

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 245905 B1

(12) Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **443190**

(22) Data zgłoszenia: **2022.12.20**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.06.24 BUP 26/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.10.28 WUP 44/2024**

(51) MKP:

A23J 1/04 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A23L 17/00 (2016.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**PATRYK KAMIŃSKI, Gryfice, PL
MARIUSZ SZYMCZAK, Goleniów, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Monika Wielecka, Szczecin, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania surowego preparatu proteaz trawiennych z ryb

PL 245905 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania surowego preparatu proteaz trawiennych z ryb. Ze względu na skład i pochodzenie preparatu najlepszym jego zastosowaniem będzie wspomaganie procesu dojrzewania ryb solonych i marynowanych, szczególnie mięsa śledzia, ale również może znaleźć zastosowanie w przetwórstwie innych gatunków ryb oraz w tenderyzacji (zmiękczeniu) niskiej jakości kulinarnej mięsa zwierząt rzeźnych.

W 2020 roku rynek enzymów na świecie miał wartość 10,6 mld dolarów, a szacuje się, że w 2027r. wartość tego rynku wzrośnie do 14,9 mld USD (Link 1: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/enzyme-market-46202020.html>);

Szelwicka, A., 2020. Przemysłowe zastosowanie enzymów [w:] Interdyscyplinarne Badania Młodych Naukowców, (ed.) Bonek, M., Tański, T., Turoń, K., Kubik, A., Jagiela-Zajac, A., 122–135). Enzymy znalazły szerokie zastosowanie w takich dziedzinach, jak przemysł spożywczy, medycyna, przemysł farmaceutyczny, oczyszczanie ścieków, czy też kosmetologia (Castro-Ceseña, A.B., Sánchez-Saavedra, M. del P., Márquez-Rocha Centro, F.J., 2012. Characterisation and partial purification of proteolytic enzymes from sardine by-products to obtain concentrated hydrolysates. Food Chemistry, 135, 583–589). Największym odbiorcą enzymów jest przemysł spożywczy, gdzie wykorzystuje się głównie mikroorganizmy do wytwarzania suplementów diety, dodatków do żywności, w przemyśle browarniczym, mleczarskim, warzywnym, owocowym, a także w piekarnictwie i rolnictwie (Fernandes, P. 2016. Enzymes in fish and seafood processing. Frontiers in Bioengineering Biotechnology, 4:59. DOI: 10.3389/fbioe.2016.00059). Głównym założeniem w branży enzymatycznej jest dążenie do (i) poprawy właściwości użytkowych i technologicznych enzymów, (ii) zwiększenia produkcji enzymów i ich pozyskiwania, (iii) zmniejszenia kosztów pozyskiwania, (iv) otrzymania i wykorzystania nowych enzymów. Większość preparatów enzymatycznych dostępnych na rynku produkowanych jest przez mikroorganizmy, zaś najmniej pochodzi z surowców roślinnych i zwierzęcych. Wynika to z kosztów produkcji oraz szybkiego rozwoju biotechnologii mikroorganizmów (Whitehurst, R., Van Oort, M. 2016. Enzymy w technologii spożywczej, Warszawa, PWN SA). Mimo to surowce roślinne, a zwłaszcza zwierzęce, pozostają w zainteresowaniu przemysłu, gdyż posiadają cenne enzymy, których nie można jeszcze wyprodukować metodami biotechnologicznymi. Dlatego aktualnie dąży się do pozyskiwania i wykorzystywania enzymów z darmowych surowców ubocznych i odpadów przemysłu spożywczego, które są źródłem enzymów wyjątkowo cennych ze względów technologicznych, np. posiadają wysoką aktywność i stabilność w niskich temperaturach, wysoką specyficzność i dopasowanie do wybranych surowców żywnościowych, mają wysoką aktywność i stabilność w środowisku typowym dla żywności (wysokie stężenie soli, niskie pH). Dlatego od wielu lat poszukiwane są metody pozyskiwania hydrolaz pochodzących ze środowiska morskiego, którego przetwórstwo odznacza się jednym z największych ilości surowców ubocznych (Daboor, S.M., Budge, S.M., Ghaly, A.E., Brooks, S-L., Dave, D. 2010. Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 6 (4): 239–263). Wnętrznosci ryb, które są bogatym źródłem enzymów, zwykle są utylizowane lub przerabiane na mączkę do skarmiania zwierząt. Szczególnie cenną i wykorzystywaną grupą enzymów pozyskiwanych z wnętrznosci ryb są proteazy. Proteazy stanowią obecnie najważniejszą grupę enzymów przemysłowych, które wykorzystuje się na świecie (Michail, M., Vasiliadou, M., Zotos, A. 2006. Partial purification and comparison of precipitation techniques of proteolytic enzymes from trout (*Salmo gair dnerii*) heads. Food Chemistry, 97, 50–55). Niestety uzyskanie odpowiedniej ilości oczyszczonych enzymów w skali przemysłowej, które będą możliwe do wykorzystania w innych procesach jest bardzo drogie, czasochłonne i wymaga specjalistycznego sprzętu, a zwiększenie specyficzności ekstraktów enzymatycznych jest dodatkowo skomplikowane i generuje jeszcze wyższe koszty.

Na świecie od stuleci wykorzystuje się enzymy naturalnie występujące (endogenne) w żywności. W przemyśle rybnym takim przykładem jest tradycyjnie solony śledź, którego proces dojrzewania mięsa odbywa się w całości z wnętrznosciami (Olsen, S., Skara, T. 1997. Chemical changes during ripening of north sea herring.. Luten, J.B., Borresen, T., Oehlenschläger, J. (Ed.), Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp. 305–317; Gildberg, A. 1993. Enzymic processing of marine raw materials. Process Biochemistry, 28(1), 1–15). Długi czas składowania śledzia w soli pozwala na aktywowanie i dyfuzję proteaz trawiennych z przewodu pokarmowego do mięśni. W skutek aktywności enzymów proteolitycznych dochodzi do proteolizy białek mięśniowych na mniejsze białka, peptydy i aminokwasy, co w konsekwen-

cji nadaje mięsu ryb charakterystyczne cechy sensoryczne dojrzałego mięsa. Drugim przykładem jest marynowany śledź, w którym za dojrzewanie mięsa odpowiadają endogenne proteazy mięśniowe nazywane katepsynami. Ze względu na koszty produkcji tradycyjne metody solenia i marynowania są coraz rzadziej stosowane w przemyśle, co powoduje trudność z uzyskaniem dojrzałego mięsa w tych produktach. Dodatkowo ze względu na zmiany klimatu i przełomienie przemysł rybny coraz częściej ma problemy z pozyskaniem wysokiej jakości technologicznej surowca do produkcji marynat. Śledzie mają nie tylko niekorzystny skład lipidów i białek, ale również obniżoną aktywność katepsyn mięśniowych, co prowadzi do obniżonego tempa dojrzewania lub w skrajnych przypadkach śledź nie uzyskuje pełnej dojrzałości mięsa. Z tych powodów przemysł rybny do produkcji śledzi solonych stosuje dodatek preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego, które mają inną specyficzność niż enzymy endogenne ryb i przez to nie umożliwiają prawidłowego procesu dojrzewania mięsa ryb (Stefansson, G. 2013. *Fish Processing; Traditional Processes*, [w]: *Enzymes in Food Processing*, [Ed.] Nagodawithana, T., Reed, G. Thierd edition, Academic Press, Inc. Harcourt Brace & Company, Elsevier, 461464). W tym przypadku na światowym rynku nie występują proteazy, które mogłyby choćby wspomagać dojrzewanie mięsa w kwaśno-słonym środowisku marynat.

W polskich zgłoszeniach patentowych P.438618 i P.441357 przedstawiono pozytywny wpływ dyfuzji enzymów trawiennych z przewodu pokarmowego na poprawę dojrzewania i jakości mięsa śledzi zarówno po składowaniu chłodniczym jak i po marynowaniu. Jednakże oba rozwiązania posiadają wady związane ze zbyt długim czasem dyfuzji proteaz z wnętrza do mięsa (wstępne przygotowanie surowca) i/lub zbyt dużą dyfuzją krwi z wnętrza do mięśni. W skutek przedostawania się hemoglobiny do mięśni, a następnie jej utleniania do oksymyoglobiny i dezoksymyoglobiny mięso marynat nabiera niekorzystnej barwy mięsa i gorzkiego smaku. Ponadto hemoglobina w dojrzewających śledziach sprzyja także utlenianiu lipidów (Andersen, E., Andersen, M.L., Baron, C.P., 2007).

Characterization of oxidative changes in salted herring (*Clupea harengus*) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9545–9553).

Większość enzymów obecnych w układzie pokarmowym ryb występuje również u zwierząt lądowych. Na rynku są dostępne preparaty proteazy trawiennych, jak tripsyna pochodzenia mikrobiologicznego lub z odpadów przetwórstwa świń. Niestety enzymy te, w porównaniu do rybich odpowiedników, wykazują niższą aktywność przy tych samych podstawowych czynnikach technologicznych: temperatura, stężenie soli i wartości pH (De-Vecchi, S.D., Coppes, Z. 1996. *Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and the south-west Atlantic region – A Review*. *Journal of Food Biochemistry*, 20(1), 193–214). Proteazy występujące w rybach można podzielić na aktywne w środowiskach kwaśnym, obojętnym i zasadowym (Haard, N. 1994. *Seafoods chemistry, protein hydrolysis in seafoods*, [w] *Processing Technology and Quality*, [Ed.]: Shahidi, F., Botta, R. Blackie Academic & Professional, Glasgow, 10-33.). Również proteazy pochodzące w obrębie różnych organizmów wodnych różnią się właściwościami fizycznymi i katalitycznymi (Han, X.Q., Shahidi, F. 1995. *Extraction of harp seal gastric proteases and their immobilization on chitin*. *Food Chemistry*, 52, 71–76). Przede wszystkim enzymy ryb morskich są dostosowane do aktywności w niższych temperaturach bytowania i wyższym stężeniu soli niż w przypadku ssaków na lądzie (Shahidi, F., Janak Kamil, Y.V.A. 2001. *Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry*. *Trends in Food Sciences & Technology*, 12: 435–464. DOI: 10.1016/S0924-2244(02)00021-3). Według Simpson i in. (Simpson, B.K., Simpson, M.V., Haard, N.F. 1989. *On the mechanism of enzyme action: digestive proteases from selected marine organisms*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 11, 226–234) enzymy trawienne ryb działają w taki sposób, aby umożliwić rybom optymalne wykorzystanie pokarmu w różnych temperaturach środowiska. Cecha ta jest bardzo ważna dla przemysłu spożywczego, gdyż zastosowanie proteaz z ryb umożliwia prowadzenie szybkiego dojrzewania mięsa w niskiej temperaturze chłodniczej, która ogranicza namnażanie się mikroorganizmów. Ponadto zastosowanie niskich temperatur sprzyja oszczędności energii i chroni składniki odżywcze w żywności przed niekorzystnymi zmianami, np. denaturacją i utlenianiem. Pozwala to na zminimalizowanie niepożądanych reakcji ubocznych (Haard, N.F. 1992. *A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1(1), 17–35). Układ pokarmowy ryb składa się głównie z żołądka, trzustki, jelit, wątroby i wyrostków pylorycznych. W poszczególnych odcinkach układu pokarmowego występuje wiele enzymów, a najbardziej poznanymi są: pepsyna, tripsyna, chymotrypsyna, kolagenaza i karboksypeptydazy (Coppola, D., Lauritano, C., Palma Esposito, F., Riccio, G., Rizzo, C., de Pascale, D. 2021. *Fish waste: from problem to valuable resource*. *Marine Drugs*, 19, 116. DOI: 10.3390/md19020116). Pepsyna i proteazy pepsyno-podobne zlokalizowane

są na ogół w żołądku, wykazują optymalną aktywność w środowisku silnie kwaśnym i mają wysoką aktywność specyficzną. Dowodzi to występowanie tego enzymu w różnych optymalnych wartościach pH środowiska kwaśnego (Gildberg, A., Raa, J. 1983. Purification and characterization of pepsins from Arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). Comparative Biochemistry and Physiology, 75A, 337–342). Z kolei tripsyna, chymotrypsyna, karboksypeptydazy i kolagenazy występujące w jelitach wykazują wysoką aktywność w środowisku obojętnym i zasadowym (Walsh, K.A., Wilcox, P.E. 1970. Serine proteases, [w:] Methods in enzymology, [Ed.]: Perlmann, G.E., Lorand, L., Academic Press, New York, NY, 31–41) (Han, X. Q. 1993. Recovery of digestive enzymes from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and their utilization in food processing. MSc thesis, Memorial University of Newfoundland, St. John's, NF, Canada).

Aby zbadać lub zastosować enzymy z surowców zwierzęcych należy najpierw je wyizolować z tkanki. Wielu autorów dokładnie opisuje metody ekstrakcji enzymów stosowane w skali laboratoryjnej. Zazwyczaj stosowano ekstrakcję za pomocą buforów tris-HCl, fosforanowych, acetonowych, buforu kakodylanowego, wodorowęglanu sodu lub chlorku sodu kierując się wyłącznie wysoką aktywnością specyficzną enzymu (czystością) i wydajnością izolacji. Po ekstrakcji najczęściej stosowanymi zabiegami są: wirowanie w temperaturze chłodniczej, filtracja, ultrafiltracja, dodatek tiocyjanianu sodu, azotku srebra, zwiększenie stężenia chlorku sodu oraz zastosowanie zamrażania-rozmrażania (Chaijaroen, T., Thongruang, C. 2015. Extraction, characterization and activity of digestive enzyme from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera waste. International Food Research Journal 23(4), 1432–1438; Raghavan, S., Hultin, H.O. 2009. Effect of various antioxidants on the oxidative stability of acid and alkali solubilized muscle protein isolates. Journal of Food Biochemistry, 33(2), 163–175; Marmon, S.K., Liljelind, P., Undeland, I. 2009. Removal of lipids, dioxins, and polychlorinated biphenyls during production of protein isolates from Baltic herring (*Clupea harengus*) using pH-shift processes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(17), 7819–7825. DOI: 10.1021/jf901266v.). Ponadto większość przeprowadzonych przez naukowców badań opiera się na ekstrakcji i oczyszczeniu pojedynczych enzymów, stosując w tym celu ekstrakty wodne, acetonowe, PEG, ultrafiltrację, siarczany amonu, liofilizację, chromatografię powinowactwa, czy też chromatografię jonowymienną. Przedstawione metody ekstrakcji są stosowane niemal wyłącznie w warunkach laboratoryjnych, gdyż są skomplikowane, wieloetapowe, kosztowne, odpowiednie dla małych prób oraz wykorzystują odczynniki, które mają działanie toksyczne lub trujące dla człowieka.

W przypadku konieczności przeznaczenia enzymów bezpośrednio do spożycia (medyczne zastosowanie) lub w celu zastosowania do produkcji żywności najczęściej stosuje się przemycanie tkanki i ekstrakcję za pomocą wody, wytrącanie izoelektryczne lub liofilizację, jak w przypadku odzyskiwania pepsyny ze świńskich żołądków (Jurado, E., Vicaria, J.M., Lechuga, M., Moya-Ramirez, I. 2012. Pepsin extraction process from swine wastes. Procedia Engineering, 42, 1469–1475. DOI: 10.1016/j.proeng.2012.07.526). Metoda ta generuje duże ilości ścieków i stosuje drogą liofilizację, a efektem jest stężony preparat pepsyny. Produkowane są również sproszkowane narządy zawierające enzymy trzustki, odwadnianie i usuwanie lipidów z rozdrobnionych narządów wykonuje się za pomocą stężonego etanolu lub innymi rozpuszczalnikami szkodliwymi dla człowieka, które coraz częściej są zastępowane przez ultrafiltrację (El Abboudi, M. 1999. Method for producing pancreatin which contains low amounts of residual organic solvent and product thereof, United States Patent 5,861,291; Dodge, T. 2016. Wytwarzanie enzymów przemysłowych [w:] Enzymy w technologii spożywczej (Ed.): Whitehurst R, Van Oort M., Warszawa, Państwowe Wydawnictwo Naukowe SA).

Przetwarzanie śledzi na produkty solone i marynowane ma taką zaletę, że zastosowane enzymy w tych procesach nie muszą być dokładnie oczyszczone, gdyż wszelkie zanieczyszczenia krwią ulegają wypłukaniu do solanki podczas solenia i marynowania. Jednakże ograniczenie zawartości hemoglobiny w preparatach enzymów jest istotne dla jakości preparatu i jakości gotowego produktu. Barwniki hemowe uznaje się za główne proutleniacze znajdujące się w rybie. Obecność krwi oraz jej składników pigmentowych może mieć wpływ na przyspieszenie utleniania lipidów, wzrost drobnoustrojów oraz zmianę barwy produktu (Abdollahi, M., Marmon, S., Chaijan, M., Undeland, I. 2016. Tuning the pH-shift protein-isolation method for maximum hemoglobin-removal from blood rich fish muscle. Food Chemistry, 212, 213–224). Ważne jest aby jak najwięcej hemoglobiny zostało usunięte tak szybko jak jest to możliwe. Dlatego osobnym problemem podczas pozyskiwania enzymów z tkanek zwierząt jest duża zawartość hemoglobiny, która przechodzi do ekstraktu i może wpływać niekorzystnie w samych preparatach na stabilność enzymów, sprzyjać utlenianiu lipidów pozostałych po ekstrakcji lub oddziaływać chemicznie i sensorycznie w żywności. Z tych powodów ekstrakty enzymów z tkanek

zwierząt próbuje się pozbażyć hemoglobiny stosując chromatograficzne metody, co znacznie podnosi koszty. Dlatego wciąż poszukuje się tańsze i szybsze metody, które oparte są na zjawisku wytrącania niepożądanych substancji z roztworu, za pomocą dodatku różnych substancji strącających (precypitanty). Chaijan i in. (Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., Faustman, C. 2005. Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. Food Chemistry, 93(4), 607–617. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.035) w swoich badaniach udowodnili, że wraz ze wzrostem czasu przechowywania w lodzie i przy obniżeniu pH zmniejsza się skuteczność usuwania hemoglobiny i mioglobiny, które ulegają samoutlenianiu. Jak wskazuje Sajib i in. (Sajib, M., Wu, FL, Fristedt, R., Undeland, I. 2021. Hemoglobin – mediated lipid oxidation of herring filleting co-products during ensilaging and its inhibition by pre-incubation in antioxidant solutions. Scientific Reports, 11:19492. DOI: 10.1038/s41598-021-98997-4) obniżenie wartości pH ma duży wpływ na deoksygenację hemoglobiny do jej utlenionych form w skutek czego dochodzi do przyspieszenia utleniania lipidów. Dlatego wielu autorów w celu poprawy jakości końcowej izolowanych białek używało: przeciwutleniaczy, kwasu cytrynowego, chlorku wapnia, czy też etanolu (Raghavan, S., Hultin, H. O. 2009. Effect of various antioxidants on the oxidative stability of acid and alkali solubilized muscle protein isolates. Journal of Food Biochemistry, 33(2), 163–175. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2008.00202.x.; Marmon, S. K., Liljelind, P., Undeland, I. 2009. Removal of lipids, dioxins, and polychlorinated biphenyls during production of protein isolates from Baltic herring (*Clupea harengus*) using pH-shift processes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(17), 7819–7825. DOI: 10.1021/jf901266v). Wiadomo również, że wraz ze wzrostem stężenia chlorku sodu obniża się rozpuszczalność hemoglobiny ryb – przy 50 mM NaCl rozpuszczalność Hb wynosi poniżej 50%, a przy 500 mM wynosi ok. 10% (Kristinsson, Hordur G.; Hultin, Herbert O. (2004). Changes in Trout Hemoglobin Conformations and Solubility after Exposure to Acid and Alkali pH. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(11), 3633–3643. DOI: 10.1021/jf034563g). Pomimo przedstawienia dużej ilości badań w literaturze naukowej, nie zbadano jeszcze wszystkich metod i nie osiągnięto optymalnych parametrów ekstrakcji enzymów. Rzadkością jest stosowanie więcej niż jednej substancji, zwłaszcza w oddzielnych etapach otrzymywania preparatów.

Warto także zauważyć, że surowe preparaty enzymatyczne uzyskane z wnętrzości ryb mają zanieczyszczenia mikrobiologiczne, które mogą ograniczać trwałość i jakość gotowych produktów spożywczych. Kamiński i in. (Kamiński, P., Szymczak, M., Szymczak, B. 2022. The effect of previous storage condition on the diffusion and contribution of digestive proteases in the ripening of marinated Baltic herring (*Clupea harengus*). LWT – Food Science and Technology, 165, 1–10. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113723; Kamiński, P., Szymczak, M., Szymczak, B. 2022. Effects of Primary Processing and Pre-Salting of Baltic Herring on Contribution of Digestive Proteases in Marinating Process. Applied Sciences, 12(21), 1–15. DOI: 10.3390/app122110877) pokazali w swoich pracach, że mikroflora występująca we wnętrzościach śledzia jest całkowicie eliminowana przez stężenie kwasu octowego i soli stosowane podczas procesu marynowania. Dlatego surowy preparat enzymatyczny po wytworzeniu powinien być natychmiast wykorzystany w produkcji żywności, aby jego jakość mikrobiologiczna oraz stabilność enzymatyczna nie uległa pogorszeniu.

Badania Kamińskiego i innych wykazały, że enzymy trawienne mogą znaleźć zastosowanie do poprawy dojrzewania marynat śledziowych produkowanych z ryb o obniżonej jakości technologicznej, tj. ryb poławianych podczas okresu żerowania, w których aktywność endogennych enzymów mięśniowych jest najniższa (Kamiński, P., Szymczak, M., Szymczak, B. 2022. The effect of previous storage condition on the diffusion and contribution of digestive proteases in the ripening of marinated Baltic herring (*Clupea harengus*). LWT – Food Science and Technology, 165, 1–10. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113723; Kamiński, P., Szymczak, M., Szymczak, B. 2022. Effects of primary processing and pre-salting of Baltic herring on contribution of digestive proteases in marinating process. Applied Sciences, 12(21), 1–15. DOI: 10.3390/app122110877). Ponadto preparat taki można zastosować do procesu solenia ryb i mięsa zwierząt rzeźnych II i III klasy kulinarnej. Preparat może być stosowany również do wstępnej (płytkiej) proteolizy w celu zmiękczenia mięsa i ryb poddawanych następnie obróbce termicznej.

Preparat enzymów trawiennych można zastosować także do poprawy dojrzewania marynat zimnych wykonanych z ryb nieśledziowatych, takich jak łososiowate, karpowate i dorszowate, które w porównaniu do śledzi mają wielokrotnie niższą aktywność mięśniowych katępsyn i wymagają dodatku proteaz do prawidłowego przebiegu procesu proteolizy mięsa w kwaśno-słonych warunkach (Spo-

sób marynowania ryb morskich i słodkowodnych opornych na marynowanie, Szymczak M., Felisiak K., Szymczak B., Tokarczyk G., patent przyznany 23.11.2020, nr P.426641).

Problem techniczny znanych rozwiązań pozyskiwania proteaz trawiennych dotyczy głównie stosowania wielu etapów oczyszczania, wielu różnych metod, dużego ich skomplikowania i wysokich kosztów. Konieczność uzyskania wysoko oczyszczonych enzymów jest związane z konkretnymi wymaganiami aplikacji preparatów enzymów (np. medyczne, żywieniowe) oraz z możliwością ich wszechstronnego zastosowania. Wieloetapowe procesy pozwalają uzyskać oczyszczone enzymy kosztem strat masy i aktywności enzymów na każdym etapie oczyszczania.

Sposób wytwarzania surowego preparatu proteaz trawiennych z ryb, według wynalazku, zwłaszcza śledzia, z wykorzystaniem ekstrakcji enzymów i chlorku sodu, charakteryzuje się tym, że rozdrobnione przewody pokarmowe ryb miesza się z 1–10% wag. wodnym roztworem etanolu w proporcji 1 : 1–10 (masa, kg : objętość, L), mieszaninę homogenizuje się, a następnie oddziela osad, przy czym przed dodaniem wodnego roztworu etanolu lub po oddzieleniu osadu po homogenizacji dodaje się NaCl do uzyskania jego końcowego stężenia co najmniej 3% wag., miesza się, a następnie oddziela się osad. W sposobie w pierwszym etapie następuje ekstrakcja, bez znaczenia czy jest to etanol czy chlorek sodu, bo oba roztwory ekstrahują enzymy. W drugim etapie następuje precypitacja hemoglobiny, znowu bez znaczenia czy etanolem czy chlorkiem sodu (jeżeli w pierwszym etapie stosowano etanol to w drugim stosuje się NaCl, natomiast jeżeli w pierwszym etapie stosowano NaCl to w drugim stosuje się etanol), bo oba roztwory mają działanie synergistyczne i działają korzystnie na wytrącanie hemoglobiny. Po obu etapach uzyskuje się surowy preparat proteaz trawiennych z ryb. W przypadku etanolu końcowe stężenie w roztworze korzystnie wynosi 8% wag., ponieważ niższe stężenie będzie miało niższy efekt synergistyczny z solą, zaś wyższe stężenia etanolu będą co raz bardziej sprzyjać denaturacji białek enzymów. Z kolei stężenie soli powinno wynosić co najmniej 3–6%, aby wystarczająco silnie obniżyć rozpuszczalność hemoglobiny i zahamować namnażanie się mikroorganizmów. Stężenia etanolu i NaCl należy dobrać nie tylko ze względu na oczekiwany efekt ekstrakcji enzymów i strącania hemoglobiny, ale również ze względu na metodę późniejszego zastosowania surowego preparatu enzymatycznego i wymagania dla gotowego produktu. Zwykle wyższe stężenia soli można łatwiej stosować dla metody nastrzyku preparatu, a niższe podczas mokrego solankowania mięsa. Roztwór etanolu najlepiej jest zastosować w pierwszym etapie, gdyż ułatwia on ekstrakcję enzymów, zaś roztwór NaCl w drugim etapie, gdyż działa synergistycznie z etanolem obniżając rozpuszczalność barwników hemowych bez spadku aktywności proteaz przewodu pokarmowego.

Korzystnie, w obu etapach, do oddzielania osadu stosuje się filtrację swobodną lub wirowanie.

Korzystnie oba etapy prowadzi się w temperaturze chłodniczej.

Sposób według wynalazku pozwala na otrzymywanie surowego preparatu proteaz trawiennych (SPP) z przewodów pokarmowych, zwłaszcza śledzia bałtyckiego, o obniżonej zawartości barwników hemowych, przy zachowaniu jak najwyższej aktywności proteaz trawiennych. Sposób pozwala na wykorzystanie jako podstawowego surowca wnętrza śledzia, które stanowią odpad w przemyśle rybnym, co powoduje, że koszt produkcji surowego preparatu enzymatycznego jest niski. Ponadto metoda produkcji jest szybka, gdyż składa się tylko z etapu rozdrabniania wnętrza, ekstrakcji, do której stosuje się wodę, chlorek sodu i etanol w małych stężeniach oraz oddzielania osadu od cieczy za pomocą filtracji swobodnej lub wirowania. W metodzie nie stosuje się substancji toksycznych, co do których przepisy dotyczące przetwarzania żywności wprowadzają zakaz ich użycia lub normują zawartość. Otrzymany surowy preparat proteaz jest wodnym roztworem, co umożliwia stosowanie dodatków innych substancji niezbędnych w technologii ryb solonych i marynowanych. Zaletą surowego preparatu enzymatycznego jest występowanie w nim wielu proteaz, przez co działają one synergistycznie, a preparat posiada szeroką specyficzność enzymatyczną wymaganą do hydrolizy różnych białek tkanki mięśniowej (białka mięśniowe i tkanki łącznej). Preparat zawiera enzymy pochodzące z ryb, które dają lepsze rezultaty dojrzewania mięsa ryb niż stosując preparaty pochodzenia mikrobiologicznego.

Sposób ekstrakcji enzymów proteolitycznych z wnętrza śledzi według wynalazku wykorzystując do ekstrakcji alkohol etylowy i dodatek NaCl charakteryzuje się tym, że do rozdrobnionych wnętrza ryb dodaje się wodny roztwór 8% etanolu i homogenizuje. Następnie przez 30 minut tkanka ryb ulega uwodnieniu, po czym homogenat homogenizuje się ponownie. Osad w homogenacie oddziela się za pomocą wirowania, a do otrzymanego supernatantu dodaje się chlorek sodu do uzyskania 6% stężenia. Dodatek soli do etanolowego ekstraktu z wnętrza powoduje kilkukrotną redukcję zawartości barwników hemowych bez spadku aktywności proteaz przewodu pokarmowego.

Wytrącone z roztworu barwniki hemowe są oddzielane po 30 minutach działania soli stosując wirowanie. Wszystkie etapy powinny być wykonywane w temperaturze chłodniczej, która poprawia stabilność proteaz i utrwala preparat.

Wynalazek oraz rozwiązania porównawcze są przedstawione w przykładzie wykonania, w tabeli 1, która przedstawia rodzaje rozpuszczalników i substancji precypitujących użytych do otrzymywania surowego preparatu proteaz z wnętrzości śledzia oraz jego charakterystyka technologiczna, oraz na rysunku, który pokazuje schemat blokowy otrzymywania surowego preparatu proteaz z wnętrzości śledzia.

Przykład wykonania

Surowiec

Śledź bałtycki (*Clupea harengus membras*) został złowiony w czerwcu 2021 roku (FAO 27IIId) i przetransportowano go w polistyrenowych skrzynkach z lodem do laboratorium w ciągu 24 godzin. Śledź miał $18,9 \pm 0,9$ cm, masę $85,7 \pm 8,9$ g, a masa wnętrzości śledzi wynosiła $4,54 \pm 1,13$ g. Dojrzałość płciowa śledzia w skali Maiera została oceniona na III stadium. Dostarczonego śledzia oceniono za pomocą analizy QIM (Kamiński, P., Szymczak, M., Szymczak, B. 2022. The effect of previous storage condition on the diffusion and contribution of digestive proteases in the ripening of marinated Baltic herring (*Clupea harengus*). LWT – Food Science and Technology, 165, 1–10. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113723) jako świeżego w której zdobył $6,8 \pm 0,4$ punktu na 29 możliwych do uzyskania.

Otrzymanie surowego preparatu proteaz

Ryby patroszono ręcznie, wnętrzości rozdzielano na gonady i układ trawienny. Następnie zebrane przewody pokarmowe śledzi (żołądek, dwunastnica i jelita, wątroba, wyrostki pyloryczne) poddano mechanicznemu rozdrobnieniu w temperaturze $2-4^{\circ}\text{C}$ stosując blender. Rozdrobnione wnętrzości w proporcji 1 : 5 (m : v) łączono z rozpuszczalnikiem i homogenizowano dwukrotnie przez 30 sekundowej z 30 min. przerwą pomiędzy homogenizacjami (Rysunek). Do ekstrakcji enzymów użyto cztery różne rozpuszczalniki: wodę, 8% etanol, 6% roztwór soli kuchennej lub roztwór 6% NaCl i 5% kwasu octowego. Otrzymane cztery różne homogenaty (próby) poddano wirowaniu przez 10 min przy 9000 g i w 4°C . Do zdekantowanego supernatantu w zależności od próby dodano różną substancję precypitującą, której końcowe stężenie w supernatancie podano w tabeli 1. Do precypitacji zastosowano: NaCl 6%, kwas octowy 5%, NaCl 6% + kwas octowy 5%, etanol 8%, EDTA 10 mM, H_2O_2 1%, kwas askorbinowy 57 mM. W sumie zbadano 21 różnych prób otrzymywania surowego preparatu proteaz (SPP) z wnętrzości ryb. Próbę kontrolną wykonano stosując wodę do ekstrakcji oraz bez dodatku substancji precypitującej.

W otrzymanych SPP oznaczono aktywność trypsyny, jako wskaźnika aktywności proteolitycznej, oraz zawartość hemoglobiny. Na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań wybrano trypsynę jako enzym dający najbardziej reprezentatywne wyniki aktywności proteaz w surowych ekstraktach z wnętrzości śledzia (Kamiński, P., Szymczak, M., Szymczak, B. 2022. The effect of previous storage condition on the diffusion and contribution of digestive proteases in the ripening of marinated Baltic herring (*Clupea harengus*). LWT – Food Science and Technology, 165, 1–10. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113723). Przed analizami SPP dodatkowo poddano wirowaniu przy 21000 g przez 10 min. w 4°C . Aktywność trypsyny oznaczono metodą spektrofotometryczną wobec chromogenego substratu N-benzoilo-DL-argininy (BAPNA) zgodnie z metodą Erlanger i in. (Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 95, 271–278. DOI 10.1016/0003-9861(6)90145-x). Zawartość hemoglobiny oznaczono spektrofotometrycznie mierząc absorbancję przy długości fali 540 nm (VAN Assendr. Lr'r, O.W., Zulstra, W.G. 1975. Analytical Biochemistry, 69, 43).

Wyniki

Uzyskane wyniki badań pokazały, że stosując wodę do ekstrakcji można uzyskać 26,61 U aktywności trypsyny w 1 ml surowego preparatu. Preparat ten (próba kontrolna) zawierał również 2,06 U hemoglobiny (Tabela 1). Następnie do preparatu kontrolnego dodano różne substancje precypitujące, co spowodowało zmiany zarówno w aktywności trypsyny i zawartości hemoglobiny. Dodatek kwasu octowego z lub bez NaCl spowodował silną redukcję zawartości hemoglobiny, jednak jednocześnie całkowitą redukcję aktywności trypsyny, co wskazuje że metoda ta nie jest odpowiednia. Kiedy do wodnego ekstraktu dodano etanol, EDTA, perhydrol (H_2O_2), lub kwas askorbinowy, to zarówno zawartość hemoglobiny i aktywność trypsyny nie uległy znacznym zmianom (Tabela 1).

Tylko dodatek NaCl do wodnego ekstraktu zwiększył aktywność trypsyny do 31,46 U, jednak sama sól kuchenna nie spowodowała wytrącania hemoglobiny w takich warunkach.

Drugim rodzajem rozpuszczalnika użytym w badaniach do izolacji proteaz był 8% etanol. W porównaniu do wody etanol jako rozpuszczalnik zwiększył wydajność ekstrakcji z wnętrzości śledzia zarówno hemoglobiny i trypsyny (Tabela 1). Prawdopodobnie etanol obniżył napięcie powierzchniowe, przez co ułatwił dostęp wody do białek, oraz etanol jest lepszym rozpuszczalnikiem dla hydrofobowych substancji. W efekcie SPP otrzymany tylko z użyciem 8% etanolu miał gorsze właściwości technologiczne (iloraz aktywności trypsyny do zawartości hemoglobiny) niż SPP otrzymany tylko z użyciem wody. Zastosowanie kwasu octowego z lub bez NaCl jako precypitatu ponownie dało niekorzystny efekt, gdyż obniżeniu uległy jednocześnie zawartość hemoglobiny i aktywność trypsyny. Również dodatek EDTA i perhydrolu do SPP otrzymanego z 8% etanolem nie spowodowało wytrącenia się hemoglobiny. Z kolei zastosowanie chlorku sodu w stężeniu 6% jako precypitatu spowodowało obniżenie zawartości hemoglobiny z 2,96 U do 0,44 U, przy jednoczesnym wzroście aktywności trypsyny z 27,72 U do 33,93 U.

Trzecim rodzajem rozpuszczalnika użytym do izolacji proteaz był 6% roztwór chlorku sodu. W porównaniu do wody i 8% etanolu wyniki pokazały, że 6% NaCl zwiększył wydajność ekstrakcji trypsyny do 31,46 U i jednocześnie ograniczył ekstrakcję hemoglobiny do 1,93 U (Tabela 1). Chaijareon i Thongruang (Chaijareon, T., Thongruang, C. 2015. Extraction, characterization and activity of digestive enzyme from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera waste. International Food Research Journal 23(4), 1432–1438) także pokazali, że ekstrakcja enzymów trawiennych z wnętrzości Tilapi nilowej solanką korzystnie zwiększyła aktywność enzymatyczną oraz niekorzystnie zawartość całkowitą białka. Prawdopodobnie zastosowane przez nas 6% stężenie soli przyczyniło się do nasolenia-pęcznienia i rozpuszczenia jednych białek oraz wysalania drugich, co było zauważalne odpowiednio jako wzrost i obniżenie ekstrakcji białek enzymów i hemoglobiny. Według Murreya i in. (Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. 2006. Biochemia Harpera. Wydawnictwo Lekarskie, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa) jony chloru oddziałują na wodę hydratacyjną białek hemoglobiny obniżając jej stabilność termiczną i przyczyniając się do szybszej agregacji tych białek. Zastosowanie w drugim etapie EDTA, etanolu lub perhydrolu do 6% ekstraktu enzymów skutkowało redukcją zawartości hemoglobiny w SPP, jednak tylko maksymalnie o połowę, przy jednoczesnym obniżeniu aktywności trypsyny.

Czwartym użytym w badaniach rozpuszczalnikiem był roztwór kwasu octowego i soli kuchennej. Posiadał on bardzo dobre właściwości obniżenia zawartości hemoglobiny w ekstrakcie wnętrzości śledzia, jednak jednocześnie hamował prawie całkowicie aktywność proteolityczną w SPP (Tabela 1). Zastosowanie precypitantów do czwartego rozpuszczalnika nie poprawiło wyników.

Wyniki pokazały zatem, że najlepszy udział aktywności proteolitycznej do zawartości hemoglobiny (UAPH) 0,013 uzyskano stosując 8% etanol do ekstrakcji i 6% dodatek NaCl w rob precypitanta (tabela 1). Metoda ta pozwoliła uzyskać 6 razy lepszą wartość UAPH niż stosując czystą wodę (0,078). Kolejną niską wartość UAPH 0,039 uzyskano stosując 8% etanol do ekstrakcji enzymów i 5% dodatek kwasu octowego do precypitacji hemoglobiny. Jednakże powodem tak dobrego wyniku była bardzo niska zawartość hemoglobiny w tej próbie 0,02 U, pomimo znacznego obniżenia aktywności trypsyny. W następnej kolejności szczególnie niską wartość UAPH 0,046 i 0,049 uzyskano stosując 6% NaCl do ekstrakcji enzymów z wnętrzości oraz precypitant w postaci dodatku, odpowiednio 8% etanolu i 1% H₂O₂.

We wszystkich ekstraktach, w których dodawany był kwas octowy absorbancja hemoglobiny była niska, ale jednocześnie aktywność enzymu była prawie całkowicie hamowana. Duże stężenie kwasu octowego obniżyło wartość pH, co przyczyniło się do inhibicji proteaz zasadowych (Kamiński, P., Szymczak, M., Szymczak, B. 2022. Effects of Primary Processing and Pre-Salting of Baltic Herring on Contribution of Digestive Proteases in Marinating Process. Applied Sciences, 12(21), 1–15. DOI: 10.3390/app122110877). We wszystkich próbach, w których użyto EDTA jako precypitant nie zauważono efektu chelatowania z hemoglobiną i łączenia się barwników hemowych w większe agregaty, które można wytrącić z roztworu.

Tabela 1

l.p.	Rozpuszczalnik użyty do ekstrakcji	Dodatek precypitanta (końcowe stężenie substancji w supernatancie)	Surowy preparat proteaz (SPP)		
			Zawartość hemoglobiny [U]	Aktywność trypsyny [U / ml]	Iloraz zawartości hemoglobiny do aktywności trypsyny
1	woda (próba kontrolna)	brak	2,06	26,61	0,078
2	woda	sól (6%)	2,09	31,46	0,067
3	woda	kwask octowy (5%)	0,08	0,72	0,107
4	woda	NaCl (6%) i kwas octowy (5%)	0,08	0,0	-
5	woda	etanol (8%)	1,99	24,23	0,082
6	woda	EDTA (10 mM)	2,06	26,94	0,076
7	woda	H ₂ O ₂ (1%)	1,99	27,44	0,072
8	woda	kwas askorbinowy (57 mM)	2,36	29,34	0,080
9	etanol (8%)	brak	2,96	27,72	0,107
10	etanol (8%)	sól (6%)	0,44	33,93	0,013
11	etanol (8%)	kwask octowy (5%)	0,02	0,61	0,039
12	etanol (8%)	EDTA (10mM)	2,23	28,60	0,078
13	etanol (8%)	H ₂ O ₂	2,83	31,93	0,089
14	etanol (8%)	NaCl (6%) i kwas octowy (5%)	0,06	0,0	-
15	roztwór NaCl (6%)	brak	1,93	31,46	0,061
16	roztwór NaCl (6%)	EDTA (10mM)	2,12	26,65	0,080
17	roztwór NaCl (6%)	etanol (8%)	1,33	29,08	0,046
18	roztwór NaCl (6%)	H ₂ O ₂ (1%)	1,63	33,30	0,049
19	6% NaCl i 5% kwas octowy	brak	0,41	0,40	1,021
20	6% NaCl i 5% kwas octowy	EDTA (10mM)	0,56	0,64	0,878
21	6% NaCl i 5% kwas octowy	H ₂ O ₂ (1%)	0,35	0,35	1,008

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania surowego preparatu proteaz trawiennych z ryb, zwłaszcza śledzia, z wykorzystaniem ekstrakcji enzymów i chlorku sodu, **znamienny tym**, że rozdrobnione przewody pokarmowe ryb miesza się z 1–10% wodnym roztworem etanolu w proporcji 1 : 1–10 (masa : objętość), mieszaninę homogenizuje się, a następnie oddziela osad, przy czym przed dodaniem wodnego roztworu etanolu lub po oddzieleniu osadu po homogenizacji dodaje się NaCl do uzyskania jego końcowego stężenia co najmniej 3%, miesza się, a następnie oddziela się osad, aby po obu etapach uzyskać surowy preparat proteaz trawiennych z ryb.
2. Sposób wytwarzania surowego ekstraktu według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do oddzielania osadu stosuje się filtrację swobodną lub wirowanie.
3. Sposób wytwarzania surowego ekstraktu według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oba etapy prowadzi się w temperaturze chłodniczej.

Rysunek

