądu stałego typu PS – 500 XT, umożliwiający regulację napięcia i natężenia prądu. Obraz żelu skanowano, wykorzystując program Image Master® VCR firmy Pharmacia. Pozwolił on na analizę komputerową udziału poszczególnych pasm białek tkanki mięśniowej i frakcji wycieku wirówkowego.

Przygotowanie prób

Do próbówki naważono 0,002 g tkanki mięśniowej lub odmierzone 10 µl wycieku wirówkowego bądź ekstraktu (mięso DFD bydła) i dodano odpowiednio 98 µl lub 90 µl buforu A (8M mocznik, 2M tiomocznik, 0,05 mM Tris, 75 mM DTT (ditiotreititol), 3% SDS, 0,05% błękit bromofenolowy). Próby dokładnie wymieszano za pomocą Vortexu i ogrzewano przez 3 min w temperaturze 98°C.

Przygotowanie żeli

Analizę elektroforetyczną białek przeprowadzono w systemie nieciągłym, w którym warstwę górną stanowił żel zagęszczający (10% akrylamid, 0,125 M Tris, dH₂O, 50% roztwór gliceryny, 10% SDS, roztwór błękitu bromofenolowego, 10% nadsiarczan amonu, TEMED), a dolną 15% żel rozdziałający (8 M mocznik, 30% akrylamid, 75% roztwór gliceryny, 3M Tris (pH 8,8), 10% SDS, 10% nadsiarczan amonu, TEMED) (Pospiech i in., 2003c). Po umieszczeniu grzebieni, tworzących miejsca nanoszenia prób, żel pozostawiono na 30 min w celu pełnej polimeryzacji.

Rozdział elektroforetyczny

Po polimeryzacji płytki z żelami i zasobniki elektrodowe napełniono buforem do elektroforezy (50 mM Tris, 0,384 M glicyna, 0,1 M SDS, 5 mM β -merkaptoetanol). Po wyjęciu grzebieni z kaset wolne przestrzenie uzupełniono buforem. W dalszej kolejności za pomocą mikrostrzykawki nakładano próby w ilości 10-12 μ l, co odpowiadało ilości 12 μ g białka na ścieżkę. Zawartość białka wyznaczono przy użyciu 2-D Quant Kit (GE Healthcare Bio-Sciences, Marlborough, MA, USA).

Następnie aparat podłączono do zasilacza i ustawiono natężenie prądu na 40 mA dla dwóch płytek. Wartość napięcia początkowego wynosiła 115 V, końcowego 250 V. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez około 1,5 h, do momentu aż czoło rozdziału znajdowało się 2–3 mm od końca płytki. Po zakończeniu rozdziału i zlaniu buforu otwierano kasety z żelami, usuwano żele zagęszczające, a żele rozdzielające umieszczono w pojemnikach w celu utrwalenia, barwienia oraz odbarwienia tła.

Barwienie i odbarwienie

Barwienie odbywało się w roztworze zawierającym 0,5 g błękitu Coomassie brilliant blue R-250, 500 ml metanolu, 400 ml dH_2O i 100 ml kwasu octowego. Umożliwiło ono obserwację rozdzielonych w żelu pasm białek. Żel całkowicie zanurzony w roztworze barwiącym inkubowano na kołysce laboratoryjnej przez 30 min. Po tym czasie usunięto roztwór barwiący, żel przepłukano wodą destylowaną i zalano roztworem odbarwiającym (100 ml metanol, 75 ml lodowaty kwas octowy, 825 ml dH_2O). Żel inkubowano na kołysce laboratoryjnej przez noc. Po odbarwieniu żele archiwizowano za pomocą zestawu Image Master[®] VDS wyposażonego w kamerę wideo (Pharmacia Biotech, Vienna, Austria). Analizę udziału procentowego poszczególnych białek oparto na założeniu, że powierzchnia wszystkich rozdzielonych na żelu pasm stanowi 100%. Półilościową ocenę wybranych pików przeprowadzono w oparciu o masę cząsteczkową standardu PageRuler Plus Protein Ladder w zakresie mas cząsteczkowych 10–250 kDa (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

4.2.4. Western blot

Identyfikację wybranych białek mięśniowych i frakcji wycieku wirówkowego wykonano przy użyciu metody Western blot, z zastosowaniem transferu półsuchego według procedury opisanej przez Fritza i Greasera (1991) (Greaser i in., 2002). Do analizy wybrano następujące białka: titinę, miozynę, troponinę-T (Tn-T) oraz dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Po przeprowadzonej jednokierunkowej separacji elektroforetycznej w 15% żelu poliakrylamidowym z SDS i 8 M mocznikiem w warunkach redukujących białka przenoszono na membranę Immobilon – P (I-P) o porowatości 0,45 μ m (Millipore). Membranę przygotowano przez zanurzenie kolejno w metanolu, wodzie destylowanej i w buforze do transferu (TB) (25 mM Tris – HCl, 192 mM glicyna, 20% metanol, pH 7,5). Elektrotransfer prowadzono w aparacie TE 77 PWR (Amersham Biosciences). Źródło prądu stanowił zasilacz EPS 601. Natężenie prądu i czas transferu zależały od masy cząsteczkowej przenoszonego białka. Transfer prowadzony był w temperaturze 4°C w następujących warunkach: titina (150 mA, 3 h), miozyna (135 mA, 2 h),

troponina-T i GAPDH (95 mA, 1 h). Po transferze membranę przepłukano wodą destylowaną, umieszczono w roztworze 2% BSA-TBST (200 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05% Tween, pH 7,5) i inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej. Następnie membranę zanurzano w roztworze 0,2% BSA-TBST, w którym rozpuszczono wybrane przeciwciała pierwszorzędowe.

Do immunoblotingu wykorzystano następujące monoklonalne przeciwciała pierwszorzędowe:

- titiny 9D10 (mouse monoclonal anti-titin 9D10, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), University of Iowa, USA),
- miozyny MF20 (MF20 monoclonal anti-myosin heavy chain, sarcomere (MHC), Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) University of Iowa, USA),
- troponiny-T (monoclonal anti-troponin-T clone JLT-12, T6277, Sigma),
- dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (monoclonal anti-GAPDH Clone GAPDH-71.1, G8795, Sigma).

Po inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędowym membranę dwukrotnie płukano w roztworze TBST i na 1,5 h umieszczono w roztworze 0,2% BSA-TBST z immunoglobuliną IgG znakowaną fosfatazą alkaliczną (AP) jako przeciwciałem drugorzędowym. Następnie membranę płukano kolejno dwa razy (po 5 min) w roztworze TBS i SB.

W celu uwidocznienia szukanego białka przeprowadzono reakcję barwną za pomocą odczynników barwiących NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium 50 mg/ml w 70% dimetyloformamide; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate 50 mg/ml w 100% dimetyloformamide rozpuszczonych w buforze SB (100 mM Tris – HCl, pH 9,0; 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂), zgodnie z instrukcją firmy Promega. Zakończenie reakcji odbywało się przez płukanie membrany wodą destylowaną, a następnie jej wysuszenie.

4.2.5. Tandemowa spektrometria mas sprzężona z chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS

Trawienie białek

Przygotowane ekstrakty białek pochodzące z mięsa o zróżnicowanej jakości w ilości 600 µL umieszczono w probówkach typu Eppendorf i poddano suszeniu w wyparce próżniowej miVac Duo Concentrator (Genevac Ltd, Ipswich, UK). Następnie całość próbki uwodniono w 250 µL 0,1 mol/L wodorowęglanu amonu (1 h). Białka zredukowano 0,2 mol/L ditiotreiolem (DTT) w temp. 56°C przez 1 h oraz alkilowano jodoacetamidem (IAA) w temperaturze pokojowej w ciemni przez 30 min. Po tym czasie pozostały z reakcji jodoacetamid blokowano przez dodanie 0,2 mol/L DTT i próbki inkubowano w temp. 21°C przez 30 min. Następnie były one trawione w roztworze wodorowęglanu amonu (pH 8,3), zawierającym 0,083 µg/µL trypsyny, w temp. 37°C przez noc (18 h). W kolejnym etapie roztwór po trawieniu oczyszczano przez ekstrakcję w układzie odwróconych faz na kolumnach Sep-Pak C18 Plus (Waters, Milford, MA, USA), wysuszono i przechowywano w zamrażarce do momentu analiz.

Analiza techniką spektrometrii mas

Analizę UHPLC-Q-TOF-MS/MS prowadzono przy wykorzystaniu ultrasprawnego chromatografu cieczowego Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) 1290 Infinity sprzężonego ze spektrometrem mas wysokich rozdzielczości Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS. Źródłem jonów było elektrorozpylanie (ESI) Agilent Technologies Jet Stream. Przed analizą UHPLC-Q-TOF-MS/MS strawiony i wysuszony ekstrakt rozpuszczono w 0,1% roztworze kwasu mrówkowego w wodzie (milli-Q), który stanowił jednocześnie fazę ruchomą A. Natomiast 0,1% kwas mrówkowy w 98% acetonitrylu był fazą ruchomą B. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD ($2,1 \times 150$ mm, średnica ziarna 1,8 μm , nr kat. 959759-902). Objętość próby nanoszonej na kolumnę wynosiła 10 μL . Etapy gradientu (3–97%) fazy ruchomej B zastosowano w następujący sposób: 0–1 min, 3% B; 1–40 min, 5% B; 40–45 min, 40% B; 45–55 min, 90% B i 5 min kondycjonowanie kolumny przy 3% B. Zastosowano następujące parametry źródła: temperatura gazu (N_2) będącego źródłem jonów 250°C, jego przepływ 14 L/min, temperatura gazu osłonowego (N_2) 250°C, jego przepływ 11 L/min, ciśnienie nebulizatora 35 psi. Napięcia zostały ustawione na 3500 V (kapilara), 1000 V (dysza) i 400 V (fragmentor). Jony dodatnie uzyskano w zakresie 100–1700 m/z dla skanów MS i 40–1700 m/z dla automatycznych skanów MS/MS, przy szybkości skanowania wynoszącej odpowiednio 5 skanów/s dla MS i 3 skany/s dla MS/MS. Włączono wewnętrzną korektę masy, stosując dwie masy odniesienia przy 121,0509 i 922,0098 m/z. Kontrolę urządzenia i zbieranie danych przeprowadzono za pomocą oprogramowania Agilent MassHunter Workstation.

Identyfikacja białek i peptydów

W celu identyfikacji białek i peptydów przeprowadzono wyszukiwanie w bazie danych UniProtKB/Swiss-Prot, stosując oprogramowanie Spectrum Mill MS Proteomics Workbench, przy tolerancji masy prekursora 20 ppm i tolerancji masy produktu 50 ppm. Zastosowano następujące parametry wyszukiwania: enzym – trypsyna, taksonomia bovine, *Bos taurus*, ustawiono karbamidometylację jako stałą modyfikację, utlenianie metioniny jako modyfikację zmienną przy dozwolonych maksymalnie dwóch pominiętych miejscach rozszczepienia. Dla wyszukiwania w bazie próg wyniku fałszywego (ang. false discovery rate, FDR) wynosił max 1,2%.

4.3. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.1 (TIBCO Software Inc., 2017). Zastosowano jednoczynnikową i dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA. Do oceny istotności różnic wykorzystano test HSD Tukeya ($p \leq 0,05$). Wyniki prezentowane w pracy są średnią arytmetyczną z co najmniej trzech niezależnych powtórzeń pomiarów wykonanych na pięciu próbkach biologicznych (np. w przypadku barwy – pięć pomiarów, kruchości – siedem pomiarów). Określenie siły związku między badanymi cechami oszaco-

wano na podstawie korelacji liniowej, testem Pearsona ($p \leq 0,05$). Uzyskane wyniki badań przedstawione w tabelach uwzględniają wartości średnich arytmetycznych i odchylenia standardowego (SD) dla poszczególnych cech z podaniem liczebności w grupach. Ponadto zastosowano wielowymiarowe analizy danych (MVA): analizę składowych głównych PCA i PCA-X (pincipal component analysis-X) oraz wykorzystano modele cząstkowych najmniejszych kwadratów PLS i dyskryminacyjną analizę ortogonalną cząstkowych najmniejszych kwadratów OPLS-DA (orthogonal partial least-squares discriminant analysis). W przypadku wyników dotyczących białek i peptydów ekstraktów z mięsa bydła o zróżnicowanej jakości – analizowanych przy użyciu wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS – ze względu na ograniczone możliwości analityczne programu Statistica 13.1 konieczne było wykorzystanie programu SIMCA-P wersja 13.1 (Umetrics, MKS Instruments Inc.).

5. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

5.1. Białka mięśniowe jako potencjalne wskaźniki jakości, wodochłonności i kruchości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością

5.1.1. Wpływ szybkości procesu wychładzania i czasu przechowywania na jakość mięsa wieprzowego

Konwersja mięśni w mięso następuje podczas glikolizy, która jest najważniejszym procesem biochemicznym zachodzącym bezpośrednio po uboju i jednocześnie kluczowym czynnikiem kształtującym jakość wieprzowiny. Szybkie obniżanie temperatury w procesie wychładzania zmniejsza szybkość reakcji chemicznych i biochemicznych, tym samym zmniejszając szybkość spadku pH (Lawrie, 1998; Meisinger, 1999). Offer (1991) wykazał, że wpływ warunków chłodzenia na występowanie wady PSE jest w dużym stopniu zależny od wskaźnika spadku pH. W celu ograniczenia występowania mięsa wodnistego zasugerowano, że schładzanie wieprzowiny do temperatury mięśni poniżej 10°C powinno trwać 12 godzin, a następnie temperaturę 2–4°C należy osiągnąć w terminie 24 godzin (Meisinger, 1999). Metoda ta wydaje się jednak zupełnie nieskuteczna, gdy pH mięsa spada gwałtownie (tj. poniżej 5,8) już w 45 min po uboju, co jest typowym zjawiskiem przy wodnistości.

W czasie poubojowego dojrzewania mięsa beztlenowa glikoliza skutkuje obniżeniem wartości pH. W niniejszej pracy, w celu weryfikacji hipotezy badawczej zakładającej, że na tempo i zakres procesu glikolizy istotnie oddziałuje zastosowana szybkość wychładzania tusz, przeprowadzono ocenę statystyczną otrzymanych wyników przewodności elektrycznej, wartości pH mięśni oraz ilości glikogenu i kwasu mlekowego. Obejmowała ona jednoczynnikową i dwuczynnikową analizę wariancji, a wyniki zestawiono w tabeli 1 i 2.

Przewodność elektryczna (PE) jest jednym z wyróżników stosowanych przy ocenie jakości mięsa wieprzowego. Wraz z pomiarem pH, oznaczeniem glikogenu i kwasu mlekowego jako wskaźnikami przemian glikolitycznych uzupełnia informacje dotyczące cech surowca. Przewodność elektryczna po 2 godzinach od uboju wynosiła 2,9 mS/cm (tab. 1). W prezentowanej pracy nie obserwowano wartości większych od 8,3 mS/cm, wskazujących na występowanie wady jakościowej PSE (Czyżak-Runowska i in., 2010).

Wartość pH jest podstawowym obiektywnym pomiarem, wykonywanym bezpośrednio po uboju i w czasie chłodniczego przechowywania tusz. Odzwierciedla zachodzący w tkance mięśniowej proces glikolizy (Lee i in., 2002). Na jej podstawie określone jest również tempo przemian poubojowych, a w konsekwencji ja-

kość pozyskanego surowca mięsnego. Diagnozowanie odchyłeń jakościowych mięsa wieprzowego związane jest z wykonaniem kolejnych pomiarów po 45 min i 24 h (Pospiech, 2000; Pospiech i in., 2011).

Przyżyciowe pH przyjmuje wartości w przedziale 7,0–7,2 i obniża się wraz z postępującym procesem glikolizy *pm* podczas składowania chłodniczego mięsa (van der Wal i in., 1995; Sieczkowska i in., 2013; Iwańska i in., 2016, 2017; Grześ i in., 2017). Na podstawie wartości pH uzyskanych po 45 min (pH_1) i 24 h (pH_2) oraz przewodności elektrycznej stwierdzono, że badane mięso charakteryzowało się normalną jakością (RFN). Powyższe wskazuje na prawidłowy przebieg procesu glikolizy w mięśniach wychładzanych ze zróżnicowaną szybkością pozyskanych w standardowych warunkach rzeźni.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że szybkość procesu wychładzania istotnie wpłynęła na pH mięsa po 2 dniach przechowywania (tab. 1). W tym terminie średnie pH prób A wychładzanych najwolniej (5,41) było istotnie niższe w porównaniu z wartością pH prób B (0,15°C/min) wyznaczoną na poziomie 5,54 (tab. 1). Wartość pH mięsa w czasie dalszego przechowywania chłodniczego obniżała się i po 6 dniach mieściła się w przedziale 5,46–5,58. Najniższe zakwaszenie w każdym terminie analiz obserwowano w mięsie B (0,15°C/min) wychładzanym z szybkością pośrednią. Najintensywniejsze obniżenie pH średnio o prawie 1 jednostkę odnotowano podczas pierwszych 24 godzin po uboju. Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji wskazano istotny wpływ czasu przechowywania chłodniczego na pH badanych mięśni (tab. 2).

Prezentowane w literaturze dane dotyczące wpływu szybkości wychładzania na wartość pH mięśni są często rozbieżne. W okresie pierwszych 24 godzin *pm* oczekiwanym rezultatem mogła być wolniejsza glikoliza, której wskaźnikiem jest wyższa wartość pH w mięśniach szybciej wychładzanych (van der Wal i in., 1995; Savell i in., 2005; Zybert i in., 2013). Ponadto przez spowolnienie tempa spadku wartości pH obserwowano zmniejszenie stopnia denaturacji mioglobiny i innych białek oraz poprawę barwy mięsa i jego wodochłonności (Huff-Lonergan i in., 2005). Wpływ szybkości procesu wychładzania na pH mięsa częściej obserwowano do kilku godzin *pm*. W badaniach przeprowadzonych przez Li i in. (2012b) wykazano, że bardzo szybko wychładzane mięśnie LL (w temp. –21°C) po 5 i 10 h charakteryzowały istotnie wyższe wartości pH. Podobnie Milligan i in. (1998) oraz Zybert i in. (2008), obserwowali wpływ szybkiego wychładzania na wartość pH głównie pomiędzy 3 i 4 h *pm*.

Wyniki wielu badań wskazują, że chłodzenie szokowe tusz wieprzowych spowodowało wolniejszy spadek kwasowości tkanek przez zmniejszenie tempa procesów metabolicznych, ale tylko we wczesnym etapie chłodzenia, tj. do 2–4 h po uboju (Juárez i in., 2009; Rees i in., 2003b; Rybarczyk i in., 2015; Zybert i in., 2008). W pracy Kerth i in. (2001) przedstawiono, że chłodzenie z nadmuchem odgrywa istotną rolę w spowalnianiu spadku pH do 4 h *pm* i zmniejszeniu o ponad 21% występowania defektu PSE (na podstawie subiektywnej skali wizualnej) w mięśniach: najdłuższym grzbietu i szynki świń obarczonych genem RYR1. Powyższego efektu nie obserwowano w mięsie świń wolnych od tego genu. Według Mohrhauser i in. (2014) zastosowanie opóźnionego, wolniejszego chłodzenia spowodowało szybszy spadek pH, co skutkowało jego niższymi wartościami po 6, 12 i 24 h. Wolniejsze

Tabela 1. Cechy jakościowe mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością
Table 1. Quality features of meat cooled at various rates

Badana cecha Tested feature	Pomiary wykonane w tuszy Measurements taken in the carcass				Ogółem Total N = 15	Wartość p (szybkość wychładzania) p value
	A (0,12°C/min) N = 5	B (0,15°C/min) N = 5	C (0,27°C/min) N = 5			
	Wariant wychładzania Cooling rate					
Przewodność elektryczna Electrical conductivity 2 h (mS/cm) pH 45 min Stężenie glikogenu Glycogen content 45 min (µmol/g) Stężenie kw. mlekowego Lactic acid content 45 min (µmol/g)						
		2,90 ±0,67	6,56 ±0,13	33,73 ±6,92	47,70 ±20,10	
Badana cecha Tested feature						
	Wariant wychładzania Cooling rate					
pH 24 h pH 2 dni pH 6 dni Stężenie glikogenu Glycogen content (µmol/g) 24 h Stężenie kw. mlekowego Lactic acid content (µmol/g) 24 h	A (0,12°C/min) N = 5	B (0,15°C/min) N = 5	C (0,27°C/min) N = 5			
	5,57 ±0,07	5,69 ±0,10	5,55 ±0,03	5,57 ±0,07	5,57 ±0,07	0,73
	5,41 ^b ±0,05	5,54 ^a ±0,08	5,52 ^{ab} ±0,07	5,49 ±0,08	5,49 ±0,08	0,02
	5,46 ±0,08	5, ±0,07	5,54 ±0,09	5,53 ±0,09	5,53 ±0,09	0,10
	28,02 ^a ±5,05	17,42 ^b ±1,82	22,20 ^{ab} ±7,48	22,54 ±6,66	22,54 ±6,66	0,03
	12,67 ±3,99	12,88 ±2,70	16,58 ±4,40	14,04 ±3,95	14,04 ±3,95	0,22
	63,12 ±21,83	73,56 ±15,61	70,81 ±19,63	69,16 ±18,35	69,16 ±18,35	0,68
	106,79 ±7,91	106,67 ±2,82	108,65 ±7,15	107,37 ±5,97	107,37 ±5,97	0,93

^{a,b}Wartości średnie oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) względem szybkości wychładzania.

^{a,b}Average values in rows marked with different indexes differ statistically substantially ($p \leq 0,05$) in relation to the cooling rate.

Tabela 2. Wpływ szybkości wychładzania (W), czasu przechowywania (T) oraz ich interakcji na wartość pH mięsa oraz stężenie glikogenu i kwasu mlekowego

Table 2. Influence of the cooling rate (W), storage time (T) and their interaction on the pH value of meat and the content of glycogen and lactic acid

Badana cecha Tested feature	Szybkość wychładzania Cooling rate W	Czas przechowywania Storage time T	Interakcja Interaction W × T
pH	NS	*	NS
Stężenie glikogenu Glycogen content ($\mu\text{mol/g}$)	NS	*	NS
Stężenie kw. mlekowego Lactic acid content ($\mu\text{mol/g}$)	NS	*	NS

* $p \leq 0,001$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

obniżanie pH w mięsie pochodzącym z tusz wychładzanych szokowo w porównaniu z wychładzanym konwencjonalnie obserwowali także Josell i in. (2003).

Kylä-Puhju i in. (2005) oraz Sionek i Przybylski (2015) zwrócili uwagę na spowolnienie zakwaszenia mięsa i jego wyższą końcową wartość pH pod wpływem obniżenia zarówno temperatury, jak i aktywności enzymów. Efektywną redukcję tempa spadku wartości pH można uzyskać przez połączenie przedubojowego chłodzenia zwierząt przez zraszanie z szybkim wychładzaniem (Long i Tarrant, 1990).

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zgodne z danymi literaturowymi, wskazującymi na brak wpływu szybkości procesu wychładzania na pH po 24 h (Hambrecht i in., 2004; Janiszewski i in., 2018). Według badań niektórych autorów (Meade i Miller, 1990) tempo zmian wartości może zależeć również od rodzaju analizowanego mięśnia. Szybkie wychładzanie przyczyniło się do redukcji spadku wartości pH w mięśniem semimembranosus (SM) w porównaniu do longissimus lumborum (LL). Podobne relacje obserwował Hambrecht i in. (2004), którzy stwierdzili, że szybkie chłodzenie nie wpłynęło ($p > 0,05$) na tempo obniżenia pH w mięśniem LL, zmniejszyło jednak spadek pH w SM ($p = 0,061$). Zauważyli oni także, że szybkie chłodzenie – w przeciwieństwie do konwencjonalnego – spowodowało obniżenie ($p \leq 0,05$) przewodności elektrycznej w LL niezależnie od stresu przed ubojem. Jednak szybkie wychładzanie nie zrekompensowało szkodliwego wpływu stresu na utratę soku mięśniowego, wodochłonność oraz barwę mięsa i według tych autorów nie jest odpowiednią metodą rozwiązywania problemów z jakością wieprzowiny spowodowanych niewłaściwym obchodzeniem się ze zwierzętami przed ubojem. Natomiast Tomović i in. (2013), podobnie jak Janiszewski i in. (2018), nie odnotowali różnic w pH mięśnia SM po 30 min, 8 h i 24 h, niezależnie od zastosowanej metody wychładzania.

Tempo procesu glikolizy oceniono również na podstawie ilości glikogenu i kwasu mlekowego. Stężenie glikogenu w mięśniem wychładzanych ze zróżnicowaną szybkością mieściło się w zakresie od 33,73 $\mu\text{mol/g}$ po 45 min do 12,67 $\mu\text{mol/g}$ po 24 h przechowywania (tab. 1). Podczas składowania mięsa, niezależnie od zastosowanej szybkości wychładzania, odnotowano obniżenie jego ilości. Po 2 h stężenie glikogenu w próbach A (0,12°C/min) wychładzanych najwolniej wynosiło

28,02 $\mu\text{mol/g}$ i była istotnie wyższa w porównaniu z próbkami B (17,42 $\mu\text{mol/g}$). Próby C (0,27°C/min) wychładzane najszybciej charakteryzowały wartości pośrednie na poziomie 22,20 $\mu\text{mol/g}$ (tab. 1). Po 24 h odnotowano wolniejszy przebieg rozpadu glikogenu w mięśniach C wychładzanych najszybciej (16,58 $\mu\text{mol/g}$). W terminie tym próby A i B wyróżniało niższe stężenie glikogenu w porównaniu do prób C, odpowiednio o 3,91 $\mu\text{mol/g}$ i 3,70 $\mu\text{mol/g}$. Pomiędzy próbkami A i B nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w badanym wyróżniku. Powyższe potwierdza spowolnienie glikolizy wywołane szybszym obniżeniem temperatury wychładzania, które obserwowali także Puolanne i in. (2006).

Obniżenie ilości glikogenu wraz z wydłużeniem czasu przechowywania i oznaczona wartość pH potwierdziły prawidłowy przebieg procesu glikolizy zachodzący podczas dojrzewania mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością. Podobne korelacje między ilością glikogenu lub potencjału glikolitycznego a wartością pH końcowego stwierdzane były również przez innych autorów, np. van Laack (2001), Henckela i in. (2002) oraz Przybylskiego (2002). Zdolność do glikolizy *pm* jest często wykorzystywana do wyjaśniania lub przewidywania pH końcowego (pHu). Zwraca się jednak uwagę, że inne czynniki niż tylko stężenie glikogenu mogą stanowić przyczynę zmian szybkości glikolizy i zakresu spadku pH *pm*. W populacji pozbawionej allelu AMPK γ 3 200Q i posiadającej szeroką zmienność potencjału glikolitycznego i glikogenu resztkowego ich wielkości były słabo związane z pHu i jakością wieprzowiny. Zatem wysoki potencjał glikolityczny nie wydawał się mieć bezpośredniego wpływu na stopień obniżenia pH *pm*. Prawdopodobnie złożone właściwości metaboliczne mięśni odgrywają bardziej istotną rolę w określaniu końcowej wartości pH niż samo stężenie glikogenu i glikoliza *pm* (Scheffler i in., 2013).

Warto zwrócić uwagę na fakt, że stężenie glikogenu w mięśniach przed ubojem wskazywane jest jako główny czynnik ograniczający zasięg glikogenolizy *pm* i przy jego niewielkiej obecności może prowadzić do powstania wady DFD.

Skutkiem rozpadu glikogenu w warunkach beztlenowych jest powstanie kwasu mlekowego i obserwowane obniżenie wartości pH (Zybert i in., 2013; Ferguson i Gerrard, 2014). W badaniach własnych odnotowano takie samo zjawisko (tab. 1). Stężenie kwasu mlekowego w mięsie wychładzanym ze zróżnicowaną szybkością mieściło się w zakresie od 47,70 $\mu\text{mol/g}$ po 45 min do 108,65 $\mu\text{mol/g}$ po 24 h przechowywania. Po 2 h średnie stężenie kwasu mlekowego wynosiło 69,16 $\mu\text{mol/g}$ i wzrastało o 19,46 $\mu\text{mol/g}$ w porównaniu do ilości oznaczonej po 45 min. Po 24 h nieco większą zawartością kwasu mlekowego wyróżniały się próbki C wychładzane najszybciej. W żadnym z analizowanych terminów badań nie obserwowano wpływu zastosowanej szybkości wychładzania na ilość kwasu mlekowego w mięsie.

Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono wysoko istotny ($p \leq 0,001$) wpływ czasu przechowywania zarówno na stężenie glikogenu jak również kwasu mlekowego (tab. 2). Wyznaczono istotną korelację pomiędzy wartością pH a stężeniem glikogenu oraz kwasu mlekowego analizowanymi łącznie w terminie 45 min i 24 h (odpowiednio $r = 0,88$ i $r = -0,94$; $p \leq 0,05$) (tab. 3). Dodatkowo po 24 h obserwowano istotną ujemną korelację $r = -0,56$ ($p \leq 0,05$) pomiędzy ilością kwasu mlekowego a wartością pH (tab. 3). Niekiedy zależności te mogą być wyższe. Scheffler i in. (2013), wskazali na liniową korelację między ilością kwasu mlekowego i glikogenu po 1 h przechowywania a obniżeniem wartości pH mięsa

Tabela 3. Współczynniki korelacji pomiędzy wartością pH a ilością glikogenu i kwasu mlekowego
Table 3. Correlation coefficients between the pH value and the content of glycogen and lactic acid

Badana cecha Tested feature	Wartość pH pH value			
	45 min i 24 h 45 min and 24 h	24 h	2 dni 2 days	6 dni 6 days
Stężenie glikogenu 45 min i 24 h Glycogen content 45 min and 24 h ($\mu\text{mol/g}$)	0,88*	0,04 ^{NS}	-0,32 ^{NS}	-0,32 ^{NS}
Stężenie glikogenu 24 h Glycogen content 24 h ($\mu\text{mol/g}$)	-	-0,58*	-0,04 ^{NS}	-0,49 ^{NS}
Stężenie kw. mlekowego 45 min i 24 h Lactic acid 45 min and 24 h ($\mu\text{mol/g}$)	-0,94*	-0,58*	-0,08 ^{NS}	-0,28 ^{NS}
Stężenie kwasu mlekowego 24 h Lactic acid content 24 h ($\mu\text{mol/g}$)	-	-0,56*	-0,49 ^{NS}	-0,64*

* $p \leq 0,05$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

(odpowiednio $r = -0,88$ i $r = 0,77$). Natomiast po upływie 24 h powyższe zależności były niewielkie i wynosiły $r = -0,24$ i $r = -0,31$ ($p \leq 0,05$) (Scheffler i in., 2013).

Tempo i zakres poubojowej glikolizy odgrywają kluczową rolę w pozyskaniu surowca o optymalnej jakości. Jak wskazują dane literaturowe, zróżnicowanie poziomu obecnego w mięśniach glikogenu i kwasu mlekowego można wiązać z występowaniem typów włókien mięśniowych (Ryu i in., 2005; Choe i in., 2008). Badania ostatniego z wymienionych zespołów badaczy wykazały, że mięśnie o mniejszej ilości glikogenu i kwasu mlekowego we wczesnym okresie *pm* charakteryzowały się znacznie większym udziałem włókien typu I i mniejszą ilością włókien typu IIB w porównaniu z mięśniami o wysokiej ilości glikogenu i kwasu mlekowego. Większe stężenie glikogenu i kwasu mlekowego wiązało się z mniejszą rozpuszczalnością zarówno białek sarkoplazmatycznych jak również miofibrylarnych (Choe i in., 2008).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zastosowanie wychładzania ze zróżnicowaną szybkością wpłynęło istotnie na wartość pH po 2 dniach i stężenie glikogenu po 2 h. Ponadto wykazano, że czas przechowywania wysoko istotnie ($p \leq 0,001$) oddziaływał na zmiany wartości pH, stężenie glikogenu i kwasu mlekowego.

5.1.2. Wpływ szybkości procesu wychładzania i czasu przechowywania na ubytki masy i wielkość wycieku wirówkowego z mięsa

Zmiany masy podczas transportu i przechowywania, utrata soku mięśniowego podczas rozmrażania, ubytki masy mięsa i jego kurczenie się podczas obróbki termicznej oraz soczystość i delikatność mięsa związane są z obecnością wody (Lawrie,

1998). Wodochłonność jest determinowana przez mechanizmy strukturalne i biochemiczne, które w konsekwencji kształtują jakość i właściwości mięsa (Offer, 1991; Bertram i in., 2003). Zdolność wiązania wody przez mięso jest dobrze opisana w literaturze (Lawrie, 1998; Hughes i in., 2014). Zależy ona od wielu innych czynników, spośród których ważną rolę odgrywają cechy genetyczne, warunki hodowlane, postępowanie z żywcem przed ubojem, obróbka poubojowa tusz, w tym sposób wychładzania, masa tusz, rozmiar przechowywanych elementów, sposób ich pakowania, czas i temperatura przechowywania oraz ogrzewania, a także procesy biochemiczne zachodzące podczas dojrzewania mięsa (Joo i in., 1999; Scheffler i in., 2013, Hughes i in., 2014; Sikes i in., 2017).

Straty soku mięśniowego są zjawiskiem naturalnym, powstają podczas wychładzania tusz, przechowywania i obróbki termicznej mięsa. Natomiast ich ilość może być bardzo zróżnicowana. Zmniejszenie masy mięsa w czasie pozyskiwania surowca mięsnego ma znaczenie nie tylko z punktu ekonomicznego jako wskaźnik procesu produkcji. Jest również bardzo ważne przy ocenie dokonywanej przez potencjalnych nabywców. Badania dowodzą, że obecność widocznego wycieku soku mięśniowego ogranicza pożądalność i akceptację wieprzowiny oraz wpływa negatywnie na podejmowane przez konsumentów decyzje związane z zakupem mięsa (Ngapo i in., 2004).

Wielkość ubytków masy mięsa podczas przechowywania przyjmowana jest często jako wskaźnik jego wodochłonności. Cecha ta jest definiowana jako zdolność mięsa do wiązania wody własnej (ang. water holding capacity, WHC) (van Laack i Solomon, 1994; Pearce i in., 2011) oraz dodanej do niego podczas procesu technologicznego. Wodochłonność mięsa można wyrazić także przez wielkość wycieku wirówkowego. Niekiedy, przy bardziej szczegółowej analizie zjawisk związanych z wodochłonnością, stosuje się jeszcze pomiar ilości wody zatrzymanej przez tkankę mięśniową podczas procesu ogrzewania. Tę cechę określa się jako zdolność do zatrzymywania wody (ang. water binding capacity, WBC) (Honikel, 1987; Offer i Knight, 1988; Hamm, 1994; Kauffman i in., 1994). Zasadnicza różnica między pomiarami zdolności wiązania i zatrzymywania wody przez mięso (poza kwestiami związanymi ze sposobem ich przeprowadzania) sprowadza się do tego, że pierwszy z nich wykonuje się na mięsie surowym lub przetworach niepoddanych ogrzewaniu, a drugi po obróbie termicznej. Ocena wodochłonności mięsa surowego wskazuje na siłę oddziaływań wiązań zarówno wodorowych, jak i van der Waalsa, występujących przede wszystkim między cząsteczkami/łańcuchami białek. Wielkość ta determinowana jest szybkością poubojowych przemian glikolitycznych oraz ich wpływem na białka. Wirowanie, na skutek zastosowania zwiększonej siły odśrodkowej, zmniejsza różnicę w efekcie oddziaływania między nimi. Ogrzewanie prowadzi zwykle do powstawania większych strat masy mięsa, które odzwierciedla pomiar ubytków termicznych. Ich przyczyną jest denaturacja i skurcz termiczny białek, które w konsekwencji ograniczają wiązanie wody przez białkowe grupy funkcyjne tworzące określone struktury tkanki mięśniowej.

W badaniach prowadzonych na potrzeby niniejszej pracy podczas 6-dniowego składowania ubytki masy mięsa wychładzanego z różną szybkością mieściły się w przedziale od 1,68% do 6,26% (tab. 4). W obu analizowanych terminach straty przechowalnicze prób A wychładzanych najwolniej były najmniejsze i wynosiły

odpowiednio 1,68% po 2 dniach i 4,06% po 6 dniach. Wielkość ubytków przechowalniczych zwiększała się wraz z wydłużeniem czasu przechowywania i w terminie 6 dni dla mięsa wychładzanego z szybkością 0,15°C/min oraz 0,27°C/min wynosiła odpowiednio 6,26% i 6,15%. Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji wykazano istotny wpływ szybkości wychładzania oraz czasu przechowywania na wielkość ubytków przechowalniczych (tab. 5).

Tabela 4. Ubytki przechowalnicze, termiczne oraz wielkość wycieku wirówkowego z mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością w czasie przechowywania

Table 4. Storage and thermal losses as well as the size of centrifugal drip from meat cooled at different rates during storage

Badana cecha Tested feature	Wariant wychładzania Cooling rate			Ogółem Total N = 15	Wartość p p value	
	A (0,12°C/min) N = 5	B (0,15°C/min) N = 5	C (0,27°C/min) N = 5			
Ubytek przechowalniczy Storage loss (%)	2 dni 6 dni	1,68 ±0,66 4,06 ±1,26	2,55 ±0,56 6,26 ±1,82	2,57 ±0,59 6,15 ±1,35	2,26 ±0,71 5,49 ±1,74	0,062 0,066
Ubytek termiczny Thermal loss (%)	2 dni 6 dni	33,98 ±1,33 34,39 ^b ±1,49	33,61 ±2,25 34,95 ^b ±1,67	37,25 ±1,28 36,44 ^a ±1,72	34,67 ±2,12 35,59 ±1,97	0,058 0,013
Wyciek wirówkowy Centrifugal drip (%)	24 h 6 dni	20,48 ^{ab} ±2,10 16,28 ±1,55	19,34 ^b ±2,38 13,95 ±2,12	23,81 ^a ±1,57 14,25 ±1,87	21,21 ±2,74 14,82 ±2,03	0,012 0,140

^{a,b}Wartości średnie oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) względem szybkości wychładzania.

^{a,b}Average values in rows marked with different indexes differ statistically substantially ($p \leq 0,05$) in relation to the cooling rate.

Tabela 5. Wpływ szybkości wychładzania (W), czasu przechowywania (T) oraz ich interakcji na ubytki przechowalnicze i termiczne oraz wielkość wycieku wirówkowego z mięsa

Table 5. Effect of cooling rate (W), storage time (T) and their interaction on storage and thermal losses as well as the size of centrifugal drip from meat

Badana cecha Tested feature	Szybkość wychładzania Cooling rate W	Czas przechowywania Storage time T	Interakcja Interaction W × T
Ubytek przechowalniczy Storage loss (%)	**	***	NS
Ubytek termiczny Thermal loss (%)	***	NS	NS
Wyciek wirówkowy Centrifugal drip (%)	*	***	*

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

Z badań przeprowadzonych przez Schäfer i in. (2002) wynika, że wielkość ubytków masy rejestrowanych w warunkach komercyjnych może być bardzo zróżnicowana. W przypadku krzyżówek świń duroc \times landrace nieposiadających genu halotanowego mieściła się w szerokim przedziale od 2,2% do 12,6% po 3–24 h przechowywania (Schäfer i in., 2002). Zybert i in. (2013) wyznaczyli ponad dwukrotnie wyższe (10,44%) ubytki masy mięśni LD pochodzących od świń rasy duroc, wychładzanych konwencjonalnie i szokowo, po 6 dniach przechowywania. Istnieje wiele prac naukowych na temat wpływu szybkości chłodzenia na fizyczne cechy mięsa, jednak wyniki prezentowanych badań bardzo często są rozbieżne. Podobnie jak w niniejszej pracy, Janiszewski i in. (2018) uzyskali istotnie wyższe (6,31%) ubytki masy mięśni wychładzanych szokowo w porównaniu z wychładzanymi konwencjonalnie (4,40%) już po 48 h *pm*. Natomiast Rybarczyk i in. (2015) poinformowali o wpływie szybkości chłodzenia na naturalną utratę soku mięśniowego, która była o 20% niższa w grupie mięśni LL schładzanych szokowo w porównaniu z wychładzanymi systemem jednostopniowym. Wpływ szybkiego chłodzenia na lepsze zatrzymanie wody tłumaczony jest efektem biochemicznym jako bezpośrednim oddziaływaniem temperatury na poubojowy metabolizm włókien mięśniowych lub efektem strukturalnym – indukowanym temperaturą – na ruchliwość i dystrybucję wody w mięśniach, a także połączeniem obu powyższych zjawisk (Bertram i in., 2001).

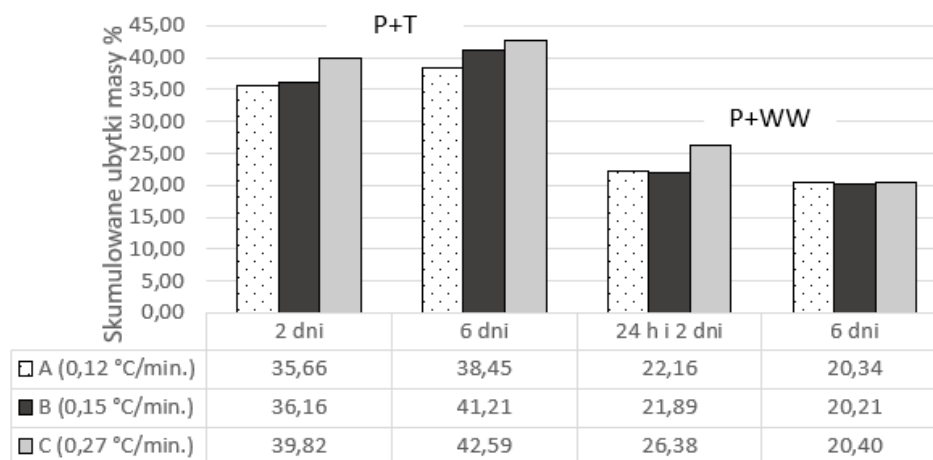
W celu wyznaczenia wielkości ubytków masy podczas ogrzewania plastry mięsa o grubości 25 mm i średniej masie 120 ± 21 gramów poddano obróbce termicznej do temperatury 72°C, mierzonej w centrum geometrycznym próbki. Wielkości ubytków termicznych z mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością podczas 6-dniowego składowania chłodniczego mieściły się w zakresie od 33,61% do 37,25% (tab. 4). W przypadku prób A i B w drugim terminie analiz odnotowano wzrost ubytków podczas ogrzewania odpowiednio o 0,41 i 1,34 punktu procentowego. Natomiast dla prób C obserwowano obniżenie strat masy podczas ogrzewania o 0,81 punktu procentowego. Po 6 dniach przechowywania istotnie wyższe 36,44% ubytki termiczne charakteryzowały mięso wychładzane najszybciej w porównaniu z próbkami A (34,39%) i B (34,95%). Wykazano, że szybkość procesu wychładzania wpłynęła wysoko istotnie ($p \leq 0,001$) na wielkość ubytków termicznych (tab. 5).

Wyniki badań innych autorów (Tomović i in., 2008) wskazują na mniejsze ubytki masy w czasie ogrzewania mięsa wychładzanego szokowo. Odnotowali oni istotnie mniejsze (38,1%) ubytki masy podczas ogrzewania mięśnia semimembranosus (pochodzącego z tusz wychładzanych szybko w tunelu chłodniczym przez 3 h w temp. -32°C) w porównaniu z mięsem pozyskanym z tusz wychładzanych konwencjonalnie (42,5%). Oprócz sposobu wychładzania determinującego tempo przemian glikolitycznych w mięsie ogrzewanie wpływa na stopień denaturacji cieplnej białek (Christensen i in., 2013). Wzrost temperatury obróbki termicznej mięśnia najdłuższego grzbietu świń rasy landrace i berkshire z 62°C do 79°C przyczynił się do zwiększenia wielkości ubytków termicznych z 14,84% do 30,18% (Crawford i in., 2010). Jak wskazali Martens i in. (1982) na wydajność procesów cieplnych znacząco wpływają temperatura i sposób prowadzenia obróbki termicznej, ale również czas utrzymywania w danej temperaturze. Zróżnicowanie poziomu denaturacji białek może skutkować odmiennym zasięgiem zmian strukturalnych w miofibrylach, a tym samym wielkością strat masy mięsa.

Wodochłonność mięsa (WHC) określono także na podstawie ilości uzyskanego wycieku wirówkowego (tab. 4). Analizując otrzymane wyniki stwierdzono istotny wpływ szybkości wychładzania oraz czasu przechowywania na jego wielkość, przy czym czas odgrywał ważniejszą rolę ($p \leq 0,001$) (tab. 5). Po 24 h przechowywania mięsa w chłodni wykazano istotne zróżnicowanie wielkości wycieku wirówkowego między próbami zależnie od szybkości wychładzania. Próby B charakteryzowały się istotnie lepszą wodochłonnością (19,34%) w porównaniu do prób C (23,81%) schładzanych najszybciej, pomimo niewielkich różnic wartości pH w analizowanym terminie (tab. 4). Mięśnie wychładzane najwolniej cechowała wartość pośrednia 20,48%. Po 6 dniach przechowywania zaobserwowano zmniejszenie wielkości wycieku wirówkowego. Mięso charakteryzowało się więc lepszą wodochłonnością w porównaniu z rezultatami uzyskanymi po 2 dniach. Mniejsze wielkości wycieku wirówkowego odnotowano w próbach wychładzanych szybciej, tzn. B (13,95%) i C (14,25%) w porównaniu z próbami A (16,28%) schładzanymi z szybkością 0,12°C/min (próba kontrolna). Różnice te były jednak nieistotne statystycznie. Najlepszą wodochłonnością charakteryzowało się mięso prób B – 19,34% po 24 h i 13,95% po 6 dniach.

Prezentowane dane wskazują, że wychładzanie ze zróżnicowaną szybkością wpłynęło na wodochłonność mięsa ocenioną 24 h po uboju, a więc bezpośrednio po zakończeniu tego procesu. Interesujące wyniki dla oceny tego zjawiska dostarcza porównanie skumulowanej wielkości ubytków masy mięsa. Wyrażono ją jako sumę ubytków przechowalniczych i wielkości wycieków wirówkowych (P + WW) dla poszczególnych grup mięśni w pierwszym terminie analiz i po 6 dniach *pm* (rys. 3). Suma ubytków P + WW w przypadku prób A i B była bardzo podobna w pierwszym terminie badań, ale znacznie niższa w stosunku do mięsa C. Po 6 dniach wielkości te mieściły się w bardzo wąskim przedziale (20,21–20,40%) i były niższe niż wyznaczone w pierwszym terminie analiz. Wskazuje to na poprawę wodochłonności mięsa wraz z upływem czasu przechowywania.

Po przeprowadzeniu podobnej analizy, ale dokonując porównania skumulowanej wielkości ubytków przechowalniczych i termicznych (P + T) dla poszczególnych grup mięśni wychładzanych ze zróżnicowaną szybkością, po 2 i 6 dniach uzyskano podobne realacje w stosunku do powyższych porównań tylko po 2 dniach przechowywania (rys. 3). W tym czasie ilość ubytków (P + T) mieściła się w przedziale od 35,66% do 39,82% i była najwyższa w mięśniach C wychładzanych najszybciej. Dla dwóch pierwszych grup (A i B) była zbliżona i wynosiła odpowiednio 35,66% oraz 36,16%. W terminie 6 dni obserwowano wzrost ubytków masy P + T w porównaniu z wyznaczonymi po 2 dniach niezależnie od zastosowanej metody wychładzania. Uzyskano więc zależność odwrotną w stosunku do obserwowanej przy porównaniach skumulowanych ubytków przechowalniczych i wycieków wirówkowych (P + WW). W przypadku prób A wynosiły one 38,24%, wyższe ubytki stwierdzono dla prób B (41,21%) i najwyższe dla mięśni z grupy C (42,59%). Różnica w wielkości ubytków P + T po 2 dniach w porównaniu z tymi po 6 dniach była największa w przypadku prób B i wynosiła 5,05 punktu procentowego. Próby A i C cechowały prawie o połowę mniejsze (odpowiednio 2,79% i 2,77%) straty masy P + T.



Rys. 3. Skumulowane ubytki masy w czasie przechowywania mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością

P + T – suma ubytków przechowalniczych i termicznych, P + WW – suma ubytków przechowalniczych i wielkości wycieku wirówkowego

Fig. 3. Accumulated weight loss during storage of meat cooled at various rates

P + T – sum of storage and thermal losses, P + WW – sum of storage losses and the size of the centrifugal drip

Zatem poddając mięśnie ogrzewaniu, w terminie 6 dni uzyskano z pewnym przybliżeniem obraz zależności podobny do tego, który obserwowano przy pomiarach po 2 dniach przechowywania. Zjawiska tego nie stwierdzono przy ocenie P + WW, gdy wielkości te po 6 dobach przechowywania były bardzo podobne dla wszystkich prób. Przyjmując, że pomiary wielkości ubytków przechowalniczych i wycieków wirówkowych są odzwierciedleniem stanu natywnego tkanki, w tym dostępności grup aktywnych białek, można przypuszczać, że ich proteoliza była podobna. Na podstawie przeprowadzonych badań trudno jednak stwierdzić, czy proteoliza dotyczyła tych samych struktur tkanki mięśniowej, czy też różnych, dając jednak w efekcie podobny rezultat.

Przy analizowaniu przemian poubojowych białek mięsa zwraca się z reguły bardzo dużą uwagę na proteolizę białek miofibrylarnych. W wyniku degradacji białek cytoszkieletowych należących do tej frakcji następuje rozluźnienie struktur włókien mięśniowych oraz miofilamentów uczestniczących w procesie skurczu, co wpływa na poprawę zdolności wiązania wody (Taylor i in., 1995b; Kristensen i Purslow, 2001; Hughes i in., 2014). Proteolizie podlegają jednak również białka sarkoplazmatyczne. Można przypuszczać, że ogrzewanie, utrwalając strukturę tkankową, spowodowało, że obserwacje po 2 dniach przechowywania znalazły odzwierciedlenie jeszcze w drugim terminie badań. Dlatego też skumulowane dane obejmujące ubytki przechowalnicze i termiczne (P + T) po 6 dobach przechowywania wykazały różnice między trzema rodzajami porównywanych prób. Tych zmian prawdopodobnie nie uchwyciło oznaczanie wielkości skumulowanych ubytków P + WW i stąd uzyskane rezultaty.

Potwierdzeniem tego przypuszczenia mogą być wyniki pomiarów siły cięcia. Wskazują one na występowanie skurczu chłodniczego w mięśniach C wychładzanych najszybciej i – co istotne – większa twardość tych mięśni utrzymywała się także po 6 dniach przechowywania w chłodni (rozdz. 4.1.3, tab. 7). Mięso uznawane jest za kruche, jeśli siła cięcia jest mniejsza niż 40 N/cm^2 , natomiast za twarde, gdy wynosi ona powyżej 60 N/cm^2 (Laville i in., 2009b). Duża twardość mięśni podlegających skurczowi chłodniczemu w późniejszych terminach po uboju, mimo że zachodzi w nich proteoliza, jest zjawiskiem znanym (Hwang i in., 2004; Weaver i in., 2008). Ich kruszenie jest jednak znacznie wolniejsze niż to w mięśniach podlegających zwykłemu skurczowi poubojowemu. Uzyskane wyniki sugerują więc, że skumulowane ubytki przechowalnicze i termiczne w największym stopniu uwzględniały zmiany struktury mięsa. Były one prawdopodobnie efektem zjawiska skurczu chłodniczego, o którym wspomina się głównie w przypadku mięśni czerwonych pochodzących z tusz bydła i owiec.

Podobnie jak w niniejszej pracy, wpływ sposobu chłodzenia na poprawę zdolności wiązania wody oznaczoną wielkością wycieku wirówkowego odnotowano również w innych badaniach: Yang i in. (2011), Kerth i in. (2001) i Bertram i in. (2001). Juárez i in. (2009) stwierdzili, że podczas wychładzania tusz z nadmuchem w porównaniu z chłodzeniem konwencjonalnym ubytki masy były mniejsze o 19% ($p = 0,009$), a straty soku mięśniowego z części LTL były około 10% mniejsze ($p = 0,001$) (Juárez i in., 2009). Badania przeprowadzone przez Springer i in. (2003) wskazały na znacząco lepszą zdolność zatrzymania wody (24 h *pm*) – wyrażoną jako zawartość wilgoci, wodę wolną, procent wody związanej i wody immobilizowanej przez mięśnie szynki wychładzane 2 i 2,5 godziny w temperaturze -32°C , a następnie w temperaturze 2°C – w porównaniu z wychładzanymi konwencjonalnie w temp. 2°C przez 24 h. Wcześniejsze doniesienia van der Wal i in. (1995) oraz D'Souza i in. (1998) nie wskazały na taki związek. Analizując mięso świń rasy duroc, również nie stwierdzono wpływu sposobu wychładzania na WHC i ubytki soku mięśniowego (Zybert i in., 2013). Zdaniem Huff-Lonergan i Lonergan (2005) spowolnienie tempa obniżenia wartości pH obok korzystnych zmian w białkach miofibryli, przyczynia się do ograniczenia stopnia denaturacji mioglobiny i innych białek sarkoplazmatycznych. Konsekwencją tych przemian jest poprawa barwy i WHC mięsa.

Na podstawie analizy wielkości wycieku wirówkowego po 6 dniach przechowywania odnotowano, że mięśnie B wychładzane z pośrednią szybkością cechowały się najlepszą wodochłonnością. W tym terminie wykazano istotne ujemne korelacje pomiędzy wielkością wycieku wirówkowego a wartością pH po 2 i 6 dniach ($r = -0,71$ i $r = -0,77$; $p \leq 0,05$) (tab. 6).

Wyjaśnienie obserwowanej zależności można wiązać z otwarciem struktury białek – zjawiskiem, które zwykle występuje podczas procesu poubojowego dojrzewania mięsa. Wodochłonność ściśle wiąże się ze strukturą tkanki mięśniowej oraz przemianami białek miofibrylarnych i sarkoplazmatycznych. Warto wspomnieć, że gwałtowne przemiany glikolityczne, których najprostszym wskaźnikiem jest wartość pH, prowadzą do obniżenia wodochłonności, denaturacji mioglobiny i szybkiego szarzenia mięsa. Ponadto uważa się, że białka saroplazmy, podlegając denaturacji, osadzają się na miofibrylach, czego efektem jest blokowanie aktywnych

Tabela 6. Współczynniki korelacji pomiędzy ubytkami masy i wielkością wycieku wirówkowego a cechami jakościowymi mięsa

Table 6. Correlation coefficients between the weight loss and the size of centrifugal drip and the quality characteristics of meat

Badana cecha Tested feature	Ubytek przechowalniczy Storage loss (%)		Ubytek termiczny Thermal loss (%)		Wyciek wirówkowy Centrifugal drip (%)		
	2 dni	6 dni	2 dni	6 dni	24 h	6 dni	
pH 45 min	-0,35 ^{NS}	-0,16 ^{NS}	0,42 ^{NS}	0,32 ^{NS}	0,29 ^{NS}	-0,12 ^{NS}	
pH 24 h	-0,33 ^{NS}	-0,28 ^{NS}	-0,28 ^{NS}	-0,45 ^{NS}	0,21 ^{NS}	-0,35 ^{NS}	
pH 2 dni	0,11 ^{NS}	0,15 ^{NS}	0,01 ^{NS}	0,26 ^{NS}	-0,14 ^{NS}	-0,77*	
pH 6 dni	-0,13 ^{NS}	-0,07 ^{NS}	-0,02 ^{NS}	-0,16 ^{NS}	-0,11 ^{NS}	-0,71*	
Stężenie glikogenu Glycogen content ($\mu\text{mol/g}$)	2 h 24 h	-0,42 ^{NS} 0,57*	-0,55* 0,50 ^{NS}	0,17 ^{NS} 0,47 ^{NS}	0,08 ^{NS} 0,84*	0,01 ^{NS} 0,51 ^{NS}	0,22 ^{NS} 0,14 ^{NS}
Stężenie kw. mlekowego Lactic acid content ($\mu\text{mol/g}$)	2 h 24 h	0,47 ^{NS} 0,62*	0,34 ^{NS} 0,44 ^{NS}	-0,12 ^{NS} 0,15 ^{NS}	0,15 ^{NS} 0,29 ^{NS}	0,04 ^{NS} 0,29 ^{NS}	0,23 ^{NS} 0,52*
Wyciek wirówkowy Centrifugal drip (%)	24 h 6 dni	0,28 ^{NS} -0,13 ^{NS}	0,25 ^{NS} -0,23 ^{NS}	0,65* 0,03 ^{NS}	0,54* -0,08 ^{NS}	1,00 ^{NS} 0,17 ^{NS}	0,17 ^{NS} 1,00 ^{NS}

* $p \leq 0,05$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

grup białek i obniżanie WHC. Stąd też pomiary pH i wodochłonności są najczęściej stosowane w ocenie jakości mięsa.

Sugeruje się, że oznaczanie wielkości ubytków przechowalniczych oraz wycieku wirówkowego jest odzwierciedleniem stanu natywnego tkanki i dostępności grup aktywnych białek, co wiąże się z postępującą proteolizą po uboju. Ogrzewanie natomiast, utrwalając strukturę tkanki, powoduje, że oznaczanie ubytków termicznych, obok oddziaływań aktywnych grup białek wiążących wodę, prawdopodobnie dostarcza informacji wskazującej również zmiany strukturalne tkanki. Różnice w skumulowanej wielkości ubytków przechowalniczych i termicznych między poszczególnymi grupami mięśni, które obserwowano po 6 dniach przechowywania mięsa, potwierdzają słuszność powyższego przypuszczenia, szczególnie gdy pod uwagę weźmie się wyniki badań kruchości mięsa. Istotnie większa twardość mięsa była charakterystyczna dla prób C wychładzanych najszybciej ($0,27^\circ\text{C}/\text{min}$) w obu terminach analiz. Prawdopodobne jest, że zmniejszona zdolność zatrzymywania wody była konsekwencją superkontrakcji mięśni i mniejszą dostępnością aktywnych grup białek miozyny i aktyny, które aktywnie uczestniczą w tym procesie, a charakteryzują się najlepszą wodochłonnością. Zachodzący po stanie skurczu pośmiertnego proces dojrzewania sprzyja rozluźnieniu miofilamentów, zwiększeniu przestrzeni między nimi i współdecyduje o zdolności utrzymywania soku przez mięso (Honikel, 2002).

5.1.3. Wpływ szybkości procesu wychładzania i czasu przechowywania na wielkość siły i pracy cięcia mięsa

Wyniki analizy wpływu zastosowanej szybkości wychładzania w czasie przechowywania chłodniczego na kruchość mięsa ocenioną na podstawie instrumentalnej wartości siły i pracy cięcia zestawiono w tabeli 7. Wskazują one, że najlepszą kruchością podczas 6-dniowego przechowywania wyróżniało się mięso A wychładzane najwolniej. Po 2 dniach gorszą kruchością w porównaniu z próbką kontrolną A ($47,79 \text{ N/cm}^2$ i $382,54 \text{ N} \times \text{mm}$) cechowały się próbki B i C wychładzane szybciej, dla których wyznaczono większe wartości średniej siły i pracy cięcia na poziomie $55,60 \text{ N/cm}^2$ i $80,03 \text{ N/cm}^2$ oraz odpowiednio $435,31 \text{ N} \times \text{mm}$ i $688,86 \text{ N} \times \text{mm}$ (tab. 7).

Tabela 7. Wielkość siły i pracy cięcia mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością w czasie przechowywania

Table 7. The size of the shear force and shear work of meat cooled at different rates during storage

Badana cecha Tested feature	Wariant wychładzania Cooling rate			Ogółem Total N = 15	Wartość p p value
	A ($0,12^\circ\text{C/min}$) N = 5	B ($0,15^\circ\text{C/min}$) N = 5	C ($0,27^\circ\text{C/min}$) N = 5		
Siła cięcia 2 dni WBSF 6 dni (N/cm^2)	$47,79^b \pm 6,05$ $38,51^b \pm 4,81$	$55,60^b \pm 10,07$ $41,07^b \pm 9,21$	$80,03^{a*} \pm 7,87$ $68,01^a \pm 13,29$	$61,14 \pm 16,10$ $49,20 \pm 16,50$	0,000 0,000
Praca cięcia 2 dni Shear work 6 dni ($\text{N} \times \text{mm}$)	$382,54^b \pm 34,62$ $317,16^b \pm 31,06$	$435,31^b \pm 72,71$ $346,38^b \pm 51,95$	$688,86^a \pm 48,24$ $619,51^a \pm 135,22$	$502,24 \pm 147,22$ $427,69 \pm 161,67$	0,000 0,000

^{a,b} Wartości średnie oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) względem sposobu wychładzania.

^{a,b} Average values in rows marked with different indexes differ statistically substantially ($p \leq 0,05$) in relation to the cooling rate.

Mięso C wychładzane z szybkością $0,27^\circ\text{C/min}$ w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla prób A i B charakteryzowało się istotnie większą wartością siły i pracy cięcia w obu terminach badań, tj. po 2 i 6 dniach przechowywania chłodniczego. Na podstawie uzyskanych rezultatów wykazano istotny wpływ szybkości wychładzania na kruchość mięsa (tab. 7). Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono, że zarówno szybkość wychładzania, jak i czas przechowywania istotnie wpłynęły na siłę i pracę cięcia mięsa (tab. 8). Natomiast interakcja między powyższymi czynnikami nie miała wpływu na zmiany kruchości wychładzanych mięśni. Po 2 i 6 dniach przechowywania odnotowano istotną dodatnią zależność pomiędzy siłą cięcia a ubytkami przechowalniczymi oraz termicznymi (odpowiednio $r = 0,59$ i $r = 0,56$ oraz $r = 0,54$ i $r = 0,75$; $p \leq 0,05$) (tab. 9). W terminie 2 i 6 dni wykazano również, że wyższa kruchość mięsa była istotnie związana z jego lepszą wodochłonnością oznaczoną na podstawie wielkości wycieku wirówkowego $r = 0,67$ i $r = 0,64$ ($p \leq 0,05$) (tab. 9).

Ultraszybkie chłodzenie może powodować skurcz chłodniczy włókien mięśnia LTL określony na podstawie skrócenia długości sarkomerów, którego skutkiem

Tabela 8. Wpływ szybkości wychładzania (W), czasu przechowywania (T) oraz ich interakcji (W × T) na wielkość siły i pracy cięcia mięsa

Table 8. Influence of cooling rate (W), storage time (T) and their interaction (W × T) on the amount of shear force and work of meat

Badana cecha Tested feature	Szybkość wychładzania Cooling rate W	Czas przechowywania Storage time T	Interakcja Interaction W × T
Siła cięcia WBSF (N/cm ²)	**	*	NS
Praca cięcia Shear work (N × mm)	**	*	NS

* $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,001$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant

Tabela 9. Współczynniki korelacji między siłą i pracą cięcia a analizowanymi cechami jakości mięsa podczas przechowywania

Table 9. Correlation coefficients between shear force and shear work and the analysed meat quality features during storage

Badana cecha Tested feature		Siła cięcia WBSF (N/cm ²)		Praca cięcia Shear work (N × mm)	
		2 dni	6 dni	2 dni	6 dni
pH 24 h		-0,35 ^{NS}	-0,44 ^{NS}	-0,27 ^{NS}	-0,37 ^{NS}
pH 2 dni		0,12 ^{NS}	0,07 ^{NS}	0,19 ^{NS}	0,17 ^{NS}
pH 6 dni		-0,06 ^{NS}	-0,24 ^{NS}	0,02 ^{NS}	-0,19 ^{NS}
Stężenie glikogenu Glycogen content (μmol/g)	2 h 24 h	-0,22 ^{NS} 0,60*	-0,11 ^{NS} 0,68*	-0,17 0,55*	-0,08 ^{NS} 0,69*
Stężenie kwasu mlekowego Lactic acid content (μmol/g)	2 h 24 h	0,24 ^{NS} 0,44 ^{NS}	0,25 ^{NS} 0,46 ^{NS}	0,15 ^{NS} 0,33 ^{NS}	0,19 ^{NS} 0,41 ^{NS}
Ubytek przechowalniczy Storage loss (%)	2 dni 6 dni	0,59* 0,60*	0,50 ^{NS} 0,56*	0,50 ^{NS} 0,51 ^{NS}	0,48 ^{NS} 0,52*
Ubytek termiczny Thermal loss (%)	2 dni 6 dni	0,54* 0,72*	0,49 ^{NS} 0,75*	0,60* 0,73*	0,52* 0,77
Wyciek wirówkowy Centrifugal drip (%)	2 dni 6 dni	0,67* -0,02 ^{NS}	0,64* 0,09 ^{NS}	0,70* -0,10 ^{NS}	0,60* -0,01 ^{NS}

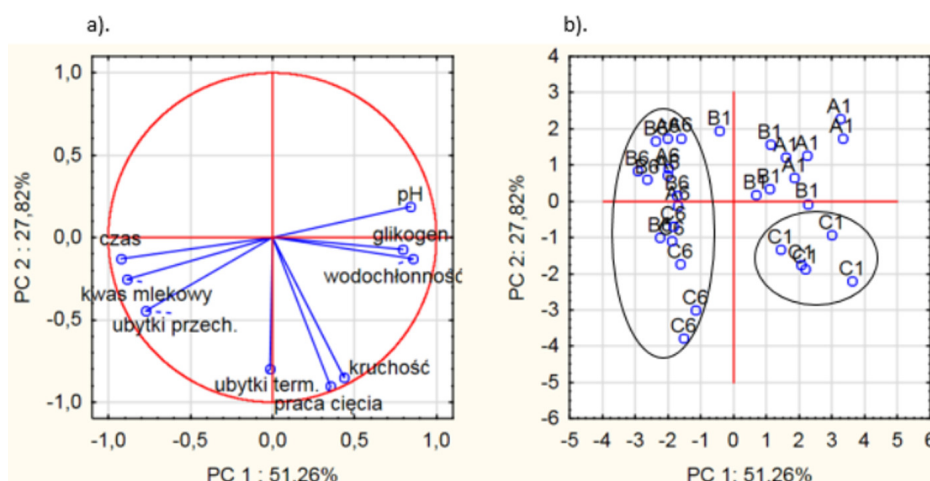
* $p \leq 0,05$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

jest większa wartość siły cięcia po 48 h, natomiast podczas przechowywania dłuższego niż 72 h różnice w kruchości mogą być nieistotne (Feldhusen i Kühne, 1992). Wyniki wielu badań wskazują na występowanie w mięśniach bydła skurczu chłodniczego wywołanego szybkim wychładzaniem (Demeyer i in., 1998, van Moesike i in., 2001). W większym stopniu dotyczy on mięśni bydła i związany jest z występowaniem włókien czerwonych. Jednakże obserwowany jest również

w mięsie świń cechujących się dużą mięsnością oraz niewielkim otłuszczeniem i zależy od masy wychładzanych półtuszy. Wycięcie mięśni z tuszy bezpośrednio po uboju indukuje skurcz włókien mięśniowych (Bowker i in., 2016). Według Sikes i in. (2017) przy braku skurczu chłodniczego szybkość glikolizy nie powinna być przyspieszana. Tego przypuszczenia nie poparły jednak prace Jacoba i in. (2012), którzy wykazali, że nawet bez skurczu większe tempo spadku wartości pH występowało w bardzo szybko wychładzanych (VFC) mięśniach jagnięcych i towarzyszyła mu poprawa tekstury. Natomiast hipoteza zaproponowana przez Warner i in. (2015), zakładała, że IMP (5-monofosforan inozyny) w mięśniach VFC (*pre-rigor*) występował w większym stężeniu. Prawdopodobne jest, że czasami zastępował on ATP na głowie miozyny, a to mogło przyczynić się do osłabienia mostka aktynowo-miozynowego i wpłynęło na kruchość mięsa (Sikes i in., 2017). Różnice w kruchości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością pomiędzy wartościami uzyskanymi w pracy a danymi literaturowymi mogą częściowo wynikać z zawartości tłuszczu śródmięśniowego (Szalata i in., 2005).

W mięsie świń dwóch genotypów large white (LW) oraz duroc × large white (duroc) zawartość tłuszczu śródmięśniowego była dodatnio skorelowana z siłą cięcia (odpowiednio $r = 0,32$ i $0,43$; $p \leq 0,0001$) (Juárez i in., 2009). Wyznaczone zależności pokazały, że wyższa zawartość tłuszczu śródmięśniowego, jaką obserwowano w genotypie D (31,81 mg/g) w porównaniu z LW (18,85 mg/g), spowodowała zmniejszenie siły cięcia. Cytowani autorzy odmiennie, w porównaniu z wynikami niniejszej pracy, nie wykazali istotnego oddziaływania wychładzania na kruchość mięsa zarówno w ocenie instrumentalnej, jak i sensorycznej. Ponadto nie stwierdzili różnicy w długości sarkomerów mięśnia LTL ($p > 0,1$) w zależności od zastosowanej metody chłodzenia (Juárez i in., 2009). Brak wpływu metody chłodzenia na siłę cięcia zaobserwowali także McFarlane i Unruh (1996), Springer i in. (2003) oraz Tomović i in. (2008). Na powyższe mogły wpłynąć stosunkowo łagodne (-25°C , 1 h, nadmuchi 2,5 m/s) warunki chłodzenia z nadmuchiem i mało prawdopodobne jest, aby spowodowały one skurcz chłodniczy w mięsie wieprzowym ze względu na bardzo wysoki udział szybkich włókien glikolitycznych, które są odporne na skurcz chłodniczy (Aalhus i in., 1997, 1998). Jones i in. (1993) odkryli, że mięso ze szczuplejszych tusz Yorkshire poddanych wychładzaniu szokowemu (3 h, temp. -40°C) było ciemniejsze, cechowało się mniejszym ubytkiem soku mięśniowego i wyższą wartością siły cięcia.

W celu zmniejszenia liczby zmiennych opisujących wpływ procesu wychładzania z różną szybkością i ustalenia zależności między ocenianymi czynnikami wykorzystano analizę składowych głównych PCA (Principal Component Analysis) (rys. 4). Projekcja wyników badanych cech: wartości pH (2 h i 24 h), zawartości glikogenu i kwasu mlekowego (2 h i 24 h), wielkości wycieku wirówkowego (wodochłonności) (24 h i 6 dni), ubytków przechowalniczych i termicznych (2 dni i 6 dni) oraz kruchości (2 dni i 6 dni) w układzie dwóch pierwszych składowych (PC 1 i PC 2), odpowiedzialnych za prawie 80% (PC 1 = 51,26% i PC 2 = 27,82%) całkowitej zmienności mięsa wychładzanego z różną szybkością, zobrazowała zróżnicowanie próbek pod względem charakterystyki ich właściwości (rys. 4a). Pierwsza składowa związana była z zawartością glikogenu, kwasu mlekowego, wartością pH oraz wodochłonnością (wielkością wycieku wirówkowego, czasem i ubytkami prze-



Rys. 4. Analiza składowych głównych (PC 1 i PC 2) cech jakościowych mięsa wychładzanego z różną szybkością: a) wykres współrzędnych współczynnika zmienności, b) wykres współrzędnych współczynnika przypadku mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością: A (0,12°C/min), B (0,15°C/min), C (0,27°C/min)

Fig. 4. Principal component analysis (PC 1 and PC 2) of qualitative characteristics of meat cooled at different rates: a) graph of coordinates of the coefficient of variation, b) graph of coordinates of the case coefficient for meat cooled at different rates A (0.12°C/min), B (0.15°C/min), C (0.27°C/min)

chowlaniczymi). Natomiast znaczny wkład w tworzenie składowej drugiej miały siła (kruchość) i praca cięcia oraz ubytki termiczne z mięsa.

Na podstawie zasobów zmienności wspólnej wykazano, że 91% wariacji kruchości oraz 75% wariacji wodochłonności wyjaśniają pierwsze dwie składowe. Z pewnym uproszczeniem można przyjąć, że utworzona dwuwymiarowa płaszczyzna jest rozpięta na składowej 1 „wodochłonność” i składowej 2 „kruchość”. Bliskie położenie wektora glikogenu i wodochłonności oraz kruchości i pracy cięcia wskazuje na dodatnie skorelowanie tych zmiennych. Natomiast przeciwne położenie wektorów wartości pH i kwasu mlekowego świadczy o wystąpieniu korelacji ujemnej. Zasadnicze zgrupowania prób wychładzanych ze zróżnicowaną szybkością po 6 dniach przechowywania obserwowano po lewej stronie wykresu i wskazuje ono na nieco mniejsze zróżnicowanie pod względem analizowanych wyróżników (rys. 4b). Natomiast po prawej stronie wyodrębniono próby wychładzane najszybciej, które charakteryzowały się istotnie mniejszą kruchością i większą pracą cięcia. Rezultaty uzyskane w niniejszej pracy potwierdziły, że badane cechy mięsa: wartość pH, stężenie glikogenu i kwasu mlekowego, wielkość wycieku wirówkowego (wodochłonność), ubytki przechowalnicze i termiczne oraz kruchość w większym stopniu różnicowały mięśnie oceniane w pierwszym terminie tj. w krótszym czasie od zakończenia wychładzania z różną szybkością.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zastosowanie szybkości wychładzania 0,27°C/min (tj. takiej, jaką wykorzystano w przypadku prób C) prowadziło do uzyskania surowca mięsnego o niepożądanym jakościowo związku z jego gorszą wodochłonnością i kruchością. Powyższe może sugerować wartość aplika-

cyjną pracy związaną ze wskazaniem maksymalnej szybkości wychładzania mięsa 0,15°C/min jako zalecanej w celu uzyskania jego pożądaných cech jakościowych, w tym wodochłonności i kruchości.

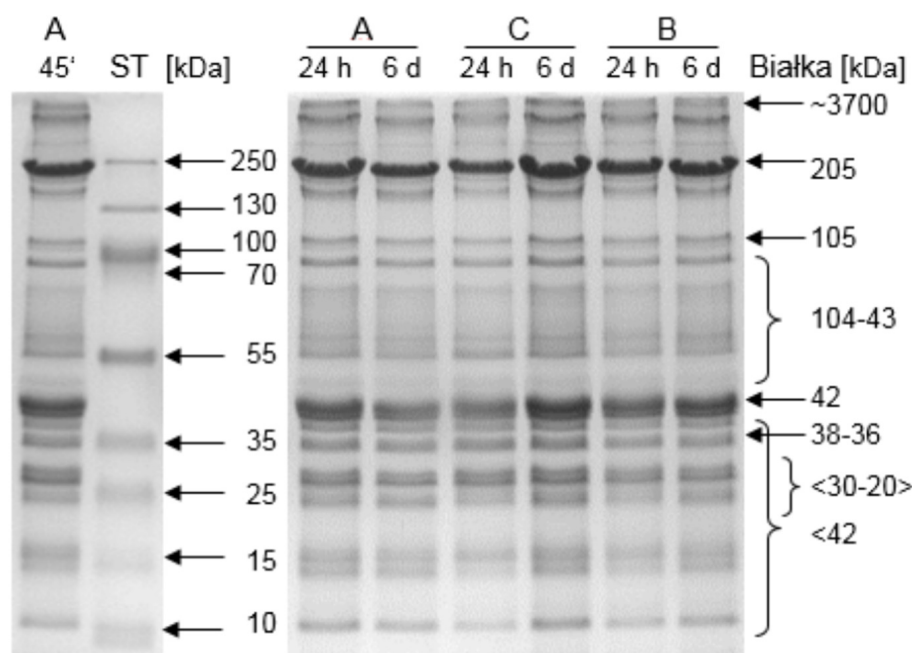
5.1.4. Określenie wpływu szybkości wychładzania mięśni wieprzowych i czasu przechowywania na zmiany udziału białek na podstawie SDS-PAGE i metody Western blot

Chociaż badania nad wpływem różnych czynników, np. elektrostymulacji (Kim i in., 2013b), temperatury procesu dojrzewania (Rees i in., 2003a), jakości (Montowska i in., 2009; Żelechowska i in., 2012) i pH końcowego mięsa (Grześ i in., 2017; Wu i in., 2014b) oraz genotypu (Laville i in., 2009b) na obecność i zmiany udziału białek mięśniowych są przedmiotem licznych doniesień literaturowych, wiele aspektów w tym zakresie nadal wymaga uzupełnienia. Jednym z nich jest poszukiwanie odpowiedzi na coraz częściej zadawane pytanie, czy i w jaki sposób proces wychładzania wpływa na zmiany udziału białek mięśniowych i jakie jest ich oddziaływanie na właściwości mięsa kulinarnego oraz przeznaczonego do przetwórstwa. Celem niniejszego rozdziału było określenie zmian udziału wybranych białek miofibrylarnych oraz białek występujących we frakcji wycieku wirówkowego i powiązanie ich z oddziaływaniem na cechy jakościowe, w tym wodochłonność i kruchość mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością.

Zmiany udziału białek mięsa wieprzowego wyznaczone na podstawie SDS-PAGE

Białka mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością rozdzielono, wykorzystując technikę elektroforezy jednokierunkowej, w 15% żelach poliakrylamidowych z SDS i 8M mocznikiem (SDS-PAGE) (rys. 5, tab. 10) (Pospiech i in., 2003c). Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego białek mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością podczas składowania w warunkach chłodniczych przedstawiono na rysunku 5. Na żelu zaznaczono masy cząsteczkowe zastosowanego standardu jak również umiejscowienie białek opisywanych w literaturze, tj. titiny (~3700 kDa), miozyny (205 kDa), α -aktyniny (105 kDa), aktyny (42 kDa), troponiny-T (Tn-T) (38–36 kDa) oraz zakresy białek analizowane w niniejszej pracy w wyznaczonych przedziałach mas cząsteczkowych.

Udział procentowy pasma o masie 3700 kDa, wskazywanego jako titina, kształtował się na poziomie od 5,44% do 6,20%, odpowiednio w próbie B po 24 h i w mięśniach C po 6 dniach (tab. 10). Nie wykazano wpływu szybkości wychładzania na występowanie powyższego białka. W drugim terminie analiz różnice – szczególnie między próbami A i B – były nieznaczne. Nieco większy udział tego pasma (6,20%) stwierdzono po 6 dniach w mięśniach wychładzanych najszybciej. Jednak była to wielkość nieistotna statystycznie w odniesieniu do pozostałych prób. Titina jest głównym białkiem cytoszkieletu włókien mięśniowych, wyróżnia się największą masą cząsteczkową spośród wszystkich białek mięsa. Jest bardzo podatna na proces degradacji w czasie poubojowego dojrzewania. Podobne rezultaty w mięsie cechującym się typową kruchością – tzn. twardym po 48 h i kruchym po



Rys. 5. Rozdział elektroforetyczny białek mięsa schładzanego ze zróżnicowaną szybkością. A (0,12°C/min), 45 min; ST – standard; A 24 h, 6 dni; C (0,27°C/min) 24 h, 6 dni; B (0,15°C/min) 24 h, 6 dni. Strzałki po lewej stronie odnoszą się do białek standardu, strzałki po prawej stronie wskazują wybrane pasma analizowanych białek, klamry obrazują zakresy

Fig. 5. Electrophoretic separation of proteins of meat cooled at different rates. A (0.12°C/min), 45 min; ST – standard; A 24 hours, 6 days; C (0.27 °C/min) 24 hours, 6 days; B (0.15°C/min) 24 hours, 6 days. The arrows on the left side refer to the proteins of the standard, the arrows on the right side indicate the selected bands of the analysed proteins, the curly brackets show the ranges

144 h (5,31–5,53%) – uzyskali Grześ i in. (2017), porównując mięśnie *longissimus dorsi* świń o zróżnicowanym przebiegu procesu kruszenia. Autorzy ci zaobserwowali istotnie większą ilość titiny (7,61%) w mięśniach charakteryzujących się największą twardością po 6 dniach przechowywania.

Udział białek o masie 205 kDa, w którego skład wchodziła najprawdopodobniej głównie miozyna, mieścił się w przedziale od 15,42% po 24 h dla prób C wychładzanych najszybciej do 17,91% dla mięsa B, również w tym terminie. Po 24 h wykazano istotne oddziaływanie szybkości wychładzania na ilość tego białka. Próby B (0,15°C/min) cechował istotnie większy (17,91%) udział pasma o masie 205 kDa, w porównaniu z wartością 15,42% uzyskaną dla mięśni C (0,27°C/min). Próby wychładzane najwolniej charakteryzowała wartość pośrednia. Po 6 dniach składowania jego wielkość w mięsie wychładzanym z szybkością 0,15°C/min zmniejszyła się do ilości 15,85%.

Tabela 10. Zmiany udziału wybranych białek mięsa wychładzanego z różną szybkością, rozdzielonych w 15% żelach poliakrylamidowych (SDS-PAGE)
Table 10. Changes in the proportion of selected meat proteins cooled at different rates, separated in 15% polyacrylamide gels (SDS-PAGE)

Masa cząsteczkowa Molecular weight (kDa)	Białka Proteins	Szybkość wychładzania Cooling rate						Ogółem Total N = 15	Wartość p p value
		45 min		24 h					
		A (0,12°C/min)	A (0,12°C/min)	A (0,15°C/min)	B (0,15°C/min)	C (0,27°C/min)	C (0,27°C/min)		
~3700	titina	6,00 ± 1,85	5,73 ± 0,72	5,44 ± 1,35	5,57 ± 0,77	5,58	5,58	0,90	
205	miozyna	16,88 ± 2,38	17,14 ^{ab} ± 0,79	17,91 ^a ± 0,88	15,42 ^{b*} ± 1,85	16,82	16,82	0,05	
105	α-aktymina	6,32 ± 0,89	6,90 ± 0,63	6,46 ± 0,47	6,65 ± 0,47	6,67	6,67	0,44	
42	aktyna	17,20 ± 1,41	16,18 ± 0,86	16,10 ± 1,12	16,24 ± 1,43	16,18	16,18	0,98	
38–36 kDa	troponina-T	4,62 ± 1,10	5,41 ± 0,94	4,10 ± 1,01	5,24 ± 1,67	4,92	4,92	0,24	
<104–43>		10,00 ± 1,54	9,72 ^b ± 0,61	11,63 ^a ± 1,07	11,33 ^{ab} ± 1,50	10,89	10,89	0,04	
<30–20>		6,29 ± 0,99	6,42 ± 1,41	6,01 ± 0,74	6,01 ± 0,51	6,15	6,15	0,74	
<42		40,70 ± 3,25	41,27 ± 2,25	39,30 ± 3,37	42,03 ± 2,45	40,87	40,87	0,30	
		6 dni							
~3700	titina	5,75 ± 1,09	5,67 ± 1,46	5,67 ± 1,46	6,20 ± 1,07	5,85	5,85	0,74	
205	miozyna	16,90 ± 0,88	15,85 ± 0,60	15,85 ± 0,60	16,78 ± 0,91	16,51	16,51	0,12	
105	α-aktymina	6,75 ± 0,76	6,09 ± 0,21	6,09 ± 0,21	6,87 ± 0,54	6,57	6,57	0,09	
42	aktyna	17,58 ^{a*} ± 0,65	18,12 ^a ± 0,83	18,12 ^a ± 0,83	14,91 ^b ± 1,24	16,87	16,87	0,00	
38–36	troponina-T	4,63 ^a ± 0,36	3,59 ^b ± 0,51	3,59 ^b ± 0,51	3,98 ^{ab} ± 0,47	4,07	4,07	0,01	
<104–43>		10,43 ± 1,03	11,48 ± 0,25	11,48 ± 0,25	10,70 ± 0,81	10,87	10,87	0,13	
<30–20>		6,06 ± 1,05	6,47 ± 0,94	6,47 ± 0,94	6,15 ± 1,16	6,23	6,23	0,81	
<42		40,32 ± 0,77	39,90 ± 2,08	39,90 ± 2,08	41,00 ± 2,41	40,40	40,40	0,65	

^{a,b}Wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) względem szybkości wychładzania.

^{a,b}Average values in rows marked with different indexes differ statistically substantially ($p \leq 0,05$) in relation to the cooling rate.

Tabela 11. Wpływ szybkości wychładzania (W), czasu przechowywania (T) oraz ich interakcji na zmiany udziału białek mięsa

Table 11. Influence of the cooling rate (W), storage time (T) and their interaction on changes in the proportion of meat proteins

Udział pasma Band proportion (%)	Białka Proteins	Szybkość wychładzania Cooling rate W	Czas przechowywania Storage time T	Interakcja Interaction W × T
~3700 kDa	titina	NS	NS	NS
205 kDa	miozyna	NS	NS	*
105 kDa	α-aktywnina	NS	NS	NS
42 kDa	aktywna	**	NS	**
38–36 kDa	troponina-T	*	*	NS
<104–43> kDa		**	NS	NS
<30–20> kDa		NS	NS	NS
<42 kDa		NS	NS	NS

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

Tabela 12. Współczynniki korelacji między udziałem wybranych białek mięśniowych a wartością pH i właściwościami mięsa w czasie przechowywania

Table 12. Coefficients of correlation between the proportion of selected muscle proteins and the pH value and properties of the meat during storage

Masa cząsteczkowa Molecular weight (kDa) N=30	Białka Proteins	Wartość pH pH value (24 h i 6 dni)	Ubytek przechowywalniczy Storage loss (%)	Ubytek termiczny Thermal loss (%)	Wodochłonność Centrifugal drip (%)	Kruchość WBSF (N/cm ²)
~3700 kDa	titina	0,09 ^{NS}	0,26 ^{NS}	-0,12 ^{NS}	-0,10 ^{NS}	0,19 ^{NS}
205 kDa	miozyna	0,02 ^{NS}	-0,09 ^{NS}	-0,35 ^{NS}	-0,01 ^{NS}	-0,02 ^{NS}
105 kDa	α-aktywnina	0,36*	-0,39*	0,06 ^{NS}	-0,03 ^{NS}	-0,04 ^{NS}
42 kDa	aktywna	0,16 ^{NS}	0,13 ^{NS}	-0,41*	-0,18 ^{NS}	-0,42*
38–36 kDa	troponina-T	-0,09 ^{NS}	-0,45*	-0,04 ^{NS}	0,50*	0,08 ^{NS}
<104–43> kDa		-0,33 ^{NS}	0,12 ^{NS}	0,10 ^{NS}	0,05 ^{NS}	0,07 ^{NS}
<30–20> kDa		0,13 ^{NS}	-0,16 ^{NS}	-0,06 ^{NS}	-0,26 ^{NS}	-0,24 ^{NS}
<42 kDa		-0,03 ^{NS}	-0,17 ^{NS}	0,37*	0,19 ^{NS}	0,11 ^{NS}

* $p \leq 0,05$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono istotny wpływ interakcji szybkości wychładzania i czasu przechowywania na zmiany białek o masie 205 kDa (tab. 11). Odnotowany najmniejszy udział pasma o masie 205 kDa w próbkach C 24 h po uboju mógł być spowodowany wolniejszą degradacją titiny, co potwierdziły dalsze badania z wykorzystaniem immunoblotingu (rys. 8, tab. 18). W skład pasma 205 kDa mogły wchodzić produkty degradacji pochodzące od titiny, obserwowane we wcześniejszych badaniach (Pospiech i in., 2000; Szalata i in., 2005). Przyczyną powyższej obserwacji mogły być także: wypadanie miozyny ze struktur cytoszkieletu włókien mięśniowych lub destrukcja mostków poprzecznych stanowiących połączenie pomiędzy aktywną i miozyną, czego konsekwencją było pojawienie się łańcuchów ciężkich miozyny we frakcji wycieku wirówkowego, co zaobserwowano podczas identyfikacji białek przy wykorzystaniu techniki Western blot (rys. 9, tab. 19).

Pasma o masie 105 kDa odpowiada przede wszystkim α -aktynie, która jest głównym składnikiem dysku Z i wiąże się z filamentami aktyny oraz białkami strukturalnymi w celu stabilizacji cytoszkieletu, odgrywając ważną rolę w procesie proteolizy (Berman i North, 2010). Jego udział mieścił się w przedziale od 6,09% do 6,90% (rys. 5, tab. 10). Zmiany udziału α -aktyny były niewielkie i nie stwierdzono wpływu zastosowanej szybkości wychładzania oraz czasu przechowywania na jej ekspresję. Zmniejszenie ilości α -aktyny po 6 dniach – szczególnie w przypadku prób A i B – może wskazywać na degradację linii Z wraz z wydłużeniem czasu przechowywania. Rezultaty te są zgodne z danymi wskazującymi na niewielkie zmiany udziału tego pasma w mięsie bydła czterech ras (holsztyno-fryzyjskiej, polskiej czerwonej, hereford i limousine) oraz w różnych mięśniach podczas dojrzewania (Iwanowska i in., 2011; Zając i in., 2016). Wyniki własne uzyskane w niniejszej pracy są zbieżne z opracowaniami dotyczącymi wpływu jakości mięsa na zmiany udziału jego białek. Podobny udział α -aktyny, na poziomie 6,14–6,56% w mięsie normalnej jakości, wodnistym i kwaśnym przedstawili Żelechowska i in. (2012), nie wykazując jednocześnie oddziaływania zróżnicowanej jakości na ekspresję tego białka (Żelechowska i in., 2012). Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano istotną dodatnią zależność między udziałem α -aktyny a wartością $\text{pH}_{24\text{h}}$ ($r = 0,36$; $p \leq 0,05$), co jest zgodne z obserwacjami innych autorów, którzy odnotowali powyższą zależność, jednak na nieco wyższym poziomie ($r = 0,63$; $p \leq 0,05$) (Żelechowska i in., 2012).

Udział aktyny, białka o masie 42 kDa w mięsie wychładzanym ze zróżnicowaną szybkością w czasie 6-dniowego przechowywania przyjmował wartości od 14,91% do 18,12%. Wyniki uzyskane po 24 h różniły się nieznacznie i wynosiły od 16,10% (A) do 16,24% (C). Po 6 dniach wykazano istotne zróżnicowanie w udziale tego białka związane z wpływem szybkości wychładzania. Jego znacząco mniejszy udział odnotowano w próbach C wychładzanych najszybciej (14,91%) w porównaniu z mięsem prób A (17,58%) i B (18,12%). Ponadto obserwowano istotne obniżenie ilości powyższego białka wraz z wydłużeniem czasu przechowywania chłodniczego mięśni B (0,15°C/min) z 16,10% do 18,12%, a nawet prób A (0,12°C/min) z 16,18% do 17,58%. Dla wszystkich analizowanych prób wykazano istotną ujemną korelację pomiędzy udziałem aktyny a ubytkami termicznymi i kruchością mięsa $r = -0,41$ i $r = -0,42$ ($p \leq 0,05$) (tab. 12). Ponadto po 6 dniach stwierdzono istotną ujemną zależność pomiędzy udziałem aktyny a ubytkami termicznymi i kruchością $r = -0,75$ i $r = -0,55$ ($p \leq 0,05$) (tab. 13).

Żelechowska i in. (2012) stwierdzili po 48 h podobny udział aktyny od 16,8% do 17,46% w mięsie świń o zróżnicowanej jakości RFN, PSE i kwaśnym. Nieco większą jej ilość 18,5% do 21,8% w mięśniach cieląt, jałówek i krów obserwowali Kołczak i in. (2003). Mniejszy udział tego pasma białek może wynikać z faktu, że w badaniach własnych mięso rozdzielone elektroforetycznie zawierało zarówno białka miofibrylarne, jak i sarkoplazmatyczne, natomiast Kołczak i in. (2003) analizowali próbki, które stanowiły wyekstrahowane białka miofibrylarne. Ponadto różnice te mogą być rezultatem pochodzenia gatunkowego tkanki mięśniowej, wieku zwierząt, rodzaju analizowanych mięśni i czasu przechowywania (Kołczak i in., 2003).

Udział troponiny-T, pasma o masie 38-36 kDa wynosił 3,59–5,41%. Po 6 dniach przechowywania stwierdzono wpływ szybkości wychładzania mięśni na zmiany ilo-

Tabela 13. Współczynniki korelacji między udziałem wybranych białek mięśniowych a cechami jakościowymi mięsa po 24 h i 6 dniach przechowywania

Table 13. Correlation coefficients between the proportion of selected muscle proteins and the quality characteristics of meat after 24 h and 6 days of storage

Masa cząsteczkowa Molecular weight (kDa) N=15	Białka Proteins	Wartość pH pH value (24 h i 6 dni)	Ubytek przechowalniczy Storage loss (%)	Ubytek termiczny Thermal loss (%)	Wodochłonność Centrifugal drip (%)	Kruchość WBSF (N/cm ²)
		24 h	2 dni	2 dni	24 h	2 dni
~3700	titina	0,07 ^{NS}	0,19 ^{NS}	-0,38 ^{NS}	-0,24 ^{NS}	0,07 ^{NS}
205	miozyna	0,02 ^{NS}	0,18 ^{NS}	-0,47 ^{NS}	-0,38 ^{NS}	-0,18 ^{NS}
105	α-aktylina	0,00 ^{NS}	-0,45 ^{NS}	0,05 ^{NS}	-0,29 ^{NS}	-0,14 ^{NS}
42	aktyna	0,18 ^{NS}	0,14 ^{NS}	-0,15 ^{NS}	0,01 ^{NS}	0,15 ^{NS}
38-36	troponina-T	-0,29 ^{NS}	-0,04 ^{NS}	0,18 ^{NS}	0,29 ^{NS}	0,03 ^{NS}
<104-43>		-0,18 ^{NS}	0,48 ^{NS}	0,10 ^{NS}	0,18 ^{NS}	0,21 ^{NS}
<30-20>		0,27 ^{NS}	-0,41 ^{NS}	-0,19 ^{NS}	-0,30 ^{NS}	-0,15 ^{NS}
<42		0,04 ^{NS}	-0,42 ^{NS}	0,48 ^{NS}	0,31 ^{NS}	-0,04 ^{NS}
6 dni						
~3700	titina	-0,31 ^{NS}	0,28 ^{NS}	0,02 ^{NS}	0,30 ^{NS}	0,45 ^{NS}
205	miozyna	-0,28 ^{NS}	-0,13 ^{NS}	-0,09 ^{NS}	0,32 ^{NS}	0,38 ^{NS}
105	α-aktylina	0,23 ^{NS}	-0,57*	0,20 ^{NS}	-0,05 ^{NS}	-0,07 ^{NS}
42	aktyna	0,08 ^{NS}	-0,17 ^{NS}	-0,75*	0,04 ^{NS}	-0,55*
38-36	troponina-T	-0,41 ^{NS}	-0,60*	-0,21 ^{NS}	0,48 ^{NS}	-0,25 ^{NS}
<104-43>		0,43 ^{NS}	0,11 ^{NS}	0,12 ^{NS}	-0,17 ^{NS}	-0,26 ^{NS}
<30-20>		0,51 ^{NS}	-0,32 ^{NS}	0,04 ^{NS}	-0,48 ^{NS}	-0,44 ^{NS}
<42		-0,01 ^{NS}	-0,03 ^{NS}	0,31 ^{NS}	-0,06 ^{NS}	0,04 ^{NS}

* $p \leq 0,05$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

ści troponiny-T (rys. 5, tab. 10). Istotnie więcej tego białka odnotowano w mięsie wychładzanym najwolniej A (4,63%) w porównaniu z próbami B (3,59%). Wykazano, że wraz z wydłużeniem okresu przechowywania mięsa ilość białek o masie 38–36 kDa ulegała zmniejszeniu szczególnie w mięsie wychładzanym najszybciej (tab. 10). Mniejszy udział troponiny-T w stosunku do prób A odnotowano również w próbach C (3,98%) wychładzanych najszybciej, jakkolwiek różnica ta była nieistotna. Na podstawie analizy korelacji dla wszystkich prób wykazano istotną dodatnią zależność $r = 0,50$ ($p \leq 0,05$), między udziałem tego pasma a wodochłonnością mięsa (tab. 12).

Obserwowane w miarę postępującego procesu dojrzewania zmniejszenie udziału pasma o masie 38–36 kDa mogło być związane z degradacją Tn-T. Ponieważ obraz żelu rozdzielonych białek mięsa może wynikać ze wzajemnego nałożenia się pasm białek miofibryli i sarkoplazmy (Pospiech, 1990; Huff-Lonergan i in., 2010), a niekiedy produkty rozpadu innych białek mają masę cząsteczkową zbliżoną do Tn-T (Szalata, 2003), stąd też dokonano identyfikacji tego białka z wykorzystaniem metody Western blot (rys. 10, tab. 18). Obserwacją wskazującą na związek pomiędzy zmniejszeniem ilości pasma białek o masie 36–38 kDa a degradacją proteolityczną Tn-T jest najprawdopodobniej wzrost udziału białek o masie 20–30 kDa, które zgodnie z danymi literaturowymi (Ho i in., 1994, 1997; Żelechowska i in., 2012;

Bowker i in., 2014) obejmują głównie produkty rozpadu Tn-T. Ponadto Muroya i in. (2010) sugerują, że każda z izoform Tn-T ulega degradacji do specyficznego fragmentu zależnego od metabolizmu mięśni.

Według Szalaty i in. (2005) bardziej intensywny proces degradacji białek, zwłaszcza titiny i troponiny-T, w mięśni *longissimus dorsi* świń o mniejszej mięsności w porównaniu z mięśniem pochodzącym od świń o większej mięsności może wskazywać na istnienie pewnych powiązań między tymi zmianami i szybszym procesem kruszenia w mięsie świń cechujących się mniejszą mięsnością. Głównymi czynnikami wpływającymi na proces kruszenia były mięsność świń oraz czas przechowywania mięsa po uboju. Natomiast interakcja wymienionych powyżej czynników była niewielka (Szalata i in., 2005).

Stwierdzono, że pasma charakteryzujące się masą cząsteczkową w przedziale od 104 do 43 kDa, istotnie różnicowały próby B i kontrolne A wychładzane z szybkością $0,12^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Po 24 h próby A cechowała istotnie mniejsza (9,72%) ilość białek w tym zakresie w porównaniu z wartościami obserwowanymi dla prób B (11,63%), a także C, jednak w tym wypadku różnica nie była istotna statystycznie (tab. 10). Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji wykazano istotne oddziaływanie szybkości wychładzania mięsa na udział pasm białek o masie cząsteczkowej od 104 do 43 kDa (tab. 11). W powyższym przedziale mas cząsteczkowych mogą występować białka szoku cieplnego (HSP) HSP90 i HSP70, charakteryzujące się masą cząsteczkową odpowiednio 90 i 70 kDa. Dane literaturowe wskazują na związek HSP z szybkością i stopniem apoptozy komórek mięśniowych oraz ich wpływ na zmiany strukturalne i metaboliczne podczas dojrzewania poubojowego (Picard i in., 2015; Picard i Gagaoua, 2017). Ponadto uważa się, że zmienny poziom HSP może odzwierciedlać jakość mięsa, cechy sensoryczne i jego kruchość (Picard i Gagaoua, 2017). Yu i in. (2009) podali, że słaba zdolność zatrzymywania wody (WHC) i szybsze obniżenie pH w mięśni najdłuższym grzbiecie świń były związane ze zmniejszeniem poziomu ekspresji HSP90 i HSP70, ponieważ białka te odgrywają ważną rolę w utrzymaniu przestrzennej struktury włókien mięśniowych. Temperatura jest jednym z czynników wpływających na wzrost ekspresji HSP, stąd próby B i C wychładzane szybciej wykazywały większy udział białek w przedziale 104–43 kDa, szczególnie w pierwszych godzinach po uboju.

Białkiem cytoszkieletowym mięśni szkieletowych występującym w zakresie od 104 do 43 kDa jest również desmina, której masa cząsteczkowa wynosi 53 kDa. Składa się ona z 473 aminokwasów i kodowana jest przez pojedynczy gen (DES) zlokalizowany na 2 chromosomie (Bär i in., 2004). Desmina buduje filamenty pośrednie typu III. Odpowiada za integralność i sztywność komórki mięśniowej. Wskazywana jest jako białko markerowe zdolności zatrzymywania wody. Wyższy jej poziom odnotowano w mięśni LD świń z mniejszymi ubytkami soku mięśniowego (van de Wiel i Zhang, 2007). Badania niniejszej pracy nie obejmowały jednak jej oznaczenia. Ułożenie desminy w poprzek włókna sprawia, że jej proteoliza jest istotna przy rozpatrywaniu wiązania wody (Huff-Lonergan i Lonergan, 2005). Natomiast jej oddziaływanie na kruchość jest rzadziej wskazywane, aczkolwiek nie jest bez znaczenia.

Hydroliza białek miofibrylarnych mięsa uważana jest za kluczowy czynnik odpowiedzialny za jego kruchość. Wykazano, że zaburza ona strukturę włókien mię-

śniowych i powiązana jest ze zmniejszeniem siły cięcia i wynikającą z tego poprawą kruchości mięsa (Kemp i in., 2010). Ponadto dowiedziono, że stopień degradacji białek miofibrylarnych wiąże się z mniejszą wartością siły cięcia i może być stosowany jako wskaźnik poziomu jego kruchości. Podczas dojrzewania mięsa kształtują się jego właściwości istotne zarówno dla producentów, jak i konsumentów, będące odzwierciedleniem zmian, jakim ulegają białka mięśniowe (Pospiech i in., 2003a). Zastosowanie optymalnie szybkiego wychładzania, które nie spowoduje wystąpienia skurczu chłodniczego ani zwiększonych strat soku mięśniowego, zapewnia dobrą jakość mięsa przeznaczonego na cele kulinarne (Honikel, 2004).

Inkubacja miofibryli z trzema różnymi endogennymi układami proteolitycznymi: m-kalpainą, ekstraktem enzymów lizosomalnych i proteasomem, spowodowała zwiększenie zatrzymania wody w miofibrylach. Podczas inkubacji z m-kalpainą i ekstraktem enzymów lizosomalnych desmina uległa degradacji, a multikatalityczna proteaza uwolniła α -aktynę, białko linii Z (Zeng i in., 2017). Na podstawie uzyskanych rezultatów Zeng i in. (2017) przedstawili model, w którym degradacja białek miofibrylarnych powodowała zmianę strukturalną i pozwalała na zwiększenie stopnia pęcznienia miofibryli w miarę przemieszczania wody z zewnętrznej do wewnętrznej przestrzeni włókienek. W konsekwencji sprzyja to zwiększeniu zatrzymania wody przez miofibryle i może wyjaśniać obserwowane zmniejszenie ilości soku mięśniowego w późniejszych terminach przechowywania (Huff-Lonergan i Lonergan, 2005; Zeng i in., 2017).

Obok enzymów endogennych (systemu kalpain, katepsyn i proteasomu) w proteolizę białek mięsa włączane są enzymy egzogenne. Ha i in. (2012), porównując wpływ różnych enzymów proteolitycznych na białka miofibrylarne, zaobserwowali działanie papainy ukierunkowane na titinę, nebulinę, łańcuchy ciężkie miozyny i aktynę. Pod wpływem ficyny, bromelainy czy papainy miozyna, białko-C i aktyna uległy degradacji (Maqsood i in., 2018).

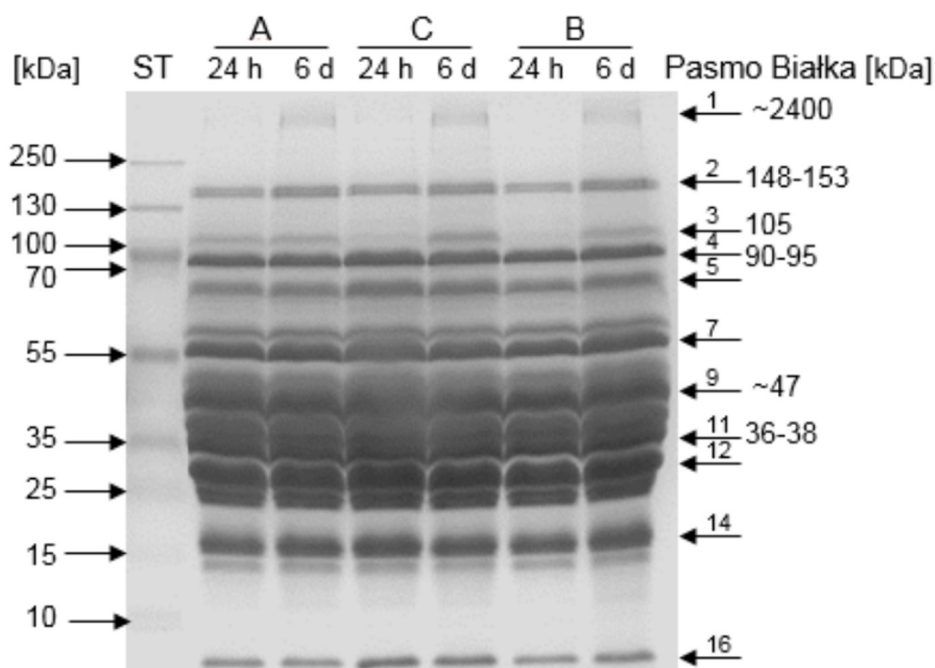
Niewątpliwą zaletą elektroforezy jest to, że pozwala ona na jednoczesną separację wielu białek. Spośród nich izoformy miozyny rozważono jako markery molekularne typu włókna mięśniowego (Bottinelli i Reggiani, 2000). Podczas skurczu mięśni izoformy miozyny współdziałają razem z innymi białkami miofibrylarnymi, zwłaszcza troponiną-T i tropomiozyną oraz ich izoformami (Bottinelli i Reggiani, 2000). Na tej podstawie wykazano, że również skład izoform białek miofibrylarnych wpływa na skurcz włókien i właściwości biochemiczne mięśni wraz z rozwojem stężenia poubojowego (Schiaffino i Reggiani, 1996; Bottinelli, 2001; Stephenson, 2001), a w konsekwencji na jakość mięsa, szczególnie wieprzowiny (Gil i in., 2003; Choi i Kim, 2009), bydła (Olivan i in., 2004; Muroya i in., 2007), królików (Ramirez i in., 2004) i owiec (Sazili i in., 2005).

Konsekwencją szybszego wychładzania był skurcz chłodniczy i w efekcie gorsza kruchość mięsa. Obserwowane po 2 dniach powolniejsze obniżenie pH w mięśniach wychładzanych szybciej mogło sprzyjać aktywności kalpain, stąd można oczekiwać bardziej rozległej proteolizy białek. Jednak aktywność kalpain zależy także od temperatury, która może spowalniać te procesy. Tak więc interakcja tych dwóch czynników, tj. pH i temperatury, prowadzi do tego, że efekt proteolizy jest trudny do zaobserwowania szczególnie wtedy, gdy badania dotyczą białek mięsa z pominięciem etapu ich frakcjonowania. Pełniejszy obraz zmian starano się uzyskać,

analizując białka frakcji wycieku wirówkowego oraz stosując metodę Western blot z przeciwciałami wybranych białek.

Zmiany udziału białek frakcji wycieku wirówkowego wyznaczone na podstawie SDS-PAGE

W skład wycieku wirówkowego wchodzi przede wszystkim białka sarkoplazmatyczne. Znajdują się w nim również białka miofibrylarne, w tym cytoszkieletowe, które przeszły do frakcji wycieku pod wpływem działania siły odśrodkowej w czasie wirowania (rys. 6, tab. 14). Obecność białek miofibrilarnych jest rezultatem zmian w tkance mięśniowej wywołanych zastosowanymi zabiegami poubojowymi oraz procesami stężenia poubojowego i następującego po nim dojrzewania. Im słabiej są one związane ze strukturą mięsa, tym więcej można ich obserwować w wycieku, a zastosowana siła odśrodkowa tylko wzmacza ten proces.



Rys. 6. Rozdział elektroforetyczny białek wycieku wirówkowego z mięsa schładzanego ze zróżnicowaną szybkością

ST – standard; A (0,12°C/min) 24 h, 6 dni; C (0,27°C/min) 24 h, 6 dni; B (0,15°C/min) 24 h, 6 dni; strzałki po lewej stronie odnoszą się do białek standardu. Strzałki po prawej stronie wskazują wybrane pasma analizowanych białek.

Fig. 6. Electrophoretic separation of centrifugal drip proteins from meat cooled at different rates

ST – standard; A (0.12°C/min) 24 h, 6 days; C (0.27°C/min) 24 h, 6 days; B (0.15°C/min) 24 h, 6 days. The arrows on the right indicate the selected bands of the analysed proteins.

Badania własne przeprowadzono na wycieku wirówkowym, który otrzymano – wykonując oznaczenie wodochłonności – w wyniku odwirowania próbki. Natomiast w literaturze charakteryzowane są częściej białka sarkoplazmatyczne soku

mięśniowego, który powstaje naturalnie podczas przechowywania surowca mięsnego (Żelechowska i in., 2012; Przybylski i in., 2016) lub pozyskiwane z mięsa po procesie ekstrakcji buforem o niskiej sile jonowej, a następnie odwirowaniu (Joo i in., 1999; Marino i in., 2014; Pomponio i in., 2018).

Na podstawie rozdziału elektroforetycznego wyznaczono zmiany udziału 16 pasm białek frakcji wycieku wirówkowego w szerokim zakresie mas cząsteczkowych – od 2400 kDa do poniżej 10 kDa (rys. 6, tab. 14). Uzyskany obraz żelu w całym zakresie mas cząsteczkowych jest zbieżny z rozdziałem elektroforetycznym białek wycieku wirówkowego przedstawionym przez Mikołajczak i in. (2005a, 2005b) oraz Montowską i in. (2009), a w przedziale 200–20 kDa do obrazu prezentowanego w pracy Di Luca i in. (2011). Natomiast w przedziale mas cząsteczkowych od 200 kDa do 15 kDa jest podobny do profilu białek soku mięśniowego pozyskanego przez Żelechowską i in. (2012) z surowego mięsa świń linii hybrydowej neckar o zróżnicowanej jakości oraz z mięsa loszek dostępnego w warunkach rzeźni komercyjnej, prezentowanego przez Pomponio i in. (2018).

We frakcji wycieku wirówkowego obserwowano charakterystyczne białka sarkoplazmatyczne, oznaczone odpowiednimi numerami analizowanych pasm: fosforylazę b (4), 6-fosfofruktokinazę (5), kinazę pirogronianową (7), enolazę (8), kinazę kreatynową (9), aldolazę (10), dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (11) oraz mioglobinę (14), występujące również w soku mięśniowym z surowego mięsa wieprzowego (Żelechowska i in., 2012; Przybylski i in., 2016; Pomponio i in., 2018), bydła (Marino i in., 2014) i wielbłądów (Maqsood i in., 2018). Wymienione białka z wyjątkiem mioglobiny oraz kinazy kreatynowej uczestniczącej w kontrakcji aktyny i miozyny są enzymami, które uczestniczą w procesie glikogenolizy zachodzącym w mięśniach po uboju.

W przypadku identyfikacji techniką spektrometrii mas białek rozdzielonych przy wykorzystaniu elektroforezy jednokierunkowej (1DE) czy dwukierunkowej (2DE) zwraca się uwagę na dwa zjawiska. Pierwsze związane jest z ekspresją wielu białek stwierdzaną w jednym paśmie/jednej plamie (Zapata i in., 2009; Żelechowska i in., 2012). Z drugiej strony produkty degradacji białek są identyfikowane w kilku prążkach/plamach charakteryzujących się mniejszą masą cząsteczkową w porównaniu z masą białek, od których pochodzą. Kilka białek czy peptydów było obecnych w więcej niż jednym prążku prawdopodobnie ze względu na obecność wielu produktów degradacji danego białka, np. kinazy kreatynowej w 4 prążkach (Purintrapiban i in., 2001), kinazy pirogronianowej w 3 czy GAPDH w 3 pasmach (Di Luca i in., 2011). Obecność łańcuchów lekkich miozyny w paśmie miozyny (MHC) tłumaczono wzajemnym połączeniem tych białek wiązaniami niekowalencyjnymi (Zapata i in., 2009). Ponadto białka o mniejszej masie cząsteczkowej przemieszczają się często razem z białkami o większej masie.

W czasie przechowywania mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością jako pierwsze na żelu pojawiała się pasmo o masie 2400 kDa, którego udział był najmniejszy spośród wszystkich analizowanych białek wycieku wirówkowego. Po 24 h jego ilość mieściła się w przedziale od 0,22% do 0,41% (tab. 14). W drugim terminie analiz, tj. po 6 dniach, białko to stawało się wyraźnie widoczne na żelu, a jego udział wynosił od 0,74% do 1,17% (rys. 6, tab. 14). W przypadku mięśni B (0,15°C/min) i C (0,27°C/min) stwierdzono jego istotnie większy udział w dru-

Tabela 14. Zmiany udziału białek wycieku wirówkowego z mięsa wychładzanego z różną szybkością, rozdzielonych w 15% żelach poliakrylamidowych (SDS-PAGE)

Table 14. Changes in the proportion of centrifugal drip proteins from meat cooled at different rates, separated in 15% polyacrylamide gels (SDS-PAGE)

Pasm Band	Masa cząsteczkowa Molecular weight (kDa)	Białka Proteins	Szybkość wychładzania – Cooling rate					Ogółem Total N = 15	Wartość p p value
			A (0,12°C/min)	B (0,15°C/min)	C (0,27°C/min)	24 h			
1			4	5	6	7	8		
1	~2400	T2/PDI1	0,37 ± 0,15	0,41 ^{B**} ± 0,15	0,22 ^B ± 0,09	0,33	0,089		
2	148–153	AG	2,90 ± 0,31	2,90 ^B ± 0,41	2,78 ^B ± 0,21	2,86	0,788		
3	103	NI	1,66 ± 0,66	1,64 ± 0,87	0,76 ± 0,35	1,35	0,087		
4	90–95	PHb/PHbK	6,77 ± 0,41	6,84 ± 0,35	6,83 ± 0,37	6,81	0,951		
5	~68	6-PFK	4,11 ± 0,31	4,54 ± 0,77	4,05 ± 0,56	4,23	0,367		
6	~61	NI	2,51 ± 0,36	2,54 ± 0,44	2,82 ± 0,45	2,62	0,461		
7	~56	PK/PGI/SA	7,20 ± 0,55	6,66 ± 0,55	7,06 ± 0,25	6,97	0,208		
8	~51	EN	3,05 ± 0,87	2,84 ± 0,94	2,70 ± 0,88	2,87	0,831		
9	~47	CK/PGAK	11,87 ± 0,98	12,51 ± 1,46	13,17 ± 1,20	12,52	0,292		
10	~42	ALD	8,29 ± 0,72	8,28 ± 1,00	9,34 ± 1,27	8,63	0,212		
11	36–38	GAPDH	11,93 ± 1,38	10,74 ± 1,46	11,40 ± 1,33	11,35	0,428		
12	~30	LDH	14,73 ± 0,86	13,84 ± 1,28	14,45 ± 0,67	14,34	0,361		
13	~23	PGAM	8,61 ± 0,59	9,13 ± 0,53	9,10 ± 0,44	8,95	0,257		
14	~17	Mb	10,50 ± 0,76	10,65 ± 0,58	10,19 ± 0,96	10,45	0,642		
15	13–14	NI	1,94 ± 0,26	2,18 ± 0,30	2,28 ± 0,30	2,14	0,189		
16	< 10	NI	3,57 ± 0,89	4,29 ± 1,41	2,86 ± 0,64	3,57	0,126		

Tabela 14 – cd.
Table 14 – cont.

1	2	3	6 dni				5	6	7	8
			4	4	4	5	6	7	8	
1	~2400	T2/PDT1	0,74	±0,29	1,17 ^A	±0,36	0,90 ^A	±0,32	0,94	0,147
2	148–153	AG	3,41 ^{b*}	±0,15	3,74 ^{ab,A}	±0,45	4,01 ^{a,A}	±0,16	3,71	0,021
3	103	NI	1,73	±0,78	1,39	±0,51	1,31	±0,28	1,47	0,469
4	90–95	PHb/PHbK	6,39	±0,47	6,27	±1,19	6,60	±0,30	6,42	0,791
5	~68	6-PFK	4,20 ^b	±0,29	4,96 ^a	±0,44	4,40 ^{ab}	±0,35	4,52	0,021
6	~61	NI	2,44	±0,35	2,77	±0,74	2,56	±0,35	2,59	0,610
7	~56	PK/PGI/SA	7,04	±0,48	6,28	±0,90	6,96	±0,28	6,76	0,141
8	~47	EN	2,51	±1,07	2,99	±1,61	2,29	±0,88	2,60	0,656
9	~42	CK/PGAK	12,09 ^{ab}	±0,57	10,79 ^b	±1,88	13,14 ^a	±1,04	12,00	0,039
10	~38	ALD	9,21	±1,05	8,50	±1,43	9,60	±0,59	9,10	0,212
11	36–38	GAPDH	12,34	±0,36	12,07	±1,87	10,90	±1,19	11,77	0,199
12	~30	LDH	13,44	±0,63	12,64	±2,00	12,41	±2,15	12,83	0,627
13	~23	PGAM	9,11	±0,40	9,65	±0,35	8,96	±0,97	9,24	0,241
14	~17	Mb	10,42	±0,53	10,85	±0,82	10,62	±0,63	10,63	0,607
15	13–14	NI	1,95 ^b	±0,39	2,51 ^a	±0,13	1,99 ^{ab}	±0,37	2,15	0,028
16	< 10	NI	3,57	±0,89	3,46	±0,43	3,35	±0,65	3,41	0,981

^{a,b}Wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) względem szybkości wychładzania. ^AWartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) względem czasu przechowywania. Białka wyciekłe wirówkowego titina T2/produkty degradacji titiny T1, AG – amylo- α -1,6-glukozydaza, NI – niezidentyfikowane, PHb/PHbK – fosforylaza b/kinaza fosforylaza b, 6-PFK – 6-fosfofruktokinaza, PK/PGI/SA – kinaza pirogronianowa/izomeraza fosfoglukozywa/albumina surowicza, EN – enolaza, CK/PGAK – kinaza kreatyny/kinaza fosfoglucerynianowa, ALD – aldolaza, GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, LDH – dehydrogenaza mleczanowa, PGAM – mutaza fosfoglucerynianowa, Mb – mioglobina.

^{a,b}Average values in rows marked with different indexes differ statistically substantially ($p \leq 0,05$) in relation to the cooling rate. ^AAverage values in columns marked with different indexes differ statistically substantially ($p \leq 0,05$) in relation to storage time. Centrifugal drip proteins T2/PDT1 – titin T2/titin T1 degradation products, AG – amylo- α -1,6-glucosidase PHb/PHbK – phosphorylase b/phosphorylase b kinase, PK/PGI/SA – pyruvate kinase/phosphoglucose isomerase/serum albumin, EN – enolase, CK/PGAK – creatine kinase/phosphoglycerate kinase, ALD – aldolase, GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, LDH – lactate dehydrogenase, PGAM – phosphoglycerate mutase, Mb – myoglobin, NI – unidentified.

gim terminie analiz. Zwiększył się on odpowiednio z 0,41% do 1,17% i z 0,22% do 0,90%. Mięso B wychładzane z szybkością pośrednią wyróżniało się największym udziałem białek o największej masie. Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariacji wykazano istotny wpływ czasu przechowywania na zmiany intensywności białek o masie 2400 kDa (tab. 15).

Tabela 15. Wpływ szybkości wychładzania (W), czasu przechowywania (T) oraz ich interakcji na zmiany udziału białek frakcji wycieku wirówkowego z mięsa

Table 15. Influence of cooling rate (W), storage time (T) and their interaction on changes in the centrifugal drip protein fraction from meat

Pasmo Band	Masa cząsteczkowa Molecular weight (kDa)	Szybkość wychładzania Cooling rate W	Czas przechowywania Storage time T	Interakcja Interaction W × T
1	~2400	NS	***	NS
2	148–153	NS	***	**
3	103	NS	NS	NS
4	90–95	NS	NS	NS
5	~68	*	NS	NS
6	~61	NS	NS	NS
7	~56	*	NS	NS
8	~51	NS	NS	NS
9	~47	NS	NS	NS
10	~42	NS	NS	NS
11	36–38	NS	NS	NS
12	~30	NS	***	NS
13	~23	NS	NS	NS
14	~17	*	NS	NS
15	13–14	*	NS	NS
16	<10	NS	NS	NS

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

Stwierdzono również istotną ujemną zależność pomiędzy udziałem pasma o masie 2400 kDa a wielkością wycieku wirówkowego i siłą cięcia $r = -0,78$ i $r = -0,50$ ($p \leq 0,05$) oraz dodatnią korelację $r = 0,52$ ($p \leq 0,05$) z ubytkami przechowalniczymi (tab. 16). W pierwszym terminie analiz dla wszystkich mięśni schładzanych z różną szybkością wykazano istotną ujemną korelację między udziałem pasma o masie 2400 kDa a wielkością wycieku wirówkowego po 24 godzinach ($r = -0,71$; $p \leq 0,05$) oraz kruchością mięsa po 2 i 6 dniach przechowywania (odpowiednio $r = -0,70$ i $r = -0,55$; $p \leq 0,05$) (tab. 17).

Wyniki badań własnych po 6 dniach składowania w warunkach chłodniczych mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością (udokumentowane metodą Western blot i opisane w następnym podrozdziale) wskazują na obecność w tym zakresie masy cząsteczkowej produktów degradacji titiny. Tym samym można sugerować, że związane są ze zmianami strukturalnymi włókien mięśniowych podczas dojrzewania. Podobnie Pomponio i in. (2018) obserwowali występowanie we frakcji sarkoplazmatycznej białek o masie powyżej 250 kDa, jednak dopiero w drugim tygodniu składowania mięsa świń w temperaturze ok. -1°C . Ponadto pasma te były wyraźnie widoczne, aż do 10 tygodnia przechowywania. Cytowani autorzy sugerowali, że powyższe pasma mogły stanowić rozpuszczalne peptydy powstające z hydrolizy białek o wyższej masie cząsteczkowej lub usieciowane białka po procesach utleniania (Estévez, 2011; Pomponio i in., 2018).

Tabela 16. Współczynniki korelacji pomiędzy udziałem wybranych białek wycieku wirówkowego a wartością pH i właściwościami mięsa w czasie przechowywania

Table 16. Correlation coefficients between the proportion of selected centrifugal drip proteins and the pH value and properties of meat during storage

Białka Proteins N = 30	Wartość pH pH value 2 h i 24 h	Zawartość glikogenu Glycogen content 2 h i 24 h	Zawartość kw. mlek. Lactic acid content 2 h i 24 h	Wartość pH pH value 24 h and 6 days	Ubytek przechowa- niczy 2 i 6 dni Storage loss 2 and 6 days (%)	Ubytek termiczny 2 i 6 dni Thermal loss 2 and 6 days (%)	Wodochłonność 24 h i 6 dni Centrifugal drip 24 h and 6 days (%)	Kruczość 2 i 6 dni WBSF 2 and 6 days (N/cm ²)
1	0,52*	-0,54*	0,52*	0,19NS	0,52*	0,04NS	-0,78*	-0,50*
2	0,61*	-0,38*	0,61*	-0,08NS	0,68*	0,31NS	-0,81*	-0,19NS
3	-0,08NS	-0,09NS	-0,08NS	0,36*	-0,18NS	-0,32NS	-0,35NS	-0,58*
4	-0,21NS	0,29NS	-0,21NS	-0,09NS	-0,01NS	0,05NS	0,31NS	0,37*
5	0,36NS	-0,45*	0,36NS	0,00NS	0,42*	-0,30NS	-0,37*	-0,12NS
6	0,02NS	-0,12NS	0,02NS	0,14NS	-0,24NS	0,04NS	-0,04NS	-0,01NS
7	-0,08NS	0,33NS	-0,08NS	-0,50*	-0,13NS	0,27NS	0,40*	0,37*
8	-0,34NS	0,10NS	-0,34NS	0,46*	-0,46*	-0,07NS	0,04NS	-0,29NS
9	0,01NS	0,11NS	0,01NS	-0,28NS	0,11NS	0,22NS	0,30NS	0,62*
10	0,24NS	-0,01NS	0,24NS	-0,27NS	0,11NS	0,47*	-0,05NS	0,17NS
11	0,20NS	0,04NS	0,20NS	-0,31NS	-0,10NS	0,06NS	0,03NS	-0,23NS
12	-0,43*	0,29NS	-0,43*	0,16NS	-0,38*	-0,30NS	0,45*	0,05NS
13	0,14NS	-0,20NS	0,14NS	0,10NS	0,28NS	0,06NS	-0,30NS	-0,15NS
14	0,11NS	0,02NS	0,11NS	-0,23NS	0,29NS	0,06NS	-0,15NS	-0,01NS
15	0,21NS	-0,25NS	0,21NS	-0,02NS	0,21NS	-0,06NS	0,05NS	0,20NS
16	-0,23NS	-0,14NS	-0,23NS	0,40*	0,01NS	-0,39*	-0,12NS	-0,25NS

* $p \leq 0,05$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

Tabela 17. Współczynniki korelacji pomiędzy udziałem białek wycieku wirówkowego po 24 h i 6 dniach przechowywania a cechami jakościowymi mięsa

Table 17. Correlation coefficients between the proportion of centrifugal drip proteins after 24 h and 6 days of storage and the quality characteristics of meat

Pasma Band N = 15	Masa cząsteczkowa Molecular weight (kDa)	Wartość pH pH value	Ubytek przechowalniczy Storage loss (%)	Ubytek termiczny Thermal loss (%)	Wodochłonność Centrifugal drip (%)	Kruchość WBSF (N/cm ²)
		24 h	2 dni	2 dni	24 h	2 dni
1	~2400	0,50 ^{NS}	-0,36 ^{NS}	-0,50 ^{NS}	-0,71*	-0,70*
2	148-153	0,27 ^{NS}	-0,40 ^{NS}	-0,08 ^{NS}	-0,47 ^{NS}	-0,18 ^{NS}
3	103	0,40 ^{NS}	-0,59*	-0,22 ^{NS}	-0,57*	-0,69*
4	90-95	0,15 ^{NS}	-0,06 ^{NS}	-0,39 ^{NS}	-0,21 ^{NS}	-0,00 ^{NS}
5	~68	0,02 ^{NS}	0,38 ^{NS}	-0,52*	-0,29 ^{NS}	-0,02 ^{NS}
6	~61	-0,14 ^{NS}	-0,11 ^{NS}	0,11 ^{NS}	-0,07 ^{NS}	0,27 ^{NS}
7	~56	-0,70*	0,10 ^{NS}	0,24 ^{NS}	0,45 ^{NS}	0,22 ^{NS}
8	~51	0,77*	-0,52*	0,06 ^{NS}	-0,20 ^{NS}	-0,40 ^{NS}
9	~47	-0,40 ^{NS}	0,58*	0,00 ^{NS}	0,37 ^{NS}	0,57*
10	~42	-0,51 ^{NS}	0,45 ^{NS}	0,61*	0,54*	0,46 ^{NS}
11	36-38	-0,34 ^{NS}	-0,05 ^{NS}	0,31 ^{NS}	0,23 ^{NS}	0,06 ^{NS}
12	~30	-0,08 ^{NS}	-0,34 ^{NS}	0,22 ^{NS}	0,18 ^{NS}	-0,17 ^{NS}
13	~23	0,44 ^{NS}	0,05 ^{NS}	-0,16 ^{NS}	-0,26 ^{NS}	0,18 ^{NS}
14	~17	-0,09 ^{NS}	0,04 ^{NS}	-0,17 ^{NS}	-0,19 ^{NS}	-0,10 ^{NS}
15	13-14	-0,01 ^{NS}	0,37 ^{NS}	0,02 ^{NS}	0,13 ^{NS}	0,56*
16	< 10	0,60*	-0,13 ^{NS}	-0,52*	-0,35 ^{NS}	-0,46 ^{NS}
6 dni						
1	~2400	0,39 ^{NS}	-0,34 ^{NS}	-0,63*	-0,48 ^{NS}	-0,55*
2	148-153	0,20 ^{NS}	-0,51 ^{NS}	-0,43 ^{NS}	0,18 ^{NS}	-0,13 ^{NS}
3	103	0,10 ^{NS}	-0,67*	-0,41 ^{NS}	0,20 ^{NS}	-0,44 ^{NS}
4	90-95	0,29 ^{NS}	0,15 ^{NS}	-0,34 ^{NS}	-0,23 ^{NS}	-0,22 ^{NS}
5	~68	0,16 ^{NS}	0,39 ^{NS}	-0,55*	-0,23 ^{NS}	-0,21 ^{NS}
6	~61	0,15 ^{NS}	-0,29 ^{NS}	0,03 ^{NS}	0,16 ^{NS}	0,05 ^{NS}
7	~56	-0,56*	0,10 ^{NS}	0,15 ^{NS}	0,38 ^{NS}	0,16 ^{NS}
8	~51	0,54*	-0,62*	-0,47 ^{NS}	-0,24 ^{NS}	-0,42 ^{NS}
9	~47	-0,20 ^{NS}	0,76*	0,60*	-0,09 ^{NS}	0,39 ^{NS}
10	~42	-0,23 ^{NS}	0,23 ^{NS}	0,50 ^{NS}	0,01 ^{NS}	0,54*
11	36-38	-0,55*	-0,13 ^{NS}	0,54*	0,52*	0,19 ^{NS}
12	~30	-0,20 ^{NS}	-0,40 ^{NS}	0,41 ^{NS}	0,13 ^{NS}	-0,00 ^{NS}
13	~23	0,54*	-0,02 ^{NS}	-0,29 ^{NS}	-0,36 ^{NS}	0,12 ^{NS}
14	~17	-0,05 ^{NS}	0,07 ^{NS}	-0,44 ^{NS}	0,04 ^{NS}	0,03 ^{NS}
15	13-14	0,22 ^{NS}	0,46 ^{NS}	0,07 ^{NS}	-0,09 ^{NS}	0,25 ^{NS}
16	< 10	0,44 ^{NS}	0,17 ^{NS}	-0,60*	-0,45 ^{NS}	-0,52*

* $p \leq 0,05$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

Udział białek o masie 148–153 kDa wzrastał istotnie wraz z wydłużeniem czasu przechowywania w próbach B i C wychładzanych z większą szybkością od wartości 2,90% i 2,78% do poziomu odpowiednio 3,74% i 4,01% (tab. 14). W drugim terminie badań wykazano istotnie więcej tego pasma w próbach C (0,27°C/min) w porównaniu z mięsem A wychładzanym najwolniej. W przypadku wszystkich analizowanych prób stwierdzono istotną zależność między udziałem białka o masie 148–153 kDa a ubytkami przechowalniczymi $r = 0,68$ ($p \leq 0,05$) (tab. 16). Wzrost jego udziału w czasie przechowywania jest zbieżny z obserwacjami własnymi doty-

czącymi analizy białek wycieku wirówkowego z mięsa wieprzowego o zróżnicowanej jakości (Mikołajczak i in., 2005a). W paśmie tym wcześniejsza identyfikacja wykonana przy wykorzystaniu spektrometrii mas MALDI-TOF wskazała na występowanie peptydów pochodzących od amylo- α -1,6-glikozydazy (ang. GDE glycogen debranching enzyme) (179,823 kDa) (Montowska i in., 2009). W badaniach na wołowym mięśniu *longissimus dorsi* Ylä-Ajos i Puolanne (2007) zwrócili uwagę na fakt istotnego zmniejszenia aktywności tego enzymu pod wpływem obniżenia temperatury tusz z 40°C do 4°C i jednocześnie na znaczne spowolnienie glikolizy.

Zgodnie z danymi literaturowymi pasmo to może być związane również z białkami miofibrylarnymi C i M lub stanowić produkty ich degradacji. Białka C i M regulują proces skurczu i wpływają na zmianę długości filamentu miozynowego oraz interakcję między aktyną i miozyną (Asghar i in., 1985; Sawdy i in., 2004). Uwalnianie białka C może zatem prowadzić do rozluźnienia filamentów miozynowych, zwiększenia ilości grup dostępnych na tych filamentach i w konsekwencji powodować polepszenie WHC. W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano, że większy udział białka o masie 148–153 kDa związany był z lepszą wodochłonnością mięsa $r = -0,81$ ($p \leq 0,05$) (tab. 16).

Pasmo o masie 90–95 kDa stanowi dobrze opisana w literaturze fosforylaza b (PHb). Jest to enzym klasy transferaz uczestniczący w procesie glikogenolizy. PHb uwalnia glukozę z glikogenu, tworząc glukozo-1-fosforan (Fischer i in., 1978). Końcowym produktem aktywności PHb i heksokinazy jest glukozo-6-fosforan. Według Meléndez i in. (1997) około 34,6% cząsteczek glikogenu jest bezpośrednio podatnych na degradację przez fosforylazę. Dodatkowo wyniki badań Ylä-Ajos i in. (2006, 2007) wykazały, że na aktywność fosforylasy i enzymu rozgałęziającego glikogen wpływają gatunek zwierząt, rodzaj mięśni oraz genotyp i kształtują one końcowe pH mięsa. W pierwszym terminie analiz udział fosforylasy wynosił od 6,77% w mięsie A wychładzanym najwolniej do 6,84% w próbie B (0,15°C/min). Wydłużenie czasu przechowywania wiązało się z nieznacznym zmniejszeniem ilości tego pasma. Po 6 dniach uzyskano wielkości w przedziale od 6,27% (B) do 6,60% (C) (tab. 14). W przypadku wszystkich prób wychładzanych ze zróżnicowaną szybkością wykazano dodatnią korelację między występowaniem fosforylasy b a kruchością mięsa $r = 0,37$ ($p \leq 0,05$) (tab. 16).

Otrzymane rezultaty są zgodne z danymi literaturowymi, wskazującymi na niewielkie zmiany udziału fosforylasy w mięsie o zróżnicowanej jakości, tj. normalnym, wodnistym i kwaśnym (Żelechowska i in., 2012) oraz podczas przechowywania mięsa świń w temperaturze ok. -1°C i w zakresie temp. 2–4°C (Pomponio i in., 2018). Podobne rezultaty niewielkich zmian ilości tego pasma podczas dwutygodniowego składowania w warunkach chłodniczych były obserwowane przez Mikołajczak i in. (2005b). Wykazano jednak istotnie większy udział tego białka w mięśniach wodnistych (PSE) w porównaniu z mięsem kwaśnym (Mikołajczak i in., 2005b). Wyniki badań Pietrzaka i in. (1997) udowodniły wytrącanie fosforylasy sarkoplazmatycznej na białkach miofibrylarnych, które było odpowiedzialne za zmniejszoną rozpuszczalność miozyny w mięsie indyków. Ponadto Alvarado i Sams (2004) analizując wpływ szybkości chłodzenia sugerowali, że powyższe zjawisko może służyć jako wskaźnik denaturacji białek mięśni indyków i dodatkowo powodować zmniejszenie zdolności zatrzymywania wody i siły żelowania. Bada-

nia przeprowadzone przez Alvarado i Sams (2004) wskazały, że istnieje związek między czasem i temperaturą schładzania a denaturacją białek. Kondycjonowanie immersyjne w temperaturze 30°C przez 45 i 90 min skutkowało występowaniem mięsa PSE, a efekt obniżonej jakości wydawał się związany ze zmniejszeniem rozpuszczalności fosforylasy. Stąd w celu zapobiegania problemom związanym z niską jakością mięsa zalecane było szybkie chłodzenie tusz indyków we wczesnym okresie *pm* (Alvarado i Sams, 2004). Fosforylase traktowano również jako kluczowy marker, który może wskazywać na denaturację białek i obecność mięsa PSE świń (Fischer i in., 1979; Zhu i in., 2013) oraz mięśni bydła o szybkiej glikolizie (Fischer i Hamm, 1980). Jednak Scheffler i Gerrard (2007) podali, że prawdopodobnie zmniejszenie rozpuszczalności fosforylasy nie jest głównym czynnikiem warunkującym zmieniony metabolizm w mięśniach typu PSE. Dodatkowo Boles i in. (1992) oraz Bjarnadóttir i in. (2010) wykazali, że wysoka temperatura przy obniżonej wartości pH powodowała denaturację białek, której skutkiem było obniżenie rozpuszczalności, będące wynikiem ich agregacji i wytrącania na miofibrylach. Laville i in. (2009a) zasugerowali, że modyfikacja rozpuszczalności niektórych enzymów może być związana z ich podatnością na utlenianie. W mięsie wychładzanym ze zróżnicowaną szybkością takie zjawiska również mogły występować, prowadząc do istotnie mniejszej wodochłonności oznaczonej na podstawie wielkości wycieku wirowkowego mięsa C wychładzanego najszybciej.

Badania własne, chociaż nie wskazują na istotne zmiany udziału pasma nr 7 (~56 kDa) opisywanego na podstawie źródeł literatury (Di Luca i in., 2011; Przybylski i in., 2016) jako kinaza pirogronianowa, izomeraza fosfoglukozowa, albumina surowicza, to na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji wykazano wpływ szybkości wychładzania mięsa na jego intensywność. Ponadto stwierdzono istotną zależność pomiędzy jego udziałem a wartością pH ($r = -0,50$; $p \leq 0,05$) oraz wodochłonnością i kruchością mięsa (odpowiednio $r = 0,40$ i $r = 0,37$; $p \leq 0,05$) (tab. 16).

Średni udział kinazy kreatynowej (pasma 9) po 24 h wynosił 12,52% i zmniejszył się w czasie przechowywania do 12,00% (tab. 14). Chociaż w prezentowanym doświadczeniu nie obserwowano zmian udziału kinazy kreatynowej między próbkami wychładzanymi ze zróżnicowaną szybkością, wcześniejsze badania wykazały jej istotnie większy udział w mięsie świń normalnej jakości (RFN) w porównaniu z RFN-s o spowolnionej glikolizie (Montowska i in., 2009). W przypadku wszystkich prób analizowanych po 48 h i 6 dniach stwierdzono istotną korelację między udziałem pasma 9 a kruchością mięsa $r = 0,62$ ($p \leq 0,05$) (tab. 16). Wyniki te są zbieżne z danymi uzyskanymi z analizy kanonicznej ($Cr = 0,8158$; $p \leq 0,05$) prezentowanymi przez Montowską i in. (2009). Natomiast po 6 dniach potwierdzono istotną zależność $r = 0,60$ ($p \leq 0,05$) (tab. 17) pomiędzy udziałem kinazy kreatynowej a wielkością ubytków termicznych, wykazaną również na podstawie analizy kanonicznej ($Cr = 0,8507$; $p \leq 0,05$) (Montowska i in., 2009). Van de Wiel i Zhang (2007) zaobserwowali wyższą zawartość kinazy kreatynowej (CK) w mięsie o niższym pH. Postawili oni hipotezę, że wysoka zawartość kinazy kreatynowej powoduje szybką degradację fosforanu kreatyny (CP) i przyspiesza glikolizę, co z kolei może przyczynić się do szybszego spadku wartości pH oraz skurczu mięśni. W konsekwencji obserwowana była ich niższa wodochłonność, określona

na podstawie większych ubytków soku mięśniowego. Fosforan kreatyny dyfunduje z mitochondriów do miofibryli, gdzie zapewnia energię do skurczu mięśni.

Pasmo 11 o masie 36–38 kDa odpowiada dehydrogenazie aldehydu 3-fosfoglicerynowego GAPDH. Jego średni udział w przypadku mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością w pierwszym terminie analiz wynosił 11,35% i zmienił się nieznacznie do wielkości 11,77% w czasie przechowywania. Po 6 dniach składowania w chłodni stwierdzono istotną zależność między udziałem tego pasma a wartością pH ($r = -0,55$), ubytkami termicznymi ($r = 0,54$) i wodochłonnością mięsa ($r = 0,52$; $p \leq 0,05$) (tab. 17).

Badania Okumury i in. (2003) wykazały związek między degradacją GAPDH a zmianami smakowości, zapachu i kruchości mięsa wieprzowego w czasie 20-dniowego przechowywania w temp. 4°C. Również Park i in. (2007) na podstawie oceny rozdziału elektroforetycznego (1DE SDS-PAGE) i spektrometrii mas dowiedli, że GAPDH obok troponiny I i kinazy kreatynowej, może być potencjalnym wskaźnikiem postępującej poubojowej proteolizy mięsa świń rasy landrace oraz czarnej koreańskiej. Dowiedziono, że proteoliza białek jest zależna od typu włókien, który ma znaczenie dla układu enzymów proteolitycznych (Park i in., 2007). Wcześniejsze badania oceny zmian białek wycieku wirówkowego pochodzącego z mięsa świń o zróżnicowanej jakości wykazały, że udział pasma o masie cząsteczkowej odpowiadającej GAPDH wyraźnie zmniejszał się po 2 tygodniach składowania w warunkach chłodniczych (Mikołajczak i in., 2005a). Podobne rezultaty otrzymali Pomponio i in. (2018). W mięśniach świń po pierwszym tygodniu przechowywania zarówno w temp. 2,5°C, jak i -1°C obserwowali oni znacznie słabsze pasmo GAPDH.

Badania przeprowadzone przez Kwasiborskiego i in. (2008) na mięśniu najdłuższym lędźwi świń pochodzących z krzyżówki large white × landrace wykazały, że GAPDH i albumina korelowały z wczesnopoubojową zmianą temperatury mięśni. Na tym etapie przemian reakcje glikolityczne są egzotermiczne i w związku z tym przyczyniają się do wzrostu temperatury mięśni bezpośrednio po uboju. Dotyczy to szczególnie zwierząt, które za życia były bardzo aktywne fizycznie lub miały większy udział włókien mięśniowych o metabolizmie glikolitycznym. Ich metabolizm jest szybszy, ponieważ intensywniej zachodzą reakcje glikolityczne, wzrasta także poziom GAPDH w ich włóknach (Kwasiborski i in., 2008).

Poniżej wyraźnego prążka nr 14 charakterystycznego dla mioglobiny (ok. 17 kDa), obserwowano pasmo 15, którego masa cząsteczkowa wynosiła 13–14 kDa. Jego udział po 24 h wynosił od 1,94% w mięśniach wychładzanych najwolniej do 2,28% w próbach C (0,27°C/min). Po 6 dniach przechowywania intensywność tego białka istotnie różnicowała mięśnie A (1,95%) i B (2,51%). Po 24 h wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy udziałem tego pasma a kruchością mięsa $r = 0,56$ ($p \leq 0,05$) (tab. 17). Identyfikacja tego pasma wymaga jednak dalszych badań, jakkolwiek Żelechowska i in. (2012) stwierdzili, że podobne pasmo oznaczone jako W12 o masie cząsteczkowej, poniżej mioglobiny cechowało się istotnie większą intensywnością w mięsie PSE i kwaśnym w porównaniu z RFN. Przy wykorzystaniu analizy techniką spektrometrii mas cytowani autorzy wykazali, że na pasmo to składały się łańcuchy B lub D hemoglobiny oraz białko wiążące kwasy tłuszczowe (fatty acid-binding protein, FABP) (Żelechowska i in., 2012). Sayd i in.

(2006) w ekstrakcie białek mięśniowych, a Żelechowska i in. (2012) w soku mięśniowym wyznaczyli zależność pomiędzy FABP i jasnością barwy (L^*).

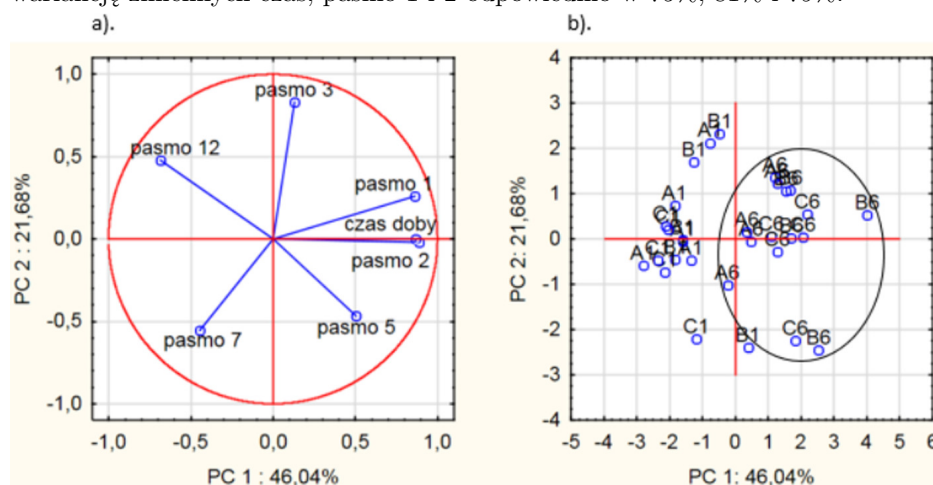
Robert i in. (1999) wykazali, że po inkubacji miofibryli z proteasomem 20S (otrzymanym z wątroby bydłowej w temp. 37°C przez 24 h) prążek α -aktyniny zanikał we frakcji miofibrylarnej, natomiast jego pojawienie się w supernatancie potwierdzono techniką Western blot. Ponadto wykazano, że multikatalityczna proteaza 20S przyczynia się w różnym stopniu do hydrolizy białek miofibrylarnych nawet o dużej masie cząsteczkowej, takich jak miozyna, filamina, aktyna i troponina-T (Robert i in., 1999). Można sugerować, że pojawiające się we frakcji wycieku wirówkowego pasmo 3 jest podobne do obserwowanej we frakcji sarkoplazmatycznej α -aktyniny po inkubacji z proteasomem. Prawdopodobnie może to świadczyć o udziale tej grupy enzymów w proteolizie białek mięsa, ich uwalnianiu i przemieszczaniu się (podczas analizy związanej z uzyskaniem wycieku wirówkowego), a także o rozpuszczalności. Zakres zmian w wyniku tego procesu zależał od szybkości wychładzania (tab. 14). W wyniku hydrolizy α -aktynina, która jest głównym składnikiem linii Z, zniknęła prawie całkowicie we frakcji miofibrylarnej i pojawiła się w supernatancie. Świadczy to prawdopodobnie o zmianach w strukturze linii Z miofibryli oraz modyfikacji oddziaływania między miozyną i aktyną (miozyny z linią Z).

Proteoliza jest wynikiem synergicznego działania różnych proteaz, zwłaszcza kalpain, katepsyn i proteasomu (Pomponio i in., 2018; Rees i in., 2002; Lamare i in., 2002; Zeng i in., 2017). Jako pierwsze działają kalpainsy aktywowane jonami wapnia Ca^{+2} , a następnie enzymy lizosomalne. Różni autorzy (Davies i Goldberg, 1987; Wenzel i Baumeister, 1993) wykazali również, że proteasom 20S bardziej wydajnie hydrolizuje utlenione lub częściowo zdenaturowane białka. Kalpainsy mogą inicjować rozerwanie i destabilizację struktur miofibrylarnych, powodując częściowe uwalnianie i denaturację białek, co umożliwia działanie katepsyn i proteasomu (Robert i in., 1999; Pomponio i Ertbjerg, 2012). Wyniki badań immunochemicznych (Li i in., 2012a; Mikami i in., 1987) oraz badań, w których zmierzono aktywność enzymów lizosomalnych (Ertbjerg i in., 1999; Wu i in., 1981) wskazują, że katepsyny są skutecznie uwalniane z lizosomów *pm*. Inkubacja miofibryli z katepsyną B i L spowodowała degradację białek miofibrylarnych (Baron i in., 2004; Mikami i in., 1987). Zmiany białek zachodzące w mięśniach po uboju mają charakter wielopłaszczyznowy i wieloetapowy. Z jednej strony ich proteoliza związana jest z aktywnością enzymów zależną od temperatury, wartości pH czy obecności jonów wapnia. Z drugiej strony kreowana jest przez wzajemne oddziaływanie białek tworzących strukturę cytoszkieletu.

Spośród 16 analizowanych pasm białek frakcji wycieku wirówkowego na podstawie współczynników korelacji wybrano potencjalne białka kandydujące jako wskaźniki jakości mięsa. Wyznaczono trzy pasma 1, 5 i 7, których zmiany udziału były skorelowane zarówno z niektórymi cechami jakościowymi: wartością pH, ilością glikogenu, kwasu mlekowego, jak również z ubytkami przechowalniczymi oraz wodochłonnością i/lub kruchością mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością (tab. 16). Natomiast dla pasm 2 i 12 wyznaczono istotną zależność między ich udziałem a wodochłonnością mięsa. W przypadku pasma 3 stwierdzono jego

korelację z kruchością. Wymienione wyżej pasma poddano analizie składowych głównych (PCA) (rys. 7).

Projekcja PCA analizy białek frakcji wycieku wirówkowego mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością w układzie dwóch pierwszych składowych (PC 1 = 46,04% i PC 2 = 21,68%) odpowiedzialnych za ponad 67% zmienności cech charakteryzujących mięso wychładzane ze zróżnicowaną szybkością została przedstawiona na rys. 7. Pierwsza składowa związana jest z czasem, pasmem 1, 2, 5 i 12, a druga z pasmem 7 i 3. Przeciwnie położenie wektorów pasm 5 i 12 świadczy o korelacji ujemnej. Na wykresie można wyodrębnić grupowanie prób analizowanych po 6 dniach przechowywania, natomiast nie obserwowano grupowania prób różniących się szybkością wychładzania. Na podstawie zasobów zmienności wspólnej, uwzględniając tylko dwie pierwsze składowe, wykazano, że wyjaśniają one variancję zmiennych czas, pasmo 1 i 2 odpowiednio w 75%, 81% i 79%.



Rys. 7. Analiza składowych głównych (PC 1 i PC 2) wybranych pasm białek wycieku wirówkowego z mięsa wychładzanego z różną szybkością

a) wykres współrzędnych współczynnika zmienności, b) wykres współrzędnych współczynnika w przypadku mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością A ($0,12^{\circ}\text{C}/\text{min}$), B ($0,15^{\circ}\text{C}/\text{min}$), C ($0,27^{\circ}\text{C}/\text{min}$) w czasie przechowywania

Fig. 7. Principal component analysis (PC 1 and PC 2) of selected protein bands of centrifugal drip from meat cooled at different rates

a) graph of coordinates of the coefficient of variation, b) graph of coordinates of the case coefficient: meat cooled at different rates A ($0,12^{\circ}\text{C}/\text{min}$), B ($0,15^{\circ}\text{C}/\text{min}$), C ($0,27^{\circ}\text{C}/\text{min}$) during storage

Podsumowując, wyciek wirówkowy jest dobrym źródłem nie tylko białek sarkoplazmatycznych, ale również miofibrylarnych, i odzwierciedla zmiany zachodzące podczas dojrzewania poubojowego mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością. Pasma 1, 2, 3, 5, 7 i 12 reprezentujące białka wycieku wirówkowego, pojawiające się na żelu w kolejności od największej do najmniejszej masy cząsteczkowej – takie jak titina T2 i produkty degradacji titiny T1 (1), amylo- α -1,6-glukozydaza (2), niezidentyfikowane pasmo bezpośrednio nad fosforylazą b (3), 6-fosfofruktokinaza (5), kinaza pirogronianowa (7), dehydrogenaza

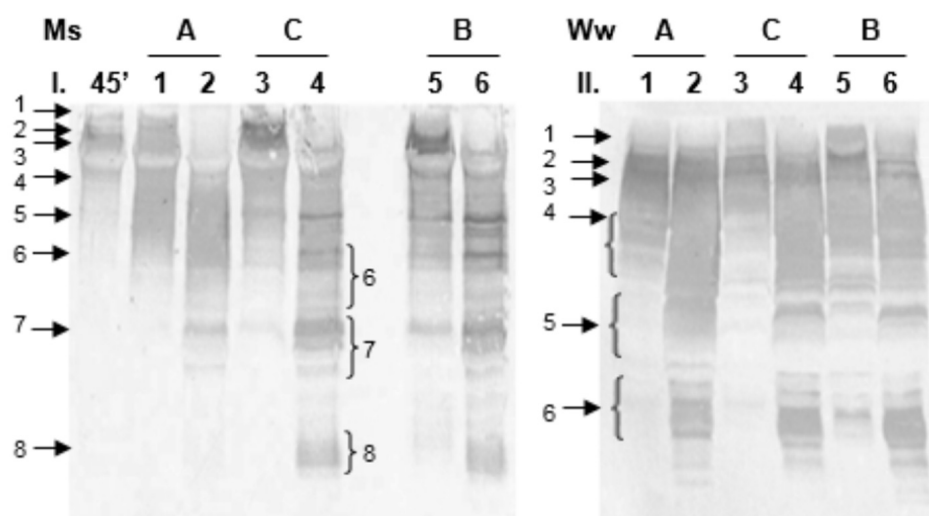
mleczanowa (12) – mogą być potencjalnymi wskaźnikami w ocenie jakości mięsa, w tym jego wodochłonności oraz kruchości. Wymaga to jednak dalszych badań w celu ich dokładnej identyfikacji oraz ustalenia, czy możliwe będzie wskazanie wzajemnie uzupełniających się grup białek odzwierciedlających cechy mięsa.

Zmiany ekspresji białek mięsa i frakcji wycieku wirówkowego wyznaczone metodą Western blot

Ocenę wpływu szybkości procesu wychładzania na zmiany ekspresji wybranych białek mięsa i wycieku wirówkowego wykonano techniką Western blot, wykorzystując specyficzną reakcję z wybranymi przeciwciałami. Próby rozdzielono w 15% żelach poliakrylamidowych z 8M mocznikiem i SDS (SDS-PAGE), o usieciowaniu, które pozwoliło obserwować białka wysokocząsteczkowe. W próbach wychładzanych ze zróżnicowaną szybkością, metodą Western blot potwierdzono obecność następujących białek: titiny, łańcuchów ciężkich miozyny (MHC), troponiny-T (Tn-T) i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) (rys. 8–11).

Rezultaty rozdziału białek mięsa uzyskane z przeciwciałem titiny, troponiny-T i MHC oraz frakcji wycieku wirówkowego dla titiny i troponiny-T przedstawiono jako procentowy udział pasma wyrażony przez objętość danego pasma w stosunku do objętości wszystkich pasm analizowanych na ścieżce rozdziału (tab. 18, 19). W programie Image Master 1D, w którym wykonano ocenę żeli i membran po analizie Western blot, objętość definiowana jest jako suma intensywności wszystkich pikseli składających się na dane pasmo i stanowi miarę jego trójwymiarowej wielkości (intensywność 3D). Western blot białek mięsa i wycieku wirówkowego z przeciwciałem GAPDH oraz miozyny we frakcji wycieku wirówkowego uwidocznił występowanie tylko jednego pasma. Stąd jego udział zawsze wynosił 100% (tab. 18, 19). Z tego powodu, w przypadku dwóch powyżej wymienionych białek wyniki wyrażono jako intensywność 3D.

Analizując obecność titiny zarówno w mięsie, jak i we frakcji wycieku wirówkowego techniką Western blot (rys. 8, tab. 18, 19), wykazano występowanie produktów jej degradacji w szerokim zakresie mas cząsteczkowych (3700–15 kDa). Wykorzystane w doświadczeniu monoklonalne przeciwciało titiny 9D10 rozpoznaje liczne epitopy tego białka, stąd obserwowana na membranie I-P ekspresja wielu pasm. W mięsie wyznaczono udziały procentowe 7 pasm po 24 h i 8 pasm lub analizowanych zakresów po 6 dniach. Natomiast w wycieku wirówkowym uzyskane rezultaty opracowano w 6 wybranych przedziałach mas cząsteczkowych. Otrzymane wyniki badań własnych są zgodne z danymi literaturowymi tłumaczącymi obserwację wielu pasm reakcją krzyżową białek mięsa z pierwszorzędowym przeciwciałem titiny 9D10 (Geesink i in., 2001). Znany jest fakt, że titina jest białkiem, które stosunkowo szybko podlega procesom degradacji w mięśniach po uboju. Titina natywna T1 o masie 3700 kDa degradowana jest w wyniku procesu proteolizy do fragmentu T2 o masie 2400 kDa oraz subfragmentu 1200 kDa (Takahashi i in., 1992). Obecność wielu produktów degradacji świadczy o zaawansowanym procesie dojrzewania. Lomiwes i in. (2014a) w celu wykazania wpływu $\alpha\beta$ -krystaliny na degradację titiny po inkubacji z μ -kalpainą (w próbkach bez dodatku $\alpha\beta$ -krystaliny), stosując przeciwciało titiny 9D10, obserwowali występowanie produktów jej



Rys. 8. Western blot z przeciwciałem titiny

I. Ms – białka mięsa, ścieżki: 45' – 45 min; 1 – A (0,12°C/min) 24 h; 2 – A 6 dni; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 dni; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B, 6 dni.

II. Ww – białka wycieku wirówkowego, ścieżki: 1 – A (0,12°C/min) 24 h; 2 – A 6 dni; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 dni; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B 6 dni. Strzałki i klamry wskazują pasma lub zakresy białek, dla których wyznaczono udziały procentowe.

Fig. 8. Western blot with the titin antibody

I. Ms – meat proteins, lanes: 45' – 45 min; 1 – A (0.12°C/min) 24 h; 2 – A 6 days; 3 – C (0.27°C/min) 24 h; 4 – C 6 days; 5 – B (0.15°C/min) 24 h; 6 – B, 6 days.

II. Ww – centrifugal drip proteins, lanes: 1 – A (0.12°C/min) 24 h; 2 – A 6 days; 3 – C (0.27°C/min) 24 h; 4 – C 6 days; 5 – B (0.15°C/min) 24 h; 6 – B 6 days. Arrows and curly brackets indicate the protein bands or ranges for which the percentages proportion were determined.

degradacji o masie 150 kDa. Inkubacja z μ -kalpainą przy obecności $\alpha\beta$ -krystatyny istotnie ograniczyła degradację titiny (Lomiwes i in., 2014a).

W mięsie pobranym 45 min po uboju stwierdzono obecność titiny natywnej T1 na poziomie 17,32%, i T2 w ilości 5,28%. Prążek 3 o masie w przedziale 1200-800 kDa był największy i stanowił 66,72%. W sumie udział powyższych pasm wynosił prawie 90% (rys. 8, tab. 18). Ponadto w mięsie tym odnotowano występowanie tylko jednego pasma oznaczonego cyfrą 4 (10,68%), poniżej łańcuchów ciężkich miozyny (MHC) o masie cząsteczkowej wyznaczonej w zakresie 200–180 kDa. Wydłużenie czasu przechowywania sprzyjało uwidocznieniu większej ilości pasm o mniejszej masie cząsteczkowej.

Po 24 h przechowywania w mięsie A wychładzanym najwolniej titina i produkty jej degradacji (T1 i T2) stanowiły istotnie większy udział (6,36% i 24,48%) w porównaniu z mięsem B (1,32% i 3,12%) oraz C (0,35% i 1,49%). W terminie 24 h, czyli bezpośrednio po zakończeniu procesu wychładzania, degradacja titiny w mięsie B (0,15°C/min) i C (0,27°C/min) w porównaniu do prób A (0,12°C/min) wyróżniała się istotnie większą intensywnością pasm 4, 6 i 7, charakteryzujących

Tabela 18. Analiza densytometryczna wybranych pasm białek mięsa, otrzymanych techniką Western blot z przeciwciałami titiny, miozyny, troponiny-T i GAPDH

Białka mięsa Meat proteins	Pasma Band	Masa cz. MW (kDa)	Mięso Meat 45 min	A			B			C	Ogółem Total N = 15	Wartość p p value
				(0,12°C/min)			(0,15°C/min)					
				Udział – Proportion %								
				5			6			7		
Titina 24 h	1	3700	17,32 ±0,45	6,36 ^a ±1,63	1,32 ^b ±0,01	0,35 ^b ±0,01	2,68 ±2,98	0,006				
	2	2400	5,28 ±2,26	24,48 ^a ±4,14	3,12 ^b ±0,01	1,49 ^b ±0,10	9,67 ±11,62	0,004				
	3	1200–800	66,72 ±1,86	28,32 ^c ±2,40	59,04 ^b ±0,04	68,06 ^a ±1,28	51,81 ±18,68	0,000				
	4	200–180	10,68 ±0,06	6,74 ^b ±0,06	8,47 ^a ±0,59	8,58 ^a ±0,34	7,93 ±0,97	0,031				
	5	~100	0,00 ±0,00	34,10 ^a ±8,23	14,96 ^{ab} ±0,56	12,24 ^b ±0,87	20,43 ±11,28	0,036				
	6	60–45	0,00 ±0,00	0,00 ^b ±0,00	4,11 ^a ±0,01	4,59 ^a ±1,16	2,90 ±2,31	0,011				
	7	43–30	0,00 ±0,00	0,00 ^c ±0,00	9,00 ^a ±0,74	4,68 ^b ±0,73	4,56 ±4,03	0,000				
Titina 6 dni	1	3700		7,70 ^a ±0,57	0,58 ^c ±0,01	4,02 ^b ±0,08	4,10 ±2,32	0,000				
	2	2400		2,95 ±0,53	3,05 ±0,03	1,38 ±0,01	2,46 ±0,92	0,067				
	3	1200–800		5,94 ^b ±0,09	11,97 ^a ±0,07	6,56 ^{ab} ±0,39	8,15 ±2,97	0,000				
	4	200–180		3,93 ±0,18	3,57 ±0,04	5,60 ±1,75	4,36 ±1,24	0,249				
	5	~100		55,65 ^a ±2,26	18,07 ^b ±2,60	15,67 ^b ±2,5	29,80 ±20,12	0,000				
	6	60–45		16,92 ^a ±0,84	15,46 ^{ab} ±0,52	13,40 ^b ±0,90	15,26 ±1,69	0,044				
	7	43–30		6,93 ^b ±0,10	27,29 ^a ±0,30	31,40 ^a ±1,97	21,87 ±11,75	0,000				
	8	20–15		0,00 ^b ±0,00	20,02 ^a ±2,81	21,99 ^a ±1,87	14,00 ±10,99	0,003				

Tabela 18 – cd.
Table 18 – cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
MHC 24 h	1 2	>250 205–180	19,59 ±1,24 80,41 ±1,24	31,34 ^b ±0,64 68,66 ^a ±0,64	37,88 ^a ±1,81 62,12 ^b ±1,81	38,76 ^a ±1,08 61,24 ^b ±1,08	35,99 ±3,75 64,01 ±3,75	0,018 0,018
MHC 6 dni	1 2	>250 205–180		39,67 ±0,73 60,33 ±0,73	37,66 ±1,15 62,34 ±1,15	40,32 ±1,39 59,68 ±1,39	39,22 ±1,51 60,79 ±1,51	0,188 0,188
Tn – T 24 h	1 2 3	36–38 32 30	97,43 ±0,17 2,57 ±0,17 0,00 ±0,00	71,35 ^c ±0,75 12,46 ±1,65 16,20 ^a ±0,90	79,13 ^b ±1,11 10,86 ±1,73 10,02 ^b ±0,62	84,90 ^a ±0,43 8,27 ±0,17 6,84 ^c ±0,26	78,47 ±6,11 10,53 ±3,57 11,02 ±4,29	0,001 0,119 0,001
Tn – T 6 dni	1 2 3	36–38 32 30		28,03 ^b ±2,04 34,06 ^a ±1,51 37,92 ^a ±0,53	34,71 ^b ±1,56 32,56 ^a ±0,74 32,74 ^{ab} ±2,31	50,08 ^a ±1,13 19,27 ^b ±0,32 30,66 ^b ±0,81	37,61 ±10,19 28,63 ±7,32 33,77 ±3,53	0,002 0,001 0,032
GAPDH 24 h	1	36–38	14 365,25 ±726,06	12 562,12 ±986,94 10 245,40 ±400,41	Intensywność 3D 11 388,66 ±280,62 9 763,88 ±463,57	11 482,24 ±601,43 10 564,63 ±444,52	11 811,01 ±789,40 10 191,30 ±494,53	0,306 0,320
GAPDH 6 dni	1	36–38						

^{a,b} Wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) względem szybkości wychładzania.

^{a,b} Average values in rows marked with different indexes differ statistically substantially ($p \leq 0,05$) in relation to the cooling rate.

Tabela 19. Analiza densytometryczna wybranych pasm białek wycieku wirówkowego otrzymanych techniką Western blot z przeciwciałami titiny, miozyny, troponiny-T i GAPDH

Table 19. Densitometric analysis of selected bands of centrifugal drip proteins obtained by Western blot with titin, myosin, troponin-T and GAPDH antibodies

Białka wycieku wirówkowego Centrifugal drip proteins	Pasma Band	Masa cz. MW (kDa)	A (0,12°C/min)		B (0,15°C/min)		C (0,27°C/min)	Ogółem Total N = 15	Wartość p p value
			Udział – Proportion %		Udział – Proportion %				
Titina 24 h	1	2400-800	81,50 ^b ±1,22	66,12 ^c ±3,68	91,23 ^a ±1,28	79,61 ±11,39	0,001		
	2	200-180	13,20 ^a ±0,20	6,83 ^b ±0,69	4,21 ^c ±0,66	8,08 ±4,16	0,001		
	3	100-65	5,31 ±1,03	7,13 ±0,04	4,57 ±1,75	5,67 ±1,49	0,227		
	4	60-55	0,00 ^b ±0,00	8,56 ^a ±0,06	0,00 ^b ±0,00	2,85 ±4,42	0,000		
	5	50-40	0,00 ^b ±0,00	3,86 ^a ±0,03	0,00 ^b ±0,00	1,27 ±1,99	0,000		
	6	30-20	0,00 ^b ±0,00	7,50 ^a ±0,61	0,00 ^b ±0,00	2,50 ±3,88	0,000		
Titina 6 dni	1	2400-800	58,12 ^a ±1,04	31,79 ^c ±0,47	48,17 ^b ±0,26	46,02 ±11,90	0,000		
	2	200-180	4,58 ^b ±0,29	7,84 ^a ±0,40	5,24 ^b ±0,66	5,89 ±1,59	0,013		
	3	100-65	7,02 ^{ab} ±0,45	8,44 ^a ±0,65	6,00 ^b ±0,54	7,15 ±1,18	0,048		
	4	60-55	4,45 ^a ±0,08	6,12 ^b ±0,37	7,29 ^b ±0,08	5,95 ±1,29	0,002		
	5	50-40	3,25 ^c ±0,07	11,31 ^a ±1,03	7,65 ^b ±0,09	7,40 ±3,64	0,002		
	6	30-20	22,59 ^c ±0,45	34,51 ^a ±0,83	25,66 ^b ±0,57	27,59 ±5,56	0,000		
Tn – T 24 h	1	36-38	75,13 ^b ±1,18	83,39 ^a ±2,16	87,38 ^a ±1,36	81,96 ±5,73	0,011		
	2	32	12,83 ^{ab} ±0,05	9,53 ^b ±2,25	8,36 ^a ±1,24	10,24 ±2,37	0,113		
	3	30	12,05 ^a ±1,13	7,09 ^b ±0,09	4,27 ^c ±0,13	7,80 ±3,56	0,003		
Tn – T 6 dni	1	36-38	45,00 ^b ±4,12	70,06 ^a ±1,53	72,44 ^a ±1,98	62,5 ±13,77	0,004		
	2	32	36,89 ^a ±3,46	15,49 ^b ±1,72	22,80 ^b ±2,34	25,06 ±9,94	0,008		
	3	30	18,12 ^a ±0,66	14,46 ^b ±0,19	4,77 ^c ±0,36	12,44 ±6,18	0,000		
MHC 24 h GAPDH 24 h GAPDH 6 dni	2	205	Intensywność – Intensity 3D		3 678,12 ±3 125,40	2 846,04 ±1 752,42	0,789		
	1	36-38	2 629,29 ±1 545,14	2 230,73 ±981,49	25 790,83 ^a ±108,19	22 736,12 ±2 470,19	0,000		
	1	36-38	21 954,67 ^b ±400,19	20 462,85 ^c ±343,43	20 674,39 ^a ±176,56	18 628,78 ±2 927,68	0,002		

^{a,b} Wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) względem szybkości wychładzania.

^{a,b} Average values in rows marked with different indexes differ statistically substantially ($p \leq 0,05$) in relation to the cooling rate.

się masą cząsteczkową odpowiednio 200–180 kDa, 60–45 kDa i 43–30 kDa (tab. 18). Próby C wychładzane najszybciej cechował największy – 68,06% udział pasma 3, porównywalny z wielkością 66,72% wyznaczoną dla prób A pobranych 45 min *pm*. Ponadto pasma 5 i 7 mięśni C stanowiły mniejszy udział w porównaniu z próbami B wychładzanymi wolniej. Powyższe świadczy o istotnie mniej zaawansowanej degradacji titiny po 24 h w mięsie C wychładzanym najszybciej.

Po 6 dniach przechowywania udział pasma 1 w mięśniach B (0,15°C/min) był najmniejszy i wynosił 0,58%. Jego istotnie większą ilość 7,70% i 4,02% odnotowano odpowiednio w próbach A i C. Mięśnie B wyróżniał największy 11,39% udział pasma 3 (1200–800 kDa) oraz podobnie jak w próbach C – obecność pięciu prążków o masie w przedziale 200–15 kDa. W próbie A udział pasma 7 był istotnie mniejszy (6,93%) w porównaniu z próbami B (27,29%) i C (31,40%) oraz nie obserwowano detekcji prążka 8 o najmniejszej masie cząsteczkowej ok. 15 kDa, którego obecność stwierdzano w mięśniach B (20,02%) i C (21,99%) wychładzanych szybciej (rys. 8, tab. 18). Szybszy proces wychładzania mięsa B i C przyczynił się do uwidocznienia istotnie mniejszej intensywności pasma 5 o masie ~100 kDa oraz większej ekspresji pasm 7 i 8 o masie cząsteczkowej 43–30 kDa i 20–15 kDa w odniesieniu do prób A (0,12°C/min).

Nieco odmiennie przedstawiał się obraz wykonany metodą Western blot białek wycieku wirówkowego z przeciwciałem titiny (rys. 8, tab. 19). Po 24 h mięśnie A (81,50%) i C (91,23%) charakteryzowały się istotnie większym udziałem pasm w przedziale 1 o największej masie cząsteczkowej 2400–800 kDa w porównaniu z mięsem B (66,12%). Pasma 2 (200–180 kDa) stanowiło największy 13,20% udział w mięsie A. Jego istotnie mniejszą detekcję wykazano w próbach B (6,83%) i C (4,21%). Rozdział białek wycieku z mięśni B (0,15°C/min) wyróżniał się obecnością pasm 4, 5 i 6 o mniejszej masie cząsteczkowej w trzech wyznaczonych zakresach – odpowiednio 60–55 kDa, 50–40 kDa i 30–20 kDa, których nie obserwowano w próbach A (0,12°C/min) i C (0,27°C/min).

Natomiast w drugim terminie analiz, tj. po 6 dniach próby B (31,79%) i C (48,17%) – wychładzane szybciej – cechował istotnie mniejszy udział pasm w zakresie 1 o masie cząsteczkowej 2400–800 kDa w zestawieniu z mięsem A (58,12%) (rys. 8, tab. 19). W mięsie C wychładzanym najszybciej stwierdzono istotnie mniejszy 6,00% udział pasma 3 (100–65 kDa) oraz występowanie na podobnym poziomie pasm w zakresie 4 (60–55 kDa) w odniesieniu do prób B. Mięso B charakteryzował największy udział pasm 5 (11,31%) i 6 (34,51%). Były to wartości istotnie większe w porównaniu zarówno z próbami A (3,25% i 22,59%), jak również z C (7,65% i 25,66%).

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy są zgodne z wcześniejszymi danymi literaturowymi (Pospiech i in., 2000; Kolczak i in., 2003), wskazującymi na pojawienie się produktów degradacji titiny we frakcji wycieku wirówkowego i wzrostu ich intensywności wraz z upływem czasu przechowywania mięsa.

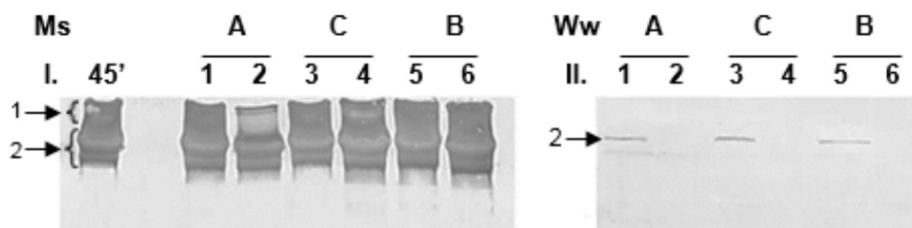
Proces wychładzania mięsa świń z różną szybkością wpłynął na ekspresję titiny analizowanej zarówno w mięsie, jak i w wycieku wirówkowym, w konsekwencji kształtując właściwości mięsa. Na podstawie powyższych obserwacji prawdopodobne jest, że szybsze wychładzanie przyczyniło się do zmiany tempa degradacji i odmiennej proteolizy titiny oraz innych białek miofibrilarnych tworzących struk-

tury cytoszkieletu włókien mięśniowych. Mechanizm tego zjawiska mógł być bardzo zróżnicowany. Z jednej strony zależał od aktywności enzymów mającej związek z temperaturą i wartością pH, obecnością jonów Ca^{2+} i zmianami fizycznymi związanymi z poubojową przepuszczalnością błon komórek miofibryli. Z drugiej strony kształtowany był kontrakcją włókien mięśniowych, przy szczególnym udziale miozyny i aktyny regulowanych przez układ wielu interakcji białko-białko. Ostatecznie znalazło to odbicie w większej twardości i gorszej wodochłonności mięśni C wychładzanych najszybciej. Wiadomo, że degradacja białek takich jak titina zależy od aktywności kalpain, enzymów proteolitycznych aktywowanych jonami Ca^{2+} (Huff-Lonergan i in., 1996; Koohmaraie i Geesink, 2006). W szczególności wykazano, że μ - i m -kalpaina przez swoją aktywność proteolityczną polepszają kruchość mięsa. Są one aktywowane w wyniku wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{+2} w konsekwencji zmian integralności sarkolemy w mięśniach *post mortem* (Goll i in., 2003).

Obserwując proces proteolizy titiny w mięsie i jej pojawienie się w wycieku wirówkowym, warto zwrócić uwagę, że zmiany białek po uboju mają charakter dynamiczny. Degradacji podlegają nie tylko molekuly natywne, jak np. titina T1, ale również produkty jej rozpadu. Nawet tak specyficzne oznaczenie, jakim jest metoda Western blot i próba ilościowego ujęcia tych przemian, są niezwykle trudne. Pasma dominujące we wcześniejszym terminie mogą zniknąć, a pojawiają się inne o mniejszej masie, które – jeśli występowały wcześniej – też podlegały tym samym procesom. Stąd też analiza ilościowa wyników uzyskanych przy zastosowaniu metody Western blot mimo swych zalet związanych z możliwością uwidocznienia występowania określonych białek w próbce może stanowić jedynie pomocne narzędzie w analizie ich proteolizy oraz oddziaływania na właściwości mięsa. Dotyczy to w szczególności interpretacji procesu proteolizy titiny, białka o bardzo dużej masie cząsteczkowej i zastosowanego unikalnego przeciwciała 9D10 rozpoznającego jej wiele epitopów. Jednak problem ten odnosi się również do innych białek i różnych metod ich detekcji.

Wyniki analizy metodą Western blot białek mięsa z przeciwciałem łańcuchów ciężkich miozyny (MHC) o masie cząsteczkowej 205 kDa wykazały obecność pasm w dwóch zakresach (rys. 9). Pierwszy z nich obserwowano nad charakterystycznym prążkiem MHC i wyznaczono jego masę cząsteczkową powyżej 250 kDa. Najprawdopodobniej stanowiły go agregaty zawierające w swoim składzie miozynę, rozpoznawane przez zastosowane przeciwciała MF20. Na powyższe zjawisko wskazują wcześniejsze prace wielu autorów (Grześ i in., 1996, 1997; Moczowska i in., 2017).

W mięsie po 45 min udział pasma 1 był najmniejszy i wynosił 19,59%, a wielkość pasma 2 o masie 205–180 kDa była ponad czterokrotnie większa i stanowiła 80,41% (tab. 18). Po 24 h intensywność pasma 1 była istotnie większa w próbach B (37,88%) i C (38,76%) w porównaniu z A (31,34%). Natomiast udział pasma 2 (205–180 kDa) w mięśniach B (62,12%) i C (61,24%) wychładzanych szybciej był istotnie mniejszy w porównaniu z próbą A (68,66%). Ilość obserwowanych agregatów wzrastała w czasie przechowywania i po 6 dniach mieściła się w przedziale od 37,66% (B) do 40,32% (C). W tym terminie ekspresja pasma 2 wynosiła średnio 60,79% i nie wykazywała istotnej zmienności w mięsie wychładzanym ze zróżnicowaną szybkością (tab. 18).



Rys. 9. Western blot z przeciwciałem miozyny

I. Ms – białka mięsa, ścieżki: 45' – 45 min Ms; 1 – A (0,12°C/min) 24 h; 2 – A 6 dni; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 dni; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B 6 dni.

II. Ww – białka wycieku wirówkowego, ścieżki: 1 – A (0,12°C/min) 24 h; 2 – A 6 dni; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 dni; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B, 6 dni. Strzałki wskazują pasma lub zakresy białek, dla których wyznaczono udziały procentowe.

Fig. 9. Western blot with the myosin antibody

I. Ms – meat proteins, lanes: 45' – 45 min Ms; 1 – A (0,12°C/min) 24 h; 2 – A 6 days; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 days; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B 6 days.

II. Ww – centrifugal drip proteins, lanes: 1 – A (0,12°C/min) 24 h; 2 – A 6 days; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 days; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B, 6 days. Arrows indicate the protein bands or ranges for which the percentages proportion were determined.

Immunoblotting białek frakcji wycieku wirówkowego z przeciwciałem łańcuchów ciężkich miozyny uwidocznili bardzo zróżnicowaną reakcję (rys. 9, tab. 19). W wycieku wirówkowym zastosowane przeciwciało MHC (MF20) reagowało tylko z jednym wyraźnym prążkiem lub reakcji nie obserwowano. Intensywność 3D analizowanego pasma wahała się w bardzo szerokich granicach i przyjmowała wartości średnie w przedziale od 2230,73 dla mięśni B do 3678,12 dla mięsa C wychładzanego najszybciej. Obecność miozyny we frakcji wycieku wirówkowego obserwowano tylko w pierwszym terminie analiz, tzn. po 24 h, bezpośrednio po zakończeniu procesu wychładzania. Po 6 dniach w wycieku wirówkowym w żadnej próbie nie stwierdzono występowania łańcuchów ciężkich miozyny (rys. 9, tab. 19).

Wyniki dotyczące łańcuchów ciężkich miozyny (MHC) uzyskane w niniejszej pracy są zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na ich zmiany degradacyjne, odnotowane na podstawie elektroforezy 2DE (Lametsch i in., 2003). Wcześniejsze doniesienia wykazały brak degradacji aktyny i degradację miozyny (MHC). Obserwowano ją tylko w mięsie utrzymywanym w podwyższonej temperaturze (ok. 30°C) (Bandman i Zdanis 1988; Huff-Lonergani in., 1995; Koohmaraie, 1994; Young i in., 1980). Lametsch i in. (2003) na podstawie zidentyfikowanych techniką spektrometrii mas, po elektroforezie 2DE, łańcuchów ciężkich miozyny oraz 11 fragmentów aktyny o masie cząsteczkowej w przedziale od 44 do 16 kDa i pH (4,52–5,55) stwierdzili, że zarówno miozyna, jak i aktyna ulegają niewielkiej degradacji *pm*. Zasugerowali jednak, że nawet niewielki stopień degradacji aktyny może osłabić siatkę miofibrylarną i w ten sposób wpływać na teksturę mięsa. Wskazano, że powyższe w szczególności sposób zależy od miejsca degradacji filamentu cienkiego. Zwrócono uwagę, że niewielka degradacja w paśmie I w pobliżu linii Z może mieć znaczący wpływ na teksturę mięsa i zmiany strukturalne istotne z punktu rozpa-

trywania jego kruchości. Nawet niewielkie rozszczepienie w obrębie domeny głowy miozyny może prowadzić do zakłócenia interakcji aktyna/miozyna i w konsekwencji objawić się osłabieniem sieci miofibrylarnej (Lametsch i in., 2002).

Zastosowane w badaniach własnych przeciwciało miozyny MF20 jest specyficzne względem jej łańcuchów ciężkich. Stosując monoklonalne przeciwciało MY-21 łańcuchów lekkich miozyny (20 kDa), Marino i in. (2014) na podstawie metody Western blot wskazali występowanie czterech łańcuchów lekkich miozyny MLCs we frakcji sarkoplazmatycznej. Uznaje się, że MLCs są składnikiem kompleksu aktomiozyny, który zapewnia integralność struktury i wytrzymałość mięsa na rozciąganie (Au, 2004). Wzrost intensywności łańcucha MLC1 we frakcji sarkoplazmatycznej wraz z wydłużeniem czasu przechowywania mięsa bydła rasy podolskiej w porównaniu z rasą holsztyno-fryzyjską wskazywały na destrukcję mostków krzyżowych w kompleksie aktomiozynowym spowodowaną przez enzymy endogenne i – jak sugerują autorzy – może być wskaźnikiem końcowej kruchości mięsa (Marino i in., 2014). Uwalnianie głównych białek miofibrylarnych do frakcji rozpuszczalnej po 21 dniach *pm* wskazywało na większą proteolizę w mięsie bydła rasy podolskiej (Marino i in., 2013). Łańcuch ciężki miozyny i aktyna to dwa białka związane z łańcuchem lekkim MLC1 (Au, 2004). Degradacja białek miofibrylarnych podczas inkubacji z μ -kalpainą była odpowiedzialna za uwolnienie MLC1 do supernatantu. Ten sam mechanizm mógł być odpowiedzialny za uwalnianie MLC1 do frakcji sarkoplazmatycznej obserwowany podczas dojrzewania wołowiny (Anderson i Lonergan, 2012). Degradacja łańcucha ciężkiego miozyny podczas dojrzewania może potencjalnie powodować uwalnianie MLC1 do frakcji sarkoplazmatycznej. Wykazano, że obecność MLC1 w kompleksie aktomiozyny wzmacnia wiązanie między aktyną i miozyną (Hayashibara i Miyanishi, 1994). Stąd uwalnianie MLC1 do frakcji rozpuszczalnej może potencjalnie osłabić siłę oddziaływania pomiędzy aktyną i miozyną. Szybkość i zakres tej reakcji w czasie pierwszych 20 godzin *pm*, wpływając na wytrzymałość wiązania aktyna/miozyna, kształtowały kruchość mięsa (Anderson i Lonergan, 2012). W innych badaniach sugerowano, że osłabienie kompleksu aktomiozyny następuje dopiero po 24 godzinach *pm* i może być ważnym czynnikiem wpływającym na kruchość w czasie przechowywania mięsa (Goll i in., 1992). Obserwowane podczas dojrzewania osłabienie wiązania między aktyną i miozyną może powodować rozerwanie mostków krzyżowych aktomiozyny i sprzyjać kruchości mięsa (Taylor i in., 1995a). Jak sugerują Anderson i Lonergan (2012), po zerwaniu wiązania aktomiozyny bezpośredni wpływ na kruchość można zauważyć w krótkim czasie *pm*. Jeżeli wiązanie zostanie tylko osłabione, ostateczne oddziaływanie na tę cechę będzie obserwowane dopiero w późniejszym okresie. Obecność MLC1 we frakcji rozpuszczalnej jest ważnym wskaźnikiem w odniesieniu do kruchości mięsa, jednak potrzebne są dalsze badania nad rolą MLC1 w stabilności aktomiozyny i mechanizmem wpływu uwalniania MLC1 na właściwości mięsa (Anderson i Lonergan, 2012). Odnosząc dane literaturowe (Anderson i Lonergan, 2012; Au, 2004; Marino i in., 2014) do rezultatów niniejszej pracy, prawdopodobne jest, że pojawienie się łańcuchów ciężkich miozyny po 24 h we frakcji wycieku wirówkowego świadczy o osłabieniu interakcji aktyna-miozyna. Zmniejszenie oddziaływania nastąpiło już w krótkim czasie *pm* i prawdopodobnie mogło być indukowane uwalnianiem jej łańcuchów lekkich.

Występowanie agregatów MHC o masie cząsteczkowej > 250 kDa opisane w niniejszej pracy jest podobne do obserwacji przedstawionych przez Wu i in. (2014b), w których zwrócono uwagę na migrację izoform łańcuchów ciężkich miozyny wraz z białkami o masie cząsteczkowej większej od MHC, takimi jak titina i nebulina oraz z produktami ich rozpadu we wczesnym okresie dojrzewania (24 h i 48 h) mięsa bydła, a także podczas jego przechowywania w chłodni (Moczkowska i in., 2017). Reakcje te intensyfikuje proces przetwórczy, czego dowodem są prace Fritza i in. (1992) oraz Grześ i in. (1996). Według Wu i in. (2014a) powyższe dowodzi, że rozpad struktury cytoszkieletu i tym samym zapoczątkowanie kruszenia mięsa rozpoczyna się w rejonie pasma A sarkomeru mięśnia.

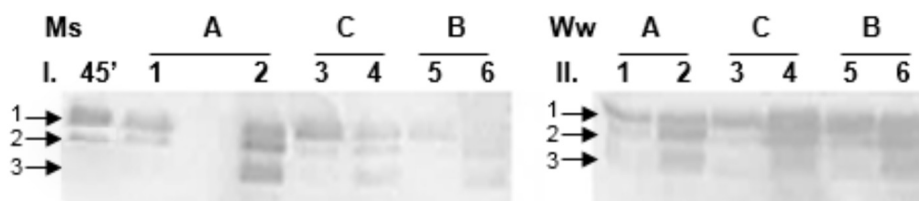
Uzyskane wyniki analizy metodą Western blot z zastosowaniem przeciwciała MF20 zwracają uwagę na dwa zjawiska. W tkance mięśniowej już 45 min po uboju zaobserwowano pasma reagujące z tym przeciwciałem, nie tylko o masie 205 kDa, ale nieco poniżej i powyżej. Szczególnie duże różnice stwierdzono, porównując próby po 45 min i 24 h, tj. po zakończeniu wychładzania. Po 24 h wzrastała wielkość pierwszego z pasm (> 250 kDa), a obniżał się udział MHC o masie 205–180 kDa. Tylko w tym samym czasie w wycieku wirówkowym stwierdzono wyraźny prążek, odpowiadający MHC o masie 205 kDa. Wskazywałoby to, że rozdziały elektroforetyczne, a następnie reakcja z przeciwciałem MF20 uwiadczenia zarówno MHC typowe, o masie 205 kDa, jak i produkty ich degradacji i agregacji. Na podstawie przeprowadzonych badań własnych trudno jednoznacznie wskazać, czy pasma o masie powyżej 250 kDa stanowiły agregaty zawierające produkty degradacji MHC, czy też miozyna tworzyła kompleksy z innymi białkami, w tym z produktami ich degradacji np. pochodzącymi od titiny. Duża ilość produktów rozpadu titiny wskazuje na możliwość takiej reakcji. Podobnie pasma poniżej masy 205 kDa mogą stanowić tylko produkty degradacji MHC, ale także kompleksy z innymi białkami.

Po 24 h w mięśniach A w porównaniu z próbami B i C stwierdzono istotnie mniej kompleksów o masie > 250 kDa, a więcej w przedziale 205–180 kDa. Szybsze wychładzanie spowodowało wzrost udziału większych agregatów. Niewielkie zmiany obserwowano po 6 dniach przechowywania mięsa, choć nieco więcej kompleksów > 250 kDa było w przypadku prób C wychładzanych najszybciej. Pojawienie się pojedynczego pasma MHC w wycieku wirówkowym tylko 24 h po uboju pozwala podejrzewać rozluźnienie głównego kompleksu tworzącego to białko, tj. aktomiozyny. Wskazuje również, że tylko niewielka ilość miozyny jest uwalniana i pojawia się w wycieku wirówkowym. Powyższe zjawisko dotyczyło wszystkich rodzajów prób niezależnie od zastosowanej szybkości wychładzania, aczkolwiek nieco większą intensywność 3D tego pasma zaobserwowano w przypadku prób C. Może to wskazywać, że szybkie wychładzanie narusza strukturę filamentu miozynowego, a fragmenty miozyny mogą wchodzić w reakcje sieciowania z innymi białkami (np. titiny) i powodować usztywnienie struktury mięsa obserwowane w postaci skurczu chłodniczego.

Badania fizykochemiczne mięsa C wychładzanego najszybciej wskazują na wystąpienie skurczu chłodniczego. Potwierdzają to przede wszystkim dane z pomiarów kruchości (WBSF), jak również wodochłonności. Zwykle omawiając skurcz chłodniczy, zwraca się uwagę na wzmożoną reakcję między aktywną i miozyną, su-

perkontrakcję tych dwóch białek. Jej efektem jest zmniejszenie rozmiarów prób, nadmierny skurcz sarkomerów i dalej włókien mięśniowych, co dokumentują badania histologiczne. Niniejsze badania wnoszą prawdopodobnie jeszcze jedną dodatkową informację, wskazującą na możliwość wyjaśnienia przyczyn skurczu chłodniczego. Stanowić ją może zwiększające się usieciowanie MHC w wyniku oddziaływania z innymi białkami, prowadzące do usztywnienia struktury.

Wyniki analizy metodą Western blot białek mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością z przeciwciałem troponiny-T uwidoczniły występowanie 2–3 immunoreaktywnych prążków o masach cząsteczkowych 38–36 kDa, 32 kDa i 30 kDa (rys. 10, tab. 18).



Rys. 10. Western blot z przeciwciałem troponiny-T

I. Ms – białka mięsa, ścieżki: 45' – Ms 45 min; 1 – A 24 h; 2 – A 6 dni; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 dni; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B 6 dni.

II. Ww – białka wycieku wirówkowego, ścieżki: 1 – A (0,12°C/min) 24 h; 2 – A 6 dni; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 dni; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B 6 dni. Strzałki wskazują pasma, dla których wyznaczono udziały procentowe.

Fig. 10. Western blot with the troponin-T antibody

I. Ms – meat proteins, lanes: 45' – Ms 45 min; 1 – A (0.12°C/min) 24 h; 2 – A 6 days; 3 – C (0.27°C/min) 24 h; 4 – C 6 days; 5 – B (0.15°C/min) 24 h; 6 – B 6 days.

II. Ww – centrifugal drip proteins, lanes: 1 – A (0.12°C/min) 24 h; 2 – A 6 days; 3 – C (0.27°C/min) 24 h; 4 – C 6 days; 5 – B (0.15°C/min) 24 h; 6 – B 6 days. The arrows indicate the bands for which the percentages proportion were determined.

Występowanie dwóch pasm o większej masie cząsteczkowej stwierdzono tylko w mięsie ocenianym 45 min *pm*. Ich udział stanowił odpowiednio 97,43% i 2,57%. Po 24 h mięśnie C wychładzane najszybciej wyróżniały się istotnie większym udziałem pasma 1 (84,90%) w porównaniu z jego ilością w mięśniach A (71,35%) i B (79,13%). W przypadku pasma 2 jego najmniejsza ilość była obserwowana w próbach po 45 min. W kolejnym terminie jego intensywność obniżała się wraz ze zwiększeniem szybkości wychładzania i mieściła się w przedziale od 8,27% (C) do 12,46% (A). Wyznaczony na poziomie 16,20% udział pasma 3 w mięsie A wychładzanym najwolniej był istotnie większy w porównaniu z jego ilością zarówno w próbach B (10,02%), jak i C (6,84%). Po 6 dniach przechowywania pod względem udziału wszystkich 3 pasm Tn-T mięso C wyróżniało się spośród analizowanych mięśni wychładzanych ze zróżnicowaną szybkością. Próby C charakteryzowały się istotnie większą intensywnością pasma 1 (50,08%), mniejszym udziałem prążka o masie 32 kDa (19,27%) i 30 kDa (30,66%) w porównaniu z próbami A i B (rys. 10, tab. 18). Udział pasma 1 Tn-T po 6 dniach przechowywania w mięsie A (28,03%) był nieco mniejszy, natomiast prążków 2 (34,06%) i 3 (37,92%) większy w odniesie-

niu do prób B i przyjmował odpowiednio wartości 34,71%, 32,56% i 32,74%. Jednak nie wskazywał na różnicowanie statystycznie istotne. Wydłużenie czasu składowania chłodniczego spowodowało zmniejszenie intensywności prążka 1 o największej masie cząsteczkowej (36–38 kDa) oraz zwiększenie udziału pasm 2 (32 kDa) i 3 (30 kDa), wskazując tym samym na postępujący proces poubojowej proteolizy mięsa.

We frakcji wycieku wirówkowego w dwóch analizowanych terminach badań (tj. po 24 h i 6 dniach) obserwowano 3 pasma o masie cząsteczkowej 38–36 kDa, 32 kDa, 30 kDa i podobnym udziale jak w przypadku analizy białek mięsa. Po 24 h ilość pasma 1 w wycieku z mięśni A była najmniejsza i wynosiła 75,13%. Istotnie więcej tego prążka charakteryzowało próby B (83,39%) i C (87,38%). Intensywność pasma 2 w mięsie wychładzanym ze zróżnicowaną szybkością różniła się nieznacznie i mieściła się w przedziale od 8,36% (C) do 12,83% (A) (rys. 10, tab. 19). Istotnie większy udział pasma 3 wyróżniał mięśnie A (12,05%) w porównaniu z próbami B (7,09%) i C (4,27%). Po 6 dniach przechowywania w próbach A obserwowano największe, prawie 60% zmniejszenie udziału pasma 1 w odniesieniu do rezultatów uzyskanych w pierwszym terminie badań. W przypadku prób B i C zmniejszenie jego udziału było istotnie mniejsze i wynosiło odpowiednio około 16% i 17%. Ponadto w próbach A stwierdzono istotnie większy udział pasma 2 (36,89%) i 3 (18,12%) w porównaniu z mięsem B (15,49% i 14,46%) oraz C (22,80% i 4,77%) (rys. 10, tab. 19). Powyższe wskazuje na powolniejszy proces degradacji Tn-T w mięśniach wychładzanych szybciej.

Troponina-T występuje jako kompleks z troponiną I i C. Wraz z tropomiozyną białka te oddziałują wzdłuż F-aktyny i odgrywają rolę w procesie skurczu (Blumenschein i in., 2005). Od dawna troponina-T uznawana jest jako wskaźnik dojrzewania mięsa (Ho i in., 1994; Szalata i in., 2005). Jej intensywniejsza degradacja związana była z czasem przechowywania i szybszym procesem kruszenia w mięsie świń charakteryzujących się mniejszą mięsnością (Szalata i in., 2005). Uważa się, że układ kalpainowy powiązany jest z kruchością wołowiny przez regulację szybkości procesu proteolizy białek, takich jak troponina-T i desmina (Huff-Lonergan i in., 2010). Prawdopodobnie poubojowa degradacja troponiny-T przez uszkodzenie struktury komórek mięśniowych wpływa na kruchość wołowiny (Contreras-Castillo i in., 2016; Cruzen i in., 2014; Wright i in., 2018; Zakrys-Waliwander i in., 2012). Podczas dojrzewania mięsa obserwowane były również degradacja i uszkodzenia oksydacyjne troponiny-T (Malheiros i in., 2019; Lana i Zolla, 2016). Tworzenie karbonyli białek łańcuchów bocznych aminokwasów przyczynia się do osłabienia konformacji białek miofibrylarnych, prowadząc do denaturacji i utraty ich funkcjonalności (Estévez, 2011).

We wcześniejszych badaniach (Iwańska i in., 2016) dotyczących porównania mięśni o różnym przebiegu procesu kruszenia obserwowano zmniejszenie udziału białek charakteryzujących się pI w przedziale 6,1–7,2 wraz z postępującym procesem poubojowej proteolizy mięsa. Ponadto analiza metodą Western blot wykazała, że białka w tym zakresie pI silnie reagowały z przeciwciałem troponiny-T, uwidaczniając produkty jej degradacji (Iwańska i in., 2016). Również wyniki prezentowane w niniejszej pracy potwierdzają udział Tn-T w kruszeniu mięsa. Ustalono, że mięso A wychładzane najwolniej, o istotnie mniejszym udziale natywnej troponiny-T

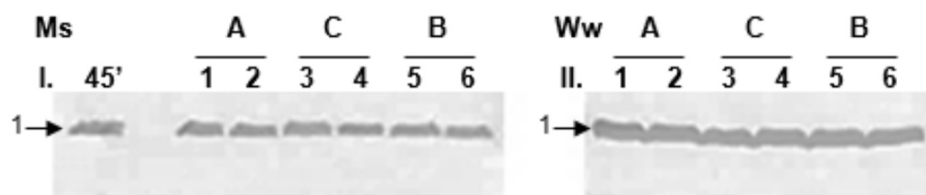
i większej detekcji produktów degradacji Tn-T (32 kDa i 30 kDa) charakteryzowało się najlepszą kruchością w dwóch analizowanych terminach badań.

Na podstawie analizy Western blot troponiny-T we frakcji sarkoplazmatycznej Marino i in. (2013, 2014) wykazali jej zróżnicowaną immunoreaktywność w mięsie różnych ras bydła, które cechowało się odmienną kruchością podczas dojrzewania. Autorzy sugerowali, że jest ona odzwierciedleniem zmian proteolitycznych zachodzących we frakcji miofibrylarnej. Uzyskane przez nich wyniki potwierdziły, że izoformy Tn-T mają różną wrażliwość podczas proteolizy poubojowej i dowodzą, że zmiany obserwowane w czasie dojrzewania mogą częściowo wynikać z różnic w aktywności enzymatycznej endogennych proteaz. Wcześniej również obserwowano obecność troponiny-T we frakcji sarkoplazmatycznej jako skutek zwiększonej rozpuszczalności indukowanej przez obróbkę wysokociśnieniową (Marcos i Mullen, 2014).

Western blot z przeciwciałem dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) wykazał obecność tylko jednego pasma w dwóch analizowanych grupach białek: mięsa i wycieku wirówkowego (rys. 11, tab. 18, 19). W mięsie wychładzanym ze zróżnicowaną szybkością na podstawie oceny ekspresji białek po immunoblotingu obserwowano zmniejszenie intensywności 3D pasma GAPDH wraz z wydłużeniem czasu przechowywania. Największą intensywność 3D pasma GAPDH 14 365,25 wyznaczono w mięśniach ocenianych 45 min *pm*. Po 24 h w próbach wychładzanych ze zróżnicowaną szybkością ilość tego białka zmieniała się nieznacznie i przyjmowała wartości średnie w przedziale od 11 388,66 (B) do 12 562,12 (A). Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie między badanymi grupami mięśni. Po 6 dniach wyznaczona intensywność tego prążka w zakresie od 9763,88 (B) do 10 564,63 (C) była zróżnicowana tylko w niewielkim stopniu i nie wykazano wpływu szybkości wychładzania na ekspresję GAPDH (tab. 18).

Ocena densytometryczna GAPDH w wycieku wirówkowym wykazała wpływ szybkości wychładzania na jej objętość w dwóch analizowanych terminach badań (rys. 11, tab. 19). Po 24 h mięso C wychładzane najszybciej charakteryzowała istotnie większa intensywność 3D pasma GAPDH w porównaniu z mięsem A i B. Podobnie po 6 dniach próby C zawierały najwięcej tego enzymu. Najmniejszą intensywność pasma GAPDH wykazywały próby B (0,15°C/min) po 24 h i 6 dniach. Wydłużenie czasu przechowywania powodowało zmniejszenie objętości 3D analizowanego enzymu, świadcząc jednocześnie o postępującym procesie dojrzewania mięsa. Zanikanie pasma GAPDH świadczyło o rozkładzie tego enzymu. Jego ilość zmniejszyła się w próbie A o ponad 16,3 punktu procentowego, a w C o 7,99 punktu procentowego.

Na podstawie analizy metodą Western blot z przeciwciałem GAPDH w mięsie wychładzanym ze zróżnicowaną szybkością wykazano istotną zależność między jej intensywnością 3D a ubytkami przechowalniczymi $r = -0,75$ ($p \leq 0,05$) i wodochłonnością oznaczoną na podstawie wielkości wycieku wirówkowego $r = 0,64$ ($p \leq 0,05$) (tab. 20). W przypadku ekspresji GAPDH we frakcji białek wycieku wirówkowego stwierdzono istotną ujemną korelację między jej objętością a ubytkami przechowalniczymi $r = -0,70$ ($p \leq 0,05$). Ponadto wykazano dodatnią zależność z wodochłonnością $r = 0,83$ ($p \leq 0,05$) i kruchością mięsa $r = 0,70$ ($p \leq 0,05$).



Rys. 11. Western blot z przeciwciałem GAPDH

I. Ms – białka mięsa, ścieżki: 45' – Ms 45 min; 1 – A (0,12°C/min) 24 h; 2 – A 6 dni; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 dni; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B 6 dni.

II. Ww – białka wycieku wirówkowego, ścieżki: 1 – A (0,12°C/min) 24 h; 2 – A 6 dni; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 dni; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B 6 dni. Strzałki wskazują pasma białek, dla których wyznaczono udziały procentowe.

Fig. 11. Western blot with the GAPDH antibody

I. Ms – meat proteins, lanes: 45' – Ms 45 min; 1 – A (0,12°C/min) 24 h; 2 – A 6 days; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 days; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B 6 days.

II. Ww – centrifugal drip proteins, lanes: 1 – A (0,12°C/min) 24 h; 2 – A 6 days; 3 – C (0,27°C/min) 24 h; 4 – C 6 days; 5 – B (0,15°C/min) 24 h; 6 – B 6 days. Arrows indicate the protein bands for which the percentages proportion were determined.

Badania Kim i in. (2013b) wykazały zmiany intensywności GAPDH we frakcjach miofibrylarnej i sarkoplazmatycznej, pozyskanych z mięsa bydła po elektrostymulacji niskonapięciowej. Według autorów były one związane z rozpuszczalnością białek. Obecność zidentyfikowanej we frakcji miofibrylarnej GAPDH sugeruje, że rozpuszczalność tego enzymu zmienia się w czasie poubojowego przechowywania mięsa (Bjarnadóttir i in., 2010; Boles i in., 1992; Laville i in., 2009b). Bjarnadóttir i in. (2010) postawili hipotezę, że zmiana rozpuszczalności może być spowodowana wytrącaniem lub agregacją białek. Z drugiej strony sugerowano, że modyfikację rozpuszczalności niektórych enzymów można łączyć z ich podatnością na utlenianie (Laville i in., 2009b).

Tabela 20. Współczynniki korelacji między intensywnością 3D GAPDH a właściwościami mięsa
Table 20. Correlation coefficients between 3D intensity of GAPDH and properties of meat

Przeciwciało GAPDH GAPDH antibody Intensywność Intensity 3D N = 30	Ubytek przechowalniczy 2 i 6 dni Storage loss 2 and 6 days (%)	Wodochłonność 24 h i 6 dni Centrifugal drip 24 h and 6 days (%)	Kruchość 2 i 6 dni WBSF 2 and 6 days (N/cm ²)
Białka mięsa Meat proteins	-0,75*	0,64*	0,27 ^{NS}
Białka wycieku wirówkowego Centrifugal drip proteins	-0,70*	0,83*	0,70*

* $p \leq 0,05$; NS – nieistotne statystycznie; NS – non-significant.

Mniejsze uszkodzenia oksydacyjne enzymów metabolizmu glikolitycznego – takich jak GAPDH, PGAM2 (mutaza fosfoglicerynowa/phosphoglycerate mutase), TPI1 (izomeraza trójfosforanowa/triosephosphate isomerase), i ENO3 (beta-eno-laza) – stwierdzono w mięsie kruchym w porównaniu z twardym (Malheiros i in.,

2019). TPI1 katalizuje odwracalną konwersję 3-fosforanu D-gliceraldehydu z dihydroksyacetonu fosforanowego i zaobserwowano, że ekspresja tego białka była podwyższona w kruchym mięsie bydła (D'Alessandro i in., 2012a; Grabež i in., 2015). Stres oksydacyjny może wyjaśniać zmiany rozpuszczalności GAPDH, która podczas dojrzewania przechodzi od rozpuszczalnych do nierozpuszczalnych agregatów (Marino i in., 2014). Zmniejszenie intensywności GAPDH w czasie przechowywania było dodatnio skorelowane z kruchością (WBSF) i ujemnie z wodochłonnością mięsa bydła (D'Alessandro i in., 2012b; Laville i in., 2009b; Marino i in., 2014). Na podstawie korelacji między cechami jakościowymi a GAPDH i innymi enzymami TPI, GPHb, CK sugeruje się, że białka te można wykorzystać jako markery aktywności proteolitycznej, stąd mogą być przydatne jako wskaźniki jakości mięsa (Di Luca i in., 2011; Lametsch i in., 2002).

Analiza metodą Western blot pozwoliła na potwierdzenie obecności wszystkich analizowanych białek: titiny, miozyny, troponiny-T oraz GAPDH w mięsie oraz we frakcji wycieku wirówkowego. Ekspresja ocenianych białek była zróżnicowana i w dużym stopniu zależała od szybkości wychładzania. Pomiarów wodochłonności i kruchości (WBSF) wskazały na wystąpienie skurczu chłodniczego w próbach C wychładzanych najszybciej. W wyjaśnieniu tego zjawiska na szczególną uwagę zasługują dwie obserwacje, tj. większy udział agregatów łańcuchów ciężkich miozyny o masie > 250 kDa w mięsie szybciej wychładzanym oraz obecność MHC w wycieku wirówkowym w terminie 24 h. Powstające z udziałem miozyny agregaty mogą sprzyjać zwiększeniu jej usieciowania z białkami tworzącymi cytoszkielet komórek i prowadzić do usztywnienia struktury włókien mięśniowych. Fakt występowania MHC we frakcji wycieku dowodzi, że tylko niewielka ilość miozyny jest uwalniana. Sugeruje, że następuje rozluźnienie aktomiozyny, czyli tworzonego przez nią podstawowego kompleksu. Powyższe obserwacje dotyczyły wszystkich rodzajów prób niezależnie od zastosowanej szybkości wychładzania. Zagadnienia związane z superkontrakcją miofilamentów miozyny i aktyny oraz oddziaływaniem środowiska, w tym również temperatury na rozmiar skurczu, jego siłę i trwałość wymagają jednak dalszych badań.

Na podstawie wyników badań przeprowadzonych w niniejszej pracy stwierdzono, że zastosowana w czasie pierwszych 24 h zróżnicowana szybkość wychładzania wpłynęła na zmiany udziału ocenianych białek. Były one wynikiem ich proteolizy, procesów degradacji i agregacji, w których istotną rolę mogły odgrywać również interakcje typu białko-białko. Na szczególną uwagę zwracają łańcuchy ciężkie miozyny, których usieciowanie prawdopodobnie w największym stopniu oddziałuje na usztywnienie struktury a także wodochłonność i kruchość mięsa.

5.2. Białka mięśniowe jako potencjalne wskaźniki jakości oraz wodochłonności i kruchości mięsa bydła RFN i z wadą DFD

5.2.1. Wprowadzenie

W prezentowanym II etapie doświadczenia – w celu weryfikacji hipotezy badawczej sformułowanej następująco: białka i peptydy są potencjalnymi wskaźnikami kruchości i wodochłonności mięsa bydła normalnej jakości (RFN) i z odchyleniem jakościowym DFD oceniono wartość pH, barwę, wielkość wycieku wirówkowego i siłę cięcia mięsa. Wykonano również analizę jego białek na podstawie elektroforezy w żelach poliakrylamidowych z SDS (SDS-PAGE) oraz techniką wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS. Ocenie poddano mięśnie bydła oraz białka i peptydy ekstraktów otrzymanych z mięsa normalnej jakości (RFN) i DFD po 10 dniach przechowywania. Celem podjętych badań było zidentyfikowanie i wskazanie potencjalnych białkowych i peptydowych markerów kruchości oraz wodochłonności mięsa o zróżnicowanej jakości.

Wada DFD z większą częstością pojawia się w mięsie bydła w porównaniu z mięsem świń. Wyczerpanie zapasów glikogenu w mięśniach przed ubojem wskazywane jest jako główny objaw występowania mięsa z odchyleniem jakościowym typu DFD (McVeigh i in., 1982; Adzitey i Nurul, 2011; Franco i in., 2015). Jego efektem jest wysoka wartość pH (pHu 12–48 h) na poziomie $\geq 6,0$ stwierdzana podczas przechowywania. Wysokie pH sprzyja większej aktywności kalpain. Przyczyną ograniczonej poubojowej glikolizy w mięśniach bydła może być długotrwały stres, związany zarówno z czynnikami wewnętrznymi, jak i zewnętrznymi. Jako czynniki wewnętrzne wskazywane są cechy genetyczne, fizjologiczne i morfologiczne włókien mięśniowych (ilość włókien czerwonych i jasnych), wiek oraz płeć. Natomiast za stresogenne stymulatory zewnętrzne uważa się temperaturę, transport, czas przetrzymywania w rzeźni, czynności okołoubojowe, obecność ludzi, brak paszy lub wody (Scheffler i Gerrard, 2007; Ferguson i Warner, 2008; Miranda-de la Lama i in., 2014; Grandin, 2020).

Właściwości mięsa *post mortem* kształtują się w wyniku wielu przemian biochemicznych zachodzących nie tylko w mięśniach poprzecznie prażkowanych, ale również w bezpośrednio przyległej tkance łącznej, w tym tłuszczowej. Konsekwencją zmian podczas poubojowego dojrzewania mięsa jest poprawa jego kruchości, wodochłonności, soczystości, delikatności, smaku i zapachu. Szczególnie w przypadku mięsa wołowego ważnym wyróżnikiem oceny jest kruchość. Różnice we właściwościach mięsa w dużym stopniu wyjaśniają długość sarkomerów, zawartość tkanki łącznej i zmiany białek mięśniowych. Zróżnicowanie tempa i zasięgu postępującego procesu dojrzewania związane jest ze zmniejszeniem ilości dostępnej energii, zmianą metabolizmu tlenowego na beztlenowy z jednoczesnym wytworzeniem kwasu mlekowego i w rezultacie obniżeniem wartości pH. Powyższe zmiany mają znaczący wpływ na białka mięśniowe. Mechanizmy biologiczne zaangażowane w strukturalne i biochemiczne zmiany podczas procesu dojrzewania odpowiadają

wiedzialne za kształtowanie cech mięsa o zróżnicowanej jakości nie są do końca poznane.

Klasyczne badanie proteomiczne oparte jest głównie na technikach elektroforezy żelowej jedno- i dwukierunkowej (Bendixen, 2005; Beldarrain i in., 2018). Stosowane początkowo klasyczne podejście w odniesieniu do zmian wyróżników jakościowych podczas dojrzewania mięsa (polegające na analizie pojedynczych białek lub genów) z czasem zastąpiono analizą złożoną, która pozwala na badanie wielu białek równolegle. Złożona strategia proteomiczna zakłada przeszukiwanie całego proteomu celem selekcji białek o odmiennej ekspresji. Wcześniejsze badania, w których uczestniczyłam, cechowało również podejście klasyczne. Dotyczyły one izolacji i analizy właściwości poszczególnych białek, m.in. titiny (Pospiech i in., 2002), a także zmian udziału wybranych białek mięśniowych titiny, troponiny-T i miozyny (Mikołajczak i in., 2005a), titiny, desminy i troponiny-T (Iwanowska i in., 2010a), izoform łańcuchów ciężkich miozyny (MHC) (Iwanowska i in., 2011; Grześ i in., 2007; Grześ i in., 2010, Iwańska i in., 2016), wybranych białek frakcji wycieku wirówkowego (Mikołajczak i in., 2005a; Montowska i in., 2009; Iwańska i in., 2014). Następnie, analizując poszczególne białka, wyznaczono zależności między nimi i wskazano na oddziaływanie z cechami jakości mięsa, przede wszystkim z kruchością i wodochłonnością (Grześ i in., 2017).

Do najczęściej stosowanych technik separacji białek należą jednokierunkowa (1DE), a następnie dwukierunkowa (2DE) elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z SDS (SDS-PAGE) czy ogniskowanie izoelektryczne (Pospiech i in., 2003c). Rutynowe analizy 2DE wymagają dużych nakładów związanych z czasem trwania i pracochłonnością metody oraz ograniczeniem w badaniu całego proteomu wynikającym z braku możliwości rozdzielania białek wysokocząsteczkowych. Dopiero w kolejnym etapie prowadzona jest identyfikacja rozdzielonych białek przy użyciu spektrometrii mas (Bouley i in., 2004). Mimo popularności elektroforezy żelowej proponowane są również inne alternatywne rozwiązania, np. elektroforeza kapilarna lub cieczowe ogniskowanie izoelektryczne (OFFGEL) (Fuente-Garcia i in., 2019). Postęp dotyczy także identyfikacji molekuł, rozpoczynając od analiz metodą Western blot przez separację różnymi technikami spektrometrii mas, a następnie przy wykorzystaniu narzędzi bioinformatycznych umożliwiających przeszukiwanie w dostępnych, proteomicznych bazach danych. Nowoczesne techniki spektrometrii mas coraz częściej znajdują wykorzystanie w analizie białek żywności. Oprócz chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas wykorzystuje się również szybkie metody z bezpośrednią jonizacją próby. Zastosowano na przykład jonizację desorpcyjnym elektrorozpylaniem (Desorption Electrospray Ionization, DESI-MS) oraz ekstrakcję cieczą z powierzchni próby (Liquid Extraction Surface Analysis, LESA-MS) do bezpośredniej identyfikacji białek mięśni szkieletowych (Montowska i in., 2014a, 2014b). Celem prowadzonych badań było wskazanie autentyczności mięsa różnych gatunków oraz identyfikowanie markerów peptydowych w mięsie surowym i poddanym różnym zabiegom technologicznym (Montowska i in., 2015).

W niniejszej pracy – w celu wyeliminowania ograniczeń tradycyjnego frakcjonowania – zaproponowano badania z wykorzystaniem wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczą UHPLC-Q-TOF-MS/MS, z pominięciem elektroforezy dwukierunkowej. Zastoso-

wano strategię proteomiki typu bottom-up, w której mieszanina białek jest najpierw trawiona specyficzną proteazą, a następnie uzyskane fragmenty peptydowe białek są identyfikowane za pośrednictwem spektrometrii mas. Niezależnie od tego postępowania na potrzeby niniejszej pracy białka ekstraktów otrzymane z mięsa normalnej jakości i z wadą DFD rozdzielono elektroforetycznie (SDS-PAGE), aby zobrazować ich profile. W kolejnym etapie ekstrakty białek mięśniowych poddano bezpośredniemu trawieniu trypsyną i wykonano analizę techniką spektrometrii mas UHPLC-Q-TOF-MS/MS, co pozwoliło na jednoczesną ocenę jakościową wszystkich wyekstrahowanych białek i peptydów obecnych w próbce.

5.2.2. Właściwości mięsa bydła o zróżnicowanej jakości

Mięśnie bydła normalnej jakości (RFN) i z odchyleniem typu DFD wybrano na linii produkcyjnej, na podstawie pomiaru wartości pH po 45 min i 2 dniach *pm*. Wyniki badanych cech jakościowych, tj. wartości pH, parametrów barwy $L^*a^*b^*$ oraz wodochłonności i kruchości mięsa o zróżnicowanej jakości badano podczas 10-dniowego przechowywania i przedstawiono w tabeli 21.

W czasie przechowywania mięsa o zróżnicowanej jakości RFN i DFD stwierdzono statystycznie istotne zmiany wartości pH. W mięsie RFN największe obniżenie poziomu pH (do wartości 5,70) obserwowano po 2 dniach *pm*, w porównaniu z terminem 45 min, w którym pH wynosiło 6,49 (tab. 21). W kolejnych terminach badań, tj. po 4 i 10 dniach pH mięśni normalnej jakości obniżyło się nieznacznie i kształtowało się na poziomie 5,53 i 5,50. Średnie pH mięsa z wadą DFD mieściło się w przedziale od 6,77 po 45 min do 6,41 po 4 dniach składowania w warunkach chłodniczych. W mięsie DFD obniżenie pH podczas dwóch pierwszych dni dojrzewania było niewielkie, jego wartość wynosiła 6,48. Wydłużenie przechowywania mięsa typu DFD spowodowało wzrost pH. Po 10 dniach odnotowano jego wartość na poziomie 6,61 (tab. 21). Rezultaty uzyskane w niniejszej pracy są zgodne z powszechną opinią wskazującą optymalne pH końcowe mięsa wołowego normalnej jakości w zakresie od 5,4 do 5,8 (Viljoen i in., 2002; Reis i Rosenvold, 2014). Wyniki wcześniejszych badań w porównaniu z uzyskanymi w niniejszej pracy wykazały nieco mniejsze wartości pH mięśnia LL buhajków rasy holsztyno-fryzyjskiej, odmiany czarno-białej, w wieku 12 m-cy po 48 h (5,47) (Iwanowska i in., 2010a).

W mięsie normalnej jakości pH zmniejsza się najszybciej w pierwszych godzinach po uboju, co wynika z aktywności enzymów glikolitycznych, która jest największa w początkowym okresie *pm* (Young i in., 2004b). Wraz z wydłużeniem czasu przechowywania aktywność tych enzymów maleje, stąd obniżenie wartości pH jest również mniejsze. W wyniku glikolizy obserwowane jest zmniejszenie ilości glikogenu i nagromadzenie kwasu mlekowego, które skutkuje spadkiem wartości pH (Immonen i Puolanne, 2000). Natomiast w mięsie DFD pod wpływem stresu przedubojowego ilość glikogenu w mięśniach jest niewystarczająca do uzyskania optymalnego pH końcowego, stąd nie dochodzi do głębszego zakwaszenia tkanki mięśniowej, a wartość pH jest podobna do przyżyciowej (Young i in., 2004b).

Tabela 21. Analiza cech jakościowych oraz wodochłonności i kruchości mięsa o zróżnicowanej jakości

Table 21. Analysis of the qualitative characteristics as well as water holding capacity and tenderness of meat of different quality

Badana cecha Tested feature	Mięso bydła – Cattle meat		Ogółem Total N = 10	Wartość p* p value*
	RFN N = 5	DFD N = 5		
pH 45 min.	6,49 ±0,17	6,77 ±0,08	6,65 ±1,29	0,000
pH 2 dni	5,70 ±0,08	6,48 ±0,19	6,09 ±0,42	0,000
pH 4 dni	5,53 ±0,04	6,41 ±0,17	5,97 ±0,47	0,000
pH 10 dni	5,50 ±0,02	6,61 ±0,20	6,05 ±0,58	0,000
Parametry barwy 10 dni Color parameters 10 days				
L*	31,11 ±1,41	20,40 ±2,62	24,75 ±5,00	0,000
a*	10,69 ±2,42	7,97 ±0,85	9,33 ±2,23	0,045
b*	11,34 ±1,83	5,71 ±1,44	8,52 ±3,28	0,000
Wyciek wirówkowy 10 dni Centrifugal drip 10 days (%)	14,67 ±2,02	0,70 ±0,84	7,69 ±7,33	0,000
Siła cięcia 10 dni WBSF 10 days (N/cm ²)	68,23 ±8,38	35,39 ±3,52	51,81 ±18,34	0,000

* $p \leq 0,05$ wskazuje na różnice istotne statystycznie.

* $p \leq 0.05$ indicates statistically substantially differences.

Prezentowane badania własne potwierdzają obserwacje innych autorów (Żywica i Banach, 2007; Adzitey i Nurul, 2011) wskazujących na fakt, że wartość pH mięsa z wadą DFD bezpośrednio po uboju jest zazwyczaj większa w porównaniu z pomiarami uzyskanymi w przypadku mięsa RFN. Pomiar wartości pH (po 2 h, 6 h, 24 h) w funkcji pH₀ bezpośrednio po uboju (0 h) powinien uwzględniać założenie, że jego mniejsze wartości (pH₀ = 6,8) są wyznacznikami wysokich wartości pH końcowego po 48 h, a tym samym mięsa z defektem DFD, stąd zalecane jest mierzenie wartości pH w każdej tuszy wołowej, zwłaszcza w mięsie niestymulowanym (Marsh i in., 1987; Żywica i Banach, 2007). Prowadzone są również badania nad opracowaniem metody i urządzenia do prognozowania jakości i okresu przydatności wołowiny na podstawie wartości natężenia prądu elektrycznego stosowanego podczas elektrostymulacji wysokonapięciowej (HVES), która jest coraz częściej wykorzystywana do poprawy jakości wołowiny na całym świecie (Żywica i in., 2018).

Barwa to jeden z ważniejszych wyróżników jakościowych mięsa (Ngapo i in., 2004; Canto i in., 2015), a jej akceptacja jest istotnym elementem decyzji podejmowanych przez konsumentów, związanych z nabyciem mięsa i produktów mięsnych. Jej ocena sensoryczna powszechnie uważana jest za wskaźnik świeżości i pożądalności konsumpcyjnej mięsa. W pomiarze instrumentalnym wykazano istotne różnice wszystkich trzech parametrów barwy (L*a*b*) w grupach mięśni o zróżnicowanej jakości. Istotnie większa wartość parametru L* określającego jasność barwy charakteryzowała mięso RFN (31,11) w porównaniu z próbami DFD (20,40) (tab. 21). Mięso DFD cechowało się ciemniejszą barwą w odniesieniu do prób RFN. Większy udział barwy czerwonej a* odnotowano w mięsie normal-

nej jakości (10,69), natomiast mięśnie z wadą DFD (7,07) wyróżniały się istotnie mniejszą wartością tego parametru. Parametr b^* określający udział barwy żółtej wynosił 11,34 w próbach RFN i przyjmował istotnie mniejszą wartość w mięśniach DFD (5,71) (tab. 21). Rezultaty badań własnych dotyczące jasności barwy mięsa RFN są podobne do wyników Vieira i in. (2009), którzy odnotowali wartość L^* na poziomie 30,31 w mięsie byków, mieszańców rasy morucha \times charolais przechowywanym 10 dni. Cytowani autorzy wyznaczyli jednak większe wartości parametrów a^* (17,24) i b^* (16,98) w mięsie kontrolnym (Vieira i in., 2009).

W badaniach przeprowadzonych przez Mahmood i in. (2018), podobnie jak w niniejszej pracy, stwierdzono istotnie mniejszą jasność L^* (32,38), jednak większy udział barwy czerwonej (17,45) i mniejszy żółtej (1,30) w mięsie z odchyleniem jakościowym DFD w odniesieniu do RFN ($L^* = 37,25$; $a^* = 23,94$; $b^* = 6,8$). Węglarz (2011), oceniając po 48 h barwę mięsa normalnej jakości krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, uzyskał nieco większą jasność L^* (35,95) i większy udział barwy czerwonej a^* (16,94). Barwa mięsa zależy od pH: im wyższe pH, tym jest ona ciemniejsza, natomiast jego mniejsza wartość związana jest z jaśniejszą barwą (Górska, 2016). Badania przeprowadzone przez Strzyżewskiego i in. (2008) wykazały, że istnieje liniowa zależność między składowymi barwy L^* i b^* a kwasowością czynną mięsa. W badaniach własnych odnotowano istotną ujemną korelację między wartością parametrów L^* (od $r = -0,80$ do $r = -0,95$; $p \leq 0,05$;) i b^* (od $r = -0,73$ do $r = -0,95$; $p \leq 0,05$) a wartością pH w każdym z analizowanych terminów badań, tj. po 45 min, 2, 4 i 10 dniach (tab. 22). Powyższe rezultaty są zgodne z wcześniejszymi danymi literaturowymi, wskazującymi na istotną ujemną zależność między jasnością i udziałem barwy żółtej a pH mięsa (Silva i in., 1999; Abril i in., 2001; Franco i in., 2015).

Tabela 22. Współczynniki korelacji między cechami jakościowymi mięsa RFN i DFD
Table 22. Correlation coefficients between the quality characteristics of RFN and DFD meat

Badana cecha Tested feature N = 10	Parametry barwy Color parameters			Wyciek wirówkowy Centrifugal drip (%)	Siła cięcia WBSF (N/cm ²)
	L^*	a^*	b^*		
Wartość pH 45 min	-0,80*	-0,43 ^{NS}	-0,73*	-0,71*	-0,61 ^{NS}
pH value 2 dni	-0,95*	-0,54 ^{NS}	-0,87*	-0,96*	-0,88*
4 dni	-0,92*	-0,61 ^{NS}	-0,90*	-0,97*	-0,89*
10 dni	-0,92*	-0,64*	-0,93*	-0,96*	-0,96*
L^*	-	0,49 ^{NS}	0,82*	0,93*	0,86*
a^*	0,49 ^{NS}	-	0,84*	0,56 ^{NS}	0,58 ^{NS}
b^*	0,82*	0,84*	-	0,85*	0,79*
Wyciek wirówkowy (%) Centrifugal drip (%)	0,93*	0,56 ^{NS}	0,85*	-	0,97*
Siła cięcia (N/cm ²) WBSF (N/cm ²)	0,86*	0,58 ^{NS}	0,79*	0,97*	-

* $p \leq 0,05$; NS – nieistotnie statystycznie; NS – non-significant.

Zdolność wiązania wody przez mięso (WHC) może być charakteryzowana w różny sposób: jako ubytki masy w czasie przechowywania, wyciek naturalny, wyciek wymuszony (oznaczony metodą Graua i Hamma lub wirówkową) czy zmiany

masy podczas ogrzewania, określane również jako zdolność zatrzymywania wody (WBC). Stąd uzyskane wartości liczbowe wykazują dużą zmienność i utrudniają porównanie wyników, wskazują jednak na bardzo podobne tendencje. Wodochłonność jest cechą mięsa istotną zarówno z punktu widzenia konsumentów, jak i przetwórstwa. Wpływa na ekonomiczny aspekt procesu pozyskiwania surowca mięsnego oraz jego atrakcyjność sensoryczną.

Wodochłonność mięsa o zróżnicowanej jakości po 10 dniach przechowywania określono na podstawie wielkości wycieku wirówkowego (tab. 21). Zgodnie z analizą uzyskanych wyników stwierdzono istotną różnicę w wielkości wycieku wirówkowego pozyskanego z mięsa RFN i DFD. Próby RFN charakteryzowały się 14,67% wyciekiem, istotnie większym w porównaniu ze średnią wartością odnotowaną w przypadku mięśni DFD (0,70%) (tab. 21). Mięso DFD cechowało się lepszą wodochłonnością w porównaniu z mięsem normalnej jakości. Wykazano istotną korelację między wielkością wycieku wirówkowego a wartością pH mierzoną po 45 min, 2, 4 i 10 dniach (odpowiednio $r = -0,71$; $r = -0,96$; $r = -0,97$; $r = -0,96$; $p \leq 0,05$) (tab. 22). Ponadto odnotowano istotną statystycznie dodatnią zależność $r = 0,93$ i $r = 0,85$ ($p \leq 0,05$) między wielkością wycieku wirówkowego a parametrami L^* i b^* barwy (tab. 22). Wyniki własne są zgodne z obserwacjami Franco i in. (2015), którzy wykazali istotnie mniejszą ilość wycieku cieplnego z mięsa DFD (12,2%) w porównaniu z RFN (22,7%). Podobnie Kim i in. (2013a) wyznaczyli mniejszą ilość soku mięśniowego w próbach z mięsa wieprzowego DFD (0,5%) w odniesieniu do RFN (2,0%).

Podczas dojrzewania mięsa wzrasta jego wodochłonność oraz zachodzą zmiany w strukturze włókien mięśniowych (Farouk i in., 2012). Struktury włókien mięśniowych ulegają rozluźnieniu w wyniku degradacji białek miofibrylarnych i cytoszkietowych (Huff-Lonergan i Lonergan, 2005; Kołczak, 2008), a także degradacji kolagenu śródmięśniowego (Purslow, 2005; Modzelewska-Kapituła i in., 2015; Mikołajczak i in., 2019). W konsekwencji zmieniają się interakcje białek i wzrasta przestrzeń kapilarna dostępna dla wody. Przyczyną tych zmian jest proteolityczny rozkład białek. W mięsie DFD obserwowany jest szybszy rozkład białek cytoszkietowych >200 kDa, stąd jego cechą jest mniejsza ilość wycieku wirówkowego (Wu i in., 2014b). W badaniach różnych frakcji kolagenu przeprowadzonych na mięśniu podgrzebieniowym (*m. infraspinatus*) Modzelewska-Kapituła i in. (2015) wykazali, że frakcją kolagenu mającą największy wpływ na WHC był kolagen rozpuszczalny w wodzie, a jego większa zawartość związana była z lepszą WHC mięsa. Istotne zróżnicowanie zdolności utrzymywania wody w mięsie RFN i DFD można tłumaczyć wielkością przestrzeni zewnątrzkomórkowej, która kształtuje się już po 24 h (Offer i Cousins, 1992; Pearce i in., 2011). W mięsie DFD obszar wyznaczony między włóknami był istotnie mniejszy i wynosił 2,7% w porównaniu z mięśniami PSE (41,6%) (Irving i in., 1989).

Po 10 dniach przechowywania mięso normalnej jakości charakteryzowało się istotnie gorszą kruchością 68,23 (N/cm²) w porównaniu z surowcem z odchyleniem jakościowym typu DFD 35,39 (N/cm²). Wyższa kruchość mięsa DFD związana była z jego lepszą wodochłonnością. Po 10 dniach przechowywania wykazano istotną korelację między kruchością a wartością pH po 2, 4 i 10 dniach (odpowiednio $r = -0,88$; $r = -0,89$; $r = -0,96$; $p \leq 0,05$) i wodochłonnością ($r = 0,97$;

$p \leq 0,05$) mięsa o zróżnicowanej jakości (tab. 22). Podobną zależność między kruchością a wartością pH i wodochłonnością wyznaczoną na podstawie wycieku cieplnego po 24 h *pm* odnotowano w badaniach przeprowadzonych przez Franco i in. (2015). Rezultaty prezentowane w niniejszej pracy odnośnie do istotnie lepszej kruchości mięsa DFD w porównaniu z RFN są zgodne z wynikami Silva i in. (1999) oraz Franco i in. (2015), którzy wykorzystali zarówno pomiar siły cięcia, jak i ocenę tekstury (TPA).

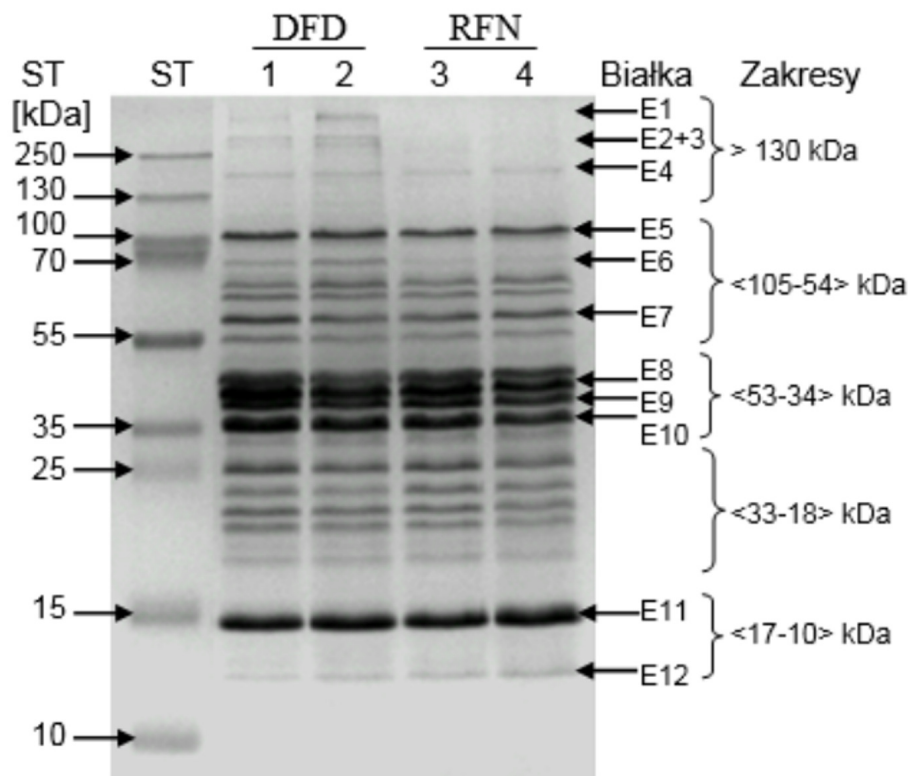
Akceptowalna kruchość mięsa jest zależna od wartości pH. W surowcu o wysokim pH końcowym (6,29–6,99) mięso kruche stwierdzano już po 1 dniu przechowywania, a w próbach cechujących się wartością pH 5,86–6,19 – po 21 dniach (Farouk i in., 2007; Wu i in., 2014b). Podczas przechowywania nieprawidłowe, wyższe pH ($> 6,0$, charakterystyczne dla mięsa DFD) może na różne sposoby przyczyniać się do lepszej kruchości. Po pierwsze, sprzyja zwiększeniu odpychania elektrostatycznego między białkami miofibrylarnymi, co powoduje mniejsze boczne kurczenie się włókien mięśniowych (Pearce, 2011). Po drugie, ogólna denaturacja białek jest mniejsza, a wysokie pH stymuluje zdolność miozyny do wiązania wody, co skutkuje również lepszą kruchością mięsa.

Podsumowując, mięso analizowane w dwóch wybranych grupach jakościowych było istotnie zróżnicowane pod względem wszystkich ocenianych cech – wartości pH, parametrów $L^*a^*b^*$ barwy, wodochłonności i kruchości. Uzyskane wartości parametrów jakościowych mięsa są zgodne z danymi literaturowymi. Jednoznacznie wskazują na zróżnicowaną jakość posiadanego surowca mięsnego RFN i z odchyleniem DFD oraz prawidłowy dobór próbek biologicznych do badań (Adzitey i Nurul, 2011; Kim i in., 2013b; Franco i in., 2015; Mahmood i in., 2018).

5.2.3. Zmiany udziału białek ekstraktów z mięsa bydła o zróżnicowanej jakości na podstawie SDS-PAGE

Ekstrakty białek mięśniowych pochodzące z mięsa bydła różniące się jakością pozyskano ze względu na fakt, że ilość wycieku wirówkowego z mięsa DFD nie zawsze jest wystarczająca do wykonania badań. Ekstrakcję białek przeprowadzono zgodnie z metodyką podaną przez Joo i in. (1999). Białka frakcji sarkoplazmatycznej rozdzielono elektroforetycznie w 15% żelach poliakrylamidowych z SDS (SDS-PAGE). Masę cząsteczkową białek wyznaczono na podstawie separacji standardu, zawierającego mieszaninę 9 białek o masie cząsteczkowej w przedziale od 250 kDa do 10 kDa (rys. 12, tab. 23).

W ekstraktach z mięsa normalnej jakości (RFN) stwierdzono występowanie 20 pasm, natomiast w próbach z odchyleniem DFD na każdej ścieżce rozdziału obserwowano 22 prążki. Na podstawie analizy densytometrycznej wyznaczono udziały procentowe wszystkich ocenianych pasm białek (Image Master 1D software, Pharmacia Biotech). Udziały procentowe 12 wybranych pasm zaznaczonych na rys. 12 symbolami od E1 do E12 zestawiono w tabeli 23. Przeprowadzono również analizę zmian udziału białek w pięciu ustalonych zakresach mas cząsteczkowych, których suma stanowiła 100% (rys. 12, tab. 23).



Rys. 12. Rozdział elektroforetyczny białek ekstraktów z mięsa bydła o zróżnicowanej jakości po 10 dniach przechowywania

ST – standard; strzałki po lewej stronie dotyczą masy cząsteczkowej białek standardu; 1, 2 – ekstrakt białek z mięsa z wadą DFD; 3, 4 – ekstrakt białek z mięsa normalnej jakości RFN, strzałki po prawej stronie wskazują pasma analizowanych białek.

Fig. 12. Electrophoretic separation of proteins extracts from beef meat of various quality after 10 days of storage

ST – standard; the arrows on the left show the molecular weight of the proteins of the standard; 1, 2 – meat protein extract with DFD defect; 3, 4 – protein extract from standard quality RFN meat. Arrows on the right indicate the bands of the analyzed proteins.

Uzyskane profile białkowe uwidoczniły największe różnice w intensywności pasm E1 i E2+3 o masie cząsteczkowej > 250 kDa oraz pasma E6, znajdującego się poniżej białka standardu o masie 70 kDa. Powyższe potwierdzono również na podstawie analizy densytometrycznej i statystycznej, wskazując na istotne zróżnicowanie udziału tych pasm w mięsie normalnej jakości i z wadą DFD (rys. 12, tab. 23). Udział procentowy pasma o masie około 2400 kDa w mięsie DFD wynosił 0,57% i był istotnie większy w porównaniu z mięsem RFN (0,00%), w którym nie obserwowano detekcji białka o powyższej masie. Pasma o wyznaczonej masie cząsteczkowej mogło zawierać w swoim składzie produkt degradacji titiny T1 (3700 kDa), opisywany w literaturze jako T2. Titina jest białkiem umiejscowionym

Tabela 23. Analiza zmian udziału wybranych pasm białek mięsa bydła o zróżnicowanej jakości
Table 23. Analysis of changes in the share of selected proteins bands of cattle meat of different quality

Masa cząsteczkowa Molecular weight (kDa)	Pasma Band	Mięso wołowe Cattle meat			
		RFN N = 5	DFD N = 5	Ogółem Total N = 10	Wartość p* p value*
~2400	E1	0,00 ±0,00	0,57 ±0,28	0,29 ±0,36	0,001
1200–400	E2+3	0,13 ±0,03	0,82 ±0,24	0,47 ±0,40	0,000
148–153	E4	0,65 ±0,20	0,67 ±0,16	0,67 ±0,17	0,733
90–95	E5	6,36 ±0,37	6,99 ±0,55	6,68 ±0,55	0,068
~68	E6	0,36 ±0,14	1,06 ±0,36	0,71 ±0,45	0,004
60	E7	5,02 ±1,22	4,51 ±0,67	4,77 ±0,97	0,441
42	E8	11,94 ±0,76	13,61 ±1,63	12,78 ±1,49	0,070
40	E9	10,69 ±1,18	9,68 ±0,52	10,18 ±1,01	0,120
36–38	E10	12,44 ±0,83	13,24 ±0,27	12,84 ±0,72	0,073
~17	E11	17,23 ±4,22	18,07 ±1,93	17,65 ±3,13	0,696
13–14	E12	1,13 ±0,21	1,50 ±1,80	1,32 ±1,23	0,666
Białka w wybranych zakresach mas cząsteczkowych Proteins in selected ranges of molecular weights					
> 130		0,77 ±0,19	2,87 ±1,23	1,59 ±0,95	0,000
<105–54>		18,87 ±2,24	18,78 ±0,78	18,90 ±1,58	0,944
<53–34>		46,23 ±2,47	43,87 ±3,26	45,57 ±2,38	0,405
<33–18>		15,77 ±1,67	14,13 ±0,94	14,97 ±1,56	0,108
<17–10>		18,36 ±4,39	20,35 ±2,74	18,97 ±3,34	0,599

* $p \leq 0,05$ wskazuje na różnice istotne statystycznie.

* $p \leq 0.05$ indicates statistically substantially differences.

w linii Z i rozciąga się do środka sarkomeru. Jej zmiany w czasie przechowywania poubojowego związane są z kruchością mięsa (Pospiech i in., 2000; Huff-Lonergan i in., 2010; Wu i in., 2014b). Z badań Wu i in. (2014b) wynika, że w mięśniach o wysokim pH (6,29–6,99) degradacja titiny rozpoczęła się bezpośrednio po uboju (0 dni *pm*), tzn. szybciej w porównaniu z próbami w dwóch pozostałych analizowanych grupach o pH $\leq 5,79$ i 5,80–6,19.

Efektem szybkiej, prawie całkowitej degradacji titiny natywnej T1 we frakcji miofibrylarnej była lepsza kruchość mięsa, a pojawianie się T2 było wskaźnikiem postępującego procesu kruszenia (Wu i in., 2014a; 2014b). Pasma T2 pojawiające się w ekstrakcie białek w niniejszej pracy wskazuje na proces kruszenia. Cytowani autorzy stwierdzili, że iloraz T1/T2 jest silnie związany z końcową wartością pH mięśni. Optymalna aktywność μ -kalpajny wskazywana jest przy neutralnym pH (Koohmaraie i Geesink, 2006). Jednak wyniki przedstawione przez Lomiwes i in. (2014b) pokazały, że względna aktywność μ -kalpajny w 0 i 1 dniu *pm* na ogół obniżała się wraz ze wzrostem pHu w przedziale od 6,3 do 6,9. W mięśniach o wysokim pH końcowym rozleglejszą proteolizę można wyjaśnić wcześniejszą aktywacją i autolizą tego enzymu. Wspomniani autorzy zaproponowali hipotezę, że aktywność μ -kalpajny przy prawie neutralnym poziomie pHu mięsa była optymalna, stąd obserwowany szybki rozkład titiny, nebuliny i filaminy w grupie o większym pHu ($\geq 6,2$) (Lomiwes i in., 2014b). Natomiast kruchość mięsa o niskim pHu (5,4–5,7) spowodowana była degradacją titiny i nebuliny przez μ -kalpajnę w nieco późniejszym okresie *pm* w połączeniu z rozległą degradacją desminy przez reszt-

Tabela 24. Współczynniki korelacji między udziałem wybranych białek ekstraktów a cechami mięsa RFN i DFD
Table 24. Correlation coefficients between the share of selected extract proteins and the characteristics of the RFN and DFD meat

Białka Proteins N = 10	Pasmo Band	Wartość pH pH value				Parametry barwy Color parameters			Wyciek wirówkowy Centrifugal drip (%)	Siła cięcia WBSF (N/cm ²)
		2 dni 2 days	4 dni 4 days	10 dni 10 days	L*	a*	b*	10 dni – 10 days		
		0,72*	0,77*	0,84*	-0,78*	-0,54 ^{NS}	-0,74*			
~2400	E1	0,72*	0,77*	0,84*	-0,78*	-0,54 ^{NS}	-0,74*	-0,85*	-0,81*	
1200–400	E2+3	0,78*	0,89*	0,93*	-0,91*	-0,54 ^{NS}	-0,81*	-0,90*	-0,83*	
148–153	E4	0,07 ^{NS}	0,16 ^{NS}	0,10 ^{NS}	-0,18 ^{NS}	-0,28 ^{NS}	-0,22 ^{NS}	-0,18 ^{NS}	-0,30 ^{NS}	
90–95	E5	0,62 ^{NS}	0,53 ^{NS}	0,60 ^{NS}	-0,54 ^{NS}	-0,30 ^{NS}	-0,44 ^{NS}	-0,65*	-0,65*	
~68	E6	0,67*	0,75*	0,79*	-0,76*	-0,40 ^{NS}	-0,63 ^{NS}	-0,83*	-0,77*	
60	E7	-0,52 ^{NS}	-0,17 ^{NS}	-0,26 ^{NS}	0,17 ^{NS}	0,13 ^{NS}	0,17 ^{NS}	0,23 ^{NS}	0,14 ^{NS}	
42	E8	0,32 ^{NS}	0,50 ^{NS}	0,43 ^{NS}	-0,44 ^{NS}	-0,37 ^{NS}	-0,48 ^{NS}	-0,51 ^{NS}	-0,55 ^{NS}	
40	E9	-0,59 ^{NS}	-0,54 ^{NS}	-0,53 ^{NS}	0,56 ^{NS}	-0,18 ^{NS}	0,31 ^{NS}	0,57 ^{NS}	0,47 ^{NS}	
36–38	E10	0,22 ^{NS}	0,43 ^{NS}	0,53 ^{NS}	-0,39 ^{NS}	-0,90*	-0,72*	-0,48 ^{NS}	-0,51 ^{NS}	
~17	E11	0,28 ^{NS}	0,05 ^{NS}	0,07 ^{NS}	-0,04 ^{NS}	0,46 ^{NS}	0,14 ^{NS}	-0,17 ^{NS}	0,14 ^{NS}	
13–14	E12	0,29 ^{NS}	0,25 ^{NS}	0,23 ^{NS}	-0,37 ^{NS}	0,14 ^{NS}	-0,06 ^{NS}	-0,19 ^{NS}	-0,07 ^{NS}	
Białka w wybranych zakresach mas cząsteczkowych Proteins in selected ranges of molecular weights										
> 130		0,67*	0,91*	0,87*	-0,86*	-0,64*	-0,89*	-0,90*	-0,88*	
<105–54>		-0,43 ^{NS}	0,08 ^{NS}	-0,00 ^{NS}	0,02 ^{NS}	0,00 ^{NS}	-0,33 ^{NS}	-0,04 ^{NS}	-0,21 ^{NS}	
<53–33>		-0,28 ^{NS}	-0,44 ^{NS}	-0,30 ^{NS}	-0,32 ^{NS}	0,38 ^{NS}	-0,24 ^{NS}	0,21 ^{NS}	0,29 ^{NS}	
<33–18>		-0,24 ^{NS}	-0,53 ^{NS}	-0,46 ^{NS}	0,47 ^{NS}	0,07 ^{NS}	0,26 ^{NS}	0,58 ^{NS}	0,58 ^{NS}	
<17–10>		0,33 ^{NS}	0,26 ^{NS}	0,17 ^{NS}	-0,24 ^{NS}	0,47 ^{NS}	0,01 ^{NS}	-0,24 ^{NS}	0,13 ^{NS}	

*p ≤ 0,05; NS – nieistotnie statystycznie; NS – non-significant.

kową μ -kalpainę i aktywność katepsyny B, która wzrastała wraz z upływem czasu dojrzewania do 28 dnia. Stąd obserwowane w niniejszej pracy pojawienie się białek miofibrilarnych o wysokiej masie cząsteczkowej w ekstrakcie z prób DFD wskazuje na ich szybsze uwalnianie do frakcji rozpuszczalnej w odniesieniu do mięsa RFN. Związane ono było również z lepszą wodochłonnością i kruchością mięsa z odchyleniem jakościowym DFD. Wcześniejsze niepublikowane wyniki badań własnych wskazują, że titina T2 pojawiała się we frakcji wycieku wirówkowego z mięsa bydła rasy holsztyno-fryzyjskiej odmiany czarno-białej z wadą DFD po 2 dniach przechowywania, natomiast po 45 min *pm* nie była obserwowana ani w mięsie normalnej jakości RFN, ani z wadą DFD. Ponadto w mięsie DFD intensywność pasma T2 była bardzo podobna podczas 28-dniowego przechowywania i istotnie większa w porównaniu z próbami RFN, w przypadku których stwierdzono zwiększenie jej udziału w kolejnych terminach analiz, tj. po 9 i 28 dniach.

Zmiany udziału dwóch kolejnych pasm (E2+3) występujących w niewielkiej odległości od siebie i cechujących się masą cząsteczkową ok. 1200–400 kDa wyrażono jako ich sumę (rys. 12, tab. 23). Wykazano istotnie większy (0,82%) udział tych białek w mięsie DFD w porównaniu z ilością 0,13% odnotowaną w próbach RFN. Pasma o masie ok. 1200 kDa występujące w ekstraktach może stanowić mieszaninę izoform titiny i miozyny (Huff-Lonergan i in., 2010; Wu i in., 2014a) i uważane jest za fragment T1, względnie produkt degradacji T1, ponieważ pasmo o takiej masie cząsteczkowej rozpoznawane jest przez przeciwciało 9D10 (Pospiech i in., 2000; Greaser i in., 2000).

Udział pasma E6 o masie \sim 68 kDa wynosił 0,36% w mięsie RFN i był istotnie mniejszy w porównaniu z intensywnością 1,06% wyznaczoną w próbach DFD (rys. 10, tab. 23). W przypadku pasm E4, E5, E7, E8, E9, E10, E11 i E12 o masach odpowiednio 148–153 kDa, 90–95 kDa, 60 kDa, 42 kDa, 40 kDa, 36–38 kDa, \sim 17 kDa i 13–14 kDa nie wykazano istotnych różnic w ich procentowym udziale w próbach pozyskanych z mięsa o zróżnicowanej jakości RFN i DFD (rys. 12, tab. 23). Spośród wszystkich rozdzielonych białek ekstraktów z mięsa o zróżnicowanej jakości największy, ponad 17% średni udział, charakteryzował pasmo o masie 17 kDa. Białka E8, E9 i E10 wyróżniały się ilością w przedziale od 10,69% do 12,44% w mięsie RFN oraz występowały w nieco większym zakresie od 9,68% do 13,61% w mięśniach DFD (rys. 12, tab. 23).

Analizując zależności między zmianami udziału białek a właściwościami mięsa bydła o zróżnicowanej jakości RFN i DFD, zauważono, że intensywność ocenianych pasm białek była skorelowana z wartością pH, barwą, wodochłonnością (wielkością wycieku wirówkowego) oraz kruchością (siłą cięcia) (tab. 24). Wykazano istotną dodatnią korelację między zmianami udziału białek E1, E2+3, E6 a wartością pH w każdym z analizowanych terminów badań (od $r = 0,67$ do $r = 0,93$; $p \leq 0,05$). Ponadto stwierdzono ujemną zależność między intensywnością powyższych pasm a jasnością barwy, wodochłonnością i kruchością mięsa o zróżnicowanej jakości (tab. 24). Po 10 dniach składowania w warunkach chłodniczych – pomimo różnicy nieistotnej statystycznie między udziałem pasma E5 o masie 90–95 kDa w mięsie RFN (6,36%) i DFD (6,99%) – wykazano istotną dodatnią korelację między jego udziałem a wartością pH po 4 dniach ($r = 0,65$; $p \leq 0,05$) oraz ujemną zależność w odniesieniu do wodochłonności ($r = -0,65$; $p \leq 0,05$) i kruchości mięsa

($r = -0,65$; $p \leq 0,05$) (tab. 24). Natomiast udział pasma E10 (36–38 kDa) był ujemnie skorelowany z parametrami a^* i b^* barwy mięsa (odpowiednio $r = -0,90$ i $r = -0,72$; $p \leq 0,05$).

Di Luca i in. (2011), oceniając białka wycieku wirówkowego z mięsa wieprzowego w pięciu grupach fenotypowych różniących się wodochłonnością (WHC) i pH, odnotowali istotnie większą objętość pasma o masie 68 kDa w próbach charakteryzujących się niewielkim wyciekami (< 2,9% i pHu < 5,56) w porównaniu z mięśniami PSE o największym wycieku soku mięśniowego. W mięsie opisanym jako DFD (wyciek < 2,2% i pHu > 5,6) objętość tego pasma była również większa niż w próbach PSE, jednak nie była to różnica statystycznie istotna. Po 7 dniach objętość omawianego pasma była istotnie większa w porównaniu z ilością odnotowaną po 3 dniach. Cytowani autorzy stwierdzili istotną korelację między objętością tego pasma a poziomem wycieku, niezależnie od kategorii fenotypowej ($r^2 = 0,295$; $p = 0,013$). Była to zależność podobna do występującej między WHC a pH po 45 min ($r^2 = 0,32$; $p = 0,001$), mimo że nie odnotowano jej w kolejnych terminach analiz, tj. po 2 h, 3 h i 24 h.

Analizowane białka, obecne w ekstraktach pochodzących z mięsa o zróżnicowanej jakości, podzielono na pięć zakresów mas cząsteczkowych: > 130 kDa, 105–54 kDa, 53–34 kDa, 33–16 kDa, 17–10 kDa. Wykazano istotną różnicę w udziale białek o masie powyżej 130 kDa w mięsie RFN i DFD. Intensywność białek tego zakresu była istotnie mniejsza w próbach RFN i wynosiła 0,77% w porównaniu z wartością 2,87% odnotowaną w mięsie DFD. Ilość białek w pozostałych zakresach mas cząsteczkowych nie różniła się istotnie. Największy udział w ocenianej frakcji sarkoplazmatycznej stanowiły białka o masie w zakresie 53–34 kDa. Wynosił on odpowiednio 46,23% w mięśniach RFN oraz 43,87% w próbach z wadą DFD (rys. 12, tab. 23). Dla białek w zakresie > 130 kDa wykazano istotną korelację między ich obecnością a wszystkimi analizowanymi cechami mięsa o zróżnicowanej jakości. Stwierdzono istotną dodatnią korelację pomiędzy udziałem tych białek a wartością pH wyznaczoną po 2 h, 2, 4 i 10 dniach – odpowiednio $r = 0,67$; $r = 0,91$; $r = 0,87$; $r = 0,90$; $p \leq 0,05$. Wykazano również istotną zależność między występowaniem białek tego zakresu a parametrami barwy $L^*a^*b^*$ (odpowiednio $r = -0,86$; $r = -0,64$; $r = -0,89$; $p \leq 0,05$) oraz wodochłonnością i kruchością mięsa RFN i DFD (odpowiednio $r = -0,90$ i $r = -0,88$; $p \leq 0,05$).

5.2.4. Identyfikacja białek i peptydów z wykorzystaniem wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS

Wcześniejsze badania z wykorzystaniem elektroforezy 1DE i 2DE (Mikołajczak i in., 2005, Mikołajczak i in., 2005b; Montowska i in., 2009) oraz wyniki prac innych autorów (Di Luca i in., 2011; Żelechowska i in., 2012; Pomponio i in., 2018) wykazały, że wyciek wirówkowy jest dobrym źródłem białek jako wskaźników jakości mięsa. Jednak jak wskazano w poprzednim rozdziale 5.2.3, w przypadku mięsa

bydła z odchyleniem jakościowym DFD nie zawsze ilość uzyskanego wycieku wirówkowego jest wystarczająca do wykonania wszystkich oznaczeń. Stąd w celu analizy proteomicznej zaproponowano ekstrakcję białek z mięsa bydła o zróżnicowanej jakości. W kolejnym etapie postanowiono sprawdzić, czy na podstawie danych dotyczących białek i peptydów uzyskanych z analizy techniką spektrometrii mas możliwa jest klasyfikacja mięsa normalnej jakości (RFN) i z odchyleniem DFD, zdefiniowanym wcześniej na podstawie wartości pH, barwy, wodochłonności i kruchości.

Wszystkie ekstrakty białek pozyskane z mięsa RFN i z wadą DFD poddano bezpośredniemu trawieniu trypsyną i analizowano, wykorzystując wysokorozdzielczą tandemową spektrometrię mas, sprzężoną z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS. Identyfikację białek przeprowadzono za pomocą algorytmu programu Spectrum Mill i porównania widm eksperymentalnych z bazą sekwencji białek UniProt/SwissProt. W sumie w uzyskanych ekstraktach zidentyfikowano ponad 1100 białek przy zawężeniu wyszukiwania do kategorii taksonomicznej bydło domowe (*Bos taurus* lub *bovine*). W niniejszym opracowaniu przedstawiono białka miofibrylarne i sarkoplazmatyczne charakteryzujące się wysoką intensywnością, zidentyfikowane na podstawie nie mniej niż dwóch peptydów i/lub przy co najmniej 10% stopniu dopasowania sekwencji oraz obecnych w przynajmniej dwóch próbach biologicznych i w dwóch powtórzeniach. Stosując powyższe kryteria, wyselekcjonowano łącznie 75 białek, z których 67 zidentyfikowano zarówno w mięsie RFN, jak i DFD (tab. 25). Natomiast białka, które występowały tylko w jednej grupie analizowanych mięśni – tj. RFN lub DFD – w ilości odpowiednio 6 i 2 zestawiono w tabeli 26.

Fakt, że danego białka nie zidentyfikowano w mięsie RFN lub DFD, nie oznacza jednoznacznie, że białko to nie występowało w próbce. Prawdopodobnie było mocno zdegradowane i/lub występowało w niewielkiej ilości. Jego ilość mogła być mniejsza niż próg detekcji zastosowanej metody UHPLC-Q-TOF-MS/MS. Z omawianych w pracy badań wynika, że proponowana metoda może być zastosowana w przypadku mięsa o zróżnicowanej jakości. Jednak obecność białek występujących w niewielkich ilościach, poniżej 1–2%, należy dodatkowo potwierdzić przez analizę ukierunkowaną, przy wykorzystaniu bardziej selektywnego instrumentu, na przykład stosując potrójny kwadrupol.

W ekstraktach z mięsa o zróżnicowanej jakości na podstawie 178 peptydów w mięśniach DFD i 53 w RFN oraz intensywności na poziomie odpowiednio $4,05 \times 10^8$ i $1,54 \times 10^7$ zidentyfikowano titinę o masie ok. 3842,9 kDa. Nie została ona jednak włączona do dalszych analiz, ponieważ nie spełniała założenia 10% dopasowania sekwencji. Wynikało to z największej masy cząsteczkowej titiny spośród wszystkich białek mięśniowych i związane było z ogromną ilością peptydów ją tworzących. Ponad dziesięciokrotnie większa obecność titiny w mięsie z odchyleniem DFD w porównaniu z RFN wskazywała na zmiany strukturalne związane z procesem proteolizy. Mogły one być związane również z aktywnością kalpain w wyniku wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{+2} w konsekwencji zmian integralności sarkolemy w mięśniach *post mortem* lub stresu oksydacyjnego. Wyniki otrzymane po analizie spektrometrii mas korespondują z profilem białek, który uzyskano na podstawie rozdziału elektroforetycznego, wskazującego

na istotnie większy udział pasm białek E1 i E2+E3 w mięsie DFD w porównaniu z RFN.

Intensywność zidentyfikowanych białek była bardzo zróżnicowana, najczęściej był to przedział rzędu 10^5 – 10^8 . Niektóre białka – np. dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanu [NAD^+] (cytoplazmatyczna), Tn-T, dehydrogenaza jabłczanowa (cytoplazmatyczna), peroksyredoksyna-6 czy podjednostka beta-syntazy ATP (mitochondrialna) – charakteryzowały się dziesięciokrotnie większą intensywnością w mięśniach RFN w porównaniu z DFD. Inne – np. alfa- i beta-enolazę, łańcuch A i B dehydrogenazy L-mleczanowej, białko 3 bogate w cysteinę i glicynę, PDZ i LIM domenę białka 3 – wyróżniała większa intensywność w próbach DFD w odniesieniu do RFN. Grupę 6 białek związanych ze stresem cieplnym reprezentowały HSP70 białko 1A i 2, HSP71 o masie cząsteczkowej ok. 70 kDa oraz HSP beta-1 i beta-6 oraz alfa krystalina (łańcuch B) o masach w przybliżeniu odpowiednio 22, 17 i 20 kDa. W mięsie DFD w porównaniu z RFN białka szoku cieplnego charakteryzowały się większą intensywnością (tab. 25).

W ekstraktach zidentyfikowano białka miofibrylarne, takie jak aktyna, miozyna 1 i 2 oraz łańcuchy lekkie 1 i 3 miozyny. Białka te należą do grupy głównych białek miofibrylarnych, występujących we włóknach mięśniowych w największej ilości. Teoretycznie stanowią grupę białek nierozpuszczalnych w buforach o niskiej sile jonowej jednak podobnie jak w niniejszej pracy niektóre z nich (fragmenty aktyny i łańcuch lekki miozyny 2) były również wcześniej ekstrahowane z białkami rozpuszczalnymi (Laville i in., 2009b).

Natomiast Pulford i in. (2008) wykazali, że wartość pH końcowego wpływa na rozpuszczalność białek opiekuńczych HSP27, α i β -krystaliny oraz HSP20. Przemieszczają się one z frakcji rozpuszczalnej do nierozpuszczalnej. Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem wyjaśniającym powyższe zjawisko, zaproponowanym przez Pulforda i in. (2008), było wytrącanie izoelektryczne. Kiedy wewnątrzkomórkowe pH osiągnęło punkt izoelektryczny białka, brak ładunku netto zmniejszył jego rozpuszczalność i powodował wytrącenie. Alternatywne mechanizmy związane z właściwościami i funkcjami białek HSP, a mianowicie tworzenie kompleksów oligomerowych, oddziaływanie z rozfałdowanymi białkami lub interakcje z miofibrylami obserwowane podczas prowokacji niedokrwiennej (ang. ischemic challenge), to także możliwe mechanizmy wyjaśniające translokację HSP z cytozolu do miofibryli (Rogalla i in., 1999; Bitar, 2002). Podczas dojrzewania modyfikacje proteomu mogą objawiać się w różny sposób. Jak wykazali Laville i in. (2009b), białka takie jak HSP27, kinaza kreatynowa (CK) i GAPDH mogą pojawiać się we frakcji nierozpuszczalnej, co wskazywało na spadek ich rozpuszczalności w terminie 5 dni *pm*. Enzymy glikolityczne CK i GAPDH należą do klasy białek regulujących, utrzymujących równowagę redoks. Posiadają wysoce reaktywne reszty cysteiny, które mogą ulegać modyfikacji pod wpływem stresu oksydacyjnego (Reddy i in., 2000; Cotgreave i in., 2002; Leichter i Jakob, 2004). Powoduje on znaczne zmiany konformacyjne, prowadzące do aktywacji lub dezaktywacji funkcji białka. Modyfikacja ich rozpuszczalności może być związana z podatnością na utlenianie.

Tabela 25. Białka zidentyfikowane w ekstraktach z mięsa wołowego RFN i DFD
Table 25. Proteins identified in extracts of RFN and DFD bovine meat

Zidentyfikowane białka Identified proteins	Numer akcesyjny Accession no.	Masa Mass (Da)	Średnia ogólna intensywność Average total intensity		Wynik unikatowy Unique score		Ilość dopasowanych peptydów ¹ Matched peptides ¹		Pokrycie sekwencji ² Sequence coverage ² (%)	
			DFD	RFN	DFD	RFN	DFD	RFN	DFD	RFN
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Albumina surowicy Serum albumin	P02769	71 289,0	$1,59 \times 10^8$	$1,96 \times 10^8$	1 052,87	1331,00	67	80	83,3	86,8
Titina Titin	FLN757	3 842 940,0	$4,06 \times 10^8$	$1,54 \times 10^7$	2 626,13	690,83	178	53	4,9	1,3
Kinaza kreatynny typ M Creatine kinase M-type	Q9XSC6	43 216,4	$6,17 \times 10^8$	$5,08 \times 10^8$	1 100,75	1081,91	60	60	90,8	93,4
Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P10096	36 095,7	$1,11 \times 10^9$	$1,12 \times 10^9$	1 183,64	1281,45	67	73	99,0	99,0
Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego specyficzna dla jąder Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	Q2KJE5	43 686,6	$2,10 \times 10^7$	$9,57 \times 10^6$	39,73	43,06	1	3	6,0	18,4
Beta-enolaza Beta-enolase	Q3ZC09	47 437,5	$4,98 \times 10^8$	$5,10 \times 10^7$	1 264,11	565,00	71	35	85,2	62,2
Alfa-enolaza Alpha-enolase	Q9XSJ4	47 667,6	$4,19 \times 10^7$	$8,73 \times 10^6$	128,00	96,11	7	5	18,6	12,2
Fosforylaza glikogenu forma mięśniowa Glycogen phosphorylase, muscle form	P79334	97 748,1	$4,60 \times 10^7$	$3,01 \times 10^7$	601,40	586,78	37	38	47,1	50,7
Fosfoglukomutaza-1 Phosphoglucosmutase-1	Q08DP0	61 873,6	$4,36 \times 10^7$	$6,63 \times 10^7$	432,03	570,77	27	34	52,4	61,5

Tabela 25 – cd.
Table 25 – cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Izomeraza triozofosforanowa Triosephosphate isomerase	Q5E956	26 917,2	$1,78 \times 10^8$	$1,45 \times 10^8$	626,74	579,12	32	30	92,3	90,3
Kinaza fosfoglicerynianowa 1 Phosphoglycerate kinase 1	Q3T0P6	44 936,2	$5,10 \times 10^7$	$7,25 \times 10^7$	442,54	515,65	27	29	70,7	76,2
Mioglobina Myoglobin	P02192	17 077,3	$1,15 \times 10^8$	$1,71 \times 10^8$	464,72	542,50	31	35	88,9	88,9
Mutaza fosfodlicerynianowa 2 Phosphoglycerate mutase 2	Q32KV0	28 855,7	$5,29 \times 10^7$	$5,75 \times 10^7$	276,01	331,57	16	18	62,0	66,4
Anhidraza węglanowa 3 Carbonic anhydrase 3	Q3SZX4	29 654,9	$1,35 \times 10^8$	$1,27 \times 10^8$	330,31	325,77	21	20	73,4	66,5
Izoenzym I kinazy adenylianowej Adenylate kinase isoenzyme 1	P00570	21 777,7	$3,11 \times 10^7$	$3,10 \times 10^7$	314,23	345,54	20	22	78,8	86,5
Białko DJ-1 Protein DJ-1	Q5E946	20 206,1	$3,59 \times 10^7$	$3,03 \times 10^7$	330,39	304,27	19	17	83,0	80,9
Białko szoku cieplnego 70 kDa 1A/1B Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	Q27975/ Q27965	70 512,4/ 70 542,5	$4,82 \times 10^6$	$2,14 \times 10^6$	200,80	151,30	13	9	24,0	17,9
Białko szoku cieplnego 71 kDa Heat shock cognate 71 kDa protein	P19120	71 467,4	$3,51 \times 10^6$	$3,74 \times 10^5$	120,77	49,93	7	3	13,8	5,3
Dehydrogenaza L-mleczanowa łańcuch A L-lactate dehydrogenase A chain	P19858	36 939,3	$2,29 \times 10^7$	$2,93 \times 10^6$	245,86	115,47	15	8	48,7	27,4
Dehydrogenaza L-mleczanowa łańcuch B L-lactate dehydrogenase B chain	Q5E9B1	37 008,3	$2,27 \times 10^6$	$2,28 \times 10^5$	56,60	25,52	3	2	8,0	12,8
Izomeraza glukoza-6-fosforanowa Glucose-6-phosphate isomerase	Q3ZBD7	63 097,8	$1,87 \times 10^7$	$2,00 \times 10^7$	182,38	242,76	12	17	27,1	41,4
Kinaza kreatynny typu S, mitochondrialna Creatine kinase S-type, mitochondrial	Q3ZBP1	47 743,8	$1,15 \times 10^7$	$3,53 \times 10^6$	224,34	92,56	15	8	75,0	20,5

Tabela 25 – cd.
Table 25 – cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Białko 1 wiążące fosfatydyloetanoloaminę Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P13696	21 099,5	$3,70 \times 10^7$	$1,56 \times 10^7$	162,24	150,59	9	9	61,4	58,2
Peroksyredoksyna-2 Peroxi-redoxin-2	Q9BGI3	22 230,8	$1,87 \times 10^6$	$2,81 \times 10^6$	51,47	151,54	4	11	37,6	64,8
Troponina-T, szybkich mięśni szkieletowych Troponin T, fast skeletal muscle	Q8MKI3	32 125,4	$2,69 \times 10^6$	$1,63 \times 10^7$	46,11	165,09	4	11	11,8	35,4
Białko 3 domeny PDZ i LIM PDZ and LIM domain protein 3	Q3SYZ8	34 808,6	$2,19 \times 10^7$	$1,36 \times 10^6$	97,19	33,59	6	2	23,1	7,5
Dehydrogenaza jabłczanowa, cytoplazmatyczna Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Q3T145	36 722,8	$2,48 \times 10^6$	$1,02 \times 10^7$	41,22	153,41	2	10	8,6	37,4
Dysmutaza ponadtlenkowa [Cu-Zn] Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P00442	15 853,4	$6,32 \times 10^6$	$4,27 \times 10^6$	111,95	137,12	7	8	81,5	75,0
Peroksyredoksyna-1 Peroxi-redoxin-1	Q5E947	22 437,3	$3,62 \times 10^6$	$3,02 \times 10^6$	106,84	134,17	7	9	40,2	54,7
Peroksyredoksyna-6 Peroxi-redoxin-6	O77834	25 123,5	$5,07 \times 10^5$	$2,06 \times 10^6$	30,09	61,55	2	4	15,1	20,9
Embrionalne jądrowe białko 1 układu mięśniowo-szkieletowego Musculoskeletal embryonic nuclear protein 1	Q32KU9	8 922,0	$2,90 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	123,45	96,54	8	7	70,7	58,5
Mitochondrialna acetylo-transferaza Acetyl-CoA	Q29RZ0	45 173,7	$3,52 \times 10^5$	$9,04 \times 10^5$	21,37	79,06	2	6	5,2	24,8
Serotransferyna Serotransferrin	Q29443	79 919,8	$1,33 \times 10^6$	$4,38 \times 10^5$	51,29	100,72	4	10	10,2	17,8
Sarkoplazmatyczna/endoplazmatyczna ATP-aza 1 Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	Q0VCY0	110 600,8	$1,97 \times 10^6$	$1,84 \times 10^6$	85,72	74,79	6	5	8,7	8,7

Tabela 25 – cd.
Table 25 – cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Aktyna mięśni gładkich Actin, aortic smooth muscle	P62739	42 407,6	$1,73 \times 10^6$	$2,87 \times 10^6$	50,38	78,80	3	5	11,6	17,5
Mitochondrialna hydrataza akonitanowa Aconitate hydratase, mitochondrial	P20004	86 099,5	$1,36 \times 10^5$	$7,89 \times 10^5$	7,15	85,90	1	6	2,4	15,3
Peptyd metioniny sulfotlenku reduktazy Peptide methionine sulfoxide reductase	P54149	26 045,9	$2,57 \times 10^6$	$5,72 \times 10^6$	48,93	60,75	3	3	21,8	21,8
Izozym 1 syntetazy adenyloburszynianu Adenylosuccinate synthetase izozym 1	A5PJR4	50 418,6	$2,11 \times 10^6$	$5,50 \times 10^5$	62,67	7,12	4	1	5,4	14,8
Czynnik elongacji 1-alfa 2 Elongation factor 1-alpha 2	Q32PH8	50 811,6	$8,13 \times 10^5$	$3,78 \times 10^5$	30,12	38,03	2	3	11,2	15,5
Glikoproteina kwasowa alfa-1 Alpha-1-acid glycoprotein	Q3SZR3	23 467,3	$8,37 \times 10^4$	$9,65 \times 10^5$	10,67	90,75	1	8	4,4	43,0
Aneksyna A6 Annexin A6	P79134	76 248,4	$7,02 \times 10^5$	$5,19 \times 10^5$	39,57	33,32	3	2	,6	4,7
Białko wiążące nukleotyd triady histydyny 1 Histidine triad nucleotide-binding protein 1	P62958	13 892,7	$3,96 \times 10^6$	$2,35 \times 10^4$	61,75	8,08	4	1	61,1	20,6
Małe białko mięśniowe Small muscular protein	Q3ZBD4	9 356,6	$6,59 \times 10^6$	$1,89 \times 10^6$	93,20	64,05	6	4	62,7	54,6
Tioredoksyna Thioredoxin	O97680	12 097,7	$3,49 \times 10^6$	$7,55 \times 10^5$	63,47	53,11	5	4	42,8	42,8
Miozyna-2 Myosin-2	Q9BE41	224 227,6	$5,69 \times 10^6$	$2,12 \times 10^6$	61,58	36,80	5	3	3,9	1,2
Glutaredoksyna-1 Glutaredoxin-1	P10575	12 010,8	$2,01 \times 10^6$	$3,28 \times 10^5$	56,72	13,98	4	1	52,8	16,9
Syntaza ATP pojednostka alfa, mitochondrialna ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P19483	59 832,7	$1,04 \times 10^5$	$1,64 \times 10^6$	10,67	43,79	1	3	4,4	5,2
Izozym 2 fruktozo-1,6-bisfosfatazy Fructose-1,6-bisphosphatase izozym 2	Q2KJJ9	37 051,8	$6,22 \times 10^5$	$7,44 \times 10^4$	30,06	16,07	2	1	3,8	5,8

Tabela 25 – cd.
Table 25 – cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Białko transportujące miedź ATOX1 Copper transport protein ATOX1	Q3T0E0	7 536,5	$1,17 \times 10^6$	$4,56 \times 10^5$	26,69	12,54	2	1	30,8	26,4
Białko 1 domeny LIM i bogata w cysteinę LIM and cysteine-rich domains protein 1	Q17QE2	41 920,1	$1,87 \times 10^5$	$2,72 \times 10^5$	16,64	41,29	1	3	4,1	5,7
Czynnik wydłużający delta-1 Elongation factor 1-delta	A5D989	31 255,3	$1,83 \times 10^5$	$8,06 \times 10^4$	20,85	21,11	1	1	8,5	8,5
Galektyna-1 Galactin-1	P11116	15 085,8	$2,21 \times 10^5$	$1,72 \times 10^5$	19,90	22,02	2	2	18,5	22,2
Białko wiążące Acetylo-CoA Acyl-CoA- binding protein	P07107	10 044,3	$3,13 \times 10^5$	$5,21 \times 10^5$	19,66	30,07	2	3	29,8	50,5
Kalmodulina Calmodulin	P62157	16 837,3	$1,11 \times 10^6$	$1,24 \times 10^4$	45,61	10,73	3	1	21,4	10,7
Czynnik wydłużający 2 Elongation factor 2	Q3SYU2	96 336,4	$6,87 \times 10^5$	$6,56 \times 10^4$	43,11	6,24	5	1	11,1	2,4

¹Ilość dopasowanych peptydów na podstawie wyszukiwania w bazie danych. ²Procent pokrycia sekwencji aminokwasów w białkach.

¹Number of matched peptides in the database search. ²Percentage of coverage of the protein amino acid sequence.

Jednym z białek, zidentyfikowanym w analizowanych ekstraktach zarówno z mięsa DFD, jak i RFN, była aneksyna A6 (annexin). Wiąże ona fosfolipidy w sposób zależny od jonów wapnia Ca^{+2} . Białko to jest związane z błonami siateczki sarkoplazmatycznej w mięśniach szkieletowych i może odgrywać rolę regulacyjną w cyklu uwalniania Ca^{+2} . Jej obecność we frakcji rozpuszczalnej była obserwowana również przez innych autorów (Laville i in., 2009b) i wskazywała na znaczącą degradację struktur, z którymi była związana (błony i miofibrylarne kompleksy kotwiczące) po 21 dniach przechowywania. W tym terminie obserwowano wzrost intensywności fragmentów aneksyny A6 i jej uwalnianie do frakcji rozpuszczalnej. Bjarnadóttir i in. (2012) wykazali istotne zmiany ekspresji tego białka w porównywanych grupach mięsa kruchego i twardego. W niniejszej pracy nieco większą intensywność tego białka w terminie 10 dni *pm* odnotowano w ekstraktach z mięsa DFD (tab. 25).

Kolejnym białkiem obecnym w ekstraktach z mięsa o zróżnicowanej jakości była peroksyredoksyna-6 (peroxiredoxin-6), należąca do rodziny 6 białek określanych jako peroksyredoksyny (Fisher, 2017) (tab. 25). Są one białkami, które w swym miejscu aktywnym posiadają resztę cysteinową. Ich rola jest złożona i stale poznawana. Najczęściej wskazywana jest ochrona przed stresem oksydacyjnym oraz udział w prawidłowym fałdowaniu białek i regulacji szlaków wewnątrzkomórkowych. Kilkakrotnie mniejsza ilość peroksyredoksyny-6 w próbkach z mięsa DFD po 10 dniach przechowywania może wskazywać na jej wcześniejszą proteolizę związaną ze stresem oksydacyjnym. Pod wpływem stresu oksydacyjnego wzrasta stężenie jonów Ca^{+2} i aktywacji ulegają enzymy proteolityczne z rodziny kalpain, np. μ -kalpaina. Wcześniej peroksyredoksynę-6 wskazano jako białkowy marker kruchości mięsa wykrywany w biopsjach i próbkach pobranych wkrótce po uboju (Jia i in., 2009). Jej obecność była skorelowana z barwą (Gagaoua i in., 2020b), marmurkowatością (Gagaoua i in., 2020a) i kruchością wołowiny (Gagaoua i in., 2021). Na podstawie wyników niniejszej pracy stwierdzono, że może ona być brana pod uwagę jako potencjalny białkowy wskaźnik mięsa o zróżnicowanej jakości.

Alfa-krystalina łańcuch B występowała tylko w ekstraktach z mięsa z odchyleniem jakościowym DFD (tab. 26). Uczestniczy ona, podobnie jak inne białka opiekuńcze, w naprawie uszkodzeń spowodowanych nieprawidłowym fałdowaniem i degradacji uszkodzonych białek. Białko to występuje najliczniej w tkankach o wysokiej zdolności oksydacyjnej. Jego największą intensywnością spośród 4 analizowanych mięśni wyróżniał się mięsień obszerny przyśrodkowy (*vastus medialis*) jagniąt. Potwierdziło to, że metabolizm oksydacyjny jest źródłem denaturacji białek (Hamelin i in., 2007). Na podstawie badań wymienieni ostatnio autorzy zasugerowali, że oksydatywne włókna mięśniowe są bardziej narażone na warunki stresowe i stąd wykazują większą ekspresję podjednostki/łańcucha B alfa-krystaliny. Podobne zjawisko mogło towarzyszyć obserwacjom w prezentowanej pracy.

Białkiem, które zidentyfikowano na poziomie $1,00 \times 10^6$ tylko w ekstraktach z mięsa DFD po 10 dniach przechowywania była kofilina-2 (tab. 26). Jest ona białkiem specyficznym dla mięśni szkieletowych, zlokalizowanym w cienkich filamentach cytoszkieletu, cytoplazmie i jądrze. Ma zdolność wiązania G- i F-aktyny w stosunku 1:1. Kontroluje odwracalną polimeryzację i depolimeryzację aktyny w sposób wrażliwy na pH, z maksymalną depolimeryzacją przy pH 8,0 i prawie

zniesioną przy $\text{pH} < 7,0$ (Papalouka i in., 2009). Oznacza to, że normalne po-ubojowe obniżenie pH z 7,0 do 5,5 z powodu akumulacji kwasu mlekowego sprzyjało polimeryzacji aktyny i skurczowi struktury sarkomeru, podczas gdy w mięsie DFD wyższe pH (powyżej 6,0) utrzymywało zależną od kofiliny depolimeryzację F aktyny, przyczyniając się do większej zarówno wodochłonności, jak i kruchości. Badania własne są zgodne z danymi literaturowymi, wskazującymi na wzrost intensywności kofiliny w odpowiedzi na stres przedubojowy cieląt rasy rubia gallega po 24 h przechowywania (Franco i in., 2015). Wcześniej istotne zmniejszenie intensywności kofiliny-2 w normalnej jakości mięśni *longissimus dorsi* i *semitendinosus* było stwierdzone w przypadku bydła rasy holsztyno-fryzyjskiej w krótkim czasie *pm* (0 w porównaniu z 24 h) (Jia i in., 2006). Zmniejszenie jej intensywności po 72 h wiązano również z postępującym procesem kruszenia mięsa świni (landrace \times yorkshire \times duroc) (Lametsch i in., 2003).

Wybrane 74 białka zestawione w tabelach 25 (z wyjątkiem titiny) i 26, na podstawie ich intensywności oraz odpowiadające im w sumie 1264 peptydy w oparciu o wartość m/z (masa/ladunek cząsteczki) uzyskanych jonów i czas retencji, poddano analizie statystycznej wykorzystując wielowymiarowe modele analizy danych (multivariate data analysis, MVA, SIMCA-P wersja 13.1, Umetrics, MKS Instruments Inc.) (Kotecka-Majchrzak i in., 2020; Rocchetti i in., 2020).

W celu zweryfikowania zróżnicowania pomiędzy mięsem RFN i DFD bydła na podstawie intensywności białek ekstraktów wykorzystano wielowymiarową analizę danych (rys. 13). Jako pierwszy zastosowano model PCA-X (pincipal component analysis-X). Po przeprowadzeniu szczegółowej analizy składowych głównych uzyskano model o dobrym zróżnicowaniu między tymi dwiema jakościowo zróżnicowanymi grupami białek mięsa (rys. 13a). Pierwsze dwa komponenty modelu PCA-X (t_1 i t_2) różnicujące mięso normalnej jakości i DFD pokazały wartości współczynnika całkowitej wariancji w wysokości 92,7% z wartościami $R^2 = 0,926$ i $Q^2 = 0,883$. Oznacza to, że 92,6% wariancji jest wyjaśnione przez dwie pierwsze składowe, a przewidywana wariancja stanowi 88,3%. Komponent pierwszy był odpowiedzialny za 79,5%, natomiast komponent drugi za 13,2% zmienności białek charakteryzujących mięso RFN i DFD.

W kolejnym etapie, aby zwiększyć separację pomiędzy grupami danych i zidentyfikować kluczowe białka odpowiedzialne za różnicowanie na poszczególne klasy jakościowe mięsa, wykonano dyskryminacyjną analizę ortogonalną najmniejszych cząstkowych kwadratów z wykorzystaniem modelu OPLS-DA (orthogonal partial least-squares discriminant analysis). Otrzymano model o wysokim zróżnicowaniu między badanymi klasami jakościowymi (rys. 13b). Zgrupowanie wariancji w jednym przewidywanym komponencie dało skorelowane współczynniki zmienności między mięsem RFN i DFD w wysokości 94,6%, przy wartościach $R^2 = 0,824$ i $Q^2 = 0,761$. Powyższe wyniki wykazały, że uzyskano bardzo dobrą separację w ramach wszystkich analizowanych klas danych, a tym samym bardzo dobre rozróżnienie między mięsem RFN i DFD po 10 dniach przechowywania.

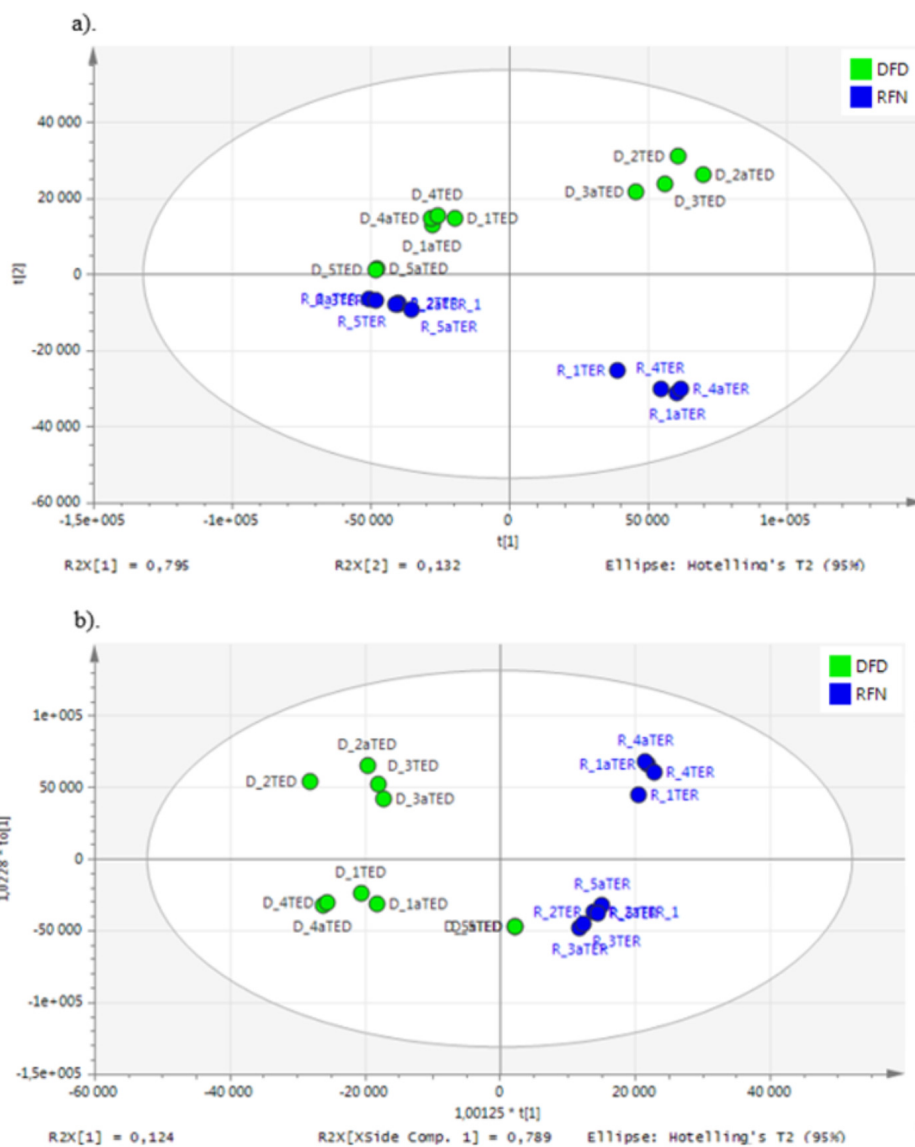
Ponadto na podstawie modelu OPLS-DA analizy wielowymiarowej dokonano dodatkowej klasyfikacji mięsa o zróżnicowanej jakości celem sprawdzenia, czy pozwoli ona na wyodrębnienie prób o odmiennej wodochłonności i kruchości. W rezultacie, porównując intensywność całego zestawu białek, spośród analizowanych

Tabela 26. Białka różniące zidentyfikowane w mięsie DFD lub RFN
Table 26. Differentiating proteins identified in DFD or RFN meat

Lp. No	Zidentyfikowane białka Identified protein	Numer akcesyjny Accession no.	Masa Mass (Da)	Średnia ogólna intensywność Average total intensity	Wynik unikatowy Score unique	Ilość dopasowanych peptydów ¹ Matched peptides ¹	Pokrycie sekwencji ² Sequence coverage ² (%)
DFD							
1.	6-fosfofruktokinaza, typ mięśniowy 6-phosphofructo- kinase, muscle type	Q0IIG5	86 147,9	$2,80 \times 10^7$	340,82	22	38,5
2.	Białko 3 cztery i pół domeny LIM Four and a half LIM domains protein 3	Q3ZBI6	33 178,3	$2,42 \times 10^6$	42,75	3	19,2
3.	Alfa-kryształina łańcuch B Alpha-crystallin B chain	P02510	20 036,4	$3,96 \times 10^6$	54,36	4	16,5
4.	Liaza adenylobursztynianowa Adenylosuccinate lyase	A3KN12	56 281,7	$6,42 \times 10^5$	33,43	3	14,4
5.	Prześciowa ATPaza retikulum endoplazmatycznego Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Q3ZBT1	90 012,8	$5,37 \times 10^5$	19,69	2	3,1
6.	Kofilina-2 Cofilin-2	Q148F1	18 850,4	$1,00 \times 10^6$	20,53	2	19,8
RFN							
1.	Anhidraza węglanowa 2 Carbonic anhydrase 2	P00921	29 113,2	$5,24 \times 10^5$	21,12	2	8,0
2.	Syntaza cytrynianowa, mitochondrialna Citrate synthase, mitochondrial	Q29RK1	51 999,8	$1,25 \times 10^5$	17,73	2	3,4

¹Ilość dopasowanych peptydów na podstawie wyszukiwania w bazie danych. ²Procent pokrycia sekwencji aminokwasów w białkach.

¹Number of matched peptides in the database search. ²Percentage of coverage of the protein amino acid sequence.



Rys. 13. Analiza PCA-X i OPLS-DA białek ekstraktów uzyskanych z mięsa o zróżnicowanej jakości DFD i RFN po 10 dniach przechowywania
 a) analiza składowych głównych PCA-X; b) analiza OPLS-DA; elipsa na rysunku przedstawia 95% przedział ufności.

Fig. 13. Analysis of PCA-X and OPLS-DA proteins in extracts obtained from meat of different quality DFD and RFN after 10 days of storage

a) principal components analysis PCA-X; b) OPLS-DA analysis; the ellipse in the figure shows the 95% confidence interval.

prób wyróżniono 4 oddzielne zbiory DFD_A i DFD_B oraz RFN_A i RFN_B. W tabeli 27 przedstawiono wielkości wycieku wirówkowego i kruchości w grupach wartości średnich wyznaczonych na podstawie wielowymiarowego modelu OPLS-DA.

Tabela 27. Analiza wielkości wycieku wirówkowego i kruchości w grupach wartości średnich wyznaczonych na podstawie modelu OPLS-DA

Table 27. Analysis of centrifugal drip size and tenderness in the groups determined on the basis of the OPLS-DA model

Właściwości Properties	Jakość mięsa – Meat quality					Wartość p p value
	DFD _A N = 2	DFD _B N = 3	RFN _A N = 2	RFN _B N = 3	Ogółem Total N = 10	
Wyciek wirówkowy Centrifugal drip (%)	1,61 ^{b*} ± 0,47	0,09 ^b ± 0,08	16,00 ^a ± 2,87	13,79 ^a ± 1,26	5,36 ± 6,94	0,000
Siła ciągnia WBSF (N/cm ²)	31,68 ^b ± 4,36	37,86 ^b ± 2,33	71,28 ^a ± 15,26	66,20 ^a ± 2,88	46,34 ± 17,01	0,000

*Wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$).

*Average values in rows marked with different indexes differ statistically substantially ($p \leq 0.05$).

Zgodnie z powyższym modelem klasy mięsa z odchyleniem jakościowym DFD_A stanowiły odpowiednio próby 2 i 3, a DFD_B próby 1, 4 i 5. Do grupy RFN_A zakwalifikowano mięśnie 2, 3 i 5, a do RFN_B – 1 i 4. Według podziału prób w wyznaczonych grupach zestawiono wartości średnie i wyniki analizy statystycznej pomiarów wodochłonności i kruchości (tab. 27).

W mięsie DFD_A wyznaczona wielkość wycieku stanowiła 1,61% i była większa w porównaniu z DFD_B (0,09%). Mięso RFN_A cechował większy (16,00%) wyciek wirówkowy w odniesieniu do jego ilości w próbach RFN_B, która była mniejsza i wynosiła 13,79% (tab. 27). Zatem próby DFD_A charakteryzowała gorsza wodochłonność i lepsza kruchość (31,68 N/cm²) w odniesieniu do mięśni DFD_B, które wyróżniała lepsza wodochłonność i gorsza kruchość (37,86 N/cm²). Mięso RFN_A w porównaniu z RFN_B cechowała niższa wodochłonność i obniżona kruchość (71,28 N/cm²). Próby RFN_B miały większą wodochłonność i lepszą kruchość (66,20 N/cm²) (tab. 27). Jednak różnice zarówno wodochłonności, jak i kruchości w grupach mięsa A i B charakteryzującego się tą samą jakością nie były istotne statystycznie.

W przypadku zidentyfikowanych peptydów, analogicznie jak w odniesieniu do białek, aby uwzględnić relacje między wyznaczonymi grupami mięsa o zróżnicowanej jakości, zastosowano wielowymiarową analizę danych PCA-X i OPLS-DA (rys. 14). Zbiór analizowanych danych zawierał 12 640 zmiennych. Model PCA-X w układzie dwóch pierwszych składowych wyjaśniał 75,3% zmienności. Składowa pierwsza odpowiadała za 55,7%, natomiast składowa druga była odpowiedzialna za 19,5% zmienności peptydów charakteryzujących mięso o zróżnicowanej jakości RFN i DFD (rys. 14a).

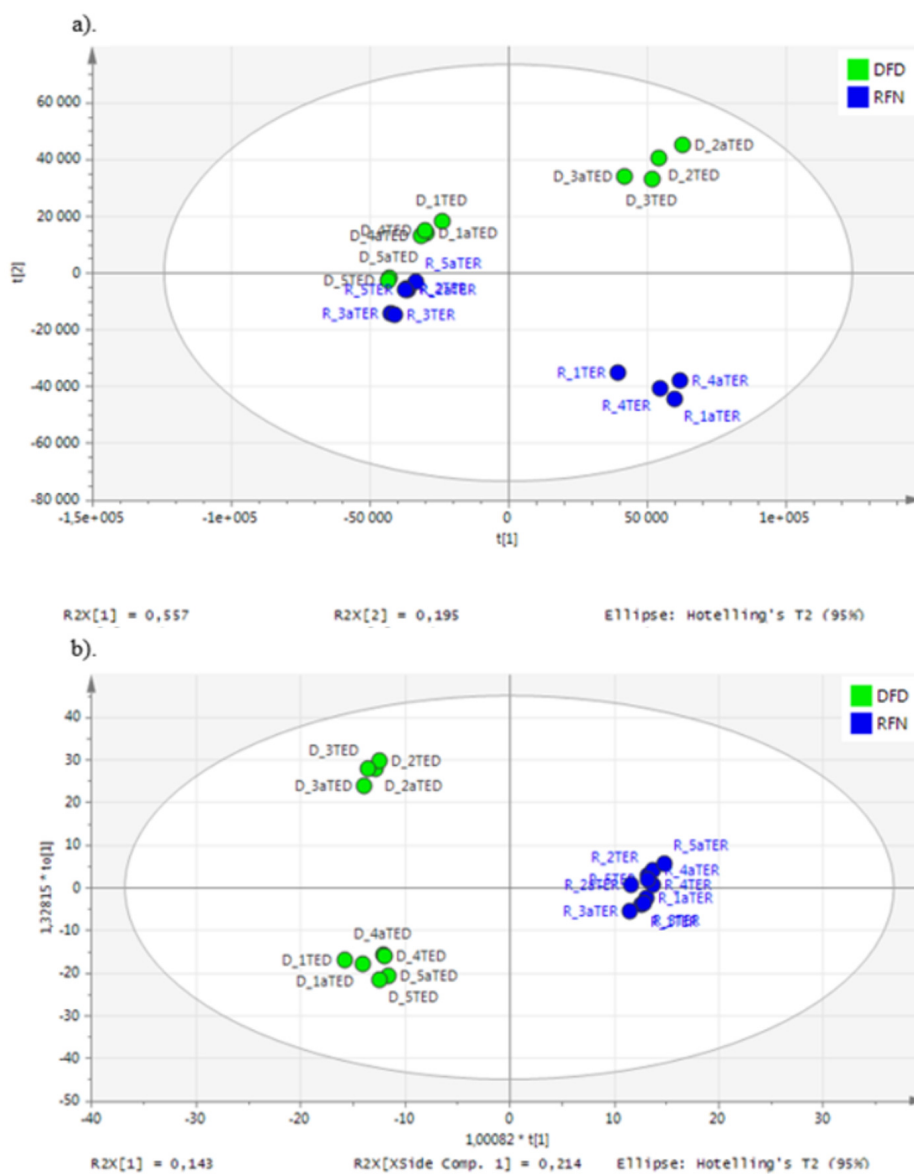
Początkowo na podstawie wyznaczonego modelu PCA-X nie było możliwe rozróżnienie między wszystkimi próbkami DFD i RFN badanego surowca. Stąd w celu lepszego rozdzielenia posiadanych danych zastosowano model OPLS-DA. Na podstawie przeprowadzonej analizy peptydów dla pierwszych czterech składników uzyskano następujące wartości modelu: $R^2 = 0,993$ i $Q^2 = 0,899$, a całkowita zmienność wynosiła 59,7%. Projekcja OPLS-DA uwidoczniła lepszą separację danych, wskazując na wyraźną dyskryminację mięsa DFD w porównaniu z RFN. Według modelu uzyskano dodatkową separację w obrębie zbioru DFD. Możliwe było wyodrębnienie grup DFD_A i DFD_B, które dotyczyły takich samych prób jak w przypadku białek. Próby RFN stanowiły tylko jedną homogeniczną podgrupę (rys. 14b).

Stwierdzono, że przy wykorzystaniu analizy białek i peptydów, stosując zaawansowane, wielowymiarowe modele PCA-X i OPLS-DA, możliwe jest precyzyjne grupowanie mięsa bydła o zróżnicowanej jakości. Ponadto na podstawie modelu OPLS-DA wskazano, że mięso o zróżnicowanej jakości DFD i RFN cechują odmienne profile białek, z których potencjał dyskryminacyjny wykazały: alfa- i beta-enolaza, białko bogate w cysteinę i glicynę (cysteine and glycine-rich protein 3), domeny PDZ i LIM białka 3 (PDZ and LIM domain protein 3), 6-fosfofruktokinaza, białka szoku cieplnego beta-1 i beta-6 (HSP beta-1 i beta-6), łańcuch A dehydrogenazy L-mleczanowej (L-lactate dehydrogenase A chain), kinaza kreatynowa typu M, myoglobina, fosfatydyloetanolamina wiążąca białko-1, troponina-T (tab. 28).

Wyżej wymienione białka w modelu OPLS-DA charakteryzowały się współczynnikiem ważności zmiennych (ang. variable importance, VIP) w przedziale od 7,29 do 1,05. W zastosowanej analizie wartości wskaźnika $VIP > 1$ wskazują zmienne o dużym znaczeniu dla modelu. Zidentyfikowane kluczowe peptydy odpowiedzialne za zróżnicowanie mięsa DFD i RFN zestawiono w tabeli 29.

Poniżej omówiono wybrane białka o największym współczynnikiem ważności zmiennych wyznaczonym na podstawie zastosowanego modelu OPLS-DA oraz odpowiadające im peptydy.

Alfa- i beta-enolaza należą do enzymów glikolitycznych. Ich intensywność była większa w mięśniach o obniżonej jakości w porównaniu z RFN i wynosiła odpowiednio $4,19 \times 10^7$ i $8,73 \times 10^6$ oraz $4,98 \times 10^8$ i $5,10 \times 10^7$. Jako enzymy cytozolowe enolazy odpowiadają za konwersję 2-fosfoglicerynianu do fosfoenolopirogronianu, przy czym izoforma alfa znajduje się w embrionalnej postaci wszystkich tkanek, a beta-enolaza występuje głównie w mięśniach poprzecznie prążkowanych. Beta-enolaza odgrywa ważną rolę w poubojowym obniżeniu wartości pH i metabolizmie. Indukuje ona metabolizm glukozy w warunkach niedotlenienia, wywołując w ten sposób odpowiedź komórkową na stres związany z ograniczeniem dopływu tlenu i poziomem glukozy. Rezultaty uzyskane w niniejszej pracy są zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi ją jako kluczowy enzym związany ze stanami niedotlenienia i warunkami stresu (Didiasova i in., 2019). Beta-enolaza została również zidentyfikowana jako dodatni biomarker silnie obrazujący kruchość wołowiny (Marino i in., 2014; Picard i Gagaoua, 2020; Gagaoua i in., 2020a). Aktywność enolaz związana jest z innymi szlakami biologicznymi, takimi jak HSP i stres oksydacyjny (Gagaoua i in., 2015).



Rys. 14. Analiza PCA-X i OPLS-DA peptydów uzyskanych z mięsa o zróżnicowanej jakości DFD i RFN po 10 dniach przechowywania
 a) analiza składowych głównych PCA-X; b) analiza OPLS-DA; elipsa na rysunku przedstawia 95% przedział ufności.

Fig. 14. Analysis of PCA-X and OPLS-DA peptides obtained from meat of different quality DFD and RFN after 10 days of storage
 a) principal components analysis PCA-X; b) OPLS-DA analysis; the ellipse in the figure shows the 95% confidence interval.

Tabela 28. Białka o największym współczynniku zmiennych w projekcji OPLS-DA oraz wybrane zidentyfikowane peptydy
Table 28. Proteins with the highest coefficient of variables in the OPLS-DA projection and selected identified peptides

1 Białka Proteins	2 Wynik białka Protein score	3 Ilość dopasowanych peptydów ¹ Number of matched peptides ¹	4 Stożenie pokrycia sekwencji ² Sequence coverage ² (%)	5 Współczynnik ważności zmiennych VIP Coefficient of variable importance VIP	6 Wybrane zidentyfikowane peptydy Selected identified peptides
Beta-enolaza Beta-enolase	1 056.81	61	84.7	7,2951	(K)ACNGLLLK(V) (K)DATNVGDEGGFAPNILENNEALELLK(T) (R)GNPTVEVDLHTAK(G)
Białko szoku cieplnego beta-1 Heat shock protein beta-1	222.22	13	85.5	2,1372	(R)LFDQAFGLPR(L) (R)LPPEWSQWLSHSGWPGYVR(A) (R)VSLDVNHFAPPEELTVK(T)
Białko 3 bogate w cystynę i glicynę 3 Cysteine and glycine- rich protein	225.99	11	64.9	1,6715	(R)CAICGK(S) (K)NFGPTGJGFGGLTHQVEK(K) (K)TVYHAEIQCNGR(S)
Białko 3 domeny PDZ i LIM PDZ and LIM domain protein 3	156.07	11	33.5	1,6598	(R)LWSPQVTEGK(A) (K)MPFCDK(C) (K)VHGGAGGTQK(M)
6-fosfofruktokinaza, typ mięśniowy 6-phosphofructoki- nase, muscle type	477.21	33	42.3	1,6551	(K)ALAVLTSGGDAQGMNAAVR(A) (R)ALVFQPVTELK(E) (R)GGTSAFDR(I)
Alfa-enolaza Alpha-enolase	146.14	9	23.5	1,6499	(K)FGANAILGVSLAVCK(A) (K)GVPLYR(H) (K)VNQIGSVTESLQACK(L)

Tabela 28 – cd.
Table 28 – cont.

1	2	3	4	5	6
Białko szoku cieplnego beta-6 Heat shock protein beta-6	224.35	13	75.0	1,50383	(R)APSVALPTAQVSTDPGHHFVLLLDVK(H) (R)ASAPLPGLSAPGR(L) (K)HFSPEEIAVK(V)
Dehydrogenaza L-mleczanowa łańcuch A L-lactate dehydrogenase A chain	287.60	19	61.7	1,4330	(R)LGVHP ¹ LSCHGWILGEHGDSSVPVWWSGVN VAGVSLK(N) (R)LNLVQR(N) (R)LVITAGAR(Q)
Kinaza kreatyny M-type Creatine kinase M-type	1 222.00	68	93.4	1,3801	(K)AEEY ² PDLSK(H) (K)AGHPFMWNEHLGYVLTCPNLTGLR(G) (K)DLFDPIQDR(H)
Mioglobina Myoglobin	467.60	30	88.9	1,3585	(K)ALELFR(N) (K)ASEDLKK(H) (K)GHHEAEVK(H)
Białko 1 wiążące fosfatyloenolaminę Phosphatidyethanolam ine binding protein	1 204.54	11	58.2	1,2123	(K)KYELGAPVAGTCYQAEWDDYVPK(L) (K)IYEQLSGK(-) (K)VLTP ¹ TQVK(N)
Troponina-T, szybkich mięśni szkieletowych Troponin-T, fast skeletal muscle	198.56	14	39.4	1,1652	(R)KKEEELVALK(E) (R)AEDDLKK(K) (K)ARREEDAK(R)

¹Ilość dopasowanych peptydów na podstawie wyszukiwania w bazie danych. ²Procent pokrycia sekwencji aminokwasów w białkach.

¹Number of matched peptides in the database search. ²Percentage of coverage of the protein amino acid sequence.

Tabela 29. Wybrane 22 peptydy o największym współczynniku ważności zmiennych w projekcji OPLS-DA, zidentyfikowane w ekstraktach z mięsa o zróżnicowanej jakości

Table 29. Selected 22 peptides with the highest coefficient of importance variables in the OPLS-DA projection, identified in extracts from meat of different quality

Peptydy Peptides	Jon macierzysty Parent ion (m/z)	Ładunek z Exp. z	Wynik peptydu Peptide score	Czas retencji	Współczynnik ważności zmiennych VIP Variable importance VIP	Białka Proteins
1	2	3	4	5	6	7
(R)AVFPSIVGRPR(H)	400.2413	3	16.63	16,44	2,1269	Aktyna mięśni gładkich Actin, aortic smooth muscle
(K)TLTQGGVTYR(G)	548.2932	2	6.86	8,82	2,1265	Białko 3 cztery i pół domeny LIM Four and a half LIM domains protein 3
(R)NKVTPSGYTLDDQCIQTGVNDNPGHPFIK(T)	747.3746	4	14.74	19,78	2,1227	Kinaza kreatynny typu S, mitochondrialna Creatine kinase S-type, mitochondrial
(R)HVLATLGEK(M)	484.2829	2	13.13	8,35	2,1096	Izoformy 1/3 łańcuchów lekkich miozyny Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform
(R)MRPEGYDVTLYPK(A)	613.3114	2	10.84	17,75	2,1030	Białko 3 domeny PDZ i LIM
(R)VLQELVNDGADDRPAGTR(S)	642.6617	3	21.52	13,36	1,9482	PDZ and LIM domain protein 3
(K)VHGGAGGTQK(M)	456.2387	2	10.84	1,42	1,9189	
(K)GIGYQGAGCLSTDTGEHLGLQFQQSPK(Q)	969.4638	3	24.75	20,74	2,0159	Białko 3 bogate w cystynę
(R)KALDSTTVAHSEIYCK(V)	674.9988	3	21.38	11,10	1,9859	i glicynę
(K)NFGPTGIGFGLTHQVEK(K)	620.3217	3	9.65	21,10	1,9266	Cysteine and glycine-rich protein 3

Tabela 29 – cd.
Table 29 – cont.

1	2	3	4	5	6	7
(R)IINEPTAAAIAYGLDKK(V)	596.6690	3	19.42	20,07	2,0031	Białko szoku cieplnego 71 kDa Heat shock cognate 71 kDa protein
(K)LAMQEFMLPVGASSFR(E)	632.9958	3	17.62	33,41	1,9987	Beta-enolaza
(K)TLGPALLEKK(K)	471.2882	2	15.67	13,76	1,9034	Beta-enolase
(K)FMIELDGTENK(S)	648.8107	2	13.11	19,93	1,8804	
(R)FRAAVPSGASTGIYEALERLDGDK(S)	631.5772	4	16.05	21,94	1,7982	
(R)ALPAAAIIEGPAYNR(A)	707.3789	2	23.04	16,50	1,9442	Białko szoku cieplnego beta-1
(R)KYTLPPGVDPITIVSSLSPEGTLTIVEAFLPK(S)	1 065.2471	3	19.81	28,95	1,7901	Heat shock protein beta-1
(K)SAITQSAEITIPVTFQAR(A)	910.4818	3	16.46	22,97	1,7742	
(K)SGSHTVAVMNVGAPAAAGMNAAVR(S)	723.3627	3	16.78	17,19	1,9107	6-fosfofruktokinaza typ mięśniowy 6-phosphofructokinase, muscle type
(K)GGSGSGPTIEEVD(-)	602.7707	2	6.98	11,85	1,8626	Białko 1 szoku cieplnego 70 kDa
(K)FIIPNIVK(Y)	472.3026	2	13.60	24,33	1,7895	Heat shock 70 kDa protein 1 Dehydrogenaza L-mleczanowa łańcuch A L-lactate dehydrogenase A chain
(R)AHLVDFHQAVDGLQEVQR(Q)	553.0334	4	12.92	23,92	1,7709	Liaza adenylobursztynianowa Adenylosuccinate synthetase isozyme 1

W mięsie DFD beta-enolazę zidentyfikowano na podstawie 71 peptydów, a w przypadku prób RFN ich ilość wynosiła 35. Na podstawie badań własnych stwierdzono, że beta-enolaza jest białkiem, które można proponować jako biomarker jakości mięsa, jednocześnie zwracając szczególną uwagę na 4 peptydy (tj. LA-MQEFMILPVGASSFR, FRAAVPSGASTGIYEALERDGDGK, TLGPALLEKK, FMIELDGTENK) wskazane w prezentowanym modelu OPLS-DA (tab. 29).

W przypadku mięsa z wadą DFD szczególną uwagę zwracają białka szoku cieplnego zaangażowane w odpowiedź komórkową na stres oraz apoptozę. Ekspresja HSP beta-1 i beta-6 (heat shock protein beta-1 i beta-6) w mięsie DFD była około 100-krotnie większa w porównaniu z próbami RFN. Na podstawie współczynnika ważności zmiennych stwierdzono duży potencjał dyskryminacyjny peptydów KYTLPPGVDPTLVSSLSPEGLTVEAPLPK, ALPAAAIEGPAYNR, SA-TQSAEITIPVTFQAR, na podstawie których zidentyfikowano HSP beta-1.

W ekstraktach z mięsa o obniżonej jakości stwierdzono również większą intensywność HSP70 kDa 1A i 1B oraz HSP71 kDa. Ponadto uzyskane wyniki pozwalają na wskazanie dwóch peptydów powyższych białek – odpowiednio GGSGSGP-TIEEVD oraz IINEPTAAAIAYGLDKK – jako potencjalnych wskaźników cech mięsa o zróżnicowanej jakości. Na podstawie profilu białek (SDS-PAGE) ekstraktów z mięsa o zróżnicowanej jakości obserwowano istotne zmiany udziału pasma o masie cząsteczkowej 68 kDa. Wyniki te korespondują z danymi uzyskanymi przy wykorzystaniu UHPLC-Q-TOF-MS/MS. Z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że były to białka szoku cieplnego HSP70 1A/1B oraz HSP71 kDa zidentyfikowane odpowiednio na podstawie 13 (DFD) i 9 (RFN) oraz 7 (DFD) i 3 (RFN) peptydów. Uzyskane wyniki są zgodne z rezultatami Di Luca i in. (2011), którzy porównywali profil białek sarkoplazmatycznych z mięsa wieprzowego w 5 grupach, w tym między innymi z wadą DFD. Mięso o najmniejszym wycieku soku mięśniowego charakteryzowała największa intensywność HSP70.

Białko 3 bogate w cysteinę i glicynę (cysteine and glycine-rich protein 3) w próbach DFD wyróżniała ponad stukrotnie większą intensywność w odniesieniu do mięsa RFN. Białko to ulega ekspresji tylko w mięśniach poprzecznie prążkowanych. Zlokalizowane jest zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie. Oddziałuje z wieloma białkami linii Z, np. α -aktyniną i kofiliną-2 oraz z białkami kostamerów. Uczestniczy w interakcjach białko-białko, pełni funkcję zarówno strukturalną, jak i funkcjonalną (Barash i in., 2005). Działa ono jako regulator homeostazy glukozy w mięśniach szkieletowych (Hernandez-Carretero i in., 2018). Wcześniej wykazano jego związek z parametrami jakości mięsa wieprzowego, z jego pH i WHC (Xu i in., 2010) oraz z kruchością wołowiny (Gagaoua i in., 2021). Stwierdzono, że trzy peptydy tego białka – GIGYGQGAGCLSTDTGEHLGLQFQQSPK, KALD-STTVAAHESEIYCK, NFGPTGIGFGGLTHQVEK – odgrywały szczególną rolę w różnicowaniu mięsa normalnej jakości i z wadą DFD.

Domeny PDZ i LIM białka 3 znane są również jako białko LIM związane z aktyniną (PDZ and LIM domain protein 3). Białko to w mięśniach DFD charakteryzowało się większą intensywnością w porównaniu z próbami RFN. Jego obecność w mięsie o obniżonej jakości zidentyfikowano na podstawie 6 peptydów. Trzy z nich (tj. MRPPEGYDVTLYPK, VLQELVNDGADDRPAGTR i VHGGAGGTQK) znalazły się na liście peptydów ważnych w odniesieniu do analizowanych grup su-

rowca. Stąd mogą być sugerowane jako peptydy determinujące cechy jakościowe mięsa DFD i RFN.

Występowanie 6-fosfofruktokinazy (6-phosphofructokinase, muscle type) odnotowano jedynie w mięsie DFD po 10 dniach przechowywania. Jest ona enzymem metabolicznym pełniącym funkcję w glikolizie i fosforylacji. Wykazuje właściwości allosteryczne. Jest aktywowana przez ADP, AMP lub fruktozobisfosforan. Na podstawie modelu OPLS-DA dla peptydu SGSHTVAVMNVGAPAAGMNAAVR wyznaczono wartość współczynnika ważności zmiennych równą 1,91. Według danych literaturowych we frakcji wycieku wirówkowego z mięsa świń o zróżnicowanej jakości intensywność tego pasma wzrastała podczas 7-dniowego przechowywania (Di Luca i in., 2011).

W literaturze jako efekt proteolizy opisywano najczęściej składniki rozległego systemu bocznego połączenia miofibryli z linią Z (które obejmują titinę, nebulinę, desminę, winkulinę, troponinę-T, α -aktyninę) oraz z błoną komórkową i blaszką podstawną – tj. winkulinę, dystrofinę, talinę, ankiryne czy lamininę (Taylor i in., 1995a; Koochmarai, 1996; Ouali i in., 2013). W niniejszych badaniach własnych intensywność troponiny-T (Tn-T fast) w ekstraktach z mięsa RFN wynosiła $1,63 \times 10^7$ i była większa w porównaniu z DFD ($2,69 \times 10^6$). Oznaczona mniejsza intensywność Tn-T oraz mniejsza liczba zidentyfikowanych peptydów w mięśniach DFD w odniesieniu do RFN świadczy o jej większej degradacji i rozpuszczalności oraz może tłumaczyć lepszą kruchość tego mięsa. Troponina-T wraz z Tn-C i Tn-I stanowią część kompleksu regulującego skurcz mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego. Wykazano, że Tn-T jest substratem dla μ -kalpajny (Ho i in., 1994). Uznawana jest powszechnie jako biomarker związany z kruchością mięsa oznaczoną sensorycznie i instrumentalnie niezależnie od płci i rasy bydła (blond d'aquitaine, norwegian red, charolais) (Picard i Gagaoua, 2020).

W prezentowanych badaniach własnych aktyne (actin, aortic smooth muscle) zidentyfikowano na podstawie 3 i 5 peptydów odpowiednio w mięsie DFD i RFN. Na podstawie modelu OPLS-DA peptyd AVFPSIVGRPR wskazano jako ważny z punktu widzenia kształtowania cech mięsa (tab. 29). Wcześniejsze badania przy użyciu elektroforezy 2-D wykazały, że fragmenty aktyny pojawiały się we frakcji rozpuszczalnej już po 10 min *pm* (Laville i in., 2009b) oraz podczas dojrzewania mięśni (Lametsch i in., 2002; Morzel i in., 2004, 2008). Według Laville i in. (2009b) obecność aktyny związana była z jej większą rozpuszczalnością w krótkim czasie *pm*. Jednocześnie w grupie nierozpuszczalnych białek miofibrylarnych wraz z wydłużeniem składowania obserwowano jej zanik, podobnie jak łańcucha lekkiego miozyny 2.

Łańcuchy lekkie 1 i 3 miozyny wyróżniały się większą intensywnością w mięśniach DFD w porównaniu z RFN. Stwierdzono, że peptyd HVLATLGEK łańcuchów lekkich 1 i 3 miozyny może odgrywać szczególną rolę jako wskaźnik mięsa o zróżnicowanej jakości DFD i RFN. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na istotnie zróżnicowaną intensywność łańcuchów lekkich miozyny 3 i 6B oraz regulatorowego łańcucha lekkiego miozyny 2 w mięsie DFD i RFN (Franco i in., 2015). W badaniach własnych zidentyfikowano trzy białka – tj. łańcuchy lekkie miozyny 1 i 3 (myosin light chain 1/3), izomerazę triofofosforanową (triosephosphate isomerase) i kofilinę-2 (cofilin-2) –

spośród dziewięciu białek różniących się intensywnością w odpowiedzi na stres przedubojowy w mięsie bydła rasy Rubia Gallega (Franco i in., 2015).

Badania stabilnych termicznie markerów peptydowych wykazały, że izoformy łańcuchów ciężkich (MHC) i lekkich miozyny (MLC) są unikalne zarówno dla danego gatunku zwierzęcia, jak i izoformy białka, z której pochodzą. Spośród białek sarkoplazmatycznych jako markery wskazano GAPDH, mioglobinę i beta-enolazę (Montowska i in., 2015). Na podstawie wyników własnych stwierdzono, że łańcuchy lekkie miozyny 1 i 3, mioglobina i beta-enolaza mogą być również białkowymi wskaźnikami jakości mięsa RFN i z wadą DFD.

Zmiany ekspresji białek w dwóch analizowanych grupach jakościowych mogły być wynikiem fosforylacji. Mato i in. (2019) wykazali, że poziom fosforylacji białek w mięsie DFD był około trzykrotnie większy w porównaniu z próbkami RFN. Według tych autorów odwracalna fosforylacja w kilku oddziałujących białkach może wywoływać szybkie i rozległe zmiany proteomu mięsa w odpowiedzi na stres. Dotyczy ona białek zaangażowanych w skurcz włókien mięśniowych, np. regulatorowego łańcucha lekkiego miozyny 2, aktyny, wolnej i szybkiej troponiny-T, metabolizmu (beta-enolaza i kinaza kreatyny) i funkcji związanych z reakcją na stres (HSP beta-1 i beta-6).

Analiza proteomiczna wykazała, że ekspresja wielu białek obserwowana po 10 dniach dojrzewania w mięsie o zróżnicowanej jakości była odmienna. Różnice dotyczyły białek strukturalnych, powiązanych ze skurczem mięśni, metabolizmem, w tym enzymów glikolitycznych, szoku cieplnego, regulujących procesy komórkowe i apoptozę oraz transportujących. W mięsie DFD wysoka wartość pH sprzyjała przyspieszeniu proteolizy i procesów uwalniania białek tworzących strukturę miofibryli. Znalazło to potwierdzenie w zastosowanych wielowymiarowych modelach PCA-X i OPLS-DA. Ostatecznie na podstawie modelu OPLS-DA wskazano 12 białek i wytypowano 22 peptydy, które charakteryzowały się największym potencjałem dyskryminacyjnym w odniesieniu do jakości mięsa definiowanej na podstawie wartości pH i barwy, która finalnie wpływała na kształtowanie jego wodochłonności i kruchości. Możliwość praktycznego wykorzystania zarówno białek, jak i peptydów wyznaczonych w prezentowanej pracy jako biomarkerów w przemysłowej produkcji wysokiej jakości mięsa wymaga jednak dalszych badań.

6. PODSUMOWANIE

Białka i ich udział w kształtowaniu jakości mięsa, jako jednego z ważniejszych składników diety wielu konsumentów, pozostają zagadnieniem wciąż aktualnym. Kompleksowe starania osób zaangażowanych w produkcję mięsa – związane z doбором materiału genetycznego, dobrostanem żywca, pozyskiwaniem surowca w zakładach mięsnych i jego jak najlepszym zabezpieczeniem przed zepsuciem – zmierzają do otrzymania mięsa o zdefiniowanej wysokiej jakości. Ze względu na złożoność problemu jeszcze nie wszystkie aspekty produkcji surowca mięsnego zostały do końca wyjaśnione. Przedmiotem niniejszej pracy była analiza białek mięśniowych jako potencjalnych wskaźników jakości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością oraz mięsa bydła z wadą DFD, ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływania na wodochłonność i kruchość pozyskanego surowca.

Wychładzanie mięsa ze zróżnicowaną szybkością wpłynęło na tempo przemian glikolitycznych ocenionych na podstawie wartości pH, ilości glikogenu i kwasu mlekowego. Zastosowanie szybkości wychładzania $0,27^{\circ}\text{C}/\text{min}$ prowadziło do zjawiska skurczu chłodniczego, które było przyczyną wysokich ubytków masy i obniżonej kruchości mięsa mimo zachodzącego procesu dojrzewania. Stosowane powszechnie zróżnicowane pomiary wodochłonności odnoszą się do nieco innych zmian w strukturze i białkach mięsa. Pomiar zdolności wiązania i zatrzymywania wody, uwzględniający jednocześnie wielkości ubytków przechowalniczych oraz termicznych, wydaje się najlepszym wskaźnikiem w ocenie jakości mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością, szczególnie wówczas, gdy istnieje ryzyko wystąpienia skurczu chłodniczego. Na podstawie badań opisanych w niniejszej pracy zaleca się stosowanie wychładzania o maksymalnej szybkości spadku temperatury wynoszącej $0,15^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Zmiany udziału białek mięśniowych i frakcji wycieku wirówkowego analizowane metodą Western blot były determinowane procesem poubojowego wychładzania, który indukował zjawisko skurczu chłodniczego oraz wpłynął na jakość mięsa wieprzowego, jego wodochłonność i kruchość. Szybsze wychładzanie przyczyniło się do zmiany tempa degradacji i odmiennej proteolizy titiny i łańcuchów ciężkich miozyny, tworzących struktury cytoszkieletu włókien mięśniowych oraz troponiny-T i GAPDH. Mogły one być związane z aktywnością enzymów indukowaną temperaturą i wartością pH, obecnością jonów Ca^{+2} , przepuszczalnością błon komórek miofibrili. Prawdopodobnie zależały one również od kontrakcji włókien mięśniowych przy znaczącym udziale łańcuchów ciężkich miozyny i aktyny regulowanych przez układ wielu interakcji białko-białko.

Ostatecznie znalazło to odbicie w większej twardości i gorszej wodochłonności mięśni C wychładzanych najszybciej. Zwykle omawiając skurcz chłodniczy, zwraca się uwagę na superkontrakcję pomiędzy aktyną i miozyną, której efektem są nad-

miernie skurczone sarkomery i włókna mięśniowe. Niniejsze badania wnoszą prawdopodobnie jeszcze jedną dodatkową informację, wskazującą na możliwość wyjaśnienia przyczyn skurczu chłodniczego. Stanowić ją może zwiększone usieciowanie łańcuchów ciężkich miozyny lub produktów ich degradacji z innymi białkami cytoszkieletu, powodujące agregację i skutkujące usztywnieniem struktury włókien mięśniowych. Zagadnienie to wymaga jednak dalszych badań, uwzględniających wpływ dostępności energii dla kontraktujących miofilamentów miozyny i aktyny oraz oddziaływania środowiska, w tym przede wszystkim temperatury na rozmiar skurczu, jego siłę i trwałość.

Białka wycieku wirówkowego (takie jak titina T2 i produkty degradacji titiny T1, amylo- α -1,6-glukozydaza, niezidentyfikowane pasmo bezpośrednio nad fosforylaza b, 6-fosfofruktokinaza, kinaza pirogronianowa, dehydrogenaza mleczanowa) mogą być potencjalnymi wskaźnikami w ocenie jakości i właściwości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością, w tym jego wodochłonności i kruchości.

Analizowane w II etapie badań mięso bydła normalnej jakości (RFN) w porównaniu z próbami mięsa wadliwego DFD po 10 dniach przechowywania charakteryzowało się istotnie mniejszą wartością pH, jaśniejszą barwą, gorszą wodochłonnością i kruchością. Jak wskazują wyniki badań opisanych w niniejszej pracy, zasięg zmian związanych z występowaniem wady jakościowej typu DFD może być zróżnicowany. Stąd ocenie elektroforetycznej i analizie z wykorzystaniem wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS poddano ekstrakty białek mięśniowych. Na podstawie profilu elektroforetycznego SDS-PAGE stwierdzono istotnie większy udział pasm E1 (2400 kDa), E2+3 (1200-400 kDa) i E6 (~68 kDa) w mięsie DFD w porównaniu z RFN. Wykazano istotną dodatnią zależność między udziałem wyżej wymienionych białek a wartością pH oraz istotną ujemną korelację z jasnością barwy, wodochłonnością i kruchością mięsa o zróżnicowanej jakości. Zastosowanie wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS z pominięciem elektroforezy dwuwymiarowej umożliwiło kompleksową analizę białek obecnych w ekstraktach pozyskanych z mięsa o zróżnicowanej jakości RFN i DFD. Identyfikacja białek i peptydów była możliwa dzięki wykorzystaniu baz danych jako narzędzi współczesnej proteomiki.

Zastosowanie wielowymiarowych modeli analizy danych pozwoliło na wskazanie potencjalnych białkowych wskaźników jakości mięsa bydła normalnej jakości (RFN) i z wadą DFD. Na liście 12 białek o dużym potencjale dyskryminacyjnym znalazły się: alfa- i beta-enolaza, białko bogate w cysteinę i glicynę (cysteine and glycine-rich protein 3), domeny PDZ i LIM białka 3, (PDZ and LIM domain protein 3), 6-fosfofruktokinaza, białka szoku cieplnego beta-1 i beta-6 (HSP beta-1 i beta-6), łańcuch A dehydrogenazy L-mleczanowej, kinaza kreatynowa typu M, mioglobina, fosfatydyloetanolamina wiążąca białko-1, troponina-T.

Wielopłaszczyznowe zmiany białek stanowią element licznych mechanizmów zaangażowanych podczas konwersji mięśni w mięso. W konsekwencji kształtują one jakość mięsa, w tym wodochłonność i kruchość. Dostępne metody analityczne pozwalają na coraz pełniejszą analizę białek mięśniowych. Badania proteomiczne

i peptydomiczne są bardzo pomocne i przybliżają możliwości opracowania oraz wdrażania technologii związanych z prognozowaniem jakości pozyskiwanego surowca mięsnego. Technologia taka przyczyniłaby się do zoptymalizowania produkcji mięsa wysokiej jakości.

7. WNIOSKI

Przeprowadzone badania pozwalają na sformułowanie następujących wniosków i stwierdzeń:

1. Zastosowanie wychładzania prób C z szybkością $0,27^{\circ}\text{C}/\text{min}$ wiązało się z wystąpieniem zjawiska skurczu chłodniczego, tj. superkontrakcją pomiędzy aktyną i miozyną. Jego skutkiem było istotne pogorszenie wodochłonności i kruchości mięsa. Uwzględniając pożądane cechy jakościowe mięsa, w tym jego wodochłonność i kruchość, zaleca się stosowanie maksymalnej szybkości wychładzania mięsa na poziomie $0,15^{\circ}\text{C}/\text{min}$. W wyjaśnieniu przyczyn skurczu chłodniczego ważną rolę przypisano łańcuchom ciężkim miozyny, których agregaty o masie > 250 kDa pojawiały się już 45 min *pm*, po analizie metodą Western blot. Można przypuszczać, że wzrost usieciowania MHC w wyniku oddziaływania z produktami degradacji lub innymi białkami sprzyjał usztywnieniu struktur włókien mięśniowych.

2. Spośród białek wycieku wirówkowego analizowanych na podstawie profilu elektroforetycznego SDS-PAGE produkty degradacji titiny natywnej T1 – takie jak titina T2, amylo- α -1,6-glukozydaza, niezidentyfikowane pasmo 3 bezpośrednio nad fosforylaza b, 6-fosfofruktokinaza, kinaza pirogronianowa i dehydrogenaza mleczanowa – mogą być potencjalnymi białkowymi wskaźnikami w ocenie jakości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością.

3. Zmiany udziału białek mięśniowych i frakcji wycieku wirówkowego obserwowane przy wykorzystaniu metody Western blot były determinowane procesem poubojowego wychładzania. Szybsze wychładzanie przyczyniło się do zmiany tempa degradacji i odmiennej proteolizy titiny oraz łańcuchów ciężkich miozyny, tworzących struktury cytoszkieletu włókien mięśniowych oraz troponiny-T i GAPDH. Były one wynikiem proteolizy, procesów degradacji i agregacji, które przez zróżnicowane interakcje białko-białko oddziaływały na strukturę cytoszkieletu. W ich efekcie następowało kształtowanie właściwości mięsa wieprzowego, jego wodochłonności i kruchości.

4. Intensywność 3D dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) we frakcji wycieku wirówkowego, zidentyfikowanej techniką Western blot, była determinowana szybkością wychładzania w dwóch analizowanych terminach badań. Wykazano, że intensywność enzymu GAPDH jest dodatnio skorelowana z wodochłonnością $r = 0,83$ ($p < 0,05$) i kruchością mięsa $r = 0,70$ ($p < 0,05$).

5. Zaobserwowane istotne różnice cech jakościowych między mięsem bydła z wadą DFD (większa wartość pH, ciemniejsza barwa, lepsza kruchość i wodochłonność) i normalnej jakości RFN znalazły odzwierciedlenie w zróżnicowanej ekspresji białek.

6. Na podstawie profilu elektroforetycznego mięsa bydła o zróżnicowanej jakości stwierdzono istotnie większy udział pasm białek oznaczonych jako E1 (2400 kDa), E2+3 (1200-400 kDa) i E6 (~68 kDa) w mięsie DFD w porównaniu z RFN. Był on skorelowany z wartością pH w każdym z analizowanych terminów badań (od $r = 0,67$ do $r = 0,93$; $p < 0,05$). Ponadto wykazano istotną ujemną zależność między zmianami udziału białek E1, E2+3, E6 a jasnością barwy, wodochłonnością oraz kruchością mięsa.

7. Zastosowanie wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS pozwoliło na wskazanie różnic w intensywności białek i ilości peptydów zidentyfikowanych w ekstraktach z mięsa bydła normalnej jakości (RFN) i z wadą DFD.

8. Wykorzystanie wielowymiarowego modelu OPLS-DA uwidocznilo potencjalne białkowe i peptydowe wskaźniki jakości mięsa RFN i DFD. Lista 12 białek o największym potencjale dyskryminacyjnym w odniesieniu do mięsa o zróżnicowanej jakości obejmuje: alfa- i beta-enolazę, białko bogate w cysteinę i glicynę, domeny PDZ i LIM białka 3, 6-fosfofruktokinazę, białka szoku cieplnego beta-1 i beta-6, łańcuch A dehydrogenazy L-mleczanowej, kinazę kreatynową typu M, mioglobinę, fosfatydyloetanolaminę wiążącą białko-1 i troponinę-T.

LITERATURA

- Aalhus, J. L., Best, D. R., Costello, F., Schaefer, A. L. (1997). The effects of porcine somatotropin on muscle fibre morphology and meat quality of pigs of known stress susceptibility. *Meat Sci.*, 45(3), 283–295.
- Aalhus, J.L., Best, D.R., Murray, A.C., Jones, S.D.M. (1998). A comparison of the quality characteristics of pale, soft and exudative beef and pork. *J. Muscle Foods*, 9(3), 267–280.
- Aberle, E.D., Forrest, J.C., Gerrard, D.E., Mille, E.W., Hedrick, H.B., Judge, M.D., Merkel, R.A. (2001). *Principles of meat sci.* Dubuque, IA, USA: Kendall/Hunt.
- Abril, M., Campo, M.M., Önenç, A., Sañudo, C., Albertí P., Negueruela, A.I. (2001). Beef colour evolution as a function of ultimate pH. *Meat Sci.*, 58, 69–78.
- Acton, J.C., Pedersen, D.K., Han, I.Y., Nielsen, H.S., Dawson, P.L. (2000). Colour stability and spoilage characteristics of chicken meat patties prepared with thigh meat from various rinse and additive treatments. 46th ICoMST, 308–309.
- Adzitey, F., Nurul, H. (2011). Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences – a mini review. *Int. Food Res. J.*, 18, 11–20.
- Alonso, V., Muela, E., Tenas, J., Calanche, J.B., Roncalés, P., Beltrán, J.A. (2016). Changes in physicochemical properties and fatty acid composition of pork following long-term frozen storage. *Eur. Food Res. Technol.*, 242(12), 2119–2127.
- Alvarado, C.Z., Sams, A. (2004). Turkey carcass chilling and protein denaturation in the development of pale, soft, and exudative meat. *Poultry Sci.*, 83(6), 1039–1046.
- Anderson, M.J., Lonergan, S.M. (2012). Myosin light chain 1 release from myofibrillar fraction during postmortem aging is a potential indicator of proteolysis and tenderness of beef. *Meat Sci.*, 90, 345–351.
- Asghar, A., Samejima, K., Yasui, T. (1985). Functionality of muscle protein in gelation mechanisms of structured meat products. *CRC Crit. Rev. J. Food Sci., Nutr.*, 22, 1, 27–84.
- Au, Y. (2004). The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell. Molec. Life Sci.*, 61, 3016–3033.
- Bandman, E., Zdanis, D. (1988). An immunological method to assess protein-degradation in post-mortem muscle. *Meat Sci.*, 22, 1–19.
- Barash, I.A., Mathew, L., Lahey, M., Greaser, M.L., Lieber, R.L. (2005). Muscle lim protein plays both structural and functional roles in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 289, C1312–C1320.
- Barbut, S., Sosnicki, A.A., Lonergan, S.M., Knapp, T., Ciobanu, D.C., Gatcliffe, L.J., Huff-Lonergan, E., Wilson, E.W. (2008). Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Sci.*, 79, 46–63.

- Barbut, S. (2009). Pale, soft, and exudative poultry meat – Reviewing ways to manage at the processing plant. *Poultry Sci.*, 88, 1506–1512.
- Baron, C.P., Jacobsen, S., Purslow, P.P. (2004). Cleavage of desmin by cysteine proteases: Calpains and cathepsin B. *Meat Sci.*, 68, 447–456.
- Bär, H., Strelkov, S.V., Sjöberg, G., Aebi, U., Herrmann, H. (2004). The biology of desmin filaments: how do mutation affect their structure, assembly and organization? *J. Struct. Biol.*, 148, 137–152.
- Beldarrain, L.R., Aldai, N., Picard, B., Sentandreu, E., Navarro, J.L., Sentandreu, M.A. (2018). Use of liquid isoelectric focusing (OFFGEL) on the discovery of meat tenderness biomarkers. *J. Proteom.*, 183, 25–33.
- Bendixen, E. (2005). The use of proteomics in meat science. *Meat Sci.*, 71, 138–149.
- Bergmeyer, H.U. (1974). *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press.
- Berman, Y., North, K.N. (2010). A gene for speed: The emerging role of α -actinin-3 in muscle metabolism. *Physiology*, 25, 250–259.
- Bertram, H.C., Donstrup, S., Karlsson, A.H., Andersen, H.J., Stodkilde-Jorgensen, H. (2001). Post-mortem energy metabolism and pH development in porcine *M. longissimus dorsi* as affected by two different cooling regimes. A ³¹P-NMR spectroscopic study. *J. Magn. Reson. Imag.*, 19(7), 993–1000.
- Bertram, H.C., Karlsson, A.H., Andersen, H.J. (2003). The significance of cooling rate on water dynamics in porcine muscle from heterozygote carriers and non-carriers of the halothane gene – A low-field NMR relaxation study. *Meat Sci.*, 65(4), 1281–1291.
- Bitar, K.N. (2002). HSP27 phosphorylation and interaction with actin-myosin in smooth muscle contraction. *Am. J. Physiol.*, 282, G894–G903.
- Bjarnadóttir, S.G., Hollung, K., Faergestad, E.M., Veiseth-Kent, E. (2010). Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the first 48 h postmortem: Shifts in energy status and myofibrillar stability. *J. Agric. Food Chem.*, 58(12), 7408–7414.
- Bjarnadóttir, S.G., Hollung, K., Høy, M., Bendixen, E., Codrea, M.C., Veiseth-Kent, E. (2012). Changes in protein abundance between tender and tough meat from bovine Longissimus thoracis muscle assessed by isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) and 2-dimensional gel electrophoresis analysis. *J. Anim. Sci.*, 90, 2035–43.
- Blicharski, I., Ostrowski, A., Komender, P. (1995). Wykorzystanie pomiaru przewodnictwa elektrycznego do wykrywania wad mięsa wieprzowego. *Gosp. Mięsn.*, 1, 38–39.
- Blumenschein, T.M.A., Stone, D.B., Fletterick, R.J., Mendelson, R.A., Sykes, B.D. (2005). Calcium-dependent changes in the flexibility of the regulatory domain of troponin C in the troponin complex. *J. Biol. Chem.*, 280(23), 21924–21932.
- Boakye, K., Mittal, G.S. (1996). Changes in colour of beef *m. longissimus dorsi* muscle during ageing. *Meat Sci.*, 42(3), 347–354.
- Boles, J.A., Parrish, F.C., Huiatt, T.W., Robson, R.M. (1992). Effect of porcine stress syndrome on the solubility and degradation of myofibrillar cytoskeletal proteins. *J. Anim. Sci.*, 70(2), 454–464.
- Borzuta, K. (2006). Aktualne poglądy na temat systemów wychładzania tusz zwierząt rzeźnych. *Chłodnictwo*, 41(1–2), 66–69.

- Bottinelli, R. (2001). Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibres: do myosin isoforms tell the whole story? *Pflug. Arch.*, 443, 6–17.
- Bottinelli, R., Reggiani, C. (2000). Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 73, 195–262.
- Bouley, J., Chambon, C., Picard, B. (2004). Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J. Proteom.*, 4(6), 1811–1824.
- Bowker, B.C., Eastridge, J.S., Solomon, M.B. (2014). Measurement of muscle exudate protein composition as an indicator of beef tenderness. *J. Food Sci.*, 79(7), 1292–1297.
- Bowker, B., Gamble, G., Zhuang, H. (2016). Exudate protein composition and meat tenderness of broiler breast fillets. *Poultry Sci.*, 95(1), 133–137.
- Brewer, M.S., Novakofski, J.E. (2008). Consumer quality evaluation of aging of beef. *J. Food Sci.*, 73(1), S78–S82.
- Canto, A.C., Suman, S.P., Nair, M.N., Li, S., Rentfrow, G., Beach, C.M., Silva, T.J.P., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Grayson, A., McKeith, R.O., King, D.A. (2015). Differential abundance of sarcoplasmic proteome explains animal effect on beef *Longissimus lumborum* color stability. *Meat Sci.*, 102, 90–98.
- Channon, H.A., Warner, R.D. (2011). Delivering consistent quality Australian pork to consumers – A systems approach. W: Barneveld van, R.J. (Ed.), *Manipulating pig production XIII*. Werribee: Australasian Pig Science Association.
- Choe, J.H., Choi, Y.M., Lee, S.H., Shin, H.G., Ryu, Y.C., Hong, K.C., Kim, B.C. (2008). The relation between glycogen, lactate content and muscle fiber type composition, and their influence on postmortem glycolytic rate and pork quality. *Meat Sci.*, 80(2), 355–362.
- Choi, Y., Kim, B. (2009). Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livest. Sci.*, 122, 105–118.
- Christensen, L., Ertbjerg, P., Løje, H., Risbo, J., van den Berg, F.W.J., Christensen, M. (2013). Relationship between meat toughness and properties of connective tissue from cows and young bulls heat treated at low temperatures for prolonged times. *Meat Sci.*, 93(4), 787–795.
- Claussen, I.C. (2011). Superchilling concepts enabling safe, high quality and long term storage of foods. *Proc. J. Food Sci.*, 1, 1907–1909.
- Contreras-Castillo, C.J., Lomiwes, D., Wu, G., Frost, D., Farouk, M.M. (2016). The effect of electrical stimulation on post mortem myofibrillar protein degradation and small heat shock protein kinetics in bull beef. *Meat Sci.*, 113, 65–72.
- Copenhafer, T.L., Richert, B.T., Schnickel, A.P., Grant, A.L., Gerrard, D.E. (2006). Augmented post-mortem glycolysis does not occur early postmortem in AMPK γ 3-mutated porcine muscle of halothane positive pigs. *Meat Sci.*, 73, 590–599.
- Cotgreave, I.A., Gerdes, R., Shuppe-Koistinen, I., Lind, C. (2002). S-glutathionylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of thiol oxidation and catalysis by glutaredoxin. *Method. Enzym.*, 348, 175–182.
- Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasome. *Ann. Rev. Biochem.*, 65, 801–847.

- Crawford, S.M., Moeller, S.J., Zerby, H.N., Irvin, K.M., Kuber, P.S., Velleman, S.G., Leeds, T.D. (2010). Effects of cooked temperature on pork tenderness and relationships among muscle physiology and pork quality traits in loins from Landrace and Berkshire swine. *Meat Sci.*, 84(4), 607–612.
- Cruzen, S.M., Paulino, P.V.R., Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E. (2014). Postmortem proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle. *Meat Sci.*, 96(1), 854–861.
- Czyżak-Runowska, G., Łyczyński, A., Pospiech, E., Koćwin-Podsiadła, M., Wojtczak, J., Rzoszińska, E., Mikołajczak, B., Grześ, B., Iwańska, E., Krzęcio-Nieczyporuk, E., Sieczkowska, H., Antosik, K. (2010). Electrical conductivity as an indicator of pork meat quality. *J. Cent. Eur. Agric.*, 11(1), 105–112.
- D'Alessandro, A., Marrocco, C., Rinalducci, S., Mirasole, C., Failla, S., Zolla, L. (2012a). Chianina beef tenderness investigated through integrated Omics. *J. Proteomics*, 75(14), 4381–4398.
- D'Alessandro, A., Rinalducci, S., Marrocco, C., Zolla, V., Napolitano, F., Zolla, L. (2012b). Love me tender: An Omics window on the bovine meat tenderness network. *J. Proteomics*, 75(14), 4360–4380.
- D'Souza, D.N., Dunshea, F.R., Warner, R.D., Leury, B.J. (1998). The effect of handling pre-slaughter and carcass processing rate post-slaughter on pork quality. *Meat Sci.*, 50, 429–437.
- Dahlmann, B., Ruppert, T., Kloetzel, P.M., Kuehn, L. (2001). Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie*, 83, 295–299.
- Dalrymple, R.H., Hamm, R. (1973). A method for the extraction of glycogen and metabolites from a single muscle sample. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 8, 4, 439–444.
- Davies, K.J., Goldberg, A.L. (1987). Protein damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cell. *J. Biol. Chem.*, 262, 8227–8234.
- Demeyer, D., Steen, D., Claeys, E. (1998). Exploratory experiments on very fast chilling of beef muscle: a survey of results with conclusions. W: Very fast chilling in beef, 3. Eating quality (pp. 43–48). Bristol, UK: University of Bristol Press.
- Didiasova, M., Schaefer, L., Wygrecka, M. (2019). When place matters: Shuttling of Enolase-1 across cellular compartments. *Front. Cell Dev. Biol.*, 7, 61.
- Di Luca, A., Mullen, A.M., Elia, G., Davey, G., Hamill, R.M. (2011). Centrifugal drip is an accessible source for protein indicators of pork ageing and water-holding capacity. *Meat Sci.*, 88(2), 261–270.
- Di Luca, A., Elia, G., Hamill, R., Mullen, A.M. (2013a). 2D DIGE proteomic analysis of early post mortem muscle exudate highlights the importance of the stress response for improved water-holding capacity of fresh pork meat. *J. Proteom.*, 13, 1528–1544.
- Di Luca, A., Elia, G., Mullen, A.M., Hamill, R. (2013b). Monitoring post mortem changes in porcine muscle through 2-D DIGE proteome analysis of Longissimus muscle exudate. *Proteom. Sci.*, 11(1), 9, 1–14.
- Dutaud, D., Aubry, L., Sentandreu, M.A., Ouali, A. (2006). Bovine muscle 20S proteasome: I. Simple purification procedure and enzymatic characterization in relation with post mortem conditions. *Meat Sci.*, 74, 327–336.
- Eilert, S.J. (1997). What quality controls are working in the plant? W: Proceedings pork quality summit (pp. 59–63). July 8–9. National Pork Producers Council, Des Moines, IA, USA.

- England, E.M., Scheffler, T.L., Kasten, S.C., Matarneh, S. K., Gerrard, D.E. (2013). Exploring the unknowns involved in the transformation of muscle to meat. *Meat Sci.*, 95(4), 837-843.
- Ertbjerg, P., Henckel, P., Karlsson, A., Larsen, L.M., Møller, A.J. (1999). Combined effect of epinephrine and exercise on calpain/calpastatin and cathepsin B and L activity in porcine longissimus muscle. *J. Anim. Sci.*, 77, 2428-2436.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: a review. *Meat Sci.*, 89(3), 259-279.
- Farouk, M.M., Beggan, M., Hurst, S., Stuart, A., Dobbie, P.M., Bekhit, A.E.D. (2007). Meat quality attributes of chilled venison and beef. *J. Food Qual.*, 30(6), 1023-1039.
- Farouk, M.M., Mustafa, N.M., Wu, G., Krsinic, G. (2012). The “sponge effect” hypothesis: An alternative explanation of the improvement in the water holding capacity of meat with ageing. *Meat Sci.*, 90, 670-677.
- Feldhusen, F., Kühne, M. (1992). Effects of ultrarapid chilling and ageing on length of sarcomeres, and tenderness of pork. *Meat Sci.*, 32(2), 161-171.
- Ferguson, D.M., Gerrard, D.E. (2014). Regulation of post-mortem glycolysis in ruminant muscle. *Anim. Prod. Sci.*, 54(4), 464-481.
- Ferguson, D.M., Warner, R.D. (2008). Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? *Meat Sci.*, 80, 12-19.
- Fink, A.L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.*, 79(2), 425-449.
- Fisher, A.B. (2017). Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 617, 68-83.
- Fischer, Ch., Hamm, R. (1980). Biochemical studies on fast glycolysing bovine muscle. *Meat Sci.*, 4(1), 41-49.
- Fischer, Ch., Hamm, R., Honikel, K.O. (1979). Changes in solubility and enzymic activity of muscle glycogen phosphorylase in PSE-muscles. *Meat Sci.*, 3(1), 11-19.
- Fischer, K., Hofmann, K., Hamm, R. (1978). Elektrophoretische Untersuchungen der Proteine von Sarkoplasma und Myofibrillen in normalem und PSE-Fleisch beim Schwein. *Fleischwirtschaft*, 2, 303-306.
- Franco, D., Mato, A., Salgado, F.J., López-Pedrouso, M., Carrera, M., Bravo, S., Parrado, M., Gallardo, J.M., Zapata, C. (2015). Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress. *J. Proteom.*, 122, 73-85.
- Fritz, J.D., Greaser, M.L. (1991). Changes in titin and nebulin in postmortem bovine muscle revealed by gel electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. *J. Food Sci.*, 56(3), 607-610.
- Fritz, J.D., Dietrich, L.J., Greaser, M.L. (1992). Cooking effects on titin in fresh and processed beef products. *J. Muscle Foods*, 3, 133-140.
- Fuente-Garcia, C., Aldai, N., Sentandreu, E., Oliván, M., García-Torres, S., Franco, D., Zapata, C., Sentandreu, M.A. (2019). Search for proteomic biomarkers related to bovine pre-slaughter stress using liquid isoelectric focusing (OFFGEL) and mass spectrometry. *J. Proteom.*, 198, 59-65.
- Gagaoua, M., Terlouw, E.M., Micol, D., Boudjellal, A., Hocquette, J.F., Picard, B. (2015). Understanding early post-mortem biochemical processes underlying meat color and pH decline in the longissimus thoracis muscle of Young blond d'Aquitaine bulls using protein biomarkers. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 6799-6809.

- Gagaoua, M., Bonnet, M., Picard, B. (2020a). Protein array-based approach to evaluate biomarkers of beef tenderness and marbling in cows: Understanding of the underlying mechanisms and prediction. *Foods*, 9, 1180.
- Gagaoua, M., Hughes, J., Terlouw, E.M.C., Warner, R.D., Purslow, P.P., Lorenzo, J.M., Picard, B. (2020b). Proteomic biomarkers of beef colour. *Trend. Food Sci. Technol.*, 101, 234–252.
- Gagaoua, M., Terlouw, E.M.C., Mullen, A.M., Franco, D., Warner, R.D., Lorenzo, J.M., Purslow, P.P., Gerrard, D., Hopkins, D.L., Troy, D., Picard, B. (2021). Molecular signatures of beef tenderness: Underlying mechanisms based on integromics of protein biomarkers from multi-platform proteomics studies. *Meat Sci.*, 172(July 2020), 108311.
- Gao, X., Wu, W., Ma, Ch., Li, X., Dai, R. (2016). Postmortem changes in sarcoplasmic proteins associated with color stability in lamb muscle analyzed by proteomics. *Eur. Food Res. Technol.*, 242, 527–35.
- Geesink, G.H., Mareko, M.H.D., Morton, J.D., Bickerstaffe, R. (2001). Effects of stress and high voltage electrical stimulation on tenderness of lamb m. longissimus. *Meat Sci.*, 57(3), 265–271.
- Geesink, G.H., Kuchay, S., Chishti, A.H., Koohmaraie, M. (2006). I-Calpain is essential for post mortem proteolysis of muscle proteins. *J. Anim. Sci.*, 84, 2834–2840.
- Gil, M., Oliver, M.A., Gispert, M., Diestre, A., Sosnicki, A.A., Lacoste, A., Carrion, D. (2003). The relationship between pig genetics, myosin heavy chain I, biochemical traits and quality of *M. longissimus thoracis*. *Meat Sci.*, 65, 1063–1070.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Taylor, R.G., Christiansen, J.A. (1992). Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie*, 74(3), 225–237.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H.Q., Wei, W., Cong, J.Y. (2003). The calpain system. *Physiol. Rev.*, 83, 731–801.
- Górska, M. (2016). Cechy sensoryczne i czynniki warunkujące jakość mięsa. *Gosp. Mięsna*, 5, 22–25.
- Grabež, V., Kathri, M., Phung, V., Moe, K.M., Slinde, E., Skaugen, M., Egelanddal, B. (2015). Protein expression and oxygen consumption rate of early postmortem mitochondria relate to meat tenderness. *J. Anim. Sci.*, 93(4), 1967–1979.
- Grandin, T. (2020). Livestock Handling at the Abattoir: Effects on Welfare and Meat Quality. *Meat Muscle Biol.*, 4(2), 6, 1–11.
- Greaser, M.L., Boyer-Berri, C., Kumazawa, Y., Szalata, M., Pospiech, E. (2000). Titin and tenderness. *Proc. 46th ICoMST, Buenos Aires, Argentyna*, 4.I-L1, 420-423.
- Greaser, M.L., Pospiech, E., Fritz, J., Swartz, D.R. (2002). Immunobloting białek mięsa. W: B. Walkowiak, V. Kochmańska (red.), *Elektroforeza – przykłady zastosowań* (s. 90–93). Łódź.
- Grześ, B., Pospiech, E., Greaser, M.L., Mozdziak, P.E. (1996). Myosin determination in centrifugal drip: a new method to evaluate structural changes in processed meat. *Proceedings of the 6th Seminar „Properties of water in foods”*, Warszawa (s. 86–93).
- Grześ, B., Pospiech, E., Greaser, M.L., Mozdziak, P.E. (1997). Evaluation of structural changes in cured meat through the determination of myosin in the centrifugal drip. *Rocz. Inst. Przem. Mięsn. Tusz.*, XXXIV, 171–177.

- Grześ, B., Pospiech, E., Rosochacki, S., Łyczyński, A., Mikołajczak, B., Iwańska, E. (2007). Comparison of polymorphic myosin forms with selected meat quality attributes of bulls of various breeds and age. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 57(4), 201–205.
- Grześ, B., Pospiech, E., Koćwin-Podsiadła, M., Łyczyński, A., Krzęcio, E., Mikołajczak, B., Iwańska, E. (2010). Relationships between the polymorphism of Myosin heavy chains and selected meat quality traits of pigs with different susceptibility to stress. *Archiv. Tierzucht.*, 53(1), 64–71.
- Grześ, B., Pospiech, E., Iwańska, E., Mikołajczak, B., Łyczyński, A., Koćwin-Podsiadła, M., Krzęcio-Niczyporuk, E. (2017). The relationship between protein changes in porcine longissimus muscle at different courses of meat tenderisation. *Eur. Food Res. Technol.*, 243(11), 2025–2034.
- Ha, M., Bekhit, A.E.A., Carne, A., Hopkins, D.L. (2012). Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chem.*, 134, 95–105.
- Hambrecht, E., Eissen, J.J., de Klein, W.J., Ducro, B.J., Smits, C.H., Verstegen, M.W., den Hartog, L.A. (2004). Rapid chilling cannot prevent inferior pork quality caused by high pre slaughter stress. *J. Anim. Sci.*, 82(2), 551–556.
- Hamelin, M., Sayd, T., Chambon, C., Bouix, J., Bibé, B., Milenkovic, D., Leveziel, H., Georges, M., Clop, A., Marinova, P., Laville, E. (2007). Differential expression of sarcoplasmic proteins in four heterogeneous ovine skeletal muscles. *Proteomics*, 7(2), 271–280.
- Hamm, R. (1994). The influence of pH on the protein net charge in the myofibrillar system. *Rec. Meat Conf. Proc.*, 47, 5–9.
- Hamoen, J.R., Vollebregt, H.M., Van Der Sman, R.G.M. (2013). Prediction of the time evolution of pH in meat. *Food Chem.*, 141(3), 2363–2372.
- Han, J., Morton, J.D., Bekhit, A.E.D., Sedcole, J.R. (2009). Pre-rigor infusion with kiwifruit juice improves lamb tenderness. *Meat Sci.*, 82, 324–330.
- Hannula, T., Puolanne, E. (2004). The effect of cooling rate on beef tenderness: the significance of pH at 7°C. *Meat Sci.*, 67(3), 403–408.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurtner, D., Buchner, J. (2005). Some like it hot: The structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12(10), 842–846.
- Hayashibara, T., Miyanishi, T. (1994). Binding of the amino-terminal region of myosin alkali 1 light chain to actin and its effect on actin–myosin interaction. *Biochemistry*, 33(43), 12821–12827.
- Henckel, P., Karlsson, A., Jensen, M.T., Oksbjerg, N., Petersen, J.S. (2002). Metabolic conditions in porcine longissimus muscle immediately pre-slaughter and its influence on peri- and post mortem energy metabolism. *Meat Sci.*, 62, 145–155.
- Hernandez-Carretero, A., Weber, N., LaBarge, S. A., Peterka, V., Doan, N., Schenk, S., Osborn, O. (2018). Cysteine- and glycine-rich protein 3 regulates glucose homeostasis in skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrin. Metab.*, 315(2), E267–E278.
- Ho, Ch.Y., Stromer, M.H., Robson, R.M. (1994). Identification of the 30 kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. *Biochimie*, 76, 369–375.

- Ho, Ch.Y., Stromer, M.H., Rouse, G., Robson, R.M. (1997). Effects of electrical stimulation and postmortem storage on changes in titin, nebulin, desmin, troponin-T, and muscle ultrastructure in *Bos indicus* crossbred cattle. *J. Anim. Sci.*, 75, 366–376.
- Hocquette, J.F., Botreau, R., Picard, B., Jacquet, A., Pethick, D.W., Scollan, N.D. (2012). Opportunities for predicting and manipulating beef quality. *Meat Sci.*, 92, 197–209.
- Hofmann, K. (1994). What is quality? *Meat Focus Int.*, 2, 73–82.
- Honikel, K.O. (1987). Critical evaluation of methods detecting water-holding capacity in meat. *Accel. Proc. Meat*, 2013, 225–239.
- Honikel, K.O. (2002). Biochemical and physical aspects of water holding capacity style. *Recip. Meat Conf. Proc.*, 55.
- Honikel, K.O. (2004). Water holding capacity of meat. W: M.F. de Pas, M.E. Everts, H.P. Haagsman (red.), *Muscle development of livestock animals: Physiology, genetics and meat quality* (s. 389–400). Cambridge: CABI Publishing.
- Hopkins, D., Geesink, G.H. (2009). Protein degradation postmortem and tenderization. W: M. Du, R.J. McCormick (Eds.), *Applied muscle biology and meat science* (pp. 149–173). CRC Press.
- Houbak, M.B., Ertbjerg, P., Therkildsen, M. (2008). In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and micro-calpain. *Meat Sci.*, 79, 77–85.
- Houben, J.H., van Dijk, A., Eikelenboom, G., Hoving-Bolink, A.H. (2000). Effect of dietary vitamin E supplementation, fat level and packaging on colour stability and lipid oxidation in minced beef. *Meat Sci.*, 55, 331–336.
- Huff-Lonergan, E., Parrish, F.C., Robson, R.M. (1995). Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. *J. Anim. Sci.*, 73, 1064–1073.
- Huff-Lonergan, E., Mitsuhashi, T., Parrish, F.C. Jr, Robson, R.M. (1996). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting comparisons of purified myofibrils and whole muscle preparations for evaluating titin and nebulin in postmortem bovine muscle. *J. Anim. Sci.*, 74, 779–785.
- Huff-Lonergan, E., Lonergan, S.M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of post mortem biochemical and structural changes. *Meat Sci.*, 71, 194–204.
- Huff-Lonergan, E., Zhang, W., Lonergan, S.M. (2010). Biochemistry of postmortem muscle – Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci.*, 86, 184–195.
- Hughes, J.M., Oiseth, S.K., Purslow, P.P., Warner, R.D. (2014). A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. *Meat Sci.*, 98(3), 520–532.
- Hunt, M.C., Sorheim, O., Slinde, E. (1999). Color and heat denaturation of myoglobin in ground beef. *J. Food Sci.*, 64, 5, 847–851.
- Hwang, I.H., Park, B.Y., Cho, S.H., Lee, J.M. (2004). Effects of muscle shortening and proteolysis on Warner-Bratzler shear force in beef longissimus and semitendinosus. *Meat Sci.*, 68, 497–505.
- Immonen, K., Puolanne, E. (2000). Variation of residual glycogen-glucose concentration at ultimate pH values below 5.75. *Meat Sci.*, 55, 3, 279–283.

- Irving, T.C., Swatland, H.J., Millman, B.M. (1989). X-ray diffraction measurements of myofibrillar lattice spacing and optical measurements of reflectance and sarcomere length in commercial pork loins. *J. Anim. Sci.*, 67(1), 152–156.
- Iwanowska, A., Iwańska, E., Grześ, B., Mikołajczak, B., Pospiech, E., Rosochacki, S., Juszczyk-Kubiak, E., Łyczyński, A. (2010a). Changes in proteins and tenderness of meat from young bulls of four breeds at three ages over 10 days of cold storage. *Anim. Sci. Paper Rep.*, 28(1), 13–25.
- Iwanowska, A., Pospiech, E., Łyczyński, A., Rosochacki, S., Grześ, B., Mikołajczak, B., Iwańska, E., Rzosnińska, E., Czyżak-Runowska, G. (2010b). Evaluation of variations in principal indices of the culinary meat quality obtained from young bulls of various breeds. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 9(2), 133–149.
- Iwanowska, A., Grześ, B., Mikołajczak, B., Iwańska, E., Juszczyk-Kubiak, E., Rosochacki, S. J., Pospiech, E. (2011). Impact of polymorphism of the regulatory subunit of the μ -calpain (CAPN1S) on the proteolysis process and meat tenderness of young cattle. *Mol. Biol. Rep.*, 38(2), 1295–1300.
- Iwańska, E., Grześ, B., Pospiech, E., Mikołajczak, B., Spychaj, A. (2014). Zmiany udziału białek w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków różnych ras i w różnym wieku, w czasie dojrzewania wołowiny. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 3(94), 78–91.
- Iwańska, E., Mikołajczak, B., Grześ, B., Pospiech, E. (2016). Wpływ procesu poubojowego dojrzewania mięsa wieprzowego na zmiany profilu białek i kruchość. *Med. Wet.*, 72(7), 458–462.
- Iwańska, E., Mikołajczak, B., Grześ, B., Spychaj, A., Pospiech, E. (2017). Wpływ szybkości wychładzania na przebieg glikolizy i kruszenia wieprzowego mięśnia LTL. *Nauka Przynr. Technol.*, 11(2), 161–167.
- Jacob, R.H., Rosenvold, K., North, M., Kemp, R.M., Warner, R.D., Geesink, G.H. (2012). Rapid tenderisation of lamb *M. longissimus* with very fast chilling depends on rapidly achieving sub-zero temperatures. *Meat Sci.*, 92(1), 16–23.
- Janiszewski, P., Borzuta, K., Lisiak, D., Bartodziejska, B., Grześkowiak, E., Królasik, J., Poławska, E. (2018). The quality of pork and the shelf life of the chosen carcass elements during storage depending on the method of carcass chilling. *J. Food Proc. Preserv.*, 42(1), 1–8.
- Jeremiah, L.E., Jones, S.D.M., Kruger, A.K., Tong, A.K.W., Gibson, R. (1992). The effects of gender and blast-chilling time and temperature on cooking properties and palatability of pork *longissimus* muscle. *Can. J. Anim. Sci.*, 72, 501–506.
- Jia, X., Hollung, K., Therkildsen, M., Hildrum, K.I., Bendixen, E. (2006). Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: *M. longissimus dorsi* and *M. semitendinosus*. *Proteomics*, 6(3), 936–944.
- Jia, X., Veiseth-Kent, E., Grove, H., Kuziora, P., Aass, L., Hildrum, K.I., Hollung, K. (2009). Peroxiredoxin-6 a potential protein marker for meat tenderness in bovine *longissimus thoracis* muscle. *J. Anim. Sci.*, 87(7), 2391–2399.
- Jones, S.D.M., Tong, A.K.W., Murray, A.C. (1987). Effects of blast-chilling carcasses of different weight and fatness on the appearance of fresh pork. *Can. J. Anim. Sci.*, 67, 13–19.
- Jones, S.D.M., Jeremiah, L.E., Robertson, W.M. (1993). The effects of spray and blast-chilling on carcass shrinkage and pork muscle quality. *Meat Sci.*, 34(3), 351–362.

- Joo, S.T., Kauffman, R.G., Kim, B.C., Park, G.B. (1999). The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Sci.*, 35, 276–278.
- Josell, Å., von Seth, G., Tornberg, E. (2003). Sensory and meat quality traits of pork in relation to post-slaughter treatment and RN genotype. *Meat Sci.*, 66(1), 113–124.
- Juárez, M., Caine, W.R., Larsen, I.L., Robertson, W.M., Dugan, M.E.R., Aalhus, J.L. (2009). Enhancing pork loin quality attributes through genotype, chilling method and ageing time. *Meat Sci.*, 83(3), 447–453.
- Kauffman, R., Joo, S. T., Warner, R., Faustman, C. (1994). Measuring water-holding capacity in post-rigor muscle. *Recip. Meat Conf. Proc.*, 47, 70–72.
- Kauffman, R.G. (1996). Assessing annual definable and potential losses due to quality problems in the U.S. pork industry. Manuscript. Meat Science and Muscle Biology Laboratory, University of Wisconsin, Madison.
- Kemp, C.M., Sensky, P.L., Bardsley, R.G., Buttery, P.J., Parr, T. (2010). Tenderness – An enzymatic view. *Meat Sci.*, 84(2), 248–256.
- Kerth, C.R., Carr, M.A., Ramsey, C.B., Brooks, J.C., Johnson, R.C., Cannon, J.E., Miller, M.F. (2001). Vitamin-mineral supplementation and accelerated chilling effects on quality of pork from pigs that are monomutant or noncarriers of the halothane gene. *J. Anim. Sci.*, 79, 2346–2355.
- Kim, Y.H.B., Lonergan, S.M., Grubbs, J.K., Cruzen, S.M., Fritchen, A.N., Malva, A., Marino, R., Huff-Lonergan, E. (2013b). Effect of low voltage electrical stimulation on protein and quality changes in bovine muscles during postmortem aging. *Meat Sci.*, 94(3), 289–296.
- Kim, G.-D., Ryu, Y.-C., Jeong, J.-Y., Yang, H.-S., Joo, S.-T. (2013a). Relationship between pork quality and characteristics of muscle fibers classified by the distribution of myosin heavy chain isoforms 1. *J. Anim. Sci.*, 91, 5525–5534.
- Kłossowska, B.M., Olkiewicz, M. (2000). Barwa modelowego, surowo-dojrzewającego produktu mięsnego. *Żywność*, 1(22), 56–64.
- Kończak, T., Pospiech, E., Palka, K., Łacki, J. (2003). Changes of myofibrillar and centrifugal drip proteins and shear force of psoas major and minor and semitendinosus muscles from calves, heifers and cows during post-mortem ageing. *Meat Sci.*, 64, 69–75.
- Kończak, T. (2008). Jakość wołowiny. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 1(56), 5–22.
- Koohmaraie, M. (1988). The role of endogenous proteases in meat tenderness. *Recip. Meat Conf. Proc.*, 41, 89–100.
- Koohmaraie, M. (1994). Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.*, 36, 93–104.
- Koohmaraie, M. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Sci.*, 43(S), 193–201.
- Koohmaraie, M., Geesink, G.H. (2006). Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.*, 74, 34–43.
- Kotecka-Majchrzak, K., Sumara, A., Montowska, M. (2020). Proteomic analysis of oil-seed cake: a comparative study of species-specific proteins and peptides extracted from ten seed species. *J. Sci. Food Agric.*, 101(1), 297–306.

- Krischek, C., Natter, R., Wigger, R., Wicke, M. (2011). Adenine nucleotide concentrations and glycolytic enzyme activities in longissimus muscle samples of different pig genotypes collected before and after slaughter. *Meat Sci.*, 89, 217–220.
- Kristensen, L., Purslow, P. (2001). The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeletal proteins. *Meat Sci.*, 58, 17–23.
- Kwasiborski, A., Sayd, T., Chambon, C., Santé-Lhoutellier, V., Rocha, D., Terlouw, C. (2008). Pig Longissimus lumborum proteome: Part II. Relationships between protein content and meat quality. *Meat Sci.*, 80, 982–996.
- Kylä-Puhju, M., Ruusunen, M., Puolanne, E. (2005). Activity of porcine muscle glycogen debranching enzyme in relation to pH and temperature. *Meat Sci.*, 69(1), 143–149.
- Lamare, M., Taylor, R.G., Farout, L., Briand, Y., Briand, M. (2002). Changes in proteasome activity during postmortem aging of bovine muscle. *Meat Sci.*, 61, 199–204.
- Lametsch, R., Roepstorff, P., Bendixen, E. (2002). Identification of protein degradation during postmortem storage of pig meat. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5508–5512.
- Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H.J., Roepstorff, P., Bendixen, E. (2003). Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *J. Agric. Food Chem.*, 51(24), 6992–6997.
- Lametsch, R., Lonergan, S., Huff-Lonergan, E. (2008). Disulfide bond within μ -calpain active site inhibits activity and autolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1784, 1215–1221.
- Lana, A., Zolla, L. (2016). Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. *J. Proteomics*, 147, 85–97.
- Laville, E., Sayd, T., Santé-Lhoutellier, V., Morzel, M., Labas, R., Franck, M., Chambon, C., Monin, G. (2005). Characterisation of PSE zones in semimembranosus pig muscle. *Meat Sci.*, 70(1), 167–172.
- Laville, E., Sayd, T., Morzel, M., Blinet, S., Chambon, C., Lepetit, J., Renand, G., Hocquette, J.F. (2009a). Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization. *J. Agric. Food Chem.*, 57(22), 10755–10764.
- Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Blinet, S., Pinguet, J., Fillaut, M., Glénisson, J., Chérel, P. (2009b). Differences in pig muscle proteome according to HAL genotype: Implications for meat quality defects. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 4913–4923.
- Lawrie, R.A. (1998). *Lawrie's meat science* (wyd. 6). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Lee, J., Cho, S., Kim, J., Park, B., Hwang, I., Chae, H. (2002). Comparison of carcasses and meat quality of purebred, F1 and three-way crossbred pigs. *W: Meat, nutrition, development: 48th International Congress of Meat Science and Technology* (t. 1, s. 340–341). Rome.
- Leichter, L.I., Jakob, U. (2004). Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLOS Biol.*, 2, 1723–1737.
- Lepetit, J., Culioli, J. (1994). Mechanical-properties of meat. *Meat Sci.*, 36, 203–237.
- Li, C.B., Li, J., Zhou, G.H., Lametsch, R., Ertbjerg, P., Brüggemann, D.A., Lundström, K. (2012a). Electrical stimulation affects metabolic enzyme phosphorylation, protease activation, and meat tenderization in beef. *J. Anim. Sci.*, 90, 1638–1649.

- Li, K., Zhang, Y., Mao, Y., Cornforth, D., Dong, P., Wang, R., Zhu, H., Luo, X. (2012b). Effect of very fast chilling and aging time on ultra-structure and meat quality characteristics of Chinese Yellow cattle *M. Longissimus lumborum*. *Meat Sci.*, 92, 795–804.
- Lomiwes, D., Farouk, M.M., Wiklund, E., Young, O.A. (2014a). Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: a review. *Meat Sci.*, 96(1), 26–40.
- Lomiwes, D., Farouk, M.M., Wu, G., Young, O.A. (2014b). The development of meat tenderness is likely to be compartmentalised by ultimate pH. *Meat Sci.*, 96, 646–651.
- Long, V.P., Tarrant, P.V. (1990). The effect of pre-slaughter showering and post-slaughter rapid chilling on meat quality in intact pork sides. *Meat Sci.*, 27, 181–195.
- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: a review. *Mol. Nutr. Food Res.*, 55, 83–95.
- Mahmood, S., Turchinsky, N., Paradis, F., Dixon, W.T., Bruce, H.L. (2018). Proteomics of dark cutting longissimus thoracis muscle from heifer and steer carcasses. *Meat Sci.*, 137, 47–57.
- Malheiros, J.M., Braga, C.P., Grove, R.A., Ribeiro, F.A., Calkins, C.R., Adamec, J., Chardulo, L.A.L. (2019). Influence of oxidative damage to proteins on meat tenderness using a proteomics approach. *Meat Sci.*, 148, 64–71.
- Maqsood, S., Manheem, K., Gani, A., Abushelaibi, A. (2018). Degradation of myofibrillar, sarcoplasmic and connective tissue proteins by plant proteolytic enzymes and their impact on camel meat tenderness. *J. Food Sci. Technol.*, 55(9), 3427–3438.
- Marcos, B., Mullen, A.M. (2014). High pressure induced changes in beef muscle proteome: Correlation with quality parameters. *Meat Sci.*, 97(1), 11–20.
- Marino, R., Albenzio, M., della Malva, A., Santillo, A., Loizzo, P., Sevi, A. (2013). Proteolytic pattern of myofibrillar protein and meat tenderness as affected by breed and aging time. *Meat Sci.*, 95, 281–287.
- Marino, R., Albenzio, M., della Malva, A., Caroprese, M., Santillo, A., Sevi, A. (2014). Changes in meat quality traits and sarcoplasmic proteins during aging in three different cattle breeds. *Meat Sci.*, 98(2), 178–186.
- Marino, R., della Malva, A., Albenzio, M. (2015). Proteolytic changes of myofibrillar proteins in Podolian meat during aging: focusing on tenderness. *J. Anim. Sci.*, 93, 1376–1387.
- Marsh, B.B., Ringkob, T.P., Russel, R.L., Swartz, D.R., Pagel, L.A. (1987). Effects of early postmortem glycolytic rate on beef tenderness. *Meat Sci.*, 21, 241–248.
- Martens, H., Stabussvik, E., Martens, M. (1982). Texture and colour changes in meat during cooking related to thermal denaturation of muscle proteins. *J. Texture Stud.*, 13, 291–309.
- Mato, A., Rodríguez-Vázquez, R., López-Pedrouso, M., Bravo, S., Franco, D., Zapata, C. (2019). The first evidence of global meat phosphoproteome changes in response to pre-slaughter stress. *BMC Genomics*, 20(1), 1–15.
- McFarlane, B.J., Unruh, J.A. (1996). Effects of blast chilling and post mortem calcium chloride injection on tenderness of pork longissimus muscle. *J. Anim. Sci.*, 74, 1842–1845.
- McVeigh, J., Tarrant, P., Harrington, M. (1982). Behavioral stress and skeletal muscle glycogen metabolism in young bulls. *J. Anim. Sci.*, 54, 790–795.

- Meade, M. K., Miller, M. F. (1990). The use of rapid chilling to reduce pale, soft and exudative pork from highly stressed market hogs. *J. Anim. Sci., Suppl.*, 68, 1–351.
- Meisinger, D. (1999). A system for assuring pork quality (pp. 7). Des Moines, IA, USA: National Pork Producers Council.
- Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., Cascante, M. (1997). How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. *J. Mol. Evol.*, 45(4), 446–455.
- Mikami, M., Whiting, A.H., Taylor, M.A.J., Maciewicz, R.A., Etherington, D.J. (1987). Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin I and lysosomal lysates. *Meat Sci.*, 21, 81–97.
- Mikołajczak, B., Pospiech, E., Greaser, M.L., Grześ, B., Iwańska, E., Łyczyński, A. (2005). Two dimensional electrophoresis of proteins from centrifugal drip of various quality meat. *Ann. Anim. Sci., Suppl.*, 2, 123–126.
- Mikołajczak, B., Pospiech, E., Greaser, M. L., Iwańska, E., Grześ, B., Łyczyński, A. (2005b). Low-molecular weight proteins of centrifugal drip as an indicator of meat tenderness. *Ann. Anim. Sci., Suppl.*, 2, 127–130.
- Mikołajczak, B., Iwańska, E., Spychaj, A., Danyluk, B., Montowska, M., Grześ, B., Banach, J.K., Żywica, R., Pospiech, E. (2019). An analysis of the influence of various tenderising treatments on the tenderness of meat from Polish Holstein-Friesian bulls and the course of changes in collagen. *Meat Sci.*, 158, 107906.
- Milligan, S.D., Ramsey, C.B., Miller, M.F., Kaster, C.S., Thompson, L.D. (1998). Resting of pigs and hot-fat trimming and accelerated chilling of carcasses to improve pork quality. *J. Anim. Sci.*, 76, 74–86.
- Miranda-de la Lama, G.C., Villarroel, M., María, G.A. (2014). Livestock transport from the perspective of the pre-slaughter logistic chain: a review. *Meat Sci.*, 98, 9–20.
- Miszczuk, B. (2009). System wychładzania tusz wieprzowych w procesie technologicznym zakładów mięsnych jako czynnik modyfikujący wartość kulinarną i przetwórczą mięsa. Rozprawa doktorska. Wydział Przyrodniczy, Akademia Podlaska, Siedlce.
- Modzelewska-Kapituła, M., Kwiatkowska, A., Jankowska, B., Dąbrowska, E. (2015). Water holding capacity and collagen profile of bovine m. infraspinatus during post-mortem ageing. *Meat Sci.*, 100, 209–216.
- Moczkowska, M., Pótorak, A., Montowska, M., Pospiech, E., Wierzbicka, A. (2017). The effect of the packaging system and storage time on myofibrillar protein degradation and oxidation process in relation to beef tenderness. *Meat Sci.*, 130, 7–15.
- Moeller, S.J., Miller, R.K., Zerby, H., Edwards, K., Logan, K., Boggess, M. (2009). Effects of pork loin quality and enhancement on consumer acceptability and cooking characteristics of pork loin chops. *Proc. Recip. Meat Conf., Rogers, AR* 62, 4–15.
- Mohrhauser, D.A., Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E., Underwood, K.R., Weaver, A.D. (2014). Calpain-1 activity in bovine muscle is primarily influenced by temperature, not pH decline. *J. Anim. Sci.*, 92, 1261–1270.
- Montowska, M., Pospiech, E., Łyczyński, A., Grześ, B., Mikołajczak, B., Iwańska, E., Kapelański, W., Bocian, M. (2009). Diversity of meat quality of heavy pigs with respect to the rate of post-mortem glycolytic and protein changes. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 59(4), 315–323.

- Montowska, M., Alexander, M.R., Tucker, G.A., Barrett, D.A. (2014a). Rapid detection of peptide markers for authentication purposes in raw and cooked meat using ambient liquid extraction surface analysis mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 86(20), 10257–10265.
- Montowska, M., Rao, W., Alexander, M.R., Tucker, G.A., Barrett, D.A. (2014b). Tryptic digestion coupled with ambient desorption electrospray ionization and liquid extraction surface analysis mass spectrometry enabling identification of skeletal muscle proteins in mixtures and distinguishing between beef, pork, horse, chicken, and turkey meat. *Anal. Chem.*, 86(9), 4479–4487.
- Montowska, M., Alexander, M.R., Tucker, G.A., Barrett, D.A. (2015). Authentication of processed meat products by peptidomic analysis using rapid ambient mass spectrometry. *Food Chem.*, 187, 297–304.
- Morzell, M., Chambon, C., Hamelin, M., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., Monin, G. (2004). Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Sci.*, 67, 689–696.
- Morzell, M., Terlouw, C., Chambon, C., Micol, D., Picard, B. (2008). Muscle proteome and meat eating qualities of longissimus thoracis of “Blonde d’Aquitaine” young bulls: a central role of HSP27 isoforms. *Meat Sci.*, 78, 297–304.
- Muroya, S., Ohnishi-Kameyama, M., Oe, M., Nakajima, I., Chikuni, K. (2007). Postmortem changes in bovine troponin T isoforms on two-dimensional electrophoretic gel analyzed using mass spectrometry and western blotting: the limited fragmentation into basic polypeptides. *Meat Sci.*, 75, 506–514.
- Muroya, S., Ertbjerg, P., Pomponio, L., Christensen, M. (2010). Desmin and troponin T are degraded faster in type IIb muscle fibers than in type I fibers during postmortem aging of porcine muscle. *Meat Sci.*, 86, 764–769.
- Nair, M.N., Suman, S.P., Chatli, M.K., Li, S., Joseph, P., Beach, C.M., Rentfrow, G. (2016). Proteome basis for intramuscular variation in color stability of beef semimembranosus. *Meat Sci.*, 113, 9–16.
- Ngapo, T.M., Dransfield, E., Martin, J.F., Magnusson, M., Bredahl, L., Nute, G.R. (2004). Consumer perceptions: Pork and pig production. Insights from France, England, Sweden and Denmark. *Meat Sci.*, 66(1), 125–134.
- Ngapo, T.M., Garipey, C. (2008). Factors affecting the eating quality of pork. *Crit. Rev. J. Food Sci. Nutr.*, 48, 599–633.
- North, M.F., Lovatt, S.J. (2012). Chilling and freezing meat. W: Y.H. Hui (red.), *Handbook of meat and meat processing* (s. 357–380). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Offer, G., Knight, P. (1988). The structural basis of water-holding in meat. W: R.A. Lawrie (red.), *Developments in meat science. Part 1: General principles and water uptake in meat processing* (t. 4, s. 61–171). Part 2: Drip losses (t. 4, s. 173–243). London: Elsevier Applied Science.
- Offer, G. (1991). Modelling of the formation of pale, soft and exudative meat: Effects of chilling regime and rate and extent of glycolysis. *Meat Sci.*, 30(2), 157–184.
- Offer, G., Cousins, T. (1992). The mechanism of drip production: Formation of two compartments of extracellular space in muscle post mortem. *J. Sci. Food Agric.*, 58(1), 107–116.
- Oh E., Lee, B., Choi Y.M. (2019). Associations of heat-shock protein expression with meat quality and sensory quality characteristics in highly marbled longissimus

- thoracis muscle from hanwoo steers categorized by Warner–Bratzler shear force value. *Foods*, 8, 638.
- Okumura, T., Yamada, R., Nishimura, T. (2003). Survey of conditioning indicators for pork loins: changes in myofibrils, proteins and peptides during postmortem conditioning of vacuum-packed pork loins for 30 days. *Meat Sci.*, 64, 467–473.
- Olivan, M., Martínez, A., Osoro, K., Sanudo, C., Panea, B., Olleta, J.L., Campo, M.M., Oliver, M.Á., Serra, X., Gil, M., Piedrafitra, J. (2004). Effect of muscular hypertrophy on physico-chemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. *Meat Sci.*, 68, 567–575.
- Olsen, E.V. (1997). How to design a pig. 43th International Congress of Meat Science and Technology – ICoMST (s. 328–329). C–39.
- Ouali, A., Gagaoua, M., Boudida, Y., Becila, S., Boudjellal, A., Herrera-Mendez, C.H., Sentandreu, M.A. (2013). Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Sci.*, 95, 854–870.
- Papalouka, V., Arvanitis, D.A., Vafiadaki, E., Mavroidis, M., Papadodima, S.A., Spiliopoulou, C.A., Kremastinos, D.T., Kranias, E.G., Sanoudou, D. (2009). Muscle Lim protein interacts with cofilin 2 and regulates F-actin dynamics in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol.*, 29, 6046–58.
- Park, B.Y., Kim, N.K., Lee, C.S., Hwang, I.H. (2007). Effect of fiber type on postmortem proteolysis in longissimus muscle of Landrace and Korean native black pigs. *Meat Sci.*, 77, 482–491.
- Pearce, K.L., Rosenvold, K., Andersen, H.J., Hopkins, D.L. (2011). Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes: a review. *Meat Sci.*, 89, 111–124.
- Picard, B., Lebret, B., Cassar-Malek, I., Liaubet, L., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Hocquette, J.F., Renand, G. (2015). Recent advances in omic technologies for meat quality management. *Meat Sci.*, 109, 18–26.
- Picard, B., Gagaoua, M. (2017). Proteomic investigations of beef tenderness. W: M. Colgrave (red.), *Proteomics in food science* (s. 177–197). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Picard, B., Gagaoua, M. (2020). Meta-proteomics for the discovery of protein biomarkers of beef tenderness: An overview of integrated studies. *Food Res. Int.*, 127, 108739.
- Pietrzak, M., Greaser, M.L., Sosnicki, A.A. (1997). Effect of rapid rigor mortis processes on protein functionality on Pectoralis major muscle of domestic turkeys. *J. Anim. Sci.*, 75, 2106–2116.
- PN-A-07005:2006. Produkty żywnościowe-Warunki klimatyczne i okresy przechowywania w chłodniach.
- PN-ISO 2917:2001. Mięso i przetwory mięsne. Pomiar pH. Metoda odwoławcza.
- Pomponio, L., Ertbjerg, P. (2012). The effect of temperature on the activity of μ - and m-calpain and calpastatin during post-mortem storage of porcine longissimus muscle. *Meat Sci.*, 91, 50–55.
- Pomponio, L., Bukh, C., Ruiz-Carrascal, J. (2018). Proteolysis in pork loins during superchilling and regular chilling storage. *Meat Sci.*, 141, 57–65.
- Pospiech, E. (1990). Zmiany termiczne białek i ich wpływ na zdolność wiązania wody przez tkankę mięśniową. *Rocz. AR Pozn. Rozpr. Nauk.*, 208.

- Pospiech, E. (2000). Diagnostowanie odchyżeń jakościowych mięsa. *Gosp. Mięsna*, 52(4), 68–71.
- Pospiech, E., Greaser, M., Mikołajczak, B., Szalata, M., Łyczyński, A. (2000). Degradation and release of titin in pork muscles. 46th International Congress of Meat Science and Technology – ICoMST (s. 426–427). 4.I–P1. Buenos Aires, Argentine.
- Pospiech, E., Greaser, M.L., Mikołajczak, B., Chiang, W., Krzywdzińska, M. (2002). Thermal properties of titin from porcine and bovine muscles. *Meat Sci.*, 62(2), 187–192.
- Pospiech, E., Grześ, B., Łyczyński, A., Borzuta, K., Szalata, M., Mikołajczak, B. (2003a). Muscle proteins and their changes in the process of meat tenderization. *Anim. Sci. P.*, 21, Suppl. 1, 133–151.
- Pospiech, E., Grześ, B., Łyczyński, A., Borzuta, K., Szalata, M., Mikołajczak, B., Iwańska, E. (2003b). Białka mięśniowe, ich przemiany a kruchość mięsa. *Mięso Wędlin.*, 1, 26–33.
- Pospiech, E., Peltre, G., Greaser, M.L., Mikołajczak, B. (2003c). Metody rozdziału. A. Elektroforeza. Podstawy teoretyczne oraz wybrane przykłady rozdzielów elektroforetycznych. W: M. Jankiewicz, Z. Kędzior (red.), *Metody pomiarów i kontroli jakości w przemyśle spożywczym i biotechnologii* (s. 157–193). Poznań: Wyd. AR.
- Pospiech, E., Montowska, M., Spychaj, A., Iwanowska, A. (2011). Postępy nauki o mięsie w doskonaleniu jego jakości. W: S. Tyszkiewicz, H. Witkowska (red.), *Innowacyjność gospodarki mięsnej w Polsce* (s. 11–28). Warszawa: Dom Wyd. Elipsa.
- Pösö, A.R., Puolanne, E. (2005). Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Sci.*, 70, 423–434.
- Przybylski, W. (2002). Wykorzystanie potencjału glikolitycznego mięśnia longissimus dorsi w badaniach nad uwarunkowaniem wybranych cech jakości mięsa wieprzowego. Rozprawa habilitacyjna. Warszawa: Fundacja Rozwój SGGW.
- Przybylski, W., Regenstein, J.M., Zybert, A. (2015). Slaughter-line operations and their effects on meat quality. W: W. Przybylski, D. Hopkins (red.), *Meat quality: Genetic and environmental factors* (s. 219–249). Boca Raton: CRC Press.
- Przybylski, W., Kaczor, D., Żelechowska, E., Jaworska, D., Kajak-Siemaszko, K., Boruszewska, K., Jankiewicz, U. (2016). Sarcoplasmic protein profile from drip loss in relation to pork quality. *J. Food Sci.*, 81(10), C2320–C2326.
- Pulford, D.J., Fraga Vazquez, S., Frost, D.F., Fraser-Smith, E., Dobbie, P., Rosenvold, K. (2008). The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. *Meat Sci.*, 79(4), 623–630.
- Puolanne, E., Ruusunen, M., Voutila, L., Ylä-Ajos, M. (2006). Growth rate, muscle physiology, carcass traits and meat quality in pigs – a collage of studies on pigs at the University of Helsinki. *Arch. Tierz.*, 49, SI 1, 126–131.
- Puolanne, E., Halonen, M. (2010). Theoretical aspects of water-holding in meat. *Meat Sci.*, 86, 151–161.
- Purintrapiban, J., Wang, M., Forsberg, N.E. (2001). Identification of glycogen phosphorylase and creatine kinase as calpain substrates in skeletal muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33, 531–540.
- Purslow, P.P. (2005). Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Sci.*, 70(3), 435–447.

- Ramirez, J.A., Oliver, M.A., Pla, M., Guerrero, L., Arino, B., Blasco, A., Pascual, M., Gil, M. (2004). Effect of selection for growth rate on biochemical, quality and texture characteristics of meat from rabbits. *Meat Sci.*, 67, 617–624.
- Reddy, S., Jones, A.D., Cross, C.E., Wong, P.S., van der Vliet, A. (2000). Inactivation of creatine kinase by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. *Biochem. J.*, 347, 821–827.
- Rees, M., Trout, G., Warner, R. (2002). Tenderness of pork *m. longissimus thoracis at lumborum* after accelerated boning. Part 2. Effect of post-slaughter ageing. *Meat Sci.*, 61, 215–224.
- Rees, M.P., Trout, G.R., Warner, R.D. (2003a). The influence of the rate of pH decline on the rate of ageing for pork. I: Interaction with method of suspension. *Meat Sci.*, 65(2), 791–804.
- Rees, M.P., Trout, G.R., Warner, R.D. (2003b). The influence of the rate of pH decline on the rate of ageing for pork. II: Interaction with chilling temperature. *Meat Sci.*, 65, 805–818.
- Reis, M.M., Rosenvold, K. (2014). Early on-line classification of beef carcasses based on ultimate pH by near infrared spectroscopy. *Meat Sci.*, 96(2), 862–869.
- Robbins, K., Jensen, J., Ryan, K.J., Homco-Ryan, C., McKeith, F.K., Brewer, M.S. (2003). Consumer attitudes towards beef and acceptability of enhanced beef. *Meat Sci.*, 65(2), 721–729.
- Robert, N., Briand, M., Taylor, R., Briand, Y. (1999). The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Sci.*, 51(2), 149–153.
- Rocchetti, G., Pateiro, M., Campagnol, C.B., Barba, F.J., Tomasevic, I., Montesano, D., Lucini, L., Lorenzo, J.M. (2020). Effect of partial replacement of meat by carrot on physicochemical properties and fatty acid profile of fresh turkey sausages: a chemometric approach. *J. Sci. Food Agric.*, 100(13), 4968–4977.
- Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A.P., Buchner, J., Gaestel, M. (1999). Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor R by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 18947–18956.
- Rosenvold, K., Andersen, H.J. (2003). Factors of significance for pork quality: a review. *Meat Sci.*, 64, 219–237.
- Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego (2004). *Dz. Urz. L* 139 z 30.4.2004.
- Rybarczyk, A., Karamucki, T., Pietruszka, A., Rybak, K., Matysiak, B. (2015). The effects of blast chilling on pork quality. *Meat Sci.*, 101, 78–82.
- Ryu, Y.C., Choi, Y.M., Kim, B.C. (2005). Variations in metabolite contents and protein denaturation of the *longissimus dorsi* muscle in various porcine quality classifications and metabolic rates. *Meat Sci.*, 71, 522–529.
- Savell, J.W., Mueller, S.L., Baird, B.E. (2005). The chilling of carcasses. *Meat Sci.*, 70 (3), 449–459.
- Sawdy, J.C., Kaiser, S.A., St-Pierre, N.R., Wick, M.P. (2004). Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. *Meat Sci.*, 67, 421–426.

- Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C., Le Roy, P., Monin, G., Chérel, P., Laville, E. (2006). Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: implications on meat color development. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2732–2737.
- Sazili, A.Q., Parr, T., Sensky, P.L., Jones, S.W., Bardsley, R.G., Buttery, P.J. (2005). The relationship between slow and fast myosin heavy chain content, calpastatin and meat tenderness in different ovine skeletal muscles. *Meat Sci.*, 69, 17–25.
- Schäfer, A., Rosenvold, K., Purslow, P.P., Andersen, H.J., Henckel, P. (2002). Physiological and structural events post mortem of importance for drip loss in pork. *Meat Sci.*, 61(4), 355–366.
- Scheffler, T.L., Gerrard, D.E. (2007). Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Sci.*, 77(1), 7–16.
- Scheffler, T.L., Scheffler, J.M., Kasten, S.C., Sosnicki, A.A., Gerrard, D.E. (2013). High glycolytic potential does not predict low ultimate pH in pork. *Meat Sci.*, 95(1), 85–91.
- Schiaffino, S., Reggiani, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.*, 76, 371–423.
- Sentandreu, M.A., Coulis, G., Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends J. Food Sci. Technol.*, 13, 400–421.
- Shen, Q.W., Du, M. (2015). Conversion of muscle to meat. W: W. Przybylski, D. Hopkins (red.), *Meat quality, genetic and environmental factors* (s. 81–100). Boca Raton: CRC Press.
- Sieczkowska, H., Antosik, K., Krzęcio-Nieczyporuk, E., Zybert, A., Koćwin-Podsiadła, M. (2013). Przydatność wybranych parametrów oznaczanych 45 min post mortem w mięśniu Longissimus lumborum do oceny jakości wieprzowiny. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 2(87), 51–60.
- Sierra, V., Fernández-Suárez, V., Castro, P., Osoro, K., Vega-Naredo, I., García-Macia, M., Rodríguez-Colunga, P., Coto-Montes, A., Oliván, M. (2012). Identification of biomarkers of meat tenderisation and its use for early classification of Asturian beef into fast and late tenderising meat. *J. Sci. Food Agric.*, 92(13), 2727–2740.
- Sikes, A.L., Jacob, R., D'Arcy, B., Warner, R. (2017). Very fast chilling modifies the structure of muscle fibres in hot-boned beef loin. *Food Res. Int.*, 93, 75–86.
- Silva, J.A., Patarata, L., Martins, C. (1999). Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat Sci.*, 52, 453–459.
- Sionek, B., Przybylski, W. (2015). Wpływ czynników środowiskowych na poziom glikogenu w mięśniach zwierząt rzeźnych. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 98(1), 35–48.
- Smulders, F.J.M., Toldra, F., Flores, J., Prieto, M. (1992). *New technologies for meat and meat products* (pp. 182, 186–188). Utrecht, Netherlands: Audet Tijdschriften.
- Sorapukdee, S., Kongtasorn, C., Banjakul, S., Vissessanguan, W. (2013). Influences of muscle composition and structure of pork from different breeds on stability and textural properties of cooked meat emulsion. *Food Chem.*, 138, 1892–1901.
- Springer, M.P., Carr, M.A., Ramsey, C.B., Miller, M.F. (2003). Accelerated chilling of carcasses to improve pork quality. *J. Anim. Sci.*, 81, 1464–1472.
- Stephenson, G.M. (2001). Hybrid skeletal muscle fibers: a rare or common phenomenon? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 28, 692–702.

- Strzyżewski, T., Bilska, A., Krzysztofiak, K. (2008). Zależność pomiędzy wartością pH a jego barwą. *Nauka Przyr. Technol.*, 2(2), 1–9.
- Suman, S.P., Joseph, P. (2013). Myoglobin chemistry and meat color. *Ann. Rev. J. Food Sci. Technol.*, 4, 79–99.
- Swatland, H.J. (1993). Pork quality, genetic and metabolic factors. W: E. Puolanne, D. I. Demeyer (red.), Wallingford, UK: CAB International.
- Szalata, M. (2003). Określenie zależności między aktywnością enzymów proteolitycznych a kruchością mięsa świń o zróżnicowanej mięsności. Praca doktorska. Akademia Rolnicza w Poznaniu.
- Szalata, M., Pospiech, E., Greaser, M., Łyczyński, A., Grześ, B., Mikołajczak, B. (2005). Titin and troponin T changes in relation to tenderness of meat from pigs of various meatiness. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 14(2), 139–143.
- Taillandier, D., Combaret, L., Pouch, M.N., Samuels, S.E., Bechet, D., Attaix, D. (2004). The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.*, 63, 357–361.
- Takahashi, K., Hattori, A., Tatsumi, R., Takai, K. (1992). Calcium-induced splitting of connectin filaments into β -connectin and a 1,200-kDa subfragment. *J. Biochem.*, 111(6), 778–782.
- Taylor, R.G., Geesing, G.H., Thompson, V.F., Koohmaraie, M., Goll, D.E. (1995a). Is Z-disk degradation responsible for post-mortem tenderization? *J. Anim. Sci.*, 73, 1351–1358.
- Taylor, R.G., Tassy, C., Briand, M., Robert, N., Briand, Y., Ouali, A. (1995b). Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Mol. Biol. Rep.*, 21, 71–73.
- TIBCO Software Inc. (2017). Statistica (data analysis software system), version 13.
- Tomović, V.M., Petrović, L.S., Džinić, N.R. (2008). Effects of rapid chilling of carcasses and time of deboning on weight loss and technological quality of pork semimembranosus muscle. *Meat Sci.*, 80(4), 1188–1193.
- Tomović, V.M., Jokanović, M.R., Petrović, L.S., Tomović, M.S., Tasić, T.A., Ikonić, P.M., Sumić, Z.M., Sojić, B.V., Skaljic, S.B., Šošo, M.M. (2013). Sensory, physical and chemical characteristics of cooked ham manufactured from rapidly chilled and earlier deboned M. semimembranosus. *Meat Sci.*, 93(1), 46–52.
- Ustawa z dnia 20 lutego 2015 r. o wspieraniu rozwoju obszarów wiejskich z udziałem środków Europejskiego Funduszu Rolnego na rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich w ramach Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich na lata 2014–2020. *Dz. U. z 2015, poz. 349.*
- van Laack R.L.J.M., Solomon, M.B. (1994). Biochemistry of lean muscle tissue as related to water-holding capacity. *Recip. Meat Conf. Proc.*, 47, 91–97.
- van Laack, R.L.J.M. (2001). Metabolic factors influencing ultimate pH. *Recip. Meat Conf. Proc.*, 54, 158–160.
- van Moeseke, W., De Smet, S., Claeys, E., Demeyer, D. (2001). Very fast chilling of beef: effects on meat quality. *Meat Sci.*, 59(1), 31–37.
- van de Wiel, D.F.M., Zhang, W.L. (2007). Identification of pork quality parameters by proteomics. *Meat Sci.*, 77, 46–54.
- van der Wal, P.G., Engel, B., van Beek, G., Veerkamp, C.H. (1995). Chilling pig carcasses: Effects on temperature, weight loss and ultimate meat quality. *Meat Sci.*, 2(40), 193–202.

- Vetharaniam, I., Thomson, R.A., Devine, C.E., Daly, C.C. (2010). Modelling muscle energy-metabolism in anaerobic muscle. *Meat Sci.*, 85(1), 134–148.
- Vieira, C., Diaz, M.T., Martínez, B., García-Cachán, M.D. (2009). Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbiological and sensory quality of rustic crossbred beef at different states of ageing. *Meat Sci.*, 83(3), 398–404.
- Viljoen, H. F., De Kock, H. L., Webb, E. C. (2002). Consumer acceptability of dark, firm and dry (DFD) and normal pH beef steaks. *Meat Sci.*, 61(2), 181–185.
- Warner, R.D., Jacob, R.H., Rosenfold, K., Rochfort, S., Trenerry, C., Plozza, T., McDonagh, M.B. (2015). Altered post-mortem metabolism identified in very fast chilled lamb *M. longissimus thoracis et lumborum* using metabolomic analysis. *Meat Sci.*, 108, 155–164.
- Warner, R.D., McDonnell, C.K., Bekhit, A.E.D., Claus, J., Vaskoska, R., Sikes, A., Ha, M. (2017). Systematic review of emerging and innovative technologies for meat tenderisation. *Meat Sci.*, 132, 72–89.
- Weaver, A.D., Bowker, B.C., Gerrard, D.E. (2008). Sarcomere length influences post-mortem proteolysis of excised bovine semitendinosus muscle. *J. Anim. Sci.*, 86, 1925–1932.
- Wendt, A., Thompson, V.F., Goll, D.E. (2004). Interaction of calpastatin with calpain: a review. *J. Biol. Chem.*, 385, 465–472.
- Wenzel, T., Baumeister, W. (1993). Thermoplasma acidophilum proteasomes degrade partially unfolded and ubiquitin-associated proteins. *FEBS Lett.*, 326, 215–218.
- Węglarz, A. (2011). Effect of pre-slaughter housing of different cattle categories on beef quality. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 29(1), 43–52.
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., Whittington, F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: a review. *Meat Sci.*, 78, 343–358.
- Wright, S.A., Ramos, P., Johnson, D.D., Scheffler, J.M., Elzo, M.A., Mateescu, R.G., Scheffler, T.L. (2018). Brahman genetics influence muscle fiber properties, protein degradation, and tenderness in an Angus-Brahman multibreed herd. *Meat Sci.*, 135, 84–93.
- Wu, J.J., Dutson, T.R., Carpenter, Z.L. (1981). Effect of postmortem time and temperature on the release of lysosomal enzymes and their possible effect on bovine connective tissue components of muscle. *J. Food Sci.*, 46, 1132–1135.
- Wu, G., Clerens, S., Farouk, M.M. (2014a). LC MS/MS identification of large structural proteins from bull muscle and their degradation products during post mortem storage. *Food Chem.*, 150, 137–144.
- Wu, G., Farouk, M.M., Clerens, S., Rosenfold, K. (2014b). Effect of beef ultimate pH and large structural protein changes with aging on meat tenderness. *Meat Sci.*, 98(4), 637–645.
- Xu, X., Qiu, H., Du, Z.-Q., Fun, B., Rothschild, M.F., Yuan, F., Liu, B. (2010). Porcine CSRP3: polymorphism and association analyses with meat quality traits and comparative analyses with CSRP1 and CSRP2. *Mol Biol Rep* 37, 451–459.
- Yang, X., Ji-Chao, H., Huang, M., Xu, B.C., Guang-Hong, Z. (2011). The effects of different chilling methods on meat quality and calpain activity of pork muscle longissimus dorsi. *J. Food Sci.*, 71, 27–32.

- Yin, S., Faustman, C., Tatiyaborworntham, N., Ramanathan, R., Maheswarappa, N.B., Mancini, R.A., Sun, Q. (2011). Species-specific myoglobin oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 59(22), 12198–12203.
- Ylä-Ajos, M., Ruusunen, M., Puolanne, E. (2006). The significance of the activity of glycogen debranching enzyme in glycolysis in porcine and bovine muscles. *Meat Sci.*, 72(3), 532–538.
- Ylä-Ajos, M.S.K., Lindahl, G., Young, J.F., Theil, P.K., Puolanne, E., Enfält, A.C., Oksbjerg, N. (2007). Post-mortem activity of the glycogen debranching enzyme and change in the glycogen pools in porcine dorsi from carriers and non-carriers of the RN-gene. *Meat Sci.*, 75, 112–119.
- Ylä-Ajos, M., Puolanne, E. (2007). Temperature shows greater impact on bovine Longissimus dorsi muscle glycogen debranching enzyme activity than does salt concentration. *Meat Sci.*, 77, 587–592.
- Young, O.A., Graafhuis, A.E., Davey, C.L. (1980). Postmortem changes in cytoskeletal proteins of muscle. *Meat Sci.*, 5, 41–55.
- Young, O.A., Thomson, R.D., Merhtens, V.G., Loeffen, M.P. (2004a). Industrial application to cattle of a method for the early determination of meat ultimate pH. *Meat Sci.*, 67(1), 107–112.
- Young, O.A., West, J., Hart, A.L., Van Otterdijk, F.F.H. (2004b). A method for early determination of meat ultimate pH. *Meat Sci.*, 66(2), 493–498.
- Yu, J., Tang, S., Bao, E., Zhang, M., Hao, Q., Yue, Z. (2009). The effect of transportation on the expression of heat shock proteins and meat quality of *M. longissimus dorsi* in pigs. *Meat Sci.*, 83(3), 474–478.
- Yu, T.Y., Morton, J.D., Clerens, S., Dyer, J.M. (2015). In-depth characterisation of the lamb meat proteome from longissimus lumborum. *EuPA Open Proteom.*, 6, 28–41.
- Zajac, M., Palka, K., Mikołajczak, B., Pospiech, E. (2016). The effect of muscle type and time of storage on myofibrillar protein proportion in beef. *Ann. J. Anim. Sci.*, 16(2), 585–600.
- Zakrys-Waliwander, P.I., O’Sullivan, M.G., O’Neill, E.E., Kerry, J.P. (2012). The effects of high oxygen modified atmosphere packaging on protein oxidation of bovine *M. Longissimus dorsi* muscle during chilled storage. *Food Chem.*, 131(2), 527–532.
- Zapata, I., Zerby, H.N., Wick, M. (2009). Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. *J. Agric. Food Chem.*, 57(11), 4956–4963.
- Zeng, Z., Li, C., Ertbjerg, P. (2017). Relationship between proteolysis and water-holding of myofibrils. *Meat Sci.*, 131, 48–55.
- Zhu, X., Ruusunen, M., Gusella, M., Zhou, G., Puolanne, E. (2011). High post-mortem temperature combined with rapid glycolysis induces phosphorylase denaturation and produces pale and exudative characteristics in broiler pectoralis major muscles. *Meat Sci.*, 89, 181–188.
- Zhu, X., Ruusunen, M., Gusella, M., Ylä-Ajos, M., Xu, X., Zhou, G., Puolanne, E. (2013). High early post-mortem temperature induces activation of AMP-activated protein kinase and development of pale, soft and exudative characteristics in turkey muscles. *Meat Sci.*, 93(3), 600–606.

- Zybert, A., Krzęcio, E., Sieczkowska, H., Podsiadły, W., Przybylski, W. (2007). The influence of chilling method on glycolytic changes and pork meat quality. W: G. Zhou, W. Zhang (red.), 53th International Congress of Meat Quality and Technology (pp. 293–294). Beijing.
- Zybert, A., Krzęcio, E., Sieczkowska, H., Antosik, K., Podsiadły, W., Koćwin-Podsiadła, M. (2008). Relationship between glycolytic potential and some physico-chemical and functional traits of longissimus lumborum muscle including chilling method of carcasses. *Rocz. Nauk. PTZ*, 4, 301–309.
- Zybert, A., Sieczkowska, H., Antosik, K., Krzęcio-Nieczyporuk, E., Adamczyk, G., Koćwin-Podsiadła, M. (2013). Relationship between glycolytic potential and meat quality of duroc pigs with consideration of carcass chilling system. *Ann. Anim. Sci.*, 13(10), 645–654.
- Żelechowska, E., Przybylski, W., Jaworska, D., Santé-Lhoutellier, V. (2012). Technological and sensory pork quality in relation to muscle and drip loss protein profiles. *Eur. Food Res. Technol.*, 234(5), 883–894.
- Żywica, R., Banach, J.K. (2007). Analysis of changes in electric current intensity during high voltage electrical stimulation in the aspect of prediction the pH value of beef. *J. Food Eng.*, 81, 560–565.
- Żywica, R., Modzelewska-Kapituła, M., Banach, J.K. (2018). Linear correlation between pH value of stimulated beef and electrical current intensity. *Int. J. Food Prop.*, 21(1), 1386–1394.