

ТРАНСФОРМАЦИЯ КАРОТИНОИДОВ МОРСКОГО ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *CERASTODERMA GLAUCUM* (BRUGUIERE, 1789) ПРИ ПИТАНИИ КУЛЬТУРОЙ ЗЕЛЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ

© 2020 г. А. В. Бородина^{1,*}, П. А. Задорожный²

¹ ФИЦ ИнБЮМ РАН, Севастополь, 299011 Россия

² Институт химии ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: borodinaav@mail.ru

Поступила в редакцию 19.02.2020 г.

После доработки 22.05.2020 г.

Принята к публикации 16.06.2020 г.

Представлены результаты эксперимента по влиянию питания культурой зеленой микроводоросли *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen, 1966) на состав и содержание каротиноидов двустворчатого моллюска *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789). В составе каротиноидов моллюсков идентифицированы: β -каротин, аллоксантин, лютеин, диадноксантин, неоксантин, фукоксантин, гетероксантин, мактраксантин и эфиры последних трех каротиноидов. Отмечено, что мактраксантин является видоспецифичным для сердцевидки. Состав каротиноидов *T. viridis* был представлен 5 соединениями: β , β -каротин, лютеин, зеаксантин, виолаксантин, неоксантин. Шестидневная диета моллюсков из монокультуры *T. viridis* привела к увеличению общей концентрации каротиноидов в тканях моллюска, в основном, за счет увеличения каротиноидов, характерных для водорослей исследуемого вида. Процесс сопровождался снижением концентрации других растительных пигментов каротиноидного ряда и изомеризацией мактраксантина. Несмотря на изменения в накоплении и трансформации каротиноидов, в эксперименте была зафиксирована гибель 20% особей, что свидетельствует о неблагоприятном влиянии однообразного питания на выживаемость моллюсков.

Ключевые слова: каротиноиды, *Cerastoderma glaucum*, *Tetraselmis viridis*, диета, метаболизм, мактраксантин

DOI: 10.31857/S0044452920060030

ВВЕДЕНИЕ

В конце прошлого века были идентифицированы каротиноиды многих морских двустворчатых моллюсков, благодаря которым и были определены основные пути трансформации растительных каротиноидов [1, 2]. Однако, помимо хорошо известных и часто встречающихся метаболических путей трансформации каротиноидов, характерных для большинства видов двустворчатых фильтрующих моллюсков, существуют еще для отдельных видов индивидуальные пути метаболических преобразований, с образованием видоспецифичных каротиноидов [3]. Возникновение этих каротиноидов напрямую связано с их особой функциональной ролью в данном организме – это представляет особый научный интерес. Среди факторов, влияющих на накопление и метаболизм каротиноидов животных, наиболее важными являются изменения в спектре питания [2–6].

Одним из типичных представителей черноморской малакофауны является двустворчатый моллюск *Cerastoderma glaucum*, фильтрующий seston на рыхлых почвах Крымского побережья [7]. Несмотря на широкий спектр питания, взрослые особи предпочитают детрит, взвешенные органические вещества, а более молодые особи питаются, в основном, одноклеточными водорослями [9]. Источником последних может быть как фитопланктон, так и бентосные виды [10]. Ранее нами была исследована сезонная изменчивость состава каротиноидов у этого черноморского вида моллюсков [8]. Всего было обнаружено 11 свободных и 4 этерифицированных каротиноидов, среди которых был идентифицирован видоспецифичный каротиноид – мактраксантин, который накапливался в 2 изомерных формах, в свободном и этерифицированном состоянии. Для моллюска *C. glaucum* была отмечена чувствительность к сезонным изменениям места обитания [8]. Известно, что прибрежный состав крымского черноморского фитопланктона пред-

ставлен 386 видами микроводорослей, 4% из которых принадлежат Chlorophyta [10]. В некоторых местах поселений моллюсков во время отлива, в бухтах, часто наблюдается временное заболачивание. В этих местах в эти периоды увеличивается рост зеленых макрофитов и микроводорослей Chlorophyta, которыми обрастают раковины моллюсков. Чувствительность *C. glaucum* к сезонным изменениям, малоизученность путей метаболизма каротиноидов у этого вида, а также обрастание раковин моллюска в естественных условиях обитания зелеными макро- и микроводорослями привели к возникновению научного интереса к трансформации каротиноидов у этого вида моллюсков.

Цель данной работы – исследовать накопление и трансформацию растительных каротиноидов зеленых микроводорослей в тканях морского двустворчатого моллюска *C. glaucum* при использовании в пищу монокультуры зеленых микроводорослей *Tetraselmis viridis*. Для этого решались задачи по установлению состава и содержания каротиноидов *T. viridis* и *C. glaucum*, а затем поставлен и проведен шестидневный эксперимент в лабораторных условиях по содержанию группы особей морских двустворчатых моллюсков *C. glaucum* на диете из зеленых микроводорослей *T. viridis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследования – *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789), морской вид двустворчатых моллюсков (сестонофагов) из семейства Cardidae. Исследования моллюсков проводились в осенний период 2016 и 2017 г. В начале была проведена работа по подробному исследованию состава каротиноидов *C. glaucum* из естественного поселения в районе Казачьей бухты (г. Севастополь), а потом был подготовлен и проведен 6-дневный эксперимент. На этапе подготовки к эксперименту были отобраны моллюски *C. glaucum* в количестве 60 особей с длиной раковины 25 мм и более. После трехдневной акклимации животных в лаборатории в естественной морской воде, взятой в прибрежной части залива, их разделили на 2 равные группы: контрольную и экспериментальную. Контрольная группа продолжала содержаться в морской воде из бухты; для экспериментальной группы морскую воду сначала фильтровали через мембранные фильтры диаметром пор 0.45 мкм, затем стерилизовали при температуре 75°C [11]. Обмен морской воды в контрольной и экспериментальной группах на удаление метаболитов проводили один раз в день в одно и то же время, после чего в экспериментальную группу вносили корм – микроводоросли *Tetraselmis viridis* из расчета 1–3 мг сухой массы на 3 л морской воды один раз в день [11]. *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) относятся к зеленым микроводорослям (Chlorodendraceae (семейство); *Tetraselmis* (род)), были взяты из центра коллективного пользования “Кол-

лекция гидробионтов Мирового океана” ФИЦ Ин-БЮМ и были выращены на среде F/2 [12]. В обеих емкостях круглосуточно проводилась аэрация.

Состав каротиноидов *T. viridis* определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в тех же условиях, что и у *C. glaucum*. Лабораторная обработка тканей моллюсков с целью определения суммарного содержания каротиноидов (ССК) и дальнейшая тонкослойная хроматография (ТСХ), подготовка и хранение образцов проводились в соответствии с мерами предосторожности, рекомендованными при работе с пигментами [13].

Спектрофотометрические методы. Мягкие ткани гомогенизировали в фарфоровой ступке пестиком, затем проводили экстракцию 100%-ным ацетоном [14]. Определение ССК проводили спектрофотометрическим методом [14]. Суммарный экстракт каротиноидов для идентификации методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии (MS) [15] был запечатан в ампулах в атмосфере азота и транспортирован при низкой температуре в Институт химии ДВО РАН.

Хроматографические методы и масс-спектрометрия. Разделение пигментов проводили хроматографическими методами: ТСХ и ВЭЖХ. При проведении ТСХ использовались пластины “Сорбфил” (Россия, Краснодар). Ацетоновые экстракты ССК выпаривали в вакууме, растворяли в хлороформе и разделяли на ацетон:гексан (2:8) при температуре воздуха 18–20°C.

Для ВЭЖХ использовались: хроматограф Shimadzu LC-20 с матричным фотодиодным детектором SPD-M20A; колонка с нормальной фазой Zorbax Sil 4.6 × 250 мм, скорость потока 1 мл × мин⁻¹, градиент гексан–ацетон (0–20 мин гексан:ацетон 8:2 изократический, градиент от 20 до 25 мин до 80% ацетона, 25–35 мин – гексан:ацетон 2:8 (изократический)). Фракции каротиноидов собирали после разделения (приблизительно 10–15 разделений), объединяли, упаривали досуха на роторном испарителе при 40°C, снова растворяли в метаноле, затем масс-спектры регистрировали с использованием масс-спектрометрического детектора низкого разрешения Shimadzu LCMS-2010EV, источник АРСІ, в режиме положительных ионов.

Омыление каротиноидов проводили повторным растворением их в 5%-ном растворе КОН в метаноле.

Оценка количественного содержания каротиноидов была основана на результатах ВЭЖХ с учетом коэффициента $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 2500 при 450 нм. Отношение максимумов III/II, % в спектрах поглощения рассчитывали, как описано в [15].

Статистический анализ. Статистическая обработка и графическое оформление полученной информации проводились при помощи пакета “Gra-

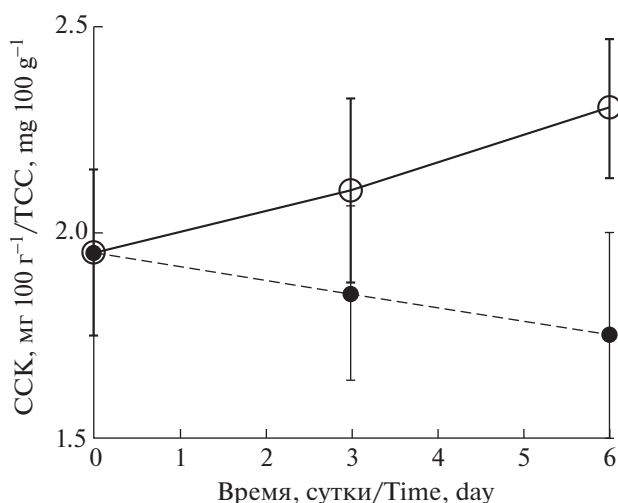


Рис. 1. Динамика содержания суммарных каротиноидов ($\text{мг}/100 \text{ г}^{-1}$) *C. glaucum* в 6-дневном эксперименте. Примечание/Note: \circ – ССК в опыте/ТСС in experiment, \bullet – ССК в контроле/ТСС in control.

Fig. 1. Dynamics of the total carotenoid content ($\text{mg}/100 \text{ g}^{-1}$) in *C. glaucum* during a 6-day experiment.

pher-7". Результаты расчета суммарных каротиноидов представлены как среднее арифметическое (\bar{x}) и стандартная ошибка средней ($S\bar{x}$). Сравнение значений ССК для опытной и контрольной групп проводили с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Все экспериментальные протоколы были выполнены в соответствии с руководящими принципами ЕС по использованию лабораторных животных и уходу за ними (86/609/СЕЕ) и при соблюдении правил, утвержденных распоряжением Президиума АН СССР от 2 апреля 1980 г. № 12000-496 и приказом Минвуза СССР от 13 сентября 1984 г. № 22. Все усилия были предприняты, чтобы использовать только минимальное количество животных, необходимое для получения надежных научных данных. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При отборе моллюсков *C. glaucum* из естественных условий обитания в Казачьей бухте осенью 2016 и 2017 г. диапазон ССК составлял от 2.0 до $3.5 \text{ мг} \times 100 \text{ г}^{-1}$ сырого веса ткани. После трех дней в лабораторных условиях среднее значение ССК уменьшилось до $1.9 \pm 0.2 \text{ мг} \times 100 \text{ г}^{-1}$. В ходе эксперимента этот показатель в контрольной группе моллюсков практически не изменился, а в опытной группе (которую кормили только *T. viridis*) он увеличился до $2.3 \pm 0.1 \text{ мг} \times 100 \text{ г}^{-1}$ (в 1.2 раза, $p < 0.05$) (рис. 1).

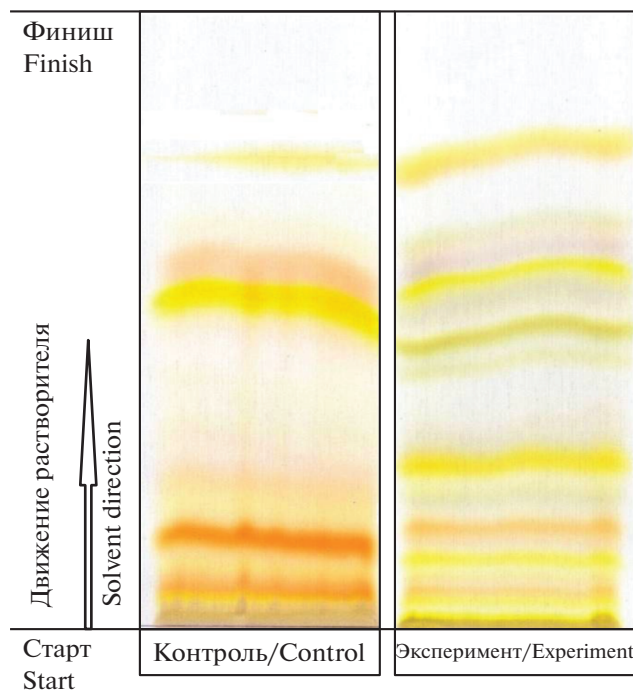


Рис. 2. ТСХ экстракта суммарных каротиноидов (в системе растворителей: ацетон:гексан (2:8)) *C. glaucum* в эксперименте: контроль и опыт.

Fig. 2. TLC of the total carotenoid extract [acetone:hexane (2:8)] from *C. glaucum* in the experiment and control.

Рост ССК в течение эксперимента в опытной группе сопровождался смертностью 20% особей относительно контрольной группы.

Качественный состав каротиноидов *C. glaucum*. ТСХ. С помощью тонкослойного разделения в системе ацетон:гексан (2:8) общего экстракта каротиноидов можно визуально выделить до 10 фракций. Очередность распределения фракций на ТСХ сверху вниз сравнима с временем выхода фракций на ВЭЖХ (рис. 2 и 3).

Метод ВЭЖХ имеет более высокую чувствительность и эффективность разделения, что позволяет определить даже незначительное содержание каротиноида в суммарном экстракте, которое на ТСХ визуально определить невозможно. Последовательность выхода идентифицированных фракций каротиноидов на ВЭЖХ (рис. 3) пронумерована и соответствует номерам каротиноидов в таблице. Результаты по содержанию каждого каротиноида у *C. glaucum* в экспериментальном и контрольном аквариумах представлены как доля (%) от ССК. Всего при использовании ВЭЖХ и МС было выделено и идентифицировано 11 каротиноидов, включая сложные эфиры (рис. 3). Состав остатков жирных кислот для этерифицированных каротиноидов не определялся. На хроматограммах, помимо каротиноидов, есть ряд пиков хлорофилла и их производных, которые присутствуют в

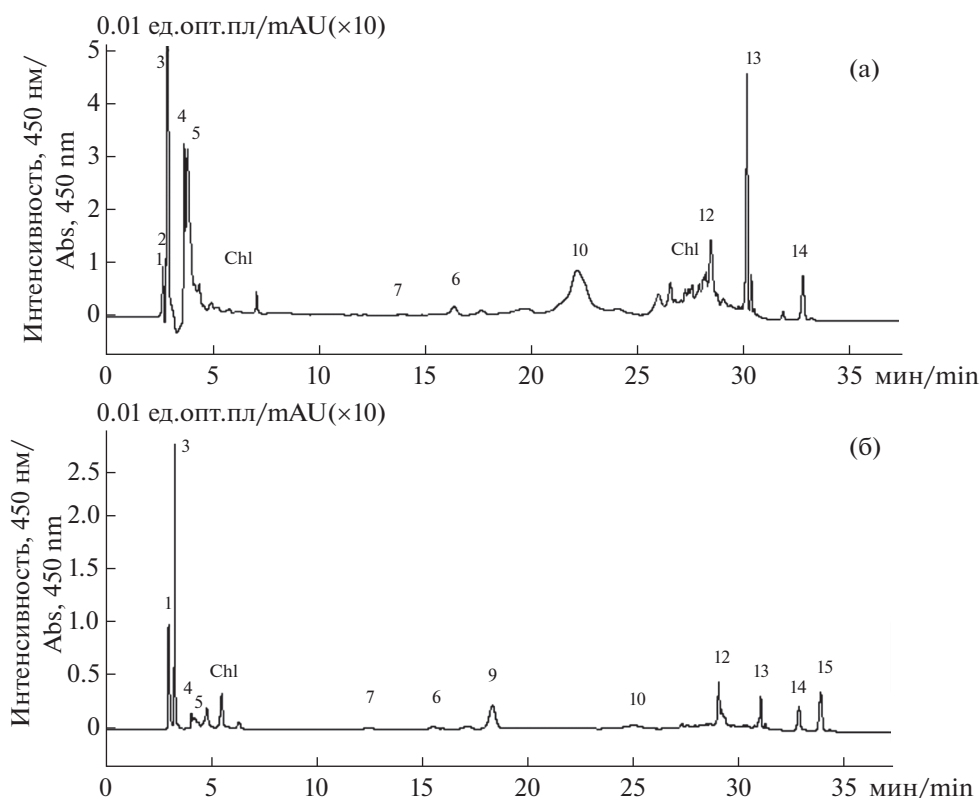


Рис. 3. ВЭЖХ экстракта суммарных каротиноидов *C. glaucum* в эксперименте: А – контроль; Б – опыт. По оси ординат: интенсивность при 450 нм; по оси абсцисс – время, мин. Обозначения пиков: 1 – каротин (β , β - и β , ϵ -), 2 – эфиры гетероксантина, 3 – эфир мактраксантина¹, 4 – эфир фукоксантина, 5 – эфир мактраксантина², Chl – хлорофилл, 6 – аллоксантин, 7 – лютеин, 9 – диадиноксантин, 10 – фукоксантин, 12 – неоксантин, 13 – гетероксантин, 14 – (транс-изомер) мактраксантина, 15 – (цис-изомер) мактраксантина. ¹⁻² – эфиры мактраксантина, образованные разными карбоновыми кислотами.

Fig. 3. HPLC of the total carotenoid extract from *C. glaucum*: A – control; B – experiment. Ordinate: intensity at 450 nm; abscissa – time, min. Peak designations: 1 – carotene (β , β - and β , ϵ -), 2 – heteroxanthin ester, 3 – mactraxanthin ester¹, 4 – fucoxanthin ester, 5 – mactraxanthin ester², Chl – chlorophyll, 6 – alloxanthin, 7 – lutein, 9 – diadinoxanthin, 10 – fucoxanthin, 12 – neoxanthin, 13 – heteroxanthin, 14 – (*trans*-isomer) mactraxanthin, 15 – (*cis*-isomer) mactraxanthin. ¹⁻² mactraxanthin esters formed by different carboxylic acids.

пищеварительной системе моллюска. В табл. 1 представлены результаты качественного состава каротиноидов контрольной и опытной группы моллюсков *C. glaucum*, структурные формулы каротиноидов приведены на рис. 4 [16].

Качественный состав каротиноидов *T. viridis*. ВЭЖХ хроматограмма пигментов микроводорослей представлена на рис. 5, нумерация пиков соответствует номерам каротиноидов в табл. 1, где также приведены их процентные соотношения (табл. 1). Были идентифицированы каротиновая фракция (соотношение β , β - и β , ϵ -изомеров не было определено), лютеин, зеаксантин, виолаксантин, неоксантин.

Идентификация каротиноидов ССК моллюсков и микроводорослей проводилась по следующим хроматографическим и масс-спектрометрическим данным:

β -каротин – время удерживания (R_t) 2.72 мин, максимумы поглощения в элюенте (λ_{max}) 425, 449, 479, соотношение %III/II 41, m/z иона $[M+H]^+$ 537;

Эфир гетероксантина – R_t 2.88 мин (30.5 мин после омыления), λ_{max} 426, 447, 477, %III/II 42;

Эфир мактраксантина¹ – R_t 2.95 мин (33.0 мин после омыления), λ_{max} 418, 441, 470, %III/II 88, $[M+H]^+$ 637 (после омыления);

Эфир фукоксантина – R_t 3.73 мин, λ_{max} 448, (468), %III/II 0;

Эфир мактраксантина² – R_t 3.89 мин (32.8 мин после омыления), λ_{max} 417, 441, 470, %III/II 90, $[M+H]^+$ 637 (после омыления);

Лютеин – R_t 12.98 мин, λ_{max} 424, 446, 475, %III/II 66, $[M+H]^+$ 569;

Зеаксантин – R_t 13.82 мин, λ_{max} 451, 478, %III/II 16, $[M+H]^+$ 569;

Таблица 1. Состав и содержание каротиноидов в *T. viridis* и *C. glaucum*
Table 1. Composition and content of carotenoids in *T. viridis* and *C. glaucum*

№ п/п	Каротиноиды/Carotenoids	Доля от ССК, %/% of ТСС		
		микроводоросли/ microalgae <i>T. viridis</i>	моллюски <i>C. glaucum</i> / mollusks <i>C. glaucum</i>	
			контроль/ control	опыт/ experiment
1	Каротин (β, β- и β, ε-)/Carotene (β, β- and β, ε-)	25	1.6	16.4
2	Эфиры Гетероксантина/Heteroxanthin ester	—	1.3	1.0
3	Эфир Мактраксантина ¹ /Mactraxanthin ester ¹	—	42.5	22.0
4	Эфир Фукоксантина/Fucoxanthin ester	—	5.0	—
5	Эфир Мактраксантина ² /Mactraxanthin ester ²	—	12.4	—
6	Аллоксантин/Alloxanthin	—	0.9	1.4
7	Лютеин/Lutein	44	0.5	1.2
8	Зеаксантин/Zeaxanthin	2	—	—
9	Диадиноксантин/Diadinoxanthin	—	—	14.5
10	Фукоксантин/Fucoxanthin	—	12.7	2.3
11	Виолоксантин/Violaxanthin	9	—	—
12	Неоксантин/Neoxanthin	11	4.4	5.4
13	Гетероксантин/Heteroxanthin	—	6.5	5.5
14	Мактраксантин/Mactraxanthin	—	2.2	5.8
15	Мактраксантин (<i>cis</i> -изомер)/Mactraxanthin (<i>cis</i> -isomer)	—	—	6.2
	Не идентифицированы/Not identified	9	10.0	18.3

Примечание: тире — каротиноид не обнаружен.

Notes: the dash means that the carotenoid was not found.

¹⁻² — эфиры мактраксантина, образованные разными карбоновыми кислотами/¹⁻² — mactraxanthin esters formed by different carboxylic acids.

Диатоксантин — Rt 14.70 мин, λ_{\max} 449, 476, %III/II 62;

Аллоксантин — Rt 15.60 мин, λ_{\max} 424 448, 477, %III/II 68;

Диадиноксантин — Rt 18.34 мин, λ_{\max} 424, 446, 475, %III/II 66, [M+H]⁺ 583;

Фукоксантин — Rt 25.00 мин, λ_{\max} 449, (469), %III/II 0, %III/II 66, [M+H]⁺ 659, [M+Na]⁺ 681, выделенная фракция неразделима со стандартом, выделенным из *Laminaria sp.*;

Виолоксантин — Rt 26.31 мин, λ_{\max} 418, 441, 471, %III/II 92, [M+H]⁺ 601;

Неоксантин — Rt 29.10 мин, λ_{\max} 415, 438, 461, %III/II 80, [M+H]⁺ 601;

Гетероксантин — Rt 30.45 мин, λ_{\max} 425, 449, 478, %III/II 58, [M+H]⁺ 601;

Мактраксантин — Rt 32.88 мин, λ_{\max} 418, 442, 471, %III/II 91, [M+H]⁺ 637;

Мактраксантин (*cis*-изомер) — Rt 33.90 мин, λ_{\max} 418, 440, 471, %III/II 94, [M+H]⁺ 637.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в неблагоприятных условиях у моллюсков (и у других организмов) происходит временное повышение ССК, что связано с попыткой организма адаптироваться к неблагоприятным условиям среды обитания [14].

Естественная среда обитания популяции *C. glaucum* на рыхлой песчаной почве в Казачьей бухте г. Севастополя представляла собой обильные заросли зеленых морских макрофитов — таких как *Cladophora*, *Ulva*, а также *Zoostera*. Часто раковины моллюсков обрастали разнообразными зелеными и бурными водорослями. Исследования подобных обрастаний на примере двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis*, сходного с сердцевидкой по типу питания, показали благоприятное влияние экзометаболитов моллюсков на рост микро- и макрофитов [17].

В опытном варианте питание моллюсков *C. glaucum* монокультурой *T. viridis* привело к увеличению концентрации β-каротина и появлению диадиноксантина в тканях, в то время как фукоксантин, характерный для диатомовых и динофитовых микроводорослей, заметно снизился из-за

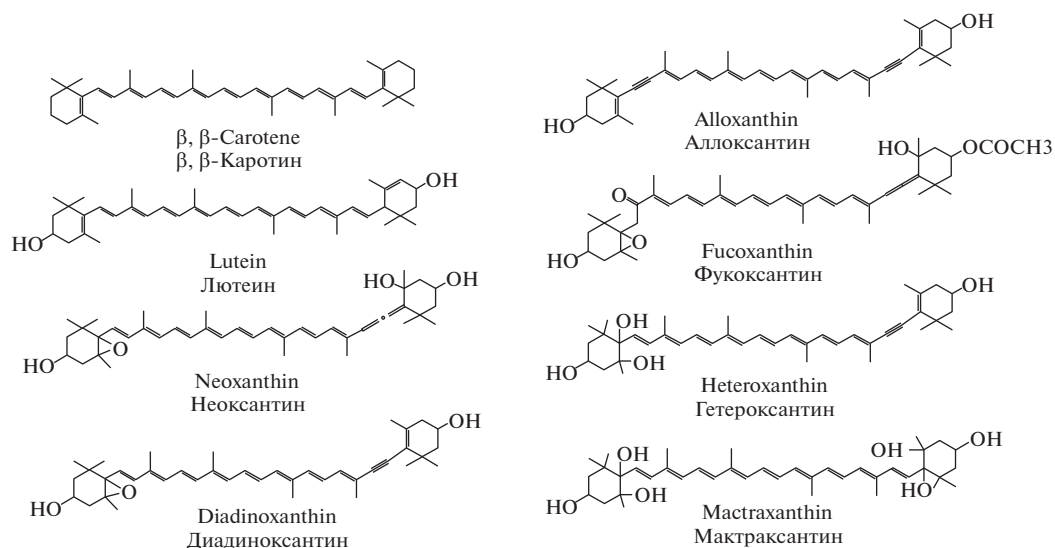


Рис. 4. Структурные формулы каротиноидов *C. glaucum* [16].
 Fig. 4. Structural formulae of carotenoids in *C. glaucum* [16].

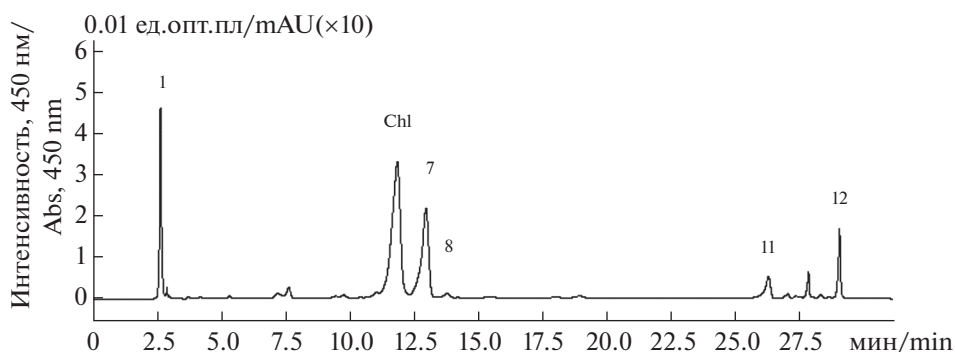


Рис. 5. ВЭЖХ экстракта суммарных каротиноидов зеленых микроводорослей *T. viridis*. По оси ординат: интенсивность при 450 нм; по оси абсцисс – время, мин. Обозначения пиков: 1 – Carotene (β, β - и β, ϵ -), Chl – хлорофилл, 7 – лютеин, 8 – зеаксантин, 11 – виолаксантин, 12 – неоксантин.
 Fig. 5. HPLC of the total carotenoid extract from the green microalgae *T. viridis*. Ordinate: intensity at 450 nm; abscissa – time, min. Peak designations: 1 – carotene (β, β - and β, ϵ -), Chl – chlorophyll, 7 – lutein, 8 – zeaxanthin, 11 – violaxanthin, 12 – neoxanthin.

его отсутствия в спектре питания. Вероятно, отсутствие полноценного питания приводило в опытном варианте к смертности 20% особей.

Согласно табличным данным, основными каротиноидами *C. glaucum* являются мактраксантин и гетероксантин (включая их сложные эфиры и изомеры), которые составляют около 70% от ССК. Гетероксантин является основным каротиноидом желто-зеленых жгутиковых микроводорослей [18]. Мактраксантин, единственный каротиноид *C. glaucum* животного происхождения, впервые был изучен на японских моллюсках *Mastra chinensis* [19]. Как единственный каротиноид животного происхождения, который способен образовываться в тканях сердцевики посредством трансформа-

ции растительного каротиноида, поступающего с пищей, его можно отнести к видоспецифичным, т.е. характерным для данного вида моллюска-сестенофага. Возможным метаболическим предшественником мактраксантина является виолаксантин [20].

Другой характеристикой метаболизма каротиноидов у *C. glaucum* является этерификация основных каротиноидов. Это явление широко распространено у моллюсков [21, 22] и, вероятно, связано с возможностью дополнительного быстрого извлечения свободных каротиноидов через их эфиры, если животные испытывают дефицит в спектре питания.

Состав каротиноидов микроводоросли *T. viridis* (табл. 1) хорошо согласуется с ранее опубликованными данными [23]. В ходе эксперимента в опытном варианте у *C. glaucum* наблюдались появление диадиноксантина, рост неоксантина и относительно стабильная концентрация гетероксантина, несмотря на его отсутствие в *T. viridis*. Вероятно, появление диадиноксантина в тканях *C. glaucum* в экспериментальной группе может указывать на превращение неоксантиновой алленовой связи, которая происходит при элиминации воды, в ацетиленовую с образованием диадиноксантина. Подобное преобразование концевой группы описано для мидии *Mytilus edulis* [24]. Наряду с прямой ассимиляцией гетероксантина из микроводорослей (в контрольной группе), его возможным предшественником (в экспериментальной группе) может быть диадиноксантин: аналогичное превращение 3-гидрокси-5,6-эпоксигруппы приведет к образованию гетероксантина (рис. 4). Подобная трансформация была предложена ранее для мидии *Mytilus edulis* [4].

При изменениях состава каротиноидов, вызванных ассимиляцией пигментов из *T. viridis*, наблюдалось появление геометрического изомера мактраксантина с неидентифицированным положением двойной цис-связи. Снижение уровня сложных эфиров мактраксантина, вызванное, скорее всего, отсутствием полноценного питания, сопровождалось увеличением концентрации свободного мактраксантина и появлением его цис-изомера. Подобные трансформации каротиноидов (переход изомерных форм) сопровождаются повышением антиоксидантных свойств этого каротиноида [25]. Это может быть связано с попыткой моллюска адаптироваться к неблагоприятным условиям питания в опыте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методами ВЭЖХ и МС был определен состав пигментов моллюска *C. glaucum*. Он включает 8 каротиноидов (β -каротин, аллоксантин, лютеин, неоксантин, диадиноксантин, фукоксантин, гетероксантин, мактраксантин (цис- и транс-изомеры)) и 4 эфира каротиноидов, что составляет 90% ССК. Состав каротиноидов *Tetraselmis viridis* был представлен β , β -каротином, лютеином, зеаксантином, виолаксантином, неоксантином.

Шестидневная диета моллюсков *C. glaucum* на монокультуре *T. viridis* сопровождалась увеличением ССК в тканях моллюсков, главным образом за счет каротиноидов, характерных для этого вида микроводорослей. С другой стороны, происходило уменьшение (до полного исчезновения) других растительных пигментов – гетероксантина, фукоксантина и их эфиров. Снижение концентрации эфиров мактраксантина сопровождалось увеличением его количе-

ства в свободном состоянии и появлением цис-изомера. Смертность моллюсков в опыте (гибель 20% особей) свидетельствует о неблагоприятном влиянии такой монодиеты на *C. glaucum* и неспособности этого вида к адаптации в подобных условиях.

Большинство каротиноидов моллюска *C. glaucum* накапливаются из спектра питания без дополнительных преобразований. Исключениями являются процессы этерификации гетероксантина, мактраксантина и фукоксантина; в случае недостатка гетероксантина возможна конверсия: неоксантин \rightarrow диадиноксантин \rightarrow гетероксантин, а также образование мактраксантина и его изомеризация. В роли предшественника мактраксантина возможен виолаксантин, но он не был обнаружен в тканях моллюсков. Мактраксантин является видоспецифичным для этого типа моллюсков.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания № 075-00808-19-01 в соответствии с планом работы ФГБУН ИнБЮМ РАН. (НИОКТР, Тема № 0828-2019-0003, Номер гос. регистрации рег. № АААА-А18-118021490093-4;).

Использовано оборудование Дальневосточного центра структурных исследований ДВО Российской академии наук.

ВКЛАД АВТОРОВ

Направление исследований на протяжении многих лет осуществляется первым автором. В работе им осуществлялись сбор материала, подготовка и проведение эксперимента, определение суммарных каротиноидов, обработка полученных результатов, написание манускрипта, подача документов и ответ рецензентам. Второй автор ответственен за идентификацию каротиноидов методами ВЭЖХ и МС в течение всего периода исследований, включая эксперимент, а также редактирование и дополнение манускрипта в области химии каротиноидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goodwin T.W. The biochemistry of the carotenoids: animals. London; New York: Chapman and Hall. 1984.
2. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (Eds). Carotenoids. Vol. 3. Biosynthesis and Metabolism. Basel: Birkhäuser Verlag. 1998.
3. Бородина А.В., Солдатов А.А. Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков. С. 87–168. В кн. Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии. Шульман Г.Е., Солдатов А.А. (ред.) Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2014. [Borodina A.V., Soldatov A.A. Karotinoidy tkanej massovyh vidov chernomorskih mollyuskov. S. 87–168. V kn. Chernomorskie mollyuski: element sravnitel'noj i ekologicheskoj biohimii. Shulman G.E., Soldatov A.A. (red.) [Carotenoids of tissues of dominant species of Black Sea shellfish. P. 87–168. In book Black Sea clams:

- elements of comparative and ecological biochemistry. Shulman G.E., Soldatov A.A. (Eds.). Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika. 2014 (in Russ)].
4. *Partali V., Tangen K., Liaaen-Jensen S.* Carotenoids in Food Chain Studies – III. Resorption and Metabolic Transformation of Carotenoids in *Mytilus edulis* (Edible Mussel). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 92 (2): 239–246. 1989.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(89\)90272-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90272-1)
 5. *Rico-Villa B., Le Coz J.R., Mingant C., Robert R.* Influence of Phytoplankton Diet Mixtures on Microalgae Consumption, Larval Development and Settlement of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture.* 256 (1–4): 377–388. 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.015>
 6. *Бородина А.В.* Влияние пищевой депривации на трансформацию каротиноидов у двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *Журнал эвол. биохим. и физиол.* 52 (4): 255–263. 2016. [*Borodina A.V.* Effect of Food Deprivation on Transformation of Carotenoids in the Bivalve Mollusc *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *J. Evol. Biochem. Physiol.* 52 (4): 282–291. 2016.]
<https://doi.org/10.1134/S0022093016040025>
 7. *Андреева С.И.* Современные Cerastoderma (Bivalvia, Cardiidae) Аральского моря: Систематика, изменчивость, эволюция. Омск: Изд-во Омского государственного педагогического университета. 2000. [*Andreeva S.I.* Sovremennye Cerastoderma (Bivalvia, Cardiidae) Aral'skogo moray: Sistematika, izmenchivost', evolyucia. [Modern Cerastoderma (Bivalvia, Cardiidae) of the Aral Sea: Systematics, variability, evolution]. Омск: Izd-vo Omskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta. 2000.]
 8. *Borodina A.V., Zadorozhny P.A.* The Annual Dynamics of Tissue Carotenoids in a Bivalve Mollusk *Cerastoderma glaucum* (Brugière, 1789). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 56 (1): 1–10. 2020
<https://doi.org/10.1134/S0022093020010019>
 9. *Kang C.K., Sauriau P.G., Richard P., Blanchard G.F.* Food Sources of the Infaunal Suspension-feeding Bivalve *Cerastoderma edule* in a Muddy Sandflat of Marennes-Oleron Bay, as Determined by Analyses of Carbon and Nitrogen Stable Isotopes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 187: 147–158. 1999.
<https://doi.org/10.3354/meps187147>
 10. *Сеничева М.И.* Видовое разнообразие, сезонная и межгодовая изменчивость микроводорослей в планктоне у берегов Крыма. С. 5–17. В кн. Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования. Токарев Ю.Н., Финенко З.З., Шадрин Н.В. (ред.) Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. [*Senicheva M.I.* Vidovoe raznoobrazie, sezonnaya i mejsodovaya izmenchivost' mikrovodorosley v planctone u beregov Krima. S. 5–17. V kn. Mikrovodorosli Chernogo moray: problemi sohraneniya bioraznoobraziya i bioteknologicheskogo ispolzovaniya. Tokarev I.N., Finenko Z.Z., Shadrin N.V. (red.) Senicheva, M.I. Species diversity, seasonal and interannual variability of microalgae in plankton off the coast of Crimea. S. 5–7. in the book. Microalgae Black Sea: Problems of Biodiversity, Preservation and Biotechnology Usage. Tokarev I.N., Finenko Z.Z., Shadrin N.V. (Eds.), Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika. 2008 (in Russ)].
 11. *Ладыгина Л.В.* Культивирование микроводорослей. С. 330–354. В кн. Выращивание мидий и устриц в Черном море. Еремеев В.Н. (ред.) Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. *Ladigina L.V.* Kultivirovanie mikrovodoroslei. S. 330–354. V kn. Virashchivanie midiy i Iustrits v Chernom more. Eremeev V.N. (red.) [The cultivation of microalgae. S. 330–354. in the book. Growing mussels and oysters in the Black Sea. Eremeev V.N. (ed.) Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika. 2010 (in Russ)].
 12. *Guillard R.R.L., Ryther, J.H.* Studies of Marine Planktonic Diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology.* 8 (2): 229–239. 1962.
<https://doi.org/10.1139/m62-029>
 13. *Maoka T., Akimoto N.* Natural Product Chemistry in Carotenoid, Some Experimental Techniques for Structural Elucidation and Analysis of Natural Carotenoids. *Carotenoid Sci. (mini review).* 13: 10–17. 2008.
<https://doi.org/10.3390/md9020278>
 14. *Карнауков В.Н.* Биологические функции каротиноидов. М.: Наука. 1988. [*Karnaukhov V.N.* Biologicheskie funkcii karotinoidov [Biological functions of carotenoids]. M.: Nauka. 1988 (in Russ)].
 15. *Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.* (Eds). Carotenoids. Vol. 1B: Spectroscopy. Basel: Birkhäuser Verlag. 1995.
 16. *Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.* (Eds). Compiled by A. Z. Mercadante and E. S. Egeland, Birkhauser Verlag, Basle, Switzerland, 2004.
<https://doi.org/10.1080/10715760410001727849>
 17. *Бородина А.В., Береговая Н.М., Беляев Б.Н.* Влияние экзометаболитов моллюсков *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) на макрофиты *Gelidium* sp. International scientific conference Science, technology and live. Czech Republic, Karlovy Vary, 27–28 December 2014. 66–71. 2014.
 18. *Nitsche H.* Heteroxanthin in *Euglena gracilis*. *Archiv. Mikrobiol.* 90 (2): 151–155. 1973.
<https://doi.org/10.1007/BF00414517>
 19. *Matsuno T., Sakaguchi S.* A Novel Marine Carotenoid, Mactraxanthin from the Japanese Edible Surf Clam. *Tetrahedron Lett.* 24 (9): 911–912. 1983.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)81562-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)81562-2)
 20. *Bridoux M.C., Sobiechowska M., Pérez-Fuentetaja A., Alben K.T.* LC-PDA/APCIit MSI identification of Algal Carotenoid and Oxysterol Precursorsto Fatty Acid Ester-sin Hydrolyzed Extracts of the Freshwater Mussel *Dreissena bugensis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (29): 6745–6760. 2017a.
<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0562-9>
 21. *Bridoux M.C., Sobiechowska M., Briggs R.G., Pérez-Fuentetaja A., Alben K.T.* Separation and Identification of Fatty Acid Esters of Algal Carotenoid Metabolites in the Freshwater Mussel *Dreissena bugensis*, by Liquid Chromatography with Ultraviolet/Visible Wavelength and Mass Spectrometric Detectorsinseries. *J. Chromatogr. A.* 1513: 93–106. 2017b.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.021>
 22. *Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Akimoto N.* Characterization of Fucoxanthin and Fucoxanthinol Esters in

- the Chinese Surf Clam, *Macra chinensis*. J. Agric. Food Chem. 55 (4): 1563–1567. 2007.
<https://doi.org/10.1021/jf063139n>
23. Ahmed F., Fanning K., Netzel M., Schenk P.M. Induced Carotenoid Accumulation in *Dunaliella salina* and *Tetraselmis suecica* by Plant Hormones and UV-C Radiation. Appl. Microbiol. Biotechnol, 99 (22): 9407–9416. 2015.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6792-x>
24. Hertzberg S., Partali V., Liaaen-Jensen S. Animal Carotenoids. 32. Carotenoids of *Mytilus edulis* (Edible Mussel). Acta Chem. Scand. B. 42 (8): 495–503. 1988.
<https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.42b-0495>
25. Polyakov N.E., Leshina T.V. Certain Aspects of the Reactivity of Carotenoids. Redox Processes and Complexation. Russ. Chem. Rev. 75 (12): 1049–1064. 2006.
<https://doi.org/10.1070/RC2006v075n12ABEH003640>

TRANSFORMATION OF CAROTENOIDS IN THE MARINE BIVALVE MOLLUSK *CERASTODERMA GLAUCUM* WHILE FEEDING WITH A CULTURE OF GREEN MICROALGAE

A. V. Borodina^{a,#} and P. A. Zadorozhny^b

^a A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia

^b Institute of Chemistry, Russian Academy of Sciences, Far Eastern Branch, Vladivostok, Russia

[#]e-mail: borodinaav@mail.ru

We present the results of experiments on the influence of feeding the marine bivalve mollusk *Cerastoderma glaucum* (Bruguere, 1789) with a monoculture of the green algae *Tetraselmis viridis* on the composition of carotenoids in its tissues. The carotenoid repertoire of *C. glaucum* was found to include β -carotene, alloxanthin, lutein, diadinoxanthin, neoxanthin, fucoxanthin, heteroxanthin, mactraxanthin and four carotenoid esters, with mactraxanthin being specific to *C. glaucum*. In *T. viridis*, carotenoids were represented by β , ϵ -carotene, lutein, zeaxanthin, violaxanthin, neoxanthin. A 6-day microalgal mono-diet led to an increase in the total carotenoid content in mollusk tissues, mainly at the expense of pigments characteristic of *T. viridis*. The process was accompanied by a decrease in the concentration of other plant carotenoids and mactraxanthin isomerization. Despite the changes in the accumulation and transformation of carotenoids, the experiment led to a 20% death rate among individuals, indicating an adverse effect of a monotonous diet on mollusks.

Keywords: carotenoids, *Cerastoderma glaucum*, *Tetraselmis viridis*, diet, metabolism, mactraxanthin