

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **232995**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **415721**

(22) Data zgłoszenia: **11.01.2016**

(51) Int.Cl.

A23B 4/22 (2006.01)

A23L 3/36 (2006.01)

A23L 3/54 (2006.01)

A23L 3/015 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

(54) **Sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpeli
pozostającej po marynowaniu śledzi**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
17.07.2017 BUP 15/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.08.2019 WUP 08/19

(73) Uprawniony z patentu:

**ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET
TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE,
Szczecin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

MARIUSZ SZYMCZAK, Goleniów, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Renata Zawadzka

PL 232995 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi. Kąpiel taka może być wykorzystana ponownie np. do marynowania śledzi.

Marynaty śledziowe są bardzo popularne w Europie oraz innych krajach na świecie. Przemysł rybny i mięsny ma problemy z prawidłowym dojrzewaniem i jakością sensoryczną ryb marynowanych, ryb solonych oraz produktów mięsnych dojrzewających. Dojrzewanie mięsa oparte jest głównie na proteolizie białek i skutkuje obniżeniem twardości tekstury przy jednoczesnym wzroście zawartości produktów hydrolizy białka (PHB). Aby przyspieszyć dojrzewanie i poprawić jakość gotowych produktów obecnie stosuje się dodatek m.in. preparatów enzymatycznych pochodzenia zwierzęcego, roślinnego, lecz najczęściej mikrobiologicznego. Enzymy te są niespecyficzne dla omawianego surowca, dlatego hydrolizują białka w sposób nie zapewniający właściwej jakości produktu, a ponadto mogą generować peptydy powodujące alergię. Dlatego przemysł poszukuje źródła naturalnych enzymów, jakimi są katepsyny występujące naturalnie w dużych ilościach np. w tkance mięśniowej. Jednakże ze względu na ograniczenia ilościowe i cenowe tego typu surowca, preparaty katepsyn są zbyt drogie, aby opłacało się je stosować w przemyśle rybnym.

W publikacji Szymczak, M. & Kołakowski, E. (2012). *Losses of nitrogen fractions from herring to brine during marinating. Food Chemistry, 132(1), 237–243* wykazano, że podczas marynowania z mięsa śledzi do kąpieli dyfundują o PHB. W publikacji Szymczak, M. & Lepczyński A. (2016). *Occurrence of aspartyl proteases in brine after herring marinating. Food Chemistry, 194, 470–475* wykazano, że oprócz PHB podczas marynowania z mięsa śledzi do kąpieli dyfundują również aktywne katepsyny w formie rozpuszczonej. Straty katepsyn aspartylowych i cysteinowych obniżają aktywność proteolityczną w dojrzewającym mięsie, niekorzystnie zmieniając skład ilościowy i jakościowy produktów hydrolizy białka w półprodukcie marynat oraz w gotowych marynatach.

Lizosomy są to organelle zawierające liczne enzymy hydrolityczne, co zostało opisane w publikacji Voet, D. and Voet, J.G. 1990 *Biochemistry. John Wiley & Sons, New York*. Katepsyna D, kwasna fosfataza, β -glukuronidaza i β -N-acetyl-glukozaminidaza powszechnie uznawane są za markery lizosomów (Karvinen, V.P., Bamford, D.H., & Granroth, B. 1982. *Changes in muscle subcellular fractions of Baltic herring (Clupea harengus membras) during cold and frozen storage. J. Sci. Food Agric. 33: 763*; Ueno R., Liston J., & Horiguchi Y. 1986. *Intracellular distribution of enzymes and particle properties of lysosomes in mackerel muscle tissue. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 52(5), 895–900*). Z publikacji znane jest zwiększanie aktywności proteolitycznej mięsa poprzez jego tzw. powolne zamrażanie-rozmrażanie, sonifikację lub zastosowanie wysokiego ciśnienia (McGann, L.E., Yang, H.Y., Walteson M. (1988). *Manifestations of cell damage after freezing and thawing. Cryobiology, 25(3):178–85*; Weiss, J., Kristbergsson, K., and Kjartansson, G.T. (2011). *Engineering food ingredients with high-intensity ultrasound, In: Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing (Eds. H. Feng, G.V. Barbosa-Cánovas, J. Weiss), Springer Science, New York, 239–285*).

Nieoczekiwanie okazało się, że w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi występują nie tylko rozpuszczone katepsyny, ale również lizosomy, w których obecne są enzymy odpowiedzialne za dojrzewanie mięsa, między innymi katepsyna D, która dominuje w ogólnej aktywności proteolitycznej zarówno we frakcji rozpuszczonych białek – enzymu oraz we frakcji lizosomalnej marynat. Enzym ten rozpoczyna proces dojrzewania, decyduje o teksturze oraz produkuje peptydy będące substratami dla innych proteaz.

Podczas badań zauważono, że aktywność proteolityczną w kąpieli można zwiększyć poprzez uszkodzenie błon lizosomów i uwolnienie enzymów stosując różne, dostępne powszechnie metody.

Pierwszy sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi, według wynalazku, charakteryzuje się tym, że kąpiel po usunięciu z niej tłuszczu i zawiesiny poddaje się co najmniej raz tak zwanemu powolnemu zamrażaniu, a następnie rozmrażaniu tak, aby utrzymać tak zwaną chłodniczą temperaturę (1–7°C) kąpieli. Powolne zamrażanie powinno odbywać się w temperaturze nie niższej niż -30°C, korzystnie w -18°C. Tłuszcz i zawiesinę usuwa się poprzez wirowanie lub filtrację. Korzystnie po zamrażaniu-rozmrażaniu usuwa się bakterie z kąpieli, na przykład, poddając kąpiel mikrofiltracji.

Drugi sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi, przez uszkodzenie błon występujących w niej lizosomów charakteryzuje się tym, że kąpiel po usunięciu z niej tłuszczu i zawiesiny poddaje się działaniu ultradźwięków o niskiej częstotliwości i dużej mocy

przez co najmniej 1–5 minut. Największą aktywność proteolityczną uzyskuje się jeśli po działaniu ultradźwiękami, kąpiel pozostawia się przez co najmniej 1 godzinę w temperaturze chłodniczej wynoszącej 1–7°C. Tłuszcz i zawiesinę usuwa się poprzez wirowanie lub filtrację. Korzystnie z kąpeli po sonifikacji usuwa się bakterie na przykład poddając kąpiel mikrofiltracji.

Jeszcze inny sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpeli pozostałej po marynowaniu śledzi, charakteryzuje się tym, że kąpiel po usunięciu z niej tłuszczu i zawiesiny poddaje się działaniu homogenizacji mechanicznej przez co najmniej 1 min., lecz nie dłużej niż 2 min. Homogenizację prowadzi się w temperaturze chłodniczej wynoszącej 1–7°C. Tłuszcz i zawiesinę usuwa się poprzez wirowanie lub filtrację. Korzystnie po homogenizacji mechanicznej usuwa się bakterie z kąpeli, na przykład poddając kąpiel mikrofiltracji.

Kolejny sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpeli pozostałej po marynowaniu śledzi, charakteryzuje się tym, że kąpiel po usunięciu z niej tłuszczu i zawiesiny poddaje się nanofiltracji na filtrach o tzw. zdolności rozdzielczej (cut-off) od 1 do 1000 kDa. Katepsyna D ma masę cząsteczkową ok. 40 kDa, zaś wszystkie katepsyny biorące udział w dojrzewaniu mięsa charakteryzują się masą w zakresie ok. 20–200 kDa. Stosunkowo mała porowatość filtra wymaga zastosowania dużego ciśnienia, aby możliwe było przepchnięcie cieczy przez filtr. Ciśnienie to uszkadza błony lizosomów uwalniając enzymy, które przechodzą do permeatu lub zostają w retencji, w zależności czy zastosowany cut-off ma odpowiednio większą lub mniejszą wartość od masy cząsteczkowej enzymu. W przypadku retentatu korzystnie po nanofiltracji usuwa się bakterie z kąpeli, na przykład poddając kąpiel mikrofiltracji, zaś w przypadku permeatu nie ma już takiej potrzeby.

Aktywność katepsyny D w kąpeli pozostałej po marynowaniu mrożonych-rozmrażanych śledzi atlantyckich rosła do 180% wraz z ilością cykli zamrażania-rozmrażania lub do 200% wraz z czasem sonifikacji (Rysunek 1). Wzrost aktywności katepsyny D pod wpływem zamrażania-rozmrażania był istotnie mniejszy niż pod wpływem sonifikacji. W pierwszym przypadku aktywność rosła liniowo, zaś w drugim logarytmicznie. Trzy cykle zamrażania-rozmrażania odpowiadały jednej minucie sonifikacji. Na wzrost aktywności katepsyny D miał również wpływ czas wykonanego pomiaru aktywności po sonifikacji. Aktywność proteolityczna zmierzona w tych samych próbach godzinę później była istotnie większa o 20–30 punktów procentowych. Wyniki pokazują, że wpływ sonifikacji i wielokrotnego zamrażania-rozmrażania jest inny na uszkodzenie błon lizosomów występujących w kąpeli. Wyniki nasze pokazują, że uwalnianie katepsyny D z lizosomów następuje również podczas mechanicznej homogenizacji kąpeli. Jednak wzrost aktywności katepsyny D stwierdzono tylko podczas pierwszych 2 min. procesu. Po 3 min homogenizacji aktywność zaczęła maleć i po 5 min. wynosiła 2/3 aktywności próby kontrolnej. Najprawdopodobniej wzrost aktywności był skutkiem zarówno mechanicznego uszkodzenia lizosomów oraz przez ultradźwięki powstające podczas szybko obracającego się noża homogenizatora. Z kolei spadek aktywności można wiązać z denaturacją białek – enzymu w wyniku intensywnie powstającej piany. W przypadku zastosowania nanofiltracji kąpeli użycie filtra o niższym parametrze cut-off bardziej przyczyniało się do zwiększenia aktywności katepsyny D. Największy wzrost aktywności do 244% wykazano w retencji 10 kDa, a najmniejszy 120% w retencji 100 kDa. Różnice te były spowodowane również przechodzeniem enzymu do permeatu, najbardziej w przypadku filtra 100 kDa.

Sposób według wynalazku przedstawiony jest w przykładach wykonania i na rysunku, na którym na wykresie przedstawiono wpływ wielokrotnego zamrażania-rozmrażania i wpływ działania ultradźwięków oraz czasu homogenizacji na aktywność katepsyny D w kąpeli pozostałej po marynowaniu mrożonych-rozmrożonych fileatów śledzia atlantyckiego.

P r z y k ł a d 1

Świeże oraz mrożone-rozmrażane filety ze śledzia bałtyckiego i atlantyckiego poddano marynowaniu metodą klasyczną powszechną w przemyśle rybnym. Po 7 dobach dojrzewania kąpiel oddzielono od ryby i poddano ją wirowaniu przy 4°C i 10000 x g przez 10 min. Otrzymany supernatant kąpeli poddano dezintegracji lizosomów poprzez cykl zamrażania i rozmrażania. W tym celu supernatant kąpeli w ilości 100 ml w szczelnych woreczkach składowano 60 min. w temperaturze -18°C w celu zamrożenia, po czym rozmrażano 30 min. przy 4–7°C. Cykl zamrażania i rozmrażania powtarzano do pięciu razy. Kąpiel po wielokrotnym zamrażaniu-rozmrażaniu poddano analizie na aktywności katepsyny D wobec specyficznego syntetycznego fluorogennego peptydu, zwanego dalej substratem. Aktywność katepsyny D+E i katepsyny E w próbach była mierzona z i bez pepstatyny A wobec substratów, odpowiednio: Mca-GKPILFFRLK(Dnp)-r-NH₂ i Mca-GSPAFLAK(Dnp)-r-NH₂. Fluorescencję mierzono w spektro-

fluorymetrze (Hitachi F7000, Japan) stosując wzbudzenie i emisję 328 i 393 nm. Aktywność katepsyny D obliczano z różnicy D+E do E. Jedną jednostkę aktywności proteazy zdefiniowano jako 1 nmol MCA uwolniony z 1 ml próby w ciągu 1 min. przy 37°C.

Przed cyklem zamrażania-rozmrażania kąpiel przesączono przez filtry 2.7, 0.6 i 0.3 µm i stwierdzono, że charakteryzuje się coraz mniejszą aktywnością katepsyny D pochodzenia lizosomalnego. Filtr 0.3 µm obniżył od 50 do 70% aktywność katepsyny D z lizosomów. Z kolei w kąpeli zamrażanej tzw. metodą szybką stosując -80°C nie wykazano wzrostu aktywności katepsyny D. Relatywną aktywność katepsyny D [%] przedstawiono w tabeli 1 oraz na rysunku.

Tabela 1

Kąpiel	Kąpiel zamrażana-rozmrażana	
	Filety świeże	Filety mrożone-rozmrażane
Kontrola	100	100
Supernatant	165.2	279.4
2.7 µm filtrat	149.1	248.1
0.6 µm filtrat	131.8	206.9
0.3 µm filtrat	125.6	194.6

Wielokrotne zamrażanie-rozmrażanie powodują/powoduje mniejszy przyrost aktywności proteolitycznej w kąpeli surowej (nieodwirowanej) niż w supernatancie, prawdopodobnie w wyniku łączenia się białek – enzymu z innymi białkami, lipidami i innymi związkami. Dlatego konieczne jest usunięcie tłuszczu i zawiesiny przed dezintegracją lizosomów czterema opisanymi metodami.

Przykład 2

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że kąpiel poddano działaniu ultradźwięków o częstotliwości 20 kHz i moc 70 W przez 2 minuty przy 4–7°C. Relatywną aktywność katepsyny D [%] przedstawiono w tabeli 2 oraz na rysunku.

Tabela 2

Kąpiel	Kąpiel sonifikowana
	Filety mrożone-rozmrażane
Kontrola	100
Supernatant	286.5
2.7 µm filtrat	264.7
0.6 µm filtrat	252.9
0.3 µm filtrat	226.3

Przykład 3

Sposób jak w przykładzie pierwszym, z tym, że supernatant kąpeli w ilości 100 ml w naczyniu szklanym poddano homogenizacji mechanicznej stosując homogenizator laboratoryjny przy prędkości noża 24000 obrotów/min. i 4–7°C. Wyniki badań przedstawiono na rysunku.

Przykład 4

Sposób jak w przykładzie pierwszym z tym, że supernatant kąpieli w ilości 15 ml poddano nanofiltracji stosując filtry wirówkowe o cut-off 100, 30 i 10 kDa. Kąpiel zatężano przy 4000 x g w temperaturze chłodniczej, uzyskując 1/20 – 1/50 pierwotnej objętości kąpieli. Zastosowanie filtra 100 kDa do filtrowania kąpieli spowodowało wzrost aktywności katepsyny D w porównaniu do próby kontrolnej, jednak aktywność rozłożyła się pomiędzy retentatem a permeatem. Kiedy zastosowano filtr o cut-off 30 i 10 kDa, czyli mniejszym od masy katepsyny D, to jej aktywność wzrosła najbardziej, i prawie w całości występowała tylko w retentacie. Relatywną aktywność katepsyny D [%] przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

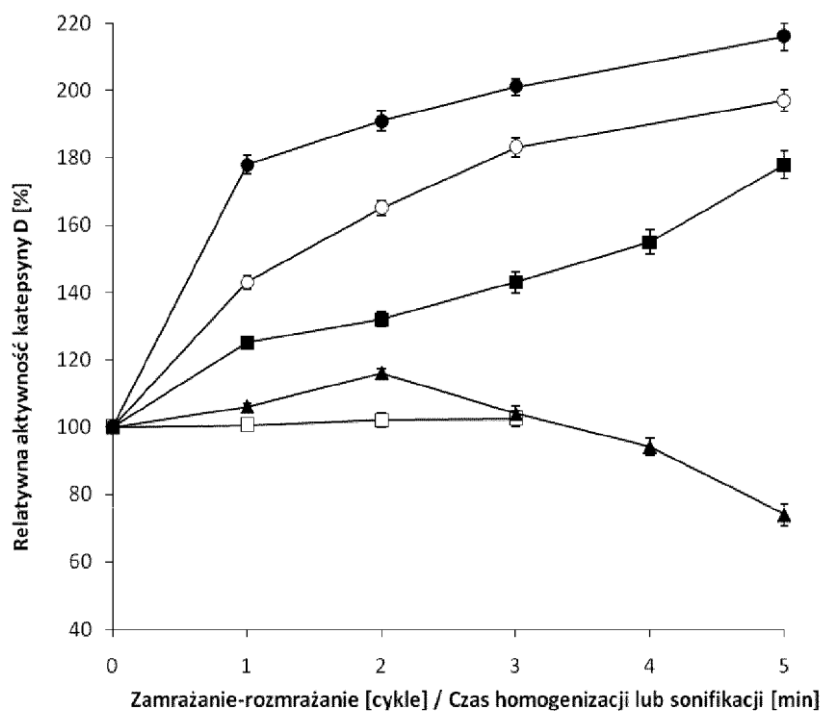
Kąpiel		Kąpiel filtrowana przez nanofiltry	
		Filety mrożone-rozmrażane	
Supernatant		100	
Retentat	100 kDa	120	
	30 kDa	200	
	10 kDa	244	
Permeat	100 kDa	60	
	30 kDa	25	
	10 kDa	0	

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi, **znamienny tym**, że kąpiel po usunięciu z niej tłuszczu i zawiesiny poddaje się co najmniej raz powolnemu zamrażaniu oraz rozmrażaniu tak, aby utrzymać chłodniczą temperaturę kąpieli wynoszącą 1–7°C.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że tłuszcz i zawiesinę usuwa się przed zamrażaniem poprzez wirowanie lub filtrację.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że z kąpieli po zamrażaniu i rozmrażaniu usuwa się bakterie, poddając ją mikrofiltracji.
4. Sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi, **znamienny tym**, że kąpiel po usunięciu z niej tłuszczu i zawiesiny poddaje się działaniu ultradźwięków o niskiej częstotliwości i dużej mocy przez co najmniej 1–5 minut.
5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że po działaniu ultradźwiękami kąpiel pozostawia przez co najmniej 1 godzinę w temperaturze chłodniczej wynoszącej 1–7°C.
6. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że tłuszcz i zawiesinę usuwa się poprzez wirowanie lub filtrację.
7. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że z kąpieli po sonifikacji usuwa się bakterie, poddając ją mikrofiltracji.
8. Sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi, **znamienny tym**, że kąpiel po usunięciu z niej tłuszczu i zawiesiny poddaje się działaniu homogenizacji mechanicznej przez co najmniej 1 min., lecz nie dłużej niż 2 min.
9. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że homogenizację prowadzi się w temperaturze chłodniczej wynoszącej 1–7°C.

10. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że tłuszcz i zawiesinę usuwa się poprzez wirowanie lub filtrację.
11. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że z kąpieli po homogenizacji mechanicznej usuwa się bakterie, poddając ją mikrofiltracji.
12. Sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi, **znamienny tym**, że kąpiel po usunięciu z niej tłuszczu i zawiesiny poddaje się nanofiltracji na filtrach o zdolności rozdzielczej (cut-off) od 1 do 1000 kDa, najkorzystniej nie mniejszej niż 200 kDa lub nie większej niż 10 kDa.
13. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że nanofiltrację prowadzi się w temperaturze chłodniczej wynoszącej 1–7°C.

Rysunek



- Kąpiel zamrażana przy -18°C
- Kąpiel zamrażana przy -80°C
- ▲ Kąpiel homogenizowana mechanicznie
- Kąpiel sonifikowana, pomiar aktywności po 10 min
- Kąpiel sonifikowana, pomiar aktywności po 70 min