

# 抗菌素发酵及其调节

周家惠

(四川省制药厂, 成都)

一个生长的微生物细胞, 把大分子的碳源、能源和氮源分解并转变为小分子的化合物, 然后吸收到细胞内, 继续降解为氨基酸、核苷酸、维生素、糖和脂肪酸等。此过程再经呼吸系统放出能量, 形成腺三磷(ATP)的高能磷酸键和二氧化碳, 以合成细胞的基本结构物质如蛋白质、细胞壁、辅酶、核酸、粘多糖、多糖和类脂质等(以上称为主要代谢物), 或合成次级代谢物如抗菌素、植物生长调节剂(如赤霉素)和毒素(如黄曲霉毒素)等。

图1说明在抗菌素发酵中底物转化为抗菌素的过程。葡萄糖可直接进入细胞, 部分用来形成碳水化合物和细胞壁, 大部分转换成能量, 用于生物合成或作为热量损失, 以及用于其他途径。

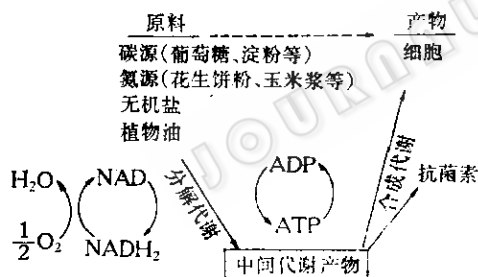


图1 抗菌素发酵时底物的转化  
NAD 为菸酰胺腺嘌呤二核苷酸  
ADP 为腺嘌呤核苷二磷酸

一个原核细胞约含有 5000 个基因, 在完成上述分解代谢和合成代谢过程时, 有成千上万种酶在起着催化作用, 借助复杂的代谢调节系统, 控制一系列的化学反应, 严格维持着动态平衡状态, 使生化过程能协调地进行, 按正确的比例合成各种物质。因此微生物合成的经济性和有效性是十分惊人的。

近十年来, 对氨基酸、核苷酸发酵的代谢调节控制机制进行了大量研究, 使发酵产量增加了许多倍<sup>[1-7]</sup>。但是次级代谢物的化学结构比较复杂, 对其代谢途径的细节知道得不多, 仅对短杆菌肽

S 的生物合成途径及其关键酶了解比较清楚<sup>[8]</sup>。采用突变株方法学 (mutant methodology) 对四环素的生物合成途径的最后几步有所了解, 但是对它们的许多酶还未研究<sup>[9]</sup>。本文根据对微生物主要代谢 (primary metabolism) 的调节机理所积累的知识了解, 来阐明抗菌素发酵的调节机制, 探讨如何采用遗传生化学方法, 排除或绕过代谢途径的正常控制系统, 来提高抗菌素的产量。

## 一、微生物的主要代谢、次级代谢和生物合成抗菌素的关系

微生物产生的抗菌素大都是次级代谢物, 只有个别的如乳酸链球菌肽是主要代谢物, 它在乳酸链球菌 (*Streptococcus lactis*) 对数生长期的早期即开始合成, 并和细胞蛋白质的形成是平行的, 对细胞生长起着调节作用<sup>[1]</sup>。抗菌素分子中的碳骨架主要来源于葡萄糖代谢, 直接从葡萄糖衍生出的抗菌素很多, 如氨基糖苷类抗菌素<sup>[10]</sup>, 和多烯族抗菌素<sup>[11]</sup>, 链霉素分子结构中链霉胍、链霉糖和 N-甲基-L-氨基葡萄糖都是直接从葡萄糖转化而来。

从图2看出, 微生物通过糖酵解途径 (EMP 途径) 或磷酸己糖分路 (HMP) 降解葡萄糖为丙酮酸。HMP 途径形成的核糖, 参与含嘌呤或嘧啶的核苷抗菌素的生物合成。4-磷酸-赤藓糖与磷酸烯醇式丙酮酸反应形成莽草酸是合成含芳基抗菌素的重要中间代谢物。丙糖是丝氨酸的前体, 丝氨酸是生物甲基化的供体, 例如力复霉素 SV 的 27 位上的甲氧基的甲基, 即来源于丝氨酸或蛋氨酸。在青霉素生物合成时, 丝氨酸亦是半胱氨酸的前体。

丙糖氧化为丙酮酸后, 继续氧化脱羧生成乙酰-辅酶 A (乙酰-CoA), 进一步羧基化生成丙二

本文于 1975 年 1 月 17 日收到。



表 1 产生主要和次级代谢物的支路途径

| 中间代谢产物                                          | 主要终产物                                     | 次级终产物                                                                             |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 莽草酸                                             | 对-氨基苯丙氨酸<br>苯丙氨酸<br>酪氨酸对-羟基苯<br>甲酸<br>色氨酸 | 氯霉素<br>绿脓菌素<br>新生霉素<br><br>吡咯硝素,放线菌<br>素,麦角植物碱                                    |
| 丙二酰-CoA<br>乙酰-CoA                               | 脂肪酸                                       | 力复霉素族、四环素<br>族、大环内酯族、多<br>烯族抗菌素、环己酰<br>亚胺、灰黄霉素、棒<br>曲霉素、桔霉素                       |
| 5-羟基-3,3-甲<br>基-羟基戊酸<br>$\alpha$ -氨基己二酸<br>乙酰乳酸 | 甾族化合物<br>异戊烯<br>赖氨酸<br>缬氨酸、白氨酸<br><br>泛酸  | 菸曲霉素、褐霉素<br>赤霉素、麦角植物碱<br>青霉素、头孢菌素<br>青霉素、头孢菌素、<br>短杆菌肽 S<br><br>短杆菌肽、抗敌<br>素、放线菌素 |
| 戊糖                                              | 核苷酸、腺-磷                                   | 核苷抗菌素(如嘌呤<br>霉素)                                                                  |

## 二、抗菌素产生菌的主要代谢调节机制

代谢反应的协调对生命过程是绝对必要的。微生物的一系列生化反应都有其调节机制进行有效地控制。比较熟知的是反馈抑制酶的活性和诱导(脱阻遏)或阻遏酶的合成<sup>[13]</sup>。下面叙述抗菌素产生菌的重要的代谢调节机制<sup>[14]</sup>。

### (一)底物诱导

细胞生成的酶分二类：一类称为结构酶，为生存所必需，不论有无诱导物都能形成，如 HMP 途径的酶。另一类叫诱导酶，仅当培养基中含有一定量的诱导物(一般为酶的底物或底物类似物)时，才能形成。人工合成的，不能被酶代谢的底物类似物(gratuitous inducer)常是极好的诱导物。例如 2, 6-二甲氨基苯基青霉素可诱导芽孢杆菌产生大量的青霉素酶( $\beta$ -内酰胺酶)。

链霉素发酵时，链霉素和甘露糖链霉素是同时产生的。后者的生物活性为前者的 20%，是我们不希望有的产物。发酵快到终点，当葡萄糖含量低于 1% 时，形成甘露糖链霉素酶( $\alpha$ -D-甘露糖苷酶)，并分解甘露糖链霉素为链霉素和 D-甘露糖。此酶可用  $\alpha$ -甲基甘露糖苷诱导。酒精皮醌内含的甘露聚糖亦可诱导此酶，而以酵母的甘露聚糖最能促使此酶合成<sup>[15]</sup>。此酶不仅受诱导物的诱导，还受分解代谢产物的阻遏。

## (二)反馈调节

### 1. 反馈抑制和阻遏

进行生物合成的酶类主要受反馈调节的控制。反馈抑制是合成途径的终产物抑制该途径中第一步的酶活性的作用。终产物抑制该途径上一种或多种酶的形成功阻遏(或称为合成阻遏)。这种代谢终产物积累到一定浓度时，就反过来反馈抑制或阻遏前阶段代谢反应的酶，停止进一步合成，可防止重要物质的过量产生。这二种调节机制保证微生物很快和有效地适应变换了的外界环境，对其生存是十分有利的。

虽然对次级代谢的反馈调节机理还知道得很少。但我们可以这样设想，一个主要代谢物若是某次级代谢物的前体，那么设法解除其主要代谢途径的反馈调节，可望增加次级代谢物。现以生物合成青霉素来加以说明。

生物合成青霉素的途径，大致依照图 5<sup>[16]</sup> 方式进行。L- $\alpha$ -氨基己二酸( $\alpha$ -AA)首先和 L-半胱氨酸缩合形成二肽，然后和 L-缬氨酸形成  $\delta$ -(L- $\alpha$ -氨基己二酰)-L-半胱氨酰-D-缬氨酸，此三肽的缬氨酸已转为 D 型<sup>[17]</sup>。然后脱氢形成  $\beta$ -内酯环，进一步在缬氨酸的  $\alpha$ -和  $\beta$ -的碳原子脱氢形成双键并形成噁唑环，这就是异青霉素 N，它是合成各种青霉素的前体。其  $\alpha$ -AA 侧链可被转酰基酶催化转换成其他羧酸侧链，如发酵液中存在苯乙酸即形成苄青霉素。如没有受体侧链，则被青霉素酰化酶裂解产生 6-氨基青霉烷酸，它是合成各种半合成青霉素的主要原料。消旋酶可转变异青霉素 N 为青霉素 N，以前称之为头孢菌素 N。

用化学方法可使青霉素环扩张合成头孢菌素，而头孢菌素 C 的生物合成途径亦可能和青霉素一样，来源于  $\alpha$ ,  $\beta$ -脱氢缬氨酸中间物(图 5)，硫原子和缬氨酸的一个甲基脱氢形成六环，氧化另一个甲基，然后乙酰化和消旋后即可形成头孢菌素 C，亦有人认为消旋发生在乙酰化前<sup>[14]</sup>。

下面探讨如何解除缬氨酸， $\alpha$ -AA 和半胱氨酸的主要代谢途径的控制机制，以便增加青霉素的产量。

(1) 缬氨酸的生物合成：青霉素中的缬氨酸是 D 型，其真正的前体是 L-缬氨酸，D 型是在形成三肽时形成，而不是在形成噁唑环时形成<sup>[17]</sup>。生物合成缬氨酸过程如图 6 所示。开始由乙酰羟酸合成酶将丙酮酸转变为乙酰乳酸( $\alpha$ -乙酰- $\alpha$ -羟丙酸)，最后形成缬氨酸。L-缬氨酸可反馈抑制



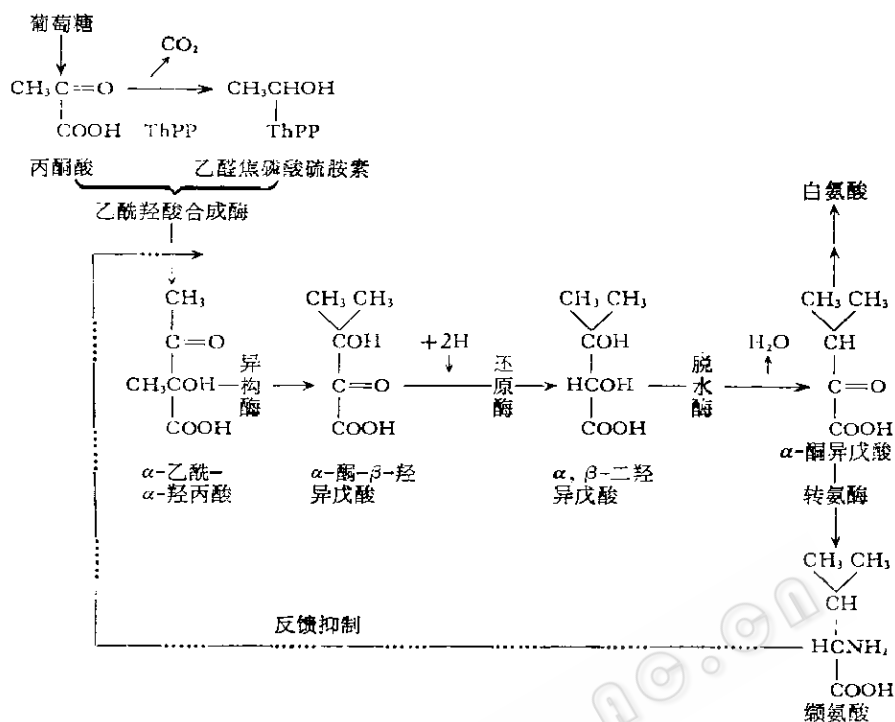


图6 赖氨酸的生物合成  
ThPP 为焦磷酸硫胺素

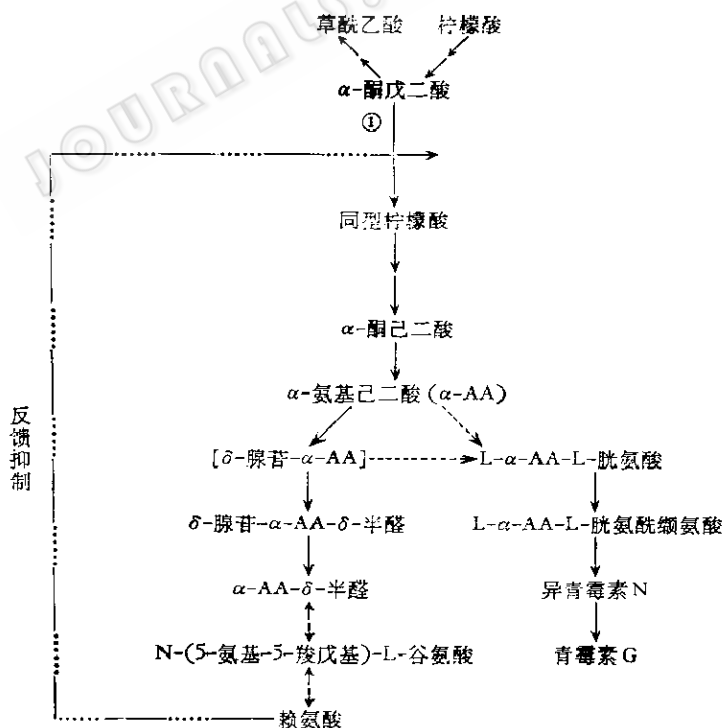


图7 产黄青霉生物合成赖氨酸和青霉素的分支途径

-----> 可能分支点。

① 同型柠檬酸合成酶

乙酰羟酸合成酶。通过诱变选育出产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 的高产菌株, 它的乙酰羟酸合成酶对 L-缬氨酸的反馈抑制比低产菌株 wis Q-176 敏感性小<sup>[19]</sup>。从而使细胞内积聚较多内源缬氨酸, 增加青霉素产量。

(2)  $\alpha$ -AA 和赖氨酸代谢:  $\alpha$ -AA 是真菌生物合成赖氨酸的中间产物。遗传研究证明,  $\alpha$ -AA 是产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 合成所有各种青霉素的中间物。赖氨酸抑制青霉素合成是因为赖氨酸反馈抑制同型柠檬酸合成酶<sup>[10]</sup>, 这样  $\alpha$ -AA 形成减少, 限制了  $\alpha$ -AA 的内源供应, 从而影响青霉素合成。

图 7 概括了现有的关于赖氨酸和青霉素生物合成途径的知识<sup>[21]</sup>。 $\delta$ -腺苷- $\alpha$ -AA 是  $\alpha$ -AA 的活化型, 是一特殊化合物。最近用生化突变株试验说明, 赖氨酸和青霉素代谢途径的分支点是在

$\delta$ -腺苷- $\alpha$ -AA 而不是  $\alpha$ -AA。

根据上述假设可以得出这样的结论, 假使应用诱变法选育获得一些赖氨酸营养缺陷型突变株, 其遗传障碍发生在  $\alpha$ -AA 形成后某一步, 合成赖氨酸被阻塞。然后在培养基中加入仅供给菌体生长量的赖氨酸, 可解除反馈抑制, 使细胞能把大量碳、氮源转变成中间产物  $\alpha$ -AA, 促使另一分支途径的终产物青霉素积累。有人试用了一些这样的突变株, 结果并不增加青霉素的产量, 有的比母株还低<sup>[21]</sup>。因此还需要深入研究真正的控制因子是什么? 是赖氨酸还是它的某些降解产物, 或者赖氨酸必需和其他化合物结合才起反馈抑制作用。看来进一步阐明赖氨酸和青霉素的代谢途径, 是可以增加青霉素产量的。顶头孢霉 (*Cephalosporium acremonium*) 能合成大量的  $\alpha$ -AA, 因此赖氨酸不抑制,  $\alpha$ -AA 亦不刺激增加头孢菌素的产

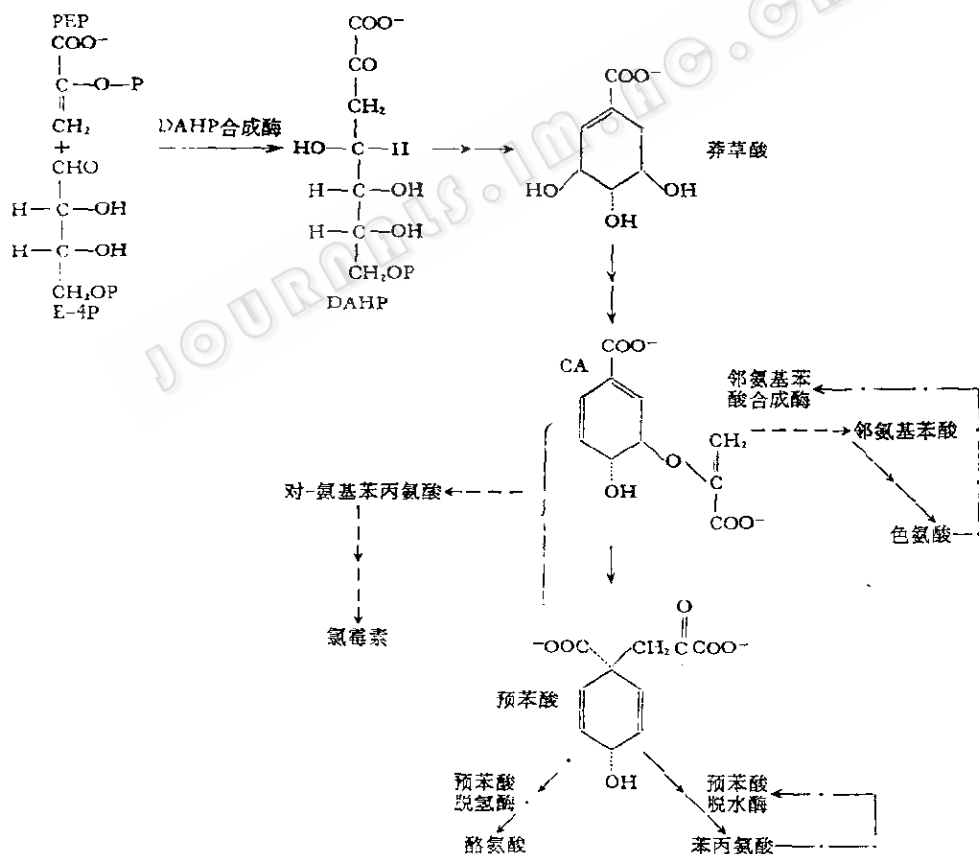


图 8 莽草酸途径和氯霉素的生物合成  
 ———→ 主要途径; - - - - -→ 支路; ·····→ 反馈抑制  
 PEP, 磷酸烯醇丙酮酸 E-4-P, 4-磷酸赤藓糖  
 CA, 3-烯醇-丙酮酸-5-脱羟莽草酸

量。

## 2. 分支途径的反馈调节

氨基酸和核苷酸发酵的分支途径的反馈调节机理, 已有很详细地讨论<sup>[11-14, 16]</sup>。可分为同功酶反馈调节、协同反馈调节、累积反馈调节、互补反馈调节和连续反馈调节等。这里仅以氯霉素加以阐明。

由图 8<sup>[22]</sup> 看出, 由莽草酸途径合成氯霉素的特殊分支点, 可能是在 3-烯醇-丙酮酰-5-脱羟莽草酸 (chorismic acid) (CA) 或是在预苯酸。这里没有“正常”的终产物抑制莽草酸途径的第一酶, 而色氨酸反馈抑制邻氨基苯酸合成酶, 苯丙氨酸反馈抑制预苯酸脱水酶。因此如培养基中含有这二种氨基酸, 就可积累大量前体中间产物 CA 和预苯酸, 由此促使合成更多的氯霉素<sup>[23]</sup>。

## (三) 分解代谢产物调节

分解代谢产物的调节是指能被迅速利用的碳源 (一般指葡萄糖) 或其分解代谢产物, 对其酶作用的抑制 (分解抑制)。分解产物抑制某些酶类的合成, 称为分解阻遏, 早先称为“葡萄糖效应”<sup>[24, 25]</sup>。

在生产青霉素的初期, 用葡萄糖和乳糖作碳源, 发现能迅速利用的葡萄糖不适于次级代谢产物青霉素的合成, 而缓慢利用的乳糖却有利于提高青霉素产量<sup>[26]</sup>。现在比较一致的看法是, 葡萄糖分解产物的积累阻遏了次级代谢物的合成酶, 从而抑制了抗菌素的产生。目前青霉素发酵已采用定时流加限量的葡萄糖液或糖蜜, 代替价格较高的乳糖。由于限制了葡萄糖的浓度, 就使分解代谢产物浓度维持在较低水平上, 不会产生分解阻遏作用。在摇瓶中加入糖和前体压成的片剂, 使其缓慢释放, 同样可提高青霉素产量 (表 2)<sup>[14]</sup>。

还有不少抗菌素在生产时使用混合碳源, 或定时流加限量葡萄糖液、麦芽糖液或液化淀粉, 以增加抗菌素产量。

表 2 蔗糖和苯乙酸钠加入方法对  
卡青霉素产量的影响

| 方 法              | 卡青霉素产量<br>(单位/毫升) |
|------------------|-------------------|
| 蔗糖(溶液), 苯乙酸钠(溶液) | 9,700             |
| 蔗糖(溶液), 苯乙酸钠(片剂) | 13,400            |
| 蔗糖(片剂), 苯乙酸钠(溶液) | 14,200            |
| 蔗糖(片剂), 苯乙酸钠(片剂) | 16,150            |

葡萄糖分解产物还能抑制所有芽孢杆菌形成多肽抗菌素和芽孢<sup>[27]</sup>, 以及抑制许多抗菌素如土霉素、自力霉素、新霉素和盐霉素 (siomycin)<sup>[28]</sup> 的合成, 后者主要被丙酮酸和二羟乙酸所抑制。葡萄糖亦能分解阻遏某些关键酶, 如甘露糖链霉素酶<sup>[29]</sup>、吩噻嗪酮合成酶 (phenoxazinone synthase)<sup>[30]</sup>。当葡萄糖耗完时, 吩噻嗪酮合成酶开始形成, 从而导致放线菌素 D 的合成 (图 9), 其活性变化与放线菌素 D 的产量高低是密切相关的。

总之, 能维持微生物较快生长的碳源可以产生分解阻遏作用。当该碳源消耗完时, 分解其他碳源的酶才得以形成。

## (四) 交叉途径的调节

以真菌生物合成半胱氨酸为例 (图 10) 来说明。工业生产上用的产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*), 主要依硫酸盐还原途径生物合成半胱氨酸, 但也可以由可逆的转硫作用从蛋氨酸形成。顶头孢霉 (*Cephalosporium acremonium*) 主要由

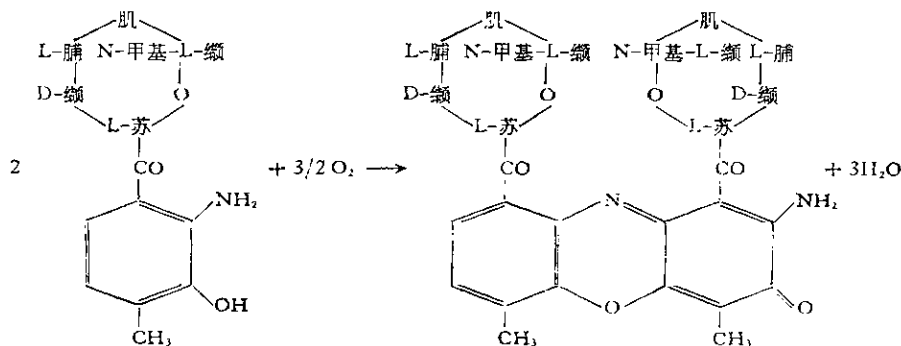


图 9 吩噻嗪酮合成酶合成放线菌素 D 的可能过程

脯——脯氨酸; 缬——缬氨酸; 苏——苏氨酸;

N-甲基-L-缬——N-甲基-L-缬氨酸; 肌——肌氨酸

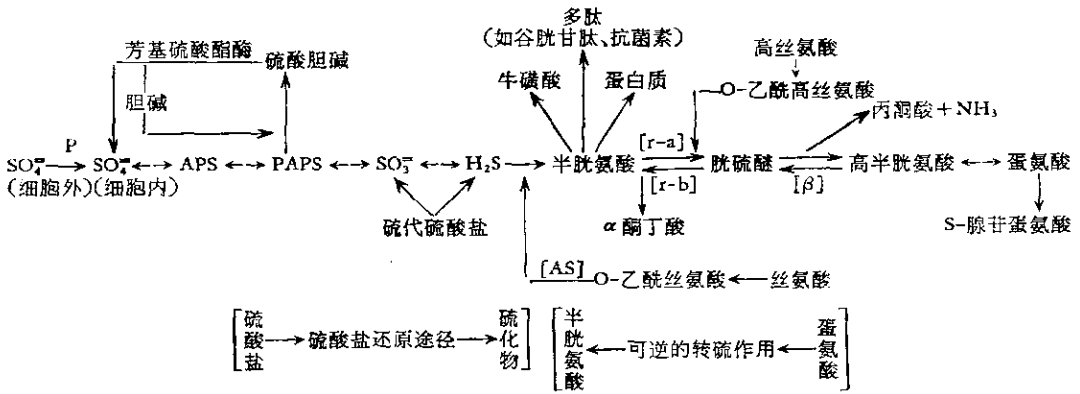


图 10 真菌的硫代谢

APS=5'-磷酸硫酸腺苷  
PAPS=5'-磷酸硫酸-3'-磷酸腺苷  
P=透性酶  
[r-a]=胱硫醚 r-合成酶  
[r-b]=r-胱硫醚酶  
[β]=β-胱硫醚酶  
[AS]=乙酰丝氨酸氨硫化酶

蛋氨酸的可逆的转硫作用形成半胱氨酸。但是用诱变法获得的工业上用的高活性菌株对硫酸盐增加了透性,可利用硫酸钙作为硫源形成半胱氨酸。实验证明,蛋氨酸促进头孢菌素 C 的作用并不是作为硫源供给者<sup>[11]</sup>,而是反馈阻遏 γ 和 β-胱硫醚酶, S-腺苷蛋氨酸可特异的抑制胱硫醚-r-合成酶。这些酶可转化半胱氨酸碳骨格为丙酮酸和氨。由于蛋氨酸的反馈阻遏从而防止了半胱氨酸的减少,也就是说在细胞中有更多的半胱氨酸转向合成头孢菌素 C。

真菌细胞以硫酸胆碱形式贮藏硫,当可利用的无机硫酸盐耗尽时,便形成芳基硫酸酯酶,释放

菌体贮藏的硫酸盐。硫酸盐及其还原途径的化合物都是芳基硫酸酯酶的阻遏物,蛋氨酸可能脱阻遏头孢菌素 C 中的芳基硫酸酯酶。图 11<sup>[12]</sup>说明头孢菌素 C 产量和芳基硫酸酯酶活性之间的关系。一些突变株酶活性的增加与抗菌素产量成正比。

青霉素高产菌株的细胞膜的透性发生了改变,摄取无机硫酸盐的能力要比低产菌株增加 2—3 倍<sup>[13,14]</sup>,并可减轻无机硫的调节机制的控制,而有效的转变为半胱氨酸,这种情况本质上可能还和诱导一种透性酶(permease)有关。

总之,半胱氨酸通过硫酸盐的还原,或蛋氨酸的可逆转硫作用途径形成。这二个途径是如何交叉相互配合控制的,现在还不明白。

### (五)无机磷的反馈调节

在抗菌素发酵过程中,培养基中磷含量,特别是可溶性无机磷酸盐对真菌、细菌和放线菌的生长、糖利用率、糖代谢途径、菌丝形态、发育特性、菌体内各种物质含量和抗菌素产量有密切关系。其中以放线菌对无机磷最敏感,产生抗菌素的最适无机磷量约为 4.5—11.5 毫克%。比生长需要量低得多。“次适”生长浓度的无机磷使菌体生长受到某些控制,代谢活性转为有利于生物合成抗菌素的状态。如培养基中磷酸盐过多,则促使葡萄糖代谢由 HMP 途径转变为所不希望的 EMP 途径<sup>[15]</sup>,抗菌素产量显著降低,菌丝内总磷酸盐浓度和核酸含量高,并形成异染颗粒。当然磷酸盐的最适量还与培养基组成,发酵时的通气情况和所用菌株有关。

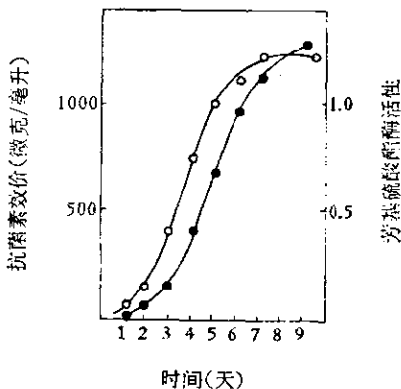
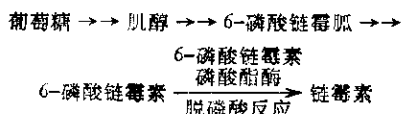


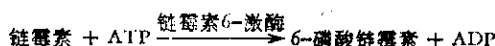
图 11 顶头孢霉培养时间和头孢菌素 C 合成与芳基硫酸酯酶活性之间的关系  
○——○ 头孢菌素 C 效价 ●——● 酶活性以每毫克细胞每分钟释放对硝基苯酚的微粒分子数表示。



“过量”磷酸盐抑制生物合成链霉素的原因,是无机磷反馈抑制磷酸酯酶的活力<sup>[36]</sup>(本文所用术语“过量”是对产生抗菌素而言,对菌体生长则可达最大值)。合成链霉素过程要形成中间产物 6-磷酸链霉素,即磷酸酯化链霉素的 6 位羟基。磷酸酯酶活性高,则产生链霉素亦多,如下方程式所示<sup>[36]</sup>。



发酵时,当链霉素开始形成后,再向培养基中加入无机磷酸盐,即停止形成链霉素,并积聚没有活性的 6-磷酸链霉素,如下方程式所示<sup>[36]</sup>。



由此看来,灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)产生链霉素(一种蛋白质抑制物的活性型)和磷酸链霉素(无活性型)的生理意义,可能是调节细胞自身蛋白质的合成。

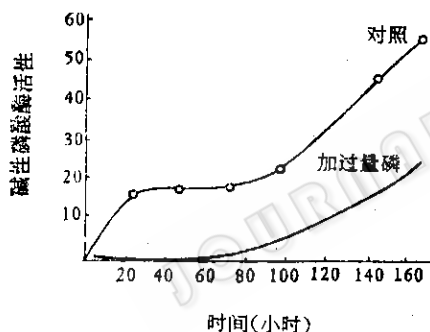


图 12 万古霉素发酵时过量磷酸盐对碱性磷酸酯酶的抑制作用  
活性以每分钟每毫克蛋白质释放磷酸盐的克分子表示

同样在万古霉素发酵时,过量磷酸盐可抑制碱性磷酸酯酶的活性(图 12)<sup>[37]</sup>。由此推测,有一些抗菌素,在形成前是先形成磷酸化中间产物,再由碱性磷酸酯酶脱磷酸化形成抗菌素。

土霉菌(*Streptomyces rimosus*) AC-T118 只能应用含 0.5% 玉米浆的培养基,且无机磷不能超过 3—4 毫克%,如再增加玉米浆用量则产量降低。这样就限制了利用大量玉米浆以增加产量的可能性。用紫外线选育获得的菌株 AC-T293 可耐 1% 玉米浆的培养基,相应的增加 30% 产量。这种能耐较高浓度无机磷的菌种,可能已部分解除了无机磷的反馈调节,有利于提高抗菌素产

量<sup>[38]</sup>。

### 三、生长期和生产期的相互关系

众所周知,细菌的发育周期可划分为 7 个不同的生长期。用放线菌、细菌和真菌生产抗菌素时,它们有相互不同的生长期,生长曲线亦随不同菌株而异,并和外界环境条件有关。为了方便,Butlock 粗略的把抗菌素发酵划分为二个不同的代谢期——生长期(trophophase,希腊文 τροφή 营养,亦可称为营养期)和生产期(idiophase 希腊文 ιδίω,独特的,指此期显示出代谢特异性,如分泌抗菌素等)。

在生长期,微生物依一定比例吸收主要营养而生长繁殖,此期结束时可因消耗完一种主要营养物质如磷、氮或硫而限制了细胞繁殖。如应用放线菌生产抗菌素,生长期结束时无机磷已耗完;在灰黄霉素发酵中,生长期结束时培养基中的氨态氮或可利用的氨基酸已耗完;青霉素发酵的生长期结束时,无机硫已耗完。显然生长期形成的代谢物是主要代谢物。进入生产期后死亡的细胞数与增殖的细胞数保持相对的平衡,此期开始形成特殊的次级代谢物。Borrow<sup>[39]</sup>把生长期称为(营养)平衡期,把生产期划分为贮藏期和持续期,前者由于细胞积聚脂肪和糖,干重继续增加,并开始产生次级代谢物。后者细胞干重不变,但继续消耗葡萄糖和分泌次级代谢物(图 13)。

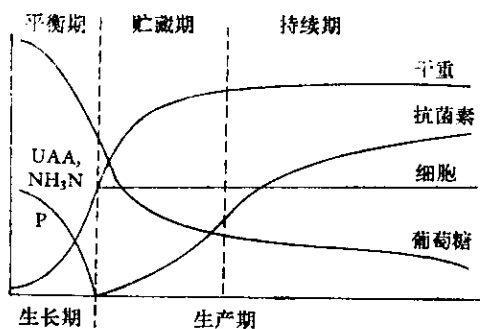


图 13 抗菌素发酵的代谢曲线模式图  
UAA——可利用的氨基酸  
顶部为 Borrow 命名术语  
底部为 Butlock 术语

生长期不形成次级代谢物的原因是,合成次级代谢物的一些关键酶处于阻遏状态,如生物合成青霉素的转酰基酶和苯乙酸活化酶;生物合成短杆菌肽 S 的酶 I 和酶 II<sup>[41]</sup>;生物合成放线菌素

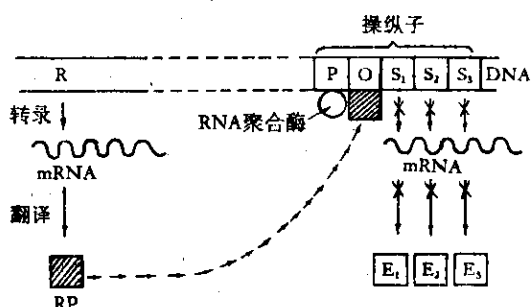


图 14 生长期阻遏生产期的酶的可能模式图  
R 为调节基因; P 为启动子; O 为操纵基因;  
S 为结构基因; E 为生物合成抗菌素的关键  
酶; X 表示抑制反应; RP 为阻遏蛋白质。

的酚噻酮合成酶和生物合成链霉素<sup>[40]</sup>与紫霉素的转脉基酶。

图 14<sup>[41]</sup>说明生长期阻遏生产期的酶的可能模式。调节基因(R)的首要功能是控制染色体中的操纵基因(O)和结构基因。调节基因能合成阻遏蛋白质(RP),从而调节酶的合成,当操纵基因与阻遏物结合, RNA 聚合酶不能在 DNA 上移动,从而阻止转录抑制形成合成抗菌素的关键酶,即整个系统被阻遏。如具有下列一些原因能解除对酶合成的阻遏作用,可促使抗菌素的形成。

(一) 阻遏物分子上有两个位点,一个结合操纵基因,另一个和诱导物结合,诱导物和阻遏物结合后,后者构型发生变化,不能再和操纵基因相结合,因此转录开始,酶也随着合成。此诱导物在菌体生长后由代谢产生,或在培养基内添加,使生产期起作用的基因解脱阻遏。

(二) 生长在能快速利用的碳源培养基中,则由于分解代谢产物阻遏了生产期起作用的一些基因,这些分解代谢产物的耗尽,这些基因也随之脱阻遏。至于分解阻遏的机制,在抗菌素产生菌中还不清楚,仅知大肠杆菌细胞内减少环式腺-磷(C-AMP)而引起葡萄糖效应<sup>[23]</sup>。

(三) 由于在能荷调节途径中 ATP 形成减少,发生脱阻遏。

(四) 转录开始时, RNA 聚合酶必需首先用于启动子,才开始 mRNA 的合成。生长期的 RNA 聚合酶只能转录生长期起作用的基因。生长停止后,酶的亚单位结构改变,相应的改变转录模式,容许转录生产期起作用的基因。例如枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) 在生长期后 RNA 聚合酶的特殊模版改变,即形成芽孢和抗菌素<sup>[41]</sup>。

如何使发酵过程的生长期缩短,迅速的转入生产期? 也就是说,采用那种方法,使这些阻遏状态的基因迅速转入脱阻遏状态? 由图 14 可设想,若在生长期加入一蛋白质抑制剂,抑制调节基因合成阻遏蛋白,或使其钝化,但是不影响结构基因合成关键酶,则可提前合成抗菌素。例如加 DL-对-氟苯丙氨酸或环己酰亚胺可刺激展开青霉(*Penicillium patulum*) 合成 6-甲基水杨酸合成酶<sup>[42]</sup>, 加 5-氟尿嘧啶可刺激抗生素链霉菌(*Streptomyces antibioticus*) 提前合成酚噻酮合成酶<sup>[43]</sup>。此外合成培养基缺少某些未知成份,可使生长率减慢,干扰合成阻遏蛋白,促使氯霉素在生长期产生<sup>[44]</sup>。

抗菌素发酵的周期有长有短,如用芽孢杆菌生产多肽抗菌素,一般只需 30 多个小时。而象灰黄霉素发酵,周期长达 300 多个小时。停止合成抗菌素的原因,大致有以下几点:(1) 细胞分化为另一阶段,形态有明显不同,停止产生次级代谢物。(2) 次级代谢物反馈抑制关键合成酶的活性。(3) 合成酶分子衰退,由于终产物反馈阻遏,不能重新形成。(4) 次级代谢物的前体耗尽。上述各点原因如能进一步搞清楚,就有可能延长发酵的生产期,增加抗菌素产量。

#### 四、生物合成途径的遗传控制

通过诱变可获得组成型突变株、抗分解阻遏或抗分解抑制突变型,以及抗反馈阻遏或抗反馈抑制的突变型等等,使基因突变不仅限于结构基因,而且还包括调节基因,选育出理想的突变株用于生产。

##### (一) 营养缺陷型变异株的选育

在合成代谢中,由于基因突变使一种酶失活的营养缺陷型变异株,常引起某一代谢中间产物的积累。在图 6 谈到缬氨酸生物合成时, $\alpha$ -酮异戊酸可形成缬氨酸或白氨酸。利波曼氏链霉菌(*Streptomyces lipmanii*) 主要生产的是 7-甲氧基头孢菌素 C, 通过选育获得白氨酸营养缺陷型菌株,就只能合成大量缬氨酸。培养此菌时,加入限量的白氨酸(0.5 微克/毫升)到培养基中,抗菌素产量增加 1.9 倍<sup>[45]</sup>。

这种营养缺陷型变异株,可以提高抗菌素的例子还很多,例如应用脂肪酸营养缺陷型变异株,显然可积聚中间代谢产物丙二酰-CoA,提高四环素、制霉菌素和环己酰亚胺等的产量<sup>[46]</sup>(参阅表

1, 图 2)。

## (二)耐类似物变异株的选育

当一个代谢终产物引起反馈抑制时, 如果获得它的结构类似物(即代谢拮抗物)耐性的突变株, 往往就是一个抗反馈抑制的突变株。这是因为接受反馈抑制的酶一般有二个活性部位, 一个是和底物相结合的催化活性中心, 一个是和代谢终产物相结合的调节部位。正常代谢终产物和这种酶的结合是暂时和可逆的, 当终产物浓度下降时, 酶活性也就恢复。代谢拮抗物的结构和代谢终产物相似, 亦能与合成途径中的第一个酶相结合, 而使它失活。由于代谢拮抗物不能被利用, 浓度不会降低, 因而酶的活性不会恢复, 微生物生长就被抑制。而抗结构类似物菌株由于它的结构基因发生突变, 酶的调节部位不再和代谢拮抗物或正常的代谢终产物相结合, 因此在代谢终产物积累的情况下, 仍将继续过量的合成这一产物。

例如金色极毛杆菌(*Pseudomonas aureofaciens*)的耐 5-氟色氨酸和 6-氟色氨酸变异株, 能提高吡咯硝素 (pyrrolnitrin) 产量 3 倍<sup>[47]</sup>。由于这种活性菌株的生物合成色氨酸途径能抗反馈抑制, 因此不需添加色氨酸作前体, 就能生产过量色氨酸进入此抗菌素中。

顺便再谈一谈选育耐前体变异株的问题。有些抗菌素发酵时, 如加入前体可显著的增加某种抗菌素的产量, 一般加入前体越多, 产量亦越高。但超过某一限度时前体对抗菌素产生菌起毒性作用。如在生产青霉素时, 选育耐高浓度前体(苯乙酸)的变异株, 往往可获得工业生产上的高活性菌株<sup>[13]</sup>。

## (三)抗菌素耐性菌株的选育

有些抗菌素在其产生菌的代谢途径中, 似乎象一调节物行使反馈调节作用。除前述链霉素外, 还有放线菌素 D 可抑制自身产生菌合成 mRNA 而调节菌体蛋白质合成。短杆菌(*Bacillus brevis*)产生的短杆菌素是该菌 RNA 聚合酶的一特殊抑制物, 对细胞本身的营养生长过渡到形成芽孢, 起调节转录的作用。又如多粘杆菌(*Bacillus polymyxa* var. *colistinus*) 过份营养生长, 大量浪费氨基酸时, 就由其调节机制合成多粘菌素 E, 对合成菌体蛋白质起了自动调节平衡作用<sup>[13]</sup>。此外象氯霉素和金霉素在细胞内积聚时, 就能阻断产生菌自身蛋白质的合成<sup>[48]</sup>。

上述抗菌素以高浓度加于培养基中, 只有高

活性菌株能承受。此现象已广泛用于生产实践中, 以选育抗菌素耐性菌株, 提高抗菌素产量。如用金霉素处理金霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*)<sup>[49]</sup>。又如在选育灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 时, 链霉素产量逐渐增加, 但这些菌株对增加培养基中的链霉素敏感, 从中挑出一个耐链霉素 600 单位的突变株, 进一步用紫外光和 X-光处理, 选育得产量增加数倍的耐性菌株<sup>[50]</sup>。以后逐渐把链霉素浓度由数千增加到 4 万单位/毫升, 获得的耐性菌株的产量进一步提高<sup>[51]</sup>。还有诺尔斯氏链霉菌 (*Streptomyces noursei*), 通过诱变获得的菌株 54/465, 可耐抗菌素浓度每毫升 20,000 单位, 产生制霉菌素的能力亦提高到每毫升 15,000 单位, 而每毫升 20 单位制霉菌素即可抑制不产制霉菌素的变异株的生长<sup>[52]</sup>。如何解释这些事实? 可能是抗菌素耐性突变株的抗菌素合成基因已脱阻遏。此外这种耐性菌株具有容易识别的标记, 是研究分子生物学的有效试验工具。

## (四)回复突变变异株的选育

一个突变株失去的某种生化特性, 经过二次突变(即回复突变)能回复该特性。这是因为当某一结构基因发生突变后, 某一酶就因结构改变而失活, 而回复突变使它的活性中心的结构复原, 但调节部位的结构仍然没有恢复, 结果是一方面酶恢复了活性, 而另一方面反馈抑制已解除或不怎么严重。例如金霉素产生菌 (*Streptomyces viridifaciens*) 先突变为蛋氨酸缺陷型, 然后回复突变为原养型, 结果其中有 85% 的回复突变变异株增加产量 1.2—3.2 倍; 另一株为先诱变为不产抗菌素的菌株, 然后又回复突变, 从中获得一高产菌株, 增加产量 6 倍<sup>[46]</sup>。又例如利波曼氏链霉菌 (*Streptomyces lipmanii*), 由营养缺陷型突变株回复突变为原养型, 提高了抗菌素的产量如表 3 所示<sup>[45]</sup>。

表 3 利波曼氏链霉菌的原养型回复突变株

| 营养缺陷型 | 回复突变株 | 分泌氨基酸     | 抗菌素效价*<br>(单位/毫升) |
|-------|-------|-----------|-------------------|
| 苏氨酸   | LE 21 | 苏氨酸, 白氨酸  | 170               |
| 半胱氨酸  | LE 8  | 半胱氨酸      | 140               |
| 异白氨酸  | LE 35 | 异白氨酸, 苏氨酸 | 190               |

\* 野生型菌株产量 100 单位/毫升。

## 五、结 束 语

本文粗略地介绍了一些抗菌素发酵的代谢调

节机理, 它们的关键酶和主要中间代谢产物。抗菌素是从糖代谢或氨基酸合成代谢途径中分支出来形成的。合成它们的酶皆受基因控制和调节。这些基因作用的阻遏和抑制或解除是控制代谢反应的关键。显然产抗菌素的特征受多个基因相互作用控制和调节。例如产生青霉素主要由产青霉菌 (*Penicillium chrysogenum*) 的细胞核基因所决定<sup>[1]</sup>。但是因为细胞质基因可以决定“侏儒型”(dwarfism), 即影响该菌的生长, 将间接的影响青霉素的合成。因限于篇幅, 不再讨论这方面的问题。

微生物不断地进化, 具备有极精细的代谢控制系统, 一旦细胞的需要得到满足时, 该系统就能发出停止制造某种物质的信息, 以阻止其过量产生。为了积累过量抗菌素, 必需设法排除或绕过代谢途径的正常调节控制系统。另一方面采用生化遗传的新理论和新研究方法, 使菌种选育工作仅从直接根据抗菌素产量, 发展到从抗菌素的生物合成途径和控制调节机制角度着手考虑, 有目的地改造菌种的特性, 甚至创造新的菌株。选育营养缺陷变异株、耐类似物变异株、抗菌素耐性菌株和回复突变株作为普通的选育菌种的方法被广泛采用。

通过多年选育过程获得的工业生产菌株, 可能已部分解除了某些正常的调节控制机制。它将过量生产某种特定的中间代谢产物或次级代谢产物。

对于微生物产生抗菌素的生物学意义, 已提出了各种各样的假说<sup>[1]</sup>。本文前面介绍的许多例子说明, 抗菌素能抑制其自身产生菌, 特别是年青菌体的生长, 它似乎象一调节物发挥反馈调节作用。此外一些抗菌素分子内含有金属原子如争光霉素含铜, 灰黄霉素含铁。另一些是强螯合剂, 能与钾、镉等结合成复合物。它们是否能通过结合细胞内的微量元素而控制酶活性, 行使调节作用呢? 因此搞清楚抗菌素在微生物代谢中的规律, 抗菌素的产生对产生菌本身起了怎样的生理功能? 将丰富和完善我们对代谢调节机制的理解。

事实上, 我们对抗菌素发酵的调节机理还刚开始了解, 特别是对于它们的遗传基础和分子作用机制远没有搞清。因此放在我们面前的研究课题还很多。今后将根据现有生物化学和分子生物学积累的知识, 把注意力着重放在微生物和环境间的代谢生理研究和生化遗传方面。从理论上分

析总结代谢调节的规律, 揭示其内在的本质的联系, 充分利用微生物的旺盛的生物合成能力, 促使抗菌素产量和质量提高。最后使微生物的遗传和生化特性朝我们设想的方向改变和控制, 使发酵中少产生或不产生不希望的代谢物, 多产生一些高效的新型抗菌素。

## 参 考 资 料

- [1] 木下祝郎: 化学工学, 38 (2): 94—100, 1974.
- [2] Demain, A. L.: 科技参考, 应用微生物, 6, 11—18, 1973.
- [3] Pardee, A. B., & Palmer, L. M.: *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 27:133—144, 1973.
- [4] 盛祖嘉: 微生物学报, 13 (1): 84—90, 1973.
- [5] 王寅章: 科学通报, 18 (3): 104—111, 1973.
- [6] 阿部重雄: 化学工业, 24 (3): 101—115, 1973.
- [7] 相田浩: 化学と生物, 11 (5): 276—285, 1973.
- [8] 周家惠: 科学通报, 19 (12): 547—555, 1974.
- [9] 小嶋道男: 化学と生物, 12 (2): 139—145, 1974.
- [10] Grisebach, H., & Schmid, R.: *Angew. Chem., Inter. Edit.* 11(3):159—173, 1972.
- [11] Hamilton-Miller, J. M. T.: *Bact. Rev.*, 37(2):166—196, 1973.
- [12] Birch, A. J.: *Science*, 156:3772, 202—206, 1967.
- [13] Stebbing, N.: *Bact. Rev.*, 38(1):1—28, 1974.
- [14] Demain, A. L.: *J. Appl. Chem., Biotechnol.*, 22(3):345—362, 1972.
- [15] Hockenhuil, D. J. D.: *Progr. Ind. Microbiol.*, 2:133—165, 1960.
- [16] 中山清: 别册化学工业, 17 (8): 129—178, 1973.
- [17] Loder, P. B., & Abraham, E. P.: *Biochem. J.*, 123(3):471—476, 1971.
- [18] Fujisawa, Y. et al.: *Nature New Biol.*, 246:153, 154—155, 1973.
- [19] Goulden, S. A., & Chattaway, F. W.: *J. Gen. Microbiol.*, 59(1):111—118, 1969.
- [20] Demain, A. L., & Masurekar, P. S.: *Ibid.*, 82(1):143—151, 1974.
- [21] O'Sullivan, C. Y., & Pirt, S. J.: *Ibid.*, 76(1):65—75, 1973.
- [22] Lowe, D. A., & Westlake, D. W. S.: *Can. J. Biochem.*, 50(10):1064—1073, 1972.
- [23] Lowe, D. A., & Westlake, D. W. S.: *Biochem. Soc. Trans.*, 1(1):219—222, 1973.
- [24] Paigen, K., & Williams, B.: *Adv. Microbiol. Physiol.*, 4:251—324, 1970.
- [25] Pastan, I. et al.: *Recent Progr. Horm.*

- Res.*, 27: 421—432, 1971.
- [26] 周家惠: 青霉菌的生理和青霉素的生物合成, 第 28 页, 1959, 科学出版社。
- [27] Schaeffer, P.: *Bact. Rev.*, 33(1): 48—71, 1969.
- [28] Kimura, A.: *Agr. Biol. Chem.*, 31(7): 845—852, 1967.
- [29] Inamine, E. et al.: *Ferment. Adv.*, 199—221, 1969.
- [30] Gallo, M., & Katz, E.: *J. Bact.*, 109(2): 659—667, 1972.
- [31] Drew, S. W., & Demain, A. L.: *Biotech. Bioeng.*, 15(4): 743—754, 1973.
- [32] Dennen, D. W., & Carver, D. D.: *Can. J. Microbiol.*, 15(2): 175—181, 1969.
- [33] Tardrew, P. L., & Johnson, M. J.: *J. Bact.*, 76(4): 400—405, 1958.
- [34] Yamamoto, L. A., & Segel, I. H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 114(3): 523—538, 1966.
- [35] 沈善炯等: 生理学报, 21(3), 302—310, 1957. 生化学报, 1, 69—77, 1958.
- [36] Walker, J. B. & Skervaga, M.: *J. Biol. Chem.*, 248(7): 2435—2440, 2441—2446, 1973.
- [37] Mertz, E. P., & Doolin, L. E.: *Can. J. Microbiol.*, 19(2): 263—270, 1973.
- [38] Орлова, Н. В., и Верховцева, Т. П.: *Антибиотики*, 4(1): 26—31, 1959.
- [39] Borrow, A. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 7(2): 227—276, 1961.
- [40] 李友荣, 全国第三次抗菌素学术会议论文集, 第二册, 抗菌素生产工艺, 142—148, 1965.
- [41] Losick, R. et al.: *Nature*, 227: 5261, 910—913, 1970.
- [42] Bu'Lock, J. D. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 15(3): 279—285, 1969.
- [43] Jones, G. H., & Weissbach, H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 137(2): 558—573, 1970.
- [44] Malik, V. S.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 15: 297—336, 1972.
- [45] Godfrey, O. W.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 4(2): 73—79, 1973.
- [46] Demain, A. L.: *Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today*, 239—245, 1972.
- [47] Elander, R. P. et al.: *Folia Microbiol.*, 16(2): 156—165, 1971.
- [48] Mikulík, K. et al.: *J. Antibiot.*, 24(12): 801—809, 1971.
- [49] Бесерова, С. И.: *Антибиотик*, 14(8): 698—702, 1969.
- [50] Dulane, E. L., *Mycologia*, 45(4): 481—487, 1953.
- [51] Alikhanian, S.: *Current Topics in Microbiol. & Immunol.*, 53: 91—148, 1970.
- [52] Dolezilova, L. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 39(3): 305—309, 1965.
- [53] Macdonald, K. D. et al.: *Ibid.*, 33(3): 375—383, 1963.