

## Ograniczanie strat związków azotowych w marynatach śledzi bałtyckich przez roślinne inhibitory proteaz

### Streszczenie

Nakreślono rolę endogennych enzymów proteolitycznych w dojrzewaniu mięsa ryb, w procesie marynowania. Wykazano możliwość zmniejszenia strat związków azotowych uwalnianych z filetów do zalewy, przez dodatek do zalewy wielofunkcyjnych, białkowych inhibitorów proteaz, tłumiących nadmierną aktywność proteaz cysteinowych, aspartylowych, serynowych, w dojrzałym już mięsie. Przedstawiono dodatkowe, potencjalne funkcje tych białek, jako substancji anty-drobnoustrojowych i antyoksydacyjnych.

**Słowa kluczowe:** ryby, marynaty, dojrzewanie mięsa, proteoliza, związki azotowe, inhibitory proteaz

## Limitation of the losses of nitrogen fractions in marinades of Baltic herrings by protease inhibitors from plants

### Summary

The significance of endogenous proteolytic enzymes in ageing for herrings fillets marinating process has been overviewed. The possibility of losses reduction of nitrogen components from fillets to brine by addition to brine multifunctional protein aceouspeptidase inhibitors able to diminish undesired cysteine, aspartyl, serine proteolysis activity in already aged meat. An antimicrobial and antioxidant factors of these proteins were also presented.

**Key words:** fish, marinades, meat ageing, proteolysis, nitrogen compounds, protease inhibitors

### Wstęp

Jakość organoleptyczna mięsa, jest ogólnym terminem obejmującym szereg takich cech, jak: smak, barwa, zapach, tekstura. Mechanizmy formowania się tych cech jakościowych, są powiązane ze sobą i uzależnione od wielu czynników, odzwierciedlając złożoność procesu marynowania i polegającej na przemianie surowej tkanki mięśniowej w dojrzałe organoleptycznie mięso (Kemp i in. 2010). Przyjmuje się, że proteoliza białek fibrylarnych mięśni, przez endogenne proteazy, jest jednym z ważniejszych procesów kształtujących cechy jakościowe mięsa (Kołakowski, Kołakowska 2006; Kemp, Parr 2012). Proteoliza *post mortem*, jest składową procesu, określanego, jako apoptoza – zaprogramowane obumieranie komórek, pozbawionych możliwości wytwarzania energii wskutek zatrzymania dostępu do tlenu i substratów oddechowych w organizmach zwierząt wykrwawionych lub śniętych (Ouali i in. 2006). Proces apoptozy uruchamia się wkrótce po uboju lub śnięciu organizmu z udziałem przynajmniej czterech wielo-enzymatycznych kompleksów proteolitycznych (Sentandreu i in. 2002; Herrera-Mendez i in. 2006):

- kalpain – kilku form wewnątrzkomórkowych proteaz cysteinowych aktywowanych przez mili- i mikro-molarne stężenia jonów wapnia;
- katepsyn – grupy lizosomalnych proteaz cysteinowych (katepsyny B, L, H, S, K, F) aktywnych w pH 5,2 – 6,8 i aspartylowych (katepsyny D i L) aktywnych w kwaśnym pH (3,0 – 5,0);
- kaspaz – kilkunastu rodzajów peptydaz cysteinowych;
- proteasomów – multikatalitycznych struktur komórkowych o masie cząsteczkowej 700000 Da.

Wysoką aktywność katepsyn D stwierdzono w mięśniach wielu gatunków ryb (Nielsen, Nielsen 2001). Biorą one

udział w metabolizmie białek miofibrylarnych, szczególnie w okresie wędrówek i tarła, jak u ryb łososiowatych, gdy część białek mięśni zostaje użyta do budowy gonad. Aktywność katepsyny D w mięśniach ryb jest w tym okresie wyższa niż w mięśniach zwierząt lądowych. Katepsyny D biorą także udział w degradacji białek mięśni *post mortem* nawet, gdy pH mięśni wynosi 6,0 – 6,5, zatem daleko od optymalnego dla tego enzymu zakresu pH (2,5 – 3,5) przyczyniając się do zmiany tekstury mięśni ryb. Obniżenie pH środowiska w marynatach znacznie ułatwia działanie katepsyny D. Nielsen i Nielsen (2001), posługując się wysoce oczyszczonym preparatem katepsyny D z mięśni śledzi, udowodnili, że enzym degraduje głównie miozynę, aktynę i tropomiozynę miofibrylli śledzia i podobny jest w swym działaniu do katepsyn D zwierząt lądowych.

Oprócz tych systemów enzymatycznych w apoptozie mogą brać udział uwalniane z komórek miękiszowych proteazy serynowe, aktywne w neutralnym pH, powodując proteolityczną degradację białek miofibrylarnych, natomiast w metabolizmie białek tkanek łącznych uczestniczy kilka metalopeptydaz. Stwierdzono, że przynajmniej w wypadku wołowiny, unieczynnienie endogennych proteaz serynowych mięśni przy pomocy inhibitorów tych proteaz spowolniło dojrzewanie mięsa wołowego, a przypuszczalnie zjawisko to dotyczy także mięśni innych zwierząt. Aktywność peptydaz serynowych i ich inhibitorów uznaje się za najbardziej miarodajny wskaźnik prognostyczny, określający tempo dojrzewania mięsa wołowego (Sentandreu i in. 2002).

Kołakowski i Bednarczyk (2002; 2003) oraz Kołakowski i in. (2004) badali udział enzymów lizosomalnych, katepsyn i kalpain w procesie dojrzewania tuszek odgłowionego i patroszonego śledzia bałtyckiego w zalewach, o różnych

stężeniach soli i kwasu octowego. Współzależność oddziaływania soli, kwasów organicznych, przypraw na proteolityczne dojrzewanie mięśni, stan bezpieczeństwa mikrobiologicznego i atrakcyjność konsumpcyjną ryb solonych i marynowanych przedstawili Kołakowski i Kołakowska (2006); Szymczak i in. (2009); Szymczak i Kołakowski (2012). Proteolityczne procesy zachodzące w filetach i tuszkach marynowanych ryb podczas kilku-tygodniowego okresu przechowywania mogą z upływem czasu spowodować pogorszenie jakości wskutek nadmiernej degradacji białek miofibrilarnych i rozpadu tkanki, uwalnianie fragmentów tkanki do zalewy, powodując jej zmętnienie, utratę jędrności, soczystości, powstawanie mączystej tekstury, straty związków azotowych przenikających do zalewy i zwiększenie ilości odpadów do utylizacji.

Ograniczenie proteolizy dojrzałego już mięsa przez inhibitory enzymów proteolitycznych powinno przedłużyć konsumpcyjną atrakcyjność marynowanych ryb, ograniczyć straty związków azotowych dyfundujących do zalewy i zmniejszyć ekologiczne obciążenie. Mając na uwadze różnorodność enzymów, jakie mogą uczestniczyć w proteolitycznym procesie dojrzewania mięsa, pożądanym byłby zestaw inhibitorów proteaz, zdolnych do inaktywacji różnorodnych proteaz obecnych w mięśniach. Takie wielofunkcyjne inhibitory enzymów proteolitycznych posiadają niektóre tkanki roślin uprawnych np. bulwy ziemniaka, nasiona soi i innych roślin motylkowatych (Jonakova i in. 1982; Pouvreau i in. 2001; Mosolov i in. 2001; De Leo i in. 2002; Pouvreau 2004; Mosolov, Valueva 2005). Służą one roślinom, jako białka zapasowe i modulatory metabolizmu własnych białek, jako czynniki anty-żywnościowe i obronne, chroniące przed atakiem szkodników roślinożernych i mikroorganizmów patogennych. Roślinne inhibitory proteaz znajdują zastosowanie w przetwórstwie żywności, jako substancje chroniące surowce przed niepożądaną autoproteolizą, np. przy wytwarzaniu surimi, przetwarzaniu morskich skorupiaków i mięczaków (Garcia-Carreno 1996). Niektóre formy ziemniaczanych inhibitorów proteaz zdolne są do inaktywacji kilku rodzajów proteaz, np.: trypsyny i chymotrypsyny; trypsyny i elastazy; trypsyny i peptydazy cysteinowych (papainy, katepsyn B i L); trypsyny i peptydazy aspartylowej (katepsyn D), a niektóre ponadto mają cechy antyoksydantów i peptydów antyrodnoustrojowych (Mares i in. 1989; Rowan i in. 1990; Ishikawa i in. 1994; Valueva i in. 1997; Gruden i in. 1997). Grupa ziemniaczanych inhibitorów proteaz wykazywała powinowactwo wobec katepsyn D z mięśni troci (Busse, Belitz 1976).

### Cel badań

Celem badań było ustalenie, czy obecne w bulwach ziemniaka białkowe inhibitory trypsyny, posiadające zarazem zdolność hamowania aktywności innych peptydaz, oddziałują na endogenne peptydazy tkanki mięśniowej marynowanych śledzi i czy mogą ograniczać dyfuzję peptydów z tkanki mięśniowej do zalewy.

### Materiał i metody

#### Ryby

Surowcem do badań były śledzie bałtyckie złowione w pobliżu Kołobrzegu w dwu terminach zimą 2005 r.. Ryby otrzymano w fazie zanikającego już stężenia pośmiertnego.

Po odłowieniu, wypatroszeniu i umyciu, podzielono płyty na dwa filety. Jeden filet rybny stanowił próbę kontrolną, a drugi filet traktowano preparatem inhibitorów proteaz według schematu (tab. 1), umieszczając 150 g porcję filetów i 150 ml zalewy w słoikach o objętości 300 ml i przechowując je w temp 6 – 10°C przez 3 miesiące.

Tabela 1. Schemat przygotowania materiału do badań

Table 1. Arrangement of experiments

Termin połowu; Time of caught	Preparat inhibitorów proteaz; Protease inhibitors	Ilość prób każda po 0,15 kg; Number of samples 0.15 kg each
Zima I - grudzień; Winter I - December	-	6
Zima I - grudzień; Winter I - December	+	6
Zima II - styczeń; Winter II - January	-	6
Zima II - styczeń; Winter II - January	+	6

### Skład zalewy

Zalewa zawierała ocet (5%), sól kuchenną (5%), cukier (0,5%) oraz przyprawy: (1 gałka ziela angielskiego, ½ liścia laurowego i 1/4 pokrojonej główki cebuli na 150 ml porcję zalewy w słoiku o objętości 300 ml. Po zagotowaniu i ostudzeniu zalewy do części zalewy dodano preparat inhibitorów proteaz uzyskując 0,05 % stężenie białek inhibitorowych w zalewie.

### Preparat inhibitorów proteaz

Inhibitory proteaz izolowano z soku roztartych ręcznie bulw ziemniaka odmiany Baszta metodą chromatografii powinowactwa na złożu Sepharose 4B z immobilizowaną przy pomocy bromocyjanu trypsyną wołową (Sigma) (Przewodowski i in. 2007). Izolowanie inhibitorów polegało na precypitacji nieinhibitorowych białek soku bulw przez obniżenie pH soku do 3,5, dializie otrzymanego roztworu wobec 0,1 M buforu octanowego w tym samym pH celem usunięcia związków fenolowych. Następnie dializowany sok doprowadzono do pH 7,8 dodając Tris (*in substantia*) i przesączano przez złożo chromatograficzne zrównoważone do takiego samego pH buforem cytrynianowym. Białka nie adsorbujące się na złożu wymywano 0,1M buforem cytrynianowym o pH 6,0 aż do zaniku absorbancji przy 280 nm w wypływie ze złoża. Związane z trypsyną białka inhibitorowe wypierano roztworem 0,005 M HCl z dodatkiem 0,4% NaCl. Otrzymany roztwór białek neutralizowano, dializowano, wyjaławiano przez filtrację na filtrze poliwęglanowym o porowatości 0,2 µm (Ultra-por) i przechowywano w postaci zliofilizowanej. Ocenę aktywności inhibitorowej preparatu wobec poszczególnych proteinaz wykonano tak jak Pouvreau (2004).

### Ocena cech organoleptycznych marynaty

Po 3-miesięcznym okresie przechowywania marynat w temperaturze 6 – 12°C, filety umieszczano na lejku wyszczelnionym propylenową siatką na owady, aż do całkowitego odcieknięcia zalewy. Filety ważono i mierzono objętość zalewy celem skorygowania zmian masy i objętości zachodzących podczas procesu marynowania i przechowywania. Ocena cech organoleptycznych filetów i zalewy dotyczyła następujących właściwości:

- mięso – zapach, barwa, smak, tekstura, wygląd;
- zalewa – zapach, barwa, smak, klarowność.

Ocenę tę przeprowadzano oddzielnie po otwarciu każdego słoika marynaty. Ocenę organoleptyczną przeprowadził zespół trzech osób. Każda z tych osób oceniała indywidualnie wszystkie cechy organoleptycznie przyjmując skalę od 1 do 5 (najniższa ocena = 1; najwyższa ocena = 5). Średnie arytmetyczne ocen indywidualnych dały końcową ocenę cech organoleptycznych filetów i zalewy.

### Oznaczenie zawartości związków azotowych

Zawartość związków azotowych oznaczano metodą Kjeldahla w aparacie Büchi. Do analizy całkowitej zawartości związków azotowych pobierano po 5 ml odciekniętej zalewy, którą przedtem ujednorodniono przez 20 sekundową homogenizację w turbinowym homogenizatorze IKA. Ponadto, w zalewie oznaczano zawartość związków azotowych rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w 5% kwasie trójchlorooctowym. Próbkę zalewy (10 ml) i takie same objętości 10% kwasu trójchlorooctowego zmieszano i pozostawiano na 20 minut, a następnie strącone w 5% TCA substancje peptydowe oddzielano przez filtrację na sączku bibułowym (Kořakowski i in. 2004). Wyniki oznaczeń zawartości związków azotowych w poszczególnych próbach analizowano testem *t* Studenta.

### Wyniki

#### Inhibitory proteaz

W skład preparatu wchodziły białka hamujące aktywność trypsyny, chymotrypsyny, subtylizyny i subtylopeptydazy, katepsyny D, katepsyn cysteinowych. Białka preparatu inhibitorów dzieliły się podczas elektroforezy w 7% żelu poliakryloamidowym na 8 frakcji (Przewodowski i in. 2007). Roztwór wodny preparatu nie ulegał ciemnieniu posiadał neutralny smak i zapach bez wyczuwalnego zapachu typowego dla ziemniaka. Roztwór preparatu przechowywany przez rok i dłużej w buforze fosforanowym lub octanowym pozostawał klarowny i wolny od bakterii i grzybów, które zwykle zasiedlają takie roztwory buforowe już po kilku miesiącach. Wskazuje to na obecność w preparacie białka inhibitorowego wobec peptydaz i zarazem o hamowaniu wzrostu mikroorganizmów przez białka preparatu.

#### Marynaty

Filety w zalewie z dodatkiem inhibitorów proteaz i bez inhibitorów proteaz nie różniły się od siebie pod względem dojrzałości konsumpcyjnej i innych właściwości organoleptycznych z wyjątkiem nieco lepszej jędrności zawartości mięsa w zalewach z dodatkiem inhibitorów.

Zalewy obu prób marynat różniły się istotnie zawartością związków azotowych (Tabela 2 i 3). W zalewach z dodatkiem inhibitorów zawartość związków azotowych była o około 40% mniejsza niż w marynatach tradycyjnych. Również odmienne były proporcje związków azotowych nierozpuszczalnych i rozpuszczalnych w 5% TCA. W zalewach z marynat tradycyjnych proporcje te były jak 1:2, natomiast w obecności inhibitorów były jak 1:1 (Tabela 2 i 3), co świadczy o spowolnieniu proteolizy w obecności dodanych inhibitorów.

Tabela 2. Procentowe zawartości azotu białkowego i w zalewie bez dodatku inhibitorów proteaz.

Table 2. Quantities of nitrogen compounds in brine without protease inhibitors

Powtórzenia; Samples	1	2	3	4	5	6	Średnia i odch. stand.;	%
Formy azotu; Nitrogen fraction							Mean Stand. Dev.	
<b>I termin połowu; Caught No 1</b>								
N całkowity; Total Nitrogen	2,0	2,01	2,06	2,03	1,89	2,03	<b>2,003 ± 0,059a</b>	<b>100</b>
N-TCA nierozpuszcz.; TCA insoluble N	0,68	0,69	0,71	0,70	0,63	0,66	0,678 ± 0,026	33,8
N TCA rozpuszcz.; TCA-soluble N	1,31	1,33	1,34	1,34	1,25	1,38	1,325 ± 0,043	66,15
<b>II termin połowu; Caught No 2</b>								
N całkowity; Total Nitrogen	1,95	1,93	1,97	2,01	1,95	1,94	<b>1,958 ± 0,028a</b>	<b>100</b>
N TCA nierozpuszcz.; TCA insoluble N	0,65	0,64	0,67	0,68	0,66	0,66	0,660 ± 0,014	33,7
N TCA rozpuszcz.; TCA soluble N	1,30	1,28	1,29	1,34	1,29	1,28	1,296 ± 0,020	66,19

Tabela 3. Procentowe zawartości azotu białkowego w zalewie z dodatkiem inhibitorów proteaz.

Table 3. Quantities of nitrogen compounds in brine amended with protease inhibitors

Powtórzenia; Samples	1	2	3	4	5	6	Średnia i odch. stand.;	%
Formy azotu; Nitrogen fraction							Mean Stand. Dev.	
<b>I termin połowu; Caught No 1</b>								
N całkowity; Total Nitrogen	1,26	1,30	1,2	1,27	1,24	1,23	<b>1,25 ± 0,034 b</b>	<b>100</b>
N-TCA nierozpuszcz.; TCA insoluble N	0,62	0,66	0,59	0,62	0,64	0,61	0,623 ± 0,024	49,84
N TCA rozpuszcz.; TCA-soluble N	0,64	0,65	0,63	0,66	0,61	0,62	0,635 ± 0,018	50,8
<b>II termin połowu; Caught No 2</b>								
N całkowity; Total Nitrogen	1,23	1,20	1,23	1,25	1,22	1,24	<b>1,230 ± 0,017 b</b>	<b>100</b>
N TCA nierozpuszcz.; TCA insoluble N	0,64	0,62	0,61	0,65	0,63	0,64	0,631 ± 0,014	51,3
N TCA rozpuszcz.; TCA soluble N	0,58	0,59	0,64	0,63	0,60	0,62	0,610 ± 0,023	49,6

a; b – te same litery oznaczają wartości na statystycznie nieistotnie różnice przy  $p = 0,05$

a; b – the same letters indicate the differences not statistically significant at  $p = 0,05$

## Podsumowanie

Spowolnienie proteolizy dotyczy raczej białek dyfundujących z tkanki mięśniowej do zalewy w późniejszych stadiach dojrzewania mięsa, ponieważ pierwszy okres dojrzewania (początkowe 2 tygodnie) przebiegał podobnie w obu próbach marynat. Wynika to prawdopodobnie z przewagi stymulacji procesu proteolizy przez znacznie szybciej wnikające do mięśni niskocząsteczkowe substancje (kwas octowy i sól) nad działającymi przeciwnie, lecz znacznie wolniej dyfundującymi dużymi białkami inhibitorowymi. Rozluźnienie tekstury mięśni osiągnięte w pierwszych stadiach autolizy przypuszczalnie ułatwia wnikanie inhibitorów do mięśni i ogranicza/modyfikuje proces proteolizy. Spowolnienie proteolizy przez inhibitory proteaz, przynajmniej w powierzchniowej warstwie dojrzałych marynat, może zmniejszać dyfuzję białek do zalewy a tym samym zmniejszać ubytki białek w mięsie marynowanych ryb i ograniczyć ekologiczne uciążliwości przetwórstwa rybnego. Straty związków azotowych podczas marynowania i solenia śledzi mogą sięgać 20 – 25% zależnie od stosowanej technologii i rodzaju surowca (Szymczak, Kołakowski 2012). Podstawowe czynniki wpływające na proces marynowania to: stężenie soli, stężenie i rodzaj kwasu, temperatura, dobór surowca (Kołakowski, Kołakowska 2004). Jednak czynniki te są stosowane w ograniczonym przedziale stężeń i wartości ze względu na ich rolę w kształtowaniu bezpieczeństwa sanitarnego, cech sensorycznych, trwałości produktu. Inhibitory proteaz można rozpatrywać, jako czynnik dodatkowo oddziałujący na niektóre cechy produktu takie jak: przedłużenie przydatności konsumpcyjnej marynat, wykorzystania antydrobnoustrojowej aktywności białek inhibitorowych dla polepszenia bezpieczeństwa sanitarnego, antyoksydacyjne właściwości inhibitorów bogatych w cysteinę. Obecność w bulwach ziemniaka białka antydrobnoustrojowego i antypeptydazowego stwierdziła Valueva i in. (1997), Kim i in. (2005), Park i in. (2005). Desorbowane z ścian komórkowych bulw ziemniaka (z wycierki) peptydy ograniczają wzrost bakterii i grzybów patogennych dla roślin ziemniaka (Pilecka i in. 2000), a także bakterii *Listeria monocytogenes* niebezpiecznych dla zdrowia ludzi (Barnyk 2007).

Sygnalizowane wstępnie w tej pracy potencjalne możliwości wykorzystania roślinnych białkowych inhibitorów proteaz w przetwórstwie rybnym wymagają przeprowadzenia szczegółowych badań technologicznych i analizy opłacalności izolowania i stosowania inhibitorów proteaz.

## Literatura

- Barnyk A. 2009. *Oddziaływanie niektórych peptydów ścian komórkowych bulw ziemniaka na mikroflorę surowców roślinnych i żywności o małym stopniu przetworzenia*. Rozprawa doktorska, Politechnika Koszalińska.
- Busse T., Belitz HD. 1976. *Inhibition of cathepsin from trout muscle and from bovine spleen by proteinase inhibitors of potato tubers*. Z. Lebensm Unters Forsch, 162(4), 357-64.
- De Leo F., Volpicella M., Licciulli F., Liuni S., Gallerani R., Ceci LR. 2002. *PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes*. Nucleic Acid Reserach, 30(1), 347-348.
- García-Carreño FL. 1996. *Proteinase inhibitors*. Trends in Food Science Technology, 7, 197-204.
- Gruden K., Strukelj B., Ravnikar M., Poljsak-Prijatelj M., Mavric I., Brzin J., Pungercar J., Kregar I. 1997. *Potato cysteine protease inhibitor gene family; molecular cloning, characterization and immunocytochemical localization studies*. Plant Molecular Biology, 34, 317-333.
- Hannapel DJ. 1993. *Nucleotide and deduced amino acid sequence of the 22-kilodalton cathepsin D inhibitor protein of potato (Solanum tuberosum L)*. Plant Physiology, 101, 703-704.
- Herrera-Mendez CH., Becila S., Boudjellal A., Ouali A. 2006. *Meat ageing: reconsideration of the current concept*. Trends in Food Science Technology, 17, 394-405.
- Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K. 1994. *A family of potato genes that encode Kunitz-type proteinase inhibitors: structural comparison and differential expression*. Plant Cell Physiology, 35(2), 303-12.
- Jonakova V., Cechova D., Zawistowska U. 1982. *Polyvalent proteinase inhibitors from potato. Isolation and characterization of acrosin inhibitors from Solanum tuberosum*. Folia Biol (Praha), 28(1), 43-59.
- Kemp CM., Parr T. 2012. *Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderization*. Meat Science, 92, 252-259.
- Kemp CM., Sensky PL., Bardsley RG., Buttery PJ., Parr T. 2010. *Tenderness – An enzymatic view*. Meat Science, 84, 248-256.
- Kim JY., Park Sch., Kim MH., Lim HT., Park Y., Hahm KS. 2005. *Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato*. Biochemical Biophysical Research Communications, 330, 921-927.
- Kołakowski E., Bednarczyk B. 2002. *Physical and sensory changes in headed and gutted baltic herring during immersed salting in brine with the addition of acetic acid Part 1. Weightlosses, color of flesh and its sensory properties*. EJPAU, 5(2).
- Kołakowski E., Bednarczyk B. 2003. *Changes in headed and gutted baltic herring during immersed salting in brine with the addition of acetic acid Part 2. Intensity of proteolysis*. EJPAU, 6(1).
- Kołakowski E., Bednarczyk B., Mordziak K., Woźniak A. 2004. *Wpływ chlorku wapnia na proces dojrzewania odgłowionego i patroszonego śledzia bałtyckiego solonego metoda zalewową*. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment, 3(1), 123-137.
- Kołakowski E., Kołakowska I. 2006. *Postępy w technologii solenia i marynowania ryb*. Akademia Rolnicza w Szczecinie.
- Mareš M., Meloun B., Pavlik M., Kostka V., Baudyš M. 1989. *Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family*. FEBS Lett, 251(1-2), 94-8.
- Mosolov VV., Grigor'eva LI., Valueva TA., 2001. *Plant proteinase inhibitors as multifunctional proteins (Review)*. Applied Biochemistry Microbiology, 37(6), 545-551.
- Mosolov VV., Valueva TA. 2005. *Proteinase inhibitors and their function in plants: A review*. Applied Biochemistry Microbiology, 41(3), 227-246.
- Nielsen LB., Nielsen HH. 2001. *Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (Clupea harengus)*. Comparative Biochemistry Physiology B, 128, 351-363.
- Ouali A., Herrera-Mendez CH., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L., Sentandreu MA. 2006. *Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanism*. Meat Science, 74, 44-58.

22. Park Y., Choi BH., Kwak JS., Kwang CW., Lim HT., Cheong HS., Hahm KS. 2005. *Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (Solanum tuberosum L. cv. Jopung)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(16), 6491-6.
23. Pilecka A., Lewosz J., Treder K. 2000. *Charakterystyka antymikrobiologicznej aktywności niektórych peptydów ścian komórkowych ziemniaka*. Progress Plant Protection, 40 (1), 188-194.
24. Pouvreau L., Gruppen H., Piersma SR., van den Broek AM., Koningsveld GA., Voragen AGJ. 2001. *Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 2864-74.
25. Pouvreau L. 2004. *Occurrence and physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tubers (Solanum tuberosum)*. PhD Thesis, University of Wageningen.
26. Przewodowski W., Lewosz J., Treder K., Barnyk A., Pilecki T. 2007. *Identyfikacja odmian ziemniaka metodą elektroforetyczną*. Biuletyn Inst. Hod. Aklim. Roślin, 207, 151-158.
27. Rowan AD., Brzin J., Buttle DJ., Barrett AJ. 1990. *Inhibition of cysteine proteinases by a protein inhibitor from potato*. FEBS Lett, 269(2), 328-330.
28. Sentandreu MA., Coulis G., Ouali A. 2002. *Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness*. Trends in Food Science, 13, 400-421.
29. Szymczak M., Kołakowski E., Tokarczyk G. 2009. *Dynamika procesu marynowania mięsa rozmrożonych śledzi bałtyckich i atlantyckich*. Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin, 272(1), 83-94.
30. Szymczak M., Kołakowski E. 2012. *Loss of nitrogen from herring to brine during marinating*. Food Chemistry, 132, 237-243.
31. Valueva TA., Revina TA., Mosolov VV. 1997. *Potato tuber protein proteinase inhibitors belonging to the Kunitz soybean inhibitor family*. Biochemistry (Mosc), 62(12), 1367-74.

**Jerzy Lewosz**

Katedra Biochemii i Biotechnologii  
Politechnika Koszalińska  
lewosz@tu.koszalin.pl