

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090625** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.09

(22) Дата подачи заявки
2018.08.29

(51) Int. Cl. *A23L 33/195* (2016.01)
C12R 1/77 (2006.01)
A23J 3/20 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
A23L 31/00 (2016.01)
A01G 18/64 (2018.01)
A01G 18/66 (2018.01)

(54) ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ДИЗАЙН БИОРЕАКТОРА

(31) **62/552,093; 62/722,074**

(32) **2017.08.30; 2018.08.23**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/048626**

(87) **WO 2019/046480 2019.03.07**

(71) Заявитель:
ДЗЕ ФИНДЕР ГРУП, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Козубал Марк А., Макур Ричард Э.,
Авнил Ювал К., Хэмилтон
Максимилиан ДеВэйн (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены способы получения препаратов биоматов съедобных нитчатых грибов в качестве самостоятельных источников белка и/или белковых ингредиентов в пищевых продуктах, а также автономный реактор "биоупленка-биомат" одноразового использования или многоразового использования, включающий контейнер по меньшей мере с одним отделением и помещенным в отделение(я) сырьевым материалом, грибной инокулятом, газопроницаемую мембрану и, необязательно, жидкую питательную среду.



A1

202090625

202090625

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561718EA/081

ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ДИЗАЙН БИОРЕАКТОРА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящая заявка относится к съедобным грибам и способам получения съедобных грибов для использования в пищевых продуктах; к жидким и твердым препаратам съедобных грибов, а также связанным с ними вариантам применения и способам; к пищевым продуктам, содержащим съедобные грибы, а также способам и вариантам их применения.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

До данным Организации Объединенных Наций численность населения мира составляла 7,5 миллиардов человек в августе 2017 года и, по прогнозам, эта цифра вырастет до 8 миллиардов в 2023 году и до 10 миллиардов в 2056 году. В соответствующем докладе Организации по продовольствию и сельскому хозяйству при Организации Объединенных Наций (FAO) указано, что, если к 2050 году население планеты достигнет 9,1 миллиардов человек, мировое производство продовольствия должно вырасти на 70% и удвоиться в развивающихся странах. Такое увеличение производства продовольствия должно произойти, несмотря на рост стоимости энергоресурсов, сокращение ресурсов подземных водоносных горизонтов, потерю сельскохозяйственных земель из-за разрастания городов и все более суровые погодные условия вследствие изменения климата (например, повышение температуры, усиление засухи, участившиеся наводнения и так далее). Это является особой проблемой для таких стран, как Африка, где согласно данным 2009 года уже имеет место недостаточное потребление белка населением, и таких стран, как Китай, Индия, Пакистан и Индонезия, которым угрожает нехватка пищевого белка. Кроме того, по прогнозам, к 2040 году возрастет глобальная потребность в мясе на 60% и в молочных продуктах на 50%.

Однако не все источники белка имеют одинаковую ценность. Продукты животного происхождения (мясо, яйца, молочные продукты) обеспечивают «полноценные» белки, поскольку они содержат все незаменимые аминокислоты; то есть, метионин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, валин, треонин, гистидин, триптофан и лизин. Растительные продукты, хотя и содержат некоторые незаменимые аминокислоты, как правило, не содержат полный их набор. Например, в белке, содержащемся в крахмалистых корнеплодах, отсутствует незаменимая аминокислота лизин, которую необходимо получать из других продуктов в рационе питания. Фасоль и бобовые содержат большие количества лизина, но в них отсутствует незаменимая аминокислота метионин. Хотя можно получать полноценный белок путем сочетания растительной пищи, намного проще обеспечивать сбалансированное питание с помощью полноценных белков.

Одним из источников полноценного белка не животного происхождения являются съедобные нитчатые грибы, такие как *Fusarium venenatum* (ранее классифицируемый как *Fusarium graminearum*). Однако до настоящего времени для производства белка из этих

источников требовались значительные инвестиции в энергоресурсы и производственное оборудование, такое как капиталоемкие биореакторы и центрифуги. Сохраняется потребность в способах выращивания, сбора урожая и производства пищевых продуктов, которые отличаются низкими энергозатратами, потреблением небольшого количества природных ресурсов и низкой себестоимостью. Настоящее изобретение решает эти проблемы.

Кроме того, одной из возможностей упрощения материально-технического снабжения, связанного с реагированием на стихийные бедствия, логистически изолированными зонами или военными и/или космическими/внеземными экспедициями, является создание замкнутого цикла жизнеобеспечения, в частности, контроль потоков отходов при одновременном предоставлении критически важных продуктов, таких как питательные и аппетитные пищевые продукты, топливо, платформы для экспрессии метаболитов, строительные материалы и/или микробные фабрики. Часто в условиях такого типа отсутствует или ограничен доступ к стерильным помещениям и/или необходима герметичная асептическая система для полного вмещения потока отходов и/или пищевых продуктов, топлива и произведенных материалов. Например, исследование Европейского космического агентства (Экспедиции 25-28, Рост и выживание цветных грибов в космосе (CFS-A)) продемонстрировало, что грибы могут расти внутри космической станции и могут разлагать пищу и другие органические материалы во влажных условиях; в этом случае сдерживание грибковой системы имеет первостепенное значение для предотвращения случайного загрязнения других материалов и поверхностей. Помимо необходимости разложения пищи и отходов в развивающейся области космических путешествий, эти потребности также имеют место в случае стихийных бедствий, военных операций в театре военных действий, операций в незаселенной местности, ситуаций в третьем мире, где санитария и охлаждение ненадежны, в ограниченных пространствах, логистически сложных аренах и в некоторых сельскохозяйственных/промышленных операциях. Необходима автономная асептическая система, которая работает эффективно с минимумом занимаемого пространства, затрачиваемой энергии и технического обслуживания.

Надежная и эффективная портативная автономная реакторная система «биопленка-биомат», которая способна превращать широкий спектр потоков отходов в множество ценных продуктов, решает эти проблемы. В настоящем документе описана простая асептическая биореакторная платформа, не нуждающаяся в перемешивании, активной аэрации, источнике энергии во время ферментации (кроме контроля температуры), не создающая, или создающая минимальные, отходы, требующая небольшого количества воды и производящая плотные, легко собираемые текстурированные биоматы. Кроме того, автономная реакторная система «биопленка-биомат» может быть переносной и/или масштабируемой для больших, более концентрированных экспедиций и/или групп населения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к препаратам съедобных нитчатых грибов. Съедобные нитчатые грибы выращивают на жидких средах в условиях поверхностной ферментации для получения биоматов нитчатых грибов. В одном варианте осуществления предложен способ получения поверхностной ферментацией биоматов съедобных грибов, включающий инокуляцию жидкой синтетической ростовой среды, содержащей источник углерода, планктонными и/или микроконициальными грибковыми клетками, инкубацию инокулированной ростовой среды при комнатной температуре и сбор целостного биомата, продуцированного грибами. В некоторых вариантах осуществления инокулированную ростовую среду инкубируют в открытых лотках, или в открытых лотках, находящихся в, по меньшей мере, полустерильных условиях.

В другом варианте осуществления способ получения поверхностной ферментацией биомата съедобных грибов позволяет собирать часть биомата, сохраняя возможность для роста остального биомата.

В следующем варианте осуществления нитчатый гриб представляет собой *Fusarium oxysporum* штамма МК7 (АТСС РТА-10698, депонированный в Американской коллекции типовых культур, 1081 University Boulevard, Manassas, Virginia, USA), который содержит 46-51% полноценного белка с высоким уровнем всех незаменимых аминокислот, в частности, 42-43% незаменимых аминокислот и 4-21% АКРЦ, что выше, чем в яйцах. Кроме того, *Fusarium oxysporum* штамма МК7 содержат 8-10% минералов и золы, включая высокие уровни кальция (1,3 мг/100 г порцию), железа (5,5 мг/100 г порцию), 1-2% нуклеиновых кислот и 6-11% липидов, из которых 85% являются ненасыщенными.

В другом варианте осуществления нитчатый гриб представляет собой *Fusarium venenatum* или *Fusarium fujikuroi*.

В другом варианте осуществления нитчатый гриб выбирают из группы, состоящей из *Agaricus bisporus* («кремини» и белый шампиньон), *Boletus edulis* (белый гриб), *Cantarellus cibarius* (лисичка), *Calvatia gigantea* (дождевик гигантский), *Cyclocybe aegerita* (каштановый гриб), *Ganoderma lucidum* (рейши), *Grifola frondosa* (гриб-баран), *Morchella* sp. (сморчок), *Hypsizyugus tessellatus* (шимиджи), *Hypsizyugus ulmarius* (устричный гриб), *Laetiporus* sp. (трутовик серно-желтый), *Lentinula edodes* (шиитаке), *Pleurotus eryngii* (вешенка степная, эринги), *Calvatia gigantean* (дождевик гигантский), *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная), *Pleurotus ostreatus* var. *columbinus* (вешенка голубая) и другие *Pleurotus* sp. (например, *P. citrinopileatus*, *tuberregium*), *Hypsizyugus ulmarius* (вешенка ильмовая), *Pholiota microspora* (чешуйчатка намеко), *Sparassis crispa* (грибная капуста) и *Tuber* sp. (трюфель).

В дополнительном варианте осуществления источником углерода является сахар (например, сахароза, мальтоза, глюкоза, фруктоза, редкие сахара и так далее), сахарный спирт (например, глицерин, полиол и так далее), крахмал (например, кукурузный крахмал и так далее), производное крахмала, гидролизат крахмала, гидрогенизированный гидролизат крахмала, лигноцеллюлозная масса или сырьевой материал (например,

свекловичный жом, жом сельскохозяйственных культур, опилки, дистиллированное сухое зерно, отходы пивоварения и так далее), кукурузный экстракт, кислая сыворотка, сладкая сыворотка, молочная сыворотка, пшеничный экстракт, промышленные воды, побочные продукты переработки пищевых продуктов/сточные воды и/или их сочетание.

В другом варианте осуществления предложен способ получения поверхностной ферментацией биоматов съедобных нитчатых грибов, начиная с плодовых тел или спор нитчатых грибов. В случае биоматов, получаемых, начиная с плодовых тел, способ включает поверхностную стерилизацию плодового тела гриба, измельчение стерилизованного плодового тела гриба, поверхностную стерилизацию измельченного плодового тела гриба, инокуляцию синтетической жидкой ростовой среды, содержащей источник углерода, клетками из стерилизованного измельченного плодового тела гриба, инкубацию инокулированной ростовой среды при комнатной температуре и сбор целостного нитчатого биомата, продуцированного грибом. В случае биоматов, получаемых, начиная со спор нитчатых грибов, способ включает инокуляцию синтетической жидкой ростовой среды, содержащей источник углерода, стерильными спорами, инкубацию инокулированной ростовой среды при комнатной температуре и сбор целостного нитчатого биомата, продуцированного грибными спорами.

В некоторых вариантах осуществления плодовое тело или споры нитчатого гриба выбирают из группы, состоящей из *Agaricus bisporus* («кремини» и белый шампиньон), *Boletus edulis* (белый гриб), *Cantarellus cibarius* (лисичка), *Calvatia gigantea* (дождевик гигантский), *Cyclocybe aegerita* (каштановый гриб), *Ganoderma lucidum* (пейши), *Grifola frondosa* (гриб-баран), *Morchella* sp. (сморчок), *Hypsizyugus tessellatus* (шимиджи), *Hypsizyugus ulmarius* (устричный гриб), *Laetiporus* sp. (трутовик серно-желтый), *Lentinula edodes* (шиитакэ), *Pleurotus eryngii* (вешенка степная), *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная и вешенка голубая), *Pholiota microspora* (чешуйчатка намеко), *Sparassis crispa* (грибная капуста) и *Tuber* sp. (трюфель). Стерильные споры нитчатых грибов получают от коммерческих поставщиков, таких как *Musco Direct* (Huntley, Illinois).

В другом варианте осуществления нитчатый биомат, получаемый из планктонных клеток, микроконидиальных клеток, измельченного плодового тела или спор нитчатого гриба, содержит агрегаты мицелия и/или гиф длиной менее 5 мм. В другом варианте осуществления измельченный нитчатый биомат содержит агрегаты длиной более 5 мм.

В следующем варианте осуществления значение pH инокулированной клетками плодового тела ростовой среды составляет примерно 4,0-4,1.

В следующем варианте осуществления источник углерода синтетической ростовой среды для роста плодового тела и/или клеток включает глицерин, крахмал, кукурузный экстракт, кислую сыворотку, или их сочетания, и/или период инкубации составляет примерно 2-10 дней или более.

Другой вариант осуществления относится к препарату нитчатого биомата съедобного гриба, содержащему частицы нитчатого биомата съедобного гриба, выделенные из нитчатых биоматов съедобного гриба, выращенных методом

поверхностной ферментации на синтетической жидкой среде.

Следующие варианты осуществления относятся к препаратам, имеющим форму жидкости, твердого вещества или геля.

Другие варианты осуществления относятся к препарату, который представляет собой пасту, муку, пористую/воздушную массу и/или твердую массу.

Другой вариант осуществления относится к пищевому продукту, содержащему препарат(ы) нитчатого биомата съедобного гриба с другими ингредиентами, или без них.

Дополнительные варианты осуществления относятся к пищевым продуктам, полученным из препарата(ов), таким как заменители мяса, крепкие напитки, безалкогольные напитки, йогурт, десерт, кондитерские изделия или конфеты.

Другой вариант осуществления относится к пищевому продукту, полученному из препарата(ов), который представляет собой мусс или замороженный десерт, такой как аналог мороженого, который не тает при комнатной температуре.

Следующие варианты осуществления относятся к применению препарата(ов) в качестве ингредиента для улучшения и/или имитации текстуры мяса (например, гамбургера, колбасы, хот-дога, курицы или индейки и/или рыбного филе) в пищевом продукте и/или для увеличения содержания белка в пищевом продукте. Следующие варианты осуществления относятся к применению жидкого дисперсионного препарата(ов) в качестве заменителя молока и/или для увеличения содержания белка в молоке, молочных продуктах и/или заменителях молока.

Другой вариант осуществления относится к получению масел из биомата съедобного нитчатого гриба.

Настоящее изобретение также относится к автономному реактору «биоупленка-биомат». В одном варианте осуществления автономный реактор «биоупленка-биомат» включает контейнер и помещенные в контейнер сырьевые материалы, грибной инокулят, газопроницаемую мембрану(ы) и, необязательно, жидкую питательную среду. В некоторых вариантах осуществления реактор представляет собой реактор одноразового использования, в то время как в других вариантах осуществления реактор может быть использован повторно.

Как правило, в различных вариантах осуществления контейнер может быть закрытым и может включать футляр для контейнера, помимо крышки. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой закрытый лоток. В других вариантах осуществления контейнер представляет собой закрытую чашку Петри или другой тип закрытого контейнера. В других вариантах осуществления контейнер представляет собой мешок. В других вариантах осуществления контейнер представляет собой трубку, верхняя часть которой выполнена из газопроницаемой мембраны (2) (смотри Фигуру 23). В некоторых вариантах осуществления контейнер состоит из множества ростовых отделений. В некоторых вариантах осуществления контейнер имеет коллекторную конструкцию и/или систему перегородок. В некоторых вариантах осуществления контейнер выполнен полностью или частично из одного или более

потребляемых видов сырья.

В некоторых вариантах осуществления сырьевой материал инокулируют клетками штамма грибов аскомицетов, таких как *Fusarium*, примерами которых являются *Fusarium oxysporum* штамма МК7 (ATCC PTA-10698, депонированный в Американской коллекции типовых культур, 1081 University Boulevard, Manassas, Virginia, USA), *Fusarium venenatum* и *Fusarium avenaceum*, *Fusarium fujikuroi*, *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp. и/или их сочетания.

В других вариантах осуществления сырьевой материал инокулируют клетками штамма грибов базидиомицетов, таких как *Agaricus bisporus* («кремини» и белый шампиньон), *Boletus edulis* (белый гриб), *Cantarellus cibarius* (лисичка), *Calvatia gigantea* (дождевик гигантский), *Cyclocybe aegerita* (каштановый гриб), *Ganoderma lucidum* (рейши), *Grifola frondosa* (гриб-баран), *Morchella* sp. (сморчок), *Hypsizygus tessellatus* (шимиджи), *Hypsizygus ulmarius* (устричный гриб), *Laetiporus* sp. (трутовик серно-желтый), *Lentinula edodes* (шиитакэ), *Pleurotus eryngii* (вешенка степная), *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная и вешенка голубая), *Pholiota microspora* (чешуйчатка намеко), *Sparassis crispa* (грибная капуста) и/или *Tuber* sp. (трюфель).

В некоторых вариантах осуществления сырьевой материал представляет собой отходы, такие как моча и/или фекалии, а также пищевые отходы и побочные продукты, промышленные отходы и/или побочные продукты, сельскохозяйственные отходы и побочные продукты, растительный материал и/или их сочетания. В других вариантах осуществления сырьевой материал может представлять собой синтезированный или изготовленный суррогат, такой как суррогатная человеческая моча. В случае сырьевого материала, который представляет собой, или включает, растительный материал, этот растительный материал, как правило, является лигноцеллюлозным. Лигноцеллюлозный сырьевой материал выбирают из группы, состоящей из остатков сельскохозяйственных культур (таких как пшеничная солома, ячменная солома, рисовая солома, гороховая солома, овсяная солома, солома мелкозерновых культур, кукурузная солома, кукурузные волокна (например, камедь кукурузных волокон (CFG)), дистиллированное сухое зерно (DDG), кукурузная глютенная мука (CGM), просо, сено люцерны, жом сахарного тростника), не сельскохозяйственной биомассы (такой как биомасса водорослей, биомасса цианобактерий, остатки растущих в городах деревьев), овощей (таких как морковь, брокколи, чеснок, картофель, свекла, цветная капуста), лесоматериалов и промышленных отходов (таких как отходы первичного/вторичного распила деревьев мягких пород, отходы первичного/вторичного распила деревьев твердых пород, шлам вторичной бумажной массы, анаэробный дигестат), содержащих лигноцеллюлозу отходов (таких как газетная бумага, макулатура), зерновых отходов пивоварения, использованных резиновых шин (URT), муниципальных органических отходов, садовых отходов, клинических органических отходов, сахара, крахмала, отработанных масел, оливкового масла, отходов переработки оливкового масла, экскрементов сверчков и отходов, образующихся при производстве биотоплива (таких как обработанная биомасса водорослей, глицерин), а также их сочетаний. Как правило, газопроницаемая мембрана находится в

непосредственном контакте и плотно прилегает к поверхности одного или более сырьевых материалов, необязательно, жидкой среды и инокулята, находящегося в контейнере. В некоторых вариантах осуществления присутствует дополнительная среда для культивирования.

В некоторых вариантах осуществления газопроницаемая мембрана состоит из полимерного материала, такого как полипропилен, полиэтилен, политетрафторэтилен, поликарбонат, полиамид, полипирролон, поли(амидоамин) дендримерный композит, ацетат целлюлозы, бутадиен-акрилонитрил, тефлон AF2400 и нейлон. В некоторых вариантах осуществления размер пор газопроницаемой мембраны находится в диапазоне 0,05-1,5 мкм, например, 0,2 мкм, 0,45 мкм и 1,0 мкм. В некоторых вариантах осуществления газопроницаемая мембрана имеет форму стерильного похожего на марлю материала, в то время как в других мембрана имеет форму похожего на бумагу материала. В некоторых вариантах осуществления поверхность имеет гладкую текстуру, в других - поверхность имеет шероховатую текстуру. В некоторых вариантах осуществления путь для диффузии газа является практически прямым, в то время как в других путь является извилистым.

В некоторых вариантах осуществления в реакторе образуется биопленка-биомат, который служит источником пищи, например, источником белка и/или источником масла. В других вариантах осуществления биопленка-биомат служит в качестве аналога кожи и/или биопластика. В других вариантах осуществления биопленка-биомат служит источником прекурсоров биотоплива или самого биотоплива. В других вариантах осуществления биопленку-биомат используют для получения органических продуктов, таких как органические кислоты, антибиотики, ферменты, гормоны, липиды, микотоксины, витамины, пигменты и рекомбинантные гетерологичные белки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1. Рост биомата *Fusarium oxysporum* штамма МК7 в питательной среде, которую обновляли ежедневно после начальной 4-дневной стадии образования биомата.

Фигура 2. Имеющий толщину три сантиметра биомат *Fusarium oxysporum* штамма МК7, который сформировался в жидкой питательной среде, обновляемой ежедневно (после дня 4). Показан нейлоновый сетчатый экран под биоматом, который используют для поднятия и перемещения биомата в свежую среду.

Фигура 3. Система непрерывного потока, разработанная для постоянного поддержания роста биомата *Fusarium oxysporum* штамма МК7 и удаления питательных веществ из среды. Показаны белые биоматы в желобах через 7 дней роста с момента инокуляции.

Фигура 4. Рост биомата через 10 дней роста с момента инокуляции (6 дней в условиях непрерывного потока+4 дня в состоянии покоя/статических условиях).

Фигура 5. Полу-непрерывное производство биомата; (А) удаление наиболее созревшей части биомата в день 12. После сбора 1/3 наиболее зрелого биомата в нижнем конце лотка оставшийся биомат физически движется вниз в направлении, указанном

стрелкой, до тех пор, когда конец биомата соприкасается с концом лотка (В). Движение биомата создает новое открытое пространство в верхнем конце лотка, где образуется новый биомат.

Фигура 6. Совокупное производство биомассы с течением времени при использовании полу-непрерывного способа производства. Пунктирная линия представляет собой кривую линейной регрессии от 5 до 19 дня ($y=0,57x - 1,52$, $r^2=0,973$). Планки погрешностей соответствуют значениям стандартного отклонения среднего значения для трех лотков-реплик. Планки погрешностей не видны, если они меньше символа точки данных.

Фигура 7. Непрерывное производство биомата, где справа показано удаление наиболее зрелой части биомата. При постоянном сборе наиболее зрелого биомата с правой стороны лотка создается новое открытое пространство на левом конце лотка, создающее возможность для образования нового биомата. Жидкую среду в лотке можно пополнять и/или добавлять по мере необходимости или непрерывно.

Фигура 8. Оранжевая пигментация биоматов *Fusarium oxysporum* штамма МК7 (два вырезанных диска справа) после облучения УФВ светом в течение четырех часов. Два вырезанных диска из необлученных контрольных биоматов показаны слева.

Фигура 9. Результаты автоэлектронной сканирующей микроскопии 4-дневных биоматов *Fusarium oxysporum* штамма МК7, полученных с использованием среды МК7-1 (описанной в PCT/US2017/020050) с глицерином, кукурузным крахмалом и кукурузным экстрактом. Изображения А, В и С показывают биомат с удаленным промыванием этанолом EPS матриксом. А) Вид верхней поверхности биоматата с воздушными гифами. В) Поперечное сечение плотного нижнего слоя, со стрелкой, показывающей границы слоя. Вид поперечного сечения создавали, разрезая биомат бритвенным лезвием. Нижняя часть биомата показана в нижнем левом углу изображения, а слабо прикрепляющийся переходный слой над плотным нижним слоем показан в верхнем правом углу. С) Вид нижней поверхности биомата. D) Вид нижней поверхности биомата с EPS матриксом (то есть, EPS не удален промыванием этаноном).

Фигура 10. Полученные с помощью работающего в проходящем свете микроскопа изображения (100x) биоматов, растущих на глицерине, крахмале и кукурузном экстракте. Изображение слева воздушного гифального слоя показывает преобладающую почти вертикальную ориентацию нитей. Изображение справа показывает плотный нижний слой и смежный переходный слой.

Фигура 11. А: Куриная грудка слева и свежий биомат с аналогичной текстурой, выращенный на глицерине, справа. В: «Микобургер», приготовленный известным шеф-поваром Бруксом Хедли с использованием грибного биомата.

Фигура 12. Биоматы, полученные с использованием раскрытого способа. А: гриб рейши; В: гриб вешенка обыкновенная; С: гриб вешенка голубая; D: грибная капуста; Е: устричный гриб; G: гриб дождевик гигантский.

Фигура 13. А. Куриный наггет, изготовленный из биомата *Fusarium oxysporum*

штамма МК7, выращенного на смеси глицерина, крахмала и кукурузного экстракта. В. Куриный нагетт, изготовленный из биомата дождевика гигантского, выращенного на солодовой среде 001 (40 г солода, 4 г пептона, 1,2 г дрожжевого экстракта, 20 капель/1 мл масла канолы, 4 г молотого овса, 1000 мл воды).

Фигура 14. Йогурт, приготовленный из живой йогуртовой культуры с использованием: А. 25% жидкой дисперсии МК7: 75% цельного молока, В. 50% жидкой дисперсии МК7: 50% цельного молока, и С. 100% жидкой дисперсии МК7. Жидкая дисперсия МК7, используемая в данных культурах, была получена из биоматов *Fusarium oxysporum* штамма МК7, выращенных на кислой сыворотке.

Фигура 15. Веганский аналог мороженого, изготовленный из биоматов *Fusarium oxysporum* штамма МК7.

Фигура 16. Образование биопленки-биомата в герметизированном реакторе начинается, когда клетки прикрепляются к газопроницаемой мембране, где кислород легко доступен. Со временем биопленка-биомат растет сверху вниз и в итоге заполняет пространство реактора, потребляя всю жидкость и питательные вещества.

Фигура 17. Биоматы *Fusarium oxysporum* штамма МК7, выращенные в течение пяти дней в статических условиях в чашках Петри, покрытых полупроницаемыми мембранами, созданными из (А)-(С) полипропилена и (D) поликарбоната. В чашке Петри практически не осталось свободной жидкости, и все питательные вещества были включены в биомат. Пустой/жидкостный объем реактора был практически заполнен биоматом.

Фигура 18. Присоединенный мешок, отделенный от жидкой среды газопроницаемой мембраной, используется для подачи и улавливания газов. Встроенная многофункциональная мембрана обеспечивает поступление кислорода и выход CO₂ и других производимых газов. Грибная биомасса, растущая в нижнем, заполненном жидкостью отделении (желтый цвет), превращает сырьевые материалы и питательные вещества в биомат, который заполняет отделение по мере роста. Плотный затвердевший биомат может быть с легкостью собран при открывании запорной системы реактора (например, типа Zip-lock[®]) и выемке из мешка.

Фигура 19. Базовый закрытый реактор (1). Показано множество желобов (4) с общими стенками/перегородками (9), передними клапанами (6) и задними клапанами (8), и газопроницаемой мембраной (2).

Фигура 20. Базовый закрытый реактор (1) с одной газосборной камерой (14).

Фигура 21. Базовый закрытый реактор (1) с желобчатыми газосборными камерами (15, 20).

Фигура 22. Базовый закрытый реактор (1) с желобчатыми газосборными камерами (15), имеющий специальные газовые желоба (30, 40) со специальными газопроницаемыми мембранами (2, 50).

Фигура 23. Базовый закрытый реактор (1) с цилиндрическими желобами (4), стенками/перегородками (9), передними клапанами (6) и задними клапанами (8), и

газопроницаемой мембраной (2).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Съедобные нитчатые грибы могут быть использованы в качестве источника белка, либо отдельно, или включенными в пищевые продукты. Например, содержание белка в вешенках обыкновенных составляет 27,25%, в вешенках голубых 24,65%, в грибах рейши 15,05% (Stamets (2005) Int J Medicinal Mushrooms 7:103-110), в дождевиках гигантских 27,3% (Agrahar-Murugkar and Subbulakshmi (2005) Food Chem 89:599-603) и в грибной капусте 32,61% (Kimura (2013) BioMed Res. Int. Article ID 982317).

Хотя плодовые тела нитчатых грибов базидиомицетов, таких как *Agaricus bisporus* («кремини» и белый шампиньон), *Boletus edulis* (белый гриб), *Cantarellus cibarius* (лисичка), *Ganoderma lucidum* (рейши), *Morchella* sp. (сморчок), *Hypsizygus tessellatus* (шимиджи), *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная и вешенка голубая), *Pleurotus eryngii* (вешенка степная), *Pholiota microspora* (чешуйчатка намеко), *Sparassis crispa* (грибная капуста), *Hypsizygus ulmarius* (устричный гриб), *Cyclocybe aegerita* (каштановый гриб), *Grifola frondosa* (гриб-баран), *Lentinula edodes* (шиитакэ), *Laetiporus* sp. (трутовик серно-желтый), *Calvatia gigantea* (дождевик гигантский) и *Tuber* sp. (трюфель), широко используются в пищевых продуктах, существует мало продуктов, в основном содержащих вегетативный мицелий нитчатых грибов базидиомицетов или аскомицетов. Это происходит частично из-за того, что мицелий, как правило, либо находится под землей, либо практически неотделим от субстрата, на котором он растет.

В определенных ситуациях нитчатые грибы могут образовывать грибные биоматы при поверхностной ферментации в анаэробных, микроаэробных или аэробных условиях, или при их сочетании. Описанные в настоящем документе биоматы нитчатых грибов содержат вид и/или штамм грибов, и/или его потомство, преимущественно в форме мицелия, фрагментов мицелия, гиф, фрагментов гиф, и в меньшей степени содержат конидии, микроконидии, макроконидии или любые, и все, их сочетания, и в некоторых случаях также могут содержать пикниды и хламидоспоры.

Как правило, нитчатые биоматы в основном состоят из мицелия; то есть, сложной сети переплетенных вегетативных нитей гиф. Средняя длина неразорванных нитей в биомате, как правило, составляет по меньшей мере 0,1 мм, например, 0,1 мм - 0,5 мм, 0,5 мм - 50 см, 0,6 мм - 40 см, 0,7 мм - 30 см, 0,8 мм - 25 см, 1,0 мм - 20 см, 1,4 мм - 15 см, 1,6 мм - 10 см, 1,7 мм - 8 см, 1,8 мм - 6 см, 2,5 мм - 4 см и 5 мм - 2 см, 2 см - 25 см, 4 см - 30 см, 5 см - 40 см, 6 см - 50 см, 8 см - 60 см, 10 см - 100 см.

Выращивание биоматов нитчатых грибов можно осуществлять методом поверхностной ферментации. Он включает инокуляцию жидкой среды, содержащей источник углерода и источник азота, клетками нитчатых грибов. Подходящими источниками углерода являются сахара (например, сахароза, мальтоза, глюкоза, фруктоза, японские редкие сахара и так далее), сахарные спирты (например, глицерин, полиол и так далее), крахмал (например, кукурузный крахмал и так далее), производное крахмала (например, мальтодекстрин, циклодекстрин, глюкозный сироп, гидролизаты и

модифицированный крахмал), гидролизаты крахмала, гидрогенизированные гидролизаты крахмала (HSH; например, гидрогенизированные глюкозные сиропы, мальтитные сиропы, сорбитные сиропы и так далее), лигноцеллюлозная масса или сырьевой материал (например, жом сахарной свеклы, жом сельскохозяйственных культур, жом лесоматериалов, дистиллированное сухое зерно, отходы пивоварения и так далее), кукурузные экстракты, кислая сыворотка, сладкая сыворотка, молочная сыворотка, пшеничные экстракты, углеводы, пищевые отходы, отходы переработки оливкового масла, гидролизат из лигноцеллюлозных материалов и/или их сочетания. Клетки нитчатых грибов образуют биоматы, которые находятся на поверхности ростовой среды; то есть, они практически плавают на поверхности ростовой среды.

Во многих случаях, особенно в случае грибов аскомицетов, ростовую среду инокулировали инокулятом, содержащим планктонные клетки нитчатых грибов. Высококачественный инокулят состоит из планктонных клеток, представляющих собой одиночные клетки, не образующие скопления или не агрегирующие, которые, предпочтительно, выделены в экспоненциальной фазе роста и могут включать микроконидии. В идеале, клетки инокулята плавают на поверхности ростовой среды, например, клетки, имеющие высокое содержание жира, что приводит к повышенной скорости роста. Клетки или скопления клеток, которые погружены в ростовую среду, отрицательно влияют на клетки, плавающие на поверхности, и биоматы, которые они образуют. В частности, биоматы, полученные в ростовой среде, содержащей значительное количество агрегированных погруженных в среду клеток, как правило, обесцвечены и обычно не образуют однородно плотные слои.

В случае инокуляции спор базидиомицетов, примерно 2 см^3 стерильных спор, суспендированных в деионизированной воде, из спорового шприца (например, MycoDirect, Huntley, IL) использовали для инокуляции примерно 75 мл ростовой среды в небольших лотках Рутех. Альтернативно, 1 см^3 стерильных спор, суспендированных в деионизированной воде, из спорового шприца высевали в контейнер, содержащий агар с солодовым экстрактом+CF (30 г сухого солодового экстракта, 20 г агара, 1000 мл воды+0,01% хлорамфеникола) в стандартных стерильных условиях. Контейнеры закрывали парафильмом и инкубировали при комнатной температуре до того момента, когда мицелий полностью покрывал поверхность агара. Вырезанный клином с агара сегмент мицелия шириной примерно 2 см нарезали кубиками наименее возможного размера, с последующим переносом в пробирку с ростовой средой. Пробирки с жидкой культурой плотно закрывали, инкубировали при комнатной температуре и встряхивали вручную или встряхивали при помощи механических устройств (то есть в корпусном реакторе с постоянным встряхиванием или постоянным перемешиванием) в течение примерно 1 минуты по меньшей мере пять (5) раз в сутки для возможно большего разбивания мицелия. Жидкие культуры инкубировали по появления видимой мутности, как правило, три или более дней. Затем жидкие культуры использовали для инокуляции ростовой среды в лотках в количестве 10% или 15% от общего объема ростовой среды.

Плодовые тела базидиомицетов также использовали для получения инокулята для инициации нитчатых биоматов. В некоторых случаях инокулят готовили путем (а) поверхностной стерилизации плодовых тел, например, в 5% растворе хлорной извести, (б) промывания стерильной средой, (с) измельчения в стерильных условиях до агрегатов длиной менее 5 мм, или более 5 мм, в зависимости от конечного применения, (d) поверхностной стерилизации измельченной грибной биомассы, например, в 5% растворе хлорной извести, с повторным промыванием стерильной средой. 5 грамм измельченной поверхностно стерилизованной биомассы плодовых тел использовали непосредственно в качестве инокулята. В других случаях использовали чистую культуру, полученную из плодовых тел. При этом ~3-мм³ фрагменты плодового тела помещали на агаровую среду, содержащую 0,01% хлорамфеникола, и инкубировали при комнатной температуре. Через 2-5 дней роста гифы переносили на свежую агаровую среду+хлорамфеникол и выращивали еще в течение 3-7 дней. Чистоту культуры подтверждали путем экстрагирования и очистки ДНК (FastDNA Spin Kit, MP Biomedicals), секвенирования последовательности 16S рРНК и/или области ITS и проведения филогенетической классификации последовательностей с использованием Blast (база данных NCBI). После подтверждения гифы использовали для инокуляции 50 мл стерильной жидкой среды и встряхивали/вращали при 185 об/мин в течение примерно 5 дней, с последующим использованием в качестве инокулята в соотношении примерно 7,5% инокулята на 92,5% жидкой среды.

Хотя можно использовать целый ряд разных сред, некоторые среды не приспособлены для выращивания биоматов нитчатых грибов, например, среда Хансена (на литр=1,0 г пептона, 0,3 г $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0 г глюкозы при отношении С:N, составляющем 26,9), в которой полные целостные биоматы не были образованы. Исключительно хорошо зарекомендовавшие себя среды включают МК7А, МК7-1, МК7-3 (все описаны в WO 2017/151684), а также среды, приведенные ниже.

Солодовая среда 001 (отношение С:N 19,1)

Ингредиент	Количество	Категория
Солод для светлого Pilsner	40,0 г	Пищевая
Пептон	4,0 г	Для исследований
Порошок дрожжевого экстракта	1,2 г	Для исследований
Масло канолы	1,0 мл	Пищевая
Дробленый овес	4,0 г	Пищевая
Водопроводная H_2O	1000 мл	Н/П

Среда МК-7 SF (отношение С:N 7,5)

Ингредиент	Количество	Категория
NH_4NO_3	7,553 г	ACS
Мочевина	2,548 г	USP

CaCl ₂	2,000 г	Реагент
MgSO ₄ * 7H ₂ O	2,000 г	USP
KH ₂ PO ₄	7,500 г	Реагент
Следовые компоненты*	2,000 мл	*
Глицерин	0,075 кг	Пищевая/USP
Дрожжевой экстракт	1,750 г	Для исследований
FeCL ₂ * 4H ₂ O	0,020 г	Реагент
ДИ H ₂ O	0,940 л	Н/П
Следовые компоненты*		
Микроэлементы*	мг/л	Категория
FeSO ₄ •7 H ₂ O	9,98	ACS
ZnSO ₄ •7 H ₂ O	4,4	USP/FCC
MnCl ₂ •4 H ₂ O	1,01	Реагент
CoCl ₂ •6 H ₂ O	0,32	Реагент
CuSO ₄ •5 H ₂ O	0,31	Техническая
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4 H ₂ O	0,22	ACS
H ₃ BO ₃	0,23	ACS
ЭДТА, свободная кислота	78,52	Для электрофореза

Солодовая среда 001 с добавлением NH₄NO₃ (отношение C:N 7,5)

Ингредиент	Количество	Категория
NH ₄ NO ₃	5,0 г	ACS
Солод для светлого Pilsner	40,0 г	Пищевая
Пептон	4,0 г	Для исследований
Порошок дрожжевого экстракта	1,2 г	Для исследований
Масло канолы	1,0 мл	Пищевая
Дробленый овес	4,0 г	Пищевая
Водопроводная H ₂ O	1000 мл	Н/П

Показатели осмотического давления снимали, стерильно отбирая 250 мкл среды и используя недавно откалиброванный осмометр (модель 3250 SN: 17060594), способный измерять вплоть до 5000 мОсм. Были сняты три показания и получены следующие результаты: среда Хансена=39, 39, 38; солодовая среда 001=169, 168, 169; МК-7 SF=1389, 1386, 1387; солодовая среда 001+NH₄NO₃=288, 287, 286.

Кроме того, среду, используемую в способе авторов изобретения, можно характеризовать на основании содержания белка в полученном биомате. Например, при том, что естественное содержание белка в плодовом теле грибов вешенок голубых, как

известно, составляет 24,65% (Stamets (2005) Int J Medicinal Mushrooms 7:103-110), биоматы вешенок голубых, выращенные способом авторов изобретения на солодовой среде 001, имели более высокое скорректированное на влажность содержание белка, составляющее 29,82%, увеличенное на 5,71% содержание белка. Еще более поразительно, что содержание белка в плодовых телах дождевика гигантского, как известно, составляет 27,3% (Agrahar-Murugkar and Subbulakshmi (2005) Food Chem 89:599-603), при этом биоматы дождевика гигантского, выращенные способом авторов изобретения на солодовой среде 001, имели скорректированное на влажность содержание белка, составляющее 32,04%, в то время как выращивание на среде МК7-1 SF приводило к показателю скорректированного на влажность содержания белка, составляющему 46,33%, а выращивание на солодовой среде 001+NH₄NO₃ приводило к показателю скорректированного на влажность содержания белка, составляющему 46,88%, в сущности, увеличение содержания белка составляло 19,85% относительно данных, полученных Agrahar-Murugkar и Subbulakshmi.

Сбор биоматов, как правило, происходит через 2-3 дня роста, хотя в некоторых случаях желательно использовать более длительные периоды роста, например, когда желательны/необходимы более толстые или плотные биоматы. Например, может быть желательно использовать периоды роста 3,5-4 дня, 3-5 дней, 4-6 дней, 5-7 дней, 6-9 дней, 7-10 дней, 19-21 дней, или даже вплоть до 2 месяцев. Из-за целостной структуры нитчатых биоматов, выращиваемых в условиях поверхностной ферментации, описанных в РСТ/US2017/020050 и в настоящем документе, нитчатые биоматы имеют достаточную прочность на разрыв, чтобы оставаться практически интактными при подъеме их с поверхности среды в конце периода роста. В Таблице 1 приведены некоторые примеры измеренной прочности на разрыв.

Таблица 1. Средние показатели прочности на разрыв некоторых биоматов нитчатых грибов

Организм	Источник С	Толщина (см)	Ширина (см)	Средняя масса для разрыва (г)	Средняя прочность на разрыв (г/см²)
Дождевик гигантский	Солодовая среда	0,13	1,2	47,12	314,13
	Глицерин	0,10-1,3	1,2	29,05	214,85
	МК7-1SF	0,25-0,35	0,65-0,8	30,67	263,98
	Солодовая среда+NH ₄ NO ₃	0,09-0,10	0,9-1,1	27	281,15
Грибная	Солодовая	0,15-2,0	1,0-1,2	101,05	507,38

капуста	среда				
	Глицерин	0,09-0,20	1,2	202,17	242,91
Рейши	Солодовая среда	0,5	1,0-1,2	101,05	1854,54
Вешенка голубая	Солодовая среда	0,5	1,2	43,40	72,74
	Глицерин	0,4	1,3	19,04	37,27
Вешенка обыкновенная	Солодовая среда	0,5	1,0-1,2	56,7	98,96
Вешенка ильмовая	Солодовая среда	0,35	1,2	50,28	143,67
F. oxysporum штамма МК7	Глицерин	0,5-0,8	1,0	>742	>570

Поверхностную ферментацию можно проводить в разных условиях, включая условия статической среды (описанные в РСТ/US2017/020050), условия полу-статической среды и условия непрерывного потока среды.

Выращивание в условиях полу-статической среды означает, что по меньшей мере часть среды заменяют до сбора биомата нитчатых грибов. Эти условия допускают линейное производство сухой биомассы со дня 4 до дня 18 ($r^2=0,995$), после чего вес биомассы стабилизируется на уровне примерно 2,5 кг сухого веса/м².

Биоматы также можно получать в условиях проточной среды, где рост биоматов происходит на поверхности ростовой среды, при этом среда под слоем биомата непрерывно обновляется или полу-непрерывно обновляется.

Однако в некоторых случаях желательно собирать растущий биомат на полу-непрерывной основе. В этой ситуации происходит удаление некоторой части биомата, и оставшуюся часть затем физически перемещают в открытую зону среды, возникающую после удаления части биомата. Это можно осуществлять путем физического захвата биомата и перемещения его до того момента, когда он начинает касаться конца контейнера для поверхностной ферментации, или за счет использования других механических средств. Полученная открытая зона затем становится доступной для роста нового биомата без этапа разделения или дополнительной инокуляции, поскольку среда уже содержит жизнеспособные грибные клетки. Этот процесс можно повторять периодически, что может быть особенно полезным при обновлении среды или при повторном введении питательных веществ, которые стали ограниченными.

Сбор биоматов также можно проводить на постоянной основе. Постоянное удаление можно облегчать за счет ряда механизмов. Одним из таких примеров является вращающийся цилиндр, соединенный со зрелым концом биомата (смотри Фигуру 7). Вращающийся цилиндр медленно поворачивается и собирает зрелый биомат, в то же

время создавая открытую среду для роста нового биомата на другом конце контейнера для поверхностной ферментации. Типичная скорость сбора составляет 1,56 см/сутки, хотя ее можно изменять в зависимости от конкретных потребностей или по желанию пользователя.

Рост под мембраной в условиях закрытого/герметично укупоренного биореактора включает плотно примыкающую жидкую ростовую среду без паровой фазы над жидкостью в соответствующей системе/контейнере. Соответствующие системы/контейнеры представляют собой, например, лотки, чашки Петри или любой контейнер, имеющий относительно большое отношение площади поверхности к глубине. Газопроницаемые мембраны помещают непосредственно на поверхность жидкой среды, и они плотно прилегают к системе/контейнеру. Соответствующие мембраны включают, например, полипропиленовые мембраны (например, KC100 Kinguard, Kimberly-Clark, Roswell, GA), полиэфирные мембраны, поликарбонатные мембраны, силиконовые мембраны, полиамидные мембраны, целлюлозные мембраны и керамические мембраны, в числе прочих. Газообмен между растущими биоматами и окружающей атмосферой происходит исключительно через полупроницаемую мембрану.

В некоторых случаях УФВ свет (290-320 нм) может инициировать продуцирование пигмента нитчатыми грибами, например, в случае *Fusarium oxysporum* штамма МК7 продуцирование пигментированного биомата. Помимо изменения цвета, которое может быть полезным для создания различных пищевых эффектов, обработка УФВ превращает эргостерол, присутствующий в мембранах грибных клеток, в витамин D2 и приводит к увеличению продуцирования каротиноидов, таких как бета-каротин и астаксантин. Следовательно, облучение нитчатых грибов, таких как *Fusarium oxysporum* штамма МК7, УФВ можно использовать для увеличения содержания витамина D2 и каротиноидов в полученных биоматах.

В некоторых случаях образовавшиеся биоматы нитчатых грибов состоят из слоев клеток, однородных по внешнему виду, одна из поверхностей нитчатого биомата находится в контакте с воздухом, и одна поверхность в контакте с синтетической средой. В других случаях по меньшей мере присутствуют два отдельных слоя: слой воздушных гиф на верхней поверхности и плотный многоклеточный нижний слой, контактирующий с синтетической средой. Часто присутствуют три отдельных слоя: (а) слой воздушных гиф на верхней поверхности, (b) плотный нижний слой и (с) переходный слой между верхним и нижним слоями. Переходный слой может быть лишь слабо прикреплен к плотному нижнему слою, что позволяет легко отделять нижний слой от остального биомата. Плотность нитей в переходном слое находится в диапазоне от слегка менее плотного, чем нижний слой в зоне контакта двух слоев, до плотности, которая сопоставима с плотностью воздушных гиф возле верхней поверхности биомата.

Инактивация биоматов нитчатых грибов

Процесс инактивации начинают с биоматами, собранными по меньшей мере через 2 дня после культивирования. При том, что биоматы можно промывать для удаления

избытка ростовой среды, промывать биоматы необязательно, хотя в некоторых случаях предпочтительно удалять ростовую среду или избыток ростовой среды. Аналогично, биоматы можно отжимать для удаления избытка ростовой среды, опять-таки, это не обязательно, но может быть предпочтительным для некоторых вариантов применения.

Лишение клеток жизнеспособности и потенциала для дальнейшего роста биомата является желательной в некоторых случаях, например, в случае использования биомата в качестве отдельного источника белка или белкового ингредиента в пищевых продуктах. Это можно осуществлять путем нагревания, облучения и/или обработки паром.

В случае нагревания биоматы нитчатых грибов можно обрабатывать в соответствии с WO 95/23843 или британским патентом № 1440642, например, или инкубировать при температурах, которые разрушают подавляющее большинство РНК организма без отрицательного воздействия на белковый состав организма.

В случае облучения биоматы нитчатых грибов подвергают воздействию ионизирующей энергии, такой как производимая изотопами ^{60}Co (или в редких случаях ^{137}Cs), рентгеновских лучей, производимых устройствами, работающими при уровне ниже номинальной энергии 5 МэВ, и ускоренных электронов, производимых устройствами, работающими при уровне ниже номинальной энергии 10 МэВ.

Обработка паром является предпочтительным способом инактивации некоторых биоматов нитчатых грибов, таких как те, которые производятся *Fusarium oxysporum* штамма МК7 и *F. venenatum*, поскольку обработка паром позволяет также удалять некоторые специфические метаболиты из конструкта биомата, если эти метаболиты производятся. В данном случае биоматы размещают так, что выделяемая из биоматов жидкость и конденсированный пар могут легко стекать каплями с биоматов. Подходящие поддерживающие биоматы системы включают пористую пластиковую сетку и пористые лотки. Другие поддерживающие биоматы системы включают, но без ограничения, системы, которые удерживают биомат в вертикальном положении, такие как системы с зажимным механизмом, который зажимает по меньшей мере один конец биомата, в то время как остальные концы биомата свисают с указанного зажима, и сетчатые системы, которые зажимают по меньшей мере две стороны биомата, в числе прочих.

Биоматы размещают в аппарате для обработки паром таким образом, что нагретый пар, например, пар с температурой выше 85°C , например, 95°C , вступает в контакт с биоматами. В тех случаях, когда несколько лотков размещают в одном аппарате для обработки паром, например, один лоток над другим, предпочтительно защищать расположенный ниже биомат от капель с расположенного выше биомата. Защита должна быть в такой форме, которая позволяет пару контактировать с биоматами, тем самым дезактивируя жизнеспособность биомата, и в то же время отклонять выделяемые из биомата жидкости и конденсированный пар, производимый на высоком уровне в аппарате, от соприкосновения с биоматами, расположенными на более низком уровне в аппарате для обработки паром. В одном варианте осуществления для достижения такого результата между верхним лотком и нижним лотком размещают конус. В других

вариантах осуществления разделение между верхним и нижним лотками также включает по меньшей мере одно устройство другой геометрической формы, такой как цилиндр, куб и/или параллелепипед, пирамида, сфера, тор и/или другие платоновы тела. В другом варианте осуществления лотки разделяют при помощи по меньшей мере одного цилиндра, куба и/или параллелепипеда, пирамиды, сферы, тора, другого платонова тела, или их сочетания.

Биоматы обрабатывают паром по меньшей мере до такой степени, когда жизнеспособность биоматов уменьшается настолько, что дальнейший рост биоматов и/или воспроизведение клеток в биоматах становится пренебрежительно малым. Жизнеспособность биоматов зависит от исходного субстрата, развития биомата, характеристик пара/переноса тепла, положения биомата в аппарате для обработки паром и ориентации биомата относительно выделяющегося пара. В качестве примера, биоматы *Fusarium oxysporum* штамма МК7, растущие на субстрате с глицерином или кислой сывороткой, становятся нежизнеспособными через 5 минут, и в некоторых случаях менее, чем через 5 минут, обработки паром. Обработанные паром биоматы можно промывать и/или отжимать для удаления выделений из биомата и конденсированного пара.

Инактивированные съедобные биоматы нитчатых грибов можно использовать непосредственно в качестве источника белка, например, в приготовлении пищевых продуктов, в значительной степени сравнимых с тофу, беконом и вяленым мясом, в числе прочих.

Инактивированные съедобные биоматы нитчатых грибов также можно измельчать для использования в качестве источника белка в пищевых продуктах. Измельчение можно производить при помощи механических средств, например, путем нарезания, измельчения, нарезания кубиками, пропускания через мясорубку, размалывания, гомогенизации и так далее, или за счет обработки ультразвуком, и его производят до смешивания с другими ингредиентами или жидкостями. Измельченные частицы могут иметь одинаковые или разные размеры. Как правило, длина измельченных частиц составляет 0,05-500 мм, ширина составляет 0,03-7 мм, и высота составляет 0,03-1,0 мм. Например, частицы в виде муки, как правило, имеют размеры в диапазоне от 0,03 мм до 0,4 мм, частицы в виде кусочков вяленого мяса имеют размеры в диапазоне от 100 мм до 500, и так далее. Могут быть получены частицы большего размера; при выращивании биомата в надувных бассейнах (диаметром 66 дюймов) был получен один биомат диаметром 66 дюймов и абсолютно круглый. Можно использовать емкости большего размера для выращивания биоматов еще большего размера.

Число измельченных частиц, получаемых из каждого биомата, зависит от исходного размера биомата и от цели, для которой будут использованы измельченные частицы биомата.

В зависимости от пищевого продукта измельченные частицы имеют среднюю длину неповрежденных нитей по меньшей мере 0,1 мм, например, 0,1 мм - 2,0 мм, 0,5 мм - 10 см, 0,5 мм - 30 см, 0,8 мм - 25 см, 1,0 мм - 20 см, 1,4 мм - 15 см, 1,6 мм - 10 см, 1,7 мм -

8 см, 1,8 мм - 6 см, 2,5 мм - 4 см, 5 мм - 2 см, 0,5- 2,5 мм, 0,5-1,8 мм, 0,5-1,7 мм, 0,5-1,6 мм, 0,5-1,4 мм, 0,5-1,0 мм, 0,5-0,8 мм, 0,5-0,6 мм, 0,6-2,5 мм, 0,6-1,8 мм, 0,6-1,7 мм, 0,6-1,6 мм, 0,6-1,4 мм, 0,6-1,0 мм, 0,6-0,8 мм, 0,8- 2,5 мм, 0,8-1,8 мм, 0,8-1,7 мм, 0,8-1,6 мм, 0,8-1,4 мм, 0,8-1,0 мм, 1,0-2,5 мм, 1,0-1,8 мм, 1,0-1,7 мм, 1,0-1,6 мм, 1,0-1,4 мм, 1,4-2,5 мм, 1,4-1,8 мм, 1,4-1,7 мм, 1,4-1,6 мм, 1,6-2,5 мм, 1,6-1,8 мм, 1,6-1,7 мм, 1,7-2,5 мм, 1,7-1,8 мм или 1,8-2,5 мм, а также с большим распределением по размерам, например, 0,1-1,0 см, 0,5-2,0 см, 1,0-5,0 см, 2,0-7,0 см, 5,0-10,0 см, 7,0-20 см, 10,0-50,0 см и 15,0-100,0 см.

Измельченные частицы биоматов нитчатых грибов также содержат разорванные нити и, в некоторых случаях, в основном присутствуют разорванные нити, например, 100% разорванных нитей, 99% разорванных нитей, 98% разорванных нитей, 97% разорванных нитей, 96% разорванных нитей и 95% разорванных нитей. Опять-таки, размер разорванных нитей выбирают для конечного получаемого пищевого продукта. Средняя длина разорванных нитей может составлять по меньшей мере 0,01 мм, например, 0,01-0,10 мм, 0,05-0,20 мм, 0,1-1,0 мм, 0,50-2,5 мм, 1,0-5,0 мм, 2,0-10,0 мм, 5,0 мм - 15,0 мм, 10,0 мм - 1,0 см, 1,0 см - 5,0 см, 5,0 см - 10,0 см, 0,3 мм - 30 см, 0,8 мм - 25 см, 1,0 мм - 20 см, 1,4 мм - 15 см, 1,6 мм - 10 см, 1,7 мм - 8 см, 1,8 мм - 6 см, 2,5 мм - 4 см, 5 мм - 2 см, 0,3- 2,0 мм, 0,3-1,8 мм, 0,3-1,7 мм, 0,3-1,6 мм, 0,3-1,4 мм, 0,3-1,0 мм, 0,3-0,8 мм, 0,3-0,6 мм, 0,3-0,5 мм, 0,6-2,5 мм, 0,6-1,8 мм, 0,6-1,7 мм, 0,6-1,6 мм, 0,6-1,4 мм, 0,6-1,0 мм, 0,6-0,8 мм, 0,8-2,5 мм, 0,8-1,8 мм, 0,8-1,7 мм, 0,8-1,6 мм, 0,8-1,4 мм, 0,8-1,0 мм, 1,0-2,5 мм, 1,0-1,8 мм, 1,0-1,7 мм, 1,0-1,6 мм, 1,0-1,4 мм, 1,4-2,5 мм, 1,4-1,8 мм, 1,4-1,7 мм, 1,4-1,6 мм, 1,6-2,5 мм, 1,6-1,8 мм, 1,6-1,7 мм, 1,7-2,5 мм, 1,7-1,8 мм или 1,8-2,5 мм.

В некоторых случаях средняя длина разорванных нитей в измельченных частицах биоматов нитчатых грибов составляет менее 1 мкм, например, менее 950 нм, менее 900 нм, менее 850 нм, менее 800 нм, менее 750 нм, менее 700 нм, менее 650 нм, менее 600 нм, менее 550 нм, менее 500 нм или менее 400 нм.

Измельченные частицы биоматов нитчатых грибов могут быть добавлены в качестве источника белка для повышения содержания белка в пищевом продукте, или могут представлять собой единственный белковый компонент. Для пищевых продуктов, полностью состоящих из биоматов нитчатых грибов, измельченные частицы могут быть оптимизированы в отношении текстуры частиц, вкусовых ощущений и разжевываемости. Например, пищевой продукт из биомата нитчатых грибов, формованный и приправленный для сходства с гамбургером, может иметь 90% частиц с длиной менее 1,5 мм, и большинство с длиной 1 мм или менее, шириной менее 1 мм и толщиной менее 0,75 мм. Для пищевого продукта такого типа характерна ощущаемая более высокая плотность во рту, его легче пережевывать, он создает во рту сливочный вкус и впечатление более изысканной еды. Интенсивно обработанные частицы биомата сравнивали с гамбургером такого типа, который подают в изысканных ресторанах. Для более плотной консистенции продукта, аналогичной консистенции таких гамбургеров, которые обычно подают в заведениях, предлагающих гамбургеры или барбекю, 90% частиц имеют длину от 4 мм до 10 мм, ширину от 1,0 мм до 3 мм, и толщину менее 0,75 мм. Возможность изменять

текстуру, вкусовые ощущения и разжевываемость позволяет адаптировать продукт для разных индивидуумов, имеющих конкретные пищевые потребности, например, для тех, кто испытывает трудности при жевании, или кому необходима/желательна более мягкая пища, но обладающая такими же питательными и вкусовыми свойствами, или для тех, кто предпочитает еду с более выраженной текстурой, более выраженным вкусом и нуждающуюся в большем разжевывании. За счет возможности легко контролировать размер частиц пищевые продукты с добавлением биоматов нитчатых грибов, или изготовленные исключительно из биоматов нитчатых грибов, имеют текстуру, очень близкую к стандартным белковым пищевым продуктам, которые они имитируют, как видно из Таблицы 2.

Таблица 2 - Результаты, полученные с использованием анализатора текстуры Stable Micro Systems TA XT plus

Пищевой продукт	Средняя максимальная твердость	Средняя площадь (г/мм)	Средняя масса (г)	Параметры
Рыбная палочка				Скорость до теста: 2,00 мм/сек; Скорость во время теста: 4,00 мм/сек Скорость после теста: 10,00 мм/сек Целевой режим: расстояние Сила: 100,0 г Расстояние: 20,000 мм Деформация: 10,0% Тип триггера: Авто (сила) Сила триггера: 5,0 г Зонд: HDP/WBV Лезвие Warner Bratzler V Slot Blade
Стандартная рыбная палочка	3654 ± 1774	17868 ± 5674	894 ± 284	
Рыбная палочка из МК7	1618 ± 180	19990 ± 610	1000 ± 100	
Куриный наггет				
Стандартный куриный наггет	3838 ± 56,8	27329 ± 3663	1367 ± 183	
Куриный наггет из заменителя мяса	4013 ± 1066,3	27751 ± 1346,4	1415 ± 111,4	
Из мелких частиц МК7	3127 ± 19,7	33065 ± 3458	1654 ± 173	
Из средних частиц МК7	2514 ± 663	27217 ± 6437	1361 ± 322	

Из крупных частиц МК7	3461 ± 77,8	34591 ± 2971,2	1730 ± 14,6	
Гамбургер				
100% говяжий гамбургер	4326 ± 714	12350 ± 46,1	1727 ± 14,1	
90% говядины, 10% МК7	5011	14048	1929	
80% говядины, 20% МК7	2615 ± 199	10641 ± 511	1456 ± 46	
70% говядины, 30% МК7	2240 ± 262	9859 ± 2947	1291 ± 300	
60% говядины, 40% МК7	2094 ± 156	8118 ± 1088	1155 ± 180	
100% МК7, измельченного (интенсивно обработанного)	2228 ± 1988	5079 ± 964	1089 ± 70,6	
Пищевой продукт	Плотность (г)			
Шоколадный мусс				Скорость до теста: 1,00 мм/сек
Шоколадный мусс Nestle	182,45			Скорость во время теста: 1,00 мм/сек
Шоколадный мусс из МК7	135,09			Скорость после теста: 10,00 мм/сек Целевой режим: расстояние Т.А. Переменная №: 5: 0,0 г Расстояние: 10,000 мм Деформация: 10,0% Тип триггера: Авто (сила) Сила триггера: 5,0 г Зонд: P/25; 25 мм DIA

				Алюминиевый цилиндр
--	--	--	--	---------------------

Примерами пищевых продуктов, которые можно получать с использованием лишь измельченного биомата нитчатых грибов, с добавлением или без добавления вкусо-ароматических добавок, и/или которые можно усиливать за счет измельченного биомата, являются мясные продукты (например, фарш из говядины, фарш из курицы, фарш из индейки, куриные наггеты, рыбные палочки или пирожки, вяленое мясо), закуски (например, чипсы), супы, смузи, напитки, аналоги молока, хлеб, паста, лапша, пельмени, выпечка (например, заварное тесто), печенье, пирожные, пироги, десерты, замороженные десерты, аналоги мороженого, йогурт, кондитерские изделия и конфеты.

Пищевые продукты, усиленные измельченным биоматом нитчатых грибов, могут иметь значительно повышенное содержание белка, что особенно важно для лиц, придерживающихся веганской диеты. Например, при добавлении в чашку супа (227 г) 68,1 г жидкой дисперсии МК7 (то есть 1 часть МК7 на 3 части воды) добавляется 8,5 г белка, и при добавлении в тарелку супа (340 г) 136 г жидкой дисперсии МК7 добавляется 17 г белка. Использование жидкой дисперсии МК7 в качестве основного ингредиента, например, в веганских супах, напитках, смузи и так далее, приводит к дополнительному увеличению содержания белка в этих пищевых продуктах. Изменение соотношения МК7 и воды в свою очередь приведет к изменению степени содержания белка.

Используют ли измельченный биомат для увеличения содержания белка в пищевых продуктах, или используют его в качестве единственного белкового компонента, в некоторых случаях связывающие вещества являются полезными для достижения желаемой текстуры. Предусмотрены одобренные для использования в пищевых продуктах связывающие вещества, такие как яичный альбумин, глютен, мука из нута, вегетарианские связывающие вещества, крахмал из кассавы, желатин, пектин, гуаровая камедь, каррагинан, ксантановая смола, сыворотка, бульон нута, измельченное льняное семя, заменитель яиц, мука, семена чиа, псилиум и так далее, которые можно использовать отдельно или в сочетании. Помимо связывающих веществ для пищевых продуктов измельченный биомат нитчатых грибов также можно смешивать с одобренными вкусо-ароматическими добавками, специями, усилителями вкуса, жирами, заменителями жиров, консервантами, подсластителями, красителями, питательными веществами, эмульгаторами, стабилизаторами, загустителями, контролирующими рН средствами, подкислителями, разрыхлителями, средствами, предотвращающими слеживание, увлажнителями, дрожжевыми питательными веществами, загустителями теста, улучшителями теста, отвердителями, ферментными препаратами, газами, а также их сочетаниями. Как правило, связывающие вещества, вкусо-ароматические добавки, специи, и так далее, выбирают в соответствии с потребностями конкретной популяции. Например, молоко и/или сухие вещества молока не используют для людей, страдающих аллергией/чувствительностью к молоку, пшеничную муку нельзя использовать для людей, страдающих аллергией/чувствительностью к глютену, и так далее.

В некоторых вариантах применения измельченный биомат нитчатых грибов

используют в пищевых продуктах, которые имитируют куриные наггеты, мясо индейки, свинину, рыбу, гамбургеры, колбасы, вяленое мясо, бекон и тому подобное. В данном случае можно использовать биомат нитчатых грибов с измельченными частицами одного размера или частицами разных размеров. Аналогично, измельченные частицы могут быть из одного источника биомата нитчатых грибов или из сочетания разных источников биоматов нитчатых грибов; например, из биоматов только МК7 или МК7+дождевика гигантского.

В некоторых вариантах применения измельченный биомат нитчатых грибов сушат, измельчают до частиц достаточно небольшого размера и используют в качестве муки для изготовления выпечки с повышенным содержанием белка, такой как хлеб, рулеты, кексы, пирожные, печенье, пироги и так далее.

В одном аспекте для введения белка в пищевой продукт используют жидкую дисперсию, полученную из биомата нитчатых грибов, в качестве ингредиента, заменяющего молоко или аналог молока. Жидкую дисперсию можно использовать в целом ряде рецептов, включая супы, мороженое, йогурт, смузи, помадки и конфеты, такие как карамель и трюфель. В некоторых случаях при использовании биоматов нитчатых грибов, полученных из разных сырьевых материалов/источников углерода, получают жидкие дисперсии, имеющие разные вкусо-ароматические свойства. Например, когда сырьевым материалом/источником углерода является глицерин, конечная жидкая дисперсия, полученная из *Fusarium oxysporum* штамма МК7, является более сладкой, в то время как жидкая дисперсия, полученная из *Fusarium oxysporum* штамма МК7, растущего на сырьевом материале/источнике углерода, который представляет собой кислую сыворотку, как правило, является более кислой. Естественная сладость или кислотность нитчатого гриба, например, *Fusarium oxysporum* штамма МК7, передается конечному пищевому продукту. Например, жидкие дисперсии после выращивания на кислой сыворотке подходят для йогурта, в то же время жидкие дисперсии после выращивания на глицерине подходят для мусса, карамели или помадок.

Соотношение биомат нитчатых грибов: вода можно корректировать для получения жидкой дисперсии соответствующей консистенции и плотности. Соотношения могут составлять от 1:2 до 10:1, с предпочтительными соотношениями, составляющими 1:3, 1:4 и 7:3. Например, коэффициент относительной плотности 1:3 подходит для аналогов мороженого, напитков и йогурта.

В некоторых случаях биомат нитчатых грибов можно использовать в качестве источника масла, например, трюфельного масла, получаемого в результате поверхностной ферментации биоматов съедобных грибов *Tuber* sp.

Использование нитчатых грибов в качестве ценных микробиологических фабрик известно давно, но обычно требовало значительной инфраструктуры и/или оборудования, энергетических затрат, дорогих реагентов и/или значительных людских ресурсов. Хорошо известно, что нитчатые грибы отличаются наибольшим метаболическим разнообразием из всех микроорганизмов на планете, включая способность продуцировать широкий спектр

органических кислот, антибиотиков, ферментов, гормонов, липидов, микотоксинов, витаминов, органических кислот, пигментов и рекомбинантных гетерологичных белков (Wiebi (2002) *Muco-protein from Fusarium venenatum: a well-established product for human consumption. Appl Microbiol Biotechnol* 58, 421-427; El-Enshasy (2007) Chapter 9 - *Filamentous Fungal Cultures - Process Characteristics, Products, and Applications. B: Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Редактор: Shang-Tian Yang. Elsevier*; Gibbs et al. (2000) *Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. Crit. Rev. Biotechnol.* 20, 17-48), а также способностью разлагать многие виды трудноразагаемых материалов, таких как лигноцеллюлоза и гуминовые вещества в почве.

При широком использовании глубинной ферментации, тем не менее, все еще существуют серьезные производственные сложности, которые включают такие важные факторы, как ограничение роста вследствие ограниченной доступности кислорода и значительные силы сдвига, создаваемые при перемешивании (Gibbs et al. (2000) *Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. Crit. Rev. Biotechnol.* 20, 17-48). Поскольку растворимость в воде кислорода в условиях, существующих на поверхности Земли, составляет примерно 8 мг/л, он легко истощается при быстром росте погруженных культур. Таким образом, необходима постоянная аэрация с использованием сложных, дорогих и энергозатратных систем аэрации и перемешивания для поддержания высоких скоростей роста. Культивирование нитчатых грибов является даже более сложным, поскольку нитчатая морфология является причиной неньютоновского реологического поведения, которое дополнительно подавляет перенос кислорода в раствор (Nørregaard et al. (2014) *Filamentous Fungi Fermentation. B: Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells, H.-P. Meyer, and D.R. Schmidhalter, eds. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 130-162*). По мере увеличения плотности культуры количество энергии, необходимое для аэрации и перемешивания культур, возрастает нелинейно, кроме того, потребности в энергии для аэрации плотных культур очень высоки. Для многих видов нитчатых грибов интенсивное перемешивание и аэрация культур становятся вредными для роста грибов и, как следствие, резко снижается скорость роста. Эти и другие проблемы, связанные с глубинной ферментацией нитчатых микроорганизмов, требуют инновационных решений для эффективного использования этих организмов при ограниченных ресурсах, доступных в космическом корабле и на внеземных станциях.

Описанная в настоящем документе закрытая реакторная система (1) решает эти проблемы и имеет следующие преимущества:

- Отсутствие необходимости в активной аэрации или перемешивании жидкой культуры
- *In situ* агрегация биомассы в один цельный слой со значительной прочностью на разрыв ($>0,1$ кг/см ширины биомата), что позволяет с легкостью собирать продукт.
- Текстурированные биоматы можно использовать для широкого спектра

критически важных в экспедиции продуктов (то есть пищи, биопластика, биотоплива, пищевых добавок, а также в качестве экспрессионной платформы для производства различных фармацевтических средств).

- Минимальное использование воды, а также минимальное количество и/или отсутствие остаточных сточных вод или питательных веществ после процесса, при этом поддержание высокого продуцирования биомассы (80-120 г/м²/д или 0,55 г/л/ч).

- Скорости роста могут позволять получать полностью сформированные биоматы всего через 2 дня, или рост может быть продлен до более чем 10 дней.

- Высокая плотность биомассы (у биоматов, как правило, составляет, 100-180 г/л)

- Можно выращивать различные нитчатые грибы (включая экстремофилы) с определенными преимуществами для разных способов.

- Масштабирование в большую или меньшую сторону является относительно простым и не приводит к уменьшению продуктивности.

- В способе можно использовать в качестве субстратов очень широкое разнообразие C и N-богатых отходов, возникающих при естественных стихийных бедствиях и/или космических экспедициях.

Описанная закрытая реакторная система (1) включает автономный реактор «биоупленка-биомат», включающий контейнер и помещенный в контейнер сырьевой материал, грибной инокулят, газопроницаемую мембрану (2) и, необязательно, жидкую питательную среду. В зависимости от обстоятельств реактор может представлять собой реактор одноразового использования или реактор многократного использования.

Как правило, контейнер может быть закрыт и может включать футляр для контейнера, помимо крышки. Некоторыми примерами контейнеров являются закрытый лоток, закрытая чашка Петри, другой вид закрытого контейнера или мешок. Для некоторых вариантов применения или в некоторых условиях контейнер имеет несколько ростовых камер, например, имеет коллекторную конструкцию и/или систему перегородок. Для максимальной эффективности в некоторых условиях окружающей среды контейнер создают из одного или более сырьевых материалов; они могут быть, или не быть, идентичными сырьевому материалу, помещенному в контейнер.

Сырьевой материал инокулируют штаммом грибов, таким как штамм грибов аскомицетов или базидиомицетов. Примерами штаммов аскомицетов являются *Fusarium oxysporum* штамма МК7 (ATCC PTA-10698, депонированный в Американской коллекции типовых культур, 1081 University Boulevard, Manassas, Virginia, USA), *Fusarium venenatum*, *Fusarium avenaceum* и/или их сочетания. Инокуляцию сырьевого материала можно производить в момент, когда сырьевой материал помещают в контейнер, или можно производить через некоторое время после размещения сырьевого материала. То есть, закрытый реактор (1) можно предварительно покрывать лиофилизированным инокулятом нитчатых грибов, который активизируется при контакте с сырьевым материалом, или сырьевой материал может быть непосредственно инокулирован после помещения его в желоб(а) закрытого реактора (4), или сырьевой материал может быть инокулирован, а

затем помещен в желоб(а) закрытого реактора.

Что касается сырьевого материала, используемого в реакторе, он может представлять собой отходы, такие как естественная моча и/или фекалии, пищевые отходы, растительный материал, промышленные отходы, такие как глицерин и ненужные побочные продукты, крахмал и/или побочные продукты гидролиза крахмала, кислую сыворотку, сахарный спирт и/или их сочетания. Также можно использовать синтезированные или произведенные суррогатные отходы, такие как суррогатная человеческая моча. Растительные сырьевые материалы, как правило, представляют собой лигноцеллюлозу. Некоторыми примерами лигноцеллюлозного сырьевого материала являются остатки сельскохозяйственных культур (например, пшеничная солома, ячменная солома, рисовая солома, солома мелкозерновых культур, кукурузная солома, кукурузные волокна (например, камедь кукурузных волокон (CFG), дистиллированное сухое зерно (DDG), кукурузная глютенная мука (CGM)), просо, жом сахарной свеклы, потоки отходов от производства пальмового масла, сено люцерны, жом сахарного тростника), не сельскохозяйственная биомасса (например, биомасса водорослей, биомасса цианобактерий, остатки растущих в городах деревьев), лесоматериалы и промышленные отходы (такие как отходы первичного/вторичного распила деревьев мягких пород, отходы первичного/вторичного распила деревьев твердых пород, шлам вторичной бумажной массы), содержащие лигноцеллюлозу отходы (например, газетная бумага, макулатура), зерновые отходы пивоварения, использованные резиновые шины (URT), муниципальные органические отходы, садовые отходы, клинические органические отходы и побочные продукты, отходы и побочные продукты, образующиеся при производстве биотоплива (например, обработанная биомасса водорослей, глицерин), а также их сочетания.

Газопроницаемая мембрана(ы) (2) позволяет оптимизировать систему несколькими различными путями, которые проиллюстрированы на Фигурах 19-22. Хотя закрытая реакторная система, показанная на Фигурах, имеет всего девять желобов (4), квалифицированный специалист понимает, что можно использовать любое количество желобов (4), от одного желоба (4) до множества желобов (4), в зависимости от пространства, доступного для размещения закрытого реактора (1). Аналогично, форма желобов (4) не ограничена прямоугольными призмами или цилиндрами, и может представлять собой любую форму, подходящую для закрытого реактора (1).

В некоторых случаях мембрану (2) помещают в прямом контакте с поверхностью сырьевого материала, необязательно, жидкой среды, и инокулят находится в контейнере, как показано на Фигуре 16. Мембрана также может плотно прилегать к поверхности сырьевого материала, например, за счет прикрепления ее к пластиковой раме со встроенной резиновой прокладкой.

В других случаях мембрана подвешена над сырьевым материалом так, что по мере того, как гриб растет и потребляет кислород, мембрана опускается вниз к биомату или на систему перегородок, расположенную между мембраной и сырьевым материалом, что позволяет расти воздушным гифам. Такая система показана на Фигуре 19. В этом случае

закрытый реактор (1) состоит из нескольких желобов (4), которые начинаются от входного клапана (6) в передней части (7) реактора, заканчиваются у выходного клапана (8) в задней части (5) реактора, и разделены перегородками/стенками (9). Газопроницаемая мембрана (2) образует верхнюю часть реактора. Дно (3) реактора может быть выполнено из любого подходящего вещества, включая, но без ограничения, как твердый, так и мягкий, пластик, такой как полиэтилентерефталат, полиэтилен высокой плотности, поливинилхлорид, полимолочная кислота, поликарбонат, акрил, ацеталь, нейлон, акрилонитрил-бутадиен-стирол, стекло, металлы, такие как алюминий, титан, нержавеющая сталь и так далее, и/или их сочетания. Перегородки/стенки (9) могут быть выполнены из аналогичных материалов. Подходящие передние (6) и задние (8) клапаны включают, но без ограничения, односторонние клапаны, 2-ходовые клапаны, сферические клапаны, двухстворчатые клапаны, запорные клапаны, пробковые клапаны, шаровые клапаны, пережимные клапаны, обратные клапаны с наклонным седлом, прикрепленные клапаны, отсоединяемые клапаны, и/или их сочетания. Входной клапан (6) служит для обеспечения доступа в камеру (4) с целью доставки сырьевого материала/среды в камеру, в то время как выходной клапан (8) позволяет удалять отработанный сырьевой материал и/или биомат нитчатых грибов. Газопроницаемая мембрана (2) может состоять из полимерного материала, такого как полипропилен, полиэтилен, политетрафторэтилен, поликарбонат, полиамид, полипирролоны, поли(амидоамин) дендримерный композит, ацетат целлюлозы, бутадиен-акрилонитрил, тефлон AF2400 и нейлон. При том, что размер пор газопроницаемой мембраны (2), как правило, находится в диапазоне 0,05-1,5 мкм, например, 0,2 мкм, 0,45 мкм и 1,0 мкм, мембрана (2) может иметь форму стерильного похожего на марлю материала или форму похожего на бумагу материала. В некоторых вариантах осуществления поверхность имеет гладкую текстуру, в других - поверхность имеет шероховатую текстуру. Кроме того, путь для диффузии газа может быть от практически прямого до более извилистого.

В других ситуациях мембрана способствует поступлению кислорода и выходу других газов, образующихся в процессе роста грибов (Фигура 18). В этой ситуации закрытый реактор (1) имеет газосборную камеру (14), которая находится непосредственно над газопроницаемой мембраной (2) (смотри Фигуру 20). Газосборная камера (14) может быть выполнена из материалов, аналогичных тем, которые используют для стенок/перегородок (9) или для дна (3) реактора; то есть, можно использовать как твердый, так и мягкий, пластик, такой как полиэтилентерефталат, полиэтилен высокой плотности, поливинилхлорид, полимолочная кислота, поликарбонат, акрил, ацеталь, нейлон, акрилонитрил-бутадиен-стирол, стекло, металлы, такие как алюминий, титан, нержавеющая сталь и так далее, и/или их сочетания. Альтернативно, газосборная камера состоит из желобов (15), которые могут являться отражением желобов (4) закрытого реактора (1), или которые включают более одного желоба закрытого реактора (20) (смотри Фигуру 21).

В других системах используют отдельные газопроницаемые мембраны для

поступления и выхода газов. На Фигуре 22 показана такая система. В этом случае две разные газопроницаемые мембраны (2, 50) подают газ в отдельные газосборные желоба (30, 40) и находятся над одним желобом реактора (4). Система такого типа позволяет подавать, выводить и/или собирать, и/или разделять, отдельные полезные газы. В качестве примера, одна мембрана может быть откалибрована для прохождения кислорода, и вторая мембрана откалибрована для прохождения диоксида углерода или водорода, или других соответствующих газообразных систем.

В реакторе (1) образуется биопленка-биомат, который служит в качестве источника питательных веществ, например, источника белка и/или источника масла. Однако биопленка-биомат также может служить в качестве аналога кожи, биопластика, источником прекурсоров биотоплива, биотоплива и/или их сочетания. В других вариантах осуществления биопленку-биомат используют для получения органических продуктов, таких как органические кислоты, антибиотики, ферменты, гормоны, липиды, микотоксины, витамины, пигменты и рекомбинантные гетерологичные белки.

Описанная технология ферментации в реакторе «биопленка-биомат» позволяет проводить выращивание на стандартных, а также экстремальных, сырьевых материалах и средах, таких как человеческие отходы жизнедеятельности (моча/фекалии), и получать очень плотный и текстурированный продукт, без необходимости в этапе разделения или концентрирования. Относительно высокие скорости производства биомассы (0,55 г/л/ч сухой биомассы) и высокая плотность культур (100-180 г/л) достигаются без необходимости активной аэрации или перемешивания. Масштабирование системы в вертикальном, горизонтальном, и/или более чем в двух измерениях, является простым и не приводит к снижению продуктивности. Полученные биопленки-биоматы, как правило, имеют толщину от 0,2 до 2,5 см, с содержанием сухого вещества, составляющим 10-30%, и могут быть с легкостью использованы для критических нужд экспедиции, например, в качестве альтернативы мясу, множества других аппетитных пищевых продуктов, а также строительных материалов.

Грибные биопленки-биоматы, растущие в описанной реакторной системе, описывают как пленки, которые во многих отношениях напоминают микробные биопленки, растущие на поверхностях, но суспендированы в жидкой культуре на границе раздела газа и жидкости. Например, показано, что бактериальные клетки в биопленках выдерживают экстремальную дезинфицирующую обработку гипохлоритом натрия (хлорной известью) и гидроксидом натрия (Corcoran, 2013). В описанной реакторной системе используют биопленочную структуру, способную расти на грубых человеческих и промышленных отходах, а также побочных продуктах, которые могут быть получены в экстремальных условиях, например, в космических экспедициях или других суровых условиях, вызываемых природными стихийными бедствиями.

Описанная конструкция реактора включает газопроницаемую мембрану, непосредственно прилегающую, или подвешенную над поверхностью жидкости. Конструкция закрытого реактора допускает газообмен с внешней атмосферой, но она

герметично закрыта, предохраняя от проникновения загрязняющих веществ или выхода газов/жидкостей. Конструкция закрытого реактора также позволяет отделять потребляемые газы от выпускаемых газов за счет газопроницаемой мембраны. Для осуществления этого в некоторых случаях клапаны и/или дополнительные пористые мембраны, обладающие такими же, или иными, свойствами, используют для формирования отдельных слоев между различными аспектами одного или более сырьевых материалов и необязательной жидкой культуральной средой.

Быстрый рост биопленки-биомата в реакторе описанной конструкции был продемонстрирован при использовании различных материалов для газопроницаемой мембраны. На Фигуре 17 показан биомат толщиной примерно 7 мм, выращенный в реакторе, где контейнер представлял собой чашку Петри, покрытую полипропиленовой мембраной, лежащей непосредственно на поверхности сырьевого материала/жидкой среды. Начальная биопленка образовалась в непосредственном контакте с мембраной и постепенно росла вниз в жидкую среду (смотри Фигуру 16). По окончании пятидневного периода роста практически весь сырьевой материал/жидкая среда был потреблен, и плотная биомасса заполнила весь объем под мембраной.

Полученный биомат был лишь слабо прикреплен к мембране и был с легкостью собран путем простого отслаивания биомата от мембраны (смотри Фигуру 17 A-D). Дополнительные эксперименты с поликарбонатными мембранами привели к аналогичным результатам (данные не представлены). Таким образом, весь объем реактора может быть эффективно использован для получения плотной, легко собираемой биомассы.

Биопленки-биоматы, обычно получаемые в описанных реакторах, являются плотными (110-180 г/л) и, в зависимости от гриба и условий выращивания, имеют волокнистую текстуру. Производство волокнистой биомассы может быть чрезвычайно важным для создания необходимых в экспедиции продуктов, таких как пищевые продукты, которым необходима текстура для имитации мяса, а также волокнистых материалов, имитирующих кожу и дерево. Плотность биомассы также позволяет с легкостью проводить сбор, без необходимости в этапе концентрирования (например, центрифугирования, фильтрации).

Использование реакторов «биопленка-биомат» в невесомости

Основной физической силой, контролирующей образование и рост биопленки-биомата в описанном реакторе, является прикрепление к мембране. Без связи с конкретной теорией, считается, что на рост в описанном реакторе не будут влиять условия невесомости, имеющие место в космическом полете. Зависимый от гравитации направленный рост или рост, контролируемый физическим смешиванием и потоком, не является подавляющим фактором в данной системе, как это имеет место в условиях гравитации. Предыдущие эксперименты в космосе успешно продемонстрировали рост грибов (Европейское космическое агентство, Экспедиции 25-28, Рост и выживание цветных грибов в космосе (CFS-A)), дополнительно поддерживая уверенность в том, что описанная реакторная система будет функционировать в условиях космического

пространства.

Для космических экспедиций, с целью легкости ввода в действие, лиофилизированный инокулят и ингредиенты, необходимые для поддержания роста на конкретных сырьевых материалах (при необходимости), можно предварительно загружать в реактор. Затем астронавты и космические путешественники могут готовить сырьевой материал, инокулят и любые компоненты среды. Время инкубации зависит от сырьевых материалов, штамма микроорганизма и других параметров роста, таких как pH, температура и содержание воды. Условия инкубации являются простыми, поскольку ферментацию проводят в статических условиях, когда инкубацию в реакторе просто оставляют происходить на месте. Плотные целостные биоматы собирают, просто открывая запорное устройство реактора (например, типа ziplock[®]) и удаляя биоматы.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Выращивание биоматов *Fusarium oxysporum* штамма МК7 и других грибов в реакторах со статическими лотками.

Биоматы нитчатых ацидофильных грибов *Fusarium oxysporum* штамма МК 7, *Ganoderma lucidum* (рейши; Фигура 1А), *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная, Фигура 1В: и вешенка голубая, Фигура 1С), *Sparassis crispa* (грибная капуста; Фигура 1D), *Hypsizyugus ulmarius* (устричный гриб; Фигура 1Е), *Calvatia gigantea* (дождевик гигантский; Фигура 1F) и *Fusarium venenatum* выращивали в реакторах с мелкими статическими лотками, как описано в PCT/US2017/020050.

Пример 2. Выращивание биомата *Fusarium oxysporum* штамма МК7 на ежедневно обновляемой питательной среде (полу-статические условия).

Плотные биоматы *Fusarium oxysporum* штамма МК7 толщиной примерно 3 см выращивали в течение 21 дня на ежедневно обновляемой питательной среде. Биоматы получали с использованием стерильной жидкой среды МК7-1 (описанной в PCT/US2017/020050), содержащей 7,5% глицерина, при pH 3,0 в 12,7×17,8 см лотках из стекла Pyrex[®]. Для начала эксперимента 200 мл питательной среды инокулировали 5% (по объему) культуры *Fusarium oxysporum* штамма МК7 в поздней экспоненциальной фазе роста, как описано ранее в PCT/US2017/020050. 200 мл инокулированной среды добавляли в каждый из трех стерильных лотков, выстланных стерильными грубыми нейлоновыми сетчатыми экранами. Культуры инкубировали непотревоженными в течение 4 дней при комнатной температуре (~22°C), позволяя развиваться начальному слою биомата, который формировался на поверхности жидкости. После 4 дней роста биоматы осторожно вынимали из лотка при помощи нейлоновых сетчатых экранов и наклоняли под углом 45 градусов, позволяя жидкости стекать с биоматов. Биоматы оставляли в данном положении для стекания жидкости до момента, когда менее одной капли жидкости стекало каждые пять секунд. Достаточное стекание, в среднем, занимает примерно 3 минуты. После стекания жидкости биоматы на их экранах помещали в свежие предварительно взвешенные 12,7×17,8 см лотки Pyrex[®], содержащие 200 мл свежей среды МК7-глицерин (описанной в PCT/US2017/020050). Лотки с биоматами повторно взвешивали. Процесс

перенесения биоматов в другой лоток, содержащий свежую среду, повторяли примерно ежедневно еще в течение 17 дней. Отбор образцов из одного из биоматов производили в дни 12, 15 и 21, и определяли содержание влаги в этих биоматах. Среднее содержание влаги в биоматах составляло 17,3% (стандартное отклонение=0,7), и это значение использовали для расчета производства сухой биомассы на всем протяжении эксперимента. Производство сухой биомассы было линейным с дня 4 до дня 18 ($r^2=0,995$), после чего вес биомассы стабилизировался на уровне примерно 2,5 кг сухой массы/м² (Фигура 1, значения на оси у нормированы на м², рост, как правило, является экспоненциальным с дня 0 до дня 4). Средняя скорость роста в течение этого периода времени линейного роста составляла 6,04 г/м²/ч. На Фигуре 2 показан биомат толщиной ~3 см, который сформировался после в общей сложности 21 дня роста с использованием данного способа.

Пример 3. Выращивание биоматов в условиях непрерывного потока.

Была создана биореакторная система с непрерывным потоком для демонстрации роста биоматов на поверхности текучей жидкой среды. Система была изготовлена из прозрачной пластиковой кровельной панели длиной 2,44 м с серией борозд, которые использовали в качестве проточных желобов. (Фигура 3). Концы каждого из желобов были закрыты силиконом (100% силикон, DAP Products Inc., Baltimore, MD), что позволяло жидкости оставаться в желобах. Был создан поток через желоба путем подачи жидкой среды к одному концу желобов через перистальтический насос, при этом жидкость выходила из другого конца желобов через отверстия в нижней части желобов. Вся система пластиковых кровельных панелей была наклонена под углом 1 см на 1 м пробега, чтобы в каждом желобе оставалось примерно 500 мл жидкости, и непрерывный поток зависел от количества жидкости и угла наклона.

Система панелей была продезинфицирована и обернута в Saran[®]-подобную пластиковую пленку для изоляции системы от внешней среды в помещении. Стерильный воздух прокачивали под полиэтиленовой пленкой со скоростью 400 мл/мин, создавая положительное давление в системе. Для инициации формирования биомата до запуска потока добавляли 500-мл объем питательной среды, инокулированной нужным нитчатый грибом, в каждый желоб и оставляли для инкубации в состоянии покоя/статических условиях на 4 дня. Через 4 дня перистальтический насос начал подавать непрерывный импульсный поток в объеме 400 мл/д для «питания» биоматов (ВКЛЮЧЕНИЕ: поток со скоростью 2,016 мл/мин в течение 49 мин, 39 сек; ВЫКЛЮЧЕНИЕ на 5 ч 10 мин 21 сек). Проводили два независимых эксперимента, с использованием в каждом эксперименте двух отдельных проточных желобов в качестве реплик (Фигура 3).

Целостные биоматы собирали после 10 дней роста на питательной среде (4 дня в состоянии покоя/статических условиях, а затем 6 дней в условиях непрерывного потока; Фигура 4). Средний сухой вес произведенной биомассы в среднем составлял 2,38 г на каждую из реплик проточных желобов. В течение периодов непрерывного потока (с дня 4 до дня 10) средние скорости извлечения C и N из проточной жидкой среды растущими

биоматами составляли 11,9 и 1,2 мг/л/ч, соответственно. Скорости извлечения С и N из жидкой среды определяли путем измерения объема жидкости и общего поступления и выведения С и N из биореакторной системы с использованием анализатора общего содержания С и N Costech (ECS 4010, Costech Analytical Technologies, Valencia, CA). Таким образом, система непрерывного потока поддерживала рост биоматов на поверхности. Эксперименты также служили для демонстрации в лабораторных масштабах непрерывной подпитки роста биоматов *Fusarium oxysporum* штамма МК7 и производства целостных биоматов. Следует отметить, что в системе такого типа можно использовать и другие сырьевые материалы, скорости потока, и достигать иных скоростей роста. Например, при использовании 10% глицерина в среде МК7-1 (описанной в РСТ/US2017/020050) при рН 2,8 ожидаемые выходы превышают 40 грамм сухой биомассы в день на м².

Пример 4. Полу-непрерывное и непрерывное производство биоматов *Fusarium oxysporum* штамма МК7.

Плотные биоматы *Fusarium oxysporum* штамма МК7 выращивали и собирали на полу-непрерывной основе в течение 19 дней. Биоматы получали с использованием кислой сыворотки в качестве сырьевого материала/источника углерода с добавлением солей среды МК7-1 в ½ концентрации (описано в РСТ/US2017/020050) при значении рН, доведенном до 4,0. Для начала эксперимента 200 мл питательной среды, инокулированной *Fusarium oxysporum* штамма МК7 (5% по объему) в поздней экспоненциальной фазе роста, добавляли в стерилизованные 12,7×17,8 см лотки из стекла Pyrex[®], которые затем накрывали пленкой Saran[®] и инкубировали при комнатной температуре. После 5 дней роста 1/3 биомата с одного конца лотка удаляли путем отрезания и удаления секции биомата 5,9×12,7 см (Фигура 5А). Затем оставшиеся 2/3 биомата физически перемещали в открытую зону среды, которая возникала в результате удаления 1/3 части биомата. Биомат смещали, физически захватывая пальцами в стерильных перчатках и перемещая биомат до того момента, когда он начинает касаться конца лотка, открывая зону среды без сформированного биомата на другом конце лотка (Фигура 5В). Процесс сбора 1/3 секции наиболее зрелой части биомата, с последующим перемещением оставшихся 2/3 биомата по открывшейся зоне среды, повторяли периодически. 50 мл среды асептически удаляли из лотка каждые 4 дня и заменяли 50 мл свежей стерильной среды (кислая сыворотка с ½ концентрацией МК7-1) для пополнения питательных веществ, удаленных из жидкой среды при удалении биомата. Выход при производстве сухой биомассы с использованием данного способа составлял 0,57 г/день на каждый лоток или 25,2 г/д/м² в дни 5-19 (Фигура 6). Таким образом, была продемонстрирована полу-непрерывная система производства, в которой наиболее зрелый конец биомата собирали со средней скоростью 1,56 см/сутки и инициировали рост свежего биомата в открытой зоне среды на другом конце лотка.

Данная система также подходит для непрерывного сбора и роста биомата, в этом случае непрерывное удаление обеспечивается за счет вращающегося цилиндра, соединенного со зрелым концом биомата (Фигура 7). Вращающийся цилиндр медленно

поворачивается и собирает зрелый биомат, в то же время создавая открытую среду для роста нового биомата на другом конце лотка. Вращающийся цилиндр поворачивается и собирает биомат со скоростью 1,56 см/сутки, воспроизводя полу-непрерывную систему, описанную выше. Желательно пополнять питательные вещества в жидкой среде со скоростью, с которой питательные вещества извлекаются биоматом.

Пример 5. Биореакторы с плотно прилегающей мембраной.

Плотные биоматы *Fusarium oxysporum* штамма МК7 выращивали в жидкой ростовой среде, заключенной в биореакторной системе без паровой фазы над жидкостью. Стерильные чашки Петри (диаметром 55 мм) заполняли до краев 57 мл инокулированной средой МК7-1 (описанной в РСТ/US2017/020050), содержащей 8% глицерина. Газопроницаемые/полупроницаемые мембраны из полипропилена и поликарбоната помещали непосредственно на поверхность жидкой среды и плотно фиксировали резинками. В начале периода роста паровая фаза над жидкостью отсутствовала.

После инокуляции среды и закрытия мембранами биореакторы оставляли непо потревоженными до сбора продукта. На Фигуре 8 показаны биоматы толщиной ~5 мм и ~1 мм гриба *Fusarium oxysporum* штамма МК7, которые росли непосредственно под полипропиленовыми (Фигура 17 А-С) и поликарбонатными (Фигура 17 D) мембранами в течение пяти дней, соответственно. Биоматы слабо прикреплялись к мембранам и могли быть с легкостью собраны простым отслаиванием биоматов с мембран (Фигура 17).

Пример 6: Производство пигментов и витамина D2 при облучении биоматов *Fusarium oxysporum* МК7 УФВ

УФВ свет (290-320 нм) использовали для инициации продуцирования пигмента биоматами *Fusarium oxysporum* штамма МК7. Биоматы *Fusarium oxysporum* штамма МК7, полученные за 3 дня на среде МК7-1 с 7,5% глицерина (описанной в РСТ/US2017/020050), облучали УФВ светом в течение 4 часов. УФВ испускала 50 Вт лампа (Slimline Desert 50 UVB T8 флуоресцентная лампа, 46 см; Zilla, Franklin, WI), помещенная на высоту 10 см над биоматом. Оранжевая пигментация визуально наблюдалась через 0,5 ч облучения и была выраженной через 4 ч облучения (Фигура 9). Кроме того, биоматы, не облученные УФВ светом, имели содержание витамина D2 менее 50 МЕ/100 г биомата, в то время как после воздействия УФВ света в течение примерно 12 часов содержание витамина D2 возрастало до примерно 1,2 миллиона МЕ/100 г биомата.

Пример 7: Биоматы *Fusarium oxysporum* штамма МК7, выращенные на смеси глицерина, крахмала и кукурузного экстракта

Биоматы *Fusarium oxysporum* штамма МК7 получали с использованием смеси глицерина, крахмала, кукурузного экстракта и солей МК7-1 (описанной в РСТ/US2017/020050) всего за 4 дня. Глицерин приобретали у компании Duda Energy LLC (Decatur, AL; чистота 99,7%; категория USP; лот № 466135376340); 100% кукурузный крахмал Argo, произведенный Argo Food Companies, Inc., (Memphis, TN) приобретали в супермаркете Albertson в Bozeman, MT, и кукурузный экстракт приобретали у компании Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX; лот № B0116). Ростовая среда представляла

собой смесь 7,5% глицерина (по массе), 2,5% крахмала и 2,5% кукурузного экстракта с солями МК7-1. Значение pH доводили до 3,3 добавлением соответствующего количества HCl, и кипятили в течение 15 минут в соответствующем контейнере. После охлаждения до комнатной температуры pH смеси доводили до 3,3, а затем инокулировали 5% (по объему) инокулятом *Fusarium oxysporum* штамма МК7, полученным, как описано в РСТ/US2017/020050. Аликвоты по 1,5 л инокулированной среды добавляли в три дезинфицированных 0,25-м² полипропиленовых лотка, помещали в дезинфицированную систему стеллажей для лотков, которую полностью накрывали алюминиевой фольгой для создания темноты и инкубировали при 23° ± 1°С. Биоматы нитчатых грибов, которые росли на поверхности среды, собирали через 4 дня, просто вынимая биоматы из лотков.

Среднее конечное значение pH остаточной жидкости в трех лотках составляло 4,45 (стандартное отклонение=0,14). Три круглых фрагмента размером 56,7 см² отрезали и отбирали от каждого из биоматов в случайных участках, и эти фрагменты сушили при 50°С в течение 48 ч для определения сухого веса. Средний сухой вес биомассы (стандартное отклонение) составлял 124,6 г/0,25 м² (43,4) или 498,4 г/м² (173,6). Средняя толщина влажных биоматов составляла 7,5 мм, и средняя плотность в расчете на сухой вес составляла 0,66 г/см³.

Для экспонирования нитей биомата и изучения методом автоэлектронной сканирующей микроскопии (FE-SEM) внеклеточные полимерные вещества (EPS) между нитями удаляли промыванием этанолом. Для выполнения этого 1-см² фрагменты (1 см x 1 см) биоматов вырезали бритвенным лезвием непосредственно перед сбором, и вырезанные фрагменты подвергали серии этапов промывания этанолом/дегидратации, последовательно погружая образцы указанное количество раз в 40 мл этанольных смесей следующим образом: 25% этанол, 75% деионизированная H₂O в течение 20 минут; 50% этанол, 50% деионизированная H₂O в течение 20 минут; 75% этанол, 25% деионизированная H₂O в течение 20 минут; 95% этанол, 5% деионизированная H₂O в течение 20 минут; 100% этанол, 0% деионизированная H₂O в течение 60 минут. Обработку 100% этанолом повторяли еще 2 раза перед помещением образцов на хранение в 100% этанол.

С целью сохранения целостности микроструктуры биоматов для FE-SEM после промывания этанолом/дегидратации проводили высушивание в критической точке с использованием устройства для высушивания в критической точке Tousimis Samdri-795 в соответствии с инструкциями производителя (Tousimis Samdri-795 Operations Manual; Tousimis, Rockville, MD). После высушивания в критической точке образцы либо непосредственно помещали на алюминиевые стойки, либо предварительно нарезали на секции толщиной <0,3 мм бритвенным лезвием. Затем образцы покрывали иридием (20 мкм, EMITECH K575X, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) и изучали при помощи JEOL 6100 FE-SEM с использованием энергии падающего луча 1 кэВ (JEOL USA, Inc., Peabody, MA).

Визуализация при помощи FE-SEM выявила сложную сеть переплетенных нитей

гиф (Фигура 10), очень похожую на структуру, видимую под световым микроскопом в биоматах, выращенных на глицерине, как описано в PCT/US2017/020050. Наблюдали три отдельных слоя: (а) слой воздушных гиф на верхней поверхности, (b) плотный нижний слой и (с) переходный слой между верхним и нижним слоями. Переходный слой был лишь слабо прикреплен к плотному нижнему слою, что позволяло легко отделять нижний слой от остального биомата. Плотность нитей в переходном слое находилась в диапазоне от слегка менее плотного, чем нижний слой в зоне контакта двух слоев, до плотности, которая сопоставима с плотностью воздушных гиф возле верхней поверхности биомата.

Вырезанные образцы также готовили для световой микроскопии путем медленного погружения в следующие растворы в том порядке и на то количество времени, которые указаны ниже:

ксилол, 3 мин; ксилол, 3 мин; 100% этанол, 3 мин; 100% этанол, 3 мин; 95% этанол, 3 мин; 95% этанол, 3 мин; 70% этанол, 3 мин; деионизированная вода, 3 мин; гематоксилин 1, 1,5 мин; промывание проточной водопроводной водой, 1 мин; раствор осветлителя, 1 мин; промывание проточной водопроводной водой, 1 мин; подсиняющий раствор, 1 мин; промывание проточной водопроводной водой, 1 мин; 70% этанол, 30 погружений; 95% этанол, 30 погружений; 95% этанол, 30 погружений; 100% этанол, 30 погружений; 100% этанол, 30 погружений; 100% этанол, 30 погружений; ксилол, 30 погружений; ксилол, 30 погружений; ксилол, 30 погружений; нанесение покровного стекла.

После описанных выше процедур препараты рассматривали под световым микроскопом (B400B, Amscope, Irvine, CA) с увеличением 100x (Фигура 11).

Фрагменты биоматов размером примерно 2 см² вырезали из свежих биоматов бритвенным лезвием непосредственно перед сбором. Эти секции затем погружали в 35 мл деионизированной воды в 50-мл центрифужных пробирках с коническим дном. Содержимое пробирок обрабатывали ультразвуком (CP200T Ultrasonic Cleaner, Crest Ultrasonics, Ewing, NJ) в течение 0, 40, 90 или 150 секунд для высвобождения нитей в жидкость с целью изучения их под микроскопом. Аликвоты жидкости (~100 мкл) из этих пробирок помещали на стеклянное предметное стекло, накрывали покровным стеклом и рассматривали под световым микроскопом (B400B, Amscope, Irvine, CA) с увеличением 100x. Определяли среднюю длину (стандартное отклонение) неразорванных нитей, которая составляла 1,1 (0,6), 1,2 (0,4), 1,0 (0,4) и 1,2 (0,2) мм при обработке ультразвуком в течение 0, 40, 90 и 160 секунд, соответственно. Максимальная длина нитей, наблюдаемая при каждом варианте обработки, составляла 2,5, 1,4, 1,8, и 1,4 мм, соответственно. Эти нити были значительно длиннее, чем при выращивании *Fusarium oxysporum* штамма МК7 в виде погруженных культур во встряхиваемых колбах, когда средняя длина нитей составляла менее 0,02 мм.

Пример 8: Приготовление куриных наггетов с использованием биоматов *Fusarium oxysporum* штамма МК7, выращенных на смеси глицерина, крахмала и кукурузного экстракта

Биомат *Fusarium oxysporum* штамма МК7, полученный, как описано выше, использовали для изготовления куриных наггетов. Влажные биоматы обрабатывали паром в пароварке при температуре 97°C в течение 0,5 часа, охлаждали до комнатной температуры и использовали в качестве основы для изготовления куриных наггетов. Обработанный паром влажный биомат (200 г) нарезали на куски длиной менее 0,5 мм и гомогенизировали с 4% (по массе; 8 г) куриного мяса и 4% яичного белка (8 г). Полученная смесь содержала более 90% биомата *Fusarium oxysporum* штамма МК7. Порциям этой смеси биомата (~30 г) придавали форму наггетов и обрабатывали паром в пароварке. Подготовленные наггеты панировали, покрывая яичным белком и затем смешивая с панировочными сухарями, прилипающими к поверхности, перед жаркой. Готовый наггет имел текстуру, похожую на куриное мясо, (Фигура 13А) и имел типичный куриный запах. Дегустация, проведенная 5 людьми, показала, что наггет близко напоминал куриные наггеты из настоящего куриного мяса по вкусу и текстуре.

Пример 9: Получение экстракта биомата *Fusarium oxysporum* штамма МК7.

Высококонцентрированные и вязкие экстракты получают из биоматов *Fusarium oxysporum* штамма МК7. Биоматы собирают через 4-16 дней культивирования, как описано ранее, промывают и обрабатывают паром, высушивают от остатков жидкости на пористой пластиковой сетке в течение 5 минут, помещают в пластиковые мешки и запечатывают. Запечатанные мешки замораживают при температуре либо -20°C, либо -80°C, в течение 24 часов, с последующей инкубацией в инкубаторе при 60°C в оригинальных запечатанных мешках в течение 48 часов после доведения рН оставшейся жидкой среды до рН 4-6. После термообработки биоматы продавливают через фильтры с размером пор <1,5 мм, и полученную жидкость собирают. Собранную жидкость кипятят в течение 10 минут в инертной емкости, затем высушивают при 60°C до того, как содержание воды составляет ~6-8%, получая липкий пастообразный экстракт. Питательная ценность экстракта аналогична питательной ценности обработанного паром биомата и муки, полученной из обработанных паром биоматов.

Пример 10. Изготовление йогурта из биоматов *Fusarium oxysporum* штамма МК7, выращенных на кислой сыворотке.

Биоматы *Fusarium oxysporum* штамма МК7 использовали непосредственно для изготовления йогурта. Биоматы выращивали в лотках на кислой сыворотке в качестве сырьевого материала/источника углерода, полученной в виде побочного продукта при изготовлении греческого йогурта, собирали через 6 дней и обрабатывали паром в пределах 20 минут после сбора. 200 г охлажденной влажной биомассы смешивали с 600 г питьевой водопроводной воды, получая молочного вида суспензию, называемую «жидкая дисперсия МК7». Жидкую дисперсию МК7 использовали в качестве самостоятельного ингредиента или в сочетании с коровьим молоком для изготовления йогурта.

Готовили три смеси с разными соотношениями жидкой дисперсии МК7 и цельного молока: 1) 25% жидкой дисперсии МК7: 75% цельного молока, 2) 50% жидкой дисперсии МК7: 50% цельного молока и 3) 100% жидкой дисперсии МК7. Смеси использовали для

получения трех партий йогурта, нагревая каждую смесь до 83°C и выдерживая при этой температуре в течение 14 минут с постоянным перемешиванием. Смеси оставляли охлаждаться до 43°C, а затем добавляли живые йогуртовые культуры в виде инокулята. Полученную смесь инкубировали при 44°C в устройстве для изготовления йогурта (модель YM80; EuroCuisine, Los Angeles, CA) в течение 8 часов. Все из полученных смесей имели внешний вид и текстуру йогурта (Фигура 14), а также запах и вкус как у обычного йогурта.

Пример 11: Выращивание грибных биоматов на глицерине.

Биоматы из биомассы грибов «кремини» (*Agaricus bisporus*) и белых грибов получали всего за 10 дней с использованием глицерина в качестве основного источника углерода (сырьевого материала). Эти обычные съедобные грибы приобретали в супермаркете Albertson в Bozeman, MT и хранили при 4°C. Среда, используемая для выращивания грибов, состояла из 1 л 7,5% глицерина с солями МК7-1 (описанная в РСТ/US2017/020050), которую кипятили в течение 10 минут, с последующим охлаждением до комнатной температуры (~23°C). pH смеси доводили до 2,7, и 200 мл среды с доведенным pH заливали в два стерильных 12,7×17,8 см лотка из стекла Ругех®. Инокулят, состоящий из 5 г измельченных, поверхностно стерилизованных «кремини» или белых грибов, добавляли к среде в каждом лотке. Грибной инокулят готовили следующим образом: 1) 10 г сырых «кремини» или белых грибов добавляли к 200 мл 5% раствора хлорной извести, и суспензию перемешивали в течение 2 минут для поверхностной стерилизации грибов, 2) затем грибы промывали путем перенесения в 200 мл стерильной среды глицерин/соли МК7-1 (описанной в РСТ/US2017/020050) и перемешивания в течение 2 минут, 3) поверхностно стерилизованные грибы измельчали в течение 30 секунд в кофемолке, которая была простерилизована промыванием 70% этанолом, 4) измельченную грибную биомассу (агрегаты длиной <5 мм) вновь поверхностно стерилизовали, повторяя этапы 1 и 2 с измельченной биомассой, 5) 5 грамм измельченной грибной биомассы добавляли к жидкой среде в лотках Ругех® (конечное значение pH=4,0-4,1 после добавления грибов) и 6) лотки накрывали и оставляли для инкубации при комнатной температуре (22 ± 2°C) в темноте.

Образование биоматов наблюдали на поверхности среды после 3 дней инкубации, и целостные биоматы собирали после 10 дней роста. Биоматы грибов «кремини» покрывали всю поверхность жидкой среды в лотке, в то время как биомат, растущий из белых грибов, покрывал примерно 1/2 жидкой среды в виде пяти плавающих островков биомата. Средняя толщина биоматов составляла 1,5 мм в случае «кремини» и 1,7 мм в случае белых грибов. Биомассу биоматов сушили при 50°C в течение 48 ч, и сухая масса, произведенная в расчете на лоток, составляла 1,14 г и 2,12 г для «кремини» и белых грибов, соответственно. Плотность в расчете на сухой вес для сухой биомассы биоматов составляла 0,033 и 0,111 г/см³ для «кремини» и белых грибов, соответственно.

Полученные с помощью микроскопа изображения показали мицелиальную природу биоматов. Средняя толщина гиф составляла 25,2 мкм (стандартное

отклонение=6,2) и 18,7 мкм (4,0) для биоматов «кремини» и белых грибов, соответственно.

Полученные биоматы «кремини» использовали для изготовления куриных наггетов. Биоматы обрабатывали паром при 97°C в течение 0,5 часа, охлаждали до комнатной температуры и использовали в качестве базы для изготовления куриных наггетов. Обработанную паром влажную биомассу (2,5 г) смешивали с 3% (по массе; 75 мг) куриной суповой основы «лучше, чем бульон» (Southeastern Mills, Inc. Rome, GA) и 3% яичного белка (75 мг; Now Foods, Bloomingdale, IL) и нарезали на кусочки длиной менее 2 мм при помощи бритвенного лезвия. Смесь формовали в виде наггета и обрабатывали паром в течение 0,5 часа. Приготовленный наггет имел типичный куриный аромат с легким грибным запахом. При дегустации наггет имел куриный или нейтральный вкус.

Пример 12. Выращивание грибных биоматов на среде с солодом и глицерином.

Биоматы из биомассы грибов, включая *Calvatia gigantea* (дождевик гигантский), *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная), *Pleurotus ostreatus* var. *columbinus* (вешенка голубая), *Hypsizyguis ulmarius* (устричный гриб), *Sparassis crispa* (грибная капуста) и *Ganoderma lucidum* (рейши), получали всего за 5 дней с использованием среды с солодовым экстрактом 001, среды с глицерином 002, среды Хансена, среды МК7-SF, среды с солодовым экстрактом+ NH_4NO_3 003 (Таблица 3). Все конечные среды содержали 0,01% хлорамфеникола.

Таблица 3. Ингредиенты, добавленные в деионизированную или питьевую водопроводную воду для приготовления питательной среды.

Среда с солодовым экстрактом 001					
Ингредиент	Количество	Категория	Лот №	Поставщик	Местонахождение
Солод для светлого Pilsner	40,0 г	Пищевая	180526B	Homebrewstuff.com	Boise, ID
Пептон	4,0 г	Для исследований	44984-57374	Research Products International	Mt. Prospect, IL
Порошок дрожжевого экстракта	1,2 г	Для исследований	53852-66581	Research Products International	Mt. Prospect, IL
Масло канола	1,0 мл	Пищевая	SEP/25/19 CA S3283	Better Living LLC	Pleasanton, CA

Дробленый овес	4,0 г	Пищевая	Jan 25, 2020 I2M 06:36	Walmart-Stores, Inc	Bentonville, AR
Водопроводная H ₂ O	1000 мл	Н/П	Н/П	N/a	Bozeman, MT
Среда с глицерином 002					
Ингредиент	Количество	Категория	Лот №	Поставщик	Местонахождение
Глицерин	40,0 г	Пищевая/USP	20149018137001	Duda Energy LLC	Decatur, AL
Пептон	4,0 г	Реагент	44984-57374	Research Products International	Mt. Prospect, IL
Порошок дрожжевого экстракта	1,2 г	Реагент	53852-66581	Research Products International	Mt. Prospect, IL
Масло канолы	1,0 мл	Пищевая	SEP/25/19 CA S3283	Better Living LLC	Pleasanton, CA
Дробленый овес	4,0 г	Пищевая	Jan 25 2020 I2M 06:36	Walmart-Stores, Inc	Bentonville, AR
Водопроводная H ₂ O	1000 мл	Н/П	Н/П	N/a	Bozeman, MT
Среда Хансена					
Ингредиент	Количество	Категория	Лот №	Поставщик	Местонахождение
Пептон	1,0 г	Реагент	44984-57374	Research Products International	Mt. Prospect, IL
KH ₂ PO ₄ * 7H ₂ O	0,3 г	Реагент	Mfg. не используется номера лотов	Eisen-Golden Laboratories	Dublin, CA
MgSO ₄ * 7H ₂ O	2,0 г	USP	81721	San Francisco Salt Co.	San Leandro, CA

Глюкоза	5,0 г	Реагент	0435C235	Fisher Scientific	Denver, CO
Водопроводная H ₂ O	1000 мл	Н/П	Н/П	N/a	Bozeman, MT
Среда МК7-SF					
Ингредиент	Количество	Категория	Лот №	Поставщик	Местонахождение
NH ₄ NO ₃	7,553 г	ACS	A0390194	Acros Organics	Somerville, NJ
Мочевина	2,548 г	USP	30570-67229	Research Products International	Mt. Prospect, IL
CaCl ₂	2,000 г	Реагент	102615	Fritz Pro Aquatics	Mesquite, TX
MgSO ₄ * 7H ₂ O	2,000 г	USP	81721	San Francisco Salt Co.	San Leandro, CA
KH ₂ PO ₄	7,500 г	Реагент	Mfg. не использует номера лотов	Eisen-Golden Laboratories	Dublin, CA
Следовые компоненты *	2,000 мл	*	*	*	*
Глицерин	0,075 кг	Пищевая/USP	20149018137001	Duda Energy LLC	Decatur, AL
Дрожжевой экстракт	1,750 г	Для исследований	53852-66581	Research Products International	Mt. Prospect, IL
FeCl ₂ * 4H ₂ O	0,020 г	Реагент	951164	Fisher Scientific	Fair Lawn, NJ
ДИ H ₂ O	0,940 л	Н/П	Н/П	Н/П	Bozeman, MT
Следовые компоненты*					
Микроэлементы*	мг/л	Категория	Лот №	Поставщик	Местонахождение
FeSO ₄ •7 H ₂ O	9,98	ACS	3562C398	Amresco	Solon, OH

ZnSO ₄ •7 H ₂ O	4,4	USP/FCC	61641	Fisher	Waltham, MA
MnCl ₂ •4 H ₂ O	1,01	Реагент	13446-34-9	Fisher	Waltham, MA
CoCl ₂ •6 H ₂ O	0,32	Реагент	7791-13-1	Fisher	Waltham, MA
CuSO ₄ •5 H ₂ O	0,31	Техническая	114675	Fisher	Waltham, MA
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4 H ₂ O	0,22	ACS	68H0004	Sigma	St. Louis, MO
H ₃ BO ₃	0,23	ACS	103289	Fisher	Waltham, MA
ЭДТА, свободная кислота	78,52	Для электрофореза	46187	Fisher	Waltham, MA
Среда с солодовым экстрактом+NH₄NO₃ 003					
Ингредиент	Количество	Категория	Лот №	Поставщик	Местонахождение
NH ₄ NO ₃	5,0 г	ACS	A039019 4	Acros Organics	Somerville, NJ
Солод для светлого Pilsner	40,0 г	Пищевая	180526B	Homebrewstuff.com	Boise, ID
Пептон	4,0 г	Для исследования	44984- 57374	Research Products International	Mt. Prospect, IL
Порошок дрожжевого экстракта	1,2 г	Для исследования	53852- 66581	Research Products International	Mt. Prospect, IL
Масло канола	1,0 мл	Пищевая	SEP/25/1 9 CA S3283	Better Living LLC	Pleasanton, CA
Дробленый овес	4,0 г	Пищевая	Jan 25, 2020 12M 06:36	Walmart-Stores, Inc	Bentonville, AR
Водопроводная H ₂ O	1000 мл	Н/П	Н/П	Н/П	Bozeman, MT

Рецепты, приведенные в Таблице 3, использовали для приготовления сред либо в 2-л бутылках Рухе[®], либо в 8-л емкостях из нержавеющей стали, путем смешивания указанных ингредиентов в указанных объемах воды, в зависимости от нужного объема

среды. Ингредиенты добавляли в воду при непрерывном перемешивании жидкости с помощью якоря магнитной мешалки или ложки. Каждый компонент среды интенсивно смешивали с жидкостью перед добавлением следующего компонента, pH среды МК7-SF доводили до 5,0, и растворы автоклавировали. Все остальные значения pH были получены в результате простого смешивания ингредиентов. Среду и емкости автоклавировали в течение по меньшей мере 20 минут при 20 psi и 121°C. Осмотическое давление жидкости измеряли с использованием осмометра модели 3250 Advanced Instruments, Inc. (Two Technology Way, Norwood, MA).

После автоклавирования среды оставляли для охлаждения до комнатной температуры, и отдельные емкости инокулировали грибами видов, указанных в Таблице 4.

Таблица 4. Споры грибов (10-см³ шприцы) были приобретены у компании MycoDirect (12172 Route 47, Ste 199 Huntley, IL 60142) и получены 8/2/2018. Споры вешенки ильмовой были приобретены у компании Everything Mushrooms (1004 Sevier Ave Knoxville, TN 37920) и получены 8/3/2018.

	Лот	Дата производства компаний
Вешенка голубая	3-P7	2-2018
Вешенка обыкновенная	9P8	12-2017
Дождевик гигантский	Н/П	3-2018
Грибная капуста	Н/П	4-2018
Вешенка ильмовая (1 см ³ сухие)	Н/П	10-2017

Инокуляцию ростовой среды проводили асептически с использованием следующих методов. Все асептические манипуляции в данных экспериментах проводили в боксе биобезопасности класса II. Шприцы со спорами использовали для прямой инокуляции примерно 75 мл ростовой среды в предварительно автоклавированных 12,7x 17,8 см лотках из стекла Ругех[®]. Это выполняли путем асептического переноса жидкой среды в автоклавированный лоток Ругех[®] и инокуляции 2 см³ суспензии, содержащейся в шприце со спорами. Лоток накрывали стерильной алюминиевой фольгой, а затем осторожно вращали для перемешивания инокулированной среды.

Чашки с агаром, содержащим солодовый экстракт (МЕА; Таблица 5), готовили асептически, автоклавируя МЕА, оставляя охлаждаться до 50°C и заливая ~25 мл в 100x15 мм стерильные чашки Петри.

Таблица 5. Ингредиенты, используемые для получения агара с солодовым экстрактом

Среда с солодовым экстрактом (МЕА)					
Ингредиент	Количество	Категория	Лот №	Поставщик	Местонахождение
Солод для	30,0 г	Пищевая	180526	Homebrewstu	Boise, ID

					(мОсм)		жидк ости		повер хност и (г/м ²)		биомата (г/см ³)
Соло д 001	0,02 2	6,28	1 9	33,1	169	5,7	5,62	32, 03	71,4	0,057	314,1
Глиц ерин 002	0,02 2	6,96	3 0	13,6	505	5,7	5,54	Н/ П	40	0,04	214,9
Ханс ена	0,02 2	8,81	2 7	30,7	39	Н/ П	Н/П	Н/ П	Н/П	Н/П	Н/П
МК7 -SF	0,02 2	4,91	7, 5	344	1387	9,0	5,07	46, 33	178,6	0,045	135,0
Соло д 001	0,25	6,96	1 9	33,1	169	6,2	6,25	32, 04	111,1	0,037	264,0
Соло д+N Н ₄ N О ₃ 003	0,25	6,88	7, 5	145,1	287	5,8	Н/П	46, 88	108,3	0,11	281,1

Пример 13. Куриный нагетт из *Fusarium oxysporum* штамма МК7

Fusarium oxysporum штамма МК7 со вкусом курицы является основным ингредиентом в ряде рецептов, включая куриные нагетты, в панировке или без панировки, курицу для азиатских блюд или другие блюда из курицы, в качестве заменителя курицы. Биоматы *Fusarium oxysporum* штамма МК7, полученные с использованием разных сырьевых материалов/источников углерода, являются слегка отличающимися по вкусовым и ароматическим свойствам заменителями курицы. Выращенный на глицерине заменитель курицы является более сладким, и выращенный на кислой сыворотке заменитель курицы, как правило, является немного более кислым.

Степень обработки продукта и используемое лезвие (то есть острое металлическое лезвие, тупое металлическое лезвие, пластиковое лезвие) приводят к разным текстурам куриных нагеттов. Кроме того, приемлемые куриные нагетты могут быть изготовлены из биомассы самых разных размеров. То есть, биомассу можно нарезать ножом, слегка обрабатывать или сильно обрабатывать, и все еще получать приемлемые аналоги курицы.

Соотношение 50-20:1:1 *Fusarium oxysporum* штамма МК7: куриная масса: связывающее вещество используют с добавлением, или без добавления, жира в соотношении 66,6% *Fusarium oxysporum* штамма МК7: жир. Подходящие жиры включают утиный жир, кокосовое масло и масло какао. После смешивания смесь обрабатывают паром в течение примерно 30 минут для схватывания связывающего вещества; однако для некоторых связывающих веществ может потребоваться больше или меньше времени. Затем можно использовать дополнительную панировку, и полученные наггеты обрабатывать обычным для таких пищевых продуктов образом.

Пример 14: Колбаса для завтрака и/или хот-дог и/или гамбургер

Соответствующий набор специй добавляют к измельченным биоматам *Fusarium oxysporum* штамма МК7 по мере необходимости для достижения нужных вкусо-ароматических свойств, что может составлять от 10 масс% смеси специй на некоторое количество *Fusarium oxysporum* штамма МК7 до 20%, часто в соотношении 10 частей *Fusarium oxysporum* штамма МК7: 1 часть смеси специй, с добавкой, или без добавки, дополнительных ингредиентов, таких как лук, связывающие вещества, а также жир, такой как масло какао. Затем смесь обжаривают для удаления соответствующего количества жидкости. После этого можно добавлять дополнительные ингредиенты, такие как булгур, овощной бульон, картофель, и так далее, с последующим приданием нужной формы и термообработкой.

Пример 15: Мороженое и мусс

Получают смесь с соотношением примерно 1:3 биомат *Fusarium oxysporum* штамма МК7: вода, имеющую размер частиц со средней длиной нитей менее 900 микрон. Эту смесь осторожно нагревают до полного исчезновения грибного запаха, а затем используют в соотношении примерно 4:1 с кешью, необязательно, соответствующим количеством ксантановой камеди и/или вкусо-ароматической добавки, для получения смеси, которую можно, необязательно, нагревать, а затем охлаждать для получения мусса. Для замороженного десерта смесь затем помещают в смеситель для мороженого и, после взбивания, замораживают до образования нетающего замороженного десерта. (Фигура 14).

Пример 16: Получение трюфельного масла из биоматов трюфеля.

Можно получать масляный экстракт из биоматов трюфеля (*Tuber* sp.), выращенных, как описано выше. В одном случае трюфельные биоматы выращивали в лотках в течение всего лишь 7 дней с использованием солодового экстракта, глюкозы и пептона в качестве основных источников углерода (сырьевого материала). Съедобный гриб трюфель приобретали у компании IGB Trading LLC на торговой площадке Amazon и хранили при 4°C. Чистую культуру гриба *Tuber* sp. готовили из приобретенного трюфеля, помещая кусочки трюфеля размером ~3 мм³ (отрезанные стерильным бритвенным лезвием) на агар с солодовым экстрактом+0,01% хлорамфеникола (используемого для подавления бактериального роста). Агар с солодовым экстрактом готовили путем смешивания 20 г солодового экстракта, 20 г глюкозы, 1 г пептона и 20 г агара в 1 л

деионизированной воды, с последующим автоклавированием в течение 30 минут и охлаждением до 50°C перед добавлением 0,01% хлорамфеникола. Затем стерильную смесь заливали в чашки Петри с диаметром 9 см и оставляли для охлаждения и затвердевания.

Рост грибов в лотках наблюдали через 3 дня. После 4 дней роста гифы собирали стерильной микробиологической петлей и наносили штрихом на новый набор чашек с агаром с солодовым экстрактом+хлорамфеникол. Гриб оставляли для роста на указанных чашках в течение 5 дней, после чего гифы собирали микробиологической петлей и использовали для подтверждения чистоты культуры методом секвенирования ДНК. Для подтверждения экстрагировали и очищали ДНК (FastDNA Spin Kit, MP Biomedicals), и секвенировали область ITS метагенома, с последующей филогенетической классификацией последовательности с использованием Blast (база данных NCBI).

Бульон с солодовым экстрактом готовили, смешивая 20 г солодового экстракта, 20 г глюкозы и 1 г пептона в 1 л деионизированной воды, с последующей стерилизацией. Гифы, собранные микробиологической петлей, также использовали для инокуляции 50 мл стерильного бульона с солодовым экстрактом в стерильных шейкерных колбах с дефлекторами, накрытых стерильной марлей. Стерильную марлю использовали, поскольку она допускала газообмен между колбой и внешней средой. Затем шейкерные колбы вращали со скоростью 185 об/мин в течение 5 дней. После вращения культуры использовали для инокуляции 350 мл стерильного бульона с солодовым экстрактом в стерильных 12,7×17,8 см лотках из стекла Pyrex®. Плотность инокулята для данной культуральной среды составляла 7,5% инокулята на 92,5% бульона. После 7 дней роста в лотках нитчатый биомат, образовавшийся на поверхности, собирали, вынимая биомат из жидкой среды. Собранные биоматы сушили при 40°C в течение 48 ч. Липиды/масло из этих собранных биоматов экстрагировали либо путем механического отжима, либо экстракцией растворителем, используя гексан, хотя можно использовать и другие методы экстракции. Также можно использовать другой метод экстракции Yuval.

Пример 17: Мука МК7

Биомат *Fusarium oxysporum* штамма МК7, полученный, как описано выше, использовали для получения сухого порошка, аналогичного стандартной пекарской муке по размеру частиц и распределению частиц по размерам. Для этого влажные биоматы обрабатывали паром в пароварке при температуре 97°C в течение 0,5 часа, охлаждали до комнатной температуры и обезвоживали в дегидрататоре Cuisinart (модель DHR-20) в течение 2-8 часов, со средним временем обезвоживания, составляющим 4 часа. Время обезвоживания зависит от количества биомассы, загруженной в дегидрататор, распределения биоматов в дегидрататоре, что влияет на поток воздуха в дегидрататоре, от содержания воды в биоматах (среднее содержание воды составляет примерно 75%) и комнатной температуры. Содержание воды после обезвоживания варьируется от 4 до 14%, со средним содержанием воды после обезвоживания, составляющим менее 12%. Обезвоженную биомассу измельчали при помощи кофемолки (KRUPS, электрический

измельчитель кофе и специй, лезвия из нержавеющей стали F2034251) до получения тонкого порошка. Средний размер частиц измельченного в муку биомата находился в диапазоне от 75 микрон до 120 микрон. Небольшая фракция более крупных частиц, примерно 5 масс%, имела размер частиц, превышающий 180 микрон. Небольшая фракция более мелких частиц, примерно 5 масс%, имела размер частиц менее 75 микрон. Указанные более мелкие частицы имеют размеры, не позволяющие мелким частицам оставаться в воздухе в течение продолжительных периодов времени. Размер частиц определяли путем просеивания 100-граммовых образцов измельченных биоматов в течение 5 минут через сита с отверстиями 180 мкм, 120 мкм и 75 мкм. Предпочтительно, если содержание воды после обезвоживания и после измельчения составляет менее 6%, поскольку более высокое содержание воды может приводить к слеживанию высушенной и измельченной биомассы.

Муку из биоматов затем использовали в качестве добавки к другим стандартным видам муки (муке King Arthur, муке Bob's Red Mill и пшеничной муке Bob's Red Mill) и готовили различную выпечку. Муку из биоматов добавляли в количествах 5 масс%, 10 масс%, 20 масс% и 30 масс%, без какого-либо отрицательного влияния на вкус, поднятие теста, текстуру, внешний вид или запах конечной выпечки. Продемонстрированные продукты включали хлеб (7-зерновой, белый и пшеничный), выпечку (из заварного теста), печенье, макароны и пельмени. Полученные продукты показали хорошие результаты при дегустации, и включение муки МК7 не было заметным для дегустаторов.

Пример 18: Наполнитель из МК7

Биомат *Fusarium oxysporum* штамма МК7, полученный, как описано выше, использовали для получения частиц биомассы, которые использовали для добавления к мясу и рыбе в качестве наполнителя (то есть для увеличения общего количества пищевого продукта за счет добавления МК7 к другим пищевым продуктам). Влажные биоматы обрабатывали паром в пароварке при температуре 97°C в течение 0,5 часа и охлаждали до комнатной температуры. Биоматы измельчали (то есть, нарезали на кубики ножом или обрабатывали в кухонном комбайне) до достижения нужного распределения частиц по размерам. Затем измельченную биомассу добавляли в разные пищевые продукты для увеличения количества мяса в случае мясного наполнителя или рыбы в случае рыбного наполнителя. В качестве примера мясного наполнителя 10%, 20%, 30%, 40% и 50% измельченной биомассы добавляли к мясу для гамбургеров. Измельчение биомассы оценивали при разном распределении частиц по размерам. Более мелкие частицы, как правило, приводили к более плотной и кремовой текстуре. Более крупные частицы, как правило, приводили к продуктам с более выраженной текстурой, более выраженными вкусовыми ощущениями, требующим большего пережевывания перед проглатыванием. Мясо с наполнителем затем обрабатывали, как без добавления биомассы. В случае наполнителя для гамбургеров можно, необязательно, добавлять специи или связывающие вещества, после чего мясо с наполнителем формовали в котлеты или фрикадельки и подвергали термообработке до достижения нужной для потребителя кондиции. Методы

термообработки включали приготовление на плите, в духовке, обжаривание и обжаривание на гриле. Дегустация показала, что приемлемые пищевые продукты были получены при всех уровнях добавки наполнителя и при всех размерах частиц добавленной биомассы. Также были протестированы наполнители для куриного мяса и свинины с аналогичными уровнями добавок и с аналогичными результатами дегустации.

Наполнитель для рыбы также тестировали при уровнях добавок 10%, 20%, 30% и 40%. Рыбное филе и рыбные фрикадельки получали путем добавления измельченного МК7 при разных вариантах распределения частиц по размерам, от очень небольших частиц (менее 1,0 мм) до крупных частиц (более 2 мм), без какого-либо отрицательного влияния на вкус, цвет, запах или общие вкусовые ощущения. При добавлении частиц небольшого размера полученные пищевые продукты имели кремовую текстуру. При добавлении крупных частиц полученные пищевые продукты имели более плотную текстуру с более крупными частицами, с необходимостью в более тщательном пережевывании перед проглатыванием. Дегустация показала, что приемлемые пищевые продукты были получены при всех протестированных уровнях добавок и при всех размерах частиц.

Пример 19: Вяленые куски МК7

Биомат *Fusarium oxysporum* штамма МК7, полученный, как описано выше, использовали для создания вяленых грибных кусков, аналогичных по внешнему виду и вкусу вяленому мясу (то есть, вяленой говядине, вяленой буйволятине, вяленой свинине, вяленой курятине, вяленой индюшатине и так далее). Влажные биоматы обрабатывали паром в пароварке при температуре 97°C в течение 0,5 часа и охлаждали до комнатной температуры. Биоматы измельчали до частиц с таким размером, который обычно имеют частицы в обычных продуктах из вяленого мяса. В некоторых случаях кусочки измельченного биомата панировали для соответствующего вкуса и аромата и обезвоживали в дегидрататоре Cuisinart (модель DHR-20) в течение 20-200 минут, со средним временем обезвоживания, составляющим 40-120 минут. Время обезвоживания зависит от количества биомассы, загруженной в дегидрататор, распределения биоматов в дегидрататоре, что влияет на поток воздуха в дегидрататоре, от содержания воды в биоматах (среднее содержание воды составляет примерно 75%), комнатной температуры и желаемого содержания воды в конечном продукте. Содержание воды после обезвоживания составляло от 8% до 12% в зависимости от желаемых характеристик продукта. В некоторых случаях перфорация биомассы перед проведением обезвоживания приводила к получению продукта, легче разрываемого на мелкие куски, что облегчало его поедание. Перфорацию биомассы выполняли при помощи вилки, ножа или молотка для отбивания, которые перфорировали биомассу, а также нарушали сеть нитей, за счет чего облегчалось разрывание. Оценивали добавление самых разных смесей специй (то есть, специй каджунской кухни, сыра, сои, уксуса, трав, сметаны и лука, «жидкого дыма», веганских вкусо-ароматических добавок к мясу и так далее). Смеси специй оценивали как до обезвоживания, так и после обезвоживания. Те образцы, к которым

добавляли специи до обезвоживания, имели более выраженный вкус, и специи лучше удерживались на биомассе, в сравнении с образцами, которые обрабатывали после обезвоживания. Все полученные вяленые куски хорошо зарекомендовали себя при дегустации.

Пример 20: Грибные чипсы

Биомат *Fusarium oxysporum* штамма МК7, полученный, как описано выше, использовали для изготовления чипсов, аналогичных по внешнему виду и вкусу картофельным чипсам или кукурузным чипсам. Влажные биоматы обрабатывали паром в пароварке при температуре 97°C в течение 0,5 часа и охлаждали до комнатной температуры. Биоматы измельчали до частиц с таким размером, который обычно имеют частицы в чипсах, а также интенсивно перерабатывали в пасту и придавали геометрическую форму чипсов. Грибные чипсы обжаривали на сковороде с горячим маслом (температура примерно составляла 380°F) до коричневого цвета. Время термообработки зависело от геометрической формы биомассы, но приготовление происходило быстро, как правило, менее чем за 15 секунд. Полученные жареные чипсы были очень приятными на вкус и были способны вызывать разные вкусовые ощущения в зависимости от специй, добавленных или нанесенных на биомассу перед жарением.

Пример 21: Герметично закрытый биореактор:биомат

Лотки 12,7×17,8 см из стекла Pyrex[®], а также чашки Петри размером 100×15 мм используют в качестве базового лотка. В стеклянные лотки помещают 200 мл сырьевого материала, смешанного с жидкой питательной средой (при необходимости) и инокулятом. Лотки накрывают и герметизируют газопроницаемой мембраной, прикрепленной к пластиковой раме со встроенной резиновой прокладкой. Система уплотнения обеспечивает эффективное асептическое уплотнение между мембраной и стеклянными лотками, она может быть с легкостью собрана, а также позволяет открывать/закрывать реактор для отбора проб и сбора продукта.

Целый ряд разных газопроницаемых мембранных материалов с разной толщиной, размерами пор и текстурами (шероховатость поверхности) используют в качестве материалов на границе раздела жидкости и газа. Исходно используют восемь (8) полимерных материалов, включая полипропилен, полиэтилен, политетрафторэтилен, поликарбонаты, полиамиды, полипирролоны, поли(амидоамин) дендримерные композиты и ацетат целлюлозы (например, Specialty Silicone Products, Inc. Corporate Technology Park, NY; Thermo-Fisher, Waltham, MA; Merck Millipore, Burlington, MA). Используют материалы с тремя размерами пор (0,2, 0,45, 1,0 мкм) для переноса газа, в дополнение к прямой диффузии газов через сами полимеры, без допуска микроорганизмов. Кроме того, используют стерильные тканеобразные материалы с различной шероховатой текстурой поверхности и извилистыми путями для диффузии газа. Такие материалы в большом выборе доступны из коммерческих источников, включая 3M, Solvay, Ube Industry и Saint-Gobain.

Для анализа и определения параметров для разных условий окружающей среды и

условий в экспедиции лотки снабжают датчиками для контроля температуры, растворенного кислорода и рН в зависимости от глубины в лотке. Отверстия для датчиков и ведущие в реактор провода, пересекающие мембрану, герметизируют силиконом, эпоксидной смолой и/или клеями, в зависимости от материала мембраны. Перегородки, интегрированные в мембраны, используют в качестве портов для образцов при сборе жидких образцов с целью анализа методами ГХ-МС, ИСП-МС, ИХ и определения общего содержания C/N. Стандартные электроды, а также микроэлектроды, используют для измерения рН и потока акцептора электронов (O_2) в реальном времени через газопроницаемую мембрану и внутри биомата через регулярные временные интервалы (например, 6, 12, 24, 36, 48 часов). Информация о потоке важна для согласования метаболических потребностей в реальном времени с газопроницаемостью мембраны и изменением концентраций и распределения доноров электронов (органических) и питательных веществ (неорганических), необходимых для оптимального роста и превращения сырьевого материала.

Пример 22: Не оборудованные приборами реакторы

Не оборудованные приборами реакторы используют для исследований роста грибов *Fusarium oxysporum* штамма МК7 в качестве модели нитчатого организма. Гриб штамма МК7 представляет собой экстремофильный гриб, который, как было показано, прекрасно растет на самых разнообразных сырьевых материалах, включая человеческие отходы жизнедеятельности, пищевые отходы, биомассу цианобактерий и водорослей, а также лигноцеллюлозные материалы. Также было показано, что биоматы штамма МК7 способны переносить высокие уровни мочевины (по меньшей мере 26 г/л), а также высокий уровень растворенного органического углерода и осмотическое давление (300 г/л глицерина).

Тестируемые сырьевые материалы включают: 1) суррогатную человеческую мочу в качестве основного источника азота; 2) суррогатные пищевые отходы (собачий корм) в качестве основного источника углерода; и 3) растительный материал (лигноцеллюлозу) в качестве дополнительного источника углерода. Все сырьевые материалы широко анализируют на органические и неорганические составляющие, рН и биологическую потребность в кислороде. Суррогатную человеческую мочу готовят с использованием состава среды, рекомендуемого учеными NASA или другими учеными, участвующими в изучении отходов в экспедициях.

Эффективность разных газопроницаемых мембран определяют путем проведения сравнительных исследований роста биопленки-биомата, при этом разные мембраны герметично закрепляют на поверхности лотков и чашек Петри, содержащих разные сырьевые материалы и инокулят МК7. Мембраны находятся в прямом контакте с жидкой фазой и являются единственным путем газообмена между внешней газо-паровой средой и жидкой средой с биопленками-биоматами. Из реакторов деструктивно отбирают пробы для измерения роста (сухого веса биомассы, толщины биомата) с течением времени. Скорости роста сравнивают со скоростями роста в контрольных лотках без мембран.

Используют факторный дизайн эксперимента, включающий сочетания сырьевых материалов и мембран, которые тестируют для подбора наилучшего соответствия сырьевого материала и мембраны. Также оценивают дополнительные переменные, включая исходное значение рН сырьевого материала и добавление неорганических питательных веществ. Кроме того, в экспериментах отслеживают число жизнеспособных бактериальных клеток из сырьевых материалов с течением времени для определения кинетики дезинфекции, связанной с ростом биоматов.

Пример 23

Наилучшие сочетания мембраны/сырьевого материала используют в дополнительных экспериментах. Сначала поток газов через выбранные газопроницаемые мембраны количественно определяют и моделируют в абиотических экспериментах. Для определения потока O_2 из паровой фазы за пределами реактора в жидкую фазу используют метод начального уклона и измеряют с использованием зондов для растворенного кислорода и изначально бескислородной среды. Для определения потока диоксида углерода из насыщенной диоксидом углерода жидкой фазы в паровую фазу также используют метод начального уклона и измеряют в анализе общего содержания неорганического углерода и при помощи рН зондов (измерение угольной кислоты). Исходно фаза растворенного неорганического углерода составляет 0%, 0,5% и 5% диоксида углерода. Данные интегрируют в модели роста грибов с подвижным фронтом для получения более точных параметров.

Наилучшие определенные сочетания мембраны/сырьевого материала затем используют для подробных экспериментов по оптимизации биоты, опираясь на модель грибного роста. Используют как стеклянные лотки, так и чашки Петри. Чашки Петри меньшего размера облегчают интенсивный деструктивный отбор образцов для анализов биомассы и жидкости с течением времени. Определяют созданные условия, при которых почти весь добавленный углерод и питательные вещества превращаются в биомассу с минимальными отходами. Для этого оценивают потоки углерода и электронов, а также условия в реакторе, путем измерения биомассы, произведенной в расчете на донора электронов, и биомассы, произведенной в расчете на акцептор электронов. Определяют элементарный состав биомассы с использованием коммерческих услуг (например, Microanalysis Inc., Wilmington DE) для завершения составления баланса биомассы. Интересующие параметры включают объемы жидкой фазы и концентрации доступных сырьевых материалов и питательных веществ (углеродный субстрат, источник азота, неорганические питательные вещества, кислород). Полученные данные используют в математической модели роста грибного биомата с подвижным фронтом, которая облегчает количественное сравнение и окончательную оптимизацию условий роста.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Препарат съедобных нитчатых грибов, содержащий частицы съедобных нитчатых грибов, при этом частицы съедобных нитчатых грибов содержат неразорванные нити нитчатых грибов, разорванные нити нитчатых грибов, или их сочетания, при этом частицы съедобных грибов выделены из биоматов съедобных нитчатых грибов.

2. Препарат по п. 1, в котором нитчатый гриб представляет собой *Fusarium oxysporum* штамма МК7 (регистрационный № депозита в АТСС РТА-10698).

3. Препарат по п. 1, в котором нитчатый гриб представляет собой *Fusarium venenatum*.

4. Препарат по п. 1, в котором нитчатый гриб выбирают из группы, состоящей из *Agaricus bisporus* («кремини» и белый шампиньон), *Boletus edulis* (белый гриб), *Cantarellus cibarius* (лисичка), *Calvatia gigantea* (дождевик гигантский), *Cyclocybe aegerita* (каштановый гриб), *Ganoderma lucidum* (рейши), *Grifola frondosa* (гриб-баран), *Morchella* sp. (сморчок), *Hypsizygos tessellatus* (шимиджи), *Hypsizygos ulmarius* (устричный гриб), *Laetiporus* sp. (трутовик серно-желтый), *Lentinula edodes* (шиитакэ), *Pleurotus eryngii* (вешенка степная), *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная и вешенка голубая), *Pholiota microspora* (чешуйчатка намеко), *Sparassis crispa* (грибная капуста) и *Tuber* sp. (трюфель).

5. Препарат по п. 1, отличающийся тем, что является жидким.

6. Препарат по п. 1, отличающийся тем, что является твердым.

7. Препарат по п. 1, отличающийся тем, что представляет собой пасту, муку, воздушную массу или плотную массу.

8. Пищевой продукт, отличающийся тем, что содержит препарат съедобного нитчатого гриба по п. 1.

9. Пищевой продукт по п. 8, в котором нитчатый гриб представляет собой *Fusarium oxysporum* штамма МК7 (регистрационный № депозита в АТСС РТА-10698).

10. Пищевой продукт по п. 8, в котором нитчатый гриб представляет собой *Fusarium venenatum*.

11. Пищевой продукт по п. 8, в котором нитчатый гриб выбирают из группы, состоящей из *Agaricus bisporus* («кремини» и белый шампиньон), *Boletus edulis* (белый гриб), *Cantarellus cibarius* (лисичка), *Calvatia gigantea* (дождевик гигантский), *Cyclocybe aegerita* (каштановый гриб), *Ganoderma lucidum* (рейши), *Grifola frondosa* (гриб-баран), *Morchella* sp. (сморчок), *Hypsizygos tessellatus* (шимиджи), *Hypsizygos ulmarius* (устричный гриб), *Laetiporus* sp. (трутовик серно-желтый), *Lentinula edodes* (шиитакэ), *Pleurotus eryngii* (вешенка степная), *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная и вешенка голубая), *Pholiota microspora* (чешуйчатка намеко), *Sparassis crispa* (грибная капуста) и *Tuber* sp. (трюфель).

12. Пищевой продукт по п. 8, который представляет собой заменитель мяса, наполнитель для мяса, хлеб, пасту, выпечку, пельмени, вяленое мясо, закуску, напиток, йогурт или десерт.

13. Пищевой продукт по п. 12, в котором заменитель мяса имитирует текстуру гамбургера, колбасы, хот-дога, куриного наггета или рыбного филе.

14. Пищевой продукт по п. 12, в котором десерт представляет собой мусс, пудинг, замороженный десерт или аналог мороженого.

15. Пищевой продукт по п. 12, в котором десерт представляет собой кондитерское изделие или конфету.

16. Способ получения пищевого продукта, включающий контактирование препарата по п. 1 с одним или более другими ингредиентами.

17. Способ получения препарата съедобного нитчатого гриба по п. 1, включающий (а) инокуляцию жидкой ростовой среды, содержащей источник углерода, микроконидиями, спорами или мицелием съедобного нитчатого гриба;

(b) инкубацию инокулированной ростовой среды при комнатной температуре;

(c) выращивание целостного биомата нитчатых грибов методом поверхностной ферментации на инокулированной ростовой среде;

(d) сбор целостного биомата нитчатых грибов; и

(e) измельчение биомата нитчатых грибов, с получением по меньшей мере двух частиц съедобного нитчатого гриба.

18. Способ по п. 17, при этом сбор целостного биомата нитчатых грибов происходит непрерывно.

19. Способ по п. 17, дополнительно включающий замену жидкой ростовой среды во время стадии инкубации на периодической или постоянной основе.

20. Способ по п. 17, в котором источник углерода представляет собой глицерин, крахмал, кукурузный экстракт, кислую сыворотку, молочную сыворотку, сладкую сыворотку, гидрогенизированные гидролизаты крахмала, производные крахмала, пшеничный экстракт, промышленные воды, побочные продукты переработки пищевых продуктов/сточные воды и/или их сочетание.

21. Способ получения препарата по п. 4, включающий

(a) поверхностную стерилизацию плодового тела нитчатого гриба;

(b) измельчение стерилизованного плодового тела нитчатого гриба;

(c) поверхностную стерилизацию измельченного плодового тела нитчатого гриба;

(d) необязательно, повторение этапов (b) и (c);

(e) инокуляцию жидкой ростовой среды, содержащей источник углерода, стерилизованным измельченным плодовым телом нитчатого гриба;

(f) инкубацию инокулированной ростовой среды при комнатной температуре;

(g) выращивание целостного биомата нитчатых грибов;

(h) сбор целостного биомата нитчатых грибов; и

(i) измельчение биомата нитчатых грибов, с получением по меньшей мере двух частиц съедобного нитчатого гриба.

22. Способ по п. 21, в котором измельченный биомат нитчатых грибов содержит агрегаты мицелия длиной менее 5 мм.

23. Способ по п. 21, в котором инокулированная ростовая среда имеет рН примерно 4,0-4,1.

24. Способ по п. 21, в котором источник углерода включает глицерин.

25. Способ по п. 21, в котором период инкубации составляет 10-20 дней.

26. Автономная асептически закрытая биореакторная система, включающая контейнер, сырьевой материал, грибной инокулят, по меньшей мере одну газопроницаемую мембрану, герметизирующую прокладку и, необязательно, жидкую питательную среду.

27. Автономная биореакторная система по п. 26, в которой контейнер содержит множество ростовых отделений.

28. Автономная биореакторная система по п. 26, в которой по меньшей мере одна газопроницаемая мембрана откалибрована для конкретного газа.

29. Автономная биореакторная система по п. 26, в которой по меньшей мере одна газопроницаемая мембрана представляет собой полимерный материал.

30. Автономная биореакторная система по п. 26, в которой газопроницаемую мембрану выбирают из группы, состоящей из полипропилена, полиэтилена, политетрафторэтилена, поликарбоната, полиамида, полипирролонов, поли(амидоамин) дендримерного композита и ацетата целлюлозы.

31. Автономная биореакторная система по п. 26, в которой сырьевой материал представляет собой естественную или синтезированную мочу, пищевые отходы, промышленные отходы и побочные продукты, сельскохозяйственные отходы и побочные продукты, глицерин, крахмал, производные крахмала, пшеничный экстракт, растительный материал, водоросли, цианобактерии, отходы и побочные продукты при переработке пищевых продуктов, гидролизаты растительных материалов, отработанные масла и побочные продукты, промышленные воды, побочные продукты переработки пищевых продуктов/сточные воды и/или их сочетания.

32. Автономная биореакторная система по п. 26, в которой грибной инокулят включает грибы аскомицеты или базидиомицеты и/или их сочетания.

33. Автономная биореакторная система по п. 32, в которой грибной инокулят включает грибы аскомицеты.

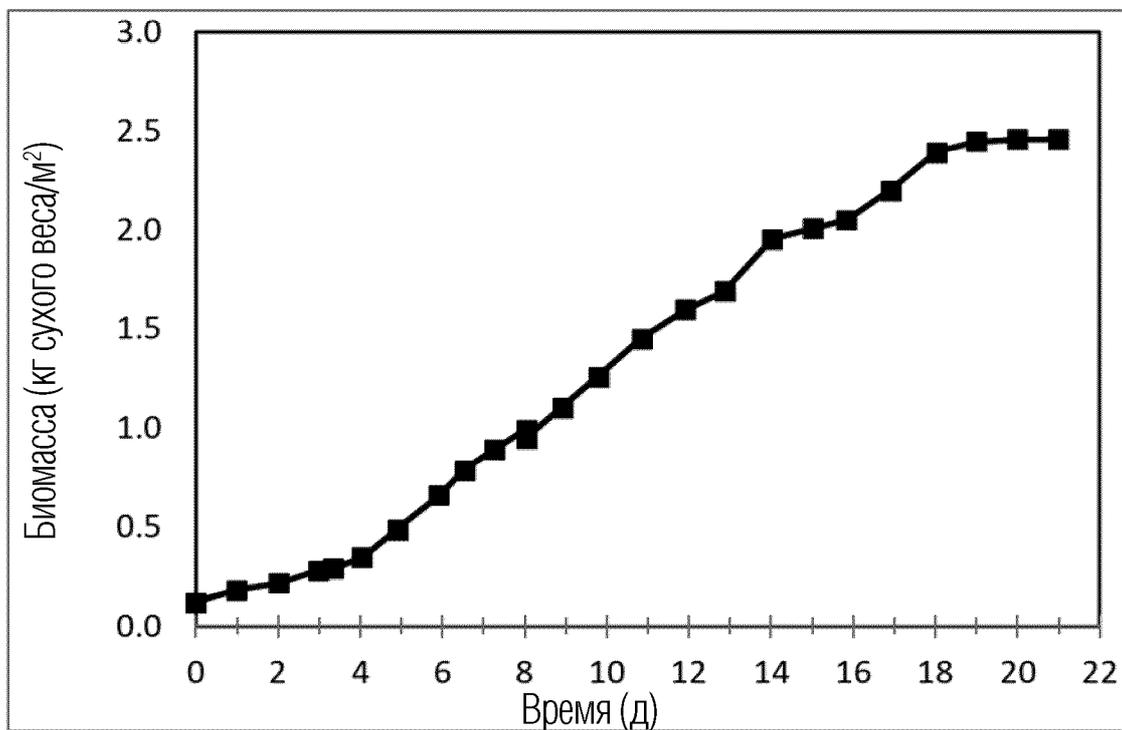
34. Автономная биореакторная система по п. 31, в которой грибной инокулят включает грибы базидиомицеты.

35. Автономная биореакторная система по п. 31, в которой грибы аскомицеты выбирают из группы, состоящей из *Fusarium oxysporum* штамма МК7, *Fusarium venenatum*, *Fusarium avenaceum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* и/или их сочетаний.

36. Автономная биореакторная система по п. 26, в которой контейнер имеет коллекторную конструкцию и/или систему перегородок.

37. Автономная биореакторная система по п. 26, в которой контейнер изготавливают из одного или более потребляемых сырьевых материалов.

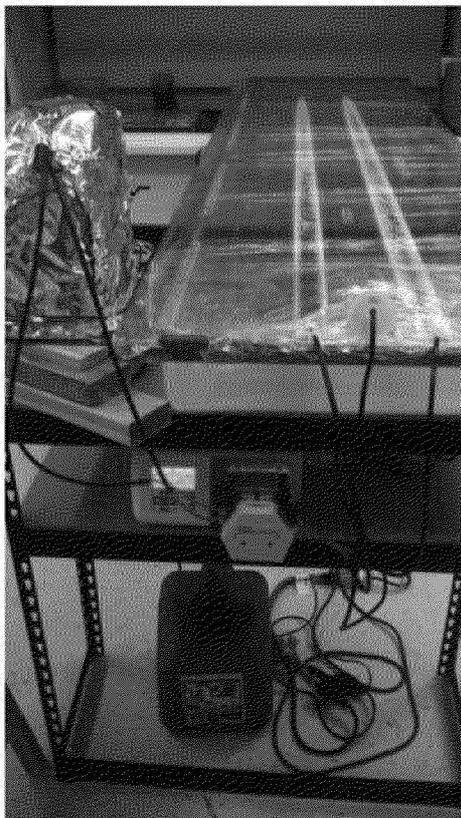
ФИГ. 1



ФИГ. 2



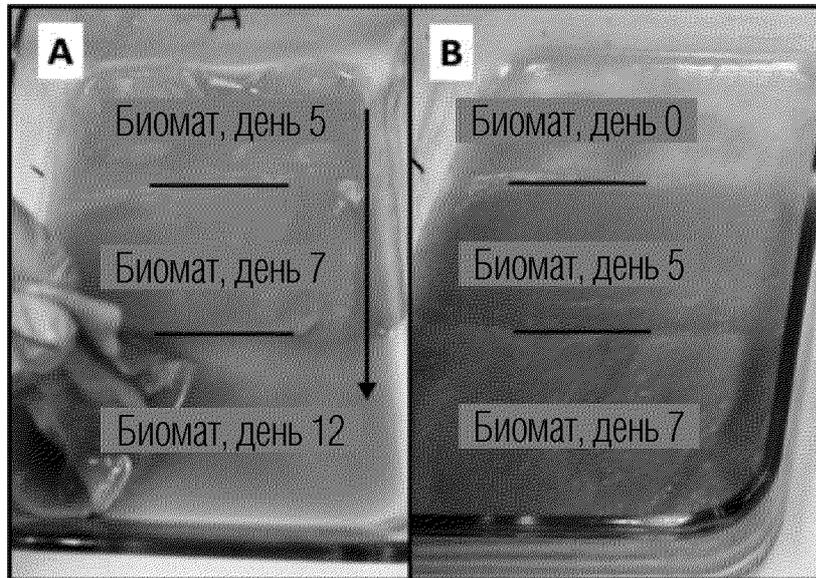
ФИГ. 3



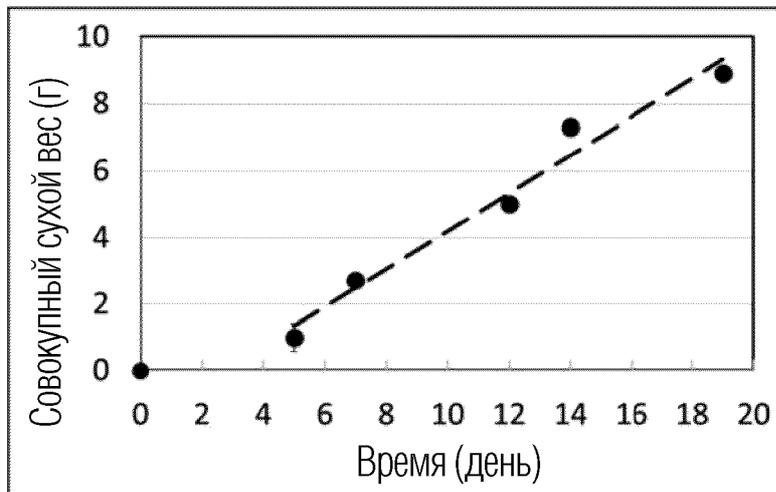
ФИГ. 4



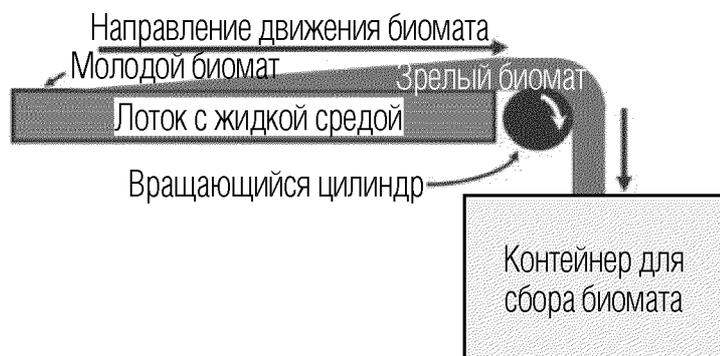
ФИГ. 5



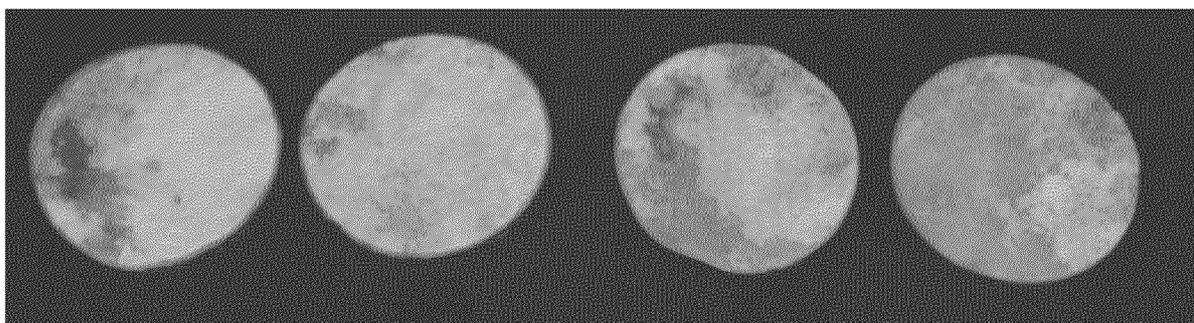
ФИГ. 6



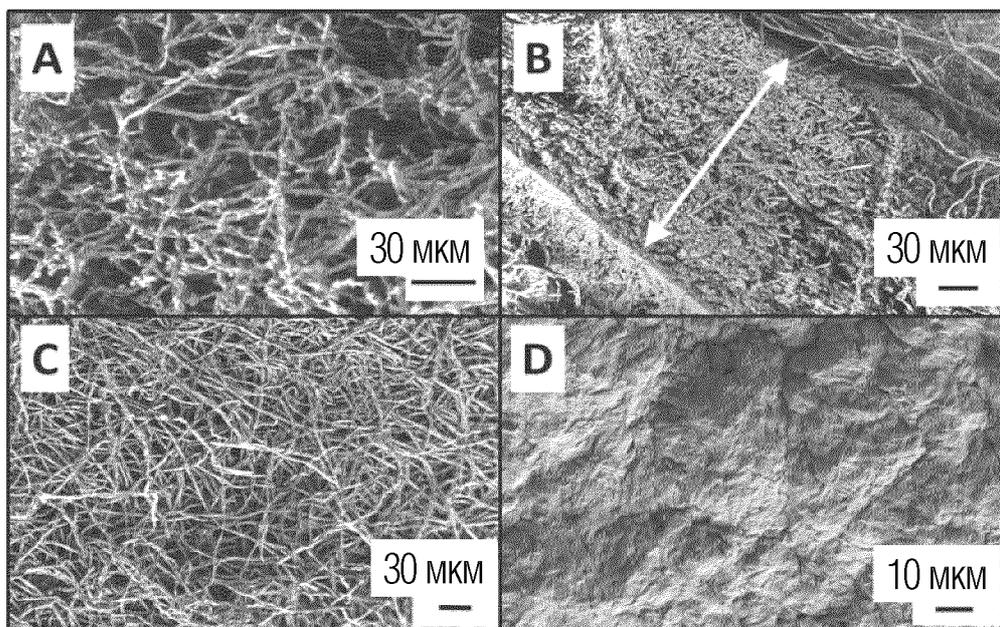
ФИГ. 7



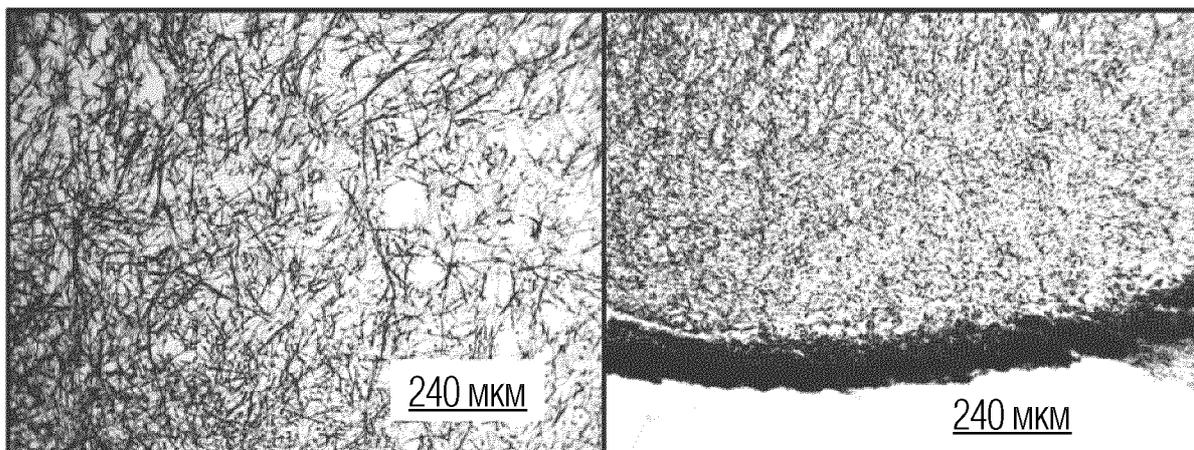
ФИГ. 8



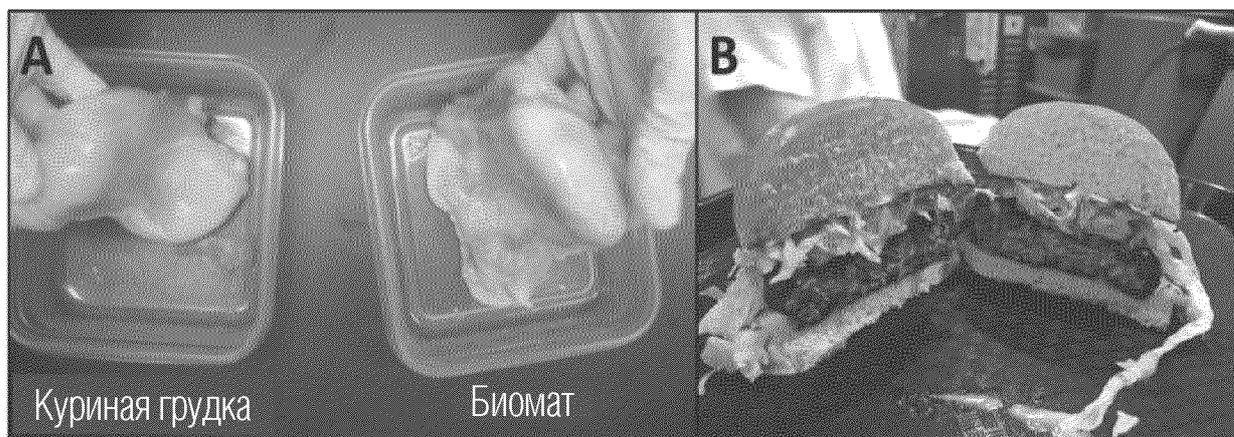
ФИГ. 9



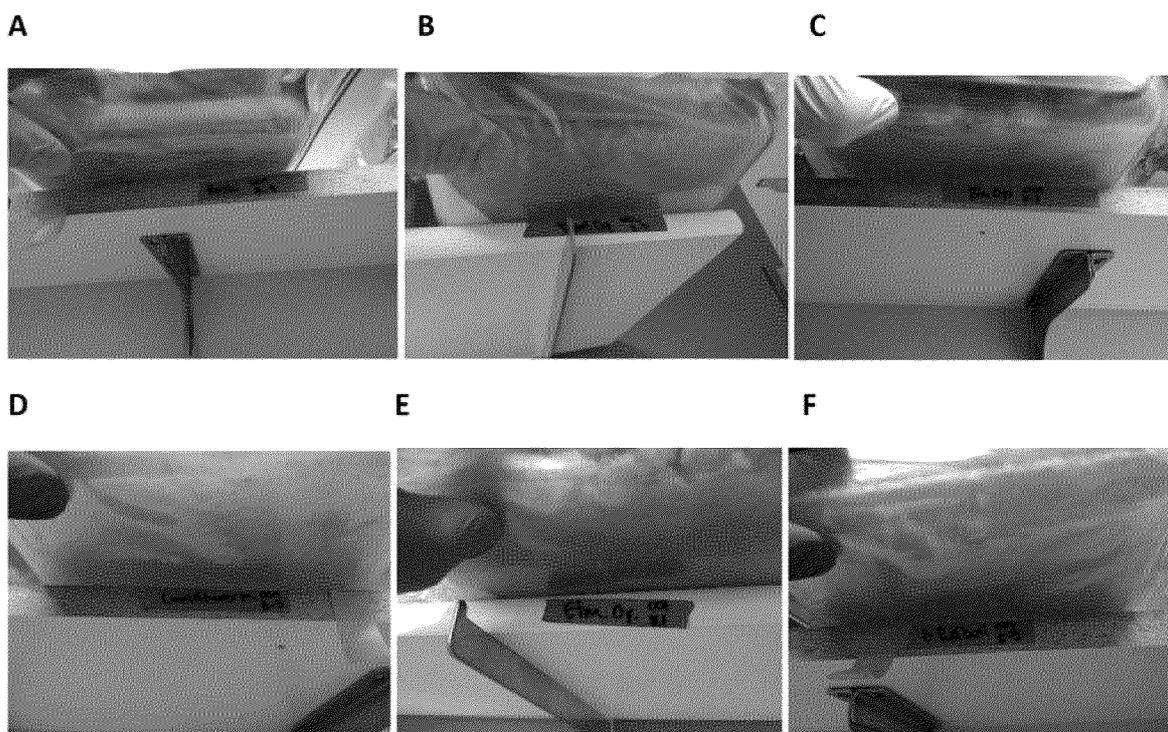
ФИГ. 10



ФИГ. 11



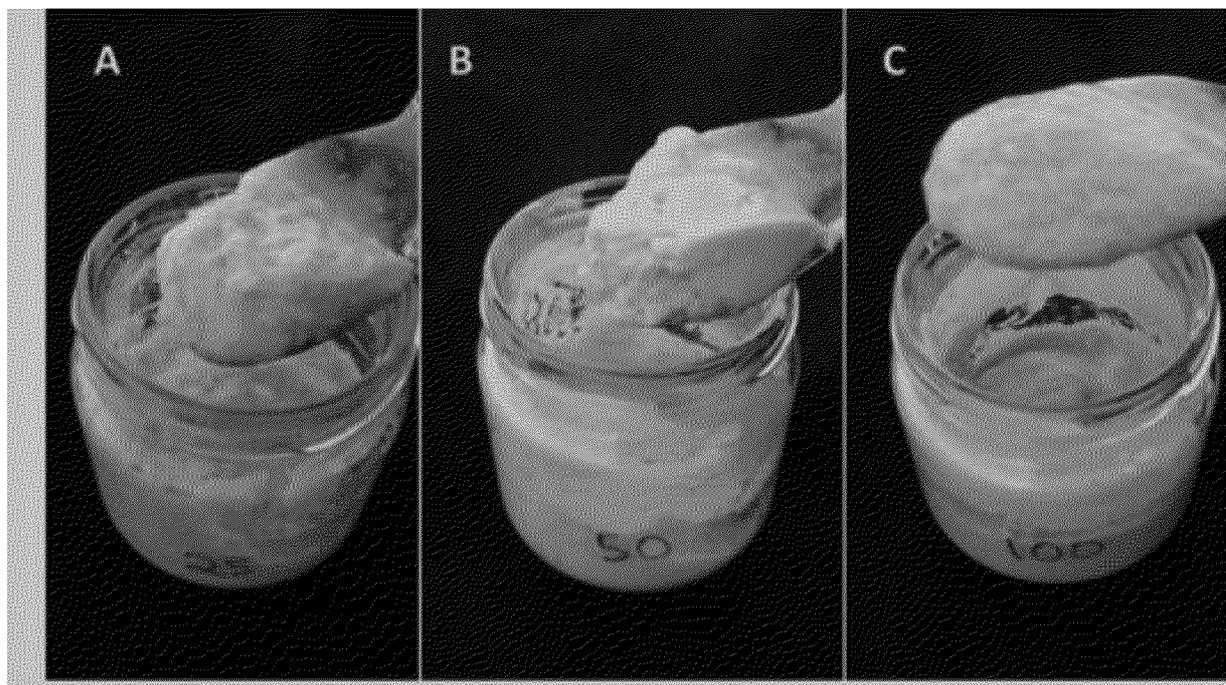
ФИГ. 12



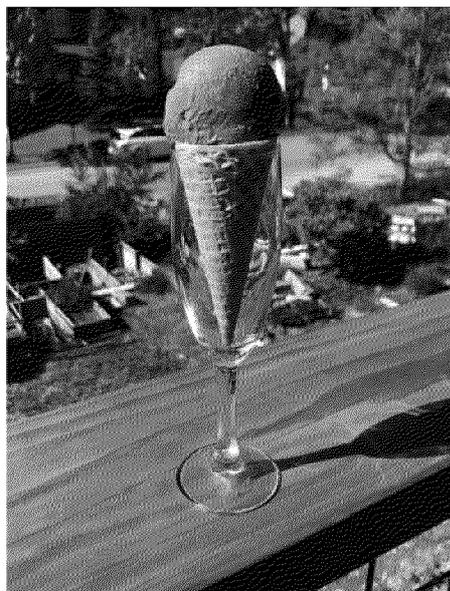
ФИГ. 13



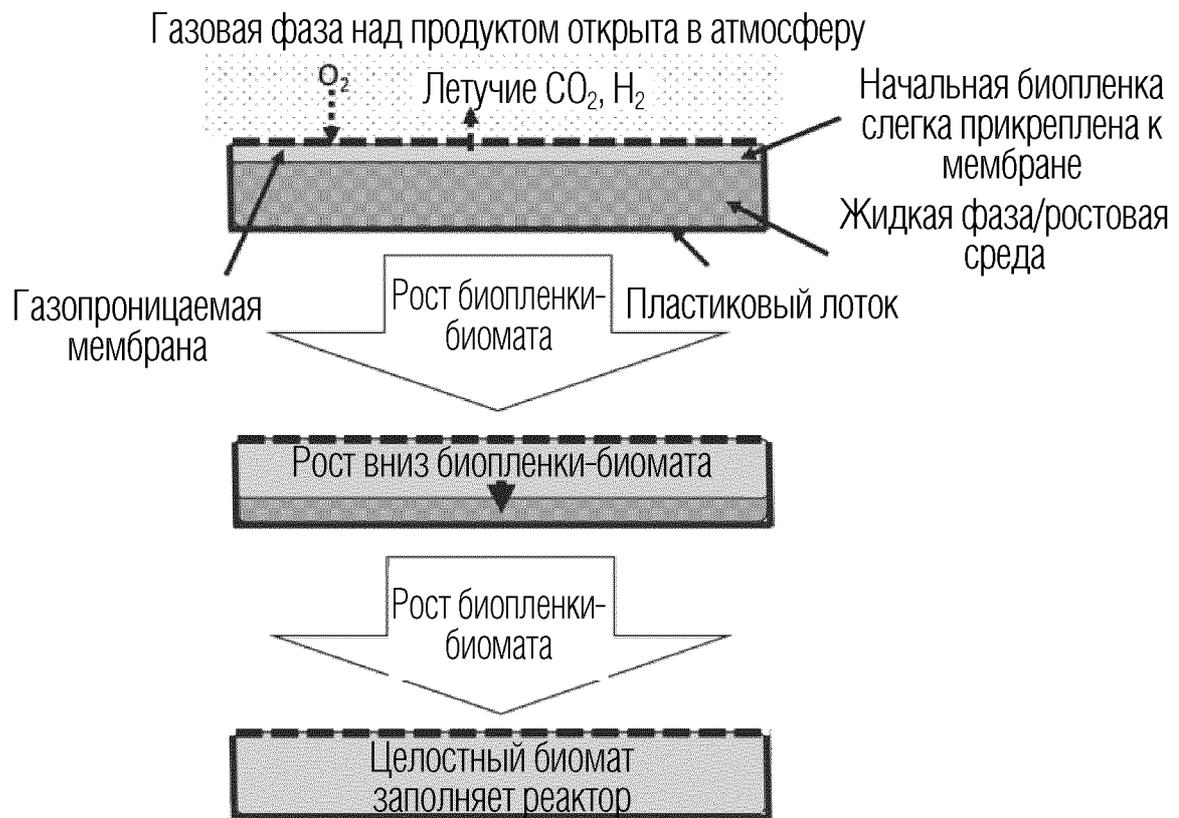
ФИГ. 14



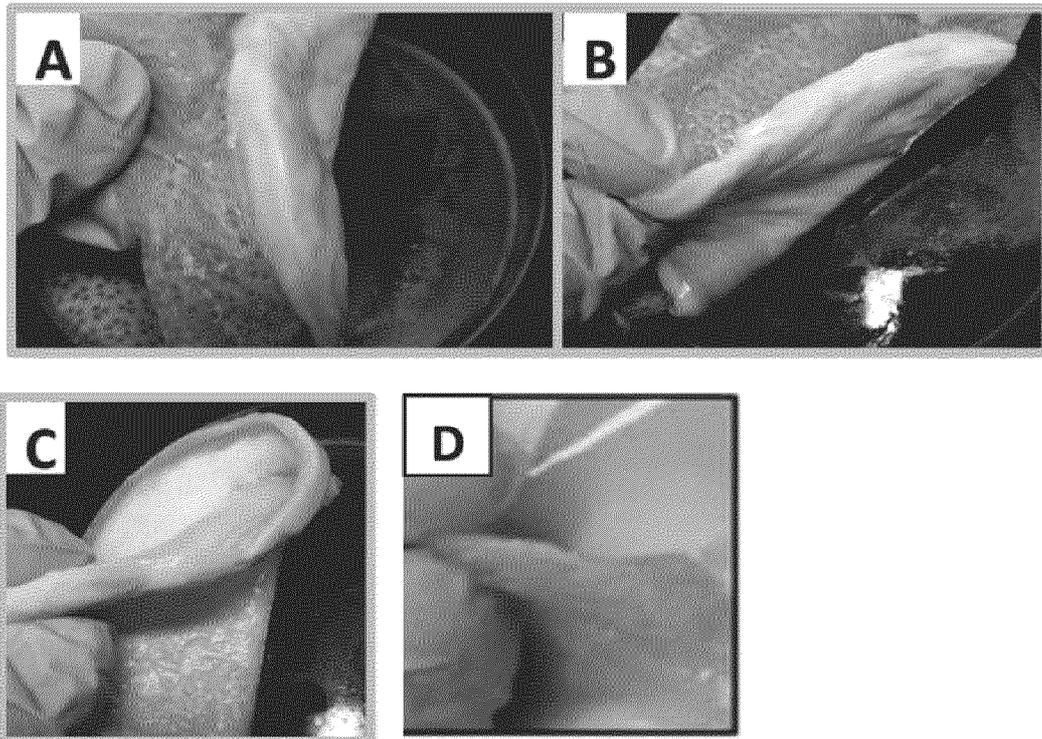
ФИГ. 15



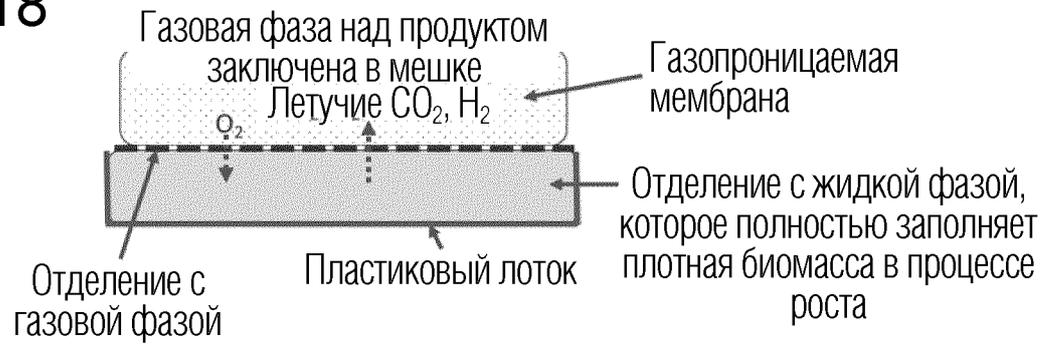
ФИГ. 16



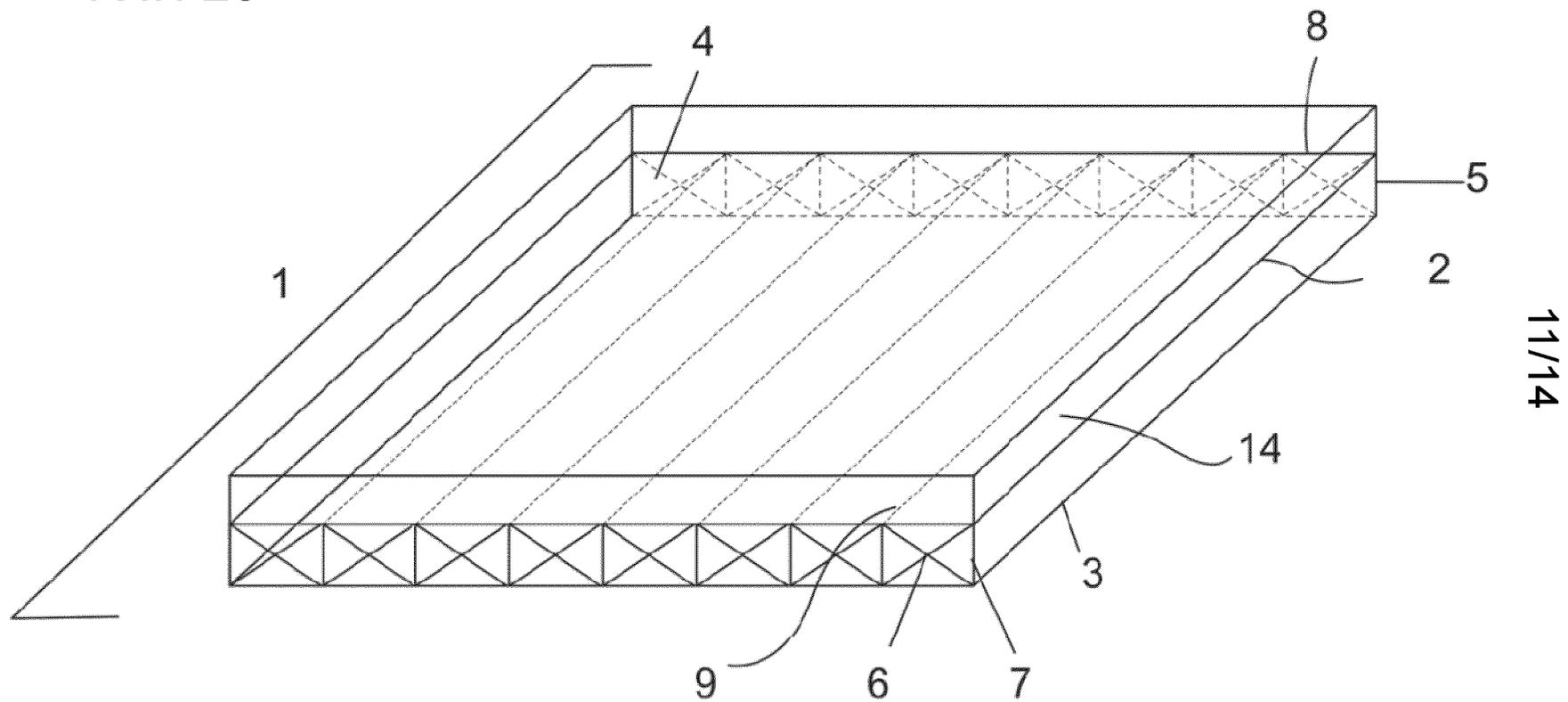
ФИГ. 17



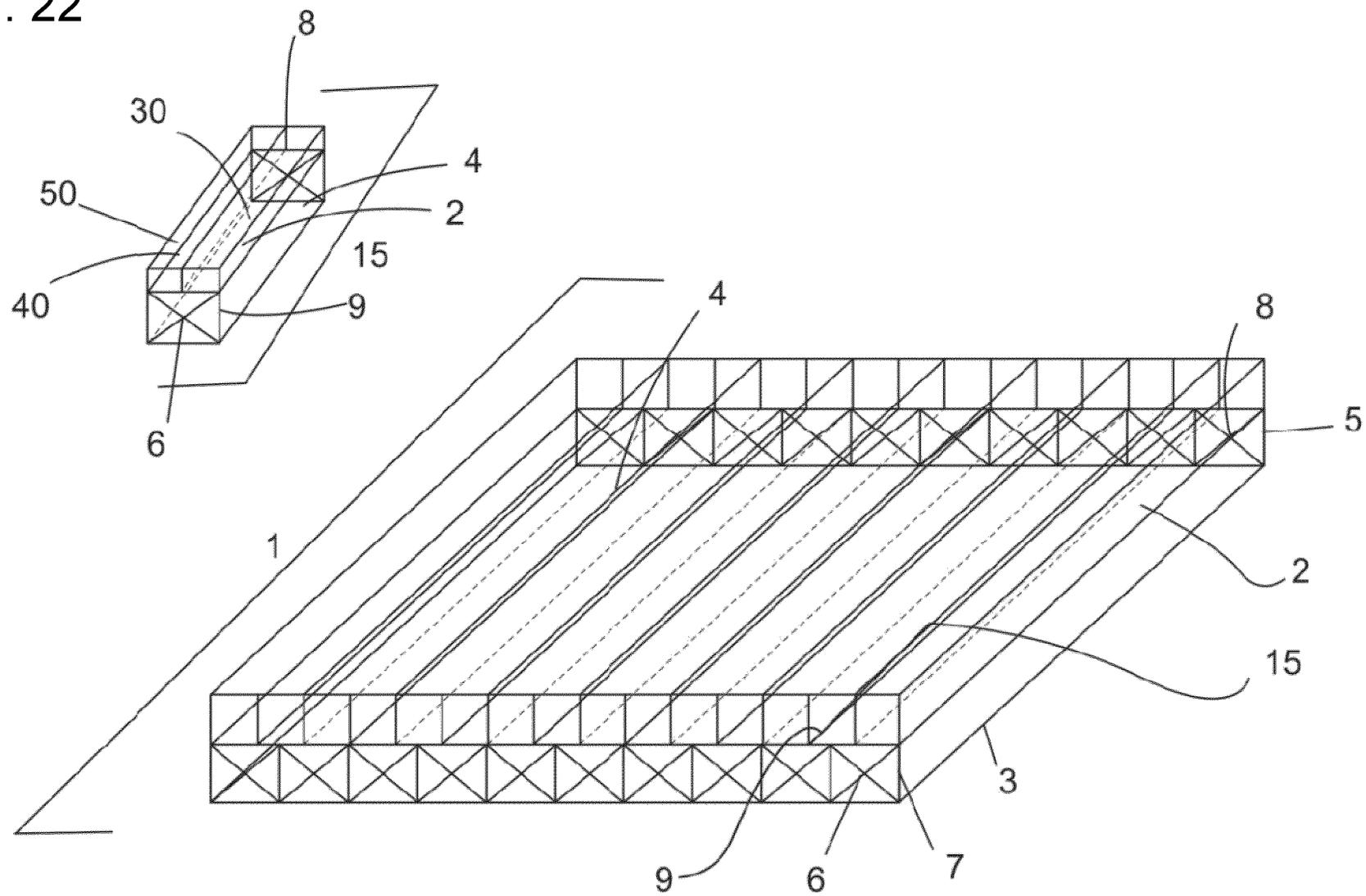
ФИГ. 18



ФИГ. 20



ФИГ. 22



ФИГ. 23

