

食用真菌蛋白——美味丝蕈霉 D-100 的研究

III. 丝状真菌连续发酵的研究

聂实践 林伯荃

(北京市营养源研究所真菌工程实验室)

摘要 本文研究了以丝状真菌 D-100 直接利用淀粉连续发酵的工艺条件。通过氮源试验,摇瓶生长曲线和发酵罐生长曲线的对比试验,发酵过程中淀粉糖化酶的定量检测,以及连续发酵过程中四个主要参数在三水平上的正交试验,确定了以 0.1—0.2% NH_4NO_3 为氮源,0.5% 玉米粉为碳源,稀释速率 D 值为 0.15,搅拌转速为 200 r/min, pH 5.5 的条件为最佳连续发酵条件。连续发酵结果是:以玉米淀粉为底物的菌体产率是 37.5%。其菌体蛋白质含量 38.5%,发酵罐效率是 0.35g 菌体干重/L·h,试验还证明该菌淀粉糖化酶的生成受还原糖的反馈控制,故发酵过程培养基中还原糖浓度恒定在一定值。培养基浓度增加时,超过玉米粉浓度 1.25% 以上其比生长速率不明显增加。

关键词 丝状真菌;连续发酵

自 50 年代中期开始,由于世界人口剧增,全球性食物危机情况日趋严重。这种食物危机实际上主要是蛋白质短缺问题,面对这种现象,人们找到了微生物蛋白质是一种最理想和最有前途的新食物资源。工业化生产单细胞蛋白(SCP)是在第二次世界大战时期开始的,随着原料的不断变化和技术的改进,这种工业得以迅速发展。目前国外对丝状真菌生产单细胞蛋白已进行了许多研究,由于菌体呈丝状,给发酵研究带来很多困难,发酵过程中有的菌丝呈球形,有的呈絮状,使物质传递更加复杂。由于机械搅拌对菌丝有损伤作用,所以提高发酵液中的溶解氧水平更加困难。美味丝蕈霉 D-100 是我所筛选得到的一株含高蛋白质,自然生成速度快,核酸含量低,在发酵过程中菌丝呈絮状的新菌种,由于菌体呈白色,菌体蛋白富含谷氨酸钠,有鲜味,因此很容易掺入食品中作为肉类代用品。本研究从美味丝蕈霉 D-100 菌的特性出发,利用自身产生的淀粉糖化酶,直接流加玉米粉进行连续发酵,得到连续发酵过程中的控制参数,及该菌的连续发酵规律和特性。

材料与方 法

1. 菌种:美味丝蕈霉 D-100 由本组选育。

2. 培养基:与 I、II 报相同^[1,2]。

3. 发酵培养条件:发酵采用 MD-500 型 10 L 发酵罐,发酵条件见 II 报^[2]。连续发酵用两台蠕动泵控制加料与排料,罐中保持 7 L 发酵液,接种量 10%,pH 由酸碱自动调节至 5.5,利用空气搅拌使流加罐中的培养基混匀,发酵过程溶氧自动记录。

4. 取样方法:定时由取样口收取发酵液 100 ml,用 40 目纤维维布过滤,收集菌体,再经清水洗两次后,于 85℃ 烘箱烘干,测其菌体干重。又经消化测总氮,水解后测定总糖和还原糖。

5. 总含氮量测定:用微量凯氏定氮法,使用 BÜCHI-322 型全自动定氮仪进行测定。

6. 总糖及还原糖测定:将菌体用硫酸水解后,用 3,5-二硝基水杨酸比色法定量测出水解液总糖,直接检测发酵液得还原糖量。

7. 淀粉糖化酶活力测定:以 2% 可溶性淀粉为底物,与发酵液共同保温一定时间,然后测定生成还原糖量。酶活力单位定义为:在 40℃,pH4.6 条件下每毫升发酵液于 1 小时能将可溶性淀粉生成还原糖的毫克数^[3,4]。

结果与讨论

(一) 美味丝基霉 D-100 菌的比生长速率

率^[5-7]

1. 根据间歇发酵的研究结果,在碳源小于 2.0% 的范围内制作美味丝基霉 D-100 菌的生长曲线(图 1,2)。

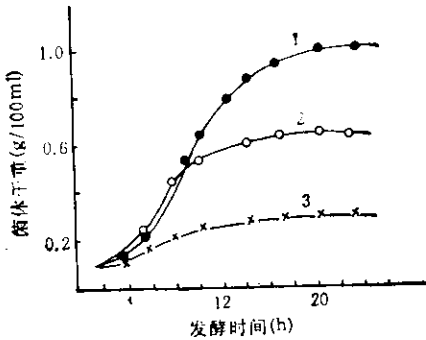


图 1 摇瓶条件下的菌体生长曲线
(玉米粉浓度: 1, 2.0% 2, 1.25% 3, 0.5%)

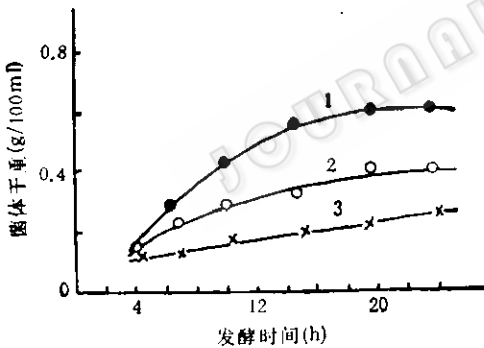


图 2 发酵罐条件下的菌体生长曲线
(玉米粉浓度: 1, 1.5% 2, 1.0% 3, 0.5%)

2. 由生长曲线计算比生长速率:

设: μ —比生长速率, x —菌体浓度, t —时间

$$\therefore \mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad \therefore \frac{dx}{x} = \mu \cdot dt$$

$$\therefore \int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{x} = \int_{t_1}^{t_2} \mu \cdot dt$$

$$\therefore \mu = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \left(\frac{x_2}{x_1} \right) \dots \dots \quad (A)$$

由生长曲线的对数期取值代入公式 (A) 可以算出 μ 值。从图 3 也得到了以后连续发酵的稀释速率在 0.1—0.2 范围较合适。

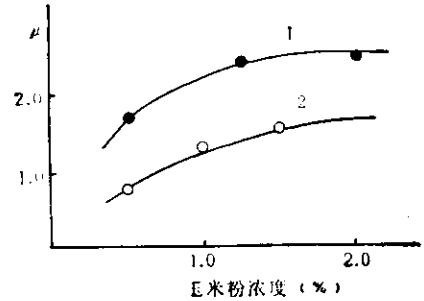


图 3 比生长速率变化曲线
(1. 摇瓶条件 2. 发酵罐条件)

(二) 发酵过程中淀粉转化规律

1. 以 1% 玉米粉浓度的培养基发酵,结果见图 4。

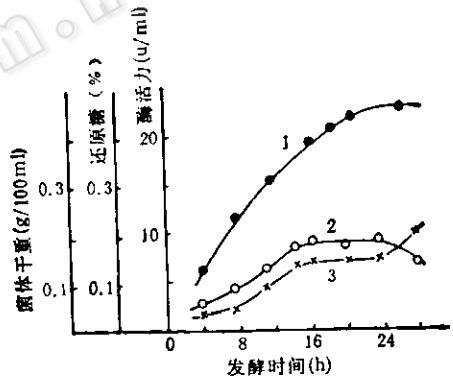


图 4 发酵过程还原糖及糖化酶变化曲线
1. 菌体干重 (g/100ml); 2. 还原糖浓度 (g/100 ml);
3. 糖化酶活力 (u/ml)

由图 4 看出,发酵 14—16 小时后,糖化酶和还原糖量处于一个比较稳定的阶段,并且发酵终期还原糖保持恒定,因此认为是糖化酶水解淀粉和菌体消耗还原糖达到平衡的结果,另外,后期酶活力增加,还原糖浓度下降。这种现象好似还原糖的反馈控制作用。

2. 在 1% 玉米粉培养基中加入 0.5% 葡萄糖,进行发酵试验,结果见图 5。

从图 5 看出,还原糖与糖化酶的生成有反馈控制的关系,原因是当菌体不能及时利用水

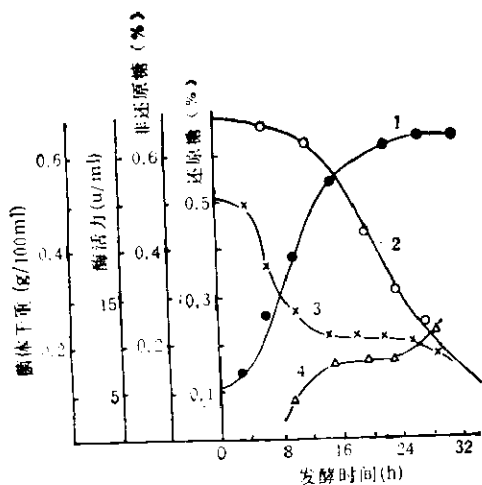


图5 发酵过程各种条件的变化曲线

1. 菌体干重 (g/100ml); 2. 糖化酶活力 (u/ml);
3. 非还原糖(%); 4. 还原糖(%)

解出的还原糖时, 糖和酶在一定阶段就处于平衡状态。由此可见, 对糖的利用和生成都是由菌体生长决定的, 它是一个关键, 菌体生长规律可以用 Monod^[5,8] 方程来描述。

(三) 菌体生长特性系数的确定

通过测定发酵液中还原糖的浓度及其对应条件下的 μ 值, 又根据 Monod 方程: $\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S}$, 以及 K_s 的定义(当比生长速率为最大比生长速率一半时的底物浓度), 用作图法^[9] 可以粗略得出 $K_s = 0.03$ (见图 6)。当酶和作用底物及作用条件不变时, K_s 值是一定值, 当其中任何一项变化时, K_s 都会改变, 因此该处所得 K_s 值只能代表该菌体在这种发酵中的特性系数。

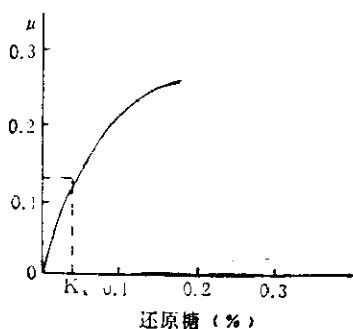


图6 比生长速率变化曲线

(四) 连续发酵条件的正交试验^[9]

根据上述试验确定的美味丝蕈霉 D-100 菌的发酵条件及参数控制范围, 得到正交试验设计所需要的数据。正交试验计算结果见表 1—4。

表 1 因素水平选择范围

因素	稀释速率	底物浓度	搅拌转速	酸碱度
水平	D	S	A, rpm	pH
1	0.10	0.5	100	4.5
2	0.15	1.0	150	5.0
3	0.20	1.5	200	5.5

表 2 正交试验设计方案表 $L_9(3)^4$

因素	D		S		A, rpm		pH	
试验								
1	1	0.10	1	0.5	1	100	1	4.5
2	1	0.10	2	1.0	2	150	2	5.0
3	1	0.10	3	1.5	3	200	3	5.5
4	2	0.15	1	0.5	2	150	3	5.5
5	2	0.15	2	1.0	3	200	1	4.5
6	2	0.15	3	1.5	1	100	2	5.0
7	3	0.2	1	0.5	3	200	2	5.0
8	3	0.2	2	1.0	1	100	3	5.5
9	3	0.20	3	1.5	2	150	1	4.5

表 1—4 结果可知, 影响美味丝蕈霉 D-100 菌体蛋白质含量的主要因素, 是稀释速率 D 和搅拌速度 A, rpm 。所以连续发酵条件应注意选择: $D = 0.15$, $S = 0.5\%$, $A, rpm = 200$, $pH = 5.5$ 。

(五) 美味丝蕈霉 D-100 菌连续发酵规律^[7,10]

用 0.5% 玉米粉浓度的培养基进行发酵, 以稀释速率为变量, 分别测定发酵过程所产生的蛋白质质量, 结果见图 7。

由图 7 看出, 当 D 值取 0.16 左右时, 发酵可以得到较高的菌体浓度和蛋白质产率。即连续发酵生产美味丝蕈霉 D-100 菌体蛋白应以稀释速率 0.16 为最佳。

表 3 正交试验结果及数据处理

	D	S	A _{rpm}	pH	转化率 %	效率 %	蛋白质 %
1	1	1	1	1	37.2	0.130	40.0
2	1	2	2	2	20.0	0.193	34.0
3	1	3	3	3	30.0	0.400	43.7
4	2	1	2	3	45.1	0.220	40.8
5	2	2	3	1	24.3	0.270	42.0
6	2	3	1	2	23.0	0.300	39.0
7	3	1	3	2	31.0	0.210	39.2
8	3	2	1	3	20.0	0.210	34.9
9	3	3	2	1	18.2	0.220	35.0
K 1	87.2	113.3	80.2	79.7	18.2	0.220	35.0
K 2	92.4	64.3	83.3	74.0	Σ =	Σ =	Σ =
K 3	69.2	71.2	85.3	95.1	248.8	2.143	348.6
k 1	29.0	37.8	26.7	26.6	D = 0.15		转化率 %
k 2	30.8	21.4	27.8	24.7	S = 0.5		
k 3	23.1	23.7	28.4	31.7	A _{rpm} = 200		
					pH = 5.5		
K 1	0.723	0.560	0.630	0.620	D = 0.15		效率 %
K 2	0.790	0.663	0.633	0.703	S = 1.5		
K 3	0.630	0.920	0.860	0.820	A _{rpm} = 200		
k 1	0.241	0.187	0.210	0.207	pH = 5.5		
k 2	0.263	0.221	0.211	0.234			
k 3	0.210	0.306	0.297	0.273			
K 1	117.7	120.0	113.9	119.0	D = 0.15		蛋白质含量 %
K 2	121.8	110.9	109.8	112.2	S = 0.5		
K 3	109.1	117.7	124.7	119.4	A _{rpm} = 200		
k 1	39.2	40.0	38.0	39.0	pH = 5.5		
k 2	40.6	37.0	36.6	37.4			
k 3	36.4	39.2	41.6	39.8			

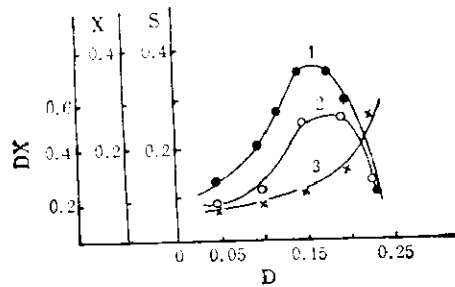


图 7 蛋白质产率 DX 和稀释速率 D 的关系

1. 菌体浓度 X(g/100ml); 2. 蛋白质产率 DX(g/L·h); 3. 玉米粉浓度 S(%)

(六) 连续发酵过程的公式推算

上述试验结果已阐明美味丝蕈霉 D-100

表 4 正交试验方差分析表

方差来源	以转化率计算				
	平方和	自由度	均方	F	显著性
D	99	2	49.5	150	*
S	469	2	234.5	710	**
A _{rpm}	4	2	2	6.0	
pH	79	2	39.5	119	*
误差	1	3	0.33		
总和	652	11			

方差来源	以蛋白质含量计算				
	平方和	自由度	均方	F	显著性
D	28	2	14	2.4	*
S	15	2	7.5	1.3	
A _{rpm}	24	2	12	2.1	*
pH	9	2	4.5	0.79	
误差	17	3	5.7		
总和	93	11			

方差来源	以效率计算				
	平方和	自由度	均方	F	显著性
D	0.0043	2	0.0021	70	(*)
S	0.0229	2	0.0114	380	**
A _{rpm}	0.0137	2	0.0068	226	**
pH	0.0067	2	0.0035	116	*
误差	0.0001	3	0.00003		
总和	0.0447	11			

菌的生长规律可以用 Monod 方程描述, 并且确定了连续发酵过程中的最佳 D 值, 推导如下^[8,10,11]:

μ —美味丝蕈霉 D-100 菌生长的比生长速率

S—发酵液中底物的瞬时浓度

S₀—底物的初始浓度

X—菌体浓度

因为连续发酵中 $D = \mu$, 代入

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \dots \dots \textcircled{1}$$

得到

$$S = \frac{DK_s}{\mu_{max} - D} \dots \dots \textcircled{2}$$

$$\therefore X = Y_{x/s}(S_0 - S) \dots \dots \textcircled{3}$$

$$\therefore DX = DY_{x/s}(S_0 - S) \dots \dots \textcircled{4}$$

将②代入④式得:

$$DX = Y_{x/s} \left(S_0 D - \frac{D^2 K_s}{\mu_{\max} - D} \right) \dots \dots \textcircled{5}$$

DX 为连续发酵的产率,则:

$$\frac{d(DX)}{dD} = 0 \text{ 时为连续发酵获得最高产率}$$

时的 D 值

$$\begin{aligned} \frac{d(DX)}{dD} &= Y_{x/s} \cdot S_0 - Y_{x/s} \\ &\cdot \frac{2DK_s(\mu_{\max} - D) + D^2K_s}{(\mu_{\max} - D)^2} = 0 \end{aligned}$$

整理为:

$$\begin{aligned} (\mu_{\max} \sqrt{S_0 + K_s} - D \sqrt{S_0 + K_s})^2 \\ = \mu_{\max}^2 K_s \end{aligned}$$

$$\therefore \mu_{\max} > D$$

$$\begin{aligned} \therefore (\mu_{\max} - D) \sqrt{S_0 + K_s} \\ = \mu_{\max} \sqrt{K_s} > 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \therefore D_{DX \max} &= \mu_{\max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_0}} \right) \\ &\dots \dots \textcircled{6} \end{aligned}$$

将前面试验求得的 D-100 菌的 $K_s = 0.03\%$,

$\mu_{\max} = 0.25$, 还原糖平衡浓度即 $S_0 = 0.18\%$ 代入⑥式得:

$$\begin{aligned} D_{DX \max} &= 0.25 \left(1 - \sqrt{\frac{0.03}{0.03 + 0.18}} \right) \\ &= 0.155 \end{aligned}$$

由此进一步证实,当 D 值在 0.16 左右时,连续发酵所得蛋白质产率最高。

(七) 美味丝蓍霉 D-100 菌连续发酵

利用上述实验得出的最佳条件及有关参

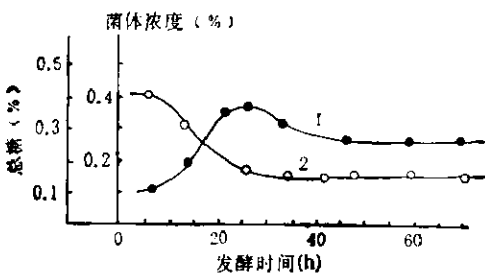


图8 美味丝蓍霉 D-100 菌连续发酵过程曲线
1. 菌体浓度 (g/100ml); 2. 总糖 (%)

数值进行连续发酵,条件为: $D = 0.15$, $S = 0.5\%$, $A_{r,pm} = 200$, $pH = 5.5$, 温度 $32^\circ C$, 通气比 1:1, 接种量 10%, 发酵连续 80 小时以上, 结果是玉米粉转化率 37.5%, 发酵罐效率 0.35g 菌体干重/L·h, 菌体蛋白质含量 38.5% (见图 8)。

结 论

1. 美味丝蓍霉 D-100 菌生长规律可以用 Monod 方程描述, $K_s = 0.03$ 。

2. 发酵过程中淀粉糖化酶的形成受还原糖的反馈控制, 发酵过程中还原糖量有一恒定期, 值为 0.18%。

3. 美味丝蓍霉 D-100 菌发酵过程中, 由于酶的反馈控制作用使玉米粉不能很快和大量转变成还原糖, 如果玉米粉浓度过高, 发酵液粘度会大大增加, 将严重影响物质传递。从经济角度来看, 低浓度的连续发酵比高浓度的间歇发酵更为合理。

参 考 文 献

1. 林伯荃等: 微生物学通报, 17(5): 267, 1990。
2. 李淑敏等: 微生物学通报, 17(5): 271, 1990。
3. 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 北京大学出版社, 17-20 页, 1980。
4. 天津轻工业学院等: 《工业发酵分析》, 轻工业出版社, 36-54 页, 1980。
5. 陈驹声: 近代工业微生物学, 上海科技出版社, 239-242 页, 1982。
6. 《微生物工程》编辑组: 《微生物工程》, 上海人民出版社, 72-80 页, 1975。
7. Isreal Goldberg: Single Cell Protein-Biotechnology 1:67. 1981.
8. S S Wang: Biochemical Engineering Fundamentals. p497, 1982.
9. 中国科学院数学研究所统计组: 《常用数理统计方法》, 科学出版社, 34-80 页, 1972。
10. Madennan DG et al.: Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms. p170, 1966.
11. Roken J S et al.: Continuous Culture 8th, p117, 1976.