

Влияние температуры на активность пищеварительных протеиназ морских беспозвоночных

Е.Б. Смирнова¹, В.А. Мухин², В.Ю. Новиков²

¹ Биологический факультет МГТУ, кафедра биохимии

² Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ПИНРО)

Аннотация. В работе рассмотрено влияние температуры на активность пищеварительных протеиназ морских беспозвоночных. В результате проделанной работы были определены общая протеолитическая активность, температурный оптимум пищеварительных протеиназ исследуемых беспозвоночных, а также установлено изменение активности протеиназ в широком диапазоне температур.

Abstract. The paper considers the influence of temperature on activity of digestive proteinase of aquatic invertebrates. The general proteolytic activity and the digestive proteinases' temperature optimum of the researched invertebrates have been determined. Some change of proteinases' activity at large temperature range has been ascertained.

1. Введение

Как известно, для каждого фермента характерны субстратная специфичность, определенная локализация в органах и тканях, свои оптимумы температуры и рН для проявления максимальной активности. Морские беспозвоночные являются пойкилотермными животными, и поэтому для них легче установить взаимосвязь организма и среды, чем для теплокровных. Изменения условий среды, в частности, температуры, значительно влияют на структуру и функции ферментов, что является примером адаптации на биохимическом уровне.

Изучение ферментной системы морских беспозвоночных, а именно, активности пищеварительных протеиназ, является весьма актуальным по ряду причин. Пищеварительные органы морских беспозвоночных, как известно, являются отходами промысла и переработки. Эти отходы в настоящее время используются лишь частично, в основном в качестве корма для пушных зверей, хотя по массе они могут составлять до 90 % от объема вылова (Мухин, Новиков, 2002). Таким образом, данное сырье является достаточно дешевым с экономической точки зрения. Но основная причина, по которой целесообразно использовать внутренние органы беспозвоночных для получения препаратов протеиназ, состоит в том, что они обладают сравнительно высокой активностью и имеют большой выход при их выделении.

Одним из эффективных способов рационального использования пищеварительных органов беспозвоночных, и тем самым решения технологической задачи, является получение ферментных препаратов из добываемого сырья и применение их в медицине, микробиологии, пищевой и легкой промышленности.

Целью данной работы было исследование влияния температуры на активность пищеварительных протеиназ морских беспозвоночных. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- определить общую протеолитическую активность пищеварительных протеиназ некоторых беспозвоночных (акклиматизированный камчатский краб *Paralithodes camtschaticus*, северная креветка *Pandalus borealis*, морская звезда *Asterias rubens*) в температурном диапазоне от 5 до 70°C;
- определить температурный оптимум активности пищеварительных протеиназ исследуемых организмов;
- сделать выводы о влиянии температуры на активность пищеварительных протеиназ данных беспозвоночных.

2. Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили представители различных таксонов беспозвоночных Баренцева моря: ракообразные – акклиматизированный камчатский краб *Paralithodes camtschaticus*, северная креветка *Pandalus borealis*; иглокожие – морская звезда *Asterias rubens*.

В качестве материала были использованы пищеварительные органы (гепатопанкреас) вышеуказанных организмов.

Порошкообразные ферментные препараты для дальнейших анализов получали из гепатопанкреаса морских беспозвоночных путем осаждения белковых веществ ацетоном. Для этого к гомогенату тканей приливали чистый холодный ацетон в соотношении 1:10 (троекратно).

В исследуемом материале определяли общую протеолитическую активность, используя метод Ансона (Мухин, Новиков, 2002) с некоторыми модификациями. При определении общей протеолитической активности последовательно изменяли температуру раствора в диапазоне от 5 до 70°C, определяя активность по расщеплению 1 %-ного раствора гемоглобина.

3. Результаты

Максимальную активность комплекс выделенных протеиназ проявляет при температуре 50-55°C (рис.). Это несущественно отличается от оптимума протеиназ, характерного для теплокровных позвоночных (55-60°C), хотя принято считать, что температурный оптимум активности ферментов обитателей холодных морей значительно ниже (Gildberg, 1988).

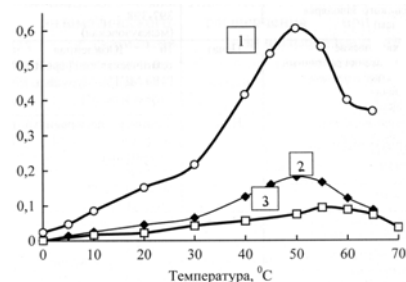
Отличительная черта протеолитической активности пищеварительного тракта морских беспозвоночных – наличие некоторой активности при низкой температуре (5-15°C), что, вероятно, следует рассматривать как пример биохимической адаптации к холодным условиям среды обитания.

Согласно полученным данным, температурный оптимум активности препарата из гепатопанкреаса камчатского краба по отношению к гемоглобину –55°C. По данным других исследователей, максимальная активность по отношению к коллагену обнаруживается также при температуре 50-55°C (Сахаров, 1992; Литвин, 1993; Chen et al., 1991).

При температуре инкубационной среды более 50°C (55°C для камчатского краба) отмечается значительное снижение протеолитической активности пищеварительных протеиназ исследуемых объектов, что, очевидно, обусловлено денатурацией ферментов.

Нельзя не отметить и тот факт, что протеолитическая активность в ферментном препарате из гепатопанкреаса камчатского краба значительно больше, чем в ферментных препаратах из гепатопанкреаса морских звезд и креветки. Подобная высокая активность протеиназ является экстенсивной эволюционной компенсацией за слабую дифференциацию пищеварительной системы, невысокую субстратную специфичность ферментов и, как уже отмечалось, за холодную среду обитания (температура воды в Северных морях далека от оптимума проявления активности большинства ферментов).

Рис. Зависимость протеолитической активности ферментных препаратов из гепатопанкреасов различных беспозвоночных от температуры инкубационной среды. Субстрат: 1-% р-р гемоглобина. Инкубация: 30 мин, рН 8,5. Источники выделения: 1 – камчатский краб *Paralithodes camtschaticus*; 2 – морская звезда *Asterias rubens*; 3 – северная креветка *Pandalus borealis*. Значения D_{280} приведены к одной концентрации ферментных препаратов.



4. Выводы

На основе полученных данных были сделаны следующие выводы:

- температурный оптимум протеолитической активности пищеварительных протеиназ исследуемых беспозвоночных (камчатский краб *Paralithodes camtschaticus*, морская звезда *Asterias rubens*, северная креветка *Pandalus borealis*) составляет 50-55°C;
- протеолитическая активность в гепатопанкреасе камчатского краба значительно превосходит таковую в гепатопанкреасе морских звезд и креветки;
- проявление некоторой активности наблюдается при низкой температуре (5-15°C) инкубационной среды;
- при температуре свыше 55°C отмечается снижение активности, что связано с денатурацией ферментов.

Литература

- Chen Y.L., Lu P.J., Tsai I. Collagenolytic activity of crustacean midgut serine proteases: Comparison with the bacterial and mammalian enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.100B, N 4, p.763-768, 1991.
- Gildberg A. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.91B, N 3, p.425-435, 1988.
- Литвин Ф.Е. Коллагенолитические протеазы из гепатопанкреаса камчатского краба: выделение и свойства. *Автореф. дис...канд. биол. наук, М.*, 20 с., 1993.
- Мухин В.А., Новиков В.Ю. Протеолиз и протеолитические ферменты в тканях морских беспозвоночных. *Мурманск, изд-во ПИИРО*, с.118, 2002.
- Сахаров И.Ю. Выделение и исследование ферментов из морских организмов и некоторые аспекты их применения. *Автореф. дис... докт. хим. наук, М.*, 47 с., 1992.