

食用真菌蛋白—美味丝蓍霉 D-100 的研究

II. 发酵工艺、安全与营养评价*

李淑敏 林伯荃 田野 孔凡津 聂实践

(北京市营养源研究所, 真菌工程室)

摘要 对美味丝蓍霉 D-100 进行了最佳生长条件试验。试验结果表明, 该菌株间歇发酵最适生长周期为 12—16 小时, 最适发酵温度为 28—34℃。D-100 菌体味美, 它可以按一定比例(20—50%) 加入肉类制品, 制成美味的肉丸子、肉松等食品。通过安全毒理试验证明它无毒。D-100 的营养价值相当于黄豆粉。

关键词 美味丝蓍霉 D-100; 发酵条件, 安全性; 营养成分

本文利用美味丝蓍霉 D-100 菌种, 进行了摇瓶发酵条件试验, 3 吨罐发酵中间扩大试验, 安全性试验和营养评价。其结果报道如下。

材 料 与 方 法

(一) 菌种

美味丝蓍霉 D-100 (以下简称 D-100) 由本组选育。

(二) 碳源

玉米粉购自延庆农村, 面粉、大米粉、鲜土豆和鲜红薯购自本市农贸市场。

(三) 培养基

1 蛋白胨琼脂培养基成分(g): 葡萄糖 20, 蛋白胨 2, K_2HPO_4 1, KH_2PO_4 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, 维生素 B_1 400 μg , 维生素 B_2 2 μg , 琼脂 20, 水 1000ml。

2. 玉米粉培养基成分: 过 40 目筛的玉米粉 3%, KH_2PO_4 0.1%, $NaNO_3$ 0.3%。

3. 大米粉培养基成分: 过 40 目筛的大米粉 3%, KH_2PO_4 0.1%, $NaNO_3$ 0.3%。

4. 普通面粉培养基成分: 面粉 3%, KH_2PO_4 0.1%, $NaNO_3$ 0.3%。

5. 鲜土豆培养基成分: 鲜土豆 20%, KH_2PO_4 0.1%, $NaNO_3$ 0.3%。

6. 鲜红薯培养基成分: 鲜红薯 20%,

KH_2PO_4 0.1%, $NaNO_3$ 0.3%。

(四) 摇瓶发酵条件试验方法

将蛋白胨琼脂斜面上生长一周的菌种接种在装有 100ml 玉米粉培养基的三角瓶内, 在旋转式摇床上 125r/min, 30℃ 培养 20 小时后, 再按 1/10 接种量转接在玉米粉培养基上, 培养条件同上。培养后测定 D-100 菌体的粗蛋白含量、干物重、发酵液 pH、总糖含量和发酵液透光度各项数据。摇瓶试验重复三次, 所得数据为三次的平均值。

(五) 发酵罐中间扩大试验方法

发酵罐培养基为玉米粉培养基。100 升发酵罐为国产标准罐, 装液量 70 升, 通气量为 0.6—0.8 v/v · m, 按接种量 10—12%, 起始 pH 自然, 培养温度 32—34℃, 发酵时间 12—16 小时。3 吨发酵罐为国产标准罐, 装液量 2.5 吨。接种量和发酵条件与 100 升罐相同。发酵后测定 D-100 菌体粗蛋白含量和干物重。

(六) 测定方法

干物重采用称重法测定; 粗蛋白含量用 BUCHI-322 全自动定氮仪测定; 还原糖和总糖用 3,5-二硝基水杨酸法测定; 温度用日本 TN,

* 本文中有安全套安全性试验和动物营养评价的结果, 是由北京市卫生防疫站毒理室提供的, 其余营养成分分析是我所分析室提供的, 特此致谢。

型温度仪测定; pH 值用雷磁 25 型酸度计测定; 粗脂肪用乙醚索氏抽提法测定; 粗纤维用 Tencator 粗纤维仪测定; 维生素 B₁ 和 B₂ 用荧光检测法测定; 氨基酸组成用 835-50 氨基酸分析仪测定; 粗脂肪组成用 163 气相色谱法测定, 透光度用 721 分光光度计测定。

试验结果

(一) 摇瓶发酵条件试验

1. 碳源试验:

(1) 五种碳源比较试验: 以玉米、小麦、水稻、土豆和红薯五种淀粉原料为碳源, 进行摇瓶比较试验 (表 1), 重复五次。

表 1 五种碳源对发酵产品的粗蛋白含量及干物重的影响

培养基	菌体生长情况	粗蛋白(%)	干物重(%)
玉米粉	+++	33.55	1.54
普通面粉	+++	34.00	1.45
大米粉	+++	32.12	1.29
鲜土豆	+++	30.33	1.79
鲜红薯	+++	27.14	1.95

“+++”表示生长良好

从表 1 结果可以看出, 利用美味丝蕈霉 D-100 发酵玉米粉、普通面粉、大米粉、鲜土豆等淀粉原料, 可以生产出粗蛋白含量为 30% 以上的菌体。玉米及土豆价廉, 成本低, 适合作为生产食用真菌蛋白的原料。

(2) 基质碳源浓度对干物重及粗蛋白含量

表 2 不同无机氮源对 D-100 蛋白质含量的影响

	(NH ₂) ₂ CO	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₃ PO ₄	CH ₃ COONH ₄	NaNO ₃	空白
氮源(%)	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0
粗蛋白含量(%)	16.4	35.5	33.1	30.3	33.4	36.3	18.1
发酵液 pH	6.7	3.5	5.0	4.5	4.5	7.0	6.7

美味丝蕈霉 D-100 虽能利用氨态氮和硝态氮为氮源, 但以 (NH₄)₂SO₄ 为氮源的发酵液, pH 值太低, 易腐蚀发酵设备, 不宜使用。而 (NH₄)₃PO₄ 及 CH₃COONH₄ 较昂贵, 所以用 NaNO₃ 及 NH₄NO₃ 作为 D-100 的无机氮源

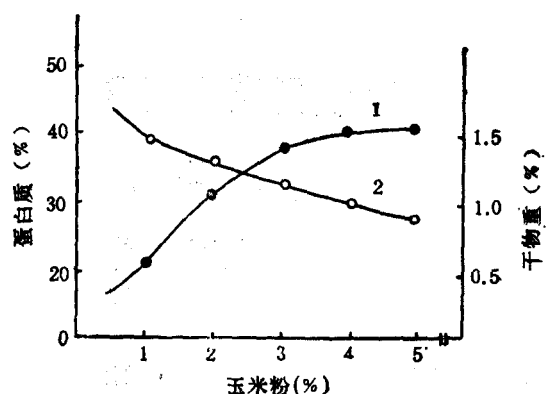


图 1 不同碳源浓度对 D-100 的影响
1. 干物重 2. 蛋白质

的影响: 在玉米粉培养基的其他成分和培养条件相同的情况下, 改变玉米粉的浓度为 1, 2, 3, 4 和 5%, 经摇瓶培养后, 测定菌体干重与粗蛋白含量, 结果见图 1。

从图 1 结果看出, 玉米粉浓度在 1—4% 的范围内, 菌体蛋白质含量随其浓度的增加而减少, 干物重随其浓度的增加而增加。从蛋白质及干物重两个因素来看, 玉米粉的浓度以 2—3% 为宜。

2 氮源试验:

(1) 不同无机氮源试验: 以 3% 玉米粉为碳源, 以不同的含氮无机盐为氮源, 经摇瓶发酵试验, 结果表明不同氮源, 菌体的蛋白质含量不同 (见表 2)。

较适宜。

(2) 不同浓度的 NaNO₃ 对菌体蛋白质含量的影响: 在其他培养条件一致的情况下, 用不同含量 (0.1—0.5%) NaNO₃ 的培养基进行发酵, 结果见图 2。

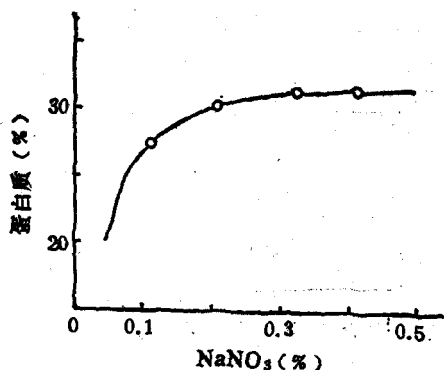


图2 不同浓度的 NaNO_3 对 D-100 蛋白质含量的影响

从图2结果看出，D-100 菌体蛋白质含量在 NaNO_3 浓度 $<0.3\%$ 时，随 NaNO_3 浓度的增加而增加，但当 NaNO_3 浓度 $>0.3\%$ 时，蛋白质含量不再增加。由此得出 NaNO_3 的最适浓度为 $0.2-0.3\%$ 。

3. 温度试验：用 2% 粗玉米粉，煮沸 10 分钟，过滤取其上清液，在温度梯度仪上以 60 次/min 的速度振荡培养 16 小时，比较不同温度下的菌体干重和总糖量的变化（见图 3）。

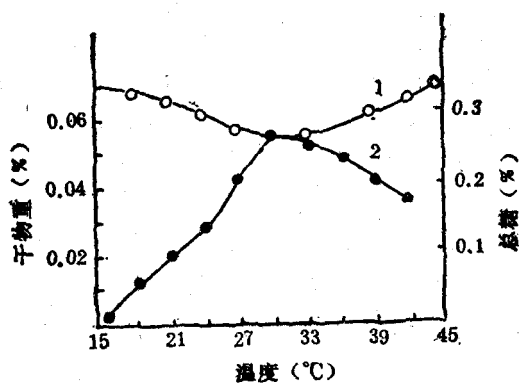


图3 温度对 D-100 干物重和总糖量的影响
1. 总糖 2. 干物重

从图3看出，D-100 在 $20-42^\circ\text{C}$ 的温度下均能生长，而在 30°C 左右干物重最高，总糖量降至最低。其生长最适温度范围为 $28-34^\circ\text{C}$ 。

4. 起始 pH 试验：将发酵培养基用 NaOH 和 HCl 调成不同的 pH，灭菌后再进一步调整。用 D-100 进行摇瓶发酵，比较发酵液的透光度与菌体干重（见图 4）。从图 4 结果看，D-100

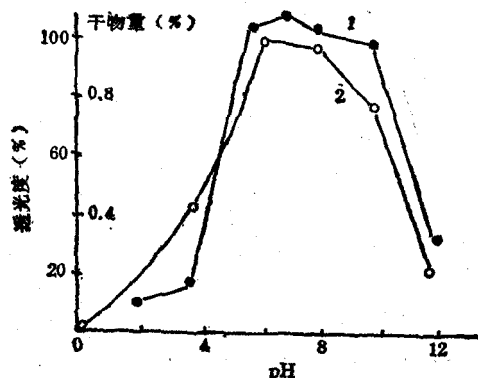


图4 不同起始 pH 对 D-100 菌体干重和发酵液透光度的影响
1. 干物重 2. 透光度

的最适起始 pH 为 $5.5-8$ 。

5. 发酵规律试验：

(1) 摇瓶发酵时间试验：在摇瓶发酵时，每隔 4 小时测定一次菌体干重与透光度（图 5）。

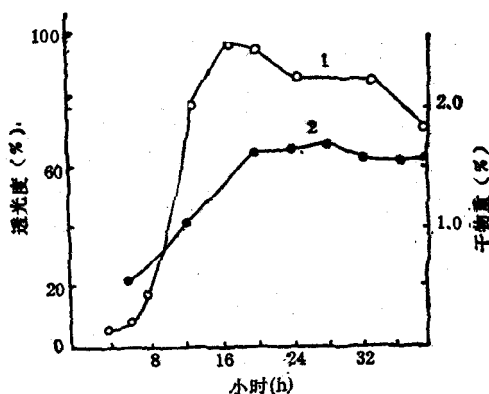


图5 摇瓶发酵时间对 D-100 的影响
1. 透光度 2. 干物重

从图5结果看出，D-100 发酵 16 小时透光度达到 90% 以上，20 小时后开始下降，菌体干重在 20 小时达到高峰 1.6%。结果说明在摇瓶条件下 D-100 发酵的最适收取时间为 16—24 小时。

(2) 发酵罐试验：用 100 升发酵罐进行重复试验，每隔 2 小时测定干物重和残余淀粉的变化（图 6）。

由图6看出，D-100 在 100 升发酵罐中，发酵至 12 小时，菌体基本不再增长，这时残余

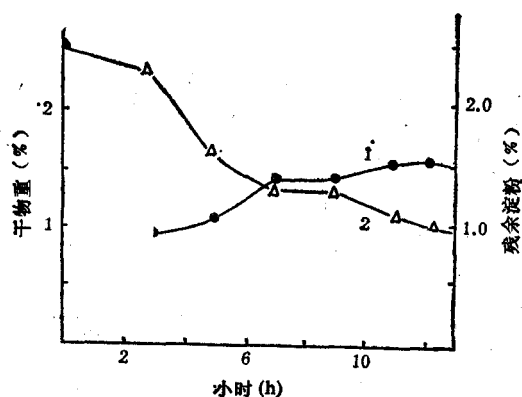


图6 100升发酵罐发酵时间对D-100的影响
1.干物重 2.残余淀粉

淀粉降低的速度变慢。在发酵罐中由于通气等发酵条件较好,所以D-100的生长速度比在摇瓶中快。

(二) 三吨发酵罐中间扩大试验

1. 七批发酵试验结果: 用3吨发酵罐进行中间扩大试验,重复7次(表3)。

表3 3吨罐中间扩大试验结果

批号	发酵时间(h)	pH		菌体对碳源收率(%)	粗蛋白含量(%)	干物重(%)
		发酵前	发酵后			
1	16	6.4	5.6	60	33.3	30
2	14	6.4	5.7	56	33.9	28
3	12	6.4	5.7	68	32.6	32.5
4	12	6.4	5.8	54	35.6	27
5	12	6.4	5.6	63	33.2	31.5
6	12	6.4	5.8	54	36.2	25
7	14	6.4	5.7	64	32.5	29
平均	13	6.4	5.7	59.8	33.9	29

表3结果说明,D-100用3吨罐发酵生产稳定,发酵周期比摇瓶短,为进一步工业化生产提供了可靠的依据。

2. 后处理及加工试验: D-100的发酵液经离心或板框过滤,即得到水分含量75%左右的鲜菌体。其鲜菌体或经冷冻贮存的鲜菌体,可按一定比例(20—50%)加入肉类制品中制成各种风味的肉类食品(肉松、炸丸子、午餐肉、肉肠、点心夹馅、夹肉面包等),味道十分鲜美。鲜

菌体经干燥粉碎可制得D-100干粉,加入面包、饼干中制成健康食品。

(三) 安全试验

对D-100菌体进行全套安全性试验,包括急性毒性试验,亚急性试验,蓄积试验,睾丸染色体畸变分析试验,沙门氏菌致癌致突变试验,微核试验,诱癌试验,两代繁殖试验,传统致畸试验,喂养致畸试验,其结果均证明了该菌体无毒,可按一定比例加入人类食品。

(四) D-100的营养成分及营养评价

将D-100菌体在65—70℃烘干后,经五次取样分析结果(%): 粗蛋白35.59,粗脂肪10.49,粗纤维11.33,碳水化合物29.8,核酸2.1,钙0.81,磷1.28,铁0.069,维生素B₁5.05mg/kg,维生素B₂24.65mg/kg。

1. D-100蛋白质的氨基酸组成(%): 天门冬氨酸2.31,苏氨酸1.41,丝氨酸1.49,谷氨酸5.41,甘氨酸1.38,丙氨酸2.15,缬氨酸1.76,蛋氨酸0.47,异亮氨酸1.56,亮氨酸3.56,酪氨酸1.26,苯丙氨酸1.44,赖氨酸1.64,组氨酸0.87,精氨酸1.58,脯氨酸1.68,色氨酸0.35,胱氨酸0.48。

2. D-100脂肪酸组成(%): 棕榈酸34.6,棕榈烯酸1, C_{16:2}5.5,硬脂酸8.2,油酸30.9,亚油酸18.9,亚麻酸0.9。

D-100的营养安全试验证明,用D-100代替饲料中的鱼粉,动物的生长低于对照组;用D-100代替黄豆粉,动物的生长与对照组无区别,表明D-100的营养价值相当于黄豆粉。

结 论

本文试验结果表明用D-100生产人类食用真菌蛋白有以下优点:

1. D-100以廉价的玉米粉为原料(蛋白质含量为8%左右),可以生产出蛋白质含量达30%以上的真菌蛋白。

2. D-100发酵周期短,摇瓶20小时,100升及3吨发酵罐12—16小时,菌体产量可达到1.5%,发酵液呈透明状,菌体经过滤很容易收取。

表4 国外食用真菌蛋白与 D-100 的比较

	英国 RHM 公司	保加利亚	北京市营养源研究所
菌种	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Polyporus brumalis</i>	<i>Papulaspora sapidis</i> (D-100)
主要原料	碳源: 木薯、土豆、糖类、乳清、葡萄糖 氮源: 液氨, 硫酸铵、磷酸铵	碳源: 葡萄糖, 糖蜜, 乳清, 甜菜粉 氮源: 硝酸铵, 尿素	碳源: 玉米粉 氮源: 硝酸钠 硝酸铵
发酵条件	30℃ pH 6 24 小时	25—27℃ pH 6—7 18—24 小时	30—34℃ pH 6—7 12—16 小时
原料转化率	48—50%	50—60%	59.8%
产品主要成分	粗蛋白 42—45% 脂肪 14% 纤维素 18%	粗蛋白 50—60% 脂肪 3—4% 纤维素 6—8%	粗蛋白 30—35%, 脂肪10—16%, 纤维素 13%, 维生素 B ₁ 5.05 mg/kg, 维生素 B ₂ 24.65 mg/kg, 钙 0.81%, 磷 1.28%, 铁 0.069%
核酸降解工艺	含核酸 7—12%, 需降解至 1—4%		含核酸 1—3%, 不需降解
制作食品情况	制成人造火腿, 猪排, 油炸食品或添入面包中	肠、罐头、肉酱、干酪夹馅、汤料	肉松, 午餐肉, 肠, 油炸食品或添入面包中

3. D-100 的蛋白质含量平均达 33.9—35.5%, 其蛋白质有较好的氨基酸组成。脂肪酸组成与大豆油相似, 其中油酸及亚油酸含量也高。核酸含量低, 不含胆固醇, 适于作人类食品。

4. D-100 安全毒性试验, 证明无毒可食用。

5. D-100 与国外食用真菌蛋白^[4-5]的比较(表4), 比较结果可以看出, 菌种发酵所用的原料基本相同, 但 D-100 具有菌种生长速度快, 发酵周期短, 菌体核酸含量低, 不用降解即可达到食用标准等优点。其不足之处是菌体蛋白质

含量相对较低, 氨基酸组成尚不理想, 所含丰富的人体必需的矿物质 Ca、P、Fe 和维生素 B₁、B₂ 的利用率还有待进一步证实。

参 考 文 献

1. Arnold Spicer: *Trpo Sci*, 13: 239—250, 1971.
2. John H Litchfield: *Bioscience*, 6(30): 387—396, 1980.
3. M Moo-Yaung: *Process Biochem*, 12(4) 6—10, 1977.
4. Isreal Goldberg: *Single Cell Protein-Biotechnology* V:1 p.112—113, 1981.
5. Atanas K Torev: U. S. patent, 4212947, 1980.

《微生物分类学》简介

张纪忠副教授主编的《微生物分类学》即将由复旦大学出版。本书是复旦大学微生物及微生物工程系《微生物分类学》教学小组通过20余年教学和科研实践, 并广泛汇集国内外最新资料, 不断总结、修改、补充而编写成的。

微生物分类学实践性强, 涉及面广, 工业、农林、医药、环境等领域的科研和生产实践都涉及到微生物分类学。本书以细菌、放线菌、丝状真菌和酵母菌四大系统分类介绍, 比目前国内外所出版的同类书籍更全面, 便于读者综观全局。内容安排都包含各大类的基本原理、目、科、属和代表种简介; 内容的取舍上考虑到既不与普通微生物学有太多重复, 又能为初学者提供足够的预备知识。书中配有分类鉴定实验 21 个。这些实验内容的安排, 考虑到读者能以最短的时间比较全面地掌握最必需的技能, 为独立开展微生物分类鉴定工作打下基础。本书可满足当前大专院校开设微生物分类学课程的要求, 可作教材或教学参考书, 更是微生物分类学初学者的一部入门书。

(本刊编辑部)