

EWA IWAŃSKA, BOŻENA GRZEŚ, EDWARD POSPIECH,
BEATA MIKOŁAJCZAK, ANITA SPYCHAJ

ZMIANY UDZIAŁU BIAŁEK W WYCIEKU WIRÓWKOWYM Z MIĘSA BUHAJKÓW RÓŻNYCH RAS I W RÓŻNYM WIEKU, W CZASIE DOJRZEWANIA WOŁOWINY

Streszczenie

Celem pracy było określenie zmian udziału białek w wycieku wirówkowym pozyskanym z mięsa buhajków czterech ras: polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (PHF) odmiany czarno-białej, polskiej czerwonej (PC), Limousine (L) i Hereford (H) ubijanych w wieku 6, 9 i 12 miesięcy, w ciągu 10-dniowego chłodniczego dojrzewania mięsa. Elektroforetyczną analizę białek wycieku wirówkowego pozyskanego z tkanki mięśniowej 45 min, 48, 96 i 240 h *post mortem* wykonywano techniką SDS-PAGE. Obecność titiny, desminy i troponiny T w wycieku wirówkowym potwierdzono metodą Western blotting z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał specyficznie rozpoznających określone białka. Stwierdzono, że czas dojrzewania był najważniejszym czynnikiem wpływającym na proteolizę białek mięsa. Największe zmiany w udziale białek o dużej masie cząsteczkowej (2400 ÷ 3700 kDa i >160 kDa) zaobserwowano po 10 dniach dojrzewania mięsa. W przypadku białek o mniejszej masie cząsteczkowej (160 kDa i 90 ÷ 95 kDa) zmiany te wystąpiły już w pierwszych dwóch dniach *post mortem*. Wszystkie analizowane czynniki zmienności, tj. rasa bydła, wiek buhajków i czas dojrzewania mięsa wpłynęły istotnie ($p \leq 0,05$) tylko na udział białek o masie cząsteczkowej 90 ÷ 95 kDa. Najbardziej zaawansowany proces proteolizy białek wielkocząsteczkowych obserwowano w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków rasy PHF.

Słowa kluczowe: buhajki, rasa bydła, czas dojrzewania, białka, wyciek wirówkowy, proteoliza

Wprowadzenie

Kruchość jest jednym z podstawowych wyznaczników jakości kulinarnej wołowiny. Najważniejszą funkcję w procesie tenderyzacji, czyli poprawy kruchości mięsa pełni białka miofibrylarne tkanki mięśniowej [7, 9, 10, 23]. Stopień ich przemian zależy od rasy, genotypu i płci bydła [3, 16, 26], umięśnienia [21], wieku [9, 10],

Dr inż. E. Iwańska, dr inż. B. Grześ, prof. dr hab. E. Pospiech, dr inż. B. Mikołajczak, dr inż. A. Spychaj, Instytut Technologii Mięsa, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań. Kontakt: eiwanska@up.poznan.pl

a także czasu chłodniczego przechowywania mięsa [3, 9, 10, 22, 30]. Poprawa kruchości mięsa w czasie dojrzewania związana jest z degradacją białek mięśniowych, które są odpowiedzialne za integrację jego mikrostruktury [2, 7, 11, 15]. Proteoliza wielko-cząsteczkowych białek miofibrylarnych jest zapoczątkowana głównie przez enzymy tkankowe, z których za najważniejsze uznaje się μ -kalpainy [7, 12, 13, 15, 19]. W wyniku ich aktywności otrzymuje się surowiec o pożądanej kruchości. W procesie dojrzewania mięsa istotna jest degradacja takich białek cytoszkieletowych, jak titina, nebulina, czy desmina [7, 10, 15, 23, 25]. W analizie białek mięsa coraz więcej uwagi poświęca się białkom występującym w wycieku wirówkowym z mięsa [6, 10, 14]. Obecność w nim białek strukturalnych, tj. białek miofibryli i cytoszkieletu, może być traktowana jako marker zaawansowania procesu kruszenia (tenderyzacji) mięsa.

Celem podjętych badań było określenie zmian udziału białek w wycieku wirówkowym, pozyskanym z mięsa buhajków czterech ras: polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (PHF) odmiany czarno-białej, polskiej czerwonej (PC), Limousine (L) i Hereford (H) ubijanych w wieku 6, 9 i 12 miesięcy, w ciągu 10-dniowego dojrzewania mięsa w warunkach chłodniczych.

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowiła część piersiowa i lędźwiowa mięśnia *longissimus dorsi* (LD) pobranego łącznie z 60 prawych półtuszy buhajków czterech ras: polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (PHF) odmiany czarno-białej, polskiej czerwonej (PC), Limousine (L) oraz Hereford (H). Żywienie zwierząt było dostosowane pod względem składników paszy i jej wartości energetycznej do wieku zwierząt, zapewniając ich prawidłowy rozwój. Buhajki poddawano ubojowi w trzech kategoriach wiekowych: 6 miesięcy – o masie $184,34 \pm 21,74$ kg, 9 miesięcy – o masie $267,50 \pm 40,22$ kg i 12 miesięcy – o masie $357,79 \pm 45,12$ kg (po 5 zwierząt w grupie). Uboju zwierząt dokonywano w standardowych warunkach w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu. Do badań pobierano mięso normalnej jakości (RFN), które identyfikowano na podstawie pomiaru wartości pH 45 min i 24 h *post mortem* (pm). Średnia wartość pH tkanki mięśniowej wynosiła odpowiednio: 6,85 i 5,79.

Wyciek do analizy białek pozyskiwano w wyniku odwirowania ($25000 \times g$, 20 min, temp. $2^{\circ}C$) 6 g naważki mięśnia LD pobranego z tuszy 45 min pm, a następnie z kawałków mięsa (o masie 700 g) poddanych dojrzewaniu w warunkach chłodniczych (w temp. $3 \pm 1^{\circ}C$) przez 48, 96 i 240 h pm. Wycinek tkanki mięśniowej pozyskany z tuszy 45 min po uboju poddano rozdrobnieniu, a następnie odważone (w 2 powtórzeniach) naważki mięsa przechowywano w ciekłym azocie do czasu ich dostarczenia do laboratorium. Wyciek z mięsa 45 min po uboju uzyskiwano w wyniku odwirowania próbek częściowo rozmrożonych w temp. pokojowej (6 g) natychmiast po ich przeka-

zaniu do laboratorium. Otrzymany w ten sposób wyciek wirówkowy z mięsa (45 min *pm*) pod względem zawartych w nim białek stanowił próbę odniesienia dla wycieków pozyskanych z mięśni LD po różnym okresie ich chłodniczego dojrzewania (48, 96 i 240 h *pm*). Do dalszych badań przeznaczono mięśnie (LD) wycięte w całości z wychłodzonych prawych półtuszy wołowych (24 h *pm*) między siódmym kręgiem piersiowym a ostatnim lędźwiowym. Następnie dzielono je na trzy równe części, pakowano próżniowo w polietylenowe worki i przechowywano w chłodni w temperaturze $3 \pm 1^\circ\text{C}$. Wyciek do analizy białek w terminach: 48, 96 i 240 h po uboju otrzymano w wyniku odwirowania 6 g naważki tkanki mięśniowej (w 2 powtórzeniach), z zachowaniem takich samych parametrów wirowania ($25000 \times \text{g}$, 20 min, temp. 2°C), jakie zastosowano wobec prób mięsa pozyskanego 45 min *post mortem*.

Rozdział elektroforetyczny białek wycieku wirówkowego prowadzono w 15-procentowym żelu poliakrylamidowym w obecności sodowego siarczanu dodecylu (SDS-PAGE) i 8 M mocznika [24], z zastosowaniem aparatu typu SE 250, firmy Hoefer Scientific Instruments. Obraz elektroforetycznego rozdziału białek w żelu poliakrylamidowym skanowano za pomocą kamery video, która wchodziła w skład zestawu Image Master[®] VDS, firmy Pharmacia. Analizę ilościową rozdzielonych w żelu białek wycieku wirówkowego z mięsa prowadzono przy użyciu programu Image Master[™] 1D Elite version 4.00. Do obliczeń przyjęto założenie, że powierzchnia pojedynczego pasma białek stanowi procentowy udział w stosunku do powierzchni wszystkich rozdzielonych białek danej próby w żelu, która wynosi 100 %. Obecność titiny, desminy i troponiny T w wycieku wirówkowym z mięsa potwierdzano metodą Western blotting, zgodnie z metodą opisaną przez Fritza i Greasera [4]. Do reakcji pierwszorzędowej zastosowano monoklonalne przeciwciała anty-titiny (9D10), anty-troponiny T (9D) i anty-desminy (De-U-10). Dwa pierwsze pochodziły z Laboratorium Nauk o Mięsie i Biologii Mięśnia (ang. The Meat Science and Muscle Biology Laboratory) Uniwersytetu Wisconsin-Madison w Stanach Zjednoczonych, natomiast przeciwciało desminy zakupiono w firmie Sigma.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie, wykorzystując program Statistica 9.0 PL [27]. Zastosowano jedno- i trzyczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z interakcjami, podając wartości średnie oraz odchylenia standardowe. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano za pomocą testu Tukeya na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Wyniki i dyskusja

W wycieku wirówkowym z mięsa szczególną uwagę zwrócono na białka o następujących masach cząsteczkowych (m. cz.): $2400 \div 3700 \text{ kDa}$, $> 160 \text{ kDa}$, 160 kDa , $90 \div 95 \text{ kDa}$, $\leq 42 \text{ kDa}$, $36 \div 38 \text{ kDa}$. Analiza wariancji wykazała istotny (na poziomie $p \leq 0,001$) wpływ czasu dojrzewania mięsa na udział białek o m. cz. $2400 \div 3700 \text{ kDa}$,

> 160 kDa, 160 kDa, 90 ÷ 95 kDa i ≤ 42 kDa, jak również rasy bydła na udział białka o masie 90 ÷ 95 kDa (tab. 1). Ponadto, rasa badanych zwierząt istotnie wpłynęła na udział białek o m.cz. 2400 ÷ 3700 kDa ($p \leq 0,05$), > 160 kDa ($p \leq 0,05$) i 160 kDa ($p \leq 0,01$). Natomiast wiek buhajków istotnie oddziaływał na udział białek o masie 90 ÷ 95 kDa ($p \leq 0,05$) i 36 ÷ 38 kDa ($p \leq 0,01$). Interakcja zachodząca między wiekiem i rasą badanego bydła istotnie ($p \leq 0,01$) wpłynęła na udział białek o m.cz. 2400 ÷ 3700 kDa, natomiast między rasą bydła i czasem dojrzewania mięsa – na udział białek o m.cz. 90 ÷ 95 kDa (tab. 1).

Tabela 1. Średnie kwadraty odchyłeń z analizy wariancji dla procentowego udziału białek w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków uwzględniające oddziaływania rasy, wieku i czasu dojrzewania oraz ich interakcji.

Table 1. Mean squares of deviations from the analysis of variance for the percentage content of proteins in centrifugal drip from meat of young bulls including impact of breed, age and ageing time, as well as interactions among them.

Czynnik zmienności Factor of variance	Stopnie swobody Degrees of freedom	2400÷3700 kDa	>160 kDa	160 kDa	90÷95 kDa	≤42 kDa	36÷38 kDa
Wiek / Age – A	2	3,67	11,42	0,52	8,49*	5,7	62,57**
Rasa / Breed – B	3	7,13*	44,51*	16,00**	27,64***	106,8	2,77
Czas dojrzewania Time of ageing – C	3	193,81***	355,99***	174,64***	239,10***	1433,9***	2,78
Interakcje / Interactions							
A x B	6	24,18**	64,79*	4,85	11,47*	187,2	9,45
A x C	6	1,08	41,08	1,52	7,97	222,4	12,25
B x C	9	4,54	66,82	3,46	16,37**	165,9	28,63

Objaśnienia/ Explanatory notes:

różnice między wartościami średnimi statystycznie istotne na poziomach: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ / statistically significant differences among mean values at *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$.

Pasmo o m. cz. 2400 ÷ 3700 kDa obejmowało titinę T1 (3700 kDa) i produkt jej degradacji T2 (2400 kDa). Zwrócono na nie szczególną uwagę, gdyż degradacja titiny wiąże się ze wzrostem kruchości mięsa [2, 4, 5, 8]. Analiza elektroforetyczna wykazała stopniowe zwiększanie się udziału tego białka w wycieku wirówkowym z mięsa podczas jego 10-dniowego chłodniczego przechowywania (tab. 2).

Udział titiny w wycieku wirówkowym pozyskanym z mięsa 45 min i 48 h *post mortem* był istotnie mniejszy ($p \leq 0,05$) w porównaniu z jego udziałem w wycieku w pozostałych terminach (tab. 2). Powyższe obserwacje wskazują na ściśle powiązanie degradacji i uwalniania titiny z cytoszkieletu miofibrili z czasem dojrzewania mięsa

[10]. Czas przechowywania mięsa w chłodni spełniał najważniejszą rolę w procesie proteolizy tego białka spośród wszystkich analizowanych czynników determinujących poubojowe przemiany titiny (tab. 1).

Tabela 2. Udział białek w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków w zależności od czasu jego chłodniczego dojrzewania [%].

Table 2. Content of proteins in centrifugal drip from meat of young bulls depending on duration of meat aging [%].

Czas dojrzewania Time of aging	Masa cząsteczkowa białek w wycieku wirówkowym z mięsa Molecular weight of proteins from muscle centrifugal drip					
	2400÷3700 kDa	>160 kDa	160 kDa	90 ÷ 95 kDa	≤ 42 kDa	36 ÷ 38 kDa
Czas dojrzewania w chłodni / Duration of cold storage						
45'	0,68 ^a ± 0,64	1,12 ^a ± 0,90	1,65 ^a ± 0,79	3,19 ^a ± 1,07	60,98 ^c ± 5,81	6,26 ^a ± 1,93
48 h	1,09 ^a ± 0,82	1,27 ^a ± 0,88	3,18 ^b ± 0,79	5,47 ^b ± 0,89	57,97 ^b ± 4,63	6,31 ^a ± 2,39
96 h	1,69 ^b ± 0,99	2,01 ^a ± 1,36	3,53 ^b ± 0,79	5,47 ^b ± 0,90	57,34 ^b ± 3,77	6,05 ^a ± 1,66
240 h	3,07 ^c ± 1,33	4,08 ^b ± 3,87	3,91 ^c ± 0,77	5,62 ^b ± 1,13	54,04 ^a ± 4,80	6,08 ^a ± 1,51

Objaśnienia/ Explanatory notes:

wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation;

a, b, c – wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p \leq 0,05$ / mean values denoted by different letters differ statistically significant at $p \leq 0.05$.

Wzrost udziału titiny w wycieku wirówkowym z mięsa wraz z czasem jego przechowywania nastąpił we wszystkich badanych próbkach, niezależnie od rasy bydła (tab. 3).

Istotną ($p \leq 0,05$) tendencję wzrostową w odniesieniu do zawartości tego białka w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków rasy PHF obserwowano już po 48 h w porównaniu do 45 min *post mortem*. Po 10 dniach dojrzewania mięsa (240 h *pm*) udział titiny w wycieku wirówkowym zwiększył się od 3 do 7 razy, w zależności od rasy badanych zwierząt. W tym terminie najwięcej titiny było w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków rasy PHF, natomiast największy, prawie 7-krotny przyrost zawartości tego białka zaobserwowano w wycieku z mięsa bydła rasy PC. Po 10 dniach *pm* najmniejszy, aczkolwiek statystycznie nieistotny udział titiny stwierdzono w wycieku z mięsa buhajków rasy L w stosunku do pozostałych ras (tab. 3). Powyższa obserwacja wskazuje na nieznacznie większą proteolizę titiny w mięsie buhajków rasy PHF w porównaniu z innymi badanymi rasami (PC, L i H).

Tabela 3. Udział białek w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków o zróżnicowanym genotypie [%].
 Table 3. Content of proteins in centrifugal drip from meat of young bulls showing different genotypes [%].

Rasa bydła Cattle breed	Masa cząsteczkowa białek w wycieku wirówkowym z mięsa Molecular weight of proteins from muscle centrifugal drip					
	2400÷3700 kDa	>160 kDa	160 kDa	90 ÷ 95 kDa	≤ 42 kDa	36 ÷ 38 kDa
45'						
PHF	0,95 ^{aA} ± 0,50	1,28 ^{aA} ± 0,71	2,06 ^{bA} ± 0,78	3,59 ^{aA} ± 1,25	60,44 ^{aB} ± 3,97	5,90 ^{aA} ± 1,61
H	0,77 ^{aA} ± 0,54	1,34 ^{aA} ± 1,05	1,71 ^{abA} ± 0,76	3,09 ^{aA} ± 0,94	61,47 ^{aB} ± 3,30	6,16 ^{aA} ± 1,79
L	0,58 ^{aA} ± 0,74	0,92 ^{aA} ± 0,91	1,63 ^{abA} ± 0,84	3,45 ^{aA} ± 0,82	62,10 ^{aC} ± 3,08	6,44 ^{aA} ± 2,55
PC	0,45 ^{aA} ± 0,70	0,93 ^{aA} ± 0,90	1,22 ^{aA} ± 0,63	2,66 ^{aA} ± 1,09	59,87 ^{aA} ± 10,08	6,52 ^{aA} ± 1,76
48 h						
PHF	1,45 ^{aB} ± 0,80	1,66 ^{aA} ± 0,90	3,52 ^{aB} ± 0,81	5,59 ^{abB} ± 0,71	56,73 ^{aA} ± 2,80	6,13 ^{aA} ± 2,47
H	1,13 ^{aA} ± 0,84	1,31 ^{aA} ± 0,85	3,21 ^{aB} ± 0,75	5,97 ^{bbB} ± 0,79	58,67 ^{aA} ± 7,95	6,12 ^{aA} ± 1,89
L	0,93 ^{aAB} ± 0,70	1,28 ^{aA} ± 0,94	3,11 ^{aB} ± 0,82	5,17 ^{abB} ± 0,77	58,40 ^{aB} ± 3,01	6,55 ^{aA} ± 3,18
PC	0,87 ^{aAB} ± 0,85	0,8 ^{aA} ± 0,72	2,92 ^{aB} ± 0,74	5,15 ^{aB} ± 1,05	57,99 ^{aA} ± 2,66	6,44 ^{aA} ± 2,04
96 h						
PHF	1,72 ^{aB} ± 0,99	2,1 ^{aA} ± 1,39	4,02 ^{bbB} ± 0,93	5,66 ^{bcB} ± 0,76	57,89 ^{aA} ± 6,30	6,46 ^{aA} ± 2,11
H	1,59 ^{aA} ± 0,81	1,89 ^{aA} ± 0,75	3,58 ^{abB} ± 0,51	6,23 ^{cbB} ± 0,58	57,34 ^{aA} ± 3,36	5,95 ^{aA} ± 1,52
L	1,80 ^{aBC} ± 1,13	2,14 ^{aAB} ± 1,88	3,26 ^{aB} ± 0,93	4,69 ^{abB} ± 0,83	56,51 ^{aA} ± 2,40	6,00 ^{aA} ± 1,48
PC	1,64 ^{aB} ± 1,10	1,82 ^{aA} ± 1,29	3,29 ^{abB} ± 0,52	5,31 ^{abB} ± 0,70	57,66 ^{aA} ± 1,91	5,80 ^{aA} ± 1,58
240 h						
PHF	3,61 ^{aC} ± 1,54	6,20 ^{bbB} ± 3,34	4,18 ^{abB} ± 0,72	5,79 ^{abB} ± 1,16	51,02 ^{aA} ± 5,10	6,84 ^{aA} ± 1,57
H	3,02 ^{aB} ± 1,35	3,59 ^{abB} ± 1,44	3,84 ^{abB} ± 0,61	6,25 ^{bbB} ± 0,74	55,92 ^{baA} ± 6,73	6,45 ^{abA} ± 1,27
L	2,67 ^{aB} ± 1,10	3,14 ^{aB} ± 1,23	4,20 ^{bcB} ± 0,91	5,21 ^{aB} ± 1,35	54,23 ^{abA} ± 2,67	5,25 ^{aA} ± 1,35
PC	3,03 ^{aB} ± 1,28	3,54 ^{abB} ± 1,59	3,45 ^{aB} ± 0,64	5,24 ^{abB} ± 0,93	54,79 ^{abA} ± 2,32	5,83 ^{abA} ± 1,49

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – różne małe litery oznaczają statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) różnice wartości średnich między rasami w danym terminie dojrzewania / various small letters denote statistically significant ($p \leq 0.05$) differences among breeds during given period of aging;

A, B, C – różne duże litery oznaczają statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) różnice wartości średnich między różnymi terminami chłodniczego przechowywania mięsa danej rasy / various capital letters denote statistically significant ($p \leq 0.05$) differences among different periods of cold storing of meat derived from given breed.

PHF – rasa polska holsztyńsko-fryzyjska / Polish Holstein-Friesian breed; PC – rasa polska czerwona / Polish Red breed; L – rasa Limousine / Limousine breed; H – rasa Hereford / Hereford breed.

Badania przeprowadzone przez Iwanowską i wsp. [8] na tym samym materiale doświadczalnym ujawniły malejący udział wielkocząsteczkowych białek miofibrylarnych po 10 dniach dojrzewania mięsa w chłodni. Powyższe potwierdza, że produkty degradacji białek miofibryli są uwalniane ze struktur mięśniowych i przechodzą do sarkoplazmy. Wraz z postępującą degradacją białek miofibrylarnych, w tym titiny natywnej (T1) w tkance mięśniowej, cytowani wyżej autorzy [8] obserwowali wzrost kruchości mięsa wołowego, jednak różnice między wartościami siły cięcia mięsa buhajków analizowanych ras były statystycznie nieistotne

W niniejszych badaniach nie wykazano istotnego ($p \leq 0,05$) wpływu wieku badanych zwierząt na udział białek o m. cz. 2400 ÷ 3700 kDa w wycieku wirówkowym z mięsa (tab. 4). Najwolniejszy wzrost udziału titiny zaobserwowano w wycieku wirówkowym z mięsa 12-miesięcznych buhajków. Udział titiny w wycieku wirówkowym z mięsa pobranego 48 i 96 h *post mortem* był większy w przypadku 6- i 9-miesięcznych buhajków w porównaniu z 12-miesięcznymi zwierzętami (tab. 4).

Po 10 dniach dojrzewania najmniejszy, choć statystycznie nieistotny, udział titiny stwierdzono w wycieku wirówkowym z mięsa 12-miesięcznych buhajków (tab. 4). Podobne zależności w udziale wielkocząsteczkowych białek, w tym titiny, w wycieku wirówkowym z mięsa stwierdzili Kołczak i wsp. [10] w trakcie 12 dni dojrzewania w chłodni mięśni *psoas major* i *semitendinosus*, pochodzących z cieląt, jałówek i krów ubijanych w wieku 3 i 18 miesięcy oraz 8 lat. Cytowani autorzy [10] nie zaobserwowali istotnych różnic między analizowanymi grupami mięśni, ale stwierdzili szybszą proteolizę wielkocząsteczkowych białek w mięsie młodszego bydła. Taki sam wpływ czasu na dojrzewanie mięsa zaobserwowali Monsón i wsp. [16] w odniesieniu do bydła ras: holsztyńsko-fryzyskiej, Brown Swiss, Limousine i Blonde d'Aquitaine, a Steen i wsp. [28] – Belgian Blue White.

Wraz z postępującym procesem dojrzewania mięsa obserwowano rozdzielenie pasma titiny na dwa pojedyncze cieńsze pasma oznaczone jako T1 i T2 (rys. 1). Powyższe wskazywało na degradację natywnej formy tego białka, którą odnotowali w swoich badaniach także inni autorzy [5, 8, 29].

Obecność titiny natywnej (T1) i jednego z produktów jej degradacji (T2) w wycieku wirówkowym pozyskanym z mięsa potwierdzono metodą immunoblottingu z wykorzystaniem monoklonalnego przeciwciała anty-titiny (9D10) (rys. 2.I). Oba pasma titiny (T1 i T2) najwyraźniej uwidoczniły się 240 h *post mortem* (rys. 1).

Na elektroforegramie (rys. 1) zwrócono również uwagę na białko o mniejszej m. cz., tj. 160 kDa (tab. 2). Pasma to może reprezentować białko M, które charakteryzuje się podobną m. cz., tzn. 165 kDa [1]. Pełni ono wraz z białkiem C (m. cz. ok. 140 kDa) funkcję stabilizatora filamentów miozyny w linii M [18]. Na udział tego białka

Tabela 4. Udział białek w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków poddanych ubojowi w różnym wieku [%].

Table 4. Proportion of the centrifugal drip proteins from meat of young bulls slaughtered at the various age [%].

Wiek zwierząt [miesiące] Age [months]	Masa cząsteczkowa białek w wycieku wirówkowym z mięsa Molecular weight of proteins from muscle centrifugal drip					
	2400÷3700 kDa	>160 kDa	160 kDa	90÷95 kDa	≤42 kDa	36÷38 kDa
45'						
6	0,50 ^{aA} ± 0,31	0,88 ^{aA} ± 0,43	1,68 ^{aA} ± 0,71	3,33 ^{aA} ± 1,10	59,53 ^{aAB} ± 8,62	6,31 ^{abA} ± 1,96
9	0,92 ^{aA} ± 0,83	1,53 ^{aB} ± 1,19	1,68 ^{aA} ± 0,65	3,03 ^{aA} ± 0,83	60,76 ^{aB} ± 3,80	5,34 ^{aA} ± 1,58
12	0,63 ^{aA} ± 0,63	0,94 ^{aA} ± 0,78	1,59 ^{aA} ± 1,01	3,22 ^{aA} ± 1,27	62,57 ^{aC} ± 3,67	7,13 ^{bA} ± 1,89
48 h						
6	1,17 ^{aAB} ± 0,50	1,33 ^{aA} ± 0,60	3,27 ^{aB} ± 0,89	5,23 ^{aB} ± 0,70	59,44 ^{aB} ± 6,95	6,57 ^{aA} ± 1,94
9	1,17 ^{aAB} ± 0,96	1,26 ^{aA} ± 0,88	3,16 ^{aB} ± 0,75	5,31 ^{aB} ± 1,07	58,12 ^{aAB} ± 3,00	5,46 ^{aA} ± 1,87
12	0,93 ^{aA} ± 0,92	1,23 ^{aA} ± 1,11	3,13 ^{aB} ± 0,77	5,86 ^{aB} ± 0,75	56,41 ^{aB} ± 2,45	6,92 ^{aA} ± 3,04
96 h						
6	1,61 ^{aB} ± 0,60	1,88 ^{aA} ± 0,68	3,63 ^{aB} ± 0,64	5,28 ^{aB} ± 0,86	56,98 ^{aAB} ± 3,31	6,48 ^{aA} ± 1,64
9	1,91 ^{aB} ± 1,13	2,51 ^{aBC} ± 1,75	3,58 ^{aB} ± 0,95	5,48 ^{aB} ± 1,11	57,22 ^{aA} ± 3,51	5,32 ^{aA} ± 1,68
12	1,55 ^{aA} ± 1,15	1,63 ^{aA} ± 1,31	3,38 ^{aB} ± 0,77	5,65 ^{aB} ± 0,69	57,81 ^{aB} ± 4,50	6,36 ^{aA} ± 1,47
240 h						
6	2,97 ^{aC} ± 1,27	5,07 ^{aAB} ± 6,37	3,88 ^{aB} ± 0,75	5,04 ^{aB} ± 0,99	54,38 ^{aA} ± 2,97	6,28 ^{aA} ± 1,75
9	3,25 ^{aC} ± 1,28	3,62 ^{aC} ± 1,57	3,79 ^{aB} ± 0,89	5,73 ^{abB} ± 1,15	54,96 ^{aA} ± 6,43	5,77 ^{aA} ± 1,35
12	2,99 ^{aB} ± 1,49	3,61 ^{aB} ± 1,86	4,06 ^{aC} ± 0,68	6,06 ^{bB} ± 1,04	52,80 ^{aA} ± 4,24	6,20 ^{aA} ± 1,45

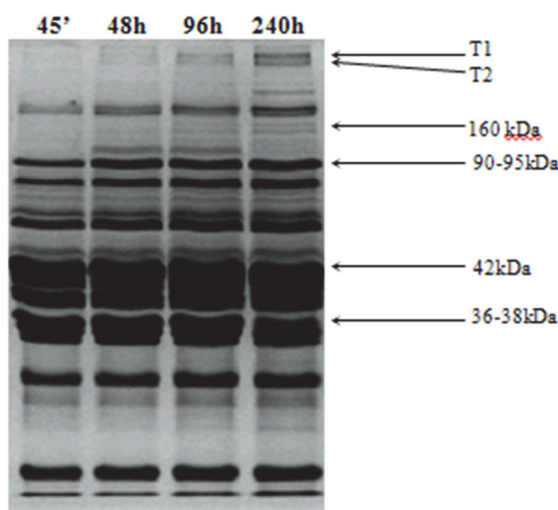
Objaśnienia/ Explanatory notes:

a, b, c – różne małe litery oznaczają statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) różnice wartości średnich między buhajkami o różnym wieku w danym terminie analizy / different small letters denote statistically significant ($p \leq 0,05$) differences among young bulls of various age during given period of analysis storage;

A,B,C – różne duże litery oznaczają statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) różnice wartości średnich między różnymi terminami analizy dla danego wieku buhajków / different capital letters denote statistically significant ($p \leq 0,05$) differences among different periods of analysis for given age of young bulls.

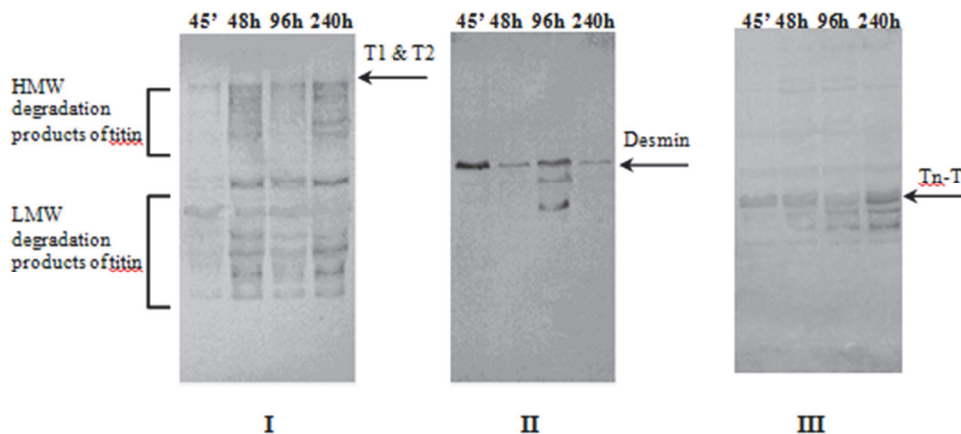
w wycieku wirówkowym znacząco wpłynął czas dojrzewania mięsa oraz w mniejszym stopniu rasa buhajków (tab. 1 i 2). W wycieku wirówkowym pochodzącym z mięsa zwierząt wszystkich badanych ras następował stopniowy wzrost udziału białka o m. cz. 160 kDa (tab. 3). Większy udział omawianego białka obserwowano w wycieku wirów-

kowym (45 min, 48 h, 96 h) pozyskanym z mięsa buhajków rasy PHF w porównaniu z pozostałymi rasami (tab. 3). Po 10 dniach dojrzewania stwierdzono mniejszy udział białka o m. cz. 160 kDa w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków rasy PC w porównaniu z pozostałymi rasami (tab. 3). Istotnie ($p \leq 0,05$) największy wzrost zawartości białka o m. cz. 160 kDa w ciągu 10 dni chłodniczego dojrzewania mięsa obserwowano w przypadku buhajków rasy L. Ponadto stwierdzono, że w ostatnim terminie badań (240 h *pm*) udział białka o m. cz. 160 kDa w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków rasy PHF i L był zbliżony (odpowiednio: 4,18 i 4,20 %). Szybkie zmiany w początkowej fazie dojrzewania mięsa obserwowane w tym paśmie mogą być z jednej strony wynikiem uwolnienia białka M z miofibryli, a z drugiej – degradacji titiny. W konsekwencji te wielkocząsteczkowe białka mogą przemieszczać się z miofibryli do sarkoplazmy, a zatem można je obserwować w wycieku wirówkowym. Obecność titiny w tym paśmie została potwierdzona za pomocą immunoblottingu z wykorzystaniem monoklonalnego przeciwciała 9D10 (rys. 2.I).



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny białek wycieku wirówkowego z tkanki mięśniowej buhajków rasy PHF w różnym czasie *post mortem* (w 15-procentowym żelu poliakrylamidowym z dodatkiem mocznika).

Fig. 1. Electrophoretic separation of proteins in centrifugal drip from muscle tissue of young PHF bulls during various *post mortem* periods of time (in 15% polyacrylamide gel with urea added).



Objaśnienia: / Explanatory notes:

I – monoklonalne przeciwciało anti-titiny (klon 9D10) / anti-titin antibody (clone 9D10); II – monoklonalne przeciwciało anti-desminy (klon DE-U-10) / anti-desmin antibody (clone DE-U-10); III – monoklonalne przeciwciało anti-troponiny T (klon 9D) / anti-troponin T antibody (clone 9D).

Rys. 2. Western blotting wybranych białek w wycieku wirówkowym z tkanki mięśniowej buhajków Limousine, poddanych ubojowi w wieku 6 miesięcy.

Fig. 2. Western blotting of selected proteins in centrifugal drip from muscle tissue of young Limousine bulls slaughtered at the age of 6 months.

Przeprowadzona analiza wariancji wykazała istotny wpływ wszystkich analizowanych czynników, tj. rasy i wieku buhajków oraz czasu dojrzewania mięsa, a także ich wzajemnych interakcji (wieku i rasy oraz rasy i czasu dojrzewania) na udział białek o m. cz. 90 ÷ 95 kDa (tab. 1). To pasmo może odpowiadać fosforylaze glikogenowej, ale może zawierać także produkty degradacji białek miofibrylarnych [20]. Okayama i wsp. [20] obserwowali degradację fosforylasy glikogenowej podczas dojrzewania mięsa pochodzącego z bydła rasy Japanese Black. W niniejszych badaniach udział białek o m. cz. 90 ÷ 95 kDa wzrastał przez cały okres dojrzewania mięsa, ale istotne ($p \leq 0,05$) zmiany zaobserwowano tylko po dwóch dniach jego przechowywania (tab. 2). Największy wzrost udziału białek podczas przechowywania obserwowano w wycieku pozyskanym z mięsa buhajków rasy H. Jego udział 240 h *post mortem* był istotnie ($p \leq 0,05$) największy i wynosił powyżej 6 % (tab. 3). Udział białek o m. cz. 90 ÷ 95 kDa w wycieku wirówkowym zwiększał się wraz z wiekiem zwierząt. Duży ich udział obserwowano w wycieku wirówkowym pochodzącym z mięsa buhajków ubijanych w wieku 12 miesięcy. Po 10 dniach dojrzewania mięsa najwięcej ($p \leq 0,05$) tych białek było właśnie w wycieku z mięsa zwierząt w omawianym wieku.

Na podstawie analizy elektroforegramów (rys. 1) trudno szczegółowo omówić zmiany ilościowe białek o niskiej m. cz., tj. ≤ 42 kDa, ponieważ zarówno pasma białek

sarkoplazmatycznych, jak również białek miofibrylarnych oraz produktów ich degradacji nakładają się na siebie. Dokładną identyfikację białek umożliwi dopiero przeprowadzony immunoblotting z zastosowaniem swoistych przeciwciał. W niniejszych badaniach, dzięki reakcji z monoklonalnym przeciwciałem anty-desminy (9D) zaobserwowano powolną degradację natywnej formy tego białka (o m. cz. $50 \div 55$ kDa) przez cały okres dojrzewania mięsa. Największy udział produktów degradacji desminy, w tym produktu o m.c.z. ok. 40 kDa stwierdzono 96 h *post mortem* (rys. 2.II). Białko o podobnej m.c.z. (ok. 38 kDa) często ujawnia się w mięsie wołowym podczas jego dojrzewania i jest uważane za główny produkt degradacji desminy [7]. Jednak obecność produktów degradacji titiny w tym paśmie (rys. 2.I) może przyczynić się do zwiększania udziału białek o m. cz. ≤ 42 kDa w wycieku wirówkowym.

Immunoblotting przeprowadzony z zastosowaniem monoklonalnego przeciwciała anty-troponiny T (9D) wykazał zwiększenie się udziału białek o m. cz. $36 \div 38$ kDa i niższej wraz z czasem dojrzewania mięsa (rys. 2.III), co potwierdza ich uwalnianie z miofibryli do wycieku.

Pojawiające się na elektroforegramach produkty degradacji troponiny T (Tn-T) są traktowane jako wskaźnik postępu procesów proteolitycznych [7, 8, 13, 17, 28, 29]. Iwanowska i wsp. [8] obserwowali zmniejszenie udziału tych białek w tkance mięśniowej buhajków podczas przechowywania mięsa w chłodni. Ich obecność w wycieku świadczy, że produkty degradacji białek miofibryli są uwalniane ze struktur mięśniowych i przechodzą do sarkoplazmy. Po 10 dniach chłodniczego przechowywania mięsa stwierdzono istotne ($p \leq 0,05$) zwiększenie się udziału białek o m. cz. $36 \div 38$ kDa w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków rasy PHF. Okumura i wsp. [22] stwierdzili w tym przedziale masy cząsteczkowej obecność enzymu GAPDH (m. cz. około $36 \div 38$ kDa), którego udział zmniejszył się podczas dojrzewania mięsa. Wyniki zamieszczone w tab. 2. wskazują, że zmiany udziału białek o m. cz. $36 \div 38$ kDa w czasie dojrzewania mięsa w chłodni były niewielkie, co może potwierdzać dość powszechne twierdzenie, że procesy proteolityczne w mięsie wołowym są wolniejsze niż w wieprzynie [25].

Wnioski

1. Czynnikiem, który w największym stopniu wpłynął na zmiany udziału białek w wycieku wirówkowym z mięsa buhajków ras: polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (PHF) odmiany czarno-białej, polskiej czerwonej (PC), Limousine (L) i Hereford (H), był czas chłodniczego dojrzewania mięsa.
2. Tylko udział białek o masie cząsteczkowej $90 \div 95$ kDa był istotnie ($p \leq 0,05$) uzależniony od oddziaływania przyjętych czynników zmienności, tj. rasy i wieku bydła oraz czasu dojrzewania mięsa.

3. Wysoki udział titiny obserwowano w wycieku wirówkowym pochodzącym z mięsa buhajków rasy PHF, odmiany czarno-białej. Szybszą degradację tego białka obserwowano w wycieku wirówkowym z mięsa bydła ubijanego w wieku 6 i 9 miesięcy w porównaniu do zwierząt 12-miesięcznych.
4. Istotnie najwięcej ($p \leq 0,05$) białek o masie $90 \div 95$ kDa zawierał wyciek z mięsa buhajków rasy Hereford.
5. Prawidłowa identyfikacja białek zawartych w wycieku wymaga przeprowadzenia immunoblottingu z zastosowaniem przeciwciał specyficznie rozpoznających określone białka, gdyż pasma białek typowych dla tej frakcji pokrywają się z białkami miofibrili lub produktami ich degradacji.

Literatura

- [1] Ashgar A., Samejina K., Yasui T.: Functionality of muscle protein in gelation mechanism of structured meat products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1985, **22** (1), 27-84.
- [2] Boyer-Beri C., Greaser M.L.: Effect of postmortem storage on the Z-line region of titin in bovine muscle. *J. Anim. Sci.*, 1998, **76** (4), 1034-1044.
- [3] Campo M.M., Santolaria P., Sañudo C., Lepetit J., Otella J.L., Penea B., Alberti P.: Assessment of breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Sci.*, 2000, **55** (4), 371-378.
- [4] Fritz J.D., Greaser M.L.: Changes in titin and nebulin in postmortem bovine muscle revealed by gel electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. *J. Food Sci.*, 1991, **56**, 607-615.
- [5] Greaser M.L., Boyer-Berri C., Kumazawa Y., Szalata M., Pospiech E.: Titin and tenderness. *Proc. 46th ICoMST, Buenos Aires, Argentina, 2000, 27 August – 1 September, 4.I-L1*, pp. 420-423.
- [6] Grześ B., Pospiech E., Greaser M. L., Mozdziak P.E.: Evaluation of structural changes in cured meat through the determination of myosin in the centrifugal drip. *Rocz. Inst. Przem. Mięs. Tuszcz.* 1997, **XXXIV**, 171-177.
- [7] Huff Lonergan E., Zhang W., Lonergan S.M.: Biochemistry of post-mortem muscle – Lesson on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci.*, 2010, **86** (1), 184-195.
- [8] Iwanowska A., Iwańska E., Grześ B., Mikołajczak B., Pospiech E., Rosochacki S., Łyczyński A.: Protein changes and tenderness meat from young bulls of different breed and age. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 2010, **28** (1), 13-25.
- [9] Kołczak T., Pospiech E., Palka K., Łącki J.: Changes in structure of *psaos major and minor* and *semitendinosus* muscles of calves, heifers and cows during *post-mortem* ageing. *Meat Sci.*, 2003, **64** (1), 77-83.
- [10] Kołczak T., Pospiech E., Palka K., Łącki J.: Changes of myofibrillar and centrifugal drip proteins and shear force of *psaos major and minor* and *semitendinosus* muscle from calves, heifers and cows during post-mortem ageing. *Meat Sci.*, 2003, **64** (1), 69-75.
- [11] Kołczak T.: Jakość wołowiny. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **1** (56), 5-22.
- [12] Koohmaraie M., Geesink G.H.: Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.*, 2006, **74** (1), 34-43.
- [13] Lametsch R., Roepstorff P., Moller H.S., Bendixen E.: Identification of myofibrillar substrates for μ -calpain. *Meat Sci.*, 2004, **68** (4), 515-521.
- [14] Luca Di A., Mullen A.M., Elia G., Davey G., Hamill R.M.: Centrifugal drip is an accessible source for protein indicators of pork ageing and water-holding capacity. *Meat Sci.*, 2011, **88** (2), 261-270.

- [15] Melody J.L., Lonergan S.M., Rowe L.J., Hiatt T.W., Mayers M.S., Huff-Lonergan E.: Early post-mortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J. Anim. Sci.*, 2004, **82**, 1195-1205.
- [16] Monsón F., Sañudo C., Sierra I.: Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. *Meat Sci.*, 2004, **68 (4)**, 595-602.
- [17] Mullen M.A., Murray B., Troy D.: Predicting the eating quality of meat. The National Food Centre, Ireland Research Report, 2000, p. 28.
- [18] Noguchi J., Yanagisawa M., Imamura M., Kasuya Y., Sakurai T., Tanaka T., Masaki T.: Complete primary structure and tissue expression of Chicken pectoralis M-protein. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267 (28)**, 20302-20310.
- [19] Nowak M.: Rola kalpain w procesie kruszenia mięsa. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **1 (42)**, 5-17.
- [20] Okayama T., Fukumoto H., Nakagawa S., Yamanoue M., Nishikawa I.: Changes in protein content in subcellular sarcoplasmic fractions of muscles during conditioning of Japanese black cattle. *Anim. Sci. Technol. (Japan)*, 1992, **63**, 855-860.
- [21] Oliván M., Martínez A., Osoro C., Sañudo C., Panea B., Otella J.L., Campo M.M., Oliver A.M., Serra X., Gil M., Piedrafita J.: Effect of muscular hypertrophy on physico-chemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. *Meat Sci.*, 2004, **68 (4)**, 567-575.
- [22] Okumura T., Yamada R., Nishimura T.: Survey of conditioning indicators for pork loins: changes in myofibrils, proteins and peptides during *post mortem* conditioning of vacuum-packed pork loins for 30 days. *Meat Sci.*, 2003, **64 (4)**, 467-473.
- [23] Pospiech E., Grześ B., Łyczyński A., Borzuta K., Szalata M., Mikołajczak B.: Muscle proteins and their changes in the process of meat tenderization. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 2003, Suppl. 1, 133-151.
- [24] Pospiech E., Peltre G., Wąsowicz E., Jeleń H., Greaser M.L., Mikołajczak B., Brewińska A., Gorączka A.: Metody separacji i ocena rozdzielów: elektroforeza, wysokosprawna kolumnowa chromatografia cieczowa, chromatografia gazowa, spektroskopia masowa. W: *Metody pomiarów i kontroli jakości w przemyśle spożywczym i biotechnologii*. Red. M. Jankiewicz i Z. Kędzior. Wyd. AR Poznań 2003, ss. 171-275.
- [25] Pospiech E., Grześ B., Elminowska-Wenda G.: Przemiany białek. W: *Mięso – Podstawy nauki i technologii*. Red. A. Pisula i E. Pospiech. Wyd. SGGW Warszawa 2011, ss. 200-225.
- [26] Sañudo C., Macie E.S., Olleta J.L., Villarroel M., Panea B., Alberti P.: The effect of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Sci.*, 2004, **66 (4)**, 925-932.
- [27] Stanisław A. *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem Statistica PL na przykładach z medycyny*. StatSoft Polska Sp. z o.o., Kraków 2007.
- [28] Steen D., Claeys E., Utterhaegen L., Desmet D., Demayer D.: Early post-mortem conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscled beef. *Meat Sci.*, 1997, **45 (3)**, 307-319.
- [29] Szalata M., Pospiech E., Greaser M.L., Łyczyński A., Grześ B., Mikołajczak B.: Changes of titin and troponin T in relation to tenderness of meat from pigs of various meatiness. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **14/55 (2)**, 139-144.
- [30] Zając M., Midura A., Palka K., Węsierska E., Krzysztoforski K.: Skład chemiczny, rozpuszczalność kolagenu śródmięśniowego i tekstura wybranych mięśni wołowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **4 (77)**, 103-116.

CHANGES IN CONTENT OF PROTEINS IN CENTRIFUGAL DRIP FROM MEAT OF YOUNG BULLS OF DIFFERENT BREEDS AT DIFFERENT AGES

Summary

The objective of the research study was to determine the changes in the content of proteins in centrifugal drip obtained from meat of young bulls of four breeds: Polish Holstein-Friesian (PHF) of Black and White variety, Polish Red (PC), Limousine (L), and Hereford (H), all of them slaughtered at the age of 6, 9, and 12 months during a 10-day period of chilled beef aging. A SDS-PAGE technique was applied to perform an electrophoretic analysis of proteins derived from centrifugal drip of muscle tissue 45 min, 48, 96, and 240 h after slaughter. The occurrence of titin, desmin and troponin T in the centrifugal drip was confirmed by a western blotting method using monoclonal antibodies to specifically identify definite proteins. The aging time was found to be the most important factor that impacted the proteolysis of proteins in meat. The greatest changes in the content of high-molecular proteins (2400 ÷ 3700 kDa and >160 kDa) were reported on the 10th day of meat ageing. In the case of proteins with a lower molecular weight (160 kDa and 90 ÷ 95 kDa), such changes occurred already during the first two days *post mortem*. All the variability factors analyzed (i.e. breed and age of cattle, and aging time of beef meat) significantly affected ($p < 0.05$) only the content of proteins with a molecular weight of 90 ÷ 95 kDa. The most advanced process of proteolysis of high molecular weight proteins was reported in the centrifugal drip from meat of bulls of PHF breed.

Key words: young bulls, cattle breed, ageing time, proteins, centrifugal drip, proteolysis ☒