ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
"ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ" ԳԻՏԱՐՏԱԴՐԱԿԱՆ ԿԵՆՏՐՈՆ ՊՈԱԿ

ԱԲԲԱՍ ԷՍՄԱՅԻԼԻ ՄՈԼԼԱ

ԲԵԼՈՒԳԱ *Huso huso* –Ի ԿՈՒԼՏԻՎԱՑՈՒՄԸ, ՍԵՌԻ ՎԱՂ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԵՎ ԹԱՓՈՆԻ ՎԵՐԱՄՇԱԿՈՒՄԸ

Գ.00.14- «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան 2011

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» ГНКО

АББАС ЭСМАЕЛИ МОЛЛА

КУЛЬТИВАЦИЯ, РАННЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА И ПЕРЕРАБОТКА ВНУТРЕННОСТЕЙ БЕЛУГИ *Huso huso*

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.00.14 «Биотехнология»

Ереван 2011

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանի գիտական խորհրդի նիստում

Գիտական դեկավար՝ կ.գ.դ. Հ.Հ. Հովհաննիսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կ.գ.դ., պրոֆեսոր Ժ.Ի. Հակոբյան

կ.գ.թ. Ա.Ա. Համբարձումյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2011թ. դեկտեմբերի 27-ին, ժամը 16^{00} ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:
Հասցե՝ 0056, ՀՀ, Երևան, Գյուրջյան փող. 14, հեռ/ֆաքս՝ (37410) 654183:
Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2011 թ. նոյեմբերի 26-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.՝ Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Ереванского государственного университета

Научный руководитель: д.б.н. Г. Г. Оганесян

Официальные оппоненты:

член корр. НАН РА, д.б.н., профессор Ж.И. Акопян

к.б.н. А.А. Амбарцумян

Ведущая организация: Научный центр зоологии и гидроэкологии НАН РА

Защита диссертации состоится 27 декабря 2011 г. в 16^{00} часов на заседании специализированного совета 018 ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.
Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (37410) 654183.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ, «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 26 ноября 2011 г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н. Г.Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность: Снижение уловов осетровых послужило стимулом для культивирования осетровых в хозяйствах с целью сохранения вида. Одной из целей развития аквакультуры является увеличение популяции осетровых содержащихся в неволе, минимизация отлова диких особей с целью размножения, и тем самым поддерживание более устойчивого развития (Li и соавт. 2009).

Белуга входит в список исчезающих видов осетровых в Каспийском море. Правительством Ирана предпринимается ряд мер с целью пополнения популяции данной рыбы. Одним из лучших способов сохранить эту рыбу является аквакультуря. Однако, ввиду того, что икрометание у белуги происходит в возрасте от 9 до 11 лет, то с экономической точки зрения, содержание всех рыб в течение 10 лет не выгодно. Ввиду чего, раннее определения пола можно использовать в качестве нового метода управления запасами, так как после определения пола, самцы будут изяты из системы и отправлены на прилавки.

Белуга (Huso huso) одна из наиболее важных коммерческих видов осетровых являющаяся источником высококачественного мяса и икры, благодаря которой широко известны и востребованы. Несмотря на значительные исследования данных рыб, и их гибридов (Dettlaff et al., 1993), а также с учетом ряда физиологических особенностей, мало что известно о половых стероидах и гормах учавствующих в половом созревании данной рыбы.

В течение последнего десятилетия, была изучена роль ароматазы и 17β эстрадиола (E_2) в половой дифференциации у рыб. Большинство этих исследований было сосредоточено на половых железах (Devlin and Nagahama, 2002; Srtussmann and Nakamura, 2002; Piferrer and Guiguen, 2008; Guiguen et al., 2009).

На практике, определение пола у особей, не достигших половозрелости используя морфологические показатели, не является возможным. Кроме того, в настоящее время нет ни одного молекулярного маркера, по которому можно отличить самок от самцов (M. Yousefian 2006).

Цель: Оптимизация параметров культивации белуги "Huso huso" в неволе, разработка легкого в использовании и безопасного метода раннего определения пола рыб, с помощью половых стероидов (тестостерон, 11-кетотестостерон и 17β-эстрадиол) и кальция в плазме. Ферментативная переработка внутреностей самцов изятых из системы в ценные продукты.

Задачами данного исследования являются:

1. Сравнение эффективности кормления свежеприготовленной и сухой пищей на темпы роста белуги в возрасте 2-3 лет.
2. Изучение условий выращивания (температура, соленость, освещение, темпы размножения) цист *A. Uremiana* с целью использования в качестве основного источника питания мальков.
3. Исследование влияния фотопериодических режимов на темпы роста белуги.
4. Определение уровней половых стероидных гормонов плазмы, таких как тестостерон, 11 - кетотестостерон, 17β-эстрадиол у 2 и 3-х летних особей культивируемых *Huso huso.*
5. Сравнительный анализ общей концентрации кальция в плазме у 2, 3-х летних самок и самцов культивируемых *Huso huso.*
6. Определение стадии развития половых желез (яичников и семенников), у 2-х и 3-х летних особей культивируемых *Huso huso.*
7. Оптимизация условий ферментативного гидролиза (температуры, продолжительности и количества ферментов), белков внутренностей белуги с использованием коммерческих ферментов Alcalase и Protamex. Определение аминокислотного состава гидролизата внутренностей белуги.

Научная новизна:

1. Были выявлены различия уровеней гормонов в плазме у 2-3 годовалых самок и самцов культивируемых "Huso huso".

2 Показана возможность раннего определения пола культивируемых "Huso huso" путем исследования уровней половых стероидов и кальция в плазме.

3. Впервые применены цисты *A. uremiana* в качестве стартового питания "Huso huso" стимулирующих рост и раннее формирование пола у рыб.

Практическое значение:

1.Данные, полученные в ходе исследования, будут использованы для разработки более эффективных диет с целью получения максимального веса культивируемых осетровых рыб.

2. Раннее определение пола у культивируемых "Huso huso" даст возможность изятия нежелательных самцов из системы, что будет способствовать снижению потребления кислорода, освобождению емкостей, снижению загрязнения воды, экономии кормов и т.д.

3. В результате переработки внутренностей можно получить обогащенную аминокислотами пищу в качестве пищевых добавок, что также приведет к снижению загрязнения окружающей среды.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены: в НПЦ, Армбиотехнология НАН РА, на заседании кафедры микробиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов биологического факультета ЕГУ (2011)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 научных статей и 1 патент.

Обьем и структура диссертации. Работа состоит из "Введения", пяти глав, "Выводов", "Списка литературы", содержащего 282 наименования на английском языке, "Приложения". Работа изложена на 105 страницах основного текста и 8 страницах Приложения, содержит 18 таблиц и 22 рисунка.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

С целью сохранения дикой популяции, начиная с 1954 г. и в течение последних 50 лет в странах окружающих Каспийское море были созданы более 23 ферм занимающихся культивацией осетровых в частности белуги (Huso huso) (Kozlov, 1993). Культивирование в рыбных хозяйствах дало возможность не только для поддержания дикой популяции, но также явилось идеальным источником высококачественного мяса и ценнейшей икры. Следует отметить, что немалое место в культивировании занимает питание, освещение и т.д. Раннее определение пола рыб также является актуальной задачей (Devlin and Nagahama 2002). При этом необходимо отметить, что существующие методики по определению пола зачастую носят инвазивный характер, что может стать причиной летального исхода.

Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Все рыбы были предоставлены осетровыми хозяйствами Шахид Раджа (SHR) и Сари (SI), Сари, Иран. В качесте корма применялись *A. Urumiana* в виде дезинфецированных цист, разрубленый карась (Carassius рыбки), в качестве влжной пищи Кутум (23% белка, 5,6% жиров, 49,46% влажности), рубленое мясо карася, в качестве сухой пищи (44% белка, 10% жира), SFK - содержащий 37,5% белка, 10,7% необработанного жира, 8,5% влаги и 3,4% клетчатки (Khorake Dam Abzian Co), CPF - 36% белка, 14% жира, 20% углеводов, 10% золы, 4% клетчатки, 11% влаги (Chine Co. Tehran, Iran).

Ферменты: Protamex с протеолитической активностью 1,5 Ансон единицу / г, Alcalase 2,4 л FG (Novozymes, Иран), Иммунотех комплекты (Immunotech Co., France и Cayman Co., USA), фосфатный буфер с желатином (PBSG). Все использованные химические реагенты по качеству соответствовали ЧДА.

2.2. Культивация белуги

Первоначально мальки рыбы содержались в пластиковых емкостях (160 × 160 × 60 см) в течение 15 дней, до достижения 100 мг, после чего их выпускают в земляные пруды (0,9 га) с плотностью 70 000 особей на гектар и кормят натуральной пищей (Carassius auratus, Rutilus frisii kutum и др.). Через 60 дней культивирования они достигают веса 2-3 г. В ранний период культивирования мальков кормили рубленой рыбой (Carassius caraciuss, Cyprinidae), которая затем была заменена влажной пищей (включающей 75% SFK и 25% рыбных отходов). Мальки выращивались в обычных условиях: находились в бетонных емкостях с 4 м диаметром и глубиной 120 см, с плотностью улова 10 кг/м^3. Вода в емкости подавалась из скважин или из рек при 17 - 23° C , pH 7,9 - 8,3, уровни растворенного кислорода - 6,0 и 8,5 мг / л. После достижения среднего веса 500 г (примерно в конце первого года), рыбы были перемещены в большие емкости (диаметр 8 м, глубина 150 см) и содержались в них до 3 лет.

2.2. Изучение влияния фотопериода: Эксперимент проводился с рыбами возраст которых составлял 24 месяца, а средний вес 866 - 1166 г.

Все рыбы акклиматизировались в течение недели под манипуляцией режимов светового дня. Были изучены шесть режимов световая и темновая фазы, включая: природный фотопериод (контроль), 24L: 0D 16L: 8D, 12L: 12D, 8L: 16D, а 0L: 24D. Пятнадцать емкостей были покрыты черными нейлоновыми покрытиями, а лампы дневного освещения были расположены на расстоянии 1 м над емкостями с таймером цифрового управления. Случайным отбором были выбраны и взяты три особи из емкости каждого биометрического времени для измерения биометрических данных. Удельная скорость роста (УСР) были рассчитаны по формуле: (FW - IW) / T где, FW - конечный вес, FW - первоначальный вес, T - продолжительность эксперимента (дней). Эффектижность конверсии пищы соотношений (ЭКР) была измерена (употребленный корм/веса тела). Различия между группами были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и многодиапазонных тестов Дункана при $P < 0,05$.

2.3. Анестезия: рыбы были помещены в 300 л контейнеры для минимизации воздействия стресса. Обезболивание проводилось с использованием масла гвоздики (Syzyglum aromaticum) - 200 ppm в течение 10 минут.

2.4. Взятие гонад (метод биопсии): Рыбы находящиеся под наркозом были размещены на столах, затем с вентральной части тела, в области 4 костного позвонка был сделан небольшой надрез (4-5 см) скальпелем, и была изята небольшая часть гонад, после чего надрез зашивался и обработывался раствором бетадина и 5% хлорамфеникола. С целью профилактики попадания инфекции, в область раны был введен с 3-4 мл 5% тетрациклин. Биопсийный материал – небольшие фрагменты гонад (семенник и яичник) были незамедлительно помещены в 4%-ный формалин для дальнейшего гистологического исследования.

2.5. Обработка материала и подготовка срезов для гистологического исследования: Небольшие фрагменты гонад были помещены в 10% буферный раствор формалина. Образцы были приготовлены по стандартной методике (Humason 1972). После фиксации тканей в буферном растворе формалина в течение 48 ч при комнатной температуре, образцы промывали в проточной воде, затем обезвоживали в восходящем ряду спиртов и заливали в парафин. Резка заключенных в парафин образцов осуществлялась на микротоме Leica RM 2025 (ФРГ) и секции были установлены на очищенных спиртом стеклах, с применением минимального количества яичного альбумина. Полученные срезы были окрашены гематоксилин - эозином.

2.6. Взятие крови: образцы крови были взяты из хвостовой вены находящейся под наркозом рыбы с помощью гепаринизированного 5 мл шприца, после чего помещались на лед. Для отделения сыворотки от клеток крови, образцы крови центрифутировали в течение 10 минут при 4000 оборотах в минуту. После чего сыворотка была собрана пипеткой в Эппендорфовы пробирки (1,5 см), маркированы и помещены в холодильник при температуре -20 ° C, до дальнейшего анализа.

2.7. Гормональные индексы в сыворотке крови: половые гормоны тестостерон (T), 17β-эстрадиол (E2) и 11-кетотестостерон (11-KT) плазмы определялись с помощью специальных

наборов производимых компанией Иммунотех, Франция и изотопным индикатором I125 применяя радиоиммунологической пробы (РИП) технологию с использованием гамма счетчика LKB и выражались в нг/мл.

Эффективность экстракции для всех стероидов определялась путем добавления титруемых стероидов в пробирки с плазмой. Эстрадиол и тестостерона были измерены с помощью антисывороток РИП (125I-эстрадиол, 125I-тестостерон) с использованием набора Иммунотех. Все образцы были проанализированы в двух экземплярах. КТ измерялся методом иммуноферментного анализа (ИФА).

2.8. Измерение концентраций кальция: общая концентрация кальция в плазме в образцах сыворотки крови определяли колориметрическим с использованиемнабор DICA-500).

2.9. Внутренности Белуги, за исключением мочевого пузыря и гонад были заморожены при температуре -20 ° C для последующего анализа. Определение влажности, золы проводилось с помощью стандартных методов (AOAC 2002). Суммарный белок определялся по методу Келдаля (AOAC 2002). Суммарные липиды определялись путем экстракции по Сокслету (AOAC 2002). Белок в супернатанте измеряется по биуретным методом с последующим центрифугированием, с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

2.10. Получение гидролизата белка рыб: Внутренности рыба были дважды измельчены при помощи промышленного миксера со средней скоростью при 10 ° C, помещены на ночь в холодильник при температуре 4 ° C. Пробы были нагреты при температуре 85 °C на водяной бане в течение 20 мин для инактивации эндогенных ферментов (Guerard et al. 2002).

Приготовленные внутренности были смешаны с натрий-фосфатным буфером 1:2 (вес / объем) и гомогенизированы в блендере Moulinex в течение 2 мин. Путем добавления 0,2N NaOH pH смеси была доведена до 8,5, оптимальной для активности Alcalase и Protamex,. После каждого отбора проб, реакции останавливались инактивацию фермента путем нагревания раствора до 95 °C в течение 15 мин, об. После чего гидролизаты охлаждались в ледяной бане и центрифугировались при 8000 об/мин, при 10 ° C в течение 20 мин, затем был собран супернатант и после удаления маслянной фазаы, растворимая фаза была высушена на распылительной сушке (на входе температура воздуха T = 170 ° C, на выходе - T = 80 ° C).

2.11. Для оптимизация условий гидролиза была использована методика поверхного ответа (RSM). Были рассмотрены три независимых переменных: температура - X1, время - X2, и активность ферментов-X3, на пяти уровнях (-α, -1, 0 и +1, + α). Дизайн эксперимента включал восемь факториалов, шесть осевых точек и четыре повтора в центральной точке. Степень гидролиза была выбрана в качестве ответа на сочетание независимых переменных. Расчет проводился по следующему уравнению:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{3} \sum_{j=i+1}^{3} \beta_{ij} X_i X_j$$

где y- зависимая переменная (степень гидролиза в реальном выражении), β_0 постоянная, и β_i, β_{ii} и β_{ij} - коэффициенты расчитанные на модели. x_i и x_j - уровни независимых переменных, которые представляют собой линейные, квадратичные и векторные произведение эффектов X1, X2 и X3. Модель дает оценку влияния каждой независимой переменной (Cao et al. 2008).

2.12. Глубина гидролиза (DH) была рассчитана по методу Hoyle and Merritt (1994) и Fonkwe и Singh (1995) в соответствии с процентным соотношением трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Степень гидролиза (DH) была рассчитана по следующей формуле:

$$\%DH = \frac{Soluble\ N\ in\ TCA\ 10\% \left(\frac{W}{V}\right) \times 100}{Total\ N\ in\ the\ sample}$$

Где DH = Степень гидролиза; TCA = трихлоруксусная кислота

2.13. Аминокислоты были проанализированы при помощи HPLC используя колонку типа C18 со скорости потока 1 мл/мин-1 с флуоресцентным детектором RF-530 (Кнауэр, Германия).

***2.4.* Статистический анализ** полученных данных проводился посредством программ: статистическая аналитическая система (SAS), Design-Expert software 6.0.6 и SPSS.

Глава III. Культивирование белуги Huso huso

Успех в производстве молоди осетровых в большой степени зависит от качества используемого первичного корма. В качетве первичного корма исполузуется Артемии (небольших ракообразные, рассматриваемые в качестве живой пищи в культивации лососевых, осетровых и т.д.). Уменьшение деформации личинок, повышение пигментации тела, устойчивость к внешним стрессорам и низкий коэффициент преобразования пищи по сравнению с дафнией и т.д., являются важными показателями артемии, для использования в качестве живой пищи в аквакультуре.

Артемии могут быть использованы в качестве дезинфецированных цист, науплиусов и, наконец, в маринованном виде. Кормление артемией осуществляется в течение дня и ночи, на регулярной основе. Первое кормление сухой пищей начинается паралельно с кормлениением артемией. С последующим каждодневным уменьшением количества артемии, и увеличением сухого пищи.

Во многих странах исполузуется вид *A. Fransiscana.* Нами были проведены сравнительные исследования цист *A. urmiania* добываемой из озера Урмия в Иране и импортируемыми из-за границы *A. fransiscana*. Живые артемия были помещены на 1,5 л блюда с содержанием соли 33 г/л, при температуре 30° C, в условиях легкой аэрации. Были изучены оптимальные условия, необходимые для размножения цист (Табл. 1).

Таблица 1: Оптимальные условия разведения цист Артемий

Вид	Температура, °C	Соленость, г/л	Освещение, lux	Масса цист, г	Выведение (%)	Период выведения ч.
A. uremiana	28	30	2000	2,4	60-80	18
A. fransiscana	28	25	2000	2,5	60-80	24

Как показали наши результаты, при аналогичных условиях цисты *A. urmiania* выводятся в более ранние сроки (18 часа от начала процесса выведения), чем цисты *A. fransiscana*. Кроме того килограм цист A. uremiana ободится 30 $ тогда как *A. Fransiscana* стоит 100 $.

3.3.Влияние состава пищи на рост Huso huso

Опыты проводились в двух соседних рыбных хозяйствах SI и SR. При равных условиях содержания в хозяйствах при кормлении рыб были исполузованы разные диеты.

На раннем этапе жизни рыб на обеих фермах кормили размолотым карасем. Спустя три месяца, рыбы в хозяйстве SR в качестве влажной пищи получали смесь Кутума и размолотого карася, в соотношении 3:1 (в/в), в то время, как в хозяйстве SI использовалась сухая пища, содержащая 44% белка и 10% жира. Кормление с обоих хозяйствах осуществлялось четыре раза в день Количество пищы определялось на основе биомассы рыб. В данной работе нами были изучены 2,3-х летние рыбы (рис.1).

Как показали результаты данного исследования в SR и SI имеются значительные различия в весе рыб. Так, в SR начальный вес рыбы колебался между 3880 +/- 490 и 3872 +/- 390, а в SI - между 3530 +/- 347 и 3467 +/- 423. В конце третьего года вес рыбы увеличился с 3880 ± 490 до 4463 ± 672 в SR и с 3530 ± 347 до 3853 ± 230 в SI (рис 1).

Исходя из полученных данных можно заключить, что свежая влажная пища (23% белков, 5,6% жиров, 49,46% влажности), используемая в рыбном хозяйстве SR является

более эффективной и приводит к большему увеличению массы рыбы, (8-10%), по сравнению с используемой в SI сухой пищей (44% белка, 10% жира).

Рис. 1 Колебания веса у 2-х (слева) и 3-х (справа) летних белуг Huso huso

3.3. Влияние фотопериодических режимов на созревания белуги:

Рыбы, использованные в эксперименте, трижды получали шесть режимов светового дня (световая - L: темновая фаза - D): природный фотопериод (контроль), 24L : 0D, 16 L : 8D, 12L:12D, 8L:16D, а 0L:24D. Пятнадцать емкостей были покрыты черными нейлоновыми пленками, лампы дневного света были расположены на расстоянии 1 м над емкостями и имели датчики управления.

Случайным образом брались по три особы из каждой емкости для измерения биометрических показателей. Удельную скорость роста был рассчитан по следующему уравнению: (окончательный вес - начальный вес) / продолжительность эксперимента (дни), а доля конвертируемой пищи (FCR) по следующей формуле: потребленая пища/прибавление в весе. Различия между группами были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа и тестов Дункан с диапазоном P <0,05 (Табл.2).

Таблица 2: Рост белуги при различных режимов фотопериода

Фазы фотопериода	Начальная суммарная длина (см)	Начальный вес (г)	Конечный вес (г)	Конечная сумм.длина (см)	TTP (%)	FCR
(1) Контроль[1]	61.50 ± 0.5	1036.06 ± 26.7	2032.6 ± 342.0^{a*}	71.52 ± 3.4^{ab}	0.91 ± 0.04^{abc}	1.68 ± 0.14^{b}
(2) 24L: 0D	60.33 ± 1.5	1037.73 ± 154.4	1804.2 ± 351.0^{b}	68.77 ± 2.7c	0.78 ± 0.17c	2.17 ± 0.40^{a}
(3) 16L: 8D	61.66 ± 2.3	1083.33 ± 76.3	2125.5 ± 255.0^{a}	72.22 ± 2.5ab	0.92 ± 0.10abc	1.58 ± 0.12^{b}
(4) 12L:12D	60.33 ± 3.5	963.83 ± 50.2	2177.9 ± 311.8^{a}	71.33 ± 3.1ab	1.08 ± 0.01a	1.40 ± 0.04^{b}
(5) 8L : 16D	63.00 ± 2.0	1044.40 ± 34.0	2194.4 ± 237.4^{a}	72.70 ± 3.0a	1.01 ± 0.10ab	1.45 ± 0.17^{b}
(6)0L : 24D	62.66 ± 1.5	1066.63 ± 44.1	1976.1 ± 215.6^{ab}	70.29 ± 2.9bc	0.84 ± 0.11bc	1.84 ± 0.25^{ab}

[1]Природный фотопериодизм: *Средние значения для каждого столбца существенно не отличаются (P > 0.05).

При режиме 5 (8L: 16D) был зарегистрирован наибольший конечный вес (2194,4 г) после 73 дня культивирования. Режимы 4, 3 и 1 (12L: 12D, 16L: 8D, и контроль) также могут быть рассматрены как лучшие режимы фотопериода для белуги. Продолжительное освящение в режиме 2 (24L: 0D) привело к значительному (P <0,05) снижению конечной массы рыбы (1804,2г). Продолжительная темнота при режиме 6 (0L: 24D) также вызвала снижение конечного веса рыбы (1976.1g) (P <0,05).

Удельная скорость роста (УСР) наблюдался при равных светло/темновой фазах (12L:12D). Данный фотопериодический режим показал низкий коэффициент FCR (1.40), однако, при режиме 8L: 16D наблюдались наиболее близкие значения SGR и FCR. С другой стороны, самые низкие показатели SGR (0,78) и самые высокие значения FCR (2,17) были отмечены в режиме постоянного освещения (24L: 0D) (табл.2).

Таким образом, культивирование белуги в условиях продолжительного освещения и периода темноты не совместимо с физиологическим состоянием данного вида и приводят к значительному снижению темпов роста. Согласно ряду авторов (Semenkova и Trenkler 1993), средний вес 4 месячной белуги находящейся под воздействием 24 ч светового дня был на 15% ниже, по сравнению с длительностью фотопериода 16 ч, что также находит свое подтверждение в нашей работе. В результате, регулируеемых фотопериод существенно повышает темпы роста и коэффициент конверсии употребленной пищи белуги.

Глава IV. Определение пола белуги *Huso-huso* методом гистологического анализа гонад:

4.1. Определение тестостерона у *Huso-huso*

Для диференциации пола белуги была определена уровень муьского гормона - тестостерона (Табл. 3, рис. 2).

Таблица 3: Основная концентрация тестостерона у 2, 3-х летних культивируемых особей белуги Huso huso

2-х летние *Huso huso No.*	Масса (г)	концентрация тестостерона T (нг/мл)	3-х летние *Huso huso No.*	Масса (г)	концентрация тестостерона T (нг/мл)
1	3880	0.05	**1**	4465	0.272
2	3530	0.4	**2**	4780	0.894
3	3970	0.3	**3**	4675	0.345
4	3345	0.3	**4**	4456	0.34
5	3278	0.14	**5**	4345	0.127
6	3568	0.12	**6**	4895	0.241
7	3870	0.22	**7**	4767	0.198
8	3654	0.38	**8**	4476	0.407
9	3384	0.16	**9**	4563	0.21
10	3670	0.1	**10**	4410	0.182
11	3874	0.04	**11**	4420	0.19
12	3467	0.06	**12**	4623	0.007
13	3674	0.09	**13**	4671	0.068
14	3987	0.02	**14**	4312	0.025
15	3260	0.03	**15**	3987	0.091
16	3276	0.07	**16**	3870	0.18
17	3643	0.04	**17**	4120	0.101

Основная концентрация тестостерона у 3-х летних культивируемых особей белуги была значительно выше (P <0,05), чем у 2-х летних. По 10 особей в каждом из рыбных хозяйств в зависимости от возраста отличались высоким уровнем тестостерона. У 3-х летних рыб с высоким содержанием тестостерона концентрация была в среднем 0,51 нг/мл

(в диапазоне 0,195 и 1,43 нг/мл), а у 2-х летних - 0,26 нг/мл (между 0,109 и 0,894 нг/мл). В группах рыб с низким уровнем гормона, у 2-х летних концентрацией тестостерона состовляла 0,1 нг/мл (в диапазоне 0.096-0.143 нг / мл), а у 3-х летних - 0,1 нг/мл (в диапазоне 0,0251-0,148 нг/мл). У 6 особей 32 рыб в SI в возрасте 24 месяцев не удалось определить пол на основе уровней гормонов плазменных андрогенов, что может быть объяснено более низким темпом роста рыб. Рыбы с неопределеных полом имели низкий уровень Т и низкий вес (2270 г) по сравнению с другими рыбами (3880 г) пол которых был определен указывающее на зависимость полового созревания белуги от условый культивирования.

Рис. 2 Концентрация тестостерона у 2-3-х летних Huso Huso

4.2. Определение 11-кетотестостерона

У всех особей белуги обеих возрастов была определена также уровень кетотестостерона. У 10-и культивируемых особей средняя концентрация 11-кетотестостерона у 2-х летних особей белуги была 0,97 нг/мл (в диапазоне 0,8-1,2 нг/мл) и 0,58 нг/мл (в диапазоне 0.4-0.8 нг/мл) для оставшихся 7,0. То есть, она значительно выше (P <0,05) в первой группе (10 особей) и ниже во второй группе (7 особей).

Изучение концентрации 11-кетотестостерона у 3 летних Huso Huso показало, что в первой группе средняя концентрация 11-кетотестостерона соответствовала 0,78 нг/мл (в диапазоне 0,21-1,3 нг/мл), а во второй группе - 0,3 нг/мл (в диапазоне 0.11-0.51 нг/мл) (табл. 4, рис. 3).

Как показали результаты, показатели КТ в плазме "самцов" и "самок" существенно отличались. Так, КТ "самцов" было более 1 нг/мл, а у "самок" - не превышало 0,5 нг/мл.

Концентрации 11-кетотестостерона 2-х летних особей белуги мало отличались от 3-х летних особей. У 2 летних самцов концентрация 11-кетотестостерона была значительно (P <0,05) выше, чем у 2 летних самок. Это указывает на тот факт, что с путем измерения концентрации 11-кетотестостерона в плазме можно определень пол рыбы уже в 24 месяца.

Исследование уровней 11-кетотестостерона у самцов и самок белуги показало незначительные колебания. Сравнительно низкие уровни данного стероида у ряда рыб могут быть обусловлены их небольшими размерами.

Схожий результат был отмечен и у сибирского осетра: самцы с низким уровнем андрогенов (тестостерон и 11-кетотестостерон) имели самый маленький вес (750 г), а гистологические исследование показали, что у небольших по размерам самцов, зародышевые клетки не достигают 2 стадии развития.

Однако в данном исследовании, колебания в размере были не столь высоки, как у сибирского осетр, так как все самки находились на 2-ой стадии развития.

Таблица 4: Концентрация 11-кетотестостерона у 2, 3-х летних культивируемых особей белуги Huso huso

2-х летние *Huso huso No.*	Масса (г)	концентрация 11-кетотестостерона КТ (нг/мл)	3-х летние *Huso huso No.*	Масса (г)	концентрация 11-кетотестостерона КТ (нг/мл)
1	3880	1.4	**1**	4465	0.73
2	3530	0.8	**2**	4780	0.94
3	3970	1	**3**	4675	1.3
4	3345	1.2	**4**	4456	1.1
5	3278	0.8	**5**	4345	0.86
6	3568	1.1	**6**	4895	1.3
7	3870	1.4	**7**	4767	0.95
8	3654	1.2	**8**	4476	0.68
9	3384	1	**9**	4563	1.1
10	3670	1.7	**10**	4410	0.21
11	3874	0.3	**11**	4420	0.31
12	3467	0.3	**12**	4623	0.11
13	3674	0.4	**13**	4671	0.41
14	3987	0.5	**14**	4312	0.32
15	3260	0.5	**15**	3987	0.41
16	3276	0.5	**16**	3870	0.33
17	3643	0.5	**17**	4120	0.22

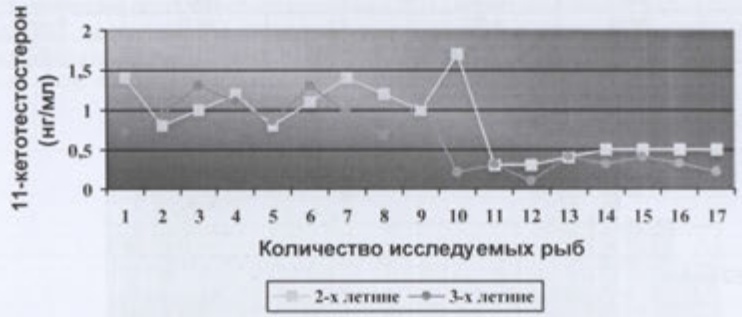

Рис.3. 11-КТ у 2, 3-х летних Huso Huso

4.3. Определение 17β-эстрадиола (E2)

Половые стероиды у самок играют важную роль в оогенезе. 17β-эстрадиол (E2) является основным половым гормоном самок рыб. Он образуется путем преобразования тестостерона в E2 во внутреннем слое гранул развивающихся ооцитов. E2 стимулирует печень, на производство вителлогенина отвечающего за производство гранул желтка в ооцитах (Barannikova et al. 2004). Концентрации 17β-эстрадиола достигают максимума в середине вителлогенеза (вторичный этап желткообразования), а затем снижаются вплоть

до конца роста ооцитов (окончательное созревание яйцеклетки). Измерениями 17β-эстрадиола, можно определить фазы вителлогенеза у осетровых рыб Doroshove et al. 1997; Moberg et al. 1995).

Как показали результаты нашего исследования в концентрациях 17β-эстрадиола (E2) у 2,3-х летних самок и самцов белуги каких либо существенных различий не наблюдалось (таблице 5, рис. 4). У 3-х летних самок средняя концентрация E2 было 10,32 нг/мл, в то время как у самцов - 11,34 нг/мл. А у 2-х летних самок средняя концентрация E2 соответствовала 12,77 мг/мл, в то время как у самцов - 11,02 нг/мл (в диапазоне 5.7-21 нг/мл).

Таблица 5: Концентрации 17β-эстрадиола (E2) у 2, 3 летних культивируемых особей белуги (Huso huso)

2-х летние *Huso huso* No.	Масса (г)	концентрация 17β эстрадиола E2 (нг/мл)	3-х летние *Huso huso* No.	Масса (г)	концентрация 17β эстрадиола E2 (нг/мл)
1	3880	11.7	**1**	4465	10.4
2	3530	10.2	**2**	4780	7.8
3	3970	8.6	**3**	4675	8.1
4	3345	7.9	**4**	4456	7.3
5	3278	5.8	**5**	4345	9.2
6	3568	8.3	**6**	4895	8.6
7	3870	10.1	**7**	4767	7.8
8	3654	12.43	**8**	4476	10.32
9	3384	10.22	**9**	4563	7.81
10	3670	9.81	**10**	4410	9.21
11	3874	7.88	**11**	4420	7.73
12	3467	11.12	**12**	4623	8.24
13	3674	8.92	**13**	4671	7.67
14	3987	9.28	**14**	4312	7.82

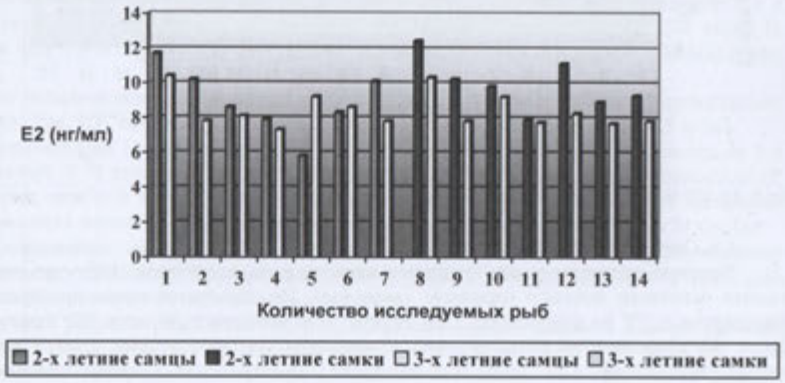

Рис.4. Концентрация E2 у 2-3-х летних Huso Huso

Измерения 17β-эстрадиола и сывороточного вителогенина, способствовали выявлению пола, а также стадии развития гонад в период их репродуктивной миграции.

4.4. Концентрации 17β-эстрадиола и кальция у 2, 3 летних культивируемых (Huso huso)

Как показали результаты данного исследования, концентрации E2 и кальция в плазме у самцов и у самок были практически одинаковы. Как было показано Feist et al. (2004) у 18 - 30 месячных белых осетровых уровни E_2 в плазме не выявляли каких либо существенных различий в зависимости от пола. Webb et al. (1999) обнаружили высокие концентрации кальция в плазме, как у самцов, так и у самок белуги, что соответствует результатам данного исследования.

Уровень 17β-эстрадиола в плазме исследуемых особей, существенно не различалась в зависимости от пола и возраста рыб. Hurvitz и соавт. (2008) было показано, что концентрация E_2 в плазме русский осетра была сниженой (<0,5 нг / мл), без существенных различий между 1-4 летними рыбами (табл. 6, рис. 5).

Таблица 6: Концентрации 17β-эстрадиола и кальция у 2, 3 летних (Huso huso)

	2 летние *Huso huso* Кол. особей	Концентр.	P-значение	3 летние *Huso huso* Кол. особей	Концентр.	P-значение
17β-эстрадиол (E2) (нг/мл)	10	11.02 ± 4.8	0.407	10	11.34 ± 2.67	0.516
	7	12.77 ± 2.5		7	10.32 ± 3.6	
Кальций (нг/мл)	10	7.52 ± 0.32	0.178	10	7.39 ±0.69	0.804
	7	7.2 ±0.57		7	7.46 ± 0.37	

Несмотря на специфические различия в концентрации половых гормонов самцов и самок, они не являются полностью надежными в определении пола ввиду их колебаний. По данной причине определение вителлогенина (ВТГ) играет позитивную роль в детерминации пола. ВТГ производится в организме самок в ответ на повышение уровня E_2 в процессе роста ооцитов. В недостигших половозрелости особей, а также у самцов, уровень ВТГ в крови очень низкий и практически не выявляется (Craig et al. 2009).

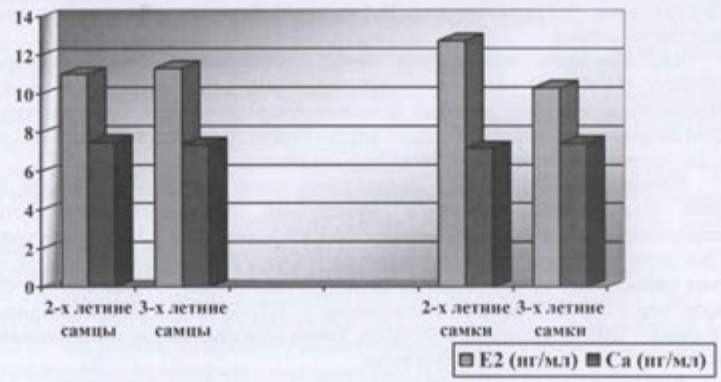

Рис. 5. Концентрация E2 и Ca у 2, 3-х летних Huso Huso.

4.5. Концентрация кальция у 2, 3-х летних культивируемых *Huso huso*

Из литературы известно, что концентрация в плазме ВТГ коррелирует с общей концентрацией кальция, исходя из чего, относительная концентрация ВТГ может быть определена по концентрации кальция в плазме (Doroshov et al. 1997; Stahl et al. 2009). Так, у костистых рыб, показатели кальция в плазме возрастают с увеличением в плазме ВТГ (Sumpter, 1985), тоже самое было выявлено и у белого осетра (Acipenser transmontanus), (Linares-Casenave et al. 2003). С целью определения пола у 2, 3 летних белуг были определены уровни кальция в плазме.

Как показали наши результаты в плазме 3-х летних самцов средняя концентрация кальция соответствует 7,39 нг/мл (в диапазоне 5.66-8.04 нг/мл), а у 3-х летних самок - 7,46 (в диапазоне 6.91-7.89 нг/мл), без существенных различий между двумя полами (табл. 7).

Таблица 7: Концентрация кальция у 2, 3-х летних культивируемых *Huso huso*

2-х летние *Huso huso* No.	Масса (г)	концентрация Ca (нг/мл)	3-х летние *Huso huso* No.	Масса (г)	концентрация Ca (нг/мл)
1	3880	7.21	**1**	4465	5.66
2	3530	6.69	**2**	4780	4.87
3	3970	7.84	**3**	4675	5.61
4	3345	8.2	**4**	4456	7.38
5	3278	8.15	**5**	4345	8.04
6	3568	7.94	**6**	4895	7.81
7	3870	7.71	**7**	4767	7.58
8	3654	6.08	**8**	4476	6.91
9	3384	7.03	**9**	4563	7.29
10	3670	7.45	**10**	4410	7.71
11	3874	7.58	**11**	4420	7.89
12	3467	7.25	**12**	4623	7.51
13	3674	6.96	**13**	4671	7.22
14	3987	6.57	**14**	4312	6.83

У 2-х летних самцов средняя концентрация кальция 7,52 мг/дл (в диапазоне 7.21-8.2 мг/дл), а у 2-х лет самок - 7,2 (в диапазоне 6.08-7.58 мг/дл), без каких либо существенных различий между двумя полами.

4.6. Критерии определение пола: Соотношение 11-кетотестостерона к 17β-эстрадиолу (11-KT/E2) также позволяет определять пол у рыб (Ceapa et al. 2002). Это соотношение может быть успешно использованы у молодняка, у особей находящихся на стадии созревания и на ранней стадии вителлогенеза. Соотношение 11-KT/E2 и E2/11-KT в 2-х, 3-х летних культивируемых *Huso huso* показано на рис. 6.

Соотношение 11-KT/E2 у самцов преобладало над таковым у самок. В 3-х летних самцов белуги была отмечена повышенная концентрация сывороточного 11-кетотестостерона, при этом соотношение 11 KT/E2 составило 0,14 (в диапазоне 0,10 - 0,20), а в 3-х летних самок данное соотношение составило 0,06 (в диапазоне 0.034 - 0.09). У 2-х летних самцов белуги, соотношение 11 KT/E2 также было значительно (P <0,05) выше у самцов, чем у самок. У самцов соотношение 11 KT/E2 было 0,15 (в диапазоне 0,05 - 0,17), но у самок - 0,05 (в диапазоне 0,03-0,09). Таким образом, данное соотношение позволяет с высокой точностью определить пол рубы.

Еще одним важным параметром, который может быть использован для определения пола является ссотношение 17β-эстрадиола и 11-кетотестостерона (E2/11-KT). В данном

исследовании проводя измерения значений E2/11-KT у культивируемых белуг, были выявлены существенные различия между двумя полами.

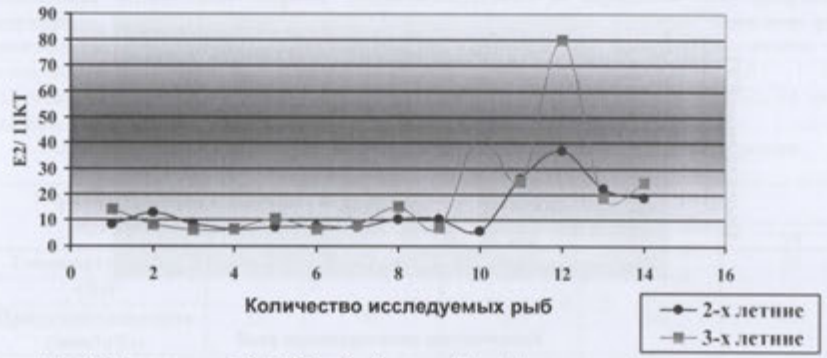

Рис.6. Соотношение E2/11KT у 2 и 3 летних Huso Huso

Концентрация 17β-эстрадиола (E_2) у самцов белуги выше, чем у самок. Поэтому соотношение E2/11 KT у самок выше, чем самцов. У 3-х летних самок белуги, соотношение E2/11-KT было примерно 17,65, что было значительно выше (P <0,05), чем у самцов (9,5). У 2-х летних рыб разница в соотношение E2/11 KT между двумя полами была такой же, как и у 3-х летних рыб. Как и у 3-х, так и у 2-х летних самок наблюдались высокие показатели E2/11-KT, по сравнению с 2-х летними самцами (20,5 и 12 соответственно) (рис. 6). Таким образом, результаты показали, что путем определения указанного соотношения можно определять пол рыб.

Соотношение 17β-эстрадиола и андрогенов обычно используется для оценки половых стероидов у рыб (Folmar et al. 1996; Ceapa et al. 2002). В норме у самок концентрация 17β-эстрадиола, выше чем тестостерона (17β-estradiol/testosterone> 1), в то время как у самцов преобладает тестостерон (17β-estradiol/testosterone <1), однако эти соотношения у отдельных рыб могут широко варьировать в зависимости от репродуктивного состояния.

Как показало данное исследование, соотношение 17β-эстрадиол/тестостерон у 3-х летних самок соответствовало 56 (с диапазоном 25.9-89.3). Однако в 3-х летних самцов белуги, это соотношение было ниже -10,98 (с диапазоном 3.51-19.87). Используя соотношение 17β-эстрадиол/тестостерон можно с высокой точностью идентифицировать пол 3-х летних культивируемых белуг. В случае с более молодой рыбой (2 года), были получены те же результаты, что и у 3-х летних особей.

В 2-х летних самок соотношение 17β-эстрадиол/тестостерон составляло 91,26 (между 72.72 и 128.9), что значительно выше, чем у 2-х летних самцов (27,48). Таким образом, измеряя соотношение 17β-эстрадиола и тестостерона, может быть точно определен пол у культивируемых белуг в более раннем возрасте (24 месяцев) (рис. 7).

В обоих хозяйствах: (SR) и (SI), у ряда рыб (13 в SI и 10 в SR) уровень T начал увеличиваться в возрасте 24 месяцев. У остальных рыб того же возраста значения T не превышали 0,2 нг / мл, в то время как у восеми рыб из 13 в SI и 2-х из 10 в SR значения T превышали 0,2 нг / мл. В обоих хозяйствах у выше отмеченных рыб в возрасте 36 месяцев значения T увеличились, в то время как у остальных рыб оставались низкими. В SI 24

месячные рыбы с массой тела около 2270 г имела крайне низкие показатели Т по сравнению с рыбами масса тела которых составляла около 3880 г.

Рис.7. Соотношение E2/T у 2- 3 летних Huso Huso

Результаты гистологического анализа гонад рыб в обоих хозяйствах (SR и SI) показали, что все рыбы 36 месяцев в обоих хозяйствах имели дифференцированные гонады и находились на 2-ой стадии. За исключением 6-и особей из 32 в возрасте 24 месяцев на SI ферме которые не имели дифференцированных гонад. Гистологический анализ показал, что все самцы в обоих хозяйствах (SR и SI) в возрасте 24 и 36 месяцев имели хорошо дифференцированные яички с кистами содержащими сперматоциты (SC) (рис. 8).

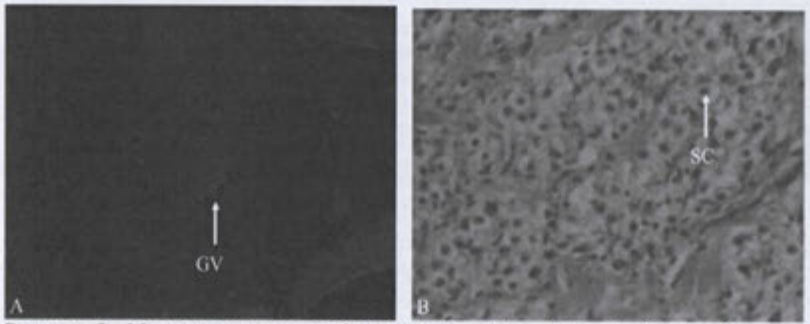

Рисунок 8: Микрограммы гонад 36 месячных *Huso huso*. А: Стадия II яичник, GV: Зародышевые пузырьки; Б: Фаза II тестис, SC: Сперматоциты.

Глава V. Получение новых продуктов из внутренностей белуги Huso huso

Особое место в биотехнологии, а в частности в биотехнологии пищи и морепродуктов занимает переработка сельскохозяйственных отходов в иные ценные продукты. Лучшим способом переработки внутренностей рыб считается метод ферментативного гидролиза.

5.1. Ферментативный гидролиз внутренностей рыбы:

В данном исследовании, для выявления оптимальных условий гидролиза внутренностей белуги, были использованы ферменты бактериального происхождения: Protamex, Alcalase. Для снижения себестоимости продукции, важным условием является уменьшение потребления энергии, продолжительности и ферментов при продукции гидролизата белка. В связи с чем, с целью оптимизации условий гидролиза при производстве гидролизатов, была применена методология поверхности ответа. В эксперименте использовались три переменных параметра: температура (X1, ° C), продолжительность (X2, минута) и ферментная активность (X3, AU / кг белка), на пяти уровнях (-α, -1, 0, а +1, + α) (табл. 8)

Таблица 8: **Независимые переменные, их нормальные и фактические уровни используемые в эксперименте**

Переменные	Уровни				
	$-\alpha^1$	-1	0	+1	+α
Температура (°C) (X_1)	33	38	45.5	53	58
Продолжительность (мин) (X_2)	53	80	120	160	187
Фементативная активность (AU/кг белок) (X_3)	14	22	34	46	55

[1] ***α= 1.68***

Эксперимент включал восемь факториал, шесть осевых точек и четыре репликации в центральной точке (Таблица 8). Степень гидролиза определялась как ответ на сочетание независимых переменных. Эксперимент был рандомизирован для минимизации эффекта непредвиденной изменчивости наблюдаемого ответа.

Как показали результаты, DH возрастала с увеличением длительности гидролиза. Быстрый рост DH наблюдался в течение первых 3 ч, после чего следовал более пониженный рост DH. Guerard и соавт. (2002) предположили, что сокращение DH по мере увеличения длительности гидролиза может быть обусловлено ограниченной ферментативной активностью с образованием продуктов реакции при высокой DH. Более того, снижение скорости гидролиза может быть также связано с уменьшением концентрации субстрата, ингибированием и дезактивацией ферментов.

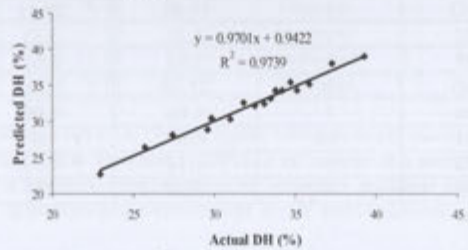

Рис. 9: Соотношения между фактическими и прогнозируемыми значениями степени гидролиза

Существенное влияние на DH оказывает активность ферментов, время реакции и температура (таблица 8). Фактические данные DH сильно отличаются прогнозируемых данных (рис. 9). Максимальное прогнозируемое значение DH соответствовало 38,94 при

температуре 38° С, длительности - 160 мин, а ферментативной активности - 46, в то время как фактические показатели DH были 39,30.

5.2. Оптимизация процесса гидролиза

Влияние X1, X2 и X3 на гидролиз (Protamex) определяли с помощью факторного дизайна, как отмечалось ранее. Лучшим уравнением для определения значение DH полученого при гидролизе (Protamex) является:

$$Y = 34,22 + (0,62 \times x1) + (2,68 \times x2) + (2,95 \times x3) - (0,95 \times x12) - (1,16 \times x22) - (0,4 \times x32) - (0.86x1x2) - (1,64 \times x1x3) - (0,29 \times x2x3)$$

Исходя из таблицы ANOVA (табл. 9) линейный, квадратичный и перекрывающийся периоды были значительны ($P<0.05$) за исключением квадратического периода ферментативной активности и перекрывающегося периода длительности и ферментативной активности ($P>0.05$).

Статистический анализ показал, что в течение каждого периода, все три фактора гидролиза оказывали сильное воздействие на DH ($P <0,05$).

Комбинирование контурных графиков и диаграмм поверхностного ответа были предложены для прогнозирования критических точек и эффективности для каждого фактора. Совокупное воздействие каждой пары переменных указывают, что в результате гидролиза белков белуга, увеличение DH достигается за счет повышения температуры, времени и активности ферментативной реакции до определенных уровней.

Оптимальные условия в настоящем исследовании, основаны на минимальном значении независимых переменных и 30% DH в качестве ответа (Рис. 9). Согласно рис. 9, ожидаемый результат соответствует 83% и является целесообразным.

Таблица 9: ANOVA таблица влияния ферментативной активности, температуры и продолжительности на DH при опытах по оптимизации процесса гидролиза

Ресурсы	Сумма квадратов	DF[1]	Среднее квадратов	F-значение	P-значение
Модель	280.99	9	31.22	45.19	< 0.0001
X_1	5.25	1	5.25	7.59	0.0203
X_2	98.28	1	98.28	142.25	< 0.0001
X_3	119.22	1	119.22	172.55	< 0.0001
X_1^2	12.97	1	12.97	18.78	0.0015
X_2^2	19.42	1	19.42	28.11	0.0003
X_3^2	2.32	1	2.32	3.35	0.0971
X_1X_2	5.95	1	5.95	8.61	0.0149
X_1X_3	21.45	1	21.45	31.05	0.0002
X_2X_3	0.66	1	0.66	0.96	0.3510
остаток	6.91	10	0.69	00	00
отклонение	5.72	5	1.14	4.79	0.0553
ошибка	1.19	5	0.24	00	00

[1] ***DF: Степень свободы***

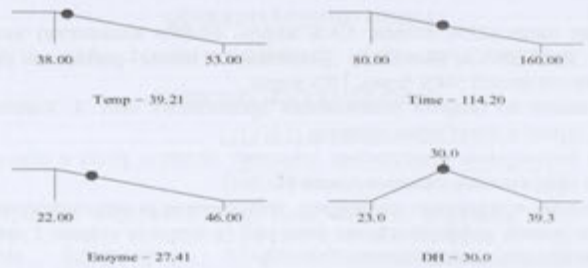

Рис. 9: Оптимальные условия гидролиза внутренних органов белуги

5.3. Аминокислотный состав гидролизатов

Химический анализ позволяет оценить питательную ценность белка. Данный параметр используется для сравнения уровней незаменимых аминокислот в исследуемых и стандартных белках. Как показало данное исследование, в гидролизате внутренностей белуги преобладают незаменимые аминокислоты по сравнению с рекомендованным для взрослого человека ФАО/ВОЗ шаблоном аминокислот.

Таблица 10: Аминокислотный состав гидролизата внутренностей белуги **(г/100г)**

Аминокислота	***Количество (г/100 г$^{-1}$)***	***Аминокислота***	***Количество (г/100 г$^{-1}$)***
Гистидин	1.87	Фенил аланин	2.67
Изолейцин	4.53	Тирозин	3.56
Лейцин	7.45	Треонин	4.12
Лизин	8.13	Триптофан	
Метионин	9.17	Аргинин	7.19

Гидролизат внутренних органов белуги имеет относительно высокое содержание белка (66,43%) и низкое содержание липидов (1,34%), и на основе его аминокислотного состава, может использоватся в аквакультуре, в качестве пищевой добавки для животных, а также как пептон, являясь эффективным источником азота необходимой для роста микробной среды (Табл. 10).

Гидролиз белков внутренностей белуги с использование Alcalase ® привело к DH более 30%. Существенное влияние на DH оказывает активность ферментов, длительность реакции и температура. Методика поверхностного ответа, используемая для оптимизации условий гидролиза, показала что оптимальными условиями для гидролиза являются: температура 50 ° С, длительность 120 мин и активность фермента 34 AU / кг.

Выводы:

1.Свежая влажная пища (23% белков, 5,6% жиров, 49,46% влажности) является более эффективной и приводит к большему увеличению массы рыбы, по сравнению с коммерционной сухой пищей (44% белка, 10% жира).
2. Цисты *A. uremiana* по скорсти размножения превосходят цист *A. fransiscana*, они легкодоступны в стране и отоят втрое дешевле.
3. Регулирование фотопериода существенно повышает скорость роста и обмена веществ у белуги. Наоболее эффективним является режим 8L: 16D.
4. Измерение уровней плазменных андрогенов тестостерона и кето-тестостерона в крови дает возможность ранней дифференциации пола рыб (в возрасте старше 2 лет) и является более безопасным чем инвазивный метод.
5. Используя соотношение 17β-эстрадиол/тестостерон можно с достаточно высокой точностью идентифицировать пол 2 - 3 летних культивруемых белуг.
6. Гистологический анализ гонад показал, что подавляющее большинство рыб в возрасте 24 месяцев, имеют дифференцированные половые железы (Стадия 2).
7. Оптимальными условиями для получения белковых гидролизатов из внутренности белуги (степень гидролиза 30%) являются: температура 39,21° С, ферментативная активность 27,41 АС / кг, и длительность 114,2 мин. В белковых гидролизатах внутренностей белуги содержится большое количество незаменимых аминокислот.
8. Гидролизат внутренних органов белуги с высоким содержанием белка (66,43%) и низким содержанием липидов (1,34%), с учетом его аминокислотного состава, может быть использовано в аквакультуре, в качестве пищевой добавки, а также в качестве источника азота в микробиологических средах.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Abbas Esmaeili Molla //Procesing of visceral waste proteins of beluga (Huso huso) using Protamex/ Biolog. j. Armenia, 2011, v.63, n.4, p.39-45.
2. Abbas Esmaeili Mola, Hrachya G. Hovhannisyan, Rajab Mohammad Nazari and Mahmoudreza Ovissipour //Early sex identification in cultured beluga (Huso huso)using plasma steroid hormones/ African Journal of Biotechnology, 2011, v.. 10, n.10, p. 1959-1965
3. Abbas Esmaeili Molla, Hrachya G. Hovhannisyan. //Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga *Huso huso* using Protamex/ Int. Aquatic Res, 2011, n. 3: p.93-99
4. Mahmoudreza Ovissipour, Majid Taghiof, Ali Motamedzadegan, Barbara Rasco, Abbas Esmaeili Molla //Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon *Huso huso* using Alcalase/ Int. Aquatic Res, 2009, n. 1: 31-38
5. M. R. Ghomi, R. M. Nazari, M. Sohrabnejad, M. Ovissipour, M. Zarei, A. Esmaili Mola, C. Makhdomi, A. Rahimian, H. Noori and A. Naghawi //Manipulation of photoperiod in growth factors of beluga sturgeon *Huso huso*/African Journal of Biotechnology, 2010, v. 9, n.13, pp. 1978-1981
6. Nazari R.M., Ovissipour M., Rasco B., Nazari G.. Makhdomi C., Naghawi A.R., Makhdomi N., Esmaili A.// Artifical differences in controlled propagation of farmed and wild beluga (Huso huso) and their differences and problems. 6th International symposium on Sturgeon 25-31 Oct. 2009, Wuhan China, P. 163-164.
7. Abbas Esmaeili Molla, Rajab Mohammad Nazari //Early identification of sex-culture of beluga sturgeon using plasma steroid hormone. Patent of Islamic Republic Iran. Serial NO: A/87-001345. Reg: AUG/24/2009.

ԱԲԲԱՍ ԷՍՄԱՅԻԼԻ ՄՈԼԼԱ

ԲԵԼՈՒԳԱ Huso huso-Ի ԿՈՒԼՏԻՎԱՑՈՒՄԸ, ՍԵՌԻ ՎԱՂ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԵՎ ԹԱՓՈՆԻ ՎԵՐԱՄՇԱԿՈՒՄԸ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Հանգուցային բառեր՝ ԲԵԼՈՒԳԱ Huso huso, Artemia urumiana, սեռի վաղ որոշում, տեստոստերոն, էստրադիոլ, 11-կետոտեստոստերոն, կալցիում, թափոնի վերամշակում

Բելուգա Հուսո Հուսոն, ինչպես նաև մի շարք արժեքավոր ձկնատեսակներ, գերձկնորսության պատճառով գտնվում են վերացման եզրին: Այս ձկնատեսակը լավագույն ձկնկիթի և բարձորակ մսի աղբյուր է հանդիսանում: Որոշ երկրներ, նույն թվում Իրանի Իսլամական Հանրապետությունը, միջոցներ է ձեռնարկում Բելուգա Հուսո Հուսոի թվաքանակի վերականգնման ուղղությամբ: Երկրի տարածքում ստեղծվել են մի շարք հզոր ձկնաբուծարաններ, որտեղ աճեցված ձկները վաղ հասակում բաց են թողնվում ծով կամ շարունակվում են բուծվել ձկնկիթ ստանալու նպատակով: Տնտեսական նկատառումներով որձերի բուծումը, ավելի քան 10 տարի միչև սեռահասուն դառնալը, նպատակահարմար չէ:
Սակայն ձկների մոտ մինչև սեռահասուն դառնալը արտաքին նշաններով հնարավոր չէ որոշել սեռը: Բելուգաները սեռահասուն են դառնում մոտ 18 տարեկան հասակում: Բուծման պայմանների օպթիմալացման միջոցով հնարավոր է որոշ չափով արագացնել սեռահասունացումը, բայց դա բավարար չէ: Այդ պատճառով բուծվող ձկների մոտ սեռի վաղ որոշումը հույժ կարևոր խնդիր է:
Ա. Էսմաեիլի Մոլլայի ատենախոսությունը նվիրված է Բելուգա Հուսո հուսոյի բուծման պայմանների օպթիմալացմանը, նրանց սեռի վավ որոշմանը և թափոնների էնզիմատիկ վերամշակմանը: Ուսումնասիրվել է սննդի, շրջակա ջերմաստիճանի, լուսային ռեժիմի ազդեցությունները Բելուգա Հուսո հուսոյի աճի վրա: Ցույց է տրվել ձկնամթերքից թարմ պատրաստված, խոնավ, վիտամիններով հարստացված կերի առավելությունը չոր կոմերցիոն կերերի հանդեպ, որը բերում է միջին քաշի մոտ10% ավելացման: Համեմատական ուսումնասիրություններում ցույց է տրվել, որ Ուրմիա լճից ստացված Artemia uremiana-ն կարող է լիովին փոխարինել արտասահմանից

ներմուծվող Artemia fransiscana- ին, բացի այդ այն ավելի արագ է հասունանում, էժան և հասանելի:

Լուսավոր և մութ ժամանակահատվածների հարաբերության ուսումնասիրությունների արդյունքում հայտնաբերվել է, որ Բելուգայի աճի համար առավել նպաստավոր է լուսվորության 8 ժամ տևողությունը:

Ձկների մեջ սեռի կանխորոշման գոյություն ունեցող մեթոդները շատ թանկ են և վտանգավոր նրանց առողջության համար: Այդ պատճառով խնդիր է դրվել մշակել սեռի կանխորոշման ապահով և հասանելի եղանակ հիստոլոգիական մեթոդների կիրառմամբ: Արյան պլազմայում տեստոստերոնի, 11 -կետոտեստոստերոնի և էստրադիոլի մակարդակների և նրանց հարաբերության որոշմամբ հնարավոր է դարձել երկու-երեք տարեկան բելուգաների մոտ ավելի քան 90% ճշտությամբ որոշել սեռը: Բելուգա Հուսո-հուսոի մոտ սեռի որոշման յուրահատուկ մեթոդի համար ստացվել է Իրանի Իսլամական Հանրապետություն արտոնագիր: Մշակված մեթոդը իր ապահովությամբ, հուսալիությամբ և հասանելիությամբ գերազանցում է հայտնի մեթոդներին: Սեռը որոշելուց հետո էգերին շարունակում են աճեցնել ձկնկիթ ստանալու նպատակով, իսկ որձերը, որպես բարձրորակ մսի աղբյուր հանվում էն վաճառքի:

Շահութաբերական և բնապահպանական նպատակներով մշակվել է ձկան թափոնի, որը կազմում է ձկան քաշի մոտ 25%-ը, վերամշակման արդյունավետ եղանակ: Մակերեսային պատասխանի մեթոդով (ՄՊՄ) օպթիմալացվել են Ալկալազ և Պրոտամեքս բակտերիալ ֆերմենտներով թափոնի վերամշակման (հիդրոլիզի) պրոցեսը: Ստացվել է կարևորագույն ամինաթթուներով հարուստ պատրաստուկ, որը հավելումների ձևով կարելի է օգտագործել կերի, սննդի և մանրէաբանական արդյունաբերության բնագավառներում:

Ա. Էսմաեիլի Մոլլաի կողմից ատենախոսության թեմայով տպագրվել են 5 հոդված գրախոսվող միջազգային ամսագրերում, 2 թեզիս միջազգային գիտաժողովներում և ստացվել է մեկ արտոնագիր:

ABBAS ESMAEILI MOLLA

Cultivation, early sex determination and viscera waste processing of Beluga (*Huso huso*)

Abstract

Key words: Beluga Huso huso, Artemia urumiana, early sex determination, testosteron, estradiol, 11-ketotestosteron, calcium, viscera processing

Beluga Huso huso, as well as a number of valuable fish species, are close to disappearance because of overfishing. This fish species are the source of the best quality meat and caviar. In some countries, including the Islamic Republic of Iran, take measures for the recovery of the number of Beluga Huso huso.

In the country there are some hatcheries, where the fishes are grown and released into the sea in an early age or continue grown in order to obtain caviar. From economic point of view breeding of male over 10 years before maturation, it is not profitable.

Sex identification in fishes by external signs till maturation is not possible. Beluga maturates in an age of 18 years. By optimization of breeding conditions it is possible to accelerate that process, but its still is not enough.

That's why early sex identification in fishes is extremely important.

The thesis is dedicated to optimization of Beluga "Huso huso" breeding conditions, early sex determination and fish waste enzymatic processing. The influence of food, temperature, and light regime effects on the growth of Beluga huso huso were investigated.

The advantage of the fresh prepared, wet, enriched by vitamins feed (the average weight increase about 10%) toward dry commercial feed were demonstrated. The comparative studies have shown that Artemia uremiana from Urmia Lake can fully replace imported Artemia fransiscana, because of its early hatching, low cost and availability.

The study of the relationship between light and dark periods shows that 8 hours lighting duration is more favorable for growth of Beluga.

The known methods of sex determination in fish are very expensive and also dangerous for their health so raised issue to develop a safe and accessible sex determination method.

Blood plasma testosteron, 11-ketotestosteron and estradiol levels as well as their relationship estimation make possible to identify the sex of two or three years beluga with 90% accuracy.

For development of unique method of sex identification of Beluga "Huso huso" a patent of Islamic Republic of Iran has been got. The developed method by its reliability and availability is

the best of the known methods. After sex determination the female kept as a caviar and meet producer and sell males as a good quality meet.

For profitable and environmental purposes created an effective method of fish viscera waste (about 25 % of weight) treatment. The process of viscera hydrolyses with bacterial enzymes Alcalase and Protamex were optimized by use of surface response method (SRM). The preparation was rich with amino acid was obtained; it was shown that such preparation could be used like food additive in food and microbiological industry.

According to the thesis Abbas Esmaili Molla has published 5 articles in pre-reviewed international journals, 2 abstracts in international conferences and received one patent.