



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Nauk o Zwierzętach

Piotr Tomasz Kostusiak

**Zależność między genami kandydującymi  
a kształtowaniem się potencjału oksydacyjnego  
mięsa wołowego**

Relationship between candidate genes and the shaping  
of oxidative potential in beef

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem:

Dr hab. Kamila Puppel, prof. SGGW

Instytut Nauk o Zwierzętach

Katedra Hodowli Zwierząt

Warszawa, 2024



### Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 14.11.2024

Czytelny podpis promotora 

### Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 14.11.2024

Czytelny podpis autora rozprawy Kesturisk Piotr





## Spis treści

Streszczenie .....	7
Summary.....	11
Wykaz zastosowanych skrótów.....	15
Zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej pt. „Zależność między genami kandydującymi, a kształtowaniem się potencjału oksydacyjnego mięsa wołowego” .....	17
1. Wstęp.....	18
1.1 Charakterystyka ras .....	18
1.2 Krzyżowanie towarowe oraz wypierające.....	20
1.3 Geny kandydujące kształtujące jakość mięsa wołowego .....	21
1.3.1 DGAT1 acetylotransferaza diacyloglicerolowa 1 .....	21
1.3.2 SCD1 desaturaza 1 stearylo CoA .....	22
1.3.3 LEP leptyna .....	22
1.3.4 SREBF1 .....	23
1.3.5 Tyreoglobulina (TG) .....	23
1.4 Zjawisko stresu oksydacyjnego .....	24
1.5 Markery stresu oksydacyjnego .....	25
1.5.1 Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) .....	25
1.5.2 Peroksydaza glutationowa (GPx) .....	25
1.5.3 Reduktaza glutationowa (GluRed) .....	26
1.5.4 Dialdehyd malonowy (MDA).....	27
1.6 Kwasy tłuszczowe .....	27
1.7 Bioaktywne składniki frakcji białkowej .....	28
1.7.1 Anseryna.....	28
1.7.2 Karnozyna.....	29
1.7.3 Koenzym Q10.....	29
1.7.4 Tauryna.....	30
1.7.4 Kreatyna .....	30
1.7.5 Kreatynina .....	31
1.8 Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach .....	31
2. Hipotezy badawcze, cel i zakres pracy .....	33

3. Materiały i metody .....	36
3.1 Finansowanie i konsorcjum .....	36
3.2 Materiał badawczy .....	36
3.3 Metody badawcze .....	39
3.4 Analiza statystyczna (P2, P3, P4) .....	43
4. Wyniki.....	45
5. Podsumowanie i Wnioski.....	55
6. Bibliografia .....	60
7. Zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej pt. „Zależność między genami kandydującymi, a kształtowaniem się potencjału oksydacyjnego mięsa wołowego” oraz oświadczenia współautorów publikacji .....	66

## Streszczenie

Badania zostały zrealizowane w ramach projektu “ERA NET SUSAN: Increasing productivity, resource efficiency and product quality to increase the economic competitiveness of forage and grazing based cattle production systems”. Projekt zrealizowano w ramach konsorcjum jednostek naukowych Newcastle University, Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, Swedish University of Agricultural Sciences, Research Institutes of Sweden, Kiel University, University of Padova. Wyniki badań opublikowano w postaci 1 pracy przeglądowej (publikacja P1) oraz 3 prac badawczych opartych na 5 rasach bydła, w których łączna liczebność zwierząt wyniosła 237 sztuk, w tym doświadczenie 1 (publikacja P2): polska holsztyńsko-fryzyjska (16), limousine (18), charolaise (17), hereford (16); doświadczenie 2 (publikacja P3): holsztyńsko-fryzyjska (45) oraz mieszańce F1 charolaise×holsztyńsko-fryzyjska (60) oraz doświadczenie 3 (publikacja P4): hereford (65).

W pierwszej publikacji (P1) dokonano przeglądu literatury dotyczącej tematyki polimorfizmu pojedynczych nukleotydów i ich roli w osiąganiu postępu genetycznego na 4 genach kandydujących takich jak miostatyna (MSTN), tyreoglobulina (TG), kalpaina (CAPN) oraz kalpastatyna (CAST). W przeglądzie literatury uwzględnionych zostało 130 pozycji literatury z zakresu hodowli bydła mięsnego, polimorfizmu genów, ich wpływu na kształtowanie jakości mięsa wołowego oraz zdrowotności zwierząt. Analiza literatury wykazała istotną rolę polimorfizmu omawianych genów w nowoczesnej hodowli bydła przez wzgląd na ich wpływ na różnice produkcyjne oraz cechy jakościowe mięsa. W przypadku genu kodującego MSTN wykazano jego związek z hipertrofią mięśni, która determinuje cechę określaną jako dwupośladowość. Wpływa ona na zwiększony udział mięśni w tuszy oraz lepsze przyrosty, jednak może zwiększać częstotliwość występowania trudnych porodów. Stwierdzono również związek polimorfizmu genu TG ze stopniem marmurkowatości mięsa oraz udziałem tłuszczu w tuszy. Mięso o większej zawartości tłuszczu śródmięśniowego cechuje lepsza kruchość, soczystość i smakowitość, czyli istotne z punktu widzenia konsumenta cechy organoleptyczne. Ponadto, przegląd literatury z zakresu układu genów kalpaina-kalpastatyna wykazał ich istotny wpływ na cechy jakościowe mięsa. Polimorficzne formy obu genów wykazywały zróżnicowany stopień i tempo zmian poubojowych, co kształtuje kruchość, soczystość i smakowitość mięsa. Omówione geny stanowią istotne czynniki determinujące jakość mięsa, co jest szczególnie ważne w hodowli bydła mięsnego. Wykorzystanie wiedzy z zakresu polimorfizmu genów w pracach hodowlanych może w znaczącym stopniu poprawić cechy jakościowe mięsa, konformację tuszy oraz tempo przemian poubojowych.

W drugiej publikacji (P2) przeprowadzono badania wartości odżywczej oraz statusu antyoksydacyjnego mięsa wołowego trzech wiodących ras mięsnych (limousine, charolaise, hereford) utrzymywanych w Polsce w porównaniu do najpopularniejszej użytkowanej w kraju rasy mlecznej (polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej), przy zastosowaniu jednolitego programu żywieniowego. Badania przeprowadzono na próbkach mięśnia półbłoniastego oraz krwi pobranych od 67 buhajów, w tym 18 limousine (LM), 17 charolaise (CH), 16 hereford (HH) i 16 polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (PHF). Próbki te poddano szczegółowym analizom obejmującym podstawowy skład chemiczny, profil kwasów tłuszczowych, zawartość witamin rozpuszczalnych w tłuszczach i  $\beta$ -karotenu, poziom bioaktywnych składników frakcji białkowej oraz wskaźniki stresu oksydacyjnego (DAP, TAS, MDA). Wyniki wskazały na przewagę ras mięsnych w kształtowaniu się zawartości białka w analizowanym mięśniu oraz niższej zawartości kolagenu. Najwyższa zawartość tłuszczu wykazana została u rasy HH. Analiza funkcjonalnych kwasów tłuszczowych oraz witamin wykazała najwyższe poziomy w grupach LM i CH, co sugeruje ich wyższy potencjał antyoksydacyjny. Podobna zależność wykazana została również w przypadku kształtowania się TAS i DAP. Ponadto stężenie MDA było najniższe u LM i CH. Analiza 6. bioaktywnych składników frakcji białkowej, w każdym przypadku wykazała lepsze predyspozycje ras mięsnych względem PHF, co wskazuje na istotny związek rasy z potencjałem antyoksydacyjnym i wartością odżywczą mięsa wołowego.

W trzeciej publikacji (P3) zaprezentowano wyniki badań dotyczących wpływu polimorfizmu pojedynczych nukleotydów w pięciu genach: DGAT1, LEP, SCD1, SREBF1 oraz TG na cechy jakościowe mięsa wołowego takie jak stopień marmurkowatości, barwa, pH i smak. Badania przeprowadzono na próbkach mięśnia półbłoniastego oraz krwi pobranych od 105 walców, w tym 45 holsztyńsko-fryzyjskich (HF) i 60 holsztyńsko-fryzyjskich $\times$ charolaise (HF $\times$ CH). Analizy genetyczne wykonano za pomocą metod RFLP oraz PCR. Wyniki wskazały, że polimorfizmy w genach SCD1, LEP, TG i DGAT1 były związane z konformacją tuszy oraz cechami jakościowymi mięsa. Wykazano również związek SREBF1 z otłuszczeniem tuszy.

W publikacji czwartej (P4) przedstawiono wyniki badań dotyczące zależności między genami kandydującymi (DGAT1, LEP, SCD1) na poziom markerów stresu oksydacyjnego. Hipotezy badawcze zakładały wpływ tych genów na poziom wybranych wskaźników stresu oksydacyjnego, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza glutationowa (GR) oraz dialdehyd malonowy (MDA), a także na zawartość antyoksydantów frakcji białkowej. Badania przeprowadzono na próbkach mięśnia półbłoniastego oraz krwi pobranych od 65 buhajów rasy hereford. Analizowane parametry

obejmowały podstawowy skład chemiczny, zawartość bioaktywnych składników frakcji białkowej oraz mierniki stresu oksydacyjnego. Analizy genetyczne przeprowadzono metodami RFLP oraz PCR. Wyniki badań wskazały, że genotyp TT w genie DGAT1 był skorelowany z podwyższonymi poziomami MDA, co sugeruje nasilenie peroksydacji lipidów oraz uszkodzeń oksydacyjnych. Ponadto zwiększona aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak GluRed i GPx w tej grupie sugeruje uruchomienie mechanizmów kompensacyjnych w odpowiedzi na uszkodzenia oksydacyjne. Dodatkowo wyższe stężenia tauryny, karnozyny i anseryny w genotypie TT mogą wskazywać na ich rolę w ochronie przed stresem oksydacyjnym, podkreślając adaptacyjne mechanizmy obronne. W przypadku genu LEP, najwyższa aktywność SOD wykazana została w genotypie CT, podczas gdy najwyższy poziom TAS w genotypie TT. Różnice te mogą sugerować, że różne warianty genotypów LEP wpływają na regulację odpowiedzi antyoksydacyjnej w odmienny sposób, prawdopodobnie poprzez różnice w lokalizacji i funkcji izoform SOD. Natomiast analiza SCD1 wykazała, że genotyp AA charakteryzował się najwyższymi aktywnościami GluRed, GPx oraz SOD. Wyższe aktywności tych enzymów w genotypie AA wskazują na zwiększoną zdolność do efektywnego neutralizowania i zarządzania stresem oksydacyjnym.

Podsumowując, wyniki badań wykazały, że polimorfizmy w genach DGAT1, LEP, SCD1, SREBF1 oraz TG mają istotny wpływ na parametry jakości mięsa oraz na regulację odpowiedzi organizmu na stres oksydacyjny. Zidentyfikowano istotne korelacje między różnymi wariantami genotypów a poziomami markerów stresu oksydacyjnego oraz aktywnością enzymów antyoksydacyjnych.

**Słowa kluczowe:** bydło mięsne, jakość wołowiny, stres oksydacyjny, geny kandydujące



## Summary

The research was part of the project “*ERA NET SUSAN: Increasing productivity, resource efficiency and product quality to increase the economic competitiveness of forage and grazing based cattle production systems.*” The project was carried out within the consortium of scientific units of Newcastle University, Institute of Genetics and Animal Biotechnology of the Polish Academy of Sciences in Jastrzębiec, Swedish University of Agricultural Sciences, Research Institutes of Sweden, Kiel University, University of Padova. The results of the research were published as 1 review (publication P1) and 3 research papers based on 5 cattle breeds with a total of 237 animals, including experiment 1 (publication P2): Polish Holstein-Friesian (16), Limousine (18), Charolaise (17), Hereford (16); experiment 2 (publication P3): Holstein-Friesian (45) and F1 crossbred Charolaise×Holstein-Friesian (60); and experiment 3 (publication P4); Hereford (65).

The first publication (P1) reviewed the literature on the impact of genes commonly used in beef cattle breeding programs. The aim of the study was to discuss the importance of single nucleotide polymorphism in achieving genetic progress based on the literature based on the widely studied and described 4 candidate genes such as myostatin (MSTN), thyroglobulin (TG), calpain (CAPN) and calpastatin (CAST). The literature review included 130 positions in the field of beef cattle breeding, gene polymorphism, their impact on shaping beef quality and animal health. The literature review showed the important role of variation in the polymorphism of the genes in question in modern cattle breeding by considering their impact on production differences and meat quality traits. In the case of the gene encoding MSTN, its association with muscle hypertrophy was pointed out, which determines the trait known as double muscling. It influences an increased proportion of muscle in the carcass and better growth rates, but can increase the proportion of difficult births. The TG gene polymorphism was also found to be related to the degree of meat marbling and the proportion of fat in the carcass. Meat with higher intramuscular fat content has better tenderness, juiciness and palatability, which are important organoleptic traits. A literature review of the calpain-calpastatin gene system showed their significant influence on meat quality traits. Polymorphic forms of both of these genes showed varying degrees and rates of post-mortem changes, which shapes meat tenderness, juiciness and palatability. The genes discussed are important determinants of meat quality, which is particularly important in beef cattle breeding. The use of knowledge of the polymorphism of the discussed genes in breeding work can significantly improve its quality traits, carcass conformation and the rate of post-slaughter transformation.

The second publication (P2) investigated the nutritional value and antioxidant status of beef from three leading beef breeds (Limousine, Charolaise, Hereford) kept in Poland compared to the most popular dairy breed used in the country (Polish Holstein-Friesian), using the same feeding program. The aim of the study was to analyse differences in the antioxidant potential of meat, taking into account the activity of protective mechanisms against antioxidant stress. The study was conducted on semimembranosus muscle and blood samples collected from 67 bulls, including 18 Limousine (LM), 17 Charolaise (CH), 16 Hereford (HH) and 16 Polish Holstein-Friesian (PHF). These samples were subjected to detailed analyses including basic chemical composition, fatty acid profile, fat-soluble vitamin content, levels of bioactive components of the protein fraction and oxidative stress indices (DAP, TAS, MDA). The results indicated the advantages of meat breeds in the formation of the protein content of the analysed muscle and lower collagen content. The highest fat content was shown in the HH breed. Analysis of functional fatty acids and vitamins showed the highest levels in the LM and CH groups, suggesting their higher antioxidant potential. A similar relationship was also shown for the formation of TAS and DAP. In addition MDA concentrations were lowest in LM and CH. Analysis of the 6 bioactive components of the protein fraction, in each case, showed a better predisposition of meat breeds toward PHF, indicating a significant relationship between breed and antioxidant potential and nutritional value of beef.

The third publication (P3) presents the results of a study on the effect of single nucleotide polymorphisms in five genes: DGAT1, LEP, SCD1, SREBF1, and TG, on beef quality traits. The study was conducted on semimembranosus muscle and blood samples taken from 105 bullocks, including 45 Holstein-Friesian (HF) and 60 Holstein-Friesian×Charolaise (HF×CH). The aim of the study was to determine the relationship between candidate genes (DGAT1, LEP, SCD1, SREBF1 and TG) and traits related to meat quality such as degree of marbling, color, pH and flavor. We hypothesized the influence of these genes on meat quality traits. Genetic analyses were performed using RFLP and PCR methods. The results indicated that polymorphisms in the SCD1, LEP, TG and DGAT1 genes were associated with carcass conformation and meat quality traits. SREBF1 was also shown to be associated with carcass fatness.

The fourth publication (P4) presents the results of a study on the effect of single nucleotide polymorphisms in three candidate genes (DGAT1, LEP, SCD1) on the level of oxidative stress markers. The purpose of the study was to determine the relationship between candidate genes and the antioxidant potential of beef, including oxidative stress markers.



The research hypotheses included the influence of these genes on the levels of selected oxidative stress markers, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and malondialdehyde (MDA), as well as on the antioxidant content of the protein fraction. The study was conducted on semimembranosus muscle and blood samples collected from 65 hereford bulls. The parameters analysed included basic chemical composition, the content of bioactive components of the protein fraction and measures of oxidative stress. Genetic analyses were carried out using RFLP and PCR methods. The results indicated that the TT genotype in the DGAT1 gene was correlated with elevated levels of MDA, suggesting increased lipid peroxidation and oxidative damage. Moreover, the increased activity of antioxidant enzymes such as GluRed and GPx in this group suggests the activation of compensatory mechanisms in response to oxidative damage. In addition higher concentrations of taurine, carnosine and anserine in the TT genotype may indicate their role in protection against oxidative stress, highlighting adaptive defence mechanisms. In the case of the LEP gene, the highest SOD activity was shown in the CT genotype, while the highest TAS level was in the TT genotype. These differences may suggest that different variants of LEP genotypes affect the regulation of the antioxidant response differently, possibly through differences in the localization and function of SOD isoforms. In contrast, SCD1 analysis showed that the AA genotype had the highest GluRed, GPx and SOD activities. The higher activities of these enzymes in the AA genotype indicate an increased ability to effectively neutralize and manage oxidative stress.

In summary, the results of the study showed that polymorphisms in the DGAT1, LEP, SCD1, SREBF1 and TG genes have significant effects on meat quality parameters and the regulation of the body's response to oxidative stress. Significant correlations were identified between different genotype variants and levels of oxidative stress markers and antioxidant enzyme activity.

**Keywords:** beef cattle, beef quality, oxidative stress, candidate genes



## **Wykaz zastosowanych skrótów**

a14 – nasycenie koloru czerwonego mięsa po 14 dniach

a7 – nasycenie koloru czerwonego mięsa po 7 dniach

ATP – adenozyntrifosforan

b14 – nasycenie koloru żółtego mięsa po 14 dniach

b7 – nasycenie koloru żółtego mięsa po 7 dniach

BB – rasa belgijska biało-błękitna

CAPN – kalpaina

CAST – kalpastatyna

CH – rasa charolaise

CLA – sprzężony kwas linolowy

CoQ10 – koenzym Q10

DAP – stopień ochrony antyoksydacyjnej

Del – delecja

DGAT1 – diacyloglicerol-O-acylotransferaza

DHA – kwas dokozaheksaenowy

DM – podwójne umięśnienie

DM\_LWG – przyrost masy ciała na suchej masie

EPA – kwas eikozapentaenowy

F1 – pierwsze pokolenie

GDF – czynnik wzrostu i różnicowania

GluRed – reduktaza glutationowa

GPx – peroksydaza glutationowa

GR – reduktaza glutationowa

GSH – glutation

HH – rasa hereford

IMF – tłuszcz śródmięśniowy

L14 – jasność mięsa po 14 dniach

L7 – jasność mięsa po 7 dniach

LA – kwas linolowy

LEP – leptyna

LM – rasa limousine

LSM – średnia najmniejszych kwadratów

LWG – przyrost masy ciała  
MDA – dialdehyd malonowy  
MUFA – jednonienasycone kwasy tłuszczowe  
ME\_LWG – wykorzystanie energii metabolicznej na przyrost masy ciała  
MSTN – miostatyna  
n-3 – kwasy tłuszczowe omega-3  
n-6 – kwasy tłuszczowe omega-6  
pH 14 – wartość pH po 14 dniach  
pH 7 – wartość pH po 7 dniach  
PHF – rasa polska holsztyńsko-fryzyjska  
PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe  
RFT – reaktywne formy tlenu  
SCD1 – Stearylo-CoA desaturaza  
SE – błąd standardowy  
SFA – nasycone kwasy tłuszczowe  
SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu  
SOD – dysmutaza nadtlenkowa  
SREBF1 – czynnik transkrypcyjny wiążący elementy regulacyjne steroli  
TAS – całkowity status antyoksydacyjny  
TG – tyreoglobulina  
VA – kwas wakceniowy  
Wlthaw14 – utrata masy podczas rozmrażania (%) po 14 dniach  
Wlthaw7 – utrata masy podczas rozmrażania (%) po 7 dniach

## **Zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej pt. „Zależność między genami kandydującymi, a kształtowaniem się potencjału oksydacyjnego mięsa wołowego”**

Rozprawę doktorską pt.: „Zastosowanie transkryptomiki, epigenomiki i proteomiki w analizie ekspresji genów kształtujących potencjał antyoksydacyjny mięsa wołowego – zależność między genami kandydującymi a kształtowaniem się potencjału antyoksydacyjnego mięsa wołowego” stanowi zbiór czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

**P1. KOSTUSIAK P., SLÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., GRODKOWSKI G., PUPPEL K.**  
(2023). Polymorphism of genes and their impact on beef quality. *Current Issues in Molecular Biology*, 4749–4762.

**IF = 2,8; 70 pkt.**

**P2. KOSTUSIAK P., SLÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., SAKOWSKI T., PUPPEL K.**  
(2023). Relationship between beef quality and bull breed. *Animals*, 13, 1–16.

**IF = 2,7; 100 pkt.**

**P3. KOSTUSIAK P., BAGNICKA E., ŻELAZOWSKA B., ZALEWSKA M., SAKOWSKI T., SLÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., PUPPEL K.** (2024). Genetic markers related to meat quality properties in fattened HF and HF x Charolaise steers. *Genes*, 5, 1–16.

**IF = 2,8; 100 pkt.**

**P4. KOSTUSIAK P., BAGNICKA E., ŻELAZOWSKA B., ZALEWSKA M., SAKOWSKI T., SLÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., PUPPEL K.** (2024). Genotype-dependent variations in oxidative stress markers and bioactive proteins in Hereford bulls: associations with DGAT1, LEP, and SCD1 genes. *Biomolecules*, 14, 1309.

**IF = 4,8; 100 pkt.**

Łączny Impact Factor czterech publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi **IF = 13,1 i 370 pkt.** wg. punktacji Ministra Nauki. Punktacja jest zgodna z aktualnym wykazem Journal Citation Reports oraz komunikatem Ministra Nauki z dnia 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych.

## 1. Wstęp

Podstawę produkcji wołowiny w Polsce stanowią mięsne oraz mleczne rasy bydła, którym towarzyszą mieszańce otrzymywane głównie na drodze krzyżowania krów mlecznych z buhajami mięsnymi. Struktura pogłowia określająca liczebności ras mięsnych i mlecznych jest zmienna, co wynika głównie z uwarunkowań przyrodniczych i kulturowych (Grodzki i Przysucha, 2010; Bąk-Filipek, 2021). Polska stanowi jeden z nielicznych krajów na świecie, w których bydło mięsne stanowi około 1% populacji bydła ogółem (Solarczyk i wsp., 2020). Liczące w 2023 roku ponad 6,4 mln sztuk pogłowie (GUS, 2023) skupione jest na produkcji mlecznej, opierając się głównie na rasie polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, co wpływa na jakość produkowanej w kraju wołowiny (Bąk-Filipek, 2021). Pośród ras mięsnych w Polsce najpopularniejsza jest limousine, która stanowi ok. 70% populacji krów czystorasowych, a kolejne charolaise i hereford odpowiednio ok. 12% i ok. 6% (PZHiPBM, 2023).

### 1.1 Charakterystyka ras

Liczne pogłowie krów mlecznych, zwłaszcza rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, generuje znaczną liczbę cieląt, które mogą być przeznaczone do produkcji wołowiny. Niemniej jednak, doskonalenie w kierunku mlecznym rasy PHF skutkuje niższymi wynikami w klasyfikacji EUROP, mniejszymi przyrostami dobowymi oraz niższymi walorami odżywczymi mięsa. Opas buhajów, walców i jałówek ras mlecznych pozwala jednak na efektywne zagospodarowanie cieląt, które są mniej kosztochłonne w zakupie w porównaniu do czystorasowych cieląt ras mięsnych. Metoda ta może poprawić wskaźniki wartości opasowej oraz zwiększyć efektywność ekonomiczną gospodarstw.

Rasa limousine (LM), pochodząca z Francji, należy do czołowych ras bydła mięsnego na świecie i jest najczęściej użytkowaną rasą mięsną w Polsce. Dzięki wykorzystaniu jako bydło robocze, rasa limousine wykształciła pożądane cechy fenotypowe, które przekładają się na wysoką wydajność rzeźną oraz korzystny skład morfologiczny tuszy. Charakteryzuje się wysoką wydajnością poubojową, która sięga 67,5% (Jasiorowski i Przysucha, 2004; Grodzki, 2008), dużym udziałem mięśni w tuszy (75%), niską zawartością tłuszczu oraz szybkim tempem wzrostu, co czyni ją preferowaną rasą zarówno wśród producentów, jak i konsumentów poszukujących mięsa o niskiej zawartości tłuszczu. Jest to rasa późno dojrzewająca, a uśredniona masa urodzeniowa buhajków czystorasowych oscyluje w granicach 38 kg i 35 kg u jałówek. Problemy z wycieleniami nie są częste, a opiekuńczość jest dobra, jednak występują w przypadku tej rasy zachowania agresywne matek w stosunku do człowieka. Uśrednione

przyrosty dobowe masy ciała na 210 dni wynoszą 1010 g/dzień u jałówek i 1096 g/dzień u buhajków, przyrosty mogą jednak przekraczać 1300g dziennie. Masa ciała dojrzałych buhajów przekracza 1100 kg i 145 cm wysokości w kłębie, natomiast krowy 600 kg i 135 cm. Predyspozycje genetyczne tej rasy dają duże możliwości również w krzyżowaniu towarowym z krowami ras mlecznych, od których pozyskiwane cielęta mają masę urodzeniową i przyrosty dzienne zbliżone do czystorasowych odpowiedników (Kostusiak i wsp., 2019).

Rasa charolaise (CH), również wywodzi się z Francji i jest kolejnym przykładem rasy o wysokiej wydajności rzeźnej osiągającej 65%. W przeszłości była najczęściej wybieraną rasą mięsną w Polsce, jednak ze względu na większe ryzyko trudnych porodów oraz skłonność do otluszczenia tuszy przy nieodpowiednim żywieniu, jej popularność ustąpiła miejsca rasie LM. Obie te rasy mają potencjał do uzyskiwania wysokich mas ciała przy stosunkowo niskim poziomie otluszczenia, jednak ich pełny potencjał produkcyjny może być osiągnięty jedynie przy właściwym żywieniu i odpowiednich warunkach utrzymania (PZHiPBM, 2023). Jest to rasa późno dojrzewająca, a uśredniona masa urodzeniowa buhajków czystorasowych oscyluje w granicach 43 kg i 40 kg u jałówek, co w połączeniu ze stosunkowo dużą głową cieląt przy porodzie powoduje zwiększony udział trudnych porodów. Uśrednione przyrosty dobowe masy ciała na 210 dni wynoszą 1085 g/dzień u jałówek i 1185 g/dzień u buhajków, przyrosty mogą jednak sięgać 1300-1400 g/dzień, a nawet 1500g dziennie. Masa ciała dojrzałych buhajów przekracza 1300 kg i 150 cm wysokości w kłębie, natomiast krowy 700-900 kg i 140 cm (Jasiorowski i Przysucha, 2004; Kostusiak i wsp., 2019).

Brytyjska rasa hereford (HH) zyskała popularność dzięki swoim cechom umożliwiającym jej użytkowanie w ekstensywnych systemach produkcji. Rasa hereford wyróżnia się łatwością wycieleń, niskimi wymaganiami paszowymi oraz dużą odpornością na niekorzystne warunki środowiskowe. Rasa ta może być efektywnie utrzymywana na terenach o niskiej jakości pastwisk oraz przy ograniczonej interwencji człowieka, co znacząco obniża koszty produkcji. Mięso pochodzące od bydła rasy hereford względem ras francuskich charakteryzuje się wyższym poziomem marmurkowatości, czyli zawartością tłuszczu śródmięśniowego, co pozytywnie wpływa na jego walory organoleptyczne, zyskując uznanie wśród konsumentów na całym świecie (Jasiorowski i Przysucha, 2004). Jest to rasa wczesnie dojrzewająca, a uśredniona masa urodzeniowa buhajków czystorasowych oscyluje w granicach 35 kg i 32 kg u jałówek, czego efektem są łatwe porody nawet w trudnych warunkach chowu ekstensywnego. Uśrednione przyrosty dobowe masy ciała na 210 dni wynoszą 1000 g/dzień u jałówek i 1100 g/dzień u buhajków. Masa ciała dojrzałych buhajów sięga 1000 kg i 135 cm wysokości w kłębie, natomiast krów 550-600 kg i 130 cm (PZHiPBM, 2023). Potencjał

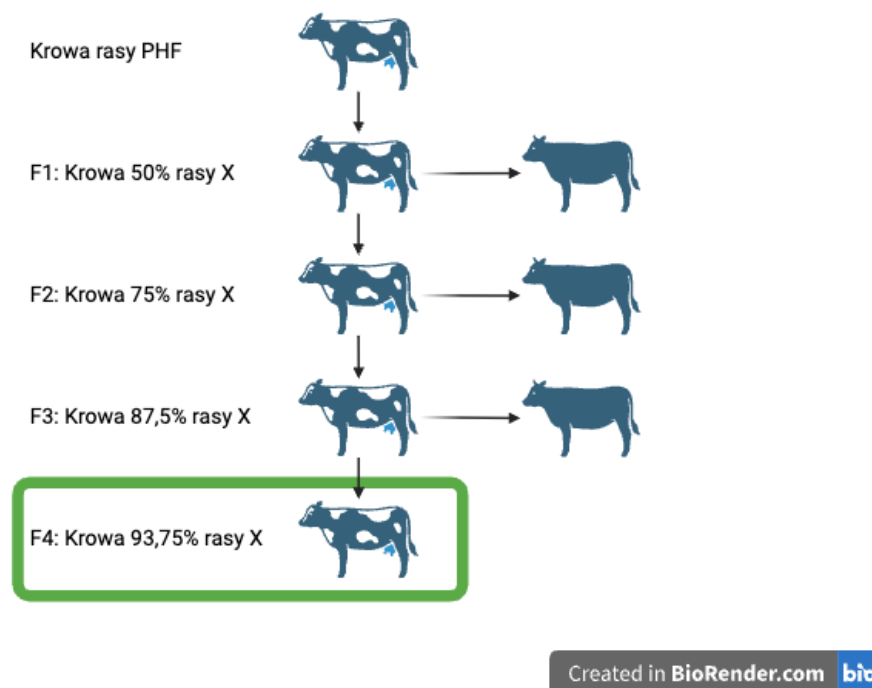
wykorzystania tej rasy nie został jeszcze w pełni odkryty w Polsce, która posiada stosunkowo duży areał słabszych ziem, mogących stanowić bazę paszową dla mniej wymagających ras bydła mięsnego, do których zaliczany jest hereford (Kostusiak i wsp., 2019).

## **1.2 Krzyżowanie towarowe oraz wypierające**

Krzyżowanie towarowe jest powszechnie stosowaną metodą w hodowli zwierząt, mającą na celu poprawę cech użytkowości opasowej i rzeźnej potomstwa. Proces ten polega na wykorzystaniu nasienia buhajów ras mięsnych, takich jak LM, CH, czy belgijska biało-błękitna (BB), w inseminacji krów ras mlecznych, na przykład rasy PHF. Efektem krzyżowania jest uzyskanie cieląt wykazujących lepsze przyrosty, efektywniejsze wykorzystanie paszy oraz korzystniejszą konformację tuszy. Kluczowym czynnikiem warunkującym poprawę tych cech jest zjawisko heterozji, określane również jako "wybująłość mieszańców", które prowadzi do wyraźnej poprawy cech opasowych u pierwszego pokolenia mieszańców (F1). Heterozja sprzyja większej heterozygotyczności loci genów w porównaniu do zwierząt czystorasowych, poprawiając wyniki produkcyjne potomstwa. Jednakże heterozja jest ograniczona do pierwszego pokolenia F1. Aby podtrzymać ten efekt, należy stosować krzyżowanie rotacyjne, czyli wprowadzanie kolejnych ras lub linii genetycznych. Z tego względu krzyżowanie rotacyjne nie jest powszechnie stosowane w produkcji mlecznej. Niemniej jednak, krzyżowanie towarowe, z uwagi na poprawę wskaźników wartości opasowej i rzeźnej oraz efektywności ekonomicznej, jest uznawane za opłacalną strategię, zwłaszcza w kontekście dużej skali produkcji mlecznej w Polsce oraz rosnącego zapotrzebowania na wołowinę o wyższej jakości odżywczej (Pogorzelska, 2007).

Zmiana profilu gospodarstwa z produkcji mlecznej na mięsną stanowi jednak wyzwanie, głównie ze względu na wysokie koszty związane z zakupem czystorasowych zwierząt ras mięsnych, co przekłada się na długi okres zwrotu inwestycji, zwłaszcza w kontekście braku dochodów aż do momentu sprzedaży odsadków lub zakończenia opasu. W takich przypadkach krzyżowanie wypierające stanowi istotną alternatywę, polegającą na systematycznym kojarzeniu krów dowolnej rasy z buhajami ras mięsnych w kolejnych pokoleniach. W efekcie, krzyżowanie wypierające umożliwia stopniową transformację stada przy jednoczesnym ograniczeniu kosztów i ryzyka związanego z zakupem czystorasowego bydła mięsnego (schemat 1).





**Schemat 1.** Zmiany w udziale procentowym genotypu w krzyżowaniu towarowym.

Krzyżowanie wypierające oferuje wiele korzyści, w tym utrzymanie ciągłości produkcji przy wykorzystaniu istniejącego stada. Metoda ta umożliwia stopniowe wprowadzanie zmian w profilu produkcyjnym, ponieważ każde kolejne pokolenie będzie charakteryzowało się wyższym udziałem genów od zwierząt czystorasowych. Niemniej jednak, znaczącą wadą krzyżowania wypierającego jest czas potrzebny na osiągnięcie docelowego stada czystorasowego. Proces ten wymaga długotrwałego cyklu, obejmującego zacielenie, ciążę oraz osiągnięcie dojrzałości hodowlanej przez kilka kolejnych pokoleń. W związku z tym, krzyżowanie wypierające wymaga starannego planowania oraz długoterminowego zarządzania, aby optymalizować wyniki hodowlane oraz finansowe (Grodzki i Przysucha, 2004).

### 1.3 Geny kandydujące kształtujące jakość mięsa wołowego

#### 1.3.1 DGAT1 acetylotransferaza diacyloglicerolowa 1

Enzym diacylo-glicerol acylotransferaza 1 (DGAT1) jest kluczowym elementem w szlaku biosyntezy trójglicerydów, katalizującym estryfikację diacyloilo-glicerolu (DAG) z kwasami tłuszczowymi. Jako enzym mikrosomalny, DGAT1 odgrywa istotną rolę w metabolizmie lipidów i kształtowaniu właściwości tłuszczów. Polimorfizm genu DGAT1

może prowadzić do istotnych różnic w kształtowaniu się jakości odżywczej i sensorycznej mięsa wołowego. Szczególnie interesujące są polimorfizmy takie jak c.572A>G i c.1416T>G, które mogą wpływać na odkładanie się tłuszczu podskórnego, stopień marmurkowatości, barwę tłuszczu oraz siłę cięcia mięsa. Zmiana K232A, polegająca na substytucji lizyny na alaninę, została powiązana ze zwiększeniem zawartości tłuszczu podskórnego. Ponadto polimorfizmy w genie DGAT1 mogą również modulować profil kwasów tłuszczowych, co ma istotne konsekwencje dla jakości mięsa i jego walorów odżywczych (Zalewska i wsp., 2021).

### **1.3.2 SCD1 desaturaza 1 stearylo CoA**

Gen SCD kodujący syntezę kwasów tłuszczowych jest kluczowym elementem w szlaku biosyntezy lipidów, odpowiedzialnym za desaturację nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) do jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) (Bartoń i wsp., 2016; Ladeira i wsp., 2016). Enzym SCD katalizuje reakcję wstawienia podwójnych wiązań w łańcuchu węglowym kwasów tłuszczowych, co jest istotnym procesem w regulacji profilu kwasów tłuszczowych i metabolizmu lipidów w organizmach zwierzęcych. Polimorfizm T878C w genie kodującym SCD, szczególnie w układzie homozygotycznym CC, koreluje z podwyższoną zawartością MUFA w tkance mięśniowej. Zmiana ta modyfikuje skład lipidowy, co ma istotny wpływ na właściwości sensoryczne mięsa, takie jak smak, soczystość i tekstura. Dodatkowo, polimorfizm g.7534G>A w obrębie tego genu jest związany z różnicami w stopniu marmurkowatości mięsa. Wariant GG wykazuje wyższą akumulację tłuszczu śródmięśniowego w porównaniu do wariantu CC, co przekłada się na zwiększoną marmurkowatość mięsa oraz poprawę jego walorów sensorycznych, takich jak soczystość i smakowitość. Analiza tych wariantów genetycznych oraz ich wpływu na profile lipidowe jest kluczowa dla precyzyjnego zarządzania programami hodowlanymi, mającymi na celu optymalizację cech jakościowych mięsa wołowego. Wiedza ta jest istotna dla doskonalenia metod selekcji oraz poprawy wartości rynkowej mięsa poprzez genotypowanie i selekcję zwierząt o pożądanym cechach fenotypowych (Zalewska i wsp., 2021).

### **1.3.3 LEP leptyna**

Leptyna jest hormonem polipeptydowym syntetyzowanym przez adipocyty, odgrywając istotną rolę w regulacji homeostazy energetycznej oraz apetytu. Gen kodujący leptynę (LEP) znajduje się na 4. chromosomie i zawiera liczne polimorfizmy genetyczne, które mogą modyfikować cechy użytkowe i fenotypowe bydła. Polimorfizmy takie jak UASMS2

oraz C1180T w obrębie genu LEP mają istotne znaczenie dla fenotypowych cech mięsa. Polimorfizm UASMS2, wpływający na regulację ekspresji leptyny, jest związany z różnicami w akumulacji tłuszczu podskórnego, natomiast polimorfizm C1180T ma wpływ na marmurkowatość mięsa (Zalewska i wsp., 2021). Marmurkowatość, która oznacza intramuskularną obecność tłuszczu, jest kluczowym wskaźnikiem jakości mięsa, ponieważ wpływa na jego smakowitość i soczystość. Leptyna pełni kluczową rolę w regulacji procesów metabolicznych, takich jak lipogeneza, lipoliza oraz termogeneza, co ma bezpośredni wpływ na zawartość tłuszczu w tuszy (Friedman i Halaas, 1998). Genotypy związane z wyższą aktywnością leptyny mogą determinować zmiany w zawartości tłuszczu, co jest ważne w kształtowaniu jakości mięsa wołowego (Carvalho i wsp., 2012).

#### **1.3.4 SREBF1**

Jednym z kluczowych specyficznych czynników transkrypcyjnych, jest białko SREBP (ang. sterol regulatory element-binding protein). SREBP odgrywa kluczową rolę w regulacji biosyntezy lipidów, a jego funkcja jest istotna dla utrzymania homeostazy lipidowej w komórkach. Istnieją dwie główne izoformy tego białka: SREBP1 oraz SREBP2, które są kodowane przez odpowiednie geny SREBF1 i SREBF2. SREBP1 i SREBP2. Działają jako transkrypcyjne aktywatory lub represory genów, które kodują enzymy zaangażowane w regulację metabolizmu cholesterolu i lipidów. SREBP1 jest głównie zaangażowane w regulację syntezy kwasów tłuszczowych, podczas gdy SREBP2 odgrywa kluczową rolę w regulacji homeostazy cholesterolu poprzez kontrolowanie ekspresji genów kodujących enzymy biosyntezy cholesterolu oraz receptorów dla LDL (lipoprotein o niskiej gęstości). Obie izoformy SREBP są syntetyzowane w formie nieaktywnej, związanej z błoną komórkową (Bhuiyan i wsp., 2009). W odpowiedzi na zmiany w stężeniu lipidów, SREBP ulega proteolitycznej aktywacji, co prowadzi do jego translokacji do jądra komórkowego. Tam, jako czynnik transkrypcyjny, indukuje ekspresję genów związanych z syntezą lipidów i regulacją metabolizmu cholesterolu. Dysregulacja SREBP może prowadzić do zaburzeń metabolicznych, takich jak hipercholesterolemia czy stłuszczenie wątroby.

#### **1.3.5 Tyreoglobulina (TG)**

Tyreoglobulina jest głównym białkiem tarczycy i stanowi do 75% białka tego gruczołu. Wpływa ona na zdolność akumulacji tłuszczu śródmięśniowego (IMF), określanego jako marmurkowatość mięsa. Zwiększona zawartość IMF poprawia walory smakowe oraz

soczystość mięsa, a cecha ta obserwowalna jest u wielu ras między innymi hereford, wagu, angus, highland. Produkcja tyreoglobuliny odbywa się w komórkach pęcherzykowych tarczycy, gdzie również jest magazynowana. Stanowi ona substrat do produkcji trójiodotyroniny (T3) oraz tyroksyny (T4). Odpowiada ona za regulacje metabolizmu, wzrostu, różnicowania oraz homeostazę komórek tłuszczowych, a uwalnianie hormonu następuje poprzez stymulację komórek tarczycy przez hormon tyreotropowy. Tyreoglobulina 5 jest jednym z najdłuższych genów u ssaków (Barendse i wsp., 2004; Zalewska i wsp., 2021). U bydła znajduje się w regionie centromerowym 14. chromosomu i składa się z 37 eksonów. Występuje w dwóch wariantach allelicznych: TG5C i TG5T i trzech genotypach: TG5CT, TG5DW i TG5T. Zwiększenie zawartości IMF jest istotnym czynnikiem determinującym jakość wołowiny, która ma również wpływ na jej wartość odżywczą, poprzez tłuszcz śródmięśniowy zawierający witaminy oraz lepszy profil kwasów tłuszczowych w porównaniu do tłuszczu okrywowego, będącego jedynie nośnikiem energii (Zhang i wsp., 2015).

#### **1.4 Zjawisko stresu oksydacyjnego**

Stres oksydacyjny jest zjawiskiem zaburzenia równowagi między procesami oksydacyjnymi a zdolnościami obronnymi organizmu, związanymi z aktywnością antyoksydacyjną. Ekspozycja komórek na reaktywne formy tlenu (RFT) jest naturalnym mechanizmem, który, choć może pełnić funkcje sygnalizacyjne w takich procesach jak proliferacja, różnicowanie i apoptoza komórkowa, wymaga skutecznej neutralizacji. Wolne rodniki, będące formą RFT, są wysoko reaktywne i mogą powodować poważne uszkodzenia komórkowe, takie jak zakłócenie integralności błon komórkowych, uszkodzenia organelli, denaturację i agregację białek, peroksydację lipidów oraz mutacje DNA. Długotrwała ekspozycja na RFT może prowadzić do mutacji genetycznych lub śmierci komórkowej. RFT dzielą się na rodniki, które charakteryzują się obecnością niesparowanego elektronu, oraz na inne formy niebędące rodnikami. Wolne rodniki powstają w wyniku różnych procesów metabolicznych, w tym niewłaściwego żywienia, stresu psychofizycznego (takiego jak stres cieplny, czy hałas), oraz infekcji bakteryjnych, wirusowych czy pasożytniczych. Kluczowym aspektem utrzymania zdrowia zwierząt jest zapewnienie stabilnej homeostazy prooksydacyjno-antyoksydacyjnej.

W hodowli bydła prewencja stresu oksydacyjnego polega na zapewnieniu optymalnych warunków środowiskowych, które sprzyjają eliminacji nadmiaru RFT. Środowisko hodowlane powinno wspierać mechanizmy obronne organizmu i nie powinno wprowadzać dodatkowych

stresorów, które mogłyby zwiększać poziom RFT i tym samym przyczyniać się do pogłębiania stresu oksydacyjnego (Puppel i wsp., 2015).

## **1.5 Markery stresu oksydacyjnego**

### **1.5.1 Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)**

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) jest kluczowym enzymem w systemie obrony przeciwutleniającej, pełniącym fundamentalną rolę w mechanizmach eliminacji reaktywnych form tlenu. Enzym ten katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^-$ ) do nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) oraz tlenu ( $O_2$ ), co jest istotne dla minimalizacji uszkodzeń oksydacyjnych w komórkach. Dysmutaza ponadtlenkowa występuje w trzech głównych izoformach (SOD1, SOD2, SOD3), różniących się lokalizacją subkompartmentalną oraz funkcjonalnością. Izoforma SOD1, obecna głównie w cytoplazmie oraz w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, pełni kluczową rolę w neutralizacji anionorodnika ponadtlenkowego generowanego w cytozolu. Ochrona ta jest istotna dla utrzymania integralności błon komórkowych oraz innych struktur komórkowych przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. SOD2, lokalizowana w macierzy mitochondrialnej, chroni mitochondrialne DNA i białka przed uszkodzeniami wywołanymi przez RFT, co jest niezbędne dla zachowania funkcji i stabilności mitochondriów. SOD3, wydzielana do przestrzeni pozakomórkowej, obecna jest w osoczu oraz limfie, gdzie jej funkcją jest ochrona komórek przed reaktywnymi formami tlenu generowanymi w przestrzeni międzykomórkowej i naczyniowej, co ma kluczowe znaczenie dla utrzymania homeostazy oksydacyjnej na poziomie tkankowym (Zheng i wsp., 2023). Zmniejszona aktywność jednej z izoform SOD jest skorelowana ze zwiększonym ryzykiem rozwoju stresu oksydacyjnego, który może prowadzić do uszkodzeń komórkowych, zaburzeń funkcji tkanek, a także do rozwoju chorób związanych z nadmierną akumulacją reaktywnych form tlenu. Dlatego dysmutaza ponadtlenkowa jest uznawana za kluczowy komponent systemu obrony przeciwutleniającej, niezbędny do utrzymania homeostazy oksydacyjnej i ochrony przed negatywnymi skutkami deregulacji procesów oksydacyjnych.

### **1.5.2 Peroksydaza glutationowa (GPx)**

Peroksydaza glutationowa to kluczowy enzym w systemie obronnym przed stresem oksydacyjnym, który katalizuje redukcję nadtlenków lipidowych oraz nadtlenku wodoru do wody i alkoholu, wykorzystując glutation jako donor elektronów. Enzym ten występuje w kilku izoformach (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4), które różnią się zarówno lokalizacją w komórce, jak

i specyficznością substratową, co pozwala na wieloaspektową ochronę przed reaktywnymi formami tlenu. GPx1, obecna głównie w cytoplazmie komórek, jest odpowiedzialna za eliminację nadtlenków produkowanych w trakcie metabolizmu komórkowego. GPx2, znajdująca się przede wszystkim w błonie śluzowej przewodu pokarmowego, odgrywa istotną rolę w ochronie przed oksydacyjnymi uszkodzeniami lipidów oraz w detoksykacji metabolitów. GPx3, obecna w osoczu, funkcjonuje jako mechanizm eliminacji nadtlenków krążących w krwiobiegu, wspierając w ten sposób ogólną homeostazę oksydacyjną organizmu. GPx4, zlokalizowana w błonach komórkowych, jest szczególnie efektywna w redukcji nadtlenków lipidowych, chroniąc integralność struktur lipidowych błon komórkowych przed peroksydacją. Aktywność GPx jest ściśle uzależniona od obecności selenocysteiny w jej centrum aktywnym, co czyni enzym ten zależnym od dostępności selenu w organizmie. Niedobór selenu prowadzi do obniżenia aktywności GPx, co zwiększa podatność komórek na stres oksydacyjny i może być związane z ryzykiem rozwoju chorób układu krążenia, nowotworów oraz schorzeń neurodegeneracyjnych. W związku z tym, GPx odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu równowagi redoks oraz ochronie komórek przed uszkodzeniami wywołanymi przez reaktywne formy tlenu (Pei i wsp., 2023).

### **1.5.3 Reduktaza glutationowa (GluRed)**

Reduktaza glutationowa jest kluczowym enzymem w cyklu glutationowym, odpowiedzialnym za redukcję utlenionej formy glutationu do jego zredukowanej postaci (GSH). Proces ten jest niezbędny dla regeneracji GSH, który pełni fundamentalną rolę jako główny wewnątrzkomórkowy antyoksydant, neutralizując reaktywne formy tlenu oraz inne nadtlenki. GSH jest kluczowy dla funkcjonowania peroksydazy glutationowej i transferazy glutationowej. GPx, w połączeniu z GSH, katalizuje reakcję redukcji nadtlenków przekształcając je w wodę i alkohole, co zmniejsza ich toksyczne działanie. Transferaza glutationowa uczestniczy w detoksykacji poprzez koniugację GSH z toksycznymi substancjami, co ułatwia ich eliminację z organizmu. Działanie GluRed jest zatem kluczowe dla utrzymania odpowiedniego poziomu GSH, co jest niezbędne do ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym. Niewydolność lub zaburzenia funkcji GluRed prowadzą do zwiększonego poziomu RFT i nadtlenków, co może powodować uszkodzenia DNA, mutacje oraz rozwój chorób neurodegeneracyjnych i sercowo-naczyniowych. A zatem regulacja homeostazy oraz utrzymanie integralności komórkowej, które są niezbędne dla zachowania

zdrowia komórkowego i ogólnego stanu zdrowia organizmu wymaga prawidłowego funkcjonowania i obecności GluRed (Kapusta i wsp., 2018b).

#### **1.5.4 Diałdehyd malonowy (MDA)**

Diałdehyd malonowy (MDA) jest aldehydem, który powstaje jako produkt uboczny peroksydacji lipidów wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, i jest szeroko stosowany jako biomarker stresu oksydacyjnego. Jego stężenie w tkankach i płynach ustrojowych może służyć do oceny stopnia uszkodzeń oksydacyjnych oraz intensywności peroksydacji lipidów. MDA charakteryzuje się dużą reaktywnością chemiczną, co umożliwia mu łatwe tworzenie wiązań z białkami oraz kwasami nukleinowymi. Te reakcje prowadzą do uszkodzeń strukturalnych i funkcjonalnych biomolekuł, co może skutkować zaburzeniami funkcji enzymatycznych, destabilizacją struktur komórkowych oraz indukcją mutacji genetycznych. W kontekście nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych, MDA jest często używany do monitorowania biomarkera stresu oksydacyjnego, ponieważ jego podwyższone stężenia mogą być wskaźnikiem zwiększonego ryzyka rozwoju takich patologii. W ocenie skuteczności interwencji terapeutycznych, takich jak suplementacja antyoksydantami, MDA wykorzystywany jest jako wskaźnik efektywności mechanizmów obronnych przed stresem oksydacyjnym. Analiza poziomów MDA pozwala na ocenę równowagi redoks organizmu i skuteczności terapii, a także może wskazywać na potrzebę modyfikacji strategii dietetycznych czy terapeutycznych w celu poprawy stanu zdrowia i zapobiegania chorobom związanym z nadmierną peroksydacją lipidów (Puppel i wsp., 2015).

#### **1.6 Kwasy tłuszczowe**

Kwasy tłuszczowe odgrywają kluczową rolę w determinowaniu jakości mięsa, wpływając zarówno na jego właściwości organoleptyczne, jak i wartość odżywczą. Ich profil lipidowy ma istotne znaczenie dla cech sensorycznych, takich jak kruchość i smak, oraz dla potencjału antyoksydacyjnego mięsa, modulując jednocześnie procesy oksydacyjne i zapalne.

Profil kwasów tłuszczowych, a także rozmieszczenie tłuszczu w mięśniach, w postaci tłuszczu śródmięśniowego i tłuszczu okrywowego, jest w dużej mierze determinowane przez rasę oraz żywienie zwierząt (Prado i wsp., 2009). Rasy francuskie jak limousine, charolaise, blonde d'aquitaine predysponowane są do odkładania mniejszych ilości tłuszczu w organizmie w trakcie opasu niż popularne na świecie rasy hereford czy angus. Szczególnie istotny jest IMF, którego profil zmienia się w zależności od rasy i wieku zwierzęcia. Profil kwasów tłuszczowych

w tłuszczu śródmięśniowym dzieli się na nasycone kwasy tłuszczowe (SFA), których udział oscyluje na poziomie 40-50%, jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA) z udziałem 40-50% i wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) z udziałem do 5-10% (Wood i wsp., 2008). Te proporcje mogą być kształtowane z wykorzystaniem odpowiedniej dawki pokarmowej w żywieniu zwierząt. Zwiększony udział zielonek w diecie oraz dodatki żywieniowe mogą korzystnie wpływać na zmiany profilu kwasów tłuszczowych. Ważnym elementem jest w tym przypadku również udział rasy. W przypadku bydła mlecznego, takiego jak polska holsztyńsko-fryzyjska, cele hodowlane są zorientowane na inne aspekty, co prowadzi do wyższej zawartości tłuszczu podskórnego. Opasanie bydła mlecznego wiąże się z niższym udziałem mięsa w tuszy oraz wyższym tłuszczu okrywowego, a także gorszym profilem kwasów tłuszczowych, co wynika z odmiennych profili metabolicznych i statusów hormonalnych w porównaniu do ras mięsnych (Keane i Allen, 2002). Żywnienie stanowi kluczowy czynnik wpływający na profil kwasów tłuszczowych tkanki mięśniowej. Odpowiednie żywienie poprzez stosowanie dodatków, takich jak oleje bogate w nienasycone kwasy tłuszczowe i zielonki, może poprawić stosunek kwasów tłuszczowych n-3 do n-6 oraz zwiększyć zawartość jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Zwiększenie udziału pasz objętościowych kosztem pasz treściwych w żywieniu bydła sprzyja wyższemu poziomowi niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, takich jak kwas linolenowy i stearynowy, a także podnosi zawartość PUFA n-3, n-6 oraz CLA, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu SFA.

## **1.7 Bioaktywne składniki frakcji białkowej**

### **1.7.1 Anseryna**

Anseryna jest dipeptydem złożonym z  $\beta$ -alaniny i N-metylohistydyny. Występuje w mięśniach szkieletowych m.in. bydła, choć głównymi jej źródłami w diecie człowieka jest znacznie popularniejszy drób oraz ryby. Wykazuje ona szereg właściwości bioaktywnych, w tym działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne oraz posiada potencjał neuroprotektyny. Anseryna posiada również zdolność modulowania sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, co prowadzi do hamowania degranulacji komórek tucznych i bazofili, przez co przypisuje się jej rolę w reakcjach alergicznych. Może również wiązać i neutralizować aldehydy pochodzące z procesu peroksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych, a także metabolizmu węglowodanów ograniczając tym ryzyko występowania stresu oksydacyjnego. U naczelnych nie dochodzi do syntezy anseryny w organizmie, wchłaniana jest z żywności przez jelito



cienkie. Występuje ona w znacząco wyższych stężeniach w mięsie drobiowym niż wołowym, które bogatsze jest w karnozynę (Wu, 2020).

### **1.7.2 Karnozyna**

Karnozyna jest dipeptydem, którego budulcem jest  $\beta$ -alanina i L-histydyna. Pełni ona wiele kluczowych funkcji biologicznych oraz fizjologicznych, wykazując działanie antyoksydacyjne, buforujące, neuroprotektoryjne, a także antyglukozylacyjne (Bellia i wsp., 2011) (Jukić i wsp., 2021). Wysoka zdolność do neutralizowania RFT pozwala zakwalifikować ją do istotnych antyoksydantów. Efektywność karnozyny wynika z właściwości skutecznego tworzenia kompleksów przenoszących ładunki z RFT będącymi wolnymi rodnikami (np. rodnikami hydroksylowymi, rodnikami ponadtlenkowymi, rodnikami nadtlennymi oraz tlenkiem azotu), RFT niebędącymi wolnymi rodnikami (np. tlenem singletowym, ozonem, nadtlennikiem wodoru), a także szkodliwymi aldehydami (np. MDA i formaldehyd) w celu ograniczenia ich szkodliwego działania i ochrony błony komórkowej. Stosowanie prekursorów karnozyny takich jak  $\beta$ -alanina, pozwala skutecznie neutralizować gromadzący się w mięśniach kwas mlekowy, ograniczając zmęczenie mięśni i zmniejszyć ryzyko wystąpienia stresu oksydacyjnego wynikającego z wysiłku (Ma i wsp., 2020). W procesie syntezy karnozyny niezbędna jest również L-histydyna, jednak nie wymaga ona dodatkowej suplementacji. Karnozyna wchłaniana jest w jelicie cienkim, a następnie hydrolizowana do  $\beta$ -alaniny i L-histydyny, z których ponownie może zostać zsyntezowana.

### **1.7.3 Koenzym Q10**

Koenzym Q10 (CoQ10), znany również jako ubichinon, jest kluczowym czynnikiem w procesie fosforylacji oksydacyjnej, która zachodzi w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. CoQ10 uczestniczy w transferze elektronów pomiędzy kompleksami, co jest niezbędne do syntezy ATP (adenozynotrójfosforanu) – głównego nośnika energii w komórkach eukariotycznych. Jego endogenna synteza zachodzi w cytoplazmie i mitochondriach większości komórek, jednak pozyskać go można również wraz z dietą. Pomimo zdolności organizmu do endogennej syntezy CoQ10, jego stężenie może ulegać zmianom w zależności od zapotrzebowania energetycznego komórek (Stojkovic i wsp., 1999). Działa on również jako silny antyoksydant, chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym poprzez neutralizację reaktywnych form tlenu oraz peroksydację lipidów. Może również wpływać na regulację stanów zapalnych w organizmie, co wynika z jego zdolności do modulacji szlaków sygnalizacyjnych związanych z procesami zapalnymi. Jako naturalny antyoksydant, CoQ10

odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu oraz w ochronie przed degeneracją oksydacyjną i zapalną (Purchas i wsp., 2004).

#### **1.7.4 Tauryna**

Tauryna jest  $\beta$ -aminokwasem dostarczany wraz z dietą, z której wchłaniana jest przez jelito cienkie do krwiobiegu, jednak może być również syntezowana endogennie z cysteiny i metioniny, co w przypadku bydła przebiega znacznie intensywniej niż u człowieka, dzięki czemu wołowina może być cennym źródłem tego aminokwasu. Szczególnie narażone na jej deficyt są osoby chore oraz wykluczające z diety produkty pochodzenia zwierzęcego (Hou i wsp., 2019). Utrzymanie odpowiedniego jej poziomu jest istotne ze względu na udział w tworzeniu soli żółciowych, działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne, transportowe, stabilizujące oraz sygnalizacyjne. Jest to więc istotny element mający wpływ na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego, nerwowego, pokarmowego, hormonalnego, odpornościowego i rozrodczego. Wspomaga ona również transport kreatyny, co pozwala na jej efektywniejsze wykorzystanie.

#### **1.7.4 Kreatyna**

Kreatyna, będąca metabolitem syntetyzowanym endogennie z aminokwasów argininy, glicyny i metioniny, odgrywa kluczową rolę w systemie energetycznym komórek. W organizmach zwierzęcych jest głównie magazynowana w mięśniach szkieletowych w formie fosfokreatyny, która poprzez reakcję hydrolizy, dostarcza grupy fosforanowe do resyntezy adenozyotrójfosforanu (ATP), stanowiącego podstawowy nośnik energii w komórkach (Bernt i wsp., 1965). Ta reakcja jest niezbędna podczas wysiłku fizycznego, gdy zapotrzebowanie na energię gwałtownie wzrasta. Poziom kreatyny w mięśniach może być kształtowany poprzez odpowiednią dietę lub suplementację, co prowadzi do zwiększenia rezerwuarów fosfokreatyny i skutkuje poprawą wydolności, siły oraz opóźnieniem wystąpienia zmęczenia. Mechanizm ten opiera się na zwiększeniu dostępności ATP w trakcie intensywnego wysiłku. Dodatkowo, kreatyna wykazuje działanie neuroprotekcyjne i wspomaga homeostazę energetyczną neuronów, co może mieć kluczowe znaczenie w kontekście ochrony przed neurodegeneracyjnymi schorzeniami, takimi jak choroba Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne, czy inne zaburzenia funkcji neuronów (Kieburz i wsp., 2015). Efekty neuroprotekcyjne są częściowo wynikiem ograniczenia występowania stresu oksydacyjnego i stanów zapalnych, co potwierdza jej istotną rolę w kształtowaniu zdrowotności.

### 1.7.5 Kreatynina

Kreatynina jest końcowym metabolitem powstałym w wyniku nieenzymatycznej dehydratacji kreatyny oraz fosfokreatyny zlokalizowanej w mięśniach szkieletowych. W procesie tym kreatyna przekształca się spontanicznie do kreatyniny, która następnie transportowana jest przez nerki i wydalana wraz z moczem. W diagnostyce nefrologicznej, stężenie kreatyniny w surowicy jest istotnym parametrem wskazującym na stan zdrowia (Bonilla i wsp., 2021). Jej poziom monitorowany jest w celu oceny przebiegu chorób nerek, skuteczności terapii nefrologicznych oraz jako parametr prognostyczny w różnych stanach patologicznych. Na wahania poziomu kreatyniny mogą wpływać zmiany ilości tkanki mięśniowej w organizmie, co wynika z ilości magazynowanej kreatyny.

### 1.8 Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach

Witamina E ( $\alpha$ -tokoferol), witamina A ( $\alpha$ -retinol) oraz  $\beta$ -karoten odgrywają ważną rolę w kształtowaniu jakości mięsa wołowego, wpływając na jego właściwości sensoryczne, wartość odżywczą i stabilność oksydacyjną. Ich koncentracja w mięśniach jest zróżnicowana w zależności od rodzaju mięśnia. Wyższe poziomy obserwowane są w mięśniach oksydacyjnych (*psaos major* i *gluteus medius*), a niższe w mięśniach glikolitycznych (*longissimus thoracis* i *longissimus lumborum*). Na ich poziom w istotny sposób wpływa również rodzaj skarmianych pasz oraz faza ich zbioru, a także sposób żywienia i skład dawki pokarmowej (Łozicki i wsp., 2012).

Witamina E, w formie  $\alpha$ -tokoferolu, jest jednym z najważniejszych lipofilnych przeciwutleniaczy.  $\alpha$ -Tokoferol pełni funkcję inhibitora peroksydacji lipidów poprzez neutralizację reaktywnych form tlenu oraz rodników tlenowych, co skutkuje zwiększoną stabilnością oksydacyjną mięsa. Efektywne działanie  $\alpha$ -tokoferolu przyczynia się do opóźnienia degradacji lipidów w mięsie, co poprawia jego trwałość, właściwości sensoryczne (takie jak smak, zapach i tekstura) oraz wartość odżywczą (Wang i wsp., 2022) (Herrera i wsp., 2022). Optymalna podaż witaminy E w diecie zwierząt jest niezbędna dla zachowania wysokiej jakości mięsa i zapobiegania negatywnym skutkom peroksydacji lipidów. Dodatkowa suplementacja witaminą E wpływa na wydłużony czas utrzymywania czerwonej barwy mięsa nawet przez 4-10 dni poprzez opóźnienie tworzenia metmioglobiny i opóźnienie utleniania lipidów do 10 dni (Trombetti i wsp., 2022; Zaaboul i Liu, 2022). Może ona również ograniczyć wyciek z mięsa, co dodatkowo wpływa na wydłużenie okresu w jakim mięso zachowuje akceptowalny przez konsumentów wygląd w warunkach sklepowych (Nemati i wsp., 2020).

Witamina A, w postaci  $\alpha$ -retinolu, jest istotna dla regulacji wzrostu i różnicowania komórek oraz dla metabolizmu lipidów. Witamina A wpływa na funkcjonowanie mięśni oraz kształtowanie jakości tłuszczu w mięsie poprzez modulację metabolizmu lipidów. Usunięcie z dawki żywieniowej palmitynianu retinylu jako suplementu witaminy A może powodować intensyfikację odkładania tłuszczu (Campos i wsp., 2020). Działa ona również wspomagająco na funkcje wzrokowe, utrzymanie integralności błon śluzowych oraz odpowiedź immunologiczną. Niedobór witaminy A może prowadzić do zaburzeń wzrostu, upośledzenia funkcji wzrokowych oraz osłabienia funkcji immunologicznych.

$\beta$ -karoten, jako prowitamina A, pełni funkcje zarówno odżywcze, jak i przeciwutleniające. Po dostarczeniu z diety,  $\beta$ -karoten jest metabolizowany do witaminy A w organizmie. Jako antyoksydant,  $\beta$ -karoten wpływa na poprawę jakości tłuszczu śródmięśniowego oraz jego barwę. Dzięki działaniu przeciwutleniającemu,  $\beta$ -karoten przyczynia się do optymalizacji właściwości sensorycznych mięsa i jego wartości odżywczej, jednak jego dodatkowa suplementacja nie wpływa na tempo wzrostu (Mitsuishi i Yayota, 2024).

Zapewnienie adekwatnych poziomów tych witamin w diecie zwierząt hodowlanych jest kluczowe dla optymalizacji jakości mięsa wołowego, zarówno pod względem jego właściwości sensorycznych, jak i wartości odżywczej.

## 2. Hipotezy badawcze, cel i zakres pracy

W pracy doktorskiej postawiono następujące hipotezy badawcze:

**Hipoteza 1 (H1):** Polimorfizmy w genie DGAT1, który koduje diacyloglicerol acylotransferazę, wpływają na jakość odżywczą mięsa wołowego poprzez modyfikację akumulacji trójglicerydów w tkance mięśniowej. Warianty genetyczne DGAT1 mogą determinować rozmieszczenie oraz skład tłuszczu śródmięśniowego, co w konsekwencji wpływa na cechy sensoryczne mięsa, takie jak marmurkowatość, kruchość i soczystość.

**Hipoteza 2 (H2):** Polimorfizmy w genie LEP, kodującym leptynę, wpływają na właściwości odżywcze mięsa wołowego poprzez regulację homeostazy lipidowej. Różnice w sekwencjach kodujących LEP mogą wpływać na mechanizmy kontrolujące rozkład tłuszczu podskórnego oraz śródmięśniowego, co wpływa na profil tłuszczowy mięsa oraz jego wartość odżywczą.

**Hipoteza 3 (H3):** Polimorfizmy w genie SCD1, kodującym desaturazę stearylo-CoA, wpływają na właściwości organoleptyczne mięsa wołowego poprzez regulację zawartości tłuszczu śródmięśniowego. Warianty SCD1 mogą różnić się efektywnością w desaturacji kwasów tłuszczowych, co ma wpływ na teksturę, soczystość i walory smakowe mięsa.

**Hipoteza 4 (H4):** Polimorfizmy w genach SREBF1 i TG mają istotny wpływ na jakość odżywczą i organoleptyczną mięsa wołowego poprzez modulację profilu lipidowego i zawartości tłuszczu w tkance mięśniowej. Gen SREBF1, kodujący czynnik transkrypcyjny zaangażowany w biosyntezę lipidów, oraz gen TG, który koduje enzym odpowiedzialny za estryfikację trójglicerydów, mogą wpływać na skład kwasów tłuszczowych oraz właściwości organoleptyczne mięsa, takie jak marmurkowatość, kruchość i smak. Zmienności genotypowe w tych genach mogą zatem determinować zarówno wartość odżywczą, związana z zawartością tłuszczu i profilem kwasów tłuszczowych, jak i aspekty sensoryczne mięsa, poprzez ich wpływ na strukturę i właściwości fizykochemiczne tłuszczu śródmięśniowego.

**Hipoteza 5 (H5):** Polimorfizmy w genach DGAT1, LEP i SCD1 modyfikują aktywność markerów stresu oksydacyjnego, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa oraz reduktaza glutationowa, a także stężenie dialdehydu malonowego w tkance mięśniowej. Zmienności genotypowe w tych genach mogą wpływać na

mechanizmy obronne przeciwko reaktywnym formom tlenu poprzez modulację aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz poziomu produktów peroksydacji lipidów. W konsekwencji, różnice te mogą determinować stabilność oksydacyjną mięsa wołowego, co w znaczący sposób wpływa na jego trwałość, jakość organoleptyczną i wartość odżywczą.

**Celem przeprowadzonych badań była analiza ekspresji genów odpowiedzialnych za modulację potencjału antyoksydacyjnego mięsa wołowego oraz określenie zależności między genami kandydującymi, a kształtowaniem się jakości odżywczej, sensorycznej oraz potencjału antyoksydacyjnego mięsa wołowego.**

Badania miały na celu:

1. Zastosowanie metod proteomicznych do identyfikacji i kwantyfikacji bioaktywnych białek oraz lipidów, a także enzymów zaangażowanych w metabolizm lipidów, w celu określenia ich roli w kształtowaniu właściwości antyoksydacyjnych mięsa wołowego.
2. Identyfikację i charakterystykę polimorfizmów w genach kandydujących, takich jak DGAT1, LEP, SCD1, SREBF1 oraz TG, w celu określenia ich wpływu na mechanizmy regulujące jakość odżywczą i sensoryczną mięsa wołowego.
3. Identyfikację i charakterystykę polimorfizmów w genach kandydujących, takich jak DGAT1, LEP oraz SCD1 w celu określenia ich wpływu na funkcjonowanie endogennych mechanizmów ochrony antyoksydacyjnej.

**Zakres prac:**

- P1. Przegląd literatury dotyczącej genów wpływających na jakość mięsa wołowego – systematyczna analiza badań naukowych dotyczących genów, które mają kluczowe znaczenie w modulacji cech sensorycznych i odżywczych mięsa wołowego.
- P2. Ocena wpływu ras bydła na potencjał antyoksydacyjny mięsa – analiza różnic w potencjale antyoksydacyjnym mięsa wołowego pochodzącego od różnych ras, z uwzględnieniem różnic w aktywności mechanizmów ochronnych przed stresem oksydacyjnym.
- P3. Analiza wpływu polimorfizmów genów kandydujących na jakość mięsa wołowego – ocena, w jaki sposób warianty genetyczne w genach takich jak DGAT1, LEP, SCD1, SREBF1 oraz TG wpływają na cechy jakościowe mięsa wołowego, w tym jego strukturę, marmurkowatość, kruchość i soczystość.

P4. Ocena zależności między zmiennościami genotypowymi a potencjałem antyoksydacyjnym mięsa wołowego – badanie korelacji między wariantami genetycznymi DGAT1, LEP i SCD1 a aktywnością mechanizmów antyoksydacyjnych mięsa wołowego. Badanie skoncentrowało się na wpływie polimorficznych form na aktywność kluczowych enzymów antyoksydacyjnych, w tym dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej oraz reduktazy glutationowej. Ponadto, analiza miała na celu określenie wpływu zmienności genotypowych na poziomy produktów peroksydacji lipidów, w tym dialdehydu malonowego, w celu określenia skuteczności mechanizmów obronnych przed stresem oksydacyjnym oraz ich wpływu na integralność komórkową i homeostazę oksydacyjną.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1 Finansowanie i konsorcjum

Badania zrealizowane zostały w ramach projektu ERA NET SUSAN: Increasing productivity, resource efficiency and product quality to increase the economic competitiveness of forage and grazing based cattle production systems. Projekt zrealizowano w ramach konsorcjum jednostek naukowych Newcastle University, Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, Swedish University of Agricultural Sciences, Research Institutes of Sweden, Kiel University, University of Padova.

#### 3.2 Materiał badawczy

##### Doświadczenie 1

**P2. KOSTUSIAK P., SŁÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., SAKOWSKI T., PUPPEL K.** (2023). Relationship between Beef Quality and Bull Breed. *Animals*, 13, 1–16.

Badania przeprowadzono na 67 buhajach ras: polska holsztyńsko-fryzyjska (16), limousine (18), charolaise (17), hereford (16). Żywnienie prowadzono w sposób ujednolicony, *ad libitum*, mieszanką paszową złożoną z kiszonki z kukurydzy (68%), jęczmienia (29%) z dodatkiem mieszanki mineralno-witaminowej (3%), (tabela 1).

**Tabela 1.** Skład dawki pokarmowej

<b>Skład</b>	<b>Wartość</b>
Kiszonka z kukurydzy (%)	68
Jęczmień (%)	29
Dodatki paszowe (%)	3
<b>Wartość odżywcza</b>	
Sucha masa (%)	54
Białko (%)	128
NEm (Mcal/kg)	1,77
Neg (Mcal/kg)	1,15
NDF (g/kg)	343
ADF (g/kg)	194
Tłuszcz surowy (g/kg)	19

NEm (Mcal/kg) - Energia netto na utrzymanie (Net Energy for Maintenance), Neg (Mcal/kg) - Energia netto na produkcję (Net Energy for Gain), NDF (g/kg) - Włókno neutralno-detergentowe (Neutral Detergent Fiber), ADF (g/kg) - Włókno kwaśno-detergentowe (Acid Detergent Fiber)



Uboj przeprowadzono w wieku 21-24 miesięcy, gdzie każda grupa badawcza ubijana była tego samego dnia. Po uboju tusze przechowywano w chłodni przez 24 godziny, w temperaturze 2-4 C, po czym pobierano 300 g mięśnia półbłoniastego (*musculus semimembranosus*).

## **Doświadczenie 2**

**P3. KOSTUSIAK P., BAGNICKA E., ŻELAZOWSKA B., ZALEWSKA M., SAKOWSKI T., SŁÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., PUPPEL K. (2024).** Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. *Genes*, 5, 1–16.

Badanie przeprowadzono na 45 wolcach rasy holsztyńsko-fryzyjskiej i 60 wolcach z krzyżowania towarowego ras holsztyńsko-fryzyjskiej (HF) z charolaise (CH). Kastrację przeprowadzono między trzecim, a czwartym tygodniem życia cieląt metodą bezkrwawą zamkniętą. W pierwszym roku, zwierzęta utrzymywane były zimą w budynku, natomiast pozostałą część roku na pastwisku. Obie grupy zostały podzielone w 12 miesiącu życia na dwie podgrupy, które żywione były intensywnie do uboju, który nastąpił w 15 miesiącu w grupie pierwszej oraz w 18 miesiącu w grupie drugiej. Dawki przedstawione w tabeli 2 oznaczone numerami 1 i 2, były dawkami przejściowymi, zadawanymi przez 7 dni przed przejściem na żywienie intensywne, oznaczone numerami 3 i 4.

**Tabela 2.** Elementy i skład chemiczny dawek przejściowych i opasu końcowego

Skład	Dawka			
	1	2	3	4
Kiszonka z traw (%)	76,8	69,1	59,3	53,5
Poekstrakcyjna śruta rzepakowa (%)	3,5	4,2	7,7	8,4
Młóto browarniane (%)	10	15	20	22,3
Pasza treściwa (pszenżyto i jęczmień 50:50) (%)	9	11	12,3	15,1
Dodatki paszowe (%)	0,7	0,7	0,7	0,7
<b>Skład chemiczny</b>				
Sucha masa (%)	61,2	69,8	75,2	79,1
Białko surowe (%)	14,2	15,5	16,6	17,5
Tłuszcz (%)	3,2	3,8	4,3	4,9
NEM, Mcal/kg suchej masy (DM)	1,7	1,9	2,1	2,3
NEg, Mcal/kg suchej masy (DM)	1,2	1,3	1,5	1,6

Dawki 1 i 2 skarmiane przez 7 dni każda; dawki 3 i 4, dawki opasu końcowego. NEM (Mcal/kg DM) - Energia netto na utrzymanie (Net Energy for Maintenance), NEg (Mcal/kg DM) - Energia netto na przyrosty (Net Energy for Gain).

Po zakończeniu opasu przeprowadzono ubój zwierząt. Następnie tusze przechowywano w chłodni przez 24 godziny, w temperaturze 2-4 C, po czym pobierano 300 g mięśnia półbłoniastego (*musculus semimembranosus*).

### Doświadczenie 3

**P4. KOSTUSIAK P., BAGNICKA E., ŻELAZOWSKA B., ZALEWSKA M., SAKOWSKI T., ŚLÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., PUPPEL K. (2024).** Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with DGAT1, LEP, and SCD1 Genes. *Biomolecules*, 14, 1309.

Badanie wykonano na 65 buhajach rasy hereford. Buhaje utrzymywane były w systemie wolnostanowiskowym, zgodnie z minimalnymi standardami utrzymania bydła (Dz. U. Nr 167/poz. 1629 z 2003 r., z późniejszymi zmianami) z dostępem do pastwiska przez pierwszy rok życia. Buhaje żywione były *ad libitum*, dawką zbilansowaną zgodnie z zaleceniami National Research Council dla bydła mięsnego (tabela 3). Ubój przeprowadzono w 22 miesiącu życia, a po upływie 24 godzin pobrano 300g próbki mięśnia półbłoniastego (*musculus semimembranosus*).

**Tabela 3.** Elementy i skład chemiczny dawek

Skład (%)	Dawka	
	1	2
Kiszonka z traw	77,9	55,8
Poekstrakcyjna śruta rzepakowa	3,3	8,0
Młóto browarniane	9,5	21,2
Pasza treściwa (pszenżyto i jęczmień 50:50) (%)	8,6	14,3
Dodatki paszowe	0,7	0,7
<b>Skład chemiczny</b>		
Sucha masa (%)	58,1	75,1
Białko surowe (%)	13,5	16,6
Tłuszcz (%)	3,0	4,7
NEm, Mcal/kg suchej masy (DM)	1,6	2,2
NEg, Mcal/kg suchej masy (DM)	1,1	1,5

Dawki: 1 = dawka przejściowa podawana przez 7 dni; 2 = opas końcowy.

### **3.3 Metody badawcze**

#### **Pobieranie próbek krwi**

**(P2, P3, P4)**

Krew do badań pobierana była z żyły szyjnej zewnętrznej przy wykorzystaniu probówek podciśnieniowych Vacuette o pojemności 10 ml zawierających antykoagulant.

#### **Podstawowy skład chemiczny tkanki mięśniowej**

**(P2, P3, P4)**

Próbki mięśnia półbłoniastego zostały posiekane, a następnie umieszczone w blenderze i mielone do uzyskania jednorodnej konsystencji. Analizy podstawowego składu chemicznego mięsa wykonano z użyciem analizatora Food Scan™ (Foss Electric, Hillerød, Denmark).

#### **Analiza jakości mięsa wołowego**

##### **Barwa mięsa (P3)**

Pomiar koloru przeprowadzono w systemie CIE L\*a\*b\* za pomocą urządzenia Minolta CM 2022 (Konica Minolta, Tokio, Japonia). Procedura określania koloru obejmowała pobranie próbki mięsa o grubości ok. 2 cm, w trzech punktach (wyniki zostały uśrednione). Odcień (b\*/a\*) oraz chromatyczność ( $\sqrt{a^2 + b^2}$ ) koloru próbki mięsa obliczono według formuły (Mordenti i wsp., 2012).

##### **Stopień marmurkowatości (P3)**

Ocena stopnia marmurkowatości została oszacowana za pomocą systemu kamer opartego na technologii VIA (VBG 2000) (Schulz i Sundrum, 2019) w miejscu przecięcia mięśnia między 10. a 11. żebrzem mięśnia *longissimus thoracis*.

##### **Analiza smaku (P3)**

Do określenia cech smakowych tkanki mięśniowej wykorzystano elektroniczny język. System składał się z pięciu czujników smaku, z których każdy był połączony ze sztuczną błoną lipidową. Zestaw czujników składał się z CA0 (do wykrywania substancji kwaśnych), C00 (do wykrywania substancji gorzkich), AE1 (do wykrywania substancji cierpkich), AAE (do wykrywania substancji umami) i CT0 (do wykrywania substancji słonych). Wszystkie czujniki były wstępnie kondycjonowane w roztworze referencyjnym przez jeden dzień przed wykonaniem pomiarów.

### **Konformacja tuszy (P3)**

Konformacja tuszy i otłuszczenie zostały ocenione zgodnie z systemem klasyfikacji tusz Unii Europejskiej (EUROP; Rada Unii Europejskiej, Nr 1234/Citation2007; Komisja Unii Europejskiej, Nr 1249/Citation2008). Ocena konformacji skupiała się na rozwoju określonych anatomicznych obszarów, w tym uda, grzbietu i łopatki, biorąc pod uwagę ich umięśnienie i ogólny kształt. System klasyfikacji EUROP przypisuje tuszy następujące stopnie: E (doskonała), U (bardzo dobra), R (dobra), O (średnia), P (słaba). Ocena otłuszczenia obejmowała badanie podskórnych oraz wewnątrzotrzewnowych złogów tłuszczu. Ocena ta wykorzystwała skalę numeryczną od 1 do 5, przy czym każda ocena wskazywała na różne poziomy odkładania się tłuszczu: 1: niski; 2: niewielki; 3: średni; 4: wysoki; 5: bardzo wysoki.

### **Przyrost masy ciała z dostarczonej energii metabolicznej (P3)**

Parametr przedstawia przyrost masy ciała, do którego zużyta została energia metabolizowana z paszy. Ilość energii na potrzeby bytowe wykorzystywana jest do wyznaczenia energii wykorzystanej do przyrostów, poprzez odjęcie jej od sumy energii metabolizowanej ogółem.

### **Utrata wody (P3)**

Próbki zhomogenizowanego mięsa o masie 40 g, zostały ciasno zapakowane w szklane naczynia wagowe. Próbki zanurzono i trzymano w łaźni wodnej w temperaturze 70 C przez 15 minut. Następnie próbki wyjęto z naczyń wagowych i pozostawiono na 24 godziny w celu odcieknięcia wody. Różnica w masie została zmierzona i wyrażona jako odsetek pierwotnej masy próbki, co stanowiło wskaźnik utraty wody.

### **pH (P3)**

Stopień kwasowości mięsa został określony przy użyciu pH-metru HI 99163 z funkcją pomiaru temperatury (Hanna Instruments, Providence, RI, USA).

### **Siła cięcia (P3)**

Z próbek mięśni wycięto kostki o wymiarach 2 × 2 × 2 cm. Siła cięcia została określona przy użyciu Zwick 5.0 Zwicky-Line (Zwick Roell Polska Sp. z o.o., Sp. k., Wrocław, Polska) (Przybylski i wsp., 2023).

## **Analiza poziomu bioaktywnych składników**

### **Anseryna, karnozyna, tauryna, koenzym Q10 (P2, P4)**

Analiza zawartości anseryny, karnozyny, tauryny oraz koenzymu Q10 została przeprowadzona przy użyciu wysokosprawnej chromatografii ciekowej RP-HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy). Separacje chromatograficzne wykonano w temperaturze pokojowej, stosując gradient rozpuszczalników na kolumnie Jupiter C18 300A (Phenomenex, Torrance, CA, USA), (Łukasiewicz i wsp., 2018). Fazami ruchomymi były: rozpuszczalnik A, który zawierał acetonitryl (Merck, Darmstadt, Niemcy), wodę (Sigma-Aldrich) oraz kwas trifluorooctowy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w stosunku 30:970:1 (v/v/v), oraz rozpuszczalnik B, który składał się z acetonitrylu, wody i kwasu trifluorooctowego w stosunku 970:30:1 (v/v/v). Przepływ wynosił 1,4 mL/min, a detekcja odbywała się przy długości fali 214 nm. Do analizy wstrzyknięto 25 µL końcowego roztworu. Wszystkie próbki analizowano dwukrotnie, aby potwierdzić powtarzalność wyników. Identyfikację i kwantyfikację potwierdzano przez porównanie ze standardami (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### **Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach i β-karoten (P2)**

Określenie zawartości witamin rozpuszczalnych w tłuszczach przeprowadzono przy użyciu chromatografu RP-HPLC Agilent 1100 oraz kolumny ZORBAX Eclipse XDB (Puppel i wsp., 2015).

### **Ekstrakcja tłuszczu i profil kwasów tłuszczowych (P2, P4)**

Ekstrakcję tłuszczu z mięsa wykonano metodą Folcha (AC, 1990). Metylacje kwasów tłuszczowych wykonano zgodnie z metodą transestryfikacji EN ISO 5509 (Iso, 2000). Zawartość funkcjonalnych kwasów tłuszczowych określono przy użyciu chromatografu gazowego Agilent 7890A oraz kolumny Varian Select FAME, (Solarczyk i wsp., 2020).

### **Analiza DNA: SCD1, LEP, DGAT1, SREBF1 i TG (P3, P4)**

DNA wyizolowano z krwi za pomocą zestawu DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z instrukcją producenta. Ilość wyizolowanego DNA zmierzono przy użyciu fluorometru Invitrogen Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) z zastosowaniem zestawu do oznaczania dsDNA o wysokiej czułości, a jakość oceniono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Próbki DNA izolowano w trzech powtórzeniach, a następnie łączono dla każdego zwierzęcia, aby zapewnić wiarygodną analizę genetyczną. Izolacja DNA i genotypowanie zostały przeprowadzone w

Instytucie Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu, przy użyciu metody polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR) wykonano zgodnie z instrukcją producenta przy użyciu mieszaniny AmpliTaq Gold DNA Master Mix (Thermo Fisher, USA).

### **Markery stresu oksydacyjnego**

#### **GluRed, GPx, SOD, TAS (P2, P4)**

Reduktaza glutationowa (GluRed), peroksydaza glutationowa (GPx), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) oraz całkowity status antyoksydacyjny (TAS) w osoczu krwi zostały zmierzone za pomocą analizatora NanoQuant Infinite M200 Pro (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) z użyciem dedykowanych zestawów ELISA od Randox Laboratories (Crumlin, UK). Dedykowane zestawy: reduktaza glutationowa (kat. nr GR2608), Ransel (peroksydaza glutationowa, kat. nr SC692), Ransod (dysmutaza ponadtlenkowa, kat. nr SD126) oraz całkowity status antyoksydacyjny TAS (kat. nr NX2331).

#### **DAP (P2, P4)**

DAP (stopień ochrony antyoksydacyjnej) został obliczony na podstawie stosunku molowego między przeciwutleniaczami a utleniaczami (Pizzoferrato i wsp., 2007).

$$DAP = \frac{\sum_{i=1}^n AC_i (n \text{ moles})}{OT(n \text{ moles})}$$

#### **MDA (P2, P4)**

Poziomy dialdehydu malonowego (MDA) w osoczu krwi (Kapusta i wsp., 2018a) zostały oznaczone za pomocą analizatora NanoQuant Infinite M200 Pro (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) przy długości fali 532 nm. W tym procesie 250 µL osocze krwi zmieszano z 25 µL 0,2% 2,6-bis(1,1-dimetyloetyl)-4-metylofenolu (Sigma-Aldrich, Warszawa, Polska) i 1 mL 5% kwasu trichlorooctowego (Sigma-Aldrich, Warszawa, Polska). Mieszaninę wirowano przy 14,000 obrotach/min przez 10 minut. Następnie 750 µL klarownego supernatantu przeniesiono do szklanej probówki i dodano 500 µL 0,6% kwasu tiobarbiturowego (Sigma-Aldrich, Warszawa, Polska). Roztwór wymieszano i inkubowano przez 45 minut w łaźni wodnej o temperaturze 90 C. Po inkubacji mieszaninę schłodzono i wirowano przy 4,000 obrotach/min przez 5 minut. Następnie 200 µL klarownego supernatantu przeniesiono do mikropłytki i wykonano pomiary za pomocą analizatora NanoQuant Infinite M200 PRO firmy Tecan (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) przy długości fali 532 nm.

### 3.4 Analiza statystyczna (P2, P3, P4)

(P2) Uzyskane dane zostały poddane analizie wariancji (ANOVA). Do zbadania rozkładu bioaktywnych składników frakcji białkowej wykorzystano test Shapiro-Wilka. Wszystkie testy zostały przeprowadzone przy użyciu pakietu IBM SPSS 23 (2023) . Dane przedstawiono jako średnie najmniejszych kwadratów z błędem standardowym średniej.

Zastosowano następujący model statystyczny:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + e_{ij}$$

gdzie:

- $Y_{ijk}$ — wartość badanej cechy,
- $\mu$  — średnia,
- $A_i$ — efekt i-tej rasy ( $i = 1-4$ ),
- $e_{ij}$ — błąd standardowy.

(P3) Analizę wariancji przeprowadzono za pomocą procedury GLM w pakiecie SAS (SAS software, wersja 9.2; Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA) (Marasinghe i Koehler, 2018), aby określić poziom istotności wszystkich zidentyfikowanych czynników, które mogły wpłynąć na badane cechy lub wpłynęły na związek między analizowanymi cechami a specyficznymi genotypami. Wszystkie zidentyfikowane czynniki miały istotny wpływ na badane cechy, dlatego zostały uwzględnione w ostatecznym modelu. Masa ciała i wiek na początku i na końcu eksperymentu były traktowane jako regresje liniowe w modelu (masa ciała w dniu rozpoczęcia tuczu, wiek zwierzęcia w dniu rozpoczęcia tuczu, wiek zwierzęcia w dniu uboju, masa ciała zwierzęcia w dniu uboju).

$$y_{ijklmno} = \mu + BREED_i + FATTENING_j + BREED * FATTENING_{ij} + \beta_o(LWSTART_k) + \beta_o(AGESTART_l) + \beta_o(LWSLAUG_m) + \beta_o(AGESLAUG_n) + e_{ijklmno}$$

- $y_{ijklmno}$  - badana cecha
- $\mu$  - ogólna średnia
- $BREED_i$  - stały efekt i-tej rasy bydła (HF, HF × CH)
- $FATTENING_j$  stały efekt j-tego rodzaju opasu (intensywne lub ekstensywne)
- $BREED * FATTENING_{ij}$ - interakcja między i-tą rasą a j-tym rodzajem opasu
- $\beta_o(LWSTART_k)$  - regresja liniowa na podstawie masy ciała w dniu rozpoczęcia opasu

- $\beta_o(AGESTART_l)$  - regresja liniowa na podstawie wieku w dniu rozpoczęcia opasu
- $\beta_o(LWSLAUG_m)$  - regresja liniowa na podstawie masy ciała w dniu uboju
- $\beta_o(AGESLAUG_n)$  - regresja liniowa na podstawie wieku w dniu uboju
- $e_{ijklmno}$  - błąd losowy

**(P4)** Analiza wariancji (ANOVA) została przeprowadzona w celu oceny wpływu polimorfizmów na poziomy biomarkerów stresu oksydacyjnego i bioaktywnych składników frakcji białkowej. Analiza ta pozwoliła na porównanie średnich pomiędzy różnymi genotypami oraz identyfikację statystycznie istotnych różnic. Aby potwierdzić wyniki ANOVA, sprawdzono rozkład normalny danych biomarkerów i poziomy białek przy użyciu testu Shapiro-Wilka.

Wykorzystano współczynnik korelacji Pearsona, aby zbadać związki pomiędzy polimorfizmami genetycznymi (DGAT1, SCD1 i LEP) a biomarkerami stresu oksydacyjnego, w tym dialdehydu malonowego (MDA), reduktazą glutationową (GluRed), peroksydazą glutationową (GPx), dysmutazą ponadtlenkową (SOD) i całkowitym statusem antyoksydacyjnym (TAS). Korelacje te pomogły zidentyfikować wszelkie istotne liniowe zależności między polimorficznymi formami genów a odpowiedzią na stres oksydacyjny.

Współczynnik korelacji Spearmana został użyty do zbadania związków między polimorfizmami genetycznymi a poziomami bioaktywnych składników. Analiza wykazała potencjalne nieliniowe zależności pomiędzy wariantami genetycznymi a stężeniami związków bioaktywnych. Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania IBM SPSS Statistics w wersji 23 (IBM, 2023).



## 4. Wyniki

**PI. KOSTUSIAK P.,** SLÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., GRODKOWSKI G., PUPPEL K. (2023). Polymorphism of genes and their impact on beef quality. *Current Issues in Molecular Biology*, 4749–4762.

Polimorficzne formy genów stanowią obiekty licznych badań związanych z nowoczesną hodowlą nakierowaną na poprawę wyników produkcyjnych zwierząt oraz ograniczenia występowania chorób. W niniejszej pracy przeglądowej zebrano i omówiono wyniki prac dotyczących czterech genów, które odgrywają fundamentalną rolę w poprawie jakości mięsa wołowego oraz wskaźników produkcyjnych w hodowli bydła mięsnego. Omówiono geny kodujące miostatynę, tyreoglobulinę, kalpainę oraz kalpastatynę.

### Miostatyna

Miostatyna (MSTN), znana również jako czynnik wzrostu i różnicowania 8 (GDF8, ang. growth and differentiation factor 8), jest jednym z kluczowych regulatorów wzrostu i rozwoju mięśni szkieletowych. Została zidentyfikowana u wielu gatunków ssaków, a jej znaczenie jest szczególnie istotne w kontekście hodowli zwierząt przeznaczonych na produkcję mięsa. Obniżona aktywność genu MSTN prowadzi do nadmiernego rozwoju tkanki mięśniowej, co wynika z przesunięcia ramki odczytu i opóźnienia sygnału hamującego przyrost mięśni, który charakteryzuje polimorfizm tego genu. Skutkuje to cechą określaną jako „podwójne umięśnienie” (DM, ang. double muscling) lub hipertrofia mięśni. Termin ten jednak bywa nieprecyzyjny, gdyż w wielu przypadkach, w tym u bydła, mutacja prowadzi do hiperplazji prenatalnej, a nie hipertrofii. Efektywność opasu jest uwarunkowana częstością występowania cechy podwójnego umięśnienia czego dowodem są liczne badania analizujące wpływ tej cechy na wydajność rzeźną. Cecha jest również związana z modulacją adipogenezy, co czyni ją szczególnie cenną w hodowli bydła mięsnego, ze względu na jej potencjalnie korzystny wpływ na konformację tuszy oraz zwiększenie udziału wyrębów wysokiej jakości. Najbardziej znaną rasą bydła mięsnego z cechą DM jest belgijska biało-błękitna, jednak wiele innych ras także charakteryzuje się znaczącą frekwencją tej mutacji w populacji (tabela 4).

**Tabela 4.** Polimorfizm genu miostatyny

<b>Rasa</b>	<b>Pozycja</b>	<b>Mutacja</b>
<b>Belgijska bialo-błękitna</b>	c.821	Del11
<b>Blonde d'aquitaine</b>	c.821	Del11
	g.3811	T>G
<b>Charolaise</b>	c.610	C>T
<b>Limousine</b>	c.821	Dell11
	c.610	C>T
	g.433	C>A
<b>Marchigiana</b>	g.874	G>T
<b>Piemontese</b>	c.938	G>A

Ze względu na strukturę pogłowia bydła w Polsce, w której dominują rasy mleczne, wykorzystanie buhajów ras mięsnych mających w genotypie DM do inseminacji krów mlecznych stanowi skuteczny sposób na poprawę cech wartości opasowej cieląt w krzyżowaniu towarowym, co oczywiście będzie przekładało się na zwiększenie opłacalności produkcji. Jednak w populacji zwierząt cechujących się hipertrofią mięśni może występować zwiększony udział włókien mięśniowych o typie glikolitycznym, które są bardziej podatne na zmęczenie oraz rozwój kwasicy metabolicznej. To z kolei wiąże się z ryzykiem wzmożonej podatności na stres oksydacyjny. Zjawisko to wymaga odpowiednich działań mających na celu jego ograniczenie.

### **Kalpaina Kalpastatyna**

Układ kalpaina (CAPN1) kalpastatyna (CAST) wykazuje niezmiernie ważny wpływ na proces kruszenia mięsa w procesie jego dojrzewania. Kruszenie mięsa jest z kolei niezwykle istotnym elementem determinującym jakość mięsa, które pokonuje długą drogę nim trafi na stół konsumenta. Z tego powodu od wielu lat prowadzone są prace badawcze nad zawartością kalpain oraz ich inhibitorów kalpastatyn, od których zależy nawet 46% zmienności w kruchości wołowiny. Na frekwencje występowania polimorfizmu genów układu kalpaina-kalpastatyna ma wpływ przede wszystkim rasa bydła, dlatego też prowadzone badania na SNP u wielu ras stanowią istotny czynnik doskonalenia zwierząt. CAPN występuje w trzech głównych formach:  $\mu$ -kalpaina (CAPN1), m-kalpaina (CAPN2), kalpaina 3 (CAPN3), których aktywność jest blokowana przez specyficzny inhibitor CAST. Formy kalpain różnią się od siebie stężeniem jonów wapnia niezbędnym do umożliwienia osiągnięcia połowy maksymalnej aktywności. W przypadku CAPN1 wartość ta wynosi 3-50 $\mu$ M, CAPN2 0,4-0,8 mM. W przypadku CAPN3 do

aktywacji niezbędne jest 0,1mM lub jony Na<sup>+</sup>, co odróżnia ją od innych CAPN. Poubojowo najważniejszą rolę odgrywają CAPN1 i CAPN2, wpływając na proteolizę w mięśniach. Za inicjatora procesu uważa się CAPN1, która aktywowana jest w niższych stężeniach jonów wapnia i wcześniej niż CAPN2 rozpoczyna proces kruszenia mięsa. Obie formy CAPN są oczywiście istotne w procesie kruszenia, jednak do ich prawidłowego funkcjonowania niezbędny jest również inhibitor CAST regulujący ich aktywność. W zależności od rodzaju mięśnia, aktywność CAST będzie zmienna. CAST1 stanowi podstawową formę kalpastatyny i występuje w większości tkanek mięśniowych, CAST2 lokalizowane jest w mięśniach, które charakteryzowały się w badaniach wysoką siłą cięcia (zjawisko niepożądane), CAST3 oraz CAST4 również wykazują potencjalny wpływ na CAPN, jednak nie zostały jeszcze dostatecznie przebadane, aby wyraźnie stwierdzić ich wpływ na proces kruszenia mięsa. Zrozumienie funkcjonowania układu CAPN-CAST jest niezwykle ważne w produkcji wołowiny kulinarnej, która wymaga wytworzenia produktu o jak najlepszych właściwościach. Poprzez prace prowadzone nad CAPN dąży się do osiągnięcia jak najlepszej kruchości po procesie dojrzewania mięsa, natomiast badania nad CAST w celu zachowania jego struktury. Poza funkcją związaną z kruszeniem mięśni, kalpainsy odpowiadają również za przyżyciowe utrzymanie homeostazy komórek, procesy ich różnicowania oraz naprawy.

Wszystkie omówione geny stanowią istotny element w produkcji wysokiej jakości mięsa wołowego. Choć ich funkcje prawdopodobnie nie zostały jeszcze w pełni poznane, liczne badania naukowe świadczą o stałym zainteresowaniu tą tematyką oraz potrzebie dalszego poszerzania wiedzy na temat wpływu poszczególnych polimorfizmów genów na jakość mięsa, wyniki produkcyjne i zdrowotność zwierząt.

**P2. KOSTUSIAK P., SŁÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., SAKOWSKI T., PUPPEL K.**  
(2023). Relationship between Beef Quality and Bull Breed. *Animals*, 13, 1–16.

Doświadczenie składało się z dwóch etapów – badań przyżyciowych oraz poubojowych. Przyżyciowo określono masę ciała oraz przyrosty dobowe 67 buhajów czterech ras. Poubojowo zaś określono masę ich tuszy. Badania przeprowadzone na mięśniach półbłoniastych od buhajów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (PHF), limousine (LM), charolaise (CH) i hereford (HH) miały zaś na celu analizę wpływu rasy na kształtowanie się jakości mięsa wołowego. Badane parametry obejmowały podstawowy skład chemiczny, profil kwasów

tłuszczowych, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, mierniki stresu oksydacyjnego oraz bioaktywne składniki frakcji białkowej.

Analiza wyników produkcyjnych wykazała, że buhaje rasy PHF osiągnęły najniższą masę ciała spośród wszystkich badanych ras, zaś buhaje LM najwyższą. Różnica ta wyniosła 158 kg, co świadczy o przewadze genetycznej rasy mięsnej do opasu. Drugi najwyższy wynik masy ciała odnotowano w grupie buhajów CH, natomiast trzeci wynik u buhajów HH. Dzielne przyrosty wynosiły odpowiednio 0,82 kg w grupie PHF, 1,08 kg w LM, 1,06 kg w CH oraz 1,04 kg w HH. Uzyskane masy ciała przełożyły się na masę tusz. Najcięższe tusze pozyskano od buhajów CH (416 kg), zaś najlżejsze od buhajów PHF (317 kg). Tusze od buhajów LM miały masę 413 kg, a od HH 390 kg. Wyniki charakteryzujące rasy mięsne wskazują na ich wyraźną przewagę nad rasą PHF i podkreślają ich przewagę w potencjale genetycznym związanym z użytkowaniem mięsnym.

Analiza wpływu rasy na podstawowy skład chemiczny (białko, tłuszcz surowy, kolagen) również ujawniła przewagę ras mięsnych nad rasą PHF. Najwyższą zawartość białka w 100 g mięśnia semimembranosus stwierdzono w próbkach pobranych od buhajów rasy LM (23,73 g), od buhajów CH (22,05 g), HH (21,21g) oraz najniższą w próbkach od buhajów PHF (19,40 g). Różnica w poziomie zawartości białka między rasą LM a PHF wyniosła 22,32%, co w połączeniu z osiąganymi przyrostami oraz masą tuszy po uboju, uwydatnia znaczenie tej rasy w produkcji wołowiny. Różnice te wpływają również na zmiany w rekomendowanym spożyciu tego mięsa. Do zobrazowania istotności różnic można założyć dzienne zapotrzebowanie na białko dorosłego mężczyzny na poziomie 1 g na 1 kg masy ciała. Spożycie dziennej dawki białka z mięsa rasy PHF przełoży się na 412,37 g, natomiast LM 337,16 g. Różnica pomiędzy rasą LM a PHF wyniesie w tym przypadku 75,21 g mięsa w celu dostarczenia tej samej ilości białka (Wu, 2016).

Zawartość tłuszczu surowego była najwyższa w badanych próbkach od rasy HH (3,01 g), mniej było w próbkach od rasy PHF (2,95 g), od rasy CH (2,26 g) oraz najmniejsza w próbkach pobranych od rasy LM (2,16 g). Francuskie rasy LM oraz CH charakteryzują się niższym udziałem tłuszczu śródmięśniowego od pozostałych ras. Ten rodzaj tłuszczu decyduje o soczystości oraz smakowości mięsa. W krajach Europy zachodniej chuda wołowina cieszy się jednak większym zainteresowaniem. Jest to odmienny trend od wielu krajów na świecie, w których konsumenci preferują mięso o wyższej zawartości tłuszczu, głównie tłuszczu śródmięśniowego.

Kolejnym analizowanym parametrem była zawartość kolagenu w mięśniach, która kształtuje kruchość mięsa. Najwyższy jego poziom (na 100g mięśnia), stwierdzono u rasy PHF (592,24 mg). Najniższą zaś zawartość odnotowano u rasy CH (542,52 mg), oraz kolejno u LM (592,24 mg) i u HH (552,2 mg).

Analiza profilu nienasyconych kwasów tłuszczowych uwzględniała kwas wakcenyowy VA (C18:1 trans-11), kwas linolowy LA (C18:2 n-6), sprzężony kwas linolowy CLA (C18:2 cis-9, trans-11), kwas alfa-linolenowy ALA (C18:3 n-3), kwas eikozapentaenowy EPA (C20:5 n-3) oraz kwas dokozaheksaenowy DHA (C22:6 n-3). Najwyższa zawartość CLA w odniesieniu do 100 g tłuszczu została stwierdzona u rasy CH (4,27 g). Uzyskano wynik o 64,86% wyższy od tego, który zaobserwowano u rasy PHF (2,59 g). Rasa ta charakteryzowała się również najniższymi wynikami w koncentracji wszystkich analizowanych kwasów tłuszczowych.

W pozostałych badanych kwasach najwyższe różnice wyniosły 96,39% dla VA u rasy CH, 63,23% dla LA w próbkach od rasy CH, 51,2% dla ALA u rasy LM, 76,19% dla EPA u rasy CH i 100% dla DHA w próbkach pobranych od buhajów rasy CH w porównaniu do rasy PHF.

W mięśni pólbloniastym pozyskanym od czterech ras określono również zawartość witamin rozpuszczalnych w tłuszczach: witaminy A w formie  $\alpha$ -retinolu,  $\beta$ -karotenu stanowiącego prekursor witaminy A i witaminy E w jej aktywnej formie  $\alpha$ -tokoferolu.

Najniższe poziomy tych trzech badanych witamin stwierdzono w próbkach mięśni pobranych od buhajów rasy PHF. U rasy LM wynik był o 80% wyższy, u rasy CH o 65%, zaś u rasy HH o 5% w przypadku badania poziomu  $\beta$ -karotenu w stosunku do zawartości tej witaminy u rasy PHF. Podobnie kształtowała się zawartość alfa-retinolu, która była wyższa w próbkach pobranych mięśni od rasy LM, CH i HH odpowiednio o 22,73%, 19,7%, 3,03% od rasy PHF. W analizie koncentracji alfa-tokoferolu stwierdzono, że w próbkach mięśni rasy CH ilość tej witaminy była o 93,17% wyższa, u rasy HH o 91,3% i u rasy LM wyższa o 72,67% od ilości odnotowanej u rasy PHF.

Analiza TAS (całkowity status antyoksydacyjny), DAP (stopień potencjału antyoksydacyjnego) i MDA (dialdehyd malonowy) wykazała istotne zróżnicowanie pośród badanych ras zwierząt. Największą różnicę stwierdzono w przypadku TAS między rasami CH i PHF, która wyniosła 147,5% na korzyść rasy CH. Rasy LM i HH uzyskały wyższy poziom TAS od rasy PHF odpowiednio o 70% i 6,25%. Najniższy poziom DAP również zanotowano

u rasy PHF i był on niższy od opasów rasy LM o 58,2%, a od rasy CH o 52,34% i o 22,07% niższy od rasy HH. Najwyższą zawartość markera stresu oksydacyjnego MDA wykazano u buhajów rasy PHF. U rasy LM było go mniej o 62,42%, o 63,64% u rasy CH i o 25,76% w próbkach rasy HH.

Badanie wpływu rasy na zawartość bioaktywnych składników frakcji białkowej (anseryny, karnozyny, tauryny, koenzymu Q10, kreatyniny oraz kreatyny) wykazało przewagę ras mięsnych nad rasą PHF. W odniesieniu do rasy PHF najwyższą zawartość anseryny stwierdzono u rasy LM i była on wyższa o 21%. W przypadku karnozyny spośród badanych ras, rasa CH miała jej najwięcej, o 14,99% w porównaniu do rasy PHF. Rasa LM charakteryzowała się zaś najwyższą zawartością tauryny w stosunku do rasy PHF o 26,87%. 35,82% różnicy uzyskano porównując wyniki zawartości koenzymu Q10 u rasy CH w stosunku do rasy PHF. 36,17% kreatyniny i 6,47% kreatyny było więcej w próbkach pobranych od rasy LM w odniesieniu do próbek pozyskanych od PHF. Najniższe różnice we wszystkich analizowanych parametrach względem rasy PHF stwierdzono w próbkach rasy HH.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na ważne korelacje między rasą bydła a kształtowaniem się jakości mięsa wołowego. Rasy późno dojrzewające, takie jak limousine i charolaise, konsekwentnie osiągały najwyższe wyniki pod względem zawartości większości analizowanych parametrów, wykazując wyraźną przewagę nad rasą PHF oraz hereford.

**P3. KOSTUSIAK P., BAGNICKA E., ŻELAZOWSKA B., ZALEWSKA M., SAKOWSKI T., SŁÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., PUPPEL K. (2024). Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. *Genes*, 5, 1–16.**

W publikacji przeprowadzono identyfikację i opisano charakterystykę polimorfizmów w genach kandydujących, takich jak DGAT1, LEP, SCD1, SREBF1 oraz TG, w celu określenia ich wpływu na mechanizmy regulujące jakość odżywczą i sensoryczną mięsa wołowego u walców rasy holsztyńsko-fryzyjskiej oraz mieszańców F1 holsztyńsko-fryzyjska x charolaise.

### **Frekwencje alleli polimorficznych form analizowanych genów**

W analizie SCD1, analizowaną mutacją była substytucja T>C, skutkująca mutacją niesynonimiczną, która powoduje w łańcuchu białkowym zmianę aminokwasu waliny na alaninę. Frekwencja występowania genotypów wynosiła odpowiednio: 5,7% dla VV, 55,0%

dla AA i 39,3% dla VA. W analizie polimorfizmu LEP mutacja jest substytucją T>C, a frekwencja genotypów wynosiła odpowiednio: 23,2% dla CC, 19,1% dla TT i 57,7% dla CT. W analizie TG, poszukiwaną mutacją była zamiana T>C. Frekwencja genotypów wynosiła 73,5% dla CC, 23,5% dla CT i 3,0% dla TT. W analizie DGAT1 poszukiwaną mutacją była zamiana T>C, a frekwencja genotypów wynosiła 83,9% dla CC, 8,8% dla TT oraz 7,3% dla CT. Mutacja w analizowanym fragmencie SREBF11 polegała na delecji 84 pz. Frekwencja genotypów była następująca: brak delecji = 91,1% i heterozygoty = 8,9%.

### **Zależność między cechami a poszczególnymi SNP.**

Badania wykazały interakcję rasy ze stopniem otluszczenia tuszy, z wyższymi wartościami w przypadku mieszańców HFxCH ( $p \leq 0,01$ ) oraz homozygotą LL w SREBP11 ( $p \leq 0,05$ ). Wykazana została interakcja między otluszczeniem, rasą i intensywnością żywienia. Wyższy stopień marmurkowatości mięsa ( $p \leq 0,01$ ) stwierdzono w grupie mieszańców, w przypadku genu TG odnotowano wyższe wartości dla TT niż dla CT ( $p \leq 0,05$ ) i CC ( $p \leq 0,05$ ). Stwierdzony został wpływ intensywności chowu na marmurkowatość ( $p \leq 0,01$ ). Stwierdzono wyższe wartości w grupach o niższej intensywności żywienia oraz wykazana została interakcja rasy i intensywności żywienia na tę cechę. W przypadku otluszczenia, stwierdzono wyższe wartości dla mieszańców ( $p \leq 0,05$ ), a w przypadku genu LEP stwierdzono wyższe wartości dla homozygoty CC niż dla homozygoty TT ( $p \leq 0,05$ ). Badanie wykazało związek LWG z rasą (wyższe wartości dla mieszańców,  $p \leq 0,01$ ), intensywnością chowu (wyższe wartości dla bardziej intensywnego żywienia,  $p \leq 0,01$ ) oraz interakcję intensywności chowu i rasy, przy czym analizowane genotypy nie miały wpływu na ten parametr. W przypadku DM\_LWG, stwierdzono, związek z intensywnością chowu, z wyższymi wartościami dla niższej intensywności ( $p \leq 0,01$ ) oraz interakcję rasy i intensywności opasu. Wyniki ME\_LWG wskazują na interakcje rasy i intensywności opasu z genotypem SCD1, w którym wykazano niższe wartości dla AA niż dla VA ( $p \leq 0,05$ ) i VV ( $p \leq 0,05$ ). Nie wykazano istotnego wpływu DGAT1 na konformację tuszy.

W badaniu wykazany został wpływ polimorficznych form genów na wybrane cechy jakościowe mięsa. Zidentyfikowano związek Wlthaw7 z rasą, w którym wyższe wartości wystąpiły w przypadku mieszańców ( $p \leq 0,05$ ), a także z polimorfizmem DGAT1 (wyższe wartości dla homozygoty TT niż CC,  $p \leq 0,05$ ). W przypadku Wlcook7 związek z polimorfizmem LEP wskazywał na wyższe wartości dla homozygoty TT niż CC ( $p \leq 0,05$ ). pH7 wykazało związek z intensywnością żywienia (wyższe wartości dla niższej intensywności,

$p \leq 0,05$ ), a także genem SCD1 (wyższe wartości dla AA niż w VA  $p \leq 0,01$  i VV  $p \leq 0,05$ ). Pomiary barwy mięsa wskazały na związek L7 z rasą (wyższe wartości dla mieszańców,  $p \leq 0,01$ ), z genotypem DGAT1 (najwyższa wartość wystąpiła u heterozygot), z genotypem TG (wyższa wartość CC niż CT,  $p \leq 0,05$ ) oraz z genotypem SCD1 (wyższe wartości VA niż CC,  $p \leq 0,05$ ). a7 był związany z rasą (wyższe wartości dla mieszańców,  $p \leq 0,01$ ), polimorfizmem TG (wyższe wartości dla TT niż heterozygoty,  $p \leq 0,01$ ) i genotypem LEP (wyższe wartości dla heterozygoty niż genotypu CC,  $p \leq 0,05$ ); natomiast b7 był związany z rasą (wyższe wartości dla mieszańców,  $p \leq 0,01$ ) i polimorfizmem TG (wyższe wartości dla genotypu CC niż dla heterozygoty,  $p \leq 0,01$ ). Wlthaw14 był związany z intensywnością chowu (wyższe wartości dla niższej intensywności  $p \leq 0,01$ ) i genotypem TG (wyższe wartości dla homozygoty CC niż TT,  $p \leq 0,01$ ). Wlcook14 zmieniał się wraz z polimorfizmem SCD1 (wyższe wartości dla heterozygoty,  $p \leq 0,05$ ). pH 14 było związane z LEP (najwyższa wartość dla genotypu CC) oraz z polimorfizmem SCD1 (wyższe wartości dla heterozygoty niż homozygoty AA,  $p \leq 0,05$ ). L14 był związany z rasą (wyższe wartości dla mieszańców,  $p \leq 0,01$ ), polimorfizmem DGAT1 (najniższa wartość dla homozygoty CC) i polimorfizmem SCD1 (wyższe wartości dla heterozygoty w porównaniu z homozygotą AA,  $p \leq 0,05$ ). Zidentyfikowany został związek między a14 a rasą (wyższe wartości dla mieszańców,  $p \leq 0,05$ ), intensywnością chowu (wyższa wartość dla niższej intensywności,  $p \leq 0,05$ ) i polimorfizmem DGAT1 (wyższa wartość dla homozygoty TT niż dla CC,  $p \leq 0,05$ ); podczas gdy b14 był związany z rasą (wyższe wartości dla mieszańców,  $p \leq 0,01$ ) i polimorfizmem DGAT1 (wyższe wartości dla homozygoty TT niż dla CC,  $p \leq 0,05$ ). Brązowy kolor mięsa był związany z rasą (z wyższymi wartościami dla wolców PHF,  $p \leq 0,05$ ), a jasny kolor mięsa był również związany z rasą (z wyższą wartością dla opasów rasy PHF,  $p \leq 0,01$ ). Na siłę cięcia wpływała jedynie rasa (z wyższą wartością dla mieszańców,  $p \leq 0,05$ ). Spośród analizowanych SNP jedynym polimorfizmem wpływającym na słodki smak był SCD1, z wyższymi wartościami dla heterozygoty niż homozygoty VV,  $p \leq 0,05$ .

Wyniki prowadzonych prac wskazują na istotne zależności między polimorfizmem analizowanych genów, a kształtowaniem się jakości mięsa wołowego.



**P4. KOSTUSIAK P., BAGNICKA E., ŻELAZOWSKA B., ZALEWSKA M., SAKOWSKI T., SLÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., PUPPEL K. (2024).** Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with DGAT1, LEP, and SCD1 Genes. *Biomolecules*, 14, 1309.

W publikacji przeprowadzono identyfikację i charakterystykę polimorfizmów w genach kandydujących, takich jak DGAT1, LEP oraz SCD1 w celu określenia ich wpływu na funkcjonowanie endogennych mechanizmów ochrony antyoksydacyjnej u buhajów rasy hereford.

#### **Zależność między genami, a markerami stresu oksydacyjnego**

Analiza polimorfizmu genu DGAT1 wykazała najwyższy poziom MDA u homozygot TT, który wyniósł 15% więcej niż w przypadku CC oraz 26% więcej niż w CT. W przypadku GluRed najwyższy poziom również stwierdzono u TT i był on wyższy o 57% od wyniku CC i 19% wyższy od wyniku CT. Homozygoty TT miała również najwyższy wynik w odnośnie poziomu GPx i był on 20% wyższy od CC i 46% od CT. W przypadku SOD najwyższy wynik zaobserwowano w genotypie CT, gdzie różnica wynosiła 14% względem CC i 28% względem TT. Również najwyższy wynik zaobserwowano w TAS dla CT i wynosił on 95% więcej niż w CC i 40% więcej niż TT.

W przypadku LEP najwyższy poziom stwierdzono dla MDA u homozygoty CC, która była 9% wyższa od CT i 10% od TT. Analiza GluRed wykazała najwyższe wartości u TT, które były wyższe o 16% od CC i 7% od CT. Najwyższe wartości dla GPx zaobserwowano w genotypie CC, które były wyższe o 5% od CT i 26% od TT. W SOD najwyższe wartości zaobserwowano u CT i wynosiły 24% więcej niż w CC i 14% niż w TT. Analiza TAS wskazała najwyższe wartości u TT i wynosiły one 24% więcej niż w przypadku CC i 9% niż u CT.

Analiza genu SCD1 wykazała najwyższe wartości MDA u heterozygoty VA, które były wyższe o 3% niż u AA i 14% wyższe od VV. Wartość GluRed była najwyższa w przypadku genotypu AA, wykazując 18% wyższy wynik w porównaniu do genotypu VA oraz 50% wyższy w porównaniu do genotypu VV. Aktywność GPx osiągnęła najwyższy poziom w genotypie VA, z 33% wyższym poziomem w porównaniu do genotypu AA i o 68% w porównaniu do VV. Aktywność SOD była najwyższa w genotypie AA, uzyskując o 35%

wyższy poziom niż w genotypie VA i o 38% wyższy niż w genotypie VV. Poziom TAS również był najwyższy w genotypie AA, o 9% wyższym wynikiem w porównaniu do genotypu VA oraz wyższą zawartością o 59% w porównaniu do homozygoty VV.

Analiza korelacji między markerami stresu oksydacyjnego, a genami kandydującymi wykazała istotne statystycznie zależności. Gen DGAT1 skorelowany był z aktywnością GluRed ( $r=0,369$ ,  $p\leq 0,01$ ), a także z poziomem TAS ( $r=0,309$ ,  $p\leq 0,05$ ), który wskazuje na ogólną wyższą zdolność ograniczania stresu oksydacyjnego, co wskazuje na związek z ochroną antyoksydacyjną. Wykazana została ujemna korelacja LEP z tauryną ( $r=-0,578$ ,  $p\leq 0,01$ ) oraz anseryną ( $r=-0,514$ ,  $p\leq 0,01$ ). W przypadku SCD1 stwierdzono istotne ujemne korelacje z GluRed ( $r=-0,318$ ,  $p\leq 0,05$ ) oraz SOD ( $r=-0,368$ ,  $p\leq 0,01$ ), co oznacza, że polimorficzne formy SCD1 są związane z obniżoną aktywnością tych związków antyoksydacyjnych. SCD1 wykazywał także ujemną korelację z TAS ( $r=-0,275$ ,  $p\leq 0,05$ ), co sugeruje odwrotną zależność z ogólną zdolnością antyoksydacyjną.

Analiza zawartości tauryny, Q10, karnozyny i anseryny z genami DGAT1, LEP i SCD1 wykazała różnice zależne od genotypów. Dla genu DGAT1, poziom tauryny był najwyższy w przypadku homozygot TT, i był wyższy o 38% w porównaniu do genotypów CC i CT. Karnozyna wykazała najwyższe wartości w genotypie TT, z 8% wyższym wynikiem w porównaniu do genotypu CC i 12% w porównaniu do CT. Poziom anseryny także był najwyższy w grupie TT, z 26% przewagą względem CC i 15% względem CT.

W przypadku genu LEP, poziom tauryny były zbliżone dla genotypów CC i CT. Stężenia Q10 były jednakowe we wszystkich genotypach. Zawartość karnozyny była najwyższa w przypadku homozygot CC z wynikiem o 6% wyższym od TT. Najwyższy poziom anseryny odnotowano u homozygot TT, wykazując przewagę o 24% względem CC i 27% względem CT.

W przypadku SCD1, poziom tauryny był o 19% niższy u homozygot AA w porównaniu do VA i VV. Stężenie Q10 były najwyższe w genotypach AA, VA i VV, bez istotnych różnic między nimi. W genotypie AA stwierdzono najwyższy poziom karnozyny i jej zawartość była wyższa o 4% w stosunku do VA i o 10% względem VV. Anseryna osiągnęła najwyższe wartości w genotypie VV, z wyższym poziomem o 13% w porównaniu do AA i VA.

Analiza korelacji wykazała, że dla genu DGAT1 korelacje z tauryną, Q10, karnozyną i anseryną były ujemne, ale nieistotne statystycznie. Dla genu LEP również zaobserwowano istotne ujemne korelacje: tauryna ( $r=-0,578$ ,  $p\leq 0,01$ ), Q10 ( $r=-0,411$ ,  $p\leq 0,05$ ), karnozyna ( $r=-$

0,278,  $p \leq 0,05$ ) i anseryna ( $r = -0,514$ ,  $p \leq 0,01$ ). Wskazywać może to na odwrotną zależność między wariantami genu LEP a tymi biomarkerami. W przypadku genu SCD1 korelacje były nieistotne statystycznie dla wszystkich biomarkerów.

Wyniki przeprowadzonych prac wskazują na powiązania między DGAT1, SCD1 i LEP, a metabolizmem tłuszczu, stresem oksydacyjnym i aktywnością antyoksydantów. Wykazane zależności stanowią podstawę do uznania analizowanych genów jako istotnych w kształtowaniu zdrowotności zwierząt poprzez odpowiednio prowadzoną selekcję połączoną z genotypowaniem, co pozwoli na ograniczenie występowania zjawiska stresu oksydacyjnego i poprawę jakości mięsa wołowego.

## 5. Podsumowanie i Wnioski

**P1. KOSTUSIAK P., SŁÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., GRODKOWSKI G., PUPPEL K.**  
(2023). Polymorphism of genes and their impact on beef quality. *Current Issues in Molecular Biology*, 4749–4762.

Analiza polimorfizmu genów związanych z jakością mięsa, takich jak miostatyna, tyreoglobulina, kalpaina oraz kalpastatyna, stanowi istotny obszar badań genetycznych. Badania nad tymi genami umożliwiają lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych regulujących fenotypowe cechy jakościowe mięsa, co jest kluczowe dla optymalizacji programów selekcyjnych. Dalsze eksploracje genów charakteryzujących się istotnym wpływem na parametry jakościowe mięsa powinny być kontynuowane, aby wspierać rozwój zrównoważonych strategii hodowlanych, które uwzględniają zarówno wydajność produkcyjną, jak i dobrostan zwierząt. Zrozumienie interakcji pomiędzy genotypem a fenotypem oraz ich wpływu na właściwości organoleptyczne i biochemiczne mięsa jest niezbędne do uzyskania produktów o wysokiej jakości, co jest ważne w kontekście rosnącego zapotrzebowania na zdrową i wysokowartościową żywność.

1. Miostatyna jest kluczowym regulatorem miogenezy, a jej polimorficzne formy mają istotny wpływ na rozwój mięśni szkieletowych. Zmniejszona ekspresja MSTN prowadzi do hipertrofii mięśniowej, objawiającej się zjawiskiem „podwójnego umięśnienia” (double muscling), co skutkuje przyrostem masy mięśniowej o 20-25%.

- Taki fenotyp sprzyja poprawie konformacji tuszy oraz zwiększeniu udziału wartościowych wyrębów, co jest korzystne w kontekście produkcji bydła mięsnego.
2. Tyreoglobulina jest istotnym czynnikiem determinującym zawartość tłuszczu śródmięśniowego, który ma kluczowe znaczenie dla soczystości i smakowitości mięsa. Zróżnicowanie genetyczne w ekspresji TG może znacząco wpływać na profile lipidowe różnych ras bydła, co w konsekwencji przekłada się na jakość wołowiny.
  3. Układ kalpaina (CAPN) i kalpastatyna (CAST) odgrywa fundamentalną rolę w procesie proteolizy mięśniowej podczas dojrzewania. Polimorfizmy w genach CAPN1 i CAST są odpowiedzialne za znaczną część zmienności w kruchości mięsa, co wskazuje na ich potencjał w selekcji genetycznej. Odpowiednia regulacja aktywności kalpain, w szczególności CAPN1, w połączeniu z inhibicją przez CAST, jest niezwykle ważna w kształtowaniu jakości mięsa.

**P2. KOSTUSIAK P., SŁÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., SAKOWSKI T., PUPPEL K.** (2023). Relationship between Beef Quality and Bull Breed. *Animals*, 13, 1–16.

Badania przeprowadzone na bydle ras polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (PHF), limousine (LM), charolaise (CH) oraz hereford (HH) wykazały istotne różnice w parametrach jakościowych mięsa, w tym potencjale antyoksydacyjnym, które można przypisać genotypowi zwierząt. Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

1. Analiza całkowitego statusu antyoksydacyjnego oraz stężenia dialdehydu malonowego wskazała na wyższą stabilność oksydacyjną mięsa pochodzącego od ras mięsnych. Niższe wartości MDA u ras takich jak limousine i charolaise sugerują bardziej efektywny mechanizm obronny przeciwko reaktywnym formom tlenu, co przekłada się na wyższy stopień ochrony antyoksydacyjnej (DAP).
2. Potencjał antyoksydacyjny mięsa ras późno dojrzewających jest wspierany przez wyższą zawartość bioaktywnych peptydów oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych, takich jak sprzężone dieny kwasu linolowego i kwasy omega-3. Te komponenty nie tylko stabilizują strukturę lipidową, ale również redukują stres oksydacyjny poprzez neutralizację reaktywnych form tlenu, co ogranicza uszkodzenia komórek mięśniowych. Wyższy poziom całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w mięsie ras

późno dojrzewających świadczy o ich przewadze w kontekście ochrony przed oksydacją.

3. Mięśnie ras mięsnych charakteryzowały się wyższymi zawartościami nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, co może mieć istotne znaczenie dla metabolizmu lipidów. Obecność bioaktywnych składników wspiera mechanizmy obronne organizmu oraz stabilizuje jakość mięsa.
4. Wyższe stężenia MDA w mięśniach rasy PHF wskazują na nasilenie peroksydacji lipidów, co jest powiązane z wyższym stresem oksydacyjnym w tej grupie. Zjawisko to może negatywnie wpływać na jakość mięsa oraz jego trwałość. W przypadku ras późno dojrzewających, takich jak limousine i charolaise, korzystniejszy profil lipidowy oraz wyższa aktywność antyoksydacyjna mogą przeciwdziałać tym negatywnym skutkom, co potwierdza ich przewagę w kontekście jakości mięsa.

**P3. KOSTUSIAK P., BAGNICKA E., ŻELAZOWSKA B., ZALEWSKA M., SAKOWSKI T., SŁÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., PUPPEL K. (2024).** Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. *Genes*, 5, 1–16.

Podsumowując, wyniki badań jednoznacznie wskazują na istotny wpływ polimorfizmów genów DGAT1, LEP, SCD1, SREBF1 i TG na kształtowanie się jakości mięsa wołowego, zarówno pod względem wartości odżywczej, jak i właściwości sensorycznych. Analizowane genotypy determinują akumulację tłuszczu oraz cechy organoleptyczne, co potwierdza wszystkie postawione hipotezy i podkreśla kluczową rolę tych genów w poprawie cech produkcyjnych w hodowli bydła mięsnego.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz postawionych hipotez można sformułować następujące wnioski:

1. Polimorfizmy w genie DGAT1, kodującym enzym diacyloglicerol acylotransferazę, istotnie wpływają na akumulację trójglicerydów w tkance mięśniowej, co przekłada się na skład tłuszczu śródmięśniowego oraz właściwości sensoryczne mięsa wołowego, takie jak marmurkowatość, kruchość i soczystość. Analiza wyników wskazuje, że warianty genetyczne DGAT1 mają bezpośredni wpływ na zawartość i rozmieszczenie tłuszczu, co determinuje różnice w jakości mięsa między genotypami homozygotycznymi i heterozygotycznymi. Homozygoty TT wykazywały wyższe

wartości w parametrach sensorycznych niż homozygoty CC, co potwierdza hipotezę o istotnym wpływie polimorfizmów tego genu na jakość mięsa.

2. Polimorfizmy w genie LEP, kodującym leptynę, wykazują istotny wpływ na właściwości odżywcze i sensoryczne mięsa wołowego, poprzez modulację mechanizmów regulujących dystrybucję tłuszczu śródmięśniowego i podskórnego. Wyniki badań potwierdzają, że różnice w sekwencjach kodujących LEP przekładają się na zróżnicowaną zawartość tłuszczu, wpływając na parametry jakości mięsa, takie jak marmurkowatość. Homozygoty CC charakteryzowały się wyższą zawartością tłuszczu i otłuszczeniem tuszy w porównaniu do homozygot TT, co potwierdza istotność polimorfizmów LEP w regulacji homeostazy lipidowej oraz ich wpływ na wartość odżywczą mięsa.
3. Polimorfizmy w genie SCD1, kodującym desaturazę stearylo-CoA, wykazują znaczący wpływ na właściwości sensoryczne mięsa poprzez modulację zawartości tłuszczu śródmięśniowego i desaturację kwasów tłuszczowych. Zróżnicowane warianty genetyczne SCD1 wpływają na teksturę i walory smakowe mięsa, co potwierdzają wyższe wartości sensoryczne u heterozygot VA w porównaniu do homozygot AA i VV. Wyniki te wskazują na istotny udział genu SCD1 w regulacji cech sensorycznych, takich jak soczystość, smak i tekstura, co jest zgodne z założeniami hipotezy 3.
4. Polimorfizmy w genach SREBF1 i TG odgrywają istotną rolę w kształtowaniu profilu lipidowego oraz właściwości odżywczych i sensorycznych mięsa wołowego. Warianty tych genów mają wpływ na zawartość tłuszczu śródmięśniowego, marmurkowatość, co przekłada się na różnice w jakości mięsa między analizowanymi grupami genotypowymi. Wyższe wartości marmurkowatości i zawartości tłuszczu zaobserwowano w homozygotach TT genu TG oraz homozygotach LL genu SREBF1, co potwierdza hipotezę o wpływie tych genów na cechy związane z jakością mięsa.

**P4. KOSTUSIAK P., BAGNICKA E., ŻELAZOWSKA B., ZALEWSKA M., SAKOWSKI T., SŁÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., PUPPEL K. (2024).** Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with DGAT1, LEP, and SCD1 Genes. *Biomolecules*, 14, 1309.

Na podstawie przeprowadzonej analizy wyników dotyczących polimorfizmu genów DGAT1, LEP i SCD1, oraz ich wpływu na markery stresu oksydacyjnego i właściwości jakościowe mięsa wołowego, można sformułować następujące wnioski:

1. Zmienności genotypowe w genach DGAT1, LEP i SCD1 miały istotny wpływ na aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenie produktów peroksydacji lipidów, takich jak dialdehyd malonowy. Genotypy homozygot TT i CC wykazały różnice w poziomach MDA, co sugeruje zróżnicowaną odpowiedź na stres oksydacyjny w tkance mięśniowej.
2. W przypadku genu DGAT1, homozygoty TT charakteryzowały się wyższym poziomem MDA oraz aktywnością enzymów GluRed i GPx. Wykazane różnice wskazują na mechanizmy adaptacyjne organizmu w odpowiedzi na zwiększone obciążenie oksydacyjne.
3. Gen LEP miał związek z wyższymi poziomami MDA u homozygot CC, co sugeruje potencjalną podatność na stres oksydacyjny. Jednocześnie, u homozygot TT wykazana została wyższa aktywność GPx.
4. Badania wykazały, że polimorfizmy w genie SCD1 wpływają na potencjał antyoksydacyjny mięsa wołowego. .
5. Wykazane korelacje między genem DGAT1 a aktywnością GluRed oraz TAS wskazują, że polimorfizmy w obrębie tego genu wpływają na zdolności adaptacyjne organizmu do utrzymania homeostazy. Ujemne korelacje między SCD1 a aktywnością enzymów antyoksydacyjnych wskazują na zależność między genotypem a odpornością na stres oksydacyjny.

Wyniki przedstawionych badań potwierdziły hipotezy dotyczące wpływu polimorfizmów genów na jakość mięsa wołowego poprzez modulację procesów związanych ze stresem oksydacyjnym.

## 6. Bibliografia

- 1 Ac A. (1990). Association of official analytical chemists. *Official methods of analysis of AOAC International*.
- 2 Barendse W., Bunch R., Thomas M., Armitage S., Baud S., Donaldson N. (2004). The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44, 669-674.
- 3 Bartoň L., Bureš D., Kott T., Řehák D. (2016). Associations of polymorphisms in bovine DGAT1, FABP4, FASN, and PPARGC1A genes with intramuscular fat content and the fatty acid composition of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Science*, 114, 18-23.
- 4 Bąk-Filipek E. (2021). *Uwarunkowania rozwoju rynku wołowiny w Polsce*, Wydawnictwo SGGW.
- 5 Bellia F., Vecchio G., Cuzzocrea S., Calabrese V., Rizzarelli E. (2011). Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases. *Molecular aspects of medicine*, 32, 258-266.
- 6 Bernt, E., Bergmeyer, H.-U., Möllering, H. (1965). Creatine. *Methods of enzymatic analysis*. Elsevier.
- 7 Bhuiyan M., Yu S., Jeon J., Yoon, D., Cho Y., Park E., Kim N., Kim K., Lee J. (2009). DNA polymorphisms in SREBF1 and FASN genes affect fatty acid composition in Korean cattle (Hanwoo). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22, 765-773.
- 8 Bonilla D. A., Kreider R. B., Stout J. R., Forero D. A., Kerksick C. M., Roberts M. D., Rawson E. S. (2021). Metabolic basis of creatine in health and disease: a bioinformatics-assisted review. *Nutrients*, 13, 1238.
- 9 Campos C. F., Costa T. C., Rodrigues R. T., Guimarães S. E., Moura F. H., Silva W., Chizzotti M. L., Paulino P. V., Benedeti P. D., Silva F. F. (2020). Proteomic analysis



- reveals changes in energy metabolism of skeletal muscle in beef cattle supplemented with vitamin A. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 3536-3543.
- 10 Carvalho T. D. d., Siqueira F., Torres Júnior R. A. d. A., Medeiros S. R. d., Feijó G. L. D., Souza Junior M. D. d., Blecha I. M. Z., Soares C. O. (2012). Association of polymorphisms in the leptin and thyroglobulin genes with meat quality and carcass traits in beef cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41, 2162-2168.
  - 11 Friedman J. M., Halaas J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395, 763-770.
  - 12 Grodzki H. (2008). Alfabet ras bydła miesnego. Część XI. Limousine. *Bydło*, 36-37.
  - 13 Grodzki H., Przysucha T. (2004). Krzyżowanie towarowe: szansa na dobrą wołowinę. *Top Agrar Polska*, 18-21.
  - 14 Grodzki H., Przysucha T. (2010). Krzyżowanie towarowe jako jedna z metod zwiększenia ilości i poprawy jakości wołowiny. *Przegląd Hodowlany*, 11, 3-7.
  - 15 Gus. (2023). *Dane z systemu Identyfikacji i Rejestracji Zwierząt (IRZ) Agencji Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa; pogłowie bydła według siedziby stada*. (Strona internetowa). Warszawa: Główny Urząd Statystyczny. [Dostęp 10.05.2024 2024].
  - 16 Herrera N. J., Sonderman J. A., Velazco D. M., Calkins C. (2022). Beef Quality and Oxidative Stability from Cattle Fed High Levels of Vitamin E. *Nebraska Beef Cattle Reports*, 1207, 96-100.
  - 17 Hou Y., He W., Hu S., Wu G. (2019). Composition of polyamines and amino acids in plant-source foods for human consumption. *Amino Acids*, 51, 1153-1165.
  - 18 IBM (2023). IBM SPSS Statistics for Windows. 23 ed. Armonk, NY, USA.
  - 19 ISO P. (2000). Animal and vegetable fats and oils—preparation of methyl esters of fatty acids. *Polish Standard Method PN-EN ISO, 5509, 2000*.

- 20 Jasiorowski H.,Przysucha T. (2004). Bydło miesne: wybor rasy. *Top Agrar Polska*, 102-104.
- 21 Jukić I., Kolobarić N., Stupin A., Matić A., Kozina N., Mihaljević Z., Mihalj M., Šušnjara P., Stupin M.,Ćurić Ž. B. (2021). Carnosine, small but mighty—prospect of use as functional ingredient for functional food formulation. *Antioxidants*, 10, 1037.
- 22 Kapusta A., Kuczyńska B., Puppel K. (2018a). Relationship between the degree of antioxidant protection and the level of malondialdehyde in high-performance Polish Holstein-Friesian cows in peak of lactation. *PLoS One*, 13, e0193512.
- 23 Kapusta A., Kuczyńska B., Puppel K.,Kamaszewski M. (2018b). The relationship between early stages of lactation and antioxidant capacity of milk and blood plasma of PHF cows. *Animal Science Papers & Reports*, 36.
- 24 Keane M., Allen P. (2002). A comparison of Friesian-Holstein, Piemontese× Friesian-Holstein and Romagnola× Friesian-Holstein steers for beef production and carcass traits. *Livestock Production Science*, 78, 143-158.
- 25 Kieburtz K., Tilley B. C., Elm J. J., Babcock D., Hauser R., Ross G. W., Augustine A. H., Augustine E. U., Aminoff M. J., Bodis-Wollner I. G. (2015). Effect of creatine monohydrate on clinical progression in patients with Parkinson disease: a randomized clinical trial. *Jama*, 313, 584-593.
- 26 Kostusiak P., Puppel K., Kunowska-Słószarz M., Słószarz J., Gołębiewski M., Grodkowski G., Solarczyk P., Wisniewski K.,Przysucha T. (2019). Beef cattle breeds in Poland. *Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW. Animal Science*, 58, 261-277.
- 27 Ladeira M. M., Schoonmaker J. P., Gionbelli M. P., Dias J. C., Gionbelli T. R., Carvalho J. R. R., Teixeira P. D. (2016). Nutrigenomics and beef quality: a review about lipogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 918.
- 28 Łozicki A., Dymnicka M., Arkuszewska E.,Pustkowiak H. (2012). Effect of pasture or maize silage feeding on the nutritional value of beef. *Annals of Animal Science*, 12, 81.

- 29 Łukasiewicz M., Puppel K., Slószarz J., Gołębiowski M., Kuczyńska B., Batorska M., Więcek J., Kunowska-Slósarz M., Popczyk B., Balcerak M. (2018). Influence of age and sex on the content of bioactive peptides and the fatty acid profile of venison (*Cervus elaphus*). *Animal Science Papers and Reports*, 36, 371-381.
- 30 Ma H., Zhao J., Meng H., Hu D., Zhou Y., Zhang X., Wang C., Li J., Yuan J., We Y. (2020). Carnosine-modified fullerene as a highly enhanced ROS scavenger for mitigating acute oxidative stress. *ACS applied materials & interfaces*, 12, 16104-16113.
- 31 Marasinghe M. G., Koehler K. J. (2018). Statistical data analysis using SAS. Springer.
- 32 Mitsuishi H., Yayota M. (2024). The Efficacy of  $\beta$ -Carotene in Cow Reproduction: A Review. *Animals*, 14, 2133.
- 33 Mordenti A. L., Martelli G., Brogna N., Nannoni E., Vignola G., Zaghini G., Sardi L. (2012). Effects of a soybean-free diet supplied to Italian heavy pigs on fattening performance, and meat and dry-cured ham quality. *Italian Journal of Animal Science*, 11, e80.
- 34 Nemati Z., Alirezalu K., Besharati M., Amirdahri S., Franco D., Lorenzo J. M. (2020). Improving the quality characteristics and shelf life of meat and growth performance in goose fed diets supplemented with vitamin E. *Foods*, 9, 798.
- 35 Pei J., Pan X., Wei G., Hua Y. (2023). Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1147414.
- 36 Pizzoferrato L., Manzi P., Marconi S., Fedele V., Claps S., Rubino R. (2007). Degree of antioxidant protection: a parameter to trace the origin and quality of goat's milk and cheese. *Journal of Dairy Science*, 90, 4569-4574.
- 37 Pogorzelska, J. (2007). Krzyżowanie towarowe. *Hodowca Bydła*, 9, 88-91.
- 38 Prado J., Prado I., Visentainer J., Rotta P., Perotto D., Moletta J., Ducatti T. (2009). The effect of breed on the chemical composition and fatty acid profile of the Longissimus

- dorsi muscle of Brazilian beef cattle. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18, 231-240.
- 39 Przybylski W., Jaworska D., Płecha M., Dukaczewska K., Ostrowski G., Sałek P., Sawicki K., Pawłowska J. (2023). Fungal biostarter effect on the quality of dry-aged beef. *Foods*, 12, 1330.
- 40 Puppel K., Kapusta A., Kuczyńska B. (2015). The etiology of oxidative stress in the various species of animals, a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 2179-2184.
- 41 Purchas R., Rutherford S., Pearce P., Vather R., Wilkinson B. (2004). Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q10, and creatine. *Meat Science*, 66, 629-637.
- 42 PZHiPBM. (2023). *Ocena Wartości Użytkowej Bydła Ras Mięsnych Wyniki Za Rok 2022*. Polski Związek Hodowców i Producentów Bydła Mięsnego. [Dostęp 09.03.2024].
- 43 Schulz L., Sundrum A. (2019). Assessing marbling scores of beef at the 10th rib vs. 12th rib of longissimus thoracis in the slaughter line using camera grading technology in Germany. *Meat Science*, 152, 116-120.
- 44 Solarczyk P., Gołębiewski M., Słószarz J., Łukasiewicz M., Przysucha T., Puppel K. (2020). Effect of breed on the level of the nutritional and health-promoting quality of semimembranosus muscle in purebred and crossbred bulls. *Animals*, 10, 1822.
- 45 Stojkovic M., Westesen K., Zakhartchenko V., Stojkovic P., Boxhammer K., Wolf E. (1999). Coenzyme Q10 in submicron-sized dispersion improves development, hatching, cell proliferation, and adenosine triphosphate content of in vitro-produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 61, 541-547.
- 46 Trombetti F., Minardi P., Mordenti A. L., Badiani A., Ventrella V., Albonetti S. (2022). The evaluation of the effects of dietary vitamin E or selenium on lipid oxidation in rabbit hamburgers: comparing TBARS and hexanal SPME-GC analyses. *Foods*, 11, 1911.

- 47 Wang Y., Li S., Chen J., Zhu H., Harsh B. N., Boler D. D., Dilger A. C., Shike, D. W., Suman S. P. (2022). Supranutritional supplementation of vitamin E influences myoglobin post-translational modifications in postmortem beef longissimus lumborum muscle. *Meat and Muscle Biology*, 6.
- 48 Wood J., Enser M., Fisher A., Nute G., Sheard P., Richardson R., Hughes S., Whittington F. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78, 343-358.
- 49 Wu G. (2020). Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health. *Amino Acids*, 52, 329-360.
- 50 Zaaboul F., Liu Y. (2022). Vitamin E in foodstuff: Nutritional, analytical, and food technology aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21, 964-998.
- 51 Zalewska M., Puppel K., Sakowski T. (2021). Associations between gene polymorphisms and selected meat traits in cattle—A review. *Animal Bioscience*, 34, 1425.
- 52 Zhang L., Ren H., Yang J., Gan Q., Zhao F., Gao H., Li J. (2015). Effect of thyroglobulin gene polymorphisms on growth, carcass composition and meat quality traits in Chinese beef cattle. *Molecular Biology Reports*, 42, 1403-1407.
- 53 Zheng M., Liu Y., Zhang G., Yang Z., Xu W., Chen Q. (2023). The applications and mechanisms of superoxide dismutase in medicine, food, and cosmetics. *Antioxidants* 12 (9): 12.

## **7. Zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej pt. „Zależność między genami kandydującymi, a kształtowaniem się potencjału oksydacyjnego mięsa wołowego” oraz oświadczenia współautorów publikacji**

Rozprawę doktorską pt.: „Zastosowanie transkryptomiki, epigenomiki i proteomiki w analizie ekspresji genów kształtujących potencjał antyoksydacyjny mięsa wołowego – zależność między genami kandydującymi a kształtowaniem się potencjału antyoksydacyjnego mięsa wołowego” stanowi zbiór czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

- P1. KOSTUSIAK P.,** SLÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., GRODKOWSKI G., PUPPEL K. (2023). Polymorphism of genes and their impact on beef quality. *Current Issues in Molecular Biology*, 4749–4762.
- P2. KOSTUSIAK P.,** SLÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., SAKOWSKI T., PUPPEL K. (2023). Relationship between beef quality and bull breed. *Animals*, 13, 1–16.
- P3. KOSTUSIAK P.,** BAGNICKA E., ŻELAZOWSKA B., ZALEWSKA M., SAKOWSKI T., SLÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., PUPPEL K. (2024). Genetic markers related to meat quality properties in fattened HF and HF x Charolaise steers. *Genes*, 5, 1–16.
- P4. KOSTUSIAK P.,** BAGNICKA E., ŻELAZOWSKA B., ZALEWSKA M., SAKOWSKI T., SLÓSZARZ J., GOŁĘBIEWSKI M., PUPPEL K. (2024). Genotype-dependent variations in oxidative stress markers and bioactive proteins in Hereford bulls: associations with DGAT1, LEP, and SCD1 genes. *Biomolecules*, 14, 1309.



Review

# Polymorphism of Genes and Their Impact on Beef Quality

Piotr Kostusiak , Jan Slószarz, Marcin Gołębiewski , Grzegorz Grodkowski and Kamila Puppel \*

Institute of Animal Science, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland; piotr\_kostusiak@sggw.edu.pl (P.K.); jan\_slosarz@sggw.edu.pl (J.S.); marcin\_golebiewski@sggw.edu.pl (M.G.); grzegorz\_grodkowski@sggw.edu.pl (G.G.)

\* Correspondence: kamila\_puppel@sggw.edu.pl

**Abstract:** The single-nucleotide polymorphism (SNP) form of genes is a valuable source of information regarding their suitability for use as specific markers of desirable traits in beef cattle breeding. For several decades, breeding work focused on improving production efficiency through optimizing the feed conversion ratio and improving daily gains and meat quality. Many research teams previously undertook research work on single-nucleotide polymorphism in myostatin (MSTN), thyroglobulin (TG), calpain (CAPN), and calpastatin (CAST) proteins. The literature review focuses on the most frequently addressed issues concerning these genes in beef cattle production and points to a number of relevant studies on the genes' polymorphic forms. The four genes presented are worth considering during breeding work as a set of genes that can positively influence productivity and production quality.

**Keywords:** cattle; beef; myostatin; thyroglobulin; calpain; calpastatin; SNP



**Citation:** Kostusiak, P.; Slószarz, J.; Gołębiewski, M.; Grodkowski, G.; Puppel, K. Polymorphism of Genes and Their Impact on Beef Quality. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2023**, *45*, 4749–4762. <https://doi.org/10.3390/cimb45060302>

Academic Editor: Madhav Bhatia

Received: 7 May 2023

Revised: 24 May 2023

Accepted: 26 May 2023

Published: 30 May 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Population growth and the enrichment of many countries are increasing the demand for quality products [1]. One of these is beef, which is an important part of many people's diets. A number of research teams previously undertook work to study the determinants of beef quality and looked for a way to implement the results of their research. This paper undertakes the task of reviewing the current state of knowledge about four candidate genes and the determination of their impact on beef quality. The genes highlighted in this work are myostatin (MSTN), thyroglobulin 5 (TG5),  $\alpha$ -calpain (CAPN1), and calpastatin (CAST). Beef has long been the third most consumed meat after poultry and pork [2], with this trend due to its high price and, thus, higher consumer demand for quality [3]. In developed countries, it probably previously reached its peak per capita consumption, and for ethical reasons and due to environmental concerns, its consumption is now slightly decreasing [4]. Customers in highly developed countries prefer meat with a lower fat content [5,6]; this contradicts their taste choices in blind tests, in which they stated that they preferred the taste of beef with a higher fat content [7]. Beef with a higher intramuscular fat (IMF) content is also more nutritious [8]. Polymorphic forms of TG5 gene can increase intramuscular fat content by 6.5% [9] and can be used to further improve of cattle performance. This state of affairs, therefore, is a challenge for breeders, who must meet the demand of customers whose actual preferences seem to contradict the choices they make. Null mutation in MSTN results in 20–25% lower muscle mass in the Belgian Blue breed [10], which makes a significant difference in terms of productivity. To increase meat tenderness, work on CAPN1 and CAST, which improve meat quality, should be carried out at the same time [11]. Genomic selection is extremely important due to its effectiveness in the process of improving meat quality. Juiciness, color, tenderness, and water-holding capacity are important elements of beef quality [12]. Meat production worldwide exceeded 337 million tons in 2020 [13], and this growth was accompanied by an increasing interest in higher quality products [14,15]. It is, therefore, necessary to conduct work on candidate genes, which can be an important tool

in shaping breeding programs and will expand our knowledge about important issues, such as production efficiency and meat quality. The literature was selected based on keywords related to the topic of the paper in several bibliographic databases of the Warsaw University of Life Sciences, including Web of Science and Scopus.

## 2. Myostatin

Myostatin (MSTN), also known as GDF8 (growth and differentiation factor 8), is one of the most important regulators of skeletal muscle development [16]. It is a highly conserved gene that can be identified in many mammal livestock species [10]. This gene plays a crucial role in muscle size development [17]. Huang et al. reported that a lack of MSTN activity resulted in the overgrowth of skeletal muscles—this issue is called the double muscling (DM) trait [18]. The double muscling phenotype is described using a number of symbols: DM or N, DM or dm, D or n, C or N, A or a, and mh or + [19]. It is highly desired among cattle producers due to its positive impact on the meat content of carcasses. MSTN can generate both a significantly higher proportion of skeletal muscle on the carcasses of slaughtered animals and the expression of adipose tissue through inhibiting or promoting adipogenesis [20]. Muscles can be as much as 20–25% larger than those of individuals without the mutation [10], while a decrease in the proportion of organ mass [21,22] and a reduced proportion of fat on the carcass are also associated traits [23].

All members of the TGF- $\beta$  (transforming growth factor - $\beta$ ) family are characterized by three distinct domains: the N-terminal signal domain, the C-terminal mature peptide, and the propeptide domain [10]. In cattle, these trait were mapped at chromosome 2 [24]. Other similar characteristics, such as the hydrophobic core of amino acids near the N-terminal signal domain, cysteine residues in the C terminal region, and the conserved RSRR proteolytic processing signal at the C-terminus, indicate that MSTN is a member of this family [25]. However, there is a difference that distinguishes MSTN from the rest of this family—the shorter nucleotide sequences at the C-terminus.

MSTN expression might be identified in various tissues. It can be identified in mammary glands, lymphocytes, spleen, and the cardiomyocytes in heart tissue, and it has an important role in skeletal muscle development [26]. It consists of three exons and two introns. The exons code for a 375 amino-acid (aa) latent protein, which later becomes biologically active through post-translational modification. Through forming disulfide bonds, the polypeptide undergoes intracellular homodimerization [27,28]. Two forms are produced: the N-terminal propeptide region and the C-terminal mature region. These forms initiate intracellular signaling cascades due to their ability to bind and activate the type II activin receptor located on the cell surface (ActRIIB and ActRIIA). Subsequently, the autophosphorylation process of ActRIIB I leads to the recruitment and activation of the low-affinity activin type I receptors ALK-4 or ALK-5. Through phosphorylating the transcription factors Smad2 and Smad3 with activated type I receptor kinase, it is possible for them to interact with Smad4 (co-Smad) and translocate to the nucleus in order to activate the transcription of the target gene [29]. The activated MSTN receptor is able to inhibit protein kinase B, which determines muscle protein synthesis and cell proliferation. The process of increasing the size of muscle fibers is called muscle fiber hypertrophy (or hypertrophy for short) and is strongly regulated through Protein kinase B (Akt). The formation of mature skeletal muscles is the result of myogenic differentiation. The high proliferation muscle precursors formed during embryogenesis differentiate into myoblasts. Myostatin determines the regulation of pre-natal muscle development processes through affecting myoblast proliferation, muscle precursors, and differentiation [30]. MSTN also affects the regulation of the marker that initiates the proliferation of the muscle precursor Pax3 in limb muscles. MSTN is additionally responsible for the increased expression of p21, which stops the proliferation of myoblasts that express myoblast determination protein 1 (MyoD), which is an important regulator of MSTN expression during myogenesis [20].

The phenomenon of muscle hypertrophy was previously identified in many mammalian species. However, muscle hypertrophy is not an accurate term because, in many



cases, muscle growth is due to pre-natal hyperplasia [31]. The literature indicates that in species such as cattle, horses, sheep, and goats, changes in MSTN gene expression mainly cause hyperplasia, while hypertrophy is observed in mice [32]. Thus, the term is used casually. Muscles with larger surface areas increase their size significantly, while deeper muscles tend to decrease in size compared to normal muscles. When raising beef cattle, muscle size is very important, as it affects the conformation of the carcass and the proportions of the valuable elements that determine profits from the sale of the animal. Reduced body weights and body fats were observed in obese rats using sActRIIB or a polyclonal antibody to MSTN [33].

MSTN is an important component in myogenesis. However, this action is not its only function that affects production yield. Some sources report that it plays an important role in adipogenesis. MSTN can inhibit either adipogenesis in preadipocytes or can promote it in pluripotent stem cells. The deletion or inhibition of MSTN might improve muscle mass and reduce fat mass [34–36]. To determine the effect of MSTN on adipogenesis, white and brown adipocytes should be distinguished. White adipocytes are responsible for storing energy in large lipid droplets, while brown adipocytes contain much more numerous small droplets, which are used in non-shivering thermogenesis [37]. Studies report that MSTN can not only inhibit the adipogenesis of white adipocytes but also of brown adipocytes. This process involves Smad3-mediated  $\beta$ -catenin stabilization and TGF- $\beta$ /Smad3 signaling [38]. Moreover, it was previously proven that under certain conditions of adipogenesis, mouse embryonic fibroblasts can differentiate into brown fat cells. MSTN-deficient primary mouse embryonic fibroblasts show differentiation into brown adipocytes with increased lipid metabolism [39]. MSTN inhibition can lead to a reduction in subcutaneous body fat in mammals. Transgenic mice whose propeptide cDNA sequence had suppressed MSTN showed reduced subcutaneous, epididymal, and retroperitoneal adipose tissue compared to normal animals [40]. McPherron and Lee [41] concluded that myostatin inhibition may be more effective at limiting adipose tissue gain than reducing it when soluble MSTN receptors from the extracellular domain of type IIB activin receptors were used in mice and induced through a high-fat diet. Reduced body weight and body fat were observed in obese rats using sActRIIB or a polyclonal antibody to MSTN. McPherron and Lee observed that white adipose tissue was converted to brown [41].

There are many reports on the effects of the various allelic variants through which breeding work was carried out to improve both slaughter yield and the quality of the meat itself, as well as reports of inactive MSTN on traits related to growth rate and carcass conformation [20,42,43]. The result of these works is the consolidation of the DM trait in the population, which is a desirable trait because of its beneficial effects on production efficiency and raising the quality of meat—a characteristic that is desired by consumers [44]. These animals have a lower proportion of bone and fat in the carcass, significantly higher proportions of muscle, a lower proportion of connective tissue, and improved meat tenderness. Many researchers focused their work on studying this phenomenon for specific breeds (Table 1).

**Table 1.** MSTN gene polymorphism in cattle breeds.

Reference	Breed	SNP	
		Position	Mutation
[24]	Belgian Blue	c.821	Del11
[10]	Blonde d'Aquitaine	c.821	Del11
[45]		g.3811	T > G
[46]	Charolaise	c.610	C > T
[46]	Limousine	c.821	Del11
[47]		c.610	C > T
[48]		g.433	C > A
[47]	Marchigiana	g.874	G > T
[46]	Piedmontese	c.938	G > A

One of the best-known cattle breeds with the DM trait is the Belgian Blue [49]. Many years of selection for this trait resulted in it being accentuated to an unprecedented level. According to a study by Grobet et al. [24], this breed has an 11-bp deletion (g.821–831 del11) in the open reading frame. There is the loss of three amino acids (275–277) and a shift in the reading frame after aa 274, resulting in a stop codon after aa 287.

The differences between DM and normal cattle can be seen in many aspects of the slaughter performance. The carcass' lower fat and bone content, the lower collagen content of the muscles, and the significant increase in the size of some muscles relative to normal cattle all account for the value of this trait in beef cattle production conditions [50]. In Belgian Blue cattle, the semitendinosus muscle can be 1.6 times larger than in normal animals [51]. There are also significant changes in subcutaneous and intramuscular fat content. It is worth separating these two types of fat due to the consumption value of the meat. European customers prefer lean beef; thus, these changes are particularly welcome. The situation is, however, different in the markets of many countries where reduced intramuscular fat reduces the steaks' attractiveness [52–54].

Myostatin plays a key role in the processes of adipogenesis and myogenesis. The deletion and inhibition of MSTN contributes mainly to an increase in size of individual skeletal muscles and a reduction in the proportion of fat in the carcass. These are important traits from the breeder's point of view; thus, they are often used in crossbreeding to improve slaughter performance.

The DM phenotype is characterized by significant muscle hypertrophy relative to normal individuals. There is significant muscle prominence in the hindquarter and anterior quadrant areas, with clearly defined individual muscle parts separated by grooves. Breeding work led to the consolidation of the DM trait, which improves production results. It was only after some time that research began on the impact of this trait on animal health. Arthur et al. pointed out health problems in such animals, stating that lower fertility and lower calf viability were observed [55,56]. Dystocia is another problem found in DM cattle [57]. The well-muscled hindquarters and the effect of hyperplasia on calves prior to birth result in a higher frequency of dystocia. Belgian Blue cattle are the best example of this—almost every parturition ends with a cesarean section. It also turns out that these animals are more likely to become ill, as evidenced by an increased frequency of disease entities involving the respiratory, urinary, digestive, motor, and many other systems. For breeders, the effect on reproduction is also important. Animals with this trait are characterized by higher birth weights, which makes calving more difficult [54]. In addition, DM cattle have increased proportions of glycolytic muscle fibers, which are characterized by a susceptibility to fatigue; thus, these animals show a lower resistance to physical exertion and a faster onset of metabolic acidosis [58].

### 3. Thyroglobulin

Thyroglobulin (TG) is the main protein of the thyroid gland and makes up to 75% of the gland's protein [59]. The thyroglobulin gene is considered to be a candidate gene that affects the ability to accumulate intramuscular fat; thus, it is important for breeders and further breeding work. Thyroglobulin production takes place in the thyroid gland's follicular cells, and is secreted from the endoplasmic reticulum into a site where it undergoes iodination (incorporation of iodine into the tyrosine residues of thyroglobulin). It is stored inside thyroid follicles [60]. As a glycoprotein homodimer, it is a substrate in the production of the thyroid's hormones and a carrier of triiodothyronine (T3) and tetraiodothyronine (T4) (called thyroxine). The influence of thyroid hormones is important for the regulation of metabolism and its effects on the growth, differentiation, and homeostasis of fat cell composition [61]. Thus, these are important hormones that affect the development of fat cells. Hormone release occurs due to the stimulation of the thyroid cells by the thyrotropic hormone (TSH). Further activity by the released hormones stimulates the hepatic processes of gluconeogenesis and lipogenesis, as well as the occurrence of glycogenolysis [62].

The TG5 gene is one of the longest genes in mammals. In cattle, it is located in the centromere region of the fourteenth chromosome, and consists of 37 exons. It is made up of two allelic variants, i.e., TG5C and TG5T, and three genotypes, i.e., TG5CT, TG5DW, and TG5T [63,64]. This gene affects the accumulation of body fat and is used for animal selection based on a single nucleotide polymorphism (SNP) located in the 5' untranslated region of this gene [65].

Intramuscular fat content is an important factor in determining the quality of beef. This trait positively correlated with the juiciness and palatability of meat, and improves its flavor, tenderness, and nutritional value. Meat rich in intramuscular fat is characterized by a higher content of fat-soluble vitamins and unsaturated fatty acids [66]. This characteristic is referred to as meat marbling, and influences consumers' interest during the purchase [67]. Most of the intramuscular fat is located between bundles of muscle fibers in the perimysium connective tissue [68].

Intramuscular fat deposition can be influenced by factors such as sex, weaning age, age and weight at slaughter, nutrition, and environmental factors. However, the trend in the quantitative change in intramuscular fat that is under the influence of the mentioned factors is related to breed [69]. Genetic potential largely determines the final marbling score (MS) [69].

In studies by Rincker et al. [70] and Casas et al., the TG5 SNP had no clear effect on beef marbling [70,71]. This result could be due to the rearing period being too short (<250 days) or other factors. Wood et al., in their meta-analysis based on 11 papers, indicated that there was a positive association between the polymorphic forms of TG5 and the degree of meat marbling [72]. A significant relationship between beef quality and TG5 for Charolaise and Angus cattle was also determined by Van Eenennaam et al. [73]. They indicated there was a significantly higher IMF content for TT genotypes compared to CC. Moreover, in the work of Barendse et al. on a sample containing 1750 cattle, it was indicated that TG5 can be used as an effective tool to improve marbling [9].

Park et al. [69], on the basis of papers written by Albrecht et al. [74] and Irie et al. [75], determined that the average IMF content in the longissimus dorsi (LD) muscle in the Japanese Wagyu breed was 36.5%; for the Korean Hanwoo breed, it was 13.7% [76–79], while for the Angus breed, it was 7.1% [80–82]. For the Hereford crossbreed, the figure was 6.9%. In research by Dubovskova et al., the presence of TT homozygote at 5% was determined in beef characterized by good marbling, and this also had the best results in terms of IMF content [83].

#### 4. The Calpain–Calpastatin System

In the case of CAST and CAPN1, the influence on meat tenderness variability is more than 40% [84]. Thus, they are an extremely important element in the beef production process and have a very strong impact on the quality of the final product. Work carried out on beef tenderness is very important for improving meat quality. Out of the group of genes on which research has been conducted for decades, most of the work focused on calpains (CAPN) and calpastatins (CAST), which are the CAPN inhibitors. From 1993 to 2021, there were at least 175 English-language papers related to the topic [85]. This is a clear signal that work should be conducted to analyze the factors affecting meat quality, in particular tenderness (associated both with CAST [86] and CAPN1 [87,88]), which is the most important determinant of the customers' willingness to buy. The variability in genes in the calpain–calpastatin system depends on the breed of cattle; therefore, the use of SNPs as genetic markers for animal selection to improve genetic progress is a promising direction [89,90]. Smith et al. indicated that meat tenderness is 46% determined by genetic factors and 54% determined by environmental factors [91].

Calpains are considered a candidate for being responsible for the meat tenderization process, alongside Takahashi's calcium tenderization theory [92]. Many authors argue that the calpains that are dependent on the presence of calcium ions are responsible for this process. There is the consideration that these calpains may be responsible by virtue of

their access to substrates, their ability to hydrolyze proteins, and because they are also found within the cells of muscle tissue. Evidence for their actions are indicated via the reduction in proteolysis under the influence of calcium ion chelators [93], as well as zinc chloride [94]. The main components of the calpain system are  $\mu$ -calpain (CAPN1), m-calpain (CAPN2), calpain 3 (originally named p94, CAPN3), and their specific inhibitor, i.e., calpastatin (CAST), which blocks their activity [95]. Calpains are found in the cytoplasm of all vertebrate cells [96]. They are named after the calcium ion concentration required for their activation:  $\mu$ -calpain requires 3–50  $\mu$ M of calcium and m-calpain 0.4–0.8 mM to reach half of its maximum activity. In live animals, calcium concentration in the muscles is 0.2  $\mu$ M [97], and only after slaughter does the calcium ion concentration rise to 100  $\mu$ M [98], thus allowing  $\mu$ -calpain activation. CAPN1 is considered to be the most important element in the maturation of meat due to its early activation stage, which occurs after slaughter. CAPN2 is activated later, when the calcium ion concentration increases further. CAPN2 is, therefore, important in the later stages of meat maturation. For CAPN3, no significant effect on the post-mortem proteolysis of meat was found [86], though some results may be promising [99–101]. The activity of  $\mu$ -calpain and calpastatin fall sharply in the first few days after slaughter [102], which correlates with an increase in meat tenderness [103]. Boehm et al., Koochmaraie, and Pringle et al., confirmed that calpain plays a major role in this process [93,104,105]. CAPN1 4751 and CAPN1 316 were addressed by research teams in several studies (Table 2), and are largely responsible for meat tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle, as well as in their crosses. In the case of CAPN4751, a significant effect on tenderness was confirmed by Morris et al. [106], while in the case of CAPN316, the cutting force was decreased by about 20% [107] in *Bos taurus* crosses, which can be used as a meat quality predictor. For the CAPN1 530 marker, no significant effect on meat tenderness was observed in any breed.

**Table 2.** CAPN gene polymorphism in cattle breeds.

Reference	Breed	Muscle	CAPN SNP
[108]	Angus, Charolaise, Brahman, and Nguni	Longissimus thoracis et lumborum	CAPN1 184 <sup>+</sup> , CAPN1 187 <sup>+</sup> , CAPN1 4751 <sup>+</sup> , and CAPN2 780 <sup>+</sup>
[109]	Charolaise, Limousine, and Retinta	Longissimus dorsi	CAPN1 <sup>+</sup>
[106]	Jersey–Limousine cross, Angus, and Hereford cross	Longissimus dorsi	CAPN1: c.947C > G <sup>+</sup>
[110]	Piedmontese–Angus cross and Jersey–Limousine cross	Longissimus thoracis	38 SNPs <sup>+</sup>
[111]	Angus, Red Angus, Beefmaster, Brangus, Hereford, Bonsmara, Romosinuano, Brahman, Limousine, Charolaise, Gelbvieh, and Simmental	No data	CAPN1 <sup>+</sup>
[107]	Brangus, Beefmaster, Bonsmara, Brahman, Romosinuano, Hereford, and Angus	Longissimus	CAPN1 316 <sup>+</sup> , CAPN1 4753 <sup>+</sup> , and CAPN1 530 <sup>+</sup>
[112]	Hanwoo	Longissimus lumborum	CAPN1:c.1589G > A <sup>+</sup> , CAPN1:c.658C > T <sup>+</sup> , CAPN1:c.948G > C <sup>+</sup> , and CAPN1:c.580A > G <sup>+</sup>

Table 2. Cont.

Reference	Breed	Muscle	CAPN SNP
[113]	<i>B. taurus</i> , <i>B. indicus</i> , and crosses	Longissimus dorsi	CAPN1 316 <sup>+</sup> and CAPN1 4751 <sup>+</sup>
[114]	Brahman	Longissimus dorsi	CAPN316 <sup>+</sup> and CAPN4751 <sup>+</sup>
[115]	Nellore	Longissimus dorsi	CAPN1 316 <sup>+</sup> , CAPN1 4751 <sup>+</sup> , CAPN1 530 <sup>+</sup> , and CAPN1 4753 <sup>+</sup>
[116]	Nellore	Longissimus dorsi	CAPN1 4751 <sup>-</sup>
[117]	Nellore	Longissimus dorsi	CAPN1 4751 <sup>+</sup>
[118]	Turkish Grey	Longissimus dorsi	CAPN1 316 <sup>+</sup> and CAPN1 4751 <sup>+</sup>
[119]	Parde de Montaña and Pirenaica	Longissimus thoracis	CAPN1 316 <sup>-</sup> , CAPN1 530 <sup>-</sup> , and CAPN1 4751 <sup>-</sup>

No association with meat tenderness, (-); association with meat tenderness, (+).

Along with  $\mu$ -Calpain, calpastatins are endogenous calcium-dependent proteinases that are responsible for mediating the proteolysis of myofibrillar proteins during meat aging processes [120]. CAPN1 is responsible for the proteolysis of cytoskeleton proteins and intermediate filaments. Endogenous proteases called calpains and their inhibitor (calpastatin) are thought to be responsible for initiating the degradation of myofibrillar proteins after slaughter [95].

The degradation of cytoskeletal and myofibrillar proteins largely influences changes in muscle cell integrity, which determines the degree to which the meat is tender and shapes organoleptic parameters. This process is shaped through the right aging conditions, such as temperature, time, and type of aging (dry or wet), which affect changes in meat pH over time. The activation of endogenous proteolytic enzymes is necessary to trigger these processes. One of the most important enzymes is  $\mu$ -calpain, which digests desmin structures and is encoded by the CAPN1 gene. Barendse et al. indicated a strong epistatic effect between the CAST and CAPN1 genes, which occurs in most breeds [121]. The study observed that substituting alanine for glycine in CAPN1: c.947G > C had the greatest effect on meat tenderness in the Angus and Belmont Red cattle breeds.

Changes in consumer needs and eating habits require breeders to make breeding progress and continually improve product quality. A number of studies carried out on calpain also included calpastatin [122], which, as its inhibitor, plays an important role in the maturation of meat [115]. There are several forms of calpastatin, such as CAST, CAST1, CAST2, CAST3, and CAST4 [123]. Calpastatin is also dependent on calcium ions. In a study by Malheiros et al., which was conducted on *Bos Indicus*, significantly higher expressions of the CAST2 isoform were observed for hard meat and very hard meat compared to medium-hard meat [124]. For the CAST and CAST1 isoforms, no significant differences were observed between the experimental groups. In a study by Muroya et al., variations in expression were observed depending on the type of muscle [125]. Such results indicate that there are variable expressions of CAST isoforms in different muscles (Table 3), which may result in different calpain inhibition and, thus affect meat maturation differently.

**Table 3.** CAST gene polymorphism in cattle breeds.

Reference	Breed	Muscle	CAST SNP
[108]	Angus, Charolaise, Brahman, and Nguni	Longissimus thoracis et lumborum	CAST 736 <sup>+</sup> and CAST 763 <sup>+</sup>
[109]	Charolaise, Limousine, and Retinta	Longissimus dorsi	CAST <sup>+</sup>
[106]	Jersey–Limousine cross, Angus–Hereford, and other crosses	Longissimus dorsi	CAST: c.2959A > G <sup>+</sup>
[111]	Angus, Red Angus, Beefmaster, Brangus, Hereford, Bonsmara, Romosinuano, Brahman, Limousine, Charolaise, Gelbvieh, and Simmental	No data	CAST <sup>+</sup>
[112]	Hanwoo	Longissimus lumborum	CAST:c.182A > G <sup>+</sup> , CAST:c.1985G > C <sup>+</sup> , and CAST:c.1526T > C <sup>+</sup>
[113]	<i>B. taurus</i> , <i>B. indicus</i> , and crosses	Longissimus dorsi	CAST-T1 <sup>-</sup>
[114]	Brahman	Longissimus dorsi	CAST <sup>+</sup>
[115]	Nellore	Longissimus dorsi	UOCAST <sup>+</sup> and WSUCAST <sup>+</sup>
[117]	Nellore	Longissimus dorsi	UOCAST <sup>+</sup>
[118]	Turkish Grey	Longissimus dorsi	UOCAST <sup>+</sup>
[119]	Parde de Montaña and Pirenaica	Longissimus thoracis	CAST1 <sup>+</sup> , CAST2 <sup>+</sup> , CAST3 <sup>-</sup> , CAST4 <sup>+</sup> , and CAST5 <sup>-</sup>

No association with meat tenderness, (-); association with meat tenderness, (+).

In a study by Allais et al., which was conducted on three beef cattle breeds (Charolaise, Limousine, and Blonde d'Aquitaine), differences were found between the CAST SNP results for each breed [126]. For the Blonde d'Aquitaine breed, an increase in required cutting power and a decrease in tenderness were observed for the GA haplotype on the CAST-2 and Cast-3 markers. Casas et al. demonstrated the additive effect of the CAST-2 G allele in the GPE cycle7 group [111], which confirmed the findings of Allais et al. and, at the same time, indicated the positive effect of CAST TT on meat tenderness [126]. Similar conclusions were reached by Johnston and Graser in the case of required cutting strength for the CRC1 population, using Angus, Hereford, and Murray Grey breeds as examples [127]. The G allele was found to have a reduced effect in Charolaise × Angus, Brahman, and Hereford populations [73]. The important role of CAST and the relationship between CAST and CAPN1 in the regulation of beef tenderness was also confirmed by Tait et al. and Lee et al. [112,128].

## 5. Conclusions

The MSTN SNP, also known as DM, is associated with a mutation in the myostatin gene that affects muscle hypertrophy relative to normal individuals, and can be used to identify the double muscle phenotype in the further selection of individuals. The identification and isolation of the gene makes it possible to distinguish between heterozygous and homozygous individuals, which provides a significant advantage in achieving genetic progress in breeding and, thus, achieving more efficient production. DM is either hyperplasia, which increases the number of muscle fibers pre-natally, or hypertrophy, which manifests itself as an increase in muscle fiber diameter post-natally. The trait is widespread in some European cattle populations, particularly Belgian Blue cattle.



The thyroglobulin gene (TG5) is an important determinant of the degree of meat marbling. Intramuscular fat content is an important element from the consumer's point of view, and enables the identification of individuals characterized by higher (TT genotype) or lower (CC genotype) proportions of fat in the muscle, which, depending on the market, can be desirable or undesirable. The TG5 SNP will allow breeding directions to be adapted to the needs of consumers in the market.

Calpain and calpastatin are the main determinants of the degree of tenderness in beef. Thus, they are an extremely important factor in the meat maturation process, which is the last stage of production; therefore, any loss in quality at this stage has the greatest consequences. CAST and CAPN1 SNP, through their influence, significantly enhance organoleptic qualities, and breeding work that utilizes them can significantly improve beef quality. It makes sense to identify those individuals that are characterized by the best meat tenderness, as this strategy encourages customers to buy beef products.

Single nucleotide polymorphisms are a kind of signpost for beef cattle breeders. They are very helpful in the process of breeding progress and allow for more rational decision-making in the selection of individuals. They are also important in scientific and research work. However, it should be remembered that realizing the genetic potential of animals requires the highest possible level of welfare and optimal environmental conditions. Many environmental factors can negatively affect animal weight gain and meat quality. Among the most important factors that we can point to is heat stress, which can cause changes in the color of meat, reduce daily gains [129], and negatively affect reproduction [130]. It is important to provide proper rearing conditions to take advantage of the genetic potential of the animals. Careful analysis of SNPs and the study of their effects on animals is an important research direction, and it is important to carry out further work to learn as much as possible about the operation of such critically important genes in breeding.

**Author Contributions:** Conceptualization, P.K. and K.P.; methodology, P.K. and K.P.; software, P.K. and K.P.; validation, P.K., J.S. and K.P.; formal analysis, P.K. and K.P.; investigation, P.K. and J.S.; resources, M.G. and G.G.; data curation, J.S.; writing—original draft preparation, P.K. and K.P.; writing—review and editing, P.K. and K.P.; visualization, G.G.; supervision, M.G.; project administration, M.G.; funding acquisition, K.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data generated or analyzed during the study are included in this published article. The datasets used and/or analyzed in the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Acknowledgments:** The paper is a part of the PhD thesis written by Piotr Kostusiak.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Kang, N.; Panzone, L.; Kuznesof, S. The role of cooking in consumers' quality formation: An exploratory study of beef steaks. *Meat Sci.* **2022**, *186*, 108730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Font-i-Furnols, M.; Guerrero, L. Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. *Meat Sci.* **2014**, *98*, 361–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Whitton, C.; Bogueva, D.; Marinova, D.; Phillips, C.J. Are we approaching peak meat consumption? Analysis of meat consumption from 2000 to 2019 in 35 countries and its relationship to gross domestic product. *Animals* **2021**, *11*, 3466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Magalhaes, D.R.; Maza, M.T.; Prado, I.N.d.; Fiorentini, G.; Kirinus, J.K.; Campo, M.d.M. An exploratory study of the purchase and consumption of beef: Geographical and cultural differences between Spain and Brazil. *Foods* **2022**, *11*, 129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Banović, M.; Chrysochou, P.; Grunert, K.G.; Rosa, P.J.; Gamito, P. The effect of fat content on visual attention and choice of red meat and differences across gender. *Food Qual. Prefer.* **2016**, *52*, 42–51. [CrossRef]
6. Killinger, K.; Calkins, C.R.; Umberger, W.; Feuz, D.M.; Eskridge, K.M. Consumer visual preference and value for beef steaks differing in marbling level and color. *J. Anim. Sci.* **2004**, *82*, 3288–3293. [CrossRef]
7. Morales, R.; Aguiar, A.; Subiabre, I.; Realini, C. Beef acceptability and consumer expectations associated with production systems and marbling. *Food Qual. Prefer.* **2013**, *29*, 166–173. [CrossRef]
8. Frank, D.; Ball, A.; Hughes, J.; Krishnamurthy, R.; Piyasiri, U.; Stark, J.; Watkins, P.; Warner, R. Sensory and flavor chemistry characteristics of Australian beef: Influence of intramuscular fat, feed, and breed. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 4299–4311. [CrossRef]
9. Barendse, W.; Bunch, R.; Thomas, M.; Armitage, S.; Baud, S.; Donaldson, N. The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Aust. J. Exp. Agric.* **2004**, *44*, 669–674. [CrossRef]
10. McPherron, A.C.; Lee, S.-J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12457–12461. [CrossRef]
11. Steen, D.; Claeys, E.; Uytterhaegen, L.; De Smet, S.; Demeyer, D. Early post-mortem conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscling beef. *Meat Sci.* **1997**, *45*, 307–319. [CrossRef]
12. Li, X.; Zhang, D.; Ren, C.; Bai, Y.; Ijaz, M.; Hou, C.; Chen, L. Effects of protein posttranslational modifications on meat quality: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 289–331. [CrossRef]
13. FAO. FAOSTAT Database. 2019. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QV> (accessed on 7 March 2023).
14. Huang, C.; Hou, C.; Ijaz, M.; Yan, T.; Li, X.; Li, Y.; Zhang, D. Proteomics discovery of protein biomarkers linked to meat quality traits in post-mortem muscles: Current trends and future prospects: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *105*, 416–432. [CrossRef]
15. Kantono, K.; Hamid, N.; Ma, Q.; Chadha, D.; Oey, I. Consumers' perception and purchase behaviour of meat in China. *Meat Sci.* **2021**, *179*, 108548. [CrossRef]
16. Lee, J.; Kim, J.M.; Garrick, D. Increasing the accuracy of genomic prediction in pure-bred Limousin beef cattle by including cross-bred Limousin data and accounting for an F94L variant in MSTN. *Anim. Genet.* **2019**, *50*, 621–633. [CrossRef]
17. Prihandini, P.W.; Primasari, A.; Aryogi, A.; Efendy, J.; Luthfi, M.; Pamungkas, D.; Hariyono, D.N.H. Genetic variation in the first intron and exon of the myostatin gene in several Indonesian cattle populations. *Vet. World* **2021**, *14*, 1197. [CrossRef] [PubMed]
18. Huang, P.; Pang, D.; Wang, K.; Xu, A.; Yao, C.; Li, M.; You, W.; Wang, Q.; Yu, H. The possible role of complete loss of myostatin in limiting excessive proliferation of muscle cells (C2C12) via activation of microRNAs. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 643. [CrossRef] [PubMed]
19. Bellinge, R.; Liberles, D.; Iaschi, S.; O'Brien, P.; Tay, G. Myostatin and its implications on animal breeding: A review. *Anim. Genet.* **2005**, *36*, 1–6. [CrossRef]
20. Aiello, D.; Patel, K.; Lasagna, E. The myostatin gene: An overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Anim. Genet.* **2018**, *49*, 505–519. [CrossRef] [PubMed]
21. Ansay, M.; Hanset, R. Anatomical, physiological and biochemical differences between conventional and double-muscling cattle in the Belgian Blue and White breed. *Livest. Prod. Sci.* **1979**, *6*, 5–13. [CrossRef]
22. Hanset, R. The major gene of muscular hypertrophy in the Belgian Blue cattle breed. In *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*; Owen, J., Axford, R., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 1991; pp. 467–478.
23. Hanset, R.; Michaux, C.; Dessy-Doize, C.; Burtonboy, G. *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1982.
24. Grobet, L.; Royo Martin, L.J.; Poncelet, D.; Pirottin, D.; Brouwers, B.; Riquet, J.; Schoeberlein, A.; Dunner, S.; Ménessier, F.; Massabanda, J. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Genet.* **1997**, *17*, 71–74. [CrossRef] [PubMed]
25. Sharma, M.; Kambadur, R.; Matthews, K.G.; Somers, W.G.; Devlin, G.P.; Conaglen, J.V.; Fowke, P.J.; Bass, J.J. Myostatin, a transforming growth factor- $\beta$  superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Cell. Physiol.* **1999**, *180*, 1–9. [CrossRef]
26. Jiao, J.; Yuan, T.; Zhou, Y.; Xie, W.; Zhao, Y.; Zhao, J.; Ouyang, H.; Pang, D. Analysis of myostatin and its related factors in various porcine tissues. *J. Anim. Sci.* **2011**, *89*, 3099–3106. [CrossRef]
27. Wolfman, N.M.; McPherron, A.C.; Pappano, W.N.; Davies, M.V.; Song, K.; Tomkinson, K.N.; Wright, J.F.; Zhao, L.; Sebald, S.M.; Greenspan, D.S. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15842–15846. [CrossRef]
28. McPherron, A.C.; Lawler, A.M.; Lee, S.-J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* **1997**, *387*, 83–90. [CrossRef] [PubMed]
29. Trendelenburg, A.U.; Meyer, A.; Rohner, D.; Boyle, J.; Hatakeyama, S.; Glass, D.J. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2009**, *296*, C1258–C1270. [CrossRef]
30. Bryson-Richardson, R.J.; Currie, P.D. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 632–646. [CrossRef]
31. Amthor, H.; Huang, R.; McKinnell, I.; Christ, B.; Kambadur, R.; Sharma, M.; Patel, K. The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. *Dev. Biol.* **2002**, *251*, 241–257. [CrossRef] [PubMed]



32. Lee, J.; Kim, D.-H.; Lee, K. Muscle hyperplasia in Japanese quail by single amino acid deletion in MSTN propeptide. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1504. [[CrossRef](#)]
33. Tang, L.; Zhao, T.; Kang, Y.; An, S.; Fan, X.; Sun, L. MSTN is an important myokine for weight-bearing training to attenuate bone loss in ovariectomized rats. *J. Physiol. Biochem.* **2022**, *78*, 61–72. [[CrossRef](#)]
34. Xin, X.-B.; Yang, S.-P.; Li, X.; Liu, X.-F.; Zhang, L.-L.; Ding, X.-B.; Zhang, S.; Li, G.-P.; Guo, H. Proteomics insights into the effects of MSTN on muscle glucose and lipid metabolism in genetically edited cattle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2020**, *291*, 113237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kärst, S.; Strucken, E.M.; Schmitt, A.O.; Weyrich, A.; de Villena, F.P.; Yang, H.; Brockmann, G.A. Effect of the myostatin locus on muscle mass and intramuscular fat content in a cross between mouse lines selected for hypermuscularity. *BMC Genom.* **2013**, *14*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hocquette, J.-F.; Bas, P.; Bauchart, D.; Vermorel, M.; Geay, Y. Fat partitioning and biochemical characteristics of fatty tissues in relation to plasma metabolites and hormones in normal and double-muscled young growing bulls. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **1999**, *122*, 127–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Deng, B.; Zhang, F.; Wen, J.; Ye, S.; Wang, L.; Yang, Y.; Gong, P.; Jiang, S. The function of myostatin in the regulation of fat mass in mammals. *Nutr. Metab.* **2017**, *14*, 29. [[CrossRef](#)]
38. Fournier, B.; Murray, B.; Gutzwiller, S.; Marcaletti, S.; Marcellin, D.; Bergling, S.; Brachat, S.; Persohn, E.; Pierrel, E.; Bombard, F. Blockade of the activin receptor IIb activates functional brown adipogenesis and thermogenesis by inducing mitochondrial oxidative metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 2871–2879. [[CrossRef](#)]
39. Braga, M.; Pervin, S.; Norris, K.; Bhasin, S.; Singh, R. Inhibition of in vitro and in vivo brown fat differentiation program by myostatin. *Obesity* **2013**, *21*, 1180–1188. [[CrossRef](#)]
40. Zhao, B.; Wall, R.J.; Yang, J. Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *337*, 248–255. [[CrossRef](#)]
41. McPherron, A.C.; Lee, S.-J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J. Clin. Investig.* **2002**, *109*, 595–601. [[CrossRef](#)]
42. Wiener, P.; Woolliams, J.; Frank-Lawale, A.; Ryan, M.; Richardson, R.; Nute, G.; Wood, J.; Homer, D.; Williams, J. The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality. *Meat Sci.* **2009**, *83*, 127–134. [[CrossRef](#)]
43. Allais, S.; Levéziel, H.; Payet-Duprat, N.; Hocquette, J.-F.; Lepetit, J.; Rousset, S.; Denoyelle, C.; Bernard-Capel, C.; Journaux, L.; Bonnot, A. The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. *J. Anim. Sci.* **2010**, *88*, 446–454. [[CrossRef](#)]
44. Purfield, D.; Evans, R.; Berry, D. Reaffirmation of known major genes and the identification of novel candidate genes associated with carcass-related metrics based on whole genome sequence within a large multi-breed cattle population. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bouyer, C.; Forestier, L.; Renand, G.; Oulmouden, A. Deep intronic mutation and pseudo exon activation as a novel muscular hypertrophy modifier in cattle. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e97399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kambadur, R.; Sharma, M.; Smith, T.P.; Bass, J.J. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* **1997**, *7*, 910–915. [[CrossRef](#)]
47. Cappucio, I.; Marchitelli, C.; Serracchioli, A.; Nardone, A.; Filippini, F.; Ajmone-Marsan, P.; Valentini, A. A GT transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophic Marchigiana beef subjects. *Anim. Genet.* **1998**, *29*, 51.
48. Sellick, G.S.; Pitchford, W.; Morris, C.; Cullen, N.; Crawford, A.; Raadsma, H.; Bottema, C. Effect of myostatin F94L on carcass yield in cattle. *Anim. Genet.* **2007**, *38*, 440–446. [[CrossRef](#)]
49. Casas, E.; Keele, J.; Shackelford, S.; Koohmaraie, M.; Sonstegard, T.; Smith, T.; Kappes, S.; Stone, R. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.* **1998**, *76*, 468–473. [[CrossRef](#)]
50. Dunner, S.; Miranda, M.E.; Amigues, Y.; Cañón, J.; Georges, M.; Hanset, R.; Williams, J.; Ménessier, F. Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* **2003**, *35*, 103–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Wegner, J.; Albrecht, E.; Fiedler, I.; Teuscher, F.; Papstein, H.-J.; Ender, K. Growth-and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *J. Anim. Sci.* **2000**, *78*, 1485–1496. [[CrossRef](#)]
52. Mwashuiya, J.T.; Manyele, S.V.; Mwaluko, G. Assessment of Beef Quality Determinants based on consumer preferences. *J. Serv. Sci. Manag.* **2018**, *11*, 657. [[CrossRef](#)]
53. Farmer, L.; Farrell, D. Beef-eating quality: A European journey. *Animal* **2018**, *12*, 2424–2433. [[CrossRef](#)]
54. Egan, A.; Ferguson, D.; Thompson, J. Consumer sensory requirements for beef and their implications for the Australian beef industry. *Aust. J. Exp. Agric.* **2001**, *41*, 855–859. [[CrossRef](#)]
55. Arthur, P.F.; Makarechian, M.; Price, M.A. Incidence of dystocia and perinatal calf mortality resulting from reciprocal crossing of double-muscled and normal cattle. *Can. Vet. J.* **1988**, *29*, 163. [[PubMed](#)]
56. King, J.; Ménessier, F. Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef. In *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1982.
57. Arthur, P.; Makarechian, M.; Price, M.; Berg, R. Heterosis, maternal and direct effects in double-muscled and normal cattle: I. Reproduction and growth traits. *J. Anim. Sci.* **1989**, *67*, 902–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Rehfeldt, C.; Ott, G.; Gerrard, D.E.; Varga, L.; Schlote, W.; Williams, J.L.; Renne, U.; Bünger, L. Effects of the Compact mutant myostatin allele *Mstn* Cmppt-dl1Abc introgressed into a high growth mouse line on skeletal muscle cellularity. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2005**, *26*, 103. [[CrossRef](#)]
59. Kowalewska-Luczak, I.; Kulig, H.; Szewczyk, K. Polimorfizm w genie tyreoglobuliny u bydła rasy jersey. *Acta Sci. Polonorum. Zootech.* **2010**, *9*, 129–134.
60. van der Spek, A.H.; Fliers, E.; Boelen, A. The classic pathways of thyroid hormone metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, *458*, 29–38. [[CrossRef](#)]
61. Ardici, S.; Dincel, D.; Samli, H.; Senturk, N.; Karalar, B.; Unlu, S.; Soyudal, B.; Kubad, E.; Balci, F. Association of polymorphisms in lipid and energy metabolism-related genes with fattening performance in Simmental cattle. *Anim. Biotechnol.* **2022**, *2*, 1–13. [[CrossRef](#)]
62. Dolmatova, I.; Sedykh, T.; Valitov, F.; Gizatullin, R.; Khaziev, D.; Kharlamov, A. Effect of the bovine TG5 gene polymorphism on milk-and meat-producing ability. *Vet. World* **2020**, *13*, 2046. [[CrossRef](#)]
63. Gan, Q.-F.; Zhang, L.-P.; Li, J.-Y.; Hou, G.-Y.; Li, H.-D.; Gao, X.; Ren, H.-Y.; Chen, J.-B.; Xu, S.-Z. Association analysis of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. *J. Appl. Genet.* **2008**, *49*, 251–255. [[CrossRef](#)]
64. Ardici, S.; Samli, H.; Dincel, D.; Ekiz, B.; Yalcintan, H.; Vatansever, B.; Balci, F. Relationship of the bovine IGF1, TG, DGAT1 and MYF5 genes to meat colour, tenderness and cooking loss. *J. Hell. Vet. Med. Soc.* **2018**, *69*, 1077–1087. [[CrossRef](#)]
65. Carvalho, T.D.D.; Siqueira, F.; Torres Júnior, R.A.D.A.; Medeiros, S.R.D.; Feijó, G.L.D.; Souza Junior, M.D.D.; Blecha, I.M.Z.; Soares, C.O. Association of polymorphisms in the leptin and thyroglobulin genes with meat quality and carcass traits in beef cattle. *Rev. Bras. De Zootec.* **2012**, *41*, 2162–2168. [[CrossRef](#)]
66. De la Fuente, J.; Diaz, M.; Alvarez, I.; Oliver, M.; i Furnols, M.F.; Sañudo, C.; Campo, M.; Montossi, F.; Nute, G.; Caneque, V. Fatty acid and vitamin E composition of intramuscular fat in cattle reared in different production systems. *Meat Sci.* **2009**, *82*, 331–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Testa, M.L.; Grigioni, G.; Panea, B.; Pavan, E. Color and marbling as predictors of meat quality perception of Argentinian consumers. *Foods* **2021**, *10*, 1465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Listrat, A.; Lebret, B.; Louveau, I.; Astruc, T.; Bonnet, M.; Lefaucheur, L.; Picard, B.; Bugeon, J. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *Sci. World J.* **2016**, *2016*, 3182746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Park, S.J.; Beak, S.-H.; Kim, S.Y.; Jeong, I.H.; Piao, M.Y.; Kang, H.J.; Fassah, D.M.; Na, S.W.; Yoo, S.P.; Baik, M. Genetic, management, and nutritional factors affecting intramuscular fat deposition in beef cattle—A review. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2018**, *31*, 1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Rincker, C.B.; Pyatt, N.A.; Berger, L.L.; Faulkner, D.B. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *J. Anim. Sci.* **2006**, *84*, 686–693. [[CrossRef](#)]
71. Casas, E.; White, S.N.; Riley, D.G.; Smith, T.P.L.; Brenneman, R.A.; Olson, T.A.; Johnson, D.D.; Coleman, S.W.; Bennett, G.L.; Chase, C.C., Jr. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle<sup>1,2</sup>. *J. Anim. Sci.* **2005**, *83*, 13–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Wood, I.A.; Moser, G.; Burrell, D.L.; Mengersen, K.L.; Hetzel, D.J.S. A meta-analytic assessment of a Thyroglobulin marker for marbling in beef cattle. *Genet. Sel. Evol.* **2006**, *38*, 479–494. [[CrossRef](#)]
73. Van Eenennaam, A.L.; Li, J.; Thallman, R.M.; Quaas, R.L.; Dikeman, M.E.; Gill, C.A.; Franke, D.E.; Thomas, M.G. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits<sup>1,2</sup>. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 891–900. [[CrossRef](#)]
74. Albrecht, E.; Gotoh, T.; Ebara, F.; Xu, J.; Viergutz, T.; Nürnberg, G.; Maak, S.; Wegner, J. Cellular conditions for intramuscular fat deposition in Japanese Black and Holstein steers. *Meat Sci.* **2011**, *89*, 13–20. [[CrossRef](#)]
75. Irie, M.; Kouda, M.; Matono, H. Effect of ursodeoxycholic acid supplementation on growth, carcass characteristics, and meat quality of Wagyu heifers (Japanese Black cattle). *J. Anim. Sci.* **2011**, *89*, 4221–4226. [[CrossRef](#)]
76. Jeong, J.; Kwon, E.; Im, S.; Seo, K.; Baik, M. Expression of fat deposition and fat removal genes is associated with intramuscular fat content in longissimus dorsi muscle of Korean cattle steers. *J. Anim. Sci.* **2012**, *90*, 2044–2053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Cho, S.; Kang, G.; Seong, P.-N.; Park, B.; Kang, S.M. Effect of slaughter age on the antioxidant enzyme activity, color, and oxidative stability of Korean Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) cow beef. *Meat Sci.* **2015**, *108*, 44–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Choi, C.; Jung, K.; Chung, K.; Yang, B.; Chin, K.; Suh, S.; Oh, D.; Jeon, M.; Baek, K.; Lee, S. Administration of zilpaterol hydrochloride alters feedlot performance, carcass characteristics, muscle, and fat profiling in finishing Hanwoo steers. *Livest. Sci.* **2013**, *157*, 435–441. [[CrossRef](#)]
79. Jung, S.; Nam, K.C.; Lee, K.H.; Kim, J.J.; Jo, C. Meat quality traits of Longissimus dorsi muscle from carcasses of Hanwoo steers at different yield grades. *Food Sci. Anim. Resour.* **2013**, *33*, 305–316. [[CrossRef](#)]
80. Greenwood, P.L.; Siddell, J.; Walmsley, B.; Geesink, G.; Pethick, D.; McPhee, M. Postweaning substitution of grazed forage with a high-energy concentrate has variable long-term effects on subcutaneous fat and marbling in *Bos taurus* genotypes. *J. Anim. Sci.* **2015**, *93*, 4132–4143. [[CrossRef](#)]
81. Krone, K.; Ward, A.; Madder, K.; Hendrick, S.; McKinnon, J.; Buchanan, F. Interaction of vitamin A supplementation level with ADH1C genotype on intramuscular fat in beef steers. *Animal* **2016**, *10*, 403–409. [[CrossRef](#)]
82. Dinh, T.; Blanton Jr, J.; Riley, D.; Chase Jr, C.; Coleman, S.; Phillips, W.; Brooks, J.; Miller, M.; Thompson, L. Intramuscular fat and fatty acid composition of longissimus muscle from divergent pure breeds of cattle. *J. Anim. Sci.* **2010**, *88*, 756–766. [[CrossRef](#)]

83. Dubovskova, M.; Selionova, M.; Chizhova, L.; Surzhikova, E.; Gerasimov, N.; Mikhailenko, A.; Dolgashova, M. Use of genetic markers of meat productivity in breeding of Hereford breed bulls. *Proc. IOP Conf. Series Earth Environ. Sci.* **2019**, *341*, 012052. [[CrossRef](#)]
84. Bernard, C.; Cassar-Malek, I.; Le Cunff, M.; Dubroeuq, H.; Renand, G.; Hocquette, J.-F. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5229–5237. [[CrossRef](#)]
85. Gonzales-Malca, J.A.; Tirado-Kulieva, V.A.; Abanto-López, M.S.; Aldana-Juárez, W.L.; Palacios-Zapata, C.M. Bibliometric Analysis of Research on the Main Genes Involved in Meat Tenderness. *Animals* **2022**, *12*, 2976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Uzabaci, E.; Dincel, D. Associations Between c. 2832A < G Polymorphism of CAST Gene and Meat Tenderness in Cattle: A Meta-Analysis CAST Geninin c. 2832A < G Polimorfizmi ile Sığırlarda Et Gevrekliği Arasındaki İlişki: Bir Meta-Analizi. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* **2022**, *28*, 613–620.
87. Koohmaraie, M.; Geesink, G. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.* **2006**, *74*, 34–43. [[CrossRef](#)]
88. Gagaoua, M.; Terlouw, E.C.; Mullen, A.M.; Franco, D.; Warner, R.D.; Lorenzo, J.M.; Purslow, P.P.; Gerrard, D.; Hopkins, D.L.; Troy, D. Molecular signatures of beef tenderness: Underlying mechanisms based on integromics of protein biomarkers from multi-platform proteomics studies. *Meat Sci.* **2021**, *172*, 108311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Abd El-Hack, M.E.; Abdelnour, S.A.; Swelum, A.A.; Arif, M. The application of gene marker-assisted selection and proteomics for the best meat quality criteria and body measurements in Qinchuan cattle breed. *Mol. Biol. Rep.* **2018**, *45*, 1445–1456. [[CrossRef](#)]
90. Brito Lopes, F.; Magnabosco, C.U.; Passafaro, T.L.; Brunes, L.C.; Costa, M.F.; Eifert, E.C.; Narciso, M.G.; Rosa, G.J.; Lobo, R.B.; Baldi, F. Improving genomic prediction accuracy for meat tenderness in Nellore cattle using artificial neural networks. *J. Anim. Breed. Genet.* **2020**, *137*, 438–448. [[CrossRef](#)]
91. Smith, T.P.; Thallman, R.M.; Casas, E.; Shackelford, S.D.; Wheeler, T.L.; Koohmaraie, M. Theory and application of genome-based approaches to improve the quality and value of beef. *Outlook Agric.* **2003**, *32*, 253–265. [[CrossRef](#)]
92. Takahashi, K. Mechanism of meat tenderization during post-mortem ageing: Calcium theory. In Proceedings of the International Congress of Meat Science and Technology, Yokohama, Japan, 1–6 August 1999; pp. 230–235.
93. Koohmaraie, M. The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie* **1992**, *74*, 239–245. [[CrossRef](#)]
94. Watanabe, A.; Daly, C.; Devine, C. The effects of the ultimate pH of meat on tenderness changes during ageing. *Meat Sci.* **1996**, *42*, 67–78. [[CrossRef](#)]
95. Bhat, Z.; Morton, J.D.; Mason, S.L.; Bekhit, A.E.-D.A. Role of calpain system in meat tenderness: A review. *Food Sci. Hum. Wellness* **2018**, *7*, 196–204. [[CrossRef](#)]
96. Dransfield, E. Meat tenderness—the  $\mu$ -calpain hypothesis. In Proceedings of the 45th International Congress of Meat Science and Technology, Yokohama, Japan, 1–6 August 1999.
97. Kurebayashi, N.; Harkins, A.; Baylor, S. Use of fura red as an intracellular calcium indicator in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 1934–1960. [[CrossRef](#)]
98. Jeacocke, R.E. The concentrations of free magnesium and free calcium ions both increase in skeletal muscle fibres entering rigor mortis. *Meat Sci.* **1993**, *35*, 27–45. [[CrossRef](#)]
99. Ilian, M.A.; Bekhit, A.E.-D.; Bickerstaffe, R. The relationship between meat tenderization, myofibril fragmentation and autolysis of calpain 3 during post-mortem aging. *Meat Sci.* **2004**, *66*, 387–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Ilian, M.A.; Morton, J.D.; Bekhit, A.E.-D.; Roberts, N.; Palmer, B.; Sorimachi, H.; Bickerstaffe, R. Effect of preslaughter feed withdrawal period on longissimus tenderness and the expression of calpains in the ovine. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1990–1998. [[CrossRef](#)]
101. Yang, X.; Chen, J.; Jia, C.; Zhao, R. Gene expression of calpain 3 and PGC-1 $\alpha$  is correlated with meat tenderness in the longissimus dorsi muscle of Sutai pigs. *Livest. Sci.* **2012**, *147*, 119–125. [[CrossRef](#)]
102. Koohmaraie, M. Effect of pH, temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle  $\mu$ -calpain. *J. Anim. Sci.* **1992**, *70*, 3071–3080. [[CrossRef](#)]
103. Thomson, B.; Dobbie, P.; Singh, K.; Speck, P. Post-mortem kinetics of meat tenderness and the components of the calpain system in bull skeletal muscle. *Meat Sci.* **1996**, *44*, 151–157. [[CrossRef](#)]
104. Boehm, M.L.; Kendall, T.L.; Thompson, V.F.; Goll, D.E. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *J. Anim. Sci.* **1998**, *76*, 2415–2434. [[CrossRef](#)]
105. Pringle, T.; Harrelson, J.; West, R.; Williams, S.; Johnson, D. Calcium-activated tenderization of strip loin, top sirloin, and top round steaks in diverse genotypes of cattle. *J. Anim. Sci.* **1999**, *77*, 3230–3237. [[CrossRef](#)]
106. Morris, C.; Cullen, N.; Hickey, S.; Dobbie, P.; Veenvliet, B.; Manley, T.; Pitchford, W.; Kruk, Z.; Bottema, C.; Wilson, T. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked M. longissimus dorsi steaks from Jersey  $\times$  Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Anim. Genet.* **2006**, *37*, 411–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. White, S.; Casas, E.; Wheeler, T.; Shackelford, S.; Koohmaraie, M.; Riley, D.; Chase Jr, C.; Johnson, D.; Keele, J.; Smith, T. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of Bos indicus, Bos taurus, and crossbred descent. *J. Anim. Sci.* **2005**, *83*, 2001–2008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Basson, A.; Strydom, P.E.; van Marle-Köster, E.; Webb, E.C.; Frylinck, L. Sustained Effects of Muscle Calpain System Genotypes on Tenderness Phenotypes of South African Beef Bulls during Ageing up to 20 Days. *Animals* **2022**, *12*, 686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

109. Avilés, C.; Juárez, M.; Peña, F.; Domenech, V.; Clemente, I.; Molina, A. Association of single nucleotide polymorphisms in CAPN1 and CAST genes with beef tenderness from Spanish commercial feedlots. *Czech. J. Anim. Sci.* **2013**, *58*, 479–487. [[CrossRef](#)]
110. Page, B.; Casas, E.; Heaton, M.; Cullen, N.; Hyndman, D.; Morris, C.; Crawford, A.; Wheeler, T.; Koohmaraie, M.; Keele, J. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.* **2002**, *80*, 3077–3085. [[CrossRef](#)]
111. Casas, E.; White, S.; Wheeler, T.; Shackelford, S.; Koohmaraie, M.; Riley, D.; Chase Jr, C.; Johnson, D.; Smith, T. Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* **2006**, *84*, 520–525. [[CrossRef](#)]
112. Lee, S.-H.; Kim, S.-C.; Chai, H.-H.; Cho, S.-H.; Kim, H.-C.; Lim, D.; Choi, B.-H.; Dang, C.-G.; Sharma, A.; Gondro, C. Mutations in calpastatin and  $\mu$ -calpain are associated with meat tenderness, flavor and juiciness in Hanwoo (Korean cattle): Molecular modeling of the effects of substitutions in the calpastatin/ $\mu$ -calpain complex. *Meat Sci.* **2014**, *96*, 1501–1508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Rubio Lozano, M.S.; Alfaro-Zavala, S.; Sifuentes-Rincón, A.M.; Parra-Bracamonte, G.M.; Braña Varela, D.; Medina, R.D.M.; Pérez Linares, C.; Ríos Rincón, F.; Sánchez Escalante, A.; Torrescano Urrutia, G. Meat tenderness genetic and genomic variation sources in commercial beef cattle. *J. Food Qual.* **2016**, *39*, 150–156. [[CrossRef](#)]
114. Smith, T.; Thomas, M.; Bidner, T.; Paschal, J.; Franke, D. Single nucleotide polymorphisms in Brahman steers and their association with carcass and tenderness traits. *Genet. Mol. Res.* **2009**, *8*, 39–46. [[CrossRef](#)]
115. Pinto, L.; Ferraz, J.B.S.; Meirelles, F.V.; Eler, J.P.; Rezende, F.M.d.; Carvalho, M.; Almeida, H.; Silva, R. Association of SNPs on CAPN 1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. *Genet. Mol. Res.* **2010**, *9*, 1431–1442. [[CrossRef](#)]
116. Pinto, L.F.B.; Ferraz, J.B.S.; Pedrosa, V.B.; Eler, J.P.; Meirelles, F.V.; Bonin, M.d.N.; Rezende, F.M.D.; Carvalho, M.E.; Cucco, D.D.C.; Silva, R.C.G.D. Single nucleotide polymorphisms in CAPN and leptin genes associated with meat color and tenderness in Nellore cattle. *Genet. Mol. Res.* **2011**, *10*, 2057–2064.
117. Rosa, A.F.; Moncau, C.T.; Poleti, M.D.; Fonseca, L.D.; Balieiro, J.C.; Silva, S.L.; Eler, J.P. Proteome changes of beef in Nellore cattle with different genotypes for tenderness. *Meat Sci.* **2018**, *138*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Kök, S.; Atalay, S. The Use of various SNPs in CAST and CAPN1 genes to determine the meat tenderness in Turkish grey cattle. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* **2018**, *24*, 1–8.
119. Calvo, J.; Iguácel, L.; Kirinus, J.; Serrano, M.; Ripoll, G.; Casasús, I.; Joy, M.; Pérez-Velasco, L.; Sarto, P.; Albertí, P. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. *Meat Sci.* **2014**, *96*, 775–782. [[CrossRef](#)]
120. Schenkel, F.S.; Miller, S.P.; Jiang, Z.; Mandell, I.B.; Ye, X.; Li, H.; Wilton, J.W. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* **2006**, *84*, 291–299. [[CrossRef](#)]
121. Barendse, W.; Harrison, B.E.; Hawken, R.J.; Ferguson, D.M.; Thompson, J.M.; Thomas, M.B.; Bunch, R.J. Epistasis Between Calpain 1 and Its Inhibitor Calpastatin Within Breeds of Cattle. *Genetics* **2007**, *176*, 2601–2610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Liu, J.; Fu, R.; Liu, R.; Zhao, G.; Zheng, M.; Cui, H.; Li, Q.; Song, J.; Wang, J.; Wen, J. Protein profiles for muscle development and intramuscular fat accumulation at different post-hatching ages in chickens. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0159722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Cônsolo, N.R.B.; Ferrari, V.B.; Mesquita, L.G.; Goulart, R.S.; e Silva, L.F.P. Zilpaterol hydrochloride improves beef yield, changes palatability traits, and increases calpain-calpastatin gene expression in Nellore heifers. *Meat Sci.* **2016**, *121*, 375–381. [[CrossRef](#)]
124. Malheiros, J.M.; Enriquez-Valencia, C.E.; da Silva Duran, B.O.; de Paula, T.G.; Curi, R.A.; de Vasconcelos Silva, J.A.I.; Dal-Pai-Silva, M.; de Oliveira, H.N.; Chardulo, L.A.L. Association of CAST2, HSP90AA1, DNAJA1 and HSPB1 genes with meat tenderness in Nellore cattle. *Meat Sci.* **2018**, *138*, 49–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Muroya, S.; Neath, K.E.; Nakajima, I.; Oe, M.; Shibata, M.; Ojima, K.; Chikuni, K. Differences in mRNA expression of calpains, calpastatin isoforms and calpain/calpastatin ratios among bovine skeletal muscles. *Anim. Sci. J.* **2012**, *83*, 252–259. [[CrossRef](#)]
126. Allais, S.; Journaux, L.; Levéziel, H.; Payet-Duprat, N.; Raynaud, P.; Hocquette, J.-F.; Lepetit, J.; Rousset, S.; Denoyelle, C.; Bernard-Capel, C. Effects of polymorphisms in the calpastatin and  $\mu$ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *J. Anim. Sci.* **2011**, *89*, 1–11. [[CrossRef](#)]
127. Johnston, D.; Graser, H.-U. Estimated gene frequencies of GeneSTAR markers and their size of effects on meat tenderness, marbling, and feed efficiency in temperate and tropical beef cattle breeds across a range of production systems. *J. Anim. Sci.* **2010**, *88*, 1917–1935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Tait Jr, R.; Shackelford, S.; Wheeler, T.; King, D.; Keele, J.; Casas, E.; Smith, T.; Bennett, G. CAPN1, CAST, and DGAT1 genetic effects on preweaning performance, carcass quality traits, and residual variance of tenderness in a beef cattle population selected for haplotype and allele equalization. *J. Anim. Sci.* **2014**, *92*, 5382–5393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Wang, J.; Li, J.; Wang, F.; Xiao, J.; Wang, Y.; Yang, H.; Li, S.; Cao, Z. Heat stress on calves and heifers: A review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2020**, *11*, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Dobson, H.; Smith, R. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.* **2000**, *60*, 743–752. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Warszawa, dn. 19.09.2024

Mgr inż. Piotr Kostusiak  
Katedra Hodowli Zwierząt  
Instytut Nauk o Zwierzętach  
piotr\_kostusiak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Słószarz Jan, Gołębiowski Marcin, Grodkowski Grzegorz, Puppel Kamila:  
Polymorphism of Genes and Their Impact on Beef Quality, Current Issues in Molecular  
Biology, 2023, 45, s. 4749-4762.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; konceptualizacji, opracowaniu  
metodologii, analizie wyników, przeglądu literatury i przygotowaniu manuskryptu, co stanowi  
60 % pracy.

Podpis

*Kostusiak Piotr*  
.....

Warszawa, dn. 19.09.2024

Dr hab. Kamila Puppel, prof. SGGW

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

kamila\_puppel@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

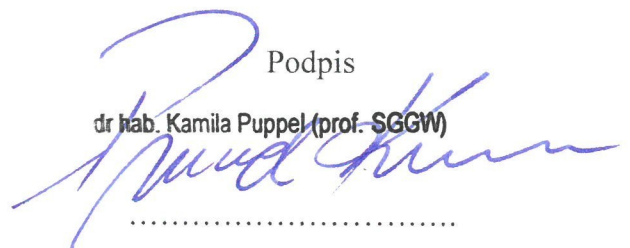
Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Słószarz Jan, Gołębiowski Marcin, Grodkowski Grzegorz, Puppel Kamila:  
Polymorphism of Genes and Their Impact on Beef Quality, Current Issues in Molecular  
Biology, 2023, 45, s. 4749-4762.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; konceptualizacji, opracowaniu metodologii, przeglądu literatury i przygotowaniu manuskryptu, pozyskaniu finansowania badań co stanowi 25 % pracy.

Podpis

dr hab. Kamila Puppel (prof. SGGW)



.....

Warszawa, dn. 19.09.2024

Dr Jan Słószarz

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

jan\_slosarz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

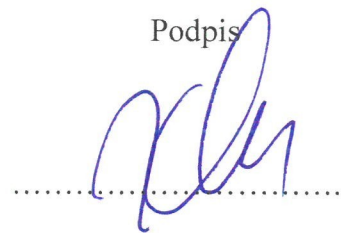
**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Słószarz Jan, Gołębiewski Marcin, Grodkowski Grzegorz, Puppel Kamila:  
Polymorphism of Genes and Their Impact on Beef Quality, Current Issues in Molecular  
Biology, 2023, 45, s. 4749-4762.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; przeglądu literatury i analizie  
wyników, co stanowi 5 % pracy.

Podpis



Warszawa, dn. 19.09.2024

Dr inż. Grzegorz Grodkowski

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

grzegorz\_grodkowski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Słószarz Jan, Gołębiewski Marcin, Grodkowski Grzegorz, Puppel Kamila:  
Polymorphism of Genes and Their Impact on Beef Quality, Current Issues in Molecular  
Biology, 2023, 45, s. 4749-4762.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; przeglądu literatury i  
opracowaniu wyników, co stanowi 5 % pracy.

Podpis

*Grzegorz Grodkowski*



Warszawa, dn. 19.09.2024

Dr hab. Marcin Gołębiewski, prof. SGGW

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

marcin\_golebiewski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

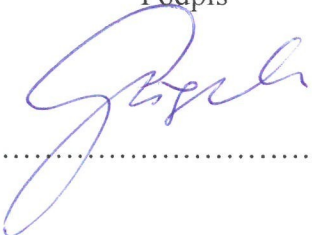
**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Słószarz Jan, Gołębiewski Marcin, Grodkowski Grzegorz, Puppel Kamila:  
Polymorphism of Genes and Their Impact on Beef Quality, Current Issues in Molecular  
Biology, 2023, 45, s. 4749-4762.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na; zarządzaniu badaniami oraz kierowaniem  
zespołem badawczym, co stanowi 5 % pracy.

Podpis



.....



## Article

# Relationship between Beef Quality and Bull Breed

Piotr Kostusiak <sup>1</sup>, Jan Slószarz <sup>1</sup>, Marcin Gołębiewski <sup>1</sup>, Tomasz Sakowski <sup>2</sup> and Kamila Puppel <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Animal Science, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland; piotr\_kostusiak@sggw.edu.pl (P.K.); jan\_sloszarz@sggw.edu.pl (J.S.); marcin\_golebiewski@sggw.edu.pl (M.G.)

<sup>2</sup> Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Science, Jastrzębiec, Postępu 36A, 05-552 Magdalenka, Poland; t.sakowski@igbzpan.pl

\* Correspondence: kamila\_puppel@sggw.edu.pl

**Simple Summary:** The aim of this study was to determine and compare the nutritional value of meat from the four most popular cattle breeds in Poland. A study comparing the nutritional value and quality of beef from the Polish Holstein-Friesian (PHF) dairy breed with that from the Limousine (LM), Hereford (HH) and Charolaise (CH) beef breeds found that beef from beef breeds had higher levels of total antioxidant status (TAS) and degree of antioxidant potential (DAP) than PHF beef. The LM breed had the highest concentration of DAP, anserine, taurine, and creatine, while CH had the highest levels of TAS, carnosine, and coenzyme Q10. In addition, LM, CH, and HH had significantly higher levels of C18:2 *cis*-9, *trans*-11. The breed significantly influences the antioxidant potential of beef.

**Abstract:** The beef industry in Poland heavily relies on the Polish Holstein-Friesian (PHF) breed, known for its primary use in dairy production, but which also contributes significantly to the beef supply. In contrast, the Limousine (LM), Hereford (HH), and Charolaise (CH) breeds have gained popularity due to their ideal specialized characteristics for beef production. As PHF continues to dominate the beef market, a thorough comparison of its beef quality and nutritional attributes with the three most popular beef breeds in Poland is essential. This study aims to address this knowledge gap by conducting a rigorous comparison. The experiment was carried out on the beef from 67 bulls kept in a free-stall system with standardized feeding. The highest total antioxidant status (TAS) was found in CH and was 147.5% higher than that in PHF. Also, compared with PHF, a large difference of 70% was observed in LM, while in HH it was only 6.25%. For degree of antioxidant potential (DAP), the highest concentration was found in LM, while CH had a slightly lower score than LM. PHF had the lowest scores for each of the analyzed parameters of protein fraction. For anserine, taurine, creatinine, and creatine content, the highest results were found for LM. For carnosine and coenzyme Q10, the highest values were found for CH. Overall, these results highlight the impact of maturity and breed on carcass composition and quality. Late-maturing breeds, such as LM and CH, tend to exhibit leaner carcasses with superior fatty acid profiles and antioxidant properties. This knowledge is valuable for producers, enabling them to make informed decisions regarding breed selection and production strategies to meet specific market demands for beef with the desired composition and quality.

**Keywords:** cattle; beef; bioactive components; fatty acid profiles; antioxidants



**Citation:** Kostusiak, P.; Slószarz, J.; Gołębiewski, M.; Sakowski, T.; Puppel, K. Relationship between Beef Quality and Bull Breed. *Animals* **2023**, *13*, 2603. <https://doi.org/10.3390/ani13162603>

Academic Editors: Sergio Ghidini, Gabriella Holló and Ferenc Szabó

Received: 14 July 2023

Revised: 6 August 2023

Accepted: 9 August 2023

Published: 12 August 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cattle production in Poland is focused on milk production [1]. This means that breeding work carried out over the years has focused on improving animals for milk, especially in the Polish Holstein-Friesian (PHF) breed, and has ignored issues to do with the meat quality of these animals; this has been influenced by the lack of tradition related to beef consumption [2]. According to Statistics Poland (GUS), in 2021 there were 6,378,742 head of cattle, including 2,289,025 cows [3]. The number of beef cows under performance

evaluation was determined by the Polish Federation of Cattle Breeders and Dairy Farmers (PZHiPBM), and on 31 December 2021 this figure was 21,840 head of cattle [4]. It was established that the average number of cows per farm was 21.8 head, and the number of herds registered with the PZHiPBM was 1147. The Polish Federation of Cattle Breeders and Dairy Farmers reported that there were 704,506 head of PHFs under dairy performance evaluation in 2021, which accounted for 88.76% of all dairy cows under evaluation in Poland and 11.04% of the total number of cattle [5]. The number of herds containing cows under performance evaluation in 2021 was 18,559. Thus, the proportion of beef cattle in Poland is dramatically low compared with the dominant dairy cattle population. This is due to milk production intensification, which results in dairy breeds dominating in beef production. In 2021, 1,866,484 bovine animals were slaughtered in Poland, including 52,053 calves, 310,881 heifers, 555,220 cows, and 948,330 bullocks and bulls [3], resulting in 553,706 tons in carcasses post-slaughter warm weight. Of the total amount of cattle in the country, 93% are dairy, so special attention should be paid to the quality and nutrient content indicators of the meat being produced, and crossbreeding should be considered as a way to improve these indicators [6]. Based on data since 2012, changes in the population of the most popular breeds have been observed. The changes in the Polish Holstein-Friesian (PHF), Limousine (LM), Charolaise (CH), and Hereford (HH) populations are shown in Table 1.

**Table 1.** Population changes of PHF, LM, CH, and HH [4].

	No. of Heads in 2012	No. of Heads in 2021	Population Change
<b>PHF</b>	597,715	704,506	106,791 (+17.86%)
<b>Limousine</b>	11,879	13,948	+2069 (+17.4%)
<b>Charolaise</b>	2265	1571	−694 (−30.6%)
<b>Hereford</b>	743	1409	+666 (+89.6%)

The characteristics of cattle production in Poland during the 2012–2021 period did not change significantly. Dairy production continued to be the dominant production sector. During this period, an increase of 17.86% in the country’s PHF herd, 17.4% in the LM herd, and 89.6% in the HH herd was observed, while the CH herd decreased by 30.6%, which is related to the higher price prosperity obtained for LM. The increases in the LM and HH herds are too low to be able to compensate for PHF beef production, which is the main contributor, so it is important to analyze and compare these breeds to determine their quality and health-promoting differences.

In order to study the influence of genotype on the formation of meat quality and its nutritional value, this study included bulls from the dominant dairy breed in Poland, the Polish Holstein-Friesian, and the three most popular beef cattle breeds, Limousine, Charolaise, and Hereford. The selection of breeds was made on the basis of available data on the proportion of breeds within the structure of beef production in Poland. The PHF breed is characterized by high milk yield, but in meat production it is characterized by poorer feed utilization and higher collagen content in muscles, which negatively affects consumption quality. Dairy cattle account for 93% of cattle heads, while the remaining 7% are made up of other cattle, including beef breeds, of which there are 15 registered in Poland. Of the beef breeds, about 70% are LM, 12% are CH, and 6% are HH. The cattle breeds used in the study make it possible to determine the quality of the meat produced in the country and to observe any differences due to the course of breeding work in Poland.

Beef is of worldwide importance as a source of protein fraction bioactive components such as anserine, carnosine, taurine, coenzyme Q10, creatine and creatinine, polyunsaturated fatty acids (FAs), fat-soluble vitamins, and of high-biological-value protein. All these

elements have beneficial effects on human health [6]. Anserine and carnosine demonstrate antioxidant activity and inhibit the formation of carbonyl groups of proteins, which, by their actions, can prevent many diseases, including Alzheimer's disease, atherosclerosis, and diabetes [7]. They also exhibit chelating and anti-glycation effects [8]. In the case the  $\omega$ -3 family of fatty acids, C18:3 n-3, C20:5 n-3, C22:6 n-3, and C18:2 n-6, as well as C18:2 *cis*-9 *trans*-11, have anti-carcinogenic properties and antioxidant properties that help build a balance between oxidants and antioxidants. Fat-soluble vitamins also reduce the effects of free radicals [9].  $\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -retinol affect the differentiation of epithelial cells in the gastrointestinal tract, urinary tract, respiratory tract, and organs for vision, and are essential for the biosynthesis of fat from sugars, as well as for catalyzing the oxidation of unsaturated fatty acids.  $\alpha$ -Tocopherol has strong antioxidant properties and protects the body from degenerative diseases [9].

The production of high-quality culinary beef is still rare on Polish farms. Crossbreeding with beef breeds could be used to improve quality parameters and nutritional value, which would improve meat quality over a relatively short period of time, as well as feed conversion and growth rates [10]. Testing the concentrations of valuable nutrients will allow the necessary directions for animal breeding to be determined. Improving the analyzed parameters in the case of the PHF breed will benefit consumer health, improve meat quality through increased proportions of antioxidant substances [11], reduce the risk of animal diseases, and improve the export value of the raw material [12]. The aim of this study was to compare the beef quality and nutritional value of the dominant dairy breed and the three most popular beef breeds in Poland. The Polish Holstein-Friesian (PHF) breed is the main source of beef produced in the country. Limousine (LM), Hereford (HH), and Charolaise (CH) are the most popular beef breeds in Poland. A comparison of the four breeds in terms of beef quality will answer whether this is a good solution, especially when it comes to the formation of the level of bioactive components in muscle tissues. The PHF breed, which is the main source of the beef produced in Poland, was taken as the reference. The aim of this study was to determine and compare the nutritional value of meat from the four most popular cattle breeds in Poland

## 2. Materials and Methods

The experiment was conducted on 67 bulls from four breeds: Limousine, Hereford, Charolaise, and Polish Holstein-Friesian (PHF). Live weight and daily gain parameters were standardized at 605 days of age (Table 2).

**Table 2.** Bull characteristics on the day of slaughter (standardized at 605 days).

	Number ( <i>n</i> )	Standardized Live Weight (kg)	Carcass Weight (kg)	Standardized Daily Gains (kg)	Daily Carcass Gains (kg)
<b>PHF</b>	16	536	317	0.82	0.53
<b>Limousine</b>	18	694	413	1.08	0.68
<b>Charolaise</b>	17	689	416	1.06	0.67
<b>Hereford</b>	16	669	390	1.04	0.66
<i>p-value</i>		0.001	0.001	0.001	0.001
SEM		4.251	8.213	0.054	0.012

The characteristics of the feed characteristics are shown in Table 3. The bulls were kept in a free-stall system in accordance with the minimum standards for the maintenance of cattle (Journal of Laws No. 167/position 1629 of 2003, as amended).

**Table 3.** Characteristics of the research material.

Composition	Value
Maize silage (%)	68
Barley (%)	29
Supplements (%)	3
<b>Nutritional value</b>	
Dry matter (%)	54
Protein (g/kg)	128
NEm (Mcal/kg)	1.77
Neg (Mcal/kg)	1.15
NDF (g/kg)	343
ADF (g/kg)	194
Crude fat (g/kg)	19

The animals were slaughtered at 21–24 months of age, and the carcass weight was recorded before slaughter (selected groups in the same day). The carcasses were then cooled for 24 h at 2–4 °C, after which 300 g of semimembranosus muscles was sampled parallel to the muscle axis. During the fattening period, all the bulls received the same TMR ration, *ad libitum*, balanced according to National Research Council recommendations for beef cattle.

### 2.1. Analytical Methods

Beef samples were chopped, then placed in a blender and ground until homogeneous. These were later analyzed using a near-infrared spectrophotometer. The basic chemical composition of the meat was determined using a Food Scan™ analyzer.

Meat fat extraction was performed using the Folch method [13]. Fatty acid methylation was performed according to the EN ISO 5509 [14] transesterification method. The functional fatty acid content was determined using an Agilent 7890A GC gas chromatograph and a Varian Select FAME column according to Solarczyk et al. [6].

The measurement of the fat-soluble vitamin content was performed using an Agilent 1100 RP-HPLC instrument and a ZORBAX Eclipse XDB column according to the methodology of Puppel et al. [15].

The measurement of the bioactive component of the protein fraction content was performed using an RP-HPLC Agilent 1100 instrument and a Jupiter 5u C18 300A column according to the methodology of Łukasiewicz et al. [8].

The determination of MDA (malondialdehyde) was carried out using a Tecan NanoQuant Infinite M200 PRO analyzer (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) according to the methodology of Kapusta et al. [16].

The cholesterol determination was achieved using an Agilent 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and a BP-5 column according to the methodology of Kapusta et al. [16].

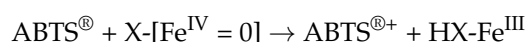
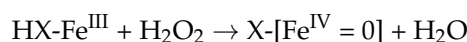
DAP (degree of antioxidant protection) was calculated from the molar ratio between antioxidants and oxidants according to Pizzoferrato et al. [17]:

$$DAP = \frac{\sum_{i=1}^n AC_i (n^{\circ} \text{ moles})}{OT (n^{\circ} \text{ moles})}$$

Total antioxidant potential (TAS) according to RANDOX application.

Incubation of ABTS® with peroxidase (methemoglobin) leads to the formation of radical cation ABTS + ·. This substance is blue-green and can be detected at 600 nm.

Antioxidants present in the sample reduce the formation of blue-green color in proportion to their concentration.



where HX-Fe<sup>III</sup>—metmyoglobin, X-[Fe<sup>IV</sup> = O], ABTS<sup>®</sup>—2,2-azino-di [3-ethylbenzothiazolin-  
osulfonate] (RANDOX materials). U/L defines the concentration of TAS.

## 2.2. Statistical Analysis

The data obtained were subjected to analysis of variance using ANOVA. The distribution of bioactive components was checked using the Shapiro–Wilk test. All tests were performed using the IBM SPSS 23 (2023) package [18]. Data were presented as least-squares means with standard error of the mean.

The following statistical model was used:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + e_{ij}$$

where  $Y_{ijk}$ —value of the tested trait;  $\mu$ —mean;  $A_i$ —effect of the  $i$ -th breed ( $i = 1-4$ );  $e_{ij}$ —standard error.

## 3. Results

For the most part, the results in Table 4 show significant differences between the protein, crude fat, and collagen content of muscle. The highest proportion of protein was determined for the LM breed, and was 22.32% higher than that of the PHF breed, which had the lowest protein content. Protein is the most valuable nutrient, so the highest possible results should be expected in resource-consuming meat production.

**Table 4.** The effect of breed on the formation of the basic chemical composition in *Semimembranosus* muscles. In parentheses are % of variation in relation to PHF. Means (in column) marked with the same letters differ significantly at: lowercase letters,  $p \leq 0.05$ ; uppercase letters,  $p \leq 0.01$ .

	Protein [g/100 g]	Crude Fat [g/100 g]	Collagen [mg/100 g]
<b>PHF</b>	19.40 <sup>A,B,C</sup>	2.95 <sup>A,B</sup>	592.24 <sup>A,B,C</sup>
<b>Limousine</b>	23.73 <sup>A,d</sup> (+22.32%)	2.16 <sup>A,C</sup> (−26.78%)	549.84 <sup>A,d</sup> (−7.16%)
<b>Charolaise</b>	22.05 <sup>B</sup> (+13.66%)	2.26 <sup>B,D</sup> (−23.39%)	542.52 <sup>B,e</sup> (−8.40%)
<b>Hereford</b>	21.21 <sup>C,d</sup> (+9.33%)	3.01 <sup>C,D</sup> (+2.04%)	552.62 <sup>C,d,e</sup> (−6.69%)
SEM	1.236	0.441	7.625

The fatty acid profile showed significantly better results for LM, CH, and HH compared with PHF in the C18:2 *cis*-9, *trans*-11 group, which is a potent antioxidant and may have anti-carcinogenic effects (Table 5). The results of the fatty acid profile were higher for HH (40.15%) and CH (64.86%). These are important differences that should be taken into consideration in consumer decisions for their health-promoting properties [19]. The greatest differences in the analyzed acids were observed in the C22:6 and C18:1 content in the CH group compared with PHF, with differences of 100% and 96.39%, respectively. Fatty acid content in the PHF breed was no higher compared to the rest. These results indicate that beef breeds have a very significant advantage over dairy breeds.



**Table 5.** The effect of breed on the formation of functional fatty acid levels in *Semimembranosus muscles*. In parentheses are % of variation in relation to PHF. Means (in column) marked with the same letters differ significantly at: lowercase letters,  $p \leq 0.05$ ; uppercase letters,  $p \leq 0.01$ .

[g/100 g]	C18:1 <i>trans</i> -11	C18:2 n-6	C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	C18:3 n-3	C20:5 n-3	C22:6 n-3
PHF	0.83 A,B,C	8.24 A,B,C	2.59 A,B,C	0.49 A,B,C	0.42 A,B,C	0.07 A,B,C
Limousine	1.39 A,D,E (+67.45%)	12.19 A,d,E (+47.94%)	4.03 A,d,E (+55.60%)	0.74 A,D (+51.2%)	0.71 A,D (+69.05%)	0.11 A,d (+57.14%)
Charolaise	1.63 B,D,F (+96.39%)	13.45 B,d,F (+63.23%)	4.27 B,d,F (+64.86%)	0.71 B,E (+44.90%)	0.74 B,E (+76.19%)	0.14 B,d,E (+100%)
Hereford	1.26 C,E,F (+51.80%)	10.38 C,E,F (+25.97%)	3.63 C,E,F (+40.15%)	0.66 C,D,E (+34.70%)	0.65 C,D,E (+54.76%)	0.09 C,D,E (+28.57%)
SEM	0.233	0.478	0.119	0.017	0.041	0.011

$\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -retinol, which function as vitamin A, showed high variability across breeds (Table 6). The lowest results were observed for PHF in each group. The smallest difference was found between HH and PHF for  $\alpha$ -retinol, with a variation of 3.03%, and the highest was between LM and PHF for  $\beta$ -carotene, at 80%. Large differences were observed in the  $\alpha$ -tocopherol group, which is a type of vitamin E with strong antioxidant properties. CH had a 93.17% higher result relative to PHF, while LM showed the smallest difference, but still high, at 72.67% relative to PHF (Table 6). In most of the analyzed cases, the differences were significant and reached dozens of percentage points, and in some cases exceeded 90%, which indicates the significantly higher amounts of vitamin content in the meat of beef breeds compared with that of the dairy PHF breed.

**Table 6.** The effect of breed on the formation of fat-soluble vitamin levels in *Semimembranosus muscles*. In parentheses are % of variation in relation to PHF. Means (in column) marked with the same letters differ significantly at: lowercase letters,  $p \leq 0.05$ ; uppercase letters,  $p \leq 0.01$ .

[ $\mu$ g/g]	$\beta$ -Carotene	$\alpha$ -Retinol	$\alpha$ -Tocopherol
PHF	0.20 A,B,C	0.66 A,B,C	1.61 A,B,C
Limousine	0.36 A,D (+80%)	0.81 A,D (+22.73%)	2.78 A,D,E (+72.67%)
Charolaise	0.33 B,E (+65%)	0.79 B,E (+19.70%)	3.11 B,D,f (+93.17%)
Hereford	0.21 C,D,E (+5%)	0.68 C,D,E (+3.03%)	3.08 C,E,f (+91.30%)
SEM	0.012	0.078	0.113

The highest total antioxidant status (TAS) was found in CH and was 147.5% higher than PHF. This is a very large difference, and indicates that the meat of this breed has significantly greater antioxidant properties compared with that of the other breeds (Table 7). Also, compared with PHF, a large difference of 70% was observed in LM, while in HH it was only 6.25%. For the degree of antioxidant potential (DAP), the highest concentration was found in LM, while CH had a slightly lower score than LM. Both the TAS and DAP indexes indicate antioxidant properties, and it is desirable to have them at their highest possible concentrations. In the case of malondialdehyde (MDA), the lower the score, the better. The lowest MDA content was found in CH, with LM being only slightly worse, while in HH the result was significantly worse. For all three analyzed elements, PHF had the worst results, indicating that it had lower quality and lower nutritional value parameters (Table 7).



**Table 7.** The effect of breed on the formation of TAS, DAP, and MDA levels in *Semimembranosus musculus*. In parentheses are % of variation in relation to PHF. Means (in column) marked with the same letters differ significantly at: lowercase letters,  $p \leq 0.05$ ; uppercase letters,  $p \leq 0.01$ .

	TAS [mmol/L]	DAP	MDA [mM/g]
PHF	0.80 <sup>A,B,C</sup>	$5.12 \times 10^{-3}$ <sup>A,B,C</sup>	3.30 <sup>A,B,C</sup>
Limousine	1.36 <sup>A,D,E</sup> (+70%)	$8.10 \times 10^{-3}$ <sup>A,d,E</sup> (+58.20%)	1.24 <sup>A,D</sup> (−62.42%)
Charolaise	1.98 <sup>B,D,F</sup> (+147.5%)	$7.80 \times 10^{-3}$ <sup>B,d,F</sup> (+52.34%)	1.20 <sup>B,E</sup> (−63.64%)
Hereford	0.85 <sup>C,E,F</sup> (+6.25%)	$6.25 \times 10^{-3}$ <sup>C,E,F</sup> (+22.07%)	2.45 <sup>C,D,E</sup> (−25.76%)
SEM	0.011	0.013	0.013

The analysis of the bioactive content of the protein fraction was in line with previous results. The higher the index of each parameter, the higher the nutritional value of the meat. PHF had the lowest scores for each of the analyzed parameters (Table 8). For anserine, taurine, creatinine, and creatine content, the highest results were found for LM. For carnosine and coenzyme Q10, the highest values were found for CH. In the HH group, all analyzed elements were at higher levels than the PHF group, but they were not as high as they were in the LM and CH groups (Table 8).

**Table 8.** The influence of breed on bioactive protein fraction levels in *Semimembranosus musculus*. In parentheses are % of variation in relation to PHF. Means (in column) marked with the same letters differ significantly at: lowercase letters,  $p \leq 0.05$ ; uppercase letters,  $p \leq 0.01$ .

[mg/100 g]	Anserine	Carnosine	Taurine	Coenzyme Q10	Creatinine	Creatine
PHF	61.22 <sup>A,B,C</sup>	387.30 <sup>A,B,C</sup>	34.28 <sup>A,B,C</sup>	1.87 <sup>A,B,C</sup>	4.12 <sup>A,B,C</sup>	396.96 <sup>A,B,C</sup>
Limousine	74.08 <sup>A,d,E</sup> (+21.00%)	431.53 <sup>A,D,E</sup> (+11.42%)	43.49 <sup>A,d,E</sup> (+26.87%)	2.33 <sup>A,d,e</sup> (+24.60%)	5.61 <sup>A,d,E</sup> (+36.17%)	422.66 <sup>A,d,E</sup> (+6.47%)
Charolaise	72.52 <sup>B,d,F</sup> (+18.46%)	445.36 <sup>B,D,F</sup> (+14.99%)	42.14 <sup>B,d,F</sup> (+22.92%)	2.54 <sup>B,d,F</sup> (+35.82%)	5.44 <sup>B,d,F</sup> (+32.04%)	418.22 <sup>B,d,F</sup> (+5.36%)
Hereford	69.29 <sup>C,E,F</sup> (+13.18%)	419.59 <sup>C,E,F</sup> (+8.34%)	37.31 <sup>C,E,F</sup> (+8.84%)	2.08 <sup>C,e,F</sup> (+11.23%)	4.85 <sup>C,E,F</sup> (+17.72%)	411.05 <sup>C,E,F</sup> (+3.55%)
SEM	0.752	1.114	0.442	0.022	0.073	0.812

#### 4. Discussion

Long et al. [20] conducted research revealing that optimal slaughter ages and weights vary significantly depending on the rate of maturity, which is characterized by the accumulation of fat during the “finishing” period. The average fattening time has been standardized at 605 days. PHF gained 0.82 kg per day, LM 1.08 kg, CH 1.06, and HH 1.04 kg (Table 2). Sakowski et al. [21], Kayar and İnal [22], and Pogorzelska et al. [23] reported similar trends in fattening rates and fattening results for LM, CH, and HH. Southgate et al. [24] conducted a study comparing breeds slaughtered at the same carcass fat cover. They found that Canadian Holsteins required approximately an additional 65 and 45 days to reach slaughter in a 16-month and 24-month production system, respectively, compared with either British Friesian or Charolais × Friesian steers. The Netto daily gains (daily carcass gains, Table 2) of PHF were 0.53 kg, 0.68 kg for LM, 0.67 kg for CH, and 0.66 for HH; this stays in agreement with McGee et al. [25] and indicates the benefits of CH steers compared with HF steers in fattening. Those results show the lowest daily gains and daily carcass gains for PHF achieved on the same feeding.

The growth ability of cattle is influenced by various factors, including breed, genetic predisposition, nutrition, microclimatic conditions, farm or breeding conditions, and the month of birth [26]. Daily weight gains can be visualized using a growth curve, which exhibits a sigmoid character [27]. Differences in growth ability exist not only among different breeds but also among individuals within the same breed, emphasizing the impact of body frame on slaughter age and carcass weight [28]. The length of the fattening period significantly affects growth parameters and carcass quality. Ustuner et al. [29] confirmed that both the initial weight at the start of fattening and the timing for the end of the fattening period are crucial for the final meat production performance. Carcass weights were 536 kg, 694 kg, 689 kg, and 669 kg for PHF, Limousine, Charolaise, and Hereford breeds, respectively (Table 2). The differences in standardized live weight among these breeds can be attributed to various factors, including genetic characteristics and growth rates. Albertí et al. [30] reported that LM and CH breeds had higher carcass yields than Angus and HH. However, HH had the highest slaughter weight. Each breed has its own genetic potential for growth and carcass development, which influences the final carcass weight attained. Abramowicz et al. [31] highlighted that fat accumulation occurs after the relative growth of muscle decreases, while bone growth continues to decrease. This suggests that as animals mature, there is a shift in nutrient allocation towards fat deposition. The growth rate of fatty tissues can vary depending on their location and the stage of growth [32]. This indicates that different fat depots may exhibit different growth patterns and rates. In the study by Berg et al. [33], the carcass composition of seven different beef breeds was compared. The breeds exhibited variations in the muscle, fat, and bone composition of the carcasses. Notably, larger-framed breeds such as Chiannina and Blonde d'Aquataine resulted in carcasses with less fat compared with Danish Red and Hereford at a standard carcass weight. This suggests that breed-specific characteristics play a significant role in determining carcass composition.

Augustini et al. [34] demonstrated that the percentage of carcass meat and the proportion of beef cuts undergo changes during the growth of cattle. As animals mature, each tissue reaches its growth maximum at different stages, resulting in alterations in carcass tissue composition. Irshad et al. [35] highlighted that late-maturing cattle breeds exhibit slower physiological development compared with early-maturing breeds. This slower development is associated with a higher growth potential and slower fat accretion. Late-maturing breeds tend to show a preference for leaner carcasses, as they exhibit faster growth rates and more efficient conversion of high-energy feed into carcass weight. Van der Westhuizen [36] supported the notion that late maturity in cattle leads to increased growth of leaner carcasses. The delayed maturity allows for faster growth rates and improved conversion of feed into carcass weight [6]. This suggests that late-maturing breeds may have advantages in terms of producing leaner beef. The highest proportion of fat was determined for the HH breed, and was 2.04% higher than that of the PHF breed (Table 4). The Limousine breed had the highest average standardized live weight of 694 kg, followed closely by the Charolais breed with 689 kg. These breeds are known for their excellent muscling and growth potential, which may contribute to their higher carcass weights. The Hereford breed had a slightly lower average standardized live weight of 669 kg (Table 4). Collectively, these studies emphasize the dynamic nature of tissue development during cattle growth and the impact of maturity on carcass composition. Kempster et al. [37] highlight that when cattle of diverse breeds are compared at the same age and under similar management conditions, there will be variations in carcass weight. These differences are influenced by various factors, including the breed-specific growth curves and the range of target weights for each breed.

The results of the basic chemical composition, functional fatty acids, bioactive components of the protein fraction, fat-soluble vitamins, and oxidative and antioxidant potential indicate that PHF beef will have a significantly lower palatability and nutritional quality. Concerning fat content, LM and CH had significantly lower percentages (−26.78% and −23.39%, respectively) than the PHF breed. In the realm of cattle genetics and fat parti-

tioning, Kempster et al. [37] conducted a seminal study demonstrating the significance of genetic variation in the distribution of fat between different depots. The findings of this study underscore the role of genetics in shaping fat deposition patterns in cattle. Additionally, Casasús et al. [38] reported that such genetic variation in fat partitioning persists even under similar nutritional conditions, further supporting the influence of genetic factors on fat distribution. Low fat content is characteristic for consumer needs in many developed countries, despite its lower palatability [39]. Only HH had a higher fat content, which was minimal at 2.04%. As the dominant breed in beef production worldwide, HH is characterized by high palatability because of its higher intramuscular fat content. The crude fat content positively influences the juiciness of the meat as intramuscular fat, but not as cover fat around the meat [40,41]. Additionally, Diler et al. [42] reported that muscle and fat type are essential sources of variations in the textural characteristics, sensory panel attributes, and fatty acid profile of meat from Holstein-Friesian bulls. The highest collagen content was found in PHF—in culinary beef production, this indicator should be as low as possible due to its negative effect on meat tenderness [43]. Increased collagen content also negatively affects meat quality [44,45], and significantly higher proportions of it were found in PHF. Compared with the beef breeds HH, CH, and LM, the dominant PHF breed significantly stands out in terms of its lower nutritional value and quality. Meat quality might be improved by crossbreeding with beef breeds [6,46]. This is a solution that will help make progress in shaping the quality of the beef produced in Poland and positively influence its health-promoting properties.

The hormonal and metabolic distinctions between beef cattle and dairy breeds play a crucial role in determining their respective fat deposition tendencies. As elucidated by Kempster et al. [37], beef cattle exhibit a remarkable ability to convert nutrients predominantly into proteins. In contrast, dairy breeds, due to their unique hormonal and metabolic status, tend to deposit more intra-abdominal fat. The influence of breed and feed type shape the basic chemical composition and nutritional value of beef. The positive effect of the fatty acids' improvement has been confirmed in a number of studies concerning the Limousine [47,48], Polish Holstein-Friesian [49,50], Charolaise [51,52], and Hereford breeds [53,54]. The authors of the studies demonstrated there is a variability in the fatty acid profile, indicating a benefit in nutritional value from the use of meat from breeds with better monounsaturated and polyunsaturated FA profiles. However, Sobczuk-Szul et al. [55] reported that intramuscular fat had a higher MUFA concentration (46.2%) than visceral fat (36.7%). Appropriate breed selection decreases the saturated FA content and improves the ratio of n-3 and n-6 fatty acids [21]. Barton et al. [56] indicated similar trends in the basic chemical composition of meat and the FA profile of LM and CH. Gregory et al. [57] pointed out that breed is an important factor in shaping slaughter performance. Comparative studies on the fattening value of PHF, LM, CH, and HH confirmed these reports [58–60]. Additionally, Sargentini et al. [61] and Humada et al. [62] reported that total SFA content did not significantly alter with increasing slaughter age. Breed has a significant effect on the fatty acid profile and how fat is deposited with age due to differences in intramuscular fat [47]. The proportion of unsaturated fatty acids in intramuscular fat increases with age [63,64]. By 18 months of age, meat palatability increases [65], accompanied by changes in soluble collagen structure [66]. The mechanism of these changes is not fully understood [67], but they are observable over the life of the cattle. Cattle slaughtered at the same weight, but of different breeds, can be characterized by different intramuscular fat content, which is deposited after the muscles' growth phase, indicating different rates of breed development [68]. Research by Nürnberg et al. [69] on the dairy German Holstein and Belgian Blue breeds indicate relatively small modifications in the proportions of saturated fatty acids and n-3 between 18 and 25 months of cattle age, which may suggest a limited effect of age on the fatty acid profile after 18 months.

Fat-soluble vitamins are an essential part of the human diet, which can be supplemented with beef that is rich in vitamins E and A. There are a number of properties of vitamins E and A, from protective effects on lipids [70] to improved health in people with

Alzheimer's [71] and cancer [72], but we can still observe deficiencies of those vitamins in human diets [73]. It seems reasonable to raise vitamin E levels in animals to benefit both animal welfare and the diets of meat consumers. The results in Table 6 show that breed has a significant effect on the formation of levels of  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -retinol, and  $\alpha$ -tocopherol, which may suggest the need for further research on the concentrations of these vitamins in beef meat. The results obtained in this study indicate that there are significantly higher concentrations of these vitamins in LM and CH relative to PHF, and, in the case of HH, that  $\alpha$ -tocopherol was clearly higher than in PHF. This allows us to conclude that the LM and CH breeds are significantly more nutritious than PHF. In addition, vitamin ratios can be further improved by pasture grazing, which beef breeds are predisposed to utilize effectively [74]. The effect of age on vitamin E content is described in the study by Warren et al. [75]. In the case of Holstein-Friesian and Angus breeds, the differences in concentration of animals uniformly fed vitamin E concentrations on the example of *Longissimus muscle* at 14, 19, and 24 months were 1.3, 1.4, and 1.6  $\mu\text{g/g}$ , respectively.

TAS results for LM and CH were characterized by high values; however, CH had the highest score. For DAP, the results for LM and CH were similar. Skaperda et al. [76] indicated increased antioxidant potential, which can be further increased by utilizing pasture grazing [77]. In contrast to TAS and DAP, where higher values benefit animal health, MDA content should be as low as possible [78]. In this case, LM, CH, and HH showed significantly lower values than PHF. Elevated MDA levels can negatively affect beef quality [79], so nutritional supplements containing selenium are used to improve this situation [79,80].

Anserine  $\beta$ -Alanyl-3-methyl-L-histidine is a dipeptide, a methyl-carnosine derivative. It consists of  $\beta$ -alanine and L-(N-methyl) histidine. With carnosine, it exhibits antioxidant activity, and high concentrations are found in skeletal muscle. The concentration is influenced by breed, sex, age, environment, and type of muscle [8]. Carnosine decreases MDA concentrations [81], reduces cellular aging processes [82], and can inhibit metmyoglobin formation [83]. The largest difference relative to PHF was found for anserine in LM and was 21%, while the smallest difference was between PHF and HH for carnosine and was 8.34% in favor of HH. The study by Watanabe et al. [84] shows that between 15 and 25 months of age there can be significant changes in the content of anserine and taurine in the *Longissimus dorsi muscle*. Such a relationship was not observed for carnosine. However, the authors indicate a significant effect of breed on each of the three and a variation in concentration in individual carcass elements [85].

Taurine is a 2-aminoethylsulfonic acid and is responsible for maintaining adequate leukocyte levels; its lack negatively affects the ability of neutrophils to oxygen burst and carry out phagocytosis. It also reduces the effects of oxidative stress and pro-inflammatory changes [86], and is involved in free radical neutralization, membrane stabilization, the formation of bile acid salts, and the maintenance of calcium homeostasis [87]. In this study, taurine was shown to have increased concentrations in all the beef breeds relative to PHF, reaching as high as 26.87% in LM. Taurine is also important for reducing nervous tension and improving mental performance by increasing glial cell metabolism [88]. It also has lipids, protective properties [89], and extends the shelf-life of beef [90].

Meat is a rich source of coenzyme Q10 [91]. It is an important component in the oxidative phosphorylation process. It converts energy from carbohydrates and fatty acids into ATP [92] and is part of the mitochondrial electron transport chain [93]. A lack of coenzyme Q10 results in the insufficient production of high-energy compounds [94]. A reduced form of coenzyme Q10 called ubiquinone is able to renew vitamin E [95]. The largest differences, when compared with PHF, were found in CH (35.82%), while in LM the variation was 24.60%, and that in HH was 11.23%.

Creatinine is a creatine derivative formed during metabolic processes as an endogenous metabolite of the non-enzymatic breakdown of creatine phosphate. Creatinine is used to store and transfer energy in muscle cells and tendons. It is synthesized in the body; however, it must also be partially supplied via the human diet from food [96,97]. All the

beef breeds in the study contained higher concentrations of creatinine relative to PHF: 36.17% for LM, 32.04% for CH, and 17.72% for HH.

Creatine is synthesized from arginine, methionine, and glycine [98]. It is responsible for providing the energy in skeletal muscles, especially muscles characterized by a high energy transfer to ADP in muscle cells [99]. Creatine is converted to creatinine through the non-enzymatic processes of creatine phosphate breakdown. Its concentration in the samples showed less variation across all the breeds than did creatinine. It was higher than PHF by only 6.47% for LM, 5.36% for CH, and 3.55% for HH.

The quality of beef is significantly influenced by functional type and breed. Beef production in Poland is based on dairy or dual-purpose cattle herds. Intensive feeding and extended finishing time can favorably affect the yield and quality of beef produced. It is important to increase the intensity and method of feeding in the final fattening stage [100]. The high growth potential of the animal at a young age is inhibited when the animal reaches somatic maturity [101]. Late-maturing animals are effective for intensive fattening. The growth phase, where most fat is deposited, is postponed, so they can be fattened to high body weights without a decrease in carcass quality. Tissue development occurs through the expansion of the skeleton, followed by muscle and fat in the last stage. Age affects nutritional value, so slaughtering rules have been adopted to help maintain quality beef [102]. All animals were fed the same diet and slaughtered at around 20 months of age, which allowed the results to be used for comparison after standardization due to the effect of age on shaping beef quality and composition. From birth to physical maturity, the rate of muscle growth is higher than the rate of fat deposition and influence on fatty acid composition [103]. The effect of age on the development of the fatty acid profile is important and should be taken into account during the current work on beef quality. It also affects the vitamin content of the meat [58] and is an important element in the formation of beef quality [21]. This also affects the bioactive protein fraction [84]. Therefore, it is important to take into account the age of the animals in comparisons for different breeds and feeding systems. The age of the animal is an important factor shaping meat quality. With age, the fat content and size of fat cells change [69,104].

Each cattle breed possesses unique genetic characteristics that influence their growth potential and carcass development. As cattle mature, there is a shift in nutrient allocation, with a decrease in the relative growth of muscle and bone and an increase in fat accumulation. This phenomenon implies that as animals reach their mature stages, they tend to deposit more fat, contributing to the final carcass weight attained. The allocation of nutrients towards fat deposition during the finishing period is essential for meat production and quality. The balance between muscle and fat development can impact the meat's marbling, tenderness, and flavor. Understanding breed-specific growth patterns and nutrient partitioning is crucial for the effective management and optimization of cattle production.

## 5. Conclusions

Overall, these results highlight the impact of maturity and breed on carcass composition and quality. Late-maturing breeds, such as LM and CH, tend to exhibit leaner carcasses with superior fatty acid profiles and antioxidant properties. The fatty acid profile showed significantly better results for LM and CH compared with HH and PHF in the C18:2 *cis*-9, *trans*-11 group, which is a potent antioxidant and may have anti-carcinogenic effects. Large differences were observed in the  $\alpha$ -tocopherol group, which is a type of vitamin E with strong antioxidant properties. CH had a 93.17% higher result relative to PHF, while LM showed the smallest difference, but still high, at 72.67% relative to PHF. The highest TAS was found in CH and was 147.5% higher than PHF. Also, compared with PHF, a large difference of 70% was observed in LM, while in HH it was only 6.25%. For DAP, the highest concentration was found in LM, while CH had a slightly lower score than LM. Both the TAS and DAP indexes indicate antioxidant properties, and it is desirable to have them at their highest possible concentrations. The lowest MDA content was found in CH, with LM being only slightly worse, while in HH the result was significantly worse. PHF had the



lowest scores for each of the analyzed parameters of protein fraction. For anserine, taurine, creatinine, and creatine content, the highest results were found for LM. For carnosine and coenzyme Q10, the highest values were found for CH. In the HH group, all analyzed elements were at higher levels than the PHF group, but they were not as high as they were in the LM and CH groups.

Collectively, these studies emphasize the dynamic nature of tissue development during cattle growth and the impact of maturity on carcass composition. Late-maturing breeds exhibit a different growth pattern, with slower fat deposition and a preference for leaner carcasses. Carcass composition is a result of the interplay between genetic factors, growth patterns, and management practices. Different cattle breeds exhibit distinct growth trajectories and rates of fat deposition, which ultimately affect the composition of their carcasses. Additionally, the target weights set for each breed based on market preferences and production goals also play a role in determining the composition of the final carcass. This knowledge has implications for breed selection, production strategies, and meeting specific market demands for beef with desired composition and quality.

**Author Contributions:** Conceptualization, P.K. and K.P.; methodology, K.P.; software, J.S.; validation, K.P. and J.S.; formal analysis, P.K. and J.S.; investigation, K.P. and T.S.; resources, T.S.; data curation, K.P.; writing—original draft preparation, P.K., M.G. and K.P.; writing—review and editing, P.K., M.G. and K.P.; visualization, P.K.; supervision, K.P.; project administration, T.S.; funding acquisition, T.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The partners of the ProYoungStock consortium gratefully acknowledge the financial support for this project provided by the CORE Organic Co-fund 2016/17 Funding Bodies, being partners in the Horizon 2020 ERA-Net project CORE Organic Cofund (Coordination of European Transnational Research in Organic Food and Farming systems, project ID 727495).

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Second Ethics Committee for Animal Experimentation in Warsaw (protocol number WAWA2/086/2018).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data generated or analyzed during the study are included in this published article. The datasets used and/or analyzed in the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Acknowledgments:** The paper is a part of the PhD thesis of Piotr Kostusiak.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Parzonko, A.; Bórawski, P. Competitiveness of Polish dairy farms in the European Union. *Agric. Econ.-Czech.* **2020**, *66*, 168–174. [CrossRef]
2. Szczepaniak, B.; Górecka, D.; Flaczyk, E. Nutritional habits relating to meat and meat products consumption among young people from selected regions of Poland. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2004**, *13*, 421–426.
3. Poland, S. Animal Production Expressed in Physical Terms in 2021. Available online: <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/produkcja-zwierzec-zwierzeta-gospodarskie/fizyczne-rozmiary-produkcji-zwierzecy-w-2021-r-2,8.html> (accessed on 13 March 2023).
4. Polski Związek Hodowców i Producentów Bydła Mięsnego. Ocena Wartości Użytkowej Bydła Ras Mięsnych Wyniki Za Rok 2021. Available online: [https://bydlo.com.pl/wp-content/uploads/2022/12/PZHiBM\\_Ocena2021\\_broszuraA4\\_prev-v3.pdf](https://bydlo.com.pl/wp-content/uploads/2022/12/PZHiBM_Ocena2021_broszuraA4_prev-v3.pdf) (accessed on 13 March 2023).
5. Farmers, P.F.o.C.B.a.D. Ocena i Hodowla Bydła Mlecznego za rok 2021-Region Oceny Wschód. Available online: [https://pfhb.pl/fileadmin/user\\_upload/OCENA/publikacje/publikacje\\_2022/wyniki\\_oceny/Wyniki\\_oceny\\_za\\_rok\\_2021\\_PFHBiPM\\_RO\\_WSCHOD.pdf](https://pfhb.pl/fileadmin/user_upload/OCENA/publikacje/publikacje_2022/wyniki_oceny/Wyniki_oceny_za_rok_2021_PFHBiPM_RO_WSCHOD.pdf) (accessed on 13 March 2023).
6. Solarczyk, P.; Gołębiewski, M.; Słószarz, J.; Łukasiewicz, M.; Przysucha, T.; Puppel, K. Effect of breed on the level of the nutritional and health-promoting quality of semimembranosus muscle in purebred and crossbred bulls. *Animals* **2020**, *10*, 1822. [CrossRef] [PubMed]
7. Artioli, G.G.; Sale, C.; Jones, R.L. Carnosine in health and disease. *Eur. J. Sport Sci.* **2019**, *19*, 30–39. [CrossRef]

8. Łukasiewicz, M.; Puppel, K.; Balcerak, M.; Slószar, J.; Gołębiewski, M.; Kuczyńska, B.; Batorska, M.; Więcek, J.; Kunowska-Słószar, M.; Popczyk, B. Variability of anserine and carnosine concentration in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*) meat. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2018**, *36*, 185–192.
9. Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **2010**, *4*, 118. [[CrossRef](#)]
10. Nogalski, Z.; Wielgosz-Groth, Z.; Purwin, C.; Sobczuk-Szul, M.; Mochol, M.; Pogorzelska-Przybytek, P.; Winarski, R. Effect of slaughter weight on the carcass value of young crossbred ('Polish Holstein Friesian'x'Limousin') steers and bulls. *Chil. J. Agric. Res.* **2014**, *74*, 59–66. [[CrossRef](#)]
11. Pogorzelska-Przybyłek, P.; Nogalski, Z.; Sobczuk-Szul, M.; Purwin, C.; Momot, M. Carcass characteristics of grass-fed crossbred bulls and steers slaughtered at two different ages. *Can. J. Anim. Sci.* **2018**, *98*, 376–385. [[CrossRef](#)]
12. Berry, D. Invited review: Beef-on-dairy—The generation of crossbred beef× dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 3789–3819. [[CrossRef](#)]
13. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*; Association of Official Analytical Chemists: Rockville, Maryland, USA, 1990; Volume 1.
14. *ISO 5509: 2000*; Animal and Vegetable Fats and Oils-Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids. ISO: Geneva, Switzerland, 2000.
15. Puppel, K.; Kapusta, A.; Kuczyńska, B. The etiology of oxidative stress in the various species of animals, a review. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 2179–2184. [[CrossRef](#)]
16. Kapusta, A.; Kuczyńska, B.; Puppel, K. Relationship between the degree of antioxidant protection and the level of malondialdehyde in high-performance Polish Holstein-Friesian cows in peak of lactation. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193512. [[CrossRef](#)]
17. Pizzoferrato, L.; Manzi, P.; Marconi, S.; Fedele, V.; Claps, S.; Rubino, R. Degree of antioxidant protection: A parameter to trace the origin and quality of goat's milk and cheese. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 4569–4574. [[CrossRef](#)]
18. IBM. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0*; IBM: Armonk, NY, USA, 2023.
19. Davis, H.; Magistrali, A.; Butler, G.; Stergiadis, S. Nutritional benefits from fatty acids in organic and grass-fed beef. *Foods* **2022**, *11*, 646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Long, C.; Stewart, T.; Cartwright, T.; Jenkins, T. Characterization of cattle of a five breed diallel: I. Measures of size, condition and growth in bulls. *J. Anim. Sci.* **1979**, *49*, 418–431. [[CrossRef](#)]
21. Sakowski, T.; Grodkowski, G.; Gołębiewski, M.; Slószar, J.; Kostusiak, P.; Solarczyk, P.; Puppel, K. Genetic and Environmental Determinants of Beef Quality—A Review. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 60. [[CrossRef](#)]
22. Kayar, T.; İnal, Ş. Comparison of fattening performance of Limousine, Charolais, Angus and Hereford breed bulls. *Euras. J. Vet. Sci.* **2019**, *35*, 104–108. [[CrossRef](#)]
23. Pogorzelska, J.; Miciński, J.; Ostoja, H.; Kowalski, I.M.; Szarek, J.; Strzyżewska, E. Quality traits of meat from young Limousin, Charolais and Hereford bulls. *Pak. Vet. J.* **2013**, *33*, 65–68.
24. Southgate, J.; Kempster, A.; Cook, G. Evaluation of British Friesian, Canadian Holstein and beef breed× British Friesian steers slaughtered over a commercial range of fatness from 16-month and 24-month beef production systems 2. Carcass characteristics, and rate and efficiency of lean gain. *Anim. Sci.* **1988**, *46*, 365–378.
25. McGee, M.; Kenny, D.; Fitzsimons, C. Intake, feed efficiency and carcass traits of Charolais and Holstein-Friesian steers offered a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 100–101. [[CrossRef](#)]
26. Bureš, D.; Bartoň, L. Performance, carcass traits and meat quality of Aberdeen Angus, Gascon, Holstein and Fleckvieh finishing bulls. *Lives. Sci.* **2018**, *214*, 231–237. [[CrossRef](#)]
27. Hozáková, K.; Vavříšínová, K.; Neirurerová, P.; Bujko, J. Growth of beef cattle as prediction for meat production: A review. *Acta Fytotech. Zootech* **2020**, *23*, 58–69. [[CrossRef](#)]
28. Mazzucco, J.P.; Goszczynski, D.E.; Ripoli, M.V.; Melucci, L.M.; Pardo, A.M.; Colatto, E.; Rogberg-Muñoz, A.; Mezzadra, C.A.; Depetris, G.; Giovambattista, G. Growth, carcass and meat quality traits in beef from Angus, Hereford and cross-breed grazing steers, and their association with SNPs in genes related to fat deposition metabolism. *Meat Sci.* **2016**, *114*, 121–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ustuner, H.; Ardicli, S.; Arslan, O.; Brav, F.C. Fattening performance and carcass traits of imported Simmental bulls at different initial fattening age. *Large Anim. Rev.* **2020**, *26*, 161–165.
30. Albertí, P.; Panea, B.; Sañudo, C.; Olleta, J.; Ripoll, G.; Ertbjerg, P.; Christensen, M.; Gigli, S.; Failla, S.; Concetti, S. Live weight, body size and carcass characteristics of young bulls of fifteen European breeds. *Livest. Sci.* **2008**, *114*, 19–30. [[CrossRef](#)]
31. Abramowicz, P.; Balcerak, M.; Brzozowski, P.; Gołębiewski, M.; Grodzki, H.; Kuczyńska, B.; Kunowska-Słószar, M.; Przysucha, T.; Puppel, K.; Slószar, J. *Meat Use of Cattle*; Przysucha, T., Gołębiewski, M., Slószar, J., Eds.; SGGW: Warsaw, Poland, 2018.
32. Robelin, J. Growth of adipose tissues in cattle; partitioning between depots, chemical composition and cellularity. A review. *Livest. Prod. Sci.* **1986**, *14*, 349–364. [[CrossRef](#)]
33. Berg, R.; Andersen, B.; Liboriussen, T. Growth of bovine tissues 1. Genetic influences on growth patterns of muscle, fat and bone in young bulls. *Anim. Sci.* **1978**, *26*, 245–258. [[CrossRef](#)]
34. Augustini, C.; Sami, A.; Schwarz, F. Effects of feeding intensity and time on feed on performance, carcass characteristics and meat quality of Simmental bulls. *Meat Sci.* **2004**, *67*, 195–201.
35. Irshad, A.; Kandeepan, G.; Kumar, S.; Ashish, K.; Vishnuraj, M.; Shukla, V. Factors influencing carcass composition of livestock: A review. *J. Anim. Prod. Adv.* **2013**, *3*, 177–186.

36. Van der Westhuizen, J. Making sense out of maturity types in beef cattle. *SA Stud. Breed./SA Stoetteler* **2014**, *2014*, 23–25.
37. Kempster, A.; Cuthbertson, A.; Harrington, G. *Carcass Evaluation in Livestock Breeding, Production and Marketing*; Granada Publishing Limited: London, UK, 1982.
38. Casasús, I.; Ferrer, R.; Sanz, A.; Villalba, D.; Revilla, R. Performance and ingestive activity of Brown Swiss and Pirenaica cows and their calves during the spring on valley meadows. *Arch. Zootec.* **2000**, *49*, 445–456.
39. Morales, R.; Aguiar, A.; Subiabre, I.; Realini, C. Beef acceptability and consumer expectations associated with production systems and marbling. *Food Qual. Prefer.* **2013**, *29*, 166–173. [[CrossRef](#)]
40. Garmyn, A. Consumer preferences and acceptance of meat products. *Foods* **2020**, *9*, 708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Testa, M.L.; Grigioni, G.; Panea, B.; Pavan, E. Color and marbling as predictors of meat quality perception of Argentinian consumers. *Foods* **2021**, *10*, 1465. [[CrossRef](#)]
42. Diler, A.; Yanar, M.; Özdemir, V.F.; Aydin, R.; Kaynar, Ö.; Palangi, V.; Lackner, M.; Koçyigit, R. Effects of Slaughter Age of Holstein Friesian Bulls on Meat Quality: Chemical Composition, Textural Characteristics, Sensory Attributes and Fatty Acid Profile. *Foods* **2022**, *12*, 158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Panea, B.; Olleta, J.L.; Sañudo, C.; del Mar Campo, M.; Oliver, M.A.; Gispert, M.; Serra, X.; Renand, G.; del Carmen Oliván, M.; Jabet, S. Effects of breed-production system on collagen, textural, and sensory traits of 10 European beef cattle breeds. *J. Texture Stud.* **2018**, *49*, 528–535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Marino, R.; Albenzio, M.; Della Malva, A.; Santillo, A.; Loizzo, P.; Sevi, A. Proteolytic pattern of myofibrillar protein and meat tenderness as affected by breed and aging time. *Meat Sci.* **2013**, *95*, 281–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Della Malva, A.; De Palo, P.; Lorenzo, J.M.; Maggiolino, A.; Albenzio, M.; Marino, R. Application of proteomic to investigate the post-mortem tenderization rate of different horse muscles. *Meat Sci.* **2019**, *157*, 107885. [[CrossRef](#)]
46. Przysucha, T.; Stefaniuk, M.; Golebiewski, M.; Slosarz, J.; Wnek, K.; Kunowska-Slosarz, M. Analysis of fattening results of Polish Holstein-Friesian bulls and PHF × Belgian Blue crossbreds bulls. *Ann. Wars. Univ. Life Sci. SGGW. Anim Sci* **2014**, *53*, 55–59.
47. Malau-Aduli, A.E.; Siebert, B.D.; Bottema, C.D.; Pitchford, W.S. Breed comparison of the fatty acid composition of muscle phospholipids in Jersey and Limousin cattle. *J. Anim. Sci.* **1998**, *76*, 766–773. [[CrossRef](#)]
48. Sobczuk-Szul, M.; Mochol, M.; Nogalski, Z.; Pogorzelska-Przybyłek, P.; Momot, M. Fattening of Polish Holstein-Friesian × Limousin Bulls under Two Production Systems and Its Effect on the Fatty Acid Profiles of Different Fat Depots. *Animals* **2021**, *11*, 3078. [[CrossRef](#)]
49. Litwińczuk, Z.; Domaradzki, P. Chemical composition, fatty acid profile, including health indices of intramuscular fat, and technological suitability of the meat of young bulls of three breeds included in a genetic resources conservation programme fattened within a low-input system. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2016**, *34*, 387–397.
50. Litwińczuk, Z.; Domaradzki, P.; Grodzicki, T.; Litwińczuk, A.; Florek, M. The relationship of fatty acid composition and cholesterol content with intramuscular fat content and marbling in the meat of Polish Holstein-Friesian cattle from semi-intensive farming. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2015**, *33*, 119–128.
51. McGee, M.; Keane, M.G.; Neilan, R.; Caffrey, P.; Moloney, A.P. Meat quality characteristics of high dairy genetic-merit Holstein, standard dairy genetic-merit Friesian and Charolais × Holstein-Friesian steers. *Ir. J. Agric. Food Res.* **2020**, *59*, 27–32. [[CrossRef](#)]
52. Corino, C.; Vizzarri, F.; Ratti, S.; Pellizzer, M.; Rossi, R. Long Term Dietary Supplementation with Omega-3 Fatty Acids in Charolais Beef Cattle Reared in Italian Intensive Systems: Nutritional Profile and Fatty Acids Composition of Longissimus lumborum Muscle. *Animals* **2022**, *12*, 1123. [[CrossRef](#)]
53. Ferrinho, A.M.; Peripolli, E.; Banchemo, G.; Pereira, A.S.C.; Brito, G.; La Manna, A.; Fernandez, E.; Montossi, F.; Kluska, S.; Mueller, L.F. Effect of growth path on carcass and meat-quality traits of Hereford steers finished on pasture or in feedlot. *Anim. Prod. Sci.* **2019**, *60*, 323–332. [[CrossRef](#)]
54. Otto, J.R.; Mwangi, F.W.; Pewan, S.B.; Adegboye, O.A.; Malau-Aduli, A.E. Lipogenic Gene Single Nucleotide Polymorphic DNA Markers Associated with Intramuscular Fat, Fat Melting Point, and Health-Beneficial Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Australian Pasture-Based Bowen Genetics Forest Pastoral Angus, Hereford, and Wagyu Beef Cattle. *Genes* **2022**, *13*, 1411.
55. Sobczuk-Szul, M.; Nogalski, Z.; Wielgosz-Groth, Z.; Mochol, M.; Rzemieniewski, A.; Pogorzelska-Przybyłek, P.; Purwin, C. Fatty acid profile in 4 types of fat depots in Polish Holstein-Friesian and Limousine × Polish Holstein-Friesian bulls. *Turk. J. Vet.* **2014**, *38*, 189–194. [[CrossRef](#)]
56. Bartoň, L.; Marounek, M.; Kudrna, V.; Bureš, D.; Zahradkova, R. Growth performance and fatty acid profiles of intramuscular and subcutaneous fat from Limousin and Charolais heifers fed extruded linseed. *Meat Sci.* **2007**, *76*, 517–523. [[CrossRef](#)]
57. Gregory, K.; Cundiff, L.; Koch, R.; Dikeman, M.; Koohmaraie, M. Breed effects and retained heterosis for growth, carcass, and meat traits in advanced generations of composite populations of beef cattle. *J. Anim. Sci.* **1994**, *72*, 833–850. [[CrossRef](#)]
58. Momot, M.; Nogalski, Z.; Pogorzelska-Przybyłek, P.; Sobczuk-Szul, M. Influence of genotype and slaughter age on the content of selected minerals and fatty acids in the longissimus thoracis muscle of crossbred bulls. *Animals* **2020**, *10*, 2004. [[CrossRef](#)]
59. Modzelewska-Kapituła, M.; Nogalski, Z.; Kwiatkowska, A. The influence of crossbreeding on collagen solubility and tenderness of Infraspinatus and Semimembranosus muscles of semi-intensively reared young bulls. *Anim. Sci. J.* **2016**, *87*, 1312–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



60. Nogalski, Z.; Sobczuk-Szul, M.; Pogorzelska-Przybyłek, P.; Wielgosz-Groth, Z.; Purwin, C.; Modzelewska-Kapituła, M. Comparison of slaughter value for once-calved heifers and heifers of Polish Holstein-Friesian × Limousine crossbreds. *Meat Sci.* **2016**, *117*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Sargentini, C.; Bozzi, R.; Lorenzini, G.; Degl'Innocenti, P.; Martini, A.; Giorgetti, A. Productive performances of Maremmana young bulls reared following organic rules and slaughtered at 18 and 24 months of age. *Ital. J. Anim. Sci.* **2010**, *9*, e31. [[CrossRef](#)]
62. Humada, M.; Serrano, E.; Sañudo, C.; Rolland, D.; Dugan, M. Production system and slaughter age effects on intramuscular fatty acids from young Tudanca bulls. *Meat Sci.* **2012**, *90*, 678–685. [[CrossRef](#)]
63. Park, S.J.; Beak, S.-H.; Kim, S.Y.; Jeong, I.H.; Piao, M.Y.; Kang, H.J.; Fassah, D.M.; Na, S.W.; Yoo, S.P.; Baik, M. Genetic, management, and nutritional factors affecting intramuscular fat deposition in beef cattle—A review. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2018**, *31*, 1043. [[CrossRef](#)]
64. Nuernberg, K. Optimising the nutritional profile of beef. *Improv. Sens. Nutr. Qual. Fresh Meat* **2009**, 321–341.
65. Bednárová, A.; Mocák, J.; Gössler, W.; Velik, M.; Kaufmann, J.; Staruch, L. Effect of animal age and gender on fatty acid and elemental composition in Austrian beef applicable for authentication purposes. *Chem. Papers* **2013**, *67*, 274–283. [[CrossRef](#)]
66. Maltin, C.; Sinclair, K.; Warriss, P.; Grant, C.; Porter, A.; Delday, M.I.; Warkup, C. The effects of age at slaughter, genotype and finishing system on the biochemical properties, muscle fibre type characteristics and eating quality of bull beef from suckled calves. *Anim. Sci.* **1998**, *66*, 341–348. [[CrossRef](#)]
67. Sadowska, A.; Rakowska, R.; Dybkowska, E.; Świąder, K. Czynniki przedubojowe warunkujące wartość odżywczą i jakość sensoryczną mięsa wołowego. *Postępy Tech. Przetwórstwa Spożywczego* **2016**, *2*, 122–128.
68. Oprządek, J.O.A. Czynniki wpływające na jakość mięsa wołowego. *Przegląd Hod.* **2000**, *68*, 42–45.
69. Nürnberg, K.; Ender, B.; Papstein, H.-J.; Wegner, J.; Ender, K.; Nürnberg, G. Effects of growth and breed on the fatty acid composition of the muscle lipids in cattle. *Z. Für Leb. Und-Forsch. A* **1999**, *208*, 332–335. [[CrossRef](#)]
70. Morittu, V.M.; Spina, A.A.; Iommelli, P.; Poerio, A.; Oliverio, F.V.; Britti, D.; Tudisco, R. Effect of Integration of Linseed and Vitamin E in Charolaise × Podolica Bulls' Diet on Fatty Acids Profile, Beef Color and Lipid Stability. *Agriculture* **2021**, *11*, 1032. [[CrossRef](#)]
71. Lloret, A.; Esteve, D.; Monllor, P.; Cervera-Ferri, A.; Lloret, A. The effectiveness of vitamin E treatment in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol.* **2019**, *20*, 879. [[CrossRef](#)]
72. Byers, T.; Perry, G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu. Rev. Nutr.* **1992**, *12*, 139–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Hallfrisch, J.; Muller, D.C.; Singh, V.N. Vitamin A and E intakes and plasma concentrations of retinol, β-carotene, and α-tocopherol in men and women of the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 176–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Descalzo, A.M.; Sancho, A. A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Sci.* **2008**, *79*, 423–436. [[CrossRef](#)]
75. Warren, H.E.; Scollan, N.D.; Nute, G.; Hughes, S.; Wood, J.; Richardson, R. Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. II: Meat stability and flavour. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 270–278. [[CrossRef](#)]
76. Skaperda, Z.; Argyriadou, A.; Nechalioti, P.M.; Alvanou, M.; Makri, S.; Bouroutzika, E.; Kyriazis, I.D.; Tekos, F.; Veskoukis, A.S.; Kallitsis, T. Redox biomarker baseline levels in cattle tissues and their relationships with meat quality. *Antioxidants* **2021**, *10*, 958. [[CrossRef](#)]
77. Descalzo, A.M.; Rossetti, L.; Grigioni, G.; Irueta, M.; Sancho, A.M.; Carrete, J.; Pensel, N.A. Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle. *Meat Sci.* **2007**, *75*, 299–307. [[CrossRef](#)]
78. Yilmaz, S.; Mustafa, I.; Kandemir, F.M.; Yusuf, G. Malondialdehyde and total antioxidant levels and hematological parameters of beef cattle with coccidiosis. *Van Vet. J.* **2014**, *25*, 41–45.
79. Grossi, S.; Rossi, L.; De Marco, M.; Sgoifo Rossi, C.A. The effect of different sources of selenium supplementation on the meat quality traits of young charolaise bulls during the finishing phase. *Antioxidants* **2021**, *10*, 596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Rossi, C.S.; Compiani, R.; Baldi, G.; Bernardi, C.; Muraro, M.; Marden, J.; Dell'Orto, V. The effect of different selenium sources during the finishing phase on beef quality. *J. Anim. Feed Sci.* **2015**, *24*, 93–99. [[CrossRef](#)]
81. Hipkiss, A.R.; Worthington, V.C.; Himsworth, D.T.; Herwig, W. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subj.* **1998**, *1380*, 46–54. [[CrossRef](#)]
82. Hipkiss, A.R.; Brownson, C.; Bertani, M.F.; Ruiz, E.; Ferro, A. Reaction of carnosine with aged proteins: Another protective process? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *959*, 285–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Bekhit, A.; Geesink, G.; Ilian, M.; Morton, J.; Sedcole, J.; Bickerstaffe, R. Pro-oxidant activities of carnosine, rutin and quercetin in a beef model system and their effects on the metmyoglobin-reducing activity. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *218*, 507–514. [[CrossRef](#)]
84. Watanabe, A.; Ueda, Y.; HIGUCHI, M. Effects of slaughter age on the levels of free amino acids and dipeptides in fattening cattle. *Anim. Sci. J.* **2004**, *75*, 361–367. [[CrossRef](#)]
85. Purchas, R.; Rutherford, S.; Pearce, P.; Vather, R.; Wilkinson, B. Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q10, and creatine. *Meat Sci.* **2004**, *66*, 629–637. [[CrossRef](#)]
86. Schuller-Levis, G.B.; Gordon, R.E.; Wang, C.; Park, E. Taurine reduces lung inflammation and fibrosis caused by bleomycin. *Taur. 5 Begin. 21st Century* **2003**, 395–402.
87. Redmond, H.P.; Stapleton, P.; Neary, P.; Bouchier-Hayes, D. Immunonutrition: The role of taurine. *Nutrition* **1998**, *14*, 599–604. [[CrossRef](#)]

88. Lajtha, A.; Oja, S.S.; Saransaari, P.; Schousboe, A. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Amino Acids and Peptides in the Nervous System*; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007.
89. Sánchez-Escalante, A.; Djenane, D.; Torrecano, G.; Giménez, B.; Beltrán, J.A.; Roncalés, P. Evaluation of the antioxidant ability of hydrazine-purified and untreated commercial carnosine in beef patties. *Meat Sci.* **2003**, *64*, 59–67. [[CrossRef](#)]
90. Djenane, D.; Sanchez-Escalante, A.; Beltrán, J.A.; Roncales, P. Ability of  $\alpha$ -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chem.* **2002**, *76*, 407–415. [[CrossRef](#)]
91. Weber, C.; Bysted, A.; Hllmer, G. The coenzyme Q10 content of the average Danish diet. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Fur Vitam. -Und Ernährungsforschung. Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **1997**, *67*, 123–129.
92. Crane, F.L. Biochemical Functions of Coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* **2001**, *20*, 591–598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Decker, E.A.; Mei, L. Antioxidant mechanisms and applications in muscle foods. *Recipr. Meat Conf. Proc.* **1996**, *49*, 64–72.
94. Rötig, A.; Appelkvist, E.-L.; Geromel, V.; Chretien, D.; Kadhom, N.; Ederly, P.; Lebideau, M.; Dallner, G.; Munnich, A.; Ernster, L. Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet* **2000**, *356*, 391–395. [[CrossRef](#)]
95. Potargowicz, E.; Szerszenowicz, E.; Staniszevska, M.; Nowak, D. Mitochondria jako źródło reaktywnych form tlenu. *Postępy Hig. I Med. Doświadczalnej* **2005**, *59*, 259–266.
96. Begum, G.; Cunliffe, A.; Leveritt, M. Physiological role of carnosine in contracting muscle. *Int. J. Sport Nutr. Exerc* **2005**, *15*, 493–514. [[CrossRef](#)]
97. Williams, M.H.; Kreider, R.B.; Branch, J.D. *Creatine: The Power Supplement*; Human Kinetics: Champaign, IL, USA, 1999.
98. Mora, L.; Hernández-Cázares, A.S.; Sentandreu, M.A.; Toldrá, F. Creatine and creatinine evolution during the processing of dry-cured ham. *Meat Sci.* **2010**, *84*, 384–389. [[CrossRef](#)]
99. Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 1107–1213. [[CrossRef](#)]
100. Honda, T.; Ishida, T.; Kobayashi, I.; Oguri, Y.; Mizuno, Y.; Mannen, H.; Iwaisaki, H.; Kuge, S.; Saito, K.; Oyama, K. Change of fatty acid composition of the lumbar longissimus during the final stage of fattening in the Japanese Black cattle. *Anim. Sci. J.* **2016**, *87*, 578–583. [[CrossRef](#)]
101. Okumura, T.; Saito, K.; Sakuma, H.; Nade, T.; Nakayama, S.; Fujita, K.; Kawamura, T. Intramuscular fat deposition in principal muscles from twenty-four to thirty months of age using identical twins of Japanese Black steers. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 1902–1907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Vázquez-Mosquera, J.M.; Fernandez-Novo, A.; de Mercado, E.; Vázquez-Gómez, M.; Gardon, J.C.; Pesántez-Pacheco, J.L.; Revilla-Ruiz, Á.; Patrón-Collantes, R.; Pérez-Solana, M.L.; Villagrà, A. Beef nutritional characteristics, fat profile and blood metabolic markers from purebred Wagyu, crossbred Wagyu and crossbred European steers raised on a fattening farm in Spain. *Animals* **2023**, *13*, 864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Wood, J.; Enser, M.; Fisher, A.; Nute, G.; Sheard, P.; Richardson, R.; Hughes, S.; Whittington, F. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 343–358. [[CrossRef](#)]
104. Albrecht, E.; Teuscher, F.; Ender, K.; Wegner, J. Growth-and breed-related changes of marbling characteristics in cattle. *J. Anim. Sci.* **2006**, *84*, 1067–1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Warszawa, dn. 19.09.2024

Mgr inż. Piotr Kostusiak  
Katedra Hodowli Zwierząt  
Instytut Nauk o Zwierzętach  
piotr\_kostusiak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Słószarz Jan, Gołębiowski Marcin, Sakowski Tomasz, Puppel Kamila:  
Relationship between Beef Quality and Bull Breed. *Animals*, 2023, 13, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; konceptualizacji, opracowaniu metodologii, analizie wyników, przeglądu literatury i przygotowaniu manuskryptu, co stanowi 60 % pracy.

Podpis

  
.....

Warszawa, dn. 19.09.2024

Dr hab. Kamila Puppel, prof. SGGW

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

kamila\_puppel@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

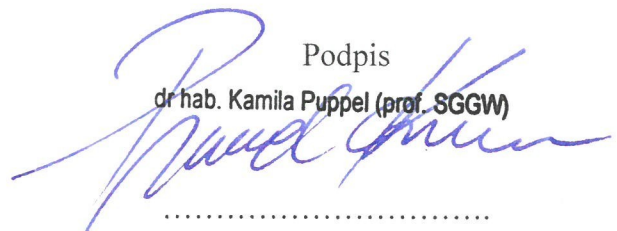
Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Słószarz Jan, Gołębiowski Marcin, Sakowski Tomasz, Puppel Kamila:  
Relationship between Beef Quality and Bull Breed. *Animals*, 2023, 13, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; konceptualizacji, opracowaniu metodologii, przeglądu literatury i przygotowaniu manuskryptu, pozyskaniu finansowania badań, co stanowi 25 % pracy.

Podpis

dr hab. Kamila Puppel (prof. SGGW)



.....

Warszawa, dn. 19.09.2024

Dr Jan Słószarz

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

jan\_slosarz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

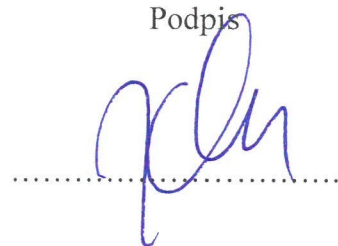
**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Słószarz Jan, Gołębiowski Marcin, Sakowski Tomasz, Puppel Kamila:  
Relationship between Beef Quality and Bull Breed. Animals, 2023, 13, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; analizie statystycznej  
wyników badań, co stanowi 5 % pracy.

Podpis



Warszawa, dn. 19.09.2024

Prof. dr hab. Tomasz Sakowski  
Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki  
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu  
t.sakowski@igbzpan.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

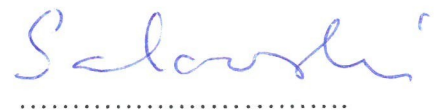
**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Słószarz Jan, Gołębiowski Marcin, Sakowski Tomasz, Puppel Kamila:  
Relationship between Beef Quality and Bull Breed. *Animals*, 2023, 13, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; przeglądu literatury,  
pozyskaniu finansowania badań i zarządzaniu projektem, co stanowi 5 % pracy.

Podpis

  
.....

Warszawa, dn. 19.09.2024

Dr hab. Marcin Gołębiewski, prof. SGGW

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

marcin\_golebiewski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

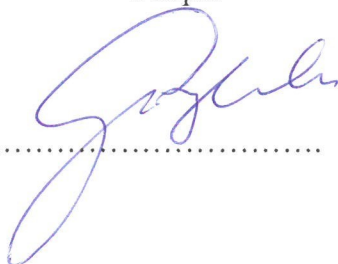
**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Słószarz Jan, Gołębiewski Marcin, Sakowski Tomasz, Puppel Kamila:  
Relationship between Beef Quality and Bull Breed. *Animals*, 2023, 13, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; przygotowaniu manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, co stanowi 5 % pracy.

Podpis









.....





## Article

# Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers

Piotr Kostusiak <sup>1</sup>, Emilia Bagnicka <sup>2</sup>, Beata Żelazowska <sup>2</sup>, Magdalena Zalewska <sup>3,\*</sup>, Tomasz Sakowski <sup>2</sup>, Jan Słószarz <sup>1</sup>, Marcin Gołębiowski <sup>1</sup> and Kamila Puppel <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Animal Science, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland; piotr\_kostusiak@sggw.edu.pl (P.K.); jan\_slosarz@sggw.edu.pl (J.S.); marcin\_golebiowski@sggw.edu.pl (M.G.)

<sup>2</sup> Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Science, Jastrzębiec, Postępu 36A, 05-552 Magdalenka, Poland; e.bagnicka@igbzpan.pl (E.B.); b.zelazowska@igbzpan.pl (B.Ż.); t.sakowski@igbzpan.pl (T.S.)

<sup>3</sup> Department of Bacterial Physiology, Institute of Microbiology, Faculty of Biology, University of Warsaw, 02-096 Warsaw, Poland

\* Correspondence: mm.zalewska10@uw.edu.pl (M.Z.); kamila\_puppel@sggw.edu.pl (K.P.)

**Abstract:** This study involved 45 Holstein and 60 Holstein-Charolaise steers, tailored with specific diets according to breed and rearing systems. DNA genotyping was conducted for DGAT1, LEP, SCD1, SREBF1, and TG genes to investigate their impact on carcass conformation traits, beef quality traits, and sensory quality traits. The results showed associations between the genetic variants and the analyzed traits. Specifically, DGAT1 was found to affect drip loss, meat brightness, and color saturation. The TG gene was associated with marbling and meat color. LEP influenced trim fat and pH levels, while SCD1 was linked to metabolic energy live weight gains, and pH levels. SREBF1 was related to fatness.

**Keywords:** beef; carcass quality; cattle; marker-assisted selection; meat trait



**Citation:** Kostusiak, P.; Bagnicka, E.; Żelazowska, B.; Zalewska, M.; Sakowski, T.; Słószarz, J.; Gołębiowski, M.; Puppel, K. Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. *Genes* **2024**, *15*, 843. <https://doi.org/10.3390/genes15070843>

Academic Editor: Chunjin Li

Received: 29 April 2024

Revised: 8 June 2024

Accepted: 25 June 2024

Published: 27 June 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The recent availability of genome sequencing methods and many previously identified molecular markers offer new opportunities for animal breeding, including the use of molecular information in selection programs [1]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are one of the most common DNA variations in mammals—they are biallelic, abundant, and easy to detect. Even though beef production traits are influenced by polygenic regulation, it is essential to apply SNP-based genetic markers to obtain animals with better genetic backgrounds. Cattle with better genetics will develop desirable meat carcass conformation and quality and sensory properties. Although meat quality depends on animal genetics, it is also affected by environmental factors—animal feed, keeping conditions, welfare, etc. Ensuring proper environmental conditions for animals with high genetic potential may affect meat quality production yield. Animals with a proper genetic background will convert fodder more efficiently [2]. This might be important in countries with high milk production and the resulting large number of calves that could be used for more efficient and profitable fattening [3].

There have been many studies that aim to assess the effect of SNPs on beef quality; some of these are characterized by a broad range of applications, while others are specific only to small populations [4]. For the purposes of our study, we decided to use the five most extensively studied genes: Stearoyl-CoA desaturase (SCD), leptin (LEP), thyroglobulin (TG), diacylglycerol O-acyltransferase (DGAT1), and sterol regulatory element binding transcription factor (SREBF1). SCD is one of the main lipogenic enzymes in the fatty acid synthesis pathway in mammalian adipocytes and participates in the conversion of saturated fatty acids to unsaturated fatty acids; thus, the composition of stored fatty acids

depends on SCD's action [5,6]. Leptin's main function is to regulate the assimilation, storage, and use of energy from nutrients [7]. TG regulates metabolism and fat deposition and also participates in fat cell development [8]. DGAT1 is engaged in triglyceride synthesis pathways and catalyzes the last step of the triglyceride's synthesis from diacylglycerol to fatty acids [9]. SREBF11 is an important transcriptional activator for several lipogenic genes [10]. Issues related to marker-assisted selection implementation have been described by Zalewska et al. [4].

Consumers care about high nutritional quality [11], but at the same time, they are interested in favorable sensory attributes. In this study we analyze genetic polymorphism in the cattle breed that predominates in the milk belt of the northeastern part of Europe—the Holstein Friesian (HF). It is well known that the growth potential and carcass composition of HFs are generally worse compared to both dual-purpose and beef breeds [12–14]. However, such differences in growth rates, especially between HF and the early-maturing beef breeds, should be negligible [15]. The meat quality and sensory parameters as well as carcass composition are measured in male calves, which are culled mostly when they have a live body weight of 100 kg—but this may be too early. For study purposes, we determined the same parameters in HF and HF × Charolaise crossbred steers. Crossbreeding with Charolaise was introduced to improve beef quality.

Among the many studies exploring the influence of SNPs on beef quality, our research focuses on five extensively studied genes: SCD, LEP, TG, DGAT1, and SREBF11. These genes play pivotal roles in various metabolic pathways governing fatty acid synthesis, energy regulation, and lipid metabolism, thereby exerting profound effects on meat quality attributes. In this study, we investigate genetic polymorphisms within the HF cattle breed, prevalent in the milk belt of northeastern Europe. Despite HF's historical association with suboptimal growth potential and carcass composition compared to beef breeds, efforts to enhance beef quality have been undertaken through crossbreeding with Charolaise cattle. Our research aims to clarify the impact of transitioning to high-quality feed and the utilization of select dietary supplements on product quality improvement, while also delineating the relationship between genetic factors and phenotypic traits.

Our study is driven by two overarching objectives:

1. To assess the influence of transitioning to high-quality feed and dietary supplementation on product quality enhancement.
2. To determine the relationships between identified genetic factors and phenotypic traits associated with meat quality in HF and HF × Charolaise crossbred steers.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Animals and Feeding Experiment

This study was conducted on 45 Holstein (HF) steers and 60 crossbred HF × Charolaise (HF×CH) steers. All the animals were castrated between three to four weeks old using the elastration method. In year 1, steers were kept on semi-natural pasture for the summer season and fed in a barn in winter. The animals were under the constant care of a veterinarian. In the performed 2 × 2 fattening experiment carried out on HF and crossbred HF×CH steers, HF steers were compared to HF×CH steers in a closed loop, fattened from weaning to slaughter at 15 and 18 months of age. Then, carcasses were chilled to 2–4 °C, and samples of semimembranosus muscle (300 g) were cut parallel to the muscle axis at 24 h postmortem. The animals were divided into four groups; all four groups were fed with grass silage with the addition of distillery spent grains and rapeseed meal. EUROP trade grades and fat classes were estimated by graders at the slaughterhouse. Carcasses were classified as having fat classes from 1 to 2+, while trade classes ranged from E to P.

Trim fat was defined as the combination of subcutaneous and intermuscular fat deposits that could be discerned and separated using a standardized cutting procedure with a knife. This procedure ensured consistency and reproducibility in the assessment of fat content within the carcass. Subcutaneous fat refers to adipose tissue located beneath the skin, while intermuscular fat resides between muscle bundles.

All steers had unlimited access to pasture for 1 year of their life. Forage availability was determined monthly using a calibrated plate meter. Forage height was measured in a 0.210-m<sup>2</sup> quadrat using a rising plate meter before being hand-clipped to ground level. Forage samples were collected by hand at random locations within each pasture, representative of animal diet, for determination of forage quality. The pasture samples were composed of approximately 63.45% Organic Matter Digestibility (OMD), 16.21% Crude Protein (CP), 43.54% Acid Detergent Fiber (ADF), 54.67% Neutral Detergent Fiber (NDF), and 10.08% Ash (A). The pasture was offered to the steers at 4% of Live weight (LW).

After the grazing period, animals were moved to a feeding unit where they were kept for a finishing phase to assess the impact on their yield and meat quality. Steers fed for 15 months (=3 months of intensive feeding) are considered as “low intensity” and those fattened for 18 months as “high intensity”. The finishing ratios fed at this stage are displayed in Table 1. During this phase, the steers were offered two ratios: intensive and semi-intensive, followed by 2 transitions diets. Rations 1 and 2 were step-up diets and were provided for 7 d each before finishing diets (3 and 4) were introduced.

**Table 1.** Ingredients and chemical composition of transition and finishing rations fed in the finishing stage.

Item	Ration			
	1	2	3	4
Ingredient composition, % as-fed				
Grass silage	76.8	69.1	59.3	53.5
Rapeseed meal	3.5	4.2	7.7	8.4
Distillers grains	10	15	20	22.3
Grain mix (triticale and barley (50:50))	9	11	12.3	15.1
Minerals	0.7	0.7	0.7	0.7
Chemical composition:				
DM, %	61.2	69.8	75.2	79.1
CP, %	14.2	15.5	16.6	17.5
Fat, %	3.2	3.8	4.3	4.9
NEm, Mcal/kg DM	1.7	1.9	2.1	2.3
NEg, Mcal/kg DM	1.2	1.3	1.5	1.6

Rations 1 and 2 = step-up diets fed for 7 d each; rations 3 and 4 = finishing diet.

All steers had unlimited access to pasture in 1 year of their life, which means that all steers were fed with the same diet. After the grazing phase animal were divided into two feeding groups (semi-intensive and intensive (Table 1; rations 3 and 4). To get the animals used to a changed diet, two step-up diets (Table 1; diets 1 and 2) were introduced. Diet 1 preceded diet 3 and diet 2 preceded diet 4. To summarize, there were two genetic groups (HF and HF×CH) × two feeding groups (fed with diets 3 and 4).

## 2.2. Slaughter, Carcass and Meat Quality

### 2.2.1. Weight Gains

The weighing of the steers was carried out using the CalmScale system (Jantar Sp. z o.o., Bielsko-Biała, Poland), which aims to minimize stress. The system, installed in the cattle’s watering area, utilizes RFID tags and antennas for precise identification. Weight data, along with other pertinent details, were recorded for analysis multiple times each day as the animals drew water. The average daily gain (ADG) was calculated by subtracting the initial weight from the current weight and dividing it by the number of days since the initial measurement, thus providing a key metric for evaluating steer growth.

### 2.2.2. Color Assessment

Color measurements were performed in the CIE L\*a\*b\* system using a Minolta CM 2022 (Konica Minolta, Tokyo, Japan). The procedure of color determination included sampling a slice of meat (ca. 2 cm thick) at 3 points (results obtained were averaged). Hue ( $b^*/a^*$ ) and chromaticity ( $\sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$ ) of meat sample color were calculated according to the formula provided by Mordenti et al. [16].

Meat Color (Brown and Bright): Meat coloration is influenced by various factors including myoglobin content, pH level, and cooking methods. “Brown meat color” typically indicates the development of Maillard reaction products and denatured proteins, resulting in a darker appearance, while “bright meat color” suggests a lighter or more vibrant hue, possibly indicative of less cooking or lower myoglobin content.

### 2.2.3. Marbling Scores and Yield Grades

Marbling scores and yield grades were directly estimated using the VIA-based camera system (VVG 2000) [17] at the rib-eye cut between the 10th and 11th rib interfaces of the longissimus thoracis. Additionally, all halves were further ribbed to assess marbling scores and yield grades, which encompassed factors such as meat surface, rib fat thickness, and carcass weight.

### 2.2.4. Taste Characteristic

An electronic tongue system was used to determine the taste characteristics of the muscle tissue. The system was composed of five taste sensors, with each sensor being attached to a typical artificial lipid membrane. The sensors were named CA0 (to detect sour substances), C00 (to detect bitter substances), AE1 (to detect astringent substances), AAE (to detect umami substances), and CT0 (to detect salty substances). All the sensors were pre-conditioned in a reference solution for one day before the measurements were taken.

### 2.2.5. Drip Loss

Drip loss was determined using samples of homogenized meat weighing 40 g, which were tightly packed into glass weighing dishes. The samples were then submerged and kept at 70 °C for 15 min in a heated bath. After that time, the meat samples were removed from the weighing dishes and left for 24 h to allow the water to drip out. The difference in weight was then measured and expressed as a percentage of the original sample weight (51).

### 2.2.6. pH

The meat's pH was determined using a pH meter HI 99163 with a temperature measurement function and a probe tip ending in a stainless-steel knife, facilitating measurements (Hanna Instruments, Providence, RI, USA).

### 2.2.7. Shear Force

The carcasses were chilled to 2–4 °C and samples of semimembranosus muscle (300 g) were cut parallel to the muscle axis at 24 h postmortem, after which muscle sections measuring 2 × 2 × 2 cm were then cut from the samples. Shear force was determined using the Zwick 5.0 Zwicki—Line strength testing machine (Zwick Roell Polska Sp. z o. o. Sp. k., Wrocław, Poland) [18].

### 2.2.8. Carcass Conformation and Fat Cover

Carcass conformation and fat cover were evaluated in accordance with the European Union Carcass Classification Scheme (EUROP; Council of the European Union, No 1234/Citation2007; Commission of the European Union, No 1249/Citation2008). Conformation assessment focused on the development of specific anatomical regions, including the round, back, and shoulder, with consideration given to their muscularity and overall shape. The EUROP classification system assigns grades denoted as follows: E (excellent), U (very good), R (good), O (fair), P (poor). The fat cover assessment involved the examination of

subcutaneous fat and intrathoracic fat deposits. This evaluation utilized a numerical scale ranging from 1 to 5, with each grade indicating varying levels of fat deposition: 1: low; 2: slight; 3: average; 4: high; 5: very high.

**Dry Matter Live Weight Gain:** This parameter signifies the increase in an animal's body weight excluding water content. It quantifies the net accumulation of structural and functional components such as proteins, fats, and minerals, which are essential for growth and development. **Metabolizable Energy Live Weight Gain:** This represents the increment in an animal's weight attributable to the assimilation and utilization of metabolizable energy derived from its diet. Metabolizable energy refers to the portion of dietary energy that is available for physiological processes such as maintenance, growth, and production after accounting for losses due to digestion and metabolism.

Live Weight Gain (LWG) was calculated by subtracting the initial live weight from the final live weight of the animals over the specified period. Dry Matter Live Weight Gain (DM\_LWG) was determined by multiplying the LWG by the dry matter percentage of the gained weight. Metabolic Energy Live Weight Gain (ME\_LWG) was calculated based on the metabolizable energy content of the gained weight. These calculations provided crucial insights into the growth performance and energy utilization efficiency of the animals during the study period.

### 2.3. DNA Sampling and Analysis

#### DNA Analysis

Blood samples were collected in tubes with anticoagulating agents from fattened HF (n = 45) and HF x Charolaise (n = 60) crossbred steers before slaughter at 15 and 18 months of age. Total DNA from whole blood was isolated using DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The quantity of the extracted DNA was analyzed using an Invitrogen Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with a dsDNA high-sensitivity assay kit; and the quality was determined using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The DNA samples were isolated in triplicate and then pooled for each animal.

DNA isolation and genotyping were performed at the Institute of Genetics and Animal Biotechnology PAS, Jastrzębiec, Poland, using the RFLP method. The following genes were chosen for analysis: Stearoyl-CoA desaturase ( $\Delta$ -9-desaturase) (SCD1), leptin (LEP), thyroglobulin (TG), diacylglycerol O-acyltransferase (DGAT1), and sterol regulatory element binding transcription factor (SREBF11), as they are all linked to the assessment of qualitative beef traits. Genes, primer sequences restriction enzymes, and polymorphisms are presented in Table 2. PCR was conducted using AmpliTaq Gold DNA Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and PCR conditions were optimized for each reaction according to the polymerase manufacturer's protocol.

The presence of the genes of interest after the PCR was confirmed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel (55 V, 50 min). Restriction enzyme digestion (Supplement Table S1) was conducted according to the manufacturer's recommendations for each digestion enzyme. The presence of bands of interest after digestion was confirmed using electrophoresis in a 2–3% agarose gel (55 V, 50 min), depending on the size of the band of interest.

Phenotypic data on daily meat yield and composition were obtained from the meat control system. This phenotypic data contained information on the quality and sensory parameters of selected traits for each animal's breed; date of birth; date of slaughter; daily gains; carcass weight; slaughter yield; evaluation of the quality of muscle and fatness of the carcass; marbling; pH after slaughter; carcass temperature after slaughter; pH after 48 h; carcass temperature at 48 h after slaughter; thawing loss due to carcass defrosting as a percentage, after 7 and 14 days; cooking losses, as a percentage, after 7 and 14 days; pH 7 and pH 14; meat color as L\*, a\*, b\* after 7 and 14 days; meat color in terms of lightness or darkness; appearance of fat cover; texture; juiciness; and palatability in terms of sweet, sour, and metallic taste.



**Table 2.** Genes, primer sequences, restriction enzymes, and genes polymorphisms.

Gene	Primers (F/R)	Amplicon Size [bp]	Restriction Enzyme	Polymorphism [bp]	Reference
SCD1	ATG TAT GGA TAC CGC CCT TAT TTC TGG CAC GTA ACC TAT ACC CT	145	Fnu4HI	T>C replacement AA 29, 48, 68 bp VA 29, 48, 68, 116 bp VV 29, 116 bp	[10]
LEP	ATG CGT GTG GAC CCC TGT ATC TGG TGT CAT CCT GGA CCT CC	94	BspEI	T>C replacement CC 75 bp CT 75, 94 bp TT 94 bp	[19]
TG	GGG GAT GAC TAC GAG TAT GAC TG GTG AAA ATC TTG TGG AGG CTG TA	548	BstYI	T>C replacement CC 75, 178, 295 bp CT 75, 178, 295, 473 bp TT 75, 473 bp	[20]
DGAT1	GCA CCA TCC TCT TCC TCA AG GGA AGC GCT TTC GGA TG	411	CfrI	T>C replacement CC 411 bp CT 203, 411 bp TT 203 bp	[20]
SREBF11	CCA CAA CGC CAT CGA GAA ACG CTAC GGC CTT CCC TGA CCN CCC AAC TTAG	432	-	deletion of 84 bp LL* 432 bp LS 348, 432 bp SS* 348 bp	[10]

SCD1-Stearoyl-CoA desaturase, LEP-leptin, TG-thyroglobulin, DGAT1-diaclyglycerol O-acyltransferase, SREBF11-sterol regulatory element binding transcription factor; \*L-long, S-short.

#### 2.4. Statistical Analysis

An analysis of variance was performed using the GLM procedure in an SAS package (SAS software, version 9.2; Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA) [21] to determine the significance level of all identified factors that may have affected the tested traits or influenced the relationship between the analyzed traits and the specific genotypes. All identified factors had a significant impact on the examined traits; therefore, they were included in the final model. Body weight and age at the start of the experiment and at the end of the experiment were treated as linear regressions in the model (body weight on the day at the start of fattening, age of the animal on the day at the start of fattening, age of the animal on the day of slaughter, weight of the animal on the day of slaughter).

$$Y_{ijklmno} = \mu + \text{BREED}_i + \text{FATTENING}_j + \text{BREED} * \text{FATTENING}_{ij} + \beta_o (\text{LWSTART}_k) + \beta_o (\text{AGESTART}_l) + \beta_o (\text{LWSLAUG}_m) + \beta_o (\text{AGESLAUG}_n) + e_{ijklmno} \quad (1)$$

where:

$Y_{ijklmno}$ -investigated trait

$\mu$ -overall mean

$\text{BREED}_i$ -fixed effect of i-th steer breed (HF, HF x CH)

$\text{FATTENING}_j$ -fixed effect of j-th fattening type (intensive or extensive)

$\text{BREED} * \text{FATTENING}_{ij}$ -interaction between i-th BREED and j-th type of fattening

$\beta_o (\text{LWSTART}_k)$ -linear regression on the body weight on the day feeding was started

$\beta_o (\text{AGESTART}_l)$ -linear regression on the age on the day feeding was started

$\beta_o (\text{LWSLAUG}_m)$ -linear regression on the body weight on the day of slaughter

$\beta_o (\text{AGESLAUG}_n)$ -linear regression on the age on the day of slaughter

$e_{ijklmno}$ -random error

Factors that did not significantly influence the investigated meat and carcass quality traits were removed from the presented model.

The databases used in the analysis compiled the genotypes of individual genes for all animals along with the following information about the animals: breed, date of birth, date of slaughter, and information about their productivity and meat quality taken at the time of slaughter. Prior to the statistical analysis, we sorted the parameters into four groups and analyzed the relationships between genotypes for selected genes and groups separately.

The first group included parameters concerning the carcass conformation traits of HF and HF×CH steers (fatness, marbling, trim fat, live weight gain [LWG], dry matter live weight gain [DM\_LWG], and metabolic energy live weight gain [ME\_LWG]). The second group consisted of factors describing the beef quality traits of HF and HF×CH steers (drip loss as a percentage after 7 days [Withaw7]; thermal drip loss as a percentage after 7 days [Wlcook7]; pH after 7 days [pH 7]; meat brightness after 7 days [L7]; meat red-color saturation after 7 days [a7]; meat yellow-color saturation after 7 days [b7]; drip loss as a percentage after 14 days [Withaw14]; thermal drip loss as a percentage after 14 days [Wlcook14]; pH after 14 days [pH 14]; meat brightness after 14 days [L14]; meat red-color saturation after 14 days [a14]; meat yellow-color saturation after 14 days [b14]; age at slaughter). The latter group of analyzed traits related to the quality of beef sensory traits of HF and crossbred steers (the meat's brown color, the meat's brightness, shear force, juiciness, tenderness, and taste—total meat taste and sweet, sour, umami and metallic taste). The phenotypic data covered information on the quality and sensory characteristics of the assessed traits and were determined 24 h after slaughter (or as stated otherwise).

### 3. Results

#### 3.1. Allele Frequencies

In the analysis of SCD1, digestion was accomplished using an Fnu4HI (S<sub>at</sub>I) enzyme, which recognizes the CC/NGC sequence. The analyzed mutation is a T>C replacement, resulting in a non-synonymous mutation that leads to a change of the valine amino acid into alanine in the protein chain. The genotype frequencies were as follows: VV = 5.7%, AA = 55.0%, and VA = 39.3%. In the analysis of the LEP polymorphism, the digestion was performed by the enzyme BspEI, which recognizes the T/CCGGA sequence. This mutation is a T>C replacement. The genotype frequencies were as follows: CC = 23.2%, TT = 19.1%, and CT = 57.7%. In terms of TG, the restriction enzyme BstYI, which recognizes the RGATCY sequence, was used to determine the SNPs' variants, and the sought mutation is a T>C replacement. The genotype frequencies were CC = 73.5%, CT = 23.5%, and TT = 3.0%. For DGAT1, digestion was performed by the enzyme CfrI, which recognizes the Y/GGCCR sequence. The mutation sought is a T>C replacement and the genotype frequencies were as follows: CC = 83.9% TT = 8.8%, and CT = 7.3%. The mutation in the analyzed fragment of SREBF11 consisted of the deletion of 84 bp. Genotype frequencies were as follows: no deletion = 91.1% and heterozygotes = 8.9% (Table 3).

**Table 3.** Allele Frequencies.

Gene	Enzyme	Recognition Sequence	Mutation	Genotype Frequencies
SCD1	Fnu4HI	CC/NGC	T>C	VV = 5.7%, VA = 39.3%, AA = 55.0%
LEP	BspEI	T/CCGGA	T>C	TT = 19.1%, CT = 57.7%, CC = 23.2%
TG	BstYI	RGATCY	T>C	TT = 3.0%, CT = 23.5%, CC = 73.5%
DGAT1	CfrI	Y/GGCCR	T>C	TT = 8.8%, CT = 7.3%, CC = 83.9%
SREBF11	N/A	N/A	84 bp deletion	No deletion = 91.1%, Heterozygotes = 8.9%

LEP-leptin, DGAT1-diacylglycerol O-acyltransferase; SCD1-Stearoyl-CoA desaturase; SREBF11-sterol regulatory element binding transcription factor; TG-thyroglobulin; N/A-Not Applicable.

#### 3.2. The Relationship between the Selected Traits and the Analyzed SNPs

During the study we found fatness to be associated with cattle breed, with higher values for the crossbred ( $p \leq 0.01$ ); and the SREBP11 LL homozygote ( $p \leq 0.05$ ) genotype;

however, we did not find the SS homozygote in the tested population. We also determined fatness to be associated with breed and intensity as a combined effect (Table 4). In terms of marbling, we found higher values for the crossbreed ( $p \leq 0.01$ ), while for TG we found higher values for TT than for CT ( $p \leq 0.05$ ) and CC ( $p \leq 0.05$ ). Also, rearing intensity affected marbling with higher values for 'low' ( $p \leq 0.01$ ). Moreover, we demonstrated marbling to be associated with breed and intensity as a mixed effect (Table 4). As for trim fat, we found higher values for the crossbreed ( $p \leq 0.05$ ), while for LEP we found higher values for the CC homozygote than for the TT homozygote ( $p \leq 0.05$ ). During the study, we identified that LWG was associated with the breed (higher values for the crossbreed,  $p \leq 0.01$ ), rearing intensity (higher values for 'high',  $p \leq 0.01$ ), and breed–intensity as a combined effect (Table 4), with the analyzed genes' genotypes having no effect on this parameter. As for DM\_LWG, we found it to be linked to rearing intensity, with higher values for 'low' ( $p \leq 0.01$ ), and with breed and intensity as a combined effect (Table 4). No effect was found for the analyzed genes' genotypes on this parameter. For ME\_LWG we found associations with breed and intensity as a combined effect, and with the SCD1 genotype, with lower values for AA than for VA ( $p \leq 0.05$ ) and VV ( $p \leq 0.05$ ). We found that DGAT1 did not have any effect on the analyzed carcass conformation traits. All the above-mentioned associations are presented in detail in Table 4.

**Table 4.** Effect of breed, rearing intensity, fattening type, and chosen gene polymorphisms on carcass conformation traits for HF and HFxCH steers.

Effect		FATNESS <sup>1</sup>		MARBLING <sup>2</sup>		TRIM FAT <sup>3</sup>		LWG <sup>4</sup>		DM_LWG <sup>5</sup>		ME_LWG <sup>6</sup>	
		LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se
Breed	1-dairy	7.87 <sup>A</sup>	0.24	1.37 <sup>A</sup>	0.16	9.28 <sup>a</sup>	0.87	1.33 <sup>A</sup>	0.03	6.4	0.17	76.32	2.04
	2-cross	9.41 <sup>A</sup>	0.25	2.08 <sup>A</sup>	0.16	12.47 <sup>a</sup>	0.91	1.48 <sup>A</sup>	0.03	5.98	0.17	71.21	2.1
Intensity	1-low	8.92	0.23	1.96 <sup>B</sup>	0.15	10.64	0.87	1.34 <sup>B</sup>	0.03	6.58 <sup>A</sup>	0.16	76.44	2.01
	2-high	8.37	0.25	1.49 <sup>B</sup>	0.17	11.11	0.92	1.47 <sup>B</sup>	0.03	5.79 <sup>A</sup>	0.17	71.09	2.14
Breed × Intensity	1 × 1	7.99 <sup>aB</sup>	0.29	1.56 <sup>C</sup>	0.18	8.48 <sup>bc</sup>	1.13	1.27 <sup>CDE</sup>	0.03	6.80 <sup>aB</sup>	0.21	79.13 <sup>a</sup>	2.61
	1 × 2	7.76 <sup>Cb</sup>	0.31	1.19 <sup>DE</sup>	0.2	10.09	1.19	1.38 <sup>CF</sup>	0.03	5.99 <sup>a</sup>	0.22	73.51	2.75
	2 × 1	9.85 <sup>BC</sup>	0.31	2.36 <sup>DC</sup>	0.2	12.80 <sup>b</sup>	1.18	1.41 <sup>DG</sup>	0.03	6.35 <sup>b</sup>	0.22	73.75	2.74
	2 × 2	8.98 <sup>abd</sup>	0.31	1.80 <sup>Ea</sup>	0.2	12.13 <sup>c</sup>	1.19	1.56 <sup>EFG</sup>	0.03	5.60 <sup>Bb</sup>	0.22	68.66 <sup>a</sup>	2.75
DGAT1	1-CC	8.94	0.14	1.96	0.08	10.66	0.55	1.4	0.01	6.11	0.1	72.91	1.27
	2-CT	8.56	0.45	1.52	0.32	11.66	1.42	1.37	0.06	6.37	0.27	75.94	3.3
	3-TT	8.43	0.35	1.71	0.26	10.31	1.09	1.44	0.04	6.08	0.21	72.43	2.53
LEP	1-CC	8.85	0.23	L. o.		11.56 <sup>d</sup>	0.73	1.41	0.02	6.2	0.15	74.05	1.78
	2-CT	0.99	0.16	L. o.		10.6	0.55	1.41	0.02	6.09	0.11	72.67	1.38
	3-TT	8.56	0.24	L. o.		9.94 <sup>d</sup>	0.75	1.38	0.03	6.13	0.15	73.09	1.82
SCD1	1-AA	8.96	0.19	2.02	0.13	10.41	0.69	L. o.		L. o.		70.96 <sup>bc</sup>	1.49
	2-VA	8.85	0.16	1.83	0.1	10.89	0.6	L. o.		L. o.		74.01 <sup>c</sup>	1.27
	3-VV	8.51	0.47	1.93	0.33	10.61	1.46	L. o.		L. o.		77.93 <sup>b</sup>	3.26
SREBF11	1-LL	8.93 <sup>a</sup>	0.12	1.91	0.08	10.73	0.54	1.41	0.01	6.14	0.1	73.25	1.26
	2-LS	8.36 <sup>a</sup>	0.36	1.8	24	10.42	1.01	1.4	0.04	6	0.19	71.58	2.35
TG	1-CC	8.84	0.14	1.90 <sup>a</sup>	0.09	11.04	0.55	1.41	0.02	6.12	0.11	72.99	1.35
	2-CT	8.93	0.23	1.80 <sup>b</sup>	0.16	9.95	0.74	1.39	0.03	6.19	0.15	73.83	1.79
	3-TT	9.09	0.49	2.61 <sup>ab</sup>	0.36	9.08	1.43	1.47	0.06	5.93	0.28	70.58	3.42

LSM-last square means; SE-standard error; LWG-live weight gain; DM\_LWG-dry matter live weight gain; ME\_LWG-metabolic energy live weight gain; LEP-leptin, DGAT1-diacylglycerol O-acyltransferase; SCD1-Stearoyl-CoA desaturase; SREBF11-sterol regulatory element binding transcription factor; TG-thyroglobulin; L. o.-low observation frequency; values with the same letters in column differ significantly: upper case at  $p \leq 0.01$ ; small case at  $p \leq 0.05$ . <sup>1</sup> EUROP system; <sup>2</sup> on a scale 1 = lean and 5 = well-marbled; <sup>3</sup> % of Right hindquarter; <sup>4</sup> kg/d; <sup>5</sup> Mcal/kg DM; <sup>6</sup> MJ/kg gain.



We found that the polymorphic forms of the chosen genes affected beef quality traits. Wlthaw7 was associated with the breed (with higher values for the crossbreed,  $p \leq 0.05$ ), and the DGAT1 polymorphism (higher values for TT than CC homozygote,  $p \leq 0.05$ ). We found that Wlcook7 was related to the LEP polymorphism (with higher values for TT than for CC homozygote,  $p \leq 0.05$ ). The pH 7 parameter was associated with rearing intensity (with higher values for 'low' type,  $p \leq 0.05$ ) and the SCD1 genotype (higher values for AA than VA,  $p \leq 0.01$ , and VV,  $p \leq 0.05$ ). We identified that L7 related to breed (higher values for the crossbreed,  $p \leq 0.01$ ), the DGAT1 genotype (the highest value for heterozygote), the TG genotype (higher values for CC than heterozygote,  $p \leq 0.05$ ), and the SCD1 genotype (higher values for heterozygote than CC homozygote,  $p \leq 0.05$ ). We found that a7 was related to breed (higher values for the crossbreed,  $p \leq 0.01$ ), the TG polymorphism (higher values for TT than heterozygote,  $p \leq 0.01$ ), and the LEP genotype (higher values for the heterozygote than CC genotype,  $p \leq 0.05$ ); while b7 was related to breed (higher values for the crossbreed,  $p \leq 0.01$ ) and the TG polymorphism (higher values for the CC genotype than for heterozygote,  $p \leq 0.01$ ). We determined that Wlthaw14 was associated with rearing intensity (higher values for "low",  $p \leq 0.01$ ) and with the TG genotype (higher values for CC than TT homozygote,  $p \leq 0.01$ ). Wlcook14 changed with the SCD1 polymorphism (higher values for heterozygote,  $p \leq 0.05$ ). We found that pH 14 was associated with LEP (the highest value for the CC genotype) and with the SCD1 polymorphisms (higher values for heterozygote than AA homozygote,  $p \leq 0.05$ ). We identified that L14 related to breed (higher values for the crossbreed,  $p \leq 0.01$ ), the DGAT1 polymorphism (the lowest value for CC homozygote), and the SCD1 polymorphism (higher values for heterozygote compared with AA homozygote,  $p \leq 0.05$ ). We also found associations between a14 and breed (higher values for the crossbreed,  $p \leq 0.05$ ), rearing intensity (higher value for low type,  $p \leq 0.05$ ), and the DGAT1 polymorphism (higher value for TT homozygote than for CC,  $p \leq 0.05$ ); while b14 was related to breed (higher values for the crossbreed,  $p \leq 0.01$ ) and the DGAT1 polymorphism (higher values for TT homozygote than for CC,  $p \leq 0.05$ ). We did not detect any effect of the SREBF11 polymorphism on the analyzed beef quality traits. All the abovementioned associations are presented in detail in Table 5.

Moreover, we identified the analyzed parameters that affected beef quality traits. The brown meat color was related to the breed (with higher values for dairy,  $p \leq 0.05$ ), and the bright meat color was also associated with the breed (with a higher value for dairy,  $p \leq 0.01$ ). Shear force was only associated with the breed (with a higher value for crossbreed,  $p \leq 0.05$ ). Of the analyzed SNPs, we found that the only polymorphism to affect the sweet taste was SCD1, with higher values for heterozygote, than VV homozygote,  $p \leq 0.05$ . The DGAT1, TG, LEP, and SREBF11 polymorphisms did not affect any of the analyzed beef sensory quality traits. All the above-mentioned associations are presented in detail in Supplement Table S2.

**Table 5.** Effect of breed, rearing intensity, and chosen gene markers on beef quality traits in HF and crossbred steers.

Effect		Withaw7		pH 7		L7		a7		b7		Withaw14		pH 14		L14		a14		b14	
		LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se	LSM	Se
Breed	1-dairy	4.98 <sup>a</sup>	0.25	5.4	0.02	34.62 <sup>A</sup>	1.05	21.22 <sup>A</sup>	0.5	9.35 <sup>A</sup>	0.39	5.3	0.31	5.4	0.03	38.3 <sup>a</sup>	1.32	22.66 <sup>a</sup>	0.4	10.83 <sup>A</sup>	0.32
	2-cross	5.70 <sup>a</sup>	0.26	5.4	0.03	39.48 <sup>A</sup>	1.09	23.67 <sup>A</sup>	0.5	11.54 <sup>A</sup>	0.4	5.9	0.32	5.4	0.03	41.32 <sup>a</sup>	1.37	23.60 <sup>a</sup>	0.42	11.97 <sup>A</sup>	0.33
Intensity	1-low	6.47	1.27	5.66 <sup>a</sup>	0.12	35.26	5.38	23.44	2.6	10.3	1.98	9.75 <sup>A</sup>	1.56	5.5	0.15	42.9	6.72	27.05 <sup>b</sup>	2.04	13.7	1.67
	2-high	4.2	1.19	5.17 <sup>a</sup>	0.12	38.84	5.04	21.43	2.4	10.6	1.85	1.53 <sup>A</sup>	1.46	5.4	0.14	36.72	6.3	19.21 <sup>b</sup>	1.91	9.12	1.51
DGAT1	1-CC	4.84 <sup>a</sup>	0.15	5.5	0.01	34.27 <sup>B</sup>	0.62	21.98	0.3	10.2	0.23	5.2	0.18	5.5	0.02	35.32 <sup>AB</sup>	0.77	22.71 <sup>c</sup>	0.23	11.09 <sup>a</sup>	0.19
	2-CT	5.5	0.49	5.4	0.05	41.59 <sup>Ba</sup>	2.06	23.49	1	10.6	0.76	5.8	0.6	5.4	0.06	42.70 <sup>A</sup>	2.57	22.6	0.78	10.9	0.62
	3-TT	5.67 <sup>a</sup>	0.39	5.4	0.04	35.3 <sup>a</sup>	1.66	21.86	0.8	10.5	0.61	5.9	0.48	5.4	0.05	41.41 <sup>B</sup>	2.08	24.04 <sup>c</sup>	0.63	12.18 <sup>a</sup>	0.05
TG	1-CC	5	0.15	5.4	0.01	35.50 <sup>a</sup>	0.66	22.39 <sup>B</sup>	0.3	10.48 <sup>B</sup>	0.21	5.43 <sup>a</sup>	0.18	5.4	0.02	36.92	0.86	22.8	0.24	11.2	0.19
	2-CT	4.83	0.28	5.5	0.03	32.83 <sup>a</sup>	1.21	20.91 <sup>B</sup>	0.5	9.20 <sup>B</sup>	0.39	5.3	0.33	5.5	0.03	35.55	1.58	23.1	0.45	11	0.36
	3-TT	4.99	0.57	5.4	0.05	34.81	2.44	21.86	1.1	10.4	0.8	3.98 <sup>a</sup>	0.67	5.5	0.06	34.11	3.2	22.3	0.91	10.8	0.72
LEPTIN	1-CC	5.29	0.26	5.4	0.02	35.67	1.14	21.19 <sup>a</sup>	0.5	9.59	0.38	5.7	0.31	5.38 <sup>Aa</sup>	0.03	37.54	1.48	22.2	0.41	10.8	0.33
	2-CT	4.84	0.17	5.5	0.02	34.38	0.73	22.34 <sup>a</sup>	3.2	10.4	0.24	5.2	0.2	5.48 <sup>A</sup>	0.02	36.1	0.95	23	0.26	11.3	0.21
	3-TT	5.04	0.29	5.4	0.03	36.41	1.26	22.43	0.6	10.6	0.42	5.2	0.34	5.48 <sup>a</sup>	0.03	36.68	1.63	22.7	0.45	11.2	0.36
SCD1	1-AA	5.07	0.21	5.49 <sup>Ab</sup>	0.02	33.49 <sup>a</sup>	0.9	22.49	0.4	10.6	0.31	5.2	0.25	5.50 <sup>a</sup>	0.02	34.44 <sup>a</sup>	1.14	22.8	0.33	11.2	0.26
	2-VA	4.9	0.17	5.42 <sup>A</sup>	0.01	35.98 <sup>a</sup>	0.71	21.92	0.3	10.1	0.25	5.4	0.2	5.43 <sup>a</sup>	0.02	37.80 <sup>a</sup>	0.91	22.9	0.26	11.2	0.21
	3-VV	5.34	0.53	5.38 <sup>b</sup>	0.05	33.43 <sup>a</sup>	2.27	21.4	1	9.61	0.79	6	0.64	5.5	0.06	34.72	2.88	21.5	0.83	9.99	0.66
SREBF11	1-LL	4.95	0.14	5.4	0.01	34.93	0.64	22.1	0.3	10.2	0.21	5.3	0.17	5.5	0.02	36.2	0.08	22.8	0.23	11.2	0.18
	2-LS	5.22	0.38	5.5	0.04	35.77	1.67	22.21	0.8	10.9	0.56	5.2	0.46	5.5	0.04	39.18	2.1	23.2	0.6	11.3	0.48
AgeSlaug	regression												**						*		

LSM-last square means; SE-standard error; Withaw7-drip loss (%) after 7 days; pH 7-pH after 7 days; L7-meat brightness after 7 days; a7-meat red-color saturation after 7 days; b7-meat yellow-color saturation after 7 days; Withaw14-drip loss (%) after 14 days; pH 14-pH after 14 days; L14-meat brightness after 14 days; a14-meat red-color saturation after 14 days; b14-meat yellow-color saturation after 14 days; LEP-leptin, DGAT1-diacylglycerol O-acyltransferase; SCD1-Stearoyl-CoA desaturase; SREBF11-sterol regulatory element binding transcription factor; TG-thyroglobulin; AgeSlaug-age at slaughter; values with the same letters differ significantly: upper case at  $p \leq 0.01$ ; small case at  $p \leq 0.05$ . \*\* significant at a level of 0.01; \* significant at a level of 0.05.

#### 4. Discussion

The molecular analysis allowed for the identification of potential candidate genes that may control economically important traits in beef production. Applying genomic techniques to breeding programs helps achieve progress faster than classic breeding methods. During the study, we focused on genetic markers related to meat quality properties in fattened HF and HF × Charolaise steers. We analyzed the effect of breed, rearing intensity, and selected polymorphisms in LEP, DGAT1, SCD1, SREBF11, and TG on carcass conformation traits, beef quality traits, and beef sensory quality traits.

It is difficult to discuss these results only in terms of the selected SNPs' effect on measured traits because all traits determined in this study depended greatly on the cattle breed. The polymorphisms that affect carcass conformation, or its quality and sensory properties are in most cases analyzed in fast-growing beef cattle or, alternatively, in dual-purpose cattle, and the various crossbreeds between them. The most extensively studied breeds belong to Angus, Hereford, Limousin, Charolaise, Gelbvieh (historically triple purpose, nowadays mainly for beef), some local beef breeds such as Chinese Qinchuan, Canchim or Caracu cattle, or dual-purpose cattle such as Simmental or Valdostana [22–24]. Nkrumah et al. stated that lines based on Angus and Hereford had, in general, higher carcass and body fat, and lower carcass leanness compared to lines based on Gelbvieh, Limousin, or Charolaise; such discrepancies in studied herds may generate more complications in interpreting the selected polymorphisms' associations with the traits [24]. The genetic background of the studied animals is also important because sometimes local breeds are not classified as pure *Bos taurus*, they may have been mated with *Bos indicus* cattle. Lin et al. have studied the genetic distance between *B. taurus* and *B. indicus* and found that the genetic distances between Asian and European cattle populations are generally high, with the greatest level of genetic differentiation detected between *B. taurus* and *B. indicus* populations (any population differentiation was not observed among any pairs of populations by exact tests) [25]. Additionally, it is difficult to find studies applied to dairy cattle, which is the most widespread breed across Europe: with approximately 20.5 mln animals in 2021, while non-dairy cattle reached only 10.5 mln [26].

##### 4.1. LEP

Leptin is considered to be associated with carcass quality traits (fat, animal body weight, growth rate) due to its main function [7]. During our study, we focused on SNPs that were described initially by Buchanan et al. and found Leptin to be associated with carcass conformation (trim fat) and beef quality (Wlcook7, a7, pH 14). Any effect of LEP polymorphism on beef sensory traits was not found [19]. The results from a study performed by Nkrumah et al. partially agreed with our observations, i.e., researchers did not find any associations between the analyzed SNP and carcass marbling for animals with different genotypes [24]. However, they did find that animals with TT genotypes had more carcass fat grade than those with CC genotypes, in contrast to our results—we found that animals with CC genotypes had more trim fat than TT homozygotes. In a similar way to our results, other researchers did not find any association between the LEP polymorphism and marbling [22,23], tenderness [23], or carcass fat thickness [22] found changes only at the trend level within their studied population, with the highest value being for TT). Moreover, Carvalho et al. found the shear force to be related to the LEP polymorphism, with higher values for the CC than the TT genotype, and the TT than the CC genotype,  $p \leq 0.05$  [22]. Due to the primary role of leptin as a regulator of appetite, body weight gain, and fat deposition [27], LEP polymorphism was considered regarding carcass conformation traits (e.g., live weight, live weight gain, marbling score, fatness); thus we attempted to assess its value also in relation to quality traits such as meat color, pH, and drip loss, together with beef sensory traits. We did not find any associations between the LEP polymorphism and beef sensory traits; however, we did find that it influenced Wlcook7, a7, and pH 14, which has not been reported previously.

#### 4.2. SCD1

Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) is an integral membrane protein that is involved in the biosynthesis of monounsaturated fatty acids from saturated fatty acids. SCD1 catalyzes the insertion of a *cis* double bond at the delta-9 position of a range of acyl-CoA substrates, including palmitoyl-CoA and stearoyl-CoA1. This enzymatic activity is crucial for the formation of oleic and palmitoleic acids, which are major components of membrane phospholipids, triglycerides, and cholesterol esters. In this study, we found SCD1 to be associated with carcass conformation (metabolic energy live weight gains), beef quality (pH 7, pH 14, Wlcock14, L7, L14), and beef sensory traits (sweet taste). The results demonstrated the effect of AA, Va, and VV forms on pH 7; and AA, VA forms on pH 14. These results do not match those of Li et al. [28]; however, SCD1 could indirectly influence pH levels due to changes in metabolic processes [10]. While the specific influence of SCD1 on beef lightness of color or brightness is not widely documented, it is plausible that variations in fat composition, influenced by SCD1, could indirectly affect these visual aspects of meat quality. The brightness or lightness of meat color is often associated with fat content and marbling [29] or potentially muscle fiber diameter as a result of pH changes [30]. Our results show that SCD1 is associated with L7 and L14 for AA and VA genotypes. These results are partially confirmed by Reardon et al. who showed that the AA genotype had a significant effect. However, these results need to be verified in future studies [31].

The relationship between Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) and thermal drip loss in beef has not explicitly been addressed in the literature yet. The results presented in our study point to the AA and VA genotypes as being potentially important in shaping the thermal drip loss trait. Various studies have investigated the genetic factors influencing drip loss, primarily in pork, which may provide indirect insights relevant to beef and potentially to SCD1. For example, Li et al. identified the triadin (TRDN) and myostatin (MSTN) genes as critical candidates for drip loss in pork due to their roles in muscle contraction and growth [32]. Ponsuksili et al. identified differentially regulated transcripts in pork muscle that were related to membrane proteins, signal transduction, and lipid metabolism, which affected water-holding capacity and drip loss [33]. Reardon et al. indicated a similar relationship between PRKAG3 and thermal drip loss in beef as well as in pork [31]. Considering SCD1's role in lipid metabolism, it might indirectly influence drip loss in beef through its effects on muscle fat composition and membrane properties. However, since current research has not directly established a link between SCD1 and thermal drip loss, it remains a speculative candidate. Further studies specifically investigating the role of SCD1 in relation to meat quality traits, including thermal drip loss, would be necessary to clarify its potential.

The expression of SCD1 in cattle is linked to crucial traits such as intramuscular fat content or marbling, a primary determinant of meat quality affecting flavor, tenderness, and juiciness. Studies by Ardiçlı et al. have demonstrated an association between SCD1 gene polymorphisms and variations in fat deposition and marbling in cattle breeds, directly influencing the quality of beef where the A allele was associated with higher performance than the G allele [34]. Additionally, SCD1 activity has implications for feed efficiency and weight gain in cattle, indicating that genetic variations in this gene can affect how efficiently cattle convert feed into body mass. This is in agreement with our results. However, we found significant ME\_LWG results in AA, VA, and VV genotypes.

Among the analyzed SNPs, we found that the only polymorphism affecting sweet taste was SCD1, with higher values observed in heterozygotes compared to VV homozygotes,  $p \leq 0.05$ . However, the DGAT1, TG, LEP, and SREBF11 polymorphisms did not influence any of the analyzed beef sensory quality traits.

#### 4.3. TG

Thyroglobulin (TG) in cattle, which is essential for thyroid hormone synthesis, is crucial for regulating metabolism and fat deposition. Key polymorphisms in the TG gene significantly influence beef quality traits such as marbling and fat deposition. The TT

genotype is often linked to higher marbling compared to the CC and CT genotypes [35,36], which is in agreement with our results. These genetic variations are utilized to improve beef quality. The TG gene, which affects carcass fat accumulation, directly influences intramuscular fat, which is vital for meat marbling and palatability. Despite study variations, TG polymorphisms seem to be important for cattle breeding aimed at enhancing meat quality [4].

Another important aspect of beef quality influenced by the TG gene is meat color, which includes traits like brightness, and red and yellow color saturation. The color of beef is an important factor affecting consumer perception. Studies have shown that specific TG gene polymorphisms can affect the saturation of red and yellow colors in beef. The variation in these color traits can be indicative of the meat's freshness, processing, and overall quality. Ardicli et al. identified greater brightness associated with CC and higher red color saturation associated with CT [37]. Except for the yellow color saturation, the results of the Ardicli et al. research seem to partially match the results of our study [37]. However, it is necessary to carry out more research work concerning this case in the future.

Drip loss associated with CC and TT genotypes presented in this study seems to partially match Du et al.'s results [38]. Water holding capacity (WHC) is positively correlated with intramuscular fat content in muscles, which is determined by TG [39–41]. These studies, while not directly studying TG gene polymorphisms and their effect on drip loss or water loss in beef, provide a broader context for understanding the genetic factors that may influence these traits in beef. Further studies on the TG gene specifically focusing on these aspects of beef quality are needed to provide more direct conclusions.

#### 4.4. DGAT1

DGAT1 is a gene that plays a crucial role in the synthesis of triglycerides, which are the main components of intramuscular fat (IMF). DGAT1 has been studied in relation to its association with beef production traits, and some studies have shown that DGAT1 has a positive effect on meat quality and carcass fatness [4]. DGAT1 has also been associated with marbling, which is an important factor in determining beef quality. It is an important candidate gene in the production of high-quality beef Yuan 2013 [9]. In this study, we identified that DGAT1 influenced drip loss after 7 days, brightness, and red and yellow color saturation. Xin Li et al. [28] in a similar study did not identify this effect; however, they found an effect on marbling which was not found in our study. The L7 and L14 effect was related to CC, CT, and TT, and a14 and b14 in CC and TT genotypes. Research by Ardicli et al. on Holstein cattle also found that DGAT1 had no effect on color or drip loss, but they suggest that it may affect color due to its influence on marbling [37]. The importance of DGAT1's effect on meat quality and the limited literature available, indicate the need for more research in this area [42].

#### 4.5. SREBF1

Sterol regulatory element-binding factor 1 (SREBF1) is a transcription factor that plays an important role in lipid metabolism and fat deposition in cattle. SREBF1 is involved in the regulation of genes associated with fatty acid synthesis and cholesterol metabolism. The mRNA synthesis of SREBF1 is regulated by nutrients, and its metabolic activity might be potentiated by diet components and changes in lipogenesis in muscle. Several studies have found correlations between the marbling score and meat flavor. Thus, nutrition and management strategies that are able to increase the intramuscular fat content might contribute to increasing the added value of beef [43,44]. Our results confirmed its impact on fatness via the LL and LS genotypes. Moreover, Maciel et al. reported that vitamin A supplementation might increase the expression of SREBF1 at weaning, which increases the chances of improving the quality of beef [45]. On the other hand, Berrios et al. note the possible negative effects of the T allele, which, in his/her study may have been responsible for conceptus death in Holstein cows on day 16 of pregnancy. Further research is needed to thoroughly analyze these risks [46].

## 5. Conclusions

In conclusion, our study revealed significant associations between various genetic polymorphisms and beef quality traits in cattle. Notably, we observed distinct effects of genetic variants on carcass conformation, fatness, marbling, and other sensory attributes of beef.

Specifically, we found that certain genotypes of genes such as SCD1, LEP, TG, and DGAT1 were associated with alterations in carcass composition and quality traits. For instance, the SCD1 AA genotype demonstrated a significant influence on parameters associated with fatness and meat tenderness compared to VA and VV genotypes. Similarly, the DGAT1 TT genotype exhibited correlations with variations in fat deposition and beef tenderness, particularly in relation to marbling and shear force, compared to CC and CT genotypes. Furthermore, our investigation uncovered relationships between genetic variations and sensory attributes of beef, encompassing meat color, tenderness, and taste perception. Notably, the SCD1 polymorphism emerged as a determinant of the sweet taste of beef, with heterozygous genotypes showing higher taste scores compared to VV homozygotes.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes15070843/s1>, Table S1: PCR and digestion conditions; Table S2: Effect of breed, rearing intensity, and the chosen gene polymorphisms on beef sensory quality traits in HF and crossbred steers.

**Author Contributions:** Conceptualization, K.P. and T.S.; methodology, K.P., T.S. and P.K.; software, M.G.; validation, J.S.; formal analysis, K.P., P.K., M.Z., E.B. and B.Ż.; investigation, P.K.; resources, E.B.; data curation, K.P.; writing—original draft preparation, P.K., K.P. and M.Z. writing—review and editing, P.K. and K.P.; visualization, P.K.; supervision, T.S.; project administration, K.P.; funding acquisition, T.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** an ERA-Net co-funded under European Union’s Horizon 2020 research, No. 696231, and the National Center for Research and Development, Poland.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Second Ethics Committee for Animal Experimentation in Warsaw (protocol number WAWA2/086/2018).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data generated or analyzed during the study are included in this published article. The datasets used and/or analyzed in the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Acknowledgments:** The paper is a part of the PhD thesis of Piotr Kostusiak.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Huang, C.-W.; Lin, Y.-T.; Ding, S.-T.; Lo, L.-L.; Wang, P.-H.; Lin, E.-C.; Liu, F.-W.; Lu, Y.-W. Efficient SNP discovery by combining microarray and lab-on-a-chip data for animal breeding and selection. *Microarrays* **2015**, *4*, 570–595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Meuwissen, T.; Hayes, B.; Goddard, M. Genomic selection: A paradigm shift in animal breeding. *Anim. Front.* **2016**, *6*, 6–14. [[CrossRef](#)]
3. Ardicli, S.; Samli, H.; Vatanserver, B.; Soyudal, B.; Dincel, D.; Balci, F. Comprehensive assessment of candidate genes associated with fattening performance in Holstein–Friesian bulls. *Arch. Anim. Breed.* **2019**, *62*, 9–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zalewska, M.; Puppel, K.; Sakowski, T. Associations between gene polymorphisms and selected meat traits in cattle—A review. *Anim. Biosci.* **2021**, *34*, 1425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bartoň, L.; Bureš, D.; Kott, T.; Řehák, D. Associations of polymorphisms in bovine DGAT1, FABP4, FASN, and PPARGC1A genes with intramuscular fat content and the fatty acid composition of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Sci.* **2016**, *114*, 18–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Taniguchi, M.; Utsugi, T.; Oyama, K.; Mannen, H.; Kobayashi, M.; Tanabe, Y.; Ogino, A.; Tsuji, S. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mamm. Genome* **2004**, *15*, 142–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



7. Gill, J.L.; Bishop, S.C.; McCorquodale, C.; Williams, J.L.; Wiener, P. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. *Genet. Sel. Evol.* **2009**, *41*, 36. [[CrossRef](#)]
8. Shin, S.; Chung, E. Association of SNP marker in the thyroglobulin gene with carcass and meat quality traits in Korean cattle. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2006**, *20*, 172–177. [[CrossRef](#)]
9. Yuan, Z.; Li, J.; Li, J.; Gao, X.; Gao, H.; Xu, S. Effects of DGAT1 gene on meat and carcass fatness quality in Chinese commercial cattle. *Mol. Biol. Rep.* **2013**, *40*, 1947–1954. [[CrossRef](#)]
10. Bartoň, L.; Kott, T.; Bureš, D.; Řehák, D.; Zahradkova, R.; Kottova, B. The polymorphisms of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) genes and their association with the fatty acid profile of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Sci.* **2010**, *85*, 15–20. [[CrossRef](#)]
11. Vahmani, P.; Mapiye, C.; Prieto, N.; Rolland, D.C.; McAllister, T.A.; Aalhus, J.L.; Dugan, M.E. The scope for manipulating the polyunsaturated fatty acid content of beef: A review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2015**, *6*, 29. [[CrossRef](#)]
12. Albertí, P.; Panea, B.; Sañudo, C.; Olleta, J.; Ripoll, G.; Ertbjerg, P.; Christensen, M.; Gigli, S.; Failla, S.; Concetti, S. Live weight, body size and carcass characteristics of young bulls of fifteen European breeds. *Livestig. Sci.* **2008**, *114*, 19–30. [[CrossRef](#)]
13. Clarke, A.M.; Drennan, M.J.; McGee, M.; Kenny, D.A.; Evans, R.; Berry, D. Intake, growth and carcass traits in male progeny of sires differing in genetic merit for beef production. *Animal* **2009**, *3*, 791–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Clarke, A.M.; Drennan, M.J.; McGee, M.; Kenny, D.A.; Evans, R.; Berry, D. Live animal measurements, carcass composition and plasma hormone and metabolite concentrations in male progeny of sires differing in genetic merit for beef production. *Animal* **2009**, *3*, 933–945. [[CrossRef](#)]
15. Bown, M.; Muir, P.; Thomson, B. Dairy and beef breed effects on beef yield, beef quality and profitability: A review. *N. Z. J. Agric. Res.* **2016**, *59*, 174–184. [[CrossRef](#)]
16. Mordenti, A.L.; Martelli, G.; Brogna, N.; Nannoni, E.; Vignola, G.; Zaghini, G.; Sardi, L. Effects of a soybean-free diet supplied to Italian heavy pigs on fattening performance, and meat and dry-cured ham quality. *Ital. J. Anim. Sci.* **2012**, *11*, e80. [[CrossRef](#)]
17. Schulz, L.; Sundrum, A. Assessing marbling scores of beef at the 10th rib vs. 12th rib of longissimus thoracis in the slaughter line using camera grading technology in Germany. *Meat Sci.* **2019**, *152*, 116–120. [[CrossRef](#)]
18. Przybylski, W.; Jaworska, D.; Plecha, M.; Dukaczewska, K.; Ostrowski, G.; Sałek, P.; Sawicki, K.; Pawłowska, J. Fungal biostarter effect on the quality of dry-aged beef. *Foods* **2023**, *12*, 1330. [[CrossRef](#)]
19. Buchanan, F.C.; Fitzsimmons, C.J.; Van Kessel, A.G.; Thue, T.D.; Winkelman-Sim, D.C.; Schmutz, S.M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet. Sel. Evol.* **2002**, *34*, 105–116. [[CrossRef](#)]
20. Thaller, G.; Kühn, C.; Winter, A.; Ewald, G.; Bellmann, O.; Wegner, J.; Zühlke, H.; Fries, R. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim. Genet.* **2003**, *34*, 354–357. [[CrossRef](#)]
21. Marasinghe, M.G.; Koehler, K.J. Statistical data analysis using SAS. *J. R. Stat. Soc. Ser. A* **2018**, *183*, 1829.
22. Carvalho, T.D.d.; Siqueira, F.; Torres Júnior, R.A.d.A.; Medeiros, S.R.d.; Feijó, G.L.D.; Souza Junior, M.D.d.; Blecha, I.M.Z.; Soares, C.O. Association of polymorphisms in the leptin and thyroglobulin genes with meat quality and carcass traits in beef cattle. *Rev. Bras. Zootec.* **2012**, *41*, 2162–2168. [[CrossRef](#)]
23. Liu, H.; Zan, L.; Xin, Y.; Tian, W. Association of polymorphism in the bovine leptin gene exon2 with carcass traits in Chinese Qinchuan cattle. *J. Appl. Anim. Res.* **2010**, *37*, 221–224. [[CrossRef](#)]
24. Nkrumah, J.; Li, C.; Basarab, J.; Guercio, S.; Meng, Y.; Murdoch, B.; Hansen, C.; Moore, S. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. *Can. J. Anim. Sci.* **2004**, *84*, 211–219. [[CrossRef](#)]
25. Lin, B.Z.; Sasazaki, S.; Mannen, H. Genetic diversity and structure in *Bos taurus* and *Bos indicus* populations analyzed by SNP markers. *Anim. Sci. J.* **2010**, *81*, 281–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Eurostat, S. 2022. Available online: <https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view> (accessed on 20 January 2024).
27. Lusk, J. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with body weight and backfat growth curve parameters for beef cattle. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 1865–1872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Li, X.; Ekerljung, M.; Lundström, K.; Lundén, A. Association of polymorphisms at DGAT1, leptin, SCD1, CAPN1 and CAST genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden. *Meat Sci.* **2013**, *94*, 153–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Wu, X.; Yang, Z.; Shi, X.; Li, J.; Ji, D.; Mao, Y.; Chang, L.; Gao, H. Association of SCD1 and DGAT1 SNPs with the intramuscular fat traits in Chinese Simmental cattle and their distribution in eight Chinese cattle breeds. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 1065–1071. [[CrossRef](#)]
30. Purslow, P.P.; Warner, R.D.; Clarke, F.M.; Hughes, J.M. Variations in meat colour due to factors other than myoglobin chemistry; a synthesis of recent findings (invited review). *Meat Sci.* **2020**, *159*, 107941. [[CrossRef](#)]
31. Reardon, W.; Mullen, A.; Sweeney, T.; Hamill, R. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 270–275. [[CrossRef](#)]
32. Li, B.; Liu, K.; Weng, Q.; Li, P.; Wei, W.; Li, Q.; Chen, J.; Huang, R.; Wu, W.; Liu, H. RNA-seq analysis reveals new candidate genes for drip loss in a Pietrain × Duroc × Landrace × Yorkshire population. *Anim. Genet.* **2016**, *47*, 192–199. [[CrossRef](#)]

33. Ponsuksili, S.; Murani, E.; Phatsara, C.; Jonas, E.; Walz, C.; Schwerin, M.; Schellander, K.; Wimmers, K. Expression profiling of muscle reveals transcripts differentially expressed in muscle that affect water-holding capacity of pork. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10311–10317. [[CrossRef](#)]
34. Ardicli, S.; Dincel, D.; Samli, H.; Senturk, N.; Karalar, B.; Unlu, S.; Soyudal, B.; Kubad, E.; Balci, F. Association of polymorphisms in lipid and energy metabolism-related genes with fattening performance in Simmental cattle. *Anim. Biotechnol.* **2023**, *34*, 3428–3440. [[CrossRef](#)]
35. Anton, I.; Zsolnai, A.; Holló, I.; Repa, I.; Holló, G. Effect of thyroglobulin gene polymorphism on the intramuscular fat content in cattle examined by X-ray computed tomography and Soxhlet methods. *Arch. Anim. Breed.* **2013**, *56*, 593–596. [[CrossRef](#)]
36. Kaplanová, K.; Dvořák, J.; Urban, T. Association of single nucleotide polymorphisms in TG, LEP and TFAM genes with carcass traits in cross-breed cattle. In Proceedings of the International PhD Students Conference Mendel Net '09 Agro', Brno, Czech Republic, 6–7 November 2009; pp. 647–651.
37. Ardicli, S.; Samli, H.; Dincel, D.; Ekiz, B.; Yalcintan, H.; Vatansever, B.; Balci, F. Relationship of the bovine IGF1, TG, DGAT1 and MYF5 genes to meat colour, tenderness and cooking loss. *J. Hellenic Vet. Med. Soc.* **2018**, *69*, 1077–1087. [[CrossRef](#)]
38. Du, L.; Chang, T.; An, B.; Liang, M.; Duan, X.; Cai, W.; Zhu, B.; Gao, X.; Chen, Y.; Xu, L. Transcriptome profiling analysis of muscle tissue reveals potential candidate genes affecting water holding capacity in Chinese Simmental beef cattle. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 11897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Schumacher, M.; DelCurto-Wyffels, H.; Thomson, J.; Boles, J. Fat deposition and fat effects on meat quality—A review. *Animals* **2022**, *12*, 1550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Hirwa, C.d.A.; Wallace, P.; Shen, X.; Nie, Q.; Yang, G.; Zhang, X. Genes related to economically important traits in beef cattle. *Asian J. Anim. Sci.* **2011**, *5*, 34–45. [[CrossRef](#)]
41. Kostusiak, P.; Slósarz, J.; Gołębiewski, M.; Grodkowski, G.; Puppel, K. Polymorphism of genes and their impact on beef quality. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2023**, *45*, 4749–4762. [[CrossRef](#)]
42. Khan, M.Z.; Ma, Y.; Ma, J.; Xiao, J.; Liu, Y.; Liu, S.; Khan, A.; Khan, I.M.; Cao, Z. Association of DGAT1 with cattle, buffalo, goat, and sheep milk and meat production traits. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 712470. [[CrossRef](#)]
43. Bhuiyan, M.; Yu, S.; Jeon, J.; Yoon, D.; Cho, Y.; Park, E.; Kim, N.; Kim, K.; Lee, J. DNA polymorphisms in SREBF1 and FASN genes affect fatty acid composition in Korean cattle (Hanwoo). *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2009**, *22*, 765–773. [[CrossRef](#)]
44. Ulum, M.; Ishak, A.; Sumantri, C. A Novel SNPs of the SREBF1 and SCARB1 Genes and the Association with Fatty Acid Profile in Bali Cattle. *Trop. Anim. Sci. J.* **2023**, *46*, 428–438.
45. Maciel, F.C.; Neto, O.R.M.; Duarte, M.S.; Du, M.; Lage, J.F.; Teixeira, P.D.; Martins, C.L.; Domingues, E.H.; Fogaça, L.A.; Ladeira, M.M. Effect of vitamin A injection at birth on intramuscular fat development and meat quality in beef cattle. *Meat Sci.* **2022**, *184*, 108676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Gonzalez-Berrios, C.L.; Bowden, C.; Pinedo, P.J.; Bishop, J.V.; Van Campen, H.; Hansen, T.R.; Thomas, M.G. 135 Gene Variants in Bola-Dmb, DECR1, Fasn and SREBF1 Associated with Conceptus Death on Day 16 of Pregnancy in Holstein Cows. *J. Anim. Sci.* **2023**, *101*, 27–28. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Warszawa, dn. 19.09.2024

Mgr inż. Piotr Kostusiak  
Katedra Hodowli Zwierząt  
Instytut Nauk o Zwierzętach  
piotr\_kostusiak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Bagnicka Emilia, Żelazowska Beata, Zalewska Magdalena., Sakowski Tomasz, Słószarz, Jan, Gołębiowski Marcin, Puppel Kamila. Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. Genes, 2024, 5, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; opracowaniu metodologii, analizie wyników, przeglądu literatury, przygotowaniu manuskryptu, odpowiedzi na recenzje, co stanowi 50 % pracy.

Podpis

*Piotr Kostusiak*  
.....

Warszawa, dn. 19.09.2024

Dr hab. Kamila Puppel, prof. SGGW

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

kamila\_puppel@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Bagnicka Emilia, Żelazowska Beata, Zalewska Magdalena., Sakowski Tomasz, Słószarz, Jan, Gołębiowski Marcin, Puppel Kamila. Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. Genes, 2024, 5, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; konceptualizacji, opracowaniu metodologii, przeglądu literatury, przygotowaniu manuskryptu, pozyskaniu finansowania badań co stanowi 20 % pracy.

Podpis

  
dr hab. Kamila Puppel (prof. SGGW)

Warszawa, dn. 19.09.2024

Dr Jan Słószarz

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

jan\_slosarz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

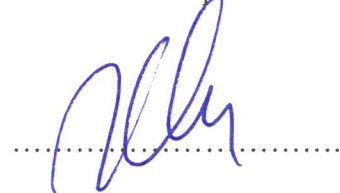
**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Bagnicka Emilia, Żelazowska Beata, Zalewska Magdalena., Sakowski Tomasz, Słószarz, Jan, Gołębiowski Marcin, Puppel Kamila. Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. Genes, 2024, 5, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; przeglądu literatury, walidacji i analizie wyników, co stanowi 5 % pracy.

Podpis



Warszawa, dn. 19.09.2024

Prof. dr hab. Emilia Bagnicka  
Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki  
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu  
e.bagnicka@igbzpan.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

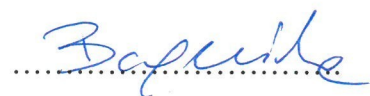
**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Bagnicka Emilia, Żelazowska Beata, Zalewska Magdalena., Sakowski Tomasz, Słószarz, Jan, Gołębiowski Marcin, Puppel Kamila. Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. Genes, 2024, 5, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; analize wyników i przygotowaniu manuskryptu, co stanowi 5 % pracy.

Podpis



Warszawa, dn. 19.09.2024

Prof. dr hab. Tomasz Sakowski  
Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki  
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu  
t.sakowski@igbzpan.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Bagnicka Emilia, Żelazowska Beata, Zalewska Magdalena., Sakowski Tomasz, Slószarz, Jan, Gołębiewski Marcin, Puppel Kamila. Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. Genes, 2024, 5, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; konceptualizacji, opracowaniu metodologii, pozyskaniu finansowania badań, co stanowi 5 % pracy.

Podpis



Warszawa, dn. 19.09.2024

Beata Żelazowska

Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki

Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt

Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

b.zelazowska@igbzpan.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Bagnicka Emilia, Żelazowska Beata, Zalewska Magdalena., Sakowski Tomasz, Slószarz, Jan, Gołębiowski Marcin, Puppel Kamila. Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. Genes, 2024, 5, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; analizy wyników, co stanowi 5 % pracy.

Podpis

.....*B. Żelazowska*.....

Warszawa, dn. 19.09.2024

Dr hab. Marcin Gołębiewski, prof. SGGW

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

marcin\_golebiewski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Bagnicka Emilia, Żelazowska Beata, Zalewska Magdalena., Sakowski Tomasz, Słószarz Jan, Gołębiewski Marcin, Puppel Kamila. Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. Genes, 2024, 5, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; obsługi oprogramowania do odczytu i analizy wyników badań, co stanowi 5 % pracy

Podpis



Warszawa, dn. 19.09.2024

Dr inż. Magdalena Zalewska

Zakład Fizjologii Bakterii

Wydział Biologii

Uniwersytet Warszawski

mm.zalewska10@uw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak Piotr, Bagnicka Emilia, Żelazowska Beata, Zalewska Magdalena., Sakowski Tomasz, Słószarz, Jan, Gołębiowski Marcin, Puppel Kamila. Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF x Charolaise Steers. Genes, 2024, 5, 1–16.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; analizie wyników, przeglądzie literatury, przygotowaniu manuskryptu, odpowiedzi na recenzje, co stanowi 5 % pracy







Podpis

*Zalewska Magdalena*



## Article

# Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with *DGAT1*, *LEP*, and *SCD1* Genes

Piotr Kostusiak <sup>1</sup>, Emilia Bagnicka <sup>2</sup>, Beata Żelazowska <sup>2</sup>, Magdalena Zalewska <sup>3,\*</sup>, Tomasz Sakowski <sup>2</sup>, Jan Słószarz <sup>1</sup>, Marcin Gołębiowski <sup>1</sup> and Kamila Puppel <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Institute of Animal Science, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland; piotr\_kostusiak@sggw.edu.pl (P.K.); jan\_slosarz@sggw.edu.pl (J.S.); marcin\_golebiowski@sggw.edu.pl (M.G.)
- <sup>2</sup> Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Science, Jastrzębiec, Postępu 36A, 05-552 Magdalenka, Poland; e.bagnicka@igbzpan.pl (E.B.); b.zelazowska@igbzpan.pl (B.Ż.); t.sakowski@igbzpan.pl (T.S.)
- <sup>3</sup> Department of Bacterial Physiology, Institute of Microbiology, Faculty of Biology, University of Warsaw, 02-096 Warsaw, Poland
- \* Correspondence: mm.zalewska10@uw.edu.pl (M.Z.); kamila\_puppel@sggw.edu.pl (K.P.)

**Abstract:** The objective of this study is to assess the influence of genetic polymorphisms in *DGAT1*, *LEP*, and *SCD1* on the oxidative stress biomarkers and bioactive protein levels in Hereford bulls. A total of sixty-eight bulls were analyzed at 22 months of age to assess growth metrics and carcass quality, with a focus on polymorphisms in these genes. The key markers of oxidative stress, including malondialdehyde (MDA), and the activities of antioxidant enzymes such as glutathione reductase (GluRed), glutathione peroxidase (GPx), and superoxide dismutase (SOD) were measured, alongside bioactive compounds like taurine, carnosine, and anserine. The results show that the TT genotype of *DGAT1* is linked to significantly higher MDA levels, reflecting increased lipid peroxidation, but is also associated with higher GluRed and GPx activities and elevated levels of taurine, carnosine, and anserine, suggesting an adaptive response to oxidative stress. The *LEP* gene analysis revealed that the CC genotype had the highest MDA levels but also exhibited increased GPx and SOD activities, with the CT genotype showing the highest SOD activity and the TT genotype the highest total antioxidant status (TAS). The *SCD1* AA genotype displayed the highest activities of GluRed, GPx, and SOD, indicating a more effective antioxidant defence, while the VA genotype had the highest MDA levels and the VV genotype showed lower MDA levels, suggesting protective effects against oxidative damage. These findings highlight genotype specific variations in the oxidative stress markers and bioactive compound levels, providing insights into the genetic regulation of oxidative stress and antioxidant defences, which could inform breeding strategies for improving oxidative stress resistance in livestock and managing related conditions.



**Citation:** Kostusiak, P.; Bagnicka, E.; Żelazowska, B.; Zalewska, M.; Sakowski, T.; Słószarz, J.; Gołębiowski, M.; Puppel, K. Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with *DGAT1*, *LEP*, and *SCD1* Genes. *Biomolecules* **2024**, *14*, 1309. <https://doi.org/10.3390/biom14101309>

Academic Editor: Chun Guo

Received: 13 September 2024

Revised: 14 October 2024

Accepted: 15 October 2024

Published: 16 October 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** genetic variations; *DGAT1*; *LEP*; *SCD1*; oxidative stress; beef

## 1. Introduction

Several point mutations in genes have been identified, with significant effects on cattle phenotypes. Among these, leptin, a polypeptide hormone predominantly secreted by adipocytes, plays a crucial role in energy homeostasis by modulating appetite and lipid metabolism [1]. The leptin gene in cattle is located on chromosome 4, where several polymorphisms associated with performance traits have been identified [2]. Studies indicate that animals with the TT genotype exhibit superior sensory preference scores compared to those with CC or CT genotypes. Additionally, SNP UASMS2 shows a significant correlation with fat thickness, where CC-genotype animals display reduced fat surrounding the loin compared to the CT or TT genotypes [3]. Diacylglycerol O-acyltransferase (*DGAT1*) is

a key microsomal enzyme catalyzing the final step in triglyceride synthesis, converting diacylglycerol and fatty acids into triglycerides. The K232A SNP involves a dinucleotide substitution (AA/GC), resulting in the amino acid substitution of lysine for alanine. Investigations have demonstrated that SNP c.572 A > G is linked with variations in fat thickness, MBS (meat quality score), fat colour, and shear force [4,5]. Specifically, animals with the BB genotype exhibit lower MBS values, reduced fat colour, and lower shear force compared to those with the AA genotype. Stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) catalyzes the conversion of saturated fatty acids (SFA) to unsaturated fatty acids (UFA) in adipocytes by introducing double bonds. *SCD* activity is regulated by key lipogenic enzymes involved in fatty acid synthesis pathways, with leptin and insulin also modulating its activity. In the gene encoding *SCD1* on chromosome 26, three SNPs in the 3'UTR and three SNPs in exon 5 have been identified. Significant associations have been observed between the g.10329 C > T polymorphism and the desaturation index and fatty acid composition [6]. Additionally, polymorphisms in *SCD1* are significantly correlated with meat sensory traits, such as colour, tenderness, and taste perception. The *SCD1* gene is a critical determinant of meat sweetness, with heterozygous genotypes showing higher sensory ratings compared to homozygous VV genotypes [7].

Enzymes, substrates, and coenzymes are compartmentalized within specialized subcellular structures, allowing for precise and selective biochemical activity [8]. This compartmentalization enables the isolation and optimization of opposing biochemical processes, such as the biosynthesis and degradation of metabolites [9,10]. The activity of enzymes in blood serum is influenced by various factors, including pathological conditions, the extent of tissue damage, and the rate of catabolism and clearance from the circulatory system. Enzymes are distributed across distinct subcellular compartments, including in the cytoplasm (e.g., aldolase, phosphohexose isomerase, lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase, sorbitol dehydrogenase), mitochondria (e.g., Krebs cycle enzymes, oxidases, glutamate dehydrogenase, aspartate aminotransferase), endoplasmic reticulum (e.g., esterases, reductases, acetylases, gamma-glutamyltransferase), ribosomes (e.g., protein biosynthesis enzymes, ceruloplasmin, cholinesterase), and lysosomes (e.g., proteases, phosphatases, collagenases). In response to oxidative stress, cattle utilize two primary defence mechanisms, namely enzymatic and non-enzymatic [11]. Enzymatic antioxidants, which facilitate redox reactions, are categorized into the following four major groups: oxidases, dehydrogenases, peroxidases, and oxygenases [12]. Key examples include superoxide dismutase (SOD), which catalyzes the disproportionation of superoxide anions [13]; glutathione peroxidase (GPx), which decomposes peroxides and mitigates oxidative damage [14]; and glutathione reductase (GluRed), which regenerates reduced glutathione [15]. Non-enzymatic defence mechanisms involve proteins with intrinsic antioxidant properties, which contribute to the cellular protection against oxidative damage [16].

Carnosine, a dipeptide composed of  $\beta$ -alanine and histidine, fulfils several critical biological functions. It exhibits chelating activity by forming stable complexes with heavy metal cations, which mitigates their toxic effects [17]. The antioxidant properties of carnosine are attributed to its ability to neutralize ROS [18], including hydroxyl radicals and peroxide radicals, thereby mitigating oxidative stress [19]. Furthermore, carnosine has antiglycative properties, as it inhibits glycation reactions in which low molecular weight aldehydes, such as methylglyoxal, cause damage to protein structures [20,21]. Anserine, a methylated derivative of carnosine consisting of  $\beta$ -alanine and L-(N-methyl)histidine, also functions as an antioxidant. It provides cellular protection against oxidative damage and contributes to the maintenance of homeostasis in muscle and brain tissues [22].

Oxidative stress in beef cattle arises from an imbalance between reactive oxidative species and the capacity for detoxification and repair mechanisms [9]. This imbalance correlates with diminished immune function and increased disease vulnerability [12]. Consequently, elevating antioxidant defences is essential for enhancing animal health and improving the oxidative stability of meat [23].

The aim of this study is to assess the influence of genetic polymorphisms in *DGAT1*, *LEP*, and *SCD1* on oxidative stress biomarkers and bioactive protein levels in Hereford bulls. The research aims to quantify how variations in these genes correlate with changes in oxidative stress markers such as malondialdehyde, glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and total antioxidant status, as well as with concentrations of bioactive compounds including taurine, anserine, carnosine, and coenzyme Q10. This investigation seeks to identify the genetic factors that modulate oxidative stress responses and bioactive protein profiles, thereby contributing to the understanding of genetic influences on meat quality and overall health in Hereford cattle.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

The study involved 65 Hereford bulls, aiming to evaluate growth performance and muscle characteristics in relation to genetic variations (Table S1). The bulls were slaughtered at 22 months of age, selected to ensure maturity for assessing growth metrics and carcass quality. Prior to slaughter, the standardized live weight was recorded with an average of 669 kg, and carcass weight was measured post-slaughter, averaging 390 kg. After slaughter, the carcasses were cooled for 24 h at temperatures between 2 and 4 °C. Following the cooling period, a muscle sample weighing 300 g was collected from the semimembranosus muscle, sampled parallel to the muscle axis to ensure consistency in the analysis of muscle composition.

All bulls had unlimited access to pasture for 1 year of their life. After the grazing phase, the animals had transition and finishing rations (Table S2). To get the animals used to a changed diet, two step-up diets were introduced. The average standardized daily gain was 1.04 kg/day, and the daily carcass gain was 0.66 kg/day.

Additionally, EUROP trade grades and fat classes were estimated by graders at the slaughterhouse. The carcasses were classified, with fat classes ranging from 1 to 2+, and trade classes ranging from U to R. This classification provided insights into the quality and fat content of the carcasses, contributing to a comprehensive evaluation of growth performance and muscle characteristics in relation to genetic variations.

### 2.2. Chemical Analyses

Beef samples were initially chopped and then processed in a blender to achieve a homogeneous mixture. This homogenized sample was analyzed using a near-infrared spectrophotometer. The basic chemical composition of the meat was determined utilizing a Food Scan™ analyser (Foss Electric, Hillerød, Denmark).

The quantification of anserine, carnosine, taurine, and coenzyme Q10 was performed using an RP-HPLC Agilent 1100 system. Chromatographic separations were executed at ambient temperature employing a solvent gradient on a Jupiter C18 300A column (Phenomenex, Torrance, CA, USA), following the procedure outlined by Łukasiewicz et al. [24]. The mobile phases comprised Solvent A, which included acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany), water (Sigma-Aldrich), and trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a volumetric ratio of 30:970:1 (*v/v/v*), and Solvent B, which consisted of acetonitrile, water, and trifluoroacetic acid in a ratio of 970:30:1 (*v/v/v*). The flow rate was set at 1.4 mL/min, with detection occurring at a wavelength of 214 nm. A 25 µL aliquot of the final solution was injected for analysis. All samples were analyzed in duplicate to ensure reproducibility. Peak identification and quantification were verified through comparison with standards (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

The levels of malondialdehyde (MDA) in blood plasma were determined using a NanoQuant Infinite M200 Pro analyser (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) at a wavelength of 532 nm. In this process, 250 µL of blood plasma was mixed with 25 µL of 0.2% 2,6-bis(1,1-dimethyl-ethyl)-4-methylphenol (Sigma-Aldrich, Warsaw, Poland) and 1 mL of 5% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, Warsaw, Poland). The mixture was centrifuged at 14,000× *g* for 10 min. Subsequently, 750 µL of the clear supernatant was transferred

to a glass tube, and 500  $\mu\text{L}$  of 0.6% thiobarbituric acid (Sigma-Aldrich, Warsaw, Poland) was added. The solution was mixed and incubated for 45 min in a 90 °C water bath. After incubation, the mixture was cooled on ice and centrifuged at 4000 $\times g$  for 5 min. Finally, 200  $\mu\text{L}$  of the clear supernatant was transferred to a microplate for measurement.

The glutathione reductase (GluRed), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and total antioxidant status (TAS) in blood plasma were assessed using a NanoQuant Infinite M200 Pro analyser (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) with dedicated ELISA kits from Randox Laboratories (Crumlin, UK). The specific kits used were as follows: glutathione reductase (Cat no GR2608), Ransel (glutathione peroxidase, Cat no SC692), Ransod (superoxide dismutase, Cat no SD126), and Total Antioxidant Status (Cat no NX2331).

### 2.3. DNA Sampling and Analysis

Blood samples were collected in tubes containing anticoagulants for genetic analysis. Total DNA was isolated from whole blood using the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's protocol. The quantity of the extracted DNA was measured with an Invitrogen Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a dsDNA high-sensitivity assay kit, while the quality was assessed with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). DNA samples were isolated in triplicate and then pooled for each animal to ensure representative and reliable genetic analysis. DNA isolation and genotyping were conducted at the Institute of Genetics and Animal Biotechnology PAS, Jastrzębiec, Poland, using the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method. The amplifications of the *SCD1* gene were performed using a forward primer 5'-ATG TAT GGA TAC CGC CCT TAT-3' and a reverse primer 5'-TTC TGG CAC GTA ACC TAT ACC CT-3'. The restriction enzyme Fnu4HI, that cuts at the 5'...GC|NGC...3' site, has been used to digest the 145 bp amplicon. A T > C polymorphism genotypes resulted in different fragment patterns, as follows: the genotype AA in fragments of 29, 48 and 68 bp, the genotype VA in 29, 48, 68 and 116 bp, and the genotype VV showed fragments of 29 and 116 bp [25]. The *LEP* gene used the primers 5'-ATG CGT GTG GAC CCC TGT ATC-3' (forward) and 5'-TGG TGT CAT CCT GGA CCT CC-3' (reverse) to amplify the 94 bp product. The enzyme BspEI was used to digest the amplicon, cutting at the 5'...T|CCGGA...3' site. The T > C polymorphism resulted in different fragment patterns for each genotype, as follows: the CC genotype fragments were 75 bp, the CT genotype fragments were 75 and 94 bp, and the TT genotype fragments were 94 bp [26]. The amplification of the *DGAT1* gene was performed using the forward primer 5'-GCA CCA TCC TCT TCC TCA AG-3' and the reverse primer 5'-GGA AGC GCT TTC GGA TG-3'. The restriction enzyme CfrI, which cuts the sequence 5'...Y|GGCCR...3', was used to digest an amplicon of 411 bp. T > C substitution resulted in a polymorphism in which the CC genotype remained undigested at 411 bp, the CT genotype resulted in fragments of 203 and 411 bp, and the TT genotype yielded fragments of 203 bp [27]. The genes selected for analysis were Stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*), leptin (*LEP*), and diacylglycerol O-acyltransferase (*DGAT1*), as these genes are associated with key qualitative traits in beef. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using AmpliTaq Gold DNA Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). PCR conditions were specifically optimized for each reaction in accordance with the manufacturer's protocol for the polymerase.

### 2.4. Statistical Analysis

Variance analysis (ANOVA) was performed to evaluate the impact of genetic polymorphisms on the biomarkers and protein levels. This analysis allowed for the comparison of means among different genotypes and the identification of statistically significant differences. To evaluate the impact of genetic polymorphisms on oxidative stress biomarkers and bioactive protein levels, we conducted an analysis of variance (ANOVA). Prior to performing the ANOVA, the normality of the data distribution was assessed using the



Shapiro–Wilk test for all variables, including oxidative stress markers such as malondialdehyde (MDA), glutathione reductase (GluRed), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and total antioxidant status (TAS), as well as for bioactive compounds such as taurine, anserine, and carnosine.

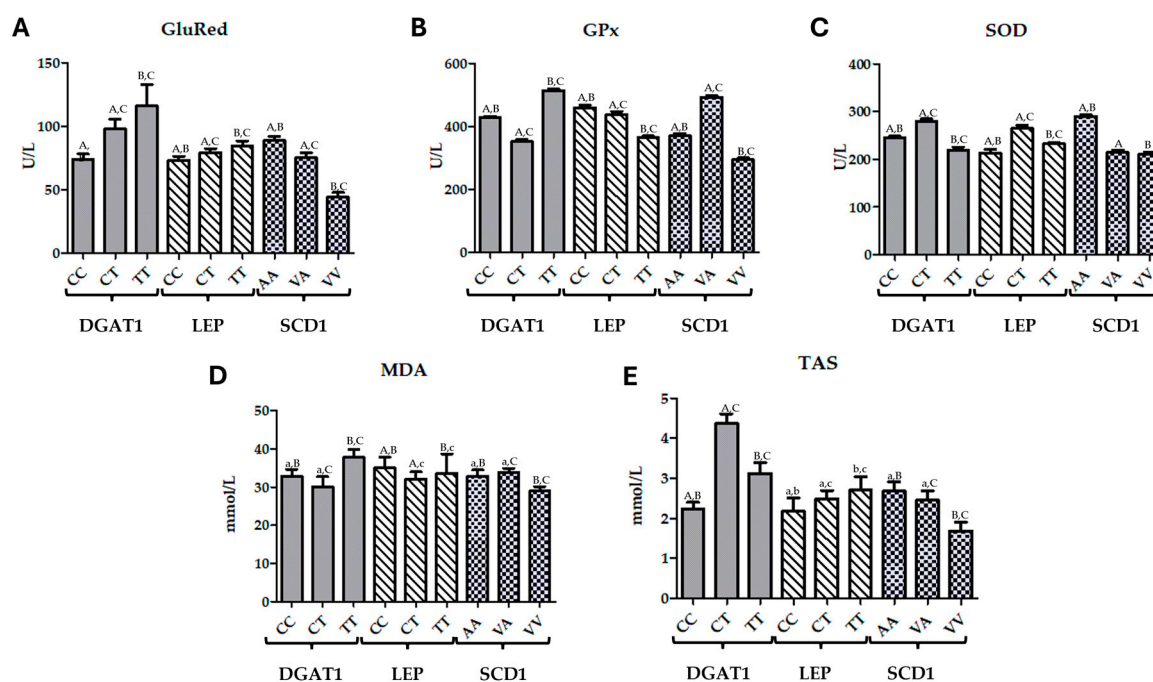
The results of the Shapiro–Wilk test confirmed that the data were normally distributed ( $p > 0.05$  for all variables), allowing us to proceed with parametric tests. If any of the variables had deviated from normality, we would have used non-parametric tests. However, as all datasets met the normality criteria, ANOVA was deemed appropriate.

In addition to ANOVA, Pearson’s correlation coefficients were calculated to explore the linear relationships between genetic polymorphisms (*DGAT1*, *LEP*, and *SCD1*) and oxidative stress biomarkers. Spearman’s correlation coefficients were used to examine potential non-linear associations between genetic variants and bioactive protein levels. Only statistically significant interactions with  $p$ -values of  $\leq 0.01$  or  $\leq 0.05$  were considered for detailed interpretation.

All statistical analyses were conducted using IBM SPSS Statistics version 23 software to ensure the accuracy and reliability of the results.

### 3. Results

The studies conducted on Hereford bulls revealed genotype-dependent variations in oxidative stress biomarkers across the *DGAT1*, *LEP*, and *SCD1* genes (Figure 1).



**Figure 1.** The effect of *DGAT1* (CC, CT, TT), *LEP* (CC, CT, TT), *SCD1* (AA, VA, VV) genetic variants on the levels of (A) glutathione reductase (GluRed), (B) glutathione peroxidase (GPx), (C) superoxide dismutase (SOD), (D) malondialdehyde (MDA), and (E) total antioxidant status (TAS) was assessed. Data are presented as figures of Last Square Means  $\pm$  SEM; values with the same letters in one gene group differ significantly: upper case indicates  $p \leq 0.01$ ; lower case indicates  $p \leq 0.05$ .

For *DGAT1*, the TT genotype showed the highest MDA levels, with an increase of 15% compared to the CC genotype and 26% compared to the CT genotype. GluRed activity was also highest in the TT genotype, with a 57% increase over the CC genotype and 19% over the CT genotype. GPx activity in the TT genotype was the most elevated, with a 20% increase compared to the CC genotype and 46% compared to the CT genotype. Interestingly, SOD activity peaked in the CT genotype, being 14% higher than in the CC genotype and

28% higher than in the TT genotype. TAS was most elevated in the CT genotype, with a 95% increase compared to the CC genotype and 40% compared to the TT genotype.

For the *LEP* gene, the CC genotype had the highest MDA levels, showing a 9% increase over the TT genotype and 10% over the CT genotype. GluRed activity peaked in the TT genotype, with a 16% increase over the CC genotype and 7% over the CT genotype. GPx activity was highest in the CC genotype, with a 5% increase over the CT genotype and a 26% increase over the TT genotype. SOD activity was greatest in the CT genotype, showing a 24% increase over the CC genotype and 14% over the TT genotype. TAS was highest in the TT genotype, with a 24% increase over the CC genotype and 9% over the CT genotype (Figure 1).

For the *SCD1* gene, the VA genotype had the highest MDA levels, with a 3% increase compared to the AA genotype, while the VV genotype had the lowest levels, with a decrease of 14% compared to AA and 17% compared to VA. GluRed activity was highest in the AA genotype, showing an 18% increase over the VA genotype and a significant 50% increase over the VV genotype. GPx activity peaked in the VA genotype, with a 33% increase compared to the AA genotype and 68% over the VV genotype. SOD activity was highest in the AA genotype, being 35% higher than the VA genotype and 38% higher than the VV genotype. TAS was also highest in the AA genotype, with a 9% increase over the VA genotype and a 59% increase compared to the VV genotype (Figure 1).

In summary, the data reveal significant genotype-dependent variations in oxidative stress biomarkers across the *DGAT1*, *LEP*, and *SCD1* genes. The TT genotype of *DGAT1* is associated with higher oxidative stress markers, as indicated by elevated MDA and GPx levels. For *LEP*, the CC genotype is correlated with higher oxidative stress, while for *SCD1*, the AA genotype is linked to increased antioxidant enzyme activities and higher TAS, suggesting a stronger antioxidant defence. These findings underscore the role of genetic polymorphisms in modulating oxidative stress and antioxidant responses.

The correlation analysis of oxidative stress markers with *DGAT1*, *LEP*, and *SCD1* gene variations reveals specific significant relationships. For the *DGAT1* gene, a significant positive correlation was observed with GluRed activity, with a correlation coefficient of 0.369 ( $p < 0.01$ ). This suggests that variations in *DGAT1* are associated with increased GluRed activity, reflecting enhanced antioxidant defence. Additionally, *DGAT1* showed a significant positive correlation with TAS, with a correlation coefficient of 0.309 ( $p < 0.05$ ), indicating that *DGAT1* variations are linked to higher overall antioxidant capacity (Figure 1).

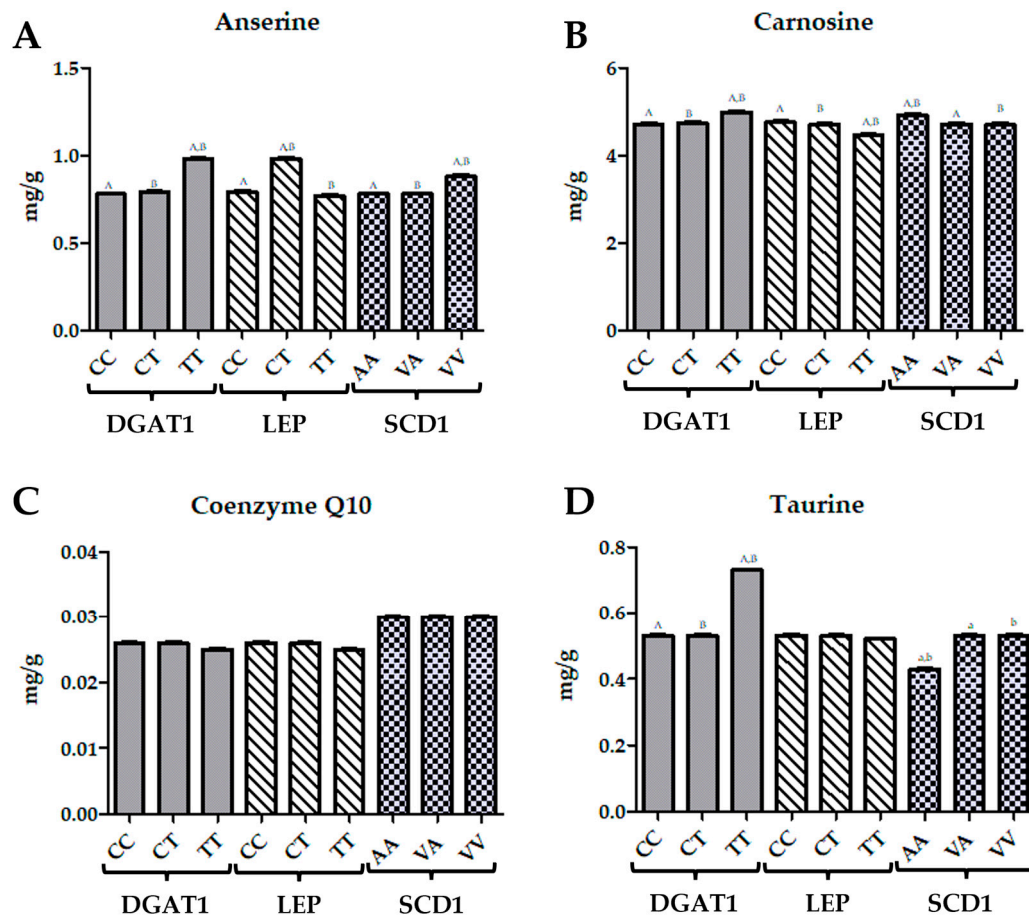
In contrast, the *LEP* gene did not show significant correlations with MDA, GluRed, GPx, and SOD. However, *LEP* exhibited significant negative correlations with taurine ( $-0.578, p < 0.01$ ) and anserine ( $-0.514, p < 0.01$ ), indicating substantial inverse relationships with these bioactive compounds (Table 1).

**Table 1.** Correlation coefficients between the biomarkers of oxidative stress and *DGAT1*, *LEP*, and *SCD1* in Hereford bulls.

	<i>DGAT1</i>	<i>LEP</i>	<i>SCD1</i>
MDA	0.075	−0.049	−0.024
GluRed	0.369 **	0.115	−0.318 **
GPX	0.056	−0.118	0.110
SOD	−0.038	0.090	−0.368 **
TAS	0.309 *	0.140	−0.275 *

*LEP*—leptin; *DGAT1*—diacylglycerol O-acyltransferase; *SCD1*—Stearoyl-CoA desaturase; MDA—malondialdehyde; GluRed—glutathione reductase; GPx—glutathione peroxidase; SOD—superoxide dismutase; TAS—total antioxidant status; \*\* Correlation significant at a level of 0.01 (two-sided). \* Correlation significant at a level of 0.05 (two-sided).

For the *SCD1* gene, significant negative correlations were found with GluRed and SOD, with correlation coefficients of  $-0.318$  ( $p < 0.05$ ) and  $-0.368$  ( $p < 0.01$ ), respectively. These correlations indicate that variations in *SCD1* are associated with decreased antioxidant enzyme activities (Figure 2). Additionally, *SCD1* had a significant negative correlation with total antioxidant status (TAS) at  $-0.275$  ( $p < 0.05$ ), suggesting a moderate inverse relationship with overall antioxidant capacity (Table 1).



**Figure 2.** The effect of the genetic variants of DGAT1 (CC, CT, TT), LEP (CC, CT, TT), SCD1 (AA, VA, VV) on levels of (A) anserine, (B) carnosine, (C) coenzyme Q10, (D) taurine. Data presented as figures of Last Square Means  $\pm$  SEM; values with the same letters in one gene group differ significantly: upper case indicates  $p \leq 0.01$ ; lower case indicates  $p \leq 0.05$ .

For the *DGAT1* gene, taurine levels were highest in the TT genotype, showing a 38% increase compared to the CC and CT genotypes. Q10 levels remained consistent across all genotypes, with no significant differences (Figure 2). Carnosine concentrations were highest in the TT genotype, representing an 8% increase compared to the CC genotype and a 12% increase compared to the CT genotype. Anserine levels were also highest in the TT genotype, showing a 26% increase compared to the CC genotype and a 15% increase compared to the CT genotype. In the case of the *LEP* gene, taurine levels were stable across the CC and CT genotypes, but were slightly lower in the TT genotype by 2%. Q10 concentrations were uniform across all genotypes. Carnosine levels were highest in the CC genotype, showing a 6% increase compared to the TT genotype. Anserine concentrations were highest in the TT genotype, with a 24% increase compared to the CC genotype and a 27% increase compared to the CT genotype. For the *SCD1* gene, taurine levels were lowest in the AA genotype, with a 19% decrease compared to the CC and CT genotypes and a 19% decrease compared to the VA and VV genotypes. Q10 levels were highest in the AA, VA, and VV genotypes, with no significant differences among them. Carnosine

concentrations were highest in the AA genotype, with a 4% increase compared to the VA genotype and a 10% increase compared to the VV genotype. Anserine levels were highest in the VV genotype, showing a 13% increase compared to the AA genotype and a 13% increase compared to the VA genotype (Figure 2).

The correlation analysis conducted for taurine, Q10, carnosine, and anserine concentrations with respect to the *DGAT1*, *LEP*, and *SCD1* genes provides insights into the relationships between these biomarkers and genetic variations (Table 2). For *DGAT1*, the correlations with taurine, Q10, carnosine, and anserine were negative but not statistically significant, with values of  $-0.055$ ,  $-0.078$ ,  $-0.051$ , and  $-0.062$ , respectively. This indicates a lack of a strong linear relationship between *DGAT1* gene variations and these biomarkers. In contrast, for the *LEP* gene, significant negative correlations were observed. Taurine showed a strong negative correlation of  $-0.578$ , which is significant at the 0.01 level, suggesting a notable inverse relationship between *LEP* and taurine concentrations. Similarly, Q10 had a significant negative correlation of  $-0.411$  at the 0.05 level, indicating a moderate inverse relationship. Carnosine and anserine also exhibited negative correlations with *LEP*, with values of  $-0.278$  and  $-0.514$ , respectively. The correlation for carnosine is significant at the 0.05 level, while anserine's correlation is significant at the 0.01 level, both indicating substantial inverse relationships. For the *SCD1* gene, the correlations with taurine, Q10, carnosine, and anserine were all negative but not statistically significant, with values of  $-0.024$ ,  $-0.037$ ,  $-0.025$ , and  $-0.014$ , respectively. These correlations suggest a weak inverse relationship between *SCD1* gene variations and the biomarker concentrations (Table 2).

**Table 2.** Correlation coefficients between bioactive proteins and genetic variants of *DGAT1*, *LEP*, and *SCD1* in Hereford bulls.

	<i>DGAT1</i>	<i>LEP</i>	<i>SCD1</i>
Taurine	$-0.055$	$-0.578^{**}$	$-0.024$
Coenzyme Q10	$-0.078$	$-0.411^{*}$	$-0.037$
Carnosine	$-0.051$	$-0.278^{*}$	$-0.025$
Anserine	$-0.062$	$-0.514^{**}$	$-0.014$

*LEP*—leptin, *DGAT1*—diacylglycerol O-acyltransferase; *SCD1*—Stearoyl-CoA desaturase \*\* Correlation significant at a level of 0.01 (two-sided). \* Correlation significant at a level of 0.05 (two-sided).

#### 4. Discussion

##### *DGAT1* Gene

The TT genotype of the *DGAT1* gene is associated with significantly elevated malondialdehyde MDA levels, showing a 15% increase compared to the CC genotype and a 26% increase compared to the CT genotype. *DGAT1* polymorphisms are closely linked to variations in lipid metabolism and oxidative stress markers [28,29]. The *DGAT1* gene encodes the enzyme diacylglycerol O-acyltransferase 1, which plays a crucial role in triglyceride synthesis by catalyzing the final step in the conversion of diacylglycerol (DAG) to triglycerides [30,31]. Variations in this gene, particularly the TT genotype, have been associated with altered lipid profiles, including increased triglyceride levels, which can contribute to the generation of reactive oxygen species ROS and subsequent oxidative stress [28]. Oxidative stress markers such as MDA, a byproduct of lipid peroxidation [32], are elevated in certain *DGAT1* genotypes, indicating higher levels of lipid oxidation. The TT genotype, for example, has been shown to have the highest MDA levels, suggesting a greater susceptibility to lipid peroxidation and oxidative damage. This increase in oxidative stress can trigger the compensatory upregulation of antioxidant enzymes such as GluRed and GPx, which are also observed to be elevated in the TT genotype. These findings suggest that *DGAT1* polymorphisms not only influence lipid metabolism by affecting triglyceride synthesis and storage, but also modulate the oxidative stress response in cells, highlighting the interconnectedness of lipid metabolism and oxidative stress in the context of this gene.



A bioactive compound analysis revealed that the taurine, carnosine, and anserine concentrations were highest in the TT genotype. Taurine levels were elevated by 38% compared to both the CC and CT genotypes, while the carnosine and anserine levels were 8% and 26% higher, respectively, in the TT genotype compared to the CC genotype. These bioactive compounds are known for their roles in reducing oxidative stress and enhancing muscle function [33], which may contribute to the adaptive responses observed in TT animals under oxidative stress conditions [9]. The lack of variation in coenzyme Q10 levels across *DGAT1* genotypes aligns with earlier research, suggesting that Q10 biosynthesis and regulation are relatively unaffected by *DGAT1* polymorphisms.

The observed variations in oxidative stress markers and bioactive proteins across different *DGAT1* genotypes can be linked to the enzymatic role of *DGAT1* in lipid metabolism and its impact on oxidative stress and inflammation. *DGAT1* catalyzes the final step in triglyceride synthesis, and its activity influences the accumulation of triglycerides, which in turn affects the cellular response to fatty acids (FAs). Notably, *DGAT1* has been shown to prefer monounsaturated fatty acids, such as oleoyl-CoA (18:1), over saturated fatty acids like palmitoyl-CoA [34]. This substrate preference suggests that *DGAT1* helps to protect cells from the toxic effects of excess FAs by incorporating them into triglycerides, thereby reducing the availability of free FAs that could lead to oxidative stress [35,36]. The protective role of *DGAT1* against inflammation is supported by evidence showing that transgenic MCK-*Dgat1* mice, when fed a high-fat diet, exhibit a reduced phosphorylation of JNK1 (p-JNK), a key component of inflammatory activation in skeletal muscle [37]. Similar protective effects have been observed with liver-specific overexpression of DGAT2, which induced hepatic steatosis without activating inflammatory markers such as p-JNK and p-NFκB, as seen in high-fat diet-induced steatosis [38]. Conversely, the chronic suppression of DGAT2 expression using a DGAT2-specific antisense oligonucleotide (ASO) has been associated with increased levels of ALT, a marker of hepatic inflammation, in mice with diet-induced hepatic steatosis [39]. These findings underscore the dual role of DGAT enzymes in managing both lipid metabolism and inflammation.

#### *LEP* Gene

Superoxide dismutase is a crucial antioxidant enzyme, categorized under oxidoreductases, which rely on metal cofactors at their catalytic core to neutralize oxidative stress [40,41]. SOD enzymes are widespread across various cellular compartments and play a pivotal role as the first line of defence against oxidative stress by catalyzing the conversion of superoxide anions ( $O_2^{\bullet-}$ ) into molecular oxygen ( $O_2$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), the latter of which requires further detoxification [42]. The different types of SOD enzymes are distinguished by the metal ion cofactor in their active site, detailed as follows: Fe-SODs are generally located in the chloroplasts of plants and prokaryotes, Mn-SODs are found in the mitochondria and peroxisomes of both eukaryotes and prokaryotes, and Cu/Zn-SODs are predominantly found in the cytosol and extracellular spaces of eukaryotic cells [43]. In the context of the *LEP* gene, the observed elevation in malondialdehyde (MDA) levels in the CC genotype suggests a link between this genotype and increased oxidative stress [44]. The increase in oxidative markers, particularly MDA levels, is counterbalanced by heightened GPx activity in the CC genotype, indicating a robust antioxidant response in these animals. Furthermore, SOD activity was significantly higher in the CT genotype, exhibiting a 24% increase over the CC genotype and a 14% increase compared to the TT genotype. This finding suggests a genotype-dependent regulation of SOD that may operate independently of lipid peroxidation levels, as indicated by the MDA data. This underscores the complexity of antioxidant responses and the potential for distinct genetic influences on oxidative stress management among different genotypes [45]. The highest total antioxidant status (TAS) in the TT genotype further supports the idea of a genotype-specific antioxidant capacity, with the TT genotype demonstrating a 24% increase over the CC genotype and a 9% increase over the CT genotype, indicating a possible correlation between TAS and genotype-specific antioxidant mechanisms. This distinct regulation of SOD and overall antioxidant capacity across genotypes may be attributed to the differential localization and

activity of SOD isoforms, with Cu/Zn-SOD (SOD1) in the cytosol, Mn-SOD (SOD2) in the mitochondria, and Cu/Zn-SOD (SOD3) in extracellular tissues, each contributing uniquely to the oxidative stress response in a genotype-dependent manner [46]. Understanding these variations could shed light on the underlying genetic mechanisms governing oxidative stress and antioxidant defences in livestock.

Bioactive compound levels associated with the *LEP* gene indicate that taurine levels remained stable across CC and CT genotypes but were slightly lower in the TT genotype. Carnosine levels were highest in the CC genotype, showing a 6% increase compared to the TT genotype, while anserine concentrations were highest in the TT genotype, with a 24% increase over the CC genotype and a 27% increase over the CT genotype. This suggests that the TT genotype may favour the accumulation of specific bioactive compounds such as anserine, which may play a role in modulating the oxidative stress response [47].

#### *SCD1* Gene

The *SCD1* gene plays a critical role in lipid metabolism, particularly in the biosynthesis of monounsaturated fatty acids (MUFAs) from saturated fatty acids [48–50]. The observed variations in oxidative stress markers and antioxidant enzyme activities among different *SCD1* genotypes highlight the gene's influence on oxidative stress regulation and antioxidant defence mechanisms. The VA genotype's association with the highest MDA levels suggests that this genotype may be more susceptible to lipid peroxidation compared to the AA and VV genotypes. MDA is a well-known marker of oxidative stress, particularly reflecting the extent of lipid peroxidation, which indicates cellular damage due to reactive oxygen species. The significant decrease in MDA levels observed in the VV genotype, compared to both the AA and VA genotypes, implies that the VV genotype might provide a protective effect against lipid peroxidation. This protection could be attributed to differences in the *SCD1* enzyme activity or the expression levels of other genes involved in lipid metabolism and ROS detoxification [51].

The AA genotype, which demonstrated the highest activities of GluRed, GPx, and SOD, suggests a robust and potentially more effective antioxidant defence system in this genotype. The elevated GluRed activity in the AA genotype, 18% higher than in the VA genotype and 50% higher than in the VV genotype, indicates a greater capacity for maintaining reduced glutathione (GSH) levels, a critical component of cellular antioxidant defences. Similarly, the highest GPx activity in the AA genotype suggests an enhanced ability to reduce hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) to water, thus preventing the accumulation of this potentially harmful ROS.

The SOD activity, which was 35% higher in the AA genotype compared to the VA genotype and 38% higher than in the VV genotype, further supports the notion of a more robust antioxidative response in the AA genotype. SOD is the first line of defence against superoxide radicals, catalyzing their conversion into hydrogen peroxide, which is subsequently reduced by GPx [52]. Therefore, the combined high activities of SOD, GPx, and GluRed in the AA genotype suggest a coordinated and efficient system for managing oxidative stress.

Total antioxidant status was also highest in the AA genotype, with a 9% increase over the VA genotype and a substantial 59% increase compared to the VV genotype. TAS reflects the cumulative action of all antioxidants present in the plasma and body fluids, indicating the overall capacity to neutralize free radicals [9]. The higher TAS in the AA genotype suggests that this genotype may have an enhanced overall ability to counteract oxidative stress, potentially due to the combined effects of increased antioxidant enzyme activities and possibly higher levels of non-enzymatic antioxidants.

These findings underscore the importance of the *SCD1* gene in modulating oxidative stress and antioxidant defences. The differential expression and activity of antioxidant enzymes across the *SCD1* genotypes could be a reflection of the gene's influence on cellular redox homeostasis. The AA genotype, with its superior antioxidant enzyme activities and higher TAS, may confer a greater resilience against oxidative stress, potentially offering a protective advantage in conditions where oxidative stress is a significant factor. Conversely,

the VA genotype's higher MDA levels suggest a vulnerability to lipid peroxidation, which could have implications for the susceptibility of individuals with this genotype to oxidative stress-related conditions. Understanding these genotype-specific differences in antioxidant defences could inform breeding strategies aimed at enhancing oxidative stress resistance in livestock.

Regarding bioactive compounds, the AA genotype had the lowest taurine levels, with a 19% decrease compared to the CC and CT genotypes, and a 19% decrease compared to the VA and VV genotypes. Carnosine levels were highest in the AA genotype, showing a 4% increase compared to the VA genotype and a 10% increase compared to the VV genotype. Anserine levels were highest in the VV genotype, with a 13% increase compared to the AA and VA genotypes, indicating that the VV genotype may have a distinct metabolic profile favouring the accumulation of anserine.

## 5. Conclusions

The analysis of *DGAT1*, *LEP*, and *SCD1* gene polymorphisms reveals significant insights into how these genetic variations influence lipid metabolism, oxidative stress, and antioxidant enzyme activity.

**DGAT1 Gene:** The TT genotype of *DGAT1* is associated with significantly higher levels of MDA, indicating increased lipid peroxidation and oxidative damage. This suggests that individuals with the TT genotype might be more susceptible to oxidative stress. This susceptibility is likely counteracted by an upregulation of antioxidant enzymes such as GluRed and GPx. The elevated levels of taurine, carnosine, and anserine in the TT genotype indicate adaptive mechanisms that help mitigate oxidative stress, suggesting a protective role for these bioactive compounds under oxidative conditions.

**LEP Gene:** For the *LEP* gene, the CC genotype is associated with the highest levels of MDA, indicating increased oxidative stress. Despite this, the higher activity of GPx and SOD in the CC genotype suggests a robust antioxidant response. Interestingly, SOD activity was highest in the CT genotype, while TAS was highest in the TT genotype. These variations imply that different *LEP* genotypes may regulate antioxidant responses differently, independent of MDA levels, potentially due to differences in the localization and activity of SOD isoforms.

**SCD1 Gene:** The AA genotype of *SCD1* exhibits the highest activities of GluRed, GPx, and SOD, suggesting a more effective antioxidant defence system. The elevated activities of these enzymes in the AA genotype indicate a stronger capacity for managing oxidative stress. In contrast, the VA genotype shows the highest MDA levels, indicating a greater susceptibility to lipid peroxidation, while the VV genotype appears to offer some protection against oxidative damage, as reflected by lower MDA levels.

This study underscores the importance of researching oxidative stress in livestock, which occurs from an imbalance between reactive oxygen species and antioxidant defences. Identifying genetic variations affecting antioxidant enzyme activity, such as glutathione peroxidase and superoxide dismutase, is vital for breeding programmes aimed at improving oxidative stress resistance and enhancing livestock resilience.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom14101309/s1>, Table S1: Characteristics of the bulls participating in the experiment. Table S2: Ingredients and chemical composition of transition and finishing rations fed in the finishing stage.

**Author Contributions:** Conceptualization, K.P. and T.S.; methodology, K.P., T.S. and P.K.; software, M.G.; validation, J.S.; formal analysis, K.P., P.K., M.Z., E.B. and B.Ż.; investigation, P.K.; resources, E.B.; data curation, K.P.; writing—original draft preparation, P.K., K.P. and M.Z. writing—review and editing, P.K. and K.P.; visualization, P.K.; supervision, T.S.; project administration, K.P.; funding acquisition, T.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** SusAn: an ERA-Net co-funded under European Union's Horizon 2020 research, No. 696231, and the National Center for Research and Development, Poland.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Second Ethics Committee for Animal Experimentation in Warsaw (protocol number WAWA2/086/2018; March 2018).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data generated or analyzed during the study are included in this published article. The datasets used and/or analyzed in the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Acknowledgments:** The paper is a part of the Ph.D. thesis of Piotr Kostusiak.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Van der Lende, T.; Te Pas, M.; Veerkamp, R.; Liefers, S. Leptin gene polymorphisms and their phenotypic associations. *Vitamins Horm.* **2005**, *71*, 373–404.
2. Dubey, P.; Sharma, A.; Kumar, D. Leptin gene and its role in cattle—A review. *Agric. Rev.* **2007**, *28*, 207–215.
3. Schenkel, F.; Miller, S.; Ye, X.; Moore, S.; Nkrumah, J.; Li, C.; Yu, J.; Mandell, I.; Wilton, J.; Williams, J. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* **2005**, *83*, 2009–2020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zalewska, M.; Puppel, K.; Sakowski, T. Associations between gene polymorphisms and selected meat traits in cattle—A review. *Anim. Biosci.* **2021**, *34*, 1425. [[CrossRef](#)]
5. Trakovicka, A.; Vavrišinova, K.; Gabor, M.; Miluchova, M.; Kasarda, R.; Moravčikova, N. The impact of diacylglycerol O-acyltransferase 1 gene polymorphism on carcass traits in cattle. *J. Cent. Eur. Agric.* **2019**, *20*, 12–18. [[CrossRef](#)]
6. Gu, M.; Cosenza, G.; Iannaccone, M.; Macciotta, N.; Guo, Y.; Di Stasio, L.; Pauciuolo, A. The single nucleotide polymorphism g.133A > C in the stearyl CoA desaturase gene (SCD) promoter affects gene expression and qualitative properties of river buffalo milk. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 442–451. [[CrossRef](#)]
7. Kostusiak, P.; Bagnicka, E.; Żelazowska, B.; Zalewska, M.; Sakowski, T.; Slósarz, J.; Gołębiewski, M.; Puppel, K. Genetic Markers Related to Meat Quality Properties in Fattened HF and HF × Charolaise Steers. *Genes* **2024**, *15*, 843. [[CrossRef](#)]
8. Robinson, P.K. Enzymes: Principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* **2015**, *59*, 1–14. [[CrossRef](#)]
9. Puppel, K.; Kapusta, A.; Kuczyńska, B. The etiology of oxidative stress in the various species of animals, a review. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 2179–2184. [[CrossRef](#)]
10. Puppel, K.; Slósarz, J.; Grodkowski, G.; Solarczyk, P.; Kostusiak, P.; Kunowska-Slósarz, M.; Grodkowska, K.; Zalewska, A.; Kuczyńska, B.; Gołębiewski, M. Comparison of enzyme activity in order to describe the metabolic profile of dairy cows during early lactation. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9771. [[CrossRef](#)]
11. Ayemele, A.G.; Tilahun, M.; Lingling, S.; Elsaadawy, S.A.; Guo, Z.; Zhao, G.; Xu, J.; Bu, D. Oxidative stress in dairy cows: Insights into the mechanistic mode of actions and mitigating strategies. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Jomova, K.; Raptova, R.; Alomar, S.Y.; Alwasel, S.H.; Nepovimova, E.; Kuca, K.; Valko, M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. *Arch. Toxicol.* **2023**, *97*, 2499–2574. [[PubMed](#)]
13. Zheng, M.; Liu, Y.; Zhang, G.; Yang, Z.; Xu, W.; Chen, Q. The applications and mechanisms of superoxide dismutase in medicine, food, and cosmetics. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Pei, J.; Pan, X.; Wei, G.; Hua, Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxiation. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1147414. [[CrossRef](#)]
15. Couto, N.; Wood, J.; Barber, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *95*, 27–42. [[CrossRef](#)]
16. Bhattacharyya, A.; Chattopadhyay, R.; Mitra, S.; Crowe, S.E. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 329–354. [[CrossRef](#)]
17. Jukić, I.; Kolobarić, N.; Stupin, A.; Matić, A.; Kozina, N.; Mihaljević, Z.; Mihalj, M.; Šušnjara, P.; Stupin, M.; Ćurić, Ž.B. Carnosine, small but mighty—Prospect of use as functional ingredient for functional food formulation. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1037. [[CrossRef](#)]
18. Ma, H.; Zhao, J.; Meng, H.; Hu, D.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Wang, C.; Li, J.; Yuan, J.; Wei, Y. Carnosine-modified fullerene as a highly enhanced ROS scavenger for mitigating acute oxidative stress. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 16104–16113. [[CrossRef](#)]
19. Bellia, F.; Vecchio, G.; Cuzzocrea, S.; Calabrese, V.; Rizzarelli, E. Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases. *Mol. Aspects Med.* **2011**, *32*, 258–266. [[CrossRef](#)]
20. Vistoli, G.; Straniero, V.; Pedretti, A.; Fumagalli, L.; Bolchi, C.; Pallavicini, M.; Valoti, E.; Testa, B. Predicting the physicochemical profile of diastereoisomeric histidine-containing dipeptides by property space analysis. *Chirality* **2012**, *24*, 566–576. [[CrossRef](#)]
21. Xing, L.; Chee, M.E.; Zhang, H.; Zhang, W.; Mine, Y. Carnosine—A natural bioactive dipeptide: Bioaccessibility, bioavailability and health benefits. *J. Food Bioact.* **2019**, *5*, 8–17. [[CrossRef](#)]
22. Wu, G. Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health. *Amino Acids* **2020**, *52*, 329–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



23. Ponnampalam, E.N.; Kiani, A.; Santhiravel, S.; Holman, B.W.; Lauridsen, C.; Dunshea, F.R. The importance of dietary antioxidants on oxidative stress, meat and milk production, and their preservative aspects in farm animals: Antioxidant action, animal health, and product quality—Invited review. *Animals* **2022**, *12*, 3279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Łukasiewicz, M.; Puppel, K.; Słószarz, J.; Gołębiewski, M.; Kuczyńska, B.; Batorska, M.; Więcek, J.; Kunowska-Słószarz, M.; Popczyk, B.; Balcerak, M. Influence of age and sex on the content of bioactive peptides and the fatty acid profile of venison (*Cervus elaphus*). *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2018**, *36*, 371–381.
25. Bartoň, L.; Kott, T.; Bureš, D.; Řehák, D.; Zahradkova, R.; Kottova, B. The polymorphisms of stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) and sterol regulatory element binding protein-1 (*SREBP-1*) genes and their association with the fatty acid profile of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Sci.* **2010**, *85*, 15–20. [[CrossRef](#)]
26. Buchanan, F.C.; Fitzsimmons, C.J.; Van Kessel, A.G.; Thue, T.D.; Winkelman-Sim, D.C.; Schmutz, S.M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet. Sel. Evol.* **2002**, *34*, 105–116. [[CrossRef](#)]
27. Thaller, G.; Kühn, C.; Winter, A.; Ewald, G.; Bellmann, O.; Wegner, J.; Zühlke, H.; Fries, R. *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim. Genet.* **2003**, *34*, 354–357. [[CrossRef](#)]
28. Yen, C.-L.E.; Stone, S.J.; Koliwad, S.; Harris, C.; Farese, R.V. Thematic review series: Glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 2283–2301. [[CrossRef](#)]
29. Kostusiak, P.; Słószarz, J.; Gołębiewski, M.; Grodkowski, G.; Puppel, K. Polymorphism of genes and their impact on beef quality. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2023**, *45*, 4749–4762. [[CrossRef](#)]
30. Chang, C.; Huh, H.Y.; Cadigan, K.M.; Chang, T.Y. Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A: Cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* **1993**, *268*, 20747–20755. [[CrossRef](#)]
31. Oelkers, P.; Behari, A.; Cromley, D.; Billheimer, J.T.; Sturley, S.L. Characterization of two human genes encoding acyl coenzyme A: Cholesterol acyltransferase-related enzymes. *J. Cell Biol.* **1998**, *273*, 26765–26771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ayala, A.; Muñoz, M.F.; Argüelles, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 360438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sun, J.; Guo, F.; Ran, J.; Wu, H.; Li, Y.; Wang, M.; Wang, X. Bibliometric and Visual Analysis of Global Research on Taurine, Creatine, Carnosine, and Anserine with Metabolic Syndrome: From 1992 to 2022. *Nutrients* **2023**, *15*, 3374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cases, S.; Stone, S.J.; Zhou, P.; Yen, E.; Tow, B.; Lardizabal, K.D.; Voelker, T.; Farese, R.V. Cloning of *DGAT2*, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J. Cell Biol.* **2001**, *276*, 38870–38876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Deng, B.; Kong, W.; Shen, X.; Han, C.; Zhao, Z.; Chen, S.; Zhou, C.; Bae-Jump, V. The role of *DGAT1* and *DGAT2* in regulating tumor cell growth and their potential clinical implications. *J. Transl. Med.* **2024**, *22*, 290. [[CrossRef](#)]
36. Sharma, A.K.; Khandelwal, R.; Wolfrum, C. Futile lipid cycling: From biochemistry to physiology. *Nat. Metab.* **2024**, *6*, 808–824. [[CrossRef](#)]
37. Liu, L.; Zhang, Y.; Chen, N.; Shi, X.; Tsang, B.; Yu, Y.-H. Upregulation of myocellular *DGAT1* augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 1679–1689. [[CrossRef](#)]
38. Monetti, M.; Levin, M.C.; Watt, M.J.; Sajan, M.P.; Marmor, S.; Hubbard, B.K.; Stevens, R.D.; Bain, J.R.; Newgard, C.B.; Farese, R.V. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing *DGAT* in the liver. *Cell Metab.* **2007**, *6*, 69–78. [[CrossRef](#)]
39. Yamaguchi, K.; Yang, L.; McCall, S.; Huang, J.; Yu, X.X.; Pandey, S.K.; Bhanot, S.; Monia, B.P.; Li, Y.X.; Diehl, A.M. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2007**, *45*, 1366–1374. [[CrossRef](#)]
40. Chidambaram, S.B.; Anand, N.; Varma, S.R.; Ramamurthy, S.; Vichitra, C.; Sharma, A.; Mahalakshmi, A.M.; Essa, M.M. Superoxide dismutase and neurological disorders. *IBRO Neurosci. Rep.* **2024**, *16*, 373–394. [[CrossRef](#)]
41. Ighodaro, O.; Akinloye, O. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex. J. Med.* **2018**, *54*, 287–293. [[CrossRef](#)]
42. Islam, M.N.; Rauf, A.; Fahad, F.I.; Emran, T.B.; Mitra, S.; Olatunde, A.; Shariati, M.A.; Rebezov, M.; Rengasamy, K.R.; Mubarak, M.S. Superoxide dismutase: An updated review on its health benefits and industrial applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 7282–7300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Azadmanesh, J.; Borgstahl, G.E. A review of the catalytic mechanism of human manganese superoxide dismutase. *Antioxidants* **2018**, *7*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kostusiak, P.; Słószarz, J.; Gołębiewski, M.; Sakowski, T.; Puppel, K. Relationship between Beef Quality and Bull Breed. *Animals* **2023**, *13*, 2603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Saed-Moucheshi, A.; Sohrabi, F.; Fasihfar, E.; Baniasadi, F.; Riasat, M.; Mozafari, A.A. Superoxide dismutase (SOD) as a selection criterion for triticale grain yield under drought stress: A comprehensive study on genomics and expression profiling, bioinformatics, heritability, and phenotypic variability. *BMC Plant Biol.* **2021**, *21*, 1–19. [[CrossRef](#)]
46. Schatzman, S.S.; Peterson, R.L.; Teka, M.; He, B.; Cabelli, D.E.; Cormack, B.P.; Culotta, V.C. Copper-only superoxide dismutase enzymes and iron starvation stress in *Candida* fungal pathogens. *J. Cell Biol.* **2020**, *295*, 570–583. [[CrossRef](#)]
47. Chen, M.; Luo, J.; Ji, H.; Song, W.; Zhang, D.; Su, W.; Liu, S. The Preventive Mechanism of Anserine on Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Liver Injury in L-02 Cells via Regulating the Keap1-Nrf2 and JNK-Caspase-3 Signaling Pathways. *Mar. Drugs* **2023**, *21*, 477. [[CrossRef](#)]

48. Dobrzyn, P.; Jazurek, M.; Dobrzyn, A. Stearoyl-CoA desaturase and insulin signaling—What is the molecular switch? *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2010**, *1797*, 1189–1194. [[CrossRef](#)]
49. Liu, R.; Fang, X.; Lu, X.; Liu, Y.; Li, Y.; Bai, X.; Ding, X.; Yang, R. Polymorphisms of the *SCD1* Gene and Its Association Analysis with Carcass, Meat Quality, Adipogenic Traits, Fatty Acid Composition, and Milk Production Traits in Cattle. *Animals* **2024**, *14*, 1759. [[CrossRef](#)]
50. Kim, H.J.; Sharma, A.; Lee, S.H.; Lee, D.H.; Lim, D.J.; Cho, Y.M.; Yang, B.S.; Lee, S.H. Genetic association of *PLAG1*, *SCD*, *CYP7B1* and *FASN* SNPs and their effects on carcass weight, intramuscular fat and fatty acid composition in Hanwoo steers (Korean cattle). *Anim. Genet.* **2017**, *48*, 251–252. [[CrossRef](#)]
51. Sun, Q.; Xing, X.; Wang, H.; Wan, K.; Fan, R.; Liu, C.; Wang, Y.; Wu, W.; Wang, Y.; Wang, R. *SCD1* is the critical signaling hub to mediate metabolic diseases: Mechanism and the development of its inhibitors. *Biomed. Pharmacother.* **2024**, *170*, 115586. [[CrossRef](#)]
52. Wang, Y.; Branicky, R.; Noë, A.; Hekimi, S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 1915–1928. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Warszawa, dn. 04.11.2024

Mgr inż. Piotr Kostusiak  
Katedra Hodowli Zwierząt  
Instytut Nauk o Zwierzętach  
piotr\_kostusiak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak P, Bagnicka E, Żelazowska B, Zalewska M, Sakowski T, Słószarz J, Gołębiewski M, Puppel K. Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with DGAT1, LEP, and SCD1 Genes. *Biomolecules*, 2024, 14, 1309.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; opracowania metodologii, analizie wyników, przeglądu literatury, przygotowaniu manuskryptu, odpowiedzi na recenzje, co stanowi 50 % pracy.

Podpis

*Piotr Kostusiak*

Warszawa, dn. 04.11.2024

Dr Jan Słószarz

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

jan\_slosarz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

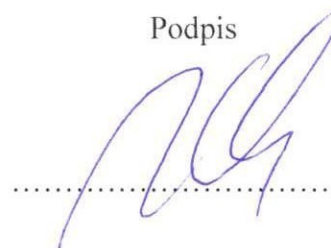
### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak P, Bagnicka E, Żelazowska B, Zalewska M, Sakowski T, Słószarz J, Gołębiowski M, Puppel K. Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with DGAT1, LEP, and SCD1 Genes. *Biomolecules*, 2024, 14, 1309.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; przeglądu literatury, walidacji i analizie wyników, co stanowi 5 % pracy.

Podpis





Warszawa, dn. 04.11.2024

Dr hab. Kamila Puppel, prof. SGGW

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

kamila\_puppel@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

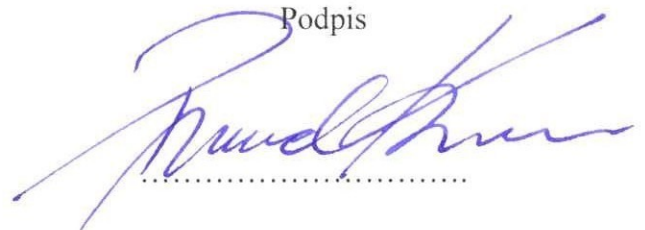
**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak P, Bagnicka E, Żelazowska B, Zalewska M, Sakowski T, Slószarz J, Gołębiowski M, Puppel K. Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with DGAT1, LEP, and SCD1 Genes. *Biomolecules*, 2024, 14, 1309.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; konceptualizacji, opracowaniu metodologii, przeglądu literatury, przygotowaniu manuskryptu, pozyskaniu finansowania badań, co stanowi 20 % pracy.

Podpis



Warszawa, dn. 04.11.2024

Dr hab. Marcin Gołębiewski, prof. SGGW

Katedra Hodowli Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

marcin\_golebiewski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak P, Bagnicka E, Żelazowska B, Zalewska M, Sakowski T, Slószarz J, Gołębiewski M, Puppel K. Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with DGAT1, LEP, and SCD1 Genes. *Biomolecules*, 2024, 14, 1309.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; obsługi oprogramowania do odczytu i analizy wyników badań, co stanowi 5 % pracy

Podpis



Warszawa, dn. 04.11.2024

Beata Żelazowska

Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki

Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt

Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

b.zelazowska@igbzpan.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

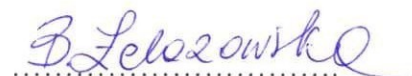
### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak P, Bagnicka E, Żelazowska B, Zalewska M, Sakowski T, Slószarz J, Gołębiewski M, Puppel K. Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with DGAT1, LEP, and SCD1 Genes. *Biomolecules*, 2024, 14, 1309.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; analizy wyników, co stanowi 5 % pracy.

Podpis



Warszawa, dn. 04.11.2024

Prof. dr hab. Tomasz Sakowski  
Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki  
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu  
t.sakowski@igbzpan.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak P, Bagnicka E, Żelazowska B, Zalewska M, Sakowski T, Słószarz J, Gołębiowski M, Puppel K. Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with DGAT1, LEP, and SCD1 Genes. *Biomolecules*, 2024, 14, 1309.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; konceptualizacji, opracowaniu metodologii, pozyskaniu finansowania badań, co stanowi 5 % pracy.

Podpis

  
.....

Warszawa, dn. 04.11.2024

Prof. dr hab. Emilia Bagnicka  
Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki  
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu  
e.bagnicka@igbzpan.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak P, Bagnicka E, Żelazowska B, Zalewska M, Sakowski T, Słószarz J, Gołębiowski M, Puppel K. Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with DGAT1, LEP, and SCD1 Genes. *Biomolecules*, 2024, 14, 1309.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; analizie wyników i przygotowaniu manuskryptu, co stanowi 5 % pracy.

Podpis



Warszawa, dn. 04.11.2024

Dr inż. Magdalena Zalewska

Zakład Fizjologii Bakterii

Wydział Biologii

Uniwersytet Warszawski

mm.zalewska10@uw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Kostusiak P, Bagnicka E, Żelazowska B, Zalewska M, Sakowski T, Słószarz J, Gołębiowski M, Puppel K. Genotype-Dependent Variations in Oxidative Stress Markers and Bioactive Proteins in Hereford Bulls: Associations with DGAT1, LEP, and SCD1 Genes. *Biomolecules*, 2024, 14, 1309.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu; analizy wyników, przeglądzie literatury, przygotowaniu manuskryptu, odpowiedzi na recenzje, co stanowi 5 % pracy.

Podpis

*Magdalena Zalewska*