

抗 菌 素 生 产 工 艺 学

——试 用 教 材——

下 册

(内部资料,注意保存)

上海化工学院

上海第三制药厂 主编

上海第四制药厂

1974.4

目 录

第五编 分论与新抗菌素菌种的筛选

第二十六章	青霉素	1
第一节	理化性质	1
第二节	菌种和发酵	10
第三节	提取和精制	15
第二十七章	半合成青霉素及头孢菌素	23
第一节	青霉素的母核——6-氨基青霉烷酸	24
第二节	几种重要的半合成青霉素	26
第三节	半合成青霉素的制法	33
第四节	半合成头孢菌素	35
第二十八章	链霉素	44
第一节	理化性质	44
第二节	菌种和发酵	51
第三节	提取和精制	55
第二十九章	四环类抗菌素	60
第一节	理化性质	60
第二节	发酵工艺	67
第三节	提取和精制	75
第三十章	灰黄霉素	81
第一节	理化性质	81
第二节	菌种和发酵	83
第三节	提取和精制	87
第三十一章	多粘菌素	90
第一节	理化性质	90
第二节	菌种和发酵	93
第三节	提炼和精制	98
第三十二章	新抗菌素菌种的筛选	101
第一节	抗菌素产生菌的采集和分离	101
第二节	菌种的分类	104
第三节	抗真菌、抗细菌抗菌素的筛选	105
第四节	抗肿瘤抗菌素的筛选	106
第五节	抗病毒抗菌素的筛选	112

第五编 分论与新抗菌素菌种的筛选

第二十六章 青 霉 素

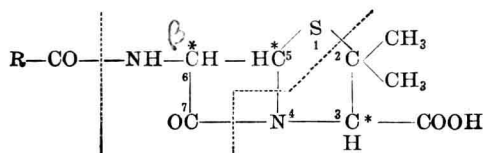
青霉素是最早发现和最重要的抗菌素。青霉素应用于临床已三十年，但仍不失为控制敏感金黄色葡萄球菌、链球菌、肺炎双球菌、淋球菌、脑膜炎双球菌及螺旋体等所引起的严重感染如败血症、肺炎、脑膜炎等疾病的一个有效武器。对敏感的革兰氏阳性球菌所引起的感染，青霉素常是首选药物，其疗效胜过四环素、氯霉素、苯甲异噁唑青霉素、氨苄青霉素、先锋霉素、庆大霉素等。

青霉素突出的优点是毒性很小，临床上细菌性心内膜炎病人每日使用1000万~6000万单位的青霉素达数星期以上，亦无任何不良反应发现。但青霉素易引起过敏反应，故应用受到一定限制。

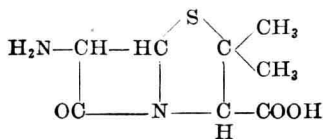
另一方面，青霉素又是半合成青霉素的原料，故对青霉素的需要量，仍有逐年增长的趋势。

第一节 理化性质

青霉素是一族抗菌素的总称，它们的共同结构如式(I)所示。由式(I)可见，青霉素分子中含有两个稠合杂环，一个是四氢噻唑环，另一个是由羧基和其β位置上的亚氨基形成的β-内酰胺环。也可以看作由两个氨基酸，即半胱氨酸和缬氨酸结合而成。若把杂环氨基酸6-



(I)



(II)

氨基青霉烷酸(II) 6-Amino-penicillanic acid 看作母核，则青霉素是该母核的N-酰基衍生物。R代表侧链，不同类型的青霉素有不同的侧链。用不同的菌种，或培养条件不同，可以得到各种不同类型的青霉素，或同时产生几种不同类型的青霉素。目前已知的有青霉素X、G、F、二氢F、K、O、V、N等(见表26-1)。它们合称为青霉素族抗菌素。其中以苄青霉素(青霉素

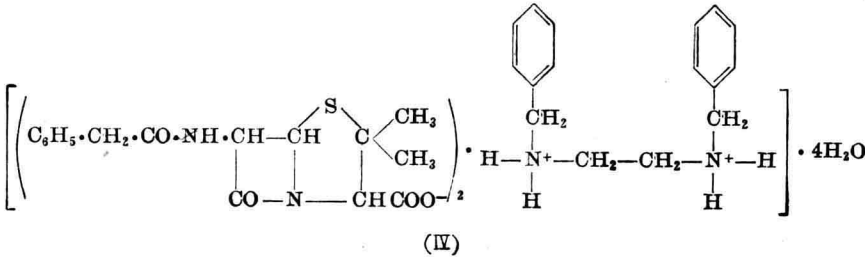
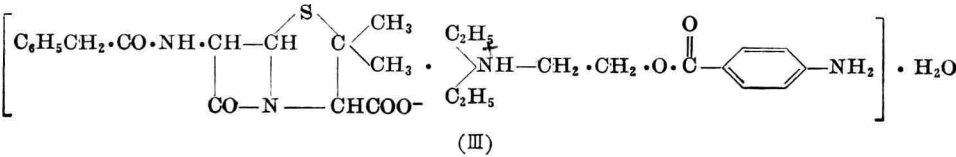
G)疗效最好,应用最广。如不特别注明,通常所谓青霉素即指苄青霉素。青霉素V对酸稳定,在胃酸中不会被破坏,可用于口服。在 pH2~3 间,青霉素V的稳定性较青霉素G大 21~25 倍。青霉素O引起过敏反应较少,适用于过敏性的病人,由于青霉素O中不能完全除去青霉素G,而微量青霉素G的存在,对过敏敏感的病人,也是很危险的,故目前青霉素O没有大规模生产。

表 26-1 各种青霉素的命名和构造

序 号	侧 链 R	学 名	俗 名
1	HO-  -CH ₂ -	对羟苄青霉素 p-Hydroxy-Benzyl Penicillin	青霉素X
2	 -CH ₂ -	苄青霉素 Benzyl Penicillin	青霉素G
3	CH ₃ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -	戊烯[2]青霉素 Δ ² -Pentenyl Penicillin	青霉素F
4	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -CH ₂ -	戊青霉素 n-Amyl Penicillin	青霉素二氢F
5	CH ₃ -(CH ₂) ₅ -CH ₂ -	庚青霉素 n-Heptyl Penicillin	青霉素K
6	$\begin{matrix} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2- \end{matrix}$	烯丙巯甲基青霉素 Ally-Mercaptomethyl Penicillin	青霉素O
7	 -O-CH ₂ -	苯氧甲基青霉素 Phenoxymethyl Penicillin	青霉素V
8	$\begin{matrix} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2- \\ \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	4-氨基-4-羧基丁基青霉素 4-Amino-4-Carboxylbutyl Penicillin	青霉素N 头孢菌素N

青霉素分子中含有三个不对称碳原子(见式 I 中标有 * 号的碳原子),故具有旋光性。

青霉素分子中含有羧基,有相当强度的酸性,其 p*K* 值为 2.76(25℃)。它能和一些无机或有机碱形成盐。在医疗上应用的有钠盐、钾盐、普鲁卡因盐和苄基乙二胺盐等。钾盐和钠盐易溶于水,能很快地被人体所吸收,但排泄也快,故作用时间短。普鲁卡因盐和苄基乙二胺盐则难溶于水,注射后,可慢慢地被吸收,因而延长了作用时间,它们的构造式分别见式(Ⅲ)



和式 (IV)。二苄基乙二胺盐的溶解度比普鲁卡因盐更小,一次注射 30~100 万单位可以维持 7~30 天,又称为长效青霉素或苄星青霉素, *Penicillinum Benzathinicum* 也有用英文缩写字母来表示,称为 DBED-(N,N'-dibenzylethylene diamine)青霉素盐。

一些青霉素 G 盐类的性质列于表 26-2 中。

表 26-2 青霉素 G 盐类的性质

名 称	分 子 式	分 子 量	熔 分 解 温 度	比 旋 度	理论效价 (u/mg)	在水中溶解度
青 霉 素 G 钠 盐	$C_{16}H_{17}O_4N_2SNa$	356.4	215℃	$[\alpha]_D^{20} = +298^\circ$ (C 2, 水)	1667	易 溶
青 霉 素 G 钾 盐	$C_{16}H_{17}O_4N_2SK$	372.5	214~217°	$[\alpha]_D^{20} = +285^\circ$ (C 0.1, 水)	1593	”
普鲁卡因青霉素 G	$C_{16}H_{17}O_4N_2S \cdot$ $C_{13}H_{20}N_2O_2 \cdot H_2O$	588.7	129~130°	$[\alpha]_D^{25} = +176^\circ$ (C 1, 含水丙酮)	1010	0.5%(20℃)
二 苄 基 乙 二 胺 二 青 霉 素 G	$2C_{16}H_{18}O_4N_2S$ $C_{16}H_{20}N_2 \cdot 4H_2O$	981.2	110~117°	$[\alpha]_D^{20} = 213^\circ$ (C 0.5, 甲醇)	1310	0.014%(20℃)

青霉素 G 与 N-乙基六氢吡啶 (N.E.P.)  N—C₂H₅ 所成的盐在醋酸戊酯、丙酮混合液中,溶解度很小,可沉淀析出。在同样条件下其它类型的青霉素不能形成沉淀(青霉素 X 除外)。故由沉淀的重量即可求得成品中青霉素 G 的含量,一般要求在 90% 以上。

必须指出,青霉素单位的标准和其它抗菌素是不同的,过去由于没有得到纯粹的青霉素结晶,以能抑制一定浓度,一定体积的金黄色葡萄球菌定为一个单位,称为牛津单位,而和 0.599 微克标准青霉素 G 钠盐的生物作用相当者定为 1 单位,由此可得青霉素 G 钠盐的理论效价为

$$\frac{1000}{0.599} = 1667 \text{ u/mg}$$

一、稳定性: 固体青霉素盐的稳定性与其含水量和纯度有很大的关系,干燥纯净的青霉素盐很稳定,国产青霉素钾盐和普鲁卡因盐的有效期都规定在三年以上。并且对热稳定,如结晶的青霉素钾盐在 150℃ 加热 1.5 小时,效价也不损失,因此结晶青霉素可进行干热灭菌。

由于醋酸钾有强烈的吸水性。所以成品中需将醋酸钾除尽,否则会影响有效期。

但青霉素的水溶液则很不稳定,而且随 pH 和温度的变化影响很大,见表 26-3。

由表 26-3 可见,水溶液 pH 在 5—7 较稳定,最稳定的 pH 为 6~6.5。一些缓冲液,如磷酸盐和柠檬酸盐对青霉素有稳定作用。柠檬酸盐的稳定能力比磷酸盐更好。这是由于磷酸盐对酸的缓冲能力较差,缓冲能力随 pH 下降而显著下降,而柠檬酸盐的缓冲能力则随 pH 下降有显著增加。

在无水的非极性溶媒中青霉素很稳定,如在水氯仿中,经 350 小时,活性无损失。

二、溶解度: 青霉素游离酸在水中溶解度很小,而易溶于有机溶媒如醋酸乙酯,苯,氯仿、丙酮和醚中。而青霉素钾,钠盐易溶于水和甲醇,可溶于乙醇,在丙醇,丁醇、丙酮,醋酸乙酯、吡啶中难溶或不溶。普鲁卡因青霉素 G 易溶于甲醇,难溶于丙酮,氯仿,不溶于水。青霉素 G 钠盐和普鲁卡因青霉素 G 在各种溶剂中的溶解度见表 26-4。

表 26-3 pH 和温度对结晶青霉素 G 钠盐半衰期的影响

pH \ 半衰期	温 度 (°C)				pH \ 半衰期	温 度 (°C)			
	0	10	24	37		0	10	24	37
1.5	1.3	0.5	0.17*		6.0			336.0	103.0
1.7	2.0	0.7	0.2*		6.5			281.0	94.0
2.0	4.25	1.3	0.31		7.0			218.0	84.0
3.0	24.0	7.6	1.7		7.5			178.0	60.0
4.0	197.0	52.0	12.0		8.0			125.0	27.6
5.0	2000.0	341.0	92.0		9.0			31.2	
5.5			—	62.0	10.0			9.3	
5.8			315.0	99.0	11.0			1.7	

* 在20℃

表 26-4 青霉素 G 钠盐和普鲁卡因青霉素 G 在各种溶剂中的溶解度 mg/ml

溶 剂	青霉素 G 钠盐	普鲁卡因青霉素 G	溶 剂	青 霉 素 钠 盐	普 鲁 卡 因 青 霉 素 G
水	>20	6.8	醋酸异戊酯	0.22	1.2
甲 醇	>20	>20	丙 酮	0.19	14.95
乙 醇	10.0	>20	甲 乙 酮	0.147	13.7
异 丙 醇	0.75	6.5	乙 醚	0.06	0.60
异 戊 醇	2.1	2.6	氯 乙 烯	0.30	2.0
环 己 烷	0.105	0.075	1,4-二氧陆环	1.9	9.8
苯	0.047	0.075	氯 仿	0.05	>20
甲 苯	0.02	1.05	二 硫 化 碳	0.083	0.51
石 油 醚	0.0	0.12	吡 啶	1.15	>20
异 辛 烷	0.032	0	甲 酰 胺	>20	>20
四 氯 化 碳	0.042	0.12	乙 二 醇	>20	>20
醋 酸 乙 酯	0.40	3.35	苯 甲 醇	11.2	>20

当溶剂中含有少量水份时，则青霉素碱金属盐在溶剂中的溶解度就大大增加，见表 26-5 和表 26-6。

表 26-5 青霉素 G 钠盐的溶解度

溶 剂	含水量 %	温 度 °C	溶解度 mg/100ml 溶剂	溶 剂	含水量 %	温 度 °C	溶解度 mg/100ml 溶剂
丙 酮	0	0	6.0	甲 乙 酮	0	0	2.4
”	0.5	0	15.6	二 氧 氯 环	0	14	15.0
”	1.0	0	31.0	正 丁 醇	0	0	81.0
”	2.0	0	100.0				

表 26-6 丁醇的含水量对青霉素 G 钾盐, 溶解度的影响

丁醇含水量, % 体积	溶 解 度, u/ml
0.16	1400
1.0	2050
2.0	3700
3.0	7940

三、紫外光谱: 青霉素 G 钠盐的紫外光谱见图 26-1, 在 252, 257, 264m μ 有弱的吸收峰, 这三个吸收峰由苯乙酰基所引起。下面我们将进一步谈到, 钠盐水溶液在室温放置, 由于生成青霉烯酸, 在 320m μ 呈吸收峰。而对羟基苄青霉素和青霉素的降解产物青霉噻唑酸的同分异构体 Penamaldic acid 在 280m μ 呈吸收峰。所以规定青霉素 G 钾(钠)盐的优级品 280 和 320m μ 的消光系数 $E_{1cm}^{0.188\%}$ 不能高于 0.05。

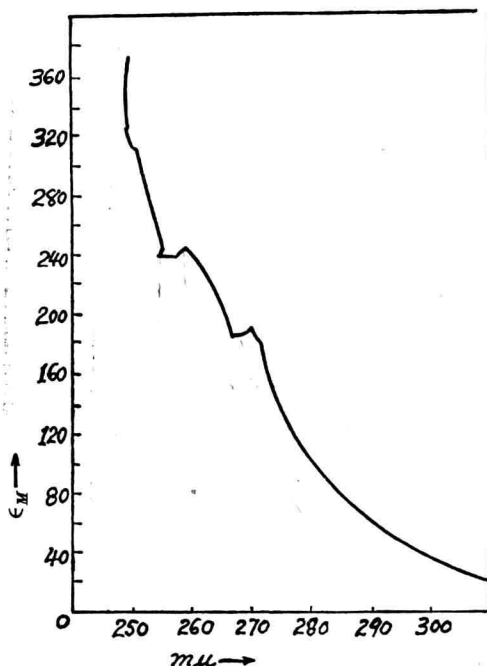
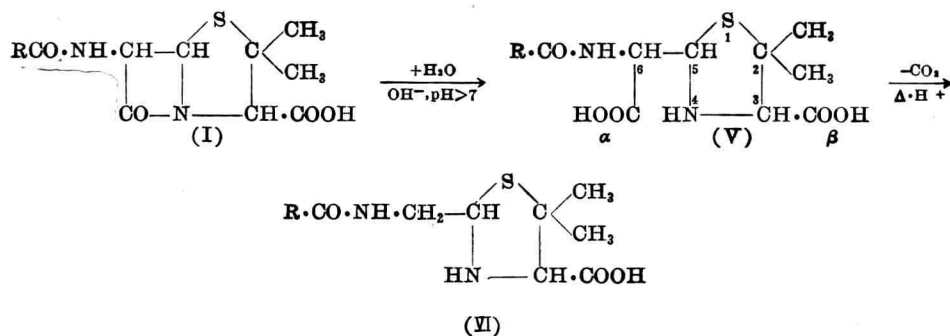


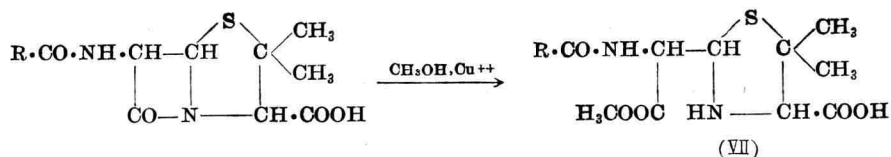
图 26-1 青霉素钠盐的紫外光谱 0.905 mg/ml 水中

四、降解反应: 青霉素是很不稳定的化合物, 遇酸, 碱或加热都易分解而失去活性, 并且分子很易发生重排, 有时甚至在很温和的条件下, 也会发生重排。分子中最不稳定的部分是 β -内酰胺环, 而其抗菌能力却正决定于 β -内酰胺环。故青霉素的降解产物几乎都不具有活性。

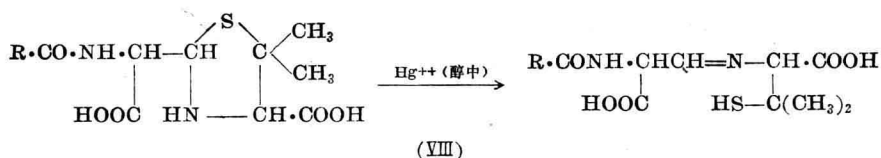
青霉素在水溶液中, 当 $pH > 7$ 时, β -内酰胺环水解而形成青霉噻唑酸 (V) Penicilloic acid。它含有两个羧基和一个碱性的亚氨基。在青霉素酶 (β -内酰胺酶), 亚硫酸氢盐和各种重金属离子的作用下, 也会生成青霉噻唑酸。青霉噻唑酸在弱酸溶液中, 会放出二氧化碳而形成失羧青霉噻唑酸 (VI) Penilloic acid, 若一加热, 反应将加快。青霉素和稀酸一起加热, 也能生成失羧青霉噻唑酸。



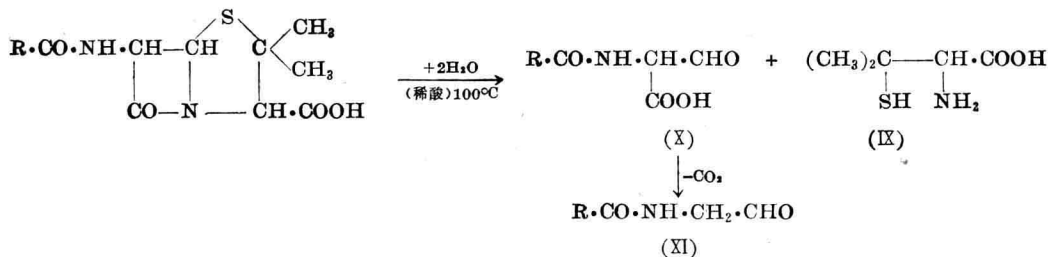
青霉素在醇溶液中较稳定, 但有微量重金属离子存在, 则会很快分解。如当有 Cu^{++} , Zn^{++} , Sn^{++} 等离子存在时, 低级醇和青霉素作用生成青霉噻唑酸相应的酯, 例如与甲醇生成青霉噻唑酸 α 甲酯 (VII)。



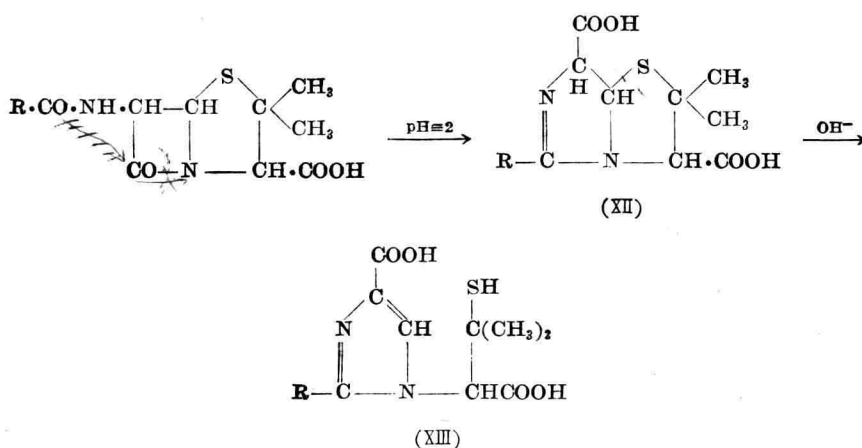
青霉噻唑酸或其酯在醇溶液中或更有 HgCl_2 存在时, 会异构化成为 Penamaldic acid 或其相应的酯(VII), 后者在 $280\text{m}\mu$ 附近有特征吸收峰。



青霉素在稀酸溶液中加热至 100°C , 则发生水解, 生成青霉胺 (IX) Penicillamine 和青霉醛酸 (X) Penaldic acid 后者失去 CO_2 变成青霉醛 (XI) Penilloaldehyde:

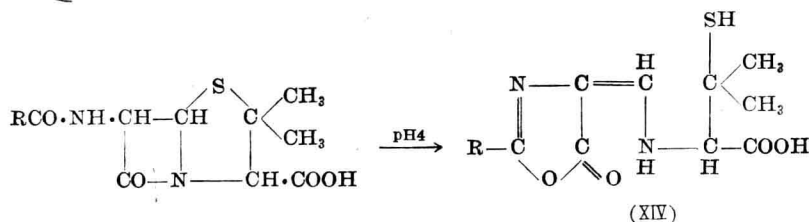


青霉素在 $\text{pH}2$ 左右, 在室温下会发生分子重排生成青霉酸 (XII) Penillic acid, 后者在碱性下 (如和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 水溶液作用), 则更进一步发生分子重排生成异青霉酸 (XIII) isopenillic acid:



从青霉素变为青霉酸的最适 pH 是 2, 收率可达到 75%, 当酸度增加时, 收率降低, 而在 $2N \text{ HCl}$ 中, 则几乎不生成青霉酸。青霉酸在 $240\text{m}\mu$ 有特征吸收峰。异青霉酸是咪唑的衍生物, 故既具碱性, 又具酸性。

青霉素在 pH4 左右会发生分子重排生成青霉烯酸 (XIV) Penicillenic acid, 它具有恶唑酮结构, 在 $320\text{m}\mu$ 有特征吸收峰。微量铜盐和汞盐的存在, 会催化上述反应而加速。青霉烯



酸在室温下, 在 95% 乙醇溶液中会转变成青霉酸。

青霉素水溶液在贮存过程中会形成青霉烯酸。表 26-7 和表 26-8 的数据表明, 在储存过程中, 青霉素效价降低, 而青霉烯酸含量则相应增加:

表 26-7 青霉素 20 万单位/毫升水溶液在储存中效价下降百分率

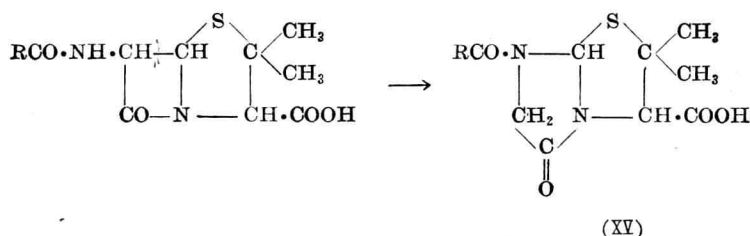
条 件 \ 时 间	4 小 时	8 小 时	24 小 时
冰 箱	0	0	0
19.5℃	1.53	2.56	5.77
30℃	2.59	5.30	55.89
37℃	6.11	30.00	93.90

表 26-8 青霉素 20 万单位/毫升水溶液中青霉烯酸含量(%)的变化(原始含量0.037%)

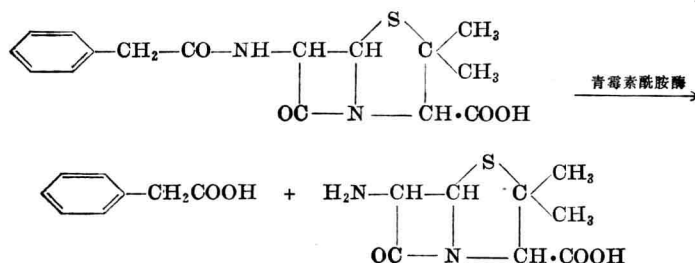
条 件 \ 时 间	4 小 时	8 小 时	24 小 时
冰 箱	0.052	0.073	0.16
19.5℃	0.10	0.22	1.01
30℃	0.31	1.25	7.7
37℃	1.04	8.01	37.1

青霉烯酸易吸潮, 如青霉素成品中混有青霉烯酸, 在储存中容易发黄变质(成品中混有青霉噻唑酸也是原因之一)。据试验, 青霉素钾盐成品在 $320\text{m}\mu$ 的消光系数, $E_{1\text{cm}}^{0.1\%}$ 如超过 0.08 则易引起发黄变质, 故规定优级品该消光系数应在 0.05 以下。

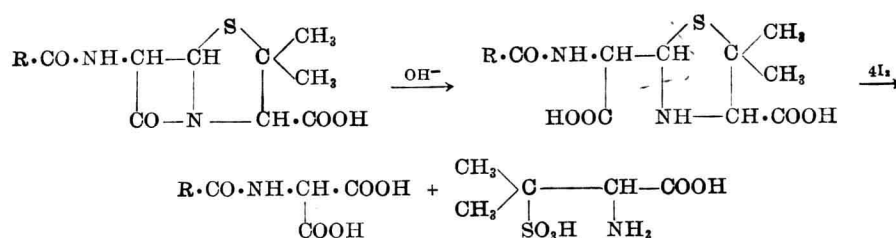
青霉素在高度真空下加热会发生分子重排生成青霉咪唑酸 (XV) Penicillonic acid,



青霉素在青霉素酰胺酶(大肠杆菌能产生)的作用下, 能裂解为青霉素的母核, 6-氨基青霉烷酸(6APA), 它是半合成青霉素的原料。



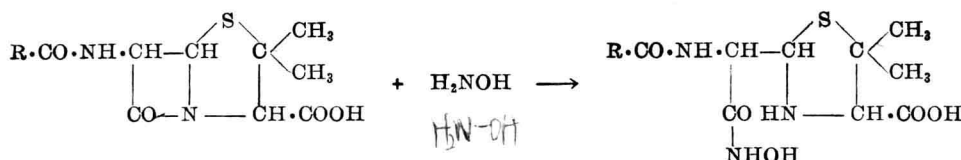
青霉素的碱性降解产物青霉噻唑酸能和 4 分子碘起作用：



青霉胺酸 Penicillaminic acid

此是碘量法测定青霉素含量的原理。测定时需平行作一空白试验，以消除存在的分解产物和其它耗碘物质的影响。

青霉素还可用比色法测定。方法之一系利用青霉素与羟胺作用生成肟酸，后者和高价铁盐生成紫色复合物：



青霉素转变为青霉烯酸的反应也可用来测定发酵液中苄青霉素含量。将苄青霉素溶在 pH 4.6 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中(含有 0.07mg/ml CuSO_4)，在沸水浴中加热 15 分钟。测定 322m μ 的光密度，以未经加热的样品作为空白，由此可求得苄青霉素的含量。发酵液中其它杂质如苯乙酰胺，6-APA，青霉噻唑酸，青霉酸等都没有干扰，因为它们 在 322m μ 的光密度很低。

为便于了解，现将青霉素主要降解反应示于图 26-2 中。

综上所述，青霉素在酸性下的最终水解产物是青霉胺，青霉醛和二氧化碳；在弱酸或中等强度的酸性下，水解不完全，分子仅经异构重排得中间产物青霉烯酸或青霉酸。但继续施以强酸或加热，则水解完全得上述三种最终水解产物。在碱性下，分子中的 β -内酰胺环亦破裂，但一般多停留在中间产物青霉噻唑酸或失羧青霉噻唑酸。如再经加热或加酸，也可完全水解，得上述最终产物。此外青霉素分子很易发生重排，异构化，各异构体在一定条件下大多可相互转换。

上述反应在相当低的温度下和青霉素提取与精制的条件下都能发生而且反应速度很快。因此这些降解产物都有可能在成品中存在。此外在产品中还可能含有某些酸性的和青霉素相近的有机酸，如苯醋酸、*o*-羟基苯醋酸、 α -甲基丁酸、吡啶基醋酸 $\text{C}_5\text{H}_5\text{N} \cdot \text{CH}_2\text{COOH}$ 等。除有机酸杂质外，尚可能含有硫酸钠或钾等无机盐类。

五、过敏反应：前已指出，青霉素的毒性很低，这是因为青霉素对细菌的细胞壁某些必要组分的合成有抑制作用，而哺乳类动物的细胞壁则无这种组分的缘故。但近年来青霉素过敏反应病例逐渐增多，严重地限制了青霉素的应用。

以非本体蛋白质注射入动物体内，动物体受到刺激在体内产生一种新的蛋白质，后者与非本体蛋白质起凝聚作用，不使这种非本体蛋白质进入体内而受损害。这种作用称为免疫作用。

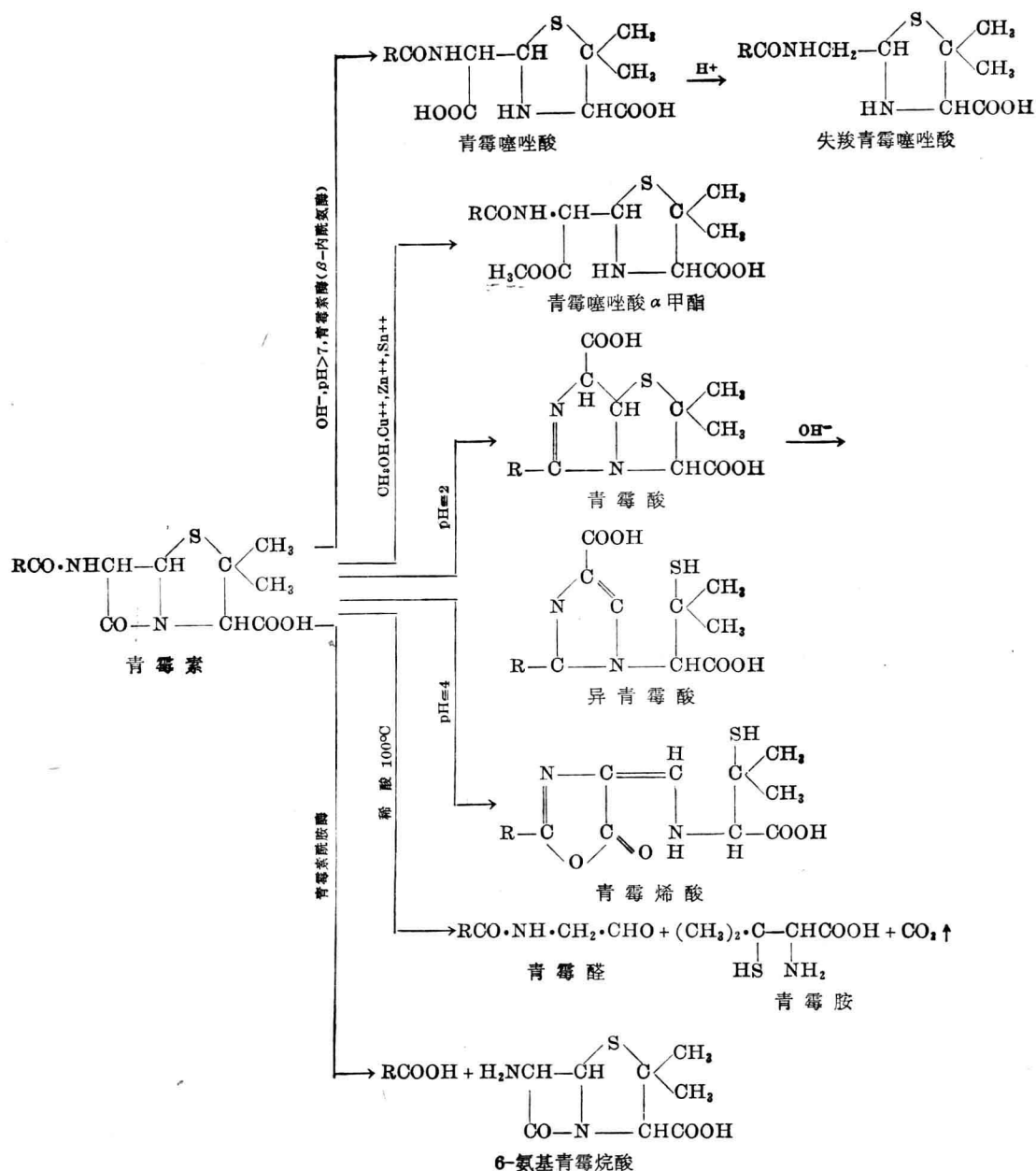


图 26-2 青霉素的主要降解反应

非本体蛋白质称为抗原，体内产生的一种新蛋白质称为抗体。过敏反应就是抗体与抗原相互作用的一种中间反应。

引起青霉素过敏原因现在还不十分明了，可能是由于青霉素的降解产物，如青霉烯酸、青霉噻唑酸等；或它们与蛋白质结合的产物，即青霉噻唑蛋白，也可以是青霉素分子本身的聚合物。用葡聚糖凝胶曾从青霉素钾盐成品中分离出青霉噻唑蛋白等聚合物。

对于青霉素致敏原因目前正大力开展研究，以期采取措施，消除过敏。

第二节 菌种和发酵

一、菌种

最早发现产生青霉素的原始菌种是音符型青霉菌 (*Penicillium notatum*), 生产能力很低, 表面培养只有几十个单位, 远不能满足工业生产要求。以后找到另一种适合于深层培养的橄榄型青霉菌 (*Pen. Chrysogenum*) 经一系列诱变、杂交、育种, 新的产量更高的菌种不断取代旧的菌种。原来橄榄型青霉菌 Q 176 发酵单位只有 1000 以下, 发展到今天的高产菌株单位在一万以上, 并取得许多有利于生产的特性, 如不产生有碍提炼的色素等。

除了青霉菌属 (*Penicillium*) 外, 曲菌属 (*Aspergillus*) 头孢菌属 (*Cephalosporium*) 和好热性真菌 (*Malkianchea Pulchella*) 等亦能产生青霉素类抗菌素。

选种方面, 使用过的各种诱变剂中以紫外线, X-射线, γ -射线, 氮芥子气, 乙烯亚胺较好。近年应用一些抗癌药如 A 4991, 争光霉素、光辉霉素等有些效果, 值得进一步试验。据报导, 以 0.25—2% 的 N-亚硝基-乙基脒在 24°C 处理青霉菌孢子液 24 小时, 变异率提高。用抗癌药

novembiquin (其结构为 $\text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \\ \text{CH}_2\text{CH ClCH}_3 \end{array}$) 0.75% 的浓度处理菌种 30 分钟, 变株产量比对照增加 10~15%。

值得注意的是, 最近国外曾发现橄榄型青霉菌受到真菌噬菌体的侵袭, 曾对这种噬菌体作过分离和纯化, 并研究过其形态, 生化特性。

二、发酵工艺要领

生产种子是由砂土孢子经甘油、葡萄糖, 胨——斜面移植到小米固体上, 25°C 培养, 孢子成熟后, 真空干燥并以这种形式保存备用。生产时, 按每吨培养基不少于 200 亿孢子的接种量接到含有葡萄糖, 乳糖, 玉米浆为主的一级种子罐内, 26°C 培养 48~50 小时, 然后按 10% 的接种量移种到含有葡萄糖, 玉米浆为主的二级繁殖罐内, 27°C 培养 24 小时, 便可作为发酵罐的种子。

种子质量要求: 菌丝长稠, 静置浓度达 9/10 [V/V] 以上, 菌丝团极微, 不仔细分辨不出。镜检粗壮, 有中小空胞, 处在 III 中~IX 中末阶段。

发酵是在含有花生饼粉, 夫质水, 母液糖, 尿素, 硝酸铵, 硫代硫酸钠, 苯乙酰胺和碳酸钙的培养基中先后在 27° 和 26°C 进行。接种量约 20%, 通气量发酵 17 小时前后分别为 1:0.8 和 1:0.9 左右。

为使前期好控制, 有的厂从基础料中抽出部分培养基另行灭菌, 于发酵液长稠, 不再加油时补进。补入体积根据空气湿度决定。

发酵过程须适当加糖, 补充氮、硫源和前体, 加糖主要控制残糖量, 前中期不同, 约在 0.3~0.6% 范围内, 加入量主要决定于耗糖速度, pH 变化, 菌丝发育情况, 用油多少, 发酵液浓稠度和罐内实际体积。加糖率一般不大于 0.13%/小时。

补氮、硫源及前体时除参照加糖各条外, 应视单位增长速度及总水平决定加入量多少。

发酵过程 pH 前期 60 小时内维持在 6.8—7.2, 以后稳定在 6.7 左右。

泡沫控制: 前期泡沫主要是花生饼粉, 夫质水引起。在前期泡沫多的情况下可间歇搅拌,

油不能多加。中期泡沫可加油控制,必要时可略为降低空气流量。后期尽量少加油。

三、影响青霉素发酵的因素

1. 培养基配方的改进

(1) 碳源 青霉菌能利用多种碳源如乳糖、蔗糖、葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、淀粉和天然油脂等。乳糖由于它被菌缓慢利用,而能维持青霉素分泌的有利条件,一直在工业生产上作为优先考虑的碳源。但是采用续加葡萄糖的办法,满足菌生长和合成抗菌素的不同需要,也同样能达到乳糖所起的作用。因此,近年为了降低生产成本,乳糖在发酵培养基中已被续加葡萄糖所取代。天然油脂,如玉米油,也能为青霉菌缓慢利用作为有效的碳源,但其折粮单耗较高,所以生产上也考虑用消沫剂取代之。最近有的厂试用玉米粉或淀粉水解液代替葡萄糖,可进一步降低成本和粮耗。

(2) 氮源 早期青霉素工业生产由于采用玉米浆,产量有很大的发展,至今在国外仍不失为主要氮源。玉米浆是玉米淀粉生产的付产物,含有多种氨基酸,如精氨酸、组氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸和丙氨酸,以及 β 苯乙胺等。后者为青霉素合成提供侧链前体。对于玉米浆的各种成份与青霉素的生物合成的关系还未充分了解。玉米浆的长处是能在适当时机和以适当速度释放出菌所需的养分。但由于它的质量不稳定,可用其他有机氮源代替,如花生饼粉,棉子饼粉,黄豆饼粉,夫质水等。

(3) 原材料质量 以花生饼粉,夫质水,苯乙酰胺,母液糖的质量影响较大。花生饼粉除注意产地,要求热榨,温度低些,出油率少些,细度以60目较好。夫质水为玉米粉碎后去渣的淀粉乳沉降后的上清液。其质量与玉米浸泡,沉降,贮藏时间有关,夏季影响较大。苯乙酰胺本身具有一定毒性,其中杂质,氯苯影响较大。

近年来,据报导,曾用青霉菌菌丝废渣代替玉米浆作为氮源。若全代,产量下降一半以上,如代替20—50%无多大影响。

有人发现用各种榨油后饼粉的水解物,作为青霉素发酵的培养基所得产量比未水解的高,以黄豆饼粉水解产物最好,其次为花生饼粉,棉子饼粉,玉米饼粉,蓖麻子饼粉的水解物。现将国外1944年与1967年使用过的青霉素发酵培养基作一对比:

1944 年	1967 年
乳糖 3—4%	葡萄糖 滴加 总量 10%
玉米浆(干重) 3.5%	4—5%
CaCO_3 1%	加酸或碱调节 pH在 6.5~7
KH_2PO_4 0.4%	
苯乙酰胺 0.5%	苯乙酸滴加,总量 0.5—0.8%
猪油消沫剂 0.25%	猪油或植物油滴加总量 0.5%
发酵单位150u/ml	15000u/ml

2. 中间代谢的控制

(1) 前体 苯乙酸或其衍生物,苯乙酰胺,苯乙胺,苯乙酰甘氨酸等均可作为青霉素的侧链前体。上述化合物不仅直接掺入青霉素分子内,还具有刺激青霉素的合成作用。菌对前体的利用有两个途径:直接结合到产物分子中;或作为养料和能源被利用,即被氧化为 CO_2 和水。前体究竟通过那一个途径决定于菌种的性能,培养基的组成,培养条件等。而菌种起决定性的作用,活性较低的菌种,例如初期采用的Q176,大部分前体(71—94%)被氧化消耗掉,只

有 2—10% 转化为青霉素。而现代工业生产的菌种前体转化率在 46—90%，为了避免前体加入浓度过大引起菌中毒，除基础料中加入 0.07% 外，其余按需要同氮源一起补入。国外有利用气相层析来控制发酵液中游离苯乙酸的浓度。

苯乙酰胺和苯乙酸浓度大于 0.1% 对菌生长和生物合成均有毒。前体的毒性取决于培养基的 pH。苯乙酰胺在碱性 pH 时毒性较大；而苯乙酸在酸性 pH 下，毒性较大。在中性 pH 时，苯乙酰胺的毒性大于苯乙酸。为此，在整个青霉素发酵过程中，前体在任何时间加入的量，不能大于 0.1%。加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 可减少苯乙酸、苯乙酰胺毒性。

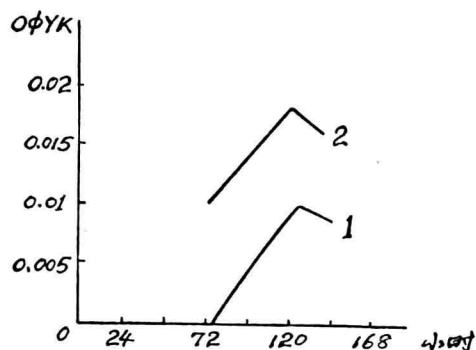


图 26-3 OPhK 在发酵过程中的堆积
1—合成培养基 2—复合培养基

研究发酵条件对前体代谢的影响结果表明，在碱性条件下，苯乙酸被菌氧化的速率，随培养基 pH 上升而增加。年轻的菌丝不氧化前体而仅利用它来构成青霉素分子。随着菌龄加大，氧化能力渐渐增加。培养基成份对前体氧化程度有较大影响，在合成培养基比复合培养基前体氧化量少。这可由前体氧化中间产物邻羟基苯乙酸 (OPhK) 在培养基中的积累得到说明 (见图 26-3)。摇瓶试验发现通气条件差的情况下，菌氧化前体能力显著降低。另外在含有葡萄糖或乳糖时比不含糖移殖到缓冲液的菌丝 (3 天菌龄) 对前体的氧化力减弱一半。

为了最大限度的减少前体的氧化，工业生产多用间歇或续加低浓度的苯乙酸的办，保持前体的供应速率仅略大于生物合成需要。有人把蔗糖和苯乙酸钠盐压成片剂办法给青霉素摇瓶发酵间歇补料。这种片剂的内含物在溶液中缓慢释放，可控制其开始释放的时间和释放速度。采用这一方法 9 天摇瓶发酵单位高达 16,150u/ml 而对照使用前体溶液的单位为 6700u/ml。

最近有人曾试用具有消沫性能的前体如苯乙基油酸酯，可达到添加前体、消沫、补充碳源的三重作用。

(2) pH 控制 在青霉素发酵过程中 pH 是通过下列手段控制的：如 pH 上升，则加糖或天然油脂。pH 较低可加入 CaCO_3 或通 NH_3 调节或提高通气量。近年有利用自动加入酸 (如 20% H_2SO_4) 或碱的办法，维持发酵的最适 pH 在 6.8—7.2，使产量增加。

新近，有人曾比较两种不同控制 pH 的方法对青霉素生物合成的影响。一种是恒速补糖，用酸碱来控制，另一种是按需补糖，即 pH 上升得快就多补些，下降时就少补以维持 pH 在 6.6—6.9 的范围，结果见图 26-4，采用后一种办法对青霉素的合成更有利，能满足菌在不同阶段的需要和同样达到控制在最适的 pH 范围而前一种方法虽然也能达到控制 pH 的目的，但恒速补糖往往不是超过便是满足不了菌的代谢和合成抗菌素的需要，并可能导致菌的代谢向不利于抗菌素合成的方向改变。

(3) 温度控制 青霉菌生长的适宜温度为 30°C 而分泌抗菌素的温度是在 20°C 左右。生产上采用变温控制办法，使之适合菌不同阶段的需要，显然是合理的。目前采用 27—26°C 发酵是适用于现有的生产条件，因 20° 培养虽能减少青霉素的破坏但周期拖的较长。最近对青霉素分批发酵应用所研究的发酵模式的计算方法，计算合适的发酵温度。结果指出发酵在头 56 时维持在 27.2°C 然后直线下降到 18.7°C 维持到 184 小时，最后 24 小时回复到 27.2°C 培养。采

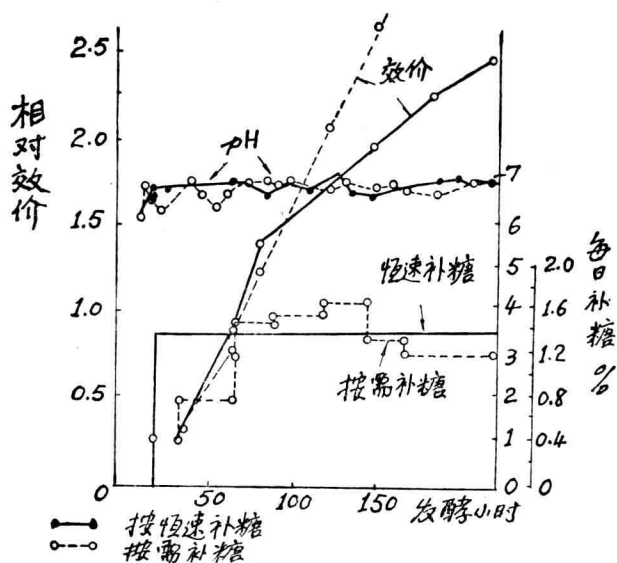


图 26-4 采用不同的方法控制 pH 对青霉素合成的影响

用这种变温培养方法比常温 25°C 培养产量增加 16%。目前这一研究尚处在理论阶段,但指出变温发酵以提高单位是简易可行的手段。

(4) 补料 针对发酵后期利用慢,浓度转稀,pH 低,单位增长差的情况,在基础料配方中增加 0.05% 尿素,在发酵过程中再补加二次,和糖水一起滴加。加后可以克服上述对生产不利情况。在单位增长趋势好的情况下,加尿素作用显著。遇发酵不正常,菌丝成葫芦状,伸展不开,应少加糖,混合料不加,可加点点尿素水。往往能扭转不良局面。

(5) 表面活性剂 在发酵过程中与料液一起补入新洁尔灭 50ppm,不仅有抑制杂菌生长,还有刺激发酵单位作用,一般平均可提高 300u/ml。早期加入对青霉菌有抑制作用,加入量增加到 300ppm 以上对单位有影响,浓度大于 2000ppm 即 0.2%,产生菌死亡。刺激生物合成的机理不明,推测可能使菌丝更好,有利于对氧和养料的吸收。加新洁尔灭后,大罐生长略为慢些,菌丝少些。

据报导,在青霉素发酵中加入吐温(Tween)型的非离子化表面活性剂,如聚氧乙烯、山梨糖醇酐、单油酸酯、单月桂酸酯、单硬酸酯、单棕榈酸酯,和三油酸酯等能增加青霉素的产量。

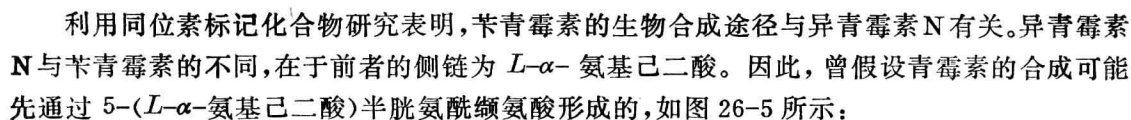
(5) 增稠剂 于青霉素发酵中加入少量(40ppm)聚乙烯醇,聚丙烯酸钠,聚二乙胺或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)能使青霉素产率增加 38%。这些可溶性高分子化合物能够提高产量的原因是:(a)当发酵罐使用较大的搅拌功率和较快的搅拌叶尖速度时,这种高分子化合物能使邻近搅拌叶的液体速度梯度降低,因而避免打断菌丝,而且在促进氧在培养基中有足够的溶解量的同时还有利于除去 CO₂; (b)菌丝生长时,由于高分子化合物起分散剂的作用,菌丝不致成团,界面面积得以增加,因而增加了氧传递到菌丝体内的总速度。

3. 一二级罐质量影响

(1) 小罐中间补料 在某厂具体条件下采用小罐补料培养 54—58 小时补入一定量全料,补后生长 6—9 小时移入中罐,结果到大罐的发酵单位比小罐不补的增加 12%。补与不补种子质量差别表现在小罐菌丝浓度由对照 35% 增加到 44%(离心沉淀法),菌丝团少,菌丝内积蓄

(2) 有的厂在二级罐基础培养基中, 就开始加入少量前体, 苯乙酰胺, 使菌丝在发酵时能很快适应。同时也可作为前体利用情况的指标。小罐如加前体, 长不好。

剖析苄青霉素的化学结构 I, 可看出青霉素的分子是由苯乙酸、L-半胱氨酸和 D-缬氨酸组成的。

[illegible]

- 14 -

可能有 α -氨基己二酸的参与。苄青霉素的产生是经侧链前体的交换进行的。

五、青霉菌的代谢与青霉素生物合成的调节

虽然青霉素形成的最后一步仍未搞清楚,但可以相信这是一步须要有一种酰基转移酶参与的酰基侧链与 6APA 缩合的反应。有人曾在橄榄型青霉菌的无细胞萃取液中测得这种酶。它在有 ATP 和 CoA 存在下能活化苯乙酸和苯氧乙酸,并发现随着酰基转移酶活力的提高,抗菌素形成能力相应增加。而此酶活力的下跌也伴随着青霉素生产速率的下降。不产生青霉素的真菌没有这个酶。诱变获得的高产青霉菌变株,其酰基转移酶的活力也提高。此酶在发酵第二天,青霉素开始生产时出现,第三天显著增加,这恰好在青霉素生产大幅度增长的前夕。

青霉素的生物合成受到赖氨酸专门的抑制。这种抑制作用能被 α -氨基己二酸,真菌中的赖氨酸前体所抵消。其大概的理由是氨基己二酸不仅是赖氨酸也是青霉素形成的前体。青霉素和赖氨酸可被当作是歧路终点产物。赖氨酸对氨基己二酸的形成的阻遏或抑制作用依次影响到青霉素的形成。

赖氨酸抑制青霉素生物合成的可能机制如图 26-6 所示:

赖氨酸对青霉素抑制作用很可能是由于它能使氨基己二酸的合成所需的酶受到抑制或其形成受到阻遏。因此若能设法减少赖氨酸的形成对提高青霉素的产量具有一定的意义。

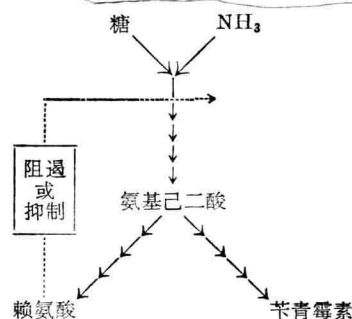


图 26-6 赖氨酸抑制青霉素生物合成的可能机制

第三节 提取和精制

发酵液中青霉素浓度很低,如发酵液为 15000u/ml,约相当于 1%。故需浓缩很多倍,才能结晶,而且发酵液中杂质很多,也需预先将它除去。从发酵液中提取青霉素,目前工业上多用溶媒萃取法。苄青霉素与碱金属所成的盐类在水中溶解度很大,而苄青霉素本身(游离酸)很易溶解于有机溶媒中。溶媒萃取法提取青霉素即利用这一性质,将青霉素在酸性溶液中转入有机溶媒(醋酸丁酯、氯仿等)中,然后再转入中性水相中。经过这样反复几次萃取,就能达到提纯和浓缩。

从发酵液中提取青霉素,也可用离子交换法或沉淀法。例如用阴离子交换树脂提取或成二苄基乙二胺盐沉淀析出,但都有缺点。早期还用过活性炭吸附法,在酸性下吸附,以中性的酒精-水或丙酮的水溶液洗脱。

根据上述青霉素不稳定的性质,整个提取和精制过程应在低温、快速下进行,并应注意清洗和保持在稳定的 pH 范围。

下面我们按溶媒萃取法的各工序,分别进行讨论。

一、发酵液的过滤和预处理 青霉素发酵液菌丝较粗大,一般用鼓式过滤机过滤。除菌丝出现自溶的情况外,一般过滤较容易。但发酵液达最高单位时,常常也是菌丝开始自溶的时候。当菌丝自溶时,菌丝在鼓式过滤机表面不形成紧密的薄层,在过滤机的吹风阶段,不能自行剥落,增长过滤时间,滤液的得量降低,且滤液发浑。因此最好在菌丝自溶前放缶,尽管发酵单位还会继续上升一些。