

乙種維他命分解菌之分離法

細菌學科主任 廖道雄 教授

(一)乙種維他命分解菌發現之歷史

1941年Green氏在明尼蘇達州之Chastek養雞場所發生之激烈急性疾患Chastek paralysis, 因見其症狀與人類的急性出血腦灰白質炎(Wernicke hemorrhagic polioencephalitis)相似而證明是Vitamin B₁缺乏所引起。繼由Woolley, Sealock等證明其本體係對熱不安定之vit. B₁不活化分子。且發現存在於淡水魚之內臟尤其是在脾臟、消化管、鰓等之「酵素」而命名為「Chastek paralysis factor」並報告為「Thiaminase」。一九四四年Krampeitz, Woolley等繼續證明Vitamin B₁破壞後生成物是4-Methyl-5-hydroxy ethyl-thiazole與2-Methyl-4-Amino-5-hydroxy methyl pyrimidine。

在同一時期,一方面在日本,藤田等在測定所有的日本食品中Vitamin B₁之含有量時,在貝類上,特別是在蛤,蜆中,發現不但無法檢出Vitamin B₁而且測驗時所加之Vitamin B₁亦消失,根據這個事實追究,辨明使Vitamin B₁不活化之因子係酵素,並命名為「Aneurinase」。

後來接着西山等報告細菌類,特別是腸內細菌或葡萄球菌,枯草菌, Aerobacter等也有Aneurinase之存在。後又查明這些細菌類不是Aneurinase而是由於Phosphorinase後來雖繼有Sealock, White, Yudkin, Jacobsohn, Jatarskaya等之研究。但尚未發現細菌會產生Aneurinase。

一九四七年張壽海(台灣台中市人)首先在特定之人的糞便中發現含有分解Vitamin B₁之因子,且證明這因子乃是Aneurinase並命名為「糞便Aneurinase」詳細研究至今仍在發展中。從張博士之研究為發端後。三澤從糞便中分離一種好氣性有芽胞性桿菌會產生Aneurinase當時我們從京都嵐山附近之畑土分離出一株如本菌的細菌然而又辨明該菌與三澤所分離之菌為同一菌,且查明本菌學名為Bacillus thiaminolyticus並在日本學士院發表。

但在我們正研究這些好氣性有芽胞菌之際又發現了與Bacillus thiaminolyticus完全不同之細菌,並加以分離,我們將此假稱為「新Aneurinase菌」專心研究此新細菌之結果證明該菌在細菌學

上及酵素學上完全相異。乃遵從Buchanan, St. John Brooks, Breed的International Bacteriological Code of Nomenclature命名此新細菌為Bacillus aneurinolyticus Kimura et, Aoyama。因此將以前的Aneurinase菌定名為Bacillus thiaminolyticus Matsukawa et. Misawa, 更因兩者所產生之Vitamin B₁分解酵素在本質上亦相違之故,另將Bacillus thiaminolyticus所產生之鹽基置換又應酵素命名為An I或Thiaminase I, Bacillus aneurinolyticus所產生之加水分解酵素命名為An II或Thiaminase II以示區別。

這兩種Aneurinase菌雖均為好氣性有芽胞桿菌,但我們於一九五二年又發見了一種能產生強力Aneurinase完全相異之新的異種嫌氣性有芽胞菌而加以分離,本菌具有高度嫌氣性,形成芽胞,分解蛋白質產生大量的瓦斯與難聞的惡臭,而無Katalase之作用為其特色。本菌屬於Clostridium,因查明為完全新種的菌,故在日本Vitamin B綜合研究委員會上正式命名為Clostridium thiaminolyticum kimura et Liao。

至目前Vitamin B₁分解細菌已有好氣性的B. thiaminolyticus B. aneurinolyticus及嫌氣性的Clostridium Thiaminolyticum等三種被發現。最近張博士報告謂從二八名本省人中分出九株,從一五名巴基斯坦人中分出一株Aneurinase菌發現此數株具有異於從前之Bacillus thiaminolyticus之性質。認為新種,惟我們以為此乃尚待檢討之問題。

(二)Aneurinase菌之分離方法：

Aneurinase菌之分離除了細菌學的一般知識外尚須Vitamin B₁定量之化學知識和酵素學的知識,同時需要上述諸項之精鍊技術。不過其分離原理若簡單來說則三種Aneurinase都為形成芽胞之菌,而其芽胞對於加熱及消毒藥品具有強度抵抗性,為了芽胞形菌之分離常予加熱操作(80°C 20分, 100°C 5分間等)然而Vegetative form僅有與一般非芽胞形或菌同程度之耐熱性,故必須於充分形成芽胞之後施行加熱操作。以後即遵從一般細菌分離方法:劃線培養於手板寒天或者根據菌之性質分離於血

液寒天, Chocolate Agar, Zeisler 加葡萄糖寒天等。將各 Colony 分離出來, 培養於血液體培地 (例如 Broth VF, bouillon 等) 檢查其上清中是否有 VitB₁ 分解能, 來確認 Aneurinase 菌之存在, 照上述反覆操作以純化 Aneurinase 菌。

現在已被發現分離的 Aneurinase 菌 (M.M.) Aneurinase 菌 (K.A.) 等在「分類學上」均屬於細菌中 (Class Schizomycetes) 之芽胞形成菌 (Family Bacillaceae), Bacillaceae 係由二個 Genus 合成, 一個是 Genus Bacillus (好氣性菌) 另一個是 Genus Clostridium (嫌氣性菌) An 菌 (M.M.) 和 An 菌 (K.A.) 俱屬於 Bacillus 且係好氣性菌, An 菌 (K.L.) 是屬於 Clostridium 之嫌氣性菌。關於好氣性菌, 嫌氣性菌之分離培養分別記載如下:

a) 關於 *Bacillus thiaminolyticus* Matsukawa et. missawa 和 *Bacillus aneurinolyticus* kimura et. Aoyama 之分離法:

兩種菌都在 Bouillon (Nutrient broth) 及普通寒天 (Nutrient agar) 等普通培養基上都很容易增殖。

被檢材料盡量用無菌的方法採取後置於滅菌皿 (Petridish) 等之內, 裝有滅菌 Bouillon (PH-7.0~7.5) 之試驗管斜靠左手掌以右手摺綿栓夾於左手指間, 先在試驗管口用火焰滅菌一次, 再以右手取白金耳以火焰烘燒至赤熱滅菌之, 冷卻後, 用白金耳取小量材料 (如糞便則約為 0.5g) 注意不觸及管壁而投入 Bouillon 中, 充分混合以作材料之內等浮液。倘若材料是糞便置於 80°C 溫水中加熱 20 分鐘, 可使非芽胞菌, 被滅菌以便以後之操作較為簡單, 繼之以 37°C 之孵卵器培養上 3~4 日間, 則 Bouillon 將溷濁或者形成相當可觀之菌膜。

由以上之操作而僅使芽胞形成菌增殖。接着用滅菌吸管採取上術培養液約 3 CC, 剩餘的培養液妥為儲藏之。將採取 3 CC 培養液注入遠心管內, 以一分 3000 迴轉遠心器開 30 分則細菌及其他沉澱物將沉澱於 Spitz glass 下面得證明之上清液, 再以潔淨之明管採取上述上清液 1 CC 移入清潔之中試管內, 利用此上清液檢查是否含有 VitB₁ 分解作用。上記之上清液用 HCl (IN) 補正 PH 至 7 附近加上新調整 56γ/c.c. VitB₁ 液 1 CC, 再加磷酸緩衝液補正 PH 使其一定。此場合中使 An 菌 (MM) 產生之 An I 之至適 PH 是 5.5 使 An 菌 (KA) 產生之 An II 之至適 PH 是 8.0, 利用此觀念以修正 PH 培養液 1 CC VitB₁ 57α, 磷酸緩衝液裝入

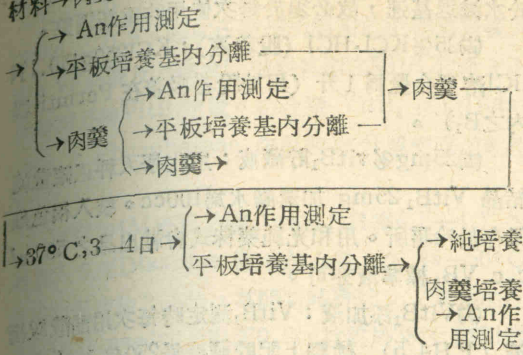
中試驗管置於 40-50°C 之恒溫槽裡使其反應 1-2 小時。因 An 菌 M.M. 所產生之 An II 之作用至適溫度是 30°C, An 菌所產生 An II 之作用至適溫度 60°C 之故, 假使確知各個欲分離之目的菌, 使用其作用至適溫度較好。接着用 HCl (IN) 修正 PH 為 4-4.5, 以 Bromcyan 氧化的 thiochrome 法測定中試管內之 VitB₁ 是否被分解, 此 VitB₁ 之測定法後包括詳細記載於後面。但若 VitB₁ 被分解不能證明其存在之時則表示有 An 之存在。當然為要判定是 An 酵素必須確認為非 VitB₁ phosphorylase, 認其係非耐熱性並不透過動物膜等。可能的話由 Aniline, Cystin, Homosulfamin 等調查能否促 An 作用, 來決定 An I 抑或 An II, 上述實驗之對照是分別使用 86°C 20 分加熱後消失 An 作用之上清液及來培養過的 Broth 盛於同樣試管內同樣操作來確定 VitB₁ 不被分解。

從上述實驗已確知含有 An 作用, 再進行下一步的分離操作, 即將前記所保存的培養液展開在普通寒天平板上盡量將各種不同的菌集落細心鈎移入 Broth 經 3-4 天之培養反覆將這些第二代之菌培養液上清液施以如前述之操作以確認有無 An 作用。An 菌純培養已奏完成, 在此情形下, 倘若鈎的菌集落每個都無法確認出 An 作用時即再度由初代培養液展開在平板寒天或者用血液平板寒天設法分離 An 菌或者再一次用初代培養液增菌以後, 進行以下之分離操作。

在平板上展開非但需要相當的技術操作, 欲將各種不同的菌集落, 展開培養使用孤立之狀態須注意平板寒天之硬度及其乾燥狀同時必須熟練於平板培地之塗抹方法, 在一般情形下好氣性球菌俱有易擴散之性質因此使平板培養基充乾燥是特別難的事。平板培地之塗抹方法雖有種種方法, 但在裡所用的方法是先充分燒灼白金身冷卻後取一白金耳之培養液, 從平板面之邊緣開始塗抹而塗抹之處要不斷抹動白金耳, 使材料充分稀釋, 漸漸達到全面。是故在充分稀釋之處, 由一個菌產生一菌集落, 再由菌集落移植, 就能純培養。塗抹時白金耳用火焰滅菌置於在桌上, 平板培地則加蓋子, 蓋子朝着下方, 在 39°C 之孵卵器培養在 24 及 72 小時, 觀察其菌集落之生長。

以上之操作, An 菌之純粹分離告成後, 進一步調查細菌學的一般性質即形態, 染色, 運動性及繁殖。特別是生物學的性質等。好氣性菌分離方法如下表。

材料→肉羹→80°C, 20分→37°C, 3-4日培養



b) *Clostridium thiaminolyticus* Kimura et Liao之分離法

因本菌係嫌氣性菌，分離方法和前二者不同，但分離原理完全相同。本菌在普通肉羹普通寒天不能生長，在液體培地則用加肝片肝臟肉羹，VF肉羹，在固體培地則用Zeissler葡萄糖血液寒天，肝臟寒天平板，寒天高層培養基，葡萄糖寒天平板等分別做嫌氣性培養。我們使用VF肉羹和高層寒天培地獲得良好成績，就將我們之方法記載在下面：

首先，取檢體（在這個時候大多為糞便）約1g投入10cc VF肉羹，充分混合加熱80°C 20分間殺死芽胞以外之菌。放入嫌氣鐘，吸引嫌氣鐘內之空氣使其接近真空狀態之後由發生氫氣之裝置，導入嫌氣鐘，再一次吸引鐘內之空氣，然後再一次導入氫，反覆3-4次，即鐘內之氧大部份消失而充滿氫入這個培養基之嫌氣鐘內，在37°C之孵卵器培養3-4日間，培養後由嫌氣鐘內提VF肉羹培養液，取出其一部份和前述好氣之部門所記載同樣之方法，調查有無VitB₁分解作用，要牢記此時An菌(KL)所產生之AnI作用至適PH是7.5溫度是30°C下來操作。假使有An作用之存在，將前記肉羹培養液一白金印與事先溶解而在50°C左右保存之普通寒天高層培養基，充分混合，使其凝固，附上棉栓，放入孵卵器培養24至48小時。普通寒天高層培養基從表面起1-2cm深度之層大多數不能看見菌集落之發生，但是愈深愈可認出小小的菌集落之產生，An菌(KL)因發生氣體導至寒天之龜裂，試驗管之外側用碘酒或其他方法充分消毒後在無菌箱中小心破開，十分小心地釣起已生之菌集落，移植於VF肉羹培養基（用前必煮沸逐出空氣，冷卻），將此VF肉羹培養基和上述同樣放入嫌氣鐘，依H₂置換法施行嫌氣性培養，反覆進行以上之操作以純粹培養。如果在高層寒天培養基內混合菌液生成菌集落之時混合菌液之菌過多，則難於釣

到孤立之菌集落，所以有時候須看情形製造菌之浮游液來混合。

以上總括如下：

糞便1g→VF肉羹 10cc→80°C 20分→嫌氣鐘氫氣置換→37°C, 3-4日間嫌氣性培養→An作用測定（關係陽性的）→普通高層寒天培養基中分離→VF肉羹→嫌氣培養→An作用測定→純培養。

c) Vitamin B₁定量法

在此只說明有關測定An作用所必要的程序（詳細請參考專門書）VB₁之測定依吾人等之經驗向以美國Hennessy所發表用ion換法作的Permtit吸着為最好。依此法可將被試體中之夾雜物去除殆盡，尤在糞便，Nutrient broth, ViF肉羹等之試料中常夾含有降低氧化時應產生之Thiochrom量或阻害Thiochrom之螢光發生的物質。因此在氧化的過程以前，必須盡量將此等夾雜物除掉為要。Permtit之吸脫着乃為此目的而用，則以Ion交接法將B₁給Permtit吸着，然後將不吸着部分一舉而全部除掉的方法。將VitB₁氧化變成Thiochrom後，測定其在紫外線所發的螢光乃是現行VitB₁，定量法中無論在感度，精度及適用範圍均為最優秀的方法，尤以使用BrCN作氧化反應時，被試體中多少含有還原物質亦不受影響，因其適應條件的範圍較寬可適用於各種被試體且精確亦相當高，吾人過去常使用此方法。用上記方法所產生之Thiochrom的螢光測定是使用螢光光度計（吾人所用者為日本島津萬能螢光光度計）

1 裝運，器具及試藥

(一)置換塔 附有活栓可調節流速（圖1）。R部之內徑為2cm，長10cm，S部之內徑為0.7cm，長15cm，T部之內徑為0.03cm，長3cm。將置換塔之活栓關閉，塔內充滿了水後，放一小扎玻璃綿球，用玻璃棒將玻璃綿球塞入S部，緊壓於基底G處。以防將放進塔內之Permtit之流出。繼而將精製Permtit（精製Permtit之製造法記於後面）大約1.5gm放進塔內，然後打開活栓將塔內之水放出，其後再用3%醋酸水10cc通過此塔。繼續用蒸溜水20cc以1分鐘1cc之流速（約3秒1滴）通過。經過此手續後即可放進被試體讓Permtit吸着。一但使用過而與被試體結合之Permtit經脫着如用大約150cc之溫水沖洗，仍然可照樣使用幾次。但如結合之VitB₁太多，或結合含有多量盲螢光之被試體時最好使用一次就換新為佳。

(二)秤量圓筒

容積25cc用於接脫離液

㉑共栓遠心沈澱管

容積50cc

㉒微量滴下管

容積2cc用於裝添加B₁液

㉓褐色試驗管

有刻度數，為以Butanol

自遠心沈澱管取出移至螢

光光度計キュベツト之用

。

㉔螢光光度計

島津萬能螢光度計是由定電

壓裝置，變壓器，螢光計本體及照電流計等組合而成。除用於比螢光之外尚可用於比色，比濁測定等。VitB₁之定量是要用水銀燈當做光源，尚且須濾光鏡。第一個濾光鏡要用紫外線透過Filter (UV.D)。キュベツト室兩側要插入F.T.101及硫酸銅濾光鏡各二張作為第二個濾光鏡。

㉕Permitt VitB₁ 定量用的Permitt要用60—100メツシュ大的。使用時需經下面的方法精製之。

①取約200gm之Permitt於三角燒瓶中再加入800cc之蒸餾水攪拌15分鐘，靜置沈澱後將上層傾斜倒掉，如此將Permitt沖洗數次。

②然後同時用3%醋酸液800cc沖洗兩次。

③再用25%KCl液600cc在恒溫槽中攪拌，做15分鐘之沸騰浴，而沖洗一次。

④再做與②同樣之過程，但不必加溫。

⑤再做與①同樣之過程，惟需要經充分的沖洗繼而將比Permitt沖開於鍍珐瑯盆中用90°C的溫度，乾燥一夜然後保存於試藥瓶中以備應用。

㉖0.1 N 硫酸

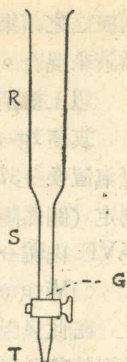
㉗4M 醋酸鈉，以544g之醋酸鈉溶於蒸餾水中成為1000cc，0.1N H₂SO₄ 15分加入本液一分，即可得PH約4.5。

㉘醋酸緩衝液 (PH約4.5)，醋酸鈉13.6g，冰醋酸6cc 混合後加蒸餾水成為1000cc。

㉙3% 醋酸水。

㉚25% KCl液，以最純KCl250g溶於蒸餾水使成為1升供Permitt沖洗用。

㉛Takadiastase (保存在除濕器內) 長時間水解時用2%，短時間水解之時用5%，以醋酸緩液溶解之，完全溶解後加入酸性白土0.2—0.4g充分振盪，使含在Diastase本身之VitB₁被白土吸着之後施行1分3000迴轉，15分遠心沈澱然後使用其上清液。Takadiastase以外之市販Diastase中



現在尚無適當之貨。Diastase之酵素力因一

於水減退甚速，故必須於每次使用時重新調製。
㉜25% KCl-HCl (脫着液)：KCl250g以1N HCl溶解全量為1升 (用於脫着吸着在 Permitt 內之B₁)。

㉝25mg% vitB₁貯藏液：用化學天秤正確量純結晶 VitB₁ 25mg 加蒸餾水為100cc。裝入棕色瓶保存於冷暗所。用和光純藥株式會社出品之200c.c. VB₁標準液亦可。

㉞VitB₁添加液：VitB₁測定時每次用醃緩液 (PH4.5) 稀釋上記貯藏液為250倍1c.c.作為添加液使用之。

㉟BrCN液：欲調製BrCN液，須先準備冰冷飽和Brom水與冰冷10% KCN液 (或10% KCN液)

①冰冷飽和 Brom 水：500cc裝之共試藥瓶內裝入蒸餾水200—300c.c. 用駒込 Pipett滴下之Br₂加入後經1分間之振盪，之後使其冷，下層必須保留殘存過剩之Br₂。

②冰冷10% KCN 液：用最純 KCN 晶調製10%液冰冷之。當使用時以50—100cc 裝白色瓶口共栓試藥瓶內，緩慢傾倒Br₂飽和水約2cc，再用駒込Pipett滴下KCN液混合之，使Br₂水赤色完全消失。傾倒飽和Br₂水之時須注意不可混入下層之Brom，如此製成的BrCN液加蓋就可明一天。Br₂ KCN, BrCN等因均有毒故須保存有適當排氣設備之處。皮膚，結膜若是觸及BrCN等液即時用水洗淨。

㊱30% NaOH：要用最純結晶調製，放置約3日後用上清液就好。

㊲n Butanol：市販品必須經再溜將盲光消除後始能使用，再溜時使用Widme之精溜就能簡單地消除盲光。蒸餾裝置全部用組合共栓 (スリアワセ共栓) 玻璃器具。橡皮樽絕對不可用。使用後之Butanol要全部收回，後用分漏漏斗分開上層Butanol下層，水層之後別再蒸餾上層之時未達117°C以前，會有一部份之Butanol和水同時溜出。故該溜液當留待下一次再溜。在下層部未達100°C以前，亦會有少Butanol與水同時溜出，該溜液亦須留待下次再溜。

㊳無水芒硝用最純品，有盲光貨不能

II 定量之術式
為着細菌 Aneurinase 測定之施行Vit B₁量之故，在肉湯或VF肉羹之培養上清液中，合一定量之VitB₁調整一定之PH，在一定溫度

定時間之作用後，定量殘存VitB₁量來決定 Aneurinase 之力價。因此在這裡所應用的主要為營養肉湯，VF肉羹及其他合成培養基中之VitB₁定量，而此時即是總VitB₁定量。結合型 VitB₁ 須以Diaspase 之 Phosphatase 作用加水分解變成游離型 VitB₁。

試料加4M醋酸鈉溶液調製PH為4.5—4.7 接着加入5%Diastase 溶液約1/4量，在45—50°C 溫浴中保持約2小時，其間時時攪拌。(或是加上2%Diastase4cc及甲苯0.2cc放置於38°C 孵卵器內一夜亦可)。冷卻至室溫後用蒸餾水添加至100cc，施以遠心沈澱(300迴轉15分)或是過濾得透明之浸出液。

如果試料中蛋白質過多，以下述方法除去蛋白，對於試料20cc，加上10%偏磷酸5cc充分振盪混合，20分後加蒸餾水至25cc，再做遠心沈澱(3000迴轉20分間)，有時須視實際情形，以小型之glass 濾過器再次過濾上清液得透明液。

經上述處理之試料，再經過下面吸着，水洗，脫着，氧化，進行測定來決定VitB₁量。

I 吸着 依上記所得PH約4.5之浸出液用hold pipette取一定量緩慢注入置換塔，以1分間1cc之流速(滴下速度每三秒一滴)，使其吸收。倘若吸着液完全通過了，再一次用HCl所調整的PH約4.5之水5cc來洗置換塔R部內面，使其以同一速度通過，Vit B₁是被吸着在Permtit內，若欲使其容器直接吸着時，當將吸着後容器用上記水約5cc洗滌二回並使該洗滌液被吸着。

II 水洗 吸着完畢後，沸騰水注入置換塔，用一分間3—4cc之速度(約一秒一滴之比率滴下)洗滌吸着層。普通30—60cc即可達成目的。

III 脫着 由於水洗置換塔尚熱期間，繼續注沸騰25%KCl液注入置換塔，與水洗同一速度通過，出來之脫着液集在25cc量筒內。冷卻後用25%HCl

KCl液正確地添滿至25cc，如果脫着後再一次用沸騰150cc洗滌パーミット層就可繼續用。

III 氧化：脫着液混和後移入三角燒瓶用 hold pipette 各取5cc，移入三支共栓遠心沈澱管，從此分為主檢，添加盲檢，進行氧化反應。

(一)主檢 脫着液 5cc，加 0.5cc 醋酸緩衝液，另加前記BrCN液3cc，充分混合後，加30%NaOH 2cc。

(二)添加 脫着液 5cc，加上記 VitB₁，添加液 0.2—0.5cc 再加 3cc，充分混合後加 30% NaOH 2cc。

(三)盲檢 脫着液5cc，加0.5cc醋酸緩衝液，次加30%NaOH 3cc充分混合後加BrCN 3cc。

繼而在這三支管上，分別加入Butanol 2cc 振盪100回後加入無水芒硝2g，再振盪100次，繼之行遠心沈澱後(1000迴轉約3分)以駒込吸管，上清液之Butanol層15cc入褐色試驗管。

V 測定：將採於褐色試驗管內之Butanol液裝入Cuvette 並準備螢光光度計，如前記將Cuvette 放在Cuvette室加蓋，切開閱讀度數。因 Thiochrom 將被紫外線逐漸分解。故影像若停止，即須記出其度數。

VI 計算：假使盲檢為fB，主檢為fH，添加為fZ，添加量B₁量為C。

則主檢中之VitB₁量M為

$$Mr = C \times \frac{fH - fB}{fZ - fH}$$

因此試料中之VitB₁量r%為

$$Xr\% = M \times \frac{N}{D} \times \frac{V}{A} \times 100r\%$$

註 V：稀釋倍數，A 吸着液量。

N：脫着液量。D：氧化所用脫着量。

(附記)

VitB₁ 定量法是用京都大學教授藤原元典博士之方法在此深表謝意。

本文承戴澄清先生翻譯，特此申謝。一編者

本刊第四期將於五十三年

一月一日出版截稿日期

十一月十五日歡迎踴躍賜稿