

《生物发酵技术》实训指导书

——青霉素仿真生产

制药工程系

目录

第一章 背景知识	4
1.1 青霉素的发现	4
1.2 青霉素分类及分子结构	4
1.3 青霉素的单位	5
1.4 作用机理	5
1.5 青霉素的应用	5
第二章 发酵工艺过程	6
2.1 菌种介绍	6
2.2 菌种的保藏	6
2.3 孢子的制备	6
2.4 种子制备	7
2.5 发酵培养基介绍	7
2.6 灭菌	8
2.7 发酵	8
2.7.1 发酵的过程控制	9
2.7.2 防止染菌的要点	10
2.7.3 空气系统的要求	10
2.7.4 蒸汽系统的要求	10
第三章 提炼工艺过程	11
3.1 发酵液预处理	11
3.2 提取	11
3.3 精制	12
3.3.1 脱色和去热原质	12
3.3.2 结晶	13

3.4 成品鉴定	13
3.5 成品分装	14
第四章 主要工艺指标	15
第五章 主要设备列表及仿真操作设备	17
第六章 操作规程	19
6.1 发酵工艺过程	19
6.1.1 正常发酵（过程）	19
6.1.2 出料	19
6.1.3 发酵过程中 PH 值低	19
6.1.4 发酵过程中 PH 值高	19
6.1.5 发酵过程中溶解氧低	19
6.1.6 残糖浓度低	20
6.1.7 发酵过程中温度高	20
6.1.8 泡沫高	20
6.2 提炼工艺过程	20
6.2.1 预处理操作	22
6.2.2 一次 BA 萃取操作	23
6.2.3 一次反萃取操作	24
6.2.4 二次 BA 萃取操作	24
6.2.5 脱色罐操作	25
6.2.6 结晶罐及抽滤、干燥操作	25

第一章 背景知识

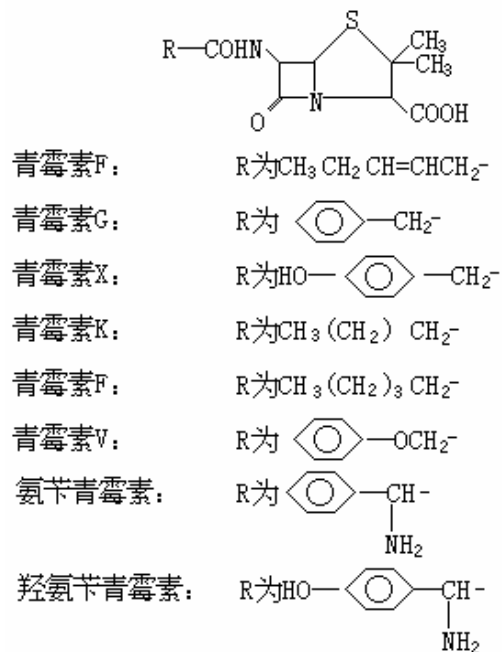
1.1 青霉素的发现

1928 年,英国细菌学家 Fleming 发现污染在培养葡萄球菌的双蝶上的一株霉菌能杀死周围的葡萄球菌。他将此霉菌分离纯化后得到的菌株经鉴定为点青霉,并将这菌所产生的抗生物物质命名为青霉素。

1940 年,英国 Florey 和 Chain 进一步研究此菌,并从培养液中制出了干燥的青霉素制品。经实验和临床试验证明,它毒性很小,并对一些革兰氏阳性菌所引起的许多疾病有卓越的疗效。

1.2 青霉素分类及分子结构

青霉素是 6-氨基青霉烷酸(6-aminopenicillanic acid, 6-APA)苯乙酰衍生物。侧链基团不同,形成不同的青霉素,主要是青霉素 G。工业上应用的有钠、钾、普鲁卡因、二苄基乙二胺盐。青霉素发酵液中含有 5 种以上天然青霉素(如青霉素 F、G、X、K、F 和 V 等),它们的差别仅在于侧链 R 基团的结构不同,其中青霉素 G 在医疗中用得最多,它的钠或钾盐为治疗革兰氏阳性菌的首选药物,对革兰氏阴性菌也有强大的抑制作用。青霉素的结构通式可表示为



1.3 青霉素的单位

目前国际上青霉素活性单位表示方法有两种：一是指定单位（unit）；二是活性质量（ μg ），最早为青霉素规定的指定单位是：50mL 肉汤培养基中恰能抑制标准金葡萄菌生长的青霉素量为一个青霉素单位。在以后，证明了一个青霉素单位相当于 0.6 μg 青霉素钠。因此青霉素的质量单位为：0.6 μg 青霉素钠等于 1 个青霉素单位。由此，1mg 青霉素钠等于 1670 个青霉素单位(unit)。

1.4 作用机理

已有的研究认为，青霉素的抗菌作用与抑制细胞壁的合成有关。细菌的细胞壁是一层坚韧的厚膜，用以抵抗外界的压力，维持细胞的形状。细胞壁的里面是细胞膜，膜内裹着细胞质。细菌的细胞壁主要由多糖组成，也含有蛋白质和脂质。革兰氏阳性菌细胞壁的组成是肽聚糖占细胞壁干重的 50%~80%（革兰氏阴性菌为 1%~10%）、磷壁酸质、脂蛋白、多糖和蛋白质。其中肽聚糖是一种含有乙酰基葡萄糖胺和短肽单元的网状生物大分子，在它的生物合成中需要一种关键的酶即转肽酶。青霉素作用的部位就是这个转肽酶。现已证明青霉素内酰胺环上的高反应性肽键受到转肽酶活性部位上丝氨酸残基的羟基的亲核进攻形成了共价键，生成青霉噻唑酰基-酶复合物，从而不可逆的抑制了该酶的催化活性。通过抑制转肽酶，青霉素使细胞壁的合成受到抑制，细菌的抗渗透压能力降低，引起菌体变形，破裂而死亡。

1.5 青霉素的应用

临床应用：40 多年，主要控制敏感金黄色葡糖球菌、链球菌、肺炎双球菌、淋球菌、脑膜炎双球菌、螺旋体等引起感染，对大多数革兰氏阳性菌（如金黄色葡萄球菌）和某些革兰氏阴性细菌及螺旋体有抗菌作用。优点：毒性小，但由于难以分离除去青霉噻唑酸蛋白（微量可能引起过敏反应），需要皮试。

各种半合成抗生素的原料：青霉素的缺点是对酸不稳定，不能口服，排泄快，对阴性菌无效。氨苄青霉素耐酸广谱；对抗绿脓杆菌的磺苄青霉素，耐酸、耐酶、口服的乙氧萘青霉素等。提供头孢菌素母核。

第二章 发酵工艺过程

2.1 菌种介绍

青霉是产生青霉素的重要菌种。广泛分布于空气、土壤和各种物上，常生长在腐烂的柑桔皮上呈青绿色。目前已发现几百种，其中产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、点青霉(*Penicillium notatum*)等都能大量产生青霉素。青霉素的发现 and 大规模地生产、应用，不仅对抗生素工业的发展起了巨大的推动作用，而且加上其他抗生素的广泛使用，比如像磺胺药物，使人类的平均寿命，再次延长了四岁。此外，有的青霉菌还用于生产灰黄霉素及磷酸二酯酶、纤维素酶等酶制剂和有机酸。1981 年报导，疣孢青霉是纤维素酶的新来源，它能分解棉花纤维。

2.2 菌种的保藏

菌种的保藏方法有：斜面菌种低温保藏法、砂土管保藏法、甘油封藏法、真空冷冻干燥法。

斜面菌种低温保藏法 利用低温对微生物生命活动有抑制作用的原理进行保藏。把斜面菌种、固体穿刺培养物或菌悬液等，直接放入 4~5℃ 冰箱中。保藏时间一般不超过 3 个月，到时必须进行移接传代，再放回冰箱。

砂土管保藏法 将干燥砂粒与细土混合后灭菌制成砂土管，然后接种保藏。若把砂土管放在低温或抽气后密封，效果更佳。此法适用于产孢子及芽孢菌种的保藏。保藏期 1~10 年。

甘油封藏法 向培养好的菌种斜面上，加入灭菌甘油，高出斜面 1cm，然后蜡封管口，放入冰箱。该法既可防止培养基水分蒸发，又能使菌种与空气隔绝。保藏期 1~2 年。

真空冷冻干燥法 是目前比较理想的一种方法。在低于 -15℃ 下，快速将细胞冻结，并保持细胞完整，然后在真空中使水分升华致干。在此环境中，微生物的生长和代谢都暂时停止，不易发生变异，故可长时间保存，一般为 5~10 年，最多可达 15 年之久。此法兼备了 低温、干燥及缺氧几方面条件，使微生物可以保存较长时间，但过程较麻烦，需要一定的设备。

2.3 孢子的制备

这是发酵工序的开端，是一个重要环节。抗生素产量和成品质量同菌种性能以及同孢子和种子的情况有密切关系。生产用的孢子需经过纯种和生产能力的检

验，符合规定的才能用来制备种子。保藏在砂土管或冷冻干燥管中的菌种经无菌手续接入适合于孢子发芽或菌丝生长的斜面培养基中，经培养成熟后挑选菌落正常的孢子可再一次接入试管斜面。对于产孢子能力强的及孢子发芽、生长繁殖快的菌种可以采用固体培养基孢子，孢子可直接作为种子罐的种子。

2.4 种子制备

种子制备是指孢子接入种子罐后，在罐中繁殖成大量菌丝的过程，其目的是使孢子发芽、繁殖和获得足够数量的菌丝，以便接种到发酵罐当中去。种子制备所使用的培养基及其它工艺条件，都要有利于孢子发芽和菌丝繁殖。

种子罐级数是在指制备种子需逐级扩大培养的次數，一般根据种子的生长特性、孢子发芽及菌体繁殖速度，以及发酵罐的容积而定。青霉素种子制备一般为二级种子罐扩大培养。

2.5 发酵培养基介绍

培养基是供微生物生长繁殖和合成各种代谢产物所需要的按一定比例配制的多种营养物质的混合物。培养基的组成和比例是否恰当，直接影响微生物的生长、生产和工艺选择、产品质量和产量等。青霉素的发酵培养基由碳源、氮源、无机盐及金属离子、添加前体、消沫剂五部分组成。

碳源的主要作用是：为微生物菌种的生长繁殖提供能源和合成菌体所必需的碳成分；为合成目的产物提供所需的碳成分。青霉素发酵中常用乳酸或葡萄糖，也可采用葡萄糖母液、糖蜜等。其中乳糖最为便宜，但因货源较少，很多国家采用葡萄糖代替。但当葡萄糖浓度超过一定限度时，会过分加速菌体的呼吸，以至培养基中的溶解氧不能满足需要，使一些中间代谢物不能完全氧化而积累在菌体或培养基中，导致 pH 下降，影响某些酶的活性，从而抑制微生物的生长和产物的合成。

氮源的作用是供应菌体合成氨基酸和三肽的原料，以进一步合成青霉素。主要有有机氮源为玉米浆、棉籽饼粉、花生饼粉、酵母粉、蛋白胨等。玉米浆为较理想的氮源，含固体量少，有利于通气及氧的传递，因而利用率较高。固体有机氮源原料一般需粉碎至 200 目以下的细度。有机氮源还可以提供一部分有机磷，供菌体生长。无机氮如硝酸盐、尿素、硫酸铵等可适量使用。

碳酸钙用来中和发酵过程中产生的杂酸，并控制发酵液的 pH 值，为菌体提供营养的无机磷源一般采用磷酸二氢钾。另外加入硫代硫酸钠或硫酸钠以提供青

霉素分子中所需的硫。由于现在还有一些工厂采用铁罐发酵，在发酵过程中铁离子便逐渐进入发酵液。发酵时间愈长，则铁离子愈多。铁离子在 $50\mu\text{g/ml}$ 以上便会影响青霉素的合成。采用铁络合剂以抑制铁离子的影响，但实际对青霉素产量并无改进。所以青霉素的发酵罐采用不锈钢制造为宜，其他重金属离子如铜、汞、锌等能催化青霉素的分解反应。

添加苯乙酸或者苯乙酰胺，可以借酰基转移的作用，将苯乙酸转入青霉素分子，提高青霉素 G 的生产强度，添加苯氧乙酸则产生青霉素 V。因此前体的加入成为青霉素发酵的关键问题之一。但苯乙酸对发酵有影响，一般以苯乙酰胺较好。也有人采用苯乙酸月桂醇酯，其优点是在发酵中月桂醇酯水解，苯乙酸结合进青霉素成品。而月桂酸作为细菌营养剂及发酵液消沫剂，且其毒性比苯乙酸小，但价格较贵。前体要在发酵开始 20h 后加入，并在整个发酵过程中控制在 $50\mu\text{g/ml}$ 左右

由于在发酵过程中二氧化碳的不断产生，加上培养基中有很多有机氮源含有蛋白质，因此在发酵罐内会产生大量泡沫，如不严加控制，就会产生发酵液逃液，导致染菌的后果。采用植物油消沫仍旧是个好方法，一方面作为消沫剂，另一方面还可以起到碳源作用，但现在已普遍采用合成消沫剂（如聚酯、聚醇类消沫剂）代替豆油。

2.6 灭菌

“灭菌”指的是用化学或物理的方法杀灭或除去物料及设备中所有的有生命物质的技术或工艺流程。

灭菌实质上可分杀菌和溶菌两种，前者指菌体虽死，但形体尚存，后者则指菌体杀死后，其细胞发生溶化、消失的现象。

工业上常用的方法有：干热灭菌、湿热灭菌、化学药剂灭菌、射线灭菌和介质过滤除菌等几种。

在青霉素的生产中，对培养基和发酵罐主要采用的是湿热蒸汽灭菌和空气过滤除菌的方法。

2.7 发酵

这一过程的目的主要是为了使微生物分泌大量的抗生素。发酵开始前，有关设备和培养基必须先经过灭菌，后接入种子。接种量一般为 5~20%。发酵周期一般为 4~5 天，但也有少于 24 小时，或长达二周以上的。在整个过程中，需要

不断通气和搅拌，维持一定的罐温和罐压，并隔一段时间取样进行生化分析和无菌试验，观察代谢变化、抗生素产生情况和有无杂菌污染。

2.7.1 发酵的过程控制

(1) 碳源控制：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。乳糖是青霉素生物合成的最好碳源，葡萄糖也是比较好的碳源，但必须控制其加入的浓度，因为葡萄糖易被菌体氧化并产生抑制抗生素合成酶形成的物质，从而影响青霉素的合成，所以可以采用连续添加葡萄糖的方法代替乳糖。

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 G 的侧链前体。菌体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利用，即氧化为二氧化碳和水。前体究竟通过哪个途径被菌体利用，主要取决于培养条件以及所用菌种的特性。

通过比较苯乙酰胺、苯乙酸及苯氧基乙酸的毒性，除苯氧基乙酸外，苯乙酰胺和苯乙酸的毒性取决于培养基的 pH 和前体的浓度。碱性时，苯乙酰胺有毒；酸性时，苯乙酸毒性较大；中性时，苯乙酰胺的毒性大于苯乙酸。前体用量大于 0.1% 时，青霉素的生物合成均下降。所以一般发酵液中前体浓度以始终维持在 0.1% 为宜。

在碱性条件下，苯乙酸被菌体氧化的速率随培养基 pH 上升而增加。年幼的菌丝不氧化前体，而仅利用它来构成青霉素分子。随着菌龄的增大，氧化能力逐渐增加。培养基成分对前体的氧化程度有较大影响，合成培养基比复合培养基对前体的氧化量少。

为了尽量减少苯乙酸的氧化，生产上多用间歇或连续添加低浓度苯乙酸的方法，以保持前体的供应速率略大于生物合成的需要。

(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 过高，则添加糖、硫酸或无机氮源；若 pH 过低，则加入碳酸钙、氢氧化钠、氨或尿素，也可提高通气量。另外，也可利用自动加入酸或碱的方法，使发酵液 pH 维持在 6.8~7.2，以提高青霉素产量。

(3) 温度控制：青霉菌生长的适宜温度为 30℃，而分泌青霉素的适宜温度是 20℃ 左右，因此生产上采用变温控制的方法，使之适合不同阶段的需要。一般一级种子的培养温度控制在 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 左右；二级种子的培养温度控制在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 左右；发酵前期和中期的温度控制在 26℃ 左右；发酵后期的温度控制在 24℃

左右。

(4) 补料控制：发酵过程中除以中间补糖控制糖浓度及 pH 外，补加氮源也可提高发酵单位。经试验证实：若在发酵 60~70h 开始分次补加硫酸铵，则在 90h 后菌丝含氮量几乎不下降，维持在 6%~7%，且 60%~70% 的菌丝处于年幼阶段，菌丝呼吸强度维持在二氧化碳量近 $30 \mu\text{l}/(\text{mg 菌丝} \cdot \text{h})$ ，抗生素产率为最高水平的 30%~40%；而不加硫酸铵的对照罐，在发酵中期菌丝含氮量为 7%，以后逐级下降。至发酵结束时为 4%。发酵结束时呼吸强度降至二氧化碳量为 $16 \mu\text{l}/(\text{mg 菌丝} \cdot \text{h})$ ，且抗生素产量下降至零，总产量仅为试验罐的 1/2。因此，为了延长发酵周期，提高青霉素产量，发酵过程分次补加氮源也是有效的措施。

(5) 铁离子的影响：三价铁离子对青霉素生物合成有显著影响，一般若发酵液中铁离子含量超过 $30 \sim 40 \mu\text{g/ml}$ ，则发酵单位增长缓慢。铁离子对产黄青霉绿色孢子合成青霉素的影响见下表。因此铁罐在使用前必须进行处理，可在罐壁涂上环氧树脂等保护层，使铁离子含量控制在 $30 \mu\text{g/ml}$ 以下。

2.7.2 防止染菌的要点

染菌是抗生素发酵的大敌，不制服染菌就不能实现优质高产。影响染菌的因素很多，而且带随机性质，但只要认真对待，过细地工作，染菌是可以防止的。请到左边的导航栏里选择查看防止染菌的要点的内容。

2.7.3 空气系统的要求

防止空气带菌主要是提高空压机进口空气的洁净度，防止空气夹带油和水及空气过滤器失效。

提高空压机进口空气的洁净度，可以从提高吸气口的位置及加强空气的压缩前过滤着手。防止空气夹带油、水，除加强去除油、水的措施外，还必须防止空气冷却器漏水，注意勿使冷却水压力大于空气压力，防止冷却水进入空气系统。

2.7.4 蒸汽系统的要求

重视饱和蒸汽的质量，要严防蒸汽中夹带大量冷凝水，防止蒸汽压力大幅度波动，保证生产时所用的蒸汽压力在 30~35 千帕以上。

(1) 连续灭菌设备：连消塔结构要求简单，易于拆装和清理，操作时蒸汽能与物料混合均匀，并易于控制温度。

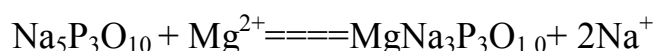
(2) 发酵罐：发酵罐及其附属设备应注意严密和防止泄漏，避免形成“死角”。凡与物料、空气、下水道连接的阀门都必须保证严密度。

(3) 无菌室：用超净工作台及净化室代替无菌室，以提高无菌程度。

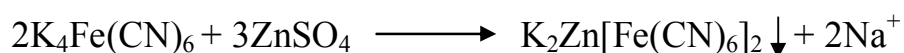
第三章 提炼工艺过程

3.1 发酵液预处理

发酵液中的杂质如高价无机离子（ Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ）和蛋白质在离子交换的过程中对提炼影响甚大，不利于树脂对抗生素的吸收。如用溶媒萃取法提炼时，蛋白质的存在会产生乳化，使溶媒合水相分离困难。对高价离子的去除，可采用草酸或磷酸。如加草酸则它与钙离子生成的草酸钙还能促使蛋白质凝固以提高发酵滤液的质量。如加磷酸（或磷酸盐），既能降低钙离子浓度，也利于去除镁离子。



加黄血盐及硫酸锌，则前者有利于去除铁离子，后者有利于凝固蛋白质。此外，两者还有协同作用。他们所产生的复盐对蛋白质有吸附作用。



为了有效的去除发酵液中的蛋白质，需加入絮凝剂。絮凝剂是一种能溶于水的高分子化合物。含有很多离子化基团（如 $-\text{NH}_2$ ， $-\text{COOH}$ ， $-\text{OH}$ ）。

3.2 提取

化学提取和精制的目的：从发酵液中制取高纯度的、合乎药典的抗生素成品。

由于发酵液中青霉素浓度很低，仅 0.1~4.5% 左右，而杂质浓度比青霉素的高几十倍甚至几千倍，并且某些杂质的性质与抗生素的非常相近，因此提取精制是一件十分重要的工作。

发酵液中常见的杂质有：菌丝、未用完的培养基、易污染杂菌、产生菌的代谢产物、预处理需要加入的杂质等。

在提炼过程中要遵循下面四个原则：

- (1) 时间短
- (2) 温度低
- (3) pH 适中
- (4) 勤清洗消毒

常用的提取方法有溶媒萃取法、离子交换法和沉淀法等。

(1) 溶媒萃取法 这是利用抗生素在不同的 pH 值条件下以不同的化学状态（游离态、碱或盐）存在时，在水及水互不相溶的溶媒中溶解度不同的特性，使抗生素从一种液相（如发酵滤液）转移到另一种液相（如有机溶媒）中去，以达到浓缩和提纯的目的。利用此原理就可借助于调节 pH 值得方法时抗生素从一个液相中被提取到另一液相中去。所选用的溶媒与水应是互不相溶或仅很小部分互溶，同时所选溶媒在一定的 pH 下对于抗生素应有较大的溶解度和选择性，方能用较少量的溶媒使提取完全，并在一定程度上分离掉杂质。

(2) 离子交换法 利用离子交换树脂和抗生素之间的化学亲和力，有选择性的将抗生素吸附上去，然后以较少量的洗脱剂将它洗下来。

(3) 沉淀法 是一种分离抗生素简单而经济的方法，浓缩倍数高，因而也是很有效的方法。

青霉素的提取采用溶媒萃取法。青霉素游离酸易溶于有机溶剂，而青霉素盐易溶于水。利用这一性质，在酸性条件下青霉素转入有机溶媒中，调节 pH，再转入中性水相，反复几次萃取，即可提纯浓缩。选择对青霉素分配系数高的有机溶剂。工业上通常用醋酸丁酯和戊酯。萃取 2—3 次。从发酵液萃取到乙酸丁酯时，pH 选择 2.8-3.0，从乙酸丁酯反萃到水相时，pH 选择 6.8-7.2。为了避免 pH 波动，采用硫酸盐、碳酸盐缓冲液进行反萃。所得滤液多采用二次萃取，用 10% 硫酸调 pH2.8~3.0，加入醋酸丁酯。在一次丁酯萃取时，由于滤液含有大量蛋白，通常加入破乳剂防止乳化。第一次萃取，存在蛋白质，加 0.05-0.1% 乳化剂 PPB。

3.3 精制

这是青霉素生产的最后工序。对产品进行精制、烘干和包装的阶段要符合“药品生产管理规范”的规定。

3.3.1 脱色和去热原质

脱色和去热原质是精制注射用青霉素中不可缺少的一步。色素是在发酵过程中所产生的代谢产物，它与菌种和发酵条件有关。热原质是在生产过程中由于被污染后杂菌所产生的一种内毒素。生产中一般用活性炭脱色去热原质，但需注意脱色时 pH、温度、活性炭用量及脱色时间等因素，还应考虑它对抗生素的吸附问题，否则影响收率。

3.3.2 结晶

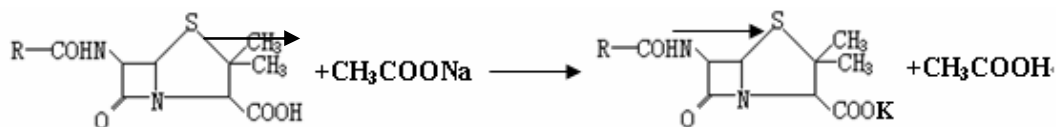
抗生素精制常用结晶法来制得高纯度成品。常用的几种结晶方法有：

(1) 改变温度结晶 利用抗生素在溶剂中的溶解度随温度变化而显著变化的这一特性来进行结晶。

(2) 利用等电点结晶 当将某一抗生素溶液的 pH 调到等电点时，它在水溶液中溶解度最小，则沉淀析出。

(3) 加成盐剂结晶 在抗生素溶液中加入盐剂使抗生素以盐的形式从溶液中能够沉淀结晶。

青霉素钠盐在醋酸丁酯中溶解度很小，利用此性质，再二次醋酸丁酯萃取液中加入醋酸钠乙醇溶液，并控制温度青霉素钠盐就结晶析出。反应如下：



醋酸丁酯中含水量过高会影响收率，但可提高晶体纯度。水分在 0.9% 以下对收率影响较小。得到的晶体要求颗粒均匀，有一定的细度。颗粒太细会使过滤、洗涤困难。晶体经丁醇洗涤，真空干燥即可等到成品。

3.4 成品鉴定

成品鉴定是根据药典的要求逐项进行分析，包括效价鉴定、毒性试验、无菌检查、热源质试验、水分测定、水溶液酸碱度及混浊度测定、结晶颗粒的色泽及大小的测定等。对于药典上未有规定的新抗生素，则可参照相近抗生素，按经验规定一些指标。

酸碱度检测 取本品，加水制成每 1ml 中含 30mg 的溶液，测定。 pH 值应为 5.0 ~7.5 。

溶液的澄清度与颜色 取样品 0.3g，加水 5ml 使溶解，溶液应澄清无色；如显浑浊，与浊度标准液比较，均不得更浓；如显色，与黄色或黄绿色标准比色液比较，均不得更深。

吸光度 取样品，加水制成每 1ml 中含 1.80mg 的溶液，在 280nm 的波长处测定吸光度，不得大于 0.10；在 264nm 的波长处有最大吸收，吸光度应为 0.80~0.88。

细菌内毒素 取样品测定，每 100 青霉素单位中含内毒素的量应小于

0.01EU。

无菌 取样品，用青霉素酶法灭活后或用适宜溶剂溶解后，转移至不少于500ml的0.9%无菌氯化钠溶液中，用薄膜过滤法处理后测定。

效价测定 取本品适量，精密称定，加水溶液并定量稀释制成每1ml中约含0.5mg的溶液，摇匀，精密量取10 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图；另取青霉素对照品适量，同法测定。按外标以峰面积计算，其结果乘以1.0658，即为本品效价。每1mg相当于1670青霉素单位。

3.5 成品分装

抗生素产品一般分装为大包装的原料药，以供制剂厂进行小包装或制剂加工。也有一些抗生素工厂在无菌条件下用自动分装机进行小瓶分装。

第四章 主要工艺指标

编号	指标	推荐值
发酵罐		
1	糖浓度	~5kg/m ³
2	氨氮含量	0.25~0.3kg/m ³
3	PH 值	6.8-7.2
4	温度	25℃
5	搅拌转速	150-250rpm
6	溶氧浓度	>30%
7	前体浓度	<1kg/m ³
8	发酵液中硫氨浓度	0.25kg/m ³
9	发酵罐压力	0.07MPa
一次 BA 萃取		
1	醋酸丁酯（BA）用量	青霉素溶液的 1/3
2	PH 值	2.8-3.0
3	破乳剂用量	100kg
4、	重相液位	80%
一次反萃取		
1	碳酸氢钠用量	青霉素溶液的 2.5
2	PH 值	6.8-7.2
3	重相液位	80%

二次 BA 萃取		
1	醋酸丁酯（BA）用量	青霉素溶液的 1/3
2	PH 值	2.8-3.0
3	重相液位	80%
脱色罐		
1	活性炭用量	25kg
结晶罐		
1	结晶温度	5℃
2	丁醇用量	500kg
3	青霉素钠盐晶体效价	1670u/ml

第五章 主要设备列表及仿真操作设备

编号	名称	备注
1	发酵罐	发酵罐容量为 170000kg，主要部件有罐体、搅拌器、挡板、轴封、空气分布器、传动装置、冷却管、视镜等。
2	进料泵	加入基质
3	空气系统	含消毒、冷却、过滤。
4	计量泵一（加氨水）	操作时有开关、调节及入罐处泵门三处要操作
5	计量泵二（加前体）	同上
6	计量泵三（加消沫剂）	同上
7	加菌种按钮	点击后自动按比例增加一次菌种
8	预处理罐	容量为 12600kg。
9	转筒真空过滤器	转筒真空过滤机是一种连续操作的过滤机械，广泛应用于各种工业中。设备的主体是一个能转动的水平圆筒，其表面有一层金属网，网上覆盖滤布，筒的下部浸入滤浆中。圆筒沿径向分隔成若干扇形格，每格都有单独的孔道通至分配头上。圆筒转动时，凭藉分配头的作用使这些孔道依次分别与真空管及压缩空气管相通，因而在回转一周的过程中每个扇形格表面即可顺序进行过滤、洗涤、吸干、吹松、卸饼等项操作。
10	混合罐	容量为 17000kg。
11	分离机	在离心力作用下，将两种密度不同且不相容的溶液分离，轻相由顶部溢流而出，重相由

		底部排出。
12	脱色罐	容量为 17000kg。
13	活性炭进料按钮	点击“进料阀”按钮，打开进料阀，点击“选择进料量”按钮，输入进料量，然后点击“进料”按钮，完成进料步骤
14	结晶罐	冷却结晶罐，容量为 14000kg，有搅拌装置，使结晶颗粒保持悬浮于溶液中，并同溶液有一个相对运动，提高溶质质点的扩散速度，加速晶体长大。
15	真空抽滤机	通过抽真空，使晶体与滤液分离
16	洗涤罐	容量为 1200。
17	移出晶体按钮	点击“移出晶体”按钮，可以将晶体
18	真空干燥机	真空干燥机是一种在真空条件下操作的接触式干燥过程，与常压干燥相比，真空干燥温度低，水分可在较低的温度下气化蒸发，不需要空气作为干燥介质，减少空气与物料的接触机会，故适用于热敏性和在空气中易氧化物料的干燥。
19	输入时间系统	点击时间显示屏，弹出一个对话框，输入时间，然后点击“确定”按钮，进入倒计时状态。

第六章 操作规程

6.1 发酵工艺过程(一)

6.1.1 正常发酵（过程）

- 1.进料(基质)，开备料泵
- 2.开备料阀
- 3.备料后（罐重 100000）kg 关备料阀
- 4.关备料泵
- 5.开搅拌器
- 6.设置搅拌转速为 200 转
- 7.开通风阀
- 8.开排气阀
- 9.投加菌种
- 10.补糖，开补糖阀
- 11.补氮，开加硫铵阀
- 12.开冷却水，维持温度在 25℃
- 13.PH 值保持在一定范围内
- 14.前体超过 1kg/m^3 （扣分步骤，出现则扣分）

6.1.2 出料

- 1.停止进空气
- 2.停搅拌
- 3.关闭所有进料，开阀出料

6.1.3 发酵过程中 PH 值低

- 1.调节 PH 值
- 2.开大氨水流量
- 3.PH 值指标

6.1.4 发酵过程中 PH 值高

- 1.关闭进氨水
- 2.开大补糖阀
- 3.调节 PH 值

6.1.5 发酵过程中溶解氧低

- 1.开大进空气阀 V02
- 2.调节溶解氧大于 30%

6.1.6 残糖浓度低

- 1.开加糖阀补糖

6.1.7 发酵过程中温度高

- 1.开通冷却水进水冷却
- 2.温度指标

6.1.8 泡沫高

- 1.添加消泡剂
- 2.泡沫高度降低到 30cm

发酵工艺过程（二）

空罐灭菌

1. 微开夹套预热蒸汽阀门 VA1, 预热发酵罐。
2. 发酵罐内温度达到 85 度以上。
3. 打开加热蒸汽进汽阀 VA2。
4. 发酵罐内温度达到 120 度。
5. 打开备料阀 VD1, 对备料管道灭菌。
6. 打开氨水阀 VD2, 对氨水管道灭菌。
7. 打开前体阀 VD3, 对前体管道灭菌。
8. 打开消泡剂阀 VD4, 对消泡剂管道灭菌。
9. 打开排气阀 V09, 对排气管道进行灭菌。
10. 打开补糖阀 V01, 对补糖管道进行灭菌。
11. 打开硫氨阀 V10, 对硫氨管道进行灭菌。
12. 打开空气进气阀 V02, 对进气管道灭菌
13. 打开出料阀 V08, 对出料管道进行灭菌。
14. 达到灭菌时间 0.5h 后, 关闭 VA2。
15. 当发酵罐泄压完毕后, 关闭备料阀 VD1。
16. 关闭氨水阀 VD2。
17. 关闭前体阀 VD3。
18. 关闭消泡剂阀 VD4。
19. 关闭排气阀 V09。

20. 关闭补糖阀 V01。
- 21 关闭硫氨阀 V10。
22. 关闭空气进气阀 V02。
23. 关闭出料阀 V08。
24. 关闭预热蒸汽阀 VA1。

实罐灭菌

1. 进料(基质)，开备料泵。
2. 打开备料阀 VD1。
3. 备料后（罐重 100T）关备料阀。
4. 关闭备料泵开关。
5. 罐重达到 100 吨。
6. 打开搅拌器开关。
7. 设置搅拌转速为 200 转。
8. 打开预热蒸汽阀 VA1，预热发酵罐。
9. 发酵罐温度达到 85 度。
10. 打开加热蒸汽进汽阀 VA2，加热发酵罐。
11. 维持发酵罐温度在 121 度。
12. 灭菌时间达到 0.5 小时。
13. 打开备料阀 VD1，再次灭菌。
14. 达到灭菌时间后，关闭阀门 VA2。
15. 当发酵罐泄压完毕后，关闭备料阀。
16. 关闭预热蒸汽阀 VA1。

正常发酵

1. 发酵罐温度降到 25 度。
2. 启动空气供应消毒系统。
3. 开通风阀。
4. 投加菌种。
5. 开补糖阀 V01（发酵过程中时时补糖，保持残糖浓度为 $5\text{Kg}/\text{m}^3$ ）。
6. 开加硫铵阀 V10（发酵过程中时时补硫氨，保持硫氨浓度为 $0.25\text{Kg}/\text{m}^3$ ）。
7. 启动进料泵 2，并设定泵频率（0-100）。
8. 开前体阀（发酵过程中时时补前体，保持硫氨浓度不超过 $1\text{Kg}/\text{m}^3$ ）。

9. 启动进料泵 3，并设定泵频率（0-100）。
10. 打开阀 VD4，向发酵罐加消泡剂。
11. 发酵过程中时时补糖，保持残糖浓度为 $5\text{Kg}/\text{m}^3$ 。
12. 发酵过程中时时补硫氨，保持硫氨浓度为 $0.25\text{Kg}/\text{m}^3$ 。
13. 开冷却水，维持发酵罐温度在 25°C
14. 控制 PH 值在 6.8 左右，但不可高于 7.3 或低于 6.0。
15. 控制通风阀及排气阀开度，保持发酵罐压力为 0.07MPa 。
16. 前体浓度不应超过 $1\text{Kg}/\text{m}^3$ 。
17. 控制通气法开度，保证发酵罐中溶氧浓度不低于 30%
18. 泡沫高度不应超过 35cm。
19. 超负荷生产，满罐。
20. 青霉菌浓度达到 $40\text{kg}/\text{m}^3$ 以上。
21. 青霉素浓度达到 $50000\text{unit}/\text{m}^3$ 以上。

出料

1. 停止进空气
2. 停搅拌
3. 关闭所有进料，开阀出料

6.2 提炼工艺过程

6.2.1 预处理操作

1. 打开阀 V14，加发酵液。
2. 待加料至 5000kg 时，关闭阀 V14。
3. 打开预处理罐搅拌器
4. 打开阀 V13，加黄血盐，去除铁离子。
5. 观察铁离子浓度变化，待铁离子浓度为零时，关闭阀 V13。
6. 打开阀 V12，加磷酸盐，去除镁离子。
7. 观察镁离子浓度变化，镁离子浓度为零时，关闭阀 V12。
8. 打开阀 V11，加絮凝剂，去除蛋白质。
9. 观察蛋白质浓度变化，蛋白质浓度为零时，关闭阀 V11。
10. 打开阀 V16、V17 及泵 P5，同时打开转筒过滤器开关及后阀 V18。
11. 待发酵液经过滤排至混合罐 B101 后，关闭阀 V16、V17、泵 P5 以及转筒过

滤器开关及后阀 V18。

12.停止预处理罐搅拌器。

13.铁离子反应完全，最终浓度为零。

14.镁离子反应完全，最终浓度为零。

15.蛋白质反应完全，最终浓度为零。

16.黄血盐所加量刚好能使铁离子反应完全，但不过剩。

17.磷酸盐所加量刚好能使镁离子反应完全，但不过剩。

18.絮凝剂所加量刚好能使蛋白质反应沉淀，但不过剩。

19.超负荷生产，满罐。

6.2.2 一次 BA 萃取操作

1.打开混合罐 B101 搅拌器

2.打开阀 V19，加 BA（醋酸丁酯）质量为发酵液的 1/4~1/3 倍。

3.关闭阀 V19。

4.打开阀 V22，加稀硫酸调节 PH 值。

5.待 PH 值调节至 2.8~3.0 时，关闭阀 V22。

6.打开阀 V21，加破乳剂。

7.加破乳剂量为 100kg 时，关闭阀 V21。

8.打开阀 V23、V24 及泵 P6，向分离机注液。

9.待分离机中有液位时，迅速打开 A101 开关。

10.打开轻液阀 V25。

11.打开萃余相回收阀 V26，调节 V26 阀门开度，控制重相液位在总液位的 80% 左右，使轻相液能充分的溢流至 B102。

12.待混合罐 B101 液体排空后，关闭阀 V23、V24 及泵 P6。

13.停止混合罐 B101 搅拌器。

14.待分离机 A101 中液体排尽后，关闭阀 V26。

15.关闭分离机 A101 开关

16.关闭阀 V25

17.BA 用量为发酵液的 1/3

18.PH 值保持在 2.8-3.0

19.控制重液相位在总液位的 80%

20.超负荷生产，满罐

6.2.3 一次反萃取操作

- 1.打开混合罐 B102 搅拌器。
- 2.打开 V28,加碳酸氢钠溶液,质量为青霉素溶液的 2.5 倍,并调节 PH 值为 6.8-7.2.
- 3.待 PH 值调节至 6.8-7.2 时,关闭阀 V28。
- 4.打开阀 V29、V30 及泵 P7,向分离机 A102 注液。
- 5.待分离机 A102 中有液位时,迅速打开 A102 开关。
- 6.打开轻液阀 V31
- 7.打开萃余相回收阀 V32,调节 V32 阀门开度,控制重相液位在总液位的 80% 左右,轻相液能充分的溢流出。
- 8.待混合罐 B102 液体排空后,关闭阀 V29、V30 及泵 P7。
- 9.停止混合罐 B102 搅拌器。
- 10.待分离机中剩余少许重液时,关闭阀 V32,防止轻液流入混合罐 B103 中
- 11.关闭分离机 A102 开关
- 12.关闭轻液阀 V31
- 13.碳酸氢钠用量为青霉素溶液的 2.5 倍
- 14.PH 保持在 6.8-7.2
- 15.控制重相液位在总液位的 80%
- 16.超负荷生产,满罐

6.2.4 二次 BA 萃取操作

- 1.打开混合罐 B103 搅拌器。
- 2.打开阀 V33,加 BA (醋酸丁酯) 质量为发酵液的 1/4~1/3 倍。
- 3.关闭阀 V33。
- 4.打开阀 V35,加稀硫酸调节 PH 值。
- 5.待 PH 值调节至 2.8~3.0 时,关闭阀 V35。
- 6.打开阀 V36、V37 及泵 P8。向分离机 A103 注液
- 7.待分离机中有液位时,迅速打开 A103 开关。
- 8.打开轻液阀门 V38
- 9.打开萃余相回收阀 V39,调节 V39 阀门开度,控制重相液位在总液位的 80% 左右,使轻相液能充分的溢流至脱色罐中。
- 10.待混合罐 B103 液体排空后,关闭阀 V36、V37 及泵 P8。
- 11.停止混合罐 B103 搅拌器。

12.待分离机 A103 中液体排尽后，关闭阀 V39。

13.关闭分离机 A103 开关。

14.关闭阀 V38

15.BA 用量为发酵液的 1/3

16.PH 值保持在 2.8~3.0

17.控制重相液位在总液位的 80%

18.超负荷生产，满罐

6.2.5 脱色罐操作

1.打开活性炭进料阀。

2.选择进料量，进料 25kg

3.进料

4.关闭进料阀。

5.打开脱色罐搅拌器，并设定搅拌时间：10min

6.搅拌 10min 后，打开阀 V41、V42 及泵 P9，将青霉素溶液经过过滤器排至结晶罐。

7.待脱色罐液体排空后，关闭阀 V41、V42 及泵 P9。

8.停止脱色罐搅拌器。

9.超负荷生产，满罐

6.2.6 结晶罐及抽滤、干燥操作

1.启动结晶罐搅拌器

2.打开阀 V43，向结晶罐中加入醋酸钠-乙醇溶液。

3.观察青霉素浓度，待青霉素刚好反应完时，关闭阀 V43。

4.打开冷却水阀 V44 及 VD10，控制结晶罐温度为 5℃ 以下，并输入保持时间，保持 10min。

5.打开阀 V45、V46 及泵 P10，将结晶液排至真空抽滤机进行抽滤

6.待真空抽滤机中上层液位达到 50%左右后，迅速打开真空阀 V47，进行抽滤。

7.同时打开 V48，回收母液。

8.待结晶罐中液体排空后，关闭阀 V45、V46 及泵 P10。

9.停止结晶罐搅拌器

10.关闭冷却水阀 V44 及 VD10

11.抽滤完成后，关闭真空阀 V47。

- 12.待母液全部回收后，关闭阀 V48。
- 13.点击“移出晶体”按钮，将抽滤后的晶体移入洗涤罐。
- 14.打开阀 V49，加丁醇进行洗涤。
- 15.待丁醇加入量为 500kg 时，关闭阀 V49。
- 16.启动洗涤罐搅拌器，并设定时间为 8min。
- 17.停止洗涤罐搅拌器。并设定时间，保持 10min。
- 18.打开阀 V50，排出废洗液。
- 19.待废洗液排尽后，关闭阀 V50。
- 20.点击“移出晶体”，将洗涤后的晶体移至真空干燥机。
- 21.启动干燥机，进行干燥，并设定时间为 20min
- 22.关闭干燥机开关，停止干燥。
- 23.青霉素反应完全，最终浓度为零
- 24.控制结晶温度为 5℃
- 25.晶体重量达 140g 以上。
- 26.结晶罐超负荷生产，满罐
- 27.真空抽滤机上层液位过高
- 28.真空抽滤机下层液位过高