

УДК 591.132:592:577.15

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2020.4: 45-56

ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЛИКОЗИДАЗ И ПЕПТИДАЗ У ЛИЧИНОК ХИРОНОМИД – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ ПИТАНИЯ РЫБ

^{1,3}Кузьмина В.В., ²Чорная Е.Ю., ¹Куливацкая Е.А., ^{2,4}Шептицкий В.А.

¹ Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН, Борок Ярославской обл., Российская Федерация; Приднестровский государственный университет им. Т.Г. Шевченко, Тирасполь, Молдова. ³Ярославская государственная сельскохозяйственная академия, Ярославль, Российская Федерация,

⁴ Институт физиологии и санокреатологии, Кишинев, Молдова.

Исследованы некоторые характеристики гликозидаз и пептидаз в гомогенатах личинок хирономид *Chironomus plumosus*. Показано, что активность гликозидаз личинок хирономид в зависимости от температуры превышает таковую казеинлитических пептидаз в 2.4- 7.8, гемоглобинлитических пептидаз – в 3.8-12.7 раз. Оптимум активности гликозидаз у мелких личинок выявлен при рН 7.0, у крупных – при рН 8.0. Температурный оптимум для гликозидаз у мелких личинок при рН 7.4 отмечен при 50°C, для казеин- и гемоглобинлитических пептидаз, независимо от рН (7.4 и 5.0) при 40°C. Относительная активность гликозидаз при 0°C выше таковой казеин- и гемоглобинлитических пептидаз (38.2, 25.4 и 23.9% соответственно). Максимальные значения температурного коэффициента Q₁₀ у гликозидаз выше (40-50°C), чем у пептидаз (~30-40°C). Величины энергии активации (E_{акт}) гидролиза различных субстратов гликозидазами и пептидазами личинок хирономид в зоне более низких температур (до точки перегиба, 10 и 20°C соответственно) ниже, чем в зоне более высоких температур. Выявленные особенности ферментов в личинках хирономид, в том числе относительно высокий уровень активности в зоне низких температур и низкие значения E_{акт}, позволяют личинкам хирономид быть не только консументами, но и объектами питания рыб, эффективно участвуя в процессах индуцированного аутолиза.

Ключевые слова: личинки хирономид, гликозидазы, пептидазы, рН, температура

Проблемы биологии продуктивных животных, 2020, 4: 45-56.

Введение

Во второй половине XX в. внимание исследователей было обращено к проблеме участия экзоферментов в процессах пищеварения у рыб (Jančarik, 1956, 1964; Dabrowski, Glogowski, 1977 a,b; Lauff, Hofer, 1984; Munilla-Moran et al., 1990). Решающую роль в разработке этой проблемы сыграло открытие механизма индуцированного аутолиза (Уголев, Цветкова, 1984). Позднее был описан методический подход, позволивший на основе сравнения активности одноимённых ферментов во всей слизистой оболочке желудка и во всём организме жертвы, находящейся на первой стадии пищеварения, когда её покровы еще не разрушены, доказать значительный вклад ферментов жертвы в процессы пищеварения у желудочных рыб (Кузьмина, 2000; Kuz'mina, Golovanova, 2004).

Поскольку активность ферментов в значительной мере зависит от их характеристик, в последнее время особое внимание уделяется изучению различных характеристик пищеварительных гидролаз объектов питания рыб. Так как в пище большинства видов рыб доминируют белковые компоненты, как правило, наиболее подробно исследуются ферменты, гидролизующие белковые компоненты корма. Так, при изучении температурных характеристик пептидаз, функционирующих в составе химуса и слизистой оболочки кишечника рыб, относящихся по типу питания к разным

экологическим группам, а также в целом организме их потенциальных жертв, выявлены не только видовые различия в характере кривых температурной зависимости, но и большая относительная активность ферментов химуса по сравнению с таковой одноимённых ферментов слизистой оболочки рыб (Kuz'mina et al., 2015, 2019). Изучение pH-зависимости пептидаз химуса и слизистой оболочки кишечника консументов, всего организма их потенциальных жертв, энтеральной и ассоциированной микробиоты также позволило обнаружить различия в положении оптимума pH и большую относительную активность в зоне низких температур в случае микробиоты (Kuz'mina et al., 2017). Характеристики гликозидаз всего организма беспозвоночных исследованы в меньшей степени (Кузьмина, 1999; Голованова, Фролова, 2005; Голованова, 2006, 2011; Кузьмина и др., 2016); при этом определение активности гликозидаз в ряде работ проводилось лишь при нескольких значениях температуры и pH (Голованова, Фролова, 2005; Голованова, 2006, 2011).

При оценке участия экзоферментов в процессах пищеварения рыб особого внимания заслуживают личинки хирономид, занимающих видное место в питании молоди всех видов рыб, а также взрослых бентофагов (Иванова и др., 1978). Фауна хирономид содержит 4147 видов (Ferrington, 2008). В фауне пресноводных водоемов России наиболее массово представлены личинки представителей сем. *Chironomidae* (Монаков, 1998), в частности личинки *Chironomus plumosus* (мотыль), питающиеся бактериями, детритом и водорослями (Извекова и др., 1983; Дмитрович и др., 2016). Сведения, касающиеся характеристик гликозидаз и пептидаз, функционирующих в целом организме личинок хирономид, фрагментарны (Кузьмина, 1999; Кузьмина и др., 2016; Скворцова и др., 2016; Золотарева и др., 2019; Kuz'mina et al., 2015, 2017, 2019). Данные, касающиеся сопоставления активности, температурных характеристик и pH-зависимости активности гликозидаз и пептидаз в целом организме личинок хирономид в литературе отсутствуют.

Цель работы – сопоставление активности, pH-зависимости и температурных коэффициентов активности гликозидаз и пептидаз, функционирующих во всем организме личинок хирономид – объектов питания взрослых бентофагов и молоди рыб, относящихся по типу питания к разным экологическим группам.

Материал и методы

Объект исследования – личинки хирономид *Chironomus plumosus*. Средняя масса одной личинки в разных опытах составляла 7.5 и 33.6 мг. Для определения активности и характеристик ферментов использовали метод смешанных проб (Егорова и др., 1974). В качестве ферментативно активных препаратов использовали гомогенаты предварительно измельчённых и тщательно перемешанных десяти личинок. Все операции проводились на холоде. Аликвоты образцов (0.5-1.0 г) гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с небольшим количеством раствора Рингера для холоднокровных животных (NaCl, 109 мМ, 1.9 мМ, KCl, 1.1 мМ, CaCl₂, pH 7.4) при температуре 2-4°C. Для этого стеклянный гомогенизатор помещали в стакан со льдом. Затем гомогенат разбавляли раствором Рингера до окончательного разведения 1:99. Для определения pH-зависимости активности ферментов растворы гомогената и субстрата предварительно доводили до соответствующих значений pH (5.0 – 9.0) при помощи pH-метра марки рХ-150 МИ при температуре 20°C Температурную зависимость активности ферментов определяли в диапазоне 0-70°C при pH гомогената и субстрата 7.4.

Активность гликозидаз (суммарная активность α -амилазы, КФ 3.2.1.1, γ -амилазы, КФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз КФ 3.2.1.20) оценивали по увеличению концентрации гексоз с использованием метода Нельсона в модификации Уголева и Иезуитовой (1969). В качестве субстрата использовали 1%-ный раствор растворимого крахмала. Активность пептидаз (преимущественно активность трипсина, КФ 3.4.21.4, химотрипсина КФ 3.4.21.1 или катепсина КФ 3.4, а также дипептидаз КФ 3.4.13) оценивали по увеличению концентрации тирозина с использованием реактива Фолина-Чиокалтеу. Для этого 0.5 мл гомогената инкубировали с 0.5 мл 1 %-ного раствора субстрата (казеина или гемоглобина, pH 7.4 или 5.0), приготовленного на том же растворе Рингера. Смесь инкубировали в течение 30 мин в специальных термостатируемых камерах

в диапазоне температур 0-70°C при непрерывном перемешивании. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 0.3 N трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Через 10 мин инкубационную смесь фильтровали через бумажный фильтр. После этого к 0.25 мл фильтрата добавляли 2 мл 0.5 N NaOH, 0.25 мл 0.025 N CuSO₄ и 0.75 мл реактива Фолина, предварительно разведённого *ex tempore* в 3 раза. Для определения исходного содержания тирозина в пробах (фон), ТХУ добавляли к гомогенату до добавления субстрата. Другие операции были идентичными. Концентрацию тирозина в пробах определяли через 30 мин.

Активность ферментов определяли с учётом фона (количество гексоз или тирозина в исходном гомогенате) и рассчитывали на 1 г влажной массы ткани, мкмоль/(г·мин). Интенсивность окраски оценивали с помощью фотоколориметра (КФК-2) при $\lambda = 670$ нм. Температурные коэффициенты (Q_{10}) рассчитывали традиционным способом, значения энергии активации ($E_{\text{акт}}$) – графическим методом 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, °K (°K = °C + 273), V – скорость реакции.

Результаты и обсуждение

Активность и характеристики гликозидаз гомогената личинок хирономид.

Активность гликозидаз гомогената личинок хирономид при стандартной температуре (20°C) и pH 7.4 – величине, рассматриваемой в качестве стандартной для энтеральной среды, в разных опытах варьировала: в среднем у мелких особей – 1.20, у крупных – 5.26 мкмоль/(г·мин). При исследовании pH-зависимости гликозидаз всех тканей у мелких личинок хирономид оптимум pH выявлен при 7.0 (2.39±0.14 мкмоль/(г·мин)), у крупных существенно выше ($P < 0.05$ по t -критерию) – при pH 8.0 (5.99±0.36 мкмоль/(г·мин)). При pH 5.0 уровень ферментативной активности существенно ниже ($P < 0.05$) максимальных значений: в первом случае – 0.17±0.01, во втором – 2.18±0.13 мкмоль/(г·мин), что составляет 7.1 и 36.6% соответственно (рис. 1).

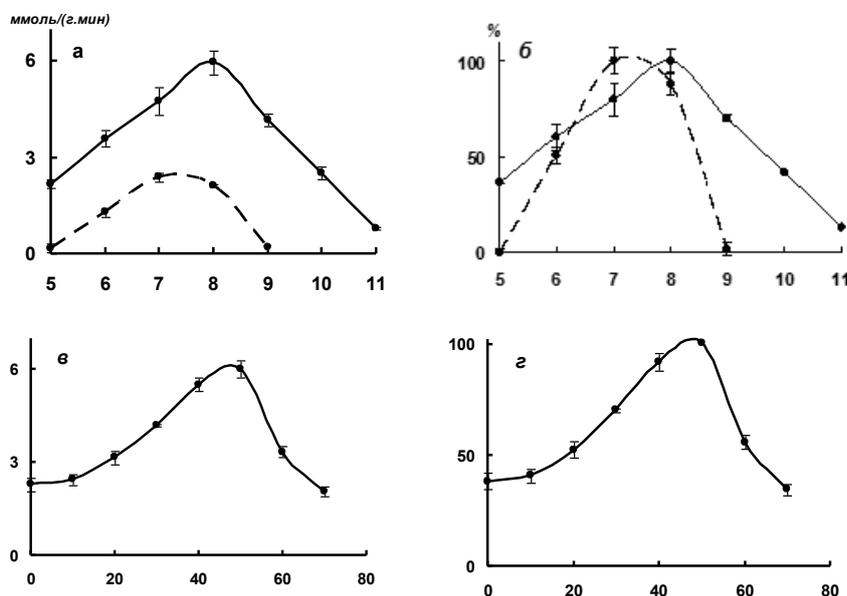


Рис. 1. pH-зависимость (а, б) и температурная зависимость (в, г) активности гликозидаз в гомогенате личинок хирономид. Обозначения: по оси абсцисс: на «а» и «б» – pH (см. рис 2: 1– крупные, 2– мелкие личинки хирономид), на «в» и «г» – температура, °C (pH 7.4); по оси ординат: на «а» и «в» – активность ферментов, мкмоль/(г·мин), на «б» и «г» – относительная активность фермента, % от максимальной активности.

В зоне постмаксимальных значений pH отмечена различная активность ферментов. Так, при pH 9.0 активность гликозидаз гомогената личинок хирономид в первом случае составила 0.20±0.03 мкмоль/(г·мин), во втором – 4.18±0.19 мкмоль/(г·мин) ($P < 0.05$) (8.4 и 70% от максимальной активности). При более высоких значениях pH активность гликозидаз выявлена лишь у крупных особей. При исследовании температурной зависимости максимальная активность гликозидаз

гомогената мелких личинок хирономид отмечена при температуре 50°C (6.0 ± 0.28 мкмоль/(г·мин)), а при температуре 0 и 70°C уровень ферментативной активности существенно ниже ($P < 0.05$): 2.29 ± 0.22 и 2.06 ± 0.15 мкмоль/(г·мин), что составляет 38.2 и 34.4% от максимальной активности.

Активность и температурная зависимость пептидаз гомогената мелких личинок хирономид по казеину и гемоглобину

Активность казеинлитических пептидаз гомогената личинок хирономид при 20°C и pH 3.0 отсутствовала, при pH 5.0 она составила 0.36 ± 0.05 , при pH 7.4 – 0.63 ± 0.10 мкмоль/(г·мин) соответственно; активность гемоглобинлитических пептидаз личинок хирономид при 20°C и pH 3.0 – 0.64 ± 0.09 , при pH 5.0 – 1.02 ± 0.27 , при pH 7.4 – 0.67 ± 0.20 мкмоль/(г·мин). Исследование активности пептидаз в широком диапазоне температур выявило как сходство, так и различия в форме кривых температурной зависимости казеинлитических и гемоглобинлитических пептидаз при разных значениях pH (рис. 2).

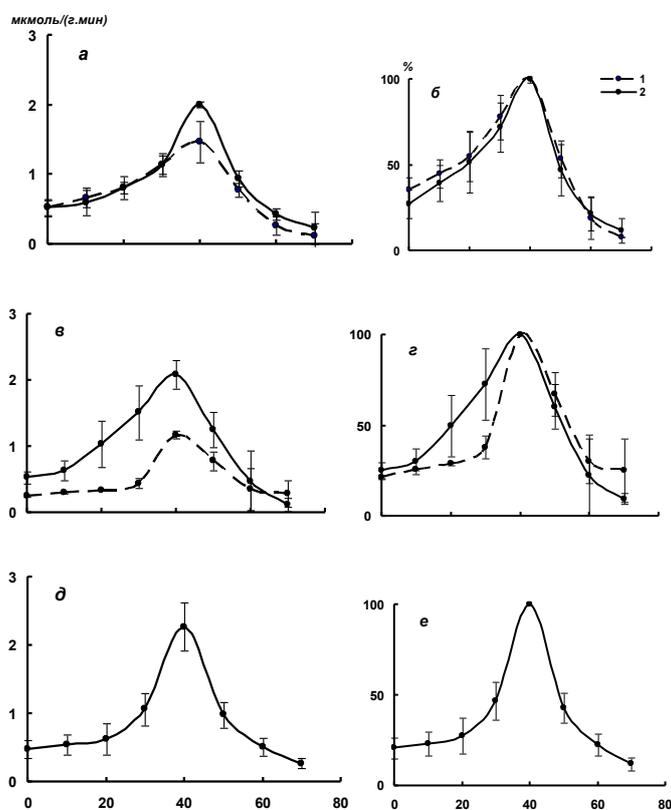


Рис. 2. Температурная зависимость гемоглобинлитических (1) казеинлитических (2) пептидаз гомогената личинок хирономид при pH 7.4 (а, б), pH 5.0 (в, г) и pH 3.0 (д, е). Обозначения: по оси абсцисс: температура, °C; по оси ординат: на а, в и д – активность ферментов, мкмоль/(г·мин), на б, г и е – относительная активность ферментов, % от максимальной активности.

Максимальная активность тех и других ферментов, независимо от pH, наблюдается при 40°C. Вместе с тем форма кривых температурной зависимости в ряде случаев значительно различается. Если при pH 7.4 в зоне пред- и постмаксимальных температур величины активности казеинлитических и гемоглобинлитических пептидаз близки, то в зоне температурного оптимума активность гемоглобинлитических пептидаз существенно выше ($P < 0.05$) таковых казеинлитических

пептидаз: 3.10 ± 0.53 и 1.65 ± 0.13 мкмоль/(г·мин) соответственно. При рН 5.0 различия в зоне температурного оптимума гемоглобинлитических и казеинлитических пептидаз уменьшаются: 1.42 ± 0.24 и 1.17 ± 0.06 мкмоль/(г·мин) соответственно, однако активность гемоглобинлитических пептидаз практически во всем диапазоне исследованных температур существенно превышает таковую казеинлитических пептидаз. Форма кривой температурной зависимости гемоглобинлитических пептидаз при рН 3.0 близка к таковой при рН 5.0, однако относительная активность ферментов в зоне низких температур при рН 3.0 несколько ниже, чем при рН 5.0 и 7.4 (20.6, 25.4 и 23.9% соответственно).

Температурные коэффициенты Q_{10} активности гликозидаз и пептидаз личинок хирономид при разных значениях рН. На основании данных по температурной зависимости активности ферментов были рассчитаны их температурные коэффициенты (табл. 1).

Таблица 1. Значения Q_{10} активности гликозидаз и пептидаз у личинок хирономид при разных значениях рН

Субстрат, рН	Температура, °С						
	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70
Крахмал, 7.4	1.2	1.2	1.2	1.2	1.1	0.4	0.1
Казеин, 7.4	1.3	1.2	1.4	1.3	0.5	0.3	0.4
Казеин, 5.0	1.2	1.0	1.4	2.7	0.7	0.5	0.8
Гемоглобин, 7.4	1.1	1.4	1.4	2.0	0.4	0.5	0.5
Гемоглобин, 5.0	1.2	1.6	1.5	1.4	0.6	0.4	0.3
Гемоглобин, 3.0	1.2	1.2	1.7	2.1	0.4	0.5	0.5

В зоне температур жизнедеятельности личинок хирономид (0-30°C) величины Q_{10} , как правило, низки. В зоне 30-40°C наблюдается резкий рост показателя у ряда казеин- и гемоглобинлитических пептидаз, сменяющийся ещё более значительным его снижением. При этом величины Q_{10} гликозидаз сохраняются на высоком уровне в большем диапазоне температур по сравнению с пептидазами, а наиболее высокие значения показателя пептидаз по гемоглобину при рН 5.0 и 3.0 наблюдаются в зоне 10-30 и 20-40°C соответственно.

Энергия активации гликозидаз и пептидаз гомогената личинок мелких хирономид. На графиках Аррениуса, построенных для определения величины $E_{акт}$ процесса гидролиза полисахаридов и белков гликозидазами и пептидазами личинок хирономид, изломы были обнаружены лишь во втором случае (табл. 2).

Таблица 2. Энергия активации гидролиза субстратов гликозидазами и пептидазами гомогената личинок хирономид при разных значениях рН

Субстрат, рН	Энергия активации, ккал/моль		
	До точки перегиба	После точки перегиба	Температура в точке перегиба, °С
Крахмал, 7.4	3.0	3.0	–
Казеин, 7.4	4.9	5.4	20
Казеин, 5.0	2.5	11.3	20
Гемоглобин, 7.4	1.9	7.2	20
Гемоглобин, 5.0	2.7	3.3	20
Гемоглобин, 3.0	1.6	11.7	20

Важно отметить, что в случае гидролиза белков в зоне более низких температур величины $E_{акт}$ ниже, чем в зоне более высоких температур, а излом наблюдается в зоне жизнедеятельности личинок хирономид. При этом значения $E_{акт}$ процесса гидролиза казеина при рН 7.4 и гемоглобина при рН 5.0 в разных температурных зонах различаются незначительно (в 1.1 и 1.2 раза соответственно). Максимальное увеличение $E_{акт}$ (в 7.3 раза) отмечено для гидролиза гемоглобина

при рН 3.0, меньшее – (в 4.5 и 3.8 раза) для гидролиза казеина при рН 5.0 и гемоглобина – при рН 7.4.

Соотношение активности гликозидаз и пептидаз гомогената мелких хирономид при разной температуре. Данные, касающиеся соотношения активности гликозидаз и пептидаз всего организма личинок хирономид, представлены в табл. 3.

Таблица 3. Соотношение активности гликозидаз и пептидаз (Г/П) у мелких личинок хирономид при разной температуре (°С, рН 7.4)

Субстрат	Температура, °С							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Крахмал/гемоглобин	4.5	4.4	4.7	3.8	2.4	6.4	7.8	7.6
Крахмал/казеин	5.9	5.2	5.0	4.7	3.8	7.7	12.7	10.3

Величины соотношения Г/П во всём диапазоне температур выше в случае сопоставления активности гликозидаз и казеинлитических пептидаз по сравнению с таковыми гемоглобинлитических пептидаз. При этом в зоне 0-30°С в случае казеинлитических пептидаз наблюдается последовательное снижение показателя, в случае гемоглобинлитических пептидаз – лишь тенденция к его снижению. Минимальные значения Г/К отмечены при температуре 40°С, максимальные – при температуре 60°С.

Прежде всего важно отметить, что при исследовании гликозидаз в организме личинок хирономид нами исследован интегративный показатель, включающий активность α -амилазы, γ -амилазы и ферментов группы мальтаз, который наиболее полно отражает участие различных ферментов в гидролизе полисахаридов. Данные, касающиеся активности гликозидаз в организме мелких личинок хирономид при стандартной температуре, близки к полученным ранее результатам (Кузьмина, 1999; Голованова, 2006, 2011; Золотарева и др., 2019; Kuz'mina et al., 2017). Значительно большая (в 4.4. раза) активность гликозидаз у крупных личинок хирономид может быть обусловлена большим содержанием детрита, богатого остатками растений и большим количеством амилитических бактерий (Ganguly, Prasad, 2012).

Оптимум рН гликозидаз гомогената личинок хирономид (7.0 и 8.0) близок к оптимуму рН кишечника у других видов хирономид. Действительно, рН кишечника у личинок *Ch. crassicaudatus* и *Glyptotendipes paripes* близок к нейтральному, варьируя от 6.7 до 7.4 и от 6.9 до 7.6 соответственно. У обоих видов слегка щелочные значения рН обнаружены в передней части мезентерона, слегка кислые – в желудочных придатках и задней части мезентерона. Максимальная активность амилазы у *G. paripes* выявлена при рН 5.5, у *Ch. crassicaudatus* – при рН 7.0 (Frouz et al., 2007). Для рыб разных видов в качестве оптимальных приводятся значения в диапазоне от 6.5 до 8.0 (Уголев, Кузьмина, 1993). Однако зона значений, близких к оптимуму рН, в условиях эквilibriumированной солевой среды (раствор Рингера), у личинок хирономид более узкая, чем у рыб (Кузьмина, 1999; Голованова, 2011).

Сведения о влиянии температуры на активность ферментов у личинок хирономид крайне ограничены. Известно, что у личинок *Ch. sancticaroli*, содержащихся при температурах 20, 25 и 30°С, на фоне последовательного снижения активности ацетилхолинэстеразы выявлено значительное увеличение активности α -эстеразы по мере увеличения температуры (Rebecchi-Baggio et al., 2016). Особо следует отметить отличие температурных характеристик гликозидаз у исследованных нами личинок хирономид от личинок, отобранных в прибрежной зоне Волжского плеса Рыбинского водохранилища (Кузьмина, 1999). В этой работе величина температурного оптимума соответствовала 60°С, а относительная активность при 0°С не превышала 10% от максимальной активности, что, по всей вероятности, обусловлено как различиями в условиях среды обитания, так и некоторыми методическими различиями.

При обсуждении данных, касающихся пептидаз, следует подчеркнуть, что нами также исследован интегральный показатель, отражающий активность ряда эндопептидаз

(преимущественно трипсин и химотрипсин) и экзопептидаз (различные ди-, amino- и карбоксипептидазы), а также, возможно, катепсинов D и B, оптимум pH которых находится в зоне кислых значений pH, и катепсинов G, L и H, оптимум pH которых находится в зоне pH 7.0 (Кузьмина, 2015). Важно отметить, что казеинлитическая активность пептидаз обусловлена трипсином, преимущественно гидролизующим пептидные связи с лизином или аргинином, и химотрипсином, преимущественно гидролизующим пептидные связи с тирозином, триптофаном, фенилаланином. Однако возможно участие трипсина в гидролизе пептидных связей с ароматическими аминокислотами, а химотрипсина – с лизином или аргинином (Dixon, Webb, 1964).

Данные, касающиеся активности казеин- и гемоглобинлитических пептидаз в тканях личинок хирономид при стандартных значениях температуры (20°C) и pH 7.4 в значительной степени близки к полученным ранее результатам. При этом активность гемоглобинлитических пептидаз при pH 5.0 в 2.8 раза выше по сравнению с таковой казеинлитических пептидаз; при pH 7.4, напротив, она в 1.1. раза ниже. Поскольку ранее было показано, что в зоне pH 3.0 у личинок хирономид присутствует лишь активность гемоглобинлитических пептидаз ([9, 33]), можно предположить, что при низких значениях pH также обнаруживается остаточная активность различных катепсинов, в частности катепсина D.

Также важно отметить, что величины активности казеинлитических пептидаз у личинок хирономид из водоёмов, находящихся в разных географических зонах, различаются в очень малой степени. Так, у личинок хирономид из Кучурганского водохранилища активность пептидаз по казеину при 20°C составляет 0.97 ± 0.04 мкмоль/(г·мин) (Золотарева и др., 2019). pH-зависимость пептидаз в данной работе не определялась, так как ранее было показано, что оптимум pH пептидаз по казеину соответствует 9.0, по гемоглобину – 10.0, а относительная активность при pH 5.0 составляет 48.1 и 31.8% от максимальной активности соответственно (Скворцова и др., 2016). Вместе с тем различия в уровне активности пептидаз по этим субстратам в диапазоне pH 8.0-10.0 не были статистически значимыми.

Температурный оптимум казеин- и гемоглобинлитических пептидаз у личинок хирономид, выращенных в искусственных условиях (наши данные, Скворцова и др., 2016), отличается от такового у личинок хирономид, обитавших в прибрежной зоне Волжского плеса Рыбинского водохранилища 40 и 50°C соответственно (Кузьмина, 1999). Ранее указывалось, что температурный оптимум активности казеин- и гемоглобинлитических пептидаз у других видов беспозвоночных (крыля *Meganocythanes norvegica*, большого сухопутного краба *Cancer pagurus*, рака-отшельника *Pagurus bernhardus*, краба-отшельника *Clibanarius striolatus*, краба-плавунца *Callinectes bellicosus*, гигантского гребешка *Pecten maximus* и других) варьирует от 40 до 55°C. Температурный оптимум катепсина D варьирует от 35°C у кальмара *Todarodes pacificus* до 50°C у личинок хирономид *Ch. plumosus* и моллюсков (*Radix ovata*, *Dreissena polymorpha*, *Unio pectorum*) (см. Кузьмина, 2015; Кузьмина, 1999).

Вместе с тем, относительная активность казеин- и гемоглобинлитических пептидаз в зоне низких температур значительно выше, чем у личинок хирономид, обитавших в Рыбинском водохранилище и близка к таковой у антарктического крыля *Euphausia superba*, рака-отшельника *Pagurus bernhardus* и коретры *Euphausia superba*, *Pagurus bernhardus* и *Choaborus sp.* (см. Кузьмина, 2015). Данные, касающиеся гемоглобинлитических пептидаз, хорошо согласуются со сведениями о том, что у ряда видов беспозвоночных активность катепсина D в зоне низких и физиологических температур значительно выше по сравнению с таковой сериновых пептидаз. Так, при 0°C активность катепсина D у личинок хирономид составляет 32%, у моллюсков – около 55% от максимальной активности (Кузьмина, 1999). Не исключено, что у личинок хирономид, как и у ракообразных Crustacea (креветка *Litopenaeus vannamei*), помимо катепсина D функционирует L-подобный катепсин, имеющий оптимум pH 5.1 (Le Boulay et al., 1996).

Соотношение активности гликозидазы/пептидазы у личинок хирономид ранее не определялось. Полученные данные свидетельствуют не только о том, что при одинаковых сроках инкубации ферментативно активных препаратов активность гликозидаз значительно выше активности пептидаз, но и о зависимости коэффициента Г/П от структуры белкового субстрата.

Данные, касающиеся температурных коэффициентов гликозидаз и пептидаз всех тканей личинок хирономид, подтверждают классические представления о резком уменьшении величин Q_{10} в зоне постмаксимальных температур в результате денатурации белковых глобул ферментов. Данные, касающиеся $E_{акт}$ гликозидаз, казеин- и гемоглобинлитических пептидаз гомогената личинок хирономид значительно ниже полученных ранее (Кузьмина, 1999) и близки к таковым у представителей ракообразных из этой же климатической зоны, в частности бореального рака-отшельника *Pagurus bernhardus* (Dittrich 1992, цит. по: Кузьмина, 2015), а также величинам $E_{акт}$ катепсина D у личинок хирономид, представителей зоопланктона и моллюсков (*Rabix ovata*, *Unio pectorum* и *Dreissena polymorpha*) (Кузьмина, 1999). При этом вычисление величин $E_{акт}$ гидролиза белковых компонентов тканей личинок хирономид позволило выявить их значительную зависимость от структуры субстрата: у контрольных особей значения $E_{акт}$ казеинлитических пептидаз в зоне низких температур ниже по сравнению с таковыми гемоглобинлитических пептидаз в 1.2 раза, в зоне высоких температур – в 1.9 раза.

Важно отметить, что наличие микроворсинок, выстилающих эпителий кишечника личинок хирономид, и обилие бактерий в его полости (Kaufman et al., 1986) позволяет предположить у них наличие не только полостного, но также мембранного и симбионтного пищеварения. Если характер рН зависимости гликозидаз и пептидаз в целом организме личинок хирономид близок таковому рыб, то температурные характеристики значительно отличаются (Кузьмина, 2018). При этом характеристики гликозидаз и пептидаз в целом организме личинок хирономид, особенно относительно высокий уровень активности в зоне низких температур и низкие значения $E_{акт}$, позволяют ферментам личинок хирономид быть не только консументами, но и пищевыми объектами рыб, эффективно участвуя в процессах индуцированного аутолиза. Последнее увеличивает эффективность всего процесса пищеварения у рыб и способствует улучшению их размерно-массовых характеристик. Действительно, показано, что введение в корм личинок лягушкового клариевого сома *Clarias batrachus* личинок хирономид *Ch. striatipennis*, обогащенных аскорбиновой кислотой, увеличивает удельную скорость роста и выживаемость рыб (Rebecchi-Baggio et al., 2016).

Заключение

Выявлена активность гликозидаз и пептидаз, функционирующих в тканях личинок хирономид *Chironomus plumosus* – объектов питания бентофагов при рН 7.4 и температуре 20°C. Активность гликозидаз личинок хирономид в зависимости от температуры превышает таковую казеинлитических пептидаз в 2.4-7.8, гемоглобинлитических пептидаз – в 3.8-12.7 раз. Оптимум рН гликозидаз гомогената мелких личинок хирономид выявлен при 7.0, у крупных – при рН 8.0. Температурный оптимум активности гликозидаз у мелких личинок хирономид при рН 7.4 соответствует 50°C, казеин- и гемоглобинлитических пептидаз, независимо от рН (7.4 и 5.0) – 40°C. В зоне температур жизнедеятельности личинок хирономид (10-30°C) для всех ферментов характерно незначительное варьирование значений температурного коэффициента Q_{10} . Полученные данные важны для понимания роли объектов питания в процессах пищеварения у рыб и разработки новых подходов к кормлению рыб в условиях аквакультуры.

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № АААА-А18-118012690102-9).
Соблюдение этических норм. Все процедуры, проводимые в исследованиях с участием рыб, соответствовали этическим нормам учреждения и практике, в которой проводились исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Заявление о благополучии животных. Были соблюдены все применимые международные, национальные и / или институциональные рекомендации по уходу и использованию животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голованова И. Л. Влияние природных и антропогенных факторов на гидролиз углеводов у рыб и объектов их питания: автореф. дисс.... д.б.н. – СПб, 2006. – 40 с.
2. Голованова И.Л. Влияние абиотических факторов (температура, рН, тяжелые металлы) на активность гликозидаз у беспозвоночных животных // Журнал эволюционной биохимии и физиологии – 2011. – Т. 47. – № 1. – С. 15-19.
3. Голованова И.Л., Фролова Т.В. Влияние меди, цинка и кадмия на активность карбогидраз водных беспозвоночных // Биология внутренних вод. – 2005. – № 4. – С. 77-83.
4. Дмитриевич Н.П., Козлова Т.В., Козлов А.И., Райлян Н.М. Питание личинок хирономид в период их нахождения в планктоне // Мат. V межд. конф. «Озерные экосистемы: Биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды» (ред. Т.М. Михеева). – Минск- Нарочь: БГУ: 2016. – С. 214- 215. <<http://elib.bsu.by/handle/123456789/163683>>
5. 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 // Журн. эвол. биохим. физиол. – 1974. – Т. 10. – № 3. – С. 223-231.
6. Золотарева Г.В., Чорная Е.Ю., Талпа Г.В., Кузьмина В.В., Филипенко С.И., Шептицкий В.А. Влияние температуры на активность протеиназ у рыб и их объектов питания из Кучурганского водохранилища // Hydroeconnex International Conference “Hydropower Impact on River Ecosystem Functioning”. – Tiraspol, 2019. – P. 127-130.
7. Иванова М.Н., Половкова С.Н., Кияшко В.И., Баканов А.И. Питание и пищевые взаимоотношения рыб в водохранилищах Волжского каскада. – Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. – Л.: Наука, 1978. – С. 55-77.
8. Извекова Э.И., Набережный А.Н., Тодераш И.К. Питание и пищевые потребности личинок // В сб.: Мотыль *Chironomus plumosus* L. (Diptera, Chironomidae): Систематика, экология, продукция. – М.: Наука, 1983. – С. 148-155.
9. Кузьмина В.В. Вклад индуцированного аутолиза в процессы пищеварения вторичных консументов на примере гидробионтов // Докл. РАН. – 2000. –Т. 373. – № 1. – С. 132-134.
10. Кузьмина В.В. Влияние температуры на пищеварительные гидролазы беспозвоночных животных // Журн. эвол. биохим. физиол. – 1999. – Т. 35. – № 1. – С. 15-19.
11. Кузьмина В.В., Золотарева Г.В., Шептицкий В.А., Филипенко С.И. Роль объектов питания и микробиоты в процессах пищеварения рыб из разных экосистем. – Тирасполь: изд. Приднестр. ун-та, 2016. – 196 с.
12. Монаков А.В. Питание пресноводных беспозвоночных. – М.: ИПЭЭ РАН, 1998, –319 с.
13. Сковрцова Е.Г., Егорова А.А., Кузьмина В.В. Влияние температуры и рН среды на активность пептидаз у личинок хирономид – потенциальных объектов питания рыб-бентофагов // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2016. – № 4. – С. 46-56.
14. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. – СПб.: Гидрометеоздат, 1993. – 238 с.
15. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз. – Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. – Л.: Наука, 1969. – С. 169-173.
16. Уголев А.М., Цветкова В.А. Индуцированный аутолиз как важный механизм начальных стадий пищеварения в естественных условиях // Физиол. журн. –1984. –Т. 70. – № 11. – С. 1542-1550.
17. Dabrowski K., Glogowski J. Studies on the proteolytic enzymes of invertebrates constituting fish food // Hydrobiologia (Hagua). – 1977a. –Vol. 52. – P. 171-174.
18. Dabrowski K., Glogowski J. The role of exogenic proteolytic enzymes in digestion processes in fish // Hydrobiologia (Hagua). – 1977b. – Vol. 54. – P. 129-134.
19. Dey A., Ghosh K., Hazra N. Improvement of growth and survival of the juvenile walking Catfish, *Clarias batrachus* (L.) (Siluriformes: Clariidae) fed on probiotics encapsulated and ascorbic acid enriched Chironomid Larvae (Diptera: Chironomidae) // Proc. Zool. Soc. – 2019. – Vol. 72. – P. 37-45.
20. Dixon M., Webb E.C. Enzymes, 2nd ed. – London: Longmans, Green and Co., 1964.
21. Ferrington L.C.Jr. Global biodiversity of non-biting midges (Chironomidae: Diptera) in freshwater. Hydrobiologia. – Special FADA Issue. – 2008. – Vol. 595. –No. 1. – P. 447-455.
22. Frouz J., Lobinske R.J., Yaqub A., Ali A. Larval gut pH profile in pestiferous *Chironomus crassicaudatus* and *Glyptotendipes paripes* (Chironomidae: Diptera) in reference to the toxicity potential of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis // J. Amer. Mosq. Contr. Assoc. – 2007. –Vol. 23. – No. 3. – P. 355-358.

23. Ganguly S., Prasad A. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism // *Rev. Fish Biol. Fisheries.* – 2012. – Vol. 22. – P. 11-16.
24. Jančarik A. Die Verdauung der Hauptnährstoffe beim Karpfen // *Z. Fischerei Hilfswiss* – 1964. – Bd 12. – S. 601-684.
25. Jančarik A. Über die Verdauung des Karpfens // *Arch. Tierernährung.* – 1956. – Bd 6. – S. 1329-1380.
26. Kaufman M.G., Pankratz H.S., Klug M.J. Bacteria associated with the ectoperitrophic space in the midgut of the larva of the midge *Xylotopus par* (Diptera:Chironomidae) // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – Vol. 51. – No. 3. – P. 657-660.
27. Kuz'mina V.V., Chornaya E.Yu., Skvortsova E.G., Kulivatskaya E.A., Sheptitskiy V.A. Temperature characteristics of peptidases of chironomid larvae, potential fish prey, at various pH values // *Biosyst. Diver.* – 2018. – No 3. – P. 201-205. DOI: 10.15421/011830
28. Kuz'mina V.V., Golovanova I.L. Contribution of prey proteinases and carbohydrases in fish digestion // *Aquacult.* – 2004. – Vol. 234. – No. 1-4. – P. 347-360.
29. 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. <<http://dx.doi.org/10.1134/S1995082919020093>. IF 0.471>
30. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Shalygin M.V., Kovalenko K.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. DOI:10.1007/s10695-015-0091-4
31. 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. – Vol. 43. – Issue 2. – P. 373-383. DOI:10.1007/s10695-016-0293-4
32. Lauff M., Hofer R. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes // *Aquacult.* – 1984. – Vol. 37. – No. 4. – P. 335-346.
33. Le Boulay C., Van Wormhoudt A., Sellos D. Cloning and expression of cathepsin L-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle // *J. Comp. Physiol.* – 1996. – Vol. 166B. – No. 5. – P. 310-318. DOI: 10.1007/BF02439917
34. Munilla-Moran R., Stark J.R., Babour A. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) // *Aquacult.* – 1990. – Vol. 88. – P. 337-350.
35. Rebecchi-Baggio D., Richardi V.S., Vicentini M., Guiloski I.C., de Assis H.C.S., Navarro-Silva M.A. Factors that alter the biochemical biomarkers of environmental contamination in *Chironomus sancticarloi* (Diptera, Chironomidae) // *Rev. Brasil. Entomol.* – 2016. – Vol. 60. – No. 4. – P. 341-346. DOI: 10.1016/j.rbe.2016.07.002.

REFERENCES (for publications in Russian)

1. Dmitrovich N.P., Kozlova T.V., Kozlov A.I., Raylyan N.M. [Nutrition of chironomid larvae during their stay in plankton]. In: *Materialy V Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii "Ozernye ekosistemy: Biologicheskie protsessy, antropogennaya transformatsiya, kachestvo vody»*. (Proc. V Intern Conf.: Lake ecosystems: Biological processes, anthropogenic transformation, water quality), Minsk-Naroch'. Minsk: BGU Publ., 2016, P. 214-215. <<http://elib.bsu.by/handle/123456789/163683>>
2. 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.
3. Golovanova I. L. *Vliyaniye prirodnykh i antropogennykh faktorov na gidroliz uglevodov u ryb i ob'yektov ikh pitaniya* (Influence of natural and anthropogenic factors on the hydrolysis of carbohydrates in fish and their food objects). Extended Abstract of Diss. Dr. Sci. Biol., St. Petersburg, 2006, 40 p.
4. Golovanova I.L. [Influence of abiotic factors (temperature, pH, heavy metals) on the activity of glycosidases in invertebrates]. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii - J. Evol. Biochem. Physiol.* 2011, 47(1): 15-19.
5. Golovanova I.L., Frolova T.V. [Effect of copper, zinc and cadmium on the activity of carbohydrase in aquatic invertebrates]. *Biol. vnutr. Vod. – Biol. Inland Waters*, 2005, 4: 7-83
6. Ivanova M.N., Polovkova S.N., Kiyashko V.I., Bakanov A.I. [Nutrition and food relationships of fish in the reservoirs of the Volga cascade] In: *Teoreticheskiye aspekty rybokhozyaystvennykh issledovaniy* (Theoretical aspects of fishery studies of reservoirs). Leningrad: Nauka, 1978, P. 55-77.
7. Izvekova E.I., Naberezhny A.N., Toderash I.K. [Nutrition and nutritional needs of larvae]. In: *Motyl' Chironomus plumosus L. (Diptera, Chironomidae): Sistematika, ekologiya, produktsiya (Chironomus plumosus L.) (Diptera, Chironomidae): Systematics, ecology, production)* – Moscow: Nauka, 1983, P. 148-155.

8. Kuz'mina V.V. [Effect of temperature on digestive hydrolases of invertebrates]. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii - J. Evol. Biochem. Physiol.* 1999, 35(1): 15-19.
9. Kuz'mina V.V. [The contribution of induced autolysis to the digestion of secondary consumers by the example of aquatic organisms]. *Doklady Rossiiskoi Akademii Nauk – Proc. Russ. Acad. Sci.* 2000, 339(1): 172-174.
10. Kuz'mina V.V., Chornaya E.Yu., Skvortsova E.G., Kulivatskaya E.A., Sheptitskiy V.A. Temperature characteristics of peptidases of chironomid larvae, potential fish prey, at various pH values. *Biosyst. Diver.* 2018, 3: 201-205. DOI: 10.15421/011830.
11. Kuz'mina V.V., Golovanova I.L. Contribution of prey proteinases and carbohydrases in fish digestion. *Aquacult.* 2004, 234: 347-360.
12. 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. <<http://dx.doi.org/10.1134/S1995082919020093>>
13. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Shalygin M.V., Kovalenko K.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: 1359-1368. DOI:10.1007/s10695-015-0091-4
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, 43: 373-383. DOI: 10.1007/s10695-016-0293-4
15. Kuz'mina V.V., Zolotareva G.V., Sheptitskiy V.A., Filipenko S.I. *Rol' ob"yektov pitaniya i mikrobioty v protsessakh pishchevareniya ryb iz raznykh ekosistem* (The role of food objects and microbiota in the digestion of fish from different ecosystems). Tiraspol': Pridnestr. Univ. Publ., 2016, 196 p.
16. Skvortsova E.G., Egorova A.A., Kuz'mina V.V. [Influence of temperature and pH of the medium on the activity of peptidases in chironomid larvae - potential food objects for benthophagous fish]. *Problemy biologii productivnykh zivotnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2016, 4: 46-56.
17. Ugolev A.M., Iezuitova N.N. *Issledovaniye pishchevaritel'nogo apparata u cheloveka. Obzor sovremennykh metodov.* (Study of the human digestive system. Review of modern methods). Leningrad: Nauka Publ., 1969: 169-173.
18. 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.
19. Ugolev A.M., Tsvetkova V.A. [Induced autolysis as an important mechanism of the initial stages of digestion in vivo]. *Fiziol. Zhurn. - Physiol. J.* 1984, 70: 1542-1550.
20. Zolotareva G.V., Chornaya E.Yu., Talpa G.V., Kuz'mina V.V., Filipenko S.I., Sheptytsky V.A. [Influence of temperature on the activity of proteinases in fish and their food items from the Kuchurgan reservoir]. In: *Hydroeconnex International Conference "Hydropower Impact on River Ecosystem Functioning"*. Tiraspol, 2019: 127-130.

Characteristics of glycosidases and peptidases in chironomid larvae – potential prey of benthophagous fish

¹Kuz'mina V.V., ²Chornaya E.Yu., ¹Kulivatskaya E.A., ²Sheptitsky V.A.

¹ Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok
Yaroslavl oblast, Russian Federation; ² Shevchenko Pridnestrovian State University,
Tiraspol, Moldova.

ABSTRACT. Some characteristics of glycosidases and peptidases in homogenates of *Chironomus plumosus* chironomid larvae were studied. It was shown that the activity of glycosidases of chironomid larvae, depending on temperature, exceeds that of caseinolytic peptidases by 2.4-7.8 times, and hemoglobinolytic peptidases by 3.8-12.7 times. The optimum activity of glycosidases in small larvae was found at pH 7.0, and in large larvae at pH 8.0. The temperature optimum for glycosidases in small larvae at pH 7.4 was noted at 50° C, for casein and hemoglobin lytic peptidases, regardless of pH (7.4 and 5.0) at 40°С. The relative activity of glycosidases at 0°С is higher than that of casein- and hemoglobinolytic peptidases: 38.2, 25.4, and 23.9%, respectively. The maximum values of the temperature coefficient Q_{10} in the case of glycosidases are higher (40-50°С) than peptidases (usually 30-40°С). The activation energy (Eact) of hydrolysis of various substrates by glycosidases and peptidases of chironomid larvae in the zone of lower temperatures (up to the inflection point, 10 and 20 ° C, respectively) is lower than in the zone of higher temperatures. The revealed features of enzymes in chironomid larvae, including a relatively high level of activity in the low temperature zone and low Eact values, allow chironomid larvae to be not only consumers, but also food objects for fish, effectively participating in the processes of induced autolysis.

Keywords: chironomid larvae, glycosidases, peptidases, pH, temperature

Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2017, 4: 45-56

Поступило в редакцию: 09.11.2020

Получено после доработки: 02.12.2020

Кузьмина Виктория Вадимовна, д.б.н., проф., тел. 8(485)472-45-26,

vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru;

Чорная Елена Юрьевна, асп.;

Куливацкая Екатерина Алексеевна, м.н.с.;

Шептицкий Владимир Александрович, д.б.н., проф.