

全民办化学工业参考资料

畜用土霉素的土法制造

化学工业部四川大邑县试点工作組 編

化学工业出版社

全民办化学工业参考資料

畜用土霉素の土法製造

化工部四川大邑試点工作組 編

化学工业出版社

本書介紹四川大邑縣化工總廠所屬的三八抗菌素廠用固體發酵土法製造畜用土霉素的方法、操作、設備及檢驗。

土法製造土霉素，設備簡單，製造容易，可供全國各地組織生產參考。
本書由化工部四川大邑試點工作組王文智和屠慕明兩位同志整理而成。

全民辦化學工業參考資料

畜用土霉素的土法製造

化工部四川大邑試點工作組 編

化學工業出版社 出版 北京安定門外和平北路

北京市書刊出版業營業許可證出字第 092 號

化學工業出版社印刷廠印刷 新华書店發行

開本：787×1092公厘1/32 1959年4月第1版

印張： $20/32$

1959年4月第1版第1次印刷

字數：13千字

印數：1—8000

定價：(9)0.10元

書號：15063·0495

畜用土霉素的土法制造

工. 前 言

土霉素除在医药上有着广泛的治疗效果外，在农业、畜牧与兽医业上同样也有着广泛的治疗效能。此外，还有刺激幼畜与家禽生长、防治疾病、降低死亡率和节约饲料等作用。

单从刺激动物生长来说，根据四川大邑县试验的结果，平均每口断奶仔猪，在90~100天中饲喂畜用土霉素1.5~2.0公斤（折合纯品3~4克），就比不喂的增重15~40%。对牛犊和鸡等也有明显的刺激生长作用。在母鸡的饲料中掺畜用土霉素，还可以增加产蛋率。

由于畜用土霉素的好处很多，因而需要大量的生产。如在农村人民公社中，能普遍推广土法制造土霉素，则农村中用土霉素肥育家畜就能自给。因此，土法生产畜用土霉素，对发展畜牧业有着很大的意义。

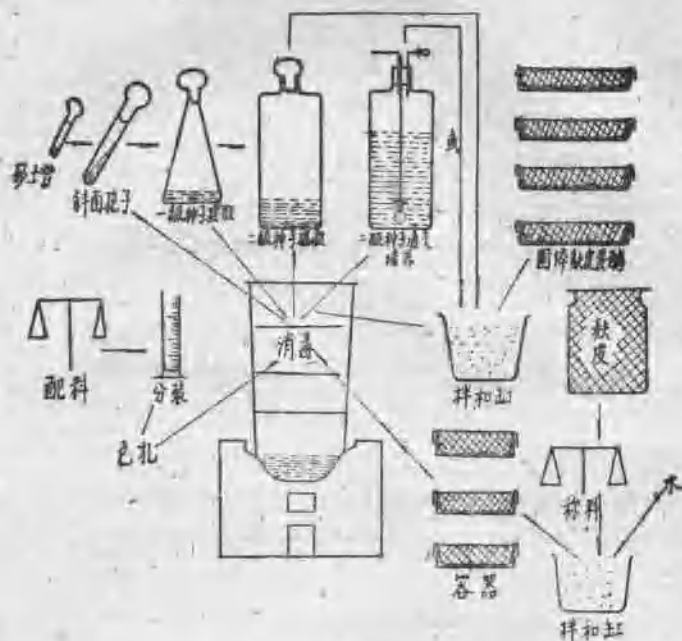
今将四川大邑县化工总厂所属的三八抗菌素厂，用固体发酵方法生产畜用土霉素的方法与操作作详细介绍，供全国各地人民公社办畜用土霉素工厂参考。

II. 生产方法与设备

(一) 采用的菌种

土霉素为放线菌属中的龟裂链丝菌所产生的一种抗菌物质。我们所用的生产菌种，是化工部上海医药工业研究所供给的。菌种编号T1001，以下列方法，在固体麸皮发酵培养基上培养5~7天左右，可以得到2000~3000单位/每克麸皮左右的产量。

(二) 生产流程图



(三) 生产方法与流程

1. 制备各种培养基

① 斜面培养基(孢子培养基)

成分:

小麦麸皮(粗麸皮)	5克
群菜	2克(或石花菜8克左右)
蒸馏水(或河水)	100毫升
pH	自然

将上述各物,用天平按上述比例分别称取,放入大口径的试管或克氏扁瓶或茄子瓶中;再加入蒸馏水(或干净河水),然后塞上棉

塞(未經脫脂的普通棉花),并用牛皮紙(不吸水的)包紮好;放入高压消毒釜內,1.05465千克/平方厘米的蒸汽消毒30分钟,再取出稍加搖动,使麸皮不致完全沉在容器底部;再放成斜面使冷却凝固,然后放入37°C的保温箱中,培养二天,經取出用肉眼观察,如果没有生长杂菌,就可放在无菌室內或清洁安全之处备用。

如无高压消毒器,可用常压(100°C)蒸煮的方法,可以用間歇法每隔23小时蒸1小时共三次,或一次連續蒸三小时(从水烧开始計算)都可以。次数多少,时数多少可按具体情况决定,总之,不論何法消毒,只要在37°C培养以后不长杂菌就行。

不过間歇法比連續法为好。霉菌与細菌生长的前一阶段叫孢子,孢子在100°C不易杀死。而当孢子长成霉菌或細菌时100°C就被杀死。間歇消毒法,即沒有杀死的孢子在23小时后又长成菌体,以100°C蒸1小时就杀死,这样反复几次蒸煮,其杀菌的效果比連續蒸煮法更好。

如用石花代替洋菜,可先将石花剪成粉末,或磨成細粉。将石花粉末加水預热一次,再加入麸皮蒸煮使石花絕大部分溶解,固形块状物愈少愈好。如果洋菜和石花供应都困难,有經驗的人也可以不用。但是,初作者对杂菌的鉴别能力与經驗不足,最好是用洋菜或石花作斜面培养基。因为在斜面培养基上,比松散的培养基容易辨别杂菌集落。必須在經驗丰富以后再放弃洋菜或石花为宜。如要制备砂土管,則还是用斜面培养基为好。

制培养基的粗麸皮与水的比例为1:1或1:0.8。把水与麸皮拌勻后分装入試管或茄子瓶中,塞上棉花塞并用牛皮紙包紮好,就可以进行消毒。消毒后麸皮在容器中是松散状的。

② 一級种籽培养基(液体)

成分:

黃豆粉(或豆餅粉)

1~1.5克

淀粉(食用)

3克

食盐(普通精盐)	0.5克
磷酸鈣(優質工業用)	0.5克
硫酸銨(工業用)	0.4克
磷酸二氫鉀(或磷酸二氫鈉)	0.02克
水	100毫升
pH	自然(6.2左右)

將上述各物用天平秤取加入水中，并充分攪勻，然后很均勻的分裝到三角瓶或細口的玻璃瓶中，瓶口塞上紗布棉花塞，用牛皮紙包紮好，進行高壓消毒(1.05465千克/平方厘米 121°C)30分鐘，或常壓(100°C)蒸6~8小時；消毒後取出冷卻備用。

如無磷酸二氫鉀時，可用磷酸氫二鉀或磷酸的鈉鹽或銨鹽代替。用量按照磷酸根之量計算之(直接量代替也行)。

所用三角瓶最好是500毫升以上的。一個500毫升瓶中約可裝培養基80~100毫升，如用各種細口瓶裝培養基，可按瓶子的形式來定，裝的數量在搖瓶震蕩時不弄濕瓶塞就行。

③ 二級種籽培養基(液體)

成分與制法完全與一級種籽培養基相同。盛培養基之容器亦可用同樣的瓶子，或用5~10公升大的細口瓶，瓶內盛培養基的量約800~1500毫升。

④ 固體發酵培養基

成分：

小麥麩皮(面粉廠的副產物)	1000克
水	300毫升

將小麥麩皮秤取需要之量，放在洗淨的瓦盆或其他容器內；加水充分和勻，不使有小團存在；再放入蒸籠或木甑中，于 100°C 蒸4~6小時。蒸好後取出放入接種室內，或經處理的發酵室內，待冷到 40°C 以下時備用。

麩皮在蒸之前，不能壓緊，以愈松愈好。這樣不會使麩皮吸水過多；同時蒸汽亦能分布均勻易于蒸透。

如用蒸籠蒸到一半時間可上下換一換再蒸。

⑤ 無菌試驗培養基(肉湯培養基)

成分:

牛肉膏	0.5克
葡萄糖	0.5克
食 盐	0.5克
蛋白胨	0.5克
水	100毫升
pH	7.4~7.6

依上述成分混合倒入水中，攪拌至完全溶解。用 NaOH 溶液小心調節 pH 到 7.4~7.6 (可用 pH 試紙測量)，不可超過，如有超過可用硫酸滴回。調好 pH 後，置沸水浴上煮 30 分鐘。煮後應補足因蒸發而減少的水分。再用脫脂棉或濾紙濾到澄清為止。將所得的澄清培養液分裝到 15×150 毫米的試管中，每支試管約裝 4~5 毫升，用棉塞塞好管口 (普通棉花)，用牛皮紙包紮好，置于高壓消毒釜中以 1.05465 千克/平方厘米 121°C 消毒 30 分鐘。取出後，放在 37°C 保溫箱中培養兩天，如依然是澄清的，即可證明無雜菌污染，可以備用。如果經培養後發現變混或有絮狀小團產生，即為雜菌污染的證明，應當丟去不用。

消毒後如果 pH 降低過多或靈敏度較差時，可以适当減少葡萄糖的用量。或在消毒前將 pH 調到 7.8。消毒後，如果有沉淀產生可能是煮的時間不夠與溫度不夠，或是 pH 調節不正確之故，應再調節 pH 值重新過濾和重新消毒。

2. 菌種保存

產生抗菌素的各種菌株，在斜面上培養傳代的次數多了，就容易產生變異。為此，各菌株的孢子須保存於砂土管中，以後再由砂土管中接種出來。這樣可以經常的達到近代的繁殖，並且可以使原種長期保存下來，供給隨時取用。

① 砂土管的配制

将河砂用水漂洗，直到没有一点夹杂物为止。弄干后用90孔的篩子过篩备用。

挖掘地面下一市尺左右之泥土(含腐植质的愈少愈好)，用水漂洗，如有条件可再用酸及碱洗；再用水洗到中性(酸碱主要是去掉腐植质)。弄干后研細备用。如果土粒太粗，可用60或80孔之篩子过篩备用。;

把处理好之砂及土按1:1，2:1或3:1的比例混合均匀，取2克左右装入10×100毫米的小試管中(約为試管总高的 $\frac{1}{6} \sim \frac{1}{5}$)，塞好棉塞，用牛皮紙包扎好，置高压消毒器中以1.05465千克/平方厘米121°C消毒3小时。并这样間歇消毒3次(或3次以上)。消毒后的砂土管还需要烤干(可以用白鉄皮自制烤箱)，以120~160°C温度烤3小时。

消毒好的砂土管，每10支中取一支或每5支中取1支，将无菌試驗培养基倒入其中(約30~40毫升)，置于37°C中培养二天，如証明消毒彻底，即可备用。

② 砂土管的制备

(甲) 湿法:

取一支孢子培养成熟的斜面(10~15毫升培养基)，在无菌操作条件下，用消毒好的无菌吸管(以下称无菌吸管)吸取5~10毫升的消毒好的水(以下称无菌水)，加入斜面培养基的試管中。用接种棒(烧灼灭菌)輕輕地刮下斜面上的表面，使孢子落入水中，再稍加搖动使成孢子悬浮液。再用无菌吸管吸取0.5毫升左右孢子悬浮液，加于处理好的砂土管中。把种有孢子的砂土管放在真空干燥器內，經真空抽干(約16~24小时)后。取出放在冰箱中或阴涼(最好在5°C以下)和干燥之处以便随时取用。但是，一般可儲藏1~3个月。時間太长需重新接种。

(乙) 干法:

取一支孢子培养成熟的斜面，在无菌操作条件下用接种棒直接

面可作較多砂土管，并且均匀。至于用干法的設備要求虽簡單，但难免在括取孢子时帶入培养基，并且不易把孢子在砂土中搅勻，一支斜面也接不了几支砂土管。只有在短期保存时才适用干法。

3. 培养孢子(斜面培养)

取制备好之孢子培养基，在无菌操作条件下用接种棒(接种耳)在砂土管中挑取少許砂土接种到斜面上(均匀的涂布在斜面上)。接种完毕将斜面置于 37°C ($35\sim 40^{\circ}\text{C}$ 也可)的保温箱中培养7~10天，孢子成熟后，取出供移种到一級种子培养用，或放置在冰箱中或阴凉干燥之处供随时取用。成熟的孢子(斜面)如放置适当可以放置15~30天不会产生較大的变异。

在孢子培养期間每天应观察是否有杂菌污染(特别是头几天)，并应注意孢子的发育和成长。发育过程是：第三天左右在斜面上就能看到有小的集落生成，第4~5天集落增大并呈黄褐色，以后集落漸漸产生白色再轉变成灰白色，同时集落呈龟裂状(不平)。到7~10天时集落形成大量灰白色的孢子，可以取出供移种用了。如在培养期間发现杂菌集落时，則不能使用。

4. 一級种子培养(液体震蕩培养)

用无菌操作吸取无菌水加于培养好的斜面孢子試管中(15毫升之斜面加无菌水約10毫升左右)，然后用接种棒輕輕括下面上的孢子使成孢子悬浮液。将此孢子悬浮液4~5毫升种入消毒好之一級种子培养基中，把接种好之一級种子瓶包扎好，放到搖瓶机上，震蕩培养2~3天，培养温度需保持 $26\sim 28^{\circ}\text{C}$ 。

搖瓶机为往复式的震蕩，震幅为12厘米，轉速为每分鐘90~100轉。

在搖瓶培养期間培养基的粘度与顏色随着土霉菌的繁殖而改变。粘度由大变小，再由小增大。顏色則由培养基原来的白色(常压消毒后之色較淺，如用高压消毒顏色較深)变到較黃，再变为浅金黃色。此即是培养完成之时，可以供作移种二級搖瓶用。

括取孢子接入处理好的砂土管中，放入冰箱中或阴凉干燥之处。

上述两法各有优缺点，如有条件(真空泵)最好用湿法，每支斜培养期间每天最好有两次将粘在瓶壁上的菌丝体与固形物质轻轻摇入培养基中。

培养时间如果是3天，就应当在第二天用无菌操作取样进行无菌检查(见四)，证明无杂菌污染后，即可备作移种二级摇瓶用。

一级种子瓶可以同时多作几瓶，除当批供移种之用外，还可以把培养完成的其余部分放在冰箱或阴凉之处，作为下批二级摇瓶的种子用。

5. 二级种子培养(液体震荡培养或通气培养)

培养成熟之一级种子按2~5%之量在无菌操作条件下，移种入消毒好的二级种子培养基中。种好后，放置在上述条件下进行震荡培养2天，此时培养基也呈金黄色。其他操作与情况全同一级种子培养。

培养24小时后可以作无菌试验(抽作一、二瓶即可)或用显微镜观察如无严重的杂菌(细菌)污染，就可以供作移种麸皮之用。

二级种子如要扩大产量，只有增加摇瓶机，但增加太多不易管，理并且进行无菌操作的时间过长以及清洗等工作量都很大，动力的消耗也大，最好是用5公升以上的细口瓶(瓶身较长者)来作通气培养。

细口瓶可放在26~28°C的暖房中(摇瓶室中或温水槽中)用玻璃管插到瓶底通入无菌空气，一个10公升瓶内可放入6~7公升培养基，每分钟通入无菌空气之体积应比培养基体积为多。由于瓶内培养基多，如用常压煮沸消毒，时间要适当延长，并须间歇消毒2~3次，以求保证消毒彻底。过滤空气用的棉花、过滤器及连接瓶的橡皮管都须消毒，并加烘干才能使用，连接橡皮管的操作要在无菌操作条件下进行。

6. 麸皮发酵培养(固体)

培养好的二级种子，按麸皮重量的30%种入消毒好的麸皮中(1公斤麸皮加300毫升)，充分搅拌均匀后，很平很松地铺在竹框上(竹

框上垫一层纱布)，高度约2厘米左右，上面再盖一层纱布放在26~28°C室中培养5~7天。

培养期间须保持麸皮湿度在60~80%，每天需检查其湿度，并适当的喷洒经煮沸过15分钟后的凉开水，但发酵的第一天由于消毒接种后，麸皮内含水分较多可以不要喷水，喷水后加以翻匀使不致成团，同时爬松，每天喷水1~2次即可。培养期间如不喷水，每天也必须翻拌爬松1~2次以利于空气流通。

培养时上面盖的纱布不能压在麸皮上(如果技术掌握得很好时，上面盖的纱布可以省去)。

翻拌前，应先仔细检查麸皮上是否长了杂菌(霉菌)集落，如有时可将它挖掉再进行操作。

每天通气的窗子应打开1~2次，每次10~20分钟，使室内空气流通(通入新鲜空气)。

要注意不使麸皮内温度超过26~28°C太多，否则亦易生霉。发酵到第三天以后，麸皮之色渐次加深并有特殊的气味产生，此时土霉菌在麸皮培养基内已进行繁殖并产生了较多的土霉素，到第5~6天可以减少喷水量，喷水量到以手握感到潮而不结团为宜，不要太多或可不加，因为十几小时后就要出框了。

培养5~6天后须测定每厘米麸皮中土霉素的含量。

7. 干燥及包装

麸皮发酵完成出框后，应当立即在40~50°C之烘房中将麸皮烘干(烘时温度不要超过60°C)，使麸皮含水量降为5~10%，烘干冷却后测定每克麸皮中土霉素的含量。

干燥的麸皮可以分装在不吸水的纸袋中或装入箱中，这样包装好的麸皮放在干燥阴凉之处，约可保存数月不会变质。

如果出框后当地立即使用不需保存与运输，则干燥与包装手续可以省去。

(四) 检 验

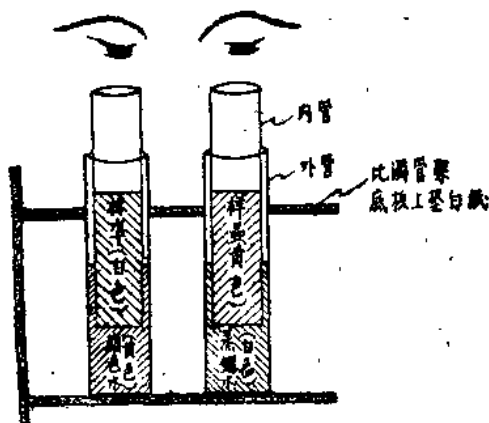
1. 效价检验(化学分析方法)

做法:

用台式天平称量1.5克样品(颗粒粗时要用研钵捣碎),放在干的小烧杯中,加入15毫升0.01当量浓度的盐酸,搅拌均匀并放置半小时,然后滤入10毫升试管中。滤纸用二层,漏斗试管都必须干的。吸取滤液2毫升,放入20毫升试管中,加5毫升2当量浓度的盐酸,并预先烧一锅水,将试管放入沸水中,使锅中水面超过试管内的液面,烧40分钟取出,在空气中放冷。近冷时可用冷水冲管的外部,倒入比浊管中用水洗二次,洗液一并倒入比浊管中并加水到刻度。

同时准备好二个比浊外管,一支盛蒸馏水或澄清河水,一支盛颜色水。将装样品的比浊管下部插入装蒸馏水的外管,先取1号标准比浊管下部插入装颜色水的外管。上下移动标准比浊管内管,从上面往下看,至得到与样品同一色泽为止。比较样品浊度与标准浊度,如果不相等则改用上一号或下一号标准比浊管再比,直到相等为止。记下标准比浊管号数,即得土霉素每克单位数。

附图:



说明:

① 如样品經0.01当量浓度的盐酸浸泡后，滤液过滤得不清时，須改为称样1.5克，加10毫升0.01当量浓度的盐酸，再加5毫升7%鞣酸，以下同原方法操作，或将混浊液加2当量浓度的盐酸5毫升后不加热，以同法操作取一讀数設为(乙)，如同法操作結果(即加热的)設为(甲)，則含量(甲)減去(乙)就是。

② 如果过滤困难可加干紙浆少許。

③ 第一次用本法工作的人員应先練習一下視力，要有区别标准比浊液混浊度的能力。

④ 如果1.5克样品所得混浊度比6号标准还渾，則改取样品0.5克或1克，測定結果乘样品重量，再以1.5除即得含量。

⑤ 标准比浊管的配法

取我国化学純度的硅酸(H_2SiO_3)，放在研鉢中充分研細，研至用手指磨研粉末，不感觉有粉末存在为止，这种細粉配出的混浊液，应在較長時間不会沉淀下来。称0.5克加入1500毫升水中，再加2滴酚，用前搖勻。

一号管配法：用吸管吸1毫升上述悬浮液加水到25毫升；

二号管配法：用吸管吸2毫升上述悬浮液加水到25毫升；

三号管配法：用吸管吸3.5毫升上述悬浮液加水到25毫升；

四号管配法：用吸管吸4.5毫升上述悬浮液加水到25毫升；

五号管配法：用吸管吸5.5毫升上述悬浮液加水到25毫升；

六号管配法：用吸管吸6.6毫升上述悬浮液加水到25毫升。

⑥ 顏色水的配法

5%氯化亚錳2.5毫升，加5%三氯化鉄1毫升，加2当量浓度的盐酸29毫升混合即得。

如样品顏色与此混合液顏色相差很远，可以改变以上三者的比例，直到与样品顏色相近为止。

2. 无菌試驗(无菌檢驗)

在无菌操作条件下，用接种棒(接种耳)挑取一点培养基，种入

无菌試驗培养基中。把接种后的无菌試驗培养基，放入 37°C 保温箱內培养 8~16 小时，取出用肉眼观察培养基是否变混浊。如变混浊，即表示培养基內染有杂菌(細菌)，如有較大的絮状团粒并能看到較粗的菌絲时，则表示培养基內染有杂菌(霉菌)。但放綫菌在无菌試驗培养基中生长时，只呈小的絮状团粒。如培养時間較如长时，則在培养基的表面，会有与固体斜面上生长的灰白色集落相同之菌落产生。

3. 显微镜检查

放綫菌的菌絲体較小，須用油浸接物鏡頭(油鏡頭)及可用呂氏碱性美蓝染色液染色才能清楚的观察到，取样方法同上。

① 呂氏碱性美蓝染色液配制

称取 0.6 克美蓝(亚甲蓝)溶于 30 毫升 95% 酒精中。加入 $1/10000$ 浓度的 KOH 溶液 100 毫升，混匀后过滤即成。

② 制片方法

取干淨的载玻片涂上样品，在酒精灯上烘干固定(烘时应注意温度不能过高并时时抖动)。加一滴染色液于样品上，一分钟后用水洗去多余之染色液。再以上法烘干后即可观察。

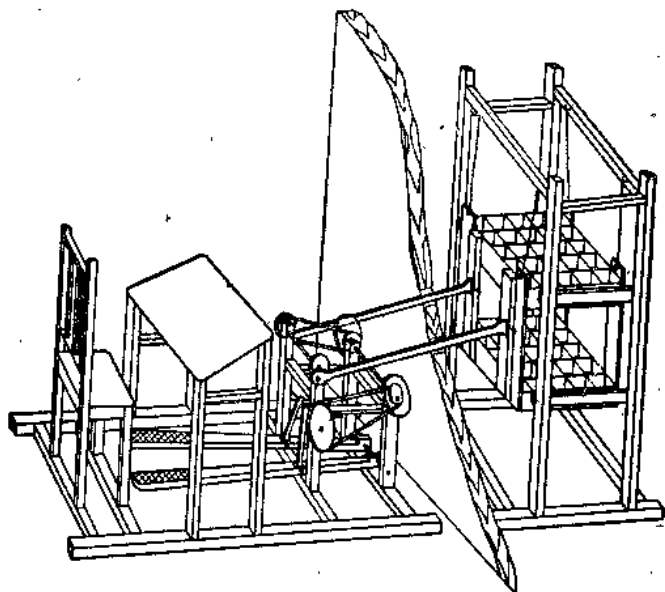
用显微镜观察龟裂鏈絲菌在液体培养基中的形态，第二天多呈放射形的网状菌絲，但培养到第三天时菌絲体有部分自溶，而断裂成短的小段，很不易与某种杆菌区别。因此初作者不能单靠显微镜观察来鉴别杂菌，还必须結合无菌試驗检查。

(五) 生产各工序的设备

大邑县三八抗菌素厂用土法固体发酵生产土霉素所用的设备，都是木質、玻璃、土陶器等，动力全用人力(有条件的地方可用畜力、水力和电力)。由于设备簡單，操作要求不高(除种子制备外)，在一般条件的农村人民公社都可生产。

1. 培养种子所需的设备

- ① 28×220毫米試管;
- ② 100克天平;
- ③ 18×180毫米試管;
- ④ 酒精噴灯;
- ⑤ 噴霧器;
- ⑥ 接種棒(接種耳可用鉄絲作);
- ⑦ 保温箱(可用双层洋鉄皮桶,在夹层中加水下面用酒精灯加热);
- ⑧ 500毫升三角瓶(或其他各式瓶子);
- ⑨ 10毫升吸管(可用玻璃管自制);
- ⑩ 搖瓶机(可用木質制見附图);
- ⑪ 10公升細口瓶;
- ⑫ 小鼓风机或打气机;



木制搖瓶机

- ⑬ 消毒器(高压消毒器或木甑或蒸籠);
- ⑭ 发酵缶(可用木桶或大汽油桶或耐烧的有釉的陶瓷桶);
- ⑮ 橡皮管及橡皮塞;
- ⑯ 空气过滤器。

2. 发酵所需的设备

- ① 竹或木制的框子(50厘米见方, 高10厘米);
- ② 木架;
- ③ 搅和缸;
- ④ 台秤(或普通的秤最好是用10进位的新秤);
- ⑤ 木甑或蒸籠(可与种子共用);
- ⑥ 大鉄鍋及炉灶;
- ⑦ 烧开水的壶(土陶壶也行);
- ⑧ 翻拌洒水用的小匙;
- ⑨ 冬季保温用的管道(土陶管就行);
- ⑩ 普通紗布或蚊帳布。

3. 檢驗所需的设备

- ① 天平(50~100克可以与配料合用);
- ② 小烧杯(50毫升);
- ③ 玻璃棒;
- ④ 滤紙(定性滤紙);
- ⑤ 玻璃小漏斗;
- ⑥ 試管(10毫升及20毫升);
- ⑦ 吸管(2毫升及5毫升);
- ⑧ 量筒(20毫升及100毫升);
- ⑨ 酒精灯或煤炉;
- ⑩ 鍋子;
- ⑪ 磁鉢;
- ⑫ 比浊管或納氏比色管, 配有橡皮塞帶有木架。內管25毫升