

## pH 與碳源對 *Penicillium chrysogenum* 發酵生產青黴素 V 之影響

陳惠婷 余世宗\* 涂瑞澤  
大葉大學食品工程學系  
\*大葉大學環境工程學系  
彰化縣大村鄉山腳路 112 號

### 摘 要

本實驗以 *Penicillium chrysogenum* (ATCC 28089) 進行振盪培養，探討起始 pH 值與不同碳源對菌體生長及生產青黴素之影響。結果顯示，起始 pH 值為 6.5 時菌體濃度最高，青黴素產量也最高，可達 0.15 g/L。在起始 pH 值 6.5 且葡萄糖為碳源時，青黴素 V 產量最多；蔗糖為碳源時，青黴素 V 的產量與葡萄糖相差不多；而乳糖為碳源時，青黴素 V 的產量較少。因此，*P. chrysogenum* 生產青黴素 V 的最適起始 pH 值為 6.5 和以葡萄糖為碳源。

**關鍵詞：***penicillium chrysogenum*，青黴素 V，振盪培養，起始 pH 值，碳源

## The Effect of pH and Carbon Sources on the Production of Penicillin V by *Penicillium chrysogenum*

HUI-TING CHEN, SHIH-TSUNG YU\* and JUI-RZE TOO

*Department of Food Engineering, Da-Yeh University*

*\*Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University*

*112 Shan-Jiau Rd., Da-Tsuen, Changhua, Taiwan*

### ABSTRACT

In this study a strain of *Penicillium chrysogenum* (ATCC 28089) was used to produce penicillin V. The effect of initial pH values and different carbon sources on penicillin V production was explored. The culture having the highest penicillin V production, reached 0.15 g/L under an initial pH value of 6.5. The experimental results also indicated that glucose is better than sucrose or lactose as a carbon source for producing biomass and penicillin V. Therefore, pH 6.5 and glucose were the best combined conditions for the flask culture.

**Key Words:** *penicillium chrysogenum*, penicillin V, shaker flask culture, initial pH value, carbon source



## 一、前言

自從 1929 年佛萊明發現了青黴素之後，直到目前為止，抗生素仍然被廣泛的研究與使用。1995 至 1997 年之間，抗生素在國內原料藥中的產值至少占了六成以上 [4]，可見抗生素在國內的原料藥有極重要的地位。以目前最大之市場調查機構 DSM(Direct Stock Market)預估，青黴素將以 4~6% 之年平均成長率穩定的增加 [1]。

青黴素屬於微生物的二次代謝產物，具有抑菌作用，是因其中的  $\beta$ -內酯環能夠抑制細菌細胞壁之交聯，使細菌無法抵抗水的滲透壓，造成細胞破裂與細胞質溶出。青黴素依其所結合的側鏈不同可分為天然型青黴素、半合成青黴素及生合成青黴素 [5]，各有不同的構造與特性，而生合成青黴素中的青黴素 V 具有對酸安定的特性，適用於口服藥劑之調製。

雖然青黴素之研究已行之有年，但由於病菌不斷發展出新的抗藥性，而且某些革蘭氏陰性菌所引起之嚴重感染有增加的趨勢，所以尋求新的抗生素仍是重要的課題，因此，青黴素的研究發展未來仍是非常樂觀的 [3]。

本實驗以 *Penicillium chrysogenum* (ATCC 28089) 進行振盪培養生產青黴素 V，首先探討起始 pH 值 (6.0、6.5 及 7.0) 對此菌株生長之影響及不同的碳源 (葡萄糖、蔗糖及乳糖) 與此菌株生產青黴素 V 之關係。培養過程中並進行各項分析 (如菌體、醣類及硫酸銨等濃度)，以了解在振盪培養過程中各成分之變化情形及與青黴素 V 產量之關係。期望將振盪培養之最適條件用於實驗室之小型發酵槽的批次培養，以進一步探討菌體生長、代謝情況及青黴素 V 產量的關係。

## 二、材料與方法

### (一) 菌株

本研究以 *Penicillium chrysogenum* (ATCC 28089) 為實驗菌株，購自食品工業發展研究所菌種保存中心 (新竹)。

### (二) 培養基

#### 1. 活化培養

每公升的培養基含有：diced potatoes 300.0 g、glucose 20.0 g、agar 15.0 g。在菌種活化之後，還需經過一、二次之繼代培養 (subculture) 才能正常生長。

#### 2. 振盪培養

每公升的培養基含有：glucose 20 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.6 g、

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g、KCl 0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g、 $\text{CaCl}_2$  0.05 g、 $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_3\text{Na}$  (sodium phenoxyacetate, 苯氧乙酸鈉) 2.0 g 以及 trace metal solution 5 mL。其中 trace metal solution 每公升含有： $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1.0 g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.0 g 及  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  4.0 g [7, 10]。

### (三) 培養條件

將培養基 250 mL 置於 1 L 之錐形瓶中，接入孢子濃度為  $7.3 \times 10^6$  spores/mL 的孢子懸浮液 4 mL，置於振盪培養箱 (LM-570R, Yih-Der, 150 rpm) 中，在 24 °C 下培養。欲探討之變因如下：

#### 1. 起始 pH 值對生產青黴素 V 之影響

為了瞭解起始 pH 值對 *P. chrysogenum* 生產青黴素 V 之影響，以決定最適培養之起始 pH 值，滅菌後的培養基，以 0.2 N 之 NaOH 溶液分別調整其 pH 值為 6.0、6.5 及 7.0。

#### 2. 碳源對生產青黴素 V 之影響

在決定最適培養之 pH 值後，以最適之 pH 值培養，並將培養基中的葡萄糖以蔗糖或乳糖取代，以找尋最適培養碳源。

由以上兩個變因之探討，可找出振盪培養最佳之起始 pH 值—碳源組合。

### (四) 分析方法

#### 1. 菌體濃度

菌體濃度是以乾菌重 (dry cell weight) 表示。培養過程中從搖瓶中取 10 mL 之發酵液，以 0.45  $\mu\text{m}$  的濾膜過濾之後，將有菌體的濾膜置於 70 °C 烘箱中烘乾至恆重，以量測其乾菌重。將培養過程中菌體的濃度 (g/L) 對時間作圖，即為菌體濃度曲線 (菌體生長曲線)。

#### 2. pH 值

培養過程中之發酵液取出後，以 0.45  $\mu\text{m}$  的濾膜過濾，以 pH 計量測其 pH 值，並進行醣類、硫酸銨濃度及青黴素 V 含量之分析。

#### 3. 醣類濃度

醣類濃度是以 HPLC 分析，以 refractive index detector (RID) 為偵測器。在本研究中所使用的醣類有葡萄糖、乳糖及蔗糖，其中葡萄糖與乳糖在 50 °C 之下進行分析 [6]，而蔗糖因為在 50 °C 時會產生裂解 (degradation)，所以進行蔗糖分析的溫度定為 30 °C [11]。所用之分析管柱為 MetaCarb 87H Column (MetaChem, USA)，使用的移動相為 0.08 N 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液，流率為 0.6 mL/min。



#### 4. 硫酸銨濃度

培養過程中，硫酸銨濃度是以測量總氮 (total nitrogen) 含量的微量 Kjeldahl 法求得 [2]。

#### 5 青黴素 V

青黴素 V 是以 HPLC 分析，所使用之分析管柱為 Lichrospher 100 RP-18 (250\*4 mm) (Merck)。移動相為氫甲烷與磷酸鈉緩衝溶液，混合比例其體積比為 25:75，須注意的是，移動相之液體必須先經過濾與去氣之步驟後才可使用。

### 三、結果與討論

#### (一) 起始 pH 值對生產青黴素 V 之影響

先將培養基的起始 pH 值以 0.2 N 的 NaOH 溶液分別調為 6.0、6.5 及 7.0，發酵過程中 pH 值、菌體、青黴素 V、葡萄糖及硫酸銨濃度隨著時間變化之關係如圖 1 所示。由圖可看出，起始 pH 值不同，呈現迅速下降的時間有所不同，但培養到最後，pH 值都接近於 3.5。由此可見，雖然培養的

起始 pH 值不同，但培養到最後，發酵液的 pH 值都是接近的。

當起始 pH 值為 6.5 時，在第 96 hr 之後，pH 值開始有明顯的下降，到了 160 hr 之後漸趨平緩。與另外兩個 pH 值比較：起始 pH 值為 6.0 時，在第 120 hr 之後，pH 值開始明顯下降，到 185 hr 後呈平緩；起始 pH 值為 7.0 時，第 160 hr 後，pH 值開始明顯下降。所以可看出，以起始 pH 值 6.5 培養，pH 值呈現明顯下降所需的時間最短。

起始 pH 值為 6.5 時，比較 pH 值變化與菌體生長曲線發現，在 pH 值明顯下降期間，菌體濃度亦快速增加。此乃因菌體生長時，其代謝會產生酸類，而使 pH 值下降。而起始 pH 值在 6.0 與 7.0 也有類似的情形。

由葡萄糖消耗情形來看，葡萄糖濃度隨培養時間的增加而漸減。起始 pH 值 6.5 時，葡萄糖消耗最快也最多，培養到末期，葡萄糖濃度從原來的 20 g/L 下降至 11 g/L 左右。另外，起始 pH 值為 6.0 與 7.0 時，葡萄糖消耗量就沒有 pH 值 6.5 時來的快。

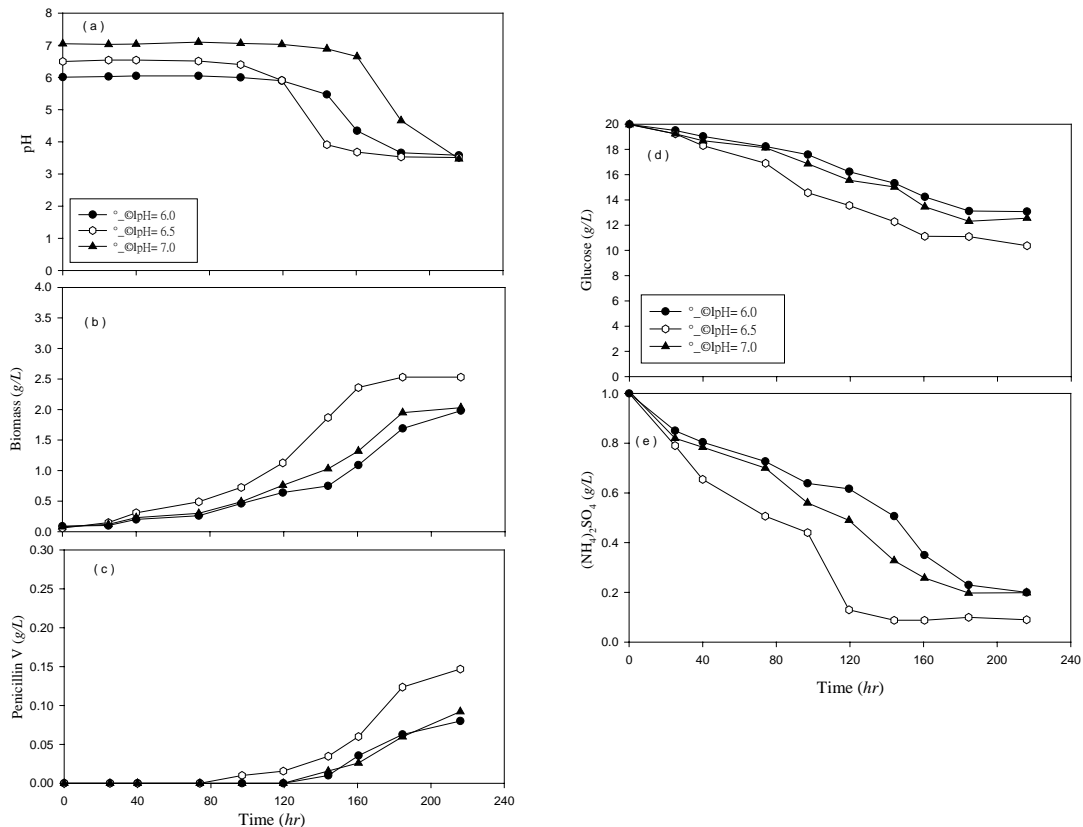


圖 1. 在不同 pH 起始值培養下，*P. chrysogenum* 發酵過程中 (a) pH (b) 菌體濃度 (c) 青黴素 V (d) 葡萄糖 (e) 硫酸銨等濃度隨時間之變化圖



培養基中以硫酸銨當做氮源，培養期間硫酸銨濃度與時間之關係如圖 1 所示，隨培養時間的增加硫酸銨濃度降低，也就是氮的含量漸少。三者中，起始 pH 值為 6.5 時，其硫酸銨消耗情形最顯著，硫酸銨的濃度由原來的 1.0 g/L 培養到最後僅剩 0.1 g/L 左右。如與菌體生長曲線比較可發現：硫酸銨消耗最快的時期與菌體快速增殖的時期大約相同，當硫酸銨消耗到最後階段（120~215 hr）時，菌體濃度呈現穩定的狀態。因為氮是構成菌體的重要元素，所以當菌體產生的量愈多，氮的消耗量也愈多，硫酸銨濃度也就隨著時間增長而下降。

青黴素 V 是屬於二次代謝產物，比較三種不同 pH 起始值培養結果發現，青黴素 V 是在菌體濃度呈現穩定的狀態之下才有明顯的增加，而產量以 pH 起始值 6.5 為最高，達到 0.15 g/L，這與菌體濃度有密切的關係，即，菌體量愈多，青黴素 V 產量也愈大。由以上的結果可看出，pH 起始值為 6.5 對於此菌株生產青黴素 V 較有利。

## (二) 碳源對生產青黴素 V 之影響

接下來將培養的 pH 起始值定為 6.5，改變碳源的種類以決定最適培養的碳源，所改變的碳源是蔗糖或乳糖，就是將培養基中的葡萄糖分別以蔗糖或乳糖取代，並分析發酵液中各成分如 pH 值、菌體、青黴素 V、醣類及硫酸銨等濃度之變化，結果如圖 2 所示。

由圖中的 pH 值變化情形發現，在這三種不同碳源培養過程中，以葡萄糖或蔗糖做為碳源時，pH 值變化情形並沒有明顯的差異；而以乳糖做為碳源時，在培養過程中 pH 值的下降比其他兩者較慢。在菌體的累積方面，以葡萄糖做為碳源時，菌體成長最快，培養到最後 215 hr 時達 3.35 g/L。以乳糖做為碳源時，菌體成長最慢。青黴素 V 的產量與菌體量有很大的關係，以葡萄糖為碳源時，其青黴素 V 的最終產量最多，以蔗糖做為碳源時，次之，而以乳糖做為碳源時則產量較差。

以葡萄糖為碳源時，醣類與硫酸銨的消耗最快，蔗糖次之，而乳糖則最慢。此一結果與 Jarvis 和 Johnson [8] 提出的論點相同，其研究中指出，菌體生長之速率隨著碳源種類

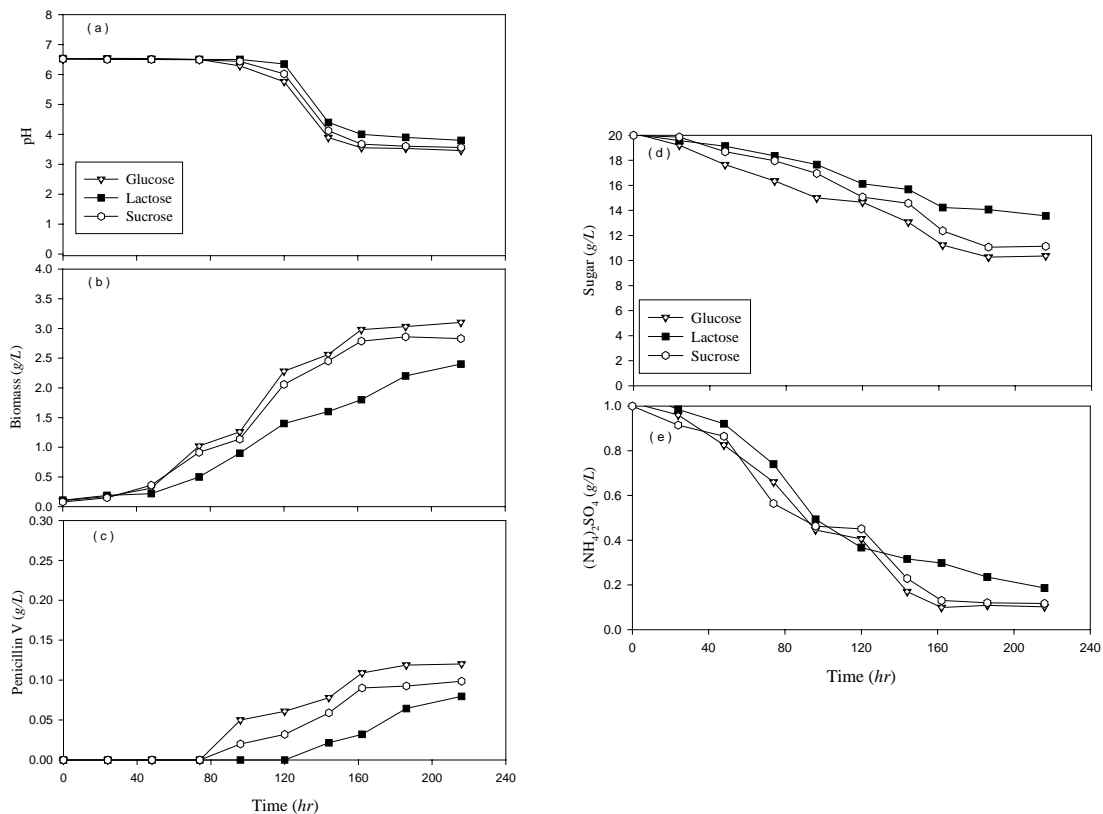


圖 2. 不同碳源培養下，*P. chrysogenum* 發酵過程中 (a) pH (b) 菌體濃度 (c) 青黴素 V (d) 醣類 (e) 硫酸銨等濃度隨時間變化之關係圖



而不同，在常使用的碳源中，葡萄糖消耗速率較快，乳糖則較慢，而蔗糖消耗速率和葡萄糖大致相同。而 Leonhartsberger 等 [9] 以不同的菌株所做研究之結果指出，若以乳糖來取代部分葡萄糖，則青黴素之產量可改善。因為乳糖的消耗速率較慢，能夠維持較長時間的發酵。但本實驗中，因乳糖的消耗速率太慢，以致菌體生長之速率也太慢，使得青黴素 V 產量最少。所以若只單獨使用乳糖作為碳源，對於菌體的生長與青黴素 V 的產量都是不利的。比較三種不同碳源，葡萄糖對生產青黴素 V 最佳。

#### 四、結論

以 pH 起始值為 6.0、6.5 及 7.0 分別培養 *Penicillium chrysogenum*，實驗結果顯示，以起始值 6.5 時的葡萄糖消耗最多也最快，而硫酸銨消耗情形也是最顯著。當菌體濃度達穩定狀態時，青黴素 V 呈現明顯的增加。菌體量愈多，青黴素 V 產量也愈高，其產量以起始值 6.5 時為最多，可達 0.15 g/L。因此 pH 起始值為 6.5 時，對於 *P. chrysogenum* 的培養有最佳的結果。雖然培養的起始 pH 值不同，但培養到最後，發酵液的 pH 值都是接近的。之後，將 pH 起始值固定在 6.5，探討不同碳源（葡萄糖、乳糖與蔗糖）對青黴素 V 產量之影響。以葡萄糖做為碳源時，青黴素 V 產量最多；而以蔗糖做為碳源時，次之，以乳糖做為碳源時，因為乳糖的消耗速率較慢，以致青黴素 V 產量較差。綜合以上的結果得知，pH 起始值 6.5，振盪培養 *P. chrysogenum*，以葡萄糖為碳源可得較高的青黴素 V 產量。

#### 參考文獻

1. 江淑芬 (民 88)，生技醫藥品素描，化工資訊，13(4)，頁 77-89。
2. 李秀、賴滋漢 (民 81)，食品分析與檢驗，頁 171-181，

精華出版社，台中。

3. 陳思豐 (民 82)，淺談內醯胺抗生素—盤尼西林及頭孢子菌素，化工技術，1(1)，頁 53-59。
4. 楊慶昌、施純榮 (民 88)，特化產業回顧與展望，化工資訊，13(3)，頁 24-32。
5. Crueger, W. and A. Crueger (1984) Antibiotics. In: *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, T. D. Brock Ed. 197-237. Science Technology, Madison, WI.
6. Guerrant, G. (1982) Analysis of short-chain acids from anaerobic bacteria by high-performance liquid chromatography. *Clinical Biochemistry*, 16(2), 355-360.
7. Henriksen, C. M., J. Nielsen and J. Villadsen (1998) High exogenous concentrations of phenoxyacetic acid are crucial for a high penicillin V productivity in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology*, 144, 2001-2006.
8. Jarvis, F. G. and M. J. Johnson (1947) The role of the constituents of synthetic media for penicillin production. *Journal of the American Chemical Society*, 69, 3010-3017.
9. Leonhartsberger, S., R. M. Lafferty and L. Korneti (1993) Use of collagen hydrolysate as a complex nitrogen source for the synthesis of penicillin by *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Bacteriology*, 30, 299-313.
10. McNeil, B., D. R. Berry, L. M. Harvey, A. Grant and S. White (1998) Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(3), 297-305.
11. Pecina, R. (1984) High performance liquid chromatography elution behavior of alcohols, aldehydes, ketones, organic acids and carbohydrates on a strong cation-exchange stationary phase. *Journal of Chromatography*, 287, 245-258.

收件：90.02.13 修正：90.05.03 接受：90.05.23

