

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042228**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.25

(21) Номер заявки
201891933

(22) Дата подачи заявки
2017.02.28

(51) Int. Cl. **C12N 1/02** (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(54) ГИФОМИЦЕТОВЫЕ БИОПОДСТИЛКИ, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/302,123; 62/340,381; 62/345,973

(32) 2016.03.01; 2016.05.23; 2016.06.06

(33) US

(43) 2019.04.30

(86) PCT/US2017/020050

(87) WO 2017/151684 2017.09.08

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

(72) Изобретатель:
**Коузыюбэл Марк, Мэкьюр Ричард,
Эвнил Ювэл (US)**

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

(56) DATABASE WPI Week 201149
Thomson Scientific, London, GB; AN 2011-H81056
XP002769954, -& JP 2011 130766 A (ROHM KK) 7
July 2011 (2011-07-07) abstract claims 1-4

WO-A1-2004052103

WO-A2-2008021999

GREWAL H S ET AL: "Fungal production of citric acid", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 13, no. 2, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 209-234, XP004045669, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/0734-9750(95)00002-8 page 218, line 9 - page 219, line 5

CA-A-751389

ANNE BEAUVAIS ET AL: "An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*", CELLULAR MICROBIOLOGY, vol. 9, no. 6, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 1588-1600, XP055370496, GB ISSN: 1462-5814, DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.00895.x page 1589, column 1, line 1 - line 26 page 1597, column 1, line 5 - line 7 page 1597, column 1, line 21 - line 24

J.L. CENIS: "Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 9, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 2380-2380, XP055370597, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/20.9.2380 page 2380, column 1, line 26 - line 31

AMANI S. AWAAD ET AL: "New Antifungal Compounds from *Aspergillus terreus* Isolated from Desert Soil", PHYTOTHERAPY RESEARCH, vol. 26, no. 12, 16 December 2012 (2012-12-16), pages 1872-1877, XP55137763, ISSN: 0951-418X, DOI: 10.1002/ptr.4668 page 1872, column 2, line 27 - line 29 page 1873, column 2, line 10 - line 23

(57) Раскрыт новый способ выращивания грибов, в котором используют сконструированную искусственную питательную среду и производят гиомицетовые биоподстилки высокой плотности, которые можно собирать с минимальной обработкой, и из которых можно выделять различные продукты грибов, такие как антибиотики, белки и липиды, причем этот способ приводит к уменьшению затрат на культивирование грибов, связанных с энергопотреблением, оксигенацией, водопотреблением и образованием потоков отходов.

B1**042228****042228****B1**

Область техники

Данное изобретение относится к изолированным штаммам гифомицетов в пределах типов Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Glomeromycota и Chytridiomycota, таким как вид рода *Fusarium*, вид рода *Aspergillus*, вид рода *Tricoderma*, вид рода *Penicillium*, виды Mucorales, включая виды рода *Rhizopus*, ацидофильный штамм гифомицетов, обозначенный как МК7, и их потомству, а также к способам проведения поверхностной ферментации для получения гифомицетовых биоподстилок из таких штаммов грибов, продуцирующих широкое разнообразие полезных продуктов.

Предшествующий уровень техники

Клетки большинства грибов растут в виде трубчатых, продолговатых и веретенообразных структур, называемых гифами, которые могут содержать множество ядер, и которые разрастаются путем роста на концах. Этим они отличаются от микроорганизмов похожего внешнего вида, таких как зеленые нитчатые водоросли, которые растут путем многократного деления клеток, образуя цепочки клеток.

Все тело гифы, представляющей собой вегетативную стадию гриба, называют мицелием (множественное число "мицелии"). Мицелий можно рассматривать как основное тело или форму гриба, и его часто описывают как нитевидный. Рост происходит путем бесполого размножения гиф, которые растут, образуя ветвящиеся цепочки. Мицелий важен для гриба, поскольку он может направленно перемещаться в почве или древесине, используя этот субстрат в качестве пищи, которая требуется грибу для образования плодовых тел (например, базидиокарпов), таких как настоящие грибы, трутовики, трюфели, аскомицеты и сморчки.

Мицелии выделяют экзоферменты, которые могут убивать живую ткань (некротрофные), а затем поглощать отмерший материал (сапротрофные), просто поглощать уже отмерший материал (также сапротрофные) или питаться живой тканью (биотрофные).

Хотя считают, что гифомицеты входят в состав всех типов царства грибов, большое количество гифомицетов, в частности, встречается среди типов Ascomycota и Zygomycota. Представители этих типов производят широкое разнообразие продуктов, таких как белки, аминокислоты, масла, лекарственные вещества (например, пенициллин), пищевые продукты (например, темпе), пищевые добавки, пищевые консерванты (например, лимонную кислоту) и промышленные ферменты, а также находят применение в хлебопечении и производстве сыров, пива и вина.

Твердофазная ферментация (ТФФ) имеет ряд отчетливых недостатков. Например, конечный продукт, т.е. продуцируемая биомасса, равномерно смешана с твердым субстратом, и их отделение друг от друга в высшей степени затруднительно. Как правило, ТФФ вырабатывает грибную биомассу в низких концентрациях, характеризуется очень низкими скоростями конверсии и, в конечном счете, приводит к низким выходам. Для эффективной ферментации при ТФФ требуются определенная водная активность. Обеспечение и поддержание надлежащего количества водной активности затруднительно для применения на практике и приводит к большим затратам. Также трудно осуществлять аэрацию систем ТФФ, что дополнительно обостряет трудности, связанные с эффективностью конверсии, и ограничивает выход системы. Как недостаточная водная активность, так и слабая аэрация налагают ограничения на перенос массы и теплоты, что приводит к перегреву и недостаточному обеспечению кислородом. Полученная в результате биомасса характеризуется наличием случайно ориентированных гиф, что значительно ограничивает пользу при некоторых видах применения, т.е. в производстве пищевых продуктов и/или кормов для животных.

Продукт Quorn™, состоящий в основном из биомассы гифомицетов *Fusarium venenatum*, содержит микопротеин, обладающий относительной питательной ценностью. Quorn™ производят с помощью существующей на уровне техники системы погруженной ферментации, способной вырабатывать большие объемы в непрерывном процессе на серийной основе. Эта методология, хотя и является конкурентоспособной, страдает несколькими отчетливыми недостатками. Чтобы Quorn соответствовал коммерческим требованиям, в его производстве используют биореакторы стоимостью \$35-40 млн. каждый. Система Quorn™ работает непрерывно в одном реакторе до тех пор, пока грибная система не перезревает до превышения ключевых показателей или не происходит ее контаминация другими биологическими видами. В этот момент производство приостанавливают, реактор и все соответствующие системы подводки опорожняют и стерилизуют; для завершения этого процесса может потребоваться несколько недель, что создает поставщику коммерческой продукции ряд серьезных проблем. Такие проблемы состоят, например, в (1) трудности прогнозирования циклов производства, (2) высоких затратах, требующихся на промывку и приостановку производства, (3) трудностях при контроле материальных запасов и т.д. Кроме того, погруженная ферментация в биореакторах большого объема требует огромных количеств энергии для аэрации и перемешивания. Для отделения биомассы от жидкости, в которой происходит ферментация, требуется центрифугирование, которое также, как известно, является капиталоемким и энергоемким процессом. Кроме того, этот процесс является водоемким, что обуславливает необходимость в обработке больших количеств сточной воды. Производимая биомасса характеризуется короткими длинами гиф, ограничивающими их способность к прямой конверсии в пищевые/кормовые продукты без введения связующих агентов и последующих технологических стадий, эффективное управление которыми требует дополнительных затрат и усилий по преодолению трудностей.

Существующие методологии выращивания мицелия гифомицетов страдают рядом недостатков. Например, установки, имеющие надлежащую аэрацию и оборудование, необходимые для выращивания грибов и последующего отделения грибных мицелиев от ростовой среды (например, центрифуги), требуют значительных капиталовложений, особенно для осуществления выращивания грибов в промышленном масштабе. Действующие процессы требуют не только существенного поступления энергии и воды, но также приводят к образованию больших потоков отходов.

Следовательно, в промышленности существует потребность в оптимизированном подходе к формированию биоподстилки из нитевидного мицелия гифомицетов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение позволяет преодолеть ограничения, связанные с используемыми в настоящее время способами. В данном случае гифомицетовые биоподстилки создают с помощью поверхностной ферментации после инокуляции желаемого грибного штамма в новую ростовую среду, где аэрация не требуется. Этот способ поверхностной ферментации применим к широко разнообразным видам грибов, способных вырабатывать широкий ассортимент продуктов во всем спектре различных отраслей промышленности. Эта разработанная питательная среда обеспечивает быстрый рост клеток, создает гифомицетовые подстилки высокой плотности с длинными гифами, производит меньше потоков отходов и позволяет конструировать производимые гифомицетовые подстилки в зависимости от источника углерода, отношения содержания углерода к содержанию азота (C:N) и технологических параметров. Общий эффект состоит в том, что высокие скорости производства достигаются при минимальном влиянии на окружающую среду, которое измеряют на основании расхода воды, расхода энергии, потребностей оборудования и объема углеродного следа.

Таким образом, в настоящем описании предложена искусственная питательная среда, подходящая для культивирования гифомицетов и обеспечивающая продуцирование ими гифомицетовой биоподстилки. Эта искусственная питательная среда содержит по меньшей мере следующие макронутриенты: азот (N), фосфор (P), кальций (Ca), магний (Mg), углерод (C), калий (K), серу (S), кислород (O), водород (H) - и следующие микроэлементы: железо (Fe), бор (B), медь (Cu), марганец (Mn), молибден (Mo) и цинк (Zn). В некоторых случаях микроэлементы обогащают следующими дополнительными микроэлементами: хромом (Cr), селеном (Se) и ванадием (V). Искусственная питательная среда характеризуется варьирующими соотношениями C:N, которые благоприятствуют получению гифомицетовых биоподстилок, характеризующихся либо высоким отношением содержания белков к содержанию липидов, либо высоким отношением содержания липидов к содержанию белков.

Также предложены условия культивирования различных гифомицетов для получения гифомицетовой биоподстилки, при этом некоторые из них являются ацидофильными, например видов и/или штаммов *Fusarium*, *Fusisporium*, *Pseudofusarium*, *Gibberella*, *Sporotrichella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Triocoderma*, видов в пределах рода *Mucorales* sp. (например, *Rhizopus* sp.) и штамма гифомицетов, обозначенных как МК7. В зависимости от вида и/или штамма pH питательной среды для культивирования находится в диапазоне от около 0,68 до около 8,5, а в некоторых случаях до 10,5. Одно воплощение способа включает инокуляцию одного или более видов и/или штаммов грибов в искусственную питательную среду и выращивания вида(-ов) и/или штамма(-ов) с получением биомассы гиф, содержащей один или более полезных продуктов.

Полученные гифомицетовые биоподстилки образуются в анаэробных, микроаэробных, аэробных условиях или их комбинации в результате поверхностной ферментации. Гифомицетовые биоподстилки содержат вид и/или штамм грибов и/или его потомство в форме конидий, микроконидий, макроконидий, пикнидий, хламидоспор, гиф, фрагментов гиф или комбинацию любых или всех этих форм.

Также предложены способы сбора гифомицетовых биоподстилок, выделения и/или очистки полезных белков, аминокислот и/или липидов, продуцируемых гифомицетами. Эти белки, аминокислоты и/или липиды можно применять в пищевых продуктах, корме для рыб, корме для животных, маслах, жирных кислотах, лекарственных препаратах, питательных веществах, фунгицидных средствах, гербицидных средствах, ингибиторах роста дрожжей, инсектицидных средствах, биологических смазках и в виде пищевого сырья для конверсии в другие продукты, обладающие дополнительной ценностью.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 А, В: штамм МК7 в природе в окружающей среде горячего источника в Йеллоустонском национальном парке; С, D: биомасса штамма МК7, полученная в определенных искусственных условиях, характеризующаяся высокой плотностью, высокой прочностью связной биомассы на растяжение; Е: биомасса штамма МК7, показанного на С, D, в поперечном разрезе.

Фиг. 2: примеры реакторов емкостью 10 л, используемых для получения посевной культуры.

Фиг. 3А: показана микробиологическая петля с белой мицелиальной подстилкой, собранной из архивной культуры 2-го поколения; В: чашка Петри с мицелиальной подстилкой штамма МК7.

Фиг. 4: рост и pH культуры штамма МК7 в биореакторе емкостью 10 л, используемом для инокуляции лотковых реакторов. Жидкая среда для МК7-1 с содержанием 7,5% глицерина и отношением C:N 7,5:1. Оптимальная культура для использования в качестве посевной культуры образуется между 72 и 90 ч в поздней экспоненциальной фазе роста биомассы (между стрелками).

Фиг. 5А: лотки, используемые для лотковых реакторов для получения биоподстилки. Длина линейки в лотке составляет 31,75 см (12,5 дюйма); В: биореактор, состоящий из системы лотков на штативах, используемых для удерживания 39 полимерных лотков. Весь реактор обернут прозрачной полимерной пленкой типа Saran®.

Фиг. 6: собранная культура биоподстилки штамма МК7, выращенная в условиях получения высокого содержания липидов при ограничении количества азота (отношение С:N 40:1), после поверхностной ферментации в течение 8 суток в лотке площадью 0,25 м с 1,5 литрами питательной среды для МК7-1 и 125 г/л глицерина.

Фиг. 7: характерная кривая роста для штамма МК7 в неглубоких лотках, показывающая лаг-фазу, где скорости накопления биомассы относительно низки (0-1,5 суток), и время формирования биоподстилки (стрелка, 1,5 суток), когда начинается экспоненциальный рост. Биоподстилку выращивали в питательной среде для МК7-1 с 7,5% глицерина и отношением С:N 30:1.

Фиг. 8: масса биоподстилок МК7 в сухом состоянии, выращенных на глицерине в лотках размеров, охватывающих диапазон трех порядков величины.

Фиг. 9: продукция линоленовой кислоты штаммом МК7 в зависимости от продолжительности и температуры культивирования. Поверхностная ферментация 4% глицерина; pH 2,8 и питательная среда для МК7-1.

Фиг. 10: изображения поперечных срезов биоподстилок МК7 5-дневного возраста, полученных с использованием питательной среды МК7-1 с глицерином, под микроскопом в проходящем свете. А, В: 50-кратное увеличение, при котором видно три слоя: слой воздушных гиф, слой переходной зоны и плотный нижний слой; С: 50-кратное увеличение, при котором отчетливо видны два слоя.

Фиг. 11: микрофотографии поперечных срезов 5-дневной биоподстилки штамма МК7, полученной с использованием питательной среды МК7 с мочевиной. А: верхняя поверхность биоподстилки штамма МК7, на которой видны воздушные гифы и мицелий, проходящий наружу из плотного мицелиального слоя. Изображение получено под микроскопом в проходящем свете при 100-кратном увеличении; В: верхняя поверхность биоподстилки штамма МК7, на которой видны воздушные гифы и мицелий, проходящий наружу из плотного мицелиального слоя. Изображение получено под микроскопом в проходящем свете при 400-кратном увеличении; С: нижняя поверхность биоподстилки штамма МК7, на которой видны гифы и мицелии. Изображение получено под микроскопом в проходящем свете при 400-кратном увеличении; D: плотная внутренняя часть биоподстилки штамма МК7, где видно, что она состоит из переплетенных волокон. Изображение получено под микроскопом в проходящем свете при 400-кратном увеличении.

Фиг. 12А, В: биоподстилка *Rhizopus oligosporus*, выращенного на лотке площадью 0,25 м в течение 6 суток с использованием питательной среды для МК-7 при pH 4,1 с 5% глицерином; С: изображение гиф *Rhizopus oligosporus* в подстилке под световым микроскопом при 400-кратном увеличении.

Фиг. 13: изображения *Fusarium venenatum*, выращенного в реакторе с площадью лотков 0,25 м², через А: 4 суток и В: 6 суток. Биоподстилки были выращены с использованием питательной среды МК7-1 при pH 5,0 и 12,5% концентрации глицерина. На изображениях С, снятом при 400-кратном увеличении под световым микроскопом, видна гифальная форма *F. venenatum*. В этих условиях *F. venenatum* продуцировал в среднем 71 г биомассы в сухом состоянии на лоток в реакторе из двух лотков.

Фиг. 14А: сбор биомассы штамма МК7, культивируемого посредством твердофазной ферментации (ТФФ), где показано, что штамм МК7 полностью включен в лигноцеллюлозу при концентрации менее 5 г биомассы штамма МК7 в сухом состоянии/л (питательная среда: сырьевая смесь); В: микрофотография собранной биомассы штамма МК7 (А); видно, что нити случайным образом интегрированы в пшеничную солому; С: биоподстилка штамма МК7, полученная путем поверхностной твердофазной ферментации (ПТФФ), где видна плотная (180 г/л), связная биомасса, по существу, чистого штамма МК7.

Фиг. 15: культивирование штамма МК7 при различных видах воздействия в лотках 12,7×12,7 см в течение 7 дней. Усы диаграммы представляют собой стандартные отклонения для трех лотков.

Фиг. 16: слева: изображение под световым микроскопом штамма МК7, культивируемого с 12,5% глицерином при pH 2,7, через 8 дней; справа: флуоресцентное изображение после окрашивания нильским красным, показывающее высокое процентное содержание липидов, оцениваемое как 40-60% площади поверхности клетки.

Фиг. 17: профили липидов, продуцируемых штаммом МК7. (Левая панель): среднее общее содержание метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) во фракции прямой перэтерификации (общий топливный потенциал) и экстрагируемой липидной фракции в зависимости от отношения С:N в питательной среде (n=3). Полосками внутри столбца экстрагируемой липидной фракции представлены компоненты три-, ди- и моноацилглицеридов (ТАГ, ДАГ, МАГ) и свободных жирных кислот (СЖК). На вкладке показана газовая хроматограмма с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД), на которой в липидной фракции преобладают молекулы ТАГ. (Правая панель): профиль МЭЖК липидов, полученных в результате прямой перэтерификации всех жирных кислот (прямая), с образованием МЭЖК, и МЭЖК, образованные только из экстрагируемых липидных предшественников (экстрагируемая). На вкладке пока-

заны хроматограммы газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) для прямой и экстрагируемой фракций.

Фиг. 18: биоподстилки штамма МК7 после 7 суток выращивания на питательных средах на основе суррогата кислой молочной сыворотки (AWS, от англ. Acid Whey Surrogate) при исходном pH 4,8 (A, B, C). Изображение (400-кратное) под микроскопом в проходящем свете биоподстилки (C), где видна гифовая структура материала.

Подробное описание

Определения.

При использовании в настоящем документе глагол "содержит" и его словосочетания используют в данном описании и в формуле изобретения в не имеющем ограничительного характера смысле, чтобы обозначить, что предметы, следующие за этим словом, включены, но конкретно не упоминаемые предметы не исключены. Кроме того, ссылка на элемент в единственном числе не исключает наличия более чем одного элемента, если контекст четко не требует, что это один и только один элемент. В этом случае обычно подразумевают "по меньшей мере один".

Используемый в настоящем документе термин "имеет происхождение из (от)" относится к источнику происхождения и может включать в себя встречающиеся в природе, рекомбинантные, очищенные или неочищенные молекулы. Грибы, имеющие происхождение от конкретного изолированного штамма грибов и/или его потомства, могут содержать одну, две или более мутаций, но тем не менее сохраняют одну, две, более двух или все отличительные морфологические и физиологические характеристики изолированных грибов или их потомства, от которых они имеют происхождение.

Используемый в настоящем документе термин "ацидофильный" относится к микроорганизму, оптимальными условиями роста которого являются кислые условия.

Используемый в настоящем документе термин "сырье" относится к любому возобновляемому биологическому материалу, который можно использовать непосредственно в качестве топлива или преобразовать в другую форму топливного или энергетического продукта. Сырьем для биомассы является материал растений и водорослей, используемых в качестве источников топлива, таких как этанол, бутанол, биодизельное топливо и другие виды углеводородного топлива.

Используемое в настоящем документе выражение "лигноцеллюлозное сырье" относится к видам сырья, содержащего лигноцеллюлозу. Не имеющие ограничительного характера примеры лигноцеллюлозного сырья включают отходы сельскохозяйственных культур, такие как пшеничная солома, ячменная солома, рисовая солома, солома мелких зерновых, кукурузная солома, кукурузные волокна (например, камедь кукурузных волокон (CFG, от англ. corn fiber gum), сушеная барда (DDG, от англ. distillers dried grains), кукурузная глютенная мука (CGM, от англ. corn gluten meal)), травянистые растения целевого назначения, растения для энергетического использования, просо, люцерновое сено, тростниково-сахарная багасса, кукурузный экстракт, свекольный жом; несельскохозяйственную биомассу (например, водорослевые подстилки, отходы городских древесных насаждений), кукурузный сироп, свекольную стружку, лесопродукцию (например, первичные/вторичные промышленные отходы древесины мягких пород, первичные/вторичные промышленные отходы древесины твердых пород, полужидкие отходы бумажной массы производства вторичной бумаги), содержащие лигноцеллюлозу отходы (например, газетную бумагу, макулатуру, пивоваренное зерно, городские органические отходы, садовые отходы, клинические органические отходы, отходы, образующиеся в процессе производства биотоплива (например, переработанную водорослевую биомассу, глицерин, отходы производства целлюлозного этанола, твердые отходы биодизельного производства) и их комбинации.

Если не указано иное, используемый в настоящем документе термин "углевод" относится к соединению углерода, водорода и кислорода, содержащему альдегидную или кетонную группу в комбинации с по меньшей мере двумя гидроксильными группами. Углеводы по настоящему изобретению могут быть также необязательно замещены или дезоксигенированы в одном или более положений. Углеводы, таким образом, включают замещенные и незамещенные моносахариды, дисахариды, олигосахариды и полисахариды. Сахарид может представлять собой альдозу или кетозу и может содержать 3, 4, 5, 6 или 7 атомов углерода. В одном воплощении изобретения они представляют собой моносахариды.

В другом воплощении изобретения они могут представлять собой пиранозные и фуранозные сахара. Они могут быть необязательно дезоксигенированы в любом соответствующем С-положении и/или замещены одной или более группировок, таких как атом водорода, атом галогена, галогеналкил, карбоксил, ацил, ацилокси, амино, амидо, карбоксильные производные, алкиламино, диалкиламино, ариламино, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфоновая кислота, тиол, амин, сульфонил, сульфанил, сулфинил, сульфоамид, сложный эфир, карбоновая кислота, амид, фосфонил, фосфинил, фосфорил, сложный тиоэфир, простой тиоэфир, оксим, гидразин, карбамат. Эти сахаридные звенья могут быть расположены в любом порядке, и химическая связь между двумя сахаридными звеньями может образоваться любым из приблизительно десяти различных путей. В результате существует огромное количество различных возможных стереоизомерных олигосахаридных цепей. В одном воплощении изобретения указанные углеводы выбраны из группы, состоящей из моносахаридов, дисахаридов, олигосахаридов, полисахаридов и их комбинаций.

Используемый в настоящем документе термин "моносахарид" относится к мономерам сахара, выбранных из группы, состоящей из трехуглеродных сахаров (триоз), четырехуглеродных сахаров (тетроз), пятиуглеродных сахаров (пентоз), шестиуглеродных сахаров (гексоз) и т.д. и их комбинаций. В одном воплощении изобретения пятиуглеродные сахара выбраны из группы, состоящей из кетопентозы (например, рибулозы, ксилулозы), альдопентозы (рибозы, арабинозы, ксилозы, ликсозы), дезоксирибозы и их комбинации. В одном воплощении изобретения шестиуглеродные сахара выбраны из группы, состоящей из альдогексоз (например, аллозы, альтрозы, глюкозы, маннозы, идозы, галактозы, талозы), циклических полуацеталей, кетогексоз (например, психозы, фруктозы, сорбозы, тагатозы). В одном воплощении изобретения указанные моносахариды выбраны из группы, состоящей из триоз, тетроз, пентоз, гексоз, гептоз и т.д. и их комбинации.

В одном воплощении изобретения моносахариды находятся в линейной форме; в другом воплощении изобретения моносахариды находятся в циклической форме.

Используемый в настоящем документе термин "ферментируемые сахара" относится к сахарным соединениям, которые могут быть преобразованы в полезные продукты ферментации с высокой добавленной стоимостью, не имеющие ограничительного характера примеры которых включают аминокислоты, белки, сахара, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты, поликетиды, витамины, фармацевтические средства, кормовые добавки для животных, химические продукты тонкого органического синтеза, химические сырьевые материалы, полимеры, растворители, различные виды топлива или другие органические полимеры, молочную кислоту и этанол. Конкретные продукты с высокой добавленной стоимостью, которые могут быть получены раскрытыми способами, включают, но не ограничены ими, Р-глюкан, молочную кислоту; химические продукты тонкого органического синтеза; органические кислоты, включая лимонную кислоту, янтарную кислоту и малеиновую кислоту; растворители; корм для рыб и кормовые добавки для животных; фармацевтические средства; витамины; аминокислоты, такие как лизин, метионин, триптофан, треонин, каротиноиды, пищевые продукты для употребления человеком, питательные вещества и аспарагиновую кислоту; ферменты промышленного назначения, такие как протеазы, целлюлазы, амилазы, глюканазы, лактазы, липазы, лиазы, оксидоредуктазы, трансферазы и ксиланазы; и химические сырьевые материалы.

Используемый в настоящем документе термин "гриб" или "грибы" относится к отдельной группе эукариотических организмов с поглощающим типом питания и не содержащих хлорофилл.

Используемый в настоящем документе термин "подкисляющий материал" относится к любым материалам, химическим соединениям, агентам и/или композициям, которые при добавлении в растворитель (например, воду) приводят к образованию раствора, обладающего повышенной активностью иона водорода по сравнению с чистым растворителем (например, водой). Этот материал может находиться в газообразной, жидкой или твердой форме. Этот материал может быть органическим и/или неорганическим. Не имеющие ограничительного характера примеры подкисляющего материала включают любой материал, содержащий галогениды водорода и их растворы (например, соляную кислоту (HCl), бромистоводородную кислоту (HBr) и йодистоводородную кислоту (HI)), оксокислоты галогенов (например, гипохлорную кислоту, хлорную кислоту, перхлорную кислоту, периодную кислоту и соответствующие соединения брома и йода), серную кислоту (H₂SO₄), фторсерную кислоту, азотную кислоту (HNO₃), фосфорную кислоту (H₃PO₄), фторантимоновую кислоту, фторборную кислоту, гексафторфосфорную кислоту, хромовую кислоту (H₂CrO₄), сульфоновые кислоты, метансульфоновую кислоту (или мезиловую кислоту, MeSO₃H), этансульфоновую кислоту (или эзилловую кислоту, EtSO₃H), бензолсульфоновую кислоту (или безиловую кислоту, C₆H₅SO₃H), пара-толуолсульфоновую кислоту (или тозилловую кислоту CH₃C₆H₄SO₃H), трифторметансульфоновую кислоту (или трифлатную кислоту, CF₃SO₃H), карбоновые кислоты (например, уксусную кислоту, лимонную кислоту, муравьиную кислоту, глюконовую кислоту, молочную кислоту, щавелевую кислоту, винную кислоту, карбоновые кислоты винилогического ряда (например, аскорбиновую кислоту, кислоты Мельдрума), кислые соли (например, бикарбонат натрия (NaHCO₃), гидросульфид натрия (NaHS), бисульфат натрия (NaHSO₄), моносодийфосфат (NaH₂PO₄) и динатрийфосфат (Na₂HPO₄)).

Используемый в настоящем документе термин "нейтрализует", "нейтрализующий" и "нейтрализация" относится к химическим реакциям в водных растворах, в которой кислота и основание взаимодействуют с образованием воды и соли, и в которой pH раствора возвращается к исходному pH.

Используемый в настоящем документе термин "донор марганца" относится к композиции или соединению, которые могут образовывать ион марганца (например, марганца (I), марганца (II) и марганца (III)) в водном растворе. Не имеющие ограничительного характера примеры доноров марганца включают Mn₂(CO)₁₀, K₅Mn(CN)₆NO, MnCl, MnF₂, MnBr₂, MnO, MnO₂, MnCh, MnF₃, MnBr₃, MnCO₃, Mn(CH₃COO)₂, C₆H₅MnO₆, MnTiO₃, [CH₃COCH=C(O)CH₃]₂Mn, [C₆H₁₁(CH₂)₃CO₂]₂Mn, (HCO₂)₂Mn, Mn(C₅HF₆O₂)₂, Mn(PH₂O₂)₂, MnI, (C₃H₅O₃)₂Mn, MnMoO₄, Mn(NO₃)₂, Mn(ClO₄)₂, C₃₂H₁₆MnN₈, MnSO₄, (CH₃COO)₃Mn, C₃₂H₁₆ClMnN₈, C₄₈H₂₈ClMnN₄O₈, C₅H₄CH₃Mn(CO₃), Mn(C₅H₄C₂H₅)₂ и C₁₆H₂₂Mn.

Используемый в настоящем документе термин "pH-забуферивающие материалы" относится к композициям, которые при добавлении в жидкую смесь могут поддерживать pH указанной жидкой смеси, при этом сохраняется pH около 0,5, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1,0, около 1,1, около

1,2, около 1,3, около 1,4, около 1,5, около 1,6, около 1,7, около 1,8, около 1,9, около 2,0, около 2,1, около 2,2, около 2,3, около 2,4, около 2,5, около 2,6, около 2,7, около 2,8, около 2,9, около 3,0, около 3,1, около 3,2, около 3,3, около 3,4, около 3,5, около 3,6, около 3,7, около 3,8, около 3,9, около 4,0, около 4,1, около 4,2, около 4,3, около 4,4, около 4,5, около 4,6, около 4,7, около 4,8, около 4,9, около 5,0, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9, около 7,0. Например, pH жидкой смеси находится в диапазоне от около 0,5 до около 3,0. Предпочтительный pH для ацидофильного штамма МК7 гифомицетов составляет от около 2,2 до около 3,0. Такая композиция может содержать соединения, такие как кислота, кислые соли, основание и основные соли, например, HCl , H_2NO_3 , H_2SO_4 , NaHCO_3 , NaHS , NaHSO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaHSO_3 , KHCO_3 , KHS , KHSO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KHSO_3 , NaOH , KOH , $\text{Mg}(\text{OH})_2$, Na_2CO_3 , K_2CO_3 , KHCO_3 , CaCO_3 , MgCO_3 , Na_2S , K_2S и т.д.

Используемый в настоящем документе термин "аэробные условия" относится к условиям, где обеспечено достаточное количество кислорода, и анаэробное дыхание микроорганизма, растущего в таких условиях, запрещено, а анаэробные метаболические пути ингибированы, предотвращая анаэробное дыхание.

Используемый в настоящем документе термин "микроаэробный" и "микроаэрофильный", которые используются взаимозаменяемо, относится к условиям, где поступление кислорода ограничено, но клеточное дыхание организма преимущественно является аэробным дыханием.

Используемый в настоящем документе термин "жирные кислоты" относится к длинноцепочечным молекулам, на одном конце которых находится метильная группа, а на другом конце карбоксильная группа.

Используемый в настоящем документе термин "изолированный гриб" относится к любой композиции, содержащей популяцию грибов, полученную из природного источника.

Используемый в настоящем документе термин "источник углерода" в целом относится к веществу, подходящему для использования в качестве источника углерода для роста прокариотической или эукариотической клетки. Источники углерода включают, но не ограничены ими, гидролизаты биомассы, кислую молочную сыворотку, сладкую молочную сыворотку, углеводы (например, крахмал, сахарозу, полисахариды и моносахариды), целлюлозу, гемицеллюлозу, ксилозу и лигнин, а также мономерные компоненты этих субстратов и/или их комбинации. Источники углерода могут содержать различные органические соединения в различных формах, включая, но не ограничиваясь ими, полимеры, углеводы, кислоты, спирты, альдегиды, кетоны, аминокислоты, пептиды и т.д. Они включают, например, различные моносахариды, такие как глюкоза, декстроза (D-глюкоза), мальтоза, олигосахариды, полисахариды, насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты, сукцинат, лактат, ацетат, этанол и т.д. или их смеси. Источником углерода также может быть сырье или лигноцеллюлозное сырье, такое как жом сахарной свеклы. Фотосинтезирующие организмы могут дополнительно продуцировать источник углерода в качестве продукта фотосинтеза.

Используемый в настоящем документе термин "биокатализатор" относится к любой системе или клетке любого типа, ускоряющей химические реакции за счет снижения энергии активации, при этом они не расходуются и не изменяются в технологическом процессе. Биокатализаторы могут включать, но не ограничены ими, микроорганизмы, такие как дрожжи, грибы, бактерии и археи. Например, изолированный вид и/или штамм(-ы) грибов по изобретению можно использовать в качестве биокатализатора в получении белков и липидов или в разложении углеродных субстратов или органических молекул для получения белков и липидов.

Используемый в настоящем документе термин "ферментация" или "процесс ферментации" относится к процессу, в котором организм или биокатализатор культивируют в питательной среде для культуры, содержащей исходные материалы, такие как источник углерода и питательные вещества, где организм или биокатализатор преобразует эти исходные материалы в продукты.

Используемый в настоящем документе термин "биомасса" относится к биологическому материалу, имеющему происхождение от живущих или недавно живших организмов, например, стеблей, листьев и крахмалсодержащих частей зеленых растений, или из древесины, отходов, лесных отходов (погибших деревьев, веток и древесных пней), скошенной газонной травы, древесных опилок, или к материалам, имеющим происхождение из водорослей или побочных продуктов животноводства и/или промышленности и потоков отходов, пищевых отходов/остатков и других простых сахаров. В некоторых случаях биомасса содержит значительную долю белка и/или липида. В других случаях она главным образом состоит из крахмала, лигнина, пектина, целлюлозы, гемицеллюлозы и/или пектина.

Используемый в настоящем документе термин "целлюлозная биомасса" относится к биомассе, состоящей преимущественно из растительных волокон, непригодных или почти непригодных в пищу для человека, и ее выраженным компонентом является целлюлоза. Эти волокна можно подвергать гидролизу с получением различных сахаров, которые могут ферментироваться микроорганизмами. Примеры целлюлозной биомассы включают траву, древесину и богатые целлюлозой отходы, получаемые из сельского хозяйства или лесной промышленности.

Используемый в настоящем документе термин "гифовая биоподстилка" и "гифомицетовая биопод-

стилка" используется взаимозаменяемо и относится к биоподстилкам, продуцируемым грибами и состоящим из них.

Используемый в настоящем документе термин "крахмал" относится к полимеру глюкозы, легко гидролизующемуся пищеварительными ферментами, например амилазами. Крахмал обычно концентрируется в специализированных частях растений, таких как картофель, кукурузные зерна, рисовые зерна, пшеничные зерна и стебли сахарного тростника.

Используемый в настоящем документе термин "лигнин" относится к полимерному материалу, главным образом состоящему из химически связанных фенольных мономерных соединений, таких как паракумариловый спирт, конифериловый спирт и синапиловый спирт, формирующему основу структурной ригидности и часто называемому древесной частью растений. Лигнин также рассматривают как не содержащую углеводов часть клеточной стенки растений.

Используемый в настоящем документе термин "целлюлоза" относится к длинноцепочечному полимерному полисахаридному углеводу бета-глюкозы формулы $(C_6H_{10}O_5)_n$, обычно обнаруживаемому в клеточных стенках растений в комбинации с лигнином и любой гемицеллюлозой.

Используемый в настоящем документе термин "гемицеллюлоза" относится к классу полисахаридов клеточной стенки растений, который может представлять собой любой из нескольких гетерополимеров. Они включают ксилан, ксиллогликан, арабиноксилан, арабиногалактан, глюкуроноксилан, глюкоманнан и галактоманнан.

Мономерные компоненты гемицеллюлозы включают, но не ограничены ими: D-галактозу, L-галактозу, D-маннозу, L-рамнозу, L-фукозу, D-ксилозу, L-арабинозу и D-глюкуроновую кислоту. Этот класс полисахаридов обнаруживается почти во всех клеточных стенках растений наряду с целлюлозой. Гемицеллюлоза характеризуется более низкой массой, чем целлюлоза, и не может экстрагироваться горячей водой или хелатирующими агентами, но может экстрагироваться водными растворами щелочей. Полимерные цепи гемицеллюлозы связывают пектин и целлюлозу в сеть поперечно сшитых волокон, формирующих клеточные стенки большинства растительных клеток.

Используемый в настоящем документе термин "пектин" относится к классу гетерогенных полисахаридов клеточной стенки растений, которые можно экстрагировать путем обработки кислотами и хелатирующими агентами. Как правило, 70-80% пектина обнаруживается в виде линейной цепи α -(1-4)-связанных мономеров D-галактуроновой кислоты. Меньшая фракция пектина RG-I состоит из чередующихся (1-4)-связанной галактуроновой кислоты и (1-2)-связанной L-рамнозы с существенным количеством арабиногалактановых ответвлений, отходящих от остатка рамнозы. Другие моносахариды, такие как D-фукоза, D-ксилоза, апиоза, уксусная кислота, Kdo, Dha, 2-O-метил-D-фукоза и 2-O-метил-D-ксилоза, обнаруживаются либо во фракции пектина RG-II (менее 2%), либо в виде минорных компонентов во фракции RG-I. Доли каждого из моносахаридов относительно D-галактуроновой кислоты различаются в зависимости от отдельного растения и его микроокружения, биологического вида и момента времени в цикле роста. По тем же причинам гомогалактуроновая и RG-I фракции могут широко различаться по содержанию метиловых эфиров на остатках GalA и содержанию ацетиловых эфиров на положениях C-2 и C-3 GalA и нейтральных сахаров.

Используемый в настоящем документе термин "факультативный анаэробный организм", либо "факультативный анаэробный микроорганизм", либо "факультативный анаэробный биокатализатор" определяют как организм, который может расти как в присутствии, так и в отсутствие кислорода, например штаммы грибов, изолированные в настоящем изобретении.

При использовании в настоящем документе термин "сушеная барда", сокращенно обозначаемый как DDG, относится к твердым веществам, остающимся после ферментации, обычно состоящим из неиспользованных сырьевых твердых веществ, остаточных питательных веществ, белка, волокна и масла, а также клеточных обломков биокатализатора. Этот термин может также включать в себя растворимый остаточный материал из ферментации, и в этом случае его называют "сушеная барда с растворимыми веществами" (DDGS, от англ. distillers dried grains and solubles).

При использовании в настоящем документе термин "питательное вещество" определяют как химическое соединение, используемое организмом или биокатализатором для роста и выживания. В качестве примера питательные вещества могут быть органическими соединениями, такими как углеводы и аминокислоты, или неорганическими соединениями, такими как соли металлов.

При использовании в настоящем документе термин "комплексное питательное вещество" определяют как источник питательных веществ, содержащий в основном мономерные органические соединения, используемые организмом или биокатализатором для продукции белков, ДНК, липидов и углеводов. Термин "обогащенное питательное вещество" используют во всем тексте взаимозаменяемо с термином "комплексное питательное вещество". Как правило, комплексные питательные вещества или обогащенные питательные вещества имеют происхождение из биологических материалов, таких как отход(-ы) убойного цеха, отход(-ы) молочной промышленности или сельскохозяйственные отходы. Комплексные питательные вещества или обогащенные питательные вещества включают, но не ограничены ими: дрожжевой экстракт, триптон, пептон, соевый экстракт, кукурузный сироп, соевый белок и казеин.

Используемый в настоящем документе термин "аэробный метаболизм" относится к биохимическо-

му процессу, в котором для получения энергии, обычно в форме АТФ, используется кислород из углеводов. В характерном случае аэробный метаболизм осуществляется посредством гликолиза и цикла трикарбоновых кислот (ТКК), где одна молекула глюкозы полностью метаболизируется до диоксида углерода в присутствии кислорода.

Используемое в настоящем документе выражение "анаэробный метаболизм" относится к химическому процессу, в котором кислород не является конечным акцептором электронов, содержащихся в восстановленном никотинамидадениндинуклеотиде (НАД-Н). Анаэробный метаболизм можно подразделить на анаэробное дыхание, в котором в качестве конечного акцептора электронов служат соединения, отличающиеся от кислорода, и ферментацию, в которой электроны от НАД-Н используются для получения восстановленного продукта посредством "ферментативного пути" метаболизма.

Используемый в настоящем документе термин "микробиологическая ферментация" относится к процессу, где органические вещества расщепляются, и происходит их сборка заново с образованием продуктов микроорганизмами. Эти вещества могут включать, но не ограничены ими, глюкозу, сахарозу, глицерин, крахмал, мальтодекстрин, лактозу, жиры, углеводороды, белок, аммиак, нитрат и источники фосфора. Продукты могут включать, но не ограничены ими, продукты тонкого органического синтеза (включая, но не ограничиваясь ими, микопептиновые продукты, соевые продукты, темпе и т.д.), традиционные продукты (включая, но не ограничиваясь ими, хлеб, пиво, вино, спирты, сыр, молочные продукты, ферментированные мясные продукты и овощи, грибы, соевый соус и уксус), сельскохозяйственные продукты (включая, но не ограничиваясь ими, гиббереллины, фунгициды, инсектициды, силос, аминокислоты, такие как L-глутамин, L-лизин, L-триптофан, L-треонин, L-аспарагиновая кислота (+), L-арилглицины), ферменты (включая, но не ограничиваясь ими, карбогидразы, целлюлазы, липазы, пектиназы, протеазы), различные виды топлива и химического сырья (включая, но не ограничиваясь ими, ацетон, бутанол, бутандиол, изопропанол, этиловый спирт, глицерин, метан, глицерин, масляную кислоту, метан, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, молочную кислоту, пропионовую кислоту, янтарную кислоту и L-глутаровую кислоту или соли любой из этих кислот), нуклеотиды, органические кислоты, фармацевтические средства и родственные соединения (включая, но не ограничиваясь ими, алкалоиды, антибиотики, гормоны, иммуносупрессанты, интерферон, стероиды, вакцины, витамины) и полимеры (включая, но не ограничиваясь ими, альгинаты, декстрин, желатин, полигидроксипропионат, склероглюкан и ксантан). Используемые для ферментации микроорганизмы могут включать как прокариотические микроорганизмы (включая бактерии, цианобактерии), так и эукариотические микроорганизмы (включая дрожжи, грибы и водоросли).

Используемое в настоящем документе выражение "растения для энергетического использования" относится к растениям, выращиваемым для получения урожая низкой стоимости и не требующего особого ухода, используемого для получения биотоплива или непосредственно, благодаря содержанию в них энергии. Коммерческие растения для энергетического использования обычно высаживают с высокой плотностью для получения высокого выхода растений там, где растения для энергетического использования будут сжигать для генерирования электроэнергии. Широко используют древесные растения, такие как ива или тополь, а также тропические растения, такие как *Miscanthus* и *Pennisetum purpureum* (известный как слоновья трава).

Используемый в настоящем документе термин "поверхностная ферментация" относится к таким видам ферментации, в которых используют рост микроорганизмов на поверхности питательной среды для ферментации без какой-либо дополнительной подложки. В характерном случае питательная среда представляет собой свободно текучую водную питательную среду. Не ограничиваясь какой-либо теорией, считают, что гифовые биоподстилки образуются в результате некоторой комбинации аэробного, микроаэробного и/или анаэробного метаболизма.

Например, считают, что дыхание на поверхности биоподстилки осуществляется на аэробной основе, тогда как в нижней части биоподстилки степень аэробности дыхания может быть от микроаэробной до анаэробной.

Используемый в настоящем документе термин "твердофазная поверхностная ферментация" относится к тем видам ферментации, в которых используют рост микроорганизмов на питательной среде для ферментации с использованием углерода и питательных веществ, потребляющих углерод и питательные вещества, обеспечиваемые твердыми веществами, погруженными в среду для ферментации. В некоторых воплощениях изобретения некоторая часть биоподстилки может быть частично погруженной.

Используемый в настоящем документе термин "погруженная ферментация" относится к тем видам ферментации, в которых используют рост микроорганизмов в погруженном состоянии внутри питательной среды для ферментации. В эту категорию попадают многие виды ферментации, такие как метод погруженной ферментации для производства пенициллина.

Используемый в настоящем документе термин "твердофазная ферментация" относится к культуре микроорганизмов, выращиваемой на выбранной для этой цели твердой подложке. Например, твердый субстрат для культивирования, такой как рисовые или пшеничные отруби, сажают на платформы после засева микроорганизмами; затем субстрат оставляют в помещении с контролируемой температурой на несколько суток. В твердофазной ферментации используют субстраты для культивирования с низким

содержанием воды (пониженной водной активностью). Питательную среду (например, рисовые или пшеничные отруби) насыщают водой, но лишь незначительная ее часть находится в свободно текучем состоянии. Твердая питательная среда содержит как субстрат, так и твердую подложку, на которой осуществляется ферментация.

Используемый в настоящем документе термин "нутрицевтический" относится к веществам, полезным для здоровья или в качестве лекарственных средств. В некоторых случаях нутрицевтики представляют собой не только пищевые добавки, но также помогают в предупреждении и/или лечении заболевания и/или расстройств. Термин "нутрицевтический", образованный от терминов "питание (от англ. nutrition)" и "фармацевтический", был введен в обращение в 1989 году врачом Стивеном Де Феличе (Stephen DeFelice), основателем и председателем Фонда инноваций в медицине (Foundation for Innovation in Medicine, FIM).

Используемый в настоящем документе термин "потомство" относится к любому или ко всем потомкам по родословной, имеющей происхождение от штамма независимо от того, каким образом и где он был получен. В используемое в настоящем документе определение "потомство" включены любые и все мутанты изолированного депонированного штамма и его потомства, где такие мутанты обладают по меньшей мере одной из физиологических и/или морфологических характеристик изолированного депонированного штамма и его потомства.

Искусственная питательная среда для выращивания гифомицетовой биоподстилки.

Для получения гифомицетовой биоподстилки используют искусственную питательную среду. Искусственная питательная среда обеспечивает питательные вещества, требующиеся для увеличенных периодов клеточного цикла по сравнению с происходящим в естественных условиях (т.е. повышенной скорости роста), что приводит в результате к повышенной плотности клеток. Искусственная питательная среда содержит, по меньшей мере, следующие макронутриенты: азот (N), фосфор (P), кальций (Ca), магний (Mg), углерод (C), калий (K), серу (S). В питательную среду для дополнения источников углерода можно также добавлять микронутриенты, такие как железо (Fe), бор (B), хром (Cr), медь (Cu), селен (Se), марганец (Mn), молибден (Mo), ванадий (V) и цинк (Zn). Источники углерода, такие как лигноцеллюлозное сырье, сладкая молочная сыворотка и/или кислая молочная сыворотка, в характерном случае обеспечивают достаточное количество питательных микроэлементов, поэтому дополнительные питательные микроэлементы не требуются.

В искусственную питательную среду можно добавлять дополнительные добавки питательных веществ. Примерами таких веществ являются углеводы (например, моносахариды, полисахариды), доноры аминокислот (например, аминокислота, полипептиды) и их комбинации. Кроме того, в искусственную питательную среду можно также добавлять соединения, облегчающие предварительную обработку лигноцеллюлозного источника углерода. Такие соединения включают, но не ограничены ими, подкисляющие вещества, доноры марганца, питательные вещества и забуферивающий pH материал.

Искусственная питательная среда может иметь форму твердого вещества, пропитанного жидкостью, жидкости или геля. Искусственная питательная среда может также иметь форму жидкости, покрывающей твердый углеродный субстрат, такой как лигноцеллюлозное сырье или другой твердый углеродный субстрат. В данном случае твердый субстрат погружен под поверхность жидкости так, что биоподстилка растет на поверхности жидкости, потребляя углерод, полученный из погруженного твердого вещества, в процессе, известном как поверхностная твердофазная ферментация (ПТФФ). Внеклеточные ферменты, выделяемые из гриба, разлагают твердый углеродный субстрат, высвобождая растворимый углерод, который может поглощаться биоподстилкой на границе с водной фазой или вблизи нее. Полученная в результате биоподстилка образует подстилку на слое жидкости над погруженным твердым субстратом. Как правило, глубина слоя жидкости над погруженным источником углерода должна составлять около 0,01-1,0 см. Слишком малое количество жидкости приводит к отсутствию образования подстилки, что ведет к твердофазной ферментации и/или погруженной ферментации. Слишком большое количество жидкости приводит в результате к неэффективной конверсии и подавлению цикла роста биоподстилки.

В качестве источника углерода для искусственной питательной среды можно использовать широкое разнообразие веществ. Эти вещества включают сахара (например, глюкозу, галактозу, маннозу, трегалозу, сахарозу, арабинозу, маннозу, ксилозу, фруктозу и т.д.), глицерин, крахмал, углеводы, глицерин, молочную сыворотку, лигноцеллюлозное сырье, поток(-и) отходов (например, кислую молочную сыворотку) и их комбинации. Подходящие виды лигноцеллюлозного сырья включают, например, просо прутьевидное, растения для энергетического использования, лес из твердолиственных пород и другие продукты, пивоваренную дробину, пшеничную солому, травы, листья, растительные отходы технологии разрушения целлюлозы аммиаком (AFEX), органический остаток анаэробного брожения, отходы сельскохозяйственных культур (например, ячменную солому, рисовую солому, солому мелких зерновых, кукурузную солому, кукурузные волокна (например, камедь кукурузных волокон (CFG), сушеную барду (DDG), кукурузную глютенную муку (CGM)), люцерновое сено, тростниково-сахарную багассу, несельскохозяйственную биомассу (например, водорослевые подстилки, отходы городских древесных насаждений), промышленные отходы (например, первичные/вторичные промышленные отходы древесины мягких пород, первичные/вторичные промышленные отходы древесины твердых пород, полужидкие отходы бу-

мажной массы производства вторичной бумаги), содержащие лигноцеллюлозу отходы (например, газетную бумагу, макулатуру, пивоваренное зерно, городские органические отходы, садовые отходы), клинические органические отходы, отходы, образующиеся в процессе производства биотоплива (например, переработанную водорослевую биомассу, глицерин, отходы производства целлюлозного этанола, твердые отходы биодизельного производства) и их комбинации. Подходящий поток (-и) отходов включают сельскохозяйственные отходы, городские органические отходы, отходы производства биотоплива (например, отходы производства целлюлозного этанола), водорослевую биомассу, пивоваренную дробину и/или потоки отходов (например, мелассы, кукурузный сироп и т.д.), промышленные отходы (например, органические молекулы, такие как фенол и другие ароматические соединения) и волокна, такие как бета-глюкан, целлюлоза, хитин, гемицеллюлоза и полидекстрин, моносахариды, дисахариды, олигосахариды, полисахариды и любую их комбинацию. Моносахариды включают в себя триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы и т.д. и любые и все их комбинации, пентозы включают в себя рибулозу, ксилулозу, рибозу, арабинозу, ксилозу, ликсозу, дезоксирибозу и любые и все их комбинации, тогда как гексозы выбраны из группы, состоящей из аллозы, альтрозы, глюкозы, маннозы, глюкозы, идозы, галактозы, талозы, психозы, фруктозы, сорбозы, тагатозы и любых и всех их комбинаций. Дисахариды включают в себя сахарозу, лактозу, мальтозу и любые и все их комбинации, тогда как полисахариды включают в себя крахмал, гликоген, целлюлозу, хитин и любые и все их комбинации.

Источник углерода, используемый для выращивания изолированного штамма грибов, может содержать целлюлозу в количестве от около 5 до около 100%, от около 10 до около 95%, от около 20 до около 90%, от около 30 до около 85%, от около 40 до около 80%, от около 50 до около 75% или от около 60 до около 70% в расчете на массу источника углерода в сухом состоянии. Альтернативно целлюлозный источник углерода содержит целлюлозу в количестве по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60% или по меньшей мере около 70% в расчете на массу источника углерода в сухом состоянии. В других случаях целлюлозный источник углерода, используемый для роста изолированного штамма грибов, содержит от около 1 до около 50%, от около 5 до около 40% или от около 10 до около 30% в расчете на массу компонента, выбранного из лигнина, гемицеллюлозы или их комбинации. В некоторых воплощениях настоящего изобретения целлюлозный источник углерода, используемый для роста микроорганизма, содержит по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20% или по меньшей мере около 30% массы компонента, выбранного из лигнина, гемицеллюлозы или их комбинации.

Подходящие источники азота включают мочевины, нитрат аммония (NH_4NO_3), сульфат аммония (NH_4SO_4), соли нитраты (например, KNO_3), соли аммония (т.е. NH_4SO_4) и органический N (например, белки, пептиды), потоки промышленных отходов с высоким содержанием азота, кукурузный сироп и их комбинации. Искусственная питательная среда, приготовленная с чистым мочевиным источником азота, обеспечивает приблизительно на 25% более быстрый рост гифомицетов, чем искусственная питательная среда, приготовленная с комбинацией мочевины и нитрата аммония (т.е. $70 \text{ г/м}^2/\text{сутки}$ по сравнению с $52 \text{ г/м}^2/\text{сутки}$ соответственно). Можно также использовать комбинации мочевины и нитрата аммония. Рост, хотя и значительно более медленный, чем при использовании одной мочевины или комбинации мочевины, также происходит при использовании сульфата аммония в качестве единственного источника азота. Хотя можно также использовать один нитрат аммония, этот источник азота также не обеспечивает энергичный рост, наблюдаемый при использовании комбинаций мочевины.

Изменения отношения углерода и азота (C:N) в искусственной питательной среде оказывают значимое влияние на композицию биоподстилки, продуцируемой видом и/или штаммом грибов. В характерном случае низкое отношение C:N, например отношение C:N 7,5:1 или менее, благоприятствует продукции белков и аминокислот по сравнению с липидами. С другой стороны, отношение C:N более 7,5:1 благоприятно для продукции липидов по сравнению с белками. Образованию липидов часто благоприятствует искусственная питательная среда, имеющая отношение C:N по меньшей мере 10:1, 15:1, 20:1, 26:1, 30:1, 40:1 или 50:1.

pH искусственной питательной среды определяют на основании желаемых продуктов и используемого вида и/или штамма(-ов) грибов. При использовании *Fusisporium*, *Pseudofusarium*, *Gibberella*, *Sporotrichella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Triocoderma*, видов в пределах рода *Mucorales* sp. (например, *Rhizopus* sp.), изолированного штамма гифомицетов, обозначенного как МК7, и их комбинаций высокая продукция липидов происходит в диапазоне pH 2,0-7,0 и оптимально при pH менее 3,5. Для высокой продукции белка, хотя на нее преимущественно влияет зависимость от отношения C:N, требуется pH по меньшей мере 2,7 и предпочтительно pH от 4,5 до 5,5.

Культуры и композиции, содержащие изолированные виды и/или штаммы грибов.

В настоящем изобретении используют чистую культуру изолированного вида и/или штамма грибов или чистую культуру двух видов и/или штаммов грибов, либо она состоит из, по существу, чистой культуры трех или более видов и/или штаммов грибов. Можно использовать широкий ряд изолированных видов и/или штаммов гифомицетов, таких как вид и/или штамм(-ы) *Fusisporium*, *Pseudofusarium*, *Gibberella*, *Sporotrichella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Triocoderma*, *Pichia* spp, видов в пределах рода *Mucorales* sp.

(например, *Rhizopus* sp.) и их комбинаций. Биологически чистая культура/совместная культура/по существу чистая культура может также содержать изолированный ацидофильный штамм гифомицетов, обозначенный как МК7, депонированный в Американской коллекции типовых культур (АТСС) под номером доступа РТА-10698, или его активные мутанты. Можно также использовать биологически чистые культуры генетически модифицированных гифомицетов. Чистый вид и/или штамм(-ы) грибов и/или его потомство в характерном случае имеет форму конидий, микроконидий, макроконидий, пикнидий, хламидоспор, гиф, фрагментов гиф и мицелиев или их комбинации.

Ацидофильный штамм МК7 гифомицетов представляет собой новый штамм гифомицетов, способный к прямой конверсии источников углерода, таких как лигноцеллюлозные источники углерода, углеводы (например, кислая молочная сыворотка) и водорослевая биомасса, в гифомицетовые биоподстилки, содержащие белки и липиды.

Способы получения полезных продуктов с использованием искусственной питательной среды и изолированного штамма грибов и/или его потомства включают:

а) инокуляцию одного или более видов или штаммов грибов и/или их потомства в искусственную питательную среду, имеющую источник углерода, выбранный из группы, состоящей из сахара, глицерина, лигноцеллюлозного сырья, углеродсодержащих продуктов сельскохозяйственных, промышленных и городских отходов, углеводов, дрожжевого экстракта, казаминовых кислот, кислой молочной сыворотки, сладкой молочной сыворотки и/или их комбинации в контейнере, где искусственная питательная среда может поддерживать рост указанного изолированного штамма грибов посредством поверхностной ферментации;

б) выращивание указанного изолированного штамма грибов в указанной искусственной питательной среде с получением гифомицетовых биоподстилок;

с) сбор гифомицетовых биоподстилок; и

д) необязательно выделение, очистку и/или получение продуктов из гифомицетовых биоподстилок.

Рост осуществляется в аэробных условиях. В другом воплощении изобретения рост осуществляется в микроаэробных условиях. Альтернативно рост осуществляется в результате любого комбинирования аэробных условий, микроаэробных условий и анаэробных условий, например, посредством поверхностной ферментации.

Полезные продукты представляют собой богатую белком биомассу, биоподстилки и/или гифомицетовую биоподстилку. Например, полезные продукты, полученные с использованием грибов, и раскрытые способы включают, но не ограничены ими, белковые биоподстилки для применения в пищевых продуктах, кормовых продуктах для рыб, кормовых продуктах для животных, биополимерах и/или их предшественниках. В данном случае рост осуществляется посредством аэробных условий, микроаэробных условий и анаэробных условий или любой их комбинации.

Широкий ряд ацидофильных видов и/или штаммов грибов, таких как *Fusisporium*, *Pseudofusarium*, *Gibberella*, *Sporotrichella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Triocoderma*, виды в пределах рода *Mucorales* sp. (например, *Rhizopus* sp.), изолированный ацидофильный штамм гифомицетов, обозначенный как МК7, и их комбинации и/или их потомство можно культивировать в отсутствие антибиотиков, при этом контаминация незначительна или отсутствует. В характерном случае контаминацию в искусственной питательной среде вызывают другие организмы, такие как бактерии, другие нежелательные грибы (например, дрожжи, плесневые грибы), водоросли, растения, насекомые и их смесь.

Также раскрыта по меньшей мере одна композиция, содержащая изолированный вид и/или штамм грибов *Fusisporium*, *Pseudofusarium*, *Gibberella*, *Sporotrichella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Triocoderma*, видов в пределах рода *Mucorales* sp. (например, *Rhizopus* sp.), дрожжей, способных к образованию гиф (т.е. *Yarrowia*), изолированного ацидофильного штамма гифомицетов, обозначенного как МК7, и их комбинации. Эта композиция может дополнительно содержать искусственную питательную среду, поддерживающую рост вида и/или штамма(-ов) грибов, и необязательно одно или более подкисляющих веществ, доноров марганца, питательных добавок и/или их смесь.

Поверхностная ферментация.

В настоящем описании поверхностную ферментацию инициируют путем инокуляции искусственной питательной среды суспензией свободно плавающих клеток желаемого вида и/или штамма(-ов) гифомицетов. Посевную культуру из инокуляционного реактора добавляют в искусственную питательную среду в концентрации, в результате которой образуется зрелая биоподстилка в течение желаемого периода времени. Теоретически среду можно инокулировать отдельной клеткой; однако при такой инокуляции для развития зрелой биоподстилки потребовались бы крайне строгие условия стерильности и значительно продленный период времени. В характерном случае в результате инокуляции 0,5-1,0 г клеток на литр ростовой среды биоподстилка образуется за период от 3 до 6 суток. Например, в результате добавления посевной культуры, содержащей около 10 г/л клеток при использовании 7,5% (в объемном соотношении) питательной среды биоподстилка образуется за период от 3 до 6 суток. В искусственную питательную среду не вводят кислород извне путем барботирования или другими способами, поскольку достаточное количество кислорода может быть извлечено из условий окружающей среды или близких к ним условий.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, считают, что, поскольку рост клеток в присутствии кислоро-

да происходит значительно быстрее, конидии, находящиеся на поверхности искусственной питательной среды, где количество кислорода больше, будут расти быстрее и начнут формировать мицелиальную биоподстилку. Считают, что концентрации кислорода значительно меньше лишь на несколько микрометров ниже поверхности искусственной питательной среды, и поэтому клетки грибов, расположенные в этих областях, помещены в стрессовые условия. Известно, что стресс усиливает выведение внеклеточных полисахаридов, имеющих "клейкий" фенотип, и поэтому будет способствовать быстрому формированию гифомицетовой биоподстилки за счет прикрепления клеток, пролиферирующих на поверхности. Однако концентрация субстрата также оказывает значимое влияние. Например, когда концентрация углеродного субстрата ниже 4%, гифомицетовые биоподстилки не сформируются. Следует отметить, что первоначальный экологический стресс при формировании подстилок необязательно предполагает формирование подвергнутой стрессу подстилки, т.е. подстилки, содержащей токсины, выделяемые организмом, подвергнутым стрессу.

Как правило, для поверхностной ферментации в контролируемых условиях температуры, влажности и потока воздуха, подходящих для используемого вида и/или штамма(-ов) грибов, используют плоские лотки, содержащие искусственную питательную среду. Для оптимального роста гифомицетовой биоподстилки поддерживают стерильные условия. Достаточный поток воздуха поддерживают, чтобы удалять тепло и диоксид углерода, образующиеся в результате дыхания микроорганизмов, и подавать кислород без перемешивания искусственной питательной среды.

Как правило, на 2-е сутки после инокуляции на поверхности искусственной питательной среды начинается формироваться "кожица". Эта "кожица" представляет собой первоначальную гифомицетовую биоподстилку, которая часто включает в себя как воздушные гифы, так и гифы, контактирующие с искусственной питательной средой, и продолжает расти и увеличивать плотность клеток. В характерном случае через три-шесть суток после инокуляции полученные в результате гифомицетовые биоподстилки имеют толщину от 1 до 30 мм и обладают достаточной прочностью на растяжение и структурной целостностью, чтобы обращаться с ними, не вызывая разрыва.

Полученные гифомицетовые биоподстилки имеют описанную структуру, которая не наблюдается в природе. Во-первых, сформированные естественным путем гифомицетовые биоподстилки состоят не из чистой культуры/совместной культуры/по существу чистой культуры. Как правило, сформированные естественным путем биоподстилки в дополнение к по меньшей мере одному виду гифомицетов содержат различные типы водорослей и/или бактерий и формируют искусственную микросистему. Примерами формирующихся естественным путем грибных биоподстилок являются микоризные грибные подстилки, которые существуют в почве в широко диспергированной форме и связаны с корнями растений, лишайниками (например, оленьим мхом и корковым лишайником) и грибами (например, *Armillaria ostoyae*).

Во-вторых, биоподстилки, формируемые с помощью описанных в настоящем документе способов и методов, имеют значительно более высокую плотность клеток, чем находящиеся в природе, даже с учетом множественных видов, обнаруживаемых в сформированных естественным путем биоподстилках. Полученные гифомицетовые биоподстилки склонны к очень высокой плотности, в характерном случае составляющей 50-200 граммов на литр. Естественные и погруженные способы выращивания гифомицетов обычно приводят в результате к плотности биомассы около 15 граммов на литр. В результате способов твердофазной ферментации получают смесь субстрата с небольшим процентным содержанием грибов, т.е. менее 5% грибной композиции. Что касается процентного содержания твердых веществ, раскрытыми в настоящем документе способами получают гифомицетовые биоподстилки, обычно содержащие 5-20% твердых веществ. Напротив, естественные и погруженные способы выращивания гифомицетов обычно приводят в результате к процентному содержанию твердых веществ менее 1,5%. Одним из результатов достигаемой плотности, гифомицетовой природы и внеклеточного матрикса, обнаруживаемых в этих плотных биоподстилках, является их способность к сохранению связной подстилки после высушивания. Это резко противоположно порошковой и/или несвязной форме, обычно обнаруживаемой в других высушенных гифомицетовых биоподстилках.

В-третьих, биоподстилки, формируемые с помощью раскрытых в настоящем документе способов и методов, обладают высокой прочностью на растяжение по сравнению с встречающимися в природе биоподстилками, что позволяет поднимать и перемещать их, не вызывая их разрушения.

В-четвертых, настоящие биоподстилки имеют определенную структуру, в некоторых случаях содержащую единый плотный слой, состоящий из длинных гиф, по существу, выровненных параллельно границе раздела между воздухом и биоподстилкой. В некоторых гифомицетовых биоподстилках существует по меньшей мере два слоя: (а) плотный нижний слой и (б) слой воздушных гиф. В некоторых гифомицетовых биоподстилках видно по меньшей мере три структурно различающихся слоя: (а) плотный нижний слой, (б) слой воздушных гиф и (с) слой переходной зоны (см. фиг. 10А и В). Для систем с воздушными гифами и систем с тремя слоями слой воздушных гиф в характерном случае является наиболее преобладающим визуально, затем виден плотный нижний слой, при этом слой переходной зоны, если и присутствует, является наименьшим. Каждый из слоев обычно имеет свою характерную плотность клеток по сравнению с другим(-и) слоем(-ями). Например, слой воздушных гиф является значительно менее плотным, чем нижний слой биоподстилки (см. фиг. 10А). Если воздушные гифы образуются, они пре-

имущественно ориентированы перпендикулярно границе раздела биоподстилки и воздуха и/или границе раздела биоподстилки и питательной среды. Для всех биоподстилок плотный слой состоит из длинных нитей, предрасположенных к параллельному выравниванию с границей раздела биоподстилки и воздуха и/или границей раздела биоподстилки и питательной среды. Кроме того, полученная в результате биоподстилка состоит из по меньшей мере большей части грибной биомассы, и в предпочтительных воплощениях изобретения, по существу, не содержит остаточного сырья и представляет собой, по существу, чистую грибную биомассу.

В тех случаях, где формируются воздушные гифы, например при использовании глицерина в качестве субстрата, между слоем воздушных гиф и плотным нижним слоем существует ряд ключевых отличительных факторов. В отношении длины воздушные гифы склонны к большей длине, чем обнаруживаемые в нижнем плотном слое. Плотность и распределение отдельных воздушных гиф меньше, чем гиф, связанных с плотным слоем мицелия. Воздушные гифы склонны к вертикальной ориентации на конце, расположенном ближе к атмосфере. Т.е. воздушные гифы склонны расти относительно перпендикулярно поверхности питательной среды. С другой стороны, гифы плотного слоя склонны расти преимущественно в параллельной ориентации относительно границы раздела воздуха и биоподстилки и/или границы раздела биоподстилки и питательной среды. Относительно низкая плотность воздушных гиф в сочетании с их большей длиной и вертикальной ориентацией предполагает максимальное увеличение поглощения кислорода. Кроме того, в слое воздушных гиф обнаруживается незначительное количество или совсем не обнаруживается внеклеточного матрикса. Напротив, в плотном нижнем слое можно обнаружить большое количество внеклеточного матрикса.

Воздушный слой биоподстилки в случае его формирования, по-видимому, ускоряет рост биоподстилки. Нарушения в зоне прерывания воздушного слоя отрицательно влияют на ускоренный рост биоподстилки. Нарушения включают в себя контакт с твердым объектом, контакт с каплями воды и трещины или микротрещины, вызванные перемешиванием жидкой питательной среды, на которой растет биоподстилка. В характерном случае в нарушенной зоне биоподстилки после устранения причины нарушения дальнейший рост не происходит. В данном случае рост осуществляется посредством аэробных условий, микроаэробных условий и анаэробных условий или любой их комбинации.

Биоподстилки обычно собирают между 3-м и 12-м днем после инокуляции в зависимости от используемого вида/штамма(-ов) и желаемого продукта, хотя также возможно их более позднее время сбора. Гифомицетовые биоподстилки можно собирать с помощью ряда различных методологий, которые могут включать: промывание, физическую обработку (уменьшение размера, обработки под давлением, дегидратацию и т.д.), инактивацию процессов жизнеспособности, циклические изменения температуры, экстракции и/или разделение компонентов биомассы и преобразование и/или включение в различные системы. В некоторых воплощениях изобретения гифомицетовые биоподстилки собирают, промывают водой и впоследствии либо высушивают в сушильном шкафу с контролируемой температурой для инактивации множества ферментов и ограничения биохимических преобразований внутри биоподстилки, либо замораживают.

Гифомицеты признаны очень полезными в качестве клеток-хозяев для платформ продукции и экспрессии рекомбинантных белков, приводящим в результате к получению полезных продуктов, экспрессируемых в биомассе и/или гифомицетовой биоподстилке. Примеры гифомицетов, применяемых в настоящее время или предложенных для применения в таких процессах, включают *Neurospora crassa*, *Acremonium chrysogenum*, *Tolypocladium geodes*, *Mucor circinelloides*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae*. Кроме того, виды микроорганизмов, используемых для получения раскрытых биоподстилок, могут быть генетически модифицированы для систем экспрессии/подавления путем манипуляций с экспрессией генов, включая транскрипцию, так, что они либо сверхэкспрессируют, либо не экспрессируют соединения или химические вещества, обнаруживаемые в их нативной или неизменной форме. Использование грибных систем и манипуляции с ними для сверхэкспрессии существующих химических веществ, экспрессионных систем, отсутствующих в природе, или систем подавления, обычно присутствующих в нативной форме, известны в данной области техники, т.е. *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp., и дрожжи, такие как *Pichia* spp. Полезные продукты, получаемые с помощью биоподстилки и раскрытых способов, включают, но не ограничены ими, биомассу и/или подстилки из биомассы, используемые для экспрессии фармацевтических средств, нутрицевтиков, химических веществ, представляющих собой строительные блоки для промышленного применения, лекарственные средства, ферменты и/или их предшественники.

Ацидофильные виды и/или штаммы грибов.

Ацидофильные виды и/или штаммы грибов, используемые в настоящем изобретении, представляют собой разрушающие лигноцеллюлозу штаммы гифомицетов и/или их потомство, обладающие, по меньшей мере, следующими идентифицирующими характеристиками:

е) изолированный штамм является ацидофильным и может расти при pH в диапазоне от около 0,68 до около 8,5; и

ф) образует гифомицеты, биоподстилки, содержащие белки и липиды, из искусственной питательной среды посредством поверхностной ферментации в аэробных условиях, микроаэробных условиях,

анаэробных условиях или любой их комбинации. В данном случае источник углерода искусственной питательной среды включает углеводы, лигноцеллюлозное сырье, углеродсодержащие продукты отходов (например, кислую молочную сыворотку) или их комбинацию.

Изолированный вид и/или штамм(-ы) в характерном случае дополнительно включает в себя одну или более из следующих дополнительных идентифицирующих характеристик:

с) способность к продукции белков, липидов, аминокислот, ферментов, нуклеиновых кислот (нуклеотидов), углеводов, волокон, таких как бета-глюканы, поликетидов, алкалоидов, пигментов и антибиотиков. Примеры включают, но не ограничены ими, сложные эфиры, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, амилазы, протеазы, целлюлазы, ксиланазы, липазы, пероксидазы, марганцевые пероксидазы, нуклеиновые кислоты/нуклеотиды: ДНК/РНК, пурины, пиримидины, олеиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, бета-глюкан, хитин, бета-каротин, гликозиды, фенольные соединения, терпеноиды из источников углерода, описанных на странице 18, параграф [80], и из водорослевого сырья и отходов, образующихся в процессе производства биотоплива (например, переработанной водорослевой биомассы, глицерина) в различных анаэробных, аэробных, микроаэробных условиях и/или любой их комбинации;

d) содержание 18S рРНК и внутренней транскрибируемой спейсерной области (ITS) последовательности ДНК, обладающей по меньшей мере 98% идентичностью с SEQ ID NO: 1.

Подходящий(-ие) ацидофильный(-ые) вид(-ы) и/или штамм(-ы) грибомицетов включают *Fusisporium*, *Pseudofusarium*, *Gibberella*, *Sporotrichella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Triocoderma*, виды в пределах рода *Mucorales* sp. (например, *Rhizopus* sp.), изолированный ацидофильный штамм грибомицетов, обозначенный как МК7, и их комбинации и/или их потомство. Штамм, обозначенный как МК7, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-10698.

Ацидофильный(-ые) вид(-ы) и/или штамм(-ы) грибомицетов и/или их потомство могут расти при низком рН максимум около 7,0, около 6,5, около 6,0, около 5,5, около 5,0, около 4,5, около 4,0, около 3,5, около 2,0, около 1,8, около 1,6, около 1,4, около 1,2, около 1,0, около 0,9, около 0,8 или около 0,7, или около 0,6, или около 0,5. Например, штамм грибов может расти при низком рН в диапазоне от около 0,68 до около 2,0.

Используемые ацидофильные виды/или штаммы могут продуцировать липиды и белки в больших количествах внутри грибомицетовых биоподстилок, выращиваемых при низких диапазонах рН, как описано выше. Например, изолированный штамм при низком рН, как описано выше, может преобразовывать источник углерода в липиды с более высокой скоростью, чем опубликовано ранее на уровне техники, например, по сравнению с описанными изолированными ранее штаммами *Fusarium* (см. Nairn и соавт., 1985, Bhatia и соавт., 2006, and Naqvi и соавт., 1997). Используемый(-ые) ацидофильный(-ые) вид(-ы) и/или штамм(-ы) может (могут) преобразовывать источник углерода в липиды со скоростью по меньшей мере 0,04 г липида/г источника углерода, 0,05 г липида/г источника углерода, 0,06 г липида/г источника углерода, 0,07 г липида/г источника углерода, 0,08 г липида/г источника углерода, 0,1 г липида/г источника углерода, 0,12 г липида/г источника углерода, 0,14 г липида/г источника углерода, 0,16 г липида/г источника углерода, 0,18 г липида/г источника углерода, 0,2 г липида/г источника углерода, 0,25 г липида/г источника углерода, 0,3 г липида/г источника углерода, 0,35 г липида/г источника углерода или 0,4 г липида/г источника углерода после 10 суток инкубации при рН 2,5.

В условиях культивирования по настоящему изобретению также образуется гифовая биомасса, имеющая более благоприятный профиль липидов по сравнению с биомассой, полученной ранее в результате культивирования грибов или микроскопических водорослей. Например, используемый(-е) ацидофильный(-ые) вид(-ы) и/или штамм(-ы) продуцирует(-ют) большее количество насыщенных жирных кислот (например, пальмитиновой (16:0) и стеариновой кислот (18:0)) и моновенасыщенных жирных кислот (например, олеиновой кислоты (18:1)), но меньшее количество полиненасыщенных жирных кислот, поверхность которых в большей степени уязвима к окислению.

Кроме того, ацидофильный(-ые) вид(-ы) и/или штамм(-ы) грибов и/или их потомство может расти при высокой концентрации металлов, где металл выбран из группы, состоящей из Mn, Ag, Zn, Fe, Al, Be, Pb, Cu, Cr, Ni, Cd, Co, Ni, Pd, Pt, U, Th, Mo, Sn, Ti, As, Au, Se, Sb и Hg.

Ацидофильный(-ые) вид(-ы) и/или штамм(-ы) грибов и/или их потомство в условиях культивирования способны к быстрому росту при высокой плотности клеток. В данном случае микроорганизмы способны достигать плотности клеток (определенной количественно как масса в сухом состоянии/л искусственной питательной среды) по меньшей мере около 10 г/л, по меньшей мере около 15 г/л, по меньшей мере около 20 г/л, по меньшей мере около 25 г/л, по меньшей мере около 30 г/л, по меньшей мере около 50 г/л, по меньшей мере около 75 г/л, по меньшей мере около 100 г/л, по меньшей мере около 125 г/л, по меньшей мере около 135 г/л, по меньшей мере около 140 г/л, по меньшей мере около 145 г/л, по меньшей мере около 150 г/л, по меньшей мере около 160 г/л, по меньшей мере около 170 г/л, по меньшей мере около 180 г/л, по меньшей мере около 190 г/л, по меньшей мере около 200 г/л, по меньшей мере около 210 г/л, по меньшей мере около 220 г/л, по меньшей мере около 230 г/л, по меньшей мере около 240 г/л, по меньшей мере около 250 г/л.

Например, ацидофильный(-ые) вид(-ы) и/или штамм(-ы) грибов и/или их потомство способны достигать плотности клеток от около 10 г/л до около 300 г/л, от около 15 г/л до около 300 г/л, от около 20 г/л

до около 300 г/л, от около 25 г/л до около 300 г/л, от около 30 г/л до около 300 г/л, от около 50 г/л до около 300 г/л, от около 75 г/л до около 300 г/л, от около 100 г/л до около 300 г/л, от около 125 г/л до около 300 г/л, от около 150 г/л до около 300 г/л, от около 170 г/л до около 300 г/л, от около 130 г/л до около 290 г/л, от около 135 г/л до около 280 г/л, от около 140 г/л до около 270 г/л, от около 145 г/л до около 260 г/л, от около 150 г/л до около 250 г/л, от около 170 г/л до около 250 г/л, от около 100 г/л до около 280 г/л. Высокую плотность роста ацидофильный(-ых) вид(-ов) и/или штамм(-ов) грибов можно дополнительно увеличить путем регулирования условий ферментации (таких как температура, pH, концентрация ионов, время инкубации и/или концентрации газов).

Виды рода *Fusarium*.

Информация, касающаяся ацидофильных видов рода *Fusarium*, способов их идентификации, выделения, условий культивирования описана в работах Nelson и соавт., (Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species, 1994, Clinical Microbiology Reviews, 7(4): 479-504), Toussoun and Nelson (1976, *Fusarium*), Booth (*Fusarium: laboratory guide to the identification of the major species*, 1977, Commonwealth Mycological Institute, ISBN 0851983839, 9780851983837) и Leslie и соавт. (*The Fusarium laboratory manual*, 2006, Wiley-Blackwell, ISBN 0813819199, 9780813819198), каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Белки, включая, например, некоторые ферменты, продуцируемые видом(-ами) и/или штаммом(-ами) гифомицетов, можно очистить из гифовой биомассы, продуцируемой этими организмами. Способы очистки белка известны специалистам в данной области техники. Подробно способы очистки белка описаны в работах Janson and Ryden (*Protein purification: principles, high-resolution methods, and applications*; Wiley-VCH, 1998, ISBN 0471186260, 9780471186267), Detscher (*Guide to protein purification, Volume 182 of Methods in enzymology*, Gulf Professional Publishing, 1990, ISBN 0121820831, 9780121820831) и Cutler (*Protein purification protocols, Volume 244 of Methods in molecular biology*, Humana Press, 2004 ISBN 1588290670, 9781588290670), полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Чтобы найти применение и пользу белков как продуктов, их необязательно очищать из подстилок. Т.е. подстилку можно обработать без очистки и извлекать из нее пользу; т.е. в качестве источника белка, в качестве пищевого продукта и/или в качестве корма для животных. Подстилки сами по себе могут образовывать продукты; смесь продуцируемых биоподстилкой *in situ* продуктов имеет значение и обладает ценностью.

Липиды ацидофильного(-ых) вида(-ов) и/или штамма(-ов) грибов.

Как отмечено выше, в условиях культивирования в искусственной питательной среде, имеющей высокое отношение C:N, образуются гифомицетовые биоподстилки, имеющие высокое содержание липидов и более благоприятный липидный профиль по сравнению с водорослями и другими организмами, продуцирующими липиды. Липиды можно экстрагировать из изолированной гифовой биомассы. В некоторых случаях липиды представляют собой в основном триацилглицериды с ацильными группами жирных кислот. В некоторых случаях жирные кислоты представляют собой, по существу, ненасыщенные жирные кислоты и/или насыщенные жирные кислоты. Ненасыщенные жирные кислоты включают олеиновую кислоту (18:1), α -линоленовую кислоту (18:3), эйкозеновую кислоту (20:1) и их комбинации. Насыщенные жирные кислоты включают пальмитиновые кислоты (16:0), стеариновые кислоты (18:0), арахидоновую кислоту (20:0), бегеновую кислоту (22:0) и их комбинации. Другие типы липидов, которые могут продуцироваться, включают, но не ограничены ими, стерин (например, эргостерин, предшественник витамина D2), диацилглицериды, каротиноиды, насыщенные жиры (например, масляную кислоту, гексановую кислоту, октановую кислоту, декановую кислоту, додекановую кислоту, тридекановую кислоту, тетрадекановую кислоту, пентадекановую кислоту, гексадекановую кислоту, гептадекановую кислоту, октадекановую кислоту, нонадекановую кислоту, эйкозановую кислоту, докозановую кислоту, тетракозановую кислоту), мононенасыщенные жиры (например, тетрадеценую кислоту, пентадеценую кислоту, гексадеценую кислоту, гептадеценую кислоту, октадеценую кислоту, эйкозеновую кислоту, докозеновую кислоту, цис-тетракозеновую кислоту) и полиненасыщенные жиры (например, гексадекадиеновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, альфа-линоленовую кислоту, гамма-линоленовую кислоту, паринаровую кислоту, эйкозодиеновую кислоту, арахидоновую кислоту, тимнодоновую кислоту, брассиновую кислоту, клупанодоновую кислоту и докозагексаеновую кислоту).

Вид(-ы) и/или штамм(-ы) гифомицетов и/или их потомство способны эффективно продуцировать липиды. В некоторых случаях количество продуцируемых липидов составляет по меньшей мере около 1 г/л/сутки, 5 г/л/сутки, по меньшей мере около 10 г/л/сутки, по меньшей мере около 20 г/л/сутки, по меньшей мере около 30 г/л/сутки, по меньшей мере около 40 г/л/сутки, по меньшей мере около 50 г/л/сутки, по меньшей мере около 60 г/л/сутки, по меньшей мере около 70 г/л/сутки или более. Например, количество продуцируемого биологического масла составляет от около 1 до около 5 г/л/сутки, от около 5 до около 70 г/л/сутки, от около 10 до около 70 г/л/сутки, от около 20 до около 70 г/л/сутки или от около 30 до около 70 г/л/сутки. Эти показатели значительно превышают самый высокий описанный в литературе показатель, составляющий около 12 г/л/сутки (см. Dey, P. et al. (2011) Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates - *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feed-

stock. *Bioresource Technology* 102: 5815-5823; Gong, Z. et al. (2013) Efficient conversion of biomass into lipids by using the simultaneous saccharification and enhanced lipid production process. *Biotechnology for Biofuels* 6: 36; Gong, Z. et al. (2014) Lipid production from corn stover by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnology for Biofuels* 7: 158; Hui, L. et al. (2010) Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 101: 7556-7562; Liang, Y. et al. (2014) Microbial lipid production from pretreated and hydrolyzed corn fiber. *Biotechnol Progress* 30: 945-951; Liu, C.-Z. et al. (2012) Ionic liquids for biofuel production: Opportunities and challenges. *Applied Energy* 92: 406-414; Ruan, Z. et al. (2013) Co-hydrolysis of lignocellulosic biomass for microbial lipid accumulation. *Biotechnol. Bioeng.* 110: 1039-1049; Sung, M. et al. (2014) Biodiesel production from yeast *Cryptococcus* sp. using Jerusalem artichoke. *Bioresource Technology* 155: 77-83; Xie, H. et al. (2012) Enzymatic hydrolysates of corn stover pretreated by a N-methylpyrrolidone-ionic liquid solution for microbial lipid production. *Green Chem.* 14: 1202-1210).

Липиды можно экстрагировать из гифомицетовых биоподстилок, используя различные методики. Не имеющие ограничительного характера примеры экстракции липидов описаны в работах King et al. (Supercritical Fluid Extraction: Present Status and Prospects, 2002, *Grasa Asceites*, 53, 8-21), Folch et al. (A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, 1957, *J Biol. Chem.*, 226, 497-509), Bligh and Dyer (A rapid method of total lipid extraction and purification. 1959, *Can. J Biochem. Physiol.*, 37, 911-917), Cabrini et al. (Extraction of lipids and lipophilic antioxidants from fish tissues - a comparison among different methods. 1992, *Comp. Biochem. Physiol.*, 101(3), 383-386), Hara et al. (Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. 1978, *Anal. Biochem.* 90, 420-426), Lin et al. (Ethyl acetate/ethyl alcohol mixtures as an alternative to Folch reagent for extracting animal lipids. 2004, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4984-4986), Whiteley et al. (Lipid peroxidation in liver tissue specimens stored at subzero temperatures. 1992, *Cryo-Letters*, 13, 83-86), Kramer et al. (A comparison of procedures to determine free fatty acids in rat heart. 1978, *J. Lipid Res.*, 19, 103-106) and Somashekar et al. (Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures, 2001, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(3): 317-320).

В другом примере липиды можно экстрагировать способами, подобными технологии FRIOLEX® (Westfalia Separator Industry GmbH, Германия), используемой для экстракции биологических масел, продуцируемых микроорганизмами. FRIOLEX® представляет собой способ физической экстракции масла на водной основе, посредством которого содержащий масло исходный материал можно использовать непосредственно для экстракции масла, не применяя какие-либо традиционные способы экстракции растворителем. В данном способе водорастворимый органический растворитель можно использовать в качестве технологической добавки, и масло выделяют из жидкой смеси исходных материалов путем разделения по плотности, используя гравитационные или центробежные силы.

После завершения экстракции липидов липиды можно выделять или отделять от нежидких компонентов любыми подходящими средствами, известными в данной области техники. Например, для отделения липидсодержащих композиций от не содержащих липиды композиций используют физические методы низкой стоимости и/или механические методы. Если при способе, используемом для экстракции липидов, образуются множественные фазы или фракции, где одна или более фаз или фракций содержит липиды, способ выделения липидсодержащих фаз или фракций может включать в себя физическое извлечение липидсодержащих фаз или фракций из не содержащих липиды фаз или фракций или наоборот. В некоторых случаях для экстракции продуцируемых микроорганизмами липидов используют способ типа FRIOLEX®, а впоследствии богатую липидами легкую фазу физически отделяют от богатой белками тяжелой фазы (например, путем снятия богатой липидами фазы, которая находится на поверхности богатой белками тяжелой фазы после разделения по плотности).

В продукции липидов видом(-ами) и/или штаммом(-ами) гифомицетов существует по меньшей мере две стадии: (а) стадия накопления гифомицетовой биоподстилки и (б) стадия продукции липидов. На стадии накопления гифомицетовой биоподстилки образуется гифовая биомасса, при этом на стадии накопления гифомицетовой биоподстилки видом(-ами) и/или штаммом(-ами) достигается накопление, составляющее, например, от около 10 до около 95%, от около 20 до около 95%, от около 30 до около 95%, от около 40 до около 95% или от около 50 до около 95% общей продукции гифомицетовой биоподстилки. В других случаях на стадии накопления гифомицетовой биоподстилки достигается от около 60 до около 95%, от около 70 до около 95% или от около 80 до около 95% общей продукции гифомицетовой биоподстилки. В других обстоятельствах гифовая биомасса, продуцируемая микроорганизмом на стадии накопления гифомицетовой биоподстилки, достигает, например, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или 100% общей продукции гифомицетовой биоподстилки. Например, от около 50% до около 95% от общей продукции гифомицетовой биоподстилки микроорганизмом достигается на стадии накопления гифомицетовой биоподстилки.

Что касается стадии продукции липидов, липиды продуцируются в течение всех стадий роста, поскольку они требуются для роста и пролиферации клеток; т.е. липиды продуцируются на стадии накоп-

ления гифомицетовой биоподстилки. Не ограничиваясь какой-либо теорией, считают, что некоторые запасные липиды продуцируются на более поздних стадиях роста биоподстилки, в то время как другие запасные липиды продуцируются на более ранних стадиях формирования биоподстилки. Кроме того, в условиях низкого содержания азота организм будет быстрее накапливать запасные липиды.

На стадии накопления липидов продуцируются липиды, так, что на стадии накопления липидов достигается от около 10 до около 95%, от около 20 до около 95%, от около 30 до около 95%, от около 40 до около 95% или от около 50 до около 95% общей продукции липидов микроорганизмом. В других случаях на стадии накопления липидов достигается от около 60 до около 95%, от около 70 до около 95% или от около 80 до около 95% общей продукции липидов микроорганизмом. В других обстоятельствах продукция липидов на стадии накопления липидов достигает, например, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или 100% общей продукции липидов микроорганизмом. Предпочтительно от около 50 до около 95% общей продукции липидов микроорганизмом достигается на стадии накопления липидов.

Как только липиды получены в соответствии с настоящим изобретением, можно использовать различные известные в данной области техники способы преобразования биологических масел в сложные эфиры жирных кислот для применения в качестве ингредиентов пищевых или фармацевтических продуктов. Получение сложных эфиров жирных кислот может включать в себя переэтерификацию продуцируемых микроорганизмом биологических масел. Экстракцию липидов из микроорганизмов и переэтерификацию липидов можно выполнять одновременно одностадийным способом. Например, культуру, содержащую изолированный штамм грибов, можно подвергать воздействию условий или видов обработки (или комбинации условий или видов обработки), способствующим как экстракции липидов, так и переэтерификации липидов. Такие условия или виды обработки включают, но не ограничены ими, pH, температуру, давление, присутствие растворителей, присутствие воды, присутствие катализаторов или ферментов, присутствие детергентов и физические/механические силы. Для осуществления одностадийного способа экстракции и переэтерификации липидов можно комбинировать две серии условий или обработок, где одна серия условий или обработок способствует процессу экстракции липидов, а другая серии условий или обработок способствует процессу переэтерификации липидов, если эти две серии условий или обработок можно объединять, не вызывая значимого снижения эффективности любого из процессов экстракции и переэтерификации липидов. Гидролиз и переэтерификацию можно выполнять одновременно на целноклеточной гифовой биомассе.

Альтернативно экстракцию липидов выполняют как стадию, отдельную от стадии переэтерификации липидов. Такие реакции переэтерификации проводят с помощью кислотных или основных катализаторов. Способы переэтерификации биологических липидов в сложные эфиры жирных кислот для применения в качестве ингредиентов для пищевых или фармацевтических продуктов включают в себя взаимодействие содержащих триглицериды биологических масел в присутствии спирта и основания с получением сложных эфиров остатков жирных кислот из триглицеридов.

Подходящие спирты для использования в переэтерификации включают любой низший алкиловый спирт, содержащий от 1 до 6 атомов углерода (т.е. C₁₋₆ алкиловый спирт, такой как метиловый, этиловый, изопропиловый, бутиловый, пентиловый, гексиловый спирты и их изомеры). Не ограничиваясь какой-либо теорией, считают, что при использовании низших алкиловых спиртов образуются низший алкиловые эфиры остатков жирных кислот. Например, при использовании этанола образуются этиловые эфиры. Если спирт представляет собой метанол или этанол, полученные сложные эфиры жирных кислот представляют собой метиловый эфир и этиловый эфир остатка жирной кислоты соответственно. В характерном случае количество спирта составляет от около 5 до около 70 мас.%, от около 5 до около 60 мас.%, от около 5 до около 50 мас.%, от около 7 до около 40 мас.%, от около 9 до около 30 мас.% или от около 10 до около 25 мас.% смеси липидной композиции, спирта и основания. Композицию и основание можно добавлять либо к чистому этанолу, либо к чистому метанолу. Как правило, используемое количество спирта можно изменять в зависимости от растворимости в спирте липидов или содержащей триглицериды композиции.

Содержащую триглицериды композицию, спирт и основание вместе подвергают взаимодействию при такой температуре и в течение такого количества времени, которые позволяют получить сложный эфир из остатков жирных кислот и спирта. Специалист в данной области техники может определить подходящее время и температуру реакции. Не намереваясь ограничиваться какой-либо теорией, считают, что остатки жирных кислот отщепляются от глицеринового каркаса триглицерида, и на стадии взаимодействия образуются сложные эфиры каждого остатка жирной кислоты. Стадию взаимодействия композиции в присутствии спирта и основания выполняют при температуре от около 20 до около 140°C, от около 20 до около 120°C, от около 20 до около 110°C, от около 20 до около 100°C или от около 20 до около 90°C. Альтернативно стадию взаимодействия композиции в присутствии спирта и основания выполняют при температуре около 20, 75, 80, 85, 90, 95, 105 или 120°C, либо выше. В зависимости от желаемого продукта стадию взаимодействия композиции в присутствии спирта и основания выполняют в течение времени

от около 2 до около 36 ч, от около 3 до около 36 ч, от около 4 до около 36 ч, от около 5 до около 36 ч или от около 6 до около 36 ч. Вместо этого стадию взаимодействия композиции в присутствии спирта и основания можно выполнять в течение около 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 5,0, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32 или 36 ч.

Стадию взаимодействия композиции липидов, спирта и основания можно проводить путем кипячения компонентов с обратным холодильником с получением сложных эфиров жирных кислот, таких как сложные эфиры полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Стадию взаимодействия композиции липидов можно также проводить при температуре, не приводящей в результате к образованию флегмы компонентами реакционной смеси. Например, проведение стадии взаимодействия композиции липидов под давлением, превышающим атмосферное давление, может привести к повышению температуры кипения растворителей, присутствующих в реакционной смеси. В таких условиях реакция может протекать при температуре, при которой растворители будут кипеть при атмосферном давлении, но которая не приведет в результате к образованию флегмы компонентами реакционной смеси. Как правило, эту реакцию проводят при давлении от около 5 до около 20 фунтов на квадратный дюйм (psi) (137,895 кПа); от около 7 (48,263 кПа) до около 15 psi (103,421 кПа) или от около 9 (62,053 кПа) до около 12 psi (82,737 кПа). Некоторые реакции проводят при давлении 7, 8, 9, 10, 11 или 12 psi. Реакции, проводимые под давлением, можно проводить при указанных выше температурах реакции. Реакции, проводимые под давлением, можно проводить при температуре около 70, 75, 80, 85 или 90°C, либо выше.

Сложные эфиры жирных кислот отделяют от реакционной смеси путем перегонки композиции для выделения фракции, содержащей сложный эфир жирной кислоты. Целевую фракцию реакционной смеси, включающую интересующие сложные эфиры жирных кислот, можно отделять от реакционной смеси и выделять. Перегонку можно выполнять в вакууме. Не ограничиваясь какой-либо теорией, считают, что перегонка в вакууме позволяет осуществлять перегонку при более низкой температуре, чем в отсутствие вакуума, предотвращая, таким образом, разложение сложных эфиров. Обычные температуры перегонки находятся в диапазоне от около 120 до около 170°C, например, перегонку выполняют при температуре менее чем около 180°C, менее чем около 175°C, менее чем около 70°C, менее чем около 165°C, менее чем около 160°C, менее чем около 155°C, менее чем около 150°C, менее чем около 145°C, менее чем около 140°C, менее чем около 135°C или менее чем около 130°C. Обычные значения давления для вакуумной перегонки находятся в диапазоне от около 0,1 до около 10 мм Hg, например, давление вакуумной перегонки составляет около 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 мм Hg, либо выше.

Липиды, экстрагируемые из вида или штамма гифомицетов и/или его потомства по настоящему изобретению, используют для получения биосмазочных материалов. Используемый в настоящем документе термин "биосмазочные материалы" относится к смазочным материалам, полученным с использованием материала, имеющего происхождение от живых или недавно живших организмов. Используемый в настоящем документе термин "смазочные материалы" относится к веществам (обычно текучим в рабочих условиях), вводимым между двумя подвижными поверхностями для уменьшения трения и износа между ними. Базовые масла, применяемые в качестве моторных масел, в целом классифицированы Американским нефтяным институтом на минеральные масла (группа I, II и III) или синтетические масла (группа IV и V). См. публикацию под номером 9 Американского нефтяного института (API, от англ. American Petroleum Institute). Одной из крупнейших областей применения смазочных материалов в форме моторного масла является защита двигателей внутреннего сгорания в транспортных средствах и энергетическом оборудовании. Как правило, смазочные материалы содержат 90% базового масла (чаще всего нефтяных фракций, называемых минеральными маслами) и менее 10% присадок. Иногда в качестве базовых масел используют растительные масла или синтетические жидкости, такие как гидрогенизированные полиолефины, сложные эфиры, силиконы, фторуглероды и многие другие. В основном они представляют собой сложные эфиры триглицериды растительного или животного происхождения. Для применения в качестве базового смазочного масла предпочтительны материалы растительного происхождения. Распространенные материалы включают масло канолы, касторовое масло, пальмовое масло, подсолнечное масло и рапсовое масло с высоким содержанием олеиновой кислоты из растительных и талловое масло из животных источников. Многие растительные масла часто гидролизуют с получением кислот, которые впоследствии избирательно комбинируют с образованием сложных эфиров тонкого органического синтеза.

Таким образом, липиды, экстрагируемые из гифомицетовых биоподстилок, формируемых видом(-ами) и/или штамм(-ами) гифомицетов и/или их потомством по настоящему изобретению, можно применять для получения композиций биосмазочных материалов на основе сложных эфиров путем добавления подходящих присадок. Способы получения композиций смазочных материалов на основе сложных эфиров известны специалистам в данной области техники. В качестве не имеющего ограничительного характера примера обеспечивают некоторое количество содержащего триглицериды масла растительного происхождения и подвергают такой обработке, чтобы гидролизовать по меньшей мере некоторые из триглицеридов и образовывать свободные жирные кислоты, которые относятся к типу, выбранному из группы, состоящей из насыщенных жирных кислот, мононенасыщенных жирных кислот и полиненасыщенных жирных кислот, а также их комбинаций. Эти жирные кислоты разделяют по типам так, чтобы, по суще-

ству, изолировать по меньшей мере мононенасыщенные жирные кислоты от насыщенных жирных кислот и полиненасыщенных жирных кислот. Далее, по меньшей мере, некоторые из мононенасыщенных жирных кислот подвергают модификации с образованием сложноэфирного продукта (например, содержащего сложные триэфиры), а по меньшей мере некоторые из насыщенных жирных кислот и/или полиненасыщенных жирных кислот подвергают гидрообработке с получением алканов (парафинов). Также следует отметить, что в некоторых воплощениях изобретения такие сложноэфирные продукты могут включать одно или более из следующего: молекулы сложных моно-, ди- и триэфиров и их гидроксильные аналоги.

Ферменты, толерантные к кислому pH, из вида(-ов) и/или штамма(-ов) *гифомицетов*.

Геном штамма 4287 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* недавно был секвенирован, и было показано, что он несет ряд генов, вовлеченных в разложение лигнина, гемицеллюлозы и целлюлозы. Кроме того, ферменты, вовлеченные в разложение этих материалов (например, целлюлаза, ксиланаза, лигниназа, глюкуронидаза, арабинофуранозидаза, арабиногалактаназа, эстераза феруловой кислоты, липаза, пектиназа, глюкоманназа, амилаза, ламинариназа, ксилоглюканаза, галактаназа, глюкоамилаза, пектатлиаза, хитиназа, экзо-β-D-глюкозаминидаза, целлобиозодегидрогеназа и ацетилксиланэстераза, ксилозидаза, α-L-арабинофуранозидаза, ферулоилэстераза, эндоглюканаза, bbb-глюкозидаза, Mn-пероксидаза и лакказы), были широко исследованы в штамме F3 *F. oxysporum* F3 (Xiros et al. (2009) Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. *Biotechnol Biofuels* 10:4). Следовательно, ожидают, что ацидофильный(-ые) вид(-ы) и/или штамм(-ы) *гифомицетов*, такой как виды рода *Fusarium* и ацидофильный штамм *гифомицетов*, обозначенный как МК7, полностью приспособлены к гидролизу комплексных источников углерода, таких как лигноцеллюлозные материалы и потоки отходов (например, кислая молочная сыворотка). Также ожидают, что, поскольку этот (эти) ацидофильный(-ые) вид(-ы) и/или штамм(-ы) *гифомицетов* способен (способны) расти при значительно более низком pH (0,7-7,5) по сравнению с другими штаммами *гифомицетов* (pH более 2; Starkey, 1973), ферменты для разложения лигнина, гемицеллюлозы и целлюлозы будут обладать более высокой активностью при низком pH. Ферменты с высокой активностью в кислых условиях были бы особенно полезными в способах, осуществляемых при низком pH.

Токсины, продуцируемые видами рода *Fusarium*.

Часто для продукции на основе микроорганизмов требуются способы предотвращения контаминации, ведущие к высоким материальным и временным затратам. Как обсуждалось выше, ацидофильный(-ые) вид(-ы) и/или штамм(-ы) *гифомицетов* обладают высокой резистентностью к контаминации другими организмами. Например, известно, что представители рода *Fusarium* образуют токсины (например, фумонизины), обладающие свойствами сильных антибиотиков, инсектицидов и фитотоксических средств. Аналогично ацидофильный штамм МК7 *гифомицетов* требует лишь незначительного или не требует добавления антибиотиков извне при применении в производстве *гифомицетовых* биоподстилок. Некоторые виды *Fusarium* могут продуцировать девять различных токсинов, продукция которых зависит от взаимоотношений с различными растениями-хозяевами (Marasas et al., 1984, *Toxigenic Fusarium species, identity and mycotoxicology*, ISBN 0271003480). Продукция токсинов также изменяется в зависимости от питательной среды, используемой для ферментации. Токсины, продуцируемые и секретируемые видами рода *Fusarium*, включают, но не ограничены ими, бикаверин, энниатины, фузаровую кислоту, ликомаразмин, монилиформин, окиспорон, трихотецены, зеарелоны, различные нафтохиноны и антрахиноны (например, нонакетидные нафтазаринхиноны, бикаверин и норбикаверин, гептакетиды, нектриафурон, 5-О-метил-яваницин и ангидрофузарубина лактол).

Дополнительно токсины из вида *Fusarium* могут включать 4-ацетоксисцирпендиол (4-3-ацетоксис-3,15-дигидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), подобное соединение моноацетилангуидина 4- или 15-ацетилсцирпентриол, 3-ацетилдезоксиниваленол (дезоксиниваленола моноацетат, 3"-ацетокси-7", 15-дигидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен-8-он), 8-ацетилнеосоланиол (неосоланиола моноацетат, 4",8",15-триацетокси-3"-гидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), 4- или 15-ацетилсцирпентриол (4-ацетоксисцирпендиол), ацетил-Т-2-токсин (3",4",15-триацетокси-8"-(3-метилбутирил(окси)-12,13-эпокситрихотец-9-ен), ангуидин (диацетоксисцирпендиол), авенацеин, боверицин, бутенолид (4-ацетамидо-4-гидрокси-2-бутеновой кислоты лактон), калонектрин (3",15-диацетокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), 15-деацетилкалонектрин (15-де-О-ацетилкалонектрин, 3"-ацетокси-15-гидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), дезоксиниваленол (Rd-токсин, вомитоксин, 3", Т', 15-тригидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен-8-он), дезоксиниваленола диацетат (диацетилдезоксиниваленол), дезоксиниваленола моноацетат (3-ацетилдезоксиниваленол), диацетоксисцирпендиол (7"-гидроксидиацетоксисцирпендиол), диацетоксисцирпендиол (ангуидин, 4,15-диацетокси-3'-гидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), диацетоксисцирпентриол (7",8"-дигидроксидиацетоксисцирпендиол), диацетилдезоксиниваленол (дезоксиниваленола диацетат, 3",15-диацетокси-7-гидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен-8-он), дацетилниваленол (ниваленола диацетат, 4,15-диацетокси-3',7'-дигидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен-8-он), 7",8"-дигидроксидиацетоксисцирпендиол (диацетоксисцирпентриол, 4,15-диацетокси-3",7",8"-тригидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), энниатины, фруктигенин, фумонизин В1 (1,2,3-пропантрикарбоновой кислоты 1,1-[1-(12-амино-4,9,11-тригидрокси-2-метилтридецил)-2-(1-метилпентил)-1,2-этандинил]сложный

эфир; макрофузин), фузаренон (фузаренон-Х, фузаренон, моноацетилниваленол, ниваленола моноацетат, 4-ацетокси-3",7",15-тригидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен-8-он), фузаровую кислоту (фузариновую кислоту, 5-бутилпиколиновую кислоту), фузариновую кислоту (фузаровую кислоту), F-2 (зеараленон), НТ-2 токсин=15-ацетокси-3",4-дигидрокси-8"-(3-метилбутирилокси)-12-эпокситрихотец-9-ен, 7"-гидрокси-диацетоксисцирпеннол (диацетоксисцирпендиол, 4,15-диацетокси-3",7"-дигидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), 8"-гидроксидиацетоксисцирпеннол (неосоланиол), 1,4-ипомеадиол (1-(3-фурил)-1,4-пентандиол), ипомеанин (1-(3-фурил)-1,4-пентантион), 1-ипомеанол (1-(3-фурил)-1-гидрокси-4-пентанон), 4-ипомеанол (1-(3-фурил)-4-гидрокси-4-пентанон), латеритин, ликомаразмин, монилиформин (калиевая или натриевая соль 1-гидроксициклобут-1-ен-3,4-диона), моноацетоксисцирпеннол (15-ацетокси-3",4"-дигидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), моноацетилниваленол (фузаренон-Х), моноацетилангуидин (4-ацетоксисцирпендиол), неосоланиол (8"-гидроксидиацетоксисцирпеннол, 4,15-диацетокси-3",8"-дигидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), неосоланиола ацетат (8-ацетилнеосоланиол), неосоланиола моноацетат (8-ацетилнеосоланиол), ниваленол (3",4",7",15"-тетрагидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен-8-он), ниваленола диацетат (диацетилниваленол), ниваленола моноацетат (фузаренон-Х), NT-1 токсин (Т-1 токсин, 4",8"-диацетокси-3",15-дигидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), NT-2 токсин (4"-ацетокси-3",8",15-тригидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), Rd токсин (дезоксиниваленол), самбуцинин, сцирпентриол (3",4",15"-тригидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), соланиол (неосоланиол), Т-1 токсин (NT-1 токсин), Т-2 токсин (4",15"-диацетокси-3" гидрокси-8"-(3 -метилбутирилокси)-12,13-эпокситрихотец-9-ен), триацетокси-сцирпендиол (4",8",15"-триацетокси-3",7"-дигидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), триацетокси-сцирпеннол (3",4",15"-триацетокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен), воми-токсин (дезоксиниваленол), яваницин, зеараленол (2,4-дигидрокси-6-(6,10-дигидрокси-транс-1-ундеценил)-бензойной кислоты лактон), зеараленон (6-(10-гидрокси-6-оксо-транс-1-ундеценил)-резорциловой кислоты лактон). Более подробно токсины, продуцируемые *F. oxysporum*, описаны в работах Tatum et al. (Naphthoquinones produced by *Fusarium oxysporum* isolated from citrus. 1985, *Phytochemistry* 24: 457-459), Tatum et al. (Naphthoquinones produced by *Fusarium oxysporum* isolated from citrus. 1987, *Phytochemistry*, 26: 2499-2500), Baker et al. (Novel anthraquinones from stationary cultures of *Fusarium oxysporum*. 1998, *J Ferment Bioeng* 85: 359-361), Thrane (*Fusarium* species on their specific profiles of secondary metabolites, in *Fusarium. Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*, 1989, ed by Chelkowski J, Elsevier, NY, USA, pp 199-225); Baker et al., Antimicrobial activity of naphthoquinones from *Fusaria*, *Mycopathologia* 111: 9-15, 1990; Marasas et al. (Toxigenic *Fusarium* species, identity and mycotoxicology, 1984, Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA), каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано приведенными ниже примерами, которые не следует понимать как имеющие ограничительный характер. Содержание всех ссылок, патентов и опубликованных заявок на патенты, цитируемых на протяжении данного документа, а также графических материалов и перечня последовательностей, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Примеры

Пример 1. Штамм МК7 в естественной окружающей среде.

Встречающийся в природе штамм МК7 в природе всегда связан с водорослями, археями и бактериями и характеризуется средней плотностью менее 0,5 г биомассы в сухом состоянии/л воды источника (фиг. 1). Кроме того, МК7 встречается в природе в виде "стримеров". Purcell и соавт. определяют "стримеры" следующим образом: "Стримеры представляют собой погруженные скопления клеток нитевидной и других морфологий, выступающие в проточную воду из точки прикрепления" (Purcell et al. (2007) *FEMS Microbiology Ecology* 7 60: 456-466). Доля штамма МК7 в процентах от общей биомассы стримеров составляет менее 10%. Кроме того, биомасса штамма МК7 в природе характеризуется тем, что более 30% биомассы составляют клетки в виде макроконидий, которые никогда не обнаруживаются в биоподстилках, полученных способами поверхностной ферментации, описанными в данном изобретении.

Пример 2. Приготовление искусственной питательной среды.

Жидкую среду для МК7-1, используемую в описанных ниже методиках, готовили путем добавления ингредиентов, перечисленных в табл. 1А, к деионизированной воде (18,2 МОм) при температуре 22-30°C с последующим доведением pH до 2,8, при этом pH снижали с помощью 13 н. HCl. pH измеряли с помощью pH-метра и датчика производства компании Oakton Instruments, модель 150 (г. Оринджберг, штат Нью-Йорк, США). Затем среду кипятили в течение 20 мин и оставляли для охлаждения до комнатной температуры (~23°C) перед применением. Непосредственно перед добавлением жидкой среды pH снова проверяли, используя pH-метр и датчик Oakton Instruments 150 и при необходимости снова доводили до pH 2,8.

Жидкую среду для МК7-3 готовили тем же способом, используя ингредиенты, перечисленные в табл. 1В.

В некоторых воплощениях изобретения используемый источник углерода представляет собой не глицерин, а может быть выбран из различных других источников углерода, таких как сахара, глицерин, лигноцеллюлозные материалы, гидролизаты лигноцеллюлозных материалов, городские или сельскохозяй-

зайственные отходы, отходы пищевой промышленности (например, кислая молочная сыворотка), продукты потоков промышленных отходов, отходы картофеля (картофельная кожура, картофельные отбросы, образующиеся в результате его разложения, картофельные обрезки, побитый картофель), отходы крахмала, отходы сахарной свеклы, жом сахарной свеклы, отходы переработки кукурузы (т.е. жидкий кукурузный экстракт), отходы производства биотоплива (отходы производства целлюлозного этанола, органический остаток анаэробного брожения и т.д.). В этих случаях состав питательной среды регулируют, чтобы учесть вклад питательных веществ из используемого источника углерода. Например, если источником углерода являются мелассы, кислая молочная сыворотка или лигноцеллюлоза, необходимые микроэлементы, вероятно, будут частично или полностью обеспечиваться источником углерода, и в питательную среду, возможно, необходимо добавлять только макронутриенты. В других воплощениях избрания источник углерода может быть классифицирован как "пищевого сорта". В этих случаях присутствие микроэлементов и макронутриентов, связанных с источником углерода, не предполагают, поэтому необходимо добавлять все микроэлементы и макронутриенты.

Таблица 1А. Ингредиенты в среде МК7-1, используемой для получения посевной культуры.

Питательная среда для МК7-1

	Для чашек		№		Место	
	Жидкая	Петри	Сорт	товарной	Постав	производ-
	(г/л)	(г/л)		партии	щик	ства
						г. Уолтем, Массачусетс,
NH_4NO_3	12,9	3	ЧДА	144801A	Fisher	США
						г. Сомервилл, Нью-Джерси,
Мочевина	4,3	0,3	ЧДА	A0355726	ACROS	США
			Для		Eiser-	
KH_2PO_4	10	2	реактивов		Golden	
						г. Сент-Луис, Миссури,
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2,6	0,4	ЧДА	53H0276	Sigma	США
			Лаборатор-	5GJ150409		г. Уолтем, Массачусетс,
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	0,3	ный	20A	Fisher	США
Дрожжевой						
экстракт	2	0				
						г. Уолтем, Массачусетс,
Агар	0	15	Технический	5287994	Fisher	

Глицерин	75	60	Пищевой	4O1941042 7A	Duda Energy	США г. Декейтер, Алабама, США
Микронутри енты*	мг/л	мг/л				
FeSO ₄ •7 H ₂ O	9,98	4,99	ЧДА	3562C398	Amresco	г. Солон, штат Огайо, США
ZnSO ₄ •7 H ₂ O	4,4	2,2	Фарм. США/КПХ	61641	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
MnCl ₂ •4 H ₂ O	1,01	0,51		13446-34-9	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
CoCl ₂ •6 H ₂ O	0,32	0,16		7791-13-1	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
CuSO ₄ •5 H ₂ O	0,31	0,16	Технический	114675	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4 H ₂ O	0,22	0,11	ЧДА	68H0004	Sigma	г. Сент-Луис, Миссури, США
H ₃ BO ₃	0,23	0,11	ЧДА	103289	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
ЭДТА, свободная кислота	78,52	39,3	Для электро- фореза	46187	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
pH	pH					
HCl	2,8	4,8	ЧДА	5GK251022	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США

Таблица 1В. Ингредиенты в среде для МК7-3.
Среда для МК7-3

	Жидкая (г/л)	Сорт	№ товарной партии	Постав- щик	Место производства
Мочевина	8,4	ЧДА	A0355726	ACROS	г. Сомервилл, Нью-Джерси, США
KH_2PO_4	10	Для реактивов		Eiser-Golden	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2,6	ЧДА	53H0276	Sigma	г. Сент-Луис, Миссури, США
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2	Лабораторный	5GJ15040 920A	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
Дрожжевой экстракт	2				
Агар	0	Технический	5287994	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
Глицерин	75	Пищевой	4O194104 27A	Duda Energy	г. Декейтер, Алабама, США
Микро- нутриенты*	мг/л				
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	9,98	ACS	3562C398	Amresco	г. Солон, Огайо, США
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	4,4	Фарм. США/КПХ	61641	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,01		13446-34-9	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,32		7791-13-1	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,31	Технически й	114675	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,22	ЧДА	68H0004	Sigma	г. Сент-Луис, Миссури, США
H_3BO_3	0,23	ЧДА	103289	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
ЭДТА, свободная кислота	78,52	Для электро- фореза	46187	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США
	pH				
HCl	2,8	ЧДА	5GK251022	Fisher	г. Уолтем, Массачусетс, США

Пример 3. Способ инокуляции.

Культуры, используемые для инокуляции в лотки, выращивали в биореакторах емкостью 10 л в условиях погруженной ферментации в жидкой среде для МК7-1. Следует отметить, что приемлемы другие размеры биореакторов, и что выбор реактора емкостью 10 л не следует понимать как ограничивающий. Реактор емкостью 10 л был сконструирован из секции, состоящей из прозрачной трубки ПВХ длиной 1,3 м и диаметром 10,16 см с концевой крышкой ПВХ внизу. К этой концевой крышке снизу был присоеди-

нен пластмассовый порт для аэрации/фиттинг с отверстием 3 мм, и к порту для аэрации была присоединена трубка для подачи воздуха. Пластмассовый порт/клапан для отбора проб был присоединен сбоку к прозрачной стенке ПВХ на расстоянии 15 см снизу от нижней концевой крышки. Верх прозрачного реактора ПВХ был покрыт стерильной марлей, которая удерживалась на месте с помощью свободно посаженной концевой крышки ПВХ с отверстием 3 мм, чтобы газы могли выходить из реактора. Собранный биореактор показан на фиг. 2.

Посевную культуру для биореактора емкостью 10 л готовили из архивной исходной культуры ацидофильного штамма МК7 гифомицетов (№ партии 003). Архивная исходная культура состояла из мицелиальной подстилки ацидофильного штамма МК7 гифомицетов, выращенной на стерильной чашке Петри, содержащей плотную среду, состоящую из 1,5% агара (гранулированный агар BD Difco, товарная партия № 5287994, ThermoFisher, г. Уолтем, Массачусетс, США), глицерина и неорганических питательных веществ, как описано в табл. 1 для питательной среды МК7-1 для чашек Петри. Среду с агаром готовили путем кипячения в течение 20 мин, после чего среду оставляли для охлаждения до 50°C, а затем наливали 25 мл этого раствора в стерильную чашку Петри. После охлаждения и затвердевания среды в чашку Петри инокулировали замороженную исходную архивную культуру второго поколения, используя стерильную петлю (нагретую до красного цвета в пламени и охлажденную) для отбора образца из архивной исходной культуры и его посева на чашке Петри (фиг. 3А).

После выращивания в течение 5 суток мицелиальная подстилка полностью выросла над поверхностью среды с агаром (фиг. 3В). Впоследствии культуру замораживали при -80°C. За пять суток до инокуляции в реактор емкостью 10 л исходную чашку Петри извлекали из морозильной камеры и оставляли для уравнивания температуры до комнатной температуры (около 23°C) на 2 ч. Впоследствии мицелиальную подстилку, выращенную на поверхности агара, извлекали стерильным пинцетом (пинцет нагревали в пламени докрасна и охлаждали изопропанолом) и помещали в 350 мл стерильной жидкой питательной среды для МК7-1 в стерильную стеклянную смесительную колбу с перегородкой емкостью 1 л, закрытую стерильной марлевой пробкой. Колбу вращали на лабораторной качалке VWR OS-500 (VWR, г. Раднор, Пенсильвания, США) со скоростью 200 об/мин в течение 5 суток, после чего использовали в качестве посевной культуры для реактора емкостью 10 л.

При подготовке к приему посевной культуры биореактор на 10 л стерилизовали добавлением 330 мл концентрированного раствора гипохлорита Na (отбеливатель Chlorox®=8,25% гипохлорита Na) к 1 л питьевой водопроводной воды в биореакторе и оставляли для уравнивания на двое суток. Через двое суток в реактор добавляли еще 330 мл концентрированного раствора гипохлорита Na. Через сутки разбавленный раствор гипохлорита Na полностью сливали из реактора, и реактор промывали кипяченой водой температуры около 80°C, добавляя 2 л горячей воды и перемешивая вращательными движениями, чтобы промыть все поверхности внутри реактора. После этого промывную воду сливали. В биореактор добавляли 3,5 л стерильной жидкой питательной среды для МК7-1 и барботировали стерильным воздухом (фильтрованным через фильтр 0,2 мкм) со скоростью 400 мл в минуту через порт для аэрации, расположенный снизу реактора. Эти условия барботирования приводили к образованию пузырьков воздуха размером в диапазоне от 3 до 30 мм в диаметре, в результате чего во время выращивания смесь грибных клеток перемешивалась и гомогенно распределялась во всем объеме жидкой питательной среды (свободно плавающие клетки). Эксперименты показали, что более высокая скорость барботирования или меньший размер пузырьков приводили к склонности к росту в виде биопленки, в результате чего формировались комки биомассы, прилипающие к поверхностям биореактора. Таким образом, склонность к росту в виде биопленки нежелательна, поскольку для инокуляции лотковых реакторов желательна гомогенная суспензия клеток. Затем в реактор емкостью 10 л добавляли посевную культуру, выращенную в смесительной колбе емкостью 1 л, используя асептический метод (опрыскивание всех близлежащих поверхностей смесью 70% изопропанола/30% воды перед открытием верха биореактора, не касаясь каких-либо внутренних поверхностей биореактора). Для дополнительного увеличения объема культуры в реакторе емкостью 10 л в реактор добавляли свежую стерильную жидкую питательную среду для МК7-1 после достижения культурой плотности 6 г/л гиговой биомассы в сухом состоянии. При необходимости в добавлении в реактор свежей жидкой питательной среды для МК7-1 ее объем не должен был превышать 9-кратный объем жидкой культуры в реакторе. Гиговую биомассу в сухом состоянии измеряли, отбирая образец через боковой порт биореактора, при этом система аэрации работала и фильтровала известный объем через фильтр с размером пор 0,22 мкм (Millipore, № по каталогу GSWP04700, г. Дармштадт, Германия) с помощью аппарата для вакуумного фильтрования (Millipore, № по каталогу WP6111560, XX1004700, XX1004705, г. Дармштадт, Германия). Предварительно взвешенный фильтр с влажной гиговой биомассой высушивают при 50°C в течение 4 ч в сушилке Benchmark Scientific Incu-Shaker Mini (г. Эдисон, Нью-Джерси, США), а затем взвешивают на весах Mettler Toledo модели MS3035 (г. Колумбус, Огайо, США).

Ацидофильный штамм МК7 в реакторе емкостью 10 л имеет удельную скорость роста около 0,024 ч⁻¹ (фиг. 4), и рост во время экспоненциальной фазы удовлетворяет уравнению

$$x = x_0 \exp^{ut} \quad (\text{Уравнение 1})$$

где x представляет собой конечную биомассу, x_0 представляет собой начальную биомассу, μ представляет собой удельную скорость роста, и t представляет собой время. Для использования в качестве посевной культуры в лотковых реакторах плотность культуры клеток в реакторе емкостью 10 л должна составлять более 6 г/л в сухом состоянии, и она должна находиться в поздней экспоненциальной фазе роста (фиг. 4; экспоненциальный рост представляет собой период роста в культуре, когда количество клеток непрерывно удваивается; поздний экспоненциальный рост представляет собой период непосредственно перед прекращением экспоненциального роста, когда скорость роста клеток начинает снижаться). Если в качестве посевной культуры используют культуральную среду с более низкой плотностью клеток, это приведет к значительно более медленному формированию биоподстилки (лаг-фаза составляет более 2 суток), что, таким образом, нежелательно.

Посевную культуру в данном случае определяют как культуру, по существу, состоящую из свободно плавающих клеток, которые определяют как отдельные клетки, не образующие комков и агрегатов и составляющие около 4 мкм в ширину и 5-20 мкм в длину.

Для инокуляции поверхностных лотковых реакторов для поверхностной ферментации или твердо-фазной поверхностной ферментации жидкую культуру извлекали из реактора емкостью 10 л через порт вблизи нижней части реактора при непрерывном перемешивании путем барботирования. Культуру, используемую в качестве посевной культуры, извлекали асептическим способом путем опрыскивания внутренней части порта смесью 70% изопропанола/30% деионизированной воды, после чего открывали клапан, чтобы слить около 25 культуры, а затем промывали клапан. Этот слив посевной культуры отбрасывали. Посевную культуру добавляют непосредственно в питательную среду для лоткового реактора, как описано в примере 3.

Пример 4. Выращивание штамма МК7 в лотковых реакторах путем поверхностной ферментации.

Ацидофильный штамм МК7 гифомицетов выращивали в плоских лотковых реакторах. Следует отметить, что для идеи настоящего изобретения приемлемы различные размеры лотков. В данном примере внутренние размеры полиэтиленовых лотков составляли 41,27 см в ширину и 61,28 см в длину, а высота боковых стенок составляли 2,54 см (общая площадь поверхности, доступная для роста биоподстилки = 0,253 м²; фиг. 5; Winco, г. Айдахо Фолс, Айдахо, США). Для сведения к минимуму возможной контаминации желательно, чтобы перед использованием лотки были очищены от клеточного дебриса и химических веществ, а также простерилизованы. Впоследствии перед использованием лотки тщательно мыли теплой питьевой водопроводной водой с мылом (50-70°C), тщательно промывали теплой водопроводной водой в течение 1 мин и подтверждали удаление всех остатков мыла. После этого все поверхности лотков опрыскивали смесью 70% изопропанола/30% деионизированной воды (18,2 МОм) до смачивания поверхностей и протирали лотки вручную в перчатках с помощью бумажного полотенца, смоченного в спиртовой смеси. Впоследствии лотки размещали внутри системы штативов так, чтобы указанный лоток мог вмещать и удерживать жидкую среду (как описано ниже), не проливая ее, и оставляли для высыхания.

Система лотков и штативов, используемая для описанного в настоящем документе способа поверхностной ферментации, обеспечивает все необходимые компоненты для формирования биоподстилки. Система штативов, используемая для удерживания лотков реактора, была выполнена из стали с хромо-вым покрытием, 39 штативов для лотков было приобретено у компании Global Equipment Company (г. Чикаго, Иллинойс, США; фиг. 5А, В). Для обертывания и заключения системы штативов и изоляции лотков от окружающего помещения использовали прозрачную полимерную пленку типа Saran® шириной 16 дюймов (Costco, г. Бозмен, Монтана, США). Это позволяло осуществлять контроль условий окружающей среды (влажность, поток воздуха) и свести к минимуму контаминацию (фиг. 5А, В). В заключенный в пленку штатив пропускали стерильный воздух со скоростью 800 мл/мин путем барботирования через 200 мл деионизированной воды (18,2 МОм), температура воды 22-30°C (для увлажнения воздуха) и пропускали через стерилизованный в автоклаве фильтр с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore, № по каталогу SLFG85000, г. Дармштадт, Германия) для удаления микроорганизмов. В идеале скорость воздушного потока такова, что она создает незначительное положительное давление в системе штативов (>0,1 psi), в результате чего количество загрязняющих веществ, попадающих из воздуха в заключенную в пленку систему штативов и лотков, сводится к минимуму до тех пор, пока биоподстилка не достигнет желаемой плотности и/или консистенции.

При этом подстилка из микроорганизмов активна, и клетки дышат, т.е. выделяют углекислый газ и теплоту, а также потребляют кислород. Накопление углекислого газа может уменьшить доступ кислорода и должно быть ограничено. Таким образом, воздушный поток должен быть таким, чтобы выдувать углекислый газ, который выделяется и накапливается в процессе дыхания микроорганизмов.

Кроме того, воздушный поток должен быть таким, чтобы удалять избыточную теплоту, образующуюся в процессе дыхания микроорганизмов, и обеспечивать достаточное количество кислорода дышащим клеткам. Воздушный поток следует регулировать в соответствии с этими потребностями. Например, по мере повышения потребности в случае использования большего количества лотков поток воздуха следует усилить в соответствии с повышенной температурой и потребностями в атмосфере. Воздушный

поток не должен быть слишком сильным, чтобы не нарушать грибные гифы и не ингибировать их рост и функционирование. В идеале воздушный поток в системе лотков приведет в результате к прохождению воздушного потока через лотки. В одном воплощении изобретения воздушный поток можно создавать с помощью фена, который пропускает воздух через фильтр 0,2 мкм, а затем через подстилки. Скорость работы фена и полученный в результате поток воздуха можно контролировать с помощью интеллектуальной системы датчиков/активаторов на основе датчиков температуры, углекислого газа и кислорода, размещенных в штативе.

Во время выращивания температура системы лотков находилась в диапазоне $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Температуру измеряли с помощью системы датчиков с программным обеспечением ThermoScientific Genesys 10S Series, Biomat 3S, Evolution 60S (Thermo Fisher, г. Уолтем, Массачусетс, США). Термопарные датчики помещали на 20 мм внутрь системы лотков и штативов на середине высоты и сверху системы лотков и штативов.

Питательную среду МК7-1 готовили, как описано в примере 2 [добавление питательных веществ, регулирование pH, кипячение и охлаждение до комнатной температуры (около 23°C)]. После приготовления среды получали посевную культуру из реактора для посевной культуры (см. пример 3) и добавляли в соотношении 7,5% (объемное отношение) питательной среды МК7-1 в контейнере. Например, 113 мг посевной культуры добавляли к 1,5 л питательной среды в контейнере. Это соотношение посевной культуры и питательной среды обеспечивает адекватные условия для быстрого роста клеток и формирования подстилки. В этом воплощении изобретения желаемая клеточная биомасса гиф в сухом состоянии после инокуляции свежей питательной среды составляла от 0,45 до 0,75 г/л. Тем не менее для успешного образования биоподстилки в настоящей системе лотков возможно использование плотности в диапазоне от 0,01 до 100 г/л. Уменьшение доли посевной культуры в питательной среде приводит к более медленному росту, как описано в примере 3.

Отношение объема углеродного субстрата к объему питательной среды влияет на полученную в результате скорость продукции биомассы. Как правило, если упомянутое выше отношение слишком мало, скорости роста замедляются из-за отсутствия доступного углерода; т.е. они становятся углерод-лимитированными. Если упомянутое выше отношение слишком велико, полученное в результате осмотическое давление становится слишком высоким, и скорости роста биомассы снижаются. Кроме того, при ограничении углерода полученная в результате плотность биомассы и связность биомассы слишком малы, что уменьшает преимущества для ее обработки и обращения с ней, обеспечиваемые процессом поверхностной ферментации. Например, условия роста штамма гифомицетов, обозначенного как МК7, оптимальны при упомянутом выше отношении 8-15%.

Суспензию питательной среды/клеток перемешивали большой стерилизованной пластмассовой ложкой (длина 30 см, стерилизуют промыванием спиртовой смесью) и добавляли в каждый лоток 1,5 л полученной в результате смеси, используя стерилизованный (промытый спиртовой смесью) градуированный цилиндр. После загрузки всех лотков в систему штативов ее обертывали прозрачной полимерной пленкой.

После 6 суток инкубации толщина полученных в результате биоподстилок составляла от 3 до 10 мм при достаточной прочности на растяжение и структурной целостности, чтобы можно было обращаться с ними, не вызывая их разрыва (фиг. 6). Биоподстилки собирали, сначала удаляя прозрачную полимерную пленку вокруг системы штативов и извлекая лотки из штатива. Биоподстилки извлекали из лотков вручную, помещали в лоток из термостойкого стекла Рутех 12,7×23 см и осторожно промывали в течение двух минут водопроводной водой питьевого качества. Промытые биоподстилки либо оставляли на стеклянном лотке и высушивали, либо помещали в полимерный пакет емкостью 3,7 л и замораживали. Для высушивания биоподстилки помещали в сушильный шкаф с контролируемой температурой и нагревали при $60 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 45 мин для инактивации множества ферментов и ограничения биохимических преобразований внутри подстилки с последующим нагреванием при $50 \pm 1^\circ\text{C}$ до тех пор, пока масса в сухом состоянии не переставала изменяться (приблизительно 48-72 ч). Средние значения массы биоподстилок в сухом состоянии, полученных в описанных выше условиях, составляли 81 г гифовой биомассы в сухом состоянии на лоток для ацидофильного штамма МК7 гифомицетов. Это эквивалентно 54 г/л, площади поверхности 324 г/м^2 и продуктивности 0,37 г/л/ч. Среднее содержание влаги в невысушенной биоподстилке составляло 0,17 гифовой биомассы в сухом состоянии/г или 83% жидкости.

Клеточный рост в лотках обычно осуществляется в соответствии с кривой роста, показанной на фиг. 7. Клетки растут в свободно плавающем состоянии (гомогенно/равномерно распределенные клетки во всем объеме среды) до времени выращивания около 48 ч. Через 48 ч клетки образуют агрегаты на поверхности питательной среды и начинают образовывать биопленку; иными словами, подстилку из микроорганизмов, в которой клетки переплетены и сцеплены вместе. Сначала эта подстилка представляет собой очень тонкую кожицу, но продолжает быстро расти, пока какой-либо лимитирующий фактор, например недостаток углеродного субстрата или другого питательного вещества, не ограничит рост.

В связи с чувствительностью биоподстилки к нарушению и последующему замедлению роста важно, чтобы лотки оставались ненарушенными, и целостность биоподстилки сохранялась в течение всего

периода выращивания. Нарушения, влияющие на биоподстилку, включают чрезмерное встряхивание лотка, приложение давления к биоподстилке, нанесение жидкости на поверхность биоподстилки, быстрый воздушный поток через биоподстилку, нарушение целостности, разрушение или сдавливание гифы или физический разрыв самой подстилки. В результате нарушений такого типа утрачиваются преимущества выращивания биоподстилки, включающие высокие скорости роста и высокую степень накопления гифовой биомассы на объем жидкости и площадь поверхности.

Предложена гипотеза, что воздушные гифы и мицелии играют важную роль в обеспечении кислорода для дыхания клеток во всей биоподстилке. Таким образом, формирование, рост и функции воздушных гиф/мицелиев важны для быстрого роста биоподстилки. Следовательно, любое нарушение, которое влияет на формирование или рост этих гиф/мицелиев приводит в результате к ухудшению роста биоподстилки.

Описанные выше способ поверхностной ферментации и питательная среда обеспечивают необходимые компоненты для формирования биоподстилки и обеспечивают быстрый рост. С использованием описанных выше концепций было проведено испытание широкого ряда лотковых систем, и была получена почти эквивалентная продуктивность на единицу площади. Например, при использовании 7,5% глицерина и соотношения 10:1 C:N по мере увеличения площади поверхности биореакторов от 0,02 до 1 м² продуктивность оставалась постоянной и равной 44 г/м²/сут в течение фазы роста.

Пример 5. Влияние размера лотка на рост и продуктивность гифомицетовой биоподстилки.

Для испытания влияния размера лотка на рост и продуктивности биоподстилки гифомицетовые биоподстилки штамма МК7 выращивали на питательной среде МК7-1 с 7,5% глицерином в стеклянных лотках Rutex® 0,02 м², полипропиленовых лотках 0,25 м² и лотке с полимерной выстилкой 1,77 м². Отношение объема жидкой среды к площади поверхности составляло 6 л/м² для всех экспериментов. Размер лотка оказывал лишь минимальное влияние на скорости роста, и после 6 суток наблюдалась линейная скорость роста (фиг. 8). Продуктивность биомассы в сухом состоянии составляла 1,32, 1,54 и 1,57/м²/ч для лотков 0,02, 0,25 и 1,77 м² соответственно.

Пример 6. Рост штамма МК7 на различных питательных средах.

Характеристики ацидофильного штамма МК7 гифомицетов (т.е. скорость роста, плотность клеток, эффективность конверсии субстрата, формирование подстилки) резко изменялись в зависимости от выбора ростовой среды и при выращивании культуры в условиях ТФФ/погруженной ферментации и ПТФФ/поверхностной ферментации. Ацидофильный штамм МК7 гифомицетов культивировали на питательной среде МК7А предшествующего уровня техники (май 2009 г. - ноябрь 2012 г.), первоначально разработанной для имитации химического состава, обнаруживаемого в естественной окружающей среде организма в Йеллоустонском национальном парке, но с повышенными концентрациями азота, фосфора, кальция и магния в соответствии с источником питательных веществ, выявленным как предпочтительный для других гифомицетов (табл. 2; МК7А). Питательная среда МК7-1 была разработана для усиления и улучшения характеристик роста ацидофильного штамма МК7 гифомицетов, особенно в отношении формирования биоподстилки путем поверхностной ферментации (табл. 2). В частности, было повышено содержание фосфата, кальция и магния и добавлен дополнительный источник азота (мочевина). Повышение концентрации кальция, магния и добавление мочевины особенно увеличивало скорости роста и усиливало формирование подстилки.

Таблица 2. Химические компоненты питательной среды МК7А предшествующего уровня техники (погруженная ферментация) по сравнению с питательной средой для погруженной ферментации МК7-1, предназначенной для формирования гифовой биомассы высокой плотности путем поверхностной ферментации

Питательная среда МК7А		Модифицированная питательная среда МК7А	
	г/л		г/л
NH ₄ NO ₃	3,5	NH ₄ NO ₃	12,9
		Мочевина	4,3
KH ₂ PO ₄	2,0	KH ₂ PO ₄	10,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,4	CaCl ₂	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,0
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,5		
		Микроэлементы*	мг/л
Микроэлементы*	мг/л	FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,99
FeCl ₃ ·8H ₂ O	20,00	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,20
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,51
CoSO ₄	0,01	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,16
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,05	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,16
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,03	(NH ₄) ₆ MoO ₇ ·4H ₂ O	0,11
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	4,50	H ₃ BO ₃	0,11
VOSO ₄ ·2H ₂ O	0,03	ЭДТА, свободная кислота	39,3
Глюкоза г/л	40,0	Глюкоза г/л	125,0
pH	2,5	pH	2,8
Отношение C:N	16,3	Отношение C:N	7,5

Первоначальные эксперименты с питательной средой МК7А проводили исключительно в условиях погруженной ферментации в смесительных колбах. Максимальные скорости роста, эффективность конверсии (г углеродного субстрата, преобразованного в гифовую биомассу) и самая высокая гифовая биомасса, которые были получены в этих условиях, составляли 0,072 г/л/ч; 22% и 8,6 г/л соответственно (табл. 3).

Таблица 3. Характеристики роста ацидофильного штамма МК7 гифомицетов в различных условиях

Биореактор	Источник углерода	Средняя скорость роста (г/л/ч)	Максимальная продуцируемая биомасса, г/л	Максимальная продуцируемая биомасса, г/м ²	Максимальная продуцируемая биомасса, г/м ² /сутки	Максимальная продуцируемая биомасса (сутки)	Эффективность конверсии
Погруженный, с аэрацией	Минимальная 4% глюкоза	0,072	8,6			5	22%
Погруженный, с аэрацией	4% глюкоза МК7-1	0,126	15,1			5	38%
Погруженный, с аэрацией	7,5% глицерин МК7-1	0,28	24,1	23			31%
Лоток 0,02 м ² – 100 мл	4% глюкоза МК7-1	0,135	19,5	110	18,3	6	49%
Лоток 0,02 м ² – 100 мл	12,5% глицерин МК7-1	0,44	64,7	324	52,9	6	52%
Лоток 0,25 м ² – 1,25 л	12,5% глицерин МК7-1	0,46	66,2	331	55,2	6	53%

Чтобы увеличить плотность клеток, питательную среду МК7А использовали в сочетании с условиями поверхностной ферментации. Биоподстилки формировались при концентрации углерода 4-15% для глюкозы или сахарозы и 4-30% для глицерина. Было обнаружено, что мочевина повышает продуктивность в условиях поверхностной ферментации, и альтернативными источниками NH₄ являются NH₄NO₃, NH₄PO₄, NH₄SO₄. Добавление мочевины обладает преимуществами в связи с более низкими ценами на рынке по сравнению с другими источниками NH₄. Было обнаружено, что для повышения плотности гифовой биомассы вплоть до 180 г/л (плотность после извлечения биоподстилки из лотка) и оптимизации скорости роста идеален субстрат, содержащий 12,5% углеродного субстрата.

Биоподстилki высокой плотности, полученные в условиях поверхностной ферментации и питательной среды МК7-1, обладают рядом преимуществ по сравнению с условиями погруженной ферментации (с любой питательной средой), включающих: (1) повышенную плотность гифовой биомассы вплоть до 180 г/л (плотность после извлечения биоподстилki из лотка) по сравнению с максимальной плотностью 24,1 г/л при погруженной ферментации (табл. 3), (2) повышенные скорости роста вплоть до 0,46 г/л/ч по сравнению с максимальными скоростями 0,28 г/л/ч в условиях погруженной ферментации, (3) повышенную плотность углеродного сырья от 7,5 до 12,5% для максимальных скоростей роста, (4) значительно облегченные условия сбора гифовой биомассы, особенно при получении гифовой биомассы высокой плотности (например отсутствие необходимости в центрифугировании), (5) отсутствие необходимости в аэрации гифовой биомассы по сравнению с объемными сложными биореакторами с аэрацией для погруженной ферментации, (6) улучшение масштабируемости и возможности расширения при использовании лотковых поверхностных систем по сравнению с коммерческими погруженными ферментерами очень большого объема, (7) меньшее количество жидких отходов.

Уменьшение отношений C:N до менее 10:1 также обладало высоким преимуществом продукции гифовой биомассы и повышенных уровней белков по сравнению с липидами. Питательная среда МК7А предшествующего уровня техники была разработана для продукции липидов ацидофильным штаммом МК7 гифомицетов, особенно при отношениях C:N выше 30:1. Изменение отношений C:N наряду с изменением условий культивирования позволяет отрегулировать концентрации липидов в биомассе ацидофильного штамма МК7 гифомицетов от 5 до вплоть до 60% массы биомассы. Профили жирных кислот гифовой биомассы, полученной на питательных средах МК7А и МК7-1, были очень сходными при использовании различных простых углеродных субстратов (например, глицерина, глюкозы, сахарозы), но было обнаружено, что при повышении температуры увеличивается концентрация полиненасыщенных жирных кислот, при этом концентрация омега-3 линоленовой кислоты увеличивается со временем при более низких относительных температурах (фиг. 9).

Пример 7. Рост штамма МК7 на питательных средах МК7А и МК7-1.

Гифомицетовые биоподстилki штамма МК7 получали в условиях поверхностной ферментации с использованием питательных сред МК7А и МК7-1 либо с сахарозой, либо с глицерином в качестве источника углерода (сырья). Для оценки гифомицетовых биоподстилок, полученных с питательными средами МК7А и МК7-1, готовили питательные среды пяти различных композиций: 1) 4% сахароза в питательной среде МК7А, 2) 4% сахароза в питательной среде МК7-1, 3) 4% глицерин в питательной среде МК7А, 4) 10% глицерин в питательной среде МК7-1 и 5) 12,5% глицерин в питательной среде МК7-1. pH всех пяти композиций питательной среды доводили до 2,7 с помощью добавления соответствующих количеств HCl с последующим кипячением в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры (около 23°C) в каждый вид питательной среды добавляли 7,5% объем/объем посевной культуры штамма МК7 в экспоненциальной фазе роста. pH снова доводили до 2,7 и добавляли аликвоты по 250 мл инокулированной питательной среды в продезинфицированные стеклянные лотки Рутех® 0,023 м².

Впоследствии лотки помещали в систему штативов для лотков и оставляли для инкубации смеси с посевной культурой при 23±1°C.

На основании результатов предшествующих экспериментов ожидали, что биомасса будет формироваться при всех комбинациях питательных сред. Также ожидали, что биомасса будет формироваться быстрее на питательной среде МК7А относительно питательной среды МК7-1. Это связано с более благоприятными условиями химического состава питательной среды МК7А для роста (например, более низкая ионная сила/осмотическое давление, более низкая концентрация аммония). Однако со временем скорость роста гифомицетовых биоподстилок, развивающихся на поверхности питательной среды МК7-1, увеличится по сравнению с биомассой, выращиваемой на питательной среде МК7А. Таким образом, обе системы характеризуются различными кривыми роста на питательной среде МК7-1, демонстрируя более быстрый рост на раннем этапе с последующим снижением скорости роста на последующих этапах. Напротив, гифомицетовые биоподстилki, выращенные на питательной среде МК7-1, сначала характеризовались относительно более медленным ростом на более ранних этапах выращивания с последующими крайне высокими скоростями роста на более поздних этапах выращивания биомассы. В конечном счете, гифомицетовые биоподстилki, выращенные на питательной среде МК7-1, становились более плотными и имели большую прочность на растяжение, чем биоподстилki, выращенные на питательной среде МК7А. Ожидают, что значительно более низкие концентрации питательных веществ в питательной среде МК7А (например, N, P, K) приведут в результате к более раннему ограничению питательных веществ, вызывая ингибирование роста биоподстилок, поэтому они не являются настолько плотными и прочными, как биоподстилki, полученные на питательной среде МК7-1.

Пример 8. Структура биоподстилок, продуцируемых штаммом МК7.

Структуру биоподстилок определяли с помощью световой микроскопии в проходящем свете. В данном случае биоподстилki были получены из штамма МК7, выращенного в течение 5 суток на питательной среде МК7-1 с 7,5% глицерином.

Биоподстилki собирали, замораживали (-20°C) и резали на квадратные блоки 1×1 см, после чего за-

ливали в 10% желатин (желатин марки Sigma G2500-3000 Bloom, Sigma-Aldrich, г. Сент-Луис, Миссури, США) в криоформах (VWR 25608-916, г. Раднор, Пенсильвания, США). Образец ткани в желатине подвергали быстрому замораживанию, подвергая криоформы воздействию паровой фазы жидкого азота в бане с жидким азотом, после чего помещали при -20°C с вечера до утра.

Криосрезы получали на криостате Leica модели 39475214 (Leica, г. Ветцлар, Германия). Образцы извлекали из криоформ и покрывали средой ОТС для замораживания тканей (Leica 14020108926), после чего получали криосрезы толщиной 10-50 мкм. Срезы образцов визуализировали и получали изображения с помощью световой микроскопии в проходящем свете (микроскоп: Zeiss AxioObserver; камера: Zeiss AxioCam HRC, Carl Zeiss, г. Оберкохен, Германия).

Для глицериновых подстилок наблюдали по меньшей мере два отчетливых слоя: (а) плотный нижний слой и (б) слой воздушных гиф. В некоторых образцах было видно по меньшей мере три структурно различающихся слоя: (а) плотный нижний слой, (б) слой воздушных гиф и (с) слой переходной зоны (см. фиг. 10А и В). Как правило, наиболее преобладающим визуально является слой воздушных гиф, за ним следует плотный нижний слой, при этом слой переходной зоны, если он присутствует и/или видим, является наименее преобладающим. В некоторых случаях, например, биоподстилки, показанной на фиг. 10А, визуальное соотношение (а) плотного нижнего слоя, (б) слоя воздушных гиф и (с) слоя переходной зоны составляло около 3,86 к около 9,43 к около 1. В другом образце, таком как биоподстилка, показанная на фиг. 18В, отношение составляло около 1,7 к около 3,7 к около 1. На фиг. 18С отчетливо видимый слой переходной зоны отсутствует.

Дополнительное оптическое изображение биоподстилки, выращенной на питательной среде МК7-3, не показывает присутствие липидов или пигментов в верхнем слое воздушных гиф по сравнению с плотным нижним слоем (фиг. 11А и 11В). Обнаружено, что воздушные гифы проходят от подстилки, и каждая выходит в атмосферу без жидкости между гифами. Этим они отличаются от гиф/мицелиев в другом(-их) слое(-ях) подстилки, который(-ые) отделяется(-ются) жидкостью и/или внеклеточным полисахаридным/белковым матриксом. Воздушные гифы ответственны за перенос кислорода и CO_2 . Доступность кислорода приводит в результате к поглощающим кислород гифам в верхнем слое воздушных гиф. Эти воздушные гифы оказываются длиннее, чем гифы/мицелии, обнаруживаемые в нижнем(-их) слое(-ях) подстилки (сравнение фиг. 11В с 11С). Воздушные гифы верхнего слоя также склонны к преобладанию вертикальной ориентации, т.е. к перпендикулярной ориентации по отношению к границе раздела гифомицетовой биоподстилки с воздухом.

Вертикальная ориентация не настолько преобладает в гифах плотного нижнего слоя (фиг. 11С). В данном случае гифы склонны к переплетению и имеют смешанные ориентации с преобладанием горизонтальных ориентаций. Оказалось, что гифы нижнего слоя также содержат пурпурный пигмент, который был не виден в верхнем слое воздушных гиф. Предварительные эксперименты показали, что нижний слой содержит приблизительно 30% липидов, а гифы заключены в белковом и/или полисахаридном матриксе. Гифы нижнего слоя также являются основной областью запасаения пигментов, липидов, углеводов и белка.

Биоподстилки, полученные из штамма МК7, выращенного на (1) питательной среде МК7-1 и (2) питательной среде МК7-3, собирали после 5 суток и замораживали при -20°C . Толщина обеих биоподстилок находилась в интервале от 2 до 4 мм. Из двух замороженных биоподстилок получали срезы площадью один см^2 в трех повторностях, а затем разрезали их пополам в поперечном направлении с получением поперечных срезов верхней и нижней половины, толщина каждого приблизительно 1,5 мм.

Средняя плотность биоподстилки, выращенной в питательной среде МК7-1, составляла $0,131 \text{ г/см}^3$ для верхнего поперечного среза (стандартное отклонение= $0,068$) и $0,311 \text{ г/см}^3$ для нижнего поперечного среза (стандартное отклонение= $0,032$). Отношение плотности верхнего и нижнего поперечного среза составляло 0,42.

Для биоподстилки, выращенной в питательной среде МК7-3, средняя плотность верхнего поперечного среза составляла $0,102 \text{ г/см}^3$ (стандартное отклонение= $0,048$), плотность нижнего поперечного среза составляла $0,256 \text{ г/см}^3$ (стандартное отклонение= $0,010$). Отношение плотности верхнего и нижнего поперечного среза составляло 0,40.

Пример 9. Структура биоподстилок, продуцируемых штаммом МК7.

Проводили оценку прочности на растяжение биоподстилки МК7, выращенной в течение 5 суток на питательной среде МК7-3. В данном случае использовали биоподстилку шириной 25,4 см, длиной 46 см, толщиной 3,5 мм. Содержание влаги в подстилке составляло около 85%, что эквивалентно приблизительно 15% массы в сухом состоянии. Общая масса в сухом состоянии составляла 70 г/лоток $0,25 \text{ м}^2$ или 280 г/м^2 . Плотность подстилки составляла $0,08 \text{ г/см}^3$.

Для измерения прочности на растяжение один конец подстилки закрепляли с помощью зажима в стационарном положении, при этом другой конец присоединяли с помощью зажима к свободно перемещающемуся аппарату. Сам свободно перемещающийся аппарат был присоединен к шкале, измеряющей прилагаемое растяжение. К подстилке прилагали стабильное и медленное растяжение путем вытягивания на шкале в течение нескольких секунд до разрыва подстилки. Измеренное растяжение, требующееся для разрушения/раскола/разрыва подстилки, находилось в диапазоне от $0,28 \text{ кг/2,54 см}$ ширины подстилки до $0,58 \text{ кг/2,54 см}$ ширины подстилки, что эквивалентно диапазону от $0,11 \text{ кг/см}$ ширины подстилки до $0,23$

кг/см ширины подстилки. Среднее значение составляло 0,5 кг/2,54 см ширины подстилки или 0,2 кг/см ширины подстилки.

Пример 10. Рост биоподстилок штамма МК7 на неочищенном глицерине.

Плотные биоподстилки штамма МК7 были получены за 8 суток с использованием неочищенного глицерина в качестве источника углерода и источника питательных веществ (сырья). Неочищенный глицерин, являющийся побочным продуктом производства биодизельного топлива, был получен от компании W-2 Fuels (код продукта GL32000, серия 4300, № по CAS 56-81-5, г. Эйдриан, Миннесота, США). Неочищенный глицерин состоял из 75-85% глицерина, 2-10% воды, 2-5% солей, 1-2% жиров, масел или сложных эфиров и менее 1% метанола.

7,5% (масса/объем) раствор неочищенного глицерина в водопроводной воде питьевого качества дополняли солями питательной среды МК7-1 либо полной концентрации, либо $\frac{1}{2}$ концентрации до получения 11 л питательной среды МК7-1 полной концентрации и $\frac{1}{2}$ концентрации. pH этих растворов доводили до 4,8 с последующим кипячением в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры (около 23°C) в питательную среду добавляли 5% (объем/объем) посевной культуры штамма МК7, подготовленной, как описано в примере 3. pH снова доводили до 4,8 и добавляли аликвоты по 1,5 л инокулированной питательной среды с неочищенным глицерином в продезинфицированные полипропиленовые лотки 0,25 м², после чего лотки помещали в систему штативов.

Смеси инкубировали при 23±1°C, и через 8 суток получили гибкие, относительно плотные биоподстилки, толщина которых составляла около 4 мм, после чего их собирали. Биоподстилки высушивали при 50°C в течение 72 ч, и их средние значения массы в сухом состоянии ± стандартное отклонение составляли 30,3±3,1 г (n=6) для эксперимента с питательной средой полной концентрации и 30,2±2,8 г (n=8) для эксперимента с питательной средой $\frac{1}{2}$ концентрации. Средняя конверсия глицерина в массу биоподстилки в сухом состоянии составляла 34%, а плотность биоподстилок во влажном состоянии в расчете на биомассу в сухом состоянии составляла 0,03 г/см² для обоих экспериментов.

Пример 11. Гифальная/мицелиальная структура биоподстилок штамма МК7, выращенных на гидролизатах пшеничной барды.

Уплотненные гифомицетовые биоподстилки штамма МК7 были получены в течение 7 суток с использованием гидролизатов пшеничной барды (ds, от англ. distillers solubles) в качестве источника углерода и питательных веществ (сырья). Пшеничные ds состояли из 31,5% белка, 8,6% масла, 2,8% крахмала, 13,5% сахара, 2,7% волокон, 8,5% золы, 0,19% кальция, 0,29% магния, 1,7% калия, 0,78% фосфора и 3,5% сульфата. Готовили эксперименты с двумя видами ростовой среды: В эксперименте 1 использовали 5% массы ds в сухом состоянии в воде, а в эксперименте 2 использовали 5% массы ds в сухом состоянии в растворе солей питательной среды МК7-1 $\frac{1}{2}$ концентрации. pH смесей доводили до 3,4. Смесей инокулировали 7,5% (объем/объем) посевной культуры штамма МК7, как описано в примере 3, и добавляли 175 мл этой среды добавляли в простерилизованные спиртом полимерные лотки 12,7x12,7 см. Гифомицетовые биоподстилки собирали после 7 суток инкубации при комнатной температуре (около 23°C). Толщина биоподстилок, выращенных на 5% ds в качестве единственного источника углерода и питательных веществ (эксперимент 1, без солей МК7-1), в среднем составляла 2,7 мм (n=3 лотка), их отчетливое расслоение не показано, и масса в сухом состоянии в среднем составляла 0,83 г при средней плотности 0,019 г/см³ и эффективности конверсии приблизительно 10%. Воздушные гифы не наблюдались, и подстилки были во всем объеме насыщены жидкостью; т.е. верхняя поверхность подстилок находилась вровень с поверхностью жидкости.

Толщина биоподстилок, выращенных на 5% ds с добавлением солей МК7-1 (эксперимент 2), в среднем составляла 6,4 мм, а их масса в сухом состоянии в среднем составляла 3,11 г при средней плотности 0,030 г/см³ и эффективности конверсии приблизительно 40%. В этих подстилках развивалась обширная система пышных воздушных гиф белого цвета, толщина которых составляла около 4-7 мм, над отчетливым более плотным слоем, толщина которого составляла 0,9 мм. Плотность верхнего слоя составляла 0,011 г/см³, а плотность нижнего слоя составляла 0,148 г/см³.

Пример 12. Рост гифомицетовых биоподстилок штамма МК7 на кукурузном экстракте и смеси кукурузного экстракта с крахмалом в качестве источника углерода и питательных веществ.

При использовании кукурузного экстракта в качестве единственного источника углерода и питательных веществ (сырья) плотные гифомицетовые биоподстилки штамма МК7 были получены уже в течение 4 суток. Кроме того, было также показано, что при использовании кукурузного экстракта с добавлением 5% крахмала также можно получить плотные гифомицетовые биоподстилки. Кукурузный экстракт представляет собой вязкий побочный продукт влажного размола кукурузы и имеет состав аминокислот, витаминов и минералов, который делает его пригодным в качестве добавки для ферментации микроорганизмов. Используемый в данном примере кукурузный экстракт приобретали в компании Santa Cruz Biotechnology, Inc. (г. Даллас, Техас, США; № товарной партии B0116). В этих экспериментах продемонстрировано использование кукурузного экстракта в качестве заменителя питательных веществ МК7-1. Эксперименты включали 10 и 20% кукурузный экстракт в качестве единственного источника углерода и питательных веществ, а 10 и 20% кукурузный экстракт с добавлением 5% крахмала (в каж-

дый) предоставлял крахмал в качестве дополнительного источника углерода для роста гифомицетовой биоподстилки.

Четыре серии питательной среды готовили путем добавления 10 или 20% кукурузного экстракта к объемам 1 л, содержащим 0 или 50 г крахмала в сухом состоянии. pH питательной среды доводили до 3,6 добавлением соответствующего количества HCl и кипятили в течение 15 мин в подходящей емкости. После охлаждения до комнатной температуры pH смеси повторно доводили до 3,6, и смесь инокулировали 7,5% посевной культурой штамма МК7, подготовленной, как описано в примере 3. Аликвоты питательной среды по 175 мл добавляли в пять квадратных лотков (площадь поверхности 0,016 м² на лоток) и инкубировали в системе штативов при 23±1°C. Гифомицетовые биоподстилки собирали через 6 суток. Средний конечный pH для экспериментов с кукурузным экстрактом концентрации 10, 20, 10% с добавлением крахмала и 20% с добавлением крахмала составлял 3,97, 3,69, 4,23 и 4,15 соответственно. Средняя масса биомассы±стандартное отклонение для этих экспериментов составляла 1,1±0,2, 0,1±0,1, 2,3±0,1 и 2,1±0,2 г соответственно.

Пример 13. Конверсия воды из отстойного бассейна площадки для откорма крупного рогатого скота в гифомицетовые биоподстилки.

Эксперименты проводили с использованием воды из отстойного бассейна площадки для откорма крупного рогатого скота в качестве единственного источника углерода и питательных веществ. Первоначальное содержание растворенного органического углерода в воде составляло 4 г/л, а первоначальное общее содержание растворенного азота составляло 0,8 г/л.

Воду из отстойного бассейна площадки для откорма доводили до pH 2,6 концентрированной HCl и инокулировали 7% посевной культурой штамма МК7, подготовленной, как описано в примере 3. Стерилизованные полипропиленовые лотки 0,25 м наполняли 1,5 л инокулированной сточной воды и помещали в систему штативов для лотков для инкубации при 24±1°C. Через 2 суток после инокуляции на поверхности жидкости начинали формироваться гифомицетовые биоподстилки. Через десять суток собирали гифомицетовые биоподстилки и остаточную жидкость в один сосуд и высушивали, после чего проводили анализ общего содержания C и N с помощью анализатора общего содержания C и N Costech (ECS 4010, Costech Analytical Technologies, г. Валенсия, Калифорния, США). Средняя продуцируемая биомасса в сухом состоянии на один лоток составляла 6,531 г (n=2). В анализах подстилки и остаточной жидкости было выявлено, что подстилками было извлечено около 77% углерода и 99-100% азота из сточной воды отстойного бассейна площадки для откорма (предел обнаружения метода около 1%). Скорости извлечения углерода и азота системой составляли 6,8 и 1,2 мг/л/ч при усреднении за 10-суточный период. В соответствии с настоящим пониманием путем подкисления отстойного бассейна до pH 2,6 HCl и инокуляции штаммом МК7 из сточных вод откормочной площадки может быть извлечена большая часть C и почти весь N.

Кроме того, возможно очищать отстойные бассейны непосредственно, в результате чего в месте площадки для откорма на поверхности воды образуется плавающая гифомицетовая биоподстилка, которую впоследствии можно собрать для последующего применения.

Пример 14. Рост биоподстилок штамма МК7 на суррогатной питательной среде на основе кислой молочной сыворотки.

Плотные биоподстилки штамма МК7 были получены из суррогатной питательной среды на основе кислой молочной сыворотки (AWS, от англ. Acid Whey Surrogate Medium) за 7 суток. Композиция среды AWS была основана на обычной композиции кислой молочной сыворотки, как описано в работе Tsakali и соавт. (2010). Композиция питательной среды Tsakali и питательной среды AWS, используемой в данном примере, описана в табл. 4.

Биоподстилки были получены в стерилизованных полипропиленовых лотках 12,7×12,7 см (0,016 м²) с использованием 87 мл питательной среды AWS pH 4,8. Питательную среду готовили путем смешивания ингредиентов, перечисленных в табл. 4, в колбе Эрленмейера емкостью 1 л, доведения pH до 4,8, а затем кипячения в течение 10 мин. После охлаждения питательной среды до около 23°C в колбу добавляли 7,5% объема (объем/объем) посевной культуры в экспоненциальной фазе роста. Эта посевная культура была получена, как описано в примере 3. Аликвоты по 87 мл инокулированной культуральной среды добавляли в протертые изопропиловым спиртом лотки (пример 3) и помещали эти лотки на лоток большего размера (0,25 м²), установленный в системе штативов для лотков, как описано в примере 3. Культуры оставляли для инкубации при 25±1°C с получением в результате относительно плотных биоподстилок, которые собирали через 7 суток (фиг. 18). Средняя арифметическая величина pH остаточной жидкости через 7 суток составляла 6,9±0,1. Таким образом, в процессе роста происходила нейтрализация pH AWS от 4,8, характерного для кислой молочной сыворотки, до почти нейтрального (около 7). С помощью световой микроскопии в проходящем свете была выявлена гифовая природа биоподстилок, образовавшихся на питательной среде AWS (фиг. 18). Средняя толщина биоподстилок во влажном состоянии составляла 4±0,5 мм. Биоподстилки высушивали при 50°C в течение 30 ч, и полученная в результате средняя масса в сухом состоянии составляла 1,88±0,2 г/л. Средняя плотность биоподстилок во влажном состоянии составляла 0,29 г/см³. Средняя конверсия сухого сырья (лактозы и суммарных белков) в сухую

биоподстилку составляла 42,2%.

Табл. 4 - композиция обычной молочной сыворотки, как описано в работе Tsakali и соавт., 2010, и суррогатной питательной среды на основе кислой молочной сыворотки (AWS), используемой в данном примере для выращивания биоподстилки МК7.

	Таблица 4	
	Tsakali	AWS
	(%)	(%)
Содержание влаги	94,5	94,5
Содержание сухого вещества	5,5	5,5
Лактоза	4	4
Молочная кислота	0,4	0
Общее содержание белка*	1	1
Лимонная кислота	0,1	0,1
Минералы**	0,6	1,3
pH	4,8	4,8

* источником общего белка для AWS был концентрат белка пшеницы в виде 100% белка пшеницы GNC ProPerformance от компании GNC, г. Питтсбург, Пенсильвания, США;

** минеральная композиция AWS представляла собой питательную среду МК7-1 $1/2$ концентрации, описанную в табл. 1А, но без глицерина.

Пример 15. Рост биоподстилок штамма МК7 на кислой молочной сыворотке.

Биоподстилки штамма МК7 выращивают в течение 6 суток, используя кислую молочную сыворотку в качестве основного источника углерода и питательных веществ. Биоподстилки получают в стерилизованных полипропиленовых лотках $12,7 \times 12,7$ см ($0,016 \text{ м}^2$) с использованием 125 мл неочищенной кислой молочной сыворотки, которая была подвергнута различным видам обработки. Эти виды обработки проводили для количественной оценки скорости роста и продуктивности биомассы после доведения pH, добавления отдельных питательных веществ и/или нагревания для сведения к минимуму конкурентных микроорганизмов.

Объемы кислой молочной сыворотки 500 мл добавляют в предварительно стерилизованные колбы Эрленмейера емкостью 1 л (нагреванием до 125°C в течение 10 мин), и жидкую среду подвергают определенным видам обработки (1-12), приведенным в табл. 5. pH либо не доводят (средний pH кислой молочной сыворотки составляет 4,8), либо доводят до pH 2,7 концентрированной HCl. Обработки добавлением питательных веществ включают: отсутствие добавления, 2,5 г/л мочевины в качестве источника азота или питательной среды МК7-1 $1/2$ концентрации в качестве полного набора питательных веществ, приготовленного в жидкости на основе кислой молочной сыворотки, как описано в примере 1, без глицерина. Стерилизацию нагреванием проводят путем кипячения жидкой питательной среды на основе кислой молочной сыворотки в течение 15 мин после проведения других видов обработки (pH и/или добавления питательных веществ). После охлаждения питательной среды до около 23°C в колбу добавляют 7,5% объема (объем/объем) посевной культуры в экспоненциальной фазе роста. Эту посевную культуру получают, как описано в примере 3. Аликвоты по 125 мл инокулированной культуральной среды добавляют в протертые изопропиловым спиртом лотки (см. процедуру стерилизации в примере 3) и помещают эти лотки на лотки большего размера ($0,25 \text{ м}^2$), установленные в системе штативов для лотков, как описано в примере 3. Культуры оставляют для инкубации при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение по меньшей мере 6 суток.

Таблица 5. Матрица обработки, используемая для количественной оценки кислой молочной сыворотки в качестве питательной среды для выращивания биоподстилок штамма МК7

Обработка	рН	Питательное	
		вещество	Нагревание
		Добавление	Стерилизация
1	не доводят	нет	нет
2	не доводят	нет	да
3	не доводят	Мочевина	нет
4	не доводят	Мочевина	да
5	не доводят	1/2 МК7-1	нет
6	не доводят	1/2 МК7-1	да
7	2,7	нет	нет
8	2,7	нет	да
9	2,7	Мочевина	нет
10	2,7	Мочевина	да
11	2,7	1/2 МК7-1	нет
12	2,7	1/2 МК7-1	да

Пример 16. Рост гифомицетовых биоподстилок штамма МК7 на органическом остатке анаэробного брожения.

Плотные биоподстилки штамма МК7 были получены за 7 суток с использованием органического остатка анаэробного брожения в качестве источника углерода и источника питательных веществ (сырья). Органический остаток анаэробного брожения представляет собой богатый лигнином твердый остаток, который остается после ферментации богатой лигноцеллюлозой биомассы (например, кукурузной соломы, пшеничной соломы, навоза крупного рогатого скота) микроорганизмами в условиях ограничения кислорода. Органический остаток анаэробного брожения считают устойчивым к дальнейшему разложению микроорганизмами, в связи с чем его часто используют для улучшения почвы или сжигают в парогенераторах для производства электроэнергии.

Влажный органический остаток анаэробного брожения (500 г) добавляли к 2 л водопроводной воды питьевого качества с образованием смеси. Естественный рН этой смеси составлял 5,5. Смесь инокулировали 7,5% (объем/объем) посевной культуры штамма МК7, подготовленной, как описано в примере 3. 200 мл полученной в результате смеси добавляли в квадратные лотки 12,7×12,7 см. Образовавшиеся на поверхности уплотненные биоподстилки собирали после 7 суток инкубации при комнатной температуре (около 23°C). Средняя толщина биоподстилок составляла 2,6 мм, а средняя масса в сухом состоянии - 0,62 г (n составляло 3, стандартное отклонение составляло 0,03 г) и соответствующая плотность 0,015 г/см³. Средняя эффективность конверсии составляла 2,3%.

Чтобы повысить степень конверсии органический остаток анаэробного брожения в биомассу микроорганизма, был проведен дополнительный эксперимент по дополнению органического остатка анаэробного брожения ячменной питательной средой, представляющей собой эффективно используемую обогащенную ростовую среду. Ячменную питательную среду использовали для стимуляции роста и индукции продукции ферментов *in situ* штаммом МК7 для дополнительного разложения и конверсии органического остатка анаэробного брожения в грибную биомассу. Обогащенную ячменную питательную среду готовили путем объединения 1 л водопроводной воды, 50 г ячменной муки, 1 г дрожжевого экстракта, 0,1 мл глюкоамилазы (Distillate VHP, Dupont), 0,1 мл альфа-амилазы (SPEZYME ALPHA, 13775 ед/г, Dupont) и 0,1 мл бета-глюконазы (Optimash TBG, Dupont). Смесь нагревали до 65°C и перемешивали в течение 15 мин при температуре 65°C. После этого смесь кипятили в течение 15 мин для инактивации ферментов. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры.

Описанный выше протокол эксперимента для органического остатка анаэробного брожения повторяли за исключением того, что водопроводную воду заменяли обогащенной ячменной питательной средой, и общие объемы каждого из используемых компонентов уменьшали наполовину. Средняя конверсия органического остатка анаэробного брожения составляла 6±2% после вычитания биомассы, полученной в контрольном эксперименте, где органический остаток анаэробного брожения не добавляли.

Пример 17. Рост других гифомицетов в лотковых реакторах.

Проводили количественную оценку роста *Rhizopus oligosporus* и *Fusarium venenatum* с использованием методов поверхностной ферментации, описанных в примерах 1, 2 и 3 для штамма МК7.

Rhizopus oligosporus широко применяют во всем мире для производства темпе (продукта питания, употребляемого человеком). *Rhizopus oligosporus* штамм ATCC 22595 был получен из ATCC 1 октября 2015 г. Образец чистой культуры *R. oligosporus*, полученный из ATCC, помещали на питательную среду МК7-1 с агаром в чашках Петри, как описано в примере 2.

Fusarium venenatum, используемый в производстве пищевого продукта Quoin™, был выбракован из пакета продукта Quoin Chik'n Nuggets (код UPC: 33735-00006), приобретенного 16 января 2016 г. супермаркетом Альбертсона в г. Бозмен, Монтана, США. Для выделения *F. venenatum* образец (~0,25 см²) продукта Quoin™ Chik'n Nuggets, содержащего *F. venenatum*, помещали в 100 мл стерильной питательной среды МК7-1 pH 5 в смесительную колбу с перегородкой емкостью 250 мл. Питательную среду и колбу стерилизовали кипячением в колбе в течение 20 мин. Среду оставляли для охлаждения до 23°C, после чего добавляли образец Quoin™. После 3 суток инкубации при 23±1°C при скорости вращения 200 об/мин отбирали 1 мл культуры и использовали для инокуляции другой идентичной колбы и среды. Еще через 3 суток инкубации таким же способом отбирали аликвоту культуры 50 мкл и высевали на стерильную питательную среду МК7-1 с агаром (pH 4,8) в стерильную чашку Петри.

Мицелиальные подстилки, которые развивались на чашках Петри с *R. oligosporus* и *F. venenatum*, использовали для инокуляции 350 мл питательной среды МК7-1 в стерильные смесительные колбы с перегородкой емкостью 1 л, как описано в примере 3. После 5 суток выращивания в смесительных колбах, как описано в примере 3, культуры использовали в качестве посевных культур для лотковых реакторов. Желаемая посевная среда для лотковых реакторов состоит из микробиологически чистых культур с плотностью клеток более 6 г/л, находящихся в поздней экспоненциальной фазе (см. пример 3). Как описано в примере 3, готовили два лотка, содержащих 1,5 л инокулированной питательной среды МК7-1, для каждого из двух организмов. pH питательной среды доводили до 4,1 для *Rhizopus* и 5,0 для *Fusarium*. Изображения полученных в результате культур и подстилок показаны на фиг. 12 и 13.

Пример 18. Сравнение гифомицетовой биоподстилки, полученной путем твердофазной ферментации (ТФФ), с биомассой, полученной путем поверхностной твердофазной ферментации (ПТФФ).

Методика ТФФ.

Твердофазная ферментация (ТФФ) применительно к настоящему документу означает процесс ферментации микроорганизмов, который осуществляется с твердыми веществами при низком содержании влаги, обычно ниже 50%.

Посевную культуру МК7 для ТФФ готовили путем добавления 20 г глюкозы к 1 л питательной среды Mandels и Reese в стеклянном сосуде емкостью 2 л и стерилизовали в автоклаве в течение 45 мин при 121°C при pH 4,5. 100 мл полученной в результате питательной среды добавляли в колбу Эрленмейера емкостью 250 мл и инокулировали 0,25 г штамма МК7 из исходной культуры в глицерине, хранившейся при -80°C. Культуру инкубировали при 30°C, 180 об/мин в течение 14 суток, после чего использовали в качестве посевной культуры в ТФФ.

Примером процесса ТФФ является такой процесс, который был использован для получения биоподстилок в WO 2016/004380 и US 2016/0002680. В частности, 100 граммов пшеничной соломы измельчали в коммерческом блендере и помещали в стеклянный флакон емкостью 2 литра. Добавляли 300 мл питательной среды Mandels и Reese и 3 мл концентрированной H₂SO₄. Полученную в результате суспензию стерилизовали в автоклаве в течение 45 мин при 121°C. pH стерилизованной в автоклаве суспензии доводили NaOH до 3,0, оставляли для охлаждения до комнатной температуры, а затем переносили равными частями в четыре колбы Эрленмейера емкостью 250 мл. Добавляли 10 мл посевной культуры штамма МК7, и колбы перемешивали на шейкере при 30°C, 180 об/мин в течение 4 суток, после чего переносили содержимое всех колб в одну чашку Петри 9×9 дюймов Pyrex®. Полученную в результате культуру покрывали пленкой Saran® и инкубировали при 30°C в течение 7 суток, а затем собирали.

Методика ПТФФ.

Посевная культура для ПТФФ описана в примере 3, а методики описаны ниже в примерах (т.е. конверсия жома сахарной свеклы и других лигноцеллюлозных материалов, плавающих на поверхности слоя жидкости. В частности, применительно к настоящему документу ПТФФ означает ферментацию, которая происходит при погружении твердого субстрата под поверхность жидкости так, что гифомицетовая биоподстилка растет на поверхности жидкости, используя углерод и питательные вещества, имеющие происхождение из погруженного твердого вещества. Полученные гифомицетовые биоподстилки являются связными, плотными и не содержат сырья (фиг. 14С).

Продукция биомассы и биоподстилки, полученные в результате методик ПТФФ и ТФФ, значительно различаются. Методологии ПТФФ и ТФФ различаются по всем важным параметрам, таким как компоненты питательной среды, ионная сила, осмотическое давление, концентрация сырья, качество посевной культуры, время культивирования (табл. 6 и 7). В результате этих различий технологических процессов значительно различаются свойства биомассы (например, плотность, формирование уплотненной подстилки, микробиологическая чистота, длина гиф, структурная организация гиф и т.д.).

Из биомассы, продуцируемой посредством ПТФФ, в результате получают гифомицетовые биоподстилки, плавающие на поверхности слоя жидкости, которые физически отделяются от твердого слоя сы-

рья. Полученная в результате гифомицетовая биоподстилка представляет собой, по существу, чистую грибную биомассу, структурно организованную в виде связной и плотной подстилки. Эта подстилка имеет высокую прочность на растяжение и состоит из длинных гиф, средняя длина которых составляет от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров (как показано на фиг. 1С, 11 и 12). Гифы преимущественно организованы параллельно поверхности биоподстилки и соединяются комками грибов высокой плотности. Поверхность биоподстилки может образовывать или не образовывать воздушные гифы, ориентированные перпендикулярно поверхности биоподстилки. Гифомицетовую биоподстилку легко извлечь из окружающей среды для роста, поскольку она физически отделяется от жидкого или твердого субстрата, что обеспечивает быстрый и простой сбор относительно чистых гифомицетовых биоподстилок.

Напротив, при выращивании биомассы с помощью ТФФ образуется биомасса, гетерогенно интегрированная с твердым субстратом в случайной конфигурации. Длина гиф полученной биомассы, как правило, составляет 100 мкм (фиг. 14В). Кроме того, биомасса, полученная с помощью ТФФ, не является связной и характеризуется низкой прочностью на растяжение, так что ее невозможно собрать в виде единого целого (см. фиг. 14А). Полученная в результате смесь биомассы и твердого субстрата склонна к низкой плотности, особенно по сравнению с гифомицетовыми биоподстилками, полученными с помощью ПТФФ.

Таблица 6. Ниже описаны ключевые различия методологий ТФФ и ПТФФ

	ТФФ	ПТФФ
Плотность (г биомассы штамма МК7 в расчете на массу в сухом состоянии/кг смеси питательной среды и субстрата)	<5	120–180
Прочность на растяжение	Невозможно измерить	Биомасса во влажном состоянии: 0,05–0,24 кг/общая ширина, среднее ~0,009 кг/общая ширина. Биомасса в сухом состоянии (без дальнейшей обработки): 2–6 кг/общая ширина, среднее ~3 кг/общая ширина.
Осмотическое давление питательной среды (атм)	3,4	18,6
Ионная сила питательной среды (моль)	0,077	0,368
Тип клеток, используемый для посевной культуры	Гифовые клетки стационарной фазы (т.е. клетки длиной > 100 мкм)	Плавающие клетки поздней экспоненциальной фазы (т.е. клетки длиной <20 мкм)
Лигноцеллюлоза в питательной среде (%)	25	2,5–25
Средняя длина гифы	0,001–0,02 см	0,05–2 см
Ориентация гифы	Случайная	Параллельная
Конечная композиция (%)	Менее 5% грибов	Более 95% грибов
Конечная консистенция биоподстилки	Хрупкая, несвязная, гетерогенная	Прочная, связная, гомогенная

Пример 19. ТФФ и ПТФФ жом сахарной свеклы штаммом МК7.

Биомассу штамма МК7 получали с использованием способов ТФФ и ПТФФ с жомом сахарной свеклы в качестве основного источника углерода. Свекловичный жом представляет собой вегетативную часть сахарной свеклы, которая остается после извлечения сахара из свекловичного жома на перерабатывающем предприятии. Жом сахарной свеклы был получен с производственного предприятия Western Sugar Cooperative в г. Биллингс, Монтана, США, и состоял из приблизительно 24% сухого вещества, 9,1% неочищенного белка, 0,6% неочищенного жира, 23,1% неочищенного волокна, 4% золы и 0,56% кальция.

Для эксперимента по ТФФ 50 г сухого свекловичного жома смешивали с 250 мл воды. Смесь стерилизовали в автоклаве для гарантии стерильности в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной тем-

пературы (около 23°C) смесь инокулировали 250 мг влажной биоподстилки штамма МК7, выращенной в виде биоподстилки на поверхности смеси кукурузной соломы и воды. Биоподстилку штамма МК7 перемешивали в смеси свекловичного жома стерилизованным шпателем, и полученную в результате инокулированную смесь оставляли для инкубации при комнатной температуре в течение 4, 5 и 7 суток.

Для экспериментов с ПТФФ свекловичный жом добавляли в концентрации 7% к питательной среде штамма МК7-1^{1/2} концентрации (отношение массы жома к объему жидкости) до получения 300 мл питательной среды. pH питательной среды доводили до 4,8 добавлением соответствующего количества HCl с последующим кипячением в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры 100 мг биоподстилки МК7, выращенной в виде гифомицетовой биоподстилки на поверхности смеси кукурузной соломы и воды, как описано в примере С, перемешивали с питательной средой с помощью стерилизованной шпателя. pH снова доводили до 4,8 добавлением соответствующего количества HCl, а затем добавляли аликвоты по 100 мл инокулированной питательной среды на основе жома в стерилизованные стеклянные лотки 0,023 м² Рутех®, после чего лотки помещали в систему штативов для лотков. Инокулированную смесь инкубировали при 23±1°C с получением в результате гибких, плотных биоподстилок, толщина которых составляла 2,9, 3,4 и 4,1 мм после 4, 5 и 7 суток соответственно. Биоподстилки собирали и высушивали при 50°C в течение 48 ч, и их масса в сухом состоянии составляла 1,85 г (4 суток), 2,25 г (5 суток) и 2,85 г (7 суток). Конверсия свекловичного жома в биомассу в сухом состоянии составляла 26,4, 32,1 и 40,7% для подстилок 4, 5 и 7 суток соответственно. Плотности биоподстилок в расчете на массу в сухом состоянии максимального объема биоподстилки составляли 0,028, 0,029 и 0,030 г/см³ для подстилок 4, 5 и 7 суток соответственно.

В результате выращивания с использованием ТФФ и с использованием ПТФФ формируются значительно различающиеся биомассы. В результате ТФФ получали структуры биомассы, представляющие собой неразделимые смеси биомассы и субстрата. Эти смеси состояли из грибной биомассы низкой плотности, переплетенной вокруг и внутри фрагментов субстрата на основе свекловичного жома. Эти неразделимые смеси в основном состояли из субстрата, чередующегося с незначительным количеством грибной биомассы. Отделение биомассы от субстрата не проводили, поскольку для этого потребовалась бы существенная дополнительная обработка, осуществление которой затруднительно с технической точки зрения.

Напротив, в результате ПТФФ получили гифомицетовые биоподстилки, которые можно было отделить физически и отличить от субстрата на основе свекловичного жома, что позволяет непосредственно и напрямую собирать биоподстилку. Дополнительно полученные в результате гифомицетовые биоподстилки были плотными, по существу, чистыми и не содержали длинных параллельных гиф.

Пример 20. Рост гифомицетовых биоподстилок штамма МК7 на отходах моркови и капусты брокколи.

Плотные биоподстилки штамма МК7 были получены за 6 суток с использованием в качестве сырья гомогенизированной капусты брокколи или гомогенизированной моркови. Капусту брокколи и морковь приобретали у компании Costco Wholesale в г. Бозмен, Монтана, США. 100 граммов каждого вида сырья гомогенизировали отдельно в коммерческом кухонном комбайне, используя металлическую лопасть с высокой скоростью, в течение 5 мин и помещали в 2-литровые химические стаканы с 9000 мл водопроводной воды. Для формирования смеси добавляли приведенные ниже средние концентрации солей.

	г/л
NH ₄ NO ₃	5,25
Мочевина	1,75
KH ₂ PO ₄	5,0
CaCl ₂	1,0
MgSO ₄ •7 H ₂ O	1,0
Микронутриенты	мг/л
FeSO ₄ •7 H ₂ O	2,50
ZnSO ₄ •7 H ₂ O	1,10
MnCl ₂ •4 H ₂ O	0,25
CoCl ₂ •6 H ₂ O	0,08
Cu SO ₄ •5 H ₂ O	0,08
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4 H ₂ O	0,06
H ₃ BO ₃	0,06

ЭДТА, свободная кислота 19,63

pH смеси доводили до 3,5 добавлением 1,3 мл концентрированной HCl. Среду закрывали алюминиевой фольгой, а затем кипятили в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры (около 23°C) к среде добавляли 50 мл (7,5% объем/объем) посевной культуры, подготовленной, как описано в примере 3, добавляли в среду для каждого вида сырья и перемешивали до образования гомогенной сме-

си. 250 мл смеси наливали в четыре отдельных лотка 5×7 дюймов (0,02 м²) и закрывали пленкой Sagan®. Лотки культивировали в течение 7 суток при 23±1°C, после чего собирали. Полученная в результате биомасса представляла собой гибкую плотную гифомицетовую биоподстилку, не содержащую остаточного сырья капусты брокколи или моркови. Таким образом, была получена гифомицетовая биоподстилка, которая не содержала остатков сырья и состояла из, по существу, чистой грибной биомассы МК7. Средняя арифметическая величина pH остаточной жидкости после сбора составляла 6,2. Средняя толщина биоподстилок во влажном состоянии составляла 3±1 мм. Гифомицетовые биоподстилки высушивали при 50°C в течение 72 ч, и средние значения массы в сухом состоянии±стандартное отклонение составляли 1,7±0,2 г для брокколи и 1,7±0,2 г для моркови. Средняя конверсия брокколи в массу в сухом состоянии составляла 52±5 г массы штамма МК7 в сухом состоянии/100 г массы брокколи в сухом состоянии. Средняя конверсия моркови в массу в сухом состоянии составляла 55±7 г массы штамма МК7 в сухом состоянии/100 г массы моркови в сухом состоянии.

Пример 21. Культивирование штамма МК7 на суррогате городских органических отходов (скошенная трава и листья в зависимости от предварительной обработки).

Количественная оценка влияния предварительной обработки кислотой и основанием на городские органические отходы представляла собой функцию процентной доли конверсии сырья в гифомицетовую биоподстилку. Скошенную траву мятлика лугового и листья ясеня по отдельности высушивали при 60°C до содержания влаги менее 8%. Каждый вид сырья измельчали в коммерческом блендере до мелкого порошка.

Предварительные обработки кислотой HCl.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл водопроводной воды при pH 2,5 (доводили 33% HCl) подвергали предварительной обработке кипячением в течение 10 мин в 3 повторностях.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл водопроводной воды при pH 2,5 (доводили 33% HCl) с добавлением 10 ммоль/л MnSO₄ подвергали предварительной обработке кипячением в течение 10 мин в 3 повторностях.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл питательной среды МК7-1 при pH 2,5 (доводили 33% HCl) подвергали предварительной обработке кипячением в течение 10 мин в 3 повторностях.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл питательной среды МК7-1 при pH 2,5 (доводили 33% HCl) с добавлением 10 ммоль/л MnSO₄ подвергали предварительной обработке кипячением в течение 10 мин в 3 повторностях.

Предварительные обработки основанием NaOH.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл водопроводной воды при pH 10,75 (доводили 1% NaOH) подвергали предварительной обработке кипячением в течение 10 мин в 3 повторностях. Конечный pH 2,5 доводили HCl.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл водопроводной воды при pH 10,75 (доводили 1% NaOH) с добавлением 10 ммоль/л MnSO₄ подвергали предварительной обработке кипячением в течение 10 мин в 3 повторностях. Конечный pH 2,5 доводили HCl.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл питательной среды МК7-1 при pH 10,75 (доводили 1% NaOH) подвергали предварительной обработке кипячением в течение 10 мин в 3 повторностях. Конечный pH 2,5 доводили HCl.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл питательной среды МК7-1 при pH 10,75 (доводили 1% NaOH) с добавлением 10 ммоль/л MnSO₄ подвергали предварительной обработке кипячением в течение 10 мин в 3 повторностях. Конечный pH 2,5 доводили HCl.

Контрольные предварительные обработки.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл водопроводной воды в 3 повторностях. Конечный pH 5,5.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл водопроводной воды с добавлением 10 ммоль/л MnSO₄ в 3 повторностях. Конечный pH 5,5.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл питательной среды МК7-1 в 3 повторностях. Конечный pH 5,5.

10 г травы/листьев (50:50 в расчете на массу в сухом состоянии) в 100 мл питательной среды МК7-1 с добавлением 10 ммоль/л MnSO₄ в 3 повторностях. Конечный pH 5,5.

Образцы помещали в лотки 12,7×12,7 см, закрывали, а затем инкубировали в течение 7 суток. Результаты представлены на фиг. 15. В каждом случае применение предварительной обработки приводило к повышению полученной в результате доли конверсии в процентах. Таким образом, в результате применения предварительной обработки кислотой или основанием и добавления марганца конверсия сырья в полученную в результате гифомицетовую биоподстилку количественно увеличивалась.

Пример 22. Рост биоподстилок штамма МК7 на крахмале.

При использовании крахмала в качестве источника углерода и питательных веществ (сырья) плот-

ные гифомицетовые биоподстилки штамма МК7 были получены уже в течение 4 суток. В этих конкретных экспериментах использовали крахмал 100% Argo Corn Starch производства Argo Food Companies, Inc (г. Мемфис, Теннесси, США), приобретенный в супермаркете Альбертсона в г. Бозмен, штат Монтана, США.

Готовили три серии крахмальной питательной среды, добавляя 6, 8 и 10% сухого порошка крахмала к 6 л объемам водопроводной воды питьевого качества в стальных контейнерах емкостью 10 л. Эту смесь дополняли солями МК7-1 и кипятили в течение 10 мин с последующим охлаждением до комнатной температуры (около 23°C). В результате нагревания смеси образовались слитые комки крахмала, которые физически дробили на более мелкие комки. Доводили pH смеси до 2,7 и инокулировали 7,5% (объем/объем) посевной культуры штамма МК7, подготовленной, как описано в примере 3.

Аликвоты по 1,5 инокулированной питательной среды добавляли в четыре продезинфицированных полипропиленовых лотка 0,25 м², помещали в систему штативов для лотков и инкубировали при 23±1°C. Плотные гифомицетовые биоподстилки наблюдали уже через 2 суток роста, и биоподстилки собирали через 6 суток. Среднее арифметическое величины pH остаточной жидкости, оставшейся в лотках после сбора, составляла 6,05, 6,11 и 5,88 для экспериментов с 6, 8 и 10% крахмала соответственно. Среднее арифметическое толщины биоподстилок составляло 2,9, 3,1 и 3,3 мм для трех экспериментов соответственно. Гифомицетовые биоподстилки высушивали при 50°C в течение 72 ч, и средние значения массы в сухом состоянии ± стандартное отклонение составляли 29,0±1,3, 34,4±1,5 и 38,2±1,9 г для лотков в четырех повторностях, содержащих 6, 8 и 10% крахмала соответственно. Это эквивалентно доле конверсии в процентах, составляющей 32, 29 и 25% крахмала от массы гифомицетовых биоподстилок в сухом состоянии. Средние значения плотности в расчете на массу в сухом состоянии для гифомицетовых биоподстилок во влажном состоянии составляли 0,04, 0,04 и 0,05 г/см² для трех экспериментов соответственно.

Пример 23. Рост гифомицетовых биоподстилок штамма МК7 на потоках отходов переработки картофеля.

Плотные биоподстилки штамма МК7 были получены за 7 суток с использованием отходов переработки картофеля в качестве источника углерода и источника питательных веществ (сырья). Отходы переработки картофеля обычно образуются в результате переработки картофеля и включают потоки отходов из операций промывки, очистки и резки (т.е. приготовления картофеля фри, картофельных кубиков, хлопьев и т.п.). Потоки отходов переработки картофеля также включают кучи картофельных отбросов, содержащих многочисленные потоки отходов переработки картофеля, собранные в неупорядоченные массивы и подвергающиеся воздействию природной окружающей среды без каких-либо покрытий. В данном примере поток отходов переработки картофеля, состоящий из отходов переработки различных сортов картофеля, был получен с фермы Bauch в г. Уайтхолл, штат Монтана, 21 сентября 2016 г. и использован в пределах 48 ч в качестве источника углерода и питательных веществ для выращивания биоподстилок штамма МК7.

Картофельные обрезки представляют собой кусочки картофеля, которые остаются после нарезки картофеля фри из целых картофелин. Картофельные обрезки имеют различные размеры и формы, в качестве не имеющего ограничительного характера примера от тонких ломтиков до кусочков, достигающих 6 дюймов длины и 0,5 дюймов толщины или более. Свежие отбросы в большинстве случаев описывают кусочки картофеля, которые вырезают из картофеля из-за его повреждения, сдавливания и т.п. В некоторых случаях в образцы отбросов включают целые картофелины. Очистки преимущественно представляют собой кожуру, счищаемую с картофеля.

Картофельные обрезки, отбросы и кожуру обрабатывали в кухонном комбайне до гомогенной консистенции (кухонный комбайн Farbarware модели 103742, установленный на высокую скорость) партиями объема приблизительно 500 мл в течение 1 мин. В целях описания в данном примере образцы, обработанные в кухонном комбайне, называют месивом.

Месиво из картофельных обрезков и свежих отходов добавляли в две варочные кастрюли из нержавеющей стали с эпоксидным покрытием емкостью 15 л в соотношении 10% массы месива во влажном состоянии к объему питательной среды МК7-1, т.е. в отношении 500 г месива на 4,5 л жидкой питательной среды МК7-1, с получением смеси. pH смеси доводили до 2,45 концентрированной HCl. Посевную культуру штамма МК7, подготовленную, как описано в примере 3, добавляли в отношении 7,5% объем/объем (т.е. 375 мл посевной культуры на 4625 мл смеси). Аликвоты по 1,5 л инокулированной суспензии добавляли в отдельные стерилизованные полипропиленовые лотки 0,25 м в трех повторностях и помещали в систему штативов для лотков. Культуры инкубировали при 23±1°C с получением в результате гибких, плотных биоподстилок, собранных через 7 суток. Среднее арифметическое величины pH остаточной жидкости, оставшейся в лотках после сбора, составляло 7,1 для эксперимента с обрезками и 6,9 для эксперимента со свежими отбросами. Собранные биоподстилки промывали в 7 л водопроводной воды при осторожном встряхивании в течение 10 мин и высушивали при 50°C в течение 72 ч.

Средняя толщина биоподстилок во влажном состоянии составляла 3,8±0,9 мм для обрезков и 3,9±1,0 мм для отбросов. Средние значения массы в сухом состоянии ± стандартное отклонение для биомассы в каждом лотке составляли 33,6±0,6 г для обрезков и 40,2±2,7 г для свежих отбросов. Средняя

плотность биоподстилок в расчете на массу в сухом состоянии составляла 0,035 г/см³ для обрезков и 0,041 г/см³ для отбросов. Средняя конверсия общего содержания твердых веществ в исходных побочных продуктах картофеля в биоподстилку в сухом состоянии составляла 36% для обрезков и 43% для свежих отбросов. С учетом того факта, что 50% потребляемого штаммом МК7 углерода выделяется в атмосферу в виде углекислого газа, почти 50% конверсию следовало бы считать 100% эффективностью конверсии углерода.

Перед проведением экспериментов по выращиванию измельченные и перемешанные картофельные очистки предварительно обрабатывали, чтобы повысить доступность питательных веществ картофельных очистков для штамма МК7. Измельченные и перемешанные картофельные очистки (175 г) добавляли в каждый из девяти стеклянных лотков 12,7×17,8 см (0,023 см²) Рутех® с получением экспериментальной матрицы для трех экспериментов с тремя повторностями в каждом. В эксперименте 1 добавляли 50 мл водопроводной воды питьевого качества. В эксперименте 2 добавляли аликвоту 45 мл гидролизата штамма МК7, содержащего набор гидролитических ферментов штамма МК7, выделенных штаммом МК7 при выращивании на кукурузной соломе. В эксперименте 3 добавляли 50 мл водопроводной воды и набор коммерческих ферментов, состоящий из 0,05 г целлюлазы Y-C (MP Biomedicals, № по каталогу 320951, № товарной партии M4156), 2,5 мл глюкоамилазы (Distillate VHP, Dupont), 2,5 мл альфа-амилазы (APEZYME ALPHA, 13,775 ед/г, Dupont) и 2,5 мл бета-глюконазы (Optimash TBG, Dupont). Лотки эксперимента 3 инкубировали при 50°C в течение 30 мин для стимуляции ферментативного гидролиза с последующим кипячением в течение 5 мин для инактивации ферментов. pH в экспериментах доводили до 3,0, используя концентрированную HCl, и все лотки инокулировали 10 мл штамма МК7, подготовленного, как описано в примере 2. Через 7 суток биоподстилки снимали с поверхности жидкости, промывали в водопроводной воде в течение 10 с и высушивали при 60°C в течение 48 ч. Конверсия массы картофельных очистков в сухом состоянии в массу биоподстилок в сухом состоянии составляла: Контроль (только H₂O) среднее арифметическое=5,9% (5,5, 6,5 и 5,8%); Ферменты штамма МК7=9,0% (7,2, 10,1 и 9,8%); и Коммерческие ферменты=9,9% (10,2, 8,4 и 11%).

Пример 24. Анализ на питательную ценность биомассы, полученной с помощью ТФФ, по сравнению с биоподстилками, полученными с помощью ПТФФ.

Анализ на питательную ценность по сравнению биоподстилок, полученных в результате методологий ТФФ и ПТФФ, был выполнен группой лабораторий Eurofins. Образцы ТФФ были получены после культивирования штамма МК7 на кукурузной соломе, предварительно обработанной с помощью технологии разрушения целлюлозы аммиаком (AFEX) Мичиганского института биотехнологии. 150 г AFEX добавляли к 500 мл водопроводной воды и стерилизовали в автоклаве при 121°C после доведения pH до 3,5 концентрированной HCl. Полученную в результате смесь инокулировали 25 мл посевной культуры штамма МК7 в соответствии с примером 18. Суспензию переносили в стеклянный лоток 23×23 см Рутех® и инкубировали при комнатной температуре в течение 11 суток. Объединенную биомассу штамма МК7 и кукурузной соломы собирали и высушивали при 60°C в течение 48 ч. Анализ общего содержания белка, общего содержания волокон, общего содержания углеводов, золы и общего содержания жиров в образцах был выполнен группой лабораторий Eurofins, США (г. Де-Мойн, Айова, США).

Образцы ПТФФ были получены из биоподстилок, выращенных на кукурузной соломе, обработанной 5% AFEX. 50 г кукурузной соломы, обработанной AFEX, добавляли к 1 л водопроводной воды и стерилизовали в автоклаве при 121°C после доведения pH до 3,5 концентрированной HCl. Полученную в результате смесь инокулировали 50 мл посевной культуры штамма МК7, подготовленной, как описано в примере 3. Суспензию переносили в стеклянный лоток 23×23 см Рутех® и инкубировали при комнатной температуре в течение 11 суток. Подстилки собирали и промывали в водопроводной воде в течение 30 с с последующим высушиванием при 60°C в течение 24 ч. Анализ общего содержания белка, общего содержания волокон, общего содержания углеводов, золы и общего содержания жиров в образцах был выполнен группой лабораторий Eurofins, США (г. Де-Мойн, Айова, США).

Таблица 7

Анализ Eurofins	ТФФ	ПТФФ
Общее содержание белка	2,56	51,10
Общее содержание жира	0,60	12,00
Общее содержание волокон	80,30	23,30
Общее содержание сахаров	2,10	<0,35
Общее содержание золы	15	12,40

Пример 25. Аминокислотный профиль ацидофильного штамма МК7 гифомицетов.

Биоподстилка ацидофильного штамма МК7 гифомицетов была получена в лотковых реакторах с использованием способа, описанного в примерах 2 и 3, в питательной среде МК7-1. Гифовую биомассу из 6 лотков объединяли, после чего высушивали при 60°C в течение 45 мин и 50°C в течение 72 ч. 400 г этой гифовой биомассы направляли в группу лабораторий Eurofins Scientific Inc. Центра анализа питания

в г. Де-Мойн, Айова, США, для анализа питательной ценности. Анализ аминокислот проводили с использованием признанных во всем мире способов, разработанных Ассоциацией официальных агрохимиков (США) (АОАС, от англ. Association of Official Agricultural Chemists) в публикации "Официальные методы анализа": АОАС 988.15 для триптофана, АОАС 994.12 mod. для цистина и метионина, АОАС 982.30 mod. для аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, суммарного лизина, тирозина и валина. Аминокислотную композицию ацидофильного штамма МК7 гифомицетов по данным, представленным Eurofins, сравнивали с аминокислотной композицией микроорганизма *Fusarium venenatum*, используемого в корме для рыб (Alriksson, B. et al. (2014) Fish feed from wood. Cellulose Chemistry and Technology 48:9-10 (2014), Quoin (Nutritional Profile of Quorn Mycoprotein, 2009), egg albumin (Food and Agriculture Organization of the United Nations. The Amino Acid Content of Foods and Biological Data on Proteins, Nutritional Study #24. Rome (1970). UNIPUB, Inc., 4611-F Assembly Drive, Lanham, MD 20706) and *Rhizopus oligosporus* (Graham, D. C., Steinkraus, K. H. & Hackler, L. R. (1976) Factors affecting production of mold mycelium and protein in synthetic media. Appl Environ Microbiol 32:381-387), в табл. 8. Общее содержание белка по данным количественного определения составляло 41,5% из 4,5% содержания биомассы во влажном состоянии. Следует отметить, что для ацидофильного штамма МК7 гифомицетов была показана более высокая концентрация незаменимых аминокислот по сравнению со всеми четырьмя из других источников белка, что делает штамм МК7 гифомицетов в высокой степени желательным источником белка для пищевых и кормовых продуктов.

В табл. 8 представлена концентрация аминокислот в процентах от общего содержания аминокислот для ацидофильного штамма МК7 гифомицетов и четырех источников пищевых/кормовых продуктов с высоким содержанием белка. Незаменимые аминокислоты обозначены звездочкой.

Таблица 8

	Штамм МК7	<i>Fusarium venenatum</i> для корма для рыб	Quorn	Альбумин куриного яйца	<i>Rhizopus oligosporus</i> (темне)
*Триптофан	1,48%	0,94%	1,24%	1,18%	0,75%
Цистин	1,04%			1,88%	
*Метионин	1,65%	1,51%	1,59%	3,01%	0,58%
Аланин	16,38%			5,49%	
Аргинин	5,39%	4,72%		4,54%	
Аспарагиновая кислота	9,17%			6,09%	
Глутаминовая кислота	10,72%			10,89%	
Глицин	5,06%			2,89%	
*Гистидин	2,12%		2,69%	1,67%	
*Изолейцин	4,48%	3,96%	3,93%	5,00%	
*Лейцин	6,84%	5,85%	6,55%	6,80%	
*Фенилаланин	3,57%		3,72%	4,94%	
Пролин	4,35%			2,92%	
Серин	4,45%			6,07%	
*Треонин	5,49%	3,77%	4,21%	3,41%	3,05%
*Лизин	7,25%	5,66%	6,28%	4,64%	4,28%
Тирозин	2,70%			3,21%	
*Валин	7,85%	4,72%	4,14%	6,02%	

Пример 26. Продукция C18-богатых липидов ацидофильным штаммом МК7 гифомицетов из глицерина пищевого сорта.

Приготовление среды: 4,5 литра питательной среды МК7-1 готовили с 125 г/л глицерина (глицерин The Chemistry Store - Kosher, пищевой сорт, более 99,7%, ASIN: B00KN1LRWQ, доступно в Интернете) (562,5 грамма) с NH_4NO_3 и изменяли концентрации мочевиного азота до получения отношения C:N 40:1 (моль углерода в источнике C : моль N в азотсодержащих соединениях).

Табл. 9 - композиция среды МК7-1, модифицированная для обеспечения отношения C:N 40:1 и концентрации глицерина 12,5%. Микронутриенты дополняли путем добавления 2 мл/л 500-кратного исходного раствора, описанного в табл. 1 (пример 1).

Таблица 9

Суммарный объем	4,5
NH ₄ NO ₃ (г)	10,8
Мочевина (г)	3,7
CaCl ₂ (г)	9,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)	9,0
KN ₂ PO ₄ (г)	45,0
Микронутриенты	
(мл)	9,0
Глицерин (г)	563
Глицерин (л)	0,446
Отношение C:N	401
pH	2,7
Денонизированная	
H ₂ O (л)	4,05
HCl (мл)	5,85

pH смеси доводили до 2,7 и стерилизовали нагреванием путем кипячения в течение 30 мин в 2-литровой колбе Эрленмейера, при этом колбу закрывали сверху алюминиевой фольгой. Смесь охлажда-ли в течение 2 ч до 25°C.

Инокуляция: посевную культуру (15 г/л свободно плавающих клеток в расчете на массу в сухом со-стоянии (см. пример 3) добавляли в охлажденную колбу в конечной концентрации 1 г/л в расчете на массу в сухом состоянии. Колбу тщательно перемешивали для равномерного распределения посевой культуры. Свободно плавающее состояние клеток принципиально важно для формирования биоподстилки, и жела-тельно свести к минимуму образование клетками кластеров (т.е. биопленки толще 1 мм). В идеале кластеры клеток размером более 2,5 мм следует отфильтровывать из посевой культуры перед распределением.

Инкубация и сбор: смесь с посевой культурой равномерно распределяли в три лотка 0,25 м в объ-еме 1,5 литра на один лоток или 6 литров на квадратный метр и инкубировали при 25°C, влажности 90-100% в течение 8 суток. Связная биомасса в виде биоподстилки образуется при плотности клеток 30 г/л, и эту биомассу можно собирать в виде одной связной подстилки. В одном воплощении изобретения под-стилку просто свертывают с лотка (фиг. 6). Подстилку промывают в течение 30 с, используя проточную воду, и оставляют для подсушивания капелек на 5-10 мин. Выжимания подстилки избегали, поскольку при чрезмерном удалении влаги происходит потеря белка и других питательных веществ гриба. Масса гифовой биомассы во влажном состоянии после подсушивания капелек составляла 410 грамм (или 1620 грамм/м²). Содержание влаги было определено как 82% (т.е. масса в сухом состоянии 18%), что соответ-ствует массе в сухом состоянии 73,8 г/лоток или 295 г/м². Масса гифовой биомассы в сухом состоянии, составляющая 18%, обладает преимуществом по сравнению с переработкой биомассы других грибов, выращенных в погруженных культурах, масса которых в сухом состоянии в характерном случае состав-ляет 1,5%. Напротив, в способах уровня техники для достижения желаемой плотности грибной биомассы используют центрифуги (энерго- и капиталоемкий процесс). Описанный в настоящем документе способ требует гораздо меньшей обработки, оборудования и подачи энергии по сравнению с этими более доро-гостоящими способами.

Анализ липидов: Количественную оценку общего содержания липидов проводили с помощью мик-роскопии в УФ-видимом свете с окрашиванием нильским красным (Cooksey и соавт., 1987; фиг. 16), в которой было установлено общее содержание липидов 40-50%. Суммарное количество внутриклеточных липидов определяли с использованием метода прямой перэтерификации, сопряженного с анализом ГХ-МС, как описано в работе Lohman и соавт. (2013), и обнаружили, что оно составляет 39%. Это соответст-вует продукции липидов 115 г липидов/м² за 8 суток (14 г/м²/сутки) или средней продуктивности 0,39 г/литр/час. Эти скорости намного выше обнаруживаемых в погруженных культурах с ацидофильным штаммом МК7 гифомицетов с 8% глицерином (0,245 г/л/ч) и обладают высокой конкурентоспособно-стью по сравнению с другими организмами, описанными в литературе, включая дрожжи и водоросли. Кроме того, ацидофильный штамм МК7 гифомицетов продуцирует липиды с такими конкурентоспособ-ными скоростями при очень высоких концентрациях глицерина, которые не переносятся большинством организмов, и является единственным организмом (по имеющимся сведениям), способным осуществлять этот процесс при кислых диапазонах pH, что обеспечивает значимые преимущества для ограничения контаминации. Кроме того, липидный коэффициент (г липидов/г субстрата) обладает высокой конкурен-тоспособностью по сравнению с другими штаммами, для которых он составляет 0,21 г липидов/г глице-рина (см. прилагаемую таблицу). Повышенные скорости продукции и плотности клеток 180 г/л имеют прямое применение для перевода в продукцию микробных масел широким рядом микроорганизмов, раз-рабатываемых или находящихся в коммерческом использовании в настоящее время.

Примечательно, что профили липидов ацидофильного штамма МК7 гиомицетов являются согласованными при различных видах обработки (т.е. pH, температура, ростовой субстрат, продолжительность культивирования, содержание влаги), при этом преобладают триацилглицериды C16:0 и C18:0, C18:1 и C18:2 (более 95% от общего содержания липидов; табл. 10 ниже; фиг. 17). Профили жирных кислот также показывают ряд продуктов, обладающих высокой ценностью, включая омега-7 вакценовую кислоту (метил-11-октадеканонат), омега-7 пальмитолеиновую кислоту (метилгексадец-9-еноат; торговое наименование Provinal™) и метиловый эфир тетракозановой кислоты. Эти жирные кислоты являются редкими, обычно не обнаруживаемыми в растительных маслах, что может обеспечить значимое повышение дохода на тонну сырья, чем только производство биодизельного топлива.

Табл. 10 - дентичность и концентрация жирных кислот, обнаруживаемых в биомассе штамма МК7, культивируемого с 12,5% глицерином в течение 8 суток при 30°C; и при отношении C:N 40:1.

Таблица 10

	<u>EuroFin</u>	<u>Твердые</u> <u>вещества (ТВ)</u>	
		<u>(n=3)</u>	
	% профиля МЭЖК	% профиля МЭЖК	STD
C10:0 (каприновая кислота)	0,3%	0,1%	0,01%
C11:0 (ундекановая кислота)	0,3%	0,0%	0,01%
C12:0 (лауриновая кислота)	0,3%	0,0%	0,00%
C14:0 (миристиновая кислота)	0,5%	0,4%	0,00%
C14:1 (миристолеиновая кислота)	0,3%	0,0%	0,00%
C15:0 (пентадекановая кислота)	0,3%	0,3%	0,03%
C16:0 (пальмитиновая кислота)	15,8%	21,2%	0,45%
C16:1 омега 7	1,0%	0,8%	0,05%
C17:0 (маргариновая кислота)	0,3%	0,1%	0,00%
C18:0 (стеариновая кислота)	4,8%	14,7%	0,39%
C18:1 (олеиновая кислота/изомеры)	23,0%	31,9%	0,14%
C18:2 омега 6 (линолевая кислота)	42,8%	26,8%	0,60%
C18:2 (изомеры)	1,0%	0,2%	0,00%
C18:3 (линоленовая кислота/изомеры)	2,3%	0,9%	0,07%
C20:0 (арахидиновая кислота)	0,3%	0,7%	0,02%
C20:1 (гадолеиновая кислота/изомеры)	0,3%	0,1%	0,01%
C18:5 омега 3 (генэйкозапентаеновая кислота)	0,3%	0,0%	0,01%
C22:0 (бегеновая кислота)	0,3%	0,5%	0,03%
C20:1 (эруковая кислота/изомеры)	0,3%	0,0%	0,00%
C24:0 (лигноцериновая кислота)	0,7%	0,7%	0,00%
C20:1 (нервоновая кислота/изомеры)	0,3%	0,0%	0,00%
Всего %:	94,7%	99,4%	

Пример 27. Анализы токсичности штамма МК7.

Был проведен количественный анализ по определению присутствия микотоксинов в пяти образцах штамма МК7, выращенных в различных условиях. Образец 1 биомассы был получен в биореакторе емкостью 10 л в таких же условиях, которые использовали для получения посевной культуры, описанных в примере 1, за исключением того, что отношение С:N составляло 30:1. Образец биомассы собирали фильтрованием через фильтр 0,2 мкм с помощью аппарата для вакуумного фильтрования, как описано в примере 1.

Образец 2 биоподстилки был получен в стерилизованном стеклянном лотке 12,7×17,8 см (0,02 м²) Рутех® с использованием 50 мл питательной среды МК7-1 pH 2,8, приготовленной, как описано в примере 1, за исключением того, что эту питательную среду дополняли 12% глицерина и 0,2% пептона (масса/объем; гранулированный пептон производства компании Fisher Scientific, № товарной партии 143241, г. Сомервилл, штат Нью-Джерси). Для образца 2 использовали такую же процедуру стерилизации, как используемая для лотков 0,25 м² в отношении примера 3.

Образец 3 выращивали в условиях, идентичных условиям для образца 2, за исключением того, что pH доводили до 4,5, и питательную среду не дополняли пептоном.

Образец 4 выращивали в условиях, идентичных условиям для образца 2, за исключением того, что питательную среду дополняли 4% глицерином.

Образец 5 выращивали в условиях, идентичных условиям для образца 2, за исключением того, что pH доводили до 2,2, и питательную среду не дополняли пептоном. Питательные среды для образцов 2-5 инокулировали 7,5% (в объемном соотношении) жидкой культуры, используемой для образца 1. Образцы биомассы во влажном состоянии собирали после 8 суток роста и хранили при -20°C до экстракции микотоксинов.

Микотоксины экстрагировали из биомассы во влажном состоянии с использованием набора реактивов для анализа Мусобинл+, поставляемого компанией Vicam (№ товарной партии 100000176: г. Никса, штат Миссури, США) в соответствии со стандартным протоколом, описанным в руководстве к набору реагентов Мусобинл+. Анализ двенадцати различных микотоксинов проводили методом жидкостной хроматографии с квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией (LC-Q-TOF), используя протокол, описанный в инструкции к Мусобинл+ по проведению жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ/МС/МС). Для идентификации и количественного определения токсинов использовали квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр Agilent 6538 Q-TOF, сопряженный с хроматографом для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) Agilent 1290, расположенный в Центральной лаборатории масс-спектрометрии государственного университета штата Монтана. В качестве аутентичных стандартов использовали фумонизин В1 и фумонизин В2.

Измеренные показатели для всех исследованных токсинов были ниже нормируемых уровней для потребления человеком, установленных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (табл. 11). Измеренные концентрации были по меньшей мере на один порядок величины ниже нормируемых уровней за исключением общего содержания афлатоксинов, обнаруженных в образце 4, составляющего 8,76 нг/г по сравнению с нормируемым уровнем 20 нг/г. Однако гены продуцирования афлатоксина отсутствуют в штамме МК7, поэтому предполагают, что источником этого токсина была контаминация из пептона и других ингредиентов, используемых в питательной среде, а не продукция МК7.

Таблица 11. Количественное определение микотоксинов в биомассе штамма МК7

№ образца	1	2	3	4	5	Нормативный предел
Количественное определение (нг/г)						
(масса во влажном состоянии)						нг/г
Афлатоксин В1	0,03	0,04	0,02	0,49	0,02	20 *
Афлатоксин В2	0,33	3,13	0,12	0,80	0,10	20 *
Афлатоксин G1	0,02	0,02	0,04	1,91	0,04	20 *
Афлатоксин G2	0,20	0,03	0,56	5,56	0,49	20 *
Охратоксин А	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	Не установлено
Дезоксиниваленол	0,24	0,10	0,02	0,13	0,02	1,000
Фумонизин В1	0,00	0,91	0,00	4,41	0,00	2,000 †
Фумонизин В2	0,00	17,40	0,04	89,58	0,02	2,000 †
Ниваленол	0,12	0,08	0,04	0,37	0,04	Не установлено
Т-2 токсин	0,07	0,00	0,02	0,00	0,03	Не установлено
НТ-2 токсин	0,13	0,11	0,04	0,14	0,05	Не установлено
Зеараленон	0,00	0,00	0,04	0,37	0,04	Не установлено

* общее содержание афлатоксинов Общее содержание фумонизинов.

Нетоксичный характер культуральной среды и биомассы МК7 был дополнительно подтвержден биологическими анализами высокочувствительного беспозвоночного макроорганизма *Daphnia magna*, часто используемым для анализов токсичности (EPA Publication, 1987; Guilhermino и соавт., 2000). Живые *D. magna* были приобретены у компании Carolina Biological Supply (г. Берлингтон, Северная Каролина, США) и выращены в условиях, описанных в инструкции, предоставляемой поставщиком. После 24 часов роста и наблюдения *Daphnia* использовали в эксперименте по определению токсичности. В три чашки Петри наливали 30 мл 30% культуры МК7 (питательная среда МК7 и МК7-1), выращенной в реакторе для посевной культуры в течение 6 суток, как описано в примере 3, и 70% воды, в которой плавали *D. magna*. Для экспериментального контроля в три дополнительные чашки Петри наливали 30 мл воды из аквариума. Семь особей *D. magna*, которые выглядели живыми, вносили в каждую из шести чашек Петри и ежедневно наблюдали в течение трех суток. Гибель *D. magna* определяли как отсутствие видимого движения через 1 мин. Значимых различий выживаемости между *D. magna*, подвергнутыми воздействию культуральной среды и биомассы МК7, и экспериментальными контролями в течение 3 суток не наблюдали (в среднем 1,2 случая гибели на одну чашку Петри после 3 суток каждого вида воздействия).

Испытание биомассы штамма МК7 на токсичность было также проведено с использованием золотых рыбок (*Carassius auratus*). Два идентичных аквариума емкостью 5,7 л, насос и фильтры были приобретены у компании Petco в г. Бозмен, Монтана, США (модель Aqueon № E414W, г. Франклин, Висконсин, США). В аквариумы наливали 5,7 л воды Poland Spring, приобретенной в супермаркете Альбертсона, г. Бозмен, Монтана, США. Шесть золотых рыбок (длина около 3 см) были приобретены у компании Petco (г. Бозмен, Монтана, США), и по три из них помещали в каждый из аквариумов. В один из аквариумов ежедневно вносили около 0,05 г сухих хлопьев корма для рыб TetraFin Goldfish Flakes Plus (г. Блэксберг, Виргиния, США) (приобретен у компании Petco, г. Бозмен, Монтана, США). В другой аквариум ежедневно вносили около 0,05 г высушенной биомассы штамма МК7. Влажная биомасса МК7 была получена в одном из лотковых реакторов в соответствии с протоколом, описанным в примере 3. Биомассу МК7 готовили, извлекая 40 г МК7 из лотка (см. пример 3) и помещая биомассу в химический стакан емкостью 250 мл. Затем влажную биомассу нагревали в микроволновой печи, используя микроволновую печь компании GE (модель WES1452SS1SS) в течение 30 с. Содержание влаги в высушенной биомассе составляло менее 0,5%. Затем биомассу измельчали шпателем из нержавеющей стали на мелкие хлопья, сходные по размеру с хлопьями корма TetraFin Goldfish Flakes. После кормления в течение 60 суток все рыбки выжили и выглядели здоровыми (энергично плавающими) и проявляли заметный энтузиазм в поедании вещества биомассы, продуцируемой МК7. Эксперимент был прекращен после 60 суток.

SEQ ID NO: 1 18S рРНК и область ITS последовательности ДНК вида ацидофильных гифомицетов, обозначенного как штамм МК7.

```
CCGCGGGGAATACTACCTGATCCGAGGTCACATTCAGAGTTGGGGTTTACGG
CTTGCCCGCGCCGCTACCGATTGCGAGGGTTTACTACTACGCAATGGAAGC
TGACGCGAGACCGCCACTAGATTTTCGGGGCCGGCTTGCCGCAAGGGCTCGCCG
ATCCCCAACACCAAACCCGGGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGG
CATGCCCCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATT
CACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGAT
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTGATTTATTTATGGTTTTACTC
AGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGGTCTCTGGCGGGCCGTCGCCGTT
TTACCGGGGAGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGT
TTGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCCGAGTTCTACCTACGGATAGG
ATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAACCCCTGTGAACATACCCATTGTTGCCT
CGGCCGATCAGCCCGCTCCCGTTAAACGGGACGGCCCGCCAGAGTACCCC
TAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAACCATAAATAAATCAAACT
TTCAACACGCATCTCTTGCTTGTGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGA
TAGTCATGTGATTGCACATTCAGTGAATCATCGATCTTGACGCACATTGCGCCT
GCAGTATTCTGGCGGTCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTAGCCCTCAGCCCTCGG
```

TTGTGTTTCGGGATCGGCGAGTCCTGCGCCAGCGACCGGATCAGTGGCGTCTGC
CTGCGCCTCCATTGCGGTTAGAGTTA AGCCCTCGCCCACTTGTTTTACGCTAAC

SEQ ID NO 2 Фактор элонгации трансляции 1 альфа (Tef1)

ATGATCACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCCATTCTCATCATTGCCGCCGGT
ACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGC
TCTTCTTGCCTACACCCTTGGTGTCAAGAACCTCATCGTCGCCATCAACAAGAT
GGACACCACCAAGTGGTCTGAGGCCGTTACCAGGAGATCATCAAGGAGACCT
CCTCCTTCATCAAGAAGGTGCGCTACAACCCCAAGGCTGTCGCTTTCGTCCCCA
TCTCCGGTTTCAACGGTGACAACATGCTTACCCCTCCACCAACTGCCCTTGGT
ACAAGGGTTGGGAGCGTGAGATCAAGTCCGGCAAGCTCACCGCAAGACCTT
CCTCGAGGCCATTGACTCCATCGAGCCTCCAAGCGTCCCGTTGACAAGCCCC
TCCGTCTTCCCTCCAGGATGTCTACAAGATCGGTGGTATTGGAACGGTTCCTCG
TCGGCCGTATTGAGACTGGTGTATCAAGCCCGGTATGGTCGTTACCTTCGCTC
CCTCCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTC
AGTGAGGGCCAGCCCGGTGACAACGTTGGTTTCAACGTGAAGAACGTCTCCGT
CAAGGACATCCGACGTGGTAACGTCGCTGGTGAATCAAGAACGACCCCCCCC
AGGGTGCCGCTTCTTTACCGCCAGGTATCGTCCTCAACCACCCCGGCCAG
GTCGGTGCTGGTTACGCTCCCGTCTCGATTGCCACACTGCCACATTGCCTGC
AAGTTCCGCCGAGATCCAGGAGAAGATCGACCGCCGAACCGGTAAAGGCTACTG
AGGCCGCTCCCAAGTTCATCAAGTCTGGTGAATCCGCCATCGTCAAGATGGTTC
CCTCCAAGCCCATGTGTGTCGAGGCTTTCAGTACTACCTCCTCTGGGTCGTT
TCGCCGTCCGTGACATGCGACAGACTGTCGCCGTGGTGTATCAAGGCCGTC
GAGAAGTCCACCGGTGCTGCTGGCAAGGTCACCAAGTCCGCTGCCAAGGCCGC
CAAGAAATAA

SEQ ID NO 3 Бета-цепь тубулина (Tub1) частичная последовательность

GTGGATCTTGAGCCCGTCTCAGGATGCCATCCGCGCCGGGCCCTAGGCCA
GCTTTTCCGCCCCGACAACTTCGTCGCCGAAATGCCAGCGCCGTAACAAC
GGGCCAAGGGTCATTACACCGAAGGTGCTGAGCTCGTTGAGGAGGCCATCGAT
GTTGTGCGACACGAGGTTGAGAACTGTGACCATCTTCAGGGTTCCAGCTCAC
CCACTCTCTCGGCGGTGGTACCGGTCTGGTATGGGAACGCTTCTTCTGTCGAA
AATCCGTGAGGAGTTTCCCGATCGCATGATGGCTACTTTTCCGTTATGCCTTC
GCCTAAGGTTTCTGATACCGTTGTCGAACCTTACAACGCCACTTTGTCATTGAA
CCAGCTTGTCGAGAACTCCGATGAGACCTTCTGTATCGATAACGAGGCTTTGTA
CGACATTTACGAGAAGACCTGAAGATTGCTGATCCTTCTTACGCCGATCTC

Список литературы

- Abe T., Hoshino T., Nakamura A., and N. Takaya. 2007. Anaerobic elemental sulfur reduction by fungus *Fusarium oxysporum*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71: 2402–7.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol*. 37: 911-917.
- Bhatia, LS, Arneja J. S. Lipid metabolism in *Fusarium oxysporum*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 29(7): 619–626.
- Boominathan, K., Reddy, C.A. 1992. cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 89: 5586–5590.
- Briggs, Michael. UNH Biodiesel Group. 2004. "Wide scale Biodiesel Production from Algae". http://www.unh.edu/p2/biodiesel/article_alge.html.
- Brimble M.A., Letecia J. Duncalband Michael R. Nairn. 1999. Pyranonaphthoquinone antibiotics — isolation, structure and biological activity. *Nat. Prod. Rep*. 16: 267–281.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25: 294–306.
- Christakopoulos P, Macris BJ, Kekos D. 1989. Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. *Enzyme Microb Tech*. 11: 236–239.
- Christakopoulos P., D. P. Koullas, D. Kekos, E. G. Koukios and B.J. Macris. 1991. Direct Ethanol Conversion of Pretreated Straw by *Fusarium oxysporum*. *Bioresource Technology*. 35: 297–300.
- Christakopoulos P., LIAN-WU L., KEKOS D., MACRIS B.J. 1993. Direct conversion of sorghum carbohydrates to ethanol by a mixed microbial culture. *Bioresource Technology*. 89–92.
- Cooksey, K.E., J.B. Guckert, S.A. Williams, and P.R. Calli. 1987. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red". *Journal of Microbiological Methods*, 6: 333–345.
- Daviere J.M., Langin T., and M.J. Daboussi. 2001. Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. *Fungal Genet Biol*. 34: 177-92.
- Dey, P., Banerjee, J. & Maiti, M. K. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates – *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology* **102**, 5815–5823 (2011).
- Gong, Z. *et al*. Efficient conversion of biomass into lipids by using the simultaneous saccharification and enhanced lipid production process. *Biotechnology for Biofuels* **6**, 36 (2013).
- Gong, Z. *et al*. Lipid production from corn stover by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnology for Biofuels* **7**, 158 (2014).

Griffin, M.A., Spakowicz, D.J., Gianoulis, T.A., Strobel, S.A. 2010. Volatile organic compound production by organisms in the genus *Ascochyne* and a re-evaluation of myco-diesel production by NRRL 50072. *Microbiology*, **156**(Pt 12), 3814-29. 10.1099/mic.0.041327-0

Gross S., and E. I. Robbins. 2000, Chemistry and Ecology of Highly Acidic Environments. Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts *Hydrobiologia* 433:91-109.

Hua-Van A., Daviere J.M., Kaper F., Langin T., and M.J. Daboussi. 2000. Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. *Curr Genet.* 37: 339-47.

Hui, L. *et al.* Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* **101**, 7556–7562 (2010).

Inskeep W.P., G.G. Ackerman, W.P. Taylor, M. Kozubal, S. Korf, and R.E. Macur. 2005. On the energetics of chemolithotrophy in nonequilibrium systems: case studies of geothermal springs in Yellowstone National Park. *Geobiology.* 3: 297–320.

Kerstetter J.D. and J.K. Lyons. 2001. Wheat straw for ethanol production in Washington: a resource, technical and economic assessment, Washington State University, Cooperative Extension Energy Program.

Kozubal M., Macur R.E., Korf S., Taylor W.P., Ackerman G.G., Nagy A., and W.P. Inskeep. 2008. Isolation and Distribution of a Novel Iron-Oxidizing Crenarchaeon from Acidic Geothermal Springs in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 942–949.

Lezinou V., Christakopoulos P., Kekos D., Macris B.J. 1994. Simultaneous saccharification and fermentation of sweet sorghum carbohydrates to ethanol in a fed-batch process. *Biotechnology Letters*. 16: 983–988.

Li Q., Du W., Liu D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 80: 749–56.

Liang, Y., Perez, I., Goetzelmann, K. & Trupia, S. Microbial lipid production from pretreated and hydrolyzed corn fiber. *Biotechnol Progress* **30**, 945–951 (2014).

Liu, C.-Z., Wang, F., Stiles, A. R. & Guo, C. Ionic liquids for biofuel production: Opportunities and challenges. *Applied Energy* **92**, 406–414 (2012).

Kerem Z. and Y. Hadar. 1995. Effect of manganese on preferential degradation of lignin by *Pleurotus ostreatus* during solid-state fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 61 (8): 3057–3062.

Mallette, N.D., Knighton, W.B., Strobel, G.A., Carlson, R.P., Peyton, B.M. 2012. Resolution of volatile fuel compound profiles from *Ascomyces sarcoides*: a comparison by proton transfer reaction-mass spectrometry and solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Applied Microbiology and Biotechnology Express*, **2**(1), 23. 10.1186/2191-0855-2-23

Meng X., Yang J., Xu X., Zhang L., Nie Q., and M. Xian. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34: 1–5.

Nairn N. Saad R.R., Nairn M., 1985, Production of lipids and sterols by *Fusarium oxysporum* (Schlecht). Utilization of some agro-industrial by-products as additives and basal medium, *Agricultural Wastes* **14**(3):207-220

Naqvi B.S., Hashmi K., Farooq A.K., Dilnawaz S., and A.M. Zafar.

1997. Production of Lipids by fermentation Preliminary Report. Journal of Islamic Academy of Sciences. 10: 13–18.

Palmqvist E., and Barbel Hahn-Hagerdal. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 74: 25–33.

Panagiotou G., P. Christakopoulos, L. Olsson. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *Fusarium oxysporum* F3-growth characteristics and metabolite profiling. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 693–699.

Patrick, C., Hallenbeck and Dipankar Ghosh. 2009. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*. In Press.

Pinzi S., I. L. Garcia, F. J. Lopez-Gimenez, M. D. Luque de Castro, G. Dorado and M. P. Dorado. 2009. The Ideal Vegetable oil-based Biodiesel Composition: A Review of Social, Economical and Technical Implications. *Energy Fuels*

Ruan, Z. *et al.* Co-hydrolysis of lignocellulosic biomass for microbial lipid accumulation. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1039–1049 (2013).

Ruiz E., I. Romero M. Moya S. Sanchez V. Bravo E. Castro. 2007. Sugar fermentation by *Fusarium oxysporum* to produce ethanol. *World J Microbiol Biotechnol.* 23: 259–267.

Seo H., Kim H., Lee O, Ha J., Lee H., and K. Jung. 2009. Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *Journal of Industrial Microbiology*

and Biotechnology. 36: 285–292.

Seraphim P., Michael K., A. George. 2004. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour Technol.* 95: 287–91.

Smith S.N. 2007. An Overview of Ecological and Habitat Aspects in the Genus *Fusarium* with Special Emphasis on the Soil-Borne Pathogenic Forms Plant Pathology Bulletin. 16: 97–120.

Starkey, R. L. 1973. Effect of pH on toxicity of copper to *Scytalidium* sp., a copper-tolerant fungus, and some other fungi. *J. gen. Microbiol.* 78: 217–225.

Sung, M., Seo, Y. H., Han, S. & Han, J.-I. Biodiesel production from yeast *Cryptococcus* sp. using Jerusalem artichoke. *Bioresource Technology* 155, 77–83 (2014).

Tebo, B.M., W.C. Ghiorse, L.G. van Waasbergen, P.L. Siering, and R. Caspi. 1997. Bacterially mediated mineral formation: Insights into manganese(II) oxidation from molecular genetic and biochemical studies. In: J.F. Banfield and K.H. Nealson (Eds.) *Geomicrobiology: Interactions Between Microbes and Minerals*. *Reviews in Mineralogy*. 35: 225–266.

Tsakali E., Petrotos K., D'Alessandro A.G., Goulas P. 2010. A review on whey composition and the method used for its utilization for food and pharmaceutical products. *Proc. 6th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-Industry (FOODSIM' 2010)*, Bragança, Portugal, June 24-26. V. Cadavez and D. Thiel eds, *EUROSIS-ETI Publication*, pp. 195-201.

White J.S., Yohannan B.K., Walker G.M. 2008. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. *FEMS Yeast Res.* 8 (7): 1175–84. Epub 2008 Jun 10.
Xie, H. *et al.* Enzymatic hydrolysates of corn stover pretreated by a N-methylpyrrolidone-ionic liquid solution for microbial lipid production. *Green Chem.* 14, 1202–1210 (2012).

Xiros, C., and P. Christakopoulos. 2009. Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by *Fusarium oxysporum* consolidated system. *Biotechnol Biofuels*. 104.

Xiros C., Topakas E, Katapodis P, Christakopoulos P. 2008. Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. *Ind Crops Prod.* 28 :213-224.

Ya. E. Sergeeva, L. A. Galanina, D. A. Andrianova, and E. P. Feofilova. 2008. Lipids of Filamentous Fungi as a Material for Producing Biodiesel Fuel. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 44: 523–527.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гифомицетовая грибная биоподстилка, содержащая по меньшей мере один слой клеток, где биоподстилка имеет плотность клеток по меньшей мере 25 г/л (сухая масса/л питательной среды) и имеет толщину от 1 до 30 мм.

2. Гифомицетовая грибная биоподстилка по п.1, где гифомицет выбран из группы, состоящей из вида рода *Fusarium* и вида рода *Rhizopus*.

3. Гифомицетовая грибная биоподстилка по п.1 или 2, где гифомицет представляет собой штамм

Fusarium, обозначенный как МК7 (номер депозита в АТСС РТА-10698), *Fusarium venenatum* или *Rhizopus oligosporus*.

4. Гифомицетовая грибная биоподстилка по любому из пп.1-3, где по меньшей один гифомицет представляет собой штамм *Fusarium*, обозначенный как МК7 (номер депозита в АТСС РТА-10698).

5. Гифомицетовая грибная биоподстилка по любому из пп.1-4, которая содержит по меньшей мере два структурно различающихся слоя клеток, контактирующих друг с другом, включая слой воздушных гиф и нижний слой, контактирующий с искусственной средой, причем слой воздушных гиф менее плотный, чем нижний слой.

6. Гифомицетовая грибная биоподстилка по любому из пп.1-5, которая содержит три структурно различающихся слоя клеток.

7. Гифомицетовая грибная биоподстилка по любому из пп.1-6, где плотность клеток составляет по меньшей мере 50 г/л.

8. Гифомицетовая грибная биоподстилка по любому из пп.1-7, которая содержит белок в количестве по меньшей мере 40%.

9. Гифомицетовая грибная биоподстилка по любому из пп.1-8, которая содержит липиды в количестве по меньшей мере 39%.

10. Гифомицетовая грибная биоподстилка по п.1, в которой гифомицеты выбраны из группы, состоящей из видов рода, выбранного из группы, состоящей из *Fusarium*, *Fusisporium*, *Pseudofusarium*, *Gibberella*, *Sporotrichella*, *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma*; вид в пределах порядка *Mucorales*; штамм гифомицетов, обозначенный как МК7; дрожжи, способные производить гифы; и их комбинации.

11. Гифомицетовая грибная биоподстилка по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что биоподстилка содержит 5-20% твердых веществ.

12. Гифомицетовая грибная биоподстилка по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что биоподстилка обладает достаточной прочностью на растяжение и структурной целостностью, чтобы обращаться с ними, не вызывая разрыва.

13. Гифомицетовая грибная биоподстилка по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что биоподстилка состоит из 5% или более по весу грибов.

14. Гифомицетовая грибная биоподстилка по п.1, в которой плотность клеток составляет по меньшей мере 75 г/л.

15. Гифомицетовая грибная биоподстилка по п.1, в которой плотность клеток составляет по меньшей мере 120 г/л.

16. Гифомицетовая грибная биоподстилка по п.1, в которой плотность клеток составляет по меньшей мере 180 г/л.

17. Гифомицетовая грибная биоподстилка по п.1, отличающаяся тем, что биоподстилка содержит плотный нижний слой и слой воздушных гиф, имеющий отношение толщин, по меньшей мере, 0,41.

18. Гифомицетовая грибная биоподстилка по п.1, отличающаяся тем, что биоподстилка имеет среднюю длину гифы от 0,05 до 2 см.

19. Гифомицетовая грибная биоподстилка по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что биоподстилка содержит аминокислоты, выбранные из триптофана, цистеина, метионина, аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, лизина, тирозина и валина.

20. Пищевой продукт, содержащий гифомицетовую грибную биоподстилку по любому из предшествующих пунктов.

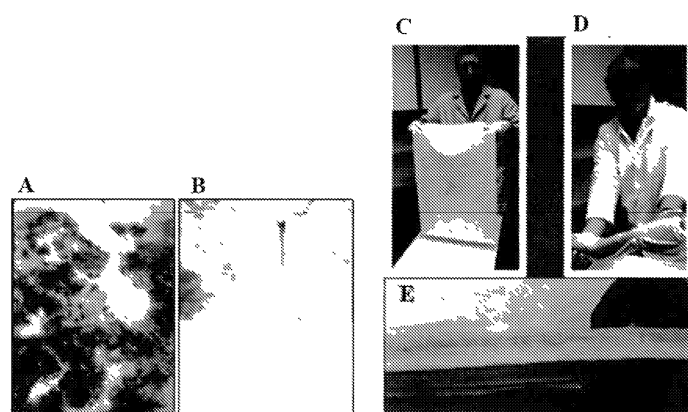
21. Способ удаления углерода и азота из воды из отстойного бассейна, включающий:

(а) доведение pH воды из отстойного бассейна до 2,6;

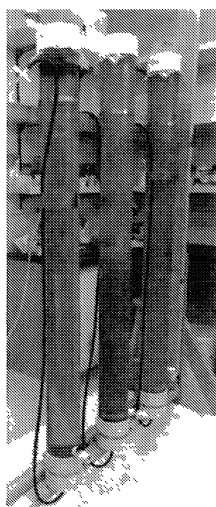
(б) инокуляцию скорректированной воды из отстойного бассейна штаммом МК7 (депонированным в АТСС под номером доступа РТА-10698); и

(с) продукцию гифомицетовой биоподстилки на поверхности отстойного бассейна;

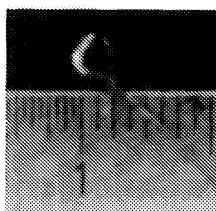
где биоподстилка содержит углерод и азот, удаленные из воды из отстойного бассейна.



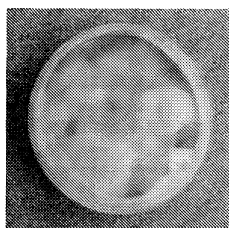
Фиг. 1



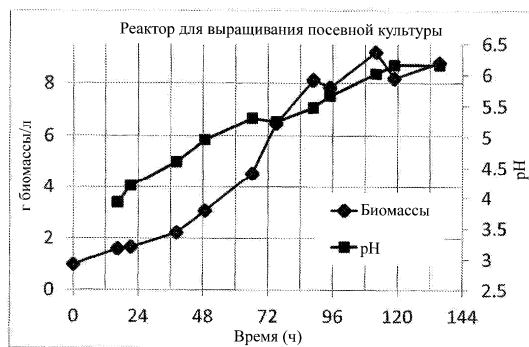
Фиг. 2



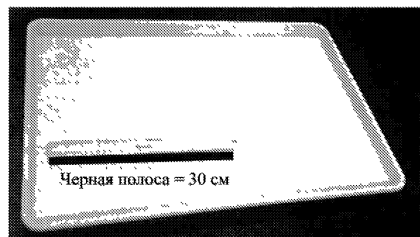
Фиг. 3А



Фиг. 3В



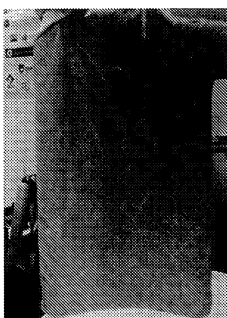
Фиг. 4



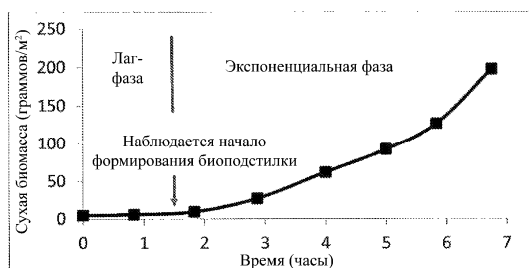
Фиг. 5А



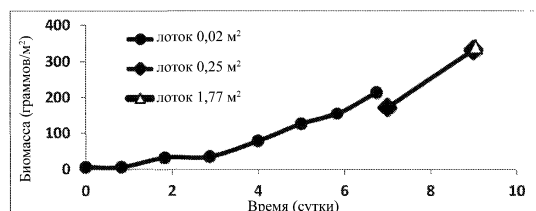
Фиг. 5В



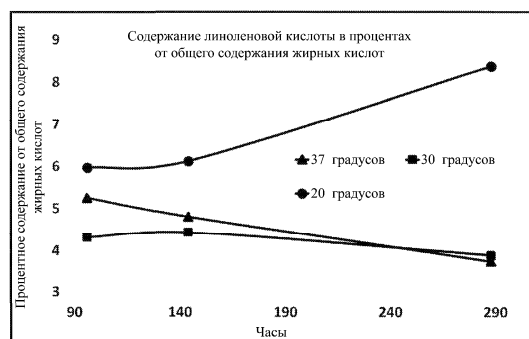
Фиг. 6



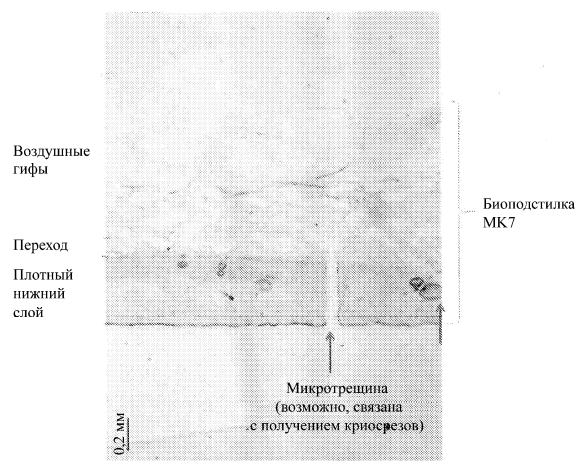
Фиг. 7



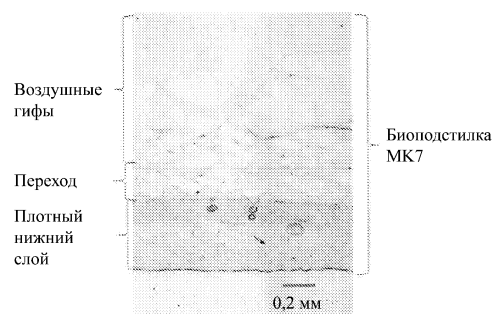
Фиг. 8



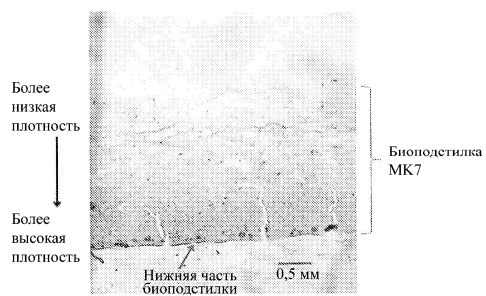
Фиг. 9



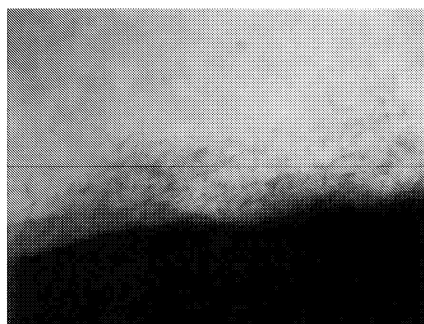
Фиг. 10А



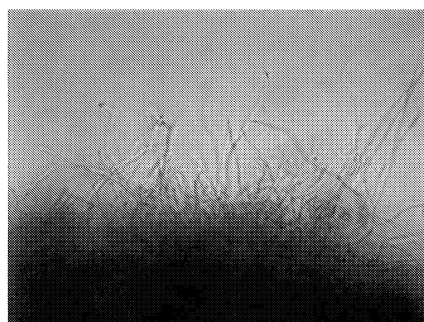
Фиг. 10В



Фиг. 10С



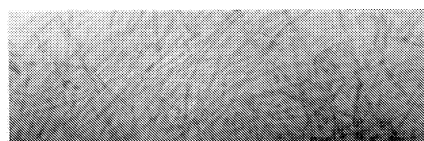
Фиг. 11А



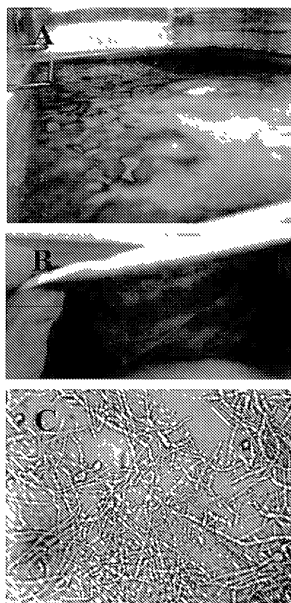
Фиг. 11В



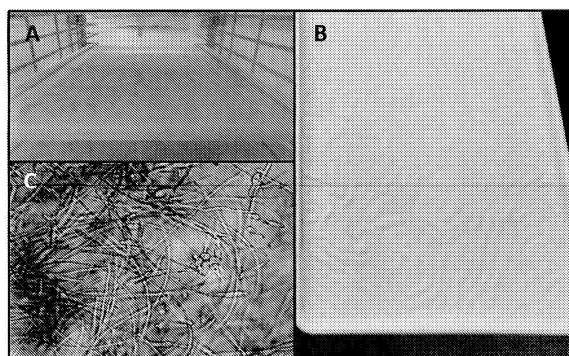
Фиг. 11С



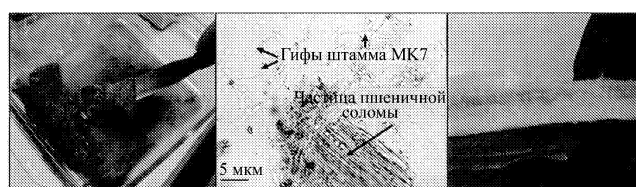
Фиг. 11D



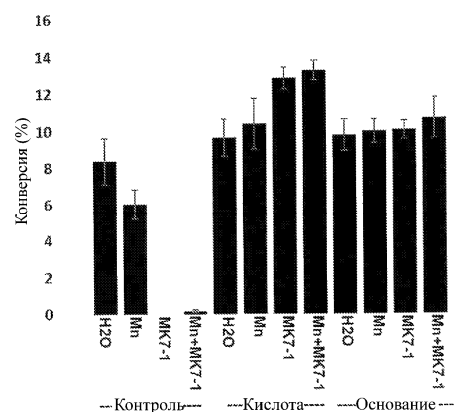
Фиг. 12



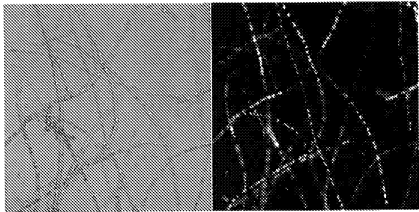
Фиг. 13



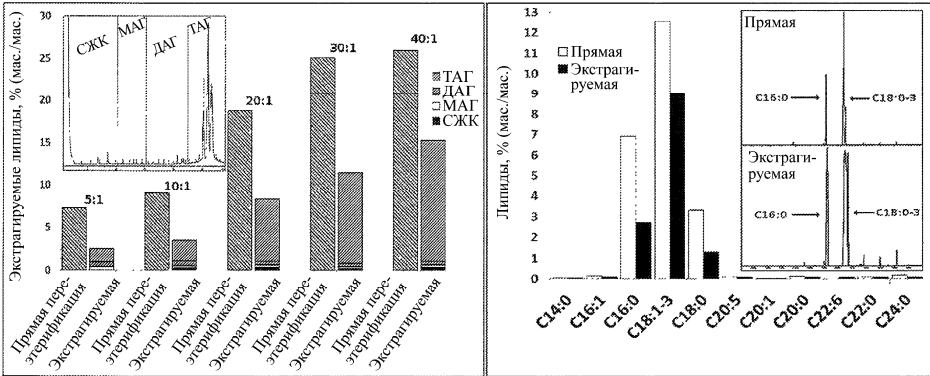
Фиг. 14



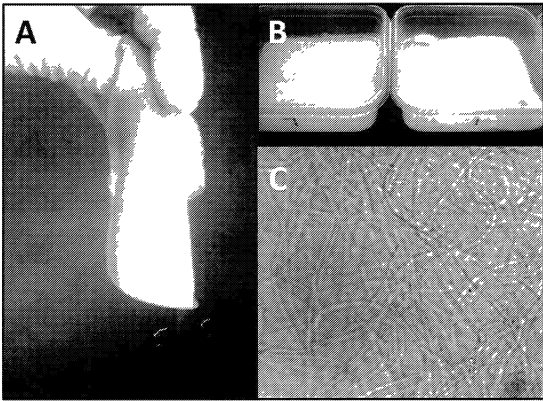
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

