



УДК 597-113.32:[556.531.32:543.843]

## ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ФЕРМЕНТОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПРОЦЕСС МЕМБРАННОГО ПИЩЕВАРЕНИЯ У ВЕСЛОНОСА И РУССКОГО ОСЕТРА

© 2010 А.Н. Неваленный, Д.А. Бедняков, Новинский В.Ю.  
Астраханского государственного технического университета.

Проведено комплексное исследование характеристик некоторых ферментов, осуществляющих мембранный гидролиз пищи у веслоноса и русского осетра. Отмечается высокая термостабильность ферментативного белка всех исследованных ферментов.

Complex research of characteristics of some enzymes which are carrying out membrane hydrolysis of food at a spoon-billed cat and Russian sturgeon is carried out. High thermostability enzymes the squirrel of all investigated enzymes is marked.

**Ключевые слова:** ферменты, веслонос, русский осетр, температура, pH, температурный оптимум.

**Keywords:** enzymes, a spoon-billed cat, Russian sturgeon, temperature, pH, a temperature optimum.

Одной из важных экологических проблем в настоящее время является снижение численности осетровых видов рыб. Одним из способов ее решения является товарное их выращивание. Перспективным объектом, в этом отношении, из-за некоторых биологических особенностей является представитель американской фауны отряда осетрообразных (*Acipenseriformes*) – веслонос. В отличие от остальных осетровых, веслонос быстрорастущий вид и по типу питания – планктонофаг, что делает его видом, подходящим для выращивания в поликультуре, включающей фитопланктофага белого толстолобика, зоопланктофага веслоноса и бентофагов – русского осетра [1].

В связи с этим целью данной работы являлось исследование влияния температуры, концентрации водородных ионов на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса и для сравнения – русского осетра.

Были использованы годовики веслоноса (*Polyodon spathula Walbaum*) и русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii Brandt*), выращенные в искусственных условиях. Пойманных рыб в специальных емкостях в течение 1-2 ч доставляли в лабораторию, где у них на холоду изымали желудочно-кишечный тракт и специальным скребком снимали слизистую оболочку кишечника. Слизистую тщательно перемешивали и отбирали аликвоту для приготовления исходного гомогената. Гомогенаты готовили при помощи гомогенизатора, добавляя охлажденный до 2–4 °С раствор Рингера для холоднокровных животных (109 мМ NaCl, 1.9 мМ KCl, 1.1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1.2 мМ NaHCO<sub>3</sub>) в соотношении 1:49. При исследовании влияния температуры содержимое пробирок инкубировали в диапазоне 0 – 70 °С для щелочной фосфатазы, мальтазы и казеинлитических протеиназ и 0 – 60 °С для  $\alpha$ -амилазы (при pH 7,4). Определение влияния pH проводили в диапазоне 3.0 – 12.0., при температуре инкубации 25 °С.

Уровень активности  $\alpha$ -амилазы (КФ 3.1.1.1) определялся по убыли крахмала модифицированным методом Смита и Роя, уровень активности мальтазы (КФ 3.2.1.20) модифицированным глюкозооксидазным методом, щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) – по степени гидролиза п-нитрофенилфосфата. Казеинлитическую активность протеиназ (КФ 3.4.21) в нейтральной (pH = 7.4) среде определяли модифицированным методом Ансона [2]. Активность фермента выражали в мг или мкмоль продуктов гидролиза, образующихся за 1 минуту инкубации в расчете на 1 г влажной массы ткани.



Известно, что уровень активности пищеварительных ферментов рыб зависит от многих факторов внешней среды, а также от экологических особенностей исследуемых видов. Одним из ключевых факторов, определяющих изменение скорости каталитических реакций в организме является температура. Изучение закономерностей влияния температуры на уровень активности пищеварительных ферментов позволяет сделать выводы об эффективности адаптации того или иного вида к условиям обитания [3, 4, 5].

Данные о влиянии температуры инкубации на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса и русского осетра представлены в таблице 1. Температурный оптимум для щелочной фосфатазы, мальтазы и казеинлитических протеиназ слизистой оболочки кишечника веслоноса установлен в диапазоне температур от 50 до 60 °С, зона оптимальных значений для  $\alpha$ -амилазы смещена в сторону более низких температур – 20 – 30 °С. Отмечается высокая термостабильность щелочной фосфатазы и казеинлитических протеиназ слизистой кишечника, т.к. при постмаксимальных температурах (70 °С) уровень активности данных ферментов остается достаточно высоким и составляет 63% и 55% от максимального значения соответственно. При 60 °С уровень активности  $\alpha$ -амилазы у веслоноса снижается до 68% от оптимального.

Для русского осетра температурный оптимум щелочной фосфатазы, мальтазы и казеинлитических протеиназ слизистой оболочки кишечника расположен в диапазоне температур от 50 до 65 °С, оптимальное значение для  $\alpha$ -амилазы установлено при 30 °С у русского осетра так же как у веслоноса. Отмечается высокая термостабильность щелочной фосфатазы слизистой кишечника, т.к. при постмаксимальных температурах (70 °С) уровень активности фермента остается достаточно высоким и составляет 80% от максимального значения. В случае с казеинлитическими протеиназами и мальтазой уровень активности при 70 °С составляет 15% и 38% от максимума соответственно.  $\alpha$ -амилаза при 60 °С полностью утрачивает свою активность.

Полученные данные свидетельствует о том, что ферментные системы, обеспечивающие гидролиз компонентов пищи как у русского осетра, так и у веслоноса адаптированы к функционированию в широком диапазоне температур [3, 4, 6]. Более выраженная устойчивость ферментных систем к высоким значениям температуры была выявлена у веслоноса.

Ранее было установлено, что ферменты обладают наибольшей активностью в определенном диапазоне концентрации водородных ионов. Пищеварительный тракт рыб в естественных условиях находится в прямом контакте с внешней средой, а его содержимое может рассматриваться как часть окружающей среды [7]. Следовательно, pH окружающей среды может непосредственно влиять на концентрацию водородных ионов в желудочно-кишечном тракте и соответственно, на активность ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение. При исследовании характеристик пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника большинства видов рыб отмечена довольно широкая зона оптимальных значений pH [4, 8].

Нами, при исследовании влияния концентрации водородных ионов на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса установлено, что зона максимальных значений активности  $\alpha$ -амилазы, щелочной фосфатазы и мальтазы находится в диапазоне pH от 7.0 до 9.0; от 9.0 до 10.0; от 6.0 до 8.0 соответственно, для казеинлитических протеиназ отмечен четкий оптимум при pH 11.0.

При исследовании влияния концентрации водородных ионов на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника русского осетра было установлено, что зона максимальных значений активности  $\alpha$ -амилазы, щелочной фосфатазы и мальтазы находится в диапазоне pH от 7.0 до 8.0; от 8.0 до 9.0; от 7.0 до 8.0 соответственно, для казеинлитических протеиназ так же как и у веслоноса отмечен четкий оптимум при pH 10.0.

Таким образом, установленные некоторые различия в оптимальных значениях уровня активности ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса и русского осетра при действии температуры и концентрации водородных ионов, что вероятно связано с отличающимися условиями обитания видов.



Влияние температуры инкубации на уровень активности ферментов, обеспечивающих мембранное пищеварение у веслоноса и русского осетра

Таблица 1.

Вид		Температура инкубации в °С									
		0	10	20	25	30	40	50	55	60	65
α-амилаза (мг/г·мин)											
Веслонос	10,91±0,59	11,42±0,43	11,76±0,43	12,10±0,26	12,10±0,17	11,34±0,17	9,72±0,27	-	8,19±0,25	-	-
Русский осетр	6,26±0,35	6,44±0,18	6,62±0,44	6,88±0,44	8,29±0,27	7,59±0,27	5,64±0,21	-	0	-	-
Мальтаза (мкмоль/г·мин)											
Веслонос	1,71±0,08	2,11±0,04	2,79±0,15	-	3,39±0,04	5,72±0,08	7,73±0,11	8,54±0,08	9,20±0,17	-	3,22±0,06
Русский осетр	3,93±0,13	5,51±0,25	8,32±0,13	-	12,95±0,40	17,46±0,15	18,10±0,06	18,82±0,15	19,59±0,13	-	7,49±0,25
Казеинлитические протеиназы (мкмоль/г·мин)											
Веслонос	0,89±0,05	1,59±0,04	3,20±0,04	-	6,94±0,10	11,78±0,04	16,98±0,12	-	17,71±0,07		9,69±0,04
Русский осетр	1,28±0,14	1,68±0,46	2,03±0,16	-	3,88±0,21	7,47±0,33	12,82±0,34	-	9,04±0,48	-	1,91±0,17
Щелочная фосфатаза (мкмоль/г·мин)											
Веслонос	0,26±0,01	0,32±0,01	0,41±0,02	-	0,73±0,01	1,11±0,05	1,66±0,02	1,87±0,02	1,78±0,01	1,68±0,01	1,18±0,02
Русский осетр	0,30±0,01	0,29±0,01	0,38±0,01	-	0,51±0,01	0,82±0,01	1,14±0,01	1,37±0,01	1,46±0,02	1,47±0,02	1,18±0,03



Таблица 2.  
Влияние концентрации водородных ионов на уровень активности ферментов, обеспечивающих мембранное пищеварение у веслоноса и русского осетра.

Вид	рН											
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
α-амилаза (мг/г·мин)												
Веслонос	2,86±0,24	4,01±0,31	5,71±0,17	7,85±0,17	9,16±0,23	9,49±0,23	8,75±0,17	8,48±0,11	8,16±0,12	6,53±0,24		
Русский осетр	2,50±0,23	3,91±0,40	4,39±0,33	5,52±0,12	8,10±0,11	8,06±0,22	7,33±0,17	7,00±0,11	6,54±0,11	5,29± 0,11		
Мальтаза (мкмоль/г·мин)												
Веслонос	3,01±0,20	4,39±0,10	4,55±0,17	6,72±0,17	6,93±0,14	6,96±0,10	6,09±0,03	4,05±0,10	3,34±0,10	2,58±0,10		
Русский осетр	3,12±0,15	5,12±0,15	6,70±0,23	10,43±0,23	12,84±0,19	12,60±0,23	10,95±0,23	5,16±0,11	4,67±0,08	4,52±0,04		
Казеинлитические протеиназы (мкмоль/г·мин)												
Веслонос	-	-	-	0,45±0,02	0,51±0,04	0,71±,04	0,73±0,04	0,86±0,04	1,19±0,02	0,36±0,09		
Русский осетр	-	-	-	4,30±0,04	7,07±0,09	8,95±0,02	9,59±0,07	10,45±0,09	7,66±0,15	1,41±0,09		
Щелочная фосфатаза (мкмоль/г·мин)												
Веслонос	0,31±0,01	0,35±0,01	0,36±0,01	0,41±0,01	0,41±0,01	0,41±0,01	0,48±0,01	0,45±0,01	0,32±0,01	0,20±0,01		
Русский осетр	0,29±0,01	0,30±0,01	0,31±0,01	0,31±0,01	0,33±0,01	0,35±0,01	0,36±0,01	0,28±0,01	0,18±0,01	0,15±0,01		



### Библиографический список

1. Пономарев С.В., Иванов Д.И. Осетроводство на интенсивной основе. М.: Колос, 2009, -312 с.
2. Неваленный А.Н., Бедняков Д.А., Держинская И.С. Энзимология. -Астрахань: ФГОУ ВПО «Астрахан. гос. техн. ун-т», 2005 -102 с.
3. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. - СПб.: Гидрометеоздат, -1993, -283 с.
4. Неваленный А.Н., Туктаров А.В., Бедняков Д.А. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб. - Астрахань: ФГОУ ВПО «Астрахан. гос. техн. ун-т», -2003. -152 с.
5. Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. - М.: Наука, 2005. -300 с.
6. Коростелёв С.Г., Неваленный А.Н. Влияние температуры на пищеварительно-транспортную функцию кишечника карповых рыб // Вопр. ихтиологии. Т. 45. № 2. 2005. - С. 225–235.
7. Кузьмина В.В., Неваленный А.Н. Влияние концентрации водородных ионов на активность карбогидраз пищеварительного тракта рыб // Вопр. ихтиологии. Т. 23. № 3. 1983. - С. 481–490.
8. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. Влияние температуры, pH и тяжелых металлов (медь, цинк) на активность протеиназ слизистой оболочки пищеварительного тракта типичных и факультативных ихтиофагов // Вопр. ихтиологии. Т. 47. № 4. 2007 - С. 566–573.

УДК 519.237:[597-1.044:597.423-113.32]

## АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОСМОЛЯРНОСТИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСА ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ РУССКОГО ОСЕТРА МЕТОДОМ МНОГОМЕРНОГО ШКАЛИРОВАНИЯ

© 2010 А.В. Туктаров.

Астраханский государственный технический университет

Статья посвящена выявлению особенностей воздействия осмотического давления на комплекс пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника русского осетра. В качестве основного средства анализа данных и визуализации результатов используется метод многомерного шкалирования. Также проводится нечеткая кластеризация экспериментальных данных. Сделаны выводы о высокой устойчивости исследуемых ферментов к воздействию высоких осмотических нагрузок и чувствительности к малым изменениям осмолярности.

The article is devoted to the exposure of the peculiarities of the influence of osmotic pressure to the complex of digestive enzymes of the intestinal mucous tunic. In the capacity of main mean of data analysis and visualization the method of multidimensional scaling is used. Also fuzzy clustering of experimental data is realized. Concludes about high resistance of researched enzymes to the high osmotic pressure and its sensitivity to the small changes of this factor are done.

**Ключевые слова:** мембранное пищеварение, многомерное шкалирование, осмолярность среды, пищеварительные ферменты, нечеткая кластеризация

**Key words:** membrane digestion

К настоящему времени достаточно подробно изучено значительное число проблем, связанных с механизмами мембранного пищеварения рыб, а также с различными адаптациями пищеварительной системы. Однако остается ряд невыясненных аспектов относительно особенностей адаптаций на уровне ферментных систем. В частности, это касается исследований воздействия на активность пищеварительных ферментов такого важного параметра водной среды как осмолярность. Изучение воздействия данного фактора среды на функциональные характеристики мембранно-связанных ферментных систем требует применения статистических методов обработки массивов данных, сочетающих возможность комплексного анализа многомерных данных, с удобным и лаконичным представлением результатов исследования.