

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 РУССКОГО ОСЕТРА  
(*ACIPENSER GÜLDENSTÄDTII* В.)**

*D. A. Bednyakov, A. N. Nevalenyyu*

**INFLUENCE OF THE TEMPERATURE AND pH ON THE LEVEL OF THE ACTIVITY  
OF THE DIGESTIVE ENZYMES OF RUSSIAN STURGEON  
(*ACIPENSER GÜLDENSTÄDTII* В.)**

Исследованы адаптации ферментов слизистой оболочки кишечника русского осетра к факторам среды (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 – 60 °С, для казеинлитических протеиназ – 50 °С. Показано, что исследованные ферменты русского осетра сохраняют достаточно высокую относительную активность при низких значениях (0 °С) температуры инкубации. Максимальная активность  $\alpha$ -амилазы и мальтазы обнаружена при pH 7–8, для щелочной фосфатазы – при pH 8–9, для казеинлитических протеиназ при pH 10. Данные оптимумы pH соответствуют таковым для рыб Волжского бассейна. Представленные данные свидетельствуют об идентичности ответной реакции ферментов слизистой оболочки кишечника русского осетра на изменение температуры инкубации и pH ответной реакции таковых других представителей сем. *Acipenseridae*.

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

The adaptations of the enzymes of intestinal mucous tunic of Russian sturgeon to environmental factors (temperature and pH) are studied. It is shown that the temperature optimum for the alkaline phosphatase is located in the temperature range 60–65 °C, for  $\alpha$ -amylase – 30 °C, for maltase – 60 °C, for caseinolytic proteinases – 50 °C. It is stated that the researched enzymes of the Russian sturgeon retain sufficiently high relative activity when uncubation temperature is low (0 °C). Maximum activity of the  $\alpha$ -amylase and maltase is detected at pH 7–8, for the alkaline phosphatase – at pH 8–9, for caseinolytic proteinases – pH 10. These optimums for pH are typical for the fish of the Volga river basin. The presented data are evidence of identity of reciprocal reaction of the enzymes of mucous tunic of the intestine of Russian sturgeon on the change of incubation temperature and pH with other species of *Acipenseridae*.

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

### **Введение**

Механизмы действия различных факторов среды 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, немного [4–6]. Следует отметить, что наибольший интерес представляет изучение влияния температуры и pH, относящихся к основным абиотическим факторам среды, которые определяют целый ряд параметров жизнедеятельности рыб (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* – русского осетра.

### **Материал и методика исследований**

Нами были исследованы 44 экз. годовиков русского осетра (*Acipenser guldienstädtii* В.), выращенных в искусственных условиях.

Пойманных рыб в специальных ёмкостях 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 температуры 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 при температуре в диапазоне 0–70 °С для щелочной фосфатазы, мальтазы и казеинлитических протеиназ и в диапазоне 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 глюкооксидазным методом, щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) – по степени гидролиза *n*-нитрофенилфосфата Na. Казеинлитическую активность протеиназ (КФ 3.4.21) определяли модифицированным методом Ансона [7]. В качестве субстратов были использованы: для α-амилазы – 0,1 %-й раствор крахмала; для мальтазы – 2 %-й раствор мальтозы; для щелочной фосфатазы – 0,6 мМ раствор *n*-нитрофенилфосфата 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 русского осетра представлены в табл. 1.

Таблица 1

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

T, °С	α-Амилаза*	Мальтаза	Щелочная фосфатаза	Казеинлитические протеиназы
0	6,26 ± 0,35	3,93 ± 0,13	0,30 ± 0,01	1,28 ± 0,14
10	6,44 ± 0,18	5,51 ± 0,25	0,30 ± 0,01	1,46 ± 0,20
20	6,88 ± 0,35	8,32 ± 0,13	0,38 ± 0,01	2,03 ± 0,16
25	6,88 ± 0,44	–	–	–
30	8,29 ± 0,27	12,95 ± 0,40	0,51 ± 0,01	3,88 ± 0,21
40	7,59 ± 0,27	17,46 ± 0,15	0,82 ± 0,01	7,47 ± 0,33
50	5,64 ± 0,21	18,10 ± 0,06	1,14 ± 0,01	12,82 ± 0,34
55	–	18,82 ± 0,15	1,37 ± 0,01	–
60	0,94 ± 0,11	19,59 ± 0,13	1,46 ± 0,02	9,04 ± 0,48
65	–	–	1,47 ± 0,02	–
70	–	7,49 ± 0,25	1,18 ± 0,03	1,91 ± 0,17

\* Мг/(г·мин).

Как видно из табл. 1, температурный оптимум щелочной фосфатазы русского 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 50–60 °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]. Было отмечено также, что при температуре 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 русского осетра активность данного фермента при температуре 0 °С составляет лишь 20 % от максимальной. Аналогичная закономерность была обнаружена ранее для кеты [10] и ленского осетра [11].

Для  $\alpha$ -амилазы слизистой оболочки кишечника русского осетра отмечены низкие значения температурного оптимума – 30 °С. Температурный оптимум данного фермента у рыб, обитающих в Волго-Каспийском бассейне, обнаруживается, как правило, при температуре 40 °С [12]. Такое же значение температурного оптимума отмечено у других исследованных представителей сем. *Acipenseridae*, обитающих в северных широтах [11]. Несмотря на низкие значения температурного оптимума, у русского осетра активность ферментов при температуре 0 °С достаточно высока и составляет 76 % от максимального значения, в то время как у большинства пресноводных костистых рыб – лишь 15 % [2].

Температурный оптимум мальтазы у русского осетра соответствует таковому для рыб Волго-Каспийского бассейна и составляет 60 °С. Относительная активность мальтазы при температуре инкубации 0 °С составляет 20 %, что также соотносится с характеристикой рыб Волго-Каспийского бассейна [3] и сем. *Acipenseridae* [11]. Значения температурного оптимума для казеинлитических протеиназ слизистой оболочки кишечника русского осетра обнаружены при температуре 50 °С. Относительная активность данного фермента при температуре 0 °С у русского осетра намного ниже, чем у костистых видов рыб Волжского бассейна и составляет 10 и 35–70 % соответственно от максимума, что является характерным для представителей данного семейства [11].

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

Таблица 2

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

рН	$\alpha$ -Амилаза*	Мальтаза	Щелочная фосфатаза	Казеинлитические протеиназы
3	2,50 ± 0,23	3,12 ± 0,15	0,29 ± 0,01	–
4	3,91 ± 0,40	5,12 ± 0,15	0,31 ± 0,01	–
5	4,39 ± 0,33	6,70 ± 0,23	0,30 ± 0,01	–
6	5,52 ± 0,12	10,43 ± 0,23	0,31 ± 0,01	4,38 ± 0,04
7	8,10 ± 0,11	12,84 ± 0,19	0,33 ± 0,01	7,05 ± 0,09
8	8,06 ± 0,22	12,60 ± 0,23	0,35 ± 0,01	8,95 ± 0,02
9	7,33 ± 0,17	10,95 ± 0,23	0,36 ± 0,01	9,75 ± 0,07
10	7,00 ± 0,11	5,16 ± 0,11	0,28 ± 0,01	10,43 ± 0,09
11	6,54 ± 0,11	4,67 ± 0,04	0,18 ± 0,01	7,58 ± 0,15
12	5,25 ± 0,02	4,52 ± 0,08	0,15 ± 0,01	1,41 ± 0,09

\* Мг/(г·мин).

Из данных табл. 2 видно, что максимальная активность  $\alpha$ -амилазы и мальтазы обнаружена при рН 7–8, для щелочной фосфатазы 8–9 и для казеинлитических протеиназ – при рН 10. Данные оптимумы соответствуют таковым для рыб Волжского бассейна [3, 4] и представителей сем. *Acipenseridae* [11].

### Заключение

Еще в XIX в. при исследовании некоторых ферментов рыб были получены данные, свидетельствующие об их способности функционировать при значениях температуры близких к 0 °С, когда ферменты теплокровных животных практически утрачивают активность [2]. Ранее при исследовании температурных адаптаций осетровых видов рыб нами [3] было установлено, что пищеварительные гидролазы белуги, стерляди, севрюги и ленского осетра сохраняют от 13 до 27 % своей активности при температуре 0 °С. Полученные нами данные свидетельствуют об идентичности ответной реакции ферментов слизистой оболочки кишечника русского осетра на изменение температуры инкубации ответной реакции таковых других представителей сем. *Acipenseridae*.

Таким образом, в ходе исследований подтверждено, что адаптационные перестройки пищеварительной системы пойкилотермных организмов (проведенные на основе анализа уровня активности пищеварительных гидролаз) 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 / А. М. Уголев // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1972. Т. 8, № 3. С. 269–278.
2. Уголев А. М. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб / А. М. Уголев, В. В. Кузьмина. СПб.: Гидрометеиздат, 1993. 283 с.
3. Невалённый А. Н. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб / А. Н. Невалённый, А. В. Туктаров, Д. А. Бедняков. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2003. 152 с.
4. Невалённый А. Н. Исследование некоторых характеристик ферментов, обеспечивающих процесс мембранного пищеварения у веслоноса *Polyodon spathula* / А. Н. Невалённый, Д. А. Бедняков, В. Ю. Новинский // Вопросы ихтиологии. 2010. Т. 50, № 3. С. 400–404.
5. Бедняков Д. А. Комплексное исследование особенностей мембранного пищеварения у севрюги / Д. А. Бедняков, В. Ю. Новинский, Л. А. Невалённая // 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 / Д. А. Бедняков // Юг России. Экология, развитие. 2010. № 4. С. 49–52.
7. Невалённый А. Н. Энзимология / А. Н. Невалённый, Д. А. Бедняков, И. С. Дзержинская. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2005. 102 с.
8. Глинский В. В. Статистический анализ: Руководство по обучению / В. В. Глинский, В. Г. Ионин. М.: ИНФРА-М; Новосибирск: Сибирское соглашение, 2002. 241 с.
9. Уголев А. М. Адаптация пищеварительной системы / А. М. Уголев, Н. М. Тимофеева, А. А. Груздков // Физиология адаптационных процессов. М.: Наука, 1986. С. 371–481.
10. Невалённый А. Н. Влияние температуры инкубации на уровень активности пищеварительных ферментов кеты (*Oncorhynchus keta*) / А. Н. Невалённый, О. Е. Левченко, С. Г. Коростелёв // Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер.: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2005. № 2 (12). С. 89–91.
11. Бедняков Д. А. Влияние температуры и pH на уровень активности пищеварительных ферментов ленского осетра (*Acipenser baerii*) / Д. А. Бедняков, Д. А. Бедняков // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер.: Рыбное хозяйство. 2013. № 1. С. 124–127.
12. Кузьмина В. В. Влияние температуры на активности  $\alpha$ -амилазы у пресноводных костистых рыб / В. В. Кузьмина, Е. Н. Морозова // Вопросы 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 the processes of food assimilation in the animal world]. *Zhurnal evoliutsionnoi biokhimi 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 regulatsiia protsessov pishchevarenii u ryb* [Functional organization and adaptive regulation of the processes of digestion of fish]. Astrakhan, 2003. 152 p.
4. Nevalennyi A. N., Bedniakov D. A., Novinskii V. Iu. Issledovanie nekotorykh kharakteristik fermentov, obespechivaiushchikh protsess membrannogo pishchevarenii u veslonosa *Polyodon spathula* [Study of some characteristics of enzymes, providing the process of membrane digestion of *Polyodon spathula*]. *Voprosy ikhtiologii*, 2010, vol. 50, no. 3, pp. 400–404.
5. Bedniakov D. A., Novinskii V. Iu., Nevalennaia L. A. Kompleksnoe issledovanie osobennostei membrannogo pishchevarenii u sevriugi [Complex study of the characteristics of membrane digestion of sterlet]. *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 lenskogo osetrov i ikh gibrida [Temperature adaptations of enzymes of mucous membrane of intestine of Russian and Lensky sturgeon and their hybrid]. *Iug Rossii. Ekologiya, razvitie*, 2010, no. 4, pp. 49–52.
7. Nevalennyi A. N., Bedniakov D. A., Dzerzhinskaia I. S. *Enzimologiya* [Enzymology]. Astrakhan, 2005. 102 p.
8. Glinskii V. V., Ionin V. G. *Statisticheskii analiz: Rukovodstvo po obucheniiu*. Moscow, INFRA-M, Novosibirsk: Sibirskoe soglashenie Publ., 2002. 241 p.
9. Ugolev A. M., Timofeeva N. M., Gruzdkov A. A. *Adaptatsiia pishchevaritel'noi sistemy* [Adaptation of the digestive system]. *Fiziologiya adaptatsionnykh protsessov*. Moscow, Nauka Publ., 1986, pp. 371–481.
10. Nevalennyi A. N., Levchenko O. E., Korostelev S. G. Vliianie temperatury inkubatsii na uroven' aktivnosti pishchevaritel'nykh fermentov kety (*Oncorhynchus keta*) [Influence of the incubation temperature on

the level of the activity of digestive enzymes of salmon (*Oncorhynchus keta*). *Vestnik Rossiiskogo universiteta družby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznediel'nosti*, 2005, no. 2 (12), pp. 89–91.

11. Bedniakov D. A., Nevalennyi A. N. Vliianie temperatury i pH na uroven' aktivnosti pishchevaritel'nykh fermentov lenskogo osetra (*Acipenser baerii*) [Influence of the temperature and pH on the level of the activity of the digestive enzymes of Lensky sturgeon]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2013, no. 1, pp. 124–127.

12. Kuz'mina V. V., Morozova E. N. Vliianie temperatury na aktivnosti  $\alpha$ -amilazy u presnovodnykh kostistykh ryb [Influence of the temperature on the activity of  $\alpha$ -amylase of freshwater bony fishes]. *Voprosy ikhtiologii*, 1977, vol. 17, no. 5, pp. 922–929.

Статья поступила в редакцию 3.07.2013

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Бедняков Дмитрий Андреевич** – Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук, доцент; зав. лабораторией «Физиология питания рыб»; [bednyakovd@rambler.ru](mailto:bednyakovd@rambler.ru).

**Bednyakov Dmitriy Andreevich** – Astrakhan State Technical University; Candidate of Biological Sciences; Head of the laboratory "Physiology of Fish Nutrition"; [bednyakovd@rambler.ru](mailto:bednyakovd@rambler.ru).

**Невалённый Александр Николаевич** – Астраханский государственный технический университет; д-р биол. наук, профессор; профессор кафедры «Гидробиология и общая экология»; [nevalennyu@rambler.ru](mailto:nevalennyu@rambler.ru).

**Nevalennyu Alexander Nickolaevich** – Astrakhan State Technical University; Doctor of Biological Sciences, Professor; Professor of the Department "Hydrobiology and General Ecology"; [nevalennyu@rambler.ru](mailto:nevalennyu@rambler.ru).