

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОМЕНА ВЫСОКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДАЗ КИШЕЧНИКА У ЧЕХОНИ *Pelecus cultratus* (L.) ПРИ ПОНИЖЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

¹Кузьмина В.В., ²Воронина У.В., ²Грачева Е.Л.

¹ Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН, п. Борок
Некоузского р-на Ярославской обл.; ²Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова, 150000 Ярославль, Российская Федерация

Цель работы – изучение влияния комплекса факторов – ферментов химуса, гормонов стресса, липидов пищи и эффектов кооперативности на температурные характеристики пептидаз в кишечнике у чехони *Pelecus cultratus* (L.), сем. карповые Cyprinidae. Рыбы выловлены в Волжском плесе Рыбинского водохранилища в августе 2018 г. Извлечённый пищеварительный тракт освобождали от жира, кишечник разрезали вдоль, изымали содержимое, отделяли слизистую оболочку кишечника и готовили её гомогенаты с использованием охлаждённого раствора Рингера для холоднокровных животных (рН 7.4). Гомогенаты и субстрат инкубировали при температуре 20 и 40 °С или в диапазоне температур 0-70°С в течение 30 мин. Для определения суммарной активности эндо- и экзопептидаз в качестве субстрата использовали казеин. Активность пептидаз (АП) определяли по приросту тирозина за 1 мин инкубации с учетом фона в расчёте на 1 г ткани. Показано, что характер температурной зависимости АП слизистой оболочки кишечника, центрифугата и химуса различается незначительно, соответствуя классической колоколообразной форме, температурный оптимум пептидаз находится в области 50°С, относительная активность не превышает 19% от максимальной активности. Добавление химуса к гомогенату слизистой слабо влияет на характер температурной зависимости ферментов. Относительная АП химуса при 0°С несколько выше (23.2%) по сравнению с таковой ферментов, функционирующих в составе гомогената и центрифугата, что ставит под сомнение высказанное авторами ранее предположение о том, что более высокая скорость протеолиза в зоне низких температур у чехони обусловлена эффектом кооперативного взаимодействия ферментов в цепи пептидаз. Установлено, что наличие гормонов в инкубате также слабо влияет на температурную зависимость пептидаз, в то время как наличие в инкубате суспендированного оливкового масла сохраняет более 50% АП в зоне низких температур. Высказано предположение, что высокое содержание в объектах питания чехони ненасыщенных жирных кислот могло способствовать поддержанию высокой пластичности клеточных мембран, а также напрямую влиять на активные центры ферментов, повышая АП слизистой при низких температурах.

Ключевые слова: чехонь, кишечник, слизистая оболочка, химус, пептидазы, адреналин, кортизол, липиды, температурные характеристики

Проблемы биологии продуктивных животных, 2019, 3: 37-47

Введение

Ранее при исследовании температурных характеристик пептидаз кишечника чехони (планктофага-факультативного ихтиофага) было показано, что в диапазоне 10-60°С уровень активности ферментов по казеину и гемоглобину фактически не изменяется, а величина Q_{10} близка к 1. При этом значения $E_{акт}$ для казеинолитических пептидаз слизистой оболочки кишечника в зоне низких температур (0-10°С) составляет 1.06, в зоне более высоких

температур (10-60°C) – 0.09 ккал/моль, для гемоглобинлитических – 1.77 и 0.52 ккал/моль соответственно (Кузьмина и др. 2017). Эти значения отличаются от данных литературы, поскольку кривые температурной зависимости активности кишечных пептидаз у рыб разных экологических групп (ихтиофагов, планкто- и бентофагов) характеризуются значительной однородностью – относительная активность пептидаз по тем же субстратам при 0°C не превышает 20% от максимальной активности (Кузьмина, 1990, 2015). Вместе с тем кривая температурной зависимости активности α -амилазы у чехони, близкой в систематическом отношении к бенто- и планктофагам (сем. Cyprinidae), но по типу питания являющейся ихтиофагом-факультативным планктофагом, была схожа с таковой у ихтиофагов – относительная активность при 0°C составляла 50% от максимальной активности (Уголев, Кузьмина, 1993). Поскольку чехонь отличается широким ареалом и обитает в бассейнах южных и бореальных морей, включая Ладожское озеро, температура в котором редко превышает 12-14°C, было высказано предположение, что столь необычные температурные характеристики пептидаз у чехони – это результат адаптации ферментов к функционированию при низких температурах. Также предполагалось, что более высокая скорость протеолиза в зоне низких температур обусловлена эффектами взаимодействия отдельных ферментов в цепи пептидаз, а эффект положительной кооперативности в процессах пищеварения играет важную роль у рыб и других животных (Кузьмина и др. 2017). Указанное расхождение данных вызвало необходимость проверки предположения о преимущественном влиянии фактора кооперативности на температурные характеристики ферментов. Опыты, проведенные на следующий год, не подтвердили это предположение, что можно объяснить возможным сочетанным действием комплекса факторов – не только эффекта кооперативности, но и гормонов стресса, а также биохимического состава пищи, в частности, липидов, на температурные характеристики пептидаз.

Цель работы – изучение влияния комплекса факторов (ферментов химуса, гормонов стресса, липидов и эффектов кооперативности в цепи пептидаз) на температурные характеристики пептидаз, гидролизующих белковые компоненты пищи в кишечнике чехони.

Материал и методы

Работа проведена в лаб. экологии рыб Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. Объект исследования – чехонь *Pelecus cultratus* (L.), относящаяся к кл. Костные рыбы Osteichthyes, п/кл Лучеперые Actinopterygii, отр. Карпообразные Cypriniformes, сем. Карповые Cyprinidae (Решетников, 1998). Рыб отлавливали в Волжском плесе Рыбинского водохранилища в течение июня 2018 г. и в течение 1.5 ч доставляли в лабораторию в контейнерах с водой. Температура воды в водоёме и контейнерах была близка к 20°C. Масса тела рыб – 243.8 ± 20.8 г., длина тела по Смитту – 28.8 ± 0.9 см. Пищеварительный тракт извлекали, помещали на ледяную баню и освобождали от жира. Кишечник разрезали вдоль, затем тщательно изымали содержимое (химус). Кишка не промывалась. При помощи мягкого пластмассового шпателя отделяли слизистую оболочку кишечника у 4-5 экз. рыб, перемешивали, брали аликвоту и готовили гомогенаты с использованием охлаждённого раствора Рингера для холоднокровных животных (pH 7.4).

Активность пептидаз (АП, суммарная активность эндо- и экзопептидаз) слизистой оболочки кишечника (преимущественно активность трипсина, разрывающего связи, образуемые карбоксильными группами аргинина и лизина) определяли по приросту тирозина с использованием реактива Фолина-Чиокальтеу (Anson, 1938). В качестве субстрата использовали 1%-ный раствор казеина, приготовленный на растворе Рингера (pH 7.4). Субстраты и гомогенаты (pH 7.4) инкубировали в течение 30 мин при постоянном перемешивании при температуре 20°C или в диапазоне температур 0-70°C. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 0.3 N трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Через 10 мин. инкубационную смесь фильтровали с использованием бумажных фильтров, затем смешивали 0.25 мл фильтрата, 2 мл 0.5 N NaOH, 0.25 мл 0.025 N CuSO₄ и 0.75 мл реактива Фолина-

Чиокальтеу, предварительно разведенного в 3 раза. Для определения исходного содержания тирозина в пробах (фона), ТХУ добавляли к гомогенату перед добавлением субстрата. Интенсивность окраски проб измеряли с помощью фотоколориметра КФК-2 при длине волны 670 нм через 20 мин после добавления реактива Фолина-Чиокальтеу. Об уровне 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 расчёте на 1 г сырой массы ткани, мкмоль/(г·мин) (Kuz'mina et al., 2015).

Для оценки влияния эффектов структурированности на характеристики пептидаз, гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин и в дальнейшем использовали центрифугат. В ряде опытов к гомогенату слизистой оболочки добавляли химус. В опытах по изучению влияния гормонов стресса на активность пептидаз схема опыта была иной. Вначале в течение 1 ч инкубировали 0.25 мл гомогената и 0.25 мл гормона (прединкубация). Затем к инкубату добавляли 0.5 мл субстрата, и смесь инкубировали ещё в течение 0.5 ч. Начальная концентрация гормонов в разных опытах варьировала; концентрация адреналина гидрохлорида составляла 0.001, 0.04 и 5 мкг/мл, кортизола – 0.02, 10 и 250 мкг/мл. В опытах по изучению влияния липидов (оливковое масло) на активность пептидаз схема опыта была такой же, однако время прединкубации составляло 30 мин. Начальная концентрация липидов в этих опытах значительно варьировала: 0.001, 0.1 и 10%.

Температурные коэффициенты Q_{10} пептидаз определяли традиционным способом (кратность увеличения скорости реакции при увеличении температуры на 10°C), энергию активации ферментативной реакции ($E_{\text{акт}}$) – по графику Аррениуса с использованием формулы: $E_{\text{акт}} = 2.3 \times 1.987 \times T_2 T_1 (\lg V_2 - \lg V_1) / (T_2 - T_1)$, где 2.3 – модуль перехода десятичного логарифма в натуральный, 1.987 – газовая постоянная, T – температура, °К (°К = °С + 273), V – скорость реакции. Достоверность различия средних значений оценивали по t -критерию для малых выборок.

Результаты и обсуждение

Активность трипсиноподобных пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса чехони при температуре 20°C. В первом опыте при определении активности пептидаз в слизистой оболочке кишечника и химуса (разведение в 100 раз) при стандартной для лета температуре (20°C) существенных различий в уровне АП у разных особей чехони не выявлено: 5.46 ± 0.88 и 5.36 ± 1.01 мкмоль/(г·мин) соответственно ($n=5$). Во втором опыте, в котором была увеличена доля химуса (слизистую разводили в 100 раз, химус – в 100 и 10 раз), различия в уровне АП были существенными: 5.73 ± 0.48 и 7.05 ± 0.15 мкмоль/(г·мин) соответственно ($P < 0.05$).

Температурная зависимость активности пептидаз слизистой оболочки и центрифугата. Исследование температурной зависимости АП гомогената и центрифугата слизистой оболочки кишечника чехони, несмотря на различия в уровне активности, выявило значительное сходство в форме их кривых (рис. 1).

В обоих случаях максимальная активность пептидаз отмечена при 50°C, а относительная активность при 0 °С соответствует 18.5 и 19.1% максимальной активности. При этом максимальный уровень ферментативной активности пептидаз, функционирующих в составе гомогената, существенно выше ($P < 0.05$) по сравнению с таковым центрифугата: 8.81 ± 0.08 и 6.35 ± 0.07 мкмоль/(г·мин) соответственно. Еще в большей степени различается термостабильность ферментов – 67.3 и 38.8% при 70°C в первом и втором случае соответственно.

Температурная зависимость активности пептидаз слизистой оболочки и содержимого кишечника (химуса). Поскольку более высокая активность гомогената могла быть обусловлена не только эффектом структурированности ферментов и разным

соотношением экзо- и эндогидролаз, но и присутствием небольшого количества химуса, в тех же условиях была исследована температурная зависимость пептидаз химуса, а также слизистой оболочки и химуса у рыб (рис. 2).

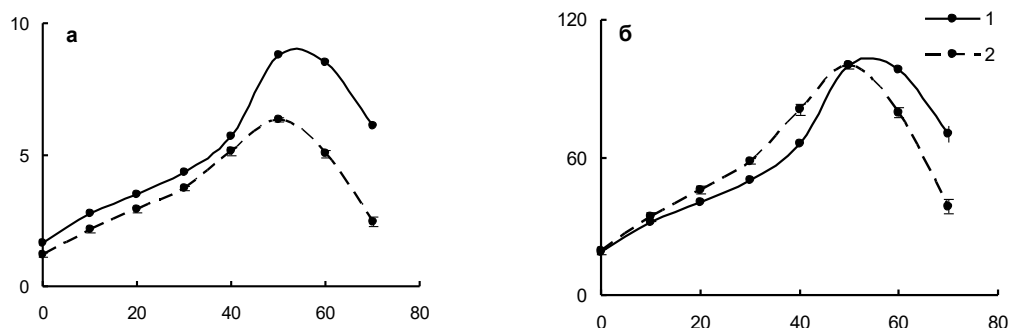


Рис. 1. Влияние температуры на активность пептидаз гомогената (1) и цетрифугата (2) слизистой оболочки кишечника чехони. По оси абсцисс: температура, °C, по оси ординат: а – активность пептидаз, мкмоль/(г·мин), б – относительная активность пептидаз, % от максимума, принятого за 100; $n = 4$.

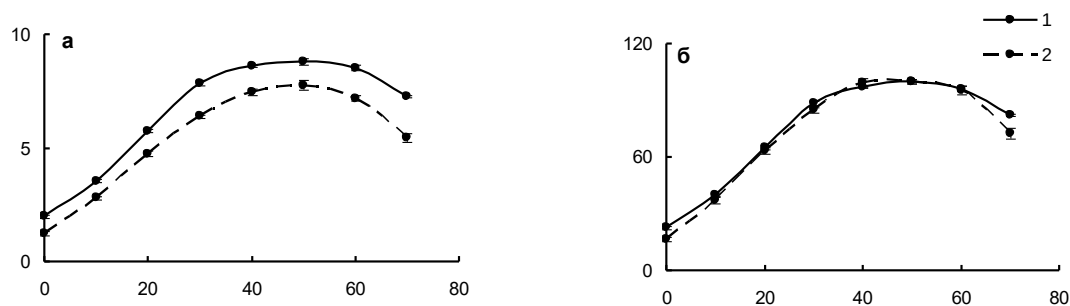


Рис. 2. Влияние температуры на активность пептидаз химуса (1) и гомогената слизистой оболочки кишечника с добавлением химуса в равном соотношении (2). По оси абсцисс: температура, °C, по оси ординат: а – активность пептидаз, мкмоль/(г·мин), б – относительная активность пептидаз, % от максимума, принятого за 100; $n = 4$.

Опыты показали, что наличие химуса в инкубате гомогената слизистой оболочки (соотношение 1:1 и разведение в 100 раз) изменило форму кривой температурной зависимости АП. При этом величина температурного оптимума сохранилась (50°C), зона оптимальных значений сократилась, а относительная активность при 0°C уменьшилось (на 16.1%). Относительная активность пептидаз при 70°C заняла промежуточное положение между таковой гомогената слизистой и химуса (70.4%). Особо следует отметить, что наличие химуса в инкубате существенно не повлияло на форму кривой температурной зависимости АП слизистой оболочки кишечника чехони. Этот факт не согласуется с высказанным ранее предположением о том, что более высокая скорость протеолиза в зоне низких температур обусловлена эффектом кооперативного взаимодействия отдельных ферментов в цепи пептидаз (Кузьмина и др., 2017). В связи с этим была апробирована другая гипотеза, согласно которой исключительно высокая активность пептидаз в диапазоне 0-60°C была обусловлена влиянием гормонов стресса.

Влияние разных концентраций адреналина и кортизола на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника. Поскольку на характеристики пептидаз могли влиять

гормоны стресса, была проведена серия опытов по влиянию различных концентраций адреналина и кортизола на АП слизистой оболочки кишечника чехони. Активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у интактных особей чехони составляла 4.18 ± 0.07 мкмоль/(г·мин). Оба гормона снижали уровень ферментативной активности, максимально при наиболее высоких концентрациях гормонов. Важно отметить два момента: 1) близкие значения концентрации гормонов (0.02 и 0.04 мкг/мл) вызывают схожий эффект: активность снижается в 1.2 и 1.1 раза соответственно; 2) несмотря на существенные различия в использованных концентрациях адреналина (в 1000 раз) и кортизола (в 12.5 раз), снижение ферментативной активности с увеличением их концентраций в обоих случаях было незначительным – в 1.3 и 1.2 раза (табл. 1).

Таблица 1. Активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у чехони под воздействием адреналина в разных концентрациях при 20 °C

Концентрация адреналина, мкг/мл	Активность пептидаз, мкмоль/(г·мин)
Адреналин	
0.001	4.01 ± 0.09
0.04	3.87 ± 0.06
5	3.17 ± 0.09
Кортизол	
0.02	3.57 ± 0.04
10	3.01 ± 0.05
250	2.94 ± 0.09

Влияние гормонов стресса на температурную зависимость активности пептидаз слизистой оболочки кишечника чехони. Под влиянием гормонов характер температурной зависимости АП гомогената слизистой оболочки кишечника чехони изменяется, особенно в зоне постмаксимальных температур (рис. 3).

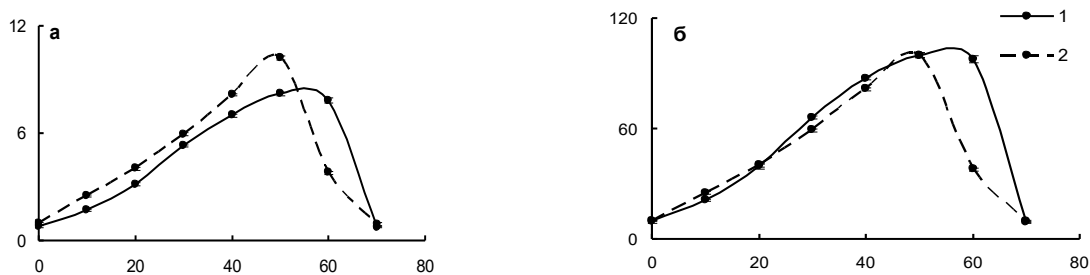


Рис. 3. Влияние адреналина (1) и кортизола (2) на активность пептидаз в составе гомогената слизистой оболочки кишечника чехони. По оси абсцисс: температура, °C, по оси ординат: а – активность пептидаз, мкмоль/(г·мин), б – относительная активность пептидаз, % от максимума, принятого за 100; n = 5.

При этом в присутствии адреналина (5 мкг/мл) максимальная активность пептидаз (8.22 ± 0.10 мкмоль/(г·мин)) также отмечена при 50°C, а относительная активность при 0°C составляет 9.8% от максимальной активности. Максимальный уровень АП (10.52 ± 0.09 мкмоль/(г·мин)) в присутствии кортизола (0.02 мкг/мл) наблюдается при той же температуре, а относительная активность при 0°C составляет 9.2% от максимальной активности. Значения относительной активности ферментов при 70°C схожи – 9.4 и 8.9% в первом и втором случае соответственно. Эти величины значительно ниже таковых, полученных при исследовании гомогената – при 0°C почти в 2 раза, при 70°C – более чем в 7 раз.

Влияние липидов на активность трипсиноподобных пептидаз слизистой оболочки кишечника чехони при температуре 0 и 40°C. Активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у интактных особей чехони составляла 1.5 ± 0.05 и 9.35 ± 0.11 мкмоль/(г·мин) при 0 и 40°C соответственно. При исследовании влияния суспендированного висцерального жира на АП слизистой оболочки кишечника чехони была установлена зависимость эффекта липидов от их разведения: резкое снижение ферментативной активности в случае меньшего разведения и менее значительное – при большем разведении, а также стимуляцию при 0°C по сравнению с интактными рыбами в двух последних случаях (табл. 2).

Таблица 2. Влияние суспендированного висцерального жира на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника чехони

Разведение препарата	t, °C	Активность пептидаз, мкмоль/(г·мин)	Активность пептидаз, % от такового у интактных рыб
1:10	0	0.90 ± 0.07 (22.4)	60.0, - 40.0
	40	4.01 ± 0.14	42.9, -57.1
1:100	0	2.07 ± 0.04 (54.3)	138.0, +38
	40	3.81 ± 0.17	40.7, -59.3
1:1000	0	2.07 ± 0.04 (59.0)	138.0, +38
	40	3.51 ± 0.18	37.5, -62.5

Примечания: в левом столбце в скобках указана относительная активность пептидаз при 0°C, % от таковой при 40°C; в правом столбце до запятой – относительная активность пептидаз при 0 и 40 °C, % от таковой у интактных рыб, после запятой – степень модификации ферментативной активности при 0° и 40°C.

При сравнении сочетанного влияния суспендированного висцерального жира и температуры оказывается, что в первом случае температура более значительно влияет на уровень ферментативной активности, чем в двух вторых. При 0°C в первом случае активность снижается на 77.6%, в двух вторых – на 45.7 и 41.0% соответственно по сравнению с таковой при 40 °C.

Температурные коэффициенты и величины энергии активации пептидаз. Расчёты показали, что во всех случаях значения коэффициента Q_{10} в исследованном диапазоне температур уменьшаются с увеличением температуры. Важно отметить неравномерное снижение величины показателя в случае гомогената слизистой, а также значительно более высокие значения коэффициента Q_{10} в зоне температур 0-10 °C в случае гомогената слизистой и химуса, а также гормонов – более, чем в 2 раза.

Таблица 3. Значения коэффициента Q_{10} пептидаз, функционирующих в различных препаратах

Препараты	Значения коэффициента Q_{10}				
	0-10°	10-20°	20-30°	30-40°	40-50°
Гомогенат слизистой	1.7	1.3	1.2	1.3	1.5
Центрифугат слизистой	1.8	1.4	1.3	1.4	1.2
Химус	1.8	1.6	1.4	1.1	1.0
Слизистая* + химус	2.2	1.7	1.3	1.2	1.0
Слизистая* + адреналин	2.1	1.9	1.7	1.3	1.2
Слизистая* + кортизол	2.6	1.6	1.5	1.4	1.3

Примечание: * гомогенат слизистой.

Величины энергии активации пептидаз. При определении величин $E_{\text{акт}}$ пептидаз гомогената и центрифугата слизистой кишечника был обнаружен излом на графике Аррениуса при 10°C (табл. 3).

Таблица 3. Величины энергии активации пептидаз кишечника чехони

Препараты	Энергия активации, ккал/моль		Температура точки перегиба, °C	Температурный оптимум, °C
	До точки перегиба	После точки перегиба		
Гомогенат слизистой	8.1	5.2	10	50
Центрифугат слизистой	9.2	4.8	10	50
Химус	8.4	3.6	20	50
Слизистая* + химус	11.2	2.6	20	50
Слизистая* + адреналин	7.1	2.7	30	60
Слизистая* + кортизол	10.9	4.6	10	50

Важно отметить, что в зоне низких температур (0-10°C) величины $E_{\text{акт}}$ АП в 1.6 и 1.9 раз выше по сравнению с таковыми в зоне более высоких температур (10-50°C). При исследовании химуса, а также слизистой в присутствии химуса излом на графике Аррениуса обнаружен при 20°C. При этом также выявлены более высокие (в 2.3 и 4.3 раза) величины $E_{\text{акт}}$ в зоне низких температур, по сравнению с таковыми в зоне более высоких температур (20-50°C). В опытах по изучению влияния гормонов на $E_{\text{акт}}$ АП слизистой были выявлены различия – в присутствии адреналина излом на графике Аррениуса был обнаружен при 30°C, кортизола – при 10°C. В первом случае значения $E_{\text{акт}}$ АП в зоне низких температур выше, чем в зоне более высоких температур в 2.6 и 2.4 раза.

При обсуждении полученных данных следует отметить, что у разных видов рыб активность сериновых пептидаз кишечника при температуре 0°C при использовании как натуральных (Кузьмина, 1990; Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina et al., 2015, 2019), так и синтетических субстратов (Pavlisko et al., 1997a,b, 1999; Ásgeirsson et al., 1989; Bezerra et al., 2001; Kishimura et al., 2006) крайне низка – относительная активность не превышает 18% от максимальной активности. При этом положение температурного оптимума (50°C) АП слизистой оболочки кишечника у чехони совпадает с таковым (50-65°C) у рыб разных таксономических групп из водоёмов бореальной (Кузьмина, 1990; Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina et al., 2015, 2019) и тропической (Pavlisko et al., 1997a,b, 1999; Ásgeirsson et al., 1989; Bezerra et al., 2001; Kishimura et al., 2006) зон.

Ранее при исследовании температурных характеристик АП кишечника чехони было показано, что в диапазоне 10-60°C активность ферментов фактически не изменяется, а величина Q_{10} близка к 1.

Проверка предположения о влиянии эффектов кооперативности на температурные характеристики ферментов показала, что максимальный уровень ферментативной активности находится при 50°C, а относительная активность при 0°C составляет 18.5% от максимальной активности. Вместе с тем сравнение разных препаратов по уровню АП при 20°C выявило значительные различия: в случае гомогената АП слизистой равна 3.51 ± 0.07 , центрифугата слизистой – 2.92 ± 0.11 , химуса – 5.76 ± 0.08 , слизистой в присутствии химуса – 7.05 ± 0.15 мкмоль/(г·мин) ($n=5$). Сопоставление двух первых значений свидетельствует о важной роли структурированности ферментов, сравнение последующих двух величин – о ещё большем влиянии химуса и эффектов кооперативности. Важно, что и в первом случае, когда изучали влияние структурированности ферментов, при сопоставлении характеристик пептидаз, функционирующих в составе гомогената и центрифугата, и во втором случае, когда исследовали характеристики химуса, не было выявлено существенных изменений в форме кривых температурной зависимости АП. Несмотря на то, что относительная АП химуса при 0°C несколько выше (23.2%) по сравнению с таковой ферментов, функционирующих в составе

гомогената и центрифугата, значительных проявлений эффектов кооперативности не наблюдалось.

С другой стороны, некоторые данные, касающиеся величин $E_{\text{акт}}$ АП, подтверждают важность этих эффектов. Действительно, значения $E_{\text{акт}}$ АП слизистой в присутствии химуса ниже по сравнению с таковым одного химуса в 1.4 раза. Следовательно, наличие химуса в инкубате у чехони существенно не влияет на форму кривой температурной зависимости пептидаз слизистой оболочки кишечника и не подтверждает вышесказанное предположение, но свидетельствует о некоторых преимуществах функционирования нативной цепи пептидаз.

В связи с этим возникло предположение о возможном влиянии гормонов стресса на температурные характеристики пептидаз. Как известно, у рыб одним из основных гормонов стресса является кортизол (Плисецкая, 1975; WendelaarBonga, 1997; Mommsen et al., 1999; Barton, 2002; Soengas, Aldegunde, 2002), который интенсифицирует процессы протеолиза в мышцах и повышает содержание аминокислот в плазме крови (Mommsen et al., 1999). В наших опытах оба гормона снижали АП, максимум в 1.4 раза. Кроме того, форма кривой температурной зависимости АП в присутствии обоих гормонов принципиально не отличалась от таковой у гомогената. Следовательно, проверка гипотезы о влиянии гормонов стресса (адреналина, кортизола) на температурные характеристики пептидаз, гидролизующих белковые компоненты пищи, также не нашла экспериментального подтверждения.

Поскольку чехонь по типу питания является планктофагом-факультативным ихтиофагом, возникло предположение о возможном влиянии состава пищи, в частности липидов, на температурные характеристики пептидаз. Известно, что для зелёных водорослей характерно содержание таких полиненасыщенных жирных кислот, как 18:3 n-3, 18:3 n-6 и 18:4 n-3, а у некоторых видов – 16:2 n-6, 16:3 n-3 и 16:4 n-3 (Сущик, 2008). Для представителей зоопланктона характерно наибольшее количество ненасыщенных ЖК с числом атомов углерода ≥ 20 (более 30%), особенно высокое содержание полиеновых жирных кислот группы 18:n и 22:n (Farcas, Herodek, 1961). В слизистой оболочке кишечника рыб Рыбинского водохранилища суммарное содержание липидов колеблется от 3.7 до 5%, а количество ненасыщенных ЖК в летний период у рыб разных видов колеблется от 40.3 до 71.2% от общей суммы ЖК (Кузьмина и др., 1984). Следовательно, высокое содержание в объектах питания чехони ненасыщенных ЖК могло способствовать поддержанию высокой пластичности мембран, а также напрямую влиять на активные центры ферментов. Действительно, несмотря на значительное снижение АП слизистой оболочки кишечника чехони в присутствии низких концентраций суспендированного висцерального жира, ферментативная активность при 0°C снижается менее чем на 50% по сравнению с таковой при 40°C. Поскольку материал, полученный ранее, был собран в августе, в период интенсивного питания чехони, а представленные данные получены при исследовании рыб, отловленных в июне, в начале активного питания рыб, можно предположить, что высокая активность пептидаз, выявленная нами ранее, может быть обусловлена наличием липидов в составе гомогенатов. При этом некоторую роль, по-видимому, могут играть и эффекты кооперативности в цепи пептидаз.

Заключение

Показано, что характер температурной зависимости АП слизистой оболочки кишечника, центрифугата и химуса у чехони различается незначительно, соответствуя классической колоколообразной форме. При этом температурный оптимум пептидаз находится в зоне 50°C, а относительная активность ферментов не превышает 19% от максимальной активности. Добавление химуса слабо влияет на форму кривых температурной зависимости ферментов. При этом относительная АП химуса при 0°C несколько выше по сравнению с таковой ферментов, функционирующих в составе гомогената и центрифугата, что ставит под сомнение высказанное ранее предположение о том, что более высокая скорость

протеолиза в зоне низких температур обусловлена эффектом кооперативного взаимодействия ферментов в цепи пептидаз. Установлено, что наличие гормонов в инкубате также слабо влияет на температурную зависимость активности пептидаз, в то время как наличие в инкубате суспендированного висцерального жира сохраняет более 50% АП в зоне низких температур. Высказано предположение, что высокое содержание в объектах питания чехони ненасыщенных ЖК могло способствовать поддержанию высокой пластичности мембран, а также напрямую влиять на активные центры ферментов, повышая АП слизи при низких температурах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузьмина В.В. Влияние температуры на уровень общей протеолитической активности пищеварительного тракта некоторых видов пресноводных костистых рыб // Вопросы ихтиологии. – 1990. – № 30. – Вып. 4. – С. 668-677.
2. Кузьмина В.В., Воронина У.В., Грачева Е.Л. Активность и температурные характеристики пептидаз слизи оболочки кишечника у чехони *Pelecuscultratus*(L.) // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2017. – № 4. – С. 40-47.
3. Кузьмина В.В., Помазанская Л.Ф., Забелинский С.А., Пустовой В.К. Особенности жирнокислотного состава слизи кишечника рыб в летний период // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1984. – Т. 20. – № 5. – С. 542-545.
4. Плисецкая Э.М. Гормональная регуляция углеводного обмена у низших позвоночных. – Л.: Наука, 1975. – 215 с.
5. Решетников Ю.С. (Ред.). Аннотированный каталог круглоротых и рыб континентальных вод России. – М.: Наука, 1998. – 220 с.
6. Сушик Н.Н. Роль незаменимых жирных кислот в трофометаболических взаимодействиях в пресноводных экосистемах (обзор) // Журнал общей биологии. – 2008. – Т. 69. – № 4. – С. 299-316.
7. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. – СПб: Гидрометеиздат, 1993. – 238 с.
8. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Physiol. – 1938. – Vol. 22. – P. 79-83.
9. Ásgeirsson B., Fox J.W., Bjarnason J.B. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua* // Eur. J. Biochem. – 1989 – Vol. 180. – P. 85-94.
10. Barton B.A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulation corticosteroids // Integ. Comp. Biol. – 2002. – Vol. 42. – P. 517-525.
11. Bezerra R.S., Santos J.F., Paiva P.M.G., Correia M.T.S., Coelho L.C.B.B., Vieira V.L.A., Carvalho L.B.Jr. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*) // J. Food Biochem. – 2001. – Vol. 25. – P. 199-210.
12. Farcaş T., Herodek S. Seasonal changes in the fatty acid composition of fresh water crustaceans // Ann. Boil. Tihany. – 1961. – Vol. 28. – P. 9-94.
13. Kishimura H., Tokuda Y., Klomklao S., Benjakul S., Ando S. Enzymatic characteristics of trypsin from pyloric caeca of spotted mackerel (*Scomber australasicus*) // J. Food Biochem. – 2006. – Vol. 30. – P. 466-477.
14. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Shalygin M.V., Kovalenko E.E. Role of peptidases of the enteral microbiota and preys in temperature adaptations of the digestive system in planktivorous and benthivorous fish // Fish Physiol. Biochem. – 2015. – Vol. 41. – No. 6. – P. 1359-1368.
15. 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. – Vol. 12. – No. 2. – P. 231-239.
16. Mommsen Th.P., Mathalakath M.V., Moon Th.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation // Fish Biol. Fish. – Vol. 199. – No. 9. – P. 211-268.
17. Pavlisko A., Rial A., Coppes Z. Characterization of trypsin purified from the pyloric caeca of the southwest Atlantic white croaker *Micropogonias furnieri* (Sciaenidae) // J. Food Biochem. – 1997. – Vol. 21. – P. 383-400.
18. Pavlisko A., Rial A., Coppes Z. Purification and characterization of a protease from the pyloric caeca of menhaden (*Brevoortia spp*) and mullet (*Mugil spp*) from the southwest Atlantic region // J. Food Biochem. – 1999. – Vol. 23. – P. 225-241.

19. Pavlisko A., Rial A., de Vecchi S., Coppes Z. Properties of pepsin and trypsin isolated from the digestive tract of *Paronassignata* "Palometa" // *J. Food Biochem.* – 1997. – Vol. 21. – P. 289-308.
20. Soengas J.L., Aldegunde M. Energy metabolism of fish brain // *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* – 2002. – Vol. 131. – P. 271-296.
21. Wendelaar Bonga S. E. The stress response in fish // *Physiol. Rev.* – 1997. – Vol. 77. – No. 3. – P. 591-625.

REFERENCES

1. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 1938, 22: 79-83.
2. Ásgeirsson B., Fox J.W., Bjarnason J.B. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *Eur. J. Biochem.* 1989, 180: 85-94.
3. Barton B.A. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulation corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.* 2002, 42: 517-525.
4. Bezerra R.S., Santos J.F., Paiva P.M.G., Correia M.T.S., Coelho L.C.B.B., Vieira V.L.A., Carvalho L.B.Jr. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *J. Food Biochem.* 2001, 25: 199-210.
5. Farcaş T., Herodek S. Seasonal changes in the fatty acid composition of fresh water crustaceans. *Ann. Boil. Tihany.* 1961, 28: 9-94.
6. Kishimura H., Tokuda Y., Klomklao S., Benjakul S., Ando S. Enzymatic characteristics of trypsin from pyloric caeca of spotted mackerel (*Scomber australasicus*). *J. Food Biochem.* 2006, 30: 466-477.
7. Kuz'mina V.V. [Effect of temperature on the level of total proteolytic activity of the digestive tract in some species of freshwater teleost fish]. *Voprosy ikhtologii - J. Ichthiol.* 1990, 30(4): 668-677.
8. Kuz'mina V.V. *Protsessy ekzotrofii u ryb. Organizatsiya. Regulyatsiya. Adaptatsii* (Processes of exotrophy in fish. Organisation. Regulation. Adaptations). Moscow: Polygraph Plus Publ., 2015, 260 p.
9. Kuz'mina V.V., Pomazanskaya L.F., Zabelinsky S.A., Pustovoy V.K. Peculiarities of the fatty acid composition of fish intestinal mucosa in the summer period. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 1984, 20(5): 542-545.
10. 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, 12(2): 231-239.
11. Kuz'mina V.V., Voronina V.V., Gracheva E.L. Activity and Temperature Characteristics of Peptidases of the Intestinal Mucosa in sabrefish *Pelecuscultratus* (L.). *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2017, 4: 40-47. (In Russian)
12. Mommsen Th.P., Mathilakath M.V., Moon Th.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Fish Biol. Fish.* 1999, 9: 211-268.
13. Pavlisko A., Rial A., Coppes Z. Characterization of trypsin purified from the pyloric caeca of the southwest Atlantic white croaker *Micropogonias furnieri* (Sciaenidae). *J. Food Biochem.* 1997, 21: 383-400.
14. Pavlisko A., Rial A., Coppes Z. Purification and characterization of a protease from the pyloric caeca of menhaden (*Brevoortia*) and mullet (*Mugil*) from the southwest Atlantic region. *J. Food Biochem.* 1999, 23: 225-241.
15. Pavlisko A., Rial A., de Vecchi S., Coppes Z. Properties of pepsin and trypsin isolated from the digestive tract of *Paronassignata* "Palometa". *J. Food Biochem.* 1997, 21: 289-308.
16. Plisetskaya E.M. *Gormonal'naya regulyatsiya uglevodnogo obmena u nizshikh pozvonochnykh* (Hormonal regulation of carbohydrate metabolism in lower vertebrates). Leningrad: Nauka Publ., 1975, 215 p. (In Russian)
17. Reshetnikov Yu.S. (Ed.) *Annotirovannyi katalog kruglorotykh i ryb kontinental'nykh vod Rossii* (Annotated catalog of the cyclostomes and fishes of the continental waters of Russia). Moscow: Nauka Publ., 1998, 220 p. (In Russian)
18. Soengas J.L., Aldegunde M. Energy metabolism of fish brain. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 2002, 131: 271-296.
19. Sushchik N.N. The role of essential fatty acids in trophometabolic interactions in freshwater ecosystems (review). *J. Obsh. Biol.* 2008, 69(4): 299-316.
20. 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 p.
21. Wendelaar Bonga S. E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 1997, 77(3): 591-625.

Influence of various factors on temperature characteristics of intestinal peptidases in sabrefish *Pelecus cultratus* (L.)

¹Kuz'mina V.V., ²Voronina U.V., ²Gracheva E.G.

¹*Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, 152742 Borok, Yaroslavl oblast;* ²*Demidov Yaroslavl State University, 150000 Yaroslavl, Russian Federation*

ABSTRACT. The purpose of the study is to study the effect of cooperativity, stress hormones (adrenaline, cortisol) and lipids on the temperature characteristics of peptidases that hydrolyze the protein components of food in sabrefish *Pelecus cultratus* (L.), fam. Cyprinidae. Fish were caught in the Volga Reach of the Rybinsk Reservoir in August 2018. After morphometric analysis, the digestive tract was removed, placed in an ice bath and cleaned from fat. The intestine was cut lengthwise, the contents were removed with a metal spatula and pincette. Using a soft plastic spatula, the intestinal mucosa was separated. The mucosa was thoroughly mixed and homogenates prepared using cooled Ringer's solution for cold-blooded animals (pH 7.4). The homogenates and the substrate were incubated at a temperature of 20 and 40 °C or in the temperature range of 0-70 °C for 30 minutes. Casein was used as a substrate to determine peptidase activity — the total activity of endo- and exopeptidases. The activity of peptidases (AP) was determined by the increase in tyrosine for 1 min of incubation in counting per 1 g of tissue, taking into account the background. It is shown that the shape of the curves of the temperature dependence of the AP of the intestinal mucosa, centrifugate and chyme differs slightly, corresponding to the classical bell-shaped form. At the same time, the temperature optimum of peptidases is at 50 °C, and the relative activity of enzymes does not exceed 19% of the maximum activity. Adding chyme has little effect on the temperature dependence of enzymes. The relative AP of chyme at 0 °C is slightly higher (23.2%) compared to that of enzymes functioning as part of the homogenate and centrifugate, which casts doubt on the previously expressed assumption that the higher rate of proteolysis in the low temperature zone is due to the effect of the interaction of individual enzymes in peptidase chain. It has been established that the presence of hormones in the incubate has little effect on the temperature dependence of peptidases, while the presence in the incubate of lipids (suspended visceral fat) retains more than 50% of AP in the zone of low temperatures. It has been suggested that the high content of unsaturated fatty acids in the food objects of the cactus could help maintain the high plasticity of cell membranes, and also directly affect the active centers of enzymes, increasing the mucosal AP at low temperatures

Keywords: sabrefish, intestine, mucosa, chyme, peptidases, adrenaline, cortisol, lipids, temperature characteristics

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2019, 3: 37-47

Поступило в редакцию: 05.08. 2019

Получено после доработки: 15.08.2019

Кузьмина Виктория Вадимовна, д.б.н., г.н.с., vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru;

Воронина Ульяна Владимировна, студ.;

Грачева Екатерина Леонидовна, ст. преп., 6652553@mail.ru