

短柄镰刀菌在生产菌丝体蛋白中的应用

本申请要求于2024年01月11日提交中国专利局、申请号为202410044012.8、发明名称为“短柄镰刀菌在生产菌丝体蛋白中的应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明属于功能微生物技术领域，具体涉及短柄镰刀菌在生产菌丝体蛋白中的应用。

背景技术

替代蛋白质是由植物或动物细胞或通过微生物发酵产生的蛋白质。这些创新食品的设计使其味道与传统动物产品相同或更好，并具有零胆固醇、低脂肪和少量膳食纤维等健康优势而其成本却相同或更低。与传统生产的动物产品相比，替代蛋白质的投入更少，例如土地、肥料和水，且产生的负面外部效应也较少，例如温室气体排放和大气污染。同时替代蛋白质还降低了食品生产对大流行风险和抗菌素耐药性的贡献。

作为替代蛋白质生产形式之一的微生物发酵蛋白，利用微生物或藻类发酵方式生产蛋白，同时含有纤维素和丰富的酶类及生物活性物质，且不含胆固醇，对心脑血管疾病患者更加友好。产业上，用于发酵生产微生物蛋白肉的主要工业菌种包括藻类、酵母和丝状真菌。藻类存在生长速度慢、密度低等问题，至今主要进行小规模蛋白生产。酵母菌生长速度快，细胞密度大，所需生产设备简单，然而低细胞壁消化率和高核酸含量在一定程度上制约了酵母发酵蛋白的进一步开发。生产蛋白的丝状真菌主要集中在镰刀菌(*Fusarium*)。镰刀菌生产的菌丝体相比酵母、细菌等单细胞蛋白更加味美，并且具有类似肉质的组织结构，同时其含有的丰富可食性粗纤维有助于人肠胃消化，是一种能够满足于现代人营养需求的肉类代用品。目前开发出了镰孢菌(*Fusarium venenatum*)菌种并用蛋白含量较高的菌丝体制备肉类产品(CN 115851458 A)，但该镰孢菌生产菌丝体蛋白的产量有待提高。此外，CN116640753 专利公开了通过缺失菌体中丙酮酸脱羧酶基因 FvPDC6 能够有效促进威尼斯镰刀菌中菌丝体蛋白产量。可见，目前天然高产蛋白的真丝菌种极其稀缺。寻找更多有潜力的且天然高产丝状真菌蛋白的菌种是一项极具商业价值的开发。

发明内容

有鉴于此，本发明的目的在于提供一种新型的镰刀菌在生产菌丝体蛋白中应用。

本发明提供了短柄镰刀菌(*Fusarium brachygibbosum*)或其微生物菌剂在生产菌丝体蛋白中的应用。

优选的，所述短柄镰刀菌为具有与 SEQ ID NO:5 至少 95 %同源性的 TEF1 基因序列和/或具有与 SEQ ID NO:6 至少 97 %同源性的 ITS1 基因序列的短柄镰刀菌菌株或所述短柄镰刀菌菌株形成的组合物。

优选的，所述短柄镰刀菌包括短柄镰刀菌菌株 FXFB001；

所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 的保藏编号为 CGMCC No:41066。

优选的, 所述短柄镰刀菌包括孢子形态和/或菌丝体形态。

本发明提供了一种食用菌丝体, 以所述食用菌丝体的干质量计, 所述食用菌丝体中蛋白质含量为 40 % 以上; 和/或膳食纤维含量为 20 % 以上; 和/或脂肪含量为 8 % 以下; 所述食用菌丝体来源于短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*);

所述短柄镰刀菌为所述应用中的短柄镰刀菌。

优选的, 所述食用菌丝体富有弹性和/或韧性。

本发明提供了一株短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 菌株 FXFB001, 保藏编号为 CGMCC No:41066。

本发明提供了一种生产蛋白质或富含蛋白质的菌丝体的微生物菌剂, 包括所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 和菌剂可接受的辅料。

优选的, 所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 和辅料的质量比为 1~10:1~100。

优选的, 所述辅料包括培养基、添加剂和载体中的一种或几种。

本发明提供了所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 或所述微生物菌剂在生产蛋白质或菌丝体中的应用。

本发明提供了一种利用短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 生产食用菌丝体的方法, 包括以下步骤:

将短柄镰刀菌或其微生物菌剂制备的种子液接种至发酵培养基中发酵培养, 得到发酵液;

将所述发酵液灭菌处理后, 分离发酵产物得到食用菌丝体;

所述短柄镰刀菌为所述应用中的短柄镰刀菌。

优选的, 所述发酵培养基包括发酵培养基 1 号和/或发酵培养基 2 号;

所述发酵培养基 1 号包括以下含量组分: 淀粉 23~27 g/L、柠檬酸 0.8~1.2 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2 g/L、硫酸铵 4.5~5.5 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 17~21 mg/L、以 Ca 计算浓度的钙盐 2.8~43 mg/L、以 Mn 计算浓度的锰盐 0.48~0.62 mg/L、以 Fe 计算浓度的铁盐或亚铁盐 0.96~1.05 mg/L、以 Zn 计算浓度的锌盐 0.72~0.91 mg/L、以 Co 计算浓度的钴盐 0.44~0.54 mg/L 和复合维生素 0.08~0.12mg/L;

所述发酵培养基 2 号包括以下含量组分: 葡萄糖 15~60 kg/m³、K₂SO₄ 0.5~1.5 kg/m³、H₃PO₄ 0.4~0.8 kg/m³、以 Mg 计算浓度的镁盐 9.75~58.5 g/m³、以 Zn 计算浓度的锌盐 2.2~22.5 g/m³、以 Mn 计算浓度的锰盐 2.46~9.85 g/m³、醋酸钙 0.1~0.3 kg/m³ 和消泡剂 0.08~0.12 kg/m³。

优选的, 当采用发酵培养基 1 号进行发酵时, 所述发酵培养的条件包括:

进入发酵培养的前 15h 内, 通气量为 900~1100 L/h, 压力控制为 0.04~0.06 MPa;

发酵培养 15h 后按 0.5~2.0 mL/L/h 的速率开始补料, 通气量为 1400~1600 L/h, 压力为 0.08~0.12 MPa; 发酵液的 pH 值为 4.0~6.0;

发酵培养的温度为 27°C~29°C, 转速为 100~450 rpm, 耦联溶氧为 20 %~50 %, 发酵培养的时间为 68~76 h;

所述补料时补料成分包括葡萄糖 280~320 g/L 和复合维生素 0.08~0.12 mg/L;

所述复合维生素包括以下质量份的组分: 维生素 B₁ 0.08~0.12 份、维生素 B₁₂ 0.08~0.12 份、维生素 B₂ 0.08~0.12 份、维生素 B₃ 0.08~0.12 份、维生素 B₅ 0.08~0.12 份、维生素 B₆ 0.08~0.12 份、维生素 B₉ 0.08~0.12 份、维生素 C 0.08~0.12 份和维生素 H 0.08~0.12 份。

优选的, 当所述发酵培养采用发酵培养基 2 号进行时, 发酵培养条件为通气量为 900~1600 L/h, 压力控制为 0.04~0.12 MPa; 发酵液的 pH 值为 4.0~6.0;

发酵培养的温度为 27°C~29°C, 转速为 100~450 rpm, 耦联溶氧为 20%~50%, 发酵培养的时间为 72~480 h;

当发酵体系中还原糖含量低于 2~5 g/L 时, 排出体积分数 20%~90% 的发酵液, 补加发酵培养基 2 号至原体积。

优选的, 所述短柄镰刀菌制备种子液的方法, 包括以下方法:

将所述短柄镰刀菌接种至第一种子培养基中依次进行一级种子培养和二级种子培养, 得到二级种子液;

将所述二级种子液接种至第二种子培养基中进行三级种子培养, 得到三级种子液。

优选的, 所述第一种子培养基含有以下含量组分: 葡萄糖 28~32 g/L、酵母浸粉 23~27 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 17~21 mg/L 和以 Ca 计算浓度的钙盐 3~4 mg/L; 所述第二种子培养基含有以下含量组分: 淀粉 23~27 g/L、柠檬酸 0.8~1.2 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2 g/L、硫酸铵 4.8~5.2 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 17~21 mg/L、以 Ca 计算浓度的钙盐 0.003~0.004 g/L、以 Mn 计算浓度的锰盐 0.48~0.62 mg/L、以 Fe 计算浓度的铁盐或亚铁盐 0.96~1.05 mg/L、以 Zn 计算浓度的锌盐 0.72~0.91 mg/L 和以 Co 计算浓度的钴盐 0.44~0.54 mg/L。

优选的, 所述一级种子培养、二级种子培养或三级种子培养的培养温度为 25°C~30°C;

所述一级种子培养、二级种子培养或三级种子培养的培养时间为 22~26 h;

所述一级种子培养、二级种子培养或三级种子培养的转速为 100~200 rpm;

所述三级种子培养的通气率为 8~12 L/min;

所述三级种子培养的压力为 0.04~0.06 MPa;

所述三级种子培养的体系 pH 值为 4.0~6.0。

优选的, 所述发酵液灭菌处理的方法为加热灭菌;

所述加热灭菌的程序为 60°C~70°C 保温 18~22 min, 升温至 88°C~92°C 保温 8~15 min。

优选的, 所述分离发酵产物的方法包括将发酵液固液分离, 固相经过洗涤后干燥得到食用菌丝体。

本发明提供了所述食用菌丝体或所述方法制备的食用菌丝体在制备肉类替代品中的应用。

优选的，所述制备的方法不包括结构工艺处理。

本发明提供了短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 在生产菌丝体蛋白中的应用。本发明首次开发短柄镰刀菌用于菌丝体蛋白的发酵生产。实验证明，所述短柄镰刀菌在发酵生产菌丝体蛋白含量方面效果优于其他镰刀菌 (威尼斯镰刀菌和镶片镰刀菌等)，采用凯氏定氮法检测菌丝体蛋白含量在 55.39% 以上，还有脂肪含量低，膳食纤维含量高的特点，总脂肪含量为 7.97%，膳食纤维含量为 26.01%，且生产的菌丝体蛋白不含毒素，是一种理想的替代蛋白质。可见，本发明利用短柄镰刀菌生产的菌丝体具有菌丝体蛋白含量高、形态好、无毒副作用，因此，本发明为工业生产替代蛋白提供了新手段，同时为开发安全食品提供了基础，同时基于发酵方法生产，能够大大提高蛋白生产效率，减少碳排放，保护环境。

本发明还提供了一株短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 菌株 FXFB001，保藏编号为 CGMCC No:41066。本发明从西藏自治区森林腐殖土样中分离菌株 FXFB001，经过形态和分子鉴定，结果表明菌株 FXFB001 为短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*)。通过初步筛选，所述菌株产生浅黄色、丝状且有弹性的菌丝体，经凯氏定氮法检测蛋白含量在 55.39% 以上。通过发酵培养，所述菌株 FXFB001 生产的富含蛋白质的菌丝体，丝状良好，且发酵液能够在未加热状态下就能自然呈现肉色颜色，无不良气味。可见，本发明提供的短柄镰刀菌菌株 FXFB001 为天然高产蛋白的微生物菌株，蛋白产量显著高于目前报道的其它种类的镰刀菌菌株，并且生产的蛋白不含毒素，具有安全无副作用的特点。因此，本发明为了工业生产替代蛋白提供了新手段，同时为开发安全食品提供了基础。

附图说明

图 1 为本发明实施例 1 中分离纯化的菌株 FXFB001 菌落形态结果；
图 2 为本发明实施例 1 中基于多基因构建的菌株 FXFB001 的系统进化树；
图 3 为本发明实施例 2 中菌株 FXFB001 初步筛选培养得到的菌饼；
图 4 为本发明实施例 3 中菌株 FXFB001 发酵培养得到的发酵产物；
图 5 为本发明实施例 3 中显微镜下观察菌株 FXFB001 发酵培养得到的富含蛋白质的菌丝体的结果。

生物材料保藏信息

本发明提供的短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 菌株 FXFB001，于 2023 年 12 月 13 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏单位简称为 CGMCC，保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院，中国科学院微生物研究所，保藏编号为 CGMCC No:41066。

具体实施方式

本发明提供了短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 或其微生物菌剂在生产菌丝体蛋白中的应用。

在本发明中，所述短柄镰刀菌包含单一短柄镰刀菌菌株或多种短柄镰刀菌菌株的组合。本发明对短柄镰刀菌菌株不做特殊限制，凡是分类学鉴定为短柄镰刀菌的菌株均属于本发明保护范围，例如所述短柄镰刀菌具有与 SEQ ID NO:5 相比 95%、96%、97%、98%、99%和 100%同源性的 TEF1 基因序列和具有与 SEQ ID NO:6 相比 97%、98%、99%和 100%同源性的 ITS1 基因序列的菌株均可，例如短柄镰刀菌菌株 FXFB001。所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 的保藏编号为 CGMCC No:41066，具有优异的产富含蛋白质的菌丝体的性能。

在本发明中，所述生产优选为发酵生产。所述发酵生产是借助微生物在有氧或无氧条件下的生命活动来制备微生物菌体本身或者直接代谢产物或次级代谢产物的过程。在本发明一个实施例中，所述发酵生产是利用短柄镰刀菌在发酵培养基提供的营养成分的条件下，大量生长，得到富含蛋白质的菌丝体的过程。本发明对所述短柄镰刀菌的形态没有特殊限制，采用本领域所熟知的任何短柄镰刀菌的活菌形态即可，例如包括孢子形态和/或菌丝形态。

本发明提供了一株短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 菌株 FXFB001，保藏编号为 CGMCC No:41066。

在本发明中，所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 是从自西藏自治区山南市森林腐殖土样中分离纯化得到，经过形态鉴定表明，在 PSA 培养基上生长的气生菌丝呈毛毡状，初期为白色，后逐渐变为粉红色，平板背面为橘红色至深红色；分生孢子形态为：大型分生孢子为镰刀状，两端稍尖，有 3~5 个隔膜，度量为 10.8~25.1 μm $\times$ 2.0~3.6 μm 。小型分生孢子呈梭形，略弯曲，两端稍平，有 0~2 隔膜。厚垣孢子呈球形，单生于菌丝中，量度为 5.2~7.5 μm 。同时还基于 TEF1 和 ITS 序列进行分子鉴定，结果表明，菌株 FXFB001 的 TEF1 序列与 *Fusarium brachygibbosum* (NCBI: MK752485.1) 的同源性为 99.84%，菌株 FXFB001 的 ITS1 序列与 *Fusarium brachygibbosum* (NCBI: GQ505450.1) 的同源性为 100%；同时构建多基因进化树结果表明，菌株 FXFB001 与短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 聚为一枝。综合形态和分子鉴定结果，所述菌株 FXFB001 的分类判断为短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*)。

在本发明一个实施例中，对所述菌株 FXFB001 产蛋白特性进行初步筛选。所述初步筛选的方法，优选为将菌株 FXFB001 接种至第一种子培养基中进行恒温振荡培养，分离固相培养产物，干燥，测定粗蛋白含量。所述第一种子培养基优选含有以下含量组分：葡萄糖 28~32 g/L、酵母浸粉 23~27 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2 g/L、七水硫酸镁 0.18~0.22 g/L 和氯化钙 0.009~0.011 g/L；更优选为葡萄糖 30 g/L、酵母浸粉 25 g/L、磷酸二氢钾 1.0 g/L、七水硫酸镁 0.2 g/L 和氯化钙 0.01 g/L。所述恒温振荡培养的温度优选为 25~30 $^{\circ}\text{C}$ ，更优选为 28 $^{\circ}\text{C}$ 。所述恒温振荡培养的时间优选为 45~50 h，更优选为 48 h。所述恒温振荡培养的转速优选为 180~220 rpm，更优选为 200 rpm。所述分离固相培养产物的方法优选为真空抽滤装置抽滤并充分洗涤滤饼。所述干燥优

选为烘干。所述烘干的温度优选为 55℃~65℃，更优选为 60℃。使用菌株 FXFB001 发酵制备的富含蛋白质的菌丝体，呈丝状菌丝形态、浅黄色滤饼颜色，滤饼有弹性，干重生物量百分比为 0.63%。凯氏定氮测定蛋白质的含量为 55.39%以上。

5 本发明提供了一种生产菌丝体蛋白质的微生物菌剂，包括所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 和辅料。

在本发明中，所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 和辅料的质量比优选为 1~10:1~100，更优选为 1~10: 5~80，进一步优选为 1:10~50。所述辅料的种类根据微生物菌剂的剂型不同而不同。

10 在本发明中，所述微生物菌剂优选包括冻干粉剂或水剂。所述微生物菌剂的水剂的制备方法，优选包括短柄镰刀菌菌株 FXFB001 的种子液制备和水剂制备。所述微生物菌剂冻干粉剂的制备方法，优选包括短柄镰刀菌菌株 FXFB001 的种子液制备和冻干。

在本发明一个实施例中，所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 的微生物菌剂的种子液的制备方法优选包括以下步骤：将活化的菌株 FXFB001 接种至第
15 一培养基中一级种子培养，得到一级种子液；将所述一级种子液再次接种至第一培养基中进行二级种子培养，得到二级种子液；将所述二级种子液接种至第二培养基中进行三级种子培养，得到三级种子液。

在本发明中，所述培养是借助人工配制的培养基和人为创造的培养条件
20 (如培养温度等)，使某些(种)微生物快速生长繁殖。所述第一种子培养基含有以下含量组分：葡萄糖 28~32 g/L、酵母浸粉 23~27 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 17~21 mg/L 和以 Ca 计算浓度的钙盐 3~4 mg/L；更优选为葡萄糖 30 g/L、酵母浸粉 25 g/L、磷酸二氢钾 1.0 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 19 mg/L 和以 Ca 计算浓度的钙盐 3.5 mg/L。所述第二种子培养基含有以下含量组分：淀粉 23~27 g/L、柠檬酸 0.8~1.2 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2
25 g/L、硫酸铵 4.8~5.2 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 17~21 mg/L、以 Ca 计算浓度的钙盐 3~4 mg/L、以 Mn 计算浓度的锰盐 0.48~0.62 mg/L、以 Fe 计算浓度的铁盐或亚铁盐 0.96~1.05 mg/L、以 Zn 计算浓度的锌盐 0.72~0.91 mg/L 和以 Co 计算浓度的钴盐 0.44~0.54 mg/L，更优选为淀粉 25 g/L、柠檬酸 1 g/L、磷酸二氢钾 1 g/L、硫酸铵 5 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 19 mg/L、以 Ca 计
30 算浓度的钙盐 3.5 mg/L、以 Mn 计算浓度的锰盐 0.56 mg/L、以 Fe 计算浓度的铁盐或亚铁盐 1 mg/L、以 Zn 计算浓度的锌盐 0.81 mg/L 和以 Co 计算浓度的钴盐 0.49 mg/L。本发明对所述淀粉的种类没有特殊限制，采用本领域所熟知的淀粉种类即可，例如红薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、土豆淀粉等。
35 本发明对钙盐、钴盐和锌盐的存在形式不做特殊限制，采用本领域所熟知的各金属盐的存在形式即可，例如钙盐以氯化钙、硫酸钙、碳酸氢钙等中的一种或几种形式存在；钴盐优选以氯化钴的形式存在；所述锌盐以氯化锌、硫酸锌等一种或两种形式存在。所述镁盐优选包括硫酸镁、氯化镁、硝酸镁等中的一种或几种。所述锰盐优选包括硫酸镁、氯化锰、高锰酸钾、锰酸钾等
40 中的一种或几种。本发明对所述发酵培养基的组分来源没有特殊限制，采用

本领域所熟知的组分购买来源即可。本发明对第一种子培养基和第二种子培养基的配制方法没有特殊限制,采用本领域所熟知的微生物培养即的配制方法即可。配制完成,优选对所述培养基进行灭菌处理。所述灭菌处理的方法优选为高压蒸汽灭菌法。在本发明实施例中,所述第一种子培养基优选含有以下含量组分:葡萄糖 28~32 g/L、酵母浸粉 23~27 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2 g/L、七水硫酸镁 0.18~0.22 g/L 和氯化钙 0.003~0.004 g/L;更优选为葡萄糖 30 g/L、酵母浸粉 25 g/L、磷酸二氢钾 1.0 g/L、七水硫酸镁 0.2 g/L 和氯化钙 0.005 g/L。所述第二种子培养基含有以下含量组分:淀粉 23~27 g/L、柠檬酸 0.8~1.2g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2g/L、硫酸铵 4.8~5.2 g/L、七水硫酸镁 0.18~0.22g/L、钙盐 0.003~0.004 g/L、一水硫酸锰 1.5~1.9 mg/L、七水硫酸亚铁 4.8~5.2 mg/L、氯化锌 0.72~0.91 mg/L 和氯化钴 0.44~0.54 mg/L;更优选为淀粉 25 g/L、柠檬酸 1.0 g/L、磷酸二氢钾 1.0 g/L、硫酸铵 5.0 g/L、七水硫酸镁 0.017~0.021 g/L、氯化钙 0.01 g/L、一水硫酸锰 1.5 mg/L、七水硫酸亚铁 5.0 mg/L、硫酸锌 1.9~2.0 mg/L 和氯化钴 1.8~2.2 mg/L。在本发明实施例中,各培养基配制时各药品试剂称量时误差不得高于 10%。所述一级种子培养、二级种子培养或三级种子培养的培养温度优选为 25°C~30°C,更优选为 28°C。所述一级和二级种子培养或三级种子培养的培养时间优选为 22~26 h,更优选为 24 h。所述一级和二级种子培养或三级种子优选在培养瓶中完成。所述一级种子培养和二级种子培养的转速优选为 180~220 rpm,更优选为 200 rpm。所述二级种子培养时,接种量优选为 4%~6%,更优选为 5%。所述三级种子培养的转速优选为 100~220 rpm,更优选为 150 rpm。所述培养期间,优选将培养瓶置于摇床中进行振荡培养。所述三级种子培养时,接种量优选为 5%~10%,更优选为 8%。本发明对种子液接种的方法没有特殊限制,采用本领域所熟知的接种方法即可,例如在无菌条件,用无菌吸管吸取少量种子液转移至对应培养基的过程。所述三级种子培养的通气率优选为 8~12 L/min,更优选为 10 L/min。所述三级种子培养的压力优选为 0.04~0.06 Mpa,更优选为 0.05 Mpa。所述三级种子培养的体系 pH 值优选为 4.0~6.0,更优选为 5.0。所述三级种子培养优选置于带有压力阀的培养罐中进行。本发明对所述培养罐的规格和品牌没有特殊限制,采用本领域所熟知的培养罐即可。

在本发明中,微生物菌剂制备时,从所述三级种子液中分离孢子,将分离的孢子与水剂溶剂或冻干保护剂混合,制备水剂或冻干粉剂。所述分子孢子的方法优选为离心。本发明对所述水剂的辅料的种类不做特殊限制,采用本领域所熟知的水剂的辅料种类即可,例如培养基。在微生物菌剂水剂中,所述菌株 FXFB001 的有效孢子数量为 $(1\sim100)\times10^7/\text{mL}$,更优选为 $5\times10^7/\text{mL}$ 。在微生物菌剂水剂中,所述菌株 FXFB001 的有效孢子数量为 $(1\sim100)\times10^7/\text{g}$,更优选为 $(1\sim100)\times10^7/\text{g}$ 。

本发明提供了一种利用短柄镰刀菌生产食用菌丝体的方法,包括以下步骤:

将短柄镰刀菌或其微生物菌剂制备的种子液接种至发酵培养基中发酵培养,得到发酵液;

将所述发酵液灭菌处理后，分离发酵产物得到食用菌丝体；

所述短柄镰刀菌为上述技术方案所述应用中的短柄镰刀菌。

在本发明中，所述短柄镰刀菌制备的种子液的制备方法同上述记载，在此不做赘述。

5 在本发明中，所述发酵是借助微生物在有氧或无氧条件下的生命活动来制备微生物菌体本身、或者直接代谢产物或次级代谢产物的过程。通常所说的发酵，多是指生物体对于有机物的某种分解过程。短柄镰刀菌发酵是利用短柄镰刀菌分解利用发酵培养基营养成分，不断生长形成大量菌丝体的过程。所述发酵培养基的组成包括氮源、碳源、无机盐和水。所述发酵培养基
10 包括发酵培养基 1 号和/或发酵培养基 2 号。所述发酵培养基 1 号优选包括以下含量组分：淀粉 23~27 g/L、柠檬酸 0.8~1.2 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2 g/L、硫酸铵 4.5~5.5 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 17~21 mg/L、以 Ca 计算浓度的钙盐 2.8~43 mg/L、以 Mn 计算浓度的锰盐 0.48~0.62 mg/L、以 Fe 计算浓度的铁盐或亚铁盐 0.96~1.05 mg/L、以 Zn 计算浓度的锌盐 0.72~0.91 mg/L、以
15 Co 计算浓度的钴盐 0.44~0.54 mg/L 和复合维生素 0.08~0.12mg/L；更优选为淀粉 25 g/L、柠檬酸 1 g/L、磷酸二氢钾 1 g/L、硫酸铵 5 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 19 mg/L、以 Ca 计算浓度的钙盐 25 mg/L、以 Mn 计算浓度的锰盐 0.54 mg/L、以 Fe 计算浓度的铁盐或亚铁盐 1 mg/L、以 Zn 计算浓度的锌盐 0.81 mg/L、以 Co 计算浓度的钴盐 0.49 mg/L 和复合维生素 0.1mg/L。所述发
20 酵培养基 2 号优选包括以下含量组分：葡萄糖 15~60 kg/m³、K₂SO₄ 0.5~1.5 kg/m³、H₃PO₄ 0.4~0.8 kg/m³、以 Mg 计算浓度的镁盐 9.75~58.5 g/m³、以 Zn 计算浓度的锌盐 2.2~22.5 g/m³、以 Mn 计算浓度的锰盐 2.46~9.85 g/m³、醋酸钙 0.1~0.3 kg/m³和消泡剂 0.08~0.12 kg/m³，更优选为葡萄糖 25~55 kg/m³、
25 K₂SO₄ 0.8~1.3 kg/m³、H₃PO₄ 0.5~0.7 kg/m³、以 Mg 计算浓度的镁盐 12.5~50.5 g/m³、以 Zn 计算浓度的锌盐 4.5~20.5 g/m³、以 Mn 计算浓度的锰盐 5.2~7.5 g/m³、醋酸钙 0.15~0.25 kg/m³和消泡剂 0.1 kg/m³。

本发明对所述淀粉的种类没有特殊限制，采用本领域所熟知的淀粉种类即可，例如红薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、土豆淀粉等。本发明对钙盐、
30 钴盐和锌盐的存在形式不做特殊限制，采用本领域所熟知的各金属盐的存在形式即可，例如钙盐以氯化钙、硫酸钙、碳酸氢钙等中的一种或几种形式存在；钴盐优选以氯化钴的形式存在；所述锌盐以氯化锌、硫酸锌等一种或两种形式存在。所述镁盐优选包括硫酸镁、氯化镁和硝酸镁等中的一种或几种。所述以 Fe 计算浓度的铁盐或亚铁盐优选包括七水硫酸亚铁、氯化铁或氯化亚铁等中的一种或几种。所述锰盐优选包括硫酸锰、氯化锰、高锰酸钾、锰
35 酸钾等中的一种或几种。本发明对所述发酵培养基的组分来源没有特殊限制，采用本领域所熟知的组分购买来源即可。

在本发明实施例中，所述发酵培养基 1 号优选包括以下含量组分：淀粉 23~27 g/L、柠檬酸 0.8~1.2 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2 g/L、硫酸铵 4.5~5.5 g/L、
40 七水硫酸镁 0.18~0.22g/L、氯化钙 0.008~0.012 g/L、一水硫酸锰 1.5~1.9 mg/L、七水硫酸亚铁 4.5~5.5 mg/L、氯化锌 1.8~2.2 mg/L、氯化钴 1.8~2.2 mg/L

和复合维生素 0.08~0.12mg/L；更优选为淀粉 25 g/L、柠檬酸 1.0 g/L、磷酸二氢钾 1.0 g/L、硫酸铵 5.0 g/L、七水硫酸镁 0.2 g/L、钙盐 0.0034 g/L、一水硫酸锰 1.7 mg/L、七水硫酸亚铁 5.0 mg/L、锌盐 0.8 mg/L、氯化钴 0.5 mg/L 和复合维生素 0.1 mg/L。在本发明实施例中，所述发酵培养基 2 号优选包括
5 以下组分：葡萄糖 35 kg/m³、K₂SO₄ 1.0 kg/m³、H₃PO₄ 0.6 kg/m³、七水硫酸镁 0.25 kg/m³、七水硫酸锌 0.05 g/m³、四水硫酸锰 0.03 g/m³、醋酸钙 0.1~0.3 kg/m³ 和消泡剂 0.1 kg/m³。

本发明对所述发酵培养基的配制方法没有特殊限制，采用本领域所熟知的配制方法即可。配制结束，优选对发酵培养基进行灭菌处理。本发明对所述发酵培养基的灭菌方法没有特殊限制，采用本领域所熟知的灭菌方法即可，例如高压蒸汽灭菌方法。灭菌结束，将发酵培养基放置室温再在无菌条件下进行接种操作。本发明对所述接种的方法没有特殊限制，采用本领域所熟知的接种方法完成即可，例如在无菌环境下，用无菌器皿准确量取一定量的种子液转移至发酵培养基中，混匀即可。所述发酵优选在带有压力阀的发酵罐中完成。本发明对所述发酵罐的规格和品牌的种类没有特殊限制，采用本领域所熟知的发酵罐即可。
10 15

在本发明中，除发酵培养基影响发酵进程和结果外，发酵条件也是影响发酵结果的重要因素，例如温度、发酵时间、体系 pH、溶解氧、转速、压力以及补料时机和补料量等都会影响发酵结果。当采用发酵培养基 1 号进行发酵时，所述发酵培养的条件优选为：进入发酵培养的前 15 h 内，通气量为 900~1100 L/h，压力控制为 0.04~0.06 mpa；发酵培养 15 h 后按 0.5~2.0 mL/L/h 的速率开始补料，通气量为 1400~1600 L/h，压力为 0.08~0.12 mpa；发酵液的 pH 值为 4.0~6.0；发酵培养的温度为 27℃~29℃，转速为 100~450 rpm，耦联溶氧为 20 %~50 %，发酵培养的时间为 68~76 h；更优选为进入发酵培养的前 15 h 内，通气量为 1000L/h，压力控制为 0.05 mpa；发酵培养 15 h 后按 1.2 mL/L/h 的速率开始补料，通气量为 1500 L/h，压力为 0.1 mpa；发酵液的 pH 值为 5.0；发酵培养的温度为 28℃，转速为 280 rpm，耦联溶氧为 35 %，发酵培养的时间为 72 h。补料的速率是指每小时每升培养基中补加的补料培养基的体积。当所述发酵培养采用发酵培养基 1 号进行时，所述补料时补料成分包括葡萄糖 280~320 g/L 和复合维生素 0.08~0.12 mg/L；更优选为葡萄糖 300 g/L 和复合维生素 0.1 mg/L。所述复合维生素包括以下质量份的组分：维生素 B₁ 0.08~0.12 份、维生素 B₁₂ 0.08~0.12 份、维生素 B₂ 0.08~0.12 份、维生素 B₃ 0.08~0.12 份、维生素 B₅ 0.08~0.12 份、维生素 B₆ 0.08~0.12 份、维生素 B₉ 0.08~0.12 份、维生素 C 0.08~0.12 份和维生素 H 0.08~0.12 份。
20 25 30 35 发酵过程中所述复合维生素的添加有利于提升菌丝体的弹性和韧性。本发明对所述发酵培养基的维生素的来源没有特殊限制，采用本领域所熟知的维生素购买来源即可。

在本发明中，当所述发酵培养采用发酵培养基 2 号进行时，发酵培养条件为通气量为 900~1600 L/h，压力控制为 0.04~0.12 MPa；发酵液的 pH 值为 4.0~6.0；发酵培养的温度为 27℃~29℃，转速为 100~450 rpm，耦联溶氧为
40

20 %~50 %，发酵培养的时间为 72~480 h；更优选为通气量为 1000~1400 L/h，压力控制为 0.05~0.1 mpa；发酵液的 pH 值为 5.0；发酵培养的温度为 28℃，转速为 280 rpm，耦联溶氧为 35 %。在发酵培养期间，当发酵体系中还原糖低于 2~5 g/L 或 3~4 g/L 时，排出体积分数 20 %~90 % 的发酵液，补加发酵培养基 2 号至原体积。排出发酵液的体积优选占原发酵液体积的 30 %~80 %，进一步优选为 40 %~70 %，最优选为 50 %。补加发酵培养基 2 号至原体积优选在 10~30min 内补料完成，优选在 20min 内完成补料。在发酵培养期间，一旦还原糖低于 2~5g/L 的条件即开启补料，补料操作可重复多次。

在本发明中，在发酵结束后，优选对发酵液进行灭菌。所述发酵液灭菌有利于使发酵液中活菌失去活性，同时还有利于使发酵过程中产生的核酸分子进一步降解，降低发酵得到的菌丝体中核酸含量，便于后续加工应用。所述发酵液灭菌处理的方法优选为加热灭菌。所述加热灭菌的程序优选为在 60℃~70℃保温 18~22 min，在 88℃~92℃保温 8~15 min；更优选为在 65℃保温 20 min，在 90℃保温 12 min。

在本发明中，灭菌后，分离发酵产物。分离发酵产物的方法优选包括将发酵液固液分离，固相经过洗涤后干燥。所述固液分离的方法包括过滤、或离心等。在本发明一个实施例中，所述分离发酵产物的方法优选为真空抽滤装置抽滤并充分洗涤滤饼。固液分离后，收集固相用纯净水洗涤。所述洗涤的次数优选为 1~3 次，更优选为 2 次。所述干燥优选为烘干。所述烘干的温度优选为 55℃~65℃，更优选为 60℃。观察上述滤饼，菌丝形态状态良好，呈丝状，浅黄色滤饼颜色，滤饼有弹性，干重生物量百分比为 0.63 %或以上。凯氏定氮测定蛋白质的含量为 55.39 %以上。经过毒素检测，所述滤饼不含毒素。同时短柄镰刀菌菌株 FXFB001 生产的菌丝体具有优异的无毒素、富含蛋白质的菌丝体的特性，因此本发明提供了所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 或所述微生物菌剂在生产菌丝体蛋白中的应用。

本发明提供了一种食用菌丝体，以所述食用菌丝体的干质量计，所述食用菌丝体中蛋白质含量为 40 % 以上；和/或膳食纤维含量为 20 % 以上；和/或脂肪含量为 8 % 以下；所述食用菌丝体来源于短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*)，例如短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 通过发酵得到食用菌丝体。

在本发明中，所述食用菌丝体中蛋白质含量优选为 45 %、50 %、55 %、60 % 或 65 % 以上。所述食用菌丝体中膳食纤维含量优选为 25 %、30 %、35 %、40 % 或 45 % 以上。所述食用菌丝体中脂肪含量优选为 7 %、6 %、5 %、4 % 或 3 % 以下。

在本发明中，所述食用菌丝体优选包括来源于保藏编号为 CGMCC No:41066 的短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 菌株。所述食用菌丝体在发酵培养过程中通过添加所述复合维生素，提升菌丝体的弹性、韧性。

在本发明中，所述发酵的方法同上述技术方案记载的利用短柄镰刀菌生产食用菌丝体的方法。发酵制备的食用菌丝体外观形态优选为丝状，颜色为

肉色，具有弹性。经过理化检测，发现所述富含蛋白质的菌丝体中不含毒素，具有良好的安全食用性。

鉴于所述食用菌丝体富含蛋白质，可以作为替代蛋白的原料应用于工业生产中。本发明提供了所述食用菌丝体或上述方法制备得到的食用菌丝体在制备肉类替代品中的应用。

在本发明中，所述肉类替代品作为食用菌丝体加工品的一种为所述食用菌丝体未经过结构工艺处理制备的肉类替代品，例如营养食品、保健品等。所述结构工艺处理优选包括剪切。

在本发明中，制备肉类替代品的的方法，以富含蛋白质的食用菌丝体为原料进行加工或深加工制备得到各种不同的产品。所述富含蛋白质的菌丝体制备成营养食品的制备方法，优选包括将所述富含蛋白质的菌丝体直接或提取纯度较高的蛋白质与其他辅料制备营养食品。因菌丝体富含弹性和韧性，并且富含的蛋白质包含多种必需氨基酸，可大大提高制备的食物产品的营养价值。所述食品产品优选以营养补充剂的形式呈现。相似地，可配制食物产品以增强口味或通过与普通食品组合制成对于消费者更具吸引力的食物产品。在某些实施方案中，本发明的组合物被配制为基于奶的产品或基于肉的产品。在本发明一个实施例中，以发酵得到的食用菌丝体代替肉原料（猪肉、牛肉、鸡肉、鱼肉、羊肉、兔肉和驴肉等）制备火腿肠或香肠。术语“基于奶的产品”意指具有变化的脂肪含量的任何液体或半固体的基于奶或乳清的产品。基于奶的产品可以是例如牛奶、山羊奶、绵羊奶、脱脂奶、全脂奶、由奶粉和乳清重组而没有任何加工的奶、或加工产品，诸如酸乳酪、凝固奶、凝乳、酸奶、酸化全脂奶、黄油乳以及其他酸奶产品。另一个重要的组包括奶饮料诸如乳清饮料、发酵奶、炼乳、婴儿或幼儿奶；调味奶、冰淇淋；含奶食物诸如糖。

在本发明中，所述富含蛋白质的菌丝体制备成保健品的制备方法，优选包括从所述富含蛋白质的菌丝体中直接或提取纯度较高的蛋白质或与其他活性成分以及辅料制备保健品。所述保健品包括可接受的赋形剂或载体。用于保健用途的可接受的载体或稀释剂在保健品领域是熟知的。例如所述载体优选包括以下任意一种或多种：乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇和山梨醇等或它们的类似物。所述稀释剂优选包括乙醇、甘油和水或其他溶剂。药物载体、赋形剂或稀释剂的选择可考虑预期的施用途径和标准药学/保健品实践来选择。所述保健品除载体、赋形剂或稀释剂之外可包含任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂。粘合剂包括淀粉、明胶和天然糖，诸如葡萄糖、无水乳糖、自由流动的乳糖、 β -乳糖；玉米甜味剂；天然和合成胶，诸如阿拉伯树胶、黄蓍胶或藻酸钠、羧甲基纤维素和聚乙二醇。润滑剂包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。在所述保健品中可提供防腐剂、稳定剂、染料以及甚至调味剂。防腐剂包括苯甲酸钠、山梨酸、半胱氨酸以及对羟基苯甲酸的酯。还可使用抗氧化剂和悬浮剂。合适的载体的另一个实例是蔗糖。防腐剂的另一个实例是半胱氨酸。

当在权利要求和/或说明书中与术语“包含”联用时，词语“一(a)”或“一(an)”可以指“一个”，但也可以指“一个或多个”、“至少一个”以及“一个或多于一个”。

如在权利要求和说明书中所使用的，词语“包含”、“具有”、“包括”或“含有”是指包括在内的或开放式的，并不排除额外的、未引述的元件或方法步骤。

虽然所公开的内容支持术语“或”的定义仅为替代物以及“和/或”，但除非明确表示仅为替代物或替代物之间相互排斥外，权利要求中的术语“或”是指“和/或”。

当用于权利要求书或说明书时，选择/可选/优选的“数值范围”既包括范围两端的数值端点，也包括相对于前述数值端点而言，所述数值端点中间所覆盖的所有自然数。

“食用菌丝体”是指真菌的发酵培养物或浓缩物或者进一步对真菌的发酵培养物进行脱水、脱核酸处理后得到的可食用的菌丝体浓缩物。并且，根据脱水后浓缩物中的水份含量，食用菌丝体可以是固态，或固液混合态。

“菌丝体”指真菌的营养生长部分，由菌丝组成，是产生真菌蛋白的重要来源。本公开中的菌丝体为来源于镰孢菌属的真菌，且真菌发酵后得到具有可食用性的菌丝体。在一些实施方式中，食用菌丝体来源于单种类真菌的发酵培养物。在一些实施方式中，食用菌丝体来源于多种类真菌的组合发酵培养物。

下面结合实施例对本发明提供的短柄镰刀菌在生产菌丝体蛋白中的应用进行详细的说明，但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

实施例1

一株短柄镰刀菌菌株FXFB001的分离筛选方法

1. 菌株来源

1.1 采集样本：菌株FXFB001于2018年6月采集自西藏自治区山南市森林腐殖土样；

1.2 分离过程：

将森林腐殖土样混匀，称取5 g，放入盛有45 mL 无菌的0.7%羧甲基纤维素钠溶液和15粒玻璃珠的三角瓶中，于30℃、150 rpm振荡30 min。取土壤悬液1 mL用无菌水进行 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 系列浓度梯度稀释，然后取 10^{-2} 、 10^{-3} 两个稀释度涂布至MGA 2.5（含有氯霉素和盐酸四环素）平板上，滴加量为100 μ L/皿，涂布均匀，待平板表面干燥后，于28℃倒置培养2~7 d。其中MGA 2.5培养基包含以下组分蛋白胨（Peptone）15 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、孔雀石绿草酸盐（Malachite green oxalate）0.0025 g、琼脂（Agar）20 g和蒸馏水1 L。

1.3 纯化过程：

采用菌丝末端逐级移植法进行纯化。菌落在平板上形成后，挑取单菌落边缘处的菌丝于麦芽浸粉琼脂/麦芽汁琼脂培养基（MEA，购买自北京奥博星生物技术有限责任公司）上，继续28℃恒温培养，直至获得纯菌落，将获

得菌落-80℃保存，命名为菌株 FXFB001。

2. 菌株鉴定

2.1 菌株 FXFB001 形态特征

将菌株 FXFB001 接种到 MEA 培养基中，28℃下培养 4 d。根据生长速度，描述菌丝形状，菌落色泽、小型分生孢子、大型分生孢子的数量及形状，产孢细胞，厚垣孢子的形状和有无，子实体类型等，对该菌株进行鉴定。

培养性状：4 d 菌落直径 3.8 cm，在 PSA 培养基上生长的气生菌丝呈毛毡状，初期为白色，后逐渐变为粉红色，平板背面为橘红色至深红色（见图 1）；

形态特征：

分生孢子：大型分生孢子为镰刀状，两端稍尖，有 3~5 个隔膜，量度为 10.8~25.1 μm × 2.0~3.6 μm。小型分生孢子呈梭形，略弯曲，两端稍平，有 0~2 隔膜。厚垣孢子呈球形，单生于菌丝中，量度为 5.2~7.5 μm。

2.2 菌株 FXFB001 分子生物学鉴定

2.2.1 TEF1 和 ITS 序列分析

1. DNA 模板制备

挑取适量菌株的菌丝体到装有 50 μL 裂解液的 PCR 管中，放入 PCR 仪器（东胜 ETC811）中，95℃加热 30 min，转至-20℃冻存 15 min。取出后放入离心机（SIGMA 3K15）3000 rpm，2 min 使细胞碎片及裂解液沉降到 PCR 管底部，同时上清液基本澄清，此时真菌遗传物质溶解在上清液中。

2. PCR 体系准备

配置 25 μL 的 PCR 体系：2 μL 上清液、超纯无菌水 8.8 μL、2 × PCR Mix 12 μL、DMSO 1 μL、10 μmol/L 的上游引物 0.6 μL、10 μmol/L 的下游引物 0.6 μL。其中引物序列如表 1 所示：

表 1 两个基因的扩增引物序列

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
TEF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC (SEQ ID NO:1)	GGARGTACCAGTSATCATG (SEQ ID NO:2)
ITS1	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG (SEQ ID NO:3)	GGTCCGTGTTTCAAGACGG (SEQ ID NO:4)

3. PCR 扩增

在 PCR 管中，加入 2 μL 上清液及配制好的 PCR 体系，置于 PCR 仪器（东胜 ETC811）进行 PCR 扩增，PCR 反应条件如下表所示。扩增完成后将 PCR 产物送至北京擎科生物科技股份有限公司使用测序仪（abi3730XL）进行测序。

PCR 反应条件如下：

TEF1：94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃扩增 1 min，34 个循环；72℃再保持 5 min。

ITS1：94℃预变性 2.5 min；95℃变性 30 s，52℃退火 30 s，72℃扩增 1 min，30 个循环；72℃再保持 5 min。

4. PCR 产物进行测序，所得的 PCR 产物序列如下：

TEF1 序列：

GACTCTGGCAAGTCGACCACTGTAAGTACCACCAAGCCTCGACCCCGC
CTAGATTTGGTGGGGTAGTCTCAAGATTCATCCATACTGACATACTTTGA
5 TAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACC
ATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTCTCATTTCCTCGATCGCGCGCCC
TTTTACCCATCGATCCATCATTGCGACTCGCTCTCTCACGACGACTCGATC
CGCGCCCGTTACCCCGCTCGAGCTCAAAAATTTTGCGAATCAATCGTAA
TTTTTTTCTTGATGGGGCTCATACCCCGCCACTCGAGTGACGGGCGCGC
10 TTGCCCTCTTCCCACAGTCATATTCATATGGGCGCGCATCATCACGTGTC
TACCAGTCACTAACCACCTTGACAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAG
GGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGT
GAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTC
GCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGCTGTACCGTTGCCTTCATCACAT
15 CCTCATACTAACACGTCCACCAGAC (SEQ ID NO:5)。

ITS1 序列：

CCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTTATGTTGCCTC
GGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCGCAGGAA
CCACAAAACCTCTGATTTTAGTGTAACCTTCTGAGTCTAAAAAACAAATAA
20 ATCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC
TGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGTTGGGG
ATCGGGCTGTACTCCAGCCCCGCCCCGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCT
25 GCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAACGCGGCG
CGGCCAAGCCGTTAAACCCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAG
GTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGA
AACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCT
CAAATTTGAAATCTGGCTCTCGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATG
30 CTTTTGATGCGGTGCCTTCCGAGTTCCTGGAACGGGACGCCATAGAG
GGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGATGCCAAATCTCTGTAAAGCTCCTTC
GACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTC
TTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTG
ATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGTACGTGA
35 AATTGTTGAAAGGGAAGCGTTTATGACCAGACTTGGGCTTGGTTAATCA
TCTGGGGTTCTCCCCAGTGCACCTTTCCAGTCCAGGCCAGCATCAGTTT
TCGCCGGGGGATAAAGGCTTCGGGAATGTGGCTCCCTCCGGGGAGTGT
TATAGCCCGTTGCGTAATACCCTGGCGGGGACTGAGGTTTCGCGCTTCTG
CAA (SEQ ID NO:6)。

40 使用 NCBI 在线比对系统 (Blast)，分别对两个基因序列进行比对，比

对数据库为 Nucleotide collection (nr/nt)，两个基因最相似的比对结果如表 2 所示；

表 2 所述菌株两基因序列比对结果

基因	NCBI 登录号	拉丁文	序列同源性	Query Cover	E 值
TEF1	MK752485.1	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	99.84 %	100 %	0
ITS1	GQ505450.1	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	100 %	100 %	0

从 FUSARIOID-ID database (www.fusarium.org) 收集所有 FSAMSC 菌株的 TEF1 基因及 ITS1 基因的序列,通过构建多基因进化树分析当前菌株所处的进化位置。

多基因进化树分析步骤如下：首先使用 MAFFT（version v7.310）分别对每个基因进行多序列比对，然后使用 GBLOCKS（version 0.91b）修剪多序列比对结果文件，再使用 AliView 手动修剪，修剪后将两个基因的序列串联拼接，对拼接的序列使用 IQ-TREE（version 2.2.5）构建多基因联合系统发育树如图 2 所示。

基于形态特征、ITS1 和 TEF1 序列分析可知，菌株 FXFB001 为短柄镰刀菌（*Fusarium brachygibbosum*）。该菌株于 2023 年 12 月 13 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏编号为 CGMCC No:41066。

实施例 2
生产菌丝体蛋白的菌株初步筛选实验

1 初筛制备菌丝体蛋白的方法

将实施例 1 分离鉴定的菌株 FXFB001 和与菌株 FXFB001 同批分离的其他微生物菌株分别接种到装有 50 mL 初筛培养基的 250 mL 三四锥形瓶中，200 rpm 恒温振荡培养 48 h。初筛培养基配方为：葡萄糖 30 g/L、酵母浸粉 30 g/L、KH₂PO₄ 1g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、CaCl₂ 0.2 g/L，121℃高压蒸汽灭菌 20 min。

用真空抽滤装置抽滤并充分洗涤滤饼，置于电热鼓风干燥箱内 60℃烘干，精确称量干燥滤饼的质量并计算生物量浓度，然后参照《GB 5009.5-2016 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》，采用凯氏定氮法测定菌丝体粗蛋白。

2 初筛制备菌丝体结果见表 3。

表 3 初筛菌株产生的菌丝体情况一览表

菌株序号	种子形态	种子滤饼颜色	发酵形态	发酵滤饼颜色	滤饼弹性	生物量 (DCW/50 ml)	粗蛋白含量 (%)	评价结果	评价理由
1	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	0.995	43.72	不合格	菌丝形态不合格
2	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	0.52	46.49	不合格	菌丝形态不合格
3	颗粒	橘红色	颗粒	橘红色	无弹性	0	0.00	不合格	菌丝形态不合格
4	丝状	橘红色	丝状	橘红色	高弹性	1.01	44.05	不合格	粗蛋白低
5	丝状	橘红色	丝状	橘红色	有弹性	0.91	47.42	不合格	粗蛋白低

6	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	0.935	47.93	不合格	菌丝形态不合格
7	丝状	橘红色	丝状	橘红色	高弹性	0.88	36.90	不合格	粗蛋白低
8	丝状	橘红色	丝状	橘红色	无弹性	0.89	48.32	不合格	滤饼质感不好， 粗蛋白较低
9	丝状	橘红色	丝状	橘红色	有弹性	0.77	43.72	不合格	粗蛋白低
10	丝状	橘红色	丝状	橘红色	有弹性	0.95	46.50	不合格	粗蛋白低
11	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	0.81	49.75	不合格	菌丝形态不好， 粗蛋白较低
12	颗粒	橘红色	颗粒	橘红色	无弹性	0.56	47.89	不合格	菌丝形态不合格
13	丝状	橘红色	丝状	橘红色	有弹性	1	45.92	不合格	粗蛋白低
14	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	0.615	51.03	不合格	菌丝形态不合格
15	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	0.66	45.11	不合格	菌丝形态不合格
16	丝状	橘红色	丝状	橘红色	高弹性	0.97	47.32	不合格	粗蛋白低
17	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	0.535	48.60	不合格	菌丝形态不好， 粗蛋白较低
18	丝状	橘红色	丝状	橘红色	无弹性	0.96	45.97	不合格	粗蛋白低
19	丝状	橘红色	丝状	橘红色	无弹性	0.86	42.40	不合格	粗蛋白低
20	丝状	橘红色	丝状	橘红色	有弹性	1.03	42.01	不合格	粗蛋白低
21	丝状	橘红色	丝状	橘红色	有弹性	0.71	45.97	不合格	粗蛋白低
22	丝状	橘红色	丝状	橘红色	高弹性	0.48	50.08	良好	各项指标良好
23	丝状	橘红色	丝状	橘红色	有弹性	0.82	44.80	不合格	粗蛋白低
24	丝状	橘红色	丝状	橘红色	有弹性	0.745	45.39	不合格	粗蛋白低
25	粉末	橘红色	粉末	橘红色	泥状	0.71	47.94	不合格	菌丝形态不合格
26	粉末	橘红色	粉末	橘红色	泥状	0.94	47.53	不合格	菌丝形态不合格
27	颗粒	橘红色	颗粒	橘红色	无弹性	1.01	49.30	不合格	菌丝形态不好， 粗蛋白较低
28	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	0.94	46.55	不合格	菌丝形态不合格
29	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	1	46.24	不合格	菌丝形态不合格
30	粉末	橘红色	粉末	橘红色	泥状	0.92	46.35	不合格	菌丝形态不合格
31	颗粒	橘红色	颗粒	橘红色	无弹性	0.24	46.14	不合格	菌丝形态不合格
32	颗粒	橘红色	颗粒	橘红色	无弹性	0	0.00	不合格	菌丝形态不合格
33	丝状	橘红色	丝状	橘红色	有弹性	0.71	49.43	不合格	粗蛋白低
34	丝状	橘红色	丝状	橘红色	高弹性	0.37	48.23	备选	粗蛋白较低，滤 饼质感好
35	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	0	0.00	不合格	菌丝形态不合格
36	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	0	0.00	不合格	菌丝形态不合格
37	粉末	橘红色	粉末	橘红色	无弹性	0	0.00	不合格	菌丝形态不合格
38	丝状	橘红色	丝状	橘红色	高弹性	0.56	47.53	不合格	菌丝形态不合格
39	丝状	橘红色	丝状	橘红色	高弹性	0.31	46.00	不合格	粗蛋白低

	+球 状		+球 状						
40	丝状	橘红色	丝状	橘红色	高弹性	0.58	51.64	良好	各项指标良好
41	丝状	浅黄色	丝状	浅黄色	有弹性	0.63	55.39	优先	粗蛋白很高，其 他指标良好

注：生物量（%）=菌丝体干重/培养基体积×100 %；
蛋白质含量（%）=（粗蛋白质量/菌体总质量）×100 %。

将编号 41 的菌株即为菌株 FXFB001。所述菌株 FXFB001 发酵制备的菌丝体，形态呈丝状菌丝、浅黄色滤饼颜色、滤饼有弹性的质感（图 3），干重生物量达 0.63 %，进一步通过凯氏定氮法测定菌丝体蛋白含量达到 55.39 %。总之，菌株 FXFB001 制备的富含蛋白质的菌丝体镜检无孢子，丝状极佳，滤饼浅黄色，有弹性，无不良气味。

实施例 3

菌株 FXFB001 及其初筛培养得到的若干微生物菌株的扩增培养和发酵生产菌丝体

1 培养方法

1.1 使用的摇瓶种子培养基如表 4（一级种子培养和二级种子培养用培养基）和表 5（三级种子培养基）。

表 4 一级种子培养和二级种子培养用培养液

配方物料	含量
葡萄糖	30 g/L
酵母浸粉	25 g/L
磷酸二氢钾	1 g/L
七水硫酸镁	0.2 g/L
氯化钙	0.01 g/L

表 5 三级种子培养基

成分	含量
玉米淀粉	25 g/L
柠檬酸	1 g/L
磷酸二氢钾	1 g/L
硫酸铵	5 g/L
七水硫酸镁	0.2 g/L
氯化钙	0.01 g/L
一水硫酸锰	1.7 mg/L
七水硫酸亚铁	5 mg/L
氯化锌	1.7 mg/L
氯化钴	2 mg/L

1.2 种子液培养条件：一级种子液的制备使用上述表 4 的种子培养基，挑取活化好的本发明的菌株（选择种子液及发酵液中菌丝形态，各指标良好的

菌株，见表 7) 接种至装有 50 mL 初筛培养基的 250 mL 三四锥形瓶中，200 rpm 恒温振荡培养 24 h。二级种子液的制备使用上述表 4 的种子培养基，按 5 %接种量转接至装有 1 L 种子培养基的 3 L 三四锥形瓶中，摇床转速 200 rpm，培养 24 h；按照 8 %的接种量将二级种子液接种到装液量为 10 L 的装
5 有表 5 所示种子培养基的发酵罐中，通气速率 10 L/min，罐压 0.05 Mpa，搅拌转速 150 rpm，温度为 28℃，在线氨水调节 pH 5.0，发酵时间 24 h 左右。

1.3 发酵培养生产富含蛋白质的菌丝体：

1.3.1 生产富含蛋白质的菌丝体的发酵培养基 1 号如表 6 所示。

表 6 发酵培养基 1 号

成分	含量
玉米淀粉	25 g/L
柠檬酸	1 g/L
磷酸二氢钾	1 g/L
硫酸铵	5 g/L
七水硫酸镁	0.2 g/L
氯化钙	0.01 g/L
一水硫酸锰	1.7 mg/L
七水硫酸亚铁	5 mg/L
氯化锌	1.7 mg/L
氯化钴	2 mg/L
复合维生素	0.1 mg/L

10 其中，本实施例中所用的复合维生素包括以下等质量比的组分：维生素 B1/硫胺素、维生素 B12/钴胺素维生素 B2/核黄素、维生素 B3/烟酸、维生素 B5/D-泛酸钙、维生素 B6/吡哆素、维生素 B9/叶酸、维生素 C 和维生素 H/D-生物素。

1.4 发酵培养方法如下：

15 按 5 %接种量将培养 24 h 的三级种子液，经灭菌后的软管从底阀泵入装液量为 30 L 的 50 L 发酵罐中；前 15 h 通气量为 1000 L/h，罐压 0.05 mpa；15 h 后按 0.5 mL/L/h 的速度开始补料，补料成分包括葡萄糖 300 g/L 和复合维生素 0.1 mg/L，并调节通气 1500 L/h，罐压 0.1 mpa；氨水控制 pH 6.0；28℃ 培养；转速 100 rpm 耦联溶氧 50%，培养 72 h。

20 1.5 发酵培养后处理工艺

1) 热处理：发酵结束后将发酵液加热到 65℃保温 20 min 左右，再加热到 90℃保温 10 min 左右，后冷却至常温。

2) 压滤、冷藏：热处理后的发酵液用板框压滤机压滤，充分洗涤并通风后取出滤饼 4℃保存。

25 3) 检测：粗蛋白测定样品预处理，烘干样品粉碎后过 60 目筛，然后按照《GB5009.5-2016 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》进行测定。食品中常见真菌毒素检测送第三方 SGS 进行检测。

各菌株发酵结果见表 7。

表 7 镰刀菌 50 L 发酵罐复筛结果

菌株序号		发酵时间	滤饼颜色	滤饼弹性	不良气味	菌丝形态	菌丝长度	菌丝直径	菌丝分支	孢子有无	粗蛋白含量	评价结果	评价理由
22	2023 0500	65	黄灰色		无	丝状	较短	细	多	较多	54.09	不合格	菌丝较短且分支多
34	2023 1029	40	土黄色	易碎	恶臭	丝状	很短	中等	多	无	不测定	不合格	颜色、质感、气味不合适
40	2023 0602	75.5	浅黄色	有弹性	无	树枝状	较短	细	很多	多	44.68	不合格	粗蛋白低，菌丝形态不好
41	2023 0519	75.6	浅黄色	高弹性	无不良气味	丝状	长	细	少	少	54.61	合格	蛋白含量高，菌丝形态较好，无其他明显不良特征

短柄镰刀菌菌株 FXFB001 在添加复合维生素的发酵培养基 1 号进行发酵培养获得的菌丝体结果与实施例 2 初步筛选制备富含蛋白质的菌丝体结果比较：

- 5
- 10
- 1、初步筛选制备菌丝体镜检无孢子，滤饼颜色灰白，弹性好，韧性较好，无不良气味；
- 2、连续发酵培养获得的菌丝体蛋白在镜检下丝状良好（图 4 和图 5），使得发酵液能够在未加热状态下就能自然呈现肉色颜色；蛋白含量在 55%左右。

由毒素检测结果可知，在上述发酵培养条件下，菌株 FXFB001 所含真菌毒素均未检出（低于限量，见表 8，检测方法参见 SN/T3136-2012 标准），总脂肪 7.97 %，粗蛋白含量 60.51 %，膳食纤维含量 26.01 %。

表 8 理化检测结果一览表

编号	检测项目	单位	检测方法	检测结果 3	定量限
1	总脂肪	g/100g	AOAC 996.06	2.2	0.01
2	#蛋白质	g/100g	AOAC979.09	16.7	-
3	膳食纤维	g/100g	AOAC 991.43	7.18	-
4	#脱氧雪腐镰刀菌烯醇	µg/kg	GB 5009.111-2016 第一法	ND	20
5	#3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	µg/kg	GB 5009.111-2016 第一法	ND	20
6	#15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	µg/kg	GB 5009.111-2016 第一法	ND	20
7	#黄曲霉毒素 B1	µg/kg	GB 5009.111-2016 第一法	ND	0.5

8	#黄曲霉毒素 B2	μg/kg	SN/T 3136-2012	ND	1
9	#黄曲霉毒素 G1	μg/kg	SN/T 3136-2012	ND	1
10	#黄曲霉毒素 G2		SN/T 3136-2012	ND	1
11	#黄曲霉毒素 B1+黄曲霉毒素 B2+黄曲霉毒素 G1+黄曲霉毒素 G2	μg/kg	SN/T 3136-2012	ND	-
12	#赭曲霉毒素 A	μg/kg	SN/T 3136-2012	ND	2
13	#伏马毒素 B1	μg/kg	SN/T 3136-2012	ND	20
14	#T-2 毒素	μg/kg	SN/T 3136-2012	ND	10
15	#HT-2 毒素	μg/kg	SN/T 3136-2012	ND	10
16	#伏马毒素 B2	μg/kg	SN/T 3136-2012	ND	20
17	#玉米赤霉烯酮	μg/kg	SN/T 3136-2012	ND	10
18	#伏马毒素 B3	μg/kg	SN/T 3136-2012	ND	20
19	#HT-2 毒素与 T-2 毒素之和	μg/kg	SN/T 3136-2012	ND	-
10	#水分	g/100g	AOAC 925.45	72.4	-

实施例 4
一种利用短柄镰刀菌发酵生产富含蛋白质的菌丝体的方法

1 培养方法

1.1 使用的摇瓶种子培养基成分如表 8（一级种子培养和二级种子培养用培养基）和表 9（三级种子培养基）。

表 8 一级种子培养和二级种子培养用培养基

配方物料	含量
葡萄糖	28 g/L
酵母浸粉	27 g/L
磷酸二氢钾	1.2 g/L
七水硫酸镁	0.18 g/L
硫酸钙	0.0122 g/L

表 9 三级种子培养基

成分	含量
红薯淀粉	24 g/L
柠檬酸	1.1 g/L
磷酸二氢钾	1.1 g/L
硫酸铵	4.8 g/L
七水硫酸镁	0.18 g/L
氯化钙	0.008 g/L
一水硫酸锰	1.5 mg/L
七水硫酸亚铁	5 mg/L
硫酸锌	2.01 mg/L
氯化钴	2.2 mg/L

1.2 种子液培养条件：一级种子液的制备使用表 8 所示的种子培养基，挑取活化好的菌株 FXFB001 接种至装有 50 mL 所述培养基的 250 mL 三四锥形瓶中，180 rpm 恒温振荡培养 26 h。二级种子液的制备使用表 8 所示的种子培养基，按 6 %接种量转接至装有 1 L 种子培养基的 3 L 三四锥形瓶中，摇床转速 220 rpm，培养 22 h；按照 10 %的接种量将二级种子液接种到装液量为 10L 的装有表 9 所述培养基的发酵罐中，通气速率 11 L/min，罐压 0.06 Mpa，搅拌转速 220 rpm，温度为 26℃，在线氨水调节 pH 6.0，发酵时间 36 h。

1.3 发酵培养生产富含蛋白质的菌丝体：
1.3.1 生产富含蛋白质的菌丝体的发酵培养基如表 10 所示。

表 10 发酵培养基 2 号

成分	含量 (kg/m ³)
葡萄糖	40
硫酸钾	1
H ₃ PO ₄	0.5
七水硫酸镁	0.2
七水硫酸锌	0.05
四水硫酸锰	0.02
醋酸钙	0.2
消泡剂	0.1

1.4 发酵培养方法如下：
按 7 %接种量将培养至 22 h 的三级种子液，经灭菌后的软管从底阀泵入装液量为 30 L 装有表 10 所示发酵培养基 2 号的 50 L 发酵罐中；发酵条件为通气量为 1100 L/h，罐压 0.05 mpa；当发酵培养基中还原糖低于 2g/L 时，将培养基放出 80 %后，在 20 min 内补料至原来体积，补料培养基为发酵培养基 2 号，并调节通气 1400 L/h，罐压 0.1 mpa；氨水控制体系 pH 值至 5.2；28℃培养；转速 350 rpm 耦联溶氧 40 %，培养 480 h。

1.5 发酵培养后处理工艺
1) 热处理：发酵结束后将发酵液加热到 65℃保温 20 min 左右，再加热到 90℃保温 10 min 左右，后冷却至常温。
2) 压滤、冷藏：热处理后的发酵液用板框压滤机压滤，充分洗涤并通风后取出滤饼 4℃保存。
3) 检测：粗蛋白测定样品预处理，烘干样品粉碎后过 60 目筛，然后按照《GB5009.5-2016 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》进行测定。食品中常见真菌毒素检测送第三方 SGS 进行检测。

在上述发酵培养条件下，菌株 FXFB001 发酵生产的菌丝体未检出任何毒素，在菌丝体干基的情况下，总脂肪 5.8 %，粗蛋白含量 54.2 %，膳食纤维含量 20.4 %。

30 实施例 5
1 培养方法

1.1 使用的摇瓶种子培养基成分如表 11（一级种子培养和二级种子培养用培养基）和表 12（三级种子培养基）。

表 11 一级种子培养和二级种子培养用培养基

配方物料	含量
葡萄糖	30 g/L
酵母浸粉	25 g/L
磷酸二氢钾	1 g/L
七水硫酸镁	0.2 g/L
氯化钙	0.01 g/L

表 12 三级种子培养基

成分	含量
玉米淀粉	25 g/L
柠檬酸	1.2 g/L
磷酸二氢钾	0.8 g/L
硫酸铵	4.8 g/L
七水硫酸镁	0.18 g/L
氯化钙	0.01 g/L
一水硫酸锰	1.9 mg/L
七水硫酸亚铁	4.8 mg/L
氯化锌	1.6 mg/L
氯化钴	1.8 mg/L

5 1.2 种子液培养条件：一级种子液的制备使用表 11 所示培养基，挑取活化好的菌株 FXFB001 接种至装有 50 mL 所述培养基的 250 mL 三四锥形瓶中，200 rpm 恒温振荡培养 24 h。二级种子液的制备使用表 11 所示的种子培养基，按 5 %接种量转接至装有 1 L 种子培养基的 3 L 三四锥形瓶中，摇床转速 200 rpm，培养 24 h；按照 8%的接种量将二级种子液接种到装液量为
10 10 L 装有表 12 所示培养基的发酵罐中，通气速率 10 L/min，罐压 0.05 Mpa，搅拌转速 150 rpm，温度为 27℃，在线氨水调节 pH 5.5，发酵时间 24 h。

1.3 发酵培养生产富含蛋白质的菌丝体：

1.3.1 生产富含蛋白质的菌丝体的发酵培养基成分如表 13 所示。

表 13 发酵培养基 1 号

成分	含量
土豆淀粉	24 g/L
柠檬酸	1 g/L
磷酸二氢钾	1 g/L
硫酸铵	5 g/L
七水硫酸镁	0.2 g/L
氯化钙	0.008 g/L
一水硫酸锰	1.7 mg/L

七水硫酸亚铁	5 mg/L
氯化锌	1.7 mg/L
氯化钴	1.8mg/L
复合维生素	0.1mg/L

所述维生素复合物为以下质量比的维生素：维生素 B1/硫胺素 0.1 mg、维生素 B12/钴胺素 0.1 mg、维生素 B2/核黄素 0.1 mg、维生素 B3/烟酸 0.1 mg、维生素 B5/D-泛酸钙 0.1 mg、维生素 B6/吡哆素 0.1 mg、维生素 B9/叶酸 0.1 mg、维生素 C 0.1 mg、维生素 H/D-生物素 0.1 mg。

5 1.4 发酵培养方法如下：

按 10 %接种量将培养 24 h 的三级种子液，经灭菌后的软管从底阀泵入装液量为 25 L 装有表 13 所示发酵培养基 1 号的 50 L 发酵罐中；前 15 h 通气量为 900 L/h，罐压 0.04 mpa；15h 后按 2 ml/L/h 开始补料，补料培养基为葡萄糖 300 g/L 和复合维生素 0.1 mg/L，并调节通气 1600 L/h，罐压 0.1 mpa；
10 氨水控制 pH 4.5；28℃培养；转速 100 rpm 耦联溶氧 30 %，培养 70 h。

1.5 发酵培养后处理工艺

1) 热处理：发酵结束后将发酵液加热到 65℃保温 20 min 左右，再加热到 90℃保温 10 min 左右，后冷却至常温。

2) 压滤、冷藏：热处理后的发酵液用板框压滤机压滤，充分洗涤并
15 通风后取出滤饼 4℃保存。

3) 检测：粗蛋白测定样品预处理，烘干样品粉碎后过 60 目筛，然后按照《GB5009.5-2016 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》进行测定。食品中常见真菌毒素检测送第三方 SGS 进行检测。

在上述发酵培养条件下，菌株 FXFB001 发酵生产的菌丝体未检出任何
20 毒素，在菌丝体干基的情况下，总脂肪 8 %，粗蛋白含量 60.5 %，膳食纤维含量 26.0 %。

实施例 6

一种利用短柄镰刀菌发酵生产富含蛋白质的菌丝体的方法

1 培养方法

25 1.1 使用的摇瓶种子培养基成分如表 14（一级种子培养和二级种子培养用培养基）和表 15（三级种子培养基）。

表 14 一级种子培养和二级种子培养用培养基

配方物料	含量
葡萄糖	28 g/L
酵母浸粉	27 g/L
磷酸二氢钾	1.2 g/L
七水硫酸镁	0.18 g/L
硫酸钙	0.0122 g/L

表 15 三级种子培养基

成分	含量
----	----

红薯淀粉	24 g/L
柠檬酸	1.1 g/L
磷酸二氢钾	1.1 g/L
硫酸铵	4.8 g/L
七水硫酸镁	0.18 g/L
氯化钙	0.008 g/L
一水硫酸锰	1.5 mg/L
七水硫酸亚铁	5 mg/L
硫酸锌	2.01 mg/L
氯化钴	2.2 mg/L

1.2 种子液培养条件：一级种子液的制备使用表 14 所示的种子培养基，挑取活化好的本发明的菌株 FXFB001 接种至装有 50 mL 所述培养基的 250 mL 三四锥形瓶中，200rpm 恒温振荡培养 22 h。二级种子液的制备使用表 14 所示种子培养基，按 6 %接种量转接至装有 1 L 种子培养基的 3 L 三四锥形瓶中，摇床转速 220 rpm，培养 22 h；按照 10 %的接种量将二级种子液接种到装液量为 10 L 装有表 15 所示的培养基的发酵罐中，通气速率 11 L/min，罐压 0.06 Mpa，搅拌转速 220 rpm，温度为 28℃，在线氨水调节体系 pH 5.0，发酵时间 42 h。

1.3 发酵培养生产富含蛋白质的菌丝体：
1.3.1 生产富含蛋白质的菌丝体的发酵培养基如表 16 所示。

表 16 发酵培养基 2 号

成分	含量 (kg/m³)
葡萄糖	50
硫酸钾	0.8
H ₃ PO ₄	0.8
七水硫酸镁	0.4
七水硫酸锌	0.008
四水硫酸锰	0.04
醋酸钙	0.3
消泡剂	0.1

1.4 发酵培养方法如下：
按 7 %接种量将培养至 22 h 的三级种子液，经灭菌后的软管从底阀泵入装液量为 30 L 装有表 16 所示的发酵培养基 2 号的 50L 发酵罐中；发酵条件为通气量为 1100 L/h，罐压 0.05 mpa；当发酵体系中还原糖低于 5 g/L 时，将培养基放出 50%后，在 20 min 内补料至原有体积，补料培养基为发酵培养基 2 号，并调节通气 1400 L/h，罐压 0.1 mpa；氨水控制体系 pH 值至 5.0；28℃培养；转速 350 rpm 耦联溶氧 40 %，培养 120 h。

1.5 发酵培养后处理工艺
1) 热处理：发酵结束后将发酵液加热到 65℃保温 20 min 左右，再加热

到 90℃ 保温 10 min 左右，后冷却至常温。

2) 压滤、冷藏：热处理后的发酵液用板框压滤机压滤，充分洗涤并通风后取出滤饼 4℃ 保存。

3) 检测：粗蛋白测定样品预处理，烘干样品粉碎后过 60 目筛，然后按照《GB5009.5-2016 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》进行测定。食品中常见真菌毒素检测送第三方 SGS 进行检测。

在上述发酵培养条件下，菌株 FXFB001 发酵生产的菌丝体未检出任何毒素，在菌丝体干基的情况下，总脂肪 8.0 %，粗蛋白含量 60.5 %，膳食纤维含量 26.0 %。

10 实施例 7

一种包括菌株 FXFB001 的微生物菌剂

将短柄镰刀菌菌株 FXFB001 按照实施例 3 记载的方法进行扩大培养，得到三级种子液添加 50 % 的甘油，-80℃ 冷冻保存即可。

15 实施例 8

一种采用实施例 5 的菌丝体制备肉类替代品（食用菌蛋白基肠）的方法
准确称量以下重量的原料：食用菌丝体 40 kg、冰水 58 kg、味精 0.1 kg、酵母抽提物 0.7 kg、食用糖 1 kg、肉味香精 0.5 kg、葵花籽油 3 kg、食用盐 0.6 kg，香辛料 0.6 kg、淀粉 2 kg、卡拉胶 2.5 kg 和辣椒红 0.106 kg。

制备方法包括以下步骤：

- 20 1、卡拉胶、淀粉与部分冰水混合，斩拌均匀，加入真菌蛋白、味精、糖、食品用香精、植物油、食用盐、香辛料、色素和剩余冰水，混合均匀；
- 2、肉馅通过灌装机灌入尼龙肠衣中，香肠挂杆，放入烟熏炉，60℃ 干燥 20 min，95℃ 蒸煮 20 min；
- 3、取出用冷风吹至 25℃ 以下，包装；
- 25 4、速冻、入库。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1.短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 或其微生物菌剂在生产菌丝体蛋白中的应用。

2.根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述短柄镰刀菌为具有与 SEQ ID NO:5 至少 95 %同源性的 TEF1 基因序列和/或具有与 SEQ ID NO:6 至少 5 97 %同源性的 ITS1 基因序列的短柄镰刀菌菌株或所述短柄镰刀菌菌株形成的组合物。

3.根据权利要求1所述应用, 其特征在于, 所述短柄镰刀菌包括短柄镰刀菌菌株 FXFB001;

所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 的保藏编号为 CGMCC No:41066。

10 4.根据权利要求1~3 中任意一项所述应用, 其特征在于, 所述短柄镰刀菌包括孢子形态和/或菌丝体形态。

5.一种食用菌丝体, 其特征在于, 以所述食用菌丝体的干质量计, 所述食用菌丝体中蛋白质质量百分含量为 40 %以上; 和/或膳食纤维质量百分含量为 20 %以上; 和/或脂肪质量百分含量为 8 %以下;

15 所述食用菌丝体来源于短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) ;

所述短柄镰刀菌为权利要求2~4 任意一项所述应用中的短柄镰刀菌。

6.根据权利要求5 所述的食用菌丝体, 其特征在于, 所述食用菌丝体富有弹性和/或韧性。

20 7.一株短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 菌株 FXFB001, 其特征在于, 保藏编号为 CGMCC No:41066。

8.一种生产蛋白质或富含蛋白质的菌丝体的微生物菌剂, 其特征在于, 包括权利要求7 所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 和菌剂可接受的辅料。

9.根据权利要求8 所述的生产蛋白质或富含蛋白质的菌丝体的微生物菌剂, 其特征在于, 所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 和辅料的质量比为 25 1~10:1~100。

10.根据权利要求8 或9 所述的生产蛋白质或富含蛋白质的菌丝体的微生物菌剂, 其特征在于, 所述辅料包括培养基、添加剂和载体中的一种或几种。

11.权利要求7 所述短柄镰刀菌菌株 FXFB001 或权利要求8~10 中任一项所述微生物菌剂在生产蛋白质或富含蛋白质的菌丝体中的应用。

12.一种利用短柄镰刀菌 (*Fusarium brachygibbosum*) 生产食用菌丝体的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

将短柄镰刀菌或其微生物菌剂制备的种子液接种至发酵培养基中发酵培养, 得到发酵液;

5 将所述发酵液灭菌处理后, 分离发酵产物得到食用菌丝体;

所述短柄镰刀菌为权利要求 2~4 任意一项所述应用中的短柄镰刀菌。

13.根据权利要求 12 所述方法, 其特征在于, 所述发酵培养基包括发酵培养基 1 号和/或发酵培养基 2 号;

所述发酵培养基 1 号包括以下含量组分: 淀粉 23~27 g/L、柠檬酸 0.8~1.2 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2 g/L、硫酸铵 4.5~5.5 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 17~21 mg/L、以 Ca 计算浓度的钙盐 2.8~43 mg/L、以 Mn 计算浓度的锰盐 0.48~0.62 mg/L、以 Fe 计算浓度的铁盐或亚铁盐 0.96~1.05 mg/L、以 Zn 计算浓度的锌盐 0.72~0.91 mg/L、以 Co 计算浓度的钴盐 0.44~0.54 mg/L 和复合维生素 0.08~0.12mg/L;

15 所述发酵培养基 2 号包括以下含量组分: 葡萄糖 15~60 kg/m³、K₂SO₄ 0.5~1.5 kg/m³、H₃PO₄ 0.4~0.8 kg/m³、以 Mg 计算浓度的镁盐 9.75~58.5 g/m³、以 Zn 计算浓度的锌盐 2.2~22.5 g/m³、以 Mn 计算浓度的锰盐 2.46~9.85 g/m³、醋酸钙 0.1~0.3 kg/m³ 和消泡剂 0.08~0.12 kg/m³。

14.根据权利要求 13 所述方法, 其特征在于, 当采用发酵培养基 1 号进行发酵时, 所述发酵培养的条件包括:

进入发酵培养的前 15 h 内, 通气量为 900~1100 L/h, 压力控制为 0.04~0.06 MPa;

发酵培养 15 h 后按 0.5~2.0 mL/L/h 的速率开始补料, 通气量为 1400~1600 L/h, 压力为 0.08~0.12 MPa; 发酵液的 pH 值为 4.0~6.0;

25 发酵培养的温度为 27°C~29°C, 转速为 100~450 rpm, 耦联溶氧为 20%~50%, 发酵培养的时间为 68~76 h;

所述补料时补料成分包括葡萄糖 280~320 g/L 和复合维生素 0.08~0.12 mg/L;

所述复合维生素包括以下质量份的组分: 维生素 B₁ 0.08~0.12 份、维生

素 B₁₂ 0.08~0.12 份、维生素 B₂ 0.08~0.12 份、维生素 B₃ 0.08~0.12 份、维生素 B₅ 0.08~0.12 份、维生素 B₆ 0.08~0.12 份、维生素 B₉ 0.08~0.12 份、维生素 C 0.08~0.12 份和维生素 H 0.08~0.12 份。

15. 根据权利要求 13 所述方法，其特征在于，当所述发酵培养采用发酵培养基 2 号进行时，发酵培养条件为通气量为 900~1600 L/h，压力控制为 0.04~0.12 MPa；发酵液的 pH 值为 4.0~6.0；

发酵培养的温度为 27℃~29℃，转速为 100~450 rpm，耦联溶氧为 20%~50%，发酵培养的时间为 72~480 h；

当发酵体系中还原糖含量低于 2~5 g/L 时，排出体积分数 20%~90% 的发酵液，补加发酵培养基 2 号至原体积。

16. 根据权利要求 12 所述方法，其特征在于，所述短柄镰刀菌制备种子液的方法，包括以下方法：

将所述短柄镰刀菌接种至第一种子培养基中依次进行一级种子培养和二级种子培养，得到二级种子液；

15 将所述二级种子液接种至第二种子培养基中进行三级种子培养，得到三级种子液。

17. 根据权利要求 16 所述方法，其特征在于，所述第一种子培养基含有以下含量组分：葡萄糖 28~32 g/L、酵母浸粉 23~27 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 17~21 mg/L 和以 Ca 计算浓度的钙盐 3~4 mg/L；

20 所述第二种子培养基含有以下含量组分：淀粉 23~27 g/L、柠檬酸 0.8~1.2 g/L、磷酸二氢钾 0.8~1.2 g/L、硫酸铵 4.8~5.2 g/L、以 Mg 计算浓度的镁盐 17~21 mg/L、以 Ca 计算浓度的钙盐 0.003~0.004 g/L、以 Mn 计算浓度的锰盐 0.48~0.62 mg/L、以 Fe 计算浓度的铁盐或亚铁盐 0.96~1.05 mg/L、以 Zn 计算浓度的锌盐 0.72~0.91 mg/L 和以 Co 计算浓度的钴盐 0.44~0.54 mg/L。

25 18. 根据权利要求 16 或 17 所述方法，其特征在于，所述一级种子培养、二级种子培养或三级种子培养的培养温度为 25℃~30℃；

所述一级种子培养、二级种子培养或三级种子培养的培养时间为 22~26 h；

所述一级种子培养、二级种子培养或三级种子培养的转速为 100~200

rpm;

所述三级种子培养的通气率为 8~12 L/min;

所述三级种子培养的压力为 0.04~0.06 MPa;

所述三级种子培养的体系 pH 值为 4.0~6.0。

- 5 19.根据权利要求 12 所述方法，其特征在于，所述发酵液灭菌处理的方法为加热灭菌；

所述加热灭菌的程序为 60°C~70°C 保温 18~22 min，升温至 88°C~92°C 保温 8~15 min。

- 20.根据权利要求 12 所述方法，其特征在于，所述分离发酵产物的方法
10 包括将发酵液固液分离，固相经过洗涤后干燥得到食用菌丝体。

21.权利要求 5 或 6 所述食用菌丝体或权利要求 12~20 中任意一项所述方法制备的食用菌丝体在制备肉类替代品中的应用。

- 22.一种肉类替代品，其特征在于，以权利要求 5 或 6 所述食用菌丝体或
15 权利要求 12~20 中任意一项所述方法制备的食用菌丝体作为肉原料制备得到。

23.根据权利要求 22 所述肉类替代品，其特征在于，包括火腿肠或香肠。