

## 藻类分子生物技术两年评

# ——与藻类活性物质研究有关的生物技术\*

严小军 秦松 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**提要** 根据1992年6月—1994年6月国内外发表资料, 评述海洋藻类活性物质研究的生物技术及最新成果。认为, 海洋生物活性物质研究的重心正转向与海洋生物技术有关的研究。运用生物技术筛选、提取并生产藻类活性物质已经成为这一领域的主流。综合文献表明, 藻类活性物质研究的生物技术正走向成熟, 大量的活性物质被发现, 光生物反应器将成为主要的下游生产技术, 通过藻类基因工程生产药物已初现端倪。

**关键词** 藻类 分子生物技术 生物活性物质 生物反应器

近年来, 大量生源学和生态学研究结果表明: 海洋生物活性物质的初始来源大部分甚至可能全部是来自低级海洋生物如藻类及其共生菌类。因此, 运用生物技术筛选、提取并生产藻类活性物质正成为这一领域的主流。本文根据1992年6月—1994年6月国内外发表的文献资料, 就藻类活性物质研究方面的有关生物技术, 予以综合评述, 以期为我国海洋生物活性物质的研究开发提供素材与思路。

## 1 藻类活性物质筛选的生物技术

### 1.1 微藻活性物质的提取

为了保证微藻活性物质筛选的可重复性, 必须能对微藻作大量、可重复提取的试验, 而微藻的采集、分离、培养等一整套生物技术正是筛选结果可重复性、可靠性的保证, 也为今后大规模工业生产提供种质资源和先期研究数据。

微藻的采集工作比较简单。一般微藻附着在沙石、贝壳、大型藻、死珊瑚等多种材料上, 所以在潮间带或潜水采集这些材料, 将之装入天然海水中, 带回实验室作分离工作。如果是丝状蓝藻也可现场分离。分离微藻首先在立体显微镜下操作, 放置几天后再作一次分离。这一方法尤其适用于生长速度较快的蓝藻。然后将分离的微藻放在一定的培养基(如f/2或ES等)中培养。对于生长速度较快的微藻要进行扩增(Gerwick, 1994)。然后, 将收集培养的细胞冷冻干燥, 制备提取物。一组是水溶性成分, 另一组是脂溶性成分, 提取方式有溶剂种类及配比变化(Gerwick, 1994; Patterson et al., 1993)。

### 1.2 微藻活性物质的筛选

\* 国家科委、山东省科委攻关合同项目, 本文第一部分发表于本刊1996年27卷第1期103—111页。

严小军, 男, 出生于1968年8月, 博士, 副研究员。

收稿日期: 1995年4月21日, 接受日期: 1996年5月29日。

筛选活性物质的检测方法已趋向系统化、规范化。抗细菌和抗真菌试验,采用标准的琼脂平板试验法。试验的菌株是海洋或陆地已知的细菌和真菌,或者用从热带褐藻表面获得的细菌和真菌菌株。试验的浓度通常是每平板 0.10mg, 1—2d 之后测量其抑菌圈。细胞毒性是指该物质对培养细胞的毒性,通常用 P-388, L-1210 白血病细胞或 KB 肿瘤细胞作体外试验。检验海洋天然产物的细胞毒性,常利用海胆受精卵,观察样品对其细胞分裂的抑制作用。抗病毒试验最常用 I 型单纯疱疹病毒 (HSV-I)、疱疹性口炎病毒 (VSV) 及 I 型灰质炎病毒,测量粗提物或化合物对病毒增殖的抑制作用(苏镜娱, 1992)。随着理性药物分子设计理论的发展,受体和配体的概念已经用于寻找药物的前导化合物(Radmer et al., 1994),尤其是组合化学技术大大地缩短了筛选时间、简化了程序,提高了肽类及核苷酸类药物的筛选效率(Alper, 1994)。对于抗肿瘤药物来说,对肌苷单磷酸脱氢酶 (IMPDH)、蛋白质酪氨酸激酶 (PTK)、蛋白质激酶 C (PKC) 的抑制,可作为筛选指标(Gerwick, 1994)。对于抗爱滋病药物筛选来说,对 HIV 逆转录酶或 HIV *gag* 基因产物蛋白质 P24, P17 的抑制,可作为筛选指标(李青选, 1993)。

自 70 年代以来,微藻生物活性物质的筛选已做了大量工作,发现微藻如蓝藻、金藻、隐藻均能产生抗肿瘤、抗病毒的新型化合物。Gerwick (1994) 小组的筛选结果表明,微藻对 IMPDH 的抑制率为 24 / 447, 即 447 种微藻提取物中有 24 种具有酶抑制活性,对 PTK 的抑制率为 8 / 501, 对 PKC 的抑制率为 9 / 462。夏威夷大学自 1981 年起培养藻类,已经筛选了 1 500 种,其中 400 种是蓝藻(Patterson, 1994)。Patterson(1991, 1993) 专门对蓝藻的生物活性作了筛选。结果表明,7% 被测蓝藻的提取物能抑制 KB 细胞系繁殖,其中真枝藻科 (Stigonemataceae) 产生的抗癌物质最丰富;色球藻目 (Chroococcales) 产生的抗病毒物质最多。在抗爱滋病活性物质筛选时发现,来自太平洋裂膜藻 (*Schizyminia pacifica*) 的一种硫酸多糖是 HIV 病毒逆转录酶的特异性抑制剂。硫酸多糖的浓度为 2 000IU / ml 时,抑制活性达 92%,而对细胞 DNA 和 RNA 合成无影响。这一物质不仅可抑制 HIV 逆转录酶,而且对其它病毒的逆转录酶也有抑制作用(李青选, 1993)。另外,从蓝藻鞘丝藻 (*Lyngbya laterheimii*) 提取分离的含硫糖脂能抑制 HIV 复制,已被 NCI(美国国立癌症研究所)批准作临床前的药理、毒理研究。硫脂的结构和生物活性已被化学合成与生物检测所证实(Gordon et al., 1992)。

### 1.3 其它

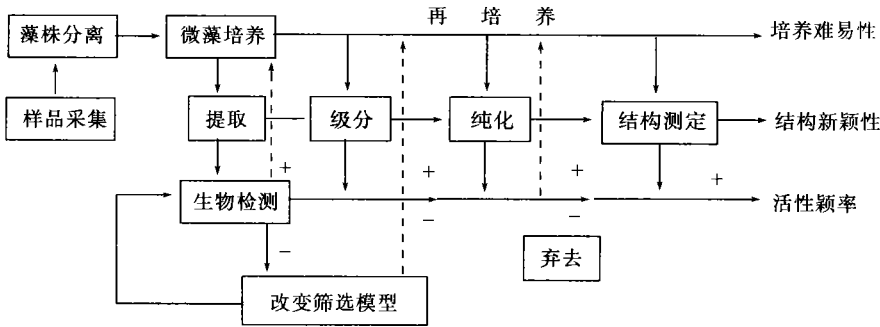
随着生物化学、分子生物学及药理学研究的日益交叉渗透,各种分子水平的筛选模型被建立起来,体外筛选技术已成为有关生物技术的一个分支。对于大型海藻活性物质筛选,Blunden 等(1994)发现,褐藻所含的高分子量多酚具有多种生物活性,包括切割质粒 DNA、血液凝集活性、脂酶及  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用等。张尔贤等(1994)研究了鼠尾藻 (*Sargassum thunbergii*) 多糖对人粒细胞超氧阴离子自由基释放的影响。采用刀豆球蛋白 A (Con A) 刺激人粒细胞释放超氧阴离子自由基,若加入鼠尾藻多糖则能增强释放能力,缩短延迟时间,表明对细胞免疫有某种调节作用。筛选藻类活性物质的过程见图 1a。

## 2 藻类活性物质生产的生物技术

藻类活性物质的筛选、提取、分离及结构鉴定等研究的目的,除了了解自然界大

目标: 确定优先研究活性化合物

a



→ 代表技术运用次序; - - - → 代表指导性作用

目标: 获得海洋药物

b

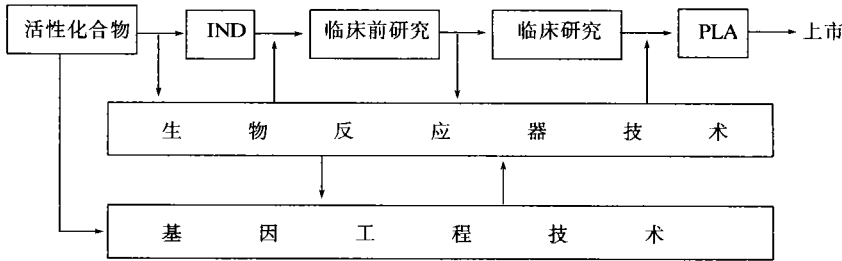


图1 藻类活性物质筛选(a)及生产(b)的技术内容及过程

Fig.1 Screening (a) and production (b) of bioactive substances from algac

生态系统中物质的生物合成、代谢及食物链传递外，还有对有明确药效、经济前景看好的活性物质进行生产。这种大规模的药物生产需要足够的生物量，这个目标只有依靠生物技术来完成，即生物反应器技术。另一方面，对于某些基础研究而言，稳定的物质来源也十分重要。例如石房蛤毒素 (Saxitoxin)、短裸甲藻毒素 (Brevetoxin) 及刺尾鱼毒素 (Maitotoxin) 等，是重要的神经药理学工具。因此，藻类活性物质的规模化连续生产，在研究、开发、应用各层次上均是必不可少的。藻类活性物质生产的相关内容见图 1b。

### 2.1 生物反应器技术

生物反应器是连接原料和产物的桥梁，也是多种学科的交叉点。在反应器中，通过目的产物合成，廉价的原料迅速升值。因此，生物反应器的设计和操作是生物工程最为重要的问题。它对产品的成本和质量有很大影响。生物反应器要适应众多的生产过程，在形状、大小和操作方式上有很大变化。尽管如此，生物反应器设计的目标却始终是提高生产成本最小。对于商业化生产来说就是扩大生产能力、提高产品质量。

由于微藻大多数属于光合作用生物，因此生物反应器的设计概念与传统的发酵有根本区别。从广义上说，光生物反应器包括两个方面：其一，大面积室外养殖，如盐藻生

产 $\beta$ -胡萝卜素,螺旋藻生产 $\gamma$ -亚麻酸等(秦松,1994)。Cohen等(1994)<sup>1)</sup>在氮饥饿高光条件下,室外培养小球藻(*Chlorella zofingiensis*)累积虾青素,日产虾青素0.8g。其二,是真正概念上的生物反应器,在可控条件下高密度养殖。有关这一技术已有许多专利保护。Blaich等(1991)申请了生物反应器的模具专利,可制造各种规格、形状的生物反应器以用于藻类、真菌、酵母、细菌的培养。Chaumont等(1993)采用透明材料制成密闭的光生物反应器系统,辅以培养介质和二氧化碳,将光导纤维浸于培养介质中,可以控制光的强度、周期及波长特性,从而对微藻的代谢产物生产过程进行调控。Hoeksema(1991)采用透明空心管从反应器中横穿,使外部光源经过空心管道进入反应器。Zhandov等(1990)描述了一个由光源、透明管组成密闭循环系统的光生物反应器,配备泵、流速控制、气体交换器、热量交换器等,在透明管外涂上电发光涂层用于增强光强。

Hu等(1994)<sup>2)</sup>设计了一种用于室外培养光自养微生物的平板生物反应器系统,它由一系列玻璃管组成,通过调节光通道长度来控制微藻的生产。Rorrer等(1994)<sup>3)</sup>将糖海带(*L. saccharina*)的雌配子体丝状组织作悬浮细胞培养,以GP2人工海水为营养介质,采用气升式搅拌型生物反应器,得到了类花生烯酸15-HETE的类似物。

## 2.2 藻类基因工程在活性物质生产中的应用

藻类基因工程是藻类分子生物技术的核心,它在活性物质研究的应用上有两个方面:其一,藻类活性蛋白质的基因工程表达,即以藻类的蛋白质或酶作为目的产物通过工程菌发酵生产。秦松等(1994)<sup>4)</sup>成功地克隆了蓝别藻蓝蛋白(APC)基因,并通过构成融合蛋白的方式实现了在大肠杆菌中的高效表达。将基因工程生产的融合别藻蓝蛋白用作抗肿瘤研究,结果表明,基因工程表达产物具有明显的抑制肿瘤、延长生命的生物活性。其抑瘤效果可能是通过激活淋巴系统发生作用。其二,藻类作为基因工程表达系统。Hagiwara等(1992)将人超氧化物歧化酶(hu-SOD)基因装入重组质粒,导入蓝藻中进行表达。结果表明,工程微藻的产物与细菌发酵产物同样有效。这为基因工程药物生产提供了一套新的表达系统。

## 2.3 重要活性物质结构类型概述

关于藻类活性物质结构已有许多综述,如苏镜娉(1992)、张成武(1992)等。Gerwick(1994)分析了海洋蓝藻天然产物的结构类型:在104种天然产物中,36%属大环内酯,39%属环肽或氨基酸衍生物,8%属类萜。Patterson等(1994)对蓝藻奇异伪枝藻(*Scytonema mirabile*)产生的38种细胞毒化合物分析发现,3种属大环内酯,24种属氢

1) Cohen, E. et al., 1994, Outdoor production of secondary carotenoids from the green microalgae *Chlorella zofingiensis*, Abstract of Fifth International Phycological Congress.

2) Hu, Q. et al., 1994, A flat bioreactor system for outdoor mass cultivation of microorganisms, Abstr. of Fifth Int. Phycol. Congress.

3) Rorrer, G. L. et al., 1994, Bioreactor seaweed cell culture for production of biomaterials, Abstr. of Fifth Int. Phycol. Congress.

4) 秦松等, 1994, 基因工程生产融合别藻蓝蛋白抗肿瘤活性研究, 全国第四次海洋湖沼药物开发研讨会论文集, 106-107.

基酸衍生物, 6种属异腈类化合物。

**大环内酯** 陆生蓝藻伪枝藻科(Scytonematoceae)中筛选出的细胞毒化合物双歧藻素(Scytophycins)是一类大环内酯化合物, 其中的主要活性成分单歧藻素(Tolytoxin)能破坏微丝组织, 使真核细胞分裂能力丧失, 它对肾癌和神经瘤的治疗十分有效(Patterson et al., 1992)。Nagai等(1992)从剧毒冈比甲藻(*Gambierdiscus toxicus*)的培养液中, 分离到一种具有抗真菌活性的化合物冈比酸(Gambieric acid)也是大环内酯。

**环肽类化合物** 从蓝藻真枝藻科(Stigonemataceae)的繁育拟惠氏藻(*Westiellopsis prolifica*)中, 分离得到一种环六肽化合物, 对KB细胞系的细胞毒为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ (Princep et al., 1992)。研究发现, 这种惠氏藻素(Westiellamide)与一种从海鞘中发现的化合物相同, 这种海鞘的共生微藻能产生这一活性物质(Hambley, 1992)。Frankmolle等(1992)从宽松鱼腥藻(*Anabaena laxa*)中分离得到两种宽松鱼腥藻素A, B(Laxaphycin A B), 分别是11肽和12肽, 具有抗真菌活性和细胞毒活性。而且这两种多肽在药理上具有协同效应。Gerwick等(1989)从热带海洋蓝藻肠形链丝藻(*Hormothamnion enteromorphoides*)中分离得到一种抗细菌和细胞毒活性的环肽链丝藻素(Hormothamnin), 是11元环肽, 对多种瘤细胞系有较强的毒性。

大环内酯及环肽类化合物结构独特、药效明显, 许多物质已成为药物研究中的先导化合物, 若通过有机合成制造仍有相当难度, 因此, 利用生物反应器技术解决化合物资源问题已成为藻类活性物质研究的必由之路。

### 3 展望

对于我国的海洋药物新药研究计划来说, 这方面的情况相当严峻。因为许多具有活性、有望成为新药的化合物都受到专利保护。例如, 抗真菌、抗肿瘤的双歧藻素(Moore et al., 1989), 抗癌药物屋甲藻素A(Goniodmin A)(Nippon Suisan Kaisha, 1990), 有免疫调节功能的微鞘藻素(Microcolin)(Koehn et al., 1992)以及耐热内切酶等(Agency of Industrial Science & Technology, 1993)。若要开发新型海洋药物, 尚需作艰苦努力。

藻类活性物质及有关的分子生物技术应是我国海洋药物开发计划的重点。生物技术为海洋药物的开发提供了捷径, 它为长期困扰海洋药物再生资源的问题提供了答案。因此, 生物学家、化学家、药理学家通过共同运用生物技术而更紧密地结合起来。

利用基因工程生产海洋药物, 将成为继生长因子之外的新的基因工程药物研究领域, 具有纯度高、产量高、成本低的优越性, 也是海洋资源型药物以外亟待发展的海洋高新技术领域, 具有广阔的应用前景。

### 参 考 文 献

- 李青选, 1993, 中国海洋药物, 12(3): 22—26。  
 张尔贤等, 1994, 药物生物技术, 1(1): 30—34。  
 张成武, 1992, 中国海洋药物, 11(3): 20—29。  
 苏镜娉, 1992, 中国海洋药物, 11(2): 18—26。  
 秦 松, 1994, 海洋科学中若干前沿领域发展趋势的分析探讨, 韩晓鹏主编, 海洋出版社(北京), 147—152。  
 Agency of Industrial Science & Technology, 1993, Japan Patent, 5 049 475。  
 Alper, J., 1994, *Science*, 264: 1 399—1 401。

- Blaich, E. et al, 1991, German Patent, 4 118 882.
- Blunden, G. et al., 1994, *J. Appl. Phycol.*, **6**:281—284.
- Chaumont, D. et al, 1993, French Patent, 2 678 946.
- Frankmölle, W. P. et al., 1992, *J. Antibiot.*, **45**: 1 451—1 466.
- Gerwick, W. H. et al., 1994, *J. Appl. Phycol.*, **6**:143—149.
- Gordon, D. M. et al., 1992, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**: 659—663.
- Hagiwara, H. et al., 1992, Japan Patent, 9 216 641.
- Hambley, T. W., 1992, *Tetrahedron*, **48**:341—348.
- Hoeksema, S. D., 1991, World Patent, 9 107 080.
- Koehn, F. et al., 1992, U. S. Patent, 5 091 368.
- Moore, R. E. et al., 1989, U. S. Patent, 4 863 955.
- Nagai, H. et al., 1992, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**(3):1 102—1 103.
- Nippon Suisan Kaisha, 1990, Japan Patent, 2 180 821.
- Patterson, G. M. L. et al., 1991. *J. Phycol.*, **27**: 530—536.
- Patterson, G. M. L. et al., 1992, *Arch. Microb.*, **157**: 406—410.
- Patterson, G. M. L. et al., 1993, *J. Phycol.*, **29**: 125—130.
- Patterson, G. M. L. et al., 1994, *J. Appl. Phycol.*, **6**: 151—157.
- Princep, M. R. et al., 1992, *J. Nat. Prod.*, **55**: 140—142.
- Radmer, R. J. et al., 1994, *J. Appl. Phycol.*, **6**: 93—98.
- Zhandov, A. M. et al., 1990, USSP Patent, 1 578 185.



Review

## TWO YEARS' REVIEW ON ALGAL MOLECULAR BIOTECHNOLOGY—BIOTECHNOLOGY IN ALGAL BIOACTIVE COMPOUNDS RESEARCH

Yan Xiaojun, Qin Song, Zeng Chengkui (C. K. Tseng)

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** The literature published mainly during the period from June, 1992 to June, 1994, showed that focus on marine bioactive compounds research was transferred to molecular biotechnology related research. Screening, extraction and production of marine algal bioactive compounds through molecular biotechnology have become the mainstream in this field especially for blue-green algae and dinoflagellates. Lots of bioactive natural products from marine microalgae have been discovered. The most distinctive compounds were macrolides such as tolytoxins, and cyclopeptides such as westiellamide. On the other hand, research on photobioreactor became more and more competitive as many new techniques have been patented by various biotechnology

development companies. Pharmaceuticals production by algal genetic engineering is feasible.

**Key words** Algae Molecular biotechnology Bioactive compounds Bioreactor

《海洋与湖沼》(学报)及编辑部系历年获奖目录

1988年	山东省科协优秀科技期刊	一等奖
1990年	中国科学院优秀自然科学期刊	二等奖
1991年	山东省科委、山东省新闻出版局、山东省科协优秀科技期刊	一等奖
1992年	中国科学院优秀科技期刊	二等奖
1992年	中国科协优秀科技期刊	一等奖
1992年	国家科委、中宣部、新闻出版总署优秀科技期刊	二等奖
1994年	华东区优秀科技期刊	一等奖
1996年	山东省科委、山东省新闻出版局科技期刊质量评估	优秀级
1996年	山东科技期刊编辑学会评定《海洋与湖沼》编辑部	先进集体
1996年	中国期刊出版协会评定孙佩锦	全国首届百佳工作者
1997年	中国科协优秀科技期刊	二等奖
1997年	国家科委、中宣部、新闻出版总署优秀科技期刊	三等奖