

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090766** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.08.27

(51) Int. Cl. *C12N 1/14* (2006.01)  
*C12N 1/04* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.09.25

---

(54) **КРУПНОМАСШТАБНОЕ ПРОИЗВОДСТВО ЖИДКИХ И ТВЕРДЫХ ПРОДУКТОВ НА  
ОСНОВЕ TRICHODERMA**

---

(31) 62/564,683

(32) 2017.09.28

(33) US

(86) PCT/US2018/052516

(87) WO 2019/067379 2019.04.04

(71) Заявитель:  
ЛОКУС АГРИКАЛЧЕ АйПи  
КОМПАНИ, ЛЛК (US)

(72) Изобретатель:

**Фармер Шон, Алибек Кен, Мазумдер  
Шармистха (US)**

(74) Представитель:

**Хмара М.В., Осипов К.В., Пантелеев  
А.С., Ильмер Е.Г., Дощечкина В.В.,  
Липатова И.И., Новоселова С.В. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение обеспечивает способ производства грибов Trichoderma в промышленном масштабе. В конкретных вариантах его осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы получения как жидких продуктов на основе Trichoderma, так и твердых продуктов на основе Trichoderma из одной и той же стартовой посевной культуры и одного и того же инокулянта.

**202090766**  
**A1**

**202090766**

**A1**

# КРУПНОМАСШТАБНОЕ ПРОИЗВОДСТВО ЖИДКИХ И ТВЕРДЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ *TRICHODERMA*

## ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 Данная заявка претендует на приоритет и эффект изобретения в соответствии с предварительной заявкой на патент США с регистрационным номером 62/564,683, поданной 28 сентября 2017 г., содержание которой полностью включено в данную публикацию посредством ссылки.

## ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 Почвенные патогенные грибы могут вызывать значительное повреждение сельскохозяйственных культур. Эти паразиты вызывают, например, выпревание («черную ножку»), корневую гниль, гниль всходов и гниль корневой шейки у самых разнообразных растений-хозяев. Наиболее распространенными патогенными грибами такого сорта являются грибы родов *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Sclerotia*, *Cercospora*, *Ralstonia*, *Fragaria*, *Rhizopus*, *Botrytis*,  
15 *Colletotrichum*, *Magnaporthe* и многих других. Роды *Rhizoctonia*, *Pythium* и *Sclerotia* имеют исключительно широкий диапазон растений-хозяев и способны поражать многие распространенные коммерческие культуры, такие как бобы, томаты, хлопчатник, арахис, картофель, латук и декоративные цветковые растения.

20 Наиболее распространенные способы борьбы с этими патогенными видами грибов включают применение химических средств борьбы; однако эти химические вещества могут быть дорогостоящими, и они могут быть вредными для здоровья людей и для окружающей среды. Кроме того, они могут нарушать микросреду растений, например – за счет изменения окружающей экосистемы.

25 Альтернативой применению химических веществ является применение биологических средств борьбы, которые естественным образом присутствуют в экосистеме. Например, некоторые виды грибов *Trichoderma* обладают антагонистическими свойствами в отношении различных вредителей. Некоторые из этих грибов полезны при внесении в почву, где они могут размножаться и расти в тесной связи с корнями растений. Они способны частично защищать корни от  
30 инвазии других патогенных для растений грибов и других микробных и животных вредителей, а также способствуют стимуляции роста растений.

*Trichoderma* может обеспечивать устойчивую и длительную колонизацию поверхностей корней, проникая в эпидермис и близлежащие подповерхностные клетки. Эти ассоциации «корень-микроорганизм» вызывают значительные изменения протеома и метаболизма растения. Они продуцируют и/или выделяют различные соединения, которые вызывают местные или системные защитные реакции, приводящие к отсутствию патогенности для растений.

Кроме того, растения защищаются против многочисленных классов растительных патогенных микроорганизмов за счет реакций, которые сходны с системной приобретенной резистентностью и системной резистентностью, вызываемой ризобактериями. *Trichoderma* spp. могут эффективно подавлять болезни, вызываемые некоторыми почвенными растительными патогенными микроорганизмами. Например, виды *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum* и *Trichoderma viride* обладают фунгицидной активностью против *Sclerotium* spp, *Rhizoctonia*, *Solani*, *Pythium* spp, *Fusarium* spp, *Cercospora* spp, *Ralstonia* spp, *Fragaria* spp, *Rhizopus* spp, *Botrytis* spp, *Colletotrichum* spp, *Magnaporthe* spp. и многих других. Кроме того, некоторые штаммы *Trichoderma* способны эффективно подавлять рост некоторых вирусных и бактериальных растительных и почвенных патогенных микроорганизмов, а также обеспечивать значимые нематоцидные эффекты.

Кроме защиты растений от патогенных микроорганизмов и вредителей, колонизация корней *Trichoderma* spp. часто усиливает рост и развитие корней, повышает продуктивность сельскохозяйственной культуры, устойчивость против абиотических стрессов и биодоступность питательных веществ.

Несмотря на потенциальную эффективность применения штаммов *Trichoderma* для повышения уровня здоровья растений, отсутствие высокоэффективной технологии крупномасштабного производства этих организмов создает определенные трудности для коммерциализации. Наиболее распространенным способом выращивания *Trichoderma* является их выращивание на стандартных твердых средах, а способы согласно предшествующему уровню техники являются слишком дорогостоящими и непрактичными для коммерческой адаптации. С другой стороны, способы выращивания *Trichoderma* в жидких средах, то есть в глубинных культурах, являются лабораторными или мелкомасштабными способами и не могут обеспечить *Trichoderma* в количествах, необходимых для того, чтобы сделать их коммерчески целесообразными (например, для обработки сотен,

тысяч или даже миллионов акров земель, занятых сельскохозяйственными культурами).

Размножение *Trichoderma* с использованием крупномасштабного способа глубинного культивирования или сочетание глубинного культивирования и культивирования на твердой среде были бы наиболее подходящими для коммерческого производства; однако неизвестны коммерческие способы такого рода, которые были бы крупномасштабными и дешевыми. Поэтому существует потребность в усовершенствованных способах производства грибов *Trichoderma*, которые могли бы быть масштабированы для коммерческого применения.

10

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к крупномасштабному производству жидких и сухих продуктов на основе микроорганизмов для коммерческого применения. Более конкретно, предложены материалы и способы для эффективного культивирования грибов, таких как *Trichoderma*, и/или получения побочных продуктов их размножения в крупном масштабе. Также предложены способы применения этих продуктов на основе микроорганизмов. Преимуществом настоящего изобретения является то, что его можно использовать в качестве экологически чистого («зеленого») способа производства микроорганизмов в крупном масштабе и с малыми затратами без выделения вредных химических веществ в окружающую среду.

20

Настоящее изобретение обеспечивает системы для эффективного производства и применения полезных микроорганизмов, а также для производства и применения веществ, таких как метаболиты, полученных из этих микроорганизмов и ферментационной среды, в которой они производятся. Организмы по настоящему изобретению включают, например, дрожжи, грибы, бактерии, археи и растительные клетки. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения микроорганизмами являются грибы. Еще более предпочтительно микроорганизмами являются грибы *Trichoderma*, включая, но не ограничиваясь этим, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* и/или *Trichoderma hamatum*.

25

В частных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает композиции на основе микроорганизмов, содержащие клад грибов *Trichoderma* и/или побочные продукты их роста. Продукты на основе *Trichoderma* могут быть, например, в жидкой или сухой форме. Преимуществом является то, что в варианте

30

осуществления настоящего изобретения продукты на основе микроорганизмов могут иметь форму инокулянта, который можно масштабировать до промышленных концентраций для коммерческих применений с использованием глубоинной ферментации, твердофазной ферментации и/или их комбинаций или гибридов.

5           Продукты на основе *Trichoderma* могут содержать сами микроорганизмы и/или побочные продукты их роста. Микроорганизмы могут быть жизнеспособными, активными или находиться в неактивной форме. Они могут находиться в форме вегетативных клеток, спор, конидий, мицелия, гиф и/или их комбинации. Не обязательно композиции могут содержать ферментационную среду, в которой  
10 размножались микроорганизмы, а также остаточные и/или добавленные питательные вещества, способствующие микробному росту.

Кроме того, продукты на основе *Trichoderma* по настоящему изобретению могут быть разработаны, например, в качестве биоудобрений и/или биопестицидов, которые можно использовать в прикладных задачах, включающих, например,  
15 садоводство, огородничество, тепличное производство, а также крупномасштабное фермерское производство и лесовосстановительную деятельность. Продукт можно также использовать, например, для обработки семян, рекультивации земель, для интенсивного производства, для укрепления здоровья корней растений и/или для стимуляции роста растений.

20           В предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает культивирование как жидких форм продуктов на основе микроорганизмов, так и твердых продуктов на основе микроорганизмов из одной посевной культуры. В частных вариантах осуществления настоящего изобретения продуктами на основе микроорганизмов являются продукты на основе *Trichoderma*  
25 согласно описанию изобретения.

Способы производства микроорганизмов могут включать глубоинную ферментацию, твердофазную ферментацию или их гибриды и/или их комбинации. В варианте осуществления настоящего изобретения способы можно использовать для производства инокулянта для производства продуктов на основе микроорганизмов в  
30 промышленном масштабе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы производства жидких и твердых продуктов на основе

микроорганизмов (например, продуктов на основе *Trichoderma*) из одной посевной культуры в промышленных количествах, которые включают:

(a) получение инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул из посевной культуры *Trichoderma*;

5 (b) культивирование инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул в жидкой питательной культуральной среде в реакторе до получения желаемой плотности микроорганизмов в гранулах;

(c) сбор инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул из жидкой культуральной среды;

10 (d) приготовление жидкой формы продукта на основе *Trichoderma*, при этом культивированные инокулянты в форме альгинат-агаровых гранул используют для инокуляции реактора для глубокой ферментации, и/или приготовление твердого продукта на основе *Trichoderma*, при этом культивированные инокулянты в форме альгинат-агаровых гранул используют для инокуляции реактора для твердофазной  
15 ферментации.

Более конкретно, в варианте осуществления настоящего изобретения способы включают (a) приготовление инокулянта на основе *Trichoderma* в форме альгинатных гранул, содержащих предварительно полученную посевную культуру, питательные компоненты, альгинат натрия и агар. Инокулянт в форме альгинатных  
20 гранул можно получить посредством объединения стерильной жидкой питательной среды со стерильной смесью 1% агара и 2% альгината натрия и 5% гомогенной суспензии посевной культуры с получением раствора инокулянта.

Затем используют капельное разбрызгивающее устройство и перистальтический насос для подачи раствора инокулянта каплями в смесительный  
25 резервуар, содержащий 1%-ный раствор хлорида кальция. Во время процесса разбрызгивания капли раствора для посева (инокулянта) образуют гелевые гранулы, содержащие питательные компоненты и культуру *Trichoderma*, заключенную в альгинат-агаровой массе. После формирования гранул жидкость, оставшаяся в смесительном резервуаре, можно удалить и слить в систему для удаления жидких  
30 отходов.

В варианте осуществления настоящего изобретения способы включают (b) культивирование инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул в жидкой

питательной культуральной среде до получения желаемой плотности микроорганизмов внутри гранул и/или на поверхности гранул. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения инокулянты в форме альгинат-агаровых гранул собирают из смесительного резервуара и затем культивируют в реакторе, содержащем достаточный объем подходящей жидкой питательной среды, до получения высокой концентрации мицелия *Trichoderma*, распределенного внутри и по поверхности альгинат-агаровых гранул. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения часть *Trichoderma* также поступает в жидкую питательную среду из гранул.

В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения посевную культуру для получения гранул инокулянта можно получить из культуры, полученной с использованием глубоинной ферментации в подходящей жидкой культуральной среде при непрерывной аэрации и непрерывном перемешивании. Во время этой стадии температуру и pH поддерживают на постоянных или по существу постоянных уровнях (то есть, температуру поддерживают в диапазоне от примерно 28°C до примерно 30°C; pH – в диапазоне от примерно 5,0 до примерно 6,5). Посевную культуру можно выращивать в течение любого периода времени, достаточного для достижения желаемой концентрации и/или плотности микроорганизма, и затем гомогенизировать с получением суспензии посевной культуры.

В варианте осуществления настоящего изобретения способ включает (с) сбор инокулянтов в форме альгинат-агаровых гранул из жидкой культуральной среды после достижения желаемой плотности мицелия. Эти гранулы инокулянта могут содержать высокую концентрацию *Trichoderma* внутри и на поверхности. Гранулы можно применять для посева масштабированных культур сразу же после сбора, или гранулы можно обработать для кратковременного и/или длительного хранения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ после стадии (с) и перед стадией (d) дополнительно включает обработку гранул для хранения. Она может включать помещение собранных инокулянтов в форме альгинат-агаровых гранул в раствор для криоконсервации, так что инокулянты можно хранить в морозильной камере или холодильнике без снижения жизнеспособности микроорганизмов. Раствор для криоконсервации предпочтительно содержит воду и глицерин в соотношении, равном, например,

50%/50%. Этот раствор с помещенными в него гранулами инокулянта можно хранить в течение продолжительных периодов времени при температурах, лежащих, например, в диапазоне от  $-80^{\circ}\text{C}$  до  $-10^{\circ}\text{C}$ , или в течение более коротких периодов времени в стандартном холодильнике при температурах, лежащих, например, в диапазоне от  $-10^{\circ}\text{C}$  до  $4,0^{\circ}\text{C}$ , без снижения эффективности инокулянтной культуры. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гранулы хранят группами, например – от 1 гранулы до 50 гранул, в герметически закрытых флаконах.

В варианте осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает (d) приготовление масштабированной жидкой формы продукта на основе *Trichoderma* и/или приготовление масштабированной сухой, или твердой, формы продукта на основе *Trichoderma*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадия (d) включает применение гранул инокулянта для засеивания масштабированной культуры в реактор для глубинной ферментации, в реактор для твердофазной ферментации или в гибридную или модифицированную форму реактора в зависимости от того, желателен жидкий или твердый продукт.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения приготовление продукта в жидкой форме включает засеивание реактора для глубинной ферментации, содержащего жидкую питательную среду, альгинат-агаровыми гранулами инокулянта по настоящему изобретению.

В частном варианте осуществления настоящего изобретения гранулы инокулянта добавляют к жидкой питательной среде, находящейся, например, в реакторе, объем которого (рабочий объем) лежит в диапазоне от 200 галлонов (757,1 л) до 250 галлонов (946,4 л), при по существу постоянном перемешивании и постоянной аэрации при температуре, лежащей в диапазоне от примерно  $28^{\circ}\text{C}$  до примерно  $30^{\circ}\text{C}$ . pH среды в течение всего процесса ферментации поддерживают в диапазоне от примерно 5,0 до примерно 6,5. Культивирование проводят в течение периода времени, лежащего в диапазоне от 3 дней до 10 дней, или до тех пор, пока плотность конидий, полученных из инокулянта, будет составлять не менее  $5 \times 10^8$  конидий на мл жидкой среды.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения приготовление продукта в жидкой форме может включать простое культивирование остаточных микроорганизмов, которые остаются в жидкой среде из стадии (b) после того, как гранулы инокулянта были собраны согласно стадии (c). Остаточные

микроорганизмы можно культивировать во втором реакторе или в том же реакторе, где протекала стадия (b).

В варианте осуществления настоящего изобретения приготовление жидкого продукта на основе микроорганизмов дополнительно включает повышение концентрации микроорганизма до 1 биллиона пропагул в миллилитре и, при необходимости, добавление дополнительных добавок, консервантов и/или регуляторов pH. «Готовый к употреблению» жидкий продукт затем можно разлить в контейнеры (например, в контейнеры, объем которых равен 1 галлону (3,785 л)), герметически укупорить и маркировать для разнообразных применений, включая коммерческую деятельность.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает приготовление масштабированного твердого продукта на основе *Trichoderma* с использованием твердофазной ферментации или ее гибридной формы или модификации. Инокулянты на основе альгинат-агаровых гранул можно смешать с твердым или полутвердым субстратом, таким как вермикулит или пищевые продукты (например, кукурузная мука, рис, паста или бобы). Субстрат предпочтительно увлажняют в подходящей питательной среде, после чего смесь можно культивировать в инкубаторе в течение периода времени, лежащего в диапазоне от примерно 3 дней до примерно 10 дней или более или от примерно 5 дней до примерно 6 дней. Затем субстрат и культуру можно смешать и/или размолоть и высушить с получением продукта на основе *Trichoderma* в форме порошка для различных применений, в том числе – в коммерческой деятельности.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также обеспечивает способы получения метаболита и/или побочного продукта роста грибов, причем способ включает культивирование грибов в условиях, благоприятных для роста и продукции метаболита и/или побочного продукта роста и, необязательно, очистку метаболита и/или побочного продукта роста. В частных вариантах осуществления метаболит и/или побочный продукт роста является ферментом, биополимером, кислотой, растворителем, биосурфактантом, аминокислотой, нуклеиновой кислотой, пептидом, белком, липидом и/или углеводом.

СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ  
ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к крупномасштабному производству жидких и сухих продуктов на основе микроорганизмов для коммерческого применения. Более конкретно, обеспечены материалы и способы для эффективного культивирования грибов, таких как *Trichoderma*, и/или побочных продуктов их роста в крупном масштабе. Также предложены способы применения эти продуктов на основе микроорганизмов.

Настоящее изобретение обеспечивает системы для эффективного производства и применения полезных микроорганизмов, а также для производства и применения веществ, таких как метаболиты, полученных из этих микроорганизмов и ферментационной среды, в которую они продуцируются. Организмы по настоящему изобретению включают, например, дрожжи, грибы, бактерии, археи и растительные клетки. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения микроорганизмами являются грибы. Еще более предпочтительно микроорганизмами являются грибы *Trichoderma*, включая, но не ограничиваясь этим, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* и/или *Trichoderma hamatum*.

В частных вариантах осуществления настоящего изобретения обеспечены материалы и способы для культивирования жидких и твердых продуктов на основе микроорганизмов, содержащих грибы клада *Trichoderma* и/или побочные продукты роста *Trichoderma* с использованием глубинной ферментации, твердофазной ферментации или их гибридов и/или комбинаций. В варианте осуществления настоящего изобретения способы можно использовать для получения инокулята для производства этих продуктов на основе микроорганизмов в промышленном масштабе.

Избранные определения

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «композиция на основе микроорганизмов» означает композицию, которая содержит компоненты, полученные в результате роста микроорганизмов или других клеточных культур. Соответственно, композиция на основе микроорганизмов может содержать сами микроорганизмы и/или побочные продукты микробного роста. Микроорганизмы могут находиться в вегетативной форме, в форме спор, в форме мицелия, в любой другой форме микробной пропагулы или в смеси этих форм. Микроорганизмы могут

быть планктонными или находиться в форме биопленки, или являться смесью этих двух форм. Побочные продукты роста могут быть, например, метаболитами (например, биосурфактантами), компонентами клеточной мембраны, экспрессируемыми белками и/или другим клеточными компонентами.

5 Микроорганизмы могут быть интактными или лизированными. Клетки могут вообще отсутствовать или присутствовать, например, в концентрации, равной  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$  или более клеток или пропагул на миллилитр композиции. При использовании в контексте настоящего изобретения «пропагула» - это любая часть микроорганизма, 10 из которой может развиваться новый и/или зрелый организм, включая, но не ограничиваясь этим, клетки, мицелий, гифы, цисты, споры (например, репродуктивные споры, конидии, эндоспоры и/или экзоспоры), почки и семена.

Настоящее изобретение также обеспечивает «продукты на основе микроорганизмов», которые являются продуктами, которые можно использовать на 15 практике для достижения желаемого результата. Продукт на основе микроорганизмов может быть просто композицией на основе микроорганизмов, собранной из процесса культивирования микроорганизмов. Альтернативно, продукт на основе микроорганизмов может содержать дополнительные ингредиенты, которые были добавлены. Эти дополнительные ингредиенты могут включать, 20 например, стабилизаторы, буферы, носители (например, воду или солевые растворы), добавленные питательные вещества для поддержки дальнейшего микробного роста, непитательные стимуляторы роста и/или агенты, которые способствуют отслеживанию микроорганизмов и/или композиции в среде, к которой они применены. Продукт на основе микроорганизмов может также содержать смеси 25 композиций на основе микроорганизмов. Продукт на основе микроорганизмов может также содержать один или более компонентов композиции на основе микроорганизмов, которая была обработана каким-либо способом, включающим, но не ограничивающимся этим, фильтрацию, центрифугирование, лизис, сушку, очистку и т.п.

30 При использовании в контексте настоящего изобретения термин «инокулюм» или «инокулянт» (мн. число «инокулюмы») может быть включен в термин «продукт на основе микроорганизмов». При использовании в контексте настоящего изобретения термин «инокулюм» («инокулянт») означает продукт на основе микроорганизмов, который можно использовать, например, в качестве посевной 35 культуры для инокуляции крупномасштабной ферментационной системы или

способа ферментации. Инокулюм можно масштабировать в такой системе ферментации для получения желаемых количеств композиций и продуктов на основе микроорганизмов.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «выделенные» или «очищенные» означает молекулу нуклеиновой кислоты, полинуклеотид, полипептид, белок, органическое соединение, такое как мелкая молекула (например, молекулы, описанные ниже), или иное соединение, которые по существу не содержат других соединений, например – клеточного материала, с которыми они связаны в природе. Например, очищенный или выделенный полинуклеотид (рибонуклеиновая кислота (РНК) или дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)) не содержит генов или последовательностей, которые фланкируют его в естественном состоянии. Очищенный или выделенный полипептид не содержит аминокислот или последовательностей, которые фланкируют его в естественном состоянии. Очищенный или выделенный штамм микроорганизмов извлечен из среды, в которой он существует в природе. Соответственно, выделенный штамм может существовать, например, как биологически чистая культура или как споры (или другие формы штамма) в носителе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения очищенные соединения составляют по меньшей мере 60 масс. % (в пересчете на сухую массу) целевого соединения. Препарат предпочтительно содержит по меньшей мере 75 масс. %, более предпочтительно – по меньшей мере 90 масс. %, и наиболее предпочтительно – по меньшей мере 99 масс. % целевого соединения. Например, очищенное соединение является соединением, которое содержит по меньшей мере 90 масс. %, 91 масс. %, 92 масс. %, 93 масс. %, 94 масс. %, 95 масс. %, 98 масс. %, 99 масс. % или 100 масс. % целевого соединения. Степень чистоты измеряют любым подходящим стандартным способом анализа, например – посредством хроматографии на колонке, тонкослойной хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Термин «метаболит» относится к любому веществу, образующемуся в результате метаболизма (например, к побочному продукту роста), или к веществу, необходимому для участия в конкретном метаболическом процессе. Метаболит может быть органическим соединением, то есть исходным материалом (например, глюкоза), промежуточным соединением (например, ацетил-СоА) или конечным продуктом (например, н-бутанол) метаболизма. Примеры метаболитов могут

включать, но не ограничиваются этим, ферменты, токсины, кислоты, растворители, спирты, белки, углеводы, витамины, минеральные вещества, микроэлементы, аминокислоты, полимеры и поверхностно-активные вещества.

5 При использовании в контексте настоящего изобретения выражения «в увеличенном масштабе», «крупномасштабный», «коммерческого масштаба» и «промышленного масштаба» можно использовать как взаимозаменяемые, и они относятся к продуктам, которые в соответствии с их объемом, концентрацией, количеством, содержанием и/или эффективностью, можно использовать в промышленных и/или коммерческих применениях. Например, промышленное  
10 количество жидкого продукта на основе микроорганизмов или сухого продукта на основе микроорганизмов, растворенного в жидком носителе, может составлять от 100 галлонов (378,5 л) до 10000 галлонов (37854 л) или более. Промышленные и/или коммерческие применения могут включать, например, садоводство, огородничество, тепличное производство, сельское хозяйство, рекультивацию  
15 почвы, биовосстановление, восстановление лесных массивов и подавление вредителей.

При использовании в контексте настоящего изобретения термин «сбор» относится к извлечению части или всей композиции на основе микроорганизмов из резервуара, где происходит размножение микроорганизмов.

20 Переходный термин «содержащий», который является синонимом для «включающий» или «имеющий в составе», является инклюзивным или неограничивающим термином, и он не исключает дополнительных, не перечисленных элементов или стадий способа. В противоположность этому, переходное выражение «состоящий из» исключает любые элементы, стадии или  
25 ингредиенты, не перечисленные в пункте формулы изобретения. Переходное выражение «состоящий по существу из» ограничивает объем пункта формулы изобретения указанными материалами или стадиями и теми материалами или стадиями, «которые не оказывают существенного влияния на базовые и новые характеристики» настоящего изобретения.

30 Если конкретно не указано или не очевидно из контекста, то при использовании в контексте настоящего изобретения термин «или» следует понимать как инклюзивный. Если конкретно не указано или не очевидно из контекста, то при использовании в контексте настоящего изобретения формы единственного или множественного числа следует понимать как таковые.

Если конкретно не указано или не очевидно из контекста, то при использовании в контексте настоящего изобретения термин «примерно» следует понимать как лежащий в диапазоне нормальных допусков в данной области техники, например – в пределах 2 стандартных отклонений от среднего.

5 «Примерно» следует понимать как лежащий в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от указанного значения.

Приведение перечня химических групп в любом определении переменной величины в данной публикации включает определения этой переменной величины как любой отдельной группы или комбинации перечисленных групп. Приведение

10 варианта осуществления переменной величины или аспекта в данной публикации включает то, что вариант осуществления является любым отдельным вариантом осуществления или комбинацией с другими вариантами осуществления или их частями.

Все источники, цитируемые в данной публикации, полностью включены в

15 данную публикацию посредством ссылок.

#### Способы производства продуктов на основе *Trichoderma*

Настоящее изобретение обеспечивает способы культивирования микроорганизмов *Trichoderma* и производства микробных метаболитов и/или других побочных продуктов микробного роста. В некоторых вариантах осуществления

20 настоящего изобретения предложены способы производства как сухой, так и жидкой формы продуктов на основе *Trichoderma*. Способы производства микроорганизмов могут включать глубинную культуру, твердофазную ферментацию или их гибриды и/или комбинации. При использовании в контексте настоящего изобретения термин «ферментация» относится к культивированию и/или росту клеток в регулируемых

25 условиях. Рост может быть аэробным или анаэробным.

В варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает материалы и способы для производства биомассы (например, жизнеспособного клеточного материала), внеклеточных метаболитов (например, мелких молекул и

30 экскретируемых белков), остаточных питательных веществ и/или внутриклеточных компонентов (например, ферментов или других белков).

Резервуар для роста микроорганизмов (например, реактор), используемый согласно настоящему изобретению, может иметь функциональные управляющие устройства/датчики, или он может быть подсоединен к функциональным

управляющим устройствам/датчикам для измерения важных факторов в процессе культивирования, таких как pH, содержание кислорода, давление, температура, влажность, вязкость и/или плотность микроорганизмов и/или концентрация метаболита.

5 Резервуар реактора можно инокулировать выбранным микроорганизмом. Предпочтительно резервуар инокулируют инокулянтom, полученным согласно настоящему изобретению, например инокулянтom в форме альгинат-агаровых гранул, описанным в данной публикации. В зависимости от размера резервуара количество инокулянтom, необходимое для инокуляции резервуара для  
10 крупномасштабного производства, может лежать в диапазоне от 1 гранулы инокулянта до 40 или 50 гранул или более.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения в резервуаре можно также осуществлять текущий контроль роста микроорганизмов (например, измерение числа клеток и определение фаз роста). Альтернативно из резервуара  
15 можно ежедневно извлекать образец и выполнять подсчет способами, известными в данной области техники, например – способом посева разведений. Посев разведений – это простой способ, используемый для определения числа микроорганизмов в образце. Способ также может обеспечить показатель, с использованием которого можно сравнивать различные среды или обработки.

20 Способ может предусматривать оксигенацию растущей культуры. В варианте осуществления настоящего изобретения используют медленное перемещение потока воздуха с целью удаления воздуха с низким содержанием кислорода и подачи воздуха с высоким содержанием кислорода. В случае глубоинной ферментации воздух с высоким содержанием кислорода может быть атмосферным  
25 воздухом, подаваемым ежедневно с использованием механизмов, включающих крыльчатки для механического взбалтывания жидкости и распылители воздуха для подачи пузырьков газа в жидкость для растворения кислорода в жидкости.

В варианте осуществления настоящего изобретения способ включает обогащение культуры источником азота. Источником азота может быть, например,  
30 нитрат калия, нитрат аммония, сульфат аммония, фосфат аммония, аммиак, мочеви́на и/или хлорид аммония. Эти источники азота можно использовать независимо друг от друга или в форме комбинации двух или более из них.

Способ может дополнительно включать обогащение культуры источником углерода. Источником углерода в характерном случае является углевод, такой как глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, трегалоза, манноза, маннитол, мальтоза, картофельная декстроза, целлюлоза, крахмал и/или ламинарин; органические кислоты, такие как уксусная кислота, фумаровая кислота, лимонная кислота, пропионовая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота и/или пировиноградная кислота; спирты, такие как этанол, пропанол, бутанол, пентанол, гексанол, изобутанол и/или глицерин; жиры и масла, такие как соевое масло, масло из рисовых отрубей, оливковое масло, масло канолы, растительное масло, кукурузное масло, кунжутное масло и/или льняное масло, и т.п. Эти источники углерода можно использовать независимо друг от друга или в форме комбинации двух или более из них.

В варианте осуществления настоящего изобретения в питательную среду включены факторы роста и микроэлементы. Это особо предпочтительно в случае культивирования микроорганизмов, которые не способны продуцировать все необходимые им витамины. Неорганические питательные вещества, включая микроэлементы, такие как железо, цинк, медь, марганец, молибден и/или кобальт, также можно включить в среду. Кроме того, можно включить источники витаминов, незаменимых аминокислот и микроэлементов, например, в форме муки тонкого или крупного помола, такой как кукурузная мука, или в форме экстрактов, таких как дрожжевой экстракт, картофельный экстракт, говяжий экстракт, соевый экстракт, экстракт банановой кожуры и т.п., или в очищенных формах. Также можно включить аминокислоты, например – аминокислоты, используемые для биосинтеза белков.

В варианте осуществления настоящего изобретения также можно включить неорганические соли. Применимыми неорганическими солями могут быть дигидрофосфат калия, вторичный кислый фосфат калия, вторичный кислый фосфат натрия, сульфат магния, хлорид магния, сульфат железа, хлорид железа, сульфат марганца, хлорид марганца, сульфат цинка, хлорид свинца, сульфат меди, хлорид кальция, карбонат кальция и/или карбонат натрия. Эти неорганические соли можно использовать независимо друг от друга или в форме комбинации двух или более из них.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ культивирования может дополнительно включать добавление в жидкую среду дополнительных кислот и/или антимикробных средств до и/или во время процесса

культивирования с целью защиты культуры против загрязнения нежелательными микроорганизмами. Кроме того, можно также добавить противовспенивающие агенты для предотвращения пенообразования и/или скопления пены при образовании газа во время культивирования.

- 5 рН смеси должен быть подходящим для роста грибов, в частности - *Trichoderma*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рН лежит в диапазоне от примерно 5,0 до примерно 7,0, предпочтительно – от примерно 5,0 до примерно 6,5. Буферы и регуляторы рН, такие как карбонаты и фосфаты, можно использовать для стабилизации рН вблизи предпочтительного значения. Если присутствуют ионы металлов в высоких концентрациях, может быть
- 10 необходимым использование хелатирующего агента в жидкой среде.

Способ и оборудование для культивирования микроорганизмов *Trichoderma* и производства микробных побочных продуктов можно осуществить в форме периодического, квазинепрерывного или непрерывного процессов.

- 15 В варианте осуществления настоящего изобретения способ культивирования осуществляют при температуре, лежащей в диапазоне от примерно 5°C до примерно 100°C, предпочтительно - от примерно 15°C до примерно 60°C, более предпочтительно - от примерно 25°C до примерно 30°C. В другом варианте осуществления настоящего изобретения культивирование можно осуществлять
- 20 непрерывно при постоянной температуре. В другом варианте осуществления настоящего изобретения культивирование может быть осуществлено при переменных температурах.

- В варианте осуществления настоящего изобретения оборудование, используемое в способе и процессе культивирования, является стерильным.
- 25 Оборудование для культивирования, такое как реактор/резервуар, может быть отдельным от блока стерилизации, например – автоклава, но соединенным с ним. Оборудование для культивирования может также иметь блок стерилизации, который осуществляет стерилизацию *in situ* до начала инокуляции. Воздух можно стерилизовать способами, известными в данной области техники. Например,
- 30 атмосферный воздух можно пропустить через по меньшей мере один фильтр перед подачей в резервуар. В других вариантах осуществления настоящего изобретения среду можно пастеризовать или, необязательно, вообще не нагревать, а для регулирования роста бактерий использовать воду с низкой активностью и низким рН.

В варианте осуществления настоящее изобретение также обеспечивает способ производства микробных метаболитов, таких как этанол, молочная кислота, бета-глюкан, белки, пептиды, промежуточные метаболиты, полиненасыщенные жирные кислоты и липиды, причем способ включает культивирование микроорганизма в условиях, благоприятных для роста и экспрессии метаболитов. В частных вариантах осуществления настоящего изобретения метаболит является ферментом, биополимером, кислотой, растворителем, биосурфактантом, аминокислотой, нуклеиновой кислотой, пептидом, белком, липидом и/или углеводом. Концентрация метаболита, произведенного способом, может быть равна, например, по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%.

В случае глубинной ферментации содержание биомассы в ферментационном бульоне может лежать, например, в диапазоне от 5 г/л до 180 г/л или более. В варианте осуществления настоящего изобретения содержание твердых веществ в бульоне лежит в диапазоне от 10 г/л до 150 г/л.

Побочный продукт микробного роста, продуцируемый *Trichoderma*, может оставаться внутри микроорганизмов или секретироваться в культуральную среду. В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ производства побочного продукта микробного роста может дополнительно включать стадии концентрирования и очистки целевого побочного продукта микробного роста. В следующем варианте осуществления настоящего изобретения жидкая среда может содержать соединения, которые стабилизируют активность побочного продукта микробного роста.

В варианте осуществления настоящего изобретения всю композицию микробной культуры извлекают после завершения культивирования (например, после достижения желаемой плотности клеток или плотности определенного метаболита в среде). В этой периодической процедуре после сбора первой партии начинают производить абсолютно новую партию.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения каждый раз извлекают только часть продукта ферментации. В этом варианте осуществления настоящего изобретения биомасса с жизнеспособными клетками остается в резервуаре в качестве инокулянта для новой культивируемой партии. Извлекаемая композиция может быть бесклеточным бульоном или субстратом, или она может содержать клетки. Таким образом создают квазинепрерывную систему.

Преимуществом является то, что способ не требует сложного оборудования или большого расхода энергии. *Trichoderma* можно культивировать в малом или крупном масштабе на месте и использовать даже в форме смеси со средой. Сходным образом микробные метаболиты также можно производить в больших количествах в том месте, где они требуются.

Организмы, которые можно культивировать с использованием настоящего изобретения, могут включать, например, дрожжи, грибы, бактерии, археи и растительные клетки. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения микроорганизмы являются грибами. Еще более предпочтительно микроорганизмы являются грибами *Trichoderma*, включающими, но не ограниченными этим, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum* (*Trichoderma narcissi*), *Trichoderma viride* и/или *Trichoderma hamatum*.

Согласно настоящему изобретению можно производить и другие грибы, включающие *Mycorrhizae*, эктомикоризные грибы, дрожжи, такие как *Starmerella bombicola*, и даже споры грибов, образующих плодовое тело, таких как шиитаке (*Lentinula edodes*).

Согласно настоящему изобретению можно выращивать крупномасштабные коммерческие количества продуктов на основе *Trichoderma*. Преимуществом является то, что *Trichoderma* можно выращивать в течение периода времени, лежащего в диапазоне от 3 дней до 10 дней или от 5 дней до 6 дней, с получением выходов, лежащих в диапазоне от  $5 \times 10^8$  до  $5 \times 10^9$  конидий на мл жидкой культуры, с использованием ферментационного реактора, объем которого равен 200 галлонам (757,1 л), и с получением более чем  $1 \times 10^9$  конидий на грамм сухого продукта в инкубаторе, таком как герметичный термостатируемый реактор.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы производства жидких и твердых продуктов на основе микроорганизмов (например, продуктов на основе *Trichoderma*) из одной посевной культуры в промышленных количествах. Преимуществом является то, что использование инокулянтов в форме альгинат-агаровых гранул (или «гранул инокулянта», «гранулированных инокулянтов», «гранул» или «инокулянтов») по настоящему изобретению обеспечивает инокуляцию реактора значительно большей концентрацией клеток, чем это было возможно при использовании стандартного жидкого инокулянта. «Высокая концентрация» означает, например, по меньшей

мере  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  или более клеток или пропагул желаемого микроорганизма на единицу (массы или объема).

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения способы включают:

5 (a) получение инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул из посевной культуры *Trichoderma*;

(b) культивирование инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул в жидкой питательной культуральной среде в реакторе до получения желаемой плотности микроорганизмов в гранулах;

10 (c) сбор инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул из жидкой культуральной среды;

(d) приготовление жидкой формы продукта на основе *Trichoderma*, при этом культивированные инокулянты в форме альгинат-агаровых гранул используют для инокуляции реактора для глубокой ферментации, и/или приготовление твердого  
15 продукта на основе *Trichoderma*, при этом культивированные инокулянты в форме альгинат-агаровых гранул используют для инокуляции реактора для твердофазной ферментации.

Более конкретно, в варианте осуществления настоящего изобретения способы включают (a) получение инокулянта на основе *Trichoderma* в форме  
20 альгинат-агаровых гранул, содержащих предварительно полученную посевную культуру, питательные компоненты, альгинат натрия и агар. Посевную культуру (например, 5%-ную гомогенную суспензию посевной культуры) можно растворить в стерильной питательной среде и объединить со смесью агара и альгината натрия с получением раствора инокулянта.

25 Концентрация альгината в растворе инокулянта может лежать в диапазоне от примерно 0,1% до примерно 3,0%, предпочтительно – от примерно 0,5% до примерно 2,5%, более предпочтительно она равна примерно 2,0%. Концентрация агара может лежать в диапазоне от примерно 0,1% до примерно 2,0%, предпочтительно – от примерно 0,5% до примерно 1,5%, более предпочтительно  
30 она равна примерно 1,0%. В варианте осуществления настоящего изобретения альгинат-агар можно автоклавировать и/или нагреть перед смешиванием с посевной культурой.

Затем используют капельное разбрызгивающее устройство и перистальтический насос для подачи раствора инокулята каплями в смесительный резервуар, содержащий раствор хлорида кальция. Во время процесса разбрызгивания капли инокулята образуют гелевые гранулы, содержащие питательные компоненты и культуру *Trichoderma*, заключенную в альгинат-агаровой массе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения из одной загрузки получают от примерно 5 кг до примерно 10 кг инокулянта в форме альгинатных гранул. После формирования гранул жидкость, оставшаяся в смесительном резервуаре, можно удалить и слить в систему для удаления жидких отходов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения раствор  $\text{CaCl}_2$  может быть раствором с концентрацией, лежащей в диапазоне от примерно 1,0% до примерно 5,0%, предпочтительно - раствором с концентрацией, лежащей в диапазоне от примерно 1,0% до примерно 2,0%.

В варианте осуществления настоящего изобретения смесительный резервуар является мобильным ротационным баком, оборудованным мотором. Бак может иметь объем, лежащий в диапазоне от примерно 2 кубических футов (56,63 л) до примерно 4 кубических футов (113,3 л) или до примерно 6 кубических футов (169,9 л) или более, и он может быть изготовлен из полиэтилена, любого другого полимерного материала или металла. Ротационный бак может содержать, например, от 5 галлонов (18,93 л) до 10 галлонов (37,85 л) 1%-ного раствора хлорида кальция.

В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения посевная культура для получения гранул инокулянта может быть получена из культуры, полученной с использованием глубинной ферментации в подходящей жидкой культуральной среде (см., например, публикацию Elad et al. (1982), содержание которой включено в данную публикацию посредством ссылки) при непрерывной аэрации и непрерывном перемешивании. Температуру и pH во время этой стадии поддерживают на постоянных или по существу постоянных уровнях (например, температуру поддерживают в диапазоне от примерно 28°C до примерно 30°C; pH поддерживают в диапазоне от примерно 5,0 до примерно 6,5). Посевную культуру можно выращивать в течение любого периода времени, достаточного для достижения желаемой концентрации и/или плотности микроорганизма, и затем гомогенизировать с получением суспензии посевной культуры.

В варианте осуществления настоящего изобретения способы включают (b) культивирование инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул в жидкой питательной культуральной среде до получения желаемой плотности микроорганизмов внутри гранул и/или на поверхности гранул. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения инокулянты в форме альгинат-агаровых гранул собирают из смесительного резервуара и затем культивируют в реакторе, содержащем достаточный объем подходящей жидкой питательной среды, до получения высокой концентрации мицелия *Trichoderma*, растущего внутри каждой альгинат-агаровой гранулы и распределенного по поверхности гранул. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения параметры культивирования для стадии (b), такие как температура, среда и pH, могут быть такими же, как параметры, использованные для производства начальной посевной культуры. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения некоторое количество клеток *Trichoderma* также растет в жидкой питательной среде, отдельно от гранул инокулянта.

В варианте осуществления настоящего изобретения способ включает стадию (c), во время которой инокулянт в форме альгинат-агаровых гранул собирают из жидкой культуральной среды. Эти гранулы инокулянта могут содержать высокую концентрацию *Trichoderma* внутри и/или на поверхности. Гранулы можно применять для посева масштабированных культур сразу же после сбора, или гранулы можно обработать для кратковременного и/или длительного хранения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гранулы после сбора помещают в контейнер, например – в пробирку или флакон.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ после стадии (c) и перед стадией (d) может дополнительно включать обработку гранул для хранения. Эта обработка может включать суспендирование собранных инокулянтов в форме альгинат-агаровых гранул в растворе для криоконсервации, так что инокулянты можно хранить в морозильной камере или холодильнике без снижения жизнеспособности микроорганизмов. Предпочтительно хранение осуществляют в пробирке, колбе, цилиндре, флаконе или чашке Петри или в другом сходном стандартном лабораторном контейнере.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения раствор для криоконсервации содержит воду и вещество-криопротектор. Криопротекторы – это известные вещества, препятствующие замерзанию, которые способны защищать

клетки и другие биологические ткани от повреждения, вызванного замерзанием и образованием льда. Многие виды животных и растений, живущих в зонах с холодным климатом, продуцируют природные криопротекторы для защиты своих организмов и клеток. Выделенные и синтетические криопротекторы используют также для консервации биологических материалов, предназначенных для биологических исследований и содержащихся в пищевых продуктах.

Примеры криопротекторов, которые можно использовать по настоящему изобретению, включают, но не ограничены этим, гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль и глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), трегалозу, 2-метил-2,4-пентандиол (МПД) и сахарозу.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения раствор для криоконсервации содержит воду и глицерин, причем процентное содержание глицерина лежит в диапазоне от 35% до 75%, предпочтительно оно равно примерно 50%.

Этот раствор с помещенными в него гранулами инокулянта можно хранить в течение длительных периодов времени в морозильной камере, например – при температуре, лежащей в диапазоне от примерно  $-80^{\circ}\text{C}$  до примерно  $0^{\circ}\text{C}$ , предпочтительно - от примерно  $-80^{\circ}\text{C}$  до примерно  $-20^{\circ}\text{C}$ . Хранение при этих температурах может длиться сколько угодно с сохранением эффективности и жизнеспособности находящегося в растворе биологического материала, например – в течение 1 месяца, 6 месяцев или 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет или даже 10 лет или более.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, когда желательным является более короткий срок хранения, равный, например, 1 месяцу или менее, контейнеры, содержащие гранулы инокулянта, суспендированные в растворе глицерина, можно хранить в холодильнике при температуре, лежащей в диапазоне от примерно  $-15^{\circ}\text{C}$  до примерно  $4^{\circ}\text{C}$ , или от примерно  $-10^{\circ}\text{C}$  до примерно  $4^{\circ}\text{C}$ , или от примерно  $0^{\circ}\text{C}$  до  $4^{\circ}\text{C}$ .

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гранулы хранят группами, содержащими раствор для криоконсервации, например – от 1 гранулы до 50 гранул в герметично закрытом контейнере.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения гранулы не собирают из ферментационного реактора согласно стадии (с), а вместо этого

заливают раствор для криоконсервации непосредственно в ферментационный реактор, использованный на стадии (b), и используют сам реактор для хранения и консервации всей партии гранул. Температуру внутри реактора можно соответствующим образом отрегулировать.

5 В варианте осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает стадию (d) приготовления увеличенного количества жидкой формы продукта на основе *Trichoderma* и/или приготовления увеличенного количества сухой или твердой формы продукта на основе *Trichoderma*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадия (d) включает применение гранул  
10 инокулянта для посева увеличенного количества культуры в реактор для глубинной ферментации, в реактор для твердофазной ферментации или в гибридную или модифицированную форму реактора в зависимости от того, желателен жидкий или твердый продукт.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения  
15 приготовление продукта в жидкой форме включает засеивание реактора для глубинной ферментации, содержащего жидкую питательную среду, альгинат-агаровыми гранулами инокулянта по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если, например, гранулы инокулянта консервировали с использованием раствора глицерина, гранулы можно  
20 извлечь непосредственно из морозильной камеры или холодильника, где они хранились, и использовать для засеивания реактора. Преимуществом является то, что способы по настоящему изобретению позволяют инокулировать несколько крупномасштабных ферментационных реакторов (например, имеющих объем, лежащий в диапазоне от 100 галлонов (378,5 л) до 2000 галлонов (7571 л) или до  
25 10000 галлонов (37854 л) или более) с использованием одной посевной культуры.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения крупномасштабное (масштабированное) производство осуществляют в новом, портативном и распределяемом реакторе. Ферментацию с использованием этой системы проводят в форме периодического процесса без взбалтывания, но с  
30 перемешиванием и аэрацией. В варианте осуществления настоящего изобретения система содержит бак большого объема. Реактор может дополнительно содержать систему перемешивания, содержащую первую и вторую системы трубопроводов, причем первая система трубопроводов расположена на левой вертикальной стороне бака, а вторая система трубопроводов расположена на правой

вертикальной стороне бака. Каждая система трубопроводов может быть оборудована насосами, способными перемещать культуральную жидкость со дна бака вверх через трубопровод и обратно в верхнюю часть бака со скоростью, достигающей примерно 200 галлонов (757,1 л) в минуту. Эти системы  
5 трубопроводов могут работать непрерывно в течение всего процесса ферментации для перемешивания культуры.

Этот однокамерный реактор может содержать распределитель воздуха, снабжаемый профильтрованным воздухом от нагнетательного вентилятора, способного подавать 2 литра воздуха на литр культуры в минуту.  
10 Профильтрованный воздух для распределения может генерироваться системой перекачивания воды большого объема, содержащей насосы, снабженные дополнительными фильтрами.

Реактор системы предпочтительно имеет рабочий объем, лежащий в диапазоне от 200 галлонов (757,1 л) до 2000 галлонов (7571 л), но он может быть  
15 меньше (например, от 100 галлонов (378,5 л) до 200 галлонов (757,1 л)) или больше (например, до 10000 галлонов (37845 л) или более). Однако размеры и конфигурация реакторов могут варьироваться (в зависимости, например, от желаемого конечного промышленного объема продукта на основе микроорганизмов). Систему можно использовать для получения культур различных  
20 штаммов и видов микроорганизмов, и она практически не имеет ограничений в отношении общего количества продукта на основе микроорганизмов, которое может быть произведено.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для снижения себестоимости производства культуры и обеспечения масштабируемости  
25 производства ферментационные системы не стерилизуют с использованием традиционных способов. Вместо этого используют способ санитарной обработки пустого резервуара, который включает обработку внутренних поверхностей 2-3%-ным раствором пероксида водорода и промывку отбеливателем и горячей водой под высоким давлением. Дополнительно для снижения вероятности значимого  
30 загрязнения воду, используемую для получения культивируемой культуры, фильтруют через фильтр с диаметром ячеек, равным 0,1 мкм. Компоненты культуральной среды обеззараживают посредством термической обработки при температуре, лежащей в диапазоне от 85°C до 90°C, или растворяют в 3%-ном

растворе пероксида водорода (соотношение объемов сухих компонентов и H<sub>2</sub>O равно 1:3).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения среда для использования на стадии расширенного производства *Trichoderma* является жидкой базовой питательной средой, содержащей бульон на основе картофельной декстрозы или глюкозу в качестве источника углерода. Среда может также содержать дополнительный источник углерода и источник азота. Дополнительный источник углерода может быть выбран из глюкозы, сахарозы, мальтозы, фруктозы, целлюлозы, крахмала и ламинарина. Необязательно среда может также содержать солодовый экстракт.

В жидкой базовой питательной среде можно использовать различные источники азота, хотя предпочтительно используют нитраты или нитриты. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения в качестве источника азота используют нитрат аммония.

Жидкая базовая питательная среда может также содержать подходящие количества минеральных веществ и микроэлементов, таких как MgSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, KCl и K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Также можно добавить другие микроэлементы и минеральные вещества.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения жидкая базовая питательная среда содержит экстракт дрожжей в качестве источника витаминов. Для того чтобы получить «органический» продукт, в питательную среду не следует включать антибактериальные вещества, такие как антибиотики. Вместо этого следует использовать натуральные компоненты с антибактериальными свойствами (например, биосурфактанты, такие как софоролипиды и рамнолипиды, и/или хмелевые кислоты или шишки хмеля), при условии, что они не оказывают неблагоприятного эффекта на микроорганизм, производимый способами по настоящему изобретению (например, различные виды *Trichoderma*).

В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения жидкая базовая питательная среда для крупномасштабного производства *Trichoderma* в реакторных системах по настоящему изобретению содержит компоненты в количествах, указанных в Таблице 1 из Примера 1, приведенного ниже.

Температура ферментации для крупномасштабного производства продуктов на основе *Trichoderma* должна лежать в диапазоне от примерно 25°C до примерно

32°C, предпочтительно – от примерно 28°C до примерно 30°C. pH должен лежать в диапазоне от примерно 5,0 до примерно 6,5, предпочтительно – от примерно 5,5 до примерно 6,0. Стабилизация pH во время ферментации не является критической, однако pH не должен снижаться ниже 4,5. При необходимости может быть выполнено регулирование или поддержание значения pH во время ферментации с использованием ручных или автоматических способов, известных в данной области техники, таких как использование автоматических pH контроллеров для добавления щелочных компонентов. Предпочтительные щелочи, используемые для регулирования pH, включают NaOH и KOH, но не ограничены ими.

10 Предпочтительно культуру поддерживают в течение периода, лежащего в диапазоне от 3 дней до 10 дней или более или от 5 дней до 6 дней, пока плотность конидий, полученных из альгинатных гранул инокулянта не будет лежать в диапазоне от примерно  $5 \times 10^8$  до  $5 \times 10^9$  конидий на миллилитр жидкой культуры.

15 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения производство жидкой формы продукта может включать простое культивирование остаточных микроорганизмов, которые сохранились в оставшейся жидкой среде после сбора гранул инокулянта согласно стадии (с). Остаточные микроорганизмы можно культивировать во втором реакторе или в том же реакторе, где была проведена стадия (b).

20 В варианте осуществления настоящего изобретения получение жидкого продукта на основе микроорганизмов дополнительно включает повышение концентрации микроорганизма до 1 биллиона пропагул на миллилитр и, при необходимости, добавление дополнительных добавок, консервантов и/или регуляторов pH. «Готовый к употреблению» жидкий продукт затем можно разлить в  
25 контейнеры (например, контейнеры, объем которых равен 1 галлону (3,785 л)), герметически закупорить и маркировать для различных применений, в том числе - в коммерческой деятельности.

30 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает производство большого количества твердого продукта на основе *Trichoderma* с использованием твердофазной ферментации или ее гибридной или модифицированной формы. Инокулянты в форме альгинат-агаровых гранул можно смешать с твердым или полутвердым субстратом, таким как вермикулит или пищевые продукты (например, кукурузная мука, паста, рис или бобы). Субстрат предпочтительно увлажняют в подходящей питательной среде. Например, лотки

можно регулярно опрыскивать (например, раз в день, раз в два дня, раз в неделю) стерильной питательной средой в течение всей культивации.

Смесь можно культивировать в инкубаторе в течение периода времени, лежащего в диапазоне от примерно 3 дней до примерно 10 дней или более или от  
5 примерно 5 дней до примерно 6 дней. Затем субстрат и культуру можно перемешать и/или размолоть и высушить с получением продукта на основе *Trichoderma* в форме порошка для различных применений, в том числе – в коммерческой деятельности.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если, например, гранулы инокулянта консервировали с использованием раствора  
10 глицерина, гранулы можно извлечь непосредственно из морозильной камеры или холодильника, где они хранились, и использовать для засеивания твердого или полутвердого субстрата.

В частных вариантах осуществления настоящего изобретения производство твердого коммерческого продукта на основе, например, *Trichoderma* может включать  
15 смешивание собранных гранул с субстратом и питательной средой и инкубирование смеси в лотках. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лотки инкубируют в расстойных шкафах или сходных нагревательных аппаратах.

В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения, в котором используют вермикулит, вермикулит подвергают термической стерилизации  
20 в печи при 150°C в течение ночи. Примерно 3 или 4 части стерилизованного вермикулита тщательно перемешивают с 1 частью альгинат-агаровых гранул. Смесь тонким слоем распределяют по лоткам. Затем можно проводить культивирование в течение периода времени, лежащего в диапазоне от примерно 5 дней до примерно 6 дней или до примерно 2 недель, с аэрацией атмосферным  
25 воздухом.

После завершения процесса культивирования температуру в инкубаторе повышают до примерно 40°C, и можно провести сушку в течение периода, времени, лежащего в диапазоне от примерно 3 дней до примерно 4 дней, с использованием  
30 подачи сухого воздуха и вакумирования влажного воздуха. Высушенный продукт на основе микроорганизмов можно измельчить, размолоть или микронизировать до желаемого размера частиц. Концентрация пропагул должна быть не менее  $1 \times 10^9$  конидий на грамм сухого продукта, и она может достигать таких значений, как  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$  или даже  $1 \times 10^{13}$  пропагул на грамм.

Сухой микробный продукт можно затем смешать с сухой диатомовой землей и коммерческим компостом для перераспределения остаточной влаги и для стандартизации конечного продукта. Концентрация спор после смешивания может быть равна, например, примерно  $1 \times 10^6$  спор на грамм. Этот конечный 5 сухой продукт на основе *Trichoderma* можно затем упаковать в маркированные мешки из полимерного материала и герметически закрыть для коммерческой реализации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конечный сухой продукт на основе *Trichoderma* может содержать источники углерода, белка 10 и/или минеральных веществ.

#### Местное производство продуктов на основе микроорганизмов

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения установка для выращивания микроорганизмов производит свежие микроорганизмы с высокой плотностью и/или целевые побочные продукты микробного роста в желаемом 15 масштабе. Установка для выращивания микроорганизмов может быть расположена в месте применения микроорганизмов или вблизи от места применения. Установка производит композиции на основе микроорганизмов с высокой плотностью микроорганизмов посредством периодического, квазинепрерывного или непрерывного культивирования.

Установки для выращивания микроорганизмов по настоящему изобретению могут быть расположены в том месте, где будет применен продукт на основе микроорганизмов (например, в рыбноводческом хозяйстве). Например, установка для выращивания микроорганизмов может быть расположена на расстоянии менее 300 миль, 250 миль, 200 миль, 150 миль, 100 миль, 75 миль, 50 миль, 25 миль, 15 миль, 25 10 миль, 5 миль, 3 миль или 1 мили от места применения (где 1 миль соответствует 1,609 км).

Поскольку продукт на основе микроорганизмов производится на месте или вблизи от места применения и нет необходимости в стабилизации, консервации, длительном хранении или широкомасштабных транспортных процессах 30 стандартного производства, можно получить значительно более высокую плотность микроорганизмов, вследствие чего потребуется гораздо меньший объем продукта на основе микроорганизмов для применения на месте. Это позволяет использовать биореактор меньшего объема (например, меньший ферментационный бак, меньшие

загрузки стартерного материала, питательных веществ, агентов, регулирующих pH и противовспенивающего агента и т.п.), что делает такую систему экономически выгодной. Кроме того, местное производство способствует транспортабельности продукта.

- 5 Местное производство продукта на основе микроорганизмов также способствует включению культуральной среды в продукт. Среда может содержать агенты, образовавшиеся во время ферментации, которые особенно хорошо подходят для местного использования.

10 Полученные посредством местного производства высокоплотные устойчивые культуры микроорганизмов являются более эффективными в полевых условиях, нежели культуры, которые были подвергнуты стабилизации вегетативных клеток или в течение некоторого времени находились в цепочке поставок. Продукты на основе микроорганизмов по настоящему изобретению особенно выгодны по сравнению с традиционными продуктами, в которых клетки отделены от  
15 метаболитов и питательных веществ, присутствующих в ферментационной культуральной среде. Сокращенное время транспортировки обеспечивает производство и доставку свежих партий микроорганизмов и/или их метаболитов к нужному моменту времени и в том объеме, в котором они необходимы на месте применения.

20 Установки для выращивания микроорганизмов по настоящему изобретению обеспечивают свежие композиции на основе микроорганизмов, содержащие собственно микроорганизмы, метаболиты микроорганизмов и/или другие компоненты среды, в которой росли микроорганизмы. По желанию, композиции могут содержать высокую плотность вегетативных клеток, инактивированные клетки  
25 или смесь вегетативных клеток, инактивированных клеток, спор, мицелия и/или других микробных пропагул. Преимуществом является то, что композиции можно адаптировать для применения в конкретном месте. В варианте осуществления настоящего изобретения установка для выращивания микроорганизмов расположена на производственном участке или вблизи производственного участка,  
30 где будут применены продукты на основе микроорганизмов.

Преимуществом является то, что эти установки для выращивания микроорганизмов обеспечивают решение современной проблемы, связанной с географической разбросанностью производителей промышленного масштаба, качество продуктов которых страдает из-за задержек при обработке на предыдущих

этапах производства, ограничивающих факторов цепочки поставок, неправильного хранения и других непредвиденных обстоятельств, которые препятствуют своевременной доставке и применению, например, продукта с высоким содержанием жизнеспособных клеток и/или пропагул и сопутствующей среды и метаболитов, в которых изначально росли микроорганизмы.

Преимуществом является то, что в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения системы по настоящему изобретению сохраняют способность природных местных микроорганизмов и побочных продуктов их метаболизма воздействовать на патогенные для растений бактерии. Местные микроорганизмы можно идентифицировать, например, на основании солеустойчивости, способности расти при высоких температурах и с использованием генетической идентификации последовательностей. Кроме того, установки для выращивания микроорганизмов обеспечивают гибкость производства благодаря их способности адаптировать продукты на основе микроорганизмов для повышения синергизма с географическими зонами назначения.

Время культивирования в конкретных резервуарах может, например, лежать в диапазоне от 1 дня до 2 недель или дольше. Продукт культивирования можно собрать любым из множества различных способов.

Местное производство и доставка в течение, например, 24 часов после ферментации обеспечивают чистые композиции с высокой плотностью микроорганизмов и значительно более низкие транспортные расходы. С учетом перспектив быстрых успехов в разработке более эффективных и мощных микробных инокулянтов, потребители получают большую выгоду вследствие этой возможности быстрой доставки продуктов на основе микроорганизмов.

Продукты на основе микроорганизмов по настоящему изобретению можно применять в различных уникальных прикладных задачах вследствие, например, возможности эффективно доставлять в удаленные места: 1) свежий ферментационный бульон с активными метаболитами; 2) смесь микроорганизмов и ферментационного бульона; 3) композицию с живыми клетками или спорами, мицелием, конидиями или другими микробными пропагулами; 4) композиции с высокой плотностью микроорганизмов, включающих живые клетки и/или споры, мицелий, конидии или другие микробные пропагулы; 5) продукты на основе микроорганизмов, готовые к употреблению; и 6) продукты на основе микроорганизмов.

## ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Лучшее понимание настоящего изобретения и его многочисленных преимуществ можно получить из следующих примеров, приведенных с целью иллюстрации. Приведенные ниже примеры иллюстрируют некоторые способы, применения, примеры осуществления и варианты настоящего изобретения. Их не следует считать ограничивающими настоящее изобретение. Можно выполнить множество изменений и модификаций настоящего изобретения.

### Пример 1

#### Производство посевной культуры и способ подсчета пропагул

10 Посевную культуру *Trichoderma* получили при pH, равном 5,5, с использованием композиции среды, приведенной в Таблице 1.

Таблица 1

#### Композиция среды для производства *Trichoderma*

Компонент	Количество (г/л)
Глюкоза	30
Экстракт дрожжей	2,8
Жидкий экстракт картофеля	0,5 (мл/л)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,005

15 Колбы инокулировали конидиями и активно растущими гифами гриба из чашки Петри. Для получения гомогенной посевной культуры гранулы с мицелием разрушали с использованием стеклянных шариков. Встряхиваемые колбы инкубировали при 30°C в течение 3-4 дней при частоте встряхиваний, равной 200 1/мин. Через 3-4 дня сформировались мицелиальные гранулы *Trichoderma* для

20 крупномасштабной ферментации. Все содержимое колб, содержащих ферментированный субстрат и биомассу, полностью гомогенизировали с

использованием стеклянных шариков в течение предварительно заданного времени, равного 180 секундам, для получения конидий и фрагментов мицелия. После гомогенизации выполняли серийные разведения и определяли число микропропагул.

5

### Пример 2

#### Получение культуры в форме альгинат-агаровых гранул

Альгинатные гранулы, содержащие *Trichoderma*, получали посредством объединения жидкой среды из Таблицы 1 выше со смесью 1% агара и 2% альгината натрия. Эту смесь объединяли с 5%-ной гомогенной суспензией посевной культуры из Примера 1. После тщательного перемешивания всю смесь медленно по каплям добавляли в автоклавированный раствор хлорида кальция с концентрацией 100 мМ при постоянном перемешивании. Сразу же образовывались альгинатные гранулы с грибковыми частицами внутри. Затем альгинатные гранулы извлекали из раствора, а оставшуюся жидкость уничтожали.

15

### Пример 3

#### Производство конидий в жидкой культуре

Конидии собирают из биологически чистой культуры *Trichoderma harzianum*, которую выращивают в реакторе. Композиция питательной среды содержит: глюкозу (30 г/л), экстракт дрожжей (2,8 г/л),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0 г/л),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 г/л),  $\text{KCl}$  (0,5 г/л),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 г/л),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 г/л),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,005 г/л). Начальный рН при культивировании равен 5,5, а температура лежит в диапазоне от 25°C до 28°C. Объем культуры равен примерно 100 галлонам (378,5 л). После культивирования в течение 5 дней выход составляет больше, чем от примерно  $5 \times 10^8$  до примерно  $5 \times 10^9$  конидий на миллилитр жидкой культуры.

25

### Пример 4

#### Твердая культура *Trichoderma* в вермикулитовом субстрате

Вермикулит и диатомовую землю подвергают тепловой стерилизации при 150°C в течение ночи в нагревательной печи. От трех до четырех частей вермикулита смешивают с одной частью диатомовой земли и либо с одной частью инокулянтных гранул *Trichoderma*, либо со 150 мл суспензии посевной культуры. Компоненты смешивают с 1 литром питательной среды. Эту смесь тонким слоем

распределяют по лотку и инкубируют при 30°C в течение 4-6 дней в расстойном шкафу с аэрацией атмосферным воздухом. Конидии впервые обнаруживают в день 4.

Выход из одного лотка до сушки и переработки составляет примерно 652,60 граммов. После завершения процесса культивирования температуру в инкубаторе можно повысить до примерно 40°C, и сушку можно проводить в течение периода времени, лежащего в диапазоне от примерно 3 дней до примерно 4 дней, с использованием подачи сухого воздуха и вакумирования влажного воздуха. После сушки и тщательного размола из каждого лотка можно получить до 4 фунтов (1,814 кг) или более продукта на основе *Trichoderma*. Высушенный продукт на основе микроорганизмов можно измельчить, размолоть или микронизировать до желаемого размера частиц и затем смешать с сухой диатомовой землей и коммерческим компостом для перераспределения остаточной влаги и стандартизации конечного продукта. Концентрация пропагул должна быть не менее  $1 \times 10^6$  конидий на один грамм сухого продукта, предпочтительно – не менее  $1 \times 10^9$ .

Этот конечный сухой продукт на основе *Trichoderma* можно затем упаковать в маркированные мешки из полимерного материала и герметически закрыть для коммерческой реализации. Продукт можно растворить в воде для различных применений.

20

#### Пример 5

##### Твердофазная ферментация спор гриба в субстрате на основе кукурузной муки

Для выращивания спор грибов, таких как *Trichoderma* spp., 250 г никстамализированной кукурузной муки смешивают с деионизированной водой и стерилизуют в паровом котле из нержавеющей стали, после чего герметично закрывают крышкой и перевязывают лентами. Эти котлы со средой на основе кукурузной муки асептически инокулируют грибковой посевной культурой. Затем котлы инкубируют в расстойном шкафу при 30°C в течение 10 дней. Через 10 дней собирают примерно  $1 \times 10^9$  пропагул/г.

30

#### Пример 6

##### Твердофазная ферментация спор грибов в субстрате на основе пасты

Для выращивания *Trichoderma* spp. 250 граммов сухой пасты из кукурузной муки смешивают с деионизированной водой, смешанной с 1000 л воды,

распределяют по паровым котлам из нержавеющей стали. Затем паровые котлы, пасту и воду автоклавируют и герметически закрывают стерилизованными крышками и лентами для котлов. Субстрат на основе пасты и воды затем асептически инокулируют посевной культурой *Trichoderma*. Котлы инкубируют в расстойном шкафу при 30°C в течение 8 дней. Через 8 дней собирают примерно  $1 \times 10^9$  пропагул /г *Trichoderma*.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ производства жидкой формы продукта на основе *Trichoderma* и твердой формы продукта на основе *Trichoderma*, который включает:

5 (a) получение инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул из посевной культуры *Trichoderma*;

(b) культивирование инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул в жидкой питательной культуральной среде в реакторе до получения желаемой плотности микроорганизмов в гранулах;

10 (c) сбор инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул из жидкой культуральной среды;

(d) приготовление жидкой формы продукта на основе *Trichoderma*, при котором культивированные инокулянты в форме альгинат-агаровых гранул используют для инокуляции реактора для глубинной ферментации, и приготовление твердого продукта на основе *Trichoderma*, при котором культивированные  
15 инокулянты в форме альгинат-агаровых гранул используют для инокуляции реактора для твердофазной ферментации.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что микроорганизм *Trichoderma* выбран из *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* и *Trichoderma hamatum*.

20 3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что стадия (a) включает объединение 5%-ной гомогенной суспензии посевной культуры из стадии (a) со стерильной жидкой питательной средой, 1% агара и 2% альгината натрия с получением раствора инокулянта и использование капельного разбрызгивающего устройства для подачи раствора инокулянта каплями в смесительный резервуар,  
25 содержащий 1%-ный раствор хлорида кальция, при этом капли образуют инокулянты в форме альгинат-агаровых гранул, содержащие питательные компоненты и частицы микроорганизма, заключенные в альгинат-агаровой массе.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что стадия (b) включает сбор альгинат-агаровых гранул и последующее культивирование их в реакторе,  
30 содержащем достаточный объем подходящей жидкой питательной среды, до получения высокой концентрации мицелия *Trichoderma*, распределенного внутри и по поверхности альгинат-агаровой гранулы.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что стадию (b) осуществляют в течение периода времени от примерно 1 дня до примерно 10 дней, при непрерывной аэрации и непрерывном перемешивании, при температуре от примерно 28°C до примерно 30°C, и при pH от примерно 5,0 до примерно 6,5.

5 6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что желаемая повышенная плотность микроорганизмов в альгинатных гранулах равна  $1 \times 10^9$  конидий на грамм альгинатных гранул.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что после стадии (c), но перед стадией (d) способ включает обработку инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул для хранения, причем обработка может включать сбор инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул из реактора и помещение гранул в раствор для криоконсервации, содержащий глицерин и воду в соотношении, составляющем 50%/50%.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что раствор для криоконсервации находится в контейнере, выбранном из колбы, пробирки, флакона и чашки Петри.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что контейнер содержит до 50 гранул инокулянта.

10. Способ по п. 8, отличающийся тем, что контейнер помещают в морозильную камеру при температуре от -80°C до -10°C.

11. Способ по п. 8, отличающийся тем, что контейнер помещают в холодильник при температуре от -10°C до 4°C.

12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что получение жидкой формы продукта на основе *Trichoderma* включает культивирование инокулянта в реакторной системе с рабочим объемом, равным по меньшей мере 200 галлонам (757,1 л), в течение периода времени от примерно 1 дня до примерно 10 дней, при непрерывной аэрации и непрерывном перемешивании, при температуре от примерно 28°C до примерно 30°C, и при pH от примерно 5,0 до примерно 6,5.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что концентрацию *Trichoderma* повышают в жидкой культуре до  $1 \times 10^9$  пропагул на миллилитр и необязательно добавляют консерванты, добавки и/или регуляторы pH.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что получение твердой формы продукта на основе *Trichoderma* включает смешивание собранного инокулянта в форме альгинат-агаровых гранул с жидкой питательной средой и твердым или полутвердым субстратом с получением смеси; распределении смеси тонким слоем по термостойким лоткам; культивирование смеси на лотках в инкубаторе при 30°C в течение периода времени от 3 дней до 10 дней при постоянной аэрации атмосферным воздухом.
15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что во время культивирования лотки регулярно опрыскивают стерильной питательной средой.
16. Способ по п. 14, отличающийся тем, что инкубатор является расстойным шкафом.
17. Способ по п. 14, отличающийся тем, что субстрат является вермикулитом, и соотношение вермикулита и альгинат-агаровых гранул в смеси равно 3:1 или 4:1.
18. Способ по п. 14, отличающийся тем, что субстрат является пищевым продуктом, выбранным из кукурузной муки, риса, бобов и пасты.
19. Способ по п. 14, отличающийся тем, что он дополнительно включает повышение температуры инкубатора до 40°C; сушку лотков в течение периода времени от примерно 3 дней до примерно 4 дней, с использованием подачи сухого воздуха и вакумирования влажного воздуха с получением высушенного продукта; измельчение высушенного продукта в дробилке до желаемого размера частиц; и смешивание измельченного высушенного продукта с сухой диатомовой землей и коммерческим компостом.
20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что он дополнительно включает упаковку сухого продукта, смешанного с диатомовой землей и коммерческим компостом, в герметически закрытые мешки для коммерческого применения.
21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что концентрация *Trichoderma* в высушенном продукте после смешивание с диатомовой землей и коммерческим компостом составляет не менее  $1 \times 10^6$  конидий на грамм.
22. Композиция, содержащая культивированный микроорганизм *Trichoderma* и/или один или более побочных продуктов микробного роста, причем эта композиция получена способом по любому из пунктов с 1 по 21.

23. Композиция по п. 22, отличающаяся тем, что она дополнительно включает культуральную среду, в которой произведен микроорганизм, и/или питательные вещества, способствующие микробному росту.