

## 丙氨酸对热带假丝酵母 NPcoN 22 长链二元酸发酵的调节

周建龙 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

本文研究了丙氨酸对热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) NPcoN 22 长链二元酸发酵的调节, 并把它与尿素的调节作了比较。在蔗糖利用、烷烃利用、菌体生长、发酵液 pH 变化和十四烷-1, 14-二羧酸积累诸方面以及在三羧酸循环、乙醛酸循环、过氧化氢酶等酶的活力方面, 丙氨酸具有与尿素相同的调节作用。丙氨酸加尿素作为混合氮源或在正常发酵过程中补加尿素或丙氨酸, 其调节效果与过量尿素或过量丙氨酸单独存在条件下的情况一样, 说明尿素和丙氨酸的调节作用具有相加效应。发酵过程中菌体对丙氨酸的利用特点表明了丙氨酸是菌体生长的限制因子。 $\beta$ -氧化的抑制剂——丙烯酸能显著提高十四烷-1, 14-二羧酸的积累。

**关键词** 丙氨酸; 热带假丝酵母; 长链二元酸; 代谢调节

热带假丝酵母多倍体变种 NPcoN 22 是热带假丝酵母 79 经多次诱变获得的正烷烃发酵生产长链二元酸的高产菌株<sup>[1,2]</sup>。尿素、精氨酸、丙氨酸等对这株菌长链二元酸发酵有调节作用<sup>[3]</sup>。而铵盐(如氯化铵、硫酸铵等)无调节作用<sup>[3,4]</sup>, 因此这种调节看来不仅是氮源的问题。尿素影响着烷烃在细胞内的代谢去向<sup>[4]</sup>, 也影响着细胞色素 P-450 及羟基化酶的活力和其它有关酶的活力<sup>[5,6]</sup>, 尿素还影响细胞的超微结构<sup>[7]</sup>。总之, 尿素对长链二元酸发酵的调节已作过一些研究, 但其调节作用的机理仍不清楚。国际上尿素调节微生物生理生化代谢未见报道。本文从比较研究的角度, 探讨了丙氨酸存在下热带假丝酵母 NPcoN 22 长链二元酸发酵过程中的几项生理指标和酶活力的消长、以及丙氨酸加尿素作为混合氮源对发酵的调节。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌株

热带假丝酵母 NPcoN 22<sup>[1]</sup>。

#### (二) 培养基和培养条件

基本同文献 [1], 实验中有不同之处将在文中说明。

#### (三) 无细胞抽提物和粗酶的制备

取不同时间的发酵液调 pH 8.0, 使二元酸充分溶解, 离心(5000 r/min, 4℃, 20 min), 用生理盐水和磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2)洗净菌体, 用适量的缓冲液悬浮菌体, 在冰浴中超声波破碎细胞(20 Kc, 4℃, 10 min), 离心(条件同上)后的上层清液即为无细胞抽提物和粗酶。

#### (四) 分析方法

1. 发酵液中菌体生长和长链二元酸测定用油度法<sup>[8]</sup>, 波长在 660 毫微米; 正十六烷烃的测定用正己烷抽提法<sup>[9]</sup>; 残留糖的测定用 3, 5-二硝基水杨酸法<sup>[9]</sup>。用 pH 试纸测定 pH。

2. 丙氨酸的测定用氨基酸自动分析仪: 调发酵液 pH 8.0, 定容, 离心(5000 r/min, 4℃, 10 min)用浓盐酸调上清液 pH 3—4, 待二元酸充分沉淀后用滤纸滤掉二元酸, 清液加入等体积

本文于 1986 年 12 月 14 日收到。

本工作得到沈永强、楼纯菊、夏国兴、顾薇玲等同志的关心和帮助, 特此致谢。

的 5% 三氯醋酸溶液, 在 95℃ 的水浴中保温 15 min 以沉淀蛋白质, 再用滤纸过滤, 用 2 mol/L NaOH 调滤液 pH 2.0, 便可进行分析测定。

3. 酶活力测定: 琥珀酸脱氢酶测定<sup>[10]</sup>; L-苹果酸脱氢酶测定<sup>[11]</sup>; 过氧化氢酶测定<sup>[12]</sup>; 谷氨酸脱氢酶测定<sup>[13]</sup>; 异柠檬酸裂解酶测定<sup>[14]</sup>; 蛋白质测定<sup>[15]</sup>。

酶活力定义为在上述酶反应测定条件下, 吸光率改变 0.001 为一个酶活力单位, 比活力是每分钟每毫克蛋白质所改变的吸光率。

## 结 果

### (一) 菌体对丙氨酸的利用

丙氨酸代替尿素作为发酵过程中菌体生长的氮源和长链二元酸积累的调节物质。用含氮量相等于 1.0 和 3.0 mg/ml 尿素的丙氨酸 2.8 和 8.4 mg/ml 分别代替尿素在发酵开始时加入培养液 (本文中其它试验类同, 适量丙氨酸和过量丙氨酸是指这两种不同浓度的丙氨酸条件), 随发酵进

表 1 在十四烷-1, 14-二羧酸发酵过程中丙氨酸的利用  
Table 1 Alanine utilization during DC-16 fermentation

发酵时间 time(h)		0	8	16	24	36	48	72	96
丙氨酸 Ala (mg/ml)	1*	2.688	2.006	0.010	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
	2*	8.341	7.250	3.472	0.054	0.002	0.002	0.000	0.000

1\* 和 2\*: 分别是适量丙氨酸和过量丙氨酸的培养条件

1\* and 2\*: Different cultural conditions of the adequate (2.8mg/ml) and excessive (8.4 mg/ml) amount of Alanine

行测定发酵液中残留丙氨酸, 结果见表 1。

过量丙氨酸条件下丙氨酸利用完毕较适量条件下迟 10 h 左右, 这一点与前者的菌体生长期比后者长 10h 的事实 (见图 1) 相吻合, 它表明了氮源是生长的限制因子。

### (二) 丙氨酸对发酵过程中蔗糖利用、烷烃利用、菌体生长、长链二元酸积累和发酵液 pH 变化的影响

在具有调节作用的氨基酸中选择了丙氨酸作为进一步研究长链二元酸发酵调节机理的代表, 测定了过量和适量丙氨酸条件下发酵过程中的上述五项生理指标的变化, 并将它们与相应条件下尿素对这几项指标的影响作了比较, 结果见图 1。

在发酵 48h 起每隔 24h 调发酵液 pH 7.5, 不同丙氨酸条件下的发酵液 pH 变化和每天调 pH 时氢氧化钠溶液的消耗量也不同, 发酵中后期尽管适量丙氨酸条件下

的发酵液中存在大量十四烷-1, 14-二羧酸, 但其 pH 变化幅度比几乎没有长链二元酸的发酵液 (过量丙氨酸条件下) 的变化幅度小, 调 pH 所耗用的氢氧化钠溶液也少。不同量丙氨酸对菌体利用蔗糖和烷烃的影响无明显不同, 发酵进行到 24h 时, 蔗糖已测不出, 但发酵液中始终存在少量的还原糖 (0.25 mg/ml)。

尿素对这些生理指标的影响与丙氨酸完全一样 (图 1)。

### (三) 丙氨酸对发酵过量中菌体内三羧酸循环、乙醛酸循环、过氧化氢酶和谷氨酸脱氢酶活力的影响

取不同发酵时期的菌体, 洗净后制成无细胞抽提物和粗酶, 测定了适量和过量丙氨酸条件下菌体内一些与基础代谢有关的酶活力, 并把它们与不同尿素条件下的相应的酶活力作了比较。

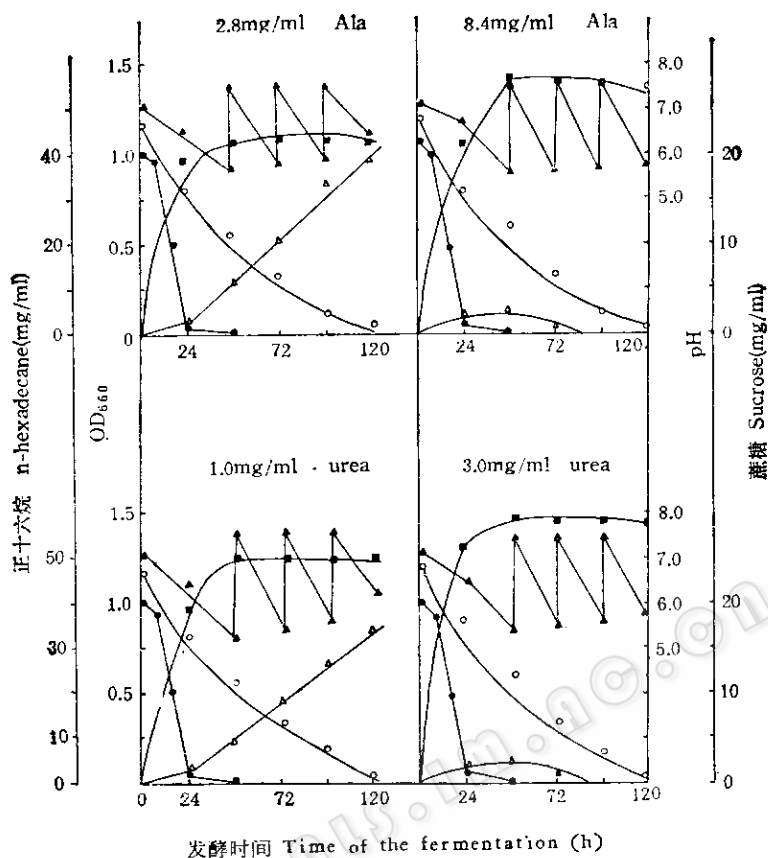


图 1 不同量尿素或丙氨酸条件下长链二元酸发酵过程中的五项生理指标

Fig. 1 Five physiological parameters during long-chain dicarboxylic acid fermentation under different amount of Ala and urea

●——● 蔗糖 Sucrose ○——○ 正十六烷 n-hexadecane △——△ 十四烷-1,14-二羧酸 DC-16  
■——■ 细胞生长 Cell growth ▲——▲ pH 变化 pH evolution

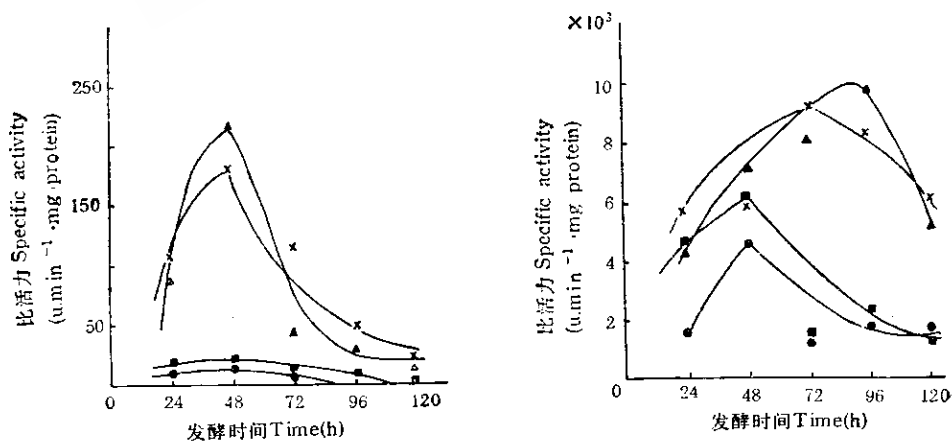


图 2 丙氨酸和尿素对琥珀酸脱氢酶(左)和 L-苹果酸脱氢酶(右)的影响

Fig. 2 Effect of urea and Ala on succinate dehydrogenase (left) and L-malate dehydrogenase (right)

×——× 8.4mg/ml Ala ●——● 2.8mg/ml Ala ▲——▲ 3.0mg/ml urea  
■——■ 1.0mg/ml urea

1. 过量丙氨酸对琥珀酸脱氢酶和 L-苹果酸脱氢酶活力的影响: 结果见图 2。

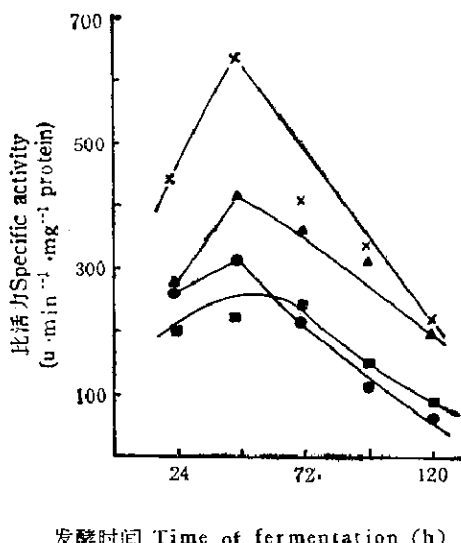
2. 过量丙氨酸对异柠檬酸裂解酶活力的影响: 测定了不同条件下这个酶的活力,结果见图 3。

3. 过量丙氨酸对过氧化氢酶活力的影响: 发酵过程中不同条件下过氧化氢酶活力的消长见图 4 (左)。

4. 过量丙氨酸对谷氨酸脱氢酶活力的影响: 测定了不同条件下发酵过程中这个酶的活力,结果见图 4 (右)。

### (四) 丙氨酸和尿素调节长链二元酸发酵的关系

1. 添加丙氨酸或尿素对适量尿素或丙氨酸条件下长链二元酸发酵的影响: 在适量丙氨酸或适量尿素条件下十四烷-1,14-二羧酸发酵的不同时间添加一定量的尿素或丙氨酸 (使发酵液中的总氮量与过量丙



发酵时间 Time of fermentation (h)  
图 3 丙氨酸和尿素对异柠檬酸裂解酶的影响  
Fig. 3 Effect of Ala and urea on isocitrate lyase

×——× 8.4mg/ml Ala ●——● 2.8mg/ml Ala  
▲——▲ 3.0mg/ml urea ■——■ 1.0mg/ml urea

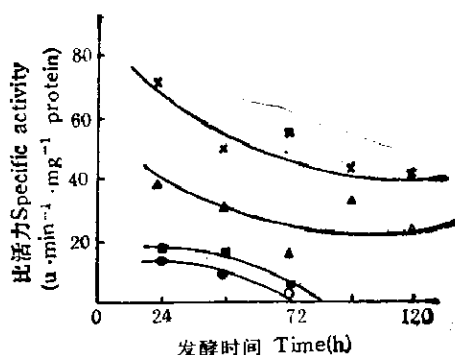
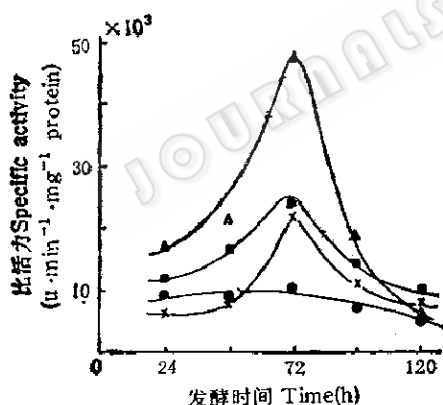


图 4 丙氨酸和尿素对过氧化氢酶和谷氨酸脱氢酶的影响

Fig. 4 Effect of Ala and urea on the catalase and glutamate dehydrogenase  
×——× 8.4mg/ml Ala ●——● 2.8mg/ml Ala ▲——▲ 3.0mg/ml urea  
■——■ 1.0mg/ml urea

氨酸的含氮量相等),再测定发酵过程中十四烷-1,14-二羧酸量的变化,结果见图 5。

实验表明: 添加尿素或丙氨酸能显著地减少长链二元酸的积累,降低其产量。

2. 丙氨酸加尿素的混合氮源对长链二

元酸发酵的影响: 丙氨酸和尿素按含氮量相等的原则加在一起作为混合氮源以同 1.0 和 2.0 mg/ml 尿素含氮量相等的浓度分别加入发酵液,观察混合氮源对发酵的影响,结果见图 6。

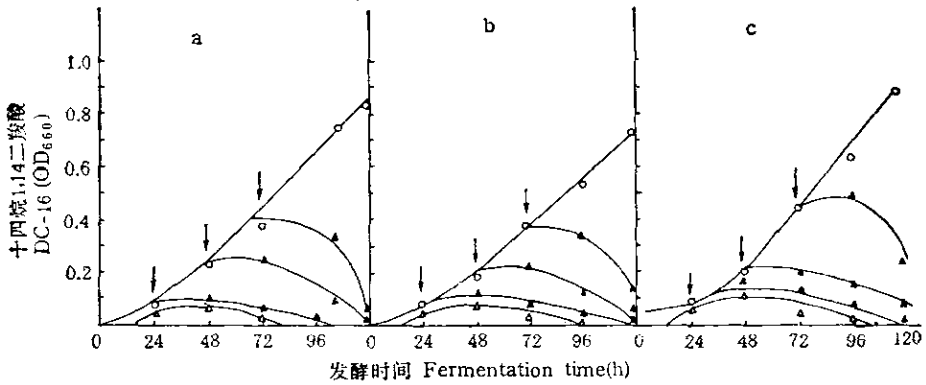


图 5 发酵过程中补加丙氨酸或尿素对十四烷-1, 14-二羧酸积累的影响

Fig. 5 Effect of adding Ala or urea on DC-16 accumulation during the fermentation

箭头处为添加丙氨酸或尿素 (at the arrows, adding Ala or urea)

- a. 在适量丙氨酸条件的发酵中添加丙氨酸 (左图)  
Adding Ala in the fermentation liquid under 2.8mg/ml Ala
  - b. 在适量尿素条件的发酵中添加尿素  
Adding urea in the fermentation liquid under 1.0 mg/ml urea
  - c. 在适量尿素条件的发酵中添加丙氨酸  
Adding Ala in the fermentation liquid under 1.0 mg/ml urea
- 1.0mg/ml urea or 2.8 mg/ml Ala    △——△ 3.0mg/ml urea or 8.4 mg/ml Ala    ▲——▲ adding urea or Ala

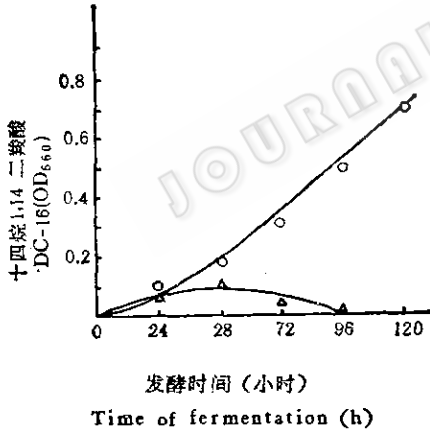


图 6 混合氮源对长链二元酸发酵的影响

Fig. 6 Effect of the mixed N-compounds on DC-16 fermentation

- 0.5mg/ml urea + 1.4 mg/ml Ala  
△——△ 1.0mg/ml urea + 2.8mg/ml Ala

### (五) 丙烯酸对长链二元酸发酵的影响

在过量尿素或过量丙氨酸条件下的发酵零和 48h, 分别加入丙烯酸, 使之在发酵液中的浓度为 1.5 mg/ml, 发酵进行到 96 h 取样测定十四烷-1, 14-二羧酸(以  $OD_{660}$

表 2 丙烯酸对十四烷-1, 14-二羧酸发酵的影响

Table 2 Effect of acrylate on DC-16 fermentation

发酵条件 Condition	过量丙氨酸 (8.4mg/ml Ala)		
	对照 Control	丙烯酸 Acrylate	丙烯酸* Acrylate*
十四烷-1,14-二羧酸 DC-16 ( $OD_{660}$ )	0.02	0.21	0.17

发酵条件 Condition	过量尿素 (3.0 mg/ml urea)		
	对 照 Control	丙烯酸 Acrylate	丙烯酸* Acrylate*
十四烷-1,14-二羧酸 DC-16 ( $OD_{660}$ )	0.02	0.17	0.15

\* 在 48h 的发酵液中加入丙烯酸, 使之总浓度为 1.5 mg/ml

\* Adding acrylate to 48 h fermentation, the final conc. of acrylate in the medium is 1.5 mg/ml

对照: 不加丙烯酸

Control: No acrylate

表示)结果见表2。

若丙烯酸在发酵液中的浓度超过2.0 mg/ml,则抑制菌体生长。另有试验表明丙烯酸对适量丙氨酸或适量尿素条件下长链二元酸发酵没有显著影响。

## 讨 论

本文从比较研究的角度探讨了丙氨酸和尿素对热带假丝酵母 NPcoN22 正烷烃发酵生产长链二元酸的调节。过量尿素和过量丙氨酸对于发酵过程中蔗糖利用、烷烃利用、菌体生长、十四烷-1,14-二羧酸的消长、pH变化以及三羧酸循环、乙醛酸循环、过氧化氢酶、谷氨酸脱氢酶等酶活力消长的影响完全一致。过量条件下菌体内基础代谢比适量尿素和适量丙氨酸条件下更活跃,说明前者菌体内长链烷烃主要由高活力的 $\beta$ -氧化生成短链一元酸或二元酸。 $\beta$ -氧化的抑制剂——丙烯酸抑制高活力的脂肪酸分解酶系从而显著提高了长链二元酸的积累,这一事实支持了上面的推断。

在适量尿素或适量丙氨酸条件下的长链二元酸发酵过程中,添加丙氨酸或尿素均能大大降低十四烷-1,14-二羧酸的积累并使已经形成且分泌到发酵液中的长链二元酸分解,这说明中途补加丙氨酸或尿素也能提高长链二元酸分解酶系的活力,调节效果很快出现。调节物质一次加入或分批加入,其效果相似。

丙氨酸加尿素的混合氮源对长链二元酸发酵的调节与尿素或丙氨酸单独存在时的情况一样,两者的调节效果具有相加效应,这可以推测为两者的调节部位是一致的,或至少也有部分重叠。但考虑到尿素和丙氨酸的分子结构不同,并且过量尿素或丙氨酸条件下菌体内丙氨酸、天冬氨酸的量也无明显异常,而精氨酸的含量很高,并且对长链二元酸发酵的调节更为强烈,因此也可能丙氨酸、尿素、天冬氨酸等都不是起调节作用的直接因子,而是通过影响其它中间调节物(如精氨酸)来完成对长链二元酸发酵的调节作用。

## 参 考 文 献

- [1] 沈永强等:植物生理学报,5: 161—170,1979a.
- [2] 沈永强等:植物生理学报,5: 171—179,1979b.
- [3] 沈永强等:植物生理学报,5: 385—393,1979c.
- [4] 焦瑞身等:植物生理学报,7: 49—56,1981.
- [5] 楼纯菊等:生物化学与生物物理学报,15: 463—467,1983.
- [6] 包慧中、焦瑞身:真菌学报,3: 45—53,1984.
- [7] 吴经纶等:实验生物学报,13: 389—401,1980.
- [8] 徐可仁等:微生物学报,23: 63—67,1983.
- [9] Miller, G. L.: *Anal. Chem.*, 31: 426, 1959.
- [10] Ellis, H. A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 85: 561, 1959.
- [11] Thorne, C. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 59: 624, 1962.
- [12] Roggenkamp, R. et al.: *FEBS Letter*, 41: 283, 1974.
- [13] Harold, J. S.: *Methods in Enzymology*, 2: 220, 1955.
- [14] Dixon, G. H. et al.: *Biochem. J.*, 72: 3p, 1959.
- [15] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.

## THE REGULATION OF ALANINE ON THE FERMENTATION OF LONG-CHAIN DICARBOXYLIC ACIDS IN *CANDIDA TROPICALIS* NPcoN22

Zhou Jianlong Chiao Juishen

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

The regulation of Ala and urea on the fermentation of longchain dicarboxylic acids in *Candida tropicalis* was investigated, from the viewpoint of the comparative studies. The DC-16 is much lower, the biomass, succinate dehydrogenase, L-malate dehydrogenase, isocitrate lyase, catalase, glutamate dehydrogenase are higher under the excessive amount of urea (3.0 mg/ml) or Ala (8.4 mg/ml) than those under the adequate amount of urea (1.0 mg/ml) or Ala (2.8 mg/ml). The different amount of urea and Ala has no influence on the utilization of sucrose or n-hexadecane. The effects of the mixed nitrogen containing compounds of urea and Ala on DC-16 fermentation are same as those of Ala or urea alone. On DC-16 accumulation, ad-

ding urea or Ala in the fermentation under adequate urea and Ala has almost same effects as the fermentation under excessive urea and Ala. These results show that the regulation of Ala and urea has the additive effect. Acrylate, the inhibitor of  $\beta$ -oxidation of fatty acids, can increase DC-16 accumulation in the medium. The mechanism of the regulation of urea and Ala on the fermentation of long-chain dicarboxylic acids was postulated. The regulatory factors: urea, Ala, Asp and the likes, exert their regulation probably via other modulators such as Arg.

### Key words

Alanine; *Candida tropicalis*; Long-chain dicarboxylic acids; Metabolic regulation