

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237103**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426641**

(22) Data zgłoszenia: **13.08.2018**

(51) Int. Cl.

A23B 4/12 (2006.01)

A23B 4/023 (2006.01)

A23B 4/22 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

(54) **Sposób marynowania ryb morskich i słodkowodnych opornych na marynowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

24.02.2020 BUP 05/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

22.03.2021 WUP 06/21

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MARIUSZ SZYMCZAK, Goleniów, PL
KATARZYNA FELISIAK, Szczecin, PL
BARBARA SZYMCZAK, Goleniów, PL
GRZEGORZ TOKARCZYK, Szczecin, PL**

PL 237103 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób marynowania ryb nieśledziowatych dotychczas uznawanych za odporne na marynowanie.

Występują 3 rodzaje marynat rybnych: zimne (tzw. dojrzewające), oraz gotowane i smażone. Marynaty zimne stanowią ponad 90% rynku marynat rybnych i charakteryzują się wyższymi wartościami odżywczymi w porównaniu do marynat gotowanych i smażonych. Produkcja marynat zimnych, czyli proces marynowania ryb odbywa się w roztworze soli i kwasu octowego, zwanym kąpielą marynującą, w temperaturze chłodniczej, stąd nazwa marynaty zimne. Podczas marynowania w mięsie ryb zachodzą zjawiska biochemiczne, w wyniku których powstają charakterystyczne cechy sensoryczne marynat, a mięso uzyskuje dojrzałość do spożycia. Głównym procesem odpowiedzialnym za dojrzewanie mięsa ryb jest proteoliza pod wpływem mięśniowych enzymów proteolitycznych. Kwas octowy obniża pH mięsa do 4.0–4.4 aktywując katepsyny, głównie D, E, B, L. Z kolei chlorek sodu w stężeniu 2.5–5% w mięsie ogranicza zbyt szybką i pełną hydrolizę białek, poprzez inhibicję katepsyn D, E i B (Szymczak M. 2017. Recovery of cathepsins from marinating brine waste, *International Journal of Food Science & Technology*, 52, 1, 154–160).

Według znanych sposobów wytwarzania zimnych marynat rybnych jako surowca do tego procesu używa się ryb oprawionych do postaci tusz, filetów ze skórą lub płatów, a niekiedy nawet ryb całych. Surowiec zalewa się roztworem soli i kwasu octowego zwanym kąpielą marynującą w taki sposób, aby całkowicie zanurzyć ryby w kąpielu marynującej oraz aby zapewnić uzyskanie odpowiedniego pH w czasie marynowania. Stosunek wagowy ryb do kąpielu marynującej najczęściej wynosi 2 : 1 do 3 : 2. Po zakończeniu procesu marynowania ryby są wybierane z kąpielu marynującej, a kąpiel marynująca wraz z zawiesiną i lipidami (substancje z mięsa dyfundują do kąpielu) jest wylewana do ścieków bezpośrednio lub po wstępnym oczyszczaniu. Stanowi to niewątpliwie duże obciążenie dla środowiska naturalnego, gdyż ścieki te są trudno neutralizowane. Ponadto tradycyjny sposób marynowania powoduje duże straty wagowe i odżywcze ryb, gdyż oprócz zawiesiny tkanki mięśniowej do kąpielu przechodzi duża ilość substancji rozpuszczalnych mięsa jak wolne aminokwasy, peptydy i polipeptydy, niektóre białka, nukleotydy, witaminy, substancje mineralne i inne. Przy rybach tłustych, które są podstawowym surowcem do marynowania, do kąpielu marynującej przechodzi także znaczna część substancji tłuszczowych i witamin rozpuszczalnych w tłuszczu.

Obecnie marynaty zimne produkuje się ze śledzi oraz ryb śledziowatych (np. sardela, sardynka). Jednakże w porównaniu do śledzi konsumenci chętniej wybierają inne ryby morskie, jak dorsz i łosoś, zaś ze słodkowodnych pstrąga i karpia. Ryby te są sprzedawane głównie w postaci świeżej, mrożonej oraz wędzonych lub solonych filetów. Dotychczas próbowano marynować takie ryby jak tuńczyk (Topuz O.K. 2016. Effects of marinating time, acetic acid and salt concentrations on the quality of little tunny fish (*Euthynnus alletteratus*) fillet. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40: 1154–1163], makrela [Zhelyazkov G.I., Popova T., Stratev D. 2015. Chemical composition and fatty acid profile of marinated mackerel (*Scomber scombrus*) during processing and storage. *Macedonian Journal of Animal Science*, 5, 2, 75–80), sajra (Sallam Kh.I., Ahmed A.M., Elgazzar, Eldaly E.A. 2007. Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific Saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4°C. *Food Chemistry*. 102, 1061–1070), pstrąg tęczowy (Yildiz P. O. 2016. Effect of thyme and rosemary essentials oils on the shelf life of marinated rainbow trout. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 26 (3), 665–673), tilapia [Santo M. L. P. E., Vivian V., Mirapalheta T., Carbonera N., Coelho G., Damian C. 2008. Chemical, physical and microbiological changes in tilapia (*Oreochromis Niloticus*) during marination. *Alim. Nutr.*, Araraquara, 18, 1, 1–5), dorada i okoń morski (Kaya G.K., Baştürk O. 2013. Organoleptic and chemical changes during storage of sea bass marinades (*Dicentrarchus labrax* L., 1758). *Journal of Food Processing and Preservation* 38: 1072–1079.; Kaya G.K., Baştürk O. 2015. Determination of some quality properties of marinated sea bream (*Sparus aurata*) during cold storage. *Food Science and Technology*. 35(2): 347–353). Niestety, mięso tych ryb nie ulega tak intensywnemu procesowi proteolizy (dojrzewaniu), jak mięso śledzi. Przypuszcza się, że jedną z przyczyn oporności na dojrzewanie tych ryb może być zbyt mała aktywność endogennych mięśniowych enzymów proteolitycznych w kwaśno-słonym środowisku. Dlatego w przypadku ryb nieśledziowatych stosuje się krótkie marynowanie (od kilkunastu minut do kilku godzin) tylko w celu wydłużenia czasu trwałości mięsa i wzrostu smakowitości, poprzez ograniczenie mikroflory, odwodnienie, wzmocnienie tkanki i nadanie kwaśnego smaku.

Z opisu patentowego PL 167938 znany jest sposób marynowania ryb, który polega na tym, że surowiec rybny rozdrabnia się na granulki lub płatki o grubości 1 do 5,5 mm i miesza z garbado stężeniu 3 do 9% kwasu spożywczego oraz 5 do 14% soli kuchennej w proporcji wagowej od 4 : 1 do 2 : 1, po czym poddaje inkubowaniu i otrzymaną mieszaninę traktuje w całości jako dojrzałą marynatę. Inkubowanie przeprowadza się jako nisko lub wysokotemperaturowe. Inkubowanie niskotemperaturowe prowadzi się w temperaturze od -1°C do $+5^{\circ}\text{C}$, w czasie od 3 dni do 3 miesięcy, natomiast inkubowanie wysokotemperaturowe prowadzi się dogrzewając mieszaninę do temperatury od 33 do 55°C w czasie od 0,5 do 6 godzin, przy ciągłym mieszaniu, a następnie schładza się do temperatury poniżej 15°C .

Naukowcy wciąż poszukują proteaz do dojrzewania ryb, które dadzą tak dobre efekty jak endogenne katepsyny występujące naturalnie w rybach. Niestety brak jest handlowych preparatów katepsyn, które można zastosować do marynowania ryb opornych. Istnieje rozwiązanie problemu oporności wielu ryb morskich i słodkowodnych na dojrzewanie mięsa w kwaśno-słonej kąpeli bez stosowania sztucznych dodatków do żywności lub dodatku preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego.

Sposób marynowania ryb morskich i słodkowodnych opornych na marynowanie (dojrzewanie), według wynalazku, polegający na zalaniu surowca rybnego kąpielą marynującą, charakteryzuje się tym, że jako kąpiel marynującą stosuje się zużytą kąpiel pozostałą po marynowaniu śledzi, zawierającą biologicznie aktywne związki przeciwutleniające i enzymy proteolityczne, którą przefiltrowuje się przez filtr o wielkości porów nie większej niż $0,22\ \mu\text{m}$ i nie mniejszej niż $0,1\ \mu\text{m}$, a po filtracji uzupełnia się stężenia chlorku sodu i kwasu octowego tak, aby uzyskać oczekiwane właściwości sensoryczne marynowanego mięsa. Proces filtracji przeprowadza się aby usunąć z kąpeli osad, lipidy i mikroorganizmy, a także aby uszkodzić błony lizosomów obecnych w kąpeli, z których uwalniane są enzymy proteolityczne, co zwiększa ogólną aktywność proteolityczną kąpeli.

Stężenie kwasu octowego i chlorku sodu do wymaganej wartości należy uzupełnić dopiero po filtracji, gdyż uzupełnienie kwasu i soli przed filtracją jest niekorzystne ze względu na wytrącanie się białek enzymów, które zostałyby zatrzymane na filtrze i nie brały później udziału w dojrzewaniu.

Zaletą sposobu według wynalazku jest to, że podczas marynowania z kąpeli do mięsa ryb dyfundują enzymy, wolne aminokwasy i peptydy, przez co rośnie ich ilość w marynowanych rybach. Biologiczna aktywność tych związków w mięsie podczas marynowania pozwala zwiększyć stopień dojrzałości mierzony parametrami fizykochemicznymi i analizą sensoryczną. Ponadto wykorzystuje się zużytą kąpiel pozostałą po marynowaniu śledzi, którą w przemyśle rybnym wylewa się do ścieków.

Sposób zastosowania zużytej kąpeli wraz z proteazami i peptydami o właściwościach przeciwutleniających, według wynalazku, do marynowania ryb nieśledziowatych takich jak: filetów z łososia norweskiego, pstrąga tęczowego, dorsza bałtyckiego i karpia przedstawiono w przykładzie wykonania. Surowiec ten reprezentował ryby morskie i słodkowodne, dzikie i hodowlane, tłuste i chude, o jasnej i łososiowej barwie mięsa.

Zużytą kąpiel (ZK) uzyskano po 7 dobach procesu marynowania śledzi atlantyckich. Początkowo ZK przefiltrowano przez filtr $50\ \mu\text{m}$, aby usunąć zawiesinę i lipidy, a następnie ostatecznie stosując filtr o wielkości porów $0,22\ \mu\text{m}$. Mikrofiltrację kąpeli przeprowadzono przy użyciu filtrów wykonanych z włókna szklanego ($\varnothing = 47\ \text{mm}$) zamontowanych w urządzeniu do filtracji próżniowej (typ 162, Sartorius AG, Goettingen, Niemcy). Następnie, stężenie chlorku sodu i kwasu octowego uzupełniono w filtracie ZK odpowiednio do 6% i 5%. Wszystkie etapy procesu regeneracji kąpeli prowadzono w temperaturze chłodniczej. Marynaty dojrzewające w świeżej kąpeli (SK) o końcowym stężeniu NaCl i kwasu octowego w stężeniu 6% i 5% służyły jako próbka kontrolna. Do przygotowania kąpeli użyto wodę wodociągową, sól kamienną i 80% esencję octową.

Filety łososia, pstrąga, dorsza i karpia ze skórą podzielono na kawałki o podobnej wielkości i masie. Filety w kawałkach ($1000 \pm 10\ \text{g}$) umieszczano w szklanych słoikach o pojemności 2 L i zalano roztworem kąpeli SK lub ZK. Proces marynowania przeprowadzono w 7°C . Stosunek ryb do solanki wynosił 1,5 : 1 (m : m). Aby ułatwić dyfuzję składników z kąpeli do mięsa ryb, każdy słoik delikatnie obracano wokół własnej osi 3 razy dziennie, przez pierwsze 4 dni. Po 7 dobach marynowania, filety i solankę przeniesiono do dużych lejków i pozostawiono do pełnego rozdzielenia kąpeli od ryby przez około 5 minut w temperaturze pokojowej. Zarówno mięso i kąpiel zważono (z dokładnością $\pm 0,1\ \text{g}$), a mięso poddano niższym analizom.

- Zawartość wody, lipidów, soli, kwasu octowego, azotu ogólnego oraz wartość pH

Wartość pH mięsa zmielnego i zhomogenizowanego z wodą destylowaną w stosunku 1 : 5 (m : v) mierzono za pomocą cyfrowego pH-metru. Zawartość wody i lipidów oraz całkowitą kwasowość wyrażoną

jako % kwasu octowego, a także zawartość soli i azotu ogółem określono przy użyciu technik analitycznych według AOAC (AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th edition, In K. Helrich (Ed.) AOAC, Arlington, p. 1298).

- Analiza frakcji azotu niebiałkowego (NPN)

Zawartość następujących związków określono w ekstraktach z mięsa przy końcowym stężeniu kwasu trichlorooctowego przy 5% : (1) azot niebiałkowy za pomocą metody Kjeldahla (AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th edition, In K. Helrich (Ed.) AOAC, Arlington, p. 1298); (2) produkty hydrolizy białka: tyrozyna (PHB (A)) i peptydy (PHB (R)) zmodyfikowaną metodą Lowry'ego (Kołakowski E. 2005. Analysis of proteins, peptides, and amino acids in foods. In S. Ötles (Ed.), Methods of analysis of food components and additives (pp. 59–96). Boca Raton: CRC Taylor & Francis); i (3) zawartość lotnych zasad amonowych (TVB-N) i trimetyloaminy (TMA-N) metodą mikrodyfuzji (Conway E.J. 1947. Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby, Lockwood and Son, Ltd. London).

- Liczba nadtlenkowa i anizydynowa lipidów

Liczbę nadtlenkową (PV) tłuszczów w mięsie oznaczono metodą tiocyjanianową (Mihaljević B, Katusin-Razem B, Razem D. 1996. The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. Free Radic Biol Med. 21(1):53–63), opartą na utlenianiu soli żelazowej za pomocą wodoronadtlenków i reakcji soli żelaza z izotiocyjanianem potasu. Utworzone czerwone kompleksy żelazowe mierzono spektrofotometrycznie. Liczbę PV wyrażano jako meq O₂ / kg lipidów. Liczbę anizydynową (AsV) i całkowitą wartość utlenienia lipidów (Totox) oznaczono zgodnie z metodą ISO-6885 (ISO 6885. 2008. Animal and vegetable fats and oils. Determination of anisidine value).

- Aktywność przeciwutleniająca

Aktywność przeciwutleniającą mięsa ryb oznaczono zgodnie z metodą Re i in. (Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol Med 26:1231–1237) w buforze (TEAC-H₂O) i w ekstraktach metanolowych (TEAC-MeOH). Zdolność zmiatania wolnych rodników DPPH (RSA) oznaczono w ekstraktach metanolowych według Brand-Williams i in. (Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm.-Wiss. Technol. 28, 25–30) i zdolność redukcji jonów żelaza III (FRAP) oznaczono w ekstraktach buforowych według Benzie i Strain (Benzie I.F., Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power”: the FRAP assay. Anal Biochem. 239, 1, 70–6). Wszystkie wyniki wyrażono jako ekwiwalenty Trolox (μTE) na 1 g mięsa.

- Aktywność katepsyn

Zmielone mięso ryb wraz z wodą (1 : 5 m : v, 0,25 M sacharozy, 1 mM EDTA) homogenizowano dwukrotnie w odstępie 30 minut w temperaturze 4°C. Po odwirowaniu (9000 g przez 10 min., 4°C) w supernatancie zmierzono aktywność peptydaz aspartylowych (katepsyna D + E) i cysteinowych (katepsyna B + L) odpowiednio wobec Mca-GKPILFFRLK (Dnp)-r-NH₂ i Z-FR-MCA (PeptaNova, Concord, Kalifornia, USA). Fluorescencję mierzono stosując mikrokuwetę za pomocą spektrofluorymetru (Hitachi, F-7000, Tokio, Japonia) o długościach wzbudzenia i emisji odpowiednio przy 328 i 393 dla aspartylowych i 322 i 460 nm dla peptydaz cysteinowych. Jedna jednostka aktywności enzymatycznej (Umca) została zdefiniowana jako 1 nmol MCA uwolniony przez 1 g mięsa podczas 1 minuty w 37°C.

- Analiza mikrobiologiczna

Analizy mikrobiologiczne marynowanego mięsa rybnego oraz zużytej kąpieli po filtracji obejmowały oznaczenie: ogólnej liczby bakterii psychrofilnych i mezofilnych (ISO 48331/2013 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 20 and 30°C by the pour plate technique), liczby drożdży i pleśni (ISO 21527-2:2009 Food and feed microbiology – Horizontal method for the determination of yeast and mold counts – Part 2: Method for counting colonies in products with water activity less than or equal to 0.95) oraz mezofilnych bakterii kwasu mlekowego (ISO 15214:2002 Microbiology of food and feed – Horizontal method for determining the number of mesophilic lactic acid bacteria – Plate method at 30°C).

- Ocena sensoryczna

Mięso marynat było analizowane za pomocą profilowania sensorycznego wykonywanego przez wyszkolony zespół sensoryczny, przy użyciu pięciostopniowej skali z dokładnością 0,5 punktu (Szymczak M., Szymczak B., Koronkiewicz A., Felisiak K., Bednarek M. 2013. Effect of cover brine type on the quality of meat from herring marinades. *Journal of Food Science*, 78, 4, 619–625). Trzy kawałki filetów ze skórą z każdej próbki podano na tacach porcelanowych. Asesorzy używali wody i chleba do czyszczenia podniebienia pomiędzy testowanymi próbkami. Słownictwo zostało opracowane podczas wstępnych sesji szkoleniowych. Atrybutami sensorycznymi były tekstura, smak, zapach i wygląd. Suma ocen indywidualnych dała ogólny wynik, który reprezentował ogólną ocenę sensoryczną marynat.

- Analiza barwy

Barwę powierzchni filetów oceniono za pomocą obiektywnej metody kolorymetrem HunterLab, typ D25-D2 (Hunter Associates Laboratory, Reston, VA, USA), stosując wzorzec C-6544 do kalibracji kolorymetru. Obliczono różnicę zabarwienia ($\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{0.5}$); gdzie ΔL , Δa i Δb są różnicami w wartościach L, a i b między próbą marynat-ponownie-użytej-kąpieli, a próbą marynat-świeżej-kąpieli.

- Parametr twardości

Twardość określono za pomocą analizatora tekstury TA-XT 2 / 25® (STable Micro Systems, Goddington, UK). Test obejmował dwukrotną penetrację cylindrycznego trzpienia P10, z odkształceniem próbki do 50% jego wysokości przy prędkości $5 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Przebieg testu rejestrowano jako krzywe reprezentujące zmiany siły w czasie. Testy przeprowadzono oddzielnie dla każdego kawałka filetu (w 2 powtórzeniach każdy), tylko w centralnej części mięśnia grzbietowego.

Poniżej wyniki przedstawiające wpływ użycia kąpieli regenerowanej na podniesienie jakości marynowanych ryb.

Po 7 dobach marynowania w świeżej kąpieli wydajność masy ryb była nieistotnie statystycznie niższa o 1 punkt procentowy niż stosując regenerowaną kąpiel (Tab. 1). Mięso ryb marynowanych w regenerowanej kąpieli zawierało tyle samo lub więcej kwasu octowego. Mimo to wartość pH była wyższa niż stosując świeżą kąpiel (Tab. 1). Ryby dojrzewające w regenerowanej kąpieli charakteryzowały się mniejszą zawartością wody. Jednak różnice były istotne tylko w przypadku karpia, w którym oznaczono mniej wody o 2,5% i jednocześnie o tyle samo więcej azotu całkowitego (Tab. 1). Zastosowanie regenerowanej kąpieli wpłynęło na mniejszą zawartość lipidów w dorszu, łososiu i pstrągu (Tab. 4).

- Aktywność katepsyn i zawartość NPN

Aktywność katepsyn w marynatkach dojrzewających w świeżej kąpieli zależała od gatunku ryby (Tab. 2). Aktywność proteaz aspartylowych najniższa była w dorszu bałtyckim (0.1 UMCA), następnie ośmiokrotnie wyższa w łososiu i pstrągu, i najwyższa w karpniu (1.5). Natomiast aktywność proteaz cysteinykowych najniższa była w dorszu i karpniu (0.2), następnie w pstrągu (0.26), a najwyższa w łososiu (0.55). Aktywność kwaśnych proteaz mięśniowych u tych ryb była niższa niż w mięsie marynowanych śledzi (Szymczak M. 2017a. Effect of technological factors on the activity and losses of cathepsins B, D and L during marinating of Atlantic and Baltic herrings, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 5, 1488–1496). Wyniki wielu badań pokazują, że optimum aktywności proteaz mięśniowych śledzi występuje w pH kwaśnym (Stoknes I., Rustadand T., Mohr V. 1993. Comparative studies of the proteolytic activity of tissue extracts from cod (*Gadus morhua*) and herring (*Clupea harengus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 3, 613–619). W mięsie dorsza atlantyckiego optimum aktywności przypadła w pH 6.6, zaś proteazy kwaśne w pH 4.0-4.5 wykazują tylko 10–15% maksymalnej aktywności (Angsupanich K. and Ledward D. A. 1998. High pressure treatment effects on cod (*Gadus morhua*) muscle. *Food Chemistry*, 63, 1, 39–50). Z kolei aktywność proteolityczna mięsa dorsza bałtyckiego w typowym dla marynat pH 4.0–4.6 jest prawie zerowa (Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejska I. 2018. Changes in enzymatic activity of fish and slaughter animals meat after high pressure treatment at subzero temperatures. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 68, 2, 125-131). W przypadku łososia optimum aktywności proteaz mięśniowych również przypada w pH 3, zaś w pH 4,2 proteazy wykazują prawie połowę maksymalnej aktywności (Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejska I. 2018. Changes in enzymatic activity of fish and slaughter animals meat after high pressure treatment at subzero temperatures. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 68, 2, 125–131). W porównaniu do wcześniej wspomnianych ryb aktywność katepsyn karpia jest relatywnie wysoka w kwaśnym środowisku, lecz brak jest wiedzy o wpływie NaCl i temperatury chłodniczej

na ich aktywność (Makinodan, Y., Akasaka, T., Toyohara, H. and Ikeda, S. 1982. Purification and properties of Carp muscle cathepsin D. *Journal of Food Science*, 47, 647–652.; Toyohara H., Makinodan Y., Ikeda S. 1982 Purification and properties of Carp muscle cathepsin A. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 8, 1145–1150.; Ogata, H., Aranishi, F., Hara, K., Osatomi, K. and Ishihara, T. 1998. Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L. *J. Sci. Food Agric.*, 76: 499–504). Również Aoki i in. (Aoki T., Yamashita T., Ueno R. 2000. Distribution of cathepsins in red and white muscles among fish species. *Fisheries Science*, 66: 776–782) stwierdzili, że aktywność katepsyn morskich ryb o czerwonym mięsie (sardynki) była stosunkowo wyższa niż ryb o białym mięsie (dorsz, łosoś) i ryb słodkowodnych (pstrąg, karp). Wyniki pokazują zatem, że słabe dojrzewanie pstrąga, łososia, a szczególnie dorsza w kąpeli marynującej może być związane w pierwszej kolejności ze zbyt niską aktywnością proteolityczną w kwaśno-słonym środowisku.

Kiedy do marynowania użyto regenerowaną kąpiel, to aktywność katepsyn D, B+L i B w mięsie ryb wzrosła średnio odpowiednio o 0.2, 0.1–0.3 i 0.05 U_{MCA} (Tab. 2). Względny wzrost aktywności proteaz wynosił od 18% w karpniu do 30–50% w łososiu i pstrągu (ryby tłuste). Z kolei w przypadku dorsza użycie regenerowanej kąpeli spowodowało aż 3-krotny wzrost aktywności katepsyny D i 20–30% wzrost katepsyny B i L. Zauważono także, że w dorszu wzrost aktywności katepsyny L (różnica w aktywności B+L do aktywności B) jest znacznie niższy niż u pozostałych ryb (Tab. 2). Może to wskazywać, że aktywność enzymatyczna w marynatach nie zależy wyłącznie od ilości tych enzymów w mięsie ryb. Stoknes i in. (Stoknes I., Rustadand T., Mohr V. 1993. Comparative studies of the proteolytic activity of tissue extracts from cod (*Gadus morhua*) and herring (*Clupea harengus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 3, 613–619) wykazali, że mniejsza aktywność kwaśnych proteaz mięśniowych dorsza niż śledzi jest spowodowana również silnym wpływem inhibitorów specyficznych dla kwaśnych proteaz mięśniowych. Można zatem sądzić, że słabe dojrzewanie marynowanego mięsa dorsza, w porównaniu do łososia i pstrąga, jest spowodowane nie tylko mniejszą aktywnością katepsyn, ale, po drugie, również aktywnością inhibitorów kwaśnych proteaz. Dlatego na tej podstawie oporność na dojrzewanie ryb nieśledziowatych podzielono na dwa stopnie: (i) oporność pierwszego stopnia, spowodowana tylko niską aktywnością katepsyn (np. łosoś i pstrąg) oraz (ii) oporność drugiego stopnia, spowodowana jednocześnie niską aktywnością katepsyn oraz wysokim wpływem inhibitorów katepsyn (np. dorsz bałtycki).

Bez względu na gatunek ryby marynowanie w regenerowanej kąpeli powodowało wzrost zawartości azotu niebiałkowego (NPN) o 40–50% (Tab. 2). Wyjątkiem był dorsz, w którym ilość NPN wzrosła tylko o 8,5%. Prawdopodobnie przyczyną mniej intensywnej dyfuzji NPN do dorsza była najniższa zawartość lipidów spośród badanych ryb (Tab. 3). Lipidy chronią białka przed denaturacją spowodowaną wysokim stężeniem kwasu octowego i soli. Zdenaturowane białko dorsza tworzy barierę na powierzchni filetów, co utrudnia dyfuzję szczególnie podczas pierwszych 2–3 dni marynowania (Szymczak M., Kołakowski E. 2012. Losses of nitrogen fractions from herring to brine during marinating. *Food Chemistry*, 132(1), 237–243.; Szymczak M. 2017a. Effect of technological factors on the activity and losses of cathepsins B, D and L during marinating of Atlantic and Baltic herrings, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 5, 1488–1496).

- Aktywność przeciwutleniająca i utlenianie lipidów

Zastosowanie zregenerowanej kąpeli spowodowało wzrost aktywności przeciwutleniającej TEAC-H₂O, która jest efektem zawartości szczególnie frakcji hydrofilowej NPN, najbardziej w dorszu (o 54%) i łososiu (47%), a najmniej w pstrągu (14%) i karpniu (6%). Aktywność przeciwutleniająca TEAC-MeOH (frakcja hydrofobowa NPN) wzrosła w mięsie dorsza (37%), pstrąga (22%) i karpia (11%). Wyjątkiem było mięso łososia, w którym wartość TEAC-MeOH zmniejszyła się o 21% (Tab. 3). Wartość RSA w mięsie dorsza i łososia marynowanego w ponownie użytej kąpeli wzrosła dwukrotnie więcej niż w mięsie pstrąga i karpia (Tab. 3). Aktywność FRAP jest typowa dla związków NPN o masie cząsteczkowej do 3kDa, stąd zastosowanie regenerowanej kąpeli pozwoliło uzyskać znacznie wyższą zdolność redukcji Fe³⁺, szczególnie w mięsie pstrąga i karpia (Tab. 3). U ryb marynowanych w regenerowanej kąpeli wartości RSA wzrosły, co może wynikać z wiązania części peptydów i aminokwasów przez wolne rodniki obecne w kąpeli i znalazło odzwierciedlenie w zmniejszonym utlenianiu lipidów (Tab. 3).

Lipidy mięsa ryb marynowanych w świeżej i regenerowanej kąpeli charakteryzowały się zbliżoną podatnością na proces oksydacji, za wyjątkiem lipidów dorsza. Jedynie w przypadku dorsza marynowanie w regenerowanej kąpeli spowodowało wzrost pierwotnych produktów utlenienia lipidów (PV) o 70% (Tab. 4). Odwrotną zależność stwierdzono dla lipidów mięsa pozostałych gatunków, przy czym w przypadku łososia i karpia zmiany te były statystycznie nieistotne. Marynowanie w regenerowanej kąpeli

ograniczyło natomiast powstawanie pierwotnych produktów utlenienia lipidów w mięsie pstrąga o 30% (Tab. 4). Z kolei największą ilość wtórnych produktów utlenienia lipidów (AsV) stwierdzono w lipidach pstrąga, marynowanego w świeżej kąpiel, natomiast najniższą dla lipidów dorsza i łososia (Tab. 4). Marynowanie w regenerowanej kąpiel spowodowało wzrost AsV ponad 3-krotnie w przypadku dorsza i o 30% u łososia. Z kolei w lipidach mięsa pstrąga i karpia wartości AsV zmalały odpowiednio o 12 i 5%. Sumarycznie parametr Totox pokazuje, że marynowanie w regenerowanej kąpiel przyczynia się do obniżenia całkowitego stopienia utlenienia lipidów, za wyjątkiem dorsza, dla którego wartość Totox wzrosła dwukrotnie (Tab. 4).

- Ocena sensoryczna, barwa i twardość mięsa

Kiedy do marynowania użyto regenerowanej kąpiel, ocena sensoryczna wszystkich ryb istotnie się poprawiła (Tab. 2). Największy wzrost ogólnej oceny sensorycznej nastąpił dla pstrąga i łososia (0.7–0.8 pkt), zaś najmniejszy 0.4–0.5 w przypadku dorsza i karpia. Charakterystyczny smak i zapach łososia był jeszcze bardziej wyczuwalny. Zastosowanie regenerowanej kąpiel zwiększało też soczystość wraz z obniżeniem twardości mięsa podczas żucia. Również analiza tekstury wykazała zmniejszenie twardości mięsa od 6 do 23% (Tab. 2).

Barwa mięsa marynowanego w regenerowanej kąpiel różniła się istotnie od mięsa marynowanego w świeżej kąpiel. Największe zmiany barwy zaobserwowano w przypadku dorsza ($\Delta E = 5,5$), następnie w pstrągu (4.9), łososiu (4.3) i karpie (3.6). Wartość ΔE powyżej 3 oznacza, że różnice w barwie były wykrywalne sensorycznie. W przypadku ryb o mięsie jasnym barwa była ciemniejsza z bardzo słabo zauważalnym żółtym odcieniem. Żółta barwa pochodzi z regenerowanej kąpiel prawdopodobnie ze względu na zawarte w niej hydrofilne produkty utlenienia lipidów. Z kolei w przypadku ryb o barwie łososiowej ich mięso miało niższą jasność, przez co barwa różowa była bardziej intensywna. U tych ryb żółty odcień nie był zauważalny, przeciwnie pozytywnie wzmacniał łososiową barwę.

- Jakość mikrobiologiczna (Tab. 5)

Stężenie soli i kwasu octowego w mięsie marynat jest niewystarczające do pełnej konserwacji. Dlatego marynaty nazywane są półprezerwami i muszą być składowane w warunkach chłodniczych. Po zastosowaniu regenerowanej kąpiel zawartość lotnych zasad w mięsie wzrosła od 13 do 88%. W przypadku dorsza wskaźnik TVB wzrósł o 70%, w przypadku łososia i karpia od 40 do 80%, a najmniejszy wpływ regenerowanej kąpiel był w przypadku pstrąga (13–55%). Mimo to, zawartość TVB w rybach marynowanych w regenerowanej kąpiel jest ponad 3-krotnie niższa niż dopuszczalna wartość 35 mg (EC DIRECTIVE. 2005. Commission regulation No 2074/2005 of 5 December 2005. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) limit values for certain categories of fishery products and analysis methods to be used). Zużyta kąpiel po przefiltrowaniu przez filtr 0,22 μm nie zawierała żadnych z pięciu badanych grup mikroorganizmów. Mimo to tylko w dorszu marynowanym w regenerowanej kąpiel wykazano obecność 2 log psychrofilii i mezofili, które nie występowały po marynowaniu w świeżej kąpiel.

Tabela 1. Wydajność marynowania, skład podstawowy i parametry barwy marynowanego mięsa ryb.

Analiza	Marynowane w świeżej kąpieli				Marynowane w regenerowanej kąpieli			
	Dorsz	Łosoś	Pstrąg	Karp	Dorsz	Łosoś	Pstrąg	Karp
Wydajność [%]	69,1 ±1 ^a	85,6±1,5 ^b	84,4±1,2 ^b	81,8±1 ^c	70,6±1,1 ^a	86,9±1,4 ^b	85,2±1 ^b	80,1±1 ^c
NaCl [%]	2,36 ±0,02 ^a	2,32 ±0,02 ^a	2,27 ±0,0 ^a	2,29 ±0,0 ^a	2,24 ±0,04 ^b	2,21 ±0,01 ^b	2,11 ±0,0	2,18 ±0,0 ^b
Kwasowość [%]	1,85 ±0,05 ^{ac}	1,80 ±0,00 ^a	1,8 ±0,0 ^a	1,73 ±0,0 ^b	2,16 ±0,02	2,00 ±0,01 ^c	1,73 ±0,0 ^b	1,73 ±0,0 ^b
pH	4,107 ±0,0 ^a	4,100 ±0,0 ^a	3,988 ±0,0 ^a	3,965 ±0,0	4,176 ±0,0	4,331 ±0,0	4,235 ±0,0	4,202 ±0,0
Zawartość wody [%]	73,33 ±0,11 ^a	61,89 ±0,09 ^b	64,22 ±0,11 ^c	76,20 ±0,12	73,03 ±0,10 ^a	60,93 ±0,38 ^b	65,26 ±0,12 ^c	73,01 ±0,04
Azot całkowity [g • 100 g ⁻¹]	3,68 ±0,02 ^a	3,26 ±0,04 ^b	3,26 ±0,05 ^b	3,06 ±0,05 ^c	3,69 ±0,06 ^a	3,24 ±0,01 ^b	3,27 ±0,10 ^{bc}	3,26 ±0,02 ^b
L*	82,3 ±2,1	66,5 ±2,3 ^a	69,0 ±3,8 ^a	75,7 ±1,0 ^b	77,2 ±3,1 ^b	62,3 ±3,7 ^a	64,2 ±4,1 ^a	72,2 ±4,7 ^b
a*	5,5 ±1,2 ^{bc}	14,2 ±2,6 ^a	12,9 ±3,6 ^a	2,5 ±0,6	6,3 ±1,5 ^b	13,8 ±0,8 ^a	12,5 ±1,3 ^a	3,3 ±0,8 ^c
b*	8,1 ±1,4 ^c	11,5 ±1,7 ^a	4,4 ±1,9 ^b	2,8 ±1,1 ^b	10,1 ±1,6 ^a	12,3 ±2,4 ^a	3,6 ±2,3 ^b	2,4 ±2,1 ^b

^{a,b,c}Średnie w wierszu małej litery lub z różną małą literą różnią się statystycznie istotnie ($p < 0.05$);

Tabela 2. Aktywność proteolityczna i wskaźniki dojrzałości mięsa ryb marynowanych w świeżej i regenerowanej kąpieli.

Analiza	Marynowane w świeżej kąpieli				Marynowane w regenerowanej kąpieli			
	Dorsz	Losoś	Pstrąg	Karp	Dorsz	Losoś	Pstrąg	Karp
Azot niebiałkowy (NPN) [mg • 100 g ⁻¹]	296 ±5 ^b	321 ±3 ^a	292 ±3 ^b	254 ±2	321 ±3 ^a	438 ±2 ^c	441 ±2 ^c	379 ±0
PHB(A) [mg • 100 g ⁻¹]	94,0 ±0,8	64,2 ±0,6 ^a	58,7 ±0,7	50,8 ±1,1	101,0 ±1,0	84,2 ±0,7 ^b	84,0 ±2,0 ^b	66,5 ±1,7 ^a
PHB(R) [mg • 100 g ⁻¹]	305,9 ±1,6	366,5 ±4,1 ^a	344,1 ±4,1 ^b	274,2 ±4,2	356,6 ±3,4 ^a	430,3 ±2,6	404,6 ±7,0	333,8 ±4,7 ^b
Katepsyna D [U _{MCA}]	0,102 ±0,008	0,751 ±0,032	0,814 ±0,062	1,481 ±0,047	0,322 ±0,022	0,989 ±0,078	1,068 ±0,065	1,756 ±0,112
Katepsyna B+L [U _{MCA}] 29000	0,198 ±0,41 ^{ab}	0,545 ±0,025	0,262 ±0,015 ^a	0,212 ±0,011 ^b	0,238 ±0,071 ^a	0,820 ±0,034	0,32 ±0,022 ^c	0,35 ±0,018 ^c
Katepsyna B [U _{MCA}]	0,121 ±0,019 ^{ab}	0,059 ±0,003	0,096 ±0,007 ^a	0,150 ±0,009 ^{bc}	0,158 ±0,035 ^c	0,092 ±0,005 ^a	0,132 ±0,011 ^{bc}	0,189 ±0,009
Twardość [N]	12,3 ±1,5 ^a	21,8 ±2,5	15,6 ±2,0 ^{ab}	16,1 ±1,4 ^b	10,8 ±1,5 ^a	16,9 ±1,7 ^b	14,4 ±2,6 ^{ab}	15,2 ±1,4 ^{ab}
Ogólna ocena sensoryczna	3,2 ±0,1 ^a	3,7 ±0,04	3,5 ±0,08 ^b	3,4 ±0,02 ^{ab}	3,5 ±0,08 ^b	4,4 ±0,02 ^c	4,3 ±0,04 ^c	3,9 ±0,04

^{a,b,c} Średnie w wierszu małej litery lub z różną małą literą różnią się statystycznie istotnie (p < 0.05)

Tabela 3-4. Wskaźniki utlenienia lipidów i właściwości przeciwutleniające w mięsie ryb marynowanych w świeżej i regenerowanej kąpieli.

Analiza	Marynowane w świeżej kąpieli				Marynowane w regenerowanej kąpieli			
	Dorsz	Losoś	Pstrąg	Karp	Dorsz	Losoś	Pstrąg	Karp
Lipidy [%]	1,41 ±0,02	19,33 ±1,09 ^a	8,02 ±1,25 ^a	6,35 ±0,17 ^b	1,22 ±0,01	18,63 ±0,34 ^a	6,8 ±0,57 ^a	5,35 ±0,36 ^b
PV [mEq O ₂ • kg ⁻¹ lipidów]	14,9 ±0,77	7,77 ±0,43 ^a	10,24 ±0,33	9,0 ±2,14 ^b	25,0 ±0,89	7,05 ±0,24 ^a	7,01 ±0,13 ^a	8,24 ±0,27 ^b
AsV [wartość • 100 g ⁻¹ lipidów]	3,3 ±0,4 ^a	3,76 ±0,14 ^a	9,4 ±0,22	6,7 ±0,6 ^b	10,34 ±0,77	4,84 ±0,22	8,25 ±0,15 ^a	6,44 ±0,23 ^b
Totox [wartość]	33,1 ±0,89	19,3 ±0,26 ^a	29,88 ±0,65	24,7 ±0,32	60,34 ±2,44	18,94 ±0,90 ^a	22,35 ±1,42 ^b	22,92 ±3,01 ^b
TEAC-H ₂ O [μTE • g ⁻¹]	7,25 ±0,7 ^{ab}	8,46 ±1,61	6,76 ±0,09	6,73 ±0,07	11,18 ±1,44 ^c	12,47 ±1,71 ^c	7,74 ±0,07 ^b	7,13 ±0,06 ^a
TEAC-MeOH [μTE • g ⁻¹]	2,7 ±0,07	3,97 ±0,03	6,10 ±0,12 ^a	6,23 ±0,06 ^a	3,70 ±0,10	3,12 ±0,05	7,49 ±0,09	6,91 ±0,04
RSA [μTE • g ⁻¹]	0,062 ±0,004	0,105 ±0,003	0,081 ±0,002 ^a	0,083 ±0,001 ^a	0,075 ±0,003	0,124 ±0,004	0,091 ±0,003	0,088 ±0,001
FRAP [μTE • g ⁻¹]	88,4 ±8,1	126,0 ±12,5	194 ±7 ^a	194 ±8 ^a	101,7 ±4,3	144,6 ±9,9	255 ±7	232 ±5

^{abc}Średnie w wierszu małej litery lub z różną małą literą różnią się statystycznie istotnie (p < 0.05)

Tabela 5. Jakość mikrobiologiczna mięsa ryb marynowanych w świeżej i regenerowanej kąpieli.

Analiza	Marynowane w świeżej kąpieli				Marynowane w regenerowanej kąpieli			
	Dorsz	Łosoś	Pstrąg		Dorsz	Łosoś	Pstrąg	Dorsz
N-TVb [mg • 100 g ⁻¹]	6,84 ± 0,2	8,32 ± 0,6 ^a	7,92 ± 0,3 ^a	7,92 ± 0,6 ^a	11,83 ± 1,0 ^b	11,74 ± 1,7 ^b	11,69 ± 0,9 ^b	11,22 ± 0,8 ^b
N-TMA [mg • 100 g ⁻¹]	0,83 ± 0,3 ^a	0,92 ± 0,4 ^a	1,41 ± 0,5 ^a	0,75 ± 0,4 ^a	1,39 ± 0,3 ^a	1,66 ± 0,3 ^a	1,60 ± 0,9 ^a	1,41 ± 0,6 ^a
N-NH3 [mg • 100 g ⁻¹]	6,01 ± 0,2 ^a	7,39 ± 0,2 ^a	6,51 ± 0,7 ^a	7,16 ± 0,4 ^a	10,44 ± 0,7 ^b	10,07 ± 1,4 ^b	10,09 ± 0,6 ^b	9,8 ± 0,4 ^b
Psychrofile [log(cfu • g ⁻¹)]	0	0	3,230	2,863 ^a	2,778 ^a	0	3,505	3,079
Mezofile [log(cfu • g ⁻¹)]	0	0	0	0	2,447	0	0	0
Drożdże i pleśnie [log(cfu • g ⁻¹)]	0	0	0	0	0	0	0	0
LAB [log(cfu • g ⁻¹)]	0	0	2,041	2,740	0	0	2,982 ^a	2,919 ^a

^{abc}Średnie w wierszu małej litery lub z różną małą literą różnią się statystycznie istotnie (p < 0,05)

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób marynowania ryb morskich i słodkowodnych opornych na marynowanie polegający na zalaniu surowca rybnego kąpielą marynującą, **znamienny tym**, że jako kąpiel marynującą stosuje się zużytą kąpiel pozostałą po marynowaniu śledzi, zawierającą biologicznie aktywne związki przeciwutleniające i enzymy proteolityczne, którą przefiltrowuje się przez filtr o wielkości porów nie większej niż $0,22\ \mu\text{m}$ i nie mniejszej niż $0,1\ \mu\text{m}$, a po filtracji uzupełnia się stężenia chlorku sodu i kwasu octowego tak, aby uzyskać oczekiwane właściwości sensoryczne marynowanego mięsa.