

孙颖颖, 朱文轩, 周静, 等. 海带中抑藻活性化合物的分离及抑藻活性分析[J]. 海洋学报, 2022, 44(2): 143–154. doi:10.12284/hyxb2022042
Sun Yingying, Zhu Wenxuan, Zhou Jing, et al. Isolation, purification and analysis of antialgal activities of antialgal compounds from *Laminaria japonica*[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(2): 143–154. doi:10.12284/hyxb2022042

海带中抑藻活性化合物的分离及抑藻活性分析

孙颖颖^{1,2,3}, 朱文轩^{1,4}, 周静⁴, 庄丽雯¹, 毛奕淋¹, 赵秀芳¹, 王长海⁵

(1. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005; 3. 江苏省海洋资源开发研究院, 江苏 连云港 222000; 4. 连云港市质量技术综合检验检测中心, 江苏 连云港 222005; 5. 南京农业大学 资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 以 2 000 g 海带为原料、米氏凯伦藻为测试微藻, 采用甲醇浸提、液液萃取、硅胶柱层析、Sephadax LH-20 凝胶柱层析和硅胶薄层层析等分离方法, 纯化可能具有抑藻活性的化合物, 制备到 5 个薄层纯样品, B₂₁ (1.39 g)、B₁₃₁ (0.51 g)、B₁₃₂ (0.48 g)、C₂₁₁ (0.016 g) 和 C₂₁₂ (0.020 g)。经鉴定, B₂₁、B₁₃₁、B₁₃₂、C₂₁₁ 和 C₂₁₂ 依次为 7-羟基庚酸、十四酸、十六酸、十八酸和油酸, 均是第一次从海带中分离获得。此 5 种脂肪酸对塔玛亚历山大藻、强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻和中肋骨条藻的生长表现出选择性抑制作用, 其中 7-羟基庚酸具有较为广泛的抑藻活性。除塔玛亚历山大藻之外, 在浓度为 50 μg/mL 时, 7-羟基庚酸对其他 5 种赤潮微藻生长的抑制作用与硫酸铜和重铬酸钾对它们生长的抑制作用接近, 生长抑制率超过 71% (第 4 天); 十四酸在浓度为 50 μg/mL 时对强壮前沟藻、米氏凯伦藻和中肋骨条藻生长也有明显的抑制作用, 第 4 天时对它们的生长抑制率在 57% 以上。在此基础上, 第一次确定了 7-羟基庚酸、十四酸、十六酸和十八酸对强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻和中肋骨条藻生长的半抑制效应浓度 (EC_{50-96 h}), 7-羟基庚酸对塔玛亚历山大藻生长的 EC_{50-96 h} 也是第一次被确定。与硫酸铜和重铬酸钾对每种赤潮微藻生长的 EC_{50-96 h} 比较, 7-羟基庚酸和十四酸在抑制强壮前沟藻上具有明显的抑藻优势。

关键词: 抑藻活性化合物; 分离; 海带; 纯化; 赤潮微藻

中图分类号: X55; S917.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)02-0143-12

1 引言

赤潮已成为三大世界性近海污染问题之一, 对近海水域生态环境和海洋养殖业造成了极大的威胁^[1-2]。报道表明, 在 300 多种可形成赤潮的海洋浮游微藻中, 超过 70 种能产生毒素^[3], 藻毒素导致了鱼类、贝类和其他海洋生物的大量死亡^[1], 也会引发人类疾病, 甚至导致死亡。国内外研究者提出了许多预防和控制赤潮的方法(Prevent and Control HABs Methods, PCM), 包括物理法(黏土^[4])、化学法(表面活性剂^[5])、生物法

(病毒^[6]、细菌^[7]和杀藻^[8]或抑藻化合物^[3,9])等。

近 30 年来, 分离自大型海藻的一些抑藻活性化合物, 被认为是开发环境友好型赤潮微藻抑藻剂的理想材料之一^[10-11]。例如, 小珊瑚藻(*Corallina pilulifera*)中的溴仿^[12]、江蓠(*Gracilaria lemaneiformis*)中的 8-hydroxy-4E 和 6E-octadien-3-on^[13]、网地藻(*Dictyota dichotoma*)中的 Dictyolactone^[14]、叶状铁钉菜(*Ishige sinicola*)中的 α-单甘酯^[15]以及条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)中的 gossonorol^[16]等。在前期工作中, 我们整理了 1960–2019 年被 Web of Science、Springer、Google

收稿日期: 2021-07-31; 修订日期: 2021-10-28。

基金项目: 江苏省第五期“333 工程”科研资助项目(BRA2020263); 江苏省优势学科建设工程资助项目; 江苏省研究生实践创新计划(SJCX20_1317); 连云港市“海燕计划”; 2018 年江苏高校优秀青年教师和校长境外研修计划。

作者简介: 孙颖颖(1978—), 女, 博士, 教授, 从事海洋生化工程研究。E-mail: syy-999@163.com

Scholar 和 CNKI 等数据库收录的大型海藻抑藻研究,发现 120 多种可抑制赤潮微藻生长的大型海藻中,大型褐藻为 40 种^[10],它们依次归属于网地藻目(Dictyotales)、水云目(Ectocarpales)、墨角藻目(Fucales)、铁钉菜目(Ishigeales)、海带目(Laminariales)和线翼藻目(Tilopteridales)(图 1)。其中,海带目的大型褐藻占 20%,例如,腔昆布(*Ecklonia cava*)^[17]、鹅掌菜(*Ecklonia kurome*)^[18]、*Eckloniopsis radicata*^[15]、笼目海带或日本厚叶海带(*Kjellmaniella crassifolia*)^[19]、海带(*Laminaria japonica*)^[19-22]、掌状昆布(*Laminaria digitata*)^[20]、皱海带(*Laminaria religiosa*)^[23]、裙带菜(*Undaria pinnatifida*)^[21]。

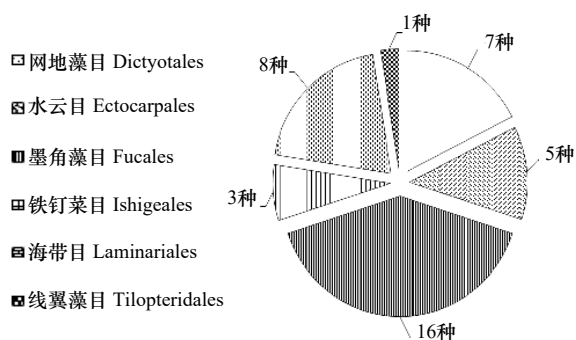


图 1 可抑制赤潮微藻的大型褐藻的目类归属分布
Fig. 1 Distribution of brown marine macroalgae with antialgal activity against red tide microalgae according to the orders

数据来源于 1960–2019 年 Web of Science、Springer、Google Scholar

和 CNKI 数据库收录的研究

Data extracted from related studies in Web of Science, Springer, Google

Scholar and CNKI between 1960 and 2019

不同研究者已经发现海带(*L. japonica*)对某些海洋微藻具有一定的抑藻活性^[19-22],李凤超^[19]对海带中防污物质进行了初步分离和鉴定。然而,目前为止,并未见抑藻活性化合物从海带中分离获得。基于此,本文采用活性追踪分离方法,以米氏凯伦藻为抑藻检测对象,从海带中分离抑藻活性化合物。进一步,分析它们对塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)、强壮前沟藻(*Amphidinium carterae*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)、米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)、球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)和中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)生长的抑制作用,获得每种化合物对赤潮微藻生长的半抑制效应浓度(EC_{50-96h}),为环境友好型赤潮微藻抑藻剂的研发奠定实验基础和提供技术支撑。

2 材料与方法

2.1 实验材料

塔玛亚历山大藻、强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米

氏凯伦藻、球形棕囊藻和中肋骨条藻无菌株由上海光语生物科技有限公司提供,在 f2 培养基中培养,培养温度为 (22 ± 2) °C,光照强度为 $40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光暗比为 12 h : 12 h。

天然海水静置 1 个月以上,经脱脂棉和 300 目筛绢过滤,高温灭菌、冷却,使用前将 pH 和盐度分别调节至 8.5 和 30 备用。

海带半干品购置于江苏碧蓝海洋生物科技有限公司,自来水清洗后,室内自然晾晒 2 d。50 °C 下烘干后,粉碎至 0.3 mm 粒径备用。

2.2 抑藻活性化合物的分离纯化

2.2.1 提取

将海带干粉末 2 000 g 和 6 L 甲醇加入到动态热回流提取浓缩机(TX-NX-10)中,在 30 °C 下浸提 6 h。上述浸提过程重复 3 次,合并浸提液。浸提液经过滤和减压蒸干,得到黑色黏稠状浸膏 68.22 g。向此浸膏中加入 90% 甲醇水溶液 300 mL,充分振荡,4 °C 下静置过夜,4 °C 下离心 10 min、过滤,去除沉淀,获得上清液 280 mL。60 °C 下减压蒸干后,溶解于蒸馏水中,配制浓度为 80 g/L 溶液(提取物溶液)进行抑藻活性检测和液液萃取分离。抑藻活性检测时,提取物浓度依次设定为 1.0 mg/mL、2.0 mg/mL、4.0 mg/mL、8.0 mg/mL 和 16.0 mg/mL。

2.2.2 液液萃取分离

将乙酸乙酯加入到上述提取物溶液中,萃取 3 次,乙酸乙酯加入体积依次为 60 mL、20 mL 和 20 mL。乙酸乙酯层合并收集后,然后在 40 °C 下减压蒸干,获得 2.58 g 组分 A。下层 40 °C 下减压蒸发除去乙酸乙酯后,加入正丁醇萃取 3 次,正丁醇加入体积依次为 60 mL、20 mL 和 20 mL。上层和下层均在 60 °C 下减压蒸干,分别获得 2.23 g 组分 B 和 11.34 g 组分 C。上述 3 种液液萃取分离组分,分别溶解于无水甲醇中,制备浓度为 20 g/L 的溶液进行抑藻活性检测(液液萃取分离组分浓度设定为 2 mg/mL)和硅胶柱层析分离。

2.2.3 硅胶柱层析分离

组分 B 加载于硅胶柱(200~300 目,3.0 cm×40 cm)上,以氯仿和甲醇(体积比为 1 : 5,以下均为体积比)为洗脱液,流速为 1.0 mL/min,每管接收馏分 10 mL。组分 C 采用硅胶层析柱(200~300 目,5.0 cm×80 cm)进行分离,氯仿和甲醇(1 : 5)为洗脱液,流速为 1.0 mL/min,每管接收馏分 20 mL。洗脱 2 倍柱体积后,所得馏分 40 °C 下减压浓缩,进行硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析检测,展开剂为氯仿和甲醇(1 : 10)。合并相同馏分后,40 °C 下减压蒸干除去溶剂,获得再分组

分 B₁ 和 B₂、再分组分 C₁、C₂ 和 C₃。上述 5 个组分分别称取 10 mg, 依次溶解于 1 mL 甲醇溶液中, 配制浓度为 10 g/L 的溶液。进行抑藻活性检测时, 再分组分浓度设定为 1.0 mg/mL。结果表明, 3 个再分组分 (B₁、B₂ 和 C₂) 对米氏凯伦藻具有较为明显的抑藻活性。

2.2.4 Sephadax LH-20 凝胶柱层析分离

将上述 3 个再分组分分别加载于 Sephadax LH-20 凝胶层析柱上 (2.0 cm×25 cm), 均以甲醇为洗脱液。洗脱 2 倍柱体积后, 所得馏分 40℃ 下减压浓缩, 经硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析检测, 合并、减压蒸干后, 依次获得凝胶分离组分 B₁₁、B₁₂、B₁₃、B₂₁ (0.56 g)、C₂₁ 和 C₂₂。将它们分别称取 5 mg, 溶解于 0.5 mL 甲醇中, 进行抑藻活性检测, 浓度设定为 0.25 mg/mL。结果表明, 凝胶分离组分 B₁₃、B₂₁ 和 C₂₁ 显著地抑制了米氏凯伦藻的生长 (其中, B₂₁ 已经完成分离纯化)。

2.2.5 薄层层析纯化制备

采用划线法将凝胶分离组分 B₁₃ 和 C₂₁ 加载于硅胶薄层层析预制板 (100 mm×200 mm) 上, 分别以石油醚和乙酸乙酯 (1:2) 及氯仿和甲醇 (4:1) 为展开剂。经展开, 凝胶分离组分 B₁₃ 和 C₂₁ 分别在硅胶预制板上呈现 2 个清晰且相距较明显的条带。将相应条带分别刮下收集, 用丙酮浸泡, 过滤和减压蒸干后, 制备得到样品 B₁₃₁ (0.24 g)、B₁₃₂ (0.19 g)、C₂₁₁ (0.008 g) 和 C₂₁₂ (0.011 g)。适量称取 5 个样品, 分别溶解于甲醇溶液后, 点样于硅胶 GF₂₅₄ 上, 依次以氯仿和甲醇 (1:1)、环己烷和乙酸乙酯 (1:2) 及正丁醇和醋酸和水 (1:1:0.5) 为展开剂进行展开, 发现此 5 个样品均呈现单一斑点; 同时, 采用通用型显色剂 (10% 硫酸溶液和碘) 检测, 发现它们同样呈现单一斑点, 表明纯度达到了薄层纯。抑藻活性检测时, 样品浓度设定为 0.25 mg/mL。

2.3 结构鉴定

采用高分辨电喷雾质谱 (HR-ESI-MS) 和核磁共振谱 (1H-NMR 和 13C-NMR) 鉴定样品结构。LTQ-Orbitrap XL 光谱仪测定 HR-ESI-MS, Bruker AV III 600 质谱仪测定 NMR (四甲基硅烷 (TMS) 为标准品)。

2.4 抑藻活性

2.4.1 分离纯化过程中抑藻活性检测

在分离纯化过程中, 以米氏凯伦藻为抑藻活性测试微藻, 接种细胞数量为 (10~12)×10⁴ cells/mL。将待测组分溶解于甲醇后, 移取 1 μL 到微藻培养体系 (米氏凯伦藻 1 mL+f/2 培养基 9 mL), 终浓度按照以上相应分离过程进行设定。对照组为 10 mL 培养体系中加入 1 μL 甲醇, 每个实验设定 3 个平行样。所有培养瓶置于光照培养箱中进行培养, 温度为 (22±2)℃,

光照强度为 62 μmol/(m²·s), 光暗比为 12 h:12 h, 培养 10 d。

2.4.2 抑藻化合物对赤潮微藻的抑藻活性分析

将化合物 (市售, 分析纯) 溶解于甲醇溶液, 配制浓度为 250 mg/mL, 再依次稀释为 50 mg/mL、10 mg/mL 和 2 mg/mL。分别量取 1 μL 上述溶液, 加入到 4 999 μL 培养体系中 (赤潮微藻 500 μL+f/2 培养基 4 499 μL), 化合物终浓度依次为 50 μg/mL、10 μg/mL、2 μg/mL 和 0.4 μg/mL。塔玛亚历山大藻、强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻和中肋骨条藻的起始细胞数量分别为 (8~10)×10⁴ cells/mL、(20~24)×10⁴ cells/mL、(8~11)×10⁴ cells/mL、(10~14)×10⁴ cells/mL、(45~49)×10⁴ cells/mL 和 (26~29)×10⁴ cells/mL。对照组为 4 999 μL 培养体系中加入 1 μL 甲醇溶液, 每个实验设定 3 个平行样。同时, 设定相同浓度的硫酸铜作为阳性对照组。所有培养瓶置于光照培养箱中进行培养, 培养 4 d, 其他培养条件同 2.4.1 节。同时, 显微镜下 (×400) 观察藻细胞形态。

2.5 实验指标测定

每日取样, 计数赤潮微藻细胞数量, 计算抑藻剂对赤潮微藻的生长抑制率 (*I*), 计算公式为

$$I = (1 - N/N_0) \times 100\%, \quad (1)$$

式中, *N* 为处理组藻细胞数量; *N*₀ 为对照组藻细胞数量。

采用文献 [24] 的方法计算硫酸铜和化合物对赤潮微藻生长的 EC_{50~96h}。

2.6 数据处理

实验数据采用 SPSS 11.5 软件包进行独立样本检验统计分析, *p*<0.05 为显著性差异, *p*<0.01 为极显著性差异。

3 结果和分析

3.1 海带中抑藻活性化合物活性追踪的分离纯化

3.1.1 海带提取物对米氏凯伦藻生长的影响

从图 2 可以看出, 随浓度增加, 海带提取物对米氏凯伦藻生长的抑制作用明显增强 (*p*<0.05)。当浓度为 8.0 mg/mL 时, 提取物对米氏凯伦藻的生长抑制率为 56.2% (第 10 天)。结果表明, 海带提取物具有明显抑制米氏凯伦藻的抑藻活性, 需要进行后续分离。

3.1.2 液液萃取分离组分对米氏凯伦藻生长的影响

在图 3 中, 组分 B 和组分 C 明显抑制了米氏凯伦藻的生长 (*p*<0.05)。第 10 天对米氏凯伦藻的生长抑制率超过 76%。因此, 将组分 B 和组分 C 进行硅胶柱层析分离。

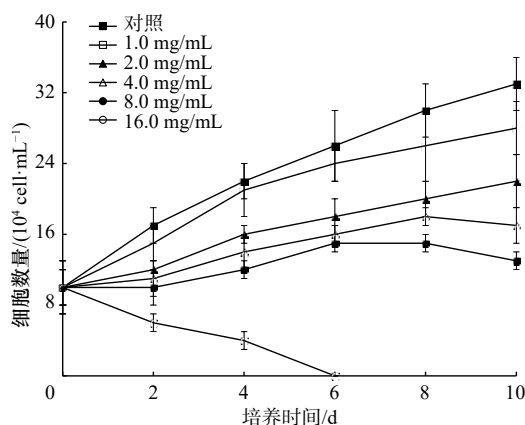


图2 海带甲醇提取物对米氏凯伦藻生长的影响
Fig. 2 Effect of the methanol extracts of *Laminaria japonica* on the growth of *Karenia mikimotoi*

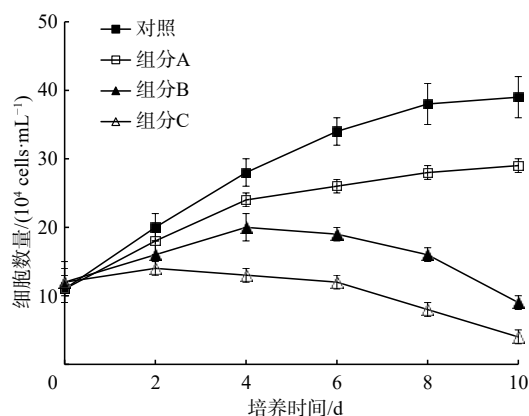


图3 液液萃取分离组分对米氏凯伦藻生长的影响
Fig. 3 Effect of several liquid-liquid extraction components from the methanol extracts on the growth of *Karenia mikimotoi*

3.1.3 硅胶柱层析和 Sephadax LH-20 凝胶柱层析分离组分以及薄层层析纯化样品对米氏凯伦藻生长的影响

由表1可知,组分B和组分C经硅胶柱层析分离后,得到5个再分组分。抑藻活性检测表明,再分组分B₁、B₂和C₂对米氏凯伦藻具有明显的抑藻活性($p < 0.05$)。

将上述3个再分组分B₁、B₂和C₂分别进行Sephadax LH-20凝胶柱层析分离,组分B₁分离为B₁₁、B₁₂和B₁₃;组分B₂分离为B₂₁;组分C₂分离为C₂₁和C₂₂(表1)。在6个组分中,B₁₃、B₂₁和C₂₁均对米氏凯伦藻生长表现出明显的抑制作用($p < 0.05$),其中B₂₁薄层层析检测显示仅有1个斑点。随后,将B₁₃和C₂₁进行硅胶薄层层析制备,

经薄层层析纯化制备,得到4个样品,B₁₃₁、B₁₃₂、C₂₁₁和C₂₁₂(表1)。浓度为0.05 mg/mL时,它们对米氏凯伦藻的生长表现出明显的抑藻活性($p < 0.05$)。

综上,采用一系列分离方法,从海带中纯化到对米氏凯伦藻的生长具有抑制作用的活性化合物,分离纯化具体过程见图4。

3.2 结构鉴定

样品B₁₃₁,无色粉末。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 3.51 (2H, t, $J=6.0$ Hz, H-7); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 177.2 (C-11)、41.8 (C-2)、23.4 (C-3)、30.4 (C-4)、30.2 (C-5)、36.8 (C-6)、63.5 (C-7)。以上数据与文献[25]基本一致,故鉴定样品B₁₃₁为7-羟基庚酸。

样品B₁₃₂,无色粉末。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 0.88 (3H, t, $J=6.6$ Hz, H-14)、2.35 (2H, m, H-2); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 177.9 (C-1)、33.8 (C-2)、24.9 (C-3)、29.2 (C-4)、29.4 (C-5)、29.9 (C-6)、29.7 (C-7)、29.6 (C-8)、31.4 (C-9)、29.5 (C-10/11)、32.1 (C-12)、22.8 (C-13)、14.3 (C-14)。这些数据与十四酸的光谱数据基本一致[26],因此,将样品B₁₃₂鉴定为十四酸。

样品B₂₁,白色粉末。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 2.32 (2H, t, $J=7.8$ Hz, H-2)、1.63 (2H, m, H-3)、0.87 (3H, t, $J=7.2$ Hz, H-16); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 179.3 (C-1)、34.2 (C-2)、25.1 (C-3)、29.5 (C-4)、29.6 (C-5)、29.8~30.1 (C-6~12)、29.8 (C-13)、32.3 (C-14)、23.1 (C-15)、14.5 (C-16)。样品B₂₁的核磁共振谱的数据与文献[27]基本一致,因此,鉴定其为

表1 组分B和组分C的分离纯化过程中抑藻活性检测

Table 1 Antialgal activity test of the fractions B and C in the isolation and purification process

浓度	组分B		组分C		
	硅胶柱层析分离(3.0 cm×40 cm)		硅胶柱层析分离(5.0 cm×80 cm)		
1.0 mg/mL(Sephadax LH-20凝胶柱层析 (2.0 cm ² ×25 cm))	组分B ₁ ⁺⁺	组分B ₂ ⁺⁺	组分C ₁ ⁻	组分C ₂ ⁺⁺	组分C ₃ ⁻
0.25 mg/mL(硅胶薄层层析制备)	B ₁₁ ⁻ 、B ₁₂ ⁻ 、B ₁₃ ⁺⁺	B ₂₁ ⁺⁺		C ₂₁ ⁺⁺ 、C ₂₂ ⁻	
0.05 mg/mL		B ₁₃₁ ⁺⁺ 、B ₁₃₂ ⁺⁺		C ₂₁₁ ⁺⁺ 、C ₂₁₂ ⁺⁺	

注: -表示没有抑藻活性; +表示微弱的抑藻活性,生长抑制率为20%~50%; ++表示强烈的抑藻活性,生长抑制率大于50%。

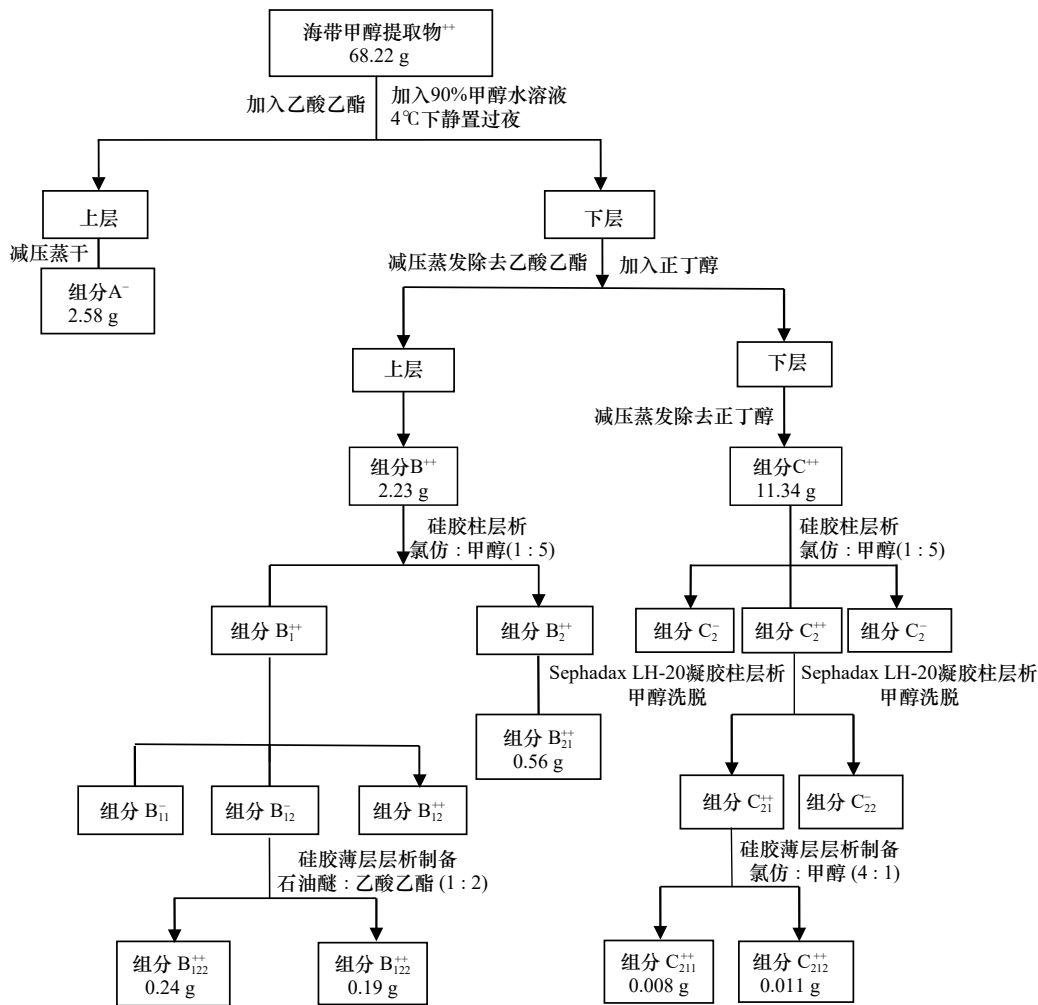


图4 海带中抑藻活性化合物的分离纯化

Fig. 4 Isolation and purification of the antialgal compounds from *Laminaria japonica*

十六酸。

样品 C₂₁₁ (白色蜡状固体), ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 2.31 (2H, t, *J*=7.8 Hz, H-2)、1.63 (2H, m, H-3)、1.28 (28H, m, H-4~H-17)、0.88 (3H, t, *J*=7.2 Hz, H-18); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 177.1 (C-1)、34.0 (C-2)、31.9 (C-16)、29.1~29.7 (C-4~C-15)、24.7 (C-3)、22.7 (C-17)、14.5 (C-18)。这些数据与文献 [28] 一致, 故将样品 C₂₁₁ 鉴定为十八酸。

样品 C₂₁₂, 无色油状物。¹H-NMR (600 MHz, MeOD) δ_H: 0.86 (3H, t, *J*=6.6 Hz, H-18)、1.23 (8H, m, m, H-4~H-7)、1.24 (20H, m, H-12~H-17)、1.61 (2H, m, H-3)、1.94 (4H, m, H-8, 11)、2.33 (2H, t, *J*=7.2 Hz, H-2)、5.28 (2H, dd, *J*=8.4, 5.4 Hz, H-9, H-10)。以上数据与油酸的核磁共振谱数据基本一致 [29]。

3.3 5种化合物对6种赤潮微藻的抑藻活性分析

在图5中, 5种化合物对6种赤潮微藻生长表现出明显的选择性抑制作用, 其中7-羟基庚酸表现出最

为强烈的抑制作用 ($p < 0.05$), 且这种抑制作用随着浓度的增加而明显增强 ($p < 0.05$)。第4天, 在浓度为 50 μg/mL 时, 7-羟基庚酸对塔玛亚历山大藻、强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻和中肋骨条藻的生长抑制率分别为 53.3%、84.3%、71.2%、72.3%、74.4% 和 87.5%; 十四酸明显地抑制了强壮前沟藻、米氏凯伦藻和中肋骨条藻的生长 ($p < 0.05$), 在浓度 50 μg/mL 时, 对它们的生长抑制率超过 52% (第4天); 十六酸仅明显抑制了强壮前沟藻的生长 ($p < 0.05$), 对强壮前沟藻的生长抑制率为 52.5% (50 μg/mL, 第4天), 对其他5种赤潮微藻的生长抑制率低于 40%; 十八酸和油酸对6种赤潮微藻没有明显的生长抑制作用 ($p > 0.05$), 在浓度为 50 μg/mL 时, 对它们的生长抑制率低于 40%。

进一步, 计算得出了7-羟基庚酸等5种脂肪酸对6种赤潮微藻生长的半抑制效应浓度 (EC_{50-96h}) (表2)。硫酸铜和重铬酸钾是藻类毒性实验中常用的阳性对

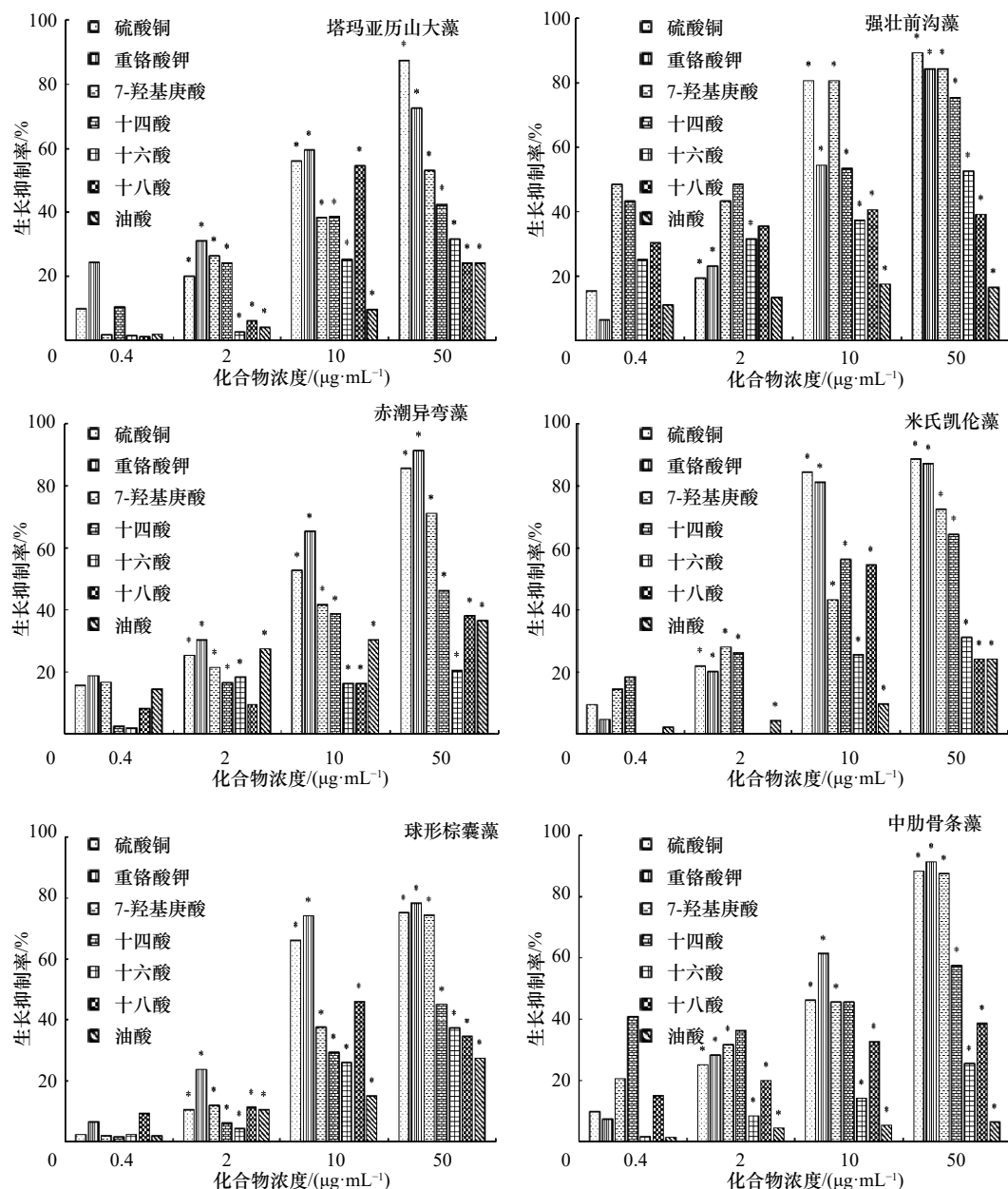


图5 不同化合物对6种赤潮微藻生长的抑制作用

Fig. 5 Growth inhibition of the different compounds against six species of red tide microalgae

图中数据为3个平行样的平均值

The data in the figure is the average of the three parallel samples

照组,硫酸铜对6种赤潮微藻生长的 EC_{50-96h} 在表2列出,由前期研究可知,重铬酸钾对强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻和中肋骨条藻生长的 EC_{50-96h} 依次为 $3.9 \mu\text{g/mL}$ 、 $36 \mu\text{g/mL}$ 、 $16 \mu\text{g/mL}$ 、 $38 \mu\text{g/mL}$ 和 $2.7 \mu\text{g/mL}$ ^[9,30]。除十四酸、十六酸和十八酸对塔玛亚历山大藻生长的 EC_{50-96h} 已被报道^[31],7-羟基庚酸等5种脂肪酸和硫酸铜对赤潮微藻生长的 EC_{50-96h} 是第一次被明确。在本文中,十四酸和十六酸对塔玛亚历山大藻生长的 EC_{50-96h} 与已有报道非常接近^[31],但十八酸对塔玛亚历山大藻生长的 EC_{50-96h}

与已有报道相差很大^[31],具体原因目前还在分析中。

国际经合组织(OECD)指出,当 EC_{50-96h} 分别为小于 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $1\sim 10 \mu\text{g/mL}$ 、 $10\sim 100 \mu\text{g/mL}$ 和大于 $100 \mu\text{g/mL}$ 时,化合物对藻类具有极高毒性、高毒性、中等毒性和极低毒性^[32]。根据此标准,7-羟基庚酸、十四酸和十六酸对6种赤潮微藻具有中等或高等毒性,其中7-羟基庚酸对塔玛亚历山大藻和强壮前沟藻、十四酸对强壮前沟藻均为高毒性。与重铬酸钾对赤潮微藻生长的 EC_{50-96h} 比较,7-羟基庚酸和十四酸对强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻和球形棕囊藻生长

表2 不同化合物对6种赤潮微藻生长的半抑制效应浓度 (EC_{50-96h} , 单位: $\mu\text{g/mL}$)Table 2 Different compounds isolated from *Laminaria japonica* for the six species of red tide microalgae (EC_{50-96h} , unit: $\mu\text{g/mL}$)

藻类	硫酸铜	7-羟基庚酸	十四酸	十六酸	十八酸	油酸
塔玛亚历山大藻	6.76	7.39	10.6	36.8	115.4	-
强壮前沟藻	4.16	2.19	3.54	54.4	-	-
赤潮异弯藻	6.42	13.9	15.4	37.3	154.3	-
米氏凯伦藻	4.43	11.1	11.4	12.6	215.9	-
球形棕囊藻	11.2	18.5	20.1	95.9	361.0	-
中肋骨条藻	6.99	18.0	18.5	32.5	292.6	-

注: -表示没有计算得出。

的 EC_{50-96h} 更小, 十六酸对米氏凯伦藻生长的 EC_{50-96h} 更小, 这表明 7-羟基庚酸和十四酸在抑制强壮前沟藻等 4 种赤潮微藻、十六酸在抑制米氏凯伦藻上比重铬酸钾更具有抑藻优势。同时, 从表 2 可以看出, 7-羟基庚酸和十四酸对强壮前沟藻的 EC_{50-96h} 明显小于硫酸铜对该赤潮微藻的 EC_{50-96h} 。综合来看, 7-羟基庚酸和十四酸在抑制强壮前沟藻上具有明显优于重铬酸钾和硫酸铜的抑藻优势。

同时, 我们发现在脂肪酸作用下, 藻细胞形态发生了某些明显变化。在 7-羟基庚酸作用下, 强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻和球形棕囊藻细胞形态改变见图 6。在图 6 中, 能清晰看到强壮前沟藻和赤潮异弯藻细胞膜模糊、类似溶解, 横鞭毛脱落, 形状改变明显; 米氏凯伦藻细胞破碎; 球形棕囊藻细胞变长、伴有色素体缺陷等现象。在十四酸和十六酸能明显抑制的赤潮微藻中, 藻细胞形态也发现了这些类似的变化。

4 讨论

大型海藻是抑制赤潮微藻活性化合物的良好来源之一^[32-35], 某些抑藻活性化合物结构已经被鉴定, 例如, α -亚麻酸^[23, 36]、dictyolactone^[14]、 α -单甘酯^[15]、二十二碳酸甲酯^[12]等。这些研究表明, 大型海藻中抑藻活性化合物结构多样, 包括脂肪酸、萜类和其他化合物^[12, 14-15, 23, 37-38]。目前, 已经从葡萄藻 (*Botryococcus braunii*)^[14]、褐藻 (*Cladosiphon okamuranus*)^[39]、小珊瑚藻 (*Corallina pilulifera*)^[39]、江蓠 (*Gracilaria lemaneiformis*)^[13]、裂片石莼 (*Ulva fasciata*)^[23]、孔石莼 (*Ulva pertusa*)^[9] 和浒苔 (*Ulva prolifera*)^[40-41] 等大型海藻中分离到脂肪酸类抑藻活性物质 (图 1)。在本文, 采用抑藻活性追踪分离方法 (图 2 至图 4, 表 1), 第一次从海带中分离到 7-羟基庚酸、十四酸、十六酸、十八酸和

油酸 (纯度为薄层纯), 其中 7-羟基庚酸、十四酸和十八酸是第一次从大型海藻中分离获得。十六酸已从葡萄藻^[34]、江蓠^[13]、肠浒苔 (*Ulva intestinalis*)^[41] 和浒苔^[40] 中分离得到; 在龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 分离到油酸^[42]。

目前, 脂肪酸对淡水微藻生长的抑制作用^[43-47] 和对赤潮微藻生长的抑制作用^[12, 23, 31, 34-35, 39-41, 48-49] 已有一些研究报道。在本文中, 除塔玛亚历山大藻和赤潮异弯藻外, 7-羟基庚酸、十四酸、十六酸、十八酸和油酸对强壮前沟藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻和中肋骨条藻生长的抑制作用是第一次被研究。在脂肪酸对淡水微藻——分散藻羊角月芽藻 (*Selenastrum capricornutum*) 急性毒性研究中, 研究者认为, 脂肪酸的抑藻作用与脂肪酸的碳链长度有关^[47]。尹玉丽^[31] 指出, 饱和脂肪酸对塔玛亚历山大藻生长抑制强弱的顺序依次为十四酸、十六酸、十八酸。何宗祥和张庭廷^[44] 及姜闻新等^[45] 也认为, 脂肪酸的抑藻作用与脂肪酸碳链长度有关。在本研究中, 我们发现 7-羟基庚酸和十四酸的抑藻活性要明显强于其他 3 种脂肪酸的抑藻活性, 十六酸、十八酸和油酸仅具有微弱的抑藻活性。然而, 十六酸、十八酸和油酸对试验赤潮微藻的抑藻活性并未有明显的强弱差异 (图 5)。因此, 本文研究结果仅在一定程度上符合“脂肪酸碳链越短, 抑制作用越强”的说法。同时发现, 在浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 7-羟基庚酸对强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻和中肋骨条藻的生长抑制率与硫酸铜和重铬酸钾对此 5 种赤潮微藻的生长抑制率接近 (第 4 天, 图 3)。

在脂肪酸对微藻生长的抑制作用机理研究中, 某些研究者认为, 脂肪酸主要通过细胞膜上离子通道的途径产生抑制作用^[32, 50-51], 具体为脂肪酸引起离子通道结构变化, 导致细胞膜通透性发生改变, 某些重要

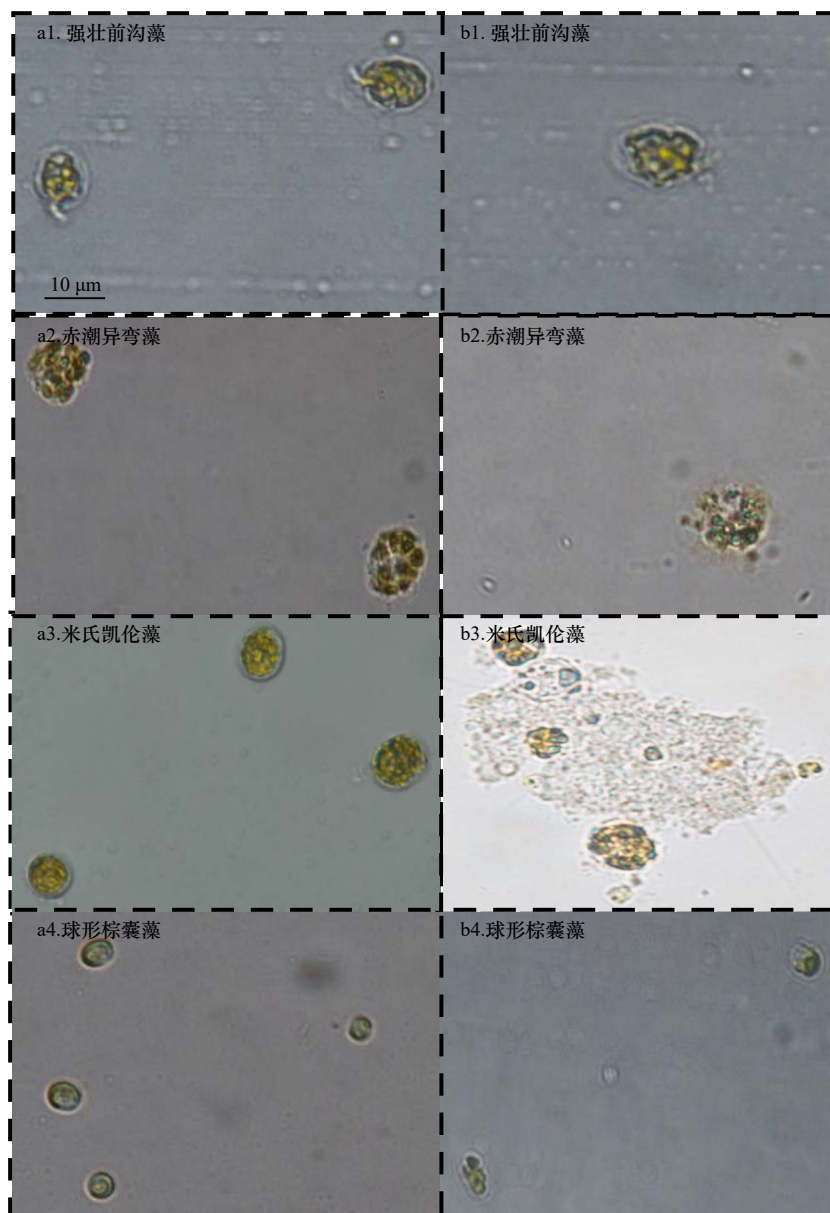


图 6 7-羟基庚酸对 4 种赤潮微藻细胞形态的影响

Fig. 6 Effect of 7-hydroxyheptanoic acid on the photographs of the four species of red tide microalgae

a1-a4. 阴性对照组; b1-b4. 添加 7-羟基庚酸实验组; 光学显微镜 ($\times 400$)

a1-a4. Negative control group; b1-b4. groups added 7-hydroxyheptanoic acid; light microscope ($\times 400$)

离子, 譬如 Ca^{2+} 流出, 致使藻细胞内与这些离子相关的生理活动受到影响, 从而引发藻细胞死亡。进一步研究指出, 由于藻细胞质膜中十六酸、亚油酸等脂肪酸含量较高, 外加这些脂肪酸时, 它们更易与质膜结合导致其构像发生变化, 致使藻细胞离子通道结构发生变化^[52]。因此, 某些研究指出, 脂肪酸对微藻生长的抑制作用与试验微藻细胞的脂肪酸组成有关系^[44-45, 49]。在本研究中, 我们发现不同脂肪酸作用下藻细胞出现细胞膜模糊、细胞破碎或色素体缺陷等现象(仅列出 7-羟基庚酸作用下藻细胞形态的某些改变, 图 6), 很明显藻细胞受到了脂肪酸不同程度的影

响。6 种试验赤潮微藻中, 除强壮前沟藻脂肪酸组成未见报道外, 其他 5 种赤潮微藻中, 十六酸含量最高, 多数含有十四酸和十八酸, 仅塔玛亚历山大藻和赤潮异弯藻含有油酸^[53-57]。5 种脂肪酸对 6 种赤潮微藻的抑藻强弱顺序为 7-羟基庚酸、十四酸、十六酸、十八酸、油酸, 根据本文现有结果尚无法确定本文试验的赤潮微藻脂肪酸组成与脂肪酸对它们的生长抑制作用之间的关系, 还需要在后续工作中进行研究。

表 2 表明, 7-羟基庚酸、十四酸和十六酸对 6 种试验赤潮微藻具有中等或高等毒性, 其中 7-羟基庚酸和十四酸对试验的赤潮微藻具有更为强烈的毒性。

与硫酸铜和重铬酸钾对试验赤潮微藻生长的 EC_{50-96h} 相比, 7-羟基庚酸和十四酸对强壮前沟藻生长的 EC_{50-96h} 影响更小。这就表明, 在抑制强壮前沟藻上, 7-羟基庚酸和十四酸更具有抑藻优势。同时, 与以往研究相比^[9-10, 16], 7-羟基庚酸对强壮前沟藻生长的 EC_{50-96h} 不仅小于孔石莼、条斑紫菜和江蓠中分离到的抑藻活性化合物对该种赤潮微藻生长的 EC_{50-96h} , 而且也小于硫酸铜和重铬酸钾对强壮前沟藻生长的 EC_{50-96h} 。硫酸铜和重铬酸钾能迅速杀死赤潮微藻, 然而, 它们对非赤潮微藻的杀灭或抑制作用, 会影响整个生态系统。7-羟基庚酸作为海带生长过程中产生的代谢物, 在自然条件下能降解, 不会长期积累, 生态安全性好, 可替代硫酸铜和重铬酸钾, 有望成为一种新型的环境友好型赤潮微藻抑藻剂。

我们的一个前期研究总结了近 20 年大型海藻抑藻活性化合物^[10], 发现分离自江蓠的 gossonorol 和 7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol^[31] 对强壮前沟藻生长的 EC_{50-96h} 与本研究中 7-羟基庚酸和十四酸对该赤潮微藻生长的 EC_{50-96h} 较为接近, gossonorol 和 7,10-epoxy-ar-bisabol-11-ol 是倍半萜类化合物、7-羟基庚酸和十四酸是脂肪酸, 从结构上来看, 羟基很可能是产生抑制作用的基团。此 4 种抑藻活性化合物的分离纯化过程有一定的相似性, 均是采用溶剂浸提、液液萃取、硅胶柱层析或薄层层析分离等方法, 但具体分离过程并不相同。让人遗憾的是, 先前工作和本研究都没有进行抑藻机理分析, 它们在对赤潮微藻生长的抑制效应方面是否存在相似性尚不得知, 需要后续进行深入研究。

参考文献:

- [1] Anderson D M, Cembella A D, Hallegraef G M. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2012, 4: 143-176.
- [2] 周名江, 朱明远. “我国近海有害赤潮发生的生态学、海洋学机制及预测防治”研究进展[J]. *地球科学进展*, 2006, 21(7): 673-679. Zhou Mingjiang, Zhu Mingyuan. Progress of the project “ecology and oceanography of harmful algal blooms in China”[J]. *Advances in Earth Science*, 2006, 21(7): 673-679.
- [3] 李贇辉, 吴婷, 杨维东, 等. 十种黄酮类化合物对两种赤潮藻的抑制作用[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2012, 33(1): 72-75. Li Yunhui, Wu Ting, Yang Weidong, et al. Inhibitory effects of ten flavonoids against two harmful algae[J]. *Journal of Jinan University (Natural Science)*, 2012, 33(1): 72-75.
- [4] 俞志明, 邹景忠, 马锡年. 一种提高粘土矿物去除赤潮生物能力的新方法[J]. *海洋与湖沼*, 1994, 25(2): 226-232. Yu Zhiming, Zou Jingzhong, Ma Xinian. A new method to improve the capability of clays for removing red tide organisms[J]. *Oceanologia ET Limnologia Sinica*, 1994, 25(2): 226-232.
- [5] Wang Xiulin, Gong Liangyu, Liang Shengkang, et al. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Harmful Algae*, 2005, 4(2): 433-443.
- [6] Nagasaki K, Tarutani K, Yamaguchi M. Growth characteristics of *Heterosigma akashiwo* virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 898-902.
- [7] Zheng Xiaowei, Zhang Bangzhou, Zhang Jinlong, et al. A marine algicidal actinomycete and its active substance against the harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(20): 9207-9215.

近 50 年来, 利用大型海藻与赤潮微藻间抑制作用来生物防控赤潮微藻的研究有了长足进步, 取得了一系列研究成果。然而, 大型海藻抑藻活性化合物分离纯化研究仍然非常欠缺, 致使利用大型海藻抑藻活性化合物开发环境友好型赤潮微藻抑藻剂受到了极大限制, 因此, 亟需海洋科学领域的研究者开展相关研究来解决这个问题。

5 结论

(1) 采用活性追踪的分离方法, 第一次从海带中分离纯化得到 7-羟基庚酸、十四酸、十六酸、十八酸和油酸, 纯化为薄层纯。

(2) 7-羟基庚酸具有较为广泛的抑藻活性, 在浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 第 4 天对塔玛亚历山大藻、强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻和中肋骨条藻的生长抑制率超过 53%。十四酸 (50 $\mu\text{g/mL}$) 也对强壮前沟藻、米氏凯伦藻和中肋骨条藻的生长表现出明显的抑制作用, 对它们的生长抑制率超过 57% (第 4 天)。

(3) 明确了 7-羟基庚酸、十四酸、十六酸、十八酸和油酸对塔玛亚历山大藻、强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、球形棕囊藻和中肋骨条藻生长的半抑制效应浓度 EC_{50-96h} 。发现 7-羟基庚酸和十四酸在抑制强壮前沟藻上比硫酸铜和重铬酸钾更具有抑藻优势。

致谢: 感谢中国医学科学院药用植物研究所马国需博士对样品结构解析的帮助。

- [8] 刘伯雅, 魏东芝, 鲁思然, 等. 灵菌红素对有害藻类的除藻活性研究[J]. 中国环境科学, 2010, 30(4): 477–482.
Liu Boya, Wei Dongzhi, Lu Siran, et al. Algicidal activity of prodigiosin against harmful algae[J]. China Environmental Science, 2010, 30(4): 477–482.
- [9] Sun Yingying, Zhou Wenjing, Wang Hui, et al. Antialgal compounds with antialgal activity against the common red tide microalgae from a green algae *Ulva pertusa*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 157: 61–66.
- [10] Sun Yingying, Dong Shasha, Zhou Wenjing, et al. A comprehensive review of secondary metabolites with antialgal activity from marine macroalgae against red tide microalgae[J]. *Journal of Coastal Research*, 2019, 93(S1): 475–488.
- [11] 张鑫洋, 刘天浩, 梅齐诚, 等. 来源于海洋天然产物的抑藻剂探究[J]. *山东化工*, 2020, 49(18): 49–50.
Zhang Xinyang, Liu Tianhao, Mei Qicheng, et al. Research on algae inhibitors derived from marine natural products[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2020, 49(18): 49–50.
- [12] Ohsawa N, Ogata Y, Okada N, et al. Physiological function of bromoperoxidase in the red marine alga, *Corallina pilulifera*: production of bromoform as an allelochemical and the simultaneous elimination of hydrogen peroxide[J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(5): 683–692.
- [13] 卢慧明. 大型海藻龙须菜化学成分及其对中肋骨条藻化感作用研究[D]. 广州: 暨南大学, 2011.
Lu Huiming. Chemical constituents of the seaweed *Gracilaria lemaneiformis* and their allelopathic effects on *Skeletonema costatum*[D]. Guangzhou: Jinan Univesity, 2011.
- [14] Kim J Y, Alamsjah M A, Hamada A, et al. Algicidal diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(10): 2571–2574.
- [15] Hirao S, Tara K, Kuwano K, et al. Algicidal activity of glycerolipids from brown alga *Ishige sinicola* toward red tide microalgae[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2012, 76(2): 372–374.
- [16] Sun Yingying, Xing Jingzeng, Zhang Jianshuo, et al. Sesquiterpenoids with antialgal activity against the common red tide microalgae from marine macroalga *Porphyra yezoensis*[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(8): 7844–7859.
- [17] Chowdhury M T H, Bangoura I, Kang J Y, et al. Comparison of *Ecklonia cava*, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis* for phlorotannin extraction[J]. *Journal of Environmental Biology*, 2014, 35(4): 713–719.
- [18] Nagayama K, Shibata T, Fujimoto K, et al. Algicidal effect of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on red tide microalgae[J]. *Aquaculture*, 2003, 218(1/4): 601–611.
- [19] 李凤超. 海带和厚叶解曼藻中防污活性物质的提取及性能研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
Li Fengchao. Extraction and performance investigation of antifouling compounds produced by *Laminaria* and *Kjellmaniella crassifolia*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.
- [20] Jeong J H, Jin H J, Sohn C H, et al. Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12(1): 37–43.
- [21] 安蓁. 大型海藻及纳米材料对赤潮中肋骨条藻的抑制作用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
An Zhen. The research of inhibitory effect on red tide *Skeletonema costatum* by macroalgae and nanomaterials[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.
- [22] Alamsjah M A, Hirao S, Ishibashi F, et al. Isolation and structure determination of algicidal compounds from *Ulva fasciata*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69(11): 2186–2192.
- [23] Suzuki Y, Takabayashi T, Kawaguchi T, et al. Isolation of an allelopathic substance from the crustose coralline algae, *Lithophyllum* spp., and its effect on the brown Alga, *Laminaria religiosa* miyabe (phaeophyta)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1998, 225(1): 69–77.
- [24] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 47(3): 469–474.
- [25] Wang Haifeng, Niu Youhong, Zhang Guoying, et al. A unified synthesis of cyclic ethers or lactones via Pd-catalyzed intramolecular O-functionalization of sp³ C-H bonds[J]. *Tetrahedron Letters*, 2016, 57(41): 4544–4548.
- [26] 李宁新, 范青飞, 宋启示. 傣药石梓皮和接骨草的化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29: 11–17.
Li Ningxin, Fan Qingfei, Song Qishi. Chemical constituents from bark of *Gmelina arborea* and *Sambucus chinensis*[J]. *Natural Product Research Development*, 2017, 29: 11–17.
- [27] 任冰如, 夏冰, 李维林, 等. 乌韭的化学成分研究(II) [J]. *中草药*, 2009, 40(1): 104–106.
Ren Bingru, Xia Bing, Li Weilin, et al. Chemical constituents of *Stenoloma chusanum*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2009, 40(1): 104–106.
- [28] Yang Nianyun, Wang Liuying, Zhang Yiwen. Immunological activities of components from leaves of *Liriodendron chinensis*[J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2015, 7(3): 279–282.
- [29] 陈路, 刘远俊, 黄菲菲, 等. 国产巴西人参醋酸乙酯部位化学成分研究[J]. *中草药*, 2018, 49(6): 1255–1260.
Chen Lu, Liu Yuanjun, Huang Feifei, et al. Chemical constituents from ethyl acetate extracts of domestic *Pfaffia glomerata*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(6): 1255–1260.
- [30] Sun Yingying, Meng Kun, Su Zhenxia, et al. Isolation and purification of antialgal compounds from the red alga *Gracilaria lemaneiformis* for activity against common harmful red tide microalgae[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(5):

- 4964–4972.
- [31] 尹玉丽. 两类植物化感物质对赤潮藻生长的影响研究[D]. 广州: 暨南大学, 2007.
Yi Yuli. Studies on inhibitive effect of two kinds allelochemicals on HABs algae[D]. Guangzhou: Jinan University, 2007.
- [32] OECD. Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test[M]//OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development, 1981.
- [33] El Amrani Zerrifi S, El Khalloufi F, Oudra B, et al. Seaweed bioactive compounds against pathogens and microalgae: potential uses on pharmacology and harmful algae bloom control[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(2): 55.
- [34] Ben Gharbia H, Yahia O K D, Cecchi P, et al. New insights on the species-specific allelopathic interactions between macrophytes and marine HAB dinoflagellates[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187963.
- [35] Złoch I, Śliwińska-Wilczewska S, Kucharska M, et al. Allelopathic effects of *Chara* species (*C. aspera*, *C. baltica*, and *C. canescens*) on the bloom-forming picocyanobacterium *Synechococcus* sp.[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(36): 36403–36411.
- [36] Chiang I Z, Huang Wenya, Wu J T. Allelochemicals of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 2004, 40(3): 474–480.
- [37] Kakisawa H, Asari F, Kusumi T, et al. An allelopathic fatty acid from the brown alga *Cladosiphon okamuranus*[J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(3): 731–735.
- [38] Oh M Y, Lee S B, Jin D H, et al. Isolation of algicidal compounds from the red alga *Corallina pilulifera* against red tide microalgae[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22(4): 453–458.
- [39] 崔峰. 浒苔对赤潮微藻的化感抑制作用以及化感物质的结构鉴定[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
Cui Feng. Studies on allelopathy effects of *Ulva prolifera* on red tide microalgae and allelochemicals identification[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014.
- [40] 高红, 周飞飞, 唐洪杰, 等. 黄海绿潮浒苔提取物的化感效应及化感物质的分离鉴定[J]. 海洋学报, 2018, 40(12): 11–20.
Gao Hong, Zhou Feifei, Tang Hongjie, et al. Allelopathy of extracts of *Ulva prolifera* on green tides in the Yellow Sea and the identification of the allelochemicals[J]. *Haiyang Xuebao*, 2018, 40(12): 11–20.
- [41] 金浩良. 肠浒苔中抑藻活性物质的分离鉴定及其对赤潮藻的影响[D]. 宁波: 宁波大学, 2011.
Jin Haoliang. Studies on the inhibition activity of *Ulva intestinalis* on red tide microalgae and the isolation and identification of the algicidal compounds[D]. Ningbo: Ningbo University, 2011.
- [42] 王国蕊. 海洋酸化对大型海藻活性代谢产物影响的研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2018.
Wang Guorui. Effects of ocean acidification on active metabolites of macroalgae[D]. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2018.
- [43] 张庭廷, 郑春艳, 何梅, 等. 脂肪酸类物质的抑藻效应及其构效关系[J]. 中国环境科学, 2009, 29(3): 274–279.
Zhang Tingting, Zheng Chunyan, He Mei, et al. Inhibition on algae of fatty acids and the structure-effect relationship[J]. *China Environmental Science*, 2009, 29(3): 274–279.
- [44] 何宗祥, 张庭廷. 四种十八碳脂肪酸抑藻时效关系分析的数学模型设计[J]. 生态学报, 2011, 31(23): 7235–7243.
He Zongxiang, Zhang Tingting. Mathematical model design of time-effect relationship analysis about the inhibition of four eighteen-carbon fatty acids on toxic *Microcystis aeruginosa*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(23): 7235–7243.
- [45] 姜闻新, 贾永, 王从彦, 等. 软脂酸和硬脂酸对铜绿微囊藻生长的抑制作用[J]. 生态环境学报, 2010, 19(2): 291–295.
Jiang Wenxin, Jia Yong, Wang Congyan, et al. The inhibitory effects of palmitic acid and stearic acid on *Microcystis aeruginosa*[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(2): 291–295.
- [46] 罗万芬, 曾仁权. 几种长链脂肪酸对铜绿微囊藻生长的影响研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2012, 37(8): 92–95.
Luo Wanfen, Zeng Renquan. Studies of some long chain fatty acids on growth of *Microcystis aeruginosa*[J]. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 2012, 37(8): 92–95.
- [47] Kamaya Y, Kurogi Y, Suzuki K. Acute toxicity of fatty acids to the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*[J]. *Environmental Toxicology*, 2003, 18(5): 289–294.
- [48] 夏钰妹, 孙雪, 徐年军, 等. α -亚麻酸对赤潮异弯藻生长的抑制作用[J]. 中国环境科学, 2012, 32(5): 880–885.
Xia Yumei, Sun Xue, Xu Nianjun, et al. Inhibitory effects of α -linolenic acid on the red tide microalgae *Heterosigma akashiwo*[J]. *China Environmental Science*, 2012, 32(5): 880–885.
- [49] 王平平. 亚麻酸对赤潮异弯藻和米氏凯伦藻化感效应及细胞凋亡机制的研究[D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2015.
Wang Pingping. Allelopathic effect and the apoptotic mechanisms of linolenic acid on *Heterosigma akashiwo* and *Karenia mikimotoi*[D]. Qufu: Qufu Normal University, 2015.
- [50] Agafonov A, Gritsenko E, Belosludtsev K, et al. A permeability transition in liposomes induced by the formation of Ca^{2+} /palmitic acid complexes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2003, 1609(2): 153–160.
- [51] 尚忠林, 孙大业. 植物细胞内的钙通道[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 625–630.
Shang Zhonglin, Sun Daye. Calcium channels in plant cells[J]. *Plant Physiology Communications*, 2002, 38(6): 625–630.
- [52] Sokolov Y, Mirzabekov T, Martin D W, et al. Membrane channel formation by antimicrobial protegrins[J]. *Biochimica et Biophysica*

- Acta (BBA)-Biomembranes, 1999, 1420(1/2): 23–29.
- [53] 娄亚迪. 海洋赤潮藻生长过程中碳源的作用机制[D]. 大连: 大连海事大学, 2020.
Lou Yadi. Carbon mechanism on the growth of marine blooms microalgae[D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2020.
- [54] Liu Yuxin, Liu Yu, Jiao Dian, et al. Synthesis and release of fatty acids under the interaction of *Ulva pertusa* and *Heterosigma akashiwo* by stable isotope analysis[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 210: 111852.
- [55] Zhao Yan, Tang Xuexi, Zhao Xiaowei, et al. Effect of various nitrogen conditions on population growth, temporary cysts and cellular biochemical compositions of *Karenia mikimotoi*[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171996.
- [56] 杨秋婵, 赵玲, 尹平河, 等. 溶藻活性物质对棕囊藻溶藻及其脂肪酸影响的模拟[J]. 环境科学, 2015, 36(9): 3255–3261.
Yang Qiuchan, Zhao Ling, Yin Pinghe, et al. Effects of algicidal substance on *Phaeocystis globosa* and its fatty acids by the simulation experiment[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(9): 3255–3261.
- [57] Ni Lixiao, Jie Xiaoting, Wang Peifang, et al. Characterization of unsaturated fatty acid sustained-release microspheres for long-term algal inhibition[J]. *Chemosphere*, 2015, 120: 383–390.

Isolation, purification and analysis of antialgal activities of antialgal compounds from *Laminaria japonica*

Sun Yingying^{1,2,3}, Zhu Wenxuan^{1,4}, Zhou Jing⁴, Zhuang Liwen¹, Mao Yilin¹, Zhao Xiufang¹, Wang Changhai⁵

(1. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 3. Jiangsu Institute of Marine Resources Development, Lianyungang 222005, China; 4. Lianyungang Quality and Technology Comprehensive Inspection and Testing Center, Lianyungang 222005, China; 5. College of Resources and Environment Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Using 2 000 g kelp as raw material and *Karenia mikimotoi* as the test microalgae, methanol extraction, liquid-liquid extraction, silica gel column chromatography, sephadax LH-20 gel column chromatography and silica gel thin layer chromatography are used to purify compounds that might inhibit algal activity. Five samples with thin layer purity, B₂₁ (1.39 g), B₁₃₁ (0.51 g), B₁₃₂ (0.48 g), C₂₁₁ (0.016 g) and C₂₁₂ (0.020 g), are prepared. Structural identification shows that B₂₁, B₁₃₁, B₁₃₂, C₂₁₁ and C₂₁₂ are 7-hydroxyheptanoic acid, tetradecanoic acid, hexadecanoic acid, octadecanoic acid, and oleic acid, respectively. They are isolated from *Laminaria japonica* for the first time. The results show that these five compounds have selective inhibition effects on the growth of six species of red tide microalgae (*Alexandrium tamarense*, *Amphidinium carterae*, *Heterosigma akashiwo*, *Karenia mikimotoi*, *Phaeocystis globosa*, and *Skeletonema costatum*). Among them, 7-hydroxyheptanoic acid has a wide range of antialgal activities. Except for *Alexandrium tamarense*, at the concentration of 50 µg/mL, the growth inhibition of 7-hydroxyheptanoic acid against the other five species of red tide microalgae is close to that of copper sulfate and potassium dichromate, and the growth inhibition is more than 71% (the 4th day). Tetradecanoic acid also shows obvious inhibition on the growth of *Amphidinium carterae*, *Karenia mikimotoi*, and *Skeletonema costatum*. On 4th day, the growth inhibition of tetradecanoic acid for the three species of red tide microalgae is more than 57%. Furthermore, $EC_{50-96\text{ h}}$ values of 7-hydroxyheptanoic acid, tetradecanoic acid, hexadecanoic acid, and octadecanoic acid for *Amphidinium carterae*, *Heterosigma akashiwo*, *Karenia mikimotoi*, *Phaeocystis globosa*, and *Skeletonema costatum* are obtained for the first time, respectively. $EC_{50-96\text{ h}}$ value of 7-hydroxyheptanoic acid for *Alexandrium tamarense* is also determined for the first time. It is found that 7-hydroxyheptanoic acid and tetradecanoic acid has the advantage of inhibiting *Amphidinium carterae*.

Key words: antialgal compound; isolation; *Laminaria japonica*; purification; red tide microalgae