

## 研究报告

## Research Report

# 微波辅助 CDA 酶法制备烹饪后龙虾壳聚糖及初步表征

窦勇<sup>1\*</sup> 胡佩红<sup>2</sup> 顾鹏程<sup>1</sup> 沈媛媛<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 江苏财经职业技术学院, 淮安, 223003; <sup>2</sup> 淮安正昌饲料有限公司, 淮安, 223005

\* 通讯作者, douyong1979@163.com

**摘要** 本文主要研究开发烹饪后小龙虾壳聚糖的环保酶法制备方法。本研究采用超声辅助 EDTA 法提取烹饪后小龙虾壳甲壳素, 所得甲壳素经乙醇浸泡和微波预处理后, 采用 CDA 酶法制备壳聚糖, 通过单因素试验选择最佳的微波功率、微波时间、加酶量、酶解温度、酶解时间, 再利用正交试验优化酶法制备小龙虾壳聚糖的最佳工艺。结果表明 酶法制备壳聚糖的最佳条件为 80%乙醇浸泡甲壳素 2 h, 微波功率 550 W, 微波时间 6 min, 加酶量 10%, 酶解时间 3 h, 酶解温度 45℃, 在此条件下制备的壳聚糖脱乙酰度高达 93.12%, 黏度为 96.8 mPa·s, 相对得率 87.74%。该制备方法与传统碱法相比, 具有无环境污染, 产品性质稳定, 高 D.D 的优势, 为环境清洁型的小龙虾壳聚糖工业化生产打下基础, 也顺应了未来经济发展趋势。

**关键词** 微波, CDA 酶, 淡水小龙虾壳, 壳聚糖, 环境清洁

## Microwave-assisted CDA Enzymatic Method for Preparation of Cooked Freshwater Crayfish Shell Chitosan and Its Preliminary Token

Dou Yong<sup>1\*</sup> Hu Peihong<sup>2</sup> Gu Pengcheng<sup>1</sup> Shen Yuanyuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Jiangsu Polytechnic of Finance & Economics, Huai'an, 223003; <sup>2</sup> Huai'an Zhengchang Feed Co., Ltd, Huai'an, 223005

\* Corresponding author, douyong1979@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.034.001429

**Abstract** Optimum environment-cleanly enzyme method of preparation for crayfish shell chitosan was developed. Using cooked freshwater crayfish shell as raw material, which chitin was extracted with ultrasonic-assisted EDTA method, the obtained chitin was pretreated after soaking in ethanol and microwave radiating, the chitosan was prepared using the CDA enzyme method. The best microwave power, microwave time, enzyme dosage, reaction temperature, and reaction time were selected with single factor experiment, the best enzyme method technology for preparation of crayfish chitosan was optimized by orthogonal test. The results show that the optimum conditions of enzymatic preparation of chitosan was: 80% ethanol chitin 2 h, 550 W microwave power, microwave time 6min, enzyme dosage of 10%, enzymolysis time 3 h, enzymolysis temperature 45℃, prepared under these conditions the degree of deacetylation of chitosan as high as 93.12%, the viscosity of 96.8 mPa·s, the relative yield of 87.74%. The preparation method and the traditional alkali method, has no environmental pollution, the product has high degree of deacetylation, stable property advantages, lay the foundation for the industrialization of chitosan production environment clean, but also conforms to the future economic trends.

**Keywords** Microwave, CDA enzyme, Freshwater crayfish shell, Chitosan, Environment-cleanly

壳聚糖(chitosan)是由甲壳素脱乙酰基得到产物,是自然界唯一带正电的可降解天然碱性多糖,具有好的生物相容性、生物降解性等优良性能(赵易尔和金丹, 2015),被广泛用于医药、造纸、化妆品、食品和生物技术等领域(Pareek et al., 2013)。淡水小

龙虾是江苏省特别是淮安地区最重要的经济水产品之一,而人们最普遍的食用方法是经烹饪后直接食用,因此的产生大量虾壳废弃物,给环境造成巨大污染,虾壳中甲壳素、壳聚糖等活性物质没有得到合理的开发利用,也造成了严重的资源浪费。小龙虾壳聚糖

基金项目:本研究由江苏省淮安市科技局科技支撑计划农业项目(SN1174)资助

是以小龙虾壳废弃物为原料,提取其中甲壳素后,经脱乙酰基制得。当今,国内外研究和生产实践仍然是利用高浓度强碱脱乙酰基制备壳聚糖(季锦林等, 2013; Sila et al., 2013)。近几年,国内采用超声波协助碱法、微波法等方法制备小龙虾壳聚糖的研究并不罕见,但制备原理基本上是利用强碱的作用破坏甲壳素分子间作用力,进而脱乙酰基,这些方法需要大量高浓度的碱液,一旦工业化生产,势必造成极大的环境污染,且大多制备壳聚糖方法具有制备时间较长、脱乙酰度(deacetylation degree, 以下简称“D.D.”)较低、性质不稳定的缺点(窦勇和胡佩红, 2014)。

为减少淡水小龙虾壳自然资源的过度浪费,以烹饪后的淡水小龙虾壳为原料,通过筛选高产甲壳素脱乙酰基酶(chitin deacetylation, 以下简称“CDA”)菌株,优化发酵条件,提取高活性的CDA,以此酶为基础,研究壳聚糖高效环保的酶法制备方法,对实现工业化生产小龙虾壳聚糖具有较高的实际应用价值。利用乙醇对所提取的小虾壳甲壳素进行浸泡处理,以破坏甲壳素分子间羰基与氨基之间H键,再利用微波对甲壳素进行加热预处理,促进甲壳素底物与CDA酶相互作用,加快酶反应速度,获得高D.D.的壳聚糖。本研究旨在建立高效环保的小龙虾壳聚糖酶法制备方法,为环境清洁型的小龙虾壳聚糖工业化生产打下基础(窦勇和胡佩红, 2014)。

## 1 结果与分析

### 1.1 微波辅助CDA酶法制备烹饪后龙虾壳聚糖单因素试验

#### 1.1.1 最佳微波功率为550 W

从图1可知,随着微波功率的提高,D.D.不断增大,功率在550 W后,D.D.变化不大,700 W时达到最高值92.13%;从黏度指标看,整体减小趋势较为明显,

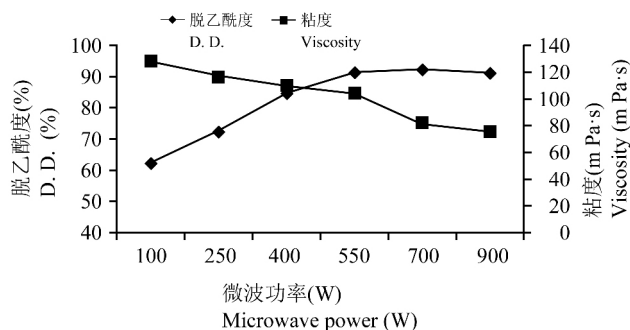


图1 微波功率对壳聚糖脱乙酰度和黏度的影响

Figure 1 Effect of microwave power on chitosan D.D. and viscosity

700 W 时候黏度下降幅度最大;为获得较高D.D.、较高黏度的壳聚糖,可见550 W为最佳微波功率。

#### 1.1.2 最佳微波处理时间为8 min

由图2可知,随微波处理时间的延长,D.D.呈上升趋势,8 min后趋于平缓,11 min达到最大值91.88%;而黏度呈缓慢下降趋势,在8 min后黏度下降较为明显;所以,综合考虑,微波处理时间为8 min为宜。

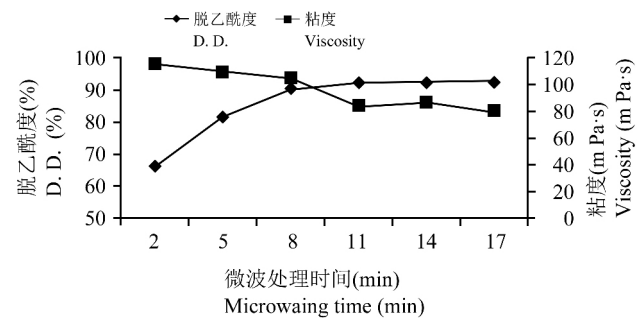


图2 微波处理时间对壳聚糖脱乙酰度和黏度的影响

Figure 2 Effect of microwaving time on chitosan D.D. and viscosity

#### 1.1.3 最佳加酶量为10%

由图3可以看出,随着加酶量的增多,D.D.呈明显上升趋势,当加酶量达到10%后,D.D.增大不多,添加量在13%时达到最大,此时D.D.为93.17%;黏度角度来看,整体波动不大,但呈缓慢减小趋势,说明酶法催化脱乙酰,没有加剧甲壳素分子断裂,生成的壳聚糖产品结构均一。从节约成本角度来看,选择10%作为最佳加酶量。

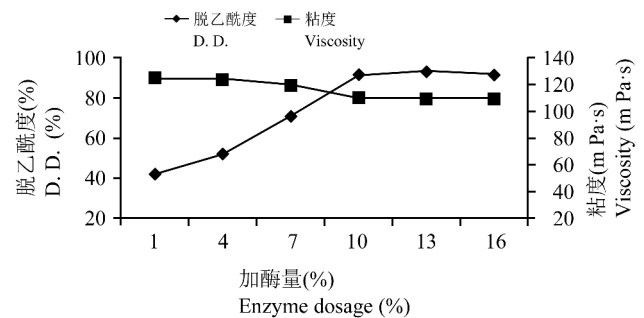


图3 加酶量对壳聚糖脱乙酰度和黏度的影响

Figure 3 Effect of enzyme dosage on chitosan D.D. and viscosity

#### 1.1.4 最佳酶解时间为3~4 h

图4显示,D.D.随着酶解时间的延长,不断升高,4 h后基本不变,此时最高D.D.为92.95;而黏度随酶解时间变化,呈下降趋势,但变化幅度不大。为提高生产效率,酶解最佳时间选择3~4 h为宜。

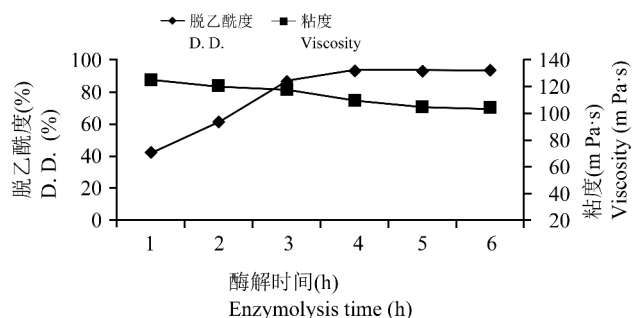


图4 酶解时间对壳聚糖脱乙酰度和黏度的影响

Figure 4 Effect of enzymolysis time on chitosan D.D. and viscosity

### 1.1.5 最适酶解温度为 50℃

由图 5 可知,随酶解温度的升高,D.D.曲线呈现先上升后趋平缓,酶解温度 50℃时,达到最高值 92.93%;而黏度随着温度的升高,也呈现下降趋势,但在 50℃后,黏度下降明显。原因分析如下,温度为 50℃,CDA 酶活性达到最高,而温度过高可能造成部分酶失活,不利于催化甲壳素脱乙酰,造成 D.D.在 50℃后基本不变;温度过高也可能造成壳聚糖中糖苷键的水解加剧,造成分子链断裂,使黏度下降。

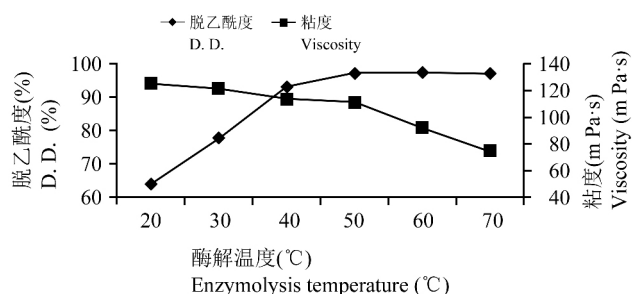


图5 酶解温度对壳聚糖脱乙酰度和黏度的影响

Figure 5 Effect of enzymolysis time on chitosan D.D. and viscosity

## 1.2 正交试验确定微波辅助 CDA 酶法制备壳聚糖的最佳条件为微波时间 6 min,加酶量 10%,酶解时间 3 h,酶解温度为 45℃

由表 1 正交试验直观分析看出,CDA 酶法制备烹饪后龙虾壳聚糖的最佳条件优化结果为:  $A_1B_2C_2D_1$ ,即微波时间 6 min,加酶量 10%,酶解时间 3 h,酶解温度为 45℃,由极差 R 的大小可知,影响烹饪后龙虾壳聚糖的制备效果的主次因素分别为  $A > C > D > B$ ,即微波时间>加酶量>酶解时间>酶解温度,由此可见微波时间对龙虾壳甲壳素脱乙酰基度的影响最大,说明微波对龙虾壳甲壳素的辐射作用,有利于 CDA 酶与底物的结合催化脱乙酰基作用,这可能与微波作用破坏甲壳素分子 H 键有关,有关机理需进一步研究。

表 1 正交试验直观表

Table 1 Orthogonal test intuitive table

试验号 No.	因素 Factors				脱乙酰度(%) D.D. (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	91.85
2	1	2	2	2	93.89
3	1	3	3	3	90.65
4	2	1	2	3	92.18
5	2	2	3	1	92.45
6	2	3	1	2	90.21
7	3	1	3	2	86.33
8	3	2	1	3	84.56
9	3	3	2	1	87.45
k1	92.13	90.12	88.87	90.58	
k2	91.61	90.30	91.17	90.14	
k3	86.11	89.44	89.81	89.13	
R	6.02	0.86	2.30	1.45	
因素主次关系					ACDB
The relationship between primary and secondary factors					
最优组合					$A_1B_2C_2D_1$
Optimal combination					

## 1.3 正交试验验证试验

由于正交试验直观分析最佳条件为  $A_1B_2C_2D_1$ ,此组合不在  $L_9(3^4)$ 的 9 组试验中,为了验证正交试验设计的预测结果可靠性,采用微波时间 6 min,加酶量 10%,酶解时间 3 h,酶解温度为 45℃,进行 3 组平行试验制备壳聚糖,测得 3 组壳聚糖 D.D.值的平均值高达 93.12%,说明该组合预测结果与实际结果相符,具有很高的可行性和实用价值。

## 1.4 壳聚糖红外光谱初步表征

CDA 酶法制备的烹饪后小龙虾壳聚糖红外光谱扫描结果如图 6 所示。壳聚糖乙酰氨基(NH-CO)有 3 个典型的特征吸收峰,分别是  $1650\text{ cm}^{-1}$  (酰胺)、 $1550\text{ cm}^{-1}$  (酰胺)和  $1310\text{ cm}^{-1}$  (酰胺)左右(吕勇等, 2013)。D.D. 较小时由于  $1559\text{ cm}^{-1}$  酰胺谱带信号强烈掩蔽了较弱的氨基变形谱带,当 D.D.增大 70%时氨基变形谱带才表现出来( $1593\text{ cm}^{-1}$ ),并随着 D.D.的不断提高,吸收峰出现在  $1599\text{ cm}^{-1}$  处,如出现  $1590\text{ cm}^{-1}$  左右的谱带,可以认为该 D.D.值在 70%以上(董炎明等, 2001)。图 6 显示,在波长  $1649.38\text{ cm}^{-1}$ ,  $1598.56\text{ cm}^{-1}$ ,  $1319.12\text{ cm}^{-1}$  三处有吸收峰,说明本法

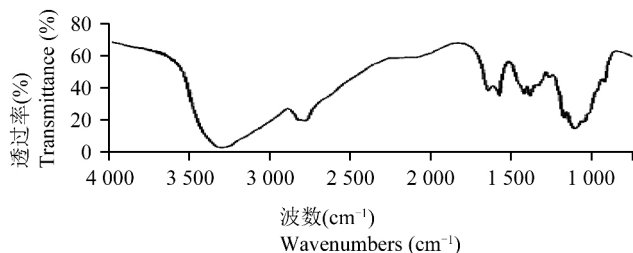


图 6 小龙虾壳聚糖红外光谱表征  
Figure 6 Infra-red spectrum token of freshwater crayfish shell chitosan

制备产物为壳聚糖；图中显示三处特征峰谱非常微弱，原因是随着 D.D. 升高，乙酰氨基含量减少所造成，说明本法制备的壳聚糖具有较高的 D.D.，从红外光谱角度证实了 CDA 酶法能制备高 D.D. 壳聚糖。

### 1.5 微波辅助 CDA 酶法制备壳聚糖的效果分析

表 2 可以看出，微波辅助酶法制备的壳聚糖所需时间为 5 h，黏度为 96.8 mPa·s，D.D. 为 93.12%，相对得率为 87.74%，本法制备的龙虾壳聚糖的 D.D.、黏度、制备时间和相对得率明显高于传统热碱法、单一超声法，具有操作时间短，高脱乙酰度，高黏度的优点，整个过程中不使用任何强酸强碱，无任何环境污染，因此本法将具有很大的市场推广价值。

## 2 讨论

本研究在预试验基础上，通过单因素分析和正交试验分析，确定以烹饪后淡水小龙虾壳为原料，虾壳经乙醇浸泡、微波辐射预处理后，采用 CDA 酶法脱乙酰基制备小龙虾壳聚糖的最佳工艺条件为：30% 乙醇浸泡 2 h，在微波功率 550 W 下处理 6 min，加酶量 10%、酶解时间 3 h、酶解温度 45℃，在此制备工艺下，脱乙酰度高达 93.12%、黏度 96.8 mPa·s，相对得率 87.74%，产品为白色粉末，其性质稳定、纯度高，可用于制备壳聚糖功能性材料、食品、医药等领域。

表 2 壳聚糖制备效果比较

Table 2 Comparison results of preparing chitosan effect

制备工艺	脱乙酰基度(%)	粘度(mPa·s)	制备时间(h)	相对得率(%)
Preparation techniques	D.D. (%)	Viscosity (mPa·s)	Preparation time (h)	Relative yield (%)
热碱法	80.15	87.89	8.5	72.16
Hot alkali method				
超声法	86.65	92.10	11.0	75.97
Ultrasonic method				
微波辅助 CDA 酶法	93.12	96.80	5.0	87.74
Microwave-assisted CDA method				

域。本研究成果有利于小龙虾废弃资源综合利用，减少资源浪费和环境污染。本法以烹饪后小龙虾加工虾壳为原料，通过 EDTA 法提取甲壳素后，再以此甲壳素为原料，利用微波辐射和乙醇作用破坏甲壳素分子内部 H 键，利用酶的高效催化及专一性对其进行脱乙酰作用，制备了高 D.D.、高粘度的壳聚糖。与常用方法相比，本法不再使用强碱脱乙酰基，且使用的 EDTA 可 100% 回收，具有制备时间短、产品脱乙酰度高、纯度高、性质稳定等优势，因此该法为环境清洁型的工业化壳聚糖生产奠定基础，顺应了未来经济发展趋势。

## 3 材料与方法

### 3.1 主要材料与试剂

烹饪后淡水小龙虾壳，采集于某龙虾馆；乙二胺四乙酸钠、双氧水等试剂购于南京化学试剂股份有限公司 AR；甲壳素脱乙酰基酶粗酶液（本实验室自制）。

### 3.2 主要仪器

仪器：傅立叶变换红外光谱仪 (FTIR-8400S, 日本岛津)、手提式高速粉碎机 (CE-500, 浙江屹立工贸有限公司)、数控加热超声清洗机 (SCQ-6201E, 上海声彦超声波仪器有限公司)、电热恒温干燥箱 (SCQ-GC26, 上海声彦超声波仪器有限公司)、微波炉 (MKJ-J1-4, 青岛迈可威微波应用技术有限公司)、数显恒温水浴锅 (HH-8, 南京宝都仪器有限公司)、粘度计 (NDJ-8S, 上海慧可实验仪器有限公司)。

### 3.3 试验方法

#### 3.3.1 微波辅助 CDA 酶法制备工艺

样品预处理 → EDTA 超声处理 → 过滤干燥 → 脱色 → 水洗至中性 → 烘干 → 乙醇浸泡 → 过滤 → 水洗 → 微波处理 → CDA 酶法脱乙酰 → 过滤 → 水洗至中性 → 烘干 → 壳聚糖。



### 3.3.2 技术要点

#### 3.3.2.1 烹饪后小龙虾壳样品预处理

洗净烹饪后小龙虾壳,以无水乙醚中洗涤 4~6 次,再以无水乙醇抽提 4~6 次,再用蒸馏水洗净后过滤,滤渣于 60℃烘箱中烘干,粉碎机粉碎至过 830 μm 目筛,备用。

#### 3.3.2.2 超声波辅助 EDTA 法提取甲壳素

称取一定量经前处理后的小龙虾壳粉末于烧杯中,按料液比 1:24 (m/V)的量,加入 pH=13 的 18%的 EDTA 溶液,置于超声频率 60 KHz,功率 180 W,温度 35℃的超声波清洗器中,搅拌反应 45 min,过滤并以蒸馏水洗涤滤渣,收集上述滤渣,于 50℃烘干。再以 10%的过氧化氢溶液在 35℃水浴中浸泡,脱色 2 h,洗净烘干后的白色粉末即为甲壳素(莫祺红等, 2009)。

#### 3.3.2.3 CDA 酶法脱乙酰基

已制备好的龙虾壳甲壳素粉碎至过 180 μm 目筛,按料液比 1:20 (m/V)加入 80%乙醇溶液,浸泡 2 h 后,置于功率为 550 W 的微波炉中,微波预处理一定时间后,冷却至室温,加入一定量的酶活约 200 U/mL 的 CDA 粗酶液,一定温度下恒温搅拌酶解,酶解时以氢氧化钠调 pH 为酶反应最适 pH 7.5,反应完全后,采用 100℃水浴灭酶活 15 min,迅速冷却至室温,2 000 r/min 离心 20 min,蒸馏水洗涤至中性,过滤得沉淀,烘干后得龙虾壳聚糖(刘振春等, 2014)。

### 3.3.3 相关指标测定及酶活定义

脱乙酰度(D.D.)、粘度测定、壳聚糖得率计算及酶活定义参考文献(窦勇和胡佩红, 2014)方法进行。

### 3.3.4 龙虾壳聚糖红外光谱表征

将制备的壳聚糖产品研磨成粉末,与 KBr 粉末压片后,采用傅立叶变换红外光谱仪扫描,扫描范围 400~4 000 cm<sup>-1</sup>,分析其特征谱峰与脱乙酰作用关系。

### 3.3.5 碱法制备龙虾壳聚糖

采用文献(周安娜等, 2003)壳聚糖制备方法。

### 3.3.6 超声波法制备淡水小龙虾壳聚糖

准确称取自制龙虾壳甲壳素约 10 g 于 80 mL 50% NaOH 溶液中,在超声频率 40 KHz,超声功率为 400 W 条件下,超声波处理 60 min 后,反应温度设置为 85℃,恒温搅拌反应 8 h 后,冷却至室温,经多次过滤和蒸馏水洗涤至中性,滤渣烘干即得小龙虾壳聚糖。

### 3.3.7 微波辅助酶法制备烹饪后小龙虾壳聚糖单因素试验(Cardoso et al., 2001; 曹健等, 2005; 李巧霞, 2006)

根据预试验,确定微波功率、微波时间、加酶量、酶解温度、酶解时间对壳聚糖 D.D.影响较大,故对此五因素进行单因素试验,设置不同梯度条件:微波功率 100 W、250 W、400 W、550 W、700 W、900 W;微波时间 2 min、5 min、8 min、11 min、14 min、17 min;加酶量(粗酶液体积与底物甲壳素质量之比, v/w) 1%、5%、9%、13%、17%、21%;酶解时间 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h;酶解温度 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃,按 3.3.1 法制备壳聚糖,并测定 D.D.值和粘度,选择各单因素最佳条件。

### 3.3.8 正交试验

选取微波时间、酶反应时间、酶反应温度和加酶量四个对脱乙酰度值影响较大因素设计正交试验,选择脱乙酰度较大的反应条件为最佳条件,见表 3,其他因素水平以 3.3.7 确定的最佳水平进行试验。

### 作者贡献

窦勇和顾鹏程负责实验的设计和文章审核,沈媛媛和胡佩红负责实验的具体实施。

### 致谢

感谢江苏省淮安市科技局科技支撑计划农业项目(SN1174)提供的资助。

### 参考文献

Cao J., Dai Y.Y., Wang H.J., and Wang Y.J., 2005, Research on

表 3 正交试验因素水平

Table 3 The level of orthogonal test

水平	因素			
Level	Factors			
	微波时间 A (min)	加酶量 B (%)	酶解时间 C (h)	酶解温度 D (°C)
	Microwaving time A (min)	Enzyme dosage B (%)	Enzymolysis time C (h)	Enzymolysis time D (°C)
1	6	8	2.5	45
2	8	10	3.0	50
3	10	12	3.5	55

- chitosan preparation by microwave deacetylation of chitin, *Shipin Kexue (Food Science)*, 26(11): 120-125 (曹健, 代养勇, 王红军, 王育军, 2005, 甲壳素微波法脱乙酰制备壳聚糖的研究, *食品科学*, 26(11): 120-125)
- Cardoso M.B., Signini R., and Campana-Filho S.P., 2001, On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation, *Polymer Bulletin*, (47): 183-190
- Dong Y.M., Wang M., Wu Y.S., and Ruan Y.H., 2001, FTIR spectroscopic determinations of chitosan derivatives, *Xian weisu Kexue Yu Jishu (Journal of Cellulose Science and Technology)*, 9(2): 42-56 (董炎明, 王勉, 吴玉松, 阮永红, 2001, 壳聚糖衍生物的红外光谱分析, *纤维素科学与技术*, 9(2): 42-56)
- Dou Y., and Hu P.H., 2014, Ultrasound-assisted CDA enzymatic method for preparation of freshwater crayfish shell chitosan, *Shipin Yu Fajiao Gongye (Food and Fermentation Industry)*, 40(11): 127-131 (窦勇, 胡佩红, 2014, 超声协同 CDA 酶法制备龙虾壳聚糖, *食品与发酵工业*, 40(11): 127-131)
- Ji J.L., Tang L.X., and Qian Q.H., 2013, Process optimization of the extraction of chitin and preparation of chitosan from prawn shells, *Shipin Keji (Food Science and Technology)*, 38(4): 200-209 (季锦林, 汤立新, 钱清华, 2013, 间歇法提取虾甲壳素和制备壳聚糖的工艺优化, *食品科技*, 38(4): 200-209)
- Li Q.X., Song B.Z., Yang Z.Q., and Fan H.L., 2006, Preparation of chitosan with high viscosity-average molecular weight and high degree of deacetylation by rapid interim microwave heating method, *The chinese journal of process engineering*, 6(5): 789-793 (李巧霞, 宋宝珍, 仰振球, 樊红雷, 2006, 微波间歇法快速制备高粘均分子量和高脱乙酰度的壳聚糖, *过程工程学报*, 6(5): 789-793)
- Liu Z.C., Han Y., Sun H.J., and Geng C.H., 2014, Preparation of ACE inhibitory peptides from mung bean using ultrasonic-assisted enzymatic method, *Xibe Nonglin Kejidaxue Xuebao (Ziran Kexue Ban) (Journal of North west A & F University (Nat.Sci.Ed.))*, 42(8): 1-8 (刘振春, 韩宇, 孙慧娟, 耿存花, 2014, 超声波辅助酶法制备绿豆 ACE 抑制肽的工艺研究, *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 42(8): 1-8)
- Lv Y., Song C., Long Z., and Dai L., 2013, Preparation of chitosan with different degree of deacetylation value and packaging performance of its coated, *Baozhuang Gongcheng (Journal of Packaging Engineering)*, 34(11): 1-4 (吕勇, 宋词, 龙柱, 戴磊, 2013, 不同脱乙酰度壳聚糖制备及涂布纸包装性能研究, *包装工程*, 34(11): 1-4)
- Mo Q.H., Lu J., Huang P.F., Yan Y.X., and Su G.J., 2009, Chitosan preparation by deacetylation of chitin under ultrasonic pretreatment *Food Science and Technology, Shipin Keji (Food Science and Technology)*, 34(8): 200-209 (莫祺红, 卢洁, 黄佩芳, 阎欲晓, 粟桂娇, 2009, 超声波预处理脱乙酰化制备壳聚糖的研究, *食品科技*, 34(8): 200-209)
- Pareek N., Vivekanand V., and Singh R. P., 2013, Chitin deacetylase: characteristic molecular features and functional aspects, In: *Advances in enzyme biotechnology*, Springer India, India, pp.125-136
- Sila A., Mlaik N., Sayari N., Balt R., and Bougatef A., 2014, Chitin and chitosan extracted from shrimp waste using fish proteases aided process: efficiency of chitosan in the of treatment unhairing effluents, *J. Polym. Environ.*, 22: 78-87
- Zhao Y.E., and Jin D., 2015, Chitosan composites for bone tissue engineering application, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 34(4): 82-848 (赵易尔, 金丹, 2015, 壳聚糖复合材料在骨组织工程中的应用, *基因组学与应用生物学*, 34(4): 842-848)
- Zhou A.N., Zhang G.D., and Zhang W.Y., 2003, The new preparation technology of one-step chitosan, *Shipin Gongye Keji (Science and Technology of Food Industry)*, 24(1): 73-75 (周安娜, 张国栋, 张文艺, “一步法”壳聚糖制备新工艺, *食品工业科技*, 24(1): 73-75)