



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Instytut Technologii Mięsa

## **Załącznik 2**

# **AUTOREFERAT**

dotyczący działalności naukowo-badawczej

**Magdalena Montowska**

**Poznań 2017**

**SPIS TREŚCI**

SPIS TREŚCI .....	2
1. DANE OSOBOWE .....	3
2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE .....	3
3. INFORMACJE O ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH .....	3
4. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA .....	4
4.1. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311) .....	4
4.2. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników wskazanego osiągnięcia .....	5
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH .....	13
5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora .....	13
5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora .....	16
6. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO .....	19

## 1. DANE OSOBOWE

*Imię i nazwisko:* **Magdalena Montowska** (nazwisko rodowe Lamęcka)

*Miejsce pracy:* Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Instytut Technologii Mięsa  
ul. Wojska Polskiego 31  
60-624 Poznań

## 2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

- **2012** – stopień doktora nauk rolniczych, specjalność technologia żywności i żywienia, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; tytuł pracy doktorskiej: „Ocena zróżnicowania niskocząsteczkowych białek mięśni wybranych gatunków zwierząt celem badania autentyczności mięsa i produktów mięsnych”, wyróżnienie, promotor: prof. dr hab. Edward Pospiech.

Moja rozprawa doktorska została wyróżniona w 2013 roku dwiema nagrodami:

- nagrodą Prezesa Rady Ministrów za wyróżnioną rozprawę doktorską w roku 2012.
- nagrodą Miasta Poznania za wyróżniającą się pracą doktorską w roku 2012.
- **2003** – wpis na listę diagnostów laboratoryjnych pod numerem 8597.
- **2003** – dyplom ukończenia studiów podyplomowych o specjalności bankowość, Wyższa Szkoła Bankowa w Poznaniu.
- **1999** – dyplom ukończenia studiów podyplomowych o specjalności żywienie człowieka, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza w Poznaniu.
- **1997** – dyplom ukończenia dwuletniego Studium Pedagogicznego, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.
- **1997** – tytuł magistra biologii o specjalności biologia środowiskowa, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

## 3. INFORMACJE O ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- **2014 do chwili obecnej** – Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Instytut Technologii Mięsa, adiunkt.
- **2012-2014** – University of Nottingham, School of Pharmacy, Centre for Analytical Bioscience, Wielka Brytania, Marie Curie Research Fellow, zatrudnienie typu post-doc.
- **2012** – Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Biochemii i Analizy Żywności, starszy specjalista.
- **2006-2011** – Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,

Instytut Technologii Mięsa, starszy specjalista.

- **2005** – Zachodni Bank Komórek Macierzystych w Poznaniu, przedstawiciel handlowy,
- **2001-2004** – Powiatowa Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Inowrocławiu, Oddział Laboratoryjny, asystent.
- **1997-2001** – CYKORIA S.A. Wierzchosławice, Dział Technologii i Kontroli Jakości, laborantka.

#### 4. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA

##### 4.1. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

Osiągnięciem będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl trzech jednotematycznych publikacji naukowych ujętych pod wspólnym tytułem:

#### **Identyfikacja stabilnych termicznie markerów peptydowych celem badań autentyczności mięsa i przetworzonych produktów mięsnych**

Osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl następujących publikacji:

1. **Montowska M.**, Rao W., Alexander M.R., Tucker G.A., Barrett D.A. 2014. Tryptic digestion coupled with ambient DESI and LESA mass spectrometry enables identification of skeletal muscle proteins in mixtures and distinguishes between beef, pork, horse, chicken and turkey meat. *Analytical Chemistry*, 86, 4479-4487. **Udział 65%**.

IF<sub>(2014)</sub> = 5,636

IF<sub>(5-year)</sub> = 5,922

MNiSW = 45 pkt.

2. **Montowska M.**, Alexander M.R., Tucker G.A., Barrett D.A. 2014. Rapid detection of peptide markers for authentication purposes in raw and cooked meat using ambient Liquid Extraction Surface Analysis Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 86, 10257-10265. **Udział 70%**.

IF<sub>(2014)</sub> = 5,636

IF<sub>(5-year)</sub> = 5,922

MNiSW = 45 pkt.

3. **Montowska M.**, Alexander M.R., Tucker G.A., Barrett D.A. 2015. Authentication of processed meat products by peptidomic analysis using rapid ambient mass spectrometry. *Food Chemistry*, 187, 297-304. **Udział 70%**.

IF<sub>(2015)</sub> = 4,052

IF<sub>(5-year)</sub> = 4,232

MNIŚW = 40 pkt.

- **Sumaryczny IF = 15,324**
- **Sumaryczny 5-letni IF = 16,076**
- **Suma punktów wg MNIŚW = 130**

Badania będące podstawą osiągnięcia zostały wykonane w ramach stypendium typu post-doc finansowanego przez Komisję Europejską w programie *People Marie Curie Actions Intra - European Fellowship (IEF)*, Call: *FP7-PEOPLE-2011-IEF*, Acronym *AUTHENTIMEAT*, "Authentication of meat products using ambient surface mass spectrometry", realizowanego w terminie od 11 czerwca 2012 do 10 czerwca 2014 roku na Uniwersytecie w Nottingham w Wielkiej Brytanii.

## **4.2. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników wskazanego osiągnięcia**

### **4.2.1. Wprowadzenie**

Zjawisko fałszowania żywności jest problemem globalnym, który przyciąga uwagę na szczeblu międzynarodowym i zwiększa obawy społeczne w zakresie jakości żywności. Producenci są zobowiązani do prawidłowego, zgodnego z obowiązującymi przepisami znakowania produktów żywnościowych. Uczciwe przekazywanie informacji jest istotnym ogniwem w zapewnieniu bezpieczeństwa łańcucha żywnościowego, szczególnie w przypadku przetworzonych produktów mięsnych, w których często jest trudno potwierdzić rodzaj i proporcje składników. Nagłaśniane w ostatnich latach przypadki nadużyć, z których najszerzym echem odbiła się afera z zastępowaniem wołowiny koniną w Europie (European Commission, 2014), ujawniły słabości systemu bezpieczeństwa żywności oraz przyczyniły się do spadku zaufania w przemyśle spożywczym. Ciągły monitoring jakości i bezpieczeństwa żywności jest obowiązkowy w Unii Europejskiej i w innych krajach, natomiast przypadki zafałszowań stają coraz bardziej wyrafinowane. Oznacza to, że metody analityczne wymagają ciągłego doskonalenia w celu zapewnienia skutecznego wykrywania oszustw.

Obecnie stosowane metody identyfikacji gatunkowej wykorzystują najczęściej techniki ELISA i PCR, które są najbardziej efektywne w przypadku analizy mięsa surowego lub prób umiarkowanie przetworzonych (Fajardo i in., 2010; Köppel i in., 2012). Podawana niższa efektywność tych metod w próbach wysoko przetworzonych jest spowodowana warunkami przetwarzania. Denaturacja termiczna i degradacja związków markerowych (typowo są to fragmenty DNA lub epitopy białka) oraz problemy reaktywności krzyżowej pomiędzy gatunkami dają niewiarygodne wyniki (Musto i in., 2014; Sakalar i in., 2012). Trudności niezawodnej analizy typu multipleks w jednym teście i obecność zanieczyszczeń DNA z innych organizmów niosą również poważne ograniczenia w przypadku analiz złożonych matryc żywnościowych.

Moje wcześniejsze badania prowadzone tradycyjną techniką elektroforezy dwukierunkowej (2-DE) wykazały, że struktura pierwszorzędowa niektórych białek mięśni szkieletowych jest stosunkowo odporna na procesy technologiczne oraz że są wśród nich białka specyficzne zarówno gatunkowo jak

i tkankowo, a zatem poszczególne białka mięśniowe mogłyby być potencjalnie zastosowane do analizy autentyczności/uwierzytelniania mięsa i produktów mięsnych (zał.4, poz. II.A.1, II.A.4, II.A.5). Uzyskane wyniki zwróciły moją uwagę na możliwości peptydomiki i nasunęły pomysł zastosowania w celu analizy autentyczności technik spektrometrii mas w warunkach otoczenia (*ambient mass spectrometry*) ze względu na ich wszechstronność, szybkość i łatwość zastosowania, które to cechy są niezmiernie istotne w przypadku analiz szybko psujących się produktów spożywczych.

W literaturze na przełomie lat 2010/2011 było niewiele informacji na temat specyficznych fragmentów peptydowych, które mogłyby być celem w analizie autentyczności produktów mięsnych, a techniki spektrometrii mas w warunkach otoczenia były tylko sporadycznie stosowane w analizie białek. Badania te przeprowadzono na białkach modelowych w stanie natywnym w celu ich sekwencjonowania lub analizy białkowych konformacji (Stokes i in., 2010; Miao i in., 2010). Od czasu wynalezienia w roku 2004 (Takats i in., 2004) techniki jonizacji desorpcyjnym elektrorozpyleniem (*Desorption Electrospray Ionization*, DESI-MS) ukazało się tylko kilka doniesień, w których analizowano białka w rzeczywistym materiale biologicznym, np. analiza wysuszonych kropli krwi (Takats i in., 2008). Niedawno wynalezioną technikę ekstrakcji cieczą z powierzchni (*Liquid Extraction Surface Analysis*, LESA) zastosowano do analizy wariantów hemoglobiny w wysuszonych kroplach krwi (Kertesz & Berkel, 2010).

Z powyższych względów po obronie doktoratu postanowiłam rozpocząć badania nad identyfikacją markerów peptydowych pochodzących z mięśni szkieletowych zwierząt hodowlanych, specyficznych gatunkowo i tkankowo, jak również odpornych na procesy technologiczne stosowane w przetwórstwie mięsa, przy użyciu wyżej wspomnianych technik spektrometrii mas DESI-MS i LESA-MS. W tym celu, w porozumieniu z prof. Davidem Barrettem, prof. Morganem Alexandrem i prof. Gregorym Tuckerem z Uniwersytetu w Nottingham, złożyłam w konkursie *People Marie Curie Actions Intra-European Fellowships* (IEF), Call: FP7-PEOPLE-2011-IEF, wniosek o dwuletnie stypendium indywidualne na realizację projektu "Authentication of meat products using ambient surface mass spectrometry", akronim *AUTHENTIMEAT*. Wniosek otrzymał bardzo wysoką punktację, na podstawie której Komisja Europejska podjęła o decyzję finansowaniu badań.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu *AUTHENTIMEAT* są podstawą niniejszego osiągnięcia. Moim celem badawczym była identyfikacja specyficznych/unikalnych peptydów, tzw. markerów autentyczności, i opracowanie metody badania autentyczności mięsa i przetworzonych produktów mięsnych przy użyciu spektrometrii mas w warunkach otoczenia. Metoda ta miała na celu wykrywanie markerów peptydowych bez zastosowania dodatkowego oczyszczania i frakcjonowania chromatograficznego. Do badań wykorzystyłam mięso i produkty mięsne wyprodukowane z udziałem wołowiny, koniny, wieprzowiny oraz drobiu. Przedstawione w osiągnięciu wyniki badań dotyczyły trzech następujących zakresów badawczych:

- i. zastosowania po raz pierwszy dwóch metod spektrometrii mas w warunkach otoczenia, a mianowicie:
  - jonizacji desorpcyjnym elektrorozpyleniem (*Desorption Electrospray Ionization*, DESI-MS), oraz
  - ekstrakcji cieczą z powierzchni próby (*Liquid Extraction Surface Analysis*, LESA-MS)

- do bezpośredniej identyfikacji białek mięśni szkieletowych i oceny możliwości ich aplikacji w celu weryfikacji autentyczności mięsa różnych gatunków,
- ii. identyfikacji markerów peptydowych w mięsie surowym i gotowanym przy użyciu metody LESA-MS,
  - iii. analizy autentyczności przetworzonych produktów mięsnych w oparciu o stabilne termicznie markery peptydowe.

#### **4.2.2. Zastosowanie technik spektrometrii mas w warunkach otoczenia do identyfikacji białek mięśni szkieletowych i ocena możliwości ich aplikacji w celu weryfikacji autentyczności mięsa różnych gatunków.**

W pierwszym początkowym etapie badań dokonano optymalizacji stosowanych metod analizując pojedyncze białka standardowe i ich mieszaniny, zawierające do pięciu białek mięśni szkieletowych (mioglobinę, troponinę C, aktynę, BSA i tropomiozynę). Białka te zostały osadzone na powierzchni płytki polimerowej i były trawione in-situ trypsyną. Za najbardziej efektywny skład roztworu rozpylającego stosowanego do desorpcji (DESI-MS) oraz ekstrakcji białek cieczą (LESA-MS) uznano mieszaninę acetonitryl/woda/kwas mrówkowy (50:50:1). Dodanie niewielkiej ilości tego ostatniego zwiększyło wydajność jonizacji. Otrzymano złożone widma masowe podobne do widm otrzymywanych techniką ESI (elektrozpylania), z przewagą jonów pojedynczo i podwójnie naładowanych. Zgodnie z oczekiwaniami, złożoność widm rosła w miarę zwiększania ilości składników białkowych, jednak nawet w widmach pochodzących z roztworów pięcioskładnikowych uzyskano wiele jonów diagnostycznych o wysokiej intensywności i dobrym stosunku sygnału do szumów.

Zaobserwowano istotne różnice pomiędzy analizami DESI-MS i LESA-MS, a mianowicie:

- a) intensywność jonów otrzymywana techniką LESA-MS była o jeden do dwóch rzędów wielkości wyższa w porównaniu z analizą DESI-MS tych samych próbek,
- b) bardziej stabilny i spójny poziom sygnału obserwowano za pomocą LESA-MS,
- c) za pomocą LESA-MS otrzymywano więcej jonów wielokrotnie naładowanych w całym zakresie widm, a mniejszą ilość jonów ogółem powyżej  $m/z$  1000 w porównaniu z DESI-MS,
- d) analiza DESI-MS z kolei wykazała więcej pojedynczo naładowanych jonów i konsekwentnie więcej jonów w regionie  $m/z$  1000-1600.

W rezultacie stwierdzono wyraźnie wyższą efektywność LESA-MS, która może być wynikiem lepszej efektywności procesu ekstrakcji próby z analizowanej powierzchni i zredukowanych strat materiału w porównaniu z zastosowaniem desorpcyjnej techniki DESI. Pojawienie się w LESA wyższej liczby wielokrotnie naładowanych peptydów wskazuje na różnice w mechanizmie powstawania jonów. LESA wykorzystuje system z nanochipem do wprowadzania analitu do spektrometru mas, dlatego mechanizm jonizacji jest podobny do nanoESI-MS. Pomimo różnic w mechanizmach jonizacji, identyfikacja białek i sekwencjonowanie peptydów de novo w złożonych mieszaninach białek była możliwa za pomocą obu tych metod, jednakże technika DESI generowała mniejszą stabilność sygnału, skutkując mniej wydajnym procesem desorpcji, choć wystarczającym do poprawnej identyfikacji białek w analizowanych mieszaninach.

Na podstawie uzyskanych widm DESI-MS i LESA-MS strawionych ekstraktów białek mięśniowych, zidentyfikowano analizowane białka z dobrym współczynnikiem pokrycia sekwencji ( $\geq 45\%$ ), co wskazało, że optymalizowany proces trawienia przebiegał w sposób efektywny. Białka zidentyfikowano techniką peptydowego odcisku palca (*Peptide Mass Fingerprinting*, PMF) w oparciu o wartości  $m/z$  jonów monoizotopowych przy wykorzystaniu serwera MASCOT i bazy NCBI nr (*National Center for Biotechnology Information, non-redundant*). Wynik MASCOT mieścił się w granicach 72-208 (gdzie  $>70$  był istotny;  $p < 0,05$ ). Pokrycie sekwencji otrzymane techniką LESA-MS było wyższe w porównaniu z DESI-MS, z wyjątkiem aktyny, dla której wartości były podobne dla obu metod (49% i 48%).

Prawidłowość identyfikacji białek potwierdzono sekwencjonując kluczowe peptydy diagnostyczne za pomocą tandemowej spektrometrii mas (MS/MS). Typowymi diagnostycznymi przykładami widm fragmentacyjnych CID otrzymanymi z analizowanych białek były w przypadku mioglobiny jony o  $m/z$  735.77(1+) i 1378.92(1+), troponiny C jony o  $m/z$  724.01(2+), 913.56(2+) i 1446.85(1+), aktyny 998.75(1+) i 1161.68(1+) oraz dla tropomiozyny jony o  $m/z$  875.63(1+), 880.01(2+), 1131.66(1+) i 1243.63(1+).

W kolejnym etapie podstawowym celem było ustalenie czy jest możliwe rozróżnienie pomiędzy pięcioma rodzajami mięsa, mianowicie wołowiną, koniną, wieprzowiną oraz mięsem kurczaka i indyka za pomocą metod DESI-MS i LESA-MS. Zaobserwowano, że uśrednione widma masowe otrzymane ze strawionych ekstraktów surowego mięsa z różnych gatunków były bardzo podobne. Jednakże, mimo powierzchownych podobieństw widma zawierały również pewną liczbę mniej intensywnych jonów, które okazały się odpowiedzialne za jednoznaczną dyskryminację pięciu rodzajów mięsa. LESA umożliwia ustawienie dłuższego czasu akwizycji jonów w porównaniu z DESI, dlatego też okazała się być bardziej odpowiednia do analiz danych zależnych (*data-dependent analysis*, DDA), pozwalających na automatyczne sekwencjonowanie peptydów poprzez MS/MS i jednoczesną identyfikację dużej ilości peptydów. W rezultacie przeprowadzonych analiz DDA MS/MS liczba zidentyfikowanych białek wyniosła od 15 do 29 w zależności od próbki. Były wśród nich najbardziej liczne białka obecne w mięśniach szkieletowych, takie jak miozyna, aktyna, tropomiozyna, troponina, mioglobina, GAPDH, aldolaza fruktozo-bisfosforanu, fosforylaza glikogenu, anhidraza węglanowa oraz beta-enolaza.

Szczegółową analizę różnicowania pomiędzy próbkami wykonano za pomocą wielowymiarowej analizy danych (*multivariate data analysis*, MVA, SIMCA-P) i modelu PCA-X (*principal component analysis-X*) aplikowanego do zbiorów danych DESI i LESA-MS otrzymanych z kompletnych ekstraktów mięśni. Pierwsze dwa komponenty modelu PCA-X różnicujące mięso wołowe i końskie pokazały wartości współczynnika całkowitej wariancji w wysokości 62% dla DESI-MS i 65% dla LESA-MS w zakresie  $m/z$  400-1000. Analizując wszystkie pięć rodzajów mięsa jednocześnie pierwsze dwa komponenty PCA-X dały wartości 45% całkowitej wariancji dla DESI-MS i 56% dla LESA-MS. Lepsze grupowanie otrzymano w przypadku zestawów danych zebranych techniką LESA-MS ze względu na wyższą powtarzalność i czułość metody. Aby zwiększyć separację pomiędzy grupami danych i zidentyfikować jony różnicujące poszczególne gatunki wykonano analizę na modelach OPLS-DA (*orthogonal partial least-squares discriminant analysis*). Zgrupowanie wariancji w jednym



przewidywanym komponencie dało skorelowane współczynniki zmienności pomiędzy wołowiną a koniną w wysokości 14% dla DESI-MS i 41% dla LESA-MS. Analiza OPLS-DA dla zestawu danych DESI-MS pięciu gatunków dała dobry model z wartościami  $R^2 = 0.97$  i  $Q^2 = 0.954$ , i zmiennością w wysokości 23%. Zestawy danych LESA-MS dały silniejszy model z wartościami  $R^2 = 0.988$  i  $Q^2 = 0.984$  oraz zmiennością 44%. Powyższe wyniki wykazały, że uzyskano bardzo dobrą separację w ramach wszystkich klastrów danych, a tym samym bardzo dobrą dyskryminację pomiędzy gatunkami. Wyniki opublikowano w czasopiśmie *Analytical Chemistry* (zał. 4, poz. I.B.1).

#### 4.2.3. Identyfikacja markerów peptydowych w mięsie surowym i gotowanym przy użyciu techniki LESA-MS.

W kolejnym etapie badań zidentyfikowano specyficzne markery peptydowe w mięsie surowym i gotowanym oraz dokonano selekcji peptydów stabilnych termicznie, o największym potencjale w analizie autentyczności przetworzonych produktów mięsnych. W tym celu skupiono się głównie na identyfikacji peptydów pochodzących z białek najliczniej reprezentowanych we włóknach mięśniowych (ciężkie łańcuchy miozyny – *myosin heavy chain* MHC, lekkie łańcuchy miozyny 1/3f – *myosin light chain* MLC 1/3f, *myosin light chain* MLC 2f, mioglobina), jako mających największy potencjał w analizie gatunku i jakości produktu. Białkową i gatunkową unikalność potencjalnego markeru potwierdzono poprzez poszukiwanie podobnych sekwencji peptydowych w formacie FASTA za pomocą narzędzi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). W wyniku przeprowadzonych eliminacji, z listy 80 peptydów zidentyfikowanych w próbach mięsa surowego i gotowanego z wykorzystaniem opracowanej metody DDA LESA-MS, wyselekcjonowano 23 stabilne termicznie peptydy, zidentyfikowane z istotnym wynikiem MASCOT, które są unikalne zarówno dla gatunku, jak i danego białka mięśniowego.

Kolejnym celem było oszacowanie limitu detekcji (LOD) opracowanej metody. Analizowano dwuskładnikowe mieszaniny składające się z gotowanej wołowiny z dodatkiem mięsa drugiego gatunku, tj. wieprzowiny, koniny, kurczaka i indyka w ilości 10%, 5%, 1% (w/w). Wielowymiarowa analiza danych (MVA) wykazała doskonałe zróżnicowanie mieszanin w trzech analizowanych wariantach ilościowych przy użyciu modeli PCA-X and OPLS-DA. Pierwsze trzy komponenty PCA-X pokazały 61% całkowitej wariancji dla zbiorów danych z prób wołowiny z 10% dodatkiem drugiego gatunku mięsa. Analiza OPLS-DA dała dobry model nawet dla mieszanin różniących się dodatkiem 1% mięsa innego gatunku z wariancją 27% i wartościami  $R^2 = 0.986$  i  $Q^2 = 0.925$ .

W ocenie LOD wzięto pod uwagę jony najbardziej intensywnych peptydów stabilnych termicznie wybranych wcześniej za pomocą DDA. Z 80 specyficznych jonów wybranych do sekwencjonowania przy użyciu LESA-MS/MS, 15 jonów wykryto w analizowanych mieszkankach mięsa, m.in. jony 508.43(2+) LVNDLTGQR i 818.64(2+) VVETMQTMLDAEIR specyficzne dla miozyny-1 pochodzącej z koniny, jon 563.67(2+) SALAHAVQSSR specyficzny dla miozyny-4 pochodzącej z wieprzowiny, jony 452.40(2+) GALEQTER, 687.57(2+) VAEQELLDATER i 854.13(2+) VLNASAIPEGQFMDSK specyficzne dla mięsa kurczaka i miozyny, jony 685.54(2+) ALGQNPTNAEINK i 756.94(2+) DQGTFFDFVEGLR specyficzne dla lekkich łańcuchów miozyny 1/3f pochodzących z mięsa kurczaka

oraz jon 694.42(2+) ALGQNPTNAEMNK specyficzny dla lekkich łańcuchów miozyny 1/3f pochodzących z mięsa indyka. W celu potwierdzenia tożsamości markerów peptydowych zidentyfikowanych w analizowanych mieszankach mięsa, widma fragmentacyjne analizowano indywidualnie porównując z widmami tych samych jonów macierzystych otrzymanych z prób jednogatunkowych.

Limit detekcji przy wykorzystaniu techniki LESA-MS/MS wyniósł 10% dla dodatku mięsa wieprzowego, koniny i mięsa z indyka do mięsa wołowego, a w przypadku mięsa z kurczaka granica wykrywalności wyniosła 5% (w/w). Dwa peptydy pochodzące z mięsa kurczaka zidentyfikowano w próbach o koncentracji 1% (w/w), jednakże okazały się one nie specyficzne dla gatunku. Poszukiwania narzędziami BLAST ich odpowiedników zidentyfikowanych u innych gatunków dały wynik pozytywny. Peptydy te uprzednio zidentyfikowano w zarodkowej izoformie miozyny (LYDQKLGK) i izoformie miozyny obecnej w mięśni sercowym bydła (NALAHALQSAR), a zatem nie można wykluczyć ich obecności w małych ilościach również w mięśniach szkieletowych, co mogło być przyczyną ich detekcji w mieszance 99:1. Natomiast uzyskano dobrą przestrzenną dystrybucję danych i wartości zmienności przy użyciu MVA w model OPLS-DA dla wszystkich zestawów danych mieszanek 99:1. Dowodzi to, że zastosowana metodologia ma duży potencjał różnicujący, umożliwiając dyskryminację mieszanek 99:1 na podstawie niewielkich różnic w intensywności jonów i składzie widm.

Efektom prac było wykazanie, że opracowana metoda może być stosowana do analizy przetworzonych i złożonych mieszanin peptydów, a zaproponowane podejście jest o wiele szybsze i prostsze niż w przypadku innych narzędzi do identyfikacji gatunkowej opartych na peptydomice. Wyniki opublikowano w czasopiśmie *Analytical Chemistry* (zał. 4, poz. I.B.2).

#### **4.2.4. Analizy autentyczności przetworzonych produktów mięsnych w oparciu o stabilne termicznie markery peptydowe.**

Uprzednio zoptymalizowaną metodę LESA-MS/MS zastosowano w celu detekcji i identyfikacji stabilnych termicznie markerów peptydowych w różnych przetworzonych produktach mięsnych typu wędliny i pasztety (łącznie 18 prób), zakupionych w supermarketach w Polsce i Wielkiej Brytanii. W tym etapie badań dokonano również porównania zidentyfikowanych izoform MHC i wyselekcjonowano stabilne termicznie peptydy unikalne dla szybko i wolno kurczliwych izoform MHC. W przetworzonych produktach zidentyfikowano te same najliczniej występujące białka miofibrylarne, które wcześniej wykryto w mięsie gotowanym, takie jak MHC, MLC, aktyna i tropomiozyna. Przykładowo w kiełbasie typu chorizo dominującymi izoformami MHC okazały się miozyna-1 (świnia, *Sus scrofa*) z wynikiem MASCOT 547 i miozyna-7 (świnia, *Sus scrofa*) z wynikiem MASCOT 190. Większość zidentyfikowanych markerów peptydowych stabilnych termicznie pochodzi z izoform MHC i MLC i są one unikalne zarówno dla danego gatunku zwierzęcia, jak i izoformy białka z której pochodzą. Spośród białek sarkoplazmatycznych źródłem markerów są GAPDH, mioglobina i beta-enolaza. Peptydy mioglobiny okazały się bardzo dobrymi markerami przetworzonego mięsa czerwonego, tj. wołowiny i koniny, natomiast peptyd pochodzący z GAPDH świni

WGDAGATYVVESTGVFTTMEK (1125.32<sup>2+</sup>), jest dobrym markerem dla produktów przetworzonych zawierających wieprzowinę. Przykładowo, w produkcie *potted beef* typu pasztet wykryto dwa markery mięsa wołowego: GQNVQQVVYAK (miozyna-7, *Bos taurus*) i EASGPINFTVFLNMFGEK (MLC2f, *Bos taurus*). W przeważającej mierze wyniki MASCOT były powyżej progu homologii lub identyczności, a wszystkie markery peptydowe zostały uszeregowane na pierwszym miejscu listy zgodnych peptydów prezentowanych przez MASCOT.

W dwóch produktach (kabanosy i parówki) stwierdzono obecność białek mleka. Wśród licznych peptydów pochodzących z białek mleka, dwa peptydy okazały się unikalne dla bydłej kazeiny alfa-S1 (HQGLPQEVLNENLLR i EPMIGVNQELAYFYPELFR). Wyniki te są zgodne z deklaracją producenta, ponieważ dodatek mleka lub sera został ujęty w wykazie składników na opakowaniu. W innym produkcie, mianowicie kielbasie końskiej, wykryto oprócz koniny wieprzowinę, ponieważ jednak w tym przypadku do wędliny nie była dołączona lista składników, to nie można było potwierdzić zafałszowania tego wyrobu. W sumie zidentyfikowano zestaw 25 peptydowych markerów autentyczności w różnego rodzaju wędlinach i pasztetach wyprodukowanych z wołowiny, wieprzowiny, koniny, mięsa kurczaka i indyka. Opracowana metoda pozwala na jednoczesną identyfikację białek i peptydów mięśni szkieletowych, jak również innych składników pochodzenia zwierzęcego, takich jak białka mleka, bezpośrednio w trawionych ekstraktach bez konieczności frakcjonowania chromatograficznego.

Stabilne termicznie peptydy unikalne dla szybko i wolno kurczliwych izoform MHC w przetworzonych produktach mięsnych zostały wyselekcjonowane po raz pierwszy. Zidentyfikowano sześć peptydów specyficznych dla MHC włókien szybko kurczliwych typu II (miozyna-1 ALEDQLSELK, miozyna-2 MEIDDLASNVETISK, miozyna-2 TLAFILFSGTPTGDSEASGGTK, miozyna-2 VVETMQTMLDAEIR, miozyna-4 SALAHAVQSSR, miozyna-2 TLAFILFSGAQTGEAEAGGK), jak również pięć peptydów specyficznych dla MHC włókien wolno kurczliwych typu I (miozyna-7 SAETEKEIALMK, GQNVQQVVYAK, GTLEDQIIEANPALEAFGNAK, MLSNLFANYLGADAPIEK, LLSNLFANYAGADTPVEK) pochodzących z mięsa wołowego, wieprzowego i koniny.

Częstsza detekcja peptydów specyficznych dla wolno kurczliwych izoform MHC niż peptydów pochodzących izoform MHC szybko kurczliwych sugeruje, że przetworzone produkty wieprzowe i wołowe będące przedmiotem badań zostały wyprodukowane głównie z mniejszych mięśni czerwonych lub pośrednich. W przypadku wcześniej analizowanych prób mięśni najdłuższych grzbietu (*m. longissimus dorsi*) bydła, koni i świni, który jest zbudowany głównie z włókien białych szybko kurczliwych, izolowane były z tych prób markery peptydowe należące do szybko kurczliwych izoform miozyny-1 (2X) i miozyny-4 (2B). W przypadku dwóch produktów rozdrobnionych, podobnych do pasztetów, mianowicie *potted beef* i *corned beef* stwierdzono obecność jedynie wolno kurczliwej miozyny-7. Peptyd GQNVQQVVYAK, unikalny dla miozyny-7 pochodzącej z wołowiny, został zidentyfikowany w obu tych produktach, ale z wynikiem MASCOT poniżej progu homologii. Może to wskazywać, że: (a) ilość mięsa w produkcie była niższa od deklarowanej zawartości, (b) produkty te zostały wyprodukowane z mięsa niższej klasy zawierającej dużą ilość tkanki łącznej i tłuszczowej, i/lub (c) mięso zostało zastąpione wysokim stopniu przez składniki pochodzenia nie mięsnego.

Uzyskane wyniki wskazują, że zdolność lub niezdolność do wykrycia markerów specyficznych białek i tkanek, takich jak peptydy pochodzące z izoform miozyny, mogą wskazywać na obecność w danym produkcie składników wysokiej lub niskiej jakości lub nawet zastąpienie pewnych składników innymi. Z uwagi na to, że miozyna jest białkiem występującym we włóknach mięśniowych w największej ilości, jej ilość stanowi 40-50% wszystkich białek mięśniowych, to markery pochodzące z izoform tego białka mogą być wskaźnikiem zawartości mięsa w produktach przetworzonych. Wyniki opublikowano w czasopiśmie *Food Chemistry* (zał. 4, poz. I.B.3).

### Podsumowanie

W wyniku powyższych badań zidentyfikowano zestaw markerów peptydowych stabilnych termicznie, które służą nie tylko jako markery identyfikacji gatunkowej, ale również mogą pomóc wyśledzić inne nielegalne praktyki powiązane z zastępowaniem składników mięsnych w różnego rodzaju przetworzonych produktach mięsnych wyprodukowanych z mięsa wołowego, wieprzowego, koniny oraz mięsa kurczaka i indyka. Badania przeprowadzono własną nowo opracowaną i szybką metodą przy zastosowaniu techniki LESA-MS/MS, która pozwoliła na radykalne uproszczenie całej procedury w porównaniu z tradycyjnymi metodami stosowanymi obecnie w peptydomice, poprzez wyłączenie etapów frakcjonowania przed i po etapie trawienia białka. Wyselekcjonowane markery peptydowe pochodzą z białek miofibrylarnych, sarkoplazmatycznych oraz mleka. Istotnym osiągnięciem było zidentyfikowanie, po raz pierwszy, w różnych przetworzonych produktach mięsnych sześciu markerów pochodzących z ciężkich łańcuchów miozyny typu II szybko kurczliwych i pięciu typu I wolno kurczliwych.

Wyniki badań opisane w niniejszym osiągnięciu były prezentowane w formie wykładów i referatów wygłoszonych na konferencjach naukowych o zasięgu międzynarodowym i krajowym (Zał. 4, poz. II.K.1–5).

### Wykaz cytowanej literatury

- European Commission. 2014. Outcome of the coordinated control plan with a view to establish the prevalence of fraudulent practices in the marketing of certain foods.  
<[http://ec.europa.eu/food/food/horsemeat/tests\\_results\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/horsemeat/tests_results_en.htm)>
- Fajardo, V., González, I., Rojas, M., Garcia, T., & Martín, R. 2010. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), 408–421.
- Kertesz, V.; Van Berkel, G. J. 2010. Fully automated liquid extraction-based surface sampling and ionization using a chip-based robotic nanoelectrospray platform. *J. Mass Spectrom.*, 45, 252–260.
- Köppel, R., Eugster, A., Ruf, J., & Rentsch, J. 2012. Quantification of meat proportions by measuring DNA contents in raw and boiled sausages using matrix-adapted calibrators and multiplex real-time PCR. *Journal of AOAC International*, 95(2), 494–499.
- Miao, Z.; Wu, S.; Chen, H. 2010. The study of protein conformation in solution via direct sampling by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 21, 1730–1736.

- Musto, M., Faraone, D., Cellini, F., & Musto, E. 2014. Changes of DNA quality and meat physicochemical properties in bovine supraspinatus muscle during microwave heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), 785–791.
- Sakalar, E., Abasiyanik, M. F., Bektik, E., & Tayyrov, A. 2012. Effect of heat processing on DNA quantification of meat species. *Journal of Food Science*, 77(9), N40–N44.
- Stokes, A. A.; Clarke, D. J.; Weidt, S.; Langridge-Smith, P.; Mackay, C. L. 2010. Top-down protein sequencing by CID and ECD using desorption electrospray ionisation (DESI) and high-field FTICR mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 289, 54–57.
- Takáts, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G. 2004. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, 306, 471–473.
- Takats, Z.; Koblíha, V.; Sevcik, K.; Novak, P.; Kruppa, G.; Lemr, K.; Havlicek, V. 2008. Characterization of DESI-FTICR mass spectrometry - from ECD to accurate mass tissue analysis. *J. Mass Spectrom.*, 43, 196–203.

## 5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

### 5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

W roku 1997 ukończyłam studia magisterskie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, broniąc pracę magisterską wykonaną w Zakładzie Mikrobiologii Wód i Biotechnologii pod kierunkiem prof. dr hab. Wojciecha Donderskiego. Praca dotyczyła określenia dynamiki rozwoju bakterii, promieniowców i grzybów oraz właściwości fizjologicznych bakterii w glebie upraw buraka cukrowego nawożonej mulczem z gorczycy i peluszką oraz obornikiem. Stwierdzono, że na poletku nawożonym obornikiem liczebność bakterii wzrosła średnio o 46%, natomiast na poletkach nawożonych mulczem z gorczycy i peluszką liczebność bakterii wzrosła odpowiednio o 56 i 60%. Nie stwierdzono wyraźnego wpływu nawożenia na liczebność promieniowców. Natomiast dodanie materii organicznej do gleby spowodowało kilkunastoprocentowy wzrost liczebności grzybów. W glebie wszystkich nawożonych poletkach wyraźnie wzrosła liczba bakterii amonifikacyjnych, denitryfikacyjnych i hydrolizujących białko. W glebie nawożonej obornikiem licznie rozwinęły się bakterie celulolityczne i pektynolityczne. W glebie nawożonej mulczem z gorczycy liczniejsze były bakterie mocznikowe i pektynolityczne, a w glebie nawożonej mulczem z peluszką liczniejsze były bakterie mocznikowe, celulolityczne i nitryfikacyjne.

Bezpośrednio po ukończeniu studiów podjęłam pracę w CYKORIA S.A. w Wierzchosławicach na stanowisku laborantki w Dziale Technologii i Kontroli Jakości. Zakład jest producentem koncentratów spożywczych, mieszanek przyprawowych oraz suszów warzyw i owoców. Do moich obowiązków należała kontrola produkcji, opracowywanie receptur nowych produktów wprowadzanych na rynek, a także analizy fizykochemiczne surowców, głównie zawartości popiołu i olejków eterycznych. W tym czasie postanowiłam poszerzyć wiedzę z zakresu technologii żywności i żywienia i pojęłam roczne studia podyplomowe o specjalności żywienie człowieka na ówczesnym Wydziale Technologii Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu, które ukończyłam w 1999 roku broniąc pracę

pt. *"Wybrane zagadnienia bezpieczeństwa żywności: żywność modyfikowana genetycznie, ekologiczna, radioaktywne skażenie żywności"*.

W 2001 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta w Powiatowej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Inowrocławiu, gdzie zajmowałam się badaniami żywności i kontrolą prawidłowości oznakowania produktów spożywczych oraz zdobywałam wiedzę w zakresie urzędowej kontroli żywności. W 2003 roku ukończyłam studia podyplomowe o specjalności bankowość na Wyższej Szkole Bankowej w Poznaniu. W tym okresie odbyłam szereg krótkoterminowych szkoleń, między innymi na następujące tematy: wykrywanie pałeczek Salmonella w wodach powierzchniowych (2004, WSSE Bydgoszcz), diagnostyka Salmonella i Shigella metodą lateksową (2003, WSSE Bydgoszcz), zasady pobierania próbek wody przeznaczonej do spożycia (2003, WSSE Bydgoszcz), kontrola jakości badań i walidacja metod mikrobiologicznych (2003, Gdańska Fundacja Wody).

Pracę w Instytucie Technologii Mięsa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu rozpoczęłam w kwietniu 2006 roku. Zatrudniona zostałam do realizacji projektu międzynarodowego, w ramach 6. Programu Ramowego UE, Akronim  $\Sigma$ Chain (zał. 4, poz. II.I.4), w którym powierzono mi zadania związane z tematyką badawczą dotyczącą kwestii autentyczności żywności. Oprócz zaangażowanie w część analityczną projektu byłam również odpowiedzialna za sprawy finansowe, przebieg audytów i sprawozdawczość z realizacji projektu. Równolegle prowadziłam badania dotyczące efektywności ekstrakcji białek z tkanki mięśniowej przy zastosowaniu metody fenolowej, z wykorzystaniem detergentu organicznego CHAPS oraz wycieku wymuszonego przez odwirowanie, a także badania mające na celu poszukiwanie wskaźników wysokiej jakości kulinarnej mięsa świń jednorazówek. Rezultaty przedstawiono na konferencjach naukowych (zał. 4, poz. III.B.2, III.B.4) oraz opublikowano (zał. 4, poz. II.D.7, II.D.9).

W 2007 roku podjęłam studia doktoranckie w Instytucie Technologii Mięsa na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. W tym okresie, w latach 2007-2008 opracowałam i wdrożyłam w Instytucie Technologii Mięsa metodę analiz białek techniką elektroforezy dwukierunkowej (2-DE) na dużych żelach o wysokiej rozdzielczości (20 x 26 cm). Pracę doktorską zatytułowaną *„Ocena zróżnicowania niskocząsteczkowych białek mięśni wybranych gatunków zwierząt celem badania autentyczności mięsa i produktów mięsnych”* wykonywaną pod kierunkiem prof. dr hab. Edwarda Pospiecha obroniłam w lutym 2012 roku.

Badania realizowałam w ramach dwóch projektów badawczych: projektu europejskiego  $\Sigma$ Chain (FOOD-FP6-518451, zał. 4, poz. II.I.1) oraz projektu badawczego własnego finansowanego przez MNiSW (N N312 205636, zał. 4, poz. II.I.2). Praca ta została wyróżniona przez Radę Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz zdobyła dwie nagrody: 1) nagrodę Prezesa Rady Ministrów za wyróżnioną rozprawę doktorską w roku 2012, 2) nagrodę Miasta Poznania za wyróżniającą się pracę doktorską w roku 2012.

Celem realizowanej pracy doktorskiej było porównanie ekspresji niskocząsteczkowych białek mięśni szkieletowych sześciu gatunków zwierząt rzeźnych, tj. bydła, świni, kurczaka, indyka, kaczki i gęsi, i wyselekcjonowanie białek różnicujących poszczególne gatunki, stabilnych w procesie dojrzewania oraz zachowujących swoje właściwości po obróbce termicznej, a także w produktach mięsnych po poddaniu typowym zabiegom technologicznym, takim jak peklowanie, wędzenie,

parzenie, podsuszanie. Porównano rozdziały 2-DE białek wyekstrahowanych z mięsa surowego z rozdziałami białek z produktów mięsnych i stwierdzono, że białka wyekstrahowane z produktów charakteryzowały się z reguły identyczną mobilnością elektroforetyczną jak w mięsie surowym. Stwierdzono bardzo duże podobieństwo, niemal identyczny rozkład białek, pomiędzy żelami referencyjnymi z surowej tkanki mięśniowej, a rozdziałami z produktów poddanych ww. zabiegom technologicznym. Pomimo denaturacji, białka nie uległy istotnej degradacji, a analizowane rozdziały nadal cechowały się specyficzną gatunkową.

Nawet w przypadku par blisko spokrewnionych gatunków jak kurczak i indyk oraz kaczka i gęś wystąpiły różnice w mobilności elektroforetycznej wybranych białek. Dostępne w bazie NCBI sekwencje izoform lekkich łańcuchów miozyny MLC1f i MLC2f zostały porównane przy pomocy programu CLUSTAL W2. Z przeprowadzonych porównań wynikało, że sekwencje aminokwasów MLC1f u bydła i świni różnią się w 2%, kurczaka i indyka w 3%, a różnice pomiędzy analizowanymi ssakami i ptakami mieszczą się w zakresie 14-15%. Z kolei w przypadku MLC2f świni i bydła te różnice wynoszą też 2%, natomiast w porównaniu z kurczakiem są nieco mniejsze, 9 i 11% odpowiednio. Porównując te wyniki z drogą migracji białek stwierdzono, że białka nawet o niewielkich (1-2%) różnicach w sekwencji miały różną mobilność elektroforetyczną i na tej podstawie można było dokonać identyfikacji gatunkowej metodą 2-DE. Różnice w mobilności elektroforetycznej nie były proporcjonalne do różnic w sekwencjach aminokwasów.

Badania wykazały, że identyfikacja gatunkowa w przetworzonych produktach mięsnych metodą 2-DE w oparciu o analizę pojedynczego białka lub jego izoformy nie jest możliwa. Natomiast wszystkie sześć gatunków można zidentyfikować w mieszankach mięs lub wyrobach w oparciu o równoczesną analizę wszystkich trzech izoform MLC (MLC1f, MLC2f i MLC3f) lub niezależnie na podstawie oceny pozostałych 22 wybranych białek, wśród których zidentyfikowano białka miofibrylarne, plazmy krwi, białka regulatorowe oraz metaboliczne. Stwierdzono, że na żelach 2-DE białka te tworzą charakterystyczny wzór, specyficzny dla każdego z analizowanych gatunków, na podstawie którego można identyfikować te gatunki w wyrobach wyprodukowanych z mieszanek mięs. Spośród wyselekcjonowanych białek miofibrylarnych i białek plazmy krwi specyficznych gatunkowo zidentyfikowano odpowiednio tropomodulinę 4 i troponinę T oraz albuminę i apolipoproteinę B. Wśród białek regulatorowych największe różnice obserwowano w przypadku peroksyredoksyny 6, białka choroby Parkinsona (DJ-1), galektyny 1, białek szoku cieplnego HSP27, HSP70.1, HSP70.9, aneksyny A6, białka wiążącego kwasy tłuszczowe (H-FABP), a wśród enzymów metabolicznych w przypadku syntazy ATP, fosfatazy fosfohistydyny (PHP), cytochromu b-c1, alfa-enolazy, beta-enolazy, GPDH-C, kinazy pirogronianowej, fosfatazy fosfoglikolanowej oraz flawoproteiny przenoszącej elektrony (alpha-ETF). Stwierdzono, że spośród analizowanych białek białka miofibrylarne (izoformy MLC, troponina T i tropomodulina) mają największy potencjał w badaniu autentyczności mięsa i produktów mięsnych, ponieważ są to białka charakterystyczne dla tkanki mięśniowej i charakteryzują się dużym zróżnicowaniem międzygatunkowym w strukturze pierwszorzędowej. Największe różnice międzygatunkowe w strukturze pierwszorzędowej wystąpiły w przypadku białek plazmy krwi, tj. albuminy surowiczej i apolipoproteiny B. W grupie białek regulatorowych największym zróżnicowaniem

charakteryzowały się HSP27 i H-FABP, natomiast wśród enzymów metabolicznych: syntaza ATP, cytochrom b-c1 podjednostka 1 i alfa-ETF.

Wyniki badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej były prezentowane w postaci komunikatów na konferencjach naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym. (zał. 4, poz. III.B.1, III.B.3, III.B.5–9). Rezultaty prac zostały opublikowane w czasopismach *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *Proteomics* i *Food Chemistry* (zał. 4, II.A.1, II.A.4, II.A.5). Zdołane doświadczenie i wiedza na temat możliwości badania autentyczności mięsa i produktów mięsnych została upowszechniona w trzech publikacjach przeglądowych w czasopismach *Food Reviews International*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *Acta Scientiarum Polonorum* (zał. 4, poz. II.A.2, II.A.3, II.D.8) i rozdziale w książce pt. "Food Authentication using Bioorganic Molecules" (zał. 4, poz. II.D.4).

## **5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora**

### **5.2.1. Analiza ekspresji białek nasion łubinu**

W ramach projektu badawczego własnego N N312 493340 (zał. 4, poz. II.I.3) pomogłam wdrożyć w Katedrze Biochemii i Analizy Żywności metodę elektroforezy dwukierunkowej. Badania miały na celu porównania ekspresji białek zapasowych nasion łubinu wąskolistnego (odmiany Bojar i Zeus) i żółtego (odmiany Lord i Parys), dwóch najważniejszych gatunków łubinu uprawianych w Polsce. W chwili obecnej szczegółowy profil białek rozdzielonych metodą 2-DE dostępny jest tylko dla nasion łubinu białego oraz istnieje tylko kilka prac opisujących częściowo profil białek łubinu wąskolistnego. Na uzyskanych obrazach elektroforetycznych w obrębie każdej z badanych odmian, stwierdzono wysokie, wynoszące średnio 80%, podobieństwo pokrycia plam białkowych. Międzygatunkowych różnice w ekspresji białka obserwowano głównie w środkowych partiach żeli 2-DE, tj. w zakresie pH 5-7. W wyniku analizy porównawczej, wyselekcjonowano łącznie 27 plam białek różnicujących badane gatunki w celu ich dalszej identyfikacji techniką spektrometrii mas (2-DE-MS/MS). W oparciu o uzyskane wyniki białka te zakwalifikowano do trzech frakcji białkowych, mianowicie  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -konglutyn. Obecność w próbach trzech frakcji konglutyn związana była z faktem, że nasiona łubinu zawierają w głównej mierze białka zapasowe, a stężenie białek katalitycznych, strukturalnych, regulatorowych i obronnych jest stosunkowo niewielkie. Mapy 2-DE wskazały na istotne różnice pomiędzy badanymi gatunkami nasion łubinu. Białka różnicujące wybrane gatunki znajdowały się głównie w obrębie frakcji  $\alpha$ - i  $\beta$ -konglutyn (zał. 4, poz. III.B.10). Wyniki zostały opublikowane w czasopismach *Journal of the Science of Food and Agriculture* i *European Food Research and Technology* (zał. 4, poz. II.A.9, II.A.10).

### **5.2.2. Ocena stopnia oksydacji białek mięsa wołowego**

Podczas procesów zarówno dojrzewania jak i dystrybucji mięsa wołowego zachodzą w nim istotne zmiany biochemiczne. Zmiany te, mają wpływ na poprawę bądź na pogorszenie jakości



produktu finalnego. System pakowania w modyfikowanej atmosferze (MAP) z wysoką zawartością tlenu ( $O_2$ ) około 80% zapewnia utrzymanie jasnoczerwonej barwy mięsa wołowego. Wysoka zawartość tlenu w atmosferze wypełniającej opakowanie sprzyja procesom oksydacji nie tylko tłuszczu, ale również białek, co ma negatywny wpływ na jakość mięsa. Ponadto wysokie stężenie tlenu może sprzyjać również agregacji białek, co przyczynia się do obniżenia kruchości i soczystości mięsa, a zwiększa wyciek oraz straty jakościowe i masowe. Dobór odpowiednich warunków i czasu przechowywania mięsa wołowego ze względu na stopień oksydacji białek i tłuszczu jest istotny nie tylko z punktu widzenia akceptacji konsumenta, ale również przemysłu mięsnego.

Badania prowadzone w ramach projektu UDAPOIG.01.03.01-00-204/09-11 (zał. 4, poz. II.1.6) miały na celu ocenę procesu oksydacji białek podczas przechowywania mięsa wołowego w modyfikowanej atmosferze z wysoką zawartością tlenu. W tym celu opracowano metodę oznaczania oksydacji białek mięsa z wykorzystaniem technik elektroforezy diagonalnej, SDS-PAGE i western blotting oraz dokonano oceny stopnia utlenienia białek na podstawie oceny międzycząsteczkowego sieciowania „*cross-linking*” ciężkich łańcuchów miozyny (MHC). Za szczególne osiągnięcie uważam opracowanie metody oksydacji białek z udziałem elektroforezy diagonalnej, która pozwala określić czy badane białko tworzy kompleksy poprzez mostki dwusiarczkowe w obecności związków utleniających, w tym przypadku tlenu.

Warunki utleniające, jakie powstają przy pakowaniu mięsa w atmosferze z wysoką zawartością tlenu, powodują oksydację białek, w tym miozyny, skutkującą jej sieciowaniem i polimeryzacją. W badaniach przeprowadzonych za pomocą wszystkich trzech technik analitycznych uzyskano zbliżone wyniki wskazujące na udział miozyny w polimerach białek pochodzących z prób mięśni zapakowanych w atmosferze z wysoką zawartością tlenu. Analizy techniką spektrometrii mas potwierdziły, że białkiem sieciującym jest miozyna. Zjawisko to najsilniej wystąpiło w próbach pakowanych w systemie łączonym SKIN/MAP. Ponadto analizy wykazały, że nieco bardziej podatnym na zmiany oksydacyjne jest mięsień *biceps femoris* (zrazowa dolna) w porównaniu z mięśniem *longissimus dorsi* (rostbef).

Przeprowadzone badania wskazały, że pakowanie mięsa w atmosferze modyfikowanej z 80% zawartością tlenu spowodowało powstawanie polimerów białkowych o wysokich masach cząsteczkowych. Zjawisko to obserwowano nie tylko w przypadku zastosowania MAP jako jedynej metody pakowania, ale również wówczas, gdy zastosowano je po pakowaniu mięsa przy wykorzystaniu technologii próżniowej SKIN. Zastosowanie MAP po SKIN skutkowało powstawaniem największych pasm odpowiadających polimerom białek na rozdzielach elektroforetycznych. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska mógł być bardziej zaawansowany stopień dojrzałości mięśni, które po 14 dniach przechowywania pakowano w MAP. Wyniki opublikowano w czasopiśmie *Meat Science* (zał. 4, poz. II.A.8).

### 5.2.3. Analiza ilościowa białek w oparciu o stabilne termicznie markery peptydowe

Moje zainteresowania badawcze nad białkami kierują się także w stronę możliwości ich analizy ilościowej. Badania są prowadzone w ramach projektu badawczego SONATA UMO-

3/11/D/NZ9/02632 (zał. 4, poz. II.1.7), którego jestem kierownikiem. W ostatnich latach zostały szeroko nagłośnione na świecie problemy niedostatecznej kontroli i ograniczonej możliwości analizy ilościowej w przetworzonych produktach mięsnych. Chociaż technika LC-MS jest z powodzeniem stosowana w analizie białek w złożonych mieszaninach, to prace te zostały dotychczas zdominowane przez analizy jakościowe. Badania ilościowe białek są ograniczone do niewielu ośrodków w Europie, zwłaszcza w nauce o mięsie. Dlatego też celem moich badań jest opracowanie metody ilościowej oznaczania białek mięśni szkieletowych w złożonych matrycach żywnościowych w oparciu o wybrane stabilne termicznie markery peptydowe przy użyciu technik spektrometrii mas w warunkach otoczenia (spektrometrii mas z infuzją przy użyciu czipu) oraz spektrometrii mas w połączeniu z chromatografią cieczową (nanoLC-MS). W celu realizacji powyższych zadań podjęłam współpracę z prof. dr hab. Piotrem Kachlickim z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu oraz dr hab. Emilią Fornal z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Wysoka temperatura wpływa na zmiany konformacyjne struktury II+IV-rzędowej białek. Chociaż denaturacja termiczna nie wpływa na zmiany w strukturze I-rzędowej białek, to powoduje utratę rozpuszczalności (tj. wzrost hydrofobowości na powierzchni białka) oraz ich agregację. Tworzenie i nierozpuszczalność białkowych agregatów może mieć negatywny wpływ na trawienie enzymatyczne i w efekcie na współczynnik pokrycia sekwencji w analizie proteomicznej, natomiast całkowite strawienie analizowanego materiału jest niezbędne w opracowaniu efektywnej metody ilościowej. Dotychczas przeprowadzone prace wykazały wysoki stopień agregacji białek mięsa ogrzewanego w temperaturze  $>100^{\circ}\text{C}$  oraz niższy współczynnik pokrycia sekwencji białek analizowanych techniką spektrometrii mas w porównaniu z mięsem surowym. W celu zwiększenia współczynnika pokrycia sekwencji białek zdenaturowanych termicznie zastosowano ekstrakcję z dodatkiem mocznika oraz chemiczną redukcję i alkilację, które powodują rozpad agregatów i zabezpieczają przed ponownym tworzeniem się mostków disulfidowych w trakcie etapu trawienia, w efekcie reszty lizyny i argininy są lepiej wyeksponowane na trawienne działanie trypsyny.

Jednym z celów projektu jest również ocena zastosowania trawienia trypsyną przy użyciu mikrofal w celu znacznej redukcji czasu trawienia i przyspieszenia proteolizy białka. W metodach konwencjonalnych w celu prawidłowej identyfikacji białek i peptydów czas potrzebny do całkowitego strawienia próby wynosił przeciętnie 6-18 h w  $37^{\circ}\text{C}$ . We wcześniejszych publikacjach opisano pozytywny wpływ działania mikrofal na szybkość trawienia standardów białek, takich jak BSA, lizozym, cytochrom c, mioglobina oraz rekombinowane ludzkie przeciwciało monoklonalne w osoczu. Badania przeprowadzone w ramach projektu wykazały, że nawet krótka ekspozycja 20 s i 40 s na promieniowanie mikrofalowe skraca czas potrzebny do trawienia próby gotowanej wołowiny do 1 h. Mimo, że białka były trawione do poziomu krótkich sekwencji peptydowych, to jednak w przypadku trawienia prób z udziałem mikrofal obserwowano znacznie większy udział peptydów nie do końca strawionych. Szczegółowa analiza uzyskanych sekwencji peptydowych miozyny-1 wykazała, że procent peptydów z pominiętymi miejscami trawienia zwiększył się z 11,4% do 45,2% i od 14,9% do 32,7%, w przypadku badanych prób wołowiny i wędlin traktowanych promieniowaniem mikrofalowym.

Interesującym jest fakt, iż mimo niekompletności trawienia przy udziale mikrofal, była możliwa detekcja sześciu najbardziej intensywnych markerów peptydowych, które pozwoliły na jednoznaczną

identyfikację przetworzonego mięsa pochodzącego z badanych gatunków. Były to peptydy HPSDFGADAQAAMSK (bydło, mioglobina), EASGPINFTVFLNMFGEK (bydło, MLC2f), VEADIAGHGQEVLR i HGTVVLTALGGILK (koń, mioglobina), VVETMQTMLDAEIR (koń, miozyna-2), GTLEDQIIEANPALEAFGNAK (koń, miozyna-7). Peptyd SALAHAVQSSR unikalny dla dwóch izoform miozyny pochodzących z wieprzowiny, tj miozyny-1 i miozyny-4, został zidentyfikowany z wynikiem MASCOT poniżej progu homologii, jednakże większość jonów *y* i *b* była obecna w widmie peptydów, ale z niską intensywnością. Uzyskane wyniki tego etapu badań wskazują, że trawienie przy udziale mikrofal może być stosowane w celu skrócenia czasu przygotowania próby tylko w połączeniu z analizą jakościową białek. Wyniki badań dotyczące tego zagadnienia zostały zaprezentowane na konferencjach (zał. 4, poz. III.B.11, III.B.12) oraz opublikowane w czasopiśmie *Food Technology and Biotechnology* (zał. 4, poz. II.A.7).

Obecnie trwają prace nad selekcją kluczowych peptydów mięśni szkieletowych odpornych na obróbkę termiczną, jak również markerów peptydowych specyficznych dla dodatków nie mięsnych obecnych w przetworzonych produktach mięsnych, takich jak białka sojowe, białka mleka i białka jaja przy użyciu metod nanoLC-MS/MS oraz spektrometrii mas z infuzją przy użyciu czipów. Wyselekcjonowano łącznie około 120 markerów peptydowych, z których te o największym potencjale są w kolejnym etapie testowane do opracowania metody ilościowej analizy białek przy udziale markerów znakowanych izotopowo. Testowana jest również metoda ilościowa bez konieczności stosowania znaczników. Wyniki prowadzonych badań zaprezentowano w postaci komunikatów i referatów na konferencjach naukowych o zasięgu międzynarodowym i krajowym (zał. 4, poz. II.K.6, II.K.7, III.B.14–16). W czasopiśmie *Food Chemistry* przyjęto do druku pierwsza z cyklu publikacji na temat analizy ilościowej białek w produktach mięsnych (zał. 4, poz. II.A.11). Planowane jest utworzenie/poszerzenie zespołu zajmującego się analizą autentyczności w oparciu o analizę białek.

## 6. PODSUMOWANIE

W czasie mojej pracy zawodowej uczestniczyłam w siedmiu projektach badawczych i współpracowałam z zespołami naukowców z różnych uczelni. Efektem prac są publikacje w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Mój całkowity dorobek naukowy prezentowany w Załączniku 4 i obliczony według punktacji MNiSW wynosi **578 punktów** (w tym 130 stanowi podstawę wniosku habilitacyjnego). Sumaryczny *Impact Factor* publikacji naukowych według bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **42,036**. Wartość wskaźnika Hirscha obliczona na podstawie bazy Web of Science wynosi **6**, natomiast liczba cytowań z pominięciem autocytowań **90**. Szczegółowe zestawienie punktacji artykułów opublikowanych w czasopismach zagranicznych i krajowych przedstawiono poniżej w tabeli 1, a zestawienie ze względu na rodzaj aktywności w tabeli 2. Zestawienie ogólnej liczby cytowań prac twórczych przedstawiono w tabeli 3.

**Tabela 1. Punktacja artykułów opublikowanych w czasopiśmie zagranicznych i krajowych wg bazy Journal Citation Reports (JCR) i MNiSW**

Nazwa czasopisma / rok ukazania się pracy	IF <sup>a)</sup>	IF 5-letni	Suma pkt. wg MNiSW <sup>b)</sup>
Food Chemistry / 2017	4,052	4,232	40
Meat Science / 2017	2,801	3,246	40
Journal of the Science of Food and Agriculture / 2017	2,076	2,212	35
European Food Research and Technology / 2017	1,433	1,778	25
Food Technology and Biotechnology / 2016	1,179	1,570	25
Fleischwirtschaft / 2016	0,077	0,052	15
Analytical Chemistry / 2014 (2 prace)	11,272	11,844	90
Food Chemistry / 2013, 2015 (2 prace)	7,311	8,464	80
Proteomics / 2012	4,132	3,666	35
Critical Reviews in Food Science and Nutrition / 2012	4,820	6,455	45
Journal of the Science of Food and Agriculture / 2011	1,436	2,212	35
Food Reviews International / 2011	1,447	2,598	30
Polish Journal of Food and Nutrition Sciences /2007, 2009	-	-	30
Acta Scientiarum Polonorum Technol. Aliment. / 2007	-	-	15
Przemysł Spożywczy / 2016, 2017 (2 prace)	-	-	24
Monografie i opracowania książkowe	-	-	14
<b>Razem</b>	<b>42,036</b>	<b>48,329</b>	<b>578</b>

<sup>a)</sup> sumaryczny Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy;

<sup>b)</sup> liczba punktów wg aktualnego wykazu czasopism naukowych MNiSW z dnia 09.12.2016.

**Tabela 2. Zestawienie dorobku naukowego ze względu na rodzaj aktywności**

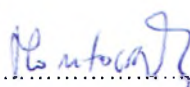
Rodzaj aktywności	Ilość	IF <sup>a)</sup>	Punkty MNiSW
Prace oryginalne	13	35,692	435
Prace przeglądowe	6	6,344	129
Rozdziały w książkach wydanych za granicą	3	-	10
Rozdziały w książkach wydanych w kraju	3	-	4
Referaty na konferencjach	7	-	-
Komunikaty na konferencjach międzynarodowych	12	-	-
Komunikaty na konferencjach krajowych	4	-	-
<b>Razem</b>	<b>48</b>	<b>42,036</b>	<b>578</b>

<sup>a)</sup> sumaryczny Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy.

**Tabela 3. Zestawienie ogólnej liczby cytowań prac twórczych na dzień 8 czerwca 2017 roku**

Liczba cytowań wg bazy		h-index wg bazy	
Web of Science	Scopus	Web of Science	Scopus
110 (z pominięciem autocytowań 90)	117 (z pominięciem autocytowań 99)	6	7

Poznań, dnia 08 czerwca 2017 r.

  
.....  
podpis