ТРУДЫ ВНИРО

ТОМ 141 2002

УДК 639.3/6:639.3.043

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК В СТАРТОВЫХ КОРМАХ

Т.К. Лебская (ПИНРО)

У представителей лососевых рыб Salmonidae переход к внешнему питанию отмечен при наличии желточного мешка, когда резорбция последнего составляет 2/3 от первоначальной массы [Стартовые и продукционные..., 1986; Павлов, 1989; Комбикорма для рыб.., 1989]. В природных условиях и при искусственном выращивании лососевых этот период отличается высокой смертностью личинок, обусловленной не только абиотическими факторами, но и слабой сформированностью пищеварительной системы.

Многочисленными исследованиями показано, что применение стартовых кормов на основе традиционных компонентов (рыбной, мясокостной, кровяной, водорослевой муки, а также сухого обрата, дрожжей кормовых, шрота соевого, пшеницы и др.) сопровождается значительной смертностью личинок. Это вызвало необходимость проведения исследований в области совершенствования рецептур стартовых кормов для повышения их усвояемости и выживания молоди в этот критический период онтогенеза.

Экспериментальными исследованиями доказана эффективность применения в стартовых кормах для различных видов рыб белковых гидролизатов и фосфолипидов.

Данные о частичной замене рыбной муки на белковые гидролизаты (БГ), а также рыбного жира на биологически активные фосфолипиды и сапонины (ФЛ) свидетельствуют о целесообразности совершенствования рецептур стартовых кормов именно в этом направлении [Остроумова, Дементьева, 1981; Турецкий, Ильина, 1985; Гидролизаты рыбной муки..., 1986; Arzel, 1995; Chen J.-C., Chen K.-W., Chen J.-M.,1996; Grisdale-Helland, Helland, 1997; Абросимова, Бирюкова, Саенко, 1997; Бигжи, 2000; Лебская, Мухина, 2000].

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния частичной замены рыбной муки белковым гидролизатом, а рыбного жира — фосфолипидами на выживаемость личинок атлантического лосося в условиях рыбоводного завода.

Желточный мешок представляет собой единственный источник питательных веществ при переходе личинок на смешанное питание. В связи с этим нами проведено исследование адекватности химического состава и биохимических свойств желточного мешка по отношению к экспериментальным кормам.

Материал и методы исследования. Объектом исследования служили личинки атлантического лосося Salmo salar L. с желточным мешком в период перехода на смешанное питание, а контролем — корм стандартной рецептуры без добавок БГ, концентрата ФЛ и параллельно — стартовый корм Respons E 0,6 финской фирмы «Рэйхо Райсио»; диеты 1 и 2 — корма, в которых рыбная мука заменена на БГ соответственно на 5 и 20%; диета 3 — корм с частичной заменой рыбьего жира на концентрат ФЛ (2%).

БГ получали из непищевых частей исландского гребешка путем ферментативного гидролиза сырья комплексом протеиназ, выделенных из гепатопанкреаса камчатского краба, акклиматизированного в Баренцевом море [Мухин,

1999]. ФЛ выделяли из гонад камбалы и вводили в рыбий жир в виде спиртового экстракта [Лебская, Шаповалова, 2000].

Общий химический состав кормов и тканей рыбы анализировали стандартными методами [Лазаревский, 1955], показатели качества липидов кормов (перекисное, альдегидное и кислотные числа) — согласно Временной инструкции по определению степени окисления липидов в кормах...[1987]. При вычислении валовой (GE) , обменной (ME) и усвоенной (DE) энергий учитывали только энергию, получаемую от белков и липидов, так как роль углеводов в обмене веществ лососевых рыб незначительна [Краснов, 1988). Валовую, обменную энергию рассчитывали по коэффициентам [Phillips, Brockway, 1959], усвоенную энергию — с учетом коэффициентов «видимой переваримости» основных питательных веществ кормов.

Фракционный состав липидов кормов и желточного мешка личинок семги определяли методом одномерной тонкослойной хроматографии. Липиды экстрагировали по методу Блайя-Дайэра [Ржавская, 1976], разгоняли на пластинках фирмы «Merck» в системе растворителей: для общих липидов это гексан – эфир – уксусная кислота (45:10:5), для фосфолипидов — бутанол – этанол – вода (25:5:20). Пятна общих и индивидуальных фосфолипидов проявляли 50%-ной серной кислотой, сканировали с помощью прибора CS-9000 фирмы «Шимадзу» (Япония) при длине волны 540 нм. Идентификацию фракций осуществляли с помощью стандартов фирмы «Сигма». Для подтверждения присутствия сапонинов применяли качественную реакцию гемолиза эритроцитов. Хроматограмму опрыскивали 0,2%-ной суспензией кровяных клеток в физиологическом растворе. Гемолиз сапонинами должен сопровождаться появлением более светлого пятна на рыжевато-коричневом фоне [Кейтс, 1975; Справочник биохимика, 1991].

Растворимость ФЛ в этиловом спирте определяли по наивысшей степени их извлечения из ФЛ, по оптической плотности спиртовых экстрактов [Лебская, Шаповалова, 2000].

Аминокислотный состав проб исследовали методом двумерной ТСХ по методике научно-производственного центра «Ленхром» [Методика разделения смеси..., 1995]. Количественное определение аминокислот проводили на приборе CS-9000 фирмы «Шимадзу» (Япония), сканирование осуществляли при длине волны 520 нм.

Продукционные свойства кормов определяли по выживаемости, приросту и химическому составу молоди [Применение методов морфофизиологического..., 1972].

Определение эффективности комбикормов проводили на Кандалакшском экспериментальном лососевом заводе Мурманской области с 3.06 по 20.07.2000. Личинок семги с начальной массой 0,145 г рассадили в 4-х прямоточных лотках размерами 2 х 0,35 х 0,25 м и глубиной воды 15 см, разделяя их на 3 части с помощью сетчатых рамок, применяемых для инкубации икры. Каждый вариант экспериментального кормления в лотках и бассейнах осуществлялся в 3-х повторностях. 19.06.2000 мальков из лотков перевели в бассейны ИЦА-1 площадью 2,25 м^2 с глубиной воды 20 см. При этом освещенность, насыщенность кислородом, расход и pH воды соответствовали нормативам [Щербина, 1983]. Кормление рыбы выполняли вручную с 8 до 20 ч, каждые 30 мин.

Результаты и обсуждение. Потребности лососевых в основных питательных веществах — белке и жире, в период личиночного развития составляют 50–55 и 20–25% соответственно [Маликова и др., 1969; Стартовые и продукционные..., 1986; Комбикорма для рыб..., 1989; Arzel, 1995; Grisdale-Helland, Helland, 1997]. На основании этого нами были сформированы рецептуры опытных кормов, адекватных по содержанию белка и жира потребностям лососевых рыб (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что опытные варианты диет с БГ и ФЛ отличались от контроля и корма финской фирмы «Рэйхо Райсио» более низким содержанием белка (48–50%) и различным содержанием жира (20–25%). Это определило показатели соотношения белка и жира в корме и их энергетические эквиваленты.

Наибольшей калорийностью характеризовалась диета 1 (23,4 МДж на 1 кг сухого корма), наименьшей — стартовый корм финского производства (21,3 МДж).

Таблица 1

Химический состав и показатели качества липидов кормов и желточного мешка

Показатели	Контроль	Диета 1	Диета 2	Диета 3	Respons E 0,6	Желточный мешок
Химический состав кормов (массовая доля, %)						
Вода	5,2	5,4	6,6	6,4	6,5	55,6
Жир	23,2	25,9	20,9	24,8	18,0	10,6
Белки	52,7	50,3	50,2	48,6	54,0	25,1
Зола	6,3	6,3	7,9	6,5	10,5	–
Показатели качества липидов кормов						
Перекисное число, % I_2	0,13	0,15	0,18	0,11	–	–
Кислотное число, мг КОН/г	7,06	6,46	12,53	8,99	–	–
Альдегиды, мг%	0,14	0,17	0,37	0,19	–	–

Сравнительный анализ кормов и желточного мешка выявил идентичность показателей валовой и перевариваемой энергии контрольной диеты, диеты с ФЛ и желточного мешка (рис. 1). В то же время распределение перевариваемой энергии было идентичным в желточном мешке и диете 2 с БГ в количестве 20% (рис. 2). Показатели качества липидов всех диет соответствовали нормативным значениям [Временная инструкция по..., 1987].

Рис. 1. Энергетическая ценность стартовых кормов и желточного мешка личинок атлантического лосося: *1* — диета 1; *2* — диета 2; *3* — диета 3; *4* — контроль; *5* — финский корм; *6* — желточный мешок

Рис. 2. Соотношение основных источников перевариваемой энергии в стартовых кормах и желточном мешке личинок атлантического лосося. Обозначения, как на рис. 1

Данные аминокислотного состава свидетельствуют о том, что белок всех исследуемых нами кормов содержал все незаменимые аминокислоты (табл. 2). Тем не менее, количество таких кислот, как валин, лизин, фенилаланин, гистидин и аргинин, было ниже значений, соответствующих потребностям лососевых в незаменимых аминокислотах [Halver, 1960; Mertz, 1972]. Замена рыбной муки

Таблица 2

Аминокислотный состав белка стартовых кормов

Показатели	Контроль		Диета 1		Диета 2		Финский корм		Рекомендуемое*	
	% от белка	мг/100 г белка	% от белка	мг/100 г белка	% от белка	мг/100 г белка	% от белка	мг/100 г белка	% от белка	мг/100 г белка
Белок, %	52,7		50,3		50,2		54,0		50–55,0	
В том числе:										
аргинин	7,51	3957	7,18	3611	7,48	3754	7,19	3882	12–12,5	6000
	5,95	3136	5,66	2846	5,50	2761	5,29	2856	6,4–8,0	3200
гистидин	2,99	1575	3,21	1614	3,30	1656	3,32	1792	3,5	1800
лейцин+изолейцин	12,61	6645	12,58	6327	12,83	6440	10,12	5464	12–12,2	6100
лизин	8,91	4695	9,81	4937	9,08	4558	7,63	4120	10,-10,5	5000
метионин	3,50	1844	3,40	1710	3,40	1706	3,60	1944	2,5–3,0	4000
треонин	4,17	2197	4,71	2369	4,60	2309	5,17	2791	4,0–4,4	2200
триптофан	1,10	579	1,11	553	1,10	552	1,10	594	1,0	500
фенилаланин	5,11	2692	4,75	2389	4,69	2354	3,90	2106	5,2–10,5	5000
Заменимые аминокислоты:										
аланин	5,65	2977	5,81	2922	5,56	2791	6,26	3380	–	–
аспарагиновая кислота	9,11	4800	9,06	4557	9,27	4653	9,31	5027	–	–
глицин	4,48	2360	4,50	2263	4,80	2409	5,10	2754	–	–
глутаминовая кислота	14,83	7815	14,64	7363	14,19	7123	16,00	8640	–	–
пролин	4,42	2329	4,17	2097	4,24	2128	5,90	3186	–	–
серин	4,54	2392	4,43	2228	4,53	2274	4,45	2403	–	–
тирозин	3,56	1876	3,54	1780	3,56	1787	3,69	1993	–	–
цистин	1,16	611	1,12	563	0,94	472	1,28	691	–	–
Общее количество аминокислот	99,6	52489	99,32	50134	99,67	49733	99,77	53632	–	–

* По литературным данным [Mertz, 1972 и др.]

Таблица 3

Фракционный состав липидов опытных кормов, %

Фракции	Контроль	Финский корм	Диета 1	Диета 2	Диета 3	Желточный мешок личинки
Нейтральные липиды, в том числе:						
диглицериды	0,8	1,2	1,3	1,3	1,0	2,5
триглицериды	47,2	48,8	47,7	47,1	46,9	55,0*
Свободные жирные кислоты	2,5	5,7	2,7	3,4	2,1**	1,0
Стерины	9,7	9,9	12,2	14,1	9,0	8,1
Эфиры стеринов	6,5	9,8	6,0	5,4	5,6	12,6
Неидентифицированные фракции, в том числе пигменты и каротиноиды	0,8	2,0	2,0	2,7	0,9	1,5
Фосфолипиды, в том числе:	32,5	22,6	28,2	26,0	34,5	18,8**
лецитин	19,8	13,7	16,6	14,7	23,1	13,1*
кефалин	8,4	6,2	7,5	7,2	8,9	3,4
Неидентифицированные фракции, в том числе другие фосфолипиды и сапонины	4,3	2,7	4,0	4,1	2,5**	2,2**

* В указанную фракцию входит суммарное содержание пигментов.

** На основании качественной реакции можно сделать вывод о присутствии в этой фракции сапонинов.

на БГ (20%) привела к тому, что содержание свободных аминокислот в диете 2 было практически идентично их количеству в желточном мешке (см. табл. 2).

В составе липидов всех кормов доминировали фракции триглицеридов (46–54%), фосфолипидов (22–34%) и лецитина (13–23%) (табл. 3). Полагают, что эффективные стартовые корма должны содержать около половины ФЛ от общих липидов при соотношении ω3/ω6 кислот в пределах от 1,3 до 1,6 [Абросимова, Бирюкова, Саенко, 1997]. В кормах нашего эксперимента наиболее высокое содержание ФЛ и лецитина было в диете 3 (см. табл. 3). Качественными реакциями выявлено присутствие в этой диете сапонинов, которые были внесены вместе с ФЛ. Эти соединения также обнаружены и в желточном мешке личинки.

Начало экспериментального кормления сопровождалось у личинок слабо выраженной положительной реакцией на корм.

Согласно данным В.Н. Тимейко и Г.Г. Новикова [1987], пищеварительный тракт личинок семги в этот период представлен узкой прямой трубкой, не дифференцированной на отделы. Пищеварительные железы желудка не развиты, что сопровождается слабой активностью кислых протеаз и неспособностью к перевариванию и усвоению поступающей пищи в виде искусственного корма. Переход на активное питание в этих условиях приводит к значительной смертности личинок [Городилов, 1986; Павлов, 1989].

Результаты наших исследований согласуются с этими представлениями и показывают высокую смертность личинок во всех вариантах кормления (рис. 3). Тем не менее, наиболее высокая выживаемость личинок (на 50% выше по сравнению с контролем и импортным аналогом) отмечалась на диете 2 с БГ (20%), самая низкая — на диете 3 с ФЛ. По всей вероятности, использование БГ в стартовых кормах внесло в состав корма легкоусвояемые низкомолекулярные пептиды, свободные аминокислоты и привело к компенсации недостаточности развития активности кислых протеаз пищеварительного тракта [Остроумова, Дементьева, 1981].

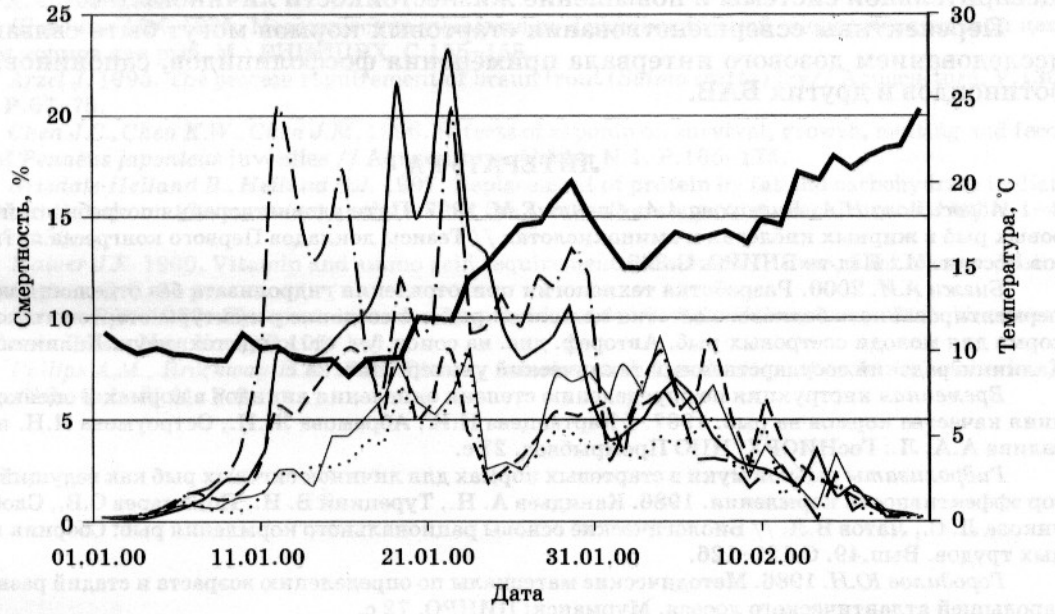

Рис. 3. Характеристика смертности личинок атлантического лосося выращиваемых на различных кормах

Значительная смертность личинок на диете 3 с ФЛ могла быть обусловлена токсичным влиянием сапонинов, выявленных нами с помощью качественных реакций в липидах диеты 3 и привнесенных в корм с фосфолипидами (см. табл. 3). Известно, что эти соединения в зависимости от концентрации могут проявлять чрезвычайно широкий спектр биологической активности — от острой токсичности до иммуномодулирующих и антиоксидантных эффектов [Калинин и др., 1994]. Так, показано, что добавление 0,1 мг сапонинов в воду при подращивании

личинок креветки сопровождается повышением скорости их роста [Chen J.C. et al., 1996]. Механизмы, посредством которых сапонины проявляют активность, еще неясны. Одно из объяснений можно связать с поверхностно-активными свойствами этих веществ и их способностью вызывать изменения структуры, повышение или нарушение проницаемости биологических мембран. При повышении проницаемости мембран, по всей вероятности, может происходить более эффективное усвоение питательных веществ, особенно на этапе перехода на активное питание, когда происходит главным образом мембранное пищеварение. Рассмотрение перспектив применения этих соединений в стартовых кормах требует проведения дополнительных исследований, в частности, точной идентификации и выяснения дозового интервала, оказывающего влияние на повышение усвояемости стартовых кормов. Можно предположить, что применение низких концентраций сапонинов приведет к повышению проницаемости мембран прямой трубки пищеварительной системы личинок и повышению усвояемости корма.

Как видно из рис. 3, после 20 сут подращивания смертность молоди, выращиваемой с использованием всех кормов, заметно снижается, и существенных различий в зависимости от диеты не обнаруживается. Это свидетельствует о том, что БГ следует применять только в начальный период перехода на экзогенное питание. При морфологической и физиологической сформированности пищеварительной системы молоди фракционный состав белка не играет такой ведущей роли, которая была отмечена в период перехода на смешанное питание многими авторами и подтверждена нашими исследованиями.

Таким образом, результаты исследований показали, что определяющими факторами повышения выживаемости личинок в период перехода на смешанное питание являются такие показатели, как распределение перевариваемой энергии корма, состав белка и содержание свободных аминокислот. Введение в корм 20% БГ, содержащего легкоусвояемые низкомолекулярные пептиды, свободные аминокислоты, определило компенсацию недостаточности развития пищеварительной системы и повышение жизнестойкости личинок.

Перспективы совершенствования стартовых кормов могут быть связаны с исследованием дозового интервала применения фосфолипидов, сапонинов, каротиноидов и других БАВ.

ЛИТЕРАТУРА

Абросимова Н.А., Бирюкова А.А., Саенко Е.М. 1997. Пути удовлетворения потребностей осетровых рыб в жирных кислотах и аминокислотах // Тезисы докладов Первого конгресса ихтиологов России. М.: Изд-во ВНИРО. С.326.

Бигжи А.И. 2000. Разработка технологии приготовления гидролизата без отделения непроферментированного белкового остатка из мелкой рыбы и создание рецептуры стартового комбикорма для молоди осетровых рыб. Автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. тех. наук. Калининград: Калининградский государственный технический университет. 24 с.

Временная инструкция по определению степени окисления липидов в кормах и оценке влияния качества кормов на рыб. 1987. / Картавцева Н.Е., Абрамова Ж.И., Остроумова И.Н. и Шабалина А.А. Л.: ГосНИОРХ, НПО Промрыбвод. 27 с.

Гидролизаты рыбной муки в стартовых кормах для личинок сиговых рыб как ведущий фактор эффективности кормления. 1986. Канидьев А. Н., Турецкий В. И., Пономарев С.В., Слободяникова Л. С., Латов В.Л. // Биологические основы рационального кормления рыб: Сборник научных трудов. Вып.49. С.121–126.

Городилов Ю.Н. 1986. Методические материалы по определению возраста и стадий развития зародышей атлантического лосося. Мурманск: ПИНРО. 72 с.

Калинин В.И., Левин В.С., Стоник В.А. 1994. Химическая морфология: тритерпеновые гликозиды голотурий (Holothurioidea, Echinodermata). Владивосток: Дальнаука. 274 с.

Кейтс М. Техника липидологии. 1975. Выделение, анализ и идентификация липидов / Пер. Вавера В.А. М.: Мир. 322 с.

Комбикорма для рыб: производство и методы кормления. 1989. / Гамыгин Е.А., Лысенко В.Я., Скляров В.Я., Турецкий В.И. М.: Агропромиздат. 168 с.

Краснов А.М. 1988. Совершенствование технологии кормления и оценка возможностей роста молоди атлантического лосося и радужной форели при выращивании в условиях рыбоводных заводов: Автореф дис. на соиск. уч. ст. канд. тех. наук. М.: ВНИИПРХ. 24 с.

Лазаревский А.А. 1955. Технохимический контроль в рыбоперерабатывающей промышленности. М.: Пищепромиздат. 518 с.

Лебская Т.К., Мухина И.Н. 2000. Эффективность биологически активных добавок в стартовых кормах для атлантического лосося // Марикультура северо-запада России. Тезисы докладов научно-практической конференции 25–27 октября 2000 г. Мурманск: изд-во ПИНРО. С.30.

Лебская Т.К., Шаповалова Л.А. 2000. К вопросу о получении биологически активной пищевой добавки на основе рыбного жира и фосфолипидов из морской камбалы // Материалы научно-практической конференции «Техника и технологии пищевых производств на рубеже 21 века» (11–12 октября, 2000 г.). Мурманск: МГТУ. С.5–15.

Маликова Е.М., Котова Н.И., Резникова И.С. Выращивание молоди балтийского лосося на рыбоводных заводах. Биотехника и приготовление искусственного корма КРТ. Рига: Зинатне. 1969. 35 с.

Методика разделения смеси 23 свободных аминокислот методом двумерной хроматографии. 1995. Санкт-Петербург: Ленхром. 8 с.

Мухин В.А. 1999. Оценка возможности комплексного использования гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* для выделения препаратов липидов и протеолитических ферментов // Материалы конференции молодых ученых Мурманского морского биологического института, посвященной 275-летию Российской академии наук (г. Мурманск, май, 1999 г.). Апатиты: Изд-во КНЦ РАН. С.87–88.

Остроумова И.Н., Дементьева М.А. 1981. О начале функционирования поджелудочной железы в пищеварительном процессе личинок карпа // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. Т.17. №3. С.302–304.

Применение методов морфофизиологических индикаторов в экологии рыб. 1972 / Смирнов В.С., Божко А.М., Рыжков Л.П. и др. // Петрозаводск: Карелия. 168 с.

Ржавская Ф.М. 1976. Жиры рыб и морских млекопитающих.-М.:Пищевая промышленность. 470 с.

Павлов Д.А. 1989. Лососевые (биология развития и воспроизводство). М.: МГУ. 216 с.

Справочник биохимика. 1991. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. М.: Мир. 544 с.

Стартовые и продукционные комбикорма для атлантического лосося. 1986 / Полина А.В., Валетов В.А., Коренев О.Н. и др // Биологические основы рационального кормления рыб. М.: ВНИИПРХ. Вып.49. С.105–109.

Тимейко В.Н., Новиков Г.Г. 1987. Протеолитическая активность пищеварительного тракта семги *Salmo salar* L. в процессе личиночного развития // Вопросы ихтиологии. Т.27. Вып.2. С.300–306.

Турецкий В.И., Ильина И.Д. 1985. Пищевые потребности личинок карпа в гидролизованных (деструктурированных) белковых продуктах // Тезисы докладов Всесоюзного совещания по промышленному рыбоводству и проблемам кормов, кормопроизводства и кормления рыб. М.: ВНИИПРХ. С.155–158.

Щербина М.А. 1985. Методические указания по физиологической оценке питательной ценности кормов для рыб. М.: ВНИИПРХ. С.155–158.

Arzel J. 1995. The protein reguirement of braun trout (*Salmo trutta*) fry// Aquaculture. V.130. N.1. P.67–78.

Chen J.C., Chen K.W., Chen J.M. 1996. Effects of saponin on survival, growth, molting and feeding of *Penaeus japonicus* juveniles // Aquaculture. V.144. N.1. P.165–175.

Grisdale-Helland B., Helland S.J. 1997. Replacement of protein by fat and carbohydrate in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) at the end of the freshwater stage // Aquaculture. V.152. N.1–4. P.167–180.

Halver J.E. 1960. Vitamin and amino acid requirements of salmon // Proc. 5 Int. Congr. Nutr., Washington, D.C. 81 p.

Mertz E.T. 1972. The protein and amino acid needs // J.E. Halver (ed.), Fish Nutrition. Academic Press. New York. P.105–143.

Philips A.M., Brockway D.R. 1959. Dietary calories at the production of trout in hatcheries // Prog. Fish. Cult. V.21. P.6.