

無色青黴菌株 W-49 133 產生 青黴素的研究

II. 以國產原料棉籽餅代替玉蜀黍漿在醱酵罐中的培 養及青黴素的提煉

張爲申 黃大釁 王文翔 馬祺勝

(中央生物製品研究所抗生素室, 北京)

自前文中得知無色青黴菌株 133 能直接利用棉籽餅, 但祇是初步結果, 不一定能適用於工業上大量生產, 如用設備完善之 30 升或 100 升的醱酵罐進行培養, 則其結果與情況頗與 15,000 加侖之大醱酵罐相似, 本室原有 100 升醱酵四個, 故利用已有設備, 進行小型工業上之試驗, 醱酵後並進行提煉, 結晶等研究, 以備將來提供生產之用。

菌 種

青黴菌株爲 W-49 133, 效價檢定用之菌種爲金黃色葡萄球菌 209 P。

培 養 基

1. 孢子培養基見前文^[1]

2. 搖瓶培養基

葡萄糖	40 克
棉籽餅	30 克
自來水	1 升

3. 攪瓶培養基

葡萄糖	40 克
棉籽餅	30 克

碳酸鈣	1.9 克
*鹽類的混合物	3.8 克
自來水	1 升
*鹽類的混合物	
KH_2PO_4	7 克
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 克
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 克
MnSO_4	0.1 克
NaNO_3	42.0 克

4. 醱酵罐的培養基

葡萄糖	10.0 克
乳 糖	40.0 克
棉籽餅	40.0 克
NaNO_3	3.0 克
NaSO_4	1.0 克
CaCO_3^*	5.0 克
自來水	1 升

*調節到 pH 5.3—5.8 再加入 CaCO_3 , 消毒後 pH 普遍升高至 7.0 左右。

培 養 方 法

搖瓶及攪瓶皆爲接種之用, 培養目的爲要得到旺盛的青黴菌絲之生長, 而不在于產生青黴素, 故培養基中所用之糖, 全爲葡萄糖而不加乳糖。

1. 孢子培養見前文^[1]。

2. 搖瓶培養: 在 2 升三角瓶中放進 250 毫升培養基, 消毒後接種 5% 的孢子懸膠液, 置於 25°C 搖床上, 搖動 36—48 小時, 俟培養液稠厚, 表示菌絲繁盛即可應用。

3. 攪瓶培養: 用 18 升大瓶, 備有攪拌器, 空氣加入管, 取樣管, 出氣管等, 加入 5 升培養基, 自搖瓶中取出 250 毫升菌絲培養液, 接種於大瓶中, 通入濾過消毒空氣, 開始攪拌, 置於 25°C 保溫水池中, 培養 36—48 小時, 俟菌絲稠厚, 即可作接種之用。

4. 醱酵罐培養：100 升不銹鋼醱酵罐備有攪拌器，空氣加入管，取樣品管，甲苯乙酸鈉加入管，去沫劑加入管，出氣管，溫度計與壓力計等之設備，溫度之保持，利用水在夾層中循環，加進培養基 70 升，去沫劑 100 毫升（去沫劑為普通香油含有 3% 的十八醇），在 115°C，消毒 30 分鐘，冷卻後，用空氣自攪瓶壓入 3.5—4.5 升含有生長繁盛之菌絲培養液，攪拌速度為每分鐘 240 轉，保持溫度在 24°—25°C，空氣加入量為 0.65 體積（即每分鐘加入空氣 45.5 升）。12 小時後開始加甲苯乙酸鈉，每隔 12 小時加入 0.05%，每天取出樣品測定效價^[2]，糖量^[3]，與 pH，俟醱酵罐中剩餘糖量少於 0.8% 或 pH 上升至 7.8 以上，此時已醱酵完畢，須要出罐提煉，否則菌絲開始消化，pH 增高，青黴素破壞，效價降低。

提 煉 方 法

1. 提取青黴素自乙酸戊酯中

青黴素醱酵完畢後，壓入筐型離心機，將菌絲及不溶解物濾掉，濾清的原液（培養液）經冷卻管冷至 2°—5°C，同時將乙酸戊酯亦冷至 2°—5°C，將原液及乙酸戊酯一同導入攪拌器內，用硫酸將 pH 調節為 2.0，經過攪拌數秒鐘，立即流入高速離心機（Sharples supercentrifuge，每分鐘 25,000 轉）分開，由兩口流出，乙酸戊酯浸提液須保持在低溫度，否則青黴素在 pH 2.0 極易破壞。

2. 提取青黴素自緩衝液

用 pH 7.1 的磷酸鹽緩衝液自乙酸戊酯溶液中提取青黴素，攪拌、靜置後將緩衝液分出，留作以後結晶之用，經過提取後緩衝液之 pH 降為 5.6，仍有一部分青黴素留於乙酸戊酯中，再加入 pH 7.6 磷酸鹽緩衝液，重行提取，這部分青黴素留作製造普魯加因青黴素（Procaine penicillin）之用。

3. 提取青黴素至氯仿中與製備青黴素鉀鹽結晶

將 pH 7.1 提取的緩衝液冷卻，再加入冷的氯仿（Chloroform），用硫酸把 pH 調節到 2.0，攪拌後靜置數分鐘將氯仿分出，加入無水硫酸鈉，搖動 5 分鐘，過濾，在濾液中加乙酸鉀溶液直至 pH 升至 7.4，在室溫中靜置 30—60 分鐘，俟結晶完全後，過濾，用丁醇洗滌兩次，置 90°C 烤箱中乾燥 3 小時，磨細後分裝。

4. 普魯加因青黴素與其油劑的製造

濾過後，氯仿中仍有一部分青黴素未全結晶出來，為增加收回率計，再把青黴素提到緩衝液中，即加入氫氧化鉀溶液，調節 pH 為 7.0，再與以上於乙酸戊酯中

加 pH 7.6 緩衝液提取物混在一起，加入略爲過量的普魯加因鹽酸鹽，置冰箱中一夜，即得結晶普魯加因青黴素，過濾，用雙蒸水洗滌兩次，乾燥後，得淡黃色針狀結晶，如欲製油劑，則將普魯加因青黴素結晶磨成微小顆粒，其直徑約爲微米，消毒後與已經消毒的脫色香油（內含硬脂酸鋁鹽）混合均勻分裝，加蓋，自混合起一切皆須在無菌操作下爲之。

分 析 手 續

1. 乳糖的測定：按照 Shaffer and Somogyi 法^[3]。
2. 效價的檢定：用杯碟法，試驗菌爲金黃色葡萄狀球菌^[2]與碘滴定法^[4]。
3. 無菌試驗：用鹽酸羥胺破壞青黴素後再培養於硫乙醇酸鈉培養基中，視察有無細菌生長^[5]。

4. 熱原質測定：用兔耳靜脈注射法^[6]。

5. 毒力測驗：用小白鼠尾靜脈注射法^[7]。

6. N-乙基六氫吡啶 (N-ethyl piperidine) 法：測定青黴素 G 的百分數^[8]。

7. 紙型色層分離法：檢定青黴素之成分^[9]手續如下：

甲、材料

(1) 玻璃缸：取直徑 29 厘米，高 42 厘米的玻璃缸一個，其中置一四方鐵架，用玻璃棒兩根支架一不銹鋼製的溶劑槽於鐵架上，另備一塊直徑 33 厘米之玻璃板作爲缸蓋，板沿磨沙並塗上凡士林，使與缸口嚴密切合，缸蓋中心鑿一小圓孔，用軟木塞套一棒形玻璃管穿過小孔，作爲傾注溶劑到溶劑槽之入口，玻璃管上端可用軟木塞塞嚴，見圖 1。

(2) 濾紙：用 Whatman 1 號或 Reeve Angel 201 號濾紙，截成 45 厘米長，0.6 厘米寬之紙條。

(3) 檢定色層分離後紙條的培養槽：製長 47 厘米，寬 23 厘米，深 1.2 厘米之鋁框，在鋁框窄的兩邊各穿進螺絲釘兩個，釘之位置適在框深之半，用一塊大小合適的長方玻璃放在鋁框中，架住在四只螺絲釘上，在玻璃與鋁框接縫處，用膠布或橡皮膏貼起，然後把鋁框翻過來，貼上的膠布可以把玻璃固定住，並可防止熔化的瓊脂自縫隙中流出。另備一稍大的玻璃板，作爲蓋鋁框之用。

(4) 培養基

底層培養基成分

胰	6.0 克
酵母粉	3.0 克
肉膏	1.5 克
瓊膠	15.0 克
蒸餾水	至 1.0 升

上層培養基成分

胰	6.0 克
胰酶消化酪蛋白	4.0 克
酵母粉	3.0 克
肉膏	1.0 克
葡萄糖	1.0 克
瓊膠	15.0 克
蒸餾水	至 1.0 升

調整 pH 令其於消毒後為 6.5—6.6

(5) 1 毫升結核菌素注射器，附 25 號針頭作為量取檢品之用。

(6) 溶劑為水份所飽和之乙醚溶液。

(7) 緩衝液。於 20% K_2HPO_4 溶液中用 85% 磷酸調整至 pH 6.2。

乙、試法

(1) 準備濾紙條與滴注檢品

用鉛筆在紙條上距上端 12.5 厘米處作一標記，整個紙條浸入 20% 磷酸鹽緩衝液內，取出後用兩張乾濾紙把緩衝液吸去，這樣使緩衝液均勻地分佈在紙條上，

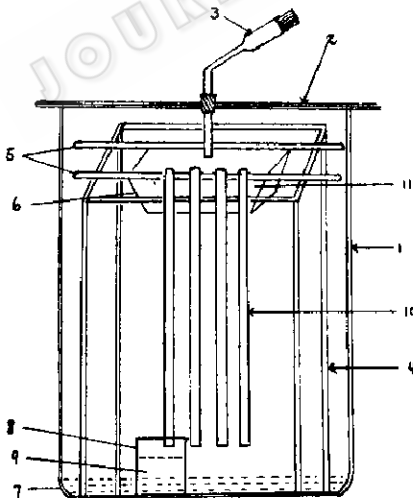


圖 1 1. 玻璃缸
2. 玻璃蓋
3. 灣曲玻璃管
4. 鐵架
5. 玻璃棒
6. 溶劑槽
7. 蒸餾水
8. 燒杯
9. 乙醚
10. 濾紙條
11. 溶劑

乾後用曲別針將紙條上端夾於一玻璃棒上，下端別一長約 1.2 厘米的細玻璃棒，使紙條不至於彎曲。將檢品稀釋至每毫升約含 100 單位青黴素，用結核菌素注射器加上約 5 微升檢品於鉛筆標記當中，乾後用一粗玻璃棒將紙條上端固定於空的

溶劑槽中，滴注檢品的位置，須距溶劑槽頂端約 2.5 厘米，其下面伸長至少爲 30 厘米。

(2) 在玻璃缸中進行色層分離的步驟

先在玻璃缸底傾入 300 毫升水，並置 100 毫升小燒杯兩個，其中裝有乙醚約 50 毫升，在 25°C 放置 24 小時，使缸內爲乙醚與水之蒸氣所飽和並達至平衡。將溶劑槽連同濾紙條放在缸內的鐵架上，1 小時後由缸蓋中心的入口處傾注溶劑至溶劑槽中，紙條上的青黴素即開始分離，其 R_f 數字係按下列次序遞增：X, G, F, H, F, K。經 20 小時後，溶劑已從紙條的下端流出，此時將紙條取出，在空氣中乾燥，剪去上端之 11.5 厘米與下端之 2.5 厘米。

(3) 用微生物檢定法測定紙條上的青黴素

在消毒的培養槽上加 200 毫升熔化的底層培養基，俟凝固後，再加上 60 毫升接種的上層培養基，其製法係將已消毒的上層培養基冷至 50°C，每 100 毫升加入曾經培養 16—18 小時的金黃色葡萄球菌 209 P 菌液 12 毫升，冷凝後，將紙條鋪上，放在 37°C 培育箱中 18 小時，再觀察結果。

實驗結果與討論

1. 以不同量之棉籽餅來比較青黴素的產量

培養基的成分皆按醱酵罐培養基，各次試驗中所不同者，即將棉籽餅成分改變。

自表 1 中的結果，可以看出 4% 的棉籽餅產生青黴素效價最高，3% 者次之，2% 的最少。兩批結果因棉籽餅的批號不同，故略有出入，但大致仍合乎規律，在第四天即達到最高單位，以往曾試過多次都要到第五天才達到最高效價，每毫升 1200 單位。那時所用的培養基是在 120°C 消毒 30—45 分鐘，空氣加入量爲 0.5 體積，接種培養基中沒有那麼多種鹽加入，自參考文獻^[10]後加以修改，始獲得這樣高的效價，並且將時間縮短 24 小時以上。

2. 以不同糖量比較青黴素的產量

以往都用 1% 的葡萄糖與 4% 乳糖，文獻^[10]載用玉蜀黍漿爲氮之來源時。祇用 1% 葡萄糖與 2.5% 乳糖。在棉籽餅培養基以何種糖量爲宜，並是否須要加進 CaCO_3 ，這兩個問題須加以研究，本實驗中所用培養基的成分，除將乳糖及 CaCO_3 加以改變外其餘皆與醱酵罐培養基相同。

表 1 青黴素效價與棉籽餅量的關係

批號—罐號	棉籽餅		時間(天)				
	%	效價*	0 天	1 天	2 天	3 天	4 天
15-1	2	效價*	0	86	412	661	1060
		pH	—	7.1	7.4	7.25	6.4
		糖量*	4.1	3.25	2.9	1.51	—
17-2	2	效價	0	25	312	580	872
		pH	7.35	6.91	7.34	7.6	6.05
		糖量	3.85	3.0	2.74	2.08	1.02
15-2	3	效價	0	108	496	808	1390
		pH	—	7.15	7.42	7.0	7.1
		糖量	4.3	3.35	2.7	1.12	—
17-2	3	效價	0	25	224	690	1168
		pH	7.2	6.97	7.39	7.52	5.75
		糖量	—	3.37	2.92	2.08	0.7
18-3	4	效價	0	—	500	1226	1424
		pH	6.65	—	7.41	7.5	7.65
		糖量	4.22	—	3.33	2.14	0.93
17-3	4	效價	0	25	568	1260	1400
		pH	7.2	6.99	7.38	7.5	7.75
		糖量	4.5	3.6	3.15	2.09	0.79

* 效價為每毫升之單位量, 糖量為未消耗之糖以百分數計。

表 2 青黴素的效價與糖量之關係及與 CaCO_3 的影響

批號—罐號	乳糖+ CaCO_3		時間(小時)					
	%	%	0	42	66	90	114	
18-1	2.5	+0.5	效價*	0	411	441	832	
			pH	6.7	7.4	7.5	7.92	
			糖量*	2.88	2.13	0.68	0.63	
18-2	2.5	+0	效價	0	161.5	321	757	
			pH	6.25	7.5	7.55	7.7	
			糖量	3.3	2.45	1.37	0.58	
18-3	4.0	+0.5	效價	0	500	1226	1424	
			pH	6.65	7.4	7.5	7.65	
			糖量	4.22	3.33	2.14	0.93	
18-4	4.0	+0	效價	0	159	222	510	672
			pH	5.9	7.25	7.0	7.1	7.4
			糖量	4.65	3.75	2.55	1.61	0.57

* 效價為每毫升之單位量, 糖量為消耗之糖以百分數計。

表 2 中看出 4% 乳糖與加 CaCO_3 的第三罐效價最高，在 90 小時每毫升即達 1424 單位，第一罐含有 2.5% 乳糖與 0.5% CaCO_3 ，在 90 小時可得到每毫升 832 單位，比第二罐不加 CaCO_3 的高些，而遠遜於第三罐，在第四罐中雖加入 4% 乳糖，但沒有 CaCO_3 ，發酵遲緩，效價亦低，至 114 小時每毫升祇有 672 單位，其 pH 也一般的比較低，可能是因為培養基中糖量高容易產生酸，全靠棉籽餅消化後的氨基酸來穩定 pH，顯然不夠，所以必須加 CaCO_3 來穩定之。

產品的青黴素 G 成分

棉籽餅代替玉蜀黍漿同樣的可以得到很高的效價，但其中所含是否全部為青黴素 G？現用下二法來鑑定：

(1) 乙酸戊酯浸提液的效價先用杯碟法測定，經過濃縮等手續後與 N-乙基六氫吡啶結合而將青黴素 G 沉澱下來，兩次實驗結果青黴素 G 為乙酸戊酯中效價之 109.36% 與 108.86%，杯碟法檢定效價可能有 15% 的誤差，故結果超出 100% 並非意外，但這結果已足夠證明乙酸戊酯浸提液中所含的青黴素有 95% 以上是 G。

(2) 紙型色層分離法之結果見圖 2：

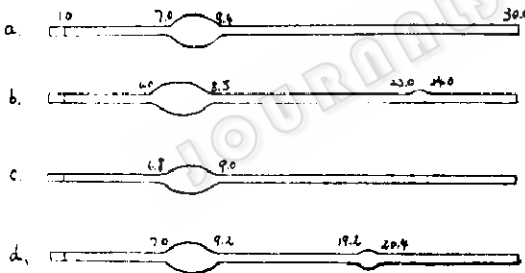


圖 2 a. F.D.A. 青黴素 G 標準，樣品是加在 1 厘米處；其抑制圈在 7.0—9.4 厘米處
b. 18 批第三罐 (18—3)
c. 18 批第四罐 (18—4)
d. 多次結晶之混合物

第一條濾紙為 F. D. A. 標準檢品含 100% G，故祇有一個抑制圈。第二條濾紙為 18—3 檢品，在上端有一大而明晰的抑制圈，在下端有半個小而模糊的抑制圈，可能是上層培養基中夾雜些抑制物，也可能是原液中含有極少的青黴素 K (1% 以下)，故原液中所含 G 之成分總在 99%。第三條濾紙 18—4 檢品，祇有一個抑制圈，很明顯的全部為 G，第四條濾紙為多次結晶混合物之檢品，上端有一清楚的大圈，下端有一小而模糊的圈，其位置頗似 H_2F ，其含量不多估計在 5% 以下，可能是某批結晶中，情況特殊，而含有 H_2F 混在一起，而發生此抑制圈，總之所分析的三批青黴素 G 之成分都在 95% 以上。

故從 N-乙基六氫吡啶法與紙型色層分離法的結果得知棉籽餅代替玉蜀黍

漿，並加入甲苯乙酸鈉，其所產生之青黴素含 G 量約佔 95—100%。

3. 提煉與結晶

表 3 各步驟提煉的效價及其收回率

批號—罐號	原液*	乙酸戊酯	pH 7.1 緩衝液	氯仿	結晶**	收回率	普魯加因 ⁺ 青黴素	總收回率
	百萬單位	百萬單位	百萬單位	百萬單位	結晶**	百分數	克	百分數
11—2	58.14	52.36	——	49.6	19.0	50.65	6.0	59.87
15—2	77.4	65.6	56.0	51.0	24.0	48.06	4.2	52.9
17—3	73.5	65.1	——	50.0	23	48.51	7.0	57.0

* 11 批第二罐共有原液 60.5 升，其效價為每毫升 961 單位，整個效價用百萬單位 (mega unit) 來表示比較簡單。15 批第二罐 60 升，每毫升 1,290 單位。17 批第三罐 52.5 升，每毫升 1,400 單位。

** 結晶青黴素之效價用杯碟法及碘滴定兩法來測定，每毫克為 1,550 單位。

+ 每克普魯加因青黴素含純青黴素 0.576 克。

由於機械設備的限制，提煉情況不能嚴格控制，三次結果並不完全相同，茲將其平均值加以討論，自原液至乙酸戊酯約損失 12%，自乙酸戊酯至 pH 7.1 緩衝液約損失 10%，自緩衝液至氯仿損失 6%。結晶後有 23% 青黴素留在氯仿中，除了以上損失，結晶收回率為 49%，再加以 pH 7.6 緩衝液所提取的青黴素與留在氯仿中的青黴素做為普魯加因青黴素，則可增加 7%，故收回率為 56%。所得的結晶青黴素(用紙型色層分離法檢定見圖 2 結晶成品)含有 95% 以上的青黴素 G，已於前節中敘述。

依上法製備之結晶青黴素及油質普魯加因青黴素分裝消毒後其成品經效價檢定，無菌試驗，毒力試驗，與熱原質試驗等均證明合格。

結 論

利用國產棉籽餅在小型醱酵罐中培養，可以產生青黴素。以 4% 棉籽餅，4% 乳糖，0.5% CaCO₃，0.65 體積空氣加入量為最適宜，在 90 小時左右可以產生每毫升 1,400 餘單位，其中青黴素 G 佔 95—100%，提煉結晶青黴素與普魯加因青黴素之總收回率平均為 56%，自青黴素副產品可以製備油質普魯加因青黴素。

誌謝： 本文中各項實驗承抗生素室全體同志熱心協助得使工作順利完成謹此誌謝。

參 考 文 獻

- [1] 張爲申、徐學瑛、朱濟廣，微生物學報，1953，1 (1)。
- [2] Food and Drug Administration, Federal Register, p. 1, Aug. 13, 1949.
- [3] Shaffer, P. A. and Somogyi, M., *J. Biol. Chem.* 1933, 100, 695.
- [4] Food and Drug Administration, Federal Register, p. 15, Aug. 13, 1949.
- [5] " " " p. 10, " "
- [6] " " " p. 11, " "
- [7] " " " p. 13, " "
- [8] " " " p. 16, " "
- [9] Antibiotics Research, University of Wisconsin, 1948, Report No. 7, p. 20, Aug. 1.
- [10] 萬國紅十字會抄寄文獻 (1952).

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

II. EXPERIMENTS ON COTTON-SEED MEAL MEDIUM IN FERMENTATION TANKS AND EXTRACTION OF PENICILLIN

CHANG W. S., HUANG D. P., WANG W. S. and MA C. S.

National Vaccine and Serum Institute, Peking, China

Penicillin was successfully produced in small fermentation tanks in a medium consisting of 4% cotton-seed meal, 4% lactose and 0.5% CaCO_3 , 0.65 volume of aeration was found optimal. A yield of 1400 units per ml. may be obtained in 90 hours. Analysis showed that the penicillin thus produced contains 95-100% penicillin G. From the culture fluid, crystalline penicillin and procaine penicillin were prepared with a total recovery rate of 56%.