

УДК [597-143.4:577.152.3]:556.551.32  
ББК 28.693.32:28.071

*Д. А. Бедняков, А. Н. Невалённый*

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И pH  
НА УРОВЕНЬ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ  
ЛЕНСКОГО ОСЕТРА (*ACIPENSER BAERI*)**

*D. A. Bednyakov, A. N. Nevalennyu*

**INFLUENCE OF THE TEMPERATURE AND pH  
ON THE LEVEL OF THE ACTIVITY OF THE DIGESTIVE ENZYMES  
OF SIBERIAN STURGEON (*ACIPENSER BAERI*)**

Исследованы адаптации ферментов слизистой оболочки кишечника ленского осетра к факторам среды обитания (температура и pH). Показано, что температурный оптимум для щелочной фосфатазы находится в диапазоне значений температуры 60–65 °С, для  $\alpha$ -амилазы – 30 °С, для мальтазы – 55 °С, для казеинлитических протеиназ – 40 °С. Показано, что исследованные ферменты ленского осетра сохраняют достаточно высокую относительную активность при низких значениях (0 °С) температуры инкубации. Максимальная активность  $\alpha$ -амилазы, мальтазы, щелочной фосфатазы обнаружена при pH 8–9, 7, 8–9 и 9–10 соответственно, для казеинлитических протеиназ оптимальное значение pH находится в диапазоне 8–10. Данные оптимумы pH соответствуют таковым для рыб Волжского бассейна. Ленский осетр обитает в более низких температурных условиях, нежели представители Волжского бассейна, скорее всего, с этим связано смещение температурных оптимумов  $\alpha$ -амилазы и казеинлитических протеиназ в сторону более низких значений температуры. Кроме того, отмечается сходство ответных реакций пищеварительных ферментов на изменение температуры инкубации у ленского осетра и рыб, обитающих в арктических широтах. Подтверждено, что температурные адаптации пищеварительной системы пойкилотермных организмов реализуются главным образом благодаря перестройкам ферментных систем.

**Ключевые слова:** ленский осетр, пищеварительные ферменты, кишечный эпителий, адаптация, температура, pH.

The adaptations of the enzymes of intestinal mucous tunic of Siberian sturgeon to the environmental factors (temperature and pH) are studied. It is shown that the temperature optimum for the alkaline phosphatase is located in the range 60–65 °C, for the amylase – 30 °C, for the maltase – 55 °C, for caseinolytic proteinases – 40 °C. It is stated that the studied enzymes of Siberian sturgeon save sufficiently high relative activity at low (0 °C) incubation temperature. Maximum activity of  $\alpha$ -amylase, maltase, alkaline phosphatase is registered at pH 8–9, 7, 8–9, and 9–10 accordingly, for caseinolytic proteinases optimal value of pH is located in the range 8–10. These pH optimums are in concordance with similar optimums of fishes of the Volga river basin. Siberian sturgeon inhabits in conditions of lower temperature in comparison with species of the Volga river basin, probably it caused the shift of temperature optimums of  $\alpha$ -amylase and caseinolytic proteinases in the direction of lower temperature values. Besides it should be noted that response of digestive enzymes of Siberian sturgeon on the change of incubation temperature is similar to analogous phenomenon of arctic fishes. It is confirmed that temperature adaptations of the digestive system of poikilotherm animals are carried out mainly due to changes of enzyme systems.

**Key words:** Siberian sturgeon, digestive enzymes, intestinal epithelium, adaptation, temperature, pH.

### **Введение**

Механизмы действия различных факторов на пищеварительные процессы достаточно подробно изучены у высших позвоночных животных, а также у некоторых видов рыб [1–4]. В то же время работ, посвященных изучению влияния этих факторов на пищеварительные ферменты осетровых видов рыб, мало [4–6]. Следует отметить, что наибольший интерес представляет изучение влияния температуры и pH – одних из основных абиотических факторов среды, которые определяют целый ряд параметров жизнедеятельности рыб, такие как скорость протекания метаболических процессов, интенсивность питания, скорость усвоения пищи, а также влияют на различные характеристики ферментов.

В связи с этим целью исследований явилось изучение влияния различных значений температуры и pH инкубации на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника у представителя сем. *Acipenseridae* – ленского осетра.

### Материал и методика исследований

Нами были исследованы годовики ленского осетра (*Acipenser baerii*), выращенные в искусственных условиях. Было исследовано 36 экз.

Пойманных рыб в специальных ёмкостях в течение 1–2 часов доставляли в лабораторию, где у них на холоде изымали желудочно-кишечный тракт и специальным скребком снимали слизистую оболочку кишечника. Гомогенаты готовили при помощи гомогенизатора (лабораторный гомогенизатор Daihan Scientific), 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 α-амилазы (при pH 7,4). Определение влияния pH проводили в диапазоне 3–12, при температуре инкубации 25 °С.

Уровень активности α-амилазы (КФ 3.1.1.1) определяли 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 *n*-нитро-фенилфосфата Na. Казеинлитическую активность протеиназ (КФ 3.4.21) определяли модифицированным методом Ансона [7]. В качестве субстратов использованы: для α-амилазы – 0,1 %-й раствор крахмала; для мальтазы – 2 %-й раствор мальтозы; для щелочной фосфатазы – 0,6 мМ раствор *n*-нитро-фенилфосфата Na, приготовленный на растворе Рингера; для казеинлитических протеиназ – 1 %-й раствор казеина, приготовленный на фосфатном буфере (1/15 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O и 1/15 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> в соотношении 4 : 1). Активность ферментов выражали в мг или мкмоль продукта гидролиза, образующегося за 1 минуту инкубации в расчёте на 1 г влажной массы слизистой.

Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методикам [8]. Данные обрабатывали с использованием приложения EXCEL программы MS Office для WINDOWS XP.

### Результаты исследования

Результаты влияния температуры инкубации на уровень активности ферментов слизистой оболочки кишечника ленского осетра представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние температуры инкубации на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника ленского осетра, мкмоль/(г·мин)

T, °С	α-Амилаза*	Мальтаза	Щелочная фосфатаза	Казеинлитические протеиназы
0	11,95 ± 0,18	3,76 ± 0,18	0,72 ± 0,02	2,31 ± 0,19
10	13,08 ± 0,17	6,43 ± 0,23	0,82 ± 0,02	4,79 ± 0,19
20	13,43 ± 0,18	11,37 ± 0,08	1,17 ± 0,01	9,45 ± 0,13
25	14,65 ± 0,26		–	–
30	14,91 ± 0,09	14,53 ± 0,19	1,82 ± 0,01	15,94 ± 0,21
40	13,17 ± 0,17	15,13 ± 0,08	3,27 ± 0,01	17,07 ± 0,19
50	12,30 ± 0,26	15,28 ± 0,08	4,14 ± 0,01	15,80 ± 0,17
55	–	16,44 ± 0,23	4,27 ± 0,06	–
60	5,93 ± 0,26	15,52 ± 0,15	4,53 ± 0,07	15,19 ± 0,30
65	–	–	4,52 ± 0,15	–
70	–	7,92 ± 0,26	2,74 ± 0,13	4,32 ± 0,17

\* мг/(г·мин).

Как видно из табл. 1, температурный оптимум щелочной фосфатазы ленского осетра составляет 60–65 °С, что соответствует полученным ранее данным для представителей других экологических групп. Так, температурный оптимум данного фермента слизистой оболочки кишечника скумбрии, ставриды и сардинеллы соответствует 50–50 °С [9]. Высокие значения температурного оптимума щелочной фосфатазы отмечены и у представителей Волжского бассейна.

Так, например, у судака, окуня, карпа, карася оптимум фермента равен 50 °С [2]. Отмечено также, что при 0 °С активность щелочной фосфатазы составляет 92 % у судака и 88 % у леща от максимальной активности, принятой за 100 % [2], в то время как у ленского осетра активность данного фермента при температуре 0 °С составляет лишь 16 % от максимальной. Аналогичная закономерность была обнаружена ранее для кеты [10].

Низкие значения температурного оптимума отмечены для  $\alpha$ -амилазы слизистой оболочки кишечника ленского осетра – 30 °С. Температурный оптимум данного фермента у рыб, обитающих в Волго-Каспийском бассейне, обнаруживается, как правило, при 40 °С [11]. Следует отметить, что данное значение температурного оптимума соответствует таковому для рыб, обитающих в северных широтах [10]. Несмотря на низкие значения температурного оптимума, у ленского осетра активность при температуре 0 °С достаточно высока и составляет 80 % от максимального значения, в то время как у большинства пресноводных костистых рыб – лишь 15 % [2].

Температурный оптимум мальтазы у ленского осетра соответствует таковому для рыб Волго-Каспийского бассейна и составляет 55 °С. Относительная активность мальтазы при температуре инкубации 0 °С составляет 23 %, что соотносится с температурной характеристикой рыб Волго-Каспийского бассейна [3]. Достаточно низкие значения температурного оптимума (40 °С) отмечены при исследовании уровня активности казеинлитических протеиназ. Относительная активность данного фермента при температуре 0 °С у ленского осетра намного ниже, чем у костистых видов рыб Волжского бассейна и составляет соответственно 13 и 35–70 % от максимума.

В табл. 2 представлены данные по влиянию pH инкубационной среды на уровень активности ферментов слизистой оболочки кишечника ленского осетра.

Таблица 2

**Влияние pH инкубации на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника ленского осетра, мкмоль/(г·мин)**

pH	$\alpha$ -Амилаза*	Мальтаза	Щелочная фосфатаза	Казеинлитические протеиназы
3	8,02 ± 0,29	1,01 ± 0,08	0,36 ± 0,01	–
4	9,10 ± 0,28	2,37 ± 0,08	0,38 ± 0,01	–
5	10,43 ± 0,37	3,92 ± 0,08	0,38 ± 0,01	–
6	12,34 ± 0,11	10,01 ± 0,11	0,42 ± 0,01	4,46 ± 0,10
7	17,77 ± 0,29	12,88 ± 0,88	0,48 ± 0,01	9,78 ± 0,29
8	14,71 ± 0,29	12,16 ± 0,15	0,50 ± 0,01	13,24 ± 0,23
9	14,55 ± 0,09	10,24 ± 0,11	0,52 ± 0,01	13,56 ± 0,23
10	13,72 ± 0,29	4,14 ± 0,11	0,37 ± 0,01	13,49 ± 0,16
11	13,37 ± 0,18	1,66 ± 0,08	0,28 ± 0,01	12,11 ± 0,22
12	9,52 ± 0,38	1,66 ± 0,11	0,27 ± 0,01	4,97 ± 0,23

\* мг/(г·мин).

Из табл. 2 видно, что максимальная активность  $\alpha$ -амилазы, мальтазы, щелочной фосфатазы обнаружена при pH 8–9, 7, 8–9 и 9–10 соответственно. Оптимальные значения pH для казеинлитических протеиназ находятся в диапазоне 8–10. Данные оптимумы соответствуют таковым для рыб Волжского бассейна [3, 4].

### Заключение

Известно, что температурные характеристики ферментов отражают условия существования вида в историческом прошлом [3]. Ленский осетр, характерный представитель бассейна р. Лены, обитает в других температурных условиях, нежели представители Волжского бассейна. Возможно, именно с этим связано смещение у него температурных оптимумов  $\alpha$ -амилазы и казеинлитических протеиназ в сторону более низких значений температуры. Кроме того, отмечается сходство ответных реакций пищеварительных ферментов на изменение температуры инкубации у ленского осетра и рыб, обитающих в арктических широтах.

Таким образом, подтверждено, что адаптационные перестройки пищеварительной системы пойкилотермных организмов реализуются главным образом благодаря перестройкам ферментных систем. Можно предположить, что, по-видимому, имеет место эволюционная адаптация гидролитической функции кишечника рыб к условиям среды обитания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уголев А. М. Мембранное пищеварение и процессы усвоения пищи в мире животных // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1972. – Т. 8, № 3. – С. 269–278.
2. Уголев А. М., Кузьмина В. В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. – СПб.: Гидрометеоздат, 1993. – 283 с.
3. Невалянский А. Н., Туктаров А. В., Бедняков Д. А. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2003. – 152 с.
4. Невалянский А. Н., Бедняков Д. А., Новинский В. Ю. Исследование некоторых характеристик ферментов, обеспечивающих процесс мембранного пищеварения у веслоноса *Polyodon spathula* // Вопр. ихтиологии. – 2010. – Т. 50, № 3. – С. 400–404.
5. Бедняков Д. А., Новинский В. Ю., Невалянская Л. А. Комплексное исследование особенностей мембранного пищеварения у севрюги // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер.: Рыбное хозяйство. – 2011. – № 2. – С. 74–77.
6. Бедняков Д. А. Температурные адаптации ферментов слизистой оболочки кишечника русского и ленского осетров и их гибрида // Юг России. Экология, развитие. – 2010. – № 4. – С. 49–52.
7. Невалянский А. Н., Бедняков Д. А., Дзержинская И. С. Энзимология. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2005. – 102 с.
8. Глинский В. В., Ионин В. Г. Статистический анализ: Руководство по обучению. – М.: ИНФРА-М; Новосибирск: Сибир. соглашение, 2002. – 241 с.
9. Уголев А. М., Тимофеева Н. М., Груздков А. А. Адаптация пищеварительной системы // Физиология адаптационных процессов. – М.: Наука, 1986. – С. 371–481.
10. Невалянский А. Н., Левченко О. Е., Коростелёв С. Г. Влияние температуры инкубации на уровень активности пищеварительных ферментов кеты (*Oncorhynchus keta*) // Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер.: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2005. – № 2 (12). – С. 89–91.
11. Кузьмина В. В., Морозова Е. Н. Влияние температуры на активности  $\alpha$ -амилазы у пресноводных костистых рыб // Вопр. ихтиологии. – 1977. – Т. 17, № 5. – С. 922–929.

REFERENCES

1. Ugolev A. M. Membranное pishchevarenie i protsessy usvoeniia pishchi v mire zhiivotnykh [Membrane digestion and processes of food adoption in the animal world]. *Zhurnal evoliutsionnoi biokhimii i fiziologii*, 1972, vol. 8, no. 3, pp. 269–278.
2. Ugolev A. M., Kuz'mina V. V. *Pishchevaritel'nye protsessy i adaptatsii u ryb* [Digestive processes and fish adaptation]. Saint Petersburg, Gidrometeoizdat Publ., 1993. 283 p.
3. Nevalennyi A. N., Tuktarov A. V., Bedniakov D. A. *Funktsional'naiia organizatsiia i adaptivnaia reguliatsiia protsessov pishchevareniiia u ryb* [Functional organization and adaptive regulation of the fish digestive processes]. Astrakhan, Izd-vo AGTU, 2003. 152 p.
4. Nevalennyi A. N., Bedniakov D. A., Novinskii V. Iu. Issledovanie nekotorykh kharakteristik fermentov, obespechivaiushchikh protsess membrannogo pishchevareniiia u veslonosa *Polyodon spathula* [Study of some characteristics of enzymes providing the process of membrane digestion of paddlefish *Polyodon spathula*]. *Vo-prosy ikhtiologii*, 2010, vol. 50, no. 3, pp. 400–404.
5. Bedniakov D. A., Novinskii V. Iu., Nevalennaia L. A. Kompleksnoe issledovanie osobennostei membrannogo pishchevareniiia u sevirugi [Complex study of peculiarities of membrane digestion of sterlate]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2011, no. 2, pp. 74–77.
6. Bedniakov D. A. Temperaturnye adaptatsii fermentov slizistoi obolochki kishechnika russkogo i len-skogo osetrov i ikh gibrida [Temperature adaptations of enzymes of intestine mucosa of Russian and Siberian sturgeon and their hybrids]. *Iug Rossii. Ekologiya, razvitie*, 2010, no. 4, pp. 49–52.
7. Nevalennyi A. N., Bedniakov D. A., Dzerzhinskaia I. S. *Enzimologiya* [Enzymology]. Astrakhan, Izd-vo AGTU, 2005. 102 p.
8. Glinskii V. V., Ionin V. G. *Statisticheskii analiz: Rukovodstvo po obucheniiu* [Statistical analysis: Guidelines to training]. Moscow, INFRA-M, Novosibirsk, Sibirskoe soglashenie, 2002. 241 p.
9. Ugolev A. M., Timofeeva N. M., Gruzdkov A. A. *Adaptatsiia pishchevaritel'noi sistemy* [Adaptation of digestive system]. *Fiziologiya adaptatsionnykh protsessov*. Moscow, Nauka, 1986, pp. 371–481.

Статья поступила в редакцию 28. 02.2012

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Бедняков Дмитрий Андреевич** – Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук, доцент; доцент кафедры «Социально-культурный сервис и туризм»; bednyakovd@rambler.ru.

**Bednyakov Dmitriy Andreevich** – Astrakhan State Technical University; Candidate of Biological Sciences, Assistant Professor; Assistant Professor of the Department "Social-Cultural Service and Tourism"; bednyakovd@rambler.ru.

**Невалённый Александр Николаевич** – Астраханский государственный технический университет; д-р биол. наук, профессор; профессор кафедры «Гидробиология и общая экология»; nevalenny@rambler.ru.

**Nevalenny Alexander Nickolaevich** – Astrakhan State Technical University; Doctor of Biological Sciences, Professor; Professor of the Department "Hydrobiology and General Ecology"; nevalenny@rambler.ru.