生物工程学报
journals.im.ac.cn
cjb@im.ac.cn

Chin J Biotech 2009, June 25; 25(6): 840-846
Chinese Journal of Biotechnology ISSN 1000-3061
© 2009 *Institute of Microbiology, CAS & CSM*, All rights reserved

农业生物技术

利迪链霉菌 A02 抗真菌活性产物的分离和结构鉴定

隋勤[1,2], 刘伟成[1], 卢彩鸽[1], 刘霆[1], 裘季燕[1], 刘学敏[2]

1 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097
2 东北农业大学植保系, 哈尔滨 150030

摘 要: 利迪链霉菌 A02 是从京郊森林土壤中分离筛选出的植物病原真菌高效拮抗菌株。为了明确其抑菌活性的物质基础, 利用大孔树脂和硅胶吸附柱层析、HPLC 循环制备分离等方法, 从菌株 A02 发酵液中分离获得了纯度达 99.845%以上的单一组分活性化合物。经紫外光谱、高分辨质谱、红外光谱和核磁共振谱的测定和解析, 确定了该活性化合物的分子量为 665, 分子式为 $C_{33}H_{47}NO_{13}$, 化学结构与四烯大环内酯类抗生素纳他霉素相同。这一结果揭示了利迪链霉菌产生抗真菌天然产物的新功能, 并为纳他霉素在植物病害生物防治中的应用开拓了新的途径。

关键词: 利迪链霉菌, 活性产物, 纳他霉素, 病原真菌

Extraction and structural identification of the antifungal metabolite of *Streptomyces lydicus* A02

Qin Sui[1,2], Weicheng Liu[1], Caige Lu[1], Ting Liu[1], Jiyan Qiu[1], and Xuemin Liu[2]

1 *Institute of Plant and Environment Protection*, *Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences*, *Beijing* 100097, *China*
2 *Department of Plant Protection*, *Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030, *China*

Abstract: We isolated a high efficient antifungal strain A02 from forest soil in a suburb of Beijing. The result of polyphasic taxonomy confirmed that strain A02 belongs to *Streptomyces lydicus*. The fermented broth of the strain presented a stable and strong inhibiting activity against many plant pathogenic fungi. The purpose of this study was to ascertain the substance base of the antifungal activity of strain A02. We extracted the antifungal metabolite of A02 by using column chromatography with X-5 macroporous resin and 100~200 mesh silica gel respectively, and then purified it by LC-9101 recycling preparative HPLC with a SP-120-15 column (JAIGEL-ODS-AP). An active compound with purity over 99.845% was finally obtained. The chemical structure of the active compound was determined with spectroscopy methods, including ultraviolet spectrometry, infrared spectrometry, high resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. According to the analysis results, we identified the active compound as a tetraene macrolide antibiotic with the molecular weight of 665, the molecular formula $C_{33}H_{47}NO_{13}$ and the same chemical structure as natamycin. Our research revealed a new biosynthetic function for *S. lydicus* to produce natamycin, and an expanding application field for natamycin to be used for the control of fungal plant diseases.

Keywords: *Streptomyces lydicus*, antifungal metabolite, natamycin, pathogenic fungi

Received: February 9, 2009; **Accepted:** April 2, 2009
Supported by: National Natural Science Foundation of China (No.30671346), Beijing Natural Science Foundation (No.6072010), Beijing Municipal Science & Technology Program (No. D0706005040231).
Corresponding author: Weicheng Liu. Tel: +86-10-51503337; E-mail: liuwc@126.com
Xuemin Liu. Tel: +86-451-55113813; E-mail: liuxuemin01@sohu.com
国家自然科学基金项目(No. 30671346), 北京市自然科学基金项目(No. 6072010), 北京市科技计划项目(No. D0706005040231)资助。

利迪链霉菌(*Streptomyces lydicus*)是重要的天然活性产物产生菌, 其著名的代表菌株是 NRRL2433, 在医药领域研究和应用广泛, 可产生具有广谱抗细菌和分枝杆菌作用的利迪霉素(Lydimycin)、抗革兰氏阳性细菌和分枝杆菌的利迪链菌素(Streptolydigin)[1]; 另有产生抗大肠杆菌(*Escherichia coli*)和肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)等革兰氏阴性细菌的苹果酸氧霉素(Malioxamycin)的菌株 15748[2], 产生抗金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等革兰氏阳性细菌的抗生素 Lydicamycin 的菌株 2249-S3[3], 以及产生抗厌氧菌的多肽类抗生素 Chandramycin 的菌株[4]; 在植物病害防治上应用较广的菌株是 WYEC108, 其能够定殖在植物的根尖部位, 主要以菌寄生方式作用于土传病害病原菌, 也能分泌几丁质酶(Chitinase)破坏真菌的细胞壁[5,6]。国内报道了菌株 23 在离体条件下对番茄溃疡病菌 (*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*)表现出很强的拮抗作用[7]。

本研究室从森林土壤中分离筛选出一株高效拮抗菌 A02, 经鉴定为利迪链霉菌, 其代谢产物具有广谱抗真菌活性, 对果蔬作物灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearium*)等多种植物病原真菌和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)有明显的抑制作用, 而对供试细菌无活性[8], 因此认为其抗菌活性不同于上述已知菌株。为了明确利迪链霉菌 A02 新抗菌活性产生的物质基础, 本研究对其代谢产物中的主要抗菌活性组分进行了分离纯化和结构鉴定。

1 材料和方法

1.1 供试菌株和培养基

利迪链霉菌 A02: 自北京远郊天然次生林土壤中分离筛选获得, 分别保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC No.1654)和北京市农林科学院植物保护环境保护研究所生防微生物菌种保藏室(BAAFS-IPEP No.A02); 指示菌: 酿酒酵母(ACCC20036)由中国农业微生物菌种保藏管理中心提供, 番茄灰霉病菌(Bc-T03)由本室分离自京郊保护地番茄病株。

固体培养基: 高氏一号琼脂和 PDA 培养基参照文献[9]的方法配制; 菌株 A02 液体种子和发酵培养基: 同文献[8]。

1.2 菌株 A02 发酵液的制备

参照文献[8]的方法摇瓶发酵 96 h。

1.3 发酵液中活性产物的粗提取

发酵液用 3 倍体积的无水乙醇预处理, 4°C 静置 2 h, 以沉淀菌体、固形颗粒和可溶性粘胶状物等, 上清液用 2 层滤纸以布氏漏斗真空抽滤, 滤液经旋转蒸发仪在 45°C 下减压浓缩, 浓缩液即为活性物质粗提物, 4°C 保存备用。

1.4 样品抗菌活性的跟踪检测

采用滤纸片琼脂扩散法[10]。

1.5 粗提物的分离纯化

1.5.1 *大孔树脂吸附柱层析*

选用 40 cm×2.6 cm 玻璃层析柱, X-5 大孔树脂(天津南开大学化工厂), 装柱体积为 150 mL。取粗提物与树脂以 1:1 的体积比动态吸附, 按以下过程进行洗脱: 2 倍柱体积的无离子水洗脱去除部分色素和水溶性杂质; 2 倍柱体积的 30%甲醇洗脱去除色素; 最后用 2 倍柱体积的 70%乙醇洗脱活性成分, 洗脱速度为 0.5 mL/min。分管收集洗脱液, 每管 15 mL, 分别以酿酒酵母和番茄灰霉病菌为指示菌进行活性测定; 合并活性洗脱液, 45°C 下减压浓缩后供下一步分离。

1.5.2 *硅胶吸附柱层析*

选用 40 cm×2.6 cm 玻璃层析柱, 100~200 目硅胶, 装柱体积为 150 mL。取大孔树脂活性洗脱浓缩液上柱进行动态吸附, 用 2~3 倍柱体积的洗脱液(8:1:1 的乙醇、氨水和水, *V*/*V*)按 0.5 mL/min 的流速洗脱, 分管收集洗脱液, 每管 5 mL。活性检测后合并活性洗脱液, 45°C 真空减压浓缩备用。

1.5.3 *制备型 HPLC 分离纯化*

采用日本分析工业株式会社 LC-9101 型循环制备 HPLC, JAIGEL-ODS-AP 型 SP-120-15 制备柱。

取硅胶柱层析活性洗脱浓缩液, 用 0.45 μm 微孔滤器过滤, 自动进样器进样, 每次进样量 6 mL; 以 7:3 的甲醇和水(*V*/*V*)为流动相, 2 mL/min 的泵流速进行循环分离, 利用 UV 检测器在波长 305 nm 处检测并自动形成分离图谱, 分别收集图谱中各曲线峰所对应的洗脱液并进行活性检测; 活性洗脱液再以 3 mL/min 的泵流速相继分离 2 次, 真空浓缩干燥。

1.5.4 *样品的纯度验证*

取少量纯样品溶于 70%甲醇水溶液，利用岛津分析型 HPLC，以甲醇和水为流动相进行梯度洗脱。色谱条件为：C_{18} 反相柱，柱温 30°C，UV 检测器，检测波长为 305 nm，SIL-10ADVP 自动进样器进样 10 μL，以 1 mL/min 的流速洗脱 60 min。

1.6 纯样品溶解度和抑菌活性的测定

按国家药典规定的标准和方法[11]进行溶解度试验行；采用 MTT 比色法[12]和菌丝生长速率抑制法[8]分别测定对酿酒酵母和番茄灰霉病菌的抑菌活性，观察最低抑菌浓度(MIC)，并利用统计分析软件 SPSS 对供试样品浓度的对数值和抑菌率对应的机率值进行回归分析，建立毒力回归方程，计算抑制中浓度(IC_{50})。

1.7 化学结构的鉴定

1.7.1 *紫外光谱测定*

纯化样品溶于 70%甲醇水溶液，用日立 UV-VIS 3010 紫外可见分光光度计在 190~400 nm 波长范围内进行全波长扫描。

1.7.2 *高分辨质谱测定*

采用德国 Bruker 公司超高分辨傅立叶变换质谱仪(9.4T Apex Q-FT-MS)，以 ESI 法测定。检出模式：正、负离子检测；质谱条件：毛细管电压 4 kV，离子源温度 180°C，扫描范围(m/z) 300~2000，泵流速 1.5 mL/min。数据分析软件为 Bruker Daltonics Data Analysis 3.4。

1.7.3 *红外光谱测定*

采用德国 Bruker 公司 TENSOR 27 傅立叶红外光谱仪，以 KBr 压片法进行 400~4000 cm^{-1} 区域扫描。

1.7.4 *核磁共振谱测定*

采用德国 Bruker 公司 AVANCE DRX-500 核磁共振谱仪，以氘代二甲基甲酰胺为溶剂，四甲基硅烷为内标，进行氢谱(^{1}H-NMR)、碳谱(^{13}C-NMR)及异核多键相关谱(HMBC)等的测定。

2 结果和分析

2.1 发酵液及其粗提物抑菌活性

摇瓶发酵液经 0.45 μm 的无菌微孔滤膜过滤除菌，滤纸片琼脂扩散法进行活性测定，结果其对酿酒酵母和番茄灰霉病菌的抑菌圈直径分别达(32.03±0.30) mm 和(47.07±0.45) mm，表明已有大量的活性产物积累；发酵液浓缩 20 倍后获得粗提物，取少量稀释至原浓度检测活性，其抑菌作用与浓缩前基本一致。

2.2 活性产物的分离纯化

大孔树脂吸附分离结果表明，活性洗脱液集中在第 48~56 管(自 4.8 倍柱体积至 5.6 倍柱体积之间的 70%乙醇洗脱液)；合并活性部分，浓缩后经硅胶吸附柱层析，洗脱液中的活性组分集中在第 7~36 管(自 0.23 倍柱体积至 1.2 倍柱体积之间的洗脱液)；硅胶层析活性洗脱浓缩液的第一次 HPLC 分离共检测到 30 个峰，其中保留时间为 57.866 min 的强吸收峰为活性峰，其相对峰面积为 35.121%；第 2 次分离检测到 6 个峰，保留时间为 41.699 min 的峰为活性峰，其相对峰面积为 97.020%；第 3 次分离检测到保留时间为 39.766 min 的活性峰(图 1)，通过峰面积计算其纯度达 99.845%以上；收集此活性峰洗脱液，真空浓缩干燥后得乳白色至淡黄色粉末状纯化样品。经分析型 HPLC 纯度验证，洗脱曲线为单一的峰，说明其为单一组分化合物，纯度达到化学结构测定的要求。

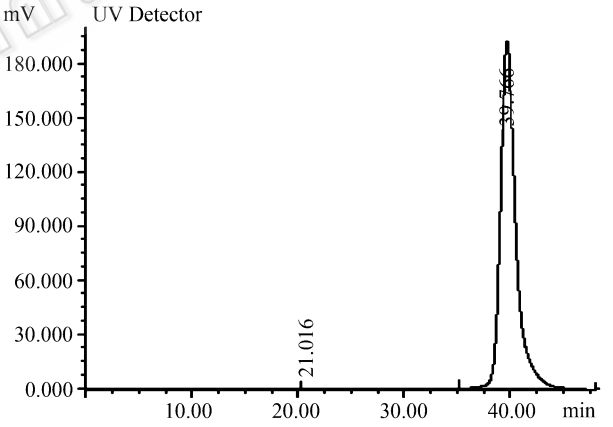

图 1 菌株 **A02** 活性产物的最终 **HPLC** 分离图谱

Fig. 1 HPLC spectrum for the final separation of the active compound of strain A02.

2.3 纯化样品的溶解特性和抑菌活性

溶解度试验结果表明，A02 抗菌活性产物纯样品溶解于甲醇、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺和冰醋酸；略溶于丙二醇、正丁醇；极微溶解于乙醇；几乎不溶于水。

MTT 法测定了 0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 μg/mL 共 10 个浓度的纯样品对酿酒酵母 ACCC20036 的抑菌活性，结果

显示浓度为 1.0 μg/mL 的样品能够完全抑制酿酒酵母的细胞增殖, 浓度再低则有活细胞检出, 表明其 MIC 为 1.0 μg/mL; 回归分析得抑菌率机率值(Y)对样品浓度对数值(X)的毒力方程为: Y=8.161+3.616X (R^2=0.968), 由此计算出 IC_{50} 为 0.1336 μg/mL。

测定了 0.625、1.25、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 μg/mL 共 8 个浓度的样品对番茄灰霉病菌 Bc-T03 的抑菌活性, 观测其 MIC 为 10.0 μg/mL; 回归分析得其毒力方程为: Y=3.488+4.619X (R^2=0.952), 计算得其 IC_{50} 为 2.1249 μg/mL。

2.4 化学结构解析

2.4.1 *紫外吸收光谱*

菌株 A02 活性产物紫外扫描图谱中有 3 个明显的吸收峰, 分别位于波长 291 nm、304.4 nm 和 319.4 nm 处, 推测其结构中有共轭发色基团存在; 其三分叉的笔架形吸收峰及其位置表现出四烯类抗生素的特征性紫外吸收谱型[13]。

2.4.2 *高分辨质谱*

A02 活性产物的质谱图中, 采用正离子检测方式检测到加合离子$[M+Na]^+$峰 m/z 688.2937, 计算值为 688.2940(图 2); 负离子检测方式检测到准分子离子$[M-H]^+$峰 m/z 664.2975, 计算值为 664.2975(图 3)。据此确定了该抗菌化合物的分子量为 665, 并解析出其分子式为 $C_{33}H_{47}NO_{13}$; 由分子式计算出该化合物的不饱和度为 11, 表明其分子结构中含有多个不饱和键与环等。

2.4.3 *红外吸收光谱*

菌株 A02 活性产物的红外光谱如图 4 所示, 在其特征频率区波数 3416.78 cm^{-1} 处有宽的强吸收峰, 为 O-H 的伸缩振动, 指纹区 1108.10 cm^{-1} 和 1004.43cm^{-1} 处有 C-O 伸缩振动吸收峰, 说明分子结构中有醇羟基; 3288.23 cm^{-1} 处有 N-H 的伸缩振动吸收峰, 1571.44 cm^{-1} 处为 N-H 变形振动吸收峰, 1267.65 cm^{-1} 处有 C-N 伸缩振动吸收峰, 分子中应该有氨基; 3017.23 cm^{-1} 处应为=CH–伸缩振动吸收峰, 1634.40 cm^{-1} 表现为 C=C 伸缩振动(共轭)吸收峰, 显示分子内有共轭烯类结构; 2980.27 cm^{-1} 和 2940.44 cm^{-1} 是烷烃 C-H 伸缩振动峰, 1400.21 应为 $–CH_3$ 变形振动吸收峰; 1715.38 cm^{-1} 表现为典型的 C=O 伸缩振动强吸收, 3400~2400 区间有 O-H 的伸缩振动, 1233.35 cm^{-1}、1190.63 cm^{-1} 和 1171.40 cm^{-1} 处为 C-O 和 C-O-C 伸缩振动峰, 推断分子中具有羧基、酮类或酯类结构。

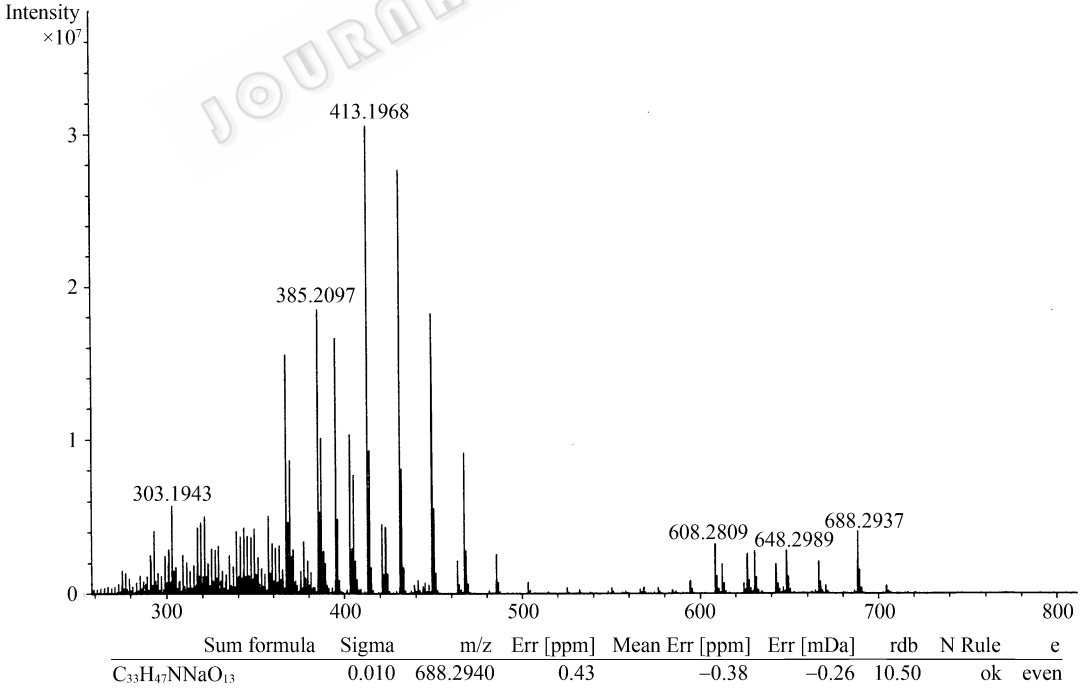

图 2 菌株 **A02** 活性产物的高分辨正离子质谱图

Fig. 2 High resolution mass spectrum (positive ion) of the active compound of strain A02.

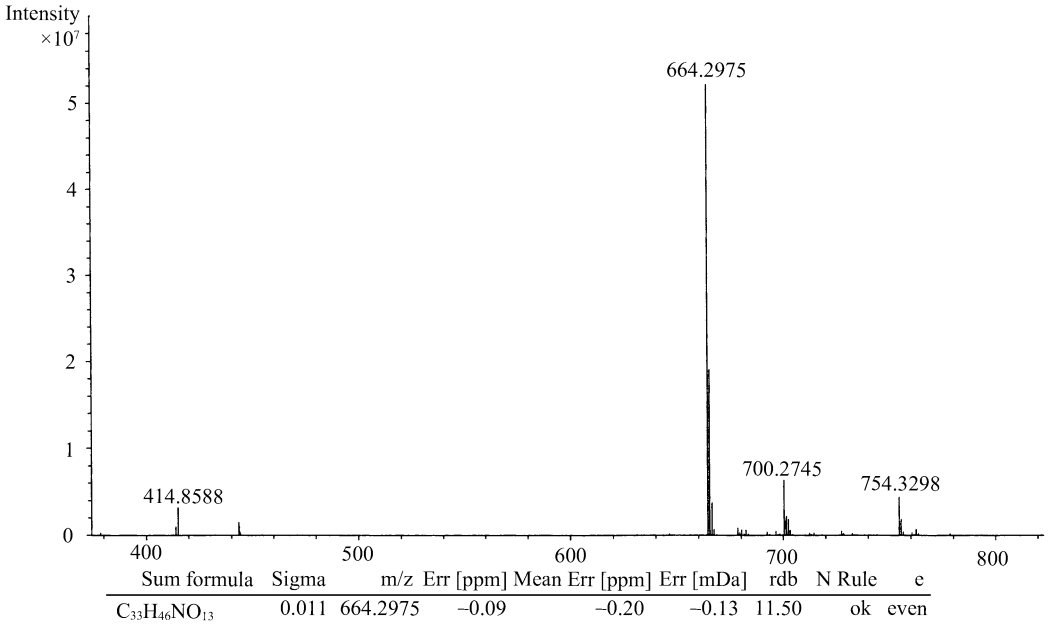

图 3 菌株 **A02** 活性产物的高分辨负离子质谱图

Fig. 3 High resolution mass spectrum (negative ion) of the active compound of strain A02.

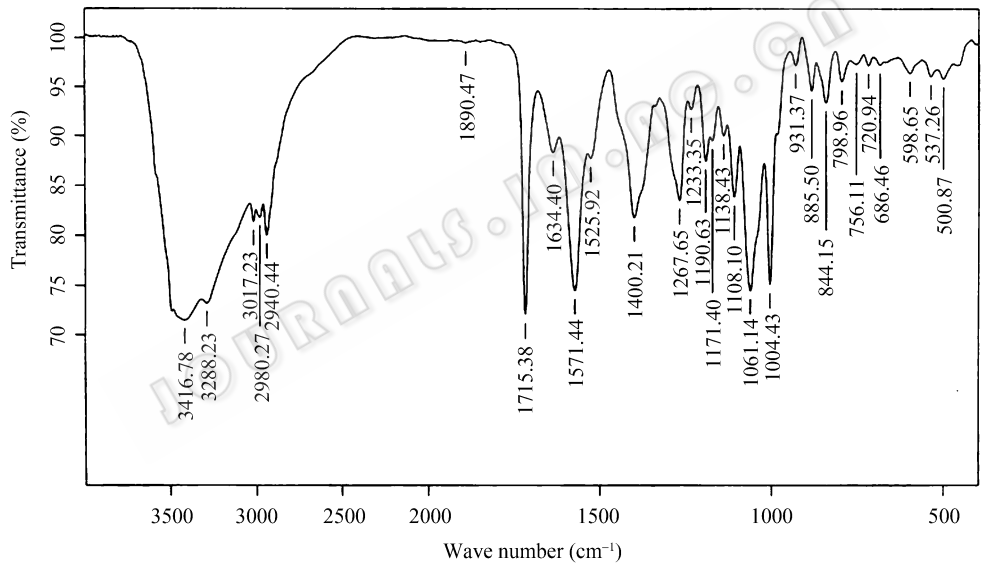

图 4 菌株 **A02** 活性产物的红外吸收光谱

Fig. 4 IR spectrum of the active compound of strain A02.

2.4.4 *核磁共振谱*

参照菌株 A02 活性产物的分子式和不饱和度等已获得的信息，对其 ^{1}H-NMR 谱和 ^{13}C-NMR 谱中各峰和 HMBC 谱中 ^{1}H-^{13}C 相关信息进行分析归属，结果列于表 1。

2.4.5 *化学结构确定*

综合分析上述实验数据，推断菌株 A02 所产生的主要抗真菌活性组分的主体结构为四烯大环内酯，化学结构式如图 5 所示。该结构与文献报道的纳他霉素结构相同[14,15]。

3 讨论

目前已知的抗生素有 50%以上是由链霉菌(*Streptomyces* spp.)产生的[16]，纳他霉素亦从纳塔尔链霉菌(*S. natalensis*)中首次分离获得，迄今未见有利迪链霉菌产生纳他霉素的报道。本研究结果表明菌株 A02 主要抗真菌活性组分的化学结构与纳他霉素相同，其溶解特性和抗菌活性也与纳他霉素一致，

表 1　菌株 A02 活性产物 ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 和 HMBC 谱峰的归属

Table 1　Assignments of the peaks in the ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR and HMBC spectra of the active compound of strain A02

Position	δ_H (J in Hz)	δ_C, multiplicity	HMBC (H → C#)
1		165.2, qC	
2	6.18, s	125.1, CH	1, 3, 4
3	6.39, d (7.5)	145.4, CH	1, 2, 4, 5
4	3.30, d (6.5)	54.4, CH	2, 3, 5, 6
5	2.89, d (6.5)	58.8, CH	4, 6, 7
6a	1.30, m	41.8, CH_2	
6b	2.10, m		
7	4.39, br	66.5, CH	
8a	1.30, m	45.1, CH_2	
8b	2.01, m		
9		96.7, qC	
10a	1.59, br	37.7, CH_2	
10b	2.45, br		
11	4.30, br	66.1, CH	
12	2.01, br	60.3, CH	
13	4.10, br	69.2, CH	
14a	1.59, m	47.6, CH_2	
14b	1.73, m		
15	4.52, s	75.3, CH	
16	6.12, br	129.2, CH	17, 18
17	6.10, s	137.2, CH	15, 16, 18, 19
18	6.25, s	132.8, CH	16, 20
19	6.61, br	134.4, CH	20, 21
20	6.41, br	132.1, CH	21, 22
21	6.41, br	131.9, CH	22, 23
22	6.18, br	136.4, CH	20, 21, 23, 24
23	5.69, s	128.9, CH	21, 24, 25
24a	2.27, br	39.9, CH_2	22, 23, 25, 26
24b	2.44, br		
25	4.74, m	71.2, CH	
26	1.32, d (5.5)	20.4, CH_3	
27		178.6, qC	
1′	4.74, br	97.8, CH	
2′	4.39, m	67.3, CH	
3′	3.15, br	57.4, CH	
4′	3.35, br	70.3, CH	
5′	3.40, br	73.5, CH	
6′	1.28, d (12.0)	18.1, CH_3	4′, 5′

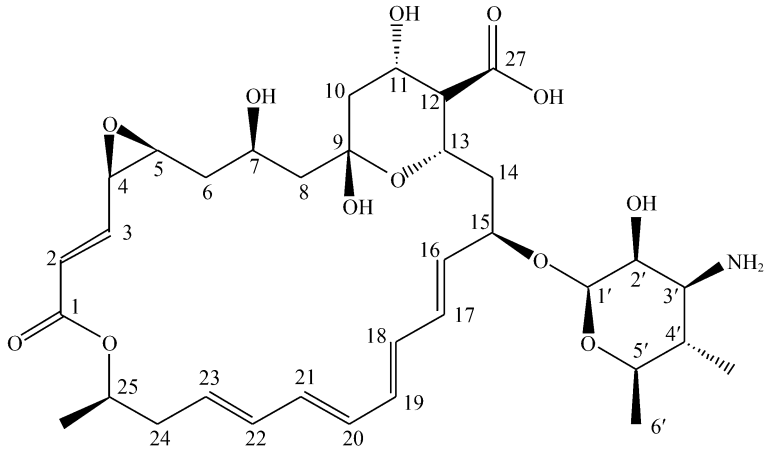

图 5　菌株 A02 活性产物的化学结构式

Fig. 5　Chemical structure of the active compound of strain A02.

因此可以确定 A02 代谢产物的主要抗菌成分为纳他霉素。这一结果揭示了利迪链霉菌产生抗真菌天然产物的新功能。

纳他霉素为广谱抗真菌天然药物，据报道对几乎所有的霉菌和酵母菌均具很强的抑制作用，最低抑菌浓度一般小于 15 μg/mL，且不易引起靶标真菌形成抗性，对哺乳动物无毒，无诱导突变、致畸、致癌作用和过敏反应[17]，具有低剂量、高效率、抗菌作用时间长等特点，是一种高效、安全的天然生物性食品防腐剂和医用抗真菌剂，目前已在 30 多个国家广泛应用；但对植物病害的防治尚缺乏系统的研究和应用。本研究阐明了菌株 A02 主要抗菌活性物质的化学结构，结合前期对其抗菌作用的实验结果[8]，说明纳他霉素能够有效地抑制多种植物病原真菌，这为利迪链霉菌及纳他霉素在植物病害生物防治中的应用开拓了新的途径。对该菌株进行进一步的菌种选育、发酵及制剂加工工艺优化，有望开发出高效、低毒、环境友好的农用杀菌剂，为植物真菌病害，尤其是有机果蔬病害的防治及果品保鲜提供良好的替代产品。

致谢 承蒙中国科学院微生物研究所车永胜研究员、中国农业大学周立刚教授指导化学结构的解析，谨此深致谢忱。

REFERENCES

[1] Zhang ZP, Hou TJ. Antibiotics and Bioactive Substances Produced by Microbes. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 302, 418.
张致平，姚天爵. 抗生素与微生物产生的生物活性物质. 北京：化学工业出版社, 2005: 302, 418.

[2] Takeuchi M, Inukai M, Enokita R, *et al*. Malioxamycin, a new antibiotic with spheroplast-forming activity. I. Producing organism, fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot*, 1980, **33**(11): 1213–1219.

[3] Hayakawa Y, Kanamaru N, Shimazu A, *et al*. Lydicamycin, a new antibiotic of a novel skeletal type I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot*, 1991, **44**(3): 282–287.

[4] Singh SK, Gurusiddaiah S. Production, purification, and characterization of chandramycin, a polypeptide antibiotic from *Streptomyces lydicus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984, **26**(3): 394–400.

[5] Yuan WM, Crawford DL. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(8): 3119–3128.

[6] Mahadevan B, Crawford DL. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme Microb Tech*, 1997, **20**(7): 489–493.

[7] Zhang WH, Yang WX, Meng QF, *et al*. Identification of *Streptomyces* strain 23 against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Acta Phytopathol Sin*, 2005, **35**(5): 459–462.
张维宏，杨文香，孟庆芳，等. 番茄溃疡病菌拮抗链霉菌菌株 23 的鉴定. 植物病理学报, 2005, **35**(5): 459–462.

[8] Liu WC, Qiu JY, Liu JH, *et al*. A *Streptomyces lydicus* strain and its application in the biocontrol of plant diseases: China patent, 200610065620.9. 2006-03-21.
刘伟成，裘季燕，刘建华，等. 一株利迪链霉菌及其在植物病害生物防治中的应用：中国专利，申请号：200610065620.9. 2006-03-21.

[9] Zhou DQ. Microbiology Experiment Manual. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1986:194.
周德庆. 微生物学实验手册. 上海：上海科学技术出版社, 1986: 194.

[10] Lu SY. Biocontrol of Plant Diseases. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1993: 248–249.
鲁素芸. 植物病害生物防治学. 北京：北京农业大学出版社, 1993: 248–249.

[11] National Pharmacopoeia Committee of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京：化学工业出版社, 2005.

[12] Bian XY. Yin XN. MTT colorimetric assay method and its application. *Sect Clin Biochem & Lab Med Foreign Med Sci*, 1998, **19**(2): 83–85.
边兴艳，尹学念. MTT 比色法及其应用. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1998, **19**(2): 83–85.

[13] Zhang ZP. Microbial Pharmaceuticals. Beijing: Chemical Industry Press, 2003, 181.
张致平. 微生物药物学. 北京：化学工业出版社，2003, 181.

[14] Ceder O, Hansson B, Rapp U. Pimaricin-VIII: Structural and configurational studies by electron impact and field desorption mass spectrometry, ^{13}C (25.2MHz) and ^{1}H (270 MHz)-NMR spectroscopy. *Tetrahedron*, 1977, **33**(20): 2703–2714.

[15] Lancelin JM, Beau JM. Stereostructure of pimaricin. *J Am Chem Soc*, 1990, **112**(10): 4060–4061.

[16] Nie LP, Li WL, Tan HR. Cloning and function of sank-a gene involved in nikkomycin biosynthesis of *Streptomyces ansochromogenes*. *Chin J Biotech*, 2000, **16**(6): 667–670.
聂丽平，李文利，谭华荣. 圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成基因-sanK 的克隆及功能研究. 生物工程学报, 2000, **16**(6): 667–670.

[17] Oostendorp JG. Natamycin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1981, **47** (2): 170–171.

JOURNALS.IM.AC.CN