

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102174051 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 07

(21) 申请号 201110067581. 7

A01P 13/00(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 03. 21

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :M2011051 2011. 02. 28

(71) 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

(72) 发明人 郑天凌 张帮周 黄丽萍 张金龙

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所

35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

C07D 493/10(2006. 01)

A01N 43/90(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

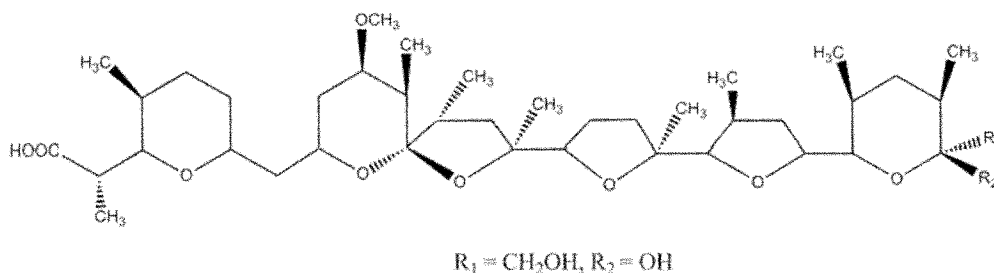
(54) 发明名称

一种强效抑藻活性化合物及其制备方法与应用

(57) 摘要

一种强效抑藻活性化合物及其制备方法与应用。涉及杀藻化合物,提供一种强效抑藻活性化合物及其制备方法与应用。其名称为尼日利亚菌素,分子式为 $C_{40}H_{68}O_{11}$, 相对分子质量为 742, 运用常规方法筛选获得了一株 *Streptomyces malaysiensis* 04-6, 已于 2011 年 2 月 28 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 :CCTCC NO :M2011051。发酵培养获得含有强抑藻活性化合物的发酵液, 将发酵液离心, 收集上清液, 然后将上清液进行分离纯化, 获得具有强抑藻活性的化合物。强抑藻活性的化合物能够高效专一地杀灭藻细胞, 具有开发成抑藻剂的潜能, 在生物降解藻类, 治理赤潮方面具有广泛的应用。

1. 一种强效抑藻活性化合物,其特征不在于其名称为尼日利亚菌素,分子式为 $C_{40}H_{68}O_{11}$, 相对分子质量为 742, 结构式为:



2. 如权利要求 1 所述的一种强效抑藻活性化合物的生产菌株,其特征不在于其为 *Streptomyces malaysiensis* 04-6, 该菌株已于 2011 年 2 月 28 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏中心保藏编号为: CCTCC NO: M2011051。

3. 如权利要求 1 所述的一种强效抑藻活性化合物的制备方法,其特征不在于包括以下步骤:

1) 将 *Streptomyces malaysiensis* 04-6 接种于平板上划线分离, 于 28 ~ 37°C 温度下培养 5 ~ 7d; 挑取单菌落接种于高氏一号液体培养基中, 于 28 ~ 37°C, 180 ~ 250rpm 培养 5 ~ 7d 后即得发酵液; 将所得发酵液进行离心, 收集上清液;

2) 用乙酸乙酯萃取步骤 1) 所得上清液, 减压浓缩, 干燥, 得乙酸乙酯萃取物;

3) 将乙酸乙酯萃取物溶于乙酸乙酯, 再加入到硅胶柱中进行洗脱, 收集洗脱液进行薄层层析分析, 根据展开图谱, 合并收集的洗脱液;

4) 将步骤 3) 所得洗脱液于 30 ~ 45°C 下真空蒸干, 产物进行抑藻活性的测定, 获得可抑藻的活性组分;

5) 将所得活性组分进行高效液相色谱洗脱, 收集洗脱液, 获得强效抑藻活性化合物。

4. 如权利要求 3 所述的一种强效抑藻活性化合物的制备方法, 其特征不在于在步骤 1) 中, 所述离心的条件为: 速率 10000 ~ 12000g, 时间 10 ~ 20min。

5. 如权利要求 3 所述的一种强效抑藻活性化合物的制备方法, 其特征不在于在步骤 3) 中, 所述硅胶柱的规格为 170mm × 30mm, 200 ~ 300 目。

6. 如权利要求 3 所述的一种强效抑藻活性化合物的制备方法, 其特征不在于在步骤 3) 中, 所述洗脱的洗脱剂为正己烷和乙酸乙酯的混合物, 所述洗脱的程序为: 用正己烷和乙酸乙酯体积比 1 : 2 的混合物洗脱 20min, 再用正己烷和乙酸乙酯体积比 1 : 1 的混合物洗脱 30min, 最后用正己烷洗脱 30min, 洗脱的流速为: 1mL/min。

7. 如权利要求 3 所述的一种强效抑藻活性化合物的制备方法, 其特征不在于在步骤 3) 中, 所述薄层层析的展开剂为乙酸乙酯, 所述薄层层析的显示剂为含 0.5% 碘的氯仿溶液。

8. 如权利要求 3 所述的一种强效抑藻活性化合物的制备方法, 其特征不在于在步骤 5) 中, 所述洗脱的程序:

0 ~ 7.5min	85% 甲醇 / 水;
7.5 ~ 10.5min	85% 甲醇 / 水 ~ 100% 甲醇;
10.5 ~ 22.5min	100% 甲醇。

9. 如权利要求 1 所述的一种强效抑藻活性化合物在制备抑藻剂中的应用。

一种强效抑藻活性化合物及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及杀藻化合物,特别涉及一种强效抑藻活性化合物及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 近年来,随着分子生态学方法的广泛使用,海洋放线菌多样性研究,尤其是深海放线菌的多样性研究取得的巨大进展。越来越多的海洋放线菌被发现 (1、Prof. Alan Claude, W., Diversity and biogeography of marine actinobacteria[J]. 2006. 9(3) : 279-286.), 包括新的 16SrDNA 序列簇 (2、Liesack, W. and E. Stackebrandt, Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. J. Bacteriol. [J], 1992. 174(15) :5072-5078. 3、Rheims, H., et al., Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. Microbiology[J], 1996. 142(10) :2863-2870.), 放线菌的种类和数量不断增加,由最初的 3 个属增加到了 170 个属。然而,放线菌的已知物种与其在自然界存在的数量相比仍然是微不足道的 (4、Bull, A. T., et al., Marine actinobacteria :perspectives, challenges, future directions. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology[J], 2005. 87(3) :259-262 ;5、Jensen, P. R., et al., Marine actinomycete diversity and natural product discovery. Antonie van Leeuwenhoek[J], 2005. 87(1) : 43-48)。

[0003] 由于海洋环境的特殊性,海洋微生物具有独特的代谢方式,产生的代谢化学结构具有极大的复杂性和多样性。近 20 年来,有关海洋微生物产生新的具有生物活性的次级代谢产物的报道逐渐增多,从海洋放线菌发现新生物活性物质的概率甚至超过陆生放线菌。从海洋放线菌获得的部分活性物质有灰紫红菌素 A, 盐孢胺 A, 盐孢胺 B, 熏衣菁蓝素, 盐胺, 河豚毒素, 海洋霉素 A、B, 四并霉素 D1, 色霉素 A3, 肠球菌素, 棘霉素, 抗霉素 A, 巴弗洛霉素, 菲律平, 脂霉素, 兔菌素, 等 (6、徐丽华等, 放线菌系统学——原理、方法及实践 [M]. 北京 : 科学出版社, 2007.)。这些研究结果表明,海洋环境是发现和筛选新的放线菌物种和代谢产物的宝贵资源库,其中蕴藏着大量放线菌资源等待开发和利用。

[0004] 20 世纪以来,伴随着沿海地区人口激增,工农业的迅速发展,内湾、河口和沿岸水域严重有机污染和富营养化。有害藻类水华 (Harmful algae blooms, HABs) 在中国的发生规模和频度呈急剧上升趋势,对我国沿海造成了严重的生态、资源、环境问题和重大的经济损失 (7、Qin, S., et al., Two New Metabolites, Epoxydine A and B, from *Phoma* sp. *Helvetica Chimica Acta*[J], 2010. 93(1) :169-174)。研究赤潮防治方法,制定有关防治对策已经成为许多国家和地区当务之急的环保措施。由于物理和化学方法治理赤潮存在难以大面积施用及易造成二次污染等不足之处,利用生物相互之间的生态作用来治理

赤潮已成为当前研究热点 (8、Skerratt, J. H., et al., Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Marine Ecology-Progress Series* [J], 2002. 244 :1-15.)。

[0005] 迄今为止,大多数筛选到的抑藻微生物是通过分泌特异的具有抑藻活性的物质来起抑藻作用的。已经报道的抑藻活性物质包括:蛋白质(含胞外酶)、多肽、氨基酸、抗生素、含氮化合物等其他尚未定性的抑藻化合物 (9、Yoshikawa, K., et al., beta-cyanoalanine production by marine bacteria on cyanide-free medium and its specific inhibitory activity toward cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* [J], 2000. 66(2) :718-722)。通过筛选高效、专一的抑藻活性物质成为开发抑藻剂用于赤潮治理的一个新思路。

发明内容

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种强效抑藻活性化合物。

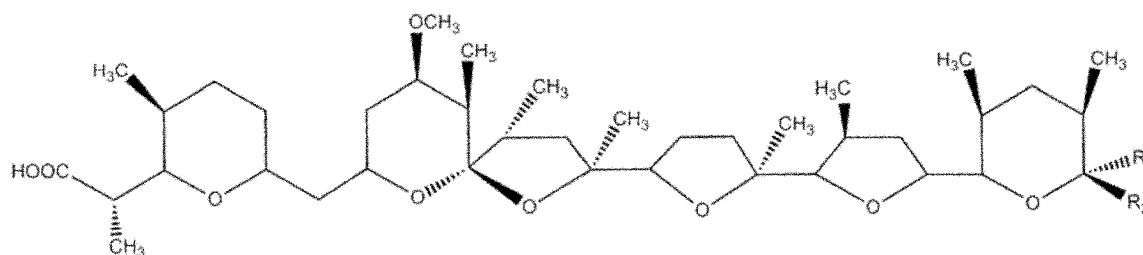
[0007] 本发明的第二个目的是提供一种生产强效抑藻活性化合物的菌株。

[0008] 本发明的第三个目的是提供一种强效抑藻活性化合物的制备方法。

[0009] 本发明的第四个目的是提供一种强效抑藻活性化合物在制备抑藻剂中的应用。

[0010] 所述强抑藻活性化合物的的名称为尼日利亚菌素 (Nigericin), 分子式为 $C_{40}H_{68}O_{11}$, 相对分子质量为 742, 结构式为:

[0011]



[0012] 所述强效抑藻活性化合物的生产菌株为 *Streptomyces malaysiensis* 04-6, 该菌株已于 2011 年 2 月 28 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏中心保藏编号为: CCTCC NO: M2011051, 地址: 中国·武汉·武汉大学。

[0013] 所述强效抑藻活性化合物的制备方法包括以下步骤:

[0014] 1) 将 *Streptomyces malaysiensis* 04-6 接种于平板上划线分离, 于 28 ~ 37°C 温度下培养 5 ~ 7d; 挑取单菌落接种于高氏一号液体培养基中, 于 28 ~ 37°C, 180 ~ 250rpm 培养 5 ~ 7d 后即得发酵液; 将所得发酵液进行离心, 收集上清液;

[0015] 2) 用乙酸乙酯萃取步骤 1) 所得上清液, 减压浓缩, 干燥, 得乙酸乙酯萃取物;

[0016] 3) 将乙酸乙酯萃取物溶于乙酸乙酯, 再加入到硅胶柱中进行洗脱, 收集洗脱液进行薄层层析分析, 根据展开图谱, 合并收集的洗脱液;

[0017] 4) 将步骤 3) 所得洗脱液于 30 ~ 45°C 下真空蒸干, 产物进行抑藻活性的测定, 获得可抑藻的活性组分;

[0018] 5) 将所得可抑藻的活性组分进行高效液相色谱洗脱, 收集洗脱液, 获得强效抑藻活性化合物。

[0019] 在步骤 1) 中,所述离心的条件可为:速率 10000 ~ 12000g,时间 10 ~ 20min。

[0020] 在步骤 3) 中,所述硅胶柱的规格可为 170mm×30mm, 200 ~ 300 目;所述洗脱的洗脱剂可为正己烷和乙酸乙酯的混合物等;所述洗脱的程序为:用正己烷和乙酸乙酯体积比 1 : 2 的混合物洗脱 20min,再用正己烷和乙酸乙酯体积比 1 : 1 的混合物洗脱 30min,最后用正己烷洗脱 30min;洗脱的流速可为 1mL/min;所述薄层层析分析的展开剂可为乙酸乙酯等,所述薄层层析分析的显示剂为含 0.5%碘的氯仿溶液等。

[0021] 在步骤 5) 中,所述洗脱的程序可为:

[0022] 0 ~ 7.5min 85%甲醇 / 水 (v/v);

[0023] 7.5 ~ 10.5min 85%甲醇 / 水 ~ 100%甲醇;

[0024] 10.5 ~ 22.5min 100%甲醇。

[0025] 收集 10.5 ~ 12.5min 洗脱液于旋转蒸发仪 30℃下真空蒸干溶解于 DMSO 验证抑藻活性。

[0026] 所得强效抑藻活性化合物经抑藻活性组分薄层色谱 (Thin Layer Chromatography, TLC) 检测,以乙酸乙酯、二氯甲烷和氯仿作为展开剂在硅胶薄层板上展开均为一个斑点,确定为纯化合物,并经 ¹H-NMR 检测,确定强效抑藻活性化合物的结构式,所述强效抑藻活性化合物可有效杀灭球形棕囊藻细胞,其在抑藻剂的制备中具有巨大的应用潜力。

[0027] 本发明运用常规方法筛选获得了一株 *Streptomyces malaysiensis* 04-6,通过发酵培养,获得含有强抑藻活性化合物的发酵液,将所述发酵液离心,收集上清液,然后将所述上清液进行分离纯化,获得具有强抑藻活性的化合物。所述强抑藻活性的化合物能够高效、专一地杀灭藻细胞,具有开发成抑藻剂的潜能,在生物降解藻类和治理赤潮等方面具有广泛的应用。

附图说明

[0028] 图 1 为强效抑藻活性化合物的高效液相图谱。在图 1 中,横坐标为时间 (min),纵坐标为吸光度 (mAU);从左至右各谱峰分别为 2.948, 10.491, 10.910, 12.042。

具体实施方式

[0029] 以下实施例是对本发明的进一步说明,但本发明不限于下述实施例。

[0030] 实施例 1 海洋链霉菌 *Streptomyces malaysiensis* 04-6 的分离筛选

[0031] 一、*Streptomyces malaysiensis* 04-6 的分离筛选具体步骤为:

[0032] 1) 福建云霄红树林湿地 (具体位置为:117° 24' -117° 30' E, 23° 53' -23° 56' N) 沉积物,于室温放置干燥 1 个月,取 10g 干燥土样,溶解于高压灭菌的 90mL 高氏一号培养基,置于 150rpm 摇床震荡 20min,使土样均匀分散;

[0033] 2) 将步骤 1) 所得样品 10 倍稀释,涂布于高氏一号 (20g 可溶性淀粉, 1g NaNO₃, 0.5gK₂HPO₄, 0.5g MgSO₄ · 7H₂O, 0.01g FeSO₄ · 7H₂O, 75 μg K₂Cr₂O₇, 10g 琼脂, 1L 海水) 固体平板,置于 28℃温度下培养 5d;

[0034] 3) 挑取不同类型单菌落划线于高氏一号固体平板,置于 28℃下培养 5d,验证是否纯培养,重复该步骤直到得到纯培养;

[0035] 4) 接种分离出的纯培养物单菌落于 4mL 高氏一号液体培养基, 置于 28℃ 摇床, 180rpm 震荡培养 5d, 取培养物于 10000g 的离心力下离心 10min, 除去菌体沉淀, 上清保存至 4.5mL 离心管;

[0036] 5) 将 1mL 上清加入到 20mL 指数期球形棕囊藻培养液中, 于 $20 \pm 1^\circ \text{C}$, 12h 光照, 12h 黑暗, $50 \mu \text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光照强度条件下培养 2d, 高氏一号培养基为对照加入藻液中, 分别设置 3 个平行; 观察球形棕囊藻细胞是否沉降, 如果沉降则代表菌体的 7d 培养物上清中含有抑藻活性物质, 从而筛选出抑藻活性菌株。

[0037] 二、*Streptomyces malaysiensis* 04-6 的分离筛选具体步骤可为:

[0038] 1) 福建云霄红树林湿地 ($117^\circ 24' -117^\circ 30' \text{ E}$, $23^\circ 53' -23^\circ 56' \text{ N}$) 沉积物, 于室温放置干燥 1 个月, 取 10g 干燥土样, 溶解于高压灭菌的 90mL 高氏一号培养基, 置于 200rpm 摇床震荡 30min, 使土样均匀分散;

[0039] 2) 将步骤 1) 所得样品 10 倍稀释, 涂布于高氏一号 (20g 可溶性淀粉, 1g NaNO_3 , 0.5g K_2HPO_4 , 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 75 $\mu \text{g K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 10g 琼脂, 1L 海水) 固体平板, 置于 37℃ 下培养 7d;

[0040] 3) 挑取不同类型单菌落划线于高氏一号固体平板, 置于 37℃ 下培养 7d, 验证是否纯培养, 重复该步骤直到得到纯培养;

[0041] 4) 接种分离出的纯培养物单菌落于 4mL 高氏一号液体培养基, 置于 37℃ 摇床, 250rpm 震荡培养 7d, 取 7d 的培养物于 12000g 的离心力下离心 20min, 除去菌体沉淀, 上清保存至 4.5mL 离心管;

[0042] 5) 将 1mL 上清加入到 20mL 指数期球形棕囊藻培养液中, 于 $20 \pm 1^\circ \text{C}$, 12h 光照, 12h 黑暗, $50 \mu \text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光照强度条件下培养 2d, 高氏一号培养基为对照加入藻液中, 分别设置 3 个平行; 观察球形棕囊藻细胞是否沉降, 如果沉降则代表菌体 7d 培养物的上清中含有抑藻活性物质, 从而筛选出抑藻活性菌株。

[0043] 实施例 2 抑藻率的计算方法

[0044] 1) 球形棕囊藻在 $20 \pm 1^\circ \text{C}$, 12h 光照, 12h 黑暗, $50 \mu \text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光照强度条件下, 于三角瓶中培养至指数期, 然后分装到 24 孔细胞培养板中, 每孔分装 2mL 藻细胞悬液, 适应生长 1d:

[0045] 2) 100 μL 待测培养物加入 24 孔板, 培养 2d;

[0046] 3) 取球形棕囊藻培养液, 200 μL 样品于 24 孔板, 用酶标仪检测 460nm 激发光激发下 680nm 处的荧光强度, 根据以下公式计算抑藻率, 同时观察藻细胞形态变化:

[0047] 抑藻率 = $(F_c - F_T) / F_c \times 100\%$

[0048] 式中, F_c 表示对照组荧光强度, F_T 表示实验组荧光强度。

[0049] 实施例 3 抑藻活性物质性质鉴定

[0050] 1) 海洋链霉菌 *Streptomyces malaysiensis* 04-6 接种于高氏一号培养基 28 ~ 37℃ 摇床, 180 ~ 250rpm 震荡培养 5 ~ 7d。发酵液在 10000 ~ 12000g 的离心力下离心 10 ~ 20min, 获得链霉菌 *Streptomyces malaysiensis* 04-6 培养液上清; 用乙酸乙酯萃取所得上清液, 减压浓缩, 干燥, 得乙酸乙酯萃取物。

[0051] 2) 温度处理实验设计: 对含抑藻活性物质的培养液上清进行 40℃、60℃、80℃、100℃ 及 120℃ 高压 30min 热处理, 设置 3 个平行实验组; 对照实验组为: 未处理培养液上

清;取 100 μ L 培养液上清加入 2mL 藻培养液中,培养 2d 后,取样按实施例 2 计算抑藻效率。实验结果(参见表 1)表明:该培养液上清进行温度梯度热处理后,其对球形棕囊藻的抑藻效率没有很大的变化,说明抑藻活性物质不能耐受 100 $^{\circ}$ C 以上高温处理。

[0052] 表 1 温度处理对抑藻活性物质抑藻效率的影响

[0053]

温度梯度处理 ($^{\circ}$ C)	抑藻效率 (%)		
	平行实验组 1	平行实验组 2	平行实验组 3
未处理	86.4	85.3	84.2
40	82.4	84.4	80.6
60	86.2	89.5	83.7
80	75.1	73.8	76.3
100	30.3	22.3	36.1
120	20.4	26.4	26.6

[0054] 3) pH 处理实验设计:测定培养液上清 pH 值,将培养液上清 pH 分别调至 1、3、5、7、9 和 11,2h 后再将其 pH 调回处理,设置 3 个平行实验组;取 100 μ L 无菌滤液加入 2mL 藻培养液中,培养 24h 后,取样按实施例 2 计算抑藻效率。实验结果(参见表 2)表明:该培养液上清进行酸化和碱化处理后,其对球形棕囊藻的抑藻效率没有很大的变化,说明抑藻活性物质在酸性条件和碱性条件下都比较稳定。

[0055] 表 2 pH 处理对抑藻活性物质抑藻效率的影响

[0056]

pH	抑藻效率 (%)		
	平行实验组 1	平行实验组 2	平行实验组 3
1	88.4	89.3	84.4
3	88.5	83.2	85.3
5	89.5	81.1	84.2
7	88.5	86.3	82.33
9	88.5	83.2	85.3
11	89.7	81.4	84.3

[0057] 4) 透析处理实验设计:利用分子截留量约为 1Kd 透析袋,对培养液上清进行透析处理,于 PBS 缓冲液透析 3h 后,转入新鲜 PBS 缓冲液继续透析 3h,设置 3 个平行实验组;对照组为未透析的培养液上清;取 100 μ L 培养液上清加入 2mL 藻培养液中,培养 24h 后,取样按实施例 2 计算抑藻效率。实验结果(参见表 3)表明:该培养液上清经过分子截留量约为 1Kd 的透析袋透析处理后,其对球形棕囊藻的抑藻效率明显降低,其抑藻效率平均仅为 21.4%,说明抑藻活性物质分子量小于 1Kd。

[0058] 表 3 透析处理对抑藻活性物质抑藻效率的影响

[0059]

培养液 处理方式	抑藻效率 (%)		
	平行实验组 1	平行实验组 2	平行实验组 3
未处理	87.7	86.8	87.2
透析处理	22.3	25.6	16.3

[0060] 5) 不同有机溶剂萃取实验设计:选择正丁醇、二氯甲烷、乙酸乙酯作为萃取剂,分别以 1 : 1 体积比萃取 500mL 培养液上清,重复 3 次萃取。500mL 培养液上清于旋转蒸发仪 30℃下真空蒸干,选择 500mL 乙腈溶解。各种有机溶剂提取物于旋转蒸发仪 30℃下真空蒸干,获得萃取粗提物。5mL DMSO 溶解粗提物,取 100 μ L DMSO 溶解物加入 2mL 藻培养液中,培养 24h 后,取样按实施例 2 计算抑藻效率,设置 3 个平行实验组,及添加 DMSO 到藻培养液对照组。实验结果(表 4)表明:该培养液上清经过不同极性有机溶剂萃取后,抑藻效率显示一定差异,乙酸乙酯萃取物抑藻率较高,平均为 87.9%,说明抑藻活性物质极性较弱容易被乙酸乙酯萃取出来。

[0061] 表 4 不同有机溶剂萃取物抑藻效率

[0062]

有机溶剂	抑藻效率 (%)		
	平行实验组 1	平行实验组 2	平行实验组 3
乙腈	11.1	19.5	14.2
正丁醇	78.8	73.1	75.4
二氯甲烷	79.1	71.4	74.7
乙酸乙酯	89.4	88.6	85.6

[0063] 实施例 4 抑藻活性组分硅胶柱层析

[0064] 链霉菌 *Streptomyces malaysiensis* 04-6 接种于高氏一号培养基 28 ~ 37℃摇床,180 ~ 250rpm 震荡培养 5 ~ 7d。发酵液在 10000 ~ 12000g 的离心力下离心 10 ~ 20min,获得链霉菌 *Streptomyces malaysiensis* 04-6 培养液上清。用乙酸乙酯萃取所得上清液,减压浓缩,干燥,得乙酸乙酯萃取物。

[0065] 100mg 乙酸乙酯萃取物溶于 1mL 乙酸乙酯中,上样于硅胶柱(170 \times 30mm,200-300目),洗脱剂:正己烷和乙酸乙酯的混合物,洗脱程序:体积比 1 : 2,20min ; 1 : 1,30min ; 1 : 0,30min ;洗脱流速:1mL/min ;用收集管收集洗脱液 2mL/管。

[0066] 实施例 5 抑藻活性组分薄层色谱 (Thin Layer Chromatography, TLC) 分析

[0067] 1) 如实施例 4,洗脱液利用 TLC 分析,展开剂为乙酸乙酯,显示剂:0.5%碘的氯仿溶液,根据展开图谱合并收集管内洗脱液。

[0068] 2) 合并洗脱液于旋转蒸发仪 30℃下真空蒸干,溶解于 DMSO,按实施例 2、实施例 3 中的方法验证抑藻活性,获得强效抑藻活性组分。

[0069] 实施例 6 抑藻活性组分高效液相色谱 (High-performance liquid chromatography, HPLC) 分析

[0070] 实施例 5 所得强效抑藻活性组分利用 HPLC 分析,洗脱程序:

[0071] 0 ~ 7.5min 85% 甲醇 / 水;

[0072] 7.5min ~ 10.5min 85% 甲醇 / 水 ~ 100% 甲醇;

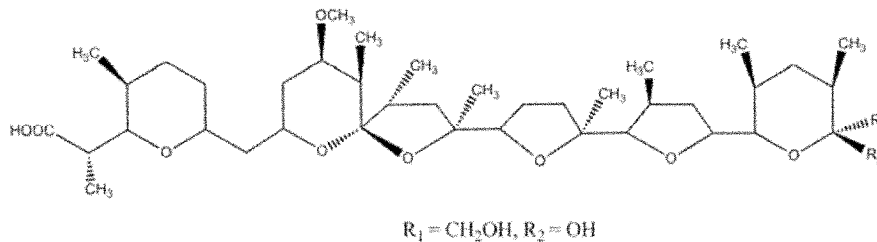
[0073] 10.5 ~ 22.5min 100% 甲醇。

[0074] 实验结果如图 1 所示,收集 10.5 ~ 12.5min 的洗脱液于旋转蒸发仪 30 ~ 45°C 下真空蒸干溶解于 DMSO,按实施例 2、实施例 3 验证抑藻活性。

[0075] 实施例 7 强效抑藻活性化合物的结构鉴定:

[0076] 实施例 6 抑藻活性检测,经 TLC 检测,以乙酸乙酯、二氯甲烷及氯仿在硅胶薄层板上展开均为一个斑点,并经 $^1\text{H-NMR}$ 检测,确定为纯化合物,结构式如下所示:

[0077]



[0078] 所述纯化合物的 ESI-MS 谱在 m/z 747.47 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 处显示分子的加合离子峰,结合 $^{13}\text{C-NMR}$ (DEPT) 谱和 $^1\text{H-NMR}$ 谱,推出其分子式为 $\text{C}_{40}\text{H}_{68}\text{O}_{11}$,相对分子质量为 742。 $^1\text{H-NMR}$ 谱显示有大量甲基、亚甲基以及 1 个甲氧基信号。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱的显示有 40 个 C,通过与 DEPT 的图谱比较,可明显得到:10 个 CH_3 (δ_c 分别为 59.53、29.00、22.76、16.98、16.41、16.12、14.38、13.39、13.07、11.48),10 个 CH_2 (δ_c 分别为 66.88、41.65、37.08、35.77、32.30、31.99、29.47、26.27、25.86、23.51),15 个 CH (δ_c 分别为 85.17、81.39、79.40、76.75、76.43、73.20、68.37、60.38、45.79、39.58、36.69、36.40、35.07、31.80、27.65),5 个季碳 (δ_c 分别为 183.83、107.49、97.15、84.78、82.31)。从 HMBC、HSQC、H-H COSY 及 NOSEY 的二维图谱,可把各 C 和 H 的相关归属确定。经 Scifinder 数据库检索,再与相应文献比对,然后综合其理化性质,确定与尼日利亚菌素一致。

[0079] 综上所述,本发明提取纯化获得的具有抑藻活性的化合物为尼日利亚菌素。

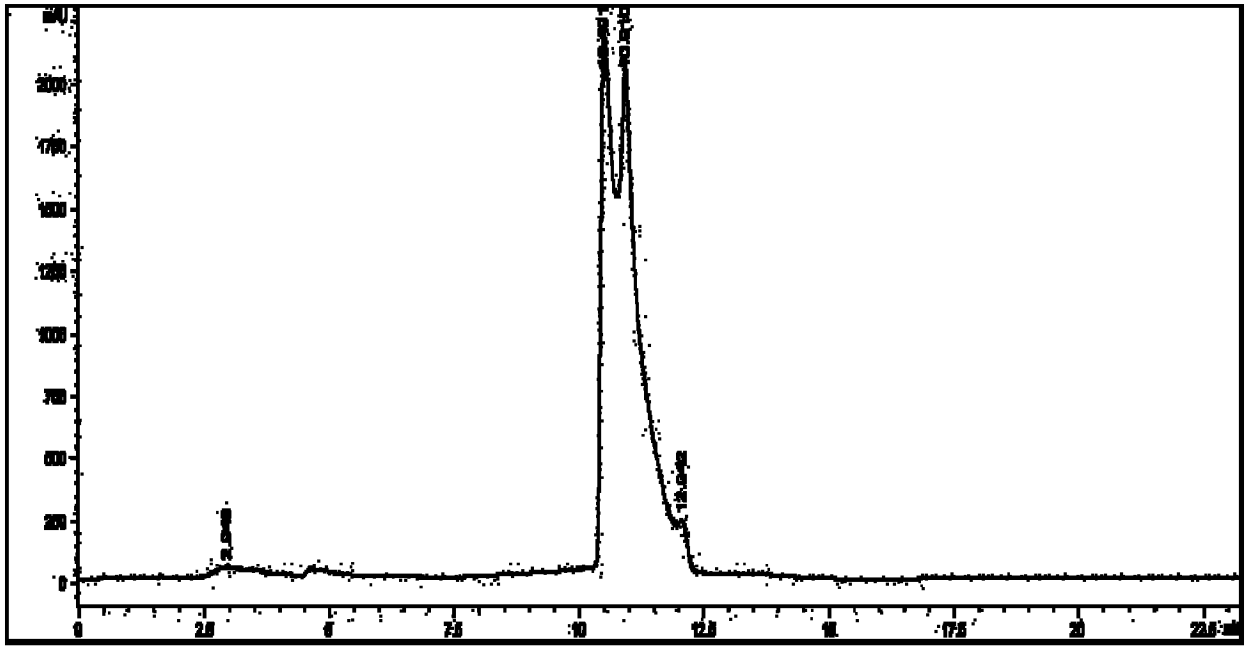


图 1