

虾壳的微生物转化和菌种的筛选

许 为 群

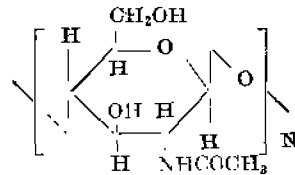
(上海水产大学, 200090)

提 要 从水产品加工场长期堆放虾壳的土壤中, 分离出一株能分解虾壳有较高活力的菌株。对该菌株 (ST90-5) 进行了形态、培养特征、生理生化特性等鉴定, 此菌为放线菌 (*Streptomyces* sp.)^[1]。这一菌株是用甲壳质为唯一碳源的筛选培养基中筛选出来, 培养基成份为 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、甲壳质、微量金属盐。该菌株产酶最适条件为 pH 7、温度 30°C、120r/min 旋转摇床培养 4—7 天。经过发酵的培养液测定 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶和 β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶的活性。

关键词 虾壳, 甲壳质的微生物转化, β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶, β -N-乙酰氨基己糖苷酶

利用虾加工后的废弃物虾壳生产酶、糖等产品一直受到各国研究者的重视^[2-4]。近年来, 分解虾壳成为糖的工艺, 有酸碱水解法和微生物酶的转化法, 二种方法相比较, 后者的转化率、产率、质量和工艺等方面都比前者有明显的优势。尤为突出的是, 用微生物酶转化法不存在由酸碱造成环境的污染问题。酸碱水解法和微生物酶转化法生产糖作为单细胞蛋白质的培养原料^[7]。用微生物分解甲壳质可转化成多种寡糖和酶^[6,8]。本实验采用放线菌分解甲壳质。

甲壳质是由 N-乙酰氨基葡萄糖以 β -1,4 糖苷键聚合成含氮多糖类物质。甲壳质的化学结构式:



微生物分解甲壳质产生 β -N-乙酰氨基己糖苷酶 (β -N-acetylhexosaminidase) 兼有 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (β -N-acetylglucosaminidase) 和 β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶 (β -N-acetylgalactosaminidase) 活力。它从几丁寡糖链的非还原末端切断 β -D-乙酰氨基己糖苷链而释放乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine)。己糖苷酶的应用很广, 是研究糖链结构的有用工具; 它可以分解某些大分子糖的缀合物; 分解甲壳质产生多种寡糖。寡糖能增强人和动物的免疫功能, 可添加在食品中作保健营养食品, 添加在乳品中作婴儿的助长营养剂, 也可作动物饲料和鱼类饵料的营养添加剂。应用微生物酶分解废弃的甲壳质, 开发综合利用了生物资源并且避免了用其他化学法造成的环境污染。本文报道分解甲壳质的微生物菌种筛选、培养、发酵和酶的测定。

材料和方法

(一) 材料来源

菌株采集于水产品加工场长期堆放虾壳的土壤中。

(二) 实验方法

1. 培养基 以甲壳质为唯一碳源的合成培养基。筛选和发酵培养液 (g/L): NaHPO₄ 3; KH₂PO₄ 2; NH₄NO₃ 3; MgSO₄·7H₂O 1; FeSO₄·7H₂O 0.3; CaCl₂·2H₂O 0.3; 甲壳质10; 微量金属盐0.5ml (MoO₃ 4; ZnSO₄·7H₂O 28; CuSO₄·5H₂O 2; H₃BO₃ 4; CaCl₂·6H₂O 4 单位为mg/L)。

2. 菌株分离 将采集的土样经稀释后,分别接入 30ml(250ml 三角烧瓶)筛选培养液中,以六层纱布封口,旋转摇床培养 120r/min,培养温度 30°C,培养时间 4—5 天,取此培养液 10%v/v 接种在 25ml 筛选培养液中,旋转摇床培养 120r/min,培养温度 30—35°C; 培养时间 72 小时,取培养物在平板培养基上划线分离,挑取单菌落观察并在斜面培养基上保存。

3. 发酵培养 40ml 发酵培养液接入菌种,120r/min 旋转摇床培养 4—5 天,培养液离心,除去菌体,上清液为粗酶液。

4. 酶的活性测定 用粗酶液 25μl 二份,分别加对硝基酚 β-N-乙酰氨基葡萄糖(paranitrophenol-β-N-acetylglucose)和对硝基酚 β-N-乙酰氨基半乳糖 (paranitrophenol-β-N-acetylgalactose) 再加 Na₂CO₃ 溶液测定二种酶的活性。

结果与讨论

(一) 菌种筛选

将采集的土样经稀释后接入 10ml 灭菌水中,摇匀,静置 1 分钟,取上清液接入筛选培养基中,分别在不同的温度中摇床培养,120r/min,涂布平板反复纯化,挑取单菌落,获得一株有较高分解甲壳质的菌株 ST90-5。

(二) 培养特征

放线菌 ST90-5 菌株在不同培养基上的培养特征,见表 1。

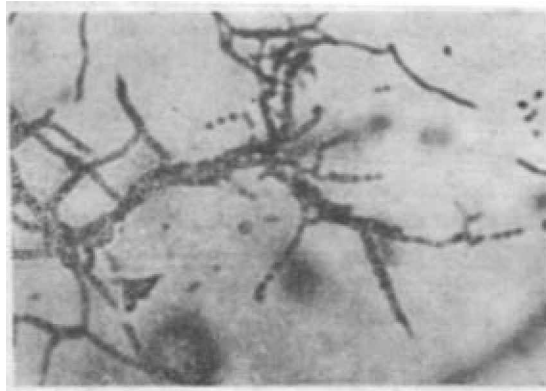
表 1 菌株 ST90-5 在不同培养基上的培养特征
Table 1 Culture characteristics of strain ST90-5

琼脂培养基	生长	气生菌丝体	基质菌丝体	可溶性色素
甲壳质合成	良	淡灰白	淡棕	无
高氏一号	良	淡灰白	棕	无
蔗糖察氏	良	灰	淡棕	微棕
葡萄糖-天门冬	良	淡	淡棕	无
马铃薯	良	淡	淡棕	淡茶色
燕麦粉	差	淡	棕	无
蛋白胨	良	淡	淡棕	无
酵母膏	差	淡灰白	淡棕	无
无机盐淀粉	良	淡灰	灰白	无

(三) 个体形态特征

在甲壳质合成培养基上的形态。

基质菌丝体分枝波曲,气生菌丝体形成波曲形孢子丝,见图版。



图版 ST90-5 菌株的孢子丝(400×)
Plate Sporophores of strain ST 90-5(400×)

(四) 生理生化特征

ST90-5 菌株的生理生化特征,见表 2。

表 2 ST90-5 菌株的生理生化特征
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of ST90-5 strain

特 征	ST90-5 菌株
生长温度范围	25—35℃
明胶液化	+
淀粉水解	+
色素生成	+
pH	7 左右
脱脂乳凝固	+
H ₂ S 产生	+

(五) 发 酵

菌种接入发酵培养液,在 30°C 96hr 旋转摇床培养。培养液经离心,取上清液即粗酶液。

(六) 酶的活性测定^[5]

取酶液 25μl 二份,一份加 2mmol/L 对硝基酚 β-N-乙酰氨基葡萄糖 25μl,另一份加对硝基酚 β-N-乙酰氨基半乳糖 25μl,50°C 保温 15min,分别加 1mol/L Na₂CO₃ 50μl,呈黄色,为阳性反应。

放线菌是分解甲壳质的微生物之一,在工业上占重要地位。研究虾壳的微生物分解,对于开发生物资源和环境保护具有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组,1975。链霉菌鉴定手册,33—37。科学出版社(京)。
- [2] Bennett, C.B. and M. A., Hood, 1980. Effects of cultural conditions on the production of chitinase by a strain of *Bacillus megaterium*. *Developments in Industrial Microbiology*, Vol.21. Washington, American Institute of Biological Sciences.
- [3] Carroad, P. A. and R. A., Tom, 1978. Bioconversion of shellfish chitin wastes: process conception and selection of microorganisms. *Food Sci.*, 43(4): 1158.
- [4] Ignacio, G. C., 1982. Bioconversion of shellfish chitin waste: Waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis. *J. Food Sci.*, 47: 901—905.
- [5] Li, Yu-teh *et al.*, 1972. *Methods in enzymology*, 24(B): 702—713. Academic Press, Inc., New York.
- [6] Reid, J. D. and D. M., Ogrzydziak, 1981. Chitinase-overproducing mutant of *Serratia marcescens*. *Applied & Environmental Microbiol.*, 41(3): 664.
- [7] Revah-Moiseev, S and P. A. Carroad, 1981. Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to singer-cell protein. *Biotechnology & Bioengineering*, 23: 1067.
- [8] Tom, R. A. and P. A. Carroad, 1981. Effect of reaction conditions on hydrolysis of chitin by *Serratia marcescens* QMB 1466 chitinase. *J. Food Sci.*, 46: 646.

MICROBIAL CONVERSION OF SHRIMP SHELL CHITIN AND ENZYME PRODUCTION

Xu Weiqun

(Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT A strain of Actinomycetes which possesses chitinase activity was isolated from a sample of mud in seafood processing factory. It grows at temperature 30°C and at pH 7. Chitin are utilized as the only source of carbon for *Streptomyces* sp. This Actinomycete was shake cultured in a media containing chitin, salts and trace metal salts at 30°C for 72—96 hr. The results showed that the β -N-acetylglucosaminidase and β -N-acetylgalactosaminidase coexisted in this strain.

KEYWORDS Microbial conversion, shrimp shell chitin, β -N-acetylgalactosaminidase, β -N-acetylglucosaminidase, N-acetylglucosamine