

金属离子对黄柄曲霉生长和抗真菌抗生素合成的影响*

李淑彬¹ 周仁超¹ 钟英长²

(华南师范大学生命科学院 广州 510631)¹ (中山大学生命科学院 广州 510275)²

摘要:不同的金属离子对兼性海洋霉菌黄柄曲霉 179 的生长有不同的影响。在 0.002mol/L 的浓度下, Hg^{2+} 、 Ag^+ 和 Cr^{3+} 能强烈抑制该菌的生长, Pb^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Co^{2+} 、 Al^{3+} 对其生长有一定的抑制, 生长量低于对照; Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 对其生长没有明显影响; Cu^{2+} 对该菌的生长有微弱的促进作用, 菌体生物量略高于对照; 不同的金属离子对曲霉 179 抗真菌抗生素 179M 合成有不同的影响。与对照相比, Ba^{2+} 对其产量没有影响; Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Sr^{2+} 有一定的抑制作用, 其发酵相对效价分别为对照的 81.4%、55.5% 和 65%; 0.002mol/L 的 Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 能强烈抑制此抗生素的合成, 在添加 0.002mol/L Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 的培养基中, 虽然菌体生长良好, 但无 179M 产生; Co^{2+} 和 Cu^{2+} 则有明显的促进作用, 当培养基中添加 0.002mol/L 的 Co^{2+} 时其发酵相对效价提高到 261.4%; 当培养基中添加 0.003mol/L 的 Cu^{2+} 时其发酵相对效价提高到 350.2%。 Co^{2+} 和 Cu^{2+} 对发酵的促进效应是相互拮抗的。

关键词:黄柄曲霉, 抗真菌抗生素, 金属离子

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0020-05

* 广东省自然科学基金资助项目 (No. 001214)

收稿日期: 2001-02-22, 修回日期: 2001-06-22

THE EFFECT OF METAL IONS ON THE PRODUCTION OF ANTIFUNGAL ANTIBIOTICS TERREIC ACID 179M OF *ASPERGILLUS FLAVIPES*

LI Shu-Bin¹ ZHOU Ren-Chao¹ ZHONG Ying-Chang²

(School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631)¹

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)²

Abstract: There were different effects of various metal ions on the growth of facultative marine mould *Aspergillus flavipes* strain 179 and the production of antifungal antibiotics terreic acid 179M. 0.002mol/L Hg^{2+} , Ag^+ and Cr^{3+} can inhibit strongly the growth of the strain and Pb^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} also had depressing effects in some extent. While 0.002mol/L Cu^{2+} can stimulate its growth slightly. On the other hand, Al^{3+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} can inhibit the production of antifungal antibiotics terreic acid 179M with the relative potency 81.4%, 55.5% and 65% respectively in comparison of the control. When adding 0.002mol/L Mn^{2+} and Pb^{2+} in the mediums, the strain can not synthesis the substance. Co^{2+} and Cu^{2+} can increase strongly the yields of 179M. When adding 0.002mol/L Co^{2+} , the relative potency of 179M increased to 261.45%; When adding 0.003mol/L Cu^{2+} , the relative potency of 179M increased to 350.25%. The stimulating effect of the two ions was antagonistic.

Key word: *Aspergillus flavipes*, Antifungal antibiotics, Metal ions

近年来,条件性致病真菌感染的发病率显著上升^[1]。这已引起了医学界极大地关注,但无论浅部皮肤真菌感染还是深部条件性致病真菌感染,目前均缺少副作用小,广谱高效的抗真菌抗生素^[2]。而植物病原真菌感染仍然是影响农作物生产的重要因素。

Terreic acid-179M(以下简称为179M)是我们从大亚湾海底沉积物中分离出的一株海洋霉菌(编号为179)所产生的代谢产物,体外试验表明179M对酵母类真菌的MIC为0.78~12.5 μ g/mL,对皮癣菌石膏样小孢子菌(*Microspore gypseum*)的MIC为1.56 μ g/mL。同时对多种植物病原真菌有强烈的抑制作用,具有较好的开发前景^[3]。我们在研究其发酵条件时发现金属离子对其生长和此种产物的形成有较大的影响,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 菌种

黄柄曲霉179(*Aspergillus flavipes*,编号为179)由本实验室从大亚湾海底沉积物中分离并鉴定。敏感测试菌白色假丝酵母(*Candida albicans*),购自中山医科大学。

1.2 主要试剂

179M:菌株179发酵液经乙酸乙酯抽提,减压浓缩后,硅胶柱层析得粗品,再经重结晶得纯品。

1.3 培养基

合成培养基:葡萄糖20g, $NaNO_3$ 1g, KCl 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $FeSO_4$ 0.01g, 定容到1L, pH自然, 0.70×10^5 Pa 灭菌30min; Sabouraud氏(SBD)培养基:葡萄糖40g, 蛋白胨10g, 琼脂1g, 定容到1L, pH6, 0.70×10^5 Pa 灭菌30min; 产孢培养基:在合成培养基中加入2%的琼脂。

1.4 菌体生物量(Dry Cells weight, DCW)的测定

一定体积的发酵液过滤后,收集菌体,用无离子水洗涤3次后,105 $^{\circ}$ C烘干至恒重,称干重,换算成g(干重)/L。

1.5 抗真菌代谢产物 179M 产量的测定——生物测定法^[4,5]

采用摇瓶一级发酵, 发酵液经乙酸乙酯抽提, 减压浓缩至一定体积。以对照样品作参比, 以 *C. albicans* 为测试菌株, 琼脂扩散法——二剂量法测定相对效价, 以相对效价表示其产量。

2 结果

金属离子 Hg^{2+} 、 Ag^+ 配成 0.1mol/L 的溶液; Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Co^{2+} 、 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 配成 1mol/L 的溶液, $0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$ 灭菌 30min。

500mL 三角瓶中装入 149.7mL 或 147mL 合成培养基, $0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$ 灭菌 30min 后, 分别加入已灭菌的金属离子溶液 0.3mL (1mol/L) 或 3mL (0.1mol/L), 使每瓶中金属离子的终浓度为 0.002mol/L, 每瓶接入一满环新鲜 179 孢子, 28°C , 180r/min 振摇 96h, 测定发酵液中 179M 的相对效价和菌体生物量。结果如表 1。

在所试的金属离子 (浓度为 0.002mol/L) 中, Hg^{2+} 、 Ag^+ 和 Cr^{2+} 能强烈抑制该菌的生长, 在添加了上述 3 种金属离子的培养基中, 培养 7d 后仍然没有菌体生长; Pb^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Co^{2+} 、 Al^{3+} 对其生长有一定的抑制, 生长量低于对照; Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 对其生长没有明显的影响; Cu^{2+} 对该菌的生长有微弱的促进作用, 菌体生物量略高于对照。

不同的金属离子对菌株 179 抗真菌抗生素 179M 的合成有不同的影响。与对照相比, Ba^{2+} 对其没有明显的影响; Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Sr^{2+} 有一定的抑制作用, 其发酵相对效价分别为对照的 81.4%、55.5% 和 65%; 0.002mol/L 的 Mn^{2+} 和 pb^{2+} 能强烈抑制此抗生素的合成, 在添加 0.002mol/L 的 Mn^{2+} 和 pb^{2+} 的培养基中, 虽然菌体生长良好, 但无 179M 产生; Co^{2+} 和 Cu^{2+} 则有明显的促进作用, 其发酵相对效价分别为 261.4% 和 333.8%。

表 1 各种金属离子对菌株 179 生长和抗真菌抗生素 179M 合成的影响

金属离子	浓度 (mol/L)	生长情况	DCW (g/L)	相对效价 (%)
对照	0	++	9.27	100
Cu^{2+}	0.002	+++	10.1	333.8
Pb^{2+}	0.002	+	7.8	0
Mn^{2+}	0.002	++	9.13	0
Ba^{2+}	0.002	++	9.33	99.8
Zn^{2+}	0.002	++	9.2	55.5
Hg^{2+}	0.002	-	0	*
Ag^+	0.002	-	0	*
Sr^{2+}	0.002	+	7.33	65.0
Co^{2+}	0.002	+	6.8	261.4
Al^{3+}	0.002	+	8.6	81.4
Cr^{2+}	0.002	-	0	*

注: “+” 愈多表示生长情况愈好, “-” 表示不生长, “*” 表示没有测定, 发酵相对效价的测定以在无添加特殊金属离子的培养基中的效价为 100% 计算

2.2 不同浓度的 Co^{2+} 对菌株 179 生长和发酵的影响

我们研究了不同浓度的 Co^{2+} 对菌株 179 生长和抗真菌抗生素 179M 合成的影响。方法同上。结果如图 1。

从图 1 的结果来看, Co^{2+} 对该菌株的生长有明显的抑制作用, 这种抑制作用随着其浓度的增高而增强, 当 Co^{2+} 浓度为 0.005mol/L 时, 菌体生物量由对照的 9.27g/L 下降到 2.27g/L, 当 Co^{2+} 浓度大于或等于 0.006mol/L 时, 该菌完全停止生长。虽然 Co^{2+} 对该菌

株的生长有明显的抑制作用, 但此离子在低浓度下能够明显促进其抗真菌代谢产物的合成。综合考虑 Co^{2+} 对生长的抑制和对代谢产物合成的促进这一对矛盾, 培养基中添加的 Co^{2+} 以 0.002mol/L 比较适宜。

2.3 不同浓度的 Cu^{2+} 对菌株 179 生长和发酵的影响

如图 2 所示, 在低浓度 (小于或等于 0.002mol/L) 下, Cu^{2+} 对 179 的生长表现为促进效应, 菌体生物量随浓度的增加而增多; 当大于 0.002mol/L 时, 则对该菌的生长有一定的抑制作用; 当浓度为 0.007mol/L 时, 该菌生长完全停止。 Cu^{2+} 能强烈促进该菌代谢产物抗真菌抗生素 179M 的合成, 当培养基中添加的 Cu^{2+} 浓度为 0.003mol/L 时, 发酵相对效价达到无该离子时的 350.2%。但浓度进一步增高时, 相对效价开始下降, 原因可能一方面是表现为低浓度促进高浓度抑制效应, 另一方面是由于高浓度使菌体生长量明显减少所致。

2.4 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 对菌株 179 发酵的复合影响

Cu^{2+} 和 Co^{2+} 对菌株 179 抗真菌代谢产物 179M 的合成均具有明显的促进效果, 在培养基中同时添加这两种金属离子, 发酵产量是否会进一步提高? 本节初步探讨了不同 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 对比对菌株 179 发酵的影响。结果表明它们的作用是互相拮抗的。同时添加这两种金属离子比单独添加其中任一种的效价低, 且生物量少, 如表 2。

表 2 不同浓度的 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 对菌株 179 生长和抗真菌抗生素 179M 合成的影响

处理 (mol/L)	生长情况	菌体生物量 (g/L)	179M 相对效价 (%)
$\text{Cu}^{2+} 0 + \text{Co}^{2+} 0$ (Control)	++	9.27	100
$\text{Cu}^{2+} 0.002$	+++	10.2	332.5
$\text{Co}^{2+} 0.002$	+	6.9	268
$\text{Cu}^{2+} 0.001 + \text{Co}^{2+} 0.002$	+	5.8	91.2
$\text{Cu}^{2+} 0.001 + \text{Co}^{2+} 0.001$	+	6.5	199.1
$\text{Cu}^{2+} 0.002 + \text{Co}^{2+} 0.001$	+	6.6	210
$\text{Cu}^{2+} 0.002 + \text{Co}^{2+} 0.002$	+	4	59.8

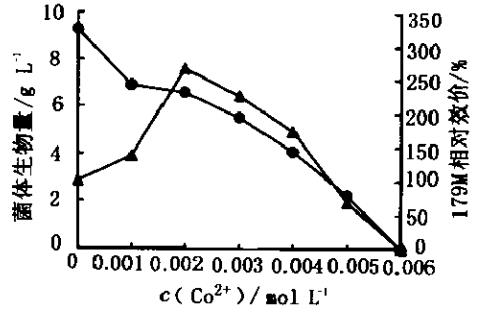


图 1 Co^{2+} 浓度对菌株 179 生长和抗真菌抗生素 179M 合成的影响

● 菌体生物量 (g/L), ▲ 179M 相对效价 (%)

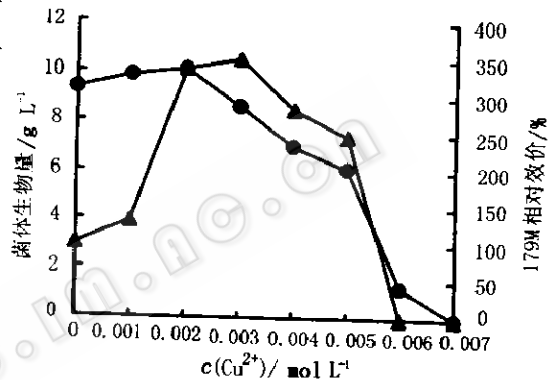


图 2 Cu^{2+} 浓度对菌株 179 生长和抗真菌抗生素 179M 合成的影响

● 菌体生物量 (g/L), ▲ 179M 相对效价 (%)

3 讨论

金属离子作为微生物生长和代谢产物合成的重要影响因子, 在微生物生理研究、酶类性质研究及蛋白质、氨基酸、核苷酸、维生素等发酵调控的研究中已有许多的报道, 但有关其对抗生素发酵的影响报导很少。铜离子和钴离子对菌株 179 抗真菌抗生素

179M的合成有强烈的刺激作用,使其发酵相对效价提高3倍左右,影响如此之大,这在微生物发酵调控中也是一种比较少见的现象。微生物抗生素的合成是多基因调控的数量性状,也许这两种金属离子能够作用于此抗生素合成的几个位点,刺激效应是累加的,其详细机理有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Pfaller M A, Wenzel P. *Eur. J. Clin Microbiol infect. Dis.* 1992, **11**: 287 ~ 291.
- [2] 张 红, 白东鲁. *中国药物化学杂志*, 1997, **26** (4): 303 ~ 309.
- [3] 李淑彬, 王 军, 杨劲松, 等. *菌物系统*, 2001, **20** (3): 362 ~ 367.
- [4] 屈 毅, 杜继昭编译. *现代医用抗生素学*. 成都: 四川科学出版社, 1987.
- [5] 张治镞编著. *抗生素药品检验*. 北京: 人民卫生出版社, 1987, 44 ~ 52.