

尹凯波, 郑子露, 金嘉悦, 等. 虾蟹壳废弃物中几丁质的制备及应用进展 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(20): 407–414. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110262

YIN Kaibo, ZHENG Zilu, JIN Jiayue, et al. Extraction Method and Application Progress of Chitin from Shrimp and Crab Shell Waste[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(20): 407–414. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110262

· 专题综述 ·

虾蟹壳废弃物中几丁质的制备及应用进展

尹凯波, 郑子露, 金嘉悦, 潘小卓, 谢勇俊, 韦倩倩, 申乃坤, 王一兵*, 姜明国

(广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西多糖材料与改性重点实验室, 广西南宁 530008)

摘要:随着虾蟹生产和消费量的逐渐增加, 大量虾蟹壳直接当做垃圾处理, 造成很大的环境压力。虾蟹壳中含有丰富的几丁质, 如能对其进行提取制备, 既有助于减轻环境污染又能提高资源利用率。受现有制备技术、生产成本和节能环保的影响, 目前利用废弃虾蟹壳制备几丁质仍处于中小型规模。科研人员一直致力于开发新的制备方法及优化工艺, 希望能够扩大虾蟹壳几丁质的生产规模, 提高废弃资源利用效率。本文主要阐述了利用化学法、生物法、物理法从虾蟹壳废弃物中制备几丁质的研究现状, 分析各种制备方法的优缺点、存在的问题和发展前景, 以及几丁质在抑菌剂、吸附剂、生物膜等方面的应用情况。目前工业上主要采用传统酸碱法制备几丁质, 其优势在于技术成熟, 工艺流程简单, 操作方便, 但该方法使用强酸强碱, 存在对环境二次污染的问题。与之相比, 低共熔溶法、酶解法及微生物发酵法更具环境效益, 因此开发低成本天然低共熔溶剂、构建重组酶、构建功能菌群, 是未来虾蟹壳废弃物中制备几丁质的研究重点。

关键词: 虾蟹壳, 几丁质, 制备工艺, 应用

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)20-0407-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110262



本文网刊:

Extraction Method and Application Progress of Chitin from Shrimp and Crab Shell Waste

YIN Kaibo, ZHENG Zilu, JIN Jiayue, PAN Xiaozhuo, XIE Yongjun, WEI Qianqian, SHEN Naikun, WANG Yibing*, JIANG Mingguo

(School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi Minzu University, Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modifications, Nanning 530008, China)

Abstract: With the gradual increase in the production and consumption of shrimp and crabs, a large amount of their shells are directly treated as garbage, resulting in significant environmental pressure. Shrimp and crab shells are rich in chitin. If extracted and prepared, it can not only help reduce environmental pollution but also improve resource utilization. Due to the limitations of existing preparation technologies, production costs, energy conservation and environmental protection, the current utilization of discarded shrimp and crab shells for chitin production remains at a small to medium scale. Therefore, researchers strive to develop new preparation methods and optimizing processes, hoping to expand the production scale of chitin from shrimp and crab shells and improve the efficiency of waste resource utilization. This review mainly elaborates on the research status of preparing chitin from shrimp and crab shell waste using chemical, biological, and physical methods. It also analyzes the advantages, disadvantages, existing problems, and development prospects of various preparation methods, as well as the applications of chitin in bacteriostatic agents, adsorbents, and biofilms. Currently, the traditional acid-base method is mainly used in industry for chitin preparation, with advantages such as mature technology, simple process flow, and convenient operation. However, this method uses strong acids and bases, posing the problem of

收稿日期: 2023-11-26

基金项目: 广西重点研发计划项目(桂科 AB21196019); 广西科技重大专项(桂科 AA18242026); 广西民族大学自治区级大学生创新创业训练计划项目(S202310608172)。

作者简介: 尹凯波(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋微生物资源利用, E-mail: 304247455@qq.com。

* 通信作者: 王一兵(1974-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 海洋生物资源开发与利用, E-mail: wybgxun@163.com。

secondary environmental pollution. In contrast, eutectic solvent method, enzymatic hydrolysis, and microbial fermentation are more environmentally beneficial. Therefore, developing low-cost natural eutectic solvents, constructing recombinant enzymes, and constructing functional microbial communities are the research focuses for preparing chitin from shrimp and crab shell waste in the future.

Key words: shrimp and crab shells; chitin; preparation technology; application

近年来甲壳类水产品养殖业迅猛发展,2020 年海水养殖产量已达 177.50 万吨。虾蟹作为甲壳类养殖主体,经加工后具有很高的经济和营养价值^[1],然而在虾蟹加工过程中会产生约占自身质量 40%~60% 的壳废弃物,在自然条件下难以降解,大量堆积会对我国生态环境造成危害^[2]。目前,大部分壳废弃物直接被当作垃圾处理,少部分经简单粉碎后用于生产饲料,该种做法虽能减少一定的环境压力,但无法有效改善,会造成资源的浪费。因此有效利用壳废弃物,开发基于壳废弃物的利用途径和产品,使壳废弃物“变废为宝”、减少环境污染、提高其附加值,对于虾蟹产业的健康发展具有重要意义^[3]。

壳废弃物中富含多种功能性物质,主要由几丁质、蛋白质、灰分(主要为碳酸钙)、及少量虾青素和脂肪(雪蟹除外,其脂肪含量高达 17.1%^[4])组成。几丁质作为壳废弃物中重要的组成成分,具有抑菌、免疫调节等生物学功能,在农业、生物医药、食品等方面有着广阔的应用前景^[5]。工业上制备几丁质多数采用酸碱法,该方法需使用大量化学试剂,易给环境造成二次伤害,加大产物回收难度,提高成本的同时降低了资源利用率。近年来随着可持续发展、资源再利用等理念的提出,如何从壳废弃物中绿色高效制备几丁质成为研究的重点。本文对近年来国内外从壳废弃物中制备几丁质的工艺方法及其应用进行综述,以期对虾蟹壳废弃物中几丁质资源的开发与利用提供一定参考。

1 几丁质概述

几丁质(chitin)又称甲壳质、甲壳素,是一种由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的天然高分子多糖,其结构与纤维素(D-葡萄糖以 β -1,4-糖苷键连接而成)相似^[6]。在自然界中几丁质以 α 、 β 、 γ 三种晶型存在,虾蟹壳中几丁质主要为 α 晶型,该晶型大分子之间存在极强的氢键作用,其化学性质稳定、不溶于绝大部分有机溶剂和水溶液^[7]。当几丁质脱乙酰度 $\geq 85\%$ 时,会转变为可溶性的壳聚糖,其溶解性与脱乙酰度、相对分子质量有关,脱乙酰度越高,相对分子质量越小,越易溶于水;脱乙酰度越低,相对分子质量越大,黏度越大。工业上常从虾蟹壳中制备几丁质,其空间结构为蛋白质与灰分牢固地镶嵌在几丁质构成的纤维网中,欲得到高纯度几丁质,需对虾蟹壳进行一定方法处理,使蛋白质和灰分从几丁质纤维网中脱离出来。

2 几丁质制备方法

2.1 化学法

2.1.1 酸碱法 现今工业上制备几丁质多数采用传统酸碱法,其大致流程为利用强酸(例如 HCl)脱灰分,强碱(例如 NaOH)脱蛋白,此时获得微黄色几丁质,再利用 H_2O_2 等溶剂脱色处理,可得白色几丁质。传统酸碱法优势在于技术成熟,工艺流程简单,操作方便。

然而传统酸碱法中所用 HCl 腐蚀性强,危险性大,需对其进行优化。有机酸可将壳中碳酸钙转化为有机钙,且危险性低,Ding 等^[8]优化传统酸碱法,利用谷氨酸代替 HCl,谷氨酸与壳中碳酸钙反应生成可溶性的谷氨酸钙,向溶液中添加磷酸氢铵,从而释放谷氨酸离子形成不溶性磷酸氢钙,通过调节 pH 至 3.2 可实现谷氨酸的回收再利用。Charoenvuttitham 等^[9]利用混合有机酸(0.25 mol/L $HCOOH$ 和 0.25 mol/L $C_6H_8O_7$)处理虾壳,处理后的溶液中富含甲酸钙和柠檬酸钙,通过醇沉法可将甲酸钙回收。然而优化后的方法中仍使用大量酸碱溶液,废水处理成本高昂。Hajiali 等^[10]开发一种“无溶剂”工艺,可减少废水处理成本,利用机械化学,通过摩擦、挤压等手段,对蟹壳及固体水杨酸施加机械能,诱导蟹壳结构发生变化,使其产生化学反应,从而获得几丁质。

目前对酸碱法的优化在一定程度上可降低成本,减少对环境的二次伤害,但仍无法从根本上解决该方法中产生的污染问题,研究者们仍需寻求新型绿色高效制备几丁质的方法。

2.1.2 EDTA 法 EDTA(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA)是一种优良的离子螯合剂,可与壳中钙离子产生螯合反应,起到脱灰分的作用。EDTA 法制备几丁质流程中,除脱灰分步骤之外,其他工艺与酸碱法相同。该方法具有操作性强、工艺简单、生产周期短、对环境污染相对较小等优点^[11]。

窦勇等^[12]利用 EDTA 法辅以超声,制备的几丁质中灰分含量仅有 0.13%。王婷^[13]对比不同方法制备几丁质,结果显示,EDTA 法几丁质提取率高于酸碱法,原因在于 HCl 会破坏几丁质分子链,而 EDTA 在与钙离子螯合时不会破坏,并且 EDTA 对蛋白质、虾青素等功能物质的破坏性较小,可提高虾蟹壳的附加价值。

EDTA 法的缺点在于脱蛋白过程仍使用强碱溶液,没有彻底避免腐蚀性化学试剂的使用和高昂的处理废液成本,同时 EDTA 价格远高于 HCl 等试剂,

导致前期成本过高,限制了 EDTA 法在工业中应用。

2.1.3 离子液体法 离子液体(Ionic Liquid, IL)或称离子性液体,其在室温~100 ℃ 呈液体形态,一般由有机阳离子和无机或有机阴离子构成,常见的有机阳离子如季铵盐离子、咪唑盐离子等,阴离子有卤素离子、无机酸离子等。IL 法主要的作用机制为阴离子与羟基发生特定的相互作用,拥有了破坏广泛氢键网络的能力,从而使壳中蛋白溶解出来。通过增加阴离子的氢键碱度,及阴阳离子不同组合来改变对无机物、有机物及聚合物的溶解性,并与碳酸钙结合生成二氧化碳和可溶性钙盐。IL 具有优良的可设计性、不挥发性、良好的热稳定性和化学稳定性等性质。

如表 1 所示, Qin 等^[14]第一次将 IL 应用到以壳废弃物制备几丁质的工艺中,发现乙酸阴离子的碱度可使 1-乙基-3-甲基咪唑乙酸盐([C₂mim]OAc)轻易的溶解甲壳类动物外壳,在微波辅助下可将 73.5% 的虾壳溶解,并有效的回收几丁质(94.0%)。Setoguchi 等^[15]利用 1-烯丙基-3-甲基咪唑溴化物(AMIMBr)直接从蟹壳中制备几丁质,在辅以柠檬酸后所得样品中蛋白含量<0.1%,脱乙酰程度<7%。结果表明 IL 不会破坏几丁质生物大分子结构,易获得高纯度几丁质。Tolesa 等^[16]比较乙酸二异丙基乙基铵([DIPEA][Ac])、二异丙基乙基铵丙酸盐([DIPEA][P])和二甲基丁基铵乙酸盐([DMBA][Ac])制备虾壳几丁质,结果表明几丁质提取效果 [DIPEA][Ac]>[DMBA][Ac]>[DIPEA][P],对所得几丁质样品进行元素分析,各样品中均没有钙离子的存在。因 IL 无毒性,使其在工业应用中具有较强优势,但 IL 高昂的生产成本限制了其应用于大规模工业化生产,如何降低 IL 生产成本成为该工艺首要解决的问题。

2.1.4 DES 法 低共熔溶剂(Deep Eutectic Solvents, DES)法是制备几丁质的新型工艺。DES 是由氢键受体(如季铵盐)和氢键供体(如酰胺、羧酸和多元醇等化合物)按照特定摩尔比例和条件混合而成的两组分或三组分低共熔混合物。DES 作为一种特殊的 IL,其溶解性和导电性优良,具有反应条件温和、合成工艺简单等优点。Zhu 等^[17]首次运用氯化胆碱-丙二酸(CCMA)混合成的 DES 从龙虾壳中提取几丁质,所得几丁质与商业几丁质的结构相似,均以稳定的 α-几丁质结构存在,而且纯度较高,提取率高于酸碱法。DES 法具有较高的环境优势,并能提高

蟹壳副产品的回收,但 DES 生产成本较为昂贵,仅能应用于小规模的生产。

近年来,研究人员在实验中发现,将许多植物的初级代谢物(包括有机酸、糖和氨基酸)以适当比例混合时,可使其由固体转变为液体,该现象的发现推动了天然低共熔溶剂(Natural Deep Eutectic Solvents, NADES)的出现,降低了 DES 的生产成本^[18]。NADES 具有良好的生物相容性和不挥发性^[19], Huang 等^[20]开发了由氯化胆碱和苹果酸通过氢键结合的 NADES,探索不同蟹壳/NADES 比率及微波照射时间,最优条件下脱灰分率高达 99.8%,脱蛋白率为 92.3%。但 NADES 弊端在于蟹壳中分离出的蛋白质会导致其过于粘稠,从而无法重复利用。目前采用 NADES 制备几丁质的应用研究较少,缺乏相关数据支撑,仍需在实验室阶段反复试验才能投入到工业生产中。

2.2 生物法

2.2.1 酶解法 酶解法与酸碱法不同之处,在于添加纯化的蛋白酶脱蛋白。该法具有绿色环保、条件温和、易于控制等优点。此外,该法中的水解液富含生物活性肽,可作为优质的生物饲料或生物肥料的原料^[21]。

目前酶解法中多数使用中性蛋白酶, Hongkul-sup 等^[22]采用乳酸-中性蛋白酶处理虾壳,与酸碱法相比,所得几丁质表现出很好的溶解性。纪蕾等^[23]利用乳酸-中性蛋白酶从鹰爪虾壳中制备几丁质,具有良好的吸湿保湿性,因为含有大量羟基,部分脱乙酰几丁质含有氨基等亲水性基团。在制备过程中,酸溶液的使用会影响中性蛋白酶的活性,随着酸性蛋白酶的开发与利用,酶的活性不会受酸性环境的影响,并且酸性水解液有助于脱灰分,减少酸溶液的用量。邓俊劲^[24]通过基因异源表达得到新的酸性蛋白酶和几丁质酶,向虾壳废弃物中先添加酸性蛋白酶,后添加几丁质酶进行连续两步水解,蛋白提取率达到 91.8%,几丁质提取率达到 88.9%,经酶水解后剩余沉淀物质无需用去离子水清洗,减少了资源的消耗。Gamage 等^[25]提取 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*和 *Penicillium* sp.分泌的酸性蛋白酶液与虾壳进行水解反应, SDS-PAGE 检测发现,经酶水解后的蛋白带显著减少。

酶解法制备几丁质已逐步应用于小规模工业生

表 1 离子液体法制备几丁质
Table 1 Ionic liquid method for extraction of chitin

阳离子	阴离子	缩写	原料	提取温度(℃)	提取时间(h)	几丁质产率(%)	参考文献
1-乙基-3-甲基咪唑	乙酸	[C ₂ mim]OAc	虾壳	100	19	-	[14]
1-烯丙基-3-甲基咪唑	溴离子	AMIMBr	蟹壳	100	48	12.6	[15]
二异丙基乙基铵	乙酸	[DIPEA][Ac]	虾壳	110	36	14.8	[16]
二异丙基乙基铵	丙酸	[DIPEA][P]	虾壳	110	30	12.1	[16]
二甲基丁基铵	乙酸	[DMBA][Ac]	虾壳	110	30	13.7	[16]

产,但该法仍面临两个问题:一是酶的纯化过程繁琐,成本高;二是虾蟹壳的紧密结构导致酶的作用位点少、酶活受到限制、几丁质产率低,不利于大规模工业生产。因此寻找并开发新的生物酶,降低酶的成本,或是通过粉碎等手段破坏壳的紧密结构,增加酶的作用位点,从而增强酶的作用效果,将成为酶解法制备几丁质的主要研究方向。

2.2.2 微生物发酵法 微生物发酵法通常利用特定微生物在发酵时分泌的有机酸或蛋白酶,以脱除壳废弃物中的灰分与蛋白,该方法发酵条件简单、温和,还可减少强酸、强碱的使用,无需对后续废水处理,从而大幅度降低生产成本。常用的发酵菌株主要为乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、沙雷菌属(*Serratia*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)等^[26]。发酵形式主要分为单菌发酵和混菌发酵,混菌发酵又分为连续两步发酵和共发酵^[27]。在生产中,研究人员可根据生产需求,选择合适的菌株及发酵形式获得不同纯度的几丁质。

单菌发酵工艺流程简单,易于操作。如表 2 所示,武波飞等^[28]利用海洋来源 *Bacillus amyloliquefaciens* MSP05 发酵虾壳,优化后脱蛋白率可达 96.47%。Xin 等^[29]利用常压和室温等离子体技术诱导 *Exiguobacterium prodeepum* 菌株,获得一株高产蛋白酶的突变体,该菌脱蛋白率为 91.48%。Cahyaningtyas 等^[30]优化 *Bacillus cereus* HMRSC30 菌株产蛋白酶条件,在最优条件下具有较高的脱蛋白率(97.42%)和较低的脱灰分率(53.76%)。Castro 等^[31]利用高产乳酸 *Lactobacillus plantarum* sp. 47 与蟹壳发酵,所得产物经低浓度的酸和碱试剂进一步纯化,达到 95.3% 脱蛋白率和 99.6% 脱灰分率,但几丁质提取率仅为 6.9%。单菌发酵过程中,脱蛋白和脱灰分两个因素难以兼顾,导致几丁质纯度及提取率低。

与单菌发酵相比,混菌发酵可获得更高纯度的几丁质,但工艺上更为复杂。其中,连续两步发酵的工艺步骤为:壳废弃物在一种菌的培养基中一次发

酵,结束后,将沉淀物分离并灭菌,再将其添加到含另一株菌的新培养基中二次发酵。连续两步发酵优点为:具有高的脱蛋白和脱灰分率,且发酵液中富含营养物质,无需进行分离纯化。如表 2 所示,Xie 等^[32]先利用 *Lactobacillus acidophilus* 脱灰分,更换培养基后接入 *Exiguobacterium profundum* 脱蛋白,最终脱灰分率为 95.0%,脱蛋白率为 85.9%。Liu 等^[33]先接入 *Lactobacillus rhamnoides* 发酵,优化后脱灰分率达到 97.5%,将发酵后的废弃物添加到含 *Bacillus amyloliquefaciens* 新的发酵培养基中,优化后脱蛋白率可达 96.8%,最终几丁质提取率为 19.6%。在连续两步发酵过程中,需重复灭菌和更换培养基,能耗较大。因此在保证几丁质纯度及提取率的前提下,研究者们开始采用共发酵形式,以降低能耗、简化工艺过程。共发酵所用菌株及添加的试剂必须具备下列特征之一:在发酵过程中添加的试剂对前一种菌的生长具有抑制作用,或发酵过程中添加的试剂对后一种菌株生长有促进作用,或所用菌株之间具有良好的协同性。如表 2 所示,Zhang 等^[34]先利用 *Bacillus subtilis* 脱蛋白,然后向培养基中同时添加 *Acetobacter pasteurianus* 和乙醇,添加的乙醇可杀灭 *Bacillus subtilis*,并作为 *Acetobacter pasteurianus* 的碳源,发酵后几丁质提取率可达 18.0%,后续研究发现,*Lactobacillus plantarum* 可利用葡萄糖快速繁殖,虾壳经 *Bacillus subtilis* 脱蛋白后,向培养基补充葡萄糖并接种 *Lactobacillus plantarum*,所得几丁质与其之前报道的相比相对分子质量降低了 9.8%,结构与商业几丁质相似^[35]。Zare 等^[36]利用 *Lactiplantibacillus plantarum* PTCC 1745 和 *Bacillus subtilis* PTCC 1720 共发酵,其中 *Bacillus subtilis* PTCC 1720 具有通过激活血红素来促进过氧化氢酶的能力,从而降低活性氧对 *Lactiplantibacillus plantarum* PTCC 1745 的毒害。Chen 等^[37]利用 *Bacillus subtilis* 先进行脱蛋白,后向培养基中添加磷酸二氢钾、乙烯醇和 *Acetobacter* sp.进行脱灰分,优化发酵条件后几丁质

表 2 微生物发酵法制备几丁质

Table 2 Microbial fermentation for extraction of chitin

发酵形式	微生物	脱灰分率(%)	脱蛋白率(%)	几丁质提取率(%)	参考文献
单菌发酵	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MSP05	—	96.47	—	[28]
	<i>Exiguobacterium prodeepum</i>	—	91.48	—	[29]
	<i>Bacillus cereus</i> HMRSC30	53.76	97.42	—	[30]
	<i>Lactobacillus plantarum</i> sp. 47	99.6	95.3	6.9	[31]
连续两步发酵	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	95.0	85.9	16.3	[32]
	<i>Exiguobacterium profundum</i>	—	—	—	—
	<i>Lactobacillus rhamnoides</i>	97.5	96.8	19.6	[33]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	—	—	—	—
共发酵	<i>Bacillus subtilis</i>	92.0	94.5	18.0	[34]
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	—	—	—	—
	<i>Bacillus subtilis</i>	96.3	94.1	—	[35]
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	—	—	—	—
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PTCC 1745	93.8	96.4	—	[36]
	<i>Bacillus subtilis</i> PTCC 1720	—	—	—	—
	<i>Bacillus subtilis</i>	92.0	94.0	18.0	[37]
	<i>Acetobacter</i> sp.	—	—	—	—

提取率达到 18.0%。

由于微生物发酵法中存在菌株生长所需时间长、生长状态不稳定等问题,导致工艺效率低,使其仍处于实验室研究阶段,无法实现规模化生产。因此,通过构建高产酶量的工程菌株或高稳定性的功能菌群、缩短工艺时间,已经成为微生物发酵法优化的可行方向。

上述研究均为液体发酵,而研究结果显示,其所能处理的壳废弃物量有限,为加大处理量,研究人员开始探索固体发酵。固体发酵具有处理步骤少、处理量大、能耗低、污水产生量小等优点,在工业应用上更具可持续性和经济性。Lu 等^[38]获得 *Streptomyces* sp. SCUT-3 可将虾壳中的蛋白作为维持其生长的碳源和氮源,通过搅拌,该实验回收了 92.6% 的水解蛋白,其中三分之二以游离氨基酸形式回收,三分之一以寡肽形式回收,并回收了 92.0% 的钙(以乳酸钙的形式),剩余的残余物作为几丁质样品回收,样品具有高纯度、低脱乙酰度等特点。目前通过固体发酵制备几丁质的报道较少,对其深入研究,有望成为壳废弃物资源化利用新途径。

2.3 物理法

物理法无法直接从虾蟹壳中制备几丁质,常与化学法、生物法结合,作为一种辅助手段在制备几丁质工艺中使用。

2.3.1 超声波辅助法 超声波能量大、穿透能力强、安全环保,可剥离覆盖在壳表面的蛋白质和碳酸钙,并使壳内部结构由紧密变得松散,因此试剂和生物酶更加容易进入壳内部作用。该方法具有缩短工艺时间、减少成本支出的优点。Zhang 等^[34]采用超声波辅助微生物发酵法从虾壳中提取几丁质,经 800 W 超声前处理的虾壳所需发酵时间更短,所纯化的几丁质具有更低的分子量(11.2 kDa),更高的几丁质纯度(89.8%)和更高的脱乙酰度(21.1%)。Vallejo 等^[39]利用高频超声脱蛋白,所得样品蛋白含量<2%,随着超声时长的增加,所得几丁质粒径及分子量降低、脱乙酰度升高。超声处理还可使几丁质酶与几丁质之间的结合力更强,以此提高几丁质酶活。超声波辅助法操作简单,有望在工业生产中使用。

2.3.2 微波辅助法 中粒子在微波磁场中会因微波

频率的提高而急速更改方向,使分子间发生撞击现象,产生大量热量从而让温度迅速升高,使固体样品表面迅速裂解,并能够在数分钟内完全分解。相较其它方法,该法具有操作简单、节省时间的优点。蓝尉冰等^[40]在酸碱法的基础上辅以微波,通过正交优化工艺参数,其几丁质提取率(26.34%±0.24%)高于酸碱法(18.43%±0.14%)。魏宏艳^[41]的研究表明,在一定范围内,几丁质脱乙酰度随着微波辐射的时间增加而增大。微波有助于几丁质及其衍生物的快速提取,其在制备几丁质方面具有广阔的应用前景。

2.4 不同几丁质制备方法的优缺点

表 3 中总结并对比了从虾蟹壳中制备几丁质不同方法的优缺点。虽然 EDTA 法、离子液体法和 DES 法均需要使用化学试剂,但它们安全性远胜于酸碱法,且产生的污染较小。因此如果能解决这些制备方法无法重复利用、生产成本高昂等问题,将有助于其在工业中的应用。酶解法与生物发酵法条件温和、环境友好,在壳废弃物绿色精炼过程中具有广阔的应用前景。但在大规模发酵过程中,酶的活性和菌株生长难以控制,且工艺时间较长。因此,可在发酵过程中添加超声波、微波等辅助手段缩短发酵时间、增加处理能力。

2.5 现代生物技术

随着生物技术的不断开发与创新,基因重组、固定化等现代生物技术逐渐应用于从虾蟹壳中制备几丁质。

基因重组技术可用于对生物合成的相关基因信息进行解析,借此构筑基因工程菌或是细胞工厂来制备几丁质。Hoffmann 等^[42]获得一株 *Bacillus licheniformis*, 该菌基因中存在聚谷氨酸合成的操纵子(pga)和几丁质酶基因的操纵子(chiB 和 chiA),通过对目标基因敲除,增强了菌株蛋白水解活性,有助于脱除虾蟹壳中蛋白并获得高分子几丁质。

固定化技术是指将游离酶束缚在一定空间或完全附着在一定的载体上,从而限制游离酶自由流动。该技术在增强酶稳定性的同时,还便于酶或产物的回收。Oh 等^[43]将 *Pseudomonas aeruginosa* K-187 分泌的蛋白酶通过共价结合的方式固定在羟丙基甲基纤维素醋酸酯琥珀酸上,发现固定蛋白酶半衰期

表 3 不同几丁质制备方法的优缺点

Table 3 Advantages and disadvantages of different methods of extracting chitin

方法	优点	缺点
化学法	酸碱法 工艺流程简单,操作方便;成本低;产量高	环境污染;使用有毒试剂
	EDTA法 操作性强;工艺简单;生产周期短;对环境污染小	前期成本高
	离子液体法 无毒性;绿色环保;不挥发;良好的热稳定性;良好的化学稳定性	成本高
	DNS法 绿色环保;反应条件温和;溶解性优良	溶液不可循环使用;成本高
生物法	酶解法 绿色环保;条件温和	能耗高;工艺复杂;成本高;耗时长
	生物发酵法 绿色环保;能耗少;成本低	不适合大规模发酵;耗时长
物理法	超声波辅助法 缩短工艺时间	-
	微波辅助法 操作简单;节省时间	-

(12 d)长于游离蛋白酶(8 d),并且固定酶的脱蛋白率达到 67%。Paul 等^[44]将 *Kurthia gibsonii* 的几丁质酶固定在以戊二醛处理的壳聚糖载体上,酶的稳定性提高的同时,脱蛋白的水平也有提高,在发酵虾壳过程中无需添加额外的营养物质,所得几丁质中蛋白含量仅为 0.8%。

相对于传统方法,现代生物技术对已有的酶和菌株进行改造,可获得适合在工业上应用的工程酶和工程菌株,在提高制备过程稳定性的同时,降低成本,实现物质的循环利用。

3 几丁质的应用

3.1 抑菌剂

几丁质及其衍生物具有广谱抗菌性,可作为优良的抑菌剂。据报道,几丁质及其衍生物主要能抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、黑曲霉菌等菌株的生长^[45]。张雪雅^[46]通过传统方法制备的纳米几丁质,可有效抑制假禾镰刀菌(麦茎基腐病的主要病原微生物之一)的生长及孢子的萌发。并且几丁质及其衍生物还可通过破坏病原菌细胞膜功能完整性,使细胞通透性增加、降低其致病能力。Cele 等^[47]通过合成壳聚糖衍生物—氟化季铵盐壳聚糖,不仅能够抑制常见病原菌,还能够抑制血链球菌、沙门氏菌、表皮葡萄球菌和枯草芽孢杆菌。

3.2 吸附剂

几丁质及其衍生物制备的生物吸附剂含有大量氨基、羧基、羟基等官能团,具有高化学反应性,对重金属离子有良好的吸附性能,在水处理和环境修复等方面具有重要的应用价值。几丁质及其衍生物吸附重金属离子主要是通过螯合反应、静电相互作用、离子交换和表面沉淀机制控制^[48]。在吸附过程中受 pH 因素影响较大,碱性环境下吸附效果大打折扣,可通过增强几丁质的机械强度,改变其力学性质等手段来降低 pH 的影响^[49]。Liu 等^[50]通过自由基聚合成功制备了含几丁质和葡聚糖的氨基水凝胶,该凝胶对 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 具有较好的吸收能力,其吸附过程属于自发单层化学吸附。Kim 等^[51]制备的聚乙烯胺交联几丁质,通过螯合反应,在吸附去除废水中染料方面具有显著地应用效果。

3.3 生物膜

几丁质及其衍生物为纤维状结构,易于改性,可制成纳米颗粒、复合敷料、水凝胶等多重形态材料,在医药行业拥有巨大发展潜能^[52]。Chen 等^[53]以壳聚糖为骨架,制备具有宫颈抗菌功能的新型碘载体羧甲基壳聚糖-g-(聚丙烯酸钠)-co-聚乙烯吡咯烷酮生物膜,在宫颈电环切手术后护理中,该膜比常规治疗具有更好的治疗效果。AlAkayleh 等^[54]通过几丁质和生物素之间的静电相互作用开发了一种新型复合薄膜,该膜具有很强的烧伤口愈合能力。几丁质与纤维素之间具有良好的融合性,可制备几丁质纳米纤维-细菌纤维复合膜,该复合膜可改善细菌纤维膜过

于亲水的问题,并提升膜的热稳定性^[55]。将几丁质纳米纤维和木质素纳米颗粒掺入可生物降解的 PVA 所制备三元纳米复合薄膜,具有优异的热稳定性和表面疏水性,并能屏蔽紫外线辐射,可应用于食品包装材料。

4 结论与展望

本文主要概述了从虾蟹壳中制备几丁质的工艺方法及研究现状,以及几丁质在抑菌剂、吸附剂、生物膜方面的应用。分析比较了各制备方法的优缺点:化学法可应用于工业上快速制备高纯度几丁质,但存在污水处理成本高,所用试剂重复利用率低、价格高等问题;生物法绿色环保,条件温和,是目前研究的主要方向,但存在工艺时间长、所得样品纯度不稳定等问题;物理法具有良好应用前景,可加快反应速度、减少试剂用量,但无法单独从虾蟹壳中制备几丁质。

为进一步提高虾蟹壳废弃物的资源化利用,扩大几丁质的制备规模,可从以下几个方面开展深入研究:a. 化学法中 IL 可逐步取代传统试剂,通过开发新型 IL,降低离子之间的作用力,从而降低黏度,增加可重复利用性,加强 NADES 的开发,降低其成本;b. 生物法可通过基因重组、固定化等技术构建高产酶量的重组酶,还可通过构建相应的功能菌群,达到稳定发酵效果,确保所得产物的产量与纯度;c. 物理法可与化学法和生物法紧密结合起来,在不同工艺阶段多次辅以微波、超声波等手段加强试剂及酶进入虾蟹壳内部作用,以此优化工艺流程,缩短工艺时间。综上所述,工业上如何绿色高效制备几丁质是该产业发展的主要方向,开发低成本 NADES、构建重组酶、构建功能菌群则是未来研究应该关注的重点。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 张爽. 2016-2020 年海水养殖发展分析[J]. 河北渔业, 2022(4): 34-37. [ZHANG S. Analysis of mariculture development from 2016 to 2020[J]. Hebei Fisheries, 2022(4): 34-37.]
- [2] HAQUE R, SAWANT P B, SARDAR P, et al. Synergistic utilization of shrimp shell waste-derived natural astaxanthin with its commercial variant boosts physio metabolic responses and enhances colouration in discus (*Symphysodon aequifasciatus*) [J]. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 2020, 15: 100405.
- [3] 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. [LIU Y, FANG G H, RONG S H, et al. Research progress on utilization of shrimp and crab shells[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(3): 461-466.]
- [4] LAGE-YUSTY M A, VILASOA-MARTINEZ M, ALVAREZ-PEREZ S, et al. Chemical composition of snow crab shells (*Chionoecetes opilio*) [J]. CyTA Journal of Food, 2011, 9(4): 265-270.

- [5] 辛雪成,毛志强,王芳,等. 几丁寡糖叶面肥对花生品质和产量的影响[J]. 陕西农业科学, 2019, 65(12): 1-4. [XIN X C, MAO Z Q, WANG F, et al. Effects of chitinol oligosaccharide foliar fertilizer on peanut quality and yield[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2019, 65(12): 1-4.]
- [6] SUTRISNO A, UEDA M, ABE Y, et al. A chitinase with high activity toward partially N-acetylated chitosan from a new, moderately thermophilic, chitin-degrading bacterium, *Ralstonia* sp. A-471[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(4): 398-406.
- [7] 孙翔宇,魏琦峰,任秀莲. 虾、蟹壳中甲壳素/壳聚糖提取工艺及应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(22): 214-219. [SUN X Y, WEI Q F, REN X L. Research progress on extraction technology and application of chitin/chitosan from shrimp and crab shells[J]. Food Research and Development, 2018, 39(22): 214-219.]
- [8] DING H P, LÜ L, WANG Z J, et al. Study on the "glutamic acid-enzymolysis" process for extracting chitin from crab shell waste and its by-product recovery[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 190(3): 1074-1091.
- [9] CHAROENVUTTITHAM P, SHI J, MITTAL G S. Chitin extraction from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) waste using organic acids[J]. *Separation Science and Technology*, 2006, 41(6): 1135-1153.
- [10] HAJIALI F, VIDAL J, JIN T, et al. Extraction of chitin from green crab shells by mechanochemistry and aging[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(34): 11348-11357.
- [11] 黄俊炯,杨建男. EDTA 处理虾壳的综合利用研究[J]. 食品科技, 2009, 34(7): 67-69. [HUANG J X, YANG J N. Comprehensive utilization of EDTA treated shrimp shells[J]. Food Science and Technology, 2009, 34(7): 67-69.]
- [12] 窦勇,胡佩红. 超声协同 CDA 酶法制备龙虾壳聚糖[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(11): 127-131. [DOU Y, HU P H. Preparation of lobster chitosan by ultrasonic synergy CDA enzymatic method[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(11): 127-131.]
- [13] 王婷. 克氏原螯虾中甲壳素提取工艺的优化[J]. 化工技术与开发, 2019, 48(1): 30-34. [WANG T. Optimization of chitin extraction process from *Procambarus cruxi*[J]. Technology & Development of Chemical Industry, 2019, 48(1): 30-34.]
- [14] QIN Y, LU X M, 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.
- [15] SETOGUCHI T, KATO T, YAMAMOTO K, et al. Facile production of chitin from crab shells using ionic liquid and citric acid[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 50(3): 861-864.
- [16] TOLESA L D, GUPTA B S, LEE M J. Chitin and chitosan production from shrimp shells using ammonium-based ionic liquids[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 130: 818-826.
- [17] ZHU P, GU Z J, HONG S, et al. One-pot production of chitin with high purity from lobster shells using choline chloride-malonic acid deep eutectic solvent[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 177: 217-223.
- [18] DAI Y T, SPRONSEN J, WITLAMP G J, et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 766: 61-68.
- [19] XIN R P, QI S J, ZENG C X, et al. A functional natural deep eutectic solvent based on trehalose: Structural and physicochemical properties[J]. *Food Chemistry*, 2017, 217: 560-567.
- [20] HUANG W C, ZHAO D D, XUE C H, et al. An efficient method for chitin production from crab shells by a natural deep eutectic solvent[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2022, 4(3): 384-388.
- [21] GUO X X, HAN X X, HE Y F, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis for preparation of shrimp flavor precursor using response surface methodology[J]. *Journal of Food Quality*, 2014, 37(4): 229-236.
- [22] HONGKULSUP C, KHUTORYANSKIY V V, NIRANIAN K. Enzyme assisted extraction of chitin from shrimp shells (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2016, 91(5): 1250-1256.
- [23] 纪蕾,刘天红,王颖,等. 鹰爪虾加工副产物制备甲壳素关键技术研究[J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(5): 64-71. [JI L, LIU T H, WANG Y, et al. Research on the key technology of chitin preparation from the by-products of eagle claw shrimp processing[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2021, 57(5): 64-71.]
- [24] 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. [DENG J J. Development of new protease and chitinase and their application in shrimp processing waste[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.]
- [25] GAMAGE M, LIYANAGE N, PETHIRANA I, et al. Evaluation of the potential of fungal acid proteases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. to produce shrimp-waste protein hydrolysates with degraded antigenic proteins[J]. *Journal of Dry Zone Agriculture*, 2022, 8(1): 21-37.
- [26] ARBIA W, ARBIA L, ADOUR L, et al. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods-a review[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2013, 51(1): 12-25.
- [27] 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 X H, XIN R Y, SONG L, et al. Research progress on green extraction technology of chitin in shrimp and crab shells[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 344-350.]
- [28] 武波飞,丁志雯,苏永成,等. 海洋产蛋白酶 *Bacillus amyloliquefaciens* MSP05 发酵南美白对虾壳脱蛋白条件优化[J]. 中国调味品, 2021, 46(12): 14-19. [WU B F, DING Z W, SU Y C, et al. Optimization of marine protease *Bacillus amyloliquefaciens* MSP05 for shell deproteinization of fermented South American white shrimp[J]. China Condiment, 2021, 46(12): 14-19.]
- [29] XIN R Y, XIE W C, XU Z Y, 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.
- [30] 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: 1-16.
- [31] CASTRO R, GUERRERO-LEGARRETA I, BORQUEZ R. Chitin extraction from *Allopetrolisthes punctatus* crab using lactic fermentation[J]. *Biotechnology Reports*, 2018, 20: e00287.
- [32] XIE J W, XIE W C, YU J, et al. Extraction of chitin from shrimp shell by successive two-step fermentation of *Exiguobacteri-*

- um profundum* and *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 677126.
- [33] LIU Y L, XING R E, YANG H Y, 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.
- [34] ZHANG Q, WANG L Y, LIU S G, 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.
- [35] ZHANG Q, XIANG Q, LI Y C. 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.
- [36] ZARE H, JAFARI Z, DARZI H H. Production of chitin and chitosan from shrimp shell wastes using co-fermentation of *Lactiplantibacillus plantarum* PTCC 1745 and *Bacillus subtilis* PTCC 1720[J]. *Applied Food Biotechnology*, 2022, 9(4): 311–320.
- [37] CHEN Y L, LING Z M, MAMTIMIN T, et al. Chitooligosaccharides production from shrimp chaff in chitosanase cell surface display system[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 277: 118894.
- [38] LU D L, ZHANG M S, DENG J J, et al. Highly Efficient shrimp shell recovery by solid-state fermentation with *Streptomyces* sp. SCUT-3[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 458: 141256.
- [39] VALLEJO D D, RUBIO R E, AGUILA A E, et al. Ultrasound in the deproteinization process for chitin and chitosan production[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 72: 105417.
- [40] 蓝尉冰, 徐开平, 韩鑫, 等. 微波辅助法制备南美白对虾甲壳素的工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(20): 135–140. [LAN W B, XU K P, HAN X, et al. Optimization of microwave-assisted preparation of chitin from *Penaeus vannamei*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(20): 135–140.]
- [41] 魏宏艳. 微波辅助法下由虾蟹壳制备可溶性壳聚糖[J]. *电子制作*, 2013(17): 66. [WEI H Y. Microwave-assisted preparation of soluble chitosan from shrimp and crab shells[J]. *Practical Electronics*, 2013(17): 66.]
- [42] HOFFMANN K, DAUM G, KOSTER 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 and Environmental Microbiology*, 2010, 76(24): 8211–8221.
- [43] OH Y S, SHIH L, TZENG Y M, et al. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27(1–2): 3–10.
- [44] PAUL M K, MINI K D, ANTONY A C, et al. Deproteinization of shrimp shell waste by *Kurthia gibsonii* Mb126 immobilized chitinase[J]. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 2022, 16(2): 909–923.
- [45] ELARABY A, EIGHADRAOUI L, ERRACHIDI F. Usage of biological chitosan against the contamination of post-harvest treatment of strawberries by *Aspergillus niger*[J]. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2022, 6: 881434.
- [46] 张雪雅. 纳米几丁质对小麦假禾谷镰刀菌抑菌性能及作用机制研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021. [ZHANG X Y. Study on antibacterial activity and mechanism of nano-chitin against *Fusarium graminearum*[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2021.]
- [47] CELE Z E D, SOMBORO A M, AMOAKO D G, et al. Fluorinated quaternary chitosan derivatives: synthesis, characterization, antibacterial activity, and killing kinetics[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(46): 29657–29666.
- [48] MALLIK A, KABIR S F, RAHMAN F B, et al. Cu(II) removal from wastewater using chitosan-based adsorbents: A review[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(4): 108048.
- [49] YANG J, CHEN X X, ZHANG J H, et al. Role of chitosan-based hydrogels in pollutants adsorption and freshwater harvesting: A critical review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 189: 53–64.
- [50] LIU X L, JIANG Q. Modification of chitosan/chitin and its oligosaccharides[M]. Springer: Singapore, 2019: 129–159.
- [51] KIM G M, WANG Z, WON S W. Removal of reactive dyes using chitin-based adsorbent PEI-chitin[J]. *Korean Chemical Engineering Research*, 2019, 57(2): 232–238.
- [52] 康雨. 壳聚糖与模型生物膜的相互作用[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2021. [KANG Y. Interaction between chitosan and model biofilm[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2021.]
- [53] CHEN Y, YANG Y M, LIAO Q P, et al. Preparation, property of the complex of carboxymethyl chitosan grafted copolymer with iodine and application of it in cervical antibacterial biomembrane[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 67: 247–258.
- [54] ALAKAYLEH F, JABER N, ALREMAWI M, et al. Chitosan-biotin topical film: Preparation and evaluation of burn wound healing activity[J]. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2022, 27(4): 479–489.
- [55] 高若航, 李青, 万芝力, 等. 细菌纤维素-甲壳素-玉米醇溶蛋白颗粒复合膜的制备与表征[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(11): 210–218. [GAO R H, LI Q, WAN Z L, et al. Preparation and characterization of bacterial cellulose-chitin-zein granular composite membrane[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(11): 210–218.]