

## **РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА И ПРОДУКТИВНОСТИ**

УДК 597.554.3:612.015.35:591.132:577.15

### **АКТИВНОСТЬ И ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕПТИДАЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШЕЧНИКА У ЧЕХОНИ *Pelecus cultratus* (L.)**

<sup>1</sup>Кузьмина В.В., <sup>2</sup>Воронина У.В., <sup>2</sup>Грачева Е.Г.

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

Цель исследования – изучение температурных характеристик пептидаз, гидролизующих белковые компоненты пищи у чехони *Pelecus cultratus* (L.), сем. Cyprinidae (карповые). Рыбы выловлены в Волжском плесе Рыбинского водохранилища. Проводили морфометрический анализ тела, извлекали кишечник, помещали его на ледяную баню, освобождали от жира, разрезали вдоль, с помощью металлического шпателя и пинцета изымали содержимое, при этом кишка не промывалась. При помощи мягкого пластмассового шпателя отделяли слизистую оболочку кишечника от 4-х рыб, перемешивали и готовили гомогенаты с использованием охлажденного раствора Рингера для холоднокровных животных при pH 7.4. Гомогенаты и субстрат инкубировали в диапазоне температур 0-70°C в течение 30 мин. Для определения активности трипсиноподобных пептидаз (суммарная активность эндо- и экзопептидаз) (АТ) в качестве субстрата использовали казеин, для определения активности химотрипсиноподобных пептидаз (АХ) – гемоглобин, активность пептидаз определяли по приросту тирозина за 1 мин инкубации с учетом фона в расчёте на 1 г ткани. Кривые температурной зависимости АТ и АХ слизистой оболочки кишечника схожи и не соответствуют классической колоколообразной форме; в диапазоне 10-60°C относительная активность пептидаз близка к величине, соответствующей температурному оптимуму (60°C). При температуре активного питания рыб величина  $Q_{10}$  для АТ и АХ слизистой оболочки кишечника близка к 1, для АХ в зоне 0-10°C – 1.1. Значения  $E_{акт}$  для АТ слизистой оболочки кишечника в зоне низких температур (0-10°C) составляет 1.06, в зоне более высоких температур (10-60°C) – 0.09 ккал/моль, для АХ – 1.77 и 0.52 ккал/моль соответственно. Более низкие величины  $E_{акт}$ , в сравнении с данными, полученными при раздельном исследовании ферментов, обеспечивающих мембранное и полостное пищеварение, а также очищенных ферментов, свидетельствует о том, что переваривание белковых компонентов корма в реальных условиях требует меньших энергетических затрат. Поскольку при приготовлении гомогенатов сохранялись все ферменты, функционирующие в зоне щеточной каймы энтероцитов, высказано предположение, что более высокая скорость протеолиза в зоне низких температур обусловлена эффектами взаимодействия отдельных ферментов цепи пептидаз, а эффект положительной кооперативности в процессах пищеварения может играть важную роль у рыб и других животных.

*Ключевые слова: чехонь, слизистая оболочка кишечника, трипсиноподобные пептидазы, химотрипсиноподобные пептидазы, температурные характеристики*

*Проблемы биологии продуктивных животных, 2017, 4: 39-46*

#### **Введение**

Изучение влияния температуры на активность пептидаз слизистой желудка и кишечника у рыб разных видов, относящихся по типу питания к разным экологическим группам, позволило выявить ряд важных закономерностей. При использовании естественных субстратов были выявлены различия в кривых температурной зависимости активности желудочных

пептидаз щуки, налима, судака и окуня, обусловленные структурой субстрата, а также отсутствие таких различий в отношении ферментов слизистой оболочки кишечника (Уголев, Кузьмина, 1993). Особенно резко отличается форма кривой температурной зависимости желудочных пептидаз по гемоглобину. Несмотря на близкие значения температурного оптимума (50-60°C), относительная активность пептидаз по казеину и другим белковым субстратам при 0°C варьирует в пределах от 5 до 30%, по гемоглобину составляет около 70% от максимальной активности. Кривые температурной зависимости активности кишечных пептидаз у ихтиофагов, планкто- и бентофагов при использовании различных субстратов обнаруживают значительную однородность – относительная активность пептидаз по тем же субстратам при 0°C не превышает 20% от максимальной активности (Кузьмина, 1990).

Сопоставление кривых температурной зависимости активности  $\alpha$ -амилазы у рыб разных видов показало, что значения температурного оптимума составляют у «планкто- и бентофагов (каarp, карась, лещ, синец, плотва) 40°C, у типичных и факультативных ихтиофагов (налим, щука, судак, окунь, ёрш, чехонь) в большинстве случаев – 30°C, реже – 40°C. При 0°C активность  $\alpha$ -амилазы у бенто- и планктофагов составляет 10-20%, у ихтиофагов – 35-70% от максимальной активности. Описанные характеристики свидетельствуют о большей адаптированности ферментов ихтиофагов к низким температурам, что позволяет им питаться в зимний период.

Важно отметить, что у представителя сем. Cyprinidae – чехони, близкой в систематическом отношении к бенто- и планктофагам, но по типу питания являющейся ихтиофагом-факультативным планктофагом, форма кривой температурной зависимости активности  $\alpha$ -амилазы схожа с таковой у ихтиофагов, причём относительная активность при 0°C составляет 50% от максимальной активности (Кузьмина, Морозова, 1977; Уголев, Кузьмина, 1993). Поскольку чехонь отличается широким ареалом и обитает в бассейнах Каспийского, Чёрного, Азовского и Балтийского морей, включая Ладожское озеро, температура в котором редко превышает 12-14°C, можно предположить, что температурные характеристики других пищеварительных гидролаз, в частности пептидаз, у чехони также близки к таковым у ихтиофагов, а ферменты хорошо адаптированы к функционированию при низких температурах. Однако ранее характеристики пептидаз, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника у ихтиофагов-факультативных планктофагов, не исследовались.

Цель работы состояла в изучении температурных характеристик пептидаз, гидролизующих белковые компоненты пищи у чехони – ихтиофага-факультативного планктофага.

### Материал и методы

Работа проведена в лаб. экологии рыб Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН летом 2017 г. Объект исследования – чехонь *Pelecus cultratus* (L.), относящаяся к кл. Костные рыбы Osteichthyes, п/кл Лучеперые Actinopterygii, отр. Cypriniformes – карпообразные, сем. Cyprinidae – карповые (Решетников, 1998). Рыбы выловлены в Волжском плесе Рыбинского водохранилища. Рыб в течение 1.5 ч доставляли в лабораторию в контейнерах с водой. После доставки в лабораторию проводили морфометрический анализ тела, извлекали кишечник, помещали его на ледяную баню, освобождали от жира, разрезали вдоль, затем при помощи небольшого металлического шпателя и пинцета изымали содержимое; при этом кишка не промывалась. При помощи мягкого пластмассового шпателя отделяли слизистую оболочку кишечника у 4-х рыб, перемешивали, брали аликвоту и готовили гомогенаты с использованием охлаждённого раствора Рингера для холоднокровных животных. рН гомогената 7.4. В течение 10 дней было проведено 8 опытов.

Активность пептидаз (суммарная активность эндо- и экзопептидаз) слизистой оболочки кишечника, действующих преимущественно по типу трипсина, разрывающего связи, образуемые карбоксильными группами аргинина и лизина (АТ) или по типу активности химотрипсина, разрывающего связи, образуемые карбоксильными группами тирозина, триптофана и фенилаланина (АХ) определяли по приросту тирозина модифицированным методом Ансона

(Anson, 1938). Субстраты и гомогенаты (рН 7.4) инкубировали в течение 30 мин при постоянном перемешивании. 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 CuSO<sub>4</sub> и 0.75 мл реактива Фолина, предварительно разведенного в 3 раза. Для определения исходного содержания тирозина в пробах (фона) ТХУ добавляли к гомогенату перед добавлением субстрата. Другие операции были идентичными. Интенсивность окраски проб измерялась с помощью фотоколориметра КФК-2 при длине волны 670 нм через 20 мин после добавления реактива Фолина. Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учётом количества тирозина в исходном гомогенате, в расчете на 1 г сырой массы ткани, мкмоль/(г·мин).

Для определения АТ в качестве субстрата использовали 1%-ный раствор казеина, для определения АХ – 1%-ный раствор гемоглобина, приготовленные на растворе Рингера (рН 7.4) (Kuz'mina et al., 2015). Температурные коэффициенты Q<sub>10</sub> пептидаз определяли традиционным способом (кратность увеличения скорости реакции при увеличении температуры на 10°C), энергию активации ферментативной реакции (E<sub>акт</sub>) – по графику Аррениуса с использованием формулы:  $E_{акт} = 2.3 \times 1.987 \times T_2 T_1 (\lg V_2 - \lg V_1) / (T_2 - T_1)$ , где 2.3 – модуль перехода десятичного логарифма в натуральный, 1.987 – газовая постоянная, T – температура, °K (°K = °C + 273), V – скорость реакции.

### Результаты и обсуждение

*Активность трипсино- и химотрипсиноподобных пептидаз слизистой оболочки кишечника при температуре 20°C.* Выявлены достоверные различия в уровне АТ и АХ слизистой оболочки кишечника чехони – для АТ при стандартной для лета температуре (20°C) он составлял 8.12±0.20, а для АХ почти в 4 раза ниже – 1.92±0.14 мкмоль/(г·мин) (P<0.001)

*Температурная зависимость активности пептидаз.* Исследование температурной зависимости АТ и АХ слизистой оболочки кишечника чехони, несмотря на разный фоновый уровень ферментативной активности, выявило удивительное сходство в форме их кривых. При этом в обоих случаях отмечена очень высокая относительная активность исследованных пептидаз слизистой оболочки кишечника во всем диапазоне исследованных температур, при этом активность почти не изменялась в интервале 10-60°C (рис. 1).

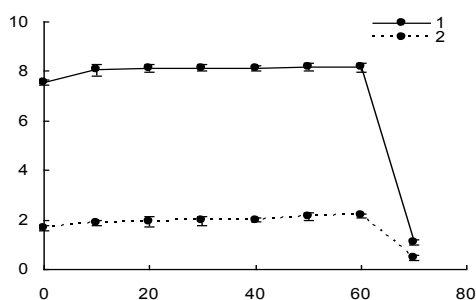


Рис. 1. Влияние температуры на активность трипсино-подобных (1) и химотрипсино-подобных (2) пептидаз слизистой оболочки кишечника чехони (n = 8). По оси абсцисс – температура, °C, по оси ординат – активность, мкмоль/(г·мин).

В диапазоне 0-60°C АТ изменяется от 7.56±0.13 до 8.16±0.19 мкмоль/(г·мин), АХ – от 1.67±0.10 до 2.17±0.07 мкмоль/(г·мин). Температурный оптимум АТ и АХ слизистой оболочки кишечника – 60°C, при этом относительная активность при 0°C в первом случае составляет 92.6%, во втором – 77% от максимальной активности

*Температурные коэффициенты и величины энергии активации пептидаз.* Расчёты показали, что в случае АТ и АХ слизистой оболочки кишечника значения коэффициента Q<sub>10</sub> в диапазоне температур жизнедеятельности рыб практически не изменяются. Величины коэф-

фициента  $Q_{10}$  для АТ во всем исследованном диапазоне температур равны 1, для АХ в диапазоне 10-40°C равны 1, в диапазоне 0-10°C – 1.1.

При определении величин энергии активации пептидаз слизистой оболочки кишечника был обнаружен излом на графике Аррениуса при 10°C (рис. 2), который, согласно современным представлениям, свидетельствует о наличии термоиндуцированных изменений в функционировании фермента.

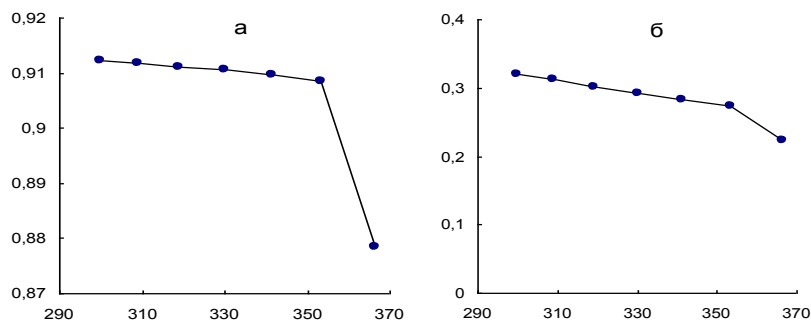


Рис. 2. График Аррениуса для казеинлитических (а) и гемоглобинлитических (б) пептидаз слизистой оболочки кишечника чехони. По оси абсцисс –  $1/T \times 10^5$ , где  $T$  – температура, °K; по оси ординат –  $\lg V$ , где  $V$  – скорость реакции, мкмоль/(с·мин).

При этом для зоны низких температур (0-10°C) характерны более высокие величины  $E_{\text{акт}}$  по сравнению с таковыми в зоне более высоких температур (10-60°C). Для АТ они составляют 1.06 и 0.09 ккал/моль, для АХ – 1.77 и 0.52 ккал/моль соответственно.

При обсуждении полученных данных следует отметить, что более высокая активность трипсиноподобных (казеинлитических) пептидаз по сравнению с химотрипсиноподобными (гемоглобинлитическими) пептидазами, хорошо согласуются с ранее полученными результатами (Natalia et al., 2004; Ушакова, Кузьмина, 2010; Kuz'mina et al., 2015). Это свидетельствует о том, что в большей степени гидролизуются связи, образуемые карбоксильной группой аргинина или лизина, чем связи, образуемые карбоксильной группой тирозина, триптофана и фенилаланина (Диксон, Уэбб, 1982). Однако результаты, касающиеся температурных характеристик пептидаз слизистой оболочки кишечника чехони, принципиально отличаются от данных, имеющих в мировой литературе – кривая температурной зависимости активности ферментов не соответствует классической колоколообразной форме. При этом относительная активность пептидаз слизистой оболочки кишечника при 0°C в случае АТ составляет 92.6%, в случае АХ – 77% от максимальной активности. Эти значения близки к таковым температурных характеристик желудочных пептидаз (Кузьмина, 1990; Уголев, Кузьмина, 1993).

Ранее подчеркивалось, 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), 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 20% от максимальной активности. Однако положение температурного оптимума (60°C) пептидаз слизистой оболочки кишечника у чехони совпадает с таковым (50-65°C) у рыб разных таксономических групп из водоемов бореальной (Кузьмина, 1990; Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina et al., 2015) и тропической (Pavlisko et al., 1997a,b, 1999; Ásgeirsson et al., 1989; Bezerra et al., 2001; Kishimura et al., 2006) зон.

Результаты, касающиеся величин  $Q_{10}$  и  $E_{\text{акт}}$  АТ и АХ слизистой оболочки кишечника чехони, также значительно отличаются от данных других исследователей. Так, значения  $Q_{10}$  лишь в одном случае незначительно превышают 1, в то время как для ферментативных реакций характерны большие значения этого показателя. Величины  $E_{\text{акт}}$  исследованных пептидаз слизистой оболочки кишечника чехони во всем диапазоне температур значительно ниже, чем у других видов рыб. Действительно, величина  $E_{\text{акт}}$  АТ слизистой оболочки кишечника у чехо-

ни даже в зоне 0-10°C незначительно превышает 1.0,  $E_{\text{акт}} \text{ AX}$  равна 1.77 ккал/моль. В зоне температур активного питания рыб эти значения еще ниже – 0.09 и 0.52 ккал/моль.

В то же время  $E_{\text{акт}}$  трипсиноподобных пептидаз слизистой оболочки кишечника у догады *Sparus aurata*, окуня-клювача *Sebastes mentella* и тюрбо *Scophthalmus maximus* при температурах 0-30°C составляет 12.1-13.0 ккал/моль (Munilla-Morán, Saborido-Rey, 1996); у щуки *Esox lucius* значения  $E_{\text{акт}}$  этих пептидаз в зоне 0-20°C – 4.0 ккал/моль, в зоне более высоких температур – 11.3, у плотвы и синца – около 12.5 ккал/моль во всем диапазоне температур (Шалыгин, 2013).  $E_{\text{акт}}$  химотрипсина у химеры *Siganus canaliculatus* в диапазоне температур 20-30°C равна 8.5 ккал/моль (Sabarathy, Тео, 1995). Следовательно, переваривание белковых компонентов корма у чехони в широком диапазоне температур требует меньших энергетических затрат, чем у всех исследованных ранее видов рыб.

Поскольку по типу питания чехонь является ихтиофагом-факультативным планктофагом, причем форма кривой температурной зависимости  $\alpha$ -амилазы схожа с таковой у ихтиофагов (Кузьмина, Морозова, 1977; Уголев, Кузьмина, 1993), изначально предполагалась близость температурной зависимости активности кишечных пептидаз к таковой у желудочных пептидаз ихтиофагов. Вместе с тем значения относительной активности гемоглоблинитических пептидаз слизистой оболочки желудка ихтиофагов не превышают 70%, в то время как относительная активность гемоглоблинитических и, особенно, казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника у чехони значительно выше.

Этот парадокс может быть связан с тем, что ранее исследовались очищенные ферменты или ферменты слизистой, обеспечивающие процессы мембранного пищеварения. В последнем случае с щеточной каймы энтероцитов при помощи раствора Рингера смывались ферменты пристеночного слоя слизи, часть ферментов, реализующих полостное пищеварение, и энтеральная микробиота. Следовательно, уменьшалась доля ферментов, осуществляющих начальные этапы гидролиза белков и пептидов. Поскольку в данной работе содержимое кишечника удаляли, но кишка не промывалась, в гомогенатах сохранялись все ферменты, функционирующие в зоне пристеночного слоя слизи и щеточной каймы энтероцитов, в том числе полостные и внеклеточные пептидазы, синтезируемые энтеральной микробиотой. Важно отметить, что сопоставление температурной (Шалыгин, 2013; Kuz'mina et al., 2015) и pH - зависимости (Kuz'mina et al., 2017) активности пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты позволило выявить компенсаторную роль последней.

В такой ситуации повышенная суммарная протеолитическая активность в зоне низких температур может быть обусловлена большей активностью эндопептидаз, обеспечивающих начальные этапы гидролиза белков и пептидов и лучшими условиями для взаимодействия отдельных ферментов цепи пептидаз. Полученные результаты свидетельствуют о значительной адаптированности пептидаз чехони к питанию при низких температурах, что способствует существованию этого вида в северных водоемах. Кроме того, эти результаты позволяют высказать предположение о важной роли положительной кооперативности в процессах пищеварения, что в определенной степени позволяет пересмотреть данные по влиянию температуры на эффективность гидролиза субстратов белковой природы и, возможно, других нутриентов, у рыб и других пойкилотермных животных. Подтверждение полученных результатов при исследовании представителей других систематических групп позволит расширить представления об адаптационных возможностях пищеварительной системы у пойкилотермных животных.

Таким образом, активность трипсиноподобных пептидаз слизистой оболочки кишечника у чехони выше активности химотрипсиноподобных пептидаз. Положение температурного оптимума этих пептидаз соответствует 60°C, при этом кривая температурной зависимости активности ферментов не соответствует классической колоколообразной форме – в зоне 0-10°C относительная активность трипсиноподобных пептидаз слизистой оболочки кишечника составляет 92.6%, химотрипсиноподобных пептидаз – 77% от максимальной активности. При температуре активного питания рыб величина  $Q_{10}$  для АТ и АХ слизистой оболочки кишечника, как правило, равна 1, исключение –  $Q_{10}$  для АХ в зоне 0-10°C (1.1).

Значения  $E_{\text{акт}}$  для АТ слизистой оболочки кишечника в зоне низких температур (0-10°C) составляет 1.06, в зоне более высоких температур (10-60°C) – 0.09 ккал/моль, для АХ – 1.77 и 0.52 ккал/моль соответственно. Более низкие величины  $E_{\text{акт}}$ , в сравнении с данными, полученными при раздельном исследовании ферментов, обеспечивающих мембранное и полостное пищеварение, а также очищенных ферментов, свидетельствует о том, что переваривание белковых компонентов корма в реальных условиях требует меньших энергетических затрат. Поскольку при приготовлении гомогенатов сохранялись все ферменты, функционирующие в зоне щеточной каймы энтероцитов, можно предположить, что более высокая суммарная скорость протеолиза в зоне низких температур обусловлена эффектами взаимодействия отдельных ферментов в цепи пептидаз, а эффект положительной кооперативности в процессах пищеварения может играть важную роль у рыб и других животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Т. 1. – М.: Мир, 1982. – 392 с.
2. 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.
3. Кузьмина В.В. Процессы экзотрофии у рыб. Организация. Регуляция. Адаптации. – М.: Полиграф-Плюс, 2015. – 260 с.
4. Кузьмина В.В. Морозова Е.Н. Влияние температуры на активность  $\alpha$ -амилазы у пресноводных костистых рыб // Вопросы ихтиологии. – 1977. – Т. 17. – Вып. 5(106) – С. 922-929.
5. Решетников Ю.С. (Ред.) Аннотированный каталог круглоротых и рыб континентальных вод России. – М.: Наука, 1998. – 220 с.
6. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. – СПб: Гидрометеоздат., 1993. – 238 с.
7. Ушакова Н.В., Кузьмина В.В. Активность протеиназ у рыб разных экологических групп и их потенциальных объектов питания // Вопросы ихтиологии. – 2010. – Т. 50. – № 4. – С. 554-560.
8. Шалыгин М. В. Роль протеиназ объектов питания и энтеральной микробиоты в температурных адаптациях пищеварительной системы рыб разных экологических групп: автореф. дисс. ... к б.н. – Борок, ИБВВ РАН, 2013. – 22 с.
9. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Physiol. – 1938. – Vol. 22. – P. 79-83.
10. 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.
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. 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.
13. 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.
14. Kuz'mina V.V., Zolotareva G.V., Sheptitskiy V.A. Proteolytic activity in some freshwater animals and associated microbiota in a wide pH range // Fish Physiol. Biochem. 2017. V. 43. Issue 2. P. 373-383. DOI:10.1007/s10695-016-0293-4.
15. Munilla-Moran R., Sabarido-Rey F. Digestive enzymes in marine species. 1. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus auratus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) // Compar. Biochem. Physiol. – 1996. – Vol. 113B. – No. 2. – P. 395-402.
16. Natalia Y., Hashim R., Ali A., Chong A. Characterization of digestive enzymes in acarnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae) // Aquaculture. – 2004. – Vol. 233. – P. 305-320.
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. – 1997a. – 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 *Parona signata* “Palometa” // *J. Food Biochem.* – 1997b. – Vol. 21. – P. 289-308.
20. Sabapathy U., Teo L.-H. Some properties of the intestinal proteases of the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* (Park) // *Fish Physiol. Biochem.* – 1995. – Vol. 14. – P. 215-221.

## 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. 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.
4. Dikson M., Uebbe E. *Fermenty. T. 1.* (Enzymes. Vol. 1). Moscow: Mir Publ., 1982, 392 p. (In Russian).
5. 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.
6. 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 - Problems of Ichthyology.* 1990, 30(4): 668-677.
7. Kuz'mina V.V. *Protsessi ekzotrofii u ryb. Organizatsiya. Regulyatsiya. Adaptatsii* (Processes of exotrophy in fish. Organisation. Regulation. Adaptations). Moscow: Polygraph Plus Publ., 2015, 260 p.
8. Kuz'mina V.V. Morozova E.N. [Influence of temperature on the activity of  $\alpha$ -amylase in freshwater teleosts]. *Voprosy ikhtologii - Problems of Ichthyology.* 1977, 17(5): 922-929.
9. 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, 41(6): 1359-1368.
10. Kuz'mina V.V., Zolotareva G.V., Sheptitskiy V.A. Proteolytic activity in some freshwater animals and associated microbiota in a wide pH range. *Fish Physiol. Biochem.* 2017, 43(2): P. 373-383. DOI:10.1007/s10695-016-0293-4.
11. Munilla-Moran R., Sabarido-Rey F. Digestive enzymes in marine species. 1. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus auratus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Compar. Biochem. Physiol.* 1996, 113B(2): 395-402.
12. Natalia Y., Hashim R., Ali A., Chong A. Characterization of digestive enzymes in acarnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture.* 2004, 233: 305-320.
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 spp*) and mullet (*Mugil spp*) 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 *Parona signata* “Palometa”. *J. Food Biochem.* 1997, 21: 289-308.
16. 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.
17. Sabapathy U., Teo L.-H. Some properties of the intestinal proteases of the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* (Park). *Fish Physiol. Biochem.* 1995, 14(3): 215-221.
18. Shalygin M.V. *Rol' proteinaz ob'ektov pitaniya i enteral'noi mikrobioty v temperaturnykh adaptatsiyakh pishchevaritel'noi sistemy ryb raznykh ekologicheskikh grupp* (Role of proteinases of food objects and enteric microbiota in temperature adaptations of the digestive system of fish of different ecological groups). Extended Abstract of Diss. Cand. Sci. Biol., Borok, 2013, 22 p.
19. 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.
20. Ushakova N.V., Kuz'mina V.V. Proteinase activity in fish of different ecological groups and their potential food objects. *J. Ichthyol.* 2010, 50(4): 554-560.

**Activity and temperature characteristics of intestinal mucosa peptidases  
in sabrefish *Pelecus cultratus* (L.)**

<sup>1</sup>Kuz'mina V.V., <sup>2</sup>Voronina U.V., <sup>2</sup>Gracheva E.G.

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

**ABSTRACT.** The aim of the study was to investigate the temperature characteristics of peptidases hydrolyzing the protein components of food in sabrefish *Pelecus cultratus* (L.), family of Cyprinidae). Fish are caught in the Volga ridge of the Rybinsk Reservoir. Morphometric analysis of the body was carried out, the intestine was removed, placed on an ice bath, intestinal fat was removed, it was cut along and the contents were removed with tweezers and the bowel was not washed. The intestinal mucosa from 4 fish was mixed, homogenates were prepared using a cooled Ringer's solution for cold-blooded animals at pH 7.4. Homogenates and substrate were incubated in the temperature range of 0-70 ° C for 30 min. Casein was used as a substrate to determine the activity of trypsin-like peptidases (AT), hemoglobin was used to determine activity of chymotrypsin-like peptidases (ACh), pH 7.4. The activity of peptidases of the intestinal mucosa was determined by the increment of tyrosine per 1 minute of incubation, taking into account the background in terms of 1 g of tissue. The value of AT of the intestinal mucosa at a temperature of 20°C is  $8.12 \pm 0.20$ , that of ACh is  $1.92 \pm 0.14 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ . The curves of the temperature dependence of AT and ACh of the intestinal mucosa are similar and do not correspond to the classical bell-shaped form; in the range of 10-60°C, the level of relative activity of peptidases is close to the value of the temperature optimum (60°C). At the temperature of active feeding of fish, the  $Q_{10}$  values for AT and ACh of the intestinal mucosa are close to 1, for ACh in the zone 0-10°C it is 1.1. The  $E_{\text{act}}$  value for AT in the low temperature zone (0-10°C) is 1.06 kcal/mol, in the zone of higher temperatures (10-60°C) - 0.09, for ACh - 1.77 and 0.52 kcal/mol, respectively. The lower values of  $E_{\text{act}}$ , in comparison with the data of other researchers, can be due to the fact that the digestion of the protein components of the food in sabrefish in a wide range of temperatures requires less energy. On the other hand, since in the present work, in the preparation of homogenates, all the enzymes that function in the area of the brush border of the enterocytes were retained, the higher total proteolysis rate probably was due to the effects of interaction of individual enzymes in the peptidase system. Such effect of positive cooperativity in digestive processes can play an important role in fish and other poikilothermic animals.

*Keywords: sabrefish, intestinal mucosa, trypsin-like peptidases, chymotrypsin-like peptidases, temperature characteristics*

**Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2017, 4: 39-46**

*Поступило в редакцию: 26.08.2017*

*Получено после доработки: 05.10.2017*

**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