

На правах рукописи



Загорская Дарья Сергеевна

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАМЧАТСКОГО КРАБА**

03.00.23 – биотехнология, 03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

10 ДЕК 2009



Щелково - 2009

Работа выполнена в ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)»

Научный руководитель: доктор биологических наук
Ковачева Николина Петкова

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Воробьева Галина Ивановна
доктор сельскохозяйственных наук
Жигин Алексей Васильевич

Ведущая организация: Российский Государственный Аграрный
Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева

Защита состоится "25" декабря 2009 г. в 10 час. на заседании диссертационного совета по защите диссертации на соискание ученой степени доктора наук Д 006.069.01 во Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте биологической промышленности по адресу: 141142, Московская область, Щелковский район, п/о Кашинцево, п. Биокombината, ВНИТИБП, E-mail: vnitibp@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности.

Автореферат разослан "24" ноября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук



Фролов Ю.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Культивирование камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* – это новое направление в марикультуре. Ввиду того, что ракообразные заметно отличаются от других объектов аквакультуры (рыб и моллюсков), их культивирование в искусственных условиях должно базироваться на оригинальных подходах, разработка которых требует детального изучения биохимических процессов, происходящих в их организме в ходе личиночного цикла. Разработка системы контроля физиологического состояния крабов, включающая в себя ряд биохимических показателей органов и тканей, а также оценки эффективности технологии культивирования ракообразных являются крайне актуальными.

Одной из важных проблем, возникающих при культивировании ракообразных, в частности камчатского краба, является преодоление линьки. Для ракообразных этот процесс является наиболее энергозатратным и часто сопряжен с фатальным исходом. Выжившие после линьки особи с ограниченной подвижностью и неокрепшим панцирем при совместном содержании подвержены каннибализму со стороны еще не линявших или уже окрепших особей.

В настоящее время весьма актуальна задача разработки рецептур специализированных кормов, включающих продукты переработки ракообразных: хитин-белковый комплекс, белковый гидролизат и хитозан, позволяющих адекватно заменить естественный рацион для личинок, мальков, и взрослых особей камчатского краба. Введение в рацион крабов кормов, содержащих низкомолекулярный хитозан, обладающий росто- и иммуностимулирующими свойствами, позволило бы повысить естественную резистентность культивируемых особей и выживаемость их после линьки, а также ослабить негативное влияние каннибализма.

Для получения низкомолекулярного хитозана лучше использовать собственные ферментные комплексы краба, обладающие субстратной специфичностью и хитинолитической активностью в отношении хитозана ракообразных, чтобы свойства получаемого вещества были наиболее близки к свойствам ана-

лога, образующегося в организме краба естественным путем. Известно, что ферментный комплекс, выделенный из гепатопанкреаса камчатского краба, проявляет гидролитическую активность в отношении крабового хитозана, которая обусловлена наличием карбогидраз и протениаз (Ильина и др., 2009).

Существующая общепринятая на промысле беспозвоночных система оценки межлиночной стадии крабов в условиях культивирования оказывается несостоятельной, поскольку используемые в ней параметры, такие как исчерченность панциря и количество обрастателей неадекватны при бассейновом содержании. Это ставит задачу разработки системы объективных биохимических показателей для более точного определения межлиночной стадии крабов.

Важным аспектом наших исследований стала разработка экологически безопасного способа переработки панцирьсодержащих отходов (ПСО) камчатских крабов в местах культивирования, добычи и переработки. Гепатопанкреас крабов, также являющийся отходом переработки, может быть использован для проведения гидролиза белковой части хитин-белкового комплекса (ХБК) и хитозана, что направит в производство новые источники сырья для получения биологически активных препаратов различного назначения.

Целью настоящей работы является получение из гепатопанкреаса, гемолимфы и панциря камчатского краба биологически активных веществ и определение биохимических индикаторов физиологического состояния культивируемых ракообразных, а также разработка рецептур специализированных кормов для ракообразных, отвечающих их естественным рационам и содержащих хитозан в качестве ростостимулирующего агента.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **основные задачи**:

- провести комплексное исследование биологически активных веществ, способных служить параметрами для оценки физиологического состояния камчатского краба в процессе культивирования: липидов и ферментов гепатопанкреаса, хитин-белкового комплекса панциря, белков гемолимфы;

- получить *in vitro* низкомолекулярный хитозан с использованием ферментного комплекса из гепатопанкреаса камчатского краба;
- разработать рецептуры кормов для ракообразных;
- предложить способ безотходного использования культивируемых и промысловых ракообразных;
- разработать комплексную методику отбора проб органов и тканей камчатского краба для биохимических исследований.

Научная новизна. Впервые определены биохимические индикаторы в комплексе для контроля физиологического состояния культивируемого камчатского краба, а также для оценки эффективности технологии культивирования: общее содержание липидов и содержание $\omega 3$ и $\omega 6$ полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в гепатопанкреасе, протеиновая и хитобиязная активности в экстракте гепатопанкреаса, суммарное содержание белка в гемолимфе, температуры первого и второго стеклования ХБК панциря.

Впервые исследованы закономерности изменения липидного состава гепатопанкреаса, а также специфических и неспецифических хитинолитических активностей ферментов гепатопанкреаса камчатского краба на различных стадиях линочного цикла.

Впервые исследована зависимость степени кристалличности ХБК панциря камчатского краба от межлиночной стадии.

Впервые разработана рецептура специализированных кормов для ракообразных с использованием ХБК и низкомолекулярного хитозана.

Разработана методика комплексного отбора проб органов и тканей камчатского краба для биохимических исследований биологически активных веществ, способных служить индикаторами физиологического состояния культивируемых ракообразных, а также являющихся компонентами кормов.

Практическое значение. Разработанные биохимические индикаторы дают возможность оценки физиологического состояния камчатского краба в процессе культивирования и эффективности методов их культивирования. Получен-

ные результаты позволяют определять межлиночную стадию краба по биохимическим показателям.

Полученные результаты легли в основу рекомендаций по составлению рецептур специализированных кормов для ракообразных.

Введение в рацион культивируемых ракообразных разработанных нами кормов, содержащих низкомолекулярный хитозан в качестве ростостимулирующего агента, позволит повысить их выживаемость после линьки, и рентабельность процесса культивирования камчатского краба в целом.

Предложен экологически безопасный способ переработки ПСО культивируемых и промысловых крабов. Показано, что гепатопанкреас крабов может быть использован для гидролиза белковой части ХБК панциря и хитозана с целью получения компонентов специализированных кормов для ракообразных.

Основные положения. На основе биохимических исследований гепатопанкреаса, гемолимфы и панциря камчатского краба установлены параметры для оценки его физиологического состояния в процессе культивирования.

Обосновано введение в специализированные корма для ракообразных компонентов, свойственных их естественным рационам: ХБК, белкового гидролизата, хитозана, полученных из гепатопанкреаса и панциря ракообразных. Введение низкомолекулярного хитозана в корма для ракообразных оказывает ростостимулирующее действие.

Апробация. Основные положения диссертационной работы доложены на 2-й и 3-й Международных научно-практических конференциях: «Пищевая и морская биотехнология: реализация, проблемы, перспективы» (Калининград, 2006, 2008), на XIII & XIV Seminar and Workshop “New Aspects of the Chemistry and Applications of Chitin and its Derivatives” (Wroclaw, 2007, Olshtyn, 2008), на международной конференции «Aquaculture Europe» (Стамбул, 2007), на 3 Международной научно-практической конференции «Морские прибрежные экосистемы. Водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки» (Владивосток, 2008), на 9-й международной конференции Европейского хитинового общества «Forthcoming Euchis - 2009» (Венеция, 2009), международной конференции

«Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (Щелково, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора: участие в планировании и постановке экспериментов, разработка методики отбора проб органов и тканей камчатского краба, пробоподготовка, исследование липидного состава гепатопанкреаса, оценка специфической и неспецифической хитинолитической активности в экстракте гепатопанкреаса, изучение белкового состава гемолимфы, изучение процесса гидролиза крабового хитозана ферментным комплексом из гепатопанкреаса краба, участие в разработке рецептур специализированных кормов, математическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов, написание научных статей, докладов и презентаций, участие в конференциях.

Структура и объём диссертации. Диссертация содержит введение, обзор литературы, методическую часть, раздел результатов и их обсуждения, выводы, практические рекомендации, список литературы, приложение. Работа изложена на 129 страницах, содержит 36 таблиц и 33 рисунка, библиографию из 151 наименования, в том числе 58 на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает благодарность к.х.н. Ильиной А.В., к.х.н. Сидорову Н.Н., д.х.н. Урьяшу В.Ф., всем сотрудникам лаборатории инженерии ферментов Центра «Биоинженерия» РАН, лаборатории термохимии Института химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, а также сотрудникам лаборатории «Воспроизводства и культивирования ракообразных» ВНИРО за содействие в проведении данной работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, ее научная новизна, определены основные направления исследований, сформулированы цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту.

1. В разделе «Обзор литературы» обобщены и проанализированы сведения о физиологических и биохимических процессах в организме камчатского краба

на протяжении линочного цикла. Уделено внимание ферментному комплексу гепатопанкреаса камчатского краба. Приведена информация об использовании в комбикормах для сельскохозяйственных животных и объектов аквакультуры хитина, хитозана и его низкомолекулярных производных. Отмечено, что технология культивирования камчатского краба по-прежнему находится на стадии разработки и для ее совершенствования необходимо создание системы контроля физиологического состояния культивируемых крабов, а также методов оценки эффективности технологии культивирования.

2. Материалы и методы исследования. Исследованы образцы органов и тканей 311 особей камчатского краба, содержавшихся в условиях установок с проточным и замкнутым циклом водообеспечения, а также добытых в Баренцевом и Охотском морях в промысловые сезоны 2005-2009 г.

Экспериментальную часть работы проводили в лаборатории воспроизводства и культивирования ракообразных ВНИРО, на промысловых судах, бассейновом комплексе ООО «Северный проект» (Мурманск), на береговой базе компании Norway King Crab AS (Бюйгенес, Норвегия), лаборатории инженерии ферментов Центра «Биоинженерия» РАН, лаборатории термохимии Института химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Схема исследований представлена на рис.1.

Фракционный состав липидов гепатопанкреаса краба определяли методом ТСХ на алюминиевых пластинах Мерк и Силуфол (Кейтс, 1975). Жирнокислотный состав липидов гепатопанкреаса краба определяли методом ГЖХ. (Фрайфелдер, 1980).

Определение суммарного количества белка в гемолимфе проводили спектрофотометрически по методу Брэдфорд (Spektor, 1978). Протеиназную активность определяли по количеству кислоторастворимых продуктов гидролиза, используя в качестве субстрата азоказеин (Шагинян, 1980). Хитобиазную активность определяли, используя в качестве субстрата 4-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминид (Kubicek-Planz, 1986).



Рис. 1. Схема исследований

Методом дифференциального термического анализа изучена динамика изменения минерализации панциря, физико-химические показатели ХБК, хитина и хитозана и температуры физических переходов (Урьяш, 1978).

Средневязкостную молекулярную массу хитозана рассчитывали по уравнению Марка-Хаувинка. Динамическую вязкость растворов хитозана определяли на ротационном вискозиметре Брукфильда с цилиндрическим ротором при 30°C (Ikeda, 1993).

Опытные партии гранулированных комбикормов изготавливали на лабораторной и пилотной установках ВНИИПРХ, моделирующих промышленную технологию кормопроизводства для рыб.

Полученные результаты исследований обрабатывали с применением методов математической статистики на уровне требований надежности с вероятностью $P=0,95$. Для построения графических зависимостей использовали стандартные программы Windows 2003, Excel 2003.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Современные технологии культивирования ракообразных предусматривают регулирование всех жизненно важных процессов объекта разведения. Биологической особенностью в развитии ракообразных является линька. От успешности ее преодоления в искусственных условиях зависит эффективность той или иной техники культивирования.

Цикл линьки традиционно подразделяют на четыре периода: предлинька, линька, послелинька и межлинька. Для увеличения точности опыта мы выделяли 8 межлиночных стадий, описание которых представлено в табл. 1.

Проведено комплексное исследование органов и тканей камчатского краба для обнаружения биологически активных веществ, способных служить индикаторами физиологического состояния краба, в частности для определения межлиночной стадии, а также для оценки эффективности технологии культивирования.

Признаки межлиночных стадий

МС	Период линьки	Описание стадии
1	После-линька	Крабы подлиняли несколько дней назад, панцирь чистый, мягкий, светлый; при нажатии или сдавливании панцирь и ноги легко ломаются без хруста. До 5 дней после линьки.
2	После-линька	Панцирь чистый, прочнее и заметно темнее, чем у крабов стадии 1. Мышечные ткани водянистые («Пустой краб»). При поднятии за ногу или надавливании на панцирь они ломаются с хрустом. От 6 дней до 3 недель после линьки.
3.0	Меж-линька	Панцирь чистый и твердый, при надавливании слегка прогибается, коксоподиты белые, без царапин. Наполнение конечностей мышечной тканью не более 30%. При поднятии краба за второй членик ходильной конечности он слегка гнется, но не ломается. От 3-х недель после линьки.
3.1	Меж-линька	Панцирь достиг максимальной прочности, на коксоподитах желтые и светло-бурые царапины, отмечаются поселения обрастателей. Шипы на внутренней части клешней и на панцире белые и острые. Наполнение конечностей до 90-95%
3.2	Меж-линька	Иногда отмечаются значительные обрастания, коксоподиты темно-бурые, нижняя поверхность ног покрыта почерневшими царапинами. Наполнение максимальное – 90% и более. Крабы линяли около года назад.
4.0	Пред-линька	Нижняя поверхность тела исчерчена, верхняя покрыта обрастателями. Панцирь вновь эластичен. Наполнение конечностей не более 40-50%, мышечные ткани обводнены.
4.1	Пред-линька	Нижняя поверхность тела исчерчена, верхняя покрыта обрастателями. Панцирь эластичен. Наполнение конечностей не более 30-40%, мышечные ткани обводнены. Абдомен раздут, двигательная активность значительно снижена. До линьки осталось 10-15 дней.
4.2	Старый краб	Очень старые крабы, имеющие изношенный панцирь, покрытый обрастателями. Такие крабы уже не линяют.

3.1. Биохимические исследования

3.1.1. Исследование липидного состава гепатопанкреаса камчатского краба. Содержание крабов в течение 5-6 месяцев в одинаковых условиях позволяет сравнивать липидные показатели гепатопанкреаса. В жире гепатопанкреаса обнаружены фосфолипиды, 1,2 и 1,3 диглицериды, холестерин, жирные кислоты (ЖК), триглицериды, алкоксиглицериды и углеводороды. Общее содержание жира составило от 9% до 27% в зависимости от межлиночной стадии.

На рис. 2 представлено содержание некоторых ЖК в гепатопанкреасе краба на 3.2 и 4.1 межлиночных стадиях.

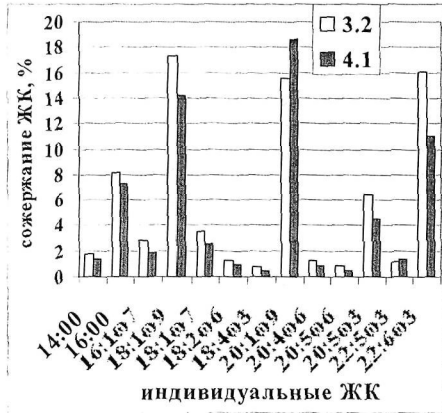


Рис. 2. Содержание ЖК в образцах липидов гепатопанкреаса камчатского краба на 3.2 и 4.1 межлиночных стадиях

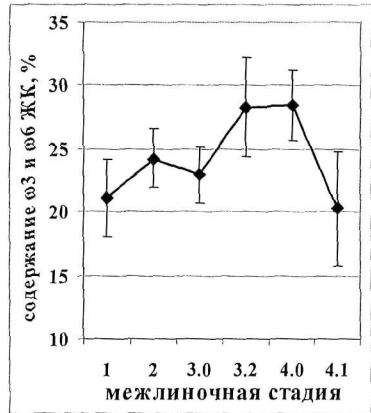


Рис. 3. Общее содержание ω3 и ω6 ПНЖК в липидах гепатопанкреаса камчатского краба в зависимости от межлиночной стадии

Разница в содержании отдельных ЖК составляет от 11 до 43%. В жирно-кислотном составе гепатопанкреаса камчатского краба преобладают моно- и полиненасыщенные жирные кислоты (МНЖК и ПНЖК) – от 60% до 69% и от 13% до 29% соответственно, состав которых изменяется в зависимости от межлиночной стадии. Содержание насыщенных ЖК колеблется в интервале 9 - 12%. Общее количество ω3 и ω6 ПНЖК изменяется в интервале 20-28% на разных межлиночных стадиях, что показано на рис. 3.

Очевидно, что максимальное содержание ω3 и ω6 ПНЖК приходится на стадии 3.2 и 4.0 (28,2 и 28,3%, соответственно). Это связано с тем, что в период межлиньки краб накапливает энергетические ресурсы для успешного преодоления линьки и полного восстановления организма в послелиночный период. Основным объектом промысла в Баренцевом море являются особи камчатского краба со степенью наполненности конечностей от 70% до 100%, что соответствует третьей поздней и четвертой ранней межлиночным стадиям. Наши исследования подтверждают, что в этот период промышленная добыча гепатопанкреаса камчатского краба как источника биологически активных веществ наиболее экономически выгодна.

Совместно с ГУ «Медицинский радиологический научный центр» РАМН проведено лабораторное тестирование радиозащитной и гемостимулирующей активности препаратов липидов из гепатопанкреаса камчатского краба на мышцах. Пероральное введение лабораторным животным препаратов жира гепатопанкреаса камчатского краба статистически достоверно увеличивает массу селезенки γ -облученных мышей и содержание в них эндогенных селезеночных колоний. Последние формируются выживающими после облучения кроветворными стволовыми клетками. Этот факт свидетельствует о наличии у исследованных препаратов гемостимулирующей и радиозащитной активности.

3.1.2. Исследование ферментного комплекса гепатопанкреаса камчатского краба. В ферментном препарате – экстракте из гепатопанкреаса камчатского краба присутствует ряд гидролитических активностей представленных в табл. 2, которые обусловлены наличием карбогидраз и протеиназ, что позволяет использовать этот ферментный комплекс для деполимеризации β - гликозидных связей в хитозане.

Ферментативная активность на разных межлиночных стадиях. Определены ферментативные активности, которые могут служить индикаторами физиологического состояния организма краба в процессе культивирования на различных межлиночных стадиях.

Наши исследования показали, что через неделю после линьки протеиназная активность в экстракте гепатопанкреаса камчатского краба увеличивается на 58%. К этому времени у краба значительно возрастает двигательная активность и появляется интерес к пище. У крабов 4.0 стадии, собирающихся линять в текущем сезоне активность хитинолитических ферментов, ответственных за поставку мономеров полисахаридов для построения нового панциря, на 70% выше, чем у крабов 4.2 стадии, перенесших последнюю линьку. Наиболее перспективными для использования в качестве индикаторов оценки физиологического состояния краба являются протеиназная и хитобиазная активности, которые обнаружены в образцах гепатопанкреаса на всех межлиночных стадиях и

отражают течение физиологических процессов, таких, как синтез и разрушение хитиновых покровов, подготовка к линьке, пищеварение и т.д.

Таблица 2

Специфические и неспецифические хитинолитические активности, присутствующие в ферментном препарате из гепатопанкреаса камчатского краба

Наименование, единицы измерения	Субстрат	Активность измеренная в экстракте	
		Жидком	Сухом
Хитиновая, мкмоль/мг × мин	Коллоидный хитин	0,02 – 0,14	0,0 – 0,04
Хитобиазная мкмоль/мг × мин	4-нитрофенил-N-ацетил-β-D- глюкозаминид	0,40 – 2,29	0,20 – 1,10
β1→4 глюкозная мкмоль/мг × мин	КМ-целлюлоза	0,09 - 0,24	0,04 – 0,14
β1→3;1→6 глюкозная мкмоль/мг × мин	Ламинарин	0,16 - 0,29	0,08 – 0,12
Гликозидная, мкмоль/мг × мин	4-нитрофенил-α-L- фукопиранозид	35 - 37	16-18
	4-нитрофенил-α-D- галактопиранозид	8,4	–
	4-нитрофенил-β-D- галактопиранозид	69 - 135	–
	4-нитрофенил-β-D- маннопиранозид	3,8 – 9,2	–
	4-нитрофенил-β-D- глюкопиранозид	14 - 30	–
Протеиновая, мг × мин –1 о.е.	Азоказеин	98 - 286	100 - 300

Наличие специфических и неспецифических хитинолитических активностей в экстракте гепатопанкреаса свидетельствует о том, что камчатский краб усваивает компоненты панциря поедаемых им ракообразных своего и других видов. Таким образом, можно рекомендовать введение в рацион культивируемых ракообразных муки из отходов переработки промысловых ракообразных, содержащих ХБК.

3.1.3. Исследование суммарного содержания белка в гемолимфе камчатского краба. Определение биохимических параметров гемолимфы является доступным методом для оценки физиологического состояния краба в процессе культивирования, не требующим его убоя.

На рис. 4 представлено среднее содержание белка в сыворотке гемолимфы для промысловых крабов баренцевоморской популяции на 2, 3.1 и 3.2 межли-

ночных стадиях, которое составило 16,5; 14,8 и 18,8 мг/мл соответственно.

На рис. 5 представлена зависимость суммарного содержания белка в сыворотке гемолимфы камчатского краба от межлиночной стадии для культивируемых особей. Содержание белка в гемолимфе возрастает до 20,3 мг/мл на стадии предлиньки и снижается на 50-60% за послелиночный период, после чего вновь идет его повышение. Резкое снижение уровня белка в предлиночном периоде связано с почти двукратным разбавлением гемолимфы краба, происходящим за счет поглощения большого количества жидкости перед линькой.

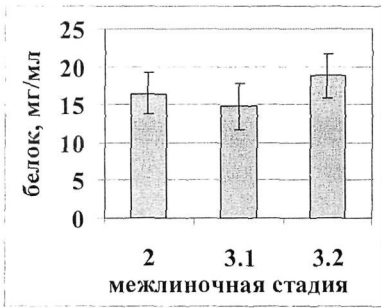


Рис. 4. Суммарное содержание белка в гемолимфе камчатского краба баренцево-морской популяции на разных межлиночных стадиях



Рис. 5. Суммарное содержание белка в гемолимфе культивируемого камчатского краба на разных межлиночных стадиях

3.1.4. Исследование физико-химических свойств ХБК панциря акклиматизированного камчатского краба (АКК) в зависимости от межлиночной стадии. С целью определения зависимости изменения структуры ХБК панциря от межлиночной стадии, совместно с лабораторией термохимии НИИ ХНГУ им. Н.И. Лобачевского нами проведено термохимическое исследование степени его кристалличности. Установлено, что в процессе укрепления панциря после линьки увеличивается упорядоченность его структуры, расширяются кристаллические области полимера. На стадии предлиньки зафиксировано протекание обратных процессов. В табл. 3 представлены физико-химические свойства и средние температуры физических переходов в ХБК, выделенном из панциря АКК на разных межлиночных стадиях.

У изученных образцов проявились два температурных интервала стеклования. Такое поведение хитина связано с наличием в нем микрообластей раз-

личной степени кристалличности (высококристаллических и аморфных). У образцов стадии послелиньки (№2 и 3) и первого образца межлиночного периода (№4) температура второго стеклования $T_{c2}=144^{\circ}\text{C}$ одинаковая, затем она понижается у образцов №5 и 6 до 137°C , повышается у образца №7 до 154°C и вновь понижается до 137°C в момент линьки (обр.№1), что проиллюстрировано рис. 6.

Таблица 3

Физико-химические свойства и средние температуры физических переходов в ХБК панциря камчатского краба

Образец	1	2	3	4	5	6	7
Стадии линьки	Экзувий	Послелинька	Межлинька			Предлинька	
Сод. воды, %	9,5	8,5	9,8	10,5	7,3	6,7	6,6
Температуры физических переходов							
$t_{\text{всп. H}_2\text{O}}, ^{\circ}\text{C}$	123	121	125	121	125	128	126
$t_{\text{в}}, ^{\circ}\text{C}$	81	61	85	66	64	62	50
$t_{c1}, ^{\circ}\text{C}$	113.5	113	118.5	111	117	117	123
$t_{c2}, ^{\circ}\text{C}$	137.5	144.5	143	144	137	136.5	145
$t_{\text{дестр1}}, ^{\circ}\text{C}$	224.5	227	214	215	215.5	214.5	224.5
$t_{\text{дестр2}}, ^{\circ}\text{C}$	266	291.5	245	274	300	299	295
Потеря массы безв. образца, мас. %	13.6	16.1	22.2	25.4	30.6	38.3	23.9

После разложения образцы взвесили и определили убыль их массы по сравнению с безводными образцами (табл. 3). Наблюдалось закономерное изменение массы образцов (рис. 7).

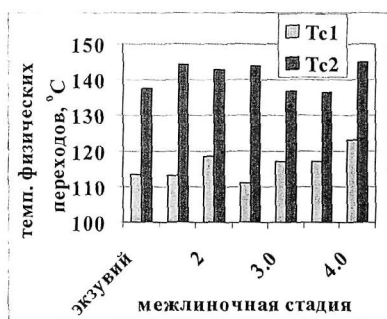


Рис. 6. Температуры первого (T_{c1}) и второго (T_{c2}) стеклования образцов ХБК на разных межлиночных стадиях



Рис. 7. Потеря массы безводного образца ХБК после деструкции

Проведенные исследования показали существенные различия физико-химических характеристик ХБК, выделенного из панциря краба на различных

межлиночных стадиях. В дальнейшем их можно будет использовать для объективной оценки соответствующего этапа в развитии краба.

Сводные результаты по разработанным биохимическим параметрам, отражающим изменения в органах и тканях камчатского краба на протяжении линочного цикла, представлены в табл. 4.

Таблица 4

Биохимические индикаторы

Параметр	Применение	Значение
<i>Гепатопанкреас</i>		
Общее содержание липидов, %	Оценка физиологического состояния. Оценка эффективности технологии культивирования	9 - 27
Содержание $\omega 3$ и $\omega 6$ ПНЖК, %	Оценка эффективности технологии культивирования	18 - 25
Протеиназная активность, о.е. - мг белка	Интенсивность физиологических процессов, в частности, деградации и образования хитиновых покровов	98 - 286
Хитобиазная активность, мколь/мг \times мин	Интенсивность процессов деградации хитиновых покровов	0,40 - 2,29
<i>Панцирь</i>		
Температура стеклования, $^{\circ}\text{C}$	Оценка степени кристалличности ХБК, определение межлиночной стадии	T_{c1} : 111-123 T_{c2} : 137-145
<i>Гемолимфа</i>		
Суммарный белок, мг/мл	Оценка физиологического состояния ракообразного в данный момент времени	8 - 20

3.2. Биотехнологические исследования

3.2.1. Гидролиз крабового хитозана ферментным комплексом гепатопанкреаса камчатского краба. Подобраны оптимальные параметры для проведения гидролиза высокомолекулярного крабового хитозана ферментным комплексом гепатопанкреаса камчатского краба: pH, фермент-субстратное соотношение, температура, продолжительность процесса деполимеризации.

Гидролиз хитозана проводили при pH 5,6, когда его растворимость составляет 10 мг/мл. При более низком pH 4,6, при лучшей растворимости хитозана 15-20 мг/мл, одновременно протекает кислотный гидролиз.

Для выбора фермент-субстратного соотношения провели деполимеризацию хитозана при pH 5,6, 37°C, в течение 30 минут. Характеристическая вязкость гидролизатов составила 4,1, 5,1, 6,6 и 7,1 дл/г при соотношениях 1:50; 1:100; 1:200 и 1:400, что соответствовало снижению вязкости на 48; 35; 17 и 10% и содержанию ферментного комплекса в гидролизатах 2; 1; 0,5 и 0,25% соответственно. Гидролиз следует проводить при фермент-субстратном соотношении 1:200, при котором содержание ферментного комплекса менее 1% и снижение вязкости больше, чем при соотношении 1:400.

Исследована термостабильность протеиназ и карбогидраз в экстракте из гепатопанкреаса камчатского краба при 37 и 50 °C в течение 5 - 120 мин. Из полученных результатов следовало, что деполимеризацию целесообразно осуществлять при 37°C, тогда как более высокая температура способствует быстрой потере гидролитической активности в экстракте.

Таблица 5

Динамика падения вязкости в процессе гидролиза хитозана в зависимости от выбранного экстракта*

Время, мин	Падение вязкости, %	
	Жидкий экстракт	Сухой экстракт
0	100	100
30	48	46
60	69	68
180	83	80
1200	98	97

*Гидролиз проводили в Na-ацетатном буфере pH 5,6; при 37°C; фермент-субстратном соотношении 1:200

Таблица 6

Влияние продолжительности процесса деполимеризации на динамическую и характеристическую вязкость*

Время, мин	Вязкость Хитозан	
	cP	дл/г
0	83 (0)**	7.9 (0)
30	43 (48)	4.7 (41)
60	26 (69)	3.1 (61)
90	—	—
120	15 (82)	1.8 (77)
240	14 (83)	1.6 (80)
1200	3 (96)	1.2 (85)

* деполимеризацию проводили жидким экстрактом из гепатопанкреаса

**падение вязкости выражено в %

Проведен гидролиз крабового хитозана экстрактом гепатопанкреаса камчатского краба. Исследование динамики изменения вязкости раствора хитозана

в процессе гидролиза сухим и жидким экстрактом свидетельствовало о снижении на 97 и 98%, с 67 до 2 сР за 20 ч, что показано в табл. 5-6.

Средневязкостная молекулярная масса (М.м.) полученных образцов составила 34-43 кДа, степень дезацетилирования - $82 \pm 3\%$.

3.2.2. Специализированные корма для ракообразных. Технология культивирования камчатского краба находится на стадии разработки и усовершенствования. На данный момент не производилось сбалансированных кормов полностью отвечающих естественным рационам камчатских крабов.

Комбикорма для ракообразных как объектов аквакультуры должны не только обеспечивать прирост массы и длины тела, но и улучшать их физиологический статус. В качестве базового варианта был использован стандартный комбикорм форелево-осетрового типа, содержащий 45-50% протеина и 9-11% жира. В табл. 7 представлен компонентный состав разработанных кормов.

Таблица 7

Компонентный состав кормов, %

Компоненты/Варианты кормов	1	2	3	4
Рыбная мука	50	50	50	50
Витазар (мука зародышей пшеницы)	16	15,5	15	14
Панцирь омара, краба	10	10	10	10
Гидролизат северной розовой креветки	6	6	6	6
Хитозан	0	0,5	1	2
Пшеничная мука	5	5	5	5
Белковая кормовая добавка (БКД)	7	7	7	7
Витаминный премикс	1	1	1	1
Рыбий жир	5	5	5	5
Белок	49,91	49,74	49,56	49,21
Жир	11,10	11,09	11,08	11,06

В состав кормов для ракообразных включена мука из панциря омара и краба, являющаяся источником минеральных веществ и хитин-белкового комплекса. В качестве аттрактанта в состав комбикормов введен белковый гидролизат из панциря северной розовой креветки, являющийся также источником белковых компонентов, в том числе и комплекса незаменимых аминокислот.

Введение в корм низкомолекулярного хитозана, благодаря его росто- и иммуностимулирующим свойствам, позволит повысить иммунный статус и сопротивляемость организма ракообразного различного рода внешним и внутренним факторам. Также известно, что все препараты хитозана и его производных обладают адгезионным действием, что весьма актуально в агрессивной водной среде.

Опытные образцы корма различались содержанием низкомолекулярного хитозана – 1 – 0%, 2 - 0,5%, 3 – 1%, 4 - 2% соответственно.

Апробация специализированных кормов для ракообразных на гигантских пресноводных креветках. Поскольку биохимические механизмы личиночного процесса у различных видов ракообразных весьма сходны, то их изучение лучше проводить на животных с коротким личинным циклом и быстрым ростом. В качестве модельного объекта для наших экспериментов с кормами для ракообразных были выбраны гигантские пресноводные креветки *Macrobrachium rosenbergii*, технология культивирования которых хорошо отработана.

Эксперименты проводили на постличинках со средним размером 1,5 см, по 16 шт. в группе. Прирост креветок, получавших корм с хитозаном, за 60 суток подопытного периода был выше, в среднем на 14%, чем в контрольном варианте корма без хитозана, что отражено на рис. 8.

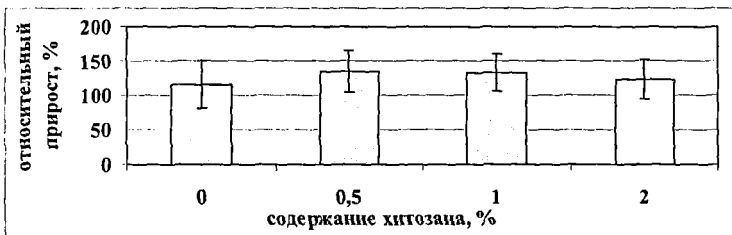


Рис. 8. Относительный прирост постличинки гигантской пресноводной креветки за 60 суток получения корма.

Средний привес постличинки сопоставим для всех вариантов корма, и составляет от 750% до 850%. Для креветок, получавших с кормом низкомолекулярный хитозан, отмечено сокращение межличинных периодов, увеличение

количества линек. Выживаемость для всех вариантов корма составила более 94%.

Из полученных данных можно заключить, что новые корма с содержанием хитозана удовлетворяют потребностям организма ракообразного и обладают ростостимулирующим эффектом, что позволяет рекомендовать их дальнейшее применение в качестве компонента в рационах.

3.3. Определение показателей безопасности хитинсодержащего сырья.

Значительный интерес, в качестве сырья для получения хитиновых веществ, представляют хитин содержащие отходы процесса культивирования, а также запасы панцирей и экзuvia акклиматизированного камчатского краба (АКК), законсервированные в естественных условиях на Российском и Норвежском побережье Баренцева моря в районе их промысла и переработки.

Для определения возможности использования данного источника сырья нами исследованы нормированные показатели безопасности, представленные в табл. 8-9.

Таблица 8

Содержание токсичных элементов и радионуклидов в панцире АКК*

Токсические элементы, мг/кг, не более						Радионуклиды, Бк/кг					
Свинец		Мышьяк		Кадмий		Ртуть		Цезий-137		Стронций-90	
п	н	п	н	п	н	п	н	п	н	п	н
4,80	10,0	2,50	5,0	1,00	2,0	0,05	0,2	120	200	70	100

* п – показатель, н-норма

Таблица 9

Микробиологические показатели панциря АКК*

КМАФ АнМ**, КОЕ/г, не более		Масса продукта (г), в которой не допускаются:							
		БГКП (коли формы)		S. aureus		Патогенные, в т.ч. сальмонеллы			
п	н	п	н	п	н	п	н		
1×10^2	5×10^4	1×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-2}	1×10^{-2}	25	25		

* п – показатель, н-норма

**Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов

Уровни содержания тяжелых металлов и радионуклидов, а также микро-

биологические показатели находятся в пределах нормы. Освоение новых ресурсов панцирьсодержащих отходов способствует расширению производства компонентов кормов для ракообразных.

ВЫВОДЫ

1. Биохимические параметры гепатопанкреаса гемолимфы и панциря культивируемого камчатского краба существенно изменяются в зависимости от межличинной стадии. Общее содержание липидов в гепатопанкреасе колеблется от 9 до 27%, содержание $\omega 3$ и $\omega 6$ ПНЖК составляет 18 - 25% от общего содержания ЖК, протеиназная активность в экстракте гепатопанкреаса изменяется от 98 до 286 мг белка (о.е.), хитобиазная активность - от 0,40 до 2,29 мколь/мг \times мин, суммарное содержание белка в сыворотке гемолимфы изменяется в интервале 8 - 20%, температуры первого и второго стеклования образцов хитин-белкового комплекса колеблются в интервалах от 111 до 123 и от 136,5 до 145 °С, соответственно.

2. В качестве параметров для оценки физиологического состояния культивируемых крабов, в частности межличинной стадии, и эффективности технологии культивирования можно применять биохимические характеристики, такие как общее содержание ЖК и содержание $\omega 3$ и $\omega 6$ ПНЖК в гепатопанкреасе, протеолитическая и хитобиазная ферментативные активности в экстракте гепатопанкреаса, степень кристалличности ХБК панциря, суммарный белок в сыворотке гемолимфы.

3. Дано научное обоснование для введения в специализированные корма для ракообразных низкомолекулярного хитозанового компонента, полученного путем гидролиза хитозана ферментным комплексом, выделенным из гепатопанкреаса камчатского краба. Из крабового хитозана с М.м. 700 кДа и степенью дезацетилирования 0,85 получены низкомолекулярные образцы хитозана с выходом 85% при 37°С и фермент-субстратном соотношении 1:200 в течение 20ч.

4. Разработана рецептура кормов для ракообразных на основе рыбной (50%) и крабовой (10%) муки с добавлением белкового гидролизата из северной розовой креветки (6%) и низкомолекулярного хитозана. Изготовлены корма с различным содержанием низкомолекулярного хитозана: от 0,5 до 2 %. Корма применены при выращивании постличинок гигантской пресноводной креветки. Выживаемость составила более 94%.

5. Добавление низкомолекулярного хитозана в корма для культивируемых ракообразных оказывает ростостимулирующее действие. Прирост постличинок гигантской пресноводной креветки, которые получали корм с хитозаном, за 60 суток подопытного периода был выше, в среднем на 14%, чем в контрольном варианте корма без хитозана. Средний привес постличинок сопоставим для всех вариантов корма, и находится в пределах от 750 % до 850%. Для креветок, получавших с кормом низкомолекулярный хитозан, отмечено сокращение межличинных периодов на 11%.

6. Разработана комплексная методика отбора проб органов и тканей ракообразных на примере камчатского краба, таких как мышечная ткань, гепатопанкреас, гемолимфа и панцирь, позволяющая оценивать изменение биохимических показателей на протяжении линочного цикла.

7. Предложен способ переработки ПСО культивирования и промысла АКК с помощью ферментного комплекса из гепатопанкреаса краба, также являющегося отходом, с целью получения специализированных кормовых продуктов для ракообразных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании полученных данных о липидах гепатопанкреаса, специфических и неспецифических хитинолитических активностях ферментов гепатопанкреаса, физико-химических свойств ХБК панциря, суммарного содержания белка в гемолимфе камчатского краба на разных межличинных стадиях, рекомендуется подразделять четвертую линочную категорию на 3 стадии: 4.0, 4.1, 4.2.

Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать введение в корма для культивируемого камчатского краба на стадиях предлиньки и послелиньки муку из панцирей морских ракообразных с целью обогащения их рациона минеральными веществами и ХБК. Для этих целей рекомендуется использовать панцири ракообразных 3.1 и 3.2 промысловых личиночных категорий, когда минерализация панциря максимальна.

Результаты исследований позволили наметить пути решения проблемы переработки отходов культивирования крабов, путем комплексного использования панциря и гепатопанкреаса для изготовления компонентов кормов.

Разработана и утверждена «Методика комплексного отбора проб различных органов и тканей камчатского краба» для биохимических исследований.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Немцев С.В., Быкова В.М., Ежова Е.А., Сорокоумов И.М., Загорская Д.С., Ковачева Н.П. Панцирь акклиматизированного камчатского краба. Экологические проблемы и пути их решения // Экология и промышленность в России. Сентябрь, 2007. С. 43-45.
2. Uryash V., Nemtsev S., Kokurina N., Ezhova E., **Zagorskaya D.**, Kovacheva N. Physicochemical properties of chitin-protein complex from shell of red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) at various stages of molting cycle // Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives. Ed. by M.M. Jaworska, Monograph v.XIII, 2008. P. 17-24.
3. **Загорская Д.С.**, Урьяш В.Ф., Немцев С.В., Кокурина Н.Ю., Ковачева Н.П. Влияние возраста акклиматизированного камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*) на физико-химические свойства его хитин-белкового комплекса // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 2008. №4. С. 53-58.
4. **Загорская Д.С.**, Сидоров Н.Н., Боева Н.П., Н.П. Ковачева Н.П., Немцев С.В. Биоконверсия липидов ракообразных на разных стадиях личиночного цикла // Рыбпром, 2008. №3-4. С. 58-62.

5. Ильина А.В., Загорская Д.С., Левов А.Н., Албулов А.И., Ковачева Н.П., Варламов В.П. Получение низкомолекулярного хитозана и его производных с использованием ферментного препарата из гепатопанкреаса камчатского краба // Прикладная биохимия и микробиология, 2009. Т. 45. №4. С. 415-421.
6. Немцев С.В., Ковачева Н.П., Загорская Д.С., Сорокоумов И.М., Панов К.Н. Панцирь акклиматизированного камчатского краба в разных личиночных стадиях, как источник получения хитина и белковых продуктов. Рыбное хозяйство, 2009. №2. С. 7-14.
7. Кокурина Н.Ю., Урьяш В.Ф., Ларина В.Н., Фаминская Л.А., Новоселова Н.В., Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Загорская Д.С., Немцев С.В., Ильина А.В. Термодинамические характеристики хитина и хитозана в зависимости от источника получения и степени упорядоченности // Материалы XVII Международной конференции по химической термодинамике в России. Казань, 2009. С. 216-220.
8. Uryash V.F., Nemtsev S.V., Kokurina N.Yu., Zagorskaya D.S., Kovacheva N.P. Physicochemical properties of chitin from chitin-protein complex of acclimatization kamchatsky crab (*Paralithodes camtschaticus*) // Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives. Ed. by M.M. Jaworska, Monograph v.XIV, 2009. P. 7-14.
9. Загорская Д.С. Использование продуктов переработки ракообразных в специализированных кормах для культивируемого камчатского краба // Материалы международной конференции «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов», 2009. С. 492-497.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АКК – акклиматизированный камчатский краб

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ЖК – жирные кислоты

МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты

М.м. – молекулярная масса

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ПСО – панцирьсодержащие отходы

ТСХ – тонкослойная хроматография

ФК – ферментный комплекс

ХБК – хитин-белковый комплекс

Подп. в печать 17.11.09 Объем 1,75 п.л. Тираж 100 экз. Заказ 525
ВНИРО. 107140, Москва В. Красносельская, 17