

УДК 597:591.132.05

**АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНАЗ ОБЪЕКТОВ ПИТАНИЯ И СОПУТСТВУЮЩЕЙ
МИКРОБИОТЫ У РЫБ-ИХТИОФАГОВ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ pH**¹Кузьмина В.В., ²Золотарева Г.В., ²Шептицкий В.А.¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина, 152742 Борок
Ярославской обл., Российская Федерация; ²Приднестровский государственный
университет им. Т.Г. Шевченко, 3300 Тирасполь, Молдова

Исследовано влияние pH на активность протеиназ, функционирующих в организме рыб – потенциальных объектов питания рыб-ихтиофагов (краснопёрка *Scardinius erythrophthalmus*, тарань *Rutilus rutilus heckeli*, ёрш *Acerina cernua*, бычок *Neogobius fluviatilis*), а также сопутствующей микрофлоры из Кучурганского водохранилища. Показано, что уровень активности протеиназ в гомогенатах всех тканей рыб и сопутствующей микробиоты в значительной степени зависит от pH. Максимальная активность протеиназ целого организма у ерша и бычка рыб наблюдается при pH 8, у краснопёрки и тарани – при pH 10. Максимальные значения протеиназ сопутствующей микробиоты у разных видов рыб варьируют в более широком диапазоне значений pH (6-10). Протеиназы тканей рыб – потенциальных объектов питания ихтиофагов, и их сопутствующей микробиоты могут эффективно функционировать в зоне кислых значений pH.

Ключевые слова: рыбы, потенциальные объекты питания, ихтиофаги, сопутствующая микробиота, протеиназы, pH.

Проблемы биологии продуктивных животных, 2015, 1: 42-52

Введение

Согласно современным представлениям, усвоение пищи – сложный многоступенчатый процесс постепенного механического и химического дробления пищевых объектов и последующего транспорта нутриентов во внутреннюю среду организма. Механическая обработка пищи, характерная для многих видов животных, необходима для дальнейшего транспорта измельченных продуктов в различные пищеварительные полости, а также для увеличения поверхности пищевой массы, доступной действию секретов пищеварительных желез, в том числе содержащихся в них ферментов. В процессе желудочного пищеварения у моногастричных животных при pH 2.0-3.0 происходит кислотная денатурация белковых компонентов пищи, которая во много раз увеличивает способность ферментов расщеплять глобулярные белки. Кроме того, в полости желудка создается оптимальная среда для действия пепсина и других карбоксильных протеиназ, в результате чего обеспечивается гидролитическое расщепление примерно 10% пептидных связей в белках (Jennings, 1972; Уголев, 1972, 1985). Однако многие животные проглатывают жертву целиком. При этом известно, что мембраны живых клеток непроницаемы для пищеварительных протеиназ (Нортроп и др., 1950).

Вместе с тем еще К. Бернар (Bernard, 1859, цит. по: Уголев, 1985) описал переваривание задних лапок живых лягушек при их введении в желудок собаки с помощью желудочной фистулы. Этот факт впоследствии был подтвержден. При этом было показано, что переваривание в большей степени зависит от концентрации в желудочном соке свободной соляной кислоты, чем от содержания в нем пепсина (Wickbom et al., 1973). Проверка результатов этих

опытов позволила А.М. Уголеву (1980, 1985) предложить концепцию индуцированного аутолиза. Согласно этой концепции в процессах пищеварения у животных из естественных популяций помимо ферментов, синтезируемых их пищеварительной системой, участвуют цитозольные и лизосомальные ферменты тканей объектов питания, причем наиболее важную роль играют последние. Для процесса аутолиза важны фагосомы, первичные и вторичные лизосомы, аутофагические вакуоли и остаточные тельца (Покровский, Тутельян, 1976; Кнор et al., 1993; Немова, 1996). Характерной чертой лизосомальных ферментов является их способность расщеплять практически все химические связи при кислых значениях pH (Покровский, Тутельян, 1971; Дин, 1981; Высоцкая, Немова, 2008). Оптимум pH большинства лизосомальных ферментов, как правило, лежит в пределах 3.0-6.0 (De Duve, 1963; Покровский, Тутельян, 1976; Дин, 1981; Высоцкая, Немова, 2008).

В реализации индуцированного аутолиза особую роль играют ионы водорода, активирующие лизосомальные гидролазы, поскольку скорость их диффузии внутрь тканей пищевого объекта примерно в 1000 раз выше, чем у пищеварительных ферментов (Уголев, 1985). При исследовании в качестве потенциальных жертв различных гидробионтов показано, что этот механизм может играть исключительно важную роль в процессах пищеварения у рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2000, 2005; Kuz'mina, Golovanova, 2004; Kuz'mina, 2008). Показано, что тотальная активность протеолитических ферментов кормовых объектов в период наиболее интенсивного питания рыб может превышать тотальную активность протеиназ слизистой оболочки желудка консумента в 5-10 раз, гликолитических гидролаз – в сотни раз (Кузьмина, Скворцова, 2003; Kuz'mina, Golovanova, 2004; Kuz'mina, 2008).

Также известно, что с объектами питания и водой в пищеварительный тракт рыб попадают микроорганизмы (Buddington et al., 1997), которые могут принимать участие в симбионтном пищеварении (Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Кузьмина, Скворцова, 2002). При этом многие микроорганизмы продуцируют внеклеточные ферменты, способные гидролизовать не только белки и углеводы, но и специфические субстраты, не гидролизующиеся ферментами рыб (Cahill, 1990; Уголев, Кузьмина, 1993; Clements, 1997; Кузьмина, Скворцова, 2002; Кузьмина, 2005; Bakke et al., 2010; Ganguly, Prasad, 2012; Ray et al., 2012a). При этом активность протеиназ и потенциальных жертв ихтиофагов, и их микробиоты в значительной мере зависит от pH среды. Оптимум pH действия протеиназ желудка у рыб разных видов соответствует 2-3, кишечника – 9-10 (Уголев, Кузьмина, 1993). Катепсины, как правило, проявляют активность в зоне pH 2.0-6.5, но в ряде случаев, в частности катепсин Н, сохраняют свою активность и при нейтральных значениях pH (Barrett, Heath, 1977; Немова, 1978; Poole, De Duve, 1983; Ashie, Simpson, 1997). Максимальная активность протеиназ бактерий р. *Bacillus* (штаммы *B. licheniformis* BF2 и *B. subtilis* BH4), выделенных из кишечника лабео *Labeo bata*, находится при pH 6.0-6.5 (Ray et al., 2012b). Вместе с тем сведения о влиянии pH на активность протеиназ целого организма потенциальных объектов питания ихтиофагов, а также выделенной из них сопутствующей микрофлоры, в доступной литературе отсутствуют.

Цель работы состояла в изучении влияния pH на активность протеиназ у ряда видов гидробионтов, доминирующих в пище ихтиофагов, а также их сопутствующей микрофлоры.

Материал и методы

Работа проведена летом 2013 г. Объекты исследования – тарань *Rutilus rutilus heckeli* (Nord.), длина 8.1 ± 0.3 см, масса 15.7 ± 0.6 г, красноперка *Scardinius erythrophthalmus* (L.), длина 6.6 ± 0.6 см, масса 10.5 ± 1.3 г, ёрш *Acerina cernua* L., длина 8.8 ± 0.3 см, масса 13.6 ± 1.5 г, бычок *Neogobius fluviatilis* (Pallas), длина 5.2 ± 0.4 см, масса 8.4 ± 0.4 г, отловленные в Кучурганском водохранилище (46°N, 30°E), Молдова (по 5 экз. каждого вида). В качестве ферментативно-активных препаратов использовали гомогенаты всего тела рыб и культуры выделенной из них

микробиоты. Чтобы не допустить изменений и потерь микрофлоры, рыб не промывали. При отборе материала для микробиологического анализа руководствовались методикой Матейса (Mattheis, 1964). Особей одного вида в стерильных условиях измельчали, объединяли, тщательно перемешивали и формировали одну пробу согласно методу смешанных проб (Richter-Otto, Fehrmann, 1956). Затем отбирали требуемое количество материала (2-3 г) для приготовления исходного гомогената. Навески тканей гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках, установленных на ледяной бане, с использованием стерильного раствора Рингера для холоднокровных животных (103 мМ NaCl, 1.9 мМ KCl, 0.45 мМ CaCl₂, 1.4 мМ MgSO₄, pH 7.0) при температуре 0-4°C. Из полученной средней пробы отбирали 1 мл и готовили разведения в 1000 раз (1:10³) в стерильной посуде с использованием того же раствора Рингера. Затем отбирали 1 мл разведенного препарата, который высевали в 100 мл мясо-пептонного бульона (МПБ). При таком разведении активность гидролаз рыб сводилась к нулю. Культивирование проводили в колбах с пробоотборниками в термостате при 28°C в течение 48 ч при регулярном перемешивании.

Для приготовления гомогенатов всех тканей тела рыб (без головы) аликвоты тканей взвешивали и навески гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с небольшим количеством того же раствора Рингера при температуре 0-4°C. Гомогенаты разводили раствором Рингера в соотношении 1:99. После этого гомогенаты доводили до соответствующих значений pH.

Активность протеиназ оценивали по приросту тирозина методом Ансона в некоторой модификации. В качестве субстрата использовали 1%-ный раствор казеина, приготовленный на том же растворе Рингера, pH 5-10 (с интервалом 1). Интенсивность окраски оценивали при помощи фотокolorиметра КФК-2 (длина волны 670 нм). Активность ферментов в каждой точке определяли в пяти повторностях с учётом фона (исходное количество тирозина в пробе) и выражали в мкмоль/(г·мин).

Статистический анализ результатов. При анализе данных использовали стандартный пакет программ Microsoft Office XP 2010, приложение Excel, **STATISTICA** 10 (однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA-тест, F-критерий).

Результаты и обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что потенциальные объекты питания рыб-ихтиофагов обладают значительной активностью протеиназ, которая при стандартных значениях температуры (20°C) и pH (7.4) у большинства видов различается слабо (табл. 1). Максимальная активность протеиназ обнаружена у ерша, минимальная у тарани ($P < 0.001$). Уровень ферментативной активности в тканях красноперки и бычка различается в меньшей степени ($P < 0.05$). Активность протеиназ сопутствующей микробиоты у исследованных видов потенциальных объектов питания рыб также варьирует незначительно. Максимальная активность протеиназ микробиоты, выделенной из гомогената тканей всего тела рыб, также выявлена у ерша. У тарани, красноперки и бычка активность протеиназ сопутствующей микробиоты в 2 раза ниже, чем у ерша.

Поскольку активность протеиназ микробиоты значительно варьирует, были вычислены коэффициенты P_p/P_m (активность протеиназ в целом организме рыб / активность протеиназ сопутствующей микробиоты). Расчеты показали, что величина коэффициентов P_p/P_m уменьшается в ряду: красноперка (4.0) → бычок (3.6) → тарань (3.1) → ерш (2.1).

Влияние pH на активность протеиназ потенциальных объектов питания ихтиофагов и микробиоты, выделенной из гомогената тканей всего тела рыб при одних и тех же значениях pH, как правило, различно (рис. 1, 2).

Оптимум pH для активности протеиназ целого организма потенциальных объектов ихтиофагов выявлен в зоне щелочных значений. Максимальная активность протеиназ у тарани и красноперки наблюдается при pH 10 (3.55 ± 0.06 и 4.95 ± 0.08 мкмоль/г·мин), у бычка и

ерша – при pH 8 (4.60 ± 0.25 и 3.60 ± 0.23 мкмоль/г·мин) соответственно. При этом у всех исследованных видов в зоне pH 8-10 активность протеиназ составляет не менее 80% от максимальной активности. В зоне низких значений pH (5) у тарани, ерша и бычка сохраняется высокая ферментативная активность, составляющая 42.5, 48.7 и 71.7% от максимальной активности соответственно. У красноперки при pH 5 активность протеиназ сравнительно низка – 11.3%.

Таблица 1. Активность протеиназ потенциальных объектов питания рыб (рыбы и беспозвоночные) и сопутствующей микрофлоры

Потенциальные объекты питания рыб-ихтиофагов	Активность протеиназ	
	Целый организм	Сопутствующая микро-биота
Тарань	2.7 ± 0.1	0.87 ± 0.09
Красноперка	3.4 ± 0.1^b	0.86 ± 0.07
Ерш	4.0 ± 0.23^b	1.90 ± 0.11^b
Бычок	3.2 ± 0.23^a	0.90 ± 0.07

Примечания: измерения проведены при стандартных значениях температуры (20°C) и pH (7.4), мкмоль/г·мин; ^aP<0.05, ^bP<0.001 по F-критерию (ANOVA-тест); разные надстрочные индексы указывают на различие между минимальным показателем и показателями у других видов в столбцах.

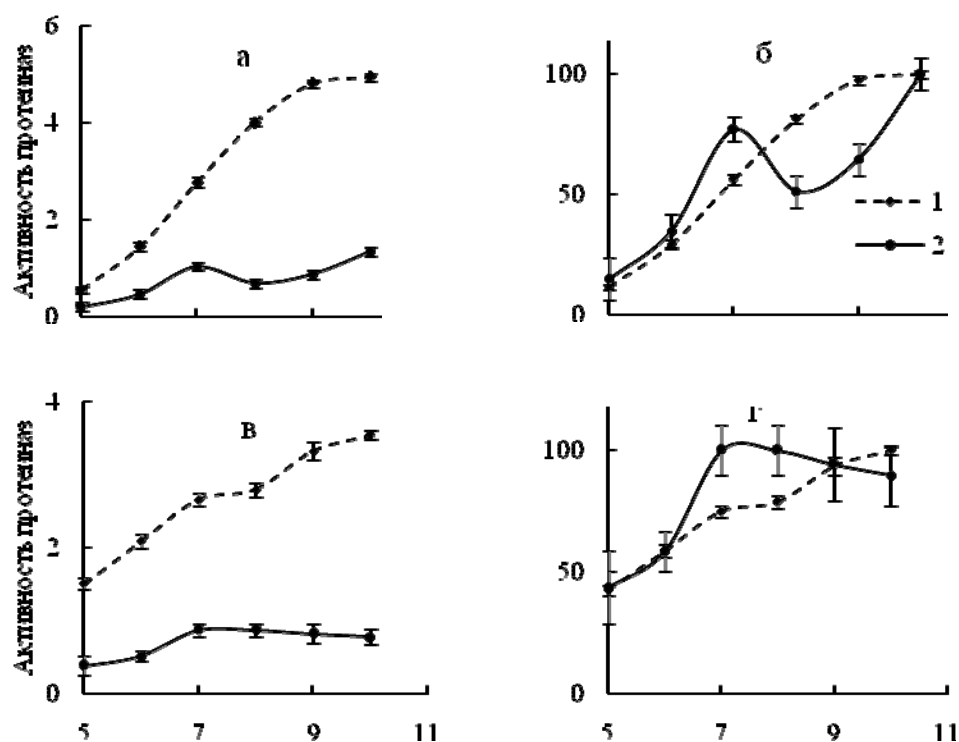


Рис. 1. Влияние pH на протеолитическую активность целого организма красноперки (а, б), тарани (в, г) и сопутствующей микрофлоры. Обозначения: по оси абсцисс – pH, по оси ординат: а, в – активность протеаз, мкмоль/(г·мин); б, г – % от максимальной активности. 1 – целый организм рыб, 2 – микрофлора.

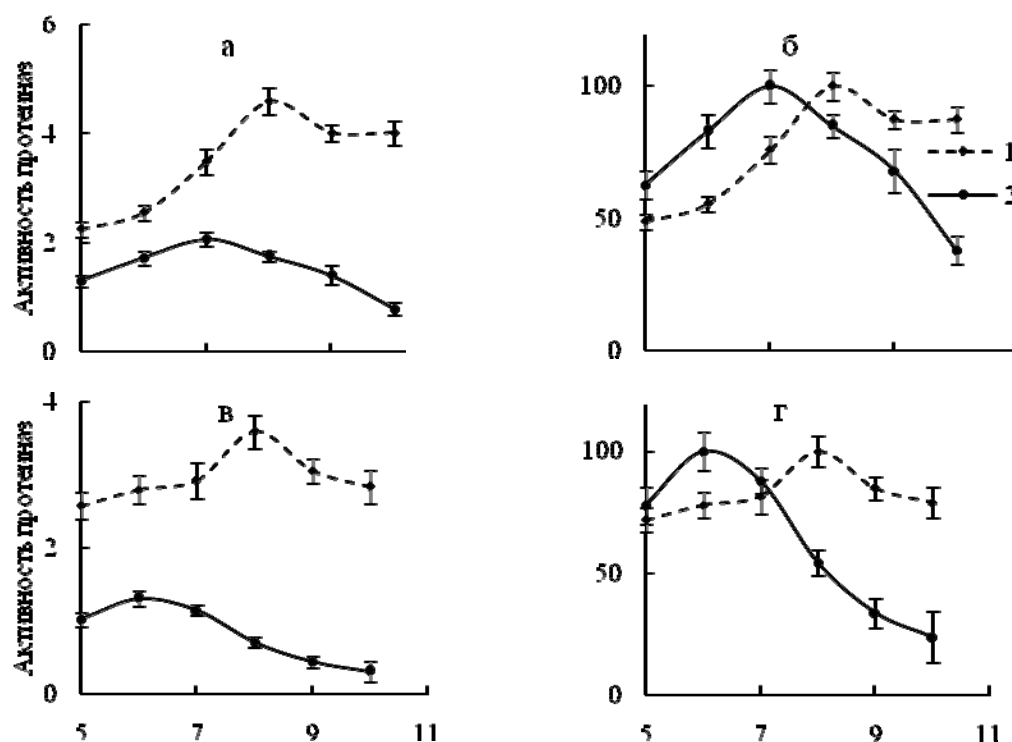


Рис. 2. Влияние pH на протеолитическую активность целого организма ерша (а, б), бычка (в, г) и сопутствующей микрофлоры. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Оптимум pH для активности протеиназ сопутствующей микрофлоры объектов питания ихтиофагов варьирует от 6 до 10. У сопутствующей микрофлоры красноперки оптимум pH активности протеиназ совпадает с таковым целого организма рыб этих видов (10), тарани – при 7 и 8 (0.87 ± 0.09 мкмоль/г•мин), бычка – при pH 6 (1.31 ± 0.10 мкмоль/г•мин), ерша – при 7 (2.06 ± 0.13 мкмоль/г•мин). При pH 5 ферментативная активность сопутствующей микрофлоры тарани, ерша и бычка составляет 43.7, 62.6 и 77.9%, у красноперки – лишь 14.8% от максимальной активности. При pH 10 максимальное снижение активности протеиназ сопутствующей микрофлоры у тарани, бычка и ерша уменьшается соответственно в 1.1, 2.6, 4.2 раза по сравнению с максимальной активностью. При pH 10 максимальное снижение активности протеиназ сопутствующей микрофлоры отмечено для ерша (в 4.2 раза), меньшее – для бычка (в 2.6 раза), минимальное – для тарани (в 1.1 раза) по сравнению с максимальной активностью.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что потенциальные объекты питания рыб-ихтиофагов обладают активностью протеиназ, сопоставимой с таковой у некоторых видов консументов (Кузьмина и др., 2014). Активность протеиназ сопутствующей микрофлоры потенциальных объектов питания ихтиофагов значительно ниже. При этом важно отметить, что у пелагической красноперки и бентофага бычка, обитающего на песчаных и каменистых грунтах, выявлены самые высокие различия между активностью протеиназ сопутствующей микрофлоры и рыб (в 4.0 и 3.6 раза). Возможно, это связано с меньшим разнообразием и численностью протеолитических бактерий в толще воды и оптимальном для бычка биотопе. По всей вероятности, вариабельность видового состава и численности сопутствующей микрофлоры у разных видов рыб влияет и на pH-зависимые характеристики экстрацеллюлярных протеиназ. Известно, что микрофлора потенциальных объектов питания пресноводных рыб включает представителей р.р. *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Micrococcus* и др. (Кузьмина, Скворцова 2002; Austin, 2006; Извекова и др., 2007). При этом протеоли-

тической активностью обладают бактерии, принадлежащие к р.р. *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* и *Enterobacter* (Ray et al., 2010). Однако представители р. *Vibrio* обильно представлены у морских рыб, а в пресноводных водоемах встречаются только в загрязненных участках (Шивокене, 1989). Не исключено, что в наибольшей степени на активность протеиназ сопутствующей микробиоты влияет численность представителей наиболее широко представленного в тканях гидробионтов р. *Pseudomonas* (Hamid et al., 1979; Hoshino et al., 1997; Belchior, Vacca, 2006).

Особого внимания заслуживают различия в характере влияния рН на активность протеиназ, функционирующих в тканях потенциальных объектов питания ихтиофагов. Большая величина оптимума рН для активности протеиназ у красноперки и тарани (10), чем у ерша и бычка (8), может быть обусловлена большим вкладом в суммарную активность протеиназ тканей рыб тех ферментов, которые синтезируются в поджелудочной железе. Действительно, оптимум рН действия сериновых протеиназ, синтезируемых поджелудочной железой, находится в зоне рН 9-11 (Уголев, Кузьмина, 1993). При этом в составе микробиоты могут доминировать микроорганизмы, оптимум рН действия протеиназ которых находится в диапазоне 5-7 – катепсины В, G, L, С и Н (Немова, 1978; Aranishi et al., 1997a,b; Ashie, Simpson, 1997; Wang et al., 2000; Visessanguan et al., 2003; Ray et al., 2012a, b). Меньшая, чем у других видов рыб, относительная активность протеиназ в зоне низких значений рН у красноперки может быть связана как с меньшей активностью сериновых протеиназ, так и с большей активностью катепсинов D, E, N и X, оптимум действия которых находится в зоне рН 2.8-4.0 (Barrett, Heath, 1977; Ashie, Simpson, 1997). Действительно, при рН 5 в тканях красноперки сохраняется около 11.3%, в то время как тарани, ерша и бычка – 42.5, 48.7 и 71.7% от максимальной активности соответственно.

Характер влияния рН на активность протеиназ микробиоты, выделенной из тканей потенциальных объектов питания рыб, также различен. Максимальная активность протеиназ у бычка наблюдается при рН 6, у тарани и ерша – при рН 7, то у красноперки при рН 7 активность несколько ниже, чем при рН 10. Пик активности протеиназ микробиоты в зоне нейтральных значений рН может быть связан с использованием в качестве субстрата казеина, что хорошо согласуется с ранее полученными данными (Кузьмина и др., 2002). Высокая активность протеиназ микробиоты у бычка при рН 6 может быть обусловлена наличием в культуре лактобактерий, что подтверждается данными о высокой активности протеиназ энтеральной микробиоты рыб при рН 5 в случае использования в качестве субстрата молока (Кузьмина и др., 2002). Более того, при изучении протеолитической активности у 168 штаммов бактерий р. *Lactobacillus*, выделенных из пищеварительного тракта карпа *Cyprinus carpio*, было установлено, что основными продуцентами трипсино- и пепсиноподобных протеиназ являются *Lactobacillus casei casei* и *L. plantarum*, причем активность трипсиноподобных протеаз приблизительно в 10 раз выше, чем пепсиноподобных гидролаз (Jankauskienė, Lesauskienė, 1995). Значительный вклад в суммарную активность протеиназ микробиоты при рН 6 могут вносить и бактерии р. *Bacillus*. Как указывалось во введении, максимальная активность протеиназ штаммов *B. licheniformis* BF2 и *B. subtilis* ВН4, выделенных из кишечника лабео *Labeo bata*, выявлена при рН 6.0-6.5 (Ray et al., 2012b). Важно отметить, что при рН 5 у микробиоты бычка сохраняется 77.9%, тарани и ерша – 43.6 и 62.6%, красноперки – 14.8% от максимальной активности соответственно. Поскольку эти величины чрезвычайно близки к таковым всех тканей рыб исследованных видов, можно предположить, что не только катепсины различных тканей рыб, но и протеиназы разных видов, входящих в состав микробиоты, могут быть адаптированы к функционированию при низких значениях рН, что позволяет компенсировать низкую активность протеиназ, функционирующих в кишечнике рыб – 5-10% от максимальной активности (Кузьмина, 1990).

Таким образом, активность протеиназ в целом организме потенциальных объектов питания ихтиофагов и сопутствующей микробиоты варьирует при разных значениях рН. Оптимум рН для активности протеиназ целого организма у тарани и красноперки находится при

pH 10, у бычка и ерша – при pH 8. Максимальные значения протеиназ сопутствующей микробиоты у разных видов рыб варьируют в более широком диапазоне значений pH (6-10). Оптимум pH для активности протеиназ сопутствующей микробиоты у бычка находится при pH 6, у тарани и ерша – при pH 7, у красноперки – при pH 10. В зоне низких значений pH активность протеиназ в целом организме потенциальных объектов питания ихтиофагов и сопутствующей микробиоты в значительной мере зависит от экологии вида – у планктофага красноперки не превышает 15%, у бентофагов составляет 42% и более.

ЛИТЕРАТУРА

1. Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. – М.: Наука, 2008. – 284 с.
2. Дин Р. Процессы распада в клетке. – М.: Мир, 1981. – 120 с.
3. Извекова Г.И., Извеков Е.И., Плотников А.О. Симбионтная микрофлора рыб различных экологических групп // Известия РАН. Серия биологическая. – 2007. – № 6. – С.728-737.
4. Кузьмина В.В. Влияние температуры на уровень общей протеолитической активности пищеварительного тракта некоторых видов пресноводных костистых рыб. // Вопр. ихтиологии. 1990. – № 30. – Вып. 4. – С.668-677.
5. Кузьмина В.В. Вклад индуцированного аутолиза в процессы пищеварения вторичных консументов на примере гидробионтов // Докл. РАН. – 2000. – Т. 373. – № 1. – С.132-134.
6. Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. – М.: Наука, 2005. – 300 с.
7. Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г. Бактерии желудочно-кишечного тракта и их роль в процессах пищеварения у рыб // Усп. совр. биол. – 2002. – Т. 122. – № 6. – С. 569-579.
8. Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г. Вклад протеолитических ферментов объектов питания в процессы пищеварения хищных рыб // Вопр. ихтиологии. – 2003. – Т. 43. – № 2 – С. 209-214.
9. Кузьмина В.В., Золотарева Г.В., Шептицкий В.А. Влияние pH на активность протеиназ слизи оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у рыб из Кучурганского водохранилища // Вопросы ихтиологии. – 2014. – Т. 54. – № 5 – С. 599-606.
10. Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г., Первушина К.А. Активность протеиназ энтеральной микробиоты рыб: влияние температуры и pH // Биол. внутр. вод. – 2002. – № 4. – С. 69-74.
11. Лубянский В., Вирбицкас Ю., Янкавичус К., Лясаускене Л., Грибаускене В., Тряпшене О., Юзоленене Ю., Ястюгенене Р., Бабянскас М., Янкаускене Р. Облигатный симбиоз микрофлоры пищеварительного тракта и организма. – Вильнюс: Мокслас, 1989. – 192 с.
12. Немова Н.Н. Катепсины животных тканей // В кн.: Экологическая биохимия животных. (Ред. В.С.Сидоров). –Петрозаводск: КНЦ АН СССР, 1978. – С. 76-88.
13. Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. – Петрозаводск: КНЦ РАН, 1996. – 104 с.
14. Нортроп Дж., Кунитц М., Херриотт Р. Кристаллические ферменты. – М.: Изд-во иностр. лит., 1950. – 347 с.
15. Покровский А.А., Тутельян В.А. Лизосомы. – М.: Наука, 1976. – 382 с.
16. Суханова Е.В. Сообщества микроорганизмов, ассоциированных с лососевидными рыбами озера Байкал: автореф. дисс... канд. биол. наук. Иркутск. – 2012, – 20 с
17. Уголев А.М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция. – Л.: Наука, 1972. – 358 с.
18. Уголев А. М. Трофология новая междисциплинарная наука // Вестник АН СССР. – 1980. – № 1. – С. 50-61.
19. Уголев А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. – Л.: Наука, 1985. – 544 с.
20. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. – СПб.: Гидрометеоздат. –1993. – 238 с.
21. Шивокене Я.С. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых. – Вильнюс: Мокслас, 1989. – 223 с.
22. Aranishi F., Hara K., Osatomi K., Ishihara T. Purification and characterization of cathepsin B from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio* // Compar. Biochem. Physiol. 1997a. – Vol. 117B. – № 4. – P. 579-587.
23. Aranishi F., Hara K., Osatomi K., Ishihara T. Cathepsin B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio* // Compar. Biochem. Physiol. – 1997b. – Vol. 117B. – № 4. – P. 601-605.

24. Ashie I.N.A., Simpson B.K. Proteolysis in food myosistem – a review // J. Food Biochem. – 1997. – Vol. 21. – P.91-123.
25. Austin B. The Bacterial Microflora of Fish, Revised // Sci. World J. – 2006. –Vol. 6. – P. 931–945.
26. Bakke A.M., Glover C., Krogdahl Å. Feeding, digestion of nutrients and absorption // In: Multifunctional gut of fish. Fish physiology (Eds. Grossel M., Farrell A.P., Brauner C.J.). – Amsterdam: Academic Press /Elsevier, 2010. – Vol. 30. – P. 57-110.
27. Barrett A.J., Heath M. Lysosomal enzymes // In: Lysosomes. A Laboratory handbook. –Amsterdam, 1977. – P.19-127.
28. Belchior S.G.E., Vacca G. Fish protein hydrolysis by a psychrotrophic marine bacterium isolated from the gut of hake (*Merluccius hubbsi*) // Can. J. Microbiol. – 2006. – Vol.52. – P. 1266-1271.
29. Buddington R.K., Krogdahl A., Bakke-Mckellep Å. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and relations with diet // Acta Physiol. Scand. – 1997. – Vol. 161. – Suppl. 638. – P.67-80.
30. Cahill M.M. Bacterial flora of fishes: a review // Microb. Ecol. – 1990. – Vol. 19. – P. 21-41.
31. Clements K.D. Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes // In: Gastrointestinal ecosystems and fermentations (Eds. R. I. Mackie and B.A. White). – New York: Chapman and Hall, 1997. – Ch. 6. – P. 156-198.
32. De Duve C. The lysosomae concept. // In: Lysosomes (Eds. A.V.S. de Reuck, M. P. Cameron). Ciba Found. Symp. – Boston: Little, Brown and Co., 1963. – P. 1-31.
33. Ganguly S., Prasad A. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism // Rev. Fish Biol. Fish. – 2012. – Vol. 22. – P. 11–16.
34. Hamid A., Sakata T., Kakimoto D. Microflora in the alimentary tract of gray mullet (4. Estimation of enzymic activities of the intestinal bacteria) // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. – 1979. –Vol. 45. – № 1. – P. 99-106.
35. Hoshino T., Ishizaki K., Sakamoto T., Kumeta H., Yumoto I., Matsuyama H., Ohgiya S. Isolation of a *Pseudomonas* species from fish intestine that produces a protease active at low temperature // Lett. Appl. Microbiol. – 1997. – Vol. 25. – P. 70-72.
36. Jankauskienė R., Lesauskienė L. Antagonistic and proteolytic activity of intestinal bacteria of the genus *Lactobacillus* in carps // Biologija. – 1995. – № 1-2. – P. 161-165.
37. Jennings J.B. Feeding, digestion and assimilation in animals. 2nd ed. – London, Basingstoke: Macmillan Press, 1972. – 244 p.
38. Kuz'mina V.V. Classical and Modern conceptions of fish digestion. // In: Feeding and Digestive Functions in Fishes (Eds. J.E.P. Cyrino, D. Bureau, B.G. Kapoor). Ch. 4. – Science Publishers, Enfield, NH etc., 2008. – P. 85-154.
39. Kuz'mina V.V., Golovanova I. L. Contribution of prey proteinases and carbohydrases in fish digestion // Aquaculture. – 2004. – Vol. 234. – P. 347-360.
40. Mattheis T. Das Vorkommen von *Vibrio anguillarum* in Ostseefischen // Ztschr. Fish. N.F., – 1964. – Vol. 12. – No. 3/5. – P. 259-263.
41. Poole B., De Duve X. Properties of lysosomes and their possible role in protein turnover // Intracellular protein catabolism: Proceedings of the Simposium. – New York, 1983. – P.11-13.
42. Ray A.K., Roy T., Mondal S., Ringo E. Identification of gut associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps // Aquacult. Res. – 2010. – Vol. 41. – P. 1462-1469.
43. Ray A.K., Ghosh K., Ringo E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review // Aquacult. Nutr. – 2012a. – Vol.18. – P. 465-492.
44. Ray A.K., Mondal S., Roy T. Optimization of culture conditions for production of protease by two bacterial strains, *Bacillus licheniformis* BF2 and *Bacillus subtilis* BH4 isolated from the digestive tract of bata, *Labeo bata* (Hamilton) // Proc. Zool. Soc. – 2012b. – Vol. 65. – No. 1. – P. 33–39.
45. Richter-Otto W., Fehrmann M. Zur Methodik von Darmflora Untersuchungen // Ernährungsforschung. – 1956. – Bd 1. – S. 584–586.
46. Visessanguan W., Menino A.R., Kim S.M., An H. Cathepsin L: A predominant heat activated proteinase in arrow tooth flounder muscle // J. Agr. Food. Chem. – 2001. – Vol. 49. – № 5. – P. 2633-2640.
47. Wang B., Wang C., Mims S.D., Xiong Y.L. Characterization of the proteases involved in hydrolyzing paddlefish (*Polyodon spathula*) myosin // J. Food Biochem. – 2000. – Vol. 24. – P. 503-515.
48. Wickbom G., Kamal M.K., Woodward E.R., Dragstedt L.R. Corrosive effects of digestive juices on legs of living frogs // Amer. Surg. – 1973. – Vol. 39. – P. 571-581.

REFERENCES

1. Aranishi F., Hara K., Osatomi K., Ishihara T. Purification and characterization of cathepsin B from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Compar. Biochem. Physiol.* 1997, 117B(4): 579-587.
2. Aranishi F., Hara K., Osatomi K., Ishihara T. Cathepsin B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Compar. Biochem. Physiol.* 1997, 117B(4): 601-605.
3. Ashie I.N.A., Simpson B.K. Proteolysis in food myosistem – a review. *J. Food Biochem.* 1997, 21: 91-123.
4. Austin B. The bacterial microflora of fish, revised. *Sci. World J.* 2006, 6: 931-945.
5. Bakke A.M., Glover C., Krogdahl Å. Feeding, digestion of nutrients and absorption. In: *Multifunctional gut of fish. Fish physiology* (Eds. Grossel M., Farrell A.P., Brauner C.J.). Amsterdam: Academic Press Elsevier, 2010, 30, P. 57-110.
6. Barrett A.J., Heath M. Lysosomal enzymes. *Lysosomes. A Laboratory handbook*. Amsterdam: North – Holland, 1977, P. 19-127.
7. Belchior S.G.E., Vacca G. Fish protein hydrolysis by a psychrotrophic marine bacterium isolated from the gut of hake (*Merluccius hubbsi*). *Can. J. Microbiol.* 2006, 52: 1266-1271.
8. Buddington R.K., Krogdahl A., Bakke-Mckellep Å. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and relations with diet. *Acta Physiol. Scand.* 1997, 161, Suppl. 638: 67-80.
9. Cahill M.M. Bacterial flora of fishes: a review. *Microb. Ecol.* 1990, 19: 21-41.
10. Clements K.D. Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes. In: *Gastrointestinal ecosystems and fermentations* (Eds. R.I. Mackie and B.A. White). New York: Chapman and Hall, 1997, Ch. 6, P. 156-198.
11. Dean R.T. *Processy degradatsii v kletke* (Degradative processes in cell). Moscow: Mir Publ., 1981, 120 p.
12. De Duve C. The lysosomes concept. In: *Lysosomes* (Eds. A. V. S. de Reuck, M. P. Cameron). Ciba Found. Symp. Boston: Little, Brown and Co, 1963, P. 1-31.
13. Ganguly S., Prasad A. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Rev. Fish Biol. Fish.* 2012, 22: 11-16.
14. Hamid A., Sakata T., Kakimoto D. Microflora in the alimentary tract of gray mullet (4. Estimation of enzymic activities of the intestinal bacteria). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 1979, 45(1): 99-106.
15. Hoshino T., Ishizaki K., Sakamoto T., Kumeta H., Yumoto I., Matsuyama H., Ohgiya S. Isolation of a *Pseudomonas* species from fish intestine that produces a protease active at low temperature. *Lett. Appl. Microbiol.* 1997, 25: 70-72.
16. Izvekova G.I., Izvekov E.I., Plotnikov A.O. *Izvestiya RAN. Ser. Biol. - Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Ser. Biol.* 2007, 6: 728-737.
17. Jankauskienė R., Lesauskienė L. Antagonistic and proteolytic activity of intestinal bacteria of the genus *Lactobacillus* in carps. *Biologija*. 1995, 1-2: 161-165.
18. Jennings J.B. *Feeding, digestion and assimilation in animals. 2nd ed.* London, Basingstoke: Macmillan Press, 1972, 244 p.
19. Kuz'mina V.V. *Voprosy ikhtologii - Problems of Ichthyology*. 1990, 30(4): 668-677.
20. Kuz'mina V.V. *Doklady Rossiiskoi Akademii Nauk - Proc. Russ. Acad. Sci.* 2000, 339(1): 172-174.
21. Kuz'mina V.V. Classical and Modern conceptions of fish digestion. In: *Feeding and Digestive Functions in Fishes*. (Eds. J.E.P. Cyrino, D. Bureau, B.G. Kapoor). Ch. 4. Science Publishers, Enfield, NH etc., 2008, P. 85-154.
22. Kuz'mina V.V. *Fiziologo-biokhimicheskie osnovy ekzotrofii ryb* (Physiologo-biochemical basis of exotrophy in fishes. Moscow: Nauka Publ., 2005, 300 pp.
23. Kuz'mina V.V., Golovanova I.L. Contribution of prey proteinases and carbohydrases in fish digestion. *Aquaculture*. 2004, 234: 347-360.
24. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G. *Uspekhi sovremennoi biologii - Advances in Contemporary Biology*. 2002, 122(6): 569-579.
25. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G. *Voprosy ikhtologii - Problems of Ichthyology*. 2003, 43(2): 209-214.
26. Kuz'mina V.V., Zolotareva G.V., Sheptitskiy V.A. *Voprosy ikhtologii - Problems of Ichthyology*. 2014, 54(5): 599-606.
27. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Pervushina K.A. *Biologiya vnutrennikh vod – Biology of Inland Waters*. 2002, 4: 69-74.

28. Lubyanskene V., Virbitskas Yu, Yankyavichus K., Lyasauskene L., Gribauskene B., Tryapshene O., Yuzolenene Yu, Yastyugenene R., Babyanskas M., Yankauskene R. *Obligatniy symbioz mikroflori pischevaritel'nogo tracta i organizma* (Obligate symbiotic microflora of the digestive tract and the body). Vilnius: Mokslas. 1989. 192 pp.
29. Mattheis T. Das Vorkommen von *Vibrio anguillarum* in Ostseefischen. *Ztschr. Fish. N.F.* 1964, 12(3/5): 259-263.
30. Nemova N.N. [Catepsins of animal tissues] In: *Ekologicheskaya biokhimiya zhivotnykh* (Ecological animal biochemistry). Petrozavodsk: KSC RAS, 1978, pp. 76-88.
31. Nemova N.N. *Vnutrikletochnie proteoliticheskie fermenty u ryb* (Intracellular proteolytic enzymes in fish). Petrozavodsk: KSC RAS, 1996, 104 pp.
32. Nortrop D., Kunitts M., Kherriott R. *Kristallicheskie fermenty* (Crystalline enzymes). Moscow, 1950, 347 p.
33. Pokrovskii A.A., Tutel'yan V.A. *Lizosomy* (Lysosomes). Moscow: Nauka Publ., 1976, 382 p.
34. Poole B., De Duve X. Properties of lysosomes and their possible role in protein turnover. In: *Intracellular protein catabolism: Proceedings of the Symposium*. New York, 1983, P. 11-13.
35. Ray A.K., Roy T., Mondal S., Ringo E. Identification of gut associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. *Aquacult. Res.* 2010, 41: 1462-1469.
36. Ray A.K., Ghosh K., Ringo E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquacult. Nutr.* 2012, 18: 465-492.
37. Ray A.K., Mondal S., Roy T. Optimization of culture conditions for production of protease by two bacterial strains, *Bacillus licheniformis* BF2 and *Bacillus subtilis* BH4 isolated from the digestive tract of *Labeo bata* (Hamilton). *Proc. Zool. Soc.* 2012, 65(1): 33-39.
38. Richter-Otto W., Fehrmann M. Zur Methodik von Darmflora Untersuchungen. *Ernährungsforschung.* 1956, 1: 584-586.
39. Shivokene J.S. *Symbiontnoe pischevarenie u gidrobiontov i nasekovich* (Symbiotic digestion in aquatic organisms and insects). Vilnius: Mokslas Publ., 1989, 223 pp.
40. Sukhanova E.V. *Soobshchestvo mikroorganizmov, associirovannich s lososevidnimi ribami osera Baikal* (Microbial communities associated with the Salmonid fishes of Lake Baikal). Extended Abstract of Diss. Cand. Sci. Biol., Irkutsk, 2012, 20 pp.
41. Ugolev A.M. *Membrannoe pischevarenie. Polysubstratnie processy, organizatsiya i regulatsiya* (Membrane digestion. Polysubstrate processes, organization and regulation). Leningrad: Nauka Publ., 1972, 358 pp.
42. Ugolev A.M. [Trophology – a new interdisciplinary science]. *Vestnik AN SSSR – Herald of Academy of Sciences of USSR.* 1980, 1: 50-61.
43. Ugolev A.M. *Evolutsia pischevareniya i printsipi evolutsii funktsii* (The evolution of the digestive system and the principles of evolution functions). Leningrad: Nauka Publ., 1985, 544 pp.
44. Ugolev A.M., Kuz'mina V.V. *Pishchevaritel'nye protsessy i adaptatsii u ryb* (Digestion processes and adaptations in fishes). St. Petersburg: Gidrometeoizdat Publ., 1993, 238 pp.
45. Visessanguan W., Menino A.R., Kim S.M., An H. Cathepsin L: A predominant heat activated proteinase in arrow tooth flounder muscle. *J. Agr. Food Chem.* 2001, 49(5): 2633-2640.
46. Vysotskaya R.U., Nemova N.N. *Lizosomy i lizosomal'nye fermenty ryb* (Lysosomal enzymes of fishes). Moscow: Nauka Publ., 2008, 284 p.
47. Wang B., Wang C., Mims S.D., Xiong Y.L. Characterization of the proteases involved in hydrolyzing paddlefish (*Polyodon spathula*) myosin. *J. Food Biochem.* 2000, 24: 503-515.
48. Wickbom G., Kamal M.K., Woodward E.R., Dragstedt L.R. Corrosive effects of digestive juices on legs of living frogs. *Amer. Surg.* 1973, 39: 571-581.

**Proteinase activity of preys and associated microbiota of fish-ichthiophagous
within a broad zone of pH**

¹Kuzmina V.V., ²Zolotareva G.V., ²Sheptytskiy V.A.

¹ *Papanin Institute for Biology of Inland Waters, 152742 Borok Yaroslavl oblast,
Russian Federation;* ² *Shevchenko Transdnestrian State University, 3300 Tiraspol, Moldova*

ABSTRACT. The influence of pH on the activity of proteinases functioning in the body of fish – potential prey of fish-ichthiophagous (rudd *Scardinius erythrophthalmus*, roach *Rutilus rutilus heckeli*, ruff *Acerina cernua*, goby *Neogobius fluviatilis*) as well as associated microflora from Cuciurgan reservoir was investigated. It is shown that the level of activity of proteinases in tissue homogenates of fish and associated microbiota largely depends on the pH. Maximum activity of proteinases of the whole organism in a ruff and goby is at pH 8, in rudd and roach it is at pH 10. The maximum values of proteinases of various species of associated microbiota vary within a wide pH range (6-10). Proteinase of the tissues in fish-benthophagous and their associated microbiota can function effectively in acidic pH zone.

Keywords: fish, potential preys, ichthiophages, associated microbiota, proteinases, pH

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2015, 1: 42-52

Поступило в редакцию: 26.11.2014

Получено после доработки: 19.01.2015

Кузьмина Виктория Вадимовна, д.б.н., гл.н.с., т. 8 920 149 25 21;

vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru;

Золотарева Галина Викторовна, н.с., т. 8 373 777 900 80; *zolotariova_g_v@mail.ru;*

Шептицкий Владимир Александрович, д.б.н., проф., т. 8 373 779 708 55;

septitchi@mail.ru