

**ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА КАРОТИНОИДОВ ГИГАНТСКОЙ УСТРИЦЫ
CRASSOSTREA GIGAS (THUNBERG)
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПЛОИДНОСТИ И УСЛОВИЙ ОБИТАНИЯ**

Приведены данные о суммарном составе каротиноидов диплоидных и триплоидных особей устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg), выведенных в питомнике «France Turbot», а также выведенных и выращенных в питомнике ИнБЮМ. При анализе качественного состава каротиноидов у всех устриц выявлены 6 общих основных каротиноидов: красостреаксантин *A*, аллоксантин, диатоксантин, красостреаксантин *B*, галоцантиаксантин и пектенол *A*. Предложены возможные пути трансформации и накопления этих каротиноидов в тканях устриц.

Ключевые слова: устрицы, *Crassostrea gigas*, плоидность, каротиноиды, метаболизм.

На протяжении многих десятилетий тихоокеанская (гигантская, японская) устрица *Crassostrea gigas* является наиболее популярным и перспективным объектом марикультуры. Однако изменению их пигментного состава в зависимости от плоидности и условий выращивания в литературе уделяется мало внимания. В начале этого столетия японскими учеными был установлен качественный состав *C. gigas*, обитающей на Дальнем Востоке. Им удалось идентифицировать 22 каротиноида, из которых многие были открыты впервые [7, 8]. Известно, что на пигментный состав моллюсков-фильтраторов большое влияние оказывает окружающая среда и особенно спектр питания (состав фитопланктона) [11]. Выращивание гигантской устрицы в условиях Чёрного моря, несомненно, отразится на составе каротиноидов данного моллюска; однако подобных исследований на этом водоёме ранее не проводилось.

Нами изучены особенности качественного и количественного состава каротиноидов гигантской устрицы *Crassostrea gigas* (Th) в зависимости от плоидности и мест выращивания.

Материал и методы. Объектом исследований являлись особи гигантской устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg) с различными плоидностями, которые были получены во французском питомнике «France Turbot» (французские устрицы), а также с обычной плоидностью, выращенные в питомнике ИнБЮМ. Французские устрицы с различной плоидностью были завезены для дальнейшего разведения в Чёрное море на мидийно-устричную ферму «Яхонт» ЛТД в район Кацивели в 2006 – 2007 гг. *C. gigas*, выведенные в питомнике ИнБЮМ, выращивались в садках, расположенных между бухтами Мартыновой и Карантинной (взморье г. Севастополя). Сравнительный анализ всех устриц проводили в марте 2009 г. Для изучения особенностей пигментного состава выбирали устриц возрастом 1+ года по 10 экз. каждой плоидности. Суммарные каротиноиды тканей определяли у каждой особи отдельно. Отдельно исследовали жабры и гепатопанкреас, а оставшиеся ткани объединяли. Определяли сырой вес тканей и экстрагировали ацетоном (100%) в соответствии с методикой определения суммарных каротиноидов [6]. Для исследования качественного состава каротиноидов ацетоновый экстракт *C. gigas* упаривали в вакууме при температуре до 25⁰С, растворяли в хлороформе и хроматографировали на тонком слое на пластинках с силикагелем («Силуфол») в системе ацетон: гексан 3:7 и 6:4. Последовательность действий при идентификации каротиноидов описана ранее [6]. Дальнейшую идентификацию проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), спектров видимой области (UV-Vis), протонно-магнитного резонанса (¹H NMR) и масс-спектров (FAB MS). ВЭЖХ определяли на приборе Shimadzu LC-6AD с использованием детектора Shimadzu SPD- 6AV при длине волны 450 нм на колонке COSMOSIL SSL-II с внутренним диаметром 4,6 мм длиной 250 мм.

В качестве элюента использовали смесь ацетон-гексан в соотношении 3:7 при скорости потока 0,5 мл в мин. [1,6]. Спектры видимой области определяли на спектрофотометре Shimadzu U-240 в диэтиловом эфире и на Specol-10 в ацетоне. Масс-спектры были получены на спектрометре JEOL JMS HX 110A на матрице из мета-нитробензилового спирта. Спектры протонного магнитного резонанса (500 MHz) сняты на Varian UNITY INOVA 500 в дейтерохлороформе: в качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан. Полученные спектры идентифицировали по опубликованным ранее спектральным характеристикам этих каротиноидов [5,10].

Цифровой материал обработан статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты представлены как $\bar{x} \pm S\bar{x}$. О нормальности распределения судили по сопоставлению величин средней арифметической и моды.

Результаты и обсуждение. Основным органом, содержащим каротиноиды, у всех *C. gigas* является гепатопанкреас (от 95,5 до 98,4%). Ранее нами были отмечены отличия в суммарном содержании и распределении каротиноидов у французских диплоидных (98,6%) и триплоидных (68,5%) устриц в период их роста до 1 года [2]. К годовалому возрасту у этих устриц достоверных различий в тканевой специфике распределения каротиноидов, как видно из рис. 1, не наблюдалось. Отмечены существенные различия по содержанию суммарных каротиноидов между полиплоидными французскими устрицами, выращенными в районе Кацивели, и устрицами, выращенными на Севастопольском взморье (ИнБЮМ): французские устрицы - $10,8 \pm 1,5 \text{ мг} \cdot 100 \text{ гр}^{-1}$ (диплоиды); $12,7 \pm 1,6 \text{ мг} \cdot 100 \text{ гр}^{-1}$ (триплоиды) и устрицы из ИнБЮМа - $1,5 \pm 0,4 \text{ мг} \cdot 100 \text{ гр}^{-1}$.



Рисунок 1. Распределение (%) суммарных каротиноидов по тканям устриц ($\bar{x} \pm s$): французские устрицы *C. gigas* А – диплоидные, Б – триплоидные; В – устриц, выращенных на Севастопольском взморье (ИнБЮМ).

Figure 1. Tissue distribution (%) of total carotenoids of oysters ($\bar{x} \pm s$): the French oysters *C. gigas* А - diploid, Б - triploid; В - oysters who have been brought up on the Sevastopol beach (of IBSS).

Предварительный анализ качественного состава каротиноидов с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) у диплоидных и триплоидных устриц показал отсутствие отличий в основном фракционном составе каротиноидов. В дальнейшем эти экстракты были объединены для изучения основных фракций каротиноидов. Сравнение состава каротиноидов *C. gigas* из Франции и из питомника ИнБЮМ с помощью ТСХ показал идентичность 5 основных фракций каротиноидов (рис. 2 а). С помощью ВЭЖХ (рис. 2 б) удалось разделить пигменты (2-5): хлорофилл, аллоксантин, диатоксантиин, красостреаксантиин В, которые сложно выделить методом ТСХ. Номер каротиноида на рис. 2б связан со временем регистрации пика поглощения при 450 нм, что указано на ВЭЖХ-хроматограмме. У выделенных таким образом каротиноидов исследованы спектры видимой области, масс-спектры и спектры протонно-магнитного резонанса.

Полученные результаты представлены в табл. 1. Спектральные характеристики этих каротиноидов соответствуют описанным ранее [4, 7, 8, 10]. Отличия в содержании некоторых непостоянных пигментов в составе *C. gigas* из ИнБЮМ от *C. gigas* из France Turbot, анализу не подвергались из-за низкой концентрации в пробах. Эти отличия могут быть связаны с различной диетой этих устриц и влиянием эвтрофикации разных мест выращивания этих устриц.

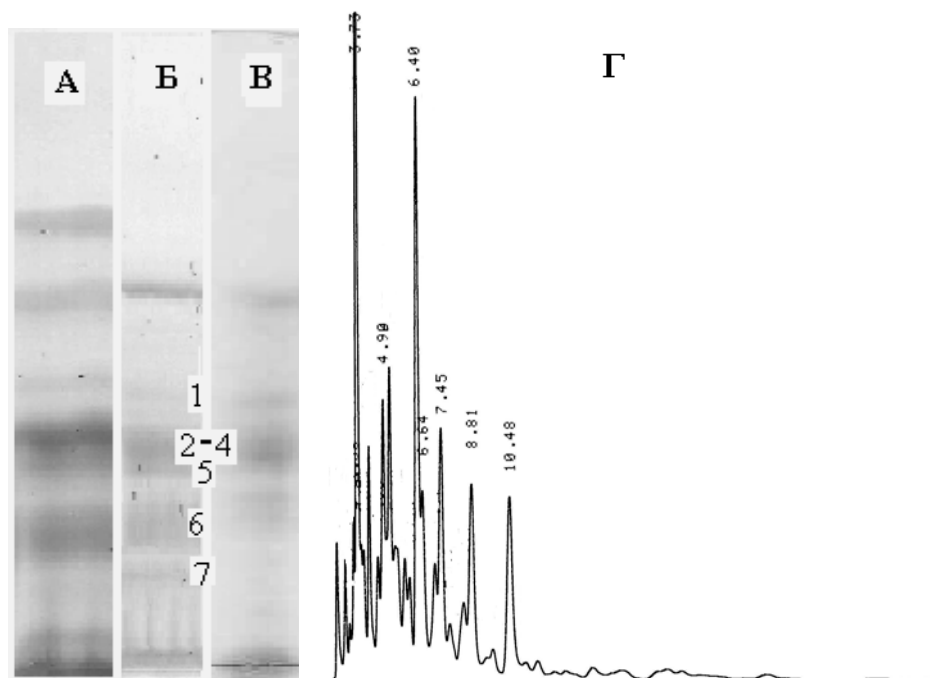


Рисунок 2. Хроматограммы каротиноидов *C. gigas*: ТСХ А) устрицы из питомника ИнБЮМ; Б) французские диплоиды; В) французские триплоиды: 1 - красостреаксантин А; 2 - 4 - смесь хлорофилла а, аллоксантина и диатоксантина; 5 - красостреаксантин В; 6 - галоцинтиаксантин; 7 - пектенол А; ВЭЖХ (Г): 3.73 - хлорофилл а; 4.90 - красостреаксантин А; 6.40 - аллоксантин; 6.64 - диатоксантин; 7.45 - красостреаксантин В; 8.81 - галоцинтиаксантин; 10.48 - пектенол А

Figure 2. Chromatography of carotenoids in the tissue of *C. gigas*: TLC А) oysters from IBSS nursery; Б) french diploid; В) french triploid. 1- crassosrteaxanthin А; 2 - 4 - chlorophyll а, alloxanthin and diatoxanthin; 5 - crassostreaxanthin В; 6 - hallocynthiaxanthin; 7 - pectenol А. HPLC (Г): 2.73 - chlorophyll а; 4.90 - crassosrteaxanthin А; 6.40 - alloxanthin; 6.64 - diatoxanthin; 7.45 - crassostreaxanthin В; 8.81 - hallocynthiaxanthin; 10.48 - pectenol А

Каротиноиды аллоксантин, диатоксантин, галоцинтиаксантин, пектенол А широко встречаются в морских организмах [5, 11], тогда как красостреаксантин А и В известны пока только для *C. gigas* [4, 5].

Процентное соотношение выделенных пигментов в суммарном экстракте *C. gigas*: красостреаксантин А - $15 \pm 5\%$; аллоксантин - $25 \pm 4\%$; диатоксантин - $5 \pm 1\%$; красостреаксантин В - $10 \pm 3\%$; галоцинтиаксантин - $10 \pm 3\%$; пектенол А - $8 \pm 1\%$, неидентифицированные каротиноиды - $17 \pm 10\%$. Качественный состав основных 6 каротиноидов *C. gigas* из питомника ИнБЮМ идентичен составу *C. gigas* из Франции [7, 8], однако их концентрация различна. У *C. gigas* (ИнБЮМ) преобладающим каротиноидом является аллоксантин. У этого же вида устриц, обитающих в Тихом океане, самое высокое содержание каротиноидов приходится на галоцинтиаксантин, чуть ниже уровень митилоксантина и фукоксантина [7, 8].

Таблица 1. Спектральные характеристики каротиноидов *C. gigas* из Франции и питомника ИИБЮМ; Table 1. Carotenoids of *C. gigas* from French and IBSS nursery

UV-Vis	Аллоксантин	Диатоксантин	Красостреаксантин <i>A</i>	Красостреаксантин <i>B</i>	Пектенол А	Галоцантиаксантин
	451, 480	450, 449	450, 470	450, 470	450, 449	450, 470
MS						
(<i>m/z</i>)	564	566	598	598	582	598
(<i>M</i> ⁺)						
¹ H-MR	мульти. (<i>J</i> в Hz)	мульти. (<i>J</i> в Hz)	мульти. (<i>J</i> в Hz)	мульти. (<i>J</i> в Hz)	мульти. (<i>J</i> в Hz)	мульти. (<i>J</i> в Hz)
2	1,41 dd (12, 12) 1,84 ddd (12, 4, 2)	1,48 dd (12, 12) 1,86 ddd (12, 4, 2)	1,48 dd (12, 12) 1,86 ddd (12, 4, 2)	1,48 dd (12, 12) 1,86 ddd (12, 4, 2)	1,57 dd (13, 4) 1,69 dd (13, 13)	1,36 dd (13, 12) 1,50 ddd (13, 4, 2)
3	3,99 m	4,01 m	4,01 m	4,01 m	3,88 m	3,82 m
4	2,03 dd (18, 10) 2,43 ddd (18, 6, 2)	2,09 dd (18, 10) 2,46 ddd (18, 6, 2)	2,09 dd (18, 10) 2,46 ddd (18, 6, 2)	2,09 dd (18, 10) 2,46 ddd (18, 6, 2)	3,94 d (3.5)	1,79 dd (14, 9) 2,33 ddd (14, 5, 2)
7					6,09 d (16)	2,60 d (18)
8					6,17 d (16)	3,66 d (18)
10	6,46 d (11)	6,30 d (11)	6,30 d (11)	6,30 d (11)	6,17 d (11)	
11	6,52 dd (14, 11)	6,82 dd (14, 11)	6,82 dd (14, 11)	6,82 dd (14, 11)	6,65 dd (14, 11)	7,15 d (11)
12	6,36 d (14)	6,35 d (14)	6,35 d (14)	6,35 d (14)	6,38 d (14)	6,58 dd (15, 11)
14	6,27 m	6,25 m	6,25 d (11)	6,25 m	6,25 m	6,67 d (15)
15	6,64 m	6,62 m	6,62 m	6,62 m	6,62 m	6,41 d (11)
16	1,15 s	1,19 s	1,19 s	1,19 s	1,07 s	6,64 m
17	1,20 s	1,25 s	1,25 s	1,25 s	1,09 s	1,04 s
18	1,92 s	1,97 s	1,97 s	1,97 s	1,90 s	0,96 s
19	2,01 s	2,00 s	2,00 s	2,00 s	1,96 s	1,22 s
20	1,98 s	1,93 s	1,93 s	1,93 s	1,97 s	1,95 s
2'	1,41 dd (12, 12) 1,84 ddd (12, 4, 2)	1,48 dd (12, 12) 1,77 ddd (12, 4, 2)	2,52 dd (15, 5) 2,69 dd (15, 7)	2,65 d (6) 2,85 d (6)	1,41 dd (12, 12) 1,84 ddd (12, 4, 2)	1,99 s 1,41 dd (12, 12) ddd (12, 4, 2)
3'	3,99 m	4,00 m	4,21 m	4,20 m	3,99 m	1,84 ddd (12, 4, 2)
4'	2,03 dd (18, 10) 2,43 ddd (18, 6, 2)	2,07 dd (18, 10) 2,39 ddd (18, 6, 2)	1,31 ddd (12, 11, 10) 2,17 ddd (12, 7, 5)	2,22 dd (13, 6) 2,44 dd (13, 8)	2,03 dd (18, 10) 2,43 ddd (18, 6, 2)	3,99 m 2,03 dd (18, 10) 2,43 ddd (18, 6, 2)
5'			2,32 ddq (11, 7, 7)			
7'		6,10 d (11)	2,86 d (13.5) 2,93 d (13.5)	3,51 d (17) 3,57 d (17)		
8'		6,15 dd (14, 11)				
10'	6,46 d (11)	6,15 d (11)	7,26 d (11)	7,20 d (10)	6,46 d (11)	
11'	6,52 dd (14, 11)	6,64 dd (14, 11)	6,59 dd (15, 11)	6,62 dd (15, 11)	6,52 dd (14, 11)	6,46 d (11)
12'	6,36 d (14)	6,36 d (14)	6,68 d (15)	6,66 d (15)	6,36 d (14)	6,52 dd (14, 11)
14'	6,27 m	6,25 m	6,42 d (11)	6,41 d (11)	6,27 m	6,36 d (14)
15'	6,64 m	6,64 m	6,66 m	6,87 m	6,64 m	6,27 m
16'	1,15 s	1,07 s	2,14 s	2,22 s	1,15 s	6,64 m
17'	1,20 s	1,07 s	1,10 s	1,64 br.s	1,20 s	1,15 s
18'	1,92 s	1,74 s	0,99 d (7)	1,68 br.s	1,92 s	1,20 s
19'	2,01 s	1,97 s	1,93 s	1,95 s	2,01 s	1,92 s
20'	1,98 s	1,97 s	1,99 s	2,00 s	1,98 s	2,01 s

s: синглет, d: дуплет, q: квартет, m: мультиплет, br.s : общий синглет

Отличие в количественном содержании основных каротиноидов между *C. gigas*, выращенными на Черном море и обитающими в Тихом океане, может быть связано с особенностями диеты и влиянием эвтрофированности вод. Накопление у устриц таких каротиноидов, как аллоксантин, диатоксантин, галоцантиаксантин и пектенол А, аналогично другому двустворчатому моллюску-фильтратору – мидии [9, 11]. Этот процесс связан с метаболической трансформацией фукоксантина до аллоксантина [11] и диатоксантина до пектенола А [9]. Присутствие в тканях устриц аллоксантина в значительных концентрациях, а также наличие галоцантиаксантина позволяют предполагать у черноморских и тихоокеанских устриц сходный с мидиями путь метаболизма от фукоксантина до аллоксантина и от диатоксантина до пектенола А [9, 11].

Каротиноиды фукоксантин и диатоксантин являются пигментами растительного происхождения и доминируют у представителей черноморского фитопланктона. Фукоксантин встречается у многих водорослей, принадлежащих отделам Bacillariophyta, Dinophyta, Prymnesiophyceae, Chrysophyta, Raphidophyta [3]. Микроводоросли отделов Bacillariophyta и Chrysophyta составляют основу черноморского фитопланктона и могут являться источником поступления этих каротиноидов к устрицам на протяжении всего года [3]. Образование в тканях устриц специфических каротиноидов красостреаксантина А и В также связано с метаболической трансформацией фукоксантина.

Выводы. Основным органом, накапливающим каротиноиды у устриц *C. gigas* (ИнБЮМ) и *C. gigas* (France Turbot), является гепатопанкреас; в нем содержится от 95 до 98% всех каротиноидов. Содержание суммарных каротиноидов в тканях *C. gigas* (France Turbot) как диплоидов, так и триплоидов, на порядок выше, чем у *C. gigas* (ИнБЮМ). Отличий в качественном составе 6 главных фракций каротиноидов между разными плоидностями *C. gigas*, выращенными на мидийно-устричной ферме в Кацивели, и *C. gigas* из питомника ИнБЮМ не выявлено. Идентифицированы следующие каротиноиды: красостреаксантин А, аллоксантин, диатоксантин, красостреаксантин В, галоцантиаксантин и пектенол А. 17% пигментов не идентифицировано. Преобладающим каротиноидом для *C. gigas*, выращенных в Черном море, являлся аллоксантин - 25%.

Благодарности. Автор выражает благодарность Dr. Takashi Maoka (Research Institute for Production development, г. Киото, Япония) за помощь в снятии спектров ВЭЖХ, МС, ЯМР, а также за дискуссию. Автор признателен к.б.н. В.И. Холодову и О.Ю. Вяловой за предоставление устриц с устричных ферм.

1. Бородин А.В., Нехорошев М. В., Солдатов А.А. Каротиноидный состав тканей двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Br. – вселенца в Чёрное море // Экология моря. – 2008. – Вып. 76 – С. 34 -39.
2. Вялова О. Ю., Бородин А.В., Щербань С. А. Первые результаты вселения и выращивания тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* различной плоидности в Черном море // Морские прибрежные экосистемы. Водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки: Тез. докл. 3-й междунар. науч.-практ. конф. (8 – 10 сент. 2008 г.) – Владивосток, 2008. – С. 231.
3. Микроводоросли Чёрного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования / Под. ред. Ю.Н. Токарева, З.З. Финенко, Н.В. Шадрина; НАН Украины, Институт биологии южных морей. - Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. – 454 с.
4. Fujiwara Y., Maoka T., Ookubo M., Matsuno T., Crassostreaxanthin A and B, novel marine carotenoids from the oyster *Crassostrea gigas* // Tetrahedron Lett. – 1992. – **33**. – P. 4941 – 4944.
5. Carotenoids. Vol. 4 : Natural Functions / Eds.: Boston ; Berlin : Birkhauser Verlag, 2008. - 370 p.
6. Maoka T., Akimoto N. Natural product chemistry in carotenoid some experimental techniques for structural elucidation and analysis of natural carotenoids // Mini-review: Carotenoid Science. – 2008. – **13**. – P. 10 – 17.
7. Maoka T. Fujiwara Y., Hashimoto K., Akimoto N. Structures of new carotenoids with a 3,4-dihydroxy- β -end group from the oyster *Crassostrea gigas* // J. Chem. Pharm. Bull. – 2005. – **53**, № 9. – P. 1207 – 1209.
8. Maoka T., Hashimoto K., Akimoto N., Fujiwara Y. Structures of five new carotenoids from the oyster *Crassostrea gigas* // J. Nat. Prod. – 2001. – **64**. – P. 578 – 581.
9. Maoka T., Matsuno T. Isolation and structural elucidation of three new acetylenic carotenoids from

- the Japanese sea mussel *Mytilus coruscus*// J. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. – 1988. – **54**. – P. 1443 - 1447.
10. *Mass Spectrometry of Carotenoids* / Contr. by Richard B. van Breemen // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. - 2001. - F2.4.1-F2.4.13. - Режим доступа : <http://www.nshtvn.org/ebook/molbio/Current%20Protocols/CPFAC/faf0204.pdf>
 11. *Partali V., Tangent K., Liaaen-Jensen S.* Carotenoids in food chain studies – III. Resorption and metabolic transformation of carotenoids in *Mytilus edulis* (edible mussel) // Comp. Biochem. Physiol. – 1989. – **92B**, № 2. – P. 239 – 246.

Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь

Получено 08.11.2009

О. В. БОРОДИНА

ОСОБЛИВОСТІ СКЛАДУ КАРОТИНОЇДІВ УСТРИЦЬ *CRASSOSTREA GIGAS* (THUNBERG) В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПЛОДІДНОСТІ І УМОВ МІЖАННЯ

Резюме

Приведені дані про сумарний склад каротиноїдів диплоїдних і триплоїдних устриць *Crassostrea gigas* (Thunberg), виведених в розпліднику "France Turbot", та устриць *C. gigas*, виведених і вирощених в розпліднику ІБІМ. При аналізі якісного складу каротиноїдів усіх устриць виявлені 6 загальних основних каротиноїдів: красостреаксантин А; алоксантин; діатоксантин; красостреаксантин В; галоцинтіаксантин; пектенол А. Запропоновані можливі шляхи трансформації і накопичення цих каротиноїдів в тканинах устриць.

Ключові слова: устриці, *Crassostrea gigas* (Thunberg), плоїдність, склад каротиноїдів, метаболізм.

A. V. BORODINA

CAROTENOID COMPOSITION CHARACTERISTICS OF OYSTERS *CRASSOSTREA GIGAS* (THUNBERG) DEPENDING ON VARIOUS PLOIDY AND HABITAT

Summary

The data on the total composition of carotenoids in diploid and triploid oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg), bred in the «France Turbot», and also bred and grown in a nursery IBSS were obtained. Six major carotenoids isolated from all oysters *Crassostrea gigas* have been identified as crassostreaxanthin A, crassostreaxanthin B, alloxanthin, diatoxanthin, halocynthiaxanthin and pectenol A. The possible path way of transformation and accumulation of these carotenoids in the tissues of oysters have been proposed.

Keywords: oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), ploidy, carotenoids composition, total carotenoids, metabolism.