

青霉素菌渣资源化为饲料原料的营养价值研究

王 璞, 刘惠玲, 王 冰, 程修文, 陈清华, 张 健

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院 城市水资源与水环境国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要: 为探讨青霉素菌渣资源化为饲料原料潜在的营养价值, 本研究以抗生素制药厂发酵剩余培养基(即青霉素菌渣)为研究对象, 利用元素分析仪、电感耦合等离子体发射光谱对菌渣中的非金属元素、金属元素进行了测定, 并利用氨基酸分析仪、凯氏定氮法、DNS法、索氏提取法对其基本营养物质氨基酸、粗蛋白、总糖及脂肪含量进行了简单分析。结果表明: C、N、S、H 4种非金属元素含量较高, 其中, 动物体有机体常量元素C含量最高, 质量分数为34.52%。相对而言, 金属元素含量较低, 其中K、Na等常量元素含量较高, 4种重金属污染物Cd、Cr、Hg、Pb含量与相关国家饲料安全标准对照而得, 均低于下限水平。此外, 以蛋白质、脂肪和总糖含量为考察指标评价了青霉素菌渣的营养特性, 并进一步分析了更有利于动物吸收利用的小分子氨基酸含量。结果表明: 青霉素菌渣具有较高的潜在营养特性, 粗蛋白、粗脂肪和总糖含量均较高, 分别为568.767、82.919、320.51 mg/g, 同时各种为生命体生长所需的氨基酸含量较丰富, 其中苯丙氨酸、蛋氨酸含量最高。

关键词: 青霉素菌渣; 非金属元素; 金属元素; 蛋白质; 糖; 氨基酸

中图分类号: X787

文献标志码: A

Nutrition Properties of Penicillin Bacterial Residue Utilized as Feedstuff

Wang Pu, Liu Huiling, Wang Bing, Cheng Xiuwen, Chen Qinghua, Zhang Jian

(State Key Laboratory of Urban Water Resources and Environment (SKLUWRE), School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: In this paper, penicillin bacterial residue was collected from microbial fermentation process in the antibiotic pharmacy as the study target to investigate the potential nutrition values of penicillin bacterial residue utilized as feedstuff. Non-metallic elements and metallic elements in the bacterial residue were determined by use of element analyzer and inductively coupled plasma spectroscopy. Simple analysis of the content of basic nutrients such as amino acid, crude protein, total sugar and fat was performed by application of amino acid analyzer, Kjeldahl method, DNS and Soxhlet's extraction methods. The results showed that the content of four non-metallic elements including C, N, S, H was comparatively higher. The content of C which was the microelement in animal bodies was highest with the mass fraction of 34.52%. In contrast, the content of metallic elements was lower, among which the content of macroelements such as K and Na was relatively higher. In comparison to the national feedstuff safety standard, the content of four heavy metals including Cd, Cr, Hg and Pb were all below the limits. In addition, the content of protein, fat and total sugar was taken as the indicators to evaluate the nutrition features of penicillin bacterial residue. Furthermore, the content of amino acid in the form of small molecules better for absorption and utilization by animals was analyzed. The results indicated that penicillin bacterial residue deposited potential higher nutrition values, with protein of 568.767 mg/g, fat of 82.919 mg/g and sugar of 320.51 mg/g. Simultaneously, the content of amino acid necessary for life growth was comparatively rich with the highest content of phenylalanine and methionine.

Keywords: Penicillin Bacterial Residue; Non-metallic Element; Metallic Element; Protein; Sugar; Amino Acid

CLC number: X787

收稿日期: 2014-06-13

基金项目: 国家环保公益项目(201209024);国家重点实验室面上项目(2010DX03, QA201416);国家创新团队(51121062)基金资助

作者简介: 王 璞(1988-), 女, 博士研究生。研究方向: 固体废物处理与处置。

通信作者: 刘惠玲(1964-), 女, 教授, 博士生导师。E-mail: hlliu2003@163.com

继1928年,青霉素首次被英国细菌学家弗莱明发现,掀开了抗生素在世界舞台上发展的帷帐。近些年,以青霉素和头孢为代表的内酰胺类抗生素已占据了世界生物制药市场65%以上^[1]。以印度、中国为代表发展中国家因其低廉的生产原料和劳动力已逐步成为原料药的生产国^[2]。2009年后,中国已跃居成为世界上最大的抗生素生产及输出国^[2],然后其存在的环境隐患逐渐也渐渐引起人们的注意及重视,尤其是耐药菌问题^[3-5]。青霉素菌渣即是青霉素发酵剩余菌丝体,大约仅有2%~5%的青霉素被释放提取出来^[1]。青霉素菌渣含有较高的青霉素残留,高达100~2 000 mg/kg^[6]。同时,青霉素菌渣富含大量的维生素、蛋白质等,具有较高的潜在利用价值作为动物饲料氮源^[7]。如果不妥善处置不但会污染环境,也会造成极大的资源浪费,近年来,伴随着微生物原料生产地向中国的迁移,大量抗生素菌丝体的处理处置已引起政府及学者的广泛关注,其中,Guo et al^[8]针对青霉素菌丝体的生物残留特性进行了研究,包括多芳香烃类物质,热降解性等,为青霉素菌丝体的研究有提供了一定的参考价值。

据文献[9-10]显示,过去几十年,干燥后加工为动物饲料或者饲料添加剂是处置的主要途径。其中,1986年美国学者研究出了一套菌丝体作为动物饲料或肥料较完善的处理工艺,并申请获批美国专利,糖浆作为外加碳源,菌丝体通过厌氧乳酸发酵产酸使青霉素降解,同时使得大分子的蛋白质分解为适口性的小肽类物质和氨基酸。之后Banerjee et al^[10]也报道了利用青霉素菌渣作为鱼塘肥料,国外目前对于抗生素菌渣的处理处置仍以饲料为主要途径。然而,随着耐药菌问题逐渐引起人们的重视。2008年之后抗生素菌渣已被列入我国危险废物名录,禁止在饲料和动物饮用水中使用的药品种目目录^[11]。不能用做饲料或饲料添加剂,甚至用做肥料也要被禁止,仅能作为危废进行焚烧处置。目前国家对抗生素菌渣的处置要求,也基本限定采用焚烧处理。这样势必带来以下问题:一是抗生素菌渣全部按危废焚烧处理,不利于实现循环经济发展;二是抗生

素菌渣焚烧处理的成本约为1 200元/t,将使国内抗生素企业处于市场竞争劣势。目前,国家有关部门对抗生素菌渣问题引起了高度重视。根据国家相关部门文件要求:要求在较短的时间内解决落实抗生素菌渣无害化处置措施。因此,于2012年由国家环保部牵头,联合各高校院所,国家环保公益性项目“微生物制药菌渣处置和利用风险控制技术”已正式启动。目前国内外对于菌渣的利用技术报道尚少,尤其对其资源化为饲料的潜在营养价值尚未见评估报道。

因此,本研究基于此国家政策为导向,本文以中国某制药厂青霉素菌渣为研究对象,初步探讨了青霉素菌渣资源化为饲料原料潜在的营养价值,为实现青霉素菌渣无害化处理处置提供一定的理论依据。

1 实验部分

1.1 实验原料

青霉素菌渣,源于微生物制药发酵工艺,是过滤提取发酵滤液后剩余的滤渣。本实验所用样品由哈尔滨市某制药厂提供,取自抗生素生产工艺正常运行时过滤后的菌渣,四分法取样,湿菌渣105℃干燥24 h研磨捣碎,之后过75 mm标准筛,置于玻璃干燥器中备用。

1.2 实验试剂

3,5-二硝基水杨酸,氢氧化钠,葡萄糖等均为分析纯化学试剂,实验用水为去离子水。

1.3 实验方法

采用Vario EL元素分析仪(日本岛津)对青霉素菌渣中的非金属元素含量进行分析,具体实验方法参考文献[12]。此外,采用电感耦合等离子发射光谱对其金属元素含量进行了分析,其中包含Pb、Cr、Hg、Cd 4种需要重点关注的重金属污染物^[13]。

牛血清蛋白为标准对照品,Lowry试剂盒法测定菌渣蛋白质含量^[14]。样品中粗蛋白的提取:准确称取1.00 g样品,放入100 mL烧杯中,调成糊状,蒸馏水定容至50 mL搅匀蛋白浸出。将浸出液(含沉淀)转移到50 mL离心管,4 000 r/min,5 min。20 mL蒸馏水重复提取一次,合并上清液定容至

100 mL, 为100倍稀释蛋白液。

葡萄糖为标准对照, DNS测定样品中的总糖、还原性糖含量^[15]。样品中还原糖的提取: 准确称取1.00 g样品, 放入100 mL烧杯中, 蒸馏水调成糊状, 定容至50 mL, 搅匀, 煮沸5 min, 使还原糖浸出。将浸出液转移到50 mL离心管中, 4 000 r/min, 5 min, 20 mL蒸馏水洗涤沉淀, 离心, 合并离心上清液, 定容至100 mL容量瓶中混匀, 即得100倍稀释还原糖液(根据实验需要逐级稀释)。

样品中总糖的水解和提取: 准确称取1.00 g样品, 加15 mL蒸馏水及10 mL、6 mol/L的HCl, 100度加热30 min。待水解液冷却后, 加入1滴酚酞指示剂, 用6 mol/L NaOH中和至微红色(至中性), 用蒸馏水定容至100 mL混匀, 即为100倍稀释总糖液(根据实验需要逐级稀释)。

索氏提取法测定样品中的粗脂肪含量^[16]。

采用日立L-8800氨基酸自动分析仪分析菌渣中氨基酸含量, 标准分析柱为4.6 mm × 60.0 mm, 反应温度为57.0 °C, 反应器温度为136.0 °C。样品处理方法参照邵金良等所报道文献^[17]。

2 结果与讨论

2.1 非金属及金属元素含量的测定

青霉素菌渣的化学特性分析对其资源化利用有重要意义, 青霉素菌渣各非金属及金属元素含量差异见图1。青霉素菌渣中主要重金属含量见表1。

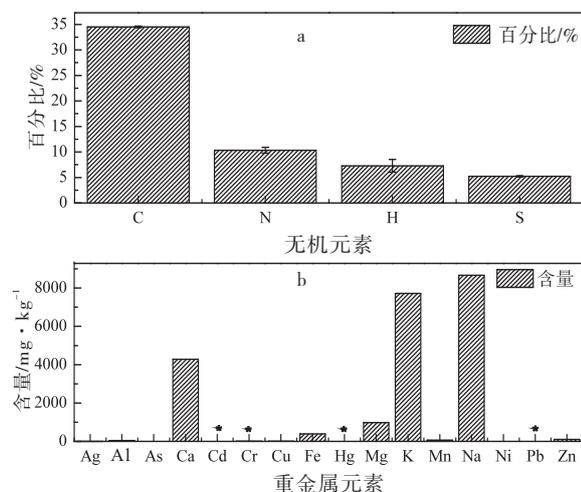


图1 青霉素菌渣无机及金属元素含量差异图

表1 青霉素菌渣中主要重金属含量 mg · kg⁻¹

金属元素名称	青霉素菌渣	GB13078—2001
Ag (银)	0.067	
Al (铝)	40.38	
As (砷)	0	
Ca (钙)	428.6	
Cd (镉)	0	≤0.5
Cr (铬)	6.322	≤13
Cu (铜)	7.283	
Fe (铁)	384.28	
Hg (汞)	0	≤0.1
Mg (镁)	973.7	
K (钾)	7721.61	
Mn (锰)	66.29	
Na (钠)	8665.8	
Ni (镍)	0	
Pb (铅)	0	≤2
Zn (锌)	107.2	

由图1a可见, 青霉素菌渣中C含量较高, 质量分数为34.52%, 相对而言, H、N、S 3种元素含量较少。这是由于菌渣中含有大量有机物和菌体蛋白, 而这些物质具有较高的营养价值, 可作为实现菌渣资源化利用为饲料原料的潜在理论依据。

由图1b和表1可以看出, 青霉素菌渣中常量金属元素Ca、K、Na、Mg金属元素含量较高, 分别为8 665.8、7 721.61、428.6、973.7 mg/kg。其次, 从营养学角度考虑, 菌渣中诸如Al、Fe、Zn、Mn等为动物生长所必须的微量金属元素, 含量也较高。因此青霉素菌渣资源化利用为动物饲料具有一定的营养价值。此外, 青霉素菌渣资源化为动物饲料, 过高的金属含量可能会引起动物重金属中毒。参照GB13078—2001国家饲料安全标准^[18], Pb、Cr、Hg、Cd为4种需要重点关注的重金属污染物, 由表1中结果可知, 菌渣中这4种重金属污染物其含量均低于对照标准下限, 符合我国饲料安全标准。但是重金属元素在动物体内的蓄积毒性尚待后续继续研究及讨论。然而, 重金属在菌渣的处置过程中会以金属离子的形式进入土壤和地下水, 若含量高于相关标准就必须加以去除防止形成二次污染, 目前未见制药菌渣在土壤上污染物的控制标准限。

2.2 青霉素菌渣基本营养物质含量的测定

青霉素菌渣的营养成分见表2。

表2 青霉素菌渣的营养成分

指标	含量/mg·g ⁻¹
粗蛋白	568.767 ± 4.92
粗脂肪	82.919 ± 0.22
总糖	320.51 ± 7.93
还原性糖	113.57 ± 2.79

由表2可知,青霉素菌渣富含多种基本营养物质,总体而言,各营养物质含量均较高,有较大的利用潜质。其中蛋白质含量最高,大约为568.767 mg/g,来源于菌渣中大量的菌体蛋白和剩余培养基中的蛋白质;相对而言,粗脂肪,总糖,还原性糖含量较低,这与青霉素菌渣的发酵基质有着必然的关系。根据上述高含量的营养物质,为菌渣的资源化提供了几个可以参考的途径:制备饲料酵母;制取高品质蛋白产品;重用为酵母膏,再次成为微生物培养的氮源。

2.3 青霉素菌渣中氨基酸含量

青霉素菌渣中所含小分子蛋白-游离氨基酸种类及含量见图2和表3。

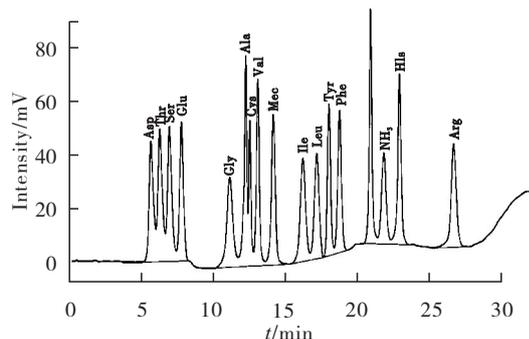


图2 青霉素菌渣中游离氨基酸色谱图

蛋白质是生命的物质基础而动物对蛋白质的需求本质上是对氨基酸的需求。饲料中氨基酸的种类和含量是衡量其质量高低的一项重要指标。且相对于大分子的蛋白,小分子的多肽类及氨基酸更具有适口性。

由表3可知,青霉素菌渣中共含有18种氨基酸,其中亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、缬氨酸为动物生长所需的7种必需氨基酸^[9],由表3结果分析可知,青霉素菌渣中必需氨基酸含量均较高,能够满足其废物资源化利用为饲料后动物体的营养需求。此外,这7种必需氨基酸的含量由高到低依次为苯丙氨

表3 青霉素菌渣中游离氨基酸含量

名称	t/min	含量/mg·g ⁻¹
Asp (天冬氨酸)	5.64	33.2750
Thr (苏氨酸)	6.27	29.7750
Ser (丝氨酸)	6.93	26.2750
Glu (谷氨酸)	7.76	36.7750
Gly (甘氨酸)	11.12	18.7750
Ala (丙氨酸)	12.24	22.2750
Cys (半胱氨酸)	12.52	30.0375
Val (缬氨酸)	13.08	29.3000
Met (蛋氨酸)	14.15	37.3000
Ile (异亮氨酸)	16.20	32.8000
Leu (亮氨酸)	17.16	32.8000
Tyr (酪氨酸)	18.01	45.3000
Phe (苯丙氨酸)	18.76	41.3000
Lys (赖氨酸)	20.89	36.5500
NH ₃ (氨基态氮)	21.83	4.25000
His (组氨酸)	22.92	38.8000
Arg (精氨酸)	26.68	43.5500
Pro (脯氨酸)	8.39	28.7750
总氨基酸		539.137

酸>蛋氨酸>赖氨酸>异亮氨酸>亮氨酸>缬氨酸。此外,青霉素菌渣中非必需氨基酸含量也较高,其中酪氨酸、精氨酸含量较高。

因此,青霉素废弃菌渣资源化利用为动物饲料,氨基酸也是评价其利用价值的重要指标。

3 结论

(1) 根据非金属及金属元素分析结果得出菌渣中C元素含量较高,Pb、Cr、Hg、Cd 4种重金属污染物含量均低于国家相关标准,含量较低,可为青霉素菌渣废物利用为饲料的安全评价提供一定的理论数据。

(2) 根据基本营养物质分析结果得出菌渣中蛋白质含量较高,大约为568.767 mg/g,具有较高的营养利用价值,这也是青霉素菌渣实现废物再利用的一个重要经济价值指标。相对而言,粗脂肪及糖类物质含量较少,这与青霉素菌渣本身的基质特点有关,含有大量菌丝体。

(3) 青霉素菌渣中氨基酸含量丰富,尤其是7种必需氨基酸含量较高,为有机生命体生长所必需。

综上所述,青霉素菌渣富含各种动物生长需

要的营养物质, 诸如蛋白质, 糖类及脂肪类物质。同时, 重金属污染物低于国家标准。因此, 青霉素菌渣制取动物饲料具有较高的潜在营养特性, 为其资源化利用提供了一定的理论依据, 为青霉素菌渣的处理处置提供了一条可参考的路线, 进而减少了长期无序管理及堆放造成的环境污染问题。进而解决当前制约中国制药企业发展的关键性问题, 推速中国制药行业的发展, 进而相辅与我国的基本医疗保障体制及民生问题。

参考文献

- [1]Elander R P. Industrial production of beta-lactam antibiotics[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 61(5-6):385-392.
- [2]Guo B, Gong L, Duan E, et al. Characteristics of penicillin bacterial residue[J]. Journal of the Air & Waste Management Association, 2012, 62(4): 485-488.
- [3]Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52(1):5-7.
- [4]Boxall A B, Kolpin D W, Halling-Sørensen B, et al. Are veterinary medicines causing environmental risks?[J]. Environ Sci Technol, 2003, 37(15): 286-294.
- [5]Thomas Schwartz, Wolfgang Kohnen, Bernd Jansen, et al. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(3):325-335.
- [6]European Commission Decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods

- and the interpretation of results[J]. Official Journal of the European Union, 2002(221):8-36.
- [7]Doctor V M, Kerur L. Penicillium Mycelium Waste as Protein Supplement in Animals[J]. Applied Microbiology, 1968, 16(11):1723-1726.
- [8]Guo B, Gong L, Duan E, et al. Characteristics of penicillin bacterial residue[J]. Journal of the Air & Waste Management Association, 2012, 62(4):485-488.
- [9]Hildegard Ebert, Kreuzfeldt Richard. Process for the preparation of penicillin free mycelium masses from penicillin production cultures formed by fermentation, and the use as animal feeds and fertilizers[P]. United States patent, 4601908, 1986-07-22.
- [10]Banerjee R K, Srinivasan K V. Recycling-Reuse of Penicillin Mycelium as Fish Pond Manure[J]. Biological Wastes, 1988, 23(2):107-116.
- [11]郭夏利. 抗生素菌渣堆肥话处理研究[D]. 郑州: 郑州大学硕士学位论文, 2010.
- [12]龚迎莉, 杨锐明, 嵯玉群. CE-400型元素分析仪测定有机样品中的碳氢氮[J]. 分析仪器, 2012, 01: 31-34.
- [13]陈庭伟, 卢庭斌, 陈永新. 电感耦合等离子体发射光谱法测定蛋白质饲料中微量元素[J]. 现代仪器, 2009, 04: 66-68.
- [14]赵书景. 粮食、饲料中蛋白质含量测定方法的研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2008.
- [15]顾丰颖. α -半乳糖苷酶碳源诱导机制研究及复合酶制剂的开发[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2013.
- [16]国家饲料质量监督检验中心. GB/T6433-2006. 饲料中粗脂肪的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [17]邵金良, 黎其万, 刘宏程, 等. 动物源饲料氨基酸含量的测定与评价[J]. 饲料工业, 2010, 31(1): 426-430.
- [18]中国农科院畜牧所. GB13078-2001. 饲料卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [19]伍国耀, 武振龙, 戴兆来, 等. 猪对“非必需氨基酸”的营养需要[J]. 饲料工业, 2013, 34 (16) : 60-64.

(上接第59页)

预处理工艺可以满足反渗透的进水要求, 可以将浊度控制在0.3NTU以下, SDI小于3。

(2) 采用预处理-反渗透处理系统对乳制品加工废水进行深度处理, COD_{Cr}、TP、硬度的出水指标分别为10、1、和20 mg/L 以下, 完全满足各回用水指标。

(3) 硬度的去除效果良好, 稳定在20 mg/L 以下, 产水率稳定在35%左右, 证明整套装置经过2个月的试验并没有受到污染, 短期内装置不需要进行维护。

(4) 本实验装置反渗透膜为一级两段, 产水率稳定在35%, 在实际工程中增加膜组件的级数和段数可大大提高产水率。

参考文献

- [1]Loeb S, Sourirajan S. High flow porous membranes for separating water from saline solutions[P]. US Patent 3133132, 1964-05-12.
- [2]刘荣娥. 膜分离技术应用手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [3]姜忠英, 夏明芳. 反渗透在水污染控制中的应用[J]. 污染防治技术, 2003, 16(1):21-23.
- [4]Gleick P H, Cooley H, Katz D, et al. The World's Water 2006-2007: The Biennial Report on Freshwater Resources[R]. USA, Chicago: Island Press, 2006:392.
- [5]王树勛, 王立蓉. 反渗透技术研究现状[J]. 甘肃科技, 2005, 21(12):166.
- [6]Bódalo A, Gómez J L, Gómez E, et al. Viability study of different reverse osmosis membranes for application in the tertiary treatment of wastes from the tanning industry[J]. Desalination, 2005, 180(1-3):277-284.
- [7]Ahmad A L, Ibrahim N. Automated electrophoretic membrane cleaning for dead-end microfiltration and ultrafiltration[J]. Separation and purification Technology, 2002, 29(2):105-112.
- [8]Košutić K, Kunst B. RO and NF membrane fouling and cleaning and pore size distribution variations[J]. Desalination, 2002, 150(2):113-120.