

# 無色青黴菌株 W-49 133 (*Penicillium chrysogenum*) 產生青黴素的研究

## I. 以國產原料棉籽餅代替玉蜀黍漿的搖瓶培養實驗

張為申 徐學瑛 朱濟廣

(中央生物製品研究所抗生素室, 北京)

產生青黴素的培養基主要成分為玉蜀黍漿與乳糖, 玉蜀黍漿為澱粉工業的副產品, 而我國澱粉工業尚未發展, 玉蜀黍漿的取給, 咸賴自國外購買, 如要大量製造青黴素, 則自國外購買, 頗不經濟, 並隨時有中斷之虞, 故希望能以現有的國產原料代替之。文獻<sup>[1]</sup>上載許多種含氮物如古巴優質糖稀 (Cuban high-test molasses), 拜克脫朮 (Bacto-peptone), 狄非可酵母粉 (Difco yeast extract), 溶解肝液 (solubilized liver), 天門冬菜汁 (asparagus-butte juice), 草汁乾粉 (grass juice powder), 米漿 (rice steep), 棉籽餅粉 (cotton-seed meal extract), 肝粉 (ground liver), 肝浸透液 (liver infusion), 與碎肉粉 (meat-scrap meal) 等其功效遠不如玉蜀黍漿。Foster 等氏<sup>[2]</sup>曾論及青黴菌 X-1612 與 Q 176 二菌株如用棉籽餅 (cotton-seed meal) 為氮的來源, 則青黴素的產量並不減於原用之玉蜀黍漿, 甚或過之。童村、馬譽激、湯飛凡<sup>[3]</sup>曾試用水解的棉籽餅以代替玉蜀黍漿, 結果良好, 但水解棉籽餅手續繁多, 如青黴菌能直接利用棉籽餅, 則可省去水解過程。無色青黴菌株 W-49 133 的青黴素產量每毫升可達 1,500 單位, 且不分泌色素, 對於提煉結晶可以減少許多困難, 但此菌株能否利用棉籽餅, 則從未加以研究。本文目的為試用 133 菌株能否直接利用棉籽餅, 同時並培養 Q 176 與 133 二菌株於玉蜀黍漿與棉籽餅兩種培養基中, 比較其生長情況, 與青黴素之產量。

### 菌 種

青黴菌株為 Q 176 與 W-49 133, 效價檢定用之菌種為金黃色葡萄球菌 209P

(*Staphylococcus aureus*)。

## 培 養 基

### 1. 孢子培養基

#### 培養基 (I)

甘油	0.75 克
葡萄糖	0.75 克
腺	0.5 克
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.005 克
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.006 克
NaCl	0.4 克
瓊脂	2.5 克
水 加至	100 毫升

#### 培養基 (II)

蜂蜜	6.0 克
腺	1.0 克
瓊脂	2.0 克
水 加至	100 毫升

### 2. 搖瓶培養基

#### 培養基 (III)

玉蜀黍漿(固體)	2.0 克
乳糖	4.0 克
NaNO <sub>3</sub>	0.3 克
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 克
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.025 克
CaCO <sub>3</sub>	0.5 克
水 加至	100 毫升

#### 培養基 (IV)

棉籽餅*	4.0 克
乳糖	4.0 克
NaNO <sub>3</sub>	0.3 克
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 克
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.025 克
CaCO <sub>3</sub>	0.5 克
水 加至	100 毫升

## 培 養 方 法

### 1. 孢子培養

培養 Q 176 時用培養基 (I), 133 則用培養基 (II), 這樣可以各得其最好的孢子生長。置 20 毫升孢子培養基於大試管 (30×195 毫米) 中, 加棉花塞, 在 15 磅壓力下消毒 40 分鐘, 放成斜面, 冷卻後用無菌操作自孢子沙土管內用白金耳取出少許含孢子的沙土, 均勻的種於斜面上, 保持在 25°C 約 5—7 日, 俟長出一厚層深綠色孢子時, 即可應用。

\* 所用棉籽餅為北京中華製油廠榨取過棉籽油的乾餅, 磨細後過篩, 約可得一半粉末。用凱氏測氮法測得其中含蛋白質量 38.4%。

## 2. 搖瓶的培養

置 100 毫升培養基 (III) 或 (IV) 於 500 毫升三角瓶中, 培養基的 pH 在未消毒前調節為 5.3—5.7, 在 15 磅壓力下消毒 30 分鐘, 冷卻後接種孢子。孢子懸膠液的製法, 係於一已經生長良好的孢子大管中, 加入 30 毫升消毒的蒸餾水, 用刮棒將孢子刮起, 均勻的懸着在水中, 用大口吸液管吸出, 每個三角瓶接種 5 毫升, 放在 25°C 保溫室搖床上搖動之, 搖動速度為每分鐘 96 次, 擺動距離為 2 寸。每隔 24 小時加進 0.1% 甲苯乙酸鈉, 培養 48 小時後, 每天取出樣品, 測定其青黴素效價、pH 與剩餘糖量。

## 分 析 手 續

1. 乳糖的測定, 按照 Shaffer 與 Somogyi<sup>[3]</sup> 方法, 但需注意, 乳糖之水解需時較長, 在 120°C 需時 30 分鐘, 100°C 則需 2 小時, 乳糖水解後與糖試劑的作用亦較慢, 需時 25 分鐘。

2. 效價檢定。用杯碟法, 試驗菌為金黃色葡萄球菌<sup>[4]</sup>。

3. 全氮之測定。用凱氏定氮法<sup>[5]</sup>。

## 實 驗 結 果 與 討 論

1. 比較 133 與 Q 176 二菌株在培養基 (III) 與 (IV) 中之青黴素產量與生長情況。

自表 1 中結果看出 133 菌株在棉籽餅培養基中能產生很高的青黴素效價, 第七瓶在第六天每毫升即達 750 單位, 雖略遜於玉蜀黍漿培養基, 但相差甚微, 176 菌株在棉籽餅培養基中青黴素之產量不如 133。在棉籽餅培養基中 133 菌株 pH 穩定直至 192 小時, 才上昇, 能維持 pH 在 7.0—7.8, 對於青黴素的產生是很有利的。133 菌株的用糖量比 176 快, 其在棉籽餅培養基中消耗糖之速度與在玉蜀黍漿培養基中相等, 至 144 小時其剩餘糖量皆甚微, 祇有 0.39—0.51%, 在這時候產生最高效價。

自第一實驗中得知 133 菌株可以直接利用棉籽餅, 下面兩個實驗用不同量的棉籽餅與不同量的乳糖, 以求得青黴素之最高產量。

2. 133 菌株在不同量的棉籽餅培養基中所產生的效價, 除棉籽餅量改變外, 其他成分皆照培養基 (IV)。

表 1 比較 133 與 Q 176 二菌株在兩種培養基中的青黴素效價 (單位/毫升), pH, 與剩餘糖量 (百分數)。

瓶號*	菌株名	時間(小時)								
		0	48	72	96	120	144	168	192	
1	176	效價	0	59	216	270	400	624	510	8.16
		pH	5.52	7.78	7.9	7.85	7.8	7.7	7.92	
		糖量	3.65	3.5	3.16	2.32	1.71	1.33	0.66	
2	176	效價	0	36	210	296	480	632	512	8.26
		pH	5.52	7.78	7.92	7.9	7.8	7.85	7.95	
		糖量	3.65	3.63	3.12	2.31	1.83	1.32	0.70	
3	133	效價	0	66	345	446	840	800	670	8.78
		pH	5.52	7.72	7.52	7.56	7.72	8.09	8.33	
		糖量	3.65	3.38	2.6	1.32	0.89	0.33	0.24	
4	133	效價	0	38	220	440	720	800	832	8.68
		pH	5.52	7.8	7.57	7.56	7.68	7.98	8.11	
		糖量	3.65	3.4	2.85	1.95	1.15	0.63	0.22	
5	176	效價	0	10	270	294	464	480	512	8.41
		pH	6.4	6.35	7.18	6.95	7.13	7.35	7.73	
		糖量	3.8	3.51	3.4	2.06	1.55	0.6	0.24	
6	176	效價	0	13	290	368	424	—	545	8.25
		pH	6.4	6.39	7.25	6.8	7.13	7.5	7.6	
		糖量	3.8	3.72	3.33	2.16	1.65	0.74	0.25	
7	133	效價	0	90	340	456	680	750	608	8.32
		pH	6.4	7.52	7.5	7.2	7.1	7.25	7.68	
		糖量	3.8	3.6	2.6	1.88	1.33	0.51	0.26	
8	133	效價	0	81	290	520	545	570	551	8.56
		pH	6.4	7.6	7.55	7.15	7.12	7.25	7.8	
		糖量	3.8	3.38	2.5	1.8	1.1	0.39	0.23	

\* 1,2,3,4 瓶係用培養基 (III); 5,6,7,8 瓶用培養基 (IV)。

自表 2 中的結果看出以 2% 棉籽餅為最適宜, 在此培養基中 133 菌株於 120 小時產生每毫升 804 單位的青黴素, 用糖亦甚快。133 菌株在 3% 棉籽餅培養基中至 144 小時始能產生每毫升 555 單位, 用糖量亦較慢。至於在 4% 棉籽餅培養基中, 其青黴素產量劇減, 至 144 小時每毫升祇有 386 單位, 糖之消耗緩慢, 此點與第一實驗結果不符, 在第一實驗中 133 菌株培植於 4% 棉籽餅培養基中其效價為每毫升 750 單位, 以後曾一再重覆這個實驗, 但皆未得到此記錄, 可能原因即所用棉籽餅批號不同, 在第一實驗所用的棉籽餅或許是所含抑制物極微, 與以後所

表 2 133 菌株在不同量的棉籽餅培養基中所產生的青黴素效價(單位/毫升), pH, 與剩餘糖量(百分數)。

瓶號	時間(小時)		48	72	96	120	144	168
	棉籽餅量	%						
1	2	效價	136	390	552	804	528	762
		pH	7.35	7.59	8.2	7.62	8.05	8.15
		糖量	3.47	2.93	2.1	1.7	0.87	0.47
2	2	效價	124	393	680	666	672	609
		pH	7.25	8.0	8.0	7.88	7.88	8.2
		糖量	3.42	2.68	1.99	1.28	0.77	0.47
3	3	效價	122	225	444	405	540	472
		pH	7.45	7.85	7.95	7.67	7.56	7.45
		糖量	3.7	3.13	2.57	2.19	1.36	0.91
4	3	效價	138	252	432	480	555	490
		pH	7.35	7.74	7.85	7.79	7.58	7.65
		糖量	—	3.13	2.5	1.97	1.3	0.89
5	4	效價	115	198	284	208	296	316
		pH	7.5	8.0	7.85	7.4	7.66	7.8
		糖量	3.82	3.7	2.97	2.47	1.8	1.45
6	4	效價	142	225	268	324	386	288
		pH	7.45	7.9	7.85	7.59	7.68	8.0
		糖量	3.5	—	2.67	2.31	1.7	1.28

用的棉籽餅不同。

3. 133 菌株在不同量的乳糖培養基中所產生的青黴素效價, 除棉籽餅改用爲 2% 與乳糖量更換外, 餘均按照培養基 (IV)。

表 3 中指出不同量的乳糖對於青黴素產量亦有影響, 133 菌株在 2% 乳糖培養基中, 至 120 小時可產生每毫升 720 單位, 剩餘糖量極微, pH 上升。用 3% 乳糖培養基在 144 小時其效價可達每毫升 800 單位, 剩餘糖量亦極微。用 4% 乳糖培養基在 120 小時可產生每毫升 740 單位, 剩餘糖量尚有 1.57%, 第五瓶擠破無記錄, 現祇用第六瓶之結果下結論似乎不夠, 但可參考表 2 中 1、2、兩瓶的結果, 因其所用培養基成分與表 3 中 5、6、兩瓶相同, 其結果最高爲每毫升 804 單位, 並不比用 3% 乳糖培養基的效價高, 爲節省乳糖計而同時能得到高的效價故以用 3% 乳糖爲最適宜。

從以上結果得知 133 菌株可以直接利用棉籽餅, 並產生相當高的青黴素效

表3 133 菌株在不同量的乳糖培養基中所產生的青黴素效價(單位/毫升), pH, 與剩餘糖量(百分數)。

瓶號	時間(小時)		48	72	96	120	144	168
	乳糖量	%						
1	2	效價	50	315	486	700	570	310
		pH	7.68	7.28	7.44	7.92	8.2	8.5
		糖量	1.98	1.08	0.55	0.26		
2	2	效價	71	432	555	720	508	225
		pH	7.72	7.36	7.62	7.62	8.3	8.6
		糖量	1.94	1.09	0.64	0.27		
3	3	效價	74	432	420	680	800	486
		pH	7.74	7.36	7.66	7.75	8.05	8.25
		糖量	2.78	1.91	1.31	0.67	0.34	
4	3	效價	76	420	399	632	790	336
		pH	7.66	7.44	7.79	7.8	8.05	8.35
		糖量	2.78	1.84	1.26	0.62	0.35	
5	4	效價						
		pH						
		糖量						
6	4	效價	84	283	366	740	726	591
		pH	7.64	7.42	7.8	7.85	7.95	8.0
		糖量	3.71	2.77	2.27	1.57	0.96	0.47

價,現用搖床速度太慢,空氣供給量不足,如換以旋轉搖床供給大量空氣,則其效價很可能再提高,時間亦或可縮短,根據文獻<sup>[6]</sup>上載 176 菌株在玉蜀黍漿培養基中其青黴素產量每毫升可達 2,100 單位,但不甚適宜於棉籽餅培養基,並且 176 分泌黃色素,對於以後提煉及結晶都有妨礙故不如選用 133 菌株為宜,培養 133 菌株的其他原料如乳糖,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CaCO}_3$  等皆係國產,將來如採用 133 菌株,大量製造青黴素,則所用原料皆可自給,特別是棉籽餅,來源豐富,價格低廉,每斤祇人民幣 700 元,較諸玉蜀黍漿每斤萬元,相差殊懸。

## 結 論

無色青黴素菌株 W-49 133 可以直接利用棉籽餅,在搖瓶培養中其效價每毫升可達 800 單位,棉籽餅的最適量為 2.0%,乳糖為 3.0%。

誌謝: 本實驗承張淑賢、李茜、宋詵三同志協助做效價檢定及糖量分析特此誌謝。

## 參 考 文 獻

- [1] Bowden, J. P. and W. H. Peterson, *Arch., Biochem.*, 1946, **9**, 387.
- [2] Foster, J. W., H. B. Woodruff, D. Perlman, L. E. McDaniel, B. L. Walker, and D. Hendlin, *J. Bact.*, 1946, **51**, 695.
- [3] Shaffer, P. A. and M. Somogy, *J. Biol. Chem.*, 1933, **100**, 695.
- [4] Food and Drug Administration, Federal Register, 1949, Aug. 13.
- [5] Hawk, P. B., B. L. Oser, and W. H. Summerson, *Practical Physiological Chemistry*, 12th Edition, p. 814.
- [6] *Antibiotics Research*, University of Wisconsin, 1949, Report No. 10, May 1.
- [7] 董村、馬譽敏、湯非凡, 中華新醫學報, 1950, 1 (1) 5月。

## PENICILLIN PRODUCTION WITH *PENICILLIUM* *CHRYSOGENUM* STRAIN W - 49 133.

### I. EXPERIMENTS ON COTTON-SEED MEAL MEDIUM IN SHAKING FLASKS.

CHANG W. S., SHIU S. Y. and CHU C. K.

*National Vaccine and Serum Institute, Peking, China*

An account is given on experimental penicillin production with *penicillium chrysogenum* W—49 133 in shaking flasks, using cotton-seed meal instead of the usual corn steep liquor in the preparation of culture medium. A yield of 800 units per ml. may be obtained in 5-6 days. The optimal amounts of cotton-seed meal and lactose are 2.0% and 3.0% respectively.