

青霉菌株133產生青霉素的研究

IV. 以淀粉原料代替乳糖在醱酵罐的 培养及提煉方法的改進

張为申 黃大釐 徐学瑛 王文翔 庄錫亮

(中央生物制品研究所抗生素室, 北京)

青霉素的生產培养基主要原料为乳糖玉蜀黍漿, 玉蜀黍漿可以用棉籽餅代替已于前文^[1]述及。至于乳糖之代用品則尚待研究。青霉菌之所以必需乳糖始能產生青霉素, 乃是因为其他糖类如葡萄糖、蔗糖等能够很快的被利用, 菌絲繁殖迅速以至青霉素之產量甚微, 故須选用一种糖, 能被青霉素緩慢地利用, 維持一定的菌絲濃度, 而且能使青霉菌分泌出大量的青霉素, 乳糖恰好適合这个条件。普通青霉菌生產培养基都含有葡萄糖 1% 与乳糖 2.5—4%。前者是为第一階段繁殖菌絲之用, 后者則用來生產青霉素。M. J. Johnson 氏^[2]論及只要 pH 在 7.0 以上与糖濃度很低时, 就可以產生青霉素, 并不限于一定要用乳糖。他利用 pH 自动調節器, 并控制葡萄糖濃度, 分次加入, 每 12 小时加入葡萄糖 0.4%, 这样可以產生青霉素每毫升达 1500 單位。現在我們沒有 pH 自动調節器的設備, 并且葡萄糖的价值亦較貴, 所以不采用分次加葡萄糖的方法。在青霉素工作中也有用淀粉者^[3]但產量并不高。現在我們試用多种不同來源的淀粉代替乳糖, 并且改变培养基的成分与培养的情况, 來使这个無色菌株醱酵, 以求能达到或超过使用乳糖培养基时所產生的青霉素效价。

菌 种

1. 青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)W-49 133
2. 金黄色葡萄球菌(*Micrococcus aureus*)209 P

培 养 基

1. 孢子培养基見前文^[4]。

2. 搖瓶種子培養基見前文^[4]。
3. 攪瓶種子培養基見前文^[4]。
4. 醱酵罐培養基見前文^[4]。

培養方法

主要都與前文^[4]同，改進處在個別實驗方法中說明。

提煉方法^[5]

採用 Sohkey 氏贈送文獻所介紹的方法^[5] 並加以改進。在濾過的培養液中加入 0.2% 體積的磺化蓖麻油，冷至 0—5°C，用 10% 硫酸溶液調節到 pH 2.0，再加入 1/3 體積的乙酸戊酯，混合後，用 Sharples 高速离心机使乙酸戊酯提取液與廢培養液分開。在乙酸戊酯提取液中加入 1/5 體積 pH 7.3 的緩沖液，攪拌後，靜置片刻，俟其分開。大部分青霉素被提取至下層的緩沖液中，將這緩沖液冷卻後，加入 1/3—1/4 體積的乙酸戊酯，再以 10% 硫酸溶液調節至 pH 2.0，攪拌後仍令其靜置片刻，這樣青霉素又被提取到上層的乙酸戊酯中。經過這些步驟的提取，青霉素的含量每毫升可達 50,000 單位以上，在這濃縮的乙酸戊酯提取液中加入 1/7 體積的乙酸鉀飽和水溶液。混合後即得白色結晶過濾，用無水丁醇將結晶洗滌二、三次，然後置于 70°C 烤箱中烘乾。

結晶青霉素鉀鹽粗制品的重結晶系採納馬譽徵氏 1950 年春之建議^[6]，試用恒沸蒸餾法進行之，經過多次研究，確定方法如下：

將結晶青霉素鉀鹽粗制品 100 克，溶于 125 毫升水中，加入丁醇 700 毫升，用活性炭脫色後，置 2 公升圓底燒瓶中，在適當溫度和壓力之下進行蒸餾，一小時後加入丁醇 100 毫升，此後盡量使所加入之丁醇量與蒸餾出之丁醇水溶液量相等。蒸餾過程中，因瓶中水分逐漸減少，故青霉素結晶漸漸增多，大約 4 小時後，瓶內即產生大量白色針狀結晶，過濾，用丁醇洗滌晶体如上法。

分析方法

1. 糖的測定：淀粉原料及乳糖須先酸化，在 120°C 水解半小時後，再按 Shaffer 與 Somogyi 法^[7]測定。
2. 青霉素效價的檢定：杯碟法^[8]與碘滴定法^[9]。
3. 青霉素 G 的檢定：色層分離法^[4]與 NEP^[10]法。

实验結果与討論

培养

1. 以小米面代替乳糖

用酸酵罐培养基, 24—1 批將乳糖用量改为 2.5%, 24—2 批不用乳糖, 先加小米面 2.5%, 培养 53 小时后再加入小米面 1%。結果見表 1。

表 1 小米面代替乳糖在酸酵罐中青霉素效价的產生(單位/毫升)
与 pH 及剩余糖量 (%) 之改变

批号—罐号 \ 時間(小时)		0	26	47	53	70	77	78	95
24—1	效 价		110	591		1010		1239	
	pH	7.3	7.3	7.5		7.3		8.0	
	糖 量	3.3	2.52	1.84		0.64		0.57	
24—2	效 价		172	522	534	772	985	—	1400
	pH	7.3	7.3	7.6	7.7	7.4	7.6	8.1	8.3
	糖 量	1.73	1.17	0.35	0.39 ↑	0.33	0.32	0.2	0.24

表 2 以純小米面代替乳糖在酸酵罐中青霉素效价的產生(單位/毫升)与
pH 及剩余糖量 (%) 之改变*

批 号—罐号 \ 小 米 面 量 % \ 时 間(小时)		0	24	47	67	82	94	
25—1	4	效 价 pH 糖 量	7.3 7.1 3.7	72 7.1 3.05	250 7.3 1.74	540 7.4 0.76	661 7.8 0.68	990
25—2	2 + 1.5	效 价 pH 糖 量	7.2 7.1 2.65	78 7.1 1.82	383 7.5 0.75 ↑	560 7.4 0.6	762 7.7 0.58	1035
7—2	2 + 1.5	時間(小时)	0	24	43	56	68	72
		效 价 pH 糖 量	148 6.8 2.35	148 7.4	636 7.6 0.59 ↑	653 7.3 0.79	871 7.6 0.73	1079 8.0 0.67
		效 价 pH 糖 量	148 7.4 2.44	592 7.3 1.38	721 7.7 0.89 ↑	973 8.1 0.8	768 8.4 0.5	

* 將酸酵罐培养基中乳糖除去, 代以不同量的小米面, 如上表二行所示, 箭头指明第二次加小米面的時間。在 7—2 与 6—2 批中棉籽餅用量改为 2%。

表3 白玉米面代替乳糖青霉素效价的产生(单位/毫升)与 pH 及剩余糖量(%)之改变*

批 号—罐号	玉 米 面量%	时 間(小时)		0	24	46	70	88
		时间(小时)		0	25	49	73	91
5—1	1.5	效 价			9.0	378	601	981
	+	pH	7.2	6.9	7.1	7.4	7.4	—
	1.5	糖 量	1.58	1.36	0.45 ↑	0.58	—	—
5—2	1.5	效 价			142	710	983	1035
	+	pH	7.1	7.0	7.5	7.6	8.5	—
	1.5	糖 量	1.64	1.58	0.51 ↑	0.52	—	—
10—1	2.0	时间(小时)	0	25	49	73	91	1026
		效 价			69	628	1138	1026
		pH	7.3	7.2	7.9	7.9	7.9	7.9
11—2	2.0	糖 量	3.32	2.17	0.8 ↑	0.91	0.63	0.63
		时间(小时)	0	25	45	67	72	72
		效 价			132	600	884	1039
11—2	+	pH	7.0	7.3	7.8	7.0	7.6	7.6
	1.5	糖 量	2.9	1.58	0.63 ↑	0.83	0.81	0.81

* 將发酵罐培养基中乳糖除去,代以不同量的白玉米面,箭头处为二次加面时间,5—2,10—1,11—2 这三批中的棉籽饼量减为2%。

表4 甜薯粉代替乳糖青霉素效价的产生(单位/毫升)与 pH 及剩余糖量(%)之改变*

批 号—罐号	山 芋 粉量%	时 間(小时)		0	25	49	73	79	91
		时间(小时)		0	25	45	67	72	91
10—2	2.0	效 价			97	547	810	1015	908
	+	pH	7.2	7.3	8.1	8.0	8.0	8.0	8.0
	1.5	糖 量	3.82	2.11	0.7 ↑	0.74	0.72	—	—
11—1	2.0	时间(小时)	0	25	45	67	72	72	72
		效 价			102	4.4	1012	946	946
		pH	7.0	6.9	7.6	7.1	7.7	7.7	7.7
13—2	2.0	糖 量	2.97	1.75	0.6 ↑	0.63	0.52	0.52	0.52
		时间(小时)	0	25	45	69	72	72	72
		效 价			174	787	805	881	881
16—1	+	pH	7.0	7.2	7.8	7.6	7.7	7.7	7.7
	2.0	糖 量	3.0	1.6	0.54 ↑	0.75	0.7	0.7	0.7
	1.0	时间(小时)	0	21	45	69	83	90	90
16—1	2.0	效 价			121	308	567	910	913
	+	pH	7.1	7.2	7.9	7.8	7.9	8.4	8.4
	1.0	糖 量	2.6	1.48	0.76 ↑	0.59	0.79	—	—

* 將发酵罐培养基中棉籽饼量都改为2%,不用乳糖而代以不同量之甜薯粉,箭头处为第二次加甜薯粉时间。

前文^[1]的結果指出兩次加糖比一次加糖產量高，所以也分为兩次加小米面，效价曾达到每毫升 1400 單位，以后連續試驗几次，都未能达到这样高的結果，追究原因，乃是由于小米面中有时含枚子面与黃豆粉，成份不等，因此試用純小米面及其它淀粉原料來代替乳糖，又進行試驗，观察和比較那一种原料最为合適。

2. 試用不同淀粉原料如小米面、白玉米面、甜薯粉等代替乳糖

从表 2、3、4 的結果看到小米面、白玉米面与甜薯粉这三种淀粉原料所產生的青霉素效价，一般都是每毫升 1000 單位左右。比用乳糖低些，上列三个表中的結果指出棉籽餅减为 2% 时，可以縮短一天的時間。由于白玉米面沒有色素，价格低廉，來源又丰富，所以以后实验都采用白玉米面为原料。

3. 以白玉米面代替乳糖所產生的青霉素一般都比乳糖培养基低些，因此除加白玉米面外又加入少量乳糖，試驗能否提高青霉素的產生。

(1) 培养 45 小时后加入乳糖。

表 5 白玉米面代替一部分乳糖青霉素效价的產生(單位/毫升)
与 pH 及剩余糖量的改变*

批 号—罐号	时 間 (小时)					
		0	23	45	68	70
19—1	效 价		180	505	943	1064
	pH	6.8	7.4	7.9	7.9	—
	糖 量	2.66	1.78	0.6 ↑	0.75	0.73
21—2	效 价		199	515	869	959
	pH	7.1	7.4	7.4	7.7	7.5
	糖 量	2.66	2.04	0.67 ↑	0.79	—

* 將棉籽餅培养基中棉籽餅量减为 2.0%，原有乳糖除去，代以白玉米面 2%，45 小时后再加入乳糖 1%。
箭头处表示加糖的时间。

表 5 結果指出經培养 45 小时后，再加入乳糖，对于青霉素效价并無顯著提高。

(2) 以白玉米面代替乳糖在开始时加入少量的乳糖，所得結果見表 6。

白玉米麪与水混和，經消毒后黏性太大，分次加入时發生困难，所以改为一次加入，如設備完善分兩次加入，或还可以把效价提高些，从表 6 中的結果看出，白玉米面中加入乳糖 1.0%、0.5% 与 0.25% 都可达到每毫升 1200 單位左右，而加入乳糖 0.1% 則只达 755 單位，为了節省乳糖而不影响青霉素產量，故在下列实验中加入乳糖 0.25%。

4. 改善孢子培养基及种子培养基后青霉素效价之提高。

有时在实验中，青霉素產量普遍降低，用乳糖培养基所產生的青霉素效价每毫升不过 1200 單位，用白玉米麪代替也是如此，經詳細檢查后發現孢子生殖不够旺盛，于是

表6 白玉米面代替乳糖,在开始时加入少量的乳糖,青霉素的产量的比较(单位/毫升)
与 pH 及剩余糖量(%)的改变*

批 号	罐号	乳糖 量%	时间(小时)	0	24	66	73	84	91	96
28—1		1.0	效价		54	449	705	947	1140	1304
			pH	7.0	7.1	7.1	7.1	—	—	7.3
			糖量	3.76	3.43	—	2.06	1.25	—	0.77
28—2		1.0	效价		46	538	673	934	1162	1283
			pH	7.1	7.1	7.1	7.2	—	—	7.2
			糖量	3.9	3.53	—	2.58	1.21	—	0.91
32—1		0.5	时间(小时)	0	25	48	69	74		
			效价		72	600	1020	1020		
			pH	7.1	6.9	7.8	7.7	7.8		
33—2		0.5	糖量	0.6	3.2	1.22	0.88	0.7		
			效价		113	606	1234	1232		
			pH	7.1	7.2	7.2	7.9	8.0		
35—2		0.25	糖量	3.5	3.3	1.06	—	0.8		
			时间(小时)	0	24	47	57	66	71	
			效价		140	706	955	1145	1115	
36—2		0.25	pH	7.0	7.1	7.5	7.5	7.7	8.0	
			糖量	3.32	—	—	0.78	0.89	0.81	
			时间(小时)	0	25	47	69	89	93	
36—2		0.25	效价		56	—	520	1170	1198	
			pH	7.2	7.1	7.0	7.3	7.7	7.9	
			糖量	3.2	3.06	2.93	1.96	0.82	0.76	
36—1		0.1	效价		71	—	340	637	755	
			pH	7.1	7.0	6.8	7.4	7.5	7.4	
			糖量	3.2	3.03	2.87	2.2	0.37	0.76	

* 以上所用之发酵罐培养基中,白玉米面含量为 3.2—3.9%,乳糖为 0.1—1%。

采用 Sohkey 氏带来文献^[5]中所述的方法,在蜂蜜-胰孢子培养基中曾加些无机盐 (NaCl 0.5—1.0%; $MgSO_4$ 0.005%; KH_2PO_4 0.006%)。这样培养后到第六天就得到很旺盛的孢子。同时在搅瓶种子培养时,将通气设备改良,因原来的进气孔比较大,空气泡很快逸出,来不及让菌丝吸收,现在进气孔外裹以网套,使空气通过网套再进入培养液,这样经过搅拌微细的空气泡可与菌丝密切接触,易于吸收利用培养 15—18 小时后繁殖很旺盛,较以往通气 48 小时还要稠得多,而且培养时间缩短了三十余小时,过去所用接种量为 7 公升(约为发酵罐培养基体积 10%),现只要接种 3.5—4.0 公升已足够用,否则发酵罐中菌丝过稠,青霉素产量反而降低。

表7 培养情况改进后以白玉米面代替乳糖与单独用乳糖时產生青霉素的比較表*

批 号—罐号	糖量%	時間(小时)	0	29	53	62	74	97	100	103
42—1	乳 糖3.5 + 葡萄糖1.0	效 价		223	916	1175	1360	1680	1447	
		pH	7.3	7.2	7.4	7.3	7.4	7.8	7.8	
		糖 量	4.65	—	2.85	—	1.17	0.75	0.7	
42—2	玉米面4.5 + 乳 糖0.25	效 价		206	597	732	1320	1944	2250	2160
		pH	7.3	7.2	6.8	6.9	6.8	7.1	7.3	7.7
		糖 量	3.95	—	2.27	—	1.2	—	1.23	1.1
43—1	玉米面4.5 + 乳 糖0.25	時間(小时)	0	25	48	69	81	93	104	112
		效 价		132	516	825	984	1176	1417	1643
		pH	7.0	7.0	6.7	6.8	7.1	7.2	—	8.1
43—2	乳 糖3.5 + 葡萄糖1.0	糖 量	3.95	3.85	2.67	1.34	—	1.14	—	1.1
		效 价		100	446	1016	1662	1826		
		pH	7.1	7.0	7.1	7.8	7.5	7.9		
43—2	葡萄糖1.0	糖 量	4.25	3.43	3.23	2.26	—	0.68		
45—1	玉米面4.5 + 乳 糖0.25	時間(小时)	0	39	61	75	87	99	109	
		效 价		460	752	940	1108	1275	1433	
		pH	7.2	6.9	7.0	6.9	7.8	7.3	7.6	
45—2	乳 糖3.5 + 葡萄糖1.0	糖 量	3.9	3.07	1.47	—	1.04	—	1.12	
		效 价		570	990	1103	1283	1462	1348	
		pH	7.2	7.0	7.5	7.1	7.8	7.5	7.4	
45—2	葡萄糖1.0	糖 量	4.25	3.4	2.2	—	0.72	—	0.49	
3—1	玉米面4.25 + 乳 糖0.25	時間(小时)	0	24	44	68	80	94	104	112
		效 价		56	423	500	820	1044	1232	1672
		pH	6.9	7.0	6.8	6.8	7.0	7.1	7.7	7.7
3—2	玉米面4.5 + 乳 糖0.25	糖 量	3.85	3.15	1.6	—	—	—	1.17	—
		效 价		42	240	776	815	1332	1440	1792
		pH	7.1	7.0	6.9	6.7	6.9	7.2	7.7	7.9
3—2	乳 糖0.25	糖 量	3.6	3.45	1.6	—	—	—	1.21	—

* 使用豆油为消沫剂,不加十八醇。

从表7的结果,得到用乳糖培养基发酵每毫升最高可达1680单位,以白玉米面代替乳糖,最高曾达每毫升2250单位,以后重复几次,虽不能产生这样高的效价,但仍可达到1600单位/毫升,故可肯定用以白玉米面代替乳糖能产生与单独用乳糖一样高的效价。从表7结果看出,用白玉米面代替乳糖,其生长情况在第一天用糖很少,前三天内一般效价都比单独用乳糖为低,但经过三天后就逐渐追上。同时在前三天pH也比较地低,一般在6.7—7.0之间,故此发酵时间较长。如有pH自动调节器维持发酵液在pH

7.4 左右或能再提高效价而把时间缩短。用白玉米面代替乳糖,不但可以省去大部分乳糖,还省去葡萄糖与十八醇,对于制造青霉素成本可以大为降低,虽仍要用 0.25% 乳糖,但这样少量,即在大量生产时亦所费不多。白玉米面代替乳糖已达到同样高的产量,并且经色层分离法与 NEP 法检定是青霉素 G。缺点是发酵时间延长了十余小时,这是亟待改良的。

提炼

1. 用乙酸钾饱和水溶液制取结晶青霉素G钾盐

取青霉素培养液 50 公升,每毫升含 1407 单位,提炼到缓冲液的总量为 3.5 公升。44-1 实验是取 1/5 量的提取液即 700 毫升,按前法 (4) 制取结晶,44-2 实验是取 1-5 量的提取液按乙酸钾饱和水溶液法制取结晶。另取青霉素培养液 117.8 公升,平均效价为每毫升 1392 单位,提炼到缓冲液的体积为 8 公升,45-1 实验是取 1/4 量即 2.0 公升,按前法制取结晶,45-2 实验是取 1/4 量用乙酸钾饱和水溶液制取结晶,所得结果见表 8。

表 8 提炼结晶青霉素钾盐回收率的比较

批 号	缓 冲 液 毫 升	乙酸戊酯 毫 升	乙酸钾饱和水 溶 液 毫 升	结晶重量 克	纯 度 单位/毫升	回收率 %
44-1	700			5.2	1361	56.4
44-2	700	200	29	6.0	1464	62.5
45-1	2000			16.0	1490	58.2
45-2	2000	700	100	19.0	1475	69

从表 8 的结果得到用乙酸钾饱和水溶液制取的结晶青霉素钾盐,其纯度每毫克达 1470 单位回收率为 62.5 与 69%,均高于前法之回收率。此实验仍在继续研究中,以求回收率能够进一步的提高。

2. 利用恒沸蒸馏法精制青霉素钾盐结晶

3. 用乙酸钾饱和水溶液方法所得之结晶青霉素钾盐,色泽不够洁白,纯度亦稍差,故利用恒沸蒸馏法,将其再结晶一次,结果见表 9。

表 9 利用恒沸蒸馏法重结晶之回收率

批 号	青霉素钾盐粗制品		温 度 °C	压 力	青霉素钾盐粗制品		回 收 率
	重 量 克	效 价 单位/毫升			重 量 克	效 价 单位/毫升	
13	50	1510	25-35	低 压	42.7	1605	90.6
15	20	1512	25-35	低 压	17.3	1602	92.1
16	33.7	1490	25-35	低 压	28.5	1600	90.8

結 論

1. 各种淀粉原料如小米面、白玉米面及甜薯粉等都可以代替乳糖,但所產生的青霉素效价不如用乳糖高。

2. 白玉米面可以代替全部葡萄糖及大部分乳糖,只要加入乳糖 0.25% 即可以產生很高的青霉素效价,一般產量每毫升可在 1600 單位左右,而且所產生的全部是青霉素 G,缺点是醱酵時間延長十小时左右。

3. 孢子培养基中加入少量鹽类(NaCl 0.5—1.0%; MgSO_4 0.005%; KH_2PO_4 0.006%),可使孢子繁殖旺盛,种子培养时改良通氣設備使种子繁殖迅速,時間縮短为 15—18 小时。这两个因素对產生高效价極為重要,按照原來乳糖培养基醱酵,青霉素產量曾一度降为每毫升 1200 單位,經改進后提高到每毫升 1600 單位。

参 考 文 献

- [1] 張為申、徐學瑛、朱濟廣:微生物學報, 1 (1): 57—63, 1953.
- [2] Johnson, M. J. *Bull. World Hlth. Org.*, 6: 116, 1952.
- [3] 有馬啓: 个别談話。
- [4] 張為申、黃大鑾、王文翔、馬祺勝: 微生物學報, 1 (1): 64—73, 1953.
- [5] Sohkey 氏贈送文獻。
- [6] 馬壽徵: 个别談話。
- [7] Shaffer, P. A. & Somogyi, M. *J. Biol. Chem.*, 100: 695, 1933.
- [8] 中華人民共和國衛生部抗生素檢定暫定規則 11—15, 1954.
- [9] 同上 15—16, 1954.
- [10] 同上 16—17, 1954.
- [11] 張為申、徐學瑛: 微生物學報, 4 (1): 123—125, 1956.

PRODUCTION OF PENICILLIN WITH *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* STRAIN W-49 133 IV. SUBSTITUTION OF STARCH FOR LACTOSE IN THE FERMENTATION BROTH AND IMPROVEMENT IN THE METHOD OF EXTRACTION

CHANG WEI-SHEN, HUANG TA-PIN, HSU HSUEH-YING, WANG WEN-HSIANG
AND CHUANG HSI-LIANG

Antibiotic Laboratory, National Vaccine and Serum Institute, Peking

As previous attempts to substitute starch for the lactose contained in the fermentation broth for penicillin production failed to prove successful, the present authors have examined this possibility again by the use of three types of starch-material millet, corn and sweet potato, and found their results in agreement with those of the previous workers. However, when the major portion of lactose and the whole of glucose were replaced by corn starch (white variety), with as little as 0.25% lactose remaining, a high yield of penicillin, amounting to 1600 units per ml was obtained. The yield was pure Penicillin G. The only defect was that it took a longer time of fermentation—about 10 hours. Later, it was found that the addition of NaCl(0.5-1.0%), $MgSO_4$ (0.05%) and KH_2PO_4 (0.006%) increased the growth of the spores, and that by the improvement of aeration, the time for the growth of inoculum was reduced to 15-18 hours, with a similar yield as the above.

In the process of extraction, it was found that following the addition of saturated aqueous solution of potassium acetate, crystals of penicillin might be obtained directly from amyl acetate extract. Its purity was found to be 1470 units per mg, and the yield of extraction, 62.5-69%. It was discovered, moreover, that when the crude penicillin was purified by the azeotropic distillation method, the yield was 90%, while the purity of the final product was 1600 units per mg.