TALLINNA ÜLIKOOL

Loodus- ja terviseteaduste instituut

Läänemere tingimustes kultiveeritud rannakarbi vääristamine

Rando Tuvikene ja Marju Robal

Tallinn 2022

EMKF
RAKENDUSKAVA
2014-2020

Euroopa Liit
Euroopa Merendus- ja Kalandusfond

Tööd on teostatud Tartu Ülikooli Eesti mereinstituudi kalanduse teabekeskuse tellimusel uuringu „Läänemere tingimustes kultiveeritud rannakarbi vääristamine“ (13.08.2020−17.10.2022) raames.

Aruande eksperimentaaltöö on teostatud Tallinna Ülikooli loodus- ja terviseteaduste instituudis ajavahemikul 13.08.2020−12.10.2022.

Töö teostajad: Rando Tuvikene, *PhD*

Marju Robal, *MSc*

Sisukord

Sissejuhatus 4
1. Rannakarp 5
2. Materjalid ja metoodika 6
2.1 Uuringuks kasutatud rannakarbi biomass 6
2.2 Hoiustamine 6
2.3 Kuivaine ja tuhasisalduse määramine 6
2.4 Rannakarbi liha keemilise koostise selgitamine 6
2.4.1 Valgusisalduse määramine 6
2.4.2 Aminohappelise koostise määramine 7
2.4.3 Glükogeeni sisalduse määramine 7
2.4.4 Lipiidide ja rasvhapete sisalduse määramine 8
2.5 Lihavalgu hüdrolüüsi efektiivsuse hindamine spektrofotomeetriliselt 8
2.6 Rannakarbi biomassi fraktsioneerimine 9
2.6.1 Mehaaniline fraktsioneerimine 9
2.6.2 Ensümaatiline hüdrolüüs 10
2.6.3 Fraktsioneerimine ultrafiltrimise teel 11
2.6.4 Rannakarbi biomassi happeline hüdrolüüs 13
2.6.5 Rannakarbi liha fraktsioonide puhastamine alkoholsadestuse meetodil 13
2.6.6 Glükogeenirikka rannakarbifraktsiooni valmistamine 15
2.7 Rannakarbi fraktsioonide prebiootiliste omaduste selgitamine 15
2.8 Rannakarbi biomassis esinevate madalmolekulaarsete lenduvate ainete tuvastamine 15
3. Tulemused ja arutelu 16
3.1 Rannakarbi liha keemiline koostis 16
3.2 Rannakarbi mineraalse komponendi osakaal 20
3.3 Rannakarbi fraktsioonide iseloomustus 21
3.4 Biomassi mineraalse komponendi vähendamine happetöötlusel 22
3.5. Preparaatide fraktsioneerimine ultrafiltrimise meetodil 23
3.6. Preparaatide prebiootiline toime 24
3.7 Biomassis esinevad madalmolekulaarsed lenduvad komponendid 27
3.8 Preparaatide glükogeeni sisaldus 28
3.9 Rannakarbi biomassist pärinevad fraktsioonid kalasööda komponendina 30
3.10 Skaleeritavus ja hinnang protsesside tasuvusele 31
Kokkuvõte 34
Kirjandusviited 35

Sissejuhatus

Läänemere karpidest on perspektiivne vesiviljeldav liik söödav rannakarp (liikide *Mytilus edulis* ja *M. trossulus* hübriid). Eesti rannikumere madala soolsuse ja suhteliselt aeglase kasvukiiruse tõttu jäävad siinse söödava rannakarbi mõõtmed väiksemaks ja koda õhemaks kui Läänemere lääneosas või Põhjameres kasvavate rannakarpide omad. Karbikasvatuse saaki saaks koristada umbes iga kahe aasta tagant, karbi maksimaalne saavutatav pikkus on ~2,5 cm.

Majanduslikult tasuva karbikasvanduse arendamise ühe osana on vajalik tegeleda ka toorme vääristamisega, et kõnealune vesiviljelus oleks jätkusuutlik. Väikesemõõduliste karpide kasutamine otse inimtoiduks on keeruline ja seetõttu inimeste toidulaual ka vähenõutud, mistõttu on selge vajadus selle biomassi vääristamiseks läbi teistsuguste aspektide. Rannakarbi biomass sobib väetise, kala-, looma- ja linnusööda tootmiseks, kuid see võiks olla ka kõrgema lisandväärtusega, farmaatsia- ja kosmeetikatööstuse toodete tooraineks.

Kuna madalas soolsuses kasvanud söödava rannakarbi biomassi alaseid teadustöid ja uuringuid on piiratud arvul, siis ei ole ka piisavalt informatsiooni, kuidas võiks Eestis kasvatusliinidelt kogutud rannakarpe efektiivselt kasutada ning milliste juba kasutusel olevate biomassidega võiks rannakarp konkureerida.

Toiteväärtuslikust aspektist on oluline välja selgitada kõnealuse biomassi keemiline koostis – mineraalse komponendi osakaal, valkude sisaldus, nende aminohappeline koostis, glükogeeni ja lipiidide sisaldus (sh dokosaheksaeenhappe, DHA ja eikosapentaeenhappe, EPA osakaalud). Biomassi fraktsioneerimise otstarbekus erinevateks komponentideks oleneb nende sisaldusest biomassis ja töötluste energiamahukusest (sh töötluse mõjust erinevatele komponentidele).

Näiteks rannakarbi biomassist saaks väärtuslikku kalasööta kui sellest eemaldada enamus mineraalset osa (peamiselt kodadest pärinev kaltsiumkarbonaat) ja liha koostises olev glükogeen. Viimast ei suuda hästi seedida lõhilased, kuid seda kasutatakse biokeemias nukleiinhapete sadestajana ning kemikaalina mõnedes teistes spetsialiseeritud laboriuuringutes.

Kuna tänapäevane kalasööt sisaldab üha suurenevas koguses taimseid komponente, mis ei pruugi maitseomadustelt kalale sobida, on aktuaalseks muutunud atraktantide lisamine kalasööta. Rannakarbi liha ja selle kogubiomassist pärinevad ekstraktid võivad toimida mitmetele röövkaladele just selliselt. Liha/ekstrakti efektiivsus maitseparandajana sõltub nende aminohappelisest koostisest, valkude/peptiidide molekulmassist ja aminohapete esinemist vabal kujul. Vees lahustumatut ja kodade küljes olevast lihast saab valke ja aminohappeid vabastada näiteks ensüümtöötlusega, mida hiljem on võimalik täiendavalt fraktsioneerida.

Mitmed rannakarbi biomassis esinevad komponendid võivad omada prebiootilist toimet, st võimet soodustada organismile kasulike (probiootiliste) mikroorganismide kasvu ning samaaegselt inhibeerida patogeenseid mikroobe. Prebiootiliselt võivad toimida nii sahhariidid kui ka valgud, toime määravad otseselt ära nende ainete molekulaarstruktuuri iseärasused ning molekulmass.

Käesoleva töö eesmärgiks on selgitada võimalusi Läänemere tingimustes kultiveeritud söödava rannakarbi biomassi vääristamiseks, võttes aluseks biomassi ja sellest saadavate preparaatide keemilise koostise karakteristikud.

1. Rannakarp

Rannakarpide keemilise koostise kvaliteedinäitajad (sh toiteväärtus ja ohutus) on peamiselt mõjutatud ümbritsevast kasvukeskkonnast. Eesti rannikumere madala soolsuse ja suhteliselt aeglase kasvukiiruse tõttu jäävad siinsete söödavate rannakarpide mõõtmed väikseks, maksimaalne saavutatav pikkus on ~2,5 cm. Saaki kasvandustest saaks umbes iga kahe aasta tagant.

Eesti lähialadel, Läti rannikuvetes kasvanud rannakarbi keemilist koostist on uuritud 2013. aastal EcoMussel projekti (Baltic Ecomussel 2003) raames. Leiti, et rannakarbi valgusisaldus oli ~20–31% liha kuivkaalust ning selle sisaldus sõltub nagu rasvasisalduski (7–18 % liha kuivkaalust) kudemisperioodist ja aastaajast. Soojal perioodil võib rasvade sisaldus olla kordades kõrgem kui talvel. Mõned autorid on viidanud fosfolipiidide ja saasteainete PAH ja PCB sisalduse omavahelisele seosele (Gonzalez et al. 2006; Capuzzo, Leavitt 1988).

Teiste hiljutiste uuringute (Naik, Hayes 2019; Adler 2021) põhjal on rannakarbi kuivliha tuhasisaldus ~10–12%, valgusisaldus ~55–59 %. Sahhariidide osakaal karbi liha kuivkaalust võib olla kuni 22,5%, lipiide ~7%. Võrreldes teiste loomalihadega on rannakarbi liha niiskusesisaldus väga kõrge (80–82%).

Tagalahe karbikasvatusest pärineva söödava rannakarbi (liikide *Mytilus edulis* ja *M. trossulus* hübriid; Wenne et al. 2020) keemilist koostist võiks võrrelda ka sarnase liigi, rändkarbi (*Dreissena polymorpha*), omaga, eriti isendite puhul, mis on kasvanud Läänemere madala soolsusega vetes. 2017. aastal valminud SA Keskkonnainvesteeringute Keskuse projekti (Lauringson, Veber 2017) raames teostati Pärnu lahes kasvatatud rändkarbi keemilise koostise analüüsid. Leiti, et karbiliha on madala kalorsusega (53 kcal/100 g märgkaalu kohta), kuna sisaldab vähe rasva (1,5–1,9% märgkaalu kohta) ning on kõrge valgusisaldusega (9,6% märgkaalu kohta, ~11% kuivkaalu kohta). Aminohapped moodustasid valgust 92%. Asendamatuid aminohappeid oli 0,5%, enim sisaldas rändkarbiliha glutamiinhapet (1,9%) ja kõige vähem tsüsteiini (0,1%). Polüküllastumata rasvhapetest oli esindatud oomega-3 rasvhapped 0,33 % sisaldusega karbi märgkaalu kohta. Rändkarbi kuivainesisalduseks saadi 17,3% ja tuhasisalduseks 2,7%. Mineraalainetest sisaldas liha enim kaltsiumit (~3,6 g/kg märgkaalutise kohta). Mikroelementidest oli peamiselt esindatud raud (~72 mg/kg) ja mangaan (75 mg/kg).

Eelmainitud uuringu käigus analüüsiti ka rannakarpide keskkonnamürkide (tinaorgaanilised ühendid, raskmetallid, kloororgaanilised pestitsiidid, polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud, dioksiinid ja dioksiinilaadsed polüklooritud bifenüülid) sisaldusi. Rändkarpide karbiliha märgkaalu kohta jäid kloororgaanilised pestitsiidid alla labori määramispiiri 0,005 mg/kg. Keskkonnakvaliteedi piirnormid jäävad aga kõnealuse ühendite grupi ainete kohta palju väiksemaks kui oli kasutatud meetodi määramispiir. Dioksiinide ja furaanide ning dioksiinide, furaanide ja PCB-de summaarne ekvivalentkontsentratsioon (TEQ) ületas rasvas piirnormi, mis on kehtestatud mereorganismidest toodetud õlidele. Seega ei sobi selline biomass inimtoiduks kasutatava õli tootmiseks.

Samuti anti aruandes soovitus, et karpide korjeaeg võiks jääda perioodi, kui sinivetikate õitsenguajad on möödas, s.o hilissügisel või talvel, sest karbid võivad sinivetikate õitsengu ajal sisaldada sinivetikatest pärinevaid toksiine.

2. Materjalid ja metoodika

2.1 Uuringuks kasutatud rannakarbi biomass

Käesolevas töös kasutatud rannakarbi biomass pärines Läänemerest, Tagalahe (58,45644N, 22,05452E) rannakarbi kasvatusfarmist 0–3 meetri sügavuselt. Karpe koguti kahel korral, 23. septembril 2020. a ja 23. novembril 2021. a; rannakarpide vanus korjehetkel oli 1–1,5 aastat.

2.2 Hoiustamine

Kogutud biomass pakendati märjalt 1-liitriste portsjonite kaupa plastikkottidesse ning hoiustati kuni laboratoorsete analüüsideni -20 °C juures.

2.3 Kuivaine ja tuhasisalduse määramine

Proovide kuivaine ja tuhasisaldused määrati gravimeetriliselt. Proovide kuivatamiseks kasutati lüofiliseerimist. Enne tuhastamist kõik proovid külmkuivatati, seejärel tuhastati muhvelahjus esialgu 550 °C juures 6 tunni jooksul, millele järgnes proovide jahutamine eksikaatoris, kaalumine ning täiendav tuhastamine 950 °C juures 3 tunni jooksul.

Rannakarbi ja selle osade (koda ja liha) tuhasisalduse määramiseks kasutati nii 2020. aastal kui ka 2021. aastal korjatud biomasse, mis sulatati toatemperatuuril, eemaldati biomassis esinenud tõruvähid, vetikad ja tühjad karbikojad. Sorteerimisel eelistati rannakarpe, mis ei olnud kaetud sammalloomadega.

Sorteeritud rannakarbid loputati demineraliseeritud veega, mille kogus oli võrdne kolmekordse rannakarpide ruumalalise mahuga (st 3 x 500 ml) ning nõrutati. Seejärel sorteeritud rannakarbid külmkuivatati.

Külmkuivatatud rannakarpidest sorteeriti omakorda välja karbid, mis ei olnud külmkuivatuse käigus avanenud või olid avanenud vähe ning seda osa biomassist kasutati kodade ja liha tuhasuse määramiseks. Avanenud karpe ei kasutatud, kuna nendest võis osa liha kuivainest külmkuivatuse käigus kojast välja pudeneda.

Tuhasuse määramiseks selekteeritud rannakarbid (40 ja 65 tk) avati õhukese spaatli abil, samuti eemaldati sama vahendiga ka koja küljest kuivanud liha. Külmkuivatatud rannakarpide puhul on liha suhteliselt kergesti koja küljest eemaldatav. Kõrgel temperatuuril kuivatatud karpide liha seevastu on koja küljest raskesti kättesaadav. Eraldi kogutud rannakarbi liha ja kojad purustati laboratoorses nugaveskis tsüklitena 3 x 7 sekundit, vältimaks proovi kuumenemist.

2.4 Rannakarbi liha keemilise koostise selgitamine

2.4.1 Valgusisalduse määramine

Lahustuva valguosa määrati Bradfordi meetodil, kasutades reagenti (Sigma, B6916) vastavalt tootjapoolsetele juhenditele.

2.4.2 Aminohappelise koostise määramine

Aminohapete sisaldused tuvastati lüofiliseeritud ja krüogeenselt jahvatatud rannakarbi liha või lihaekstraktide proovides, kasutades gaasikromatograafilist meetodit kombineerituna massispektromeetrilise detekteerimisega (GC-MS).

Biomassis (sh valkude koosseisus) esinevate aminohapete määramine. 0,02 g kuiva proovi hüdrolüüsiti hermeetiliselt suletud klaastuubides 15 h 120 °C juures 2 ml 6 M HCl lahuses. Hüdrolüüsitud proov kuivatati 95 °C juures lämmastikuvoolus ning lahustati 2 ml vees.

Vabade aminohapete määramine. 0,05 g märjale proovile lisati 1,5 ml 0,1 M HCl ning loksutati tugevalt 1400 rpm juures toatemperatuuril 5 min. Seejärel segu tsentrifuugiti 15 min 4 °C juures pööretel 21000 x g ning supernatant säilitati analüüsini temperatuuril -80 °C.

Gaasikromatograafiline analüüs. 100 µl eelnevates etappides saadud aminohappeid sisaldavale lahusele lisati 250 µl atsetonitriili, loksutati ning tsentrifuugiti 21000 x g juures 3 min. 100 µl supernatanti pipeteeriti kuumuskindlasse korgiga suletavasse Eppendorf tuubi ning lisati 100 µl sisestandardi lahust (5 µg/ml DL-norleutsiini). Proov aurutati lämmastikuvoolus kuivaks, lisati 50 µl diklorometaani, loksutati ettevaatlikult ning aurutati taaskord lämmastikuvoolus kuivaks. Kuivatatud proovile lisati 100 µl MTBSTFA (Supelco, 77626) ja 100 µl atsetonitriili ning segati hoolikalt. Segu kuumutati 100 °C juures 1 h, misjärel tsentrifuugiti 15 min 4 °C juures pööretel 21000 x g, viidi 200 µl mahuga prooviviaali. Viaalis olevat lahust tsentrifuugiti veelkord 2000 rpm juures 5 min ning seejärel analüüsiti GC-MS meetodil.

Aminohapete kontsentratsioonid määrati Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra gaasikromatograafi süsteemiga, kasutades massidetektorit (MS) ning ränitäidisega kapillaarkolonni Phenomenex Zebron ZB-5MS (30 m x 0,25 mm, kihipaksus 0,25 µm). Kandegaasina kasutati heeliumi voolukiirusel 1 ml/min. Proovi sisestusseade opereeris 280 °C juures, kasutati 2 mm sisediameetriga sirget lainerit. MS detektor töötas temperatuuril 325 °C, ioonallikas 300 °C juures. Skaneeringute vahemik oli m/z = 25–500, proovi sisestamine toimus *split* režiimis (jaotusvool 100), proovi sisestusruumala oli 0,5 µl. Analüüsiprogrammis hoiti kolonni 2 min vältel 100 °C juures, seejärel tõsteti temperatuur 5 °C/min 298 min juurde ja hoiti seal 25 min. Kvantifitseerimine toimus analüütiliste standardite (Supelco A6407, A6282) kaudu.

2.4.3 Glükogeeni sisalduse määramine

Glükogeeni sisaldus tuvastati lüofiliseeritud ja krüogeenselt jahvatatud rannakarbi liha või lihaekstraktide proovides, kasutades leeliselist ekstraktsiooni ja spektrofotomeetrilist tuvastamist fenool-väävelhappe reagendi abil.

Proovide ettevalmistus. 0,001–0,005 g lüofiliseeritud karbiliha asetati keeratava korgiga Eppendorf tuubidesse, lisati 100 µl 30% KOH vesilahust, segati ettevaatlikult ning kuumutati termoloksutajas 99 °C juures 20 min (1000 rpm). Seejärel jahutati segu jäävannis, lisati 150 µl 96% etanooli ja segati intensiivselt 2000 rpm juures. Proovid asetati 15 minutiks termoloksutajasse 99 °C juurde (1000 rpm), seejärel jahutati ja analüüsiti spektrofotomeetriliselt.

Spektrofotomeetriline analüüs. Eelmises etapis valmistatud proovidele lisati 1250 µl demineraliseeritud vett ning segati intensiivselt 2000 rpm juures. 60 µl saadud lahust pipeteeriti uude 2 ml suurusesse Eppendorf tuubi ja lisati 180 µl vett. Segu loksutati tugevalt 2000 rpm juures ning lisati

20 µl 80% fenooli vesilahust. Seejärel lisati automaatpipetiga kiirelt 1200 µl kontsentreeritud väävelhapet (happejuga suunati otse lahusekihi keskele). Proovi segati intensiivselt vorteksil, lasti seejärel 30 minutit toatemperatuuril seista, valati polümetüülmetakrülaadist (PMMA) pool-mikro küvetti ning mõõdeti neelduvus 490 nm juures. Mõõtmised teostati, kasutades võrdlusküvetis puhast vett. Glükogeeni kvantifitseerimiseks kasutati austritest pärinevat glükogeeni standardainet (Sigma, G8751).

2.4.4 Lipiidide ja rasvhapete sisalduse määramine

Lipiidide üldsisalduse tuvastamine. Lipiidide sisaldus tuvastati lüofiliseeritud ja krüogeenselt jahvatatud rannakarbi liha või lihaekstraktide proovides, kasutades ekstraktsiooniks kloroform:metanool (2:1, v/v) segu. 0,3 g homogeniseeritud lihapulbrit asetati klaasist katseklaasi ja lisati 1 ml metanooli ning 2 ml kloroformi. Saadud suspensiooni loksutati tugevalt 90 sekundi vältel ning seejärel inkubeeriti 40 °C juures ultrahelivannis 30 min. Seejärel lisati 1,25 ml 2% NaCl vesilahust ning 1,25 ml kloroformi ning loksutati tugevalt. Proovi tsentrifuugiti 1700 x g juures 20 minutit ning kloroformikiht viidi klaasist Pasteuri pipeti abil eelnevalt kaalutud klaasist ekstraktsioonituubi. Orgaanilised solvendid eemaldati kuivatamisel lämmastikuvoolus ning proovi kuivmass (karbiõli) väljendati lipiidide protsentuaalse sisaldusena algmaterjali suhtes.

Rasvhapete metüülestrite valmistamine. Valmistati rasvhapete metüülestrid (FAME), mille sisaldused kvantifitseeriti gaasikromatograafilisel meetodil. Klaasist katseklaasi kaaluti ligikaudu 0,05 g eelmises etapis saadud karbiõli, lisati 1,5 ml 5% väävelhappe lahust metanoolis. Segu kuumutati 1 h 50 °C juures vesivannil, seejuures iga 15 minuti järel õrnalt 30 sekundi vältel loksutades. Seejärel jahutati tuubid jää ja vee segus ning proovidele lisati 1 ml vett ning 1,5 ml heksaani. Seejärel loksutati segu tugevalt ning lasti kihistuda. Ülemine kiht viidi klaasist Pasteuri pipeti abil uude klaastuubi, aurutati lämmastikuvoolus kuivaks ning lisati 500 µl heksaani. Proove säilitati GC analüüsini -20 °C juures.

Rasvhapete sisalduse määramine. Eelmises etapis saadud rasvhapete metüülestrid kvantifitseeriti Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra gaasikromatograafi süsteemiga, kasutades massispektromeetrilist detektorit ning ränitäidisega kapillaarkolonni Phenomenex Zebron ZB-5MS (30 m x 0,25 mm, kihipaksus 0,25 µm). Kandegaasina kasutati heeliumi voolukiirusel 30 cm/s. Proovi sisestusseade opereeris 280 °C juures. MS detektor töötas temperatuuril 325 °C, ioonallikas 300 °C juures. Skaneeringute vahemik oli m/z = 25–500, proovi sisestamine toimus *split* režiimis (jaotusvool 100), proovi sisestusruumala oli 1 µl. Analüüsiprogrammis tõsteti kolonni temperatuur 160 °C juurest 2,5 °C/min 260 min juurde, seejärel 5 °C/min 298 °C juurde ja hoiti seal 15 min. Tulemused väljendati massiprotsendina kogu identifitseeritud rasvhapete suhtes. Rasvhapete identifitseerimiseks kasutati PUFA-2 (Sigma, 47015U) ja 38 FAME Mix (Supelco CRM47885) standardite segu.

2.5 Lihavalgu hüdrolüüsi efektiivsuse hindamine spektrofotomeetriliselt

Rannakarbi lihavalgu ensüümtöötluse efektiivsuse kiireks ja esialgseks hindamiseks kasutati *o*-ftaaldialdehüüdi (OPA) meetodit, mis võimaldab spektrofotomeetri vahendusel hinnata lahuses esinevate vabade aminohapete ja peptiide hulka. OPA-meetodi kohaldamiseks kõnealuse töö katsete tarvis kasutati peamiselt Nielsen et al. (2001) poolt väljatöötatud meetodit. Ensümaatilise hüdrolüüsi

hindamiseks antud töö raames kasutati neelduvuse muutust algproovi suhtes või ekvivalenti (%) L-seriini suhtes.

100 ml reagendi valmistamiseks kasutati järgnevaid koguseid ja etappe:

Lahus A: 3,81 g dinaatriumtetraboraat dekahüdraati (booraks) ja 0,1 g naatriumdodetsüülsulfaati (SDS) lahustati ~75 ml demineraliseeritud vees ja viidi üle 100 ml mõõtekolbi.

Lahus B: 0,07836 g *o*-ftaaldialdehüüd (OPA) lahustati 2 ml 96% etanoolis ja viidi kvantitatiivselt üle lahusesse A.

Lahus C: 0,088 g DL-ditiotreitool (DTT) lahustati mõnes milliliitris demineraliseeritud vees ja viidi kvantitatiivselt üle lahusesse A+B. Lahuse nivoo viidi kolvi mõõtejooneni demineraliseeritud veega.

Saadud reagenti hoiustati pimedas.

Spektrofotomeetriline analüüs. Polümetüülmetakrülaadist (PMMA) pool-mikro küvetti pipeteeriti 10 µl proovilahust ja seejärel 1690 µl reagenti. Neelduvus mõõdeti Shimadzu UV-1800 spektrofotomeetriga 340 nm juures täpselt 2 minuti möödudes.

2.6 Rannakarbi biomassi fraktsioneerimine

Antud katses kasutati 2020.a korjatud rannakarbi biomassi. Teostati kaks fraktsioneerimist (variant I ja variant II), mis mõlemad sisaldavad kolme peamist töötlustappi: mehhaaniline fraktsioneerimine, biomassi ensümaatiline hüdrolüüs ja sellest saadud vees lahustuva proovi fraktsioneerimine ultrafiltratsiooni teel. Fraktsioneerimised erinevad üksteisest alaetappide arvu ja kasutatud biomassi koguste poolest.
Selguse mõttes on fraktsioneerimisetapid tähistatud numbritega ning visualiseeritud parema ülevaate saamiseks **joonisel 1** ja **tabelis 1**.

2.6.1 Mehaaniline fraktsioneerimine

Variant I

1) ~1 kg (~1,8 L) külmutatud rannakarpe pesti suurel plastiksõelal mõni minut ~20 °C voolava kraaniveega kuni kõik rannakarbid olid üksteisest lahti sulanud. (→ „Pestud nõrutatud karbid“)
2) Seejärel nõrutati karpe ~15 min sõelal.
3) Karbimassile lisati samas mahuosas toasooja demineraliseeritud vett ja segu homogeniseeriti blenderiga (Philips ProBlend 6 3D) 3 min maksimumpööretel.
4) Homogeniseeritud karbimassil lasti paar minutit settida, seejärel dekanteeriti ülemine liharikas osa. Purustatud sadenenud kojad koguti eraldi. (→ „Purustatud kojad“)
5) Dekanteeritud vedelikku tsentrifuugiti (~300 g kogustes) 4500 x g juures 5 minutit temperatuuril ~15 °C.
6) Fuugijääk ja supernatant eraldati üksteisest. (→ „Supernatant-1“)
7) Fuugijäägile lisati kahekordses massikoguses demineraliseeritud vett, segati ühtlaseks massiks ja tsentrifuugiti uuesti (~300 g kogustes) 4500 x g juures 5 min temperatuuril ~15 °C.
8) Saadud fuugijääk ja supernatant eraldati üksteisest. (→ „Supernatant-2“)
9) Fuugijäägile lisati demineraliseeritud vett, et tekiks 50% lahjendus. (→ „Fuugijääk-1“)

10) Tekkinud fraktsioonidest määrati kuivaine- ja tuhasisaldused ning pH.
11) Fraktsioonid külmutati ja hoiustati edasisteks analüüsideks -20 °C juures.

Variant II

1) ~1,17 kg (~2,11 l) külmutatud rannakarpe pesti suurel plastiksõelal mõni minut ~20 °C voolava kraaniveega kuni kõik rannakarbid olid üksteisest lahti sulanud. (→ „Pestud nõrutatud karbid“)
2) Seejärel nõrutati karpe ~15 min sõelal.
3) Karbimassile lisati 400 ml (so 4,5 korda väiksemas mahuosas ja 2,5 korda väiksemas massiosas kui pestud rannakarpe) toasooja demineraliseeritud vett ja segu homogeniseeriti blenderiga (Philips ProBlend 6 3D) 3 min maksimumpööretel.
4) Homogeniseeritud biomassi tsentrifuugiti 4500 x g juures 5 minutit temperatuuril ~15 °C.
5) Fuugijääk ja supernatant eraldati üksteisest. (→ „Supernatant-X“ ja „Fuugijääk-X“)
6) „Fuugijääk-X“-le (690 g) lisati 3 korda väiksemas massikoguses demineraliseeritud vett (so 230 g) kui saadud fuugijääk ja segati ühtlaseks massiks.
7) Tekkinud fraktsioonidest määrati kuivainesisaldused.
8) „Supernatant-X“ külmutati ja hoiustati -20 °C juures edasisteks analüüsideks. „Fuugijääk-X“ kasutati ensüümtöötluse ja ultrafiltratsiooni jaoks.

2.6.2 Ensümaatiline hüdrolüüs

Variant I

12) Toatemperatuuril sulatati üles -20 °C juures hoiustatud rannakarbi mehhaanilise fraktsioneerimise käigus saadud „Fuugijääk-1“.
13) Sulatatud fraktsioonile lisati samasuguses massiosas MQ-vett. (→ „2x lahjendatud Fuugijääk-1“)
14) Veega lahjendatud Fuugijääk-1 (pH 7,86) lisati **1% enüüm subtilisiini** (2,4 U/g) bakterist *Bacillus licheniformis* (Sigma, P4860) ja proovi ensüümtöödeldi 2 tundi 60 °C juures vesivannis magnetsegajal.
15) Ensüüm inaktiveeriti 99 °C juures vesivannil 15 min jooksul. (→ „Ensüümtöödeldud proov“)
16) Inaktiveeritud jahutatud proovi tsentrifuugiti 2x10 min 15 °C juures pööretel 9500 x g. Fuugijääk ja supernatant koguti eraldi. (→ „Fuugijääk-2“ ja „Supernatant-3“)

Variant II

9) Rannakarbi mehhaanilise fraktsioneerimise käigus saadud „Fuugijääk-X“ (pH 7,80) lisati **0,5% enüüm subtilisiini** (1,2 U/g) bakterist *Bacillus licheniformis* (Sigma, P4860) ja proovi ensüümtöödeldi
2,5 tundi 60 °C juures vesivannis magnetsegajal.
10) Ensüüm inaktiveeriti 99 °C juures vesivannil 15 min jooksul. (→ „Ensüümtöödeldud proov“)
11) Inaktiveeritud jahutatud proovi tsentrifuugiti 2x10 min 15 °C juures pööretel 9500 x g. Fuugijääk ja supernatant koguti eraldi. (→„Fuugijääk-2X-E, FC1“ ja „Supernatant-X-E, FC2“)

2.6.3 Fraktsioneerimine ultrafiltrimise teel

Variant I

17) Saadud fraktsiooni „Supernatant-3“ kasutati ultrafiltratsiooniga fraktsioneerimisel. Ultrafiltratsiooniks kasutati VivaFlow200 PES-membraani 10000 MWCO. Proovi ruumala vähendati membraaniga 14,5 korda, seejärel pesti retentaati 13-kordse demineraliseeritud vee kogusega. (→ „UF-Filtraat“ ja „UF-Retentaat“)

18) Saadud fraktsioonides hinnati OPA-meetodi kaudu lahuses esinevate vabade aminohapete ja/või peptiide olemasolu, mõõdeti pH-väärtused ning määrati kuivaine sisaldus ja tuhasus (vt **Tabel 5** ja **6**).

Variant II

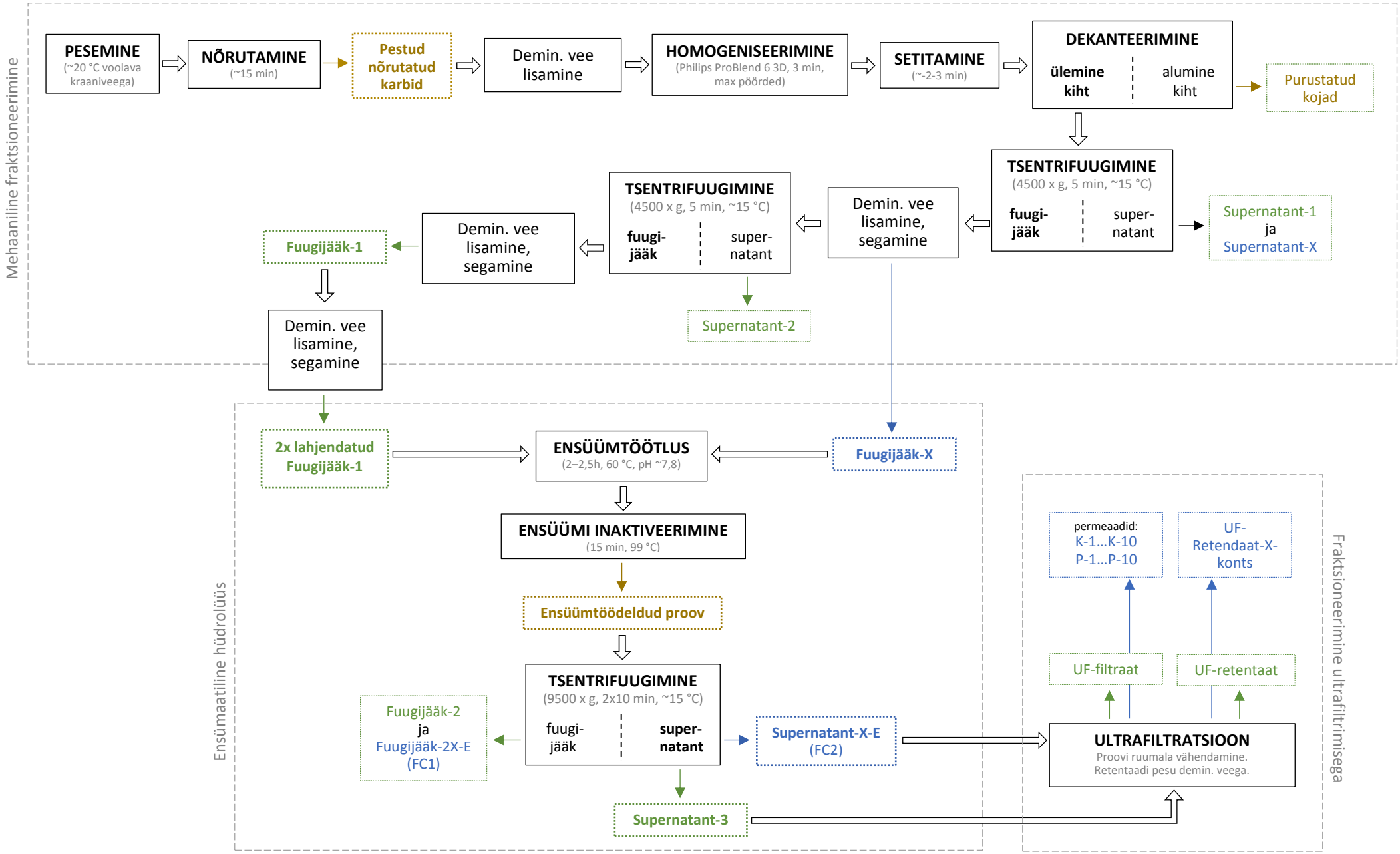
12) Proovi „Supernatant-X-E“ kasutati ultrafiltratsiooniga fraktsioneerimisel. Ultrafiltratsiooniks kasutati VivaFlow200 HY-membraani 2000 MWCO. Proovi ruumala vähendati membraaniga 4,5 korda, mille käigus koguti ~25 ml kaupa 10 permeaadi (→ „K-1…K-10“) proovi.

13) Kontsentreeritud retentaati (→ „UF-Retentaat-X-konts“) pesti 30 ml demineraliseeritud vee kogustega 10 korda. Peale iga nn pesuvee lisamist retentaat kontsentreeriti uuesti ja koguti 30 ml permeaati (→ „P-1…P-10“). Protsessi lõpuks saadi proov „UF-Retentaat-X-konts-pestud“).

14) Saadud permeaatide ja retentaatide puhul hinnati OPA-meetodi kaudu lahuses esinevate vabade aminohapete ja/või peptiide olemasolu. Mõõdeti proovide UV neelduvused 280 nm juures, elektrijuhtivused, pH-väärtused ja kuivainesisaldused (vt **Joonis 7**).

Tabel 1. Rannakarbi biomassi töötlemise ja fraktsioneerimise käigus saadud proovide/fraktsioonide nimekiri.

Variant I		Variant II	
Etapi nr	**Proov / fraktsioon**	**Etapi nr**	**Proov / fraktsioon**
1	Pestud nõrutatud rannakarbid	1	Pestud nõrutatud rannakarbid
4	Purustatud kojad	5	Supernatant-X
6	Supernatant-1	5	Fuugijääk-X
8	Supernatant-2	11	Supernatant-X-E
9	Fuugijääk-1	11	Fuugijääk-2X-E
13	2x lahjendatud Fuugijääk-1	12	permeaadid, 10 tk, „K-1…K-10“
15	Ensüümtöödeldud proov	13	UF-Retentaat-X-konts
16	Fuugijääk-2	13	permeaadid, 10 tk, „P-1…P-10“
16	Supernatant-3	13	UF-Retentaat-X-konts-pestud
17	UF-Filtraat		
17	UF-Retentaat		



Joonis 1. Rannakarbi biomassi fraktsioneerimise üldskeem (variant I ja variant II).

2.6.4 Rannakarbi biomassi happeline hüdrolüüs

Valmistati HCl lahused järgmiste kontsentratsioonidega: 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M ja 0,2 M. Kaaluti neli keeratava korgiga tühja Eppendorf 2 ml mahutavusega tuubi, seejärel lisati neisse ~0,4 g homogeniseeritud lihamassi (Fuugijääk-1) ja märgiti üles täpsed kaalutised. Segati omavahel vastavas kontsentratsioonis soolhappe lahus ja Fuugijääk-1. Segu inkubeeriti 4 h 25 °C juures termoloksutajas 1000 rpm juures. Pärast inkubatsiooni proovid tsentrifuugiti (15000 rpm, 3 min). Supernatant dekanteeriti (visati ära), sadet pesti 1 ml koguse MilliQ veega (pidevalt vortexil loksutades) ja tsentrifuugiti uuesti. Pesuetappi korratati kokku 3 korda. Sademed jäeti tuubidesse ja lüofiliseeriti. Määrati proovide kuivmassid. Happe tulemusel lahustunud karbikodade kogus tuvastati gravimeetriliselt.

2.6.5 Rannakarbi liha fraktsioonide puhastamine alkoholsadestuse meetodil

Katses kasutati 2020.a korjatud rannakarbi biomassi. Meetod A puhul ülessulatatud rannakarpe üheski töötlusetapis ei kuumutatud, seda tehti meetodis B. Selguse mõttes on fraktsioneerimisetapid tähistatud numbritega ning visualiseeritud parema ülevaate saamiseks **joonisel 2**.

Meetod A

1) ~1 kg (~1,8 l) külmutatud rannakarpe pesti voolava kraaniveega kuni kõik karbid olid üles sulanud ning nõrutati seejärel ~15 min.

2) Karbimassile lisati samas mahuosas külma (4 °C) demineraliseeritud vett ning segu homogeniseeriti blenderiga (Philips ProBlend 6 3D) 3 min maksimumpööretel.

3) Homogeniseeritud karbimass tsentrifuugiti 10 min 12000 x g juures temperatuuril 4 °C ning eraldati supernatant ning sade. Supernatandi täiendavaks puhastamiseks filtriti see vaakumfiltratsioonil läbi klaasmembraanfiltri (poorsus P3).

4) Supernatandile lisati kolmekordne mahuosa 96% etanooli, segati, sadestunud materjal eraldati tsentrifuugimise teel, lüofiliseeriti ja säilitati edasisteks analüüsideks (→ „fraktsioon A-F1“).

5) Punktis 3 saadud sademele lisati võrdne mahuosa 96% etanooli, segati ning hoiti 24 h 4 °C juures. Seejärel segu tsentrifuugiti 10 min 12000 x g juures temperatuuril 20 °C ning edasisteks analüüsideks eraldati supernatant (→ „fraktsioon A-FE0“) ning sade (→ „fraktsioon A-F0), viimane lüofiliseeriti.

Meetod B

6) ~1 kg (~1,8 l) külmutatud rannakarpe pesti voolava kraaniveega kuni kõik karbid olid üles sulanud ning nõrutati seejärel ~15 min.

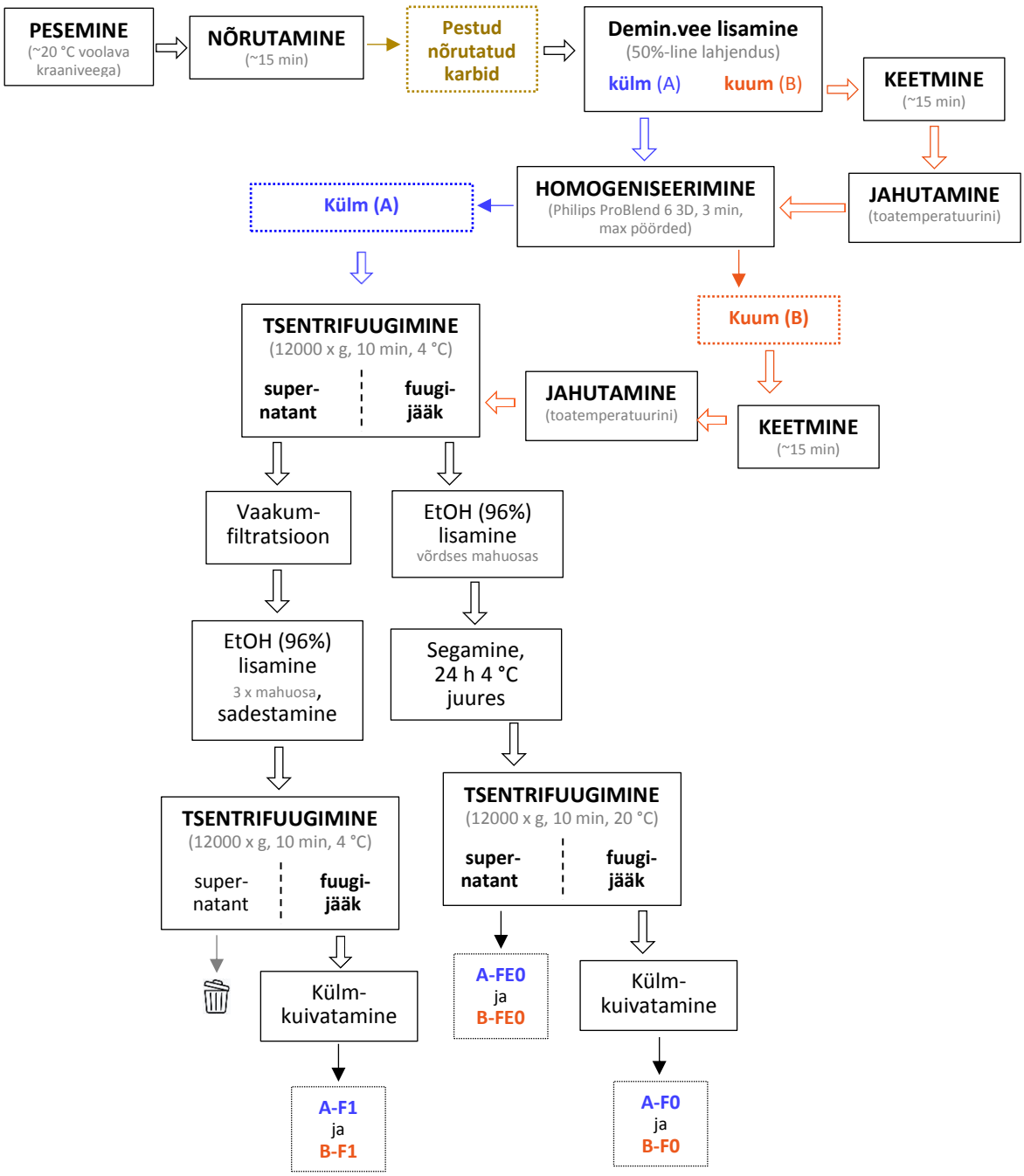
7) Seejärel valati karbimass samasse mahuosasse keeva vette ning keedeti 15 min.

8) Segu jahutati vesivannis toatemperatuurile ning homogeniseeriti blenderiga (Philips ProBlend 6 3D) 3 min maksimumpööretel.

9) Homogeniseeritud segu keedeti veel 15 min ning seejärel tsentrifuugiti 10 min 12000 x g juures temperatuuril 4 °C ning eraldati supernatant ning sade. Supernatandi täiendavaks puhastamiseks filtriti see vaakumfiltratsioonil läbi klaasmembraanfiltri (poorsus P3).

10) Supernatantile lisati kolmekordne mahuosa 96% etanooli, segati, sadestunud materjal eraldati tsentrifuugimise teel, lüofiliseeriti ja säilitati edasisteks analüüsideks (→ „fraktsioon B-F1“).

11) Punktis 9 saadud sademele lisati võrdne mahuosa 96% etanooli, segati ning hoiti 24 h 4 °C juures. Seejärel segu tsentrifuugiti 10 min 12000 x g juures temperatuuril 20 °C ning edasisteks analüüsideks eraldati supernatant (→ „fraktsioon B-FE0“) ning sade (→ „fraktsioon B-F0“), viimane lüofiliseeriti.



Joonis 2. Rannakarbi liha fraktsioonide puhastamine alkoholsadestuse meetodil (variandid **A** ja **B**).

2.6.6 Glükogeenirikka rannakarbifraktsiooni valmistamine

12) ~0,5 kg (~0,8 l) külmutatud rannakarpe pesti voolava kraaniveega kuni kõik karbid olid üles sulanud ning nõrutati seejärel ~15 min.

13) Karbimassile lisati 200 ml külma (4 °C) demineraliseeritud vett ning segu homogeniseeriti blenderiga (Philips ProBlend 6 3D) 3 min maksimumpööretel.

14) Saadud segule lisati 100 g KOH, segati hoolikalt ning kuumutati 30 min 95 °C juures vesivannil.

15) Segu jahutati külmal vesivannil kiirelt toatemperatuurile ning tsentrifuugiti 10 min 12000 x g juures temperatuuril 20 °C.

16) Supernatandile lisati 1,5-kordne mahuosa 96% etanooli ning tekkiv sade eraldati tsentrifuugimise teel. Leelisejääkide vähendamiseks korrati etanooliga sadestamise protseduuri 3 korda.

17) Seejärel lisati sademele väike kogus vett ning neutraliseeriti ettevaatlikult 1 M HCl vesilahusega kuni happelise reaktsioonini. Lahustunud biopolümeerid eraldati lahusest taaskordse etanooli lisamise ja tsentrifuugimise teel, misjärel sadestamisprotseduuri korrati veel ühe korra. Sadestunud glükogeenirikas fraktsioon lüofiliseeriti (→ „fraktsioon A-FG“).

2.7 Rannakarbi fraktsioonide prebiootiliste omaduste selgitamine

Preparaatide prebiootilisi omadusi hinnati kasutades mikroorganisme *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ja *Cutibacterium acnes* subsp. *acnes*. Selleks kultiveeriti mikroorganisme vedelsöötmes 37 °C juures 72 h, suspensiooni optiline tihedus seati lahjendamise teel 0,5 peale ning pipeteeriti 96 süvendiga mikroplaadile. Seejärel lisati rannakarbi preparaatide 0,5% vesilahused ning inkubeeriti 48 h. Bakterite kasvu hinnati kasutades kommertsiaalset mikroorganismide elulemuse tuvastamise kolorimeetrilist analüüsikomplekti (Abcam, ab284554) vastavalt tootjapoolsele analüüsiprotokollile. Selleks lisati igasse kaevu 10 µl WST/ECS lahust, inkubeeriti pimedas 4 h ning neelduvus 460 nm juures mõõdeti mikroplaadilugejaga FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, San Diego, USA). Elulemus väljendati protsendina kontrollkatse suhtes.

2.8 Rannakarbi biomassis esinevate madalmolekulaarsete lenduvate ainete tuvastamine

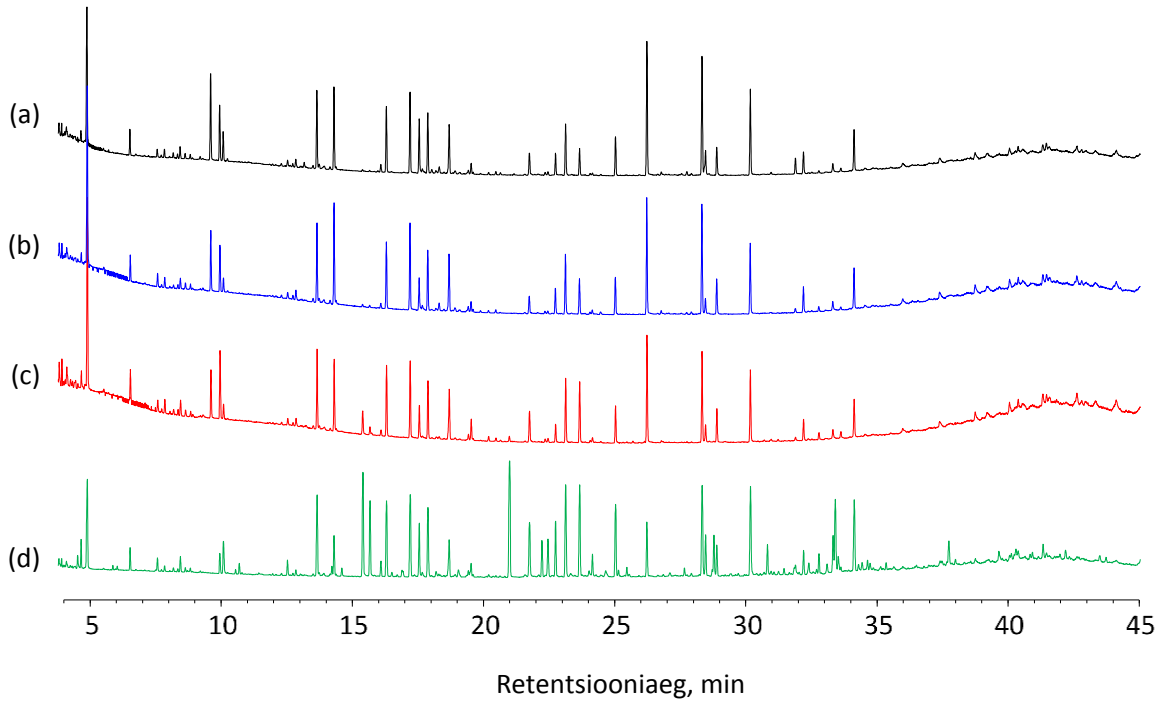
Punktis 2.6.5 kirjeldatud metoodika alusel valmistatud etanoollahustuvates rannakarbi fraktsioonides (fraktsioon A-FE0 ja fraktsioon B-FE0) esinevate lenduvate ühendite tuvastamiseks kasutati gaasikromatograafilist (GC-MS) meetodit. Selleks pipeteeriti 1 ml uuritavat fraktsiooni klaasist katseklaasi ning aurutati 40 °C juures lämmastikuvoolus kuivaks. Aurutusjäägile lisati 1 ml heksaani ning loksutati tugevalt. Saadud lahus filtriti läbi 0,45 µm poorsusega teflonfiltri ning sisestati gaasikromatograafi süsteemi. Kasutati ZB-5MS kolonni (pikkus 30 m, statsionaarse kihi paksus 0,25 µm, sisediameeter 0,25 mm), mille temperatuuri tõsteti analüüsi vältel lineaarselt 180 °C juurest 297 °C juurde (5 °C/min) ning seejärel hoiti 5 min. Kandegaasi voolukiirus oli 31 cm/s, jaotusvoolu (*Split*) suhe 50, sisestusseadme temperatuur 250 °C, proovi ruumala 1 µl. Proovides esinevad ühendid identifitseeriti GC-MS NIST2011 spektritekogu abil ning ühendi esinemine loeti positiivseks kui see andis esinemistõenäosuseks vähemalt 90%.

3. Tulemused ja arutelu

3.1 Rannakarbi liha keemiline koostis

Rannakarbi liha on hea valkude ja funktsionaalsete lipiidide (sh oomega-3 rasvhapete) allikas. Lisaks sisaldab see sageli märkimisväärsetes kogustes glükogeeni. Sõltuvalt liha separeerimise meetodist võib proovidesse sattuda ka erinev kogus kodadest pärinevat kaltsiumkarbonaati.

Käesolevas töös uuriti rannakarbi preparaatide aminohappelist koostist GC-MS meetodil, mis tagas kõigi uuritavate aminohapete jaoks derivatiseerimisjärgselt hea lahutuvuse (**Joonis 3**). Selgus, et uuritud rannakarbi liha aminohapete kogusisaldus kuivmassis peale valkude happelist hüdrolüüsi oli vahemikus 44,2–48,2%. Uuritud preparaatide aminohapete profiilid on esitatud **tabelis 2** ja **joonisel 4**. Tuvastati, et uuritud rannakarbi liha on rikkalik glutamiinhappe, lüsiini, glütsiini ja leutsiini allikas, mõnevõrra väiksemates kogustes esineb selles aspargiinhapet, alaniini ja isoleutsiini. Lihamassis esinevate vabade aminohapete osakaaluks hinnati 0,02–0,49% ja selle moodustasid peamiselt glutamiinhape, arginiin ja alaniin. Kuna glütsiin ja alaniin toimivad mitmetele kalaliikidele atraktantidena, võimaldavad rannakarbi biomassi baasil valmistatud söödalisandid maskeerida kaladele mitteatraktiivseid söödakomponente.



Joonis 3. Aminohapete profiil rannakarbi biomassi fraktsioonides (GC-MS kromatogrammid). Proovid: a) seotud aminohapped 2020. a. septembris kogutud rannakarbi lihas, b) seotud aminohapped 2021. a. novembris kogutud rannakarbi lihas, c) seotud aminohapped ja d) vabad aminohapped ensüüm subtilisiiniga töödeldud rannakarbi biomassi lahustuvas fraktsioonis (FC2).

Täiendavalt vaadeldi aminohapete profiile ka proteaastöötluse läbinud biomassi vesilahustumatus (FC1) ja vesilahustuvas (FC2) fraktsioonis. Lahustumatus fraktsioonis sisaldus aminohappeid vaid 0,11% proovi kuivmassist, mis näitab, et proovis esines valgulist komponenti väga vähesel määral. Selle

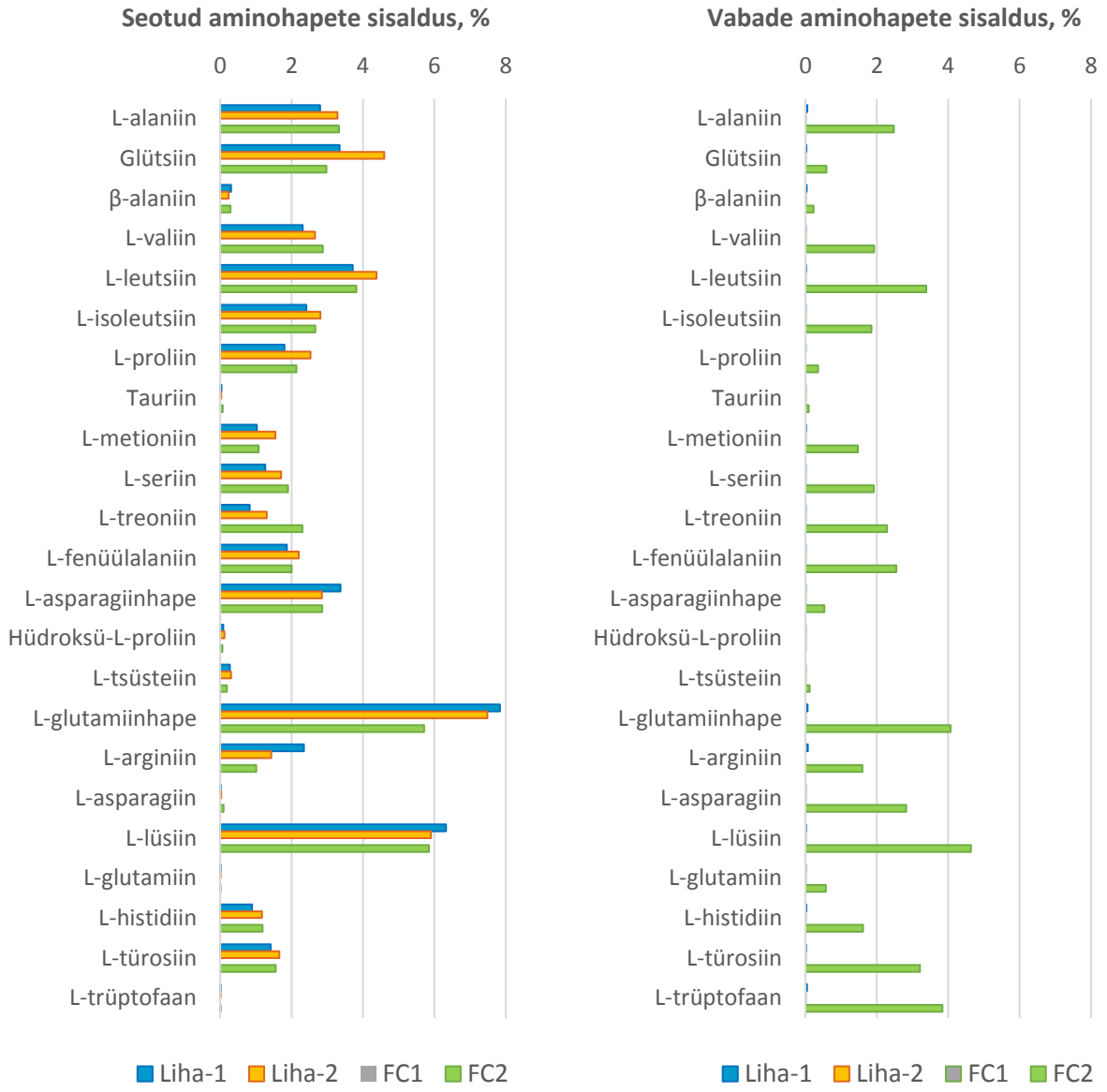
preparaadi peamisteks koostisosadeks olid karbikodadest pärinev anorgaaniline komponent, õlid ja glükogeen. Seotud aminohapete kogusisaldus ensüümtöödeldud fraktsiooni lahustuvas osas jäi sarnaselt rannakarbi lihas määratule 44% juurde. Ka oli selle proovi aminohapete profiil sarnane liha omale – enim leidus glutamiinhapet, lüsiini, leutsiini ja alaniini.

Vabade aminohapete sisaldus ensüümtöödeldud biomassi lahustuvas fraktsioonis oli 42,2%. Sellest võib järeldada, et proteaasid lagundasid lihas esinevad valgud efektiivselt aminohapeteks. Sellisel viisil töödeldud fraktsioon ehk rannakarbi hüdrolüsaat ei erinenud aminohapete profiili poolest väga oluliselt lihas määratud valkude koosseisus esinevate aminohapete omast. Enim leidus ka selles preparaadis glutamiinhapet, lüsiini, leutsiini ja alaniini. Peamiseks erinevuseks oli aga türosiini, trüptofaani ja asparagiini suhteliselt rohke esinemine proovis. Need aminohapped võivad pärineda biomassile lisatud proteaasipreparaadist või tuleneda asjaolust, et ensüümtöötlusega proovi ettevalmistamisel GC-MS analüüsiks ei kasutatud töötlust kõrgel temperatuuril tugevalt happelises keskkonnas.

Tabel 2. Rannakarbi liha ja selle fraktsioonide aminohappeline koostis ning lihamassis ja preparaatides esinevate vabade aminohapete profiil

Tähis	Aminohape	Aminohappe sisaldus (%) rannakarbi preparaadi kuivmassis*							
		Seotud aminohapped				Vabad aminohapped			
		L-1	L-2	FC1	FC2	L-1	L-2	FC1	FC2
Ala	L-alaniin	2,80	3,29	0,01	3,32	0,054	0,002	0,000	2,48
Gly	Glütsiin	3,34	4,60	0,01	2,98	0,025	0,001	0,000	0,59
β-Ala	β-alaniin	0,31	0,24	0,01	0,29	0,034	0,010	0,003	0,23
Val	L-valiin	2,31	2,65	0,01	2,88	0,011	0,001	0,000	1,92
Leu	L-leutsiin	3,71	4,38	0,02	3,81	0,020	0,001	0,001	3,38
Ile	L-isoleutsiin	2,41	2,81	0,01	2,67	0,011	0,001	0,000	1,85
Pro	L-proliin	1,80	2,53	0,00	2,13	0,007	0,000	0,000	0,35
Tau	Tauriin	0,04	0,03	0,01	0,07	0,008	0,002	0,000	0,10
Met	L-metioniin	1,03	1,55	0,00	1,07	0,014	0,001	0,000	1,47
Ser	L-seriin	1,26	1,71	0,00	1,90	0,012	0,000	0,000	1,92
Thr	L-treoniin	0,82	1,31	0,00	2,30	0,013	0,000	0,000	2,29
Phe	L-fenüülalaniin	1,86	2,20	0,01	2,00	0,012	0,001	0,000	2,54
Asp	L-asparagiinhape	3,37	2,85	0,00	2,86	0,012	0,000	0,000	0,53
Hyp	Hüdroksü-L-proliin	0,09	0,12	0,00	0,06	0,000	0,000	0,000	0,00
Cys	L-tsüsteiin	0,27	0,30	0,01	0,19	0,005	0,002	0,001	0,12
Glu	L-glutamiinhape	7,84	7,49	0,00	5,71	0,061	0,000	0,000	4,06
Arg	L-arginiin	2,34	1,43	0,00	1,01	0,068	0,000	0,000	1,60
Asn	L-asparagiin	0,01	0,03	0,01	0,09	0,002	0,001	0,001	2,82
Lys	L-lüsiin	6,32	5,91	0,00	5,85	0,022	0,000	0,000	4,64
Gln	L-glutamiin	0,00	0,00	0,00	0,01	0,010	0,000	0,000	0,57
His	L-histidiin	0,89	1,17	0,00	1,19	0,026	0,000	0,000	1,61
Tyr	L-türosiin	1,42	1,66	0,00	1,56	0,020	0,000	0,000	3,21
Trp	L-trüptofaan	0,00	0,00	0,00	0,01	0,039	0,001	0,000	3,84
Kokku:		**44,24**	**48,23**	**0,11**	**43,95**	**0,49**	**0,02**	**0,01**	**42,12**

* L-1 – 2020. a. septembris kogutud rannakarbi liha; L-2 – 2021. a. novembris kogutud rannakarbi liha; FC1 – ensüüm subtilisiiniga töödeldud rannakarbi biomassi lahustumatu fraktsioon; FC2 – ensüüm subtilisiiniga töödeldud rannakarbi biomassi lahustuv fraktsioon.

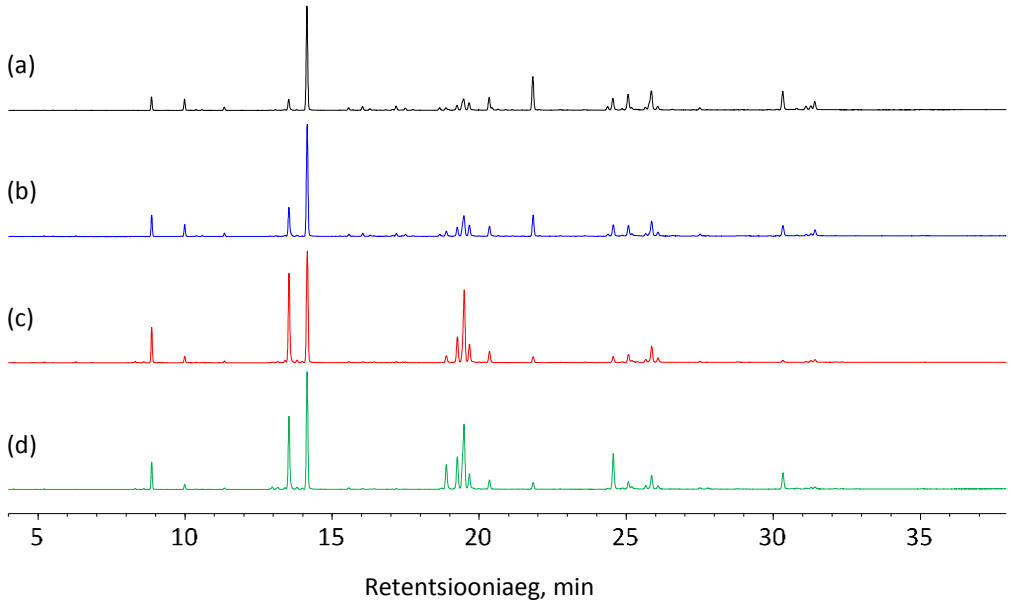


Joonis 4. Rannakarbi liha ja selle fraktsioonide aminohappeline koostis ning lihamassis ja preparaatides esinevate vabade aminohapete profiil graafiliselt. Tähised on selgitatud Tabel 2 juures.

Lipiidide (rannakarbi õli) üldsisaldus uuritud rannakarbi lihamassis jäi vahemikku 6,4–10,4%, seejuures oli õli osakaal suurem novembris kogutud rannakarpide lihas (**Tabel 3**). Rakendatud kromatograafiline meetodi andis uuritud biomassi jaoks sobiliku resolutsiooniga tulemuse (**Joonis 5**), millest selgus, et rasvhapetest esines õlis kõige rohkem palmitiinhapet (16:0), mis moodustas 25,9–29,5% õli kogumassist. See on küllastunud rasvhapetest biomassides ka kõige levinum ning leiab laialdast kasutamist paljudes valdkondades, eelkõige toiduainetööstuses. Kinnitati ka märkimisväärsete koguste dokosaheksaeenhappe (DHA – 22:6 ω3, 8,1–15,1%) ja eikosapentaeenhappe (EPA – 20:5 ω3, 7,1–7,4%) esinemine. Rannakarbi liha rasvhapete profiilis tuvastati lisaks suhteliselt suurtes kogustes eikoseenhapet (20:1 ω9, 3,2–4,8%). Varasemad uuringud on näidanud, et Atlandi ookeanis kasvanud rannakarbi õlis sisaldub eelnimetatud oomega-3 rasvhappeid mõnevõrra rohkem: tuvastatud on 20–22% DHA ning 12–17% EPA sisaldusi (Alkanani 2007).

Kuna tervislikud oomega-3 rasvhapped DHA ja EPA moodustavad rannakarbi rasvhapete profiilist olulise osa, võib rannakarbi või sellest pärinevate õlirikaste ekstraktide tarbimine vähendada südame-veresoonkonnahaiguste riski. Arvestades õli sisaldust rannakarbi biomassis ning selles leiduvate kasulike oomega-3 rasvhapete summaarset sisaldust (DHA + EPA), esineb rannakarbi liha kuivmassis neid rasvhappeid 1,4–1,6%. Oomega-3 rasvhapete päevaseks vajaduseks loetakse kogust 0,1–0,4 g (Leskanich, Noble 1997), sellele vastav rannakarbi liha kuivpreparaadi kogus on 6–26 g, mis sisaldub 120–520 keskmise suurusega Läänemere tingimustes kultiveeritud rannakarbis.

Biomassi töötlus ja fraktsioneerimine mõjutavad otseselt saadavate preparaatide lipiidisisaldusi ja rasvhapete profiili. Ensümaatiliselt (subtilisiiniga) töödeldud rannakarbi biomassi lahustumatus fraktsioonis (FC1) sisaldus lipiide 6,4%, lahustuva osa kuivjäägis (FC2) aga kõigest 1,2% (**Tabel 3**). Saadud fraktsioonide rasvhapete profiilid osutusid aga väga erinevaks. Kui segu vesilahustumatu osa koosseisus tuvastati oomega-3 rasvhapete summaarseks sisalduseks vaid 3,4%, siis lahustuvas osas oli see näitaja 18,3%. Küllastunud rasvhapete osakaal viimases oli aga oluliselt madalam. Seetõttu võib proteaastöötluse teel saadud aminohapete/peptiidide rikast fraktsiooni lugeda hoolimata selles esineva õli suhteliselt madalast sisaldusest, tervist toetava rasvhapete profiiliga preparaadiks.



Joonis 5. Rasvhapete profiilid rannakarbi õlides (GC-MS kromatogrammid). Proovid: a) septembris kogutud rannakarbi liha, b) novembris kogutud rannakarbi liha, c) ensüüm subtilisiiniga töödeldud rannakarbi biomassi lahustumatu fraktsioon (FC1), d) ensüüm subtilisiiniga töödeldud rannakarbi biomassi lahustuv fraktsioon (FC2).

Tabel 3. Rannakarbi õli üldsisaldus ja selles esinevate rasvhapete profiil

Rt, min	Rasvhappe lühend	Rasvhappe sisaldus rasvhapete koguhulgast, %			
		Liha-1	**Liha-2**	**FC1**	**FC2**
8,867	14:0	1,7	3,7	5,0	3,2
11,340	15:0	1,0	1,0	0,4	0,2
14,153	16:0	25,9	29,5	21,6	17,0
13,533	16:1 ω7	3,2	12,2	25,8	16,9
20,350	18:0	3,6	1,9	2,1	1,3
19,700	18:1 ω9 trans	1,8	2,5	3,5	1,8
19,943	18:1 ω9 cis 18:2 ω6 trans 18:3 ω3	4,9	8,4	17,4	13,8
19,257	18:2 ω6 cis	2,0	4,1	9,3	8,2
25,863	20:1 ω9	4,8	3,2	2,2	1,4
25,667	20:2 ω6	1,2	1,1	1,0	0,8
24,380	20:4 ω6	2,3	1,2	2,9	13,6
24,557	**20:5 ω3**	7,1	7,4	2,5	11,5
30,330	**22:6 ω3**	15,1	8,1	0,9	6,8
		Õli sisaldus preparaadi kuivmassis, %			
		Liha-1	**Liha-2**	**FC1**	**FC2**
		6,4	10,4	6,4	1,2

Varasemad uuringud on näidanud, et *Mytilus edulis* pehmete kudede glükogeenisisaldus jääb vahemikku 10–35% (Zwaan, Zandee 1972). Glükogeeni sisaldus käesolevas töös uuritud rannakarbi lihas oli keskmiselt ~20%. Seega on Läänemere tingimustes kultiveeritud söödav rannakarp hea glükogeeni allikas ning perspektiivne biomass glükogeeni või glükogeenirikaste preparaatide saamisel.

3.2 Rannakarbi mineraalse komponendi osakaal

Rannakarbi kuivmassist moodustab liha 15–20% ja koda 82–85% (**Tabel 4**). Liha mineraalne osa (~7%) ja karbonaatide osakaal sellest jääb võrreldes kodade (~94%) omaga tagasihoidlikuks. Karbonaatide olemasolu näitab tuhasuste vahe 550 °C ja 950 °C juures tuhastamisel – mida suurem on nende kahe näitaja vahe, seda rohkem on proovis karbonaatseid ühendeid.

Võrreldes omavahel 2020. a. korjatud rannakarpe 2021. a. korjatuga, siis 2020. a karbid olid suuremad, mistõttu kulus sama kaalutise saavutamiseks karpe ~1,6 korda vähem (40 karpi vs 65 karpi) kui 2021. a karpe. Kuivaine mineraalse koostise poolest on need korjed siiski väga sarnased.

Tabel 4. Rannakarbi ja selle osade kuivaine tuhasisaldused

Proov	Tk	Kuivmassi kaalutis (g)	Osakaal karbi kuivmassist (%)	Tuhasisaldus 550 °C juures (%)	Tuhasisaldus 950 °C juures (%)	Tuhasuste vahe (%)
Rannakarp 2020	40	13,82	-	77,5	44,7	32,8
Liha 2020	-	2,48	18	7,6	5,7	1,9
Koda 2020	-	11,34	82	93,6	53,5	40,1
Rannakarp 2021	65	13,26	-	-	-	-
Liha 2021	-	2,00	15	6,0	5,5	0,5
Koda 2021	-	11,26	85	94,1	54,0	40,1

3.3 Rannakarbi fraktsioonide iseloomustus

Varasematest rannakarbi biomassi töötlustest on teada, et värskete ja keedetud rannakarpide homogeniseeritud ekstraktide settimise karakeristikud on erinevad, nt. toore rannakarbi puhul settivad suuremad lihatükid koos purustatud kodadega eelkõige anuma põhja, keedetud rannakarbi puhul tõusevad suuremad lihatükid hoopis pinnale. Viimast põhjustab õhumullikeste kinnijäämine kuumtöödeldud lihasse, mis omakorda muudab lihtatükikesi hõlmavate agregaatide tiheduse vee omast väiksemaks. Vabade valkude osakaal rannakarbi homogenisaadis on madal, st enamus valkudest esineb lihaosakeste koosseisus. Valkude ja/või aminohapete vabastamiseks lihatükikestest on vajalik nende keemiline või ensümaatiline lõhustamine. Kui eesmärgiks on lihavalgust vabastada väikemaid peptiide ja/või aminohappeid, siis tuleb arvestada asjaoluga, et denatureeritud valgu ensümaatiline hüdrolüüs on raskendatud, ja seega soojusenergia kulu liha keetmiseks ja lihatükikeste pinnale kergitamiseks ei pruugi ära tasuda.

Rannakarbi biomassi mehhaanilises fraktsioneerimises lähtuti eesmärgist, et see oleks võimalikult lihtne ning tekiks kolm peamist fraktsiooni (**Tabel 5**): vees lahustumatu (purustatud karbikojad), vees lahustunud mineraalainetevaene osa ning kõrge mineraalainete sisalduse ja lihatükikestega fraktsioon. Viimasest on võimalik ensüümide abil vabastada väiksemaid peptiide ja/või aminohappeid.

Tabel 5. Rannakarbi biomassi ja selle mehhaanilise fraktsiooneerimise saagised, kuivaine- ja tuhasisaldused.

Nr	Proov / fraktsioon	pH	Kuivaine saagis (%)	Kuivaine-sisaldus (%)	Tuhasus 550 °C juures (%)	Tuhasus 950 °C juures (%)	Tuhasuste vahe (%)
1	Pestud nõrutatud rannakarbid	-	100	36	77,5	44,7	32,8
4	Purustatud kojad	-	77	68,5	93,7	53,6	40,1
6	Supernatant-1	7,13	11	1,8	10,4	6,1	4,3
8	Supernatant-2	7,44	1	0,7	9,8	7,8	2,0
9	Fuugijääk-1	7,54	11	11,7	62,9	37,8	25,1

Lihavalku hüdrolüüsiva ensüümi valikul lähtuti eelkõige rannakarbi biomassi homogenisaatide pH-väärtustest, mis jäävad vahemikku ~7–8. St kõige sobilikumad ensüümid lihavalgu hüdrolüüsiks on

aluselises keskkonnas toimivad ensüümid. Happelist keskkonda vajavad ensüümid kõnealuse biomassi lihavalgu töötluseks ei sobi, kuna vajavad kõrge karbonaatide sisalduse tõttu kange happe lisamist ja pH sättimist ka ensüümtöötluse ajal. Aluselises keskkonnas toimivate ensüümide puhul ei ole üldjuhul vajalik lisada lahuse pH väärust muutvaid kemikaale ka ensüümtöötluse ajal, sest karbonaatide puhverdusvõime tõttu püsib pH suhteliselt stabiilsena.

Suuremamahuliseks rannakarbi biomassi fraktsiooni ensüümtöötluseks valiti eelkatsetuste põhjal välja aluselises keskkonnas toimiv ensüüm bakterist *Bacillus licheniformis* (subtilisiin, tuntud ka kui alkalaas), mis on küll efektiivne, kuid vajab toimimiseks kõrget temperatuuri (60 °C). Ka täielikuks inaktivatsiooniks on vajalik peaaegu vee keemislähedane temperatuur (99 °C). Kõnealuse ensüümi plussiks võib aga lugeda valgu hüdrolüüsimist eelkõige väiksemateks peptiidideks, mitte aminohapeteks. Nii on hüdrolüsaadile kibeda maitse tekkimise tõenäosus on väiksem.

Tabelist 6 nähtub, et ensümaatiline hüdrolüüs on olnud efektiivne ja ensüümtöötluse tulemusena muudeti lahustuvaks enamus lihastükikestes olnud valgust ja/või selle komponentidest. Sademesse jäi peamiselt mineraalainete ja karbonaatide rikas osa ning ultrafiltratsiooniks kasutatud membraani läbilaskepiiriga 10 kDa on läbinud enamus peptiididest.

Tabel 6. Rannakarbi biomassi ensümaatilise hüdrolüüsi ja ultrafiltratsiooni saagised, kuivaine- ja tuhasisaldused.

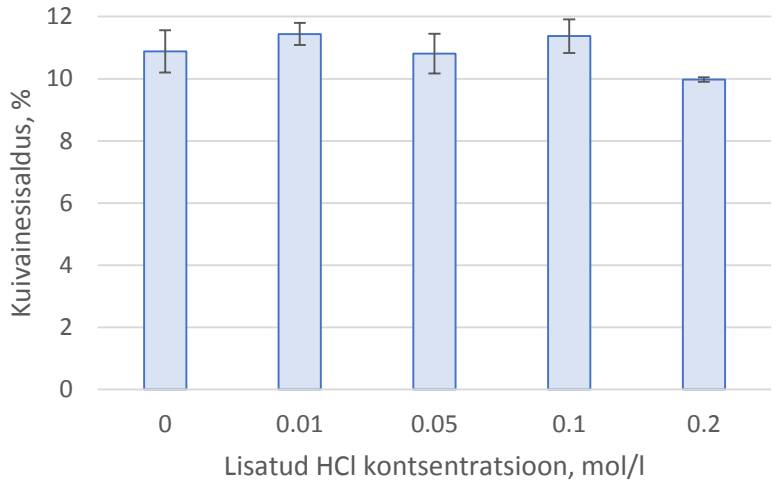
Nr	**Fraktsioon**	**pH**	**Kuivaine saagis (%)**	**Kuivaine-sisaldus (%)**	**Tuhasus 550 °C juures (%)**	**Tuhasus 950 °C Juures (%)**	**Tuhasuste vahe (%)**	**OPA** (abs)
13	2x lahjendatud Fuugijääk-1	7,86	6,3	5,9	-	-	-	0,207
15	Ensüümtöödeldud proov	-	6,3	5,9	-	-	-	2,640
16	Fuugijääk-2	-	1,8	18,1	81,4	48,1	33,3	-
16	Supernatant-3	7,29	2,3	2,3	4,4	4,34	0,06	2,432
17	UF-Filtraat	7,30	2,1	1,2	3,4	2,7	0,7	1,560
17	UF-Retentaat	6,84	0,07	0,3	15,1	6,4	8,7	0,145

3.4 Biomassi mineraalse komponendi vähendamine happetöötlusel

Rannakarbi lihafraktsioonis esinevad mikroskoopilised kojafragmendid suurendavad preparaadi mineraalse osa (peamiselt $CaCO_3$) sisaldust ning vähendavad seeläbi lihafraktsiooni kasutatavust mitmesugustes rakendustes, sh lõhesööda komponendina. Sellest tulenevalt selgitati, millisel määral võimaldab lihamassi happetöötlus (soolhappega) preparaadi mineraalse osa sisaldust vähendada. Mineraalse komponendi osakaalu vähenemist hinnati gravimeetriliselt materjali vees lahustumatu osa kuivainesisalduse mõõtmise teel.

Katsetulemustest selgus, et lihafraktsiooni happetöötlus ei vähendanud mineraalse osa sisaldust lisatud HCl kontsentratsioonivahemikus 0–0,1 mol/l (**Joonis 6**). Töötlus 0,2 M HCl lahusega vähendas lõpp-preparaadi kuvainesisaldust vaid 0,9% võrra (esialgse 10,9% pealt 10,0% juurde). Kuna sedavõrd kõrgete happesisalduste korral on tõenäoline valkude hüdrolüüs ning mineraalse komponendi

vähenemine ei ole märkimisväärne, siis ei ole mineraalse komponendi vähendamine happetöötluse teel antud biomassi puhul otstarbekas. Eksperimendi käigus toimuv liha hüdrolüüs takistab filtrimise/setitamise rakendamist orgaanilise komponendi eraldamiseks anorgaanilisest materjalist, sest mõlemad komponendid muutuvad sedavõrd suure happesisalduse juures lahustuvaks.



Joonis 6. Rannakarbi biomassi liharikka fraktsiooni kuivmassi sõltuvus töötluseks kasutatud HCl kontsentratsioonist.

3.5. Preparaatide fraktsioneerimine ultrafiltrimise meetodil

Ultrafiltrimine on suure jõudlusega, automatiseeritav ja hästi skaleeritav meetod paljude biomolekule sisaldavate segude, sh valguhüdrolüsaatide puhastamiseks. Meetod põhineb vedelikus lahustunud molekulide fraktsioneerimisel vastavalt nende suurusele. Ultrafiltrimisel kasutatavate tööparameetrite optimeerimiseks on vajalik mitmete karakteristikute üheaegne monitoorimine protsessi erinevate etappide vältel.

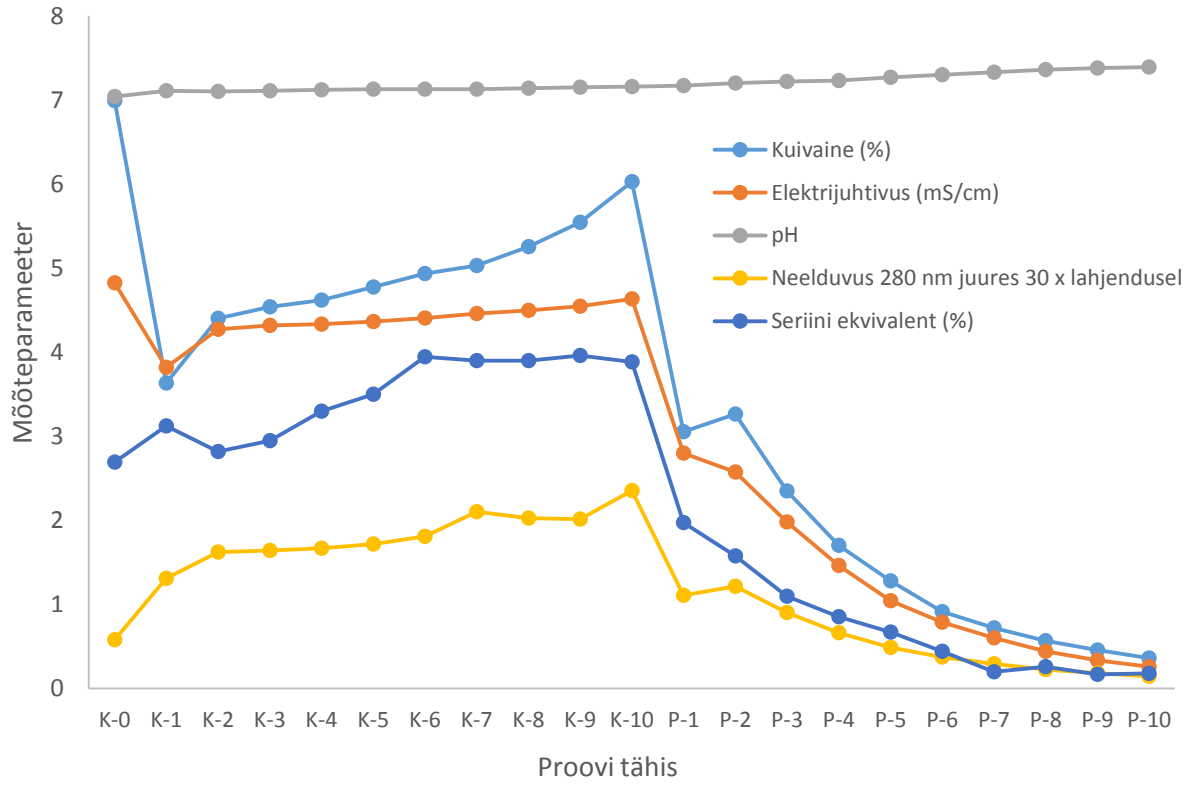
Käesolevas töös võeti vaatluse alla rannakarbi lihaekstrakt, mida oli valkude lagundamise eesmärgil töödeldud ensüümiga subtilisiin. Sellisel viisil saadav ekstrakt on segu erineva suurusega valkudest, peptiididest ja aminohapetest, kuid sisaldab mõningal määral ka mittevalgulisi komponente (rasvad, pigmendid, sahhariidid, mineraalained). Läbi 2 kDa poorsusega tselluloosmembraani (Hydrosart, Sartorius) filtrides saadi 4,5 korda kontsentreeritud retentaat.

Ultrafiltrimiseks võetud valguhüdrolüsaadi (Supernatant-X-E, Joonisel 7 tähistatud K-0) kuivainesisadus oli 7,0%, pH 7,04, elektrijuhtivus 4,8 mS/cm ja neelduvus 280 nm juures 30 kordse lahjenduse korral 2,91 (**Joonis 7**). Ultrafiltrimise kontsentreerimise etappides (K-1…K-10) tõusis kuivainesisaldus järk-järgult 3,6% juurest 6,0% juurde, samuti tõusis lahuse elektrijuhtivus 3,8 mS/cm pealt 4,6 mS/cm juurde. Seejuures jäi lahuse pH suhteliselt stabiilseks (pH 7,11–7,16), neelduvus fraktsioonide 30 x lahjenduse korral aga tõusis protsessi kulgedes märgatavalt (1,31 juurest 2,36 juurde). Vabade aminohapete/väiksemate peptiidide sisalduste muutusi protsessis jälgiti OPA-meetodi abil.

Ultrafiltrimise pesuetappide (P-1…P-10) puhul leidis protsessi kulgedes aset kõigi mõõteparameetrite (välja arvatud pH) väärtuste langus. See on otseselt põhjustatud kogutud ultrafiltraadi fraktsioonide

lahjenemisest pesuetapis. Pesu 300 ml veekogusega viis kuivainesisalduse ja neelduvuse 8 x languseni, elektrijuhtivus ja aminohapete sisaldus vähenesid protsessis 11 x.

Uuritud hüdrolüsaatide puhul esines tugev positiivne korrelatsioon (R^2 = 0,98) proovi kuivainesisalduse ja neelduvuse vahel ning seda iseloomustab seos y = 2,28x + 0,7628, kus y on proovi kuivainesisaldus ja x 20 korda lahjendatud proovi neelduvus 280 nm juures. Nii on võimalik kiiresti seda tüüpi hüdrolüsaatide kuivainesisaldusi protsessi vältel hinnata.



Joonis 7. Rannakarbi lihahomogenisaadi subtilisiiniga töödeldud fraktsiooni ultrafiltrimise profiil. Y-teljel on esitatud ultrafiltraadi mõõteparameetrid protsessi erinevatel etappidel. K-0 ehk Supernatant-X-E – algpreparaat enne ultrafiltrimise algust (preparaadi kogus 350 ml), K-1…K-10 – kontsentreerimise etapi fraktsioonid (fraktsiooni suurus 25 ml), P-1…P-10 – pesuetapi fraktsioonid (fraktsiooni suurus 30 ml).

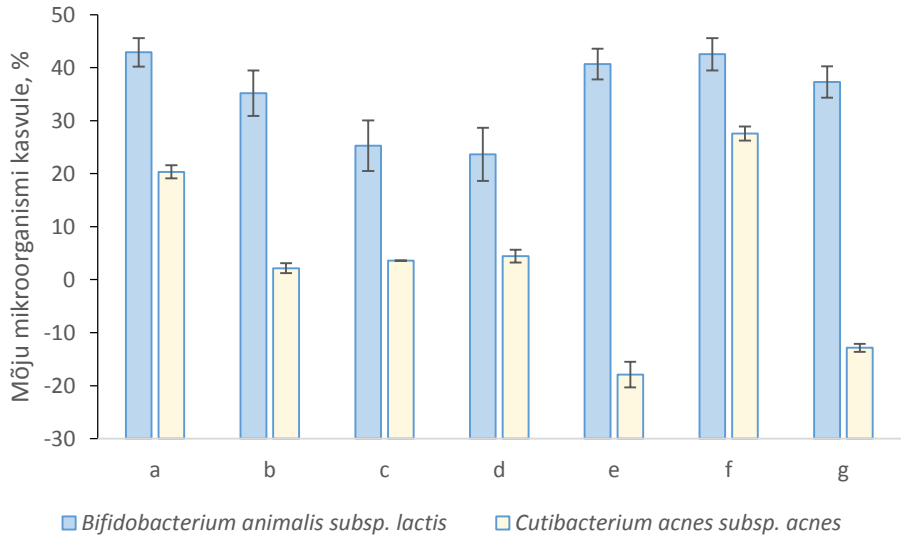
3.6. Preparaatide prebiootiline toime

Mitmetel biomolekulidel on täheldatud prebiootilist toimet, st võimet soodustada organismile kasulike (probiootiliste) mikroorganismide kasvu ning samaaegselt inhibeerida patogeenseid mikroobe. On tuvastatud, et prebiootiliselt võivad toimida nii sahhariidid kui ka valgud, toime määravad otseselt ära nende ainete molekulaarstruktuuri iseärasused ning molekulmass. Käesolevas uuringus hinnati rannakarbi biomassist erinevate menetlustega valmistatud preparaatide prebiootilisi omadusi ning selgitati nende sobivus nahale kantavate formulatisoonide koostises.

Prebiootilise toime hindamiseks uuriti preparaatide mõju võrdlevalt probiootilise bakteri *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ja patogeense bakteri *Cutibacterium acnes* subsp. *acnes* kasvule. Tulemused (**Joonis 8**) väljendati protsendina võrdluskatse suhtes, mille puhul rannakarbi preparaati mikroorganismidega kontakti ei viidud (positiivne väärtus näitab kasvu soodustamist, negatiivne väärtus kasvu inhibeerimist).

Prebiootilisteks uuringuteks võeti järgmised 7 rannakarbi fraktsiooni:

a) keedetud rannakarbi ekstrakti vesilahustuv fraktsioon B-F1;
b) glükogeenirikas rannakarbi fraktsioon A-FG;
c) ensüümtöötlemata rannakarbi fraktsiooni vesilahustuv komponent;
d) ensüümtöödeldud (pankreatiin) rannakarbi vesilahustuv fraktsioon;
e) ensüümtöödeldud (subtilisiin) rannakarbi fraktsiooni vesilahustuv osa, fraktsioon „Supernatant-3“;
f) ensüümtöödeldud (subtilisiin) rannakarbi fraktsiooni vesilahustuva osa retentaat (fraktsioon „UF-retentaat“);
g) ensüümtöödeldud (subtilisiin) rannakarbi fraktsiooni vesilahustuva osa ultrafiltraat (fraktsioon „UF-filtraat“).

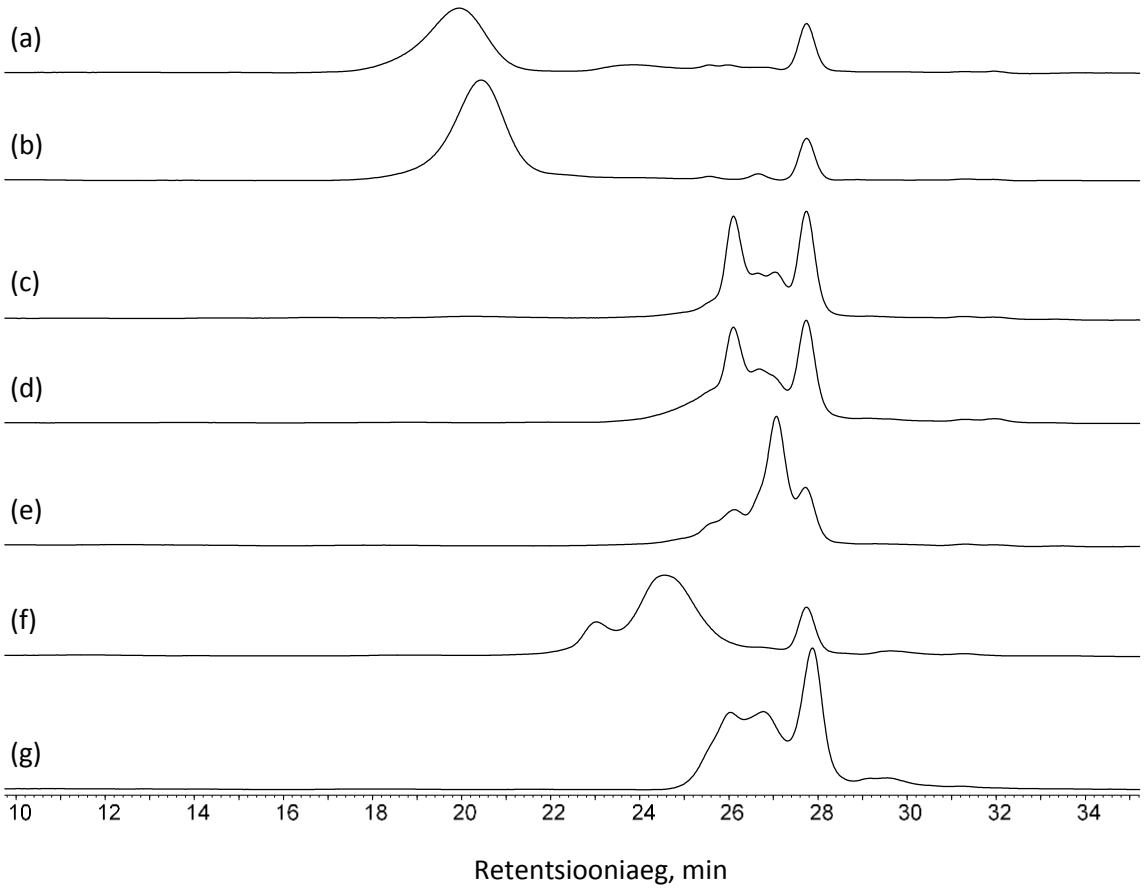


Joonis 8. Rannakarbi fraktsioonide mõju mikroorganismide *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ja *Cutibacterium acnes* subsp. *acnes*. kasvule. Fraktsioonide tähised on esitatud aruande peatükis 3.6.

Vaatluse alla võetud preparaatidest olid suurima prebiootilise toimega subtilisiiniga lagundatud rannakarbi valguekstraktid **(e)** ja **(g)**. Mõlema preparaadi juuresolekul vähenes *Cutibacterium acnes* subsp. *acnes* kasv 12–18% ning suurenes Bifidobacterium animalis subsp. Lactis elulemus 37–40%. Subtilisiiniga töödeldud valguekstrakti ultrafiltrimisel eraldatud suurema molekulmassiga fraktsioon **(f)** aga prebiootiliselt ei toiminud. Sellest järeldub, et rannakarbist valmistatud preparaatidest suurimat potentsiaali omavad väikese molekulmassiga peptiidid. Täheldati ka, et märgatav prebiootiline toime puudus, kui valguhüdrolüsaadi valmistamiseks kasutati pankreatiini. Ühelgi ensüümtöötlemata preparaatidest prebiootilist toimet ei avaldunud, samuti ei täheldatud prebiootilisi omadusi glükogeenirikkal rannakarbi fraktsioonil.

Rannakarbi biomassist valmistatud preparaatide molekulmassjaotused (**Joonis 9**) tuvastati kõrgsurvevedelikkromatograafilise meetodiga (HP-SEC). Meetod võimaldab hinnata erinevate töötluste mõju valgulise ja glükogeense komponendi molekulmassidele, komponentide retentsiooniajad on seda suuremad, mida väiksemad on nende molekulmassid. Nii saadav info on biomassi töötlusparameetrite optimeerimise üheks aluseks.

Selgus, et glükogeenirikas fraktsioon on molekulmassjaotuse osas suhteliselt homogeenne ning selle preparaadi keskmine molekulmass oli 310 kDa. Mõnevõrra suurem oli vastav näitaja keedetud rannakarbist valmistatud ekstraktil (416 kDa) ning see oli ka kõigist uurituist suurima molekulmassiga preparaat. Ensüümtöödeldud preparaatide puhul jäi põhikomponendi molekulmass alla 1 kDa, ensüümtöödeldud proovi fraktsioneerimine ultrafiltratsiooni tehnikaga andis retentaadi, mille peamise koostisosa molekulmass jäi 5,4 kDa juurde. Tulemused näitavad, et prebiootilised toimed on suurimad preparaatidel, mille molekulmass jäi alla 0,7 kDa.

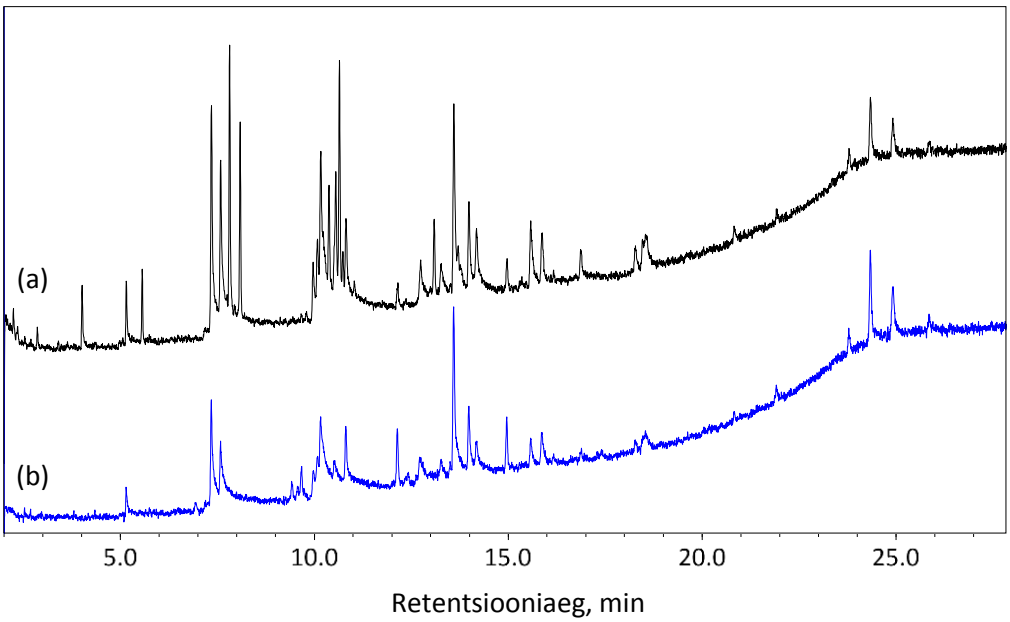


Joonis 9. Rannakarbi fraktsioonide molekulmassjaotused mõõdetuna HP-SEC meetodil. Fraktsioonide tähised on esitatud aruande peatükis 3.6.

3.7 Biomassis esinevad madalmolekulaarsed lenduvad komponendid

Lenduvate ühendite tuvastamiseks kasutati gaasikromatograafilist meetodit, proovides esinevad ühendid identifitseeriti GC-MS raamatukogu abil. Detailsemalt vaadeldi 96% etanoolis lahustuvaid komponente keedetud ja keetmata rannakarbi fraktsioonidest A-FE0 ja B-FE0.

Rannakarbi etanoollahustuvat fraktsiooni iseloomustab mitmekesine keemiline koostis, seejuures tuvastati rohkem erinevaid ühendeid keetmata rannakarbi biomassist valmistatud fraktsioonis (**Joonis 10**). Samuti olid selles fraktsioonis esinevate komponentide sisaldused üldjuhul suuremad. Põhjuseks on tõenäoliselt asjaolu, et keetmise käigus osad ühendid lenduvad või lagunevad. Samuti võib komponentide ekstraheerumine keedetud biomassist olla mõnevõrra aeglasem.



Joonis 10. GS-MS kromatogrammid rannakarbi biomassis esinevate lenduvate ühendite kohta. Fraktsioonid (a) keetmata rannakarbist, A-FE0 ja (b) keedetud rannakarbist, B-FE0.

Uuritud proovides identifitseeriti 13 peamist ühendit (**Tabel 7**), sh rasvhappeid (tridekanoonhape, pentadekanoonhape, 9-heksadetsenoonhape, eikosapentaeenhape, linoolhape, dokosaheksaeenhape), rasvhapete estreid (etüültridekanoaat, heksadetsenoonhappe etüülester, palmitiinhappe etüülester), aldehüüde (7-tetradekanaal, 13-oktadetsenaal), amiide (nonadekaanamiid), alkoholeid (2-heksüüldekanool). Nendest nelja komponenti (etüültridekanoaat, 9-heksadetsenoonhappe etüülester, palmitiinhappe etüülester, dokoneksent) keedetud rannakarbi biomassist ei leitud.

Tabel 7. Peamised ühendid rannakarbi etanoollahustuvates fraktsioonides.

Retentsiooniaeg, min	Komponendi nimetus
5,17	tridekanoonhape
5,57	etüültridekanoaat*
7,35	9-heksadetsenoonhape
7,59	pentadekanoonhape
7,82	9-heksadetsenoonhappe etüülester*
8,01	palmitiinhappe etüülester*
9,78	7-tetradekanaal
10,38	eikosapentaeenhape (EPA)
10,55	linoolhape
10,81	nonadekaanamiid
13,09	dokosaheksaeenhape (DHA)*
14,18	2-heksüüldekanool
15,58	13-oktadetsenaal

* komponent puudus keedetud rannakarbi biomassist saadud fraktsioonis.

Identifitseeritud ühenditest on olulise bioloogilise funktsiooniga polüküllastumata oomega-6 rasvhapete hulka kuuluv linoolhape ning oomega-3 rasvhapete rühma esindajad eikosapentaeenhape ja dokosaheksaeenhape, mida sageli kasutatakse toidu-/söödalisandite koostises. Eraldi väärib märkimist ka heksüüldekanool, mille järele on selle aine madala viskoossuse ja nahka niisutava ning pehmendava toimet tõttu suur nõudlus kosmeetikatööstuses.

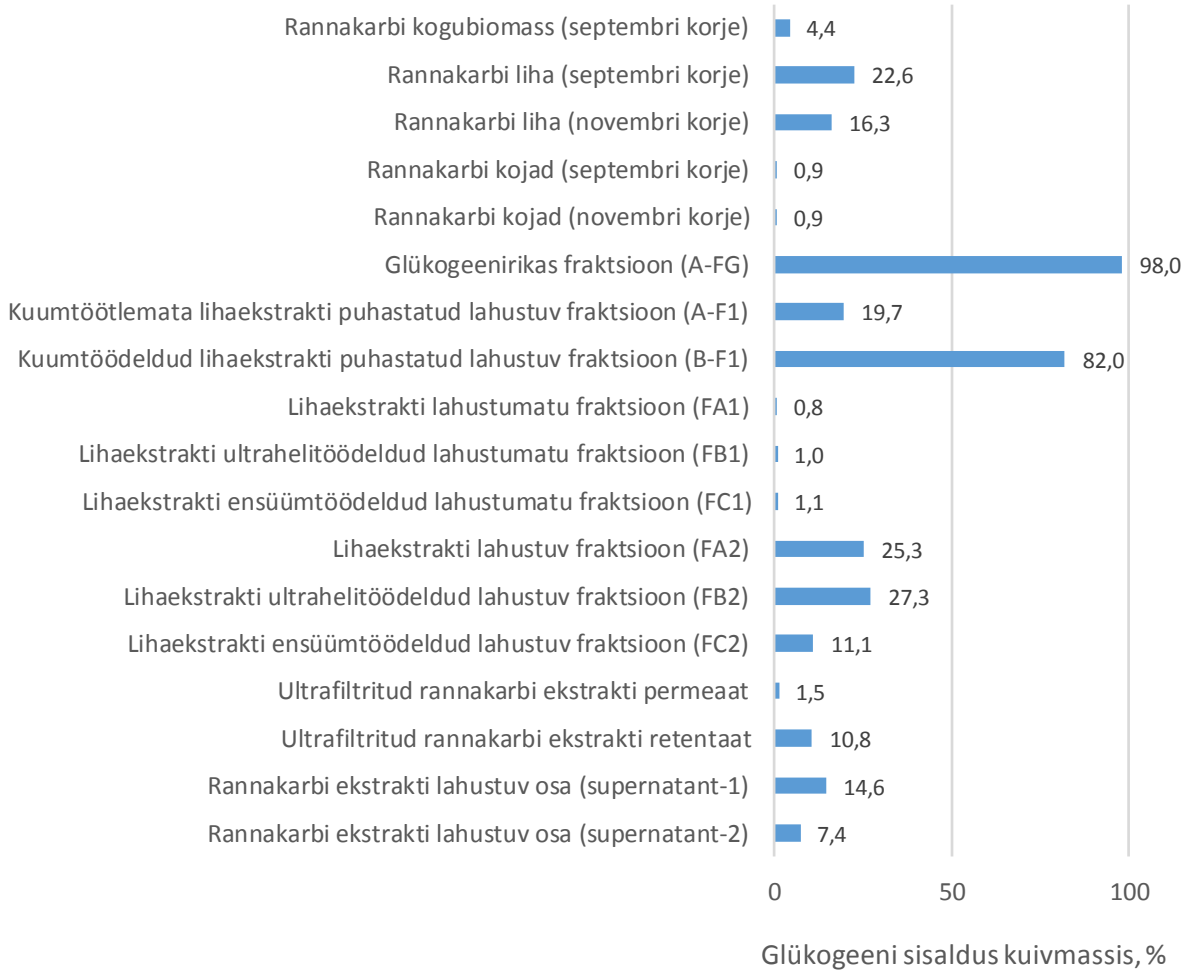
3.8 Preparaatide glükogeeni sisaldus

Glükogeeni sisaldus rannakarbi biomassis ja sellest erinevate töötluste abil valmistatud preparaatides määrati kolorimeetriliselt glükoosi põhjal, tulemused on esitatud **joonisel 11**. Rannakarbi kogubiomassis sisaldus 4,4% glükogeeni, lihas 16,3–22,6% ning lihast eraldatud kodades 0,9%. Septembris 2020. a. kogutud rannakarbi lihas sisaldus glükogeeni novembris 2021. a. püütud materjaliga võrreldes mõnevõrra rohkem. 20% juurde jäävaid glükogeenisisaldusi võib pidada tavapäraseks, sest üldiselt jääb glükogeeni kontsentratsioon karbilihas lähedaste liikide puhul vahemikku 5–30%. Eraldatud kodadest leitud väike glükogeeni kogus tuleneb kodade siseseinale jäänud orgaanika-rikkast kelmest ning seejuures ei täheldatud sõltuvust biomassi kogumise ajast. Glükogeenirikkas fraktsioonis, mis valmistati rannakarbi biomassi kuumutamisel leeliselahuses, oli glükogeeni sisaldus ootsuspäraselt kõrge (98%). Meetod sobib seega hästi glükogeenirikaste preparaatide valmistamiseks.

Töö tulemusel selgus, et kuumtöödeldud biomassi homogeniseerimisel suspendeerub glükogeeni lahusesse märkimisväärselt suuremates kogustes, kui kuumtöötlemata biomassi puhul. Nii oli kuumtöötlemata filtritud lihasuspensiooni (fraktsioon A-F1) glükogeenisisaldus 19,7%, samadel tingimustel valmistatud kuumtöödeldud fraktsiooni (B-F1) puhul aga koguni 82%. Glükogeeni kõrgenenud sisaldus tuleneb sellest, et kuumtöötlemisega kaasnev valkude denatureerumine vähendab nende suspendeerumist ning seeläbi sisaldub neid saadavas fraktsioonis vähem. Samuti võib

kuumtöötlemine glükogeeni teatud määral kudedest vabastada. Kõrge glükogeenisisaldusega preparaatide saamiseks võib kuumtöötlemine olla heaks alternatiiviks leelistöötlusele.

Leiti, et lihaekstrakti valmistamisel liigub oluline osa glükogeenist lahustuvasse (filtrit läbivasse) fraktsiooni. Lihaekstrakti lahustumatus osas (fraktsioon FA1) sisaldus glükogeeni vaid 0,8%, lahustuvas fraktsioonis (FA2) oli seda aga 25,3%. Lihaekstrakti ultrahelitöötlus (teostatud QSonica Q700 sukeldatava sonikaatoriga 100% võimsusel 15 min) suurendas vähesel määral glükogeenisisaldust (27,3%, FB2). See on ühest küljest tingitud lihaosakeste mõõtmete vähenemisest, samas aga kaasneb ultrahelitöötlusega paratamatult mõningane temperatuuri tõus, mis komponentide jaotumust fraktsioonides mõjutab. Kõige enam avaldas glükogeenisisaldusele mõju lihaekstrakti proteaastöötlus, mis vähendas ekstrakti lahustuva komponendi osakaalu üle kahe korra. Nii oli subtilisiiniga töödeldud lahustuva fraktsiooni glükogeenisisaldus vaid 11,1%.



Joonis 11. Glükogeeni sisaldus rannakarbi biomassis ja selle erinevates fraktsioonides.

Glükogeeni jaotumust suure ja väikese molekulmassiga preparaatide vahel uuriti, kasutades ultrafiltratsiooni. Selgus, et lihaekstraktis sisalduvad komponendid, mis läbivad 10 kDa poorsusega PES-membraani, ei sisalda märkimisväärsetes kogustes glükogeeni. Selle polüsahhariidi sisaldus ultrafiltraadis (permeaadis) jäi kõigest 1,5% juurde, seejuures sisaldas ultrafiltrimisprotsessi retentaat

glükogeeni aga oluliselt suuremates kogustes (10,8%). Nii on võimalik glükogeenirikkaid fraktsioone ultrafiltratsiooni abil edukalt valmistada ning kontsentreerida.

Käesolevas töös toestatud katseseeriad näitavad, et glükogeen liigub/suspendeerub purustatud rannakarbi biomassist lahusesse suhteliselt kiiresti. Samas ei leostu glükogeen biomassist välja korraga. Nii liikus purustatud biomassi esimese pesuga ekstrakti glükogeeni ligi 2 korda rohkem kui teise (sademe täiendava) pesuga saavutati. Kõnealuses katses saadud glükogeeni sisaldus oli esimese supernatandi kuivmassis (Supernatant-1) 14,6%, teise supernatandi kuivmassis (Supernatant-2) aga 7,4% (**Joonis 11**).

3.9 Rannakarbi biomassist pärinevad fraktsioonid kalasööda komponendina

Sageli kasutatakse kõrgekvaliteetse kalasööda ühe komponendina kalajahu. Kirjanduse andmetel on rannakarbi liha oma aminohapete profiililt kalajahule lähedane, suhteliselt valgurikas ning sisaldab lisaks rohkesti oomega-3 rasvhappeid (Berge, Austreng 1989). Sellest tulenevalt võib rannakarbi biomassi ja sellest eraldatud fraktsioone pidada perspektiivseks kalasööda komponendiks.

Tänapäevane kalasööt sisaldab üha suurenevas koguses taimseid komponente, see võib aga viia sööda maitseomaduste halvenemiseni. Seetõttu on aktuaalne sööda maitseomaduste parandamine sellesse atraktantide lisamise teel. Sööda tarbimise suurendamine kalakasvandustes on eriti oluline perioodidel, mil üldine söödatarve on vähenenud, nt haiguspuhangute ajal või keskkonnavahetusest tingitud stressi tingimustes. Sumpades kasvatatava kala puhul avaldab toidutarbimus paaril esimesel nädalal peale merevette laskmist olulist mõju noorkalade tervisele ja heaolule.

On täheldatud, et rannakarbi liha ja selle kogubiomassist pärinevad ekstraktid toimivad mitmetele röövkaladele, sh harilik merikeel (*Solea solea*), Jaapani hiidlest (*Paralichthys olivaceus*), pruun kaljuhammas (*Takifugu rubripes*), harilik kammeljas (*Scophthalmus maximus*), atraktantidena (Kikuchi, Sakaguchi 1997; Kikuchi et al. 2002; Nagel et al. 2013). Kirjanduse andmetel võivad sellised lisandid mõnede kalasööda komponentide ebameeldivat maitset maskeerida juba suhteliselt madalate sisalduste (< 10%) juures ja olla seetõttu perspektiivsed maitseparandajad (Nagel et al. 2013). Valgufraktsioonide efektiivsus maitseparandajana sõltub nende aminohappelisest koostisest ning hüdrolüüsiastmest (valkude/peptiidide molekulmassist). On näidatud, et atraktantidena toimivad eriti hästi valgupreparaadid, milles sisaldub rohkesti teatud aminohappeid ja nende derivaate, eriti glütsiini, alaniini, betaiini, seriini, metioniini, lüsiini ja tauriini (Nagel et al. 2013). Eriti tõhusa toimega on preparaadid, kus neid aminohappeid esineb vabal kujul.

Rannakarbis esinevate valkude koosseisus esineb eelnimetatud aminohapetest rohkesti glütsiini ja lüsiini. Vabadest aminohapetest leidub aga märkimisväärsetes kogustes alaniini. Sobivaimad kalasööda lisandid on proteaastöötluse teel saadud valgufraktsioonid, sest nendes esineb vabasid aminohappeid/peptiide rohkem. Keemilise koostise spetsiifikast tulenevalt võib Läänemere tingimustes kultiveeritud rannakarp ja sellest pärinevad fraktsioonid olla headeks kalasööda maitseomadusi parandavateks preparaatideks. Atraktandi tõhususe täpsemaks hindamiseks ja efektiivsete koguste väljaselgitamiseks on vajalik aga läbi viia toitmiskatsed konkreetsete kalaliikide peal. Tähele tuleb aga panna, et kalasööda lisandina kasutatavad preparaadid ei tohiks sisaldada palju mineraalset osa (kodadest pärinevat kaltsiumkarbonaati), samuti ei ole teatud kalaliikide söödas soovitav liigne glükogeen, mida nt lõhilased hästi seedida ei suuda.

3.10 Skaleeritavus ja hinnang protsesside tasuvusele

Rannakarbi biomassist õli- ja valgurikka fraktsiooni eraldamine ja nende kaubastamiseks vajaliku puhtusastme saavutamiseks on vajalik rea järjestikuste töötlusetappide rakendamine (**Joonis 12**). Alljärgnevalt käsitletakse peamisi töötlusetappe, antakse hinnang nende etappide skaleeritavusele, olulisusele ning ressursimahukusele.

Biomassi korjejärgne hoiustamine

Biomassi väljapüügile järgnevalt on otstarbekas see liiva ja muude võõrosakeste eemaldamiseks **mageda veega pesta**. Pestud biomassi on hiljem lihtsam töödelda, seeläbi on võimalik saavutada lõpptoodangu kõrgemad kvaliteedinäitajad (puhtusastmed) ning vähendada seadmete (sh jahvatusterade) ülemäärast kulumist.

Sobivaim on **biomass kiirelt peale kogumist külmutada** ning säilitada kuni töötluseni -18...-30 °C juures. Külmutamisel formeeruvad jääkristallid lõhuvad rannakarbi kudesid ning võimaldavad soovitud komponentide hõlpsamat ekstraheerumist. Samuti inaktiveerib külmutamine osasid biomassis looduslikult esinevaid ensüüme ja hävitab mikroobe. Töötluseks on võimalik kasutada ka värsket, külmutamata biomassi, kuid see allub homogeniseerimisele/purustusprotsessile erinevalt ning mõjutab hilisemaid kodade eraldamisetappe. Biomassi kuivatamine ei ole soovitav, sest sellisel juhul on oluliselt raskendatud kodade ja liha hilisem separeerimine. Nii pesemise, külmutamise kui ka võimaliku kuivatamise etapid on otseselt labori skaalalt tootmise skaalasse üle viidavad.

Biomassi ettevalmistamine homogeniseerimiseks

Kõrgekvaliteetse valgu- ja õlifraktsioonide saamiseks on soovitav külmutatud **biomassi sulamisjärgselt täiendavalt pesta** ja nõrgvesi eemaldada. Ühtlasi võimaldab täiendav pesu parandada saadavate preparaatide maitseomadusi. Mikroobide hävitamiseks ja endogeensete ensüümide inaktiveerimiseks võib biomassi blanšeerida. See on aga energiamahukas ning raskendab hiljem kodade ja lihamassi eraldamist. Samuti ei saa kuumtöödeldud biomassi puhul järgnevates etappides efektiivselt rakendada proteaastöötlust. Pesemise, nõrutamise ja blanšeerimise etapid on otseselt labori skaalalt tootmise skaalasse skaleeritavad.

Biomassi homogeniseerimine ja mineraalse komponendi osakaalu vähendamine

Kuna Eesti rannikuvetes kasvanud rannakarbi mõõtmed jäävad väikeseks ning karbi kojad on suhteliselt õhukeseseinalised ning haprad, on seesuguse rannakarbi biomassi homogeniseerimine tehniliselt suhteliselt lihtne. Kui eesmärgiks ei ole kodade ja liha kohene separeerimine, võib homogeniseerimiseks kasutada kruviveskit. Seeläbi on võimalik biomass purustada täiendavalt vett lisamata. Biomassi spetsiifikast tulenevalt on aga otstarbekas **kasutada suurtel pööretel töötavat blender tüüpi nugaveskit**, mille puhul lisatakse biomassile vett (enamasti piisab biomassiga võrsest mahuosast) ning mass homogeniseeritakse. Kuna purustatud kodade tükid settivad kiiremini, saab neist olulise osa setitamise teel lihahomogenisaadist eemaldada. Kuigi peamiselt kaltsiumkarbonaati sisaldavad kojad lahustuvad happelises keskkonnas, ei ole sel viisil mineraalse komponendi lahustamine ja lihamassist eraldamine efektiivne ega otstarbekas. Jahvatusmeetodi ja setitamiseks kasutatava tehnoloogia viimine labori skaalalt katsetootmise mahtudesse on skaleeritav, kuid eeldab seejärel süsteemiprotsesside/parameetrite täiendavat optimeerimist.

Valguhomogenisaadi valmistamine

Vähendatud mineraalse komponendi osakaaluga lihamass võib olla lõpptooteks, kuid selline preparaat sisaldab paratamatult teatud määral kodade jääke. Lihamassist valgulise komponendi eraldamiseks on otstarbekas **kasutada proteaastöötlust subtilisiiniga**. See on kommertsiaalselt suurtes kogustes toodetav ensüüm (tuntud ka nimetustega alkalaas ja savinaas), mida kasutatakse laialdaselt toidu- ja söödatehnoloogias. Töötlus subtilisiiniga viiakse läbi kõrgendatud temperatuuri (60–75 °C) tingimustes, mil mikroobide kasv valgurikkas homogenisaadis on pärsitud. Proteaastöötlusel vabanevad peptiidid lahustuvad vees ning neid on seetõttu suhteliselt lihtne lahustumatust materjalist (kodade tükid, rasvad, glükogeen) eraldada. Proteaastöötlus on hästi skaleeritav labori skaalalt katsetootmise ja hilisema tootmise skaaladesse. Võttes arvesse toiduainetööstusesse sobiva kvaliteediga subtilisiini turuhinna 0,015 EUR/AU ning 1 kg rannakarbi biomassi töötluseks kuluva ensüümi koguse (20 AU), on ensüümi kulu sellise biomassi koguse kohta 0,3 EUR.

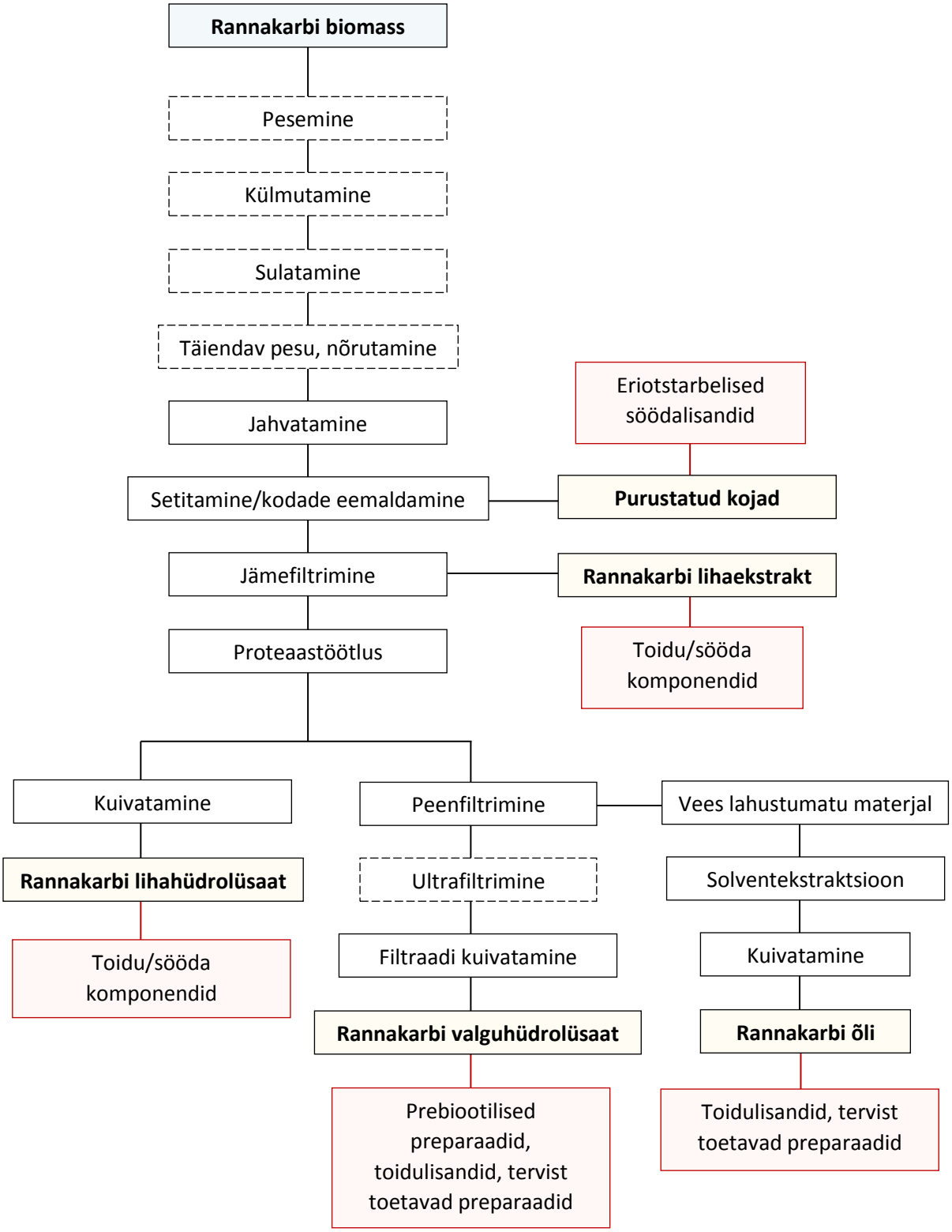
Valguhüdrolüsaadi puhastamine

Proteaastöötluse teel lahustuvaks muudetud valkude, peptiidide ja aminohapete segu saab hõlpsasti **filtrida**. Saadava hüdrolüsaadi puhtusaste on seda suurem, mida väiksema poorsusega filtrit kasutatakse. Kuna vees lahustumatu materjali hulgas on palju rasvarikkaid osakesi, võivad väga väikese poorsusega filtrid kergesti ummistuda. Filtrimisjääki on võimalik edasi vääristada kas glükogeenirikka preparaadi valmistamiseks või rasvarikka fraktsiooni (rannakarbi õli) saamiseks. Esimesel juhul lahustatakse glükogeen tugevalt leeliselises keskkonnas, teisel juhul lahustatakse rasvad orgaanilises solvendis või eraldatakse ülekriitilise CO_2 ekstraktsiooni teel. Filtrimisprotsess on skaleeritav, kuid kavandatav suuremahuline süsteem peab võimaldama filtrite perioodilist (automaatset) puhastamist või väljavahetamist.

Valguhüdrolüsaadi täiendavaks puhastamiseks ja fraktsioneerimiseks võib kasutada ultrafiltrimise tehnikat. Seeläbi on võimalik eraldada ka peptiidid ja aminohapped suurema molekulmassiga vesilahustuvatest valgulistest lisanditest; viimased protsessi käigus ka kontsentreeruvad. Ultrafiltrimise tehnika kasutamine on otstarbekas siiski vaid spetsiifilistesse rakendustesse sobilike kõrgema väärtusega preparaatide saamiseks, nt prebiootilised preparaadid, kosmeetikatoodete lisandid, eriotstarbelised toidulisandid. Ultrafiltrimise tehnika on hästi skaleeritav.

Produktide viimine valmispreparaatide kujule

Rannakarbi valgurikaste preparaatide/hüdrolüsaatide viimiseks valmispreparaadi kujule on kõige otstarbekam kasutada kuivatamist. Optimaalse kuivatustehnoloogia valik sõltub suuresti lahuse/suspensiooni kuivainesisaldusest. Ebasoovitavate reaktsioonide vältimiseks ei tohiks kuivatustemperatuur ületada 60–70 °C. Kõrge veesisaldusega preparaatide puhul on otstarbekas kasutada spreikuivatuse tehnoloogiat, suurema kuivainesisalduse puhul ka trummelkuivatust. Valgupreparaatide säilitamine vett sisaldavate kontsentraatidena ei ole otstarbekas seoses energiamahuka steriliseerimisvajadusega ning ka steriilsete suspensioonide puhul võivad nende pikemaaegsel säilitamisel aset leida keemilised muutused, osakeste agregateerumine ning väljasettimine. Valgulist päritolu preparaatide kuivatamiseks kasutatavad eriotstarbelised seadmed on tööstuslike mahtude jaoks laialt kättesaadavad ja meetodid skaleeritavad. Siiski tuleb protsessiparameetrid hoolikalt valitud seadme jaoks sobivaks häälestada.



Joonis 12. Rannakarbi biomassi vääristamise peamised rajad ning saadavate produktide potentsiaalsed kasutusvaldkonnad. Katkendliku joonega on tähistatud valikulised etapid.

Kokkuvõte

Läänemere tingimustes kasvanud söödava rannakarbi (liikide *M. edulis* ja *M. trossulus* hübriidi) biomass on potentsiaalne tooraine valgurikaste preparaatide, õlide, glükogeeni ja kaltsiumirikaste fraktsioonide saamiseks.

Töös selgitati, et söödava rannakarbi liha kuivmassist ligi poole moodustab valguline komponent, õlisid leidub ≈10%, glükogeeni ≈20%; kodade ja liha kuivmasside suhe on ≈5:1, täiskasvanud rannakarbi kuivkaal keskmiselt 0,2–0,35 g. Rannakarbi õli sisaldab rohkesti kasulikke polüküllastumata oomega-3 rasvhappeid (≈20% EPA + DHA), õli sisaldus lihas varieerub, sõltuvalt aastaajast, suurtes piirides. Aminohapetest esineb rannakarbis rohkesti glutamiinhapet, lüsiini, leutsiini ja glütsiini.

Aminohapete rikka fraktsiooni saamiseks on kõige otstarbekam läbi viia purustatud biomassi töötlus subtilisiiniga, lahustuv aminohapete rikas fraktsioon rakendada toiduainetööstuses või söödalisandina, lahustumatut materjali kasutada aga oomega-3 rasvhappeid sisaldava rannakarbi õli valmistamiseks. Proteaastöötluse teel saadavad vabade aminohapete ja peptiidide rikkad preparaadid on peale puhastamist (nt ultrafiltrimise tehnika abil) kasutatavad prebiootilite preparaatidena kosmeetikatööstuses. Lüsiini, alaniini ja glütsiini rohke esinemine rannakarbi valgurikastes fraktsioonides suurendab nende preparaatide potentsiaali atraktantidena kalasööda formulatsioonides.

Riimveelise päritoluga söödavat rannakarpi võib, hoolimata selle väikestest mõõtmetest, pidada potentsiaalseks toormeks kõrgema lisandväärtusega valgu- ja õlirikaste preparaatide saamisel.

Kirjandusviited

Adler, I. (2021). Läänemeres kasvatatud söödava rannakarbi (*Mytilus edulis*/*trossulus* L.) väärindamise võimalused. Magistritöö. (Eesti Maaülikool).

Baltic Ecomussel (2003). The Baltic EcoMussel project. Final report.

Berge, G. M., Austreng, E. (1989). Blue mussel in feed for rainbow-trout. *Aquaculture*, **81**, 79–90. http://www.kurzemesregions.lv/userfiles/files/Baltic_EcoMussel_Final_Report.pdf

Capuzzo, J.M., Leavitt, D.F. (1988). Lipid composition of the digestive glands of *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* in response to pollutant gradients. *Marine Ecology Progress Series*, **46**, 139–145.

González, J.J., Viñas, L., Franco, M.A., Fumiga, J., Soriano, J.A., Grueiro, G., Muniategui, S., López-Mahía, P., Prada, D., Bayona, J.M., Alzaga, R., Albaigés, J. (2006). Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the Prestige oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, **53**, 250–259.

Kikuchi, K., Sakaguchi, I. (1997). Blue mussel as an ingredient in the diet of juvenile Japanese flounder. *Fisheries Science*, **63**, 837–838.

Kikuchi, K., Ueda, A., Sugita, H., Takeda; S. (2002). Effect of dietary inclusion of blue mussel extract on growth and body composition of Japanese flounder Paralichthys olivaceus. *Journal of the World Aquaculture Society*, **33**, 41–47.

Lauringson, V., Veber, T. (2017). Merekeskkonna seisundi parandamine vesiviljeluse abil. SA Keskkonnainvesteeringute Keskuse projekti nr. 9658. lõpparuanne. Tartu Ülikooli Eesti Mereinstituut.

Leskanich, C. O., Noble, R. C. (1997). Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid composition of avian eggs and meat. *World's Poultry Science Journal*, **53**, 155–183.

Nagel, F., Danwitz, A., Schlachter, M., Kroeckel, S., Wagner, C., Schulz, C. (2013). Blue mussel meal as feed attractant in rapeseed protein-based diets for turbot (*Psetta maxima* L.). *Aquaculture Research*, **45**, 1964–1978.

Naik, A.S., Hayes, M. (2019). Bioprocessing of mussel by-products for value added ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, **92**, 111–121.

Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *JFS: Food Chemistry and Toxicology*, **66**, 642–646.

Zwaan, A., Zandee, D.I. (1972). Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of the common sea mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **43A**, 53–58.

Wenne R., Kuklinski P., Árnyasi M., Zbawicka M., Bach l., Strelkov P., Gantsevich M., Kijewski T., McDonald J.H., Sundsaasen K.K., Lien S., Kaasik A., Herkül K., and Kotta J. (2020). Trans-Atlantic distribution and introgression as inferred from single nucleotide polymorphism: Mussels *Mytilus* and environmental factors. *Genes*, **11**, 530.