

冻土毛霉两型性的研究*

陈聿美 张雪聪 吴经纶 王丽雯 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所微生物室, 上海)

本文报道了冻土毛霉两型菌体(M型与Y型)形成条件,比较了两种菌体的主要生理特征和超显微结构,并对 CO_2 引起代谢途径改变的机制作了初步探讨。

在无足量的 CO_2 存在下,仅有M型菌体形成,好气条件下的M型菌体具有高度氧化代谢,在嫌气条件下的M型(通 N_2)则进行酒精发酵。在有足量 CO_2 (30%)存在下,不论 O_2 分压的高低,均形成Y型菌体。 CO_2 使菌体形态呈Y型的同时,代谢途径由有氧代谢转变为酒精发酵。

CO_2 抑制氧化代谢的作用是可逆的,在无 CO_2 条件下 $\text{Y}_{\text{O}_2+\text{CO}_2}$ 型菌体的呼吸迅速上升,呼吸商由2以上下降为1.0左右;在有足量 CO_2 存在下,菌体呼吸维持在较低水平,呼吸商在2以上。

M型与 $\text{Y}_{\text{O}_2+\text{CO}_2}$ 型菌体离体酶活力比较结果,表明两种菌体EMP、HMP和TCA循环主要的酶活力无显著区别,仅Y型菌体的酒精脱氢酶和草酰乙酸脱羧酶活力比M型分别高5和6倍。

CO_2 对离体的琥珀酸脱氢酶有显著的竞争性抑制作用,并且在琥珀酸脱氢酶的专一性抑制剂丙二酸存在下,菌体亦呈现Y型。丙二酸·Y型的生理特征与 $\text{Y}_{\text{O}_2+\text{CO}_2}$ 型十分相似,因而琥珀酸脱氢酶是 CO_2 或丙二酸引起形态转变的一个共同作用部位。

许多真菌的菌体形态能在一定条件下,呈菌丝型(M型)或酵母型(Y型)。关于两型性产生的条件,最初认为是缺氧所致^[1]。后来许多学者对这一问题进行研究^[2-13],结果虽然阐明了一些真菌两型性转变的条件,但对两型性转变的原始作用部位和作用机制没有涉及到。

本文报道冻土毛霉在不同培养条件下形成的两型菌体的生理特征和代谢途径。

材料和方法

(一) 菌种

冻土毛霉(*Mucor hiemalis*)。

(二) 培养条件和方法

1. 培养基成分(%): 葡萄糖1, 蛋白胨0.5, 酵母膏0.3。消毒前pH6.8。

2. 接种方法: 每支斜面制成30毫升孢子悬液,每50毫升培养基接种1毫升。

3. 培养条件

(1) 通气培养: 500毫升三角瓶内装培养基50毫升,在往复摇床上28℃培养12小时。

(2) 通 CO_2 培养: 5升玻璃瓶内装培养基2升,接种后通入纯化过的 CO_2 30分钟,再将气体进出口关闭,28℃培养48—72小时。

(3) 通 N_2 培养: 大试管(25×200毫米)内装培养基30毫升,连续通入纯化过的 N_2 气,在28℃培养22小时。

(4) 通 O_2 -30% CO_2 培养: 10升玻璃瓶内装培养基3升,在往复摇床上,同时连续通入空气和30%(体积/体积) CO_2 ,测定其溶解氧为0.2毫克分子/分/升,溶解 CO_2 为7.5毫克分子/分/升。

本文于1978年8月24日收到。

* 张庭兰同志参加部分工作。

以上各种不同气体的培养都是在常压下进行的。

4. 气体纯化方法

(1) CO_2 纯化方法: CO_2 先通过颗粒型活性炭吸收器, 再通过 0.1N $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液 (在 10N H_2SO_4 中) 处理。

(2) N_2 纯化方法: N_2 预经焦性没食子酸 NaOH 溶液, 吸收其中少量的氧气, 经溶解氧测定, 证明无氧。

(三) 分析和测定方法

1. 还原糖的分析: 用二硝基水杨酸方法^[14]。

2. 酒精的分析: 用康威氏微量弥散法^[15], 稍加改进。中间槽中加 0.1N 酸性重铬酸钾溶液 2 毫升, 外槽中加样品 1 毫升 (酒精含量 0.2—2.5 毫克), 密封后, 在 37℃ 放置 12—18 小时, 将中间槽中的溶液吸出, 测 560 毫微米吸光率, 根据标准曲线计算酒精量。

3. 生长的测定: 测定培养液中菌体的干重。

4. 有机酸的纸层析: 将培养液浓缩酸化后, 用乙醚抽提器抽提 48 小时, 蒸去乙醚, 将残渣溶于少量水中, 进行纸层析。层析系统: 异丁醇: 吡啶: 醋酸: 水 (12:6:1:4)。用 0.05% 溴酚蓝酒精溶液显色。

5. 菌体呼吸的测定: 用瓦氏呼吸器。 CO_2 分压的维持是按 Handerson-Hasselback 方程式计算与一定 CO_2 分压平衡的 NaHCO_3 缓冲液浓度^[16]。反应瓶内加入所需量的 NaHCO_3 溶液, 所用的溶液全部预经 CO_2 饱和, 测定前由 U 形管闭口端连续通入 30% CO_2 与 O_2 的混合气体 20 分钟, 然后开始读数。

6. 溶解氧的测定: 参照 Cooper 等亚硫酸钠氧化法^[17]。

7. 溶解 CO_2 的测定: 瓶内放置所需体积的 1N Na_2CO_3 , 通空气与 CO_2 后, 定时取样 5 毫升, 立即加入 5 毫升 2N NaOH , 再加入过量的饱和 BaCl_2 溶液 (10 毫升), 使生成 BaCO_3 沉淀, 用 0.5N HCl 滴定剩余的 NaOH (以酚酞为指示剂), 根据两次滴定的差数, 计算溶解 CO_2 值。

8. 细胞色素的观察: 将菌体用研磨法制得无细胞抽出液, 加连二亚硫酸钠还原后, 用 Fuess 微分光镜观察。

9. 蛋白质的测定: 按 Levin 等改进的双缩脲方法^[18]。

10. 电子显微镜观察: 参照前文方法^[19]。

(四) 酶活力测定方法

1. 无细胞抽出液的制备

(1) 冻化法: 湿菌体加等量甘氨酸甘氨酸缓冲液 (0.1M, pH7.8), 放在干冰中, 待菌体冻结后, 取出直接浸入 30℃ 水浴中, 待菌体融化, 如此反复冻化 10 次, 3000 × g 离心 10 分钟, 吸出上清液, 测定糖酵解和己糖支路的酶活力。

(2) 研磨法: 湿菌体加等量玻璃粉和等量 Tris 缓冲液 (0.2M, pH7.4) 0℃ 研磨 15 分钟, 3000 × g 离心 10 分钟, 取出上部无细胞抽出液, 再经 10,000 × g 低温离心 20 分钟, 取上清液和下部颗粒部分分别测定三羧酸循环和末端呼吸的酶活力。

2. 酶活力的测定: G-6-P 脱氢酶、6-P-G 脱氢酶、醛缩酶、G-3-P 脱氢酶、酒精脱氢酶、乌头酸酶、异柠檬酸脱氢酶、苹果酸酶、草酰乙酸脱氢酶、NADH 氧化酶均按“酶学方法”^[20] 中的方法测定。苹果酸酶的反应系统改用 Tris 缓冲液, pH9.0。磷酸己糖异构酶在已证明酶制剂中有 G-6-P 脱氢酶存在时, 以 F-6-P 为底物, 测定 NADP 的还原。琥珀酸脱氢酶按 Ellis 的方法^[21] 以 PMS (二氮蒽甲硫酸盐) 和 DCPIP (2, 6-二氯酚靛酚) 为电子受体, 测定 600 毫微米吸光率的下降。延胡索酸酶按 Racker 的方法^[22]。苹果酸脱氢酶按 Thornc 的方法^[23]。异柠檬酸酶按 Dixon 和 Kornberg 的方法^[24] 测定。

3. 测定酶活力时 CO_2 浓度的控制: 将所需浓度的 NaHCO_3 缓冲液预先通入 CO_2 饱和, 测定酶活力时, 在加好反应液的比色杯中, 加入所需量的 NaHCO_3 缓冲液, 立即加酶, 开始反应。

结果和讨论

(一) 培养条件与菌体形态

由表 1 和图版 I-1—4 可以看出在嫌气条件下并不能形成 Y 型菌体, 一定量的 CO_2 的存在是 Y 型菌体形成的条件。即使将 O_2 分压提高到空气中 O_2 分压的两倍

时,只要维持 0.3 大气压的 CO_2 , 菌体仍呈 Y 型,说明 O_2 的多少并无影响。

表 1 不同培养条件下冻土毛霉的菌体形态

培养条件	菌体形态、大小
通空气	M 型、6—8×100—300 微米
通 CO_2	Y 型、5—20 微米,以 14—18 微米为主
通 N_2	M 型、2—3×100×300 微米
通 O_2 -30% CO_2	Y 型、5—20 微米,以 14—16 微米为主

(二) 各种培养条件下菌体的生长、呼吸和代谢产物

如表 2 所示,不同气体下培养的菌体不仅形态不同,菌体的生长和代谢产物也有显著差异。在嫌气条件下(通 CO_2 或通 N_2)菌体生长少,积累大量酒精。在好气条件下菌体生长旺盛,产极少酒精。而在通 O_2 -30% CO_2 条件下,虽有氧的存在,但有大量酒精生成,并产生一未知有机酸。由以上结果可以看出 CO_2 在引起形态转变的同时,代谢途径也有改变。

表 2 各种培养条件下冻土毛霉的生长和代谢产物

菌体	生长 %(耗糖)	酒精 %(耗糖)	琥珀酸	乳酸	未知酸
M _{空气} 型	40	1	+	+	-
Y _{CO₂} 型	5	40	-	-	-
M _{N₂} 型	10	35	-	-	-
Y _{O₂+CO₂} 型	15	30	+	+	+

表 3 各种培养条件下冻土毛霉菌体的呼吸和细胞色素系统

菌体	呼 吸		细胞色素
	Q _{O₂}	R. Q.	
M _{空气} 型	60—80	1.0—0.8	b, c, a— a_3
Y _{CO₂} 型	25	2.7	b, c
M _{N₂} 型	40—60	2.8	—
Y _{O₂+CO₂} 型	40→70 10 分钟	2.1→1.0 10 分钟	b, c a— a_3

各种菌体呼吸的测定与生长测定结果相符(表 3)。Y_{O₂+CO₂} 型菌体由于氧的存在,细胞色素系统完整,菌体呼吸较高,同

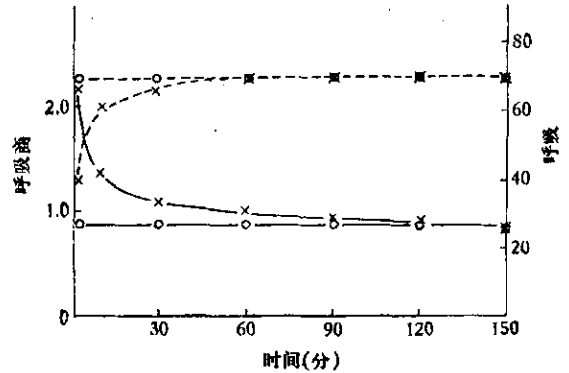


图 1 M_{空气}型和 Y_{O₂+CO₂} 型菌体的呼吸和呼吸商

○—○ M_{空气}型
×—× Y_{O₂+CO₂}型
--- 呼吸
— 呼吸商

时由于 CO_2 的作用,使代谢途径趋向酒精发酵,因而呼吸商较高,但在测定呼吸过程中,气相为空气时,呼吸商迅速下降到 1.0 左右,呼吸提高到 M_{空气} 型水平(图 1)。

(三) CO_2 作用的可逆性

在培养过程中,如将 CO_2 降低到 30% 以下, Y_{O₂+CO₂} 型菌体即生长成 M 型,同样,

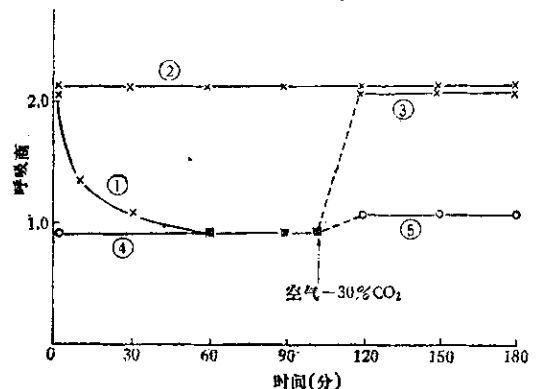
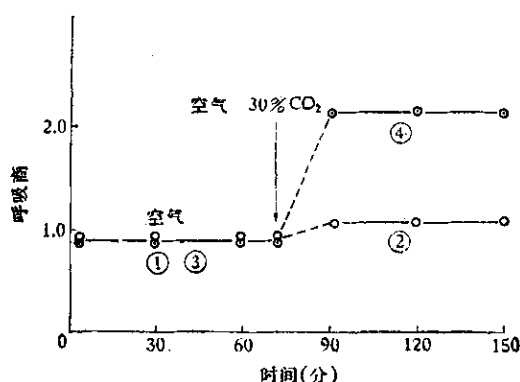
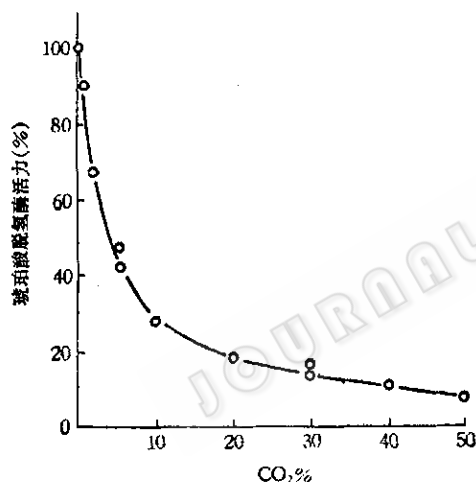


图 2 冻土毛霉 M_{空气} 型与 Y_{O₂+CO₂} 型菌体呼吸商的变化

① Y_{O₂+CO₂} 型 气相成分: 空气
② Y_{O₂+CO₂} 型 气相成分: 空气-30% CO_2 或 40% O_2 -30% CO_2
③ Y_{O₂+CO₂} 型 在空气中呼吸商下降后通入空气-30% CO_2
④ M_{空气} 型 气相成分: 空气
⑤ M_{空气} 型 气相中通入空气-30% CO_2
--- 表示通气过程

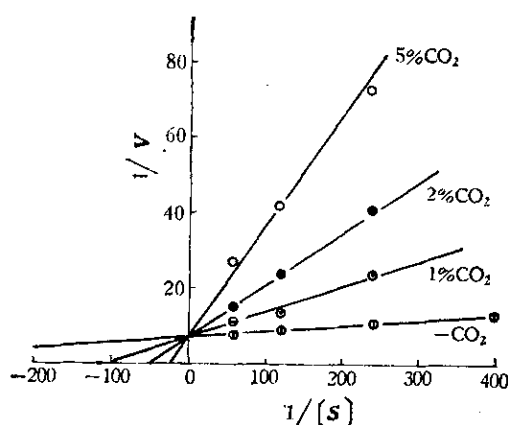
图3 $M_{\text{型}}$ 菌体呼吸商的变化

- ① ② 反应瓶中底物为葡萄糖
③ ④ 反应瓶中底物为葡萄糖+氮源(0.2% 尿素)
----- 表示通气过程

图4 CO_2 对琥珀酸脱氢酶的抑制作用

将M型菌体在通有30% CO_2 条件下培养也会逐渐变成Y型(图版I-9-11)。

在菌体呼吸的测定中,我们观察到 $\text{Y}_{\text{O}_2+\text{CO}_2}$ 型菌体的呼吸商较高,但在测定过程中,如气相是空气,呼吸商迅速下降到1.0左右(图1、2),如在气相中通以空气和30% CO_2 , $\text{Y}_{\text{O}_2+\text{CO}_2}$ 型菌体的呼吸商则始终维持在2以上,即使 O_2 的分压提高到空气中 O_2 分压的2倍,只要维持 CO_2 分压为0.3大气压,呼吸商仍维持在原有水平(图2、3)。如果 $\text{Y}_{\text{O}_2+\text{CO}_2}$ 型菌体呼吸商在空气

图5 CO_2 对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用

$1/V$ 是2分钟内 ΔA 的倒数($\times 1,000$)
[S] 是琥珀酸的克分子浓度

中下降后,气相中再通入 O_2 和30% CO_2 ,呼吸商即又上升到原来水平(图2、3)。以上结果说明 CO_2 对Y型菌体作用的可逆性。

由图2④、⑤两曲线可看出, $M_{\text{型}}$ 菌体呼吸商在有或无 CO_2 条件下都在1.0左右, CO_2 的作用不明显。但如果在测定呼吸的反应瓶中除底物葡萄糖外,同时加入氮源(0.2% 尿素),则在通半小时30% CO_2 后,菌体形态虽无变化,菌体的呼吸却改变为 $\text{Y}_{\text{O}_2+\text{CO}_2}$ 型水平,即呼吸降低,呼吸商提高(图3)。以上结果表明,菌体形态分化之前,先有代谢途径上的改变。而由M型转变为Y型的代谢途径,亦即M型感受 CO_2 的作用,需要氮源存在,经过一诱导时期。由 $\text{Y}_{\text{O}_2+\text{CO}_2}$ 型呼吸转变为 $M_{\text{型}}$ 型呼吸则不需诱导时期, CO_2 除去后,呼吸迅速升高,呼吸商降低。这可能是 CO_2 抑制了 $\text{Y}_{\text{O}_2+\text{CO}_2}$ 菌体氧化代谢的酶系,因而除去 CO_2 后,氧化代谢可迅速恢复。

(四) 两型菌体离体酶活力比较

我们比较了 $M_{\text{型}}$ 型和 $\text{Y}_{\text{O}_2+\text{CO}_2}$ 型菌体的离体酶活力,结果如表4所示。两种菌体都有糖酵解,己糖支路,三羧酸和乙醛酸

循环,以及末端呼吸的主要酶系,两种菌体酶活力无显著区别,只是 $Y_{O_2+CO_2}$ 型菌体的酒精脱氢酶活力比 $M_{\text{空气}}$ 型高五倍,草酰乙酸脱羧酶比 M 型高六倍。

从酶活力测定结果可以看出, $Y_{O_2+CO_2}$ 型菌体生长虽较低,但仍具备了与 $M_{\text{空气}}$ 型菌体相似的三羧酸循环酶活力,这说明 CO_2 的作用并没有阻遏有氧代谢酶系的合成,而是抑制了有氧代谢酶系的作用。

$Y_{O_2+CO_2}$ 型菌体的草酰乙酸脱羧酶活力较高,这说明 $Y_{O_2+CO_2}$ 型菌体由丙酮酸或磷酸烯醇式丙酮酸固定 CO_2 的能力较强,丙酮酸或磷酸烯醇式丙酮酸羧化生成草酰乙酸。Pardee 和 Potter^[25] 曾报道草酰乙酸对琥珀酸脱氢酶有强烈的抑制作用。可能正是草酰乙酸反馈抑制 Y 型菌体的三羧酸循环的运转。

表 4 冻土毛霉 $M_{\text{空气}}$ 型与 $Y_{O_2+CO_2}$ 型菌体
离体酶制剂的酶活力

酶	活力 ($\Delta A/\text{分}$)	
	$M_{\text{空气}}$ 型	$Y_{O_2+CO_2}$ 型
磷酸己糖异构酶	105	85
醛缩酶-G-3-P 脱氢酶	56	68
酒精脱氢酶	30	145
G-6-P 脱氢酶	205	125
6-P-G 脱氢酶	20	40
乌头酸酶	875	660
异柠檬酸脱氢酶	775	330
琥珀酸脱氢酶	490 ¹	236 ¹
延胡索酸酶	70	88
苹果酸脱氢酶	3750	1210
NADH 氧化酶	272 ¹	151 ¹
苹果酸酶	207	123
异柠檬酸酶	16.4 ²	13.5 ²
QCO ₂ (微升 CO ₂ /小时)		
草酰乙酸脱羧酶	12.7	78.9

1. 用颗粒部分测定,其他都用无细胞抽出液测定。
2. 上清液经 30% 和 65% 二次硫酸铵沉淀,此系二次硫酸铵沉淀部分的酶活力。

(五) CO_2 对琥珀酸脱氢酶的作用

值得重视的结果是 CO_2 对琥珀酸脱氢

酶有显著的抑制作用。由图 4 可以看出 30% CO_2 几乎全部抑制琥珀酸脱氢酶的活力,而且 CO_2 的抑制作用是竞争性的(图 5)。

由离体酶活力测定结果,可以解释在测定呼吸中观察到的现象(图 1、2、3)。 $Y_{O_2+CO_2}$ 型菌体已具有三羧酸循环的酶系和完整的细胞色素系统,在有 CO_2 存在的条件下, CO_2 抑制琥珀酸脱氢酶的作用,使三羧酸循环运转受到干扰,而使丙酮酸走向酒精发酵。显然, CO_2 引起的是抑制作用,而非阻遏作用,因而在除去 CO_2 的情况下, $Y_{O_2+CO_2}$ 型菌体不需诱导新的酶系的合成,能迅速恢复有氧代谢,而 $M_{\text{空气}}$ 型菌体的酒精脱氢酶和草酰乙酸脱羧酶活力均较低,在 CO_2 存在下,需要经过这一酶系的诱导合成,才能使代谢途径转变为酒精发酵。

CO_2 抑制琥珀酸脱氢酶的作用机制,是由于 CO_2 与丙酮酸生成草酰乙酸反馈抑制琥珀酸脱氢酶,还是 CO_2 本身就是琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂是值得进一步探讨的。

(六) 丙二酸对菌体形态的影响

丙二酸是琥珀酸脱氢酶专一性的竞争性抑制剂。在发现 CO_2 对离体酶制剂的琥珀酸脱氢酶有显著的抑制作用后,我们试验了丙二酸对菌体形态的影响。结果在 $3 \times 10^{-2}M$ 丙二酸存在下,菌体呈现 Y 型(图版 I-5-8)。丙二酸- Y 型菌体生长量是耗糖的 10% 左右,酒精产量是耗糖的 35-40%,细胞色素系统完整,与 $Y_{O_2+CO_2}$ 型相近。

CO_2 和丙二酸都能使冻土毛霉产生 Y 型菌体,而两者又都对琥珀酸脱氢酶有抑制作用,显然,琥珀酸脱氢酶的被抑制与 Y 型菌体的出现有着联系。

如果 M 型转变为 Y 型是由于三羧酸循

环受到障碍,则其他三羧酸循环的专一性抑制剂也应有类似的作用。我们试验了氟乙酸的影响,氟乙酸是乌头酸酶的专一性的竞争性抑制剂,在加入氟乙酸后生长被抑制,而菌体却仍呈M型,这进一步说明琥珀酸脱氢酶是 CO_2 或丙二酸引起两型性转变的一个作用部位。除琥珀酸脱氢酶外, CO_2 与丙二酸是否还有其他作用部位,以及究竟如何引起形态变化则尚待研究。

(七) M型与Y型菌体超显微形态的比较

我们将不同条件下培养的冻土毛霉菌体进行了超显微形态的观察,并着重比较了线粒体的形态结构和分布,如图版 II-12 所示, M型菌体线粒体多数位于细胞膜附近,其形状为圆形或椭圆形,嵴呈放射状。而 $\text{Y}_{\text{O}_2+\text{CO}_2}$ 型和 $\text{Y}_{\text{丙二酸}}$ 型菌体(图版 II-13, 15)不但有较多的线粒体,其结构和大小也与M型有明显的差别,多数呈歪曲状,有丰富的嵴,嵴相互交织成网状结构。这种结构上的差别显然是由于 CO_2 或丙二酸对菌体呼吸作用的抑制所引起的。而在 CO_2 下培养的Y型菌体(图版 II-14)中几乎只存在少数电子密度增大的线粒体结构,这与低通气 and 完全厌气条件下所观察到的线粒体相似^[26,27]。我们认为存在于线粒体内膜上的呼吸酶系,特别是琥珀酸脱氢酶活力受到 CO_2 或丙二酸抑制时,可能使线粒体结构发生改变。但一般菌体线粒体和嵴都应随通气而增加,我们曾观察到真菌线粒体的数量、结构与菌体的呼吸程度有密切的关系(未发表),因此,在空气-30% CO_2 或丙二酸条件下培养的Y型菌体具有大而结构比较复杂的线粒体,可能是由于有氧代谢受到抑制,菌体以增加线粒体膜的面积来补偿细胞的呼吸功能的结果。

参 考 文 献

- [1] Foster, J. W.: Chemical Activity of Fungi, 1949, pp. 296—302.
- [2] Bartnicki-Garcia, S. & W. J. Nickerson: *Biochim. Biophys. Acta*, 58: 102—119, 1962.
- [3] Bartnicki-Garcia, S. & W. J. Nickerson: *J. Bacteriol.*, 84: 829—858, 1962.
- [4] Bartnicki-Garcia, S.: *Bacteriol. Rev.*, 27: 293—304, 1963.
- [5] Bartnicki-Garcia, S.: *J. Bacteriol.*, 96: 1586—1594, 1968.
- [6] Haidle, C. W. & R. Storek: *Ibid.* 92: 1236—1244, 1966.
- [7] Haidle, C. W. & R. Storek: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22: 175—180, 1966.
- [8] Terenzi, H. F. & R. Storek: *Ibid.*, 30: 447—452, 1968.
- [9] Terenzi, H. F. & R. Storek: *Mycologia*, 61: 894—901, 1969.
- [10] Terenzi, H. F. & R. Storek: *J. Bacteriol.*, 97: 1248—1261, 1969.
- [11] Clark-Walker, G. D.: *Ibid.*, 116: 972—980, 1973.
- [12] Larsen, A. D. & P. S. Sypherd: *Ibid.*, 117: 432—438, 1974.
- [13] Paznokas, J. L. & P. S. Sypherd: *Ibid.*, 124: 134—139, 1975.
- [14] Sumner, J. B. & V. A. Graham: *J. Biol. Chem.*, 47: 5—9, 1921.
- [15] Conway, E. J.: *Microdiffusion Analysis and Volumetric error*, 5th ed., 1962, pp. 246—255.
- [16] Umbreit, W. W. et al.: *Manometric Techniques*, 3rd ed., 1957, pp. 17—25.
- [17] Cooper, C. M.: *Ind. Eng. Chem.*, 36: 504, 1944.
- [18] Levin, R. & R. W. Brauer: *J. Lab. Clin. Med.*, 38: 474, 1951.
- [19] 焦瑞身、吴经纶: 科学通报, 17: 371—374, 1966.
- [20] Colowick, S. P. & N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*, vol. I, 1955.
- [21] Ellis, H. A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 85: 561—562, 1959.
- [22] Racker, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 4: 211, 1950.
- [23] Thorne, C. J. R.: *Ibid.*, 59: 624—633, 1962.
- [24] Dixon, G. H. & H. L. Kornberg: *Biochem. J.*, 72: 3p., 1953.
- [25] Pardee, A. B. & V. R. Potter: *J. Biol. Chem.*, 176: 1085—1094, 1948.

STUDIES ON THE DIMORPHISM OF *MUCOR HIEMALIS*

Chen Yu-mei, Zhang Xue-cong, Wu Jing-lun,
Wang Li-wen, Jiao Rui-shen

(Section of Microbiology, Shanghai, Institute of
Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

In this report the environmental conditions required for the cultivation of two types of growth (mycelial and yeast-like) of *Mucor hiemalis*, and some of the physiological and ultrastructural differences between these growth types were studied. The mechanism of the effect of CO_2 on the morphogenesis of both forms was also discussed.

1. In the absence of sufficient CO_2 , aerobically or anaerobically, *M. hiemalis* produced exclusively cells of the mycelial type (M-type). The aerobic M-type cells exhibited a high aerobic metabolism, while the anaerobic M-type cells carried out simply alcohol fermentation. However, under a sufficiently high CO_2 partial pressure (30%), the organism formed only yeast-like cells (Y-type), even when the O_2 partial pressure was increased to twice as much as that of the atmosphere. The Y-type cells obtained under CO_2 or air- CO_2 formed alcohol as the main metabolic product.

2. The respiration of the Y-type cells produced under air- CO_2 was inhibited by CO_2 , while the respiration rised rapidly, and the corresponding respiratory quotient (R. Q.) declined simultaneously under conditions devoid of CO_2 . However, when there was enough CO_2 , the R. Q. maintained at above 2. Apparently, the effect of CO_2 on the respiration of the Y-type cells was a re-

versible inhibition of the aerobic metabolism.

3. Cell free preparations were obtained from both the aerobic M-type and air- CO_2 Y-type cells, and their enzymic activities of the EMP, HMP, and TCA systems were compared. It was found that there was no fundamental difference between these two types of cells, except that the specific activity of alcohol dehydrogenase and oxaloacetate decarboxylase of the Y-type cells were 5 and 6 times that of the aerobic M-type cells respectively. Furthermore, it was observed that the succinic dehydrogenase activity in cell-free preparation was competitively inhibited by CO_2 . This suggested that CO_2 inhibited hyphal morphogenesis not by repressing the synthesis of succinic dehydrogenase, but by inhibiting its activity, and hence leading the metabolic flux towards the alcohol fermentation.

4. The presence of malonic acid, a specific inhibitor of succinic dehydrogenase, also induced *M. hiemalis* to produce Y-type cells exclusively. The cells thus obtained were quite similar in shape and also in some of their physiological characteristics to those formed under air- CO_2 . These suggested that succinic dehydrogenase might be one of the targets of CO_2 or malonate in vivo in the formation of Y-type cells.