

大量青霉素酶的制备^{* **}

童村 丁曼丽 许文思 李椿 张筱玉 魏敏芳

(轻工业部国营上海第三制药厂)

青霉素制剂的无菌检验与临床样品培养,须将青霉素完全破坏,使其所含杂菌,特别是对于青霉素敏感的,得以繁殖。破坏青霉素的物质,必须效力强,作用快,并无抑菌性能。青霉素酶是符合以上要求的。国内检定机构,各自用静置或摇瓶培养青霉素酶,经无菌过滤使用。但因保存困难,必须经常制备并在试验室制取青霉素酶,手续麻烦,需时较长,效价不高也不一致,且酶中常含有抗生物质,所以对于一种易于保存,使用方便,质量标准化青霉素酶的要求,就益感迫切。

生产青霉素酶的惯用方法,是在培养过程中,按时加入青霉素,促进产酶菌新陈代谢,增加酶产量,此法不仅操作复杂,并且也不经济。加藤嵩一^[1]曾用青霉菌与腊状杆菌在摇瓶中同时培养。产酶菌所需青霉素,由青霉菌供给,酶产量很高,因此用我厂发酵设备,在控制条件下,于发酵罐中培养青霉菌与腊状杆菌,可得大量青霉素酶,予以提纯,制成粉末,再加以灭菌,质量经久不变,同时亦可省去过滤手续。经过研究试制,所得成品,可以满足要求,兹将制造过程详述于下。

在150公升不锈钢制发酵罐找出了共同培养青霉菌与腊状杆菌的条件。首先确定了在25°C,搅拌每分钟200转及以1:2通气体量进行发酵。在灭菌环境下,将已发酵到36小时的100公升青霉菌原液,导入罐内。该原液除含有500单位/毫升青霉素外,尚有剩余原料(原配料3%棉籽粉及乳糖,1%葡萄糖,0.3%硝酸钠及碳酸钙与少量豆油)可以继续被利用生长青霉素,促进腊状杆菌的新陈代谢。同时将振荡培养到18小时的腊状杆菌菌液,按青霉菌原液5%并将0.2%蛋白胨种入青霉菌原液内,混合培养。每隔4小时作效价检定一次。检定条件是以在中性的pH,37°C 1小时破坏一个单位青霉素所需用的酶,为一个酶的单位。在控制环境下,培养至35小时,pH上升至8.2时,酶产量达到最高峰,每毫升能含酶30万单位,按上述方法作过5批,单位容积产量,均可达到20—30万单位。

* 1956年4月20日收到。

** 已在1955年全国抗生素学术会宣读。

由發酵罐放出来的原液,先用筐式离心机分离菌体,取得比較清晰的原液。再經超速离心机將原液濃縮,然后放入 50% 硫酸銨,用冰醋酸調节 pH 至 5.2—5.4。在此时加入 2% 矽藻土,控制 pH 在 5.4—5.2 以下,經冷却 24 小时過濾。將所得濃餅,用 0.5% 濃度的氨水,分次洗脫酶及一部分类似酶的蛋白質,經過過濾將不溶解物質濾除,嗣將 15% 純硫酸銨放于濾液內并濾过,去除不需要的蛋白質,再加入 45% 硫酸銨,將 pH 調节至 5.2—5.4 經冷却几小时后,過濾。濃餅用無水丙酮洗滌。在室温进行真空干燥,得褐色無定形粉末,純度可达 15 万單位/公絲。总回收率約为 50%。

將粉末溶于 pH 8.0 水內,過濾后即可使用。惟考虑到現時国内个别使用部門,恐缺乏沙棒或玻璃沙漏斗等無菌過濾設備,为了配合他們的要求,將已秤好的小量粉末,裝于瓶內,用氧化乙烯灭菌 6 小时,將沾染的杂菌完全杀死,而酶的活动力則毫未减低。用鉛盖封閉,質量經久不变,使用时在無菌环境下,以适当量 pH 8 的水,將粉末溶解,稀釋到所需單位含量,直接加入样品內,免去了秤量与過濾手續。

我厂用鹽酸羥胺破坏普魯卡因青霉素来檢驗成品染菌,結果是經常無菌的,自从用青霉素酶破坏青霉素,培养样品,就發現个别批号成品有染菌。但用靜置培养的酶作对照檢查,兩者結果就不是完全一致的。提純的酶似乎比較灵敏些;經研究結果,查出了靜置培养的酶有时含有抗生物質,抑制杂菌的生長,这种物質在何种条件下才能生長,是一个很有意义的問題,我們正在作进一步的研究。

参 考 文 献

[1] 加藤嵩一:日本生物科学季刊 5:(2)56,(3)105,1953.

A STUDY ON THE LARGE SCALE PRODUCTION OF PENICILLINASE

TUNG TSUN, TING MAN-LI, HSU WEN-SHIH, LI TSUN, CHANG SHIAO-YI,

AND WEI MIN-FANG

The National Shanghai Pharmaceutical Plant No. 3, Shanghai

For the inactivation of penicillin in the detection of bacterial contamination of penicillin preparations, or the isolation of organisms from clinical specimens from patients given penicillin, it is customary to employ filtrates of penicillinase prepared from still or shake flasks which require fresh preparations, order irregular in potency, and often contain active antibiotic substances. In order to overcome such shortcomings, we have attempted to cultivate

penicillinase in fermentation tanks and have obtained large amounts of purified substance of uniform quality.

The optimal conditions for cultivating penicillinase producing organisms in a 150-liter stainless steel fermentor was as follows: 100 liters of penicillin fermentation broth of 36 hours duration and 5 liters of *B. cereus* shake flask culture of 18 hours duration were transferred to the fermentor. These two were brought together and let the *Penicillium chrysogenum* and *B. cereus* grow together for about 30 hours when the pH became above 8 and when the production of penicillinase reached the maximum. The yield was 200,000 to 300,000 units per ml.

The resulting culture broth was first clarified through centrifugation, and then, the penicillinase was extracted from the clear broth by salting out process using 50% ammonium sulfate. The precipitate was dissolved in ammonia water and the salting out process was repeated under controlled pH conditions. The resulting precipitate was washed with anhydrous acetone and vacuum dried at room temperature. The dried powder was sterilized by ethylene oxide and sealed in glass bottles. The preparation is ready for use when it is dissolved in slightly alkaline water.