

微生物次级代谢的调节 (续)

(日) 中山 清

九、次级代谢调节中的诱导作用

当微生物生长达到平衡后,即“无限制的”生长期(营养期)之后,由于特定营养成分减少而停止急剧生长,进入有限的生长期——繁殖期,此时次级代谢才开始进行。因为在营养期一般不出现催化次级代谢的酶,所以可以认为在这个转换期中发生了次级代谢酶的诱导或解阻遏。

下面,谈谈已经搞清楚了了的诱导效应物的一些反应情况。在磷酸抑制一节中,已谈到参与麦角碱合成的二甲基烯丙基色氨酸合成酶受色氨酸诱导的现象。这里首先谈谈对于苯二氮杂草生物碱类合成的诱导。在圆弧形青霉的发芽期或生长初期,若加入前体物苯丙氨酸或不能作为前体物的苯丙氨酸结构类似物(m-甲基苯丙氨酸、β-甲基丙氨酸、m-羧基苯丙氨酸)均可促进生物碱(圆弧形菌素、圆弧形菌醇)的生成^[120]。甚至由该菌菌丝中分离到分子量为1,000—1,500的对热稳定物质,若在接种后0—8小时的生长初期加入也可促进生物碱的产生。用这些天然的效应物处理过的培养物,生长期可被促进,48小时前后,蛋白质合成速度约为对照的1—2倍,随之形成孢子和产生生物碱的过程都开始得更早。圆弧形菌素、圆弧形菌醇的最大产生速度为对照的一倍。而这时蛋白质合成速度及蛋白质含

量和对照并无差别。由测定圆弧形菌醛(Cydopetine)脱氢酶得知,生物碱产量和伴随着有关

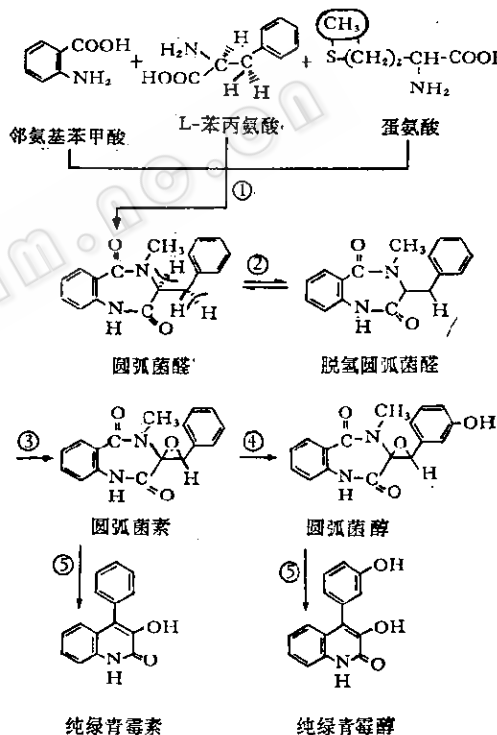


图15 圆弧形青霉合成圆弧形菌素-纯绿青霉素类生物碱的过程

- ① 圆弧形菌醛合成酶复合物
- ② 圆弧形菌醛脱氢酶
- ③ 脱氢圆弧形菌醛环氧化物
- ④ 圆弧形菌素-间位羟化酶
- ⑤ 圆弧形菌素酶

酶的增加是平行的。由于菌体抽提物不含有能检出的氨基酸，所以其效应不是苯丙氨酸或其衍生物造成的。又由于添加时间和在繁殖期表现作用之间有着一段间隔，所以看来促进生物碱产生是一个继发作用，大概是由于繁殖期过程的展现所必需的因子(调节蛋白质，内部效应物等)的增多而引起的(图 15)。

展开青霉素是具有抗菌性和对植物有毒性的真菌毒素，最先被检出的它的生物合成中间体是由 4 个乙酸基合成的 polyketide——6-甲基水杨酸。棒曲霉素生物合成途径的主要部分广泛存在于许多种植物中^[121]。在荨麻青霉 NRRL 2159 A 中，6-甲基水杨酸合成酶和脱羧酶在次级代谢条件下同时被诱导，间甲酚和龙胆醛之间的酶是被共轭地诱导，使棒曲霉素开环的加氧酶也与此相随而被诱导（图 16）。可以看到在这一体系中，通过分解产物阻遏和诱导的平衡而调节着生物合成。cAMP（二丁酰衍生物）促进 m-羟苯乙醇脱氢酶的合成^[122]。

Khokhlov 等^[123]曾报道分离到一种称作 A

因子的物质, 它强烈影响灰色链霉菌产生链霉素的^[24]过程。A 因子的结构式如图 17 所示, 已确定是 2S-异辛酰基-3R-氧甲基- γ -丁酸内酯^[24]。A 因子可在灰色链霉菌、比基尼链霉菌 (S-

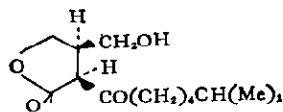


图 17 影响链霉素合成过程的A因子的结构式

bikiniensis) 的培养液中找到,而在卡那霉素链霉菌、弗氏链霉菌、鲜黄链霉菌 (*S. galbus*)、灰肉色链霉菌、(*S. griseocarneus*)、马书链霉菌 (*S. mashiensis*) 中并未发现^[125]。1 毫克精制物可使缺失 A 因子的变异株 1439 产生 5×10^4 毫克的链霉素。在变异株 1439 中,当加入 A 因子后即可以测到催化链霉素合成的转氨酶。显然,基因不同时的表达,与其调节效应有关。A 因子与产生抗菌素的能力无关,而且可由不产生链霉素的菌株分泌。不过在高产菌株的培养液中,当培养期终止时它的含量即迅速下降。对缺失 A 因子的变异株 1439 而言,只有在接种后立即或不久加入 A 因子才能表现促进链霉素产生的效果。这一点与在麦角属中加入色氨酸;圆弧青霉中加入苯丙氨酸促进生物碱合成的情况相似。在这三种情况下,若是营养期的初期加入促活物均无效。如把 A 因子加入缺失 A 因子的变异株中,则该菌株的孢子形成、形态、菌落颜色、初级代谢的酶活性等都是正常的。所以, A 因子不是次级代谢本身的效应物,宁可说它的作用类似于高等动植物中的激素。在链霉菌中,可能还有一种影响繁殖期中各种变化的因子^[126]。

已证明在维及尼链霉菌 (*S. virginiae*) 开始产生抗金霉素期间的培养液及菌体中, 含有诱导抗金霉素的因子^[127]。这一因子, 使培养 8 小时的菌体置换培养物中立即产生抗金霉素而不出现停滞期。这种诱导因子的产生期间很短, 仅仅在开始产生抗菌素前 1.5 小时产生。已证明诱导因子分子式为 $C_{12}H_{22}O_4$, 属于内酯结构的脂肪酸^[128]。已知的内酯中, 十一烷

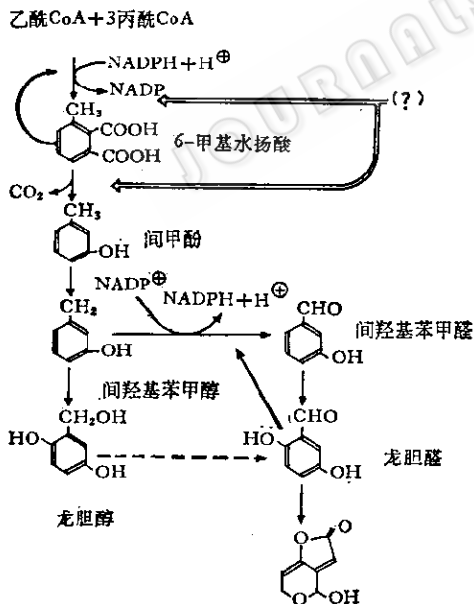


图 16 棒曲霉素生物合成途径的调节

酸内酯 20 微克/毫升也同样诱导抗金葡菌素的产生。

粘杆菌素是多粘菌素群的脂肪族酰基多肽类抗菌素,粘杆菌素A的酰基部分为6-甲基辛酸(6MOA),B为异辛酸(IOA)。6-甲基辛酸来自L-异亮氨酸(Ile),异辛酸来自L-缬氨酸(Val)。即脂肪酸部分来自天门冬氨酸系或丙氨酸系氨基酸。再者, α,γ -二氨基丁酸(DAB)亦来自L-

要化合物,它是 α,β -二氨基丁酸、L-苏氨酸(Thr)、L-异亮氨酸的前体物。认为它是借助磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧化酶、转氨酶或天门冬氨酸酶由PEP形成的。在产生粘杆菌素的菌中,虽然该羧化酶受到相当程度的阻遏,但是从天门冬氨酸可活跃地合成蛋白质和粘杆菌素来看,可以认为天门冬氨酸的反馈抑制得到了解除。此外,从粘杆菌素的合成平行于生长的现象来看,可能赖氨酸和苏氨酸对天门冬氨酸激酶的协同反馈抑制不起什么作用。

α,γ -二氨基丁酸抑制L-苏氨酸参入蛋白质中,但参入粘杆菌素的量增加。 α,γ -二氨基丁酸微弱抑制L-天门冬酰胺-tRNA合成酶(在所试验的氨基酰-tRNA合成酶中是活性最大的)^[129]。所以,如果 α,γ -二氨基丁酸在细胞内一旦产生即抑制或许还阻遏L-天门冬酰胺-tRNA合成酶,而其本身的合成即增加。从这样意义上说, α,γ -二氨基丁酸成了粘杆菌素合成的引物,进而又证实有中间体N'-6-甲基辛酰- α,γ -二氨基丁酸产生^[132](图18)。

卡那霉素生物合成的中间体4-O-(6-氨基葡萄糖基)-2-脱氧链霉胺(6-AG-DOS),在诱导卡那霉素乙酰化酶的同时促进卡那霉素的产生。另一方面卡那霉素却阻遏该酶。但是,卡那霉素若和6-O-(3-氨基葡萄糖基)-DOS(3-AG-DOS)同时存在时可解除阻遏。虽然可以估计到6-AG-DOS的乙酰化是和3-AG结合,即合成卡那霉素的前体N-乙酰卡那霉素所必要的过程,但由卡那霉素乙酰化酶催化的6-AG-DOS乙酰化反应,比卡那霉素的乙酰化要缓慢的多。另一方面,据认为由于卡那霉素迅速地乙酰化,夺取了细胞内的乙酰CoA,从而竞争性地抑制了6-AG-DOS的乙酰化,同时乙酰CoA的缺乏,就阻遏了卡那霉素乙酰化酶的合成^[133]。进行卡那霉素6'-N-乙酰化的卡那霉素乙酰化酶在生长初期迅速地出现而后又骤

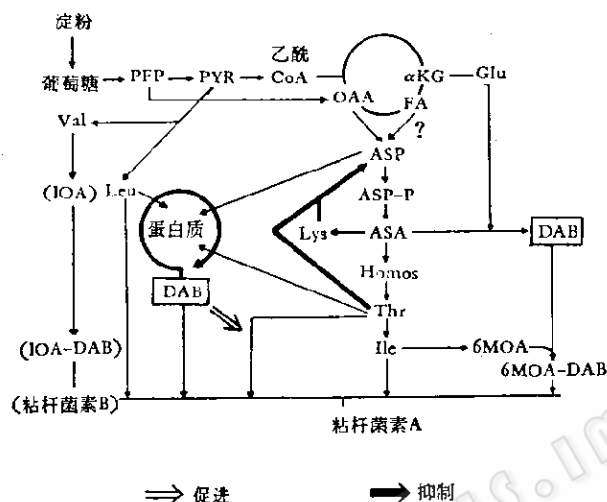


图18 粘杆菌素生物合成的调节

PYR: 丙酮酸, α -KG: α -酮戊二酸, OAA: 草酰乙酸, FA: 延胡索酸, Homos: 高丝氨酸。其余缩写含义请见正文。

天门冬氨酸(ASP),大概是经天门冬氨酰磷酸(ASP-P)、天门冬氨酸- β -半缩醛(ASA),再通过后者和L-谷氨酸(Glu)之间的转氨作用^[129]而生成的。在这一反应中,L-天门冬氨酸、L-丙氨酸不能作为氨基供给体。D-亮氨酸(Leu)来自L-亮氨酸。由此可见:L-天门冬氨酸和丙氨酸系氨基酸在粘杆菌素的合成中有作用。在淀粉硫酸铵培养基上生长的产生粘杆菌素的细胞中,参与形成天门冬氨酸系氨基酸的调节酶被解阻遏而表现强活性,所以L-氨基酸在细胞内含量丰富。另一方面,三羧酸循环酶只表现弱活性。用在葡萄糖肉汁培养基上生长的细胞作为对照,该种细胞只产生微量的粘杆菌素,因为L-谷氨酸库大,它象一般的芽孢杆菌一样三羧酸循环酶活性强^[130, 131]。L-天门冬氨酸是一种重

根据毛霉科的许多种(例如大毛霉 (*Mucor mucedo*); 布拉克须霉 (*Phycomyces blakesleeanus*) 及三孢布拉霉 (*Blakeslea trispora*) 的研究, 可以得出这样的结论: 自成熟的营养菌丝向生成接合孢子的转化过程中, 顺次展现出下列异戊烯化合物代谢的反应^[135]: (1) 在繁殖期初期开始, 可合成少量对性别特异的三孢酸 (tyisporic acid) 的前体物 (P^+ 及 P^-) 并分泌到周围的培养基中; (2) 这些前体物由相对立的接合型菌丝转变为三孢酸; (3) 生成的三孢酸诱导其自身的前体物 β -胡萝卜素增加合成, 这种诱导作用依赖于 RNA 及蛋白质的合成; (4) 三孢酸和性别特异性的前体物或二者之一引起接合子梗

β-胡萝卜素

维生素A

(+)菌株

(-)菌株

(推测结构)

(化学结构未知)

P⁺

P⁻

三胞酸B

三胞酸C

Goodwin 等^[136]指出,三孢酸有使胡萝卜素生物合成途径的酶解除阻遏的作用。已知 β -紫罗酮会促进类胡萝卜素合成,Reyes 等^[137]报告, β -紫罗酮的作用部位是在萜烯合成途径中由5-磷酸甲羟戊酸向二甲基烯丙基焦磷酸转变的反应。因为三孢酸和 β -紫罗酮结构类似,曾试验过 β -紫罗酮是否在三孢酸的作用部位发生拮抗^[138]。若向已加入饱和量 β -紫罗酮的(一)培养物(NRRL2896)中加入三孢酸时无效,同时在加有饱和量的三孢酸培养物中, β -紫罗酮也无效。根据这些结果,可以推测二者在类胡萝卜素生物合成途径的同一部位起作用。利用不同浓度的组合试验中,仍呈现拮抗,不因其它促进物质而有增效性。在(一)株及接合株中,对类胡萝卜素合成的促进方面、而且在对促进甾体合成方面,都可见到二者作用的类似性。其它

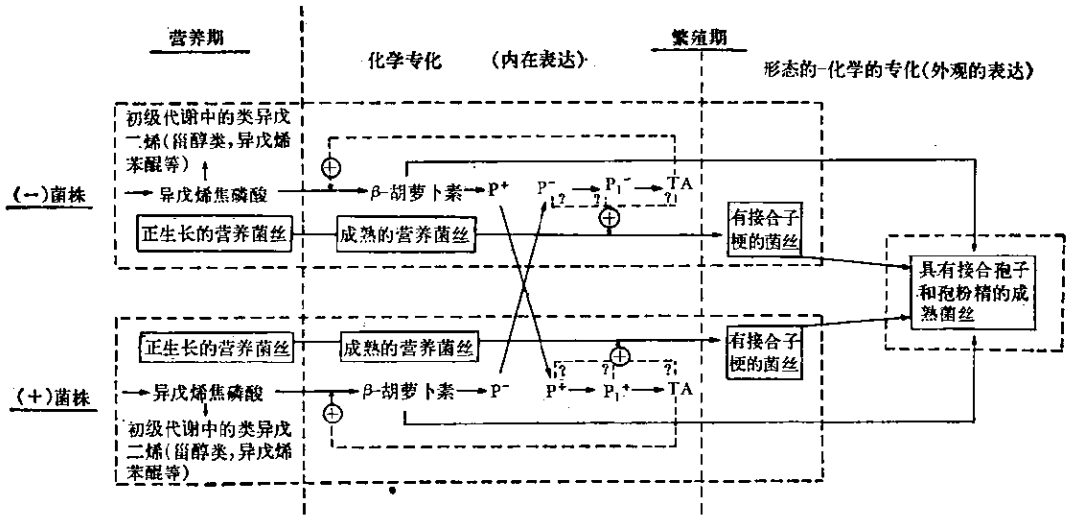


图 20 雌雄异株毛霉菌生长期的次级代谢

的研究者也得出 β -紫罗酮和三孢酸对三孢布拉霉有类似作用的结论,并指出三孢酸对于转录起着更强烈的作用。维生素A也可增加布拉克须霉^[140]、三孢布拉霉^[141]的 β -胡萝卜素合成(图21)。

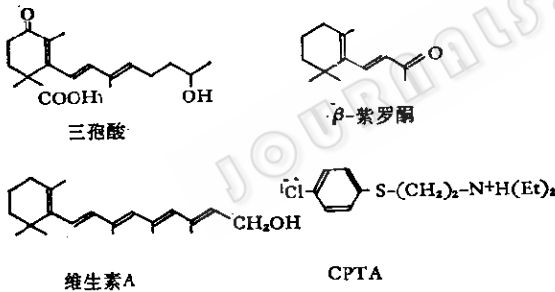


图 21 促进类胡萝卜素合成的化合物

从发现在类胡萝卜素生物合成中起作用的非天然产物 CPTA [2-(4-氯代苯硫)三乙胺盐酸盐]^[142]以来,已报道了许多被认为和 CPTA 有同样作用的物质,其中有些作用机制仍不清楚。CPTA 促进 C-40 非环状类胡萝卜素番茄红素的合成。在三孢布拉霉中可使其含量由 1 克菌体 10 微克增加至 4,300 微克,在布拉克须霉中以及许多合成类胡萝卜素的组织(植物)中也有促进效果。推测 CPTA 的作用有如图 22 所示^[143]。

利用黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 进行的柠

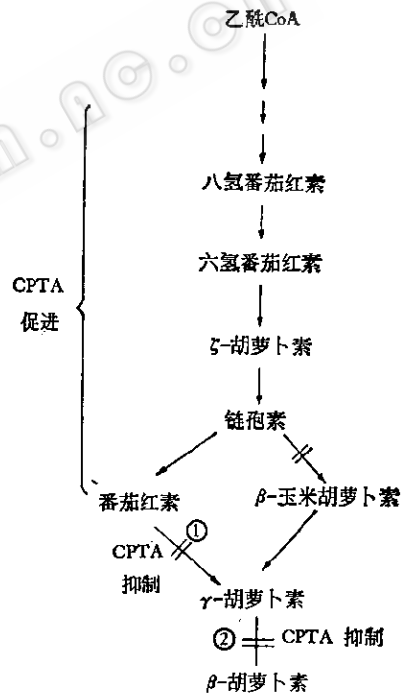


图22 CPTA 对三孢布拉霉的类胡萝卜素生物合成的作用点

檬酸发酵中,当 Zn^{2+} 的浓度高时处于营养期,由于 Zn^{2+} 缺乏则转变为繁殖期并积累柠檬酸^[44]。若向生长在低 Zn^{2+} 浓度下培养物中,加入 cAMP 可影响生长速度和柠檬酸的合成速度^[45]。即 cAMP 不是诱导营养期向繁殖期转换,而是这种转换决定于 Zn^{2+} 浓度。cAMP 增

加发酵初期的生长量,以后菌丝对 cAMP 的反应发生变化, cAMP 便抑制生长。当柠檬酸开始积累时, cAMP 可增加其合成量^[146]。cAMP 对孢子的发芽、菌丝粘着性也有影响^[147],但这种效应在生长期增大而到繁殖期则下降。因此可以说 Zn^{2+} 是决定着发酵的时相, cAMP 则在各时相中促进其特异的生理活性^[144]。

在北里链霉菌 (*S. kitasatoensis*) 产生柱晶白霉素的过程中,可以看到柱晶白霉素 A_1 向 3- α -乙酰柱晶白霉素 A_1 (即柱晶白霉素 A_3) 变换的能力由葡萄糖所诱导^[145]。这种诱导作用又为柱晶白霉素的前体物丁酸所抑制。

此外,也报告过氢化链霉菌中由 11 β 、21-二羟基-4,17(20)娠甾二烯-3-酮诱导 20- β -羟基甾醇脱氢酶的作用^[149]。不仅限于次级代谢,还已经知道所谓“超诱导”(Superinduction)或与其类似的现象,这里拟作一些说明。

曾研究蛋白质合成抑制剂、环己酰亚胺和几种氨基酸结构类似物对展青霉的 6-甲基水杨酸合成酶表现活性^[150]。并发现用完全抑制蛋白质合成的环己酰亚胺浓度(10微克)能够抑制该合成酶的合成,但用部分抑制蛋白质合成的浓度(0.3 微克/毫升)却促进酶产生活性。DL-对氯苯丙氨酸, DL-4-甲基色氨酸在 10—100 微克/毫升的浓度下促进 6-甲基水杨酸合成酶活性,而 1 毫克/毫升时则部分地抑制。这表明抑制剂促成了代谢变化,这种变化和在发生了 6-甲基水杨酸合成的老化的培养物中所看到的情况相同。这也向人们提示,可以把这种抑制效应应用于某些抗菌素生产以提高其产量^[150]。曾观察到放线菌素^[151]、多粘菌素^[152]的合成可由氯霉素促进。若在放线菌素生产菌中加入 5-氟尿嘧啶可观察到吩噻嗪合成酶发生“早熟的”合成^[153]。在红霉素发酵中可以看到由红霉素自身引起的“自动刺激作用”^[154]。我们在低产的嵯峨霉素 (Sagamicin) 的菌株中也曾发现“自动刺激作用”^[155]。

十 次级代谢的反馈抑制

关于次级代谢产物的生理意义有各种各样

的说法,还没有得出一个象说明初级代谢产物那样的定义。所以,以下叙述的次级代谢产物的合成及由该代谢产物本身所造成的抑制,要同初级代谢的反馈调节一样来考虑恐怕还有困难,不过从现象上说可看成是类似的。

曾经发现^[156]在链霉菌 3022a 产生氯霉素的条件下生长的菌体抽提液中有一种酶,它催化以谷氨酰胺作为氨基供给体,使谷氨酸氨基化,生成邻氨基苯甲酸及对氨基-L-苯丙氨酸^[98]的反应。该酶不存在于不产生氯霉素的菌株内,可能它与氯霉素的合成有关。在合成培养基中,虽然氯霉素的产生和生长同时开始,但这时期上述酶(芳基胺合成酶)的活性最高,之后活性便下降而不稳定。在合成培养基上合成氯霉素时,若加入 50 毫克/毫升的氯霉素,芳基胺合成酶的活性几乎立即下降,同时内源氯霉素的产生降低^[156]。但是,其它芳香族氨基酸途径上的酶不受抗菌素的影响(图 23)。比较与氯霉素相关物质的效果时,观察到用和氯霉素同样浓度的生物合成中间体 DL-对氨基苯丙氨酸(仅 L-型有生物活性)会抑制芳基胺合成酶,苏-L-对硝基苯丝氨酸则有轻微的抑制作用。添加氯霉素的对甲硫基衍生物 50 毫克/毫升,即完全抑制芳基胺合成酶。氯霉素的抑制作用在 100 毫克/升时最大,在这一浓度下对生长和合成芳香族氨基酸的其它酶无影响。

因为氯霉素难于透过生长着的细胞^[157],所以氯霉素不可能是阻遏物。按上所述试验过的

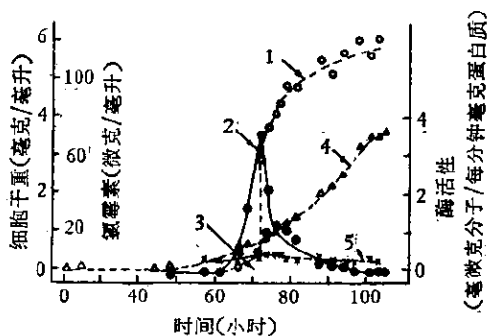


图 23 氯霉素对氯霉素合成途径中的酶的抑制^[156]

1. 氯霉素 2. 芳基胺合成酶 3. 加入氯霉素
4. 细胞干重 5. 邻氨基苯甲酸合成酶

其它化合物中,因DL-对氨基苯丙氨酸及L-苏-对硝基苯丝氨酸呈现阻遏物的活性。所以认为,这些化合物有可能作为细胞中潜在的阻遏物起作用(顺序阻遏),抑制用于合成氯霉素的后面几个步骤(参见图 11)。甲硫基结构类似物很易透过细胞,对产生氯霉素和生长均可产生抑制作用^[158]。由此虽然可以暗示对硝基在抑制方面并不重要,但是,也可以用生物合成的最后阶段在细胞中可能发生对氨基氧化为对硝基的假说^[159]来加以说明。

已分离出该菌的色氨酸营养缺陷型,这一突变株缺失芳胺合成酶。这株菌生成的邻氨基苯甲酸与所加入的色氨酸浓度成比例。而且邻氨基苯甲酸合成酶的水平增加到亲株的 10 倍。原养型回复突变株也不积累邻氨基苯甲酸,生成氯霉素,具有接近于正常水平的邻氨基苯甲酸合成酶活性。可以看出,这时邻氨基苯甲酸合成酶不是作为氯霉素合成的催化剂起作用,而是作为盆酸的“释放因子泵”起作用。这个例子或许可以说明营养缺陷型不产生抗菌素的一种机制(图 24)。

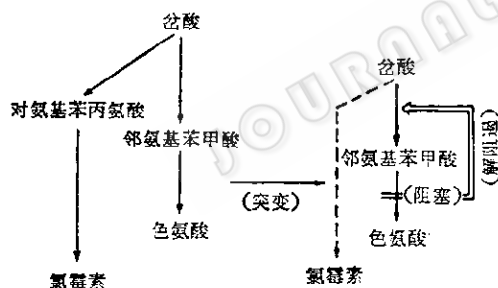


图 24 色氨酸营养缺陷型不产生氯霉素的机制

棒状杆菌属细菌产生氯霉素的结构类似物棒状杆菌素的过程中,也能见到棒状杆菌素、对氨基苯丙氨酸抑制棒状杆菌素的生成。据认为这是存在顺序调节的例子^[160]。这种场合,对棒状杆菌素合成抑制作用最强的是对氨基苯乙醇。

在诺尔斯氏链霉菌培养过程中,培养基内加了环己酰亚胺可抑制该抗菌素的进一步积累^[161]。以后,用灰色链霉菌研究了环己酰亚胺的合成^[162]。在培养的第一天开始迅速利用糖,

这和培养基中开始积累环己酰亚胺是相一致的。若在培养 48 小时后加入不同量的环己酰亚胺,则纯合成量随加入量增加而下降。除环己酰亚胺之外,无抗菌活性的异环己酰亚胺及无水环己酰亚胺也有同样的活性。

据认为,把终产物排出体系外,是从培养技术上解除终产物抑制的一种方法。利用透析培养就可以使效价提高。透析培养的缺点是必须有大量培养物贮存器,但对环己酰亚胺而言,利用连续抽出渗析液的方法,可以不必浪费培养基(图 25)。利用这一方法环己酰亚胺的效价提高了一倍。

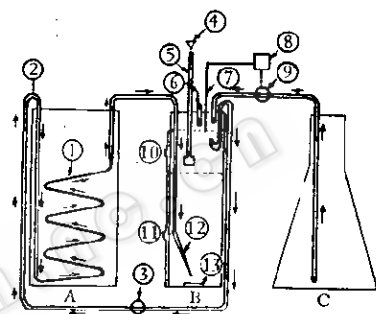


图 25 环己酰亚胺发酵的连续透析装置^[163]

- A. 发酵罐 B. 抽提器 C. 储水器
①透析管 ②橡皮管 ③蠕动泵 (40 毫升/分)
④供气装置(每分钟 3 升) ⑤烧站玻璃分布器
⑥空气出口 ⑦恒液探针 ⑧探针替续系统
⑨蠕动泵 ⑩水的液面 ⑪ MeCl_2 的溶剂层
⑫玻璃管 ⑬磁力搅拌棒

据说催化霉酚酸生物合成最后一步,即由 S-腺苷酰蛋氨酸向去甲基霉酚酸转移甲基的酶已从葡枝青霉(*Penicillium stoloniferum*)中提纯出来^[165]。该酶受霉酚酸、S-腺苷酰高半胱氨酸拮抗抑制。已经发现在霉酚酸存在下强烈抑制霉酚酸合成。培养的后半期酶活性降低,可想而知,由于这种下降,其它的酚类化合物便积累起来。

催化吡嗪霉素生物合成的 L-色氨酸转氨酶和吡嗪丙酮酸 C-甲基化酶已从灰色链霉菌的无细胞提取液中进行了部分提纯。后者催化把 S-腺苷酰蛋氨酸的甲基转移至吡嗪丙酮酸侧链的 3 位的反应,该酶粗提液的活性受吡嗪霉素、色氨酸甘氨酸和 L-色氨酸(较弱)的拮抗

抑制($K_i = 0.17$ 毫克分子)^[164]。但是, 这些抑制作用, 由于酶在提纯过程中, 通过葡聚糖凝胶(Sephadex) G-150 而消失。因为大部分吡啶毒素存在培养液中, 是否它能在发酵过程中达到能引起抑制的浓度尚属疑问。

金醛(aurodox)是高德链霉菌合成摩雪霉素(和黄色霉素相同)时同时合成的抗菌素, 后者是前者的N-去甲基衍生物。这种抗菌素(图

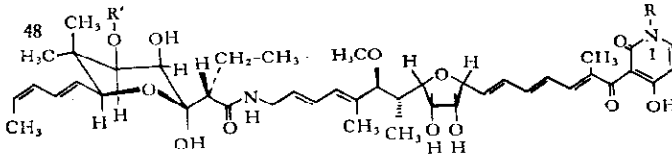


图 26 金醛及相关抗菌素的结构

R = CH₃; R' = H; 金醛(X-5108)
R = R' = H; 摩雪霉素(黄色霉素)
R = CH₃; R' = 双糖(C₁₅H₂₇O₈) cfrotomycin

26)主要是对革兰氏阳性细菌有活性,并可促进家畜成长。向生长期的培养物中加入金醛,这种抗菌素的合成就被抑制^[165]。这种抑制可能是由于抗菌素本身的作用,用¹⁴C标记的金醛进行研究后,得知金醛在起抑制作用时没有发生改变。而且,用洗涤细胞的方法除去加入的金醛即可解除抑制,这也支持上述看法。通过标记前体(蛋氨酸)的参入进行测定,500 微克/毫升金醛即可完全抑制。这一观察与所用的高德链霉菌菌株产生抗菌素的上限为500 微克/毫升是一致的。在培养物中加入摩雪霉素时,也观察到同样的抑制情况^[165]。抗菌素的合成可由一些结构类似物(其中包括没有抗菌活性的)所抑制^[165]。对抑制的敏感性,随培养物的菌龄增大、金醛浓度的增高而下降^[166]。金醛合成能力高的菌株,在所试验过的金醛浓度下,对抑制作用的抗性的增长比合成能力低的菌株要快得多。金醛也抑制蛋白质的合成,并使其抗性与这种抑制作用平行增长。另一方面,在不产生抗菌素的菌株中,或产生抗菌素的菌株在不产生抗菌素的培养基上,并不使其抗性增长起来。所有这些表明金醛的产生(或存在)是使它对抗菌素的抗性增大起来所必需的。这种抗性的大

小取决于培养液中金醛的浓度。

由产生麦角碱的麦角菌 SD-58 中提纯的二甲基烯丙基色氨酸(DMAT)合成酶,在生理浓度下,受该代谢途径终产物田麦角碱及箭匣棒麦角碱的抑制^[167](参见图 5)。抑制为混合(非拮抗)型,表明抑制物的结合部位和活性部位不同,或者和两种底物的结合部位重叠。处在合成途径后面的裸麦角碱环化酶也稍受裸麦角碱和箭匣棒麦角碱抑制^[168]。有趣的是该菌株的邻氨基苯甲酸合成酶也敏感地受箭匣棒麦角碱的抑制^[169]。因为接近培养完毕时,箭匣棒麦角碱达到抑制浓度,假如不向外分泌以降低细胞内浓度,生物碱合成即停止。细胞内生物碱周期性的升降,说明了向外分泌导致

再度合成,积累则造成合成停止的情况。虽然在培养后期 DMAT 合成酶下降,但进行透析却呈现更高的活性,据认为这表明有一部分受到反馈抑制,然而,即使进行透析,培养物依然会老化,并且酶水平下降,所以也存在通过阻遏作用进行的调节。用使培养物生物碱的产生达到饱和量(5 毫克分子)的培养基,(1)代替新鲜的培养基;或(2)用补加了箭匣棒麦角碱(2.5 毫克分子)的培养基代替新鲜的培养基并继续静置培养。则在第(2)种情况下比第(1)种情况下生物碱合成速度更慢,但最后二者均可达到5 毫克分子^[167]。

荨麻青霉生物合成棒曲霉素的过程中,反馈调节表现有由龙胆醛抑制脱氢酶^[170]和由6-甲基水杨酸抑制其自身以乙酸为前体进行的生物合成(参见图 16)的过程。 $2-6 \times 10^{-4}$ 克分子的6-甲基水杨酸抑制荨麻青霉的一般代谢,而浓度为 $5-10 \times 10^{-3}$ 克分子时则特异地抑制由乙酸合成6-甲基水杨酸^[169]。在荨麻青霉中没有检测到m-羟基苯乙醇脱氢酶,通过未能互相分离酶的作用,可把m-羟基苯乙醇和龙胆醛分别变为m-羟基苯乙醛和龙胆醇,已找到将m-羟基苯乙醛变为龙胆醇的酶^[171]。

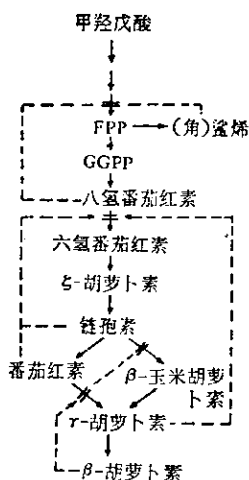


图 27 布拉克须霉类胡萝卜素合成的调节

FPP: 焦磷酸法尼烯, GGPP: 牻牛儿苗基牻牛儿苗焦磷酸

已经证明,布拉克须霉合成类胡萝卜素系统中有如图 27 所示的反馈调节作用^[172,173]。

产黄青霉变异株 E-15 的青霉素发酵中,在发酵的任何时期加入苯氧甲基青霉素(青霉素 V 10 毫克/毫升)都抑制发酵液中进一步积累青霉素,但对菌的生长无影响^[174]。苯青霉素、6-氨基青霉素(6-APA)也有这种效果,而青霉素 N、青霉素 C、头孢菌素 C 及 7-氨基脱乙酰氧基头孢菌素无抑制作用。试验青霉素 V 对有不同青霉素合成活性的菌株合成青霉素的影响,发现加入浓度和试验菌株在对照条件下所积累的浓度相等,或超过该浓度时青霉素 V 即抑制青霉素合成。低于上述浓度仍产生青霉素,但青霉素的产生量只等于其能产生的量与加入量之差。

若外加青霉素 V 及 6-APA 各 10 毫克/毫升,则抑制 6-APA 的积累。这一抑制浓度,比不存在前体物时正常产生的 6-APA 量要高得多。

在含有不同浓度的青霉素 V 时测定葡萄糖及乙酸的利用情况表明,当 Q_{O_2} 无差别时,青霉素对于菌利用这些底物几乎不显示效果。青霉素的抑制不是不可逆的,若将细胞加以洗涤并加回到营养物耗尽的培养 48 小时后的培养基

内,则产生和对照同一水平的青霉素。也就是说,青霉素的停止产生,不是由于损伤了青霉素合成的机制造成的。

青霉素虽然是这样抑制着青霉素的积累,但是,即使有达到抑制浓度的抗菌素存在的情况下,仍可见到标记的前体物(半胱氨酸、缬氨酸及苯羟乙酸钠)参入青霉素。这一事实表明,尽管发酵液中抗菌素没有增加,青霉素合成仍持续进行着,青霉素作为一种不稳定的发酵产物进行着一定的代谢运转。在产黄青霉菌中虽然已证实有青霉素酰化酶,但在该项工作中还没有得出青霉素水解为 6-APA 及相应的酰化物的证据。此外,也没有证明有其它的青霉素分解酶或产物。青霉素对青霉素合成的抑制是由于对诸如青霉素酰基转移酶反馈抑制而造成的,这被认为是青霉素酰基转移酶的特异性和青霉素合成抑制之间的同一性。根据这种看法,可以预期通过这些作用会积累 6-APA、异青霉素 N 或其它 β -内酰胺中间体,然而并不是这样,如前所述,青霉素 V 及 6-APA 阻止了 6-APA 环的增长。由此可见,青霉素的抑制作用是在缬氨酸和半胱氨酸参入以前发生的。若从这点看,Demain 等的实验是应该重视的,他们指出,苯青霉素在高浓度下(20 毫克分子)抑制高柠檬酸合成酶 50% 的活性,赖氨酸可促进这种抑制(参见第六节)。若考虑到酶的区域化(compartmentation)有可能高浓度青霉素存在于一定的区域。这些设想有待于今后研究。关于青霉素对由葡萄糖等前体物参入 6-APA 的影响也有研究的必要。

若将红霉素生物合成的中间体红霉交酯 B 加到红霉素链霉菌的培养物中,则显著抑制由 $2-^{14}C$ -丙氨酸合成红霉交酯 B^[175]。另一方面,就 $[2,3-^3H]$ -丙氨酸向红霉素的参入而言,它向红霉素 A、B 的参入明显受抑制,而对参入红霉素 C 的抑制较弱。红霉素的生物合成途径如图 28 所示,据认为这种网状的途径依实验条件、菌株的稳定性而在运用上可作各种变通。

关于卡那霉素生物合成受卡那霉素的抑制,在第九节中已谈到。抗菌素的产生受该抗

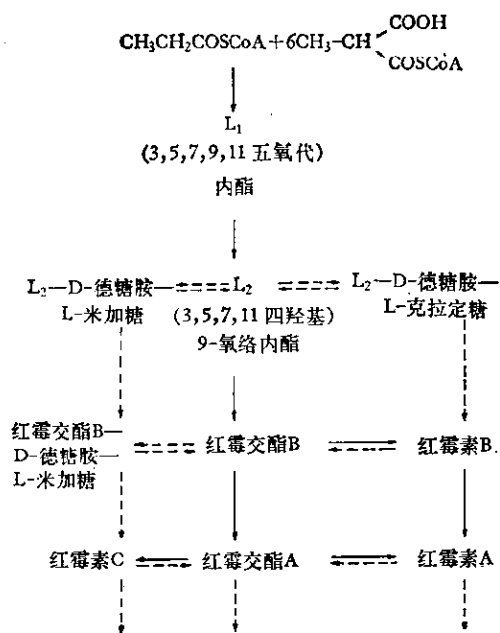


图 28 推测的红霉素合成途径

菌素本身抑制一事，虽然还不清楚所作用的特定酶反应步序，而且未见到对于实质性生物合成的抑制，但从表面上观察到抑制现象的报告不少。利用地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) 的变异株生产利福霉素 S 时，如向生长着的培养物中加入利福霉素 S 则抑制菌丝产生抗菌素的活性，从而抑制抗菌素的高产^[176]。利福霉素 S 也抑制正在生长着的菌的生长。若在培养基内加入四环素，不抑制金霉素链霉菌的生长而抑制四环素的合成^[177]。向合成环己酰亚胺和制霉菌素的诺尔斯氏链霉菌培养物中加入制霉菌素，则抑制制霉菌素的合成而增加环己酰亚胺的产生。这可用由于对二种抗菌素共同的前体物丙二酸的代谢途径发生拮抗来解释^[178]。向产生白六烯菌素菌的培养物中加入白六烯菌素，甚至会停止抗菌素的产生^[178]。另一方面，向产生制假丝菌素的培养物中加入制假丝菌素却不抑制抗菌素的产生。在进行抗菌素生产菌的改良时，利用对所产生抗菌素的抗性进行选种收效虽然不少^[179]，但还没有同时搞清它和反馈抑制关系的例子。

维及尼链霉菌 (*S. virginiae*) 产生抗金葡霉素时，发酵过程本身很特殊，生产期短，而且

在菌的增殖过程中即停止产生，而抗金葡霉素 S 的特异之处则是在生产期不抑制其产生，在延滞期的中期菌具有敏感性^[180]。把接种后 48 小时的培养物放在 10 微克/毫升的抗金葡霉素中处理 60 分钟以上才能不再产生抗菌素。在置换培养中它可以产生抗菌素而不出现新的延滞期。同时，即使置换少量的菌体也相应其量而产生抗菌素。另一方面，开始产生抗菌素之前，加入蛋白质合成抑制剂卡那霉素，则可完全抑制抗菌素的产生；在已产生抗菌素后加入，则依然产生。据推测抗金葡霉素合成系统是在这一时期形成，但在比较短的时间内即结束其形成过程（关于对抗金葡霉素合成的诱导作用请参见第九节所述）。结实原线放菌瑞斯托霉素变种产生瑞斯托菌素的过程中，如在接种合成培养之前加入 400 微克/毫升的瑞斯托菌素，则抑制抗菌素的产生^[181]，而不抑制菌的生长。

十一 溶解氧和金属的影响

次级代谢产物的产生和其它发酵一样，也要求有最适量的溶解氧。利用无细胞体系由青霉素 N 进行头孢菌素^[182]合成，随氧分压的增大而被促进，是次级代谢中通气效果与生物合成酶系直接有关的例子。同时，它由于加入 KCN 或减少搅拌而减少产量。这说明青霉素转换为头孢菌素与加氧酶有关。可以认为生物转换与加氧酶有关，和化学合成类似，也要求一定程度的氧移动。这和用完整菌体进行实验的结果是一致的，增大氧分压则减少青霉素 N，而增加头孢菌素的产量^[184,185]。

在其它的抗菌素生物合成中涉及氧化系的情况也很多。例如构成氨基糖苷类抗菌素糖组份的生物合成系统等即是。

关于次级代谢中微量金属的作用^[185, 186] Weinberg 已和温度的影响一起进行过综述，可以参考。就放线菌、霉菌而言，已得出 Fe 和 Zn 是“关键”金属的结论。为次级代谢所必需的金属浓度比生长所必需的最低量 (约 10^{-7}M) 要低一个数量级，或是更低。虽然在初级代谢中对各种金属的耐性可达 10^{-3} 克分子，但在次级代

谢中甚至比它低 2 个数量级一般就会受到抑制。已知许多事例说明金属会影响次级代谢产物的产生,但似乎不存在统一的作用。而且,表明因体系不同而可能有着几种作用。多数情况下认为它们是次级代谢中的合成酶的活化因子,但有时表明在转录、转译水平上也起作用。下面介绍一下堀田等^[187,188]最近研究 Mg^{2+} 对氨基糖苷类抗菌素产生的影响。

产生卡那霉素、新霉素及链霉素菌株的菌丝,在生长的对数期及静止期非特异地结合着这些抗菌素。这种结合作用可因 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等阳离子的作用而显著降低。溶菌酶、 NH_4OH 、 HCl 及 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等阳离子可使结合在菌丝上的抗菌素游离。原生质体则几乎不结合其自产的抗菌素。 Mg^{2+} 可增加产生菌对所产抗菌素的抗性。在天然培养基中卡那霉素链霉菌产生卡那霉素和弗氏链霉菌产生新霉素,可被加入 5-20 毫克分子的 Mg^{2+} 而显著促进。 Mg^{2+} 也促进抗菌素分泌到培养基中去。 Mg^{2+} 甚至增加卡那霉素链霉菌的卡那霉素乙酰化酶、乙酰卡那霉素胺基水化酶和弗氏链霉菌的碱性磷酸酶的活性,或促进它们的合成。这些酶分别参与卡那霉素^[133]、新霉素^[188]的生物合成。已知链霉素的生物合成中有链霉素激酶^[190,191]、碱性磷酸酶参与^[192]。在产生链霉素时 Mg^{2+} 使链霉素从菌丝上游离并增大菌对链霉素的抗性,对链霉素的产生则几乎无作用,这或许是链霉素激酶产量低的缘故。在产生卡那霉素的过程中,因为必须由乙酸供给乙酰 CoA,为此要求有 ATP。加入氧化磷酸化的促进剂核盘菌素 (Sclerin) 可增加卡那霉素等的产生^[193]。 Mg^{2+} 是能量代谢的必需因子,在这一点上或许有类似核盘菌素的作用。

十二 过量产生的次级代谢产物

开始虽然说过,在繁殖期产生是次级代谢产物的特点,但上面也说到它在生长期中产生的例子。例如,氯霉素在天然培养基中于繁殖期产生,而在前述合成培养上,它的产生可与生长平行。这样的例子颇多,如表 5 所示。据认

为在自然的环境条件下,更多的是这种产生抗菌素和生长平行进行的条件——一般是从营养少而生长缓慢考虑得多。于是有人提出所谓“归一代谢”(unitary metabolism)一词^[195]。

除抗菌素外,产生其它次级代谢产物的菌株,例如产生生物碱的麦角菌的营养缺陷型菌株,在含有可使之迅速生长的葡萄糖及酵母膏的天然培养基中,在繁殖期产生生物碱,但在合成培养基中生长缓慢,从一开始就产生生物碱^[196]。产生黄曲霉素的寄生曲霉 (*Asp. parasiticus*) 菌株在繁殖期产生该物质,而发生了代谢阻塞并能大量产生 norsolorinic acid 的变异株,在繁殖期只合成微量的黄曲霉素,而该种物质则在生长期即合成,其过程和生长完全平行^[197]。

Light 等^[198]发现在单菌落分离的展青霉(荨麻青霉的异名) NRRL 2159 A 菌株中,找到过在繁殖期产生 6-甲基水杨酸的普通型菌株 (late MSA 株) 和将菌丝接种在 Czapek-Dox 培养基上不久便产生 6-甲基水杨酸的菌株 (early MSA 株)。该菌株在初期和 6-甲基水杨酸的出现同时合成大量 6-甲基水杨酸合成酶。

表 5 和生长相平行地产生的抗菌素
(包括因条件不同而在繁殖期产生的抗菌素)

(1) 链霉菌产生的抗菌素	氯霉素 杀假丝菌素 普鲁霉素 亚德里亚霉素 红霉素 利福霉素 放线菌素 抗霉素 A 雷纳抗癌素 日光霉素
(2) 小单孢菌产生的抗菌素	扁枝衣霉素
(3) 霉菌产生的抗菌素	思镰孢菌素 头孢菌素 C 青霉素 N 棒曲霉素 酰霉素 粘菌素
(4) 细菌产生的抗菌素	杆菌肽 棒状杆菌素 2-氨基-2-脱氧鸟苷

在大量积累初级代谢产物氨基酸、核酸类物质的场合,有许多也能把产生时期区分为营养期和繁殖期的。核黄素虽然是初级代谢产物,但阿舒假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*)^[199]、棉阿舒囊霉 (*Ashbya gossypii*)^[200,201] 是在繁殖期产生该物质。测定菌体核黄素含量亦是这种情况。

利用营养缺陷型菌株发酵时,作为反馈调节的效应物或阻遏物的所需营养物质,由于生长而消耗到一定水平之前不产生产物,即为繁殖期产生型。因此,如果培养基中加入所要求的营养物质的量在该水平之下,在细胞内该营养物质的量在调节酶(或蛋白质)(变构蛋白质)的S型抑制曲线的转折点以下,就应该有产物产生。所以,在这种场合产物的产生和生长平行。实际上,很多情况是:由于加入培养基中的所要求的营养物质(效应物)浓度和抑制浓度的相关性,在生长过程中即开始产生产物。但是,产生产物最多的时期则多在生长停止期。具体例子如图29所示,这是我们用大肠杆菌的蛋氨酸、赖氨酸双重营养缺陷型进行L-苏氨酸发酵的

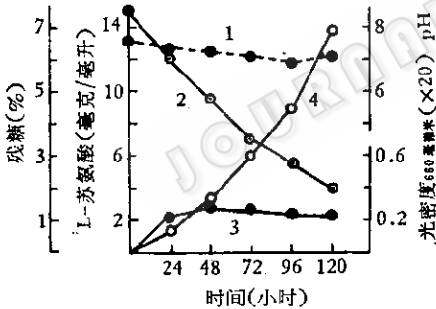


图29 用大肠杆菌 KY6280 在7.5%果糖培养基上进行L-苏氨酸发酵的过程^[202]
1. pH 2.残糖 3.光密度 4. L-苏氨酸

过程^[202], 苏氨酸的产生始于生长过程中,进入静止期仍继续产生。图30^[203]是利用高丝氨酸或苏氨酸和蛋氨酸双重营养缺陷型进行赖氨酸发酵中,加入蛋氨酸和不同水平的苏氨酸进行发酵的情况,苏氨酸量多时不用说会生长,若天门冬氨酸激酶的效应物苏氨酸不消耗到一定水平,就不会开始产生赖氨酸。图31是利用组氨酸营养缺陷型生产组氨酸的发酵过程^[204],在生长到一定程度后才开始产生组氨酸。在这种场

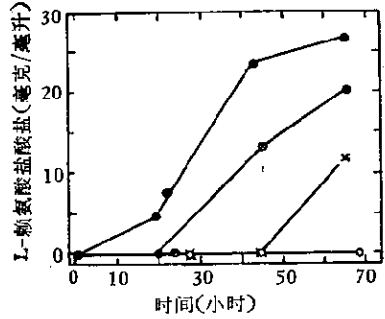


图30 L-苏氨酸浓度对谷氨酸棒杆菌突变株产生L-赖氨酸的影响^[203]

苏氨酸添加量(微克/毫升):
●—● 0.25 或 62.5, ○—○ 500 或 1000,
◎—◎ 125, ×—× 250

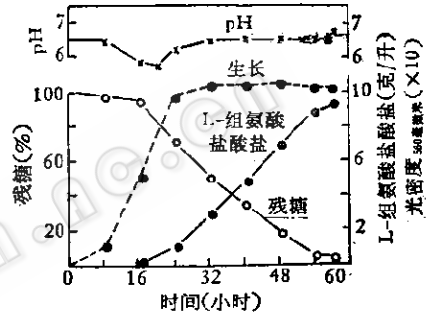


图31 L-组氨酸的发酵过程^[204]

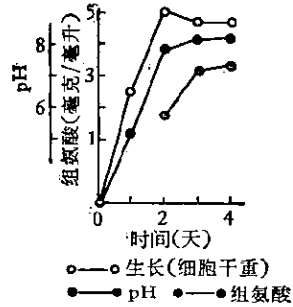


图32 棒状杆菌属的组氨酸结构类似物抗性菌株的组氨酸发酵^[205]

合,可以设想,若减少组氨酸的添加量,组氨酸的产生可较早开始,但实际生产中应考虑到产量、发酵时间和生长量也有关系,所以要决定最适添加量。

就结构类似物抗性菌株来看,因为使其从遗传上解除了原有的调节,所以在生长期即开始产生产物。图32是用谷氨酸棒状杆菌的组氨酸结构类似物抗性菌株生产组氨酸的过

程^[205],此时组氨酸的产生和生长平行进行。对带有结构类似物抗性和营养要求缺陷二种标记的菌株而言,它在生长期就开始产生,但在营养缺陷标记对产物的产生有重大作用的情况下,直到所要求的物质的浓度下降前,产物才充分地产生。这么说,产物产生过程的动力学也是混合型。图 33 是枯草杆菌的鸟嘌呤缺陷和 8-氮杂鸟嘌呤抗性双重标记的变异株的肌苷发酵过程^[206],这个过程就说明了上述情况。

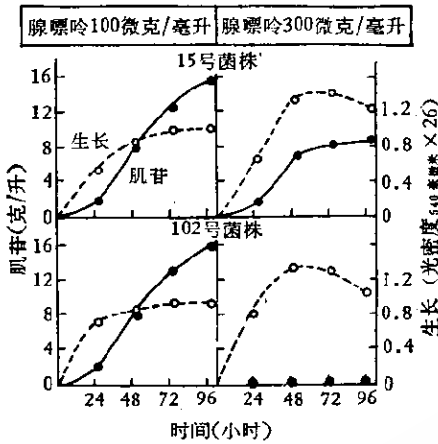


图 33 枯草杆菌的肌苷发酵过程^[206]

用甘氨酸作为藤仓赤霉 (*Gibberella fujikuroi*) 的氮源,研究了赤霉素和 Polyketide 色素双卡瓦林的合成^[207]。虽然二者的生成均依赖于营养成分的消耗量,特别是生成共同的前体物乙酰 CoA,但赤霉素和双卡瓦林并不同时产生。在标准发酵条件下,约在 30 小时双卡瓦林开始合成,此时赤霉素的含量下降至约 13 毫克分子。另一方面,甚至到 20 小时前也不出现赤霉素的迅速产生期。即使在以磷酸盐作为限制因子的培养物中,也同样会出现开始产生时间有先后的情况。Bu'Lock 探索过这种现象,主张引起次级代谢产物合成的机制是氮或磷的匮乏水平,认为不同的次级代谢产物产生过程的解阻遏,必须有不同程度的营养成分缺乏。控制次级代谢过程的基因的表达,据认为是对不同程度营养成分缺乏的反应。营养成分缺乏有个过程,引起缺乏的速度决定于临界营养成分的含量和营养成分消耗速度的相对比例。营养期和

繁殖期的进程可以更精密地看成是生长过程和非生长过程之间发生缓慢变化的关系。

由上述情况表明,初级代谢产物的产生也会因与营养成分的含量有关而成为繁殖期产生型。另一方面,次级代谢产物也有变成营养期产生类型的。次级代谢产物也有与营养成分水平无关,而和生长平行地产生的类型。在由于次级代谢阻塞而生成其它相关的次级代谢产物的情况下,虽不表现营养缺陷,但变得和调节突变株一样,即象初级代谢的调节突变株(结构类似物抗性株)那样,成为和生长平行地产生产物的类型。如前述黄曲霉素和 norsolorinic acid 的产生就是如此。当然,若变成了与次级代谢开始有关的调节突变株,就可以预期次级产物会在营养期产生。

从发酵生产的立场看,把在繁殖期产生视作次级代谢产物的特征并不合适,可以认为,不管初级还是次级产物的大量积累都是在遗传方面或培养条件方面某种解除调节的状况下发生的。初级代谢产物的过量产生,可以说是和次级代谢产物的过量生产按同一方式进行的。把柠檬酸、尿刊酸等看成是次级代谢产物,而氨基酸被认为是初级代谢产物,这从发酵的立场上看是无关紧要的。这样说,并不是否定把它们加以区分,或者否定从产物对生物的意义方面提出的次级代谢产物的概念。

Martin 及 McDaniel^[208] 对多烯大环内酯抗菌素合成的动力学研究中,采用了 Braun 及 Vaas^[209] 提出的所谓“细胞成熟时间”的见解进行解析,所谓成熟过程确实是前面谈到的效应物-阻遏物的消耗过程,和一般意义的“成熟”不同,因此宁可用“解除调节时间”一词更好些。

十三 结 语

以上就所知的关于次级代谢调节的内容进行了综述。若从整体来看,可认为在一定条件(说到底是非平衡的生长条件)下,由于缺乏特定营养成分,生长变为不平衡,而使细胞内特定的初级代谢产物的关键物质的库存增大,它成为引物,起到使次级代谢酶的解除阻遏或被诱

导的作用,从而使次级代谢开始。至于究竟生成什么产物,则决定于特定菌株所具有的酶的种类。在这里可看成是营养成分的物质是多种多样的,例如有时连氧也是。如短小芽孢杆菌 ATCC 10068 生长变慢就会开始产生短杆菌素,这不是由于营养成分缺乏,而是由于氧化代谢所必需的氧供应不足^[210]。当由于细菌的生长,培养物对氧的需求超过扩散于培养基中的量时,就会发生这种情况。有时由于从遗传上解除了对次级代谢开始进行的调节控制,也会在迅速生长期进行次级代谢。有时次级代谢途径的阻塞并不表现为营养缺陷,或无关紧要的系统发生不曾觉察到的阻塞,它们也会在调节方面影响次级代谢系统。Haavik^[211-214]曾发现一株菌,杆菌肽在该菌株中对输送微量金属方面有作用,在生长过程中也会产生微量杆菌肽,而在生长过程之后则不产生。这株菌对杆菌肽过量产生的控制不受 Mn^{2+} 的促进。据认为偶尔破坏了这种控制的菌株是杆菌肽的高产株,在这种场合,杆菌肽会在菌的生长后期、特别是由于加入了 Mn^{2+} 而过量产生。

如杆菌肽那样,对于生产菌具有特定意义的产物还将有待于今后阐明。现在关于次级代谢产物对产生菌的普遍性意义^[215]众说纷纭,仍不清楚。抗菌素产生菌对自身所产抗菌素的抗性机制^[115,216],从次级代谢产物的角度来看也是重要的。

关于次级代谢产物的定义前已说过。如果要补充的话,那就是有关象尿刊酸那样的异化途径中的产物,它虽然不是初级代谢产物,却也必须排除在这里所说的一般次级代谢产物之外,因为它的合成并未增加一次需要能量的合成反应。若把尿刊酸作为次级代谢产物,则应把这里所说的次级代谢产物看成是继发性生物合成的产物,尿刊酸就可归为异化的次级代谢产物。在异化次级代谢产物中,也包括诸如头孢菌素 C 分子中的 α -氨基己二酸等次级代谢产物。而且,如果考虑到异化系统中的代谢调节和次级代谢有许多共同的特征,对于异化系统的代谢调节当然也有考虑的必要。

最后,现已发现质体参与次级代谢产物的合成,我们可以期待将会有前所未有的大发展。值此时刻,但愿拙著能给日以继夜地为开发以抗菌素为主的次级代谢产物而努力的诸位有所助益,同时衷心希望给予指正。(续完)

参 考 文 献

- [120] R. Dunkel, W. Müller, L. Never and M. Luckner: Stimulation of alkaloid formation in *Penicillium cyclopium* Westling by phenylalanine and mycelial extracts, "Secondary Metabolism and Coevolution", ed. by M. Luckner, K. Mothes and L. Nover, Nova Acta Leopoldina Suppl., Vol. VII, 1976, p. 281.
- [121] G. M. Gaucher and J. Sekiguchi: 5th Intern. Fermentation Symp. Abst. No. 12. 17(1976).
- [122] P. I. Forrester and G. M. Gaucher: *Biochemistry*, 11, 1108(1972).
- [123] A. S. Khokhlov, I. I. Tovarova, L. N. Borisova, S. A. Pliner, L. A. Shevchenko, E. J. Kornitskaya, N. S. Trkina and I. Arapoport: *Dokl. Akad. Nauk USSR*, 177, 232(1967).
- [124] S. M. Kleiner, S. A. Pliner, V. S. Soifer. V. V. Onoprienko, T. A. Balashova, B. V. Rozynov and A. S. Khokhlov: *Bioorg. Khim.*, 2, 1142 (1976).
- [125] E. Ya. Kornitskaya, I. I. Tovarova and A. S. Khokhlov: *Mikrobiologiya*, 45, 302 (1976).
- [126] A. S. Khokhlov, I. I. Tovarova and L. N. Anisova: Regulators of streptomycin biosynthesis and development of *Actinomyces streptomycini*, "Secondary Metabolism and Coevolution", ed. by M. Luckner, K. Mothes, L. Nova, Nova Acta Leopoldina Suppl., Vol. VII, 1976, p. 289.
- [127] M. Yanagimoto and G. Terumi: *J. Ferment. Technol.*, 49, 604(1971).
- [128] 柳本正胜、江夏敏郎、照井尧造: 発酵工学会大会要旨集, p. 128 (1973).
- [129] M. Ito, K. Aida and T. Uemura: Formation mechanism of colistin produced by *Bacillus colistinus* Koyama, "Progress in Antimicrobial and Antituberculosis Chemotherapy", Proceeding of 6th Intern. Congress of Chemother, Vol. II, Univ. of Tokyo Press, 1970, p. 1128.
- [130] M. Ito, K. Aida and T. Uemura: *Agric. Biol. Chem.*, 33, 262(1969).
- [131] M. Ito, K. Aida and T. Uemura: *ibid.*, 33, 949(1969).
- [132] M. Ito, K. Aida and T. Uemura: *ibid.*, 34, 476(1970).
- [133] A. Satoh, H. Ogawa and Y. Satomura: *ibid.*, 39, 2331(1975).
- [134] A. Satoh, H. Ogawa and Y. Satomura: *ibid.*, 40, 191(1976).

- [135] M. Luckner, L. Nover and H. Böhm: *Mol. Biol. Biochem. Biophys.*, **23**, 1(1977).
- [136] D. M. Thomas, R. C. Harris, J. T. O. Kirk and T. W. Goodwin: *Phytochemistry*, **6**, 361(1967).
- [137] P. Reyes, C. O. Chichester and T. O. M. Nakayama: *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 578 (1964).
- [138] S. Rao and V. V. Modi: *Experientia*, **33**, 31 (1977).
- [139] E. P. Feofilova, T. V. Fateeva and V. A. Arbuzov: *Mikrobiologiya*, **45**, 169(1976).
- [140] A. P. Eslava, M. J. Alvarey and E. Cerdá-Olemdo: *Europ. J. Biochem.*, **48**, 617(1974).
- [141] E. P. Feofilova and M. N. Bekhtereva: *Mikrobiologiya*, **45**, 557 (1976).
- [142] C. W. Coggins, G. L. Henning and H. Yokoyama: *Science*, **168**, 1589 (1970).
- [143] W. J. Hsu, H. Yokoyama, H. C. W. Coggins: *Phytochemistry*, **11**, 2985(1972).
- [144] W. S. M. Wold and I. Suzuki: *Can. J. Microbiol.*, **22**, 1083(1976).
- [145] W. S. M. Wold and I. Suzuki: *ibid.*, **22**, 1093 (1976).
- [146] W. S. M. Wold and I. Suzuki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 237(1973).
- [147] W. S. M. Wold and I. Suzuki: *ibid.*, **55**, 824 (1973).
- [148] S. Omura, J. Miyazawa, H. Takeshima, C. Kitao and M. Aizawa: *J. Antibiot.*, **30**, 192(1977).
- [149] J. Betz and L. Träger: *Z. Physiol. Chem.*, **356**, 357(1975).
- [150] R. J. Light: *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**, 494 (1967).
- [151] E. Katz and H. Weissbach: *J. Biol. Chem.*, **238**, 666(1963).
- [152] H. Paulus and E. Gray: *ibid.*, **239**, 865(1964).
- [153] E. H. Jones and H. Weissbach: *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 558(1970).
- [154] R. L. Smith, H. R. Bungay and R. C. Pittinger: *Appl. Microbiol.*, **10**, 293(1962).
- [155] 中山 清, 本多春雄: 未发表。
- [156] A. Jones and D. W. S. Westlake: *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1599(1974).
- [157] V. S. Malik and L. C. Vining: *ibid.*, **18**, 583 (1972).
- [158] V. S. Malik and L. C. Vining: *ibid.*, **18**, 137 (1972).
- [159] D. W. Swestlake and L. C. Vining: *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 1125(1969).
- [160] H. Nakano, F. Tomita and T. Suzuki: *Agrio. Biol. Chem.*, **38**, 2505(1974).
- [161] J. Spizek, I. Malik, J. Suchy, M. Vondracek and Z. Vaneek: *Folia Microbiol.*, **10**, 263(1965).
- [162] L. A. Kominek: *Antimicrobial Ag. Chemother.*, **7**, 856(1975).
- [163] W. L. Muth and C. H. Nash: *ibid.*, **8**, 321 (1975).
- [164] M. K. Speedie: *J. Biol. Chem.*, **250**, 7819 (1975).
- [165] C. M. Liu, T. Hermann and P. A. Miller: *J. Antibiot.*, **30**, 244(1977).
- [166] C. M. Liu and T. Hermann: 77th Ann. Mtg. Amer. Soc. Microbiol., New-Orleans. La., 8—13, May, 1977, Abst. p. 250.
- [167] H. G. Floss, J. E. Robbers and P. F. Heinstein: *Recent Adv. Phytochem.*, **8**, 141(1974).
- [168] D. Erge, W. Maier and D. Gröger: *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **164**, 232(1973).
- [169] J. D. BúLock, M. A. Hulme and D. Shepherd: *Nature*, **211**, 1090(1966).
- [170] S. A. Arihood and R. J. Light: *ibid.*, **210**, 629 (1966).
- [171] G. Murphy and F. Lyneu: *Eur. J. Biochem.*, **58**, 467(1975).
- [172] P. M. Bramley and B. H. Davies: *Phytochemistry*, **15**, 1913(1976).
- [173] B. H. Davies: *Pure and Appl. Chem.*, **35**, 1 (1973).
- [174] E. Z. Gordeev and L. E. Day: *Antimicrobial Ag. Chemother.*, **1**, 315(1972).
- [175] J. Spizek, M. Chick and J. W. Coreoran: "Antimicrobial Agents and Chemotherapy—1965", Amer. Soc. Microbiol., 1966, p. 138.
- [176] M. T. Küniz, J. Gruner, A. Fiechter and J. Nuesch: *Experientia*, **33**, 141(1977).
- [177] T. A. Ryabushko and V. D. Piksha: *Microorg. Prom St. Sel'sk. Khoz.*, 1975, 101.
- [178] J. F. Martin and L. E. McDaniel: *Adv. Appl. Microbiol.*, **21**, 1 (1977).
- [179] W. Kurylowicz (ed): "Antibiotics a Critical Review", Polish Medical Publishers, Warsaw, 1976.
- [180] M. Yanagimoto and G. Terui: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 604(1971).
- [181] N. S. Egorov, E. G. Toropova and L. A. Suchkova: *Mikrobiologiya*, **40**, 475(1971).
- [182] M. Khosaka and A. L. Demain: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 465 (1976).
- [183] B. Smith, S. C. Warren, C. G. F. Newton and E. P. Abraham: *Biochem. J.*, **103**, 877(1967).
- [184] C. M. Stevens, E. P. Abraham, F. C. Huang and J. Sih: *Federation Proc.*, **34**, 625(1975).
- [185] E. D. Weinberg: *Perpect Biol. Med.*, **5**, 432 (1962).
- [186] E. D. Weinberg: *Adv. Microbiol. Physiol.*, **4**, 1(1970).
- [187] K. Hotta and Y. Okami: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 563(1976).
- [188] K. Hotta and Y. Okami: *ibid.*, **54**, 572(1976).
- [189] M. K. Majumdar and S. K. Majumder: *Antimicrobial Ag. Chem.*, **5**, 431(1974).
- [190] J. B. Walker and M. Skorruga: *J. Biol. Chem.*, **248**, 2441(1973).
- [191] O. Nimi, G. Ito, S. Sueda and R. Nomi: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 848(1971).

(下转 41 页)

(上接 32 页)

- [192] O. Nimi, H. Kiyohara, T. Mizoguchi, Y. Ohata and R. Nomi: *ibid.*, **34**, 150 (1970).
- [193] A. Satoh, H. Ogawa and Y. Satomura: *ibid.*, **39**, 1953 (1975).
- [194] V. S. Malik and L. C. Vining: *Can. J. Microbiol.*, **16**, 173 (1970).
- [195] T. K. Audhya and D. W. Russell: *J. Gen. Microbiol.*, **86**, 327 (1975).
- [196] W. A. Taber, S. S. Brarr and C. S. Giam: *Mycologia*, **60**, 806 (1968).
- [197] R. W. Detroy, S. Freer and A. Ciegler: *Can. J. Microbiol.*, **19**, 1373 (1973).
- [198] R. J. Light: *J. Biol. Chem.*, **242**, 1880 (1967).
- [199] F. Kaprálek: *J. Gen. Microbiol.*, **29**, 403 (1962).
- [200] M. N. Mickelson: *J. Bacteriol.*, **59**, 659 (1950).
- [201] V. F. Pfeifer, F. W. Tanner and D. H. Trautler: *Ind. Eng. Chem.*, **42**, 1776 (1955).
- [202] H. Kase, H. Tanaka and K. Nakayama: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 2089 (1971).
- [203] D. A. Daoust and T. H. Stoud: *Dev. Ind. Microbiol.*, **7**, 23 (1966).
- [204] K. Kubota, T. Shiro and S. Okumura: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 1 (1971).
- [205] K. Araki and K. Nakayama: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 2081 (1971).
- [206] K. Ishii and I. Shiio: *ibid.*, **36**, 1511 (1972).
- [207] J. D. BuLock: *Dev. Ind. Microbiol.*, **16**, 11 (1975).
- [208] J. F. Martin and L. E. McDaniel: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 925 (1975).
- [209] D. E. Brown and R. C. Vaas: *ibid.*, **15**, 321 (1973).
- [210] B. Seddon and G. H. Fynn: *J. Gen. Microbiol.*, **74**, 305 (1973).
- [211] H. I. Haavik: *Acta Path. Microbiol. Scand., Sect., B*, **83**, 534 (1975).
- [212] H. I. Haavik: *ibid.*, **83**, 519 (1975).
- [213] H. I. Haavik: *ibid.*, **84**, 117 (1976).
- [214] H. I. Haavik: *J. Gen. Microbiol.*, **96**, 393 (1976).
- [215] A. L. Demain: *Annals New York Acad. Sci.*, **235**, 601 (1974).
- [216] H. B. Woodruff: *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, **16**, 22 (1966).

[李玲阁译, 青宁生校]