

# 玉米粉及續加葡萄糖代替乳糖發酵青黴素

虞 悝 汪 靚 余爾穀 包德熾  
官希玲 許文思 童 村

(化學工業部第三製藥廠)

青黴素發酵所用的碳源, 至今被認為乳糖最佳, 因為它在產生青黴素的階段中, 能緩慢而又均勻地被利用, 且不會很快地用於菌絲生長, 能使產生青黴期延長。惟乳糖來源終歸有限, 價值亦昂, 自然要用其他糖類代替。有關乳糖代用品的研究已有很多記載<sup>[1-9]</sup>。其中比較切合實際的, 當推 Johnson 氏的連續添加葡萄糖以維持青黴菌在發酵過程中半飢餓狀態的方法<sup>[1]</sup>。惟能否用於大規模生產, 尚無所聞。我們認為在青黴素發酵過程中, 完全用連續加葡萄糖作為碳源是不必需的。因此就在培養基中加 4.0% 白玉米粉作為一部分碳源, 待澱粉將趨用盡時, 即分期續添加葡萄糖以至發酵終了。本文將研究結果報導出來。

## 材 料 和 方 法

使用菌種為 *P. chrysogenum* P1001 C<sub>2</sub>\*。發酵培養基主要成分由玉米粉花生粉組成; 花生粉用量為 3.6%, 滅菌後 pH 6.3—6.6。種子由二級種子培養或發酵過程中的菌絲供給, 接種量為 7—10%。發酵缶為鐵製伍式(Waldhof type), 容量 5000 公升。發酵過程間保持缶溫在 27.5°C。前體為苯醋酸鈉, 用量 0.175%。葡萄糖(工業用)每隔 2 小時用人工添加。青黴素效價於接種後 32 小時開始用碘滴定法; 測定糖分析用 Somogyi 法可溶性多醣, 以測定水解後之還原糖計算。

## 試 驗 結 果

在 3.6% 花生粉培養基中, 以 4% 玉米粉為基礎碳源。培養基滅菌後, 可溶性多醣為 1.6—2.8% 不等, 其中還原糖量不超過 0.5%。在我們的條件下, 菌絲生長情況與含乳糖培養基相似, 僅在生長期菌絲略短。培養至 24 小時後, 由於菌絲已產生較多的澱粉酶, 有時可得到還原糖的增加[見圖 1a—d 及圖 2a, b]。

依照鏡檢菌絲形態來控制加糖, 不僅可以決定最合適的加糖開始時間, 而且可以消除因接種量略有出入而造成的產量波動。用不染色的標本作鏡檢時, 發現當菌絲中顆粒狀貯藏物質消失, 原形質已呈均勻以密集的中小空泡為主時, 即達半飢餓狀態, 可以開始加糖。有時菌絲中少量顆粒狀貯藏物質還未消失, 但大部分菌絲已有密集排列的中小空泡,

1958 年 1 月 28 日收到。

\* 從 P1001 菌株生產過程中分離而得。

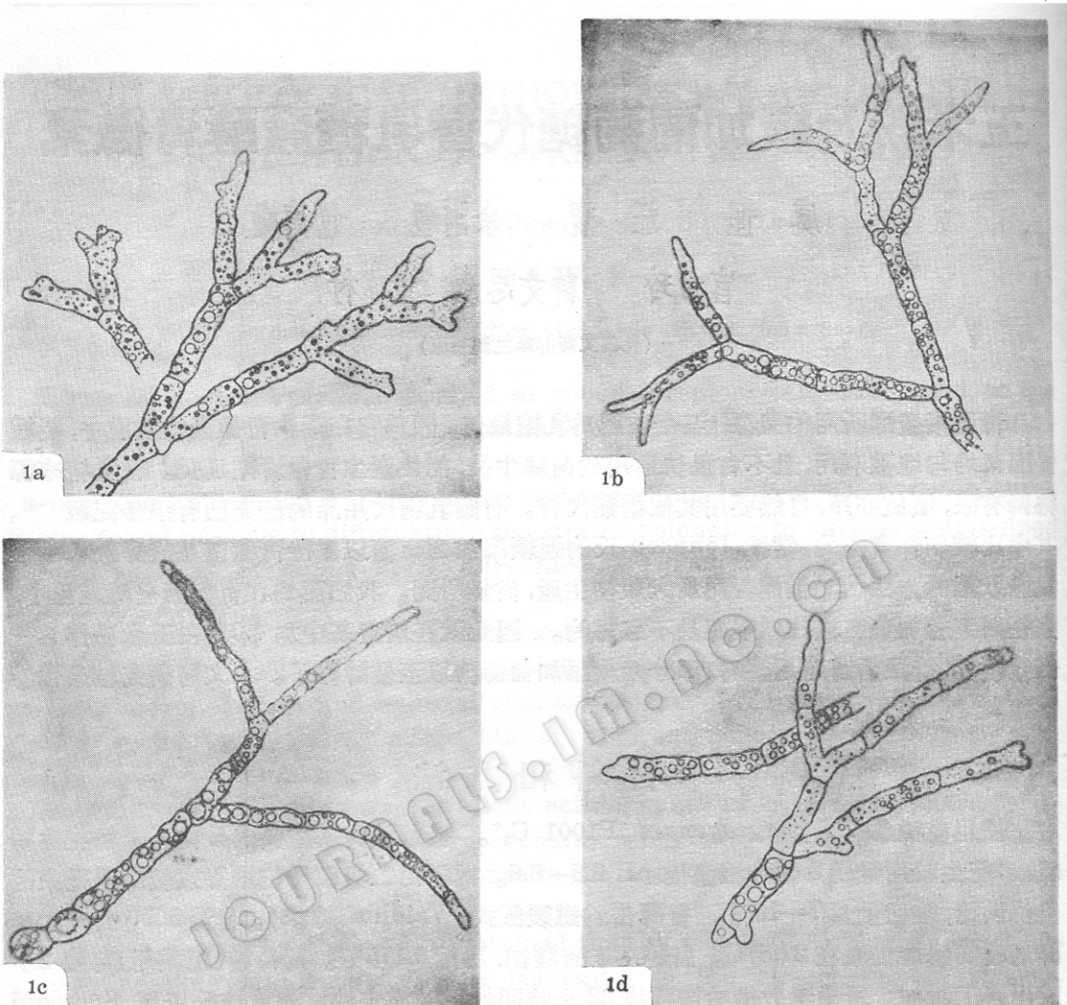


圖 1. 4% 玉米粉作碳源, 3.6% 花生粉作有機氮源時, 生長時期的菌絲形態(根據 25×45 繪製)及青黴素分泌最高時期以前的菌絲形態(以 54303 為例)

- a. 培養 16 小時 菌絲長約 220 $\mu$  左右, 直徑 6.1 $\mu$  左右, 菌絲中充滿着顆粒狀貯藏物質。
- b. 培養 24 小時 菌絲長約 160—210 $\mu$ , 直徑 6.1 $\mu$  左右  
菌絲生長旺盛具有顆粒狀貯藏物質及小空泡略有少數中空泡。
- c. 培養 32 小時 菌絲長約 110 $\mu$ , 直徑 6.1—7.2 $\mu$   
菌絲繼續生長, 但呈中小空泡型, 仍有顆粒狀貯藏物質出現不少膨大細胞培養液中可溶性多糖 0.95%。
- d. 培養 40 小時 菌絲長約 110 $\mu$ , 直徑 4.9 $\mu$  左右, 菌絲呈小空泡型尚殘留小顆粒狀之貯藏物質培養液中可溶性多糖 0.39%。  
青黴素效價 1493 u/ml。

且有相當比例的中空泡甚至有的空泡直徑已與細胞直徑相接近, 此時亦可開始加糖。在這個培養條件下, 加糖開始時間一般在接種後 38—44 小時, 而培養至 40 小時可溶性多糖在 0.1—0.8% 不等。加糖開始後, 隨時進行菌絲形態檢查, 使菌絲形態維持在下列情況: (1)全部是密集排列的中小空泡; (2)中空泡為主但間距不密或略有極少數大空泡; (3)介於兩者之間。當菌絲形態從密集排列的中小空泡轉到中空泡比例有增加的趨勢, 或發現少數大空泡時, 應該適當增加加糖率。在菌絲形態以中空泡為主而略有大空泡, 雖在短時

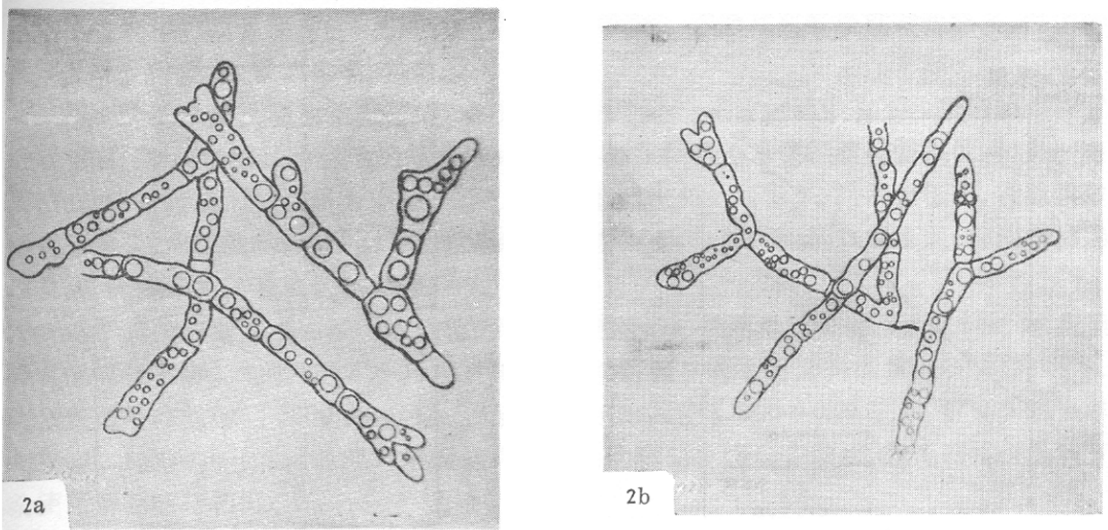


圖 2. 以 3.6% 花生粉作有機氮源, 碳源為 4% 及續加葡萄糖時青黴素分泌旺盛時期的菌絲形態——菌絲中無顆粒貯藏物質, 呈密集排列的中小空泡型  
 a. 培養 48 小時 菌絲長約  $110\mu$ , 直徑  $4.9\mu$  左右  
 b. 培養 56 小時 菌絲長以  $86-110\mu$  為主, 直徑  $4.9\mu$  左右  
 從 48—56 小時內青黴素增長率  $82 \text{ u/ml/hr}$

期內加糖稍多亦無害處。相反的, 如形態較為年輕, 以減少加糖率為宜; 若加糖過多, 則菌絲頂端出現很多芽狀分枝, 呈生長狀態。因此在續加葡萄糖時期內加糖率的變化, 一定要與菌絲形態的變化相適應。一般加糖率為每小時  $0.04-0.08\%$ 。最佳的情況下, 在添加葡萄糖的時期內, 青黴素的增長率 ( $\text{u/ml/hr}$ ) 與乳糖培養基中的情況相接近, 甚至相等。在 68 小時內, 最高達到  $3850 \text{ u/ml}$ , 一般可以達到  $3300-3600 \text{ u/ml}$ 。與乳糖培養基比較, 48 小時以前的青黴素效價 ( $\text{u/ml}$ ) 相等, 48 小時後青黴素的增長率則較用乳糖時略低。故在相同的發酵時間內, 用玉米粉及葡萄糖作碳源所得青黴素的產量較低 (詳見表 1, 表 2 及圖 3)。

表 1 3.6% 花生粉培養基中玉米粉及續加葡萄糖與乳糖的比較

培 養 基 碳 源	u/ml						發酵時間	各批內發 酵單位變 化範圍	試驗 批數
	32	40	48	56	64	發酵終了			
1.5%玉米粉續加葡萄糖	1298	1986	2488	2854		3336	63—66	3203—3451	3
4.0%玉米粉續加葡萄糖	1406	1911	2462	3135	3600	3703	66—68	3610—3852	10
乳 糖	903	1524	2377	3154	3734	3919	±68	3834—4011	10
6%玉米粉	—	—	1769	2206	2643	2890	70	2727—2936	3

表 2 以玉米粉及續加葡萄糖作碳源時青黴素的增長率與用乳糖時的增長率比較

培 養 基 碳 源	青 黴 素 增 長 率 ( $\text{u/ml/hr}$ )								
	40—48 小時			48—56 小時			56—64 小時		
	最 高	最 低	平 均	最 高	最 低	平 均	最 高	最 低	平 均
4% 玉米粉續加葡萄糖	93	22	69	112	70	84	86	53	58
乳 糖	114	84	107	126	71	97	90	31	72
6% 玉米粉						54			55

青黴素效價  
u/ml

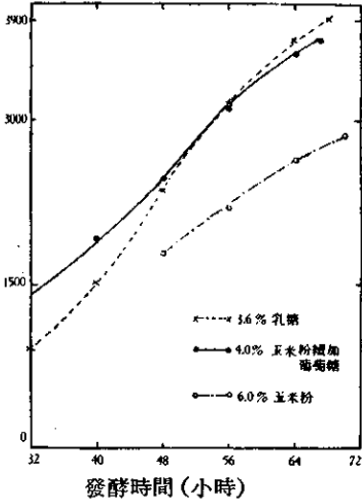


圖 3. 花生粉培養基中用不同的碳源發酵時青黴素效價的增長情況 (P1001 菌株)

青黴素效價  
u/ml

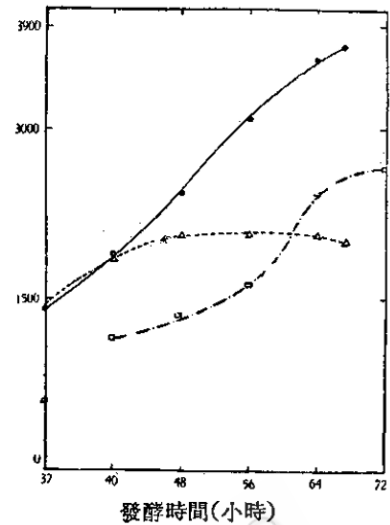
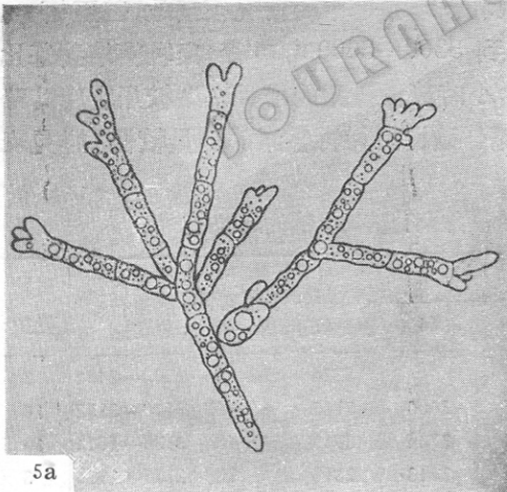
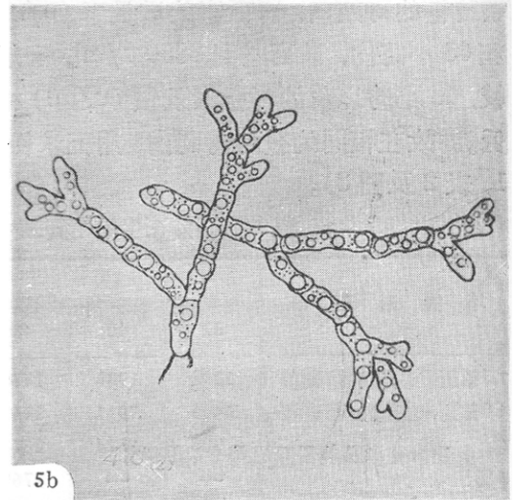


圖 4. 以 3.6% 花生粉及 4.0% 玉米粉為主的培養基中葡萄糖的添加與青黴素效價增長的關係

- 適當的開始加糖時間及加糖率的幅度 (接種後 42 小時左右加糖, 加糖率 0.04—0.08%/小時)
- △——△ 加糖不足及加糖過晚 (接種後 42.5 小時加糖, 加糖率 0.04%/小時)
- 加糖時菌絲中殘留着顆粒狀貯藏物質 (接種後 47 小時加糖, 加糖率 0.04—0.08%/小時) P1001



5a



5b

圖 5. 以 3.6% 花生粉作有機氮源以玉米粉為唯一的碳源時產青黴素期的菌絲形態

- a. 培養 48 小時 中小空泡型的菌絲中殘留着顆粒狀貯藏物質
  - b. 培養 56 小時 中小空泡及大中空泡型的菌絲中殘留着顆粒狀貯藏物質
- 48—56 小時內青黴素增長率低

單用玉米粉作青黴素發酵碳源所得效果不顯著。在培養至 56 小時以前, 菌絲中顆粒狀貯藏物質始終存在 (圖 5)。雖然在 56 小時以後, 顆粒狀貯藏物質逐漸減少, 但至培養終了菌絲依舊殘留顆粒狀物質, 從未發現有在玉米粉及續加葡萄糖時所呈現的產青黴素最佳的菌絲形態。並在玉米粉用量少於 5.5% 時 56 小時後, 總糖幾乎不變, 而效價不高,

說明了可利用的碳源缺少。若玉米粉用量多於 5.5%，雖然在發酵後期碳源略多，但由於前期菌絲長得更濃，效價也不高。

用 4% 玉米粉及續加葡萄糖時，如在一開始即加糖，正值菌絲中有不少殘留的顆粒狀貯藏物質，則於加糖後青黴素的增長率即不佳，直至發酵終了青黴素產量很低。另一方面，在加糖時菌絲形態已呈大中空泡，而加糖後始終使用 0.04%/小時的加糖率，青黴素效價幾不增長，培養液轉稀。由於加糖過晚及加糖量不足，可利用的碳源不足，促使菌絲過早自溶，青黴素的產量更低（詳見圖 4）。

爲了減少培養基中固體物質佔位的缺點，將玉米粉的用量逐漸減少到 1.5%，花生粉及其他成分不變。加糖於 28 小時左右開始，雖然將續加葡萄糖時間延長，在相同時間內，青黴素產量亦能達到 3300 u/ml 以上（表 1），加糖率則爲 0.06—0.08%，可溶性多醣很早就用盡。加糖的開始時間亦早，培養過程間添加的葡萄糖總量亦增加，故此種情況已與完全使用葡萄糖時相似。

## 討 論

Johnson 氏等利用葡萄糖的連續添加法使產青黴素期的菌絲保持在半飢餓狀態，此時培養液的 pH 變化，依加糖率而異。爲了將培養液的 pH 值控制在青黴素產生的最適當範圍內，須用 pH 自動控制及記錄等設備。我們用鏡檢菌絲形態來掌握加糖時間及控制加糖量，不僅解決了缺乏 pH 自動控制及記錄設備的困難，而且可以迅速獲得發酵情況，指出添加葡萄糖時與青黴素產生有關的生理狀態的標誌，可以使添加的葡萄糖起了恰到好處的作用。另一方面，依照我們的經驗，最適當的 pH 範圍，不一定是產生青黴素的絕對因素，而 pH 又不能很正確地表現出菌絲的半飢餓狀態，這更使我們感覺到鏡檢菌絲是較爲有利的。

有關以葡萄糖代乳糖發酵青黴素的文獻，都是以玉米漿作爲青黴素發酵的有機氮源。由於我們一向用花生餅粉作爲發酵氮源，所以這項試驗是在花生粉培養基中進行的。結果早已指出，青黴素發酵可以不用玉米漿作有機氮源，而乳糖也同樣可以用玉米粉及間歇添加葡萄糖的方法替代。而在發酵過程中，菌絲的生長期結束後，迅速轉入產青黴素期，在 68 小時內足夠滿足青黴素發酵工業所需的各種要求。在最佳的情況下，青黴素的增長率達到 90—100 u/ml/hr。這個速率與用乳糖作碳源無何區別，也能在同樣時間內使青黴素的產量達到最高峯，說明葡萄糖在間歇加入後起的效用是與乳糖相同的。

張爲申氏等（待發表）於 1956 年在 1500 公升試驗缶中，用 2.5% 花生粉、5% 玉米粉培養基發酵 72 小時，青黴素產量爲 2621—2899 u/ml。某些批號延長時間至 87 小時能達 3300—3400 u/ml，與我們在 5000 公升缶中用 6% 玉米粉發酵 70 小時獲得 2727—2936 u/ml 的結果相符。因爲我們能於比較短的發酵時間內獲得最高單位，又爲了便於管理我們一向是用 72 小時作爲發酵週期的，因此在這項試驗中，就未在延長發酵時間上作更進一步的研究。

用玉米粉及續加葡萄糖代替乳糖時，在添加葡萄糖前已具有較高的青黴素增長率，可使葡萄糖加料時間縮短至 24 小時左右，有利於大規模生產。此外鐵製發酵缶在初用或遭受腐蝕時，在花生粉培養液中鐵含量增加，影響青黴素產量。採用含有玉米粉培養基，在

一定的鐵含量範圍內,可使此種影響減少,甚至不顯。另一方面則因玉米粉經過煮沸黏度增加,有利於泡沫的控制;但不利之處為固體量增加,影響濾液產量。我們認為再經進一步的研究,以玉米粉續加葡萄糖代乳糖發酵青黴素,是可以提高產量的。

## 結 論

(1) 在花生粉培養基中,以玉米粉及續加葡萄糖代替乳糖發酵青黴素時,依照菌絲形態鏡檢控制加糖開始的時間與加糖率,能使菌絲倚持在半飢餓狀態 68 小時左右中的發酵週期中,葡萄糖在 42 小時左右添加加糖率 0.04—0.08% / 小時青黴素的產量達到 3300—3600 u/ml, 最高 3850 u/ml。在相同的 68 小時左右的發酵週期內,青黴素的發酵單位較用玉米粉為唯一的碳源時提高 28.13%,較乳糖低 5.52%。但因用 4% 玉米粉時,過濾收率較乳糖稍低,故使青黴素的總產量較乳糖發酵時降低 10.98%,但成本則較使用乳糖時降低 4.17%。

(2) 菌絲形態鏡檢的控制可以應用於代替乳糖發酵青黴素的工作中而獲得良好的效果。

## 參 考 文 獻

- [1] Hosler, P. and Johnson, M. J.: *J. E. C.* **45**: 871—874, 1953.
- [2] Saltero, F. V. and Johnson, M. J.: *Appl. Microbiol.* **1**: 52—57, 1953.
- [3] Saltero, F. V. and Johnson, M. J.: *Appl. Microbiol.* **2**: 41—44, 1954.
- [4] 野口祐一等:日本農藝化學會誌 **29**: 707—711, 1955; **30**: 45—50, 163—166, 1956.
- [5] Rolinson, G. N. and Lumb, M. J. *Gen. Microbiol.* **3**: 265, 1956.
- [6] 大瀧虎男等:日本青黴素雜誌 **1**: (4) 205—208, 1948.
- [7] 張為申等:全蘇第二次抗生素會議發表, 1956.
- [8] 張為申等:微生物學報, **4**: 127—136, 1956.
- [9] Беккер, З. Э., Смирнова, А. Д. и Михеев, Н. С., *Антибиотики* **2**: (1) 29—33, 1957.

## THE USE OF CORN STARCH AND INTERRUPTED ADDITION OF GLUCOSE IN THE PRODUCTION OF PENICILLIN

YU, L., WANG, G., YU, R. K., PAO, T. H., KUAN, H. C.,

Hsu, W. S. and Tung, T.

(No. 3 Pharmaceutical Factory, Ministry of Chemical Engineering, Shanghai)

Hitherto, in the production of penicillin, lactose is being extensively employed and is considered to be the best source of carbon. However, in view of the present limited supply of lactose, search has been made for some substitutes which could replace lactose. We have experimented with Johnson's method of interrupted addition of glucose in a basic medium which contains starch and which has been routinely employed in our penicillin production; and we have, in addition, employed the morphological appearance of the mycelial growth as indications for the addition of glucose. The results have been fairly satisfactory, as the yield was only about 11% less than the conventional method, while more than 4% of economy could be effected.