

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243225 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438618**

(22) Data zgłoszenia: **2021.07.29**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.01.30 BUP 05/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.07.17 WUP 29/2023**

(51) MKP:

A23L 17/00 (2016.01)

A23B 4/06 (2006.01)

A23B 4/22 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

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

(74) Pełnomocnik:

Monika Wielecka, Szczecin, PL

(54) Tytuł:

**Sposób poprawy dojrzałości mięsa marynat zimnych ze śledzi poławianych
w okresie żerowania**

PL 243225 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób poprawy dojrzałości mięsa marynowanych śledzi (marynat zimnych ze śledzia) poławianych w okresie żerowania z wykorzystaniem proteaz trawiennych. Sposób można stosować dla śledzi bałtyckich jak i atlantyckich.

Polska jest jednym z największych producentów marynat zimnych ze śledzi w Europie. Duża skala produkcji oraz obniżanie limitów połowowych na śledzia bałtyckiego i atlantyckiego sprawiły, że w przemyśle rybnym przetwarza się śledzie poławiane przez cały rok. Niestety śledź bałtycki złowiony w sezonie żerowania (po tarle) posiada najniższą przydatność technologiczną do produkcji zimnych marynat rybnych. Jest to spowodowane niską zawartością lipidów i niską aktywnością proteaz w tkance mięśniowej (Kołakowski, E., Bortnowska, G., Lachowicz, K., 1993. Wpływ sezonu połowu na szybkość dojrzewania marynat ze śledzia bałtyckiego. XXIV Sesja Naukowa KTiChŻ PAN, Wrocław, 36).

Prawidłowo dojrzałe zimne marynaty ze śledzia posiadają bardzo miękką tkankę mięśniową o charakterystycznym smaku. Za dojrzewanie marynat odpowiada wysoka aktywność kwaśnych proteaz (katepsyn). Niestety ich aktywność jest najmniejsza podczas żerowania śledzia (Kołakowski, E., Bortnowska, G., Lachowicz, K., 1993. Wpływ sezonu połowu na szybkość dojrzewania marynat ze śledzia bałtyckiego. XXIV Sesja Naukowa KTiChŻ PAN, Wrocław, 36). W tym okresie dominuje aktywność proteaz przewodu pokarmowego, który jest wyrzucany podczas filetowania śledzi. Marynaty wykonane ze śledzia złowionego podczas żerowania posiadają mniejszą zawartość produktów hydrolizy białka (aminokwasy i peptydy), które nadają typowy smak i zapach produktu (Sikorski Z., Kołakowski E. 2000. Endogenous Enzyme Activity and Seafood Quality: Influence of Chilling, Freezing, and Other Environmental Factors in: Seafood enzymes Ed.: Haard, N.F. & Simpson). Substancje te posiadają także aktywność biologiczną, cenną dla zdrowia człowieka, np. przeciwutleniającą, regulującą ciśnienie krwi, transportującą mikroskładniki itd. (Gildberg A. 2004. Enzymes and Bioactive Peptides from Fish Waste Related to Fish Silage, Fish Feed and Fish Sauce Production. Journal of Aquatic Food Product Technology, 13, 3–11). Mniejszy stopień proteolizy objawia się także bardziej twardą i gumowatą teksturą mięsa typową dla śledzia surowego.

Na rynku brakuje handlowych preparatów proteaz, które są aktywne w kwaśnym środowisku marynat i mogłyby zastąpić lub uzupełnić niską aktywność katepsyn śledzi. Ze względu na kwaśne środowisko marynat zimnych, tzn. pH w zakresie 3,5–4,5 oraz zawartość soli 2–5%, podczas marynowania najbardziej aktywne są katepsyny: B, D i L. Endoproteazy jakimi są katepsyny D, B1, i L są odpowiedzialne za wzrost miękkości mięśni podczas dojrzewania. Egzoproteazy takie jak A, B2 i C są odpowiedzialne za tworzenie się takich cech sensorycznych jak smak i zapach. Katepsyny działają synergicznie dlatego też pojedynczy enzym nie jest w stanie zastąpić całego kompleksu enzymów odpowiedzialnego za dojrzewanie marynat rybnych. Enzymy przewodu pokarmowego takie jak trypsyna, chymotrypsyna oraz karboksypeptydazy A i B aktywne są w środowisku zasadowym i obojętnym. Dlatego enzymy te są wykorzystywane tylko do tradycyjnego solenia śledzi, a nie do produkcji kwaśnych marynat. Proteaza trawienna jaką jest trypsyna stanowi rolę podobną do katepsyny D. Zaczyna działać jako pierwsza aktywując inne enzymy trawienne. Ponadto nadtrawia ściany komórkowe wnętrza powodując zjawisko pęknięcia brzuszków. Chymotrypsyna w rybach występuje w formie A i B, które mają wysoką aktywność i niską tolerancję na temperaturę i pH (Zhou, L., Budge, S.M., Ghaly, A.E., Brooks, M.S., Dave, D., 2011 Extraction, Purification and Characterization of Fish Chymotrypsin: A Review. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 7, 104–123). Karboksypeptydazy i aminopeptydazy, podobnie do katepsyny B2, A i C, rozkładają białka do peptydów i wolnych aminokwasów, czyli wpływają na smak. Zauważono, że zastosowanie enzymów proteolitycznych z wnętrza śledzia pomogło w uwolnieniu katepsyn z mięśni oraz śledziony i wątroby (Siebert, G., 1958. Aktivität Eiweiss spaltender Enzyme in Fischen. Experientia 14, 65–66; McLay, R., 1980. Activities of cathepsin A and D in cod muscle. Journal of the Science of Food and Agriculture, 31, 1050–1054).

Szymczak i Lepczyński (Szymczak, M., Lepczyński, A., 2016. Occurrence of aspartyl proteases in brine after herring marinating. Food Chemistry, 194, 470–475) stwierdzili, że w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi występują nie tylko aktywne katepsyny ale również pepsyna, pochodząca z przewodu trawiennego śledzi. Wiadome jest, że enzymy trawienne mogą dyfundować do mięśni śledzi podczas składowania chłodniczego ryb (Mukundan, M.K., Antony, P.D., Nair, M.R., 1986. A Review on Autolysis in Fish. Fisheries Research, 4, 259–269). Jednakże, ze względu na zbyt duże różnice w specyficzności enzymów trawiennych, w porównaniu do katepsyn, dotychczas nie uwzględniano ich roli w dojrzewaniu marynat. Ponadto nieprawidłowe składowanie śledzi całych z przewodem pokar-

mowym prowadzi do szybkiego zepsucia ryby. Śledź w okresie tarła można składować chłodniczo do 2 tygodni zaś w okresie żerowania do 1 tygodnia.

Znane są także metody nieenzymatyczne, które poprawiają dojrzewanie marynat zimnych. Należą do nich mrożenie oraz wielokrotne mrożenie-rozmrażanie mięsa śledzi, które powoduje uszkodzenia lizosomów i uwalnianie katepsyn (Szymczak M., Kamiński P., Felisiak K., Szymczak B., Dmytrów I., Sawicki T. 2020. Effect of constant and fluctuating temperatures during frozen storage on quality of marinated fillets from Atlantic and Baltic herrings (*Clupea harengus*). LWT – Food Science and Technology, 133, 109961) (Sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi, Szymczak M., nr prawa wyłącznego P.415721). Fizyczne uszkodzenia struktury mięśni wynikają z powstawania i zmiany wielkości kryształków lodu w zamrażanej żywności.

Problemem technicznym znanych rozwiązań jest brak wykorzystania proteaz trawiennych (zwane zasadowymi proteazami) w procesie marynowania zimnego śledzi z uwagi na ich znikomą aktywność w kwaśnym środowisku marynat. Również dotychczas nie stosowano metody wstępnej enzymatycznej obróbki filetów z udziałem proteaz trawiennych lub innych preparatów proteolitycznych przed procesem zimnego marynowania do poprawy dojrzewania zimnych marynat ze śledzi.

Sposób poprawy dojrzałości mięsa marynowanych śledzi poławianych w okresie żerowania, według wynalazku, z wykorzystaniem proteaz trawiennych, charakteryzuje się tym, że przed marynowaniem składowuje się chłodniczo śledzia całego w wodzie z lodem lub w lodzie o temperaturze od 0 do 4°C przez czas od jednej do czternastu dób, nie dłużej niż do rozpoczęcia pęknięcia brzuchów śledzi. Śledzia całego składowuje się chłodniczo w mieszaninie wody z lodem wodnym zgodnie z metodą CFW – Clean Fresh Water (Mallikage, M. 2001. The effect of different cooling system on quality of pelagic species. (Final project). The United Nations University, Reykjavik, IS.). W sposobie można stosować tradycyjne lodowanie (ryba w lodzie), ale CFW umożliwia składowanie chłodnicze dużej masy śledzi w basenie (1×1×1 metr) bez zginięcia śledzi, z lepszą kontrolą temperatury, bez konieczności odcieku roztopiającego lodu. CFW umożliwia dłuższe składowanie w optymalnych warunkach niż lodowanie. Po składowaniu chłodniczym śledzie są filetowane i poddawane marynowaniu zgodnie z własną technologią marynowania śledzi. W pierwszym wariantcie przed składowaniem chłodniczym śledzia całego zamraża się i składowuje zamrażalniczo przez co najmniej dwie doby w temperaturze nie wyższej niż -20°C, następnie rozmraża się śledzia w temperaturze od 0 do 7°C. Śledzie zamraża się zgodnie z Rozporządzeniem WE nr 853/2004, zał. III, sek. VIII. Rozdz. III D, pkt 1–2. Śledzie rozmraża się zgodnie z dowolną metodą. W innym wariantcie po składowaniu chłodniczym śledzie filetuje się, a następnie filety ze śledzi zamraża się i składowuje zamrażalniczo przez co najmniej dwie doby w temperaturze nie wyższej -20°C, następnie rozmraża się filety w temperaturze 0–7°C. Śledzie zamraża się zgodnie z Rozporządzeniem WE nr 853/2004, zał. III, sek. VIII. Rozdz. III D, pkt 1–2. Śledzie rozmraża się zgodnie z dowolną metodą.

Korzystnie śledzie składowane chłodniczo mają stopień świeżości odpowiadający ocenie QIM w zakresie 9–18 punktów w skali 29 punktowej.

Zaletą rozwiązania według wynalazku jest to, że podczas składowania chłodniczego całego świeżego śledzia następuje dyfuzja proteaz trawiennych z wnętrza do mięśni śledzia. Enzymy trawienne wykonują wstępną proteolizę białek przed marynowaniem, uwalniają katepsyny z lizosomów i wspierają je w procesie marynowania śledzi, w tym bałtyckich. Marynaty otrzymane sposobem według wynalazku mają większą aktywność proteolityczną, większą zawartość produktów hydrolizy białka, które nadają charakterystyczne cechy sensoryczne marynat. Sposób nie wpływa negatywnie na zanieczyszczenie mikrobiologiczne marynowanych filetów śledzi. Sposób według wynalazku wskazuje jaki potrzebny jest czas składowania chłodniczego śledzia aby uzyskać pozytywny wpływ proteaz trawiennych z przewodu pokarmowego na lepsze dojrzewanie marynowanych filetów śledzi. W sposobie wykorzystuje się pozytywny wpływ proteaz trawiennych z przewodu pokarmowego na lepsze dojrzewanie marynowanych filetów śledzi, co jest możliwe dzięki zastosowaniu zamrażania-rozmrażania śledzi całych lub ich filetów przed lub po składowaniu chłodniczym.

Sposób według wynalazku przedstawiono w przykładzie wykonania oraz na rysunku, na którym Fig. 1 przedstawia etapy produkcji marynat zimnych sposobem według wynalazku, Fig. 2 przedstawia aktywność proteaz trawiennych (Fig. 2A) chymotrypsyny, (Fig. 2B) trypsyny esterazowej, (Fig. 2C) karboksypeptydazy A i (Fig. 2D) karboksypeptydazy B w marynatach wyprodukowanych ze śledzi składowanego chłodniczo od 0 do 5 dób z i bez mrożenia, Fig. 3 przedstawia aktywność katepsyny B, D i L w marynatach ze śledzi wyprodukowanych ze śledzi składowanego chłodniczo od 0 do 5 dób z i bez mrożenia, Fig. 4 przedstawia zawartość azotu niebiałkowego oraz frakcji tyrozyny i peptydów

w marynatach wyprodukowanych ze śledzia składowanego chłodniczo od 0 do 5 dób z i bez mroźnia. Na rysunku skróty oznaczają: SCh – Składowany Chłodniczo, SCh+M – Składowany Chłodniczo + Mrożone filety, M+SCh – Mrożony cały + Składowany Chłodniczo, ^{abc}wyniki oznaczone tą samą małą literą nie różnią się statystycznie wpływem czasu składowania chłodniczego; ^{ABC}wyniki oznaczone tą samą dużą literą nie różnią się statystycznie wpływem metody utrwalania.

Przykład

Śledzie złowiono podczas sezonu żerowania i podzielono na 3 próby:

- a) Składowane chłodniczo (SCh) – śledzie całe umieszczono w szczelnie zamkniętych wiadrach z wodą i lodem odpowiednio w stosunku 2:0,4:0,9 (m:m:m), ryby składowano chłodniczo od 1 do 5 dób w temp. $0,8 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$, po czym filetowano i marynowano przez 7 dób w kąpeli marynującej zawierającej 5% kwasu octowego i 6% chlorku sodu w temperaturze 7°C . Udział masy filetów do masy kąpeli wynosił 1,0:1,5. Marynowanie wykonano w szczelnie zamkniętych wiaderkach.
- b) Składowane chłodniczo + Mrożone filety (SCh+M) – śledzie całe składowano chłodniczo tak jak SCh, a następnie filetowano i zamrożono w -20°C w workach z tworzywa PE-PA i składowano zamrażalniczo 3 doby. Filety śledzia w worku rozmrożono w wodzie o temperaturze $+10^{\circ}\text{C}$ i marynowano w sposób opisany powyżej.
- c) Mrożone w całości + Składowane chłodniczo (M+SCh) – śledzie całe zamrożono, składowano zamrażalniczo i rozmrożono jak opisano powyżej. Następnie śledzie całe składowano chłodniczo od 1 do 5 dób, jak opisano powyżej i filetowano. Filety poddano marynowaniu jak opisano powyżej.

Stopień świeżości śledzia przed i podczas składowania chłodniczego oceniono metodą Quality Index Method (QIM) zgodnie z metodą (Nielsen D, Hyldig G. Influence of handling procedures and biological factors on the QIM evaluation of whole herring (*Clupea harengus* L.) Food Res Int. 2004; 37, 975–983). Po marynowaniu z każdej z trzech prób pobierano po 2 filety do badań mikrobiologicznych zachowując zasady aseptyczności. Pozostałe filety odciekały na sicie przez 5 min. W odciekniętych filetach wykonano ocenę sensoryczną metodą Szymczak i in. (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). Pozostałe filety odkórzono, zmielono kuchenną maszynką do mielenia mięsa i w farszu wykonano oznaczenia biochemiczne:

Aktywność proteaz trawiennych

Aktywność proteaz oznaczono w ekstraktach mięsa marynowanego śledzia. Enzymy ekstrahowano z mięsa buforem TrisHCl 150 mM o pH 7,8 (1:10; w:v), ekstrakt odwirowano (9000 g przez 10 min w 4°C) i w supernatancie oznaczono aktywność:

- (i) esterazową trypsyny w pH 8,2 wobec $N\alpha$ -p-Tosyl-L argininę metyl ester hydrochlorida (TAME) metodą Hummel (1959), 1 U zdefiniowano jako 1 μM zhydrolizowanego TAME w 1 min przy 247 nm,
- (ii) chymotrypsyny w pH 7,8 wobec N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) metodą Hummel (1959), 1 U zdefiniowano jako 1 μM zhydrolizowanego BTEE w 1 min przy 256 nm,
- (iii) karboksypeptydazy A w pH 7,5 wobec 4-Methoxyphenylazofornyl-Phe (AAFP) zgodnie z Mock et al. (1996), 1 U zdefiniowano jako 1 μM AAFP zhydrolizowanej w 1 min, stosując pomiar przy 350 nm,
- (iv) karboksypeptydazy B w pH 7,65 wobec Bz-Gly-Arg (BGA) metodą Folk et al. (1960). 1 U zdefiniowano jako 1 μM zhydrolizowanego BGA w 1 min, stosując pomiar przy 254 nm.

Aktywność katepsyn

Aktywność katepsyn oznaczono w ekstraktach mięsa marynowanego śledzia zgodnie z metodą Szymczak (Szymczak M. Sposób zwiększenia aktywności proteolitycznej w kąpeli pozostałej po marynowaniu śledzi, P.415721). Enzymy ekstrahowano z mięsa wodą destylowaną (1:5 m:v), a następnie ekstrakt odwirowano (9000 g przez 10 min w 4°C). W supernatancie zmierzono aktywność katepsyny D oraz katepsyn B i L, odpowiednio wobec substratów: Mca-GKPILFFRLK, (Dnp)-r-NH₂ i Z-FR-MCA. Podczas reakcji fluorescencję mierzono stosując mikrokuwetę za pomocą spektrofлуorymetru (Hitachi, F-7000, Tokio, Japonia) o długościach wzbudzenia i emisji odpowiednio przy 328 i 393 dla katepsyny D i 322 i 460 nm dla peptydaz cysteinowych. Aktywność katepsyn wyrażono w jednostkach fluorescencji (Flu).

Zawartość frakcji produktów hydrolizy białka

Zawartość trzech frakcji azotowych oznaczono w ekstraktach z mięsa przy końcowym stężeniu kwasu trichlorooctowego równym 5%:

- zawartość azotu niebiałkowego 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],
- zawartość 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].

Analiza mikrobiologiczna

Analizę mikrobiologiczną wykonano dla fileatów marynowanego śledzia. Przygotowanie próbek do badań wykonano zgodnie z normą (ISO 6887-1:2017-05 Przygotowanie próbek do badań, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych – Część 1: Ogólne zasady przygotowania zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych). Wykonano oznaczenie: ogólnej liczby bakterii psychrofilnych i mezofilnych zgodnie z normą (ISO 4833-1/2013 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 mould counts – Part 2: Method for counting colonies in products with water activity less than or equal to 0.95) oraz *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-1:2017-08 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae* – Część 1: Wykrywanie *Enterobacteriaceae*).

Uzyskane wyniki badań pokazały, że marynaty wykonane ze śledzia nawet bez składowania chłodniczego (czas 0) zawierały aktywność proteaz trawiennych (Fig. 2ABCD). Dłuższy czas składowania chłodniczego, szczególnie po 3–5 dobach, śledzia całego świeżego powodował wzrost aktywności proteaz trawiennych w marynowanym śledziu (Fig. 2). W efekcie marynaty SCh miały jedną z najwyższych aktywności proteaz trawiennych ale dopiero po 4–5 dobach składowania chłodniczego surowca. Dodanie obróbki mrożenia śledzia całego spowodowało z jednej strony inaktywację proteaz (chymotrypsyny, trypsyny estereazowej oraz karboksypeptydazy A) oraz ułatwiło dyfuzję tych proteaz z wnętrza do mięsa śledzia podczas składowania chłodniczego. W efekcie marynaty M+SCh miały najniższą aktywność proteaz ze śledzia składowanego 0 dob oraz wzrost aktywności wraz z czasem składowania chłodniczego surowca (Fig. 2). Marynaty przygotowane z fileatów śledziowych poddanych zamrażaniu/rozmarzaniu cechowały się dużymi różnicami w aktywności karboksypeptydazy A i B, trypsyny estereazowej szczególnie w 2 i 4 dobie przechowywania (Fig. 2BD). Obecność proteaz trawiennych w marynatach była spowodowana dyfuzją tych enzymów z przewodu pokarmowego do mięsa podczas składowania chłodniczego całego świeżego śledzia. Wyniki pokazały, że dłuższy czas składowania chłodniczego zwykle sprzyjał dyfuzji proteaz trawiennych. Prawdopodobnie ze względu na wartość pH aktywność proteaz trawiennych była największa podczas składowania chłodniczego, zaś podczas marynowania aktywność tych proteaz była znacznie niższa. Oznacza to, że proteazy trawienne wykonały wstępną proteolizę tkanki mięśniowej śledzia, uwolniły część katepsyn z lizosomów, przygotowały substrat dla katepsyn głównie podczas składowania chłodniczego oraz w mniejszym stopniu podczas marynowania. Dowodem na to są wyniki aktywności katepsyn pokazane na Fig. 3 oraz wyniki zawartości produktów hydrolizy białka pokazane na Fig. 4.

Aktywność katepsyny D była większa w marynatach zrobionych ze śledzia dłużej składowanego chłodniczo, szczególnie zamrażanego przed składowaniem chłodniczym (Fig. 3A). W przypadku katepsyny B aktywność była większa tylko po zastosowaniu mrożenia przed składowaniem chłodniczym (Fig. 3B). Badane metody składowania śledzia nie miały wpływu na wyższą aktywność katepsyny L w marynatach oprócz marynat M+SCh wykonanych ze śledzia bez składowania chłodniczego (Fig. 3C).

Składowanie zamrażalnicze śledzi może obniżyć aktywność katepsyny B i L, ale dopiero po przynajmniej 1–2 miesiącach w temp. ok. -18°C. Krótki czas zamrażania głównie wpływa na uwalnianie katepsyn do przestrzeni międzykomórkowej (Szymczak, M., Kamiński, P., Felisiak, K., Szymczak, B., Dmytrów, I., Sawicki, T. 2020. Effect of constant and fluctuating temperatures during frozen storage on quality of marinated fillets from Atlantic and Baltic herrings (*Clupea harengus*). LWT – Food Science and Technology, 133, 109961). Dlatego można przypuszczać, że wyższa aktywność katepsyn była spowodowana przez (i) uwalnianie katepsyn z lizosomów przez proteazy trawienne i/lub (ii) uszkodzenie lizosomów przez kryształy lodu.

Wysoka aktywność proteaz trawiennych (Fig. 2) i jednocześnie katepsyn (Fig. 3) w marynatach ze śledzia mrożonego w całości i składowanego chłodniczo (M+SCh) przełożyła się na największą zawartość azotu niebiałkowego (NPN) w tych marynatach do 3 doby składowania śledzia (Fig. 4A). Mniejszą zawartość NPN zawierały marynaty ze śledzi składowanego i mrożonego, a najmniejszą zawartość NPN miały marynaty ze śledzi tylko składowanych chłodniczo. Po 3–4 dobach składowania surowca zawartość NPN w marynatach była najniższa, po czym zawartość NPN rosła do 5 doby składowania. Wzrost NPN z czasem składowania wskazuje na większą aktywność proteaz w mięsie marynat, zaś spadek zawartości NPN może wskazywać na dyfuzję tych związków z mięsa do kąpiel, która jest intensywniejsza w śledziu o wyższym stopniu proteolizy białka (Szymczak, M., Kołakowski, E., 2012. Losses of nitrogen fractions from herring to brine during marinating. *Food Chemistry*, 132, 237–243). Poszczególne frakcje peptydów i aminokwasów występujące w NPN również potwierdzają pozytywny wpływ proteaz trawiennych na marynowanie śledzia. W marynatach M+SCh, w których stwierdzono największy wzrost aktywności endopeptydaz, również stwierdzono największą zawartość frakcji peptydów (Fig. 4B). Natomiast w marynatach SCh+M zawartość PHB(R) rosła łagodniej (Fig. 4B), co było powiązane z mniejszą aktywnością endopeptydaz (Fig. 2 i Fig. 3). W przypadku frakcji aminokwasów [PHB(A)] różnice w zawartości pomiędzy trzema metodami były mniejsze niż dla frakcji peptydów. Zawartość PHB(A) w marynatach była większa gdy śledzia całego dłużej składowano chłodniczo, jednak wzrost był zauważalny dopiero po 1–3 dobach składowania (Fig. 4C). Najwyższą zawartość frakcji aminokwasowych miały marynaty ze śledzia mrożonego i do 3 doby składowania chłodniczego surowca. Marynaty sporządzone po 5 dobach składowania chłodniczego surowca nie różniły się istotnie zawartością PHB(A) bez względu na metodę składowania (Fig. 4C).

Podczas składowania chłodniczego śledzia świeżego rosła wartość oceny QIM od 9 punktów w dobie 0 do 18,6 punktów po 5 dobach składowania (Tabela 1), w skali 29 punktów. Wraz z wyższą wartością QIM rosła wartość oceny sensorycznej marynat SCh i SCh+M od 4,6 do 4,8–4,9 punkta, zaś w marynatach SCh+M od 4,1 do 4,4 tylko do 2 doby składowania surowca (Tabela 1). Od 1 do 3 doby składowania śledzia najwyższą ocenę sensoryczną otrzymały marynaty SCh, zaś od 4 do 5 doby składowania otrzymały marynaty SCh+M. Najniższą ocenę uzyskały marynaty M+SCh, gdyż mrożenie spowodowało denaturację wrażliwych proteaz, przez co w proteolizie białek śledzia większy udział miała chymotrypsyna. Ponadto dezintegracja struktury tkanki mięśniowej białek mięśniowych śledzia pod wpływem mrożenia spowodowała nierównomierne wnikanie proteaz trawiennych i/lub uwalnianie katepsyn. Mrożenie sprzyjało wysokiej aktywności chymotrypsyny, która hydrolizuje wiązania peptydowe z różnymi grupami karbonyłowymi α -aminokwasów i atakuje większe niepolarne grupy aromatyczne (tyrozyna, fenyloalanina, tryptofan), z których powstają gorzkie produkty hydrolizy białek. Gorzki smak PHB pochodzi od gorzkich peptydów, a przede wszystkim od aminokwasów hydrofobowych (fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan, leucyna, walina i izoleucyna) ułożonych na C-końcu peptydu (Umetsu, H., Ichishima, E., 1985. Mechanism of Digestion of Bitter Peptide from a Fish Protein Concentrate by Wheat Carboxypeptidase. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 32, (4), 281–287). Peptydy takie są wielokrotnie bardziej gorzkie niż pojedynczy aminokwas występujący na końcu tego peptydu (Nishimura, T., Kato, H., 1988. Taste of Free Amino and Peptides. *Food Reviews International*, 4(2), 175–194).

Wysoka aktywność karboksypeptydaz A i B w marynatach SCh i SCh+M, w przeciwieństwie do marynat M+SCh, wpłynęła na polepszenie cech sensorycznych tych pierwszych. Wymienione karboksypeptydazy odpowiadają za usuwanie goryczki w żywności poprzez (i) wytwarzanie niskocząsteczkowych kwaśnych peptydów posiadających zdolność maskowania gorzkiego smaku oraz (ii) przez odcięcie gorzkich aminokwasów od peptydów wskutek czego smak gorzki obniża się nawet kilkusetkrotnie (Broncano, J.M., Timón, M.L., Parra, V., Andrés, A.I., Petró, M.J., 2011. Use of proteases to improve oxidative stability of fermented sausages by increasing low molecular weight compounds with antioxidation activity. *Food Research International*, 44 (9), 2655–2659; Kołakowski, E., 2005. Enzymy i ich wykorzystanie w modyfikacji białek żywnościowych [w: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*]. Red. E. Kołakowski, W. Bednarski, S. Bielecki. Wyd. Akademii Rolniczej w Szczecinie, Szczecin 31–99). Zatem niska aktywność karboksypeptydazy B w marynatach M+SCh mogła zdecydować o niższej ocenie sensorycznej (Tab. 1).

Wyniki badań mikrobiologicznych wykazały, że czas składowania chłodniczego oraz metoda składowania nie wpłynęły na zwiększenie zanieczyszczenia marynowanych filetów przez bakterie psychrofilny i mezofile, oraz drożdże i pleśnie. Zanieczyszczenie tymi mikroorganizmami było mniejsze niż 1 log(jtk/g) (Tabela 2). W badanych marynatach stwierdzono obecność *Enterobacteriaceae*, które stanowią florę fizjologiczną przewodu pokarmowego śledzi. Prawdopodobnie bakterie te dyfun-

dowały z wnętrzości do mięsa razem z materia ą przewodu pokarmowego, w podobny sposób jak przypadku proteaz trawiennych. Najwi ksze zanieczyszczenie *Enterobacteriaceae* wynosi ło tylko 0,801 log(jtk/g) w marynatach zrobionych ze śledzia bez składowania chłodniczego (czas 0 dni). Dł uższy czas składowania chłodniczego obniży ło istotnie ilo ść *Enterobacteriaceae* w marynatach nawet do < 0,1 log(jtk/g). Zastosowanie mrozenia przed lub po składowaniu chłodniczym śledzia spowodowa ło redukcję liczebno ści *Enterobacteriaceae* do poziomu poniżej 0,1 log(jtk/g). Nowa metoda produkcji marynat nie mia ła zatem istotnie negatywnego wpływu na jako ść mikrobiologiczn ą mięsa marynat.

Tabela 1

Ocena QIM śledzia całego podczas składowania chłodniczego oraz ocena sensoryczna marynowanych filetów stosuj ąc różne metody składowania śledzia.

| Metoda składowania śledzia przed marynowaniem | Czas składowania chłodniczego (doby) | Ocena QIM dla śledzia całego podczas składowania chłodniczego (punkty) | Ocena sensoryczna marynowanych filetów śledzia (punkty) |
|--|--------------------------------------|--|---|
| Składowany chłodniczo (SCh) | 0 | 9,1 ±0,6 | 4,61 ±0,15 |
| | 1 | 13,1 ±0,5 | 4,69 ±0,08 |
| | 2 | 13,8 ±0,5 | 4,78 ±0,05 |
| | 3 | 14,8 ±0,5 | 4,76 ±0,01 |
| | 4 | 16,2 ±0,5 | 4,79 ±0,03 |
| | 5 | 18,6 ±0,4 | 4,80 ±0,05 |
| Składowany chłodniczo + Mrożone filety (SCh+M) | 0 | 9,1 ±0,6 | 4,61 ±0,15 |
| | 1 | 13,1 ±0,5 | 4,67 ±0,10 |
| | 2 | 13,8 ±0,5 | 4,73 ±0,03 |
| | 3 | 14,8 ±0,5 | 4,72 ±0,07 |
| | 4 | 16,2 ±0,5 | 4,83 ±0,02 |
| | 5 | 18,6 ±0,4 | 4,92 ±0,05 |
| Mrożony cały + składowany chłodniczo (M+SCh) | 0 | 12,2 ±0,5 | 4,13 ±0,32 |
| | 1 | 12,6 ±0,4 | 4,03 ±0,28 |
| | 2 | 14,2 ±0,5 | 4,40 ±0,31 |
| | 3 | 13,8 ±0,4 | 4,24 ±0,28 |
| | 4 | 14,3 ±0,4 | 4,32 ±0,21 |
| | 5 | 14,2 ±0,4 | 4,27 ±0,29 |

Tabela 2

Zanieczyszczenie mikrobiologiczne marynowanych filetów ze śledzia składowanego przed marynowaniem od 0 do 5 dób trzeba metodami [log(jtk/g)].

| Metoda składowania śledzia | Czas składowania śledzia (doba) | Psychrofile | Mezofile | Drożdżc i pleśnie | <i>Enterobacteriaceae</i> |
|---|---------------------------------|-------------|----------|-------------------|---------------------------|
| Składowanie chłodnicze (SCh) | 0 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | 0,801 |
| | 1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | 0,739 |
| | 2 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | 3 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | 0,746 |
| | 4 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | 5 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| Składowanie chłodnicze + mrożenie (SCh+M) | 0 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | 0,801 |
| | 1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | 2 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | 3 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | 4 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | 5 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| Mrożenie + składowanie chłodnicze (M+SCh) | 0 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | 1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | 2 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | 3 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | 4 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | 5 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób poprawy dojrzałości mięsa marynowanych śledzi poławianych w okresie żerowania z wykorzystaniem proteaz trawiennych, **znamienny tym**, że przed marynowaniem składa się chłodniczo śledzia całego w lodzie lub w wodzie z lodem o temperaturze od 0 do 4°C przez czas od 1 do 14 dób, nie dłużej niż do rozpoczęcia pęknięcia brzuchów śledzi, przy czym przed składowaniem chłodniczym śledzia całego zamraża się i składa zamrażalniczo przez co najmniej dwie doby w temperaturze nie wyższej niż -20°C, następnie rozmraża się śledzia w temperaturze 0–7°C lub po składowaniu chłodniczym filety ze śledzia zamraża się i składa zamrażalniczo przez co najmniej dwie doby w temperaturze nie wyższej -20°C, następnie rozmraża się filety w temperaturze 0–7°C.
2. Sposób poprawy dojrzałości mięsa marynowanych śledzi według zastrz. 1, **znamienny tym**, że śledzie składowane chłodniczo mają stopień świeżości odpowiadający ocenie Quality Index Method QIM w zakresie 9–18 punktów w skali 29 punktowej.

Rysunki

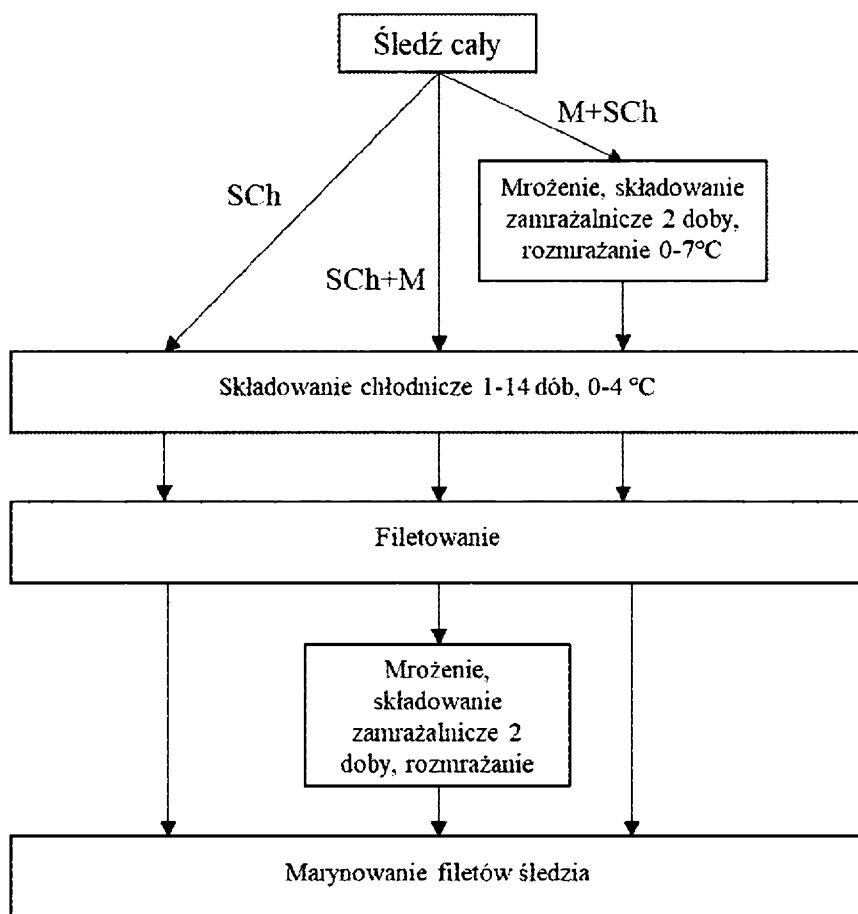


Fig. 1

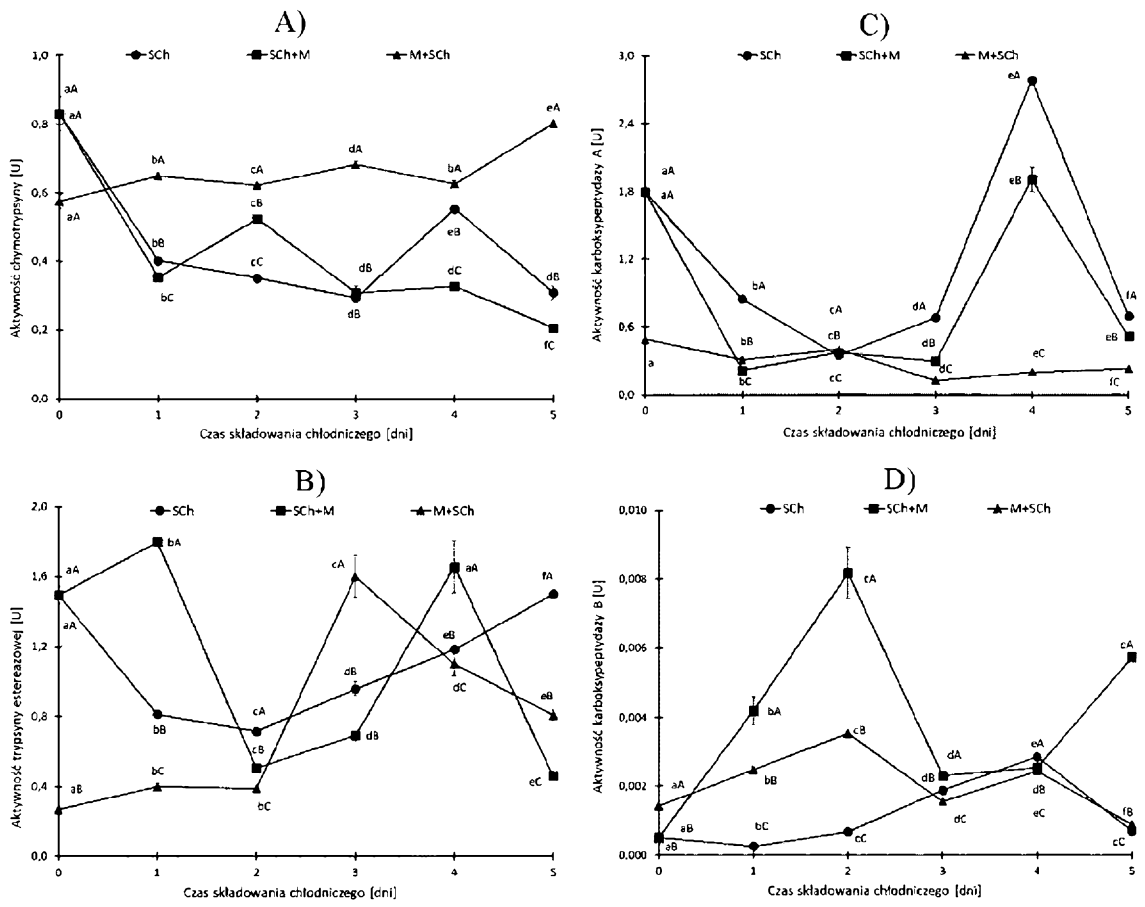


Fig. 2

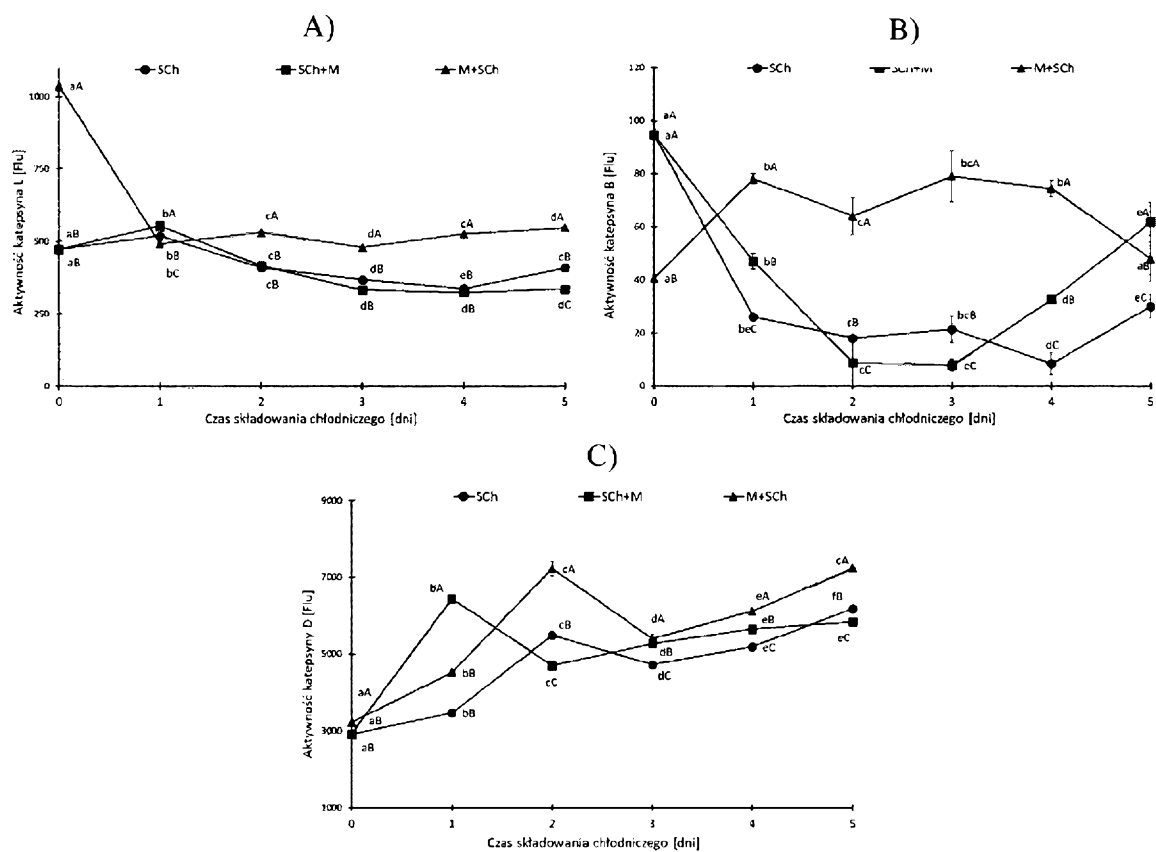


Fig. 3

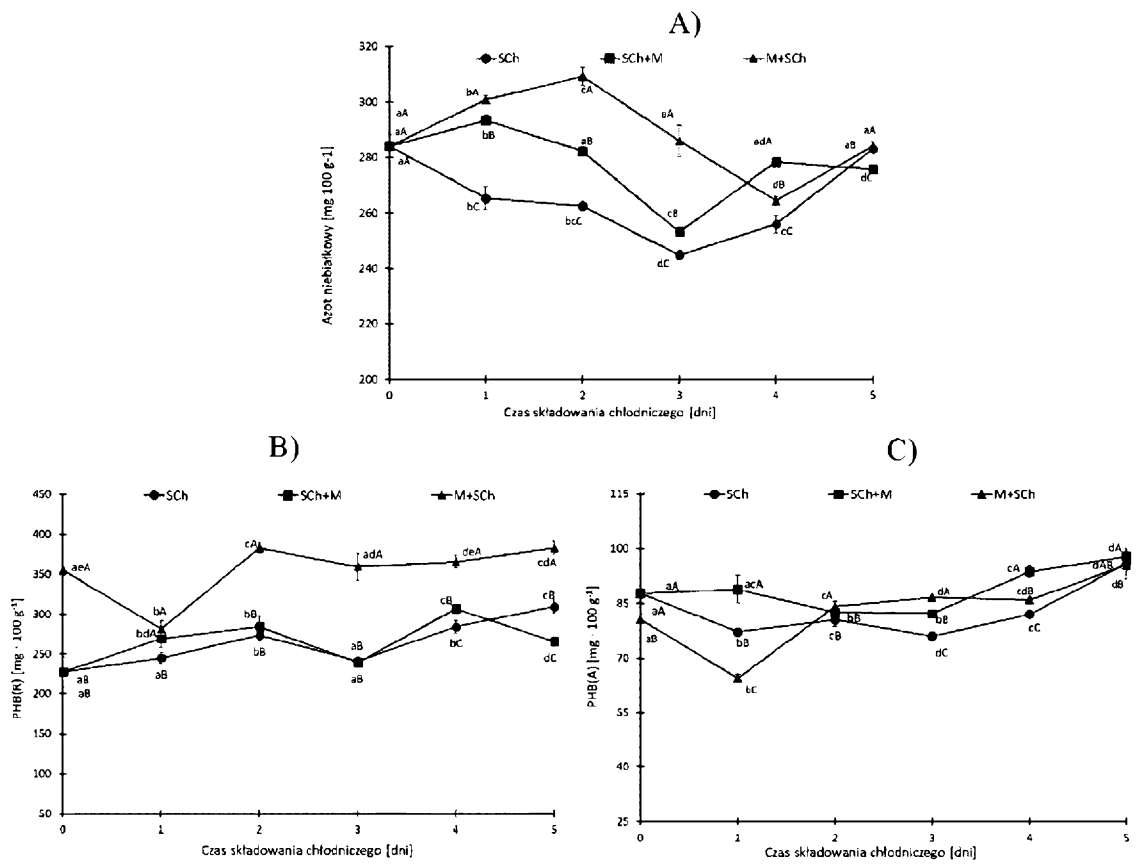


Fig. 4