

# 尿素对热带假丝酵母合成长链二元酸途径的调节

## III. 菌体生长和碳代谢平衡

徐可仁 夏浩 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所微生物室, 上海)

本文通过热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)在不同量尿素中的生长、磷和碳代谢方面的研究来探讨尿素的调节作用。结果指出,过量尿素(0.3%)培养 120 小时的酵母菌体干重为适量尿素(0.1%)培养的菌体干重的 162%,但二元酸及其它代谢产物的量却大为减少。发酵过程中尿素的吸收和二氧化碳的释出明显地高于 0.1% 尿素的发酵过程。

热带假丝酵母多倍体变种在适量尿素(0.1%)的条件下,十三烷 1,13-二羧酸产量可达 77g/l;而尿素量增至 0.2%时,长链二元酸产量则极低<sup>[1]</sup>。焦瑞身等(1981)<sup>[2]</sup>以相当于尿素含氮量的酒石酸铵或硫酸铵代替尿素进行试验,指明抑制长链二元酸合成的主要不是氮的作用。此外,尿素结构类似物也显示了相似的调节作用。过量尿素(0.3%)的发酵产物中短链二元酸和氨基酸类的产量虽然比适量尿素(0.1%)为高,但长链二元酸产量是大幅度减少,从代谢产物上看远未达到物料平衡。

为了研究不同用量的尿素条件下,烃类氧化途径的差异,我们对两种尿素用量条件下的代谢产物进行分析,并对热带假丝酵母 NP<sub>Co</sub>N<sub>22</sub> 的生长和碳代谢作了定量的研究。

## 材料和方法

### (一) 菌种和培养条件

热带假丝酵母多倍体突变种 NP<sub>Co</sub>N<sub>22</sub> 及培养条件同前文<sup>[3,4]</sup>。本文中正十五烷用量为 4.2%。

### (二) 总磷的测定

在不同发酵时间里定量取发酵液,用 1N NaOH 调 pH 至 8.0,离心并滤去菌体;用少量重蒸蒸馏水洗菌体一次,合并滤液于容量瓶,稀释至刻

度。按 Chen 方法<sup>[5]</sup>进行。

### (三) 挥发酸的测定

在不同发酵时间里定量取发酵液,加到一定体积的蒸馏水中,滴加 1ml 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 1ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>;然后加热蒸馏,将馏出液(约 200ml)用 0.1N NaOH 滴定,计算。

### (四) 发酵过程残留正十五烷的测定

定量均匀地取不同发酵时间的发酵液,用 1N NaOH 调 pH 至 8.0。用正己烷抽提 3-4 次,合并正己烷抽提液。在 40℃ 以下减压蒸去正己烷,称残留物重。

### (五) 菌体干重的测定

将正己烷抽提过的定量发酵液,离心收集菌体;蒸馏水洗菌体二次,将菌体在 105℃ 以下干燥,称重。

### (六) 发酵过程呼吸的测定

定量取发酵液,用 SKW-2 微量呼吸检压仪测定氧吸收和二氧化碳的释出,按 Umbreit 等方法<sup>[6]</sup>进行。

### (七) 发酵液中碳素含量的测定

分去菌体和正十五烷的发酵液,按 Thorn 等的方法<sup>[7]</sup>进行。

## 结 果

### (一) 不同量尿素的发酵过程中磷的消耗

测定结果见图 1。从图 1 可以看出过

本文于 1982 年 1 月 12 日收到。

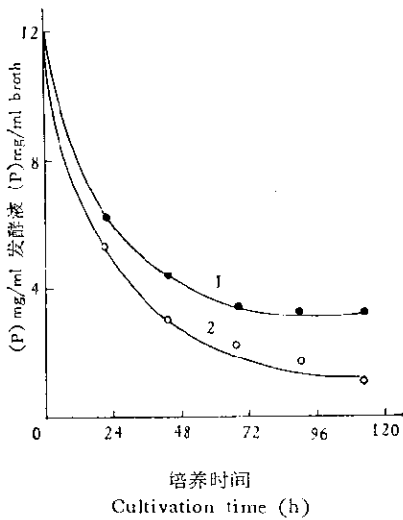


图 1 不同量尿素发酵过程发酵液中总磷量的变化  
Fig. 1 Total phosphorus in broth in fermentation with various amounts of urea  
1: 0.1% 尿素 urea 2: 0.3% 尿素 urea

量尿素(0.3%)的发酵过程对磷的消耗大于适量尿素(0.1%)的发酵,说明有较多的无机磷为菌体同化利用。

## (二) 不同量尿素的发酵过程中挥发酸含量的变化

结果见表 1。从表 1 中可知,过量尿素(0.3%)的发酵过程所产生的挥发酸均略高于适量尿素(0.1%)的发酵过程,但不论尿素是适量或过量,挥发酸均非热带假丝酵母多倍体突变种  $NP_{Co}N_{22}$  的主要代谢

表 1 不同量尿素发酵过程的挥发酸含量测定结果  
Table 1 Volatile acids content in broth during fermentation with various amounts of urea.

发酵时间(小时) Fermentation time (hrs.)	0.1% 尿素 挥发酸量 (g/l) 0.1% Urea Volatile acids (gr./l)	0.3% 尿素 挥发酸量 (g/l) 0.3% Urea Volatile acids (gr./l)
24	0.12	0.16
48	0.14	0.25
72	0.40	0.35
96	0.14	0.27
120	0.20	0.23

产物。

## (三) 不同量尿素的发酵过程酵母 $NP_{Co}N_{22}$ 菌体生长的差异

经几次试验测得过量尿素(0.3%)培养的酵母突变种发酵至 120 小时菌体干重大约比 0.1% 尿素培养的菌体干重增加 62% 左右。

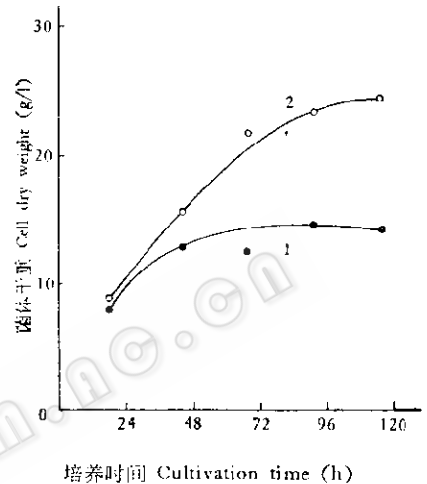


图 2 不同量尿素发酵过程菌体生长的比较  
Fig. 2 Contrast of the growth of yeast in fermentation with various amounts of urea  
1: 0.1% 尿素 urea, 2: 0.3% 尿素 urea

从图 2 可知过量尿素(0.3%)培养的整个过程,菌体处于不断增殖之中,生长明显地比 0.1% 尿素快。0.1% 尿素培养过程,菌体增殖主要是在 48 小时以前。

沈永强等(1979)的报道<sup>[1]</sup>中采用简便的浊度法测定菌体生长,显然有较大的误差,因为菌体、析出的二元酸以及残烃都增加浊度,所以未能看出不同尿素用量条件下,菌体生长的差异。

## (四) 不同量尿素发酵 120 小时的发酵液去菌体和正十五烷以后的含碳量测定

结果见表 2。由焦瑞身等(1981)的报道<sup>[2]</sup>已知在 0.1% 尿素发酵过程的代谢物中,长链二元酸占 90% 左右。因此,本报表 2 所示在 0.1% 尿素发酵液中的含碳代

表 2 不同量尿素发酵 120 小时发酵液的含碳量\*测定结果 (单位: g/l)

Table 2 Carbon content\* in fermentation broth with different concentration of urea after 120 hrs.

尿素量(%) Urea concentration (%)	批号 Exp. number	1404	1408	1511	平均值 Average
0.1		18.11	18.79	18.57	18.49
0.3		11.00	15.59	10.77	12.69

\* 除去菌体、CO<sub>2</sub> 和 n-C<sub>15</sub>, without cells, CO<sub>2</sub> & n-C<sub>15</sub>.

谢产物主要是长链二元酸。而 0.3% 尿素的发酵液含碳量远低于 0.1% 尿素。

### (五) 不同量尿素发酵过程的氧吸收和二氧化碳释出测定

图 3 为氧的吸收, 图 4 为二氧化碳释出情况。当尿素过量时氧的吸收与二氧化碳的释出均明显高于 0.1% 尿素培养。从 96 和 120 小时的测定结果看到氧吸收和二氧化碳释出急剧下降, 而当 72 小时补加正十五烷后, 在 120 小时测得氧吸收和二氧化碳释出明显高于没补加正烷烃的 0.3% 尿素培养。这一结果可能说明在过量尿素 (0.3%) 条件下, 酵母 NP<sub>CO</sub>N<sub>22</sub> 呼吸能力的增强是与烃氧化能力有关的。发酵后期因

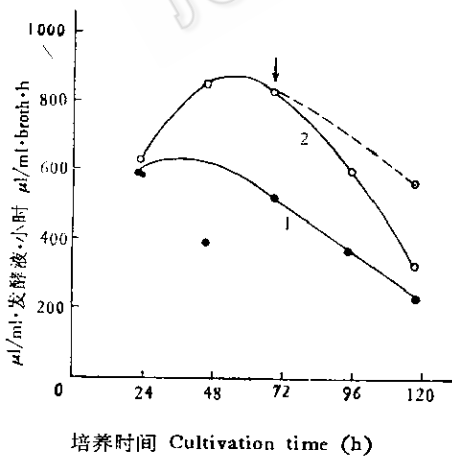


图 3 不同量尿素发酵过程的氧吸收  
Fig. 3 O<sub>2</sub> assimilated in fermentations with various concentrations of urea.  
1: 0.1% 尿素 urea; 2: 0.3% 尿素 urea  
↓ 处补加 Supplement 1% n-C<sub>15</sub>

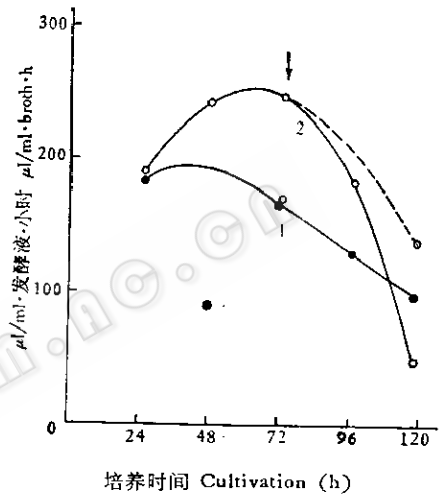


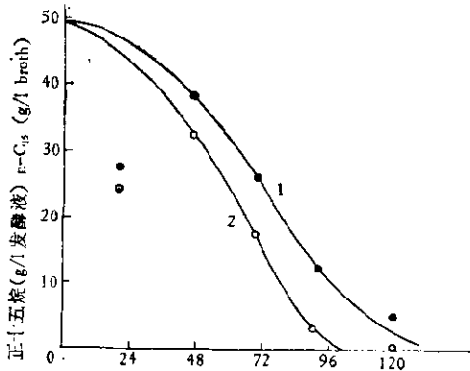
图 4 不同量尿素发酵过程二氧化碳的释出  
Fig. 4 CO<sub>2</sub> liberated in fermentations with various concentrations of urea.  
1: 0.1% 尿素 urea 2: 0.3% 尿素 urea  
↓ 处补加 Supplement n-C<sub>15</sub>

为烃基质大大减少 (见图 5), 所以呼吸能力就急剧下降, 而在 72 小时补加正十五烷后则缓和了急剧下降的趋势。

根据图 4 可读出 1ml 发酵液在 120 小时内各阶段释出二氧化碳的量, 经积分则算出每 1 发酵液在 120 小时里二氧化碳的总释出量。0.1% 尿素发酵共呼出 9.54g/l 的二氧化碳, 而 0.3% 尿素发酵共呼出 12.04g/l 的二氧化碳。

### (六) 不同量尿素发酵过程的正十五烷利用情况

发酵过程不同时间取样测定结果见图 5。显然, 过量尿素 (0.3%) 发酵过程正十



培养时间 Cultivation time (h)

图 5 不同量尿素发酵残留正十五烷测定

Fig. 5 Residual n-C<sub>15</sub> in fermentation with various amounts of urea

1:0.1% 尿素 urea 2:0.3% 尿素 urea

五烷的消耗比 0.1% 尿素发酵为快。

## 讨 论

1. 不同量尿素发酵的菌体干重测定结果表明(图 2),在适量尿素(0.1%)培养下,48 小时后菌体生长趋于稳定,而过量尿素(0.3%)在 48 小时后仍处于明显增殖状态。酵母菌体继续增殖(图 2),烷烃利用比 0.1% 尿素时快(图 5),表明此时酵母 NP<sub>CO</sub>N<sub>22</sub> 同化正十五烷作为增殖菌体的碳源。这也说明多倍体突变种 NP<sub>CO</sub>N<sub>22</sub> 的  $\beta$ -氧化酶系受阻的性质<sup>[4]</sup>是可逆的,受尿素量的调控。

2. 根据结果换算成含碳量,其中菌体含碳量依 Sperber (1945)分析结果<sup>[8]</sup>,即菌体干重  $\times 0.46 =$  菌体含碳量。正十五烷、二氧化碳和蔗糖根据分子式折算成含碳量。挥发酸按醋酸分子含碳量计。发酵前的碳源为 2% 蔗糖和 4.2% 正十五烷。由此得出碳代谢的平衡如表 3 所示,并从平衡表看出尿素用量的变化是怎样调节碳代谢的。

3. 本文结果(四)和表 3 指出,0.3% 尿素发酵液中含碳代谢物(去菌体、烷烃和挥

发成分)较适量尿素(0.1%)少三分之一左右的原因是菌体增殖和释出大量二氧化碳之故。前文(II)报道<sup>[9]</sup>亦指出在尿素用量大于 0.1% 时,酵母的  $\beta$  氧化酶系活力、三羧酸循环及乙醛酸循环均显著增强。因此我们认为,在过量尿素条件下,酵母 NP<sub>CO</sub>N<sub>22</sub> 对正十五烷的同化能力提高了,酵母菌体不断增殖并释出大量二氧化碳,所以长链二元酸大大减少。

4. 从图 1 指明过量尿素(0.3%)的发酵过程磷的消耗明显大于适量尿素(0.1%)发酵以及图 3、图 4 所示过量尿素发酵有较高的氧吸收和二氧化碳呼出的结果,都是过量尿素条件下酵母对烷烃氧化能力加强以及菌体不断增殖的佐证。

5. 沈永强等(1979)<sup>[11]</sup>及焦瑞身等(1981)<sup>[12]</sup>的报道中认为尿素主要不以氨的形式起调节长链二元酸合成的作用。楼纯菊等(1981)<sup>[13]</sup>报道过量尿素对  $\beta$ -氧化酶

表 3 不同量尿素发酵前后碳代谢的平衡(单位: g/l)

Table 3 Carbon balance in fermentations with different concentration of urea.

尿素量 (%) Urea added (%)	0.1	0.3
酵母菌体干重(含 C 量) Yeast cells dry weight (carbon content)	6.36	10.30
残留 n-C <sub>15</sub> (含 C 量) Residual n-C <sub>15</sub> (carbon content)	0.57	0
发酵液含 C 代谢物(除去菌体、CO <sub>2</sub> 和烷) Carbon content of broth (without cells, CO <sub>2</sub> & n-C <sub>15</sub> )	18.49	12.45
120 小时 CO <sub>2</sub> 总释出量(含 C 量) Carbon dioxide liberated during 120 hours. (carbon content)	9.54	12.04
挥发酸(含 C 量) Volatile acids (carbon content)	0.08	0.09
合计 Total carbon	35.04	34.88
发酵前加入的碳源(含 C 量) Carbon added before fermentation (carbon content)	35.28	35.28

系、三羧酸循环和乙醛酸循环途径的促进, 从而提高了烷烃的降解和利用。与此同时必然有较多的尿素作为氮源被利用。

我们曾以甘氨酸、丙氨酸、丙氨酸和门冬氨酸等代替尿素, 都观察到和尿素相似的调节作用, 有关机制均待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 沈永强等: 植物生理学报, 5(4): 385—393, 1979。  
[2] 焦瑞身等: 植物生理学报, 7(2): 175—183, 1981。

- [3] 沈永强等: 植物生理学报, 5(2): 161—170, 1979。  
[4] 沈永强等: 植物生理学报 5(2): 171—179, 1979。  
[5] Chen, P. S.: *Anal. Chem.*, 28: 1756—1758, 1956。  
[6] Umbreit, W. W. et al.: 检压技术。科学出版社(中译本), 1961。  
[7] Thorn, J. A. & Ping Shu: *Canad. J. of Chem.*, 29: 558—562, 1951。  
[8] Sperber, E.: *Studies in the metabolism of growing Torulopsis utilis under aerobic conditions.* Uppsala. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB.  
[9] 楼纯菊等: 1981年上海生物化学学会年会论文报告。

## REGULATORY EFFECT OF UREA ON THE DETERMINAL OXIDATION OF N-ALKANE WITH *CANDIDA TROPICALIS* TO PRODUCE DICARBOXYLIC ACIDS III. A STUDY ON MICROBIAL GROWTH AND BALANCE OF CARBON METABOLISM

Xu Keren Xia Jie Chiao Ruishen.

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

In this paper, the effects of excessive amount of urea on the utilization of n-alkane, production of dicarboxylic acids and growth of the yeast were studied.

When cultivated with an excess of urea (0.3%), the cell dry weight of polyploid mutant was increased to about 162% of

that of fermentation with 0.1% of urea. Furthermore, in fermentation with an excess of urea (0.3%), the oxygen assimilation and carbon dioxide liberation were much higher than that of fermentation with normal amount of urea.