潘小卓, 谢勇俊, 尹凯波, 等. 虾壳高效脱灰分菌株的筛选及发酵工艺的优化 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 279−288. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120364

PAN Xiaozhuo, XIE Yongjun, YIN Kaibo, et al. Screening and Optimization of High-efficiency Demineralization Bacterial Strains for Shrimp Shell Fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 279−288. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120364

· 工艺技术 ·

虾壳高效脱灰分菌株的筛选及发酵工艺的优化

潘小卓, 谢勇俊, 尹凯波, 郑子露, 王一兵*

（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: 虾壳是目前几丁质的最主要来源，对虾壳脱灰分是制备几丁质的关键步骤。本研究从废弃虾塘中分离到两株产酸菌株 GXUN-XS3 和 GXUN-XS8，运用形态学及分子生物学方法对其进行鉴定，通过单因素实验及响应面试验优化菌株的最优发酵工艺，利用 SEM 对发酵产物进行表征分析。结果表明，GXUN-XS3 和 GXUN-XS8 分别为粪肠球菌和海岸微小杆菌。优化后 GXUN-XS3 在含 2% 虾壳粉、3% 葡萄糖、1% 氯化钠的培养基中以温度 30.5 ℃、初始 pH5.6、接种量 3.3% 条件下发酵 3 d，虾壳脱灰分率达到 96.09%，较优化前提高 6.29%。GXUN-XS8 在含 2% 虾壳粉、2% 麦芽糖、1% 氯化钠的培养基中以温度 30.7 ℃、初始 pH5.7、接种量 3.9% 条件下发酵 4 d，虾壳脱灰分率达到 95.73%，较优化前提高 6.17%。SEM 分析发现，产物的微观结构均呈现出纤维状态并带有孔隙，与酸碱法制备的工业几丁质相比，其纤维组织更加完整。本研究为微生物发酵法降解虾壳废弃物提供了菌株资源和有益参考。

关键词: 虾壳, 产酸菌, 脱灰分, 工艺优化, 响应面法

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0279−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120364　　本文网刊:

Screening and Optimization of High-efficiency Demineralization Bacterial Strains for Shrimp Shell Fermentation

PAN Xiaozhuo, XIE Yongjun, YIN Kaibo, ZHENG Zilu, WANG Yibing*

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

Abstract: Shrimp shells are currently the primary source of chitin, and demineralization of shrimp shells is a key step in the preparation of chitin. In this study, two acid-producing strains, GXUN-XS3 and GXUN-XS8, were isolated from abandoned shrimp ponds. They were identified through morphological and molecular methods. The optimal fermentation conditions were optimized using single-factor and response surface experiments. SEM analysis was used to characterize the fermentation products. The results showed that the isolated strains GXUN-XS3 and GXUN-XS8 were identified as *Enterococcus faecalis* and *Exiguobacterium aestuarii*, respectively. The optimized GXUN-XS3 was fermented in a medium containing 2% shrimp shell powder, 3% glucose, and 1% sodium chloride at a temperature of 30.5 ℃, an initial pH of 5.6, and an inoculum size of 3.3% for 3 days. The demineralization of shrimp shell reached 96.09%, which was an increase of 6.29% compared to before optimization. The optimized GXUN-XS8 fermented in a medium containing 2% shrimp shell powder, 2% maltose, and 1% sodium chloride at a temperature of 30.7 ℃, an initial pH of 5.7, and an inoculum size of 3.9% for 4 days. The demineralization of shrimp shell reached 95.73%, which was an increase of 6.17% compared to before

收稿日期: 2024−12−30

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: 潘小卓（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋微生物资源的开发与利用, E-mail: zhuo1861work@163.com。

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

optimization. SEM analysis revealed that the products had a fibrous structure with pores, more intact than industrial chitin produced by acid-alkali methods. This study provides microbial resources and references for the microbial fermentation degradation of shrimp shell waste.

Key words: shrimp shell; acid-producing bacteria; demineralization; process optimization; response surface methodology

南美白对虾是我国养殖虾类的主导品种之一，其具有生长快、适应性强和营养价值高等优势[1]。在 2021 年，仅广西地区对虾产量就超过 29 万吨[2]。对虾在整个生命周期中需蜕十几次壳，由此产生的虾壳废弃物约占整虾质量的 40%~60%[3]。虾壳主要由灰分（30%~50%）、蛋白质（15%~50%）和几丁质（15%~30%）组成[4]，对其脱灰分（demineralization，DM）是制备几丁质的关键步骤。在该处理过程中仅需添加少量碱液，即可获得几丁质[5]。几丁质具有抗菌、免疫调节等生物活性[6−7]，在生物医药和食品等领域具有广泛的应用潜力[8]，对其进行制备有助于虾壳的高值化利用[9]。

现阶段虾壳 DM 的主要方法为酸碱法和微生物发酵法[10]。其中，酸碱法 DM 废水处理成本高，环境危害大，不利于功能物质的回收。而微生物发酵法主要利用微生物代谢过程中产生的有机酸及蛋白酶去除虾壳中的矿物质和蛋白质[11]，从而获得几丁质。Cira 等[12] 通过利用一种乳酸杆菌对虾壳进行发酵处理，结果表明虾壳矿物质去除率达到了 85%，而蛋白质去除率为 87.6%。张婧[13] 通过嗜热链球菌发酵虾头，使用 10% 的虾头和 5% 的葡萄糖，在发酵 64 h 后，达到了 94.15% 的蛋白质去除率和 83.27% 的脱灰分率。虽然上述研究具有条件温和、环境友好等优点，但仍面临菌株选择有限和工艺复杂等问题，这影响了微生物发酵法在降解虾壳及制备几丁质中的进一步应用[14]。

因此，本研究希望从北部湾地区废弃虾塘池淤泥中筛选出能够高效脱除虾壳灰分的菌株，运用形态学及分子生物学进行菌种鉴定，通过单因素及响应面试验，确定菌株 DM 最优发酵工艺条件，并对所得几丁质进行表征分析，拟开发绿色高效的虾壳灰分脱除技术。以期为虾壳废弃物资源化利用提供新的菌种，并为微生物发酵法降解虾壳废弃物制备几丁质提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

采集广西北部湾地区废弃虾塘淤泥样品，将样品放入无菌样品袋中，提前准备好的干冰置于泡沫箱中与样品袋一起送回实验室。网上购入已剔除虾肉水洗后烘干的对虾壳，经粉碎，过 65 目筛（直径 250 μm）；种子液培养基（g/L）：MRS 肉汤培养基 52.2 g，虾壳粉 5.0 g。pH5.7±0.2，118 ℃ 灭菌 15 min；发酵培养基（g/L）：虾壳粉 20.0 g、葡萄糖 20.0 g、氯化钠 10.0 g。pH 自然，121℃ 灭菌 20 min。

GI54DS 高压蒸汽灭菌锅　厦门致微仪器有限公司；LEGEND MICR017 微量台式离心机　美国 Thermo Scientific 公司；Bio Rad T100 Master-cycler nexus 聚合酶链式反应仪　美国 Bio-Rad 公司；ZXMP-A1230 电热恒温培养箱　上海智城分析仪器制造有限公司；HNYC 1102 智能恒温培养振荡器　天津欧诺仪器有限公司；PHS-3Cb pH 计　上海越平科学仪器有限公司；SUPRA 55 Sapphire 扫描电子显微镜（SEM）　德国卡尔蔡司公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株筛选

1.2.1.1 初筛　取 2 g 淤泥样品置入 18 mL 无菌水中，34 ℃、180 r/min 培养 12 h。取其上清液稀释成 10^{-3}、10^{-4} 和 10^{-5} 3 个梯度菌悬液，将该悬液涂布于添加 2% 碳酸钙的 MRS 固体培养基上，34 ℃ 倒置培养 3~5 d。将此期间产生透明圈的菌株，接种至 30 mL 发酵培养基中，34 ℃、180 r/min 培养 24 h。在培养期间，每 2 h 测定一次发酵液 pH，筛选出 pH 较低的菌株进行复筛，并置甘油管中-20 ℃ 保藏。

1.2.1.2 复筛　挑取初筛所得菌株，接种至 30 mL 种子液培养基中，34 ℃、180 r/min 摇床中活化 18 h，其 OD_{600} 为 0.8~1.0。再以 3% 接种量，接种至 50 mL 发酵培养基中，34 ℃、180 r/min 培养 6 d 后，4 ℃ 4000 r/min 离心 10 min，取沉淀，去离子水反复清洗两到三遍，直到沉淀物中没有明显杂质，置于 65 ℃ 下烘干至恒重[15]。测定沉淀物中灰分含量，并以 DM% 为筛选标准。

1.2.2 菌株鉴定

1.2.2.1 菌株形态及生理生化　将筛选出的菌株接种到 MRS 固体培养基上，34 ℃ 恒温培养 48 h，观察菌株的菌落形态及进行革兰氏染色。生理生化试验：参考《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》，对筛选菌株进行糖类代谢试验、氧化-发酵试验、甲基红试验、明胶液化试验、硫化氢试验、石蕊牛奶试验、靛基质试验。

1.2.2.2 菌株 16S rDNA 序列分析及系统发育树构建　按照张奇等[16] 的方法进行菌株 16S rDNA 扩增，并将 PCR 扩增产物送于生工生物工程（上海）股份有限公司测序。所得序列提交 Ezbiocloud，并与数据库中同源性较高的序列进行比对。使用 MEGA 11 软件进行 16S rDNA 序列的比对分析，并构建系统发育树。

1.2.3 单因素实验　初始发酵培养基：2% 虾壳粉、2% 葡萄糖、1% 氯化钠。初始发酵条件：3% 接种量，初始 pH 为 7，34 ℃、180 r/min 摇床发酵。

1.2.3.1　发酵时间优化　在初始发酵培养基及初始发酵条件基础上, 优化发酵时间因素 1、2、3、4、5、6 d。发酵结束后, 4 ℃ 4000 r/min 离心 10 min, 取沉淀, 去离子水反复清洗两到三遍, 直到沉淀中没有明显杂质, 置于 65 ℃ 下烘干至恒重, 计算虾壳粉 DM%, 并在发酵过程中参照 GB 12456-2021《食品中总酸的测定》中酸碱指示剂滴定法测定发酵液中总酸浓度(total acid, TTA)[17]。

1.2.3.2　发酵培养基优化　在发酵时间优化及初始发酵条件基础上, 优化初始发酵培养基中 a.虾壳粉浓度(w/v): 1%、2%、3%、4%、5%; b.碳源种类: 乳糖、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉; c.在碳源种类优化的基础上进行碳源浓度优化(w/v): 1%、2%、3%、4%、5%。发酵结束后, 离心, 取沉淀, 去离子水反复清洗, 置于 65 ℃ 下烘干至恒重, 计算虾壳粉 DM%。

1.2.3.3　发酵条件优化　在发酵时间优化及发酵培养基优化基础上, 优化初始发酵条件中 a.接种量(v/v): 1%、2%、3%、4%、5%; b.初始 pH: 4、5、6、7、8; c.发酵温度: 28、31、34、37、40 ℃。发酵结束后, 离心, 取沉淀, 去离子水反复清洗, 置于 65 ℃ 下烘干至恒重, 计算虾壳粉 DM%。

1.2.4　响应面试验　采用 Box-Behnken 中心组合试验进行条件优化, 以温度(A)、初始 pH(B)、接种量(C)为变量, 以 DM(Y)为响应值设计 3 因素 3 水平试验, 试验方案中的各因素和水平如表 1 和表 2 所示。

表 1　GXUN-XS3 响应面试验因素与水平

Table 1　Factors and levels of GXUN-XS3 response surface experiments

因素	变量	水平		
		−1	0	1
A	温度(℃)	28	31	34
B	初始pH	5	6	7
C	接种量(%)	2	3	4

表 2　GXUN-XS8 响应面试验因素与水平

Table 2　Factors and levels of GXUN-XS8 response surface experiments

因素	变量	水平		
		−1	0	1
A	温度(℃)	28	31	34
B	初始pH	5	6	7
C	接种量(%)	3	4	5

1.2.5　灰分含量测定　准确称取 0.2 g 样品(精确至 0.0001 g), 并参照 GB 5009.4-2016《食品中灰分的测定》中总灰分法测定虾壳粉中灰分含量[18]。灰分脱除率计算公式:

$$DM(\%)=\frac{C_0\times M_0-C_1\times M_1}{C_0\times M_0}\times 100$$

式中: DM 表示灰分脱除率, %; C_0 表示发酵前虾壳粉中灰分含量, %; C_1 表示发酵后虾壳粉中灰分含量, %; M_0 表示发酵前虾壳粉质量, g; M_1 表示发酵后虾壳粉质量, g。

1.2.6　几丁质表征分析　利用扫描电子显微镜(SEM)观察未处理虾壳与所得几丁质表面形态, 并进行比较。

1.3　数据处理

所有实验均为三组平行, 实验结果以平均值±标准差(S.D.)表示。利用 IBM SPSS Statistics 21 对实验数据通过单因素方差分析方法(One-way analysis of variance, one-way ANOVA)进行显著性差异分析(P<0.05)。采用 Design-Expert 13 软件, 依据 Box-Behnken 中心组合原则, 进行三因素三水平设计。图表绘制使用 Origin 64 软件。

2　结果与分析

2.1　菌株的筛选与鉴定

2.1.1　菌株的筛选　本实验从广西北部湾地区废弃虾塘池淤泥中共筛选出 8 株产酸的菌株。其发酵过程中 pH 变化如图 1A 所示, GXUN-XS1、GXUN-XS3、GXUN-XS4 和 GXUN-XS8 较于其他菌株 pH 下降快, 降到相同 pH 时所用时间短, 当发酵 16 h 后, pH 逐步趋于稳定并维持在 4.5~4.7, 远低于其他菌株 pH。在发酵过程中 pH 的降低通常表明有微生物产生了有机酸, 而这些酸性物质的产生往往与菌株

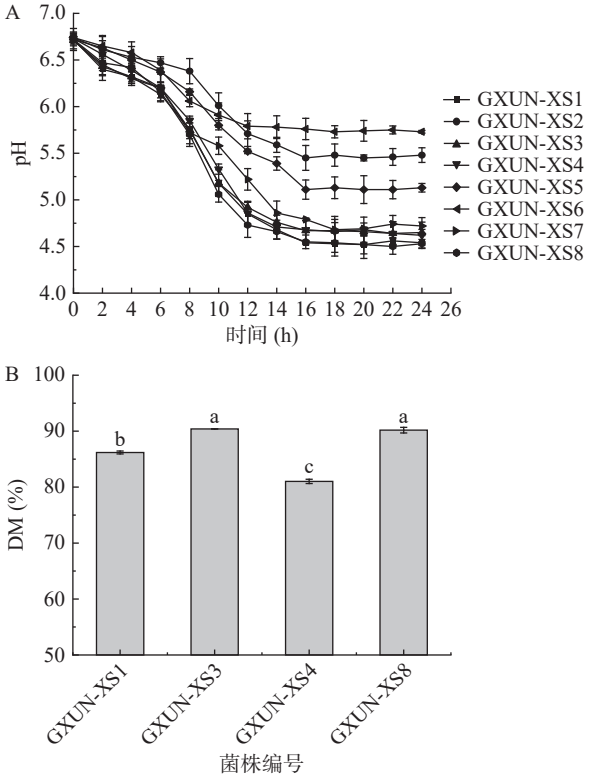


图 1　不同菌株发酵过程中 pH 变化及虾壳 DM% 结果

Fig.1　pH changes and DM% results of shrimp shells during fermentation of different strains

注: A-发酵过程中 pH 变化; B-虾壳 DM%; 不同字母表示差异显著(P<0.05), 图 4~图 8 同。

发酵潜力密切相关[19]。为了进一步筛选出产酸能力强的菌株，对上述 4 株菌进一步筛选，其虾壳 DM% 结果如图 1B 所示，GXUN-XS3 和 GXUN-XS8 的 DM% 分别达到 90.40%±0.02%、90.18%±0.50%，显著（P<0.05）高于其他两种菌株。因此，结合发酵液 pH 及虾壳 DM% 结果，最终选定 GXUN-XS3 和 GXUN-XS8 为虾壳降解菌。

2.1.2 菌株的鉴定 GXUN-XS3 菌落形态如图 2A 所示，为乳白色、周边整齐的圆形、湿润光滑且不透明，经革兰氏染色结果如图 2B 所示，为阳性，通过镜检观察，细菌均呈单个、成双或短链排列的卵圆形球菌，无芽孢、无鞭毛，该菌可初步鉴定为肠球菌[20]；GXUN-XS8 菌落形态如图 2C 所示，为浅橙色、周边整齐的圆形、湿润光滑且不透明，经革兰氏染色结果如图 2D，为阳性，细菌早期均呈杆状，后期部分呈球状，无芽孢、无鞭毛，该菌可初步鉴定为微小杆菌[21]。两株菌生理生化试验结果见表 3。GXUN-XS3 具有乳糖发酵能力、甲基红试验阳性、靛基质还原能力、酸性牛奶反应，表现出较强的酸性代谢特性，且能分解较多种糖类。而 GXUN-XS8 没有乳糖发酵能力，但能发酵淀粉，且没有靛基质还原能力，显示出不同的代谢特征，可能在代谢产物和酶的生产上与 GXUN-XS3 有所不同。

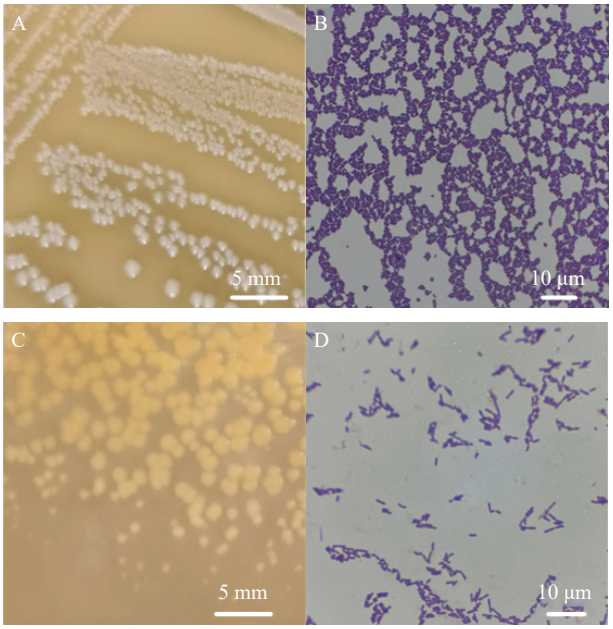


图 2 菌株在 MRS 固体培养基上菌落形态及革兰氏镜检结果

Fig.2 Colony morphology of the strain on MRS solid agar and the Gram stain results

注：A-GXUN-XS3 菌落形态；B-GXUN-XS3 革兰氏染色；C-GXUN-XS8 菌落形态；D-GXUN-XS8 革兰氏染色。

GXUN-XS3 系统发育树如图 3A 所示，GXUN-XS3 与粪肠球菌 AT CC 19433（*Enterococcus faecalis*）同源性为 100%，同时，结合该微生物的菌落形态及生理生化鉴定结果，认定 GXUN-XS3 为粪肠球菌；GXUN-XS8 系统发育树如图 3B 所示，GXUN-XS8 与海岸微小杆菌 TF-16（*Exiguobacterium aestuarii*）同源性为 100%，同时，结合该微生物的菌落形态及生理生化鉴定结果，认定 GXUN-XS8 为海岸微小杆菌。

表 3 GXUN-XS3 和 GXUN-XS8 菌株生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of GXUN-XS3 and GXUN-XS8

生理生化试验	GXUN-XS3	生理生化试验	GXUN-XS8
葡萄糖	+	葡萄糖	+
麦芽糖	+	麦芽糖	+
蔗糖	+	蔗糖	+
乳糖	+	乳糖	−
淀粉	−	淀粉	+
氧化-发酵试验	发酵型	氧化-发酵试验	发酵型
甲基红试验	+	甲基红试验	−
明胶液化试验	+	明胶液化试验	+
硫化氢试验	−	硫化氢试验	−
石蕊牛奶试验	酸凝固	石蕊牛奶试验	产酸
靛基质试验	+	靛基质试验	−

注：+表示可利用/阳性，−表示不可利用/阴性。

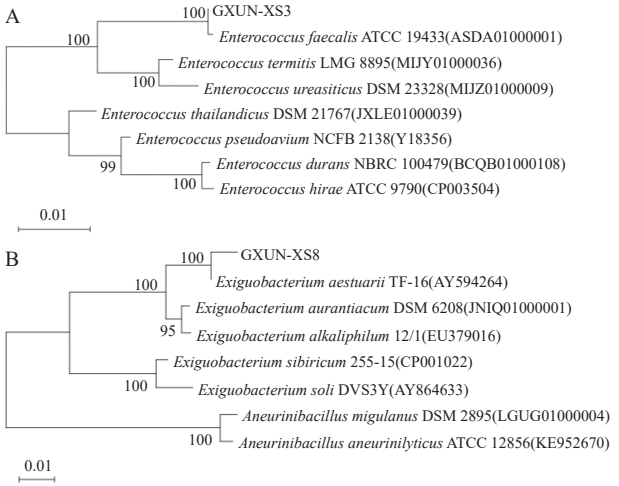


图 3 不同菌株 16S rDNA 系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of 16S rDNA of different strains

注：A-GXUN-XS3 系统发育树；B-GXUN-XS8 系统发育树。

2.2 单因素实验结果与分析

2.2.1 最佳发酵时间的确定 GXUN-XS3 发酵时间对虾壳 DM% 影响如图 4A 所示，1~3 d 时，其 DM% 快速增长，存在显著性差异（P<0.05），DM% 在发酵第 3 d 达到最大 90.60%±0.02%，在发酵时间 3 d 后趋于稳定，没有显著变化（P>0.05）；TTA 在发酵 2 d 后，随着发酵时间的延长显著增加（P<0.05）。原因在于发酵过程中 pH 逐渐降低，过酸环境造成细胞膜受损，细胞内糖酵解酶活性降低，菌株分解代谢速率减慢[22]。GXUN-XS8 发酵时间对虾壳 DM% 影响如图 4B 所示，1~4 d 时，随着发酵时间延长其 DM% 快速增长，存在显著性差异（P<0.05），DM% 在第 4 d 达到最大 90.34%±0.48%，之后趋于稳定，没有显著变化（P>0.05），说明菌株的代谢效率和干物质分解能力已经达到了最佳状态。TTA 在发酵过程中

虽然出现了短期波动，但从整体来看，TTA 在虾壳 DM% 达到最大后继续上升，说明该菌的代谢活动在这个时间段稳定且持续产酸，这与屈晓伟[23] 研究结果类似。发酵初期，虾壳中的微生物菌株通过代谢活动产生有机酸，这些有机酸与虾壳中的矿物质发生反应，导致矿物质的溶解和脱除[24]。此时发酵液中的有机酸积累较少，因此 TTA 较低且增长缓慢；当虾壳 DM% 达到最大时，有机酸的积累逐渐稳定，TTA 快速增长，此时 TTA 增长较 DM% 具有滞后性。因此经优化后，GXUN-XS3 和 GXUN-XS8 发酵时间分别为 3 d 和 4 d。

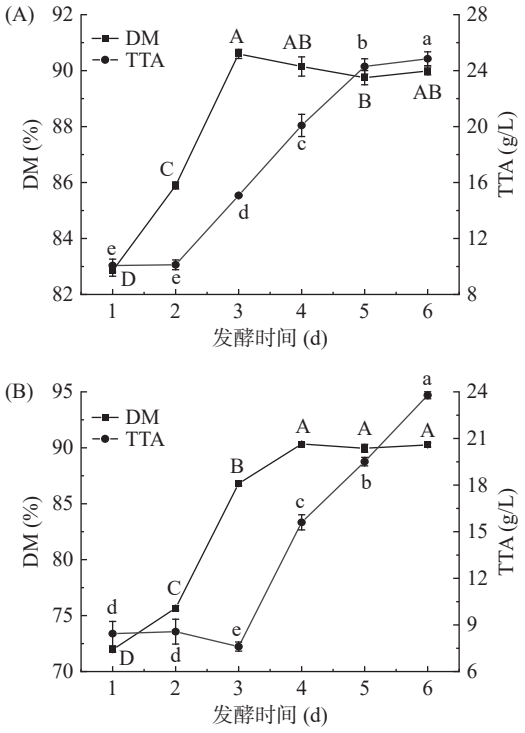


图 4　不同菌株发酵时间对虾壳 DM% 及发酵液中 TTA 的影响

Fig.4　Effect of fermentation times by different strains on DM% of shrimp shells and TTA in fermentation broth

注：A-GXUN-XS3 发酵时间及 TTA；B-GXUN-XS8 发酵时间及 TTA。

2.2.2　最佳发酵培养基的确定　虾壳中丰富的蛋白质可作为菌株发酵过程中的唯一氮源。由图 5A、图 6A 可知，不同虾壳粉浓度组间差异显著（$P<0.05$），当虾壳粉添加浓度为发酵液体积的 2% 时，GXUN-XS3（图 5A）和 GXUN-XS8（图 6A）有最大 DM% 分别为 90.37%±0.24% 和 90.02%±0.67%。之后随着虾壳粉浓度的增加 DM% 逐渐降低，这是由于虾壳粉浓度增加，导致发酵液中蛋白浓度也增加，蛋白具有黏性，将虾壳粉吸附并包裹，使有机酸较难进入虾壳内部与灰分反应[25]。碳源的选择和优化对发酵效率和产物生成具有显著影响。GXUN-XS3（图 5B）以葡萄糖为碳源时 DM% 最高，当葡萄糖添加量为发酵液体积的 3% 时（图 5C），其 DM% 可达到 93.93%±0.58%，与优化前（90.40%±0.02%）相比，提高了 3.91%。GXUN-XS8（图 6B）在发酵过程中可以利用葡萄糖和麦芽糖，其 DM% 之间存在显著性（$P<0.05$）差异，但以麦芽糖为碳源时有最高 DM% 为 91.21%±0.38%，当麦芽糖的添加量为发酵液体积的 2% 和 3% 时（图 6C），两个浓度之间 DM% 无显著性（$P>0.05$）差异，考虑成本因素，最终选择麦芽糖浓度为 2%。与 Duan 等[26] 报道中添加 15% 碳源结果相比，本实验所需碳源浓度更低，有望在后续工业化应用中低碳排放，达到绿色环保的生产要求。

经单因素优化，GXUN-XS3 发酵培养基优化为：2% 虾壳粉、3% 葡萄糖、1% 氯化钠；GXUN-XS8 发酵培养基优化为：2% 虾壳粉、2% 麦芽糖、1% 氯化钠。

2.2.3　最佳发酵条件的确定　菌株接种量的变化对虾壳 DM% 的影响较大。由图 7A、图 8A 可知，不同接种量各组之间存在显著差异（$P<0.05$）。GXUN-XS3（图 7A）接种量在 3%（v/v）时，虾壳 DM% 最大为 93.10%±1.26%；GXUN-XS8（图 8A）接种量在 4%（v/v）时，虾壳 DM% 最大为 95.31%±0.72%。接种量过低，菌株产酸速率较慢，发酵时间延长；接种量过高，菌株快速消耗营养物质，优先用于繁殖而非产酸。随着初始 pH 的降低，GXUN-XS3（图 7B）和

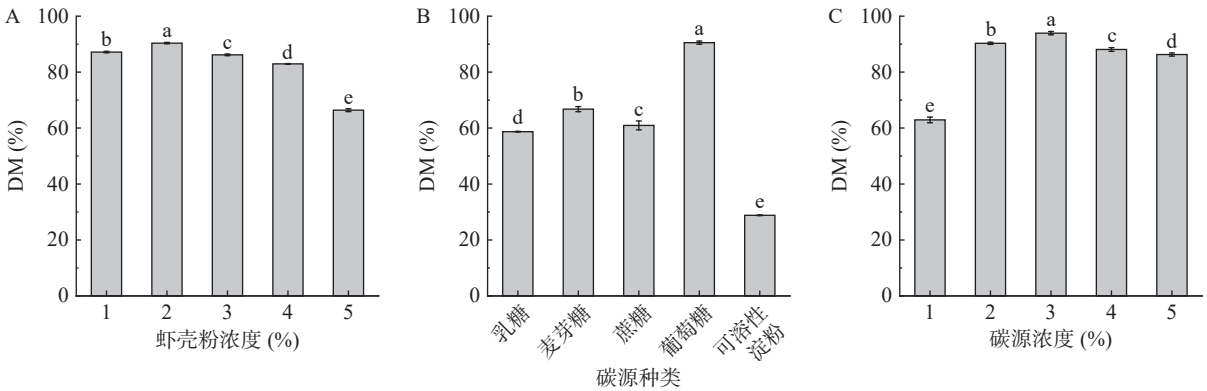


图 5　GXUN-XS3 发酵培养基优化

Fig.5　Optimization of fermentation medium for GXUN-XS3

注：A-虾壳粉浓度；B-碳源种类；C-碳源浓度。

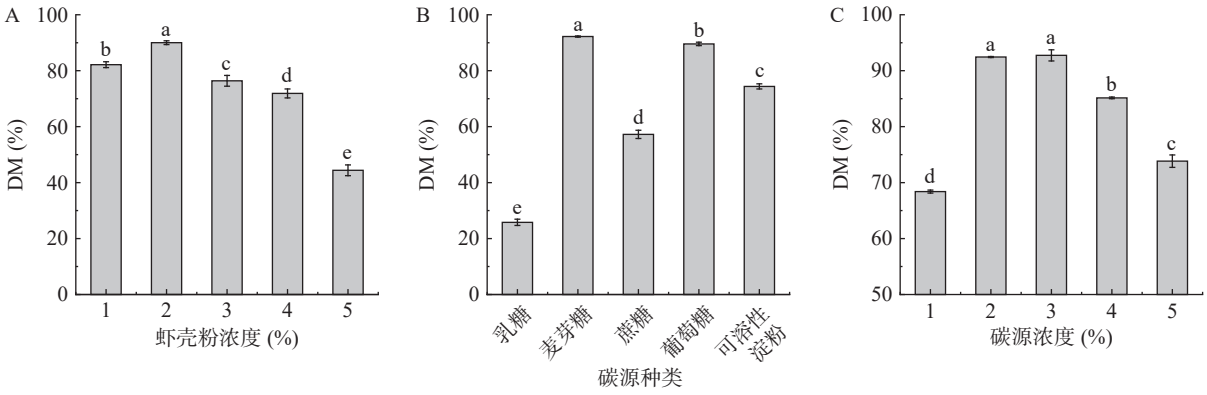


图 6 GXUN-XS8 发酵培养基优化

Fig.6 Optimization of fermentation medium for GXUN-XS8

注: A-虾壳粉浓度; B-碳源种类; C-碳源浓度。

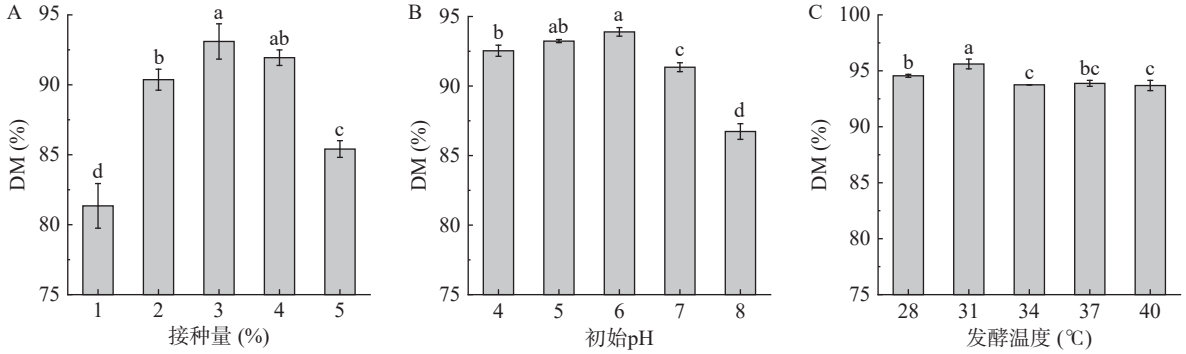


图 7 GXUN-XS3 发酵条件优化

Fig.7 Optimization of fermentation conditions of GXUN-XS3

注: A-接种量; B-初始 pH; C-温度。

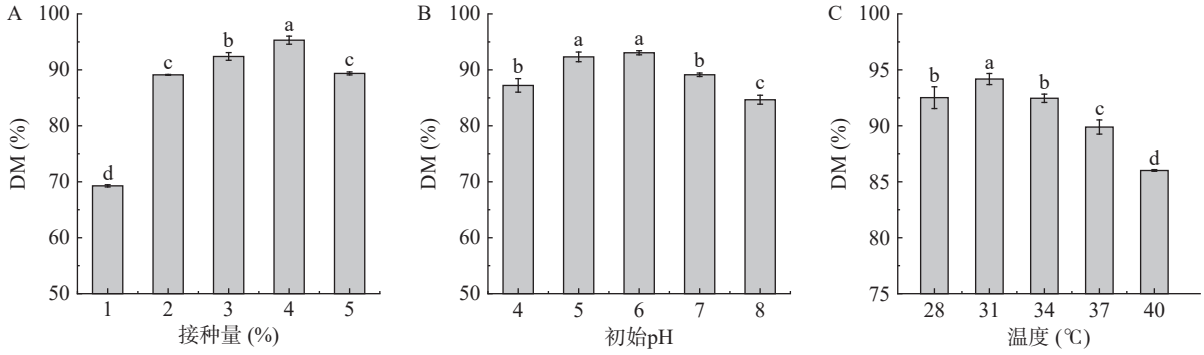


图 8 GXUN-XS8 发酵条件优化

Fig.8 Optimization of fermentation conditions of GXUN-XS8

注: A-接种量; B-初始 pH; C-温度。

GXUN-XS8(图 8B)发酵虾壳 DM% 均呈现先增加后降低的趋势, 与 Rao 等[27] 报道结果相一致, 在降解过程中较高初始 pH(6.5)拥有比较低初始 pH(5.5)更高的 DM%。GXUN-XS3(图 7B)在初始 pH 为 6 的条件下, 发酵虾壳 DM% 达到最大值 93.89%±0.31%; GXUN-XS8(图 8B)在初始 pH 为 5 和 6 时, 发酵虾壳 DM% 无显著(P>0.05)差异。培养基未调节时 pH 为 6.7±0.2, 调节到更低 pH 则需消耗更多试剂, 经优化 GXUN-XS3 和 GXUN-XS8 初始 pH 均为 6。发酵温度是影响菌株酸性代谢能力的关键因素之一[28]。随着温度的升高, GXUN-XS3(图 7C)和 GXUN-XS8(图 8C)发酵虾壳 DM% 均呈现先增加后降低的趋势, 在温度为 31 ℃ 时, 两株菌具有最大 DM% 分别为 95.61%±0.43% 和 93.40%±0.66%, 显著(P<0.05)高于其他温度。

2.3 响应面试验结果与分析

2.3.1 Box-Behnken 试验设计与结果分析 在单因素实验结果基础上, 探究各因素间的交互作用对虾壳 DM% 的影响。采用 Design-Expert 13 对表 4 和表 5 中试验结果进行多元回归方程拟合, 得到

GXUN-XS3 回归方程: $Y=95.82+0.3525A-0.5100B+0.4500C+0.1475AB+0.4325AC-0.4575BC-0.8302A^2-0.9352B^2-0.8353C^2$; GXUN-XS8 回归方程: $Y=95.68-0.3100A-0.5050B+0.4350C-0.1125AB-0.3825AC+0.3925BC-1.02A^2-0.9732B^2-2.20C^2$。

表 4　GXUN-XS3 Box-Behnken 试验设计方案及结果
Table 4　Design scheme and results of GXUN-XS3 Box-Behnken experiment

试验号	A温度(℃)	B初始pH	C接种量(%)	DM(%)
1	34	6	4	94.71
2	34	7	3	93.38
3	31	5	4	95.36
4	28	5	3	95.02
5	31	6	3	95.85
6	34	6	2	92.77
7	28	7	3	93.67
8	31	5	2	93.72
9	31	7	2	93.65
10	28	6	4	94.67
11	28	6	2	94.46
12	31	6	3	95.54
13	31	7	4	93.46
14	31	6	3	95.69
15	34	5	3	94.14
16	31	6	3	96.19
17	31	6	3	95.82

表 5　GXUN-XS8 Box-Behnken 试验设计方案及结果
Table 5　Design scheme and results of GXUN-XS8 Box-Behnken experiment

试验号	A温度(℃)	B初始pH	C接种量(%)	DM(%)
1	31	7	3	91.96
2	28	5	4	94.28
3	31	7	5	91.91
4	28	6	3	92.89
5	31	6	4	95.74
6	28	6	5	92.75
7	34	6	5	91.27
8	28	7	4	93.63
9	31	6	4	95.02
10	31	6	4	96.01
11	31	5	3	93.89
12	34	7	4	92.88
13	34	5	4	93.98
14	31	6	4	95.99
15	34	6	3	92.94
16	31	5	5	92.27
17	31	6	4	95.66

GXUN-XS3 回归模型方差分析结果见表 6, 模型中 A、B、C、AC、BC、A^2、B^2、C^2 对 Y 值影响极显著, 其余影响不显著。模型 $P<0.01$, 表明模型极显著; 失拟项 $P>0.05$, 表明模型拟合度良好; $R^2_{Adj}=0.9571$, 表明 95.71% 的响应值变化可以通过该模型进行解释; $R^2=0.9812$, 介于 0 到 1 之间, 表明实际值与预测值相关程度高。因此, 该模型可应用于实际 GXUN-XS3 发酵虾壳 DM 的预测与分析。

GXUN-XS8 回归模型方差分析结果见表 7, 该模型中 B、C、A^2、B^2、C^2 对 Y 值影响极显著, A、AC、BC 对 Y 值影响显著, 其余影响不显著。模型 $P<0.01$, 表明模型极显著; 失拟项 $P>0.05$, 表明模型拟合度良好; $R^2_{Adj}=0.9575$, 表明 95.75% 的响应值变化可以通过该模型进行解释; $R^2=0.9814$, 介于 0 到 1 之间, 表明实际值与预测值相关程度高。因此, 该模型可应用于实际 GXUN-XS8 发酵虾壳 DM 的预测与分析。

表 6　GXUN-XS3 回归模型方差分析
Table 6　Analysis of variance of GXUN-XS3 regression model

来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	17.01	9	1.89	40.62	<0.0001	**
A	0.9941	1	0.9941	21.37	0.0024	**
B	2.08	1	2.08	44.74	0.0003	**
C	1.62	1	1.62	34.83	0.0006	**
AB	0.0870	1	0.0870	1.87	0.2136	
AC	0.7482	1	0.7482	16.09	0.0051	**
BC	0.8372	1	0.8372	18.00	0.0038	**
A^2	2.90	1	2.90	62.40	<0.0001	**
B^2	3.68	1	3.68	79.18	<0.0001	**
C^2	2.94	1	2.94	63.16	<0.0001	**
残差	0.3256	7	0.0465			
失拟项	0.0925	3	0.0308	0.5291	0.6859	不显著
纯误差	0.2331	4	0.0583			
总误差	17.33	16				

注: *表示显著, $P<0.05$; **表示极显著, $P<0.01$, 表7同。

表 7　GXUN-XS8 回归模型方差分析
Table 7　Analysis of variance of GXUN-XS8 regression model

来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	37.07	9	4.12	41.10	<0.0001	**
A	0.7688	1	0.7688	7.67	0.0277	*
B	2.04	1	2.04	20.36	0.0028	**
C	1.51	1	1.51	15.11	0.0060	**
AB	0.0506	1	0.0506	0.5052	0.5002	
AC	0.5852	1	0.5852	5.84	0.0463	*
BC	0.6162	1	0.6162	6.15	0.0422	*
A^2	4.37	1	4.37	43.56	0.0003	**
B^2	3.99	1	3.99	39.80	0.0004	**
C^2	20.44	1	20.44	203.96	<0.0001	**
残差	0.7015	7	0.1002			
失拟项	0.0569	3	0.0190	0.1178	0.9450	不显著
纯误差	0.6445	4	0.1611			
总误差	37.77	16				

响应曲面坡度的陡峭与平缓可直接反映出 3 个因素对虾壳 DM% 的影响。由图 9 可知, GXUN-XS3 的 3 个因素所呈现的图像均为凸型, 反映了极高的响应值, 较为陡峭的曲面坡度说明各因子之间交互作用复杂, 除 AB 项外的其余交互因素对虾壳 DM% 的影响均达到极显著水平。由图 10 可知, GXUN-XS8 的 AB 交互作用不显著, AC、BC 交互显著。响应面图的结果与表 6、表 7 中的数据有着较好的一致性。

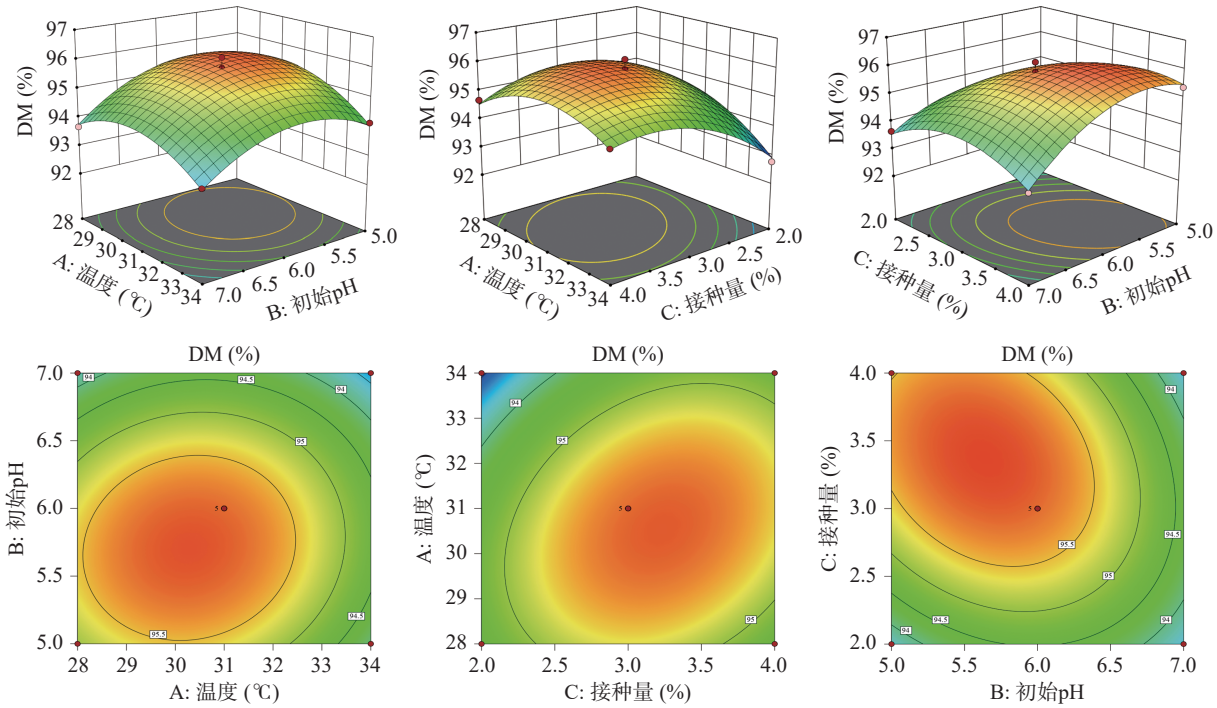


图 9　GXUN-XS3 各因素间的交互作用图

Fig.9　Interaction plot between different factors of GXUN-XS3

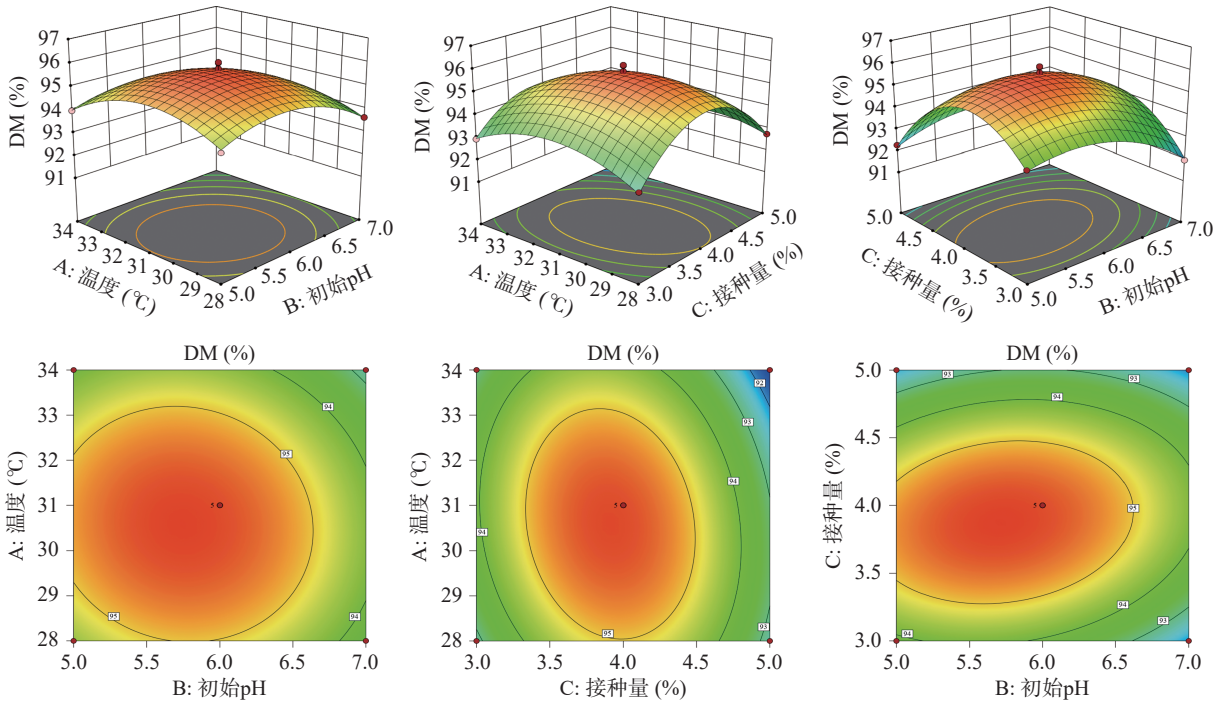


图 10　GXUN-X8 各因素间的交互作用图

Fig.10　Interaction plot between different factors of GXUN-XS8

2.3.2　验证实验　利用 Design-Expert 13 软件分析，得到 GXUN-XS3 最佳 DM% 参数：温度 30.525 ℃、初始 pH5.634、接种量 3.328%，此时虾壳 DM% 预测值为 96.013%，根据实际的实验条件，将工艺条件修改为温度 30.5 ℃，初始 pH5.6，接种量 3.3%，实际虾壳 DM% 为 96.09%±0.10%，与理论值接近，较优化前(90.40%±0.02%)提高了 6.29%；得到 GXUN-XS8 最佳 DM% 参数：温度 30.653 ℃、初始 pH5.724、接种量 3.887%，此时虾壳 DM% 预测值为 95.796%，根据实际的实验条件，将工艺条件修改为温度 30.7 ℃，初始 pH5.7，接种量 3.9%，实际虾壳 DM% 为 95.74%±0.12%，与理论值接近，较优化前(90.18%±0.50%)提高了 6.17%。与 Sedaghat 等[29]使用铜绿假单胞菌对废弃虾壳进行发酵处理，接种量为 20%，发酵时间 6 d，DM% 为 82% 的结果相比，GXUN-XS3 和 GXUN-XS8 的虾壳脱灰分率更高，且接种量更低，发酵时间短，有望在工业化生产过程中通过减少对原料的消耗，来降低生产成本，提高资源利用率。

2.4　样品中物质含量

GXUN-XS3 和 GXUN-XS8 在最优发酵工艺条件下发酵虾壳结果如表 8 所示。本实验发酵菌株具有高 DM% 分别为 96.09%±0.10% 和 95.74%±0.12%，说明该发酵工艺对虾壳废弃物处理效果良好。且发酵后灰分含量分别为 2.69%±0.07% 和 2.96%±0.04%，该含量符合 SC/T 3403-2018《甲壳素、壳聚糖》中工业几丁质标准（≤3.0%），避免了过高的矿物质残留对产品品质的影响，保证了产品的质量。这些结果表明，本实验的发酵工艺具有良好的竞争力，能够为虾壳脱灰分的绿色生产提供有效支持。

表 8　最优工艺条件下虾壳发酵前后灰分含量及 DM 变化

Table 8　Changes in ash content and DM of shrimp shells before and after fermentation under optimal process conditions

样品	灰分含量(%)	DM(%)
SSP	31.62±0.45	–
SSP-3	2.69±0.07	96.09±0.10
SSP-8	2.96±0.04	95.74±0.12

注：SSP表示未处理虾壳；SSP-3表示经GXUN-XS3发酵后虾壳；SSP-8表示经GXUN-XS8发酵后虾壳。

2.5　几丁质表征分析

SEM 照片如图 11 所示，可以看出四种样品的显微结构明显不同。未处理的虾壳粉（图 11A）表面粗糙且多孔，且附着有矿物质和蛋白质微粒，展现出典型的天然生物材料特征。经 GXUN-XS3 发酵后所得几丁质（图 11B）表面孔径变多变密集了，经 GXUN-XS8 发酵后所得几丁质（图 11C）也发生了明显变化，孔径变大，表面颗粒物已被去除，呈现多孔性的纤维组织结构，与 Daraghmeh 等[30] 研究结果相符。微生物发酵法所得几丁质与酸碱法制备的工业几丁质（图 11D）相比，其纤维组织更加完整，原因在于强酸、强碱使几丁质发生脱乙酰化和解聚反应，导致纤维组织出现断裂。

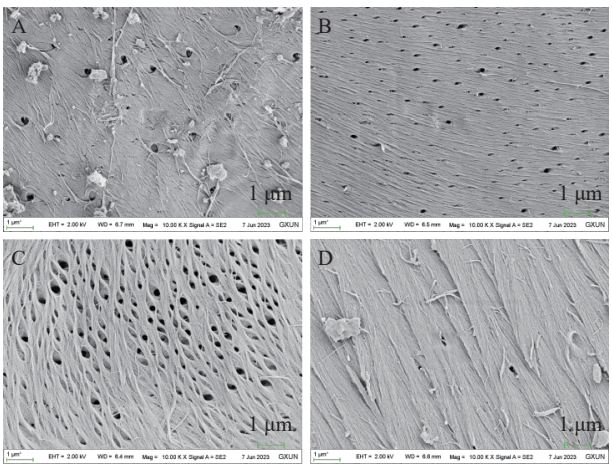


图 11　不同处理下的几丁质 SEM 图（10000×）

Fig.11　SEM images of chitin under different treatments (10000×)

注：A-未处理虾壳；B-经 GXUN-XS3 发酵后所得几丁质；C-经 GXUN-XS8 发酵后所得几丁质；D-工业几丁质。

3　结论

本研究筛选出两株高效脱除虾壳灰分的菌株 GXUN-XS3 和 GXUN-XS8，经鉴定为粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）和海岸微小杆菌（*Exiguobacterium aestuarii*）。通过单因素及响应面试验，确定两株菌最优的虾壳 DM 发酵工艺。GXUN-XS3 优化的发酵培养基为 2% 虾壳粉、3% 葡萄糖、1% 氯化钠，发酵温度 30.5 ℃、初始 pH5.6、接种量 3.3%、时间 3 d，在该条件下虾壳 DM% 为 96.09%±0.10%。GXUN-XS8 优化的发酵培养基为 2% 虾壳粉、2% 麦芽糖、1% 氯化钠，发酵温度 30.7 ℃、初始 pH5.7、接种量 3.9%、发酵时间 4 d。在该条件下虾壳 DM% 为 95.74%±0.12%。GXUN-XS3 和 GXUN-XS8 发酵后所得几丁质纤维组织更加完整，呈现明显的多孔特征，相较于工业法制备的几丁质性能更优越。综上，与已报道的菌株相比，本研究中的 GXUN-XS3 和 GXUN-XS8 在虾壳脱灰分方面展现出了一定的优势，为实现微生物发酵法工业化制备几丁质提供参考依据。

© The Author(s) 2026. 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］ 唐佳伟，陈紫罗，刘子烁，等. 天然植物源虾青素对南美白对虾生长性能、抗氧化及免疫能力的影响[J]. 饲料研究，2023，46(15)：46−50. ［TANG Jiawei, CHEN Ziluo, LIU Zishuo, et al. Effect of natural plant astaxanthin on growth performance, antioxidant and immune capacity of *Penaeus vannamei*[J]. Feed Research, 2023, 46(15): 46−50.］

［2］ 唐东姣，潘传营，闫晓琼，等. 广西南美白对虾养殖现状及产业发展建议[J]. 中国水产，2023(6)：78−80. ［TANG Dongjiao, PAN Chuanying, YAN Xiaoqiong, et al. Current situation of *Penaeus vannamei* culture in Guangxi and suggestions for industrial development[J]. China Fisheries, 2023(6): 78−80.］

［3］ 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, 2021, 15: 100405.

［4］ HURYA H A S A, NOURA S A K H, MOHAMMED H A, et al. Structural characterization of polymeric chitosan and mineral from Omani shrimp shells[J]. Water-Energy Nexus, 2021, 4: 199−207.

［5］ 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.

［6］ SALEMBIER R, de HAES C, BELLEMANS J, et al. Chitin-mediated blockade of chitinase-like proteins reduces tumor immunosuppression, inhibits lymphatic metastasis and enhances anti-PD-1 efficacy in complementary TNBC models[J]. Breast Cancer Research, 2024, 26(1): 63.

［7］ 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. ［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.］
［8］ ILANGUMARAN G, STRATTON G, RAVICHANDRAN S, et al. Microbial degradation of lobster shells to extract chitin derivatives for plant disease management[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 781.
［9］ 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 chitin oligosaccharide foliar fertilizer on quality and yield of peanut[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2019, 65(12): 1−4.］
［10］ 雷家炽, 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.］
［11］ TASER B, OZKAN H, ADIGUZEL A, et al. Preparation of chitosan from waste shrimp shells fermented with *Paenibacillus jamilae* BAT1[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 1191−1199.
［12］ CIRA L A, HUERTA S, HALL G M, et al. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery[J]. Process Biochemistry, 2002, 37(12): 1359−1366.
［13］ 张婧. 利用嗜热链球菌发酵虾头回收虾青素等营养物质的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013. ［ZHANG Jing. Nutrients recovery from shrimp head fermentation with *Streptococcus thermophilus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.］
［14］ 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.
［15］ 刘勇亮. 甲壳素/壳寡糖的生物法制备及其对凡纳滨对虾的促生长作用研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2020. ［LIU Yongliang. Study on biological preparation of chitin/chitosan oligosaccharides and its growth promotion effect on *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2020.］
［16］ 张奇, 王一兵, 申乃坤, 等. 产几丁质酶菌株 GXUN-20 的筛选、鉴定及其产酶条件优化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 119−127. ［ZHANG Qi, WANG Yibing, SHEN Naikun, et al. Screening and identification of chitinase-producing strain GXUN-20 and optimization of its enzyme producing conditions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(24): 119−127.］
［17］ 王丽蓉, 黄秀菁. GB 及 ISO 中酸碱指示剂法测定食品中总酸的指示剂研究[J]. 分析科学学报, 2002, 18(6): 518−519. ［WANG Lirong, HUANG Xiujing. Indicator study on acid-base titrimetric determination of total acid in food among GB and ISO method[J]. Journal of Analytical Science, 2002, 18(6): 518−519.］
［18］ 祁琛, 辛雨霏. 食品中总灰分测定方法的简化[J]. 现代食品, 2021, 27(1): 210−212. ［QI Chen, XIN Yufei. Simplification of the determination method of total ash in food[J]. Modern Food, 2021, 27(1): 210−212.］
［19］ 刘晓毅, 许华, 曹红, 等. 五株菌混合发酵及其五个单株菌发酵液的 GC-MS 酸性代谢产物分析[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(2): 133−136. ［LIU Xiaoyi, XU Hua, CAO Hong, et al. GC-MS analysis of Wuzhuwang oral liquid and it's five individual bacterium fermentation liquor metabolic product[J]. Food Research and Development, 2008, 29(2): 133−136.］
［20］ 杨超. 酸马奶中乳酸菌的分离鉴定及生物学特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021. ［YANG Chao. Isolation, identification and biological characteristics of lactic acid bacteria in sour horse milk[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.］
［21］ 张军, 朱檬, 汤伟, 等. 一株低温蛋白酶产生菌的分离及该酶的鉴定与酶学性质表征[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(15): 175−183. ［ZHANG Jun, ZHU Meng, TANG Wei, et al. Isolation of a psychrotroph producing cold-adaptive protease and identification and characterization of the protease[J]. Food Research and Development, 2023, 44(15): 175−183.］
［22］ BENDIG T, ULMER A, LUZIA L, et al. The pH-dependent lactose metabolism of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: An integrative view through a mechanistic computational model[J]. Journal of Biotechnology, 2023, 374: 90−100.
［23］ 屈晓伟. 乳酸菌发酵西兰花工艺优化及风味特征解析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021. ［QU Xiaowei. Optimization of broccoli fermentation by lactic acid bacteria and analysis of flavor characteristics[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2021.］
［24］ SHIM K, MOK J S, JEONG Y, et al. Effect of organic acids on the formation of biogenic amines in fermented anchovy sauce comprising raw anchovy materials with different levels of freshness[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 59(2): 703−714.
［25］ 林晓彤. 南美白对虾壳主要组分清洁提取与综合利用研究[D]. 厦门: 集美大学, 2022. ［LIN X T. Study on clean extraction and comprehensive utilization of main components in the shell of *Litopenaeus vannamei*[D]. Xiamen: Jimei University, 2022.］
［26］ DUAN Shan, LI Lei, ZHUANG Zejuan, et al. Improved production of chitin from shrimp waste by fermentation with epiphytic lactic acid bacteria[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(4): 1283−1288.
［27］ RAO M S, MUÑOZ J, STEVENS W F. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(6): 808−813.
［28］ LI Jiawei, SONG Ru, ZOU Xiaoyu, et al. Simultaneous preparation of chitin and flavor protein hydrolysates from the by-products of shrimp processing by one-step fermentation with *Lactobacillus fermuntum*[J]. Molecules, 2023, 28(9): 3761.
［29］ SEDAGHAT F, YOUSEFZADI M, TOISERKANI H, et al. Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguiensis* using lactic acid fermentation: An alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 104: 883−888.
［30］ DARAGHMEH N H, CHOWDHRY B Z, LEHARNE S A, et al. Chitin[J]. Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, 2011, 36: 35−102.