

# 大腸菌變種 44110-1 用於 蛋氨酸微生物測定法的研究\*

高俊德 高澤岩

(北京市第二地方工業局化驗室)

蛋氨酸是人體必需氨基酸之一，同時它又可用作某些肝臟疾患的治療藥物。其分析方法有化學分析法和微生物測定法兩種。藥用的化學純品可用化學分析法；但食品或身體及其代謝物中蛋氨酸測定時因提純手續很麻煩，所以常常採用微生物測定法。目前蛋氨酸微生物測定法中已被採用的菌種是乳酸菌，如 *Lactobacillus fermenti*<sup>[1-2]</sup>、*Leuconostoc mesenteroides*<sup>[3]</sup>、*Strep. faecalis*<sup>[4]</sup> 及 *Lactobacillus arabinosus*<sup>[5]</sup> 等。

在這些乳酸菌法中，往往需要特別處理的腺或多種氨基酸組成的複雜的氮源，及許多種維生素；除此之外，還需要核蛋白水解物中之腺嘌呤、鳥嘌呤及尿嘧啶等。這些藥品自己作起來很費事，想買也不易湊齊。為了避免和除掉這些缺點，我們應用對蛋氨酸相當敏感的 44110-1 號大腸菌變種<sup>[4]</sup> 進行了蛋氨酸測定的研究。

## 實 驗

### (一) 菌種及實驗方法

菌種 大腸菌變種 44110-1。

實驗方法 比濁法<sup>[6]</sup>。

### (二) 菌種培養基

葡萄糖	2 克	磷酸鎂	0.1 克
蛋白胨	2 克	維生素 B <sub>12</sub>	15 微克
磷酸氫二鉀	7 克	瓊脂	25 克
磷酸二氫鉀	3 克	蒸餾水	1000 毫升
硫酸銨	1 克	pH 6.8	
檸檬酸鈉	0.5 克		

### (三) 測定(定量)用基礎培養基<sup>[6]</sup>

磷酸氫二鉀	14 克	硫酸鎂	0.2 克
磷酸二氫鉀	6 克	蒸餾水	1000 毫升
檸檬酸鈉	1 克	pH 6.8	
硫酸銨	2 克	另單配 2% 葡萄糖溶液滅菌備用	

滅菌條件 培養基 120°C 20 分鐘滅菌  
葡萄糖溶液 110°C 15 分鐘滅菌

### (四) 定量用大腸菌細胞混懸液的製備

1957 年 8 月 13 日收到。

\* 本文曾在中國藥學會北京分會 1957 年論文報告會上宣讀。

於試驗前一天用上記(二)項菌種培養基斜面,接種大腸菌,放入 37°C 保溫箱中培養 16—18 小時後,先取滅菌的沉澱管盛 10 毫升的滅菌生理食鹽水,將已發育好的菌細胞刮取二、三白金耳混懸於其中,再用離心機(4000 轉/每分)使菌細胞沉澱,將上澄液傾出,反復洗滌 3 次後,再將菌細胞混懸於滅菌生理食鹽水中,其混懸程度按透光率計應為 90% 以上透光的稀薄的菌細胞懸液。

#### (五)蛋氨酸標準液的配製

精秤蛋氨酸結晶 (Walker's DL-methionine, Synthetic) 26.3 毫克加蒸餾水 263 毫升,作成 1000 微克/毫升的蛋氨酸標準液備用。

#### (六)標準曲線作法

取滅菌試管 (18 × 180 毫米規格一致) 18 支,管上註明 10、20、30、40、50、60、70、80 微克/管及空白等記號各 2 支,在無菌操作箱中於每管中各注加上記基礎培養基 5 毫升及 2% 葡萄糖溶液 1 毫升,各管再分別加入管上所記濃度的蛋氨酸標準液一定量,然後各管添加滅菌蒸餾水使各管中全量成 10 毫升,最後每管中滴入大腸菌懸液一滴,用多層滅菌紗布蓋好管口,放在 37°C 保溫箱中培養 15 小時左右,取出用光電比色計(用 510 m $\mu$  濾光板)測各管中大腸菌發育的混濁程度(以同條件培養的空白對照管為 100% 透光,與其他各管比較),其結果見表 1 及圖 1。

表 1 大腸菌變種發育(濁度)與蛋氨酸含量的關係

蛋氨酸含量微克/管	0	10	20	30	40	50	60	70	80
大腸菌發育(濁度)透光率%	100	82.6	67.4	48.6	38.4	34.4	26.8	21.2	21.2

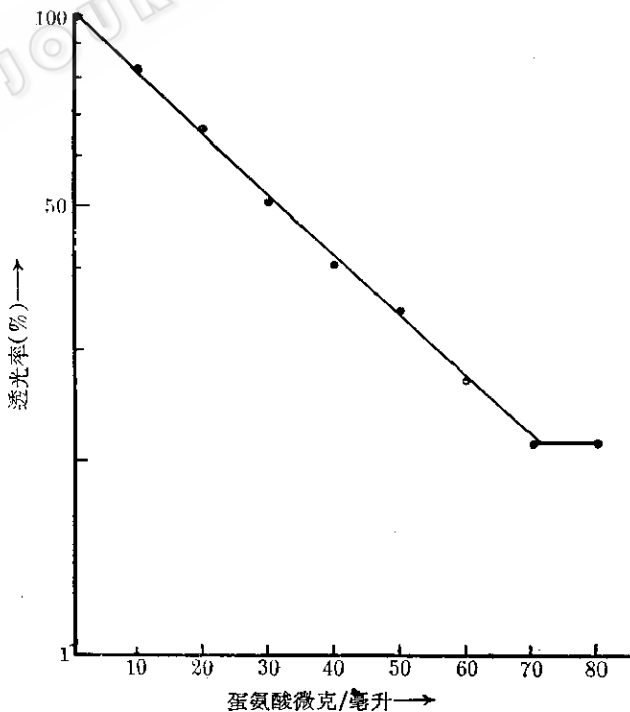


圖 1 大腸菌變種的發育與蛋氨酸含量間的曲線關係

## (七)樣品測定試驗

樣品：北京市製藥廠試製肝精注射液(牛肝臟提取液)批號京生字 1076 號

(1) 樣品中干擾物質(即維生素 B<sub>12</sub>) 的除去

本實驗所用的大腸菌變種 44110-1 號菌種作者<sup>[4]</sup>已證明不僅對蛋氨酸相當敏感,同時對維生素 B<sub>12</sub> 也相當敏感,所以想利用該菌作蛋氨酸測定時應先將維生素 B<sub>12</sub> 除去,才可準確的測定蛋氨酸。樣品中維生素 B<sub>12</sub> 的破壞方法<sup>[5]</sup>,取樣品 5 毫升加等量的 0.2 N NaOH,煮沸 30 分種,用 1 N HCl 調 pH 6.8 供試。

## (2) 樣品的測定

將(1)項已處理好的樣品稀釋為 250 倍和 125 倍兩種濃度,按製標準曲線的方法及相同條件,取其各 1 毫升加入各組的兩個試管中,接種,培養後,比其大腸菌變種發育後的混濁程度,以此測得的透光率,在同條件下作出的標準曲線上換算該樣品 1 毫升中所含蛋氨酸的量,測得結果見表 2。

表 2 同一樣品稀釋不同倍數後所測得的蛋氨酸含量

樣品稀釋倍數	大腸菌發育透光率(%)	蛋氨酸含量(微克/管)
125 ×	50.0	30.05
250 ×	72.4	15.00

由表 2 將樣品不同稀釋倍數所測得含量都換算成 250 倍,則兩種濃度所測得含量為 15.025 及 15.00,二者再平均時則為 15.01,以此平均值乘原稀釋倍數則得原樣品中蛋氨酸含量為  $15.01 \times 250 = 3753$  微克/毫升。

按一般微生物測定法常規,同一樣品稀釋不同倍數測得結果與各倍數測得數據平均值不超過 5% 時,這結果即可信任。由本試驗表 2 結果看來,單一濃度測得結果與平均濃度測得結果僅相差 1%,故可認為這個結果是可信任的。

## (八)回收試驗

在上記樣品各 1 毫升中分別加入標準蛋氨酸 20 微克及 10 微克,按上記方法試驗,測得結果見表 3。

表 3 樣品中摻入一定量標準蛋氨酸時測得總含量及其回收率(%)

標準品(微克)	添加樣品數量	透光率(%)	蛋氨酸含量微克	收 回 率
20	125 × / 毫升	32.0	50.05	100%
20	250 × / 毫升	45.0	36.00	103%

從表 3 結果看來,回收率不超過 ± 3%。

## 結 論

由以上實驗結果看來,大腸菌變種 44110-1 號菌可作蛋氨酸微生物測定法之用,其可測定範圍是 0~70 微克/毫升。

## 參 考 文 獻

- [ 1 ] Baumgarten, W. et al.: *Cereal Chem.*, **23**: 135, 1946.  
[ 2 ] Sanberlich, H. E.: *J. Biol. Chem.*, **166**: 417, 1946.  
[ 3 ] Riesen, W. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **165**: 327, 1946.  
[ 4 ] 高俊德等: 藥學學報, **4**: 209, 1956.  
[ 5 ] Букки, В. Н.: *Биохимия*, **19**: 712, 1954.  
[ 6 ] 焦瑞身、W. H. Peterson: *Appl. Microb.*, **1**: 42, 1953.

## MICROBIOLOGICAL ASSAY OF METHIONINE USING A MUTANT STRAIN OF *E. COLI* 44110-1

KAO CHUN-TÊ and KAO TSÊ-YEN

(The Second Municipal Bureau of Industry, Peking, China)

This experiment has proved that by means of the turbidimetric method, *E. Coli* 44110-1 could be used for the determination of methionine. Its limit of sensitivity was 0~70 r/ml.

In comparison with the turbidimetric method employing lactobacillus for determining methionine reported previously, this method was rather simpler. The composition of the culture medium did not require many kinds of amino acids and vitamins, neither did it require hydrolyzed nucleic acid, such as; Adenine sulfate, Guanine HCl, Uracil, etc. In this method, the medium used was: (in g per liter)  $K_2HPO_4$ , 7.0;  $KH_2PO_4$ , 3.0; Na-citrate· $3H_2O$ , 0.53;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1;  $(NH_4)_2SO_4$ , 1.0; Glucose 2.0; with pH adjusted to 6.8.

The only disadvantage of this method was that this organism was sensitive to methionine, as well as to vitamine  $B_{12}$ . For a satisfactory result, the sample must be tested beforehand if it contained vitamine  $B_{12}$ . If vitamine  $B_{12}$  were present, it must be removed by the treatment of KOH before the determination of methionine, and then a satisfactory result might be obtained.