

УДК 639.3594.121

Л.В. ЛАДЫГИНА

Ин-т биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины,
пр. Нахимова, 2, 99011 Севастополь, Украина

КАРОТИНОИДНЫЙ СОСТАВ КОРМОВЫХ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ

Исследован количественный состав каротиноидов микроводорослей, используемых в качестве корма для личинок двусторчатых моллюсков. Установлено, что каротиноиды микроводорослей *Isochrysis galbana* Parke, *Dunaliella viridis* Teod., *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. и *Phaeodactylum tricornutum* Bohl. представлены шестью фракциями. Суммарное содержание каротиноидов в микроводорослях зависит от фазы роста культуры.

Ключевые слова: микроводоросли, каротиноиды, личинки устриц.

Введение

Микроводоросли являются основным видом корма личинок двусторчатых моллюсков (мидий и устриц) в контролируемых условиях. Качество корма оказывает существенное влияние на рост и выживаемость моллюсков. Наличие каротиноидов в клетках кормовых микроводорослей имеет большое значение для роста личинок. Каротиноиды астаксантин, зеаксантин, лютеин и β -каротин являются мощными ингибиторами перекисления липидов, действие которых в несколько раз сильнее, чем действие α -токоферола. Поэтому они могут выполнять защитную функцию в организме морских животных от активных форм кислорода (Miki, 1995). Кроме того, β -каротин является предшественником витамина А и способствует улучшению роста и повышению иммунитета животных (Isler, 1971). При введении в рацион ювенильных особей морского ушка (*Haliotis discus*) микроводорослей с разными дозами β -каротина его содержание в гепатопанкреасе и мускуле увеличивалось пропорционально вносимой дозе. Добавление в корм микроводорослей, содержащих до 500 ppm β -каротина, способствовало увеличению выживаемости моллюсков в два раза (Tsushima, Matsuno, 1998). Наличие астаксантина и β -каротина в рационе приводило к 100 %-му оплодотворению морского ежа *Pseudocentrotus depressus*. Самый низкий процент патологии был у животных, в рационе которых было максимальное количество β -каротина, что свидетельствует о важности данного каротиноида для моллюсков на ранних стадиях развития (Miyuki, 1997).

© Л.В. Ладыгина, 2010

Целью данной работы было исследование количественного состава каротиноидов четырех видов микроводорослей: *Isochrysis galbana* Parke, *Phaeoda cylum tricorntutum* Bohl., *Dunaliella viridis* Teod. и *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch., используемых в качестве корма для личинок двустворчатых моллюсков.

Материалы и методы

Водоросли выращивали в колбах объемом 2 л и полиэтиленовых мешках объемом 18 л на питательной среде Конвея (Walne, 1966) в собственной модификации, в накопительном режиме, при температуре 22-24 °С, круглосуточном освещении 10 клк и постоянной аэрации газовой воздушной смесью, содержащей около 2 % углекислого газа.

Содержание каротиноидов в микроводорослях и в личинках устриц анализировали спектрофотометрическим методом (Карнаухов, 1988; Repeta, 1997). Водоросли растирали с кварцевым песком в фарфоровой ступке. Пигменты экстрагировали смесью ацетон : хлороформ (2 : 1), затем промывали дистиллированной водой и центрифугировали при 3000 об/мин. Полученные экстракты досуха упаривали на вакуумном роторном испарителе. Фракционный состав каротиноидов анализировали методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV-254» в системе растворителей гептан : ацетон (7 : 3). Фракции каротиноидов идентифицировали по хроматографическим показателям (*R_f*) и спектральным характеристикам пигментов (Repeta, 1997). Элюировали фракции с пластин ацетоном и определяли концентрацию каротиноидов по оптической плотности экстрактов в области 450 нм на спектрофотометре «Спекол-10» с использованием следующих коэффициентов удельной экстинкции: $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 1660$ – для фукоксантина (Haugan, 1986), $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 2500$ – для β-каротина (Hiyama, 1968), $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 2550$ – для лютеина (Jeffery, 1997), $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 2230$ – для диадиноксантина (Johansen, 1974), $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 2270$ – для неоксантина (Jeffery, 1997).

Эксперименты проводили в 3-4 повторностях. Их вариабельность характеризуется доверительным интервалом.

Результаты и обсуждение

Исследованные микроводоросли существенно различались по качественному составу каротиноидов, что определяется их принадлежностью к разным систематическим группам (см. таблицу). Микроводоросли *D. viridis* и *T. suecica* содержали типичные для отдела *Chlorophyta* фракции каротиноидов, но доминировали β-каротин, лютеин и ксантофиллы виолоксантинового ряда (неоксантин и виолоксантин).

Микроводоросли *I. galbana* и *Ph. tricornutum*, несмотря на различное систематическое положение, имели сходный состав каротиноидов. Доминирующими фракциями каротиноидов у этих водорослей были фукоксантин, β -каротин и диадиноксантин; кроме того, *I. galbana* содержала слабо выраженную фракцию неоксантина.

Информация о количественном содержании каротиноидов в микроводорослях, используемых в качестве корма для личинок и спата моллюсков, практически отсутствует. Имеющиеся литературные данные не всегда сопоставимы, так как касаются различных штаммов, выращенных в неидентичных условиях, а результаты выражены в различных единицах измерения (мг, % на сырую и сухую массу, на одну клетку водоросли или на единицу объема культуры).

Таблица. Фракции, доминирующие в составе каротиноидов микроводорослей

Каротиноид	<i>Prymnesiophyceae</i>	<i>Bacillariophyceae</i>	<i>Chlorophyta</i>	
	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Dunaliella viridis</i>	<i>Tetraselmis suecica</i>
β -каротин	+	+	+	+
Фукоксантин	+	+	-	-
Лютеин	-	-	+	+
Диадиноксантин	+	+	-	-
Виолоксантин	-	-	+	+
Неоксантин	+	-	+	+

Обозначения. Наличие (+) и отсутствие (-) фракций каротиноидов в микроводорослях.

Наши исследования количественного состава каротиноидов показали, что их содержание в водорослях зависит от фазы роста культуры (рис. 1). Суммарное содержание каротиноидов увеличивалось при переходе водорослей в стационарную фазу роста. У *I. galbana* отмечено максимальное количество β -каротина в логарифмической фазе роста (31,7 мкг/мг), тогда как в стационарной фазе оно уменьшалось почти вдвое (16,4 мкг/мг). Содержание фукоксантина и диадиноксантина существенно увеличивалось с возрастом культуры. В логарифмической фазе роста концентрация фукоксантина и диадиноксантина составила, соответственно, 34 и 13,5 мкг/мг, в стационарной фазе она увеличилась, соответственно, до 68,2 и 40,3 мкг/мг.

У микроводоросли *Ph. tricornutum* содержание всех фракций каротиноидов достигало максимального значения в стационарной фазе роста: содержание β -каротина увеличилось в 1,8 раза с 7,8 до 14,4 мкг/мг, а

фукоксантина – более чем в 2 раза и составило 56,8 мкг/мг. Концентрация диадиноксантина возрастала в 1,4 раза (с 7,2 до 10,2 мкг/мг).

В зеленых водорослях *T. suecica* и *D. viridis* содержание каротиноидов существенно увеличивалось с возрастом культур (рис. 2). Доминирующей фракцией был лютеин, максимальный пул которого в стационарной фазе роста составил у *D. viridis* 63,0, у *T. suecica* – 58,5 мкг/мг, что в 8-9 раз выше, чем в логарифмической фазе роста. Максимальные концентрации β -каротина у *D. viridis* и *T. suecica* в стационарной фазе роста отличались незначительно – 32,4 и 28,2 мкг/мг соответственно. В логарифмической фазе роста количество β -каротина у этих водорослей было в 6 раз ниже. Содержание суммарной фракции ксантофиллов (виолоксантин, неоксантин) в стационарной фазе составило, соответственно, 6,8 и 8,4 мкг/мг.

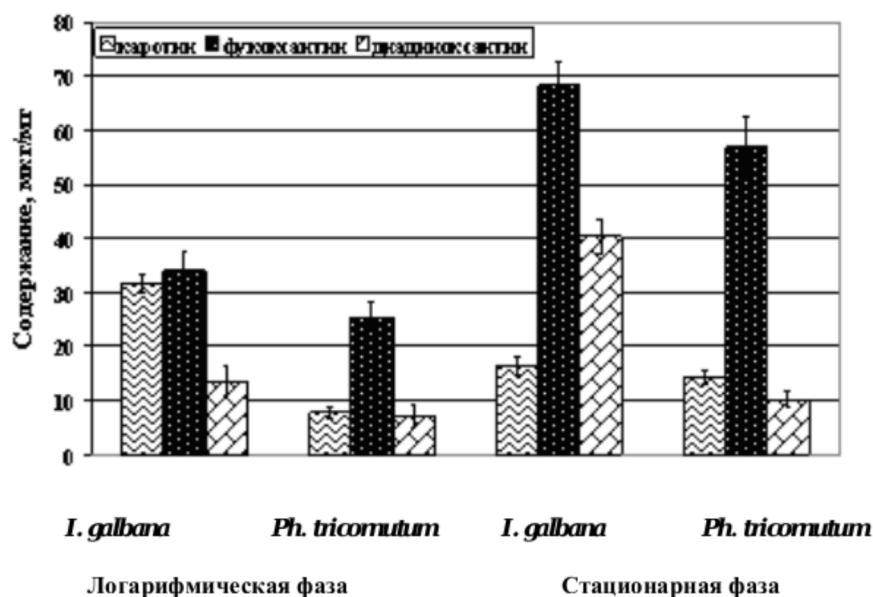


Рис. 1. Содержание каротиноидов в микроводорослях *Isochrysis galbana* и *Phaeodactylum tricorutum* на разных фазах роста культуры

Исследование соотношения между фракциями каротиноидов у *I. galbana* и *Ph. tricorutum* показало, что в стационарной фазе роста на фукоксантин приходится более половины всех каротиноидов – 55 и 70 %, а на β -каротин – 13 и 18 % соответственно. В микроводорослях *D. viridis* и *T. suecica* основная фракция каротиноидов – лютеин, на которую приходится, соответственно, 62 и 61 %. β -каротин у этих видов составляет 32 и 30 %. На суммарную фракцию ксантофиллов (виолоксантин, неоксантин) приходится, соответственно, 6 и 9 %.

В процессе роста микроводорослей увеличивается концентрация клеток, что влечет за собой уменьшение их освещенности. Изменение этих параметров влияет на процесс каротиногенеза. В стационарной фазе роста, когда биомасса микроводорослей увеличивается, а количество света, проходящего через культуру, уменьшается, наблюдается увеличение концентрации светособирающих пигментов. Поэтому содержание β -каротина, фукоксантина и лютеина было значительно выше, чем в экспоненциальной фазе роста (Милько, 1962; Масюк, 1973; Абдуллаев, 1974).

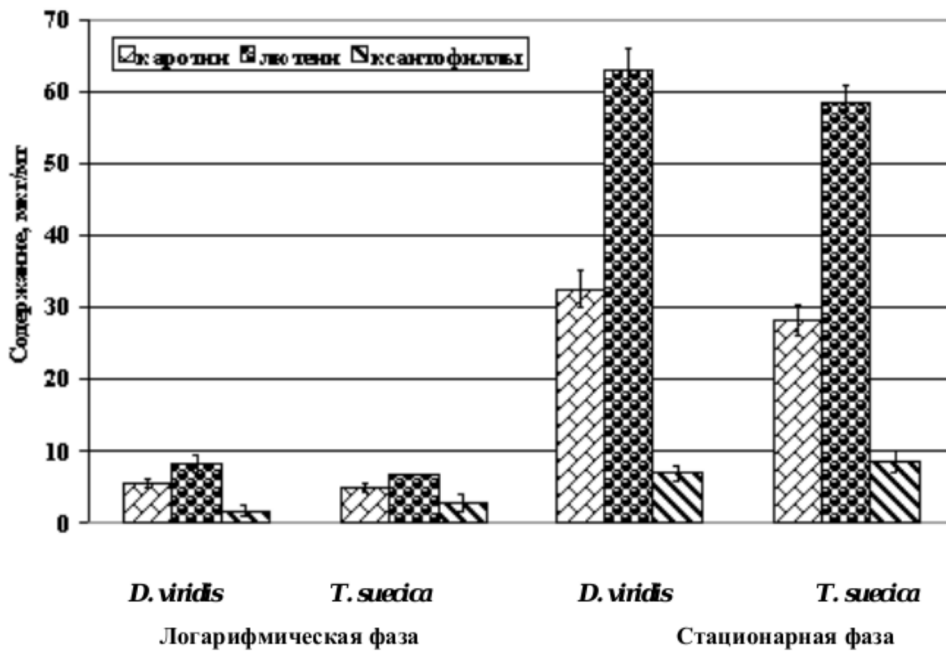


Рис. 2. Содержание каротиноидов в зеленых микроводорослях на разных фазах роста культуры

Повышение содержания каротиноидов в стационарной фазе роста микроводорослей, вероятно, связано с уменьшением концентрации биогенов (азота и фосфора) в среде. По данным Е.С. Милько (1962), при недостатке биогенных элементов содержание β -каротина может увеличиваться в 2,5-5 раз.

Известно, что процесс накопления β -каротина в клетках водорослей зависит не только от условий культивирования, но и от конструктивных особенностей фотобиореакторов (Божков, Мензянова, 1997). При выращивании микроводорослей в культиваторах разного типа нами выявлено увеличение содержания каротиноидов по мере увеличения плотности культуры.

Так, при одинаковых условиях культивирования микроводоросли *D. viridis* (температура, освещенность, питательная среда) в колбах и полиэтиленовых мешках обнаружены различия в содержании β -каротина (рис. 3). Для *D. viridis*, выращиваемой в колбах, отмечено два пика накопления β -каротина – на 12-й и 20-й день культивирования. Максимальные концентрации составили 18,0 и 28,4 мкг/мг соответственно.

При культивировании микроводоросли в мешках наблюдали линейное увеличение содержания β -каротина. На 24-й день выращивания максимальная концентрация его составила 31,1 мкг/мг. Содержание β -каротина у *D. viridis*, выращиваемой в колбе, не достигало такого высокого значения как в мешках, что, вероятно, вызвано более быстрым старением культуры при выращивании в небольших объемах. Однако тенденция увеличения содержания β -каротина прослеживалась при переходе в стационарную фазу роста.

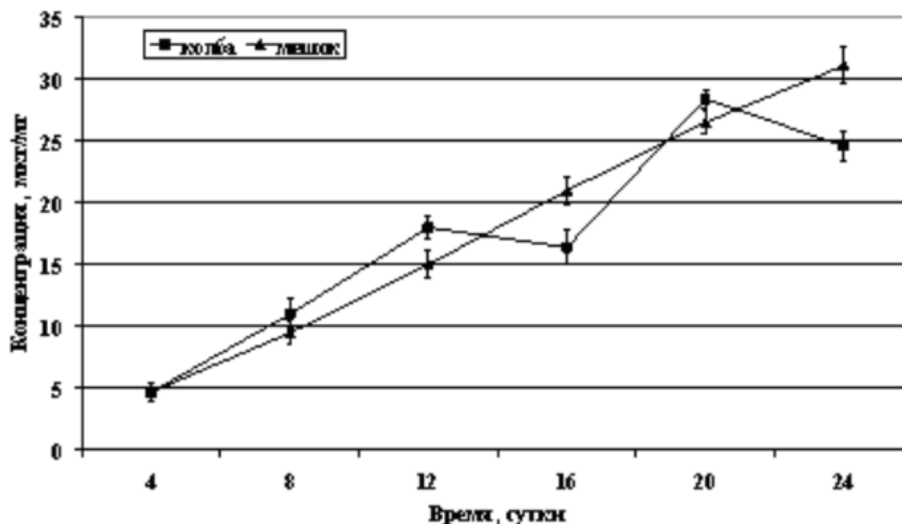


Рис. 3. Накопление β -каротина в клетках *Dunaliella viridis* при выращивании в культиваторах разного типа

Следовательно, интенсивность каротиногенеза в клетках *D. viridis* находится не в прямой зависимости от условий культивирования и стадии роста культуры, а является функцией взаимодействия метаболической системы клетки с комплексом факторов среды, результатом которого является новое метаболическое состояние с разным содержанием β -каротина и других компонентов (Божков, Мензянова, 1997).

Исследования качественного состава каротиноидов кормовых микроводорослей позволяют выяснить, как происходит накопление каротиноидов личинками мидий и устриц, выращиваемых в питомниках.

Известно, что морские животные, в т. ч. двустворчатые моллюски, не синтезируют каротиноиды *de novo*, поэтому их нахождение в организме моллюсков является результатом накопления из водорослей или за счет частичных изменений в результате метаболических реакций. Имеются литературные данные о содержании каротиноидов во взрослых моллюсках (Анцупова, Русак, 1990; Маока, 2005), однако подобной информации для личинок и спата устриц и мидий найти не удалось.

Проведенные нами исследования по накоплению каротиноидов личинками устриц на поздних стадиях развития (педивелигер) и спата показали, что каротиноидный состав личинок и водорослей, которыми они питались, совпадает (рис. 4).

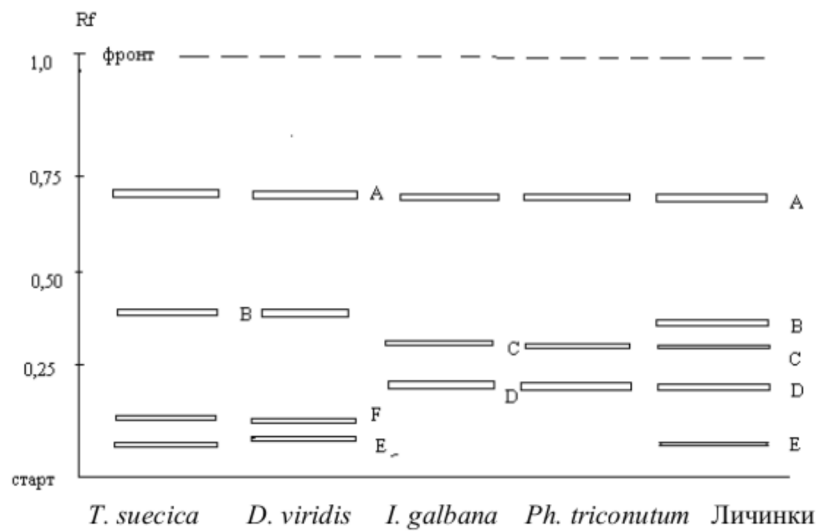


Рис. 4. Хроматограмма каротиноидного состава микроводорослей и личинок устриц на стадии педивелигер: A – β-каротин; B – лютеин; C – диадиноксантин; D – фукоксантин; E, F – ксантофиллы (виолоксантин, неоксантин)

Состав каротиноидов спата устриц отличался от состава каротиноидов микроводорослей. Кроме фракций неоксантина и β-каротина у спата появляются новые фракции каротиноидов. Исследования каротиноидного состава у взрослых особей гигантской устрицы *Crassostrea gigas* (Takashi, 2005) показали, что основной каротиноид диатомовых водорослей фукоксантин в результате метаболических реакций образует каротиноиды митилоксантин и крассеэтраксантин.

Следовательно, у спата начинается процесс трансформации каротиноидов водорослей, в результате чего появляются новые фракции, а у личинок устриц на поздних стадиях развития (педивелигер) каротиноиды накапливаются в том же виде, что и в кормовых микроводорослях.

Поэтому для повышения темпов роста и выживаемости личинок и спата устриц необходимо включать в их рацион водоросли с высоким содержанием каротиноидов.

Заключение

У микроводорослей *Isochrysis galbana*, *Dunaliella viridis*, *Tetraselmis suecica* и *Phaeodactylum tricornutum*, используемых в качестве корма личинок двустворчатых моллюсков, доминирующими фракциями каротиноидов являются: β -каротин, лютеин, фукоксантин. Содержание каротиноидов в микроводорослях зависит от фазы роста и условий культивирования. Стационарная фаза роста характеризуется максимальным содержанием всех фракций каротиноидов. Максимальное количество β -каротина и лютеина – 32,4 и 63 мкг/мг, соответственно, синтезировала *D. viridis*; фукоксантина (68,2 мкг/мг) – *I. galbana*. Содержание β -каротина в клетках водорослей накапливалось линейно или ритмически в зависимости от типа культиватора.

Микроводоросли *D. viridis* и *I. galbana* являются хорошей кормовой базой для личинок и спата устриц, выращиваемых в искусственных условиях.

Благодарности

Выражаем глубокую благодарность А.В. Пирковой, Г.С. Минюк, М.В. Нехорошеву за помощь при подготовке рукописи к печати.

L.V. Ladigina

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Nakhimov Prosp., 99011 Sevastopol, Crimea, Ukraine

CAROTENOID COMPOSITION IN MICROALGAE FOR LARVAE OF BIVALVE MOLLUSKS

Quantitative composition of microalgae carotenoids, which are used as feed for larvae of the bivalve mollusks, has been investigated. It was stated that carotenoids of the microalgae *Isochrysis galbana* Parke, *Dunaliella viridis* Teod., *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch., and *Phaeodactylum tricornutum* Bohl. are represented by six fractions: β -carotene, lutein, fucoxanthin, diadinoxanthin, and xanthophylls of the violoxanthin row (neoxanthin and violoxanthin). Total content of carotenoids in the microalgae depends on the phase of the culture

growth. The maximal content of all carotenoid fractions was determined in the stationary fractions. Total content of carotenoids in the microalgae depends on the phase of the culture growth.

Keywords: microalgae, carotenoids, larvae of oysters.

- Абдуллаев А.А., Семенов В.Е. Интенсивная культура *Dunaliella salina* и некоторые ее физиологические характеристики // Физиол. раст. – 1974. – 6, № 21. – С. 1145-1153.
- Анциупова Л.В., Русак Е.М. Каротиноиды мидий Одесского залива // Экол. моря. – 1990. – 36. – С. 61-64.
- Божков А.И., Мензянова Н.Г. Динамика роста, липидный состав и содержание β-каротина в клетках *Dunaliella viridis* Teod. при культивировании в разных типах фотобиореакторов // Альгология. – 1997. – 7, № 1. – С. 78-86.
- Карнаухов В.И. Биологические функции каротиноидов. – М.: Наука, 1988. – 223 с.
- Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология и географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. – Киев: Наук. думка, 1973. – 242 с.
- Милько Е.С. Влияние различных факторов среды на пигментообразование зеленой водоросли *Dunaliella* // Микробиология. – 1962. – 32, № 2. – С. 35-44.
- Haugan J.A., Liaaen-Jensen S. Improved isolation procedure for fucoxanthin // Phytochem. – 1986. – 28. – P. 2797-2798.
- Hiyama T., Nishimura M., Chance B. Determination of carotenes by thin-layer chromatography // Analit. Biochem. – 1968. – 29. – P. 339-350.
- Islar O. Carotenoids. – Basel; Stuttgart: Birkhauser Verlag. – 1971. – 905 p.
- Jeffery S.W., Mantoura P.F., Bjornlang T. Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments // Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. – Paris: Unesco Press. – 1997. – P. 493-559.
- Johansen J.E., Svee W.A., Liaaen-Jensen S., Haxo E.T. Carotenoids of the *Dinophyceae* // Phytochem. – 1974. – 13. – P. 2261-2271.
- Maoka T., Hashimoto K., Akimoto N. Structure of new carotenoides with a 3, 4-dihydroxy group from oyster *Crassostrea gigas* // Chem. Pharm. Bull. – 2005. – 59, N 9. – P. 1207-1209.
- Miki W., Otaki N., Shimidzu N., Yokoyama A. Carotenoids as free radical scavengers in marine animals // J. Mar. Biotechnol. – 1995. – 2, N 1. – P. 35-37.
- Myuki T., Takahiro K., Minoru M., Takao M. The role of carotenoids in the development of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus* // Invert. Rep. Dev. – 1997. – 32, N 2. – P. 149-153.
- Repeta D.J., Bjornland T. Preparation of carotenoid standards // Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. – Paris: Unesco Press, 1997. – P. 239-261.
- Takashi M., Yasuhiro F., Keeji H., Naoshige A. Structure of new carotenoids with a 3,4 dihydroxy-β and group from the oysters *Crassostrea gigas* // Chem. Bull. – 2005. – 53, N 9. – P. 1207-109.
- Tsushima M., Matsuno T. The role of beta – carotene on growth and survival of juvenile Japanese abalone *Haliotis discus* // Fish. Sci. – 1998. – 64, N 4. – P. 660-661.
- Walne P.R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. // Fish. Invest. Ser. 2. – 1966. – 25, N 4. – P. 54-60.

Получена 02.03.09

Рекомендовала к печати Е.И. Шнюкова