

# 生物技术清洁生产替代高污染化学法制备 甲壳素的研究与应用\*

周湘池 刘必谦<sup>①</sup> 郭春苹 王亚军

(应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

**提要** 从虾壳中分离到一株乳杆菌 BR-3, 研究发现其最佳发酵起始 pH 为 6.50, 最佳培养温度为 35℃, 在此培养温度下达到对数生长期的时间为 42h。采用乳杆菌发酵方法, 进行了虾壳制备甲壳素的研究, 比较了接种量、葡萄糖加入量、发酵时间等因素对产品质量的影响。结果表明, 当接种量为 10%、葡萄糖浓度为 4.5%、固液比为 1:3、发酵温度为(35±2)℃、发酵时间为 3—4d 时, 平均灰分去除率达 95.67%, 甲壳素产品灰分含量均小于 6%, 最低可达 1%, 产品质量等于或优于传统的酸碱生产方法。发酵液可部分或全部回收, 洗涤废水可作下一轮发酵用水, 生产废水接近零排放。虾壳乳酸发酵法生产甲壳素是一种清洁生产方法。BR-3 培养时间短, 培养条件粗放, 温度和 pH 适应范围宽, 产酸效率高, 残糖少, 适合于工业化生产。

**关键词** 乳杆菌, 优化, 发酵, 虾壳, 甲壳素清洁生产

**中图分类号** Q946

甲壳素(chitin)是自然界中唯一带正电荷的天然高分子聚合物(Robert *et al.*, 1999), 学名为(1, 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-葡萄糖(C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, 其在医药、化工等居多领域用途广泛(郎亚军等, 2004; Esteban *et al.*, 2000), 有专家指出, 人类社会 21 世纪是甲壳素的世纪(郭振楚, 1997)。我国是甲壳素及其衍生物的生产大国, 国内甲壳素年总产量在 5000t 左右, 占全球产量的 80%以上。

现行的甲壳素生产方法为传统的酸碱法, 即用盐酸脱矿物质, 用氢氧化钠脱蛋白质、油脂和色素, 这一生产方式会导致严重问题和产生讨厌的副产物(Bhowmick *et al.*, 2007)。生产 1t 甲壳素, 产生废水 400—1000t, 年向环境排放废水 200—500 万 t。这种废水十分难处理, 国内许多研究机构和生产厂家进行过多种处理方式的研究, 但都无法实现达标排放, 严重污染海洋环境、影响海洋生态和海水养殖, 高污染成为甲壳素

产业生存与发展的瓶颈。一种甲壳素清洁生产方法近几年见于国外文献中, Shiraia 等(2001)报道用乳杆菌发酵可以生产甲壳素, Luis 等(2002)也报道通过细菌发酵生产甲壳素, 但未见产业化的报道。国内还未见虾蟹壳微生物发酵法生产甲壳素的报道。

作者在本研究中以自然界中筛选到的乳杆菌应用于虾壳发酵生产甲壳素, 以期替代现有的甲壳素生产工艺奠定基础。利用微生物生长产生的酸脱去虾壳中的矿物质(以下简称脱钙)来进行甲壳素的生产, 基本上不产生污染(Bustos *et al.*, 1996<sup>1)</sup>; Morrow, 2001<sup>2)</sup>, 同时可大量降低生产用水。生产废液能被有效回收利用(Bautista *et al.*, 2001), 废液中富含氨基酸、多肽、蛋白质、乳酸钙、脂肪、色素及活乳杆菌(Hall *et al.*, 1992; Raa *et al.*, 1983), 可作为水产饲料的原料及添加剂, 能使鲑鱼增色(汪家铭, 1997), 其中所含乳酸钙是很好的动物补充饲料(Rao *et al.*, 2000)。

\* 浙江省重点社会发展资助项目, 2004C13037 号。周湘池, 副研究员, E-mail: zhouxiangchi@nbu.edu.cn

1) Morrow J, 2001. Biotechnological Utilisation of NepHrops Shell Waste. Ph.D Thesis, The Queen's University of Belfast

2) Bustos R O, 1996. Microbial Extraction of Chitin from Prawn Shell Waste. Ph.D Thesis, The Queen's University of Belfast

通讯作者: 刘必谦, 博士, 研究员, E-mail: lbqhy@nbu.edu.cn

收稿日期: 2007-09-22, 收修改稿日期: 2007-11-17

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

斜面培养基, MRS 培养基, 虾壳取自台州丰润生物化学有限公司。10kg 钢质发酵罐(台州丰润生物化学有限公司自制)。

### 1.2 方法

**1.2.1 测定方法** pH 测定方法: 电位滴定法; 乳杆菌计数方法: 平板菌落计数法; 灰分测定方法: 灼烧称重法; 蛋白质测定: 凯氏定氮法; 残酸测定: 酸碱滴定法。

#### 1.2.2 实验方法

(1) 目标菌筛选 称 25g 虾壳样品在研钵中磨碎, 置于 225ml 0.85% 无菌生理盐水中, 摇匀, 静置 30min, 取 1ml 于 100ml MRS 液体培养基中, 37℃ 富集培养 48h, 然后用 0.85% 生理盐水对培养液进行  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  三个浓度梯度稀释, 再分别吸取 50 $\mu$ l 涂布于固体 MRS 培养基平板上, 37℃ 培养 24h 后观察细菌生长情况, 并记录观察结果。

(2) 目标菌分离、纯化 根据 MRS 培养基上生长菌落的形态、颜色以及大小, 将分离到的菌株在 MRS 液体培养基中进行培养, 通过 pH 的测定来初步确定是否为产酸菌, 通过菌相分析及 DNA 检测来最后确证菌株种类。将获得的目标菌株接种到 MRS 斜面培养基中, 在 37℃ 下培养 48h 后放置于 4℃ 冰箱保种。

(3) 目标菌培养温度优化 将筛选到的菌株分别接到 30ml MRS 液体培养基, 37℃ 培养 24h 后作为种子备用。移取种子液 30 $\mu$ l 于 30ml 无菌 MRS 液体培养基中, 每种菌株分别设置 15、25、30、35、40℃ 五个温度梯度, 培养 48h 后, 分别测其 pH, 根据 pH 的大小来判断菌株的最佳生长温度。

(4) 目标菌培养时间优化 将筛选到的乳杆

菌株分别接到 30ml MRS 液体培养基, 最佳温度下培养 24h 后作为种子备用, 移取种子液 30 $\mu$ l 置于 30ml 无菌 LB 液体培养基中, 每种菌株分别设置 12、18、24、30、36、48、60、72h 八个时间梯度, 最佳温度下培养 24h 后分别测其 pH, 以判断其到达对数生长期所需要的时间。

(5) 目标菌培养基 pH 优化 经过温度、时间优化得到的最终乳杆菌接种到 pH 6.25 的 100ml MRS 液体培养基中, 最佳温度下培养 24h 后作为种子备用, 分别移取种子液 50 $\mu$ l 置于 pH 分别为 5.50、6.00、6.25、6.50、6.75、7.00 的 100ml 无菌 MRS 液体培养基中, 最佳温度下培养 36h 后, 涂布 MRS 固体培养基平板, 放置于 37℃ 下培养 24h 后记数。

(6) 发酵实验 用筛选到的乳杆菌在设置的实验条件下进行发酵实验, 虾壳经清洗处理(不灭菌, 不使用化学试剂)后进行发酵。小型发酵实验在 1250ml、2500ml 塑料瓶中进行, 扩大试验在 10kg 发酵罐中进行。

## 2 结果与amp;讨论

### 2.1 目标菌的分离筛选

从 MRS 固体培养基中分离到 8 种菌株, 生化和 DNA 分子鉴定确定为乳杆菌属细菌 (*Lactobacillus Beijerinck*, 1901)(菌株鉴定另文发表), 将其分别命名为 BR-1、BR-2、BR-3、BR-4、BR-5、BR-6、BR-7 和 BR-8。

### 2.2 目标菌温度优化

将八种菌株分别接到 MRS 液体培养基上分别培养 24h, 各取 50 $\mu$ l 的量分别接于 MRS 液体培养基, 将其放在设定的各个温度下培养 48h, 其 pH 测定结果见表 1。

表 1 八种乳杆菌菌株在不同培养温度下的 pH  
Tab.1 The pH values at different culture temperatures for the eight *Lactobacillus* strains

菌种	15	25	30	35	40
BR-1	4.65 ± 0.01 <sup>c</sup>	4.09 ± 0.38 <sup>c</sup>	3.80 ± 0.01 <sup>c</sup>	3.67 ± 0.02 <sup>e</sup>	3.71 ± 0.01 <sup>d</sup>
BR-2	3.86 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.83 ± 0.04 <sup>b</sup>	3.80 ± 0.06 <sup>ef</sup>	3.77 ± 0.03 <sup>d</sup>	3.92 ± 0.07 <sup>c</sup>
BR-3	4.51 ± 0.02 <sup>ef</sup>	3.92 ± 0.07 <sup>f</sup>	3.63 ± 0.03 <sup>f</sup>	3.61 ± 0.06 <sup>e</sup>	3.62 ± 0.04 <sup>f</sup>
BR-4	5.93 ± 0.01 <sup>a</sup>	5.91 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.92 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.91 ± 0.04 <sup>a</sup>	3.63 ± 0.04 <sup>f</sup>
BR-5	4.55 ± 0.02 <sup>f</sup>	4.31 ± 0.08 <sup>d</sup>	4.26 ± 0.07 <sup>c</sup>	4.33 ± 0.06 <sup>c</sup>	4.31 ± 0.07 <sup>a</sup>
BR-6	5.43 ± 0.03 <sup>b</sup>	5.38 ± 0.12 <sup>b</sup>	4.55 ± 0.10 <sup>bc</sup>	4.62 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.42 ± 0.01 <sup>a</sup>
BR-7	5.13 ± 0.02 <sup>c</sup>	4.69 ± 0.17 <sup>cd</sup>	4.33 ± 0.12 <sup>cd</sup>	4.38 ± 0.12 <sup>bc</sup>	4.36 ± 0.14 <sup>a</sup>
BR-8	5.00 ± 0.02 <sup>d</sup>	4.86 ± 0.02 <sup>c</sup>	4.62 ± 0.12 <sup>b</sup>	4.36 ± 0.12 <sup>c</sup>	4.36 ± 0.12 <sup>a</sup>

注: 表中数据为平均值 ± 标准差, 下同; 同列数据上标不同者为差异显著 ( $P < 0.05$ )

由表 1 可知: 在相同培养温度下, BR-4—BR-8 的 pH 都高于 BR-1—BR-3, 且差异显著, 即它们的产酸能力相对较弱; 在温度 30—40 范围内, BR-1—BR-3 的 pH 均可以达到 4 以下, 但在 35 的温度下均达到各自的最低 pH, 其中 BR-3 所能达到的 pH 最低, 说明 BR-3 的产酸能力相对最强; 在(35±5) 的温度范围内, BR-1—BR-3 的产酸能力相差不大, 这种特性很适合工业生产, 故以下取 BR-1—BR-3 进行培养时间的优选。

### 2.3 目标菌株培养时间优化

将 BR-1、BR-2、BR-3 分别接至 MRS 液体培养基上, 在 35 温度下培养不同时间, 其 pH 测定结果见表 2。

表 2 BR-1、BR-2、BR-3 在培养不同时间后的 pH  
Tab.2 The pH of strain BR-1, BR-2 and BR-3 at different culture times

菌种	BR-1	BR-2	BR-3
12h	5.02 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.08 ± 0.03 <sup>a</sup>	4.84 ± 0.06 <sup>a</sup>
18h	4.23 ± 0.03 <sup>b</sup>	4.31 ± 0.03 <sup>b</sup>	4.28 ± 0.05 <sup>b</sup>
24h	4.03 ± 0.04 <sup>c</sup>	3.85 ± 0.01 <sup>c</sup>	3.82 ± 0.05 <sup>c</sup>
30h	3.82 ± 0.11 <sup>de</sup>	3.67 ± 0.02 <sup>e</sup>	3.62 ± 0.06 <sup>de</sup>
36h	3.84 ± 0.05 <sup>e</sup>	3.64 ± 0.03 <sup>ef</sup>	3.62 ± 0.06 <sup>e</sup>
42h	3.61 ± 0.05 <sup>f</sup>	3.57 ± 0.02 <sup>f</sup>	3.58 ± 0.03 <sup>de</sup>
48h	3.60 ± 0.05 <sup>def</sup>	3.57 ± 0.02 <sup>f</sup>	3.60 ± 0.05 <sup>d</sup>
54h	3.63 ± 0.03 <sup>df</sup>	3.61 ± 0.05 <sup>ef</sup>	3.59 ± 0.03 <sup>de</sup>
60h	3.57 ± 0.02 <sup>f</sup>	3.61 ± 0.03 <sup>ef</sup>	3.63 ± 0.03 <sup>de</sup>
66h	3.56 ± 0.12 <sup>def</sup>	3.60 ± 0.02 <sup>e</sup>	3.61 ± 0.05 <sup>de</sup>
72h	3.63 ± 0.05 <sup>f</sup>	3.54 ± 0.05 <sup>ef</sup>	3.59 ± 0.04 <sup>de</sup>

注: 同列数据上标不同者为差异显著( $P < 0.05$ )

由表 2 可知: BR-1、BR-2 和 BR-3 在分别培养 30h、24h 和 24h 以上后, pH 到达 4 以下, 并以此时间段为界, 在此时间段以后的差异显著, 在此时间段以前的差异不显著(个别点例外)。说明三种目标菌株产

酸能力率相差不大, 它们均可用于发酵虾壳生产甲壳素。但 BR-3 的培养时间和稳定性相对更好些, 故在以下的实验中仅选用 BR-3。

### 2.4 BR-3 培养基 pH 优化

由表 3 可知: BR-3 在培养基 pH 为 6.0—6.50 范围时菌落数较多, pH 为 6.50 时菌落数最多, 为  $31.4 \times 10^8$ 。所以用 BR-3 进行种子培养和发酵时, 其最佳起始 pH 定为 6.50。

### 2.5 发酵实验

**2.5.1 固液比的确定** 未经预处理的新鲜原料虾壳与发酵液的比例(固液比)为 1:3 时, 可将虾壳表面浸没, 因此将固液比设定为 1:3、1:4 和 1:5, 结果显示, 甲壳素产品灰分含量无明显变化。且固液比过大时, 其生产用水、残糖和残酸的总量会随之增大, 因而会增加发酵用糖量, 造成成本增大和副产物深度回收时的困难, 因此适当的固液比为 1:3—1:4。但原料虾壳经适当工艺预处理后, 原料体积有所减小, 发酵固液比可为 1:3, 以下实验中均取此固液比。

**2.5.2 接种量对甲壳素产品灰分含量的影响** 由表 4 可知: 随着接种量的增加, 甲壳素产品灰分逐渐减少。因为接种量直接影响到发酵体系中优势种群的建立, 接种量越大, 产酸的时间越早, 在相同的发酵时间内, 虾壳与乳酸作用的时间越长, 脱钙越好, 故产品灰分越低。此外, 增大接种量又可减少或消除异型发酵。因为在乳酸菌还没有完全形成优势的情况下, 酵母菌或其他杂菌处于优势, 存在部分酒精发酵或其他异型发酵, 此过程要消耗葡萄糖。因此, 接种量越大, 体系越不易腐败, 因而越能保证发酵的成功。当 BR-3 的接种量大于 8% 后, 产品灰分小于 8%, 产品质量符合工业生产要求; 接种量大于 10% 后, 产品灰分没有明显降低, 可能是受体系中葡萄糖的量所限, 因为一定的碳源只能维持一定的生物量。综合考虑发酵成功率、产品质量和生产成本, BR-3 的接种量以 10% 为佳。

表 3 不同起始 pH 培养基培养 BR-3 的菌落数( $\times 10^8$ )

Tab.3 The bacteria biomass of strain BR-3 at various original pH values of the culture medium

起始 pH	5.50	6.00	6.25	6.50	6.75	7.00
菌落数	10.71 ± 0.246	22.64 ± 0.136	24.56 ± 0.140	31.41 ± 0.246	9.57 ± 0.200	10.63 ± 0.080

表 4 BR-3 接种量对产品灰分含量的影响

Tab.4 The relationship between bacteria biomass of strain BR-3 and ash of chitin

接种量(%)	6	8	10	12	14	16
灰分(%)	15.87 ± 0.255	8.19 ± 0.110	2.91 ± 0.031	2.63 ± 0.175	2.47 ± 0.117	2.43 ± 0.114

注: 葡萄糖含量为 6.0%, 温度为(35±1), 发酵 168h。葡萄糖浓度和接种体积均相对于发酵液体积而言, 下同

**2.5.3 葡萄糖加入量对产品灰分的影响** 由表 5 可知：随着发酵液中葡萄糖浓度的增加，甲壳素产品灰分逐渐减少。不加葡萄糖或葡萄糖浓度低时，虾壳一直都沉于发酵瓶的底部，且虾壳和发酵液发黑发臭，这是由于腐败菌等杂菌生长的缘故。乳杆菌的生长需要碳源，其发酵时也将碳源转化为乳酸，葡萄糖加得越多，发酵产气量越多，说明脱钙或脱矿物质的效果越好，而且发酵液颜色越红，表明有更多的虾壳色素释放出来，即脱蛋白质和脱油脂的效果越好，意味着产品品质更好。因为葡萄糖是发酵的限制性底物，但当葡萄糖的加入量达 4.5% 以后，产品灰分已小于 8%，符合工业生产要求；当葡萄糖加入量达 6% 后，对产品质量的改善已无意义，因为虾壳中的灰分已基本去除，多余的糖只会增加残酸和残糖的浓度，况且此时的 pH 值已在 3 附近，在如此低的 pH 环境中，发酵所产生的乳酸若不能及时被碳酸钙中和，则

乳杆菌最终将受到抑制或被杀死，从而导致发酵终止；且发酵液中残糖太多会影响副产物乳酸钙的精制，因此可将葡萄糖加入量定为 4.5%—5% 之间，具体要根据对产品的质量要求决定，且在发酵后期糖的加入可采用流加的形式，以避免残糖和残酸过高造成浪费。

**2.5.4 发酵时间对产品灰分的影响** 由表 6 可知，随着发酵时间的增加，甲壳素灰分含量逐渐降低。发酵前期灰分含量下降较快，以后趋于平缓。乳杆菌 BR-3 发酵虾壳 48h 后，甲壳素产品灰分含量小于 10%，发酵 72h 后，甲壳素产品灰分约 3%。均符合工业生产的质量要求。发酵 120h 后，甲壳素产品灰分含量趋于稳定，实际生产中，也可根据对甲壳素产品质量的要求不同，将发酵时间控制在 48—120h 之间。但从生产成本、产品质量和后续工艺考虑，将发酵时间定为 72h。

表 5 葡萄糖加入量对产品灰分的影响  
Tab.5 The relationship between concentration of glucose and ash of chitin

葡萄糖(%)	0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
灰分(%)	腐败	17.38 ± 0.125	11.20 ± 0.093	5.62 ± 0.053	4.09 ± 0.123	3.63 ± 0.137	2.87 ± 0.057

注：菌种为 BR-3，接种量为 10%，温度为(35 ± 1)，发酵 168h

表 6 发酵时间对甲壳素灰分的影响  
Tab.6 The relationship between fermentation time and ash of chitin

发酵时间(h)	24	48	72	96	120	144	168
产品灰分(%)	12.49 ± 0.123	8.58 ± 0.068	3.55 ± 0.176	3.15 ± 0.078	2.64 ± 0.088	2.04 ± 0.056	1.56 ± 0.087

注：菌种为 BR-3，葡萄糖含量为 4.7%，接种量为 10%，温度为(35 ± 1)

## 2.6 用 MRS 替代培养基的扩大发酵试验

虾壳清洗液中含大量营养物质，以虾壳水洗液+葡萄糖(或蔗糖)作为 BR-3 的种子培养基，可以降低种子培养的成本。培养出的 BR-3 种子进行扩大发酵(鲜虾壳 10kg)实验，结果见表 7。

由表 7 可知：用替代培养基培养 BR-3 种子进行发酵的产品指标能达到商品甲壳素的质量要求(灰分 10%)。虾壳中有大量的蛋白质、脂肪、矿物质和其他物质，它们可以提供细菌生长所需的营养物质，故可以替代种子培养基中的蛋白胨和其他营养物质。

## 2.7 酸碱法与乳杆菌发酵法生产排放对比

见表 8。乳杆菌发酵法 COD、BOD 排放量比酸碱法减量 98% 以上，特别是前者不使用对环境损害大的高浓度盐酸和烧碱，不产生环境中无法降解的 COD，副产物容易回收(周湘池等, 2007)。浙江地区甲

壳质生产厂均在淡水匮乏和水价极高的海边，乳杆菌发酵法的淡水用量仅为酸碱法的 1/4—1/10，节约资源。

表 7 虾壳水洗液+葡萄糖培养基培养菌种发酵产品指标测定结果

Tab.7 The quality index of chitin produced with the medium of shell-washing water and glucose

指标	第一批次	第二批次	第三批次
发酵最终 pH	3.85	3.77	3.51
残酸(g/100ml)	1.47	1.49	1.53
残糖(mg/100ml)	0.18	0.13	0.11
蛋白质绝对去除率(%)	79.45	79.30	80.49
产品灰分(%)	5.95	4.75	3.82
产品得率(%)	18.39	16.26	15.64

注：菌种为 BR-3，葡萄糖含量为 5%，接种量为 10%，温度为(35 ± 1)，时间为 72h

表 8 酸碱法与乳杆菌发酵法生产废水排放对比(每吨甲壳质)  
Tab.8 Comparison of waste water from two methods of chitin production

方法名称	酸碱法	乳杆菌发酵法
原料	HCl, NaOH	糖
生产用水(t)	400—1000	100
环境中不能降解 COD (t)	0.53—0.57	0
BOD 排放量(t)	1.76(蛋白质)+0.59(油脂) = 2.35	0—0.035(排污减量 98.5%)
COD + BOD 总排放量(t)	3	0—0.035
副产物回收情况	难	易
副产物利用价值	低	高
废水排放情况	不达标或难达标	达标或零排放

从本文实验可以看出, BR-3 种子培养条件和发酵条件粗放, 残糖少, 产酸效率高, 且其发酵温度低, 发酵周期短, 发酵条件粗放(原料虾壳无需灭菌), 是发酵虾壳生产甲壳质的较佳菌株, 再结合细胞固定化技术, 可望用于工业化甲壳素生产(BR-3 和采用市售多种乳杆菌产品的发酵对比试验结果也是如此, 另文发表)。

### 3 结论

3.1 从虾壳中分离一株本土乳杆菌株 BR-3, 其最佳培养温度为 35 , 最佳培养 pH 为 6.50, 在此培养温度下达到对数生长期的时间为 42h, 发酵液 pH 小于 4, 有较好的产酸能力。

3.2 BR-3 用于发酵虾壳生产甲壳素时, 其最佳发酵起始 pH 为 6.5, 在较佳的发酵条件下, 产品灰分 6%, 质量优于酸碱法生产的产品(灰分 10%)。

3.3 BR-3 用于发酵虾壳生产甲壳素时, 其种子培养基 MRS 培养基可用虾壳洗水中的水溶性蛋白来代替, 其发酵培养基只用葡萄糖。BR-3 种子培养条件和发酵条件较粗放, 非常适合甲壳素的工业化生产。

3.4 通过扩大试验, 证明了乳杆菌发酵法生产甲壳素是可行的。乳杆菌发酵法生产甲壳素是一种环境友好、资源节约的清洁生产方法。

### 参 考 文 献

汪家铭, 1997. 甲壳素开发应用前景广阔. 精细与专用化学品, 3: 1  
郎亚军, 张苓花, 王运吉, 2004. 甲壳素的研究和应用. 中国食品添加剂, 1: 83—86  
周湘池, 刘必谦, 徐君义等, 2007. 甲壳质生产物料平衡分析及清洁生产途径. 海洋学研究, 25(3): 66—74

郭振楚, 1997. 甲壳素研究进展. 日用化学工业, 2: 29—32  
Bautista J, Jover R M, Gutierrez J F *et al*, 2001. Preparation of crawfish chitin by *in situ* lactic acid production. Process Biochem, 37: 229—234  
Bhowmick R, Ghosal A, Chatterjee N S, 2007. Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholera*. J Appl Microbiol, 103(1): 97—108  
Esteban M A, Mulero V, Cuesta A *et al*, 2000. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream. Fish & Shellfish Immunology, 10: 543—554  
Hall G M, Silva S D, 1992. Lactic acid fermentation of shrimp (*Penaeus monodon*) waste for chitin recovery. In: Brine C J, Sandford P A, Zikakis J P ed. Advance in chitin and chitosan. London: Elsevier Applied Sciences, 633—638  
Luis C A, Huerta S, Hall G M *et al*, 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Process Biochemistry, 37: 1359—1366  
Raa J, Gildberg A, Stroem T, 1983. Silage production-theory and practice. In: Ledward D A, Taylor A J, Lawrie R A ed. Upgrading waste for feeds and food. London: Butterworths, 117—132  
Rao M S, Munoz J, Stervens W F, 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. Appl Microbiol Biotechnol, 54: 808—813  
Robert L M, Clemens K, Peterbauer K P *et al*, 1999. Expression of Two Major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. Applied and Environmental Microbiology, 65(5): 1858—1863  
Shiraia K, Guerrero I, Huertaa S *et al*, 2001. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. Enzyme and Microbial Technology, 28: 446—452

## FERMENTATION OF *LACTOBACILLUS* USED FOR CLEAN PRODUCTION OF CHITIN BASED ON SHELLFISH WASTE AS MATERIAL

ZHOU Xiang-Chi, LIU Bi-Qian, GUO Chun-Ping, WANG Ya-Jun

(Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology, Ministry of Education, Faculty of Life Science and Biotechnology,  
Ningbo University, Ningbo, 315211)

**Abstract** Wastes from conventional chitin production pollute marine environment and ecology seriously. A new and green procedure using *Lactobacillus* BR-3 from shrimp shell was developed in which few or nil waste was released. The BR-3 strain was isolated from shrimp shell at the optimum cultural conditions of temperature, time, and original pH of culture medium at 35 °C, 42h and 6.50 respectively. Factors affecting the production quality were bacteria biomass, concentration of glucose, and fermentation time were tested. The results indicate that the glucose or carbon source was the restrictive substrate in the fermentation procedure at the conditions: bacteria biomass at  $10^9$  cfu, solid/liquid ratio 1 : 3, glucose concentration 4.5%, temperature  $(35 \pm 2)$  °C, and fermentation time 3 to 4 days. The efficiency of de-mineral and de-protein were 96.67% and 78.82%, respectively. The procedure produced quality chitin with ash content <6% equal to or better than that produced with traditional methods. Moreover, all the protein, peptides, amino acid, fat, astacin, calcium lactate could be reused for recycle. Therefore, the *Lactobacillus* fermentation method is an environment friendly and efficient one to produce chitin from shrimp shell waste and could be applied in an industrial scale.

**Key words** *Lactobacillus*, Optimization, Fermentation, Shrimp shell waste, Clean chitin production