

白地霉的氧化代謝*

張樹政 楊廉婉

(中国科学院微生物研究所, 北京)

三羧酸循环在动物組織中的普遍存在是早已确定了的, 但在微生物中三羧酸循环的証实在开始时遇到了一些困难。微生物完整細胞多不能氧化外加的三羧酸循环的中間体。現在知道这主要是由于細胞透过障碍造成的。Kornberg^[1]在綜述中指出: 在很多种微生物特别是好氧的細菌中, 已經确定了三羧酸循环作为主要的末端呼吸途径, 关于霉菌的工作則相当少^[2-7], 关于白地霉的工作, 尙未見报导。最近 Kornberg 等^[8,9]又提出在微生物中还有乙醛酸循环作为三羧酸循环的补充。我們过去的工作^[10]指出白地霉中有 EMP¹⁾及磷酸戊糖循环途径, 本工作为前一工作的繼續, 指出在白地霉无細胞提取液中有三羧酸循环及乙醛酸循环的一系列的酶存在。

一、材料和方法

菌种及其培养: 菌种为本所保藏的白地霉 (*Geotrichum candidum* Link 2.361)。培养方法見以前报导^[11]。

靜息細胞悬液及无細胞提取液的制备 与过去所用方法^[11]相同, 如有不同, 另行說明。

酶活力測定法 三羧酸循环中間体及有关化合物的氧化以及有消耗 O_2 或放出 CO_2 的酶反应, 用普通瓦氏呼吸計进行。联系 NAD 或 NADP 的脫氫酶用 Hilger 分光光度計測定在 340 毫微米波长处光密度的变化, 各个酶的測定方法詳見后述。

試剂 乙醛酸按 Weinhouse 等^[12]的方法制备, 并制成 2,4-二硝基苯腈衍生物, 由乙醇水重結晶三次, 融点 $190^\circ C$ (文献 $190^\circ C$)。順烏头酸酐由反烏头酸与乙酸酐反应制备^[13], 融点 $78-79^\circ C$ (文献 $76-77^\circ C$), 用时溶于水轉化为順烏头酸, 并以 NaOH 中和。NAD、NADP、CoA 为中国科学院生化所东风生化試剂厂出品, 其他試剂均系商品。

分析方法 蛋白質用双縮脲法測定^[14], 檸檬酸用仓富等^[15]的方法測定, 乙醛酸用 Friedemann 和 Haugen 的方法測定, 为了避免其他酮酸的干扰, 按 Olson^[16]利用乙醛酸所呈的顏色对热不稳定的性質, 以热处理前后光密度之差代表乙醛酸。用乙醛酸 2,4-二硝基苯腈作标准曲綫。苹果酸用螢光法測定^[17]。

二、結 果

(一) 完整靜息細胞对三羧酸循环中間体的氧化

完整靜息細胞对各种有机酸及乙醇的氧化情况見表 1。由实验 I 看出, 乙醇氧化速

* 任永娥同志参加部分技术工作, 林应銳同志合成順烏头酸酐, 在試驗进行中得到方一澄、王惠蓮等同志的帮助, 特此一并致謝。

1) 本文采用以下簡写: EMP = Embden-Meyerhof-Parnas 糖酵解途径。NAD = 輔酶 I。NADH₂ = 还原輔酶 I。NADP = 輔酶 II。CoA = 輔酶 A。ATP = 腺三磷。EDTA = 乙二胺四乙酸。A = 光密度。

本文 1963 年 8 月 15 日收到。

表 1 白地霉对三羧酸循环有关的各种有机物的氧化

实验号	底 物	Q_{O_2}
I	乙醇	59.3
	丙酮酸钠	34.9
	乙酸钠	30.0
	草酰乙酸钠	24.3
	琥珀酸钠	7.7
	乳酸钠	5.9
	延胡索酸钠	4.5
	α -酮戊二酸钠	4.2
	苹果酸钠	3.5
II	檸檬酸钠	4.7
	順烏头酸钠	4.9
	异檸檬酸钠	5.1

* Q_{O_2} = 微升 O_2 /毫克干重/小时, 內呼吸已扣除。反应系统: 靜息細胞悬液 1 毫升相当細胞干重 8.2 毫克, 底物 25 微克分子, pH7.5 M/15 磷酸緩冲液加至 2.5 毫升。中央小室加 20% KOH 0.2 毫升。实验 II 基本上与实验 I 同, 只是用飢餓过的細胞, 細胞干重为 13.7 毫克, pH6.0 M/15 磷酸緩冲液加至 2.5 毫升。30°C, 振速 100 次/分。

度最快, 其次是丙酮酸、乙酸和草酰乙酸, 氧化比較慢的是琥珀酸、乳酸、延胡索酸、 α -酮戊二酸和苹果酸。在实验 I 条件下因內呼吸較高, 看不出三羧酸的氧化, 故又将細胞在搖床上振蕩, 使內呼吸降低, 同时还降低了氧化时緩冲液的 pH 值 (6.0), 为了使有机酸較易透过細胞, 在这种条件下即可看到檸檬酸、异檸檬酸及順烏头酸的氧化 (表 1、实验 II)。

(二) 无細胞提取液中三羧酸循环酶活力的測定

1. 縮合酶: 按 Stern 和 Ochoa^[18] 的方法測定, 在有 ATP、CoA 和 Mg^{++} 存在时, 将乙酸盐和草酰乙酸盐与无細胞提取液共同保温, 经过一定時間后取样、加三氯乙酸終止反应, 离心除去蛋白質沉淀, 分析上清液中柠檬酸含量, 結果见图 1。在完全系統形成相当多量的柠檬酸; 缺少 Mg^{++} 、ATP 及 CoA 时, 柠檬酸量即大为降低, 說明乙酸需先轉变为乙酰, CoA 才能与草酰乙酸进行縮合反应, 也說明无細胞提取液中有乙酸激活酶存在。

2. 异檸檬酸脫氫酶: 按 Ochoa^[19] 方法測定, 以 DL- 异檸檬酸为底物, 在有 Mg^{++} 及 Mn^{++} 存在下, 与 NADP 及无細胞提取液共同保温, 測定 NADP 的还原, 結果见图 2。NADP 的还原速度很快, 可知无細胞提取液中有活跃的异檸檬酸脫氫酶存在, 不加底物时无作用, 以 NAD 代替 NADP 时无作用。

3. 順烏头酸酶: 无細胞提取液中如有順烏头酸酶存在, 則可将檸檬酸或順烏头酸轉变为异檸檬酸, 后者可作为异檸檬酸脫氫酶的底物。因此即按上节方法, 只是以檸檬酸或順烏头酸代替异檸檬酸进行測定, 結果见图 3。NADP 的还原說明有順烏头酸酶存在。

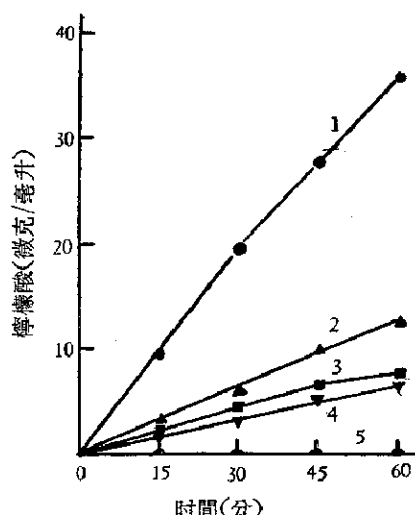


图 1 縮合酶的活力

反应系统: 草酰乙酸钠 250 微克分子, 乙酸钠 250 微克分子, CoA 2 微克分子, ATP 1.5 微克分子, $MgCl_2$ 2.5 微克分子, L-半胱氨酸 50 微克分子, 0.4 M $NaHCO_3$ 1 毫升, M/15 磷酸緩冲液 pH 7.4 0.5 毫升, 无細胞提取液含蛋白質 40 毫克。37°C 保温 60 分钟, 每隔 15 分钟取 2 毫升, 样品加 20% 三氯乙酸 1 毫升終止反应。然后离心, 取上清液进行檸檬酸钠的定量分析。

曲线 1. 完全系統;
2. 无 $MgCl_2$;
3. 无 ATP;
4. 无 CoA;
5. 无底物。

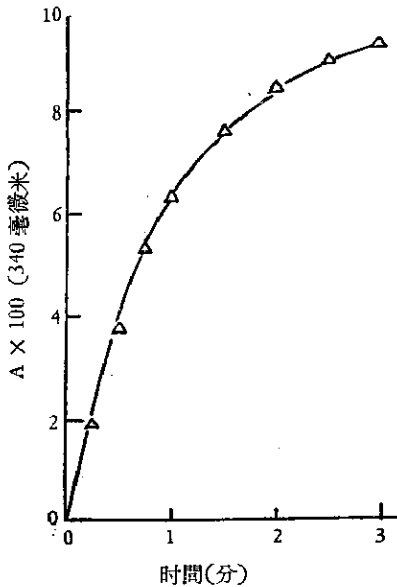


图2 异柠檬酸脱氢酶

反应系统: *DL*-异柠檬酸钠 2 微克分子, NADP 0.3 微克分子, $MnCl_2$ 1.5 微克分子, $MgCl_2$ 10 微克分子, 0.1M Tris 缓冲液 pH 7.4 0.5 毫升, 无细胞提取液蛋白 1.2 毫克。总体积为 2.82 毫升。最后加底物开始反应。

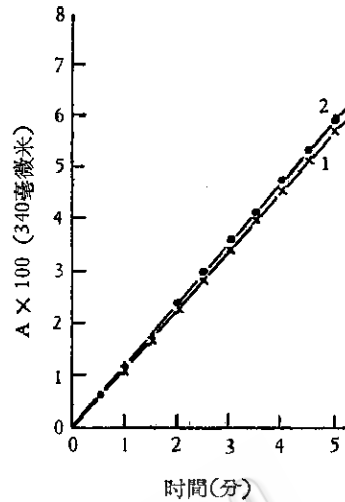
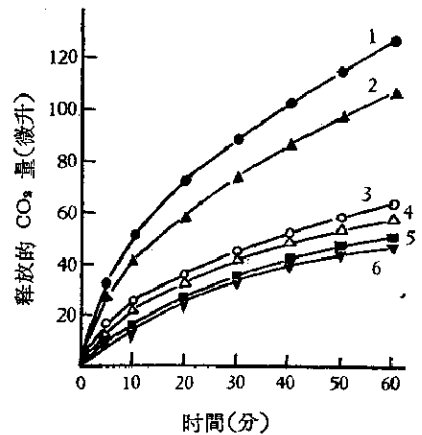


图3 顺乌头酸酶及异柠檬酸脱氢酶活力

反应系统同图2, 只是以顺乌头酸及柠檬酸代替异柠檬酸
曲线 1. 柠檬酸钠;
2. 顺乌头酸钠。

4. α -酮戊二酸脱氢酶: 按 Kaufman 等^[20]的方法测定, 先用分光光度计法测定, 但加入 NAD 后光密度不但不上升反而稍微有点下降, Kaufman 等认为粗提取液中有 $NADH_2$ 氧化酶, 不能用分光光度法测定, 我们测出粗酶液中确实有 $NADH_2$ 氧化酶。 $NADH_2$ 的氧化速度为 1.56 微克分子/毫克蛋白·小时。因此我们又改用 Kaufman 等^[20]测定粗提取液中该酶活力的方法, 即利用 α -酮戊二酸的歧化反应, 在有 NH_4^+ 存在下, α -酮戊二酸 1 分子氧化脱羧生成琥珀酸, 另 1 分子则还原氨化生成 *L*-谷氨酸, 在有过量 *L*-谷氨酸脱氢酶存在下, 测定 CO_2 的放出, 我们没有另外加入 *L*-谷氨酸脱氢酶, 但也能测出有 CO_2 放出(图4), 可知无细胞提取液中除有 α -酮戊二酸脱氢酶外, 尚有 *L*-谷氨酸脱氢酶存在, α -酮戊二酸脱氢酶需 NAD 不能以 NADP 代替, CoA 及半胱氨酸也是必要的。 CO_2 释放速度为 0.23 微克分子/毫克蛋白·小时。远远低于 $NADH_2$ 的氧化速度, 因此用分光光度法测不出酶活力。

5. 琥珀酸脱氢酶: 琥珀酸脱氢酶用两种方法测

图4 α -酮戊二酸脱氢酶的活力

反应系统: α -酮戊二酸钠 50 微克分子, NH_4Cl 50 微克分子, *L*-半胱氨酸 10 微克分子, CoA 0.3 微克分子, pH 5.0 磷酸缓冲液 80 微克分子, 无细胞提取液含蛋白质 15.5 毫克, NAD (或 NADP) 0.3 微克分子, 总体积 2 毫升, 30°C, 转速 100 次/分。

曲线 1. 完全系统; 4. 无半胱氨酸;
2. 无 CoA; 5. 加 NADP, -NAD;
3. 无 NAD; 6. 无底物。

定,一种方法为以甲烯蓝为受氢体,在有 KCN 存在下,测定氧的消耗量^[21]。在此试验中无细胞提取液的制备稍有不同,系根据 Linnane^[22] 等采用蔗糖-EDTA-磷酸缓冲液,以保护腺粒体不受破坏;另外又试验了丙二酸钠的抑制作用,结果见图 5。可以看出丙二酸钠对琥珀酸脱氢酶有抑制作用,另一方法以高铁氰化钾为受氢体^[23]。用光电比色计在420毫微米波长观察光密度的变化,结果见图 6,也能测出琥珀酸脱氢酶活力。又此试验中所用无细胞提取液是用磷酸缓冲液提取的,未加蔗糖和 EDTA,看来,提取白地霉的琥珀酸脱氢酶,不一定要蔗糖和 EDTA 保护腺粒体。

6. 延胡索酸酶: 按 Massey^[24] 方法测波长 300 毫微米处光密度的降低,也就是延胡索酸的减少,结果见图 7。在 3 分钟内光密度降低 0.06, 相当减少延胡索酸 10 微克分子,表明有延胡索酸酶存在。

7. 苹果酸脱氢酶: 参考 Ochoa^[25] 的方法,但改为以 DL-苹果酸为底物,测定 NAD 的还

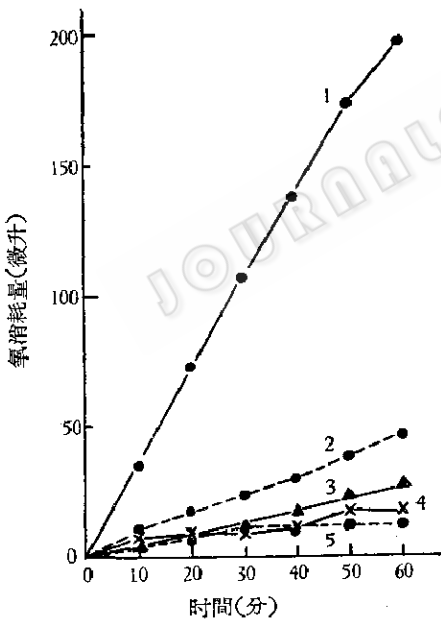


图 5 琥珀酸脱氢酶活力

反应系统: 蔗糖-EDTA-磷酸缓冲液提取的无细胞提取液 1.3 毫升含蛋白质 25.3 毫克,琥珀酸钠 40 微克分子, KCN (中和) 30 微克分子,甲烯蓝 1 微克分子, 0.5M 蔗糖-0.005M EDTA-0.1M 磷酸钾缓冲液 0.3 毫升,总体积 3 毫升。反应温度 30°C。振速 100 次/分。

- 曲线 1. 琥珀酸钠 40 微克分子;
2. 同上+丙二酸钠 10 微克分子;
3. 同上+丙二酸钠 20 微克分子;
4. 丙二酸钠 10 微克分子;
5. 无底物。

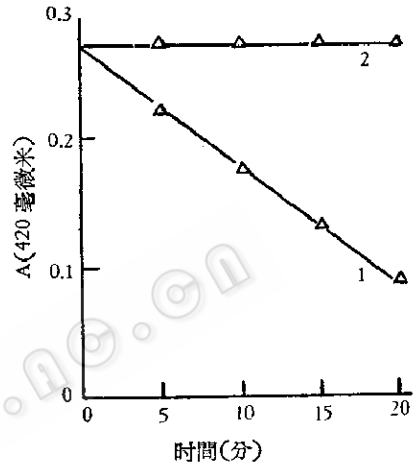


图 6 琥珀酸脱氢酶

反应系统: 琥珀酸钠 100 微克分子, KCN (pH 7.0) 60 微克分子, 高铁氰化钾 6 微克分子, 0.1M pH 7.5 磷酸缓冲液 3.2 毫升,无细胞提取液蛋白 5.04 毫克,总体积 6 毫升。37°C。

曲线 1. 完全系统; 2. 无琥珀酸钠。

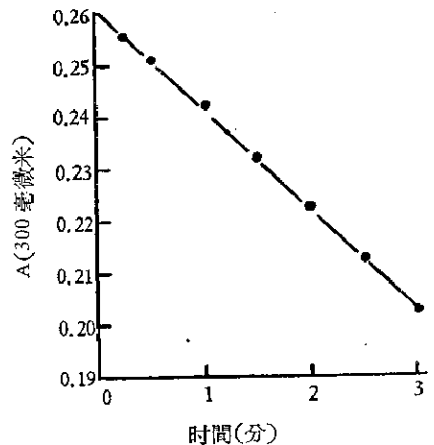


图 7 延胡索酸酶活力

反应系统: 延胡索酸钠 30 微克分子, M/15 磷酸缓冲液 (pH7.4) 2 毫升,无细胞提取液含蛋白质 1.07 毫克。总体积 3.0 毫升。

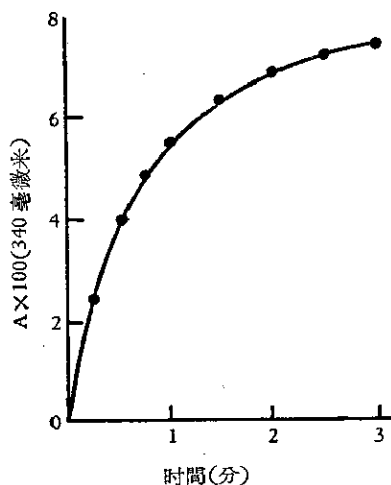


图8 苹果酸脱氢酶

反应系统: pH 8.5 0.1M Tris 缓冲液 0.3 毫升, DL-苹果酸钠 30 微克分子, KCN (中和) 30 微克分子, $MnCl_2$ 1.5 微克分子, NAD 0.75 微克分子, 无细胞提取液蛋白 0.13 毫克, 总体积 2.9 毫升。

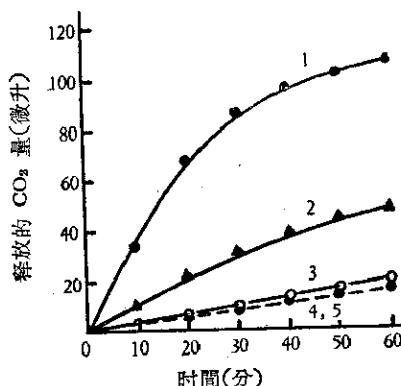


图9 苹果酸酶的活力

反应系统: DL-苹果酸钠 100 微克分子, $MnCl_2$ 2.5 微克分子, NADP (或 NAD) 0.3 微克分子, pH 5.0 磷酸缓冲液 80 微克分子, 无细胞提取液含蛋白 7.6 毫克, 总体积 2 毫升。30℃, 振速 100 次/分。

曲线 1. 完全系统;
2. - $MnCl_2$;
3. -NADP;
4. +NAD, -NADP;
5. -底物。

原, 结果见图 8。有苹果酸脱氢酶活力, 内作用很低, 可忽略。又如以 NADP 代替 NAD 时无反应, 在反应系统中加有 KCN, 可以抑制 $NADH_2$ 的氧化, 可见光密度的升高是由 NAD 被还原而引起的。

8. 苹果酸酶: 苹果酸酶在有 Mn^{++} 及 NADP 存在下, 催化苹果酸氧化脱羧生成丙酮酸并放出 CO_2 , 用瓦氏呼吸计来测定 CO_2 的释放。结果见图 9。系统中除去 Mn^{++} 时, 苹果酸酶活力大大降低, 以 NAD 代替 NADP 则测不出活力。

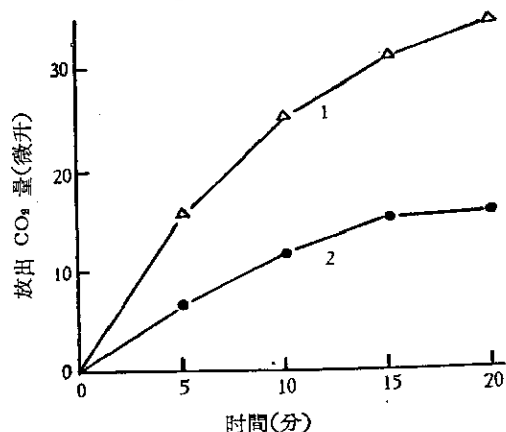


图10 草酰乙酸羧化酶

反应系统: 在瓦氏呼吸计小瓶中含下列反应物(微克分子数): 乙酸缓冲液 pH 4.6 100; $MnCl_2$ 1; NADP 0.03; 草酰乙酸钠 50; 无细胞提取液蛋白 7 毫克。总体积 2.5 毫升。25℃。曲线 1. 完全系统; 2. 无酶液。

9. 草酰乙酸羧化酶: 按 Ochoa^[26] 方法用瓦氏呼吸计测定由草酰乙酸释放的 CO_2 , 结果见图 10。可知有草酰乙酸羧化酶活力, 无酶液时草酰乙酸有较弱的自然脱羧作用。

(三) 乙醛酸循环酶活力的测定

1. 异柠檬酸酶: 按 Olson^[14] 的方法进行测定, 异柠檬酸酶催化异柠檬酸分解为琥珀酸及乙醛酸, 在有氨基脲存在下(可固定乙醛酸), DL-异柠檬酸与酶液共同保温, 经过一定时间取样, 加三氯乙酸沉淀蛋白, 然后分析上清液中的乙醛酸含量。结果见图 11。可知有异柠檬酸酶存在。

2. 异柠檬酸酶反应产物的光谱鉴定: 将异柠檬酸酶反应产物与已知的丙酮酸, α -酮戊二酸及乙醛酸均作成 2,4-二硝基苯腙, 比

較其光譜,由图 12 可以看出反应产物与标准乙醛酸相似,最高吸收峯在 450 毫微米,但曲綫形状不完全一致,可能是因反应产物不够純所造成的,但这并不妨碍乙醛酸的定量測定,因为乙醛酸是利用热处理顏色消失的性質来定量的。

3. 苹果酸合成酶: 按 Kornberg 等^[9] 的方法測定,在有 CoA、ATP 及 Mg^{++} 存在下,将酶液与乙醛酸及乙酸共同保温,經一定時間后測定形成的苹果酸,結果见图 13。完全系統有苹果酸生成,可知苹果酸合成酶存在。

三、討 論

以上結果为用葡萄糖培养的菌体进行的,我們同时用木糖培养的菌体也进行了測定,也同样能測出各酶活力。

完整靜息細胞虽然能氧化各种三羧酸循环的中间体,但氧化的速度比起乙醇、乙酸及丙酮酸来則甚低,可能是由于透过障碍造成的,我們曾試用干冰或液体空气处理菌体以改变細胞的透过性。但結果未

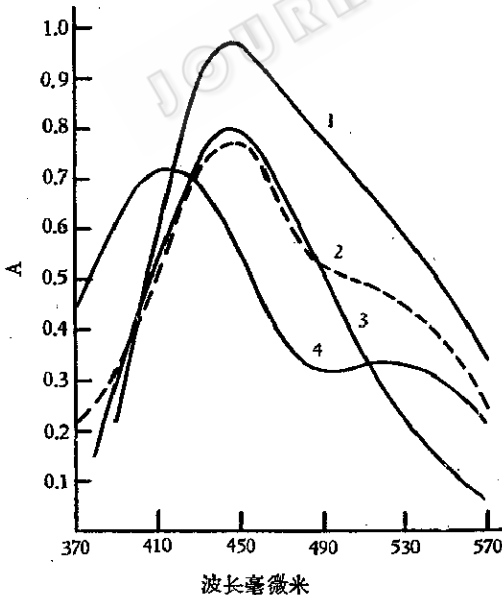


图 12 异檸檬酸酶催化 DL-异檸檬酸反应产物的吸收光譜。反应系統同图 11。

曲綫 1. 反应产物; 2. 丙酮酸; 3. 乙醛酸; 4. α -酮戊二酸。以上均为 2,4-二硝基苯胺衍生物。

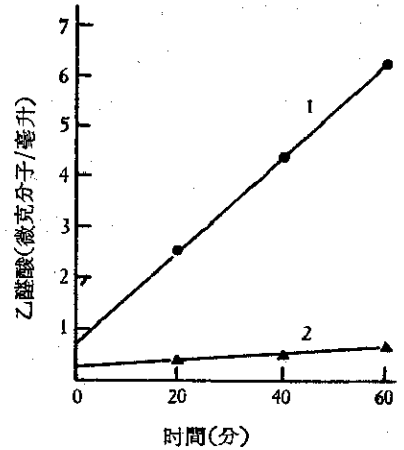


图 11 异檸檬酸酶活力

反应系統: DL-异檸檬酸鈉 60 微克分子, 氨基脲 50 微克分子, 无細胞提取液含蛋白为 36.3 毫克。总体积 7.5 毫升, 反应不同時間取 1.5 毫升, 加 20% 三氯乙酸 1.5 毫升, 离心, 取上清液 2 毫升測定乙醛酸。

曲綫 1. 完全系統;

2. 无 DL-异檸檬酸鈉。

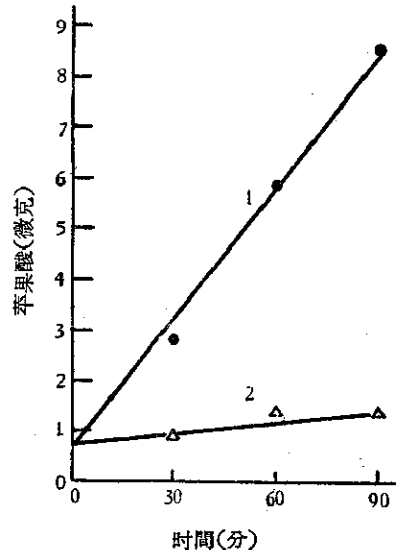


图 13 苹果酸合成酶活力

反应系統: pH 7.6 0.5M 磷酸鉀緩冲液 2.4 毫升, $MgCl_2$ 40 微克分子, 谷胱甘肽 20 微克分子, CoA 0.64 微克分子, ATP 80 微克分子, 乙醛酸鈉 50 微克分子, 乙酸钠 120 微克分子, 无細胞提取液蛋白 18 毫克, 总体积 8 毫升。30℃。定时取样 2 毫升加等体积 20% 三氯乙酸, 离心, 取上清液 1 毫升測定苹果酸含量。

曲綫 1. 完全系統; 2. 无底物。

能提高对三羧酸的氧化速度。现在已经知道,底物的透过细胞是通过特殊的所谓“透过酶”(permeases)来控制的,并且“透过酶”有适应酶的特性^[27]。在三羧酸上培养的细胞则能氧化该三羧酸,据此,我们也曾用柠檬酸培养的白地霉作呼吸试验,但亦未能提高对三羧酸的氧化速度。

白地霉无细胞提取液中测出了三羧酸循环的一系列的酶活力及乙醛酸循环的两个关键的酶活力,可知三羧酸循环与乙醛酸循环均为白地霉的末端呼吸途径。

四、摘 要

1. 白地霉完整静息细胞氧化乙醇、乙酸、丙酮酸及草酰乙酸的速度很高,对其他三羧酸循环各酸如:琥珀酸、延胡索酸、 α -酮戊二酸、苹果酸、柠檬酸、顺乌头酸及异柠檬酸也能氧化,但速度甚低。

2. 在白地霉无细胞提取液中测出了三羧酸循环中以下各种酶活力:柠檬酸缩合酶、异柠檬酸脱氢酶、顺乌头酸酶、 α -酮戊二酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、延胡索酸酶、苹果酸脱氢酶、苹果酸酶、草酰乙酸羧化酶等,并间接得知有乙酸激活酶及L-谷氨酸脱氢酶存在。

3. 在白地霉无细胞提取液中测出了乙醛酸循环的两个关键的酶即异柠檬酸酶及苹果酸合成酶。

4. 由以上结果可知白地霉可利用三羧酸循环及乙醛酸循环作为末端呼吸途径。

参 考 文 献

- [1] Kornberg, H. L.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **13**:49, 1959.
- [2] Ramakrishnan, C. V.: *Enzymologia*, **17**:169, 1954.
- [3] Strauss, B. S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **55**:77, 1955.
- [4] Goldschmidt, E. P., Yall, I., & Koffler, H.: *J. Bacteriol.*, **72**:436, 1956.
- [5] Bonner, B. A. & Machlis, L.: *Plant Physiol.*, **32**:291, 1957.
- [6] Moses, V.: *J. Gen. Microbiol.*, **13**:235, 1955.
- [7] Mickelson, M. N. & Schuler, M. N.: *J. Bacteriol.*, **65**:297, 1953.
- [8] Kornberg, H. L., & Krebs, H. A.: *Nature*, **179**:988, 1957.
- [9] Kornberg, H. L., & Madsen, N. B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **24**:651, 1957.
- [10] 张树政、方一澄、杨廉婉:白地霉的戊糖代谢, 2. 木糖和葡萄糖培养菌球糖代谢的比较。(待发表)
- [11] 张树政、黎青翔、王惠莲:生物化学与生物物理学报, **2**:238, 1962.
- [12] Lewis, K. F., & Weinhouse, S.: *Methods in Enzymology*, Vol. **3**, p. 269. S. P. Colowick & N. O. Kaplan (Eds). Academic Press 1957.
- [13] Deutsch, D. H. & Phillips, R. E.: *ibid.*, p. 424.
- [14] Lein, R. & Braver, R. W.: *J. Lab. clin.* **38**:474, 1951.
- [15] 仓富一兴、细谷宪政:生化学, **27**:72, 1955.
- [16] Olson, J. A.: *J. Biol. Chem.* **234**:5, 1959.
- [17] Hummel, J. P.: *ibid.*, **180**:1225, 1949.
- [18] Stern, J. R. & Ochoa, S.: *ibid.*, **179**:491, 1949.
- [19] Ochoa, S.: *ibid.*, **174**:133, 1948.
- [20] Kaufmann, S., Gilvarg, C., Cori, O. and Ochoa, S.: *ibid.*, **203**:869, 1953.
- [21] Slater, E. C.: *Biochem. J.*, **45**:1, 1949.
- [22] Linnane, A. W. & Still, J. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* **59**:383, 1955.
- [23] Slater, E. C. & Bonner, W. D.: *Biochem. J.*, **52**:185, 1952.
- [24] Massey, V. I.: *ibid.*, **51**:490, 1952.
- [25] Ochoa, S.: *Methods in Enzymology*, Vol. **1**. p. 735.
- [26] Ochoa, S.: *ibid.*, p. 739.
- [27] Cohen, G. N., & Monod, J.: *Bacteriol. Revs.*, **21**:169, 1957.

OXIDATIVE METABOLISM IN *GEOTRICHUM CANDIDUM*

CHANG SHU-CHENG AND YANG LIEN-WAN

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

(1) Intact resting cells of *Geotrichum candidum* readily oxidized ethanol, acetate, pyruvate and oxalacetate, but other intermediates of the TCA cycle, such as succinate, fumarate, α -ketoglutarate, malate, citrate, cis-aconitate and isocitrate were slowly oxidized.

(2) The following enzymes or enzyme systems of the TCA cycle were detected in cell-free extract of *Geotrichum candidum*: condensing enzyme, isocitric dehydrogenase, α -ketoglutaric dehydrogenase, succinic dehydrogenase, fumarase, malic dehydrogenase, "malic" enzyme, oxalacetic carboxylase, and the existence of the acetate activating enzyme and L-glutaric dehydrogenase was also indicated.

(3) The two key enzymes of glyoxalate cycle, isocitratase and malate synthetase were also detected in cell-free extract of this mold.

(4) From the above results, it was obvious that *Geotrichum candidum* could use the TCA cycle and the glyoxalate cycle as the pathways of terminal respiration.