

吉氏芽胞杆菌来源来氟米特分析与检测

陈 峥, 刘 波*, 朱育菁, 潘志针

(福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003)

摘 要: **目的** 对吉氏芽胞杆菌 *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 来源的来氟米特成分进行分析与检测。**方法** 采用高效液相四级杆飞行时间质谱分析吉氏芽胞杆菌 *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 发酵液中胞外代谢物的成分。运用安捷伦公司的 MassHunter 软件, 对数据进行分子特征提取(MFE), 并通过 Metlin 代谢物质谱数据库检索, 获得总体代谢物的信息。**结果** 在吉氏芽胞杆菌 *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 发酵液中, 用液相质谱检测到 561 种代谢物, 通过 Metlin 谱库搜索得到初步鉴定结果的有 15 种。其中, 来氟米特是相对含量和匹配率最高的成分。来氟米特的匹配得分达到 90.89, 占其发酵液总代谢物相对含量的 1.14%。来氟米特的保留时间为 6.522 分钟, 精确质量数为 270.0623。**结论** 为吉氏芽胞杆菌来源的该免疫调节剂的开发与利用提供理论依据。

关键词: 液相四级杆飞行时间质谱法; 吉氏芽胞杆菌; 胞外代谢物; 来氟米特

Analysis and testing on leflunomide from *Bacillus gibsonii* FJAT-10019

CHEN Zheng, LIU Bo*, ZHU Yu-jing, PAN Zhi-Zhen

(Institute of Agrobiological Resources, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

ABSTRACT: Objective To analyze and test on leflunomide from *Bacillus gibsonii* FJAT-10019. **Methods** Extracellular metabolites of *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 were analyzed by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Molecular Feature Extraction(MFE)and database retrieval were applied by Agilent MassHunter software, for the information overall metabolites. **Results** Totally 561 compounds were detected, and 15 compounds were identified by library searching of Metlindatabase. The compound of leflunomide with the match score 90.89, and relative content is 1.14%. The retention time of leflunomide is about 6.522 min, accurate mass is 270.0623. **Conclusion** This result provided the theory basis for development and utilization of this immunomodulator from *Bacillus gibsonii*.

KEY WORDS: liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry; *Bacillus gibsonii*; extracellular metabolites; leflunomide

1 引 言

芽胞杆菌具有很强的抗逆性, 对高温、紫外线、干燥、电离辐射和有毒化学物质具有很强的抗性^[1]。

由于以上特性, 芽胞杆菌作为一类重要的功能微生物, 在工业、农业、医学等领域被广泛应用。在工业领域应用于环境污染治理和提取工业用酶等; 农业领域应用于生物农药、抗生素等; 医学领域应用于新型药物

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303094)、福建省农科院青年创新基金(2013dqd-6)

Fund: Supported by the Chinese Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest(201303094), The Youth Innovation Fund of FAAS (2013dqd-6).

*通讯作者: 刘波, 研究员, 主要研究方向为微生物生物技术与农业生物药物。Email: fzliubo@163.com

*Corresponding author: LIU Bo, Researcher, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian 350003, China. E-mail: fzliubo@163.com

载体, 肠胃功能调节和活性制剂生产等。而以上这些应用的提前就是对菌株及其代谢物的挖掘和利用。

来氟米特(leflunomide, LEF)通过其活性代谢产物 A771726 抑制二氢乳清酸脱氢酶活性, 阻断嘧啶的合成途径, 使增生活跃的 T、B 淋巴细胞等受到抑制^[2]; 抑制 NF κ B 的活化, 下调多种炎性因子包括 IL-1、TNF 等; 抑制金属蛋白酶的表达, 延缓骨质破坏。LEF 最早应用于类风湿关节炎的患者。医药上使用的来氟米特是人工合成的小分子异噁唑衍生物。我们从吉氏芽胞杆菌(*Bacillus gibsonii*FJAT-10019)中首次发现了来氟米特, 并对其进行了分析检测。

关于吉氏芽胞杆菌的研究报道较少, 张保国^[3]从碱性土壤中分离出吉氏芽胞杆菌 S-2, 对其产碱性果胶酶进行研究, 得到两种均一组分, 分子量均为 41 kD。李祖明等^[4]研究结果表明吉氏芽胞杆菌 S-2 菌种发酵生产的碱性果胶酶对黄瓜黄化苗具有诱导抗病作用, 并对其酶谱进行系统分析, 得到三个均一组分, 分别为 39 kD、37 kD、38 kD^[5]。朱震等^[6]通过室内离体和温室盆钵试验, 以吉氏芽胞杆菌 SL-25 菌悬液对根结线虫二龄幼虫, 24 h 致死率和 7 d 虫卵孵化率分别达到 66.7 % 和 28.9 %, 表现出作为根结线虫生防菌的应用前景。然而, 吉氏芽胞杆菌来氟米特成分研究未见报道。本研究选用液相四级杆飞行时间质谱(LC-QTOF-MS), 对菌株发酵液中来氟米特成分进行研究, 为了进一步探索具有生物活性的成分提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 材 料

供试菌株: 吉氏芽胞杆菌 *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 由福建省农业科学院农业生物资源研究所提供。菌株种子培养基: 淀粉 1.0 %, 牛肉膏 0.5 %, 蛋白胨 0.3 %, 蔗糖 1.0 %, 酵母粉 0.5 %, CaCl₂ 0.5 %, pH 7.0。菌株发酵培养基: TSB。

实验试剂: TSB 培养基(美国 BD 公司), 色谱纯乙腈(美国 JT Baker 公司), 色谱纯乙酸铵(CNW, 上海安谱科学仪器有限公司)。

实验仪器: 液相四级杆飞行时间质谱联用仪 Agilent 1260/6520(美国安捷伦科技公司); 电子天平 METTLER TOLEDO AL104(瑞士梅特勒·托利多仪器

有限公司); 恒温培养振荡器智城 ZHWY-2102C (上海智城分析仪器有限公司); pH 计 Sartorius PB-10(德国赛托利斯公司)。

2.2 方 法

发酵液制备: 用 LB 培养基平板将吉氏芽胞杆菌 *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 菌株划线活化并培养 24 h。取活化的菌株接入 20 mL LB 种子培养基中, 以 37 °C 200 r/min 振荡培养 12 h, 成为种子液。取该种子液以 1 % 接种量接入预先装入 50 mL 的 TSB 液体培养基中, 继续 37 °C 200 r/min 振荡培养 48 h。将吉氏芽胞杆菌 *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 发酵液密封后, 置于 4 °C 冰箱中准备制备。

样品制备方法: 取 50 mL *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 发酵液, 离心取上清液, 过 0.25 μ m 微孔滤膜后, 加入 GC 小瓶。置于 4 °C 冰箱保存, 等待进样。色谱质谱条件: 色谱柱为 Agilent ZORBAX Extend C₁₈(2.1 μ m \times 50 mm, 1.8 Micron); 柱温: 35 °C; 进样量: 2 μ L; 流动相: A=10 mmol/L 乙酸铵+水, B=乙腈; 流速: 0.2 mL; 梯度程序: B=90 % 0~3 min; B=50 % 3~25 min; B=90 % 25~35 min; MS 运行条件: 负离子模式; 干燥气温度: 300 °C, 干燥气流速 5 L/min; Nebulizer 30 psig; Capillary voltage 3500 V; Fragmentor 175 V; Skimmer 65.0 V; Mass range 150~1000 m/z。参比离子: 112.9855、119.036、301.9981、966.0007、980.0163、1033.9881、1633.9486、1933.9306、2533.8923。

3 结果与分析

3.1 吉氏芽胞杆菌 *Bacillus gibsonii* FJAT- 10019 发酵液 LC-MS 物质成分分析

从该菌发酵液中得到成分 561 种, 其中与数据库匹配, 得到初步鉴定结果的有 15 种, 见表 3。分别为: 磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸、氯米非那胺、氯甲苯噻嗪、2,3-二溴-1-丙醇、Plocamene C、beta-2,3,4,5,6- Pentachlorocyclohexanol、5-氯-2,4-二磺酰胺基苯胺、对氯苯基对氯苯磺酸酯、羟基乙叉二膦酸、丁酯磷、氯塞酮、来氟米特、Zuccagin 和 Galbeta1-3GalNAcalpha1-3(Fucalpha1-2)Galbeta1-4GlcNAcbeta1-3Galbeta1-4Glc eta-Cer(d18:1/18:0)、PE(26:2(5E,9Z)/26:2(5E,9Z))。其他 546 种成分未与谱库内的化合物相匹配, 暂不列出, 有待进一步研究。

表 1 吉氏芽胞杆菌 *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 菌株发酵液成分
Table 1 The composition of *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 fermentation broth

化合物序号 Cpd	化合物名称 Name	METLIN 号 METLIN	质量数 Mass	质荷比 m/z	匹配得分 Score	保留时间 RT	相对含量 Vol %
538	Leflunomide(来氟米特)	66762	270.0623	269.055	90.89	6.522	1.14
543	Zuccagin	50018	284.0696	283.0623	67.6	8.909	0.21
535	Chlorthalidone(氯塞酮)	1747	338.0138	337.0065	56.16	5.5	0.09
384	2,3-Dibromo-1-propanol(2,3-二溴-1-丙醇)	72947	215.8782	214.8709	54.27	1.309	0.3
389	beta-2,3,4,5,6-Pentachlorocyclohexanol	71135	269.8948	268.8875	52.79	1.313	0.2
69	Galbeta1-3GalNAcalpha1-3(Fucalalpha1-2) Galbeta1-4GlcNAc beta1-3Galbeta1-4Glcbeta-Cer (d18:1/18:0)	54990	1765.966	881.9756	51.63	1.054	0.09
75	PE(26:2(5E,9Z)/26:2(5E,9Z))	40567	963.7646	480.875	51.46	1.054	0.03
490	Etidronic acid(羟基乙叉二膦酸)	2629	205.9738	204.9666	49.51	1.774	0.02
496	Butonate(丁酯磷)	72726	325.9631	324.9558	49.42	1.857	0.29
400	Chloraminophenamide(5-氯-2,4-二磺酰胺基苯胺)	66651	284.9649	283.9576	49.31	1.331	0.12
480	Chlorfenson(对氯苯基对氯苯磺酸酯)	72775	301.9563	300.949	48.36	1.675	0.06
296	Chloraminophenamide(氯米非那胺)	66651	284.9654	283.9581	47.18	1.066	0.11
337	Diazoxide(氯甲苯噻嗪)	1992	229.9908	228.9835	47.11	1.083	0.87
192	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3)磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸	7040	629.9532	628.9459	45.25	1.058	0.02
388	Plocamene C	71568	317.9332	316.9259	45.1	1.313	0.1

3.2 吉氏芽胞杆菌 *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 发酵液来氟米特成分分析

在 *Bacillus gibsonii* FJAT-10019 发酵液的成分中, 与谱库有匹配出化合物的 15 种物质中, 匹配度在 90% 以上的有 1 种, 为来氟米特 LEF(N-(4-三氟-甲基)-5-甲基异恶唑-4-羧酰胺), 匹配得分(Score)为 90.89, 相对含量为 1.14%。来氟米特的化合物提取色谱图及离子提取色谱图, 见图 1、2, 其保留时间为 6.522 min, 峰的相对丰度为 2.5×10^4 。来氟米特同位素峰结果见图 3, 质谱图见图 4。其中同位素峰图提供了同位素峰的相对强度和同位素峰的间距。由于本试验采用负离子模式电离, 负离子模式下产生的不同的分子离子, 如 $[M-H]^-$ 、 $[M+X]^-$ (X 为所有溶剂或缓冲剂阴离子) 等。故判断 269.0550 峰为 $[M-H]^-$ 分子离子峰, 推测该成分的质量数为 270.0550。根据所预测

的分子式结果, 同时参考同位素峰的相对强度和间距, 以及 Metlin 库中匹配的分值, 基本可以确定该成分为来氟米特。

4 讨论

在对芽胞杆菌发酵液化学成分研究方面, 高程海等^[7]采用常规柱色谱和高效液相色谱及理化和波谱分析, 对枯草芽胞杆菌的化学成分进行分离鉴定, 分离得到 7 个环二肽类化合物。乔莉等^[8]采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、高效液相色谱, 结合理化和波谱分析方法, 对海洋细菌 *Bacillus sp.* 的次生代谢物进行分析, 分离得到 9 个化合物。常规芽胞杆菌发酵液的化学成分研究方法获得的代谢物鉴定结果可靠, 但分析的周期较长, 不适用于对大量样品功能物质的初步筛选研究。

本研究采用液相-四级杆飞行时间质谱联用仪(LC-QTOF MS)对芽胞杆菌发酵液进行分析与检测。LC-QTOF MS 具有高灵敏度、高分辨率、高质量精度、高选择性等优点^[9], 其强大的定性分析能力被认为最好的复杂样品分析技术之一^[10]。本研究为非靶向研究, 在液相和质谱的参数选择上采用常规的

设置参数, 以获得尽可能多的代谢物信息。通过 Agilent 的 MassHunter 软件, 对数据进行分子特征提取(MFE), 并通过 Metlin 数据库检索, 获得总体代谢物的信息。目前应用该技术对吉氏芽胞杆菌代谢物进行研究, 尚未见报道。

用液相质谱获得极性成分 561 种, 其中通过谱库

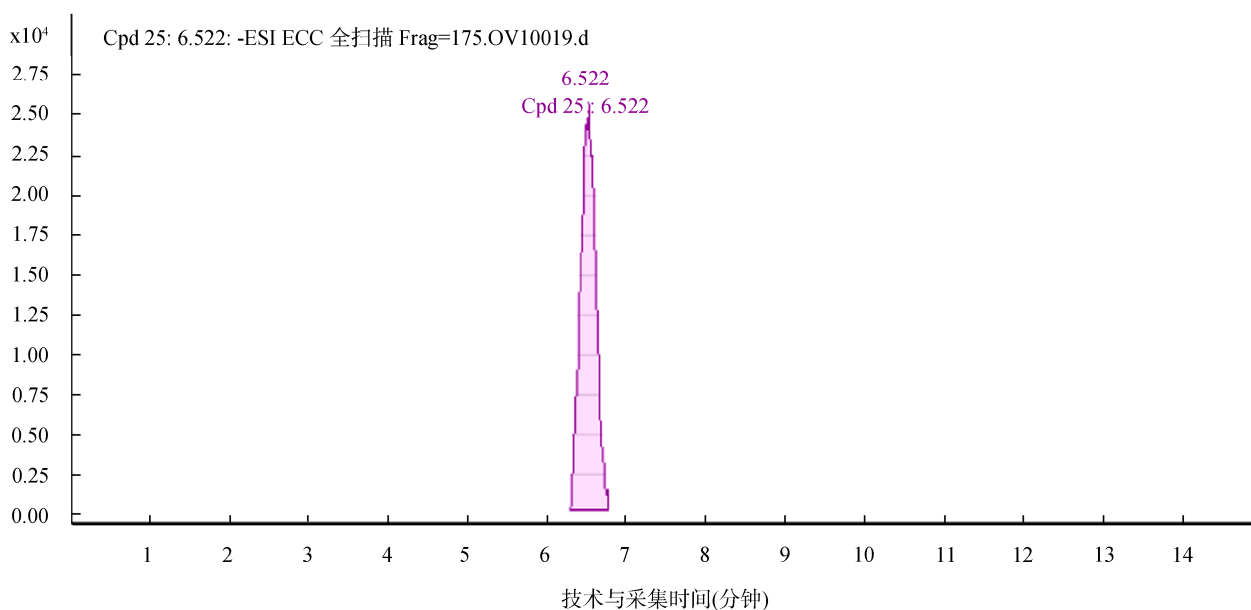


图 1 样品中来氟米特化合物提取色谱图

Fig. 1 Extracted compound chromatogram(ECC)of leflunomide in sample

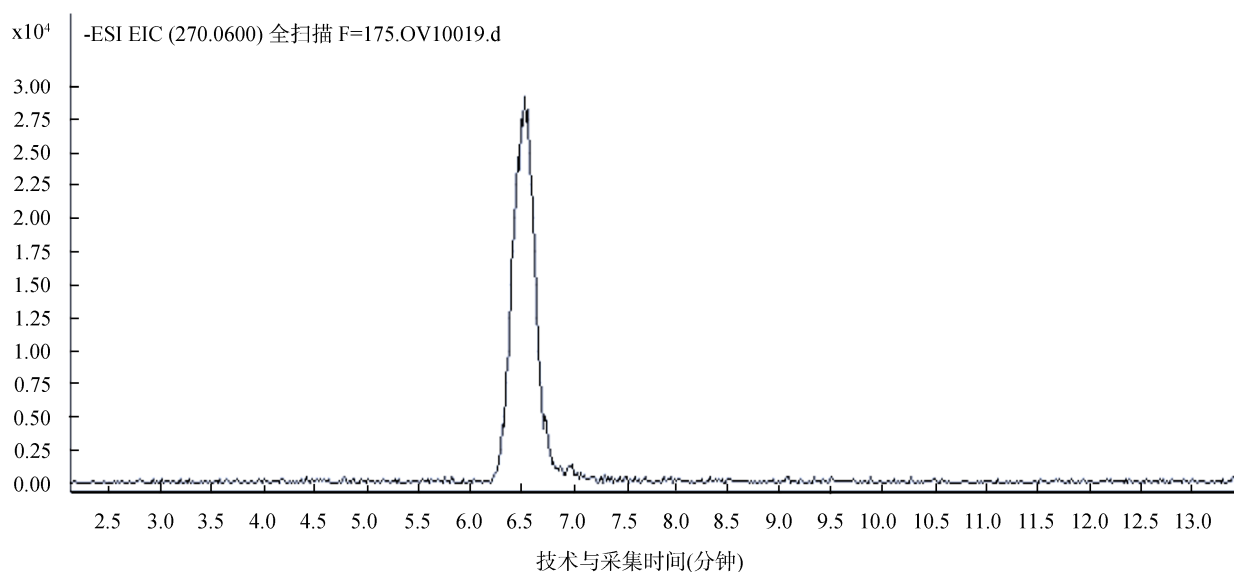


图 2 样品中来氟米特离子提取色谱图

Fig. 2 Extracted ion chromatogram (EIC) of leflunomide in sample

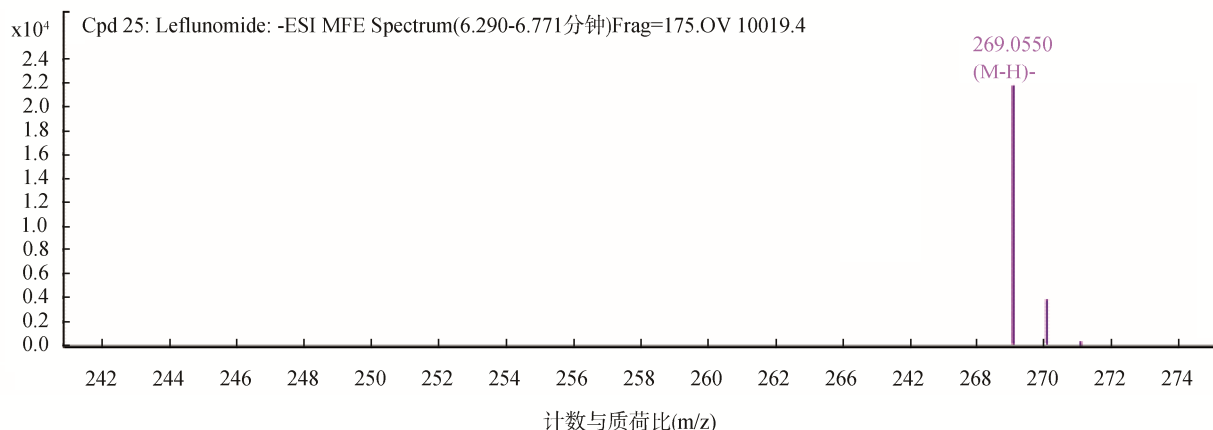


图 3 样品中来氟米特同位素峰结果
Fig. 3 Isotopic peak of leflunomide in sample

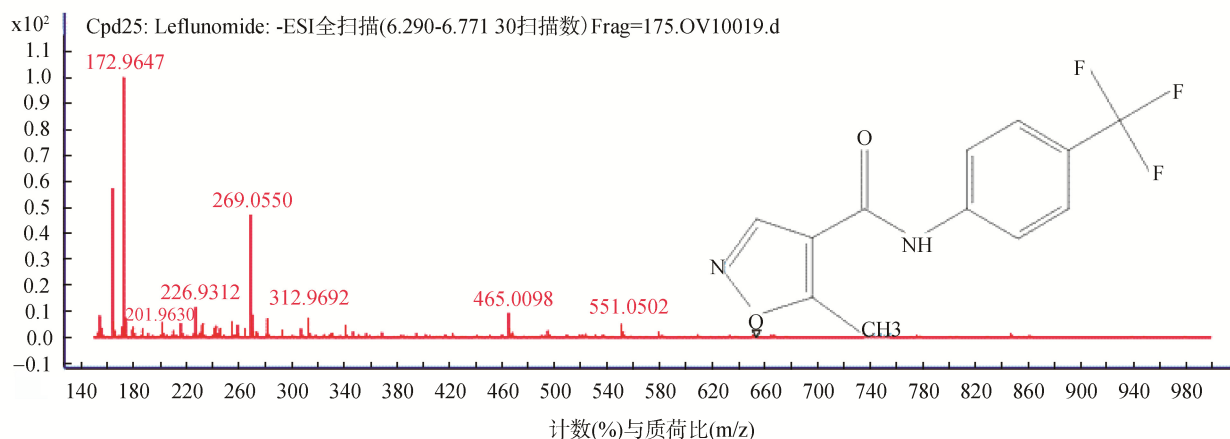


图 4 样品中来氟米特质谱图
Fig. 4 Mass spectrum of leflunomide in sample

搜索得到 15 种。从所测定的成分中, 将所匹配到的成分分为两类: (1)可能与免疫相关的成分: 来氟米特 (LEF), 化学名为 N-(4-三氟甲基苯基)-5-甲基异噁唑-4-甲酰胺, 化学式为 $C_{12}H_9F_3N_2O_2$, 是一个具有多重生理活性的新型免疫调节剂^[11]。主要功效在于治疗自身免疫性疾病(类风湿性关节炎等)、肾小球疾病、皮肤疾病、强直性脊柱炎等, 并在器官移植中被应用^[12]。LEF 是一个具有多种活性的免疫调节剂, 在体内快速转化为活性代谢物 A-771726, 抑制酪氨酸磷酸化和嘧啶核苷酸的合成, 并通过抑制表皮生长因子受体酪氨酸激酶实现抗癌作用^[13]。LEF 的主要作用机理包括三个方面: a.抑制 T、B 淋巴细胞的增殖及影响细胞因子及其受体的表达; b.抑制蛋白酪氨酸激酶

的活性; c.抑制二氢乳清酸脱氢酶的活性^[12]。(2)其他作用的成分。氯甲苯噻嗪(diazoxide)是一种非苯并噻二嗪利尿剂, 抗高血压药物。羟基乙叉二膦酸(etidronic acid)偕二磷酸对骨吸收的抑制作用。氯塞酮(chlorthalidone)是一种噻嗪类利尿成分。

来氟米特是一个具有抗增殖活性的异唑类免疫调节剂, 其作用机制主要是抑制二氢乳清酸脱氢酶的活性, 从而影响活化淋巴细胞的嘧啶合成。在医学上, 来氟米特主要通过化学合成来获得。在芽胞杆菌中存在为首次发现。在对吉氏芽胞杆菌的发酵液的质谱分析中, 发现来氟米特相对含量为 1.14%, 匹配得分为 90.89, 为吉氏芽胞杆菌来源的该免疫调节剂的开发与利用提供了理论依据。该菌发酵液中与质谱谱

库无匹配或者匹配率较低的成分有很多, 说明该微生物主要的次生代谢成分有待深入研究。该成分是否为来氟米特或者是来氟米特的同分异构体, 还有待进一步验证。

参考文献

- [1] 刘国红, 林营志, 林乃铨, 等. 芽胞杆菌分类研究进展[J]. 福建农业学报, 2011, 26(5): 911-917.
Liu GH, Lin YZ, Lin NQ, *et al.* Study on Genus Bacillus Classification[J]. Fujian J Agric Sci, 2011, 26(5): 911-917.
- [2] Miceli-Richard C, Dougados M. Leflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Expert Opin Pharmacother[J]. 2003, 4(6): 987-997.
- [3] 张保国. 碱性果胶酶的发酵条件研究及酶的分离纯化[D]. 天津: 天津科技大学, 2005.
Zhang BG. The fermentation conditions of alkaline pectinase research and enzyme purification[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2005.
- [4] 李祖明, 白志辉, 张洪勋, 等. 碱性果胶酶诱导植物抗病的研究[J]. 中国植保导刊, 2008, 28(9): 5-8.
Li ZM, Bai ZH, Zhang HX, *et al.* Studies on inducing plant disease resistance by alkaline pectinase[J]. China Plant Prot, 2008, 28(9): 5-8.
- [5] 李祖明. 芽胞杆菌碱性果胶酶的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
Li ZM. Research of bacillus alkaline pectinase[D]. Beijing: China Agricultural University, 2006.
- [6] 朱震, 陈芳, 肖同建, 等. 拮抗菌生物有机肥对番茄根结线虫的防治作用[J]. 应用生态学报, 2011, 4: 1033-1038.
Zhu Z, Chen F, Xiao TJ, *et al.* Inhibitory action of the biological organic fertilizer on tomato root knot nematodes[J]. Chin J Appl Ecol, 2011, 4: 1033-1038.
- [7] 高程海, 龙彬, 孙海燕, 等. 海洋细菌中活性次生代谢产物研究进展[J]. 广西科学院学报, 2014, 2: 69-73.
Gao CH, Long B, Sun HY, *et al.* Research progress of the activated secondary metabolites of marine bacterium[J]. J Guangxi Acad Sci, 2014, 2: 69-73.
- [8] 乔莉, 周玉枝, 陈欢, 等. 海洋细菌 Bacillus sp. 次生代谢产物的研究[J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(3): 219-221.
Qiao L, Zhou YZ, Chen H, *et al.* The metabolites from the broth of marine bacterium Bacillus sp. [J]. Chin J Med Chem, 2008, 18(3): 219-221.
- [9] 许国旺, 杨军. 代谢组学及其研究进展[J]. 色谱, 2003, 21(4): 316-320.
Xu GW, Yang J. Recent Advances in Metabonomics[J]. Chin J Chromatogr, 2003, 21(4): 316-320.
- [10] 史怀, 刘波, 陈峥, 等. 基于 LC/QTOF MS 的芽胞杆菌代谢组学分析方法[J]. 福建农业学报, 2012, 27(10): 1112-1119.
Shi Hi, Liu B, Chen Z, *et al.* Metabonomics Analysis of Bacillus based on LC/Q-TOF MS[J]. Fujian J Agric Sci, 2012, 27(10): 1112-1119.
- [11] 苏国栋, 姜永悦, 吕延文. 来氟米特合成工艺的改进[J]. 化工时刊, 2011, 25(4): 11-14.
Su GD, Jiang YY, Lv YW. Improvement in synthesizing technology of Leflunomide[J]. Chem Ind Times, 2011, 25(4): 11-14.
- [12] 薛海, 张士勇. 来氟米特在免疫性疾病中的应用进展[J]. 安徽医药, 2009, 13(7): 723-726.
Xue H, Zhang SY. Progress in the application of Leflunomide in autoimmune disease[J]. Anhui Med Pharm J, 2009, 13(7): 723-726.
- [13] 贺俊峰, 恽榴红. 化学合成免疫调节剂研究进展[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(5): 547-550.
He JF, Yun LH. Advances in synthetic immunomodulating agents[J]. Chin J New Drugs, 2005, 14(5): 547-550.
- [14] 王强, 陈利宏, 高秀侠, 等. 来氟米特治疗原发性难治性肾病综合征的临床观察[J]. 安徽医学, 2011, 32(5): 648-649.
Wang Q, Chen LH, Gao XX, *et al.* Clinical observation of treatment of refractory nephrotic syndrome by Leflunomide[J]. Anhui Med J, 2011, 32(5): 648-649.
- [15] 赵先英, 周小霞, 张定林, 等. 来氟米特的临床应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(5): 591-593.
Zhao XY, Zhou XX, Zhang DL, *et al.* The clinical application progress of Leflunomide[J]. Int J Lab Med, 2014, 35(5): 591-593.
- [16] 傅玉如, 陈双, 曾德强. Leflunomide 对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 外科理论与实践, 2004, 9(3): 214-216.
Fu YR, Chen S, Zeng DQ. The Effect of Leflunomide on cellular proliferation and apoptosis in human colon cancer cells[J]. J Surg Concept Pract, 2004, 9(3): 214-216.
- [17] 陈峥, 刘波, 朱育菁, 等. pH 条件对短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 次生代谢物产生的影响[J]. 福建农业学报, 2012, 27(1): 71-76.
Chen Z, Liu B, Zhu YJ, *et al.* Effects of initial pH value for the fermentation of Brevibacillus brevis FJAT-0809-GLX on the generation of secondary metabolites substances[J]. Fujian J Agric Sci. 2012, 27(1): 71-76.

- [18] 陈峥, 刘波, 车建美, 等. 龙眼微生物菌株 FJAT-0809-GLX 发酵液丙酮萃取液的成分分析[J]. 福建农业学报, 2012, 27(3): 294-298.
Chen Z, Liu B, Che JM, *et al.* GC/MS analysis on acetone extracts from microbial fresh-keeping agent for fruit longan [J]. Fujian J Agric Sci, 2012, 27(3): 294-298.
- [19] Liu J, Lei Y, Wang F, *et al.* Immunostimulatory activities of specific bacterial secondary metabolite of *Anoxybacillus flavithermus* strain SX-4 on carp, *Cyprinus carpio*[J]. J Appl Microbiol, 2011, 110(4): 1056-1064.
- [20] 樊金华, 谢映平, 薛皎亮, 等. 一株寄生油松毛虫的白僵菌毒素化学成分[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 596-601.
Fan JH, Xie YP, Xue JL, *et al.* Isolation and identification of toxins inhibiting *Dendrolimus tatariciformis* from an antagonistic strain of *Beauveria*[J]. Acta Microbiol Sinica, 2008, 48(5): 596-601.
- [21] 龚春燕, 张道敬, 魏鸿刚, 等. 多粘类芽孢杆菌 HY96—2 发酵液化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21 (3): 379-381, 387.
Gong CY, Zhang DJ, Wei HG, *et al.* Compounds from Culture Broth of *Paenibacillus polymyxa* HY96-2[J]. Natural Prod Res Dev, 2009, 21 (3): 379-381, 387.
- [22] 谢晶, 葛绍荣, 陶勇, 等. 多粘类芽孢杆菌 BS04 拮抗成分分离纯化及其特性[J]. 化学研究与应用, 2004, 16(6): 775-777.
Xie J, Ge SR, Tao Y, *et al.* Purification and characteristic of anti-bacterial components of *Paenibacillus polymyxa* BS04[J]. Chem Res Appl, 2004, 16(6): 775-777.
- [23] 王芳, 纪明山, 谷祖敏, 等. 枯草芽孢杆菌 B36 抑菌活性成分的初步提取[J]. 湖北农业科学, 2009, (4): 874-876.
Wang F, Ji MS, Gu ZM, *et al.* Primary Extraction of Antifungal Substances from *Bacillus subtilis* B36 Strain[J]. Hubei Agric Sci, 2009, (4): 874-876.
- [24] 江木兰, 赵瑞, 王国平. 油菜内生枯草芽孢杆菌 BY-2 抗油菜菌核病菌有效成分的鉴定和分离提纯[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28 (4): 453-456.
Jiang ML, Zhao R, Wang GP. Identification and purification of anti-Sclerotinia sclerotiorum substance from endobacterium BY-2 in oilseed rape[J]. Chin J Oil Crop Sci, 2006, 28(4): 453-456.
- [25] 赵明. 新型免疫抑制剂 Leflunomide 的研究进展[J]. 国外医学, 1997, 17(2): 77-78.
Zhao M. The research progress of new type of immunosuppressant-Leflunomide[J]. Foreign Med Sci, 1997, 17(2): 77-78.
- [26] 李家明, 张完美, 查大俊. 来氟米特的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(2): 53-55.
Li JM, Zhang XM, Zha DJ. Synthesis of Leflunomide[J]. Chin J Pharma, 2002, 33(2): 53-55.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



陈 峥, 助理研究员, 主要研究方向为微生物代谢物研究。
E-mail: acerdestiny@163.com



刘 波, 研究员, 主要研究方向为微生物生物技术与农业生物药物。
E-mail: fzliubo@163.com