

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045115**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.30

(51) Int. Cl. *A23L 17/30* (2016.01)
A23B 4/027 (2006.01)

(21) Номер заявки
202191695

(22) Дата подачи заявки
2019.11.20

(54) **СПОСОБ ОБРАБОТКИ ИКРЫ ИЗ ЖИВЫХ, ЗРЕЛЫХ, ОВУЛИРОВАННЫХ ИКРИНОК РЫБ ИЛИ РАКООБРАЗНЫХ И СООТВЕТСТВУЮЩИЙ ПРОДУКТ**

(31) **10 2018 132 386.7; 18212833.0;
62/780,356**

(32) **2018.12.17**

(33) **DE; EP; US**

(43) **2021.09.24**

(86) **PCT/DE2019/100993**

(87) **WO 2020/125848 2020.06.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**АЛЬФРЕД-ВЕГЕНЕР-ИНСТИТУТ
ХЕЛЬМХОЛЬЦ-ЦЕНТРУМ ФЮР
ПОЛАР- УНД МЕЕРЕСФОРШУНГ
(DE)**

(72) Изобретатель:
Кёлер-Гюнтер Ангела (DE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) DUFRESNE L. ET AL.: "Kinetics of actin assembly attending fertilization or artificial activation of sea urchin eggs" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Vol. 172, No. 1, 01 September 1987 (1987-09-01),

pages 32-42, [retrieved on 1987-09-01] DOI: 10.1016/0014-4827(87)90090-5 ISSN: 0014-4827, XP024858354, page 33, last paragraph; figures 4, 5, page 40, line 2 - line 5

G.E. BLEDSOE ET AL.: "Caviars and Fish Roe Products" CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION, USA, Vol. 43, No. 3, 01 May 2003 (2003-05-01), pages 317-356 DOI: 10.1080/10408690390826545, ISSN: 1040-8398, XP055273360, page 348; table 8

EP-B1-2522226

Thomson Scientific, London, GB; Vol. 1992, No. 16, 15 My 1991 (1991-07-15), AN 1992-130346, Retrieved from: DATABASE WPI [online], XP002791935 & SU 1662469 A1 (SEA FISH OCEANOGRAP), 15 July 1991 (1991-07-15), abstract

Thomson Scientific, London, GB; Vol. 1996, No. 29, 20 November 1995 (1995-11-20), AN 1996-285116, Retrieved from: DATABASE WPI [online], XP002791936 & RU 2048111 C1 (KOPYLENKO L. R.), 20 November 1995 (1995-11-20), abstract

DE-A1-2416685

WO-A1-2007045233

(57) Получение икры от живого осетра и икорных продуктов от живых рыб или живых ракообразных является особенно длительным и экономически весьма эффективным. В уровне техники живые, зрелые икринки обрабатывают катионами кальция и тем самым ферментативно образуют структурно упрочненную оболочку икринки. В соответствующем изобретению способе живые, зрелые икринки, которые у рыб и ракообразных имеют три или более слоев в оболочке икринки, на стадии воздействия калием приводят в контакт с катионами калия в растворе в деионизированной воде, причем концентрация катионов калия и температура воды не оказывают никакого вредного влияния на живые икринки. Икринки в условиях постоянной электрической деполяризации образуют новый стабилизирующий слой (SS) в оболочке икринки. Он является упругим и придает икре или икорному продукту новую текстуру и новое поведение при дальнейшей переработке. Катионы калия в качестве используемого технического вспомогательного вещества в конечном продукте не содержатся. Возможна дополнительная обработка катионами кальция. Полученные согласно изобретению продукты могут быть сохранены особенно долго и даже могут быть заморожены без потери качества.

045115 B1

045115 B1

Изобретение относится к способу, служащему для получения икры или икорного продукта из живых, зрелых икринок рыб или ракообразных, причем живые, зрелые икринки находятся в способном к оплодотворению, но в неоплодотворенном состоянии, и имеют естественное содержание калия в цитоплазме, путем обработки живых, зрелых икринок в безвредном для них растворе поваренной соли, и затем по меньшей мере в растворе, содержащем воду и по меньшей мере один растворенный в ней, действующий как стабилизирующий оболочку икринки живых, зрелых икринок катионный компонент, и к икре или икорному продукту.

Приготовленные, неоплодотворенные икринки, в частности, рыб, ценятся как деликатес и потребляются во все большем количестве. "Рыбьей икрой" называют (непрофессионально) икринки в любой степени зрелости, то есть от незрелой до зрелой, причем степень развития икринок не является четко определенной. В отношении "икры" речь идет о живых, зрелых икринках, которые самки рыб, омаров или других водных животных откладывают в водоеме, чтобы оплодотворить их. Овулированные икринки представляют собой зрелые, способные к оплодотворению живые икринки, которые в яичниках вышли из фолликулярных оболочек и были переданы в полость тела. Оттуда они затем выводятся или выдавливаются. Согласно Продовольственному кодексу (Комиссии Codex Alimentarius) продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO), пищевая икра может быть получена только из рыбьей икры самок рыб различных осетровых пород. Между тем, наряду с дикими осетрами, для получения икры также применяют разведение осетров в аквакультурных заводах в пресной воде. За некоторыми немногими исключениями, осетры нерестятся исключительно в пресной воде. К наиболее известным видам осетров (Acipenseridae) относятся, среди прочих, виды *A. baerii*, *A. guldenstaedtii*, *Huso huso* (также называемые белугой), *A. transmontanus*, *A. ruthenus*, и их альбиносы. Но следует также назвать гибриды между *A. schrenckii* (самками) и *A. dauricus* (самцами), и с осетрами, которые являются близкородственными американскому "веслоносу" (*Polydon spatula*). На рынке известны многочисленные сорта икры, которые, в частности, называют севрюгой, осетром и белугой. От осетров-альбиносов получают белую икру (также "золотую икру"). От альбиносов породы *A. ruthenus* в отдельных случаях в аквакультурных заводах создают так называемую "царскую икру". Но при этом речь идет не о "подлинно царской икре", которая имеет происхождение от альбиносов белуги (*Huso huso*) и является очень редкой.

В настоящее время получают и продают на рынке икорные продукты от около 38 других сортов рыбы, которые не относятся к осетровым породам, например, сравните публикацию авторов P. Bronzi и др.: "Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview" ("Современное и будущее состояние производства и продажи осетровых и икры: Общий обзор рынка") (*Journal of Applied Ichthyology*, 2014, том 30 SI, выпуск 6, стр. 1536-1546). К ним относятся икорные продукты от тунца, пинагора, лосося, форели, сельди, трески, карпа, сига и мойвы, из которых добывают незрелую икру для икорных продуктов (также называемых "заменителем икры" или "поддельной икрой"). Икра омара, крупных речных раков и других ракообразных тоже может быть переработана в икорные продукты. На эти указанные (и также прочие подходящие, но не названные) рыбы и ракообразные ссылаются описанные в изобретении способ и получаемые им продукты. Если не приведено четкое указание на икру осетровых, далее следует иметь в виду и подразумевать всякий раз как икру, так и икорные продукты иных рыб, нежели осетровые, и ракообразных, в частности, омара и широкопалого речного рака.

Икра и икорные продукты являются ценными продуктами питания. Икра богата белком с высоким содержанием жизненно важных аминокислот, и жиром. Икра содержит витамины D, E, B₁₂ и никотиновую кислоту, минеральные вещества на основе натрия, калия, магния и кальция, а также микроэлементы фосфор, фтор, йод и цинк. Кроме того, она имеет высокое содержание полезного холестерина (HDL). Икра и икорные продукты могут быть использованы как продукты питания, так и в качестве материала в производстве косметики или в других отраслях промышленности, которые используют подобные ценные материалы. Размеры и прочность икринок в значительной мере зависят как от данной породы рыбы или ракообразного, так и от зрелости и тем самым от момента времени ее промысла.

На рынке в настоящее время находятся некоторые икорные продукты из зрелых овулированных икринок осетровых пород. Но в нынешнее время главным образом по-прежнему предлагают икру, в отношении которой речь идет о незрелой рыбьей икре, которую добывают из яичников убитых осетров. При этом речь идет о традиционных способах получения икры. Прежде всего в отношении икры выращенных в условиях аквакультуры осетров исходили из того, что здесь также - как раньше с икрой диких рыб - незрелые икринки без дополнительной обработки имеют достаточную прочность в условиях инвазивной обработки в стадиях промывания для удаления остаточных тканей половых желез и для фасовки. Однако с накоплением производственного опыта в получении икры от осетров из аквакультуры в прошедшие 20 лет оказалось, что эта незрелая рыба икра выращенных в условиях аквакультуры убитых осетров является слишком мягкой, и может быть переработана только с применением буры или других консервантов, или пастеризации, для получения пригодного для фасовки и хранящегося больше 2-3 месяцев продукта.

Убой самок животных для получения икры в случае вылова диких особей, вместе с резким чрезмерным выловом, загрязнением водоемов промышленными, сельскохозяйственными и бытовыми сточными водами, и сооружением затворов и плотин, преграждающих пути миграции в места нереста в пресных водах, приводит к огромной угрозе поголовью почти 27 различных пород осетровых. Во многих

регионах по-прежнему процветают браконьерство и нелегальный черный рынок, несмотря на меры защиты осетров согласно Вашингтонскому соглашению о защите диких видов (CITES). По всему миру были инициированы дорогостоящие программы повторного заселения, но которые, по данным Всемирного общества охраны осетровых рыб, к сожалению, оказались малорезультативными, например, прежде всего в Китае, но также в Иране и России. Только меры, направленные на сохранение запасов и повторное заселение в США и Канаде, показали первые успехи. Наряду с разрешенным выловом половозрелых животных, осетровых рыб различных пород, также из аквакультуры, в рамках программ восстановления с различным успехом выпускали в открытые водоемы, чтобы спасти находящиеся в опасности запасы. В большой опасности также находятся запасы ракообразных и европейских раков, помимо всего прочего, вследствие загрязнения окружающей среды и занесенных болезней, например, таких как раковая чума. Решительный прогресс в разведении раков в условиях аквакультуры и обширные меры насады молодежи играют важную роль для сохранения местных запасов. В аквакультуре самок животных оставляют живыми для разведения, и икринки получают выскабливанием. Напротив, для получения икры в аквакультуре до сих пор традиционно, как правило, просто убивают самок осетров, так как щадящие способы не доминируют. При этом полностью игнорируют тот факт, что они с возрастом проявляют значительно улучшенную репродуктивную функцию. Также частично практикуемые именно в России "способы кесарева сечения" ни в коем случае не относятся к щадящим способам, так как они сопровождаются высокой смертностью обработанных таким образом осетров.

Уровень техники

Из RU 2232523 C2 известен способ получения гранулированной икры из овулированной осетровой икры. При этом собранные овулированные икринки сначала обрабатывают в горячем водном растворе консерванта с концентрацией от 1,5 до 2%, чтобы подготовить их к последующей пастеризации при температурах от 65 до 70°C. Кроме того обстоятельства, что каждый процесс нагревания значительно влияет на вкус рыбьей икры, при применении овулированных икринок, которые имеют очень мягкую и клейкую оболочку икринок, не обеспечивается надежность того, что они выдержат последующие обработки консервантами без разрывания. Но уже небольшая доля разорванных икринок значительно ухудшает качество икры, так как разорванные икринки можно удалить лишь с большим трудом. Пастеризация приводит к денатурации ценных белков и придает икре мучнистый вкус.

В связи с получением овулированной икры осетровых, например, из публикации авторов М. Szczepkowski и др.: "A simple method for collecting sturgeon eggs using a catheter" ("Простой способ сбора осетровой икры с использованием катетера") (Arch. Pol. Fich. (2011), том 19, стр. 123-128) известно применение для этого катетера. Тем самым икринки могут быть простым путем слиты или отсосаны при пониженном давлении. Также известно извлечение икринок из брюшной полости осетра простым массажем. Это способ называется "выдавливанием", и является самым щадящим способом сбора.

Ближайший к изобретению вариант осуществления согласно уровню техники раскрыт в WO 2007/045233 A1. Описан способ получения икры или икорных продуктов из зрелых овулированных, но неоплодотворенных икринок водных животных, предпочтительно рыб, посредством внешней обработки зрелых икринок в растворе, причем это приводит к внутреннему морфологическому изменению бесклеточных оболочек икринок, которые отделяют яйцеклетку (цитоплазму яйцеклетки с окружающей мембраной яйца) от окружающей среды, со структурной стабилизацией. При этом используемый раствор содержит воду и по меньшей мере один катионный компонент (катионы кальция Ca⁺⁺), который растворен в воде при предварительно заданной концентрации, и при контакте с икринками обуславливает структурную стабилизацию. Кальций участвует в типичной для клеток молекулярной сигнальной трансдукции, причем в яйцеклетке в ее цитоплазме запускается кальциевая волна, которая опять же приводит к кортикальной реакции и к высвобождению и активации овопероксидазы. Этот фермент в экстрацеллюлярной оболочке яйца обеспечивает необратимое структурное сшивание белковых цепей в результате встраивания молекул тирозина во внутреннюю лучистую зону (Zona Radiata Externa) и внешнюю лучистую зону (Zona Radiata Externa). Таким образом, индуцированный процесс в живой, имеющей обмен веществ икринке приводит к структурной стабилизации оболочки икринки. У незрелых икринок подобная стабилизация не достигается, так как соответствующие рецепторы и ферментативные каскады еще не созрели. У убитых икринок процесс не может быть инициирован, поскольку метаболизм уже не происходит. Живые зрелые икринки благодаря овариальной жидкости при контакте с водой сразу же образуют клейкий слой, чтобы в природе на месте нереста быть в состоянии прочно приклеиваться к камням и растениям. Поэтому икринки перед началом обработки промывают не повреждающим живые икринки ("физиологическим") раствором поваренной соли, чтобы удалить овариальную жидкость. Благодаря этому живые зрелые икринки имеют естественное содержание калия в цитоплазме. То есть, например, им перед сбором не были введены никакие вредные дозы калия (например, для инициирования овуляции).

Описанную последовательность реакций в литературе называют "второй реакцией". Речь идет о медленной метаболической реакции, которая после слияния первого сперматозоида с яйцеклеткой строит постоянную, физико-механическую структуру для защиты яйцеклетки от агрегирования на яйце с дополнительными внешними спермиями (полиспермии), но прежде всего от экологических вредных веществ, микробов и механических повреждений образовавшегося эмбриона. В известном способе эта вторая ре-

акция срабатывает без оплодотворения спермием. Достигнутая структурная стабилизация при потреблении продукта обеспечивает "эффект лопания" и взрывное высвобождение жидкой цитоплазмы. Предпочтение специфического проявления эффекта лопания является сильно зависящим от использования икры и характера потребителей.

Кроме того, из EP 252226 B1 известно консервирование незрелой необработанной икры выращенных в аквакультуре рыб в композиции из флавоноида и антиоксиданта таксифолина (дигидрохверцетина) и органической соли, в частности, также цитрата калия.

Но применяемые при этом высокие концентрации композиции приводят к явным изменениям содержания ионов во внутриклеточной среде, что инициирует запрограммированную гибель клетки (апоптоз). То есть, обработанная таким образом икра сразу же погибает. В опубликованных документах SU 1662469 A1 и RU 2048111 C1 представлены способы консервирования осетровой икры, в которых использованы соединения калия в таких огромных концентрациях, что в икринках сразу же развивается апоптоз, и они погибают. То же справедливо также для соответствующего вышеуказанному документу RU 2232523 C2 документа EP 2868207 B1, причем здесь происходит еще и дополнительная денатурация вследствие нагревания.

Публикация авторов G. E. Bledsoe и др.: "Caviars and Fish Roe Products" ("Икра и продукты из рыбьей икры") (Critical Reviews in Food Science and Nutrition, том 43, № 3, 1 мая 2003, стр. 317-356) описывает, в рамках основополагающего применения нитрата вообще как консерванта для икры крабов, осетров и других рыб, также использование нитрата калия. Но это, как это является обычным при всех процессах консервирования, выполняют при столь высоких концентрациях, что проявляется губительное для клеток действие, которое чувствительно нарушает осмотический баланс и сразу же убивает обработанные икринки. Кроме того, консервируют только незрелые икринки на ранней стадии развития выпотрошенной рыбы, которые, во-первых, нужно механически выскабливать из гонад, примиряясь с повреждениями, и, во-вторых, которые еще не имеют полностью сформированные структуры в созревшей оболочке икринок, так что этот подход для изобретения неприменим.

Из DE 2416685 A известен способ улучшенного сохранения красного цвета при консервировании икры лосося или семги добавлением разрешенных пищевым законодательством добавок в форме цитрата. По завершении способа он остается обнаруживаемым в конечном продукте и изменяет его состав. Применяемые при этом высокие концентрации (от 5 до 10 вес.%) опять же убивают живые икринки сразу же после приведения в контакт. Поскольку применяют только незрелую икру, она может быть промыта водой. В случае зрелой икры образовывалось бы уже упомянутое клейкое гелеобразное покрытие. Замораживание незрелой икры как до, так и после консервирования всегда приводит к повреждению замороженной мембраны икринки и к усиленной потере воды, так как еще не сформированная и нестабилизированная оболочка икринки не может защищать ее. Из JP S63 - 36763 A известен способ снижения концентрации хлорида натрия при консервировании рыбьей икры, чтобы уменьшить соленый привкус. При этом хлорид натрия также заменяют различными соединениями калия. Правда, это опять же осуществляется при столь высоких концентрациях, что икринки, в отношении которых речь идет о незрелой икре, погибают, и уже больше не может происходить никакой обмен веществ. Из JP 2001 - 299 285 A известен способ обработки замороженной в незрелом состоянии икры для улучшения текстуры. При этом икринки промывают при 5°C в течение до 24 ч с использованием содержащих калий химикатов. Подобная длительная продолжительность обработки прерывает любой процесс обмена веществ. Поскольку икра была заморожена без защиты от замерзания, незрелые икринки уже больше не проявляют никакой метаболической активности, и также не способны к созреванию. Поэтому они также неприменимы для заявляемого изобретения. Но представляемый изобретением способ имеет дело не с обусловленными консервированием губительными обесцвечиванием или замораживанием, а с первичным получением икры и икорных продуктов из необработанных зрелых живых икринок. Консервирование или замораживание после обработки живой икры являются для изобретения лишь необязательными дополнительными стадиями. Обесцвечивание полностью исключается, так как оно не требуется.

Из публикации авторов Huang Hui и др.: "Effect of Synthetic Preservatives on Volatile Flavor Compounds in Caviar of Sturgeon" (*Huso dauricus*×*A. schrenckii*) ("Действие синтетических консервантов на летучие вкусо-ароматические соединения в икре осетровых") ([J] FOOD SCIENCE, 2015, том 36 (вып.12): стр. 97-103) известно стремление предотвращать потери вкуса во время хранения охлажденной икры, для чего проводят синтетическое консервирование посредством таких консервантов, как сорбат калия (E202, сорбиновая кислота) и аскорбат (витамин С). При этом был использован сорбат калия в различных тестовых группах с постоянным уровнем 0,5 промилле. Применяли незрелые икринки, которые в результате консервирующей обработки должны получать интенсивный вкус. Сорбат калия действует как задерживающий плесневение и брожение, но также может ухудшать вкус продукта.

Публикация авторов L. Dufresne и др.: "Kinetics of actin assembly attending fertilization or artificial activation of sea urchin eggs" ("Кинетика сопровождающей оплодотворение актиновой сборки или искусственной активации икры морских ежей"), *Experimental Cell Research*, издательство Elsevier, Амстердам, Нидерланды, том 172, № 1, сентябрь 1987 г., стр. 32-42) описывает способность морских ежей к искусственной активации. Хотя настоящее изобретение не имеет дела с обработкой морских ежей, так как они не

имеют надлежащую структуру (оболочку икринок только с двумя слоями), в этом месте следует вкратце остановиться на этой публикации. Во-первых, использована икра морских ежей, которая была добыта впрыскиванием раствора 0,5 М КСl с предельно высокой концентрацией хлорида калия в брюшную полость морского ежа. Вследствие этого на икринку уже было оказано сильное влияние в отношении ее состояния электрической поляризации, и явно изменено естественное содержание калия в цитоплазме. Кроме того, все икринки морского ежа перед обработкой были приведены в контакт с водой и образовали гелевое покрытие, которое затем нужно было механически удалять. Вследствие этого основательно изменены морфологические и физиологические свойства также бесклеточной оболочки икринок. Таким образом, икринки морского ежа вследствие не только их в принципе иной структуры, но и из-за грубого вмешательства в метаболизм действием хлорида калия во время их извлечения, неприменимы в изобретении. Кроме того, не содержащая кальций морская вода не является деионизированной, она содержит на литр, помимо всего прочего, свыше 10 г натрия, 0,43 г калия и 1,3 г магния, и 20 г хлора. Тем самым промывание икринок не содержащей кальций водой также не соответствует промыванию не повреждающим живые, зрелые икринки раствором поваренной соли.

Структура оболочки икринок рыбы икры и икры ракообразных соответствует базовому принципу, и для способа будет описана согласно терминологии, приведенной в публикации авторов Siddique и др.: "A review of the structure of sturgeon egg membranes and of the associated terminology" ("Обзор структуры мембран осетровой икры, и связанная с этим терминология"), (J. Appl. Ichthyol. (2014), стр. 1-10). Чтобы обеспечить согласование понятий, здесь следует вкратце остановиться на этом.

В случае созревших икринок (ооцитах, яйцеклетках) в яичниках животных фолликул, состоящий из гранулезных клеток (также называемых фолликулярными клетками, фолликулярными оболочками, фолликулярным эпителием) и тека-клеток (также называемых внутренней, наружной текой), окружает яйцо, чтобы снабжать его сигнальными и питательными веществами. Между гранулезными клетками и тека-клетками находится еще базальная мембрана (в науке также называемая перифолликулярной мембраной, мембраной, базальной мембраной). Плазма яйца (ооцитоплазма, Oolemma, цитоплазма, внутренность яйца) окружена мембраной яйца (ооцитомембраной, плазматической мембраной PM, клеточной оболочкой яйца). При овуляции икринка отделяется от фолликулярных клеток и выводится в брюшную полость рыбы. Овулированная икринка теперь сохраняет свою образованную во время самого созревания бесклеточную оболочку икринки (в науке также называемую внеклеточным матриксом или внеклеточной мембраной), которая структурно сформирована, снаружи внутрь из альвеолярного слоя AL (в науке также называемого гелевой оболочкой, адгезивным слоем, гелевым покрытием, (второй наружной) желатинозной оболочкой, слоем 3, хорионом (2)), самым наружным слоем бесклеточной оболочки икринки наружной лучистой зоны ZRE (в науке также называемой наружной вителлиновой оболочкой (лучистая зона=вителлиновая оболочка), наружной вителлиновой зоной, наружной вителлиновой мембраной, слоем 2, слоем 2 хориона, Zona Pellucida Externa (латинск.), Zona Radiata Externa (латинск.), слоем 1B оболочки, второй оболочкой), самой наружной части вителлиновой оболочки, лежащей непосредственно под альвеолярным слоем эпитаксиального слоя EP (в науке также называемого эпислойем 1, слоем 4, наружным слоем первой оболочки), который отделяет ZRE от ZRA, имеется не во всех видах икринок внутренней лучистой зоны ZRI (в науке также называемой внутренней вителлиновой оболочкой, внутренней вителлиновой зоной, внутренней вителлиновой мембраной, слоем 1 хориона, Zona Pellucida Interna (латинск.), Zona Radiata Interna (латинск.), слоем 1A оболочки, внутренним слоем первой оболочки), самой внутренней частью вителлиновой оболочки, тесно связанной с ZRA, и перивителлинового пространства (в науке также называемой внеооцитовым матриксом, зазором с выростами микроворсинок цитоплазмы), тонкого пространства между ZRI и мембраной икринки, внутрь которой цитоплазма выпячивает многочисленные микроворсинки (MV).

Живые овулированные яйцеклетки являются электрически возбуждаемыми через ионные каналы, которые локализованы в их клеточной мембране. Изменения электрических свойств клеточной мембраны, помимо всего прочего, создают предпосылку для активации икринки и действуют в оболочке икринки. Новаторские работы в области морских беспозвоночных продемонстрировали ионные токи катионов калия через мембрану икринки, которые вызывают временное изменение потенциала через мембрану (потенциал оплодотворения FP). Этот потенциал генерируется в результате активации временного зависящего от напряжения внутреннего тока внутри икринки. Было показано, что деполяризация мембранного потенциала (RP) обуславливается течением ионов через мембрану икринки (ионный ток (током оплодотворения FC)). Этот ток протекает через отверстия более крупных неспецифических и высокопроводящих ионных каналов, которые могут быть активированы спермой или искусственными химическими или механическими воздействиями. Гипотетические до сих пор модели относительно роли различных ионных каналов и соответствующих ионов показывают видоспецифические различия.

В природных яйцеклетках калий играет центральную роль, сравни публикацию авторов E. Tosti и др.: "Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans" ("Электрические эффекты во время созревания гамет и оплодотворения у животных и людей") (2004 Human Reproduction Update, том 10, стр. 53-65). Калий K^+ представляет собой тот катион, который решающим образом определяет потенциал покоя яйцеклетки. При этом калий⁺-градиент и проницаемость яйца для ионов регули-

руются транспортными белками и ионными каналами. Согласно исследованиям Института имени Альфреда Вегенера, в зрелых неоплодотворенных икринках осетров вида *A. baerii* естественные внутриклеточные концентрации катионов калия составляют 50 ммол/л. Напротив, внеклеточный кальций не оказывает влияния на потенциал покоя/потенциал оплодотворения икринок, и поэтому сам даже не участвует в первой быстрой электрической блокаде (смотри ниже). Ионный состав внутри яйцеклетки отличается от ионного состава внешней окружающей среды. Это разделение между внутренностью клетки и внешней средой должно сохраняться для метаболической активности, и тем самым для выживания клетки. Различное распределение электрических зарядов внутри и снаружи клетки создает электрический градиент через клеточную мембрану, который может быть измерен как разность потенциалов (потенциал покоя).

Сущность изобретения

Исходя из ближайшего к изобретению уровня техники согласно WO 2007/045233 A1, который в плане родового понятия также служит для получения икры и икорных продуктов, задачу настоящего изобретения следует усматривать в таком усовершенствовании описанного там способа на основе живых, неоплодотворенных, зрелых икринок рыб или ракообразных, что может быть достигнуто модифицирование органолептического восприятия в отношении текстуры, вкуса, транспортирования, хранения и глубокого замораживания зрелых икринок. Но при этом должны оставаться неизменными вышеописанные преимущества в отношении получаемых этим способом или иным путем икры или икорных продуктов, которые также заявлены изобретением. Решение этой задачи следует из независимого пункта формулы изобретения. Предпочтительные усовершенствования изобретения указаны в зависимых пунктах формулы изобретения и в описывающих продукты пунктах формулы изобретения, и впоследствии более подробно разъяснены в связи с изобретением.

Заявленный способ получения икры или икорного продукта на основе живых, зрелых икринок рыб или ракообразных согласно изобретению отличается тем, что на стадии воздействия калием в качестве катионного компонента калий растворяют в воде до концентрации, не повреждающей живые, зрелые икринки и не изменяющей естественное содержание калия в них, причем вода перед добавлением донора калия является деионизированной для образования катионного компонента, и имеет не повреждающую живые, зрелые икринки температуру, и что подвергают живые, зрелые икринки обработке в растворе в течение времени воздействия калием до достижения желательной упругой стабилизации оболочки икринок.

В заявленном в изобретении способе применяют живые, зрелые икринки, которые могут быть получены естественным путем, без вреда для рыбы или ракообразного. Живые, зрелые икринки способны к оплодотворению, но находятся в неоплодотворенном состоянии. Овариальная жидкость была удалена предыдущим промыванием не повреждающим живые, зрелые икринки раствором поваренной соли, так что на наружной оболочке не может образоваться клейкий гелевый слой. Кроме того, икринки имеют естественное, не измененное искусственно содержание калия. Используют исключительно эффективные в отношении клеточной физиологии концентрации катионов калия. Живые икринки, которые в случае рыб и ракообразных имеют в оболочке икринки более двух слоев, то есть, три или более слоев, электрически активируют. Исходным продуктом являются живые, зрелые, способные к оплодотворению, но неоплодотворенные икринки, у которых полностью функционирует метаболизм, так что уже при незначительных концентрациях катионов калия, которые не причиняют вреда и также не оставляют никаких следов в икринках, могут действовать процессы транспорта через оболочку икринок и процессы обмена веществ в цитоплазме. Созданные или получаемые этим путем икра или икорные продукты проявляют новую текстуру с благоприятной стабилизированной упругостью посредством нового полупрозрачного внеклеточного слоя (упругого стабилизирующего слоя) в оболочке икринок, который при комнатной температуре несколько размягчается без сокращения стабильности икры. Желательная степень упругой стабилизации может быть без проблем определена собственным испытанием (степень упругости икринок). Вкус является приятным, свежим и пряным, без "рыбного" привкуса. Благодаря чистоте используемых икринок, уже без добавления консервантов, например, запрещенной во многих странах буры, достигают длительного срока годности (от 9 до 12 месяцев) при стандартных температурах между -2°C и -4°C. Обработанные заявленным способом икринки к тому же могут быть однократно заморожены без потери качества, благодаря чему получают огромные преимущества в отношении хранения и транспортирования, сравни дополнительно приведенное ниже.

В результате соответствующего изобретению приведения в контакт живых, зрелых икринок с катионами калия (K^+) в физиологической, то есть, безвредной для клеток концентрации, икринки в рамках электрических эффектов изменяются, и инициируется так называемая "первая реакция", которая за кратчайшее время (в диапазоне от секунд до минут) приводит к электрически индуцированному устранению клейкости при контакте с водой, и при последующем ходе обработки обуславливает образование нового, упругого стабилизирующего слоя внутри оболочки икринок. Этот новый стабилизирующий слой придает оболочке икринок упругость, так что согласно изобретению уже к этому моменту времени икра или икорный продукт имеют наивысшее качество, так что они могут быть подвергнуты обработке в необязательных технологических стадиях, в частности, консервирования и глубокого замораживания (при -18°C), без потери качества.

Активация икринок включает и проходит целую серию клеточно-биологических каскадов. Используемая в WO 2007/045233 A1 "вторая (медленная) реакция" (медленная блокада) с кортикальной реакцией сопровождается там кальций-зависимой ферментативной активацией для усиления и, наконец, для существенной структурной перестройки оболочки икринки в результате необратимого сшивания тирозином белковых цепей в *Zona Radiata Interna* и *Zona Radiata Externa*. В природе тем самым подготавливается первое деление клетки для развития эмбриона. Напротив, используемая в настоящем изобретении "первая (быстрая) реакция" (быстрая блокада, электрическая блокада, быстрая электрическая блокада) с последующими деполяризацией/гиперполяризацией и их непрерывностью с различной продолжительностью в зависимости от вида животного происходит в начале всех клеточно-биологических каскадов. Оба процесса явственно различаются в зависимости от применяемых веществ, а именно, А) катионов калия для быстрого электрического блокирования с деполяризацией оболочки икринки и обусловленных этим активации икринки и образования отдельной, дополнительной, новой зоны в оболочке икринки (образования упругого структурированного слоя), и В) катионов кальция для медленного механического блокирования с ферментативно управляемой морфологической перестройкой в существующих слоях оболочки икринки (образования структурного стабилизирующего слоя).

Первое электрическое событие (акт) представляет собой быструю деполяризацию или даже гиперполяризацию в пределах миллисекунд, и в природе после оплодотворения должно предотвращать присоединение дополнительных сперматозоидов. Быстрая гиперполяризация сменяется постоянной гиперполяризацией в пределах последующего времени до 60 мин (у некоторых видов водных животных, например, таких как омар, даже до 5 ч). Оставшиеся в окружении икринки спермии хоть и могут после быстрой электрической блокады еще прикрепляться и фиксироваться в вителлиновой мембране оболочки икринки (мягкой оболочке), но не могут проникнуть через клеточную мембрану для плазмы икринки для фактического оплодотворения, как это удалось показать на моллюсках. При продолжении воздействия катионов калия согласно заявленному изобретением способу у живой, способной к оплодотворению, но неоплодотворенной и зрелой икринки наблюдается образование до сих пор в литературе неизвестной, совершенно новой, полупрозрачной (просвечивающей, стекловидной, гелеобразной) зоны (упругого стабилизирующего слоя), которая является GAG-положительной (возрастающее появление глюкозаминогликанов) и эозинофильной (окрашиваемой красным, кислотным диагностическим красителем эозином) для визуализации клеточных органелл, белков плазмы, соединительной ткани и их предстаций, в которой застревали бы спермии. Образование этого упругого стабилизирующего слоя происходит в течение постоянной гиперполяризации за 10 с сначала в отдельных областях в пределах оболочки икринки, и после завершения он находится между *Zona Radiata Externa* и альвеолярным слоем у живых икринок со структурной конфигурацией, как у рыб и ракообразных (по меньшей мере два слоя в оболочке икринки). Причина формирования нового упругого стабилизирующего слоя видится в непрерывной деполяризации оболочки икринки в результате соответствующей изобретению подачи катионов калия в физиологической концентрации.

Согласно правилам стран-участниц Европейского союза (EU) в отношении пищевых добавок для целей питания разрешено применение только указанных там соединений калия, например, таких как бикарбонат калия (гидрокарбонат калия, KHCO_3) (CAS-№ 298-14-6), карбонат калия (K_2CO_3) (CAS-№ 584-08-7), цитрат калия (CAS-№ 6100-05-6), гидроксид калия (KOH) (CAS-№ 1310-58-3), хлорид калия (KCl) (CAS-№ 7447-40-7), К, иодид калия (KI) (CAS-№ 7681-11-0), иодат калия (KIO_3) (CAS-№ 7758-05-6). Эти соединения могут быть также добавлены к пищевым продуктам согласно проекту правил Европейского парламента и Совета от 10.11.2003 года (окончательно КОМ (2003) 671). К продуктам питания для технологических целей также могут быть добавлены определенные соединения калия, например, такие как цитрат калия (E 332), лактат калия (E 326), ортофосфат калия (E 340). Соответствующим изобретением способом обработки живых, зрелых икринок рыб или ракообразных катионами калия в приемлемых для клеток концентрациях (физиологических концентрациях, то есть, не повреждающих икринку) и без образования остатков могут быть созданы икра или икорные продукты, которые удовлетворяют всем национальным и международным требованиям органов власти, торговых организаций и потребителей к качеству. Исследования концентраций внутриклеточных ионов с использованием оптической эмиссионной спектроскопии (OES) в цитоплазме икринок в Институте имени Альфреда Вегенера, в которых калий использовали как новое вещество для постоянной деполяризации наружной оболочки икринки, не показали изменений концентрации в плазме икринок после обработки даже при различных применяемых концентрациях и длительностях времени обработки. Тем самым используемые в соответствующем изобретении способе катионы калия однозначно считаются техническим вспомогательным веществом. Техническое вспомогательное вещество применяют при промышленной обработке и получении пищевых продуктов. В отношении технических вспомогательных веществ речь идет о пищевых добавках, которые добавляют, чтобы облегчить технологические процессы, например, такие как резка и фильтрация. Однако в конечном продукте технические вспомогательные вещества совершенно не должны содержаться, или присутствовать только в неизбежных (незначительных) остаточных количествах. В отличие от модифицированных пищевых добавок, которые также должны быть декларированы на упаковке, технические вспомогательные вещества уже не могут проявлять никакого действия в конечном продукте, что

является особенным преимуществом. Их применение должно быть технически неминуемым, не влияющим на технологический режим, не вызывающим опасений в отношении здоровья, а также безвредным для запаха и вкуса. Поскольку вещества в обработанных пищевых продуктах уже не присутствуют или не проявляют своего действия, их применение не должно быть маркировано. Это также справедливо для остатков, реакционных продуктов или остаточного содержания.

Особенно предпочтительным и благоприятным является, когда в качестве донора калия для образования катионного компонента растворяют в воде по меньшей мере одну соль калия, предпочтительно соль лимонной кислоты (цитрат калия E332), и/или соль соляной кислоты (хлорид калия E508), и/или соль сорбиновой кислоты (сорбат калия E202). Под донором калия подразумевают соединение, которое после его растворения в воде поставляет катионы калия, причем их концентрацию регулируют посредством концентрации данного соединения калия в воде и сообразно его структурной формуле. Даже все указанные соли калия являются допустимыми как пищевые добавки с E-номерами, хотя их согласно изобретению используют только как технические вспомогательные вещества, которые уже больше не содержатся в конечном продукте, и не подлежат извещению. Особенно благоприятная и предпочтительная концентрация катионов калия в растворе с использованием предварительно деионизированной воды, согласно следующей модификации способа, составляет величину между 0,1 и 3,0 ммол/л, предпочтительно 0,1 ммол/л, 0,5 ммол/л, 0,65 ммол/л, 1,6 ммол/л, или 2,0 ммол/л, особенно предпочтительно 0,1 ммол/л и 1,5 ммол/л. При этом во всех приведенных в рамках этого изобретения диапазонах значений (также других параметров) всегда учитывают все краевые и промежуточные значения (целочисленные и нецелочисленные). Чтобы могли быть получены указанные концентрации катионов калия в воде, она должна быть деионизированной. Но поскольку в воде постоянно происходит также диссоциация молекул воды, понятно, что осуществимая степень деионизации может быть достигнута только техническими средствами (электропроводность в воде между 1 мкСм и 15 мкСм при 25°C как мера достижимой деионизации).

Кроме того, продолжительность воздействия калием на стадии воздействия калием предпочтительно и благоприятно составляет величину между 5 и 30 мин, предпочтительно в течение 10 мин, 12 мин, 15 мин, 20 мин или 25 мин. Но могут быть выбраны также другие длительности воздействия калием. При обработке зрелых икринок омара (ракообразного) продолжительности воздействия могут достигать до 50 мин или более. Формирование нового упругого стабилизирующего слоя, который уплотняет оболочку икринок, начинается уже через несколько секунд (до 10 с) после начала обработки. Но поскольку не все икринки одновременно реагируют при постоянной деполяризации и с образованием стабилизирующего слоя в частичных областях поверхности оболочки икринок, рекомендуется более продолжительное время обработки до 10 мин для достижения постоянной деполяризации во всех обрабатываемых икринках. С увеличением продолжительности обработки она перемещается наружу, и, наконец, локализуется между *Zona Radiata Externa* и альвеолярным слоем во всей оболочке икринок вокруг икринок. Тем самым живые, зрелые икринки единообразно достигают упругой стабилизации так, что они без проблем могут быть засолены, упакованы и подвергнуты глубокому замораживанию.

В качестве дополнительной необязательной модификации в заявленном изобретении способе может быть дополнительно предусмотрена стадия воздействия кальцием, которая может быть проведена после выполнения стадии воздействия калием, или же может быть проведена как предшествующая ей. Обусловленные этим в каждом случае изменения на оболочке икринок в обеих последовательностях происходят независимо друг от друга в отношении их описываемых характеристик. На стадии воздействия кальцием предпочтительно и благоприятным образом кальций растворяют в воде с образованием другого раствора кальция как катионного компонента, при не повреждающей живые, зрелые икринки (то есть, физиологической) концентрации, причем вода перед добавлением донора кальция для образования катионного компонента является деионизированной. Живые, зрелые икринки на стадии воздействия кальцием подвергают обработке так долго, пока не будет достигнута желательная структурная стабилизация оболочки икринок. Желательная степень структурной стабилизации может быть без проблем определена собственным испытанием (степени эффекта лопания икры). На стадии воздействия кальцием предпочтительно и благоприятным образом в качестве донора кальция (поставщика кальция, определение смотри, как для донора калия) применяют по меньшей мере одну соль кальция, предпочтительно цитрат кальция, хлорид кальция и/или сорбат кальция. Соли кальция в качестве пищевых добавок разрешены в Европейском союзе под номерами E333 и E509, без ограничения наибольшего количества, и E203 с ограничением наибольшего количества. Для лучшей различимости добавки обоих видов ионов были выбраны орфографические формы "калий" и "кальций" (не Kalzium).

Кальций физиологически уже находится в яйцеклетке и является существенной составной частью клеточного метаболизма. Из уже приведенного выше документа WO 2007/045233 A1 известно применение хлорида кальция, и тем самым достижение структурного упрочнения оболочки икринок в результате необратимого сшивания белков встраиванием молекул тирозина. Дополнительно к принципиально достигаемой в изобретении улучшенной и регулируемой упругости оболочки икринок, она может быть еще и структурно упрочнена механически проведением стадии воздействия кальцием. Тем самым может быть достигнута оптимальная стабилизирующая комбинация для определенных сортов икры и замените-

лей икры. В частности, это является благоприятным в случае очень крупных нестабильных икринок (более 3,2 мм в диаметре, например, икры белуги как осетровой породы, или белого осетра), или у таких, которые являются особенно мягкими в зрелом состоянии (при максимальной силе, меньшей или равной 0,3 Н до разрыва в испытании прочности, например, икры стерляди как осетровой породы). При этом в результате применения обеих стадий обработки получают качественно очень высокоценную икру или икорные продукты без создающих проблемы (в отношении размера, мягкости) икринок.

Благоприятным образом и предпочтительно концентрация катионов кальция в другом растворе составляет между 0,1 ммол/л и 3,0 ммол/л, предпочтительно 0,1 ммол/л, 0,5 ммол/л, 0,8 ммол/л, 1,0 ммол/л, 1,5 ммол/л, 1,6 ммол/л или 2,0 ммол/л. При этом продолжительность обработки кальцием предпочтительно составляет время между 9 и 30 мин, предпочтительно в течение 10 мин, 12,5 мин, 15 мин, 16 мин, 20 мин или 25 мин. При выборе продолжительности обработки следует учитывать, что прочность оболочки икринки постоянно возрастает с увеличением длительности воздействия кальцием вплоть до предельного значения. В природе у оплодотворенных икринок рыб сильно затвердевшая оболочка икринки достигается спустя примерно 60 мин так, что она уже становится непригодной для питания. У омара это может длиться до 24 ч.

Существенным технологическим параметром для заявленного изобретением способа является температура растворов, в которых обрабатывают зрелые икринки. Она должна быть физиологической, то есть, она не препятствует естественным процессам в живых икринках. В заявленном способе температура растворов всегда составляет величину в диапазоне естественной температуры икры рыб или ракообразных. Тем самым обеспечивается то, что надежно происходит вызванная на стадии обработки калием электрическая активация оболочки икринки с начинающейся с потенциала покоя деполяризацией. При неестественных температурах икры, например, у рыб или ракообразных из полярных областей, выше 15°C, напротив, электрическая активация не происходит, и живые зрелые икринки не могут быть стабилизированы электрически или ферментативно. Они являются атретическими. Аналогичное справедливо для икринок рыб или ракообразных из зон с умеренным и тропическим климатом. В принципе действительно, что при температурах растворов выше 35°C икринки вследствие дегенерации претерпевают сильные потери качества.

Для согласования температур растворов с условиями естественной среды, в настоящем изобретении области обитания рыб и ракообразных во время периодов естественного размножения, в которые могут быть использованы живые, зрелые икринки, грубо подразделены на три климатических зоны: полярные зоны (у полюсов), умеренные зоны (между полярными зонами и тропической зоной), тропическую зону (у экватора). В настоящем изобретении предпочтительно и благоприятным образом предусмотрено, что температура одного раствора (при обработке калием) и/или другого раствора (при обработке кальцием) в диапазоне температур полярной области принята как величина между 1°C и 15°C, предпочтительно между 5°C и 12°C, особенно предпочтительно 10°C, в диапазоне температур умеренной области принята как величина между 10 и 20°C, предпочтительно 15°C, особенно предпочтительно 12°C, или в диапазоне температур тропической области между 20°C и 29°C, предпочтительно 27°C, особенно предпочтительно 21°C. Температуры, которые приводят к изменению - дегенерации, гибели клеток - икринок, например, такие, какие имеют место при пастеризации нагреванием при температурах выше 40°C, в изобретении не допускаются в любой момент времени исполнения способа.

Поскольку при применяемых в способе согласно изобретению концентрациях катионов возбуждаются специфические для пород животных физиологические реакции электрической (воздействие катионов калия) и метаболической (воздействие катионов кальция) природы, и тем самым влияют на переработку с образованием стабильного пригодного для питания конечного продукта, всегда необходимо исходить из деионизированной воды в растворе, чтобы достигать точной концентрации электрически (при воздействии катионов калия) и метаболически (при воздействии катионов кальция) активных катионов (положительно заряженных). Поэтому технически достижимо и тем самым предпочтительно или благоприятно, когда деионизированная вода при 25°C имеет удельную электрическую проводимость между 1 мкСм/см и 15 мкСм/см, предпочтительно 10 мкСм/см или ниже, особенно предпочтительно 1 мкСм/см. Питьевая и артезианская вода в зависимости от региональных источников имеет весьма переменное содержание различных ионов, которые по обстоятельствам могут проявлять даже противоположные действия на клеточный метаболизм. При температуре 25°C удельная электрическая проводимость, например, самой чистой воды составляет 0,055 мкСм/см, деионизированной воды 1 мкСм/см, дождевой воды 50 мкСм/см или питьевой воды 500 мкСм/см. Для возможности получения воспроизводимых результатов при осуществлении заявленного способа важно знать электрическую проводимость деионизированной воды.

Поскольку заявленным в изобретении способом обрабатывают живые клетки в форме активируемых зрелых яйцеклеток, то, помимо всего прочего, также важно, чтобы растворы были согласованы с метаболизмом клеток, тем самым могут протекать также индуцированные при исполнении способа процессы обмена веществ. Поэтому является благоприятным и предпочтительным, когда один и/или другой раствор имеет (физиологическое, не вредящее живому организму) значение рН между 6,8 и 8,0, предпочтительно между 7,0 и 7,9, особенно предпочтительно 7,2, или 7,4, или 7,5. В частности, установленное в

растворе значение рН является важным для медленной метаболической реакции на стадии обработки кальцием. Поскольку ферментативные процессы в клетке в значительной мере регулируются величиной рН, также было исследовано внутриклеточное значение рН на стадии обработки калием (электрический процесс). Но значение рН в цитоплазме икринок, обработанных различными содержащими калий веществами при различных концентрациях и с различной продолжительностью, остается по существу неизменным при оптимальной величине рН между 7 и 8, и проявляет ожидаемые индивидуальные различия у отдельных рыб и ракообразных.

Согласно изобретению различные стадии воздействия служат для эндогенной стабилизации (упругой и, необязательно, структурной) оболочки икринки живых, зрелых икринок. Тем самым икра или икорный продукт уже готовы для дальнейшей переработки, такой как засолка и упаковка. Во время овуляции живые, зрелые овулированные икринки выдавливаются из фолликулярных клеток так, что больше не налипают никакие тканевые остатки кровеносных сосудов или остатки фолликулярных клеток, на которых могли бы поселиться бактерии или грибы. Поэтому собранные икринки имеют высокую чистоту, и тем самым лучшие предпосылки для длительной сохранности. Это надежно обеспечивается, когда затем на проводимой в последнюю очередь стадии обработки для консервирования и интенсификации вкуса выполняют умеренное подсаживание хлоридом натрия в количестве, относительно количества икры или икорного продукта, от 2,0 до 3,8%, предпочтительно 3,5%. При этом хлорид натрия не должен содержать доноры калия и кальция, например, такие, как содержащиеся в средствах против комкования, так как тем самым предотвращается неконтролируемое изменение оболочки икринки обрабатываемых икринок при посоле. В случае икры из икринок осетровых пород проводят сухой посол с простой поваренной солью (хлоридом натрия NaCl), тогда как мокрый посол часто выполняют при переработке икры других пород рыбы для получения икорных продуктов, таких как икра лососевых и форели. Проводимый согласно изобретению посол в указанном диапазоне представляет собой совершенно легкое подсаживание, которое также называется "малосольным" и является однозначным признаком высокого качества. Пастеризация или нагревание при температуре 60°C и выше для заявленных изобретением икры или икорного продукта полностью исключены, так как это не нужно, и только ухудшало бы качество продукта и его органолептические свойства. Малосольной обработкой при посоле полученных заявленным способом икры или икорных продуктов обеспечивают минимальный срок годности при хранении при -2°C по меньшей мере от 9 до 12 месяцев. При этом благодаря лишь легкому подсаживанию они не замерзают.

Дополнительное улучшение качества полученной икры или икорного продукта согласно изобретению достигают, когда согласно дополнительной модификации сразу после консервирования и интенсификации вкуса предпочтительно и благоприятным образом проводят хранение икры или икорного продукта в закрытых непроницаемо для воздуха стеклянных сосудах в течение нескольких месяцев, предпочтительно от одного до трех месяцев. В результате хранения икра "дозревает", и, в зависимости от степени зрелости, приобретает интенсивный вкус. Но это дозревание следует рассматривать в смысле дополнительного усовершенствования во вкусовом отношении (например, как в случае сыра), и не имеет ничего общего со "степенью зрелости" используемой в изобретении зрелой икры в смысле биологического развития. Здесь зрелость относится к пригодности для оплодотворения, и тем самым к состоянию развития живых икринок. При дозревании во вкусовом отношении хранение проводят в стеклянных сосудах, которые оставляют икре достаточно пространства для созревания, поскольку она не является сдавленной (как при упаковке в металлические консервные банки с надеваемой сверху крышкой), и тем самым сохраняет свои интенсифицирующие вкус масла. Упакованную таким образом в стекло икру согласно изобретению не следует путать с пастеризованной икрой, которую тоже часто упаковывают в стекло. Кроме того, при хранении в экологически благоприятных стеклянных сосудах предотвращают часто критикуемый металлический привкус традиционно упакованной в металлические банки икры.

Согласно следующей модификации способа, является предпочтительным и благоприятным, когда после консервирования и интенсификации вкуса или хранения и дозревания во вкусовом отношении проводят замораживание икры или икорного продукта при температуре в диапазоне между -20°C и -15°C, предпочтительно при -18°C. В идеальном случае икра созревает во вкусовом отношении для потребления человеком до желательной для данного потребителя степени зрелости, и ее замораживают либо свежей после 14 дней после получения, либо после максимально 3-4 месяцев созревания. Икру замораживают либо в 500-граммовых стеклянных сосудах перед помещением во внешнюю тару, либо после помещения во внешнюю тару для конечных потребителей в стеклотару по 30 г, 50 г, 125 г, 250 г или 500 г (при необходимости, до 1000 г), которые могут быть вакуумированы. Полученную традиционным способом икру замораживать нельзя. Хотя пастеризованная или подвергнутая нагреванию икра может быть заморожена, однако она проявляет предельное ухудшение качества вследствие тепловой обработки. Благодаря возможности замораживания икры или икорного продукта согласно изобретению может быть обеспечена оптимальная подготовка к продаже икры, которая соответствует современным требованиям в отношении готовых к употреблению продуктов. Подготовка к продаже вследствие специфических, точно выдерживаемых температур при перевозке и хранении от -2°C до -4°C до сих пор сталкивается с ограничениями, так как большинство провайдеров не соблюдает их. Поэтому традиционно полученную икру обрабатывают сомнительными консервантами, например, такими как бура, или пастеризуют, чтобы сде-

лать возможной ее сохранение в течение по меньшей мере периода времени 12 месяцев или дольше. Между тем, полученная согласно настоящему изобретению икра может быть простым путем заморожена, и тем самым храниться и оставаться свежей на протяжении более длительного периода времени. Испытания показали, что медленно оттаивающая при температуре от +4°C до +7°C в холодильнике икра не проявляет никаких потерь вкуса или изменений текстуры.

Обработку икринок согласно изобретению проводят в ванне с раствором (водным раствором, раствором в воде). Прибавляют икринки и выдерживают в ванне с раствором в течение такого времени, пока в зависимости от применяемого вида икры не будет достигнута желательная степень стабилизации (упругой и, по обстоятельствам, структурной). Затем икринки просто извлекают из ванны. Чтобы после извлечения надежно избежать нежелательной дальнейшей стабилизации катионами в еще налипшем растворе, согласно дополнительной модификации способа является предпочтительным и благоприятным, когда после достижения желательной упругой (и, необязательно, структурной) стабилизации для удаления со зрелых икринок соответствующих внесенных катионов проводят погружение (кратковременное окунание) живых, зрелых икринок в не повреждающий их раствор поваренной соли (физиологический раствор поваренной соли). В результате этого смывают катионы, и сразу же прекращают обусловленные ими процессы стабилизации. Достигнутую до этого (желательную) степень стабилизации оболочки икринок надежно получают как конечное состояние.

Применяемые согласно изобретению живые, зрелые икринки способны к оплодотворению, но не являются оплодотворенными. Кроме того, они не смочены водой и имеют естественное содержание калия в цитоплазме. Подобные живые икринки могут быть выведены либо из гонад в брюшной полости рыбы, и оттуда собраны через половое отверстие. Например, это может быть выполнено естественным икротетанием, выдавливанием (массажем брюшной полости снаружи) или применением катетера, через который икринки вытекают или отсасываются из брюшной полости. В отношении извлеченных из гонад в брюшной полости икринок говорят о овулированных икринках (5-ой степени зрелости), которые еще окружены слизистой овуляционной жидкостью. Чтобы предотвратить образование клейкого слоя на икринках при контакте с водой, овуляционную жидкость перед началом обработки смывают физиологическим раствором поваренной соли. Овулированные икринки могут быть получены у живого животного, что является особенно продолжительным. Но согласно изобретению также могут быть использованы живые, зрелые икринки 3-ей или 4-ой степени зрелости, которые еще извлекают из гонад убитого животного, и затем сортируют. Хороший обзор различных степеней зрелости у трески приведен в публикации авторов I.G. Katsiadaki и др.: "Assessment of quality of cod roes an relationship between quality and maturity stage" ("Оценка качества тресковой икры и взаимосвязь между качеством и степенью зрелости") (J. Sci Food Agric, том 79: стр. 1249-1259 (1999)), в частности, там в табл. 1. Численное определение степени зрелости может быть сделано с помощью так называемого "коэффициента поляризации". Его рассчитывают из отношения расстояния между ядром клетки и клеточной мембраной к диаметру яйцеклетки между анимальным и вегетативным полюсом (большая полуось). Поэтому согласно следующему варианту осуществления изобретения, является предпочтительным и благоприятным, когда обрабатывают живые, зрелые икринки рыб или ракообразных с коэффициентом PI поляризации $0,05 \leq PI \leq 0,15$, предпочтительно $0,05 \leq PI \leq 0,12$. Икринки с этим PI являются особенно пригодными для сбора для обработки согласно изобретению. Более подробную информацию о коэффициенте PI поляризации икринок можно найти, например, в директивах для разведения осетров (публикация FAO Ankara 2011, Технический документ 570 по рыболовству и аквакультуре (Fisheries and Aquaculture Technical Paper 570 "Sturgeon Hatchery Practises and Management for Release -Guidelines" ("Практика и управление разведения осетров для выпуска - инструкции"))).

Заявленным в изобретении способом могут быть обработаны живые, зрелые икринки рыб и ракообразных (научное наименование Crustacea), икринки которых имеют необходимую для изобретения основную структуру (более двух слоев в оболочке икринки), и пригодны для потребления в форме икры или икорных продуктов. Предпочтительно и благоприятно могут быть обработаны живые, зрелые икринки рыб и ракообразных из выловленных диких животных или из выращенных в условиях аквакультуры, которые были получены в овулированном состоянии выдавливанием или другим способом целевого сбора, например, с использованием катетера. При этом, например, сбор также может быть выполнен из таких животных, которые предусмотрены для повторного выпуска на свободу в природу, например, в рамках проекта пополнения запасов. Тогда выручка от продажи икры и икорных продуктов может быть опять направлена на меры по насаду рыбной молоди. Особенно предпочтительным и благоприятным является, когда в заявленном способе подвергают обработке живые зрелые икринки от современных и древних костистых рыб, предпочтительно от живых осетровых. Тогда этим способом может быть получена (подлинная) икра высшего качества. Но заявленным способом согласно изобретению также могут быть получены высококачественные икорные продукты от омара или других ракообразных, например, речного рака. Кроме того, предпочтительно и благоприятно могут быть обработаны очень крупные (с диаметром более 3,2 мм) или мягкие, нестабильные икринки (с текстурой в испытании твердости ниже 0,3 Н, с разрыванием при большем значении), так как заявленный в настоящем изобретении способ не-

обязательно также может включать две стадии воздействия как для упругой (электрически стимулированной), так и структурной (ферментативно стимулированной) стабилизацией оболочки икринки.

Наконец, согласно изобретению заявлены также различные продукты из живых, зрелых икринок рыб или ракообразных, которые могут быть получены заявленным способом, но также другими способами. Продукты типично отличаются тем, что в оболочке икринки дополнительно формируют упругий стабилизирующий слой в форме эозинофильного, полупрозрачного слоя со встроенными глюкозаминогликанами. Но при этом живая икринка является неоплодотворенной, сообразно чему упругий стабилизирующий слой в природе не возникает. Согласно изобретению, упругий стабилизирующий слой находится между Zona Radiata Interna и альвеолярным слоем, предпочтительно между Zona Radiata Externa и альвеолярным слоем. То есть, он может возникать только у живых икринок с более чем двухслойной структурой оболочки икринки. Например, морские ежи имеют только ровно два слоя в оболочке икринки. Новый стабилизирующий слой является прозрачным, сформирован гелеобразным и упругим, и может быть окрашен эозином в красный цвет и альцианом в синий при гистологическом определении. При получении заявленным в изобретении способом на его проявление влияет используемая концентрация катиона калия на стадии воздействия калием, на его положение влияет продолжительность воздействия калием.

Для удаления овариальной жидкости живые зрелые икринки перед обработкой подвергают обработке не повреждающим икринки раствором поваренной соли. При этом речь предпочтительно и благоприятно идет о физиологическом растворе поваренной соли. Кроме того, является благоприятным и предпочтительным, когда раствор поваренной соли образован как раствор поваренной соли с концентрацией от 0,6-процентной до 1,0-процентной, особенно предпочтительно как 0,9-процентный раствор поваренной соли. Для получения 0,9-процентного раствора поваренной соли 9 г хлорида натрия (NaCl) растворяют в 1 л применяемой воды. Эта концентрация соответствует естественному уровню в человеческом организме, поэтому раствор поваренной соли и называют "физиологическим".

Кроме того, заявлены икра или икорный продукт из неоплодотворенных, зрелых икринок от водных животных, которые отличаются тем, в оболочке икринки дополнительно проводят необратимое сшивание белковых цепей встраиванием молекул тирозина. При этом такое дополнительное необратимое сшивание локализовано в Zona Radiata Interna и Zona Radiata Externa живых икринок рыб или ракообразных. Необратимое сшивание приводит к дополнительной структурной стабилизации оболочки икринки. Вместе с имеющейся упругой стабилизацией тем самым могут быть обработаны также особенно крупные или мягкие икринки. Икра или икорный продукт могут быть получены заявленным способом, причем степень структурной стабилизации в оболочке икринки тогда зависит от продолжительности воздействия кальцием и концентрации катионов кальция на стадии воздействия кальцием. Также применимы другие способы получения икры или икорного продукта с таким же проявлением необратимого сшивания белков в оболочке икринки. Дополнительные варианты исполнения заявленного в изобретении способа и продукты могут быть заимствованы из нижеследующей специальной описательной части к примерам исполнения.

Примеры осуществления изобретения

Далее более обстоятельно разъяснены способ получения икры или икорного продукта из живых, зрелых икринок водных животных, и подобные продукты согласно изобретению, и их предпочтительные модификации, для дополнительного понимания изобретения на примерах осуществления и посредством фигур. Как при этом показано,

Фиг. 1А, В, С представляют полученные в растровом электронном микроскопе (REM) фотографии для сравнения полученных живых икринок в незрелом и в зрелом состоянии (согласно уровню техники),

Фиг. 2 представляет первую таблицу измерений толщины оболочки икринки при обработке живых, зрелых икринок сибирского осетра,

Фиг. 3 представляет вторую таблицу измерений толщины оболочки икринки при обработке живых, зрелых икринок белуги семейства осетровых,

Фиг. 4А, В, С, D представляют REM-фотографии циклов обработки для образования стабилизирующего слоя по-разному обработанных живых, зрелых икринок осетра способом обработки катионами калия, в сравнении с двойной обработкой катионами калия и кальция, также только катионами кальция,

Фиг. 5А, В, С, D представляют полученные в трансмиссионном электронном микроскопе (ТЕМ) фотографии формирования слоев оболочки икринки с образованием нового стабилизирующего слоя (SS) между Zona Radiata Externa (ZRE) и альвеолярным слоем (AL),

Фиг. 6А, В, С, D представляют ТЕМ-фотографии кортикальных гранул и по-разному (только катионами калия, двойной обработкой катионами калия и кальция, только катионами кальция) обработанных зрелых икринок осетра,

Фиг. 7А, В, С, D представляют полученные с использованием оптического микроскопа фотографии необработанных зрелых икринок сибирского осетра и обработанных ионами калия живых, зрелых икринок сибирского осетра,

Фиг. 8А, В, С, D представляют полученные с использованием оптического микроскопа фотографии обработанных катионами кальция живых, зрелых икринок, и обработанных катионами калия и катионами кальция живых, зрелых икринок сибирского осетра, и

Фиг. 9А, В представляют полученные с использованием REM- и оптического микроскопа фотографии строения оболочки икринки белуги семейства осетровых после обработки живых, зрелых икринок катионами калия и кальция.

Из исследований соотношений между весом и, соответственно, возрастом осетров и размером икринок и, соответственно, количеством собранной икры, известно, что с увеличением веса и, соответственно, возраста осетра возрастает диаметр икринок, и тем самым качество икры. Кроме того, с увеличением веса и, соответственно, возраста осетра возрастает количество собранной икры, и тем самым экономический успех. Осетры в природных условиях впервые достигают половой зрелости, в зависимости от вида, лишь к 12-26 годам. Фазу роста до первого репродуктивного возраста многие осетровых проводят в море или в эстуариях, и затем мигрируют в реки, чтобы найти свои области нереста на каменистом грунте в пресной воде. Но в аквакультуре также осетрам требуются от около 5 до 16 лет, в зависимости от вида осетровых, до первой половой зрелости, и тем самым до первого сбора икры. Повторяющийся сбор икры в аквакультуре у живых самок в течение многих лет предполагает бережное обращение с рыбами с оптимальным откармливанием и низким поголовьем на единицу площади, и вследствие позднего полового созревания и длительной продолжительности жизни всегда является экономически и экологически целесообразным. Производство икры в экономически интересном диапазоне в тоннах является легко достижимым при координированном технологическом режиме сбора и обработки выделенных икринок с образованием икры. Подходящими мерами масштабирования может быть достигнута ежедневная добыча до 80 кг или более, в зависимости от возраста рыб и тем самым связанного с этим количества икры.

В заявленном способе применяют живые, зрелые икринки, которые до этого были очищены раствором поваренной соли. При этом речь идет тогда об овулированных икринках, которые перед этим, соответственно их стадии зрелости (стадии готовности к овуляции и способности к оплодотворению), тонкими мышечными волокнами фолликулярных клеток были выдавлены из гонад, в процессе, который называется овуляцией. Овулированные икринки выводятся в яйцеводы и брюшную полость без остатков клеток и других остатков. Оттуда они могут затем выдавлены массажем живота, без ущерба для жизни рыбы. Полностью очищенная поверхность икринок не оставляет никаких ниш и складок для поражения бактериями или грибами, благодаря чему достигают высокой сохраняемости икры или икорного продукта. Применение способов консервирования, например, с использованием буры, которая является вредной для здоровья человека, не требуется. На фиг. 1А, В, С представлены полученные с использованием растровой электронной микроскопии (REM) фотографии живой икринки и процесса овуляции согласно уровню техники. Фиг. 1А показывает незрелую яйцеклетку с фолликулярной клеткой, какие встречаются в традиционной икре от убитого осетра. Фиг. 1В показывает *in-situ* овуляцию и выведение зрелой яйцеклетки из окружающей ее фолликулярной клетки. Затем фиг. 1С показывает живую, зрелую икринку осетра, которая на вид является полностью гладкой и чистой.

Далее на одном примере исполнения с живыми, зрелыми икринками после овуляции более подробно разъясняется возможная последовательность стадий заявленного способа с некоторыми необязательными дополнительными стадиями:

извлечение из живых самок осетра живых икринок в стадии V зрелости после лизиса терминальных везикул,

немедленный перенос извлеченных живых икринок вместе с овариальной жидкостью в лабораторию для обработки икры (с всемерным избеганием простоев, при неизбежных перерывах в действиях с икринками обеспечивают исключение доступа кислорода покрыванием овариальной жидкости воздухо-непроницаемой полимерной пленкой),

непосредственное основательное промывание живых икринок 0,9-процентным физиологическим раствором поваренной соли, вплоть до полного удаления овариальной жидкости,

проведение стадии воздействия калием:

получение от 0,1 - до 2-миллимолярного раствора катионов калия из цитрата калия в деионизированной воде с удельной проводимостью 10 мкСм/см (при 25°C) при температуре полярной области 10°C,

помещение живых, зрелых икринок в раствор в течение 10 минут продолжительности воздействия калием, и

извлечение обработанных икринок из раствора, и

кратковременное погружение обработанных икринок в 0,9-процентный физиологический раствор поваренной соли.

Также возможны другие способы получения зрелых икринок. При применении живых, зрелых икринок от убитого перед этим животного также должны быть смыты кровь и жир, или икринки даже еще выдавлены из гонад, чего достигают предварительной обработкой предпочтительно физиологическим раствором поваренной соли. Посредством погружения можно дополнительно контролировать упругость и диаметр стабилизирующего слоя (то есть, наряду с выбором продолжительности воздействия). В результате описываемой обработки в живых икринках вследствие электрического влияния введенных катионов калия образуется полупрозрачный, упругий стабилизирующий слой между *Zona Radiata Externa* и альвеолярным слоем в оболочке икринки. Для икринок с нормальными величинами и мягкостью доста-

точной является обработка на стадии воздействия калием. Но если применяют особенно крупные, мягкие или чувствительные икринки некоторых осетровых пород, например, *Huso huso*, *Acipenser transmontanus* или *Acipenser ruthenus*, может быть еще добавлена (или проведена предварительно) стадия воздействия кальцием:

проведение дополнительной стадии воздействия кальцием:

получение другого от 0,5- до 2-миллимолярного раствора катионов кальция из хлорида кальция в деионизированной воде с удельной проводимостью 10 мкСм/см (при 25°C) при температуре полярной области 10°C,

помещение живых, зрелых икринок в раствор в течение 12 минут продолжительности воздействия кальцием, и

извлечение обработанных икринок из другого раствора, и

кратковременное погружение обработанных икринок в 0,9-процентный физиологический раствор поваренной соли.

Тем самым дополнительно к упругому стабилизирующему слою из стадии воздействия калием происходит еще и структурное сшивание белков оболочки икринки, которое у рыб и ракообразных локализовано в уже имеющихся зонах *Radiata Interna* и *Radiata Externa* оболочки икринки. Это дополнительное структурное сшивание белков оболочки икринки остатками тирозина прежде всего придает крупным и мягким до обработки или чувствительным икринкам еще и пластическую прочность - наряду с упругостью после стадии обработки калием. Здесь также необязательное погружение опять же служит для дополнительной возможности регулирования. В отношении образованного продукта речь идет о (подлинной) икре из живых, зрелых икринок, которая затем может быть переработана следующим образом:

смешение икры с сухой, не содержащей ни дозоры калия, ни дозоры кальция (не содержащие K^+ и Ca^{++} средства против комкования) поваренной солью NaCl (3,5 г/100 г икры, 3,5%), что соответствует малосольному посолу для консервирования,

заполнение слегка подсоленной икрой стеклянных сосудов, предпочтительно стеклянных банок для созревания вместимостью 500 г, и воздухонепроницаемое вакуумное закупоривание банок закручивающимися крышками, и этикетирование,

хранение стеклянных банок при -2°C в течение периода от 2 до 4 месяцев для дальнейшего созревания икры, и, необязательно,

замораживание свежей икры или созревшей икры по желанию потребителя в стеклянных банках при -18°C.

Обработанные на стадии воздействия калием живые, зрелые икринки в результате обработки образуют полностью новую зону: стабилизирующий слой, который сформирован упругим и полупрозрачным (гелеобразным). Для подтверждения этого стабилизирующий слой может быть просто окрашиваемым. Он локализован между альвеолярным слоем AL и *Zona Radiata Externa* ZRE, и до сих пор не был описан в литературе. В отношении структурного строения икринки рыб и ракообразных следует привести ссылку на вводную часть описания в соответствующем глоссарии автора Siddique.

В основу таблицы на фиг. 2 положены измерения диаметра (в мкм) внеклеточной оболочки икринок на зрелых икринках сибирского осетра посредством криосечения на слои с постоянной толщиной (10 мкм), с помощью анализа изображений с компьютерным управлением (фирмы Zeiss), под влиянием различных условий обработки для стабилизации оболочки икринок. В таблице показаны образование нового стабилизирующего слоя SS и диаметр имеющихся слоев (ZRI, ZRE, AL) оболочки икринки при обработке добавками с различными концентрациями в ммол/л только катионов калия K^+ (из цитрата калия), и в комбинации с катионами кальция Ca^{++} (из хлорида кальция), в ходе различных стадий воздействия согласно изобретению. Обработке были подвергнуты живые, зрелые икринки сибирского осетра *Acipenser baerii*. Наряду с уже ранее указанными и разъясненными в работе аббревиатурами автора Siddique сокращение Mw означает еще среднее значение, Std стандартное отклонение. Приведены значения для нового упругого стабилизирующего слоя SS. Кроме того, приведена ссылка на уровень техники согласно вышеуказанному документу WO 2007/045233 A1.

Испытания качества после обработок показали, что лишь при концентрациях катионов калия выше 1 ммол/л и 1,5 ммол/л толщина оболочки икринки достигает по меньшей мере 12 мкм, и возникает промежуточный слой, что утрачивалась клейкость, и икра является достаточно стабильной для последующей переработки. Кроме того, оказалось, что целесообразна продолжительность обработки предпочтительно в течение 10 минут, и тем самым также метаболически реагируют все находящиеся в растворе живые икринки. Удалось достигнуть в одной обрабатывающей установке количества обработанной икры на уровне 2,5 кг (в примерно 25 л раствора). Органолептическое испытание икры после соответствующей обработке катионами калия показало, что упругая текстура икры сибирского осетра не проявила изменений при вариациях концентраций между 1 ммол/л и 1,5 ммол/л. Напротив, обработанные в растворе с более низкими концентрациями катионов калия икринки различаются по текстуре, и только некоторые немногие икринки стабильны, тогда как необработанные икринки являются очень мягкими и разорванными. Согласно проведенным органолептическим испытаниям, обработка в двух стадиях воздействия (катионов калия и кальция) приводит к прочному, жемчужному продукту, также называемому

"Superplop (с превосходным лопанием)" в случае икринок сибирского осетра.

Таблица на фиг. 3 показывает наличие и диаметр (в мкм) слоев внеклеточной оболочки икринок на зрелых икринках при различных условиях обработки согласно изобретению живых крупных икринок белуги породы *Huso huso* осетровых. При обработке этой икры катионами калия также (из цитрата калия) наблюдалось образование нового зоинофильного стабилизирующего слоя SS во внеклеточной оболочке икринки, который тоже локализован между ZRE и AL. Проведенные органолептические испытания крупных икринок белуги показали, что двойная обработка катионами калия и кальция приводит к оптимальным результатам в отношении текстуры хрупких живых, зрелых икринок.

Фиг. 4А, В, С, D показывают REM-фотографии изменения структуры внеклеточных оболочек икринок взятых в качестве примера живых, зрелых икринок сибирского осетра при различных условиях обработки. Показаны виды в двух степенях увеличения: слева с 6000-кратной, и справа (на фрагментах) с 12000-кратной. При этом обработки всегда проводили на живой икринке, которую для получения гистологического криосечения для сохранения нативного состояния подвергали мгновенному замораживанию в гексане при -80°C .

Фиг. 4А В необработанных зрелых икринках зоны оболочки икринки не проявляют четкого отделения друг от друга (уровень техники).

Фиг. 4В Под действием 0,5 ммол/л калия уже возникает новый стабилизирующий слой SS между Zona Radiata Externa ZRE и альвеолярным слоем AL, тогда как Zona Radiata Interna ZRI и Zona Radiata Externa ZRE проявляют неизменную рыхлую связь белков, как в необработанных икринках.

Фиг. 4С Последовательная двойная обработка икринок катионами калия и кальция показывает в REM оба характеристических морфологических признака, а именно, стабилизирующий слой SS в результате обработки калием и скручивание и сшивание белковых цепей в Zona Radiata Interna ZRI и Zona Radiata Externa ZRE, которое является характеристическим для обработки кальцием, сравни фиг. 4D.

Фиг. 4D Обработка только кальцием приводит к сильному скручиванию и сшиванию рыхлых белковых цепей в Zona Radiata Interna ZRI и Zona Radiata Externa ZRE (уровень техники), сравнительно с фиг. 4А и фиг. 4В без обработки кальцием. Фиг. 5А, В, С, D показывают полученные в трансмиссионном электронном микроскопе фотографии (TEM, 3000-кратное увеличение) многослойной структуры оболочки икринки зрелых осетровых икринок при обработке катионами калия с концентрацией 1,0 ммол/л. Фиг. 5А показывает Zona Radiata Interna ZRI с несвязанными, мутными фибриллами, которая отделена от Zona Radiata Externa ZRE эпитаксиальным слоем EP (явление может быть идентифицировано только на уровне ультраструктуры). Zona Radiata Externa ZRE может быть охарактеризована волокнистой сетчатой структурой из длинных растянутых фибрилл. Фиг. 5В показывает ультраструктурное формирование нового стабилизирующего слоя SS с мелкозернистой структурой непосредственно между Zona Radiata Externa ZRE и - согласно фиг. 5С - альвеолярным слоем AL, который проникает до периферии оболочки икринки - согласно фиг. 5D - мелкими дуктулами (маленькими протоками, каналцами). Ультраструктурные анализы подтвердили, что обработка катионами калия (1,0 ммол/л) согласно изобретению приводит к образованию до сих пор неизвестного нового стабилизирующего слоя SS с аморфной структурой и позиционированием у рыб и ракообразных между Zona Radiata Externa ZRE и альвеолярным слоем AL.

На фиг. 6А, В, С, D показаны TEM-фотографии (3000-кратное увеличение) кортикальных гранул CG в периферической цитоплазме внутри плазматической мембраны зрелых икринок, причем фиг. 6А показывает необработанную икринку (уровень техники), фиг. 6В показывает обработанную катионами калия икринку, фиг. 6С показывает обработанную катионами калия и кальция икринку, и фиг. 6D показывает обработанную только катионами кальция икринку (уровень техники).

Кортикальные гранулы представляют собой секреторные органеллы (структурно ограничиваемые области), которые находятся в икринках и тесно связаны с событием оплодотворения. Кортикальные гранулы содержат ферменты, такие как пероксидаза, и структурные элементы для тирозинового сшивания Zona Radiata Interna ZRI и Zona Radiata Externa ZRE. Как с помощью TEM было проанализировано влияние различных условий обработки, индуцируется кортикальная реакция, и происходит высвобождение ее содержимого исключительно вследствие обработки катионами кальция. Идентичный процесс происходит также при естественном оплодотворении при индуцированной спермием кальциевой волне на клеточной мембране икринки. В необработанной икринке (фиг. 6А) в периферической цитоплазме кортикальные гранулы CG четко различимы по своему ферментативному оснащению как крупные, круглые везикулы (пузырьки), которые также содержат структурные элементы. Точно так же кортикальные гранулы CG при обработке только калием согласно изобретению (фиг. 6В), как и ранее, остаются неизменными. Правда, можно наблюдать сильный везикулярный транспорт на мембране икринки из цитоплазмы во внеклеточную оболочку икринки. На фиг. 6А и фиг. 6В символом D обозначен желток. При двойной обработке катионами калия и кальция (фиг. 6С) это приводит как к высвобождению (стрелки) содержимого кортикальных гранул CG, так и к образованию нового стабилизирующего слоя SS. Обработка только катионами кальция (фиг. 6D) опять же приводит к кортикальной реакции, причем содержащее высвобождается во внеклеточную оболочку икринки, и инициируется ферментативное сшивание Zona Radiata Interna ZRI и Zona Radiata Externa ZRE остатками тирозина. В цитоплазме остаются пустые вакуоли V.

Для диагностического скрининга криосрезов для выяснения действия калия согласно изобретению, на фиг. 7А и фиг. 7В показаны полученные в оптическом микроскопе фотографии (400-кратное увеличение) соответствующих уровню техники необработанных живых икринок сибирского осетра *Acipenser baerii*. Левая фотография согласно фиг. 7А показывает HE-окрашивание (окрашивание гематоксилин-эозином), правая фотография согласно фиг. 7В показывает окрашивание альциановым синим. В этом тесте окрашены глюкозаминогликаны GAG, гиалурон и фибрин. Можно различить, что альциановый синий отсутствует в различных слоях оболочки икринки, но четко проявляется в ооплазме ОР. Отдельные слои обозначены соответственно приведенным выше вариантам исполнения, и их толщины обозначены двунаправленными стрелками.

Напротив, на фиг. 7С и фиг. 7D представлены фотографии криосрезов обработанных заявленным в изобретении способом на стадии воздействия калием живых, зрелых икринок в овулированном состоянии сибирского осетра *Acipenser baerii*. Икринки были обработаны катионами калия при концентрации 1,5 ммол/л (из цитрата калия). Явственно видно появление нового стабилизирующего слоя SS между *Zona Radiata Externa ZRE* и альвеолярным слоем AL во внеклеточной оболочке икринки. В левой фотографии согласно фиг. 7С после окрашивания эозином видно, что этот новый стабилизирующий слой SS является особенно эозинофильным. На правой фотографии согласно фиг. 7D после окрашивания альциановым синим четко видно, что этот новый стабилизирующий слой SS особенно обогащен GAG. Этим обуславливается особенно благоприятная упругость нового стабилизирующего слоя SS.

Для диагностического скрининга криосрезов для выяснения действия только кальция и эффекта двойной обработки катионами калия и кальция, на фиг. 8А и фиг. 8В представлены фотографии криосрезов обработанных соответствующим уровню техники способом согласно документу WO 2007/045233 А1 зрелых икринок сибирского осетра *Acipenser baerii* с 400-кратным увеличением. Левая фотография согласно фиг. 8А показывает HE-окрашивание (окрашивание гематоксилин-эозином), правая фотография согласно фиг. 8В показывает окрашивание альциановым синим. Были обработаны овулированные икринки сибирского осетра. На левой фотографии согласно фиг. 8А с HE-окрашиванием можно различить сшитые молекулами тирозина белковые цепи в *Zona Radiata Interna ZRI* и *Zona Radiata Externa ZRE*. Кроме того, явственно различимо разделение между обеими зонами. В результате сшивания получается структурная стабилизация оболочки икринки. На правой фотографии согласно фиг. 8В с окрашиванием альциановым синим можно распознать, что *Zona Radiata Interna ZRI* и *Zona Radiata Externa ZRE* лишь слабо окрашены, из чего можно сделать вывод о малом содержании GAG, и судить о меньшей упругости, в то время как в ооплазме ОР сильное окрашивание свидетельствует об очень большом количестве GAG.

На фиг. 8С и фиг. 8D показаны фотографии криосрезов обработанных заявленным способом живых, овулированных икринок, которые были обработаны на дополнительной стадии воздействия кальцием способом согласно документу WO 2007/045233 А1. Живые, овулированные икринки сибирского осетра *Acipenser baerii* были обработаны на стадии воздействия калием катионами калия с концентрацией 1,5 ммол/л (из цитрата калия), и на стадии воздействия кальцием катионами кальция с концентрацией 1,6 ммол/л (из хлорида кальция). Дополнительно к показанному на фотографиях согласно фиг. 8А и 8В упорчяющему сшиванию оболочки икринки теперь можно различить также показанный на фотографиях согласно фиг. 8С и 8D новый полупрозрачный стабилизирующий слой SS с его упругим стабилизирующим действием на оболочку икринки. Обработанные живые, зрелые икринки сибирского осетра тем самым являются как упругими (благодаря GAGs), так и структурно (в результате сшивания белков) стабилизированными, и образуют превосходную икру.

На фиг. 9А представлена характеристическая REM-фотография (с 12000-кратным увеличением) оболочки икринки живых, зрелых овулированных икринок белуги осетрового вида *Huso huso* после двойной обработки согласно изобретению. Фиг. 9В показывает полученную в оптическом микроскопе фотографию (с 400-кратным увеличением) оболочки икринки живых, зрелых овулированных икринок белуги *Huso huso* после двойной обработки согласно изобретению. Обе фотографии показывают новый стабилизирующий слой SS и сшивание *Zona Radiata Interna ZRI* и *Zona Radiata Externa ZRE*. Кроме того, явственно видно, что икринки вида *Huso huso* имеют исключительно выраженный альвеолярный слой AL с крупными вакуолями V. Скрининг с использованием криосрезов с H&E-окрашиванием согласно изобретению подтверждает образование нового упругого стабилизирующего слоя SS при проведении стадии воздействия катионов калия и дополнительного сшивания белков в оболочке икринки в двух стадиях воздействия катионов калия и кальция.

Список ссылочных позиций

- AL - альвеолярный слой
- Ca⁺⁺ - катионы кальция
- CG - кортикальные гранулы
- CYT - цитоплазма (ОР)
- D - желток
- EP - эпитаксиальный слой
- K⁺ - катионы калия

Mw - среднее значение
 OP - цитоплазма икринки (плазма икринки)
 pAL - альвеолярный слой (к периферии оболочки икринки)
 PO - плазматическая мембрана ооцита (яйцеклетки)
 SS - стабилизирующий слой
 Std - стандартное отклонение
 V - вакуоль
 ZRI - внутренняя лучистая зона (Zona Radiata Interna)
 ZRE - внешняя лучистая зона (Zona Radiata Externa)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обработки икры из живых, зрелых, овулированных икринок рыб или ракообразных, которые в оболочке икринок имеют три или более слоя, причем живые, зрелые, овулированные икринки находятся в способном к оплодотворению, но в неоплодотворенном состоянии, и имеют естественное содержание калия в цитоплазме, в 0,6-1,0% растворе поваренной соли, и затем по меньшей мере в растворе, содержащем воду и по меньшей мере один растворенный в ней, действующий как стабилизирующий оболочку икринки живых, зрелых, овулированных икринок катионный компонент,

отличающийся тем, что осуществляют стадию воздействия калием, на которой в качестве катионного компонента калий растворяют в воде с концентрацией катионов калия от 0,1 до 3,0 ммоль/л, причем вода перед добавлением донора калия является деионизированной для образования катионного компонента и имеет лежащую в диапазоне естественной температуры икры рыб или ракообразных температуру от 1 до 29°C, и что живые, зрелые, овулированные икринки подвергают обработке в растворе для воздействия калием в течение времени от 5 до 30 мин, причем в заключении осуществляют погружение живых, зрелых, овулированных икринок в 0,6-1,0% раствор поваренной соли.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве донора калия применяют по меньшей мере одну соль калия, предпочтительно соль лимонной кислоты и/или соль соляной кислоты, и/или соль сорбиновой кислоты.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что концентрация катионов калия в растворе составляет 0,1 ммоль/л, 0,5 ммоль/л, 0,65 ммоль/л, 1,6 ммоль/л или 2,0 ммоль/л, предпочтительно 1,0 ммоль/л или 1,5 ммоль/л.

4. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что продолжительность воздействия калием на стадии воздействия калием составляет 10 мин, 12 мин, 15 мин, 20 мин или 25 мин.

5. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что после или до стадии воздействия калием дополнительно осуществляют стадию воздействия кальцием, на которой растворяют кальций в качестве катионного компонента в воде с образованием другого раствора концентрацией катионов кальция от 0,1 до 3,0 ммоль/л, причем вода перед добавлением донора кальция является деионизированной для образования катионного компонента и имеет лежащую в диапазоне естественной температуры икры рыб или ракообразных температуру от 1 до 29°C, и что подвергают живые, зрелые, овулированные икринки обработке в растворе в течение времени воздействия кальцием от 9 до 30 мин, причем в заключении осуществляют погружение живых, зрелых, овулированных икринок в 0,6-1,0% раствор поваренной соли.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что в качестве донора кальция применяют по меньшей мере одну соль кальция, предпочтительно цитрат кальция, хлорид кальция и/или сорбат кальция.

7. Способ по п.5 или 6, отличающийся тем, что концентрация катионов кальция в другом растворе составляет 0,5 ммоль/л, 0,8 ммоль/л, 1,0 ммоль/л, 1,5 ммоль/л, 1,6 ммоль/л или 2,0 ммоль/л.

8. Способ по одному из пп.5-7, отличающийся тем, что продолжительность воздействия кальцием на стадии воздействия кальцием составляет 10 мин, 12,5 мин, 15 мин, 16 мин, 20 мин или 25 мин.

9. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что температура одного раствора при воздействии калием и/или другого раствора при воздействии кальцием в диапазоне температур полярной области составляет величину между 1 и 15°C, предпочтительно между 5 и 12°C, особенно предпочтительно 10°C, в диапазоне температур умеренной области между 10 и 20°C, предпочтительно 15°C, особенно предпочтительно 12°C, или в диапазоне температур тропической области между 20 и 29°C, предпочтительно 27°C, особенно предпочтительно 21°C.

10. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что деионизированная вода при 25°C имеет удельную электрическую проводимость между 1 и 15 мкСм/см, предпочтительно 10 мкСм/см или ниже, особенно предпочтительно 1 мкСм/см.

11. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что один и/или другой раствор имеет значение pH между 6,8 и 8,0, предпочтительно между 7,0 и 7,9, особенно предпочтительно 7,2, или 7,4, или 7,5.

12. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что затем на проводимой в последнюю очередь стадии воздействия для консервирования и интенсификации вкуса выполняют уме-

ренное подсаливание хлоридом натрия в количестве от 2,0 до 3,8%, предпочтительно 3,5%, относительно количества икры, причем хлорид натрия не содержит доноры калия и кальция.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что после консервирования и интенсификации вкуса проводят хранение икры в закрытых непроницаемо для воздуха стеклянных сосудах в течение нескольких месяцев, предпочтительно от одного до трех месяцев, при температуре между -2°C и -4°C .

14. Способ по п.12 или 13, отличающийся тем, что после консервирования и интенсификации вкуса или хранения проводят замораживание икры при температуре в диапазоне между -20°C и -15°C , предпочтительно при -18°C .

15. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что обрабатывают живые, зрелые, овулированные икринки рыб или ракообразных с коэффициентом PI поляризации $0,05 \leq PI \leq 0,15$, предпочтительно $0,05 \leq PI \leq 0,12$.

16. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что обрабатывают живые, зрелые, овулированные икринки рыб или ракообразных из выловленных диких животных или из выращенных в условиях аквакультуры, которые были собраны в овулированном состоянии выметыванием или выдавливанием.

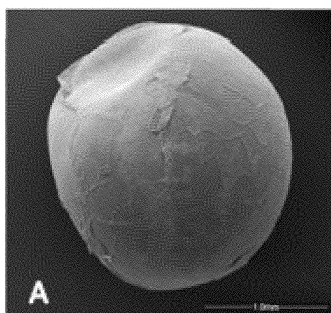
17. Способ по п.16, отличающийся тем, что обрабатывают живые, зрелые, овулированные икринки от современных и древних костистых рыб, предпочтительно от осетровых, или живые, зрелые икринки ракообразных, предпочтительно от омара.

18. Способ по одному из пп.6-17, отличающийся тем, что обрабатывают очень крупные живые, зрелые, овулированные икринки с размером зерен, равным или превышающим 3,2 мм в диаметре, или мягкие, нестабильные живые, зрелые, овулированные икринки, выдерживающие нагрузку до разрыва, меньшую или равную 0,3 Н.

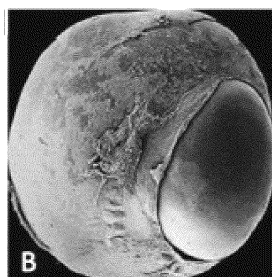
19. Способ по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что раствор поваренной соли представляет собой 0,9% раствор поваренной соли.

20. Икра из живых, зрелых, овулированных икринок рыб или ракообразных, которые в оболочке икринок в качестве слоев имеют Zona Radiata Interna (ZRI), Zona Radiata Externa (ZRE) и альвеолярный слой (AL), обработанная способом по любому из пп.1-19, причем живые, зрелые, овулированные икринки находятся в способном к оплодотворению, но в неоплодотворенном состоянии, и имеют естественное содержание калия в цитоплазме, и в оболочке икринки сформирован упругий стабилизирующий слой (SS) между Zona Radiata Externa (ZRE) и альвеолярным слоем (AL), который имеет эозинофильные и полупрозрачные свойства, и которые обусловлены содержащимися глюкозаминогликанами.

21. Икра по п.20, отличающаяся тем, в оболочке икринки Zona Radiata Interna (ZRI) и Zona Radiata Externa (ZRE) дополнительно необратимо сшиты молекулами тирозина.

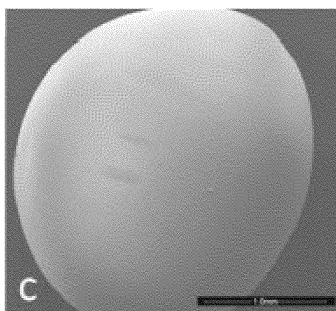


Фиг. 1А
Уровень техники



Фиг. 1В
Уровень техники

045115



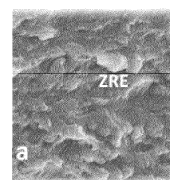
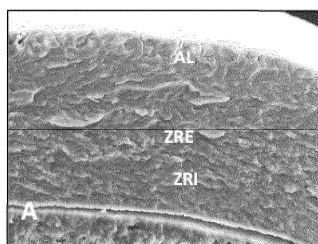
Фиг. 1С
Уровень техники

Слои оболочки икрилки	ZRI Mw	ZRI Std	ZRE Mw	ZRE Std	SS Mw	SS Std	AL Mw	AL Std
Контроль, необработанный	21,2	6,0	32,9	7,5	0,0	0,0	64,2	9,6
K⁺ из цитрата калия								
K ⁺ 0,1 ммол/л	18,0	5,5	24,8	4,7	6,3	0,6	72,2	16,4
K ⁺ 0,5 ммол/л	20,5	5,3	28,9	5,3	6,9	1,0	97,4	29,7
K ⁺ 1,0 ммол/л	18,8	4,4	19,0	3,0	12,6	1,5	77,3	3,7
K ⁺ 1,5 ммол/л	17,5	2,5	27,7	5,8	12,5	3,7	73,2	13,5
K ⁺ 0,5 ммол/л + Ca ⁺⁺ 0,8 ммол/л	17,3	1,8	27,3	3,8	12,0	1,9	67,4	8,9
WO 2007/045233 A1								
Ca ⁺⁺ 0,4 ммол/л	16,7	4,7	27,7	5,1	0,0	0,0	92,0	17,6
Ca ⁺⁺ 0,8 ммол/л	21,0	3,9	27,0	6,4	0,0	0,0	92,4	25,3

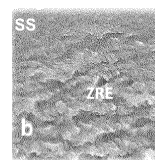
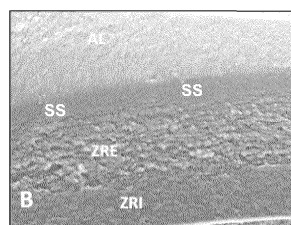
Фиг. 2

Слои оболочки икрилки	ZRI Mw	ZRI Std	ZRE Mw	ZRE Std	SS Mw	SS Std	AL Mw	AL Std
Контроль, необработанный	12,6	1,9	9,8	1,7	0,0	0,0	37,6	5,9
K⁺ из цитрата калия								
K ⁺ 0,5 ммол/л	15,7	0,4	15,0	2,4	13,2	1,8	61,8	9,2
K ⁺ 0,65 ммол/л	17,0	3,2	13,8	2,4	17,0	2,1	60,0	8,2
K ⁺ 0,65 ммол/л + Ca ⁺⁺ 1,6 ммол/л	13,1	1,5	12,0	2,4	10,7	0,0	53,5	9,2

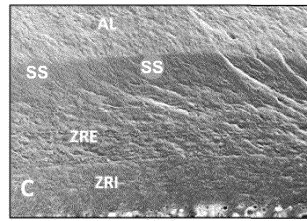
Фиг. 3



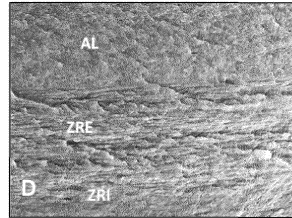
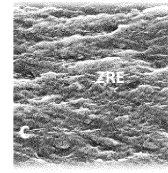
Фиг. 4А
Уровень техники



Фиг. 4В

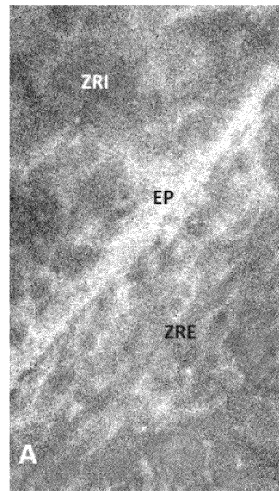
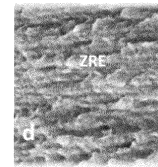


Фиг. 4С

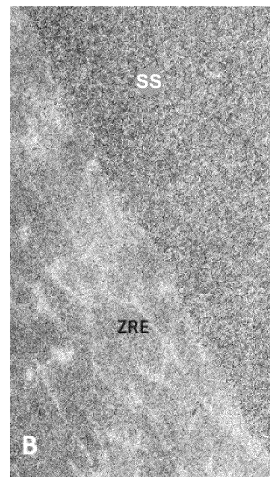


Фиг. 4D

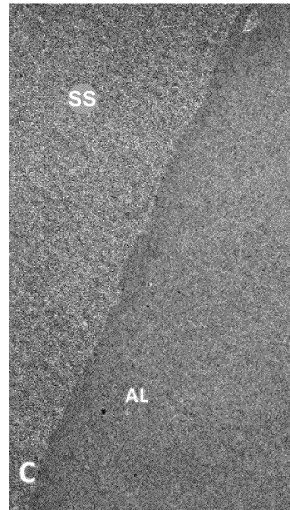
Уровень техники



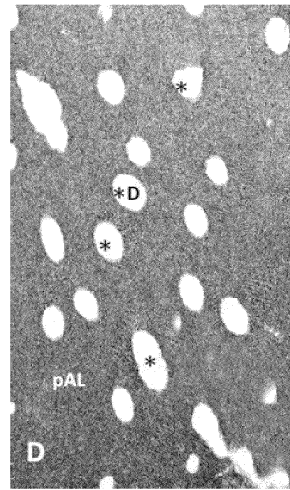
Фиг. 5A



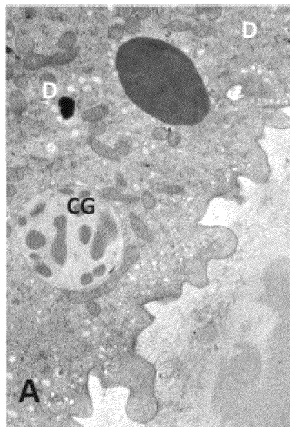
Фиг. 5B



Фиг. 5С

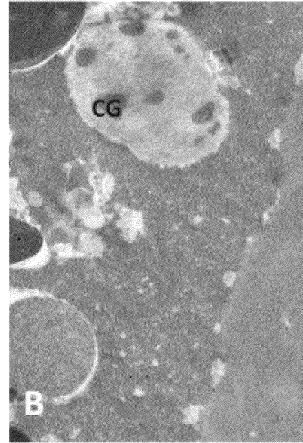


Фиг. 5D

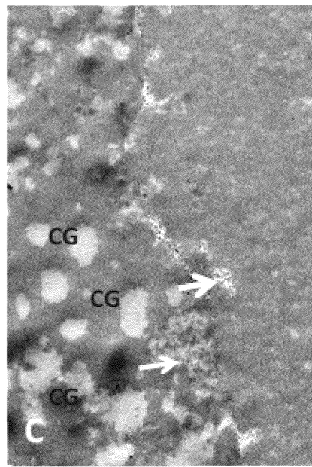


Фиг. 6А

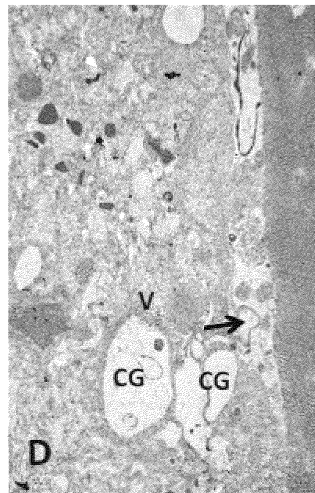
Уровень техники



Фиг. 6B

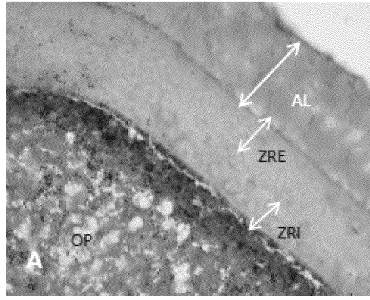


Фиг. 6C

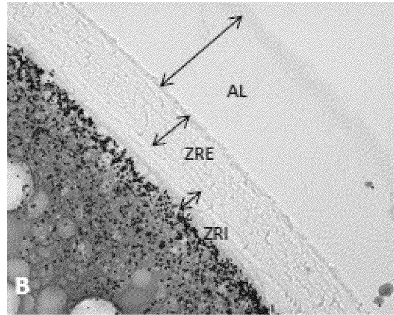


Фиг. 6D

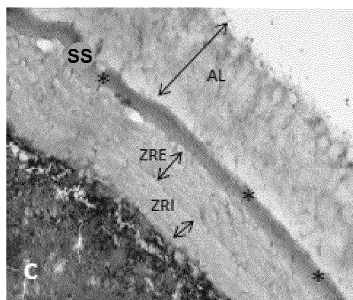
Уровень техники



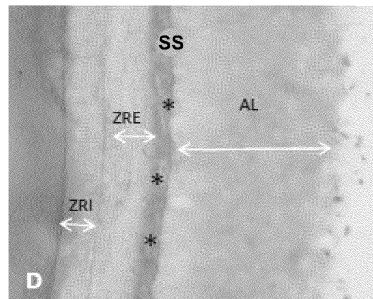
Фиг. 7А
Уровень техники



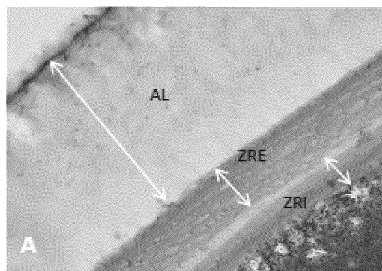
Фиг. 7В
Уровень техники



Фиг. 7С

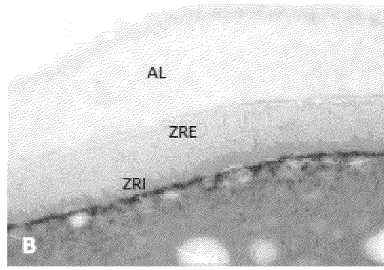


Фиг. 7D

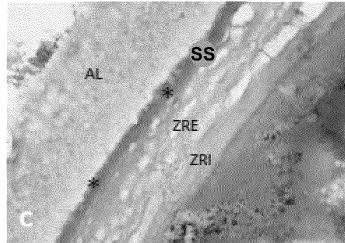


Фиг. 8А
Уровень техники

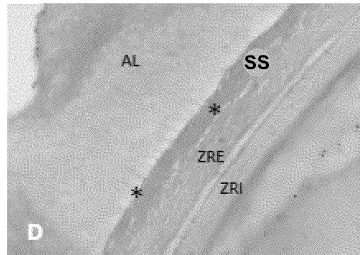
045115



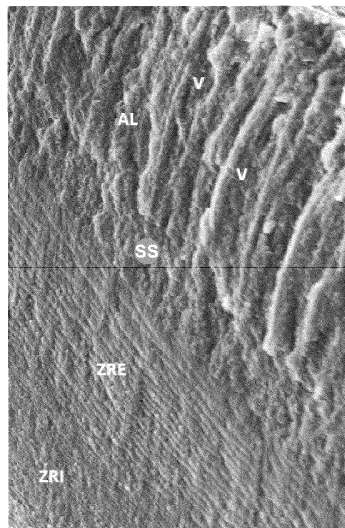
Фиг. 8В
Уровень техники



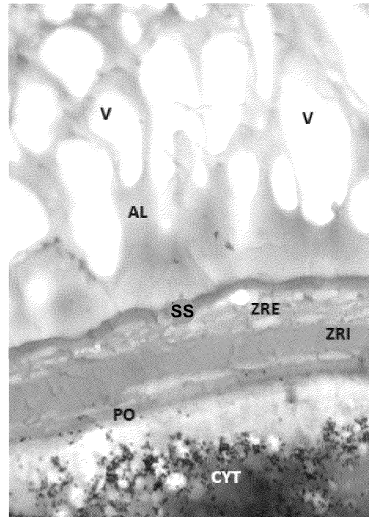
Фиг. 8С



Фиг. 8D



Фиг. 9А



Фиг. 9В