

武夷菌素高产基因工程菌株 *Streptomyces albulus* OoWysR 活性成分的分离鉴定

韦秋合, 施李鸣, 葛蓓宇, 张维, 杨森冷, 吕朝阳, 张克诚*

中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193

韦秋合, 施李鸣, 葛蓓宇, 张维, 杨森冷, 吕朝阳, 张克诚. 武夷菌素高产基因工程菌株 *Streptomyces albulus* OoWysR 活性成分的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1774-1785

Wei Qiuhe, Shi Liming, Ge Beibei, Zhang Wei, Yang Miaoling, Lü Zhaoyang, Zhang Kecheng. Isolation and identification of active ingredients from high wuyiencin-producing genetically engineered strain *Streptomyces albulus* OoWysR[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1774-1785

摘要:【背景】武夷菌素高产基因工程菌株 *Streptomyces albulus* OoWysR 具有明显的抑菌效果。【目的】明确 *S. albulus* OoWysR 的活性成分。【方法】采用柱层析法, 利用大孔吸附树脂、离子交换树脂和高效液相色谱等对 *S. albulus* OoWysR 的活性成分进行分离纯化, 经高分辨率电喷雾电离质谱(high-resolution electrospray ionization mass spectrometry, HR-ESI-MS)和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)等波谱技术对化合物化学结构进行鉴定, 并通过生长速率法测定化合物的生物活性。【结果】从 *S. albulus* OoWysR 中分离鉴定出 4 个化合物, 分别为对羟基苯甲酸(1)、吡咯-2-羧酸(2)、对羟基苯乙醇(3)和云南霉素(4)。化合物 1 对玉米弯孢病菌、番茄叶霉病菌、玉米小斑病菌和烟草赤星病菌具有一定的抑制作用; 化合物 2 对番茄灰霉病菌、大豆菌核病菌、苹果腐烂病菌、玉米小斑病菌、小麦赤霉病菌、稻瘟病菌和烟草赤星病菌具有一定的抑制作用; 化合物 3 对番茄灰霉病菌、苹果轮纹病菌、玉米小斑病菌和黄瓜炭疽病菌具有一定的抑制作用。【结论】*S. albulus* OoWysR 的活性成分除武夷菌素外还包括对羟基苯甲酸、吡咯-2-羧酸、对羟基苯乙醇和云南霉素。本研究结果为进一步开发与利用该菌株提供了理论依据。

关键词: 武夷菌素; 基因工程菌株; 活性成分; 分离鉴定; 生物活性

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201100)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0201100)

*Corresponding author: E-mail: zhangkecheng@sina.com

Received: 2021-07-20; Accepted: 2021-12-27; Published online: 2022-02-09

Isolation and identification of active ingredients from high wuyiencin-producing genetically engineered strain *Streptomyces albulus* OoWysR

WEI Qiuhe, SHI Liming, GE Beibei, ZHANG Wei, YANG Miaoling, LÜ Zhaoyang, ZHANG Kecheng*

Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: [Background] High wuyiencin-producing genetically engineered strain *Streptomyces albulus* OoWysR showcases pronounced antifungal effect. [Objective] To identify the active ingredients of *S. albulus* OoWysR. [Methods] The active ingredients of *S. albulus* OoWysR were separated and purified by the column chromatography of macroporous resin, ion-exchange resin column chromatography, and high-performance liquid chromatography, respectively. The chemical structures of compounds were identified by high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESI-MS), nuclear magnetic resonance (NMR), and other spectral methods. The biological activity of compounds was determined with the growth rate method. [Results] Four compounds were isolated and identified from *S. albulus* OoWysR, which were respectively (1) p-hydroxybenzoic acid, (2) pyrrole-2-carboxylic acid, (3) p-hydroxyphenethyl alcohol, and (4) yunnanmycin. Compound 1 showed inhibitory effect on *Curvularia lunata*, *Fulvia fulva*, *Alternaria alternata*, and *Bipolaris maydis*. Compound 2 exerted certain inhibitory activity against *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *B. maydis*, *Valsa ceratosperma*, *Fusarium graminearum*, *Pyricularia oryzae*, and *A. alternata*. Compound 3 had specific inhibitory activity against *B. cinerea*, *B. maydis*, *Botryosphaeria dothidea*, and *Colletotrichum gloeosporioides*. [Conclusion] The active ingredients of *S. albulus* OoWysR include p-hydroxybenzoic acid, pyrrole-2-carboxylic acid, p-hydroxyphenethyl alcohol, and yunnanmycin, in addition to wuyiencin. This study provides a theoretical basis for further development and utilization of this strain.

Keywords: wuyiencin; genetically engineered strain; active ingredients; isolation and identification; biological activity

武夷菌素是由小白链霉菌武夷变种 (*Streptomyces albulus* var. *wuyiensis*) CK-15 产生的农用抗生素^[1], 对番茄、黄瓜等作物的真菌性病害有良好的防治效果^[2-4], 同时对一些水果的贮藏病害也具有一定的防治效果, 可作为防腐保鲜剂。除了防治作用, 其还具有提高植株免疫力、提高果实品质及促生增产的作用^[5-6]。

为了提高武夷菌素产量、降低工业化生产成本, 本实验室前期开展了武夷菌素产生菌基

因工程育种研究, 明确了调控基因 *wysR3* 与菌株表型相关, 其缺失突变株的生长速率加快^[7]; 调控基因 *wysR* 与武夷菌素的生物合成相关, 其过表达菌株的武夷菌素产量显著提高^[8]; 过量表达 *wysR3* 基因缺失突变株 $\Delta wysR3$ 中的 *wysR* 基因, 获得了武夷菌素高产基因工程菌株 *Streptomyces albulus* OoWysR, 该菌株发酵周期缩短了约 12 h, 武夷菌素产量提高了 40%, 抑菌活性提高了 7%^[9]。

为了进一步明确 *S. albulus* OoWysR 的活性成分, 本研究采用柱层析法结合质谱技术和核磁共振波谱技术对其活性成分进行分离鉴定。由于武夷菌素产生菌的主要活性成分集中在水溶性部分^[10-11], 因此, 本研究对该菌株发酵液的水溶性部分进行分离鉴定, 以期明确 *S. albulus* OoWysR 的活性成分, 为解析该菌株的抑菌活性及生产应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

武夷菌素高产基因工程菌株 *S. albulus* OoWysR 由中国农业科学院植物保护研究所农用抗生素研究组提供, 该菌株于 2019 年 1 月构建成功^[9], 具有发酵周期短、武夷菌素产量高和抑菌效果好的特点。

植物病原真菌: 番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、杨树水泡溃疡病菌 (*Botryosphaeria ribis*)、大豆菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*)、苹果轮纹病菌 (*Botryosphaeria dothidea*)、苹果腐烂病菌 (*Valsa ceratosperma*)、葡萄黑腐病菌 (*Physalospora obtusa*)、小麦纹枯病菌 (*Rhizoctonia cerealis*)、玉米弯孢病菌 (*Curvularia lunata*)、小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、芦笋茎枯病菌 [*Phomopsis asparagi* (Sacc.) Bubak]、稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*)、番茄叶霉病菌 (*Fulvia fulva*)、玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*)、黄瓜炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、剑麻炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc]、棉铃疫病菌 (*Phytophthora boehmeriae* Sawada) 和桃根霉病菌 (*Rhizopus stolonifer*), 由中国农业

科学院植物保护研究所农用抗生素研究组提供, 均具有致病性。

1.1.2 主要试剂和仪器

二水合草酸, 国药集团化学试剂有限公司; 色谱级三氟乙酸, 北京迈瑞达科技有限公司; 色谱级甲醇、乙腈, Merck 公司; 氨水、对羟基苯甲酸、吡咯-2 羧酸、对羟基苯乙醇等试剂均为国产分析纯。

旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; 真空冷冻干燥仪, 维特斯公司; 分析型高效液相色谱仪, 岛津公司; 制备型高效液相色谱仪, 北京创新通恒科技有限公司; 高分辨率质谱仪, Thermo Fisher Scientific 公司; 核磁共振仪, Bruker Biospin Billerica 公司。

1.1.3 层析柱填料

DIAION HP20 大孔吸附树脂, 三菱化学公司; 钠型 732 阳离子交换树脂, 北京索莱宝科技有限公司。

1.1.4 培养基

MS 培养基: 黄豆粉(平均粒径为 13 μm) 2.0 g, 甘露醇 2.0 g, 琼脂 1.7 g, 加蒸馏水至 100 mL。1 \times 10⁵ Pa 高压灭菌 30 min 备用。

种子培养基: 葡萄糖 2.0 g, 蛋白胨 0.6 g, 酵母粉 0.6 g, NaCl 1.0 g, 加蒸馏水至 100 mL。1 \times 10⁵ Pa 高压灭菌 30 min 备用。

发酵培养基: 黄豆粉(平均粒径为 13 μm) 2.0 g, (NH₄)₂SO₄ 0.4 g, 葡萄糖 2.0 g, 玉米粉 3.0 g, CaCO₃ 0.3 g, 加蒸馏水至 100 mL。1 \times 10⁵ Pa 条件下灭菌 30 min 备用。

PDA 培养基: PDA 粉末 3.9 g, 加蒸馏水至 100 mL。1 \times 10⁵ Pa 高压灭菌 30 min 备用。

1.2 方法

1.2.1 *S. albulus* OoWysR 发酵液的制备

将 *S. albulus* OoWysR 接种到 MS 培养基上(直径为 90 mm 的平皿, 加入 25 mL 的 MS 培养

基), 28 °C 恒温培养 7 d 后, 接种于种子培养基中, 28 °C、220 r/min 培养 24 h 获得种子液, 按 2% 的接种量将种子液接种于发酵培养基中, 28 °C、220 r/min 发酵 72 h, 25 °C、6 000 r/min 离心 15 min 去除培养基残渣及菌体后即得发酵液。

1.2.2 *S. albulus* OoWysR 活性成分的分离纯化与鉴定

(1) 发酵液预处理

向发酵液中加入草酸, 调节 pH 值至 2.0–2.5, 静置过夜, 使发酵液中的钙离子与草酸充分结合产生草酸钙沉淀, 同时酸性环境能使发酵液中的蛋白质变性产生沉淀, 25 °C、6 000 r/min 离心 15 min 去除沉淀, 发酵液经旋转蒸发器减压浓缩后, 获得发酵液粗提物。

(2) 柱层析法初步分离纯化

粗提物通过 DIAION HP20 大孔吸附树脂层析柱吸附, 以蒸馏水为流动相进行洗脱, 收集洗脱液。经高效液相色谱仪检测后合并相同组分, 减压浓缩后再通过 732 阳离子交换树脂进行吸附。先用去离子水洗脱, 除去糖分等一些未解离的杂质后, 再使用 0.5 mol/L 的氨水进行解吸, 收集洗脱液。经高效液相色谱仪检测后合并相同组分, 减压浓缩后待进一步精制。

(3) 制备型高效液相色谱精制

获得的组分用适量蒸馏水溶解后, 使用制备型高效液相色谱仪进行纯化。

(4) 化合物化学结构鉴定

采用 HR-ESI-MS、氢谱核磁共振(^1H -nuclear magnetic resonance, ^1H -NMR)、碳谱核磁共振(^{13}C -nuclear magnetic resonance, ^{13}C -NMR)等波谱技术鉴定化合物的化学结构, 并与已知化合物的波谱数据进行比较, 确定化合物的化学结构。

高效液相色谱条件: 使用 CAPCELL PAK

C₁₈ AQ S3 4.6 mm×250 mm 色谱柱, 以 1% 三氟乙酸水溶液为流动相, 1 mL/min 的流速进行洗脱, 柱温为 25 °C, 检测波长为 254 nm。

制备液相色谱条件: 使用 DAC-50 50 mm×500 mm 色谱柱, 以 1% 三氟乙酸水溶液为流动相, 80 mL/min 的流速进行洗脱, 柱温为 25 °C, 检测波长为 254 nm。

1.2.3 化合物生物活性的测定

(1) 植物病原真菌的活化

将番茄灰霉病菌(*B. cinerea*)、杨树水泡溃疡病菌(*B. ribis*)和大豆菌核病菌(*S. sclerotiorum*)等 20 种植物病原真菌分别接种到 PDA 培养基上活化, 25 °C 恒温条件下培养至菌落直径达培养皿直径的一半左右, 保证菌落边缘处菌丝鲜嫩即可使用。

(2) 生物活性的测定

采用生长速率法^[12]测定化合物的生物活性, 分别将各化合物溶于甲醇中, 配制成浓度为 200 mg/mL 的母液, 采用 0.22 μm 孔径的无菌滤膜过滤后备用。分别吸取 50、150 和 250 μL 的母液加入到灭菌后温热(约 40 °C)的 100 mL PDA 培养基中, 制成化合物终浓度分别为 100、300 和 500 μg/mL 的培养基。每个实验组都设有空白对照并以甲醇作为阴性对照, 从活化好的病原真菌菌落边缘处切取制成菌饼, 分别接种到上述 3 种不同处理组培养基上, 菌丝面朝下, 每个处理设置 3 个重复, 25 °C 恒温培养至空白对照组病原真菌菌丝生长至培养皿边缘。用十字交叉法测量各病原真菌菌落直径。按照公式(1)计算抑菌率。

抑菌率(%)=

$$\frac{(\text{阴性对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径})}{\text{阴性对照组菌落直径}} \times 100$$

(1)

1.2.4 数据统计与分析

采用 SPSS 20 单因素方差分析结果的显著性, 采用 GraphPad Prism 8 作图, 结果以平均数 \pm 标准误差表示。

2 结果与分析

2.1 化合物化学结构的鉴定

化合物 1 (图 1): 白色结晶, HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 137.024 3 ($[M-H]^-$, $C_7H_5O_3$ 计算值 137.024 4)。 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) 显示 4 个芳香氢信号 δ_H 7.87 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2, 6)、6.81 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3, 5)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) 显示 7 个碳信号 δ_C 122.7 (C-1)、133.0 (C-2, 6)、116.0 (C-3, 5)、163.4 (C-4) 和 170.1 (C-7)。以上物理性质和波谱数据与文献[13-14]的报道基本一致, 因此鉴定化合物 1 为对羟基苯甲酸。

化合物 2 (图 2): 灰白色粉末, HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 110.204 7 ($[M-H]^-$, $C_5H_4O_2N$ 计算值 110.204 7)。 1H NMR 显示 2 个活泼氢质子信号 δ_H 12.19 (1H, s, COOH)、11.70 (1H, s, NH), 3 个芳香氢信号 δ_H 6.71 (1H, m, H-3)、6.13 (1H, m, H-4) 和 6.95 (1H, m, H-5)。 ^{13}C NMR 显示 5 个碳信号 δ_C 109.3 (C-4)、114.6 (C-3)、122.9 (C-2)、123.8 (C-5) 和 162.3 (COOH)。以上数据和文献[15]的报道基本一致, 因此确定化合物 2 为吡咯-2-羧酸。

化合物 3 (图 3): 白色结晶, HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 137.060 79 ($[M-H]^-$, $C_8H_9O_2$

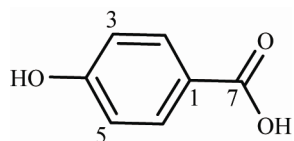


图 1 化合物 1 的化学结构

Figure 1 The chemical structure of compound 1.

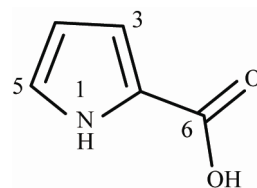


图 2 化合物 2 的化学结构

Figure 2 The chemical structure of compound 2.

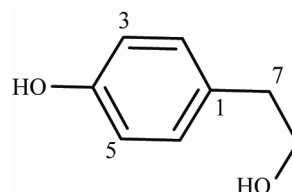


图 3 化合物 3 的化学结构

Figure 3 The chemical structure of compound 3.

计算值 137.060 8)。 1H NMR 显示 1 个活泼氢质子信号 δ_H 9.11 (1H, s, OH), 4 个芳香氢信号 δ_H 6.97 (2H, d, $J=7.0$ Hz, H-2, 6)、6.65 (2H, d, $J=7.0$ Hz, H-3, 5), 2 个亚甲基信号包括一个不含氧亚甲基信号 δ_H 2.59 (2H, t, $J=7.0$ Hz, H-7) 和一个含氧亚甲基信号 3.51 (2H, t, $J=7.0$ Hz, H-8)。 ^{13}C NMR 显示 8 个碳信号 δ_C 129.4 (C-1)、129.6 (C-2, 6)、114.9 (C-3, 5)、155.4 (C-4)、38.2 (C-7) 和 62.6 (C-8)。以上数据和文献[16]的报道基本一致, 因此化合物 3 为对羟基苯乙醇。

化合物 4 (图 4): 白色粉末, HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 445.167 6 ($[M+H]^+$, $C_{16}H_{25}N_6O_9$ 计算值 445.167 7)。 1H NMR 显示在低场区存在 2 个芳香质子 δ_H 6.12 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-5)、7.83 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-6), 1 个糖上的端基质子 δ_H 5.69 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-1'), 5 个连氧次甲基质子 δ_H 4.55 (1H, t, $J=5.0$ Hz, ser- α)、3.81 (2H, m, H-2', 3')、4.04 (1H, m, H-4')、4.01 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-5'), 3 个亚甲基质子 δ_H 3.87 (2H, m, ser- β)、3.96 (1H, d, $J=16.0$ Hz, gly- α) 和 4.00 (1H, d, $J=16.0$ Hz, gly- α)。 ^{13}C NMR

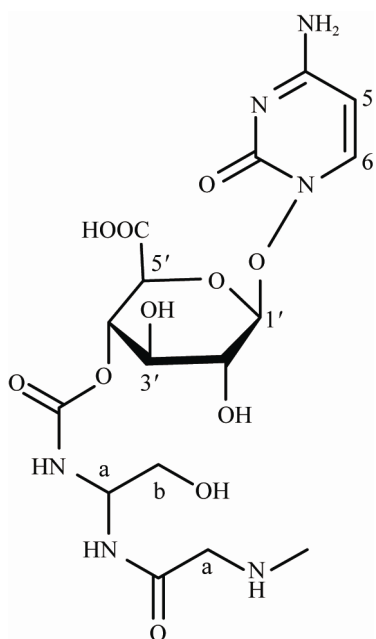


图 4 化合物 4 的化学结构

Figure 4 The chemical structure of compound 4.

显示 16 个碳信号包括 5 个季碳 δ_C 160.6 (C-2)、168.8 (C-4)、176.9 (C-6')、174.2 (ser-CO) 和 169.3 (gly-CO), 8 个次甲基碳 δ_C 100.0 (C-5)、144.9 (C-6)、86.0 (C-1')、76.6 (C-2')、74.7 (C-3')、56.3 (C-4')、80.9 (C-5') 和 58.5 (ser- α), 2 个亚甲基碳 δ_C 64.2 (ser- β) 和 52.4 (gly- α), 1 个甲基碳 δ_C 35.7 (-NCH₃)。以上数据和文献[17]的报道基本一致, 因此确定化合物 4 为云南霉素。

2.2 化合物生物活性的测定

2.2.1 不同浓度化合物 1 的抑菌活性

由图 5 可看出, 化合物 1 对玉米弯孢病菌、番茄叶霉病菌、烟草赤星病菌和玉米小斑病菌具有一定的抑制作用。由表 1 和图 6 可知, 化合物 1 对受试菌的抑制作用由强至弱依次为烟草赤星病菌、玉米小斑病菌、番茄叶霉病菌、玉米弯孢病菌。

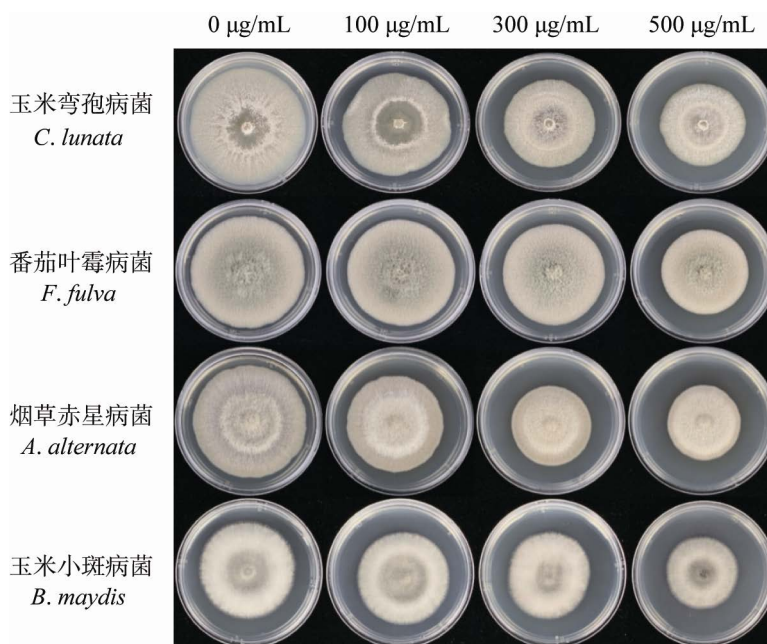


图 5 不同浓度化合物 1 对病原真菌的抑制效果 图中由上而下分别为玉米弯孢病菌、番茄叶霉病菌、烟草赤星病菌和玉米小斑病菌; 化合物 1 的终浓度从左到右分别为 0、100、300、500 $\mu\text{g/mL}$

Figure 5 The inhibitory effects of compound 1 with different concentrations against pathogenic fungi. From top to bottom in the figure are *C. lunata*, *F. fulva*, *A. alternata*, and *B. maydis*; the final concentrations of compound 1 from left to right are 0, 100, 300, and 500 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

表 1 不同浓度化合物 1 对病原真菌的抑制率

Table 1 The inhibition rates of compound 1 with different concentrations against pathogenic fungi (%)

病原真菌 Pathogenic fungi	化合物 1 终浓度 The final concentrations of compound 1 ($\mu\text{g/mL}$)			
	0	100	300	500
玉米弯孢病菌 <i>C. lunata</i>	0.00d	6.33 \pm 0.78c	19.91 \pm 0.00b	27.15 \pm 0.45a
番茄叶霉病菌 <i>F. fulva</i>	0.00d	6.87 \pm 0.77c	10.86 \pm 0.38b	24.17 \pm 0.00a
烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>	0.00d	15.77 \pm 0.45c	30.18 \pm 0.23b	36.26 \pm 0.23a
玉米小斑病菌 <i>B. maydis</i>	0.00d	5.36 \pm 0.00c	12.30 \pm 1.41b	31.55 \pm 0.27a

注：表中数据为平均值 \pm 标准误差；同一行不同的小写字母表明：在 $P<0.05$ 水平上，不同浓度化合物 1 的抑菌率有显著差异

Note: Data represent the mean \pm standard error of three independent experiments; different lowercase letters in the same line indicate that at the $P<0.05$ level, the inhibition rates of compound 1 with different concentrations are significantly different.

2.2.2 不同浓度化合物 2 的抑菌活性

由图 7 可看出,化合物 2 对番茄灰霉病菌、大豆菌核病菌、苹果腐烂病菌、玉米小斑病菌、小麦赤霉病菌、稻瘟病菌和烟草赤星病菌表现出不同程度的抑制作用。由表 2 和图 8 可知,化合物 2 浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时,对大豆菌核病菌、玉米小斑病菌、小麦赤霉病菌和稻瘟病菌具有较强的抑制作用,其中对大豆菌核病菌抑菌作用最强,抑菌圈直径最小,抑菌率达到 65.80%。

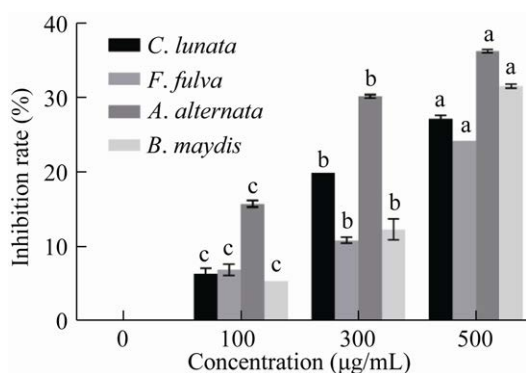


图 6 不同浓度化合物 1 对病原真菌的抑制率
图中不同的小写字母表明：在 $P<0.05$ 水平上，不同浓度化合物 1 的抑菌率有显著差异

Figure 6 The inhibition rates of compound 1 with different concentrations against pathogenic fungi. Different lowercase letters indicate that at the $P<0.05$ level, the inhibition rates of compound 1 with different concentrations are significantly different.

2.2.3 不同浓度化合物 3 的抑菌活性

由图 9 可看出,化合物 3 对番茄灰霉病菌、苹果轮纹病菌、玉米小斑病菌和黄瓜炭疽病菌具有一定的抑制作用。由表 3 和图 10 可知,化合物 3 浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时,4 种受试菌对化合物 3 表现出不同的敏感性,其中黄瓜炭疽病菌对化合物 3 最敏感。

3 讨论与结论

武夷菌素高产基因工程菌株 *S. albulus* OoWysR 在野生型菌株 CK-15 的基础上采用基因工程方法筛选获得,通过抑菌试验发现该菌株发酵液抑菌效果明显提高,为了进一步明确该菌株的活性成分,采用柱层析法对其发酵液进行了分离纯化。首先用草酸调节发酵液 pH 值至 2.0–2.5,以除去发酵液中的钙离子和蛋白质等部分杂质,获得发酵液粗提物。前期武夷菌素产生菌的活性成分的分离纯化采用活性炭对发酵液进行吸附,但活性炭对武夷菌素的吸附能力过强,存在解吸困难的问题,造成武夷菌素的大量损失。由于武夷菌素极性较强且不能被树脂吸附的特点,本研究采用非极性的 DIAION HP20 大孔吸附树脂对发酵液进行吸附,以水为流动相进行洗脱,能够将武夷菌素完全洗脱下来,提高了武夷菌素的收率,同时

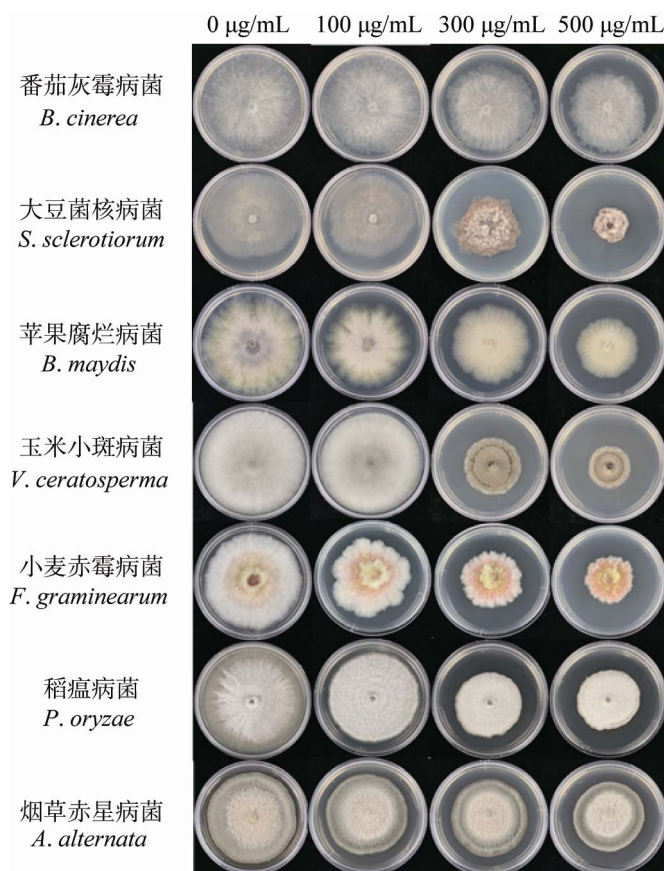


图 7 不同浓度化合物 2 对病原真菌的抑制效果 图中由上而下分别为番茄灰霉病菌、大豆菌核病菌、苹果腐烂病菌、玉米小斑病菌、小麦赤霉病菌、稻瘟病菌、烟草赤星病菌；化合物 2 的终浓度从左到右分别为 0、100、300、500 µg/mL

Figure 7 The inhibitory effects of compound 2 with different concentrations against pathogenic fungi. From top to bottom in the figure are *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *B. maydis*, *V. ceratosperma*, *F. graminearum*, *P. oryzae*, and *A. alternata*; the final concentrations of compound 2 from left to right are 0, 100, 300, and 500 µg/mL, respectively.

表 2 不同浓度化合物 2 对病原真菌的抑制率

Table 2 The inhibition rates of compound 2 with different concentrations against pathogenic fungi (%)

病原真菌 Pathogenic fungi	化合物 2 终浓度 The final concentrations of compound 2 (µg/mL)			
	0	100	300	500
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	0.00d	5.88±1.36c	16.08±1.04b	25.50±1.41a
大豆菌核病菌 <i>S. sclerotiorum</i>	0.00d	3.46±1.89c	34.63±3.85b	65.80±1.15a
苹果腐烂病菌 <i>B. maydis</i>	0.00d	15.51±0.71c	24.08±0.71b	38.78±0.71a
玉米小斑病菌 <i>V. ceratosperma</i>	0.00d	3.14±0.39c	44.71±0.00b	55.88±0.34a
小麦赤霉病菌 <i>F. graminearum</i>	0.00d	21.96±2.57c	36.47±0.68b	46.67±0.78a
稻瘟病菌 <i>P. oryzae</i>	0.00d	13.73±0.39c	28.24±0.68b	41.18±2.04a
烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>	0.00d	10.67±0.77c	17.78±0.44b	24.89±0.44a

注: 表中数据为平均值±标准误差; 同一行不同的小写字母表明: 在 $P<0.05$ 水平上, 不同浓度化合物 2 的抑菌率有显著差异
 Note: Data represent the mean±standard error of three independent experiments; different lowercase letters in the same line indicate that at the $P<0.05$ level, the inhibition rates of compound 2 with different concentrations are significantly different.

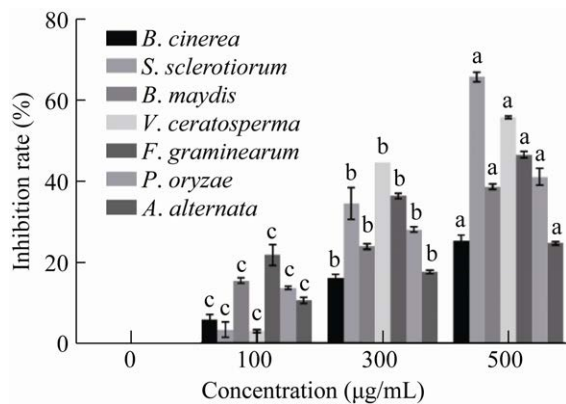


图 8 不同浓度化合物 2 对病原真菌的抑制率
图中不同的小写字母表明：在 $P < 0.05$ 水平上，不同浓度化合物 2 的抑菌率有显著差异

Figure 8 The inhibition rates of compound 2 with different concentrations against pathogenic fungi. Different lowercase letters indicate that at the $P < 0.05$ level, the inhibition rates of compound 2 with different concentrations are significantly different.

使武夷菌素与非极性物质分开，去除了部分杂质和色素。然而以水为流动相进行洗脱时，发酵液中大部分糖分会随着武夷菌素一同洗脱下来，造成粗提物含糖量高。如何高效去除糖分是分离纯化工作的难点。732 阳离子交换树脂对可解离的物质具有非常优越的分离性能，而糖分作为非电解质不能吸附到树脂上，当以水为流动相进行洗脱时，可将糖分与解离的物质分开。因此，本研究以 732 阳离子交换树脂为层析柱填料，建立了去除糖分的分离纯化方法，发现粗提物经过 732 阳离子交换树脂后黏度明显降低，证明样品糖分少，达到了高效去除糖分的效果。采用制备型高效液相色谱仪对分离到的组分进行精制，获得了 4 个化合物。利用 HR-ESI-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 等波谱技术对化合物的化学结构进行鉴定，并与文献中已

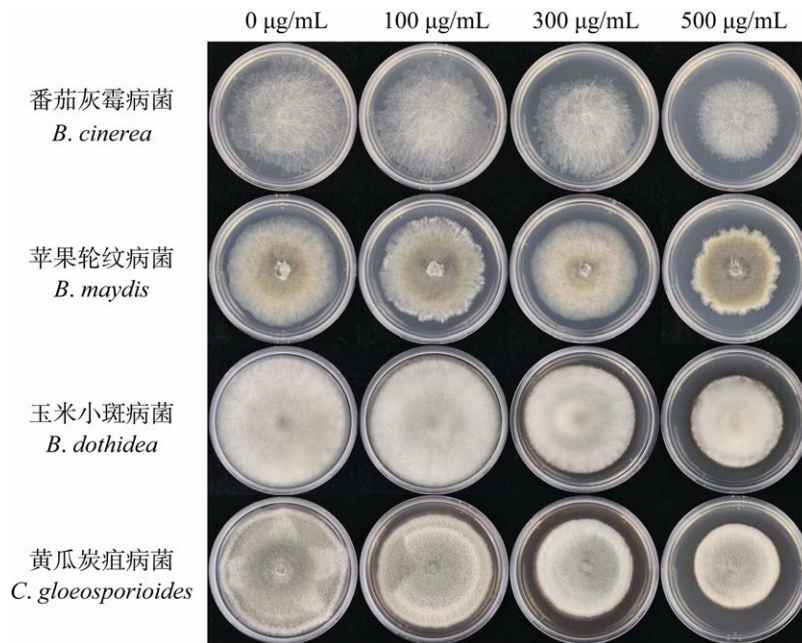


图 9 不同浓度化合物 3 对病原真菌的抑制效果 图中由上而下分别为番茄灰霉病菌、苹果轮纹病菌、玉米小斑病菌和黄瓜炭疽病菌；化合物 3 的终浓度从左到右分别为 0、100、300 和 500 µg/mL

Figure 9 The inhibitory effect of compound 3 with different concentrations against pathogenic fungi. From top to bottom in the figure are *B. cinerea*, *B. maydis*, *B. dothidea*, and *C. gloeosporioides*; the final concentrations of compound 3 from left to right are 0, 100, 300, and 500 µg/mL, respectively.

表 3 不同浓度化合物 3 对病原真菌的抑制率

Table 3 The inhibition rates of compound 3 with different concentrations against pathogenic fungi (%)

病原真菌 Pathogenic fungi	化合物 3 终浓度 The final concentrations of compound 3 ($\mu\text{g/mL}$)			
	0	100	300	500
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	0.00d	1.36 \pm 1.20c	11.36 \pm 2.08b	28.64 \pm 1.20a
苹果轮纹病菌 <i>B. maydis</i>	0.00d	9.82 \pm 0.45c	15.63 \pm 1.55b	24.11 \pm 1.61a
玉米小斑病菌 <i>B. dothidea</i>	0.00c	0.00 \pm 0.00c	12.94 \pm 0.68b	29.80 \pm 0.39a
黄瓜炭疽病菌 <i>C. gloeosporioides</i>	0.00d	8.23 \pm 1.48c	21.81 \pm 1.65b	33.33 \pm 0.00a

注: 表中数据为平均值 \pm 标准误差; 同一行不同的小写字母表明: 在 $P<0.05$ 水平上, 不同浓度化合物 3 的抑菌率有显著差异

Note: Data represent the mean \pm standard error of three independent experiments; different lowercase letters in the same line indicate that at the $P<0.05$ level, the inhibition rates of compound 3 with different concentrations are significantly different.

知化合物的波谱数据进行比较, 确定 4 个化合物分别为对羟基苯甲酸、吡咯-2-羧酸、对羟基苯乙醇和云南霉素。

据报道, 对羟基苯甲酸对金黄色葡萄球菌、肠系膜链球菌、酿酒酵母、白色念珠菌和枯草芽孢杆菌具有一定的抑制作用, 而有关该化合物对植物病原真菌的抑制作用鲜见报道^[18]。吡咯-2-羧酸对核盘菌、辣椒疫霉病菌和黑曲霉具

有良好的抑制效果^[19-21]; 对羟基苯乙醇对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和绿脓杆菌具有良好的抑菌活性, 但对一些植物病原真菌如苹果腐烂病菌、玉米大斑病菌、禾谷镰刀菌、柑橘炭疽病菌和水稻纹枯病菌无抑制作用^[22]; 云南霉素对黄瓜和烟草花叶病毒以及由这 2 种病毒引起的番茄、辣椒、大白菜等作物的病毒病、花叶病等均具有良好的防治效果^[23]。本研究采用生长速率法, 以 20 种植物病原真菌为试验对象, 对 4 个化合物的生物活性进行了测定。由于受分离得到的化合物含量的限制, 仅对已经商品化的对羟基苯甲酸、吡咯-2-羧酸和对羟基苯乙醇的生物活性进行测定。结果表明, 对羟基苯甲酸除了对细菌有作用之外, 还对植物病原真菌如玉米弯孢病菌、番茄叶霉病菌、玉米小斑病菌和烟草赤星病菌具有一定的抑制作用; 吡咯-2-羧酸对番茄灰霉病菌、大豆菌核病菌、苹果腐烂病菌、玉米小斑病菌、小麦赤霉病菌、稻瘟病菌和烟草赤星病菌具有一定的抑制作用; 对羟基苯乙醇对番茄灰霉病菌、苹果轮纹病菌、玉米小斑病菌和黄瓜炭疽病菌具有一定的抑制作用。

本研究丰富了武夷菌素高产基因工程菌株 *S. albulus* OoWysR 活性成分的种类, 初步解析了该菌株抑菌效果明显的原因, 为进一步开发与利用该菌株提供了理论依据。

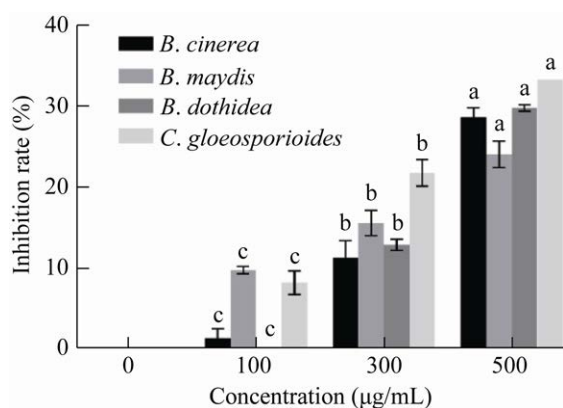


图 10 不同浓度化合物 3 对病原真菌的抑制率
图中不同的小写字母表明: 在 $P<0.05$ 水平上, 不同浓度化合物 3 的抑菌率有显著差异

Figure 10 The inhibition rates of compound 3 with different concentrations against pathogenic fungi. Different lowercase letters indicate that at the $P<0.05$ level, the inhibition rates of compound 3 with different concentrations are significantly different.

REFERENCES

- [1] Liu BH, Ge BB, Ma JJ, Wei QH, Khan AA, Shi LM, Zhang KC. Identification of WysP as an activator of morphological development in *Streptomyces albulus* CK-15[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2550
- [2] Yang M, Wei Q, Shi L, Wei Z, Lü Z, Asim N, Zhang K, Ge B. Wuyiencin produced by *Streptomyces albulus* CK-15 displays biocontrol activities against cucumber powdery mildew[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(6): 2957-2970
- [3] Yang ML, Zhang W, Lü Z, Shi LM, Zhang KC, Ge BB. Evaluation of the inhibitory effects of wuyiencin, a secondary metabolite of *Streptomyces albulus* CK-15, against *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*[J]. *Plant Disease*, 2022, 106(1): 156-164
- [4] 施李鸣. 武夷菌素有效成分分离鉴定、防病机制及对土壤细菌的影响研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2019
- Shi LM. The study on isolation and identification of the effective components of wuyiencin, the grey mould prevention mechanism and impact on soil bacteria[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese)
- [5] 曾洪梅, 石义萍. 防治作物真菌病害新农药: 武夷菌素[J]. *精细与专用化学品*, 2003, 11(S1): 15-16, 14
- Zeng HM, Shi YP. Wuyiencin, a new antibiotic for controlling crop fungi diseases[J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2003, 11(S1): 15-16, 14 (in Chinese)
- [6] 武哲, 孙蕾, 刘彦彦, 王家旺, 张克诚. 生物农药武夷菌素对保护地番茄灰霉病的防治效果[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(25): 173-178
- Wu Z, Sun L, Liu YY, Wang JW, Zhang KC. Effects of bio-pesticide wuyiencin on controlling tomato gray mould in protected field[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(25): 173-178 (in Chinese)
- [7] Ge BB, Liu Y, Liu BH, Zhao WJ, Zhang KC. Characterization of novel DeoR-family member from the *Streptomyces ahngroscopicus* strain CK-15 that acts as a repressor of morphological development[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(20): 8819-8828
- [8] Liu YY, Ryu H, Ge BB, Pan GH, Sun L, Park K, Zhang KC. Improvement of wuyiencin biosynthesis in *Streptomyces wuyiensis* CK-15 by identification of a key regulator, WysR[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 24(12): 1644-1653
- [9] Wei Q, Aung A, Liu B, Ma J, Shi L, Zhang K, Ge B. Overexpression of *wysR* gene enhances wuyiencin production in Δ *wysR3* mutant strain of *Streptomyces albulus* var. *wuyiensis* strain CK-15[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129(3): 565-574
- [10] Cui ZJ, Zhang KC, She GM, Lin YN, Sun L, Cheng Y, Tan BB. Antimicrobial activity investigation on wuyiencin fractions of different polarity[J]. *Molecules*: Basel, Switzerland, 2010, 15(5): 3179-3185
- [11] 李海涛. 农抗武夷菌素的分离纯化和结构鉴定[D]. 北京: 中国协和医科大学中国医学科学院硕士学位论文, 2001
- Li HT. Separation, purification and structural identification of agricultural antibiotic wuyiencin[D]. Beijing: Master's Thesis of Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, 2001 (in Chinese)
- [12] 盖智星, 王日葵, 贺明阳, 周炼, 韩冷, 黄小兰. 肉桂酸钾对柑橘采后主要病原真菌的抑制作用[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(3): 109-113
- Ge ZX, Wang RK, He MY, Zhou L, Han L, Huang XL. Antifungal activity of potassium cinnamate against the main postharvest fungal pathogens of citrus fruits[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(3): 109-113 (in Chinese)
- [13] El-Gendy MMA, Shaaban M, Shaaban KA, El-Bondkly AM, Laatsch H. Essramycin: a first triazolopyrimidine antibiotic isolated from nature[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2008, 61(3): 149-157
- [14] Matsui T, Kudo A, Tokuda S, Matsumoto K, Hosoyama H. Identification of a new natural vasorelaxant compound, (+)-osbeckic acid, from rutin-free tartary buckwheat extract[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(20): 10876-10879
- [15] 姚蓉, 马明, 付晖, 单伟光, 林文翰. 海洋放线菌 *Kocuria* sp. 次级代谢产物的研究[J]. *中国海洋药物*, 2017, 36(3): 11-17
- Yao R, Ma M, Fu H, Shan WG, Lin WH. Studies on the secondary metabolites of marine actinomycete *Kocuria* sp.[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2017, 36(3): 11-17 (in Chinese)
- [16] Adhami HR, Zehl M, Dangel C, Dorfmeister D, Stadler M, Urban E, Hewitson P, Ignatova S, Krenn L. Preparative isolation of oleocanthal, tyrosol, and hydroxytyrosol from olive oil by HPLC[J]. *Food Chemistry*, 2015, 170: 154-159
- [17] 陈文君, 戚长菁, 潘俊. 新的抗肿瘤抗生素云南霉素 II. 提纯、理化性质与鉴别[J]. *中国抗生素杂志*, 1998, 23(3): 170-174
- Chen WJ, Qi CQ, Pan J. Yunnanmycin, a novel

- antitumor antibiotic II. Extraction, purification, physico chemical properties and identification[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 1998, 23(3): 170-174 (in Chinese)
- [18] Cho JY, Moon JH, Seong KY, Park KH. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1998, 62(11): 2273-2276
- [19] He H, Hao X, Zhou W, Shi N, Feng J, Han L. Identification of antimicrobial metabolites produced by a potential biocontrol actinomycete strain A217[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(4): 1143-1152
- [20] Nguyen XH, Naing KW, Lee YS, Kim YH, Moon JH, Kim KY. Antagonism of antifungal metabolites from *Streptomyces griseus* H7602 against *Phytophthora capsici*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55(1): 45-53
- [21] Gálvez-Iriqui AC, Cortez-Rocha MO, Burgos-Hernández A, Calderón-Santoyo M, Argüelles-Monal WM, Plascencia-Jatomea M. Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against *Aspergillus niger*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(7): 2985-3000
- [22] 孙涛, 张雅梅, 张霞, 田野, 李亚威, 刘文丛. 七星瓢虫成虫石油醚提取物的化学成分及抑菌活性[J]. 昆虫学报, 2013, 56(3): 257-262
Sun T, Zhang YM, Zhang X, Tian Y, Li YW, Liu WC. Chemical composition and antimicrobial activity of petroleum ether extracts from adults of *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2013, 56(3): 257-262 (in Chinese)
- [23] 朱英杰, 何永斌, 徐滇闽, 白一彬, 李朝荣, 张春华. 云南霉素在制备生物农药中的应用: CN101107927A[P]. 2008-01-23
Zhu YJ, He YB, Xu DM, Bai YB, Li CR, Zhang CH. Application of yunnan fusidic acid in preparation of biological pesticide: CN101107927A[P]. 2008-01-23 (in Chinese)