

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ТЕМПЕРАТУРНЫЕ  
ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЛИКОЗИДАЗ КИШЕЧНИКА У ЧЕХОНИ *Pelecus cultratus* (L.)**

<sup>1</sup>Кузьмина В.В., <sup>2</sup>Воеводина И.С., <sup>2</sup>Грачева Е.Л.

<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 *in vitro* температурных характеристик активности гликозидаз, гидролизующих углеводные компоненты пищи у чехони *Pelecus cultratus* (L.), а также влияние на них гормонов стресса (адреналин, кортизол) и висцерального жира. Рыбы были выловлены в Волжском плесе Рыбинского водохранилища летом 2018 и 2019 г.г. После морфометрического анализа извлекали пищеварительный тракт, помещали его на ледяную баню и освобождали от жира. Кишечник разрезали вдоль, с помощью металлического шпателя и пинцета изымали содержимое. У каждой рыбы при помощи мягкого пластмассового шпателя отделяли слизистую оболочку кишечника. Слизистую тщательно перемешивали и готовили гомогенаты с использованием охлажденного раствора Рингера для холоднокровных животных (рН 7.4). Гомогенаты и субстрат инкубировали при температуре 20°C или в диапазоне температур 0-70°C в течение 30 мин. Для определения активности гликозидаз (суммарная активность эндо- и экзогидролаз) в качестве субстрата использовали растворимый крахмал. Общую амилолитическую активность (ОАА) определяли по приросту гексоз за 1 мин инкубации с учетом фона в расчёте на 1 г ткани. Показано, что форма кривых температурной зависимости ОАА слизистой оболочки кишечника и химуса различается незначительно, соответствуя классической колоколообразной форме. При этом температурный максимум активности гликозидаз находится при 50°C, а относительная активность ферментов не превышает 13% от максимальной активности. Форма кривой температурной зависимости ОАА центрифугата слизистой отличается от таковой гомогената слизистой оболочки кишечника меньшей величиной максимальной активности (20-30°C). Установлено, что наличие гормонов стресса и висцерального жира в инкубате слабо влияет на температурную зависимость ОАА, но значительно снижает уровень ОАА практически во всем диапазоне исследованных температур.

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

*Проблемы биологии продуктивных животных, 2020, 3: 55-63*

### **Введение**

Изучение влияния температуры на активность ферментов пищеварительного тракта у рыб разных видов началось в первой половине XX в., когда были выявлены существенные различия в термостабильности трипсина у рыб из водоемов, значительно различающихся по температурному режиму (Коржуев, 1936). Позднее были показаны различия в форме кривых температурной зависимости активности щеточнокаемных дипептидаз и мальтазы у радужной форели и бычка-кругляка. У первого вида, обитающего в Ленинградской обл., относительная активность ферментов в зоне низких температур была выше, чем у бычка-кругляка, обитающего в Черном море. Кроме того, температурный оптимум активности мальтазы у первого вида находился в зоне 20-40°C, у второго – при 50°C. Эти результаты позволили предположить наличие адаптаций мембранных ферментов к температуре среды обитания рыб (Егорова и др., 1974). Поскольку среда обитания исследованных видов рыб отличалась не только температурой, но солевым составом, было

проведено два цикла исследований на пресноводных и морских рыбах, позволивших выявить видовые различия температурных характеристик разных ферментов у тех и других (Уголев, Кузьмина, 1993; Gelman et al., 2008). Подробное изучение температурных характеристик гликозидаз и пептидаз у рыб из одного водоёма, но относящихся по типу питания к разным экологическим группам, позволило установить, что адаптивными свойствами обладают ферменты, находящиеся в начале ферментативной цепи. Это  $\alpha$ -амилаза в цепи гликозидаз и пепсин в цепи пептидаз (Кузьмина, Морозова, 1977; Кузьмина, 1990; Уголев, Кузьмина, 1993).

Сопоставление кривых температурной зависимости активности  $\alpha$ -амилазы у рыб разных видов показало, что температурный оптимум активности у планкто- и бентофагов (синец, карп, карась, лещ, плотва) наблюдается при 40°C, у типичных и факультативных ихтиофагов (налим, щука, судак, окунь, ёрш, чехонь) в большинстве случаев – при 30°C, реже – при 40°C. При 0°C относительная активность  $\alpha$ -амилазы у планкто- и бентофагов находится в зоне 10-20%, у ихтиофагов – в зоне 50-70% от максимальной активности. Эти характеристики  $\alpha$ -амилазы свидетельствуют о большей адаптированности к низким температурам ферментов ихтиофагов по сравнению с одноименными ферментами планкто- и бентофагов, что позволяет им питаться в зимний период. При этом у чехони, близкой в систематическом отношении к другим исследованным планкто- бентофагам (сем. Cyprinidae), но по типу питания являющейся планктофагом-факультативным ихтиофагом, форма кривой температурной зависимости активности  $\alpha$ -амилазы близка к таковой у ихтиофагов, причём относительная активность при 0°C составляет 50% от максимальной активности (Кузьмина, Морозова, 1977; Уголев, Кузьмина, 1993). Ранее характеристики гликозидаз, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника и химуса у планктофагов-факультативных ихтиофагов, не исследовались. Также нет сведений о влиянии гормонов стресса и биохимического состава пищи, в частности липидов, на температурные характеристики гликозидаз.

Цель работы состояла в изучении *in vitro* температурных характеристик активности кишечных гликозидаз, гидролизующих углеводные компоненты пищи у планктофага-факультативного ихтиофага чехони, а также влияния на них гормонов стресса и висцерального жира.

### Материал и методы

Работа проведена в лаб. экологии рыб Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН в течение 2018-2020 г.г. Объект исследования – чехонь *Pelecus cultratus* (L.), сем. карповые Cyprinidae (Решетников, 1998). Рыбы, выловленные летом в Волжском плёсе Рыбинского водохранилища, в течение 1.5 ч в контейнерах с водой доставлялись в лабораторию. После морфометрического анализа, у 5 экз. рыб извлекали кишечник, помещали его на ледяную баню, освобождали от жира, разрезали вдоль, затем индивидуально при помощи небольшого металлического шпателя и пинцета изымали содержимое. При помощи мягкого пластмассового шпателя отделяли слизистую оболочку кишечника, перемешивали, брали аликвоту и готовили гомогенаты с использованием охлаждённого раствора Рингера для холоднокровных животных (109 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 1.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.84 mM NaHCO<sub>3</sub>) в разведении 1:99 (pH 7.4). В опытах по влиянию на активность гликозидаз температуры в диапазоне 0-70 °C использовали суммарные пробы от 5 экз. рыб (Егорова и др., 1974). В качестве субстрата использовали 1%-ый растворимый крахмал (pH 7.4). Гомогенаты и субстрат инкубировали в течение 30 мин при постоянном перемешивании. 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 случае адреналина составляла 5 мкг/мл, кортизола – 0.02 мкг/мл. В опытах по изучению влияния липидов (суспендированный висцеральный жир чехони) на активность пептидаз схема опыта была такой же. Начальная концентрация липидов в этих опытах составляла 0.5%. Активность гликозидаз (суммарная активность  $\alpha$ -амилазы,  $\gamma$ -амилазы и ферментов группы мальтаз) слизистой оболочки кишечника определяли в 4-х повторностях по приросту гексоз методом Уголева и Иезуитовой (1969). Интенсивность окраски проб измеряли с помощью

фотоколориметра КФК-2 при длине волны 670 нм. Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учётом количества гексоз в исходном гомогенате, в расчете на 1 г сырой массы ткани, мкмоль/(г·мин).

### Результаты и обсуждение

*Активность гликозидаз химуса и слизистой оболочки кишечника чехони при стандартной температуре (20°C).* В опытах 2018 г. уровень общей амилолитической активности (ОАА) химуса при стандартной температуре составлял  $3.68 \pm 0.06$ , слизистой оболочки кишечника –  $2.72 \pm 0.03$  мкмоль/(г·мин). Различия между уровнем ОАА химуса и слизистой оболочки кишечника статистически существенны ( $P < 0.05$  по *t*-критерию). В опытах 2019 г. уровень ОАА слизистой оболочки кишечника при стандартной температуре составлял  $4.67 \pm 0.13$ , химуса –  $3.06 \pm 0.36$  мкмоль/(г·мин).

*Температурная зависимость активности гликозидаз химуса и слизистой оболочки кишечника чехони.* Исследование температурной зависимости ОАА гомогената слизистой оболочки кишечника и химуса у чехони, несмотря на больший уровень активности последнего во всем диапазоне исследованных температур, выявило значительное сходство в форме кривых температурной зависимости (рис. 1).

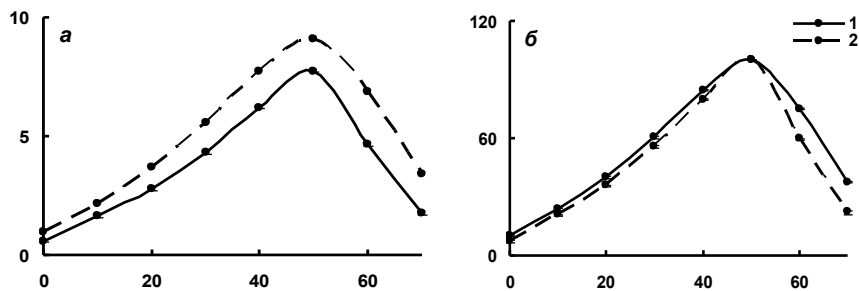


Рис. 1. Влияние температуры на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника (1) и химуса (2) чехони. Обозначения: здесь и далее по оси абсцисс – температура, °С, по оси ординат для а – активность гликозидаз, мкмоль/(г·мин), для б – относительная активность, % максимума, принятого за 100.

При этом различия в уровне ферментативной активности с ростом температуры уменьшаются. Если при 0°C значения ОАА химуса выше таковых слизистой оболочки в 1.7 раза, то в зоне температурного оптимума (50°C) – лишь в 1.2 раза. Значения относительной активности ОАА в зоне 0-50°C минимальны. При 0°C значения относительной активности ОАА химуса составляли 5.3%, слизистой оболочки – 12.3% от максимальной активности.

*Температурная зависимость активности гликозидаз гомогената и центрифугата слизистой оболочки кишечника чехони.* Исследование температурной зависимости ОАА гомогената и центрифугата слизистой оболочки кишечника чехони выявило значительные различия как по уровню ферментативной активности, так и по форме кривых температурной зависимости (рис. 2).

Прежде всего, важно отметить принципиальное сходство кривых температурной зависимости ОАА слизистой оболочки кишечника в этом и в предыдущем опыте. Максимальная ОАА гомогената слизистой оболочки кишечника чехони отмечена при 50 °С. Однако при исследовании центрифугата максимальная ОАА выявлена в зоне 20-30 °С. При этом ОАА слизистой оболочки кишечника была существенно ( $P < 0.01$  –  $P < 0.001$ ) выше по сравнению с таковым центрифугата в диапазоне температур 0-60°C, а максимальный уровень ОАА слизистой оболочки кишечника превышал таковой центрифугата в 4.3 раза:  $6.32 \pm 0.23$  и  $1.46 \pm 0.17$  мкмоль/(г·мин) соответственно.

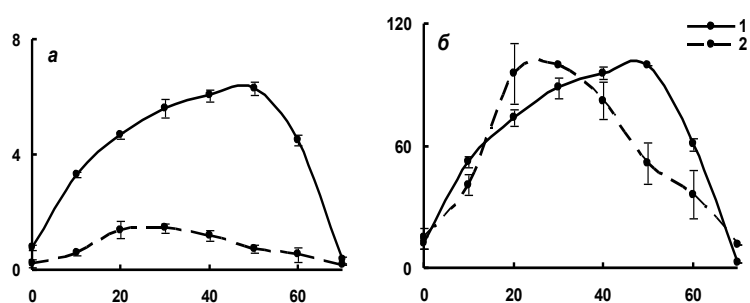


Рис. 2. Влияние температуры на активность гликозидаз гомогената (1) и центрифугата (2) слизистой оболочки кишечника чехони

Несмотря на то, что форма кривых температурной зависимости различалась кардинально, величины относительной активности обоих препаратов при 0°C различались незначительно – 7.5 и 15.1% от максимальной активности соответственно.

*Влияние гормонов стресса на температурную зависимость активности гликозидаз слизистой оболочки кишечника чехони.* Прежде всего, важно отметить, что используемые нами дозы соответствуют дозам гормонов, значительно снижающих ОАА при 20°C. Несмотря на различия в используемых дозах в 250 раз (5 мкг/мл в случае адреналина и 0.02 мкг/мл в случае кортизола), на фоне значительного снижения уровня ОАА форма кривой характер температурной зависимости ОАА гомогената слизистой оболочки кишечника чехони под влиянием гормонов изменяется незначительно (рис. 3).

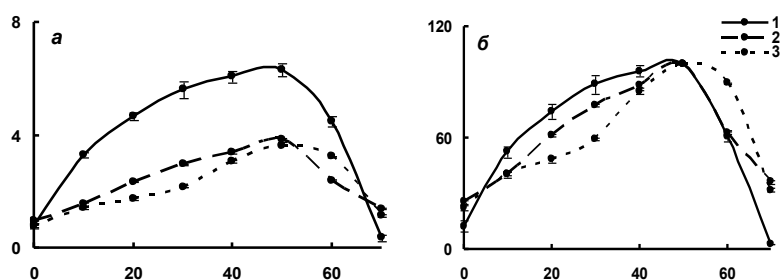


Рис. 3. Влияние адреналина и кортизола на активность гликозидаз, функционирующих в составе гомогената слизистой оболочки кишечника чехони. 1 – контроль, 2 – адреналин, 3 – кортизол.

В контроле максимальная активность гликозидаз равна  $6.32 \pm 0.23$  мкмоль/(г·мин), а температурный оптимум наблюдается при 50°C. В присутствии гормонов положение температурного оптимума не изменяется, в то время как ферментативная активность снижается. В присутствии адреналина максимальная активность гликозидаз составляет  $3.82 \pm 0.06$  мкмоль/(г·мин), а относительная активность при 0°C равна 25.4% от максимальной активности. В присутствии кортизола наибольшая активность гликозидаз составляет  $3.62 \pm 0.03$  мкмоль/(г·мин), а относительная активность при 0°C – 22.1% от максимальной активности, что выше таковой гомогената – лишь 12.2% от максимальной активности. Относительная активность ферментов при 70°C также выше таковой гомогената. Однако в отличие от адреналина, кортизол в большей степени снижает ОАА в зоне 20-30°C и увеличивает при 60°C.

*Влияние липидов на температурную зависимость активности гликозидаз слизистой оболочки кишечника и химуса у чехони.* Активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у интактных особей чехони составляла  $0.77 \pm 0.09$  и  $6.32 \pm 0.03$  мкмоль/(г·мин), химуса –  $0.54 \pm 0.04$  и

$10.13 \pm 0.07$  мкмоль/(г·мин) при 0 и 50 °С соответственно. Величины относительной активности обоих препаратов при 0°С различаются незначительно – 12.3 и 5.3% от максимальной активности соответственно. При исследовании влияния суспендированного висцерального жира на ОАА слизистой оболочки кишечника чехони и химуса было установлено значительное снижение ферментативной активности в диапазоне 10-70 °С (рис. 4).

В присутствии висцерального жира максимальные значения ОАА в слизистой оболочки кишечника и в химусе снижаются в 2.5 раза по сравнению с контролем: до  $3.05 \pm 0.03$  мкмоль/(г·мин) и  $3.62 \pm 0.02$  мкмоль/(г·мин) соответственно. При этом величины относительной активности обоих препаратов при 0°С увеличиваются по сравнению с контролем, особенно в случае химуса – 14.8 и 24.9 % от максимальной активности соответственно.

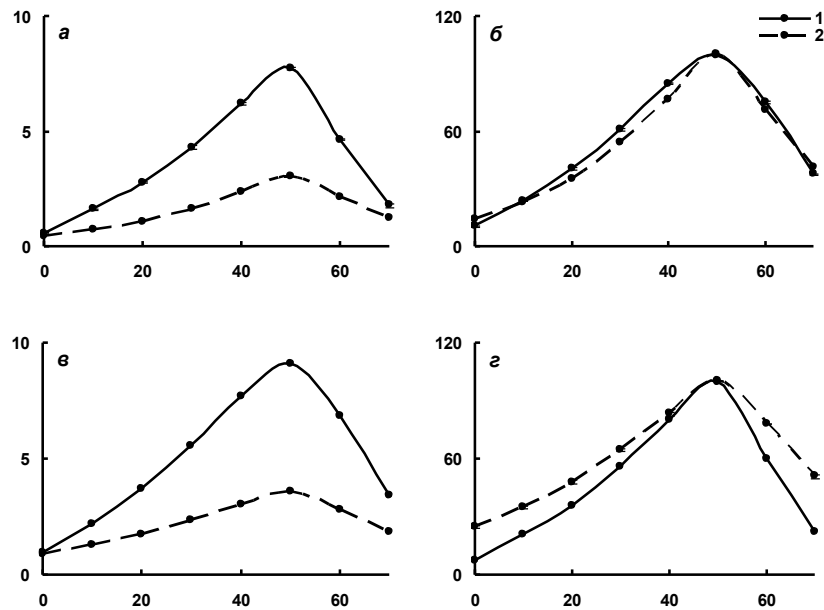


Рис. 4. Влияние суспендированного висцерального жира на активность гликозидаз, функционирующих в составе гомогената (а, б) слизистой оболочки кишечника и химуса (в, г) чехони. 1 – контроль, 2 – суспендированный висцеральный жир. На а и в – активность гликозидаз, мкмоль/(г·мин), на б и г – относительная активность, % от максимума, принятого за 100.

Следует отметить, что у чехони, относящейся к сем. карповых *Cyprinidae*, а типу питания – к группе планктофагов-факультативных ихтиофагов, кривая температурной зависимости  $\alpha$ -амилазы близка к таковой у хищных рыб. Поскольку  $\alpha$ -амилаза реализует начальные этапы гидролиза полисахаридов в полости кишечника, а ферменты группы мальтаз и  $\gamma$ -амилаза завершают его на мембранах энтероцитов, важно было исследовать температурную зависимость всего процесса гидролиза полисахаридов. Если в первом случае активность панкреатической по происхождению  $\alpha$ -амилазы определяли по убыли субстрата, то во втором – по приросту гексоз, главным образом глюкозы. Логичным было ожидать, что уровень ОАА в слизистой оболочке кишечника будет выше, чем в химусе, так как на структурах щеточной каймы энтероцитов присутствуют все ферменты цепи гликозидаз. Более высокий уровень ОАА в химусе практически во всем диапазоне температур позволяет предположить участие в гидролизе олигосахаридов ферментов десквамированных энтероцитов, энтеральной микробиоты и, возможно, объектов питания чехони (Уголев, Кузьмина, 1993).

Вместе с тем, кривая температурной зависимости ОАА отличается от таковой  $\alpha$ -амилазы более высоким значением температурного оптимума (не 30-40, а 50°С) и более низким уровнем относительной активности в зоне низких температур. Действительно, относительная активность  $\alpha$ -

амилазы при 0°C составляет 50%, ОАА – не превышает 15% от максимальной активности (Кузьмина, Морозова, 1977; Уголев, Кузьмина, 1993). Характеристики ферментов группы мальтаз слизистой оболочки кишечника также отличаются от таковых ОАА – величина температурного оптимума у большинства видов рыб из этого же водоема (Рыбинское водохранилище) составляет 60°C, а относительная активность при температуре 0°C у бентофагов близка к 30%, у ихтиофагов – к 40% от максимальной активности (Уголев, Кузьмина, 1993). Сопоставление этих данных позволяет понять промежуточную величину температурного оптимума всего процесса гидролиза пилисахаридов. Однако вопрос, касающийся исключительно низкого уровня ОАА в зоне низких температур остается открытым, так как в обеих сериях опытов использовался один и тот же субстрат. Можно предположить, что гомогенизация нарушает последовательность действия различных гидролаз. В свою очередь, низкая величина температурного оптимума ОАА центрифугата близка таковой  $\alpha$ -амилазы, что свидетельствует о меньшей термостабильности ферментов, находящихся в растворе по сравнению ферментами, функционирующими в составе гомогената. По всей вероятности, завершению процесса деполимеризации олигосахаридов в зоне низких температур препятствует отсутствие ферментов группы мальтаз и  $\gamma$ -амилазы.

Прежде чем обсуждать влияние гормонов стресса на температурную зависимость ОАА чехони, важно отметить, что они оказывают значительное влияние на различные системы организма рыб (Wendelaar, Bonga, 1997; Momsen et al., 1999; Barton, 2002; Conte, 2004; Braithwaite, Ebbesson, 2014; Serre et al., 2014; Herrera et al., 2019). При этом исследованные нами гормоны, особенно адреналин, слабо влияют на характер температурной зависимости ОАА, причем положение температурного оптимума ферментов остаётся неизменной. Вместе с тем, значительное снижение уровня ОАА свидетельствует о прямом действии гормонов на ферменты. По всей вероятности, это обусловлено их воздействием на регуляторные центры ферментов, причем способность кортизола в этом плане приблизительно в 5 раз выше, чем у адреналина. Кроме того, возможно, что равное количество молекул кортизола в большей степени изменяет конформацию фермента, по сравнению с адреналином.

Ингибирующий эффект гормонов стресса, возможно, является частным случаем аллостерического регулирования активности ферментов. Ранее было показано, что аллостерическое регулирование наблюдается в тех случаях, когда субстрат-регулятор (модификатор), не будучи стерическим аналогом субстрата данного фермента, может связываться с ним в центре, пространственно не совпадающим с активным центром, вызывая изменение конфигурации и, как следствие, его активности (Monod et al., 1965). При этом некоторые мембранные ферменты являются амфипатическими, причем гидрофильная часть молекулы выполняет каталитические функции, а гидрофобная – якорные (Louvard et al., 1975). Предполагается, что гидрофобная часть также участвует в поддержании оптимальной конформации и регуляции свойств гидрофильной части фермента (Ugolev, 1989).

Иллюстрацией такого взаимодействия являются результаты опытов по влиянию суспендированного висцерального жира на активность гликозидаз, функционирующих в составе гомогената слизистой оболочки кишечника и химуса чехони. Эти опыты имели принципиальное значение, поскольку ранее было показано, что у представителей сем. карповых *Cyprinidae* леща и плотвы трибутирин значительно ингибирует ОАА практически во всем диапазоне исследованных температур (0-70 °C), в то время как у типичного ихтиофага щуки – значительно стимулирует ОАА в диапазоне 10-70 °C (Кузьмина, 1989). Ингибирование ОАА в диапазоне температур 10-70 °C свидетельствует о близости характеристик ферментов к таковым у рыб других видов сем. карповых *Cyprinidae*. Следовательно, и модельный жир – трибутирин, и висцеральный жир, входящий в состав естественной пищи рыб, оказывают одинаковые эффекты на ОАА.

### **Заключение**

В проведенном исследовании показано, что форма кривых температурной зависимости общей амилазной активности слизистой оболочки кишечника и химуса при воздействии изученных факторов различается незначительно, соответствуя классической колоколообразной форме. При этом температурный оптимум активности пептидаз находится при 50°C, а

относительная активность ферментов не превышает 13% от максимальной активности. Форма кривой температурной зависимости ОАА центрифугата слизистой отличается от таковой гомогената слизистой оболочки кишечника меньшей величиной оптимума активности (20-30°C). Установлено, что наличие гормонов стресса и висцерального жира в инкубате слабо влияет на температурную зависимость ОАА, но значительно снижает уровень ОАА практически во всем диапазоне исследованных температур.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова В.В., Иезуитова Н.Н., Тимофеева Н.М., Туляганова Е.Х., Гурман Э.Г., Щербаков Г.Г., Уголев А.М. Некоторые температурные характеристики и температурные адаптации ферментов, обеспечивающих мембранное пищеварение у пойкилотермных и гомойотермных животных // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1974. – Т. 10. – № 3. – С.223-231.
2. Коржув П.А. Влияние высокой температуры на трипсинтепловых и холоднокровных животных // Физиологический журнал. – 1936. – Т. 21. – № 3. – С.433-437.
3. Кузьмина В.В. Влияние температуры на регуляторные свойства ферментов, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у рыб // Вопросы ихтиологии. – 1989. – Т. 29. – № 4. – С. 634-643.
4. Кузьмина В.В. Влияние температуры на уровень общей протеолитической активности пищеварительного тракта некоторых видов пресноводных костистых рыб // Вопросы ихтиологии. – 1990. – № 30. – № 4. – С. 668-677.
5. Кузьмина В.В., Морозова Е.Н. Влияние температуры на активность  $\alpha$ -амилазы у пресноводных костистых рыб // Вопросы ихтиологии. – 1976. – Т. 16. – № 5. – С. 944-946.
6. Решетников Ю.С. (Ред.) Аннотированный каталог круглоротых и рыб континентальных вод России. – М.: Наука, 1998. – 220 с.
7. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. – СПб: Гидрометеоздат, 1993. – 238 с.
8. 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.
9. Braithwaite V.A., Ebbesson L.O.E. Pain and stress responses in farmed fish // *Rev. Sci. Technol.* – 2014. – Vol. 33. – P. 245-253. 10.20506/rst.33.1.2285
10. Conte F. S. Stress and the welfare of cultured fish // *Appl. Anim. Behav. Sci.* – 2004. – Vol. 86. – P. 205–223. 10.1016/j.applanim.2004.02.003
11. Gelman A., Kuz'mina V., Drabkin V., Glatman L. Temperature adaptations of fish digestive enzymes. – Feeding and digestive functions in fishes (J.E.P. Cyrino, D. Bureau, B.G. Kapoor, Eds.). Ch. 5. – Enfield: NH etc.: Science Publishers. 2008. – P. 155-226.
12. Herrera M., Mancera J.M., Costas B. The Use of Dietary Additives in Fish Stress Mitigation: Comparative Endocrine and Physiological Responses // *Front Endocrinol. (Lausanne)* – 2019. – Vol 10. – Art. 447. doi: 10.3389/fendo.2019.00447.
13. Louvard D., Maroux S., Vannier C., Desnuelle P. Topological studies on the hydrolases bound to the intestinal brush membrane. 1. Solubilization by papain and triton x-100 // *Biochim. Biophys. Acta.* 1975. – Vol. 375. – No. 1. – P. 236–248.
14. Mommsen Th.P., Mathilakath M.V., Moon Th.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation // *Fish Biol. Fisheries.* – Vol. 9. – P. 211-268.
15. Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. On the nature of allosteric transitions: A plausible model // *J. Mol. Biol.* – 1965. – Vol. 12. – No. 1. – P. 88–118.
16. Serra M., Urbinati E.C., Wolkers C.P.B. The Stress Response and Fish Welfare in Aquaculture // *Jacobs J. Aquacult. Res.* – 2014. – Vol. 1. – No. 1. – P. 6-12.
17. Ugolev A.M. (Ed.). In: Membrane digestion. New facts and concepts. – Moscow: Mir Publ., 1989. – P. 39-116.
18. Wendelaar Bonga S. E. The stress response in fish // *Physiol. Rev.* – 1997. – Vol. 77. – No. 3. – P. 591-625

#### REFERENCES

1. 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.
2. Braithwaite V.A., Ebbesson L.O.E. Pain and stress responses in farmed fish. *Rev. Sci. Technol.* 2014, 33: 245-253. 10.20506/rst.33.1.2285

3. Conte F. S. Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2004, 86: 205-223. 10.1016/j.applanim.2004.02.003
4. Egorova V.V., Iezuitova N.N., Timofeeva N.M., Tulyaganova E.Kh., Gurman E.G., Shcherbakov G.G., Ugolev A.M. [Some temperature characteristics and temperature adaptations of enzymes providing membrane digestion in poikilothermic and homeothermic animals]. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii - J. Evol. Biochem. Physiol.* 1974. 10(3): 223-231. (In Russian)
5. Gelman A., Kuz'mina V., Drabkin V., Glatman L. Temperature adaptations of fish digestive enzymes. *Feeding and digestive functions in fishes.* (Eds. J.E.P. Cyrino, D. Bureau, B.G. Kapoor). Ch. 5. Enfield, NH etc.: Science Publishers. 2008, P. 155-226. (In Russian)
6. Herrera M., Mancera J.M., Costas B. The use of dietary additives in fish stress mitigation: comparative endocrine and physiological responses. *Front Endocrinol. (Lausanne)*. 2019, 10, Art. 447. doi: 10.3389/fendo.2019.00447.
7. Korzhuev P.A. [The effect of high temperature on trypsin in warm-blooded and cold-blooded animals]. *Fiziologicheskii zhurnal - Physiological J.* 1936, 21(3): 433-437. (In Russian)
8. 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): P. 668-677.
9. Kuz'mina V.V. [Influence of temperature on the regulatory properties of enzymes that provide membrane digestion in fish]. *Voprosy ikhtologii - J. Ichthiol.* 1989, 29(4): 634-643. (In Russian)
10. Kuzmina V.V., Morozova E.N. [Influence of temperature on the activity of  $\alpha$ -amylase in freshwater teleost fishes]. *Voprosy ikhtologii - J. Ichthiol.* 1976, 16(5): 944-946.
11. Louvard D., Maroux S., Vannier C., Desnuelle P. Topological studies on the hydrolases bound to the intestinal brush membrane. 1. Solubilization by papain and triton x-100. *Biochim. Biophys. Acta.* 1975, 375(1): 236-248.
12. Mommsen Th.P., Mathilakath M.V., Moon Th.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Fish Biol. Fisheries.* 1999, 9: 211-268.
13. Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* 1965, 12(1): 88-118.
14. 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)
15. Serra M., Urbinati E.C., Wolkers C.P.B. The stress response and fish welfare in aquaculture. *Jacobs J. Aquacult. Res.* 2014, 1(1): P. 6-12.
16. Ugolev A.M. (Ed.). In: *Membrane digestion. New facts and concepts.* Moscow: Mir Publ., 1989. P. 39-116. (In Russian)
17. 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. (In Russian)
18. Wendelaar Bonga S. E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 1997, 77(3): 591-625.



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

<sup>1</sup>Kuz'mina V.V., <sup>2</sup>Voevodina I.S., <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 study the temperature characteristics of glycosidases that hydrolyze the carbohydrate components of food in sabrefish *Pelecus cultratus* (L.), as well as the effect of stress hormones (adrenaline, cortisol) and visceral fat on them. The fish were caught in the Volzhsky reach of the Rybinsk reservoir in the summer of 2018 and 2019. After morphometric analysis, the digestive tract was removed, placed in an ice bath, and freed from the fat. The intestines were cut lengthwise, and the contents were removed using a metal spatula and tweezers. The intestinal mucosa was removed from each fish using a soft plastic spatula. The mucosa were thoroughly mixed and homogenates were prepared using chilled Ringer's solution for cold-blooded animals (pH 7.4). Homogenates and substrate were incubated at 20°C or in the temperature range 0-70°C for 30 min. To determine the activity of glycosidases (the total activity of endo- and exohydrolases), soluble starch was used as a substrate. The total amyolytic activity (TAA) was determined by the increase in hexoses per 1 min of incubation, taking into account the background, calculated per 1 g of tissue. It was shown that the shape of the curves of the temperature dependence of the TAA of the intestinal mucosa and the chyme differs slightly, corresponding to the classic bell-shaped shape. In this case, the maximal temperature of glycosidases activity is at 50 °C, and the relative activity of enzymes does not exceed 13% of the maximum activity. The shape of the temperature dependence curve of the TAA of the mucosal centrifugate differs from that of the homogenate of the intestinal mucosa by a lower optimum (20-30 °C). It was found that the presence of stress hormones and visceral fat in the incubate has little effect on the temperature dependence of TAA, but significantly reduces the level of TAA in almost all the temperature ranges studied.

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

**Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2020, 3: 55-63**

*Поступило в редакцию: 07.08.2020*

*Получено после доработки: 26.08.2020*

**Кузьмина Виктория Вадимовна**, д.б.н., г.н.с., тел. 8(485)472-45-26; vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru;  
**Воеводина Ирина Сергеевна**, студ.;  
**Грачева Екатерина Леонидовна**, ст. преп., 6652553@mail.ru