

dr inż. Beata Mikołajczak

Katedra Technologii Mięsa

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

AUTOREFERAT



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Spis treści

1. Imię i nazwisko	5
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	5
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	5
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	6
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	6
4.2. Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników wskazanego osiągnięcia	6
4.2.1. Wstęp	6
4.2.2. Cel naukowy osiągnięcia oraz omówienie wyników badań.....	9
4.2.3. Podsumowanie	21
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	27
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	38
6.1. Działalność dydaktyczna.....	38
6.2. Działalność organizacyjna	39
6.3. Działalność popularyzująca naukę lub sztukę	40
7. Inne ważne informacje dotyczące kariery zawodowej.....	40
7.1. Udział w konferencjach.....	40
7.2. Udział w projektach badawczych.....	41
7.3. Współpraca z jednostkami naukowymi krajowymi i zagranicznymi, działalność międzynarodowa.....	41
7.4. Otrzymane nagrody i wyróżnienia.....	41
7.5. Odbyte szkolenia i kursy.....	42
7.6. Informacja o współpracy z otoczeniem społecznym i gospodarczym.....	42
7.7. Dorobek publikacyjny.....	43

1. **Imię i nazwisko:** Beata Mikołajczak
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**
 - **Magister inżynier** w zakresie technologii żywności, Akademia Rolnicza w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, 21 czerwca 1995 r.
 - tytuł pracy magisterskiej: „**Porównawcza charakterystyka wybranych właściwości funkcjonalnych ekstraktów białek mięśniowych**”.
 - promotor: dr inż. Piotr Konieczny
 - **Doktor nauk rolniczych** w zakresie technologii żywności i żywienia, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, 13 września 2004 r.
 - tytuł rozprawy doktorskiej: „**Ocena wpływu przemian białek mięsa świń o zróżnicowanej jakości na kruchość i wodochłonność tkanki**”.
 - promotor: prof. dr hab. Edward Pospiech
 - **Inne posiadane dyplomy:**

Świadectwo ukończenia Studiów Podyplomowych: „Menadżer projektów badawczych”, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Fizyki, 2011.
3. **Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych**
 - **01.02.1996 – 30.09.2005 asystent**

w Instytucie Technologii Mięsa, Zakładzie Surowców Zwierzęcych, Wydziału Technologii Żywności, Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu
 - **01.10.2005 – obecnie adiunkt**

w Katedrze Technologii Mięsa (do 2018 roku w Instytucie Technologii Mięsa), Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

W okresie 16.05.2000–02.10.2000 oraz 25.08.2006–28.12.2006 przebywałam na urlopie macierzyńskim. Od 01.12.2003 do 31.05.2004 byłam na urlopie naukowym.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięciem naukowym, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego na podstawie art. 219 ust. 1 pkt. 2a Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) jest monografia naukowa pod tytułem:

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

Mikołajczak B.: Białka mięśniowe jako wskaźniki jakości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością oraz mięsa bydła z wadą DFD, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Rozprawy Naukowe 520, 149 stron, Poznań 2021, ISSN 1986-1894, ISBN 978-83-7160-997

Recenzent wydawniczy: prof. dr hab. Joanna Stadnik, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

4.2. Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników wskazanego osiągnięcia

4.2.1. 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 to interesujące związki, zróżnicowane pod względem budowy i pełnionych funkcji. Dzieli się je na trzy główne grupy, mianowicie białka miofibrylarne, wśród których wyróżnia się białka kurczliwe, cytoszkietowe i regulatorowe, oraz białka sarkoplazmatyczne i białka łącznotkankowe (Pospiech i in., 2003; 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, jakie zachodzą w mięsie podczas chłodniczego przechowywania i wymagają szczególnej uwagi.

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.

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, 2013; 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). 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 dodatnio skorelowana z cechami tekstury, takimi jak żujność, spójność, elastyczność i twardość mięsa. 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 około 15 kDa do 180 kDa (Żelechowska i in., 2012; Marino i in., 2014; Przybylski i in., 2016).

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. Wychładzanie tusz ma na celu zapewnienie bezpieczeństwa żywności i wydłużenie okresu przydatności do spożycia.

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 skurczu chłodniczego. Zjawisko to najczęściej zachodzi wówczas, gdy temperatura w mięśniach jest poniżej 10 – 12°C, a wartość pH jest powyżej 6,0 – 6,3. Powyższe zakresy temperatury i pH zależą od rodzaju włókien mięśniowych, które dominują w analizowanych mięśniach. Problem ten dotyczy nie tylko mięśni bydła i owiec, dla których zjawisko to jest znane już od dawna, ale także świń, szczególnie tych o wysokiej mięsności. W tym przypadku warstwa zewnętrzna, którą stanowi przede wszystkim słonina, jest cienka i chroni mięśnie w tuszy przed chłodem tylko w bardzo ograniczonym stopniu.

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 świnię o dużej mięsności obarczone genem podatności na stres. Stąd, przy zachowaniu dobrostanu zwierząt podczas obrotu okołoubojowego przyspieszona glikoliza jest zjawiskiem rzadkim. Natomiast, wykorzystanie ultraszybkiego wychładzania może zwiększać ryzyko pogorszenia jakości i wodochłonności mięsa.

Szybkość wychładzania wpływa na tempo zmian glikolitycznych w tkance mięśniowej po uboju i w ten sposób oddziałuje na jakość oraz właściwości mięsa wieprzowego (Josell i in., 2003; Zybert i in., 2007; Iwańska i in., 2016; Marino i in., 2013, 2014; Ouali i in., 2013; Picard i in., 2015). Wyniki wielu badań wskazują na oddziaływanie aktywności enzymów glikolitycznych na szybkość glikolizy *post mortem* (*pm*). Wpływają one na tempo i zakres metabolizmu poubojowego, w konsekwencji przyczyniają 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; Copenhagen i in. 2006; Kriskhek i in., 2011).

Zarówno w przypadku mięsa wieprzowego, jak również 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 również oceniana na podstawie instrumentalnego pomiaru wartości siły cięcia (WBSF). W dużym stopniu długość sarkomerów, zawartość tkanki łącznej i zmiany białek mięśniowych wyjaśniają różnice

we właściwościach mięsa, w tym jego kruchości. Czynnikiem, który może również wpływać na kruchość mięsa jest szybkość procesu wychładzania (Jeremiah i in., 1992, Jones i in., 1987; Iwańska i in., 2017). W badaniach prezentowanych w niniejszej pracy analizowano białka mięsa i frakcji wycieku wirówkowego, w którego skład wchodziły białka sarkoplazmatyczne jak również miofibrylarne, w tym cytoszkieletowe. Przyjęto założenie, że równoczesna analiza białek mięsa i frakcji wycieku wirówkowego umożliwi głębsze 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.

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, a w dalszym etapie ich oksydację i S-nitrozylację. Zmiany białek w czasie dojrzewania mięsa determinowane są przebiegiem procesu glikolizy. Wszelkie odchylenia od normalnego tempa glikolizy i obniżania pH determinują zmiany białek. Jednocześnie mają wpływ na powstawanie wad jakościowych mięsa, powodując ograniczenie 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 częstością 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, 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 zarówno w Polsce jak i 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 DFD. Jego występowanie powoduje duże straty dla przemysłu. W związku z tym, zakłady zainteresowane są posiadaniem przyżyciowego testu, który pozwoliłby na wyeliminowanie sztuk, z których mięso po uboju może być obciążone wadą DFD. W przypadku odchylenia jakościowego DFD zasadnym 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, stąd uzasadnionym jest podjęcie tego tematu w niniejszej pracy.

Mimo dość obszernych danych związanych z oceną białek mięsa była dotychczas nie zwracano uwagi na powiązanie ich występowania z wadą DFD. Główne zainteresowanie skupiono na analizie możliwości wczesnego prognozowania kruchości mięsa wołowego w oparciu o profil jego białek (Picard i in., 2015; Oh i in., 2019; Picard i Gagaoua, 2020).

Obserwacje białek w mięsie o obniżonej jakości DFD były przedmiotem tylko nielicznych prac. Pulford i in. (2008), podobnie jak Lomiwes i in. (2014), Mahmood i in. (2018), Oh i in. (2019) szczególną uwagę skierowali na białka szoku cieplnego oraz zależność pomiędzy ich występowaniem a jakością mięsa. Cytowani powyżej 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 ekstraktach tzn. z pominięciem rozdziału przy wykorzystaniu elektroforezy.

Zmiany obserwowane w białkach mięsa z wadą DFD są odpowiedzią komórek na stresory, czynniki wywołujące stres komórkowy. Stąd też szczególną uwagę zwracają białka szoku cieplnego (HSP) powszechnie nazywane także chaperonami - białkami opiekuńczymi. Jest to duża grupa białek o zróżnicowanej masie cząsteczkowej od 12 do 100 kDa, która stanowi jedno z kryteriów ich klasyfikacji (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 istotną rolę w funkcjonowaniu mięśni, ich skurczu, polimeryzacji aktyny, stabilizacji mikrofilamentów oraz cytoszkieletu. 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. Pozwala również na określanie kluczowych białek odpowiedzialnych za wodochłonność i kruchość mięsa (Marino i in., 2015). Proteomika jest narzędziem analitycznym wspierającym wysiłki na rzecz odkrycia sekwencji peptydów bioaktywnych czy funkcjonalnych, które mogą stanowić wartość dodaną białek jako składników mięsa (Yu i in., 2015). Przystępując do badań oczekiwano, że za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE, analizy 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 jako potencjalnych wskaźników jakości mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością oraz mięsa bydła z wadą DFD. Ponadto przyczyni się do dalszego wyjaśnienia zależności pomiędzy ich występowaniem oraz zmianami ich udziału, a wodochłonnością i

kruchością jako podstawowymi właściwościami mięsa istotnymi zarówno z punktu widzenia konsumentów, jak również producentów.

4.2.2. Cel naukowy osiągnięcia oraz omówienie wyników badań

Celem badań realizowanych w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego 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 wywołać zjawisko skurczu chłodniczego, będące przyczyną wysokich 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 jego 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 wytypowanie potencjalnych białkowych wskaźników jego jakości, wodochłonności i kruchości.

Weryfikację powyższych hipotez oparto o aktualne metody badawcze i analityczne umożliwiające m.in.: ocenę wskaźników tempa przemian poubojowych oraz wodochłonności i kruchości mięsa wieprzowego wychładzanego z różną szybkością, w warunkach modelowych, określenie zmian udziału białek mięśniowych i białek frakcji wycieku wirówkowego na podstawie elektroforezy na żelach poliakrylamidowych z SDS (SDS-PAGE) oraz metodą Western blot.

Ocenie poddano również właściwości mięsa bydła normalnej jakości (RFN) i z wadą DFD. Wykorzystując SDS-PAGE scharakteryzowano profil białek mięśniowych. Na podstawie UHPLC-Q-TOF-MS/MS dokonano identyfikacji białek oraz wyznaczono potencjalne białkowe i peptydowe wskaźniki jakości mięsa.

Założenia badawcze 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.

Badania pierwszego etapu doświadczenia przeprowadzono na mięśniu najdłuższym klatki piersiowej i lędźwi (LTL) (*m. longissimus thoracis et lumborum*) świni krzyżówek rasy

wbp×pbz z knurami rasy pbz. Mięśnie pochodzące z 5 wyselekcjonowanych tusz wieprzowych rozpoczynając od części piersiowej podzielono na trzy części. Każdą część poddano wychładzaniu A - w tuszy, B - w woreczku foliowym z zamknięciem strunowym, C - w woreczku foliowym z zamknięciem strunowym obłożonym lodem. 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). Przygotowano próbki przeznaczone do oznaczenia zawartości glikogenu i kwasu mlekowego (po 45 min. i 2 h). Próby do analizy białek mięsa pobrane 45 min. po uboju zabezpieczono przez bezpośrednie zanurzenie w ciekłym azocie. Następnego dnia mięso podzielono na porcje, zapakowano próżniowo i przechowywano w warunkach chłodniczych przez 6 dni. Białka mięsa (po 45', 24 h i 6 dniach) i białka frakcji wycieku wirówkowego (po 24 h i 6 dniach) rozdzielono za pomocą elektroforezy jednokierunkowej na żelach poliakrylamidowych z SDS (SDS-PAGE). Identyfikację wybranych białek, mianowicie titiny, łańcuchów ciężkich miozyny (MHC), troponiny-T (Tn-T) i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), zarówno w mięsie jak również w wycieku wirówkowym, wykonano metodą Western blot.

Uzyskane rezultaty potwierdziły prawidłowy przebieg procesu glikolizy zachodzący podczas dojrzewania mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością. Stwierdzono, że szybkość procesu wychładzania istotnie wpłynęła na pH mięsa po 2 dniach przechowywania. 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. Najniższe zakwaszenie w każdym terminie analiz obserwowano w mięsie B (0,15°C/min.) wychładzanym z szybkością pośrednią. Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji wskazano istotny wpływ czasu przechowywania chłodniczego na pH badanych mięśni.

Stężenie glikogenu w mięśniach wychładzanych ze zróżnicowaną szybkością mieściło się w zakresie od 33,73 µmol/g po 45 min. do 12,67 µmol/g po 24 h przechowywania. 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 µmol/g i było istotnie wyższe w porównaniu z próbami B (17,42 µmol/g). Próby C (0,27°C/min.) wychładzane najszybciej charakteryzowały wartości pośrednie na poziomie 22,20 µmol/g. Po 24 h odnotowano wolniejszy przebieg rozpadu glikogenu w mięśniach C wychładzanych najszybciej.

Stężenie kwasu mlekowego w mięsie wychładzanym ze zróżnicowaną szybkością mieściło się w zakresie od 47,70 µmol/g po 45 min. do 108,65 µmol/g po 24 godzinach przechowywania. 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. 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 $r = -0,94$; $p \leq 0,05$).

Straty soku mięśniowego są zjawiskiem naturalnym, powstają podczas wychładzania tusz, przechowywania i obróbki termicznej mięsa. Jednak ich ilość może być bardzo zróżnicowana. Podczas 6 dniowego składowania ubytki masy mięsa wychładzanego z różną szybkością mieściły się w przedziale od 1,68% do 6,26%. 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. Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji wykazano istotny wpływ szybkości wychładzania oraz czasu przechowywania na wielkość ubytków przechowalniczych.

Ubytki termiczne z mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością wynosiły od 33,61% do 37,25%. Po 6 dniach przechowywania istotnie wyższe 36,44% ubytki termiczne charakteryzowały mięso wychładzane najszybciej w porównaniu z próbami A (34,39%) i B (34,95%). Wykazano, że szybkość procesu wychładzania wpłynęła wysoko istotnie ($p \leq 0,001$) na wielkość ubytków termicznych.

Wodochłonność mięsa (WHC) określono także na podstawie ilości uzyskanego wycieku wirówkowego. Stwierdzono istotny wpływ szybkości wychładzania oraz czasu przechowywania na jego wielkość. Po 24 h 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. 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. Najlepszą wodochłonnością cechowało się mięso prób B - 19,34% po 24 h i 13,95% po 6 dniach.

Wyniki analizy wpływu zastosowanej szybkości wychładzania na kruchość mięsa ocenioną na podstawie wartości siły i pracy cięcia wskazują, 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 N/cm² i 382,54 Nxmm), cechowały się próbki B i C wychładzane szybciej (odpowiednio 55,60 i 80,03 N/cm² oraz 435,31 i 688,86 (Nxmm)). Mięso C wychładzane z szybkością 0,27°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. Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono, że zarówno szybkość wychładzania jak również czas przechowywania wpłynęły istotnie na siłę i pracę cięcia mięsa. 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 $r = 0,75$; $p \leq 0,05$). 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 $r = 0,64$ ($p \leq 0,05$).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zastosowanie szybkości wychładzania 0,27°C/min., tj. takiej jaką wykorzystano w przypadku prób C prowadziło do uzyskania surowca mięsnego o niepożądanym jakości związanej z jego gorszą wodochłonnością i kruchością. Powyższe może sugerować wartość aplikacyjną pracy związaną ze wskazaniem maksymalnej szybkości wychładzania mięsa 0,15°C/min., jako zalecanej w celu uzyskania jego pożądanym cech jakościowych, w tym wodochłonności i kruchości.

Ocena elektroforetycznego profilu białek mięśniowych wykazała, że udział pasm o masach 205 kDa, 42 kDa i 38-36 kDa związany był z zastosowaną szybkością wychładzania. Po 24 h próby B (0,15°C/min.) cechował istotnie większy (17,91%) udział białek o masie 205

kDa w porównaniu z wartością 15,42% uzyskaną dla mięśni C (0,27°C/min.). Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono istotny wpływ interakcji szybkości wychładzania i czasu przechowywania na zmiany udziału białek o masie 205 kDa.

Po 6 dniach przechowywania stwierdzono wpływ szybkości wychładzania mięśni na zmiany ilości aktyny i troponiny-T. W mięsie C wychładzanym najszybciej udział aktyny był istotnie niższy w porównaniu z próbami A i B. W terminie tym stwierdzono istotną ujemną zależność pomiędzy udziałem aktyny a ubytkami termicznymi i kruchością mięsa $r = -0,75$ i $r = -0,55$ ($p \leq 0,05$). Istotnie więcej troponiny-T wykazano w mięsie wychładzanym najwolniej A w porównaniu z próbami B. Analiza korelacji dla wszystkich prób wykazała istotną dodatnią zależność $r = 0,50$ ($p \leq 0,05$), pomiędzy udziałem tego pasma a wodochłonnością mięsa.

Na podstawie SDS-PAGE wyznaczono zmiany udziału 16 pasm białek wycieku wirówkowego w szerokim zakresie mas cząsteczkowych od 2400 kDa do poniżej 10 kDa. We frakcji tej obserwowano charakterystyczne białka sarkoplazmatyczne oznaczone odpowiednimi numerami analizowanych pasm: fosforylase b (4), 6-fosfofruktokinazę (5), kinazę pirogronianową (7), enolazę (8), kinazę kreatynową (9), aldolazę (10), dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (11) oraz mioglobinę (14). 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 pierwszym terminie badań nie wykazano wpływu szybkości procesu wychładzania na zmiany udziału białek frakcji wycieku wirówkowego. Obecność pasma 1 (2400 kDa) i 2 (148-153 kDa) zwiększała się znacząco w czasie przechowywania. Stwierdzono istotną ujemną zależność pomiędzy udziałem pasma o masie 2400 kDa a wielkością wycieku wirówkowego i siłą cięcia $r = -0,78$ i $r = -0,50$ ($p \leq 0,05$).

Udział białek o masie 148-153 kDa w drugim terminie badań był istotnie większy w próbach C (0,27°C/min.) w porównaniu z mięsem A wychładzanym najwolniej. W przypadku wszystkich analizowanych prób stwierdzono istotną zależność pomiędzy udziałem tego białka a ubytkami przechowalniczymi $r = 0,68$ ($p \leq 0,05$). W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano, że większy udział białka o masie 148-153 kDa związany był z lepszą wodochłonnością mięsa $r = -0,81$ ($p \leq 0,05$).

Spśród 16 analizowanych pasm białek frakcji wycieku wirówkowego na podstawie współczynników korelacji wybrano potencjalne białka kandydujące jako wskaźniki jakości mięsa. Wytypowane pasma 1, 2, 3, 5, 7 i 12 poddano analizie składowych głównych (PCA). Przedstawiona projekcja PCA białek wycieku wirówkowego z mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością w układzie dwóch pierwszych składowych (PC 1 = 46,04% i PC 2 = 21,68%) wykazała, że są one odpowiedzialne za ponad 67% zmienności cech charakteryzujących mięso wychładzane ze zróżnicowaną szybkością. 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. Wyodrębniono 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 wariancję zmiennych, tj. czas, pasmo 1 i 2 odpowiednio w 75%, 81% i 79%.

Uzyskane rezultaty pozwalają na stwierdzenie, że wyciek wirówkowy jest dobrym źródłem nie tylko białek sarkoplazmatycznych, ale również miofibrilarnych 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 fosforylaza b (3), 6-fosfofruktokinaza (5), kinaza pirogronianowa (7), dehydrogenaza mleczanowa (12), mogą być potencjalnymi wskaźnikami w ocenie jakości mięsa, w tym jego wodochłonności i kruchości.

Ocenę wpływu szybkości procesu wychładzania na zmiany ekspresji wybranych białek mięsa i wycieku wirówkowego wykonano również techniką Western blot. Potwierdzono obecność następujących białek: titiny, łańcuchów ciężkich miozyny (MHC), troponiny-T (Tn-T) i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH).

Analizując obecność titiny zarówno w mięsie jak również we frakcji wycieku wirówkowego, wykazano występowanie produktów jej degradacji w szerokim zakresie mas cząsteczkowych (3700-15 kDa). 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. Wynika to z faktu, że wykorzystane w doświadczeniu monoklonalne przeciwciała titiny 9D10 rozpoznaje liczne epitopy tego białka, stąd obserwowana ekspresja wielu pasm. W mięsie pobranym 45 minut 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%. Ponadto w mięsie tym odnotowano występowanie tylko jednego pasma oznaczonego cyfrą 4 (10,68%), o masie cząsteczkowej wyznaczonej w zakresie 200-180 kDa. Wydłużenie czasu przechowywania sprzyjało uwidocznieniu większej ilości pasm o mniejszej masie cząsteczkowej wskazując na postępujący proces proteolizy.

Po 24 h przechowywania w mięsie A wychładzanym najwolniej titina i produkty jej degradacji (T1 i T2), stanowiły istotnie większy udział w porównaniu z mięsem B oraz C. W terminie tym, 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 o niższej masie cząsteczkowej. W próbach A nie obserwowano pasm 6 i 7. Próby C wychładzane najszybciej cechował największy (68,06%) udział pasma 3 porównywalny z wielkością 66,72% wyznaczoną dla prób A pobranych 45 minut *pm*. Ponadto pasma 5 i 7 mięśni C stanowiły mniejszy udział w porównaniu z próbami B wychładzanymi wolniej. Powyższe świadczy o odmiennej degradacji titiny po 24 h w mięsie C wychładzanym najintensywniej.

Po 6 dniach przechowywania mięśnie B wyróżniał istotnie mniejszy udział pasma 1 oraz największy udział pasma 3 w porównaniu z próbami A i C. 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 i C wychładzanych szybciej. 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. Po 24 h mięśnie A i C charakteryzowały się istotnie

większym udziałem pasm w przedziale 1 o największej masie cząsteczkowej 2400-800 kDa w porównaniu z mięsem B. 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 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%). W mięsie C wychładzanym najszybciej stwierdzono istotnie mniejszy 6,00% udział pasma 3 (100-65 kDa) w odniesieniu do prób B.

Wyniki analizy metodą Western blot białek mięsa z przeciwciałem łańcuchów ciężkich miozyny (MHC) o masie cząsteczkowej 205 kDa, wykazały obecność pasm w dwóch zakresach >250 kDa i 205-180 kDa. Pierwszy z nich obserwowano nad charakterystycznym prążkiem MHC. Najprawdopodobniej stanowiły go agregaty zawierające w swoim składzie miozynę, rozpoznawane przez zastosowane przeciwciała MF20. W mięsie po 45 minutach udział pasma 1 był najmniejszy, a wielkość prążka 2 była ponad czterokrotnie większa. Po 24 h intensywność pasma 1 była istotnie większa w próbach B i C w porównaniu z A. Natomiast udział pasma 2 (205-180 kDa) w mięśniach B i C wychładzanych szybciej był istotnie mniejszy w porównaniu z próbą A. Ilość obserwowanych agregatów wzrastała w czasie przechowywania. Po 6 dniach ekspresja pasma 2 nie wykazywała istotnej zmienności w mięsie wychładzanym ze zróżnicowaną szybkością. W wycieku wirówkowym zastosowane przeciwciała MHC (MF20) reagowało tylko z jednym wyraźnym prążkiem lub reakcji nie obserwowano. Obecność miozyny we frakcji wycieku wirówkowego obserwowano tylko po 24 h, tj. bezpośrednio po zakończeniu procesu wychładzania.

Wyniki analizy metodą Western blot białek mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością z przeciwciałem troponiny-T uwidoczniły występowanie od 2 do 3 immunoreaktywnych prążków o masach cząsteczkowych 38-36 kDa, 32 kDa i 30 kDa. Występowanie dwóch pasm o większej masie cząsteczkowej stwierdzono tylko w mięsie ocenianym 45 minut *pm*. Po 24 h mięśnie C wychładzane najszybciej wyróżniały się istotnie większym udziałem pasma 1 w porównaniu z jego ilością w mięśniach A i B. W przypadku pasma 2 jego najmniejsza ilość była obserwowana w próbach po 45 minutach. W kolejnym terminie jego intensywność obniżała się wraz ze zwiększeniem szybkości wychładzania. Wyznaczony udział pasma 3 w mięsie A wychładzanym najwolniej był istotnie większy w porównaniu z jego ilością zarówno w próbach B jak również C. 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, mniejszym udziałem prążków o masie 32 kDa i 30 kDa w porównaniu z próbami A i B.

We frakcji wycieku wirówkowego 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. Istotnie więcej tego prążka charakteryzowało próby B i C. Intensywność pasma 2 w mięsie wychładzanym ze zróżnicowaną szybkością różniła się tylko nieznacznie. Istotnie większy udział pasma 3 wyróżniał mięśnie A w porównaniu z próbami B i C. Po 6 dniach przechowywania w próbach A obserwowano

największe zmniejszenie udziału pasma 1 w odniesieniu do rezultatów uzyskanych w pierwszym terminie badań. Ponadto w próbach A stwierdzono istotnie większy udział pasma 2 i 3 w porównaniu z mięsem B oraz C. Powyższe wskazuje na powolniejszy proces degradacji Tn-T w mięśniach wychładzanych szybciej.

Western blot z przeciwciałem GAPDH wykazał obecność tylko jednego pasma w dwóch analizowanych grupach białek: mięsa i wycieku wirówkowego. W mięsie wychładzanym ze zróżnicowaną szybkością obserwowano zmniejszenie intensywności 3D pasma GAPDH wraz z wydłużeniem czasu przechowywania. Największą intensywność 3D GAPDH odnotowano w mięśniach ocenianych 45 minut *pm*. Zarówno po 24 h jak również po 6 dniach wyznaczona intensywność tego była zróżnicowana tylko w niewielkim stopniu i nie wykazano wpływu szybkości wychładzania na ekspresję GAPDH.

Ocena densytometryczna GAPDH w wycieku wirówkowym wykazała wpływ szybkości wychładzania na jej objętość w dwóch analizowanych terminach badań. 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.

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

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. Badania fizykochemiczne mięsa C wychładzanego najszybciej wskazują na wystąpienie skurczu chłodniczego. Potwierdzają to przede wszystkim dane z pomiarów kruchości (WBSF) jak również wodochłonności. 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. Powyższe najprawdopodobniej wnosi dodatkową informację wskazującą na możliwość wyjaśnienia przyczyn skurczu chłodniczego.

Fakt występowania MHC we frakcji wycieku dowodzi, że tylko niewielka ilość miozyny jest uwalniana. Sugeruje, że następuje rozluźnienie aktomiozyny, podstawowego kompleksu jaki ona tworzy. 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 najprawdopodobniej w największym stopniu oddziałuje na usztywnienie struktury, a także wodochłonność i kruchość mięsa.

W drugim etapie badań materiał badany stanowił mięsień najdłuższy klatki piersiowej i lędźwi (LTL) (*m. longissimus thoracis et lumborum*) pozyskany z byczków rasy holsztyńsko-fryzyskiej, odmiany czarno-białej. 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 5 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.

W przypadku surowego, wychłodzonego mięsa z wadą DFD nie zawsze możliwe jest pozyskanie wycieku wirówkowego, stąd postanowiono zastosować proces ekstrakcji białek. Ekstrakcja buforem rigor o małej sile jonowej pozwoliła na otrzymanie frakcji białek, która była przedmiotem badań w niniejszej pracy. Białka ekstraktów analizowano z zastosowaniem elektroforezy na żelach poliakrylamidowych z SDS (SDS-PAGE) oraz przy wykorzystaniu wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową UHPLC-Q-TOF-MS/MS. W badaniach własnych wykorzystano UHPLC-Q-TOF-MS/MS z pominięciem elektroforezy dwukierunkowej. Zastosowano strategię proteomiki typu „bottom-up”, w której mieszanina białek jest najpierw trawiona specyficzną proteazą (trypsyną), a następnie uzyskane fragmenty peptydowe białek są identyfikowane za pośrednictwem spektrometrii mas. Pozwoliło to na jednoczesną ocenę jakościową wszystkich wyekstrahowanych białek i peptydów obecnych w próbce.

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 oraz wskazanie potencjalnych białkowych i peptydowych markerów mięsa o zróżnicowanej jakości.

Mięso bydła z wadą DFD wyróżniało się istotnie wyższą wartością pH, ciemniejszą barwą (L*a*b*), lepszą wodochłonnością i kruchością w porównaniu z mięsem normalnej jakości RFN. Wykazano istotną korelację pomiędzy wielkością wycieku wirówkowego a wartością pH mierzoną po 45 min., 2, 4 i 10 dniach (odpowiednio $r = -0,71$; $r = -0,96$; $r = -0,97$; $r = -0,96$; $p \leq 0,05$). Ponadto odnotowano istotną statystycznie dodatnią zależność $r = 0,93$ i $r = 0,85$ ($p \leq 0,05$) pomiędzy wielkością wycieku wirówkowego a parametrami L* i b* barwy. Po 10 dniach przechowywania wykazano istotną korelację pomiędzy 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.

Białka ekstraktów rozdzielono przy wykorzystaniu elektroforezy na żelach poliakrylamidowych z SDS (SDS-PAGE). W ekstraktach z mięsa normalnej jakości (RFN) stwierdzono występowanie 20 pasm, natomiast w próbach z odchyleniem DFD na każdej ścieżce rozdziału obserwowano 22 prążki. Udziały procentowe 12 wybranych pasm oznaczono symbolami od E1 do E12.

Na podstawie analizy densytometrycznej uzyskanych profili białek wskazano na istotne zróżnicowanie udziału pasm o masie cząsteczkowej > 250 kDa, tj. E1 i E2+3 oraz pasma E6 (~ 68 kDa) w mięsie o zróżnicowanej jakości. 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 białka o powyższej masie. 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. Wykazano istotnie większy (0,82%) udział tych białek w mięsie DFD w porównaniu z ilością 0,13% odnotowaną w próbach RFN. Udział pasma E6 o masie ~ 68 kDa wynosił 0,36% w mięsie RFN i był istotnie mniejszy w porównaniu z intensywnością 1,06% wyznaczoną w próbach DFD.

Analizując zależności pomiędzy 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). Wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy 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 pomiędzy intensywnością powyższych pasm a jasnością barwy, wodochłonnością i kruchością mięsa o zróżnicowanej jakości. Po 10 dniach składowania mięsa w warunkach chłodniczych wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy udziałem pasma E5 o masie 90-95 kDa 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 ($r = -0,65$; $p \leq 0,05$). Natomiast udział pasma E10 (36-38 kDa) był ujemnie skorelowany z parametrami a^* i b^* barwy mięsa (odpowiednio $r = -0,90$ i $r = -0,72$; $p \leq 0,05$).

Wszystkie ekstrakty białek pozyskane z mięsa RFN i z wadą DFD poddano bezpośrednio 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 również w DFD. Liczba białek, które występowały tylko w jednej grupie analizowanych mięśni, tj. RFN lub DFD wynosiła odpowiednio 6 i 2.

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. Powyższe wynikało 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 również wynikiem aktywności 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-kryształina (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.

Wybrane 74 białka (z wyjątkiem titiny), na podstawie ich intensywności oraz odpowiadające im w sumie 1264 peptydy w oparciu o wartość m/z (masa/ładunek 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.). W celu zweryfikowania zróżnicowania pomiędzy mięsem RFN i DFD była na podstawie intensywności białek ekstraktów wykorzystano wielowymiarową analizę danych. Jako pierwszy zastosowano model PCA-X (*principal component analysis-X*). Po przeprowadzeniu szczegółowej analizy składowych głównych uzyskano model o dobrym zróżnicowaniu pomiędzy tymi dwiema jakościowo zróżnicowanymi grupami mięsa. Pierwsze dwa komponenty modelu PCA-X (t1 i t2) 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 pomiędzy badanymi klasami jakościowymi. Zgrupowanie wariancji w jednym przewidywanym komponente dało skorelowane współczynniki zmienności pomiędzy 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, pomiędzy mięsem RFN i DFD po 10 dniach przechowywania.

W przypadku zidentyfikowanych peptydów, analogicznie jak w odniesieniu do białek, aby uwzględnić relacje pomiędzy wyznaczonymi grupami mięsa o zróżnicowanej jakości, zastosowano wielowymiarową analizę danych PCA-X i OPLS-DA. Zbiór analizowanych danych zawierał 12640 zmienne. 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.

Początkowo na podstawie wyznaczonego modelu PCA-X nie było możliwe rozróżnienie pomiędzy 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.

Stwierdzono, że przy wykorzystaniu analizy białek i peptydów stosując zaawansowane, wielowymiarowe modele PCA-X i OPLS-DA możliwe jest precyzyjne grupowanie mięsa byłą 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.

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. Poniżej omówiono wybrane białka o największym współczynnikiem ważności zmiennych wyznaczonym na podstawie zastosowanego modelu OPLS-DA oraz odpowiadające im zidentyfikowane kluczowe peptydy odpowiedzialne za zróżnicowanie mięsa DFD i RFN.

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.

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. LAMQEFMILPVGASSFR, FRAAVPSGASTGIYEALERDGDGK, TLGPALLEKK, FMIELDGTENK wskazane w prezentowanym modelu OPLS-DA.

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 KYTLPPGVDPTLVSSSLSPGTLTVEAPLPK, ALPAAAIEGPAYNR, SATQSAEITIPVTFQAR 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 GGSGSGPTIEEVD 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.

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 przątkowanych. 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 również funkcjonalną (Barash i in., 2005). Działa ono jako regulator homeostazy glukozy w mięśniach szkieletowych (Hernandez-Carretero i in., 2018). Wcześniej wykazano jego związek z pH i WHC mięsa wieprzowego, (Xu i in., 2010) oraz z kruchością wołowiny (Gagaoua i in., 2021). Stwierdzono, że trzy peptydy tego białka GIGYGQGAGCLSTDTGEHLGLQFQQSPK, KALDSTTVA AHESIYCK, 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 surowca. 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 SGSHTVAVMNVGAPAAGMNA AVR wyznaczono wartość współczynnika ważności zmiennych równą 1,91.

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.

W prezentowanych badaniach własnych aktynę (*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. Łańcuchy lekkie 1 i 3 miozyny wyróżniały się większą intensywnością w mięśniach DFD w porównaniu z RFN. Wykazano, że peptyd HVLATLGEK łańcuchów lekkich 1 i 3 miozyny może odgrywać szczególną rolę jako wskaźnik mięsa o zróżnicowanej jakości DFD i RFN. 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.

Analiza proteomiczna wykazała, że ekspresja wielu białek obserwowana po 10 dniach dojrzewania w mięsie była o zróżnicowanej jakości była odmienna. Różnice dotyczyły białek strukturalnych, powiązanych ze skurczem mięśni, metabolizmem, w tym enzymów glikolitycznych, białek 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 mięsa normalnej jakości i z wadą DFD. Możliwość praktycznego wykorzystania zarówno białek jak również peptydów wyznaczonych w prezentowanej pracy jako biomarkerów w przemysłowej produkcji wysokiej jakości mięsa wymaga jednak dalszych badań.

4.2.3. Podsumowanie

Zrealizowane badania wskazują, że białka, ich udział w kształtowaniu jakości mięsa pozostają zagadnieniem wciąż aktualnym. Kompleksowe starania osób zaangażowanych w produkcję mięsa, związane z doborem 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 na poziomie 0,27°C/min. spowodowało wystąpienie zjawiska skurczu chłodniczego, które było przyczyną wysokich ubytków masy i obniżonej kruchości mięsa. Stosowane powszechnie zróżnicowane pomiary wodochłonności odnoszą się do nieco innych zmian w strukturze i białkach mięsa. Pomiar zdolności wiązania i zatrzymywania wody, uwzględniający jednocześnie sumę wielkości ubytków przechowalniczych oraz termicznych wydaje się być najlepszym wskaźnikiem w ocenie jakości mięsa wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością, szczególnie wówczas, gdy istnieje ryzyko wystąpienia skurczu chłodniczego. Na podstawie badań przeprowadzonych w niniejszej pracy zaleca się stosowanie wychładzania o maksymalnej szybkości spadku temperatury wynoszącej 0,15°C/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 Ca²⁺, przepuszczalnością błon komórek miofibryli. 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 nadmiernie skurczone sarkomery i włókna mięśniowe. Niniejsze badania wnoszą prawdopodobnie jeszcze jedną dodatkową informację wskazującą na możliwość wyjaśnienia przyczyn skurczu chłodniczego. Stanowią 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 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 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 pomiędzy udziałem wyżej wymienionych białek a wartością pH oraz istotną ujemną korelację z jasnością barwy, wodochłonnością i kruchością mięsa o zróżnicowanej jakości. Zastosowanie 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 wytypowanie potencjalnych białkowych wskaźników jakości mięsa bydła 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 (L-lactate dehydrogenase A chain), 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 oraz jego właściwości, 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 ta może w przyszłości przyczynić się do zoptymalizowania produkcji mięsa o wysokiej jakości.

Badania wykonane w ramach osiągnięcia naukowego umożliwiły wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Zastosowanie wychładzania prób C z szybkością 0,27°C/min., wiązało się z wystąpieniem zjawiska skurczu chłodniczego, tj. superkontrakcją pomiędzy aktyną i miozyną. Jego efektem 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°C/min. W wyjaśnieniu przyczyn skurczu chłodniczego ważną rolę przypisano łańcuchom ciężkim miozyny, których agregaty o masie >250 kDa pojawiały się już 45' *pm*, w 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 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 i łańcuchów ciężkich miozyny, tworzących struktury cytoszkieletu włókien mięśniowych oraz troponiny-T i GAPDH. Były one wynikiem proteolizy, procesów degradacji i agregacji, które poprzez 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, pomiędzy 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 białek mięsa bydła o zróżnicowanej jakości stwierdzono istotnie większy udział pasm 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 pomiędzy 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 właściwości 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, fosfatydyloetanoloaminę wiążącą białko-1 i troponinę-T.

Literatura

1. 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.
2. 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.
3. Canto, A. C., Suman, S. P., Nair, M. N., Li, S., Rentfrow, G., Beach, C. M., Silva, T.J.P., Wheller, 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.
4. 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.
5. 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.
6. Di Luca, A., Elia, G., Mullen, A. M., Hamill, R. (2013). Monitoring post mortem changes in porcine muscle through 2D DIGE proteome analysis of *Longissimus* muscle exudate. *Proteome Sci.*, 11, 9, 1–14.
7. Gagaoua, M., Terlouw, E. M. C., Mullen, A. M., Franco, D., Warner, R. D., Lorenzo, J. M., ... 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.
8. 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.
9. Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, 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.
10. 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. Endocrinology and metabolism*, 315(2), E267–E278.
11. 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.
12. Huff-Lonergan, E., Zhang, W., Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of postmortem muscle – Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci.*, 86, 184–195.
13. 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.
14. Iwańska, E., Mikołajczak, B., Grześ, B., Spychaj, A., Pospiech, E. (2017). Wpływ szybkości wychładzania na przebieg glikolizy i kruszenia wieprzowego mięśnia LTL. *Nauka Przyr. Technol.*, 11, 2, 161–167.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Lepetit, J., Culioli, J. (1994). Mechanical-properties of meat. *Meat Sci.*, 36, 203–237.
21. Lomiwes, D., Farouk, M. M., Wu, G., Young, O. A. (2014). The development of meat tenderness is likely to be compartmentalised by ultimate pH. *Meat Sci.*, 96, 646–651.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.

26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Picard, B., Lebret, B., Cassar-Malek, I., Liaubet, L., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., ..., Renand, G. (2015). Recent advances in omic technologies for meat quality management. *Meat Sci.*, 109, 18–26.
31. Picard, B., Gagaoua, M. (2020). Meta-proteomics for the discovery of protein biomarkers of beef tenderness: An overview of integrated studies. *Food Research International*, 127, 108739.
32. Pomponio, L., Bukh, C., Ruiz-Carrascal, J. (2018). Proteolysis in pork loins during superchilling and regular chilling storage. *Meat Sci.*, 141, 57–65.
33. Pospiech, E., Grześ, B., Łyczyński, A., Borzuta, K., Szalata, M., Mikołajczak, B. (2003). Muscle proteins and their changes in the process of meat tenderization. *Anim. Sci. P.*, 21, Suppl. 1, 133–151.
34. 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.
35. Pösö, A. R., Puolanne, E. (2005). Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Sci.*, 70, 423–434.
36. 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.
37. 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.
38. Scheffler, T. L., Gerrard, D. E. (2007). Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Sci.*, 77(1), 7–16.
39. Shen, Q. W., Du, M. (2015). Conversion of muscle to meat. In: W. Przybylski, D. Hopkins (Eds.), *Meat quality, genetic and environmental factors* (pp. 81–100). Boca Raton: CRC Press.
40. Sierra, V., Fernández-Suárez, V., Castro, P., Osoro, K., Vega-Naredo, I., García-Macia, M., ..., 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Zybert, A., Krzęcio, E., Sieczkowska, H., Podsiadły, W., Przybylski, W. (2007). The influence of chilling method on glycolytic changes and pork meat quality. In: G. Zhou, W. Zhang (Eds.), *53th International Congress of Meat Quality and Technology* (pp. 293–294). Beijing.
46. 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.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W latach 1990/91-1994/95 byłam studentką studiów wyższych magisterskich na Wydziale Technologii Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu, na kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka. Uwieńczeniem studiów była obrona pracy magisterskiej nt.: *Porównawcza charakterystyka wybranych właściwości funkcjonalnych ekstraktów białek mięsniowych*, napisanej pod kierunkiem dr. Piotra Koniecznego. Poruszone w niej zagadnienia związane z analizą różnych właściwości białek, w tym przede wszystkim z procesem ich ekstrakcji z materiału biologicznego oraz analiz związanych z rozpuszczalnością i hydrofobowością białek wykorzystywałam w dalszej pracy zawodowej.

W październiku 1995 r. na podstawie umowy zlecenia dołączyłam do zespołu Zakładu Surowców Zwierzęcych, którego kierownikiem był prof. dr hab. Edward Pospiech. Otrzymałam do realizacji zadanie w ramach projektu badawczego nr 5 S3 07 006 06 nt.: *Właściwości biochemiczne i technologiczne cytoszkieletowych białek mięsa wybranych gatunków zwierząt*. Od 1 lutego 1996 r. zostałam zatrudniona w Instytucie Technologii Mięsa (obecnie Katedra Technologii Mięsa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu) na stanowisku asystenta.

W roku akademickim 1997/1998 ukończyłam kurs pedagogicznego kształcenia asystentów i doktorantów [Zał. 6: 1.7]. Kolejny etap mojej ścieżki naukowej (od 1 listopada 1998 r.) stanowiły studia doktoranckie, realizowane na Wydziale Technologii Żywności. Stopień doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia otrzymałam w 2004 r., przygotowując rozprawę nt.: *Ocena wpływu przemian białek mięsa świń o zróżnicowanej jakości na kruchość i wodochłonność tkanki*. Promotorem mojej pracy był prof. dr hab. Edward Pospiech. Od października 2005 r. do chwili obecnej jestem zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Technologii Mięsa, na Wydziale Nauk o Żywności i Żywnieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Po zakończeniu Studiów Podyplomowych „Menadżer projektów badawczych”, na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza w Poznaniu z sukcesem aplikowałam o staż w Projekcie „Naukowiec w biznesie - staże pracowników naukowych w przedsiębiorstwach” [Zał. 6: 1.1; 1.8].

W początkowym okresie mojego zatrudnienia podjęłam wyzwania związane z realizacją projektu, którego przedmiotem była charakterystyka właściwości biochemicznych i technologicznych cytoszkieletowych białek mięsa wybranych gatunków zwierząt. Następnie skupiłam się na poznaniu szerszej problematyki badań podejmowanych w jednostce i z zapałem włączyłam się w prowadzone analizy dotyczące fizykochemicznych właściwości mięsa przede wszystkim świń i bydła, ze szczególnym uwzględnieniem jego kruchości i wodochłonności. Badania te skłoniły mnie do kontynuowania tematyki badawczej związanej z białkami mięsniowymi, które stały się później głównym nurtem moich zainteresowań. Badania dotyczące białek mięsniowych są kontynuowane również obecnie.

W pierwszych latach pracy wyspecjalizowałam się w metodach oczyszczania, separacji i identyfikacji białek mięsniowych oraz poznałam metodę skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Zdobyte między innymi w tym zakresie umiejętności pozwoliły mi na prowadzenie badań nad białkami żywności pochodzenia zwierzęcego jak również roślinnego w ramach szerokiej i często wieloletniej współpracy z licznymi ośrodkami naukowymi.

Wszystkie jednostki (łącznie 14), z którymi podjęłam współpracę zostały wymienione w Załączniku 4: II.12.

Tematyka badawcza, którą zajmuję się od początku zatrudnienia związana jest przede wszystkim z surowcem mięsnym i wpływem różnych czynników na zmiany białek i właściwości mięsa. Przedmiotem analiz były m. in. czynniki genetyczne i środowiskowe oraz zabiegi technologiczne, tj. zastosowanie soli mikrokapsułkowanej, pakowanie w atmosferze modyfikowanej, elektrostymulacja, kondycjonowanie oraz proces wychładzania.

W dużym stopniu moja aktywność naukowa oraz nawiązana współpraca prowadziły do aplikowania o finansowanie, a następnie do realizacji projektów. W okresie mojego zatrudnienia byłam wykonawcą w 8 projektach badawczych [Zał. 4: II.9].

Moje wieloletnie badania koncentrowały się wokół poniższych obszarów składających się na mój całkowity dorobek naukowy:

- a) badania właściwości białek wieprzowiny i wołowiny oraz ich roli w kształtowaniu kruchości i wodochłonności mięsa,
- b) ocena wpływu czynników genetycznych i środowiskowych na jakość mięsa świń i zmiany białek,
- c) analiza zależności między właściwościami mięsa bydła a przemianami poubojowymi jego białek, ich polimorfizmu i ekspresją genów,
- d) technologiczne możliwości kształtowania właściwości surowca mięsnego,
- e) białka pochodzenia roślinnego ze szczególnym uwzględnieniem nasion lnu.

Ad. a).

W obszarze dotyczącym zagadnień związanych z białkami mięsa chciałabym wyróżnić:
- wieloletnią współpracę z prof. Marionem Greaserem z **Muscle Biology Laboratory University of Wisconsin, Madison, USA** i dr. Gabrielem Peltre z **Pasteur Institute, Unit Immuno-Allergy, Paryż, Francja**

W pierwszych miesiącach pracy intensywnie zapoznawałam się z metodyką badań przewidzianych w realizowanym już projekcie, dotyczącym pozyskania, a następnie oceny właściwości biochemicznych i technologicznych cytoszkieletowych białek mięśniowych. Współpraca z prof. M. Greaserem to przede wszystkim problematyka badań, która koncentruje się wokół białek cytoszkieletowych mięsa, w tym szczególnie titiny. W latach 90-tych temat dotyczący rozpoznania roli białek cytoszkieletowych stanowił jeden z najbardziej aktualnych problemów w nauce o mięsie i był realizowany w nielicznych ośrodkach naukowych na świecie. Zagadnienie to stanowi jedno z ważniejszych osiągnięć w moim całkowitym dorobku. Początkowo podjęte jako kontynuacja badań prowadzonych wówczas w Zakładzie Surowców Zwierzęcych i jako przedmiot grantu, którego kierownikiem był prof. dr hab. Edward Pospiech [Zał. 4: II.9.1], następnie było realizowane w ramach poszerzania własnych zainteresowań.

Białka cytoszkieletowe stanowią swoisty szkielet wewnątrzkomórkowy, rusztowanie dla miofibrili, utrzymujące integralność komórki mięśniowej. Ich odkrycie zmieniło dotychczasowe spojrzenie na strukturę miofibrili i zmiany zachodzące w procesie konwersji

mięśni w mięso. Do najważniejszych białek z tej grupy należą: titina (konektyna), nebulina, białka filamentów pośrednich (desmina) oraz białka kostamerów (winkulina, dystrofina).

Ważnym wyzwaniem było dopracowanie warunków ekstrakcji i wyizolowanie titiny w formie natywnej z mięsa bydła i świń. Metodyka, która stanowiła podstawę procesu dotyczyła jej izolacji z mięśnia sercowego. W związku z pojawiającymi się trudnościami niezbędne było dokonanie wielu jej zmian. Polegały one między innymi na modyfikacji składu buforu przemywającego rozdrobioną tkankę mięśniową, zastosowaniu dwukrotnej dializy i rozdzieleniu na kolumnie Sepharose 6B. Poszczególne frakcje były zbierane zagęszczane i identyfikowane z zastosowaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z SDS (SDS-PAGE) oraz metody Western blot. Przy wykorzystaniu skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) wyznaczyłam właściwości termiczne titiny pochodzącej z mięśnia najdłuższego świń i bydła. Denaturację termiczną wyekstrahowanej i oczyszczonej titiny z mięsa dwóch wymienionych powyżej gatunków charakteryzował pojedynczy pik o temperaturze odpowiednio 75,6°C i 78,4°C. Relatywnie wysoka temperatura denaturacji sugerowała, że titina jest częściowo odpowiedzialna za kruchość mięsa ogrzewanego w temp. powyżej 60°C. Uwieńczeniem badań były prezentacja w formie posteru oraz publikacja w *Meat Science* [Zał. 4: II.4.1.1]. Za największe osiągnięcie w tym obszarze badań uważam opracowanie metody, która z sukcesem pozwoliła na pozyskanie oczyszczonej titiny, jej identyfikację oraz wyznaczenie temperatury denaturacji. W wielu dalszych badaniach zastosowano monoklonalne przeciwciała titiny, udostępnione przez prof. Greasera [Zał. 4: II.4.2.6, II.4.2.7, II.4.2.11, II.4.2.12, II.4.2.13, II.4.4.1, II.4.4.3, II.7.2.2, II.7.2.17, II.7.2.17, II.7.2.42, II.7.2.45, II.7.2.46].

Swoje doświadczenia naukowe związane z analizą białek rozwijałam również pod kierunkiem dr. Gabriela Peltre, który wprowadzał mnie w tajniki oceny punktu izoelektrycznego (PI) białek za pomocą ogniskowania izoelektrycznego (IEF). Celem przeprowadzonych badań była ocena rozdzielności IEF białek z mięsa różnych gatunków zwierząt (świń, bydła, cieląt, owiec, kóz, drobiu i indyków) przy wykorzystaniu elektroforezy bezpośredniego kontaktu (DCE) na żelu agarozowym. W kolejnym etapie porównano rozdzielność białek wycieku swobodnego i wirówkowego pozyskanych z surowca mięsnego. Rozdziałom towarzyszył immunoblotting z przeciwciałem titiny. Rozdziały DCE białek mięsa były podobne do rozdzielności białek wycieku wirówkowego jednak ich jakość była nieco gorsza. Otrzymane prążki były mniej regularne. Warunki wstępnej elektroforezy związanej z miejscem położenia próbki na żelu, nie pozwalały natomiast na migrację i rozdział białek umocowanych w strukturze miofibrylarniej tkanki. W przypadku wycieku wirówkowego z mięśni świń wykazano, że w czasie przechowywania przez 168 h zmienia się nie tylko ilość białek, lecz także ich punkt izoelektryczny. Produkty degradacji titiny miały zwykle wyższe wartości PI [Zał. 4: II.4.2.7, II.7.1.15, II.7.1.17]. Okazało się również, że zmiany PI białek związane są z jakością oraz kruchością mięsa [Zał. 4: II.4.2.12, II.4.2.13, II.4.4.3, II.7.1.15].

Ponadto, pod opieką naukową dr. Peltre odbyłam 3 tygodniowy, intensywny staż naukowo-badawczy w Instytucie Pasteur'a w Paryżu, w ramach modułu drugiego nt.: *Metody pomiarów i kontroli jakości w biotechnologii*, programu TEMPUS_JEP 09917-95 [Zał. 4: II.4.11.1; Zał. 6: 1.2]. Opanowany warsztat badawczy zaowocował przygotowaniem części praktycznej szkoły letniej *Metody pomiarów i kontroli jakości w biotechnologii*, nt.: *Zastosowanie elektroforezy w analizie żywności*, która odbyła się w terminie 2-6.VI.1997 r., na

Akademii Rolniczej w Poznaniu. Rok później w dniach 1-4 czerwca 1998 r. byłam współorganizatorem kursu nt.: *Techniki rozdziału*, prowadziłam warsztaty praktyczne.

Efektom zdobytych umiejętności jest rozdział w dwukrotnie wydanej monografii pod wspólnym tytułem *Metody pomiarów i kontroli jakości w przemyśle spożywczym* [Zał. 4: II.2.1, II.2.2]. W pierwszym wydaniu opisano teoretyczne aspekty elektroforezy białek. Natomiast rozdział wydania drugiego istotnie zmieniono i uzupełniono. Stanowi on cenne źródło informacji praktycznych opracowanych metodyk. Dotyczą one szczegółowo przedstawionych przykładów rozdziałów elektroforetycznych, tj. ogniskowania izoelektrycznego w warunkach natywnych, na żelach agarozowych w gradiencie 3-10 pH oraz wykonania odcisku na membranę nitrocelulozową i następnie immunoblotting, elektroforezy denaturującej na żelach z zastosowaniem agarozy SeaKem® Gold oraz przy wykorzystaniu żeli poliakrylamidowych z SDS, transfer białek „na mokro”.

Ad. b).

W obszarze mojej działalności naukowej związanej z oddziaływaniem czynników genetycznych i środowiskowych na zmiany białek mięśniowych oraz właściwości kulinarne i technologiczne mięsa świń chciałabym z kolei wyróżnić:

- wieloletnią współpracę z zespołem prof. dr. hab. Andrzeja Łyczyńskiego z **Katedry Surowców Pochodzenia Zwierzęcego, Wydziału Zootechnicznego Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu** (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach);
- wieloletnią współpracę z zespołem prof. dr. hab. Marii Koćwin-Podsiadłej, z **Katedry Hodowli Trzody Chlewnej i Oceny Mięsa Akademii Podlaskiej w Siedlcach**, (obecnie Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny);
- współpracę z prof. dr. hab. Wiesławem Przybylskim, z **Katedry Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**;
- współpracę z zespołem prof. IBPRS dr. hab. Karola Borzuty z **Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego w Warszawie**, kontynuowaną obecnie pod kierownictwem prof. IBPRS dr. hab. Dariusza Lisiaka (obecnie **Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego**);
- współpracę z zespołem prof. dr. hab. Wojciecha Kapelańskiego z **Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy**, kontynuowaną z zespołem prof. UTP dr. hab. Joanny Boguckiej (obecnie **Politechnika Bydgoska, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt**).

W powyższym temacie głównym nurtem badań były zagadnienia związane z wpływem genotypu, żywienia i mięsności na jakość pozyskanego surowca, kształtowanie jego właściwości i zmiany białek. Efektom szeroko prowadzonych wieloletnich badań są liczne publikacje i doniesienia [Zał. 4: II.4.1.2, II.4.1.3, II.4.1.4, II.4.1.5, II.4.2.1, II.4.2.2, II.4.2.3, II.4.2.4, II.4.2.5, II.4.2.6, II.4.2.9, II.4.2.10, II.4.2.11, II.4.2.14, II.4.2.15, II.4.2.16, II.4.2.17, II.4.2.18, II.4.2.23, II.4.2.25, II.4.2.26, II.4.2.27, II.4.2.28, II.4.2.29, II.4.2.30, II.4.2.32, II.4.2.33, II.4.3.5, II.4.4.1, II.4.4.2, II.4.4.3, II.4.4.4, II.4.4.5, II.4.4.6, II.4.4.7, II.7.2.1-II.7.2.5,

II.7.2.7- II.7.2.16, II.7.2.18-II.7.2.22, II.7.2.35, II.7.39-II.7.2.46, II.7.2.48-II.7.2.50, II.7.2.56-II.7.2.59].

W pierwszym etapie współpracy tuczniaki landrace x yorkshire x duroc [(LxY)xD], wolne od genu RYR1 poddano ubojowi w dwóch różnych terminach. Pomimo, że analizowany surowiec charakteryzował się normalną jakością, stwierdzono istotne różnice w wartości pH (po 48 h i 144 h po uboju), przewodności elektrycznej (po 35 min. i 3 h po uboju), wielkości wycieku wirówkowego i termicznego oraz kruchości. Obserwowano również istotne zmiany udziału produktu degradacji titiny T2 we frakcji przemytych miofibryli i izoformy łańcuchów ciężkich miozyny MHC 2a w tkance mięśniowej pomiędzy porównywanymi grupami świń. Zróżnicowanie to wynikało z różnej szybkości wzrostu świń oraz odmiennych właściwości metabolicznych włókien mięśniowych, co potwierdzono na przykładzie udziału MHC 2a [Zał. 4: II.4.2.17, II.7.2.21].

Wykazano również, że świnię linii 890 były nosicielem genu RYR1, zarówno genotypu CT jak również TT i w porównaniu z mieszańcami [(LxY)xD] o genotypie (CC) charakteryzowały się obniżoną kruchością. Lepszej kruchości mięsa świń o genotypie CC towarzyszył zwiększony udział produktów degradacji titiny natywnej (T1), w tym T2 oraz białek o masie cząsteczkowej 200 kDa, które obejmują również dalsze produkty degradacji titiny [Zał. 4: II.4.2.29].

W dalszych badaniach oceniono właściwości kulinarne i technologiczne mięsa pięciu grup genetycznych świń: rasy landrace duńska (L), landrace duńska x duroc (LxD), landrace duńska x yorkshire (LxY), (landrace duńska x yorkshire) x duroc i linii 890. Najlepszą kruchością po 48 h charakteryzowało się mięso tuczników LxD, natomiast po 144 h pochodzące od krzyżówki (LxY)xD. Mięso świń rasy LxD wyróżniały niższe ubytki masy w czasie 48 h przechowywania w porównaniu z grupą genetyczną LxY i (LxY)xD. Mięso mieszańców (LxY)xD cechowała najlepsza soczystość i wodochłonność oceniona na podstawie wielkości wycieku wirówkowego oraz ubytków termicznych. Najgorzej pod względem właściwości kulinarnych oceniono mięso pochodzące od linii 890 [Zał. 4: II.4.2.17]. Wpływ podatności na stres, w tym związanej z występowaniem genu RYR1 i mięsa kwaśnego RN⁻ oraz ich oddziaływaniem na kruchość mięsa świń był przedmiotem jeszcze innych prac [Zał. 4: II.4.1.5, II.4.2.10].

Wykazano, że wysoki poziom energii i białka w diecie skutkował obniżoną mięsnością tusz i wpłynął na oceniane właściwości mięsa. Dieta wysokoenergetyczna przyczyniła się do szybszych zmian glikolitycznych, których wynikiem była większa częstość występowania mięsa wodnistego [Zał. 4: II.4.2.1, II.7.2.3, II.7.2.4, II.7.2.14, II.7.2.15].

Problematyka jakości mięsa wiąże się nieodłącznie z mięsnością zwierząt. Dotychczas z reguły panowało przekonanie, że zwiększonej mięsności, szczególnie w przypadku mięsa świń, towarzyszy pogorszenie jego jakości. Okazało się jednak, że znając czynniki, które wywołują wady mięsa, można tak sterować hodowlą i produkcją zwierząt, że pozyska się mięso bez wad typu PSE, RSE, DFD, czy „mięsa kwaśnego” [Zał. 4: II.4.2.5, II.4.2.27, 4.5.2, 7.1.16].

W ramach współpracy z **Pig Improvement Company (PIC) Poland Ltd.** wykonano analizę porównawczą mięsa świń hybrydowych PIC i wielka biała polska (wbp). Mięso PIC cechowało się wyższą wartością pH, większą zawartością białka, mniejszą ilością tłuszczu i lepszą wodochłonnością w porównaniu z wbp. Mięsność tusz PIC była o ponad 5 punktów procentowych większa w odniesieniu do wbp. Na podstawie uzyskanych rezultatów wykazano,

że możliwe jest pozyskanie surowca o wysokiej mięsności i dobrej jakości [Zał. 4: II.4.2.2, II.7.2.1, II.7.2.13].

We współpracy z **Instytutem Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego** zrealizowano projekt badawczy nr 5 P06G 007 16 nt.: *Polepszenie kruchości mięsa wieprzowego ze świń o dużej mięsności w oparciu o ocenę przemian poubojowych mięsa i jego składu podstawowego*. Eliminacja występowania wad nie oznacza jednak, że musimy pozyskać mięso o dobrej wartości kulinarnej. Zauważono, że mięso pochodzące od zwierząt, które zawierały dużą ilość mięsa w tuszy jest często twarde i to nawet w przypadku wieprzowiny. W oparciu o prowadzone badania wykazano, że gorsza kruchość mięsa z tusz świń o wysokiej mięsności była związana z większymi przyrostami tkanki mięśniowej. Mięso świń o wysokiej mięsności cechowała mniejsza intensywność procesów degradacyjnych białek, w tym szczególnie titiny i troponiny-T. Nie obserwowano różnicy w aktywności kalpain. Natomiast spośród enzymów lizosomalnych katepsyna B była bardziej aktywna w mięsie pozyskanym ze świń o mięsności < 50% [Zał. 4: II.4.3.2, II.4.3.3, II.7.2.8, II.7.2.12, II.19.1.2]. Problematyka oceny zawartości mięsa w tuszy jest wielowątkową, wiąże się z doskonaleniem jakości żywca, ze stosowaniem klasyfikacji EUROP w warunkach krajowych oraz oceną wartości rzeźnej tusz na podstawie wydajności wyrębów podstawowych. Stwierdzono, że wydajność schabu, szynki i karkówki, a także sumaryczny udział pięciu części zasadniczych był istotnie uzależniony od klasy mięsności tusz [Zał. 4: II.4.2.32].

Kontynuacją badań dotyczących jakości wieprzowiny oraz roli białek w kształtowaniu właściwości mięsa były badania podjęte w pracy doktorskiej. Dotyczyły one charakterystyki zmian białek mięśnia najdłuższego grzbietu (*m. longissimus dorsi*), pochodzącego ze świń o zróżnicowanej jakości, tj. mięsa normalnego (RFN), „kwaśnego” (ASE) i wodnistego (PSE), podczas dwutygodniowego przechowywania w temperaturze 4°C. Uzyskano nowe informacje, wskazujące na największy udział białek o masie cząsteczkowej 200 kDa we frakcji przemytych miofibryli rozdzielanych jako jedno pasmo obejmujące łańcuchy ciężkie miozyny i produkty degradacji titiny natywnej (T1) w mięśniach ASE a najmniejszy w przypadku mięsa wodnistego we wszystkich terminach badań. Analiza Western blot wykazała, że degradacja troponiny-T była najwolniejsza w przypadku mięsa normalnej jakości a najgwałtowniejsza w mięśniach PSE. Począwszy od 168 godziny przechowywania w chłodni obserwowano zmniejszanie się udziału produktów degradacji troponiny-T, co wskazywało na dalsze etapy ich przemian. We frakcji wycieku wirówkowego zaobserwowano pasmo białek o masie cząsteczkowej 148-153 kDa, które obejmowało najprawdopodobniej białko C. Zasugerowano, że jego obecność w wycieku oznacza zmianę siły oddziaływań pomiędzy białkami kompleksu aktomiozynowego w czasie przechowywania. Jednocześnie może wpływać na kształtowanie kruchości i wodochłonności mięsa. W wycieku wirówkowym szczególną uwagę zwrócono na pasmo o masie około 36-38 kDa. Jego udział 48 godzin po uboju był skorelowany z wodochłonnością mięśni RFN w tym terminie ($r=-0,76$; $p<0,05$). W mięsie wodnistym udział białek o punkcie izoelektrycznym poniżej 4,69 oraz w zakresie 4,7-5,59 był skorelowany z wielkością wycieku wirówkowego po tygodniu jego składowania w chłodni (odpowiednio $r=-0,93$ i $r=0,96$; $p<0,05$). Immunoblotting z przeciwciałem titiny po ogniskowaniu izoelektrycznym wykazał, że w miarę upływu czasu przechowywania mięsa wzrastała ilość i intensywność pasm charakteryzujących się wyższą wartością pI. Największy, prawie dwukrotny, wzrost udziału tego białka wraz z postępującym procesem proteolizy stwierdzano w zakresie 7,7-8,79 pI.

Analizując dwukierunkowe rozdziały elektroforetyczne stwierdzono, że intensywność plamy C wskazywanej jako pochodzącej od titiny najlepiej różnicowała mięso PSE w porównaniu z kwaśnym i normalnej jakości we wszystkich terminach badań. Rezultatem tych badań są publikacje oraz komunikat [Zał. 4: II.4.2.7, II.4.2.12, II.4.2.13 II.7.2.23].

Moje innowacyjne podejście do badań białkowych zakładało pozyskanie frakcji wycieku wirówkowego. Okazało się bowiem, że równoczesna analiza tkanki mięśniowej i wycieku wirówkowego daje pełniejszy obraz zmian białek mięsa. Dodatkowo wykazano, że w wycieku wirówkowym możliwa jest obserwacja i ocena udziału białek cytoszkieletowych, a w szczególności produktów ich degradacji. Niewątpliwie moim ważnym osiągnięciem jest implementacja elektroforezy dwukierunkowej (2DE) do rozdziału wysokocząsteczkowych białek mięśniowych (>200 kDa). Wiele wysiłku włożono w opracowanie metody przygotowania prób, zastosowania żeli agarozowych w pierwszym kierunku 2DE, a następnie sposobu przeniesienia na żele drugiego kierunku i warunków prowadzonego rozdziału. Jestem także współautorką artykułów naukowych i prac przeglądowych przybliżających tematykę białek mięśniowych i ich roli w kształtowaniu kruchości oraz wodochłonności mięsa [Zał. 4: II.4.3.2, II.4.3.3, II.4.3.4].

Współpracę z **Akademią Techniczno-Rolniczą w Bydgoszcy** zapoczątkowano realizując temat dotyczący oceny przemian poubojowych i właściwości mięsa pozyskanego z loszek jednorazówek. W badaniach porównano właściwości mięsa o zróżnicowanej jakości (RFN, RFN-s, PSE i ASE), pochodzącego od loszek jednorazówek przy uwzględnieniu zmian udziału izoform łańcuchów ciężkich miozyny (MHC). Pomiedzy badanymi grupami obserwowano istotne zróżnicowanie w wartości pH (45' i 24 h), przewodności elektrycznej (90 min. i 24 h), wielkości wycieku wirówkowego, a także siły cięcia (po 48 i 144 h) kruchości. Na podstawie elektroforezy SDS-PAGE w mięśniach RFN-s stwierdzono największy udział izoform MHC typu 2a i typu I, a najmniejszy typu 2x w porównaniu do pozostałych grup. Występowanie powyższych izoform było związane z wolniejszymi przemianami w mięsie RFN-s, szczególnie w odniesieniu do procesu kruszenia. Na podstawie elektroforezy dwukierunkowej (2DE) i identyfikacji wybranych plam metodą spektrometrii mas MALDI-TOF dokonano również oceny białek wycieku wirówkowego. W mięsie RFN-s wykazano istotnie większy udział kinazy kreatyny, który był związany z wolniejszym obniżeniem wartości pH. Prawdopodobnie mniejsze zakwaszenie przez dłuższy czas po uboju sprzyjało również aktywności kalpain i doprowadziło do zmian białek, które przyczyniły się do mniejszej ilości wycieku cieplnego z mięsa RFN-s. Jednocześnie mniejsze zakwaszenie mięsa RFN-s pochodzącego od świń cięższych, bogatego w bardziej usieciowany kolagen mogło spowolnić zmiany w tkance łącznej i wpłynąć na jego gorszą kruchość.

W ostatnim czasie (2020 r.) uczestniczyłam w badaniach mających na celu określenie wpływu efektywnych mikroorganizmów (Ems) obecnych w diecie na jakość mięsa świń, jego mikrostrukturę i profil elektroforetyczny białek. Dodatek Ems przyczynił się do pozyskania mniejszego wycieku termicznego z mięsa, grubszych włókien i większej ich średnicy. Suplementacja Ems skutkowała najkorzystniejszym udziałem poszczególnych białek. W próbach kontrolnych dodatek Ems istotnie obniżył wodochłonność mięsa. System żywienia wpłynął istotnie na kruchość mięsa. Efektem powyższej współpracy są publikacje i komunikaty [Zał. 4: II.4.1.2, II.4.2.20, II.4.4.4, II.7.2.20, II.7.2.48, II.7.2.50, II.4.1.17].

Ad. c).

Przy realizacji zagadnień związanych z właściwościami mięsa bydła pragnę podkreślić:

- współpracę z zespołem prof. dr. hab. Stanisława Rosochackiego z **Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu**;

- współpracę z zespołem prof. dr. hab. Tadeusza Kołczaka z **Akademii Rolniczej w Krakowie (obecnie Uniwersytet Rolniczy im. H. Kollataja)**.

Przeprowadzone badania polegały na ocenie wpływu wieku (6, 9, 12 m-cy) i rasy bydła (czarno-białej, czerwonej polskiej, hereford, limousine) na skład podstawowy tkanki mięśniowej i jej jakość. Pozyskany surowiec charakteryzował się normalną jakością. Jedynie w przypadku rasy hereford wiek wpłynął istotnie na zmniejszenie zawartości wody, a zwiększenie suchej masy i białka w mięsie. W przypadku mięsa bydła rasy czarno-białej wraz z wiekiem istotnie wzrastała zawartość tłuszczu. Na podstawie elektroforezy oraz metody Western blot przy wykorzystaniu przeciwciał wybranych białek a mianowicie titiny, desminy i troponiny-T, stwierdzono, że decydujące znaczenie dla udziału procentowego białek miała rasa. Dostrzeżono podobieństwa w procesie degradacji białek pomiędzy rasą czarno-białą i hereford oraz pomiędzy rasą limousine i polską czerwoną. Po 10 dniach przechowywania chłodniczego wyznaczono najmniejszą wartość siły cięcia. Kruchość mięsa związana była obniżeniem udziału titiny (T1) i troponiny-T, a także wzrostem produktów ich degradacji [Zał. 4: II.4.1.6; II.7.2.31]. W kolejnym etapie badania polegały na określeniu wpływu polimorfizmu genu μ -kalpajny (CAPNIS) na przemiany białek i kruchość tkanki mięśniowej bydła w czasie przechowywania. Wykazano istotne oddziaływanie CAPNIS na kruchość mięsa. Najlepszą kruchością wyróżniało się mięso heterozygoty CT. Poprawa kruchości była związana z proteolizą białek. Objawiała się w szczególności znacznym zmniejszeniem udziału pasma o masie 37 kDa (troponina-T i GAPDH), a zwiększeniem udziału białka o masie 200 kDa (produkty degradacji titiny). Analiza profilu białek mięsa pochodzącego od heterozygot genu CAPNIS wykazała najwyższy udział izoformy typu 2a łańcuchów ciężkich miozyny (MHC), a najniższy typu 1 MHC. Podobny przebieg zmian degradacyjnych białek w mięśniach porównywanych genotypów przy jednoczesnej różnicy w polimorfizmie MHC dowodzą, że polimorfizm ten związany z wpływem genu CAPNIS był decydującym czynnikiem kształtującym kruchość mięsa [Zał. 4: II.4.1.7]. W wyniku współpracy z **Instytutem Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN** zrealizowano projekt badawczy PBZ-KBN-113/P06/2005/02 nt.: *Polimorfizm i ekspresja genów warunkujących przemiany poubojowe zachodzące w tkance mięśniowej i wpływające na wybrane właściwości mięsa u bydła*. Jego rezultatem był rozdział monografii, publikacje w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i liczne komunikaty [Zał. 4: II.2.3, II.4.1.6, II.4.1.7, II.4.2.19, II.4.2.22, II.4.2.31, II.4.4.8, II.7.2.23, II.7.2.25, II.7.2.26, II.7.2.28, II.7.2.50, II.7.2.51, II.7.2.52, II.7.2.53, II.7.2.54, II.7.2.55, II.7.2.60, II.7.2.61, II.7.2.64, II.7.2.65, II.7.2.66, II.7.2.67].

Analizowano również zmiany ultrastruktury, tekstury i miofibrylach mięśni: *m. psoas* i *m. semitendinosus* krów podczas dojrzewania chłodniczego. Obserwowano rozluźnienie struktury linii Z i zanik linii M. Wykazano tylko niewielkie różnice w profilu białkowym (SDS-PAGE) obu mięśni. Mięśnie *psoas* charakteryzowały się większą kruchością, która mogła być związana z degradacją nebuliny, troponiny-T i troponiny-I oraz łańcuchów lekkich miozyny MLC-1 i 2 [Zał. 4: II.7.2.6].

Kolejnym zagadnieniem badawczym była analiza profilu białek frakcji przemitych miofibrilli 8 mięśni jałowek (*m. longissimus dorsi (thoracis et lumborum)* (LD), *m. biceps femoris* (BF), *m. semimembranosus* (SM), *m. semitendinosus* (ST) *m. pectoralis profundus* (PP), *m. infraspinatus* (IS), *m. triceps brachii* (TB) i *m. serratus ventralis* (SV) podczas 14 dniowego przechowywania. Wykazano, że szybkość proteolizy wybranych mięśni zależała od ich typu. W czasie przechowywania zmniejszał się istotnie udział titiny T1 oraz pasma o masie 800 kDa, natomiast zwiększał się udział troponiny-T (38 kDa) i prążków w przedziale <205-42> oraz <42 kDa. Kooperacja z **Uniwersytetem Rolniczym w Krakowie** została udokumentowana publikacją i doniesieniem konferencyjnym [Zał. 4: II.4.1.9, II.7.2.6].

Tematyka związana z badaniami nad jakością mięśni była i udziałem białek w kształtowaniu jego właściwości jest kontynuowana również obecnie. Wyniki dotyczące szczegółowej analizy białek mięsa z wadą DFD przedstawiono w II etapie monografii stanowiącej osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego [Zał. 3: 4.2].

Ad. d).

Do obszaru moich dotychczasowych zainteresowań należały również technologiczne możliwości kształtowania właściwości surowca mięsnego. Szczególną uwagę poświęciłam problemom związanym z zastosowaniem kwasu mlekowego, dodatkiem lizozymu w atmosferze modyfikowanej, elektrostymulacji i kondycjonowaniu tusz. Początkowo badania były ukierunkowane na wykorzystanie kwasu mlekowego jako naturalnej substancji wpływającej na kształtowanie kruchości mięsa wieprzowego. Jego użycie jest jednak ograniczone ze względu na niekorzystne oddziaływanie kwasu na niektóre właściwości funkcjonalne mięsa, szczególnie wówczas, gdy stosowany jest on równocześnie z solą kuchenną. Negatywne oddziaływanie kwasu przy równoczesnym jego wykorzystaniu z chlorkiem sodu zminimalizowano przy użyciu technologii kapsułkowania. W efekcie zastosowania soli mikrokapsułkowanej uzyskano pogorszenie jakości mikrobiologicznej, jednak ilość bakterii nie przekraczała obowiązujących w Polsce norm [Zał. 4: II.4.2.8, II.7.2.47].

W innym doświadczeniu wykorzystano dodatek lizozymu do mięsa pakowanego w atmosferze modyfikowanej. Po 21 dniach przechowywania uzyskano istotnie wolniejszy rozwój mikroorganizmów w mięsie z dodatkiem lizozymu, w atmosferze modyfikowanej z tlenem w porównaniu z próbami bez jego dodatku. Jednocześnie ze wzrostem mikroflory obserwowano zmniejszenie hydrofobowości białek [Zał. 4: II.4.2.21, II.7.2.24, II.7.2.63].

Kierunek badań dotyczący wykorzystania elektrostymulacji i kondycjonowania tusz była zrealizowano dzięki współpracy z prof. dr. hab. Ryszardem Żywicą i dr hab. Joanną Banach z **Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**. Tusze była holsztynofryzjskiego odmiany czarno-białej poddano elektrostymulacji wysokonapięciowej (E), kondycjonowaniu (C) oraz łącznie obu zabiegom (E+C). Zastosowanie elektrostymulacji samodzielnie i łącznie z kondycjonowaniem przyczyniło się do przyspieszenia przemian glikolitycznych mięsa, którego rezultatem było jego większe i szybsze zakwaszenie w porównaniu do mięsa prób kontrolnych i C. Wykazano, że elektrostymulacja przyczyniła się do istotnej poprawy kruchości oraz zwiększenia rozpuszczalności kolagenu. Zabieg elektrostymulacji pozwolił na skrócenie czasu dojrzewania mięsa wołowego z 28 dni do 10 dni.

Wykazano, że rozgotowalność kolagenu w przypadku mięsa z młodego bydła nie była czynnikiem decydującym o jego kruchości. Zastosowanie zabiegów tenderyzacyjnych spowodowało większą degradację szybkich izoform troponiny-T, białek szoku cieplnego o masie 27 kDa oraz zwiększonego udziału α -1-aktyny, które mogą być szczególnie przydatne w prognozowaniu procesu kruszenia mięsa z młodego bydła. Jednym ze składników tworzących strukturę mięsa są poza licznymi białkami miofibrylarnymi - białka łącznotkankowe. Ich głównym przedstawicielem jest kolagen, który przede wszystkim w przypadku bydła, odgrywa ważną rolę w kształtowaniu kruchości mięsa. Jego oddziaływanie uwidacznia się szczególnie wraz ze wzrostem wieku zwierząt. Stanowi on także istotny czynnik wpływający na właściwości mięsa wówczas, gdy surowiec pozyskuje się z młodych zwierząt. Sukcesem, w tym zakresie było dopracowanie trawienia nieenzymatycznego kolagenu w obecności CNBr oraz pozyskanie jego typów I i III. Rozdział elektroforetyczny uwidoczniał występowanie polipeptydów α 1(I)CB7 i α 1(I)CB8 kolagenu typu I oraz polipeptydu α 1(III)CB5 kolagenu typu III. W badaniach stwierdzono, że procesom dojrzewalniczym towarzyszyły zmiany w udziale polipeptydów α 1(I)CB7 i α 1(I)CB8 kolagenu typu I i polipeptydu α 1(III)CB5 kolagenu typu III. Kondycjonowanie przyczyniło się do degradacji kolagenu typu I szczególnie w odniesieniu do polipeptydu α 1(I)CB7, jednak miało mniejszy udział w kruszeniu mięsa [Zał. 4: II.4.1.14, II.4.2.24, II.7.2.29, II.7.2.30, II.7.2.31, II.7.2.32, II.7.2.72].

Moje zainteresowania badawcze koncentrowały się również wokół zagadnień związanych z procesem wychładzania [Zał. 4: II.2.4, II.2.5, II.7.2.34, II.7.2.68, II.7.2.69, II.7.2.70]. Szczególne zainteresowanie zwróciłam na zmiany białek oraz kształtowanie cech jakościowych mięsa wieprzowego wychładzanego ze zróżnicowaną szybkością. Szerszą i pogłębioną analizę przeprowadzonych badań przedstawiłam w monografii, która jest osiągnięciem będącym podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego [Zał. 3: 4.2].

Ad. e).

Ważnym osiągnięciem ostatnich kilku lat jest moja aktywność naukowa ukierunkowana na białka pochodzenia roślinnego. W ramach współpracy dr hab. Katarzyną Waszkowiak z **Katedry Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej UPP** wykonano eksperymenty mające na celu ocenę stabilności oksydacyjnej i wyznaczenie profilu białkowego nasion lnu. Materiał badawczy pochodził z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Poznaniu. We frakcji wodnej zaobserwowano wpływ warunków obróbki wstępnej nasion na aktywność przeciwrodnikową. Wykazano istotne zmiany w profilu białkowym nasion lnu, prażonych w temp. 200°C. Związane one były z zanikiem białka o masie 19 kDa. Odnotowano również zależne od zastosowanej obróbki cieplnej istotne zmniejszenie udziału pasma o masie 13 kDa. W oparciu o profile elektroforetyczne białek ekstraktów wodnych (w warunkach redukujących i nieredukujących) stwierdzono, że warunki prażenia mają istotne znaczenie dla ekstrakcji białek. Dodatkowo przy współpracy z **Uniwersytetem Ekonomicznym** w Poznaniu rozszerzono zakres prowadzonych badań o ocenę związków fenolowych obecnych w nasionach lnu. Obróbka termiczna nasion lnu jest stosowana, ponieważ poprawia akceptowalność sensoryczną i zmniejsza zawartość substancji antyodżywczych. Ponadto wykazano, że prażenie istotnie zmienia profil białek. Obserwowano agregację i/lub sieciowanie białek indukowane termicznie. Najistotniejsze zmiany stwierdzono dla białek o masie 13 kDa i 53 kDa.

Jednocześnie w wyniku prażenia uzyskano istotne pogorszenie stabilności oksydacyjnej oleju. Zmiany w profilu białek i stabilności utleniającej mogą wpływać na wartość żywieniową, właściwości technologiczne i trwałość. Parametry obróbki termicznej powinny być monitorowane wówczas, gdy nasiona lnu stanowią składnik żywności.

W następnym doświadczeniu odtłuszczone mączki 3 odmian nasion lnu (szafir, oliwin, jantarol) poddano ocenie po procesie prażenia w temp. 160-200°C. Analizowano udział głównych frakcji białek w mechanizmie tworzenia produktów reakcji Maillarda i ich znaczenie dla systemu antyoksydacyjnego. Wykazano istotną korelację pomiędzy temperaturą prażenia a zawartością produktów reakcji Maillarda i udziałem procentowym białek, dla których obserwowano zmiany (tj. o masie 13 kDa oraz 19 kDa i 17 kDa). Efekty uzyskane w ramach powyższej współpracy opublikowano w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym [Zał. 4: II.4.1.12, II.4.1.15, II.4.1.16].

Zasługującym na szczególne wyróżnienie jest nawiązany kontakt z **Uniwersytetem Medycznym w Lublinie** (UML) i rozwijająca się nadal współpraca z prof. UML dr hab. Emilią Fornal. Została ona zapoczątkowana poprzez zrealizowany przeze mnie miesięczny staż [Zał. 6: 1.8]. Jego wynikiem było podwyższenie moich kwalifikacji, zdobycie doświadczenia zawodowego oraz wzmocnienie umiejętności praktycznych i posiadanych kompetencji, w zakresie możliwości praktycznego wykorzystania technik spektrometrii mas w analizie związków chemicznych. W tym obszarze z sukcesem przeprowadziłam doświadczenie polegające na identyfikacji białek i peptydów obecnych w burgerach wołowych dostępnych na rynku. Wyniki badań identyfikacji białek mięsnych, wchodzących w skład burgerów były zgodne z deklaracją producenta umieszczoną na etykiecie. Zostały one opublikowane w czasopiśmie naukowym *Molecules* i w formie doniesienia [Zał. 4: II.4.1.13, II.7.2.73, II.7.2.74]. Ponadto wykonane wówczas badania identyfikacji białek i peptydów w mięsie z odchyleniem jakościowym DFD, stanowią jeden z rozdziałów monografii będącej podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego (rozdział 4.2).

Stosunkowo nowym zagadnieniem, nad którym obecnie pracuję jest identyfikacja białek mięśniowych i mięsnych oraz metabolitów przy zastosowaniu poznanych, zaawansowanych technik spektrometrii mas. W pewnym stopniu kontynuacją i rozszerzeniem powyższych badań będzie realizacja rozpoczętego, w tym roku, pod kierunkiem prof. UPP Magdaleny Montowskiej, projektu NCN, OPUS-19 nt.: *Porównawcza peptydomiczna i genetyczna analiza autentyczności żywności pochodzenia zwierzęcego (2021-2025)*, w którym jestem wykonawcą.

Kolejnym ważnym problemem wokół, którego koncentrowała się moja praca naukowo-badawcza jest zwiększenie wartości żywieniowej produktów mięsnych poprzez częściowe zastąpienie mięsa surowcami pochodzenia roślinnego. Przy produkcji pulpetów z udziałem mięsa wieprzowego, króliczego i z perliczki zastosowano makuchy z konopi. Ich dodatek przyczynił się do redukcji karbonylacji białek i obniżenia wskaźnika TBARS, co skutkowało wolniejszym procesem oksydacji białek i tłuszczów. Wykazano, że konopie mogą być stosowane jako składnik funkcjonalny, natomiast wielkość dodatku jest limitowana w ocenie sensorycznej konsumentów [Zał. 4: II.4.1.18, II.7.2.38].

Oprócz przedstawionych powyżej głównych obszarów badawczych, chciałabym podkreślić moje zaangażowanie w badania realizowane we współpracy z **Katedrą Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności**, jednostką Wydziału Nauk o Żywności

i Żywieniu UPP. W obliczu globalnych niedoborów żywności poszukiwane są alternatywne surowce żywieniowe i paszowe bogate w białko. Znane są właściwości prozdrowotne małży. Ekstrakty z ich tkanek miękkich są stosowane jako środek przeciwgrzybiczy, przeciwbakteryjny lub nawet środek przeciwnowotworowy. Przeprowadzone badania dotyczyły charakterystyki szczepu z gatunku *Anodonta woodiana*, należącej do gromady małże. Określono stabilność termiczną białek za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) oraz elektroforetyczny profil białek szczepu. W badaniach wykazano, że spośród rozdzielonych białek największym udziałem wyróżniała się paramiozyna. Na podstawie DSC znaczące różnice pomiędzy tkanką surową i mrożoną obserwowano jedynie dla całkowitej entalpii denaturacji mięśnia przywodziciela. Efekty prowadzonych prac przedstawiono w publikacji naukowej i w formie doniesień [Zał. 4: II.4.1.8, II.7.2.33, II.7.2.71].

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Działalność dydaktyczna

Od początku mojej pracy w Instytucie Technologii Mięsa (obecnie Katedra Technologii Mięsa) brałam czynny udział w przygotowywaniu i doskonaleniu prowadzonych ćwiczeń laboratoryjnych. Doprowadziłam do zorganizowania pracowni elektroforetycznej białek oraz stanowiska do oceny rozdziałów, przygotowałam opisy metodyczne. W 2015 roku zajmowałam się opracowywaniem i uaktualnianiem instrukcji oraz protokołów dotyczących poszczególnych ćwiczeń laboratoryjnych. Opracowałam metodykę i zorganizowałam nowe stanowisko pomiarowe do wyznaczania hydrofobowości powierzchniowej białek wraz z opisem przebiegu tego ćwiczenia i wstępem teoretycznym, który stanowi materiał dydaktyczny. Ćwiczenie zostało włączone do harmonogramu ćwiczeń laboratoryjnych w ramach przedmiotu kierunkowego *Innowacyjne technologie żywności pochodzenia zwierzęcego*, realizowanego na II^o studiów.

Dużą część swojej aktywności zawodowej poświęcam na przygotowanie i prowadzenie zajęć ze studentami polsko i anglojęzycznymi [Zał. 4: II.18.1], opiekę naukową nad studentami realizującymi prace inżynierskie i magisterskie na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu, na kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka oraz licencjackie na kierunku Dietetyka. Byłam promotorem 30 prac magisterskich oraz 36 prac inżynierskich i licencjackich. Ponadto wykonałam 36 recenzji prac realizowanych na WNoŻiŻ [Zał. 4: II.18.3].

W czasie zatrudnienia na stanowisku adiunkta realizowałam zajęcia dydaktyczne średnio w wymiarze przekraczającym wymagane pensum (ok. 19%) [Zał. 4: II.18.2]. Jako asystent prowadziłam zajęcia laboratoryjne na kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu z wielu przedmiotów takich jak: *Surowce zwierzęce i roślinne, Ogólna technologia żywności, Kierunkowe technologie żywności, Technologia specjalizacyjna Ekologia i ochrona środowiska, Doświadczalnictwo*. Jako adiunkt prowadzę zajęcia laboratoryjne i seminaria dla studentów studiów I^o i II^o, stacjonarnych i niestacjonarnych na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu, na kierunkach Technologia Żywności, Dietetyka oraz Jakość i Bezpieczeństwo Żywności. Miedzy innymi realizuję zajęcia w ramach przedmiotów: *Analiza sensoryczna żywności, Przetwórstwo surowców zwierzęcych, Zasady projektowania produktów żywnościowych, Innowacyjne technologie żywności*

pochodzenia zwierzęcego, Projektowanie jakości żywności pochodzenia zwierzęcego, Projektowanie produktów żywnościowych – żywność o cechach prozdrowotnych, Surowce pochodzenia zwierzęcego, Technologiczne uwarunkowania jakości produktów pochodzenia zwierzęcego. Po awansie na stanowisko adiunkta dodatkowo powierzono mi prowadzenie wykładów. W ramach wykonywanej pracy dydaktycznej opracowałam programy dla 2 przedmiotów do wyboru, których jestem koordynatorem. Ponadto w latach 2009 - 2012 prowadziłam wykłady z przedmiotu *Radioekologia* dla studentów I° studiów stacjonarnych i niestacjonarnych na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii na kierunku Ochrona Środowiska [Zał. 4: II.18.1].

W czerwcu 2020 roku zostałam uczestniczką programu wsparcia dla kadry dydaktycznej "PKD - Program Podnoszenia Kompetencji Dydaktycznych Kadry Uczelni" prowadzonego w ramach projektu „Najlepsi z natury! Zintegrowany Program Rozwoju Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu” (POWR.03.05.00-00-Z218/17), w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój [Zał. 4: II.15.7; Zał. 6: 1.2]. W lutym 2021 roku uczestniczyłam w szkoleniu nt.: *Podstawy statystyki – statystyka dla niestatystyków* organizowanym w ramach projektu, dotyczącym możliwości wykorzystania programu Statistica w przygotowaniu danych do analizy, ocenie wyników badań empirycznych oraz wnioskowania statystycznego [Zał. 6: 1.7].

6.2. Działalność organizacyjna

Poza aktywnością naukową i dydaktyczną podczas całego okresu zatrudnienia starałam się uczestniczyć w działalności organizacyjnej zarówno Instytutu Technologii Mięsa (obecnie Katedry Technologii Mięsa), jak również Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu oraz Uczelni. Od momentu zakupu sprawuję opiekę nad fluorymetrem LS-55 firmy Perkin-Elmer, wyposażonym w czytnik mikropłytek ELISA oraz zestawem do wizualizacji i oceny żeli po analizie elektroforetycznej Image-Master VDS[®] firmy Pharmacia Biotech.

Od początku zatrudnienia na stanowisku adiunkta byłam odpowiedzialna za dokumentację magazynu odczynników chemicznych reglamentowanych oraz roczną inwentaryzację. Jestem członkiem zespołu ds. planowania i rozpisywania godzin dydaktycznych dla pracowników katedry.

W 1997 r. byłam członkiem Komisji Rekrutacyjnej Wydziału Technologii Żywności kandydatów na studia stacjonarne. W latach 2012 – 2017 byłam członkiem Rady Instytutu Technologii Mięsa, a następnie Rady Katedry Technologii Mięsa do 2019 r., jako przedstawiciel adiunktów i asystentów.

W ramach aktywności organizacyjnej na rzecz Wydziału, w styczniu 2012 roku zostałam powołana w skład Wydziałowej Komisji Wyborczej (WKW), w której w latach 2012-2016 pełniłam funkcję sekretarza. W kadencji 2016-2020 byłam członkiem Wydziałowej Komisji do Spraw Kadr Naukowych. Ponadto w okresie tym czynnie włączyłam się w prace Zespołu do Spraw Jakości Kształcenia na kierunku Technologia Żywności i Żywienie Człowieka, realizując zadania w ramach Zespołu ds. stosowania procedury oceny zajęć dydaktycznych oraz nauczycieli akademickich przez studentów.

W grudniu 2015 roku na mocy uchwały Senatu UP 326/2015 z dnia 16.12.2015 r. zostałam powołana w skład Uczelnianej Komisji Wyborczej (UKW) na kadencję 2016-2019 [Zał. 6: 1.3]. W kadencji 2020-2024 pełnię funkcję członka Odwoławczej Komisji

Dyscyplinarnej dla Studentów, powołanej przez Senat i Rektora UPP. Obecnie (od 2020 r.) jestem również zaangażowana w działalność Rady Programowej Kierunku Studiów Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka, wspierającej organizację procesu kształcenia na w/w kierunku [Zał. 6: 1.3].

Od 1997 roku jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności (PTTŻ), czynnie uczestnicząc w organizowanych przez Oddział Wielkopolski Towarzystwa seminariach naukowych oraz konferencjach.

6.3. Działalność popularyzująca naukę lub sztukę

Prowadzona przeze mnie działalność popularyzatorska obejmuje czynny udział (od 2013 r. do 2019 r.) w organizacji V-XI Edycji Nocy Naukowców na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu [Zał. 6: 1.2]. Przygotowałam i prowadziłam zaplanowane pokazy i warsztaty praktyczne nt.: *Na polskim stole, Polskie dziedzictwo kulinarne, Na polskim stole zdrowo i tradycyjnie*. Ponadto wykorzystując bezpośrednie kontakty z przedsiębiorcami w 2015 r. zorganizowałam warsztaty nt.: *Na polskim stole ekologicznie i tradycyjnie* połączone z degustacją i pokaz szerokiego asortymentu produktów ekologicznych oferowanych przez firmę Eko Wital.

W ramach Patronatu Naukowego nad Technikum Przemysłu Spożywczego przy Zespole Szkół Przemysłu Spożywczego im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich przy ul. Warzywnej w Poznaniu przygotowałam i zaprezentowałam wykład oraz przeprowadziłam ćwiczenie laboratoryjne nt.: *Ocena histologiczna mięsa i jego podstawowe cechy jakościowe*, z uczniami klasy 3. Dodatkowo nawiązałam kontakt i zorganizowałam dla uczniów *Zespołu Szkół Ponadgimnazjalnych* w Czarnkowie, na Wydziale Nauk o Żywności i Żywnieniu w dniu 09.05.2016 r., jedno z trzech ćwiczeń laboratoryjnych prowadzonych w Instytucie Technologii Mięsa nt.: *Mięso jego skład chemiczny – analityczne metody oznaczania* [Zał. 6: 1.4].

Biorę także udział w działaniach promujących Uczelnię oraz wiedzę z zakresu technologii żywności. Przez wiele lat (2010-2018) pełniłam funkcję przewodniczącej Komisji Oceniającej XIII-XXI Olimpiady Wiedzy o Żywności, etap okręgowy, Okręg Łódzki w Tomaszowie Mazowieckim. Moja aktywność w ramach tej pracy polegała na sprawdzaniu prac uczestników i przeprowadzeniu części ustnej Olimpiady [Zał. 4: III.6.3; Zał. 6: 1.4].

7. Inne ważne informacje dotyczące kariery zawodowej

7.1. Udział w konferencjach

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora brałam czynny udział w 6 konferencjach naukowych. W tym, w organizację dwóch seminariów o zasięgu międzynarodowym i 1 konferencji krajowej byłam zaangażowana jako członek komitetu organizacyjnego [Zał. 4: II.8.1-8.3]. Wyniki swoich prac badawczych prezentowałam łącznie w postaci 18 plakatów, z czego 7 w języku angielskim [Zał. 4: II.7.2.1-7.2.18].

Po obronie pracy doktorskiej uczestniczyłam w 8 konferencjach naukowych krajowych i 5 o zasięgu międzynarodowym, na których prezentowałam w formie plakatów rezultaty mojej dotychczasowej pracy naukowej [Zał. 4: II.7.2.19-7.2.74]. Łącznie jestem współautorką 74 komunikatów konferencyjnych (w tym 56 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora), 31 w

języku polskim, 43 w języku angielskim oraz 8 prac konferencyjnych, z których 6 opracowano w języku angielskim (tab. 1). Byłam zaangażowana w prace komitetu organizacyjnego 3 konferencji oraz 1 i 3 Forum Technologicznego, innowacyjnej formuły stanowiącej płaszczyznę kontaktu nauki z praktyką przemysłową [Zał. 4: II.8.4-8.8; Zał. 6: 1.8]. Przy organizacji Międzynarodowej Konferencji Naukowej nt.: *Jakość surowca mięsnego stan obecny i perspektywy w jego doskonaleniu*, byłam odpowiedzialna za opracowanie edytorskie streszczeń, wykładów plenarnych i doniesień zakwalifikowanych do wydruku.

7.2. Udział w projektach badawczych

Od początku mojego zatrudnienia jako wykonawca brałam udział w realizacji sześciu projektów badawczych KBN [Zał. 4: II.9.1, II.9.2, II.9.3, II.9.4, II.9.5, II.9.7], jednego projektu międzynarodowego finansowanego przez Unię Europejską w ramach 6. Programu Ramowego [Zał. 4: II.9.6] oraz jednego projektu badawczego NCBR [Zał. 4: II.9.8]. Podczas realizacji powyżej wymienionych grantów prowadzone były przeze mnie analizy białkowe. Wykorzystałam w nich swoją wiedzę i zdobyte doświadczenie, jednocześnie nadal doskonaliłam warsztat badawczy. Pozwoliło to na osiągnięcie założonych celów badań. Obecnie przygotowuję się do wykonania zadań zaplanowanych w projekcie badawczym NCN OPUS-19, rozpoczętym w roku 2021 [Zał. 4: II.9.8].

7.3. Współpraca z jednostkami naukowymi krajowymi i zagranicznymi, działalność międzynarodowa

Podczas mojej pracy w Katedrze Technologii Mięsa UPP nawiązałam współpracę z dwiema jednostkami zagranicznymi oraz licznymi naukowcami łącznie z 12 różnych jednostek naukowych z kraju, w tym 3 z macierzystej Uczelni. Szczegółowy wykaz ośrodków naukowych, z którymi dotychczas współpracowałam, znajduje się w Załączniku 4: II.12. Efektem tej współpracy jest 17 artykułów opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR, 3 rozdziały w monografii naukowej, 33 oryginalne prace w innych czasopiśmie, 5 artykułów naukowych, 8 prac konferencyjnych oraz liczne doniesienia konferencyjne [Zał. 4: II.4].

W odpowiedzi na zaproszenia edytorów wykonałam dotychczas 16 recenzji prac naukowych dla czasopism o zasięgu międzynarodowym, m.in. dla: *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, *International Journal of Food Science and Technology*, *Foods*, *Nutrients*, *Sustainability*, *Molecules*, *Applied Science*, *Animals* [Zał. 6: 1.5]. Szczegółowe zestawienie wykonanych recenzji znajduje się w Załączniku 4: II.14.

7.4. Otrzymane nagrody i wyróżnienia

Za ważne uważam wyróżnienie komunikatu naukowego nt.: *Właściwości termiczne titiny z mięśni świń i bydła*, prezentującego białka cytoszkieletowe, ich charakterystykę oraz udział w kształtowaniu cech mięsa, wygłoszony podczas XXVIII Sesji Naukowej KTiCHŻ PAN w Gdańsku w 1997, którego byłam współautorką.

Dwukrotnie otrzymałam nagrodę zespołową II (1999, 2006) i III (2004, 2007) stopnia JM Rektora UP w Poznaniu za oryginalne i twórcze osiągnięcia naukowe udokumentowane publikacjami naukowymi. Dodatkowo w 2006 r. zostałam wyróżniona nagrodą III stopnia JM

Rektora UPP za przedsięwzięcia, które spowodowały istotną poprawę warunków pracy dydaktycznej i wyników kształcenia [Zał. 6: 1.6].

Ponadto w 2019 r. otrzymałam nagrodę za osiągnięcia organizacyjne, a w szczególności pracę w Uczelnianej Komisji Wyборczej [Zał. 4: II.19.2, Zał. 6: 1.6].

7.5. Odbyte szkolenia i kursy

Warto zaznaczyć, że w celu poszerzenia swojej wiedzy i umiejętności uczestniczyłam w licznych szkoleniach, kursach i warsztatach, wyszczególnionych w Załączniku 4: II.19.3. W zakresie technik i nowoczesnych metod badawczych były to szkolenie nt. *Immunochemical methods* (Agricultural University of Poznań), *semimaria: Challenges in Food Flavor Analysis* (UPP), *Oczyszczanie białek rekombinowanych & Proteomika* (Warszawa), *Praktyczne metody pomiaru i recepturowania barwy* (Poznań), *Nowoczesne rozwiązania w analizie instrumentalnej* (Poznań), *Protein electrophoresis* (Warszawa), *Spektrometria mas w analizie żywności* (Poznań) oraz *12 Międzynarodowe Sympozjum Zaawansowane Technologie Ekstrakcji ExTech*, (Poznań). W obszarze komercjalizacji wyników i analizy danych pragnę podkreślić udział w szkoleniach nt. „STATISTICA” w badaniach naukowych i nauczaniu statystyki (Poznań), *Podstawy statystyki – statystyka dla niestatystyków*, *Komercjalizacja wyników badań naukowych w ramach projektu nt. InnCOM_PLUS* [Zał. 6: 1.7].

W czerwcu 2003 roku brałam udział w międzynarodowym, tygodniowym kursie organizowanym przez Department of Food Science Norwegian University of Agriculture w As (Norwegia) nt.: *Fresh Meat Technology* [Zał. 4: II.19.3, Zał. 6: 1.7].

7.6. Informacja o współpracy z otoczeniem społecznym i gospodarczym

W obszarze działalności z otoczeniem społecznym w 2009 roku na zaproszenie Stowarzyszenia Rzeźników i Wędliniarzy RP byłam członkiem komisji oceniającej Konkursów Wędliniarskich podczas Międzynarodowych Targów Przemysłu Spożywczego POLAGRA FOOD. W latach 2013-2016 byłam odpowiedzialna za przygotowanie dokumentacji oraz prezentację wędlin w Konkursie na Najlepszy Wyrób Wędliniarski w Ocenie Konsumentckiej, podczas Forum Rzeźnictwa i Wędliniarstwa odbywającego się przy okazji targów POLAGRA FOOD [Zał. 4: III.6.1, III.6.2].

W ramach wspólnych działań z sektorem gospodarczym, w 2010 r. nawiązałam wieloletnią współpracę z Zakładem Przemysłu Mięsnego „Biernacki” Sp. z o.o., zainteresowanym produkcją wysokiej jakości mięsa bydła. Otrzymałam również dofinansowanie w Projekcie „Naukowiec w biznesie - staże pracowników naukowych w przedsiębiorstwach” w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki i odbyłam staż. Efektem nawiązanych relacji była realizacja pracy magisterskiej oraz pozyskanie surowca do badań [Zał. 4: III.2.1, Zał. 6: 1.8].

Natomiast kontakty z Lubuskimi Zakładami Drobiarskimi ELDROB umożliwiły mi opracowanie i wygłoszenie wykładów nt.: *Jakość mięsa i możliwości kształtowania jego właściwości*, w czasie szkolenia dla pracowników [Zał. 4: III.5.1].

Zapoczątkowana w 2013 r. współpraca z Unią Producentów i Pracodawców Przemysłu Mięsnego (UPEMI) dała mi możliwość czynnego zaangażowania w przygotowanie zeszytu branżowego nt.: *Produkty garmażeryjne z farszem mięsnym* [Zał. 4: III.5.2].

7.7. Dorobek publikacyjny

Pełna lista moich osiągnięć naukowych znajduje się w Załączniku 4 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego (Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny). W tabeli 1 zestawiono dorobek publikacyjny przed i po uzyskaniu stopnia doktora, a w tabeli 2 znajduje się zestawienie publikacji naukowych.

Tabela 1. Zestawienie dorobku publikacyjnego przed i po uzyskaniu stopnia doktora

Dorobek publikacyjny	Liczba publikacji		Liczba punktów	
	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	MNiSW ₂₀₁₇	IF
1. Publikacje naukowe				
<i>Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie JCR</i>	1	17	815	33,252
<i>- w tym recenzowane prace naukowe w suplementach</i>	-	3	75	0,480
<i>Publikacje naukowe w czasopismach nie-uwzględnione w bazie JCR w roku wydania</i>	9	24	398	-
<i>Rozdziały w monografiach</i>	2	3	20	-
<i>Prace konferencyjne</i>	2	6	-	-
<i>Liczba opublikowanych artykułów</i>	3	2	46	-
<i>- w języku kongresowym</i>	1	1	40	
<i>- w języku niekongresowym</i>	2	1	6	
Ogółem publikacje naukowe	17	52	1279	33,252
2. Inne osiągnięcia naukowe			Dorobek całkowity	
<i>Komunikaty naukowe</i>	18	56	74	
<i>- na konferencjach krajowych</i>	11	20	31	
<i>- na konferencjach międzynarodowych</i>	7	36	43	
<i>Niepublikowane opracowania, w tym sprawozdania z grantów</i>	2	3	5	
<i>Recenzje publikacji naukowych</i>	-	16	16	
<i>Wykonane ekspertyzy lub inne projekty na zamówienie</i>	-	1	1	

* Punkty za publikacje naliczono zgodnie z komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 25 stycznia 2017 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych, z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach. Punkty za publikacje od 2019 roku przyznano zgodnie z komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 31 lipca 2019 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów.

** Impact factor zgodnie z rokiem wydania, w przypadku prac z roku 2020-2021 podano IF z roku 2019

Tabela 2. Zestawienie publikacji naukowych

Nazwa czasopisma	Liczba publikacji	Rok publikacji	Ilość punktów MNiSW* 2017/2019	IF**	Suma punktów	
					MNiSW 2017/2019	Impact Factor
1. Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie JCR						
Animals	1	2020	-/100	2,752	100	2,752
Animal Science Papers and Reports	4	2006 (2) 2009 2010	25/40	0,047 0,349 0,386	100/160	0,829
Annals of Animal Science	1	2016	15/100	0,731	15/100	0,725
Archiv fur Tierzucht – Archives Animal Breeding	1	2010	20/70	0,519	20/70	0,519
European Food Research and Technology	1	2017	25/70	1,919	25/70	1,919
Foods	1	2020	-/70	4,350	70	4,350
International Journal of Food Science and Technology	1	2020	25/70	2,281	25/70	2,281
Journal of Thermal Analysis and Calorimetry	1	2016	20/70	1,998	20/70	1,998
Journal of the Science of Food and Agriculture	1	2018	35/100	2,422	35/100	2,422
Meat Science	1 1	2002 2019	35/140 140	1,252 3,644	175/280	4,896
Medycyna Weterynaryjna	1	2016	15/20	0,161	15/20	0,161
Molecular Biology Reports	1	2011	15/70	2,929	15/70	2,929
Molecules	2	2019 2021	-/100	3,060 4,411	200	7,471
Suma 1	18	-	-	-	815/1240	33,252
2. Publikacje naukowe w czasopismach nieuwzględnione w bazie JCR w roku wydania						
Acta Scientiarum Polonorum-Technologia Alimentaria	1	2010	15/20	-	15/20	-
Annals of Animal Science	11	2002 (2) 2005 (8) 2006	15/100	-	165/1100	-
Journal of Central European Agriculture	1	2010	14/20	-	14/20	-
Nauka. Przyroda. Technologie	2	2016, 2017	9/-	-	18/-	-
Polish Journal of Food and Nutrition Sciences	10	1998 (2), 2001, 2005 (4), 2007 2009, 2010	15/100	-	150/1000	-
Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego	1	2015	7/20	-	7/20	-
Roczniki Naukowe Zootechniki	2	2000 (2)	7/20	-	14/40	-
Żywność. Nauka. Technologia. Jakość	1	2014	13/20	-	15/20	-
Roczniki Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego	3	1999, 2006, 2009	-	-	-	-
Trzoda Chlewna	1	1998	-	-	-	-
Suma 2	33	-	-	-	398/2220	-
3. Pozostałe prace						
Prace konferencyjne	8	2000-2010	-	-	-	-
Rozdziały w monografiach	5	2001, 2003 2016 (2), 2009	4	-	12	-

4. Artykuły naukowe						
Ogólnopolskie Sympozjum Szkoleniowe	1	1996	-	-	-	-
Animal Science Papers and Reports	1	2003	25/40	-	25/40	-
Mięso i Wędliny	1	2003	-	-	-	-
Polish Journal of Food and Nutrition Sciences	1	2005	15/100	-	15/100	-
Przegląd Hodowlany	1	2007	6/-	-	6/-	-
Suma 3-4	18	-	-	-	66/160	-
SUMA 1-4	69				1279/ 3620	33,252

* Punkty za publikacje naliczono zgodnie z komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 25 stycznia 2017 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych, z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach. Punkty za publikacje od 2019 r. przyznano zgodnie z komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 31 lipca 2019 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów.

** Impact factor zgodnie z rokiem wydania, w przypadku prac z roku 2020-2021 podano IF z roku 2019

.....
Beata Mikołajczak

(podpis wnioskodawcy)