



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114107073 B

(45) 授权公告日 2022.04.08

(21) 申请号 202210110282.5

(22) 申请日 2022.01.29

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114107073 A

(43) 申请公布日 2022.03.01

(83) 生物保藏信息  
CGMCC NO.20740 2020.10.12

(73) 专利权人 中国科学院天津工业生物技术研  
究所  
地址 300308 天津市滨海新区空港经济区  
西七道32号

(72) 发明人 马延和 李德茂 陈吴西 童胜  
齐显妮 曾艳 王钦宏 孙媛霞

(74) 专利代理机构 北京知文通达知识产权代理  
事务所(普通合伙) 16051

代理人 欧阳石文

(51) Int.Cl.  
C12N 1/14 (2006.01)  
C12P 21/00 (2006.01)  
C12R 1/77 (2006.01)

审查员 张思源

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种利用糖蜜生产菌丝蛋白的方法

(57) 摘要

本发明涉及菌丝蛋白生产生物技术领域,具体涉及利用糖蜜生产菌丝蛋白的方法。所述方法包括以糖蜜为原料,利用丝状真菌TB01来发酵生产菌丝蛋白的步骤。本发明方法可以在加/或不加外源氮源或者无机盐的条件下高效的将糖蜜液全部转化为菌丝蛋白,菌丝蛋白经过水洗后呈白色,无任何异味,可以用于饲料、食品和轻工业等其他领域;同时,也可以实现废弃物的高效转化利用,同时不产生废液不污染环境,发酵液加入配料以后可以直接用于蛋白饲料领域。

1. 一种利用糖蜜生产菌丝蛋白的方法,其特征在于,包括以糖蜜为唯一培养成分的发酵液,对丝状真菌进行发酵培养的步骤,以及从发酵培养液中收获单细胞蛋白质,其中所述丝状真菌为2020年10月12日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC NO. 20740的镰刀菌*Fusarium venenatum* TB01。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,发酵培养液中糖蜜的用量为5-500g/L。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述发酵于pH3.0~7.5,温度21℃~35℃的条件下进行。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,丝状真菌TB01接种于发酵培养液之前进行活化培养,其活化培养基为活化种子培养基,含有一水葡萄糖20~60 g/L,酵母粉0.5~2g/L。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,所述丝状真菌接种于发酵培养液是将活化种子液按照3~10%体积比接入发酵培养基中,25-35℃,通气量为0.5-2vvm,培养12h-48h。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,发酵过程用氨水调节发酵pH=6。

7. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,在发酵的0-12h调节通气量为0.5vvm,12h以后调节通气量为1.5vvm。

8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,控制发酵培养液中的糖蜜浓度,在发酵液中的蔗糖、果糖和葡萄糖被消耗尽时,然后调节通气量为1vvm,继续用氨水调节pH=6培养,使菌体继续利用氨水合成细胞蛋白质。

9. 如权利要求1至7任一项所述的方法,其特征在于,在一次发酵结束后,取1-10%的发酵液作为下一批发酵的种子液,实现连续发酵。

10. 如权利要求1至7任一项所述的方法,其特征在于,在一次发酵结束后,对发酵培养基进行抽滤,收集滤液作为下一批发酵代替水配制含糖蜜的发酵培养液。

## 一种利用糖蜜生产菌丝蛋白的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及菌丝蛋白生产生物技术领域,具体涉及利用糖蜜生产菌丝蛋白的方法。

### 背景技术

[0002] 随着人类经济社会快速发展,预计到2050年,全球总人口即将突破100亿。肉制品作为人类获取蛋白质等营养物质的重要来源之一,需求将上升70%。作为人口大国的中国,每年花费在蛋白质进口方面的费用高达1500亿元,其中主要包括进口大豆蛋白和动物蛋白。但由于植物和动物具有较长的生长周期,这无疑大大增加了动物蛋白和植物蛋白的生产成本。而且大规模的畜牧养殖业带来的环境问题和社会问题也日益严峻,传统养畜温室气体排放约占全球总排放量的15%,所占用的土地资源也会带来可能出现的粮食安全危机。此外,高度密集的畜牧养殖容易滋生病菌并相互感染,养殖行业不得不大规模使用抗生素以保证养殖效率。而抗生素的使用无论是对人体还是自然生态的健康都会产生不可逆转的损害。因此,急需一种新的蛋白供给模式既能维持人类肉食需求和供给平衡,又有利于优化生态环境,实现人类食品安全的提升和饮食健康状况的改善。

[0003] 菌丝蛋白是由丝状真菌经过发酵技术产生的多细胞蛋白质,与酵母、细菌的单细胞蛋白相比更加味美,而且具有类似肉质的组织结构。菌丝蛋白脂肪含量低,氨基酸种类齐全,富含微量元素和维生素,同时还含有丰富的能够利于人胃肠蠕动的可食性粗纤维,是一种能够满足于现代人营养需求的肉类代用品。而且发酵法生产菌丝蛋白不受土地、光照、气候条件的制约,生产周期短、所需投资成本相对较低,后工艺简单,产品易于加工成型。

[0004] 糖类代谢是菌丝蛋白合成的重要前提物质及主要能量供应。发酵过程中利用的碳源不同,也会影响发酵的结果,因此选择合适的底物进行发酵至关重要。糖蜜是甘蔗制糖的主要副产物之一。含有大量糖分,其中蔗糖含量为40%左右,且含有维生素、微量元素等多种可利用成分,不仅营养丰富,而且价格比较低廉。因此在菌丝蛋白生产中合理利用糖蜜不仅可以有效地控制制糖过程中废弃物造成的环境污染,而且可以降低菌丝蛋白生产成本,为菌丝蛋白的使用产生更高的经济效益。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术的需求,本发明的目的在于提供一种高效生产的菌丝蛋白的方法。

[0006] 本发明提供一种利用糖蜜生产菌丝蛋白的方法,包括以糖蜜为唯一培养成分的发醇液,对丝状真菌进行发酵培养的步骤,其中所述丝状真菌是镰刀菌TB01,其保藏编号为CGMCC NO.20740,分类命名为镰刀菌*Fusarium venenatum*,于2020年10月12日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号)。

[0007] 具体地,包括如下步骤:

[0008] 1)将所述丝状真菌接种于含有的糖蜜的发醇培养液中进行发醇;

- [0009] 2)从发酵培养液中收获单细胞蛋白质。
- [0010] 优选地,发酵培养液中糖蜜的用量为5-500g/L。
- [0011] 在一个具体实施方式中,所述发酵于pH3.0~7.5,温度21℃~35℃的条件下进行。
- [0012] 在另外的实施方式中,所述丝状真菌接种于发酵培养液之前进行活性培养,其活化培养基为活化种子培养基,含有一水葡萄糖20~60 g/L,酵母粉0.5~2g/L。
- [0013] 具体地,丝状真菌TB01接种于发酵培养液是将活化种子液按照3~10%体积比接入发酵培养基中,25-35℃,通气量为0.5-2vvm,培养12h-48h。
- [0014] 在优选实施方式中,发酵过程用氨水调节发酵pH=6。另一优选实施方式中,在发酵的0-12h调节通气量为0.5vvm,12h-36h以后调节通气量为1.5vvm。
- [0015] 更优选地,控制发酵培养液中的糖蜜浓度,在发酵至消耗尽其中的蔗糖、果糖和葡萄糖时,调节通气量为1vvm,继续用氨水调节pH=6培养,使菌体继续利用氨水合成细胞蛋白质。
- [0016] 在另外的实施方式中,在一次发酵结束后,取1-10%的发酵液作为下一批发酵的种子液,实现连续发酵。优选地,在一次发酵结束后,对发酵培养基进行抽滤,收集滤液作为下一批发酵代替水配制含糖蜜的发酵培养液。
- [0017] 本发明还提供上述方法所获得的菌丝蛋白。
- [0018] 进一步,本发明还提供所述的菌丝蛋白在生产食品、保健品或饲料中的应用。
- [0019] 本发明有益效果在于,以糖蜜为唯一培养成分,对丝状真菌TB01进行发酵,在利用糖蜜的基础上生产高附加值的蛋白,为绿色、低成本生产菌丝蛋白提供技术支撑。丝状真菌TB01可高效利用糖蜜产蛋白质,因此糖蜜可作为较优的原料进行丝状真菌TB01的发酵,为生产食物,保健品或饲料产品提供理论基础。
- [0020] 更进一步地,建立了一种两阶段碳氮调控的发酵技术工艺,在糖蜜耗尽以后,继续培养促使菌体利用体内积累的碳源合成蛋白,有效提高了蛋白含量。采用5 L发酵体系对丝状真菌TB01进行发酵,结果表明培养液仅含有糖蜜的条件下丝状真菌TB01的生物量达到15.39g/L,蛋白含量达到56.24%。
- [0021] 本发明的其它优点、目标和特征将部分通过下面的说明体现,部分还将通过对本发明的研究和实践而为本领域的技术人员所理解。

## 具体实施方式

- [0022] 下面通过具体实施例对本发明作进一步的阐述,以便更好的理解本发明,但并不构成对本发明的限制。
- [0023] 实施例1:葡萄糖和糖蜜对丝状真菌TB01发酵的影响
- [0024] 一、培养基
- [0025] 1、PDA固体培养基,pH自然
- [0026] 2、活化种子培养基(g/L):一水葡萄糖30,酵母粉1.0,pH6;
- [0027] 3、发酵培养液(g/L):糖蜜或者葡萄糖,无机盐类(硫酸镁1.5,氯化钾0.2,硫酸钠0.5,磷酸二氢钾23,碳酸钙2,硫酸铵10),pH6;
- [0028] 二、培养条件
- [0029] 丝状真菌TB01接种在PDA固体培养基中,29℃,培养三天活化菌株。将活化好的菌

株用手术刀划分大小相等的菌块接种到盛有50ml种子培养基的250ml摇瓶中,29℃,180rpm培养36h。活化种子液按照5%体积比接入发酵培养液中,29℃,180rpm培养两天。

### [0030] 三、实验方法

[0031] 实验分为碳源为葡萄糖组,浓度为60g/L;碳源为糖蜜组,糖蜜浓度分别为25,75,125,175和250g/L。发酵两天后,发酵液倒入布氏漏斗中真空抽滤,抽滤后菌体复溶在装有100ml蒸馏水的烧杯中清洗,抽滤,重复3遍,菌体冷冻干燥,称重,超声破碎仪破碎。利用总有机碳/总氮分析仪(N/C 2100S)测定总氮含量并计算菌丝体蛋白含量。

### [0032] 四、结果

[0033] 测定丝状真菌TB01在不同糖蜜浓度和葡萄糖为碳源下的生长情况以及蛋白含量,结果如表1所示。

### [0034] 表1葡萄糖和糖蜜对丝状真菌TB01发酵的影响

类别	用量 (g/L)	生物量 (g/L)	蛋白含量 (%)
葡萄糖	60	4.92	33.44
糖蜜	25	5.90	57.98
[0035] 糖蜜	75	10.42	58.75
糖蜜	125	14.68	62.38
糖蜜	175	13.71	55.99
糖蜜	250	13.63	58.18

[0036] 从表1可以看出TB01菌株在以葡萄糖为碳源时,生物量仅为4.92 g/L,蛋白含量为33.44%。以糖蜜为碳源时,菌体的生物量随着糖蜜浓度的增加而增加呈正相关关系,当糖蜜浓度增加到125g/L时生物量达到最大为14.68g/L,蛋白含量为62.38%,但当继续增加糖蜜浓度为250g/L时,生物量,蛋白含量开始下降。因此选择糖蜜125g/L为最合适的浓度,进行接下来的实验。

### [0037] 实施例2:不同无机盐对丝状真菌TB01发酵的影响

#### [0038] 一、培养基

[0039] 1、PDA固体培养基,pH自然

[0040] 2、活化种子培养基(g/L):一水葡萄糖30,酵母粉1.0,pH6;

[0041] 3、发酵培养液(g/L):糖蜜125,无机盐类(硫酸镁1.5,氯化钾0.2,硫酸钠0.5,磷酸二氢钾23,碳酸钙2,硫酸铵10),pH6;

#### [0042] 二、培养条件

[0043] 丝状真菌TB01接种在PDA固体培养基中,29℃,培养三天活化菌株。将活化好的菌株用手术刀划分大小相等的菌块接种到盛有50ml种子培养基的250ml摇瓶中,29℃,180rpm培养36h。活化种子液按照5%体积比接入发酵培养基中,29℃,180rpm培养两天。

### [0044] 三、实验方法

[0045] 实验分为五组,分别为:糖蜜+无机盐组、糖蜜+50%无机盐组、糖蜜不加无机盐组、糖蜜+3 g/L硫酸铵组和糖蜜+6 g/L硫酸铵组。发酵两天后,发酵液倒入布氏漏斗中真空抽滤,抽滤后菌体复溶在装有100ml蒸馏水的烧杯中清洗,抽滤,重复3遍,菌体冷冻干燥,称重,超声破碎仪破碎。利用总有机碳/总氮分析仪(N/C 2100S)测定总氮含量并计算菌丝体蛋白含量。

[0046] 四、结果

[0047] 测定丝状真菌TB01在碳源为糖蜜,不同的无机盐浓度下的生长情况以及蛋白含量,结果如表2所示。

[0048] 表2 不同无机盐对对丝状真菌TB01发酵的影响

组别	生物量(g/L)	蛋白含量(%)
发酵培养基对照组	13.51	46.49
糖蜜+发酵培养基中的50%无机盐	13.65	48.90
糖蜜不加无机盐	14.51	61.22
糖蜜+3 g/L硫酸铵	14.46	36.19
糖蜜+6 g/L硫酸铵	13.75	40.36

[0050] 从表2可以看出TB01菌株在以糖蜜为碳源,不加无机盐的情况下生物量达到最大为14.51g/L,蛋白含量为61.22%。

[0051] 实施例3:丝状真菌TB01利用糖蜜作为碳源的连续发酵

[0052] 一、培养基

[0053] 1、PDA固体培养基,pH自然

[0054] 2、活化种子培养基(g/L):一水葡萄糖30,酵母粉1.0,pH6;

[0055] 3、发酵培养液(g/L):糖蜜按照125g/l的浓度加入摇瓶,灭菌前调pH 6.0。

[0056] 二、培养条件

[0057] 丝状真菌TB01接种在PDA固体培养基中,29℃,培养三天活化菌株。将活化好的菌株用手术刀划分大小相等的菌块接种到盛有50ml种子培养基的250ml摇瓶中,29℃,180rpm培养36h。活化种子液按照5%体积比接入发酵培养基中,29℃,180rpm培养两天。

[0058] 三、实验方法

[0059] 第一批发酵结束后,每瓶取5ml放入无菌离心管作为下一批发酵的种子液。余下的发酵液倒入布氏漏斗中真空抽滤,滤液收集,作为下一批发酵代替水配制糖蜜发酵液;菌体复溶在装有100ml蒸馏水的烧杯中清洗,抽滤,重复3遍,菌体冷冻干燥,称重,超声破碎仪破碎。利用总有机碳/总氮分析仪(N/C 2100S)测定总氮含量并计算菌丝体蛋白含量。共发酵5批,结果如表3所示。

[0060] 表3 丝状真菌TB01利用糖蜜作为碳源的连续发酵的蛋白含量

组别	生物量 (g/L)	蛋白含量 (%)
第一代	14.35	43.35
第二代	10.46	44.88
第三代	10.02	46.13
第四代	9.41	45.63
第五代	8.65	46.97

[0062] 结果表明,利用糖蜜发酵后的废液作为发酵液继续发酵是可行的,即将上一批次的发酵废液收集后用于后一批发酵的用水,这样就可以实现无废水排放的发酵,即降低了生产成本,节约了发酵用水,又实现了无废排放,保护了环境。

[0063] 实施例4:5L发酵罐培养丝状真菌TB01

[0064] 一、培养基

[0065] 1、PDA固体培养基,pH自然

[0066] 2、活化种子培养基(g/L):一水葡萄糖30,酵母粉1.0,pH6;

[0067] 3、发酵培养液(g/L):称取糖蜜2000g在流加瓶中单独灭菌,按照125g/l的糖蜜浓度加入发酵罐。

[0068] 二、培养条件

[0069] 丝状真菌TB01接种在PDA固体培养基中,29℃,培养三天活化菌株。将活化好的菌株用手术刀划分大小相等的菌块接种到盛有50ml种子培养基的250ml摇瓶中,29℃,180rpm培养36h。活化种子液按照5%体积比接入发酵培养液中,29℃,转速300rpm,在发酵的0-12h调节通气量为0.5vvm,12h-36h调节通气量为1.5vvm;控制发酵液中的糖蜜浓度,在发酵的36h时经检测,已消耗尽其中的蔗糖、果糖和葡萄糖(取发酵液用液相色谱测定发酵液中的蔗糖、果糖和葡萄糖含量均为0),发酵过程用氨水调节pH为6.0。然后以后调节通气量为1vvm,继续用氨水调节pH=6培养12h,使菌体继续利用氨水合成细胞蛋白质。

[0070] 三、实验结果

[0071] 发酵结束后,发酵液抽滤,蒸馏水清洗2-3遍,菌体冷冻干燥,称重,总氮分析仪测蛋白含量。最终生物量为15.39g/L,蛋白含量为56.24%。本实施例采用了三阶段通气、后期无糖促进蛋白积累的发醇技术,三阶段通气发酵充分利用了菌体对氧的需求特点,降低了能耗,后期无糖促进蛋白积累可以在后期无糖过程中消耗菌体内多余的糖或者是碳来利用N积累蛋白,可以显著提升蛋白含量。