

金枪鱼加工副产物酶解液对顶头孢霉菌发酵产物的影响

王欢^{1,2}, 李晔^{2*}, 戴娟², 苏秀榕²

(1. 宁波大学 食品与药学学院, 浙江 宁波 315832; 2. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315832)

摘要: 以金枪鱼加工副产物为原料, 研究其酶解液对顶头孢霉菌(*Cephalosporium acremonium*)发酵产物的影响. 以头孢菌素 C (CPC) 的产量为指标, 通过正交实验和响应面方法, 研究不同添加量的酶解液对顶头孢霉菌发酵产抗生素的作用, 再利用气相-质谱联用仪(GC-MS)分析酶解液对顶头孢霉菌代谢物的影响. 研究结果显示: 在顶头孢霉菌的发酵培养基中, 酶解液的添加量为 $30.86 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, CPC 产量最高, 为 $8.106 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 比未添加酶解液增加 67.82%; 酶解液的加入显著改变了顶头孢霉菌代谢物的种类和含量.

关键词: 金枪鱼副产物; 酶解液; 顶头孢霉菌; 头孢菌素 C

中图分类号: TS254.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2019) 05-0017-06

金枪鱼是一种深海鱼类, 因其丰富的营养成分而倍受消费者的喜爱. 金枪鱼主要被加工成生鱼片和罐头供大家食用, 然而在加工过程中会产生大量的副产物, 包括鱼头、胰脏、鱼骨、鱼皮和碎肉等, 约占总重量的 40%~50%^[1]. 这些加工副产物中含有丰富的蛋白质、磷脂质、维生素、矿物质等成分, 目前大多用于生产低值的鱼粉、鱼浆^[2]. 高值化地开发利用加工副产物, 有助于提升我国水产品加工综合利用能力和企业竞争力, 也有利于生态环境的保护.

目前对这类副产物的利用研究, 主要包括酶解制备功能肽、鱼油的纯化、鱼皮胶原蛋白的提取等^[3], 其中酶解液因氨基酸组成比例合理, 必需氨基酸含量丰富^[4], 其利用价值被不断地研究和开发. 王霞等^[5]用蛋白酶水解黄鳍金枪鱼胰脏制备活性肽, 并通过响应面分析找到了最佳的水解工艺. 动物实验表明, 胰脏酶解液可改善糖尿病大鼠血糖、血脂, 促进糖代谢和脂代谢的良性循环^[6]. 蔡本利等^[7]研究发现, 金枪鱼头蛋白酶解液能显著提高环磷酰胺造成的免疫力低下小鼠的免疫脏器指数、巨噬细胞吞噬能力、淋巴细胞增殖活性, 正向调节免疫力低下小鼠的免疫功能.

头孢菌素类抗生素是临床的重要药品之一, 目前国内生产头孢菌素类抗生素主要采用顶头孢霉菌发酵法, 而如何提高抗生素产量, 降低生产成本一直是研究的重点. 张铭等^[8]研究发现, 在保持培养基中总糖含量的基础上, 增加葡萄糖比例并减少豆油浓度可提高头孢菌素 C (CPC) 的产量. 李宁慧^[9]研究发现, 发酵培养基中添加金枪鱼浸膏能显著提高顶头孢霉菌产 CPC 的产量, 而顶头孢霉菌在发酵过程中的次级代谢产物及 CPC 的产量都与培养基中的营养物质有关.

本文以金枪鱼加工副产物的酶解液为原料, 研究其作为培养基中的有机氮源对顶头孢菌素产 CPC 的作用, 并结合 GC-MS 分析酶解液对顶头孢霉菌代谢物的影响, 探究酶解液的作用机理.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金枪鱼加工副产物取自宁波今日食品有限公司; 碱性蛋白酶($2 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)和动物蛋白水解酶($2 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)购于广西南宁庞博生物工程有限公司; CPC 标准品购于上海甄准生物科技有限公司; 吡啶、甲氧基胺盐酸盐、N,O-双(三甲基硅烷基)三氟

收稿日期: 2018-11-27.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 宁波市海洋经济创新发展区域示范项目 (2013716, 20161216).

第一作者: 王欢 (1994-), 女, 河北石家庄人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品工程. E-mail: 1583301194@qq.com

*通信作者: 李晔 (1980-), 女, 浙江宁波人, 副教授, 主要研究方向: 食品安全、生物与分子生物学. E-mail: liye@nbu.edu.cn

乙酰胺、正庚烷、二十二烷购于美国 Sigma 公司; 顶头孢霉菌(*Acremonium chrysogenum*)(40514)由中国工业微生物菌种保藏管理中心提供。

1.2 仪器与设备

KYC-1102C 空气恒温摇床、JN98-111 超声波细胞破碎仪(宁波江南仪器厂); Agilent 1200 高效液相色谱仪、300SB-C18 色谱柱和 Agilent 7890A 气相色谱仪(美国 Agilent 公司); M7-80EI 质谱仪(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.3 方法

1.3.1 酶解液的制备

称取一定量的金枪鱼加工副产物, 捣碎, 按固液比 1:2 加入一定量的水。加入 1.4% 以 1:1 混合的动物蛋白酶和碱性蛋白酶, 在 60 °C 下水解 6 h, 水解结束后经过 95 °C, 5 min 灭酶, 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液。将上清液经过 60 °C, 120 r·min⁻¹ 旋转蒸发浓缩, 得到金枪鱼加工副产物酶解液。

1.3.2 酶解液的用量

以顶头孢霉菌发酵产 CPC 的常规培养基(葡萄糖 16 g·L⁻¹、蔗糖 5 g·L⁻¹、玉米浆 70 g·L⁻¹、豆油 30 mL·L⁻¹、蛋氨酸 6 g·L⁻¹、硫酸铵 14 g·L⁻¹、磷酸二氢钾 4 g·L⁻¹、碳酸钙 5 g·L⁻¹, 自然 pH)^[10]为对照, 比较添加不同量的酶解液(10、20、30、40、50 mL·L⁻¹)对 CPC 产量的影响, 同时相应减少同为氮源的玉米浆的用量(60、50、40、30、20 g·L⁻¹)。进一步利用响应面, 以 CPC 产量为指标, 采用 Box-Behnken 中心组合设计实验, 结果见表 1。

表 1 响应面实验设计因素与水平 g·L⁻¹

水平	因素		
	酶解液	玉米浆	豆油
-1	20	50	20
0	30	60	30
1	40	70	40

1.3.3 PC 含量检测

用 HPLC 检测发酵液中 CPC 含量。取发酵液于 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液。过滤膜加入样品瓶中, 用于 HPLC 检测。HPLC 检测 CPC 的色谱条件: 色谱柱为 300SB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为 20 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾与乙腈, 两者比例为 80:20; 紫外检测波长为 254 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 37 °C; 进样量为 20 μL。

1.3.4 培养条件

对照组和各实验组在相同条件下发酵培养顶头孢霉菌。培养条件为: 装瓶量(通气量) 50 mL, 接种量 20%, 接种时间 60 h, 发酵时间 5 d。

1.3.5 顶头孢霉菌代谢物的制备

发酵结束后离心收集菌体, 清洗后准确称取对照组和最优实验组的湿菌体 1.0 g, 液氮充分研磨至粉末状。加入 15 mL 60% 的冷甲醇提取剂^[11], 超声破碎 20 min 后于 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清, 氮吹, 冷冻干燥后保存备用。

1.3.6 代谢物的衍生化

对照组和最优实验组的冻干粉中分别加入质量浓度为 15 mg·mL⁻¹ 的甲氧基胺盐酸盐/吡啶溶液 100 μL, 溶解后置于 40 °C 水浴反应 90 min; 然后分别加入质量浓度为 15 mg·mL⁻¹ 的双(三甲基硅基)三氟乙酰胺 100 μL, 70 °C 水浴 30 min^[12]; 冷却, 加入 0.10 mg·mL⁻¹ 含二十二烷的正庚烷 100 μL 作为内标物^[13], 混匀后 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。取上清液 100 μL 用于 GC-MS 分析。

1.3.7 GC-MS 分析

气相色谱条件: DB-5MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm, Agilent); 进样量为 1 μL, 采用分流进样模式, 分流比为 8:1, 载气为 He, 流速为 1.00 mL·min⁻¹, 溶剂延迟时间 8 min。程序升温为 90 °C 保持 3 min, 以 3 °C·min⁻¹ 升至 160 °C, 保持 20 min; 然后以 2 °C·min⁻¹ 升温至 220 °C, 保持 1 min; 最后以 10 °C·min⁻¹ 上升至 290 °C, 保持 10 min。质谱条件: 离子源温度 250 °C, 电离方式 EI, 电子能量 70 eV, 接口温度 280 °C, 扫描质量范围 45~550 m·z⁻¹, 扫描时间 60 min。

1.3.8 数据分析

GC-MS 检测结果通过计算机谱库 WILEY 和 NIST 进行定性分析, 将所得化合物中相似度低于 80 的组分视为未鉴定出, 进一步根据内标法定量计算胞内代谢物的浓度。

2 结果与讨论

2.1 酶解液对 CPC 产量的影响

酶解液的添加量对 CPC 产量的影响见表 2。从表 2 可知, CPC 的产量随着酶解液添加量的增加而增大, 当酶解液加入量为 30 mL·L⁻¹ 时, 产量最大,

为 $(5.342\pm0.038)\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. 与对照组相比, 抗生素产量增加 10.60%.

表 2 酶解液对 CPC 产量的影响

组项	酶解液/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	CPC 产量/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照组	0	4.830 ± 0.015
	10	5.106 ± 0.023
	20	5.007 ± 0.013
实验组	30	5.342 ± 0.038
	40	5.335 ± 0.024
	50	5.205 ± 0.051

2.2 响应面优化培养基中的碳氮比

进一步以 CPC 产量为指标, 采用 Box-Behnken 中心组合设计实验, 结果见表 3.

表 3 响应面设计方案及结果

实验号	因素			CPC 产量/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
	$A/(\text{mL}\cdot\text{L}^{-1})$	$B/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$C/(\text{mL}\cdot\text{L}^{-1})$	
1	-1(20)	-1(50)	0(30)	4.902
2	0(30)	1(70)	-1(20)	6.165
3	0(30)	0(60)	0(30)	7.633
4	0(30)	0(60)	0(30)	7.878
5	1(40)	0(60)	1(40)	6.771
6	-1(20)	0(60)	-1(20)	6.316
7	-1(20)	0(60)	-1(20)	5.419
8	0(30)	1(70)	1(40)	6.821
9	-1(20)	1(70)	0(30)	5.734
10	1(40)	1(70)	0(30)	6.832
11	0(30)	0(60)	0(30)	8.099
12	-1(20)	0(60)	1(40)	6.553
13	0(30)	0(60)	0(30)	7.896
14	0(30)	0(60)	0(30)	8.211
15	0(30)	-1(50)	-1(20)	4.754
16	0(30)	-1(50)	1(40)	6.340
17	1(40)	-1(50)	0(30)	5.100

注: A 为酶解液; B 为玉米浆; C 为豆油. 下表同.

在对发酵培养基中的碳氮组成进行优化的同时, 建立数学模型, 确定最佳的碳氮比. 根据表 3 结果, 用 Design Expert 8.0 对数据进行多元回归拟合, 得到回归方程模型为:

$$S_{\text{CPC}}=7.94+0.30A+0.56B+0.48C+0.22A\times B-0.17A\times C-0.23B\times C-1.03A^2-1.27B^2-0.65C^2,$$

(1)

式中: S_{CPC} 为 CPC 含量, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; A、B、C 均为编码值.

式(1)回归方程表示 CPC 产量与各因素之间的关系. 回归方程的方差分析结果见表 4. 由表 4 可知, 回归方程模型 $P<0.05$ 显著, 失拟项 $P>0.05$ 不显著, 说明模型显著^[14]. 模型中自变量一次项 A、B、C 和二次项 AB、BC、 A^2 、 B^2 、 C^2 ($P<0.05$)均显著. 软件分析得到 F 值为 49.85, 多元相关系数 R^2 为 0.984 6, 说明模型的拟合性较好^[15], 3 个因素水平区间设计合理, 因此可用该模型预测实验数据.

表 4 响应面回归方程的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	平均方差	F 值	P 值
模型	20.30	9	2.23	49.85	<0.000 1
A	0.73	1	0.73	16.27	0.005 0
B	2.48	1	2.48	55.59	0.000 1
C	1.83	1	1.83	41.09	0.000 4
AB	0.20	1	0.20	4.54	0.070 7
AC	0.12	1	0.12	2.58	0.152 2
BC	0.22	1	0.22	4.84	0.063 7
A^2	4.45	1	4.45	99.72	<0.000 1
B^2	6.82	1	6.82	152.84	<0.000 1
C^2	1.78	1	1.78	39.88	0.000 4
失拟项	0.11	3	0.04	0.76	0.570 5

图 1 为响应面分析各因素间交互作用结果. 从图 1(a)可看出, 等高线呈椭圆形, 则玉米浆和酶解液的交互作用比较明显. 随着玉米浆用量的增加, CPC 产量呈先增后减的趋势. 初始速效氮源较多, 导致顶头孢霉菌前期菌体大量生长繁殖, 氮源主要用于菌丝的生长, 从而导致后期发酵时氮源的不足, 影响了 CPC 的合成. 从图 1(b)可看出, 酶解液和豆油等高线呈近似圆形, 表明二者作用不明显, 且随着豆油量的改变, CPC 产量的变化曲线较平缓. 图 1(a)和 1(b)均表明, 酶解液含量的改变引起的 CPC 产量呈先升后降的趋势. 酶解液蛋白含量高, 氨基酸丰富, 适当的添加量有利于产物的产生, 比如蛋氨酸、谷氨酸可促进 CPC 的合成^[16]. 但当浓度过高时会导致发酵液黏度增加, 溶氧降低, 反而会抑制 CPC 的生物合成. 从图 1(c)可知, 豆油加入量曲线的变化比较平缓, 说明在实验范围内豆油的添加量对 CPC 产量的影响不显著.

实验结果表明: 在中心点附近的响应值最大. 通过对回归方程拟合得到发酵 CPC 的最佳配方用

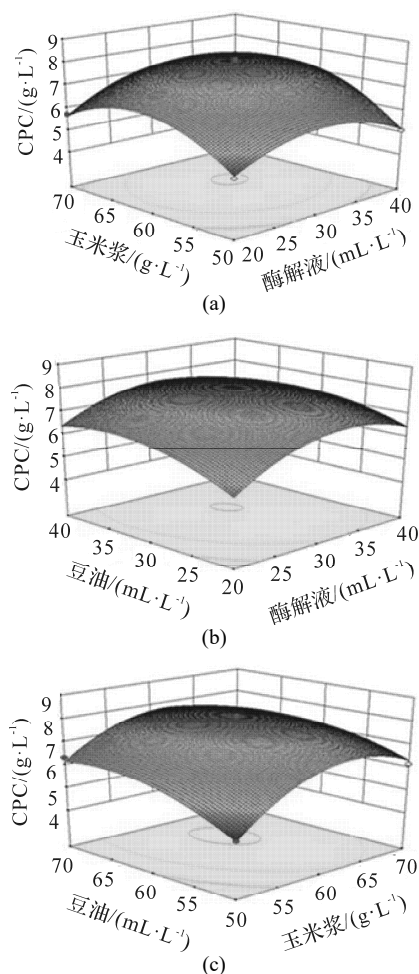


图1 交互项因素对CPC含量影响的响应面三维图

量为: 酶解液 $30.86 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, 玉米浆 $60.37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 豆油 $30.12 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$. 在此条件下进行实验, 得到头孢菌素C的产量为 $8.106 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. 未添加酶解液时产量为 $4.830 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (表2), 增加了 67.82%, 与理论值基本相符.

氮源是菌体细胞的构成物以及合成代谢产物. 氮源的种类、质量、浓度都会影响发酵产量. 有研究表明^[17], 在顶头孢霉菌中, 高浓度铵盐(NH_4^+)会强烈地抑制抗生素的产生, 因此发酵培养基中更适合以 L-天门冬酰胺和 L-精氨酸作为氮源. 玉米浆是顶头孢霉菌发酵过程中常用的氮源, 但玉米浆质量波动较大, 且总氮和氨基态氮含量较低, 往往不能完全满足顶头孢霉菌的菌体生长和合成CPC的需要. 用金枪鱼加工副产物制备的酶解液能有效弥补玉米浆的不足. 本研究表明: 在发酵培养基中, 添加一定量的酶解液, 能有效提高CPC的产量. 此外, 有研究^[18]通过诱变育种来提高CPC

的产量, 使其产量达到 $31.90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. 因此, 考虑在诱变育种的基础上, 用金枪鱼加工副产物酶解液优化培养基, 以期产生更好的效果.

2.3 顶头孢霉菌胞内代谢物的GC-MS分析

2.3.1 顶头孢霉菌代谢物种类比较

通过GC-MS在对照组和最优实验组顶头孢霉菌菌体中分别鉴定出42种和40种化合物, 主要为氨基酸(8种和19种)、酸类化合物(18种和12种)、糖类化合物(各4种)、醇类化合物(6种和3种)、胺类化合物(3种和1种)、其他化合物(3种和1种). 对照组和最优实验组代谢物的种类组成相似, 其中氨基酸和酸类化合物所占比重较大, 对照组中两者所占比例为 59.81%, 最优实验组中为 83.08%. 但不同种类代谢物所占比例差异较大(图2).

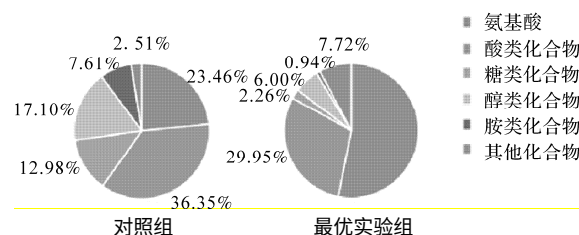
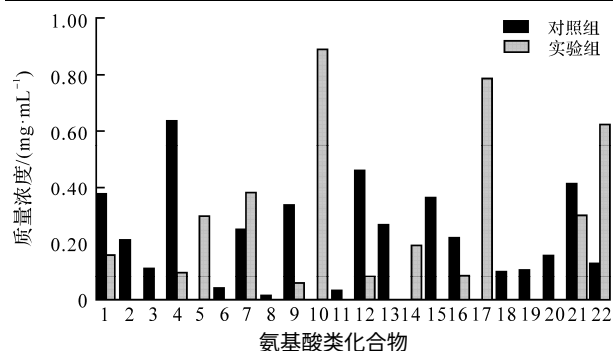


图2 酶解液对顶头孢霉菌发酵代谢物的影响

2.3.2 顶头孢霉菌主要代谢物差异性分析

图3为对照组和最优实验组中氨基酸类代谢物的质量浓度比较. 氨基酸是微生物胞内代谢活动产生的重要初级代谢产物之一, 是微生物生命活动不可或缺的重要代谢产物^[19]. 实验中共检测出19种氨基酸, 对照组与实验组中氨基酸含量差异较大的有7种, 包括L-缬氨酸、丝氨酸、L-异亮氨酸等, 与对照组相比, 实验组中除了赖氨酸含量减少, 其余6种含量均增加.

对氨基酸类化合物的种类及含量分析发现, 实验组的甘氨酸、苏氨酸、L-谷氨酸、丙氨酸、L-缬氨酸和L-异亮氨酸含量较高. L-谷氨酸在转氨酶的作用下能产生 α -酮戊二酸, 其对氨基酸的代谢具有重要作用^[20]. 有研究表明^[21], L-谷氨酸在CPC发酵过程中含量变化较大, 对CPC的合成具有促进作用. L-缬氨酸被认为在CPC合成的第二步反应中具有不可或缺的作用, 其与二肽通过加成反应形成三肽, 所以实验组中L-缬氨酸含量的提高对CPC产量具有很大的促进作用^[22]. 此外, L-天门冬氨酸、L-苏氨酸和丝氨酸等其他氨基酸对CPC的

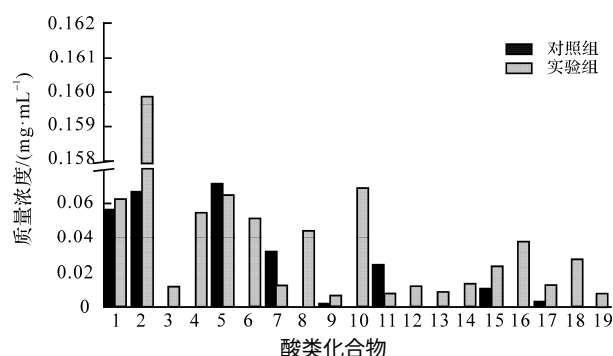


1 为丁烯酸; 2 为乙二酸; 3 为丁酸; 4 为丁二酸; 5 为(Z)-9-十八碳烯酸; 6 为丙酸; 7 为磷酸; 8 为丙二酸; 9 为(Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸; 10 为 9-十八碳烯酸; 11 为(E)-2-延胡索酸; 12 为棕榈酸; 13 为乙酸; 14 为 1-氨基环丙烷羧酸; 15 为戊二酸; 16 为 1,2,3-丙三羧酸; 17 为 10,12-十八碳二烯酸; 18 为苯乙酸; 19 为 1,2-丙二醇-1-磷酸; 20 为 11-十八碳烯酸; 21 为反油酸; 22 为硬脂酸。

图3 氨基酸类化合物浓度比较

产生也具有促进作用, 是单独作用还是共同作用尚不明确^[21]。

酸类物质是微生物胞内代谢物中重要组成成分, 主要是微生物通过糖酵解, 磷酸戊糖和氨基酸分解等代谢途径产生的代谢产物。图4是2组酸类化合物的质量浓度比较。实验中共检测出21种酸类物质, 实验组中9-十八碳烯酸、10,12-十八碳二烯酸和硬脂酸含量较高, 其代谢通路是脂肪酸的生物合成。脂肪酸能够作为CPC合成的碳源, 提高CPC的产量^[23]。对照组中浓度较高的为丁二酸、棕榈酸、反油酸、戊二酸和(Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸, 其中棕榈酸、反油酸和(Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸都是脂肪酸的生物合成代谢所产生; 乙酸、(E)-2-延胡索酸和1,2,3-丙三羧酸是柠檬酸循环的产物。2组



1 为丙氨酸, 2 为甘氨酸, 3 为 L-亮氨酸, 4 为 L-缬氨酸, 5 为 L-谷氨酸, 6 为丝氨酸, 7 为 L-赖氨酸, 8 为 L-异亮氨酸, 9 为 L-脯氨酸, 10 为 L-苏氨酸, 11 为 L-天门冬氨酸, 12 为 β-丙氨酸, 13 为甘氨酸-L-谷氨酸, 14 为 DL-鸟氨酸, 15 为 L-蛋氨酸, 16 为 N-乙酰-L-赖氨酸, 17 为酪氨酸, 18 为 L-苯丙氨酸, 19 为 L-酪氨酸。

图4 酸类化合物浓度比较

中的磷酸和反油酸含量均较高, 其中磷酸是邻氨基苯甲酸的降解产物, 反油酸是脂肪酸合成代谢产物。此外, 有些酸类化合物, 如 9-十八碳烯酸、(Z)-十八碳烯酸、11-十八碳烯酸均是脂肪酸生物合成中的代谢产物。

3 结语

本文研究了金枪鱼加工副产物酶解液的不同添加量对顶头孢霉菌发酵产抗生素的作用, 得到头孢菌素 C 的最佳产量为 $8.106 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 比未添加酶解液时增加了 67.82%。对照组和最优实验组发酵条件下的顶头孢霉菌的代谢物对比发现, 两者主要代谢物的组成种类相似, 但同一类别化合物的含量差别较大。

金枪鱼加工副产物酶解液的添加在一定程度上提高了 CPC 的产量, 可能是由于其丰富的游离氨基酸和粗蛋白对顶头孢霉菌发酵过程中的胞内代谢物产生了影响, 进而促进了 CPC 的产生, 但其对胞内代谢物的影响机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 张华丹, 余辉, 陈小娥, 等. 双酶酶解金枪鱼加工下脚料提油工艺[J]. 食品科技, 2012, 37(8):125-129.
- [2] 程芬芬, 朱江, 龙彩云, 等. 酶水解技术在鱼下脚料加工中的应用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(24):426-429.
- [3] 方健民, 黄富雄, 郑钟新, 等. 金枪鱼的营养价值和加工利用[J]. 水产科技, 2006, 11(2):8-11.
- [4] 刘建华, 王斌, 丁玉庭, 等. 金枪鱼暗色肉酶解工艺及其水解物营养价值评价[J]. 食品科学, 2014, 35(20):1-5.
- [5] 王霞, 苏秀榕, 丁进锋, 等. 响应面法优化双酶水解黄鳍金枪鱼胰脏的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(11):1229-1233.
- [6] 王霞, 王奇, 苏秀榕, 等. 金枪鱼胰脏酶解液对糖尿病大鼠血糖和血脂的作用[J]. 中国食品学报, 2012, 12(7):24-28.
- [7] 蔡本利, 洪鹏志, 杨萍, 等. 黄鳍金枪鱼头蛋白酶解液对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(5):791-795.
- [8] 张铭, 李继晨. 优化培养基提高头孢菌素 C 产量[J]. 黑龙江医药, 2002, 15(2):100-101.
- [9] 李宁慧. 头孢菌素 C 高产顶头孢霉菌的选育和发酵培养基优化[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [10] 孟国庆. 头孢菌素 C 高产菌株选育及发酵特性研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2011.

- [11] Meyer H, Liebeke M, Lalk M. A protocol for the investigation of the intracellular *Staphylococcus aureus* metabolome[J]. Analytical Biochemistry, 2010, 401(2): 250-259.
- [12] Chen M M, Li A L, Sun M C, et al. Optimization of the quenching method for metabolomics analysis of *Lactobacillus bulgaricus*[J]. Journal of Zhejiang University (Science B), 2014, 15(4):333-342.
- [13] Huang X, Gong Y F, Yu K, et al. Gas chromatography-mass spectrometry based on metabonomics study of carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007, 35(12): 1736-1740.
- [14] 侯付景, 金春华, 董明敏, 等. 响应面分析法优化海地瓜酶解工艺及其抗氧化活性的研究[J]. 营养学报, 2010, 32(3):276-280.
- [15] 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 38-41.
- [16] 刘烦. 发酵生产头孢菌素 C 在线补料控制和优化工艺研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [17] 刘佳佳, 刘钢. 头孢菌素 C 生物合成调控研究进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(3):461-470.
- [18] 黎亮, 王泽建, 郭美锦, 等. 头孢菌素 C 产生菌的诱变育种及培养基优化[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(8): 61-66.
- [19] Kunji E R S, Mierau I, Hagting A, et al. The proteolytic systems of lactic acid bacteria[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1996, 70(2/4):187-221.
- [20] Kieronczyk A, Skeie S, Olsen K, et al. Metabolism of amino acids by resting cells of non-starter lactobacilli in relation to flavour development in cheese[J]. International Dairy Journal, 2001, 11(S4/7):217-224.
- [21] 王敏. β -内酰胺类抗生素发酵用玉米浆关键成分的分析[D]. 保定: 河北大学, 2010.
- [22] Park H J, Khang Y H. Production of cephalosporin C by immobilized cephalosporin acremonium in polyethylene-modified barium alginate[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1995, 17(5):408-412.
- [23] 任强, 赵林, 王晓娜, 等. 头孢菌素 C 发酵过程中植物油作用机理的研究[J]. 齐鲁工业大学学报(自然科学版), 2014, 28(2):47-50.

Effects of hydrolysates of tuna processing by-products on the fermentation products of *Cephalosporium acremonium*

WANG Huan^{1,2}, LI Ye^{2*}, DAI Juan², SU Xiurong²

(1.College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

2.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: The by-products of tuna were used as raw materials to study the effects of the hydrolysates on the fermentation products of *Cephalosporium acremonium*. Firstly, based on the yield of cephalosporin C (CPC), the effects of different amounts of hydrolysates on the production of antibiotics by *C. acremonium* were studied by orthogonal experiment and response surface method. The results showed that in the fermentation medium with the amount of hydrolysates being $30.86 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, the production of CPC reached a maximum of $8.106 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. It was 67.82% higher than that without the hydrolysates. Further, the effect of the hydrolysates on the metabolites of *C. acremonium* was qualitatively and quantitatively analyzed by GC-MS. It was found that the addition of the hydrolysates significantly changed the species and content of the metabolites of *C. acremonium*. It was of great significance to improve the production of CPC and the comprehensive economic and environmental benefits of tuna processing that uses the resources of tuna processing by-products to develop fermentation industrial medium.

Key words: tuna by-products; hydrolysates; *Cephalosporium acremonium*; cephalosporin C

(责任编辑 史小丽)