

◆特邀栏目◆

几丁质降解菌的筛选及其降解虾壳废弃物的研究^{*}陈建荣¹, 徐雨茶¹, 阳丽艳¹, 黄艳冰², 杨登峰², 潘丽霞^{1**}

(1. 广西科学院, 非粮生物质能技术全国重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西科学院, 广西海洋科学院(广西红树林研究中心), 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室, 广西南宁 530007)

摘要: 虾蟹壳废弃物产量的日益增加造成了巨大的资源浪费和严重的环境污染。为了提高虾蟹壳废弃物的综合利用价值, 本研究从土壤中筛选出几丁质高效降解菌, 并通过单因素试验探究降解虾壳的最佳条件及其对虾壳的降解能力。利用胶体几丁质为唯一碳源, 采用平板透明圈法对来源于喀斯特地貌的土壤微生物进行富集、分离和纯化, 获得了4株具有几丁质降解活力的菌株: 粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* gxas3、蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* gxas5、嗜麦芽糖窄食单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia* gxas7 以及水生几丁质降解菌 *Chitinilyticum aquatile* gxas1。其中 *C. aquatile* gxas1 在96 h时达到最大粗酶活力0.244 U/mL, 优于其他3株菌株。利用单因素试验探究 *C. aquatile* gxas1 降解虾壳废弃物的能力, 并优化其培养基和培养条件, 最终确定最佳产酶培养基为果糖2 g/L、KH₂PO₄ 0.7 g/L、K₂HPO₄ 0.3 g/L、MgSO₄ · 6H₂O 0.6 g/L、酵母粉0.5 g/L、牛肉膏4 g/L、蛋白胨4 g/L。最佳发酵条件为接种量2.0%、pH值8.0、温度20℃、发酵时间9 d。在最佳发酵条件下, *C. aquatile* gxas1 对虾壳废弃物达到最大降解率60%, 其中脱蛋白率为76.77%, 几丁质回收率为87%。该研究为微生物降解虾蟹壳废弃物提供了重要的理论依据。

关键词: 微生物降解; 几丁质; 虾蟹壳废弃物; 几丁质降解菌; 水生几丁质菌 gxas1

中图分类号: TS254.9 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2023)04-0452-09

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyb.20231226.012

虾蟹是世界渔业生产的重要产品, 近年来每年虾蟹总产量高达1 000万吨, 虾蟹在剥离可食部分后会产生大量固体废弃物, 包括头部、壳体和尾部^[1], 这些固体废弃物在生产和消费过程中不可避免。然而, 这

些废弃物在环境保护和资源利用方面具有巨大的潜力。虾壳中含有约50%的蛋白质、20%的几丁质以及天然抗氧化剂虾青素等有价值的组分, 这些组分在虾壳中相互紧密结合, 不能被动物有效消化吸收利

收稿日期: 2023-09-11 修回日期: 2023-10-07

^{*} 国家自然科学基金项目(31960203), 广西科技基地和人才专项(桂科 AD23023007)和广西创新驱动发展专项重大科技创新基地建设项目“非粮生物质酶解国家重点实验室”(2022-36-Z06)资助。

【第一作者简介】

陈建荣(1999-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事海洋资源利用相关酶的功能与结构研究, E-mail: 17861506571@163.com。

【**通信作者简介】

潘丽霞(1981-), 女, 研究员, 主要从事工业用酶结构生物学研究, E-mail: panlixia@gxas.cn。

【引用本文】

陈建荣, 徐雨茶, 阳丽艳, 等. 几丁质降解菌的筛选及其降解虾壳废弃物的研究[J]. 广西科学院学报, 2023, 39(4): 452-460.

CHEN J R, XU Y C, YANG L Y, et al. Screening of Chitin-degrading Bacteria and the Study of Their Efficient Degradation of Shrimp Shell Waste [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2023, 39(4): 452-460.

用^[1,2]。传统的强酸碱等加工工艺破坏了虾蟹壳中的蛋白质和其他有价值组分,会造成严重的环境污染和生物资源浪费^[3]。在一些发达国家,处理虾蟹壳废弃物花费了高昂的成本^[4]。因此,如何综合利用虾蟹壳废弃物是亟需解决的问题,同时,如何降解动物难以消化吸收的几丁质为高值的益生几丁寡糖也是当今研究的热点之一。

几丁质,又称甲壳素,是一种含氮多糖,由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖(N-Acetyl-D-glucosamine, GlcNAc)聚合而成,它是自然界中除纤维素外的第二大生物物质,在甲壳类动物的外骨骼和大多数真菌的细胞壁中存在^[5]。与纤维素等多糖不同,几丁质是 N-乙酰-D-氨基葡萄糖经 β -1,4 糖苷键聚合形成的含氮多糖,地球上几丁质的含氮量超过人类通过 Haber-Bosch 方法(氮肥合成的方法)固定的氮气总量,其产物 N-乙酰-D-氨基葡萄糖及几丁寡糖具有较好的生理功能。在哺乳动物中,N-乙酰-D-氨基葡萄糖是透明质酸和关节滑液合成的重要前体^[6]。近年来的研究还发现蛋白质(包括转录因子)存在 N-乙酰葡萄糖胺修饰,并调控了众多的免疫激活、代谢调节等通路,这些机制赋予了几丁寡糖丰富的生物学活性,包括美颜、缓解关节炎、血糖调节、抗肿瘤和抗炎作用等^[7-9]。因此,越来越多的人开始关注几丁质及其水解产物的价值。

目前工业上对虾蟹壳废弃物的利用主要是通过化学法去除虾蟹壳废弃物中的矿物质和蛋白质,再生产几丁质、壳聚糖和几丁寡糖等物质。Percot 等^[10]对现有化学法生产几丁质的条件进行了优化,最终获得了脱矿度和脱蛋白度都很高的几丁质,但是处理过程中仍然会大量使用盐酸和氢氧化钠,不仅对环境造成严重污染,而且导致几丁质 N-乙酰值的变化从而影响产品品质。为了解决化学法降解虾蟹壳中蛋白质等物质存在的问题,人们开始利用酶法和微生物法降解虾蟹壳。酶法包括使用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和消化酶等,但酶的成本较高、提取效率低。微生物法主要通过发酵过程中微生物产生的蛋白酶和有机酸实现脱蛋白和脱矿,从而使几丁质暴露出来^[3,7,11]。

微生物处理法的优点在于实现资源重新利用的同时不会产生过多对环境有害的物质,这种方法有潜力解决虾蟹壳废弃物处理的问题。然而,目前微生物处理法还处在探索阶段,限制了其实际应用。此外,微生物降解虾蟹壳涉及的过程也相对复杂,需要进一步研究和优化^[8,12]。因此,本研究旨在寻找能够高效

降解虾蟹壳的微生物,有效地将虾蟹壳废弃物转化为有用的产物,如生物肥料、动物饲料或生物能源;优化目标微生物降解虾蟹壳废弃物的降解条件,实现虾蟹壳废弃物的综合利用,减轻对环境的负荷。因此,研究虾蟹壳降解微生物对资源利用和环境保护都具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试剂和原料

虾壳为温州洞头特产虾壳(购自洞头特产渔夫之家淘宝店),50 °C 烘箱烘干剪碎后过 40 目筛,灭菌烘干备用。

1.2 菌种土样来源

将新鲜的土样样品活化并筛选出能高效降解几丁质的细菌。这些土样样品分别从广西河池市天峨县川洞,巴马瑶族自治县长寿村,盘阳河流域,都安瑶族自治县桃花水母天窗、九灵天窗,百色市乐业石围天坑群等地采集。

1.3 培养基配方

配方中含有糖的培养基灭菌温度为 115 °C,时间为持续 15 min;而其他培养基的灭菌温度为 121 °C,时间为持续 20 min。

(1)液体富集培养基 1 000 mL: FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.6 g, 胶体几丁质 10 g, K₂HPO₄ 0.7 g, KH₂PO₄ 0.3 g, 初始 pH 值 7.0。

(2)分离培养基 1 000 mL: K₂HPO₄ 0.3 g, NaCl 0.1 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, NH₄Cl 0.1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 0.7 g, 胶体几丁质 10 g, 琼脂 15-20 g, 初始 pH 值 7.0。

(3)种子培养基 1 000 mL: 葡萄糖 4 g, KH₂PO₄ 0.7 g, K₂HPO₄ 0.3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.6 g, 酵母粉 2 g, 蛋白胨 2 g, pH 值 7.0。

(4)发酵培养基 1 000 mL: 果糖 2 g, KH₂PO₄ 0.7 g, K₂HPO₄ 0.3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.6 g, 酵母粉 0.5 g, 牛肉膏 4 g, 蛋白胨 4 g, 初始 pH 值 8.0。

1.4 富集培养

取 1 g 土壤样品加入 30 mL 无菌水中,30 °C、200 r/min 培养 6 h,充分混合后,取上清液置于富集培养基中,30 °C、150 r/min 恒温摇床下培养 3 d,得到富集的菌样。

1.5 几丁质降解菌的筛选与纯化

平板透明圈法是筛选几丁质菌的一种高效方法,即在固体培养基中加入溶解性差、可被微生物利用的

营养成分,造成浑浊、不透明的培养基背景,待筛选的菌落附近就会形成透明圈,透明圈的大小反映了菌落降解此物质的能力^[13,14]。吸取富集菌的培养液按 $10^{-3} - 10^{-4}$ 梯度稀释后,每个稀释梯度取 100 μL 均匀地涂覆在分离培养基中并于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养,定期观察。挑取菌落周围出现透明圈较大的菌落进行 4 区划线纯化。

1.6 菌株的鉴定

以 27F 和 1492R 作为引物,以菌体作为模板。按表 1 配制成 25 μL 的体系后进行 PCR 反应扩增并对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。选出有目的片段的 PCR 产物,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果提交美国国家生物技术信息中心(NCBI)官网上的 BLAST 对 16S rDNA 序列进行分析,确定菌株的分类地位。实验使用 25 μL 体系进行 PCR 扩增,程序建立如表 2 所示,反应共 30 个循环。

表 1 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system

添加物 Additive	用量/ μL Amount/ μL
DNA templates	1.0
Forward primer 27F	1.0
Reverse primer 1492R	1.0
ddH ₂ O	9.5
2 \times Taq Master Mix	12.5

表 2 PCR 程序

Table 2 PCR procedure

程序 Procedure	温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	时间 Time
Pre-denaturation	95	15 min
Denaturation	95	30 s
Annealing	50	30 s
Extend	72	90 s
Post-extension	72	10 min

1.7 产几丁质酶菌种直径比的测定

将筛选到的菌种接种于种子培养基中,25 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 12 h,用牙签蘸取少量菌液接种于分离培养基中并于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养,定期测量透明圈和菌株的大小,并通过两者的比值确定该菌株的直径比。

1.8 几丁质粗酶活力测定

几丁质酶可水解几丁质的 β -1,4-糖苷键并生成还原糖,本研究利用二硝基水杨酸(DNS)法^[15]测定几丁质酶活力,以 N-乙酰-D-氨基葡萄糖为底物,测定不同底物浓度在 540 nm 处的吸光度,绘制标准曲

线。利用含有以胶体几丁质为唯一碳源的富集培养基,选择直径比较大的几株菌进行粗酶活力测定,比较其酶活力大小并进一步选择酶活力较高的菌株探究其对虾壳的降解能力。反应体系:离心后的发酵液上清液 100 μL 和 400 μL 胶体几丁质,反应温度为 45 $^{\circ}\text{C}$,反应时间为 30 min,水浴结束后沸水浴 10 min 终止反应,加入 500 μL 的 DNS 溶液,沸水浴中反应 5 min,冰水冷却至室温后 12 000 r/min 离心 3 min,于 540 nm 处测量吸光度。通过标准曲线求出其还原糖含量。酶活力定义为在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 7 的条件下,每分钟生成 1 μmol 还原糖所需酶量。

1.9 产几丁质酶菌株降解虾壳条件的优化

取虾壳烘干并剪碎后过 40 目筛,灭菌后烘干备用。将 *C. aquatilis* gxa1 菌种接种于种子培养基中,25 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 12 h,接种于 100 mL 发酵培养基中,培养 24 h 后,按照 2% 的添加量加入过筛后的虾壳进行发酵试验条件优化,通过不同培养条件发酵后虾壳的损耗量选择最佳培养条件。

1.9.1 氮源对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响

以不加虾壳废弃物的发酵培养基为对照组,在温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 7 的发酵条件下发酵 7 d,选择牛肉膏(0.8%)、蛋白胨(0.8%)、麦芽提取物(0.8%)以及牛肉膏+蛋白胨(0.4%+0.4%)作为氮源,探究不同氮源对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响,每组设 3 个平行样,其他培养基成分为葡萄糖 2 g/L, KH₂PO₄ 0.7 g/L, K₂HPO₄ 0.3 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.6 g/L,酵母粉 0.5 g/L。

1.9.2 碳源对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响

在温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 7 的发酵条件下发酵 7 d,选择葡萄糖、果糖、蔗糖以及麦芽糖作为碳源探究不同碳源对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响,每组设 3 个平行样,其他培养基成分为 KH₂PO₄ 0.7 g/L, K₂HPO₄ 0.3 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.6 g/L,酵母粉 0.5 g/L,牛肉膏 4 g/L,蛋白胨 4 g/L。

1.9.3 发酵时间对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响

在温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 7 的发酵条件下,确定最优碳源和氮源后,设置发酵时间分别为 3、5、7、9 d,每组设 3 个平行样,探究不同发酵时间对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响。

1.9.4 发酵温度对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响

在 pH 值为 7、最优碳源和氮源的发酵条件下发

酵9 d, 设置发酵温度分别为20、25、30、37℃, 每组设3个平行样, 探究发酵温度对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响。

1.9.5 发酵接种量对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响

在温度为20℃、pH值为7、最优碳源和氮源的发酵条件下发酵9 d, 设置发酵接种量分别为0.2%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%, 每组设3个平行样, 探究发酵接种量对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响。

1.9.6 初始pH值对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响

在温度为20℃、最优碳源和氮源、接种量为2.0%的条件下发酵9 d, 设置发酵初始pH值分别为6.0、7.0、7.2、8.0, 每组设3个平行样, 探究初始pH值对产几丁质酶菌株降解虾壳能力的影响。

1.10 虾壳降解率的测定

称取经过发酵处理或未经发酵处理的虾壳0.2 g, 烘干, 称重, 得到经过发酵处理或未经发酵处理的干虾壳的重量, 根据公式计算发酵处理后虾壳的降解率。计算公式如下:

$$X(\%) = (m_0 - m) / m_0 \times 100\%$$

式中, X 为虾壳的降解率, m_0 为未经发酵处理的干虾壳的质量, m 为经过发酵处理的干虾壳的质量。

1.11 微生物降解虾壳过程中的生长曲线及pH值变化

将 *C. aquatilis* gxa1 菌种接种于种子培养基中, 30℃、160 r/min 培养24 h, 得到活化菌液。取活化菌液以2.0%接种量接种于100 mL 发酵培养基中培养24 h后得到菌液, 在所得菌液中加入2 g 虾壳, 20℃发酵培养9 d, 每12 h取发酵液, 检测发酵液的 OD_{600} 和pH值。

1.12 蛋白质含量测定

在最佳条件下发酵, 发酵结束后, 离心, 弃上清, 沉淀为样品虾壳。以未经过发酵处理的相同质量的虾壳为对照, 利用凯氏定氮法^[16]检测两种虾壳中蛋白质的含量。具体检测方法: 将虾壳(经过发酵处理的样品虾壳或未经过发酵处理的虾壳)分别用15 mL 1 mol/L NaOH 处理4 h(搅拌2 h, 60℃干燥箱放置2 h)进行脱蛋白处理, 处理结束后12 000 r/min 离心10 min, 取上清液作液体样品; 用等量的1 mol/L NaOH 为空白对照; 在实验组和空白对照组分别加入3 g 催化剂(硫酸铜和硫酸钾)和10 mL 浓硫酸进行消化, 然后放入消化炉中, 盖上漏斗盖子, 同时打开

水阀循环吸收气体; 冷却之后将50 mL 水倒入消化管中(加水前先将样品摇匀), 然后每个管加入过量NaOH; 打开自动定氮仪, 首先用水清洗一遍管子, 然后开始过样品, 同时放置装有硼酸的接收瓶(每个样5 min), 最后在装有硼酸的接收瓶里加入指示剂进行盐酸滴定、空白滴定, 液体颜色由蓝变红即为滴定终点。计算公式如下:

$$X = [(V_1 - V_2) \times c \times 0.014] / m \times F \times 100,$$

式中, X 为蛋白质含量, V_1 为空白对照滴定消耗的标准溶液(mL), V_2 为样品滴定消耗的标准溶液(mL), c 为盐酸标准溶液的浓度(mol/L), m 为样品质量(g), 0.014 为氮的毫摩尔质量(g/mmol), F 为蛋白质系数, 100 为单位换算系数。根据公式计算脱蛋白率。

脱蛋白率(%) = (未经发酵处理的虾壳中蛋白质的含量 - 样品虾壳中蛋白质的含量) / 未经发酵处理的虾壳中蛋白质的含量 × 100%。

1.13 几丁质含量的测定

根据张恒^[17]的方法提取几丁质。分别称取经过发酵处理或未经发酵处理的虾壳0.2 g 与15 mL 1 mol/L NaOH 溶液混合后放到搅拌器上搅拌30 min, 接着放入干燥箱内干燥2.5 h, 重复两次; 然后离心机离心(12 000 r/min、5 min), 倒掉上清后用水将虾壳反复离心清洗至中性; 再取15 mL 2 mol/L HCl 溶液和虾壳一起倒入小烧杯中常温搅拌3 h, 结束后离心机12 000 r/min 离心5 min, 弃上清液并用去离子水反复冲洗并离心, 直至pH为中性, 最后放入干燥箱内干燥后称重, 得到经过发酵处理或未经发酵处理的虾壳中几丁质的含量。其中用NaOH和HCl溶液处理的目的是分别去除虾壳中的蛋白质和钙离子。计算几丁质的回收率。

几丁质的回收率(%) = (未经发酵处理的虾壳中几丁质的含量 - 经发酵处理的虾壳中几丁质的含量) / 未经发酵处理的虾壳中几丁质的含量 × 100%。

2 结果与分析

2.1 几丁质降解菌的筛选及其分离纯化

样品经富集培养、分离纯化后得到了4株具有降解几丁质能力的细菌。表3是经过筛选得到的4株菌株的测序鉴定结果, 其中粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* gxa3 与 *S. marcescens* strain 27F 相似性为98.41%, 蜡样芽孢杆菌 *B. cereus* gxa5 与 *B. cereus* strain NS26 相似性为99.36%, 嗜麦芽糖窄食

单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia* gxa57 与 *S. maltophilia* strain BF4-4 相似性为 99.45%，水生几丁质菌 *C. aquatile* gxa51 与 *C. aquatile* strain PS4R-81 相似性为 97.5%。

表 3 菌株测序鉴定结果

Table 3 Results of sequencing identification of strains

菌株 Strains	相似菌株 Similar strains	相似性/% Similarity/%
<i>Serratia marcescens</i> gxa53	<i>S. marcescens</i> strain 27F	98.41
<i>B. cereus</i> gxa55	<i>B. cereus</i> strain NS26	99.36
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> gxa57	<i>S. maltophilia</i> strain BF4-4	99.45
<i>C. aquatile</i> gxa51	<i>C. aquatile</i> strain PS4R-81	97.50

2.2 菌落透明圈及粗酶活力测定

如表 4 所示, *B. cereus* gxa55 的直径比最大, 为 4.8, 其次为 *C. aquatile* gxa51 和 *Serratia marcescens* gxa53, *Stenotrophomonas maltophilia* gxa57 最小。

表 4 菌落透明圈直径

Table 4 Diameter of colony transparent circle

菌株 Strains	透明圈直径 (D)/mm Diameter of transparent circle (D)/mm	菌落直径 (d)/mm Colony diameter (d)/mm	D/d
<i>Serratia marcescens</i> gxa53	34	15.0	2.27
<i>B. cereus</i> gxa55	12	2.5	4.80
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> gxa57	17	16.5	1.03
<i>C. aquatile</i> gxa51	29	12.5	2.32

选择 *B. cereus* gxa55、*Serratia marcescens* gxa53 和 *C. aquatile* gxa51 进行粗酶活力测定, 探究不同菌株的产酶情况, 结果如图 1 所示。这 3 株菌在不同时期其产酶活力也不同, 其中 *S. marcescens* gxa53 在发酵 72 h 时粗酶活力最高, 达到 0.20 U/mL; *B. cereus* gxa55 在发酵 36 h 时粗酶活力最高, 达到 0.158 U/mL; *C. aquatile* gxa51 在发酵 96 h 时粗酶活力最高, 达到 0.244 U/mL。

2.3 虾壳最适降解发酵条件优化

2.3.1 氮源的优化

氮源对发酵降解虾壳废弃物的降解率如图 2 所示。采用菌株 *C. aquatile* gxa51 处理虾壳, 培养基以牛肉膏 + 蛋白胨为氮源时的降解能力最强, 为 48%, 比牛肉膏、蛋白胨和麦芽提取物分别高 4%、4% 和

2%, 因此选择牛肉膏 + 蛋白胨 (0.4% + 0.4%) 为发酵氮源。

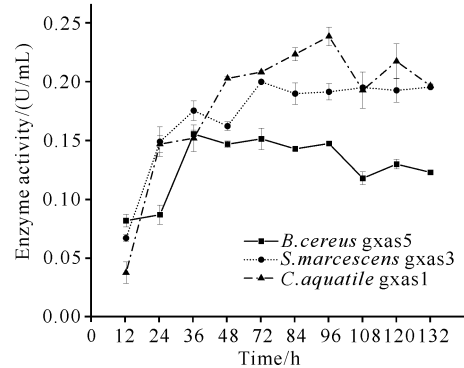


图 1 几丁质高效降解菌株粗酶活力

Fig. 1 Crude enzyme activity of chitin-degrading strain

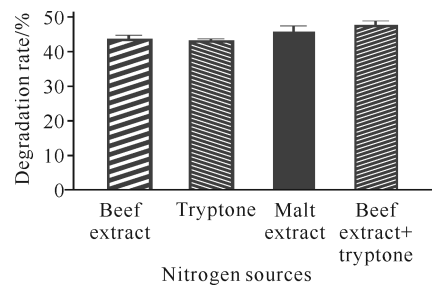


图 2 氮源对虾壳降解的影响

Fig. 2 Effects of nitrogen sources on shrimp shell degradation

2.3.2 碳源的优化

由图 3 可知, 4 种碳源对菌株 *C. aquatile* gxa51 的产量和生长状况的影响存在差异, 其中以果糖作为碳源为 *C. aquatile* gxa51 提供能量时对虾壳的降解率最高, 为 50%, 而以麦芽糖和葡萄糖作为碳源时对 *C. aquatile* gxa51 的影响较大, 其中蔗糖对虾壳的降解率最低, 为 37%。因此选择果糖作为发酵培养基的碳源。

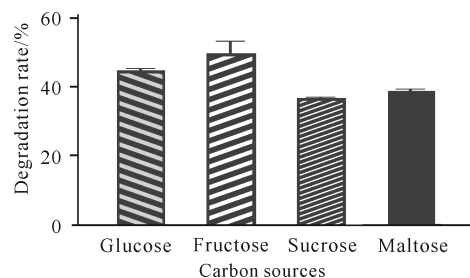


图 3 碳源对虾壳降解的影响

Fig. 3 Effects of carbon sources on shrimp shell degradation

2.3.3 发酵时间的优化

发酵时间对虾壳降解影响较大。如图4所示,当菌株 *C. aquatilis* gxa1 对虾壳发酵到第9 d时,降解能力最优。

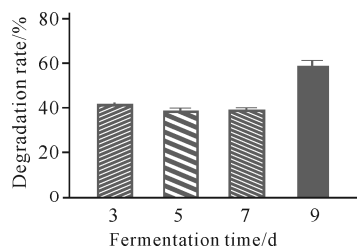


图4 发酵时间对虾壳降解的影响

Fig. 4 Effects of fermentation time on shrimp shell degradation

2.3.4 发酵温度的优化

发酵温度对虾壳降解的影响如图5所示。当温度为20℃时,菌株 *C. aquatilis* gxa1 对虾壳的降解能力最优。

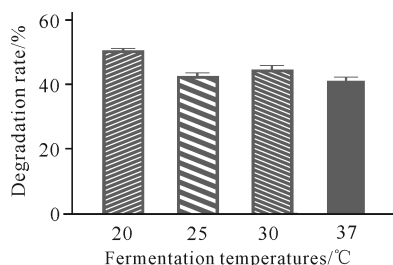


图5 发酵温度对虾壳降解的影响

Fig. 5 Effects of fermentation temperatures on shrimp shell degradation

2.3.5 发酵接种量的优化

发酵接种量对虾壳降解的影响如图6所示。当发酵接种量为2.0%时,菌株 *C. aquatilis* gxa1 对虾壳的降解能力最强;当菌液接种量小于2.0%时, *C. aquatilis* gxa1 对虾壳的降解能力有所下降。因此,采用 *C. aquatilis* gxa1 降解虾壳时,最佳菌液接种量为2.0%。

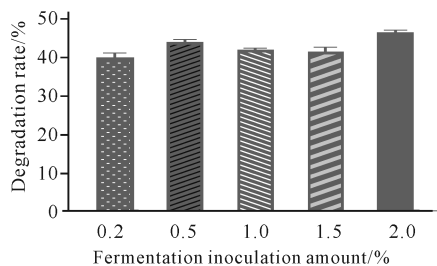


图6 发酵接种量对虾壳降解的影响

Fig. 6 Effects of fermentation inoculation amount on shrimp shell degradation

2.3.6 发酵培养基初始pH值的优化

微生物在生长代谢过程中会引起培养环境pH值的变化,pH值过高或过低都会影响其进一步的生长。如图7所示,当发酵培养基初始pH值分别为6.0、7.0、7.2、8.0时,菌株 *C. aquatilis* gxa1 对虾壳的降解能力差别较小。当初始pH值为8.0时, *C. aquatilis* gxa1 对虾壳的降解能力最强,为46%。

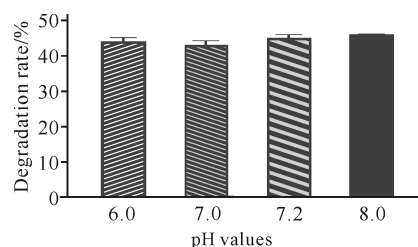


图7 发酵培养基初始pH值对虾壳降解的影响

Fig. 7 Effects of initial pH values of fermentation media on shrimp shell degradation

2.4 菌株 *C. aquatilis* gxa1 降解虾壳过程中的生长状况及pH值变化

如图8所示, *C. aquatilis* gxa1 在降解虾壳过程中, OD_{600} 值在加入虾壳的第1天至第2天呈快速上升趋势,第2天至第7天缓慢上升,菌株生长趋于稳定。如图9所示,pH值在加入虾壳的前两天呈快速上升趋势,之后呈缓慢上升趋势。

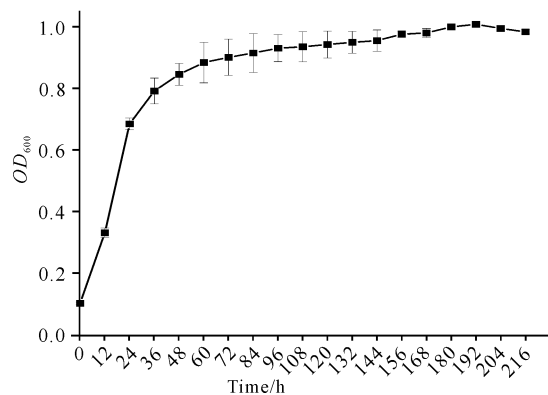


图8 菌株 *C. aquatilis* gxa1 降解虾壳的生长曲线

Fig. 8 Growth curve of strain *C. aquatilis* gxa1 in the treatment of shrimp shell

2.5 菌株 *C. aquatilis* gxa1 发酵虾壳最优试验

单因素优化试验得出, *C. aquatilis* gxa1 发酵虾壳试验最优发酵培养基碳源为果糖、氮源为牛肉膏+蛋白胨,最优发酵条件初始pH值为8.0、接种量为2.0%、发酵天数为9 d、发酵温度为20℃。在最优条件下进行菌株降解虾壳试验,最终得出 *C. aquatilis* gxa1 对虾壳的降解率为60%,其中几丁质回收率为87%、脱蛋白率为76.77%。

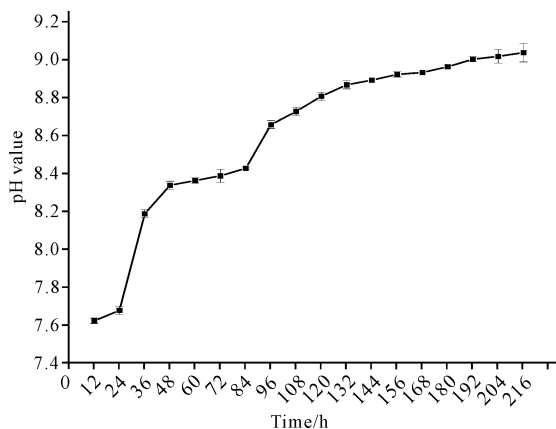


图9 菌株 *C. aquatile gxas1* 降解虾壳的 pH 值变化曲线

Fig. 9 pH value variation curve of strain *C. aquatile gxas1* in the treatment of shrimp shell

3 讨论

与传统对环境污染严重的化学法和能耗高的物理法相比,利用微生物发酵法降解虾蟹壳废弃物中的几丁质和蛋白质是一种更绿色环保、成本更低的方法,可进一步作为未来实现绿色降解虾蟹壳废弃物的方向。本研究筛选到一株能够降解几丁质的菌株 *C. aquatile gxas1* 并探究其降解虾蟹壳的能力。通过单因素优化试验确定了培养基的最佳碳源为果糖(0.2%),最佳氮源为牛肉膏+蛋白胨(0.4%+0.4%);最优发酵条件初始 pH 值为 8.0,接种量为

表5 微生物降解虾壳国内外研究

Table 5 Domestic and foreign research on microbial degradation of shrimp shell

菌株 Strains	几丁质 得率/% Chitin yield/%	几丁质 回收率/% Chitin recovery rate/%	脱蛋白率/% Deproteini- zation rate/%	脱矿率/% Deminerali- zation rate/%	发酵时间/d Fermen- tation time/d	参考文献 References
<i>C. aquatile gxas1</i>		87	76.77		9	This study
<i>Lactobacillus fermentum</i>		16.3	89.48	85.11	4	[20]
<i>Serratia marcescens</i> B742 and <i>L. plantarum</i> ATCC 8014	18.90		94.50	93	6	[21]
<i>Bacillus subtilis</i> and <i>A. pas- teurianus</i>	18		94.50	92	5	[22]
<i>L. rhamnoides</i> and <i>B. amyloliq- uefaciens</i>	19.60		96.80	97.50	5.5	[23]
<i>B. subtilis</i>		93.00	84	72	15	[24]
<i>Exiguobacterium profundum</i> and <i>L. acidophilus</i>	16.32	47.82	85.9±1.2	95±3	5	[25]

Note: chitin yield indicates the residual chitin content after fermentation of shrimp and crab shells by microbial fermentation, chitin recovery rate indicates the ratio of the residual chitin in the shrimp shell after degradation to the chitin content in the shrimp shell before degradation.

本研究只测定了菌株 *C. aquatile gxas1* 发酵虾壳后的蛋白质和几丁质含量变化,其脱矿率及产物等仍需要进一步分析。除此之外,连续发酵或共发酵也

2.0%,培养温度为 20℃。在上述最优条件下,菌株 *C. aquatile gxas1* 在第 9 d 时达到虾壳最大降解率 60%,其中,脱蛋白率为 76.77%,几丁质回收率为 87%,优于铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*^[18]、植物乳杆菌和苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis*^[19]。表 5 列举了近年来微生物降解虾壳废弃物的一些研究。Li 等^[20]利用发酵乳杆菌 *L. fermentum* 使虾壳脱蛋白率、脱矿率以及几丁质回收率分别为 89.48%、85.11%和 16.30%。菌酶连用、连续发酵或共发酵可提高虾壳的脱蛋白率和脱矿率。Zhang 等^[21]利用 *S. marcescens* B742 和 *L. plantarum* ATCC 8014 对虾壳进行处理,虾壳的脱矿率和脱蛋白率分别为 93%和 94.50%。Zhang 等^[22]采用枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 和巴氏醋杆菌 *A. pasteurianus*、Liu 等^[23]采用鼠李糖乳杆菌 *L. rhamnoides* 和戊酸芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 对虾壳进行共发酵,虾壳的脱矿率和脱蛋白率均达到 90%以上。影响微生物降解虾壳的因素主要包括发酵 pH 值、接种量、温度、预处理和发酵时间等。严金红等^[26]研究发现,不同有机酸对虾壳的软化程度不同。Rao 等^[27]通过调节发酵初始 pH 值以及调节发酵过程中糖的添加量,发现发酵过程中 pH 值的变化对虾壳中灰分和蛋白质的去除有较大影响。

被用于降解虾壳,未来仍需进一步探究 *C. aquatile gxas1* 与其他菌株连续发酵或共发酵对虾壳降解率的影响,为微生物降解虾蟹壳提供理论依据。

4 结论

对来源于广西河池市和百色市的土壤进行富集培养,分离纯化后得到4株能够降解几丁质的菌株 *Serratia marcescens* gxa3、*B. cereus* gxa5、*Stenotrophomonas maltophilia* gxa7 以及 *C. aquatilis* gxa1。对 *Serratia marcescens* gxa3、*B. cereus* gxa5 以及 *C. aquatilis* gxa1 进行粗酶活力测定发现 *C. aquatilis* gxa1 的酶活力在 96 h 时最高,为 0.244 U/mL。

利用 *C. aquatilis* gxa1 对虾壳进行降解,通过对比处理前后虾壳的干重以及蛋白质、几丁质含量的变化发现 *C. aquatilis* gxa1 对虾壳具有较好的降解能力。利用单因素试验对发酵培养基和发酵条件进行优化,结果显示 *C. aquatilis* gxa1 发酵虾壳的最优条件是以果糖(0.2%)作为碳源、牛肉膏+蛋白胨(0.4%+0.4%)作为氮源,发酵温度为 20℃、培养基初始 pH 值为 8.0、接种量为 2.0%,在此条件下发酵 9 d 时 *C. aquatilis* gxa1 对虾壳的降解率最大,为 60%,其中脱蛋白率为 76.77%,几丁质回收率为 87%。研究结果表明,在优化条件下, *C. aquatilis* gxa1 对虾壳具有较好的降解能力,可以用于废弃虾蟹壳的资源化利用,为实现绿色降解虾蟹壳废弃物提供了研究思路。本研究结果将有助于减少虾蟹壳废弃物对环境的污染,促进虾蟹养殖业的可持续发展。

参考文献

- [1] 邓俊劲. 新型蛋白酶及几丁质酶的开发及其在虾加工废弃物中的应用[D]. 广州:华南理工大学,2020.
- [2] 刘宇,方国宏,戎素红,等. 虾、蟹壳利用的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(3):461-466.
- [3] 张荣,凌晓宁,李昆太. 微生物降解角蛋白机制及角蛋白酶应用研究进展[J]. 生物灾害科学,2020,43(4):331-337.
- [4] 刘妍池. 设计人工“几丁质小体”降解几丁质[D]. 保定:河北农业大学,2019.
- [5] 王艳君. 海洋假交替单胞菌属细菌降解几丁质的特性及新型几丁质酶的表达[D]. 济南:山东大学,2020.
- [6] 常艺锦. N-乙酰-D-氨基葡萄糖水凝胶修复软骨损伤的机制研究[D]. 锦州:锦州医科大学,2022.
- [7] LEE C G. Chitin, chitinases and chitinase-like proteins in allergic inflammation and tissue remodeling [J]. *Yonsei Medical Journal*, 2009, 50(1): 22-30.
- [8] YOUNES I, RINAUDO M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications [J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(3): 1133-1174.
- [9] 解鑫. N-乙酰-D-氨基葡萄糖的制备及其抗氧化性研究[D]. 大连:大连工业大学,2010.
- [10] PERCOT A, VITON C, DOMARD A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells [J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4(1): 12-18.
- [11] TASER B, OZKAN H, ADIGUZEL A, et al. Preparation of chitosan from waste shrimp shells fermented with *Paenibacillus jamilae* BAT1 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 183: 1191-1199.
- [12] CHEONG J Y, MUSKHAZLI M, NOR AZWADY A A, et al. Three dimensional optimisation for the enhancement of astaxanthin recovery from shrimp shell wastes by *Aeromonas hydrophila* [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 27: 101649.
- [13] 傅嘉敏,刘腾飞,韩晓阳. 山东茶园土壤几丁质降解菌的分离、鉴定及产酶特性研究[J]. 山东农业科学, 2018, 50(10): 80-84.
- [14] 王宜磊,邓振旭. 透明圈法快速筛选半纤维素分解菌[J]. 生物技术, 2000, 10(1): 37-39.
- [15] 沈诚,李戎,胡婷莉,等. 木聚糖酶活力的二硝基水杨酸(DNS)测定法[J]. 印染, 2011, 37(2): 35-39.
- [16] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定:GB 5009.5-2016 [S]. 北京:中国标准出版社,2017.
- [17] 张恒. 龙虾壳中几丁质的提取与应用[J]. 食品与机械, 1997, 13(4): 31-32.
- [18] SEDAGHAT F, YOUSEFZADI M, TOISERKANI H, et al. Chitin from *Penaeus merguensis* via microbial fermentation processing and antioxidant activity [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 82: 279-283.
- [19] ROSMAWATI A, RUMHAYATI B, SRIHARDYAS-TUTIE A. Biorecovery of chitin from shrimp shell waste (*Litopenaeus vanamme*) using fermentation and co-fermentation of *L. plantarum* and *B. thuringiensis* [J]. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2019, 546(2): 022019.
- [20] LI J, SONG R, ZOU X, et al. Simultaneous preparation of chitin and flavor protein hydrolysates from the by-products of shrimp processing by one-step fermentation with *Lactobacillus fermentum* [J]. *Molecules*, 2023, 28(9): 3761.
- [21] ZHANG H, JIN Y, DENG Y, et al. Production of chitin from shrimp shell powders using *Serratia marcescens* B742 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 successive two-step fermentation [J]. *Carbohydrate Research*, 2012, 362: 13-20.
- [22] ZHANG Q, WANG L, LIU S, et al. Establishment of successive co-fermentation by *Bacillus subtilis* and

- Acetobacter pasteurianus* for extracting chitin from shrimp shells [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 258: 117720.
- [23] LIU Y, XING R, YANG H, et al. Chitin extraction from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) shells by successive two-step fermentation with *Lactobacillus rhamnoides* and *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 148: 424-433.
- [24] DUN Y, LI Y, XU J, et al. Simultaneous fermentation and hydrolysis to extract chitin from crayfish shell waste [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123: 420-426.
- [25] XIE J, XIE W, YU J, et al. Extraction of chitin from shrimp shell by successive two-step fermentation of *Exiguobacterium profundum* and *Lactobacillus acidophilus* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 677126.
- [26] 严金红, 缪文华, BHOKE M N, 等. 有机酸软化凡纳滨对虾壳的效果研究[J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 37(5): 394-399.
- [27] RAO M S, MUÑOZ J, STEVENS W F. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp bio-waste [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(6): 808-813.

Screening of Chitin-degrading Bacteria and the Study of Their Efficient Degradation of Shrimp Shell Waste

CHEN Jianrong¹, XU Yucha¹, YANG Liyan¹, HUANG Yanbing², YANG Dengfeng², PAN Lixia^{1* * *}

(1. National Key Laboratory of Non-food Biomass Energy Technology, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Academy of Marine Sciences (Guangxi Mangrove Research Center), Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

Abstract: The increasing production of shrimp and crab shell waste has caused huge waste of resources and serious environmental pollution. In order to improve the comprehensive utilization value of shrimp and crab shell waste, this study screened chitin-degrading bacteria from soil, and explored the optimal conditions for degrading shrimp shells and the degradation ability of shrimp shells through single factor experiments. Using colloidal chitin as the sole carbon source, the soil microorganisms derived from karst landform was enriched, separated and purified by plate transparent circle method. Four strains with chitin-degrading activity were obtained; *Serratia marcescens* gxas3, *Bacillus cereus* gxas5, *Stenotrophomonas maltophilia* gxas7 and *Chitinilyticum aquatile* gxas1. Among them, *C. aquatile* gxas1 reached the maximum crude enzyme activity of 0.244 U/mL at 96 h, which was better than the other three strains. The ability of *C. aquatile* gxas1 to degrade shrimp shell waste was investigated by single factor experiment, and its medium and culture conditions were optimized. Finally, the optimal enzyme production medium was determined to be fructose 2 g/L, KH₂PO₄ 0.7 g/L, K₂HPO₄ 0.3 g/L, MgSO₄ · 6H₂O 0.6 g/L, yeast powder 0.5 g/L, beef extract 4 g/L, peptone 4 g/L. The optimum fermentation conditions were inoculation amount of 2.0%, pH value of 8.0, temperature of 20 °C and fermentation time of 9 d. Under the optimal fermentation conditions, the maximum degradation rate of *C. aquatile* gxas1 shrimp shell waste reached 60%, the deproteinization rate was 76.77%, and the chitin recovery rate was 87%. This study provides an important theoretical basis for microbial degradation of shrimp and crab shell waste.

Key words: biodegradation; chitin; shrimp and crab shell waste; chitin-degraded bacteria; *Chitinilyticum aquatile* gxas1