

УДК 597.5.591.132.577.15

ВЛИЯНИЕ pH НА ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫМИ ГИДРОЛАЗАМИ РЫБ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ХАРАКТЕРУ ПИТАНИЯ

© 2019 г. В. В. Кузьмина¹, *, Г. В. Золотарева²

¹Институт биологии внутренних вод РАН – ИБВВ, пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская область, Россия

²Приднестровский государственный университет – ПГУ, Тирасполь, Республика Молдова

*E-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru

Поступила в редакцию 22.05.2018 г.

После доработки 26.06.2018 г.

Принята в печать 26.07.2018 г.

Исследовано влияние pH на активность пептидаз и гликозидаз, функционирующих в кишечнике, а также обеспеченность этими ферментами пяти видов рыб Рыбинского водохранилища с разным типом питания (плотва *Rutilus rutilus*, лещ *Abramis brama*, окунь *Perca fluviatilis*, судак *Zander lucio-perca* и щука *Esox lucius*). У всех видов рыб максимальная активность казеинлитических пептидаз кишечника и обеспеченность ими особей наблюдается при pH 9, гликозидаз – от 7 до 8. Значения pH, соответствующие максимальным значениям активности гликозидаз, близки рекомендуемым для оценки активности ферментов в пищеварительном тракте позвоночных, пептидаз – значительно выше. Предполагается, что различия в характере влияния pH на обеспеченность пептидазами и гликозидазами связаны с особенностями спектра питания исследованных видов рыб.

Ключевые слова: бентофаги, ихтиофаги, pH, кишечник, пептидазы, гликозидазы, обеспеченность ферментами.

DOI: 10.1134/S0042875219030123

О состоянии пищеварительной системы обычно судят по активности ферментов, способных гидролизовать те или иные пищевые субстраты. При этом уровень ферментативной активности зависит от целого ряда природных и антропогенных факторов (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2008). Хорошо известно о влиянии циркадианных и особенно сезонных ритмов на активность пищеварительных гидролаз, в значительной степени совпадающих с интенсивностью питания рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina, 2017). Показано, что с увеличением возраста и массы рыб уровень относительной активности ферментов, рассчитанный на единицу массы тела, как правило, снижается (Строганов, Бузинова, 1970; Kuz'mina, 1996). Поскольку для оптимального функционирования ферментов, обеспечивающих гидролиз различных компонентов пищи в кишечнике рыб необходима соответствующая среда, важно оценивать влияние ряда факторов на их активность. Одними из наиболее важных параметров среды, влияющих на активность ферментов, являются температура и pH.

Сведения о влиянии температуры и pH на активность пищеварительных ферментов у рыб разных видов обобщены в ряде обзоров. Установлено, что с повышением температуры до определённого

предела, при котором происходит денатурация белка, активность ферментов всегда увеличивается (Уголев, Кузьмина, 1993; Gelman et al., 2008; Kuz'mina, 2017), тогда как оптимум pH одноимённых пищеварительных гидролаз у рыб разных видов может различаться. Также различаются оптимумы pH ферментов разных цепей. Так, оптимумы pH трипсина и химотрипсина у большинства видов рыб находятся в диапазоне 8–10 (Murakami, Noda, 1981; Хаблюк, 1984; Torrisen, 1984; Hidalgo et al., 1999; Castillo-Yáñez et al., 2005; Kumar et al., 2007; Kishimura et al., 2008; Kuz'mina et al., 2017). Оптимум pH разных гликозидаз находится в зоне нейтральных значений (Уголев, Кузьмина, 1993), иногда – нейтральных и щелочных (Соловьев и др., 2015). При этом оптимум pH ферментов может варьировать в зависимости от используемого субстрата. Так, у японского анчоуса *Engraulis japonica* оптимум pH химотрипсина при использовании в качестве субстрата казеина равен 9, N-бензоил-L-аргинин-p-нитроанилида (BAPNA) – 8 (Heu et al., 1995). Кроме того, оптимум pH зависит от температуры: при повышении температуры от 20 до 30 и 50°C оптимум pH пептидаз кишечника тюрябы *Scophthalmus maximus* снижается с 11 до соответственно 10 и 8 (Munilla-Morán, Saborido-Rey, 1996). Есть данные о том, что оптимум pH пепти-

даз меняется с возрастом рыб: оптимум pH трипсиноподобной пептидазы сеголеток фугу *Fugu obscurus* соответствует 9.0, двухлеток — 8.5 (Yin et al., 2000).

При этом величины pH в кишечнике рыб разных видов также значительно варьируют. Так, у дорады *Sparus aurata* значения pH в кишечнике изменяются в пределах 6.5–7.9 (Deguara et al., 2003), у налима *Lota lota* — 7.2–7.5 (Izvekova et al., 2013), у сига *Coregonus nasus* — 7.1–9.6 (Sabapathy, Тео, 1994). В среднем отделе кишечника карпа *Cyprinus carpio* pH чистого сока, собранного из фистулы, соответствует 7.5, pH слизи — 7.5–8.5 (Краюхин, 1963). В его проксимальном отделе значения pH могут быть ниже 7 (Barrington, 1957; Кузьмина, Неваленный, 1983; Соловьев и др., 2015; Solovyev et al., 2018). Однако при изучении pH кишечника 20 видов пресноводных рыб различия между разными участками кишки были выявлены лишь у шести видов (*Coregonus lavaretus*, *C. migratorius*, *Catostomus catostomus*, *Carassius gibelio*, *Rutilus rutilus*, *Leuciscus leuciscus*). На величину pH в кишечнике влияет сезон, спектр питания и степень наполнения пищеварительного тракта (Краюхин, 1963; Соловьев и др., 2016; Solovyev et al., 2018), причём значительное влияние на эту величину оказывает pH не только сока поджелудочной железы, но и желчи. Так, при питании карпа рапсовым жмыхом pH желчи выше, чем при питании трубочником, — 7.4 против 6.8 (Краюхин, 1963). У ряда видов рыб весной и осенью значения pH в кишечнике выше, чем летом (Solovyev et al., 2018).

Вместе с тем активность разных ферментов в кишечнике позвоночных традиционно определяют в диапазоне pH 7.0–7.5 (Уголев, Иезуитова, 1969). Несовпадение значений pH в кишечнике рыб, величин оптимумов pH пептидаз и значений pH, используемых в опытах *in vitro*, не может не отразиться на результатах оценки обеспеченности рыб ферментами, гидролизующими белковые компоненты пищи. Вопрос об обеспеченности рыб теми или иными ферментами был поставлен ранее (Строганов, Бузинова, 1970). При этом авторы учитывали, а затем суммировали активность одних и тех же гидролаз в разных участках пищеварительного тракта и гепатопанкреаса рыб. Близкий этому подход был использован при оценке вклада ферментов объектов питания в процессы пищеварения рыб (Dabrowski, Glogowski, 1977). Однако включение гепатопанкреаса в оценку суммарной активности гидролаз представляется не вполне корректным, поскольку синтезирующиеся в нём ферменты не участвуют в процессах пищеварения. Кроме того, неизвестна скорость поступления ферментов из поджелудочной железы в кишечник рыб. При этом принципиальное значение имеет суммарная оценка активности ферментов слизистой оболочки и химуса, поскольку в составе химуса

функционируют не только ферменты, синтезируемые поджелудочной железой и энтероцитами, но и ферменты объектов питания рыб (Dabrowski, Glogowski, 1977; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2017). Для оценки обеспеченности рыб пищеварительными ферментами идеальным объектом являются безжелудочные рыбы. В этом случае достаточно рассчитать суммарную активность ферментов, функционирующих в химусе и слизистой оболочке всего кишечника, и сопоставить её с массой тела рыб. В случае желудочных рыб может учитываться лишь обеспеченность ферментами, реализующими пищеварение в кишечнике. Сведения о влиянии pH на обеспеченность рыб пищеварительными гидролазами в литературе отсутствуют.

Цель работы — изучить влияние pH на обеспеченность рыб пищеварительными ферментами в диапазоне значений pH, фиксирующихся в кишечнике, на базе данных о суммарной активности пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки и химуса во всём кишечнике.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования служили половозрелые особи пяти видов рыб, отловленные летом в Волжском плёсе Рыбинского водохранилища: лещ *Abramis brama*, плотва *Rutilus rutilus*, окунь *Perca fluviatilis*, судак *Sander lucioperca* и щука *Esox lucius*. Рыб в течение 1.0–1.5 ч доставляли в лабораторию. После максимально быстрого проведения морфометрического анализа вскрывали брюшную полость рыб, изымали кишечник, помещали его на стекло ледяной бани, освобождали от жира, осушали фильтровальной бумагой и разрезали вдоль. Индивидуально исследовали сытых и голодных рыб каждого вида без учёта пола. Рыб, кишечники которых содержали химус, считали сытыми; рыб, кишечники которых не содержали химус, — голодными.

В качестве ферментативно активных препаратов использовали химус и слизистую оболочку всего кишечника. Химус аккуратно собирали при помощи специального скребка и небольшого стеклянного шпателя (5 мм). Затем специальным пластмассовым скребком снимали слизистую оболочку кишечника. Пробы химуса и слизистой оболочки взвешивали отдельно, тщательно перемешивали и отбирали аликвоту (около 1 г), которую гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с небольшим количеством раствора Рингера (1–2 мл) для холоднокровных животных (103 ммоль/л NaCl, 1.9 ммоль/л KCl, 0.45 ммоль/л CaCl₂, 1.4 ммоль/л MgSO₄, pH 7.0) при температуре 0–4°C. Гомогенаты разводили тем же раствором Рингера в соотношении 1 : 9, затем в случае гликозидаз дополнительно разводили в два или три

раза, в случае пептидаз — в 10 раз. После этого гомогенаты доводили до соответствующего уровня pH (от 6 до 9 с интервалом 1) при помощи pH-метра рХ-150МИ.

Активность пептидаз (ПА — суммарная активность трипсина, НФ 3.4.21.4, химотрипсина, ЕС 3.4.21.1 и дипептидаз НФ 3.4.13.1-ЕС 3.4.13.11) оценивали по приросту тирозина с использованием реактива Фолина—Чиокалтеу (Anson, 1938). Амилолитическую активность (АА — суммарная активность α -амилазы НФ 3.2.1.1, γ -амилазы, НФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз НФ 3.2.1.20) оценивали по приросту гексоз согласно модифицированному методу Нельсона (Уголев, Иезиутова, 1969). В качестве субстрата использовали 1%-ные растворы казеина и растворимого крахмала, приготовленные на растворе Рингера, pH 6–9. Гомогенаты и субстрат инкубировали при 20°C в течение 30 мин. Интенсивность окраски оценивали при помощи фотоколориметра КФК-2 (длина волны 670 нм). Активность ферментов в каждой точке определяли в пяти повторностях с учётом фона (для пептидаз исходное количество тирозина, для гликозидаз — гексоз). После определения ПА и АА во всём кишечнике (мкмоль/мин) для сопоставления данных, полученных при исследовании рыб как разного размера, так и разных видов, вычисляли показатели обеспеченности рыб соответствующими ферментами в расчёте на 1 кг массы рыб (мкмоль/(мин кг массы тела)) — относительную протеолитическую и амилолитическую активность (ОПА и ОАА).

Принципиальным отличием применяемого нами метода от предложенного ранее является изучение активности ферментов только в пищеварительном тракте, а также усреднение результатов не на уровне активности отдельных участков кишечника, а на уровне проб химуса и слизистой оболочки всего кишечника. При наличии гомогенизатора с большим объёмом стаканчика можно одновременно гомогенизировать слизистую и химус (т.е. получать единый (суммарный) гомогенат слизистой оболочки и химуса всего кишечника, а не отдельные пробы химуса и слизистой), что ускоряет обработку проб и уменьшает число операций, связанных с расчётом ферментативной активности.

Результаты обработаны статистически при помощи стандартного пакета программ (Microsoft Office XP 2010, приложение Excel, STATISTICA 10). Достоверность различий оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA-тест, по F -критерию) при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сытые рыбы. У бентофагов плотвы и леща активность пептидаз во всём кишечнике при стандартном значении pH, равном 7, близка, гликозидаз — различна (табл. 1). При этом у леща активность гликозидаз в 1.8 раза ниже, чем у плотвы. Наибольшая активность пептидаз у обоих видов рыб наблюдается при pH 9, гликозидаз у плотвы — при pH 7, у леща — 8. Сопоставление активности ферментов при увеличении значений pH от 6 до 9 свидетельствует о последовательном увеличении активности пептидаз у плотвы и леща соответственно в 2.0 и 1.9 раза. Активность гликозидаз в этом диапазоне pH у плотвы снижается в 1.3 раза, у леща при pH 6 и 9 близка, но ниже, чем при pH 8 в 1.2 раза.

Величина коэффициента ОАА/ОПА последовательно снижается по мере увеличения pH с 6 до 9 у плотвы и леща соответственно в 2.7 и 2.0 раза. Особого внимания заслуживает тот факт, что обеспеченность ферментами обеих цепей у плотвы во всём исследованном диапазоне pH значительно выше, чем у леща.

У ихтиофага щуки по сравнению с судаком активность пептидаз во всём кишечнике при стандартном значении pH 7 выше в 19.5 раза, гликозидаз — ниже в 1.9 раза (табл. 1). Наибольшая активность пептидаз у судака, как и у бентофагов, наблюдается при pH 9, у щуки фактически не изменяется, гликозидаз — у обоих видов при pH 7. При увеличении pH от 6 до 9 активность пептидаз у судака последовательно увеличивается в два раза, у щуки — незначительно повышается (в 1.1 раза) и относительно стабильна в зоне 7–9. Активность гликозидаз при pH 6 и 9 у судака ниже, чем при pH 7 соответственно в 1.6 и 1.5 раза, у щуки — в 1.3 и 2.6 раза.

У ихтиофага щуки по сравнению с судаком активность пептидаз во всём кишечнике при стандартном значении pH 7 выше в 19.5 раза, гликозидаз — ниже в 1.9 раза (табл. 1). Наибольшая активность пептидаз у судака, как и у бентофагов, наблюдается при pH 9, у щуки фактически не изменяется, гликозидаз — у обоих видов при pH 7. При увеличении pH от 6 до 9 активность пептидаз у судака последовательно увеличивается в два раза, у щуки — незначительно повышается (в 1.1 раза) и относительно стабильна в зоне 7–9. Активность гликозидаз при pH 6 и 9 у судака ниже, чем при pH 7 соответственно в 1.6 и 1.5 раза, у щуки — в 1.3 и 2.6 раза.

Величина коэффициента ОАА/ОПА у щуки последовательно снижается по мере увеличения pH с 6 до 9 в 2.5 раза. У судака при pH 7 наблюдается подъём показателя по сравнению с таковым при pH 6 в 1.6 раза и последующее снижение в 1.5 раза (при pH 9 по сравнению с максимумом). Важно отметить, что обеспеченность пептидазами у щуки во всём исследованном диапазоне значений pH существенно выше, чем у судака. Различия в уровне обеспеченности гликозидазами у рыб этих видов рыб не столь значительны.

Голодные рыбы. У непитающихся плотвы и леща по сравнению с питающимися рыбами активность пептидаз во всём кишечнике при стандартном значении pH 7 ниже соответственно в 8.1 и 9.2 раза, тогда как гликозидаз — всего в 2.1 и 3.6 раза. У щуки, напротив, в большей степени снижается активность гликозидаз — в 2.1 раза, в то время как пептидаз лишь в 1.2 раза (табл. 2). У всех видов рыб максимальная активность пептидаз отмечена при pH 9, гликозидаз — при pH 7 (исключение — окунь). При увеличении pH от 6 до 9 активность пептидаз у плотвы и леща увеличива-

Таблица 1. Влияние pH на показатели обеспеченности пептидазами и гликозидазами процесса гидролиза белковых и углеводных компонентов корма в кишечнике питающихся рыб

Вид (число рыб, экз.)	Масса		pH	Активность ферментов во всём кишечнике, мкмоль/мин		Относительная активность, мкмоль/(мин кг массы тела)		Коэффициент обеспеченности (ОАА/ОПА)
	рыбы, кг	химуса и слизистой, г		пептидаз	гликозидаз	пептидаз (ОПА)	гликозидаз (ОАА)	
Плотва (5)	0.412 ± 0.020	8.4 ± 1.0	6	5.2 ± 1.2 ^a	88.1 ± 11.9 ^a	12.5 ± 2.7 ^a	213.8 ± 25.1 ^b	17.10
			7	9.7 ± 2.3 ^b	88.7 ± 11.4 ^a	23.4 ± 5.1 ^b	213.9 ± 23.7 ^b	9.10
			8	10.0 ± 2.1 ^b	85.7 ± 11.3 ^a	24.1 ± 4.8 ^b	206.8 ± 23.6 ^b	8.60
			9	10.5 ± 1.6 ^b	66.0 ± 8.9 ^b	25.2 ± 3.4 ^b	160.7 ± 18.9 ^a	6.30
Лещ (5)	1.350 ± 0.050	11.2 ± 2.2	6	7.6 ± 2.4 ^a	43.3 ± 8.9 ^a	5.4 ± 1.6 ^a	31.2 ± 5.5 ^a	5.80
			7	9.2 ± 2.7 ^b	48.9 ± 9.9 ^b	6.6 ± 1.7 ^a	35.3 ± 6.0 ^b	5.30
			8	11.0 ± 3.0 ^{b, c}	50.7 ± 10.7 ^b	7.9 ± 1.9 ^a	36.5 ± 6.6 ^b	4.60
			9	14.6 ± 3.3 ^c	42.4 ± 9.2 ^a	10.5 ± 2.0 ^b	30.6 ± 5.6 ^a	2.90
Судак (5)	1.475 ± 0.980	4.4 ± 3.4	6	2.2 ± 1.98 ^a	2.8 ± 2.3 ^a	1.1 ± 0.7 ^a	1.6 ± 0.5 ^a	1.50
			7	2.8 ± 2.5 ^a	4.4 ± 3.4 ^a	1.4 ± 0.8 ^a	2.6 ± 0.6 ^b	1.90
			8	3.8 ± 3.2 ^a	3.6 ± 2.8 ^a	2.1 ± 0.8 ^b	2.1 ± 0.5 ^b	1.00
			9	4.5 ± 3.7 ^a	3.0 ± 2.3 ^a	2.5 ± 0.9 ^b	1.7 ± 0.4 ^a	0.70
Щука (5)	1.682 ± 0.530	13.4 ± 4.3	6	50.4 ± 15.0 ^a	1.8 ± 0.5 ^b	29.9 ± 9.3	1.1 ± 0.3 ^a	0.05
			7	54.6 ± 20.6 ^a	2.3 ± 0.7 ^b	32.5 ± 7.8 ^a	1.4 ± 0.3 ^a	0.04
			8	53.1 ± 20.8 ^a	2.0 ± 0.7 ^b	31.5 ± 7.6 ^a	1.2 ± 0.3 ^a	0.04
			9	54.7 ± 22.2 ^a	1.5 ± 0.4 ^a	32.5 ± 7.9 ^a	0.9 ± 0.3 ^a	0.02

Примечание. Здесь и в табл. 2: а, b, c – достоверные различия показателей в зависимости от pH для одного вида (в колонках) при уровне значимости $p \leq 0.05$ (ANOVA-тест); ОПА, ОАА – относительная протеолитическая и амилалитическая активность.

ется в большей степени (в 7.3 и 7.0 раза), чем у окуня и щуки (1.9 и 2.3 раза). Активность гликозидаз при pH 9 ниже, чем при pH 7 у тех же видов рыб в 1.4, 1.3, 1.1 и 1.6 раза. Вместе с тем у окуня максимальная активность гликозидаз отмечена при pH 8, причём уровень ферментативной активности выше, чем при pH 9 в 1.4 раза.

Обеспеченность рыб пептидазами при увеличении pH от 6 до 9 у плотвы и леща увеличивается в 7.2 и 6.1 раза, у окуня — в 1.8, у щуки — в 2.3 раза. Обеспеченность рыб гликозидазами снижается в меньшей степени (максимум в 1.4 раза у плотвы и 1.5 раза у щуки). Величина коэффициента ОАА/ОПА также последовательно снижается по мере увеличения pH у всех видов рыб соответственно в 9.4, 6.7, 1.5 и 2.0 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего, следует отметить, что независимо от степени наполнения кишечника обеспеченность гликозидазами у бентофагов всегда выше, чем у ихтиофагов, что хорошо согласуется с данными по активности этих ферментов (Уголев, Кузьмина, 1993; Bakke et al., 2010). Обеспеченность пептидазами у разных видов рыб варьирует в широких пределах, причём у щуки этот показатель значительно выше, чем у других видов. Особо следует отметить неожиданно низкую ферментативную активность и обеспеченность пептидазами судака. Эти данные выглядят парадоксально, поскольку кормовые коэффициенты у судака почти в два раза ниже, чем у щуки — 5.1 против 9.7 (Иванова, 1968). Однако, поскольку переваривание белков начинается в желудке, можно предположить большую активность пепсина или более низкие значения pH в этом органе у судака, чем у щуки. У разных видов рыб оптимальные значения pH пепсина составляют от 2 до 4 (Munilla-Morán, Saborido-Rey, 1996; Castillo-Yáñez et al., 2004; Concha-Frias et al., 2016). При этом значения pH желудочного сока (содержимого желудка) могут варьировать от 1.6–2.0 до щелочных значений (Кузьмина, 1968; Fange, Grove, 1979). У судака из оз. Чаны pH протеаз в пустом желудке равно 6.47, в полном — 4.2, у щуки из оз. Байкал — соответственно 6.58 и 4.65 (Solovyev et al., 2018). Поскольку эти различия незначительны, скорее всего, существенно более низкая активность ферментов у судака связана с меньшей наполненностью пищеварительного тракта.

Ранее более высокая обеспеченность гликозидазами по сравнению с пептидазами была отмечена у белого амура *Stenopharyngodon idella* (Строганов, Бузинова, 1970). Несмотря на то что авторы обозначили исследуемые ферменты как амилаза и трипсин, судя по используемым полуколичественным методам, они определяли активность тех же ферментов в неочищенных препаратах

слизистой и химуса, что и в нашей работе. При этом в нашей работе обеспеченность гликозидазами у плотвы почти на порядок выше, у леща близка, у ихтиофагов почти в два раза ниже таковой у двух- и трёхлеток растительноядного амура. Обеспеченность пептидазами у всех видов, кроме судака, выше, чем у амура. У непитавшихся рыб эти различия в большинстве случаев ниже.

Важно отметить, что коэффициент обеспеченности (ОАА/ОПА), численно равный отношению активности гликозидаз к активности пептидаз (Г/П), у исследованных видов рыб также различен. В этом отношении особенно интересны безжелудочные бентофаги. Так, у плотвы при стандартных условиях (pH 7) величина ОАА/ОПА значительно выше, чем у леща (9.1 против 5.3). Значения ОАА/ОПА у рыб, различающихся по спектру питания, близки полученным ранее величинам коэффициента Г/П (по старой терминологии — К/П, или карбогидразы/протеазы) (Уголев, Кузьмина, 1993; Solovyev et al., 2014). Действительно, в пище леща Рыбинского водохранилища преобладают олигохеты (*Oligochaeta*) и личинки хирономид (*Chironomidae*), иногда встречаются моллюски (*Viviparus* sp. и *Valvata* sp.) и в значительно меньшей степени другие гидробионты. Плотва, помимо личинок хирономид, потребляет личинок и куколок ручейников (*Trichoptera*), зоопланктон, растительность и моллюсков, главным образом *Dreissena polymorpha*. При этом у рыб младших возрастных групп в пищевом комке значительную долю составляет растительность, у рыб старших возрастных групп — *D. polymorpha* (Поддубный, 1971; Рыбы ..., 2015).

Учитывая то обстоятельство, что мы исследовали крупных особей плотвы, у которых доля белковых компонентов в пище выше доли углеводных компонентов, можно было ожидать меньших различий величин коэффициента ОАА/ОПА у плотвы и леща. Почти двукратное превышение величины коэффициента ОАА/ОПА у первого вида может быть обусловлено значительной долей растительности в питании рыб младших возрастных групп, а также доминированием растительности в питании плотвы в период, предшествующий заселению водоёма дрейссеной (Рыбы ..., 2015), что не могло не повлиять на формирование ферментативного спектра у рыб этого вида.

Особого внимания заслуживает зависимость величины коэффициента ОАА/ОПА от pH, которая при увеличении pH от 6 до 9 снижается у плотвы в 2.7 раза, у леща в 2.0 раза в случае сытых рыб, а у голодных рыб соответственно в 9.4 и 6.7 раза. Большее снижение коэффициента ОАА/ОПА у голодных рыб, чем у сытых, может быть обусловлено большим увеличением обеспеченности пептидазами по мере роста pH у последних. Так, у сытых особей плотвы и леща обеспеченность пептидазами с

Таблица 2. Влияние pH на показатели обеспеченности пептидазами и гликозидазами процесса гидролиза белковых и углеводных компонентов корма в кишечнике непитавшихся рыб

Вид (число рыб, экз.)	Масса		pH	Активность ферментов во всём кишечнике, мкмоль/мин		Относительная активность, мкмоль/(мин кг массы тела)		Коэффициент обеспеченности рыб (ОАА/ОПА)
	рыбы, кг	слизистой, г		пептидаз	гликозидаз	пептидаз (ОПА)	гликозидаз (ОАА)	
Плотва (5)	0.321 ± 0.020	4.40 ± 0.7	6	0.6 ± 0.1 ^a	42.1 ± 6.7 ^b	1.9 ± 0.3 ^a	130.9 ± 20.8 ^b	68.90
			7	1.2 ± 0.2 ^b	44.8 ± 7.1 ^b	3.7 ± 0.6 ^b	139.5 ± 22.2 ^b	37.70
			8	1.9 ± 0.3 ^c	42.2 ± 6.7 ^b	6.0 ± 0.9 ^c	131.5 ± 20.8 ^b	21.80
			9	4.4 ± 0.7 ^d	32.0 ± 5.1 ^a	13.7 ± 2.2 ^d	99.7 ± 15.8 ^a	7.30
Лещ (5)	0.770 ± 0.170	3.30 ± 0.8	6	0.5 ± 0.1 ^a	11.6 ± 2.8 ^a	0.8 ± 0.3 ^a	16.7 ± 7.3 ^a	20.90
			7	1.0 ± 0.3 ^b	13.5 ± 3.3 ^b	1.5 ± 0.7 ^b	19.4 ± 8.5 ^a	12.90
			8	1.7 ± 0.4 ^b	13.1 ± 3.2 ^b	2.4 ± 1.04 ^b	18.8 ± 8.3 ^a	7.80
			9	3.5 ± 0.8 ^c	10.6 ± 2.6 ^a	4.9 ± 2.2 ^c	15.2 ± 6.7 ^a	3.10
Окунь (5)	0.378 ± 0.040	2.3 ± 0.97	6	2.2 ± 0.9 ^a	6.4 ± 2.7 ^a	5.5 ± 1.8 ^a	16.1 ± 4.9 ^a	2.90
			7	3.0 ± 1.4 ^a	8.4 ± 3.6 ^a	7.4 ± 2.6 ^a	21.1 ± 6.5 ^a	2.90
			8	3.7 ± 1.7 ^{a, b}	10.4 ± 4.4 ^a	9.2 ± 3.1 ^{a, b}	25.9 ± 7.9 ^b	2.80
			9	4.1 ± 1.8 ^b	7.6 ± 3.2 ^a	10.1 ± 3.3 ^b	18.9 ± 5.8 ^a	1.90
Щука (3)	1.760 ± 0.880	7.8 ± 5.50	6	23.8 ± 16.6 ^a	0.4 ± 0.1 ^a	13.5 ± 2.7 ^a	0.2 ± 0.1 ^a	0.02
			7	45.9 ± 27.8 ^b	1.1 ± 0.6 ^b	26.1 ± 4.5 ^b	0.6 ± 0.1 ^a	0.02
			8	48.8 ± 29.6 ^b	0.9 ± 0.5 ^b	27.8 ± 4.8 ^b	0.5 ± 0.1 ^a	0.02
			9	53.8 ± 32.6 ^b	0.7 ± 0.4 ^b	30.6 ± 5.3 ^b	0.4 ± 0.1 ^a	0.01

увеличением pH увеличивается соответственно в 2.0 и 1.9 раза, у голодных — в 7.2 и 6.1 раза. Столь значительные различия во влиянии pH на исследованные показатели, по всей вероятности, обусловлены разным спектром пептидаз в слизистой оболочке и химусе, поскольку в последнем, помимо ферментов, синтезируемых пищеварительной системой рыб, присутствуют различные пептидазы их объектов питания. У сытых рыб на обеспеченность ферментами могут влиять как ферменты пищеварительной системы жертвы, так и ферменты других тканей. В частности, несмотря на то что катепсины, как правило, проявляют активность в зоне pH 2.0–6.5 (Немова, 1978; Ashie, Simpson, 1997; Лысенко и др., 2011), в ряде случаев некоторые из них сохраняют активность и при более высоких значениях pH. Так, для катепсинов С хека *Merluccius productus* и тихоокеанской трески *Gadus macrocephalus* характерно два оптимума pH, в кислой и щелочной среде (Ashie, Simpson, 1997).

Также следует отметить, что большая обеспеченность исследованными ферментами наблюдалась при значениях, близких оптимумам pH пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки и химуса. При этом обеспеченность ферментами у рыб разных видов при соседних значениях pH не всегда достоверно различается, что связано как с размерно-возрастными различиями, так и с разной степенью наполнения кишечника рыб. Данные, касающиеся пептидаз, в значительной степени близки результатам исследования влияния pH на активность щелочных протеиназ у ряда видов рыб из оз. Чаны, когда в зоне pH 7–9 различия в активности не всегда достоверны, а у сазана *Cyprinus carpio* уровень ферментативной активности практически одинаков (Соловьев и др., 2015). Также следует обратить внимание на то, что у голодных рыб по сравнению с сытыми влияние pH на обеспеченность пептидазами выражено в большей степени. Это свидетельствует о том, что ферменты слизистой оболочки в большей степени подвержены влиянию pH, чем ферменты, функционирующие в составе химуса.

Результаты исследования показали, что pH значительно влияет на обеспеченность рыб пептидазами и гликозидазами, а показатель обеспеченности ферментами цепи пептидаз и гликозидаз и коэффициент ОАА/ОПА в большей степени отражают состояние пищеварительной системы, чем активность соответствующих гидролаз, что необходимо учитывать при оценке условий питания рыб в естественных экосистемах, а также при создании кормов с оптимальными для наращивания массы рыб значениям pH.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012690102-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Иванова М.Н. 1968. Пищевые рационы и кормовые коэффициенты хищных рыб в Рыбинском водохранилище // Биология и трофические связи пресноводных беспозвоночных и рыб / Под ред. Кузина Б.С., Штегмана Б.К. Л.: Наука. С. 180–198.
- Краюхин Б.В. 1963. Физиология пищеварения пресноводных костистых рыб. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 129 с.
- Кузьмина В.В. 1968. Влияние пищеварения на реакцию pH желудочного сока налима (*Lota lota* L.) // Вопр. ихтиологии. Т. 8. Вып. 3(50). С. 570–576.
- Кузьмина В.В. 2008. Физиология питания рыб. Влияние внешних и внутренних факторов. Борок: Изд-во ИБВВ РАН, 276 с.
- Кузьмина В.В., Неваленный А.Н. 1983. Влияние концентрации водородных ионов на активность карбогидраз пищеварительного тракта рыб // Вопр. ихтиологии. Т. 23. Вып. 3. С. 481–490.
- Лысенко Л.А., Немова Н.Н., Канцерова Н.П. 2011. Протеолитическая регуляция биологических процессов. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 482 с.
- Немова Н.Н. 1978. Катепсины животных тканей // Экологическая биохимия животных. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН. С. 76–88.
- Поддубный А.Г. 1971. Экологическая топография популяций рыб в водохранилищах. Л.: Наука, 312 с.
- Рыбы Рыбинского водохранилища: популяционная динамика и экология. 2015 / Под ред. Герасимова Ю.В. Ярославль: Филигрань, 418 с.
- Соловьев М.М., Кашинская Е.Н., Извекова Г.И., Глухов В.В. 2015. Значения pH и активность пищеварительных ферментов в желудочно-кишечном тракте рыб озера Чаны (Западная Сибирь) // Вопр. ихтиологии. Т. 55. № 2. С. 207–214.
- Соловьев М.М., Кашинская Е.Н., Русинек О.Т., Извекова Г.И. 2016. Физиологические значения pH в пищеварительном тракте обыкновенного окуня *Perca fluviatilis* из разных мест обитания // Там же. Т. 56. № 2. С. 231–237.
- Строганов Н.С., Бузинова И.С. 1970. Сезонные и возрастные изменения обеспеченности амура и толстолобика пищеварительными ферментами // Вестн. МГУ. № 5. С. 11–15.
- Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. 1969. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата человека / Под ред. Уголева А.М. Л.: Наука. С. 192–196.
- Уголев А.М., Кузьмина В.В. 1993. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеоздат, 238 с.
- Хаблюк В.В. 1984. Очистка и свойства пищеварительных ферментов из гепатопанкреаса карпа: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Краснодар: ПТИ, 20 с.

- Anson M. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Phys. V. 22. P. 79–83.
- Ashie I.N.A., Simpson B.K. 1997. Proteolysis in food myo-system – a review // J. Food Biochem. V. 21. P. 91–123.
- Bakke A.M., Glover Ch., Krogh A. 2010. Feeding, digestion and absorption of nutrients // Fish physiology. V. 30. The multifunctional gut of fish / Eds. Grosell M. et al. Amsterdam; Boston: Acad. Press. P. 57–110. doi 10.1016/S1546-5098(10)03002-5
- Barrington E.J.W. 1957. The alimentary canal and digestion // The physiology of fishes. V. 1. N.Y.; London: Acad. Press. P. 109–161.
- Castillo-Yáñez F.J., Pacheco-Aguilar R., García-Carreño F.L., Navarrete-Del Toro M. 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera // Food Chem. V. 85. P. 343–350.
- Castillo-Yáñez F.J., Pacheco-Aguilar R., García-Carreño F.L., Navarrete-Del Toro M.A. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) // Comp. Biochem. Physiol. V. 140B. P. 91–98.
- Concha-Frias B.B., Alvarez-González C.A., Gaxiola-Cortes M.G. et al. 2016. Partial characterization of digestive proteases in the common snook *Centropomus undecimalis* // Int. J. Biol. V. 8. № 4. doi 10.5539/ijb.v8n4p1
- Dabrowski K., Glogowski J. 1977. The role of exogenic proteolytic enzymes in digestion processes in fish // Hydrobiologia (Hagua). V. 54. P. 129–134.
- Deguara S., Jauncey K., Agius C. 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream // J. Fish Biol. V. 62. P. 1033–1043.
- Fänge R., Grove D. 1979. Digestion // Fish physiology. V. 8 / Eds. Hoar W.S. et al. N.Y.; San Francisco; London: Acad. Press. P. 162–260.
- Gelman A.G., Kuz'mina V.V., Drabkin V., Glatman M. 2008. Temperature adaptations of fish digestive enzymes // Feeding and digestive functions in fishes / Eds. Cyrino J.E.P. et al. Enfield, N.H.: Sci. Publ. P. 155–226.
- Heu M.S., Kim H.R., Pyeun J.H. 1995. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica* // Comp. Biochem. Physiol. V. 112B. P. 557–567.
- Hidalgo M.C., Uera E., Sanz A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities // Aquaculture. V. 170. № 3–4. P. 267–283.
- Izvekova G.I., Solovyev M.M., Kashinskaya E.N., Izvekov E.I. 2013. Variations in the activity of digestive enzymes along the intestine of the burbot *Lota lota* expressed by different methods // Fish Physiol. Biochem. V. 39. № 5. P. 1181–1193.
- Kishimura H., Klomklao S., Benjakul S., Chun B.-S. 2008. Characteristics of trypsin from the pyloric caeca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) // Food Chem. V. 106. P. 194–199.
- Kumar S., Garcia-Carreno F.L., Chakrabarti R. et al. 2007. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency // Aquacult. Nutrit. V. 13. P. 381–388.
- Kuz'mina V.V. 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts // Aquaculture. V. 148. P. 25–37.
- Kuz'mina V. 2017. Digestion in fish. A new view. Balti: Lambert Acad. Publ., 310 p.
- Kuz'mina V.V., Zolotareva G.V., Sheptitskiy V.A. 2017. Proteolytic activity in some freshwater animals and associated microbiota in a wide pH range // Fish Physiol. Biochem. V. 43. № 2. P. 373–383. doi 10.1007/s10695-016-0293-4
- Munilla-Morán R., Sabarido-Rey F. 1996. Digestive enzymes in marine species. 1. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus auratus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) // Comp. Biochem. Physiol. V. 113B. № 2. P. 395–402.
- Murakami K., Noda M. 1981. Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. I. Purification and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca // Biochim. Biophys. Acta. V. 658. P. 17–26.
- Sabapathy U., Teo L.H. 1994. Some kinetic properties of amylase from the intestine of the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* (Park) // Comp. Biochem. Physiol. V. 109B. P. 139–144.
- Solovyev M.M., Kashinskaya E.N., Izvekova G.I. et al. 2014. Feeding habits and ontogenic changes in digestive enzyme patterns in five freshwater teleosts // J. Fish Biol. V. 85. № 5. P. 1395–1412. doi 10.1111/jfb.12489
- Solovyev M.M., Izvekova G.I., Kashinskaya E.N., Gisbert E. 2018. Dependence of pH values in the digestive tract of freshwater fishes on some abiotic and biotic factors // Hydrobiologia. V. 807. № 1. P. 67–85. doi 10.1007/s10750-017-3383-0
- Torrisen K.R. 1984. Characterization of proteases in the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Comp. Biochem. Physiol. V. 77B. P. 669–674.
- Yin N., Zhao Q., Li Z., Zhao Q. 2000. Preliminary study of protease activity in cultivated fugu, *Fugu obscurus* // J. Nanjing Norm. Univ. Natur. Sci. V. 24. № 1. P. 101–104.