

УДК 593.96+664.951.7:639.4

А.Д. Перцева

Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ТКАНЕЙ ТРЕПАНГА И КУКУМАРИИ

Представлены результаты исследования протеолитической активности ферментов тканей голотурий. Используются мышечная ткань и внутренние органы трепанга и кукумарии. Протеолитические ферменты мышечной ткани трепанга и кукумарии наиболее активны в нейтральной зоне рН. Самая высокая активность внутренних органов выявлена у протеаз трепанга в кислой зоне рН. Результаты могут быть использованы в совершенствовании биотехнологии переработки голотурий при получении новых функциональных продуктов и БАВ.

Ключевые слова: голотурии, трепанг, кукумария, протеолитические ферменты.

A.D. Pertseva

COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF ENZYME ACTIVITY IN TISSUES OF A TREPANG AND CUCUMARIA

The results of a study of proteolytic enzyme activity in tissues of sea cucumbers are presents. The muscle tissue and internal organs of trepang and cucumaria has been used. Proteolytic enzymes muscle tissue of trepang and cucumaria are most active in a neutral zones pH. The highest activity of the viscera proteases were detected in trepang in an acidic zones pH. The results can be used to improve biotechnology processing of sea cucumbers in obtaining new functional products and biologically active compounds.

Key words: sea cucumbers, trepang, cucumaria, proteolytic enzymes.

Введение

Известно, что состав и технохимические характеристики пищевой продукции из водных биологических ресурсов часто зависят от активности ферментов в тканях этих объектов. Так, высокая протеолитическая активность катепсинов мышечной ткани сельдевых, лососевых, анчоусовых рыб позволяет получать пресервы с хорошими органолептическими характеристиками [1]. Высокая активность ферментов может играть и отрицательную роль в технологии переработки гидробионтов. Так, высокая липолитическая активность тканей анчоуса приводит к быстрой потере товарного вида и качества этого объекта [2]. Основная проблема использования голотурий для пищевой продукции заключается в том, что после вылова мышечная ткань вследствие посмертных изменений очень быстро теряет свои упруго-эластичные свойства и переходит в стадию автолиза, при которой происходит разжижение и размягчение мышечной оболочки и теряется товарный вид продукта [3]. Одной из причин такого процесса может являться активность протеаз в тканях.

Голотурии по типу питания относятся к собирающим депозитофагам. Они питаются, захватывая околоротовыми щупальцами верхний слой рыхлого осадка или частицы осажженной взвеси на поверхности твердых грунтов. Поэтому основная часть содержимого их кишечника представлена песком, фрагментами морских растений, обломками раковин моллюсков и скелетными элементами иглокожих, мелкими ракообразными, а также частицами терригенного происхождения [4].

Ферменты, участвующие в переваривании пищи, вырабатываются секреторными клетками слизистой кишечной трубки. Сведения о составе пищеварительных ферментов у дальневосточного трепанга вызывают противоречия ученых. Танака [5] указывает на наличие протеазы или группы протеаз, функционирующих в условиях слабой кислотности при рН около 6,1. Чои [6] представил данные о наличии в кишечнике трепанга целлюлазы, ами-

лазы, пектиназы, протеиназы и депептидазы. Нормальная величина рН в кишечнике близка к оптимальной для амилазы, выше отмеченной для целлюлазы и значительно ниже определённой для протеиназы и эстеразы. Однако исследование стенки кишечника дальневосточного трепанга, предварительно отмытой от микроорганизмов, не показало целлюлазной активности, что вызывает сомнение в присутствии фермента целлюлазы [7].

Данных об активности протеолитических ферментов мышечной ткани голотурий в литературе мало. Известны работы по выделению катепсина-L из мышечной ткани трепанга *Stichopus japonicus* [8].

Целью настоящей работы было сравнительное исследование протеолитической активности мышечной ткани и внутренностей трепанга и кукумарии.

Объекты и методы исследований

Объектами исследований служили дальневосточный трепанг *Apostichopus japonicus* и кукумария *Cucumaria japonica*, выловленные в бухте Северная (зал. Славянский) Японского моря в мае 2014 г.

Протеолитическую активность мышечной ткани и внутренних органов определяли по методу Каверзневой [9]. Для этого использовали 2%-й раствор казеина (в растворимое состояние переводили нагреванием в течение 15 мин) в 0,05 М фосфатном буфере (рН 8,0) и 2%-й раствор гемоглобина в 0,2 М ацетатном буфере (рН 3,6) и в 0,05 М фосфатном (рН 6,0).

Результаты и их обсуждения

Исследования протеолитической активности мышечной ткани голотурий показали (рис. 1), что преобладающими являются нейтральные протеазы, при этом данный вид ферментов в кукумарии в 8,1 раз активнее, чем в трепанге. Не выявлено активности кислых протеаз в мышечной ткани кукумарии и щелочных – в трепанге. Полученные данные согласуются с данными литературы. Джоу с соавторами выделяли катепсин-L из мышечной стенки трепанга *Stichopus japonicus*, который имел рН-оптимум при 5,0, молекулярную массу 63 кД, ингибировался тиоловыми блокаторами. Похожие катепсины содержат мышцы карпа и камбалы [10].

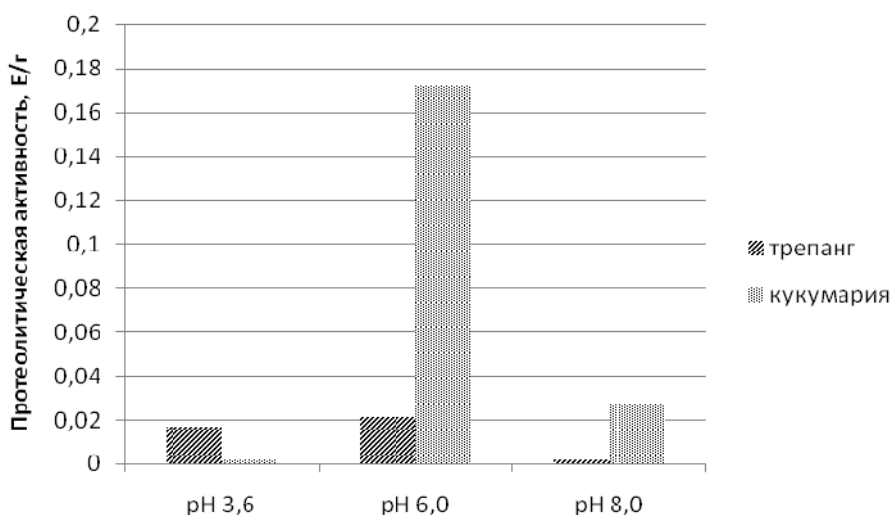


Рис. 1. Активность протеолитических ферментов в мышечной ткани трепанга и кукумарии
 Fig. 1. The activity of proteolytic enzymes in the muscle tissue of trepan and cucumberia

Имеются работы по изучению внутриклеточных Са-зависимых протеиназ мышц некоторых беспозвоночных и рыб [11], а также данные по протеолитическим ферментам мышечной ткани некоторых видов рыб [12; 13; 14; 1]. Согласно данным, в мышечной ткани кеты определены три пика протеолитической активности с максимумами при значениях рН 4,0,

6,5 и 7,0–8,5 [12], при этом основной вклад в пик активности с рН-оптимумом 4,0 вносит катепсин Д, а пик активности с рН 6,5 обеспечен катепсинами В, Н и L. Щелочной пик активности обеспечивается действием кальпаина и неидентифицированной щелочной протеазой [13]. Свойства кальпаин-подобных белков мидий и амфипод позволяет отнести изучаемые ферменты к цистеиновым протеиназам семейства кальпаинов. Этим ферментам беспозвоночных свойственны специфические особенности структуры и свойств по сравнению с кальпаинами рыб, выражающиеся в меньшей чувствительности к Ca^{2+} , меньшей термостабильностью, чувствительностью к ингибиторам протеиназ нецистеинового типа [11].

В настоящей работе во внутренностях голотурий определяли активность протеаз в кислой, нейтральной, щелочной зонах рН. Наиболее активными оказались кислые протеазы, при этом в трепанге в 2,4 раза данная активность больше, чем в кукумарии (рис. 2). Протеолитические ферменты в нейтральной зоне рН также более активны в трепанге (в 5,2 раза). Активность щелочных протеаз внутренностей выше в кукумарии.

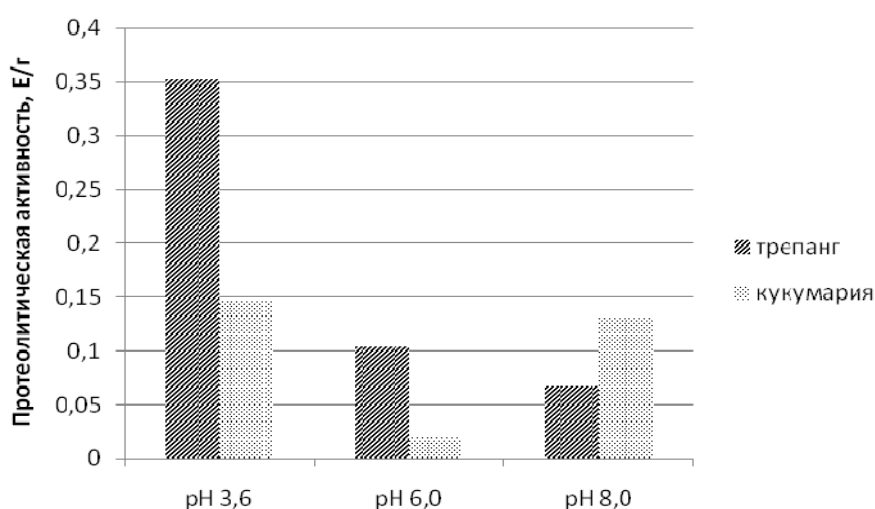


Рис. 2. Активность протеолитических ферментов внутренностей трепанга и кукумарии
Fig. 2. The activity of proteolytic enzymes in the entrails of trepang and cucumaria

Известно, что основу внутренностей голотурий составляет кишечник с содержимым (пищевыми остатками, илом). Основу выстилки кишечника составляют везикулярные энтероциты, функцией которых является продуцирование пищеварительных ферментов [15]. Исследования по изучению качественного, количественного составов и биохимических свойств бактериального сообщества кишечника дальневосточного трепанга показали, что среди представителей микрофлоры трепангов, обитающих в различных районах Японского моря, наличие протеолитической активности было выявлено у нескольких штаммов бактерий, которое составило от 0,106 до 0,237 П/ед [16].

Выводы

Таким образом, протеолитическая активность мышечной ткани трепанга и кукумарии может обеспечиваться активностью нейтральных катепсинов и кальпаинов, а протеолитическая активность внутренностей голотурий может обеспечиваться как эндогенными ферментами, вырабатываемыми везикулярными энтероцитами, так и деятельностью микроорганизмов, обитающих в микрофлоре кишечника.

Активность протеолитических ферментов, обнаруженная в мышечной ткани и внутренностях голотурий, может оказать влияние на процесс ферментативного гидролиза мышечной ткани и при использовании голотурий целиком при выделении БАВ и получении функциональных продуктов из данного объекта.

Список литературы

1. Буй Суан Донг. Изучение протеолитической активности ферментной системы мышечной ткани и внутренних органов прудовых видов рыб с целью применения в производстве пресервов // Вестн. АГТУ. Сер. Рыб. хоз-во. – 2009 – № 1. – С. 137–140.
2. Sharma R., Chisti Y, Banerjee U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases // *Biotechnology Advances*. – 2001. – Vol. 19. – P. 627–662.
3. Слуцкая, Т.Н. Исследования по химии и технологии трепанга и кукумари: автореф. дис. ... канд. техн. наук / Т.Н. Слуцкая. – Владивосток, 1975. – 24 с.
4. Левин, В.С. Дальневосточный трепанг. Биология, промысел, воспроизводство / В.С. Левин. – СПб.: Голанд, 2000. – 200 с.
5. Tanaka Y. Feeding and digestive processes of *Stichopus japonicus*. – *Bull. Fac. Hokkaido Univ.* – 1958. – Vol. 9. – P. 14–28.
6. Choe S. Biology of the Japanese common sea cucumber *Stichopus japonicus* Selenka. – Tokyo: Kaibundo, 1963. – 226 p.
7. Yokoe Y., Yasumasu I. The distribution of cellulose in invertebrates // *Biochem. and Physiol.* – 1964. – Vol. 13. – P. 323–338.
8. Wu HT, Li DM, Zhu BW, Sun JJ, Zheng J, Wang FL, Konno K, Jiang X. Proteolysis of non-collagenous proteins in sea cucumber, *Stichopus japonicus*, body wall: characterisation and the effects of cysteine protease inhibitors // *Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 141. – P. 1287–1294.
9. Каверзнева, Е.Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз / Е.Д. Каверзнева // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1971. – Т. 7, № 2. – С. 225–228.
10. Zhou DY, Chang XN, Bao SS, Song L, Zhu BW, Dong XP, Zong Y, Li DM, Zhang MM, Liu YX, Murata Y. Purification and partial characterisation of a cathepsin L-like proteinase from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its tissue distribution in body wall // *Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 158. – P. 192–199.
11. Канцерова, Н.П. Ca^{2+} -зависимые протеолитические ферменты некоторых водных беспозвоночных и рыб: дис. ... канд. биол. наук / Н.П. Канцерова. – Петрозаводск, 2011. – 139 с.
12. Виняр, Т.Н. Изменение активности мышечных пептидгидролаз при посоле созревающих и несозревающих рыб / Т.Н. Виняр, Л.А. Герасимец, А.Г. Зубов, Г.Н. Тимчишина // Тез. докл. Всесоюз. семинара. – Владивосток: ТИНРО, 1989. – С. 11–12.
13. Виняр, Т.Н. Выделение и исследование некоторых свойств протеаз мышечной ткани рыб / Т.Н. Виняр, Т.П. Калиниченко, А.М. Павловский, Т.Н. Слуцкая // Тез. докл. Всесоюз. конф. – Владивосток: ТИНРО, 1991. – С. 223–224.
14. Слуцкая, Т.Н. Особенности мышечной ткани нерестовой кеты / Т.Н. Слуцкая, Т.Н. Виняр, Т.П. Калиниченко, А.М. Павловский, М.И. Юрьева, Е.В. Якуш // *Изв. ТИНРО*. – 1999. – Т. 125. – С. 60–71.
15. Каменев, Я.О. Ультраструктура внутренних органов, бесполое размножение и регенерация у голотурии *Cladolabes schmeltzii*: дис. ... канд. биол. наук / Я.О. Каменев. – Владивосток, 2013. – 121 с.
16. Богатыренко, Е.А. Характеристика культивируемых гетеротрофов микробного сообщества кишечника дальневосточного трепанга *Apostichopus Japonicus*: дис. ... канд. техн. наук / Е.А. Богатыренко. – Владивосток, 2013. – 128 с.

Сведения об авторе: Перцева Анна Дмитриевна, аспирант,
вед. специалист НИЦ «Морские биотехнологии», e-mail: niib@dgtru.ru.