全国高校基础微生物学讲座
及教学经验交流班

次生代谢调控

焦瑞身

北京师范学院
生物系
资料室

一九八四年八月上海

SWTi/1438/13

次生代谢调控（提纲）

（一）初级代谢与次生代谢

（A）初级代谢与次生代谢

两者的比较：从功能、合成时期、途径、产生菌以及合成反应的专一性

（B）分批发酵中抗生素后期产生的问题：生长与合成的关系，抗生素合成的生态学观点

（二）研究次生代谢途径的方法

（A）标记化合物的应用

（B）无细胞抽出液的应用

（C）突变株的应用：特殊营养突变株，共合成

（三）次生代谢产物的合成

（A）大致的过程

（B）次生代谢产物的前体

（C）起限制作用的前体

（D）次生代谢物的合成

（1）关键酶

（2）聚合过程

（3）后期修饰

（4）装配

（四）抗生素合成的控制

（A）碳代谢物的阻遏

（B）氮代谢物的阻遏

（C）磷的调节

（D）诱导

（E）抗生素合成酶的抑制

（五）从代谢调节角度进行遗传操作选育高产菌株

（A）常规筛选

（B）理论指导下的筛选

（C）回复突变

（D）阻遏的解除，突变合成，基因工程

上海植物生理研究所
微生物室 焦瑞身
1984.8.

（一）初级代谢与次生代谢的比较

初级代谢为细胞生长提供能量和初级代谢产物，用于合成对生命必需的蛋白质和核酸等生物高分子物质。而次生代谢所涉及的产物，在细胞生长和繁殖中的功能，都不明确。原来次生代谢产物（secondary metabolites）一词最早是植物生理学家用来指植物碱，色素等对植物细胞无明确功能的一些植物产物。后来，微生物学家借用这个词指无明显生理功能，或者对微生物细胞非生长必需的微生物产物，如抗生素，色素等。下面我们从几个方面阐明两个类型的微生物代谢产物的区别。

1．功能　初级代谢包括错综复杂的能提供生物合成中间产物和能量的异化途径，两用途径（TCA，乙醛酸途径）和同化途径以及转化这些前体为生命必需的高分子物质如DNA，RNA，蛋白质。脂肪。多糖等。初级代谢基本上在所有生物都是共同的，而且初级代谢中的反应都有相互间的平衡，超过细胞生存所需要的中间产物很少能够积累。

和初级代谢物相反，次生代谢物化学结构比较复杂，而且对产生菌的生长不是必需的，不过在自然界条件下，可能对产生菌的存活有利。

2．合成的时期　初级代谢是生长必需，自然这些初级代谢物伴随着细胞生长繁殖时期。次生代谢物也叫特殊产物（idiolites），通常在分批培养的合成期（idiophase production phase）也就是当生长速度降低时期合成。有关生长和合成时期的关系以及对次生代谢物的调节，将在下节进行讨论。

3．合成途径　上面提出初级代谢途径在各种生物基本是相同的，也是比较简单的，虽然在调节上存在着各式各样的机制。次级代谢产物在化学结构上十分复杂，属于多种类型。例如吲哚衍生物，内酯，大环内酯，萜，核苷类，多肽，吩噻类，多炔类，多烯类，吡咯类，萜类，四环类，氨基糖类等等，而且常会有不寻常的化学键如β－内酰胺，环多肽，大环内酯等等。这些类型的化合物反映了次生代谢物的多种合成途径，远比初级代谢物复杂。不过，尽管结构和合成途径是多样的，但很多次生代谢产物只从少数几种前体经过聚合，装配和修饰反应而形成。

4．产生菌，合成反应的专一性　初级代谢物是普遍存在的，但其酶反应有高度的专一性，一般只能接受一种底物，产生一种产物。反之，次生代谢产物一般只由一属的一些种产生，所以在就产生菌的范围讲，局限性很大，但产物又往往如上面所提到的又常以一族化合物的形式出现，说明反应的专一性较低。例如青霉素有10种，意味着侧链的专一性不强。另外，在下面方法部分提到的突变合成就是利用次生代谢产物的反应专一性较低的特点而进行的。

有关次生代谢产物合成的调节，如上述与生长阶段的密切联系，是当代微生物代谢研究主流之一，近年也是颇有进展的。总的看来，次生代谢产物如初级代谢产物一样，也受到各式各样的调节，如诱导，分介物阻遏，终点产物的反馈调节等。另外，上面已指出，次生代谢产物是由少数中间产物（前体）经缩合等反应产生，这些前体合成中的调节，自然也影响了次生代谢产物的产生。显然，次生代谢产物受到两个阶段的调节。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

（二）分批发酵中抗生素后期产生的问题

（a）有关生长和合成时期的关系上，单细胞细菌和线状结构微生物，包括放线菌和霉菌表现出不同的行为。

i）单细胞细菌产生的抗生素

在丰富培养基中，高水平的抗生素通常出现在细胞生长达到最高峰之后，这在具有明显对数生长期的单细胞细菌中，最为明显。生长期称为 trophophase，产生抗生素的时期，称为 idiophase。

ii）在丝状菌的分批培养中，生长期和合成期的分界线并不十分明显，在合成期开始后，菌体干重继续增加，虽然其速度低于生长期。显然，干重不是真正生长的指标。实际上菌体包括细胞复制必需的结构物质（细胞膜、壁、细胞器、核糖体、核等）和通过同化而积累的储藏物质如多脂肪、多元醇、聚β-羟基丁酸、聚磷酸，以及非结构醣类。就是细胞壁的比例也不一定是固定不变的。在合成期，菌体干重的增加通常就是由于这些储藏物质的增加，有的情况下，可达到菌体干重的50-60%。可能真正代表复制性的生长是DNA。例如在杀念珠菌素的发酵中（图1），用DNA作为生长指标，看出生长与抗生素合成，可以明显地分为两个时期。

其他参数可作为复制生长期的停止的是呼吸活力，RNA合成速度的下降等。

在多种抗生素发酵，如青霉素、杆菌肽、氯霉素、粘菌素（colistin），在丰富培养基中，典型的生长期—合成期的模式出现，但在生长缓慢的合成培养基中，两个时期则有重叠。控制抗生素生物合成开始可能是生长营养因素的匮缺，以致生长停

止。次生代谢产物生物合成通过某些机制即行开始。这将是本章讨论的重点。

在生长缓慢的合成培养基中，有的营养因素从一开始就限制了生长，就在缓慢生长的同时，抗生素开始合成了。

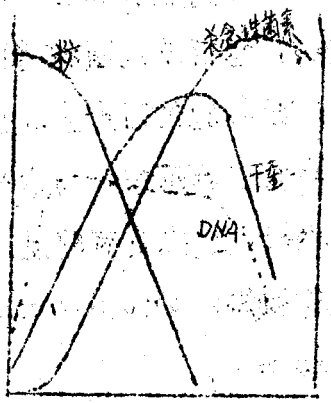


图1 S. griseus 的DNA合成，菌体干重与Candicidin合成的关系

从上面的讨论可以看出，我们不应从它出现的时期来决定一个产物是否次生代谢产物，因为在比较理想的分批发酵中，两个时期可以分开，但实际上常常重叠。应从一个代谢产物是否为对数生长所必需的来判断它是否属于次生代谢物。

（b）下面我们着重从生态学观点讨论为什么抗生素常常延迟到合成期的问题。

在营养条件丰富环境如哺乳动物肠道中养料充足，微生物无需产生抗生素去抑制或杀死其他微生物，但在其他自然环境下，如土壤与水中，养料有限，生存竞争激烈，抗生素的合成有利于产生菌的生存。而养料缺乏常常引起芽孢杆菌形成芽孢和放线菌形成分生孢子。在这些分化过程中，一些抗生素可能作为分化作用物（effectors）。如果抗生素的确作为分化作用物，它们的合成应限于分化时间，而已有实验证据，说明芽孢杆菌在芽孢形成的初期即有抗生素产生。

以上是从自然环境中，抗生素的形成有利于产生菌的生存。

另外，从产生菌生理要求，抗生素也应在生长接近完成时期合成，因为产生菌在生产阶段对所产生的抗生素还是敏感的。一般，这种敏感性限于生长时期，而在后期产生菌才变为抗性的。

表1　抗生素产生菌对抗生素的敏感性

抗生素	产生菌	产生菌敏感程度	
		生长期	后期
羟基链霉素	S.griseocarneus	5μg/ml	300μg/ml
放线菌素	S.antibioticus	4μg/ml 抑制生长50%	合成能力 120μg/ml
四环素	S.aureofaciens	400μg/ml 抑制生长	2000μg/ml 不抑制蛋白质合成
氯霉素	产生菌 S.sp.3022	生长受抑制	
新生霉素	S.niveus S.spheroides	生长受抑制	

（二）研究次生代谢途径的方法

所有微生物活细胞的初级代谢基本上是相同的，而且代谢调节是在高度平衡之下进行的。所以一个初级代谢中间体很少能积累。次生代谢物一般是一个种或一些株所特有的，而且常常可以大量积累于培养基或菌体中。应指出的是就是具有产生次生代谢物的种或株也很少能在初级代谢旺盛时期（trophophase）积累次生代谢产物，只有当生长减速下来（idiophase），各种代谢变化可以发生，转化初级代谢物为次生代谢产物，如抗生素。

用于研究初级代谢和次生代谢途径的方法是共同的，较特别一些的是应用突变株方面。

（A）标记化合物的应用

在次生代谢研究上，同位素标记化合物的应用占主要地位。作为抗生素分子组份的糖或氨基糖各有其特殊结构，但都来源于葡萄糖。所以一开始人们总是将全标记的D-葡萄糖（D-〔U-^{14}C〕-glucose）加入到生长中的产生菌培养中，再研究产生的抗生素中同位素的参入情况。在参入确定后，即可用不同部位标记的D-葡萄糖作为碳源，并将所产生的抗生素进行降解，再确定标记原子的部位。为了更好地决定生物合成机制，双标记前体（^{14}C，^{2}H，^{3}H或^{15}N）可以应用。如果前体中两种同位素放射性之比等于产生的代谢物中两种同位素放射性之比，则前体很可能未经降介而参入。如果比例有变化，则断裂或生化变化可能发生过。应用^{13}C标记前体大有优点，因为产物中^{13}C的部位可由比较同位素富集的产物与自然丰度产物的^{13}C-NMR谱而决定。

^{15}N-氨基酸进行示踪实验，远在30年代已经开始，但对氨基糖苷类物质并不适用。近年来，由于质谱，NMR等的进展，^{15}N参入的测定容易进行了，扩大了这个同位素的应用范围。

标记葡萄糖或氨基葡萄糖参入研究可以指出可能的中间体，但为了确定葡萄糖到抗生素之间的中间体顺序，应该进行多种可能中间体的参入比较。但实际上不可能大量地制备各种标记化合物，所以下列间接方法常常可以应用。

1）第一个方法同位素竞争法就是比较一个标记物质参入速率，同时加入或不加入未标记可能的中间体。如果，生物合成按下列途径进行，外源加入的中间体（Bex）比标记底物（*Aex）产生的内源中间体（Ben）更易参入，外源中间体将干扰标记底物的参入。这就证明B是一个中间体。应用这一方法，不需要标

记的中间体B。

$$Aex^{*} \rightarrow Ben \rightarrow Cen \rightarrow 抗生素^{*}$$
$$\uparrow$$
$$Bex$$

应用这一方法之例：D[^{14}C]-葡萄糖参入到链霉胺，链霉素的一个亚单位，因myo-肌醇的存在而降低，指明链霉胺是从葡萄糖经myo-肌醇而合成。

2）另一个方法是测定生物合成中，中间体的标记次序。当生物合成从标记Aex*开始，如上列模式所示，Ben比Cen先标记。所以，人们可以从比较不同时间取样各种中间体放射性，即可决定生物合成的顺序反应。

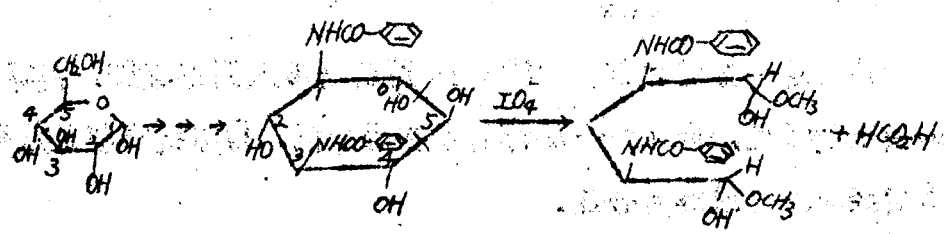
应指出的是，以上同位素技术在研究一个亚单位的生物合成途径，很有用，但对各亚单位的装配没有太多的用处。

应用前体的方法有其缺点，就是外源加入前体能否透入细胞壁和膜。就是能够透入细胞壁和膜，外源底物进入到抗生素合成酶系的活性中心仍应考虑。另外，标记前体可被细胞中其他酶所降介而稀释。所以，最好应用含有必要的酶系和辅助因子的细胞抽出液。如果可能的话，最好应用前体和纯化过的酶，补充已知的辅助因子。不过次生代谢的酶一般不易提取，因为这些酶常呈团聚体状态存在，易因拆离而钝化。再者，抗生素产生菌可能产生蛋白酶，将抗生素合成酶破坏。应用同位素成功之例也很多，下面介绍从G-6-P合成链霉胍的研究。

链霉胍是Scyllo-肌醇的二胍基衍生物来自葡萄糖。

1．葡萄糖和链霉胍分子碳的对应关系　S.griseus培养于不同位置标记的葡萄糖上，提取链霉胍，再经碱水解。链霉

胺苯甲酰化后经过碘酸氧化，所得降解产物上的^{14}C位置如下所示。



葡萄糖(1)　　(2)　　(3)　　(4)

葡萄糖^{14}C位置	降介后^{14}C位置
1. 1-^{14}C（链霉胍C-5）	甲酸
2. 2-^{14}C 3，4-^{14}C 6-^{14}C	(3)上

链霉胍C-5和C-3分别来源于葡萄糖C-1和C-3

D-[1-^{3}H]-葡萄糖 } ⟶ ⟶链霉胍 { C-5
D-[3-^{3}H]-葡萄糖 } ⟶ ⟶链霉胍 { C-3

D[6-^{14}C]-葡萄糖 ⟶ ⟶链霉胍C-6

显然，葡萄糖和链霉胍分子中碳原子对应关系如下：（见下页）

2．中间体的确定　myo-肌醇是链霉胍的前体，因myo-肌醇特别与糖氨酸同时补加，能促进链霉素合成，并降低[^{14}C]-葡萄糖中放射性的参入到链霉胍部分。

另外，myo-[u-^{14}C]-肌醇补加后，所有放射性同位素都进入到链霉胍部分。

以上结果明确myo-肌醇是葡萄糖转化为链霉胍过程中的一

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

葡萄糖	链霉胍
C-1	C-5
C-3	C-3
C-6	C-6
C-2	C-4
C-4	C-2
C-5	C-1

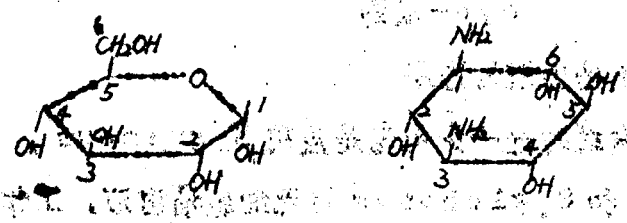
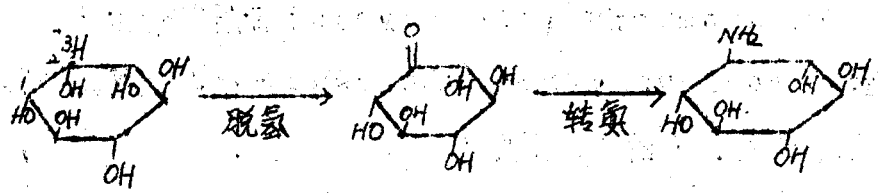


图 2 葡萄糖和链霉胍碳原子对应关系

个中间体。

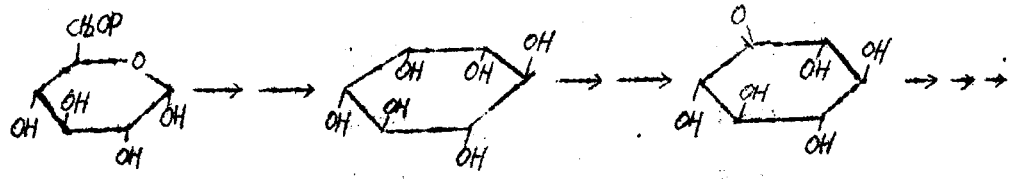
进一步的中间体是 Scyllo-inosamine。假如 myo-肌醇经下列反应，转变为 Scyllo-inosamine，



myo〔2-^{3}H〕-肌醇 inososе，肌醇 inosamine，肌醇胺 C-2 标记的氚，将在反应中损失，所形成的链霉胍不含有氚标记。为了证实这一中间体，将 myo-〔2-^{3}H〕-肌醇和 myo-〔2-^{14}C〕-肌醇混合物补加，进行参入试验，分析所得链霉素分子中的链霉胍的^{3}H／^{14}C 比值。在加入标记混合物中，^{3}H／^{14}C＝25.4／2.22，但在链霉胍中^{3}H／^{14}C＝1.3／0 氚参入的量微

乎其微，指明 Scyllo-inososе是链霉素合成中的一个中间体。

综上所述，链霉胍形成是通过下列顺序反应：



G-6-P　　myo-肌醇

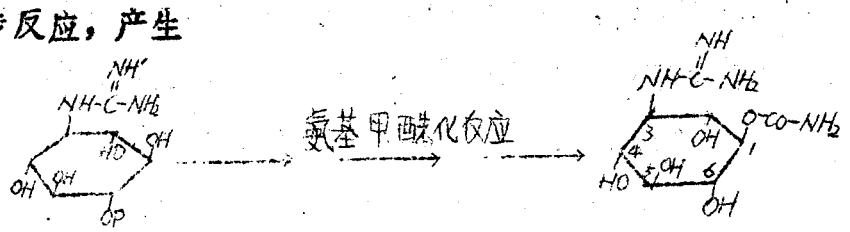
（B）无细胞抽出液的应用

链霉胍合成途经的进一步研究是应用 S. griseus，S. bikiniensis 和 S. glebosus 的无细胞抽出液，工作主要由 J. B. Walker 及其同事完成。有关综述见 Lloydia 34，363-371，1971；酶反应的方法见 Methods in Enzymology 43，429-470，1975。

链霉胍-6-P合成途径（图3）见下页。

Bluensomycin（glebomycin）青质霉素由 S. hygroscopicus forma glebosus 产生，是双氢链霉素的一胍相似物：（图4见下页）

在 Bluensomycin，bluensidine 代替了链霉胍。根据 Walker 的意见前者由 myo-肌醇，经 Scylbinosamine 合成，inosamine 经氧化，转氨和磷酸化，脱磷酸化和转脒几步反应，产生



12　N-amidino-Scyllo-inosamine-P　　bluensidine

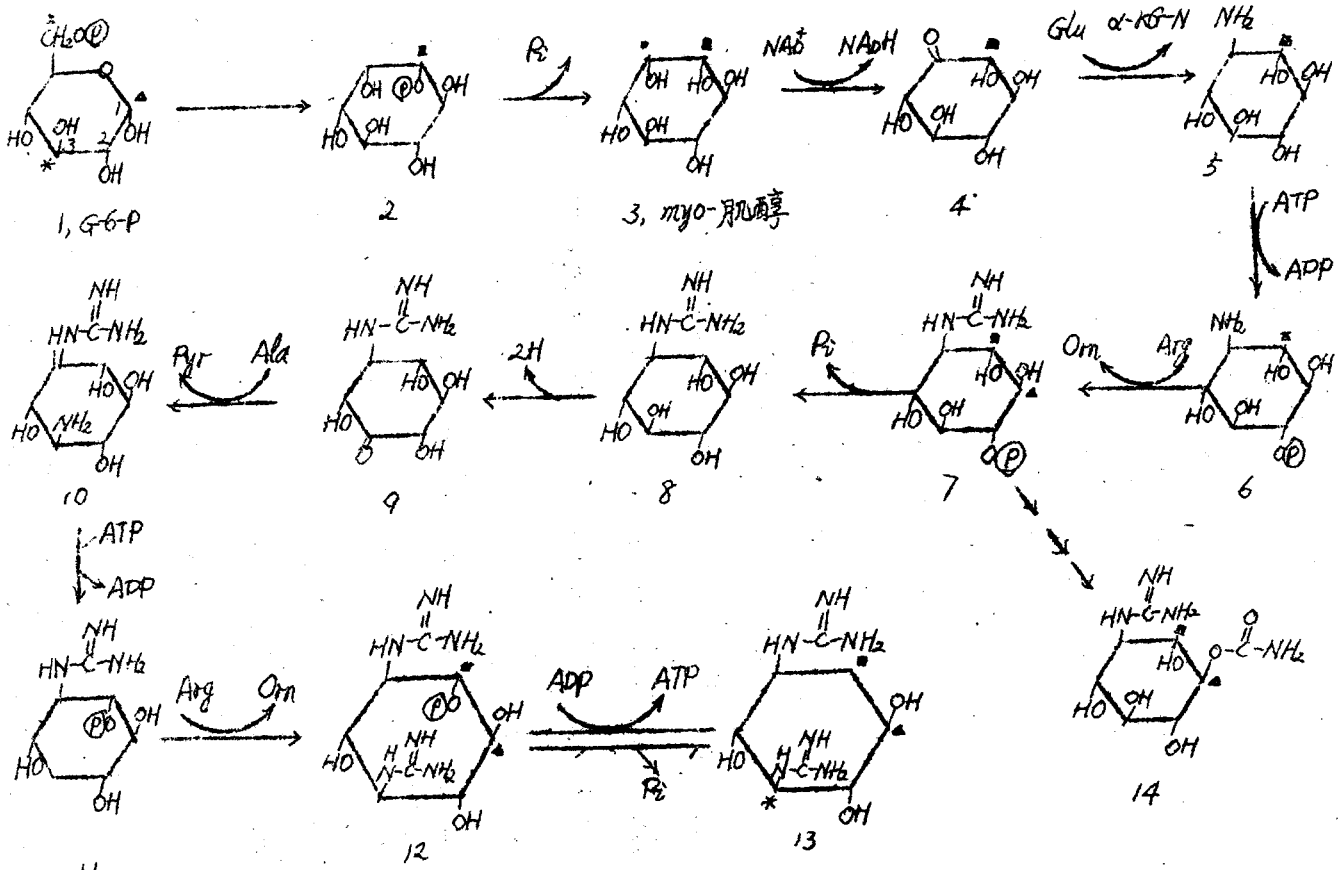


图 3　精氨酸-6-P 合成途径

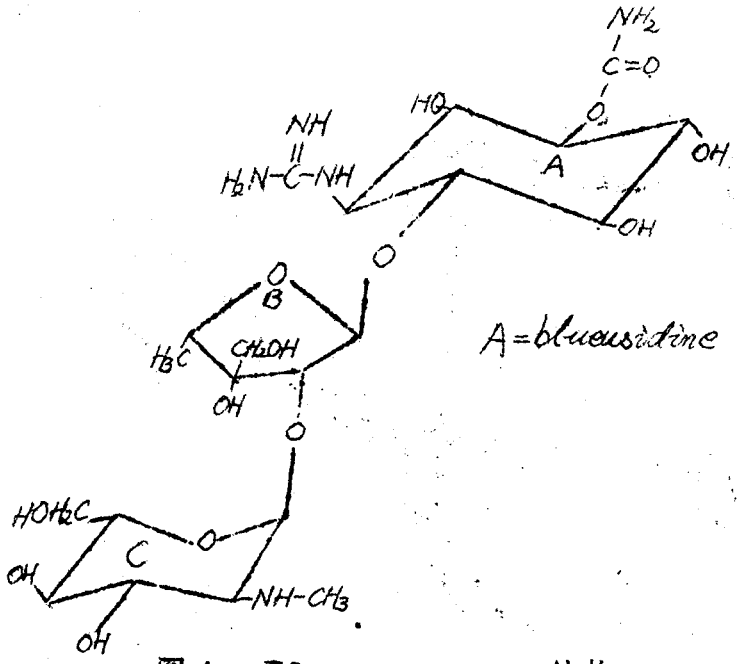


图 4　Bluensomycin 结构

氨基甲酰化反应在 Scyllo-肌醇和 bluensidine-6-P 之间发生，具体部位尚不明确。

（C）突变株的应用：在合成途径研究上，一般选用无活力突变株，或称阻断突变株。

微生物突变株可大致分为两个类型：

1．营养缺陷型突变株（auxotrophs）：在生长必需代谢物合成途径上因有阻断，必须由外源供应这一代谢物才能生长的突变株称为营养缺陷型。

2．特异营养突变株（idiotrophs，idio，peculier；troph，nutrition）一个突变株，必须有特殊营养料供应才能合成这个菌株特有的产物，称为特异营养突变株。这种突变株能在最低培养基上生长，但不能产生特异产物（次生代谢物），除非将这个次生代谢物的前体加以补充。

营养缺陷型远在50年代即广泛用来研究初级代谢物的合成途径。但特异营养突变株在次生代谢研究上应用并不多。这是因为在初级代谢，途径的阻断容易检查，不补充生长必需的代谢物菌株即不能生长。与此相反，次生代谢物合成能力的丧失不易检出。但可将筛选营养缺陷型突变株的方法加以修改，即可用来选出特异营养突变株。最早筛选这种突变株是氨基糖苷类抗生素的阻断变种（Shier等，1969）。他们从产生新霉素的菌种的突变株中找出特异营养突变株，只有当2-脱氧链霉胺存在时才能合成新霉素（DOS⁻突变株）。

控制初级代谢产物生物合成的基因编码在染色体DNA，但控制次生代谢不仅在染色体上，而且也在质粒上。质粒可比较容易地用吖啶，EB等消除，但应用这些消除剂所得突变株常常不适宜于选育特异营养突变株，因为消除整个质粒的突变常常在生物合成的几个步骤同时缺失。显然为了研究抗生素生物合成比较有用的是用DNA烷化剂或用[illegible]照射所得突变株。

共合成　当两个不能合成抗生素的突变株一同培养，原来的抗生素常可产生。这一现象称作“合作生物合成”（Cooperative biosynthesis）或“共合成”（cosynthesis），这是因为一个菌株分泌的中间体可被另一菌株转化为抗生素（Delic等，1969）。共合成可以在液体培养基或者在琼脂平板上进行。在液体培养基中进行共合成的报导有链霉素、庆大霉素、力复霉素等。应用液体培养基不能决定哪个菌株是分泌者哪个菌株是转化者。在平板上进行共合成实验，这种关系容易显示出来。

1. 力复霉素共合成-产生菌 Nocardia mediterranei

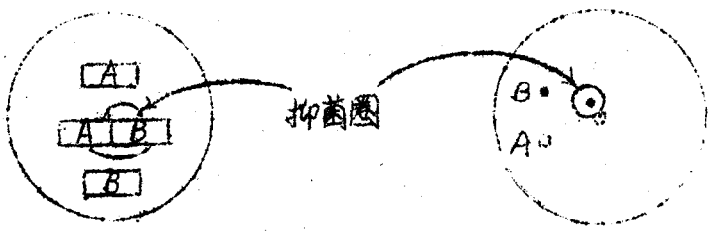


图5 共合成检测

A(A-32), B(NGB1)为无活力菌株

A：分泌者 B：转化者

2. Butirosin 共合成-产生菌 B. circulans，8株无活力菌株进行共合成，结果见下图。

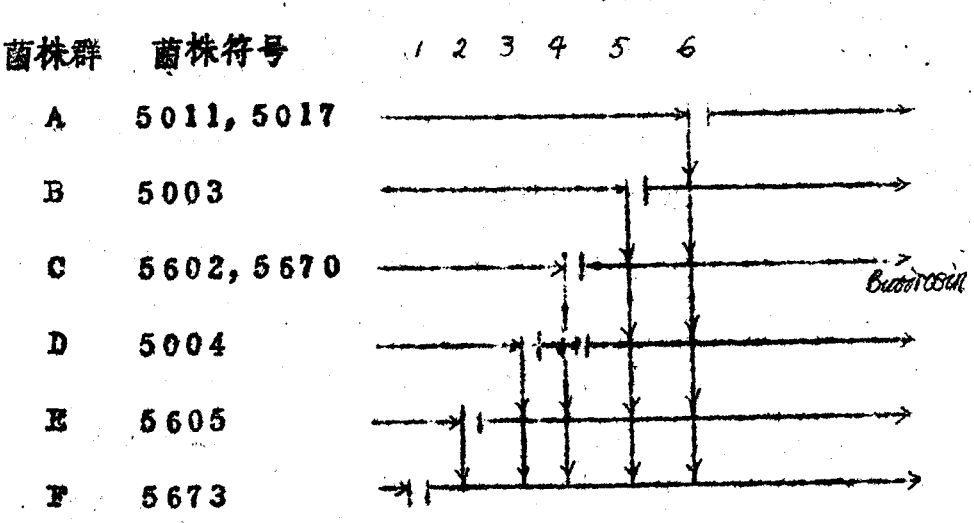


图6 Butirosin 共合成

阻断突变株可通过共合成及中间产物研究明确合成途径。这在Butirocin, platiwomycin和rifamycin等方面都取得进展。下面介绍在β-内酰胺抗生素生物合成方面的一个重要

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com