

# 白地霉的内呼吸——甘露醇为主要的内呼吸底物

張樹政 楊廉婉 关世斌\*

(中国科学院微生物研究所, 北京)

我們曾发现白地霉菌体中含有大量的甘露醇, 并进行了甘露醇形成机制的研究<sup>[1]</sup>。至于甘露醇的生理功能問題, 我們初步判断是作为貯存的营养物。为了进一步闡明此观点, 我們进行了白地霉內呼吸作用的研究。指出甘露醇为主要的內呼吸底物, 这一点在文献中尚未見有报导。

## 材料与方法

**菌种** 所研究的菌种为本所保藏的白地霉(*Geotrichum candidum*) A. S. 2.361。

**培养方法及静息細胞悬浮液的制备:**

培养基成分及培养方法同以前报导<sup>[2]</sup>, 但所用接种物为培养12小时后在冰箱保存一星期者。因为由这样的接种物所获得的菌体含甘露醇較高。培养时间为12小时。培养好的菌体抽滤, 并用生理盐水或蒸馏水洗3—5次, 悬浮于  $M/15KH_2PO_4$  溶液中, 直接供作实验(未飢餓菌体)或在搖床上振蕩5小时使之飢餓(飢餓菌体)。此外, 又用了其他培养基进行比较, 詳見后述。

## 分析方法

氧消耗及二氧化碳的释放用普通 Warburg 呼吸計进行測定。菌体内的甘露醇用80%热乙醇提取后用 Lambert 及 Neish<sup>[3]</sup> 的方法, 即用过碘酸氧化后加变色酸比色測定。过碘酸氧化时间严格限定为5分钟, 在此情况下还原糖的干扰很小。总氮用微量凱氏定氮法<sup>[4]</sup>測定。总氮乘以6.25作为蛋白质含量。游离氨基酸用正丁醇提取<sup>[5]</sup>, 用茚三酮比色測定<sup>[6]</sup>, 用白氨酸作标准。脂肪用 Soxhlet 抽提法<sup>[7]</sup>測定。还原糖用 Nelson 比色法<sup>[8]</sup>測定, 使用改良的 Somogyi 試剂<sup>[9]</sup>, 以葡萄糖作标准。多糖的測定先将菌体用25%盐酸水解2.5小时, 再測定还原糖, 乘以0.9作为多糖含量。用 Conway 氏法<sup>[10]</sup>測定游离氮。

## 紙上层析

菌体内游离氨基酸用正丁醇提取<sup>[5]</sup>。

菌体蛋白质的水解, 用正丁醇提取氨基酸后的殘渣, 加6N盐酸10毫升, 在封管中110℃水解24小时后过滤, 滤液在水浴上蒸发除去盐酸, 加少量水作为层析样品。

氨基酸的測定用新华1号滤紙作双向层析。溶剂系統<sup>[11]</sup>为: (1)正丁醇:88%甲酸:水=15:3:2(v/v); (2)正丁醇:12%氨水=13:3(v/v)。显色剂为0.5%茚三酮的无水丙酮溶液<sup>[12]</sup>, 或吲哚醌試剂<sup>[13]</sup>。

\* 中国科学院林业土壤研究所生物分所进修同志。

本文1964年8月2日收到。

还原糖及甘露醇的纸上层析,用水饱和酚加 0.04% 8-羟基喹啉为溶剂。用  $\text{AgNO}_3$  丙酮溶液及  $\text{NaOH}$  乙醇溶液显色<sup>[14]</sup>。

## 结 果

### 1. 不同培养时间菌体的甘露醇含量与内呼吸强度的关系。

由过去的实验<sup>[1]</sup>知道,甘露醇的含量随培养时间而变化。为了查明甘露醇含量与内呼吸强度的关系,采用了不同培养时间的菌体及相应经过饥饿的菌体,分别测定甘露醇含量及内呼吸强度。以  $Q_{O_2}$  对甘露醇含量作图(图 1) 可以看出,二者成直线关系,但饥饿前后的两线不重合。在同样的甘露醇浓度时,饥饿后菌体的  $Q_{O_2}$  值较大。可能是当甘露醇含量降低之后,有另外的物质作为内呼吸底物。

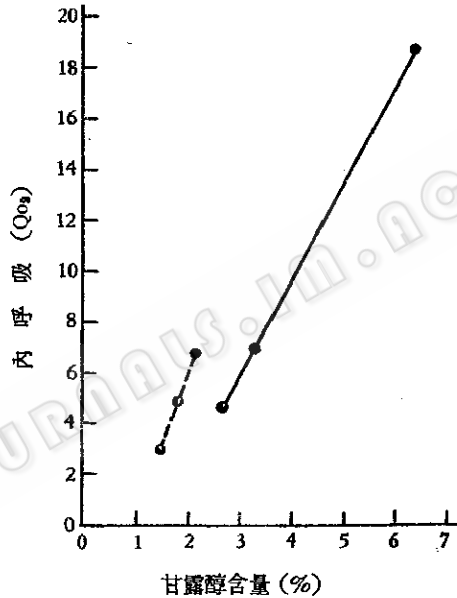


图 1 内呼吸强度与甘露醇含量的关系。

●——● 饥饿; ●——● 未饥饿。

2. 饥饿前后菌丝体中其他主要物质的变化,为了查明菌丝体中其他主要物质,如多糖、脂肪、氨基酸、蛋白质等,是否在呼吸过程中有所消耗,我们测定了菌丝体饥饿前后各种成分的含量,结果见表 1。可以看出,在饥饿前后甘露醇含量的变化最大,多糖也有变化。可能它就是仅次于甘露醇的内呼吸底物。其他成分则差别很小。纸层析法分析饥饿前后游离氨基酸及蛋白质氨基酸,亦未看出有何差异。它们不象是主要的内呼吸底物。

表 1 饥饿前后白地霉菌体各种成分分析\*(%干重)

	总 氮	游离氨基酸 (按亮氨酸计算)	粗 脂 肪	还 原 糖	多 糖	甘 露 醇
饥饿前	7.20	0.67	10.39	0.67	32.5	6.67
饥饿后	7.28	0.56	9.88	0.53	30.3	3.08
差	- .08	0.11	0.51	0.14	2.2	3.55

\* 表中数字为 4—6 批样品分析结果的平均值。

3. 飢餓过程中悬液成分的分析：

飢餓过程中甘露醇显著减少，它可能是作为内呼吸底物被消耗掉，但也有可能由菌体透出到悬液中。经过分析证明，悬浮液中并无甘露醇存在。可知甘露醇确实是被消耗掉。

又据文献报导，很多种微生物于内呼吸过程中形成游离氨，指出是氨基酸作为内呼吸底物被氧化的结果<sup>[15]</sup>，我们也测定了飢餓过程中悬浮液中的游离氨，结果未能查出其存在。可知氨基酸并未作为内呼吸底物。

4. 内呼吸的呼吸商(RQ)值。

呼吸商通常可以用来推测被氧化物的性质。因此我们测定了不同培养时间的菌体及相应经过飢餓的菌体的呼吸商，结果见表 2。

表 2 不同培养时间的菌体内呼吸 R. Q. 值

菌龄 (小时)	处 理	实验号			
		1	2	3	平 均
6	飢餓前	0.80	0.84	0.81	0.82
	飢餓后	0.81	0.87	0.89	0.86
12	飢餓前	0.88	0.85	0.92	0.88
	飢餓后	0.90	0.88	0.95	0.91
24	飢餓前	0.95	0.90	0.96	0.94
	飢餓后	0.98	1.06	0.99	1.01

注：氧化葡萄糖的 R. Q. 值为 1.06 (8 次平均)。

葡萄糖氧化的 RQ 值理论上应为 1.0；甘露醇为 0.92。由表 2 看出，内呼吸的 RQ 值，特别是培养 12 小时的菌体的 RQ 值，很接近 0.92。这与甘露醇作为内呼吸底物是相符合的。如果将不同培养时间及飢餓前后的菌体 RQ 值加以比较，则可以看出，RQ 值随培养时间加长而增高，飢餓后较飢餓前为高。培养 24 小时的菌体，飢餓前为 0.94，飢餓后为 1.01。因为 24 小时甘露醇含量已经是比较低，飢餓后则更低，在这种情况下有多糖参与氧化，因此 RQ 值高到 1 左右。培养 6 小时的菌体 RQ 值低于 0.92，特别是飢餓前的菌体更低，可能因为 6 小时的菌体生长旺盛，有较多的碳参与合成之故。

5. 内呼吸和氧化葡萄糖时菌体内甘露醇含量的变化。

将白地霉菌体悬浮液(1.5 克湿菌体悬浮于 60 毫升磷酸缓冲液中，pH 4.5，M/15)在摇床上振荡，经过不同时间取样分析甘露醇含量，并同时测定内呼吸强度。经过 5 小时于悬浮液中加入葡萄糖至 5% 的浓度，再于不同时间取样，抽滤，分离菌体，测定甘露醇及内呼吸。结果见图 2。可以看出，在飢餓过程中甘露醇含量逐渐降低，当加入葡萄糖时立即又积累甘露醇。同时可以看出，内呼吸强度与甘露醇含量也有平行的变化。

6. 内呼吸底物与培养基的关系：

微生物的组成通常易受培养基的影响，因此在不同培养基上生长的菌体内呼吸底物也可能有所不同。我们使用的培养基较贫乏，特别是缺乏有机氮源。因此又采用了几种富含氮化合物的培养基，或将原培养基改变 C:N 比值。将如此培养所得菌体进行了甘露醇含量的分析，并观察菌体飢餓时是否有游离氨释放。结果见表 3 及 4。可以看出，虽然

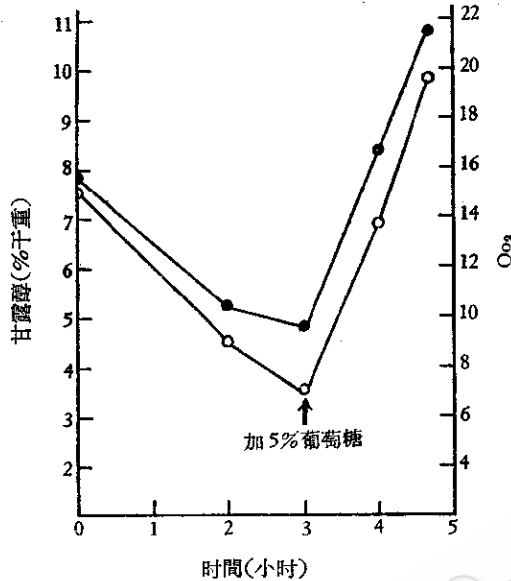


图2 白地霉饥饿过程中及氧化葡萄糖时菌体中甘露醇及 QO<sub>2</sub> 的变化。

●——● QO<sub>2</sub>; ○——○ 甘露醇。

表3 在不同培养基上生长的白地霉的甘露醇含量

培养基名称		麦芽汁	5%葡萄糖	1%葡萄糖	1%蛋白胨+1%葡萄糖	牛肉汁	乙酸钠	乙醇	甘油	乳酸钠
培养基编号		1	2	3	4	5	6	7	8	9
甘露醇含量(%干重)	饥饿前	9.08	8.84	6.67	1.73	1.50	4.50	6.05	5.15	5.30
	饥饿后	3.90	2.10	3.08	2.01	1.80	4.80	—*	—	—

注: 培养基成分: 1. 麦芽汁 (16 波林)。2. 葡萄糖, 5%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5%;  $\text{MgSO}_4$ , 0.1%; 蛋白胨, 0.1%; 酵母汁, 0.2%。3. 葡萄糖, 1%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5%;  $\text{MgSO}_4$ , 0.1%; 酵母汁, 0.2%。4. 除加 1% 蛋白胨外, 其他成分同上。5. 牛肉汁, 100 毫升; 蛋白胨, 1 克;  $\text{NaCl}$ , 0.5 克; 葡萄糖, 1 克。6, 7, 8, 9. 各以该碳源代替 3 中之葡萄糖。 \* “—” 未测定。

在各种培养基上生长的白地霉均含有甘露醇, 但含量却相差甚大。在麦芽汁及在 5% 葡萄糖的培养基上生长的含甘露醇最多, 平均可达 8—9%, 个别的达 10% 以上。在蛋白胨牛肉汁培养基上生长的菌体甘露醇含量低得多, 仅为 1.5%—1.7%。因为这些含甘露醇量低, 恐怕化学分析有误差, 又均用纸层析法鉴定, 其中确实有甘露醇。在菌体饥饿过程中, 悬浮液中游离氨的含量也有明显差异 (见表 4)。在氮源丰富的培养基上生长的菌体, 在饥饿过程中即释放出大量的游离氨。在这种情况下, 可能是以氨基酸或蛋白质为内呼吸底物。在乙酸盐上培养的菌体饥饿时也释放大量的游离氨。这一点是未预料到的。因此, 又进一步分析了其含氮物质的变化。游离氨基酸在饥饿前后分别为 1.3% 及 1.0%; 总氮含量分别为 5.6% 及 3.5%, 总氮的变化特别大。这是什么原因, 尚待进一步研究阐明。在氮源丰富的培养基上生长的菌体饥饿后, 甘露醇含量反而稍有增加, 这

是因为含氮物质减少的较多，饥饿前后各自按其干重计算，因而甘露醇含量相对地增加了。

表 4 在不同培养基上生长的白地霉饥饿时释放  $\text{NH}_3$  的量

培养基	名称	麦芽汁	5% 葡萄糖	1% 葡萄糖	1% 葡萄糖 + 1% 蛋白胨	牛肉汁	乙酸钠
	编号	1	2	3	4	5	6
游离 $\text{NH}_3$	毫克/100 毫升悬液	0.84	0	0	3.43	5.61	17.80
	毫克/100 毫克干菌体	0.11	0	0	0.58	1.04	2.42

注：培养基成分同表 3。

## 讨 论

关于微生物的内源代谢作用，Dawes 和 Ribbons 最近作了综述<sup>[16]</sup>，指出这方面的研究还是很不完美的。在内源代谢的底物方面，对细菌的情况了解较多。已经报导的有碳水化合物，包括糖原及聚葡萄糖等，脂肪、聚  $\beta$ -羟基丁酸、蛋白质、肽、氨基酸、核糖核酸、无机聚磷酸以及硫细菌中的无机硫等。酵母的内源代谢底物已报导的有多糖、脂肪、氨基酸等。Dawes 等<sup>[16]</sup>未提到丝状真菌的内呼吸底物。Cochrane<sup>[17]</sup>则指出，关于真菌的内呼吸底物至今尚不明了。仅根据呼吸商推测为脂类<sup>[18]</sup>。最近，Mizunuma<sup>[19]</sup>报导了曲霉的内呼吸底物取决于培养基的 C:N 比值。在 C:N 比值低时，氨基酸、蛋白质和核酸优先被用作内呼吸底物。当 C:N 比值高时，则碳水化合物或脂类作为主要内呼吸底物。

我们的实验结果指出，甘露醇为白地霉的主要内呼吸底物。这一点文献中尚未见有报导。当然它并不是唯一的内呼吸底物。当培养条件改变时或甘露醇被消耗掉之后，其他物质也会作为内呼吸底物。

## 摘 要

1. 白地霉的内呼吸强度与菌体内甘露醇含量成直线关系。内呼吸的呼吸商 (RQ) 值也近似甘露醇氧化的 RQ 值。菌体饥饿前后各种成分中以甘露醇含量变化最为显著。因此可知甘露醇是白地霉的主要内呼吸底物。

2. 甘露醇在内呼吸过程中被消耗，含量降低。当外加葡萄糖时，含量又立即上升。

3. 在不同培养基上生长的菌体甘露醇含量随培养基成分不同而有很大变动，高的 C:N 比值有利于甘露醇的形成，低的 C:N 比值则使得菌体内含氮物质增加并作为内呼吸底物。

## 参 考 文 献

- [1] 张树政、黎青翔：生物化学与生物物理学报，3(3):247, 1963。
- [2] 张树政、黎青翔、王惠莲：生物化学与生物物理学报，2(4):237, 1962。
- [3] Lambert, M. & Neish, A. C.: *Can. J. Res.*, 28B:83, 1950.
- [4] 中国医学科学院劳动卫生劳动保护及职业病研究所营养学系编著：食品营养成分测定法，14—18 页，人民卫生出版社，1961。

- [5] Hais, I. M., Macek, K.: Handbuch der Papierchromatographie, vol. I. p. 783, veb Gustav Fischer Verlag, Jena, 1958.
- [6] Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.: Methods in Enzymology, vol. III. p. 468.
- [7] 中国医学科学院劳动卫生, 劳动保护及职业病研究所营养学系编著: 食品营养成分测定法 18—21 页, 人民卫生出版社, 1961。
- [8] Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**:375, 1944.
- [9] Somogyi, M.: *ibid.*, **195**:19, 1952.
- [10] Белозерский, А. Н., Проскуряков, Н. И. 著: 植物生物化学实验指导, 曹宗巽、顾孝诚、吴相钰译, 127 页, 1957。
- [11] 陈丽筠: 生化学报, **1**:19, 1958。
- [12] Giri, K. V. Radhakrishnan, A. N. and Vaidyanathan, C. S.: *J. Ind. Inst. Sci.*, **35**:145, 1953.
- [13] Бояркин, А. Н.: Физиол. раст. **5**:86, 1958.
- [14] Trevelyan, W. E., Procter, D. P. and Harrison, J. S.: *Nature*, **166**:444, 1950.
- [15] Gronlund, A. F. and Campbell, J. J. R.: *J. Bacteriol.*, **81**:721, 1961.
- [16] Dawes, E. A. and Ribbons, D. W.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **16**:241, 1962.
- [17] Cochrane, V. W.: *Physiology of Fungi*, John Wiley & Sons, Inc., p. 210, 1958.
- [18] MacMillan, A.: *Physiol. Plantarum*, **9**:533, 1956.
- [19] Mizunuma: *Agr. Biol. Chem.*, **27**:88, 1963.

## ENDOGENOUS RESPIRATION IN *GEOTRICHUM CANDIDUM* MANNITOL AS A MAIN SUBSTRATE OF ENDOGENOUS RESPIRATION

CHANG SHU-CHENG, YANG LIEN-WAN AND KUAN SHIH-PIN

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

1. Mannitol has been found to be a main substrate of the endogenous respiration in *Geotrichum candidum* as evidenced by the facts that: 1) the rate of the endogenous respiration had a linear relation with the mannitol content in the mycelium, 2) the RQ of the endogenous respiration was similar to the theoretical RQ of mannitol oxidation and 3) the mannitol content changed more significantly than any other cell component during the period of starvation.

2. The mannitol content in the mycelium has been found diminished during endogenous respiration and replenished by the addition of glucose to the medium.

3. The mannitol contents in the mycelia, harvested from different growth media, varied with the composition of the media, a high C:N ratio favored the mannitol formation while a low C:N ratio gave higher contents of nitrogenous compounds which may be served as endogenous substrates.