

## 产抗生素链霉菌的原生质体融合重组

J. M. De Araújo F. D. De A. Lyra W. Kurylowicz\*

已知抗生素的 65% 以上是放线菌产生的, 其中 80% 以上是由链霉菌中筛选得到的。近年来发展起来的细菌、链霉菌、酵母和真菌的原生质体融合技术, 它不仅有助于工业上重要菌株的改良, 而且也有助于更好地了解抗生素合成的次生代谢途径, 并得以阐明微生物的一些遗传结果, 适于制作精确定位基因的多重连锁图, 但是它们的生化表达在多数情况下是不清楚的。

在遗传学研究中应用原生质体融合开始是在高等植物上。但由于微生物生长快, 所以原生质体融合在微生物中发展最为迅速。在工业微生物研究方面取得了显著进展, 融合实验让我们更好地了解微生物细胞的基本调节过程。但看来无论从理论的还是实践的目的而言, 原生质体融合还处于开发的初期<sup>[1]</sup>。

原生质体融合不仅在两个或两个以上的突变体之间是可能的<sup>[2]</sup>, 而且在一些菌株的种内或种间的原生质体融合也是可能的。最近资料指出, 原生质体融合有可能在不同属间进行, 甚至在不同界的原生质体之间融合也有报导。

由聚乙二醇 (PEG) 诱导的不同生物原生质体之间的融合, 看来既不同它们的分类地位有关, 也不同它们的免疫化学特性有关。由于同融合有关的细胞膜结构对整个生物界是十分相似的, 所以融合过程看来也相似<sup>[3]</sup>。

PEG 诱发原生质体融合的机制不很清楚。Ahkong 等人推测 PEG 诱导原生质体融合与下列过程有关: 开始是由于强烈的脱水而使原生质体粘在一起, 并形成聚合体。原生质体收缩并高度变形。原生质体之间接触而扩大, 首先是脂质膜双层结构可能发生混乱, 从而增加了脂质区域的流动性, 在脂质结构中的这些变化使膜内蛋白颗粒起凝聚作用。其次, 通过细胞质小桥, 在紧密相接的膜内, 蛋白质和糖蛋白分子相互作用和混合, 使紧密接触的原生质体融合<sup>[4]</sup>。

一些作者强调作为融合剂的二价阳离子的重要作用。根据 Ferenczy<sup>[5]</sup> 所述, 由于原生质体化的培养基中含有  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$ , 所以在原生质体形成过程中, 原生质体融合就开始了。

PEG 诱导原生质体融合以获得链霉菌重组子需

要: 1. 选择两个或两个以上用于重组的亲本菌株。2. 要具有标记的实变体, 最好是营养缺陷型和抗生素的抗性株。3. 形成稳定的原生质体, 要能再生出正常的细胞壁, 并能高效融合。4. 重组子鉴定和筛选以及对它们进行分析。

### 一、选择重组的菌株

如果选用产生不同抗生素的 (但结构上又属于同一大类的) 两株或两株以上亲株的原生质体进行融合, 它的目的是使编码合成抗生素的酶基因转移, 这就有可能把酶基因引到新的寄主中去, 使其产生一个“天然”抗生素的结构类似物<sup>[6]</sup>。原生质体融合的另一目的是提高抗生素的产量, 以及产生新的“杂种”抗生素。

通过融合获得重组子, 必须考虑到两个相互作用亲本 DNA 之间的同源性<sup>[7]</sup>。然而应当强调指出, 已经有了一些种内和种间重组, 营养互补和基因转移的证据。并且由产生完全不同化合物的不同菌株的重组所产生的一个新的“杂种”抗生素所证实。

根据 Normansell<sup>[8]</sup> 的结果, 链霉菌的基因组具有  $1.5 \times 10^7$  碱基对, 一个基因的平均大小约 1500 碱基对, 亦即在这个基因组里约有 10,000 个基因。假如影响某个抗生素产量的基因有 100 个, 这就相当于  $1.5 \times 10^5$  碱基对。链霉菌中与抗生素产生有关的遗传信息是如此丰富, 因此原生质体融合在这些微生物中将是大有作为的。

### 二、要具有遗传标记的突变体

尽管重组在链霉菌里是很普遍的, 但用来“改良”菌株的范围相当有限。可能与未采用具有可选择性的遗传标记的突变体有关, 最好选用抗生素的抗性和营养缺陷型, 当然引入遗传标记是费时间的。

链霉菌的营养突变株可以经 NTG (N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍) 处理后筛选获得。它在低致死水平具有高效诱变作用。并在一定区域诱发多重突变。分离营养缺陷型特别有效。Delić 等人描述了用 NTG 有效地诱变链霉菌的条件, 链霉菌需要比其他一些微

\* 此文由波兰科学院院士、微生物学家库里诺维奇等人于 1983 年底撰写, 全文约 14000 字, 附图 9 张, 文献 63 篇, 现由庄增辉摘译, 薛禹谷校。

生物更长的处理时间和更大的剂量。用 1mg/ml NTG 在 pH9.0 处理 50 分钟,存活细胞的 5% 是营养缺陷型。天蓝色链霉菌在含有 3mg/mlNTG 的 0.05MTris-maleic acid 缓冲液中培养 2 小时,在存活菌中获得了约 11% 的营养缺陷型。而龟裂链霉菌在 3mg/ml NTG、pH9.0 培养 1 小时,存活细胞中 21% 以上为营养缺陷型。

为了获得链霉菌抗生素抗性营养缺陷突变体,通常用 Szybalski 的梯度平皿技术,或者用反复转移的系列稀释法。

三、形成稳定的原生质体

根据细菌和丝状真菌原生质体融合实验的结果,以及链霉菌原生质体形成、稳定和再生的报道,对原生质体形成和再生程序综合如下(表 1):

表 1 原生质体形成和再生程序

a. 菌丝(细胞)的产生	在液体培养基中(具有或不具有甘氨酸)培养到生长对数的中期,收集。
b. 洗涤菌丝并离心	用 0.3M 蔗糖的高渗溶液。
c. 溶菌酶处理菌丝	每克湿菌丝,用溶解在 P 培养基中的 0.7—1.4 mg 溶菌酶处理。
d. 原生质体的形成	在最适的温度中(28—32℃)保温,每隔 10 分钟,取样在显微镜下观察。
e. 离心-洗涤-过滤	用 P 培养基(不含溶菌酶)洗涤原生质体,通过棉花或玻璃滤器过滤。
f. 原生质体的稳定	在含有二价阳离子的培养基中,置 28℃ 稳定 60 分钟。
g. 显微镜计数原生质体	在相差显微镜下的计数室。
h. 原生质体再生	原生质体在 P 培养基中稀释之后,用软琼脂培养基铺到 R <sub>2</sub> 再生培养上培养。

P 培养基是原生质体形成的培养基,具有稳定原

表 2 原生质体形成的培养基 (P)

组分 (g)	培养基 P <sup>[14]</sup>	培养基 P <sub>2</sub> <sup>[14]</sup>
蔗糖	103 (0.3M)	171 (0.5M)
*KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05	—
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25	—
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.03(0.01M)	1.0(5mM)
*CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.68(0.025M)	0.73(5mM)
*TES 缓冲液 pH7.2(ml)	100(0.25M)	10(0.025M)
微量元素溶液 (ml)	2	—
NaCl	—	4.13(70mM)
蒸馏水总体积 (L)	1	1

\* 分别灭菌

微量元素溶液 (每升): ZnCl<sub>2</sub>40mg; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 200mg; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10mg; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10mg; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 10mg; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10mg<sup>[14]</sup>

生质体的高渗压,二价阳离子以及一些微量元素,其组分列于表 2:

原生质体的形成取决于一些因素,这是分别由每株菌所确立的。其中有使菌丝同步生长的培养基组分,而用于制备原生质体的菌丝是在它生长对数的中期(平均加倍 6—10 次)收集的。菌丝在摇瓶中生长 18—24 小时之后可能需要添加甘氨酸(0.5—1.5%)到培养基中去。有些菌丝在溶菌前需要超声处理。

Ogawa 等人<sup>[13]</sup>报道了用分解细胞壁的复合酶去制备链霉菌和小单孢菌的原生质的方法:用溶菌酶、裂解酶 NO<sub>2</sub> 以及消色肽酶不同组合去处理绿色产色链霉菌,威德摩尔链霉菌、卡那霉素链霉菌和生米卡链霉菌以制成原生质体并再生,比较结果指出:溶菌酶同消色肽酶复合比溶菌酶同裂解酶 NO<sub>2</sub> 复合有效,它能使原生质体形成率提高 10 到 100 倍。

通常原生质体在溶菌酶处理几分钟之后就个别出现了,因此在相差显微镜下不断检查,很容易确定细胞转变成原生质体所需的时间。之后用不含溶菌酶的 P 培养基洗涤,并悬浮后,通过棉花或玻璃滤器过滤,以便除去残留菌丝或细胞。

R 培养基即再生培养基,现根据文献收集到的不同再生培养基列于表 3。

四、原生质体的稳定性

Okanishi 等人<sup>[14]</sup>测定了 Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 对原生质体形成和渗漏的效应。在含有 0.3—0.5 M 蔗糖、MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 浓度为 0.02—0.05 M 以及 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 为 0.05—0.02M 的高渗培养基中,原生质体很稳定。

在低浓度的二价阳离子中,灰色链霉菌形成的原生质体里,既看不到细胞壁层也看不见间体。在黑产色链霉菌的原生质体周围有三层细胞质膜。细胞质呈现出核区和大量的核糖体。

生长稳定期的菌丝,在低浓度的溶菌酶(50μg/ml)下,形成的原生质具有附着在细胞膜上的小泡。

五、原生质体的再生

原生质体再生是重组的决定性的一步。用弗氏链霉菌对数期和稳定期之间的细胞制成原生质体,其再生率更为有效<sup>[9]</sup>。灰色链霉菌和委内瑞拉链霉菌的原生质体再生分别为 41% 和 51%,而且强烈地依赖于含有磷酸盐和酪蛋白氨基酸的再生培养基中二价阳离子的存在<sup>[14]</sup>。Kurzatkowski 等人在黑产色链霉菌的两株营养缺陷突变体的原生质体再生中也获得同样的再生率<sup>[9]</sup>。

Pigac 等人<sup>[11]</sup>用最适渗透压稳定的浓度,以及改进铺上层琼脂的操作,使龟裂链霉菌原生质体再生率高于 50%。

Shirahama 等人改进原生质体再生条件,改用 R<sub>2</sub> 再生培养基,把原生质体包埋到低熔点软琼脂糖中

表3 再生培养基(R)的组分

组分 (克)	R <sub>1</sub> <sup>[14]</sup>	R <sub>2</sub> <sup>[14]</sup>	R <sub>3</sub> <sup>[16]</sup>	R <sub>4</sub> <sup>[13]</sup>	R <sub>5</sub> <sup>[12]</sup>
蔗 糖	103—171 (0.3—0.5M)	103—171 (0.3—0.5M)	—	137(0.4M)	171(0.5M)
琥珀酸二钠·6H <sub>2</sub> O	—	—	150 (0.555M)	—	—
KCl	—	—	0.5	15	—
*K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	—	0.2	—	—
*KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05	0.05	—	0.05	0.05
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25	0.25	—	0.25	0.25
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4.07 (0.02M)	10.12 (0.05M)	8.1(40mM)	10.1	10.12
*CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.37 (0.05M)	2.95 (0.02M)	2.2(15mM)	7.4	2.95
葡萄糖	10	10	10	10	10
*L-天冬氨酸	2	—	—	2	1.8
酪蛋白胨琼脂	0.1	0.1	—	0.5	—
*胰氨酸	—	3	—	—	—
酵母膏	—	—	4	—	1
多 肽	—	—	4	—	—
玉米麦 12V/V 玉米浆上清液 pH7.0	—	—	—	30	—
TES 缓冲液 pH7.2(ml)	100(0.25M)	100	10(0.25M)	10	—
HEPE 缓冲液 pH7.2(ml)	—	—	—	—	100 (0.25M)
微量元素溶液 (ml)	2	—	—	2	2
牛血清白蛋白 Fr. V	—	—	—	—	0.2
*NaOH(1N, ml)	—	—	—	—	5
琼 脂	22	22	18	7.5	22
* 水或蒸馏水总体积 (L)	1	1	1	1	1
琼脂糖(低熔点)	—	—	***	—	***5.5

微量元素溶液见表2注。

\* 分开灭菌。

\*\* R<sub>3</sub> 培养基的软琼脂上层 (3ml)。

\*\*\* 高渗软琼脂上层含有 R<sub>3</sub> 培养基浓度的蔗糖。MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 以及 HEPES 缓冲液(N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethanesulfonic acid) (琼脂糖或琼脂 0.65%)。

(0.4%)、铺到底层 R<sub>3</sub> 琼脂的干燥表面上,原生质体培养在较低温度下。春日链霉菌的再生率为 70%,弗氏链霉菌和雪白链霉菌约 90%,而卡那霉素链霉菌 30%,只有湿链霉菌的再生率较低,约为 10%。

再生率大大地依赖于原生质体再生时和细胞生长时的培养温度。在原生质体再生最佳条件下(具有最适温度),对 4 种菌进行比较:白色链霉菌(GJ1074)、生二素链霉菌(ATCC15154)、弗氏链霉菌 C373(ATCC 19509)和灰褐链霉菌(ATCC23916)的原生质体都以近乎 100% 的效率再生成活细胞<sup>[13]</sup>。

Ikeda 等人<sup>[6]</sup>指出:血浆类物质[聚乙烯吡咯烷酮(PVP) K90 以及牛血清蛋白(fraction V)]影响到三株产大环内酯类菌株的原生质体再生;生二素链霉菌 KA-427,卷须链霉菌 KA11B-3 和弗氏链霉菌 KA427,再生频率在 79% 到 100%。

原生质体再生过程已为 Okanishi 等人<sup>[14]</sup>所证实。直径为 1~2 μm 的灰色链霉菌的原生质体培养在 R<sub>1</sub> 培养基上,40 小时增加到约 30 μm,再过 8 小时,它

们长出纤维状菌丝,65 小时后菌丝数目增加,73 小时菌丝扩展分枝。有一些膨大的原生质体不能回复生长到菌丝状。

有些链霉菌的原生质体在标准条件下呈非同步再生,较早长出的菌落产生自身抑制物,这些物质抑制周围原生质体的再生。这个现象显然不是由于抗生素的合成所引起的。因为有人观察到在枯草杆菌原生质体中产生一种可逆抑制因子(RIF),它在高浓度下妨碍原生质体的再生。而 RIF 是一种自溶酶,它为胰蛋白酶所钝化,而为巯基乙醇所活化。RIF 在细胞再生期间阻碍了细胞壁的合成。

原生质体再生是改良产抗生素链霉菌的一种有效的方法。Ikeda 等人<sup>[15]</sup>比较了下列三株菌原生质体再生后产大环内酯抗生素的能力:弗氏链霉菌产泰乐菌素的产量比再生前高出约三倍,生二素链霉菌产螺旋霉素约高出二倍。而卷须霉菌产的卷须霉素产量提高低于前两株菌。作者们认为:产素能力的提高来自于“遗传变异”。

CFPE 抗生素研究所在产生环霉素的上升岛链霉菌上获得类似的结果,原生质体再生后不经诱发融合,就可筛选到环霉素产量比原始菌株高五倍的菌株。

六、原生质体融合

原生质体融合有可能应用于菌种“改良”并获得产生“杂种”抗生素的菌种,关键是要诱发生原生质体融合。在多数情况下,把抗生素抗性以及颜色标记的营养缺陷突变体用于融合。自从发现聚乙二醇(PEG)可作为植物原生质体融合剂之后,许多作者就把 PEG 应用于微生物原生质体的融合中。而且不同分子量(1,000, 1,543, 4,000 和 6,000)的 PEG 用于放线菌原生质体融合,其融合效应大体相同。根据文献报道综合原生质体融合的步骤列于表 4。

表 4 原生质体融合步骤

a. 把来自两个或两个以上亲本的原生质体混合	用等光密度和等体积的原生质体悬浮液
b. 离心	15 分钟 1000×G
c. 沉淀物悬浮在 PEG (1,000~6,000MW) 溶液中	溶液组成为: PEG55%-1 体积 DMSO15%-1.5 体积 培养 30 秒钟
d. 加 P 培养基 5 体积,PEG 55%-1 体积	培养 5 分钟
e. 离心	15 分钟, 6000×G
f. 沉淀物再悬浮在 P 培养基中	轻轻混合
g. 把原生质体铺到固体培养基上	在 P 培养基中不同稀释,铺到 R <sub>2</sub> 或任何其他固体的高渗培养基上

Fodor 等人采用热处理(55℃, 3 小时)钝化巨大芽孢杆菌原生质体,不能再生,但仍能用于融合。钝化的原生质体能增补到作为配偶体的非钝化的营养缺陷型的原生质体中去。这一系统的优点,只需要一株营养缺陷突变体,不用再附加标记。在小单孢菌上也获得了同样的结果<sup>[1]</sup>。根据 Hopwood 等人<sup>[6]</sup>的工作,在融合前立即用 UV 照射两个亲本原生质体的悬浮液,可使低频重组提高 10 倍。如果重组率已高达 20%,用高到足以杀死 99% 原生质体的 UV 剂量,仍能加倍到 40%。它消除与融合无关的原生质体<sup>[4]</sup>。

七、产抗生素链霉菌原生质体的融合重组

Hopwood 等人在天蓝色链霉菌、小小链霉菌、变铅青链霉菌、灰色链霉菌和吡啶霉素链霉菌的原生质体融合中,加 15% W/V DMSO,以及融合前用致死剂量的 UV 照射获得很高的重组频率。根据已发表的天蓝色链霉菌重组子遗传分析,重组率有时超过 10%。甚至在非选择条件下,从天蓝色链霉菌获得的重组率为 10—20% (占再生培养物全部子代孢子的百分比)。

多重交换类型重组子遗传分析<sup>[6]</sup>指出,两个融合配偶体的基因组几乎是完整的、并产生暂时二倍体状态。杂合二倍体状态在天蓝色链霉菌中是暂时的而融合菌落只含有缺掉另一亲本的重组子。在其他菌

中,重组子和亲本的基因组都能发现。在同一菌落里,也可观察到不同重组基因型的存在。重组与已知的性因子 SCP1 和 SCP2 无关。

小小链霉菌和抗生链霉菌的营养突变体原生质体融合重组率很高,比接合方式高出 10<sup>4</sup> 倍,这为 Godfrey 等人的结果所证实<sup>[4]</sup>。在小小链霉菌中获得了稳定的重组子,而在抗生链霉菌中既分离到稳定的原养型,也分离到不稳定的营养互补的杂合体<sup>[12]</sup>。

Svoboda 等人通过棘孢小单孢菌的营养缺陷,抗生素抗性突变体(标记为 Cas<sup>-</sup>, rfp<sup>+</sup>)同亲本(即原养型、抗生素敏感)的原生质体融合获得了 90% 以上稳定的重组子。

Fleck 等人<sup>[11]</sup>从产紫霉素 B<sub>1</sub> 的紫色链霉菌和保护霉素的吸水链霉菌的两个阻断突变体构建了一株重组菌株,该重组菌株(紫色链霉菌 ssp. *iremyceticus* IMET43615)产生一种杂种抗生素,含有紫霉素的糖苷配基部分和保护霉素的糖的部分,这个杂种抗生素同 γ-紫红霉素糖苷是一致的。

Godfrey 等人<sup>[4]</sup>描述了弗氏链霉菌和比基尼链霉菌的营养缺陷型接合的程序,既用常规的,也用原生质体融合的技术。原生质体融合的重组频率比常规接合法要高 200 到 10,000 倍。在含 40% PEG 的原生质体化的培养基中, Ca<sup>2+</sup> 浓度应为 20mM。

通过原生质体融合已把两株产氨基糖苷类抗生素的菌株(产链霉素的灰色链霉菌和产 istamycin 的 *S. tenjimaiensis*)进行了重组,筛选出的重组菌株产生的新抗生素不同于两亲本各自所产的抗生素<sup>[13]</sup>。Nakano 等人<sup>[10]</sup>把淡紫灰链霉菌 S55-B1 的两株不同营养缺陷突变体的原生质体进行了融合,经连续分离得到稳定的原养型菌株,说明原生质体融合可形成稳定的二倍体,这一结果与 Hopwood 等人在天蓝色链霉菌上所获得的结果不一样。产 β-内酰胺酶、色素以及像孢子形成那样的分化功能,在原生质体融合后的重组子中找不出规律性。有些重组子与一个亲本类型相同,但另一些重组子的特性却与两个亲本都不同。这些结果说明次生代谢产物的产生看来受多重调节所控制。

结合突变筛选,在产生 Carbapenem 抗生素(Carpenimycin A、B 和 E,以及 epithienamycin 和 Olivanic acids)的灰色链霉菌阻断突变体之间,用原生质体融合方法获得了重组子。这些抗生素的一部分是硫酸化的,而另一些是非硫酸化的。这两类产生的比例决定于培养基中硫酸盐的浓度。硫酸转移酶的突变体(需要硫代硫酸盐或半胱氨酸)不能产生硫酸化的抗生素,但能产生比亲株产量高得多的非硫酸化的 Carbapenem 化合物。通过原生质体融合使硫酸盐转移系统从亲株再引入硫酸转移酶的突变体中去。在稳定的重组子里曾发现硫酸化的 Carbapenem 抗生素的高产菌株<sup>[18,17]</sup>。

PEG 诱导链霉菌转化的过程不能同融合过程分

开, 因为把转化作用的 DNA 分子引入原生质体的机制看来涉及原生质体的融合。

最近发展起来的用于工业微生物的遗传育种方法中, 原生质体融合和原生质体转化看来是非常有希望的。它们为基础研究, 以及为更好地了解产抗生素链霉菌的调节过程开辟了新途径。

### 参 考 文 献

- [1] Baltz, R. H. and P. Matsushima: *J. Gen. Microbiol.*, **127**: 137—146, 1981.
- [2] Ferenczy, L.: Genetics as a Tool in Microbiology, ed. Glover, S. W. D. A. Hopwood, 31 Symp. Soc. Gen. Micro., Cambridge University Press, 1—34, 1981.
- [3] Fleck, W. F.: Genetics of Industrial Microorganism, ed. Sebek, O. K. and A. I. Laskin, Am. Soc. Microbiol., Washington D., p. 117—122, 1979.
- [4] Godfrey, O. et al.: *Canadian J. Microbiol.*, **24**: 994—997, 1978.
- [5] Hopwood, D. A. *Genetics as a Tool in Microbiology*, ed. Glover, S. W. and D. A. Hopwood, Cambridge University Press, p. 187—218, 1981.
- [6] Hopwood, D. A. and H. M. Wright: *J. Gen. Microbiol.*, **111**: 137—143, 1979.
- [7] Ikeda, H. et al.: *J. Antibiotics*, **36**: 283—288, 1983.
- [8] Kitano, K. et al.: Abstracts of the 4th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Kyoto, p. 66, 1982.
- [9] Kurzatkowski, W. et al.: *Proceed. Congress. of Hungarian Soc. Chemotherapy*, Hajduszoboszlo, p. 129—142, 1979.
- [10] Nakano, M. M. et al.: *J. Antibiotics*, **35**: 359—363, 1982.
- [11] Normansell, J. D.: *J. Chem. Techn. Biotechnology*, **32**: 296—303, 1983.
- [12] Ochi, K. et al.: *J. Bacteriol.*, **139**: 984—992, 1979.
- [13] Ogawa, H. et al.: *J. Antibiotics*, **36**: 184—186, 1983.
- [14] Okanishi, M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **80**: 389—400, 1974.
- [15] Pigas, J. et al.: *Appl. and Environmental Microbiol.*, **44**: 1178—1186, 1982.
- [16] Shirahama, T. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**: 1271—1273, 1982.
- [17] Vournakis, J. N. and R. P. Elander: *Science*, **219**: 703—709, 1983.