

鏈霉素的試制

張为申 黃大猷 庄錫亮 范成典 吳國梧 徐学瑛 王文翔

(中央生物制品研究所, 抗生素室)

鏈霉素为常用的几种主要抗生素之一, 在臨床上可用來治療結核病、腦膜炎及鼠疫等症, 特别是能够治療某种类型結核病, 因此不論在臨床上或在研究和制造上都异常地受到重視。灰色鏈霉菌極易变异, 產生鏈霉素的能力容易衰退, 如欲得到產生鏈霉素較高的菌种, 就必须加以適當处理, 就像用X射綫或紫外光輻射等方法, 然后将所得之优良菌种進行培养。發酵过程中需使用適當的培养基和合宜的生長条件才能產生出更多的鏈霉素, 發酵完畢, 進行提煉。提煉方法虽可采用活性炭吸附法^[1], 但所得之鏈霉素含雜質較多而且收回率甚低, 故改用离子交換法, 進行提煉, 茲將鏈霉素試制步驟列述如下:

菌 种

1. 灰色鏈霉菌 (*Streptomyces griseus*) 601
2. 枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*)
3. 肺炎桿菌 (中檢 4601)

培 养 基

1. 孢子培养基

肉 膏	0.5%
胰	0.5%
氯化鈉	0.5%
葡萄糖	1.0%
瓊 膠	2.0%
pH 7.0	

2. 种子培养基

酵母粉	1.0%
葡萄糖	2.5%
氯化鈉	0.25%
硫酸鎂	0.3%
磷酸二氫鉀	0.02%
調節 pH 7.8 后加碳酸鈣	0.4%

3. 醱酵培养基

黃豆餅粉	1.5%
胰	0.5%
硫酸銨	0.25%
葡萄糖	2.0%
淀粉	1.0%
硫酸鎂	0.025%
磷酸二氫鉀	0.02%
氯化鈉	0.4%
調節 pH 7.8 后加碳酸鈣	1.0%

分 析 方 法

(一) 效价檢定——杯碟法^[2]与化学檢定法

化学檢定法系参考 John 氏方法^[3]并加以改進,茲將此法抄錄如下:

1. 培养液的处理: 取培养液少許, 用硫酸調節 pH 到 2.0 左右, 加入活性炭 1%, 激烈搖盪数分鐘后, 過濾, 用氫氧化鈉溶液將濾液中和。

2. 樹脂的处理: 將羧基樹脂^[4](顆粒为 40—60 篩号) 浸于 1 N 氫氧化鈉溶液中片刻, 然后用蒸餾水洗至中性, 再浸于 1 N 鹽酸溶液中, 同样用蒸餾水洗至中性。取 1.5 克樹脂裝入交換柱內, 加氫氧化鈉溶液, 使其成为 Na^+ 式羧基樹脂。

3. 鏈霉素的交換: 取处理过的培养液 20 毫升通过离子交換柱, 時間維持 15—20 分鐘, 于是鏈霉素都被交換到樹脂上, 然后用水洗滌樹脂, 將其中黃色雜質洗掉。

4. 鏈霉素的釋出: 从离子交換柱上端加入 1 N 硫酸溶液 15 毫升, 尽量在 10—15 分鐘內將 15 毫升硫酸溶液流完, 最初流出之 2 毫升溶液不含鏈霉素, 这时用少量蒸餾水洗滌樹脂并用量筒接收自交換柱底部流出之溶液, 使其体積恰为 20 毫升正。

5. 顏色反应

(1) 將鏈霉素破坏成为落叶松皮素(Maltol), 取試管 4 支加入不同量的釋出液, 但每支試管中鏈霉素含量不得低于 500 單位。否則与氯化高铁試剂之顏色反应不够灵敏。每支試管裝好釋出液后, 用蒸餾水稀釋至 4 毫升, 然后每支試管中各加 5 N 氫氧化鈉 1 毫升, 在沸水浴中煮 3 分鐘, 此时鏈霉素却破坏为落叶松皮素, 冷却后每支試管中各加 5 N 硫酸 2 毫升, 备用。

(2) 落叶松皮素与氯化高铁的顏色反应 將上述酸性溶液各加入氯化高铁試剂 1 毫升, 溶液即呈紫色, 10 分鐘后以光电比色計進行測定, 濾鏡波長为 550 毫微米, 所得之讀数, 可从标准曲綫上算出鏈霉素的含量。

(3) 标准曲綫的建立 取 7 支或 8 支試管，分別在每支試管中加相当于鏈霉素 500, 600, 700, 800.....1200單位左右的純落叶松皮素，然后依照上述方法進行比色，所得之讀数做为縱座标，鏈霉素單位为橫座标，于是即可繪成一标准曲綫(見圖 1)。

表 1 比色計讀数与鏈霉素單位对照表

比色計讀数 鏈霉素單位	試驗次数 1	2	3	4
492	4.3	4.3	4.4	4.2
615	5.6	5.6	5.2	5.6
738	6.9	6.9	7.0	6.8
860	8.1	8.1	7.9	8.0
984	9.8	9.8	9.8	9.7
1108	10.8	11.0	11.3	11.0
1230	11.1	11.8	11.9	12.0

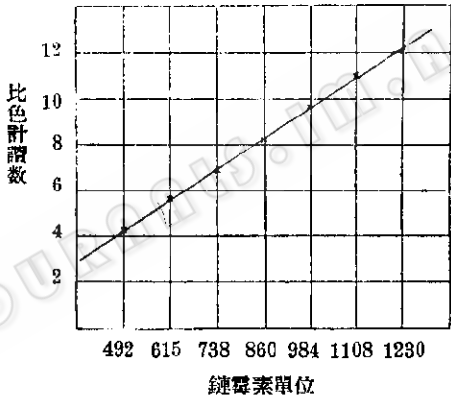


圖 1 鏈霉素标准曲綫圖

6. 化学檢定与生物檢定之比較

取同一样品分別以生物檢定方法和化学檢定方法進行鏈霉素單位測定所得之結果(見表 2)。

表 2 生物檢定法与化学檢定法測定鏈霉素培养液單位的比較

鏈霉素單位 方法	試驗次数 1	2	3	4	5	6	7
生物檢定	460	517	510	254	570	616	609
化学檢定	420	490	512	257	600	650	590

从表 2 看出化学檢定与生物檢定的結果比較接近，化学檢定方法手續簡單，時間

迅速, 2 小时内可得到结果。

(二) 鏈霉菌成分之測定——紙型色層分离法^[5]。

菌种的处理方法

(一) 紫外光处理法 所用之仪器为 18 吋紫外光灯一支, 500 W 电灯一盏, 双碟 16 付, 1 毫升及 10 毫升吸液管各 5 支, 500 毫升三角瓶 100 个, 处理步骤如下:

1. 处理菌种的前一天將芽孢培养基分裝在双碟中, 每个双碟的裝量为 25 毫升。

2. 在鏈霉菌孢子旺盛的大試管中加滅菌蒸餾水少許, 用不銹鋼棒把孢子刮下, 將这懸液通过滅菌的脫脂棉過濾二、三次, 經顯微鏡观察, 如看到絕大部分是單顆孢子时, 稀釋至適當濃度, 备用。

3. 取單顆孢子懸液 0.2 毫升, 接种于双碟上, 用玻璃棒小心地將其鋪勻在瓊膠上。

4. 把加过孢子的双碟盖掀开, 放在紫外光灯下照射, 時間和距离可以適當改变, 一般照射時間为 3—7 分鐘, 距离为 15 厘米。

5. 紫外光照射后, 立即將双碟盖上, 放在 500W 灯光下照射 2 小时。

6. 用 500W 灯光照射后, 把双碟放在 25°C 恒温室中培养 7 天, 挑选出倖存的而且形态变异的菌落, 每一菌落接种于兩支含有孢子培养基的中管中, 培养 7 天后, 取一管作搖瓶試驗, 若搖瓶培养產生的效价很高, 即把另一管孢子接种在沙土管内, 冷冻干燥后, 儲存备用。

(二) 温度处理法 主要步骤与紫外光处理法相同, 用加温方法代替紫外光照射, 促使孢子变异。將裝有單顆孢子的懸液試管放在 80°C 热水中, 維持 8 分鐘, 立即用冷水冷却至 15—20°C, 然后取出 0.2 毫升, 均匀地接种在盛有孢子培养基的双碟上。培养 7 天, 然后挑选形态变异的菌落, 進行搖瓶試驗。

培养方法

1. 孢子培养 用白金环自沙土管中取少許沙土接种在含有孢子培养基的罗氏瓶中。培养 7—9 天, 斜面上生長出一層很厚的白色粉末, 这就表示孢子生長旺盛, 可以做接种之用。

2. 搖瓶种子培养 取一孢子生長旺盛的罗氏瓶, 加進滅菌蒸餾水 25 毫升, 用不銹鋼棒將孢子刮起, 吸出孢子懸液少許接种在 4 公升三角瓶內, 其中含有种子培养基 400 毫升, 放在 25°C 恒温室中搖床上, 培养 36—48 小时后, 培养液稠厚, 表示菌絲繁盛, 即可作下一步种子培养之用。

3. 攪瓶種子培養 攪瓶設備見青霉菌培養研究^[6]。瓶中裝種子培養液 5 公升，自 4 公升三角瓶中將全部培養液接種于攪瓶中，通入無菌空氣并加以攪拌，置于 25°C 恒溫水池中培養 24—36 小時，俟菌絲稠厚即可作接種醱酵罐之用。

4. 醱酵培養 醱酵罐設備見青霉素的研 究^[6]。每罐裝醱酵培養基 50 公升，豆油 100 毫升，在溫度 115°C 滅菌 30 分鐘，冷卻后，將攪瓶種子液接種在醱酵罐中，攪拌速度為每分鐘 240 轉，溫度為 24—25°C，空氣量為 0.5 體積。

提煉方法

離子交換法：陽離子羧基樹脂是根據梅澤純夫氏方法^[4]綜合而成，顆粒大小為 20—40 篩號，陰離子樹脂為 Ionic-A-300。

1. 培養液的处理 取培養液 40—50 公升，加入草酸 100 克，用硫酸調節至 pH 2.0，加活性炭 1—2%，攪拌 5 分鐘后，加適量助濾粉 (Celite) 過濾，如濾液不清可再濾一次，用氫氧化鈉溶液將濾液調節至 pH 7.5—8.0，然后過濾，除去懸濁物。

2. 鏈霉素在陽離子樹脂上的交換 將所得之澄清濾液通過 Na^+ 式樹脂，進行交換，鏈霉素及部分色素被吸附或交換在樹脂上。以蒸餾水洗滌樹脂，去掉雜質，用 1 N 硫酸把鏈霉素由樹脂上釋出，后一部分釋出液含酸頗多，可用 OH^- 式陰離子樹脂中和之，并通過 $\text{SO}_4^{=}$ 式陰離子樹脂除去綠色色素，然后再使其通過 Na^+ 式陽離子樹脂進行交換，同樣地用 1 N 硫酸將鏈霉素釋出，取濃度最高的部分，加在丙酮中 (1:4)，于是無定形鏈霉素硫酸鹽即沉淀出來，鏈霉素濃度較低部分，其中酸性較強，下次提煉時可作釋出樹脂上鏈霉素之用。

3. 鏈霉素硫酸鹽的精制 將上述粗制品溶于適量雙蒸餾水中，調節至 pH 4.0，加氧化鋁 5%，激烈攪拌后，過濾，濾液呈淡黃色，通過塞氏過濾器滅菌，在嚴格無菌操作下，分裝，然后進行冷凍干燥，如此所得之成品純度可達 600 單位/毫克以上。

實驗結果与討論

1. 处理菌种的結果

(1) 紫外光处理：利用紫外光处理鏈霉菌孢子，死亡率極高，一般可達 99.9% 以上 (見表 3)。

113 号鏈霉菌孢子懸液稀釋 100,000 倍后，接種于雙碟上，不經紫外光照射，結果可生長 500 顆以上菌落，但將孢子懸液不加稀釋經紫外光照射 5 分鐘后，僅存 10 顆菌落，故死亡率極高。

表3 紫外光照射時間对菌落生存数量之影响

113 号孢子懸液濃度	原液稀釋十萬倍	原 液		原 液		原 液		原 液	
紫外光照射時間(分)	0	2		3		4		5	
500W 灯光輻射時間(分)	0	0	120	0	120	0	120	0	120
每碟菌落生長數(顆)	500以上	16	200	8	70	汚染	45	9	10

原始 601 号鏈霉菌，經在搖瓶中培养，產量僅200單位/毫升，經多次紫外光处理后，得 F17 号菌种，在醱酵罐中培养，效价可达 854 單位/毫升。

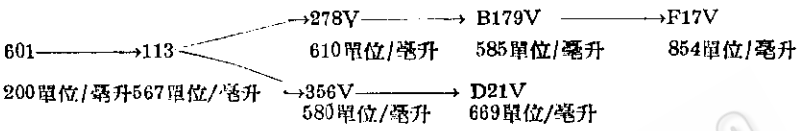


圖2 601 号菌种經紫外光处理后菌种衍变及產量增加之情况
(在醱酵罐中結果)

(2) 温度处理:

温度处理亦能得到產量較高的菌种，但衰退比用紫外光处理的菌种更快，產量随培养次数逐漸下降(見表4)。

表4 在搖瓶中温度处理与紫外光处理后菌种穩定性的比較，產量單位/毫升

菌 种	挑选时產量	第一次重复后產量	第二次重复后產量	第三次重复后產量	第四次重复后產量
F 7-V	640	570	460	760	600
F17-V	600	660	416	568	680
F 5-T	680	480	231	很低	很低
F11-T	630	480	216	很低	很低

註: -V 代表用紫外光处理的菌种，-T 代表用温度处理的菌种。

2. 培养結果

將經過紫外光处理后所得之优良菌种分別進行醱酵罐培养，每个菌种最初几次培养时所產之效价均高于后几次的效价(見表5)，不同培养温度如 25℃ 或 27℃ 对于鏈霉素產量虽有影响，但不十分明顯，从試驗結果看來，温度 25℃ 較為適宜(見表6)。

3. 提炼結果

鏈霉素培养液經第一次离子交换后，鏈霉素完全被交换至樹脂上，廢液中并不含有鏈霉素，但用 1 N 硫酸釋出时，僅为全量之 80% 左右，將此釋出液經過陰离子樹脂中和并脫色，通过第二离子交换柱，廢液中仍無鏈霉素，再釋出时又有 15—20% 損失，故在正

常情況下, 提煉總收率均為 52—62.5% (見表 7)。

表 5 不同菌種在酸酵罐中產量的比較 (25°C)

菌		种		号			
278		356		D21		F17	
批 号	產 量	批 号	產 量	批 号	產 量	批 号	產 量
54—12	510	54—12	670	54—29	652	54—40	834
54—15	610	54—15	550	54—30	530	54—40	854
54—18	542	54—18	580	54—32	669	54—41	738
—	—	54—21	552	54—32	588	54—42	729
—	—	54—22	442	54—33	500	54—43	672
—	—	54—28	420	54—39	402	54—44	630

表 6 F17 號菌種在不同培養溫度下對產量之影響

產量 (單位/毫升) 溫 度	批 號	54—44	54—46
	號		
25°		630	683
27°		616	630

表 7 鏈霉素提煉結果

批 號	培 養 液		第一次離子交換			第二次離子交換			粗 制 品		總收率 %
	效 價 單位/毫升	體積 公升	廢液	釋出液 單位/毫升	收回 %	廢液	釋出液 單位/毫升	收回 %	重量 克	效 價 單位/毫克	
15	535	45	—	4720	70	—	15300	61.8	30	430	52
16	330	40.5	—	3000	90	—	10760	80.0	17	450	58
40	588	34	—	3200	82	—	15500	64.0	17.3	516	44.7
41	603	58	—	4800	80	—	21900	50.0	21	450	43.2
42	600	50	—	1890	75	—	15000	60.0	18.2	620	52.9
43	560	42	—	2040	72	—	18800	65.0	13.3	546	53.2
44	511	39	—	3300	74	—	13200	67.0	14	636	62.5

一定量的鏈霉素溶液通過離子交換柱時, 液體的流速與樹脂的始漏容量 (leakage capacity) 成反比 (見圖 3)。流速愈慢, 鏈霉素的始漏容量愈大。例如將含有 400 單位/毫升的鏈霉素培養液以每分鐘 50 毫升的流速通過離子交換柱 (內裝樹脂 500 克, 20—40 篩號)。連續交換至 65 公升時, 流出的廢液始含鏈霉素 20 單位/毫升 (始漏點)。如流速改為每分鐘 200 毫升, 則 40 公升時已達始漏點。為了使樹脂發揮最大的能力, 必需注意控制培養液流速。

利用紙型色層分離法測定鏈霉素培養液中是否含有它種鏈霉素, 如甘露糖鏈霉素

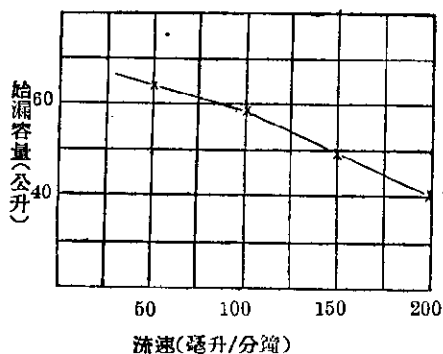


圖3 树脂交换容量与流速的关系

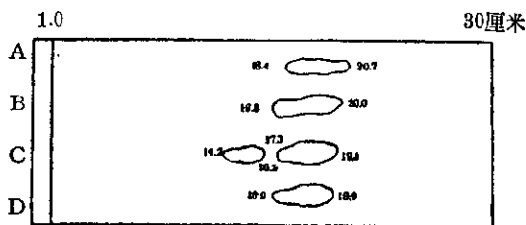


圖4 鏈霉素培养液之色層分离

- A. 鏈霉素培养液(1953. 6. 15 第4罐);
 B. 鏈霉素培养液(1953. 6. 15 第3罐);
 C. 双氢鏈霉素与 F.D.A. 标准鏈霉素;
 D. F.D.A. 标准鏈霉素。

(manosido streptomycin) 等, 可將培养液稀释至每毫升含 100 單位, 用注射器加 10 微升到濾紙条上。放入玻璃缸中, 經過 20 小时后取出, 進行生物檢定, 观察仰菌圈的位置。从实验結果来看, 鏈霉素标准品仰菌圈位置 $R_f = 0.6$ (見圖 4), 檢品为 $R_f = 0.61 - 0.65$ 。故此証明培养液中含鏈霉素与标准品一致, 不含其他种鏈霉素。

結 論

本試驗初步建立了鏈霉素制造方法。

鏈霉菌經過紫外光处理后, 可选得較高的菌种, 在醱酵罐中產生鏈霉素最高可达 854 單位/毫升, 但容易变异, 效价逐漸降低。目前尚未觉得產量穩定的菌种, 鏈霉素生產过程中每一步驟可用化学檢定作参考且与生物檢定結果接近, 并能在 2 小时内得出結果, 提煉收回率平均約为 52—62%; 所得之鏈霉素硫酸鹽純度可达 636 單位/毫克。培养液經過色層分离的測定, 并不含它种鏈霉素。

参 考 文 献

- [1] Carter et al. *J. Biol. Chem.* 160: 337, 1945.
- [2] 中華人民共和國衛生部抗生素檢定暫行規則 26—30, 1954.
- [3] C. V. St. John. et al. *Anal. Chem.* 23:1289, 1951.
- [4] 梅澤純夫等: *J. of Antibiotics* (日文) 5:417, 1952.
- [5] Peterson, D. H. et al. *J.A.C.S.* 72:3598, 1950.
- [6] 張为申、黃大麟、王文翔、馬祺勝: 微生物学报, 1(1):66, 1953.

EXPERIMENTAL PRODUCTION OF STREPTOMYCIN

CHANG WEI-SHEN, HUANG TA-PIN, CHUNG HSI-LIANG, FAN CHENG-TIEN, WU KUO-WU

HSU HSUEH-YING AND WANG WEN-HSIANG

Antibiotic Laboratory, National Vaccine and Serum Institute, Peking

In order to facilitate the production of streptomycin in this country, experimental procedures concerned have been studied by the authors in the hope that the results may prove helpful to the actual manufacturing process.

Streptomyces selected with the aid of ultraviolet rays yielded certain strains producing 854 units per ml in the fermentation tank. However, the organism showed a marked tendency to variation with the loss of ability to produce antibiotics within a short period of time. It has not yet been possible to maintain the high titre variant in the laboratory thus far.

The authors were able to check the various steps in the production of streptomycin by means of chemical determinations, which agreed within 5% with the biological method. This chemical test could be carried to completion within two hours.

The actual yield in the purification process was about 52%, and eventually the purified sulfate salt contained 636 units per mg. It was also found to be free from other types of streptomycin.