

黃豆蛋白水解物作為傷寒疫苗液體培養基之研究

I. 水解物的製造與過敏性試驗

鄭寶芬 林國鏞* 余傳霖 林飛柳

(上海第一醫學院)

目前國內所用的細菌疫苗(傷寒、霍亂等),一般均用固體培養基製造,如肉浸液瓊脂培養基(卡介苗除外)。使用固體培養基的原因有三:(一)常用的液體培養基,如肉浸液,因其中含有大份子蛋白,故不適於直接注射,否則將引起過敏性反應。(二)在固體培養基上,細菌與空氣的接觸面積甚大,故生長較在液體培養基中為茂盛。一般而言,除厭氧菌外,大多數細菌的大量繁殖均需充分的空氣,而在普通之培養情況下,細菌在開始時發育正常,但不久隨培養基中空氣的消耗,生長率即迅速降低,並趨於死亡。(三)在固體培養基上,部分有害的代謝產物可藉瓊脂的吸收作用而除去。相反,在液體培養基中,細菌的生長則因有害代謝產物的堆聚,往往在早期中受到限制。然而,固體培養基也有兩個缺點:(一)使用盛器甚多,因而大大地增加了工作的負擔和污染的機會。(二)部分細菌的可溶性抗元被吸收到瓊脂中而遭到損失。魏錫華與 Singer 氏(1948)^[1]將霍亂弧菌接種在半固體培養基中,經24小時孵育後,發現培養基中有一種類似外毒素的抗元,其病理作用則與內毒素相同,能使動物腸壁之表面細胞脫落。以此抗元所製之免疫血清能阻止內毒素的中毒作用。Sokhey 氏(1950)^[2]報告用液體培養基所製成的霍亂疫苗對小白鼠的保護力,可超過用固體培養基製成者的6—9倍。

一種理想的製造疫苗用的培養基須兼有液體與固體培養基的優點,而無二者的缺點。這種培養法已在若干國家內由於應用半綜合培養基而獲得成功。一般係採

* 地址為中國人民解放軍醫學科學院

用酪蛋白酸或酶水解物為氮的來源，並加入熱力的來源、生長因子與無機鹽類。酪蛋白水解物中的氮化物主要為各種氨基酸和多肽而無蛋白質。氨基酸和多肽在注射後不引起過敏性反應，而且對細菌的營養價值也較蛋白質為高，故能促進細菌的生長與保證最高之生長濃度。此種半綜合培養基適用於製造各種細菌疫苗，如霍亂^[2]、百日咳 (Cohn 及 Wheeler 氏, 1946)^[3]、鼠疫疫苗 (Sokhey, Babbn 及 Bharucha 氏, 1950)^[4] 等。在已發表的文獻中，一般均採用淺培養法，故仍需大量的玻器，而且生長濃度亦未能提至最高峯。資本主義國家的私人企業使用大型的盛器，通入各種氣體以供給所需氣體與促進細菌的氧化作用，而保證細菌的繼續繁殖至最高濃度。雖然有關這方面的文獻發表很少，但這種新的製造方法已受到普遍的重視，並且在繼續發展之中，這是無可懷疑的趨勢。

除酪蛋白外，黃豆蛋白亦含有豐富的氨基酸。黃豆蛋白約佔黃豆重量之 36—40%。其中所含氨基酸的種類和含量與酪蛋白相差不多 (表 1)，故具有酪蛋白之各種應用，然而二者間的價格則甚懸殊。在我國目前條件下，牛乳的產量尚不充

表 1 酪蛋白與黃豆蛋白之氨基酸含量
(以每 100 克蛋白含蛋白氮 16 克計)

氨基酸	酪蛋白含量(克) (Casein)	黃豆蛋白含量(克) (Soybean meal)
精氨酸 (arginine)	4.2	5.8
異白氨酸 (isoleucine)	6.5	4.7
組氨酸 (histidine)	2.5	2.3
離氨酸 (lysine)	7.9	5.4
酪氨酸 (tyrosine)	6.9	4.1
色氨酸 (tryptophane)	1.4	1.2
苯丙氨酸 (phenylalanine)	5.2	5.7
胱氨酸 (cystine)	0.3	0.9
甲硫氨酸 (methionine)	3.5	2.0
蘇氨酸 (threonine)	4.1	4.0
白氨酸 (leucine)	9.9	6.6
缬氨酸 (valine)	6.7	4.2
甘氨酸 (glycine)	0.6	17.4
丙氨酸 (alanine)	2.8	8.8
絲氨酸 (serine)	7.5	—
麥氨酸 (glutamic acid)	24.2	21.0
門冬氨酸 (aspartic acid)	6.3	—
羥脯氨酸 (hydroxyproline)	0	—
脯氨酸 (proline)	8.0	—

— : 未定

(摘自 "Advances in protein chemistry", vol. 2. M. L. Anson and John. F; Edsall)

裕，如果黃豆蛋白適用於此項目的時，頗有提倡與推廣的價值。

蛋白質的水解方法分為酸水解法與酶水解法兩種。酸水解法很簡易，且分解完全，因之不會引起過敏性反應。但缺點是其中的色氨酸受到了破壞。某些傷寒菌株，如陸軍 58 型 (Army 58) 之生長，需要色氨酸為其生長要素，故不能在酸水解物中繁殖，而需有外來色氨酸的補充。酶水解法的過程較繁，需時亦久，且消化亦不完全。然而其中色氨酸不被破壞，故可供傷寒桿菌陸軍 58 型之生長。但用此法所得之製品尚含有少量之蛋白質，必須用其他方法將其除去，以防止過敏性反應之發生。這點在本實驗中尚未做到，有待日後之繼續研究。

除培養基的營養料外，細菌的良好發育尚需要充分之空氣。據 Rahn 與 Richardson 氏 (1941, 1942)^[5,6] 之報告，在普通培養情況下，細菌在最初期內發育正常，但當其進入對數期 2—4 小時以後，培養基中的空氣已經用盡，故細菌的發育僅在培養基的表層進行，而在培養基的深層細菌生長則極慢，甚至漸趨死亡。因此，雖經長期的孵育，仍不能達到最大的生長濃度。如果在培養基中引入大量空氣，則能保持細菌生長之對數期至較長時間。因之在很短的孵育時間細菌的生長率可達最高峯。Gerhardt 及 Gee 氏 (1946)^[7] 根據此一原則，在培養豕布氏桿菌時用振盪法與通入空氣法以引入大量空氣，發現此菌發育所需的時數可由 50—70 小時縮短至 24 小時，最後之生長濃度則由每毫升 5×10^8 菌數增至 6×10^{10} 菌數。

試驗材料與方法

培養基的製備：本研究中之培養基係用黃豆蛋白酸水解物為基礎，加入黃豆蛋白或酪蛋白酶水解物以補足色氨酸的不足。黃豆蛋白水解物係在本實驗室中製備，其方法如下：

(一)黃豆蛋白之分離：將黃豆浸於蒸餾水中一夜。次日取出用石磨子磨成薄糊，以絨布二層過濾，棄去粗渣。在濾液中加 10% 純鹽酸，調節酸鹼度至 pH 4.2 (黃豆蛋白之等電點) 使黃豆蛋白沉澱，然後用濾紙過濾，棄去濾液，所得沉澱物即為黃豆蛋白。此蛋白之純度為 90—91.2% (以含氮 16% 計算)。

(二)黃豆蛋白之酸水解法：硫酸與鹽酸均可作為黃豆蛋白之水解劑。但前者於水解完成後不易除去，而後者則無此困難。本試驗係用鹽酸水解法，並儘量減少鹽酸之用量，使最後產物中鹽酸量較少。雖不用真空蒸餾以除去過量之氯游子亦無防礙。在一般設備較差之實驗室中亦可進行。

酸水解法之步驟：將黃豆蛋白在 80°C 烘箱中烘乾。每 120 克乾燥之黃豆蛋白加純鹽酸（比重 1.19）77 毫升。置於 500 毫升容量之開氏燒瓶中迴流約 14 小時（頭上裝一大試管作為冷凝器）。此時酸性混合物呈深棕色，然後加入蒸餾水 100 毫升，在蒸發皿中蒸發至呈薄糊狀。如此重複三次可除去大部分鹽酸。後用 10% 氫氧化鈉校正 pH 二次；第一次校正到 pH 3 左右，第二次到 pH 7.5 左右。每次校正後用活性炭脫色一次。經二次脫色後，最後之製品即成淡黃色透明液體。

（三）黃豆蛋白之酶水解法：黃豆蛋白中含有抗胰蛋白酶素（trypsin inhibitor）能阻止胰蛋白酶的酶水解作用，故必須設法除去之（Borchers, Ackerson 及 Sandstedt 氏，1947）^[8]。

酶水解法之步驟：加容量 10 倍之 0.05 N 鹽酸於黃豆蛋白中，拌攪後放在冰箱中一夜浸出之。此時混合液的 pH 為 4.2，與黃豆蛋白之等電點相同。因此黃豆蛋白的損失很少，而大部分的抗胰蛋白酶素則可浸出。次日用離心機將蛋白沉澱，用蒸餾水洗滌之。然後即可進行酶水解法。此蛋白含水量為 81%。

取已除去抗胰蛋白酶素之黃豆蛋白 1,000 克加 2 倍蒸餾水，煮沸 10 分鐘，用飽和碳酸鈉校正 pH 至 8.3。然後加入已磨碎的新鮮豬胰子 60 克與防腐劑（甲苯與氯仿各 10 毫升）。放在 38°C 溫箱中消化 10 天。每天振搖數次。10 日後再加豬胰子 60 克和防腐劑若干，繼續消化至氮氮量不再增加為止（共需時約一月）。消化完畢後，將酶水解物用氫氧化鋁處理之，以除去不完全水解之蛋白質與雜質。所得濾液呈透明淡黃色。

結 果

（一）黃豆蛋白酸水解物

共製就酸水解物 13 批，各批經稀釋後用開氏微量測氮法（micro kjeldahl method）測定其總氮量；用 Sørensen 氏氨基酸甲醛滴定法（Sørensen formal titration）測定其氮氮量；與用 Volhard 氏定氮法測定其氮游子量。結果如表 2：

各批中總氮量的相差，是由於稀釋程度的關係。蛋白水解的程度在 60.2%—65.4% 之間。

由表 2 看出， $\frac{\text{總氮量}}{\text{氯化鈉}}$ 之比例為 1:3.95—1:4.66。在實際應用中，總氮量須校正至 0.27%。如果氯化鈉的濃度為 0.9%（等壓溶液），則 $\frac{\text{總氮量}}{\text{氯化鈉}} = \frac{0.27}{0.9} = \frac{1}{3.33}$ ，故較表 2 中所列者為低。然相差並不太大。如用真空蒸餾法去氮，氮基量

表 2 黃豆蛋白酸水解物之總氮量、氨氮量與氯化鈉量

黃豆蛋白酸水解物之批數	總 氮 量 毫克/毫升	氨 氮 量 毫克/毫升	氨氮量 總氮量 %	總氮量 氯化鈉
酸 水 解 物 (一)	7.80	5.10	65.4	1 : 4.60
酸 水 解 物 (三)	8.14	4.90	60.2	1 : 4.66
酸 水 解 物 (四)	5.15	3.13	60.7	1 : 3.95
酸 水 解 物 (六)	8.68	5.65	65.1	1 : 4.58

沒有顯著的分解，而氯化鈉的含量也減低不多，如表 3：

表 3 用真空蒸餾法去氨游子後之酸水解物中氨氮量與總氮量之比

黃豆蛋白酸水解物之批數	氨氮量 總氮量 %	總氮量 氯化鈉 %
酸 水 解 物 (十)	59	1 : 3.6
酸 水 解 物 (十一)	57	1 : 3.5
酸 水 解 物 (十二)	60	1 : 3.3

由表 4 中可看出：消化時間的長短（8—26 小時），對於酸水解物的程度並無若何影響。

表 4 消化時間對於酸水解程度的影響

黃豆蛋白酸水解物之批數	消化時間(小時)	氨氮量 總氮量 %
酸 水 解 物 (五)	8	55
酸 水 解 物 (十一)	12	57
酸 水 解 物 (十二)	14	60
酸 水 解 物 (七)	20	55
酸 水 解 物 (八)	26	56

(二)黃豆蛋白酶水解物

共製酶水解物 10 批，以同法測定其總氮量與氨氮量，結果如表 5：

表 5 黃豆蛋白酶水解物之總氮量與氨氮量

黃豆蛋白酶水解物之批數	總 氮 量 毫克/毫升	氨 氮 量 毫克/毫升	氨氮量 總氮量 %
酶 水 解 物 (一)	1.66	1.26	75.9
酶 水 解 物 (二)	4.12	2.46	59.7
酶 水 解 物 (三)	4.73	3.04	64.3
酶 水 解 物 (十)	5.24	3.16	60.3

(三) 黃豆蛋白水解物之腺休克 (peptone shock) 與過敏性試驗

將黃豆蛋白酸水解物與酶水解物加水稀釋至每毫升中含總氮量 0.27% (培養基所用濃度), 校正 pH 至 7.6, 高壓蒸氣滅菌 15 磅 20 分鐘。然後將每批製品注射荷蘭豬兩隻。荷蘭豬甲注射 1.0 毫升製品於心臟內, 觀察 20 分鐘, 以視其是否有腺休克現象。荷蘭豬乙注射 1.0 毫升製品於皮下。三星期後再注射同樣製品於甲乙荷蘭豬之心臟內, 觀察 20 分鐘, 視其有無過敏性反應之症狀。所得結果如表 6:

表 6 黃豆蛋白水解物的腺休克與過敏性試驗

黃豆蛋白水解物 之種類與批數	第 1 次 注 射		第 2 次 注 射	
	荷蘭豬甲 (心臟) (腺休克試驗)	荷蘭豬乙 (皮下)	荷蘭豬甲 (心臟)	荷蘭豬乙 (心臟) (過敏性試驗)
酸水解物 (一)	—	—	—	—
酸水解物 (二)	—	—	—	—
酸水解物 (三)	—	—	—	—
酸水解物 (四)	—	—	—	—
酶水解物 (一)	—	—	—	—
酶水解物 (二)	—	—	顫抖與氣喘	休克後死亡
酶水解物 (三)	—	—	輕度顫抖	輕度顫抖
酶水解物 (五)	跳躍, 擦擊 後恢復	—	顯著氣喘約 10 分鐘	輕度氣喘約 1—2 分鐘

由表 6 可知, 酸水解法的消化很完全, 不含有蛋白質, 故未引起過敏性休克; 而酶水解法因消化不完全, 故仍有此種反應。其中 1 隻荷蘭豬在第二次心臟內注射後 (酶水解物第 2 批) 死亡, 足見其中尚含有未經水解之蛋白質。

討 論

黃豆蛋白之酸水解物和酶水解物各有其優缺點, 前者操作簡易、迅速、消化時間短, 且水解比較完全, 沒有大分子之蛋白質或腺存在, 故用荷蘭豬作腺休克及過敏性試驗均為陰性 (表 6)。但缺點是對某些菌株必需的營養品, 如色氨酸被破壞。同時用鹽酸作水解劑時, 氯游子之含量亦高。酶水解物則無色氨酸的被破壞與含大量氯游子的缺點, 可是製備時間頗長, 且有腺休克或過敏性反應發生的可能 (表 6)。除了酶水解物第一批外, 其餘各批在第二次注射後均發生反應。因此, 我們為了改良酸水解物的不足, 建議加少量酶水解物作為色氨酸的來源, 並在用鹽酸作為水解劑時, 儘量減少鹽酸之用量 (以黃豆蛋白 120 克加比重 1.19 之

鹽酸 77 毫升為最適宜)。消化完畢後，僅蒸發 3 次即可除去大部分之氯游子，以使 $\frac{\text{總氮量}}{\text{氯化鈉}}$ 之比值接近於 1:3.33。由表 2 中可見，四批酸水解物之比值為 1:3.95—1:4.60，略高於 1:3.33。即含總氮量為 0.27% 的酸水解物，氯化鈉的含量為 0.96—1.25%，和等滲壓溶液相差不遠，還不致妨礙細菌之生長。如用真空蒸餾法除去氯游子(表 3)時， $\frac{\text{總氮量}}{\text{氯化鈉}}$ 之比值為 1:3.3—1:3.6，雖比蒸發法以除去氯游子較好，但較為浪費，在設備差的實驗室中甚為不便。此外，酸水解物的 $\frac{\text{氮總量}}{\text{總氮量}}$ 不及酶水解物高，且增加消化時間，亦不能增加 $\frac{\text{氮總量}}{\text{總氮量}}$ 之數值(表 4)。酶水解物雖有腺休克和過敏性反應的缺點，如用色層分離法(NacHod, Frederick C. 1949)^[9]來精製酶水解物則可免除腺休克反應，這點尚待以後繼續之研究。

結 論

(一)黃豆蛋白含有豐富之氨基酸，將其水解後在理論上可代替酪蛋白水解物作為細菌液體疫苗之培養基。

(二)本篇中敘述了黃豆蛋白酸水解物與酶水解物之製造法。酸水解法的步驟比較簡易，分解完全，對荷蘭豬的腺休克和過敏性試驗均屬陰性。其缺點是色氨酸遭到破壞，所以不適於某些細菌，如傷寒桿菌陸軍 58 型菌株的生長。

(三)黃豆蛋白酶水解法的步驟較繁，分解程度不易完全，能引起荷蘭豬的腺休克或過敏性反應。但其中所含之氨基酸不受破壞，因之傷寒桿菌陸軍 58 型菌株可在其中生長。

參 考 文 獻

- [1] Singer, E., Wei, S. H. & Hao, S. H. *J. Immunol.* **59**. 341, 1948.
- [2] Sokhey, S. S., *Bull. World Health Org.* **3**. 33. & 43, 1950.
- [3] Cohn, S. M. & Wheeler, M. W. *Amer. J. Pub. Health.* **36**. 371, 1946.
- [4] Sokhey, S. S., Babhn, M. K. & Bharucha, K. H. *Bull. World Health Org.* **3**. 25, 1950.
- [5] Rahn, O. Richardson, G. L. *J. Bact.* **41**. 225-249, 1941.
- [6] Rahn, O. & Richardson, G. L. *J. Bact.* **44**. 321-332, 1942.
- [7] Gerhardt, P. & Gee L. L. *J. Bact.* **52**. 261-269, 1946.
- [8] Borchers, R., Ackerson, C. W. & Sandstedt, R. M. *Arch. Biochem.* **12**. 367-574, 1947.
- [9] NacHod, Frederick C. "Ion Exchange", 279, 1949.

SOYBEAN PROTEIN HYDROLYSATE AS LIQUID CULTURE MEDIUM FOR TYPHOID VACCINE PRODUCTION

I. PREPARATION OF ACID AND ENZYMATIC HYDROLYSATE OF SOYBEAN PROTEIN AND TEST FOR HYPERSENSITIVE- NESS INDUCING CAPACITY ON GUINEA-PIG

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

Shanghai First Medical College, Shanghai

Liquid culture medium has gained popularity over solid culture medium in bacterial vaccine production for the following reasons; (1) it is more economical in cost as well as time and labor saving, and (2) there is no loss of antigenic substances incurring to solid medium due to absorption into agar. The requirement for such a medium is that it should be free from substances capable of inducing hypersensitivity besides being able to support good growth. Casein hydrolysate is being widely employed for such a purpose.

Being just as rich in amino-acids contents as casein, but much cheaper in cost, soybean protein hydrolysate was deemed a suitable substitute. This paper describes the preparation of acid and enzymatic hydrolysis of soybean protein. Acid hydrolysis is simple to perform, the process of digestion is complete, but the tryptophane fraction, essential for the growth of *B. typhosus*, army 58, is destroyed. The enzymatic digest preserves tryptophane, but it is more time-taking to prepare, and the digestion is less complete, the final products often being capable of inducing hypersensitiveness in guinea-pig.

For practical purpose, it is suggested that acid hydrolysate is employed as the base of medium, with the addition of enzymatic hydrolysate or preferably of tryptophane prepared from tryptic digest by organic cation exchange method as source of this amino acid.