

# 石油醱酵蛋白質之毒性研究\*

林碧堯 王立鈞

## 摘要

石油醱酵蛋白質之開拓，已成為目前探求蛋白質新來源諸研究中頗具有遠景的一項工作，主要是由於其生產成本低廉，生產速率迅速的緣故。不過在另一方面，由於此項工作係以石油為原料，在安全上仍有許多顧慮；例如 3,4-benzopyrene 此種致癌物質會不會仍殘存於成品中？因此本研究工作，係以中國石油公司嘉義分廠所出品之石油醱酵蛋白做試料，對其毒性做測定之工作。

- 一、實驗方法係以生物測定法及白鼠飼養試驗同時進行，二者均無毒性之顯示，其結果是平行的。
- 二、粗蛋白試料對於黴菌並無生長阻抗之結果。
- 三、從粗蛋白所分離之雜質（非蛋白部分），對於黴菌及白鼠之生長均無生長抑制之現象。換句話說，對於殘留石油中之毒性物質在此部分似不存在。
- 四、淨化後之蛋白質，顯示出其品質略為遜色，但沒有毒性反應之顯示。
- 五、由於營養成份不足，粗蛋白試料不宜單獨做為飼養動物之飼糧，但此項缺點可由填加其他成份而獲得改進。

---

\* 本專題研究獲得嘉義溶劑廠及國科會之補助。

STUDY OF THE TOXICITY OF SINGLE-CELL PROTEIN  
FROM HYDROCARBON FERMENTATION<sup>\*1</sup>

by

Pi-yao Lin<sup>\*2</sup>, and Li-chung Wang<sup>\*3</sup>

Single-cell protein from microbiological fermentation is a potentially valuable new source of protein. However, before accepting single-cell protein as a protein source of rations studies of its possible toxicity to the organism are necessary. This paper reports such a study. The crude protein (Candida) sample was produced by the Chiayi Solvent Works (the branch of Chinese Petroleum Corporation).

Tests for the toxicity of single-cell protein were carried out using both the Trichoderma Bioassay and rats feeding experiments. The results from both methods indicated no toxic effects. Furthermore, from the nutrition point of view, the crude protein sample was inadequate as the sole protein source in a diet for feeding rats.

---

\*1. Supported by the research grants from the Chiayi Solvent Works and the National Science Council.

\*2. Department of Chemistry, Tunghai University.

\*3. Department of Chemistry, National Cheng Kung University.

## 引言

由於國民生活水準日漸提高，在日常生活中蛋白質之需要量亦隨著增加。於是，對於蛋白質來源的尋求也成為當今科學家們所努力的目標。

石油蛋白質正是目前所探討的新蛋白質來源之一，此種方法係利用石油工業的副產品—碳氫化合物，混合於硫酸銨、尿素，以及其他礦物質在醱酵槽中培養微生物，然後從中可獲得大量的蛋白質，此即一般所謂的單細胞蛋白質 (Single-Cell Protein)。由於此種培養方法，可以大量生產，而且培養期間較短，其整個培養過程，均在實驗室中進行，控制微生物的生長並不困難，更無自然環境，種種因素的威脅與影響，所以此種方法比起從飼養家禽家畜去獵取蛋白質更為簡便與經濟得多。在探尋蛋白質新的來源上，石油蛋白質遂成為最具前途的研究工作。

不過，由於石油蛋白質係來自醱酵槽中的微生物，在其分離過程上仍有技術上的種種困難，在其本身的品質上和動植物中所含的蛋白質稍有不同，使得石油蛋白質的經濟價值因使用上做了若干保留而受到影響。為了探討石油蛋白質中是否可能含有毒性，在這裡，做了微生物培養 (Trichoderma Bioassay) 以及白鼠試驗，觀察其生長情況來對照檢討毒素存在的可能性，以期能夠謀求石油蛋白質在品質上有所改進，進而造福於人群。

採用 Trichoderma 做為微生物培養，主要此種黴菌對於許多毒性物質均能顯現出相當高的感受性。據 Dr. Zimmer 及王立鈞博士在這方面的研究報告，皂苷，含羞草酸，等等毒性物質對於 Trichoderma 均有明顯的生長抑制作用，因此 Trichoderma 遂被採用來檢驗石油蛋白質是否含有毒性的初步工作。不過其結果仍需配合以白鼠試驗之進一步探討，於是幼鼠生長試驗被用來做更進一步的印證。

## 誌謝

本研究工作之進行，特別感謝歐保羅博士 (Dr Paul S. Alexander) 為我們的白鼠試驗，特地從亞北美國海軍研究所 (NAMRU-2) 帶回健康的幼鼠，以及在生理解剖上的指導。還有，在白鼠試驗中，有關一些技術上的問題，非常感謝臺大生化研究所黃伯超教授的指導。

## 實驗材料與方法

I、微生物培養法 (*Trichoderma Bioassay*)甲：使用之微生物：*Trichoderma Viride*

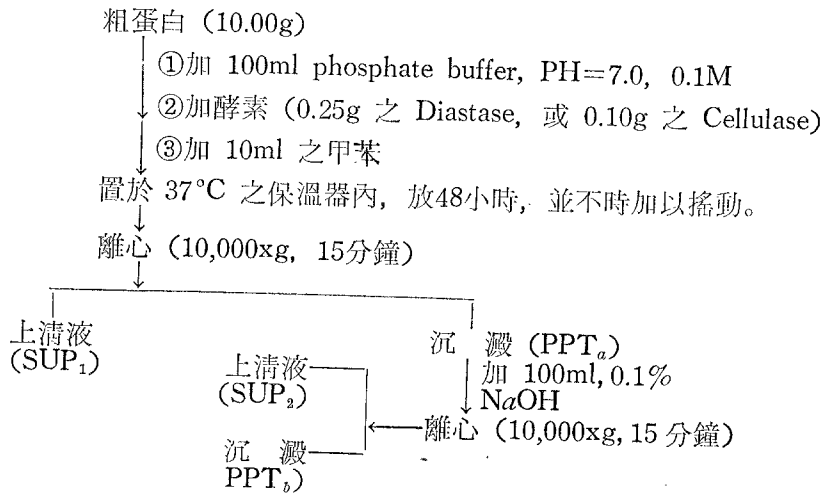
乙：培養基：Potato Dextrose Agar (Difco, U.S.A.)

丙：試品種類：

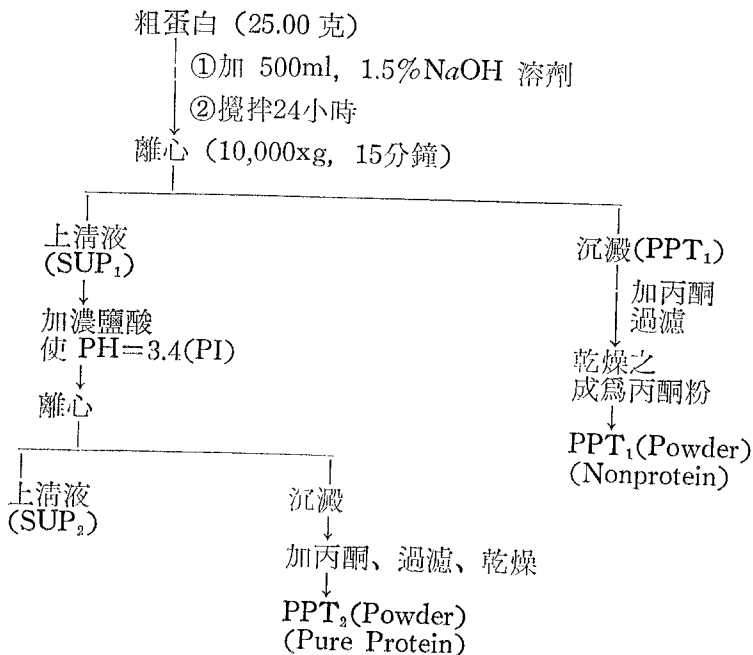
1) 粗蛋白：嘉義溶劑廠提供之石油蛋白。

2) 粗蛋白淨化過程中，各部分之產品。

i) 酵素處理法：



ii) 氫氧化鈉處理法：



## 丁、實驗方法：

將 1 克的試品粉末加 20ml 水後，在蒸鍋（121°C）加熱 20 分鐘，過濾，取其濾液數毫升混合培養基溶液，使在試管中之總體積為 30ml，其中培養液的最後濃度為 4%，試品液所需量，視要配製之濃度而定。將此項混合液再放入蒸鍋中（121°C）加熱 20 分鐘，取出將溶液傾入兩個直徑 90mm 的培養皿（事先消毒過）中。待冷卻後，將一直徑 5mm 而帶有 *Trichoderma* 菌絲的培養基移植到兩個培養皿正中央。放入 30°C 保溫器中約經過 36 小時後，即可紀錄菌絲生長的直徑長度（量四次，取其平均值）。除了試品外，另外準備相同數目的對照組（Blank Test），以求比較。

II、白鼠試驗 (*Rat Feeding Experiment*)

## 甲、白鼠：Wistar, albino

由臺北美國海軍研究所贈送實驗前之平均體重，見表 I，

乙、分組：共分為七組（Group A. B. C. D. E. F. & G）每組飼養 6 隻老鼠，雌雄各半，分別飼養在兩個鼠籠中。各組所使用飼料，見表 I。

丙、飼料：對照組以臺糖公司出產之臺糖飼料為主，每一百克中混入一粒田邊之綜合維他命丸。臺糖飼料（TSC）之大概成分如下：

臺糖飼料之成分分析：

粗蛋白：不低於 16%；粗脂肪：不低於 2.5%

粗纖維：不超過 8%；灰分：不超過 11%

水份：不超過 11%；其他：不超過 2%

## 丁、石油蛋白質之處理：

使用氫氧化鈉處理方法（見 I，微生物培養法之丙）來淨化粗蛋白。

各試品混合臺糖飼料之情形，見表 I。

## 戊、實驗方法：

老鼠分組後，全以臺糖飼料餵養兩天，以期適應新環境，然後開始餵以各種試驗飼料，水份以自來水供應。飼料之供應以讓老鼠自由取食，不限制其食量為原則。每天觀察老鼠之生長情況，隔日記錄各鼠之體重，每日供應並記錄飼料之消耗量。四個禮拜以後，實施解剖，觀察其內臟有否異常，並取肝臟，做切片觀察。

Table I. The Grouping of Rats and The Composition of Diet for Each Group

Group	Initial Body Weight (Ave.) in gm.	Diet Composition
A	40.5±5.8	Basal (TSC) Diet
B	45.1±5.9	60% of Basal Diet+40% of Crude Protein (Candida)
C	50.9±5.4	60% of Basal Diet+20% of Cascin+20% of Corn Starch
D	40.2±5.3	100% of Crude Protein (Candida)
E	41.8±4.4	90% of Basal Diet+5% of PPT <sub>1</sub> +5% of Casein
F	42.3±3.9	60% of Basal Diet+22% of PPT <sub>2</sub> +18% of Corn Starch
G	49.7±6.6	80% of Basal Diet+10% of PPT <sub>1</sub> +10% of Casein

## 結 果

### I、石油蛋白質之淨化：

在此項試驗過程，使用兩種方法處理，其結果列於表Ⅱ。使用纖維素酶 (Cellulase) 先行處理，使得 90.16% 的蛋白質存在於上清液 (SUP<sub>1</sub>+SUP<sub>2</sub>) 中。如果只使用 1.5% NaOH 做同時間之處理，存在於上清液 (SUP<sub>1</sub>) 中的蛋白質要高於95%以上。使用高速離心機的效果，要比用濾紙過濾來得理想。

測定粗蛋白之蛋白含量約為20~25%，佔總含氮量之40~60%。

### II、微生物培養試驗

#### 一、液態試品部分：

在表Ⅲ所見，上清液 (SUP<sub>1</sub> 及 SUP<sub>2</sub>) 對於 *Trichoderma* 黴菌之生長並無抑制作用呈現，從其 *Trichoderma* 值和對照組 (Blank Test) 比較，其差異並無統計上之意義。

#### 二、固態試品部分：

在表Ⅲ中之粗蛋白，不論在培養液中所含濃度高或低，均對微生物之生長沒有影響。PPT<sub>1</sub> 是屬於分離過程中蛋白含量很低的雜質部分，其 *Trichoderma* 值雖隨 PPT<sub>1</sub> 之濃度增加而略為減少，但此與 PPT<sub>1</sub> 所含殘餘NaOH量有關，如果 PPT<sub>1</sub> 經過加稀酸處理 (使 PH=7.0) 時，即無此現象。再者上項差異亦不具統計上之意義。PPT<sub>2</sub> 是含蛋白質高達95%以上的部分，其 *Trichoderma* 值則甚為穩定，和對照組比較，其生長情況可說不分上下。

### III、白鼠試驗：

#### 一、一般情況之觀察：

在D組白鼠中，經飼養兩週以後，即有輕微之下痢狀的大便，肛門略紅 (似發炎)。第三週起，其背、腹部有顯著之脫毛現象。

在F組中，大便排泄正常，唯第四週即可發現頭部之毛較為稀疏，有輕微之脫毛現象。

其他各組，在形態上及排泄方面均無異常。

#### 二、生長曲線之觀察：

在 Fig.1A 中可看出 A、B、C、D 共四組老鼠之生長情況。B 組與 A 組之生長情況相仿。C 組之生長曲線一直高於 A 組，但其差別不顯著。至於 D 組，從開始即呈現嚴重之生長遲滯。

在 Fig.1B 中，E、G 兩組之生長情形和 A 組比較，開始時彼此不相上下，最後却畧為降低，但不明顯。至於 F 組，情況比 D 組好些，但其與 A 組所產生的差別仍然很大，亦即有顯著的生長遲滯現象。

Fig. 3 圖上所示，可以看出各組體重平均增加情形，以及其標準偏差 (Standard Deviation) 的範圍，可用於統計學上之檢查各組間之差別是否有意義。

#### 三、飼料消耗量之觀察：

在 Fig.2A 中，B與C兩組之飼料消耗情形和對照組(A)比較，並無區別。然而D組則有顯著的減少，經統計上之檢查，此項差別是有意義的。

在 Fig.2B 中，E與G兩組之飼料消耗和A組比較，均屬正常。而F組之情況雖不若D組減少那麼多，然而A組比較，此項差別還是有意義的。

#### 四、在解剖上之觀察：

實驗期結束之後，即將老鼠進行解剖，俾便進一步觀察內臟之發育情況；但是在體重本身之差異外，內臟之發育並無異常，尤其肝、腎及小腸更經詳細之觀察，並做成切片，但均無異常之現象被發現（此項觀察得力於動物生理學教授 Dr. Paul Alexander，助教黃奕燦先生之協助）。



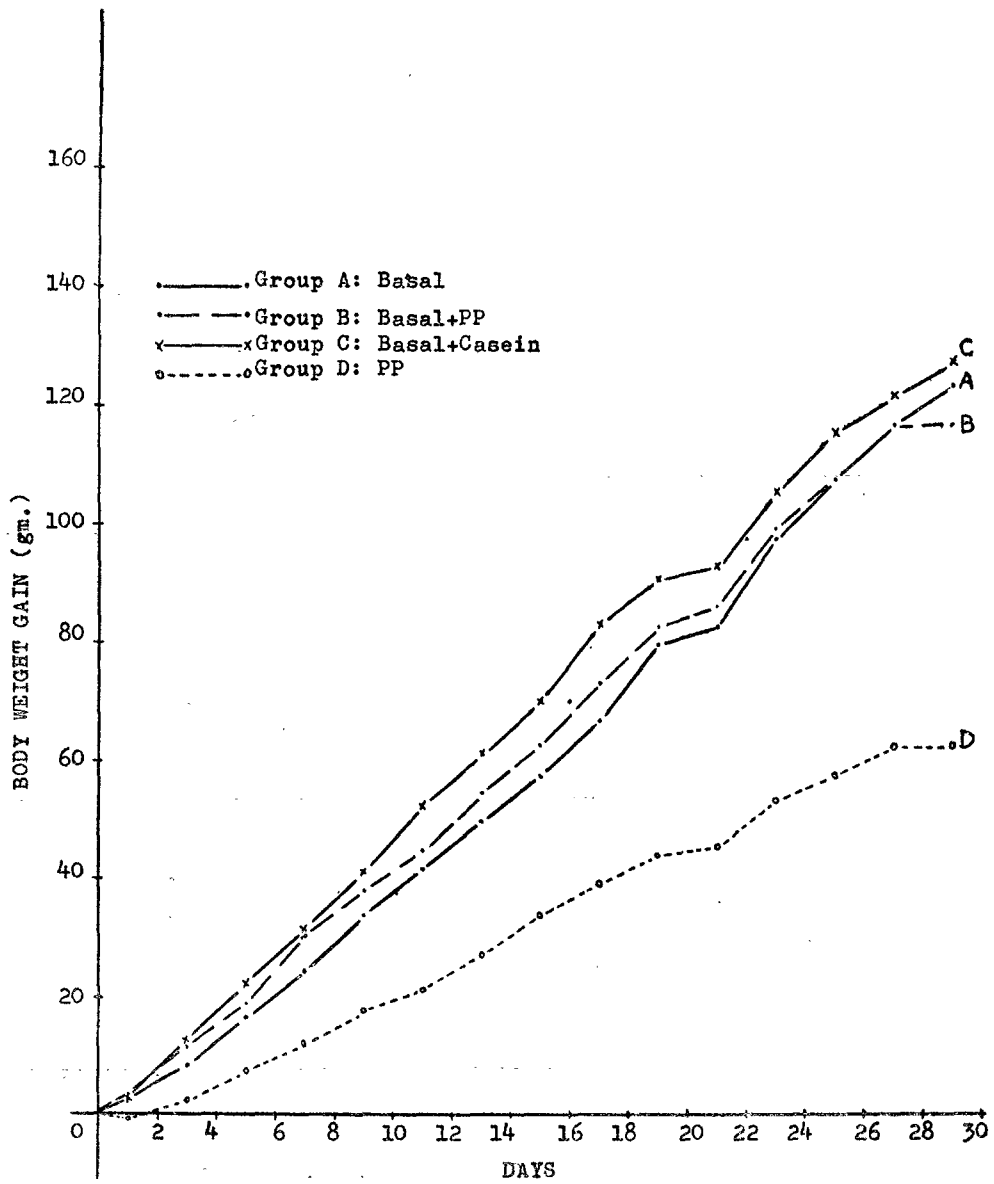
**Table II. The Nitrogen Content<sup>1</sup> (N) and The Protein Content<sup>2</sup> (P) of Each Fraction from The Purification of The Petroleum Protein**

Method	SUP <sub>1</sub>		SUP <sub>2</sub>		TPP		TOTAL	
	N <sup>1</sup> (mg%)	P <sup>2</sup> (mg%)	N <sup>1</sup> (mg%)	P <sup>2</sup> (mg%)	N <sup>1</sup> (mg%)	P <sup>2</sup> (mg%)	N <sup>1</sup> (mg%)	P <sup>2</sup> (mg%)
Cellulase Treatment	2.84	7.45	2.45	10.90	2.28	2.48		
	2.87	7.45	2.50	11.59	2.32	1.59		
Ave.	2.86	7.45	2.48	11.24	2.30	2.04	7.64	20.73
Alkali-Treatment								
Centrifuge Method	5.18	23.74			1.75	1.24	6.93	24.98
Filtration Method	3.92	16.90			0.68	0.35	4.60	17.25
Crude Petroleum Protein.....							8.12	21.46

1. Nitrogen Content (N) estimated by Kjeldahl Method.
2. Protein Content (P) estimated by Folin-Ciocalteu Method.

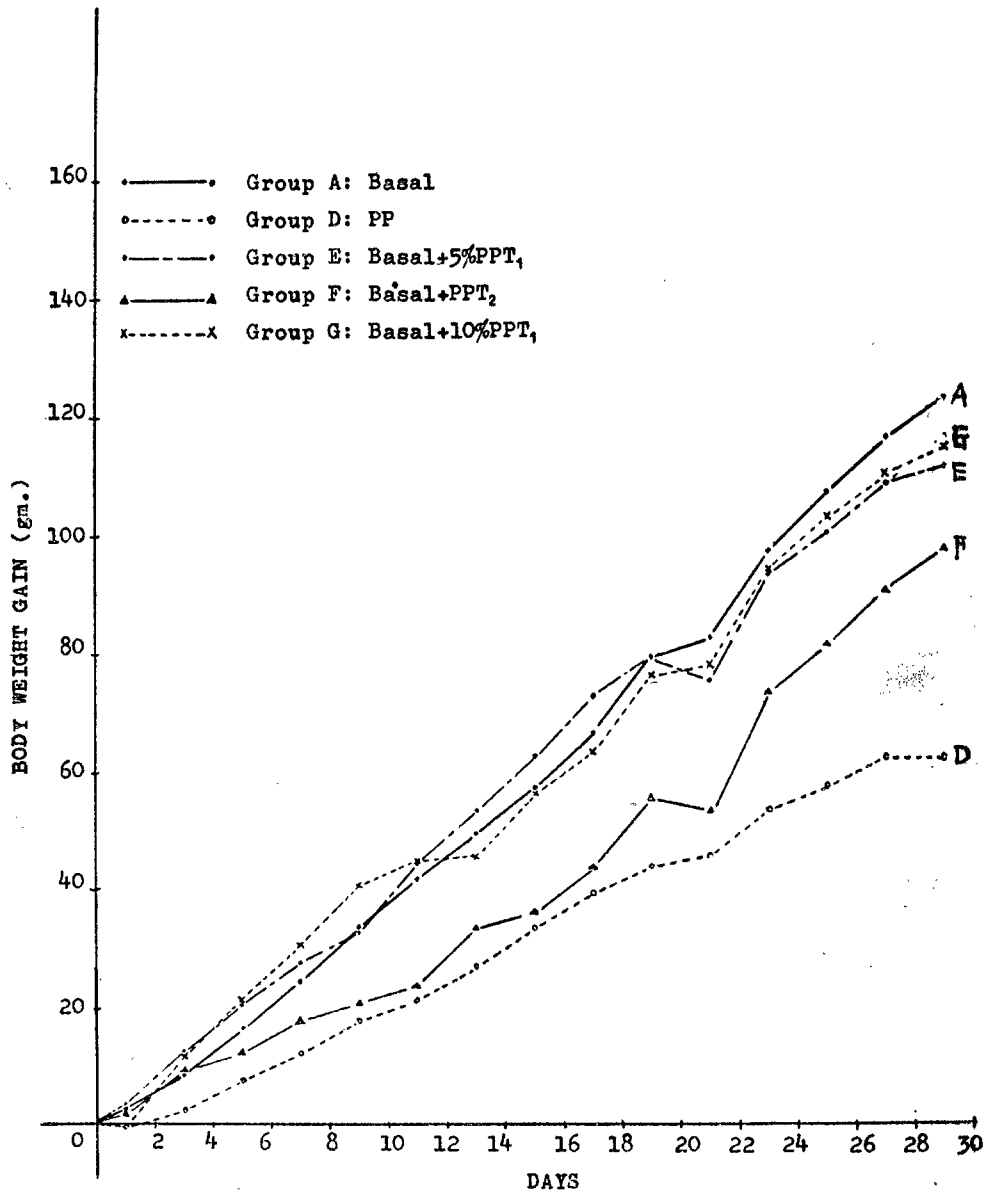
**Table III. Trichoderma Value of The Crude Protein and The Fractions from The Protein Purification.**

Experiment	Sample	Trichoderma Value (mm)
I	Crude Protein (1.0%)	56.2±6.5
	Crude Protein (2.0%)	56.5±4.1
	SUP <sub>1</sub> (1.0%)	54.7±4.3
	SUP <sub>1</sub> (2.0%)	50.1±3.1
	SUP <sub>2</sub> (1.0%)	59.5±2.1
	SUP <sub>2</sub> (2.0%)	55.3±3.4
	Blank	56.4±1.6
II	PPT <sub>1</sub> (0.1%)	53.5±2.5
	PPT <sub>1</sub> (0.5%)	51.8±0.6
	PPT <sub>1</sub> (1.0%)	50.9±1.7
	PPT <sub>2</sub> (0.1%)	54.7±1.0
	PPT <sub>2</sub> (0.5%)	53.9±1.0
	PPT <sub>2</sub> (1.0%)	53.9±1.2
	Blank	53.8±3.7



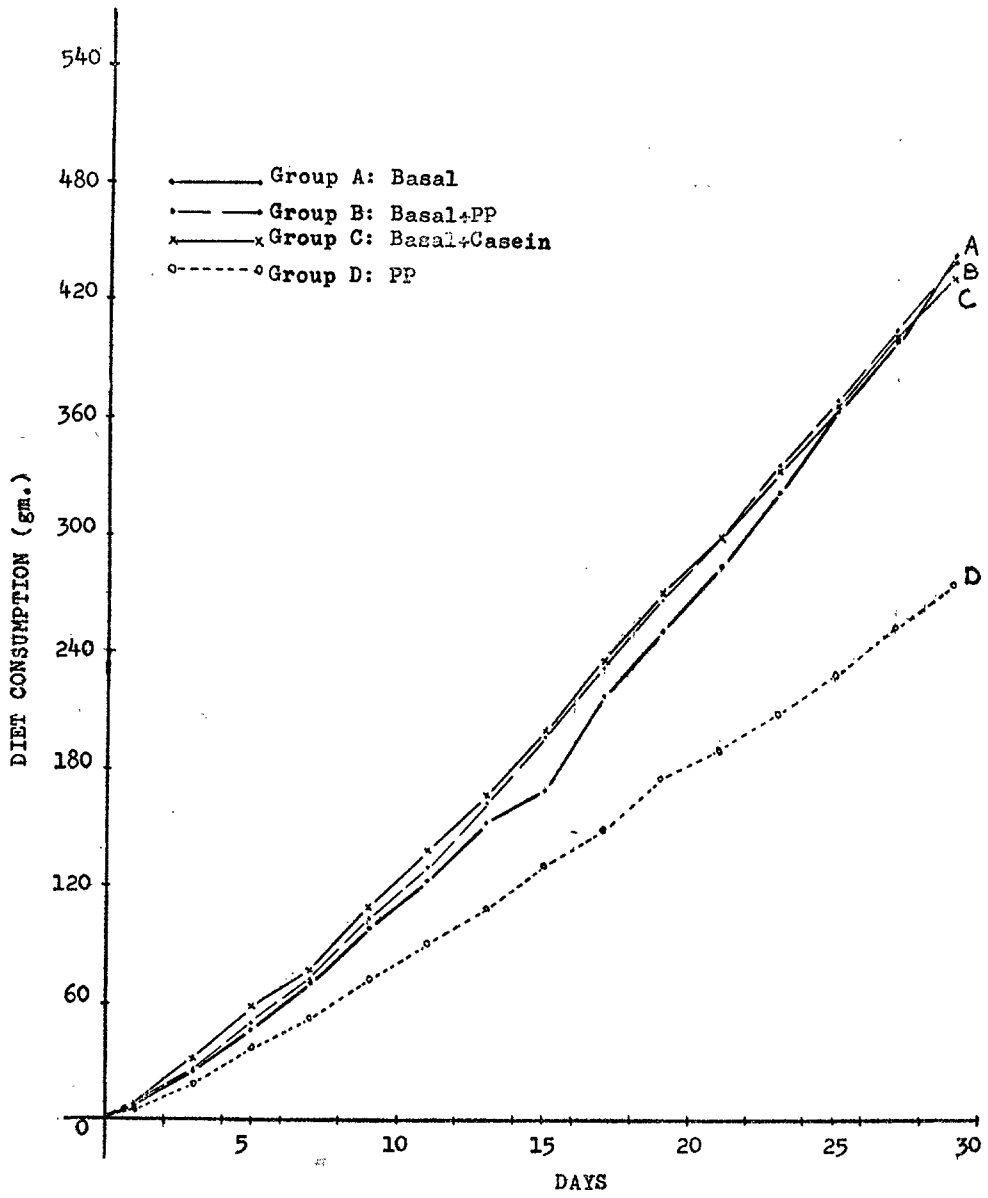
生長曲線

FIG. IA GROWTH CURVES OF RATS IN THE FEEDING EXPERIMENT



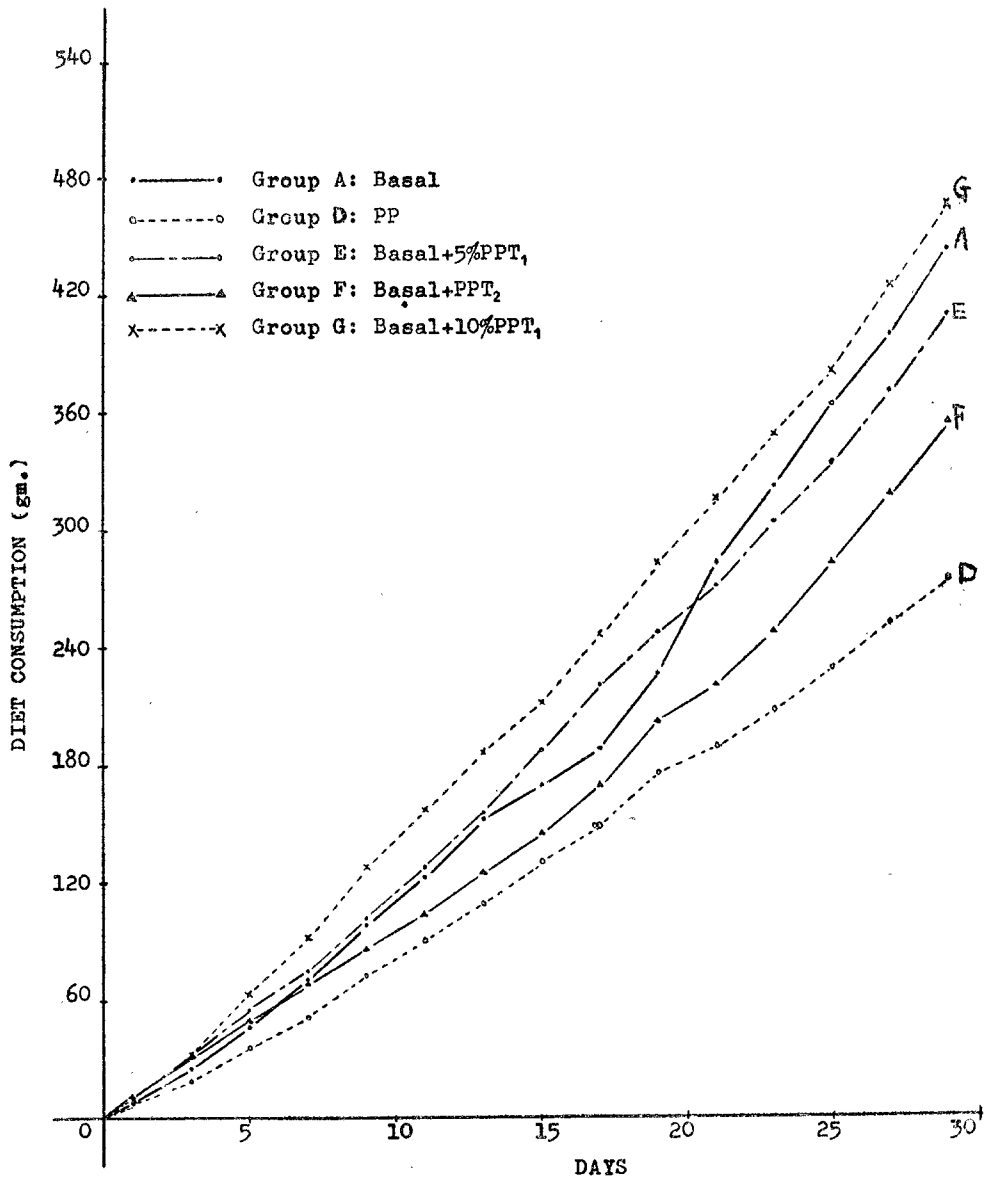
生長曲線

FIG. 1B GROWTH CURVES OF RATS IN THE FEEDING EXPERIMENT



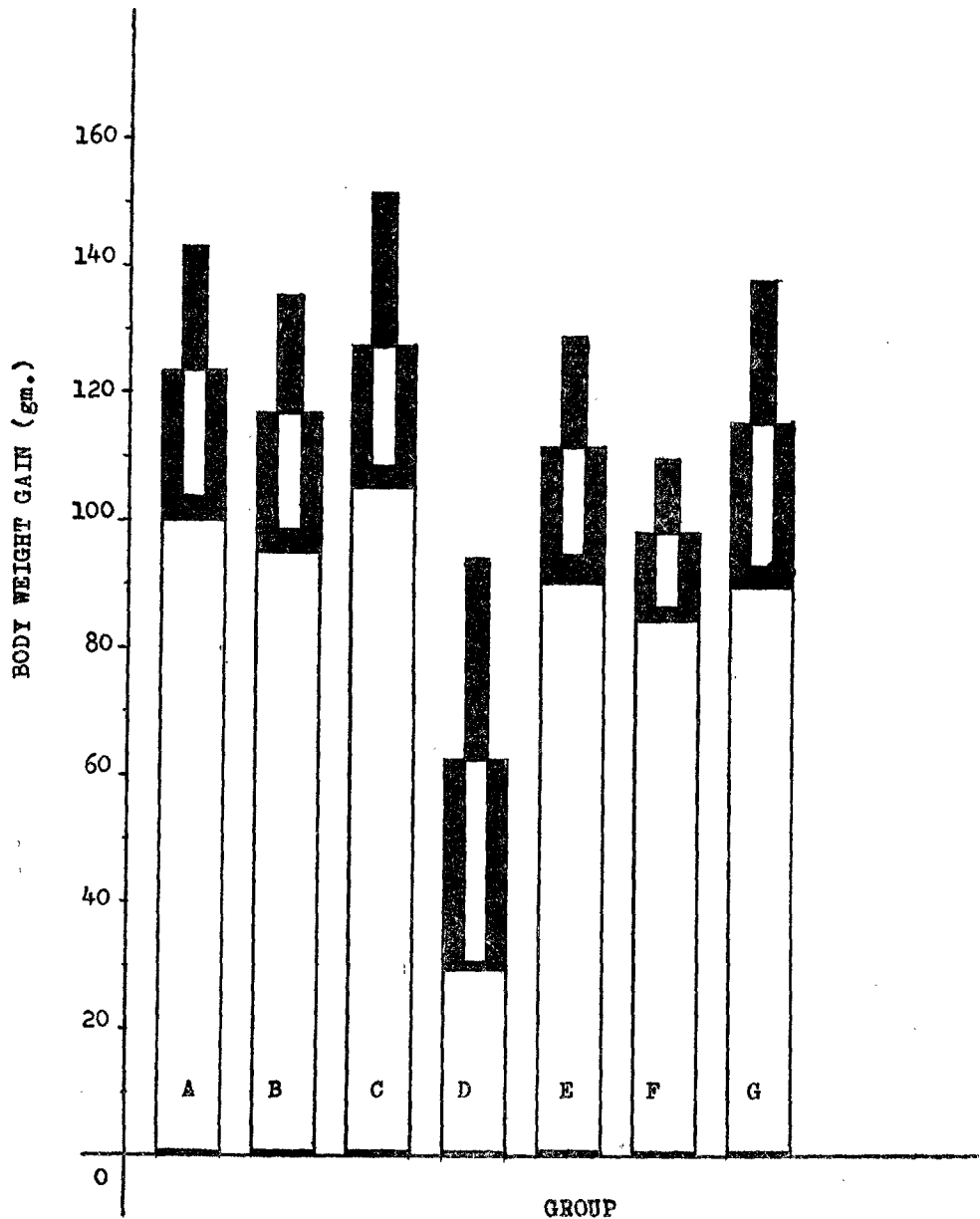
飼料消耗量

FIG. 2A DIET CONSUMPTION OF RATS IN THE FEEDING EXPERIMENT



飼料消耗量

FIG. 2B DIET CONSUMPTION OF RATS IN THE FEEDING EXPERIMENT



每組每隻老鼠體重總增加量

FIG. 3 TOTAL BODY WEIGHT GAIN PER RAT IN THE FEEDING EXPERIMENT

## 討 論

## I、粗蛋白之淨化法：

由表 II 所顯示的結果，利用酵素處理，在學理上雖然可認為酵素 (Diastase 或 Cellulase) 可以將石油蛋白上所夾帶之雜質加以消化，但就終結果來看，Diastase 的效果不如 Cellulase，此二者亦不如純用氫氧化鈉來得方便，尤其在經濟上來比較，氫氧化鈉處理法更值得引用。經過 NaOH 處理後，在上清液部分使用濃鹽酸改變其 PH 值，直到 PH=3.4，則絕大部分 (Yield 在 98% 以上) 的蛋白質可以析出。如果再調整第二次 PI，純度可以提高。

## II、微生物培養試驗：

從表 III 的結果來看，不論蛋白質是否經過淨化，在微生物的培養觀察，對於微生物之生長情形並沒有影響產生。本來，皂苷 (Saponin) 對於 Trichoderma 之生長有很敏感而強有力的生長抑制作用。在做本實驗之前，檢查過 Trichoderma 在這方面之感受活性，結果均屬正常，因此在相同的條件下做相同的培養觀察，此項結果可證明對微菌並無毒性之顯示。

## III、白鼠試驗：

從 Fig.1A 及 Fig.3 兩圖的結果來看，單用石油蛋白 (100%) 當做食糧飼養的結果 (D 組) 是能夠影響到老鼠的正常生長，其原因可能是 D 組飼料中，除了蛋白質外，其他成份不足以使白鼠獲得充分的生長條件所致。例如其大便異常以及脫毛現象等可能即由營養不良所引起。如果除石油蛋白外，填加適量的其他飼糧，生長情形即可改善，B 組的生長情形 (Fig.1A) 可以說明此種可能性。

至於 C 組，在飼料中和 B 組的差別，是用酪蛋白取代了石油蛋白，結果發現用酪蛋白的效果似乎要比石油蛋白較有利於白鼠的生長。由 Fig.2A 所示看來，B、C 兩組在飼料消耗上幾近相同，可知食量並不影響到 B、C 兩組在生長上所顯示的輕微差別。因此這或可能和蛋白品質有關，不過，此項輕微差別在統計學上並無顯著的意義。

爲了進一步瞭解石油蛋白質在品質上是否有問題，於是將粗蛋白加以淨化，而得到高純度的 PPT<sub>2</sub>，以及雜質 PPT<sub>1</sub>，分別將此二者混入基礎飼料內，進行生長試驗。在 E、G 兩組中，PPT<sub>1</sub> 在飼料中的百分比不同，由 Fig.1B 所見的生長結果並無顯著的差異，至於 G 組最終體重增加量畧勝於 E 組，這可能由於酪蛋白填加量之多少所致，因爲從 Fig.2B 可以看出，酪蛋白比率增加有助於消耗飼量的增加，同時明顯地表示出，PPT<sub>1</sub> 的填加量無礙於白鼠的生長。因此一般人對於石油蛋白質中是否含有殘留在碳氫化合物 (即正烷烴) 中的釀毒物質所產生的疑慮，由此初步結果似可掃除在這方面的顧慮。F 組是在飼料中填加 22% PPT<sub>2</sub>，結果不但食量有顯著的下降，生長情況亦受到影響而顯得低落。在飼料的成分上，C 與 F 組的成份是相近的，在屬於蛋白質的含氮量是幾近相同的，可是在生長情況上却有明顯的差別。同時在飼料之消耗上，F 組也降低了很多。其原因可能 (一)：石油蛋白質本身的品質不夠好；也可能 (二)：蛋白質淨化處理而影響到它的消化率與利用率。要是起因於蛋白質本身品質上的問題，那麼飼料消耗量似乎不

應有那麼明顯的減少，所以這方面尚待進一步的研究。

從 B、F 兩組的飼料成份 (Table I) 來討論，兩者之間的差異是 40% 的粗蛋白被 22% 的 PPT<sub>2</sub> 及 18% 的玉米澱粉所取代，結果在生長情況却有顯著的差別，換句話說，粗蛋白中的雜質對於老鼠的生長似乎不無裨益。對於 PPT<sub>2</sub> 是否含有毒性的假設也就顯得比較不可能。再根據黃伯超教授分析石油蛋白質的成分來看，石油蛋白中的含硫胺基酸含量較少 (稱之為 Limiting Amino Acid)；此種缺點可以在飼料中填加適當量的含硫胺基酸加以補救。此種情形，如果從 B、D 及 F 三組加以比較，當作基礎飼糧的臺糖飼料似乎正好有這種類似的效果。

在解剖工作上，肉眼初步觀察各內臟並無異常現象被發現，做成切片檢查，均屬正常。如果飼養期間較長的話，所得結果將可更確切地否定含有任何毒素存在的可能性。

總之，單純的石油蛋白質，對於 *Trichoderma* 並無毒性顯示；但是對於白鼠的生長，則顯示其營養價值可能有問題，不過此項缺點是可以加以補救的。經淨化所得的 PPT<sub>2</sub> 蛋白質，可能係處理過程所導致蛋白質本身利率 (或消化率) 的下降，或者亦可能顯示出石油蛋白質本身在品質上畧為遜色。



## 參 考 文 獻

1. Huang, P.C., et al, Protein Quality of Hydrocarbon-grown *Pseudomonas Aeuginosa*, Journal of the Chinese Agriculture Chemical Society, 9:73-79, 1971
2. Lee, P.K., et al, Nutritive Value of Locally Produced Petroleum Yeast for Broilers and Rats, Taiwan Agriculture Quarterly, 7:157-180, 1971
3. Lee, P. K., Effect of Heavy Petroleum Bacteria Protein in Rations on Growth Rate, Feed Conversion and Carcass Quality of Broilers, Taiwan Agriculture Quarterly, 8:136-153, 1972
4. Mitsuda, Hisateru, et al, Studies on Protein Foods (Part I), Isolation of protein from *Torula Yeast*, Nutrition and Food (Japanese), 17:342-346, 1963
5. Pederson, M. W., et al, Proceeding of 10th International Grassland Congress Helsinki, p.266-269, 1966
6. Wang, L.C., Quantitative Evaluation of Saponin Content in Du Puits Alfalfa with *Trichoderma*, Ph.D. Thesis, Utah State University, Logan, Utah, 1969
7. Zimmer, D.E., et al, A Bioassay for Alfalfa Saponin Using the Fungus, *Trichoderma Viride*, Crop Science, 7:223-224, 1967