

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 597.553.2:577.15

ВОЗДЕЙСТВИЕ ЭЛЛАГОТАНИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДАЗ
КИШЕЧНИКА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ

© 2023 г. Д. В. Микряков*, А. Ф. Тарлева*^{*, @}

*ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
Ярославская область, Борок, 109, 152742 Россия

[@]E-mail: ns_tarleva@ibiw.ru

Поступила в редакцию 04.07.2022 г.

После доработки 24.08.2022 г.

Принята к публикации 24.08.2022 г.

Изучено влияние эллаготанинов на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса форели. Опытным группам рыб давали корм с добавкой на основе эллаготанинов (с содержанием активного вещества 0.38, 0.76 и 1.14 г/кг корма). Отбор проб проводили у 8 особей из каждой группы перед началом эксперимента, на 15, 30, 45 и 60 сутки. Исследование показало, что эллаготанины, оказывают стимулирующий эффект на активность пептидаз. Максимальное увеличение ферментативной активности в опытных группах по сравнению с контрольной зафиксировано на 45 сут эксперимента. Установлено более значительное увеличение активности пептидаз слизистой оболочки кишечника, по сравнению с химусом. Сделан вывод, что эллаготанины стимулируют первоначальный этап расщепления белковых компонентов пищи.

Ключевые слова: форель, эллаготанины, пептидазы, слизистая оболочка кишечника, химус

DOI: 10.31857/S1026347023700178, **EDN:** MXSXVU

В последнее время проводится много исследований влияния препаратов растительного происхождения на физиологические параметры организма рыб. Показано, что добавление в корм растительных препаратов улучшает рост, иммунную активность и выживаемость рыб (Immanuel *et al.*, 2009; Aly Salah Masalhy *et al.*, 2010; Tkachenko *et al.*, 2018), усиливает защиту от возбудителей различных заболеваний (Sahu *et al.*, 2007, 2008; Won Kyung *et al.*, 2008; Harikrishnan *et al.*, 2009; Nya, Austin, 2009; Ramasamy *et al.*, 2009; Nya *et al.*, 2010; Дегтярик и др., 2016).

Кормовые добавки на основе эллаготанинов — одни из многочисленных препаратов природного происхождения. Эти вещества способны связываться с белками, благодаря обратимым ионным и слабым водородным связям. В отличие от другой группы танинов — конденсированных, содержащихся в большинстве травянистых и древесных растений, не обладают антипитательными свойствами (Использование эллаготанинов в рационах аквакультуры — 2020. — URL: <https://apknews.su/article/213/2594/> (дата обращения 04.08.2021). Ранее проведенные исследования показали положительное влияние на рост, массонакопление, иммунную систему, антибактериальные и антиоксидантные свойства и, как следствие, выживаемость рыб в условиях аквакультуры (Coccia *et al.*, 2019; Miş

Yonar Serpil 2019; Зеков и др., 2021). Усиление роста и увеличение массы тела, по-видимому, связано с изменением интенсивности процессов пищеварения за счет улучшения усвоения организмом белковых компонентов пищи. Однако в доступной литературе нет данных о влиянии эллаготанинов на протеолитическую активность пищеварительного тракта рыб. Проведение таких исследований позволит выявить за счет каких механизмов происходит усиление ферментативных процессов в пищеварительной системе рыб. Полученные данные помогут в разработке современных методик кормления, направленных на улучшение процессов роста и массонакопления у рыб, выращиваемых в условиях аквакультуры. Это будет способствовать увеличению производства рыбной продукции, что отражено в Концепции развития рыбохозяйственного комплекса Российской Федерации (Федеральный закон об аквакультуре № 148 от 02.07.2013 19) и служить гарантом продовольственной безопасности.

Цель работы — исследование влияния эллаготанинов на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса радужной форели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в апреле-июне в аквариальной Института биологии внутренних вод

им. И.Д. Папанина Российской академии наук на годовиках радужной форели *Parasalmo mykiss irideus* (Walbaum, 1972). Рыб для исследования доставили из форелевого хозяйства “Ярославская форель”, которое находится на озере Глубокое. После транспортировки форель (средней массой 75.00 ± 6.38 и полной длиной (TL) 18.17 ± 0.50) поместили в проточный бассейн с принудительной аэрацией объемом 16 м^3 где содержали в течение 14 сут для акклиматизации. Далее с помощью сетчатых вставок бассейн разделили на 4 части и случайным образом разместили по одинаковому числу особей (контрольная группа и 3 опытных). За время эксперимента температура воды повысилась от $13\text{--}16^\circ\text{C}$ в первый месяц до $17\text{--}19^\circ\text{C}$ во второй месяц эксперимента. В зависимости от температуры постепенно снижалось содержание кислорода в воде, от 8 мг/л в начале до 6.5 мг/л в конце опыта. Уровень pH колебался в пределах $8.3\text{--}8.5$, а концентрация аммиака и аммония не превышала нормы.

Форель кормили полноценным продукционным кормом для рыб фирмы “Alltech® Coppens”, гранула размером 3–4 мм. В ходе эксперимента использовали одинаковые корма одной серии. В контрольной группе давали только корм, а в трех опытных к корму добавляли препарат АКВАТАН на основе эллаготанинов (с содержанием активного вещества 0.38 , 0.76 и 1.14 г/кг корма) производства компании “Танин” г. Севница (Словения) на основе эллаготанинов. Введение кормовой добавки в готовые гранулированные корма осуществляли в виде суспензии водного раствора. В предварительно подготовленные объемы растворителя добавлялся препарат в соответствующих концентрациях и распределялся по всему объему корма при помощи перемешивания. Отбор проб проводили перед началом эксперимента, на 15, 30, 45 и 60 сут. Материал для исследования отбирали у 8 особей из каждой группы. Для получения ферментативно активных препаратов у рыб вскрывали брюшную полость, изымали кишечник и замораживали.

Кишечник рыб, помещали на стекло ледяной бани, освобождали от жира, осушали фильтровальной бумагой и разрезали вдоль. Химус собирали при помощи пластмассового скребка и небольшого (5 мм) стеклянного шпателя. Затем снимали слизистую оболочку кишечника. Навески химуса и слизистой оболочки кишечника гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с небольшим количеством раствора Рингера для холоднокровных животных (103 mM NaCl , 1.9 mM KCl , 0.45 mM CaCl_2 , 1.4 mM MgSO_4 , pH 7.4) при температуре $0\text{--}4^\circ\text{C}$. Использовали гомогенаты слизистой оболочки кишечника и химуса в разведении $1 : 99$ (раствор Рингера, pH 7.4). В пробирки добавляли по 0.5 мл гомогената и субстрата (1% раствор казеина pH 7.4) и инкубировали 30 мин. Все операции проводили

при 20°C и непрерывном перемешивании в 5-ти повторностях с учетом фона и выражали в единицах скорости реакции, $\text{мкмоль}/(\text{г} \cdot \text{мин})$. Активность пептидаз (преимущественно активность трипсина, КФ 3.4.21.4) оценивали по увеличению концентрации тирозина при 20°C (Kuz'mina *et al.*, 2019). О ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учетом фона (количество тирозина в исходном гомогенате) в расчете на 1 г сырой массы ткани, $\text{мкмоль}/(\text{г} \cdot \text{мин})$. Интенсивность окрашивания определяли на фотоколориметре (КФК-2) при красном светофильтре, $\lambda = 670 \text{ нм}$.

Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартного пакета прикладных программ Statistica 10, MS Excel 2010. При сравнении результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Различия считали значимыми при $p \leq 0.01$ и 0.05 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные исследования показали, что активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса форели изменялась в течение всего эксперимента (табл. 1). Во все сроки наблюдения исследуемый показатель во всех группах был ниже, чем у рыб перед началом опыта, за исключением данных активности пептидаз химуса на 15 сут эксперимента у особей 3 группы. Из табл. 1. видно, что практически во все сроки наблюдения активность пептидаз слизистой и химуса у опытных групп превышала показатели контрольных особей. Исключение составили данные форели первой и второй опытных групп на 15 сут эксперимента. У этих особей отмечено снижение активности пептидаз слизистой на 8% в первой и 1% второй группе, а также на 4.5% химуса в первой группе. Максимальное увеличение активности на $16\text{--}21\%$ исследуемых ферментов слизистой и химуса зафиксировано на 45 сут во всех трех группах по сравнению с контрольными значениями. На 60 сут эксперимента стимулирующий эффект эллаготанинов снизился до 0.4 и 6.5% . Стоит отметить, что большинство значимых отличий между опытными и контрольными группами зафиксированы в слизистой, а в химусе только на 30 сут в 3 группе (табл. 1). Достоверные значения положительного эффекта эллаготанинов на активность пептидаз слизистой установлены у всех опытных рыб к концу первого месяца эксперимента, за исключением особей 3 опытной группы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Переваривание белковых компонентов пищи у рыб – комплексный процесс, включающий их деполимеризацию ферментами организма асси-

Таблица 1. Воздействие эллаготанинов поступающих с пищей на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса радужной форели

Группы	Активность пептидаз мкмоль/(г · мин)	
	Слизистая	Химус
Контроль перед опытом	13.45±0.66	15.30±0.65
Контроль (15 сутки)	<u>12.60 ± 0.33</u> 100%	<u>13.62 ± 0.41</u> 100%
Опыт с добавкой гр. (15 сутки)	<u>11.60 ± 0.23</u> -7.9%	<u>13.01 ± 0.35</u> -4.5%
Опыт с добавкой 2 гр. (15 сутки)	<u>12.48 ± 0.23</u> -1.0%	<u>13.53 ± 0.24</u> +4.0%
Опыт с добавкой 3 гр. (15 сутки)	<u>12.70 ± 0.35</u> +1.0%	<u>15.31 ± 0.50</u> +17.7%
Контроль (30 сутки)	<u>10.10 ± 0.11</u> 100%	<u>12.10 ± 0.18</u> 100%
Опыт с добавкой 1 гр. (30 сут)	<u>11.62 ± 0.20*</u> +15.1%	<u>13.37 ± 0.34</u> +10.5%
Опыт с добавкой 2 гр. (30 сутки)	<u>11.74 ± 0.38*</u> +16.2%	<u>13.68 ± 0.42</u> +13.1%
Опыт с добавкой 3 гр. (30 сутки)	<u>10.10 ± 0.4</u> -	<u>13.90 ± 0.25*</u> +14.9%
Контроль (45сутки)	<u>10.11 ± 0.41</u> 100%	<u>10.85 ± 0.21</u> 100%
Опыт с добавкой 1 гр. (45 сутки)	<u>11.74 ± 0.22**</u> +16.1%	<u>13.10 ± 0.17</u> +20.7%
Опыт с добавкой 2 гр. (45 сутки)	<u>11.83 ± 0.21**</u> +17.0%	<u>12.73 ± 0.14</u> +17.3%
Опыт с добавкой 3 гр. (45 сутки)	<u>12.18 ± 0.15**</u> +20.5%	<u>12.75 ± 0.20</u> +17.5%
Контроль (60 сутки)	<u>11.16 ± 0.28</u> 100%	<u>13.10 ± 0.68</u> 100%
Опыт с добавкой 1 гр. (60 сут)	<u>11.74 ± 0.20*</u> +5.2%	<u>13.68 ± 0.2</u> +4.4%
Опыт с добавкой 2 гр. (60 сутки)	<u>11.68 ± 0.20*</u> +4.7%	<u>13.85 ± 0.19</u> +5.7%
Опыт с добавкой 3 гр. (60 сутки)	<u>11.89 ± 0.20*</u> +6.5%	<u>13.15 ± 0.43</u> +0.4%

Примечание. Группы 1, 2, 3 получали эллаготанины в концентрации 0,38, 0,76 и 1,14 г/кг корма, соответственно. Над чертой – уровень ферментативной активности, под чертой – изменение активности пептидаз, % от контроля, принятого за 100. * – значимые различия между опытом и контролем при $p \leq 0,05$, ** – при $p \leq 0,01$.

милятора, энтеральной микробиоты и объектов питания за счет всех известных в настоящее время типов пищеварения. Пептидазы, разлагающие белки и другие белковые компоненты, доминирующие в пище рыб, имеют большое значение для

жизнедеятельности рыб (Шульман, 1972; Шатуновский, 1980; Кузьмина, 2005, 2015, 2018). Высокие показатели активности пептидаз, зафиксированные у особей перед началом опыта, вероятно, связаны с тем, что рыбы начали активно питаться

после зимовки. Известно, что во время продолжительного голодания снижается общая протеолитическая активность (Abolfathi *et al.*, 2012), а после возобновление питания значительно увеличивается (Caruso *et al.*, 2014).

На начальном этапе пищеварения в просвет кишечника происходит секреция различных ферментов. С их помощью в желудочно-кишечном тракте рыб проводится предварительная обработка пищевого комка. В результате их действия происходит расщепление белковых компонентов. В кишечнике рыб функционируют преимущественно сериновые эндопептидазы панкреатического происхождения. Трипсин (КФ 3.4.21.4) гидролизует пептидную связь лизин-изолейцин в пептидах, амидах и некоторых сложных эфирах, химотрипсин (КФ 3.4.21.1) – предпочтительно по карбоксильным группам ароматических аминокислот тирозина, триптофана и фенилаланина (Антонов, 1983). Помимо этих ферментов, в кишечнике функционируют эластаза (КФ 3.4.21.36), аминопептидазы (КФ 3.4.11) карбоксипептидазы (КФ 3.4.16). Аминопептидазы отщепляют N-концевые аминокислоты пептидов, карбоксипептидазы – C-концевые аминокислоты пептидов. Завершают гидролиз белков кишечные дипептидазы, функционирующие на мембранах и в цитозоле энтероцитов (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005, 2015, 2018).

Анализ результатов показал, что под влиянием эллаготанинов активность пептидаз слизистой оболочки кишечника увеличилась больше, по сравнению с химусом. Эллаготанины стимулируют первоначальный этап расщепления белковых компонентов пищи, что позволяет увеличить интенсивность процессов пищеварения. Это, по-видимому, приводит к увеличению всасывания организмом рыб количества белков.

Незначительные различия активности пептидаз между контрольной и опытными группами в конце эксперимента, скорее всего, связаны со снижением стимулирующего эффекта эллаготанинов вследствие длительного применения. Также возможно, это связано с ухудшением условий содержания рыб. Повышение температуры воды и снижение содержания кислорода оказывают негативное влияние на организм форели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате двухмесячного эксперимента зафиксировано стимулирующее влияние эллаготанинов на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса радужной форели. Положительное воздействие зафиксировано на 30 сут и возрастало до максимума к 45 сут. К концу эксперимента эффективность постепенно снизилась, что вероятно связано с длительностью

применения препарата. Наиболее значительное влияние эллаготанины оказали на первоначальный этап пищеварения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств гранта РФ (проект № 22-26-20111) и частично в рамках государственного задания №№ 121050500046-8 и 121051100100-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1983. 367 с.
- Дегтярик С.М., Гребнева Е.И., Слободницкая Г.В., Бенецкая Н.А., Максимьюк Е.В., Беспалый А.В. Влияние растительных экстрактов на возбудителей аэромоназов и псевдомоназов рыб // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. 2016. № 32. С. 249–261.
- Зеков Д.Д., Ульянов М.В., Микряков Д.В., Суворова Т.А. Определение эффективных норм введения кормовой добавки Акватан в рацион радужной форели с биологической оценкой влияния на рыбохозяйственные показатели // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2021. № 11. С. 66–77.
- Кузьмина В.В. Процессы экзотрофии у рыб. Организация. Регуляция. Адаптации. М.: Полиграф-Плюс. 2015. 260 с.
- Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М. Наука. 2005. 300 с.
- Кузьмина В.В. Процессы пищеварения у рыб. Новые факты и гипотезы. Ярославль: Филигрань, 2018. 300 с.
- Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеоздат, 1993. 238 с.
- Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 288 с.
- Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищевая промышленность, 1972. 368 с.
- Abolfathi M., Hajimoradloo A., Ghorbani R., Zamani A. Compensatory growth in juvenile roach *Rutilus caspius*: effect of starvation and re-feeding on growth and digestive surface area // J. Fish Biol. 2012. V. 81. № 6. P. 1880–1890.
- Aly S.M., El Naggat G.O., Mohamed M.F., Mohamed W.E. Effect of garlic, echinacea, organic green and vet-yeast on survival, weight gain, and bacterial challenge of overwintered Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*) // J. Appl. Aquacult. 2010. V. 22. № 3. P. 210–215.
- Caruso G., Denaro M.G., Caruso R., De Pasquale F., Genovese L., Maricchiolo G. Changes in digestive enzyme activities of red porgy *Pagrus pagrus* during a fasting–re-feeding experiment // Fish Physiol Biochem. 2014. V. 40. № 5. P. 1373–1382.
- Coccia E., Siano F., Grazia Volpe M., Varricchio E., Tufan Eroldogan O., Paolucci M. Chestnut. Shell Extract modulates immune parameters in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // Fishes. 2019. V. 4(1). P. 18. <https://doi.org/10.3390/fishes4010018>

- Harikrishnan R., Chellam B., Subramanian D., Yong-Gun M., Man-Chul K., Ju-Sang K., Moon-Soo H.* Effect of plant active compounds on immune response and disease resistance in *Cirrhina mrigala* infected with fungal fish pathogen, *Aphanomyces invadans* // *Aquacult. Res.* 2009. V. 40. № 10. P. 1170–1181.
- Immanuel G., Uma R.P., Iyapparaj P., Citarasu T., Punitha Peter S.M., Michael Babu M., Palavesam A.* Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus* // *J. Fish Biol.* 2009. V. 74. № 7. P. 1462–1475.
- Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Shalygin M.V.* Role of peptidases of the enteric microbiota and prey in temperature adaptations of the digestive system in boreal carnivorous fish // *Inland Water Biol.* 2019. V. 12. № 2. P. 231–239.
- Ramasamy H., Chellam B., Subramanian D., Yong-Gun M., Man-Chul K., Ju-Sang K., Moon-Soo H.* Effect of plant active compounds on immune response and disease resistance in *Cirrhina mrigala* infected with fungal fish pathogen, *Aphanomyces invadans* // *Aquacult. Res.* 2009. V. 40. № 10. P. 1170–1181.
- Nya E.J., Dawood Z., Austin B.* The garlic component, alliin, prevents disease caused by *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) // *J. Fish Diseases.* 2010. V.33. № 4. P. 293–300.
- Nya E.J., Austin B.* Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) // *J. Fish Diseases.* 2009. V. 32. № 11. P. 963–970.
- Sahu S., Das B.K., Mishra B.K., Pradhan J., Sarangi N.* Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila* // *J. Appl. Ichthyol.* 2007. V. 23. № 1. P. 80–86.
- Sahu S., Das B.K., Mishra B.K., Pradhan J., Samal S.K., Sarangi N.* Effect of dietary *Curcuma longa* on enzymatic and immunological profiles of rohu, *Labeo rohita* (Ham.), infected with *Aeromonas hydrophila* // *Aquacult. Res.* 2008. V. 39. № 16. P. 1720–1730.
- Mişe Yonar S.* Growth performance, haematological changes, immune response, antioxidant activity and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diet supplemented with ellagic acid // *Fish and Shellfish Immunology.* 2019. V. 95. P. 391–398.
- Tkachenko H., Buyun L., Kasiyan O., Terech–Majewska E., Osadowski Z.* The antibacterial activity of the ethanolic leaf extract of *Ficus Pumilla* L. (MORACEAE) against Fich Bacterial Patogens // *Scientific J. Far East State Technical Fisheries University.* 2018. № 2. V. 45. P. 20–30.
- Won Kyoung M.* Effect of the residuum extract of Siberian ginseng *Eleutherococcus senticosus* on non-specific immunity in olive flounder *Paralichthys olivaceus* / M. Won Kyoung, Kim Pyong K., Lee Sung H., Park Soo I. // *Fish. Sci.* 2008. V. 74. № 3. P. 635–641.

Effects of Ellagotannins on Intestinal Peptidase Activity in Rainbow Trout

D. V. Mikryakov¹ and A. F. Tarleva^{1, #}

¹ Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, st pos. Borok, Nekouz district, Yaroslavl region, 152742 Russia

[#] e-mail: ns_tarleva@ibiw.ru

The effect of ellagotannins on the activity of peptidases of the intestinal mucosa and chyme of trout was studied. Experimental groups of fish were fed with an additive based on ellagitannins (with an active substance content of 0.38, 0.76 and 1.14 g/kg of food). Sampling was carried out in 8 individuals from each group before the experiment, at 15, 30, 45 and 60 days. The study showed that ellagotannins, has a stimulating effect on the activity of peptidases. The maximum increase in the enzymatic activity in the experimental groups compared with the control group was recorded on day 45 of the experiment. A more significant increase in the activity of peptidases of the intestinal mucosa compared with chyme was established. It is concluded that ellagotannins stimulate the initial stage of cleavage of protein components of food.

Keywords: trout, ellagotannins, peptidases, intestinal mucosa, chyme