

# 虾蟹壳中甲壳素绿色提取技术研究进展

杨锡洪<sup>1,2</sup>, 辛荣玉<sup>1</sup>, 宋琳<sup>1</sup>, 董泽群<sup>1</sup>, 李钰金<sup>3</sup>, 解万翠<sup>1,2</sup>

(1. 青岛科技大学海洋科学与生物工程学院, 山东青岛 266042) (2. 山东省生物化学工程重点实验室, 山东青岛 266042) (3. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

**摘要:** 甲壳素的提取需经脱除蛋白质、矿物质、脂质和色素等工艺, 酸碱法有成本高、环境危害等缺点, 微生物发酵、酶法或基因工程等生物法绿色提取技术亟待研究。本文综述以虾蟹壳为原料, 由传统化学法、生物法绿色提取技术的进展; 分析微生物发酵、酶法及基因工程等生物法的优缺点, 微生物生物转化及酶处理利用发酵产生的有机酸和蛋白酶, 经济有效易实现大规模生产, 提出微生物发酵法提取甲壳素具有产业化潜力; 最后对遗传操作和代谢工程在近几年的进展也进行了讨论。以生物法绿色提取技术生产甲壳素既具备环境友好又具备高效性, 具有重要的发展前景。

**关键词:** 甲壳素; 虾蟹壳副产物; 生物法; 微生物发酵; 提取

文章编号: 1673-9078(2020)07-344-350

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.0856

## Green Extraction Technology of Chitin from Shrimp Shells and Crab Shells: a Review

YANG Xi-hong<sup>1,2</sup>, XIN Rong-yu<sup>1</sup>, SONG Lin<sup>1</sup>, DONG Ze-qun<sup>1</sup>, LI Yu-jin<sup>3</sup>, XIE Wan-cui<sup>1,2</sup>

(1.College of Marine Science and Biological Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China) (2.Key Laboratory for Biochemical Engineering of Shandong Province, Qingdao, 266042, China) (3.College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, 266003, China)

**Abstract:** Chitin extraction requires the removal of proteins, minerals, lipids and pigments. Traditional methods have the disadvantages of high cost, environmental degradation. The method of extracting chitin by biological methods such as microbial fermentation, enzymatic or genetic engineering needs to be developed. The progresses of green extraction techniques such as chemical methods and biological methods using shrimp and crab shells as raw materials were reviewed in this paper. The advantages and disadvantages of biological methods such as microbial fermentation, enzymatic method and genetic engineering were analyzed, and the extraction of chitin from microbial fermentation was discussed. Microbial biotransformation and enzyme treatment utilize organic acids and proteases produced by fermentation, which are economical and efficient and easy to achieve large-scale production. It was proposed that the extraction of chitin by microbial fermentation has industrial potential. Finally, the progress of genetic manipulation and metabolic engineering in recent years was also expected. Therefore, the production of chitin by biological green extraction technology is environmentally friendly and efficient, and has important development prospects.

**Key words:** chitin; by-product of shrimp and crab shell; biological method; microbial fermentation; extraction

引文格式:

杨锡洪, 辛荣玉, 宋琳, 等. 虾蟹壳中甲壳素绿色提取技术研究进展[J]. 现代食品科技, 2020, 36(7): 344-350

YANG Xi-hong, XIN Rong-yu, SONG Lin, et al. Green Extraction technology of chitin from shrimp shells and crab shells: a review [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 344-350

收稿日期: 2019-09-03

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0901703); 国家自然科学基金项目(31772089); 国家自然科学基金项目(31271938); 山东省重点研发计划(2016YYSY016)

作者简介: 杨锡洪(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 海洋生物资源化学

通讯作者: 李钰金(1966-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 海洋生物资源高值化利用; 共同通讯作者: 解万翠(1969-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品风味和食品质量与安全

甲壳素(C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>N)<sub>n</sub>, 又称甲壳质、几丁质。1811年由法国学者布拉克诺(Braconno)发现, 1823年由欧吉尔(Odier)从甲壳动物外壳中提取。“甲壳素”是自然界唯一带正电荷的阳离子动物纤维素, 被欧美学术界称之为继蛋白质、脂肪、糖类、维生素、矿物质五大生命要素之后的“第六大生命要素”, 是一种多功能天然海洋多糖。因其具有优异的生物相容性、生物降解性和无毒性, 在食品, 医药, 水处理, 纺织和化妆品行业和农业中都具有广泛的应用<sup>[1]</sup>。

传统方法是通过强酸与强碱提取虾蟹壳中甲壳素<sup>[2]</sup>, 然而, 化学法易导致甲壳素的脱乙酰化和水解, 造成甲壳素生理特性的改变<sup>[3]</sup>。且化学处理会造成严重的环境污染<sup>[4]</sup>。为了克服化学处理方法的不足, 一些有利环保的替代方法经过了多次的生产变革。酶脱蛋白技术具有污染小、反应条件温和, 对甲壳素的主链结构影响比较小等优点, 如宇佐美曲霉酸性蛋白酶促进蛋白质的消化和分离<sup>[5]</sup>。接着出现了利用真菌或细菌产生的有机酸及蛋白酶去除矿物质及蛋白质的微生物发酵技术, 如使用 *Lactobacillus sp. B2*<sup>[6]</sup>, *Bacillus*<sup>[7]</sup> 去除蛋白质和矿物质<sup>[6]</sup>。近年来基因工程等新兴生物技术, 利用基因克隆、基因敲除等遗传操作技术, 也具有良好的开发潜力。

本文讨论酶解法、微生物发酵法、基因工程等生物法提取甲壳素的研究进展情况, 以为生物法提取甲壳素的产业化应用提供一定的参考依据, 使得甲壳素的提取逐渐向简单, 快速, 有效, 清洁, 经济, 可控的生物过程发展。

### 1 甲壳素的来源及特性

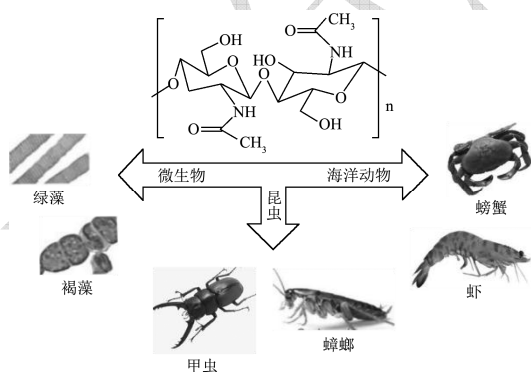


图1 甲壳素的主要来源

Fig.1 The main source of chitin

甲壳素是很多生物的结构成分, 如节肢动物的外骨骼、头足类动物<sup>[8]</sup>、脊椎动物、高等植物以及部分微生物的细胞壁、膜和孢子(如图1所示)<sup>[9]</sup>。甲壳类动物每年生产的甲壳素约为 10<sup>11</sup> 吨<sup>[10]</sup>, 其中由于海产品加工业废物的高可用性, 海洋生物是甲壳素的主要来

源, 并且虾蟹废物居多<sup>[11]</sup>, 因此甲壳素的提取成为处理虾蟹废物的一种替代处理方式。

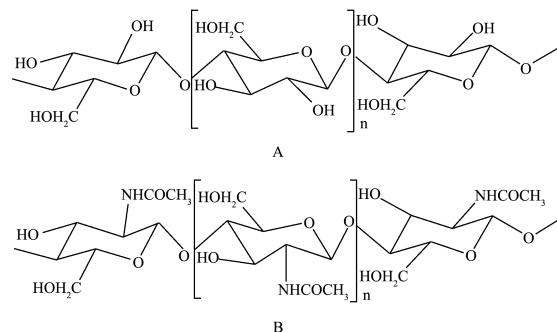


图2 (A) 纤维素, (B) 完全乙酰化甲壳素的重重复合物链的结构

Fig.2 (A) cellulose, (B) fully acetylated chitin polymer chain of fully deacetylated chitosan

如图2所示, 甲壳素是由重复的 N-乙酰葡萄糖胺糖单体组成, 除了纤维素的 C(2)-羟基被乙酰胺基取代之外, 甲壳素的结构与纤维素非常相似<sup>[12]</sup>, 但不同的是, 甲壳素含有以乙酰化胺基形式存在的 5%~8% 非蛋白氮, 使得甲壳素适合于胺的典型反应<sup>[10]</sup>, 如酰化反应、醛亚胺反应-schiff 碱反应, 硫酸酯化反应等胺反应。

### 2 虾蟹壳中甲壳素的提取、制备技术

#### 2.1 理化方法

传统的物理化学方法包括三个步骤-去矿化、脱蛋白和脱色, 包括用强酸进行酸性处理去除矿物成分, 碱处理用于脱蛋白处理, 如果需要无色产品, 则添加脱色步骤。丙酮或有机溶剂混合物用于去除色素如类胡萝卜素等<sup>[13]</sup>。彭元怀<sup>[14]</sup>等人使用盐酸对虾蟹壳进行去矿化, 何明<sup>[15]</sup>盐酸与 NaOH 对虾壳中的甲壳素进行提取, 李平<sup>[16]</sup>等人使用盐酸除矿物质、NaOH 除蛋白质、次氯酸钠脱色, 从而高效率的提取甲壳素。然而该方法导致虾蟹壳中的蛋白质、虾青素等成分难以回收利用, 且这些生产过程需要中和处理废水, 易导致环境问题和高废物处理成本, 从而与我国资源循环利用和生态能源环保这一长期发展目标相悖。此外, 低分子量的甲壳素的低生物学价值可能限制其在动物饲料工业中的应用, 因此需要找到解决化学提取问题的替代方案。

#### 2.2 酶法脱蛋白绿色提取

酶法主要是将蛋白酶用于壳废物的脱蛋白, 从而避免碱处理, 这也是近年来提出的生物替代方法之一。已经测定了各种商业蛋白酶从甲壳动物壳中去除蛋白质, 如胰凝乳蛋白酶, 木瓜蛋白酶, 胃蛋白酶, 胰酶

和胰蛋白酶等蛋白水解酶已应用于虾蟹壳的脱蛋白处理。另外,研究了粗蛋白水解提取物的利用,如 Bkhairia 等<sup>[17]</sup>人使用碱性蛋白酶脱除了虾废物 76.0% 的蛋白质, Hamdi 等<sup>[18]</sup>人使用消化碱性蛋白酶脱除了蟹壳 84.69%、虾壳 91.06% 的蛋白质, Hamdi 等<sup>[19]</sup>人使用 *Portunus segnis* 的粗酶提取物脱除了蓝蟹壳中 85% 的蛋白质。这种替代方法避免了强酸强碱的使用,降低了废物处理成本,且能够获得高分子量的甲壳素和生产具有营养价值的蛋白质水解产物的优点,但是这种情况下获得的脱蛋白水平通常低于使用碱性处理获得的脱蛋白水平。另一种替代方法是利用微生物大量生成和积累特定的代谢产物或菌体的过程来提取甲壳素的微生物发酵法。

### 2.3 微生物发酵法脱钙、脱蛋白绿色提取

微生物发酵法是以甲壳动物废弃物为底料制备甲

壳素的方法,它包括单菌发酵、共发酵、连续两步发酵以及运用基因工程等新兴绿色生物技术。其原理一方面是葡萄糖分解形成的乳酸与虾蟹壳中的碳酸钙反应,形成乳酸钙沉淀;另一方面是通过微生物产生的蛋白水解酶对虾蟹壳废弃物进行脱蛋白。因此,用于发酵提取甲壳素的微生物主要有能够产乳酸或产蛋白水解酶的微生物,包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)等菌属。

近二十年间发表的基于甲壳类废料利用微生物发酵的研究报道见表 1,其主要目标是甲壳素的生产以及甲壳类废料的脱钙与脱蛋白。在利用微生物用于虾蟹壳的生物加工中,主要有乳酸菌、芽孢杆菌以及其他微生物,脱蛋白率在 56% 和 97.1% 之间变化,而脱钙率在 69% 和 98% 之间变化。

表 1 微生物发酵提取甲壳素

Table 1 Extraction of chitin using microbial fermentation

微生物	所用品种	脱蛋白率/%	脱钙率/%	参考文献	
Lactobacillus	<i>Lactobacillus plantarum</i> 541	植物乳杆菌 虾头 83; 壳 66	虾头 88; 壳 63	[20]	
	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1058	植物乳杆菌	-	[21]	
	<i>Lactobacillus</i> sp. B2	乳酸杆菌	56	88	[6]
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌	98.2	97.2	[22]
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	瑞士乳杆菌	78	98	[23]
	<i>Pediococcus acidolactici</i>	乳酸片球菌	72.5±1.5	97.9±0.3	[24]
Bacillus	<i>Bacillus cereus</i> SV1	蜡状芽孢杆菌	88.8±0.4	-	[25]
	<i>Bacillus subtilis</i> OKF04	枯草芽孢杆菌	-	-	[26]
	<i>Bacillus subtilis</i> NA12	枯草芽孢杆菌	-	-	[27]
	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌	96.0	82.1	[28]
	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌	84	72	[29]
	<i>Bacillus cereus</i>	蜡状芽孢杆菌	97.1	95	[30]
	<i>Bacillus pumilus</i> A1	短小芽孢杆菌	94±1	80±0.6	[31]
	<i>Bacillus licheniformis</i> NH1	地衣芽孢杆菌	90±1.5	83±0.5	[31]
	<i>Bacillus subtilis</i> A26	枯草芽孢杆菌	91.25	79.9	[7]
	<i>Bacillus mojavencis</i> A21	莫海威芽孢杆菌	88	-	[7]
	<i>Bacillus pumilus</i> A1	短小芽孢杆菌	94	88	[32]
其他	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	铜绿假单胞菌	94	82	[1]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> F722	铜绿假单胞菌	63	92	[33]
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	嗜热链球菌	93.59	-	[34]
	<i>Streptomyces griseus</i>	灰色链霉菌	91.10	-	[11]
	Natural probiotic	天然益生菌	89	69	[35]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A2	铜绿假单胞菌	89	96	[36]

研究中使用单一的或混合的微生物,通过不同发酵工艺对虾蟹壳中的甲壳素进行提取,在甲壳素的生

产中具有重要的意义。

### 2.3.1 单菌发酵提取甲壳素

#### 2.3.1.1 乳酸菌发酵提取甲壳素

乳酸菌是用来去除虾蟹壳中矿物质和蛋白质,制备甲壳素的常用菌。乳酸菌发酵时产生的乳酸由葡萄糖分解产生,从而形成抑制腐败微生物生长的低 pH 条件;乳酸与碳酸钙反应形成的乳酸钙沉淀可通过洗涤除去;虾蟹废物的脱蛋白通过菌株产生的蛋白水解酶水解。如 Rao 等人<sup>[20]</sup>使发酵体系的 pH 维持在 6.0,结果发现植物乳杆菌发酵虾壳后蛋白质和灰分的去除率分别达到了 83%和 88%。Bhaskar 等人<sup>[24]</sup>采用乳酸片球菌发酵虾生物废料达到 97.9%±0.3%的脱蛋白质和 72.5%±1.5%的脱钙率。Flores-Albino 等<sup>[6]</sup>人用乳酸杆菌发酵蟹壳,利用响应面分析进行优化后达到了 88%和 56%的灰分去除率和蛋白质去除率。表 1 所示,乳酸菌的脱钙率已超过 90%,脱蛋白率高于 60%,虽然乳酸菌发酵效率不如化学法,但乳酸菌发酵法可脱除大部分的碳酸钙,因此将乳酸菌用于虾蟹壳中碳酸钙的去除是比较理想的方法,但是开发其他方案以改善虾蟹壳中蛋白质的去除率是必要的。

#### 2.3.1.2 芽孢杆菌发酵提取甲壳素

芽孢杆菌因其产蛋白酶能力较强成为制备甲壳素的常用菌。如 Laila Manni 等人<sup>[25]</sup>利用蜡样芽孢杆菌的蛋白酶从对虾的虾废料中提取甲壳素,脱除 88.8%±0.4%的蛋白质。Sini 等人<sup>[29]</sup>使用枯草芽孢杆菌发酵后,约 84%的蛋白质和 72%的矿物质从虾壳中去除。Ghorbel-Bellaaj 等<sup>[32]</sup>人用响应面分析法优化短小

芽孢杆菌发酵虾壳提取甲壳素的条件,在最优的发酵条件下达到了 88%的灰分去除率和 94%的蛋白质去除率。表 1 所示,芽孢杆菌的脱蛋白率明显高于乳酸菌,其蛋白质去除率范围为 84%~96%,但其脱钙率却低于乳酸菌属。因此将芽孢杆菌用于虾蟹壳的脱蛋白是比较理想的方法,但是开发其他方案以改善虾蟹壳中碳酸钙的去除率是必要的。

#### 2.3.1.3 其他菌发酵提取甲壳素

除了芽孢杆菌和乳酸菌之外,还有很多其他的菌种因为其产酸或产蛋白酶能力而用于提取虾蟹壳中的甲壳素(表 1)。Oh 等人<sup>[33]</sup>用新分离的铜绿假单胞菌接发酵蟹壳废样,在提取甲壳素过程中脱钙率为 92%和脱蛋白率为 63%。Zhang 等人<sup>[34]</sup>使用嗜热链球菌产生抗氧化剂并回收虾头中的甲壳素,脱蛋白率为 93.59%,且由嗜热链球菌发酵制备的甲壳素具有最高脱乙酰度。Ghorbel-Bellaaj 等人<sup>[36]</sup>在优化后的发酵条件下使用铜绿假单胞菌发酵可以达到高达 96%的脱钙率以及 89%的脱蛋白率。与乳酸菌与芽孢杆菌相比,其他菌的脱钙或脱蛋白能力与之相类似,但此法脱钙和脱蛋白质不够充分,符合工业级要求的甲壳素极少。

### 2.3.2 共培养和连续发酵提取甲壳素

从以上描述中知,单菌发酵去除蛋白质或者矿物质的能力一般较弱,为使甲壳素的纯度更高,更多的研究者开始使用两种或两种以上菌株的联合发酵或共发酵(表 2)。

表 2 用于生物过程中的共培养和连续发酵

Table 2 Co-cultivation and continuous fermentation using in biological processes

微生物	脱蛋白率/%	脱钙率/%	参考文献
<i>lactic acid bacteria</i> +产蛋白酶的细菌	-	90.99	[37]
<i>Bacillus licheniformis</i> 21886+ <i>Gluconobacter oxydans</i> DSM-2003	87	93.5	[38]
<i>Bacillus mojavensis</i> A21+ <i>Scorpaena scrofa</i>	96	-	[39]
<i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Aspergillus niger</i>	-	-	[40]
<i>Serratia marcescens</i> B742+ <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	94.5	93.0	[41]

从表 2 可以看出,与单菌发酵方式相比,连续发酵提取甲壳素的效率更高,其脱蛋白率与脱钙率都高于 90%,如 Wahyuntari<sup>[42]</sup>等将地衣芽孢杆菌菌株 F11.1 用于脱蛋白过程,嗜酸乳杆菌 FNCC116 用于去矿化过程。第一道工序蛋白质减少 47.37%,矿物质减少 50.23%,而第二道工序减少 79.61%蛋白质和 88.65%灰分。Zhang<sup>[43]</sup>通过粘质沙雷氏菌 B742,植物乳杆菌 ATCC 8014 和日本根霉 M193 的连续三步发酵法发酵虾壳,得到甲壳素的制备得率达到 21.35%。因此联合发酵或共发酵处理虾蟹壳使蛋白质去除率和矿物质去除率升高,并提取出更纯的甲壳素,因此连续发酵或

共发酵具有一定优势,产业化应用的潜力很大。

## 2.4 基因工程等新兴绿色生物技术

虾蟹壳的脱蛋白是甲壳素生产中的关键步骤。如铜绿假单胞菌,枯草芽孢杆菌和乳酸菌等微生物已被反复用于虾蟹壳的脱蛋白。但是,脱蛋白程度不够或发酵过程耗时过多都不利于甲壳素的纯化。为了获得高质量的甲壳素,获得高蛋白水解活性的微生物是必要的,基因工程等新型生物技术逐渐应用于甲壳素的纯化。Hoffmann 等<sup>[44]</sup>人研究了地衣芽孢杆菌菌株对于虾蟹壳的有效脱蛋白和高质量甲壳素获得的遗传改

良,野生型地衣芽孢杆菌 F11.1 产生大量蛋白水解酶并具有低的几丁质酶活性。在该研究中靶向删除地衣芽孢杆菌中的聚谷氨酸操纵子得到地衣芽孢杆菌 F11.1 的变体,最终从虾壳中获得高分子量的甲壳素,表明遗传操作是生产长链甲壳素和壳聚糖的强有力工具。Xin 等<sup>[45]</sup>人为提高用于微生物的蛋白酶活性,采用常压和室温等离子体技术将传统发酵虾酱中分离的产蛋白酶菌诱变。在几轮筛选之后,并将该菌株用于脱蛋白过程,去除 91.48%±2.60% 的蛋白质。

虽然部分新兴技术已经用于甲壳素提取,且这些新兴技术具有较强的脱蛋白或脱钙的能力。因其操作复杂,难以得到理想的菌株,故很难大规模的应用于提取甲壳素的工业化生产中,但是基因工程等新兴技术有待于进一步发展。因此具有环境友好性,技术灵活性和经济可行性等优点的传统微生物发酵是提取高质量甲壳素的有效方法。

### 3 结论

3.1 微生物发酵技术应用于甲壳素的提取具有广阔的发展空间,通过进一步筛选产酸能力强和产蛋白酶能力强的菌株,优化发酵条件等方式生产出高纯度的甲壳素,同时深入研究副产物的回收方法,实现绿色提取及对副产物的高效综合利用。

3.2 我国的海岸线较长,对甲壳素的开发应用水平仍然比较低,克服化学方法的缺点、使操作步骤简化、提高其纯度及其他物质的回收效率,并实现大规模的工业化生产,对我国虾蟹壳资源的回收和再利用具有十分重要的意义。

### 参考文献

- [1] 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
- [2] 郝鲁青,黄国清,肖军霞.从虾头中提取壳聚糖的工艺研究[J].食品研究与开发,2014,14:22-24  
HAO Lu-qing, HUANG Guo-qing, XIAO Jun-xia. Study on the extraction of chitosan from shrimp head [J]. Food Research and Development, 2014, 14: 22-24
- [3] Younes I, Ghorbel-Bellaaj O, Nasri R, et al. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 2032-2039
- [4] Kim Y, Park R D. Progress in bioextraction processes of chitin from crustacean biowastes [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2015, 58(4): 545-554
- [5] 叶夏青,刘必谦,唐杰,等.甲壳质清洁生产中酸性蛋白酶脱蛋白的研究[J].食品工业,2011,6:56-58  
YE Xia-qing, LIU Bi-qian, TANG Jie, et al. Study on deproteinization of acid protease in clean production of chitin [J]. Food Industry, 2011, 6: 56-58
- [6] Flores-albino B, Arias L, Gómez J, et al. Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp. B2 using sugar cane molasses as carbon source [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2012, 35(7): 1193-1200
- [7] Ghorbel-Bellaaj O, Younes I, Maâlej H, et al. Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(5): 1196-1201
- [8] 王琳,岳田利.甲壳素/壳聚糖在果蔬贮藏和果汁澄清中的应用[J].食品与机械,2002,6:22-24  
WANG Lin, YUE Tian-li. Application of chitin/chitosan in fruit and vegetable storage and fruit juice clarification [J]. Food and Machinery, 2002, 6: 22-24
- [9] Halder S K, Mondal K C. Microbial valorization of chitinous bioresources for chitin extraction and production of chito-oligomers and N-acetylglucosamine: trends, perspectives and prospects [J]. Microbial Biotechnology, 2018, 2(15): 69-107
- [10] Islam S, Bhuiyan M A R, Islam M N. Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering [J]. Journal of Polymers & the Environment, 2016: 1-13
- [11] Hongkulsup C, Khutoryanskiy V V, Niranjana K. Enzyme assisted extraction of chitin from shrimp shells (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2016, 91(5): 1250-1256
- [12] Sjaifullah A, Santoso A B. Autolytic isolation of chitin from white shrimp (*Penaeus vannamei*), waste [J]. Procedia Chemistry, 2016, 18: 49-52
- [13] Hamed I, Fatih Özogul, 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
- [14] 彭元怀,王胜,李程鹏,等.凡纳滨对虾下脚料生产甲壳素过程中盐酸的循环利用[J].南方水产科学,2017,13(1):104-109  
PENG Yuan-huai, WANG Sheng, LI Cheng-peng, et al.

- Recycling of hydrochloric acid in the production of chitin from the prawn of *Vannamei* [J]. South China Fisheries Science, 2017, 13(1): 104-109
- [15] 何明,金邻豫,王玮.不同虾壳为原料的甲壳素与壳聚糖的制备[J].河南大学学报(医学版),2004,23(3):23-24  
HE Ming, JIN Lin-yu, WANG Wei. Preparation of chitin and chitosan from different shrimp shells [J]. Journal of Henan University (Health Sciences), 2004, 23(3): 23-24
- [16] 李平,章莹.蝇蛆壳中提取甲壳素工艺研究[J].化工生产与技术,2007,14(3):35-36  
LI Ping, ZHANG Ying. Study on the extraction of chitin from the fly maggot shell [J]. Chemical Production and Technology, 2007, 14(3): 35-36
- [17] Bkhairia I, Ktari N, Younes I, et al. Golden grey mullet (*Liza aurata*) alkaline proteases: biochemical characterization, application in the shrimp wastes deproteinization, laundry commercial detergents, and preparation of antioxidant protein hydrolysate [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2015, 24(6): 597-613
- [18] Hamdi 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
- [19] 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
- [20] Rao M S, Stevens W F. Chitin production by *Lactobacillus*, fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2005, 80(9): 1080-1087
- [21] Khanafari A, Marandi R, Sanatei S. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods [J]. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering, 2008, 5(1): 19-24
- [22] 刘斯雅,林瑞君,庄泽娟,等.植物乳杆菌发酵虾头、虾壳回收蛋白质和甲壳素的研究[J].现代食品科技,2011,27(4):408-411  
LIU Si-ya, LIN Rui-jun, ZHUANG Ze-juan, et al. Study on the recovery of protein and chitin from *Lactobacillus plantarum* and shrimp shell by fermentation of *Lactobacillus plantarum* [J]. Modern Food Science & Technology, 2011, 27(4): 408-411
- [23] 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
- [24] Bhaskar N, Suresh P V, Sakhare P Z, et al. Shrimp biowaste fermentation with acidolactici, CFR2182: optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2007, 40(5): 1427-1434
- [25] Manni L, Ghorbel-Bellaaj O, Jellouli K, et al. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1 [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2010, 162(2): 345-357
- [26] Sun J, Mao X. An environmental friendly process for Antarctic krill (*Euphausia superba*) utilization using fermentation technology [J]. Journal of Cleaner Production, 2016, 127: 618-623
- [27] A S Bashandy, E I Raffat, H M M Ibrahim, et al. Characterization of chitosan produced from fermented shrimp shell waste by *Bacillus subtilis* NA12 using gamma radiation [J]. Arab Journal of Nuclear Science and Applications, 2017, 50(1): 120-130
- [28] Gamal R F, El-Tayeb T S, Raffat E I, et al. Optimization of chitin yield from shrimp shell waste by *Bacillus subtilis* and impact of gamma irradiation on production of low molecular weight chitosan [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 598-608
- [29] 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.
- [30] Sorokulova I, Krumnow A, Globa L, et al. Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(8): 1123-1126
- [31] Sawssen H, Olfa G B, Islem Y, 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
- [32] Ghorbelbellaaj 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(10): 243-250

- [33] Oh K T, Kim Y J, Nguyen V N, et al. Demineralization of crab shell waste by *Pseudomonas aeruginosa* F722 [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(7): 1069-1074
- [34] Man X, Zhang J, Kan F, et al. Antioxidant production and chitin recovery from shrimp head fermentation with *Streptococcus thermophilus* [J]. Food Science & Biotechnology, 2013, 22(4): 1023-1032
- [35] Prameela K, Mohan C H M, Smitha P V, et al. Bioremediation of shrimp biowaste by using natural probiotic for chitin and carotenoid production an alternative method to hazardous chemical method [J]. Landbauforschung Volkenrode, 2010, 60(2): 73-78
- [36] 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
- [37] Healy M, Green A, Healy A. Bioprocessing of marine crustacean shell waste [J]. Acta Biotechnologica, 2010, 23(2-3): 151-160
- [38] Xue C, Liu P, Liu S, et al. Cofermentation of *Bacillus licheniformis* and *Gluconobacter oxydans* for chitin extraction from shrimp waste [J]. Biochemical Engineering Journal, 2014, 91: 10-15
- [39] Younes I, Hajji S, Rinaudo M, et al. Optimization of proteins and minerals removal from shrimp shells to produce highly acetylated chitin [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 84: 246-253
- [40] Sunita D. Extraction of chitin from trash crabs (*Podophthalmus vigil*) by an eccentric method [J]. Current Research Journal of Biological Sciences, 2010, 2(1): 72-75
- [41] 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]. Carbohydr Res, 2012, 362(2): 13-20
- [42] Wahyuntari B, Junianto, Setyahadi S. Process design of microbiological chitin extraction [J]. Microbiology Indonesia, 2011, 5(1)
- [43] 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
- [44] Hoffmann K, Daum G, Köster M, et al. Genetic improvement of bacillus licheniformis strains for efficient deproteinization of shrimp shells and production of high-molecular-mass chitin and chitosan [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(24): 8211-8221
- [45] 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