

黃豆蛋白水解物作為傷寒疫 苗液體培養基之研究

II. 培養基的成份與初步試用結果

林飛卿 余傳霖 鄭寶芬 林國鏞*

(上海第一醫學院)

在前篇中(鄭寶芬等, 1954)^[1]曾敘述黃豆蛋白酸水解與酶水解物的製造步驟。酸水解物的製法簡便, 分解完善, 但色氨酸受到破壞。酶水解物中雖能保全色氨酸, 但製法較繁, 且分解不完全, 能引起荷蘭豬的腺休克或過敏性休克反應。後一點在本實驗中未曾設法改正, 但是可以克服的。本篇的目的係用黃豆蛋白酸水解物加入色氨酸或含色氨酸的酶水解物作為培養傷寒桿菌陸軍 58 型菌株的基礎。在培養期中用不同方法引入空氣以促進細菌的生長。此種培養法的使用結果不僅證明在這種液體培養基中, 此菌發育良好, 而且最後的細菌濃度可高達每毫升含菌三十億以上, 較用靜止培養法超出 4.5—5.5 倍。

實驗材料

(一)培養基的基礎: 將黃豆蛋白酸水解物稀釋至含總氮量 0.27% 作為氮的來源, 並加入下列各物之一, 以補色氨酸的不足:

1. 黃豆蛋白酶水解物(總氮量 0.27%)。
2. 酪蛋白酶水解物: 係美製之口服治療劑, 商名 Amigen, 含總氮量 12%。使用前稀釋至含總氮量 0.27%。將此稀釋液注射 2 隻荷蘭豬, 以觀測有無腺休克或過敏性休克現象。結果發現甲豬在第一次注射後(心臟內), 動物立即發生痙攣與跳躍, 於 25 分鐘後始恢復, 乙豬則無反應(皮下注射)。12 日後 2 豬各接受第二次同樣製品的注射(心臟內), 結果均無反應。每次注射劑量均為 1 毫

* 地址為中國人民解放軍醫學科學院

升。以上說明此製品中尚有較大份子的氮化合物能引起腺休克，但無蛋白質。

3. 純色氨酸。

(二)最後培養基：在黃豆蛋白酸水解物中加入定量的酶水解物或色氨酸，另加入葡萄糖 0.3—0.5% 與 K_2HPO_4 0.2% 作為熱力與磷的來源，即成為最後培養基。如用酶水解物為基礎時，另加入氯化鈉 0.5%，最後 pH 為 7.4—7.6。

(三)菌種：試驗用菌種主要為傷寒桿菌陸軍 58 型菌株。此菌需要色氨酸為其生長因子，但傷寒桿菌 901 型則不然。除二株傷寒桿菌外，其他菌種僅做了初步試驗，計有副傷寒桿菌甲、乙與丙，志賀氏與甘露糖發酵赤痢桿菌。菌種係保存在肉浸液瓊脂斜面上，使用前將其移種至即將試驗的培養基中，37°C 孵育一夜應用。

(四)細菌生長濃度的檢查法：細菌經培養後與自製之 Pyrex 玻璃標準濃度管相比較。此標準管係根據傷寒桿菌陸軍 58 型菌株在顯微鏡下計數法所製，故雖可用作測定此菌株的生長濃度，但對其他菌種則僅有相對的準確性。

實驗步驟與結果

培養方法分為靜止的、振搖的與通入空氣三種，茲將培養方法與培養基試用結果分述如下。

(一)靜止培養法：於口徑均等的試管中加入試驗用培養基 5 毫升，種入 24 小時各種細菌培養物一白金耳，每菌接種 2 管，直立於試管架上，37°C 孵育一夜，次日檢查結果。

1. 黃豆蛋白酸水解物對於幾種腸道病菌的營養價值：所用培養基共 7 種，成份如下：

培 基 基 礎	批 數	色 氨 酸 補 充	葡 萄 糖	K_2HPO_4
1.*酸水解物	(三)	—	0.5%	0.2%
2.*酸水解物	(三)	色氨酸 2 毫克%	0.5%	0.2%
3.*酶水解物	(二)	—	0.5%	0.2%
4.*酶水解物	(三)	—	0.5%	0.2%
5.*酶水解物	(五)	—	0.5%	0.2%
6. 肉浸液	—	—	0.5%	0.2%
7.*酪蛋白酶水解物	—	—	0.5%	0.2%

* 酸與酶水解物的總氮量均為 0.27%。

試驗結果如表 1：

表 1 黃豆蛋白水解物對幾種細菌的營養價值

菌種	1	2	3	4	5	6	7
傷寒桿菌陸軍 58 型	0	600	600—700	500	650	550	600
傷寒桿菌 901 型	500—600	600	600—700	700	500	600	700
副傷寒桿菌甲	1,100(5.1)	—	1,050	1,200(6.4)	500(5.1)	500(5.4)	1,200(6.4)
副傷寒桿菌乙	1,400(5.8)	—	1,200	1,700(6.4)	1,200(5.8)	900(5.4)	1,700(6.5)
副傷寒桿菌丙	1,050	—	1,050	1,200	600	650	1,600
甘露糖酸酵赤痢桿菌	1,300	—	1,100	1,600	700	650	1,600
志賀氏赤痢桿菌	500	—	500	1,600	600	600	1,600

註：菌的數量以百萬為單位

0 = 無生長 — = 未做

() 表示最後之 pH 價值

由上表中可看出：

(1) 傷寒桿菌陸軍 58 型菌株之生長需要色氨酸為其生長因子。黃豆蛋白水解物中無此氨基酸，故此菌未生長。如在酸解物中加入純色氨酸 0.002%，則細菌的生長濃度與酶水解物相同。

(2) 傷寒桿菌 901 型與其餘菌種均能自營色氨酸，在酸水解物中發育良好，不亞於含有色氨酸的培養基。

(3) 黃豆蛋白水解物中細菌的生長較酪蛋白水解物中為差，但並不亞於常用的肉浸液。

2. 不同濃度色氨酸對於傷寒桿菌陸軍 58 型菌株生長的影響：色氨酸對於此菌株的生長為不可缺少的因子。然而究竟培養基中須含有若干色氨酸，細菌方能發育茂盛？試驗方法係在黃豆蛋白酸水解物中加入不同量色氨酸或酶水解物，以資測定促進細菌生長至最高濃度所需的色氨酸量。所用培養基共 5 種如下。各種酸或酶水解物的氮總量均經調節至 0.27%。

培養基基礎(批數)	色氨酸補充	葡萄糖	K ₂ HPO ₄
1. 黃豆蛋白酸水解物(三)	0.05—2 毫克%	0.5%	0.2%
2. 同 上	黃豆蛋白酶水解物 加入量 $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{10}$	0.5%	0.2%
3. 同 上	酪蛋白酶水解物加 入量 $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{10}$	0.5%	0.2%
4. 酪蛋白酶水解物	—	0.5%	0.2%
5. 肉浸液	—	0.5%	0.2%

表 2 黃豆蛋白酸水解物(三)加入不同量色氨酸
對於傷寒桿菌陸軍 58 型菌株生長的影響

色氨酸, 毫克%	2	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1	0.05	0	肉浸液	酪蛋白 水解物
生長濃度(百萬)	700	700	700	700	650	500	400	300	±	500	800
最後 pH	—	5.5	5.2	5.5	5.5	5.32	5.8	6.5	7.15	5.1	61

根據 Burrows 氏 (1939)^[2] 研究色氨酸對於促進傷寒桿菌生長的結果, 發現某些菌株需要色氨酸為其生長因子, 某些菌株則不需要。前者在生長開始需要此氨基酸為生長刺激素, 其最低濃度為 0.05—0.1 毫克%。小於此劑量時, 細菌的潛伏期延長。但一旦開始發育, 生長率與最後濃度並不受色氨酸的影響, 故較大量的生長因子並不能促進細菌的正常發育。表 2 中色氨酸之最適量為 0.6%, 較小的劑量因潛伏期加長, 經同一培養時期後, 生長濃度相應的減低。

純色氨酸的價值頗昂, 但因需量甚微, 故可用酶水解物代替之。以黃豆蛋白酸水解物為基礎, 加入不同量的黃豆或酪蛋白酶水解物, 最後容量仍為 5 毫升, 總氮量 0.27%, 所得結果如表 3。

表 3 黃豆蛋白酸水解物(三)加入不同量酶水解物對
於傷寒桿菌陸軍 58 型菌株生長的影響

黃豆蛋白酶水解物: 黃豆蛋白酸水解物	1:100	1:50	1:40	1:30	1:20	1:10	黃豆蛋白 水解物
生長濃度(百萬計)	500	750	800	800	800	800	800
色氨酸含量 毫克%(計算)	0.20	0.40	0.51	0.68	1.01	2.03	20.25
酪蛋白酶水解物: 黃豆蛋白酸水解物		1:50	1:40	1:30	1:20	1:10	酪蛋白酶 水解物
生長濃度(百萬計)		750	800	800	800	800	850
色氨酸含量 毫克%(計算)		0.47	0.59	0.71	1.18	2.36	23.63

色氨酸的含量係按黃豆蛋白中含此氨基酸 1.2%, 酪蛋白中含 1.4% (Anson and Edsall, 1945)^[3] 計算出來。以每百克蛋白含蛋白氮 16%, 和我們所用的蛋白水解物培基稀釋至含總氮量 0.27%, 即可求得二者所含色氨酸量如下:

$$\begin{aligned} \text{黃豆蛋白酶水解物的色氨酸含量: } & 0.27\% \times \frac{100}{16} \times 1.2\% = 0.02025\% \\ & = 20.25 \text{ 毫克\%} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{酪蛋白酶水解物的色氨酸含量: } & 0.27\% \times \frac{100}{16} \times 1.4\% = 0.02363\% \\ & = 23.63 \text{ 毫克\%} \end{aligned}$$

然後從稀釋度中求出答案。由上表中, $1/40$ 稀釋黃豆蛋白酶水解物 (含色氨酸

酸 0.51 毫克%)， $1/40$ 稀釋酪蛋白酶水解物 (含色氨酸 0.59 毫克%) 為最適濃度。在以後試驗中大多使用了 $1/40$ — $1/20$ 酶水解物濃度為色氨酸的來源。

3. 影響細菌最後生長濃度的主要因素：為了給促進細菌的最後生長濃度創造條件，應先測定在試管培養法中限制細菌生長的主要原因。首先我們觀察培養基的總氮量濃度對於細菌生長的影響。我們將酸解物稀釋至不同濃度，使含總氮量為 0.15%，0.19%，0.23%，0.27%，4.0% 與 5.4%，然後加入黃豆或酪蛋白酶水解物 (總氮量 0.27%) $1/40$ ，以補色氨酸的不足。經試驗後，發現增加總氮量至 0.23% 以上，不再增加細菌生長的最後濃度。但如將其減低至含總氮量 0.19% 以下，細菌生長的最後濃度有明顯的減低，但不與總氮量的減低成正比例，足見培養基中總氮量不是限制細菌生長的主要因素。

如將孵育時間延長至 48 小時，不但細菌的濃度不增，而且在若干例中反而有減少現象。此時將其接種至瓊脂平板上，菌落生長稀少，有時竟沒有生長。由此點與表 1 及表 2 中最後 pH 降低的情況看來，可知限制細菌繼續發育的主要因素是培養基中缺乏空氣使有機酸發生積累，因而限制了細菌的生長。以下擬試用引入空氣法來克服這一障礙。

(二) 振盪培養法：一般需氧或兼性需氧菌的最佳繁殖均需大量空氣。充份的空氣能使碳水化合物氧化趨於完全，阻止 pH 下降和促使細菌的繼續發育。在初步試驗中我們發現淺培養中細菌的生長較在試管中為佳。但在淺培養中空氣進入培養基很慢，穿透力亦極有限，遠不能應付細菌生長的需要。因此，僅在培養基表面的細菌能繼續生長至較長時期，然不久即因培養基中 pH 之降低而停止繁殖，故必須設法由外面通入空氣。

引入空氣法有二種，即振盪法與通入空氣法。前者係用淺培養法，並在培養時期不斷加以振盪，使空氣與培養基充份混合。後者則用抽氣機與吹氣頭將空氣引入培養基內。此法適用於深培養法，故較為實用。

1. 振盪培養法與靜止培養法對於細菌生長影響的比較：振盪培養法之操作法如下：將培養基分裝至 125 毫升容量的依氏燒瓶中，每瓶 20 毫升，消毒後接種 24 小時之傷寒桿菌陸軍 58 型菌株，培養物為一白金耳， 37°C 溫箱中孵育數小時，俟有確定之生長後，即移到振盪器中振盪之。振盪器的擺動速率為每分鐘 140 次，擺動寬度為 3 市寸。機中裝有調節機以保護機器勿使太熱，因此振盪是間歇的。振盪與間歇時間相比約為 1:2。整個振盪機係放置在溫室內使用。

如果在接種後立即振盪，不僅無此需要而反有害，結果細菌不能發育或竟被殺死。如初期時培養時期太久，由於碳水化合物的分解而使 pH 降低太多，則部分細菌已開始死亡而影響實驗的結果。為了便於控制時間，我們不先加入葡萄糖而改在振盪開始時方加入。由接種到振盪開始時為一夜，振盪時間為 5—6 小時。另一瓶不振盪以為對照用。所用培养基共四種，各種水解物的總氮量為 0.27%。

培养基基礎	色氨酸補充	葡萄糖	K ₂ HPO ₄
1. 黃豆蛋白酶解物	黃豆蛋白酶解物 1/20 容積	0.3%	0.2%
2. 黃豆蛋白酶解物	—	0.3%	0.2%
3. 黃豆蛋白酶解物	酪蛋白酶解物 1/20 容積	0.3%	0.2%
4. 酪蛋白酶解物	—	0.3%	0.2%

試驗結果見表 4：

表 4 振盪與靜止培養法對於傷寒桿菌陸軍 58 型菌株生長的影響

培养基 培養法	1		2		3		4	
	振盪法	靜止法	振盪法	靜止法	振盪法	靜止法	振盪法	靜止法
細菌生長 最後濃度 (百萬為單位)	2100(7.4)	1200(6.1)	4500(7.8)	—	2700(7.2)	—	4000(8.0)	1000(5.5)
	1800	900	4200(>8.4)	—	2700(7.5)	—	6600(>8.4)	750(5.8)
	2100(7.6)	1200(6.6)	3600	1200	2100(7.2)	—	5700	—
	—	—	3600(>8.4)	1500(6.8)	2400(7.5)	—	4500(>8.4)	1200(6.8)
	—	—	—	—	2100(7.9)	1050	5100(8.2)	1500(6.0)
	—	—	—	—	2250	1200	4500(8.4)	1500(6.5)
	—	—	—	—	3000(8.4)	1350(6.6)	—	—
	—	—	—	—	2250(7.6)	1350(6.2)	—	—
細菌生長 平均數	2000	1,100	4000	1350	2400	1250	5100	1200
超出試管 法倍數*	3.3×	1.8×	6.8	2.2×	4×	2×	8.5×	2×

* 試管法以 6 億細菌/毫升計。

由表 4 得結論如下：

(1) 振盪培養法比靜止培養法的細菌生長濃度超過 2—4 倍。在前者中，培養基的最後 pH 在 7.0 以上。生長愈佳，pH 值亦愈高。在後者中，pH 值在 7.0 以下。

(2) 與表 1 及表 2 相比較，淺培養法較試管培養法（深培養法）的生長為旺盛。前者的 pH 在 6.0 以上，後者在 6.0 以下。由以上二點可見阻止培養基 pH 的下降為促進細菌繼續發育的一重要因素。

(3) 在振盪培養法中，細菌的生長不再受 pH 降低所限制，因之培養營養價值的差別比較明顯。例如，酶水解物培養基較酸水解物為佳。與試管法相比較，經振盪後酶水解物培养基中的最後生長約 8—9 倍於試管法，而酸水解物培养基加入酶水解物的結果僅超過 3—4 倍。酶水解物的優點尚可從表 5 中發現。

表 5 黃豆蛋白酸水解物加不同量酪蛋白酶水解物對於傷寒桿菌陸軍 58 型菌株生長的影響(振盪法)

黃豆蛋白酸水解物 + 酪蛋白酶水解物	1/40 容量	1/30 容量	1/10 容量
細菌生長濃度(百萬)	1,350	2,700	3,600
最後 pH	6.2	7.2	7.9
超過試管法倍數	2.2×	3.5×	4.7×

2. 不同量色氨酸在振盪培養法中對於細菌生長的影響：表 4 與表 5 中所顯示純酶水解物培养基之優於酸水解物加入少量酶水解物，是否與色氨酸的含量有關？在用試管培養法中我們發現色氨酸的最適限量為 0.6 毫克%。在振盪法中由於細菌的生長旺盛，所需的色氨酸是否因之需要增加？由表 6 中可知在振盪培養法中，最適量的色氨酸仍為 0.6 毫克%，此時細菌之生長濃度為 5.1×10^9 ，故與酶水解物中的結果相等。

表 6 黃豆蛋白酸水解物(十三)加入不同量色氨酸對於振盪培養法中傷寒桿菌陸軍 58 型菌株生長的影響(生長濃度以百萬為單位)

色氨酸 毫克%	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
最後生長濃度	1,560	2,100	2,700	3,300	3,900	5,100	5,100	4,500	5,100
最後 pH	—	—	—	7.2	7.3	7.6	7.6	7.3	7.6
*超過試管法倍數	4×	4×	—	5×	—	7.5×	—	6.5×	—

*與表 2 比較

本試驗中可見當色氨酸含量為 0.6 毫克%時(最適量)，細菌的生長濃度為 51 億，而當色氨酸含量為 0.3 毫克%時，細菌的生長濃度僅為 27 億。與表 5 相比，後者相當於黃豆蛋白酸水解物加入 1/20 酪蛋白酶水解物中之生長。用計算法求之，1/20 酪蛋白酶水解物中應含色氨酸 $1/20 \times 23.63 = 1.18$ 毫克%，亦即四倍於 0.3 的數字。換言之，在酶水解物中可能僅約 1/4 色氨酸係在游離狀況下存在，其餘 3/4 則尚未從蛋白中解放出來，後者在細菌迅速發育中不能立即應用，而須經分離後方可。但在靜止培養中因有其他因素限制了細菌的繼續發育，故此因素得不顯露。

3. 不同濃度葡萄糖對於細菌生長的影響：少量葡萄糖能促進細菌的生長，但如用量過大反而有害，原因是葡萄糖的濃度愈高則分解愈速，產酸亦愈多。在這種狀況下，即使在振盪培養法中亦不易將其產物全部氧化，因而不易保持酸鹼度在 7.0 以上。此點可由表 7 中看出。

表 7 培養基中不同量葡萄糖對於傷寒桿菌陸軍 58 型菌株生長的影響

基礎培養基	葡萄糖	細菌生長濃度*與最後 pH		葡萄糖	細菌生長濃度*與最後 pH	
	%			%		
黃豆蛋白酸解物(三) + 色氨酸 2 毫克%, + K_2HPO_4 0.2%	0.3	5100	7.3	0.3	5700	8.0
	0.45	5100	6.8	0.375	5700	7.6
	0.6	4000	5.3	0.45	3900	6.6
	0.75	4500	<5.2	0.525	3900	5.4
	0.9	4500	<5.2	0.6	3300	<5.2
	1.05	3900	<5.2	0.675	3000	<5.2
	1.2	3900	<5.2	0.75	3000	<5.2

* 以百萬為單位

由表 7 中可見在本試驗之情況下，最適量的葡萄糖含量為 0.3—0.4%。

(三) 通入空氣法：此法係用壓氣或抽氣法將外界空氣經一細孔吹氣頭引入培養基中。空氣進入時有大量氣沫出現，必須設法阻止以免溢出。Gerhardt 與 Gee 二氏 (1946)^[4] 在研究冢布氏桿菌的培養時，發現用粗孔吹氣頭時，可用純豬油作為抗泡沫劑。但如用細孔吹氣時，純豬油有毒性作用，而必須同時加入枸橼三丁烷(tributyl citrate)。吹入氣泡愈細則細菌之發育愈佳。如用玻璃粉濾器(sintered glass filter) 第六號，與每分鐘用負壓法引入二倍培養基容量的空氣時，則對細菌的生長能創造最有效的條件。

本實驗室中曾試用了數種自製之吹氣頭，而最後選擇了沙濾器用的沙棒。所用沙棒長 3 吋，粗 1 吋。使用時將其倒掛在培養基的深處，用抽氣法使培養基表面產生負壓，此時空氣即由沙棒中引入培養基內。

所用盛器為 1,400 毫升容量的廣口瓶，內置培養基 1,000 毫升。因所需培養基較多，故將培養基的總氮量減半 (0.13%)。接種前，將傷寒桿菌陸軍 58 型菌株，先通過同樣培養基。接種量為百分之一的培養基容量。在 37°C 溫箱中孵育一夜，次日加入葡萄糖至 0.3%，無菌豬油 1 毫升，換去棉塞，裝上橡皮塞與吹氣裝置，開始引入空氣。經初期孵育後方加入葡萄糖，然後開始吹氣，其意義與振盪培養法中同。同時尚做振盪培養法與淺瓶靜止培養法比較。所得結果如表 8。

表 8 通入空氣法對於傷寒桿菌陸軍 58 型菌株生長的影響

試驗	培養基的成份	色氨酸含量, 毫克%	培養方法	培養時間	細菌的生長濃度(百萬計)	最後 pH	超過試管培養法生長倍數*
1	黃豆蛋白酸水解物(十三)(含總氮量0.13%) + 色氨酸 2 毫克%, + 葡萄糖 0.3%	2 (加入量)	通入空氣	6	3,300	7.2	5.5×
			振盪法	6	1,800	7.3	3×
			淺瓶靜止法	6	1,200	5.7	2×
2	黃豆蛋白酸水解物(七) (總氮量0.13%)+20% 黃豆蛋白酶水解物(七) (總氮量0.13%)+葡 萄糖 0.3% 同上, 僅酶水解物 為 15% 為 10% 為 5%	2 (計算量)	通入空氣	7	2,700	7.2	4.5×
			振盪法	7	1,800	8.1	3×
			振盪法	7	1,350	8.1	2×
			振盪法	7	1,050	7.8	1.6×
			振盪法	7	810	7.3	1.2×
	黃豆蛋白酶水解物 (總氮量0.13%)+葡 萄糖 0.3%	10.1 (計算量)	振盪法	7	1,800	7.0	3×
3	黃豆蛋白酸水解物 (五)(總氮量0.13%) + 酪蛋白酶水解物 20%(總氮量0.13%) + 葡萄糖 0.3% 酪蛋白酶水解物(總 氮量 0.13%) + 葡 萄糖 0.3%	2.36 (計算量)	通入空氣法	6	3,000	7.1	5×
			振盪法	6	2,100	7.4	3.5×
			淺瓶靜止法	6	1,200	—	2×
			通入空氣法	5	2,400	6.8	4×
			通入空氣法	10	4,500	—	7.5×

* 過去試驗中所用的培養基濃度較本試驗中高一倍。

本試驗僅為初步觀測，對於吹氣頭的選擇，引入空氣量的測定，抗泡沫劑的種類等均未深入研究與控制，由此所得結果與應得之結果距離很遠。但就表 8 中的數字仍可得出下列二點：

1. 通入空氣法比振盪法的結果好。在前者中細菌的生長濃度為試管法之 4.5—5.5 倍，後者為 3—3.5 倍。(注意此二種方法中之所用培養基的總氮量僅為試管法的半數)。

2. 在振盪法中酶水解物中所含的色氨酸超過 2 毫克%時(計算法)，生長不再增加，少於此量時，則生長有顯著減少。前已指出在酶水解物中僅約 1/4 量色氨酸為游離狀態，亦即當其含量為 2 毫克%時，實際上僅相當於純色氨酸 0.5—

0.6 毫克%的效價（見表 2 與 6）。

討 論

用半綜合培養基製造細菌液體疫苗有二大優點：（1）手續簡便、材料節省、適於大規模製造用。（2）細菌的全部抗元毫無損失。最近 Staub 與 Combo 二氏（1953）^[5]在測定傷寒桿菌的“0”抗元含量時，發現由細菌生長的液體或用作洗滌細菌的鹽水中尚可獲得 6—7% 菌體抗元（“0”抗元）。在固體培養基中此項抗元很可能部分被瓊脂所吸收而遭損失。惜以我科目前缺乏條件滴定培養物的保護作用，以致關於這一很有意義的事實無法證實。

培養方法以通入空氣法為最佳。因用此法時，細菌不像在振盪法中之震動過劇易趨疲竭而死亡，同時此法是一種深培養法可節省盛器和操作手續，適於大規模製造之用。欲獲得最佳結果，必須研究空氣之進入量、氣泡大小、抗氣泡劑的種類、培養基濃度、與最適培養時間等。例如 Garhardt 與 Gee 二氏（1946）^[4]在用吹氣法培養豕布氏桿菌時所得之細菌生長最後濃度比用靜止培養法高 100 倍（ $5 \times 10^8 \rightarrow 6 \times 10^{10}$ ），而培養時間則由 50—70 小時縮減至 24 小時。本試驗的結果僅較試管法高 5 倍，足見尚有大大提高的可能性。雖然如此，本試驗中之最後細菌濃度已經超出單價疫苗，甚至多價疫苗的標準濃度。

結 論

（一）在黃豆蛋白酸水解物培养基中（含總氮量 0.27%），傷寒桿菌 901 型、副傷寒桿菌與赤痢桿菌均能發育良好，但因酸水解物中不含色氨酸，故傷寒桿菌陸軍 58 型菌株不能生長，而黃豆蛋白酶水解物中之色氨酸未被破壞，故此菌能在其中生長。

（二）在普通情況下，由於空氣之不易補充，細菌的生長很快受到限制。但如用振盪法或通入空氣法，細菌生長的最後濃度超出試管培養法數倍，其中以通入空氣法之結果為更佳。用後一種培養法，在黃豆蛋白酸水解物培养基中加入少許酶水解物或色氨酸以補此生長因子之不足，最後細菌濃度可達每毫升含菌三十億個或以上。

（三）酪蛋白酶水解物對於傷寒桿菌的營養價值較黃豆蛋白酶水解物為佳。在用通入空氣培養法，在前者中細菌的生長濃度高達每毫升含菌四十五億個。

(四) 酶水解物的色氨酸不如同量的純色氨酸為有效的原因，可能與游離色氨酸的含量有關。

參 考 文 獻

- [1] 鄭寶芬、林國鎬、余傳霖、林飛卿，微生物學報，2 (1) 5—12, 1954.
- [2] Burrows, W., *J. Inf. Dis.* **64**:145-156, 1939.
- [3] Anson M. L. and Edsall, John F. "Advances in Protein Chemistry", vol. 2, 1945.
- [4] Gerhardt, P. and Gee, L. L., *J. Bact.*, **52**:261-269, 1946.
- [5] Staub, A. M. and Combes, R., *Bull. Hyg.*, **28**:466, 1953.

SOYBEAN PROTEIN HYDROLYSATE AS LIQUID CULTURE MEDIUM FOR TYPHOID VACCINE PRODUCTION

II. PREPARATION OF CULTURE MEDIUM AND RESULTS OF PRELIMINARY TRIAL USE

LIN F. C., YUI C. L., CHENG P. C. and LIN K. H.

Shanghai First Medical College, Shanghai.

The medium employed consisted of acid hydrolysate of soybean protein, with the addition of enzymatic hydrolysate of soybean protein or casein or of tryptophane as source of this amino acid. The organism used throughout is *B. typhosus*, army 58, which requires tryptophane as its essential growth factor. Three culture methods employed includes; (1) test tube method, (2) shake method and (3) bubbling method. The superiority of various methods employed were compared in terms of final density of bacterial growth.

In the test tube method, the growth in various media were about equal, and compared favorably with the standard meat-infusion-peptone medium. The limiting factor here is the lowering of pH values incident to the exhaustion of air in the medium.

The two aerated methods, shaking and bubbling, increased final growth greatly by continuous supply of air. In both the test tube and aerated methods, the optimal amount of tryptophane added is 0.6 mg. %, but amount of enzyme digest added to the acid digest has to be increased from 1:40—1:20 parts in case of test tube method, to 1:5 in case of aerated method in order to obtain maximal growth, presumably due to existance of tryptophane in the digest medium both in free and combined state, the latter being unavailable to rapidly growing bacteria. The final growth in aerated media reached 3 billion organisms/ml. or over as compared with 0.6 billions organisms/ml. in test tube method. When casein hydrolysate is used instead of soybean protein enzymatic hydrolysate as source of tryptophane the result was definitely better, the final bacterial growth attained a concentration of 4.5 billion/ml.

The possibility of obtaining much better growth by employing optimal concentration of digest, time of incubation, rate of introducing air, choice of suitable anti-foaming substances, etc. was pointed out.