

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291061** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.23

(22) Дата подачи заявки
2020.10.07

(51) Int. Cl. **A23L 33/195** (2016.01)
A21D 2/26 (2006.01)
A23C 11/06 (2006.01)
A23G 1/32 (2006.01)
A23G 9/38 (2006.01)
A23J 3/20 (2006.01)
A23C 9/13 (2006.01)

(54) ПИЩЕВЫЕ КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ БЕЛКОВЫЙ ИЗОЛЯТ METHYLOCOCCUS CAPSULATUS

(31) **62/911,970**

(32) **2019.10.07**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/054507**

(87) **WO 2021/071895 2021.04.15**

(71) Заявитель:
КАЛИСТА, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Хуан Цзяньсэнь, Ньюмен Лиза Мари,
Кхуань Уоррен, Гивер Лори Дж.,
Шифф-Деб Селина (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к пищевым композициям для человека, включающим белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт, где этот белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт состоит по меньшей мере из 70% неочищенного белка, который характеризуется скорректированным аминокислотным коэффициентом усвояемости белков (PDCAAS) равным по меньшей мере 0,9 и отклонением изотопной сигнатуры $\delta^{13}\text{C}$ от приблизительно -70 до приблизительно -30‰. Предложенные белковые изоляты *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточные продукты можно использовать для получения заменителей мяса, а также других пищевых композиций, таких как протеиновые батончики, питательные напитки, порошкообразные протеиновые заменители, замороженные немолочные десерты и хлебобулочные изделия.



A1

202291061

202291061

A1

ПИЩЕВЫЕ КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ БЕЛКОВЫЙ ИЗОЛЯТ
METHYLOCOCCUS CAPSULATUS

5

Область техники

Настоящее изобретение относится к пищевым композициям, предназначенным для потребления человеком и включающим белковый изолят *Methylococcus capsulatus*.

10

Предпосылки сознания настоящего изобретения

Считается, что к 2050 году население мира достигнет 9,5 миллиардов человек. Чтобы прокормить более 9 миллиардов человек в мире в 2050 году, потребуется увеличить общее производство продуктов питания, при этом спрос на белок животного происхождения, по прогнозам, удвоится (Henchion et al, 2017, Foods 6:53). Однако белок животного происхождения вызывает опасения в связи с экологической рациональностью и продовольственной безопасностью. Продукты животного происхождения вызывают экологические опасения по нескольким причинам: (i) более высокий уровень выбросов парниковых газов по сравнению с продуктами растительного происхождения, (ii) значительное воздействие на земле- и водопользование; и (iii) потеря биоразнообразия из-за перевода лесов, водно-болотных угодий и природных пастбищ в категорию сельскохозяйственных угодий. Высокое потребление мясных белков, содержащих большое количество насыщенных жирных кислот, вызывает проблемы со здоровьем. Производство белков животного происхождения также вызывает этические опасения в отношении промышленного животноводства и убоя скота.

В настоящее время растительные источники белка составляют большую часть мировых запасов белка (57%). Однако растительные источники белка характеризуются субоптимальным аминокислотным составом, то есть в большинстве случаев не хватает одной или нескольких аминокислот в количествах, достаточных для удовлетворения потребностей человека в питательных веществах (Henchion et al, 2017, Foods 6:53). Хотя белки растительного происхождения могут характеризоваться более благоприятным землепользованием и выбросами парниковых газов по сравнению с белками

30

животного происхождения, они по-прежнему вызывают экологические проблемы, которые включают значительное земле- и водопользование, деградацию почвы и загрязнение пестицидами. Более того, существуют проблемы сезонности и масштабируемости, связанные с производством и вкусом растительных белков, а также функциональные ограничения на использование растительных белков в определенных пищевых композициях (например, заменители мяса). Таким образом, существует необходимость в новых источниках белка для потребления человеком, которые позволят преодолеть экологические, этические, медицинские, пищевые проблемы белков животного и растительного происхождения, обеспечивая при этом масштабируемое и стабильное производство. Настоящее изобретение удовлетворяет такие потребности, а также обеспечивает другие связанные с ними преимущества.

Краткое описание вариантов осуществления настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к пищевым композициям для потребления человеком, содержащим белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к пищевой композиции для человека, содержащей белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus*: (а) состоит из более 70 мас.% неочищенного белка; (б) характеризуется скорректированным аминокислотным коэффициентом усвояемости белков (PDCAAS) равным по меньшей мере 0,9; и (в) характеризуется отклонением изотопной сигнатуры $\delta^{13}\text{C}$ от приблизительно -70‰ до приблизительно -30‰. В другом варианте осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* состоит по меньшей мере из 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по массе белка. В дополнительных вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* характеризуется отклонением изотопной сигнатуры $\delta^{13}\text{C}$ от приблизительно -60‰ до приблизительно -40‰.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения белковый изолят *Methylococcus capsulatus* характеризуется содержанием: (а) менее 6 мас.% нуклеиновых кислот; (б) менее 7 мас.% золы; (в) менее 10 мас.% неочищенного жира; (г) по меньшей мере 0,05 мг гема / г белкового изолята; или любой их комбинацией.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения *Methylococcus capsulatus* не является генетически модифицированным.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения *Methylococcus capsulatus* представляет собой *Methylococcus capsulatus* (Бат), *Methylococcus capsulatus* (Техас) или *Methylococcus capsulatus* (Абердин).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получают из *Methylococcus capsulatus*, выращенного на углеродном сырье, содержащем метан или метанол. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения углеродное сырье, содержащее метан, представляет собой природный газ или природный газ из нетрадиционных источников.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения белковый изолят *Methylococcus capsulatus* культивируют в условиях при низкой концентрации меди.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получают из *Methylococcus capsulatus*, культивируемого в среде с концентрацией не более 100 мг меди / кг массы сухих клеток (DCW). В другом варианте осуществления настоящего изобретения белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получают из *Methylococcus capsulatus*, культивируемого в условиях от 1 до 100, от 1 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30 до 40, от 40 до 50, от 50 до 60, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от 90 до 100, от 1 до 90, от 1 до 80, от 1 до 70, от 1 до 60, от 1 до 50, от 1 до 40, от 1 до 30, от 10 до 90, от 10 до 80, от 10 до 70, от 10 до 60, от 10 до 50, от 10 до 40, от 10 до 30, от 20 до 90, предпочтительно от 20 до 80, от 20 до 70, от 20 до 60, от 20 до 50 или от 20 до 40 мг меди / кг биомассы.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения выделение белкового изолята *Methylococcus capsulatus* из биомассы *Methylococcus capsulatus* включает стадию кислотного осаждения.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения белковый изолят *Methylococcus capsulatus* представляет собой жидкость, гель, порошок, зерна, хлопья, агломераты, суспензию, ядра или крошку.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения белковый изолят получают путем разрушения клеток *Methylococcus capsulatus* с образованием клеточного лизата, отделения и/или концентрирования белков из

клеточного лизата с образованием белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, и необязательно, высушивания белкового изолята.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получают из *Methylococcus capsulatus*, который культивируют и обрабатывают в условиях Надлежащей производственной практики (GMP).

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения белковый изолят *Methylococcus capsulatus* характеризуется: (а) прочностью при гелеобразовании от приблизительно 10 г до приблизительно 300 г; (б) стабильностью в виде эмульсии при хранении при комнатной температуре в течении по меньшей мере 24 ч; (в) избыточным пенообразованием по меньшей мере 200%; (г) растворимостью по меньшей мере 75% при нейтральном рН; или любой их комбинацией. В другом варианте осуществления пищевая композиция характеризуется прочностью при гелеобразовании от приблизительно 10 г до приблизительно 300 г (например, от приблизительно 15 г до приблизительно 300 г, от приблизительно 25 г до приблизительно 300 г, от приблизительно 50 г до приблизительно 300 г, от приблизительно 15 г до приблизительно 150 г или от приблизительно 25 г до приблизительно 250 г), и эта пищевая композиция представляет собой заменитель мяса, заменитель рыбы/морепродуктов, экструдированные перекусы, пудинг, выпечку, макаронные изделия или чипсы. В другом варианте осуществления настоящего изобретения пищевая композиция является стабильной в виде эмульсии при хранении при комнатной температуре в течении по меньшей мере 24 ч, и эта пищевая композиция представляет собой соус, подливу, заправку, суп, приправу с уксусом, протеиновый коктейль, питательный напиток или заменитель молочных продуктов. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения пищевая композиция характеризуется избыточным пенообразованием по меньшей мере 200%, и эта пищевая композиция представляет собой заменитель мяса, чипсы, заменитель яиц или выпечку. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения пищевая композиция характеризуется растворимостью по меньшей мере 75% (например, по меньшей мере 76%, 77%, 78%, 79% или 80%) при нейтральном рН, и эта пищевая композиция представляет собой соус, подливу, заправку, суп, приправу с уксусом, заменитель молочных продуктов, протеиновый коктейль, питательный напиток, протеиновый гель или порошкообразную протеиновую

добавку. Типичные заменители молочных продуктов включают немолочное молоко, немолочные сливки, немолочную сметану, немолочный йогурт, немолочные взбитые топпинги или немолочное мороженое. Типичные заменители мяса включают котлеты, фрикадельки, фарш, колбасу, вяленое мясо, мясной хлеб, филе, бекон, хот-дог или наггетсы.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения пищевая композиция дополнительно включает по меньшей мере одну пищевую добавку, такую как эмульгирующий агент, агент повышающий вязкость, связующий агент, антислеживающий агент, консервант, подсластитель, экстракт, природный ароматизатор, усилитель вкуса, заменитель жира, агент контролирующий pH, разрыхлитель, увлажнитель, питательное вещество, пищевой ингредиент, масло или их комбинация.

Количество белкового изолята *Methylococcus capsulatus* в пищевых композициях, описанных здесь, может находиться в интервале от приблизительно 0,1 мас.% до приблизительно 35 мас.%, таком как от приблизительно 0,5 мас.% до приблизительно 35 мас.%.

Краткое описание фигур

На Фиг. 1А-1В представлена схема типичной обработки биомассы ниже по потоку, использованной в Примерах 2 и 4. На Фиг. 1А показана схема основного процесса получения белкового изолята из бактериальной биомассы. На Фиг. 1Б представлена схема типичного процесса микрофльтрации и ультрафльтрации для получения белкового изолята из бактериальной биомассы. На Фиг. 1В представлена схема, на которой указан типичный флокулянт (например, хитозан), и процесс ультрафльтрации для получения белкового изолята из бактериальной биомассы.

На Фиг. 2 представлен график, на котором указано процентное содержание неочищенного белка в белковом изоляте, полученном как указано в Примере 2, из биомассы *Methylococcus capsulatus* Бат при культивировании с низким уровнем меди (25 мг меди/кг биомассы) и с нормальным уровнем меди (154 мг меди/кг биомассы). Препараты В091 и В093 представляют собой биомассу, полученную при непрерывной ферментации с низким уровнем меди в различные моменты времени. Препарат В089 представляет собой биомассу, полученную при ферментации с нормальным уровнем меди.

На Фиг. 3 представлен график, на котором указано содержание неочищенного белка (мас.% в расчете на массу сухого вещества) в биомассе *Methylococcus capsulatus* Бат при культивировании с низким уровнем меди (38 мг меди/кг биомассы), с нормальным уровнем меди (154 мг меди/кг биомассы) и с высоким уровнем меди (371 мг меди/кг биомассы). Номера #24 и #28 означают два различных цикла ферментации.

На Фиг. 4 представлен график, на котором указано содержание неочищенного белка, жира и золы в биомассе *Methylococcus capsulatus* Бат при культивировании с различными уровнями меди (то есть 23, 80, 96 и 140 мг меди/кг биомассы).

На Фиг. 5 представлен профиль аминокислотного анализа и скорректированным аминокислотным коэффициентом усвояемости белков (PDCAAS) контрольного образца, полученного после концентрирования, инактивации при нагревании и высушивания биомассы *Methylococcus capsulatus* (Tees002-6).

На Фиг. 6 представлен профиль аминокислотного анализа и коэффициент PDCAAS образца белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, полученного методом микрофильтрации/ультрафильтрации, как описано в Примере 4 (B066).

На Фиг. 7 представлен профиль аминокислотного анализа и коэффициент PDCAAS образца белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, полученного с использованием хитозана и метода ультрафильтрации, как описано в Примере 4 (B058).

На Фиг. 8 представлен профиль аминокислотного анализа и коэффициент PDCAAS образца белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, полученного с использованием хитозана и метода кислотного осаждения, как описано в Примере 4 (B060).

На Фиг. 9 представлены значения коэффициента PDCAAS белков мяса и белков растительного происхождения.

На Фиг. 10 представлено качество гелеобразования белковых изолятов *Methylococcus capsulatus*, полученных различными методами. На левом изображении показано, что белковый изолят полученный с использованием хитозана и метода ультрафильтрации, как описано в Примере 4, формирует слабый гель. На правом изображении показано, что белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, полученный с использованием высокоскоростного

центрифугирования и кислотного осаждения, как описано в Примере 4, характеризуется хорошим гелеобразованием.

На Фиг. 11 показано тестирование на прочность при гелеобразовании с использованием анализатора Brookfield Texture белковых изолятов *Methylococcus capsulatus*, полученных методами высокоскоростного центрифугирования и кислотного осаждения (Acid PPT) или с использованием хитозана и метода ультрафильтрации (хитозан/UF), концентрата сывороточного белка (WPC) и яичного белка.

На Фиг. 12 показаны значения PDCAAS для контрольного образца и типичных белковых изолятов по настоящему изобретению (см. пример 5).

На Фиг. 13 показаны гомогенизированные образцы белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, которые были обработаны гексаметафосфатом натрия и DATEM + предварительным нагреванием (средний химический стакан) или без предварительного нагревания (правый химический стакан), формируют устойчивую эмульсию. Концентрат сывороточного белка (левый химический стакан) использовали в качестве контроля.

На Фиг. 14А-14Б показаны два различных вида образцов белкового изолята, слева направо: концентрат сывороточного белка, белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, которые были обработаны гексаметафосфатом натрия и DATEM + предварительным нагреванием (средний вид), и белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, обработанный гексаметафосфатом натрия и DATEM, и без предварительного нагревания, которые формируют стабильные эмульсии после хранения в течение 24 ч.

На Фиг. 15А-15Б показано вспенивание раствора белкового изолята *Methylococcus capsulatus*. На Фиг. 15А-15Б показаны различные виды вспенивания образца через 2 мин взбивания. На Фиг. 15В показано вспенивание раствора белка *Methylococcus capsulatus*, полученного с использованием хитозана и процесса ультрафильтрации (левая коническая пробирка), по сравнению с яичным белком (правая коническая пробирка).

На Фиг. 16А-16Б показана меренга, приготовленная с использованием белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, полученного с использованием хитозана и метода ультрафильтрации. На Фиг. 16А показаны слабые пики из теста меренги, приготовленного с использованием белкового изолята *Methylococcus capsulatus*. На Фиг. 16Б показано печенье-меренга,

приготовленное с использованием белкового изолята *Methylococcus capsulatus* (справа), и контрольное печенье-меренга, приготовленное с использованием яичного белка (слева).

На Фиг. 17А-17Б показаны растворимость и содержание неочищенного
5 белка (метод Дюма) белковых изолятов *Methylococcus capsulatus*, полученных с использованием хитозана и метода ультрафильтрации (УФ) (без предварительного нагревания биомассы перед обработкой, нагреванием биомассы при 65°C в течение 10 с перед обработкой и нагреванием биомассы при 65°C в течение 5 с перед обработкой) и высокоскоростного
10 центрифугирования и кислотного осаждения. Полученные после кислотного осаждения белки характеризовались ~100%-ной растворимостью при рН 7,0 и 0%-ной растворимостью при рН 4,3. Полученный после кислотного осаждения белковый изолят *Methylococcus capsulatus* характеризовался более высоким содержанием белка по сравнению с белковыми изолятами *Methylococcus*
15 *capsulatus*, полученными другими методами.

На Фиг. 18 представлено содержание неочищенного белка в контрольном образце и типичных белковых изолятов по настоящему изобретению (см. Пример 5).

На Фиг. 19А-19Д показано, что белковый изолят *Methylococcus capsulatus*
20 или цельноклеточный продукт были использованы при формировании котлеты из заменителей мяса. Дегидратированный, текстурированный соевый белок (Dupont, Response 4310 IP Textured Soy Protein Concentrate) (Фиг. 19А) регидратировали и смешивали с белковым изолятом *Methylococcus capsulatus* для формирования котлеты из заменителя мяса с цветом свежего мяса (Фиг. 19Б), которая темнела в ходе приготовления (Фиг. 19В). Котлета из заменителя мяса, приготовленная после тепловой обработки из белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, характеризовалась улучшенной текстурой, хорошим гелеобразованием и водосвязывающими свойствами (Фиг. 19Г), см. Пример 11. Котлеты из заменителей мяса, приготовленные после тепловой обработки из
25 цельноклеточного или гомогенизированного цельноклеточного ингредиента *Methylococcus capsulatus* также характеризовались цветом и внешним видом мяса после тепловой обработки (Фиг.19Д), см. Пример 17.

На Фиг. 20 показаны типичные составы котлет-гамбургеров из заменителей мяса, включающих белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или

цельноклеточный ингредиент, и сравнение с содержанием белка в других котлетах, изготовленных из заменителей мяса растительного происхождения.

На Фиг. 21А-21Д показано немолочное мороженое, изготовленное из
белкового изолята *Methylococcus capsulatus*. На Фиг. 21А показан типичный
5 процесс получения немолочного мороженого. На Фиг. 21Б показана типичная
композиция немолочного клубничного мороженого и контрольная композиция
молочного клубничного мороженого в правом столбце. На Фиг. 21В показана
типичная композиция немолочного шоколадного мороженого и контрольная
композиция молочного шоколадного мороженого в правом столбце. На Фиг. 21Г
10 показана типичная композиция немолочного мороженого из темного шоколада и
контрольная композиция молочного шоколадного мороженого в правом столбце.
На Фиг. 21Д показано сравнение шоколадного мороженого (верхняя часть
изображения) и клубничного мороженого (нижняя часть изображения),
изготовленного из сливок и сывороточного белка (слева) или из белкового
15 изолята *Methylococcus capsulatus* (справа). Мороженное из белкового изолята
Methylococcus capsulatus характеризовалось хорошими эмульгирующими
свойствами, гладкой текстурой и хорошим ощущением во рту.

На Фиг. 22 показаны крекеры, приготовленные из теста из пшеничной муки
(верхняя часть) или из теста из пшеничной муки с добавлением белкового
20 изолята *Methylococcus capsulatus* (нижняя часть) до (слева) и после выпечки
(справа). Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* придает красноватый цвет
тесту для крекеров, которое при выпечке приобретает коричневый цвет.

На Фиг. 23 показаны обогащенные белком чипсы, изготовленные из
белкового изолята *Methylococcus capsulatus*. Слева сверху по часовой стрелке: на
25 первом изображении показано раскатанное тесто красноватого цвета,
придаваемого белковым изолятом *Methylococcus capsulatus*; на втором
изображении показаны обжаренные во фритюре белковые чипсы, содержащие
белковый изолят *Methylococcus capsulatus*; на третьем изображении показано
сравнение контрольных обжаренных чипсов обогащенных белком,
30 приготовленных из кукурузной муки Masa, и чипсов обогащенных белком,
приготовленных из белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, приобретающих
темно-оранжевый цвет после приготовления. На четвертом изображении
показаны обжаренные чипсы, обогащенные белковым изолятом *Methylococcus*
capsulatus (правая часть изображения), по сравнению с контрольными

кукурузными чипсами без белкового изолята *Methylococcus capsulatus* (левая часть изображения).

На Фиг. 24 показан типичный способ приготовления подливы, содержащей белковый изолят *Methylococcus capsulatus*.

5 На Фиг. 25 показан типичный способ приготовления йогурта, содержащего белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный ингредиент.

На Фиг. 26 показан типичный состав немолочного йогурта, содержащий белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный ингредиент.

10 На Фиг. 27 представлена блок-схема, на которой показан типичный способ вниз по потоку обработки биомассы для получения цельноклеточного ингредиента из бактериальной биомассы, используемой в Примере 16.

Подробное описание вариантов осуществления настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к пищевым композициям, предназначенным для потребления человеком и включающим белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт. *Methylococcus capsulatus* способен превращать субстрат C1, например природный газ, в пищевой продукт, и не конкурирует с пищевой цепью человека. В частности, белковый изолят *Methylococcus capsulatus* (а) состоит по меньшей мере из 70% белка; (б) характеризуется скорректированным аминокислотным коэффициентом усвояемости белков (PDCAAS) равным по меньшей мере 0,90; и (в) характеризуется отклонением изотопной сигнатуры $\delta^{13}\text{C}$ от приблизительно -70‰ до приблизительно -30‰. Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт получают из биомассы *Methylococcus capsulatus*.

20 Применение белкового изолята *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточного продукта представляет собой альтернативный белковый источник, который не содержит компоненты животного происхождения и может быть генетически немодифицированным. *Methylococcus capsulatus* в качестве источника белка является в значительной степени более экологически устойчивым по сравнению с белками растительного и животного происхождения с точки зрения водо- и

25 землепользования, а также обеспечивает масштабируемое и стабильное производство. Кроме того, источник белка *Methylococcus capsulatus* предлагает определенные преимущества для здоровья и питания по сравнению с белками животного и растительного происхождения, в том числе не вызывает аллергии, характеризуется меньшим содержанием насыщенных жирных кислот и обогащен

30

незаменимыми аминокислотами. Кроме того, источник белка *Methylococcus capsulatus* также обеспечивает гемопротеином, то есть биодоступным гемовым железом, и придает улучшенный вкус и/или визуальную привлекательность полученных пищевых композиций. Кроме того, сигнатура $\delta^{13}\text{C}$ белка

5 *Methylococcus capsulatus* обеспечивает прослеживаемость и верификацию пищевых композиций, изготовленных из него, по всей цепочке поставок.

10 Перед более подробным раскрытием этого раскрытия, может быть целесообразным для его понимания дать определения некоторых терминов, которые используются в настоящем документе. Дополнительные определения изложены в данном раскрытии.

15 Следует понимать, что любой интервал концентраций, процентный интервал, интервал отношений или целочисленный интервал включает значение и поддиапазон в указанном диапазоне, если не указано иное. Используемый здесь термин «приблизительно» означает $\pm 10\%$ от указанного интервала, значения или структуры, если не указано иное. Термин «состоящий в основном из» ограничивает объем формулы изобретения указанными материалами или стадиями или терминами, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленного раскрытия. Следует понимать, что используемые здесь компоненты в единственном относятся к «одному или более» из 20 перечисленных компонентов. Использование варианта (например, «или») следует понимать как означающий любой из вариантов, оба варианта или любую их комбинацию. Используемые здесь термины «включать», «иметь» и «содержать» используются как синонимы, и эти термины и их варианты следует рассматривать как неограничивающие объем изобретения термины или 25 варианты.

Используемый здесь термин «субстрат C_1 » или «соединение C_1 » относится к органическому соединению или композиции, содержащей органическое соединение, в котором отсутствует углерод-углеродная связь. Типичные субстраты C_1 включают природный газ, нетрадиционный природный газ, биогаз, 30 метан, метанол, формальдегид, муравьиную кислоту или ее соль, метилированные амины (например, метиламин, диметиламин, триметиламин и т.п.), метилированные тиолы, метилгалогениды (например, бромметан, хлорметан, йодметан, дихлорметан и т.п.), цианид или любую их комбинацию. В

некоторых вариантах осуществления субстрат C_1 содержит природный газ или метан.

Используемый здесь термин «метанотроф», «метанотрофная бактерия» или «метанотрофные бактерии» относится к бактериям, способным утилизировать метан или любой другой метансодержащий субстрат C_1 (например, природный газ) в качестве основного или единственного источника углерода и энергии. Метанотрофные бактерии могут являться «облигатными метанотрофными бактериями», которые могут использовать только метан в качестве источника углерода и энергии, или «факультативными метанотрофными бактериями», которые могут использовать субстраты, отличные от метана, в качестве источника углерода и энергии, такие как метанол. Типичные облигатные метанотрофные бактерии включают следующие виды: *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, (например, *Methylococcus capsulatus* Бат, *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylomonas sp.* 16a, *Methylomonas methanica*, *Methylomonas albus*, *Methylomicrobium alcaliphilum*, *Methylobacter capsulatus*, *Methylomonas sp.* AJ-3670, *Methylomicrobium buryatense* 5G, *Methylosinus sporium*), или подобные. Факультативные метанотрофные бактерии включают, например, некоторые из следующих видов: *Methylocella*, *Methylocystis*, и *Methylocapsa* (например, *Methylocella silvestris*, *Methylocella palustris*, *Methylocella tundrae*, *Methylocystis daltona* SB2, *Methylocystis bryophila*, и *Methylocapsa aurea* KYG), и *Methylobacterium organophilum*.

Использованный здесь термин *Methylococcus capsulatus* относится к одному или более штаммов метанотрофных бактерий *Methylococcus capsulatus*, включая *Methylococcus capsulatus* (Бат), *Methylococcus capsulatus* (Техас), и *Methylococcus capsulatus* (Абердин). В некоторых вариантах осуществления, *Methylococcus capsulatus* относится к *Methylococcus capsulatus* (Бат).

Используемый здесь термин «пищевая композиция», также известная как пищевой продукт или продукты питания, относится к любой композиции, которая предназначена или предполагается для употребления людьми в качестве источника питания и/или калорий. Пищевая композиция может представлять собой напиток, гель или твердую пищу. Пищевая композиция может представлять собой пищевой продукт, готовый к упаковке, приготовлению или употреблению. Пищевая композиция может представлять собой ингредиент, который комбинируют с одним или несколькими ингредиентами, при этом

получают пищевой продукт, готовый к упаковке, приготовлению или употреблению. Типичные пищевые композиции включают, но не ограничиваясь перечисленным, заменители мяса, заменители яиц, выпечку, подливки, масла, пасты для намазывания на хлеб, соусы, заправки для салатов, супы, заменители 5 молочных продуктов, пудинги, пасту, чипсы, белковые закуски, протеиновые коктейли, питательные напитки, протеиновые батончики, протеиновые гели, порошкообразные протеиновые добавки, порошкообразные пищевые добавки.

Использованный здесь термин «пищевой ингредиент» относится к пищевому веществу, которое используют в комбинации с одним или 10 несколькими ингредиентами, при этом получают пищевой продукт, предназначенный для употребления человеком.

Используемый здесь термин «заменитель мяса», также известный как «аналог мяса», «имитация мяса», «мясозаместитель», «вегетарианское мясо», «суррогат мяса» или «искусственное мясо», относится к пищевой композиции, 15 содержащей белки, частично полученные из белков животного происхождения, но дополненные источником(ами) белка неживотного происхождения, или содержащие белки, полностью полученные из источника(ов) неживотного происхождения. В некоторых вариантах осуществления заменитель мяса содержит белки, полученные только из источника(ов) неживотного 20 происхождения. Заменители мяса могут быть получены в различных формах, включая котлету, фрикадельки, фарш, колбасу, вяленое мясо, мясной хлеб, филе, бекон, хот-дог или наггетсы.

Используемый здесь термин «хлебобулочные изделия» относится к пищевой композиции, которая получена при выпекании в печи и обычно 25 содержит разрыхлитель. Хлебобулочные изделия включают, но не ограничиваясь перечисленным, печенье, шоколадное печенье брауни, пирожные, меренги, пироги, выпечку, булочки, хлеб и хлеб быстрого приготовления (например, крекеры).

Используемый здесь термин «заменитель молочных продуктов», 30 «молочный аналог», «немолочный продукт» или «безмолочная продукция» относится к пищевой композиции, которая содержит 0,5 мас.% или менее молока в форме казеина/казеинатов (молочный белок). Молочные заменители включают, но не ограничиваясь перечисленным, немолочное молоко, немолочный крем,

немолочные сливки, немолочный йогурт, немолочный топпинг и немолочное мороженное.

Используемый здесь термин «пищевая добавка» относится к композиции, предназначенной для дополнения рациона за счет предоставления специфических питательных веществ в отличие от общих калорий. Пищевая добавка может содержать один или более витаминов, минералов, волокон, жирных кислот и аминокислот. Пищевая добавка может присутствовать в форме таблетки, порошка, геля или жидкости.

Используемый здесь термин «Надлежащая производственная практика» или «GMP» относится к правилам, опубликованным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США в соответствии с Федеральным законом о пищевых продуктах, лекарствах и косметике 21 CFR 110 (для пищевых продуктов для человека) и 111 (для пищевых добавок) или к аналогичным правилам, установленным в юрисдикциях за пределами США, которые описывают условия и методы, необходимые для производства, обработки, упаковки или хранения пищевых продуктов для обеспечения их безопасности и соответствующего состояния.

Ферментация

Настоящее изобретение относится к пищевым композициям для потребления человеком, содержащим белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, полученный из биомассы *M. capsulatus*. *M. capsulatus* можно выращивать методом периодического или непрерывного культивирования. В некоторых вариантах осуществления культуры выращивают в контролируемой установке для культивирования, такой как ферментер, биореактор, ячейка с полыми волокнами и т.п. Как правило, клетки в логарифмической фазе часто используют для массового производства исследуемого продукта или промежуточного продукта в некоторых системах, тогда как в других системах можно использовать производство в стационарной или постэкспоненциальной фазе.

Классический метод периодического культивирования представляет собой закрытую систему, в которой состав среды устанавливают при запуске культивирования и не изменяют в процессе культивирования. То есть в начале процесса культивирования в среду высеивают один или несколько выбранных микроорганизмов, а затем выращивают без добавления каких-либо ингредиентов в систему. Используемый здесь термин «периодическая» культура относится к

неизменному количеству первоначально добавленного конкретного источника углерода, тогда как контроль таких факторов, как рН и концентрация кислорода, можно контролировать и изменять во время культивирования. В периодических системах составы метаболитов и биомассы в системе постоянно изменяются
5 вплоть до прекращения культивирования. В периодических культурах бактериальные клетки обычно переходят от статической лаг-фазы к логарифмической фазе быстрого роста и к стационарной фазе, где скорость роста снижается или останавливается (что в конечном итоге приводит к гибели клеток, если условия действительно меняются).

10 Периодическая система с подпиткой представляет собой разновидность стандартной периодической системы, в которой исследуемый углеродный субстрат добавляется постепенно по мере роста культуры. Системы периодического действия с подпиткой являются пригодными, когда предполагается, что клеточный метаболизм ингибируется в результате
15 катаболитной репрессии и когда желательно иметь ограниченное количество субстрата в среде. Поскольку измерение фактической концентрации субстрата в системах периодического действия с подпиткой представляет проблему, оценка проводят на основе изменений измеряемых факторов, таких как рН, растворенный кислород и парциальное давление отходящих газов.

20 Периодическая система и периодическая система с подпиткой являются стандартными методами культивирования и известны в данной области техники (см. например, статью Thomas D. Brock, *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, 2-nd Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989); Deshpande, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36:227 (1992)).

25 Непрерывные системы культивирования являются «открытыми» системами, то есть определенная культуральная среда непрерывно подается в биореактор, в то время как равное количество использованной («кондиционированной») среды одновременно удаляется для обработки. Непрерывные культуры обычно поддерживают клетки при постоянной высокой плотности жидкой фазы, когда
30 клетки находятся в основном в логарифмической фазе роста. В одном варианте осуществления настоящего изобретения непрерывное культивирование можно использовать на практике с использованием иммобилизованных клеток (например, биопленки), когда углерод и питательные вещества постоянно добавляются, а ценные продукты, побочные продукты и отходы непрерывно

удаляются из клеточной массы. Иммобилизацию клеток можно проводить с использованием широкого спектра твердых подложек, состоящих из природных материалов, синтетических материалов или их комбинации.

Непрерывное или полунепрерывное культивирование позволяет
5 модулировать один или несколько факторов, влияющих на рост клеток или концентрацию конечного продукта. Например, один метод может обеспечивать подачу ограниченного питательного вещества с фиксированной скоростью (например, источник углерода, азот), при этом все остальные параметры
10 изменяются с течением времени. В другом варианте осуществления несколько факторов, влияющих на рост, могут постоянно изменяться, в то время как концентрация клеток, измеряемая по мутности среды, остается постоянной. Назначение системы непрерывного культивирования состоит в том, чтобы поддерживать стабильные условия роста, и при этом поддерживать баланс в отношении потери клеток из-за откачки среды в зависимости от скорости роста
15 клеток. Способы модулирования питательных веществ и факторов роста для непрерывных процессов культивирования и способы сведения к максимуму скорости образования продукта хорошо известны в данной области (см., например, Thomas D. Brock, *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, 2-nd Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989); Deshpande, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36:227 (1992)).
20

В некоторых вариантах осуществления, культуральная среда включает углеродный субстрат в качестве источника энергии для метанотрофных бактерий. Пригодные субстраты включают C_1 субстраты, такие как метан, метанол, формальдегид, муравьиная кислота (формиат), монооксид углерода,
25 диоксид углерода, метилированные амины (метиламин, диметиламин, триметиламин и т.п.), метилированные тиолы или метилгалогениды (бромметан, хлорметан, иодметан, дихлорметан и т.п.). В другом варианте осуществления культуральные среды могут включать один C_1 субстрат в качестве
30 единственного источника углерода для метанотрофной бактерии или могут включать смесь двух или более C_1 субстратов (смешанная композиция C_1 субстратов) и в качестве множества источников углерода для метанотрофной бактерии. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения в качестве источника углерода можно использовать природный газ (который в основном содержит метан) или нетрадиционный природный газ.

В ходе бактериального культивирования величину pH ферментационных смесей обычно регулируют таким образом, чтобы величина pH находилась в интервале от приблизительно 6 до приблизительно 8, например, от 5
приблизительно 6 до приблизительно 7, от приблизительно 7 до приблизительно 8 или от приблизительно 6,5 до 7,5.

В ходе бактериального культивирования температуру поддерживают в интервале, оптимальном для культивируемой бактерии. Например, для *M. capsulatus* Бат температура может составлять от 40°C до 45°C, например 42°C.

Предпочтительно, *M. capsulatus* можно культивировать с использованием 10 метана в качестве источника углерода, воздуха или чистого кислорода для оксигенации и аммиака в качестве источника азота. В некоторых вариантах осуществления углеродным сырьем, включающим метан и используемым для культивирования *M. capsulatus*, является природный газ или нетрадиционный природный газ. Кроме этих субстратов, для бактериальной культуры обычно 15 требуются вода, фосфат и несколько минералов, таких как магний, кальций, калий, железо, медь, цинк, марганец, никель, кобальт и молибден. Типичные питательные среды включают среду Хиггинса с минимальным содержанием нитратов (NSM) или среду MM-W1, смесь MMF (master mix feed), как описано в Примере 1, среду MMF1.1, среду MMS1.0 или среду AMS. Концентрацию меди в 20 этих средах можно регулировать в соответствии с условиями низкого содержания меди, как описано выше.

Композиция среды MMS 1,0 характеризуется следующим составом: 0,8 мМ MgSO₄·7H₂O, 30 мМ NaNO₃, 0,14 мМ CaCl₂, 1,2 мМ NaHCO₃, 2,35 мМ KH₂PO₄, 25
3,4 мМ K₂HPO₄, 20,7 мкМ Na₂MoO₄·2H₂O, 6 мкМ CuSO₄·5H₂O, 10 мкМ Fe^{III}-Na-EDTA, и 1 мл на литр раствора рассеянных металлов (содержащего в литре: 500 мг FeSO₄·7H₂O, 400 мг ZnSO₄·7H₂O, 20 мг MnCl₂·7H₂O, 50 мг CoCl₂·6H₂O, 10 мг NiCl₂·6H₂O, 15 мг H₃BO₃, 250 мг EDTA). Конечная величина pH среды составляет 7,0±0,1.

Композиция среды AMS характеризуется следующим составом: 10 мг NH₃, 30
75 мг H₃PO₄·2H₂O, 380 мг MgSO₄·7H₂O, 100 мг CaCl₂·2H₂O, 200 мг K₂SO₄, 75 мг FeSO₄·7H₂O, 1,0 мг CuSO₄·5H₂O, 0,96 мг ZnSO₄·7H₂O, 120 мкг CoCl₂·6H₂O, 48 мкг MnCl₂·4H₂O, 36 мкг H₃BO₃, 24 мкг NiCl₂·6H₂O и 1,20 мкг NaMoO₄·2H₂O.

Композиция среды MMF1.1 характеризуется следующим составом: 0,8 мМ MgSO₄·7H₂O, 40 мМ NaNO₃, 0,14 мМ CaCl₂, 6 мМ NaHCO₃, 4,7 мМ KH₂PO₄, 6,8

мМ K_2HPO_4 , 20,7 мкМ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 6 мкМ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 10 мкМ Fe^{III} -Na-EDTA, и 1 мл раствора на литр раствора рассеянных металлов (содержащего в литре 500 мг $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 400 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 мг $MnCl_2 \cdot 7H_2O$, 50 мг $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 мг $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 15 мг H_3BO_3 , 250 мг EDTA).

5 Пригодные ферментеры для культивирования метанотрофных бактерий могут представлять собой реактор петлевого типа или аэролифтный реактор. Типичные ферментеры включают ферментеры с U-образной петлей (см. патент US7579163, WO2017/218978), ферментеры змеевикового типа (см. WO2018/132379), и ферментеры Kyliindros (см. WO2019/0366372).

10 В некоторых вариантах осуществления *M. capsulatus* культивируют в условиях Надлежащей производственной практики (GMP).

В другом варианте осуществления *M. capsulatus* культивируют в виде изолированной культуры в отсутствии другого организма. В некоторых вариантах осуществления *M. capsulatus* можно культивировать в присутствии
15 одного или более гетерологичных организмов, которые могут способствовать росту бактерии *M. capsulatus*. Например, *Methylococcus capsulatus* Бат можно культивировать в присутствии бактерий *Cupriavidus sp.*, *Amerinibacillus danicus*, или обеих бактерий, и необязательно в комбинации с бактериями *Brevibacillus agri*.

20 В некоторых вариантах осуществления *M. capsulatus* можно культивировать (прежде всего в условиях непрерывного культивирования) в условиях с низким уровнем меди. Авторами настоящего изобретения неожиданно было установлено, что метанотрофные бактерии, культивированные в таких условиях, продуцируют биомассу с более высоким содержанием неочищенного белка,
25 низким содержанием липидов и/или низким содержанием золы, по сравнению с бактериями, культивированными в условиях с нормальным или высоким содержанием меди (см. Пример 2). Такая биомасса позволяет получать белковый изолят с высоким содержанием неочищенного белка, а также обеспечивает высокий выход и/или минимальное содержание нуклеиновой кислоты. Без
30 ограничения какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения предполагают, что увеличение содержания неочищенного белка в биомассе метанотрофных бактерий, культивируемых в условиях с низким содержанием меди, может быть связано с уменьшением количества внутренней мембранной структуры (включая

липиды и мембранные белки), что связано с условиями с низким содержанием меди.

Термин «условия с низким содержанием меди» относится к условиям непрерывного культивирования, где количество или уровень меди в непрерывной культуре составляет не более 100 мг меди (то есть элементарной меди или элемента меди) на кг массы сухих клеток (DCW).

«Условия непрерывного культивирования» относятся к условиям, при которых *M. capsulatus* культивируют в системе непрерывного культивирования, где определенная культуральная среда (или ее компонент(ы)) непрерывно добавляется в систему, в то время как равное количество использованной среды одновременно удаляется для обработки.

Термин «непрерывная культура» относится к смеси культуральной среды и бактерий, которые культивируют в среде в условиях непрерывного культивирования.

«Масса сухих клеток (DCW)» относится к массе сухой биомассы, собранной из бактериальной культуры.

Определенное количество элементарной меди обычно обеспечивается соответствующим или эквивалентным количеством соли меди, которая содержит такое же количество молей элементарной меди. Например, 100 мг меди составляют приблизительно 1,57 ммоль и могут быть обеспечены приблизительно 394 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Термин «условия с высоким содержанием меди» относится к условиям непрерывного культивирования, при которых количество меди в непрерывной культуре составляет более 200 мг меди на кг массы сухих клеток (DCW).

Заданные условия содержания меди обычно устанавливают при регулировании скорости подачи меди с учетом массы собранных сухих клеток DCW. Например, для обеспечения низкой концентрации меди (Cu) 50 мкг Cu/г DCW и скорости сбора 5 г/л/ч DCW, скорость подачи (расход) Cu (например, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) должна составлять 250 мкг Cu/л/ч.

В некоторых вариантах осуществления концентрацию меди можно контролировать с помощью устройства (например, насоса) для подачи непрерывной культуры с определенной скоростью.

В другом варианте осуществления уровень меди в условиях с низкой концентрацией меди составляет от 1 до 100, от 1 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30,

от 30 до 40, от 40 до 50, от 50 до 60, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от 90 до 100, от 1 до 90, от 1 до 80, от 1 до 70, от 1 до 60, от 1 до 50, от 1 до 40, от 1 до 30, от 10 до 90, от 10 до 80, от 10 до 70, от 10 до 60, от 10 до 50, от 10 до 40, от 10 до 30, от 20 до 90, предпочтительно от 20 до 80, от 20 до 70, от 20 до 60, от 20 до 50, или от 20 до 40 мг меди / кг биомассы. В некоторых вариантах осуществления *M. capsulatus* можно культивировать в условиях с нормальным уровнем меди. Термин «условия с нормальным уровнем меди» относятся к условиям непрерывной культуры, где количество меди в непрерывной культуре находится в интервале от 100 мг до 200 мг меди на кг массы сухих клеток (DCW). В другом варианте осуществления уровень меди в условиях с нормальным содержанием меди составляет от 100 до 180, от 100 до 170, от 100 до 160, от 100 до 150, от 100 до 140, от 100 до 130 мг меди/кг биомассы.

В некоторых вариантах осуществления *M. capsulatus* можно культивировать в условиях с высоким уровнем меди. Термин «условия с высоким уровнем меди» относится к условиям непрерывного культивирования, где количество меди в непрерывной культуре составляет более 200 мг меди на кг массы сухих клеток (DCW). В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения уровень меди в условиях с высоким содержанием меди составляет от 200 до 800, от 200 до 700, от 200 до 600, от 200 до 500, или от 200 до 400 мг меди / кг биомассы.

Типичные условия культивирования *M. capsulatus* представлены в Примерах 1 и 3. Дополнительное описание культивирования биомассы метанотрофных бактерий *M. capsulatus* можно найти в предварительной заявке US «Способы культивирования метанотрофных бактерий и выделения белков из бактериальной биомассы», поданной 7 октября 2019 г.

25 Биомасса, белковый изолят и цельноклеточный продукт

Белковый изолят *M. capsulatus*, используемый в пищевых композициях, получают при очистке белков из биомассы, полученной, как описано здесь.

Термины «биомасса» или «бактериальная биомасса» относятся к органическому материалу, собранному из бактериальной культуры. Биомасса в основном (т.е. более 50 мас.%) состоит из бактериальных клеток, но может включать и другие материалы, такие как лизированные бактериальные клетки, мембраны бактериальных клеток, тельца включения и внеклеточный материал (например, продукты, секретируемые или выделяемые в культуральную среду) или любую их комбинацию, которые накапливаются (например, с помощью

центрифугирования) в результате бактериальной ферментации вместе с бактериальными клетками. Предпочтительно биомасса включает более 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% клеток, собранных из культуры бактериальной ферментации.

5 Биомассу можно накапливать или собирать из бактериальной культуры различными способами, такими как седиментация, микрофилтрация, ультрафилтрация и распылительная сушка. Предпочтительно биомассу собирают из бактериальной культуры методом центрифугирования (например, при 4000 g в течение 10 мин при 10°C). Например, можно собирать и
10 центрифугировать ферментационный бульон (клетки и жидкость). После центрифугирования жидкость можно отбрасывать и осажденные клетки можно сохранить и необязательно лиофилизировать.

В некоторых вариантах осуществления бактериальная биомасса в основном состоит или состоит из биомассы, собранной из *M. capsulatus*, культивированной
15 в условиях с низким уровнем меди, уровень меди в которой составляет не более 100 мг меди на кг DCW (мг/кг). В другом варианте осуществления уровень меди в биомассе *M. capsulatus* составляет от 1 до 100, от 1 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30 до 40, от 40 до 50, от 50 до 60, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от
20 90 до 100, от 1 до 90, от 1 до 80, от 1 до 70, от 1 до 60, от 1 до 50, от 1 до 40, от 1 до 30, от 10 до 90, от 10 до 80, от 10 до 70, от 10 до 60, от 10 до 50, от 10 до 40, от 10 до 30, от 20 до 90, от 20 до 80, от 20 до 70, от 20 до 60, от 20 до 50, или от 20 до 40 мг меди / кг DCW.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения содержание неочищенного белка в биомассе *M. capsulatus*, культивированной в условиях с
25 низким содержанием меди, составляет по меньшей мере 60% неочищенного белка, например, по меньшей мере 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, или 81% неочищенного белка. Термины «неочищенный белок», «содержание неочищенного белка», «концентрация неочищенного белка» или «процентное
30 содержание неочищенного белка» относятся к измерению азота в образце белка. Количество азота указывает на количество белка в образце. Содержание неочищенного белка в биомассе или белковом изоляте, описанном здесь, измеряют методом Дюма. В другом варианте осуществления настоящего изобретения биомасса *M. capsulatus* состоит из приблизительно от

приблизительно 60% до приблизительно 99%, от приблизительно 65% до
приблизительно 99%, от приблизительно 71% до приблизительно 99%, от
приблизительно 75% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до
приблизительно 99%, от приблизительно 82% до приблизительно 99%, от
5 приблизительно 60% до приблизительно 95%, от приблизительно 65% до
приблизительно 95%, от приблизительно 71% до приблизительно 95%, от
приблизительно 75% до приблизительно 95%, от приблизительно 80% до
приблизительно 95%, от приблизительно 82% до приблизительно 95%, от
10 приблизительно 60% до приблизительно 90%, от приблизительно 65% до
приблизительно 90%, от приблизительно 71% до приблизительно 90%, от
приблизительно 75% до приблизительно 90%, от приблизительно 80% до
приблизительно 90%, от приблизительно 82% до приблизительно 90%, от
15 приблизительно 60% до приблизительно 85%, от приблизительно 65% до
приблизительно 85%, от приблизительно 71% до приблизительно 85%, от
приблизительно 75% до приблизительно 85%, от приблизительно 60% до
приблизительно 80%, от приблизительно 65% от приблизительно 80%, или от
приблизительно 71% до приблизительно 80% неочищенного белка.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения содержание
истинного белка в биомассе *M. capsulatus*, культивированной в условиях с
20 нормальным или низким уровнем меди, составляет по меньшей мере 50%, 51%,
52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%,
67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, или 80%
истинного белка. Термины «истинный белок», «содержание истинного белка»,
«концентрация истинного белка» или «процентное содержание истинного белка»
25 относятся к измерению неочищенного белка минус содержание небелкового
азота в образце белка. В некоторых вариантах осуществления содержание
истинного белка в биомассе *M. capsulatus* составляет от приблизительно 50% до
приблизительно 99%, от приблизительно 55% до приблизительно 99%, от
приблизительно 60% до приблизительно 99%, от приблизительно 65% до
30 приблизительно 99%, от приблизительно 70% до приблизительно 99%, от
приблизительно 75% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до
приблизительно 99%, от приблизительно 50% до приблизительно 95%, от
приблизительно 55% до приблизительно 95%, от приблизительно 60% до
приблизительно 95%, от приблизительно 65% до приблизительно 95%, от

приблизительно 70% до приблизительно 95%, от приблизительно 75% до
приблизительно 95%, от приблизительно 80% до приблизительно 95%, от
приблизительно 50% до приблизительно 90%, от приблизительно 55% до
приблизительно 90%, от приблизительно 60% до приблизительно 90%, от
5 приблизительно 65% до приблизительно 90%, от приблизительно 70% до
приблизительно 90%, от приблизительно 75% до приблизительно 90%, от
приблизительно 80% до приблизительно 90%, от приблизительно 50% до
приблизительно 85%, от приблизительно 55% до приблизительно 85%, от
приблизительно 60% до приблизительно 85%, от приблизительно 65% до
10 приблизительно 85%, от приблизительно 70% до приблизительно 85%, от
приблизительно 75% до приблизительно 85%, от приблизительно 50% до
приблизительно 80%, от приблизительно 55% до приблизительно 80%, от
приблизительно 60% до приблизительно 80%, от приблизительно 65% до
15 приблизительно 80%, от приблизительно 70% до приблизительно 80%, от
приблизительно 50% до приблизительно 75%, от приблизительно 55% до
приблизительно 75%, от приблизительно 60% до приблизительно 75%, от
приблизительно 50% до приблизительно 70%, от приблизительно 55% до
приблизительно 70%, от приблизительно 60% до приблизительно 70%, от
20 приблизительно 50% до приблизительно 65%, от приблизительно 55% до
приблизительно 65%, или от приблизительно 50% до приблизительно 60%
истинного белка.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения содержание
зола в биомассе *M. capsulatus*, культивированной в условиях с низким
содержанием меди, составляет не более 14%, например не более 13%, 12% или
25 11% зола. Термин «зола» означает материал, который остается в образце после
его сжигания (например, в печи в течение 12-18 ч или в течение ночи при
550°C).

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения содержание
нуклеиновых кислот в биомассе *M. capsulatus*, культивированной в условиях с
30 нормальным или низким уровнем меди, составляет не более 10%, например не
более 9%, 8%, 7%, 6%, или 5% нуклеиновых кислот. Содержание нуклеиновых
кислот в биомассе или белковом изоляте, описанных здесь, измеряют с
использованием набора Lucigen Masterpure Complete DNA & RNA Purification Kit
MC85200.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения содержание неочищенного жира в биомассе *M. capsulatus*, культивируемой в условиях с нормальным или низким уровнем меди, составляет не более 5%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7,5%, 7%, 6% или 5% неочищенного жира. Неочищенный жир можно измерять после кислотного гидролиза с последующей экстракцией в органическом растворителе. Кратко, жиры или липиды в бактериальной биомассе и/или в биомассе метанотрофных бактерий сначала разрушают в условиях кислотного гидролиза перед экстракцией растворителем (например, простым эфиром или гексаном). Затем растворитель упаривают и полученный материал называют «неочищенным жиром».

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения в биомассе *M. capsulatus*, культивируемой в условиях с нормальным или низким уровнем меди, содержится по меньшей мере 0,01 мг гема / г белка, например, по меньшей мере 0,05 мг гема / г белка. Количество гема в биомассе или белковом изоляте *M. capsulatus*, как описано здесь, измеряют методом на основе конверсии гема в флуоресцентное производное порфирина за счет удаления гемового железа в кислотных условиях (Sassa, Journal of Experimental medicine 143: 305-315, 1976). В других условиях содержание гема в биомассе *M. capsulatus* составляет по меньшей мере 0,01 мг, по меньшей мере 0,5 мг, или по меньшей мере 1,0 мг, гема на г белка. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения биомасса *M. capsulatus* содержит от 0,01 до 10 мг гема / г белка, например, от 0,1 до 1, от 1 до 5, от 5 до 10, от 0,2 до 0,5, от 0,5 до 1, от 1 до 2, или от 2 до 4 мг гема / г белка.

Гем представляет собой координационный комплекс иона железа, координированного с молекулой порфирина. *M. capsulatus* продуцирует гемопротейны, которые содержат по меньшей мере один гем, который в стехиометрическом количестве прочно связан с белками (например, с константой связывания в диапазоне от 10^{-8} до 10^{-15} М) и в большинстве случаев его можно идентифицировать по их красному цвету. Гемопротейны можно измерять при измерении пика при 410-415 нм и пика при 500-550 нм с помощью абсорбционной спектроскопии в УФ-видимой области. Гемопротейны, продуцируемые *M. capsulatus*, включают мультигемовые цитохромы с-типа и дигемовые цитохром с-пероксидазы (см. например, Karlsen et al, FEMS Microbiol Lett 323: 97-104, 2011).

Ион железа, координированный с молекулой порфирина в геме, относится к терминам «гемовое железо» или «гем железа». Гемовое железо в качестве пищевого источника железа усваивается в значительной степени быстрее, чем негемовое железо, и по пути, отличному от пути негемового железа. Гемовое железо остается растворимым в окружающей среде с высоким рН в верхнем отделе тонкой кишки, в отличие от неорганического, негемового железа. Количество гемового железа можно рассчитать на основе молярного соотношения гем / гемовое железо 1:1 после измерения количества гема.

В некоторых вариантах осуществления *M. capsulatus* культивируют в присутствии одного или более гетерологичных организмов, таких как *Cupriavidus* sp., *Amerinibacillus danicus* или оба вида, и в комбинации с бактериями *Brevibacillus agri*, при этом бактериальная биомасса дополнительно к биомассе *M. Capsulatus*, может включать биомассу гетерологичного(ых) организма(ов).

Предпочтительно, бактериальная биомасса в основном включает (т.е. более 50%, например, более 55 мас.%, более 60 мас.%, более 65 мас.%, более 70 мас.%, более 75 мас.%, более 80 мас.%, более 85 мас.% или более 90 мас.%) биомассы *M. capsulatus*.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, если *M. capsulatus* культивируют в присутствии одного или более гетерологичных организмов, то уровень меди в бактериальной биомассе и/или биомассе *M. capsulatus* составляет не более 100 мг меди на кг DCW (мг/кг). В некоторых вариантах осуществления уровень меди в бактериальной биомассе и/или биомассе *M. capsulatus* составляет от 1 до 100, от 1 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30 до 40, от 40 до 50, от 50 до 60, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от 90 до 100, от 1 до 90, от 1 до 80, от 1 до 70, от 1 до 60, от 1 до 50, от 1 до 40, от 1 до 30, от 10 до 90, от 10 до 80, от 10 до 70, от 10 до 60, от 10 до 50, от 10 до 40, от 10 до 30, от 20 до 90, от 20 до 80, от 20 до 70, от 20 до 60, от 20 до 50, или от 20 до 40 мг меди / кг DCW.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, если *M. capsulatus* культивируют в присутствии одного или более гетерологичных организмов, то содержание неочищенного белка в бактериальной биомассе *M. capsulatus*, культивируемой в условиях с нормальным или низким уровнем меди, составляет по меньшей мере 60% неочищенного белка, например, по меньшей

мере 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, или 81% неочищенного белка, например, от приблизительно 60% до приблизительно 99%, от приблизительно 65% до приблизительно 99%, от приблизительно 71% до приблизительно 99%, от приблизительно 75% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до приблизительно 99%, от приблизительно 82% до приблизительно 99%, от приблизительно 60% до приблизительно 95%, от приблизительно 65% до приблизительно 95%, от приблизительно 71% до приблизительно 95%, от приблизительно 75% до приблизительно 95%, от приблизительно 80% до приблизительно 95%, от приблизительно 82% до приблизительно 95%, от приблизительно 60% до приблизительно 90%, от приблизительно 65% до приблизительно 90%, от приблизительно 71% до приблизительно 90%, от приблизительно 75% до приблизительно 90%, от приблизительно 80% до приблизительно 90%, от приблизительно 82% до приблизительно 90%, от приблизительно 60% до приблизительно 85%, от приблизительно 65% до приблизительно 85%, от приблизительно 71% до приблизительно 85%, от приблизительно 75% до приблизительно 85%, от приблизительно 60% до приблизительно 80%, от приблизительно 65% до приблизительно 80%, или от приблизительно 71% до приблизительно 80% неочищенного белка.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, если *M. capsulatus* культивируют в присутствии одного или более гетерологичных организмов, то содержание истинного белка в бактериальной биомассе и/или в биомассе *M. capsulatus*, культивируемой в условиях с нормальным или низким уровнем меди, составляет по меньшей мере 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, или 80% истинного белка, например, по меньшей мере от приблизительно 50% до приблизительно 99%, от приблизительно 55% до приблизительно 99%, от приблизительно 60% до приблизительно 99%, от приблизительно 65% до приблизительно 99%, от приблизительно 70% до приблизительно 99%, от приблизительно 75% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до приблизительно 99%, от приблизительно 50% до приблизительно 95%, от приблизительно 55% до приблизительно 95%, от приблизительно 60% до приблизительно 95%, от приблизительно 65% до приблизительно 95%, от приблизительно 70% до

приблизительно 95%, от приблизительно 75% до приблизительно 95%, от
приблизительно 80% до приблизительно 95%, от приблизительно 50% до
приблизительно 90%, от приблизительно 55% до приблизительно 90%, от
приблизительно 60% до приблизительно 90%, от приблизительно 65% до
5 приблизительно 90%, от приблизительно 70% до приблизительно 90%, от
приблизительно 75% до приблизительно 90%, от приблизительно 80% до
приблизительно 90%, от приблизительно 50% до приблизительно 85%, от
приблизительно 55% до приблизительно 85%, от приблизительно 60% до
приблизительно 85%, от приблизительно 65% до приблизительно 85%, от
10 приблизительно 70% до приблизительно 85%, от приблизительно 75% до
приблизительно 85%, от приблизительно 50% до приблизительно 80%, от
приблизительно 55% до приблизительно 80%, от приблизительно 60% до
приблизительно 80%, от приблизительно 65% до приблизительно 80%, от
приблизительно 70% до приблизительно 80%, от приблизительно 50% до
15 приблизительно 75%, от приблизительно 55% до приблизительно 75%, от
приблизительно 60% до приблизительно 75%, от приблизительно 50% до
приблизительно 70%, от приблизительно 55% до приблизительно 70%, от
приблизительно 60% до приблизительно 70%, от приблизительно 50% до
приблизительно 65%, от приблизительно 55% до приблизительно 65% или от
20 приблизительно 50% до приблизительно 60%, истинного белка.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, если *M. capsulatus* культивируют в присутствии одного или более гетерологичных организмов, то содержание золы в бактериальной биомассе и/или в биомассе *M. capsulatus*, культивируемой в условиях с нормальным или низким уровнем меди,
25 составляет не более 14%, например не более 13%, 12% или 11%.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, если *M. capsulatus* культивируют в присутствии одного или более гетерологичных организмов, то содержание нуклеиновой кислоты в бактериальной биомассе и/или в биомассе *M. capsulatus*, культивируемой в условиях с нормальным или
30 низким уровнем меди, составляет не более 10%, например не более 9%, 8%, 7%, 7,5%, 6% или 5% нуклеиновой кислоты.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, если *M. capsulatus* культивируют в присутствии одного или более гетерологичных организмов, то содержание неочищенного жира в бактериальной биомассе и/или

в биомассе *M. capsulatus*, культивируемой в условиях с нормальным или низким уровнем меди, составляет не более 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6% или 5% неочищенного жира.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, если *M. capsulatus* культивируют в присутствии одного или более гетерологичных организмов, то содержание гема в бактериальной биомассе и/или в биомассе *M. capsulatus*, культивируемой в условиях с нормальным или низким уровнем меди, составляет по меньшей мере 0,01 мг гема / г белка. В некоторых вариантах осуществления содержание гема в бактериальной биомассе *M. capsulatus* составляет по меньшей мере 0,01 мг, по меньшей мере 0,05 мг, по меньшей мере 0,1 мг, по меньшей мере 0,5 мг, по меньшей мере 1,0 мг гема на г белка в биомассе. В другом варианте осуществления биомасса *M. capsulatus* содержит от 0,01 до 10 мг гема / г белка, например, от 0,05 до 0,1, от 0,1 до 1, от 1 до 5, от 5 до 10, от 0,2 до 0,5, от 0,5 до 1, от 1 до 2, от 2 до 4, или от 0,05 до 5 мг гема / г белка.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения биомассу собирают из *M. capsulatus*, которую культивируют в условиях GMP.

Термин «белковый изолят» относится к композиции, которая в основном включает белки, выделенные, экстрагированные или очищенные из бактериальной биомассы, которая прежде всего включает состоит или состоит из биомассы *M. capsulatus*. Композиция, которая в основном включает белки, выделенные из бактериальной биомассы, относится к композиции, в которой более 50% (например, более 55 мас.%, 60 мас.%, 70 мас.%, 75 мас.% или 80 мас.%) составляют белки из бактериальной биомассы. При использовании методов выделения, экстракции или очистки белков (например, микрофилтрации, ультрафилтрации, флокуляции хитозана, центрифугирования, кислотного осаждения или их комбинаций) белковый изолят характеризуется более высоким содержанием белка (например, по данным измерения неочищенного белка в процентах) по сравнению с бактериальной биомассой, из которой был получен белковый изолят. Однако при выделении, экстракции или очистке белков не требуется, чтобы индивидуальные белки в определенной степени были отделены друг от друга. Вместо этого белковый изолят, в основном представляет собой смесь белков, выделенных, экстрагированных или очищенных из бактериальной биомассы, в которой

удалены по меньшей мере некоторые из других компонентов, прежде всего по меньшей мере некоторые, предпочтительно большинство (например, более 50%, 60%, 70% , 80%, 90% или 95%) или все твердые компоненты (например, клеточный дебрис и/или клеточная стенка).

5 В основном биомассу, собранную из культуры метанотрофной бактерии, обрабатывают на стадии разрушения клеток (например, гомогенизации, помола в шаровой мельнице, циклов замораживание/размораживание, ферментативного расщепления, обработки ультразвуком, френч-прессом и химической солюбилизации), при этом получают лизат, который сначала подвергают стадии
10 разделения и/или стадии концентрирования белков (таких как флокуляция, микрофльтрация, ультрафльтрация, нанофльтрация, осаждение, изоэлектрическое осаждение (градиент рН или соли), осаждение растворителем, хроматографические методы, основанные на адсорбционной, ионообменной хроматографии, гель-проникающей хроматографии или аффинной
15 хроматографии, и денатурация при нагревании) лизата для получения белкового изолята. Полученный белковый изолят может представлять собой жидкий белковый изолят или в последствии высушенный препарат (например, высушивание при распылении, лиофилизация, упаривание, высушивание в вакууме), при этом получают сухой белковый изолят. Схема представлена на
20 Фиг. 1А.

Типичный рабочий процесс приготовления белкового изолята заключается в гомогенизации бактериальной биомассы (например, с помощью микрофлюидизатора), центрифугировании лизата (также называемого гомогенатом) с получением осветленного супернатанта, микрофльтрации
25 супернатанта, ультрафльтрации полученного фильтрата и лиофилизации полученного концентрата белкового изолята с получением препарата в виде сухого порошка. Схема конкретного типичного рабочего процесса, использованного в Примерах 2 и 4, показана на Фиг. 1Б.

Другой типичный рабочий процесс приготовления изолята белка
30 заключается в гомогенизации бактериальной биомассы (например, с помощью микрофлюидизатора), добавлении флокулянта (например, хитозана) в гомогенат, центрифугировании полученной смеси для удаления клеточного дебриса и получения осветленного супернатанта и в ультрафльтрации осветленного супернатанта, и затем в лиофилизации полученного концентрата с получением

белкового изолята в виде сухого порошка. Схема конкретного типичного рабочего процесса, использованного в Примере 4, показана на Фиг. 1В.

5 Еще один типичный рабочий процесс приготовления изолята белка заключается в гомогенизации бактериальной биомассы (например, с помощью микрофлюидизатора), добавлении флокулянта к гомогенату, центрифугировании полученной смеси для удаления нуклеиновых кислот и/или клеточного дебриса и получения осветленного супернатанта, в обработке осветленного супернатанта кислотным осаждением (например, доведение рН приблизительно до 4,5 с использованием H_2SO_4), необязательно в промывке осажденных белков, 10 нейтрализации и ресуспендировании осажденных белков (например, доведение рН до 7 с использованием гидроксида натрия) и в лиофилизации ресуспендированных белков с получением белкового изолята в виде сухого порошка. Схема этого конкретного типичного рабочего процесса, описана в Примере 4.

15 Другой типичный рабочий процесс приготовления изолята белка заключается в гомогенизации бактериальной биомассы (например, с помощью микрофлюидизатора), центрифугировании гомогената для удаления клеточного дебриса и получения осветленного супернатанта, в обработке осветленного супернатанта кислотным осаждением (например, доведение рН до 20 приблизительно 4,5 с использованием H_2SO_4), необязательно в промывке осажденных белков, нейтрализации и ресуспендировании осажденных белков (например, доведение рН до 7 с использованием гидроксида натрия) и в лиофилизации ресуспендированных белков с получением белкового изолята в виде сухого порошка. Схема этого конкретного типичного рабочего процесса, 25 описана в Примере 4.

Флокулянты, особенно катионные флокулянты, которые можно использовать при получении белкового изолята для уменьшения количества нуклеиновой кислоты и/или клеточного дебриса, включают хитозан (например, хитозан, полученный из моллюсков или грибов), поли-L-лизин, 30 полиэтиленимин (PEI), DEAE (диэтиламиноэтил-ионообменная смола), гидрохлорид DEAE-декстрана, амидированный пектин (например, амидированный низкомолекулярный метоксилпектин), продукт Tramfloc серия 860 (алкиламинэпихлоргидрин), pDADMAC (хлорид диаллилдиметиламмония), продукт Isinglass, желатин и яичный белок. Предпочтительно флокулянт

представляет собой хитозан, поли-L-лизин, DEAE, алкиламинэпихлоргидрины, pDADMAC или любую их комбинацию.

Как описано выше, культивирование метанотрофных бактерий в условиях с
5 низкой концентрацией меди не только повышает содержание неочищенного
белка в бактериальной биомассе, но также может повысить выход белкового
изолята. Соответственно, выход белкового изолята, полученного из биомассы
метанотрофных бактерий, культивированных в условиях с низкой
10 концентрацией меди, может превышать выход белкового изолята, полученного
из биомассы метанотрофных бактерий, культивированных в условиях с
нормальной или высокой концентрацией меди. В некоторых вариантах
осуществления отношение выхода белкового изолята, полученного из биомассы
метанотрофных бактерий, культивированных в условиях с низкой
15 концентрацией меди, к выходу белкового изолята, полученного из биомассы
метанотрофных бактерий, культивированных в условиях с нормальной или
высокой концентрацией меди (например, при уровне меди 150 мг на кг DCW),
составляет по меньшей мере 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, или
предпочтительно по меньшей мере 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4 или 2,5.

Термин «выход белкового изолята» относится к процентному содержанию
20 белка из гомогената биомассы, сохраненного в белковом изоляте. Другими
словами, выход белкового изолята представляет собой процентное содержание
белка в белковом изоляте, если принять за 100% процентное содержание белка в
гомогенате биомассы, из которого получают белковый изолят. Гомогенат
биомассы представляет собой смесь, полученную в результате гомогенизации
25 биомассы. Содержание белка можно измерить методом BCA (Smith et al, Anal
Biochem. 150(1):76-85, (1985)), например, с использованием набора для анализа
белка BCA ThermoFisher Scientific Pierce).

В некоторых вариантах осуществления выход белкового изолята оставляет
30 по меньшей мере 10%, например, по меньшей мере 11%, 12%, 13%, 14%, 15%,
16%, 17%, 18%, 19%, предпочтительно по меньшей мере 20%, 21%, 22%, 23%,
24% или 25%.

В другом варианте осуществления белковый изолят *Methylococcus*
capsulatus, используемый в пищевых композициях по настоящему изобретению,
состоит по меньшей мере из 70% неочищенного белка. В некоторых вариантах
осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* состоит по меньшей

мере приблизительно из 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в расчете на массу неочищенного белка. В некоторых вариантах осуществления содержание белка в белковом изоляте *Methylococcus capsulatus* находится в интервале от приблизительно 70% до приблизительно 99%, от приблизительно 71% до приблизительно 99%, от приблизительно 75% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до приблизительно 99%, от приблизительно 81% до приблизительно 99%, от приблизительно 85% до приблизительно 99%, от приблизительно 90% до приблизительно 99%, от приблизительно 70% до приблизительно 95%, от приблизительно 71% до приблизительно 95%, от приблизительно 75% до приблизительно 95%, от приблизительно 80% до приблизительно 95%, от приблизительно 70% до приблизительно 90%, от приблизительно 71% до приблизительно 90%, от приблизительно 75% до приблизительно 90%, от приблизительно 80% до приблизительно 90%, от приблизительно 70% до приблизительно 80% неочищенного белка, или от приблизительно 71% до приблизительно 80% в расчете на массу белка. Как показано на Фиг. 3 и 18, белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, полученный различными способами, характеризуется содержанием неочищенного белка более 70 мас. %.

В еще одном варианте осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, используемый в пищевых композициях по настоящему изобретению, состоит по меньшей мере из 60% истинного белка. В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* состоит по меньшей мере из приблизительно 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% истинного белка. В другом варианте осуществления содержание белка в белковом изоляте *Methylococcus capsulatus* находится в интервале от приблизительно 60% до приблизительно 99%, от приблизительно 60% до приблизительно 95%, от приблизительно 60% до приблизительно 90%, от приблизительно 60% до приблизительно 85%, от приблизительно 60% до приблизительно 80%, от приблизительно 60% до приблизительно 75%, от приблизительно 60% до приблизительно 70%, от приблизительно 65% до приблизительно 99%, от приблизительно 65% до приблизительно 95%, от

приблизительно 65% до приблизительно 90%, от приблизительно 65% до
приблизительно 85%, от приблизительно 65% до приблизительно 80%, от
приблизительно 65% до приблизительно 75%, от приблизительно 70% до
приблизительно 99%, от приблизительно 70% до приблизительно 95%, от
5 приблизительно 70% до приблизительно 90%, от приблизительно 70% до
приблизительно 85%, от приблизительно 70% до приблизительно 80% в расчете
на массу белка, от приблизительно 75% до приблизительно 99%, от
приблизительно 75% до приблизительно 95%, от приблизительно 75% до
приблизительно 90%, от приблизительно 75% до приблизительно 85%, от
10 приблизительно 80% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до
приблизительно 95% или от приблизительно 80% до приблизительно 90%
истинного белка.

В еще одном варианте осуществления содержание нуклеиновых кислот в
белковом изоляте *Methylococcus capsulatus* составляет менее 10%, 9%, 8%, 7%,
15 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, или 1%. Содержание нуклеиновых кислот в биомассе или
белковом изоляте, описанных здесь, измеряли с использованием набора Lucigen
Masterpure Complete DNA & RNA Purification Kit MC85200.

В одном варианте осуществления содержание золы в белковом изоляте
Methylococcus capsulatus составляет менее 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%
20 или 1% в расчете на массу золы. “Зола” означает материал, остающийся в
образце после его сжигания (например, в печи в течение 12-18 ч или в течение
ночи при 550°C).

В другом варианте осуществления содержание неочищенного жира в
белковом изоляте *Methylococcus capsulatus* составляет менее 15%, 14%, 13%,
25 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% в расчете на массу
неочищенного жира.

В еще одном варианте осуществления содержание гема в белковом изоляте
Methylococcus capsulatus составляет по меньшей мере 0,01 мг / г белка. В еще
одном варианте осуществления содержание гема в белковом изоляте
30 *Methylococcus capsulatus* составляет по меньшей мере 0,01 мг, по меньшей мере
0,05 мг, по меньшей мере 0,1 мг, по меньшей мере 0,5 мг, по меньшей мере 1,0
мг гема на грамм белка в белковом изоляте. В другом варианте осуществления
содержание гема в белковом изоляте *Methylococcus capsulatus* находится в
интервале от 0,01 до 10 мг гема / г белка, например, от 0,05 до 0,1, от 0,1 до 1, от

1 до 5, от 5 до 10, от 0,2 до 0,5, от 0,5 до 1, от 1 до 2, от 2 до 4 или от 0,05 до 5 мг гема / г белка.

В одном варианте осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* является обогащенным по содержанию одной или более следующих
5 аминокислот: L-цистеин, L-триптофан, L-аспарагиновая кислота, L-тирозин и L-фенилаланин, по сравнению с биомассой *Methylococcus capsulatus*, из которой он получен. Например, в некоторых вариантах осуществления концентрация в
мас.% одной или более перечисленных выше аминокислот в белковом изоляте
повышается по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 35% по
10 сравнению с биомассой *Methylococcus capsulatus*, из которой он получен.

Белковый изолят, полученный из *Methylococcus capsulatus*, который
культивировали в условиях с пониженным уровнем меди, характеризуется более
высоким содержанием неочищенного белка, чем белковый изолят, полученный
тем же способом из метанотрофной бактерии, культивированной в условиях с
15 нормальным или более высоким уровнем меди. В некоторых вариантах
осуществления белковый изолят, полученный из *Methylococcus capsulatus*,
который культивировали в условиях с пониженным уровнем меди,
характеризуется содержанием неочищенного белка по меньшей мере 72%,
например по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%,
20 по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей
мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%,
по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей
мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%,
по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей
25 мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, или по меньшей мере
96%. В другом варианте осуществления белковый изолят состоит из
неочищенного белка, содержание которого находится в интервале от
приблизительно 72% до приблизительно 99%, от приблизительно 75% до
приблизительно 99%, от приблизительно 78% до приблизительно 99%, от
30 приблизительно 80% до приблизительно 99%, от приблизительно 82% до
приблизительно 99%, от приблизительно 85% до приблизительно 99%, от
приблизительно 90% до приблизительно 99%, от приблизительно 72% до
приблизительно 95%, от приблизительно 75% до приблизительно 95%, от
приблизительно 78% до приблизительно 95%, от приблизительно 80% до

приблизительно 95%, от приблизительно 82% до приблизительно 95%, от
приблизительно 85% до приблизительно 95%, от приблизительно 90% до
приблизительно 95%, от приблизительно 72% до приблизительно 90%, от
приблизительно 75% до приблизительно 90%, от приблизительно 78% до
5 приблизительно 90%, от приблизительно 80% до приблизительно 90%, от
приблизительно 72% до приблизительно 85%, от приблизительно 75% до
приблизительно 85%, от приблизительно 78% до приблизительно 85%, от
приблизительно 80% до приблизительно 85%, неочищенного белка.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus*
10 *capsulatus*, культивированный в условиях с пониженным уровнем меди,
характеризуется содержанием истинного белка по меньшей мере 62%, 63%, 64%,
65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%,
80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%
или 95% истинного белка. В другом варианте осуществления белковый изолят
15 *Methylococcus capsulatus*, культивированный в условиях с пониженным уровнем
меди, состоит из белка, содержание которого находится в интервале от
приблизительно 62% до приблизительно 99%, от приблизительно 62% до
приблизительно 95%, от приблизительно 62% до приблизительно 90%, от
приблизительно 62% до приблизительно 85%, от приблизительно 62% до
20 приблизительно 80%, от приблизительно 62% до приблизительно 75%, от
приблизительно 65% до приблизительно 99%, от приблизительно 65% до
приблизительно 95%, от приблизительно 65% до приблизительно 90%, от
приблизительно 65% до приблизительно 85%, от приблизительно 65% до
приблизительно 80%, от приблизительно 65% до приблизительно 75%, от
25 приблизительно 70% до приблизительно 99%, от приблизительно 70% до
приблизительно 95%, от приблизительно 70% до приблизительно 90%, от
приблизительно 70% до приблизительно 85%, от приблизительно 70% до
приблизительно 80%, от приблизительно 75% до приблизительно 99%, от
приблизительно 75% до приблизительно 95%, от приблизительно 75% до
30 приблизительно 90%, от приблизительно 75% до приблизительно 85%, от
приблизительно 80% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до
приблизительно 95%, или от приблизительно 80% до приблизительно 90% в
расчете на массу истинного белка.

Белковый изолят, полученный из *Methylococcus capsulatus*, который культивировали в условиях с пониженным уровнем меди, предпочтительно содержит минимальное количество нуклеиновых кислот, чтобы свести к минимуму потенциальные предварительные эффекты высокого уровня нуклеиновых кислот на животных или человека, потребляющих белковый изолят (например, вызывающие подагру и образование камней в почках). В некоторых вариантах осуществления содержание нуклеиновых кислот в белковом изоляте, полученном из *Methylococcus capsulatus* и культивированном в условиях с пониженным уровнем меди, составляет максимально 10%, 9%, 8%, 7%, предпочтительно 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%, в расчете на массу нуклеиновых кислот.

Белковый изолят, полученный из *Methylococcus capsulatus*, который культивировали в условиях с пониженным уровнем меди, предпочтительно содержит минимальное количество золы. В некоторых вариантах осуществления содержание золы в белковом изоляте, полученном из *Methylococcus capsulatus* и культивированном в условиях с пониженным уровнем меди, составляет менее приблизительно 10%, 9%, 8%, предпочтительно менее приблизительно 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% в расчете на массу золы.

Белковый изолят, полученный из *Methylococcus capsulatus*, который культивировали в условиях с пониженным уровнем меди, предпочтительно содержит минимальное количество жира. В некоторых вариантах осуществления содержание неочищенного жира в белковом изоляте составляет менее приблизительно 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, предпочтительно менее приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%, в расчете на массу неочищенного жира.

Белковый изолят, полученный из *Methylococcus capsulatus*, который культивировали в условиях с пониженным уровнем меди, предпочтительно характеризуется повышенным уровнем гема. В некоторых вариантах осуществления содержание гема в белковом изоляте *Methylococcus capsulatus* составляет по меньшей мере 0,01 мг, по меньшей мере 0,05 мг, по меньшей мере 0,5 мг, по меньшей мере 1,0 мг гема на грамм белка в биомассе. В другом варианте осуществления, белковый изолят *Methylococcus capsulatus* содержит от 0,01 до 10 мг гема / г белка, например, от 0,01 до 0,1, от 0,1 до 1, от 1 до 5, от 5

до 10, от 0,2 до 0,5, от 0,5 до 1, от 1 до 2, от 2 до 4, или от 0,05 до 0,5 мг гема / г белка.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят, полученный из *Methylococcus capsulatus*, который культивировали в условиях с пониженным уровнем меди, характеризуется уровнем меди максимально 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, или 5 мг меди на кг белкового изолята. В некоторых вариантах осуществления белковый изолят, полученный из *Methylococcus capsulatus*, который культивировали в условиях с пониженным уровнем меди, характеризуется уровнем меди в интервале от 1 до 100, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30 до 40, от 40 до 50, от 50 до 60, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от 90 до 100, от 1 до 90, от 1 до 80, от 1 до 70, от 1 до 60, от 1 до 50, от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 10, от 5 до 90, от 5 до 80, от 5 до 70, от 5 до 60, от 5 до 50, от 5 до 40, от 5 до 30, от 5 до 20, от 10 до 90, от 10 до 80, от 10 до 70, от 10 до 60, от 10 до 50, от 10 до 40, от 10 до 30, от 20 до 90, от 20 до 80, от 20 до 70, от 20 до 60, от 20 до 50, от 20 до 40 мг меди / кг белкового изолята.

Белковый изолят характеризуется также скорректированным аминокислотным коэффициентом усвояемости белков (PDCAAS) равным по меньшей мере 0,9. В некоторых вариантах осуществления коэффициент PDCAAS белкового изолята *Methylococcus capsulatus* составляет по меньшей мере 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98 или 0,99. Коэффициент PDCAAS представляет собой метод оценки качества белков на основе как присутствия незаменимых аминокислот, так и их усвояемости. Коэффициент PDCAAS был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США и Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций/Всемирной организацией здравоохранения (ФАО/ВОЗ) в качестве предпочтительного наилучшего метода определения качества белка.

Как описано здесь, коэффициент PDCAAS определяют с использованием анализа усвояемости белков, разработанного фирмой Megazyme (см. K-PDCAAS Data, Megazyme, 2019), метода ферментивного расщепления *in vitro*, в значительной степени скорректированного с традиционным анализом *in vivo* с использованием крыс для измерения степени расщепленного белка, которое происходит при кормлении продуктом, содержащим белок. Используя метод

PDCAAS, оценку качества белка определяют при сравнении аминокислотного профиля образца белка со стандартным аминокислотным профилем, а также измерений некоторых параметров усвояемости. Более высокий уровень PDCAAS в целом указывает на более высокое качество белка за счет обеспечения
5 необходимого количества незаменимых аминокислот. Как правило, PDCAAS ограничен значением 1,0, где 1,0 соответствует «идеальному» белку. Однако при измерении PCAAS *in vitro* можно получить значение, превышающее 1,0. Белки животного происхождения, как правило, характеризуются более высокими значениями PDCAAS (близкими к 1,0), чем большинство белков растительного
10 происхождения (обычно <0,9) (Фиг. 9).

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, полученный из биомассы *Methylococcus capsulatus*, выращенной на субстрате, полученном из природного газа, отличается своим углеродным отпечатком, представленным значениями $\delta^{13}\text{C}$ (как и продукты, полученные из таких микроорганизмов *Methylococcus capsulatus*). В качестве фона для оценки глобальных источников и выбросов метана широко используются подходы оценки стабильных изотопов и баланса масс (см. Whiticar и Faber, Org. Geochem. 10:759, (1986); Whiticar, Org. Geochem. 16: 531, 1990). Чтобы использовать значения $\delta^{13}\text{C}$ остаточного метана для
15 определения количества окисленного метана, необходимо знать степень изотопного фракционирования, вызванного микробным окислением метана. Например, в присутствии аэробных метанотрофов метан может подвергаться метаболизму с помощью специфического фермента, метанмонооксигеназы (ММО). Метанотрофы превращают метан в метанол, а затем в формальдегид. Формальдегид может дополнительно окисляться до CO_2 для обеспечения клетки
20 энергией в форме восстанавливающих эквивалентов (NADH) или включаться в биомассу в ходе циклов RuMP или Serine (Hanson и Hanson, Microbiol. Rev. 60:439, 1996), которые напрямую аналогичны путям ассимиляции углерода в фотосинтезирующих организмах. В частности, метанотроф типа I, такой как *Methylococcus capsulatus*, использует путь RuMP для синтеза биомассы и
25 полностью генерируют биомассу из CH_4 , тогда как метанотроф типа II использует сериновый путь, который ассимилирует 50–70% клеточного углерода из CH_4 и 30–50% из CO_2 (Hanson и Hanson (1996)). Методы измерения состава изотопов углерода представлены, например, в статье Templeton et al (Geochim. Cosmochim. Acta 70:1739, 2006), и эти способы в полном объеме включены в

настоящий документ в качестве ссылки. В Примере 11 описана характеристика распределения стабильных изотопов углерода в клетках различных партий ферментации микроорганизмов *Methylococcus capsulatus*. Значения $\delta^{13}\text{C}$ продуктов, описанных здесь (то есть микроорганизм *Methylococcus capsulatus*,
5 родственная биомасса, белковый изолят и пищевые композиции, полученные из него), могут изменяться в зависимости от источника и чистоты C_1 субстрата, как продемонстрировано в Примере 11.

В некоторых вариантах осуществления микроорганизм *Methylococcus capsulatus*, и родственная биомасса, белковый изолят и пищевые композиции,
10 полученные из него, характеризуются значениями $\delta^{13}\text{C}$ менее 30‰, менее -31‰, менее -32‰, менее -33‰, менее -34‰, менее -35‰, менее -36‰, менее -37‰, менее -38‰, менее -39‰, менее -40‰, менее -41‰, менее -42‰, менее -43‰, менее -44‰, менее -45‰, менее -46‰, менее -47‰, менее -48‰, менее -49‰, менее -50‰, менее -51‰, менее -52‰, менее -53‰, менее -54‰, менее -55‰,
15 менее -56‰, менее -57‰, менее -58‰, менее -59‰, менее -60‰, менее -61‰, менее -62‰, менее -63‰, менее -64‰, менее -65‰, менее -66‰, менее -67‰, менее -68‰, менее -69‰, или менее -70‰.

В некоторых вариантах осуществления микроорганизм *Methylococcus capsulatus* по настоящему изобретению и родственная биомасса, белковый
20 изолят и пищевые композиции, полученные из него, характеризуются значениями $\delta^{13}\text{C}$ в интервале от приблизительно -35‰ до приблизительно -50‰, от приблизительно -45‰ до приблизительно -35‰, или от приблизительно -50‰ до приблизительно -40‰, или от приблизительно -45‰ до приблизительно -65‰, или от приблизительно -60‰ до приблизительно -70‰,
25 или от приблизительно -30‰ до приблизительно -70‰.

В другом варианте осуществления микроорганизм *Methylococcus capsulatus*, и родственная биомасса, белковый изолят и пищевые композиции, полученные из него, характеризуются значениями $\delta^{13}\text{C}$ менее -30‰ или в интервале от приблизительно -40‰ до приблизительно -60‰.

30 Характеристика значений $\delta^{13}\text{C}$ некоторых C_1 метаболизирующих микроорганизмов, включая *Methylococcus capsulatus*, культивированных в присутствии сырья, полученного из природного газа, продемонстрирована ниже в примерах.

Микроорганизмы *Methylococcus capsulatus*, из которых получают белковый изолят, могут быть генетически модифицированными или генетически немодифицированными. В предпочтительном варианте осуществления *Methylococcus capsulatus* является генетически немодифицированным.

5 В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получают из *Methylococcus capsulatus* (Бат), *Methylococcus capsulatus* (Техас), *Methylococcus capsulatus* (Абердин) или их комбинации. В предпочтительном варианте белковый изолят получают из *Methylococcus capsulatus* (Бат).

10 Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* может быть представлен в форме жидкости, геля, порошка, гранул, хлопьев, агломератов, ядер, взвеси или крошки.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* обрабатывают в условиях Надлежащей производственной практики (GMP).

15 Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* обладает требуемыми технологическими свойствами для включения в пищевые композиции. Белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, полученный с использованием кислотного осаждения, как описано в Примере 4, характеризуется хорошими гелеобразующими свойствами (Фиг. 10 и 11). Гелеобразующие свойства белкового изолята *Methylococcus capsulatus* позволяют использовать его в качестве белкового связующего или заменителя яичного белка (например, в хлебобулочных изделиях, меренгах) в пищевой композиции. Гелеобразные пищевые продукты, в которых можно использовать белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, включают заменители мяса, немолочные йогурты, протеиновые пудинги, протеиновые гели, чипсы, экструдированные перекусы, макаронные изделия, заменители рыбы/морепродуктов (например, паста, палочки, филе) и заменитель крабового мяса. В некоторых вариантах осуществления 5% раствор белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, который нагревали до 75°C в течение 1 ч, характеризуется прочностью при гелеобразовании от приблизительно 10 г до приблизительно 300 г (например, от приблизительно 15 г до приблизительно 300 г, от приблизительно 25 г до приблизительно 300 г, от приблизительно 50 г до приблизительно 300 г, от приблизительно 15 г до приблизительно 150 г или от приблизительно 25 г до

приблизительно 250 г). В другом варианте осуществления 15% раствор
белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, который нагревали при 75°C в
течение 1 ч, характеризуется прочностью при гелеобразовании приблизительно
10 г, 20 г, 30 г, 40 г, 50 г, 60 г, 70 г, 80 г, 90 г, 100 г, 110 г, 120 г, 130 г, 140 г, 150
5 г, 160 г, 170 г, 180 г, 190 г, 200 г, 210 г, 220 г, 230 г, 240 г, 250 г, 260 г, 270 г, 280
г, 290 г или 300 г, или прочностью при гелеобразовании в любом интервале
между двумя указанными значениями. В другом варианте осуществления 15%
раствор белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, который нагревали при
75°C в течение 1 ч, характеризуется прочностью при гелеобразовании в
10 интервале приблизительно от 250 г до приблизительно 300 г. Для проведения
испытаний гелей на сжатие можно использовать анализатор Brookfield СТЗ
Texture.

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* может также формировать
стабильные эмульсии, в частности при добавлении эмульгирующего агента или в
15 отсутствии стадии нагревания до формирования эмульсии (например, в
гомогенизаторе, микрофлюидизаторе или смесителе) (Фиг. 13-14Б). В некоторых
вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* смешивают
с маслом, предпочтительно растительным маслом с образованием эмульсии. В
еще одном варианте осуществления эмульсия, включающая белковый изолят
20 *Methylococcus capsulatus*, содержит от приблизительно 2% до приблизительно
12% белкового изолята *Methylococcus capsulatus* и от приблизительно 3% до
приблизительно 25% масла. В одном варианте осуществления эмульсия,
включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, содержит
приблизительно от 2% до приблизительно 5% белкового изолята *Methylococcus*
25 *capsulatus* и от 12% до приблизительно 18% масла. Пищевые продукты на основе
эмульсии, для которых можно использовать белковый изолят *Methylococcus*
capsulatus, включают заправки, соусы, спреды, майонез, голландский соус,
заправки для салата с уксусом, немолочные сливки для кофе, крем-соусы, крем-
супы, масло, маргарин, протеиновые коктейли и питательные напитки. В
30 некоторых вариантах осуществления эмульсия, содержащая белковый изолят
Methylococcus capsulatus, является стабильной при хранении при комнатной
температуре без разделения фаз или образования кремообразного слоя в течение
по меньшей мере 24 ч, например, по меньшей мере 36 ч, 48 ч, 60 ч или 72 ч.

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* также характеризуется хорошим вспениванием (Фиг. 15-16 и табл. 3), которое можно использовать при его применении в качестве заменителя яичного белка (например, в хлебобулочных изделиях, меренгах) и заменителях мяса и чипсах. Типичные хлебобулочные изделия включают меренгу, крекеры, пирожные (например, бисквит на белках), пироги, выпечку, печенье, булочки, хлеб и хлеб быстрого приготовления. В некоторых вариантах осуществления пена, полученная из изолята белка *Methylococcus capsulatus*, характеризуется избыточным пенообразованием по меньшей мере 200%, 225%, 250%, 275%, 300%, 325%, 350%, 375%, 400%, 425%, 450%, 475%, 500%, 525%, 550%, 575% или 600%. В дополнительных вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* характеризуется избыточным пенообразованием от приблизительно 200% до приблизительно 600%, от приблизительно 250% до приблизительно 600%, от приблизительно 300% до приблизительно 600%, от приблизительно 400% до приблизительно 600% или от приблизительно 500% до приблизительно 600%. Избыточное пенообразование в процентах рассчитывают по формуле: (масса раствора – масса пены)/масса пены×100%, и его можно измерять с использованием пикнометра объемом 11,5 мл (Cole-Parmer Part #EW-38001-00). В еще одном варианте осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* характеризуется стабильностью пены по меньшей мере 30 мин, 35 мин, 40 мин, 45 мин, 50 мин, 55 мин или 1 ч. Стабильность пены можно измерять в процентах по формуле: Степень пены (%)=(остаточный объем пены)/(общий объем пены)×100.

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* также характеризуется хорошей растворимостью, в частности при нейтральном pH pH(~7,0) (Фиг. 17А-17Б). Типичные пищевые композиции, для которых требуется растворимость, включают соусы, подливки, заправки для салата, супы, пасты для намазывания на хлеб, протеиновые коктейли, питательные напитки, протеиновые гели, безмолочные продукты (например, сливки, мороженое, молоко) и протеиновые порошки. В некоторых вариантах осуществления растворимость белкового изолята *Methylococcus capsulatus* при нейтральном pH составляет по меньшей мере приблизительно 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Растворимость можно измерять при растворении белкового изолята

Methylococcus capsulatus в воде, при этом получают 2% раствор, и при центрифугировании при 7000 об/мин (4000×g) в течение 10 мин и содержание неочищенного белка в супернатанте измеряют методом Дюма.

Использованный здесь термин «цельноклеточный продукт», «цельноклеточный ингредиент», «цельноклеточный белок», «цельноклеточные белки», «цельноклеточный препарат» или т.п. относится к продукту, полученному из биомассы *Methylococcus capsulatus* в отсутствие стадии отделения растворимых белков от других компонентов биомассы, прежде всего от твердых компонентов, таких как клеточный дебрис и/или клеточная стенка. В некоторых вариантах осуществления процесс получения цельноклеточного продукта может включать стадию нагревания для активации природных нуклеаз (например, природные эндонуклеазы) для деградации некоторых нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), присутствующих в биомассе.

Например, цельноклеточные продукты можно получить при ресуспендировании собранной биомассы *Methylococcus capsulatus* в жидкости (например, в воде), необязательно подвергая ресуспензию тепловому шоку (например, при 90°C в течение 10 с) для активации природных нуклеаз (например, природных эндонуклеаз) в биомассе, при нагревании ресуспензии (например, при 60°C в течение 30 мин), для запуска реакций, катализируемых активированными нуклеазами, охлаждении нагретой ресуспензии (например, до менее 20°C) и лиофилизации охлажденной композиции. В некоторых вариантах осуществления процесс может включать стадию гомогенизации, предпочтительно после стадии нагревания. Типичный процесс получения цельноклеточных продуктов описан в Примере 16, схема которого представлена на Фиг. 27. В другом варианте осуществления цельноклеточные продукты *Methylococcus capsulatus* в получают в условиях Надлежащей производственной практики (GMP).

Цельноклеточные продукты, предлагаемые здесь, могут содержать некоторое количество неочищенного белка, истинного белка, нуклеиновой кислоты, золы, неочищенного жира, гема или гемового железа, и характеризуются уровнями обогащения одной или более аминокислот (например, L-цистеина, L-триптофана, L-аспарагиновой кислоты, L-тирозина, L-фенилаланина), аналогичными белковым изолятам *Methylococcus capsulatus*, описанным выше. В некоторых вариантах осуществления цельноклеточные

продукты характеризуются требуемой технологичностью (например, способностью связывания воды и масла) для включения в пищевые композиции.

Пищевые композиции

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* можно использовать в различных пищевых композициях, пригодных для потребления человеком без вреда для здоровья, и обеспечивающих энергетическую ценность.

Типичные пищевые композиции, в которых можно использовать белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, включают заменители мяса (например, котлету, фрикадельки, фарш, колбасу, вяленое мясо, мясной хлеб, филе, бекон, хот-дог или наггетсы), заменители рыбы/морепродуктов (например, рыбный фарш, паштет, рыба, филе), заменители молочных продуктов (например, немолочное молоко, нелактозные сливки, немолочный крем, немолочный йогурт, немолочные взбитые топпинги и немолочное мороженое), хлебобулочные изделия (например, меренги, печенье, пирожные (например, бисквит на белках), пироги, выпечку, шоколадные печенье брауни, булочки, хлеб и хлеб быстрого приготовления), соусы (например, голландский соус), подливки, пасты для намазывания на хлеб, майонез, заправки для салатов с уксусом, сливочные соусы, крем-супы, масло, маргарин, протеиновые батончики, экструдированные протеиновые чипсы, протеиновые коктейли, протеиновые гели и питательные напитки. Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* можно использовать в пищевых продуктах, обогащенных белком (например, в обогащенных белком закусках, чипсах, крекерах, слоеных пирожных и макаронах).

Типичная эмульсионная композиция, включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, содержит приблизительно 2-6% белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 12-18% масла (например, растительного масла) и необязательно 0,1-0,75% эмульгирующего агента (например, гексаметафосфата натрия, DATEM или оба ингредиента).

Типичная композиция для меренги, включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, содержит приблизительно 15-18 г воды, 3-18 г белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 10-20 г подсластителя (например, сахара), и 0,3-1,0 г винного камня (битартрата калия). Другая типичная композиция для меренги включает 18 г воды, 5 г белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 15 г сахара, и 0,4 г винного камня, из которой получают приблизительно 10 пирожных меренги.

Типичная композиция для крекеров, включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, содержит приблизительно 5-20% белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, приблизительно 55-75% муки (пшеничной муки), 0,94% разрыхлителя (например, бикарбоната натрия, бикарбоната аммония или
5 оба ингредиента), приблизительно 5-10% подсластителя (например, сахара или кукурузного сиропа), приблизительно 0,55% соли, приблизительно 0,5-2% эмульгирующего агента (например, димодана) и 2,2-6,6% масла. Другая типичная композиция для крекеров, включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, содержит 16 г пшеничной муки, 3,75 г белкового изолята
10 *Methylococcus capsulatus*, 0,15 г бикарбоната натрия, 1,35 г сахара, 0,13 г соли, 0,24 г димодана (эмульгирующего агента), 0,08 г бикарбоната аммония и 1,1 г растительного масла, из которой получают приблизительно 12 небольших крекеров.

Гемовые белки, присутствующие в белковом изоляте *Methylococcus capsulatus*, делают его особенно пригодным для применения в заменителях мяса.
15 Гемовые белки придают необработанным заменителям мяса природный цвет свежего мяса, который темнеет в процессе приготовления, а также придают аромат при кулинарной обработке и слабый металлический привкус без необходимости использования генетически модифицированных организмов.

20 Как будет описано ниже более подробно, в зависимости от конечных пищевых продуктов, пищевые композиции, представленные здесь, могут включать белковый изолят *Methylococcus capsulatus* в количестве от приблизительно 0,5 до приблизительно 35 мас.%, например, от 0,5% до 5%, от 5% до 10%, от 10% до 15%, от 15% до 20%, от 20% до 25%, от 25% до 30%, от
25 30% до 35%, от 1% до 10%, от 10% до 20%, от 20% до 35%, от 1% до 15%, от 15% до 35%, от 1% до 20%, от 1% до 35%, от 2% до 5%, от 2% до 10%, от 2% до 15%, от 2% до 20%, от 2% до 25%, от 2% до 30%, от 2% до 35%, от 5% до 10%, от 5% до 15%, от 5% до 20%, от 5% до 25%, от 5% до 30%, от 5% до 35%, от 10% до 25%, от 10% до 35%, от 15% до 25%, или от 15% до 35%.

30 В некоторых вариантах осуществления котлета из заменителя мяса (гамбургер) содержит приблизительно 2,5-5 г (13-25)% белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, приблизительно 12-20 г (50-70%) растительного белка (например, текстурированного соевого белка), приблизительно 2,5-4,5 г (5-15%) масла (например, растительного масла) и необязательно воду, приблизительно 0-

4 г (0-11%) связующего (например, муки), по меньшей мере одну пряность (приблизительно 1,48-2,18%), или их комбинацию. В другом варианте осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получен после обработки биомассы кислотным осаждением.

5 Типичная композиция котлеты из заменителя мяса (гамбургер), включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, содержит 2 г муки, 2,5 г белкового изолята *Methylococcus capsulatus* и 15 г текстурированной сои. В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получен после обработки биомассы кислотным осаждением.

10 Другая типичная композиция котлеты из заменителя мяса (гамбургер), включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, содержит 2 г муки, 3,5 г белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 1,2 г кокосового масла, 0,2 г соли, 0,15 г порошкообразного чеснока, 0,15 г порошкообразного репчатого лука и 15 г замоченной текстурированной сои, при этом общая масса предназначенного
15 для кулинарной обработки продукта составляет 22,20 г. В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получен после обработки биомассы кислотным осаждением.

Еще одна типичная композиция котлеты из заменителя мяса (гамбургер) содержит 2 г муки, 4,5 г белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 1,2 г
20 кокосового масла, 0,2 г соли, 0,15 г порошкообразного чеснока, 0,15 г порошкообразного репчатого лука и 15 г замоченной текстурированной сои, при этом общая масса предназначенного для кулинарной обработки продукта составляет 23,20 г. В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получен после обработки биомассы кислотным
25 осаждением.

Другая типичная композиция для котлеты из заменителя мяса (гамбургер), включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, содержит 9% муки, 15,7% белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 5,4% кокосового масла, 0,9% соли, 0,7% порошкообразного чеснока, 0,7% порошкообразного репчатого лука
30 и 67,6% гидратированной текстурированной сои. В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получен после обработки биомассы кислотным осаждением.

Еще одна типичная обогащенная белком композиция чипсов включает 19-25 г (65-80%) муки из зерновых (например, кукурузная мука, рисовая мука, мука

из киноа, пшеничная мука), 6,5-8 г (20-26%) белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 0,3-0,5% разрыхлителя и необязательно воду. В другом типичном варианте обогащенная белком композиция чипсов, включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, включает 22,9 г кукурузной муки Masa, 7,1 г белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 0,45 г продукта Aquamin™ (CaCO₃) и 26,5 г воды.

В определенных вариантах осуществления безмолочное мороженое включает 3-10% белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 45-60% воды, 10-20% подсластителя (например, сахар), 8-16% масла (например, растительное масло, такое как кокосовое масло), и необязательно 10-30% фруктов, наполнителя, ароматизатора или их комбинацию.

Типичная композиция безмолочного клубничного мороженого, включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, содержит 4 г белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 50 г воды, 7,7 г кокосового масла, 16,2 г сахара, 0,125 г лимонной кислоты, 11,1 г клубничного пюре, 11,1 г клубники в 100 г партии мороженого.

Типичное безмолочное шоколадное мороженое включает 45-60% воды, 3-10% белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 8-16% масла (например, растительное масло, такое как кокосовое масло), 10-25% подсластителя и 6,5-8% какао-порошка.

Другая типичная композиция безмолочного шоколадного мороженого, включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, содержит 4,78 г белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 59,7 г воды, 10,6 кокосового масла, 21,1 г сахара, 3,8 г кокосового масла в 100 г партии мороженого.

Еще одна типичная композиция безмолочного шоколадного мороженого, включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, содержит 3,99 г белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, 55,29 г воды, 13,7 г кокосового масла, 21,42 г сахара, 3,74 г порошкообразного какао-порошка и 1,87 г темного какао-порошка на 100 г партии мороженого.

В некоторых вариантах осуществления пищевая композиция, включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, характеризуется красноватым цветом. В другом варианте осуществления пищевая композиция, включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, не характеризуется красноватым цветом.

Кроме пищевых композиций, приготовленных из белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, здесь также описаны пищевые композиции, приготовленные из цельноклеточных продуктов *Methylococcus capsulatus*. Например, цельноклеточные продукты можно использовать для приготовления композиций заменителей мяса (например, котлета из заменителя мяса) и немолочного йогурта. Типичные композиции из заменителей мяса и немолочного йогурта, включающие цельноклеточные продукты *Methylococcus capsulatus*, описаны в Примерах 17 и 18 (см. Фиг. 19Д и 26).

Добавки и дополнительные ингредиенты для пищевых композиций

Одну или более пищевых добавок можно объединять с белковым изолятом или цельноклеточным продуктом *Methylococcus capsulatus* в пищевых композициях, описанных здесь. Пищевой добавкой является любое вещество, которое добавляют в пищевую композицию и которое может влиять на характеристики пищевой композиции.

В некоторых вариантах осуществления, эмульгирующий агент, известный также как эмульгатор, добавляют в белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или в цельноклеточный продукт или в полученные из них пищевые композиции. Эмульгирующие агенты являются особенно пригодными в пищевых композициях, представляющих собой эмульсии. Эмульгирующий агент представляет собой поверхностно-активный агент, который действует как граница раздела между двумя несмешивающимися жидкостями, такими как масло и вода, обеспечивая их смешение в стабильные эмульсии. Эмульгирующие агенты также снижают слипание, контролируют кристаллизацию и предотвращают расслоение. Эмульгирующие агенты представляют собой соединения, которые обычно содержат полярную или гидрофильную часть (т.е. водорастворимую) часть и неполярную (т.е. гидрофобную или липофильную) часть. Из-за этого эмульгирующие агенты имеют тенденцию к большей или меньшей растворимости как в воде, так и в масле. Более растворимые в воде (и, соответственно, менее растворимые в масле) обычно образуют эмульсии “масло-в-воде”, в то время как эмульгирующие агенты, более растворимые в масле, образуют эмульсии вода-в-масле.

Примеры эмульгирующих агентов, которые можно использовать в качестве пищевых добавок, включают соль фосфорной кислоты, лецитин, диацетиловый сложный эфир винной кислоты и моноглицерида (DATEM), сложный эфир

уксусной кислоты и моноглицерида (AMG), сложный эфир молочной кислоты и моноглицерида (LMG), сложный эфир лимонной кислоты и моноглицерида (CMG), сложный эфир янтарной кислоты и моноглицерида (SMG), стеариллактат натрия, моноглицерид, диглицерид, полисорбат, каррагинан, гуаровую камедь, стеариллактат кальция (CSL), сложный эфир полиглицерина (PGE), полирицинолеат полиглицерина (PGPR), сложный эфир сорбитана кислоты (SOE), моностеарат сорбитана, сложный эфир пропиленгликоля и жирной кислоты (PGME), сложный эфир сахара (SE), димодан или их любые комбинации. Примеры солей фосфорной кислоты, которые используют для приготовления пищевых продуктов, включают фосфат натрия, фосфат калия, фосфат кальция, гексаметафосфат натрия и дифосфат, трифосфат и полифосфат ортофосфорной кислоты.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включают агент повышающий вязкость, также известный под названием загустителя или желирующего агента. Повышающий вязкость агент повышает вязкость и улучшает стабильность, предотвращая разделение эмульсии, образование кристаллов льда и расслоение ингредиентов. Повышающие вязкость агенты включают крахмалы (такие как крахмал из корней маранта, кукурузный крахмал, картофельный крахмал и тапиоковый крахмал), сыворотку, растительные камеди (такие как гуаровая камедь, камедь бобов рожкового дерева, ксантановая камедь), коллаген, желатин, альгиновую кислоту, альгинат кальция, альгинат калия, альгинат кальция, агар-агар, каррагинан, пектин или их любые комбинации.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включают связующий агент. Связующие включают муку (например, пшеничную, рисовую, тапиоковую, конжачковую, ржаную, желудевую, миндальную, амарантовую муку, муку бобов, маниоковый крахмал, муку банана, каштана, нута, кукурузы, конопли, мескита, гороха, сорго, сои, маранта, таро, киноа, маниока и абиссинской травы), крахмалы (например, кукурузный, рисовый, картофельный, крахмалы из тапиоки, маранта, пшеницы, сладкого картофеля, саго и золотистой фасоли), камеди (например, ксантановую, гуаровую, агаровую, плодов рожкового дерева), каррагинан,

карбоксиметилцеллюлозу, целлюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, белки канолы, пектин, овсяное волокно, рисовые отруби, семена льна, семена чиа, оболочка семян подорожника или любые их комбинации.

5 В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включают антислеживающий агент для предотвращения комкования, слеживания или склеивания. Типичные антислеживающие агенты включают
10 фосфаты кальция, диоксид кремния, цитрат железа-аммония, силикаты (кальция, алюминия и трикальция) и стеариновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включает консервант для сохранения натуральных свойств, внешнего вида или повышения срока хранения пищевых продуктов. Типичные
15 консерванты, которые можно использовать в белковом изоляте *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточном продукте или пищевой композиции, полученной из них, включают соль, сахар, спирт, уксус, бензоаты (например, бензоат натрия, бензойную кислоту), нитраты (например, нитрат натрия), сульфиты (например, диоксид серы), сорбаты (например, сорбат натрия, сорбат калия), антиоксиданты
20 (например, витамин С, витамин Е, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ)), лимонную кислоту, диоксид серы, пропионовую кислоту, пропионат кальция, эритроборат натрия, EDTA, эритроборат натрия, эриторборовую кислоту, диацетат натрия, сукцинат натрия, экстракт из косточек винограда, экстракт из сосновой коры, яблочный экстракт,
25 чайные полифенолы, янтарную кислоту и аскорбиновую кислоту, парабены, дегидроацетат натрия и их любые комбинации.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включает подсластитель. Типичные подсластители включают природные
30 и синтетические подсластители, такие как сахароза (сахар), глюкоза, фруктоза, сорбит, маннит, кукурузный сироп, кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы, сахарин, аспартам, сукралоза, ацесульфам калия (ацесульфам-К), мед, агава, патока и неотам.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включает экстракты или натуральные ароматизаторы.

5 В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включает краситель. Примеры красителей включают природные или синтетические красители, такие как FD&C синий № 1 и 2, FD&C зеленый № 3, FD&C красный № 3 и 40, FD&C желтый № 5 и 6, оранжевый В, Citrus красный № 2, экстракт аннато, бета-каротин, экстракт из кожицы винограда, экстракт из
10 кошениля или кармин, маслосмолы паприки, жженный сахар, фруктовые и растительные соки и шафран.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включает усилитель вкуса, такой как глутамат мононатрия (MSG),
15 гидролизованный соевый белок, экстракт дрожжевого автолизата, гуанилат или инозинат динатрия.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включает заменитель жира, такой как олестра, целлюлозный гель,
20 каррагинан, полидекстроза, модифицированный пищевой крахмал, микрочастицы протеина яичного белка, гуаровая камедь, ксантановая камедь, концентрат белка молочной сыворотки.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная
25 из них, включает контролирующий рН агент, такой как молочная кислота, лимонная кислота, гидроксид аммония и карбонат натрия.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включает разрыхлитель. Типичные разрыхлители включают пищевую
30 соду (бикарбонат натрия), бикарбонат аммония, монофосфат кальция и карбонат кальция. В некоторых вариантах осуществления разрыхлитель включает продукт Aquamin, который представляет собой мультиминеральный комплекс на основе красных морских водорослей.

В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включает увлажнитель, такой как глицерин или сорбит.

5 В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, включает питательное вещество (нутриент), такое как гидрохлорид

тиамина, рибофлавин (витамин В2), ниацин, ниацинамид, фолат или фолиевая кислота, бета-каротин, иодид калия, сульфат железа или сернокисл

двухвалентное железо, альфа-токоферолы, аскорбиновая кислота или витамин D.

10 В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт или пищевая композиция, полученная из них, предпочтительно характеризуется запахом свежего мяса и может

включать одну или более серо-содержащих аминокислот, усиливающих запах при готовке (например, цистеин, цистин, тиамин и метионин), и/или гемо-

15 защитных или стабилизирующих агентов (например, ниацин, имидазол, 4-метилимидазол и гистидин).

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт можно объединять с одним или более другим пищевым ингредиентом, включающим, но не ограничиваясь только ими, зерно, фрукты, овощи, белки,

20 масла, жиры, травы, специи, мясные продукты, яйца и молочные продукты. Пищевые ингредиенты могут быть сырыми, подвергнутыми кулинарной

обработке, природными, синтетическими, обработанными или необработанными. Примеры трав включают базилик, лавровый лист, стебли сельдерея, кервель, кориандр, листья карри, укроп, шнитт-лук, пажитник, лебеда

25 благовонная, лепестки розы, листья каффир-лайма, лаванда, лемонграсс, майоран, мята, орегано, петрушка, розмарин, шалфей, чабрец, эстрагон и тимьян. Типичные специи включают соль, перец, какао-бобы, какао-порошок, семена тмина, кардамон, семена сельдерея, порошок чили, хлопья чили, корица, цитрусовая цедра, гвоздика, кориандр, кумин, семена укропа, экстракты,

30 фенхель, порошкообразный чеснок, порошкообразный лук, порошкообразный имбирь, порошкообразный хрен, ягоды можжевельника, мускатный орех, горчица, паприка, семена мака, порошок из белых грибов, шафран, сумах, анис звездчатый, куркума и ваниль.

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт объединяют с дополнительным источником белка, включая животный белок, растительный белок и белок из микроорганизмов. Типичные растительные белки включают сою, горох, семена рапса, бобы (фасоль, фасоль пинто, черные бобы и чечевицу), нут, молоко, сыворотку, рис, пшеницу и овес. Растительные белки включают гидрированные и дегидрированные растительные белки. В некоторых вариантах осуществления растительные белки включают текстурированные овощные белки, такие как текстурированный соевый белок.

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт объединяют с источником белка животного происхождения. Массовое соотношение белкового изолята *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточного продукта к источнику белка животного происхождения или массовое соотношение белков из белкового изолята *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточного продукта к белкам из источника белка животного происхождения может составлять от 1:100 до 100:1, такое как от 1:20 до 20:1, от 1:10 до 10:1, от 1:5 до 5:1, от 1:3 до 3:1, от 1:2 до 2:1.

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт объединяют с источником белка растительного происхождения. Массовое соотношение белкового изолята *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточного продукта к источнику белка растительного происхождения или массовое соотношение белков из белкового изолята *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточного продукта к белкам из источника белка растительного происхождения может составлять от 1:100 до 100:1, такое как от 1:20 до 20:1, от 1:10 до 10:1, от 1:5 до 5:1, от 1:3 до 3:1, от 1:2 до 2:1.

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт можно объединить с маслом. Использованный здесь термин “масло” означает любой триацилглицерид из растений, животных или микроорганизмов, который обычно представляет собой жидкость при комнатных температуре и давлении. Предпочтительно масло представляет собой масло растительного происхождения, такое как соевое масло, рапсовое, каноловое, пальмовое, пальмоядровое, кокосовое, оливковое, подсолнечное, хлопковое, куфеи, арахисовое, рыжиковое, горчичное, масло семян кешью, овсяное, люпиновое масло, масло гибискуса коноплевого, календулы, конопля, кофе, семян льна, масло фундука, эуфорбии, тыквенное масло, кориандра, камелии, кунжутное

масло, сафлоровое, рисовое, тунга китайского, кокосовое, сушеного ядра кокосового ореха, мака, клещевины, пекана, жожоба, ятрофы, макадами, бразильского ореха или авокадо.

5 Следует понимать, что пищевая добавка может характеризоваться одной или более функциями в пищевой композиции. Кроме того, предполагается что пищевые композиции, предлагаемые здесь, могут включать любую комбинацию добавок или ингредиентов, раскрытых здесь.

10 В настоящем изобретении также предлагаются способы получения пищевой композиции для потребления человеком, включающие: объединение белкового изолята *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточного продукта, где *Methylococcus capsulatus* культивируют и обрабатывают в условиях GMP, по меньшей мере с одним другим пищевым ингредиентом или пищевой добавкой. В некоторых вариантах осуществления пищевую композицию объединяют по меньшей мере с одним источником белка растительного происхождения, по 15 меньшей мере с одним источником белка животного происхождения и/или по меньшей мере с одним источником белка бактериального происхождения. В некоторых вариантах осуществления белковый изолят *Methylococcus capsulatus* или цельноклеточный продукт используют в качестве заменителя белка на мясной основе, заменителя яйца или заменителя молочного ингредиента в 20 пищевой композиции.

Примеры

Пример 1

Культивирование *Methylococcus capsulatus* Бат при различной концентрации меди в непрерывной культуральной системе

25 *M. capsulatus* Бат дикого типа культивировали при непрерывной ферментации в сосудах объемом 2 л. Питательные вещества, необходимые для культивирования, за исключением различных количеств меди, обеспечивали в избытке в общей реакционной смеси питательных веществ (MMF). Состав MMF представлен в Табл. 1.

30 Таблица 1

Состав общей реакционной смеси питательных веществ

Соединение	Источник	Концентрация	Единицы	Материал	Единицы
H ₃ PO ₄	Концентрированный раствор	85	% (мас./мас.)	0,948	г

Соединение	Источник	Концентрация	Единицы	Материал	Единицы
MgSO ₄ ×7H ₂ O	Соль	100	%	0,456	г
K ₂ SO ₄	Соль	100	%	0,201	г
FeSO ₄ ×7H ₂ O	Соль	100	%	0,025	г
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	Раствор	6	г/л	0,0264	мл
MnSO ₄ ×H ₂ O	Раствор	2	г/л	0,0051	мл
CoSO ₄ ×7H ₂ O	Раствор	2	г/л	0,0114	мл
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	Раствор	2	г/л	0,0201	мл
NiCl ₂ ×6H ₂ O	Раствор	2	г/л	0,0055	мл
Дистиллированная вода QS	Количество, необходимое для доведения до			1000	мл

5 *M. capsulatus* Бат характеризуется способностью захватывать медь в клетку, а затем использовать или сохранять все количество меди при концентрациях в интервалах, как исследовано в примере 2, описанном ниже. Для определения влияния концентрации меди на неочищенный белок медь подавали через шприцевой насос при рассчитанных скоростях подачи. Расчет осуществляли предполагая, что все количество подаваемой меди поглощается бактерией. Например: для низкой концентрации меди 50 мкг Cu/г DCW (масса сухих клеток) и скорости сбора культуры 5 г/л/ч DCW расход Cu - CuSO₄×5H₂O будет 10 составлять 250 мкг/л/ч.

Условия непрерывной ферментации в присутствии метана приведены в Табл. 2.

Таблица 2.

Параметры непрерывного культивирования в присутствии метана

Параметр	Условия/комментарий
Рабочий объем	1,5 л
Температура	42°C
Перемешивание	1200 об/мин
Микро-распределитель, (20 мкМ)	Метан
Поток метана	100 мл/мин
Кольцевой распределитель	Воздух
Поток воздуха для контроля рО ₂	360 - 720 мл/мин
Заданная величина рО ₂	10% потока воздуха
Заданная величина рН	6,5
Контроль Н	1 н. NaOH, 0,5 М H ₂ SO ₄
Общая смесь питательных веществ (MMF)	Без добавления меди

Параметр	Условия/комментарий
Скорость подачи ММФ	Поддержание роста культуры до 15 г/л DCW
Подача азота	0,5 М HNO ₃
Интервал N-NO ₃	5 - 60 мг/л
Интервал разбавления	0,1-1/ч

Сбор биомассы

В ходе эксперимента периоды промывки осуществляли после изменения условий для промывки биомассы, полученной при предыдущей концентрации меди, и установления нового устойчивого состояния ферментации.

Продолжительность периода промывки составляла 20-24 ч или два объема ферментации. Для каждого установленного набора условий собирали от 2 до 3 л непрерывно откачиваемого ферментационного бульона, которые представляли собой объем для получения 15-20 г массы сухих клеток биомассы. В ходе сбора ферментационный бульон хранили в холодильнике. Собранный бульон центрифугировали и влажные клеточные осадки хранили при -80 °С. Затем осадки лиофилизировали и проводили анализ сухой клеточной биомассы на неочищенный белок и элементный анализ. В ходе сбора биомассы осуществляли анализ газов метана, кислорода и диоксида углерода.

Пример 2

Получение белкового изолята с использованием микрофльтрации и ультрафльтрации

Материалы и методы

Ферментационный бульон собирали после непрерывной ферментации и центрифугировали. Жидкость удаляли. Собранную биомассу ресуспендировали в холодной деионизированной воде до общего содержания твердых веществ 6-8%. рН смеси доводили до 8 с использованием 5 н. раствора гидроксида натрия. Раствор гомогенизировали с использованием процессора Microfluidics LM-10 при 22000 фунтов на кв. дюйм или 1300 бар. Раствор гомогенизировали в ходе одного цикла пропускания через процессор и хранили охлажденном во льду. После гомогенизации повторно доводили рН от 7 до 8 с использованием 5 н. раствора гидроксида натрия.

Затем содержание твердых веществ в гомогенизированном растворе доводили до 2% с использованием холодной воды и центрифугировали при 3000

g в течение 5 мин при 10°C. Супернатант аккуратно декантировали в чистый сосуд и осадок удаляли. Супернатант подвергали микрофльтрации с использованием системы Millipore Pellicon 2 и кассеты фильтров Durapore с диаметром пор 0,65 мкм. Давление циркуляции концентрата поддерживали при 5 фунтов на кв. дюйм. Объем концентрата поддерживали постоянным при добавлении воды и собирали 2-3 объема фильтрата, который концентрировали в 10 раз с использованием ультрафльтрации на кассете Pellicon 2 10kDa. Концентрат сушили лиофильно на лиофильной сушке Columbia International Vacuum Freeze Dryer модели FD50-B2A.

10 Сухой белковый изолят характеризовали по содержанию неочищенного белка в % с использованием метода Дюма на анализаторе азота LECO 828. Краткое описание метода: исследуемый образец порошкообразного сухого белкового изолята быстро сжигали в горячей печи в среде чистого кислорода. Высвободившийся азот в газообразном продукте сгорания оценивали с
15 использованием детектора теплопроводности и гелия в качестве газа-носителя. Влагу из газообразного продукта сгорания удаляли с использованием термоэлектрического охладителя. Уровень азота в образце белкового изолята определяли при сравнении с количеством высвобожденного азота калибровочных стандартов с известным уровнем азота. Содержание
20 неочищенного белка в белковом изоляте рассчитывали при умножении уровня азота в образце на фактор конверсии азота белка.

Уровень нуклеиновых кислот определяли с использованием набора для очистки ДНК и РНК Lucigen Masterpure Complete MC85200.

25 На Фиг. 1Б представлена схема типичного процесса микрофльтрации и ультрафльтрации для получения белкового изолята.

Результаты

Показано, что белковый изолят, полученный из биомассы, культивированной при низких уровнях меди (25 мг меди/кг биомассы), характеризуется высоким содержанием неочищенного белка 87-88% по сравнению с белковым изолятом, полученном при культивировании биомассы при нормальных уровнях меди (154 мг/кг, см. Фиг. 2). Уровень нуклеиновых кислот оставался низким 2-3% в расчете на общую массу белкового изолята в условиях как низких, так и нормальных уровней меди.

На Фиг. 3 представлено увеличение содержания неочищенного белка в биомассе, собранной при ферментации с низким уровнем меди. При ферментации с низким уровнем меди (0,038 г/кг) образуется 82-83% неочищенного белка, в то время как при ферментации с нормальным уровнем меди (0,154 г/кг) и с высоким уровнем меди (0,371 г/кг) образуется 5
приблизительно 75% и 75-77% неочищенного белка, соответственно.

На Фиг. 4 представлены результаты анализа неочищенного белка, жира и золы в биомассе при культивировании с различными уровнями меди (23, 80, 96 и 140 мг/кг). Сниженные уровни меди приводят к повышению процентного содержания неочищенного белка в белковых изолятах и к снижению 10
процентного содержания жира и золы.

Можно заключить, что результаты свидетельствуют о более высоком процентном содержании неочищенного белка в биомассе, культивированной при низких уровнях меди, по сравнению с биомассой, культивированной при 15
нормальных уровнях меди (Фиг. 3 и 4). Кроме того, более высокий уровень неочищенного белка в биомассе поддерживали в продукте белкового изолята при обработке в аналогичных условиях ниже по потоку (DSP, Фиг. 2).

Пример 3

Культивирование *Methylococcus capsulatus* Бат (NCIMB 11132) в условиях 20
нормальных уровней меди

Бактерии культивировали при 42°C в сосудах для сыворотки, содержащих минимальную нитратную солевую среду Higgins (NSM) или среду MM-W1. Состав свободного пространства доводили до объема метан/воздух 1:1. Сосуды встряхивали со скоростью 200-250 об/мин. В другом варианте культуру 25
выдерживали в чашках со средой NSM, загущенных 1,5% мас./об. агаром, культивированным в газонепроницаемой камере, содержащей смесь газов метан/воздух 1:1 (об./об.). Чашки инкубировали в перевернутом виде в камере при 42°C.

Для ферментации в биореактор объемом 3 л, содержащий 1,25 л стерильной 30
среды MMF1.1, высевали клетки из сред, выращенных в полунепрерывной культуре в сосудах для сыворотки (10-20% об./об.), снабженной смесью метан/воздух 1:1 (об./об.). Состав среды MMF1.1 включал: 0,8 мМ MgSO₄×7H₂O, 40 мМ NaNO₃, 0,14 мМ CaCl₂, 6 мМ NaHCO₃, 4,7 мМ KH₂PO₄, 6,8 мМ K₂HPO₄, 20,7 мкМ Na₂MoO₄×2H₂O, 6 мкМ CuSO₄×5H₂O, 10 мкМ Fe^{III}-Na-EDTA и 1 мл/л

раствора редких металлов (содержащего на 1 л 500 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 мг $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 мг $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 мг $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 мг H_3BO_3 , 250 мг EDTA). Фосфат, бикарбонат и Fe^{III} -Na-после автоклавирования и охлаждения среды добавляли EDTA. Содержимое реактора перемешивали с использованием вертикальной мешалки при постоянной скорости 750 об/мин. В культуру добавляли питательные вещества при постоянном распылении метана со скоростью приблизительно от 60 до приблизительно 200 мл/мин, в то время как концентрированный кислород (>85%) подавали при варьируемой скорости 15-90 мл/мин и уровень растворенного кислорода поддерживали на уровне менее 10% (относительно насыщения среды воздухом).

Температуру в биореакторе поддерживали при 44°C и pH поддерживали при $7,0 \pm 0,1$ с использованием автоматического добавления 0,5 М NaOH и 0,5 М HCl, одновременно с добавлением к культуре меди и железа (конечные концентрации 5 мкМ CuSO_4 , 5 мкМ FeSO_4 , 10 мкМ Fe^{III} -Na-EDTA) каждые 3-6 ч (согласно увеличению OD_{600} до приблизительно 3-5 оптических единиц (OD) после достижения OD 5). В таких условиях наблюдали в значительной степени линейный рост с эффективной скоростью эффективного образования биомассы более 5 г массы сухих клеток на литр в день до OD_{600} более 10. Культуральную биомассу собрали центрифугированием, клетки 1 раз промывали средой MM-W1 и клеточные осадки либо замораживали при -80°C или использовали немедленно для фракционирования клеточных компонентов.

Истощение питательных средств устанавливали, когда наблюдалось ограничение выхода клеток в ходе ферментации. Для исключения ограничения питательных веществ, в основном азота и фосфата, инициировали подачу питательных средств, состоящих из 2-кратно концентрированной среды MMF1.1, после того, как количество OD_{600} культуры превышало 5. Подачу питательных веществ инициировали при степени разбавления, соответствующей примерно половине скорости роста культуры для исключения вымывания и для поддержания роста OD при увеличении объема культуры. Ферментацию в биореакторе продолжали согласно описанному выше протоколу таким образом, что многократные циклы роста и восстановления биомассы можно было проводить в ходе одного процесса ферментации.

Пример 4

Получение белкового изолята *Methylococcus capsulatus* из биомассы

Микрофильтрация и ультрафильтрация – образец B006

Ферментационный бульон из непрерывной ферментации собирали и центрифугировали. Супернатант удаляли. Собранную биомассу ресуспендировали в холодной деионизированной воде при содержании твердых веществ 2,65% (4,75 л) и рН смеси доводили до 8 с использованием 5 н. NaOH. Раствор гомогенизировали с использованием 1 цикла гомогенизатора Microfluidics LM-10 при 22000 пси или 1300 бар. Клеточный лизат хранили охлажденным во льду. Гомогенизированный раствор доводили до общего содержания твердых веществ 1,4% с использованием холодной воды и центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин при 10°C. Супернатант аккуратно декантировали в чистый сосуд и осадок удаляли. Супернатант подвергали микрофильтрации с использованием системы Millipore Pellicon 2 и кассеты фильтров Durapore с диаметром пор 0,45 мкм. Давление циркулирующего концентрата поддерживали при 5 фунтов на кв. дюйм. Объем концентрата поддерживали постоянным при добавлении воды. Собирали 2-3 объема фильтрата. Фильтрат концентрировали в 10 раз с использованием ультрафильтрации и кассеты с фильтрами Pellicon 2 10kDa. Концентрат сушили лиофильно с использованием вакуумной лиофильной сушилки Columbia International модели FD50-B2A, при этом получали порошок. Сухой белковый изолят характеризовали процентным содержанием неочищенного белка с использованием метода Дюма. Схема данного процесса получения белкового изолята представлена на Фиг. 1Б.

Хитозан и ультрафильтрация – образец B058

Ферментационный бульон после непрерывной ферментации собирали и центрифугировали. Супернатант удаляли. Собранную биомассу ресуспендировали в холодной деионизированной воде при содержании твердых веществ 3,9% (2 л) и рН смеси доводили до 8 с использованием 5 н. NaOH. Раствор гомогенизировали с использованием 1 цикла гомогенизатора Microfluidics LM-10 при 22000 фунтов на кв. дюйм или 1300 бар. Клеточный лизат хранили охлажденным во льду. Хитозан добавляли к клеточному лизату до конечной концентрации 0,03% (мас./об.) клеточного лизата. Смесь перемешивали в течение 1 ч во льду. Смесь центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин при 10°C. Осветленный супернатант концентрировали в 5 раз с использованием ультрафильтрации и кассеты с фильтрами Pellicon 2 10kDa.,

промывали 2,5 объемами холодной воды, концентрировали в 10 раз с использованием фильтра 10 kDA и сушили лиофильно с использованием вакуумной лиофильной сушки Columbia International модели FD50-B2A, при этом получали порошок. Схема данного процесса получения белкового изолята
5 представлена на Фиг. 1В.

Хитозан и кислотное осаждение – образец В060

Ферментационный бульон после непрерывной ферментации собирали и центрифугировали. Супернатант удаляли. Собранную биомассу ресуспендировали в холодной деионизированной воде при содержании твердых
10 веществ 3,9% (2 л) и pH смеси доводили до 8 с использованием 5 н. NaOH. Раствор гомогенизировали с использованием 1 цикла гомогенизатора Microfluidics LM-10 при 22000 фунтов на кв. дюйм или 1300 бар. Клеточный лизат хранили охлажденным во льду. Хитозан добавляли к клеточному лизату до конечной концентрации 0,03% (мас./об.) клеточного лизата. Смесь
15 перемешивали в течение 1 ч во льду. Смесь центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин при 10°C. Осветленный супернатант переносили в сосуд и pH доводили до 4,5 при медленном добавлении 0,2 н. серной кислоты. Смесь центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин при 10°C. Осветленный супернатант переносили в сосуд и доводили до pH 4,5 при медленном
20 добавлении 0,2 н. серной кислоты. Раствор перемешивали в течение 30 мин и затем центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин при 10°C. Супернатант удаляли и белковый осадок промывали 1 раз равным объемом подкисленной воды при pH 4,5, центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин при 10°C, при этом получали белковый осадок. Белковый осадок ресуспендировали в воде и pH
25 доводили до 7 при добавлении гидроксида натрия. Конечный раствор белка сушили лиофильно, при этом получали сухой порошок.

Высокоскоростное центрифугирование и кислотное осаждение

Ферментационный бульон после непрерывной ферментации собирали и 30% суспензию биомассы получали в 20 mM буферном растворе фосфата натрия,
30 pH 7,0. Ресуспендированные клетки гомогенизовали с использованием одного цикла пневматического дезинтегратора клеток Microfluidics LM-10 при 22000 фунтов на кв. дюйм. Гомогенат хранили охлажденным во льду. Гомогенат центрифугировали при 9000 об/мин при 4°C в течении 90 мин на центрифуге Beckman J2-21 с ротором JA-10 для удаления клеточного дебриса. Осветленный

супернатант переносили в сосуд и рН доводили до 4,5 при медленном добавлении охлажденной 0,2 н. серной кислоты. Раствор перемешивали в течение 30 мин и затем центрифугировали при 3000 g в течение 20 мин при 10°C. Супернатант удаляли и белковый осадок промывали 1 раз равным объемом подкисленной воды при рН 4,5, центрифугировали при 3000 g в течение 20 мин при 10°C, при этом получали белковый осадок. Белковый осадок ресуспендировали в воде и рН доводили до 7 при добавлении гидроксида натрия. Конечный раствор белка сушили лиофильно, при этом получали сухой порошок.

Пример 5

Оценка питательной ценности белкового изолята *Methylococcus capsulatus*

Скорректированный аминокислотный коэффициент усвояемости белка (PDCAAS) представляет собой способ оценки качества белка, основанный на присутствии незаменимых аминокислот для питания человека и их усвояемости. С использованием набора для анализа усвояемости белков (безопасный для животных метод точного определения качества белка) (Megazyme) определяли аминокислотный профиль и коэффициент PDCAAS белковых изолятов *Methylococcus capsulatus*, полученных, как описано в примере 4, и цельноклеточных продуктов, как описано в примере 16, или аналогичным способом. Безопасный для животных метод точного определения качества белка представляет собой способ расщепления ферментами *in vitro* с высокой степенью корреляции с традиционной моделью пищеварения крысы *in vivo*. Результаты для контрольного образца и трех типичных белковых изолятов, полученных согласно примеру 4, представлены на Фиг. 5-8: для контрольного образца на Фиг. 5, для образца белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, полученного способом микрофльтрации/ультрафльтрации (B066) на Фиг. 6, для образца белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, полученного с использованием хитозана и способа ультрафльтрации (B058) на Фиг. 7, и для образца белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, полученного с использованием хитозана/способа кислотного осаждения (B060) на Фиг. 8. Контрольный образец получали концентрированием, инактивированием при нагревании и высушивании биомассы *Methylococcus capsulatus*. Белковые изоляты *Methylococcus capsulatus* характеризуются коэффициентами PDCAAS равным по меньшей мере 0,90 и превышают коэффициенты большинства белков растительного происхождения (Фиг. 9).

Значение PDCAAS некоторых дополнительных белковых изолятов приведены на Фиг. 12. Контрольный образец, как описано на Фиг. 5, включен в качестве контрольного образца на Фиг. 12. Различные белковые изоляты получали следующим образом: концентрация меди, использованная для ферментации, составляла 125 мг/кг (если не указано иное), биомассу, полученную при ферментации, гомогенизировали, смешивали с хитозановым флокулянт (количество добавляемого хитозана варьировали, выражали в г хитозана на г DCW (масса сухой клетки) биомассы), осветляли центрифугированием, концентрировали ультрафильтрацией и сушили (лиофильно, если не указано иное).

Более подробно, различные белковые изоляты получали следующим образом:

(а) Концентрацию меди в ферментационном бульоне варьировали от 25 мг/кг Cu до 100 мг/кг Cu, для получения следующих образцов белковых изолятов использовали лабораторную напольную центрифугу и 0,0085 г хитозана/г DCW биомассы

25 мг/кг Cu, 0,0085 флок. PI

50 мг/кг Cu, 0,0085 флок. PI

75 мг/кг Cu, 0,0085 флок. PI

100 мг/кг Cu, 0,0085 флок. PI

(б) Для получения следующих образцов белковых изолятов использовали лабораторную дисковую центрифугу, при этом количество хитозана варьировали от 0,0085 до 0,04 г хитозана/г DCW биомассы

Набор дисков (Alfa Laval), 0,0085 флок. PI

Белковый изолят 0,02 флок

Белковый изолят 0,04 флок

(в) Для получения следующих образцов белковых изолятов в полупрепаративном масштабе использовали 0,0085 г хитозана /г DCW биомассы.

Термин “СPI лиофильно высушенный” означает лиофильно высушенный белковый изолят.

Термин “СPI высушенный с распылением Drytech spray” означает белковый изолят, высушенный с распылением.

Измеряли также значения PDCAAS для трех цельноклеточных продуктов. Два цельноклеточных продукта получали, как описано в примере 16, и третий

цельноклеточный продукт получали с использованием дополнительной стадии гомогенизации после термообработки. Соответствующие значения PDCAAS составили 0,98, 1,02 и 1,02.

5 Результаты свидетельствуют о том, что средние значения PDCAAS составляют 0,89 для контрольного образца, 1,01 для трех цельноклеточных продуктов и 1,23 для белковых изолятов, представленных на Фиг. 12.

Белковые изоляты, значения PDCAAS которых представлены на Фиг. 12, также анализировали методом Дюма для определения процентного содержания (мас.%) неочищенного белка. Результаты показаны на Фиг. 18.

10 Контрольный образец и три цельноклеточных продукта, описанных выше, также анализировали методом Дюма для определения количества неочищенного белка. Результаты составляют 73,2% (для контрольного образца), 74,1%, 70,6% и 70,0%.

Пример 6

15 Гелеобразование белкового изолята of *Methylococcus capsulatus*

Гелеобразование белковых изолятов *Methylococcus capsulatus*, полученных, как описано в Примере 4, оценивали с использованием анализатора Brookfield СТЗ. 34 г дистиллированной воды добавляли в сосуд объемом 100 мл (с магнитным мешальником). Сосуд помещали на магнитную мешалку и 6 г

20 порошкообразного белка постепенно добавляли в сосуд. рН раствора белка доводили до 7,0 с использованием 1 н. раствора NaOH или HCl. Раствор белка перемешивали в течение 1 ч. Раствор белка инкубировали без перемешивания в течение 30 мин для разрушения пены. Раствор белка выливали в оболочку (плоскую, 34 мм), закрывали и герметизировали стяжкой. Заключенный в

25 оболочку раствор белка нагревали на водяной бане при 75°C в течение 60 мин. Заключенный в оболочку белок охлаждали в проточной водопроводной воде в течение 1 ч. Заключенный в оболочку белок хранили в холодильнике в течение ночи, а затем помещали в проточную водопроводную воду на один час.

30 Оболочку осторожно отделили от желатинизированного белка и измеряли максимальную прочность желатинизированных белков с использованием анализатора Brookfield СТЗ с цилиндрическим зондом 12,5 мм. Как показано на Фиг. 11, концентрат сывороточного белка (WPC) характеризовался прочностью при гелеобразовании приблизительно 280 г. Исходная прочность сначала была низкой, а затем увеличивалась при сжатии до 280 г. Гель белкового изолята

Methylococcus capsulatus («Хитозан/УФ»), полученный из хитозана и методом ультрафильтрации, как описано в примере 4, оказался хрупким при разрезании оболочки и неэластичным. Прочность на сжатие быстро возрастала, а затем быстро снижалась. Образец, содержащий белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, полученный высокоскоростным центрифугированием и кислотным осадением, как описано в примере 4, оказался эластичным и характеризовался хорошей прочностью при гелеобразовании (Фиг. 10-11).

Пример 7

Растворимость белкового изолята *Methylococcus capsulatus*

10 Растворимость белковых изолятов *Methylococcus capsulatus*, полученных с помощью хитозана и процесса ультрафильтрации ("УФ") или высокоскоростного центрифугирования и процесса кислотного осадения, Измеряли как описано в примере 4. Для белковых изолятов «UF» *M. capsulatus* биомассу предварительно нагревали при 65°C в течение 10 с перед выделением белка из биомассы, биомассу предварительно нагревали при 65°C в течение 5 с перед выделением белка из биомассы, или биомассу предварительно не нагревали перед выделением белка из биомассы. Для каждого образца получали по два 2,0% раствора белка в сосудах объемом 100 мл (0,5 г белкового изолята в 24 г воды). Значение pH одного из растворов доводили до 7,0 с использованием NaOH, а pH другого раствора доводили до 4,3 с использованием HCl. Массу обоих растворов доводили до 25 г с использованием воды. Растворы перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре и 1,5 мл раствора белка центрифугировали при 7000 об/мин (4000 g) в микроцентрифуге Eppendorf 5414C в течение 10 мин. Содержание белка в 2%-ном растворе и супернатанте измеряли с использованием анализатора белка Дюма, в котором количественно определяют содержание азота при сжигании и с последующим анализом выделяющегося газообразного N₂. Растворимость в % рассчитывали при делении содержания белка в супернатанте на содержание белка в исходном образце (x100%) (Фиг. 17А-17Б). Осажденные кислотой белковые изоляты *Methylococcus capsulatus* характеризовались почти 100% растворимостью при pH 7,0 и 0% растворимостью при pH 4,3.

Содержание белка в белковых изолятах *Methylococcus capsulatus* также измеряли в белковых растворах, полученных из белковых изолятов *M. capsulatus*, которые были получены с использованием хитозана и процесса

ультрафильтрации с предварительным нагреванием биомассы до 65°C в течение 5 с перед обработкой, или высокоскоростным центрифугированием и кислотным осаждением (Фиг. 18А-18В). Для каждого образца готовили 2,0% растворы белка из 1 г белкового изолята в 49 г воды. Для приготовления 24% раствора

5 трихлоруксусной кислоты (ТСА) использовали 24 г ТСА и 76 г воды. Равные объемы раствора белка и 24% ТСА (20 мл + 20 мл) смешивали и затем центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин (7000 об/мин на микроцентрифуге Eppendorf 5414С). Содержание азота (белка) в 2% растворе

10 белка и содержание азота (белка) в супернатанте определяли методом Дюма.

Общий (неочищенный) белок = (содержание белка в 2% растворе)/0,02. % небелкового азота (NPN) = 2 x (содержание азота в супернатанте)/0,02 x 100. % истинного белка = общий белок - %NPN.

Пример 8

Тестирование на стабильность эмульсий белковых изолятов *Methylococcus capsulatus*

15

Белковые изоляты *Methylococcus capsulatus* тестировали также на стабильность эмульсий. 2% белкового изолята, 82% воды (3 г белкового изолята, 24 г растительного масла и 123 г воды) и необязательно стабилизаторы (0,05 - 0,25% гексаметафосфата натрия, 0,1-0,5% DATEM) смешивали с помощью

20 ручного блендера и необязательно нагревали до 50°C и смешивали с 16% растительным маслом с использованием микрофлюидизатора при 2500 фунт/кв. дюйм. Предыдущие испытания показали, что белковые изоляты *Methylococcus capsulatus* являются чувствительными к нагреванию и не образуют хороших эмульсий. После исключения стадии предварительного

25 нагревания («NH») или добавления эмульгирующего агента (например, фосфатов + DATEM) белковые изоляты *Methylococcus capsulatus* образовывали стабильные эмульсии (Фиг. 13-14Б).

Пример 9

Тестирование на пенообразование белковых изолятов *Methylococcus capsulatus*

30

4% белковые растворы получали при добавлении 2 г порошкообразного белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, полученного с использованием высокоскоростного центрифугирования и способа кислотного осаждения, как описано в примере 4, к 48 г воды, при этом рН доводили до 7,0. 20 мл 4%

раствора белка *Methylococcus capsulatus* добавляли в сосуд объемом 100 мл. Температуру жидкости регистрировали цифровым термометром. Образец взбивали в течение 2 мин с помощью электрического венчика или вспенивателя молока, располагая венчик на границе раздела жидкость/воздух. Высоту образовавшейся пены регистрировали с помощью газового пикнометра (емкость 11,5 мл, отверстие 1/8 дюйма в крышке, номер по каталогу Cole-Parmer EW-38001-00). Объем пены рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Избыточное пенообразование (\%)} = (\text{Масса раствора} - \text{Масса пены}) / (\text{Масса пены}) \times 100$$

Для измерения стабильности пены 15 мл 4% раствора белка *Methylococcus capsulatus* взбивали в мерном цилиндре на 50 мл в течение 2 мин. Высоту образовавшейся пены регистрировали при маркировке на внешней стороне конической пробирки. Образец выдерживали в течение 30 мин либо при комнатной температуре, либо при 20°C, в зависимости от исходного состояния образца. Затем в образце регистрировали разделение пены на пену и жидкую фазу для определения стабильности пены. Высоту любой оставшейся пены измеряли, используя метки на внешней стороне конической пробирки. Стабильность пены рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Стабильность пены (\%)} = (\text{Остаточный объем пены}) / (\text{Общий объем пены}) \times 100$$

Как показано в Табл. 3 и на Фиг. 15А-15В, образец, содержащий белковый изолят *Methylococcus capsulatus* Бат, характеризовался хорошим пенообразованием, несмотря на присутствие пеногасителя во время процесса ферментации. В качестве контрольного образца использовали яичный белок.

Таблица 3

Избыточное пенообразование

Образец	Избыточное пенообразование
Яичный белок	279%
Белковый изолят <i>Methylococcus capsulatus</i> Бат (кислотное осаждение)	584%

Пример 10

Меренга, содержащая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*

Меренгу готовили с использованием составов, представленных в Табл. 4.

Белковый раствор (яичный белок или белковый изолят *Methylococcus capsulatus*)

5 готовили с использованием воды, смешивали с винным камнем и взбивали портативным электрическим миксером на низкой скорости в течение 1 мин или до образования мягких пиков. Постепенно добавляли сахар, взбивая на высокой скорости около 5 мин или до тех пор, пока смесь не образовывала жесткие, блестящие пики, а сахар не растворялся (при растирании небольшого количества

10 теста между двумя пальцами до ощущения абсолютно гладкого теста). Пенообразную массу выкладывали на противень, разделяя его на примерно 10 печений, и выпекали примерно 1 ч при температуре 200°F до тех пор пока влажность не составила 2%.

Таблица 4

15 Состав печения меренга

Ингредиент	3 г белка/унция композиции	5 г белка/унция композиции	Композиция белкового изолята <i>Methylococcus capsulatus</i> Бат
Вода	20 г	16 г	18 г
Белок	2,8 г	6 г	5 г
Сахар	17,2 г	17,6 г	15 г
Винный камень	0,4 г	0,4 г	0,4 г

Тесто меренги, приготовленное с использованием белкового изолята *Methylococcus capsulatus* Бат, формировало пики (Фиг. 16А). Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* Бат придавал печенью-меренга мягкий вкус с

20 некоторой розовой окраской (Фиг. 16Б).

Пример 11

Заменитель мяса, включающий белковый изолят *Methylococcus capsulatus*

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* Бат содержит гемосодержащие белки, которые придают пищевым композициям - заменителям мяса темнеющий

25 в процессе кулинарной обработки цвет свежего мяса, слегка металлический вкус и запах мяса. Хорошая гелеобразующая способность белкового изолята *Methylococcus capsulatus* Бат также обеспечивает улучшенную текстуру.

Белковый изолят *Methylococcus capsulatus* Бат также характеризуется профилем питания с высоким содержанием белка.

Типичная композиция заменителя мяса представлена в Табл. 5.

5 Обезвоженный текстурированный соевый белок (концентрат текстурированного соевого белка Dupont, Response 4310 IP, минимум 69% белка) (Фиг. 19А) замачивали в воде для регидратации перед использованием. Сухая масса текстурированного соевого белка составляет приблизительно 22,2%. Белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, полученный с использованием хитозана и метода ультрафильтрации, описанного в примере 4, муки, масла и других специй 10 добавляли к гидратированному текстурированному соевому белку и их смешивали. Из смеси формовали котлеты и замораживали перед кулинарной обработкой (Фиг. 19В). Котлета характеризовалась цветом свежего мяса, темнела и приобретала коричневый цвет в ходе кулинарной обработки (Фиг. 19В). Приготовленная котлета-заменитель мяса, полученная из белкового 15 изолята *Methylococcus capsulatus*, характеризовалась улучшенной текстурой, хорошим гелеобразованием и водосвязывающими свойствами (Фиг. 19Г).

Таблица 5

Композиция заменителя мяса

Мука	9%
Белковый изолят <i>Methylococcus capsulatus</i> Бат (хитозан и ультрафильтрация)	15,7%
Кокосовое масло	5,4%
Соль	0,9%
Порошкообразный чеснок	0,7%
Порошкообразный лук	0,7%
Гидратированный текстурированный соевый белок	67,6% (15% сухого текстурированного соевого белка + 52,6% воды)
Белок в белковом изоляте <i>Methylococcus capsulatus</i> Бат	12,1%
Белок из сухой текстурированной сои	10,4%
Общий белок в композиции заменителя мяса	22,5%

20 Дополнительные композиции котлет из заменителя мяса с использованием белкового изолята *Methylococcus capsulatus* Бат (хитозан и ультрафильтрация) также показаны на Фиг. 20.

Пример 12

Немолочное мороженое, содержащее белковый изолят *Methylococcus capsulatus* Бат

Клубничное и шоколадное мороженое, содержащее белковый изолят *Methylococcus capsulatus* (полученный с использованием хитозана и метода ультрафильтрации, как описано в примере 4), готовили в соответствии со способом и композициями, показанными на Фиг. 21А-21Г. Шоколадное мороженое, содержащее изолят белка *Methylococcus capsulatus*, характеризовалось более гладкой текстурой и хорошим ощущением во рту по сравнению с контрольным шоколадным мороженым, приготовленным из концентрата сывороточного белка.

Пример 13

Закуски, обогащенные белковым изолятом *Methylococcus capsulatus*

Крекеры готовили либо из пшеничной муки, либо обогащали белковым изолятом *Methylococcus capsulatus* (полученным с использованием хитозана и методом ультрафильтрации, описанным в примере 4) в соответствии с составом, показанным в Табл. 6. Тесто для крекеров раскатывали, из теста вырезали примерно 12 форм крекеров (примерно 2 г на крекер), и крекеры выпекали при 350°F в течение приблизительно 25 мин или до коричневого цвета. Как показано на Фиг. 22, белковый изолят *Methylococcus capsulatus* Бат придавал тесту для крекеров красный цвет, который во время выпекания становился коричневым.

Таблица 6

Состав крекеров

Ингредиенты	Композиция на основе белкового изолята <i>Methylococcus capsulatus</i> Бат	Контрольная композиция на основе пшеничной муки
Пшеничная мука	16 г	19,75 г
Белковый изолят <i>Methylococcus capsulatus</i> Бат	3,75 г (16,7%)	0 г
Бикарбонат натрия	0,15 г	0,15 г
Сахар	1,35 г	1,35 г
Соль	0,13 г	0,13 г
Димодан (эмульгатор)	0,24 г	0,24 г
Карбонат кальция	0 г	0 г
Бикарбонат аммония	0,08 г	0,08 г
Растительное масло	1,1 г	1,1 г

Ингредиенты	Композиция на основе белкового изолята <i>Methylococcus capsulatus</i> Бат	Контрольная композиция на основе пшеничной муки
Сухие ингредиенты	23,36 г	23,36 г
Белок, % (>22,32%)	22,48	11,53
Вода	9,5 г	9,5 г

Чипсы, обогащенные белковым изолятом *Methylococcus capsulatus* Бат (полученным с использованием хитозана и метода ультрафильтрации, как описано в примере 4), получали в соответствии с составом, приведенным в Табл. 7 ниже. Минеральную добавку Aquamin™, содержащую карбонат кальция, добавляли в количестве 1,5 мас.% для улучшения текстуры и цвета (см. Фиг. 23). Тесто раскатывали. Чипсы вырезали из раскатанного теста и выпекали при 250°F, а затем жарили в масле при 350°F. Полученные чипсы содержат 5 г белка на порцию.

10 Таблица 7

Состав чипсов

Ингредиент	Масса (г)
Кукурузная мука Маса	22,9
Белковый изолят <i>Methylococcus capsulatus</i> Бат	7,1
Минеральная добавка Aquamin	0,45
Вода	26,5

Пример 14

15 Влияние источника и чистоты метана на распределение стабильных изотопов углерода

Для изучения роста метанотрофов на компонентах природного газа, содержащих метан, в серию сосудов для сыворотки объемом 0,5 л, содержащих 100 мл определенной среды MMS1.0, высевали *Methylosinus trichosporium* OB3b или *Methylococcus capsulatus* Бат из сосуда для сыворотки периодической культуры (5 об.%), выращенных в той же среде, снабженной смесью метана и воздуха 1:1 (об./об.). Композиция среды MMS1.0 включала следующие компоненты: 0,8 мМ MgSO₄×7H₂O, 30 мМ NaNO₃, 0,14 мМ CaCl₂, 1,2 мМ NaHCO₃, 2,35 мМ KH₂PO₄, 3,4 мМ K₂HPO₄, 20,7 мкМ Na₂MoO₄×2H₂O, 6 мкМ CuSO₄×5H₂O, 10 мкМ Fe^{III}-Na-ЭДТА и 1 мл на литр раствора редких металлов

(содержащего на 1 л: 500 мг $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 400 мг $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 20 мг $\text{MnCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 50 мг $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 10 мг $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 15 мг H_3BO_3 , 250 мг ЭДТА). Фосфат, бикарбонат и Fe^{III} -Na-ЭДТА добавляли после автоклавирования и охлаждения среды. Конечный pH среды составил $7,0 \pm 0,1$.

5 Сосуды с инокулированной средой закрывали резиновыми пробками и вводили 60 мл газообразного метана, который добавляли с помощью шприца через стерильный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и стерильные иглы 27G. В каждую дублирующую культуру вводили 60 мл объемов (А) метана 99%-ной чистоты (класс 2.0, Praxair Alliance Gas, Сан-Карлос, Калифорния), (Б) метана 10 70%-ной чистоты, представляющего собой стандарт природного газа Sigma-Aldrich, также содержащий 9% этана, 6% пропана, 3% метилпропана, 3% бутана и другие второстепенные углеводородные компоненты), (В) метан чистотой 15 85%, поставляемый в виде смеси 1:1 источников метана А и Б, и (Г) метан >93% (класс 1.3, Specialty Chemical Products, South Houston, TX; по данным лабораторного анализа: состав >99% метана). Культуры инкубировали при 30°C (штамм *M. trichosporium* ОВ3b) или 42°C (*M. capsulatus* Бат) при вращательном встряхивании со скоростью 250 об/мин и рост измеряли с интервалами примерно в 12 ч, отбирая образцы объемом 1 мл для определения оптической плотности OD_{600} . В это время сосуды продували, а свободное пространство заменяли 20 соответствующего источника метана (А, Б, В или Г) и 60 мл концентрированного кислорода (чистота по меньшей мере 85%). С интервалами примерно в 24 ч образцы объемом 5 мл отбирали, клетки собирали центрифугированием (8000 об/мин, в течении 10 мин) и затем хранили при -80°C перед анализом.

25 Оценивали содержание углерода и азота (% сухой массы), а также соотношения стабильных изотопов углерода (^{13}C) и азота (^{15}N) для метанотрофной биомассы, полученной из *M. trichosporium* штамма ОВ3b и *M. capsulatus* Бат. В Табл. 8 представлены результаты анализа стабильных изотопов углерода образцов биомассы *M. capsulatus* Бат, выращенной на метане разной степени чистоты и в различных культуральных сосудах.

Таблица 8

Распределение стабильных изотопов углерода образцов биомассы *M. capsulatus* Бат, выращенной на источниках метана разной степени чистоты

Метан*	№ партии	Время (ч)†	OD ₆₀₀	DCW (г/л)	δ ¹³ C клетки
А	62С	22	1,02	0,36	-40,3
		56	2,01	0,71	-41,7
		73	2,31	0,82	-42,5
	62D	22	1,14	0,40	-39,3
		56	2,07	0,73	-41,6
		73	2,39	0,85	-42,0
Б	62E	22	0,47	0,17	-44,7
		56	0,49	0,17	-45,4
		73	0,29	0,10	-45,4
	62F	22	0,62	0,22	-42,3
		56	0,63	0,22	-43,6
		73	0,30	0,11	-43,7
В	62G	22	0,70	0,25	-40,7
		56	1,14	0,40	-44,8
		73	1,36	0,48	-45,8
	62H	22	0,2	0,22	-40,9
		56	1,03	0,37	-44,7
		73	1,23	0,44	-45,9

5 * Чистота метана: А: 99% метан, класс 2.0 (мин. 99%); Б: 70% метан, стандартный природный газ (содержит 9% этана, 6% пропана, 3% метилпропана, 3% бутана); В: 85% метан (смесь метана А и Б 1:1)

† Время означает время культивирования в сосудах в часах.

10

Среднее значение коэффициента δ¹³C для *M. capsulatus* Бат, выращенного на одном источнике метана (А, 99%), составило -41,2 ± 1,2, в то время как среднее значение δ¹³C для *M. capsulatus* Бат, выращенного на другом источнике метана (Б, 70%), составило -44,2 ± 1,2. При смешивании источников метана А и Б наблюдалось промежуточное среднее значение δ¹³C, равное -43,8 ± 2,4. Эти данные свидетельствуют, что δ¹³C клеточного материала, выращенного на источниках метана А и Б, значительно отличаются друг от друга из-за различий коэффициентов δ¹³C вводимого метана. Однако клетки, выращенные на смеси

15

двух газов, предпочтительно используют ^{12}C и, следовательно, демонстрируют тенденцию к более отрицательным значениям $\delta^{13}\text{C}$.

Аналогичный эксперимент проводили для оценки различий между двумя разными метанотрофами, *Methylococcus capsulatus* Бат и *Methylosinus*

5 *trichosporium* ОВ3b, выращенными на разных источниках метана и в разных культуральных сосудах. Различие в распределении $\delta^{13}\text{C}$ показано в Табл. 9.

Таблица 9

Распределение стабильных изотопов углерода различных метанотрофов, выращенных на источниках метана разной степени чистоты

Штамм	Метан*	№ партии	Время (ч)†	OD ₆₀₀	DCW (г/л)	$\delta^{13}\text{C}$ клетки
Mc Бат	А	62I	18	0,494	0,18	-54,3
			40	2,33	0,83	-42,1
			48	3,08	1,09	-37,1
Mc Бат	Г	62J	18	0,592	0,21	-38,3
			40	1,93	0,69	-37,8
			48	2,5	0,89	-37,8
Mc Бат	Г	62K	18	0,564	0,20	-38,6
			40	1,53	0,54	-37,5
			48	2,19	0,78	-37,6
Mt ОВ3b	А	68D	118	0,422	0,24	-50,2
			137	0,99	0,55	-47,7
			162	1,43	0,80	-45,9
Mt ОВ3b	А	68E	118	0,474	0,26	-49,9
			137	1,065	0,59	-47,6
			162	1,51	0,84	-45,2
Mt ОВ3b	Г	68F	118	0,534	0,30	-45,6
			137	1,119	0,62	-38,7
			162	1,63	0,91	-36,4
Mt ОВ3b	Г	68G	118	0,544	0,30	-44,8
			137	1,131	0,63	-39,1
			162	1,6	0,89	-34,2

10

* Источники и чистота метана: А: 99% метан (класс 2.0), Г: метан >93% (класс 1.3)

† Время означает время культивирования в сосудах в часах.

Среднее значение коэффициента $\delta^{13}\text{C}$ для *M. capsulatus*, культивированного на первом источнике метана (А), составило $-44,5 \pm 8,8$, в то время как среднее значение $\delta^{13}\text{C}$ для *M. trichosporium* составило $-47,8 \pm 2,0$, культивированного на том же источнике метана. Среднее значение $\delta^{13}\text{C}$ для *M. capsulatus*, культивированного на втором источнике метана (Б), составило $-37,9 \pm 0,4$, в то время как среднее значение $\delta^{13}\text{C}$ для *M. trichosporium* составило $-39,8 \pm 4,5$. Эти данные показывают, что $\delta^{13}\text{C}$ клеточного материала, культивированного на источнике метана, в основном аналогично коэффициенту $\delta^{13}\text{C}$ клеточного материала другого штамма, культивированного на том же источнике метана. Таким образом, наблюдаемый коэффициент $\delta^{13}\text{C}$ клеточного материала, по-видимому, в первую очередь зависит от состава используемого газа, а не от свойств конкретного изучаемого бактериального штамма.

15 Пример 15

Концентрация гема в белковом изоляте *Methylococcus capsulatus*

Концентрацию гема измеряли на основании превращения гема во флуоресцентное производное порфирина при удалении гемового железа в кислотных условиях, как описано в статье Sassa, Journal of Experimental Medicine. т. 143, сс. 305-315 (1976). Гемовое железо рассчитывали с использованием соотношения 1 моль железа гема/моль гема. Три партии белкового изолята *M. capsulatus*, полученные с использованием флокуляции хитозана с последующей ультрафильтрацией, как описано в примере 4, и эти концентрации гема и гемового железа показаны в Табл. 10.

25 Таблица 10

Концентрации гема и гемового железа для белковых изолятов *M. capsulatus*

Партия	Мг гема/г белка	Мг гемового железа/ г белка
B001	0,450	0,0408
B110	0,370	0,0335
SK173	0,680	0,0616

Пример 16

Получение цельноклеточных продуктов *Methylococcus capsulatus*

30 Центрифугированную бактериальную биомассу, полученную в результате непрерывной ферментации *M. capsulatus*, ресуспендировали в холодной

деионизированной воде до общего содержания сухих веществ 8% или 13-14%. Суспензию перемешивали до гомогенного состояния и доводили рН до 7 с использованием 5 н. NaOH. Затем весь объем бактериальной биомассы прокачивали через 5-метровый нагревательный змеевик, погруженный в водяную баню при температуре 90°C, с помощью перистальтического насоса Watson Marlow 505U. Скорость насоса устанавливали на уровне 75 об/мин и ее рассчитывали для обеспечения десятисекундного времени пребывания свежей биомассы при 90°C. Нагретую биомассу собирали в сосуд, который выдерживали при 60°C при умеренном перемешивании. После перемещения всего объема в сосуд его выдерживали в течение еще 30 мин, затем охлаждали до температуры ниже менее 20°C. Затем биомассу сушили или концентрировали с помощью ультрафильтрации (УФ). 8% общего твердого цельноклеточного продукта концентрировали в 2-3 раза с использованием ультрафильтрации с кассетным фильтром Pellicon 2 10 кДа. Концентрированные целые клетки лиофилизировали с использованием вакуумной лиофильной сушки Columbia International модели FD50-B2A. 13-14% общего твердого цельноклеточного продукта подвергали прямой лиофильной сушке в установке HarvestRight HR9000-AL. Конечные высушенные цельноклеточные продукты оценивали по процентному содержанию неочищенного белка с использованием метода Дюма, а содержание нуклеиновых кислот определяли с использованием набора для очистки ДНК и РНК Lucigen Masterpure Complete MC85200. Процесс представлен на Фиг. 27.

Было установлено, что отсутствуют изменения в процентном содержании неочищенного белка в цельноклеточном продукте по сравнению с биомассой, выращенной без теплового шока в нормальных условиях непрерывной ферментации, на уровне 72-74%. Содержание нуклеиновых кислот в 8% исходных твердых веществ составило 2-3% в расчете на общую массу цельноклеточного продукта. Содержание нуклеиновых кислот в 13-14% исходных твердых веществ оказалось выше и составило 3,6-4,7% в расчете на общую массу цельноклеточного продукта.

Пример 17

Заменитель мяса, включающий цельноклеточные продукты *Methylococcus capsulatus*

5 Цельноклеточные продукты из *Methylococcus capsulatus*, полученные с использованием гомогенизации или без нее, были включены в состав котлет для гамбургеров. Цвет обеих котлет для гамбургеров оказался светлее по сравнению с цветом гамбургера, приготовленного с использованием белковых изолятов *Methylococcus capsulatus* (например, белковых изолятов, полученных путем флокуляции хитозана с последующей ультрафильтрацией).

10 Во время жарки/гриля цвет обеих котлет с цельноклеточными продуктами от розоватого изменялся на более темный и коричневый (см. Фиг. 19Д). Их текстура оказалась мягче, а цвет светлее по сравнению с котлетами с белковым изолятом, полученным в процессе флокуляции хитозана. Котлета с гомогенизированным цельноклеточным продуктом оказалась темнее котлеты с
15 цельноклеточным продуктом без гомогенизации.

Пример рецепта приготовления котлет для гамбургеров с использованием цельноклеточных продуктов показан на Фиг. 20.

Пример 18

20 Маркировка йогурта, содержащего белковые изоляты или цельноклеточные продукты *Methylococcus capsulatus*

Белковые изоляты и цельноклеточные продукты, полученные из биомассы *Methylococcus capsulatus*, могут быть приготовлены в виде немолочного йогурта или йогурта не животного происхождения. Их можно использовать в йогуртовой смеси для замены молока животных для разработки немолочных, не животного
25 происхождения, растительных йогуртов или греческих йогуртов.

В частности, белковые изоляты могут действовать в качестве эмульгаторов для получения белка, стабилизированного в смеси масло-в-воде. Белковые изоляты и цельноклеточные продукты являются хорошими органическими субстратами для культуры молочнокислых бактерий.

30 Для имитации состава молока белковый изолят или цельноклеточный продукт *M. capsulatus* гидратировали водой и смешивали с маслом, сахаром (глюкозой, сахарозой, фруктозой), минералами (карбонатом кальция, фосфатами натрия) и другими стабилизаторами. После гомогенизации и пастеризации культуру молочнокислых бактерий или запатентованную культуру йогурта на

растительной основе (YoFlec YF-L02 DA фирмы CHR Hansen) высевали для получения йогуртов или греческих йогуртов без использования молока. Схема типичного процесса приготовления йогурта показана на Фиг. 25.

5 Для соответствия текстуры настоящим молочным йогуртам или греческим йогуртам можно добавлять некоторые загустители, такие как крахмалы (модифицированные и немодифицированные) и гидроколлоиды (ксантановая камедь, каррагинан, гуар, фасоль, геллан и т. д.). Для улучшения вкуса и аромата можно добавлять клубничный топпинг, клубничное пюре или топпинги или
10 пюре из других фруктов. Уровни фруктового топпинга или пюре можно варьировать от 20% до 30%. Небольшое количество экстрактов ванили, лимона, шоколада или других ароматизаторов также может быть включено в рецептуру для улучшения вкуса.

Для получения дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения можно объединять различные варианты осуществления, описанные
15 выше. Все патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на выдачу патентов США, иностранные патенты, иностранные патентные заявки и непатентные публикации, упомянутые в данном описании и/или перечисленные в информационном перечне заявки, включая заявку на патент US62/911970, поданную 7 октября 2019 г, полностью включены в настоящий документ в
20 качестве ссылок. Объекты вариантов осуществления можно изменять при необходимости, для использования концепций различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения можно включать в варианты осуществления настоящего изобретения с учетом приведенного выше подробного описания. В
25 целом, используемые в приведенной ниже формуле изобретения термины не следует понимать как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, а следует понимать как включающие все возможные варианты осуществления, а также полный объем эквивалентов, к которым они относятся. Соответственно,
30 формула изобретения не ограничивается раскрытием настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пищевая композиция для человека, включающая белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus*:

- 5 (а) состоит из более 70 мас.% неочищенного белка;
- (б) характеризуется скорректированным аминокислотным коэффициентом усвояемости белков (PDCAAS) равным по меньшей мере 0,9; и
- (в) характеризуется отклонением изотопной сигнатуры $\delta^{13}\text{C}$ от приблизительно -70‰ до приблизительно -30‰.

10

2. Пищевая композиция по п. 1, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus* состоит по меньшей мере из 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% в пересчете на массу неочищенного белка.

15

3. Пищевая композиция по п. 1 или п. 2, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus* характеризуется отклонением изотопной сигнатуры $\delta^{13}\text{C}$ от приблизительно -60‰ до приблизительно -40‰.

20

4. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-3, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus* характеризуется содержанием:

- (а) менее 6 мас.% нуклеиновых кислот;
- (б) менее 7 мас.% золы;
- (в) менее 10 мас.% неочищенного жира;
- 25 (г) по меньшей мере 0,05 мг гема / г белкового изолята;
- или любой их комбинацией.

30

5. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-4, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus* не является генетически модифицированным.

6. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-5, где *Methylococcus capsulatus* представляет собой *Methylococcus capsulatus* (Бат), *Methylococcus capsulatus* (Техас) или *Methylococcus capsulatus* (Абердин).

7. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-6, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получают из *Methylococcus capsulatus*, выращенного на углеродном сырье, содержащем метан или метанол.

5 8. Пищевая композиция по п. 7, где углеродное сырье, содержащее метан, представляет собой природный газ или природный газ из нетрадиционных источников.

10 9. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-8, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получают из *Methylococcus capsulatus*, культивированного в условиях низкого содержания меди.

15 10. Пищевая композиция по п. 9, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получают из *Methylococcus capsulatus*, культивируемого в среде с содержанием не более 100 мг меди / кг массы сухих клеток (DCW).

20 11. Пищевая композиция по п. 9, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получают из *Methylococcus capsulatus*, культивируемого при содержании от 1 до 100, от 1 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30 до 40, от 40 до 50, от 50 до 60, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от 90 до 100, от 1 до 90, от 1 до 80, от 1 до 70, от 1 до 60, от 1 до 50, от 1 до 40, от 1 до 30, от 10 до 90, от 10 до 80, от 10 до 70, от 10 до 60, от 10 до 50, от 10 до 40, от 10 до 30, от 20 до 90, предпочтительно от 20 до 80, от 20 до 70, от 20 до 60, от 20 до 50 или от 20 до 40 мг меди / кг биомассы.

25 12. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-11, где выделение белкового изолята *Methylococcus capsulatus* из биомассы *Methylococcus capsulatus*, включает стадию кислотного осаждения.

30 13. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-12, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus* представляет собой жидкость, гель, порошок, зерна, хлопья, агломераты, суспензию, ядра или крошку.

14. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-13, где белковый изолят получают путем разрушения клеток *Methylococcus capsulatus* с образованием клеточного лизата, отделения и/или концентрирования белков из клеточного лизата с образованием белкового изолята *Methylococcus capsulatus*, и
5 необязательно высушивания белкового изолята.

15. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-14, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus* получают из *Methylococcus capsulatus*, который культивируют и обрабатывают в условиях Надлежащей производственной
10 практики (GMP).

16. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-15, где белковый изолят *Methylococcus capsulatus* характеризуется:

(а) прочностью при гелеобразовании от приблизительно 10 г до
15 приблизительно 300 г;

(б) стабильностью в виде эмульсии при хранении при комнатной температуре в течении по меньшей мере 24 ч;

(в) избыточным пенообразованием по меньшей мере 200%;

(г) растворимостью по меньшей мере 75% при нейтральном рН; или
20 любой их комбинацией.

17. Пищевая композиция по п. 16, где такая пищевая композиция характеризуется прочностью при гелеобразовании от приблизительно 50 г до
25 приблизительно 300 г, и эта пищевая композиция представляет собой заменитель мяса, заменитель рыбы/морепродуктов, экструдированные перекусы, пудинг, выпечку, макаронные изделия или чипсы.

18. Пищевая композиция по п. 16, где такая пищевая композиция является стабильной в виде эмульсии при хранении при комнатной температуре в течении
30 по меньшей мере 24 ч, и эта пищевая композиция представляет собой соус, подливу, заправку, суп, приправу с уксусом, протеиновый коктейль, питательный напиток или заменитель молочных продуктов.

19. Пищевая композиция по п. 16, где такая пищевая композиция характеризуется избыточным пенообразованием по меньшей мере 200%, и эта пищевая композиция представляет собой заменитель мяса, чипсы, заменитель яиц или выпечку.

5

20. Пищевая композиция по п. 16, где такая пищевая композиция характеризуется растворимостью по меньшей мере 80% при нейтральном рН, и эта пищевая композиция представляет собой соус, подливу, заправку, суп, приправу с уксусом, заменитель молочных продуктов, протеиновый коктейль, питательный напиток, протеиновый гель или порошкообразную протеиновую добавку.

10

21. Пищевая композиция по п. 17 или п. 19, где заменитель мяса представляет собой котлету, фрикадельку, фарш, колбасу, вяленое мясо, мясной хлеб, филе, бекон, хот-дог или наггетсы.

15

22. Пищевая композиция по п. 21, где заменитель мяса представляет собой котлету, включающую белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, растительный белок, масло и необязательно воду, связующий агент, по меньшей мере одну специю и/или приправу или их комбинацию.

20

23. Пищевая композиция по п. 18 или п. 20, где заменитель молочных продуктов представляет собой немолочное молоко, немолочный крем, немолочные сливки, немолочный йогурт, немолочный взбитый топпинг или немолочное мороженое.

25

24. Пищевая композиция по п. 23, где заменитель молочных продуктов представляет собой немолочное мороженое, которое включает белковый изолят *Methylococcus capsulatus*, воду, подсластитель, масло и необязательно фрукт, наполнитель, ароматизатор или их комбинацию.

30

25. Пищевая композиция по п. 17 или п. 19, где хлебобулочные изделия включают меренгу, крекер, пирожное, пирог, выпечку, шоколадное печенье брауни, булочку, хлеб или хлеб быстрого приготовления.

26. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-25, где пищевая композиция дополнительно включает по меньшей мере одну пищевую добавку.

5 27. Пищевая композиция по п. 26, где пищевая добавка представляет собой
эмульгирующий агент, агент повышающий вязкость, связующий агент,
антислеживающий агент, консервант, подсластитель, экстракт, природный
ароматизатор, усилитель вкуса, заменитель жира, агент контролирующий pH,
10 разрыхлитель, увлажнитель, питательное вещество, пищевой ингредиент, масло
или их комбинацию.

28. Пищевая композиция по любому из п.п. 1-27, включающая белковый
изолят *Methylococcus capsulatus* в количестве от приблизительно 0,5 мас.% до
приблизительно 35 мас.%.

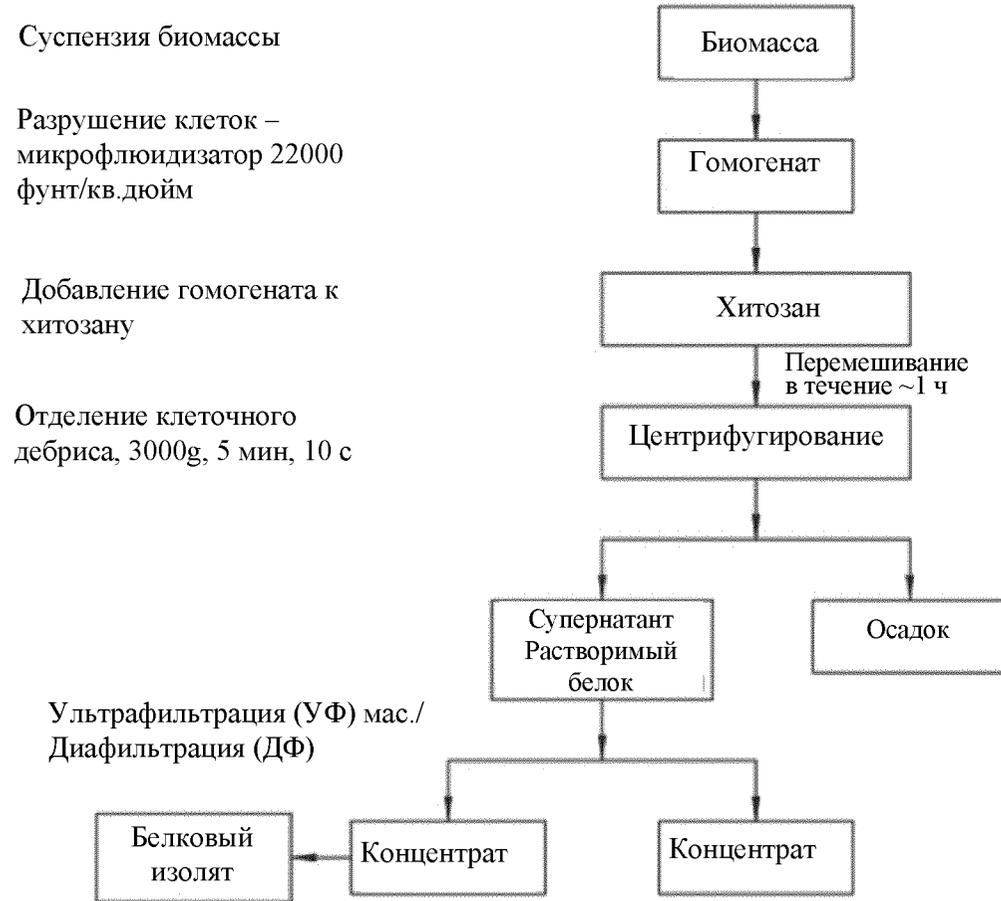
15



Фиг. 1А

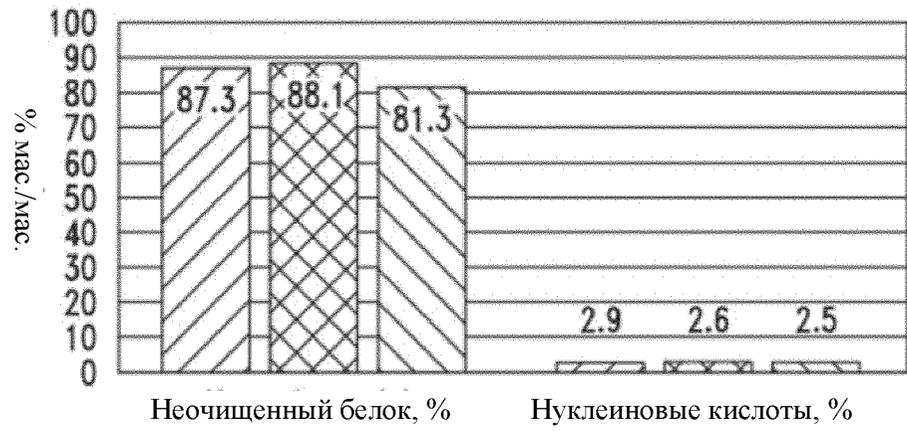


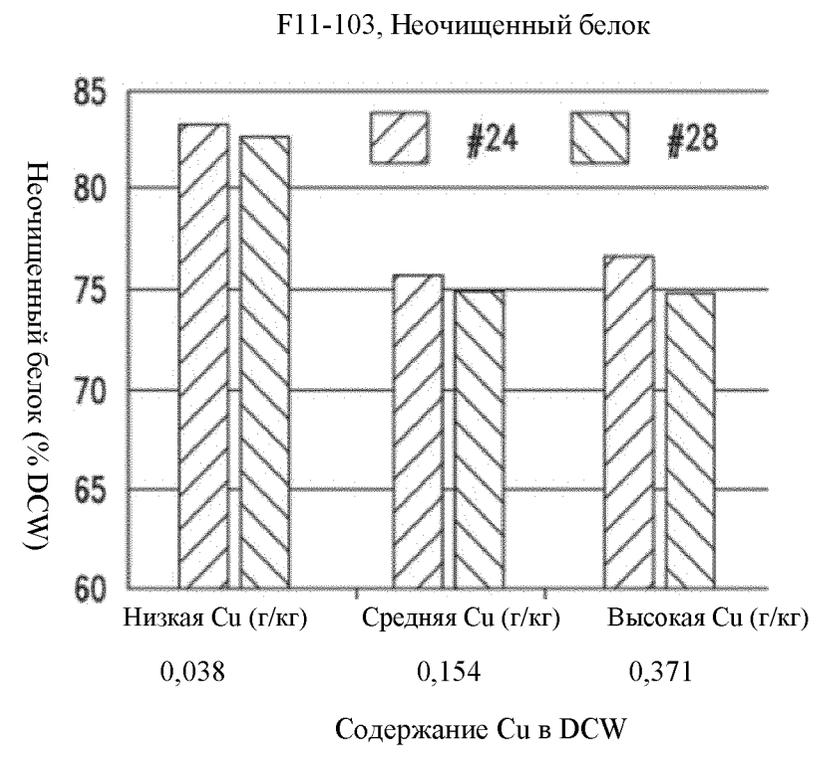
Фиг. 1Б

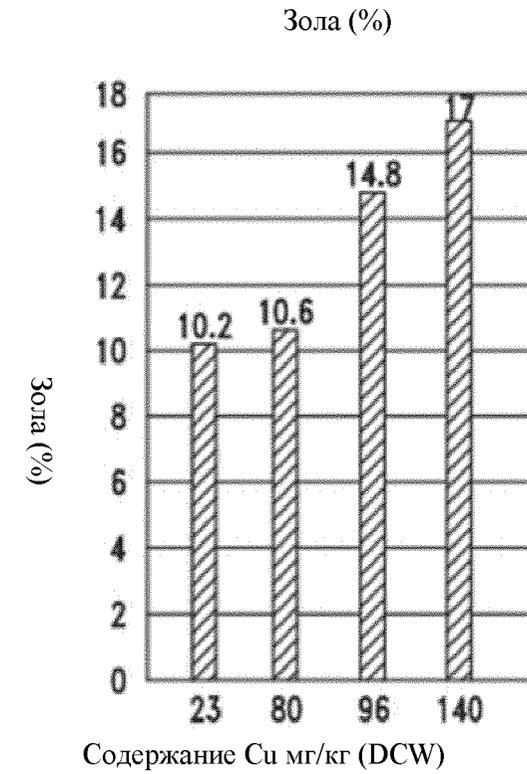
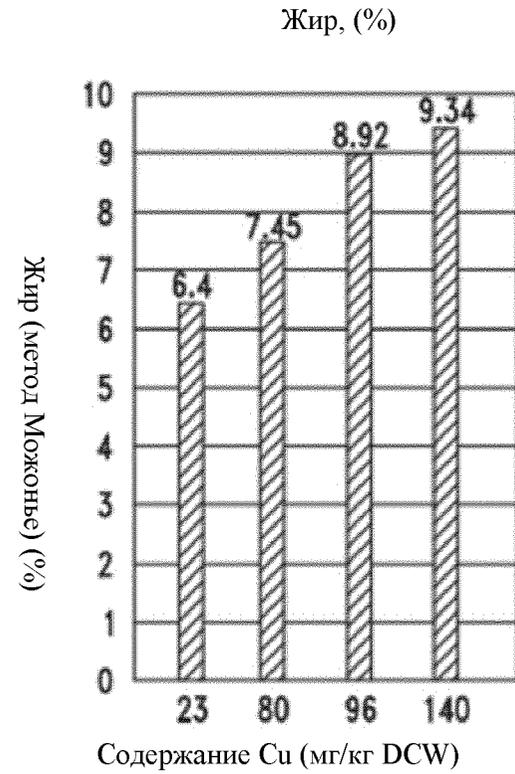
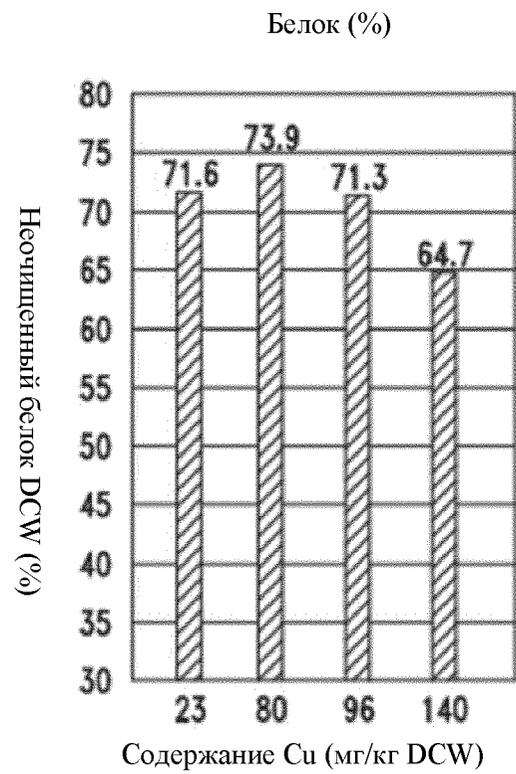


-  Низкое содержание меди В093
-  Низкое содержание меди В091
-  Норма содержания меди В089

Содержание неочищенного белка и нуклеиновых кислот, %







Фиг. 4

Фиг. 5

Аминокислота	Tees002-6 Tees002-6 (г/100г образца)	Tees002-6 Tees002-6 (г/100г белка)	Tees002-6 Tees002-6 (мг/100г белка)	1991 Станд.белок (мг/100г белка)	Соотно- шение
L-Цистеин + L-Метионин*	2,26	3,08	30,85	25,00	1,234
L-Триптофан*	1,22	1,67	16,67	11,00	1,515
L-Гидрокси- пролин*	0,00				
L-Аспараги- новая кислота*	5,78				
L-Треонин*	3,06	4,18	41,80	34,00	1,230
L-Серин*	2,34				
L-Глутамино- вая кислота*	7,28				
L-Пролин*	2,54				
L-Глицин*	3,41				
L-Аланин*	4,80				
L-Валин*	3,85	5,26	52,60	35,00	1,503
L-Изолейцин*	2,93	4,00	40,03	28,00	1,430
L-Лейцин*	5,02	6,86	68,58	66,00	1,039
L-Тирозин+L- Фенилаланин*	5,09	6,95	69,54	63,00	1,104
L-Лизин*	3,81	5,20	52,05	58,00	0,897
L-Гистидин*	1,66	2,27	22,68	19,00	1,194
L-Аргинин*	4,21				
Общий белок=59,26					

+ незаменимая аминокислота для питания
2 лимитирующая аминокислота для образца

Влажность образца в % (печь с принудительной подачей воздуха, 70°C, 16 ч =	2,60
Белок в образце, %, анализ Дюма (на основе массы сырого вещества) =	73,2
Усвояемость in vitro =	0,99
Первая лимитирующая аминокислота =	L-Лизин*
Аминокислотный индекс =	0,897
Коэффициент PDCAAS =	0,89

Фиг. 6

Аминокислота	12-70 345 МФ/УФ В066 (г/100г образца)	12-70 345 МФ/УФ В066 (г/100г белка)	12-70 345 МФ/УФ В066 (мг/100г белка)	1991 Станд.белок (мг/100г белка)	Соотно- шение
L-Цистеин + L-Метионин*	3,80	3,99	39,92	25,00	1,597
L-Триптофан*	2,67	2,80	28,05	11,00	2,550
L-Гидрокси- пролин*	0,00				
L-Аспараги- новая кислота*	11,80				
L-Треонин*	2,93	3,08	30,78	34,00	0,905
L-Серин*	2,77				
L-Глутамино- вая кислота*	11,70				
L-Пролин*	4,29				
L-Глицин*	5,41				
L-Аланин*	6,99				
L-Валин*	6,14	6,45	64,50	35,00	1,843
L-Изолейцин*	3,73	3,92	39,18	28,00	1,399
L-Лейцин*	7,82	8,21	82,14	66,00	1,245
L-Тирозин+L- Фенилаланин*	8,85	9,30	92,96	63,00	1,476
L-Лизин*	8,34	8,76	87,61	58,00	1,510
L-Гистидин*	2,53	2,66	26,58	19,00	1,399
L-Аргинин*	5,23				
Общий белок=95,00					

+ незаменимая аминокислота для питания
2 лимитирующая аминокислота для образца

Влажность образца в % (печь с принудительной подачей воздуха, 70°C, 16 ч =

Белок в образце, %, анализ Дюма (на основе массы сырого вещества) =

Усвояемость in vitro =

Первая лимитирующая аминокислота =

Аминокислотный индекс =

Коэффициент PDCAAS =

95,2
1,07
L-Треонин*
0,905
0,97

Фиг. 7

Аминокислота	12-70 345 0,03% Хит DF1 B058 (г/100г образца)	12-70 345 0,03% Хит DF1 B058 (г/100г образца)	12-70 345 0,03% Хит DF1 B058 (г/100г образца)	1991 Станд.белок (мг/100г белка)	Соотно- шение
L-Цистеин + L-Метионин*	2,48	3,19	31,92	25,00	1,277
L-Триптофан*	2,34	3,01	30,12	11,00	2,738
L-Гидрокси- пролин*	0,00				
L-Аспараги- новая кислота*	7,46				
L-Треонин*	2,86	3,68	36,81	34,00	1,083
L-Серин*	2,59				
L-Глутамино- вая кислота*	7,68				
L-Пролин*	3,23				
L-Глицин*	4,01				
L-Аланин*	5,37				
L-Валин*	4,69	6,04	60,36	35,00	1,725
L-Изолейцин*	3,54	4,56	45,56	28,00	1,627
L-Лейцин*	6,09	7,84	78,38	66,00	1,188
L-Тирозин+L- Фенилаланин*	7,57	9,74	97,43	63,00	1,546
L-Лизин*	4,54	5,84	58,34	58,00	1,007
L-Гистидин*	1,85	2,38,	23,81	19,00	1,253
L-Аргинин*	4,96				
Общий белок = 71,26					

+ незаменимая аминокислота для питания
2 лимитирующая аминокислота для образца

Влажность образца в % (печь с принудительной подачей воздуха, 70°C, 16 ч =

Белок в образце, %, анализ Дюма (на основе массы сырого вещества) =

Усвояемость in vitro =

Первая лимитирующая аминокислота =

Аминокислотный индекс =

Коэффициент PDCAAS =

Фиг. 8

Аминокислота	12-70 345 0,03% Хит DF1 B058 (г/100г образца)	12-70 345 0,03% Хит DF1 B058 (г/100г образца)	12-70 345 0,03% Хит DF1 B058 (г/100г образца)	1991 Станд.белок (мг/100г белка)	Соотно- шение
L-Цистеин + L-Метионин*	2,70	3,62	36,10	25,00	1,444
L-Триптофан*	1,15	1,54	15,37	11,00	1,398
L-Гидрокси- пролин*	0,00				
L-Аспараги- новая кислота*	7,12				
L-Треонин*	2,89	3,86	38,64	34,00	1,136
L-Серин*	2,50				
L-Глутамино- вая кислота*	7,61				
L-Пролин*	3,03				
L-Глицин*	4,12				
L-Аланин*	5,38				
L-Валин*	4,61	6,16	61,63	35,00	1,761
L-Изолейцин*	3,57	4,77	47,73	28,00	1,705
L-Лейцин*	5,93	7,93	79,28	66,00	1,201
L-Тирозин+L- Фенилаланин*	7,23	9,67	96,66	63,00	1,534
L-Лизин*	3,86	5,16	51,60	58,00	0,890
L-Гистидин*	1,66	2,22	22,19	19,00	1,168
L-Аргинин*	4,94				
Общий белок=	71,26				

+ незаменимая аминокислота для питания
2 лимитирующая аминокислота для образца

Влажность образца в % (печь с принудительной подачей воздуха, 70°C, 16 ч =

Белок в образце, %, анализ Дюма (на основе массы сырого вещества) =

Усвояемость in vitro =

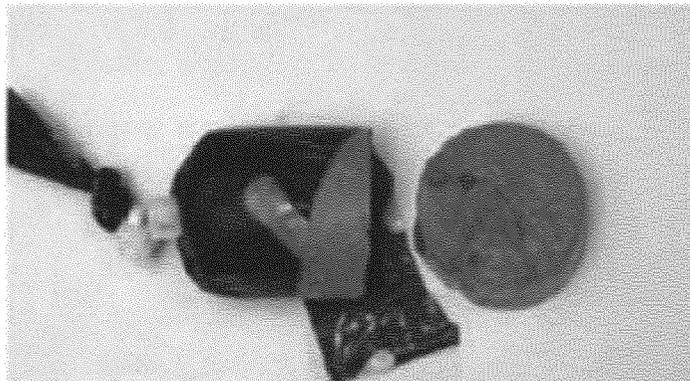
Первая лимитирующая аминокислота =

аминокислотный индекс =

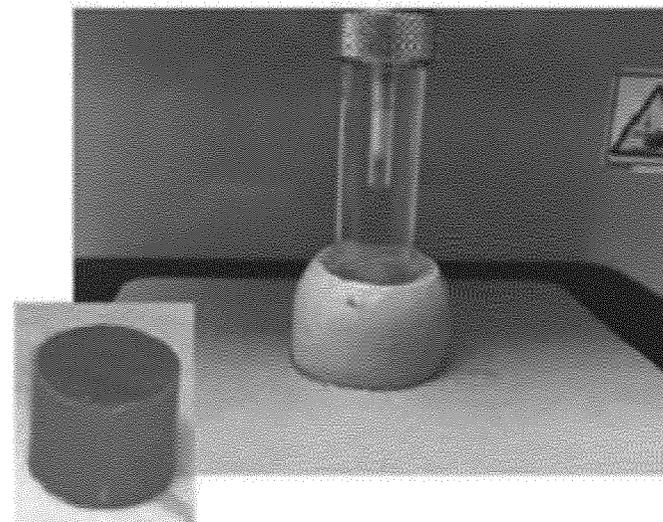
Коэффициент PDCAAS =

Фиг. 9

Источник белка	Значение коэффициента PDCAAS
Казеин	1,00
Яичный белок	1,00
Белковый концентрат сои	0,99
Белковый концентрат рапса	0,93
Белковый изолят сои	0,92
Мясо говядины	0,83
Белковый концентрат гороха	0,73
Фасоль	0,68
Горох	0,61-0,68
Фасоль Пинто	0,57-0,63
Овсяные хлопья	0,57
Черная фасоль	0,53
Арахис	0,53
Чечевица	0,51-0,52
Цельное зерно пшеницы	0,40
Глютен из цельной пшеницы	0,25
*Эти значения взяты из Отчета экспертной оценки качества белков The Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation	

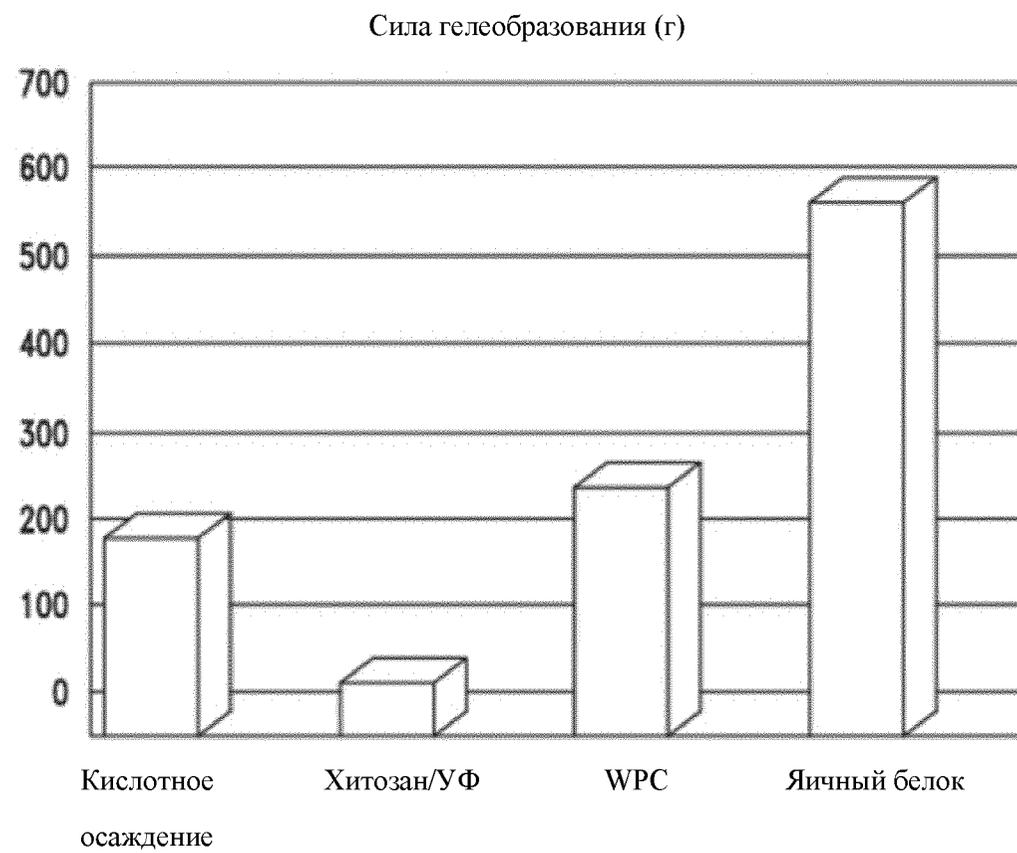


В случае белкового изолята,
полученного методом УФ,
формируется слабый гель

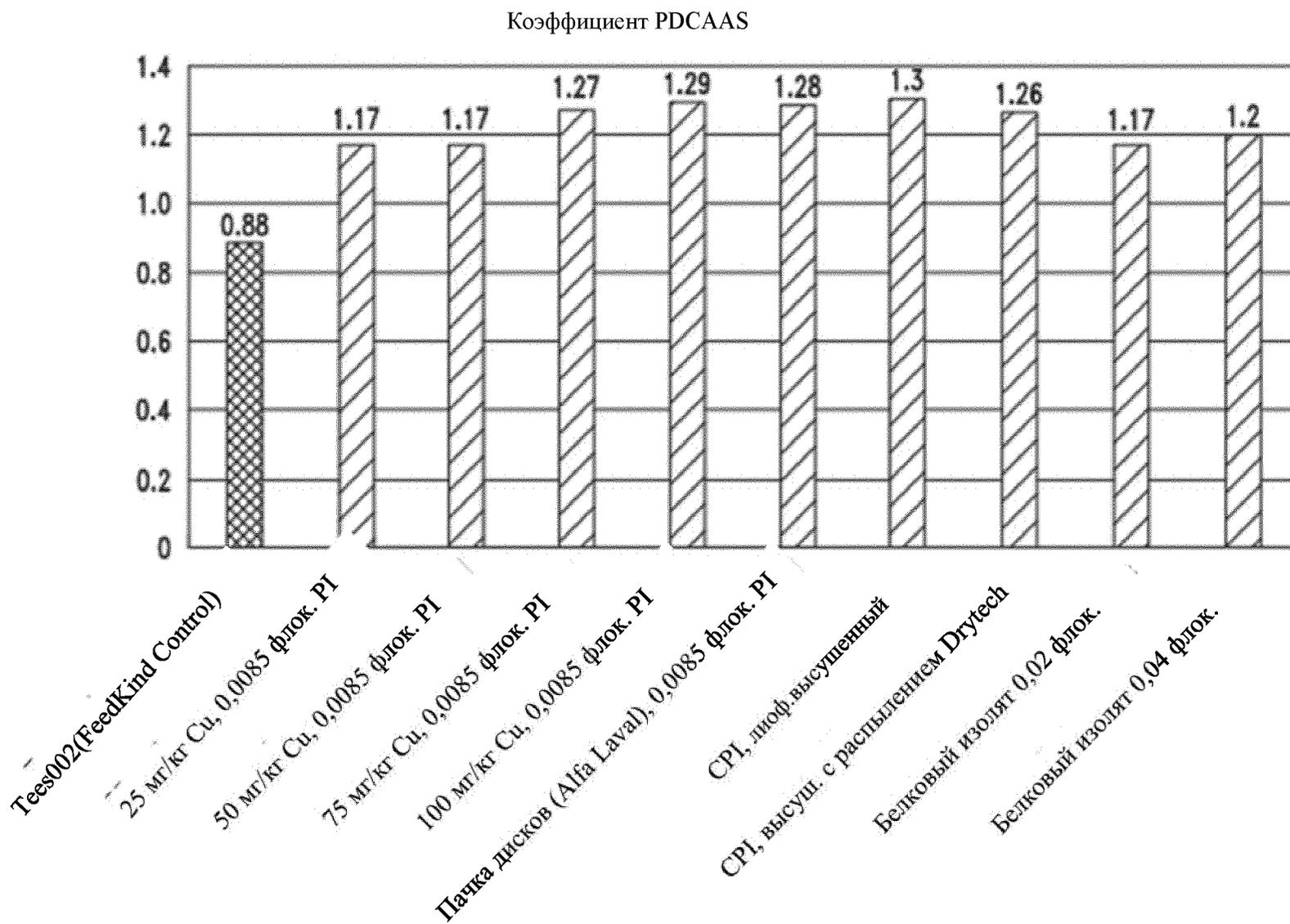


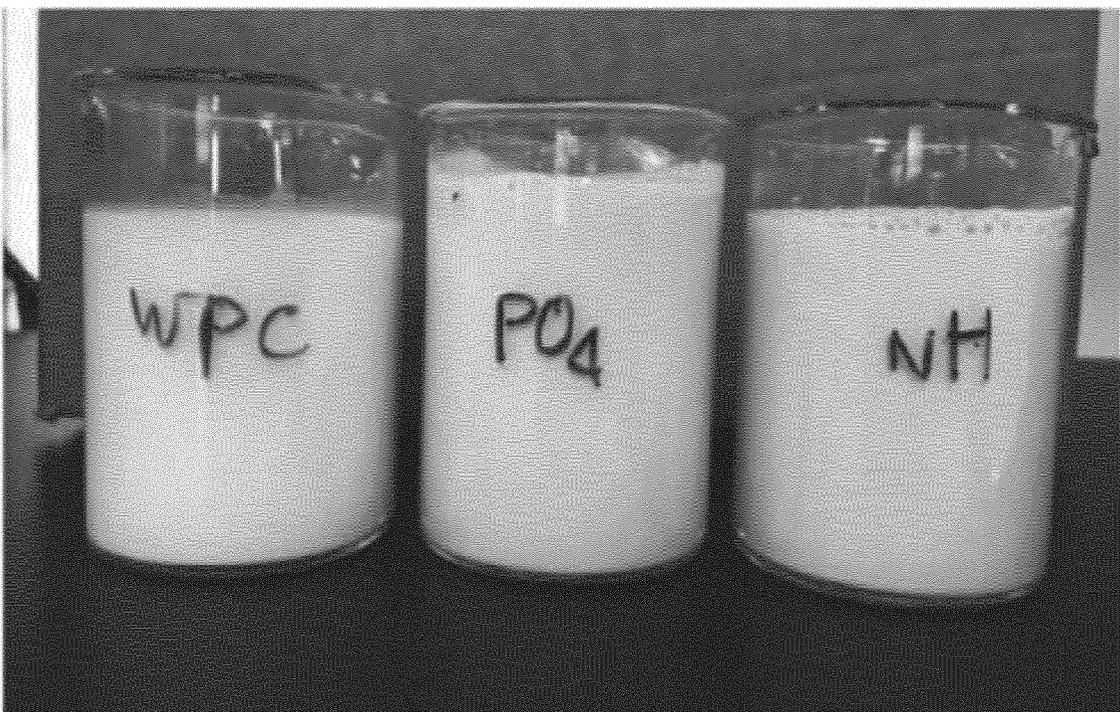
В случае белкового изолята,
полученного кислотным
осаждением, наблюдается хорошее
гелеобразование

Фиг. 11

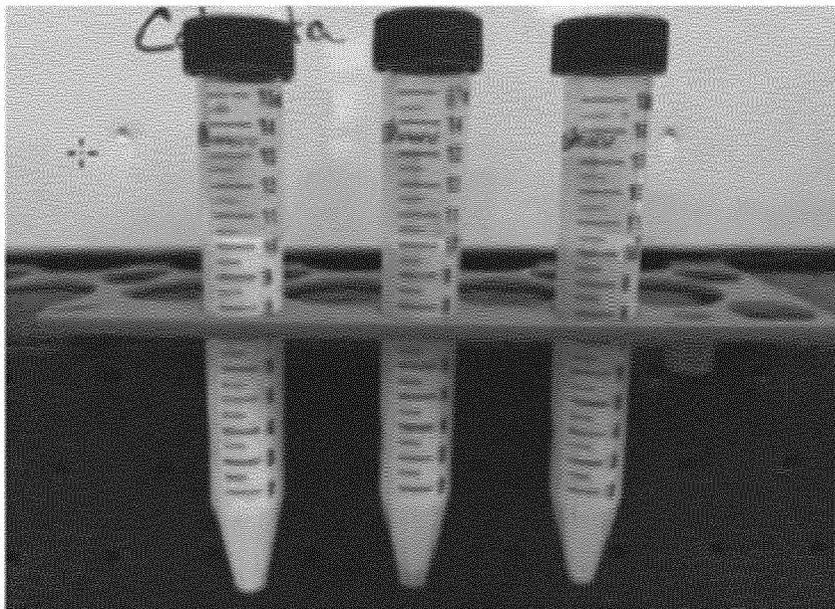


Фиг. 12

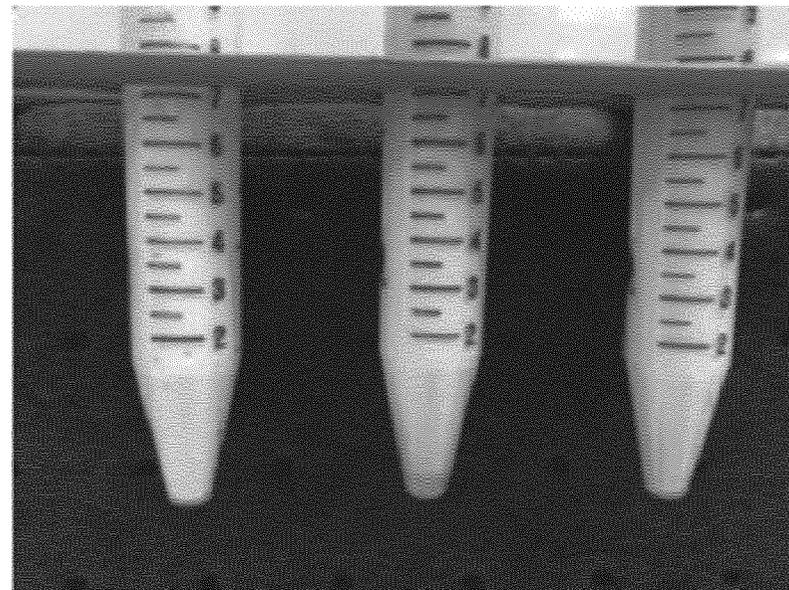




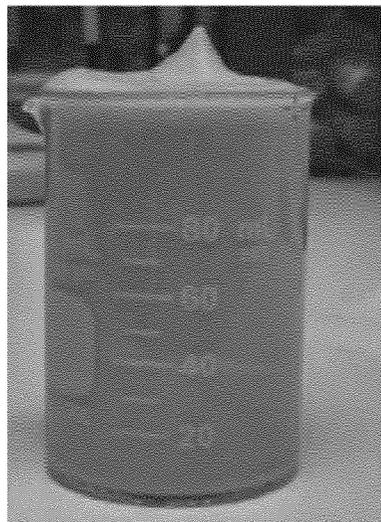
Фиг. 13



Фиг. 14А



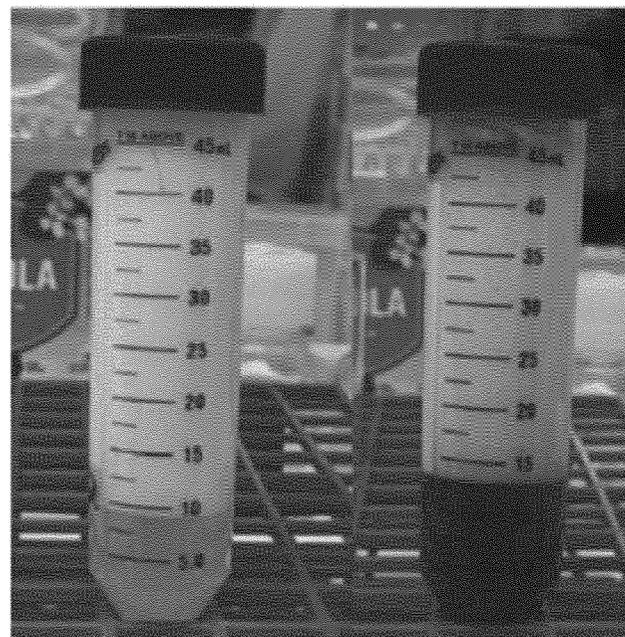
Фиг. 14Б



Фиг. 15А



Фиг. 15Б



Фиг. 15В

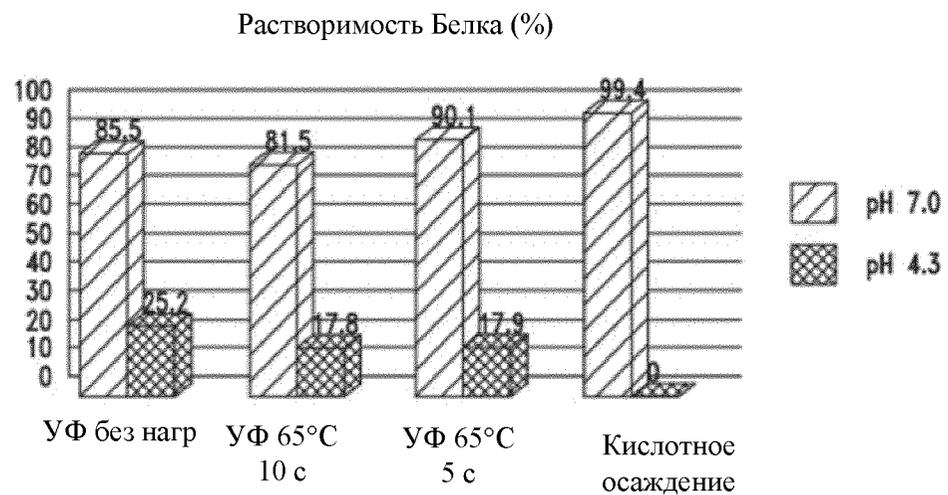


Фиг.16А



Фиг.16Б

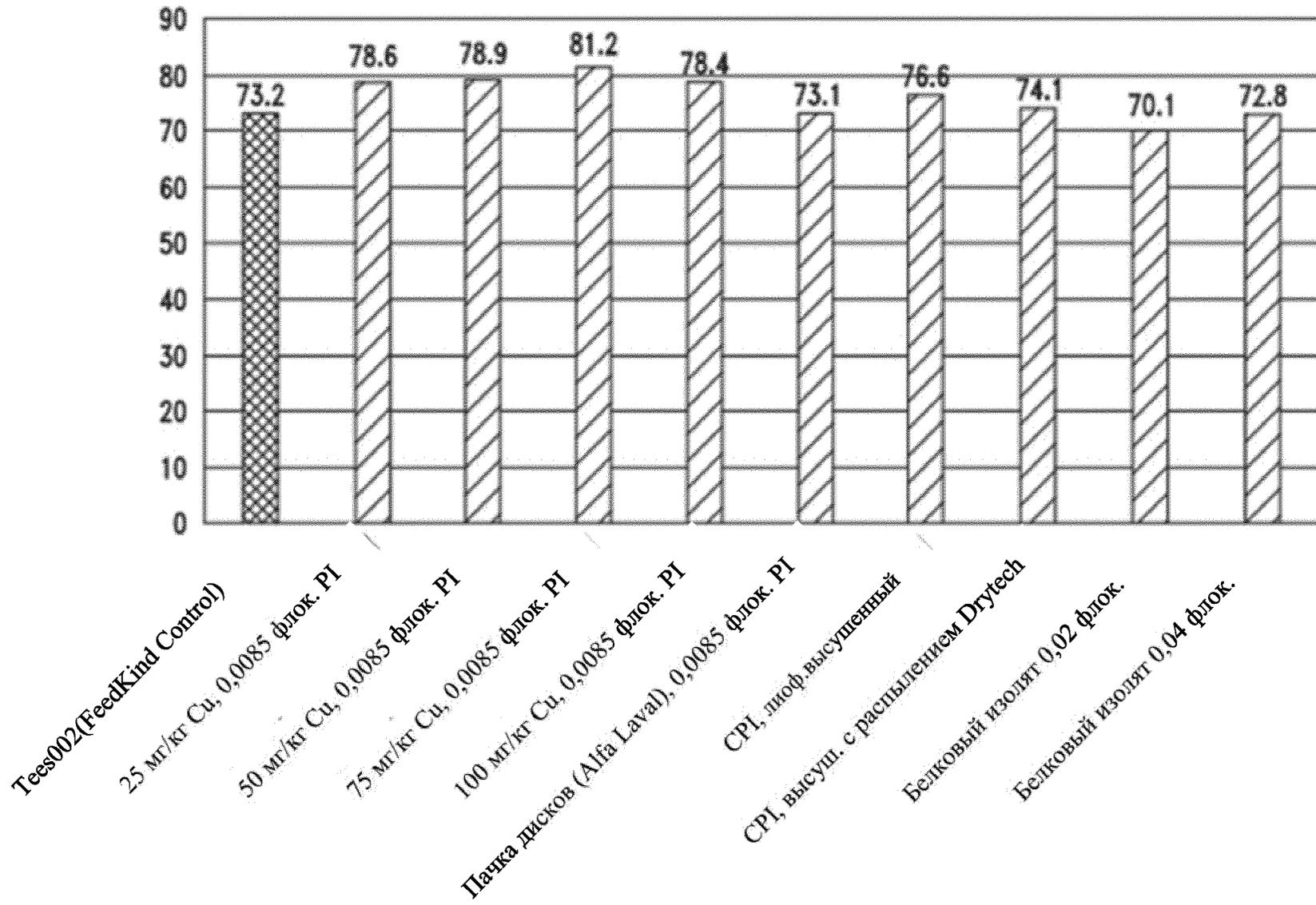
Фиг. 17

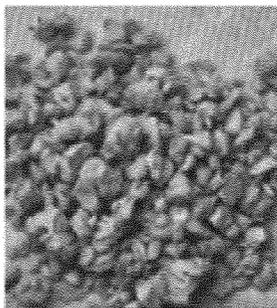


Фиг.17А

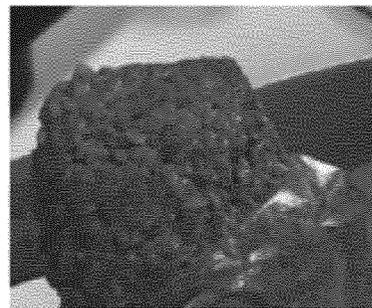
Раствор	Белок % метод Дюма	Растворимость белка %	
		pH 7.0	pH 4.3
Без нагревания	77.3	85.5	25.2
65C 10s	76.6	81.5	17.8
65C 5s	77.1	90.1	17.9
Кисл.РРІ #1	93.5	99.4	0

Неочищенный белок (%) – белковый изолят

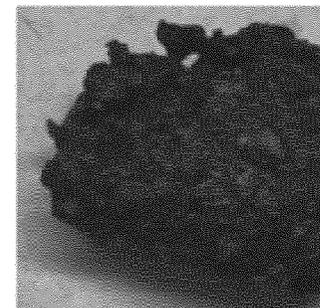




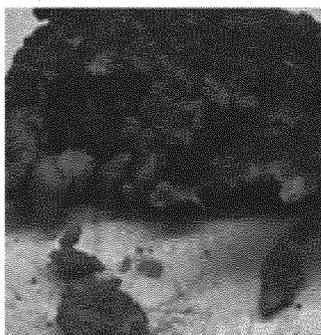
Фиг. 19А



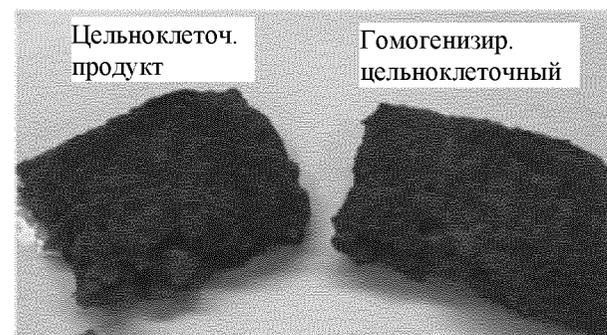
Фиг. 19Б



Фиг. 19В



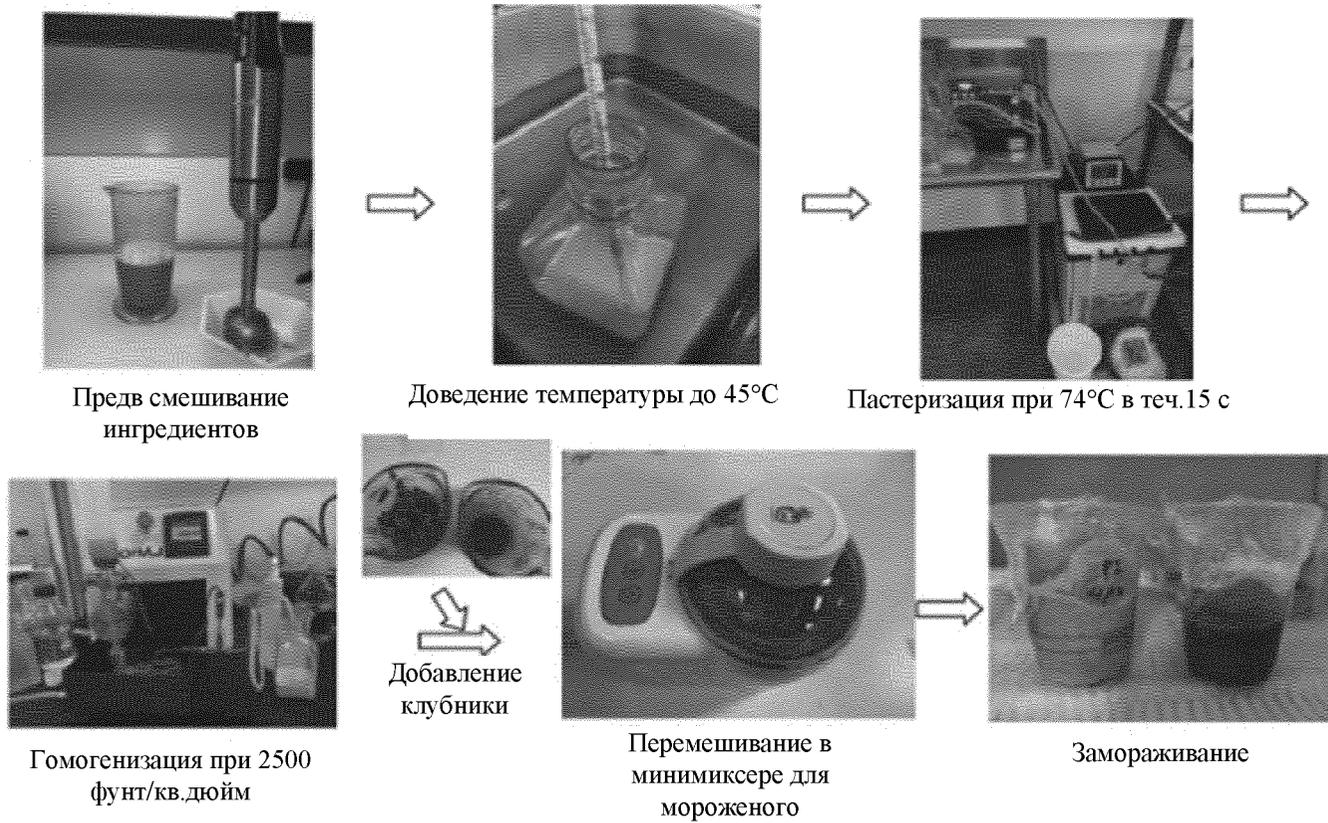
Фиг. 19Г



Фиг. 19Д

Фиг. 20

Ингредиент	Белок %	Состав # 1 (г)	Состав # 2 (г)	Состав # 3 (г)	Состав # 4 (г)	Новый неосуществимый бургер (г)	Старый неосуществимый бургер (г)
Мука	13	2	2	2	2		
Белковый изолят	77	2,5	3,5	4,5			
Цельноклеточный	73				3,5		
Кокосовое масло			1,2	1,2	1,5	14	17
Соль (г)			0,33	1,2	0,2		
Порошкообраз- ный чеснок			0,15	0,15	0,15		
Порошкообразный репчатый лук			0,15	0,15	0,15		
Черный перец					0,018		
Замоченная текс- турированная соя		15	15	15	15		
Общая масса		19,5	22,13	23,20	22,50	113	113
Высушенная текс- турированная соя	69	3,33	3,33	3,33	3,33		
Сухие ингредиенты		7,83	10,66	11,53	10,83		
Белок из белкового изолята		1,93	2,70	3,47	2,70		
Белок из высушенной текс- турированной сои		2,30	2,30	2,30	2,30		
Общий белок		4,22	4,99	5,76	4,99	19	27
Общий белок/113 г		24,47	25,27	28,07	25,07	19	27
г РИ/цельноклеточ- ный на 113 г		11,16	13,64	16,88	13,53		



Фиг. 21А

Состав клубничного мороженого

	Состав			Клубничное мороженое, контроль
	65 г/порция	100 г партия	400 г партия	
Ингредиенты				65 г/порция
Белковый изолят Calysta	2,6	4,0	16,0	
Вода	32,5	50,0	200	31,5
Жир – кокосовое масло	5	7,7	30,8	5
Сахар	10,5	16,2	64,6	14
Лимонная кислота		0,125	0,5	
Пюре из клубники	7,2	11,1	44,3	
Клубника	7,2	11,1	44,3	13
Общая масса	65,0	100,1	400,5	
Экстракт ванили			¼ чайной ложки	
Экстракт клубники			¼ чайной ложки	
Общий белок	2			2
Белок %	3,08			

Фиг. 21В

	Состав				Клубничное мороженое, контроль 65 г/порция
	65 г/порция	100 г партия	334,8 г партия		
Ингредиенты					
Белок Calysta	3,11	4,78	16,0		
Вода	38,83	59,7	200		
Жир – кокосовое масло	6,87	10,6	35,4		7
Сахар	13,75	21,1	70,8		16
Какао-порошок	2,45	3,8	12,6		
Общая масса	65,00	100,0	334,8		65,0
Общий белок	2,39				2
Белок %	3,68				

Состав шоколадного мороженого

Фиг. 21Г

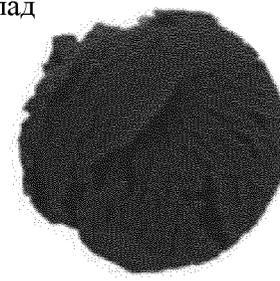
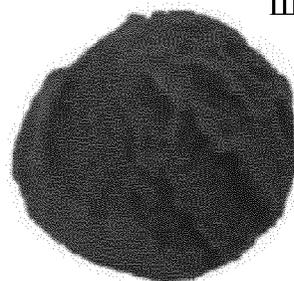
Ингредиенты	Шоколад с темным какао-порошком		Шоколадное мороженое, контроль
	65 г/порция	100 г партия	65 г/порция
Белковый изолят (В067)	2,59	3,99	
Вода	35,94	55,29	
Жир – кокосовое масло	8,90	13,70	7
Сахар	13,92	21,70	16
Какао-порошок	2,43	3,74	
Специальный темный какао-порошок	1,21	1,87	
Общая масса	65,00	100,0	65,0
Общий белок/65 г	2,0		2
Белок %	3,07		

Фиг. 21Д

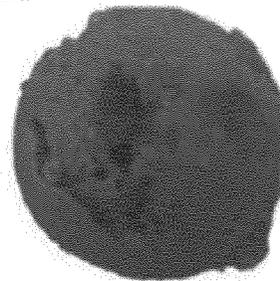
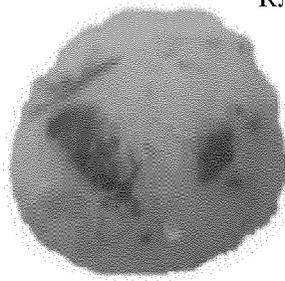
Рецепт молочного
мороженого с
сывороочным белком

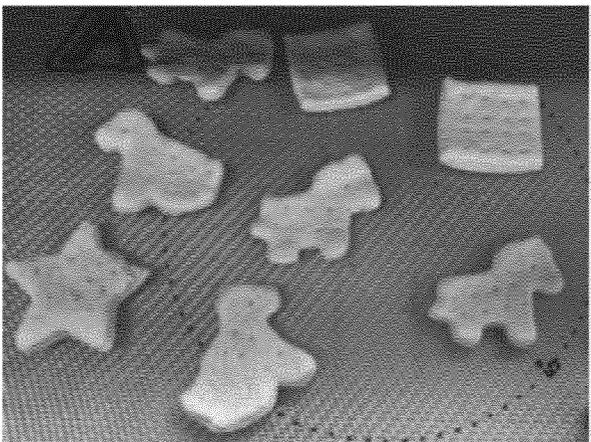
Рецепт безмолочного
мороженого с белковым
ингредиентом Calysta

Шоколад

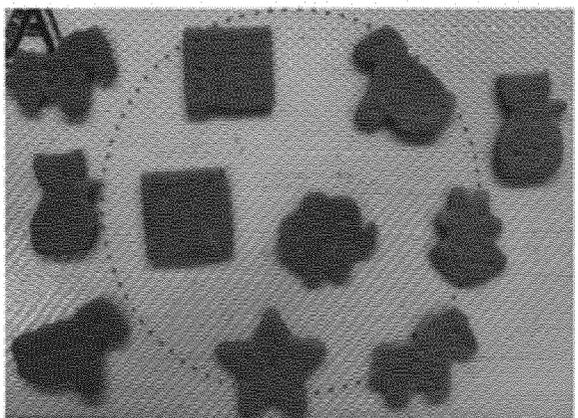
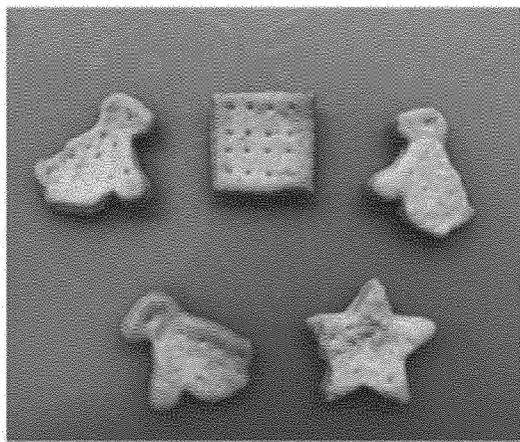
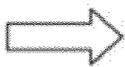


Клубника

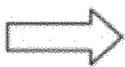




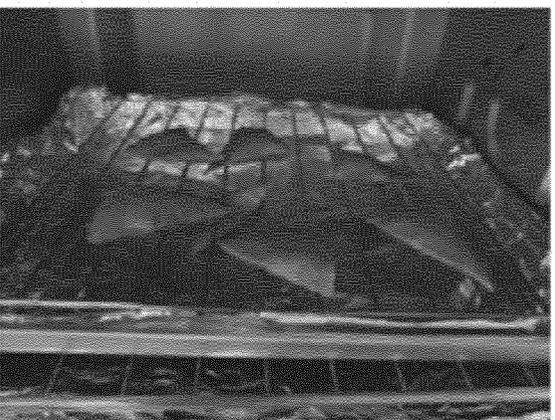
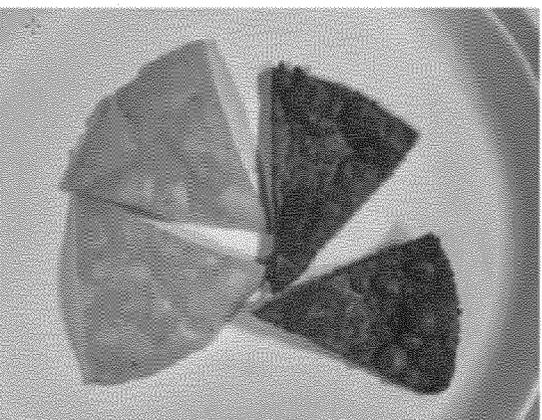
Пшеничная
мука



M.capsulatus



Фиг. 22

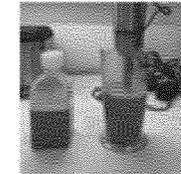
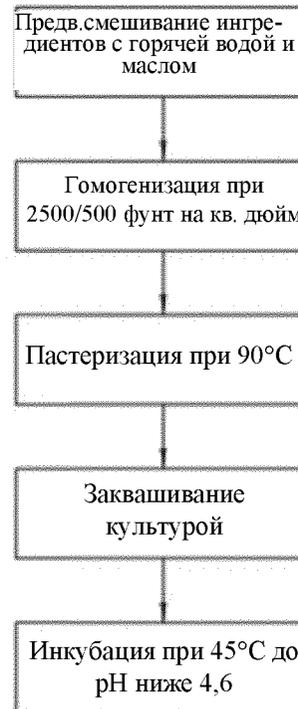


Фиг. 23

Фиг. 24



Процесс получения йогурта



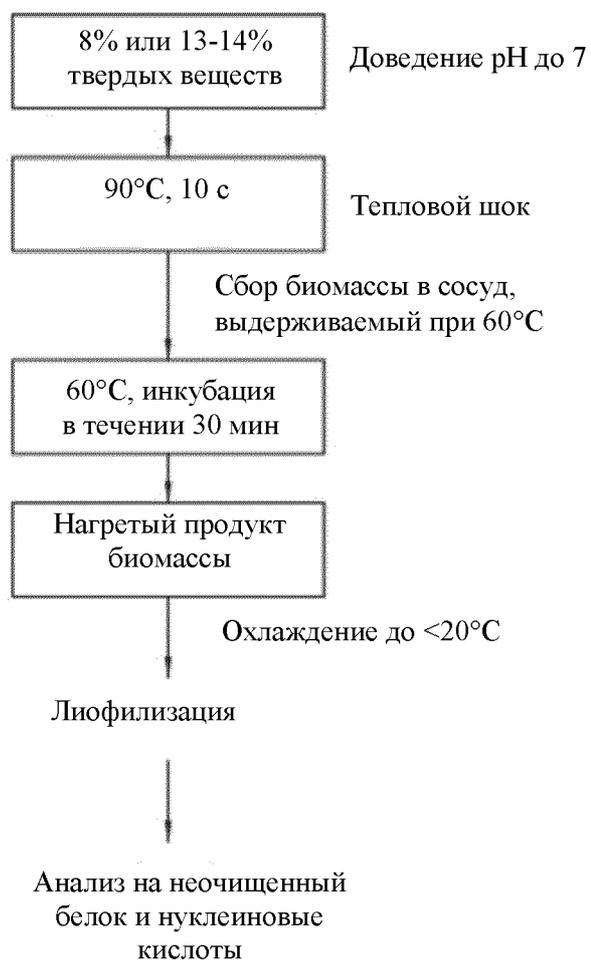
Фиг. 25

Состав немолочного йогурта

Ингредиенты	%	г/400 г партия
Растительное масло (кокосовое)	4,00	16,00
Белковый изолят или цельноклеточный препарат	5,50	22,00
Сахар - Глюкоза	5,00	20,00
Полифосфат натрия, JONA C-New	0,16	0,64
Тапиоковый крахмал-Кустарный промысел Create 315 (Ingredion)	2,16	8,64
Карбонат кальция	0,27	1,08
Ксантановая камедь	0,1	0,4
Культура-Yo Flex YF-L02 DA, CHR Hansen	0,04	0,16
Вода	Добавить до 100%	Добавить до 400 г
Общий белок	4,125	
Белок в порции 150 г	6,2 г	

Фиг. 26

Схема получения цельноклеточного продукта в лабораторном масштабе



Фиг. 27