هشتمین همایش صنایع دریایی
۹ لغایت ۱۱ آبانماه ۱۳۸۵
استان بوشهر

ظرفیتها و چالشهای پیش روی مهندسی فرآیند و تولید فرآورده های زیستی دریا

پیمان اقتصادی عراقی[۱]

[۱] استادیار و مدیر گروه علوم زیستی دریا، مرکز ملی اقیانوس شناسی، خ فاطمی، خ اعتمادزاده، پلاک ۹

eghtesadi@inco.ac.ir

چکیده

تولید فرآورده های زیستی از دریاها زمینه ای تازه است که در سال ۲۰۰۲ میلادی ۲/۲ میلیارد دلار در آمد با رشد ۱۰درصدی نسبت به سال قبل از آن حاصل نموده و پیش بینی می شود با رشد آن در سالهای آینده به تغییرات جدی در تولید دانش جدید علمی و صنعتی و روند بازار فرآورده های زیستی بیانجامد. تا کنون شناسایی و کاربردهای جدید این فرآورده ها، منجر به کشف مشتقات دارویی، بهداشتی- آرایشی، مکمل های غذایی، آنزیم ها و پیگمانت ها گردیده است. کشف و توسعه منابع دریایی به فاکتورهایی وابسته است که از جمله آنها میتوان به شناسایی فراورده های زیستی جدید، استفاده مناسب از تولیدات ، اپتیمم کردن تولیدات و بهینه سازی موثر و کارآمد تولید اشاره کرد. شناسایی فراورده های زیستی جدید نیز بستگی به پیچیدگی روند مورد مطالعه و ملکولهای مورد نظر، فراوانی ارگانیزمها در طبیعت، منبع ترکیب ، شرایط و وضعیت رشد و مسیر بیو سنتز محصول دارد که نیازمند همکاری تیم های اقیانوس شناس، بیولوژیست ها، شیمیست ها و مهندسین می باشد.

در این مقاله برای آشنایی مدیران و پژوهشگران دریایی وضعیت کنونی و پتانسیل های آتی مهندسی فرآیندهای زیستی مرتبط با اکتشاف، توسعه و استفاده مناسب از ترکیبات و مشتقات دریایی با کاربردهای گوناگون و طراحی روش های توسعه و گسترش مناسب منابع دریایی شناخته شده و همچنین اختراع ابزار و کشف مراحل و فرآیندهای تازه تولید فرآورده های زیستی از اقیانوس ها توضیح داده شده است.

کلمات کلیدی: محصولات زیستی – فناوری زیستی - دریا- اقیانوس - فرآورده های زیستی

مقدمه

محیط دریایی به عنوان منبع غنی از تنوع و گوناگونی در زمینه های شیمیایی و بیولوژی محسوب می شود. اقیانوس ها حدود ۳۰۰/۰۰۰ گونه شناخته شده را در بر می گیرند، اما تخمین زده شده است که این تعداد فقط در صد کمی از کل گونه هایی را که تا کنون شناخته شده اند را در بر می گیرد (Winston1988, Malakof, 1997). بیشترین درصد گونه های دریایی ناشناخته را میکروارگانیسم ها تشکیل می دهند . (Colwell, 1997) باکتریهای دریایی به تنهایی بیش از ۱۰٪ کل کربن موجود در موجودات زنده را تشکیل دهند(Parkes et al., 1994) . هزاران ترکیب شیمیایی تنها از تعداد نسبتا کمی از این گونه ها که تا کنون مورد مطالعه قرار گرفته اند جدا شده است (Ireland et al., 1993). در عین حال فقط درصد کوچکی از این ترکیبات بخاطر توان و پتانسیل آنها به عنوان فرآورده های مناسب مورد مطالعه قرار گرفته اند. اقیانوس ها دارای منابع بکر و بهره برداری نشده ای برای کشف بیشتر ترکیبات شیمیایی جدید برای استفاده در موارد دارویی، تغذیه ای، بهداشتی-آرایشی، آگروشیمی، پروب های مولکولی و آنزیم ها می باشند. هر کدام از این ترکیبات زیستی دریایی دارای ارزش چند بیلیون دلاری می باشد (Bio Scienc 1996).

مهندسین فرآیندهای زیستی دریا عهده داران اصلی کشف و گسترش ترکیبات و مشتقات دارویی دریایی و پروب های مولکولی موثر بر روی بیماری های انسانی هستند.

برای شناسایی فرآورده ها و تولیدات جدید نیز استفاده مناسب از محصولات و اپتیمم کردن تولید، فرآیندها و ابزارهای جدید مورد نیاز می باشند که این مهم نیز عمدتا بر عهده مهندسین فرآیندهای زیستی دریا است.

۲- شناسایی تولیدات جدید و گسترش و توسعه تکنولوژی های جدید پایش

امروزه برای تحقیق و بررسی در زمینه کشف دارو، ارگانیسم های دریایی با استفاده از روش های معمول از قبیل غواصی، کف روب ها[1] و تور ترال جمع آوری می شوند. غواصی دانشمندان را قادر به دستیابی به زیستگاه های غیر معمول از زیستگاه های بنتیک عمیق دریا می سازد و برخی سیستم ها به ابزارها و اتاق های ویژه ای مجهز هستند که نمونه ها می توانند تحت شرایط کنترل شده به عنوان مثال فشار بالا و دمای کم در آن نگهداری شوند. البته هنوز کمبود و نیاز برای توسعه و گسترش بیوراکتورهای چند منظوره ای که بتوانند در محیط هایی با شرایط ویژه (از قبیل شوری زیاد ، متخلخل و نفوذپذیر ، محیط فاقد اکسیژن و زیستگاه های عمیق دریا) کاربرد داشته باشند، وجود دارد. چنین بیوراکتورهایی می توانند برای جمع آوری، کشت میکروارگانیسمها در دریا و ارزیابی تولید محصولات متابولیکی ماکرو و میکرو ارگانیسم ها به کار روند. بنابراین تولید متابولیت های آنها می تواند تحت شرایط فیزیولوژیکی که تا حد امکان شبیه شرایط کنترل شده باشد به عنوان فرآورده ای زیستی مورد بررسی قرار گیرد.

روش دیگر شناسایی وکاربرد محصولات جدید، مهندسی سنسورهای زیستی کوچک شده (مینیاتوری) به عنوان ابزارهای جمع آوری و بیوراکتورهایی جهت سرعت بخشیدن تولید محصول مورد نظر در درون بدن موجود زنده می باشد. تعدادی از سنسورهای زیستی و پروب هایی که در مطالعه بیماری های انسان مورد استفاده قرار می گیرند، در حال توسعه و پیشرفت هستند. آداپته کردن این موارد برای ارزیابی و بررسی فراوردهای مشتق شده از دریا چالش جالبی در بیومهندسی خواهد بود.

[1] Dredging

۳. استفاده مناسب وپایداراز منابع دریایی

با توجه به پتانسیل بالای موجود در کشف، توسعه و بازاریابی محصولات دریایی جدید نیاز به ایجاد متدهایی است که به وسیله آنها این محصولات بتوانند به طریقی که برای اکوسیستم مضر نبوده و یا منابع را با خطر روبرو نسازند نگهداری شوند. جمع آوری ترکیبات مشتق شده ازدریا یک فاکتور مهم درمطالعات دارویی است، اغلب متابولیتها با مقادیر جزئی در ارگانیزمها دیده می شود که منبع پایداری برای مطالعات پاراکلینیکی نیست. به طورکلی فراوانی طبیعی این مواد در منابع ارگانیزمها جوابگوی فرایند تولید براساس منابع موجود وحشی نیست. بعضی راهکارها برای استفاده با دوام و طولانی از منابع دریایی عبارتند از: سنتزشیمیایی، بهره برداری کنترل شده ، کشت آب ورزی[۲] ارگانیزمهای منبع، تولید مصنوعی[۳] ازطریق کشت سلولی منابع میکرو یا ماکروارگانیزمی و تولید ترنسژنیک. هرکدام ازاین راهها مزایا و محدودیتهای خود را دارند ، همه متدها برای جمع آوری هرمحصول دریایی قابل استفاده نبوده و بیشتراین متدها هنوزکاملا" توسعه نیافته اند. رسیدن به هدف مورد نظربرچندین اصل استوار است:

۳-۱- پیچیدگی ملکول : آیا میتواند بوسیله فرایندی صنعتی سنتز شود؟

فرآیندهای سنتزی برای بسیاری از محصولات دریایی که به عنوان داروکاربرد دارند قبلا منتشرشده است. (Kageyama and Tamura,1990; Corey et al.,1996; Harried et al.,1997). متاسفانه بیشتر فرآیندهای سنتزی فرآیندهایی چندمرحله ای هستند که امکان سنتز مقرون به صرفه درمقیاس صنعتی را نمی دهند و قیمت مواد موردنیاز برای یک مقیاس کوچک به مراتب به صرفه ترازمقیاس بزرگ است. بعلاوه بسیاری ازترکیبات طبیعی ملکولهایی پیچیده باچندین مرکز فضایی هستند که کنترل استریوشیمی واکنش را ضروری می کند. اگرترکیب یک انانتیومرباشد و هردو ایزومر سنتز شوند در نهایت نیاز به جداسازی ایزومرها باتکنیکهای کروماتوگرافی است که درمقیاس بزرگ هزینه بردارخواهدبود.

---

[۲] Aquaculture
[۳] In vitro

سایر منابع تولیدگسترده معمولا" به بررسی های اولیه ای چون اپتیمم سازی سنتز شیمیایی درمقیاس صنعتی نیازمندند. بنابراین فرصت و بازارمناسب برای تولید محصولات دریایی از کشت آب ورزی ، تولیدمصنوعی وتولید ترنسژنیک هم برای کاربردهای بلندمدت و هم کوتاه مدت وجود دارد.

۳-۲- فراوانی ارگانیزمها در طبیعت : در موردتاثیر نوع جمع آوری برجمعیت گونه ها و زیستگاهها چه می دانیم؟

پیش از صید عظیم یک ارگانیزم برای بازیابی محصول بیولوژیکی ، مطالعات بهره برداری پایدار در مورد یک محصول باید انجام شود که شامل تعریف فاکتورهایی مانند ذخیره موجود ارگانیزم، سرعت رشد آن ، فاکتورهای موثر بررشد و همچنین تاثیر صید و پس از صید بر ارگانیزم موردنظر میباشد.این اطلاعات میتواند نه تنها برای ارزیابی ظرفیت جمع آوری و صید بکارروند بلکه برای توسعه مدلهای کشت آب ورزی و یا تولید مصنوعی بکارگرفته شود که متاسفانه به ندرت انجام میشود. یک استثنا دراین مورد مطالعه ای است که روی اسفنجهای نیوزلند ازجمله اسفنج Lissodendoryx که هالیکندرینها (halichondrins) ،ترکیبات موثر آنتی تومور، را تولید میکنند انجام شده است، این اسفنج درناحیه ای محدود بنام Kaikoura Peninsula دیده میشود.مطالعه انجام شده بوسیله Battershill et al.,1998 نشان میدهدکه صید به همراه کف روبی به طورمشخصی میزان ذخیره اسفنج را کاهش میدهد میزان ذخیره اسفنج را کاهش می دهد اما جمعیت آن می تواند به سرعت درنتیجه انتشار غیرجنسی اجزای اسفنج دراثر کف روبی بازیابی گردد. این نوع اطلاعات نه تنها در طراحی صید کنترل شده ضروری هستند بلکه برای انتخاب ذخیره های برترژنتیکی جهت کشت آب ورزی وتولید مصنوعی مهم بشمار می روند.

۳-۳- منبع ترکیب : آیا به طریقه میکروبی تولید شده است؟

تعدادی ازمحصولات دریایی بیولوژیکی با پتانسیل دارویی درمیکروارگانیزمهای هتروتروپیک جدا شده ازرسوبات ساحلی شناسایی شده اند (Fenical, 1993 ; Kobayashi & Ishibashi ,1993; Davidson , 1995). بعلاوه برخی ازاین محصولات دریایی که از ماکروارگانیزمها مانند اسفنجها گرفته شده اند، به صورت تجمعهای میکروبی کشف شده اند (Bewley et al.,1996) . اگر این میکروارگانیزمهای همزیست را بتوان جداسازی وکشت کرد، اپتیمم کردن تولید در بیوراکتورهای میکروبی دریایی، می تواند به یک راه صنعتی وعملی منجرشود.

یکی از مثالهایی که کاربرد بازرگانی کشت میکروبی فوتواوتروپیک و هتروتروپیک بعضی از مشکلات بیومهندسی را نشان می دهد، تولید فوتواتوتروپیک اسیدهای چرب پلی اشباع نشده در مقیاس بزرگ جهت استفاده به عنوان منبع غذایی است که درتعدادی از مقالات به آن اشاره شده است. در صورتیکه منبع ترکیب، خود ماکروارگانیزم باشد، توسعه تولیدمصنوعی می تواند به حفظ ذخایر اصلی موجود زنده کمک کند. تحقیق درمورد تولیدمصنوعی متابولیتهای اسفنجها درآزمایشگاهها منجر به کشت اولیه سلولهای اسفنجی شده که به وسیله لکتینها (lectins)و سایر ترکیبات تنظیم کننده رشد تسریع می شوند تا تقسیم وادامه تولید ترکیبات بیواکتیو پس از دوتایی شدن اتفاق بیفتد(Pomponi et al., 1997,1998). مهمتراینکه شناخت فرآیندهای سلولی و ملکولی که تولید این متابولیتها را کنترل میکند میتواند برای اپتیمم کردن فرایند جریانات بیرونی/ کشت و تسریع تولید ترکیبات طبیعی"غیرمعمول" (موادیکه ارگانیزمها درشرایط نرمال تولید نمی کنند اما ممکن است از ترکیبات طبیعی آنها قویتر عمل کنند)، بکار گرفته شود. مشکلات زیادی وجود دارند که باید قبل از اینکه تولید مصنوعی بی مهرگان دریایی بصورت یک راهکار جهت تولید حجیم محصولات بیولوژیکی درآید برآنها غلبه نمود. نشان داده شده که در مقیاس آزمایشگاهی تولیدات متابولیسم های بیواکتیو توسط یاخته های بی مهرگان دریایی امکان پذیر می باشد.

۳-۴- شرایط و وضعیت رشد: آیا کشت آب ورزی به عنوان یک روش قابل توجه برای ارگانیسم های آبهای عمیق بشمار می آید؟

با اینکه کشت آب ورزی در بعضی از اسفنجهای آبهای عمیق امکان پذیر می باشد و در دریا یک متد کاملا اقتصادی و موثر به لحاظ مخارج تولید است، اما هنوز از عهده بیان تولید حجیم ترکیبات مرود نظر و کنترل کامل پارامترهای محیطی برنیامده است.

سیستم های بیورآکتورهای بسته [۴] فرصتی ویژه جهت پرورش ارگانیسم ها در هر دو ناحیه کم عمق و آبهای عمیق برای مهندسین فرآیندهای زیست دریایی می باشد. تلفیقی از کشت سلولهای پرورش داده شده و تکنیکهای کشت آب ورزی جهت پیشرفت سیستم های رآکتورهای زیستی بسته بکار می رود. برای مثال، می توان از ماتریکس های سه بعدی جهت تکثیر دانه در محیط آزمایشگاهی از سلولهای گونه های مهم طبی – زیستی استفاده شود. وقتی این ماتریکس ها دانه بندی شده ثبات گرفتند می توان آنها را به رآکتورهای زیستی بسته منتقل نمود تا عملیات بهینه سازی تولید محصول در مقیاس بالاتر انجام شود.

۳-۵- مسیر بیو سنتزها: آیا دید مهندسین ژنتیک جهت تولید ترکیبات، واقع بینانه است؟

اگر هدف از بیو سنتز کردن ترکیبات، قبلا تعریف شده باشد آن زمان جهت مجزا کردن، تولید مثل و بیان گروه ژنهای شناخته شده ای که در تولید محصول متابولیسم استفاده می شوند. البته مشکل اینجا است که در بیشتر حالات، محصولات بیوسنتز شده، ناشناخته می باشند و یا چندین فرآیند را درگیر واکنشهای آنزیمی می کنند. در چنین شرایطی، محصولات ترنس ژنیک، بعنوان فرآیندی ارزشمندی تلقی نمی شود.

در عوض سنتز شیمیایی-آنزیمی [۵]، که سنتز فرآورده های زیست دریایی موجود در سلول توسط آنها می تواند انجام گیرد، تکنیکی تکمیلی برای روشهای تولید مصنوعی و ترنس ژنتیک برای تولید فرآورده های زیستی دریایی محسوب می شود.

---

[4] Closed Bioreactor
[5] Chemoenzymatic

۴- نتیجه

پیش بینی می شود با رشد پژوهش در زمینه زیست فناوری در دریاها و کاربرد آن در سالهای آینده، تغییرات جدی در تولید دانش جدید علمی و صنعتی و روند بازار فرآورده های زیستی به وجود آید. بازار فرآورده های زیستی دریاها که هنوز زمینه ای به لحا ظ علمی کاملا جوان است، از محصولاتی نظیر مشتقات دارویی، بهداشتی- آرایشی، مکمل های غذایی، آنزیم ها و پیگمانت ها در آمد ۲/۲ میلیارد دلاری حاصل نموده که اهمیت پژوهش در زمینه شناسایی و کاربردهای جدید این فرآورده ها، منجر به کشف گردیده است. این افق آنجا امید دهنده تر می شود که بدانیم دانش فنی به کار رفته در این زمینه تا به حال پیچیدگی زیادی نداشته است. بومی سازی دانش کشف و توسعه منابع دریایی در کشور می تواند شامل شناسایی محصولات مورد نیاز بازار و سپس شناسایی منابع زیستی کشور و اپتیمم کردن هزینه تولیدات مربوطه و بهینه سازی موثر و کارآمد باشد. در این مورد در مرحله اول پیچیدگی ملکول و سپس فراوانی ارگانیزمها در طبیعت و تاثیر جمع آوری برجمعیت گونه ها و زیستگاهها پیش از صید عظیم یک ارگانیزم برای بازیابی محصول بیولوژیکی ، مطالعات بهره برداری پایدار در مورد یک محصول باید انجام شود که شامل تعریف فاکتورهایی مانند ذخیره موجود ارگانیزم، سرعت رشد آن ، فاکتورهای موثر بررشد و همچنین تاثیر صید و پس از صید بر ارگانیزم است. تولید میکروبی ترکیب برای کشور جزو با صرفه ترین روشها به نظر می رسد در حالی که مهندسی ژنتیک برای تولید بیشتر و اقتصادی تر ترکیبات با رعایت ملاحظات علمی و اخلاقی محصولات زیست فناوری و پیچیدگی آن نیز نسبتا مفید به نظر می رسد.

۵- مراجع

Badminton, M.N., Kendall, J.M., Sala-Newby, G., Campbell, A.K., 1995. Nucleoplasmin-targeted aequorin provides evidence for a nuclear calcium barrier. Exp. Cell Res. 216, 236–243.

Battershill, C.N., Page, M.J., Duckworth, A.R., Miller, K.A., Bergquist, P.R.,

Blunt, J.W., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Newman, D.J., Pomponi, S.A., 1998. Discovery and sustainable supply of marine natural products as drugs, industrial compounds and agrochemicals: chemical ecology, genetics, aquaculture and cell culture. In: Origin and Outlook: 5th International Sponge Symposium 1998, Book of Abstracts. Queensland Museum, Brisbane, Australia, p. 16.

Bewley, C.A., Holland, N.D., Faulkner, D.J., 1996. Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. Experientia 52, 716–722.

BioScience, 1996. Marine Biotechnology Special Issue, 46. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263, 802–805.

Colwell, R.R., 1997. Microbial biodiversity and biotechnology. In: Reaka-Kudla, M.E., Wilson, E. (Eds.), Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Biological Resources. Joseph Henry Press, Washington, DC, pp. 279–287.

Corey, E.J., Gin, D.Y, Kania, R.S., 1996. Enantioselective total synthesis of ecteinascidin 743. J. Am. Chem. Soc. 118, 9202–9203.

Davidson, B.S., 1995. New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. Curr. Opin. Biotechnol. 6, 284–291.

ESPGAN Committee on Nutrition, 1991. Comment on the content and composition of lipids in infant formulas. Acta Paediatr. Scand. 80, 887–896.

Fenical, W., 1993. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. Chem. Rev. 93, 1673–1683.

Fodor, S.P.A, Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T., Solas, D., 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science 251, 767–773.

Glaser, K.B., Jacobs, R.J., 1986. Molecular pharmacology of manoalide. Inactivation of bee venom phospholipase A2. Biochem. Pharmacol. 35, 449–453.

Glazer, A.N., 1989. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. J. Biol. Chem. 264, 1–4.

Harried, G.Y., Strawn, M.A., Myles, D.C., 1997. The total synthesis of (_)-discodermolide: an application of the chelation-controlled alkylation reaction. J. Org. Chem. 62, 6098–6099.

Hopkins, C., Grilley, M., Miller, C., Shon, K.J., Cruz, L.J., Gray, W.R., Dykert, J., Rivier, J., Yoshikami, D., Olivera, B.M., 1995. A new family of *Conus* peptides targeted to the nicotinic acetylcholine receptor. J. Biol. Chem. 38, 22361–22637

Ireland, C.M., Copp, B.R., Foster, M.D., McDonald, L.A., Radisky, D.C., Swersey, J.C., 1993. Biomedical potential of marine natural products. In: Attaway, D.H., Zaborsky, O.R. (Eds.), Marine Biotechnology. Pharmaceutical and

Bioactive Natural Products, vol. 1. Plenum Press, New York, pp. 1–43.

Kageyama, M., Tamura, T., 1990. Synthesis of bryostatin 7. J. Am. Chem. Soc. 112, 7404–7408. Kerr, R.G., Lawry, J., Gush, K.A., 1996a. Invitro biosynthetic studies of the bryostatins, anticancer agents from the marine bryozoan *Bugula neritina*. Tetrahedron Lett. 37, 8305–8308.

Kerr, R.G., Rodriguez, L., Kellman, J., 1996b. A chemoenzymatic synthesis of 9(11)-secosteroids using an enzyme extract of the marine gorgonian *Pseudopterogorgia americana*. Tetrahedron Lett. 37, 8301–8304.

Kobayashi, J., Ishibashi, M., 1993. Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. Chem. Rev. 93, 1753–1769.

Look, S.A., Fenical, W., Jacobs, R.S., Clardy, J., 1986. The pseudopterosins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6238–6240.

Malakoff, D., 1997. Extinction on the high seas. Science 277, 486–488.

Matsunaga, T., 1998. Screening of marine microalgae for fine chemicals and bioremediation. In: Wijffels, R.H., et al. (Eds.), International Symposium Marine

Bioprocess Engineering, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, Book of Abstracts, p. 14.

Mattila, P., Korpela, J., Tenkanen, T., Pitkanen, K., 1991.Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase—an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. Nucleic Acids Res. 19, 4967–4973.

McConnell, O.J., Longley, R.E., Koehn, F.E., 1994. The discovery of marine natural products with therapeutic potential. In: Gullo, V.P. (Ed.), The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 109–174.

Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Lake, R.J.U., Litaudon, M., Battershill, C.N., Page, M.J., 1994. From seabed to sickbed: what are the prospects? In: Van Soest, R.W.M., Van Kempen, T.M.G., Braekman, J.-C. (Eds.), Sponges in Time and Space, Proceedings of the 4th International Porifera Congress. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 473–484.

Osinga, R., Tramper, J., Wijffels, R.H., 1997. Cultivation of marine sponges. In: Marino, D., Willensky, D., Capone, D. (Eds.), 4th International Marine Biotechnology Conference, Abstracts. Stazione Zoologica ‘Anton Dohrn’, Naples, Italy, p. 210.

Parkes, R.J., Cragg, B.A., Bale, S.J., Getliff, J.M., Goodman, K., Rochelle, P.A., Fry, J.C., Weightman, A.J., Harvey, S.M., 1994. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. Nature (London) 371, 410–413.

Pettit, G.R., Herald, C.L, Doubek, D.L, Herald, D.L., 1982. Isolation and structure of bryostatin 1. J. Am. Chem. Soc. 104, 6846–6848.

Pomponi, S.A., Willoughby, R., Kaighn, M.E., Wright, A.E., 1997. Development of techniques for Invitro production of bioactive natural products from marine sponges. In: Maramorosch, K., Mitsuhashi, J. (Eds.), Invertebrate Cell Culture: Novel Directions and Biotechnology Applications. Science Publishers, Inc, Enfield, New Hampshire,USA, pp. 231–237.

Pomponi, S.A., Willoughby, R., Wright, A.E., Pecorella, C., Sennett, S.H., Lopez, J., Samples, G., 1998. Invitro production of marine-derived antitumor ompounds. In: Le Gal, Y., Halvorson, H.O. (Eds.), New Developments in Marine Biotechnology. Plenum Press, New York, pp. 73–76.

Rinehart, K.L., Holt, T.G., Fregeau, N.L., Stroh, J.G., Keifer, P.A., Sun, F., Li, L.H., Martin, D.G., 1990. Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*.J. Org. Chem. 55, 4512–4515.

Schaufelberger, D.E., Koleck, M.P., Beutler, J.A., Vatakis, A.M., Alvarado, A.B., Andrews, P., Marzo, L.V., Muschik, G.M., Roach, J., Ross, J.T., Lebherz, W.B.,

Reeves, M.P., Eberwein, R.B., Rodgers, L.L., Testerman, R.P., Snader, K.M., Forenza, S., 1991. The large-scale isolation of bryostatin 1 from *Bugula neritina* following good manufacturing practices. J. Nat. Prod. 54, 1265–1270.

Shon, K.J., Grilley, M., Jacobsen, R., Cartie, G.E., Hopkins, C., Gray, W.R., Watkins, M., Hillyard, D.R., Rivier, J., Torres, J., Yoshikami, D., Olivera, B.M., 1997. A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. Biochemistry 31, 9581–9587.

Suffness, M., Newman, D.J., Snader, K., 1989. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. In: Scheuer, P.J. (Ed.), Bioorganic Marine Chemistry, Vol. 3. Springer-Verlag, New York, pp. 131–168.

Tachibana, K., Scheuer, P.J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y., Schmitz, F.J., 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. J. Am. Chem. Soc. 103, 2469–2471.

Winston, J.E., 1988. The Systematists' Perspective. In: Fautin, D.G. (Ed.), Biomedical Importance of Marine Organisms. California Academy of Sciences, San Francisco, CA, pp. 1–6.

Wright, A.E., Forleo, D.A., Gunawardana, G.P., Gunasekera, S.P., Koehn, F.E., McConnell, O.J., 1990. Antitumor tetrahydroisoquinoline alkaloids from the colonial ascidian *Ecteinascidia turbinata*. J. Org. Chem. 55, 4508–4512