

微生物次级代谢的调节

(日) 中山 清

编者按: 本刊今后拟扩大综述文章的比重, 希望从事微生物学研究及教学的有关同志积极撰稿。为便于制订组稿计划, 请作者事先与编辑部联系。

本刊一般不登译文, 但为了能将国外某些重要领域而水平又较高的综述文章介绍过来, 以补我之不足, 也有必要偶尔刊登少量译稿。这类稿件由编辑部特约。此次初作尝试, 欢迎读者提出意见。

一、前言

次级代谢调节的研究晚于初级代谢调节的研究。这当然是因为次级代谢产物生物合成途径的阐明较晚之故。但是, 这方面的研究, 也和初级代谢的情况一样, 继研究产物鉴定、生物合成之后, 转向了代谢调节的研究。由于次级代谢产物的种类、结构多种多样以及其它原因, 进展缓慢的状况看来不会迅速改变。然而, 如果按生源 (biogenesis) 加以整理, 即使是如此多样化的次级代谢产物, 也有共同之处, 对于它的研究, 无须悲观。本文拟综述关于次级代谢产物的代谢控制方面迄今所知的观察结果。我认为, 与其列举大量孤立的事实, 还不如象 Bu' Lock^[1] 那样, 以其与生长相联系的调节为重点加以总结更为合适, 并且着重介绍对今后工作有用的结果。

二、次级代谢

生物的初级代谢是供给生物能量和合成中间体, 以及象蛋白质、脱氧核糖核酸一类高分子物质的过程, 这个过程在所有生物中基本上是相同的。相对于初级代谢生成的物质为初级代谢产物而言, 对生存、发育、繁殖无关的那类物质均称为次级代谢产物, 与此有关的代谢称为次级代谢^[2-5]。但是, 这一定义并不确切。例

如, 玉蜀黍赤霉 (*Gibberella zeae*) 产生的次级代谢产物 Zearalenone, 已证明 cAMP 促进其合成, 并且它与有性生殖的控制有关^[6]。关于初级代谢和次级代谢的区别虽有争议, 但建立这样一个一般概念, 应是非常有用的。本文的叙述也希望按一般的概念来理解。

首先, 就次级代谢、次级代谢产物的特点谈一些看法。产生次级代谢产物的微生物范围狭窄, 它对特定的产生菌或许是重要的, 但一般在生活过程中并无普遍的功能。通常, 它是一群化学上非常近似组分的混合物。例如, 已知杆菌肽有 10 种、丝裂霉素有 5 种、青霉素有 10 种以上、黄曲霉素有 8 种、放线菌素有 20 种以上。一种菌产生次级代谢产物的能力易因变异而丧失 (菌株的退化)。不再产生次级代谢产物的菌株并不发生营养要求缺陷, 可以在和培养亲本菌株相同的培养基上生长。这一点, 和初级代谢产物有很大的不同。次级代谢产物的一个特点是一般都不在迅速生长期 (等于营养期、生长期) 产生, 而是在相继而来的繁殖期 (idiophase) 才产生。最近有人主张, 把次级代谢途径被阻塞的变异株作为特需型 (idiotroph) (相当于初级代谢中的营养缺陷型), 把繁殖期产生的次级代

* 原载 *Amino Acid and Nucleic Acid 氨基酸与代谢*, No. 36, (1977)。

谢产物称为特产物(idiolite)^[7]。

抗菌素是一类次级代谢产物,直到生长完成之前并不形成特异地与抗菌素生物合成有关的酶,因而不产生抗菌素。下列实验已间接地证明了这一点:在生长期终了或接近于终了时加入抑制蛋白质及核酸合成的抑制剂,抗菌素的合成即被抑制^[8,9]。下列抗菌素酶的记载则可提供直接证据:链霉素合成过程中的转脒基酶^[10]、灭瘟素S合成酶I及与同一抗菌素合成有关的苯丙氨酸消旋酶^[11],生物合成放线菌素的酚嘧啶合成酶^[12],吡咯嘧啶核苷类抗菌素合成中的GTP8-甲酰水解酶^[9]等。

次级代谢产物的产生不只是在生长期结束即可开始,而且对培养条件和营养期的经历非常敏感。

次级代谢产物具有非常多样化的结构,若分析它们的生物合成途径,则可见它以较少的交叉点与比较均一的初级代谢网相结合,初级代谢的关键中间体多半是次级代谢链的前体物。例如在霉菌中,由乙酰辅酶A所形成的一系列次级代谢产物是多种多样的,而且它在初级代谢中居于重要地位。它们虽然分别受一定程度的独立调节,但同时二者又将整合了同化过程的糖代谢和三羧酸循环结合起来。而且它还是发酵的异化和好气的异化之间,以及细胞质过程和线粒体过程之间的平衡点(图1)。从这些关键点出发,次级代谢途径可再根据分枝途径更细地划分,最后到达特定的次级代谢产物(图2)。所以,每一类群可大可小,反应呈群特异性。我们有必要这样来理解次级代谢产物的分类和代谢调节。一般的代谢调节是控制分枝系列中的早期阶段。

次级代谢的酶不一定象初级代谢酶那样具有高度的特异性。这从对细胞生活的必要性而言、也是可

以理解的。因为次级代谢酶对底物的特异性在一定程度上不那么严格,供给类似结构的底物即可得到和天然物不同的次级代谢物。最有名的例子,是用其它的酰基置换异青霉素的N-L- α -氨基己二酰侧链合成青霉素。该酶虽然对6-氨基青霉酸特异性高,但在酰基侧链上可以结合许多种乙酰化合物。最近,还利用这种技术在植物组织培养中进行天然产物结构类似物的生物合成。

次级代谢产物生物合成系列中这种缺乏严格特异性的性质造成了派生性的结果。系列中的一个酶的底物和产物的双方,都能成为别的

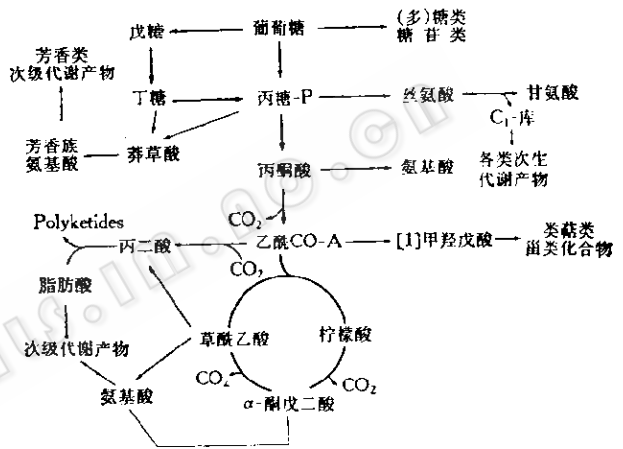


图1 从碳代谢流看初级代谢和次级代谢的联系

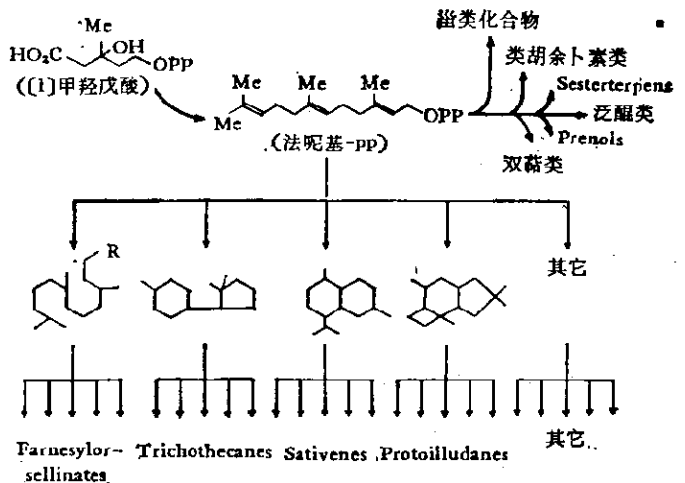


图2 次级代谢的分枝途径(以霉菌合成的倍半萜为例)

酶的底物。因此,系列中每一步的正确顺序不一定是重要的,一种产物可由几种途径和中间体而来。所以,可以认为所谓“代谢网络”(metabolic network)或“代谢栅栏”(metabolic grid)是一连串的途径,而培养条件、菌株的差异决定着它的生物合成主要途径,这种场合,不能认为它仅仅是一条独特的途径。还可以看到,有由 6-甲基水杨酸生成展开青霉素及其它酚衍生物的例子^[2,13](图 3)。

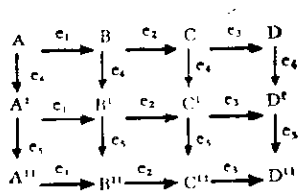


图 3 “代谢栅栏”

有时添加前体物有增加次级代谢产物产量的效果。例如在苯青霉素的生产中加入苯乙酸;放线菌素及泰乐菌素生产中加入氨基酸;新生霉素生产中加入苯甲酸均有效。但是,一般在初级代谢的许多过程中,总体动力学通常受底物水平支配,相反,在次级代谢过程中,许多是受酶水平限制。从次级代谢在细胞经济性结构中的地位来看,可以说是理所当然的。

三、分解产物阻遏

自 1942 年 Epps, Gale 报道氨基酸脱氨酶的生成受葡萄糖抑制以来,已报道了葡萄糖及其相关化合物对各种微生物的酶(主要是异化过程中的酶)生成的抑制效应。Magasanik(1961)^[14]的研究指出,这种葡萄糖效应不是葡萄糖本身的作用,它的代谢产物才是阻遏剂,基于这一认识,把这种抑制作用命名为分解产物阻遏。这一现象据认为是由利用迅速的碳源的分解产物抑制了酶的诱导而产生的。已经证明,大肠杆菌的乳糖操纵子与由 cAMP (环化腺一磷)所活化的蛋白质有关。这种蛋白质 CRP (环化腺一磷受体蛋白质, cAMP receptor protein) 只有在和 cAMP 结合时才呈现活性,结合到 i 基因和操纵基因之间的启动子 (promotor) 部位上。由于这

种结合,在 DNA 上发生变化, RNA 多聚酶结合在启动子部位,加入核苷三磷酸便通过 RNA 多聚酶开始转录。所以 cAMP 和特殊的诱导物质二者,对于大肠杆菌的许多诱导酶的合成是必要的,缺乏任何一种,酶都几乎不能合成。与特异的诱导物促进相应的特定酶或一群酶的合成相反, cAMP 控制许多蛋白质的合成。葡萄糖及其它碳水化合物由于 cAMP 的浓度下降而降低诱导酶的合成速度。cAMP 在启动子部位容易使之开始进行转录,但这一作用必须有另外的蛋白质 CRP。在色氨酸酶合成时, cAMP 在翻译阶段促进酶合成,使信使核糖核酸 (mRNA) 停止合成(用原黄素或放线菌素 D 处理),或除去诱导物后加入 cAMP 即能促进该酶合成一事,证明了这种作用。因为葡萄糖使 cAMP 的浓度降低的情况,与培养基内出现 cAMP 同时出现,所以开始认为葡萄糖效应是使细胞内部容易分泌出 cAMP,但是降低细胞内 cAMP 水平的效应并不是由于细胞内 cAMP 的排出或 cAMP 磷酸二酯酶的作用加强,而是一种取决于葡萄糖的对腺苷酸环化酶的抑制作用。虽然对大肠杆菌乳糖操纵子而言,已明确了这种情况,但对另外

表 1 次级代谢产物产生的分解产物阻遏的实例

产 物	生 产 菌
链霉素	灰色链霉菌(<i>Streptomyces griseus</i>)
盐霉素	盐屋链霉菌(<i>S. siroyaensis</i>)
春日霉素	春日链霉菌(<i>S. kasugaensis</i>)
吡啶霉素	灰色链霉菌(<i>S. griseus</i>)
丝裂霉素	轮丝链霉菌(<i>S. verticillatus</i>)
白六烯菌素	绿黄链霉菌(<i>S. viridoflavus</i>)
赤念珠菌素	灰色链霉菌(<i>S. griseus</i>)
放线菌素	抗生链霉菌(<i>S. antibioticus</i>)
卡那霉素	卡那霉素链霉菌(<i>S. kanamyceticus</i>)
新霉素	弗氏链霉菌(<i>S. fradiae</i>)
嘌呤霉素	白黑链霉菌(<i>S. alboniger</i>)
潮霉素 B	吸水链霉菌(<i>S. hygroscopicus</i>)
链丝菌素	淡紫灰链霉菌(<i>S. lavendulae</i>)
Gardimycin	<i>Actinoplanes liquiriae</i>
杆菌肽	地衣芽孢杆菌(<i>Bacillus licheniformis</i>)
灵菌红素	粘质赛氏杆菌(<i>Serratia marcescens</i>)
紫色杆菌素	紫色色杆菌(<i>Chromobacterium violaceum</i>)
青霉素	产黄青霉(<i>Penicillium chrysogenum</i>)
棒曲霉素	荨麻青霉(<i>Pen. urticae</i>)
麦角生物碱	麦角菌(<i>Claviceps</i> sp.)

的体系,分解产物阻遏的机制尚未搞清楚。

抗菌素生产方面,最先报告过青霉素发酵中葡萄糖的抑制作用,之后陆续知道在许多抗菌素发酵中存在这种作用。表1所示即其中一部分。有两三种已明确其对特定酶的阻遏作用。

放线菌素合成中,氧化酚噻合成酶催化二分子 3-羟基-4-甲基邻氨基苯甲酸或其衍生物的氧化缩合^[15]。采用含有 1% 半乳糖和 0.1% 葡萄糖的谷氨酸无机盐培养基时^[6],在 20—24 小时内葡萄糖已代谢 90%,形成 75% 菌体。至 30 小时实际上葡萄糖消耗殆尽,培养物进入静止期。开始 20 小时几乎不合成氧化酚噻合成酶,但在 20—36 小时该酶的比活性增加至 5—6 倍,至 48 小时则为 12 倍。放线菌素合成比酶合成稍晚,必须到 24 小时后才能检出。葡萄糖消耗完以后,才开始渐渐利用半乳糖。和葡萄糖不同,它被缓慢地代谢(图4)。在

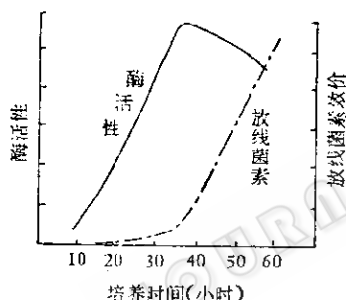
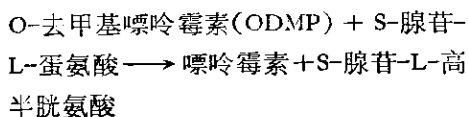


图4 抗生链霉菌培养过程中氧化酚噻合成酶和放线菌素的生成

半乳糖培养基内加入各种浓度的葡萄糖时,随着葡萄糖浓度的增加明显抑制该酶合成^[12]。除葡萄糖以外,甘露糖、甘油也呈现明显阻遏作用。一般能使其迅速生长的碳源阻遏效果更大。采用柠檬酸时虽然生长差,产生的酶的比活性却最大。在 12、18、24 小时加入葡萄糖时,其后 6 小时内几乎完全阻遏酶的合成。

催化下列被认为是嘌呤霉素合成的终止反应的酶(ODMPO-甲基转移酶),已在嘌呤霉素产生菌白黑链霉菌的抽提液中找到^[17]。



该酶的活性自低水平开始,到对数生长期达最大,在静止期则下降或完全消失。已证明该酶的合成受分解产物阻遏^[17]。不存在分解该酶的酶活性,据认为减少有保护性的底物引起活性迅速下降,但其原因还不清楚。用溴化乙锭(EB)处理也可抑制该酶的生成,这部分地说明是由于对转录有区别的抑制作用所致^[18],但尚不能否定质体的参与。

对粘质赛氏杆菌产生灵菌红素的分解产物阻遏可由茶碱(theophylline)部分地解除^[19],而茶碱可抑制该菌的 cAMP 磷酸二酯酶。因为已知 cAMP 参与该菌的灵菌红素合成^[20],所以若抑制 cAMP 磷酸二酯酶,那就可以推断是由于引起了细胞内 cAMP 浓度增高。

甘露糖苷链霉素酶可将链霉素发酵中副生的甘露糖苷链霉素分解为链霉素和甘露糖。该酶的合成可受分解产物阻遏。但是,丧失该酶合成能力的突变株仍然产生链霉素,所以可以认为甘露糖苷链霉素不是链霉素生物合成过程中必有的中间体^[21]。

已经证明 pH 下降、酸的生成是杆菌肽发酵中葡萄糖抑制作用的重要因素^[22,23]。在不含葡萄糖的合成培养基上杆菌肽的产生和生长平行,但是加入 1% 葡萄糖时抗菌素的产生则明显受抑制,杆菌肽的生成延迟。添加葡萄糖时, pH 在开始生长期下降。通过分析培养滤液,已证明 pH 下降是乙酸和丙酸造成的。若用碳酸钙中和培养液,既可防止由葡萄糖引起的 pH 下降又可排阻对产生杆菌肽的抑制作用。无葡萄糖时,在生长至 12 小时用盐酸调 pH 使降低到 5.5 也不抑制杆菌肽产生。但是,用乙酸和丙酸混合物(1:1)使下降到同样 pH 时,则明显抑制杆菌肽的产生。将乙酸和丙酸中和后再加入时则不被抑制,仅用乙酸降低 pH 时抑制杆菌肽的产生和生长,用丙酸降低 pH 时则只抑制杆菌肽的产生。在由 Epps 及 Gale^[24]最先发现的分解产物阻遏系统中,葡萄糖效应比 pH 降低的效应远为巨大。为此,探讨了用 pH 5.0 的磷酸盐缓冲液降低 pH 对酶活性的影响,在此实验中也研究了邻苯二甲酸的作用,未见有效。

杆菌肽生成的场合，他们的结论是：由葡萄糖代谢生成的有机酸，只有在酸性条件下才发生抑制。Dagley 等揭示有机酸的毒性是依赖于 pH，在上面产生杆菌肽的场合则不单是 pH 效应，还有由酸引起的作用。有机酸在低 pH 下呈非解离型，非解离型容易透过膜。所以，解离态可造成细胞内部低 pH。可以认为这种较低的内部 pH 抑制了杆菌肽的产生。利用无细胞制品进行的组氨酸参入杆菌肽实验的最适 pH 是 7.4，而低于这一 pH 时则显著降低组氨酸的参入，这和上述情况非常一致^[25]。乙酸的解离常数比丙酸高，在 pH 5.5 的培养基中丙酸有大量未解离分子存在，所以乙酸比丙酸能造成更低的内部 pH。菌体生长比杆菌肽的产生对低 pH 更为敏感，因此，可以认为乙酸对杆菌肽的产生和菌的生长都会发生抑制。

葡萄糖或分解迅速的碳水化合物，虽然可认为它们是伴随着 pH 下降而同时发生分解产物阻遏作用，但是，在其它情况下，只是低 pH 值和未解离有机酸也会有抑制作用。新霉素发酵的分解产物阻遏伴同着 pH 的下降发生，若加入 0.1% 的乙酸钠，便可使 pH 上升而提高效率^[26]。

四、解除分解产物阻遏的方法

在次级代谢产品的生产中，还未见到尝试合理运用这种技术的报告。个别变异菌株的抗菌素合成与生长初期同时，连这样的菌株也很难分离到。但是，在这类变异菌株中，或许有可能从遗传性方面解除分解产物阻遏。

关于培养过程中逃避分解产物阻遏的方法，可以举出以下几种实际方法：使用利用缓慢的碳源；连续流加碳源；使用含有慢慢向培养基内渗出营养物质的颗粒（锭剂）。

可以认为，利用缓慢的碳源多半是在为寻求良好碳源而选择培养基时无意选择到的。被选中的良好发酵培养基中的天然成份，不单单是要廉价，而且应考虑适当的碳-氮-磷-无机物的平衡，特别是在利用缓慢的场合，更要多加考虑这一点。例如，对于春日链霉菌产生春日霉

素^[27]，能被迅速利用的葡萄糖、甘油并不适当，而麦芽糖可以缓慢利用，更为合适。地衣芽孢杆菌生成杆菌肽时^[28]，葡萄糖、蔗糖因利用迅速而不合适，所以选择利用缓慢的适宜碳源——淀粉。其它的例子如表 2 所示。

表 2 葡萄糖以外的碳源用于次生代谢产物发酵的例子

产 物	最适宜的碳源
青霉素	乳糖
赤霉素	甘油+乳糖
放线菌素	半乳糖
盐霉素	麦芽糖
头孢菌素 C	蔗糖
生物碱	半乳糖、甘露醇、山梨醇
氯霉素	甘油、麦芽糖
杆菌肽	淀粉
春日霉素	麦芽糖

青霉素发酵中，用利用缓慢的乳糖比利用迅速的蔗糖作为碳源时，青霉素的产生开始得早，效价也高^[29]。但是，不用乳糖，运用低浓度流加葡萄糖的方式，也可得到比用乳糖时更高的青霉素效价^[30,31]。这是众所周知的。利用绿黄链霉菌进行的白六烯菌素发酵中，流加缓慢利用的糖，也有效果^[32]。对于制霉菌素^[33]、七烯 OJ-400^[34]、两性霉素 B^[35]，也有同样的效果。大肠杆菌中，在生物合成方面与这种大环内酯类似的脂肪酸合成，也会受到分解产物阻遏，这一现象是意味深长的^[36,37]。用串珠镰孢 (*Fusarium moniliforme*) 生产赤霉素^[38]，采用开始加入 2% 葡萄糖、从第 24 小时加 3% 葡萄糖和按 0.02%/时的比率从第 24 小时开始流加总计 3% 的葡萄糖等三种方式，在 50 加仑发酵罐中分别生成 130、320 及 620 毫克/升的赤霉素。pH 的变化也有三种情况。利用缓慢的甘油作为碳源时与缓慢流加葡萄糖时，pH 变化情况类似，可得到高效价 (650 毫克/升)。用类球形放线菌 (*Actinomyces spheroides*) 生产新生霉素，分数次加入比培养开始一次加入葡萄糖时产量提高^[39]。这样的流加-单批 (fed-batch) 型发酵方式用的很多，不限于用在次级代谢产物生产上，但理解它们在各种场合下的含义是重要的。

表 3 是青霉素发酵中用含有能缓慢浸出的

蔗糖的颗粒及同样的苯乙酸颗粒代替流加法进行三角瓶培养的例子^[40]。

也有很多考虑到生长速度，采用利用迅速和利用缓慢的碳源混合物的情况。例如，在头孢菌素发酵中^[41]就采用了葡萄糖和蔗糖的混合物。

表 3 不同的方法添加蔗糖和苯乙酸对青霉素产量的效果

加入方法		卡青霉素产量 (单位/毫升)
蔗糖	苯乙酸钠	
溶液	溶液	9,700
溶液	颗粒	13,400
颗粒	溶液	14,200
颗粒	颗粒	16,150

五、磷酸盐抑制

已广泛地观察到过量无机磷酸盐也会和葡萄糖一样抑制次级代谢产物的生成^[42]。这一现象，也可归入广义的分解产物阻遏范畴，但详细机制一般地说还不清楚。表 4 为磷酸盐抑制的

表 4 无机磷酸盐对次级代谢产物合成有抑制作用的一些例子

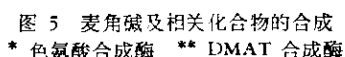
产 物	产 生 菌
链霉素	灰色链霉菌
新霉素	弗氏链霉菌
金霉素	金霉素链霉菌 (<i>Streptomyces aureofaciens</i>)
土霉素	龟裂链霉菌 (<i>S. rimosus</i>)
四环素	金霉素链霉菌
万古霉素	东方链霉菌 (<i>S. orientalis</i>)
放线菌素	抗生链霉菌 (<i>S. antibioticus</i>)
新生霉素	雪白链霉菌 (<i>S. niveus</i>)
新生霉素	牙买加链霉菌 (<i>S. jamuensis</i>)
紫霉素	链霉菌 (<i>Streptomyces</i> sp.)
杀假丝菌素	灰色链霉菌
制霉菌素	诺尔斯氏链霉菌 (<i>S. noursei</i>)
头霉素	灰色链霉菌
瑞斯托菌素	结实原放线菌 (<i>Proactinomyces fructiferi</i>)
绿脓菌兰素	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
吩嗪-1-羧酸	致金色假单胞菌 (<i>Ps. aureofaciens</i>)
灵菌红素	粘质赛氏杆菌
多粘菌素	多粘芽孢杆菌 (<i>Bacillus polymyxa</i>)
麦角碱	雀稗麦角 (<i>Claviceps purpurea</i>)
布雷非德菌素	弯孢 (<i>Curvularia lunata</i>)
柠檬醛	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)

例子，多数是采用对生长亚适量的磷酸盐浓度来生产次级代谢产物。当然，有时也必需高浓度磷酸盐，例如，利用灰平链霉菌 (*S. griseoplanus*) 生产抗荚膜菌素^[43]时，就必需高浓度的磷酸盐和葡萄糖。磷酸抑制杆菌肽产生^[44]，可用 pH 下降来解释；对土霉素而言，采用无机氮源的合成培养基磷酸盐的效果大，在用有机氮源氨基酸的培养基中，用不同种类的有机氮源时磷酸盐的适宜浓度亦不同，用 β -丙氨酸等时，即使磷酸盐浓度相当高抑制作用也小^[45]。

Weinberg^[46] 推测生长时用完的磷酸，有夺取细胞必需的金属的作用，但缺乏证据。对烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 的麦角碱生成而言^[47]，使用可继续增加生长的无机磷酸盐浓度 (10 克/升)，则生物碱的合成减半。高磷酸水平下，色氨酸合成酶活性降低，菌体内的色氨酸浓度下降。可是补以色氨酸，则恢复生物碱的合成。在麦角属 (*Claviceps*) 中，磷酸盐对麦角碱合成的抑制，也可由色氨酸消除。这表示磷酸盐抑制是通过色氨酸而发挥作用的^[48]。上述抑制作用甚至也可由色氨酸结构类似物 4-甲基色氨酸、5-甲基色氨酸来消除^[49]。在发生了磷酸盐抑制的培养物中，合成途径上第一个酶二甲基丙烯基色氨酸合成酶 (由色氨酸及其结构类似物诱导的酶) 水平很低，而色氨酸或其结构类似物可增加其活性达 10 倍以上^[49] (图 5)。

磷酸盐起抑制碱性磷酸酶合成的作用，该酶为链霉素^[50,51]、紫霉素^[52] 及万古霉素^[53] 等抗菌素生物合成中间体的脱磷酸过程所必需。磷酸对灵菌红素的抑制和磷酸对碱性磷酸酯酶抑制大体平行^[54]，虽然磷酸酯酶在灵菌红素形成中的作用尚未确定，但可以认为磷酸的作用是影响该酶的合成或活性。就万古霉素、绿脓菌兰素及灵菌红素而言，它们开始产生时，立即可以观察到碱性磷酸酯酶活性的增加。

已有磷酸抑制多烯大环内酯抗菌素 (两性霉素 B、抗酵母素、杀假丝菌素、制假丝菌素、制酵母菌素、七烯枝菌素及制霉菌素) 合成的报告^[55]。Liu 等^[56] 观察到在培养灰色链霉菌时，若加入 10 毫克分子的磷酸盐，则抑制 96% 杀



暗示细胞内 ATP 或细胞的能荷控制抗菌素合成。ATP 含量在抗菌素合成开始即同时迅速下降。可能是培养液中磷酸盐的水平控制着细胞内 ATP 水平,细胞内 ATP 水平则作为开始抗菌素合成的效应物而起作用。如用氯霉素或利福平抑制蛋白质合成或 RNA 合成,杀假丝菌素生成速度便降低。这就表示抗菌素产生过程中有着杀假丝菌素合成酶的连续更新。若在这样的体系中加入磷酸盐,则进一步抑制杀假丝菌素生成^[59]。在这种条件下,杀假丝菌素合成酶的合成已不发生。所以,磷酸盐至少部分地起着抑制杀假丝菌素合成酶活性的作用。

已获得不能由培养液内磷酸盐浓度调节杀假丝菌素产生的变异株^[60]。这样的变异株不仅保证高速度产生抗菌素,还生成大量的菌体,所以对抗菌素工业生产有用。

由于缺乏磷酸所造成的营养生长的限制,被认为是由于把代谢转换为产生次级代谢产物的缘故。Bu[']Lock^[62]认为对营养物的限制不是瞬时现象,而是连续的,并已提出证据表明,引起不同的次级代谢产物的生成,对营养物的限制程度不同。

氮和碳、磷同是机体的主要成分,由于这些元素提供给细胞的形式不同,导致酶的种类、中间产物及终产物不同。氮浓度与碳浓度比率适当时可带来最大的产量。这种情况在发酵生产

中是常见的。次级代谢产物生产中, 供给高浓度的容易被利用的无机铵态氮时(有时氨基酸、肽也易被利用), 由于它们促进生长或不发生影响, 强烈抑制着次级代谢产物产生。

例如, 由抗生素链霉菌生产竹桃霉素^[64], 因促进生长的铵盐浓度而使抗菌素的产生减少。由猩红梭孢(*Fusidium coccineum*)生产梭链孢酸的过程中, 玉米浆之类易被利用的氮源, 采用促进生长的浓度则产量减少^[65]。此外, 无机氮源、氨基酸、肽也有同样的作用^[66], 象蛋白质那样的氮源则可促进抗菌素的产量。由带小棒链霉菌(*S. clavuligenus*)生产头霉素^[67]和由雪白链霉菌产生新生霉素^[68]时, 可观察到铵盐或无机氮源对抗菌素产生的抑制。由绿黄链霉菌生产白六烯菌素^[69]时, 在抗菌素产生期流加氮源, 使培养物逆转到生长期而降低抗菌素产生。由荨麻青霉生产棒曲霉素时^[70]由于限制氮源而使繁殖期开始。

七、初级代谢调节对次级代谢的作用

因为次级代谢产物来自初级代谢的关键中间体, 所以初级代谢调节影响次级代谢是理所当然的。氨基酸、酰基辅酶 A(乙酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A)、核酸碱基-核苷酸、糖等前体物且不待说, 而且能量水平、还原型 NAD 的水平也有关系。

很早以前就知道, 赖氨酸对产黄青霉产生青霉素有抑制作用。该菌赖氨酸合成途径中对高柠檬酸合成酶的反馈抑制作用, 已在活体内证明^[71]。但是, 在离体时该酶对赖氨酸不敏感, 用高浓度的苜蓿青霉素(20 毫克分子)可部分抑制(50%)、赖氨酸则可增强抑制(和 20 毫克分子赖氨酸共存时抑制 70%)^[72]。看来还必须考虑离体时酶的脱敏问题, 这需要进一步研究(图 6)。

关于链霉菌产生头孢菌素的研究^[73-75]已证明, 它的前体物和参与由霉菌生物合成头孢菌素 C 的前体物相同, 为半胱氨酸、缬氨酸及 α -氨基己二酸(α -AAA)。在链霉菌中, 赖氨酸经由二

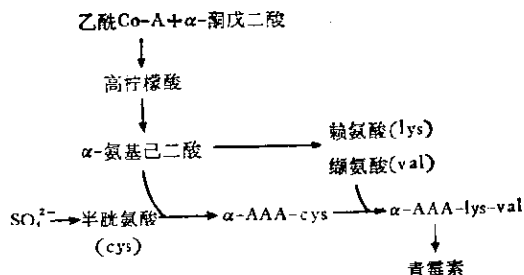


图 6 产黄青霉中青霉素合成和赖氨酸的关系

氨基庚二酸(DAP)生成, 因为 α -AAA 不是赖氨酸生物合成的中间体, 所以 α -AAA 不是来自 α -酮戊二酸和乙酰 Co-A, 而是由赖氨酸通过异化作用生成的。因此, 赖氨酸不参入霉菌的头孢菌素 C, 但参入放线菌的头孢菌素合成。和头孢菌素不同, 在头霉素 C 的生物合成中, α -AAA 的生成是调节反应。添加 α -AAA 可促进耐内酰胺链霉菌(*S. lactamdurans*)合成头霉素 C。7-甲氧基的生源是 L-蛋氨酸的甲基; L-精氨酸的胍基则是氨甲酰基侧链的来源。从利波曼氏链霉菌(*S. lipmanii*)中分离到缺失 DAP 脱羧酶的赖氨酸营养缺陷型(LA 423)^[76], 它由于缺乏赖氨酸而会在细胞内积累 DAP^[75]。这种情况暗示赖氨酸控制着赖氨酸生物合成的早期步序。用 ¹⁴C-天门冬氨酸已确定其途径。抗菌素合成和 α -AAA 的合成依赖于供给的赖氨酸浓度, 这也证实了 α -AAA 是赖氨酸的异化产物的推断。Whitney 等^[74]用 ¹⁴C-DL-赖氨酸进行的参入实验表明放射性活性大部分进入抗菌素的侧链上。赖氨酸异化作用的第一步是以 α -酮戊二酸作为转氨作用的氨基受体^[77]。该酶活性水平减低了的变异株(LF-22)既不产生青霉素也不产生头孢菌素[这时为 7-(5-氨基-5-羧基戊酰胺)-7-甲氧基头孢酸]。这种情况下, 即便补充转氨作用的产物 α -AAA 半缩醛也不合成抗菌素。此外, 利波曼氏链霉菌的赖氨酸营养缺陷型突变株, 在补给 200 微克/毫升的赖氨酸时虽然生长正常, 但既不生成青霉素也不合成头孢菌素^[78]。不合成的原因还不清楚(图 7)。

关于蛋氨酸对顶头霉(*Cephalosporium acremonium*)产生头孢菌素 C 和青霉素 N 的效应,

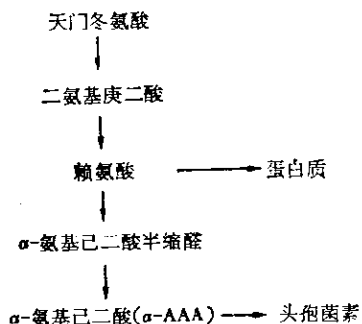


图 7 链霉菌中赖氨酸的生物合成和头孢菌素的关系

已有很多研究。虽然已清楚地表明 ^{35}S -蛋氨酸稀积并参入头孢菌素 C^[79], 但根据一些观察, 有人认为这不是作为硫的生源而是一种还不了解的生理作用^[80-82]。最近用半胱氨酸及蛋氨酸代谢途径阻塞的变异株^[82-85]进行的观察结果, 支持了这样的假说。野生型菌株在硫酸盐合成培养基上合成 90 微克/毫升的头孢菌素 C, 尽管半胱氨酸是比蛋氨酸(无论 D 型或 L 型均有效)更直接的硫供给体, 但只是稍微增加抗菌素的产量(120 微克/毫升)。另一方面, 蛋氨酸可促进头孢菌素 C 产量达 400 微克/毫升, 用非含硫结构类似物正亮氨酸亦可促进抗菌素合成。在蛋氨酸最适浓度下加入正亮氨酸并不增加抗菌素的合成。这种情况暗示蛋氨酸和正亮氨酸的作用机制是相同的。就连在硫酸盐培养基中抗菌素合成量低的情况下, 也受蛋氨酸的调节。因为自半胱氨酸至蛋氨酸途径发生遗传阻塞的变异株(一步获得的 Met⁻变异株)在加了足以维持最适生长的蛋氨酸的硫酸盐培养基中也不产生抗菌素。早期步序被阻塞的变异株 274-1(met⁻/cys⁻) 在含过量半胱氨酸培养基中产 400 微克/毫升头孢菌素 C, 在含足供生长的蛋氨酸的培养基中产生头孢菌素 C 800 微克/毫升。在这种初期步序被阻塞之上再增加自半胱氨酸至蛋氨酸途径被阻塞的双重变异株 S-1, 在上述条件(过量的半胱氨酸和维持生长的蛋氨酸)下不合成头孢菌素 C。加入过量的蛋氨酸或正亮氨酸时开始合成头孢菌素 C。H 菌株是初期的硫代谢存在阻塞, S 自蛋氨酸至半胱氨酸的转移也

被阻塞的双重突变株(双重 cys⁻突变株), 就该菌株而言, 虽然还存在为生长所必需的半胱氨酸抑制蛋氨酸的摄取问题, 但已采用把蛋氨酸·肽向细胞“强制运载”(illicit transport)的方法进行过实验。该变异株的头孢菌素合成为丙氨酰蛋氨酸或甘氨酰蛋氨酸促进。即发现不利用蛋氨酸作为硫的生源的变异株, 头孢菌素 C 的合成也可由蛋氨酸促进。蛋氨酸除作为前体物以外的调节作用虽已有所了解, 但其机制至今还不清楚。以前曾认为是由于对半胱氨酸脱巯基酶的阻遏而造成的半胱氨酸分解抑制效应, 但已为实验所否定。

由硫酸盐合成头孢菌素 C 能力增强的变异株中, 已经见到头孢菌素 C 的合成受蛋氨酸抑制的现象^[86]。甚至在缺硫的细胞中, 不含硫的正亮氨酸也和蛋氨酸一样抑制头孢菌素 C 的合成^[86]。把该突变株缺硫的细胞在含有硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐或 L-胱氨酸的条件下培养时, DL-正亮氨酸抑制头孢菌素 C 和青霉素 N 的产生^[87]。可是, 在培养一段时间后再加入则不抑制。另一方面, 对于亲株, 则不管何时添加正亮氨酸都有促进抗菌素产生的效果。加入 L-蛋氨酸或正亮氨酸和硫酸盐时, 可看到细胞内半胱氨酸库增加。蛋氨酸和正亮氨酸甚至促进半胱氨酸脱巯基酶合成, 这一效应在该突变株中是显著的。已证明该酶为半胱氨酸或胱氨酸所诱导。根据这些, 认为变异株中具有维持高水平半胱氨酸库能力的推测得到了支持。进而又了解到, 估计是参与从蛋氨酸合成半胱氨酸的 L-丝氨酸巯基酶活性, 大约增加为亲株的一倍。所以可以推测到, 在变异株中蛋氨酸容易变为半胱氨酸, 而使半胱氨酸增加到抑制抗菌素产生的浓度。还发现细胞内半胱氨酸的分解产物牛磺酸也会增加。正亮氨酸的作用也可用细胞内半胱氨酸库的增加来说明(图 8)。

在培养初期加入蛋氨酸、正亮氨酸时有作用, 在加了蛋氨酸的培养基中比在硫酸盐培养基中生长要慢, 生长菌丝的代谢活性提高^[81]。至于菌的形态, 在硫酸盐培养基上生长的菌呈丝状, 而在含蛋氨酸中生长的菌膨胀而不规则,

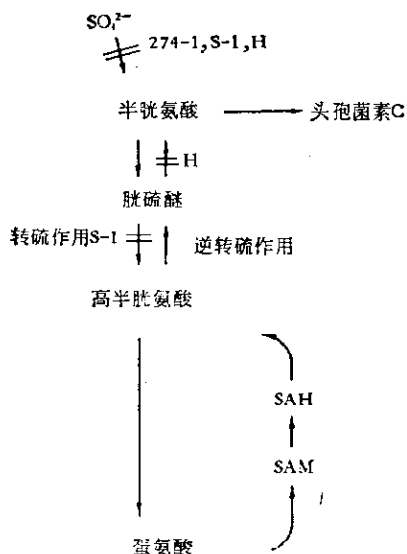


图 8 头孢菌素 C 合成和蛋氨酸的关系

并生成断裂为许多节的孢子^[81, 88]。用正亮氨酸时，也可见到菌丝易断裂成段^[89]。还有报道说，对同化无机硫的控制由于发生变异而改变，从而深刻地影响着头孢菌素 C 的合成。

灰色链霉菌产生的多烯大环内酯抗菌素杀假丝菌素分子中的氨基苯乙酮部分，由葡萄糖经莽草酸、对氨基苯甲酸(PABA)而形成。5 毫克分子的 L-色氨酸、L-酪氨酸及 L-苯丙氨酸混合物抑制 50% 的杀假丝菌素的合成。从外面摄入 PABA 则促进 50%^[90]。可以认为细胞内 PABA 合成受到外来的过量芳香族氨基酸反馈

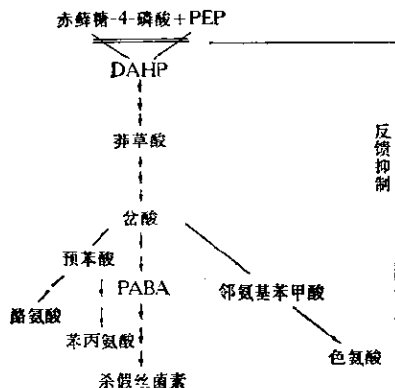


图 9 芳香族氨基酸对芳香族多烯大环内酯生物合成的调节机制

抑制，而外部的 PABA 可以更高效率被摄入。用静息细胞研究这种情况，表明芳香族氨基酸中色氨酸有这种效果，苯丙氨酸、酪氨酸无效^[91]。显然有图 9 所示的调节作用。

杀假丝菌素的生物合成受脂肪酸合成酶聚合亚基的特异抑制剂浅兰菌素抑制^[92]。另一方面，根据标记的乙酸盐及丙酸盐分子在不同位置参入的结果，已证明多烯大环内酯抗菌素由和脂肪酸相同的原材料组成^[93]。为此，可以认为在杀假丝菌素的生物合成中，乙酸和丙酸按和脂肪酸合成时同样的机制进行缩合。油酸、棕榈酸之类长链脂肪酸抑制杀假丝菌素的合成，可认为是受到了脂肪酸合成时同样的反馈抑制，如图 10 所示^[93]。从脂肪酸和油脂作用的差

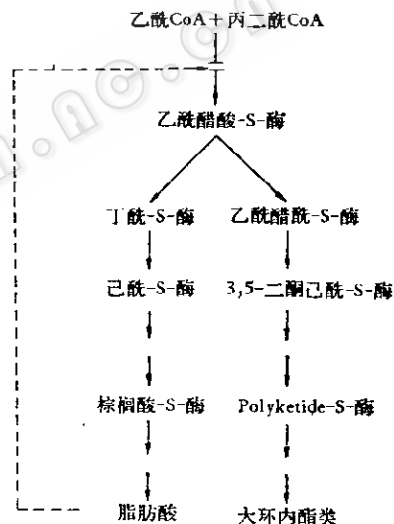


图 10 脂肪酸对多烯大环内酯生物合成的调节

异可以得出这样的结论：长链脂肪酸的抑制作用不是作为去污剂作用于膜。油分解缓慢，不能达到有抑制作用的脂肪酸浓度。已报告过几种天然油脂可促进多烯大环内酯抗菌素、制酵母菌素的产生^[94]。亦报道过诺尔斯氏链霉菌(产生制霉菌素的菌)的乙酰 Co-A 羧化酶的反馈抑制^[95]。脂肪酸型消泡剂抑制灰黄霉素的合成一事，或许也可用对羧化酶反应的反馈抑制来说明。已知促进羧化酶反应的物质有柠檬酸^[96]。

基糖苷类抗菌素嵯峨霉素合成中,添加杆菌肽等可使培养物在一段时间内增加抗菌素产量,抑制葡萄糖胺参入细胞壁而增加其参入抗菌素的量^[107](图 12)。

在金霉素链霉菌、龟裂链霉菌中,氟代乙酸、亚铁氰化钾、硫氰酸苯酯使三羧酯循环活性下降,但促进四环素的产生^[108]。可以认为,当三羧酸循环活性降低而导致 ATP 水平下降时,便促进由积累的乙酸和由磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 生成丙二酰-CoA,从而便促进脂质的生物合成和四环素的合成。在四环素高产菌株中,可见到标记的乙酸盐参入脂肪酸的量比低产株高 4 倍^[109]。还可看到,对丙二酰-CoA 的生成而言,由 PEP 羧化酶生成草酰乙酸,再由草酰乙酸氧化脱羧生成丙二酰辅酶 A 的活性比由乙酰 Co-A 羧化酶生成的要高^[110]。若比较一下高产株和低产株,则可见到高产株中三羧酸循环中的酶活性低,ATP 水平也低。由 ATP 生成聚甲基磷酸酯的过程中,可能产生 ADP,通过该过程可能进行乙酸的氧化。在低产菌株中,聚合磷酸酯的含量在整个生长期比高产株高 8—10 倍。无论高产株或低产株,在对数生长期末聚合磷酸酯含量都最高^[111]。生长期的糖分解过程,是借助 ATP 葡萄糖激酶,而在抗菌素产生期的糖分解过程则是使用聚合磷酸酯的高能磷酸键而进行的^[112]。人们注意到,为了产生同一生物合成中间体(丙二酰 Co-A、己糖磷

酸)在初级代谢和次级代谢中使用了不同的酶系。图 13 是金霉素链霉菌中三羧酸循环可能的调节机制。

八、人为控制初级代谢使次级代谢产物增加产量

如前所述,因为次级代谢一般是酶水平受到限制的,所以前体物的增加并不一定立即导致产量的增加。虽然也有增加产量的例子,但多数是不增加的。然而,根据上一节的说明,已经可以理解,次级代谢产物既在生物合成方面,又在调节方面通过调节物质和初级代谢相联系着。假若具备了一定程度有关次级代谢产物的生物合成途径、调节的知识,则可以根据合理的推测,有目的地从培养条件和遗传方面着手,使其增加产量或改变次级代谢产物相互间的合成比例。实例虽少,下面仍想举几个。

吸水链霉菌所产的麦里多霉素 6 个组份中,组份(III)可因添加异亮氨酸而以高效率合成,在被认为是提高了异亮氨酸合成能力的缬氨酸抗性株中,即使不加入异亮氨酸,该组份也可以高效率地合成(图 14)。

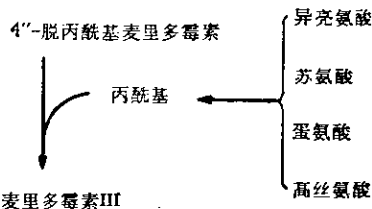


图 14 异亮氨酸与麦里多霉素 III 合成反应的关系

吡咯亚硝菌素是由色氨酸合成的抗霉菌抗菌素,加入色氨酸可提高其合成产量。和氨基酸发酵时一样,分离到的色氨酸的结构类似物抗性变异株中,不加色氨酸也会增加吡咯亚硝菌素合成量的菌株高频率出现^[114]。

在 β -内酰胺抗菌素中, α -AAA、半胱氨酸、缬氨酸是前体物,可以尝试分离与这些氨基酸有关的结构类似物抗性菌株,对三氟亮氨酸、2-氨基乙基-L-半胱氨酸、DL-正缬氨酸、DL-烯丙基甘氨酸等有抗性的菌株,抗菌素效价均提高,

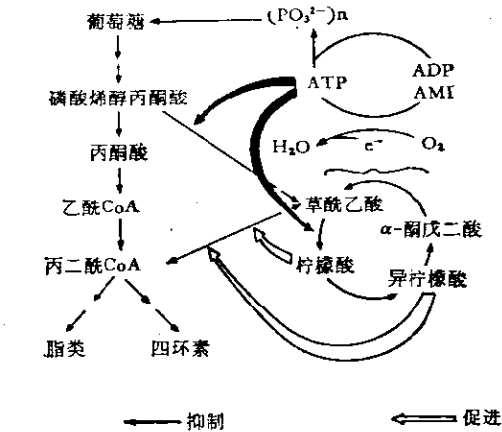


图 13 金霉素链霉菌中可能存在的三羧酸循环调节机制

有的菌株的产量比亲菌高 2 倍^[15]。半胱氨酸营养缺陷型回复突变株中也有提高了产量的菌株。已报道过产黄青霉中硫酸根离子的输送受蛋氨酸抑制的现象, 并已得到解除了对摄取硫酸根离子调节作用的变异株^[16]。在头孢菌素中已获得改善了利用硫酸根离子的能力的变异株^[17], 由于改善了对蛋氨酸的利用而使头孢菌素的合成得到改良^[18]。

已经报道, 在提高了青霉素生产能力的产黄青霉变异株中, 缬氨酸生物合成途径上的第一个酶——乙酰氧肟酸合成酶发生了脱敏和解阻遏^[19]。

(待续)

参 考 文 献

- [1] J. D. Bu'Lock: Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development, "Filamentous Fungi", Vol. I. Industrial Mycology, ed. by J. D. Smith and D. I. Berry, Edward Arnold, London, 1975.
- [2] J. D. Bu'Lock: "The Biosynthesis of Natural Products. An Introduction to Secondary Metabolism", McGraw-Hill, Benhsire, 1965.
- [3] 中山 清: 发酵における微生物代謝の意図的制御, 最近の微生物工業, 化学と工業社, 1973, p.129.
- [4] 梅沢浜夫: 科学 46, 130 (1976).
- [5] 阿西昌则: *Amino Acid and Nucleic Acid*, No. 35, 15(1977).
- [6] J. C. Wolf and C. J. Mirocha: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 546(1977).
- [7] K. Nagaoka and A. L. Demain: *J. Antibiot.*, 28, 627(1975).
- [8] E. D. Weinberg and S. M. Tonniss: *Appl. Microbiol.*, 14, 850(1966).
- [9] E. F. Elstner and R. J. Subadonnik: *J. Biol. Chem.*, 246, 6973(1971).
- [10] J. B. Walker and V. S. Hnilica: *Biochim. Biophys. Acta*, 89, 473(1964).
- [11] K. Kurahashi, M. Yamada, K. Mori, K. Fujikawa, M. Kambe, Y. Imae, E. Satō, H. Takahashi and Y. Sakamoto: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 34, 815(1969).
- [12] M. Gallo and E. Katz: *J. Bacteriol.*, 109, 659(1972).
- [13] P. I. Forrester and G. M. Gaucher: *Biochemistry*, 11, 1102(1972).
- [14] B. Magasanik: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 26, 249(1961).
- [15] E. Katz and H. Weissbach: *J. Biol. Chem.*, 237, 882(1962).
- [16] R. Marshall, E. Redfield and H. Weissbach: *Arch. Biochem. Biophys.*, 123, 317(1968).
- [17] L. Sankaran and B. M. Pogall: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 8, 721(1975).
- [18] L. Sankaran and P. M. Pogall: *Nature New Biol.*, 245, 257(1973).
- [19] S. Clements-Jewery: *Experientia*, 15, 421(1976).
- [20] H. V. Rickenberg: *Ann. Rev. Microbiol.*, 25, 396(1974).
- [21] A. L. Demain and E. Inamine: *Bacteriol. Revs.*, 34, 1(1970).
- [22] H. J. Haavik: *J. Gen. Microbiol.*, 84, 321(1974).
- [23] H. J. Haavik: *ibid.*, 84, 383(1974).
- [24] H. M. Epps and E. F. Gale: *Biochem. J.* 36, 619(1942).
- [25] H. Ishihara, T. Sasaki and K. Shimura: *Biochem. Biophys. Acta*, 166, 496(1968).
- [26] S. Managallam, A. A. Vashi, R. S. Sakapure and K. S. Gopalakrishnan: *Ind. Antibiot. Bull.*, 17, 1(1974).
- [27] 八木佳明、岡村和彦、尾崎浅一郎: 发酵工学会大会講演要旨集, p.162 (1972).
- [28] 本下蔵郎ら: *J. Antibiot. Ser. B.*, 7, 1(1954).
- [29] V. F. Davey and M. J. Johnson: *Appl. Microbiol.*, 1, 208(1953).
- [30] F. V. Soltero and M. J. Johnson: *ibid.*, 1, 52(1953).
- [31] F. V. Soltero and M. J. Johnson: *ibid.*, 2, 4(1954).
- [32] J. F. Martin and L. E. McDaniel: *Develop. Ind. Microbiol.*, 15, 324(1974).
- [33] I. M. Tereshin: "Polycyclic Antibiotics—Present and Future" Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 1976.
- [34] G. Siewert and K. Kieslick: *Appl. Microbiol.*, 21, 1007(1971).
- [35] G. A. Brewer and W. R. Frazier: "Antimicrobial Agent and Chemotherapy—1961", Amer. Soc. Microbiol., 1962, p. 217.
- [36] P. Overath and E. M. Raufuss: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29, 28(1967).
- [37] G. Weeks, M. Shapiro, R. O. Burns and S. J. Wakil: *J. Bacteriol.*, 97, 827(1969).
- [38] M. A. Darken, A. L. Jensen and P. Shu: *Appl. Microbiol.*, 7, 301(1959).
- [39] L. P. Ovehinnikova: *Tr. Biol. Inst., Akad. Nauk SSSR, Sib. Otd.*, 25, 103(1975) [cf. *CA*, 84, 15657c(1976)].
- [40] V. Matelova, A. Břečka and J. Mtušková: *Appl. Microbiol.*, 23, 669(1972).
- [41] A. L. Demain: *Clinical Med.*, 70, 2045(1963).
- [42] E. D. Weinberg: *Dev. Ind. Microbiol.*, 15, 70(1974).
- [43] L. D. Boeck, K. L. Christy and R. Shah: *Appl. Microbiol.*, 21, 1075(1971).
- [44] H. I. Haavik: *J. Gen. Microbiol.*, 84, 226(1974).
- [45] W. A. Zygmunt: *Appl. Microbiol.*, 12, 195(1964).
- [46] E. D. Weinberg: *Adv. Microbiol. Physiol.*, 4, 1(1974).
- [47] K. K. Rao and A. R. Gupta: *Naturwissenschaften*, 62, 394(1975).

- [48] J. E. Robbers, L. W. Robertson, K. M. Hornemann, A. Jindra and H. G. Floss: *J. Bacteriol.*, **112**, 791(1972).
- [49] V. M. Krupinski, J. E. Robbers and H. G. Floss: *ibid.*, **125**, 158(1976).
- [50] A. L. Miller and J. B. Walker: *ibid.*, **104**, 8 (1970).
- [51] J. B. Walker: *Lloydia*, **34**, 363(1971).
- [52] L. Pass and K. Raczyńska-Bojanowska: *Acta Biochim. Pol.*, **15**, 355(1968).
- [53] F. P. Mertz and L. E. Doolin: *Can. J. Microbiol.*, **19**, 263(1973).
- [54] F. R. Witney, M. L. Failla and E. D. Weinberg: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1042(1977).
- [55] J. F. Martin and L. E. McDaniel: *Adv. Appl. Microbiol.*, **21**, 1(1977).
- [56] C. M. Liu, L. E. McDaniel and C. P. Schaffner: *Antimicrobial Ag. Chemother.*, **7**, 196 (1975).
- [57] J. F. Martin and L. E. McDonald: *Europ. J. Appl. Microbiol.*, **3**, 135(1976).
- [58] J. F. Martin and A. L. Demain: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 1103(1976).
- [59] J. F. Martin: Phosphate regulation of gene expression in candidian biosynthesis, "Microbiology-1976", ed. by D. Schlessinger, Amer. Soc. Microbiol. Washington, 1977, p. 548.
- [60] J. F. Martin, P. Liras and A. L. Demain: Abstracts 5th Intern. Fermentation Symp. Berlin, 1976 Abstract No. 804.
- [61] E. Čurdová, E. Křemen, A. Vaněk and Z. Hošťálek: *Folia Microbiol.*, **21**, 481 (1976).
- [62] M. Herold and Z. Hošťálek: The carbohydrate metabolism of producing microorganisms and the biosynthesis of tetracycline antibiotics, "Biogenesis of Antibiotic Substances" ed. by Z. Vaněk and Z. Hošťálek, Czechoslovak Acad. Sci. Prague, 1965, p. 93.
- [63] J. D. Bu'Lock, R. W. Detroy, Z. Hošťálek and A. Munin-Al-Shakarchi: *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **62**, 377(1974).
- [64] E. I. Surikova, L. M. Novikova and T. M. Gerasimova: *Antibiotiki*, **21**, 195(1976).
- [65] G. A. Penzikova, N. E. Stepanova and M. M. Levitova: *ibid.*, **22**, 29(1977).
- [66] G. A. Penzikova, N. E. Stepanova and M. M. Levitova: *ibid.*, **20**, 867(1975).
- [67] Y. Aharonowitz and A. L. Demain: 16th Inter-science Conference on Antimicrobial Ag. Chemother. 27—29, Oct. 1976—Chicago, Abst. No. 49.
- [68] C. G. Smith: *Appl. Microbiol.*, **8**, 42(1976).
- [69] J. F. Martin and L. E. McDaniel: *Dev. Ind. Microbiol.*, **15**, 1324(1974).
- [70] J. W. D. Grootwassink, J. D. Ehman and G. M. Gaucher: 5th Intern. Fermentation Symp. 1976, Berlin Abst. No. 12, 16.
- [71] A. L. Demain and P. S. Massekarak: *J. Gen. Microbiol.*, **82**, 143(1974).
- [72] P. S. Massekarak and A. L. Demain: *Appl. Microbiol.*, **28**, 265(1974).
- [73] E. Inamine and J. Birnbaum: Absts. Ann. Mtg. Amer. Soc. Microbiol., Philadelphia, 1972, p. 12.
- [74] J. G. Whitney, D. R. Brannon, J. A. Mabe and K. J. Wicker: *Antimicrobial Ag. Chemother.*, **1**, 247(1972).
- [75] J. R. Kirkpatrick, L. E. Doolin and O. W. Godfrey: *Antimicrobial Ag. Chemother.*, **4**, 542 (1973).
- [76] J. R. Kirkpatrick and O. W. Godfrey: *Folia Microbiol.*, **18**, 90(1973).
- [77] J. R. Kirkpatrick, O. W. Godfrey and L. E. Doolin: Absts. 73rd Ann. Mtg. Amer. Soc. Microbiol., Miami Beach, 1973, E 74.
- [78] O. W. Godfrey and J. R. Kirkpatrick: Absts. 72nd Ann. Mtg. Amer. Soc. Microbiol. Philadelphia, 1972, E-69.
- [79] P. G. Caltrider and H. F. Niss: *Appl. Microbiol.*, **14**, 746(1966).
- [80] A. L. Demain, J. F. Newkirk and D. Hendlin: *J. Bacteriol.*, **85**, 339(1963).
- [81] P. G. Caltrider, F. M. Huber and L. E. Day: *Appl. Microbiol.*, **16**, 1913(1968).
- [82] S. W. Drew and A. L. Demain: *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 743(1973).
- [83] S. W. Drew and A. L. Demain: *Europ. J. Appl. Microbiol.*, **1**, 121(1975).
- [84] S. W. Drew and A. L. Demain: *Antimicrobial Ag. Chemother.*, **8**, 5(1975).
- [85] S. W. Drew and A. L. Demain: *J. Antibiot.*, **28**, 889(1975).
- [86] K. Komatsu, M. Mizuno and R. Kodaira: *ibid.*, **28**, 881(1975).
- [87] K. Komatsu and R. Kodaira: *ibid.*, **30**, 226 (1977).
- [88] J. Nüesch, M. Liersch and H. J. Treichler: Absts. 4th Intern. Fermentation Symp. Kyoto. 1973, p. 228.
- [89] S. W. Drew, D. J. Winstanley and A. L. Demain: Absts. Ann. Mtg. Amer. Soc. Microbiol., Miami Beach, 1973, p. 12.
- [90] C. M. Liu, L. E. McDaniel and C. P. Schaffner: *J. Antibiot.*, **25**, 116(1972).
- [91] J. F. Martin and L. E. McDaniel: *Appl. Microbiol.*, **21**, 1(1977).
- [92] J. F. Martin and L. E. McDaniel: *Biochim. Biophys. Acta*, **411**, 186(1975).
- [93] J. F. Martin: *Dev. Ind. Microbiol.*, **17**, 223 (1976).
- [94] I. M. Tereshin: "Squibb Lectures on Biosynthesis and Mode of Action of polyene Macrolide Antibiotics", Inst. Microbiol. Rutgers Univ., 1974 (由文献[93]引用)。
- [95] K. Raczyńska-Bojanowska: *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **28**, 499(1974).
- [96] S. J. Wakil and E. M. Barnes: Fatty acid metabolism, "Comprehensive Biochemistry", ed.

- by M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1971, p. 57.
- [97] V. S. Malik: *Adv. Appl. Microbiol.*, **15**, 297 (1972).
- [98] A. Jones and L. C. Vining: *Can. J. Microbiol.*, **22**, 237(1976).
- [99] D. A. Lowe and D. W. S. Westlake: *Can. J. Biochem.*, **49**, 448(1971).
- [100] D. A. Lowe and D. W. S. Westlake: *ibid.*, **50**, 1064(1972).
- [101] F. Lingens, W. Goebel and H. Uessler: *Europ. J. Biochem.*, **2**, 442(1967).
- [102] H. G. Floss: Regulation of alkaloid biosynthesis, "Microbiology-1976", ed. by D. Schlessinger, *Amer. Soc. Microbiol.*, Washington, 1977, p. 353.
- [103] H. P. Schmauder and D. Gröger: *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **164**, 41(1973).
- [104] H. G. Floss and U. Mothes: *Arch. Mikrobiol.*, **48**, 213(1964).
- [105] O. Nimi, A. Kokan, K. Manabe, K. Machara and R. Nomi: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 587 (1976).
- [106] K. Basak and S. K. Majumder: *Folia Microbiol.*, **21**, 43(1976).
- [107] 伊藤菁我、中山 清: 未发表。
- [108] Z. Hošťálek, M. Tintěrová, V. Jechová, M. Blumauerová, J. Suchý and Z. Vaněk: *Bio-technol. Bioeng.*, **11**, 539(1969).
- [109] V. Běhal, J. Cudlín and Z. Vaněk: *Folia Microbiol.*, **14**, 117(1969).
- [110] V. Běhal, V. Jechová, Z. Vaněk and Z. Hošťálek: *Phytochemistry*, **16**, 347(1977).
- [111] I. S. Kulayev, A. M. Bobyk, I. Tobek and Z. Hošťálek: *Biokhimiya*, **41**, 343(1976).
- [112] Z. Hošťálek, I. Tobek, M. A. Bobyk and I. S. Kulayev: *Folia Microbiol.*, **21**, 131(1976).
- [113] 内田 稔、鈴木勝、宮川權一郎、杉田紀夫、沢田秀和、東出荣治: 農芸化学大会講演要旨集, p.86 (1975)。
- [114] R. P. Elander, J. A. Mabe, R. L. Hamill and M. Gorman: *Folia Microbiol.*, **16**, 156(1971).
- [115] O. T. Godfrey: *Antimicrobial Ag. Chemother.*, **4**, 73(1973).
- [116] I. H. Segel and M. J. Johnson: *J. Bacteriol.*, **81**, 91(1961).
- [117] H. F. Niss and C. H. Nash, III: *Antimicrobial Ag. Chemother.*, **4**, 474(1973).
- [118] J. H. Nuesch, J. Treichler and M. Liersch: The biosynthesis of cephalosporin C, "Genetics of Industrial Microorganisms Actinomycetes and Fungi", Vol. II, ed. by Z. Vaněk, L. Hošťálek and J. Cudlín, Academia Pragne, 1973, p. 309.
- [119] S. A. Goulden and F. W. Chataway: *J. Gen. Microbiol.*, **59**, 111 (1969).

[李玲阁译, 曹宁生校]