

甲壳素提取方法的研究进展

周 忆^{1,4}, 邢荣娥^{1,2,3}, 杨皓月^{1,3}, 刘 松^{1,2,3}, 李鹏程^{1,2,3}

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 甲壳素是一类重要且应用广泛的天然高分子。海洋甲壳类加工副产物, 如虾壳、蟹壳等, 是甲壳素的重要来源之一, 常见的提取方法主要有化学法、酶法、微生物发酵法等, 其中微生物发酵法是一种依赖微生物发酵完成脱矿(DM)、脱蛋白(DP)过程的方法, 整个过程不引入任何化学试剂, 绿色无污染, 是解决目前甲壳素生产过程中酸、碱用量大导致污染严重的关键技术。本文综述了各种甲壳素提取方法及各种影响因素在提取过程对所得甲壳素性质的影响, 讨论了微生物发酵法的相关内容, 以期对相关研究提供理论支撑。

关键词: 甲壳素; 提取方法; 微生物发酵

中图分类号: P745 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-3096(2023)11-0132-12

DOI: 10.11759/hyhx20220905001

甲壳素的英文“chitin”最早起源于希腊单词“χτὼν”, 意为“coat of mail”, 即“盔甲、甲冑”, 广泛存在于海洋生物、节肢动物(如昆虫)角质层以及部分藻类和真菌的细胞壁中, 主要起保护支持的作用。甲壳素是一种由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖组成的多糖, 是自然界中生物量仅次于纤维素的天然有机化合物, 也是自然界唯一大量存在的碱性多糖和最多的含氮有机化合物。甲壳素主要以 α -、 β -、 γ -三种晶体构型(图 1)存在, α -甲壳素和 β -甲壳素分别以反平行和平行结构排列, 其中 α -构型最常见且最稳定, 分布于层内和层间的氢键构成了紧密的网络结构, 导致了较差的溶解度和较高的结晶度^[1]。 β -甲壳素存在于鱿鱼软骨、硅藻等中, 仅具有松散的平行链结构^[2], 分子间作用力较 α -甲壳素弱, 表现出更好的反应特性、溶胀性和溶剂亲和性, 经过碱性处理后不可逆转化为 α -构型。 γ -构型可能是前两种甲壳素结构的混合形式, 即平行链与反平行链的混合, 目前报道存在于鱿鱼的胃及甲虫属的茧中^[3], 反应活化能介于其他两者之间^[4]。

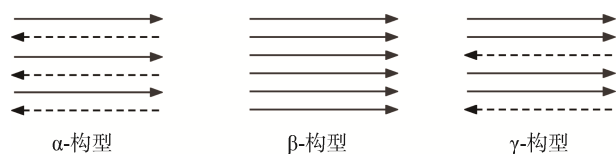


图 1 甲壳素晶体构型

Fig. 1 Crystalline structures of chitin

甲壳素用途广泛, 在医药、食品、材料、环保、日化等领域均有应用价值^[5]。海洋甲壳类动物的外壳通常含有 20%~40%的蛋白质、20%~50%的矿物质及 15%~40%的甲壳素^[6], 还存在少量的色素、脂质等成分。一般来说, 不同来源的甲壳素的物化性质各不相同, 与物种、收获季节、生物健康状况及生理阶段、地理位置等均有关^[7]。虾蛄中的甲壳素与蛋白质结合相对紧密, 因此比普通虾壳更难去除蛋白质^[8]。此外, 不同提取方法也会导致终产物存在差异。近年来, 以昆虫为代表的节肢动物逐渐成为甲壳素提取研究中的新来源之一。在节肢动物外骨骼中, 甲壳素与邻苯二酚共价结合, 蛋白质在其上附着^[9]。有报道称昆虫外骨骼几乎不含无机物质, 只需轻度脱矿处理即

收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-11-20

基金项目: 中国科学院海洋大科学研究中心重点部署项目(技术研发类)(COMS2020J04); 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2022CXGC020413); 国家重点研发计划(2018YFC0311305)

[Foundation: Key Deployment Projects of the Marine Science Research Center of Chinese Academy of Sciences, No. COMS2020J04; Shandong Key R&D Plan, Major Scientific and Technological Innovation Project, No. 2022CXGC020413; the National Key Research and Development Program of China, No. 2018YFC0311305]

作者简介: 周忆(1999—), 女, 山东日照人, 在读硕士, 研究方向为海洋生物制品, E-mail: zhouyi212@mailsucas.ac.cn; 邢荣娥(1975—), 通信作者, 女, 内蒙古牙克石市人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事海洋生物资源高值利用研究, 电话: 0532-82898780, E-mail: xingronge@qdio.ac.cn

可回收甲壳素, 乙酰化程度较低^[2], 可作为良好的甲壳素新来源。此外, 有报道称鱼类加工产业中的鱼鳞也可作为甲壳素的潜在来源^[10-11]。虾蟹壳是甲壳素最常见的商业来源, 全球每年废弃的虾蟹壳高达 $8 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ t, 干质量估计超过 3.14×10^6 t。中国渔业统计年鉴(2022)显示, 中国 2021 年的水产养殖总产量为 5.39×10^7 t, 同比增长 3.26%, 其中甲壳类养殖产量为 6.44×10^6 t。这些虾蟹壳大部分被丢弃或作为垃圾填埋, 对环境造成了极大的负担, 在废物分解过程中, 苍蝇、蚊子等害虫也会引起传染病的传播。

目前工业上从虾蟹壳中提取甲壳素最常用的方法为化学法, 即酸碱处理。化学法一般包括脱矿(主要为 CaCO_3)、脱蛋白、脱色三个过程, 是否进行脱色过程视情况而定, 工艺路线见图 2。脱矿常用酸包括无机酸(如盐酸、硫酸、硝酸)和有机酸(如甲酸、乙酸、乳酸、柠檬酸)等, 其中最常用的是盐酸, 但在有环保、低成本^[12]或分子量等甲壳素内在性质需求^[13]

时会优先考虑有机酸。不同的酸对 α -甲壳素的结构没有影响, 但强酸处理所得甲壳素的结晶指数较高^[14]。酸可以更快打破原料的晶体结构, 从而实现原料与试剂更有效的接触, 因此通常先进行脱矿, 但也有研究认为应当先除去蛋白质再脱矿, 这样可以减少酸与碳酸钙反应产生的大量泡沫^[15], 脱矿过程所需要的酸性环境也会抑制微生物及酶的活性。此外, 优先脱蛋白也利于甲壳素复合物的分解——在发酵液中浸泡后, 原料中的微纤维得以膨胀——利于后续脱矿^[16]。化学法工艺简单且用时短, 是目前工业生产所采用的方法, 但全程涉及酸碱及高温处理, 对生产仪器的抗腐蚀要求高, 同时会产生大量废水。此外, 获得的甲壳素也存在分子量、乙酰化程度降低等问题, 影响产品的质量和均一性, 其他有效成分(如虾青素)也无法充分利用。因此, 对于新的或改进的加工生产方式的需求越来越大, 使用更温和环保的方法提取甲壳素已引起广泛关注。

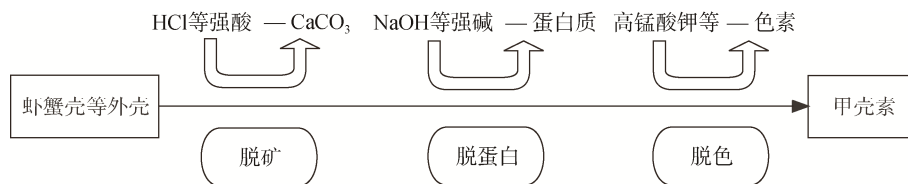


图 2 化学法从虾蟹壳中提取甲壳素的工艺路线图

Fig. 2 Process for chemical extraction of chitin from shrimp and crab shells

本文概述了常见的甲壳素提取方法, 重点介绍了微生物发酵法的常用菌株、发酵策略及影响因素, 分析了目前存在的问题及未来发展方向, 以期对相关研究提供借鉴。

1 甲壳素的提取方法

1.1 常见提取方法及特点

近年来, 绿色提取技术在新的时代背景下迅速发展起来, 已经报道了多种利用绿色提取技术从不同来源提取甲壳素及其衍生物的方法, 主要包括酶法、微生物发酵法、离子液体法、深共熔溶剂法、微波或超声辅助法等。以上五种提取方法的优缺点见表 1。微生物发酵法详见后续小节。

酶法常采用蛋白水解酶, 如木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 等, 其中木瓜蛋白酶具有广泛的选择性, 但在脱蛋白过程中会导致甲壳素脱乙酰化^[1]。有研究称来自枯草芽孢杆菌的商用蛋白酶发挥作用时需要锌元素和钙元素,

其中锌对催化活性至关重要, 而钙可以维持酶的结构刚性, 防止蛋白酶自溶^[28]。脱蛋白率(DP)、脱矿率(DM)是评价所提取甲壳素质量的重要参数。高质量甲壳素中所含蛋白质通常 $< 1\%$ ^[29], 工业上对甲壳素中矿物质的质量分数求为低于 3% ^[30]。酶法的主要问题是脱矿或脱蛋白不充分导致残留量较高, 因此多选择与化学法结合, 即先采用酶法除去大部分的杂质, 再采用低浓度的化学试剂进一步处理纯化。Hamdi 等利用从蓝蟹(*Portunus segnis*)内脏中提取的粗碱性蛋白酶处理蟹壳(*P. segnis*)和虾壳(*Penaeus kerathurus*), DP 分别为 $84.69\% \pm 0.65\%$ 和 $91.06\% \pm 1.40\%$, 脱矿则直接采用盐酸处理^[31]。采用甲酸联合酸稳定性蛋白酶(acid stable protease, ASP)一步发酵处理虾壳可以获得超过 99% 的脱矿和大于 95% 的脱蛋白效果^[32]。酶法与化学法所得甲壳素具有相似的纯度, 但结晶指数和热稳定性较低, 在制备甲壳素衍生物方面具有优势^[33]。Hongkulsup 等的研究得到相似结论: 酶法所得甲壳素具有较低的结晶度, 同时具有较高的

表 1 五种甲壳素绿色提取方法的优缺点

Tab. 1 Advantages and disadvantages of five chitin green extraction methods

方法	优点	缺点	参考文献
酶法	环境友好; 可重复性好; 反应条件温和	反应时间长; 去除不完全; 成本高	[17]
微生物发酵法	环境友好; 成本低; 潜在营养成分可利用; 解聚程度较低	时间长; 去除不完全; 发酵过程复杂, 影响因素多	[8, 18]
离子液体法	不可燃; 高溶解性; 不挥发	成本高; 毒性大; 生物降解性差	[19-22]
深共熔溶剂法	可生物降解; 安全无毒; 环境友好; 制备简单	溶解机理尚不清楚; 所得甲壳素有所降解; 黏度高; 非天然成分生物相容性差	[20, 23-26]
物理辅助法	加速提取; 降低操作成本	常作为辅助, 不单独使用; 过量使用可能导致酶失活	[27]

乙酰化程度、更好的溶解性及更小的解聚程度^[34]。在酶作用的脱蛋白体系中添加焦亚硫酸钠可以提高脱蛋白效率, 原因是焦亚硫酸钠影响了蛋白质的二硫键连接, 从而增加了蛋白质的溶解度^[35]。有研究指出虾头中存在内源性蛋白酶, 因此脱蛋白效果不仅与添加的蛋白酶有关, 还部分依赖内源性蛋白酶的自溶作用^[36]。总体来说, 酶法具有良好的应用效果且环境友好, 但难以实现高杂质去除率, 通常与化学法共同使用。此外, 酶反应条件要求较高, 反应时间较长, 限制了该方法的大规模使用^[37]。

离子液体法和深共熔溶剂法是两种新兴的绿色提取技术, 符合绿色环保的要求, 优缺点见表 1。离子液体(ILs)是完全由离子(一般为有机阳离子和无机阴离子的组合)组成的液体, 在室温或接近室温的条件下呈现液态。由于可组合的阴阳离子种类众多, 所组成的离子液体的性质非常广泛, 还可通过引入特殊基团形成功能性离子液体。1-烯丙基-3-甲基咪唑溴化物 (AMIMBr) 可溶解浓度高达 4.8% (wt) 的甲壳素, 并在较高浓度下形成凝胶^[38]。AMIMBr 还可用于制备甲壳素纳米晶体^[39]。深共熔溶剂(DESs)由氢键受体(HBA)和氢键供体(HBD)按一定比例通过分子间氢键结合而成, 理化性质与离子液体相似。酸性 HBD 与矿物质反应, 破坏甲壳素复合物的紧密结构, HBA 则能使甲壳素-蛋白微纤维断裂, 从而完成脱蛋白过程。此外, DESs 还能有效去除甲壳素的非晶区域, 形成高结晶度的棒状纳米晶体(ChNCs)^[40]。天然深共熔溶剂(NADESs)由天然化合物构成。在微波辅助下, 蟹壳与 NADES(氯化胆碱和苹果酸在 80℃ 下以 1:1 的摩尔比混合)比值为 1:30 时的脱矿和脱蛋白效率分别达到 99.8% 和 92.3%^[41]。Wang 等对 NADESs 进行改造, 引入 N-乙酰-D-氨基葡萄糖基

团, 并用于提取雪蟹 (*Chionoecetes opilio*) 中的甲壳素, 得到了 3.92×10^5 Da 的高分子量甲壳素, 比传统酸碱法所得分子量高出 3.16 倍, 收率达到 85.6%, 且多次循环后仍能保持较高的甲壳素产率^[24]。目前这两种方法在甲壳素提取领域的研究仍处在起步阶段, 未来除开展提取效果的研究外, 还应更多关注潜在的限制因素(如稳定性、离子液体的后处理等)以及成本问题, 为扩大应用规模提供理论指导。

物理辅助法可用于预处理阶段, 常与生物法联合使用以提高提取效率。最普遍使用的方法为机械研磨。聚合物的结晶度可通过机械研磨降低^[42], 有利于提高提取效率。甲壳素组分的物化性质受粒径大小的影响, 研磨过程中产生的剪切力及热量可能导致甲壳素的降解和去乙酰化^[43], 因此建议采用低温研磨的方式以制备更高质量的甲壳素, 但有其他研究显示, 低温研磨与球磨处理的差异并不大, 所得甲壳素的乙酰度和分子量无统计学差异^[44]。此外, 在实验过程中, 粒径过小容易引起原料聚集, 导致接触不充分, 且不同步骤间的洗涤操作也更容易造成原料损失^[45], 因此在具体实验过程中应具体研究。微波处理是替代传统加热方法的有效手段, 更常见于甲壳素脱乙酰化制备衍生物的过程^[46]。微波辐射可以直接快速地将能量传递到生物质基质和催化剂中, 从而提高反应效率^[1], 同时减少了能源消耗。Nguyen 等的研究显示, 微波处理有效改善了乳酸单独处理虾 (*Jasus edwardsii*) 壳脱矿效果差的情况, 矿物质残留量由 10% 降至 0.99%^[47]。超声辅助法具有提取温度低、提取率高、提取时间短的独特优势, 可通过形成特殊的空化效应、热效应和机械效应加速破裂和内容物的流出^[48], 在快速提取活性物质时常被采用。Zhang 等探讨了超声处理对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus*

subtilis)和巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*)共发酵提取虾壳粉中甲壳素的效果及机制,发现高强度超声(800 W)处理会破坏原料结构,剥离并溶出更多蛋白质,从而促进枯草芽孢杆菌产蛋白酶,并进一步水解覆盖在表面杂蛋白,最终提高杂质去除率,并得到了低分子量和高脱乙酰度的甲壳素^[27]。但有研究指出,在使用超声预处理后并不能显著改善脱蛋白效率^[49],推测可能与所使用的壳原料(壳的物种、身体部位、粒径大小等)、采用的超声强度、作用时间等多种因素有关,具体的影响与作用机制还有待于进一步研究。

综上所述,商业酶昂贵、生物酶提取纯化过程复杂、酶促反应条件要求较高等缺点限制了酶法的使用;离子液体法和深共熔溶剂法应用于甲壳素提取的研究时间较短,仍处于探索阶段,且还未得到有效应用于甲壳素提取的组合;微波、超声等物理辅助方法只是一种辅助提取手段,无法单独应用。微生物是各种酶的重要来源,多种细菌在生长过程中会产生多种有机酸和/或蛋白酶,可实现虾蟹壳废弃物的脱矿和脱蛋白过程。这种应用微生物处理废弃物的方法即为微生物发酵法,目前已成为甲壳素绿色提取方法的重要研究方向之一。

1.2 微生物发酵法

1.2.1 研究现状

微生物发酵法相比化学法具有绿色环保、反应条件温和、发酵液可进一步利用等优势。Taokaew等在采用微生物法从雪蟹(*C. opilio*)中提取甲壳素时总结了微生物法与化学法所得甲壳素的区别^[50]:乙酰化程度与分子量相似,其中生物法所得甲壳素降解温度较高,但结晶度相对较低。其他研究也得到了结晶度较低的结论^[51-52]。然而,Pacheco等利用乳酸发酵(LAFs)辅以低浓度酸碱处理虾(*Litopenaeus vannameii*)壳,所得甲壳素却表现出较高的分子量和结晶指数^[53]。关于结晶度的相悖结论,我们认为与提取方法和条件、原料成分等多种影响因素均有关,仅对比结果意义不大。

从目前的研究结果来看,至今所发现的微生物基本无法同时实现化学法所能达到的低矿物质和低蛋白残留。X-射线衍射(XRD)图显示,蟹壳中的钙分布在嵌于覆盖蛋白质的甲壳素基质空腔内的方解石晶体中,不用酸很难除去^[50]。Arbia等利用瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)处理虾壳,得到的脱蛋白

率仅为78%^[54]。Cahyaningtyas等采用蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* HMRSC30),在优化条件下实现了97.42%±0.28%的高DP,但DM仅为53.76%±0.21%,进一步使用0.4 mol/L的盐酸或乙酸处理即可达到90±0.1%^[55]。Aranday-Garcia等采用短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)和寡孢根霉菌(*Rhizopus oligosporus*)发酵虾废弃物,指出可用低浓度酸处理去除微生物发酵后残留的灰分,纯化后的灰分残留仅为1.01%^[56]。本实验室利用从菌种保藏中心、海水、底泥、凡纳滨对虾肠道内容物以及菌种诱变处理等多种来源中筛选出了鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* LA01和解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* BA01,用于从虾壳中提取甲壳素,同时实现了高脱矿和高脱蛋白效果(DM: 97.5%; DP: 96.8%)^[37],是目前报道的仅采用微生物发酵所得到的最高杂质去除率。

微生物发酵法提取甲壳素的研究进展见表2。

1.2.2 常用发酵菌种

细菌是微生物发酵法的主要应用群体,常用产蛋白酶菌株包括枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*)、假单胞菌(*Pseudomonas adaceae*)等,常见产酸菌包括植物乳杆菌(*L. plantarum*)、鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)、葡萄糖酸杆菌(*G. oxydans*)等。采用不同菌株、处理方式或发酵条件都将导致不同的杂质去除效果,在进行实验时应根据实验条件具体分析。选择铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)处理虾壳,但所处理虾的种类及发酵条件不一致,得到的发酵结果也不同;分别采用铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa* A2)和短小芽孢杆菌(*B. pumilus* A1)处理同种虾壳,所得的杂质去除率也不同(详见表2)。Dayakar等研究了虾壳加工方式(是否煮熟处理)对甲壳素提取效果的影响,发现煮熟虾壳中的蛋白更容易去除^[68]。Sedaghat等研究了三种菌(*P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *B. pumilus*)处理虾(*P. merguensis*)壳后的杂质去除效果,结果显示不同菌种的DP和DM之间表现出统计学差异($P < 0.05$),其中*P. aeruginosa*的效果最好,DP和脱DM分别为74.76%和78.46%^[69]。

菌株诱变常用于筛选性能更加优良的菌株,常见的处理方法包括紫外照射、化学诱变剂、基因工程等。紫外照射是一种常用的物理诱变方法,操作简

表 2 微生物发酵法提取甲壳素的研究进展

Tab. 2 Research progress of chitin extraction by microbial fermentation method

废料来源	微生物种类	发酵时间	DM/%	DP/%	其他	参考文献
Shrimp shell waste	<i>Halobacterium salinarum</i> 盐生盐杆菌、 <i>Halococcus dombrowskii</i> 多姆布氏盐球菌	16 d	—	98.99	虾壳煮熟处理; 0.5 mol/L NaOH 进一步脱蛋白	[57]
	shrimp (<i>Penaeus merguensis</i>) shells	6 d	82	94	20%葡萄糖, 20%接种量	[58]
Prawn shell waste	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 铜绿假单胞菌 <i>Bacillus megaterium</i> 巨大芽孢杆菌、 <i>Bacillus subtilis</i> 枯草芽孢杆菌	5 d	70.75	75.12	不添加葡萄糖	[59]
	shrimp waste	4 d	21.30	96.44	虾壳煮熟处理	[29]
shrimp (<i>L. vannamei</i>) head waste	<i>Bacillus licheniformis</i> 地衣芽孢杆菌、 <i>Gluconobacter oxydans</i> 氧化葡萄糖酸杆菌	4 d	93.5	87	先接种 <i>B. licheniformis</i> 后接种 <i>G. oxydans</i> ; 60 h 后添加 5%葡萄糖	[60]
	Shrimp shells(<i>Parapenaeus longirostris</i>)	15 d	98	78	添加蔗糖、矿物质和钙	[54]
Shrimp shells of headless <i>Penaeus vannamei</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i> 瑞士乳杆菌 <i>Serratia marcescens mutans</i> 粘质沙雷氏菌突变体	3 d	—	91.4±4.6	浸没发酵	[61]
Crayfish (<i>Procambarus clarkii</i>) shell waste powder	<i>Bacillus coagulans</i> 凝结芽孢杆菌	2 d	91	93	50 °C 下与蛋白酶 K 共同水解; 5%葡萄糖	[62]
shrimp (<i>Metapenaeus monoceros</i>) shells	<i>Bacillus pumilus</i> 短小芽孢杆菌	6 d	94	88	35 °C; 葡萄糖浓度 50 g/L	[7]
	shrimp (<i>M. monoceros</i>) shells	5 d	96	89	葡萄糖浓度 50 g/L	[63]
<i>Allopetrolisthes punctatus</i> crab	<i>Lactobacillus plantarum</i> 植物乳杆菌	60 h	99.6	95.3	15%蔗糖; 低浓度酸碱进一步处理	[64]
	shrimp shells	6 d	96.3	94.1	先接种 <i>B. subtilis</i> , 再接种 <i>L. plantarum</i>	[65]
Shrimp shell powders	<i>S. marcescens</i> 粘质沙雷氏菌、 <i>L. plantarum</i> 植物乳杆菌	2 d	93.0	94.5	超声处理 2 h	[66]
	shrimp shells powders (SSP)	5.5 d	97.5	96.8	先接种 <i>L. rhamnosus</i> (添加 5%葡萄糖), 再接种 <i>B.amylolyquefaciens</i> (添加 4%葡萄糖)	[37]
Shrimp shells	<i>Exiguobacterium profundum</i> 深部外生杆菌、 <i>Lactobacillus acidophilus</i> 嗜酸乳杆菌	—	95±3	85.9±1.2	先接种 <i>L. acidophilus</i> , 替换培养基, 再接种 <i>E. deepundum</i>	[67]

注: —表示原文未提及

便,较化学诱变剂安全,但变异方向较随机,且易造成资源浪费。化学诱变剂多具有专一性,但也具有随机性^[70]。基因工程育种可以按照意愿对菌株进行改造,目的性强,操作简便,但在安全性方面存在不确定性,工业化生产受限。常压室温等离子体(业上对甲壳素中矿,ARTP)是一种新兴的诱变系统,具有高效诱变、高安全性、快速可控等优点,已用于100余种微生物和动植物的诱变育种^[71]。Xin等采用ARTP法对从虾膏中提取的产蛋白酶菌株*E. profundum*进行诱变处理,筛选蛋白水解能力较强的菌株MS 10017并用于发酵虾壳。结果显示,MS 10017的蛋白酶活性比野生型菌株提高了36.39%,DP及甲壳素回收率见表3。此外,扫描电子显微镜(SEM)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)和XRD分析结果均显示发酵法与化学法所得甲壳素的性质相似,得到的突变菌株具有良好的遗传稳定性,具有工业化应用的潜力^[72]。王常高等采用紫外诱变及硫酸二乙酯化学法对多种酿造用菌株进行突变选育,获得一株产蛋白酶菌株UD-7,比野生型菌株的产蛋白酶活性提高了222%^[73]。朱明军等对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)进行两轮紫外-硫酸二乙酯复合诱变处理,最终得到菌株DES-59在60 h发酵后酶活达到7 307 U/mL,相比出发菌株提高了59.68%^[74]。

表3 *E. Profundum* 及其突变体 MS 10017 发酵所得甲壳素回收率及脱蛋白率

Tab. 3 Chitin recovery and deproteinization from fermentation of *E. profundum* and mutant MS 10017

所用菌株	甲壳素回收率/%	DP/%
<i>E. Profundum</i>	60.75±1.22	79.58±1.67
MS 10017	70.18±2.68	91.48±2.60

1.2.3 常见发酵策略

发酵策略的不同对提取效果也有重要的影响,微生物发酵提取甲壳素采用的主要发酵策略为单菌发酵和多菌发酵,多菌发酵可进一步划分为连续发酵和共发酵。多菌发酵时,不同菌种的接种量(主导性)、接种顺序、发酵时间等将组合成多种可能性,且菌株间存在未知的相互作用(如产酸菌所营造的酸性pH环境是否会抑制产蛋白酶菌的活性,进而影响整个发酵过程的效率),共同造成了发酵过程的复杂性。Zhang等采用一步连续发酵法从虾壳中提取甲壳素,先利用枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)完成脱蛋白过程,3 d后直接接种植物乳杆菌(*L. plantarum*),继续

培养3 d完成脱矿过程,DP和DM效率分别达到94.1%和96.3%。*L. plantarum*在共发酵第5 d时成为主导菌,制造的酸性环境对*B. subtilis*仅有轻微影响。结构分析结果表明,发酵所得的甲壳素与商品甲壳素具有相似的结构^[65]。Liu等利用地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)和葡萄糖酸杆菌(*G. oxydans*)发酵提取甲壳素,并对比单菌发酵和共发酵的效果:单菌发酵时添加的葡萄糖限制了产蛋白酶菌株的生长,导致蛋白质去除效率不高;共发酵采取三种策略,分别为两种菌同时接种、先接种*B. licheniformis* 21886(*B. licheniformis* 21886)和先接种*G. oxydans* 2003(*G. oxydans* 2003),发酵结果见表4。只采用*G. 2003*发酵产生的有机酸(乳酸、葡萄糖酸及其他有机酸)远低于连续共发酵,SEM显示连续共发酵所得甲壳素高度均匀且多孔,呈现密集的断裂结构^[60]。本实验室的Liu等采用两步发酵法,利用*L. rhamnoides* LA01和*B. amyloliquefaciens* BA01从虾壳中提取甲壳素,得到了97.5%的脱矿率和96.8%的脱蛋白率,比以往报道的仅使用微生物去除杂质所得的去除率都要高,且得到的甲壳素通过FTIR、XRD等手段验证,与化学法提取甲壳素结构完全一致^[37],具有产业化的应用潜力。

表4 通过 B. 21886 和 G. 2003 处理 SHW^a 获得的发酵残渣的结果

Tab. 4 The results of fermented residues obtained treated SHW by *B. 21886* and *G. 2003*

发酵策略 ^b	葡萄糖质量浓度	DP/%	DM/%
B + G	5%	58.5 ± 4.2	55.6 ± 0.5
B → G	60 h 后 5%	87 ± 0.2	93.5 ± 0.1
G → B	5%	71 ± 1.3	51.7 ± 0.1

^aSHW: Shrimp head waste^bB + G: 同时接种; B → G: 首先接种*B. 21886*,再接种*G. 2003*; G → B: 首先接种*G. 2003*,再接种*B. 21886*

1.2.4 常见影响因素

1.2.4.1 影响菌株生长的因素

如前所述,微生物在发酵过程中受到多重因素的影响,包括发酵培养基中的营养源、接种量、pH值、培养温度、培养时间、固液比等。其他因素不做讨论,在实验中应具体考察,这里仅讨论营养源的影响。部分菌株可直接利用虾蟹壳等废料中的蛋白质获取生长所需的碳氮^[69],原料中的蛋白质被蛋白酶水解得到水溶性物质也可作为菌株的营养物质^[50]。乳酸菌通过同型乳酸发酵过程利用葡萄糖产生乳酸,因此研究中多向发酵体系添加葡萄糖作为额外碳源

以提高脱矿效果。葡萄糖的添加量对微生物的生长和体系的 pH 影响较大, 过少不足以供给乳酸菌生长, 过多则可能抑制微生物的生长, 同时增加成本^[75]。常见的葡萄糖添加量为 5%(质量浓度), 接种量超过 5% 后对于脱矿效果的提高效果不显著^[75-76]。若添加量过少, 除导致脱矿效果的提升不明显外, 产酸过慢也会导致腐生菌的生长和原料的变质^[64]。因此, 在选用产酸菌发酵时需要考虑糖酸转化效率, 还需要综合考虑固液比、发酵初始 pH、接种量等多种因素。是否添加葡萄糖对脱蛋白也有一定的影响。Ghorbel-Bellaaj 等采用 6 种产蛋白酶芽孢杆菌发酵处理虾壳, 测定了添加葡萄糖前后的蛋白酶水解活性, 发现部分菌株在添加葡萄糖后酶活反而有所降低, 可能是由于葡萄糖诱导了蛋白酶合成抑制或分解代谢抑制(catabolic repression)^[77]。来自该团队的另一项研究将虾壳换成蟹壳, 也得出了相似的结论^[78]。其他常见碳源还有蔗糖、麦芽糊精、糖蜜等, 但由于不是单糖, 均需酶解后才能被利用, 故一般不如葡萄糖^[79]。此外, 糖蜜虽含有高浓度蔗糖, 但由于其黏度较高, 导致菌株难以利用。在成本方面, 蔗糖相对葡萄糖更加廉价^[64]。

1.2.4.2 原料来源及处理方式的影响

不同来源的甲壳素在成分和性质方面具有不同的特点, 甲壳素的晶体结构、纯度和聚合物链组成随来源和所含甲壳素比例的不同而不同^[1], 即使采用相同的提取方法也可能得到不同的产量和质量。因此, 对各种来源及提取方法的评估具有重要意义。目前大多数研究是从单一原料中提取甲壳素, 主要探究处理方法的不同所造成的影响, 针对来源方面影响的研究不多。Zhou 等人分别采用化学法和发酵-有机酸法处理了 6 种中国常见的养殖虾类, 讨论了两种方法的适用性及所得甲壳素的特点^[33]。从单种方法来看, 不同来源的原料对提取效果存在影响, 但由于方法的差异也会影响提取效果, 不同方法之间无法进行比较。由于没有统一的行业评价标准, 且甲壳素提取来源广泛而复杂, 目前关于甲壳素提取的研究独立性较强, 难以进行比较和参考, 相似的研究甚至会得出相悖的结果。

虾、蟹壳通常被认为是最佳的甲壳素来源, 也是研究最多的来源。最近有研究指出泥蟹 (*Scylla serrata*) 壳中存在的甲壳素相对更多, 说明该物种可能是甲壳素的丰富来源^[80], 但是否具有普遍性还有待进一步研究。Achinivu 等采用离子液体法从五种

生物质来源提取甲壳素得到了不同的效果, 其中来自虾壳的甲壳素产量最高, 所制备的纤维强度也最大, 蟹壳和龙虾壳来源的甲壳素次之, 蝇幼虫中所得甲壳素则存在严重的蛋白质污染, 相同浓度下由于黏度过低而无法形成纤维^[81]。Doan 等的研究指出, 脱蛋白的效果与虾的种类、身体部位及处理方式均有关系。对样品进行分析发现, 虾头中所含的蛋白质普遍高于虾壳, 脱蛋白率也相对较低, 但不同物种间的虾壳脱蛋白效率并无统计学差异。研究还指出, 经过煮熟处理后, 虾壳中的蛋白质可能发生了变性, 从而影响微生物的蛋白质去除能力^[29]。原料中存在部分蛋白质通过非共价键与甲壳素结合, 通过热处理即可分离, 其他共价连接的蛋白质则需要化学试剂或蛋白酶处理去除。少部分蛋白质受到甲壳素的保护, 因此通常无法实现 100% 脱蛋白^[82]。

2 总结与展望

甲壳素及其衍生物的相关研究呈现不断增加的趋势。微生物发酵法作为一种绿色环保的提取新技术逐渐受到重视和推广, 目前的研究也取得了一定的进展, 但适用规模非常有限。目前从生物质中提取甲壳素存在的主要问题是缺乏统一的标准, 方法、原料的不同都将影响所得产品的质量, 导致各研究之间无法进行准确的比较, 迫切需要涉及各种提取和检测方法的指导性标准的出现。但这项工作非常繁琐且困难, 需要长期的规划和努力。此外, 微生物发酵法本身也有许多需要改进的地方, 比如多菌发酵过程可能涉及到发酵液的替换及原料的清洗, 都可能导致原料的黏附损失。因此, 如何尽量避免或减少操作过程中的损失在未来的研究中也应引起重视。

微生物法的另一大优点是提取甲壳素后的副产物发酵液也有很大的利用价值。发酵液中含有多种必需氨基酸及微量元素, 且不含金属元素, 浓缩后可直接用于饲料添加^[59], 从而提高附加值。Liu 等对发酵液中的活性物质进行了研究, 结果显示发酵液(主要是产蛋白酶菌株所在的发酵液)中含有多种游离氨基酸, 其中必需氨基酸占 44.49%, 接近人体所需比例, 说明该发酵液具有较高的营养价值, 可用作饲料甚至食品添加剂^[37]。此外, 发酵液普遍具有良好的抗氧化性, 有的具有抗菌活性, 主要取决于水解产物中的活性物质, 有用作食品或制药时的天然添加剂的潜力^[78]。Doan 等将发酵液中的蛋白酶分离纯化并进行了表征, 确定了酶的分子量(SDS-PAGE

分析为 32 kDa, 凝胶过滤分析为 34 kDa), 对影响酶促反应动力学的不同因素进行了分析, 为后续研究提供了借鉴^[29]。后续研究方向还可以聚焦于发酵液中活性成分的提取纯化和表征, 以实现活性物质更高效、更有针对性的利用。

关于利用微生物发酵法大规模制备甲壳素的研究较少。Zhang 等采用 10 L 发酵罐评估连续三步发酵法的大规模发酵特点, 所得甲壳素产率为 21.35%^[52]。Duan 等从虾壳废弃物中分离出附生嗜酸乳杆菌 SW01(*L. acidophilus* SW01)并用于发酵实验和中试实验。中试发酵 48 h 后, 矿物质和蛋白质残留量分别为 0.98%和 8.44%, 与实验所得接近, 说明菌株发酵稳定, 适用于工业发酵^[83]。后续需要更多研究筛选或改造出适合工业化规模要求的菌株, 在改造微生物时, 除重点提高杂质脱除效率外, 还可考虑提高菌株利用廉价营养源和多种来源生物质的能力, 针对产蛋白酶菌则需要提高耐酸能力^[84]。此外, 还需要考虑到微生物对不同种类甲壳素来源的普适性以及降低能耗、循环利用、简化过程等符合工业化规模发酵需求, 进一步推进微生物发酵法的工业化进程, 找到适合甲壳素产业高效且可持续发展的新路线。

参考文献

- [1] MOHAN K, GANESAN A R, EZHILARASI P N, et al. Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 287: 119349.
- [2] MAJTAN J, BILIKOVA K, MARKOVIC O, et al. Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, 40(3): 237-241.
- [3] HAMED I, OZOGUL F, REGENSTEIN J M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 48: 40-50.
- [4] JANG M K, KONG B G, JEONG Y I, et al. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources[J]. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, 2004, 42(14): 3423-3432.
- [5] 秦丽芳, 刘德明. 甲壳素与壳聚糖的应用[J]. *山西化工*, 2017, 37(5): 76-78.
QIN Lifang, LIU Deming. Application of chitin and chitosan[J]. *Shanxi Chemical Industry*, 2017, 37(5): 76-78.
- [6] KHOUSHAB F, YAMABHAI M. Chitin research revisited[J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(7): 1988-2012.
- [7] GHORBEL-BELLAJ O, HAJJI S, YOUNES I, et al. Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 61: 243-250.
- [8] PAKIZEH M, MORADI A, GHASSEMI T. Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from shrimp shells[J]. *European Polymer Journal*, 2021, 159: 110709.
- [9] AMBARISH C N, SRIDHAR K R. Isolation and characterization of chitin from exoskeleton of pill-millipedes[J]. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 2015, 29(2): 155-159.
- [10] KUMAR M, AGRAWAL R, PAREEK N. Extraction and physicochemical properties assessment of chitin and chitosan from fish scales[J]. *Macromolecular Symposia*, 2021, 399(1): 2100006.
- [11] SATPATHY A A, DASH S, DAS S K, et al. Functional and bioactive properties of chitosan from Indian major carp scale[J]. *Aquaculture International*, 2021, 29(2): 417-430.
- [12] TISSERA W, RATHNAYAKE S I, ABEYRATHNE E, et al. An improved extraction and purification method for obtaining high-quality chitin and chitosan from blue swimmer (*Portunus pelagicus*) crab shell waste[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2021, 30(13): 1645-1655.
- [13] POHLING J, DAVE D, LIU Y, et al. Two-step demineralization of shrimp (*Pandalus Borealis*) shells using citric acid: an environmentally friendly, safe and cost-effective alternative to the traditional approach[J]. *Green Chemistry*, 2022, 24(3): 1141-1151.
- [14] RAHAYU A P, ISLAMI A F, SAPUTRA E, et al. The impact of the different types of acid solution on the extraction and adsorption performance of chitin from shrimp shell waste[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 194: 843-850.
- [15] HISHAM F, MAZIATI AKMAL M H, AHMAD F B, et al. Facile extraction of chitin and chitosan from shrimp shell[J]. *Materials Today: Proceedings*, 2021, 42: 2369-2373.
- [16] CIRA L A, HUERTA S, GEORGE M, et al. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37(12): 1359-1366.
- [17] WANG S L, LIU C P, LIANG T W. Fermented and enzymatic production of chitin/chitosan oligosaccharides by extracellular chitinases from *Bacillus cereus* TKU027[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90(3): 1305-1313.

- [18] 李娇, 李奇缘, 王伟平. 生物法利用虾壳及虾头废弃物的研究进展[J]. 中国调味品, 2018, 43(12): 164-167. LI Jiao, LI Qiyuan, WANG Weiping. Research progress of the utilization of shrimp shell and shrimp head wastes by biological method[J]. China Condiment, 2018, 43(12): 164-167.
- [19] HUANG W C, ZHAO D, GUO N, et al. Green and Facile production of chitin from crustacean shells using a natural deep eutectic solvent[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(45): 11897-11901.
- [20] LV J, LV X, MA M, et al. Chitin and chitin-based biomaterials: A review of advances in processing and food applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 299: 120142.
- [21] QIN Y, LU X, SUN N, et al. Dissolution or extraction of crustacean shells using ionic liquids to obtain high molecular weight purified chitin and direct production of chitin films and fibers[J]. Green Chemistry, 2010, 12(6): 968-971.
- [22] ROMERO A, SANTOS A, TOJO J, et al. Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 151(1): 268-273.
- [23] LI K, FANG H, DUAN X, et al. Efficient uptake of NH₃ by dual active sites NH₄SCN-imidazole deep eutectic solvents with low viscosity[J]. Journal of Molecular Liquids, 2021, 339: 116724.
- [24] WANG Y, YANG Y, WANG R, et al. Efficient extraction of chitin from crustacean waste via a novel ternary natural deep eutectic solvents[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 286: 119281.
- [25] WANG Y, YANG Y, WANG R, et al. Effectively inhibiting the degradation of chitin during extraction from crustacean waste via a novel deep eutectic solvent aqueous solution[J]. Process Biochemistry, 2022, 121: 142-151.
- [26] ZHANG Q, DE OLIVEIRA VIGIER K, ROYER S, et al. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications[J]. Chemical Society Reviews, 2012, 41(21): 7108-7146.
- [27] ZHANG Q, DUAN L, LI Y. Positive effects and mechanism of ultrasound on chitin preparation from shrimp shells by co-fermentation[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 88: 106066.
- [28] SINI T K, SANTHOSH S, MATHEW P T. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation[J]. Carbohydrate Research, 2007, 342(16): 2423-2429.
- [29] DOAN C T, TRAN T N, NGUYEN V B, et al. Chitin extraction from shrimp waste by liquid fermentation using an alkaline protease-producing strain, *Brevibacillus parabrevis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 706-715.
- [30] 程倩, 吴薇, 籍保平. 微生物发酵法提取甲壳素的国内外研究进展[J]. 食品科技, 2012, 37(3): 40-44. CHENG Qian, WU Wei, JI baoping, et al. Progress on the extraction of chitin by microbial fermentation[J]. Food science and technology, 2012, 37(3): 40-44.
- [31] HAMD I M, HAMMAMI A, HAJJI S, et al. Chitin extraction from blue crab (*Portunus segnis*) and shrimp (*Penaeus kerathurus*) shells using digestive alkaline proteases from *P. segnis* viscera[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 101: 455-463.
- [32] BARON R, SOCOL M, ARHALIASS A, et al. Kinetic study of solid phase demineralization by weak acids in one-step enzymatic bio-refinery of shrimp cuticles[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(12): 2215-2223.
- [33] ZHOU Y, GUO N, WANG Z, et al. Evaluation of a clean fermentation-organic acid method for processing shrimp waste from six major cultivated shrimp species in China[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 294: 126135.
- [34] HONGKULSUP C, KHUTORYANSKIY V V, NIRANJAN K. Enzyme assisted extraction of chitin from shrimp shells (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2016, 91(5): 1250-1256.
- [35] MARZIEH M N, ZAHRA F, TAHEREH E, et al. Comparison of the physicochemical and structural characteristics of enzymatic produced chitin and commercial chitin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 139: 270-276.
- [36] 李婷, 胡小喜, 周幸芝, 等. 从虾蟹壳中提取甲壳素的研究进展[J]. 食品工业, 2014, 35(6): 209-212. LI Ting, HU Xiaoxi, ZHOU Xingzhi, et al. Advances in extraction of chitin from shrimp and crab shells[J]. The Food Industry, 2014, 35(6): 209-212.
- [37] 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.
- [38] KADOKAWA J I. Dissolution, derivatization, and functionalization of chitin in ionic liquid[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123: 732-737.
- [39] KADOKAWA J-I, TAKEGAWA A, MINE S, et al. Preparation of chitin nanowhiskers using an ionic liquid and their composite materials with poly(vinyl alcohol)[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(4): 1408-1412.
- [40] LI Z, LIU C, HONG S, et al. Recent advances in extraction and processing of chitin using deep eutectic

- solvents[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 446: 136953.
- [41] HUANG W-C, ZHAO D, XUE C, et al. An efficient method for chitin production from crab shells by a natural deep eutectic solvent[J]. *Marine Life Science and Technology*, 2022, 4(3): 384-388.
- [42] NAKAGAWA Y S, OYAMA Y, KON N, et al. Development of innovative technologies to decrease the environmental burdens associated with using chitin as a biomass resource: Mechanochemical grinding and enzymatic degradation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83(4): 1843-1849.
- [43] DELEZUK J A D M, PAVINATTO A, CAMPANA-FILHO S P. Influence of the process parameters on β -chitin and α -chitin extraction: probing about the grinding and particles size[J]. *Materials Today: Proceedings*, 2019, 14: 722-732.
- [44] SHAMSHINA J L, STEIN R S, ABIDI N. Choosing the right strategy: cryogrinding vs. ball milling – comparing apples to apples[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(23): 9646-9657.
- [45] 王琪鑫. 生物发酵法制备甲壳素的研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2021.
WANG Qixin. Study on preparation of chitin by biological fermentation[D]. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2021.
- [46] AJAVAKOM A, SUPSVETSON S, SOMBOOT A, et al. Products from microwave and ultrasonic wave assisted acid hydrolysis of chitin[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90(1): 73-77.
- [47] NGUYEN T T, BARBER A R, SMITH P, et al. Application and optimization of the highly efficient and environmentally-friendly microwave-intensified lactic acid demineralization of deproteinized Rock lobster shells (*Jasus edwardsii*) for chitin production[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2017, 102: 367-374.
- [48] 彭元怀, 黄川, 赵泽洁. 超声波辅助提取虾壳甲壳素的工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(9): 304-308.
PENG Yuanhuai, HUANG Chuan, ZHAO Zejie. Study on optimization of ultrasonic wave-assisted extraction of chitin from shrimp shell[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(9): 304-308.
- [49] HAMDI M, HAJJI S, AFFES S, et al. Development of a controlled bioconversion process for the recovery of chitosan from blue crab (*Portunus segnis*) exoskeleton[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 77: 534-548.
- [50] TAOKAEW S, ZHANG X, CHUENKAEK T, et al. Chitin from fermentative extraction of crab shells using okara as a nutrient source and comparative analysis of structural differences from chemically extracted chitin[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 159: 107588.
- [51] RAKSHIT S, MONDAL S, PAL K, et al. Extraction of chitin from *Litopenaeus vannamei* shell and its subsequent characterization: an approach of waste valorization through microbial bioprocessing[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(9): 1943-1956.
- [52] ZHANG H, YUN S, SONG L, et al. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 96: 334-339.
- [53] PACHECO N, GARNICA-GONZALEZ M, GIMENO M, et al. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(9): 3285-3290.
- [54] ARBIA W, ADOUR L, AMRANE A, et al. Optimization of medium composition for enhanced chitin extraction from *Parapenaeus longirostris* by *Lactobacillus helveticus* using response surface methodology[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 31(2): 392-403.
- [55] CAHYANINGTYAS H A A, SUYOTHA W, CHEIRSILP B, et al. Optimization of protease production by *Bacillus cereus* HMRSC30 for simultaneous extraction of chitin from shrimp shell with value-added recovered products[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29(15): 22163-22178.
- [56] ARANDAY-GARCÍA R, ROMÁN GUERRERO A, IFUKU S, et al. Successive inoculation of *Lactobacillus brevis* and *Rhizopus oligosporus* on shrimp wastes for recovery of chitin and added-value products[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 58: 17-24.
- [57] DAYAKAR B, XAVIER K A M, DAS O, et al. Application of extreme *halophilic archaea* as biocatalyst for chitin isolation from shrimp shell waste[J]. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2021, 2: 100093.
- [58] SEDAGHAT F, YOUSEFZADI M, TOISERKANI H, et al. Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: An alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 104(Pt A): 883-888.
- [59] MATHEW G M, PUTHIYAMADAM A, SASIKUMAR K, et al. Biological treatment of prawn shell wastes for valorization and waste management[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2021, 15: 100788.
- [60] LIU P, LIU S, GUO N, et al. Cofermentation of *Bacillus licheniformis* and *Gluconobacter oxydans* for chitin extraction from shrimp waste[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 91: 10-15.
- [61] ZHANG H, FANG J, DENG Y, et al. Optimized production of *Serratia marcescens* B742 mutants for pre-

- paring chitin from shrimp shells powders[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 69: 319-328.
- [62] 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.
- [63] GHORBEL-BELLAAJ O, HMIDET N, JELLOULI K, et al. Shrimp waste fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* A2: optimization of chitin extraction conditions through Plackett-Burman and response surface methodology approaches[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(4): 596-602.
- [64] CASTRO R, GUERRERO-LEGARRETA I, BORQUEZ R. Chitin extraction from *Allopetrolisthes punctatus* crab using lactic fermentation[J]. Biotechnology Reports (Amst), 2018, 20: e00287.
- [65] ZHANG Q, XIANG Q, LI Y. One-step bio-extraction of chitin from shrimp shells by successive co-fermentation using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2022, 80: 103057.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] 雷家焱, 张俊, 刘海, 等. 甲壳素绿色提取技术的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(12): 319-328.
LEI Jiachi, ZHANG Jun, LIU Hai, et al. Research progress of green extraction technology of chitin[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(12): 319-328.
- [69] 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.
- [70] 李林玉, 张玉婷, 朱芝宜, 等. 功能菌株选育研究进程与展望[J]. 林业科技情报, 2021, 53(2): 1-3.
LI Linyu, ZHANG Yuting, ZHU Zhiyi, et al. Research process and prospect of breeding functional strains[J]. Forestry Science and Technology Information, 2021, 53(2): 1-3.
- [71] 唐晨旻, 张劲松, 刘艳芳, 等. 常压室温等离子体诱变育种与微生物液滴培养筛选技术应用进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1177-1194.
TANG Chenmin, ZHANG Jingsong, LIU Yanfang, et al. Application progress of atmospheric and room temperature plasma mutation breeding and microbial microdroplet culture screening technology[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1177-1194.
- [72] XIN R, XIE W, XU Z, et al. Efficient extraction of chitin from shrimp waste by mutagenized strain fermentation using atmospheric and room-temperature plasma[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 1561-1568.
- [73] 王常高, 杜馨, 林建国, 等. 酿造虾头虾壳功能性调味料用高产菌株选育研究[J]. 中国调味品, 2021, 46(8): 17-19.
WANG Changao, DU Xin, LIN Jianguo, et al. Study on breeding of high-yield strain used for functional seasoning of brewed shrimp head and shell[J]. China Condiment, 2021, 46(8): 17-19.
- [74] 朱明军, 区健发, 陈鸿图. 中性蛋白酶高产菌株的诱变选育[J]. 现代食品科技, 2013, 29(11): 2686-2691.
ZHU Mingjun, OU Jianfa, CHEN Hongtu. Mutation and screening of neutral protease high-yield strain[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(11): 2686-2691.
- [75] 张建平, 曹海龙, 赵勇, 等. 乳酸菌发酵蟹壳脱钙的菌株筛选及条件优化[J]. 中国酿造, 2013, 32(6): 31-34.
ZHANG Jianping, CAO Hailong, ZHAO Yong, et al. Screening of lactic acid bacteria and optimization of fermentation condition for decalcification of crab shell[J]. China Brewing, 2013, 32(6): 31-34.
- [76] SHIRAI K, GUERRERO I, HUERTA S, et al. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28(4/5): 446-452.
- [77] GHORBEL-BELLAAJ O, YOUNES I, MAALEJ H, et al. Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(5): 1196-1201.
- [78] HAJJI S, GHORBEL-BELLAAJ O, YOUNES I, et al. Chitin extraction from crab shells by *Bacillus* bacteria. Biological activities of fermented crab supernatants[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79: 167-173.
- [79] 汤立, 李雪平. 碳源对乳酸菌生长的影响[J]. 中国饲料添加剂, 2020, 10: 41-42.
TANG Li, LI Xueping. The effects of carbon sources on the growth of lactic acid bacteria[J]. China Feed Additive, 2020, 10: 41-42.
- [80] NARUDIN N A H, ROSMAN N A, SHAHRIN E W E S, et al. Extraction, characterization, and kinetics of N-deacetylation of chitin obtained from mud crab shells[J].

- Polymers and Polymer Composites, 2022, 30.
- [81] ACHINIVU E C, SHAMSHINA J L, ROGERS R D. Chitin extracted from various biomass sources: It's not the same[J]. Fluid Phase Equilibria, 2022, 552: 113286.
- [82] HAJJI S, YOUNES I, GHORBEL-BELLAAJ O, et al. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 65: 298-306.
- [83] DUAN S, LI L, ZHUANG Z, et al. Improved production of chitin from shrimp waste by fermentation with epiphytic lactic acid bacteria[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(4): 1283-1288.
- [84] SHARMA S, KAUR N, KAUR R, et al. A review on valorization of chitinous waste[J]. Journal of Polymer Research, 2021, 28(11): 406.

Research progress on chitin extraction methods

ZHOU Yi^{1,4}, XING Rong-e^{1,2,3}, YANG Hao-yue^{1,3}, LIU Song^{1,2,3}, LI Peng-cheng^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. National Laboratory of Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. Marine Research Center, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Sep. 5, 2022

Key words: chitin; extraction methods; microbial fermentation

Abstract: Chitin is an important and widely used natural polymer. Byproducts obtained during the processing of marine crustaceans, such as shrimp and crab shells, are an important source of chitin. Commonly used chitin extraction methods include chemical, enzymatic, and microbial fermentation methods. Among them, the microbial fermentation method relies on microbial fermentation for the completion of demineralization and deproteinization processes. The entire process does not involve the use of chemical reagents, making it a green and pollution-free method. This article reviews various chitin extraction methods, factors affecting its extraction, the effect of the extraction process on the properties of chitin, and discusses some relevant contents of microbial fermentation hoping to provide a theoretical foundation for related research.

(本文编辑: 杨 悦)