

dr inż. Mariusz Szymczak

A U T O R E F E R A T

dotyczący działalności naukowo—badawczej

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

Szczecin 2016

Spis treści

1. DANE OSOBOWE	3
2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE	3
3. INFORMACJE O ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....	4
4. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA.....	4
4.1. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):.....	4
4.2. Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników wskazanego osiągnięcia.....	5
4.2.1. Wstęp.....	5
4.2.2. Założenia pracy	8
4.2.3. Cel pracy	9
4.2.4. Wyniki	9
4.2.5. Podsumowanie	21
4.2.6. Bibliografia.....	23
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH	25
5.1. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego po doktoracie	29

1. DANE OSOBOWE

Mariusz Krystian Szymczak

Katedra Technologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

71-459 Szczecin, ul. Papieża Pawła VI 3

mariusz.szymczak@zut.edu.pl, www.mszyuczak.zut.edu.pl

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

2004 – 2008 **Uzyskany tytuł doktora w dziedzinie nauk rolniczych**

Dyscyplina: technologia żywności i żywienia

Specjalność: technologia rybna

Nazwa jednostki: Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Technologii Żywności i Rybactwa

Tytuł pracy: „Wpływ podstawowych czynników technologicznych na proces marynowania śledzia”

Promotor: Prof. dr hab. Edward Kołakowski

2003 – 2004 **Uzyskany tytuł magistra w zakresie technologii rybnej i ogólnej**

Nazwa jednostki: Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Technologii Żywności i Rybactwa

Tytuł pracy: „Analiza składu aminokwasowego odbiałczonych ekstraktów mięsa pstrąga”

Promotor: Prof. dr hab. Edward Kołakowski

1999 – 2003 **uzyskany tytuł inżyniera**

Nazwa jednostki: Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Technologii Żywności i Rybactwa

1994– 1999 **Dyplom technika ochrony środowiska**

Średnia Szkoła Zawodowa im. I. Łukasiewicza w Policach, Technikum Ochrony Środowiska,

Temat pracy dyplomowej: „Regeneracyjne metody usuwania SO₂ z gazów odlotowych”

Promotor: mgr inż. Mieczysław Uniejewski

3. INFORMACJE O ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- 17 grudnia 2009 - obecnie **Stanowisko: Adiunkt**
Nazwa i adres pracodawcy: Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Nauk o
Żywności i Rybactwa
- 17 grudnia 2008 - 17 grudnia 2009 **Stanowisko: Asystent**
Nazwa i adres pracodawcy: Akademia Rolnicza w
Szczecinie, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

4. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA

4.1. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Występowanie endopeptydaz aspartylowych w kąpieli po marynowaniu śledzi

Moim osiągnięciem, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl czterech jednotematycznych publikacji (Autor/autorzy, rok wydania, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa):

- H1. **Szymczak M.**, Lepczyński A. 2016. Occurrence of aspartyl proteases in brine after herring marinating. *Food Chemistry*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.048, 194, 470-475. IF=3.393, MNiSW=40, udział 95%
- H2. **Szymczak M.** 2016. Distribution of cathepsin D activity between lysosomes and a soluble fraction of marinating brine. *Journal of Food Science*, DOI: 10.1111/1750-3841.13375, 81(8), E1966-E1970. IF=1.696, MNiSW=30, udział 100%
- H3. **Szymczak M.** 2016. 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, DOI: 10.1002/jsfa.7889. IF=1.714, MNiSW=35, udział 100%

H4. **Szymczak M.** 2016. Recovery of cathepsins from marinating brine waste, *International Journal of Food Science & Technology*, DOI: 10.1111/ijfs.13273. IF=1.384, MNiSW=25, udział 100%

Jestem autorem koncepcji naukowej powyższych publikacji, w trzech pracach jedynym wykonawcą i jedynym autorem, a w jednej pracy głównym wykonawcą i głównym autorem, który napisał wszystkie manuskrypty oraz autorem korespondencyjnym odpowiedzialnym za wartość merytoryczną i proces publikowania wszystkich manuskryptów w wiodących czasopismach międzynarodowych.

- Sumaryczny Impact Factor powyższych publikacji według listy Journal Citation Reports za 2015 rok wynosi 8.187, zaś sumaryczny Impact Factor rok zgodnie z danymi zamieszczonymi na stronach tych wydawnictw za 2016 wynosi 9.281.
- Suma punktów za 4 publikacje zgodnie z listą MNiSW za 2015 rok wynosi 130.

Oświadczenie współautora przedstawionej powyżej pracy naukowej [H1] wraz z określeniem indywidualnego udziału wykazano w **Załączniku 4**.

4.2. Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników wskazanego osiągnięcia

Osiągnięcie obejmuje 4 publikacje, w tym trzy jedno-autorskie, przedstawiające badania nad występowaniem, preparatyką, oczyszczaniem, charakterystyką aktywności, określeniem strat i odzyskiwaniem endopeptydaz aspartylowych dyfundujących z mięsa do kąpieli podczas marynowania śledzi.

4.2.1. Wstęp

Konsumpcja ryb na świecie wzrosła ze średnio 9,9 kg w 1960 roku do 19,2 kg w roku 2012, głównie ze względu na ich wysoką wartość odżywczą i specyficzne właściwości prozdrowotne. Szczególne znaczenie mają ryby morskie tłuste, jak śledź. Obecnie na rynku polskim dominują marynaty śledziowe oraz produkty z nich wytwarzane (GUS, 2015). Prawdopodobnie Polska jest największym producentem marynat rybnych

w Europie, co stwarza wiele korzyści dla gospodarki, jak również liczne problemy dla przetwórstwa i ochrony środowiska. W Polsce produkuje się 80-100 tys. ton marynat rybnych rocznie. W Unii Europejskiej dużą część z 960 000 tys. ton śledzia przerabia się na przetwory marynowane i solone (Gringer, 2014). Po procesie marynowania półprodukt wraz z zalewą smakową pakuje się do opakowań jednostkowych, a kąpiel marynującą pozostałą po marynowaniu w przemyśle trafia do ścieków. W wielu przypadkach w pobliżu zakładów brakuje oczyszczalni ścieków i kąpeli jest tylko rozcieńczana, aby obniżyć poziom między innymi soli, kwasu i związków organicznych do wymaganego poziomu. Powstające odpady są obciążeniem dla środowiska naturalnego oraz powodują obniżenie wartości odżywczej i wzrost cen gotowych produktów (Kołodziej, 2008, 2010). Podczas marynowania udział ryby do kąpeli wynosi od 1 : 1 do 2 : 1. Z kolei masa marynowanej ryby w gotowym produkcie marynat stanowi średnio 50 %. Na podstawie tych danych można oszacować, że potencjalnie w Polsce do ścieków wylewa się:

- A) ok. 40-50 tys. ton kąpeli, gdy udział wynosi 1 : 1,
- B) ok. 27-33 tys. ton kąpeli, gdy udział wynosi 1,5 : 1,
- C) ok. 20-25 tys. ton kąpeli, gdy udział wynosi 2 : 1.

Ze względu na sposób przygotowania marynaty rybne dzielimy na zimne, które stanowią ponad 92 % rynku, oraz smażone i gotowane. Proces dojrzewania mięsa zachodzi tylko w przypadku marynat zimnych ze względu na brak obróbki termicznej ryby przed marynowaniem (Sikorski, 2004). Marynaty zimne charakteryzują się niespotykanymi w innych produktach walorami sensorycznymi oraz zawierają relatywnie dużo biologicznie aktywnych produktów hydrolizy białek (aminokwasy i peptydy). Dojrzewanie rozpoczyna się z chwilą umieszczenia surowca w kąpeli marynującej, z której sól i kwas octowy wnikają do tkanki ryby. Marynaty zimne najczęściej wytwarza się ze śledzi i innych ryb śledziowatych (Shenderyouk i Bykowski, 1990).

Dojrzewanie marynat jest złożonym procesem, podczas którego dominującym zjawiskiem jest proteoliza białek. Ze względu na słono-kwaśne środowisko marynowanych ryb w proteolizie biorą udział głównie katepsyny – kwaśne proteazy występujące naturalnie w tkance mięśniowej. Katepsyny to grupa kilkunastu endo- i egzopeptydaz oznaczonych kolejno literami alfabetu. Ze względu na parametry procesu marynowania (pH 3,5 – 4,5 i zawartość soli 2 – 5 %) główną aktywność w tym procesie przypisuje się endopeptydazom aspartyłowemu (katepsyna D i E) i cysteinowemu (katepsyna B i L), a w mniejszym stopniu katepsynom A, C i H (Levanidov et al., 1987). Almy (1926)

zbadala zjawisko przenikania pepsyny z wnętrzości do mięśni brzusznych śledzi, jednak ta endopeptydaza aspartylowa dotychczas nie była uwzględniana w dojrzewaniu śledzi marynowanych. Różnorodna specyficzność substratowa, kinetyka i synergiczne działanie katepsyn wskazują, że cechy marynat są kształtowane przez grupę proteaz, a nie tylko jeden enzym (Makinodan et al., 1983; Szymczak et al., 2011-2014). Wszystkie katepsyny, oprócz E, występują w lizosomach. Są to organelle ograniczone pojedynczą membraną, zwykle o średnicy ok. 0,1 – 2,0 μm (Lullmann-Rauch, 2007), zawierające liczne enzymy hydrolityczne do trawienia związków i recyklingu składników komórkowych (Voet and Voet, 1990). Katepsyna D i kwaśna fosfataza powszechnie uznawane są za markery lizosomów (Karvinen et al., 1982; Ueno et al., 1986).

Główną i najczęściej badaną aspartylową endopeptydazą lizosomalną jest katepsyna D. Jej aktywność jest wielokrotnie większa w mięśniach ryb niż u ssaków (Mukundan et al. 1986). Katepsyna D podczas hydrolizy tworzy produkty, które są substratem dla innych, enzymów, np. katepsyny A i C (Makinodan et al., 1983). An et al. (1994) wykazali również, że katepsyna D sprzyja uwalnianiu innych wewnątrzkomórkowych proteaz. Dlatego też uważa się, że endopeptydazy, szczególnie katepsyna D, odgrywa główną rolę w dojrzewaniu marynat rybnych. W wyniku aktywności peptydaz podczas procesu marynowania mięso ryb staje się miękkie i powstają w nim duże ilości produktów hydrolizy białek (PHP) o małej masie cząsteczkowej, jak aminokwasy i peptydy. Nadają one charakterystyczny smak marynat rybnych (Kiesvaara, 1975). Zatem peptydazy kształtują właściwości technologiczne, poprzez zmianę tekstury mięsa, i właściwości funkcjonalne, poprzez powstawanie związków biologicznie aktywnych, smakowych i zapachowych.

Ostatnie badania wykazały, że podczas marynowania następuje dyfuzja substancji azotowych z mięsa śledzi do kąpieli (Szymczak i in., 2012; Szymczak i in., 2015ab; Szymczak i Kołakowski 2012; Szymczak i Kołakowski 2016). Wyniki te naprowadziły do przypuszczenia, że dyfuzja do kąpieli marynującej dotyka także mięśniowe endopeptydazy aspartyłowe. Postawiono również pytania w jakiej formie peptydazy występują w kąpieli, jak straty peptydaz wpływają na dojrzewanie marynat i czy można odzyskać aktywne endopeptydazy aspartyłowe z kąpieli. Pomimo dużej liczby badań dotyczących procesów marynowania ryb, w dostępnej literaturze brak jest informacji na temat występowania i aktywności endopeptydaz aspartyłowych w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi. Dotychczas katepsyny izolowano i oczyszczano głównie z surowców mięsnych oraz ze zwierząt wodnych (Artigas et al. 1996; Krause 2009; McLay 1980). Jest wiele prac

o oczyszczaniu peptydaz, i pomimo że we wszystkich stosowano te same etapy (np. wysalanie, chromatografię i filtrację), to każdy z autorów opracował indywidualną metodę oczyszczania, gdyż nie istnieje jedna uniwersalna metoda dla wszystkich enzymów i różnych surowców. Witwicki i Ardelt (1984) stwierdzają, że „popularna jest nawet opinia, że wyodrębnianie enzymów jest w większym stopniu sztuką niż nauką”. DeWitt and Morrissey (2002ab) po wykonaniu wielu prób opracowali najpierw metodę laboratoryjną, a następnie w skali pilotażowej metodę odzyskiwania peptydaz z wody pozostałej po produkcji surimi przy użyciu nanofiltracji. Pomimo, że woda po przemywaniu surimi wydaje się łatwiejsza do oczyszczania niż kąpiel marynująca, gdyż nie zawiera tak dużych ilości lipidów, białek i ich produktów hydrolizy, to osiągnięto wydajność tylko ok. 80 % otrzymując głównie katepsynę L.

Poszukiwania taniego źródła aktywnych peptydaz mięśniowych są związane z ich wyjątkowymi właściwościami technologicznymi i funkcjonalnymi, zbyt dużymi cenami peptydaz izolowanych z cennych tkanek zwierząt oraz z powodu niewystarczających rezultatów po zastosowaniu peptydaz pochodzenia roślinnego i mikrobiologicznego wykorzystywanych w technologii żywności (Ha et al., 2012; Toldra and Reig, 2015). Dotychczasowy brak zainteresowania odzyskiwaniem peptydaz z kąpieli prawdopodobnie można tłumaczyć praktycznie brakiem wiedzy na temat aktywności proteolitycznej w kąpieli marynującej oraz brakiem dobrych metod regeneracji kąpieli i odzyskiwania peptydaz.

4.2.2. Założenia pracy

W pracy postawiono następujące tezy:

1. Podczas marynowania z mięsa śledzi do kąpieli dyfundują endopeptydazy aspartyłowe zarówno w formie rozpuszczalnej i lizosomalnej.
2. Endopeptydazy aspartyłowe występujące w kąpieli po marynowaniu są aktywne.
3. Peptydazy można uwolnić z lizosomów, co doprowadzi do zwiększenia aktywności proteolitycznej kąpieli.
4. Podstawowe czynniki technologiczne mają wpływ na straty endopeptydaz aspartyłowych.
5. Aktywne endopeptydazy aspartyłowe dają się odzyskać z kąpieli marynującej.

4.2.3. Cel pracy

Podstawowym celem poznawczym pracy było zbadanie aktywności proteolitycznej występującej w kąpieli marynującej pozostającej po marynowaniu śledzi, szczególnie w kierunku aktywności endopeptydaz aspartylowych. Celem teoretycznym pracy było także zbadanie w jakiej formie występują endopeptydazy aspartyłowe obecne w kąpieli, które z nich dominują i jak ich aktywność zmienia się w zależności od podstawowych parametrów technologicznych marynowania.

Z kolei celem praktycznym pracy było zbadanie przydatności i opracowanie parametrów kilku metod: (i) otrzymywania endopeptydazy aspartyłowych z kąpieli w formie wysoko oczyszczonych preparatów, (ii) uwalniania endopeptydaz z frakcji lizosomalnej kąpieli oraz (iii) odzyskiwania aktywnych endopeptydazy aspartyłowych z kąpieli marynującej w formie surowych/handlowych preparatów. W dalszej kolejności celem była charakterystyka otrzymanych preparatów proteolitycznych, aby określić ich możliwe zastosowanie w przemyśle spożywczym.

4.2.4. Wyniki

4.2.4.1. Doskonalenie metod badawczych

W dostępnej literaturze naukowej dotychczas brak było danych dotyczących enzymów proteolitycznych, a szczególnie endopeptydaz aspartyłowych w kąpieli marynującej. Stosowane przez innych naukowców parametry metod analitycznych okazały się niewystarczające do przeprowadzenia zaplanowanych badań. Wszystkie metody należało dostosować i zoptymalizować do analiz kąpieli marynującej i peptydaz w niej występujących. W publikacjach wskazanych do osiągnięcia naukowego znajduje się tylko mała część zmagania metodycznych. Doskonalenie metod badawczych było ważną częścią osiągnięcia habilitacyjną, gdyż bez tego nie powstały by zaprezentowane publikacje. Dlatego poniżej przedstawiono prawie wszystkie zmiany dokonane w użytych metodach, które doprowadziły do ostatecznych parametrów metod podanych w publikacjach.

Oznaczanie aktywności proteolitycznej

Przed rozpoczęciem badań właściwych wykonano badania wstępne mające na celu określenie czy w kąpieli pozostającej po marynowaniu śledzi występują aktywne peptydazy,

a szczególnie aktywne endopeptydazy aspartylowe i cysteinowe. Oznaczanie ogólnej aktywności proteolitycznej (GPA) wykonano wobec kwaśnej hemoglobiny optymalizując czas inkubacji w zakresie od 30 min do 24 h, stężenie substratu od 1 do 4 %, udział kąpeli do substratu od 0,5 : 2 do 3 : 1 i pH reakcji w zakresie od 3,0 do 5,0. Największy przyrost produktów hydrolizy białek (PHP) w czasie inkubacji i jednocześnie najmniejszy udział PHP próby kontrolnej do PHP próby właściwej stwierdzono stosując 2 h inkubacji, 2 % hemoglobiny, pH 3,5 – 4,0 oraz udział kąpeli do substratu 1 : 2. Prawidłowe wyniki otrzymano stosując kąpiel odwirowaną przez 10 min przy 14000 x g i 4 °C. Produkty proteolizy oznaczano metodą Lowry'ego w modyfikacji Kołakowskiego. Metoda ta dawała lepsze rezultaty niż pomiar absorbancji przy 280 nm lub pomiar zawartości białka metodami kolorymetrycznymi. Aktywność danej grupy peptydaz oznaczano wobec kwaśnej hemoglobiny z dodatkiem specyficznych inhibitorów, takich jak pepstatyna-A, E-64 i PMSF.

Aby potwierdzić i dokładniej scharakteryzować aktywność poszczególnych endopeptydaz zastosowano również metody wobec specyficznych syntetycznych fluorogennych peptydów dla katepsyn D+E, E, B+L i B, z i bez dodatku powyższych inhibitorów. Na początku próbowano wykorzystać dostępny spektrofotometr fluorescencyjny Hitachi F2000, jednak aparat ten okazał się nieodpowiedni do tych badań. Również opis metod w publikacjach okazał się niewystarczający. Zastosowanie czytnika mikropłytkowego Tecan Infinite 200Pro pozwoliło na znaczne zwiększenie liczby analiz w jednostce czasu. Zrobiono skanowanie 3D substratów i wzorca MCA w pełnym zakresie wzbudzenia i emisji, opracowano własne ilości reagentów oraz rozcieńczenia i ilości kąpeli. Zoptymalizowano inkubację ze względu na czas i pH buforów dla endopeptydaz aspartylowych i cysteinowych. Opracowane metody przeniesiono na precyzyjniejszy kuwetowy spektrofotometr fluorescencyjny Hitachi F7000, który uprzednio dostosowano do pomiarów enzymatycznych montując w nim odpowiednią przystawkę i termostat. Aby lepiej ocenić przydatność metod fluorymetrycznych określono wpływ inhibitorów i pH na wyniki, które porównano do metody z substratem naturalnym. Większość prób kąpeli marnujących, a szczególnie wstępnie oczyszczone i zagęszczone, zawierają duże ilości białek i produktów ich hydrolizy, które po ogrzaniu do temperatury 37 °C, powodowały powstawanie mętności i wygaszanie fluorescencji. Efektem tej oceny było ustalenie liczby rozcieńczeń danej próby, aby uniknąć interferencji wywołanych różnymi związkami występującymi w kąpeli. Pomimo wielu optymalizacji oznaczanie aktywności endopeptydaz aspartylowych w kąpielach zawierających wysokie stężenie soli i/lub kwasu

okazało się problematyczne. Empirycznie określono, że do prawidłowego przebiegu reakcji proteolitycznej należy także kąpiel rozcieńczyć tak, aby otrzymać w mieszaninie reakcyjnej nie więcej niż 0,5 % NaCl. Do wykonania ekstraktów peptydaz z mięsa marynowanych śledzi testowano bufor fosforanowy pH 7,0, bufor octanowy pH 4,0, dodatek KCl, lecz najlepsza okazała się woda zawierająca 0,25 M sacharozy i 1 mM EDTA.

Wstępne przygotowanie kąpeli marynującej

Podczas badań istotnym problemem okazało się prawidłowe przygotowanie surowej kąpeli. Nie było możliwe zastosowanie jednej metody do usuwania zawiesiny i lipidów podczas wszystkich rodzajów analiz. Przygotowanie kąpeli do badań należało wykonać od razu po zakończeniu marynowania śledzi. Aktywność proteolityczna w składowanej chłodniczo kąpeli bardzo szybko malała do ok. 50 - 70 % wartości początkowej już po 2 dobach. Zwykle straty aktywności w składowanej kąpeli najbardziej ograniczały wstępne filtrowanie, wirowanie i dodatek azotku azotu w przeciwieństwie do dodatku soli i/lub kwasu octowego. Przyczyny strat aktywności składowanej kąpeli oceniono na podstawie analiz fizykochemicznych i mikrobiologicznych.

Do pozyskania małej objętości próby do oznaczania aktywności proteolitycznej wystarczyło odwirować kąpiel 10 min przy 14000 x g. Przy większej objętości próby wirowanie kąpeli przez 20 min przy 9000 x g było nie wystarczające, gdyż w kąpeli nadal unosiła się zawiesina oraz wysoka warstwa frakcji lipidowo-proteinowej. Dlatego kąpiel do frakcjonowania/oczyszczania poddawano wirowaniu, a następnie filtrowaniu, co opisano w publikacji [H1]. Zastosowanie tylko filtrowania powodowało powstawanie grubego kożucha na sączku, szybkie zatrzymanie filtracji, a nawet obniżenie aktywności endopeptydaz w filtracie.

Z kolei wstępne oczyszczanie kąpeli do badań aktywności we frakcji lizosomalnej wymagało zastosowanie filtracji kąpeli na odpowiednio ułożonej wełnie szklanej, a następnie wirowanie przy niskiej sile odśrodkowej, co opisano w publikacji [H2].

Oczyszczanie endopeptydaz aspartylowych

Z pośród wielu metod do oczyszczania enzymów (Wilk, 2001) wybrano chromatografię powinowactwa, która jest najnowocześniejszą techniką umożliwiającą

otrzymanie najczystszych aktywnych enzymów. W skrócie, wybrana metoda polega na zastosowaniu złoża agarozy połączonej z pepstatyną-A, która jest specyficznym inhibitorem katepsyny D. Zgodnie z teorią w kwaśnym środowisku tylko katepsyna D łączy się ze złożem (papstatyną-A), a po wymyciu pozostałych białek, zmienia się bufor na zasadowy, który odłącza katepsynę D od złoża. Początkowo rozdziały wykonywano zgodnie z instrukcją podaną przez producenta i innych dostawców tego złoża, tj.: Sigma-Aldrich, GBioscience i BioRad. Niestety tak otrzymywane preparaty posiadały zbyt dużą zawartość białka oraz zbyt małą aktywność endopeptydaz aspartylowych.

Do wstępnego zateżania peptydaz z kąpeli przetestowano wiele metod. Zastosowanie acetonu w stosunku do kąpeli od 1 : 1 do 4 : 1, a także dodatek tetr-butanolu podczas wysalania enzymów siarczanem amonu dawało zbyt małą wydajność aktywnych proteolityczną. Wstępna zmiana pH kąpeli lub strącanie izoelektryczne peptydaz nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Metoda dializy kąpeli wobec wody destylowanej, aby obniżyć stężenie soli i kwasu octowego, po czym liofilizacja dawała stabilne preparaty. Jednak wadą tej metody jest długi czas dializy, duże zużycie membrany dializacyjnej, wody, koszty liofilizacji oraz mała aktywność specyficzna preparatu. Podobne spostrzeżenia do dializy uzyskano w stosunku do diafiltracji stosując filtry wirówkowe. Ostatecznie precypitat peptydaz otrzymano wytrącając białka siarczanem amonu koniecznie z kąpeli dokładnie pozbawionej zawiesiny i frakcji lipidowej poprzez wirowanie i/lub filtrowanie.

Obniżenie pH buforu do rozpuszczania precypitatu z 7,0 do 3,0 zmniejszyło kilkakrotnie ilość białka w próbie nanoszonej na kolumnę chromatograficzną. Zastosowanie filtrów z włókna szklanego i filtrów wirówkowych (10 kDa) wyeliminowało długotrwały etap dializy i dodatkowo obniżyło zawartość PHP w próbie. Niezbędne było wykonywanie nowej kolumny co kilka miesięcy, ze względu na krótką żywotność stosowanego złoża. Podczas chromatografii powinowactwa dodano etap przemywania złoża stężonym mocznikiem, co wielokrotnie zwiększyło specyficzność otrzymywanych enzymów [H1]. Rozdział SDS-PAGE 2D pokazał obecność przynajmniej 10 białek w preparacie. Wyeliminowanie pięciu białek towarzyszących, których masa była zbyt duża w stosunku do oczyszczanych endopeptydaz aspartylowych i tym samym wzrost wartości parametru wydajności oczyszczania udało się osiągnąć poprzez (i) zamianę bufora cytrynianowego o pH 3,0 do rozpuszczania precypitatu i kondycjonowania złoża, na bufor octanowy o pH 4,0; (ii) zwiększenie objętość z jednoczesnym zmniejszeniem o połowę szybkość przepływu buforu eluującego enzym [H1]. Pomimo, że pik podczas wymywania

endopeptydaz aspartylowych opadał do linii bazowej, to nadal w wypływającym eluencie występowała aktywność proteolityczna. Zbyt duże rozcieńczenie enzymu eliminowano zatężając go ok. 50 krotnie z jednoczesnym usunięciem NaCl i wymianą bufora na bardziej odpowiedniego do liofilizacji enzymu [H1]. W rezultacie ograniczono skład jakościowy w gotowym preparacie, które próbowano zidentyfikować. Wycięcie plam z żelu i ich identyfikacja po trawieniu trypsyną okazała się niezadawalająca. Pomimo zastosowania dwóch różnych metod i dwóch różnych spektrofotometrów MALDI-TOF MS/MS uzyskano w rozdziałach tylko 3-4 piki, co prawda charakterystyczne dla katepsyny D, jednak było to niewystarczające dla pełnej identyfikacji białek. Znana jest metoda rozróżnienia katepsyny D od pepsyny, jednak opiera się ona na inhibitorze izolowanym z ludzkich glizd, który jest niedostępny handlowo (Minarowska i in., 2009). Dlatego identyfikację proteaz w publikacji [H1] wykonano stosując specyficzne substraty, aktywatory i inhibitory.

Czystość preparatu starano się zwiększyć stosując jeszcze chromatografię żelową na złożu Sephadex G-75 (60 x 0,8 cm) i jonowymienną na złożu Sepharose-4B (30 x 1,3 cm). Bufor fosforanowy o pH 7,0, w porównaniu do buforów cytrynianowego i octowego o różnym pH, lepiej zabezpieczał endopeptydazy aspartyłowe przez autolizę podczas długiego procesu oczyszczania. Opracowano właściwe przygotowanie zatężonej kąpieli, gdyż próby nakładano na złożę ręcznie, eluent podawano do kolumny siłą grawitacji, a frakcje eluatu zbierano ręcznie. Próby o zbyt dużej zawartości białka blokowały przepływ, co prowadziło do zapowietrzenia złoża G-75 i konieczność ponownego napełniania kolumny zregenerowanym złożem. Dobór buforów, ich stężenia molowe, pH, siłę jonową, szybkość przepływu dobrano na podstawie instrukcji podanych przez producenta złożów oraz na podstawie metodyk opisanych w kilkudziesięciu publikacjach o oczyszczaniu katepsyny D. Aktywność otrzymanych preparatów zbadano w różnym pH oraz różnych stężeniach NaCl i metali ciężkich występujących w soli kamiennej oraz w obecności dodatków stosowanych w przemyśle podczas marynowania ryb. Rezultatem opisanego dochodzenia trwającego prawie 3 lata jest metoda oczyszczania proteaz aspartylowych z kąpieli przedstawiona w publikacji [H1].

Dezintegracja błon lizosomów w kąpieli marynującej

Dezintegracja błon lizosomów pod wpływem zamrażania najkorzystniej następowała przy odpowiednio powolnym zamrażaniu kąpieli w -18 °C.

Dobrym wskaźnikiem tego procesu była zmiana barwy zamrażanej kąpieli. Z kolei najlepsza temperatura do rozmrażania kąpieli wynosiła 0 - 4 °C, gdyż w wyższej po wielokrotnie powtarzanych cyklach następowały istotne straty aktywności proteolitycznej [H2]. Skuteczność sonifikacji w uszkodzaniu błon lizosomów sprawdzono używając trzy różne sondy, przy różnej mocy i interwałach wyzwalania dźwięków, stosując różną objętość kąpieli. Wzrost aktywności osiągnęto stosując jak najniższą temperaturę podczas sonifikacji oraz przy prawidłowej głębokości zanurzenia sondy w kąpieli.

Z kolei zastosowanie od 0,1 do 0,3 % dodatku detergentów niejonowe, takich jak Triton X-100, Tween 20, Brij 58 i n-Octyl glucoside, nie przyniosło spodziewanych rezultatów. Również zastosowanie siły odśrodkowej od 10 000 do 200 000 x g nie dało istotnej różnicy w aktywności endopeptydaz pomiędzy próbami. Pomimo zamontowania nowego czujnika obrotów kolejna awaria ultrawirówki uniemożliwiła dalsze wykorzystanie tej metody.

W przypadku mikrofiltracji pod obniżonym ciśnieniem problemem było pienienie się kąpieli, przez co otrzymywano nieprawidłowe wyniki i konieczne okazało się stosowanie filtrację swobodnej. Zateżanie lizosomów stosując filtry wirówkowe o parametrze cut-off 10, 30 i 100 kDa było możliwe stosując tylko najniższe ciśnienie hydrostatyczne [H4]. Stabilność lizosomów była również obniżona przez kwaśne środowisko kąpieli, dlatego stosowano dodatek sacharozy do kąpieli. Z kolei zubożnianie kąpieli najlepsze rezultaty dawało przed etapem zateżania stosując bufor fosforanowy lub tris-HCl [H4].

4.2.4.2. Osiągnięcia przedstawione w publikacjach

Występowanie endopeptydaz aspartylowych w kąpieli

Kąpiel surową pozbawioną zawiesiny i lipidów nasycano siarczanem amonu. Otrzymany precypitat rozpuszczano, diafiltrowano i nanoszono na kolumnę ze złożem Pepstatin-A Agarose [H1]. Preparat enzymatyczny otrzymany z kąpieli był oczyszczony ponad 2650 razy, wydajność procesu wynosiła ok. 14 %. Preparat nie wykazywał aktywności wobec substratów specyficznych dla endopeptydaz cysteinowych. Pepstatyna-A hamowała całą aktywność preparatu wobec substratu specyficznego dla endopeptydaz aspartylowych. Oznacza to, że uzyskany preparat składał się wyłącznie z endopeptydaz aspartylowych [H1]. Preparat miał maksymalną aktywność w pH 2,0, oraz drugi pik w pH

4,0. Analiza SDS-PAGE 2D wykazała obecność 5 białek w preparacie. Masy cząsteczkowe trzech najmniejszych białek (39,8, 40 i 40,1 kDa) są charakterystyczne dla katepsyny D i pepsyny. Również ze względu na masę prawdopodobnie katepsyna E została zidentyfikowana jako spot nr 4. Trzy pierwsze białka posiadały punkt izoelektryczny w pH 5,2 - 5,5, charakterystycznym dla katepsyny D. Wyniki wskazywały, że preparat składa się z co najmniej dwóch endopeptydaz aspartylowych.

Preparat wykazywał ok. 45 % aktywności wobec substratu dla katepsyny E. Kolejne badania pokazały, że substrat ten jest hydrolizowany również przez handlowy preparat pepsyny. Aby zahamować tylko aktywność katepsyny D bez wpływu na pepsynę zastosowano dodatek mocznika o stężeniu 3 i 6 M. Ostateczne wyniki pokazały, że w kąpieli mogą występować trzy endopeptydazy aspartylowe, a w uzyskanym preparacie ponad połowa aktywności pochodziła od katepsyny D, niemal 1/3 od pepsyny, zaś ok. 17 % od katepsyny E [H1].

Najważniejszym osiągnięciem w publikacji [H1] jest opis wykrycia i potwierdzenia występowania aktywnych endopeptydaz aspartylowych w kąpieli marynującej. Nowością jest obecność pepsyny w kąpieli, która jak dotąd w literaturze nie była uwzględniana w procesie dojrzewania marynowanych śledzi. Z kolei opracowana metoda oczyszczania i identyfikacji endopeptydaz z kąpieli może pozwolić w przyszłości na rozwój badań nad powtórным wykorzystaniem odpadów przetwórstwa rybnego.

Aktywność endopeptydaz we frakcji lizosomalnej

Założeniem drugiej pracy było przypuszczenie, że peptydazy występują w kąpieli nie tylko w formie rozpuszczalnej, co przedstawiono w pierwszej publikacji, ale również w formie lizosomalnej. Słuszność tego założenia w publikacji [H2] potwierdzono trzema metodami.

Pierwsza metoda wymagała uszkodzenia błon lizosomów, aby uwolnić enzymy, które powinny zwiększyć aktywność mierzoną w kąpieli. Najpopularniejsze metody uszkodzania błon lizosomów polegają na wielokrotnym ich zamrażaniu lub poddaniu działaniu ultradźwięków. Aktywność katepsyny D w kąpieli zwiększono dwu krotnie po 5 cyklach zamrażania-rozmrażania w -18 °C. Z kolei po 5 min sonifikacji kąpieli aktywność katepsyny D rosła trzy krotnie [H2]. W sonifikowanej kąpieli po 30 min składowania chłodniczego aktywność katepsyny D nie tylko nie malała, lecz istotnie wzrosła o kolejne 20-30 punktów procentowych. Oznacza to, że zapoczątkowane pęknięcia błon powiększają

się z czasem i dyfuzja enzymów z wnętrza lizosomów trwa w czasie pomimo zakończenia sonifikacji i może zależeć od skali dezintegracji błon. Uwalnianie katepsyny D z lizosomów następowało również podczas mechanicznej homogenizacji kąpielii, jednak tylko podczas pierwszych 2 min procesu. Po 3 min homogenizacji aktywność zaczęła maleć i po 5 min wynosiła 75 % aktywności w porównaniu do próby kontrolnej [H2].

Aktywność katepsyny D mierzono wobec fluorogennego substratu specyficznego także dla katepsyny E, która nie występuje w lizosomach. Po wykonaniu oznaczenia aktywności katepsyny E okazało się, że jej aktywność maleje w kąpielii pod wpływem sonifikacji o 20 - 30 % oraz o 10 - 20 % po 5 cyklach zamrażania. Wyniki te pozwoliły na obliczenie realnego wzrostu aktywności katepsyny D uwalnianej z frakcji lizosomalnej. Wykazano, że wzrost aktywności proteolitycznej z frakcji lizosomalnej jest możliwy tylko po uprzednim usunięciu frakcji lipidowej z kąpielii marnującej. Stopień dezintegracji lizosomów w kąpielii mierzono również oznaczając aktywność kwaśnej fosfatazy [H2].

Druga metoda polegała na usunięciu lizosomów z kąpielii stosując filtry z włókna szklanego o porowatości od 0,3 do 2,7 μm , filtry z celulozy 0,1 – 0,45 μm i filtry strzykawkowe 0,1 – 0,45 μm , przez co zastosowanie dezintegracji błon nie powinno prowadzić do wzrostu aktywności. Wyniki pokazały, że mikrofiltracja skutecznie zatrzymuje lizosomy obecne w kąpielii. Ponadto im mniejsza była średnica porów filtra, tym większa była różnica w aktywności lizosomalnej katepsyny D pomiędzy kąpielią po sonifikacji, a kąpielią po wielokrotnym zamrażaniu-rozmrażaniu. Oznacza to, że mrożenie dezintegruje głównie większe lizosomy, w przeciwieństwie do sonifikacji [H2].

Ostatnia, trzecia metoda miała na celu zatężenie lizosomów, których obecność mierzono poprzez zmiany barwy dodanego barwnika podczas jego wnikania do lizosomów. Najlepsze rezultaty uzyskano stosując filtr 100 kDa, w przeciwieństwie do 10 kDa. Do retentatów dodawano barwnik Neutral Red, po czym przez kilkadziesiąt minut mierzono spadek barwy żółtej i przyrost barwy czerwonej. Nieuszkodzone lizosomy, do których wniknął barwnik udało się również zobaczyć stosując mikroskop świetlny przy 1000 krotnym powiększeniu [H2].

Najważniejszymi dokonaniem przedstawionymi w publikacji [H2] jest odkrycie lizosomów w kąpielii oraz zbadanie jaki udział aktywności endopeptydaz aspartylowych przypada na frakcję rozpuszczalną i lizosomalną. Wyniki pracy [H2] pokazały nową przyczynę gorszego dojrzewania mrożonych-rozmrożonych śledzi w porównaniu do surowca świeżego obserwowane we wcześniejszych badaniach (Szymczak, 2011). Praca [H2] przedstawia również ważne dla technologów metody zwiększania aktywności

proteolitycznej w kąpieli poprzez uwolnienie enzymów z lizosomów. Na podstawie wyników tych badań zgłoszono patent krajowy pod tytułem „Sposób na zwiększenie aktywności proteolitycznej w kąpieli pozostałej po marynowaniu śledzi”.

Straty aktywności proteolitycznej podczas marynowania śledzi

Dwie pierwsze prace pokazują, że dyfuzja endopeptydaz aspartylowych z mięsa do kąpieli jest nieodłącznym zjawiskiem podczas marynowania śledzi. Dlatego celem trzeciej publikacji [H3] było zbadanie jaki wpływ na straty peptydaz podczas marynowania śledzi ma rodzaj użytego surowca oraz podstawowe czynniki technologiczne stosowane w przemyśle. Aktywność proteolityczną w mięsie i kąpieli mierzono z i bez dodatku inhibitorów wobec kwaśnej hemoglobiny (GPA) oraz wobec specyficznych substratów dla katepsyny D+E, B, B+L. Wykonano również wiele oznaczeń fizyko-chemicznych, szczególnie skład frakcji azotu niebiałkowego mięsa i kąpieli. W sumie w publikacji [H3] przedstawiono 4176 wyników, które poddano wnikliwej analizie statystycznej.

Wykazano, że aktywność proteolityczna w marynowanych śledziach istotnie zależy od podstawowych parametrów technologicznych. Dłuższy czas marynowania wpływał na wzrost GPA w mięsie od dwóch razy dla śledzia bałtyckiego do 6 razy dla śledzia atlantyckiego. Udział endopeptydaz aspartylowych w GPA mięsa surowych śledzi stanowił 60 – 95 % i podczas marynowania malał do 30 - 70 %, przy jednoczesnym wzroście udziału egzopeptydaz w drugim etapie dojrzewania [H3].

Zwiększenie stężenia soli z 5 do 8 % w kąpieli, co odpowiada 2-3 % NaCl w mięsie, nie miało istotnego wpływu na GPA mięsa. Kiedy użyto 12 % NaCl (4,5 % w mięsie), to wartość GPA mięsa po 7 dobach była 5 krotnie mniejsza. Wyższe stężenie soli wpływa na mniejszą wartość GPA mięsa poprzez spadek prawie wyłącznie aktywności endopeptydaz aspartylowych. Najwyższą aktywność endopeptydaz aspartylowych zmierzono w marynatach zawierających 2,0 - 2,5 % soli w mięsie. Wyniki tłumaczą dlaczego największa ilość azotu niebiałkowego (NPN) występuje w marynatach dojrzewających w kąpieli zawierającej tylko 5 - 7 % soli. Analiza statystyczna wykazała, że GPA silnie dodatnio korelowała z zawartością NPN i zawartością peptydów, słabiej z aktywnością endopeptydaz aspartylowych, a najslabiej z zawartością tyrozyną. Z kolei użycie wyższego stężenia kwasu octowego w kąpieli powodowało wzrost wartości GPA mięsa. Kiedy użyto 6 lub 9 % kwasu (pH mięsa 4,15 lub 4,0), to GPA wzrosło 3 krotnie, a aktywność endopeptydaz aspartylowych tylko 2 krotnie przy najwyższym stężeniu

kwasu. Analiza statystyczna potwierdziła silną zależność pomiędzy niskim pH a wysoką aktywnością proteolityczną mięsa. Jest to ważna informacja, gdyż przy optymalnym pH enzymy są najbardziej aktywne i endopeptydazy aspartyłowe tworzą najkrótsze PHP. Wyniki wskazują, że bardzo wysokie stężenie kwasu powoduje wzrost GPA, lecz głównie poprzez wzrost aktywności endopeptydaz aspartyłowych. Zauważono, że stosowanie wysokiego stężenia kwasu octowego może powodować ograniczenie udziału i inhibicję egzopeptydaz, co przyczynia się do obniżenia zawartość wolnych aminokwasów i gorszej oceny sensorycznej marynat. Podczas marynowania śledzi świeżych i mrożonych-rozmrożonych wartości GPA były zbliżone, zaś aktywność endopeptydaz aspartyłowych była istotnie większa o 50 - 100 % w tych pierwszych. Obniżenie temperatury marynowania z 12 do 5 - 6 °C powoduje istotne obniżenie GPA mięsa i aktywności endopeptydaz aspartyłowych, odpowiednio o 10 - 24 i 16 - 50 %, ale tylko do 4 - 7 doby marynowania. W próbach marynowanych w 12 °C aktywność proteolityczna silniej koreluje z zawartością tyrozyny, niż z zawartością peptydów. Potwierdza to, że marynowanie w wyższej temperaturze bardziej sprzyja powstawaniu wolnych aminokwasów, niż peptydów, które powstają głównie podczas chłodniczego marynowania [H3].

W drugiej części publikacji [H3] opisano wpływ czynników technologicznych na dyfuzję peptydaz z mięsa do kąpeli marynującej. Porównując aktywność kąpeli do aktywności w mięsie (ml : g) stwierdzono, że stanowi ona 50 - 260 % aktywności w mięsie. Z kolei przeliczając aktywność peptydaz na białko zawarte w kąpeli i mięsie (g : g) stwierdzono, że aktywność w kąpeli jest 10 - 80 (średnio 30) razy większa niż w mięsie. Udział endopeptydaz aspartyłowych w GPA kąpeli w zależności od próby wynosił 40 - 98 %. W zależności od zastosowanych parametrów technologicznych udział ten od 1. do 7. doby marynowania zmienia się o 10 - 20 %. Pomiary wobec specyficznych substratów pokazały, że aktywność endopeptydaz aspartyłowych w kąpeli jest średnio 5 razy większa od katepsyny L i 10 razy od katepsyny B. Z kolei aktywność katepsyny L w kąpeli jest średnio 3,5 razy większa niż katepsyny B. Wyniki pokazują szybki wzrost aktywności endopeptydaz aspartyłowych w kąpeli do 2 doby. Największą aktywność endopeptydaz aspartyłowych oznaczono w kąpeli po 1 dobie marynowania mrożonych-rozmrożonych śledzi bałtyckich. Dwa razy większe straty GPA do kąpeli w przypadku marynat ze śledzi bałtyckich niż atlantyckich tłumaczą mniejszą aktywność w mięsie u tych pierwszych. Różnice w GPA mięsa pomiędzy śledziem atlantyckim a bałtyckim, a szczególnie skala i struktura strat enzymów, mogą tłumaczyć dlaczego śledź bałtycki jest

postrzegany jako gorszy surowiec do marynowania i solenia. Prawdopodobnie gwałtowna dyfuzja endopeptydaz aspartylowych z mięsa do kąpieli jest ważnym powodem spadku ich udziału w GPA mięsa podczas marynowania. Najmniejsze straty GPA do kąpieli oznaczono w przypadku marynat dojrzewających w największej ilości soli (12 %) lub w największej ilości kwasu octowego (9 %). W przypadku kwasu octowego pozytywny efekt utrzymuje się tylko do 1 - 2 dób, w przeciwieństwie do soli, która ogranicza straty przez cały okres marynowania. Wyniki pokazują, że ograniczenie strat peptydaz przyczynia się do wzrostu ich aktywności w mięsie marynowanych ryb. Wysoka aktywność endopeptydaz aspartylowych w mięsie tych prób silnie dodatnio koreluje z zawartością peptydów, bardziej niż w próbach, w których występują większe straty peptydaz. Największe straty odnotowano w przypadku śledzi bałtyckich, szczególnie poddanych procesowi mrożenia-rozmrażania. Śledzie bałtyckie, szczególnie mrożone, w porównaniu do atlantyckich, traciły do kąpieli więcej endopeptydaz aspartylowych i katepsyny L niż B. Może to oznaczać, że gorsza tekstura marynat ze śledzi bałtyckich jest skutkiem większych strat endopeptydaz, w tym katepsyny L, która wykazuje specyficzność wobec kolagenu. Zastosowanie 12 zamiast 6 °C podczas marynowania zwiększyło do 10 % wartość GPA oraz aktywność i udział endopeptydaz aspartylowych w kąpieli [H3].

Najważniejszymi osiągnięciami w publikacji [H3] jest wykazanie, że straty poszczególnych peptydaz z tkanki śledzi do kąpieli istotnie zależą od podstawowych czynników technologicznych marynowania. Ważne jest również porównanie aktywności proteolitycznej w kąpieli do aktywności w marynowanej rybie. Nowością naukową jest także analiza korelacji strat endopeptydaz aspartylowych ze składem ilościowym i jakościowym azotowych frakcji odpowiedzialnych za jakość marynowanych śledzi.

Odzyskiwanie peptydaz z kąpieli marynującej

Po odkryciu aktywnych peptydaz w kąpieli w formie rozpuszczonej i lizosomalnej, celem czwartej publikacji [H4] było opracowanie w skali laboratoryjnej metod odzyskiwania aktywnych enzymów z kąpieli marynującej. Dodatkowym celem była również krótka charakterystyka otrzymanego preparatu, aby ocenić jego możliwe przyszłe zastosowanie. Do wysalania peptydaz z kąpieli użyto siarczan amonu, jednak dla osiągnięcia najwyższej wydajności odzyskiwania enzymów konieczne było wykonanie w pierwszej kolejności badań w zakresie wyboru bufora do rozpuszczania precypitatu, jego pH i objętości. Największą aktywność specyficzną endopeptydaz aspartylowych

otrzymano stosując bufor octanowy, następnie fosforanowy, a najmniejszą w przypadku wody. Określono również, że po 4 godzinach wydajność wysalania endopeptydaz aspartylowych jest wyższa niż po 2 lub 12 godzinach. Wysalanie siarczanem amonu pozwala odzyskać z kąpieli do 86 % endopeptydaz aspartylowych, jeśli osad rozpuszczono w pH 8,0 lub 78 % stosując pH 4,0. W przypadku endopeptydaz cysteinowych najwyższą wydajność do 82 % uzyskano rozpuszczając precypitat w pH 5,0. Najmniejszą zawartość białka w preparacie uzyskano stosując pH 2,0 – 4,0. Po zwiększeniu pH buforu do 5,0 – 8,0 ilość rozpuszczonego białka wzrosła od 2 do 5 razy. Ostatecznie czystość endopeptydaz aspartylowych i cysteinowych po wysoleniu wzrosła odpowiednio 15 i 8 razy w porównaniu do surowej kąpieli [H4].

Wykazano, że endopeptydazy aspartyłowe łatwiej od cysteinowych wytrącają się z kąpieli przy niższym stężeniu soli. Przy 50 % stężeniu siarczanu amonu odzyskano połowę endopeptydaz aspartylowych i tylko 20 % endopeptydaz cysteinowych. Najwięcej endopeptydaz aspartylowych wysala się z kąpieli w zakresie 40 – 60 % soli, zaś cysteinowych w zakresie 50 – 80 %. Precypitacja endopeptydaz aspartylowych w niższym stężeniu siarczanu amonu niż cysteinowych jest skutkiem różnej struktury i właściwości tych enzymów. Endopeptydazy aspartyłowe (katepsyna D i E) w porównaniu do cysteinowych (katepsyna B i L) mają większą masę cząsteczkową i wyższy indeks hydrofobowości. Analiza supernatantu pozostałego po wysalaniu wykazała w nim brak aktywności endopeptydaz aspartylowych i cysteinowych, odpowiednio po osiągnięciu 80 i 90 % stężenia siarczanu amonu [H4].

Wysalanie siarczanem amonu pozwala odzyskać tylko peptydazy rozpuszczalne z pominięciem frakcji lizosomalnej. Aby zwiększyć ilość pozyskanych enzymów konieczne jest wykonanie wstępnego etapu dezintegracji lizosomów opisane w publikacji [H2]. Dlatego do odzyskiwania enzymów zastosowano ultrafiltrację, która w jednym etapie pozwala odzyskać peptydazy z obu frakcji rozpuszczalnej i lizosomalnej. Metoda ta ma wiele zalet i dlatego jest coraz częściej wykorzystywana w przetwórstwie żywności. Użycie filtrów 10 - 100 kDa umożliwiło zatężyć kąpiel $36,5 \pm 12$ razy oraz odzyskać peptydazy z frakcji rozpuszczalnej i lizosomalnej [H4]. Wydajność odzyskiwania peptydaz wzrosła z 73 - 77 % do 119 - 123 % wraz z obniżeniem cut-off membrany ze 100 do 10 kDa. Ze względu na masę cząsteczkową enzymów nanofiltracja pozwala odzyskać więcej endopeptydaz aspartylowych niż cysteinowych. Straty enzymów do permeatu wynosiły od 0 do 40 % w zależności od membrany filtra i enzymu. Retentaty zawierały od 10 do 20 % białka w porównaniu do surowej kąpieli. W przypadku endopeptydaz aspartylowych

aktywność specyficzna i stopień oczyszczenia były najwyższe dla membrany 30 kDa. Dla endopeptydaz cysteinowych parametry te były porównywalne dla trzech badanych membran. Udział aktywności endopeptydaz aspartylowych do cysteinowych w retentatach wynosił od 2 : 1 do 1,25 : 1.

Dotychczas pozyskiwane preparaty proteolityczne z odpadów ryb zawierają jeden dominujący enzym o znanych właściwościach, np. pepsyna lub tripsyna. W preparatach proteolitycznych z kąpieli występuje wiele peptydaz, które wykazują synergiczne działanie. Preparat proteolityczny pozyskany z kąpieli miały najwyższą wartość GPA w pH 2,5 oraz 80 % tej aktywności w pH 4,0 [H4]. Aktywność pochodziła głównie od endopeptydaz aspartylowych. Z kolei aktywność peptydaz cysteinowych miała optimum w pH 5,0 osiągając ok. 35 % GPA. Endopeptydazy aspartylowe w preparacie wykazywały największą aktywność przy 1,5 % stężeniu NaCl, zaś peptydazy cysteinowe przy 3 % soli. Zaletą preparatu proteolitycznego z kąpieli jest duża aktywność w szerokim zakresie pH od 2,0 do 6,0, w szerokim zakresie stężeń NaCl od 0 do 7 % oraz duża stabilność podczas składowania zamrażalniczego.

Po zdobyciu wiedzy na temat aktywności endopeptydaz w kąpieli i metod ich oczyszczania zastosowano zregenerowaną kąpiel marynującą do marynowania śledzi. Wyniki ze wstępnych badań pokazują, że endopeptydazy mają zdolność do przenikania z kąpieli do mięsa ryby, co skutkuje wzrostem aktywności proteolitycznej w marynowanej rybie, większą zawartością produktów hydrolizy białek, mniejszą twardością i wyższą pożądalnością sensoryczną.

4.2.5. Podsumowanie

W Polsce produkuje się duże ilości marynat śledziowych. Kąpiel marynująca pozostała po marynowaniu w przemyśle jest wylewana do ścieków. W piśmiennictwie naukowym dotychczas nieznane były prace dotyczące występowaniu i odzyskiwaniu endopeptydaz aspartylowych z kąpieli marynującej. Stosując najnowsze metody do oczyszczania, identyfikacji i oznaczania aktywności peptydaz oraz dzięki optymalizacji tych metod udało się przedstawić dowody na występowanie endopeptydaz aspartylowych w kąpieli marynującej pozostałej po marynowaniu śledzi. Wykazano, że endopeptydazy aspartylowe obecne w kąpieli są aktywne pomimo znacznego stężenia soli, kwasu

octowego i innych związków wyekstrahowanych z ryby podczas marynowania. Wykazano, że peptydazy występują w kąpieli nie tylko w formie rozpuszczonej, ale również we frakcji lizosomalnej. Dezintegracja błon lizosomów za pomocą ultradźwięków lub wielokrotnego zamrażania-rozmrażania umożliwia kilkukrotny wzrostu aktywności proteolitycznej w kąpieli – „efekt wzbogacania kąpieli”. Największy udział w aktywności proteolitycznej kąpieli ma grupa endopeptydaz aspartylowych, z których dominuje katepsyna D, a następnie pepsyna i katepsyn E. W kąpieli występują także peptydazy cysteinowe (katepsyna B i L) oraz peptydazy serynowe. Specyficzna aktywność (U/g białka) w kąpieli jest kilkadziesiąt razy większa niż w mięsie. Dyfuzji endopeptydaz aspartylowych z ryby do kąpieli istotnie zależy od podstawowych czynników technologicznych, takich jak rodzaj śledzia, metoda jego utrwalenia, czas i temperatura marynowania, stężenie soli i kwasu octowego w kąpieli. Mrożenie ryb uwalnia enzymy i ułatwia ich dyfuzję do kąpieli podczas marynowania w formie rozpuszczalnej i lizosomalnej. Dowiedziono, że straty endopeptydaz aspartylowych do kąpieli mają istotne znaczenie na skład ilościowy i jakościowy produktów hydrolizy białek odpowiedzialnych za charakterystyczny smak i zapach marynowanych śledzi. Wykazano, że jest możliwe odzyskiwanie aktywnych peptydaz z kąpieli. Proste metody, takie jak wysalanie pozwalają odzyskać enzymy tylko w formie rozpuszczonej, zaś ultrafiltracja również z frakcji lizosomalnej. Preparaty pozyskane z kąpieli marynującej mają wysoką aktywność proteolityczną w szerokim zakresie pH i stężenia NaCl. Dlatego praktycznym aspektem badań jest wykazanie, że po oczyszczeniu kąpieli i uzupełnieniu w niej stężenia soli i kwasu octowego, istnieje możliwość powtórnego wykorzystania do marynowania śledzi.

Otrzymane wyniki pokazują, że kąpiel marynująca może być wykorzystywana do produkcji peptydaz, aby zastosować je w technologii żywności. Wstępne obliczenia wskazują, że potencjalnie z 1 litra kąpieli marynującej można otrzymać preparat proteolityczny o aktywności od 500 do 1500 U. Ceny preparatów analitycznych katepsyny B, D lub L o czystości od kilkunastu jednostek/mg osiągają kilkaset dolarów. Co roku przemysł rybny tylko w Polsce wyrzuca kilkadziesiąt tysięcy ton kąpieli do ścieków. Dlatego planowane są dalsze badania nad oczyszczaniem i wykorzystywaniem preparatów peptydaz z kąpieli marynującej.

4.2.6. Bibliografia

1. Almy L.H. 1926. The role of the proteolytic enzymes in the decomposition of herring. *Journal of the American Chemical Society*, 48, 2136-2146.
2. An H., Weerasinghe V., Seymour A.T., Morrissey M.T. 1994. Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi proteins. *J. Food Sci.*, 59(5), 1013–1017, 1033.
3. Artigas G., Sárraga C. García Regueiro J.A. 1996. Purification process to obtain cathepsin D, B and L suitable to be used in food industry. *Food Biotech.*, 10(1), 41–54.
4. Gringer N., Osman A., Nielsen H.H., Undeland I., Baron C.P. 2014. Chemical characterization, antioxidant and enzymatic activity of brines from Scandinavian marinated herring products. *J. Food Process Technol.*, 5(7), 1–10.
5. GUS. 2015. Gospodarka rybna, w: *Rocznik statystyczny gospodarki morskiej*. Główny Urząd Statystyczny, Szczecin 2015.
6. Ha M., Bekhit A.E. A., Carne A., Hopkins D. L. 2012. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chem.*, 134, 95–105.
7. Karvinen, V.P., Bamford, D.H., Granroth, B. 1982. Changes in muscle subcellular fractions of Baltic herring (*Clupea harengus membras*) during cold and frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* 33, 763.
8. Kiesvaara M. 1975. On the soluble nitrogen fraction of barrel-salted herring and semi-preserved during ripening. Technical Research Centre of Finland. Materials and Processing Technology. Publication 10, 99, Acad. Diss.
9. Kołodziej K. 2008. Przegląd inwestycji istotnie redukujących oddziaływanie na środowisko zrealizowanych w ramach SPO “Rybołówstwo i przetwórstwo ryb 2004-2006”. *Wiadomości Rybackie*, 1-2 (161), 16-18.
10. Kołodziej K. 2010. Zastosowanie ultrafiltracji do regeneracji zużytych solanek. *Magazyn Przemysłu Rybnego*, 5 (77), 45-47.
11. Krause J. 2009. Purification and partial characterization of cathepsin D from ostrich skeletal muscle, and its activity during meat maturation. Nelson Mandela Metropolitan University, PhD Thesis.
12. Levanidov I.P., Ionas G.P., Sluckaja T.N. 1987. *Technologija solenych, kopconych i vialenych rybnych produktom*. Agropromizdat, Moskwa, 15–20.
13. Lullman-Rauch, R. 2007. History and morphology of the lysosome, in: *Lysosomes. Medical intelligence unit* (Ed. Safting P.). Springer Science, New York, USA, pp. 1–16.
14. Makinodan Y., Toyohara H., Ikeda S. 1983. Combined action of carp muscle cathepsin A and D on proteins. Short Paper. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 49(7) 1153.

15. McLay R. 1980. Activities of cathepsin A and D in cod muscle. *J. Sci. Food Agric.*, 31, 1050–1054.
16. Miranowska A., Karwowska A., Gacko M. 2009. Quantitative determination and localization of cathepsin D and its inhibitors. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 47(2), 153-177.
17. Mukundan, M.K., Antony, P.D., Nair, M.R., 1986. A review on autolysis in fish. *Fish. Res.* 4, 259-269.
18. Shenderyuk V.I., Bykowski P.J. 1990. Salting and marinating of fish, in: *Seafood: resources, nutritional composition, and preservation* (ed. Sikorski Z.), CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida 9, 147–162.
19. Sikorski Z.E. 2004. Marynowanie ryb, w: *Ryby i bezkręgowce morskie. Pozyskiwanie, właściwości i przetwarzanie* (ed. Sikorski Z.E.), Wydawnictwo WNT.
20. Szymczak M., Kołakowski E. 2016. Total volatile basic nitrogen in meat and brine during marinating of herring. *J. Aqua. Food Prod. Technol.*, 25(3), 373–387.
21. Szymczak M., Kołakowski E., Felisiak K. 2015. Effect of addition of different acetic acid concentrations on the quality of marinated herring. *J. Aqua. Food Prod. Technol.*, 24(6), 566–581.
22. Szymczak, M. 2011. Comparison of physicochemical and sensory changes in fresh and frozen herrin (*Clupea harengus* L.) during marinating. *J. Sci. Food Agric.*, 91, 68–74.
23. Szymczak, M., Kołakowski E. 2012. Losses of nitrogen fractions from herring to brine during marinating. *Food Chem.*, 132(1), 237-243.
24. Szymczak, M., Kołakowski E., Felisiak K. 2012. Influence of salt concentration on properties of marinated meat from fresh and frozen herring (*Clupea harengus* L.). *Inter. J. Food Sci. Technol.*, 47(2), 282–289.
25. Szymczak, M., Szymczak, B., Koronkiewicz, A., Felisiak, K., and Bednarek, M. 2013. Effect of cover brine type on the quality of meat from herring marinades. *J. Food Sci.*, 78(4), 619–625.
26. Szymczak, M., Tokarczyk, G., Felisiak, K. 2015. Marinating and salting of herring, nitrogen compounds' changes in meat and brine, in: *Processing and Impact on Active Components in Food* (ed. Preedy V.), Academic Press, USA, Elsevier, chapter 53, 439–445.
27. Toldra F., Reig M. 2015. Enzymes in meat and fish, in: *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality* (ed.) Rickey Yada, Elsevier, 199–212.
28. Ueno R., Liston J., Horiguchi Y. 1986. Intracellular distribution of enzymes and particle properties of lysosomes in mackerel muscle tissue. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52(5), 895–900
29. Voet, D., Voet, J.G. 1990. "Biochemistry". John Wiley & Sons, New York.
30. Wilk S. 2001. Purification of proteolytic enzymes, in: *Proteolytic enzymes. Practical Approach*, 2nd ed., (ed. Beynon R., Bond J.S.). 23-104. Oxford University Press, New York.

31. Witwicki J., Ardelt W. 1984. Elementy enzymologii. PWN, Warszawa.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH

W 1999 roku, po ukończeniu Technikum Ochrony Środowiska w Policach, rozpocząłem studia na Wydziale Nauk o Żywności i Rybactwa w Akademii Rolniczej w Szczecinie, na kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka. Podczas studiów magisterskich otrzymywałem stypendium naukowe. Pracę magisterską pt. "*Analiza składu aminokwasowego odbiałczonych ekstraktów mięsa pstrąga*" napisaną pod kierunkiem Prof. dr. hab. inż. Edwarda Kołakowskiego obroniłem w 2004 roku z oceną bardzo dobrą. Badania do pracy wykonałem samodzielnie obsługując komory do chromatografii i elektroforezy bibułowej. Metodę rozdziału aminokwasów przy użyciu chromatografii elektroforezy bibułowej opracowaną przez Podeszewskiego w modyfikacji Kołakowskiego dostosowałem i zoptymalizowałem do prób odbiałczonych ekstraktów trichlorooctowych. Metoda ta została później wykorzystana w wielu badaniach m.in. do czterech prac magisterskich i jednej pracy doktorskiej, w których wykonywałem lub pomagałem wykonać analizy. Efektem tych prac są doniesienia na konferencji oraz publikacja.

W 2004 roku rozpocząłem Międzywydziałowe Studia Doktoranckie w Akademii Rolniczej w Szczecinie w Katedrze Profesora Kołakowskiego. Na pierwszym roku studiów oprócz właściwych badań kontynuowałem temat oznaczania aminokwasów w produktach rybnych i 12-16 grudnia 2004 roku odbyłem tygodniowe szkolenie w obsłudze analizatora aminokwasów (INGOS AAA400) na Politechnice Łódzkiej, czego efektem były wyniki badań przedstawione na konferencji. Podczas studiów doktoranckich zajmowałem się wpływem podstawowych czynników technologicznych na proces dojrzewania marynowanych śledzi. Moimi podstawowymi technikami badawczymi były analizy składu frakcji azotowych powstających w mięsie i kąpieli podczas procesu marynowania. Wykonałem siedem serii badań, z których każda wymagała kilku miesięcy analiz. Pracę doktorską obroniłem w 2008 roku, a otrzymaną ogromną ilość wyników badań opublikowałem jako jedyny lub główny autor w wielu prestiżowych międzynarodowych czasopismach, takich jak *Food Chemistry*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *Journal of Food Science*, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *International Journal of Food Science & Technology*. Prace te dały nową wiedzę oraz uporządkowały dotychczas znane zagadnienia w zakresie wpływu rodzaju surowca, sposobu jego obróbki i utrwalenia oraz wpływ stężenia soli i kwasu octowego na proces marynowania ryb.

Nowością naukową w tych publikacjach była charakterystyka procesu marynowania śledzi od strony przemian zachodzących w kąpieli marynującej i zalewie smakowej podczas dojrzewania marynat. Za szczególnie ważną uważam publikację z 2012 roku dotyczącą strat frakcji azotowych z mięsa do kąpieli. Badania te były inspiracją do mojej pracy habilitacyjnej oraz prawdopodobnie dla naukowców z Dani, którzy w latach 2014-2016 roku cytowali moje prace w publikacjach na temat bioaktywnych związków azotowych obecnych w solankach.

Wiedza, doświadczenie i dorobek naukowy w prestiżowych czasopismach zdobyte dzięki pracy doktorskiej przyczyniły się między innymi do (i) powstania tematu mojej pracy habilitacyjnej, (ii) opracowania *Technologii wysokiej wydajności marynowania ryb*, zgłoszonej jako know-how, przedstawionej na *European Seafood Exposition* w Brukseli, a następnie sprzedanej w formie licencji niewyłącznej, (iii) zgłoszeń patentowych oraz (iv) zdobycia i kierowania trzema projektami naukowymi, finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz przez Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa.

Wpływ na moje osiągnięcia miały również odbyte staże w zakładach przetwórstwa rybnego. W 2011 roku odbyłem 3 miesięczny staż naukowy w zakładzie przetwórstwa surimi Lucky Union Foods Euro Poland w Dziale Jakości, a następnie byłem opiekunem stażystki mgr Honoraty Okseniuk, która jest kierowniczką w Dziale Badań i Rozwoju w tym samym zakładzie. Podczas stażu zaproponowałem, opracowałem i we współpracy ze stażystką wykonałem dwie prace polegające na (i) optymalizacji zastosowania handlowych preparatów transglutaminazy do specyfiki surowca oraz (ii) optymalizacji temperatury utrwalania paluszków krabowych z surimi w celu obniżenia wycieku wody i podniesienia jakości gotowego produktu pakowanego próżniowo. Wyniki obu prac zostały wdrożone w cykl produkcyjny zakładu, a wyniki pierwszej zostały również przedstawione na konferencji. W 2013 roku odbyłem staż w zakładzie produkującym marynaty śledziowe Przedsiębiorstwo Przetwórstwa Artykułów Spożywczych ZGODA, gdzie w latach 2014-2015 wykonałem badania przedwdrożeniowe finansowane z projektu MNiSW dla mojej technologii know-how o marynowaniu ryb. Były to badania zaplanowane i wykonane we współpracy z przedsiębiorcą – producentem marynat śledziowych, co miało wpływ na pozytywne rezultaty. Podczas dotychczasowego zatrudnienia wykonałem również kilka ekspertyz na zlecenia zarówno małych i największych zakładów przetwórstwa spożywczego w Polsce, głównie rybnego.

W 2015 roku byłem ekspertem w komisji i jestem współautorem podstawy programowej kształcenia w zawodzie *Przetwórcy Ryb* na wniosek Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Z kolei na lata 2016-2017 zostałem ekspertem do reprezentowania zawodu Przetwórcy ryb na Forum Przedstawicieli Partnerów Społecznych w ramach projektu „Partnerstwo na rzecz kształcenia zawodowego” organizowanego przez Ośrodek Rozwoju Edukacji (Minister Edukacji Narodowej) w Warszawie. W 2016 byłem członkiem komisji bloku technologia żywności podczas etapu okręgowego XL Olimpiady Wiedzy i Umiejętności Rolniczych w Technikum Mechanizacji Rolnictwa w Pyrzycach.

W latach 2010-2015 byłem webmasterem strony internetowej mojego Wydziału. Moja znajomość technik programowania umożliwiła stworzenie nowej strony internetowej oraz opiekę nad nią przez pięć lat, aż do zatrudnienia wykwalifikowanego informatyka przez nasz Wydział.

Ciągle doskonalam swoje umiejętności i doksztalcam się. Ukończyłem 11 kursów i szkoleń dotyczących pozyskiwania funduszy i prowadzenia projektów naukowych, jak np. „Zarządzanie badaniami sektora produkcji żywności” prowadzone przez Polskie Zrzeszenie Producentów Bydła Mięsnego. W celu podnoszenia kwalifikacji brałem udział również w kursach na temat innowacyjności i komercjalizowania własnych wyników badań.

Brałem aktywny udział w 6 konferencjach. Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 22 publikacje, w tym 12 publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (sumaryczny IF wynosi prawie 19) oraz jeden rozdział w renomowanym zagranicznym wydawnictwie. Większość tych publikacji dotyczy tematu marynowania ryb i mój udział zaangażowania w nich średnio wynosi ok. 90 %. Ilość cytowań moich prac wynosi 84, zaś Indeks Hirscha 5 (wg Google Scholar). Za osiągnięcia naukowe zostałem dwukrotnie uhonorowany nagrodami indywidualnymi pierwszego i drugiego stopnia przez Rektora Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie oraz za osiągnięcia otrzymałem indywidualne stypendium Prorektora ds. Nauki na kontynuowanie badań. Zważywszy na (i) okres mojej aktywności naukowej (1 rok - asystent + 7 lat - adiunkt) oraz na (ii) wyniki innych badaczy na świecie w temacie marynat rybnych, uważam że osiągnięte przeze mnie wyniki są na wysokim światowym poziomie. Publikacje w moim dorobku są stosunkowo nowe (1-5 lat), lecz mimo to są cytowane od kilku do kilkunastu razy, pomimo obszaru naukowego w którym ukazuje się tylko po kilka wysoko punktowanych publikacji rocznie.

Moje doświadczenie naukowe znalazło uznanie poprzez zaproszenie mnie do pełnienia funkcji jako Handling Editor (od 2013 w *Journal of Coastal Development, OMICS Group*), Editorial Board Member, Review Editor (od 2013 w *International Journal of Nutrition and Food Science, Science Publishing Group, USA*), Advisory Board Reviewer (od 2015 w *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*) oraz wykonania 38 recenzji dla 15 renomowanych czasopism naukowych: *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, Archives of Polish Fisheries, Biosensors Journal, Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Food Chemistry, Food Science and Technology International, International Journal of Nutrition and Food Science, Journal of Aquatic Food Product Technology, Journal of Coastal Development, Journal of Food Process Engineering, Journal of Food Quality, Journal of Nutritional Health & Food Science, Journal of the Science of Food and Agriculture, Membrane Water Treatment, An International Journal, Nauka Przyroda Technologie - Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. Od 2014 roku recenzowałem kilka projektów naukowych zgłaszanych do Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach konkursów *Program Badań Stosowanych* i *BIOSTRATEG* oraz jednego projektu zakończonego w ramach *POIG*.

Szczególnym wyróżnieniem było dla mnie imienne zaproszenie przez prof. Victor'a R. Preedy z King's College w Londynie do udziału w przygotowaniu rozdziału pt. „Marinating and salting of herring, nitrogen compounds' changes in meat and brine” w książce „*Processing and Impact on Active Components in Food*” wydanej przez Academic Press, Elsevier Inc., które odbieram jako dostrzeżenie moich osiągnięć naukowych na forum międzynarodowym. Kolejnym dużym osiągnięciem w 2016 roku jest dla mnie wybór mojej osoby przez Nova Publishing Science (NY, USA) na edytora książki „*Acetic Acids: Advances in Research and Applications*”.

W latach 2010 – 2015 byłem opiekunem studentów studiów niestacjonarnych na kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka. Byłem promotorem 8 prac magisterskich, 12 inżynierskich. Wykonałem recenzje 7 prac magisterskich i 7 prac inżynierskich. Od 2013 roku jestem członkiem *Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności* (Warszawa), a od 2016 roku jestem członkiem *Institute of Food Technologists* (USA, Chicago). W latach 2005 – 2006 byłem współopiekunem *Studenckiego Koła Naukowego Technologów Żywności*, w katedrze w której wykonywałem pracę doktorską. Koło to występując we Wrocławiu i w Szczecinie z tematem marynat śledziowych zdobyło

III miejsce. W 2012 roku wraz z dr inż. Katarzyną Felisiak założyliśmy i opiekujemy się *Studenckim Kołem Naukowym Technologii Rybnej i Enzymów* w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym, które regularnie bierze udział w konferencjach, publikuje wyniki badań i otrzymuje wyróżnienia. W semestrze zimowym 2016/2017 wraz z dr inż. Katarzyną Felisiak jesteśmy opiekunami i prowadzimy zajęcia w języku angielskim dla studenta z Turcji, który w ramach programu Erasmus przyjechał do mojej Katedry w celu wykonania badań do pracy magisterskiej.

5.1. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego po doktoracie

Nazwa czasopisma lub osiągnięcia	Ilość	Rok opublikowania	IF ^a	Punkty wg MNiSW ^a	Udział [%]	Ilość cytowań ^b
Food Chemistry	2	2012	3.334	45	90*	18
		2016	3.391	40	95*	3
Journal of Food Science	2	2013	1.791	35	85*	13
		2016	1.698	30	100*	1
Journal of the Science of Food and Agriculture	2	2011	1.436	35	100*	18
		2016	1.714	35	100*	0
Journal of Aquatic Food Product Technology	2	2016	0.688	20	90*	0
		2015	0.688	20	95*	2
Folia Microbiologica	1	2015	0.791	15	15	7
International Journal of Food Science & Technology	2	2012	1.240	25	85*	9
		2016	1.384	25	100*	0
Żywność. Nauka. Technologia. Jakość	2	2016	0	13	10	0
		2012	0.155	15	40*	4
Przemysł Spożywczy	1	2016	0	12	70*	0
Rozdziały w monografii naukowej w j. ang.	1	2015	-	5	60*	2
Edytor monografii naukowej w j. ang.	1	2017	-	-	-	-
Towaroznawcze Problemy Jakości	1	2013	0	7	60*	0
Folia Pomer. Univ.	5	2010	0	6	10	0

Technol. Stetin., Agric., Aliment., Pisc. Zootech.		2009 2009 2008 2008		6 6 4 4	85* 95* 15 80*	1 5 0 2
Publikacje razem:	22	8 lat	18.310	403	70,5 %	85
Zgłoszenia patentowe	2	2015 2014	-	-	100* 100*	-
Know-how	1	2014	-	-	70*	-
Wdrożenia własnych technologii, ilość umów licencyjnych	1	2014	-	-	-	-
Zespoły badawcze - kierowanie projektami badawczymi	3	2012-2015 2013-2017 2014-2015	-	WNOZIR NCN POIG	-	-
Komunikaty naukowe wygłoszone na krajowych konferencjach tematycznych	6	-	-	-	5* z 6	-
Komunikaty naukowe prezentowane w formie posterów na międzynarodowych konferencjach tematycznych	1	-	-	-	1*	-
Opinie i ekspertyzy	43	-	-	-	42* z 43	-
Recenzje publikacji i projektów naukowych	42	-	-	-	-	-

^a Punktacja na dzień opublikowania zgodnie z rozporządzeniami MNiSzW,

^b Ilość cytowań zgodnie z bazą Google Scholar (na podstawie Publish or Perish),

* Osiągnięcie w którym jestem autorem korespondencyjnym lub głównym autorem,

Szczecin, 05-10-2016

Mariusz Szymczak
podpis