(12) **PATENT**

(19) NO (11) **334360** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl.
A23L 1/328 (2006.01)
A23B 4/027 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20082247	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.10.18 PCT/DE2006/001867
(22)	Inng.dag	2008.05.19	(85)	Videreføringsdag	2008.05.19
(24)	Løpedag	2006.10.18	(30)	Prioritet	2005.10.19, DE, 10 2005 050 723
(41)	Alm.tilgj	2008.05.19			
(45)	Meddelt	2014.02.17			

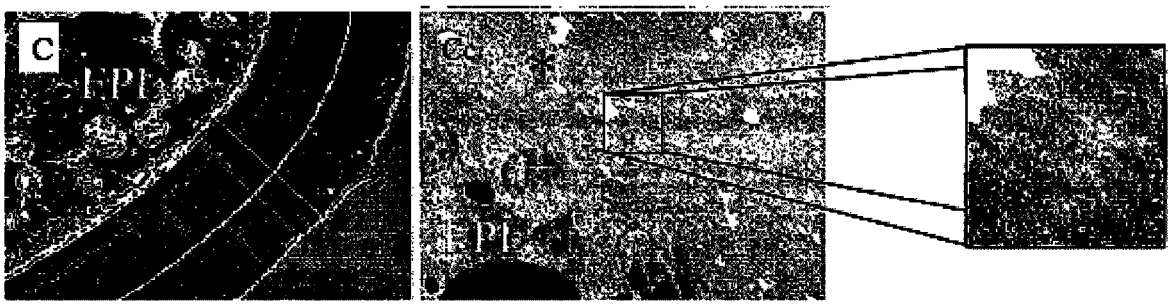
(73) Innehaver Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Am Handelshafen 12, DE-27570 BREMERHAVEN, Tyskland
(72) Oppfinner Angela Köhler-Günther, Immenweg 35, DE-27574 BREMERHAVEN, Tyskland
(74) Fullmektig Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO, Norge

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for behandling av ovulerte egg fra akvatiske dyr til delikatessematvarer samt ovulerte egg behandlet ved anvendelse av fremgangsmåten**

(56) Anførte publikasjoner RU 2236159 C1
RU 2232523 C2

(57) Sammendrag

Bearbeidelse av ovulerte, modne egg, som kan sankes naturlig uten å slakte dyret, har hatt utilfredsstillende resultater inntil nå, fordi ovulerte egg vanligvis brister. I fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse, blir ovulerte egg etter naturlig innhøsting, behandlet eksogent med bruk av minst ett signaltransduksjonsmolekyl som også forekommer naturlig i eggcellen, som hydrogenperoksid og/eller kalsiumklorid. Ovoperoksidase blir således aktivert, hvilket forårsaker dannelse og herding av ekstracellulært eggmembran. En helt harmløs behandlingsmulighet, uanstøtelig i forhold til lovgivning om næringsmidler, for å herde de ovulerte egg er blitt funnet ved behandling av de ovulerte egg med bruk av et molekyl som også naturlig forekommer i eggcellen, som ellers formes i den normale cellemetabolisme for å unngå polyspermi. Graden av herding kan justeres ved behandlingstid. De herdede egg, hvis kunstige herding er detekterbart under elektronmikroskop ved en spesiell struktur, kan konserveres og lagres bedre, fordi fremgangsmåten også har en bakteriedrepende effekt og unngår tyrosinkrystallisering.



Beskrivelse

Denne oppfinnelse gjelder en fremgangsmåte for fremstilling av ovulerte egg fra akvatiske dyr for å lage delikatessematvarer der de ovulerte egg innhøstes uten skadelige inngrep på det akvatiske dyr, eksogen behandling av de ferskt innhøstede ovulerte egg i en vandig oppløsning ved tilsetning av signaltransduksjonsmolekylene hydrogenperoksyd og/eller kalsiumklorid, som også er naturlig forekommende i eggcellen, for fysiologisk stabilisering av eggmembranen ved hjelp av ovoperoksydase-aktivering, og etterfølgende konservering, Oppfinnelsen angår også ovulerte egg som er fremstilt på denne måten, som angitt i krav 1.

De bearbeidede, alltid ubefruktede, egg fra diverse akvatiske dyr har i lengre tid vært verdsatt som delikatesser i velstående samfunnslag og spises i økende grad. De ennå ikke naturlig lagte, umodne (i diverse stadier) egg fra fisk refereres til som rogn. Rognen kan, teoretisk sett, komme fra enhver hunnfisk (eller akvatisk hunndyr), hvis egg ikke er giftige. Dette inkluderer Stillehavsarten som på japansk kalles fugu og på engelsk kalles blowfish, som er svært giftig også med korrekt tilberedning. Såkalt "ekte kaviar" eller "russisk kaviar" framstilles av rogn fra stør. En differensierer her mellom ossietra-, beluga- og sevruga-kaviar. I tillegg til vill stør brukes oppdrettsstør for å framskaffe kaviar. Rogn fra rognkjeks, torskefisk og sild brukes for å framstille kaviarerstatning ("tysk kaviar"). "Islandsk kaviar" framstilles av lodderogn. Ørretrogn framskaffes fra ørret, og lakserogn med rødlig farge framskaffes fra laks. Videre framskaffes rogn fra kråkeboller. Til slutt skal amfibier, som padder, som formerer seg ved å legge egg, også inkluderes i begrepet "akvatiske dyr", som gjengitt i dette dokument. Rogn blir vanligvis saltet, av og til også røket. Røket rogn framstilles av rogn lokalisert i intakt rognpose ved varmrøking. Den kommer typisk fra torsk og seifisker *"pollack"*. Rogn fra hummer, store kreps og andre skalldyr, så vel som den orangefargete rognen i kamskjell, refereres til som "corail".

I tillegg til den høye nytelsesverdien, har rogn også andre verdifulle egenskaper. Rogn er rikt på protein (25 til 30 %), med en høy andel av essensielle aminosyrer. Med 16 % fett er det imidlertid ikke mager mat. Rogn inneholder vitaminene D, E, B_{12} og niacin, så vel som mineralene jod og natrium. I tillegg har rogn en høy andel "godt" kolesterol.

Den "kaviar" som for tiden er tilgjengelig på markedet er den behandlede (rensede og saltede) rogn, som på et umodent stadium tas fra hunnfiskens ovarier, fordi de umodne egg her har tilstrekkelig stabilitet for de følgende bearbeidelsestrinn. For å få fram

kaviar av den beste kvalitet, blir eggene nå høstet før de har oppnådd sin maksimale modenhet (ovuleringsstadiet).

Et svært vesentlig problem i kaviarproduksjon er å framskaffe rognen. Å slakte hunndyr for å oppnå kaviar (eksempelvis med stør) er et problem både med villfisk og med oppdrettsfisk (ca.2 500 tonn året på verdensbasis). I århundrer har det vært standard metode å drepe dyrene før man fjerner rognen for å tilvirke kaviar og rogn fra diverse fiskeslag. Et hovedargument for å slakte hunnfisk er, for eksempel når det gjelder stør, at eggene høstes i umoden tilstand før fisken når det naturlige ovuleringsstadium, fordi rognen som har modnet maksimalt i morfisken inntil ovulering, og følgelig kan befruktes, er for bløte. Disse modne eggene ville briste ved konservering i salt (natriumklorid) alene, og i kombinasjon med boraks ville de klebre seg sammen til en uspiselig, slimete masse. Under ovulering, det vil si utstøting av egg fra eggstokkens follikler, gjennomgår eggene naturlige endringer (avherding av egghinne for den forestående befruktning av sæd), som begrenser dens direkte bruk som kaviar. I tillegg er det osmotiske effekter som opptrer senere, i løpet av salting. Eksperimenter kjent fra tidligere teknikk med bruk av mildt saltet størrogn, som ble produsert for testformål fra ovulerte (modne) og ikke-ovulerte (umodne) egg, viste at de modne eggene brast allerede ved lett kontakt og løste seg opp i en fettet, deigaktig masse. Vesentlige endringer i smak var derimot ikke påviselige.

Denne praksis med slakting har, sammen med kraftig overfiske, resultert i at de ville bestandene av ca. 30 forskjellige arter stør er utryddelsestruet. I Russland er det blitt utviklet en ny metode, med hvilken umoden rogn kan høstes uten å slakte fisken. En type multippel "keisersnitt" utføres på ovariene under bedøvelse, de umodne egg presses ut, og innsnittene lukkes igjen. Når disse snittsår er leget, kan fisken igjen slippes ut eller holdes i oppdrettsanlegg for senere kaviarfjerning. Dødeligheten ved denne veldig kompliserte metode, som virker sterkt stressende på fisken, er imidlertid over 40 %. Videre er denne prosedyre forbudt i henhold til tysk lov om dyrebeskyttelse.

Dyre bestandsgjenoppbyggingstiltak er blitt iverksatt verden over. I sitt naturlige miljø blir stør kjønnsmodne først ved 8 – 12 års alder, i oppdrettsanlegg tidligst ved 2 – 4 års alder, avhengig av art stør. Diverse størarter er blitt sluppet fra oppdrettsanlegg ut i marin villmark innenfor rammene av bestandsgjenoppbyggingsprogrammer, med varierende hell, for å redde utryddelsestruede bestander. Mens hunndyret fortsetter å leve for kultivering og eggene framskaffes ved stryking, er problemet med slakting av hunndyr av ovennevnte grunner fortsatt tilstedeværende ved kaviarproduksjon i oppdrettssammenheng.

Høye kommersielle tap må imidlertid også tas i betraktning for kultivering av larver og yngel for oppdrettsformål og for bestandsgjenoppbyggingstiltak, fordi hunnene utviser vesentlig bedret reproduksjonsevne med økt alder.

Dens behandling etter innhøsting er vesentlig for kaviarens kvalitet. Mild salting gjør den mer oppbevarbar. Kaviar av høy kvalitet er saltet akkurat nok til det som fordres for den begrensete lagringsevne. En kaviar som betegnes som "malossol" kan ha et saltinnhold på maksimalt 2.8 til 4 %. Den naturlige smak er i høy grad bevart i malossolkaviar. I tillegg til malossol kaviar, fins også saltet kaviar, som kan oppbevares i lang tid, og som er blandet med cirka 10 – 12 % koksalt. Fersk kaviar er veldig temperatursensitiv og således vanskelig å lagre og servere. Den tradisjonelle form for emballering er den lufttette, innvendig overflatebehandlete boks for bare saltet, men ikke oppvarmet, kaviar. Pasteurisert kaviar som er gjort oppbevarbar ved kort oppvarming til 60 grader C, selges på glass med skrulokk og på metallboks med åpningsring og kan lagres uåpnet i ett år.

Ett problem ved lagring av fersk kaviar er vekst av eksisterende bakterieflora, hvilket resulterer i raskere fordervelse av produktet. Ved pasteurisering mister imidlertid kaviar kornethet og smak på grunn av varmebehandlingen. Et ytterligere problem ved lagring av kaviar og andre rognprodukter er krystallisering av tyrosin-molekyler, som lagres i eggene som ikke-essensielle aminosyrer. Videre er det også et problem med behandlingshastighet for den framskaffede rogn. Inntil dette punkt kan ikke mer enn 10 minutter forløpe fra innhøsting av egg fra hunnen til dekantering av kaviar i bokser, ellers forderves eggene.

Det er imidlertid helt nødvendig ved hvert trinn av behandlingen (bl.a. konservering, pasteurisering) etter innhøsting av eggene at de innhøstede egg overlever det aktuelle behandlingstrinn uten å briste, fordi bristing av eggene resulterer i et ugjenkallelig kvalitetstap og derved ubrukelighet for produktet.

Tidligere teknikk

En metode for produksjon av innpakket silderogn er kjent fra **JP 60091934A**, i hvilken den innhøstede silderogn, tatt ved umodent stadium fra på forhånd slaktet hunnsild, behandles antibakterielt ved bruk av en oppløsning laget av hydrogenperoksid og salt etter en konservering med bruk av salt for rognstivning. Den anvendte konsentrasjon av hydrogenperoksid kan reduseres ved øyeblikkelig fjerning av blod fra den innhøstede silderogn, hvilket resulterer i smaksforbedring av silderognen. Etter hydrogenperoksid-

og saltbehandling, utføres en enzymbehandling med bruk av katalase for å fjerne den oksiradikale hydrogenperoksid. Øyeblikkelig fjerning av ennå ikke koagulert blod kan bare inntreffe rett etter at fisken er slaktet eller kort tid før tining av fisk som er frosset rett etter slakting. Ettersom øyeblikkelig fjerning på ferskslaktet fisk kun kan utføres med stor grad av anstrengelse, er det imidlertid slik at fisk typisk fryses først, hvilket igjen resulterer i forringelse av kvalitet.

Videre er det kjent fra tidligere teknikk at anvendelse av tanninsyre (*tannic acid*) er et bevist middel for å få fram rognfisk. De befruktede eggene behandles med en tanninoppløsning for å fjerne den klebrige hinnen. Eggene kan således bedre desinfiseres i løpet av avlsforløpet og sopp- og bakterieangrep under utklekking kan reduseres. Denne behandling er standard for diverse fiskearter som havabbor, inkludert stør (jfr. **publikasjon I** ved Mizuno m.fl.: *"Elimination of adhesiveness in the eggs of shishamo smelt Spirinchus lanceolatus using kaolin treatment to achieve high hatching rate in environment with high iron concentration"*, tidsskriftet Aquaculture 242 (2004), s.713-726). Tannin, som er en polyfenol, er den kommersielle formen av garvesyre. Dens struktur er basert på glukoseestere fra gallesyre. Tanninsyre brukes som trefargingsmiddel og fins naturlig i eik, valnøtt, mahogni og ekte kjempegran som en brannhemmer. Det kan også deduseres fra publikasjon I (figur 5) at et høyere eggepress opp til bristepunktet kan oppnås ved en behandling med anvendelse av tannin. Det er imidlertid kjent at eggmembranen herdes som gummi på grunn av behandlingen med tannin og er således ikke lenger egnet for konsum.

En fremgangsmåte for farging er kjent fra **RU 2 126 218 C1**, der ovulert rogn med en svak naturlig farge, særlig også hos arter av "lavere kvalitet" enn stør, farges og saltes i trinn med et intervall på minst 0,5 timer. I det første trinn blir 2/3 av pigmentet direkte tilført rognen, og i det andre trinn tilføres den resterende komponent av pigmentet sammen med en lipid-protein emulsjon i en kvantitet fra 5 til 10 % i forhold til rognmasse. Salting utføres før det andre fargetrinn. Det kan således i denne fremgangsmåten ikke utelukkes at den ovulerte rogn vil briste i løpet av den etterfølgende salting etter tilsetting av farge i det første trinn. Lipid-protein emulsjonen tilføres etter saltingen og brukes for stabil farging og forbedring av organoleptiske trekk og strålingsbeskyttelsesegenskaper hos rognen.

En fremgangsmåte for å produsere kornet kaviar fra ovulert rogn fra stør er kjent som **RU 2 232 523 C2**, fra hvilken den inneværende oppfinnelse følger som den nærmeste tidligere teknikk. Til dette formål blir de innhøstede ovulerte egg først behandlet i en varm 1,5 – 2 % vannaktig oppløsning av et konserveringsmiddel, for å forberede dem

for en påfølgende pasteurisering ved temperaturer på 65 – 70 grader C. Bortsett fra det faktum at enhver varmebehandling vesentlig påvirker smaken på rogn når det brukes ovulerte egg, som er kjent for å ha en veldig myk eggmembran, er det ikke sikret med visshet at de vil kunne utstå påfølgende behandling med bruk av konserveringsmidler uten å briste. Selv en liten andel egg som brister forringer kaviarens kvalitet vesentlig, fordi de bristede egg kun kan fjernes med møye. Det faktum at dyrene verken må slaktes eller behandles av stressende kirurgi før innhøsting av egg, er imidlertid særlig fordelaktig om det brukes ovulerte egg.

Fra RU 2236159 C1 er det kjent en fremgangsmåte for kaviar fra ovulerte egg hvor eggene blir behandlet med jernoksid før selve konserveringen.

I henhold til funnene og bearbeidelsesteknologiene i tidligere teknikk, antas det således per i dag at fullverdikaviar ikke produseres av modne (ovulerte) egg fra stør, fordi naturlig modnete egg er for myke som resultat av den forventede befruktning og brister øyeblikkelig ved kontakt med salt og andre konserveringsmidler. De omtalte fremgangsmåter for å få fram kaviar fra ovulert rogn gir ikke tilfredsstillende resultater.

Redegjørelse for hensikt

En fremgangsmåte i henhold til arten skal følgelig spesifiseres som inneværende oppfinnelses **hensikt**, en fremgangsmåte som omfatter de trekk som er angitt i krav 1, og som bearbeider ovulerte egg som er nylig høstet fra levende akvatiske dyr på en slik måte at de kan bearbeides videre uten forringelse av kvalitet, i særdeleshet uten å briste, til fullverdimatvarer i delikatessesegmentet og således oppnå en markedsførbar og konkurransedyktig kvalitet. Det er særlig lavere sensitivitet hos eggene i løpet av bearbeidelsen og vesentlig lenger holdbarhet selv uten sterke konserveringsmetoder som oppnås ved fremgangsmåten. Videre vil fremgangsmåten være lett anvendbar og kostnadseffektiv og utformet på en slik måte at den også kan utføres for å lage et ferdig produkt.

Oppnåelsen av hensikten i henhold til inneværende oppfinnelse legges frem i fremgangsmåtekravet og inneholder følgende fremgangsmåtetrinn:

- innhøsting av ovulerte egg uten skadelige inngrep på det akvatiske dyr,

- eksogen behandling av de nylige innhøstede, ovulerte egg i en vannholdig oppløsning med tilførsel av minst ett signaltransduksjonsmolekyl som også

forekommer naturlig i eggcellen for fysiologisk stabilisering av eggmembranen ved ovoperoksidaseaktivering og påfølgende

- konservering

Nyttige detaljer av fremgangsmåten legges fram i underkravene og forklares i større detalj i det følgende i forbindelse med inneværende oppfinnelse. Videre er det slik at de ovulerte egg som er bearbeidet i henhold til inneværende oppfinnelse, har et herdet ekstracellulært ytre skinn som har tverrbundne proteintråder og irreversible innlemmede tyrosinmolekyler. En molekylærstruktur av denne type opptrer ikke naturlig i ubefruktede egg. Et kunstig produsert produkt av denne type har ikke hittil vært å finne i tidligere teknikk.

I fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse, blir de ovulerte egg, dvs. eggene som er fullt modne for befruktning (gyting), innhøstet fra de hvilende akvatiske dyr, hovedsakelig stør, ved naturlig utstøting av de ovulerte egg fra kroppsåpningen og enkel stryking. Stressbelastning på dyrene blir slik minimalisert og belaster dem knapt. De nylig innhøstede, ovulerte egg blir eksogent behandlet før konservering med bruk av et signaltransduksjonsmolekyl som også forekommer naturlig i eggcellen. Enzymovoperoksidasen aktiveres dermed, hvilket initierer dannelse og herding av et ekstracellulært ytre skinn og således en fysiologisk stabilisering av eggmembranen. En helt uskadelig behandlingsmulighet, uanstøtelig i forhold til lovgivning om næringsmidler, for å herde eggene er blitt funnet gjennom behandling av de ovulerte egg ved bruk av minst ett molekyl som også forekommer naturlig i eggcellen, men som ellers formes bare i lave konsentrasjoner i den vanlige cellemetabolismen. En kunstig initiert senere herding av de innhøstede egg fremkalles ved å bruke fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse ved enkel tilføring av en naturlig substans, som gjør de ovulerte egg vesentlig mindre sensitive i forhold til senere behandling, framfor alt i løpet av konserveringen og dekanteringen, men også i løpet av lagring og ompakking. En ytterligere fordel ved denne kunstige senere herding er bedre lagringsevne og dermed markedsføring av de innhøstede egg, fordi forekomst av tyrosinkrystaller under lagring unngås. På grunn av aktivering av ovoperoksidase, oppstår tverrbinding av proteintråder og den irreversible innlemmelse av tyrosin i et upenetrerbart membran og dermed unngås krystalldannelse. Videre har behandlingen en bakteriedrepende effekt, hvilket i vesentlig grad forlenger produktets lagringsevne.

Fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse omfatter en ekstern behandling av de nylig høstede ovulerte egg med bruk av minst ett molekyl som også forekommer

naturlig i eggcellen, og som spiller en sentral rolle i signaltransduksjonskjeden, som initierer herdingen av membranen ved en naturlig befruktning. Dette gjelder i særlig grad kalsiumioner (Ca^{++}), som flyter i en bølge gjennom egget etter en eksogen stimulering og resulterer i enzymaktivering. I tillegg fins det minst ett ytterligere nøkkelmolekyl. Dette er molekylet formet av den NADPH (hydrogenperoksid H_2O_2)-avhengige oksidase. Hydrogenperoksid initierer den naturlige, endogent forårsakede dannelse av en solid befruktningsmembran rundt egget i ekstremt små mikromolare konsentrasjoner. Kalsiumioner (Ca^{++}) fins i det ubefruktede egg i såkalte kalsium-lagre, mitokondriene og endoplasmatisk retikulum i cytoplasma, men kan også komme inn i cellen ved å flyte inn fra utsiden via spesifikke reseptorer. Enzymene slippes fra de interne cellulære lagre, i hvilke de lagres i inaktiv form, av denne kalsiumbølgen. Disse enzymene (dvs. glukose-6-fosfat-dehydrogenase) produserer så NADPH. NADPH refererer til den fosforylerte form av NADPH, vesentlig i anabolisme, som er et resultat av NAD (nikotinamidadenindinukleotidfosfat) ved tilførsel av et hybridion. NADPH-oksidase produserer hydrogenperoksid, som igjen er substratet for ovoperoksidase, som forårsaker herding av eggmembranen.

I naturen, er det ubefruktede, ovulerte egg i en dvaletilstand før det bombarderes av sæd i løpet av den naturlige befruktning. All sæd, bortsett fra den ene sædcelle som kommer inn i egget, må holdes tilbake. Under naturlig befruktning herdes eggmembranen sekunder etter sædcellens penetrering for å forhindre multippel befruktning av multippel sæd (polyspermi, med unntak av lav multippel befruktning, hvilket resulterer i enkeltegg multiple fødsler), som er dødelig for embryo. Det resulterende embryo utfører denne oppgaven ved å forme et ekstracellulært eksternt skinn i løpet av sekunder, og dette er upenetrerbart for ettertidig sæd. I tillegg beskyttes embryo mot fysisk skade og toksiner. Det sentrale enzymet for denne fremgangsmåten er ovoperoksidase, som er tilgjengelig i korn (kortikale granulater) under eggmembranen i en ventende posisjon. Ved befruktningsøyeblikket settes den ovenfor beskrevne prosess i gang. På grunn av den produserte ovoperoksidase tverrbindes proteintråder med tyrosinkinase, som stimulerer fremgangsmåten, tyrosin blir irreversibelt innlemmet i en upenetrerbar ekstracellulær membran, som beskytter embryo. Denne mekanismen fins i hele dyreriket hos invertebrater som kråkeboller og vertebrater som fisk, mus og mennesker, for å beskytte fostrene (jfr. eksempelvis, **publikasjon II** av La Fleur m.fl.: "*Searching ovoperoxidase: oocyte specific member of a heme dependent peroxidase superfamily that functions to stop polyspermy*", i utgivelsen Mechanisms of Developments 70 (1998), s. 77 – 89, og **publikasjon III** av Wessel m.fl.: "De kortikale granulaters biologi" (*The biology of Cortical Granules*), i utgivelsen Int. Rev. Cytol. 209 (2001), s. 117 – 206).

I **publikasjon IV**: "*Conformational Control of Ovoperoxidase Catalysis in the Sea Urchin fertilization Membrane*" av T.L. Deits m.fl. (tidsskriftet Journal of Biological Chemistry, Bind 261, Nr.26, utgivelse av 15. September, s.12159 – 12165, 1966) og **publikasjon V** "*Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks*" av Ch.A. Foerder m.fl. (tidsskriftet Proc. Natl. Acad.Schi., Bind 74, Nr.11, s.4214 – 4218, oktober 1977, Biochemistry) ble det for første gang grunnleggende fastslått ved bruk av kromatografiske metoder at og hvordan tverrbinding av tyrosin og herding av membranen oppstår. Videre viste analyse at tyrosin (restkonsentrasjon) spiller en viktig rolle i herdeprosessen. Det ble funnet gjennom spesifikke inhibitorer av oksidase at (ovo) peroksidase tilsynelatende spiller en viktig biologisk rolle i tyrosintverrbindingen og således i herdingen av membranen.

På basis av det ovenfor beskrevne cellebiologifenomenet, ble fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse, den eksogene tilførsel av minst ett signaltransduksjonsmolekyl som også forekommer naturlig i eggcellen for å herde eggmembranen, utviklet. Signaltransduksjonsmolekylene kan fortrinnsvis være det oksiradikale hydrogenperoksid H_2O_2 eller en kalsiumkloridoppløsning $CaCl_2$ for å framskaffe kalsiumioner. Et samlet bruk av begge signaltransduksjonsmolekyler er mulig, fordi det er den nærmeste simulering av den naturlige prosess for å herde eggmembranen, og på denne måten er individuelt produktdesign mulig, særlig med hensyn til graden av hardhet i de behandlede egg, avhengig av markedsstrategi. Den eksogene tilførsel og penetrering av de kunstig framskaffede signaltransduksjonsmolekylene i det ubefruktede, ovulerte egg i henhold til inneværende oppfinnelse simulerer den signaltransduksjonskaskade man finner i naturlig befruktning, og det danner seg et solid ekstracellulært, eksternt skinn på det ubefruktede, ovulerte egg.

Ens herding av alle egg oppnådd med fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse øker med varigheten av behandlingen, fra 1 minutt til 20 minutter. Graden av hardhet kan slik tilpasses individuelt via behandlingsvarigheten. Den framskaffede konsentrasjon av signaltransduksjonsmolekyler, som også forekommer naturlig i eggcellen, utviser derimot den sterkeste effekt på grad av hardhet ved lave konsentrasjoner (jfr. figur 5 C for H_2O_2). Dette er rimelig, fordi den naturlige konsentrasjon av signaltransduksjonsmolekyler i cellen virker også i det nanomolare og mikromolare område. Behandlingen av de nylig innhøstede egg med bruk av fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse kan utøves med særlig fordel i et vannbad med bruk av en 0,01 % - 0,02 % tilførsel av hydrogenperoksid og/eller kalsiumioner i form av kalsiumklorid $CaCl_2$ i fem minutter. Begge signaltransduksjonsmolekyler kan brukes individuelt, eller i kombinasjon.

Etter innhøsting, kan de ubefruktede, ovulerte egg som skal bearbeides, først vaskes i fysiologisk koksaltoppløsning før kontakt med vann, for å forhindre for tidlig klebrighet og forlenge bearbeidbar tid for de ferske eggene. Vasketrinnet foregår fortrinnsvis under sterile forhold. De sterile, vaskede egg helles så ganske enkelt over i et samsvarende bad som har de spesifikke konsentrasjoner av hydrogenperoksid og/eller kalsiumklorid fastsatt i fremgangsmåteutviklingen og frasortert etter utløp av virketid. Den inneværende oppfinnelse gjelder således en svært enkel, rask og dog kostnadseffektiv fremgangsmåte. Den lave konsentrasjon av kjemikalier som brukes er også fordelaktig her, det kreves bare den absolutt minste nødvendige kvantitet, som i sin tur også har en positiv effekt på smaken av de behandlede ovulerte egg. Hydrogenperoksid nedbrytes til vann og oksygen og er derfor uten smak. Kalsium er tilstede i alle dyre- og planteceller og smaker noe krittaktig kun ved svært høye konsentrasjoner, som imidlertid ikke brukes i den inneværende oppfinnelse.

Fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse brukes på ubefruktede, ovulerte egg (rogn) fra det aktuelle akvatiske dyr. Innhøsting fra et levende akvatisk dyr foretrekkes, selvsagt, for ikke å true den aktuelle bestand. Uttrekking fra et slaktet eller dødt akvatisk dyr er imidlertid også mulig. Fordelen i dette tilfelle, er at eggene fra villfangst og også fra oppdrett, selv om de har utviklet seg i modenhet til ovuleringsstadiet, fortsatt kan bearbeides. I dag blir rogn som alt er i ovuleringsstadiet, kastet ubrukt i fiskeforedlingsindustrien, hvilket resulterer i vesentlig økonomisk tap. På den ene siden kan rogn fra akvatiske dyr slaktet av andre grunner (som for å spises) brukes, på den andre siden behøver ikke akvatiske dyr lenger slaktes til ingen nytte hvis det viser seg at eggene allerede er i ovuleringsstadiet (inntil nå er slike egg blitt kastet, ubrukt, som ubrukelige). Fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse forhindrer også, gjennom det tverrbundne, stabile innskudd av tyrosin i den stivnede eggmembran, dens krystallisering i løpet av lagring, hvormed vesentlig produktforbedring og ofte til og med produktredning oppnås. Videre har fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse bakteriedrepende, antiseptiske egenskaper, hvormed lagringsevne for ovulerte egg som sådan og de derav produserte delikatessematvarer forbedres i vesentlig grad.

Hovedfordelen med fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse er imidlertid at det er mulig å for første gang bearbeide de modne ovulerte egg fra fisk og andre akvatiske dyr som kaviar i ovuleringsstadiet. Eggene sankes ved stryking, men de kan også sankes mekanisk eller ved å bruke en pumpeinnretning, slik at hunndyrene forblir i live. I tillegg til å verne bestander av truede arter, fins det også en fordel ved å bevare hunner med formeringsevne, hvormed en vesentlig økonomisk fordel oppnås for opp-

drettsnæringen. Ved å forlenge forplantingsstadiet mange ganger, vil mengden sanket rogn og formeringssuksess (andel levedyktige embryo) øke i vesentlig grad.

Fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse kan anvendes enkelt og problemfritt på enhver type egg fra dyr som lever i og på vann og kan således bidra til å verne sjeldne dyrearter. Den utgjør selvsagt en særskilt økonomisk fordel i produksjon av kaviar fra støregg og i produksjonen av corail fra hummeregg. I tillegg er pålitelig konservering av egg, for eksempel, ved bruk av koksalt eller boraks muliggjort ved herdingen av de innhøstede ovulerte egg utført ved anvendelse av fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse. Det er også mulig å røke eggene uten problemer. Det er uansett ikke lenger nødvendig å takle bristing av egg, hvilket i vesentlig grad hever produktkvaliteten. Videre kan kaviar produseres i diverse grader av hardhet ved variasjoner i behandlingstid/konsentrasjoner og i kombinasjon med salt og/eller boraks og således skreddersys til de organoleptiske smakskrav i den aktuelle kundekrets.

De sankede ovulerte egg er vesentlig endret med hensyn til morfologien til den herdede eggmembran ved anvendelse av fremgangsmåten i inneværende oppfinnelse. Særlig vil et herdet ekstracellulært, eksternt skinn med tverrbundne proteintråder og irreversibelt innlemmede tyrosinmolekyler kunne identifiseres enkelt og klart av en som er kyndig i teknikken ved hjelp av lysmikroskopi og, i detalj, ved bruk av elektronmikroskopi. Denne framtoning inntreffer ikke i naturlige, konvensjonelt behandlede egg fra akvatiske dyr. En herdet eggcelle kan alltid bare oppstå i forbindelse med fullført befruktning og således med tilstedeværelse av minst én sædcelle i den befruktede eggcelle. Anvendelsen av fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse kan derfor påvises klart og utvetydig i det ferdige, ubefruktede produkt.

Utførelseseksempler

Gjennomføring av fremgangsmåten for å bearbeide eggene fra akvatiske dyr til delikatessematvarer i henhold til inneværende oppfinnelse forklares i større detalj i det følgende på grunnlag av figurene.

Figur 1 viser den naturlige herdingsprosess på egg fra kråkebolle,

Figur 2 viser analysen med intervallmikroskopi av NADPH-produksjon ved anvendelse av fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse,

Figur 3a viser et ubehandlet ovulert egg fra kråkebolle,

Figur 3b viser et behandlet ovulert egg fra kråkebolle,

Figur 4A viser bilder av ultratynne seksjoner gjennom egg-membranen av et ubehandlet ovulert egg fra stør,

Figur 4B viser bilder av ultratynne seksjoner gjennom egg-membranen av et ubehandlet ovulert egg fra stør etter en behandling med kalsiumklorid,

Figur 4C viser bilder av ultratynne snitt gjennom egg-membranen av et ubehandlet ovulert egg fra stør etter en behandling med hydrogenperoksid,

Figurer 5A,B viser diagrammer av målene på membrankomponentenes proporsjoner i membranens totale tykkelse i % av umodne egg fra stør (kaviar) behandlet i henhold til inneværende oppfinnelse, og

Figurer 5C,D viser diagrammer av målene på membrankomponentenes proporsjoner i membranens totale tykkelse i % av ovulerte egg fra stør (kaviar) behandlet i henhold til inneværende oppfinnelse.

Figur 1 viser den naturlige befruktning av egg fra kråkebolle og dannelsen av en ekstracellulær befruktningsmembran. Det venstre bilde viser det ubefruktede egg forstørret 200 ganger. Det høyre bilde viser det befruktede egg i samme forstørrelse, med den herdete befruktningsmembran (pil). De små strekene viser angripende sæd.

Fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse ble prøvd på levende egg fra kråkeboller (Psammechinus miliaris) og på egg fra sibirsk stør (Acipenser baerii). Resultatene av herdingen av de ovulerte egg ble overvåket i den levende organisme på grunnlag av målinger av enzymaktiviteter og morfologi i egg fra kråkebolle og egg fra stør.

Som tidligere nevnt, er aktivering av enzymet glukose-6-fosfat dehydrogenase, som oppstår på sekunder, for å produsere reduksjonsekvivalenten NADPH for H_2O_2-produksjon som substrat for ovoperoksidase den begynnende utløser for eggherding av eggmembranen. Økning i G6PDH-aktivitet kan måles i de levende egg under innflytelse av eksogen stimulans. Fremgangsmåten med tetrazoliumsalt i henhold til Van Noorden og Fredericks (1992) ble overført til levende celler som bevis. NADPH som oppstår ved substratreaksjon, reduserer tetrazolium salt (TNBT) kvantitativt for å forme et brunt

reaksjonsprodukt, formazan. Dannelsen av reaksjonsproduktet påvises i rett tid med hjelp av absorpsjonsmålinger ved bølgelengde på 585 nm.

Figur 2 viser intervallmikroskopi (avbilding ved bruk av Zeiss Axiovert, Axiocam, KS300 Software, Axiovision Software) av NADPH-produksjon i levende egg fra kråkebolle. Pilen viser anvendelse av eksogen stimulans (H_2O_2 1 % i sjøvann). De to øvre absorpsjonskurver i den kortikale region (egg-grense) og i cytoplasma (egg innvendig) viser en vesentlig økning i tid i sekunder etter tilførsel. En kontroll ble foretatt uten eksogen stimulans. De to lave absorpsjonskurvene for den kortikale region og cytoplasma viser ingen endring etter påføring. Målemaskene (målemakro) for mikroskopi vises i de to nedre bilder i figur 2. Det venstre bilde viser den ringformede målemaske for den kortikale region, det høyre bilde viser den sirkelformete målemaske for cytoplasma. Enzymaktiviteten er høyest i den kortikale region under eggmembranen fordi det høyeste NADPH-behov for H_2O_2-konsum fins her. En identisk kurve for enzymaktivitet ble observert for ovoperoksidase etter H_2O_2-tilførsel.

Figur 3a viser et ubehandlet ovulert egg fra kråkebolle uten beskyttende membran (forstørret 400 ganger). De kortikale granulater ligger løst distribuert på eggoverflaten og dekkes bare av et tynt vitellinlag, som ikke er gjenkjennelig i lysmikroskopi. **Figur 3b** viser et egg behandlet ved bruk av fremgangsmåten i henhold til inneværende oppfinnelse med et klart formet beskyttende membran (pil, forstørret 400 ganger). Påvisning utføres ved histologiske prøver av tynne deler av festet eggemateriale (4 % Bakers formaldehyd, omsluttet av Epon for TEM, farging ved bruk av toluidin blå) før og etter behandling med bruk av et eksogent herdemiddel i henhold til inneværende oppfinnelse.

Omfattende forsøk på innhøstede egg fra stør (Acipenser baerii) viste at fremgangsmåten utviklet på egg fra kråkebolle kan overføres direkte og gir det ønskede resultat. Konservering ved bruk av koksalt og boraks utført etter herding av eggene og også holdbarhetsforsøk over 12 måneder viste at eggene forblir stabile.

Figurer 4 A til **C** viser lysmikroskopibilder av kryostatseksjoner farget av H&E, elektronmikroskopbilder av ultratynne snitt av egg fra stør festet med GA og osmium og omsluttet av Epon. Bildene viser membranendringer i ovulerte egg fra stør ved en behandling i henhold til inneværende oppfinnelse.

Figur 4 A viser et lysmikroskopibilde av et snitt gjennom et ovulert egg fra stør uten behandling i henhold til inneværende oppfinnelse. Posen (den ubrutte linjen) som omslutter eggeplasma (EPL) i stør-egg består av flere membranlag. Det innerste membran

indikeres med en stjerne (*), den ytterste membran (befruktningsmembran) indikeres med tre stjerner (***). **Figur 4Aa** viser elektronmikroskopibilder i 3000 X-forstørrelse av den innerste membranens område (*) og en detalj fra dette i 12 000 X-forstørrelse med løse tyrosinfiberbunter.

Figur 4B viser et ovulert egg fra stør behandlet med 115 mg/l kalsiumklorid i henhold til inneværende oppfinnelse. **Figur 4Bb** viser et elektronmikroskopibilde i 3000 X-forstørrelse og en detalj i 12 000 X-forstørrelse av en kompaktering av tyrosin tverrbinding. **Figur 4C** viser et ovulert egg fra stør behandlet med 0,01 % hydrogenperoksid. **Figur 4Cc** viser et elektronmikroskopiopptak i 3000 X-forstørrelse og en detalj i 12 000 X-forstørrelse av kompaktering til tråder av tyrosintverrbinding.

Ved sammenligning mellom **figurer 4A** (ubehandlet), **4B** (behandlet med kalsiumklorid), **4C** (behandlet med hydrogenperoksid) kan det ses klart at ved behandling i henhold til inneværende oppfinnelse, avtar den innerste membran (*) på ovulerte egg fra stør i diameter og kompakterer med tyrosin tverrbinding, mens den ytre membran (***) øker i diameter, men blir også mer kompakt. Kompaktering resulterer i den ønskede herding av eggmembranen. Graden av herding kan justeres ved utmåling av eksogene tilførsler med hensyn til type, kvantitet og varighet.

Figurer 5 A...D viser diverse diagrammer over mål på proporsjonene på membrandelene i den totale membrantykkelse i % på nåværende kommersielt tilgjengelig kaviar fra umodne egg (**figurer 5A, 5B**) og på ovulerte egg (**figurer 5C, 5D**) etter behandling i henhold til inneværende oppfinnelse med bruk av hydrogenperoksid eller kalsiumklorid. **Figurer 5A** og **5C** viser en behandling med hydrogenperoksid H_2O_2 (behandling 0: ubehandlet, behandling 1: 0,01 % oppløsning, behandling 2: 0,02 % oppløsning, behandling 3: 0,05 % oppløsning, behandling 4: 0,1 % oppløsning), figurer **5B** og **5D** viser en behandling med kalsiumklorid $CaCl_2$ (behandling 0: ubehandlet, behandling 1: 115 mg/l, behandling 2: 123 mg/l, behandling 3: 130 mg/l med I= per liter oppløsning). Dette betyr at utmåling av kalsiumioner i det mikromolare område skal inneholde vesentlig flere kalsiumioner enn den mengde som fins i normalt drikkevann og vann fra springen. Befruktningsmembran indikeres med "FM" og oppstår uten befruktning bare gjennom behandling i henhold til inneværende oppfinnelse, den indre membran indikeres med "IM".

Det går tydelig frem at ved behandling av for tiden kommersielt tilgjengelig kaviar, dvs. umodne egg, oppstår ingen vesentlige endringer i membrantykkelse, jfr. **figurer 5A** og **5B**, mens endring i tykkelsesproporsjoner i indre membran i forhold til den produserte

befruktningsmembran, som skaper herding ved behandling av ovulerte egg i henhold til inneværende oppfinnelse, jfr. **figurer 5C** og **5D**, er vesentlig. Medianene ved 50 målinger hver av den indre membran (IM) og den ytre befruktningsmembran (FM) vises med verdifordeling i konfidensintervall med 25 % - 75 % fjerdedeler og minimums- og maksimumsverdiene.

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for fremstilling av ovulerte egg fra akvatiske dyr for å lage gourmet-mat,
karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter de følgende trinn:

- å innhøste de ovulerte egg uten skadelig påvirkning på det akvatiske dyr,
- eksogen behandling av de ferskt innhøstede ovulerte egg i en vandig oppløsning ved tilsetning av signaltransduksjonsmolekylene hydrogenperoksyd og/eller kalsiumklorid, som også er naturlig forekommende i eggcellen, for fysiologisk stabilisering av eggmembranen ved hjelp av ovoperoksydase-aktivering og etterfølgende
- konservering.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved en eksogen behandling av de ovulerte egg i et vannbad med en vandig oppløsning med 0,01; 0,02; 0,05 eller 0,1 prosent tilsetning av hydrogenperoksyd.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
karakterisert ved en eksogen behandling av de ovulerte egg i et vannbad med en vandig oppløsning av 0,01 prosent tilsetning av hydrogenperoksyd i 1 til 5 minutter , hvor varigheten av behandlingen bestemmes som en funksjon av den ønskede hardhet av de behandlete ovulerte egg.

4. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 3,
karakterisert ved en eksogen behandling av de ovulerte egg i et vannbad av en vandig oppløsning med tilsetning av 115 mg/l, 123 mg/l eller 130 mg/l av kalsiumklorid.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 4,
karakterisert ved en eksogen behandling av de ovulerte egg i et vannbad med en vandig oppløsning med tilsetning av 115 mg/l kalsiumklorid i 10 til 20 minutter, hvor behandlingsvarigheten bestemmes som en funksjon av den ønskede hardhet av de behandlete ovulerte egg.

6. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 5,
karakterisert ved en kombinasjonsbehandling av de ovulerte egg i et vannbad

med en vandig oppløsning med tilsetning av hydrogenperoksyd og kalsiumklorid i 1 til 20 minutter hvor behandlingsvarigheten bestemmes som en funksjon av den ønskede hardheten av de behandlete ovulerte egg.

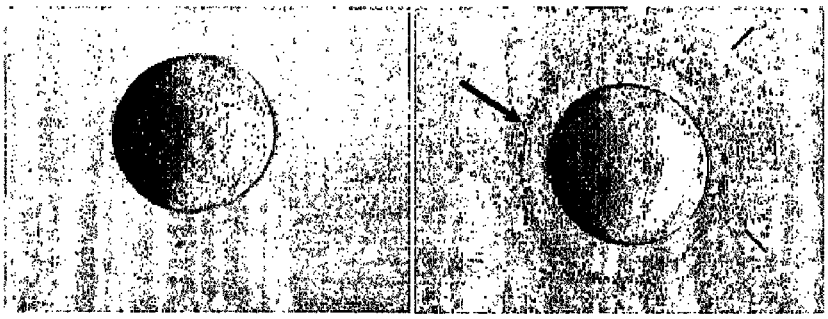
7. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 6,
karakterisert ved en skylling av de ovulerte egg i en fysiologisk saline-oppløsning unde sterile betingelser før den eksogene behandling.

8. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 7,
karakterisert ved en innhøsting av de ovulerte egg fra levende akvatiske dyr.

9. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1 til 8,
karakterisert ved en innhøsting av de ovulerte egg fra spiselige fisk og skalldyr.

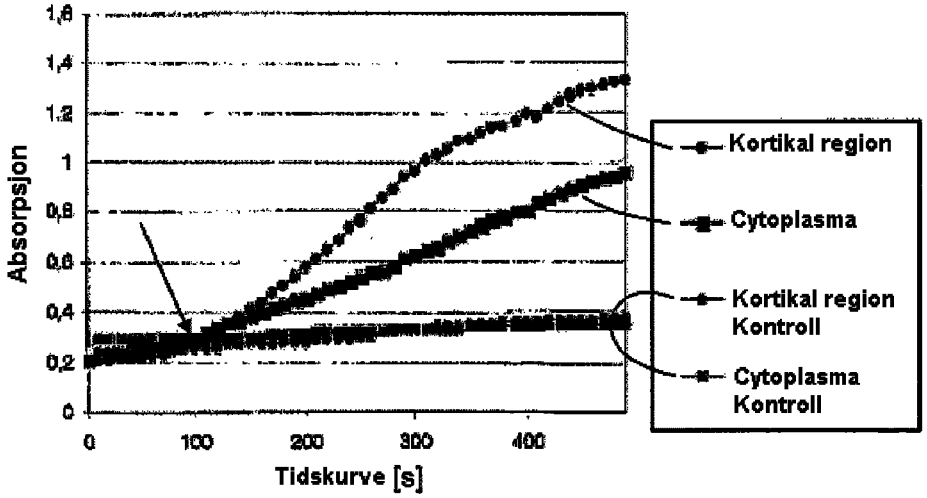
10. Fremgangsmåte ifølge krav 9,
karakterisert ved en innhøsting av de ovulerte egg fra stør som spiselig fisk for fremstilling av ekte kaviar.

11. Ovulerte egg fra akvatiske dyr fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 1 til 10 for å danne delikatesse-mat,
karakterisert ved en herdet ytre kapsel med fornettede proteinkjeder og irreversibelt integrerte tyrosin-molekyler uten en befruktningstilstand.



Tidligere teknikk

Fig.1



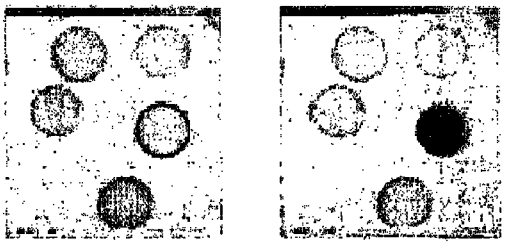


Fig.2

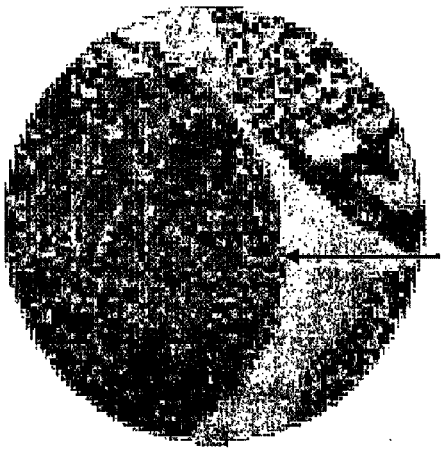


Fig.3a

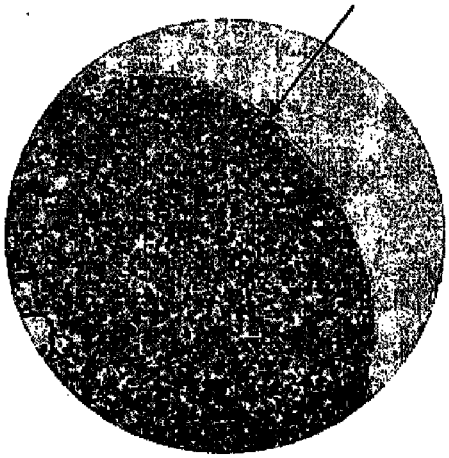


Fig.3b

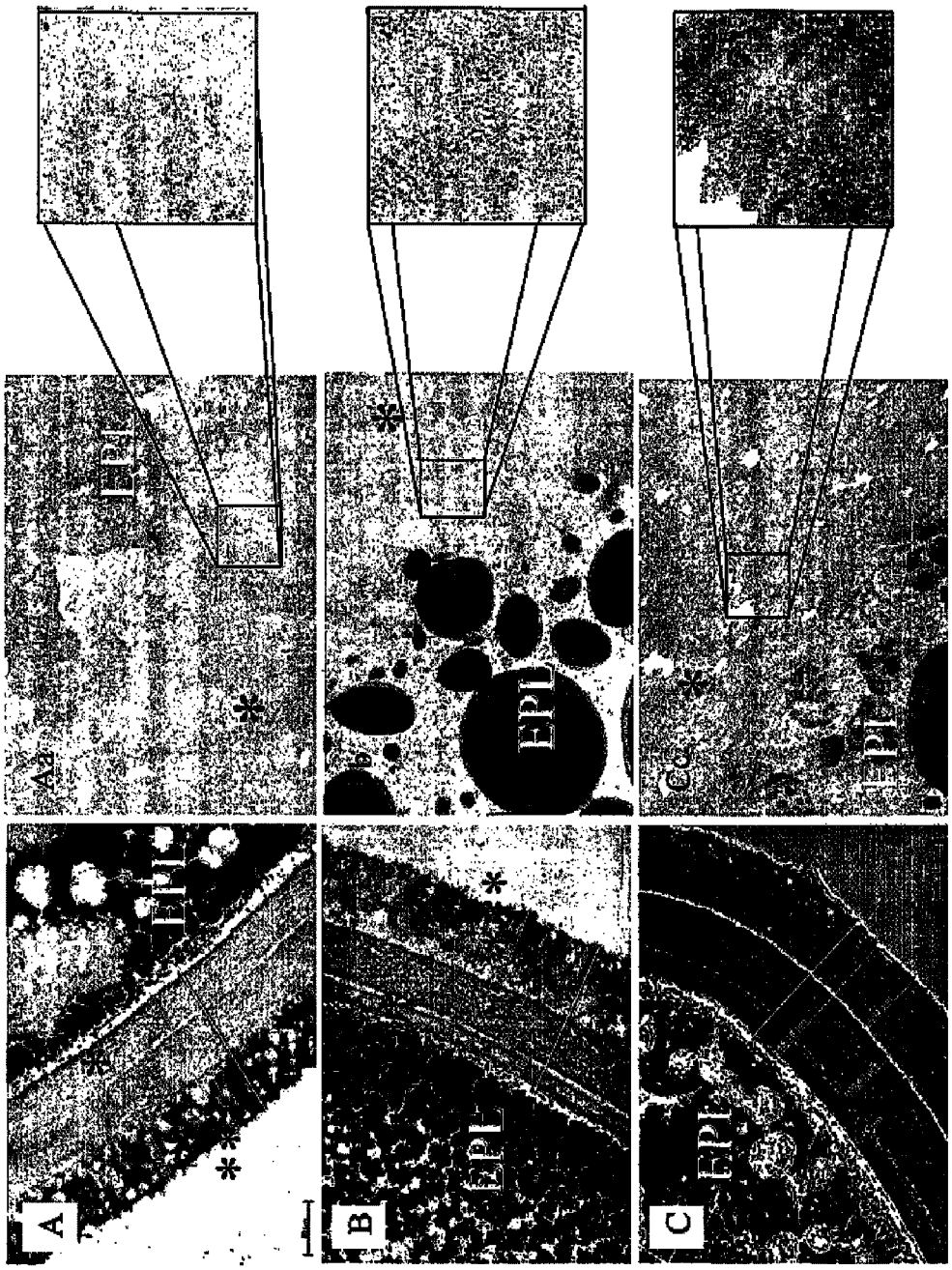


Fig.4

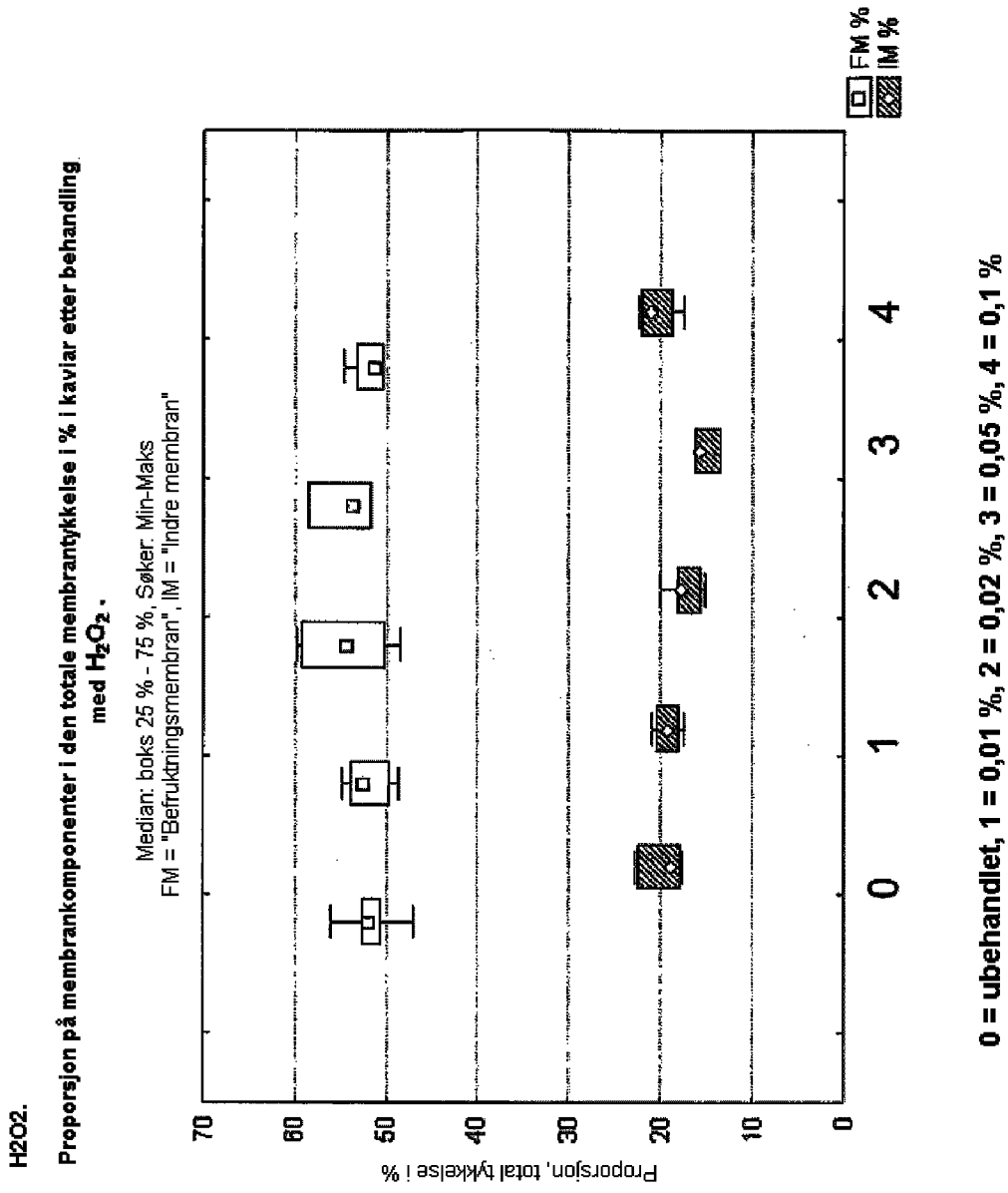

H2O2.
Proporsjon på membrankomponenter I den totale membrantykkelse I % I kavlar etter behandling med H_2O_2 .
Median: boks 25 % - 75 %, Søker: Min-Maks
FM = "Befruktningsmembran", IM = "Indre membran"
Proporsjon, total tykkelse i %
0
10
20
30
40
50
60
70
0
1
2
3
4
FM %
IM %
0 = ubehandlet, 1 = 0,01 %, 2 = 0,02 %, 3 = 0,05 %, 4 = 0,1 %

Fig.5A

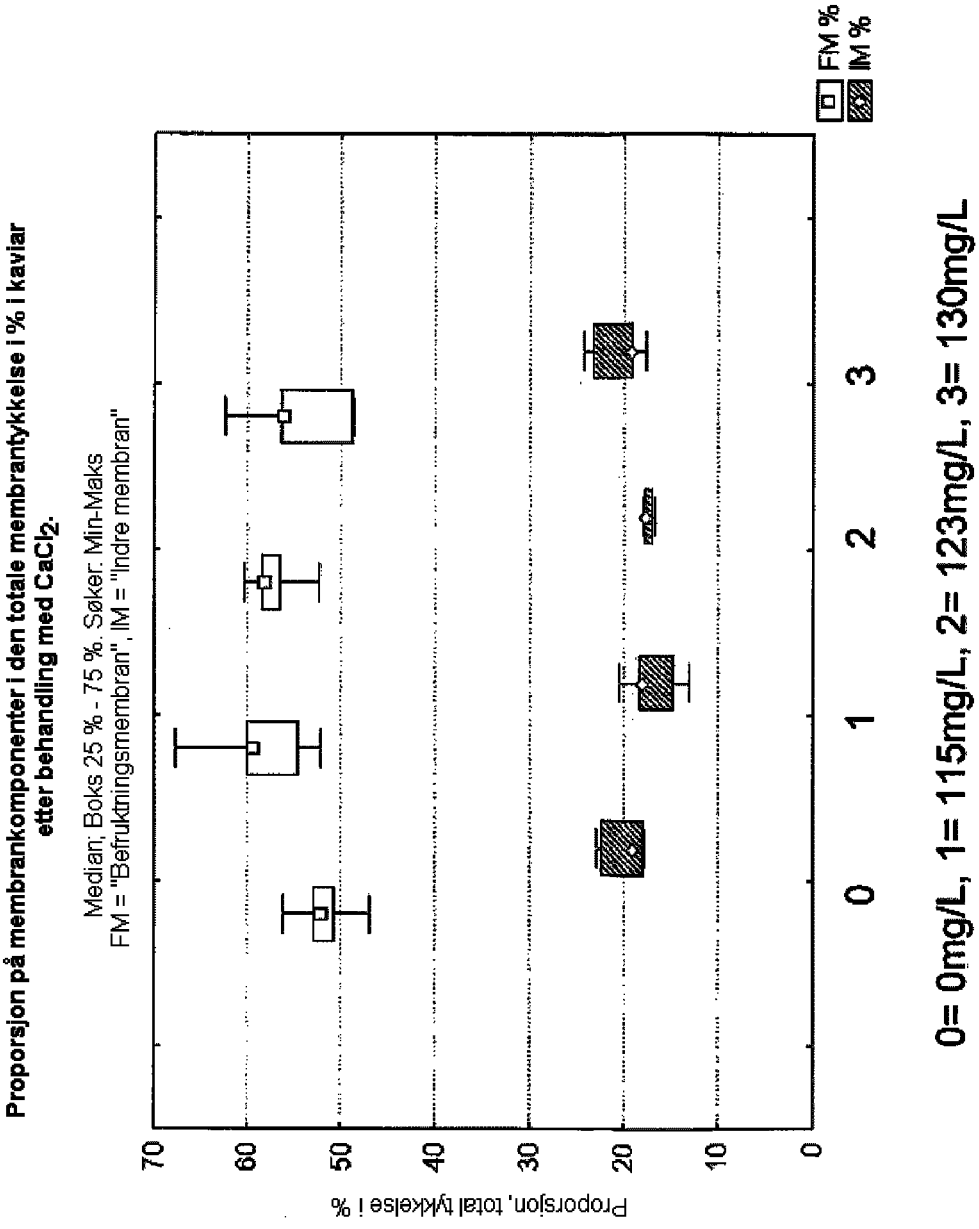

Proporsjon på membrankomponenter i den totale membrantykkelse i % i kaviar etter behandling med $CaCl_2$.
Median; Boks 25 % - 75 %, Søker: Min-Maks
FM = "Befruktningsmembran", IM = "Indre membran"
FM %
IM %
Proporsjon, total tykkelse i %
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
0= 0mg/L, 1= 115mg/L, 2= 123mg/L, 3= 130mg/L

Fig.5B

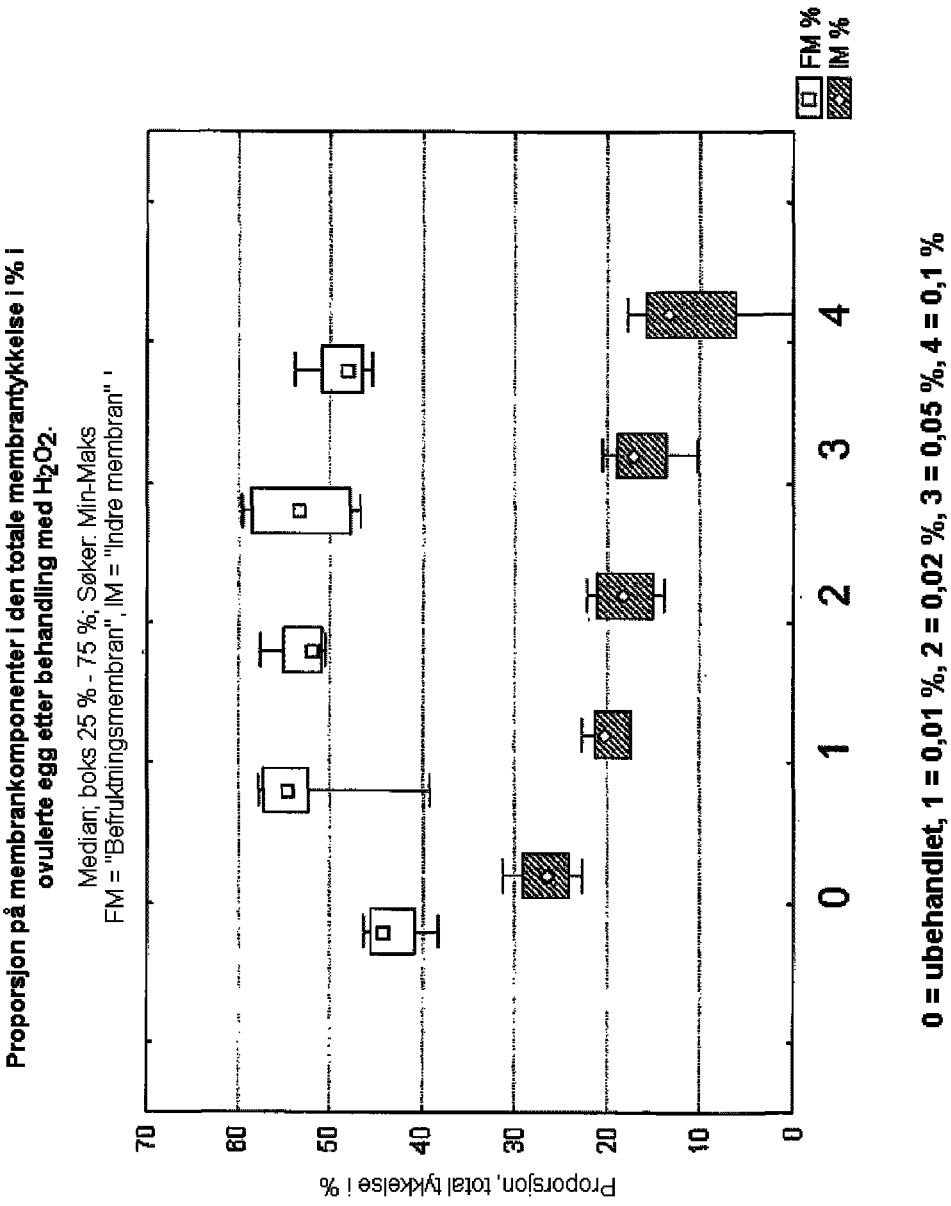

Proporsjon på membrankomponenter i den totale membrantykkelse i % i ovulerte egg etter behandling med H_2O_2.
Median; boks 25 % - 75 %; Søker: Min-Maks
FM = "Befruktningsmembran", IM = "Indre membran"
FM %
IM %
Proporsjon, total tykkelse i %
0
10
20
30
40
50
60
70
0
1
2
3
4
0 = ubehandlet, 1 = 0,01 %, 2 = 0,02 %, 3 = 0,05 %, 4 = 0,1 %

Fig.5C

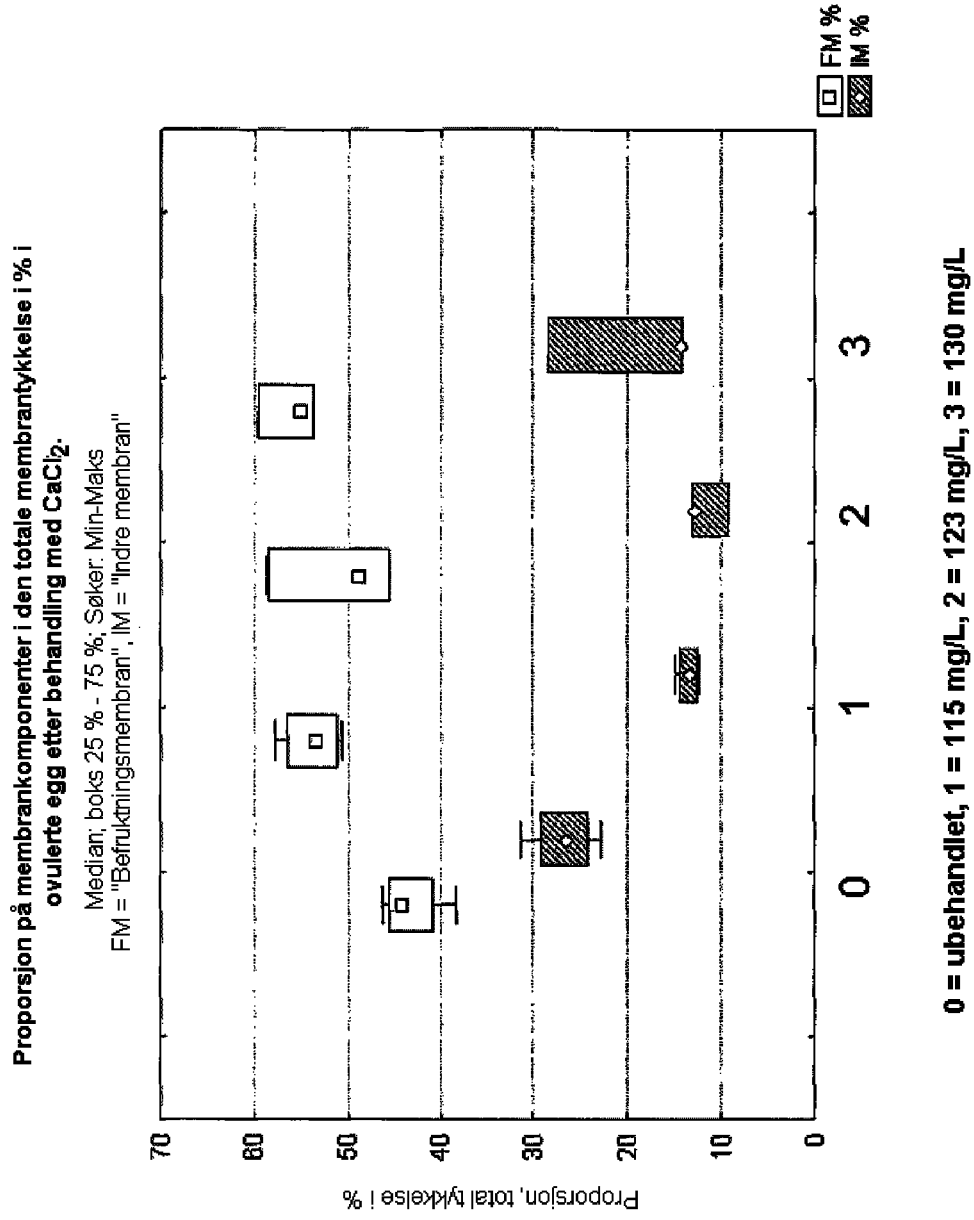

Proporsjon på membrankomponenter i den totale membrantykkelse i % i ovulerte egg etter behandling med CaCl2.
Median; boks 25 % - 75 %; Søker: Min-Maks
FM = "Befruktningsmembran", IM = "Indre membran"
FM %
IM %
Proporsjon, total tykkelse i %
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
0 = ubehandlet, 1 = 115 mg/L, 2 = 123 mg/L, 3 = 130 mg/L

Fig.5D