

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291864** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.10.03

(51) Int. Cl. *C12N 1/00* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.01.22

(54) **ГИДРОЛИЗАТЫ БЕЛКОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ, И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/965,303**

(32) **2020.01.24**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/014795**

(87) **WO 2021/151025 2021.07.29**

(71) Заявитель:
ЭЙР ПРОТЕИН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Рид Джон С., Робертсон Дэн И. (US)

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Предложена композиция гидролизата белка, полученная из микроорганизма, такого как хемоавтотрофный микроорганизм, и способы ее получения и применения. Композиция гидролизата белка может быть получена экологически чистым способом путем фиксации двуокиси углерода из биогенных или атмосферных источников. Композиция гидролизата белка находит применение в качестве добавки к культуральной среде для бессывороточного культивирования клеток животных, а также для выращивания других типов клеток, таких как пробиотические и молочнокислые бактерии. Таким образом, в настоящем изобретении предложены экологически чистые, гуманные способы культивирования клеток для фармацевтического и нутрицевтического применения, а также для употребления человеком в качестве пищевого ингредиента или продукта.

A1

202291864

202291864

A1

ГИДРОЛИЗАТЫ БЕЛКОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ, И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[01] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/965303, поданной 24 января 2020 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[02] Настоящее изобретение относится к области гидролизатов белков, полученных из биологических источников, и к способам их получения. В частности, настоящее изобретение относится к получению гидролизата белка из возобновляемых источников, таких как биологические процессы, предназначенные для улавливания выбросов диоксида углерода и других процессов переработки или утилизации отработанного углерода. Настоящее изобретение относится к применению гидролизатов белков для поддержки роста других микроорганизмов или отдельных клеток, включая пробиотические микроорганизмы, эукариотические клетки и клетки, продуцирующие витамины. Настоящее изобретение также относится к способам культивирования клеток для получения мясоподобных продуктов, включая культивирование клеток животных, *например*, получения искусственного мяса с использованием среды, не содержащей компонентов животного происхождения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[03] Различные системы клеточных культур используют для получения полезных биологических продуктов, включая небольшие биомолекулы, терапевтические антитела и клеточную терапию. Промышленные ферментации часто выполняют в полуопределенных и комплексных средах, которые могут давать более высокие уровни биомассы или продуктов, полученных в результате ферментации. Необработанные и неизвестные добавки, такие как пептоны, гидролизаты белка, дрожжевые экстракты, факторы роста и т. д., могут быть добавлены в ферментационную среду для обеспечения широкого спектра питательных веществ. Включение материалов животного происхождения в микробиологические среды имеет долгую историю. Традиционно среды для культивирования клеток животных включали сыворотку животных или

гидролизаты белков животного происхождения для поддержания и стимулирования роста клеток. Например, сыворотка животных обеспечивает питательные вещества, гормоны, факторы роста и прикрепления, микроэлементы, такие как железо, буферную емкость, защиту от активных форм кислорода и механического сдвига, а также различные другие полезные факторы. Гидролизат животного белка служит источником азота и содержит пептиды и/или аминокислоты и витамины.

[04] Положительное влияние гидролизатов белка на рост клеточных культур, таких как культуры клеток животных или культуры молочнокислых бактерий (МКБ), хорошо известно, и они служили полезными добавками для клеточных культур в течение многих десятилетий. МКБ обладают ограниченной способностью синтезировать аминокислоты и зависят от экзогенных источников аминокислот и пептидов. Следовательно, обеспечение биохимических источников азота (*например*, белков, пептидов и аминокислот) имеет важное значение для роста культур МКБ. Типичными источниками аминокислот являются пептиды, содержащиеся в молоке и других гидролизованных белках. Известно, что гидролизаты белка различного происхождения по-разному действуют на различные штаммы МКБ, причем некоторые из них способствуют росту организма, а другие индуцируют определенный тип метаболизма аминокислот. Различные коммерческие продукты гидролизата белка, которые, как сообщается, успешно использовались для ферментации МКБ, включают N-Z амин, Ну-Case, Ну-Soy, Edamin и N-Z-Case (Misono, H., Goto, N., & Nagasaki, S. (1985). Purification, crystallization and properties of nadp⁺-specific glutamate dehydrogenase from lactobacillus fermentum. *Agricultural and Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866676>; Molskness, T. A., Lee, D. R., Sandine, W. E., & Elliker, P. R. (1973). -D-phosphogalactoside galactohydrolase of lactic streptococci. *Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.25.3.373-380.1973>; Viniegra-Gonzalez, G., & Gomez, J. (1984). Lactic acid production by pure and mixed bacterial cultures. *Bioconversion Systems*. Boca Raton, FL; CRC Press. P, 17–39.; Vedamuthu, E. R. (1980). *Method for diacetyl flavor and aroma development in creamed cottage cheese*. Патент США 4191782; Kegel, M. A., & Wallace, D. L. (1989). *Use of stabilizing agents in culture media for growing acid producing bacteria*. Патент США 4806479).

[05] Триптон (расщепление казеина протеазой трипсин или панкреатическое расщепление казеина) является обычным ингредиентом в лабораторных и ферментационных средах для выращивания микроорганизмов дикого типа и генетически модифицированных микроорганизмов. Появление технологии рекомбинантной ДНК и

ее внедрение в производство биофармацевтических продуктов привело к увеличению спроса на среды, содержащие компоненты животного происхождения.

[06] Гидролизаты белка, содержащие олигопептиды и свободные аминокислоты, широко используют в культуре клеток животных для получения, например, терапевтических белков. Сообщалось, что они увеличивают плотность клеток и дают более высокие выходы белковых продуктов. Многие коммерчески производимые продукты, такие как гормон роста человека, антибиотики, инсулин и т. д., производятся рекомбинантными штаммами, выращенными на питательных веществах и компонентах сред, полученных из крупного рогатого скота.

[07] Существует множество различных типов коммерчески доступных гидролизованных белков, полученных из различных источников, от овощей до мяса и молока. Примеры источников включают казеины, сывороточные белки, обезжиренное молоко, изоляты и концентраты молочных и сывороточных белков, лактальбумин, мясо и ткани животных, коллаген, желатин, кукурузу, семена хлопка, соевую муку, изоляты и концентраты соевых белков. Некоторые из этих материалов являются побочными продуктами других процессов и сильно различаются. В других случаях, даже несмотря на то, что конкретный источник белка (*например*, казеин и сыворотка) может иметь довольно постоянный состав аминокислот, различные гидролизаты белка из одного и того же источника могут иметь значительные различия в профилях пептидов и аминокислот. Кроме того, различные источники белка, такие как казеин, мясо, желатин, соя и т. д., отличаются друг от друга по общему аминокислотному составу и структуре белка. Гидролизаты молочных продуктов богаты аминокислотами, такими как Glu, Ile, Leu, Val и Met, тогда как гидролизаты мяса/сои относительно более богаты Arg, Cys, Gly и Pro.

[08] Гидролизаты животного происхождения, которые исторически нашли применение в качестве питательных добавок для клеточных культур для производства фармацевтических препаратов, таких как вакцины и биологические препараты, включают гидролизат лактальбумина, гидролизат казеина и приматон. Однако у таких добавок для роста животного происхождения есть и недостатки. Состав сыворотки и гидролизатов белка точно не определен и варьирует от партии к партии. Из-за своего животного происхождения сыворотка сопряжена с риском загрязнения случайными агентами и загрязняющими веществами, такими как прионы. Это послужило основной причиной исключения сыворотки из процессов культивирования клеток. Обеспокоенность биофармацевтической промышленности и регулирующих органов по поводу прионов, таких как трансмиссивные губчатые энцефалопатии (ТГЭ), и других

побочных агентов, таких как вирусы и микоплазма, при использовании компонентов животного происхождения побудила исключить компоненты животного происхождения из сред. С появлением губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (ГЭКРС) и последующим усилением правил Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) предпринимаются усилия по устранению материалов из крупного рогатого скота из ферментационных сред. Сыворотка также дорога в производстве. Другие факторы, такие как доступность сыворотки, деградация молекул-мишеней сывороточными протеазами, влияние на сложность последующей очистки продукта, потенциальная иммуногенность и другие артефакты, связанные с сывороткой, также вызывают озабоченность. Кроме того, растет интерес к использованию гуманных и устойчивых способов производства биологических продуктов. Например, растет интерес к устойчивым способам выращивания мясных продуктов без использования животных.

[09] Традиционно для клеток млекопитающих обычно требуется питательная смесь (основная среда), дополненная 5-20% сыворотки или компонентов, полученных из сыворотки. Фетальная телячья сыворотка (ФТС), также называемая фетальной бычьей сывороткой (ФБС), является богатым источником веществ, составляющих среду, включая гормоны (*например*, инсулин), факторы роста, транспортные белки (такие как трансферрин и альбумин), питательные вещества и факторы прикрепления. Сыворотку традиционно включали в питательные среды как источник питательных веществ, гормонов, факторов роста и ингибиторов протеазы. Она способствует прикреплению и распластыванию клеток животных, обеспечивает неспецифическую защиту от механических повреждений и сил сдвига, связывает токсические соединения и улучшает буферную емкость среды. Альбумин и трансферрин в сыворотке действуют как переносчики липидов, жирных кислот, гормонов и микроэлементов, таких как железо.

[10] Чтобы избежать использования ингредиентов животного происхождения, поставщики сред, кормов и ингредиентов в ответ разработали среды, в которых используют ингредиенты растительного происхождения или которые производятся путем рекомбинантной экспрессии. Гидролизаты белков (*например*, пептоны) десятилетиями использовали для замены сыворотки и компонентов сыворотки в различных процессах с культурами млекопитающих. Было обнаружено, что гидролизаты белка растительного происхождения, например, из семян хлопка, сои или пшеницы, используемые по отдельности или в комбинации, являются подходящими альтернативами бычьей сыворотке в некоторых системах культивирования клеток.

Относительно неочищенные лизаты и экстракты органов, тканей и белков животного происхождения, которые использовали в исторических производственных процессах, заменяются более воспроизводимыми заменителями растительного происхождения и из дрожжей. Гидролизаты молока и мяса во многих случаях также были заменены растительными и дрожжевыми гидролизатами.

[11] Гидролизаты белков растительного происхождения могут содержать смесь олигопептидов, свободных аминокислот, углеводов, витаминов, минералов, таких как калий, кальций, железо, и микроэлементы, липиды, нуклеозиды, нуклеотиды, следовые количества низкомолекулярных компонентов и неопределенных компонентов. Гидролизаты белков могут увеличить как скорость роста клеток, секрецию рекомбинантного белка, так и долгосрочную жизнеспособность клеток. Гидролизаты белка могут поставлять питательные вещества, адгезионные компоненты и/или аналоги факторов роста. Гидролизаты белков используют в качестве основных добавок к средам в бессывороточных процессах культивирования клеток для промышленного производства терапевтических рекомбинантных белков. Хорошо задокументирован положительный эффект гидролизатов растительного происхождения на промышленно важные типы клеток, такие как гибридома, почка африканской зеленой обезьяны (VERO), яичник китайского хомячка (CHO), почка эмбриона человека (HEK), почка детеныша хомячка (BHK) и инфицированные бакуловирусом клетки насекомых *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Сообщается, что гидролизаты белка стимулируют более эффективный клеточный метаболизм с более эффективным использованием аминокислот, часто улучшая клеточный метаболизм по сравнению с сывороткой.

[12] Тем не менее, по-прежнему существует постоянная потребность в новых типах добавок к средам для культивирования клеток, не содержащих компонентов животного происхождения. Некоторые гидролизаты растительного происхождения продемонстрировали плохую эффективность в определенных областях применения. Предыдущие исследования показали, что экстракты глютена пшеницы или экстракты с высоким содержанием свободных аминокислот могут быть токсичными или вызывать токсические эффекты в определенных типах клеток *in vitro* и могут ингибировать синтез белка в бесклеточных системах клеток животных. Есть опасения по поводу остатков пестицидов и гербицидов в некоторых гидролизатах растительного происхождения. Для использования в коммерчески успешных ферментациях ингредиенты сред должны быть недорогими, легкодоступными и воспроизводимого качества. К сожалению, многие сложные питательные вещества, в том числе гидролизаты белков животного и

растительного происхождения, экстракты и сыворотки, подвержены большим несоответствиям из-за различий в биологических источниках и различиях этих материалов в зависимости от региона, климата и времени года. Эти изменения могут значительно повлиять на качество конечного продукта ферментации, что приведет к значительным различиям в результатах и производственных потерях. Существует спрос на комплексные питательные вещества, такие как лизаты, гидролизаты белка и пептидные композиции, которые являются более однородными и не подвержены региональным, климатическим или сезонным изменениям. Существует потребность в продуктах гидролизата белка, имеющих более стабильные пептидные и аминокислотные профили. Существует спрос на гидролизаты белка неживотного происхождения в качестве замены компонентов сред животного происхождения, включая питательные компоненты сред, гидролизаты белка и сыворотку животного происхождения. Необходимо свести к минимуму вариативность между партиями питательных сред и/или добавками питательных сред. Существует также спрос на гидролизаты белка, не содержащие пестицидов, гербицидов, фунгицидов, гормонов или остатков антибиотиков. Поскольку компоненты животного происхождения могут содержать инфекционные агенты, существует интерес к разработке сред, содержащих минимальное количество компонентов животного происхождения или полностью не содержащих компонентов животного происхождения. Также существует этическое и экологическое требование минимизировать использование продуктов животного происхождения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[13] В настоящем изобретении предложены композиции гидролизата белка, полученные из микроорганизмов, выращенных путем ферментации на источнике органического углерода или выращенных хемоавтотрофно. В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы выращивают на источнике углерода C1, например: хемоавтотрофный рост на CO₂ в качестве источника углерода, карбоксидотрофный рост на CO в качестве источника углерода или метанотрофный или метилотрофный рост на CH₄ и/или CH₃OH в качестве источника углерода.

[14] Гидролизаты белка, описанные в настоящем документе, подходят в качестве замены всей или части добавки компонента животного происхождения для стимуляции пролиферации, поддержания, размножения и/или дифференцировки клеток животных в культуре в отсутствие одного или нескольких компонентов культуры клеток животного происхождения, таких как аминокислоты, гидролизаты белков или сыворотка.

Например, гидролизаты белков могут быть пригодны для применения в качестве добавки, не содержащей компонентов животного происхождения, *например*, в среде, не содержащей компонентов животного происхождения, или бессывороточной среде. Лизаты и/или гидролизаты, полученные, как описано в настоящем документе, могут обеспечивать стимулирующие рост пептиды, аминокислоты, углеводы, липиды, минералы и/или витамины. В некоторых вариантах осуществления пептиды, полученные, как описано в настоящем документе, выполняют одну или несколько из следующих функций: источник аминокислот (*например*, заменяя или дополняя свободные аминокислоты); стимулятор роста и/или получения биомассы и/или представляющих интерес молекул; защита клеток от напряжения сдвига. В некоторых вариантах осуществления лизаты и/или гидролизаты, описанные в настоящем документе, стимулируют более эффективный клеточный метаболизм посредством механизмов, включающих, помимо прочего, более эффективное поглощение и использование аминокислот. В некоторых вариантах осуществления лизаты и/или гидролизаты улучшают скорость роста и/или экспрессию белка в культуре, которая выращивается на среде, содержащей лизат и/или гидролизат, по сравнению с культурой, которая не включает лизат и/или гидролизат. В некоторых вариантах осуществления лизаты и/или гидролизаты улучшают характеристики культур, выращенных на среде, которая включает лизат и/или гидролизат, за счет эффектов, включая, помимо прочего, осмопротекторные и/или антиапоптотические эффекты. В некоторых вариантах осуществления лизаты и/или гидролизаты помогают защитить от эффектов сдвига. В определенных вариантах осуществления лизаты и/или гидролизаты способствуют прикреплению и/или последующему распространению клеток.

[15] Настоящее изобретение включает гидролизаты белка, не содержащие компоненты животного происхождения, подходящие для использования в производстве мясных продуктов, пригодных к употреблению в пищу, полученных из культивируемых клеток животных. Кроме того, настоящее изобретение включает гидролизаты белка, не содержащие компоненты животного происхождения, подходящие для выращивания организмов, которые «общепризнанны безопасными» (GRAS, англ.: generally recognized as safe), и/или пробиотических микроорганизмов, которые также могут быть переработаны в мясоподобные продукты и/или продукты с высоким содержанием белка, а также в другие пищевые продукты, ингредиенты, питательные вещества и ароматизаторы. Кроме того, настоящее изобретение включает гидролизаты белка, не содержащие компоненты животного происхождения, подходящие для выращивания

организмов, которые считаются полезными членами растительного или животного микробиома. В некоторых вариантах осуществления растение или животное используют для получения продуктов питания для человека или корма для животных, или других продуктов растительного или животного происхождения, которые используются людьми. Гидролизаты белков, не содержащие компоненты животного происхождения, могут быть получены экологически чистым способом, *например*, путем микробной фиксации CO₂ из экологических и чистых источников, таких как CO₂, отходящий газ от ферментации на пивоваренном или винодельческом заводе, а также CO₂, улавливаемый из атмосферы или какого-либо другого природного источника.

[16] Композиции гидролизатов белка по настоящему изобретению могут быть определены обильным содержанием аминокислот, распределением пептидов по размерам, обильным содержанием различных пептидных последовательностей, идентичностью и обильным содержанием белка, липидным составом, обильным содержанием органических полимеров, витаминами, минералами и т. д. В данном изобретении предложена библиотека гидролизатов белков, в которой различные композиции в библиотеке характеризуются одним или несколькими из следующих показателей: обильным содержанием различных аминокислот, распределение пептидов по размерам, обильным содержанием пептидных последовательностей, идентичностью и обильным содержанием белка, липидным составом, обильным содержанием органических полимеров, витамины, минералы и др. Композиция гидролизата белка может быть подходящей для стимуляции конкретных аспектов (*например*, пролиферации, размножения, развития, дифференцировки) культуры клеток животных или микроорганизмов, в зависимости от композиции гидролизата.

[17] Настоящее изобретение включает композиции гидролизата белка, содержащие биостимулирующие компоненты. В некоторых таких вариантах осуществления биостимулятор улучшает продуктивность или характеристики культуры растения или гриба. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает биостимулирующий полиэстер, такой как полимер полигидроксиалканоата (ПГА). В некоторых вариантах осуществления полимер ПГА может продуцироваться микроорганизмом, *например*, хемоавтотрофным микроорганизмом, из которого получают композицию гидролизата белка. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает полигидроксibuтират (ПГБ). В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает полигидроксивалерат (ПГВ). В некоторых вариантах осуществления композиция

гидролизата белка включает сополимеры, которые включают ПГБ и/или ПГВ. В других вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает олигомеры ПГБ или ПГА, или ПГВ, или их сополимеры. В некоторых вариантах осуществления олигомеры образуются в результате гидролиза соответствующего полимера, содержащего ПГБ или ПГА, или ПГВ. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает мономеры гидроксипутрата (ГБ) или гидроксивалерата (ГВ).

[18] Настоящее изобретение включает композиции гидролизата белка, содержащие один или несколько витаминов. Витамин может продуцироваться хемоавтотрофным микроорганизмом, из которого получена композиция гидролизата белка. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает один или несколько витаминов группы В, таких как витамин В₁, витамин В₂ и/или витамин В₁₂.

Также в настоящем изобретении предложены способы получения композиции гидролизата белка из культуры микроорганизмов, такой как культура хемоавтотрофных микроорганизмов. Композиция гидролизата белка по настоящему изобретению может варьироваться в зависимости от различных производственных параметров, таких как группа и штамм микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, используемого в культуре, условий роста, источника углерода и/или энергии, используемых для культивирования микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, способ приготовления гидролизата белка, геновая инженерия микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма и т. Д. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм представляет собой хемоавтотрофный микроорганизм, *например*, любой подходящий хемоавтотрофный микроорганизм, который может фиксировать углерод из источника углерода С1, такого как СО₂. В некоторых вариантах осуществления фиксация СО₂ связана с окислением Н₂. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм, *например*, хемоавтотрофный микроорганизм, является генетически сконструированными. Или в других вариантах осуществления микроорганизм, *например*, хемоавтотрофный микроорганизм, не является генетически сконструированным и представляет собой либо встречающийся в природе штамм, либо мутантный или вариантный штамм, созданный с помощью одного или нескольких известных способов, не связанных с геновой инженерией.

[19] Композицию гидролизата белка можно приготовить путем физической, химической и/или ферментативной обработки биомассы, полученной в результате роста микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма. Физические обработки включают воздействие на биомассу повышенного давления и/или повышенной

температуры. Химическая обработка включает воздействие на биомассу кислотных или щелочных условий. Ферментативные обработки включают протеолиз экзопроотеазами и/или специфичными для последовательности эндопротеазами и/или металлопротеазами. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка сохраняет биостимулирующие компоненты и/или витамины после воздействия на биомассу процессом приготовления.

[20] Также предложены способы культивирования клеток, включая клетки животных, с использованием композиции гидролизата белка по настоящему изобретению в качестве добавки к культуральной среде. Композиция гидролизата белка может обеспечивать культуральную среду питательными веществами, подходящими для поддержания роста и/или стимулирования развития и дифференцировки животных клеток в культуре. Способ может включать введение гидролизата белка в культуральную среду и культивирование клеток животных в культуральной среде. Композиция гидролизата белка может заменять один или несколько компонентов обычной среды для культивирования клеток, которые обычно получают из животного источника, таких как аминокислоты, гидролизат белка или сыворотка. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток животных, дополненная композицией гидролизата белка, представляет собой бессывороточную культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, дополненная композицией гидролизата белка по настоящему изобретению, представляет собой веганскую культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, включая, помимо прочего, среду для культивирования клеток животных, в которую добавлена композиция гидролизата белка, представляет собой культуральную среду, не содержащую компоненты животного происхождения. В некоторых вариантах осуществления лизат, гидролизат белка и/или аминокислотную композицию, полученную из микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, вводят вместе с сывороткой в культуру клеток животных. В некоторых вариантах осуществления лизат, гидролизат белка и/или аминокислотную композицию используют для роста зависимых от прикрепления клеток. В других вариантах осуществления лизат, гидролизат белка и/или аминокислотную композицию используют для роста независимых от прикрепления клеток.

[21] Композиция гидролизата белка может подходить для применения в культуральной среде для культивирования клеток для различных целей, включая рекомбинантные клеточные линии для экспрессии терапевтических антител, белков или

низкомолекулярных веществ, или иммунные клетки, культивируемые для клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка может подходить для применения в культуральной среде для выращивания мясного продукта, включая, помимо прочего, искусственное мясо или продукт-заменитель мяса. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка может подходить для применения в культуральной среде для культивирования пробиотических или витамин-синтезирующих микроорганизмов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[22] На **Фиг. 1** показана схематическая диаграмма способа в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения получения и экстракции питательных веществ из первого биопроцесса, которые используют в питательной среде для второй культуры клеток.

[23] На **Фиг. 2** показана схематическая диаграмма способа в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения хемоавтотрофного получения богатой белком биомассы из CO₂ и последующего преобразования богатой белком биомассы в гидролизат белка, который используют в питательной среде для второй культуры клеток.

[24] На **Фиг. 3** показана схематическая диаграмма способа в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения хемоавтотрофного получения богатой белком биомассы из CO₂ и последующего преобразования богатой белком биомассы в гидролизат белка, который используют в питательной среде для культуры клеток животных, из которой клетки животных выращивают и извлекают для получения выращенного мяса, *т.е.* мясных продуктов, которые не включают гибель целых многоклеточных животные.

[25] На **Фиг. 4** показана схематическая диаграмма способа в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения хемоавтотрофного получения богатой белком биомассы из CO₂ и последующего преобразования богатой белком биомассы в гидролизат белка, который используют в питательной среде для микробной культуры, содержащей пробиотические и/или полезные микроорганизмы для людей, растений, животных.

[26] На **Фиг. 5** показан рост полезного гриба *Trichoderma atroviride* на среде с добавлением гидролизата белка (ГБ), полученного из *C. necator*, выращенного на CO₂ в качестве источника углерода, по сравнению с ростом контрольного *Trichoderma atroviride* без добавки ГБ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[27] Предложена композиция гидролизата белка, полученная из микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, и способы ее получения и применения. Композиции гидролизата белка, полученного из микроорганизмов, могут быть получены из микробной биомассы и могут быть использованы в качестве добавки к среде для обеспечения питательными веществами и поддержки клеток животных, выращенных в культуре, или могут быть использованы в качестве питания для других эукариотических и/или прокариотических клеток, таких как, *например*, молочнокислые бактерии (МКБ) и/или пробиотики. Подобно другим гидролизатам белка растительного происхождения или из дрожжей, гидролизаты белка, полученного из микроорганизмов, по изобретению можно использовать в качестве добавки к культуральной среде для размножения, дифференцировки и/или развития клеток, таких как эукариотические клетки (*например*, клетки животных) и/или прокариотические клетки (*например*, молочнокислые бактерии и/или пробиотические клетки), без использования компонентов животного происхождения, таких как сыворотка или факторы роста. В некоторых вариантах осуществления хемоавтотрофные микроорганизмы можно культивировать автотрофно, *например*, путем фиксации CO_2 в сочетании с окислением H_2 , для получения биомассы, *например*, из чистого и экологического источника CO_2 , такого как отходящий газ от ферментации на пивоваренном или винодельческом заводе, или CO_2 , улавливаемого из атмосферы, океана или других природных источников, таких как геотермальные или горячие источники. Использование хемоавтотрофных микроорганизмов обеспечивает большую гибкость в выборе источника углерода в качестве сырья для производства; от отходящих газов от ферментации до природных источников CO_2 , промышленных дымовых газов и газификации биомассы, *например*, сельскохозяйственных или лесных отходов.

[28] Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает экологически чистый источник гидролизатов белка, который можно использовать для поддержки гуманных способов культивирования клеток животных и получения пищевых продуктов с животными белками и другими питательными веществами.

[29] В настоящем изобретении предложены способы получения культуральной среды для культивирования микроорганизмов или клеток, включающие: культивирование первого микроорганизма и, таким образом, получение биомассы; обработку биомассы, полученной от первого культивируемого микроорганизма, с получением богатого

белком продукта, полученного из биомассы, такого как, помимо прочего, лизат с высоким содержанием белка или композиция гидролизата белка; и добавление богатой белком питательной композиции (*например*, богатого белком лизата или гидролизата белка) в культуральную среду для второй культуры, содержащей второй микроорганизм или клетки, при этом богатая белком питательная композиция (*например*, богатый белком лизат или гидролизат белка) служит источником питательных веществ для роста второго микроорганизма или клеток. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления вторая культура содержит клетки животных.

[30] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка по изобретению может использоваться в качестве добавки к среде для культивирования пищевого продукта, такого как мясной продукт, и, таким образом, поддерживает устойчивые, гуманные способы производства пищевых продуктов, таких как выращенное мясо.

[31] Производство новых белковых композиций, пригодных для употребления в пищу человеком, которые точно имитируют свойства мяса и функционируют в качестве заменителей мяса или искусственных мясных продуктов, описано, например, в заявке РСТ № РСТ/US20/67555, поданной 30 декабря 2020 г. и озаглавленной «ПИЩЕВЫЕ КОМПОЗИЦИИ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ БЕЛКА», которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

[32] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка по настоящему изобретению может включать биостимулирующие компоненты, такие как полимеры полигидроксиалканоатов (ПГА), которые способствуют пролиферации, поддержанию, развитию и/или дифференцировке клеток, в отличие от растений, которые обычно не продуцируют ПГА. ПГА, олигомеры ПГА и мономеры, полученные в настоящем изобретении, могут действовать как питательные вещества и биологически активные вещества.

[33] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка по изобретению включает один или несколько витаминов, таких как, помимо прочего, витамин В₁, В₂ и/или витамин В₁₂, которые могут стимулировать рост, развитие и/или дифференцировку клеточной культуры и/или улучшать пищевую ценность выращиваемого пищевого продукта при добавлении в питательную среду гидролизата белка. Гидролизаты, полученные, как описано в настоящем документе, могут содержать уникальные питательные вещества, которые не синтезируются растениями и которые обычно не присутствуют в растениях в заметных количествах, такие как, помимо

прочего, витамин В₁₂.

[34] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка по изобретению может улучшать или усиливать вкус выращиваемого пищевого продукта, если она содержится в культуральной среде. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка по изобретению обладает питательными свойствами, которые сравнимы или превосходят таковые у гидролизатов и экстрактов животных, растений и дрожжей.

[35] В настоящем изобретении предложены способы производства гидролизатов, лизатов и/или экстрактов белка с рядом преимуществ, включая, помимо прочего: последовательные и полностью определенные начальные субстратов, начиная с хемоавтотрофного превращения СО₂ и/или других субстратов С1 в богатую белком биомассу; композиционная целостность; крупномасштабные производственные мощности при небольшой занимаемой площади; отсутствие перемещения сельскохозяйственных угодий; меньшее потребление воды по сравнению с гидролизатами растительного или животного происхождения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для получения гидролизатов, лизатов и/или экстрактов белка, полученных, как описано в настоящем документе, не требуются пахотные земли.

[36] В настоящем изобретении предложены способы кислотного, основного и ферментативного гидролиза с получением гидролизатов, обогащенных желаемыми фракциями, включая, помимо прочего: пептиды, служащие источником пригодных для использования аминокислот или оказывающие специфическое воздействие на здоровье растений или клеток; эндопротеазы, специфичные для расщепления аминокислотной последовательности, или комбинации протеаз для расщепления белка; регулирование состава пептидов для получения гидролизатов, обогащенных пептидами желаемой длины; пептиды с распределением остатков от около 2 до около 10 аминокислотных остатков, которые улучшают рост и/или выход некоторых культивируемых клеток животных.

[37] Некоторые пептиды могут действовать как внешние молекулярные сигналы, влияющие на растения, животных и микробиомы. Гидролизаты белка могут обеспечивать растения питательными веществами на уровне корней или стимулировать полезные микробные штаммы в ризобиоме почвы, косвенно способствуя росту и продуктивности растений. Некоторые гидролизаты, лизаты и/или экстракты белка по настоящему изобретению могут стимулировать организмы в растительном или

животном микробиоме, что повышает устойчивость к болезням и/или поглощение питательных веществ.

[38] Гидролизаты, лизаты и/или экстракты белка, описанные в настоящем документе, могут обеспечивать животное питательными веществами и биоактивными веществами через кишечник или стимулировать полезные для хозяина штаммы в кишечном микробиоме.

[39] Если не указано иное в данном документе, научные и технические термины, используемые в данном изобретении, должны иметь значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Кроме того, если контекст не требует иного, термины в единственном числе включают множественное число, а термины в множественном числе включают единственное число. Способы и методики по настоящему изобретению обычно выполняют в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники. Как правило, номенклатура, используемая в связи с биохимией, энзимологией, молекулярной и клеточной биологией, микробиологией, генетикой, химией белков и нуклеиновых кислот, и гибридизацией, и их методами, описанная в данном документе, хорошо известна и обычно используется в данной области техники. Способы и методы по настоящему изобретению, как правило, выполняют в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных источниках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иное.

[40] Singleton, et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, second ed., John Wiley and Sons, New York (1994), и Hale & Markham, *The Harper Collins Dictionary of Biology*, Harper Perennial, NY (1991) предоставляют специалисту в данной области техники общий словарь многих терминов, используемых в этом изобретении. Любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, могут использоваться на практике или при тестировании способов, систем и композиций, описанных в настоящем документе.

[41] Практика настоящего изобретения будет использовать, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии и биохимии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методы полностью описаны в литературе, например, в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook et al., 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al., eds., 1994); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*

(Mullis et al., eds., 1994) и *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (Kriegler, 1990).

[42] Предусмотренные в данном документе числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон.

[43] Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записывают слева направо в ориентации от 5' к 3'; аминокислотные последовательности записывают слева направо в аминокислотной ориентации, соответственно.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[44] Упоминания единственного числа в описании и формуле изобретения включает множественное число, если явно не указано иное, таким образом, упоминания единственного числа в описании и формуле изобретения следует понимать как означающие «по меньшей мере один».

[45] Термин «около», используемый в данном документе применительно к измеримому значению, такому как количество, временная продолжительность и т.п., означает, что он охватывает отклонения в $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ или $\pm 0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие варианты подходят для выполнения описанных способов или в связи с описанной композицией.

[46] «Ацетоген» относится к микроорганизму, который вырабатывает ацетат и/или другие короткоцепочечные органические кислоты с длиной цепи до C4 в качестве продукта анаэробного дыхания.

[47] «Ацидофил» относится к типу экстремофилов, которые хорошо растут в очень кислых условиях (обычно при pH 2,0 или ниже).

[48] Термин «аминокислота» относится к молекуле, содержащей как аминогруппу, так и карбоксильную группу, которые связаны с углеродом, который обозначен как альфа-углерод. Подходящие аминокислоты включают, без ограничения, как D-, так и L-изомеры природных аминокислот, а также неприродные аминокислоты, полученные органическим синтезом или другими метаболическими путями. В некоторых вариантах осуществления одна «аминокислота» может иметь несколько боковых цепей, доступных на удлиненном алифатическом или ароматическом каркасе основной цепи. Если в контексте конкретно не указано иное, термин «аминокислота», используемый в данном документе, включает аналоги аминокислот. В данном документе используют стандартные трехбуквенные сокращения для аминокислот, например: Cys - цистеин; Gln - глутамин; Glu - глутаминовая кислота (глутамат); Gly - глицин; His - гистидин; Ile -

изолейцин; Leu - лейцин; Lys - лизин; Met - метионин; Phe - фенилаланин; Pro - пролин; Ser - серин; Thr - треонин; Trp - триптофан; Tyr - тирозин; Val - валин;

[49] Фразу «и/или», употребляемую в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую «любой из или оба вместе» для элементов, соединенных таким образом, т. е. элементов, которые в одних случаях присутствуют вместе, а в других - отдельно. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных фразой «и/или», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами, если явно не указано иное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на «А и/или В» при использовании в сочетании с неограничивающей формулировкой, такой как «содержащий», может относиться в одном варианте осуществления к А без В (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления к В без А (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления как к А, так и к В (необязательно включая другие элементы); и т. п.

[50] Термин «биомасса» относится к материалу, полученному путем роста и/или размножения клеток. Биомасса может содержать клетки и/или внутриклеточное содержимое, а также внеклеточный материал, включая, помимо прочего, соединения, секретируемые клеткой.

[51] Термин «биореактор» или «ферментер» относится к закрытому или частично закрытому сосуду, в котором выращивают и поддерживают клетки. Клетки могут находиться в жидкой суспензии, но не обязательно. В некоторых вариантах осуществления вместо того, чтобы содержать в жидкой суспензии, клетки можно альтернативно выращивать и/или поддерживать в контакте с другим нежидким субстратом, на нем или внутри него, включая, помимо прочего, твердый материал для поддержки роста.

[52] «Биостимулятор» или «био-стимулятор» относится к соединениям, способным стимулировать рост, пролиферацию и/или развитие клеток при наличии в культуральной среде, и/или к организмам, при поглощении или ином введении в организм в доступной форме.

[53] Термин реакция или путь «фиксации углерода» относится к ферментативным реакциям или метаболическим путям, которые превращают молекулы углерода C1, включая формы углерода, которые являются газообразными в условиях окружающей среды, включая, помимо прочего, CO₂, CO и CH₄, в биохимические вещества на основе

углерода, включая биохимические молекулы, которые являются жидкими или твердыми в условиях окружающей среды, или которые растворяются или удерживаются во взвешенном состоянии в водном растворе.

[54] «Источник углерода» относится к типам молекул, из которых микроорганизм получает углерод, необходимый для органического биосинтеза.

[55] «Карбоксидотрофные» относятся к микроорганизмам, которые могут переносить или окислять монооксид углерода. В предпочтительных вариантах осуществления карбоксидотрофный микроорганизм может использовать СО в качестве источника углерода и/или в качестве источника восстанавливающих электронов для биосинтеза и/или дыхания.

[56] «Хемоавтотрофный» относится к способности организма получать энергию путем окисления химических доноров электронов химическими акцепторами электронов и синтезировать все органические соединения, необходимые организму для жизни и роста из углекислого газа.

[57] В формуле изобретения, а также в описании, все переходные фразы, такие как «содержащий», «включающий», «несущий», «имеющий», «содержащий», «вмещающий», «удерживающий» и т. п. следует понимать как неограничивающие, *т. е.*, означающие включение, но не ограничиваясь этим. Только переходные фразы «состоящий из» и «состоящий по существу из» должны быть соответственно ограничивающими или полуограничивающими переходными фразами.

[58] Термин «культивирование» относится к выращиванию и поддержанию популяции клеток, например микробных клеток или клеток животных, в подходящих условиях для пролиферации, размножения, поддержания, развития и/или дифференцировки в жидкой или твердой среде.

[59] Термин «полученный из» охватывает термины «происходящий из», «полученный из», «доступный из», «выделенный из» и «созданный из» и обычно указывает, что один конкретный материал происходит из другого указанного материала или обладает свойствами, которые можно описать со ссылкой на другой указанный материал.

[60] «Источник энергии» относится либо к донору электронов, который окисляется кислородом при аэробном дыхании, либо к комбинации окисляемого донора электронов и акцептора электронов, который восстанавливается при анаэробном дыхании.

[61] «Экстремофил» относится к микроорганизму, который хорошо растет в физически или геохимически экстремальных условиях (например, при высокой или низкой температуре, рН, или высокой солености) по сравнению с условиями на поверхности

Земли или океана, которые обычно переносятся большинством форм жизни, обитающих на поверхности земли или вблизи нее.

[62] Термин «газификация» относится, как правило, к высокотемпературному процессу, в ходе которого материалы на основе углерода превращаются в смесь газов, включающую водород, монооксид углерода и диоксид углерода, называемую синтетическим газом, синтез-газом или генераторным газом. Процесс обычно включает в себя частичное сжигание и/или применение генерируемого извне тепла вместе с контролируемым добавлением кислорода и/или пара, так что кислорода недостаточно для полного сгорания углеродсодержащего материала.

[63] «Галофил» относится к типу экстремофилов, которые хорошо растут в среде с очень высокой концентрацией соли.

[64] «Гетеротрофный» относится к способу роста и поддержания организма путем поглощения и метаболизма органических веществ, таких как вещества растений, животных или микроорганизмов. Рост является гетеротрофным, когда организм не синтезирует все органические соединения, необходимые организму для жизни и роста, из углекислого газа, а использует органические соединения. Во время гетеротрофного роста организмы не могут производить свою собственную пищу и вместо этого получают пищу и энергию, поглощая и метаболизируя органические вещества, такие как вещества растений или животных, *т. е.*, вместо того, чтобы фиксировать углерод из неорганических источников, таких как двуокись углерода.

[65] «Окислитель водорода» относится к микроорганизму, который использует восстановленный H_2 в качестве донора электронов для производства внутриклеточных восстановительных эквивалентов и/или при дыхании.

[66] «Гипертермофил» относится к типу экстремофилов, которые хорошо растут в чрезвычайно жарких условиях на протяжении всей жизни, обычно около $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($140\text{ }^{\circ}\text{F}$) или выше.

[67] Термин «knallgas» относится к смеси молекулярного водорода и газообразного кислорода. «Водородокисляющий (knallgas) микроорганизм» — это микроорганизм, который может использовать водород в качестве донора электронов и кислород в качестве акцептора электронов при дыхании для выработки внутриклеточных переносчиков энергии, таких как аденозин-5'-трифосфат (АТФ). Термины «оксигород» и «оксигородный микроорганизм» могут быть использованы как синонимы терминов «knallgas» и «водородокисляющий (knallgas) микроорганизм», соответственно. Водородокисляющие (knallgas) микроорганизмы обычно используют

молекулярный водород с помощью гидрогеназ, при этом часть электронов, переданных от H_2 , используется для восстановления NAD^+ (и/или других внутриклеточных восстанавливающих эквивалентов), а часть электронов от H_2 используется для аэробного дыхания. Водородокисляющие (knallgas) микроорганизмы, как правило, автотрофно фиксируют CO_2 посредством путей, включая, помимо прочего, цикл Кальвина или обратный цикл лимонной кислоты [“Thermophilic bacteria”, Jakob Kristjansson, Chapter 5, Section III, CRC Press, (1992)].

[68] Термин «лизат» относится к жидкости, содержащей смесь и/или раствор клеточного содержимого, полученного в результате лизиса клеток. В некоторых вариантах осуществления лизат может быть обезвожен с образованием концентрированного лизата или высушен с образованием сухого твердого вещества. В некоторых таких вариантах осуществления сухой лизат находится в форме порошка. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают очистку химических веществ или смеси химических веществ в клеточном лизате. В некоторых вариантах осуществления способы включают очистку аминокислот и/или белка в клеточном лизате.

[69] Термин «лизис» относится к разрыву плазматической мембраны и клеточной стенки клетки, если она присутствует, так что значительное количество внутриклеточного материала выходит во внеклеточное пространство. Лизис можно проводить с помощью электрохимических, механических, осмотических, термических или вирусных средств. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают проведение лизиса клеток или микроорганизмов, как описано в настоящем документе, для выделения химического вещества или смеси химических веществ из содержимого биореактора. В некоторых вариантах осуществления способы включают проведение лизиса клеток или микроорганизмов, описанных в настоящем документе, для отделения аминокислоты или смеси аминокислот, и/или белков, и/или пептидов от небелкового содержимого биореактора или среды для роста клеток.

[70] «Метаноген» относится к микроорганизму, который вырабатывает метан как продукт анаэробного дыхания.

[71] «Метилотроф» относится к микроорганизму, который может использовать восстановленные одноуглеродные соединения, включая метанол или метан, в качестве источника углерода и/или в качестве донора электронов для роста.

[72] «Метанотроф» относится к микроорганизму, который может метаболизировать метан в качестве источника углерода и/или донора электронов для роста.

[73] Термины «микроорганизм» и «микроб» означают микроскопические одноклеточные формы жизни.

[74] Термин «молекула» означает любую отдельную или различимую структурную единицу вещества, содержащую один или несколько атомов, и включает, например, углеводороды, липиды, полипептиды и полинуклеотиды.

[75] «Требовательны к питательным веществам» штамм относится к организму со сложными или специфическими потребностями в питательных веществах, *например*, к организму, который будет расти только при наличии определенных питательных веществ.

[76] «Олигопептид» относится к пептиду, который содержит относительно небольшое количество аминокислотных остатков, например от около 2 до около 20 аминокислот.

[77] Используемый в данном документе в описании и в формуле изобретения «или» следует понимать как имеющий то же значение, что и «и/или», как определено выше. Например, при разделении элементов в списке «или» или «и/или» следует интерпретировать как включающее, т. е., включение по меньшей мере одного, но также и более одного, из количества или списка элементов, и, необязательно, дополнительных элементов, не внесенных в список. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как «только один из» или «ровно один из» или, при использовании в формуле изобретения, «состоящий из» будут относиться к включению ровно одного элемента из количества или списка элементов. Как правило, термин «или», используемый в данном документе, должен интерпретироваться только как указывающий на исключительные альтернативы (то есть «один или другой, но не оба»), когда ему предшествуют условия исключительности, такие как «либо», «один из», «только один из» или «ровно один из». «Состоящий по существу из» при использовании в формуле изобретения имеет свое обычное значение, используемое в области патентного права.

[78] Термин «органическое соединение» относится к любому газообразному, жидкому или твердому химическому соединению, содержащему атомы углерода, за следующими исключениями, которые считаются неорганическими: карбиды, карбонаты, простые оксиды углерода, цианиды и аллотропы чистого углерода, такие как алмаз и графит.

[79] «Пептид» относится к соединению, состоящему из двух или более аминокислот, связанных в цепь, причем карбоксильная группа каждой кислоты соединена с аминогруппой следующей посредством связи типа R-OC-NH-R', и может включать от около 2 до около 50 аминокислот.

[80] Используемый в данном документе термин «полинуклеотид» относится к

полимерной форме нуклеотидов любой длины и любой трехмерной структуры, а также одноцепочечной или многоцепочечной (например, одноцепочечной, двухцепочечной, трехспиральной и т. д.), которая содержит дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и/или аналоги или модифицированные формы дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, включая модифицированные нуклеотиды или основания, или их аналоги. Поскольку генетический код является вырожденным, для кодирования конкретной аминокислоты может использоваться более одного кодона, и настоящее изобретение охватывает полинуклеотиды, которые кодируют конкретную аминокислотную последовательность. Можно использовать любой тип модифицированного нуклеотида или аналога нуклеотида при условии, что полинуклеотид сохраняет желаемую функциональность в условиях применения, включая модификации, повышающие устойчивость к нуклеазам (например, дезокси, 2'-О-Ме, фосфоротиоаты и т. д.). Метки также могут быть включены в целях обнаружения или захвата, например, радиоактивные или нерадиоактивные метки или якоря, например, биотин. Термин полинуклеотид также включает пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК). Полинуклеотиды могут быть встречающимися в природе или не встречающимися в природе. Термины «полинуклеотид», «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид» используются в данном документе взаимозаменяемо. Полинуклеотиды могут содержать РНК, ДНК или и то, и другое, и/или их модифицированные формы, и/или аналоги. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Одна или более фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными линкерными группами. Эти альтернативные связывающие группы включают, помимо прочего, варианты осуществления, в которых фосфат заменен на P(O)S («тиоат»), P(S)S («дитиоат»), (O)NR₂ («амидат»), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ («формацеталь»), в которых каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий эфирную связь (--O--), арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не все связи в полинуклеотиде обязательно должны быть идентичными. Полинуклеотиды могут быть линейными или кольцевыми или содержать комбинацию линейных и кольцевых частей.

[81] Используемый в данном документе термин «полипептид» относится к композиции, состоящей из аминокислот и признанной специалистами в данной области белком. Можно использовать обычный однобуквенный или трехбуквенный код аминокислотных остатков. Термины «полипептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер

может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может быть разделен не аминокислотами. Кроме того, указанные термины включают аминокислотный полимер, который был модифицирован природным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидацией, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такие как конъюгация с меченым компонентом. Также термин включает, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включающие, например, неприродные аминокислоты и т. д.), а также другие модификации известные в данной области техники.

[82] Термин «предшественник» обозначает промежуточный продукт для производства одного или нескольких компонентов готового продукта.

[83] Термин «пробиотик» относится к микроорганизму, который приносит пользу для здоровья при употреблении, *например*, к полезной кишечной флоре.

[84] «Генераторный газ» относится к газовой смеси, содержащей различные пропорции H_2 , CO и CO_2 и имеющей теплотворную способность, как правило, в пределах от половины до одной десятой теплотворной способности природного газа на единицу объема при стандартных условиях. Генераторный газ может быть получен различными способами из различного сырья, включая газификацию, паровую конверсию или автоконверсию углеродсодержащего сырья. В дополнение к H_2 , CO и CO_2 генераторные газы могут содержать другие компоненты, включая, помимо прочего, метан, сероводород, конденсирующиеся газы, смолы и золу, в зависимости от процесса производства и исходного сырья. Доля N_2 в смеси может быть высокой или низкой в зависимости от того, используется ли воздух в качестве окислителя в реакторе или нет, и от того, обеспечивается ли тепло для реакции прямым сжиганием или косвенным теплообменом.

[85] Термин «продуцирующий» включает как внутриклеточную, так и внеклеточную продукцию соединений, включая секрецию соединений из клетки.

[86] «Психрофил» относится к типу экстремофилов, способных к росту и размножению при низких температурах, обычно около $10^{\circ}C$ и ниже.

[87] Термин «рекомбинантный» относится к генетическому материалу (т. е. нуклеиновым кислотам, полипептидам, которые они кодируют, а также к векторам и клеткам, содержащим такие полинуклеотиды), который был модифицирован для изменения его последовательности или характеристик экспрессии, например, путем мутации кодирующей последовательности для получения измененного полипептида, слияния

кодирующей последовательности с последовательностью другого гена, помещения гена под контроль другого промотора, экспрессии гена в гетерологичном организме, экспрессии гена при пониженной или повышенной уровнях, экспрессии гена условно или конститутивно способом, отличным от профиля его естественной экспрессии, и т.п. Как правило, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, полипептиды и клетки на их основе подвергались манипуляции таким образом, чтобы они не были идентичны родственным нуклеиновым кислотам, полипептидам и клеткам, встречающимся в природе. Рекомбинантную клетку также можно назвать «сконструированной».

[88] Термины «восстановленный», «выделенный», «очищенный» и «отделенный», используемые в данном документе, относятся к материалу (*например*, белку, нуклеиновой кислоте или клетке), который удален по меньшей мере из одного компонента, с которым он естественным образом связан. Например, эти термины могут относиться к материалу, который в основном или по существу свободен от компонентов, которые обычно сопровождают его в нативном состоянии, как, например, интактная биологическая система.

[89] Фраза «практически не содержит» в отношении любого данного компонента означает, что такой компонент присутствует, если вообще присутствует, только в количестве, которое является функционально незначительным количеством, т. е. не оказывает существенного отрицательного влияния на предполагаемую производительность или функцию любого процесса или продукта. Как правило, практически не содержит означает менее около 1%, в том числе менее около 0,5%, в том числе менее около 0,1%, а также включая ноль процентов по массе такого компонента.

[90] «Окислитель серы» относится к микроорганизмам, которые используют восстановленные серосодержащие соединения, включая, помимо прочего, H_2S в качестве доноров электронов для получения внутриклеточных восстановительных эквивалентов и/или при дыхании.

[91] «Синтез-газ» или «синтетический газ» относится к типу газовой смеси, которая, как и генераторный газ, содержит H_2 и CO , но которая была специально адаптирована с точки зрения содержания H_2 и CO , соотношения и уровня примесей для синтеза определенного типа химического продукта, такой как, помимо прочего, метанол или дизельное топливо Фишера-Тропша. Синтез-газ обычно содержит H_2 , CO и CO_2 в качестве основных компонентов и может быть получен с помощью установленных способов, включая: паровую конверсию метана, сжиженного нефтяного газа или биогаза; или путем газификации любого органического, легковоспламеняющегося

материала на основе углерода, включая, помимо прочего, биомассу, отходы органических веществ, различные полимеры, торф и уголь. Водородный компонент синтез-газа может быть увеличен за счет реакции CO с паром в реакции конверсии водяного газа с сопутствующим увеличением содержания CO₂ в смеси синтез-газа.

[92] «Термофил» относится к типу экстремофилов, которые хорошо растут при относительно высоких температурах на протяжении всей жизни, обычно от около 45 °C до около 122 °C.

[93] «Титр» относится к количеству вещества, продуцируемого микроорганизмом, на единицу объема в микробной культуре. Например, титр биомассы может быть выражен в граммах биомассы, полученной на литр раствора (*например*, культуральной среды).

[94] «Витамин» представляет собой соединение, например органическое соединение, необходимое для роста и/или питания организма, обычно требуемое в небольших количествах в рационе или в ростовой или культуральной среде.

[95] Используемый в данном документе термин «витамер» относится к химическим аналогам конкретного витамина, которые эффективно функционально заменяют друг друга и/или эффективны при устранении дефицита витамина.

[96] «Дикий тип» относится к микроорганизму, встречающемуся в природе.

[97] «Выход» относится к количеству продукта, полученного из кормового материала, по отношению к общему количеству вещества, которое было бы произведено, если бы все сырьевое вещество было преобразовано в продукт. Например, выход аминокислоты может быть выражен как % произведенной аминокислоты по отношению к теоретическому выходу, если 100% исходного вещества было превращено в аминокислоту.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКА

Культивирование микроорганизма

[98] В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению включает культивирование микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, в биореакторе или ферментере в условиях, подходящих для роста микроорганизма и образования биомассы, которая затем может быть преобразована в композицию гидролизата белка. Для культивирования микроорганизмов можно использовать любые подходящие способы. Микроорганизм можно выращивать в любых подходящих условиях, в среде, подходящей для роста и производства биомассы. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм можно выращивать в условиях автотрофного

культивирования, в условиях гетеротрофного культивирования или в условиях сочетания автотрофного и гетеротрофного культивирования. Гетеротрофная культура может включать подходящий источник углерода и энергии, такой как один или несколько сахаров (*например*, глюкоза, фруктоза, сахароза и т.д.). Автотрофная культура может включать химические вещества C1, такие как окись углерода, двуокись углерода, метан, метанол, формиат и/или муравьиная кислота, и/или смеси, содержащие химические вещества C1, включая, помимо прочего, различные составы синтез-газа или различные составы генераторного газа, *например*, полученные из низкоценных источников углерода и энергии, таких как, помимо прочего, лигноцеллюлозные энергетические культуры, пожнивные остатки, багасса, опилки, лесохозяйственные отходы или продукты питания, посредством газификации, частичного окисления, пиролиза или паровой конверсии указанных низкоценных источников углерода, которые могут быть использованы кислородоводородным микроорганизмом или водородокисляющим микроорганизмом, или микроорганизмом, окисляющим монооксид углерода, в качестве источника углерода и источника энергии. Подходящие способы культивирования микроорганизмов и получения биомассы для использования в способах по изобретению описаны, *например*, в заявках РСТ № РСТ/US2010/001402, РСТ/US2011/034218, РСТ/US2013/032362, РСТ/US2014/029916, РСТ/US2017/023110, РСТ/US2018/016779 и патенте США № 9157058, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления организм может быть выращен путем фотосинтеза в биореакторе, в системе гидропоники, в теплице или на возделываемом поле, или может быть собран из отходов или природных источников.

[99] Микроорганизм можно культивировать с использованием любого подходящего биореактора или ферментера. Подходящие биореакторы включают, помимо прочего, один или несколько из следующих: эрлифтные реакторы; биологические скрубберные колонны; реакторы с барботажной колонной; реакторы с мешалкой; реакторы с мешалкой непрерывного действия; реакторы противоточные, с восходящим потоком и с увеличенным придонным слоем; реакторы с расщеплением, и, в частности, системы с расщеплением, такие как известные из предшествующего уровня техники очистки или биоремедиации канализации и сточных вод; фильтры, включая, помимо прочего, капельные фильтры, вращающиеся биологические контакторные фильтры, вращающиеся диски, почвенные фильтры; реакторы с псевдооживленным слоем; газлифтные ферментеры; реакторы с иммобилизованными клетками; петлевые

реакторы; мембранные биопленочные реакторы; смесители с воздушным перемешиванием; реакторы с уплотненным слоем; реакторы идеального вытеснения; статические смесители; реакторы со струйным слоем и/или биореакторы с вертикальным валом.

[100] В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы выращивают и поддерживают в среде, подходящей для хемоавтотрофного роста, содержащей газообразный углерод и источники энергии, такие как, помимо прочего, синтез-газ, генераторный газ, остаточный газ, пиролизный газ или газовые смеси H_2 и CO_2 и/или CO . При хемоавтотрофной фиксации CO_2 свет не требуется, и в некоторых вариантах осуществления света в окружающей среде для роста мало или он отсутствует.

[101] В иллюстративном, но не ограничивающем варианте осуществления биореактор, содержащий питательную среду, инокулируют продуцирующими клетками. Как правило, последует лаг-фаза, прежде чем клетки начнут удваиваться. После лаг-фазы время удвоения клеток уменьшается, и культура переходит в логарифмическую фазу. За логарифмической фазой в конечном итоге следует увеличение времени удвоения, которое, хотя и не должно быть ограничено теорией, считается результатом либо ограничения массопереноса, истощения питательных веществ, включая источники азота или минералов, либо повышения концентрации ингибирующих химических веществ, или чувство кворума микробами. Рост замедляется, а затем прекращается, когда культура входит в стационарную фазу. В некоторых вариантах осуществления стационарной фазе предшествует арифметическая фаза роста. Для сбора клеточной массы культуру в некоторых вариантах осуществления собирают в логарифмической фазе, и/или в арифметической фазе, и/или в стационарной фазе.

[102] Условия роста, включая контроль растворенных газов, таких как диоксид углерода, кислород и/или другие газы, такие как водород, а также другие растворенные питательные вещества, микроэлементы, температуру и pH, можно контролировать в биореакторе. В некоторых вариантах осуществления богатую белком клеточную массу выращивают до высокой плотности и/или выращивают с высокой продуктивностью в жидкой суспензии в биореакторе.

[103] Питательные среды, а также газы могут быть добавлены в биореактор либо периодически, либо время от времени, либо в ответ на обнаруженное истощение или запрограммированную заданную точку, либо непрерывно в течение периода выращивания и поддержания культуры. В некоторых вариантах осуществления биореактор при инокуляции заполняют стартовой загрузкой питательной среды и/или

одного или нескольких газов в начале роста, и после инокуляции не добавляются дополнительные питательные среды и/или один или несколько газов. В некоторых вариантах осуществления после инокуляции периодически добавляют питательную среду и/или один или несколько газов. В некоторых вариантах осуществления после инокуляции добавляют питательную среду и/или один или несколько газов в ответ на выявленное истощение питательных веществ и/или газа. В некоторых вариантах осуществления после инокуляции непрерывно добавляют питательную среду и/или один или несколько газов.

[104] Для некоторых вариантов осуществления добавленная питательная среда не содержит никаких органических соединений, *например*, не содержит источника органического углерода, такого как молекулы сахара или другие органические молекулы, которые могут метаболизироваться микроорганизмами в качестве источника углерода.

[105] В некоторых вариантах осуществления небольшое количество клеток микроорганизмов (*т.е.* инокулят) добавляют к заданному объему культуральной среды; затем культуру инкубируют; а клеточная масса проходит лаг-, экспоненциальную, замедленную и стационарную фазы роста.

[106] В системах периодического культивирования условия (*например*, концентрация питательных веществ, pH и т. д.), в которых культивируют микроорганизм, обычно непрерывно изменяют в течение всего периода роста. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления, чтобы избежать колебаний условий, характерных для периодического культивирования, и для повышения общей продуктивности системы культивирования, микроорганизмы, используемые для получения белка, и/или витаминов, и/или других питательных веществ, выращивают в системе непрерывного культивирования, называемой хеостатом (*например*, в биореакторе или другой емкости для культивирования, в которые непрерывно добавляют свежую среду, в то время как культуральную жидкость, содержащую оставшиеся питательные вещества, конечные продукты метаболизма и микроорганизмы, непрерывно удаляют с той же скоростью, чтобы поддерживать постоянный объем культуры). В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы, которые используют для получения белка, и/или витаминов, и/или других питательных веществ, выращивают в системе непрерывного культивирования, называемой турбидостатом (*например*, устройство непрерывного микробиологического культивирования, которое имеет обратную связь между мутностью культуральной емкости и скоростью разбавления).

[107] В некоторых вариантах осуществления биореакторы имеют механизмы, позволяющие смешивать питательные среды, которые включают, помимо прочего, одно или несколько из следующего: вращающиеся мешалки, лопасти, импеллер или турбины; вращающиеся, раскачивающие или поворачивающиеся сосуды; газлифты, барботажи; рециркуляция бульона снизу вверх через рециркуляционный трубопровод, прохождение бульона через петлю и/или статические смесители. Культуральные среды можно перемешивать непрерывно или периодически.

[108] В некоторых вариантах осуществления питательная среда, содержащая микроорганизмы, может быть удалена из биореактора частично или полностью, периодически или непрерывно, а в некоторых вариантах осуществления может быть заменена свежей бесклеточной средой для поддержания клеточной культуры в фазе экспоненциального роста и/или в арифметической фазе роста, и/или для пополнения истощенных питательных веществ в ростовой среде, и/или для удаления ингибирующих отходов.

[109] Порты, которые являются стандартными для биореакторов, могут использоваться для доставки или отвода газов, жидкостей, твердых веществ и/или взвесей в и/или из емкости биореактора, содержащего микроорганизмы. Многие биореакторы имеют несколько портов для разных целей (*например*, порты для добавления среды, добавления газа, датчики для рН и растворенного кислорода (РК) и отбора проб), и данный порт может использоваться для различных целей в ходе цикла ферментации. Например, порт может использоваться для добавления питательной среды в биореактор в один момент времени, а в другой момент может использоваться для отбора проб. В некоторых вариантах осуществления можно осуществлять многократное использование порта для отбора проб без внесения загрязнения или инвазивных видов в среду выращивания. К отверстию для отбора проб может быть подключен клапан или другой исполнительный механизм, обеспечивающий управление потоком пробы или непрерывный отбор проб. В некоторых вариантах осуществления биореакторы оснащены по меньшей мере одним портом, подходящим для инокуляции культуры, который может дополнительно использоваться для других целей, включая добавление среды или газа. Порты биореактора позволяют контролировать состав газа и скорость потока в культуральную среду. Например, порты можно использовать в качестве впускных отверстий для газа в биореактор, через которые газы прокачиваются.

[110] Для некоторых вариантов осуществления газы, которые могут закачиваться в биореактор, включают, помимо прочего, один или несколько из следующих: синтез-газ,

генераторный газ, пиролизный газ, газообразный водород, CO, CO₂, O₂, воздух, смеси воздух/CO₂, природный газ, биогаз, метан, аммиак, азот, благородные газы, такие как аргон, а также другие газы. В некоторых вариантах осуществления CO₂, закачиваемый в систему, может поступать из источников, включая, помимо прочего: CO₂ от газификации органического вещества; CO₂ от обжига известняка, CaCO₃, для производства негашеной извести, CaO; CO₂ от парового риформинга метана, например, побочный продукт CO₂ от производства аммиака, метанола или водорода; CO₂ от сгорания, сжигания или факельного сжигания; побочный продукт CO₂ анаэробной или аэробной ферментации сахара и/или любого другого органического углеродного субстрата, используемого для ферментации; побочный продукт CO₂ от метанотрофного биопроцесса; побочный продукт CO₂ от карбоксидотрофного биопроцесса; побочный продукт CO₂ от гетеротрофного метаболизма; CO₂ от очистки сточных вод; побочный продукт CO₂ от производства фосфата натрия; геологически или геотермально произведенный или выброшенный CO₂; CO₂, удаленный из кислого газа или природного газа. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления CO₂ удаляют из промышленных дымовых газов или улавливают из геологического источника, который в противном случае естественным образом выбрасывался бы в атмосферу. В некоторых вариантах осуществления источник углерода представляет собой CO₂, и/или бикарбонат, и/или карбонат, растворенные в морской воде или других поверхностных или подземных водоемах. В некоторых таких вариантах осуществления неорганический углерод может быть введен в биореактор растворенным в жидкой воде и/или в виде твердого вещества. В некоторых вариантах осуществления источником углерода является CO₂, захваченный из атмосферы. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления CO₂ улавливают из закрытой кабины как часть системы жизнеобеспечения с замкнутым контуром с использованием такого оборудования, как, помимо прочего, узел удаления CO₂ (CDRA), который используют, например, на Международной космической станции (МКС).

[111] В некоторых неограничивающих вариантах осуществления геологические объекты, такие как, помимо прочего, геотермальные и/или гидротермальные жерла, которые выделяют высокие концентрации источников энергии (*например*, газообразных H₂, H₂S, CO) и/или источников углерода (*например*, CO₂, HCO₃⁻, CO₃²⁻), и/или другие растворенные минералы могут быть использованы в качестве источников питательных веществ для микроорганизмов.

[112] В некоторых вариантах осуществления один или несколько газов в дополнение к

диоксиду углерода или вместо диоксида углерода в качестве альтернативного источника углерода либо растворяют в растворе и подают в культуральный бульон, либо растворяют непосредственно в культуральном бульоне, включая, помимо прочего, газообразные доноры электронов и/или источники углерода (*например*, водород, и/или СО, и/или газообразный метан). В некоторых вариантах осуществления входные газы могут включать другие доноры электронов и/или акцепторы электронов, и/или источники углерода, и/или минеральные питательные вещества, такие как, помимо прочего, другие компоненты газа и примеси синтез-газа (*например*, углеводороды); аммиак; сульфид водорода; и/или другие кислые газы; и/или О₂; и/или минерал, содержащий твердые частицы и золу.

[113] После прохождения через систему реактора, содержащую микроорганизмы, которые поглощают газы, в некоторых вариантах осуществления остаточные газы могут быть либо рециркулированы обратно в биореактор, либо сожжены для получения технологического тепла, либо сожжены в факеле, либо введены под землю, либо выпущены в атмосферу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, использующих Н₂ в качестве донора электронов, Н₂ можно подавать в сосуд для культивирования либо барботируя его через культуральную среду, либо путем диффузии через известную в данной области техники водонепроницаемую и водонепроницаемую мембрану, которая соприкасается с жидкой культуральной средой.

[114] В некоторых вариантах осуществления молекула С1, такая как, помимо прочего, диоксид углерода, окись углерода, метан, метанол, формальдегид, формиат или муравьиная кислота, и/или смеси, содержащие молекулы С1, включая, помимо прочего, различные композиции синтез-газа, полученные из различного газифицированного, пиролизированного или посредством парового риформинга сырья с фиксированным углеродом, используются микроорганизмом в качестве источника углерода и биохимически превращается в органические молекулы с более длинной цепью (*т.е.* молекулы с С2 или более длинной цепью и, в некоторых вариантах осуществления, молекулы с С5 или более длинной углеродной цепью) при одном или нескольких из следующих условий: аэробные, микроаэробные, бескислородные, анаэробные и/или факультативные условия. В некоторых вариантах осуществления газообразный СО₂ используется микроорганизмом в качестве источника углерода и хемоавтотрофно превращается в органические молекулы с более длинной цепью (*т. е.*, С2 или более длинные и, в некоторых вариантах осуществления, С5 или более длинные молекулы углеродной цепи) в аэробных, микроаэробных, бескислородных, анаэробных и/или

факультативных условиях. В некоторых вариантах осуществления H_2 используется в качестве донора электронов, а O_2 используется в качестве акцептора электронов для фиксации углерода и превращения молекулы углерода C_1 в органические молекулы с более длинной цепью. В некоторых вариантах осуществления H_2 используется в качестве донора электронов, а O_2 используется в качестве акцептора электронов для хемоавтотрофной фиксации углерода и превращения CO_2 в органические молекулы с более длинной цепью.

[115] В некоторых вариантах осуществления органический источник углерода используется в качестве источника углерода и/или для восстановления электронов в клеточном метаболизме. В некоторых вариантах осуществления такой рост и метаболизм являются гетеротрофными или миксотрофными.

[116] В некоторых вариантах осуществления в биореакторе отслеживают и/или контролируют один или несколько из следующих параметров: уровни отходов; pH; температура; соленость; растворенный кислород; растворенный углекислый газ; расход жидкости; скорость перемешивания; давление газа. В некоторых вариантах осуществления рабочие параметры, влияющие на хемоавтотрофный рост, отслеживаются с помощью датчиков (*например*, датчика растворенного кислорода или датчика окисления-восстановления для измерения концентраций доноров/акцепторов электронов) и/или управляются либо вручную, либо автоматически на основе обратной связи от датчиков с использованием оборудования, включая, помимо прочего, приводные клапаны, насосы и мешалки. В некоторых вариантах осуществления температура поступающего бульона, а также поступающих газов регулируется такими системами, как, помимо прочего, охладители, нагреватели и/или теплообменники.

[117] В некоторых вариантах осуществления получение белка и распределение молекул аминокислот, продуцируемых микроорганизмом, оптимизируют с помощью одного или нескольких из следующего: контроля условий биореактора, контроля уровней питательных веществ и/или генетических модификаций клеток. В некоторых вариантах осуществления пути к аминокислотам, или белкам, или другим питательным веществам, или цельноклеточным продуктам контролируют и оптимизируют для получения химических продуктов путем поддержания определенных условий роста (*например*, уровней азота, кислорода, фосфора, серы, микронутриентов в следовых количествах, таких как неорганические ионы, и, если присутствуют, каких-либо регуляторных молекул, которые обычно не считаются питательными веществами или источником энергии). В некоторых вариантах осуществления растворенный кислород (РК) можно

оптимизировать, поддерживая бульон в аэробных, микроаэробных, бескислородных, анаэробных или факультативных условиях, в зависимости от требований микроорганизмов. Факультативной средой считаются аэробные верхние слои и анаэробные нижние слои, обусловленные расслоением водной толщи или пространственным разделением аэробных или микроаэробных областей, а также анаэробные области, обусловленные пространственным разделением областей, подверженных воздействию газов, содержащих O_2 , и областей, не подвергающихся воздействию газов, содержащих O_2 .

[118] В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы, *например*, хемоавтотрофные микроорганизмы, выращивают в условиях, способствующих накоплению микроорганизмами полигидроксиалканата (ПГА), *например*, полигидроксибутирата (ПГБ) и/или полигидроксивалерата (ПГВ). В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы, *например* хемоавтотрофные микроорганизмы, выращивают при ограничении одного или нескольких питательных веществ, *например*, при ограничении азота или фосфора, чтобы вызвать накопление ПГА (например, ПГБ; ПГВ). В некоторых вариантах осуществления микроорганизм, такой как хемоавтотрофный микроорганизм, выращенный на H_2/CO_2 и/или синтез-газе, накапливает ПГА, такой как ПГБ и/или ПГВ, в клеточной биомассе. В некоторых вариантах осуществления ПГА (*например*, ПГБ; ПГВ) накапливается до около 50% или более биомассы микроорганизмов по массе, около 60% или более или около 70%, или более по массе.

[119] В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы, *например*, хемоавтотрофные микроорганизмы, выращивают в условиях, способствующих выработке витаминов, таких как, помимо прочего, витамины группы В, *например*, один или несколько из витамина B_1 , витамина B_2 и/или витамина B_{12} , микроорганизмами. В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы можно выращивать хемоавтотрофно для получения одного или нескольких витаминов, таких как витамин B_1 , витамин B_2 и/или витамин B_{12} .

[120] Биомасса, образованная культивируемыми микроорганизмами, *например*, хемоавтотрофными микроорганизмами, может быть собрана любым подходящим способом, а затем из собранной биомассы может быть получен гидролизат белка. В некоторых вариантах осуществления биомассу отделяют от жидкой среды с помощью подходящего способа. Подходящие способы включают, помимо прочего, центрифугирование; флокуляцию; флотацию; фильтрацию с использованием

мембранных, полых волокон, спирально-навитых или керамических систем фильтров; вакуумную фильтрацию; тангенциальную поточную фильтрацию; очистку; осаждение; гидроциклон. В некоторых вариантах осуществления, когда микробная клеточная масса может быть иммобилизована на матрице, ее можно собирать способами, включая, помимо прочего, гравитационное осаждение или фильтрацию, и отделять от ростового субстрата соскабливанием или силой сдвига жидкости.

[121] Собранные микробные клетки в некоторых вариантах осуществления могут быть вскрыты для приготовления лизата с использованием хорошо известных способов, включая, помимо прочего, один или несколько из следующих: измельчение в шаровой мельнице, кавитационное давление, обработка ультразвуком, гомогенизация или механическое измельчение. В некоторых вариантах осуществления клетки в биомассе могут быть лизированы одним или несколькими циклами замораживания-размораживания, литическим ферментом, детергентами, растворителями или антибиотиками.

[122] Собранная биомасса в некоторых вариантах осуществления может быть высушена на стадии или стадиях процесса. В некоторых вариантах осуществления сушка биомассы может быть выполнена с использованием любого подходящего способа, включая, помимо прочего, один или несколько из следующих способов: центрифугирование, барабанную сушку, выпаривание, лиофильную сушку, нагревание, распылительную сушку, вакуумную сушку и/или вакуумную фильтрацию. В некоторых вариантах осуществления для сушки биомассы можно использовать отработанное тепло. В некоторых вариантах осуществления для сушки биомассы можно использовать отработанное тепло от промышленного источника дымовых газов, используемых в качестве источника углерода. В некоторых вариантах осуществления побочный тепловой продукт от образования доноров электронов и/или источника углерода C1 можно использовать для сушки биомассы. В некоторых вариантах осуществления для сушки биомассы можно использовать побочный тепловой эффект от газификации, риформинга в потоке метана, автореформинга или частичного окисления.

[123] В некоторых вариантах осуществления биомасса дополнительно обрабатывается после сушки или без предшествующей стадии сушки, чтобы облегчить разделение и получение полезных биохимических веществ. В некоторых вариантах осуществления эта дополнительная обработка включает отделение белкового или липидного содержимого, или витаминов, или нуклеиновых кислот, или других целевых биохимических веществ от микробной биомассы. В некоторых вариантах осуществления

разделение липидов может быть выполнено с использованием неполярных или полярных растворителей для экстракции липидов, таких как, помимо прочего, один или несколько из: гексана, циклогексана, додекана, этилового эфира, спирта (метанола, изопропанола, этанола и т. д.), трибутилфосфата, сверхкритического диоксида углерода, триоктилфосфиноксида, аммиака, вторичных и третичных аминов, пропана, ацетона, пропиленкарбоната, дихлорметана или хлороформа. В некоторых вариантах осуществления другие полезные биохимические вещества могут быть экстрагированы с использованием растворителей, включая, помимо прочего, один или несколько из: хлороформа, дихлорметана, ацетона, этилацетата, пропиленкарбоната и тетрахлорэтилена. В некоторых вариантах осуществления лизис клеток проводят для выделения и получения полезных биохимических веществ.

[124] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть микробной биомассы не подвергают гидролизу белка, и продукт представляет собой или включает лизат микробных клеток. В некоторых вариантах осуществления этапы разделения или сушки лизата и/или гидролизата не применяют, и лизат и/или гидролизат представляет собой неочищенную смесь растворимых и нерастворимых компонентов. В некоторых таких вариантах осуществления лизат и/или гидролизат является непрозрачным и/или мутным. В некоторых вариантах осуществления к лизату и/или гидролизату применяют стадию разделения твердой и жидкой фаз, в результате чего получают растворимый продукт и нерастворимый побочный продукт. В некоторых вариантах осуществления растворимый продукт лизата или гидролизата является прозрачным и/или не мутным. В некоторых вариантах осуществления лизат или гидролизат пропускают через ультрафильтрацию. В некоторых таких вариантах осуществления ультрафильтрация имеет отсечение по молекулярной массе около 10000 или меньше. В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат подвергают одному или нескольким из следующих последующих процессов: центрифугированию; пластинчатая и рамочная фильтрация; микрофильтрация; ультрафильтрация; нанофильтрация; ионообменная хроматография. В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат пропускают через фильтр, который включает один или несколько типов угля. В некоторых таких вариантах осуществления уголь удаляет цвет лизата и/или гидролизата. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или фильтрат лизата, и/или гидролизата пропускают через ионообменную хроматографию, *например*, для снижения содержания соли.

[125] В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат, как описано в

настоящем документе, пропускают через стерильную фильтрацию перед использованием для выращивания другой клеточной культуры.

[126] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или фильтрат того же самого концентрируют с использованием одного или нескольких из следующего: испаритель с падающей пленкой; испаритель с восходящей пленкой; мембранная дистилляция, нанофильтрация; обратный осмос.

[127] В некоторых вариантах осуществления один или несколько лизатов, и/или гидролизатов, и/или экстрактов, и/или концентратов, и/или изолятов, как описано в настоящем документе, используют в промышленных ферментационных и/или обезвоженных культуральных средах и/или в культурах клеток. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, как описано в настоящем документе, подвергают ультрафильтрации для удаления материалов с более высокой молекулярной массой. В некоторых вариантах осуществления клеточная культура, выращенная на среде, содержащей продукт такой ультрафильтрации, превосходит клеточную культуру, выращенную на нефилтрованном эквиваленте. В некоторых вариантах осуществления один или несколько лизатов и/или гидролизатов, описанных в настоящем документе, используют для выращивания клеток животных в культуре. В некоторых таких вариантах осуществления клетки животных представляют собой клетки млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления клеточную культуру выращивают с использованием лизата и/или гидролизата, как описано в настоящем документе, который продуцирует белки и/или ткани, используемые для получения мясоподобного продукта. В некоторых таких вариантах осуществления мясоподобный продукт производят для потребления человеком.

[128] В некоторых вариантах осуществления клеточные культуры выращивают с использованием лизата и/или гидролизата, как описано в настоящем документе, которые продуцируют один или несколько фармацевтических продуктов. В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество или кофактор, полученные, как описано в настоящем документе, заменяют один или несколько компонентов животного происхождения в средах, используемых для выращивания различных природных или рекомбинантных клеток, таких как прокариотические клетки, для получения пищевых продуктов и/или биофармацевтических препаратов. В некоторых вариантах осуществления такие природные или рекомбинантные прокариоты

включают, помимо прочего, один или несколько из следующих: *Bacillus subtilis*; *Corynebacterium ammoniagenes*; *Pseudomonas sp.*; *Streptomyces lividans*. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические продукты включают, помимо прочего, один или несколько из: антибиотиков, таких как, помимо прочего, цефалоспорины и цефамицины; антикоагулянтов; факторов крови; вакцин; полисахаридных вакцин; рекомбинантных вакцин; рекомбинантных белков; антител; цитокинов, таких как, помимо прочего, интерлейкин-11, человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (hG-CSF); слитых белков; факторов роста; интерферонов; факторов свертывания крови; гормонов, таких как, помимо прочего, гормон роста человека, инсулин, гонадотропин-высвобождающий гормон, гормон паращитовидной железы человека; моноклональных антител; нуклеиновых кислот; терапевтических ферментов, таких как, помимо прочего, активатор плазминогена в тканях человека; фибринолитических ферментов; терапевтических белков, таких как, помимо прочего, слитый белок трансформирующего фактора роста- β -псевдомонадного экзотоксина (TGF- β -PE40), человеческий эпидермальный фактор роста (hEGF). В некоторых вариантах осуществления клеточные культуры выращивают с использованием лизата и/или гидролизата, как описано в настоящем документе, которые продуцируют рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело, полученное с использованием компонентов среды (*например*, микробного лизата и/или гидролизата), как описано в настоящем документе, включает, помимо прочего, одно или несколько из: герцептина; ремикейда, ритуксана, синагиса. В некоторых вариантах осуществления лизат или гидролизат, как описано в настоящем документе, используют для замены сыворотки или компонентов, полученных из сыворотки, включая фетальную телячью сыворотку (ФТС).

[129] В некоторых вариантах осуществления цельноклеточная биомасса, и/или лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или ПГБ, и/или гидроксипутират, и/или витамин, и/или другое питательное вещество, или кофактор, продуцируемые как описано в настоящем документе, вводят одному или нескольким другим организмам или клеткам (*например*, одному или нескольким организмам или клеткам, отличным от микроорганизма, из которого получена цельная клеточная биомасса, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидный состав, и/или аминокислотный состав, и/или ПГБ, и/или гидроксипутират, и/или витамин и/или получено другое питательное вещество или кофактор), включая, помимо прочего, один или несколько из следующих: *Actinomycetes*,

Aspergillus awamori, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus foetidus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *E. coli*, *E. coli* штамм В, *E. coli* штамм С, *E. coli* штамм К, *E. Coli* штамм W, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces murinus*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizomucor miehei*, *Rhodococcus opacus*, клетки 293, клетки 3Т3, клетки ВНК, клетки СНО, клетки COS, клетки Cvl, клетки HeLa, клетки MDCK, клетки P12, клетки VERO.

[130] В некоторых вариантах осуществления цельноклеточная биомасса, и/или лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или ПГБ, и/или гидроксibuтират, и/или витамин, и/или другое питательное вещество, или кофактор, продуцируемые как описано в настоящем документе, вводят одному или нескольким другим организмам или клеткам (*например*, одному или нескольким организмам или клеткам, отличным от микроорганизма, из которого получена цельноклеточная биомасса, и/или лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или ПГБ, и/или гидроксibuтират, и/или витамин, и/или другое питательное вещество или кофактор), включая, помимо прочего, представителей одного или нескольких из следующих родов: *Aspergillus*, *Bacillus*, *Chrysosporium*, *Escherichia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Kluyveromyces*, *Lactobacillus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pichia*, *Pleurotus*, *Pseudomonas*, *Rhizomucor*, *Rhodococcus*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Trametes*, *Trichoderma*, *Yarrowia*.

[131] В некоторых вариантах осуществления цельноклеточная биомасса и/или лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или ПГБ, и/или гидроксibuтират, и/или витамин, и/или другое питательное вещество, или кофактор, продуцируемые как описано в настоящем документе, вводят одному или нескольким другим организмам или клеткам (*например*, одному или нескольким организмам или клеткам, которые отличаются от микроорганизма, из которого получена цельноклеточная биомасса, и/или лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидный состав, и/или аминокислотный состав, и/или ПГБ, и/или гидроксibuтират, и/или витамин и/или получено другое питательное вещество или кофактор), которые полезны для растений и/или являются полезными членами

растительного микробиома и/или ризосферы, и/или являются полезными почвенными организмами, включая, помимо прочего, один или несколько из: *Trichoderma atroviride*; *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium japonicum* и/или микоризные грибы, в том числе арбускулярные микоризные грибы.

[132] В некоторых вариантах осуществления цельноклеточная биомасса и/или лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или ПГБ, и/или гидроксibuтират, и/или витамин, и/или другое питательное вещество, или кофактор, продуцируемые как описано в настоящем документе, вводят одному или нескольким другим организмам или клеткам (*например*, одному или нескольким организмам или клеткам, которые отличаются от микроорганизма, из которого получена цельноклеточная биомасса, и/или лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидный состав, и/или аминокислотный состав, и/или ПГБ, и/или гидроксibuтират, и/или витамин и/или получено другое питательное вещество или кофактор), включая, помимо прочего, одну или несколько из следующих: клетки архей, бактериальные клетки, включая грамотрицательные бактерии и/или грамположительные бактерии, клетки мицелиальных грибов, клетки грибов, клетки насекомых, клетки млекопитающих, клетки животных, клетки растений, дрожжевые клетки.

[133] В некоторых вариантах осуществления клеточным культурам вводят цельноклеточную биомассу и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, и/или ПГБ, и/или гидроксibuтират, и/или витамины, и/или другие питательные вещества или кофакторы, полученные, как описано в настоящем документе, в качестве источника питательных веществ для получения одного или нескольких микробных или химических продуктов, таких как, помимо прочего, один или несколько из следующих: полисахариды, липиды, биодизель, бутанол, этанол, пропанол, изопропанол, пропан, алканы, олефины, ароматические соединения, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, спирты; 1,3-пропандиол, 1,3-бутадиен, 1,3-бутандиол, 1,4-бутандиол, 3-гидроксипропионат, 7-АДЦК/цефаспорин, ϵ -капролактон, γ -валеролактон, акрилат, акриловая кислота, адипиновая кислота, аскорбат, аспартат, аскорбиновая кислота, аспарагиновая кислота, с апролактама, каротиноиды, цитрат, лимонная кислота, ДГК, доцетаксел, эритромицин, этилен, гамма-бутиролактон, глутамат, глутаминовая кислота, ГПК, гидроксibuтират, изопентенол, изопрен, изопреноиды, итаконат, итаконовая кислота, лактат, молочная кислота, ланостерол, левулиновая кислота, ликопин, лизин, малат, малоновая кислота, пептиды, омега-3 ДГК, омега-3 ЭПК, омега-3 АЛК, омега жирные кислоты, омега-7

жирные кислоты, богатые омега-7 масла, паклитаксел, ПГА, ПГБ, поликетиды, полиолы, пропилен, пирролидоны, серин, сорбит, статины, стероиды, сукцинат, терефталат, терпены, ТГФ, каучук, восковые эфиры, полимеры, товарные химикаты, промышленные химикаты, специальные химикаты, заменители парафина, добавки, пищевые добавки, нутрицевтики, фармацевтические препараты, фармацевтические промежуточные продукты, средства личной гигиены; коммерческие ферменты, антибиотики, аминокислоты, витамины, биопластики, глицерин, реактивное топливо, дизельное топливо, бензин, октан.

[134] Использование хемоавтотрофных микроорганизмов для получения белков, аминокислот и других питательных веществ из газообразного сырья, содержащего H_2 , и/или CO_2 , и/или CO , и/или CH_4 , описано, например, в международной патентной заявке, полученной 18 марта 2017 г., № РСТ/US17/23110 с названием «МИКРООРГАНИЗМЫ И ИСКУССТВЕННЫЕ ЭКОСИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА, ПИТАНИЯ И ПОЛЕЗНЫХ СОПРОДУКТОВ ИЗ C1 СУБСТРАТОВ». Эта заявка полностью включена в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

[135] Использование хемоавтотрофных микроорганизмов для получения питательных веществ для растений, животных и человека из газообразного сырья, содержащего H_2 , и/или CO_2 , и/или CO , и/или CH_4 , описано, например, в заявке РСТ № РСТ/US2018/016779, поданной от 4 февраля 2018 г., с названием «ВЕГАНСКИЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА, УДОБРЕНИЯ, БИОСТИМУЛЯТОРЫ И СИСТЕМЫ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ СЕКВЕСТРАЦИИ ПОЧВЕННОГО УГЛЕРОДА», которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

[136] Получение гидролизатов белка из микробных источников описано, например, в заявке РСТ № РСТ/US20/50902, поданной 15 сентября 2020 г., с названием «КОМПОЗИЦИИ ГИДРОЛИЗАТОВ МИКРОБНЫХ БЕЛКОВ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ», которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

[137] В некоторых неограничивающих вариантах осуществления лизаты и/или гидролизаты, как описано в настоящем документе, концентрируют до содержания твердых веществ от около 25% до около 50%. В некоторых таких вариантах осуществления за стадией сушки следует концентрирование до около 25-50% твердых веществ. В некоторых вариантах осуществления лизаты и/или гидролизаты находятся в форме концентрата, который можно перекачивать насосом. В некоторых таких вариантах осуществления перекачиваемый лизат и/или гидролизат содержит от около

25% до около 60% твердых веществ. В других таких вариантах осуществления перекачиваемый лизат и/или гидролизат содержит около 60% твердых веществ или более. В некоторых вариантах осуществления концентрированный лизат и/или гидролизат имеет достаточно низкую активность воды, что делает его микробиологически стабильным. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или фильтрат, и/или супернатант, и/или их концентрат прокачивают через патронный фильтр для удаления любых более крупных частиц. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или фильтрат, и/или супернатант, и/или их концентрат сушат любым подходящим способом, включая, помимо прочего, один или несколько из следующих способов: распылительную сушилку; роликовая барабанная сушилка; лиофилизацию.

[138] В некоторых вариантах осуществления осуществляют одну или несколько стадий обезжиривания биомассы и/или лизата, и/или гидролизата. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько стадий обезжиривания удаляют или снижают содержание липополисахаридов (ЛПС) в продукте. В некоторых вариантах осуществления на лизате и/или гидролизате проводят одну или несколько стадий фильтрации или ультрафильтрации. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько стадий фильтрации или ультрафильтрации удаляют или снижают содержание ЛПС в продукте. В некоторых вариантах осуществления этап ультрафильтрации имеет отсечение по молекулярной массе 100 килодальтон (кДа) или менее, или 50 кДа или менее, или 25 кДа или менее, или 20 кДа или менее, или 10 кДа или менее, или 5 кДа или менее. В некоторых вариантах осуществления ЛПС, удаленный или сниженный на одной или нескольких стадиях обезжиривания и/или на одной или нескольких стадиях фильтрации или ультрафильтрации, представляет собой эндотоксин.

[139] Лизаты, и/или гидролизаты, и/или пептидные композиции, и/или аминокислотные композиции, полученные, как описано в настоящем документе, могут обеспечить одно или несколько из: пептидов, включая, помимо прочего, пептиды, стимулирующие рост; аминокислот; нуклеозидов, нуклеотидов и/или нуклеиновых кислот; углеводов; липидов; минералов, таких как, помимо прочего, калий (K), кальций (Ca), магний (Mg), железо (Fe), марганец (Mn), и микроэлементов; витаминов и/или других низкомолекулярных компонентов в следовых количествах. В некоторых вариантах осуществления пептиды могут действовать как факторы роста и/или выживания в клеточной культуре. В некоторых вариантах осуществления лизаты, и/или гидролизаты, и/или пептидные композиции, и/или аминокислотные композиции, и/или экстракты,

полученные, как описано в настоящем документе, действуют как источник нуклеотидов (предшественников РНК и ДНК) для другой культуры и/или консорциума, и/или микробиома, и/или нуклеотиды возвращают обратно в биореактор и/или к микроорганизмам, которые используются для получения белков и/или биомассы, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды используют вместе с источником углерода CO_2 при миксотрофном росте и/или продукции.

[140] В некоторых вариантах осуществления лизаты, и/или гидролизаты, и/или пептидные композиции, и/или аминокислотные композиции улучшают скорость роста и/или экспрессию белка в культуре клеток, выращенных на среде, содержащей лизат и/или гидролизат, и /или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию по сравнению со средой, которая не включает лизат, и/или гидролизат, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию. В некоторых вариантах осуществления лизаты, и/или гидролизаты, и/или пептидные композиции, и/или аминокислотные композиции, как описано в настоящем документе, улучшают один или несколько из следующих параметров в культуре, получившей композицию: скорость роста; производительность; и/или долгосрочная жизнеспособность. В некоторых вариантах осуществления лизаты, и/или гидролизаты, и/или пептидные композиции, и/или аминокислотные композиции обеспечивают или облегчают адгезивную фибронектиноподобную активность, способствуя прикреплению и распространению клеток на субстрате. В некоторых вариантах осуществления лизаты, и/или гидролизаты, и/или пептидные композиции, и/или аминокислотные композиции улучшают продуктивность культур, выращенных на среде, содержащей композицию(и), за счет эффектов, включая, помимо прочего, осмопротекторные и /или антиапоптотические эффекты. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты белка, и/или пептидные композиции, и/или аминокислотные композиции, как описано в настоящем документе, используют в растворах для криоконсервации клеток животных. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты белка, и/или пептидные композиции, и/или аминокислотные композиции, как описано в настоящем документе, используют в средах для замораживания эмбрионов. В некоторых указанных вариантах осуществления гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция улучшают выживаемость клеток и/или эмбрионов во время стадий замораживания и/или размораживания.

[141] В некоторых вариантах осуществления биомасса может быть переработана для

экстракции и/или очистки биоразлагаемого полиэстера до, во время или после получения композиции гидролизата белка, включая, помимо прочего, полигидроксиалканоатный (ПГА) полимер. В некоторых вариантах осуществления биомасса может быть переработана для извлечения полимерного продукта, который включает полигидроксibuтират (ПГБ). В некоторых вариантах осуществления биомасса может быть переработана для извлечения полимерного продукта, который включает полигидроксивалерат (ПГВ). Полимер ПГА, или ПГБ, или ПГВ можно экстрагировать из биомассы любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления полимер ПГА, или ПГБ, или ПГВ может быть экстрагирован сначала путем смешивания биомассы с растворителем, таким как один или несколько из хлороформа, метанола, метилхлорида, 1,2-дихлорэтана, дихлорметана, диэтилсукцината, ацетона, гексана, пропиленкарбоната, изопропанола и этанола. В некоторых вариантах осуществления биомассу лизируют (*например*, путем гомогенизации) перед смешиванием с растворителем. Экстракцию можно проводить при любой подходящей температуре, а также при температуре от комнатной до 150°C или выше. В некоторых вариантах осуществления экстракция включает разделение водной фазы и органической фазы после смешивания биомассы с растворителем. Разделение фаз можно проводить с использованием любого подходящего способа, такого как центрифугирование, но не ограничиваясь им. В некоторых вариантах осуществления экстракция включает осаждение ПГА, или ПГБ, или ПГВ, *например*, путем охлаждения смеси и/или добавления к смеси антирастворителя (*например*, гексана). Экстракция может включать удаление растворителя из смеси биомассы и растворителя. В некоторых вариантах осуществления после экстракции экстрагированный материал дополнительно очищают путем смешивания экстрагированного материала со вторым растворителем, таким как гексан, в котором растворимы неполярные липиды, но нерастворим ПГА, или ПГБ, или ПГВ. Второй растворитель может быть удален после смешивания. Подходящие способы экстракции полимера ПГА, ПГБ или ПГВ описаны, *например*, в Fei, et al. (2016) “Effective recovery of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biopolymer from *Cupriavidus necator* using a novel and environmentally friendly solvent system” *Biotechnol Prog.* 32(3):678-85; Ujang, et al. (2009) “Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Mixed Microbial Cultures by Simple Digestion and Saponification” *Malaysia: University Teknologi, Institute of Environmental and Water Resource Management*, 8-15, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Получение композиции гидролизата белка

[142] Биомасса, полученная из культуры микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, может быть гидролизована для получения гидролизата белка в соответствии с аспектами настоящего изобретения. Гидролиз можно проводить с использованием одной или нескольких физических, химических и ферментативных обработок, применяемых к биомассе микроорганизмов. Качество полученного гидролизата белка (*например*, пептон, пептиды, гидролизованные белки) определяется такими факторами, как исходное сырье, используемые гидролизующие агенты, параметры процесса и степень гидролиза. Степень гидролиза обычно определяется соотношением аминного азота/общего азота (АА/ОА). Различные методы расщепления белка приводят к высвобождению аминокислот и пептидов с разной степенью гидролиза (СГ%). Размер и аминокислотный состав этих высвобождаемых пептидов могут влиять на скорость роста и выход биомассы организмов, получающих гидролизат белка. Биологическая ценность конкретного гидролизата белка определяется не только общим содержанием аминокислот, но и их формой (*например*, олигопептидами, ди- и трипептидами или в виде свободных аминокислот). Различные коммерческие гидролизаты имеют разные СГ% и содержание общего белка.

[143] В некоторых неограничивающих вариантах осуществления биомасса микроорганизмов гидролизуется по меньшей мере одним ферментом, который способен гидролизовать микробные (*например*, бактериальные) белки в свободные аминокислоты и/или короткие пептиды. В некоторых вариантах осуществления контролируемое расщепление белков, полученных, как описано в настоящем документе, осуществляют с использованием добавленных протеаз и/или смесей протеаз и пептидаз. В некоторых вариантах осуществления несколько коммерчески доступных протеолитических ферментов с различной специфичностью используют для расщепления белков, полученных, как описано в настоящем документе. В других неограничивающих вариантах экзогенные ферменты не используют в процессе гидролиза. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает гидролиз очищенным ферментом. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает гидролиз смесью фермента и среды, в которой был получен фермент.

[144] В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает гидролиз ферментом растительного, и/или животного, и/или бактериального, и/или архейного, и/или грибного происхождения. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает гидролиз смесью одного или нескольких ферментов

растительного, животного, бактериального, архейного и/или грибного происхождения. В некоторых вариантах осуществления используют ферменты неживотного происхождения. В некоторых вариантах осуществления ферменты, используемые при ферментативном гидролизе, получены не из животных источников (*например*, трипсин, полученный из поджелудочной железы свиньи). В некоторых вариантах осуществления используют протеазы, а также непротеолитические гидролазы, которые могут высвобождать первичные компоненты полимеризованной небелковой фракции сырья, *например*, микробная биомасса, например, хемоавтотрофная биомасса. В типичных вариантах осуществления бактериальные клетки могут быть гидролизованы одной или несколькими протеазами, липазами и/или амилазами. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает один или несколько протеолитических ферментов бактериального, растительного, грибного, архейного и/или животного происхождения.

[145] В некоторых вариантах осуществления способ включает использование одной или нескольких щелочных протеаз, и/или кислых протеаз, и/или нейтральных протеаз для гидролиза. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает использование одной или нескольких экзопротеаз. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает использование одной или нескольких эндопротеаз, включая эндопротеазы, специфичные к последовательности. Подходящие эндопротеазы включают, помимо прочего, сериновые протеазы, аспарагиновые протеазы, металлопротеазы и цистеиновые протеазы. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает гидролиз по меньшей мере одним ферментом, выбранным из панкреатина, папаина, бромелаина, фицина, бактериальной протеазы, грибной протеазы, нейтральной протеазы, продуцируемой *Bacillus* sp. алкалазы 2,4L, *бациллой B. licheniformis*, и/или *субтилизины карлсберг*, эсперазы из *B. lentus*, нутраза из *B. amyloliquifacis*, протамекса из *Bacillus* sp., теролизина/теролазы из *B. thermoproteolyticus*, флавузима из *Aspergillus oryzae*, протеазы 2A *Aspergillus* sp., протеазы N из *B. subtilis*, нейтралазы *B. subtilis*, трипсина, химотрипсина, кератиназы, пепсина, субтилизина и/или ренина. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает гидролиз белков в биомассе с использованием нескольких протеаз последовательно или одновременно.

[146] В некоторых вариантах осуществления пептон или триптон получают из биомассы и/или белка, выделенного из одного или нескольких описанных в данном документе микроорганизмов. В некоторых вариантах осуществления панкреатический

перевар или триптический перевар получают из биомассы и/или белка, выделенного из одного или нескольких микроорганизмов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления для гидролитической обработки используют рекомбинантные протеазы. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные протеазы обеспечивают уникальную специфичность расщепления и/или более гомогенные гидролизаты.

[147] Ферментативный гидролиз биомассы микроорганизмов может включать объединение фермента и биомассы микроорганизмов в подходящем количестве в подходящих условиях. В некоторых вариантах осуществления условия давления, температуры, pH и времени ферментативного гидролиза являются такими, при которых достигается максимальный или подходящий уровень ферментативной активности. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает объединение фермента и биомассы микроорганизма в весовом соотношении в диапазоне от около 0,1 до около 10 г фермента на 100 г содержания азота в биомассе. В другом конкретном варианте осуществления ферментативный гидролиз проводят с использованием концентрации 0,05%-0,5% по объему исходного раствора фермента с активностью около 70000 единиц с использованием анализа азоказеина. В различных иллюстративных вариантах осуществления можно использовать любой подходящий способ для повышения эффективности ферментативного гидролиза биомассы микроорганизмов. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает объединение фермента и биомассы микроорганизма и перемешивание объединенных фермента и биомассы микроорганизма любым подходящим способом. Ферментативную обработку можно проводить в любом подходящем устройстве, таком как, например, реактор с контролем температуры и перемешиванием.

[148] В некоторых вариантах осуществления ферменты используют для расщепления белков по конкретным пептидным связям. Например, пепсин расщепляет амидную связь между аминокислотами в белке, где по меньшей мере одна из аминокислот является ароматической аминокислотой (*например*, фенилаланин, триптофан или тирозин). В некоторых вариантах осуществления пепсин используют для расщепления амидных связей, включающих ароматическую аминокислоту.

[149] Как указано выше, гидролиз можно проводить в любых подходящих условиях, однако в различных иллюстративных вариантах осуществления гидролиз можно проводить при pH в диапазоне от около 2 до около 10. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз проводят в условиях pH, находящихся в

диапазоне рН от около 4 до около 12. В других вариантах осуществления гидролиз проводят в диапазоне рН от около 5 до около 9,5, или при рН около 6 и около 8, или при рН около 7. В некоторых конкретных вариантах осуществления значение рН поддерживают постоянным во время ферментативного гидролиза путем добавления основания, такого как, например, аммиак, гидроксид аммония, гидроксид калия, оксид кальция или фосфат калия, и в других вариантах осуществления рН поддерживают добавлением кислоты, такой как фосфорная кислота, серная кислота или угольная кислота (*m. e.*, CO₂). В различных примерах осуществления гидролиз можно проводить при температуре от около 15,5°C до около 55°C и в течение периода времени от около 2 до около 120 часов. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз проводят при температуре от около 10°C до около 80°C, а в других вариантах осуществления - при температуре от около 10°C до около 65°C или от около 10°C до около 55°C. рН, температура и продолжительность, используемые для гидролиза, могут зависеть от конкретного используемого(ых) фермента(ов) и желаемой степени гидролиза (*например*, распределения по размеру пептидов).

[150] В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает приведение фермента в контакт с биомассой микроорганизма в присутствии катализатора. Можно использовать любой катализатор, улучшающий эффективность фермента или ферментов, такой как гетерогенные катализаторы, гомогенные катализаторы и/или электрокатализаторы. В некоторых таких вариантах осуществления катализатор включает по меньшей мере один из железа, меди, кобальта, никеля, бора, магния, кальция и редкоземельных металлов, таких как лантан, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает приведение фермента в контакт с биомассой микроорганизмов при приложении электрического тока. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает обработку биомассы микроорганизмов электрическим током до и/или во время ферментативного гидролиза биомассы микроорганизмов. Электрический ток можно подавать на биомассу микроорганизмов любым подходящим способом и при любых подходящих условиях. В различных иллюстративных вариантах осуществления электрический ток подается в количестве от около 2 В до около 120 В в течение периодов времени от около 1 до около 60 минут.

[151] Различные иллюстративные варианты осуществления описанных в данном документе способов могут дополнительно включать предварительную обработку перед ферментативным гидролизом биомассы микроорганизмов. Эффективность гидролиза

микробного белка с помощью ферментов можно повысить, применяя различные методы предварительной обработки. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает обработку биомассы микроорганизмов кислотой или основанием перед ферментативным гидролизом. В различных иллюстративных вариантах осуществления кислотная предварительная обработка осуществляется путем доведения рН суспензии, содержащей биомассу, до диапазона от около 3 до около 5 с использованием кислоты, такой как, помимо прочего, соляная кислота, серная кислота, фосфорная кислота или угольная кислота (*например*, CO_2). В некоторых вариантах осуществления кислотная предварительная обработка может проводиться при температуре от около 100°C до около 130°C в течение периода времени от около 0,25 часа до около 10 часов. В различных иллюстративных вариантах осуществления основная предварительная обработка осуществляется путем доведения рН суспензии биомассы до значения от около 9 до около 14, *например*, от около 10 до около 13, в том числе от около 11 до около 13, с использованием основания, такого как, помимо прочего, гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид аммиака, оксид кальция или аммиак. В некоторых вариантах осуществления основную предварительную обработку можно проводить при температуре от около 100°C до около 130°C в течение периода времени от около 0,25 часа до около 10 часов. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает обработку биомассы микроорганизмов ультразвуковой вибрацией до и/или во время ферментативного гидролиза. В некоторых вариантах осуществления ферментативный гидролиз включает обработку биомассы микроорганизмов сверхкритической водой и/или сверхкритическим диоксидом углерода перед ферментативным гидролизом.

[152] Некоторые варианты осуществления включают способ получения гидролизата или экстракта органического фермента посредством «однореакторного» процесса. В контексте изобретения выражение «однореакторный» означает, что процедура проводится без промежуточных стадий разделения. В некоторых вариантах осуществления физическая обработка клеточного бульона, содержащего биомассу микроорганизмов, происходит без разделения фаз при давлении выше атмосферного и высокой температуре, когда клеточный бульон обрабатывают концентрированным основанием перед ферментативным гидролизом. В некоторых вариантах осуществления суспензию биомассы подвергают типу «однореакторного» процесса, который в некоторых неограничивающих вариантах осуществления включает следующие стадии:

(а) добавление концентрированного основания к суспензии микробных клеток для

регулирования ее pH; (b) воздействие на смесь, полученную на стадии (a), давлением выше атмосферного и высокой температурой; и (c) воздействие на смесь, полученную на стадии (b), ферментативным гидролизом с получением органического экстракта фермента. В некоторых вариантах осуществления щелочная обработка на стадии (a) использует подходящее основание, такое как основание, выбранное из одного или нескольких из гидроксида аммония, аммиака, гидроксида калия и/или гидроксида кальция. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления используют гидроксид аммония в количестве около 28 масс.%, а в других используют около 10 М гидроксида калия.

[153] В некоторых вариантах осуществления после щелочной обработки бульона проводят физическую обработку смеси при давлении выше атмосферного и/или высокой температуре. В одном конкретном неограничивающем варианте осуществления на стадии (b) при повышенной температуре прикладывают давление от около 102 кПа до около 141 кПа. В некоторых конкретных вариантах осуществления при физической обработке используют температуру от около 90°C до около 140°C. В некоторых конкретных вариантах осуществления на стадии (b) прикладывают давление от около 102 кПа до около 141 кПа при температуре от около 90°C до около 140°C. Эту физическую обработку проводят в любом подходящем устройстве, выбранном специалистом в данной области техники, таком как, например, автоклав.

[154] В некоторых вариантах осуществления ферментативную обработку проводят после физической обработки. В некоторых вариантах осуществления после физической обработки и перед ферментативной обработкой добавляют концентрированное основание и/или кислоту, чтобы обрабатываемая смесь имела оптимальное значение pH для используемого фермента. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ферментов, используемых в ферментативном гидролизе на стадии (c), представляют собой протеолитические ферменты бактериального, растительного, грибного, архейного или животного происхождения. В конкретном варианте осуществления ферментативный гидролиз на стадии (c) проводят при температуре от около 40°C до около 70°C и pH от около 8 до около 11 в течение периода от около 2 часов до около 48 часов. В некоторых вариантах осуществления одnoreакторный процесс повышает простоту процесса и/или снижает затраты, и/или менее загрязняет окружающую среду, чем сопоставимые многореакторные процессы.

[155] Гидролиз биомассы микроорганизмов с помощью ферментов или без них может быть осуществлен путем применения кислотного или щелочного гидролиза в сочетании

с достаточными условиями тепла и давления. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления гидролиз биомассы микроорганизмов включает проведение кислотного гидролиза. В некоторых таких вариантах осуществления кислотный гидролиз включает корректировку рН композиции, содержащей микробные клетки, с помощью кислоты, такой как, например, по меньшей мере один агент, выбранный из серной кислоты, соляной кислоты, фосфорной кислоты, угольной кислоты, борной кислоты, уксусной кислоты, пропионовой кислоты и лимонной кислоты. В различных иллюстративных вариантах осуществления кислотный гидролиз осуществляют путем доведения рН крема из биомассы микроорганизмов до рН от около 0,5 до около 5. В некоторых таких вариантах осуществления кислотный гидролиз включает регулирование рН суспензии, содержащей биомассу микроорганизмов, и нагревание суспензии с отрегулированным рН до подходящей температуры, например температуры от около 30°C до около 200°C, в течение подходящего периода времени, например, от около 10 минут до около 48 часов. В некоторых таких вариантах осуществления кислотный гидролиз включает регулирование рН суспензии, содержащей биомассу микроорганизмов, и нагревание суспензии с отрегулированным рН под давлением. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления гидролиз микробных клеток включает проведение щелочного гидролиза. В некоторых таких вариантах осуществления проведения щелочного гидролиза включает доведение рН суспензии, содержащей биомассу микроорганизма, до рН от около 8 до около 14. В некоторых таких вариантах осуществления щелочной гидролиз включает корректировку рН композиции, содержащей биомассу микроорганизмов, с помощью по меньшей мере одного основания, такого как основание, выбранное из гидроксида калия, гидроксида натрия, оксида кальция, оксида магния, гидроксида аммония, аммиака и трикалийфосфата. В некоторых таких вариантах осуществления щелочной гидролиз включает регулирование рН композиции, содержащей биомассу микроорганизмов, и нагревание композиции с отрегулированным рН до температуры от около 30°C до около 200°C в течение периодов времени от около 10 минут до около 48 часов. В некоторых таких вариантах осуществления щелочной гидролиз включает регулирование рН композиции, содержащей биомассу микроорганизмов, и нагревание композиции с отрегулированным рН под давлением. В некоторых вариантах осуществления щелочной или кислотный гидролиз проводят при повышенном давлении. В некоторых вариантах осуществления суспензию, содержащую биомассу микроорганизмов, подвергают воздействию давления от около 5 до около 40 фунтов на кв. дюйм во время щелочного или кислотного

гидролиза. Такие методики кислотного или щелочного гидролиза, описанные в данном документе, обычно дают композицию гидролизата, включающую растворимый материал и дебрис клеточных стенок. В некоторых вариантах осуществления указанный дебрис клеточных стенок можно отделить от гидролизата белка путем разделения твердой и жидкой фаз, например центрифугированием.

[156] В некоторых неограничивающих вариантах осуществления гидролиз биомассы микроорганизмов включает добавление кислоты или основания. В некоторых вариантах осуществления кислота или основание представляют собой сильную кислоту или основание, соответственно. В некоторых вариантах осуществления кислота включает одну или несколько из серной кислоты, фосфорной кислоты, соляной кислоты и/или угольной кислоты. В некоторых вариантах осуществления основание включает одно или несколько из следующих соединений: гидроксид калия, аммиак, гидроксид аммония, фосфат калия, оксид кальция, оксид магния и/или гидроксид натрия. Кислотный или основной гидролиз не является сайт-специфическим и, следовательно, обычно приводит к более однородным размерам пептидов и более высоким уровням пептидов с низкой молекулярной массой (ММ) и/или свободных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления более однородное распределение пептидов по размерам и/или более высокие уровни пептидов с низкой молекулярной массой достигают с помощью кислотного или основного гидролиза. При достаточном времени обработки и/или интенсивности применяемых условий (*например*, рН, температуры (Т), давления (Р)), кислотный или основной гидролиз может полностью высвободить все или практически все свободные аминокислоты (*например*, казामीновые кислоты). В некоторых вариантах осуществления вводимые белки в значительной степени или полностью превращаются в свободные аминокислоты посредством кислотного и/или основного гидролиза. Белки, подвергшиеся кислотному или основному гидролизу до свободных аминокислот, обычно могут содержать до 40% солей, таких как NaCl. В некоторых вариантах осуществления получают композицию свободных аминокислот, в значительной степени или полностью свободную от солей, *например*, где содержание NaCl составляет менее около 2%. В некоторых таких вариантах осуществления общее содержание соли может составлять менее около 20%, около 10%, около 5% или около 2%. При кислотном гидролизе некоторые аминокислоты (*например*, цистеин (Cys), триптофан (Trp)) могут быть разрушены. В некоторых вариантах осуществления используют ферментативный и/или панкреатический перевар для сохранения лабильных аминокислот, таких как цистеин и/или триптофан.

[157] В некоторых вариантах осуществления автолиз клеток проводят с использованием контролируемых температурных и/или осмотических изменений, в результате чего получают клеточный лизат. В некоторых вариантах осуществления автолиз может быть запущен с использованием одного или нескольких из следующих факторов: кислоты, основания и/или нагревания. В некоторых вариантах осуществления за автолизом клеток следует и/или он сопровождается расщеплением белка эндогенными ферментами, что приводит к получению клеточного лизата, содержащего гидролизованные белки, и/или гидролизат белка, и/или олигопептиды, и/или свободные аминокислоты.

[158] В некоторых вариантах осуществления исходная биомасса, например, хемоавтотрофная биомасса или лизат, содержит некоторые белки с молекулярной массой ≥ 10000 Да. В некоторых таких вариантах осуществления продукт одной или нескольких стадий гидролиза белка, описанных в настоящем документе, приводит к меньшему количеству или отсутствию белков или пептидов с молекулярной массой ≥ 10000 Да. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средняя молекулярная масса пептида и аминокислот в продукте гидролизата белка, полученного в результате одной или нескольких описанных в данном документе стадий гидролиза белка, находится в пределах от около 9000 до около 10 000 Да или от около 8000 до около 9000 Да, или от около 7000 до около 8000 Да, или от около 6000 до около 7000 Да, или от около 5000 до около 6000 Да, или от около 4000 до около 5000 Да, или от около 3000 до около 4000 Да, или от около 2000 до около 3000 Да, или от около 1000 до около 2000 Да, или менее около 1000 Да. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка (ГБ) имеет среднюю молекулярную массу для содержания в нем пептидов и аминокислот примерно около 700 Да.

[159] В некоторых вариантах осуществления различные гидролизующие агенты используют для конструирования ГБ, имеющего желаемый диапазон пептидных фракций и соотношение пептидов к свободным аминокислотам и среднюю ММ. Известно, что гидролизаты с низкомолекулярными пептидами стимулируют рост молочнокислых бактерий (МКБ). В некоторых вариантах осуществления получают ГБ, который включает пептиды с низкой молекулярной массой. В некоторых вариантах осуществления ГБ, который включает пептиды с низкой молекулярной массой, продуцируемые, как описано в настоящем документе, вводят в другую культуру, такую как, помимо прочего, культуру, которая включает МКБ. В некоторых указанных вариантах осуществления культура МКБ включает один или несколько штаммов *L. lactis*.

В некоторых вариантах осуществления ГБ, полученный, как описано в настоящем документе, содержит большее количество малых пептидов (от трех до семи аминокислотных остатков) и свободных незаменимых аминокислот, чем один или несколько из следующих типов гидролизата белка: папаиновый гидролизат казеина; соевые пептоны и/или сыворотка.

[160] В некоторых вариантах осуществления разработан источник ГБ и/или азота, который включает комбинацию олигопептидов, поддерживающих начальный рост, а также ди- и трипептидов и незаменимых аминокислот, которые можно транспортировать через клеточную мембрану и использовать для синтеза биомассы с минимальным расходом свободной энергии (АТФ). В некоторых вариантах осуществления композиция аминокислот, ди- и трипептидов рассчитана на минимальную потребность в АТФ при транспортировке аминокислот, ди- и трипептидов в другую клетку и/или организм.

[161] Известно, что при ферментативном и кислотном гидролизе разрушаются некоторые аминокислоты, например, цистеин (Cys) в гидролизатах казеина и триптофан (Trp) в расщепленном кислотой казеиновом пептоне. В некоторых вариантах осуществления гидролизные агенты и способ выбирают для сохранения чувствительных аминокислот, таких как, помимо прочего, Cys и/или Trp. В некоторых вариантах осуществления панкреатическое расщепление белков проводят для сохранения Trp.

[162] Существует несколько особенностей ферментов, которые следует учитывать при разработке ГБ и питательной среды. Сообщается, что биосинтез протеиназы PrtB/PrtH лактобацилл регулируется пулом пептидов культуральной среды и подавляется средой, богатой пептидами (Kenny, O., FitzGerald, R. J., O’Cuinn, G., Beresford, T., & Jordan, K. (2003) Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00073-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00073-6)). Аналогичным образом, pepX и pepN лактококков, как сообщается, регулируются содержанием пептидов в питательной среде. С другой стороны, сообщается, что активность аминопептидазы pepN в *Lactobacillus helveticus* CRL 1062 и активность pepX, pepI и pepN в *Lactobacillus bulgaricus* (Morel, F., Gilbert, C., Geourjon, C., Frot-Coutaz, J., Portalier, R., & Atlan, D. (1999) The prolyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* belongs to the α/β hydrolase fold family. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00264-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00264-7)) не зависят от содержания пептидов в питательной среде. Сообщается, что у *L. helveticus* активность таких ферментов, как аминопептидазы, дипептидазы, трипептидазы и эндопептидазы, зависит от штамма и вида. Следовательно, в тех случаях,

когда штаммы лактобактерий будут применять в качестве стартовой культуры для сыра или дополнительной культуры, следует использовать ингредиенты среды, которые индуцируют и поддерживают важные метаболические пути, такие как внеклеточные и внутриклеточные протеолитические системы. Эти микробные свойства обеспечивают подкисление молока в течение предсказуемого времени и/или высвобождение ферментов, необходимых для развития вкуса во время созревания сыра.

[163] В некоторых вариантах осуществления, где богатая пептидами среда подавляет важные метаболические пути, такие как внеклеточные и внутриклеточные протеолитические системы, цельноклеточную биомассу и/или лизаты, и/или цельные белки (*m.e.* негидролизированный белок), полученные, как описано в настоящем документе (*например*, хемоавтотрофно), используют в качестве компонентов среды. В некоторых таких вариантах осуществления такую среду можно использовать для выращивания стартовых и/или дополнительных культур. В отличие от некоторых стартовых и вспомогательных культур, основным приоритетом при получении пробиотических штаммов (*например*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*) является высокий выход и количество жизнеспособных клеток, что позволит культурам пережить лиофильную сушку и длительное хранение при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления питательные вещества, такие как цельноклеточная биомасса, и/или лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или экстракты других питательных веществ или кофакторов, и/или составы, включающие один или несколько из предыдущих компонентов, выбирают таким образом, чтобы максимизировать одну или несколько из следующих характеристик культуры, питаемой указанными питательными веществами: выход; количество жизнеспособных клеток; выживаемость клеток при лиофильной сушке; и/или срок хранения при комнатной температуре. В некоторых таких вариантах осуществления культура включает пробиотические штаммы, такие как, помимо прочего, один или несколько из *L. acidophilus*, *L. johnsonii* и/или *L. reuteri*.

[164] В некоторых вариантах осуществления получают неопределенные или определенные стартовые культуры, состоящие из нескольких видов/штаммов. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты белка и/или другие питательные вещества, а также их составы в комплексных средах предназначены для поддержания воспроизводимых характеристик и/или поддержания надлежащего и/или желаемого соотношения между штаммами/видами на протяжении процессов субкультивирования и ферментации. Для достижения этого в состав среды оптимизируют различные факторы,

такие как, помимо прочего, правильный баланс источников углерода и азота в среде для выращивания при ферментации.

[165] В некоторых вариантах осуществления гидролизованная биомасса может подвергаться одному или нескольким процессам после гидролиза, таким как осветление, концентрирование, сушка, пастеризация и/или разделение. В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе способ включает одну или несколько дополнительных стадий после гидролиза, на которых гидролизат подвергают концентрированию для получения концентрированного гидролизата. Концентрированный гидролизат в некоторых вариантах осуществления содержит по меньшей мере 40% по весу сухого вещества, в других вариантах осуществления по меньшей мере 50% по весу сухого вещества и в других вариантах осуществления от около 50% до около 55% по весу сухого вещества или выше. Эта концентрация может быть достигнута любым обычным способом, известным в данной области техники, таким как, например, нагревание и использование роторного испарителя с термостатической баней или обратным осмосом, или любого другого подходящего устройства. В некоторых вариантах осуществления гидролизованную биомассу лиофилизируют для удаления большей части или практически всей содержащейся воды.

[166] В некоторых вариантах осуществления лизаты и/или гидролизаты белка, и/или пептиды, и/или аминокислотные композиции дополнительно очищают ультрафильтрацией и/или химическими средствами, такими как, помимо прочего, осаждение ацетоном, *например*, для удаления небелковых компонентов. В некоторых вариантах осуществления лизаты и/или гидролизаты белка, и/или пептиды, и/или аминокислотные композиции фракционируют с помощью эксклюзионной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления фракции, полученные в результате такого фракционирования, используют в качестве отдельных продуктов и/или побочных продуктов. В некоторых вариантах осуществления лизаты и/или гидролизаты белка, и/или пептиды, и/или аминокислотные композиции подвергают тонкому фракционированию. В некоторых таких вариантах осуществления выделяют и очищают наиболее активный пептид или пептиды. В некоторых вариантах осуществления высокоэффективные процедуры фракционирования применяют к лизатам и/или гидролизатам белка, и/или пептидам, и/или аминокислотным композициям, полученным, как описано в настоящем документе, *например*, для получения гомогенных пептидов. В некоторых вариантах осуществления гомогенные пептиды секвенированы.

[167] В другом конкретном варианте осуществления способ включает дополнительную стадию (стадии) после гидролиза белка, на которой гидролизат белка, полученный после гидролиза, подвергают разделению с получением: (i) растворимой фракции гидролизата и (ii) твердой фазы, нерастворимой фракции гидролизата. Это разделение можно осуществить любым подходящим способом разделения твердой и жидкой фаз, таким как, например, фильтрация или центрифугирование с использованием декантера или другого подходящего промышленного оборудования.

[168] В некоторых неограничивающих вариантах осуществления лизат и/или гидролизат подвергают стадии или стадиям разделения твердой и жидкой фаз, включая, помимо прочего, одну или несколько из следующих операций: центрифугирование и/или фильтрации. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления нерастворимые компоненты клеточной мембраны отделяют от растворимой фракции. В некоторых вариантах осуществления растворимую и/или нерастворимую фракцию подвергают сушке, включая, помимо прочего, распылительную сушку и/или сублимационную сушку. В некоторых вариантах осуществления растворимая фракция используется в приложениях для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления нерастворимая фракция используется в пищевых применениях для растений, животных, грибов или других организмов.

[169] В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к включению белков, пептидов и аминокислот, лизат, и/или гидролизат, и/или аминокислотная композиция включает один или несколько из: витаминов; липидов; углеводов; нуклеиновых кислот; минералов и/или других микроэлементов.

[170] Различные варианты осуществления способов гидролиза, описанных в настоящем документе, позволяют получать гидролизаты белка, и/или пептидные композиции, и/или аминокислотные композиции различной степени чистоты. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, полученная, как описано в настоящем документе, относится к одному или нескольким из следующих сортов: технический сорт; пищевой и/или непищевого качества. В некоторых вариантах осуществления стартовая культура производится с использованием только пищевых материалов. В некоторых вариантах осуществления культура МКБ и/или пробиотическая культура, и/или отдельный клеточный белок, и/или культура клеток животных, такая как, помимо прочего, культура клеток млекопитающих, и/или другое питательное вещество, включая, помимо прочего, один или несколько витаминов, получают с использованием только пищевых материалов. В

некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, полученные, как описано в настоящем документе, используют в качестве заменителя гидролизатов белка, и/или пептидных композиций, и/или аминокислотных композиций, обычно получаемых из мясных, и/или соевых, и/или пшеничных, и/или молочных белков.

[171] В некоторых вариантах осуществления одну или несколько партий биомассы из одного или нескольких различных микроорганизмов или совместных культур, или консорциумов микроорганизмов можно обрабатывать с использованием нескольких протоколов гидролиза для создания библиотеки гидролизатов, имеющих дискретные композиции. В некоторых вариантах осуществления библиотека может быть создана с использованием одного или нескольких различных организмов; одного или нескольких различных гидролизующих агентов; одного или нескольких разных наборов параметров процесса; одного или нескольких различных степеней гидролиза и одной или нескольких различных стадий постгидролизной обработки и/или очистки. В библиотеке гидролизатов конкретная композиция гидролизата может подходить для культивирования определенных типов клеток и/или стадий роста клеток, таких как, помимо прочего, типы клеток животных и/или стадии роста клеток животных.

[172] В некоторых вариантах осуществления биомасса, полученная из культуры микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, может быть обработана для экстракции органического полимера, который микроорганизм накапливает во время роста. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм, как описано в настоящем документе, может расти на H_2/CO_2 и/или синтетическом газе, и микроорганизм может накапливать полигидроксиалканоат (ПГА), *например*, полигидроксибутират (ПГБ) и/или полигидроксивалерат (ПГВ), до около 50% или более клеточной биомассы по массе. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм обладает природной способностью направлять большой поток углерода через промежуточное соединение метаболизма ацетил-КоА, что может приводить к биосинтезу жирных кислот, наряду с рядом других путей синтеза, включая синтез ПГА, и/или ПГБ, и/или ПГВ, а также аминокислот. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм, проявляющий эти признаки, представляет собой *Cupriavidus necator* (*например*, *Cupriavidus necator* DSM 531 или DSM 541) и/или *Cupriavidus metallidurans* (*например*, *Cupriavidus metallidurans* DSM 2839).

[173] В некоторых вариантах осуществления обработка биомассы, полученной из хемоавтотрофного микроорганизма, включает экстракцию ПГА, ПГБ, и/или ПГВ из

нерастворимой фракции гидролизата. В других вариантах осуществления обработка биомассы, полученной из хемоавтотрофного микроорганизма, включает выделение твердого вещества, богатого ПГА, ПГБ, или ПГВ, из растворимой фракции гидролизата. Можно использовать любой подходящий способ экстракции ПГА, ПГБ, или ПГВ, как обсуждалось выше в отношении обработки биомассы микроорганизмов для экстракции ПГА, ПГБ, или ПГВ.

[174] В некоторых вариантах осуществления один или несколько лизатов, и/или гидролизатов, и/или аминокислотных композиций, как описано в настоящем документе, комбинируют с другими факторами и/или пептидами для обогащения среды питательными веществами, и/или повышения стабильности глутамина, и/или повышения плотности жизнеспособных клеток. Сообщалось, что небольшие олигопептиды, низкомолекулярные вещества и свободные аминокислоты положительно влияют на питательную ценность среды и/или продуктивность культуры, выращенной на такой среде, для многих различных типов клеток. В некоторых вариантах осуществления олигопептиды, низкомолекулярные вещества и свободные аминокислоты, полученные как описано в данном документе, вносят вклад в питательную ценность среды и/или повышают продуктивность культуры, выращенной на такой среде. В некоторых вариантах осуществления в среду могут быть добавлены олигопептиды, низкомолекулярные вещества и/или свободные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления олигопептиды, низкомолекулярные вещества и/или свободные аминокислоты могут секретироваться и/или высвобождаться в среду одним или несколькими описанными в данном документе микроорганизмами. В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы включают *Cupriavidus necator* (например, *Cupriavidus necator* DSM 531 или DSM 541) и/или *Cupriavidus metallidurans* (например, *Cupriavidus metallidurans* DSM 2839). В одном варианте осуществления микроорганизмы включают *Cupriavidus necator* DSM 541.

[175] В некоторых вариантах осуществления пептиды, полученные, как описано в настоящем документе, уменьшают присутствие токсичных уровней неорганических ионов, оказывая защитное действие на культуру клеток. В некоторых вариантах осуществления цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, как описано в настоящем документе, являются источником одного или нескольких из: витаминов; жирных кислот, включая, помимо прочего, олеиновую, арахидоновую и/или линолевою кислоту; фосфолипидов и/или стероидов.

[176] В некоторых вариантах осуществления цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, как описано в настоящем документе, влияют на функцию и физиологию клеток в клеточной культуре или организме, к которым они были применены.

МИКРООРГАНИЗМЫ

[177] В некоторых вариантах осуществления микроорганизм по настоящему изобретению представляет собой хемоавтотрофный микроорганизм. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм по настоящему изобретению способен к миксотрофному росту и/или является гетеротрофным микроорганизмом. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм по настоящему изобретению представляет собой фотосинтезирующий микроорганизм. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм по настоящему изобретению представляет собой оксигородный или водородокисляющий (knallgas) штамм, *т.е.* микроорганизм, который может использовать водород в качестве донора электронов и кислород в качестве акцептора электронов при дыхании для выработки внутриклеточных переносчиков энергии, таких как аденозин-5'-трифосфат (АТФ). Водородокисляющие (knallgas) микроорганизмы обычно используют молекулярный водород с помощью гидрогеназ, при этом часть электронов, переданных от H₂, используется для восстановления NAD⁺ (и/или других внутриклеточных восстанавливающих эквивалентов), а часть электронов от H₂ используется для аэробного дыхания. Водородокисляющие (knallgas) микроорганизмы, как правило, автотрофно фиксируют CO₂ хемоавтотрофно, посредством путей, включая, помимо прочего, цикл Кальвина или обратный цикл лимонной кислоты.

[178] В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы или композиция, содержащая микроорганизмы, содержит один или несколько из следующих водородокисляющих (knallgas) микроорганизмов: *Aquifex pyrophilus*, *Aquifex aeolicus*, или другие *Aquifex* sp.; *Cupriavidus necator* или *Cupriavidus metallidurans* или другие *Cupriavidus* sp.; *Corynebacterium autotrophicum* или другие *Corynebacterium* sp.; *Gordonia desulfuricans*, *Gordonia polyisoprenivorans*, *Gordonia rubripertincta*, *Gordonia hydrophobica*, *Gordonia westfalica*, или другие *Gordonia* sp.; *Nocardia autotrophica*, *Nocardia opaca*, или другие *Nocardia* sp.; пурпурные несерные фотосинтезирующие бактерии, включая, помимо прочего, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas capsulata*, *Rhodopseudomonas viridis*, *Rhodopseudomonas sulfoviridis*, *Rhodopseudomonas blastica*, *Rhodopseudomonas spheroides*,

Rhodopseudomonas acidophila, или другие *Rhodopseudomonas* sp.; *Rhodobacter* sp.; *Rhodospirillum rubrum*, или другие *Rhodospirillum* sp.; *Rhodococcus opacus* или другие *Rhodococcus* sp.; *Rhizobium japonicum* или другие *Rhizobium* sp.; *Thiocapsa roseopersicina* или другие *Thiocapsa* sp.; *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas flava*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas hydrogenovora*, *Pseudomonas hydrogenothermophila*, *Pseudomonas palleronii*, *Pseudomonas pseudoflava*, *Pseudomonas saccharophila*, *Pseudomonas thermophile*, или другие *Pseudomonas* sp.; *Hydrogenomonas pantotropha*, *Hydrogenomonas eutropha*, *Hydrogenomonas facilis*, или другие *Hydrogenomonas* sp.; *Hydrogenobacter thermophilus*, *Hydrogenobacter halophilus*, *Hydrogenobacter hydrogenophilus*, или другие *Hydrogenobacter* sp.; *Hydrogenophilus islandicus* или другие *Hydrogenophilus* sp.; *Hydrogenovibrio marinus* или другие *Hydrogenovibrio* sp.; *Hydrogenothermus marinus* или другие *Hydrogenothermus* sp.; *Helicobacter pylori* или другие *Helicobacter* sp.; *Xanthobacter autotrophicus*, *Xanthobacter flavus*, или другие *Xanthobacter* sp.; *Hydrogenophaga flava*, *Hydrogenophaga palleronii*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, или другие *Hydrogenophaga* sp.; *Bradyrhizobium japonicum* или другие *Bradyrhizobium* sp.; *Ralstonia eutropha* или другие *Ralstonia* sp.; *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes facilis*, *Alcaligenes hydrogenophilus*, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes paradoxus*, *Alcaligenes ruhlantii*, или другие *Alcaligenes* sp.; *Amycolata* sp.; *Aquaspirillum autotrophicum* или другие *Aquaspirillum* sp.; штамм *Arthrobacter* 11 /X, *Arthrobacter methylotrophus*, или другие *Arthrobacter* sp.; *Azospirillum lipoferum* или другие *Azospirillum* sp.; *Variovorax paradoxus* или другие *Variovorax* sp.; *Acidovorax facilis*, или другие *Acidovorax* sp.; *Bacillus schlegelii*, *Bacillus tusciae*, другие *Bacillus* sp.; *Calderobacterium hydrogenophilum* или другие *Calderobacterium* sp.; *Derxia gummosa* или другие *Derxia* sp.; *Flavobacterium autothermophilum* или другие *Flavobacterium* sp.; *Microcycilus aquaticus* или другие *Microcycilus* sp.; *Mycobacterium gordoniae* или другие *Mycobacterium* sp.; *Paracoccus denitrificans* или другие *Paracoccus* sp.; *Persephonella marina*, *Persephonella guaymasensis*, или другие *Persephonella* sp.; *Renobacter vacuolatum* или другие *Renobacter* sp.; *Seliberia carboxydohydrogena* или другие *Seliberia* sp.; *Streptomyces coelicoflavus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces xanthochromogenes*, *Streptomyces thermocarboxydus*, и другие *Streptomyces* sp.; *Thermocrinis ruber* или другие *Thermocrinis* sp.; *Wautersia* sp.; цианобактерии, включая, помимо прочего, *Anabaena oscillarioides*, *Anabaena spiroides*, *Anabaena cylindrica*, или другие *Anabaena* sp.; и *Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxima*, или другие *Arthrospira* sp.; зеленые водоросли, включая, помимо прочего, *Scenedesmus obliquus* или другие *Scenedesmus* sp.; *Chlamydomonas reinhardtii* или другие

Chlamydomonas sp.; *Ankistrodesmus* sp.; и *Rhaphidium polymorphium* или другие *Rhaphidium* sp; а также консорциум микроорганизмов, включающий оксигенородные микроорганизмы.

[179] В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы или композиции, содержащие микроорганизмы, содержат облигатные и/или факультативные хемоавтотрофные микроорганизмы, включая один или несколько из следующих: *Acetoanaerobium* sp.; *Acetobacterium* sp.; *Acetogenium* sp.; *Achromobacter* sp.; *Acidianus* sp.; *Acinetobacter* sp.; *Actinomadura* sp.; *Aeromonas* sp.; *Alcaligenes* sp.; *Alcaliigenes* sp.; *Aquaspirillum* sp.; *Arcobacter* sp.; *Aureobacterium* sp.; *Bacillus* sp.; *Beggiatoa* sp.; *Butyribacterium* sp.; *Carboxydotherrmus* sp.; *Clostridium* sp.; *Comamonas* sp.; *Dehalobacter* sp.; *Dehalococcoide* sp.; *Dehalospirillum* sp.; *Desulfobacterium* sp.; *Desulfomonile* sp.; *Desulfotomaculum* sp.; *Desulfovibrio* sp.; *Desulfurosarcina* sp.; *Ectothiorhodospira* sp.; *Enterobacter* sp.; *Eubacterium* sp.; *Ferroplasma* sp.; *Halothibacillus* sp.; *Hydrogenobacter* sp.; *Hydrogenomonas* sp.; *Leptospirillum* sp.; *Metallosphaera* sp.; *Methanobacterium* sp.; *Methanobrevibacter* sp.; *Methanococcus* sp.; *Methanococcoides* sp.; *Methanogenium* sp.; *Methanolobus* sp.; *Methanomicrobium* sp.; *Methanoplamus* sp.; *Methanosarcina* sp.; *Methanospirillum* sp.; *Methanothermus* sp.; *Methanotherix* sp.; *Micrococcus* sp.; *Nitrobacter* sp.; *Nitrobacteraceae* sp.; *Nitrococcus* sp.; *Nitrosococcus* sp.; *Nitrospina* sp.; *Nitrospira* sp.; *Nitrosolobus* sp.; *Nitrosomonas* sp.; *Nitrosospira* sp.; *Nitrosovibrio* sp.; *Nitrospina* sp.; *Oleomonas* sp.; *Paracoccus* sp.; *Peptostreptococcus* sp.; *Planctomycetes* sp.; *Pseudomonas* sp.; *Ralstonia* sp.; *Rhodobacter* sp.; *Rhodococcus* sp.; *Rhodocyclus* sp.; *Rhodomicrobium* sp.; *Rhodopseudomonas* sp.; *Rhodospirillum* sp.; *Shewanella* sp.; *Siderococcus* sp.; *Streptomyces* sp.; *Sulfobacillus* sp.; *Sulfolobus* sp.; *Thermothrix* sp.; *Thiobacillus* sp.; *Thiomicrospira* sp.; *Thioploca* sp.; *Thiosphaera* sp.; *Thiothrix* sp.; *Thiovulum* sp.; окислители серы; окислители водорода; окислители железа; ацетогены; и метаногены; консорциумы микроорганизмов, включающие хемоавтотрофы; хемоавтотрофы, обитающие по меньшей мере в одном из гидротермальных источников, геотермальных источников, горячих источников, холодных просачиваний, подземных водоносных горизонтов, соленых озер, соляных образований, шахт, дренажей кислых шахтных, хвостов шахт, нефтяных скважин, сточных вод нефтеперерабатывающих заводов, угольных пластов, глубоких недр; очистных сооружений сточных вод и сточных водах; геотермальных электростанциях, сульфатных полях и почвах; и экстремофилы, выбранные из одного или нескольких термофилов, гипертермофилов, ацидофилов, галофилов и психрофилов.

[180] В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы или композиции,

содержащие микроорганизмы, содержат метанотроф и/или метилотроф. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм относится к роду *Methylococcus*. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм представляет собой *Methylococcus capsulatus*. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм представляет собой метилотроф. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм относится к роду *Methylobacterium*. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм происходит из одного или нескольких из следующих видов: *Methylobacterium zatmanii*; *Methylobacterium extorquens*; *Methylobacterium chloromethanicum*. В некоторых вариантах осуществления предложены композиции, в которых микроорганизм представляет собой водородокисляющий хемоавтотроф, и/или карбоксидотроф, и/или метилотроф, и/или метанотроф.

[181] Охарактеризован ряд различных микроорганизмов, способных расти на монооксиде углерода в качестве донора электронов и/или источника углерода (*m. e.* карбоксидотрофные микроорганизмы). В некоторых случаях карбоксидотрофные микроорганизмы также могут использовать H_2 в качестве донора электронов и/или расти миксотрофно. В ряде случаев карбоксидотрофные микроорганизмы являются факультативными хемолитоавтотрофами [Biology of the Prokaryotes, edited by J Lengeler, G. Drews, H. Schlegel, John Wiley & Sons, Jul 10, 2009, полностью включен в настоящий документ посредством ссылки]. В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы или композиции, содержащие микроорганизмы, содержат один или несколько из следующих карбоксидотрофных микроорганизмов: *Acinetobacter sp.*; *Alcaligenes carboxydus* или другие *Alcaligenes sp.*; *Arthrobacter sp.*; *Azomonas sp.*; *Azotobacter sp.*; *Bacillus schlegelii* или другие *Bacillus sp.*; *Hydrogenophaga pseudoflava* или другие *Hydrogenophaga sp.*; *Pseudomonas carboxydohydrogena*, *Pseudomonas carboxydovorans*, *Pseudomonas compransoris*, *Pseudomonas gazotropha*, *Pseudomonas thermocarboxydovorans*, или другие *Pseudomonas sp.*; *Rhizobium japonicum* или другие *Rhizobium sp.*; и *Streptomyces G26*, *Streptomyces thermoautotrophicus*, или другие *Streptomyces sp.* В некоторых вариантах осуществления используют карбоксидотрофный микроорганизм. В некоторых вариантах осуществления используют карбоксидотрофный микроорганизм, способный к хемолитоавтотрофии. В некоторых вариантах осуществления используют карбоксидотрофный микроорганизм, способный использовать H_2 в качестве донора электронов при дыхании и/или биосинтезе.

[182] Микроорганизм, *например*, хемоавтотрофный микроорганизм по настоящему изобретению, может представлять собой встречающийся в природе штамм или может

быть получен с помощью генной инженерии. Микроорганизм может быть генетически модифицирован для экспрессии одного или нескольких белков, которые имеют высокую питательную ценность для клеток животных, когда гидролизат, содержащий белок, предоставляется клеткам в культуре, *например*, в качестве добавки к культуральной среде. В некоторых вариантах осуществления хемоавтотрофный микроорганизм может быть генетически модифицирован для экспрессии полипептидной последовательности, содержащей множественные пептидные субпоследовательности, которые чередуются с сайтами расщепления протеазами. Такая полипептидная последовательность может быть представлена схематично как: $H_2N-X-C-[A-C]_n-Y-COOH$, где « H_2N » и « $COOH$ » представляют собой N- и C-концы полипептида, соответственно; «A» представляет собой пептидную последовательность; «C» представляет собой сайт расщепления протеазой; «X» и «Y» представляют собой линкерные последовательности, которые могут присутствовать или отсутствовать; и n представляет собой целое число от 1 или больше, например, 2 или больше, 5 или больше, 10 или больше, включая 20 или больше. Пептидная последовательность (A) может быть сконструирована так, чтобы включать пептидную последовательность (A'), оказывающую благотворное влияние на рост клеток животных в культуре при наличии в культуральной среде. Когда биомассу, полученную из генетически модифицированного микроорганизма, гидролизуют с использованием подходящей протеазы для разрезания сайтов расщепления, полученный гидролизат белка может быть обогащен полезными пептидами.

[183] В некоторых вариантах осуществления микроорганизм, *например*, хемоавтотрофный микроорганизм, может быть генетически модифицирован для нарушения экспрессии одного или нескольких эндогенных генов, участвующих в пути биосинтеза. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм может быть генетически модифицирован для нарушения экспрессии одного или нескольких генов, участвующих в биосинтезе полигидроксиалканоата, такого как полигидроксибутират. Подходящие гены, участвующие в биосинтезе полигидроксиалканоата, экспрессия которых может быть нарушена, включают, помимо прочего, ген, кодирующий 3-кетотиолазу, ацетоацетил-КоА-редуктазу и/или ПГБ-синтазу. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм может быть генетически модифицирован для нарушения или увеличения экспрессии одного или нескольких генов, участвующих в биосинтезе витамина, такого как, помимо прочего, витамин B₁, витамин B₂ и/или витамин B₁₂. В некоторых вариантах осуществления нарушена или увеличена экспрессия гена, участвующего в биосинтезе витамина B₁₂. Экспрессия одного или нескольких генов

может быть нарушена или увеличена любым подходящим способом, *например*, путем делеции или мутации всей или части кодирующей области или регуляторной области гена в геноме микроорганизма, или путем репликации кодирующей области или регуляторной области гена в геноме микроорганизма.

[184] Микроорганизм может быть генетически сконструирован с использованием любого подходящего метода. Генная инженерия водородокисляющих (*knallgas*) микроорганизмов описана, например, в патенте США № 9879290 В2, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

КОМПОЗИЦИИ ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКА

[185] В настоящем изобретении предложена композиция гидролизата белка, полученная из микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, как описано в настоящем документе. Композиция гидролизата белка пригодна для использования в качестве добавки к культуральной среде, например, в средах для культивирования клеток животных, *например*, в качестве замены всей или части сыворотки, например, для создания сред для культивирования клеток, не содержащих сыворотки или компонентов животного происхождения, для размножения, развития и/или дифференциации клеток животных или для замены одного или нескольких компонентов животного происхождения в средах для культивирования клеток животных.

[186] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка имеет органическое содержание, обогащенное белком, пептидами и/или свободными аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления органическое содержание гидролизата белка включает количество аминокислот (в белке, пептиде или в виде свободных аминокислот), масс./масс. органического содержания, около 10% или более, *например*, около 20% или более, около 30% или более, около 40% или более, около 50% или более, около 60% или более, около 70% или более, около 80% или более, включая около 90% или более. В некоторых вариантах осуществления органическое содержание гидролизата белка включает количество аминокислот (в белке, пептиде или в виде свободных аминокислот), масс./масс. органического содержимого в диапазоне от около 10% до около 98%, *например*, от около 20% до около 98%, от около 30% до около 98%, от около 40% до около 98%, от около 50% до около 95%, от около 60% до около 95%, от около 70% до около 95%, включая от около 75% до около 95%. Общее органическое содержание может быть измерено с использованием любого подходящего метода.

[187] Композиция гидролизата белка по настоящему изобретению может включать распределение по размеру полипептидов. В некоторых вариантах осуществления средний размер полипептидов в композиции гидролизата составляет около 25 кДа или меньше, *например*, около 20 кДа или меньше, около 15 кДа или меньше, около 10 кДа или меньше, около 5 кДа или меньше, около 2 кДа или меньше, около 1 кДа или меньше, включая около 0,5 кДа или меньше. В некоторых вариантах осуществления средний размер полипептидов в композиции гидролизата находится в диапазоне от около 0,1 кДа до около 100 кДа, *например*, от около 0,5 кДа до около 50 кДа, от около 0,1 кДа до около 10 кДа, от около 0,5 кДа до около 20 кДа, от около 1 кДа до около 10 кДа, включая от около 1 кДа до около 5 кДа. В некоторых вариантах осуществления около 10 % или более, *например*, около 20 % или более, около 30 % или более, около 40 % или более, около 50 % или более, около 60 % или более, около 70 % или более, около 80 % или более, около 90 % или более, включая около 95 % или более полипептидов по количеству составляет около 25 кДа или меньше, *например*, около 20 кДа или меньше, около 15 кДа или меньше, около 10 кДа или меньше, около 5 кДа или меньше, около 2 кДа или меньше, около 1 кДа или меньше, включая около 0,5 кДа или меньше, *например*, от около 0,1 кДа до около 100 кДа, *например*, от около 0,5 кДа до около 50 кДа, от около 0,1 кДа до около 10 кДа, от около 0,5 кДа до около 20 кДа, от около 1 кДа до около 10 кДа, включая от около 1 кДа до около 5 кДа. В некоторых вариантах осуществления средняя молекулярная масса пептидов находится в диапазоне от около 600 до около 1100 Да.

[188] В некоторых вариантах осуществления лизат, гидролизат белка, пептидная композиция и/или аминокислотная композиция, полученные, как описано в настоящем документе, содержат пептиды с молекулярной массой в диапазоне от около 600 до около 1100 Да. В некоторых вариантах осуществления диапазон молекулярных масс лизата, гидролизата белка, пептидной композиции или аминокислотной композиции составляет от около 0,1 кДа до около 100 кДа, или от около 0,1 кДа до около 10 кДа, или от около 1 кДа до около 10 кДа. В некоторых вариантах осуществления небольшая часть молекулярных масс или ни одна из них не превышает около 10 кДа.

[189] В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат белка включает около 1% свободных аминокислот, или около 5% свободных аминокислот, или около 30% свободных аминокислот, или около 40% или более свободных аминокислот.

[190] В некоторых вариантах осуществления лизат, гидролизат белка, экстракт, пептидная композиция и/или аминокислотная композиция, полученные, как описано в настоящем документе, обладают одной или несколькими из следующих характеристик:

по меньшей мере около 60% общего содержания аминокислот (*m.e.* включая аминокислоты, полимеризованные в пептидах и/или белках, и/или других биохимических веществах), или \geq около %, или \geq около 73%, или \geq около 75%, или около \geq 80% общего содержания аминокислот по массе; из которых от около 35% до около 40%, или от около 30% до около 45%, или от около 20% до около 50% составляют свободные аминокислоты; и от около 10% до около 15% или от около 5% до около 20% составляют ди- и трипептиды; и от около 40% до около 45%, или от около 30% до около 50%, или от около 20% до около 60% составляют олигопептиды с молекулярной массой от около 2000 Да до около 3000 Да.

[191] В некоторых вариантах осуществления среда с определенным химическим составом содержит пептиды с низкой молекулярной массой, полученные, как описано в настоящем документе, и/или гидролизат белка, как описано в настоящем документе, который включает пептиды с низкой молекулярной массой. В некоторых вариантах осуществления пептиды с низкой молекулярной массой в основном или полностью имеют молекулярную массу \leq около 1000 Да. В некоторых вариантах осуществления пептиды с низкой молекулярной массой и/или гидролизат белка вводят в культуру, которая включает, помимо прочего, один или несколько кисломолочных бактерий, таких как *Lactobacillus*, например, штаммы *L. lactis*. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, содержит пептиды с низкой молекулярной массой со средней молекулярной массой около 700 Да, менее чем около 700 Да или от около 700 Да до около 1000 Да. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, *например*, гидролизат белка с пептидами с низкой молекулярной массой, как описано в настоящем документе, вводят в культуру, содержащую кисломолочные бактерии.

[192] В некоторых вариантах осуществления лизат, гидролизат белка, экстракт, пептидная композиция и/или аминокислотная композиция, полученные, как описано в настоящем документе, содержат пептиды, которые являются гидрофобными и/или содержат основные пептидные фракции с молекулярными массами в диапазоне от около 600 Да до около 1100 Да. В некоторых вариантах осуществления лизат, гидролизат белка, экстракт, пептидная композиция и/или аминокислотная композиция, полученные, как описано в настоящем документе, содержат более высокую долю и/или массовый процент гидрофобных пептидов и/или содержат основные пептидные фракции с молекулярными массами в диапазоне от около 600 Да до около 1100 Да, чем молоко или полученные из молока белок или гидролизаты белка. В некоторых вариантах

осуществления такие гидрофобные и/или основные пептиды с молекулярной массой в диапазоне от около 600 Да до около 1100 Да вносят в культуру молочнокислых бактерий, включая, помимо прочего, культуру, которая включает штамм *Lactobacillus*, например, *L. lactis*.

[193] В некоторых вариантах осуществления источник питательных веществ, такой как лизат, гидролизат белка, экстракт, пептидная композиция и/или аминокислотная композиция, полученные, как описано в настоящем документе, содержит более низкую долю и/или массовый процент кислых фосфопептидов с молекулярной массой от около 1400 Да до около 3200 Да, чем молоко или полученные из молока белок или гидролизаты белка. В некоторых вариантах осуществления источник питательных веществ, содержащий относительно низкое содержание кислых фосфопептидов с молекулярной массой от около 1400 Да до около 3200 Да, вносят в культуру молочнокислых бактерий, включая, помимо прочего, культуру, которая включает штамм *Lactobacillus*, например, *L. lactis*.

[194] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, предоставляют одному или нескольким штаммам, которые используют гидролизаты белка для роста и/или продукции лучше, чем они могут использовать цельные белки (*m.e.* негидролизованные белки). В некоторых таких вариантах осуществления указанный(е) штамм(ы) включает один или несколько молочнокислых бактерий, таких как лактобациллы.

[195] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе гидролизат белка лучше усваивается культурой, чем гидролизат соевого белка и/или цельные соевые белки.

[196] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, добавляют в культуральную среду в концентрации около 3% (мас./об.). В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, представленный в концентрации около 3% (мас./об.), имеет среднюю молекулярную массу пептида около 700 Да или от около 700 Да до около 1000 Да. В некоторых вариантах осуществления источник азота (*например*, белковая биомасса, лизат, гидролизат белка, пептидная композиция и/или аминокислотная композиция), полученный, как описано в настоящем документе, добавляют в культуру в количестве от около 0,5% до около 2,5% (масс./об.).

[197] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, приводит к увеличению роста и/или титра одного или

нескольких продуктов, продуцируемых клеточной культурой. В некоторых вариантах осуществления повышенный рост и/или титр (г/л) наблюдают в культуре молочнокислых бактерий по биомассе и/или молочной кислоте. В некоторых вариантах осуществления добавление гидролизата белка, полученного, как описано в настоящем документе, приводит к более высокому росту и/или титру продукта, чем добавление соевых пептидов, гидролизата соевого белка и/или цельных соевых белков. В некоторых вариантах осуществления добавление гидролизата белка, как описано в настоящем документе, приводит к титру молочной кислоты \geq около 50 г/л по сравнению с идентичной культурой, выращенной в той же культуральной среде без добавки гидролизата белка, что приводит к титру молочной кислоты $<$ около 50 г/л. В некоторых вариантах осуществления добавление гидролизата белка, полученного, как описано в настоящем документе, приводит к сокращению времени ферментации для достижения рН 4,50 для культуры молочнокислых бактерий по сравнению с идентичной культурой, выращенной в той же культуральной среде без добавки гидролизата белка.

[198] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или экстракт, как описано в настоящем документе, включает пептиды с от двух до десяти аминокислотными остатками. В некоторых вариантах осуществления композиция лизата и/или гидролизата белка и/или пептида, как описано в настоящем документе, в основном состоит из пептидов, состоящих из от двух до десяти аминокислотных остатков, или включает их. В некоторых вариантах осуществления очищенный продукт в основном состоит из пептидов, состоящих из двух-десяти аминокислотных остатков, или включает их. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или экстракт, как описано в настоящем документе, включает от ди- до пентапептидов (от двух до пяти аминокислотных остатков). В некоторых указанных вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или пептид, и/или аминокислотная композиция, и/или экстракт в основном состоят из пептидов, состоящих из от ди- до пентапептидов, или включают их.

[199] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка включает пептиды, которые имеют степень полимеризации (СП), которая составляет около 50 или менее, *например*, около 40 или менее, около 30 или менее, около 20 или менее, около 10 или менее, в том числе около 5 или меньше, *например*, любое из около 50, 40, 30, 20, 10 или от 5 до около 1. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка включает пептиды, которые имеют СП в диапазоне от около 1 до около 50, *например*, от около 1

до около 30, от около 1 до около 20, в том числе от около 2 до около 10.

[200] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, имеет отношение АА/ОА от около 10% до около 30%. В некоторых указанных вариантах осуществления гидролизат белка с АА/ОА от около 10% до около 30% получают с использованием ферментов. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, имеет отношение АА/ОА от около 20% до около 50%. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка с АА/ОА от около 20% до около 50% получают в виде панкреатического гидролизата. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, имеет отношение АА/ОА от около 50% до около 80%. В некоторых указанных вариантах осуществления гидролизат белка с АА/ОА от около 50% до около 80% получают с использованием кислоты или основания. В некоторых вариантах осуществления цельноклеточный продукт или лизат и/или гидролизат белка, полученные, как описано в настоящем документе, имеют соотношение АА/ОА менее около 10%. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка и/или аминокислотная композиция, полученная, как описано в настоящем документе, имеет соотношение АА/ОА более чем около 80%.

[201] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка по существу не содержит полноразмерных белков. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка обеднен белками и полипептидами и обогащен свободными аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка по существу не содержит белков и полипептидов. Распределение по размерам полипептидов может зависеть от степени гидролиза, достигаемой с использованием одного или нескольких ферментативных, химических и физических способов, как описано в настоящем документе.

[202] В некоторых вариантах осуществления композиция белкового гидролизата обогащена одним или несколькими пептидами, имеющими специфическую аминокислотную последовательность, которые могут оказывать благотворное влияние на рост и/или развитие клеток. В некоторых вариантах осуществления обогащенная последовательность может быть составлять около 0,001% или более, *например*, около 0,01% или более, около 0,1% или более, около 1% или более, включая около 5% или более от общего количества полипептидов в гидролизате. В некоторых вариантах осуществления обогащенная последовательность может быть представлена в диапазоне от около 0,001% до около 5%, *например*, от около 0,001% до около 1%, включая от около 0,01% до около 1% от общего количества полипептидов в гидролизате.

[203] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка имеет содержание золы от около 5% до около 50%, *например*, от около 10% до около 40%, включая от около 10% до около 35%. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка имеет содержание золы менее или равное около 5%. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка имеет общее содержание азота от около 3% до около 20%, *например*, от около 5% до около 15%, включая около 5% и около 15%.

[204] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает один или несколько витаминов. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает витамин В₁, витамин В₂ и/или витамин В₁₂, и/или их витаминеры. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает витамин В₁₂ и/или один или несколько его витаминеров (*например*, цианокобаламин, гидроксокобаламин, аденозилкобаламин, метилкобаламин). В некоторых вариантах осуществления концентрация витамина В₁₂ и/или его витаминеров относительно летучего органического вещества в гидролизате белка составляет от около 2 мкг витамина В₁₂ и/или его витаминера/100 г сухого летучего органического вещества до около 6,5 мкг/100 г летучего органического вещества, или от около 6,5 мкг/100 г летучего органического вещества до около 13 мкг/100 г летучего органического вещества, или около 13 мкг/100 г летучего органического вещества или выше. В некоторых вариантах осуществления витамин В₁₂ и/или его витаминер(ы) получают из микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма.

[205] В некоторых вариантах осуществления витаминеры, такие как, помимо прочего, рибофлавин и/или витамин В₁₂ (и/или его витаминеры), продуцируются микроорганизмом, выращенным на гидролизатах белка и/или других питательных веществах, продуцируемых, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления один или несколько вкусов или ароматизаторов, таких как, помимо прочего, ванилин, продуцируются микроорганизмом, выращенным на гидролизатах белка и/или других питательных веществах, полученных, как описано в настоящем документе.

[206] В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат белка, полученные, как описано в настоящем документе, обеспечивают одно или несколько из: питательных веществ; адгезионных компонентов; и/или аналогов фактора роста к другой клеточной культуре. В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат белка, полученные, как описано в настоящем документе, используют в среде, не

содержащей аминокислот или гидролизатов белка животного происхождения. В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат белка, полученные, как описано в настоящем документе, используют в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат белка, полученные, как описано в настоящем документе, используют для уменьшения или замены аминокислот, гидролизатов белка животного происхождения и/или эмбриональной телячьей/бычьей сыворотки, которые часто используют в культурах клеток человека, животных, грызунов и/или насекомых. В некоторых вариантах осуществления лизат, гидролизат белка и/или композицию свободных аминокислот, как описано в настоящем документе, добавляют к культуре клеток в комбинации с ИТС (инсулин-трансферрин-селен), например, около 1% ИТС.

[207] В некоторых вариантах осуществления пептиды, полученные, как описано в настоящем документе, используют в качестве одного или нескольких из следующего: непосредственно в качестве источника аминокислот; косвенно как стимулятор (*например*, замена сыворотки); и/или для защиты культивируемых клеток от напряжения сдвига (*например*, апоптоза).

[208] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или аминокислотная композиция, полученная, как описано в настоящем документе, обеспечивает источник витаминов для растущих клеток в культуре. Лизат и/или гидролизат белка, и/или аминокислотная композиция могут быть источником витаминов, таких как, помимо прочего, витамин В₁, витамин В₂ и/или витамин В₁₂, и/или их витаминеры. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гидролизат белка и/или аминокислотная композиция могут быть источником одного или нескольких витаминов, включая, помимо прочего: витамин А; бета-каротин; лютеин; зеаксантин; тиамин (В₁); рибофлавин (В₂); ниацин (В₃); пантотеновая кислота (В₅); витамин В₆; фолат (В₉); витамин В₁₂; холин; витамин С; витамин D; витамин Е; и/или витамин К; и/или их витаминеры. Гидролизат белка и/или аминокислотная композиция могут быть источником одного или нескольких минералов, включая, помимо прочего: кальций; железо; магний; марганец; фосфор; калий; натрий; и/или цинк.

[209] В некоторых вариантах осуществления продукт цельноклеточный биомассы, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество, кофактор или компонент, и/или состав, включающий один или несколько из них, полученные, как описано в данном документе, используют для выращивания одного или нескольких

других организмов, которые продуцируют один или несколько из следующих витаминов: витамин А; бета-каротин; лютеин; зеаксантин; тиамин (В₁); рибофлавин (В₂); ниацин (В₃); пантотеновая кислота (В₅); витамин В₆; фолат (В₉); витамин В₁₂; холин; витамин С, витамин D; витамин Е; и/или витамин К; и/или их витаминеры.

[210] В некоторых вариантах осуществления продукт цельноклеточный биомассы, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другой экстракт, полученные, как описано в настоящем документе, служат источником одного или нескольких из: аминокислот; пептидов, включая олигопептиды; липидов; углеводов; полисахаридов; витаминов и/или минералов, включая железо, для другой клеточной культуры.

[211] В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат белка, полученные, как описано в настоящем документе, растворимы в воде.

[212] В некоторых вариантах осуществления композиция лизата, и/или гидролизата белка, и/или пептида, полученная, как описано в настоящем документе, стимулирует более энергоэффективный метаболизм в клеточной культуре, питаемой композицией лизата, и/или гидролизата белка, и/или пептида, по сравнению с эквивалентной смесью свободных аминокислот, содержащей те же или подобные пропорции и количества каждой аминокислоты в свободной форме по сравнению с полимеризованной формой. В некоторых вариантах осуществления клеточная культура, получающая лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, полученную, как описано в настоящем документе, продуцирует меньше аммиака и/или лактата и/или подвергается меньшему гликолизу и/или глутаминолизу по сравнению с эквивалентной смесью свободных аминокислот, содержащей те же или подобные пропорции и количества каждой аминокислоты в свободной форме по сравнению с полимеризованной формой.

[213] В некоторых вариантах осуществления лизаты, и/или гидролизаты белка, и/или аминокислотные композиции, полученные, как описано в настоящем документе, получены из более чем одного микробного источника. В некоторых вариантах осуществления микробные источники включают один или несколько хемоавтотрофных микроорганизмов. В некоторых вариантах осуществления микробные источники представляют собой или включают консорциум микроорганизмов.

[214] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает биоразлагаемый полиэстер. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает полигидроксиалканоатный (ПГА) полимер, такой как ПГБ и/или ПГВ. В некоторых вариантах осуществления полимер ПГА может быть

представлен формулой: $[\text{COCH}_2\text{CH}(\text{R})\text{O}]_n$, где R представляет собой C1-C5 алкил, а n представляет собой целое число, равное 50 или больше. В некоторых вариантах осуществления присутствуют олигомеры ПГА, которые могут быть представлены формулой: $[\text{COCH}_2\text{CH}(\text{R})\text{O}]_n$, где R представляет собой C1-C5 алкил, а n представляет собой целое число, равное 50 или меньше. В некоторых вариантах осуществления присутствуют свободные гидроксibuтиратные и/или другие гидроксиалканоатные (*например*, гидроксивалератные) мономеры. В некоторых вариантах осуществления средняя молекулярная масса полимера ПГА составляет около 1 кДа или более, *например*, около 10 кДа или более, около 100 кДа или более, включая около 1000 кДа или более. В некоторых вариантах осуществления средняя молекулярная масса полимера ПГА находится в диапазоне от около 1 кДа до около 10000 кДа, *например*, от около 10 кДа до около 5000 кДа, включая от около 100 кДа до около 2000 кДа. В некоторых вариантах осуществления средняя молекулярная масса олигомера ПГА составляет около 1 кДа или менее. В некоторых вариантах осуществления полимер ПГА включает полигидроксibuтират (ПГБ), где R представляет собой CH_3 . В некоторых вариантах осуществления полимер ПГА представляет собой сополимер, включая блок-сополимер. В некоторых вариантах осуществления ПГА (*например*, ПГБ и/или ПГВ) получают из одного или нескольких микроорганизмов, *например*, включая хемоавтотрофные микроорганизмы.

[215] Композиция гидролизата белка может включать биоразлагаемый полиэстер, *например*, ПГА (*например*, ПГБ и/или ПГВ), в количестве около 1% масс./масс. или более, *например*, около 5% масс./масс. или более, около 10% масс./масс. или более, около 20% масс./масс. или более, около 30% масс./масс. или более, около 40% масс./масс. или более, включая около 50% масс./масс. или более. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка может включать биоразлагаемый полиэстер, *например*, ПГА (*например*, ПГБ и/или ПГВ), в диапазоне от около 1% до около 90% масс./масс., *например*, от около 5% до около 80% масс./масс., от около 10% до около 70% масс./масс., от около 20% до около 60% масс./масс., включая от около 30% до около 50% масс./масс.

[216] В некоторых вариантах осуществления сосуды, используемые для производства лизатов, и/или гидролизатов белка, и/или аминокислотных композиций, как описано в настоящем документе, были должным образом продезинфицированы, и для устранения возможного перекрестного загрязнения материалами животного происхождения, которые могут быть получены с использованием того же технологического

оборудования. В некоторых вариантах осуществления процессы гидролиза осуществляются на предприятии, где оборудование, используемое для обработки материалов неживотного происхождения, отделено от оборудования, используемого для обработки материалов животного происхождения. В некоторых вариантах осуществления процессы гидролиза осуществляют на предприятии и/или с использованием оборудования, которое использовали только для обработки материалов неживотного происхождения. В некоторых вариантах осуществления не было вторичного воздействия биомассы и/или лизатов, и/или гидролизатов, и/или аминокислотных композиций, полученных, как описано в настоящем документе, на материалы животного происхождения, такие как питательные компоненты в бактериальном ферментационном бульоне или ферменты животного происхождения. В некоторых вариантах осуществления в производственном процессе отсутствуют вторичные материалы животного происхождения.

[217] В некоторых вариантах осуществления биомасса, и/или лизаты, и/или гидролизаты белка, и/или аминокислотные композиции, как описано в настоящем документе, не содержат каких-либо остатков пестицидов, и/или гербицидов, и/или фунгицидов, и/или не подвергались воздействию каких-либо пестицидов и/или гербицидов и/или фунгицидов. В некоторых вариантах осуществления биомасса, и/или лизаты, и/или гидролизаты белка, и/или аминокислотные композиции, как описано в настоящем документе, не подвергались воздействию каких-либо антибиотиков, таких как, помимо прочего, цефалоспорин.

[218] Также в настоящем документе предложена добавка к среде для культивирования клеток, включая, помимо прочего, добавку к среде для культивирования клеток животных, которая включает источник питательных веществ, такой как лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, полученную из микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления дополнительный источник питательных веществ дополняет гидролизаты белка и/или другие питательные соединения и факторы роста в данной культуральной среде.

[219] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка может быть объединена с основной культуральной средой для получения полной культуральной среды, подходящей для культивирования клеток животных. Основная среда обычно включает аминокислоты, витамины, органические и/или неорганические соли, микроэлементы, буферные соли и сахара. Примеры основных сред включают,

помимо прочего, DMEM (среду Игла в модификации Дульбекко), DMEM/F12, среду Дульбекко в модификации Искова (IMDM), IMDM/F12, IMDM/F12/NCTC 135, MEM (минимальную необходимую среду Иглу), среду 199, RPM-I 1640 и RPMI 1640/DMEM/F12. Полная культуральная среда, приготовленная путем добавления к базовой среде композиции гидролизата белка по настоящему изобретению, может поддерживать рост и/или развитие клеток животных в культуре без необходимости каких-либо дополнительных компонентов или без необходимости каких-либо компонентов животного происхождения, таких как аминокислоты или гидролизаты белка, полученные от животных, или сыворотку животного происхождения. В некоторых вариантах осуществления базовая среда может быть дополнена композицией гидролизата белка и одним или несколькими дополнительными компонентами, такими как, помимо прочего, факторы роста или гидролизаты белка растительного происхождения или из дрожжей, и т. д. В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат белка, и/или аминокислотная композиция по настоящему изобретению могут быть использованы для замещения или замены питательных компонентов в основных средах, включая, помимо прочего, один или несколько из: аминокислот; витаминов; органических и/или неорганических солей; микроэлементов; буферных солей; и/или сахаров. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или аминокислотную композицию по изобретению можно использовать вместо или в качестве заменителя основной среды.

[220] В некоторых вариантах осуществления питательное(ые) вещество(а), такое как продукт цельноклеточной биомассы, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество, кофактор или компонент, которые были получены, как описано в настоящем документе (*например*, посредством хемоавтотрофного биосинтеза из CO_2), могут быть объединены с другими типичными компонентами среды из других источников, такими как, помимо прочего, аминокислоты, витамины, органические и/или неорганические соли, микроэлементы, буферные соли и/или сахара, для получения комплексной среды. В некоторых таких вариантах осуществления указанная комплексная среда представляет собой полную культуральную среду, пригодную для культивирования другой клеточной культуры. В некоторых вариантах осуществления питательное(ые) вещество(а), такое как продукт цельноклеточной биомассы, и/или лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество, кофактор или компонент, который были получены, как описано в настоящем

документе, используют для дополнения и/или замены компонентов среды в обычно используемых комплексных средах, таких как, помимо прочего: бульон Элликера (также известный как бульон для молочнокислых бактерий); среда триптон-глюкозного дрожжевого экстракта (TGYE); лизогенный бульон (также известный как бульон Луриа-Бертани - ЛБ); посевная среда; среда M9; M9CA; комплексная среда M101; среда YT; среда MMBL; бульон Terrific; супербульон; среда дрожжевого экстракта-солодового экстракта (YEME). В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или экстракт, полученные, как описано в настоящем документе, используют для замены или дополнения гидролизата белка животного, молочного или растительного происхождения и/или аминокислотной композиции, используемой в одной из вышеупомянутых комплексных сред, таких как, помимо прочего, один или несколько из следующего: триптон; казеиновый (кислотный и/или ферментный) гидролизат; пептон; казаминовые кислоты; и/или используют для замены или дополнения дрожжевого экстракта и/или солодового экстракта. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или экстракт, полученные, как описано в настоящем документе, используют в комплексной среде в концентрации от около 5 г/л до около 25 г/л. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или экстракт, полученные, как описано в настоящем документе, используют в комплексной среде в концентрации от около 25 г/л до около 32 г/л или от около 32 г/л до около 52 г/л или больше около 52 г/л. В некоторых вариантах осуществления методология поверхностной реакции (ÉRONESE, T. V, BOUCHU, A., PERLOT, P., PARK, J. W., PARK, K. N., WEBER, F. J., TRAMPER, J., RINZEMA, A., D'SOUZA, F., LALI, A., & others (1999) D. LEVISAUSKAS, V. GALVANAUSKAS, R. SIMUTIS and A. L ÜBBERT 37--42. *Biotechnology Techniques*, 13, 937–943), применяется для определения оптимальной концентрации (г/л) питательных веществ, полученных, как описано в настоящем документе, для включения в комплексную среду, *например*, для максимизации желательного показателя культуры, такого как, например, биомасса или выход продукта.

[221] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в составе питательной среды для другой культуры, включая, помимо прочего, штамм молочнокислых бактерий. В некоторых вариантах осуществления изменения питательных веществ или питательные добавки вносят свой вклад или удовлетворяют потребности в азоте другой культуры, включая, помимо прочего, культуру молочнокислых бактерий. В некоторых вариантах

осуществления состав может включать источник углеводов (*например*, лактозу). В некоторых вариантах осуществления углеводов может быть превращен в кислоту, такую как, помимо прочего, в молочную кислоту, например, с помощью культуры молочнокислых бактерий, снижая pH, что может служить для сохранения продукта и улучшения вкуса и аромата продукта.

[222] Дрожжевые экстракты, концентрированные растворимые компоненты из клеток дрожжей, также широко используют в среде для выращивания культур. В некоторых вариантах осуществления состав, полученный, как описано в настоящем документе, может содержать лизат, и/или гидролизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, и/или другое питательное вещество или кофактор, полученные, как описано в настоящем документе, и дрожжевой экстракт (*например*, в сочетании с дрожжевым экстрактом или замещение части дрожжевого экстракта в среде). В других вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество или кофактор, полученные, как описано в настоящем документе, используют для замены всего дрожжевого экстракта в составе.

[223] В некоторых вариантах осуществления добавление к базовому составу гидролизата белка, полученного, как описано в настоящем документе, происходит в количестве от около 100 мг/л до около 2,5 г/л. В некоторых вариантах осуществления в культуральную среду добавляют гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, в концентрации от около 0,25 до около 4 г/л, или от около 4 г/л до около 25 г/л, или от около 25 г/л до около 32 г/л, или от около 32 г/л до около 52 г/л, или выше около 52 г/л.

[224] В некоторых вариантах осуществления гидролизаты молока и/или мяса заменены гидролизатами микробного происхождения, полученными, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат белка, и/или аминокислотная композиция, как описано в настоящем документе, обеспечивает снижение количества сыворотки животного происхождения или исключение сыворотки животного происхождения, такой как фетальная телячья сыворотка, обеспечивая полностью бессывороточную среду. В некоторых вариантах осуществления такая замена гидролизатов молока и/или мяса и/или уменьшение или исключение сыворотки способствует одобрению регулирующими органами. В некоторых вариантах осуществления такая замена гидролизатов молока и/или мяса и/или уменьшение или исключение сыворотки устраняет требования по валидации процесса удаления

потенциальных посторонних агентов из сомнительного сырья.

[225] Гидролизаты белка обычно относительно стабильны и могут храниться в сухом виде, *например*, в холодильнике. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, хранится в сухом виде и/или в холодильнике.

[226] Получение сухой среды традиционными процессами измельчения в шаровой мельнице может быть затруднено включением определенных гидролизатов белка, поскольку повышенные температуры и физическое повреждение могут привести к деградации лабильных компонентов гидролизата. В некоторых вариантах осуществления, использующих лизат и/или гидролизат белка, и/или аминокислотную композицию, как описано в настоящем документе, используют процесс получения среды, который сокращает время пребывания, термическую денатурацию и механический сдвиг, такой как молотковая мельница или грануляция в псевдооживленном слое.

СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

[227] Также предложен способ культивирования клеток, *например*, эукариотических клеток, таких как клетки животных, или прокариотических клеток, таких как молочнокислые бактерии (МКБ), в культуральной среде, дополненной или содержащей композицию лизата и/или гидролизата белка, и /или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, и/или другие питательные вещества, полученные из микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма или консорциума микроорганизмов, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другие питательные вещества, полученные, как описано в настоящем документе, обеспечивают источник энергии, и/или углерода, и/или азота для другой культуры. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другие питательные вещества, полученные, как описано в настоящем документе, дополняют или заменяют источник азота, используемый в культуральной среде, такой как, помимо прочего, один или несколько из следующих: гидролизаты белка и/или аминокислоты из животных или растительных источников; и/или дрожжевые экстракты.

[228] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или экстракт другого питательного

вещества или кофактора, и/или состав, включающий один или несколько из предыдущих компонентов, разработаны и/или выбраны на основе пищевых потребностей другого микроорганизма и/или организма, включая, помимо прочего, один или несколько из следующих: пептиды; аминокислоты; источник углерода; источник азота; витамины; минералы; факторы роста; и/или другие питательные вещества. В некоторых вариантах осуществления питательные компоненты и/или составы разработаны и выбраны для обеспечения или оптимизации одного или нескольких из следующего: предсказуемого времени ферментации; выхода клеток; жизнеспособности клеток; последующей обработки; и/или срока годности.

[229] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или экстракт другого питательного вещества или кофактора, и/или состав, включающий один или несколько из предыдущих компонентов, разработаны и/или выбраны на основе одного или больше из следующего: степени гидролиза; пептидного профиля; соотношения аминного азота (АА) и общего азота (ОА); уровня свободных аминокислот; содержания минералов; стоимости производства; простоты восстановления и/или последующей обработки; соотношения цены и качества; и/или соответствия нормативным требованиям.

[230] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество или кофактор удовлетворяют потребности в питании другого вида/штамма, обеспечивая основные элементы, включая, помимо прочего, один или несколько из следующих: аминокислоты; пептиды; витамины; минералы; основания нуклеиновых кислот; и/или другие факторы роста. В некоторых вариантах осуществления один или несколько пептонов, гидролизатов белка, дрожжевых экстрактов, факторов роста и/или витаминов заменены или замещены одним или несколькими питательными веществами, полученными, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество, кофактор или компонент, включая, помимо прочего, один или несколько из липидов, полисахаридов, сахаридов, ПГБ, ПГА, ПГВ, нуклеиновых кислот, витаминов и/или минералов, используют для замены компонентов среды, включая, помимо прочего, один или несколько из следующих компонентов: сахара, такие как моносахариды (*например*, глюкоза, фруктоза), дисахариды (*например*, лактоза, сахароза, мальтоза), декстрины и/или мальтодекстрины; источники белка, такие как обезжиренное сухое молоко,

сыворотка и/или концентраты сывороточного белка; гидролизаты или лизаты белка, такие как пептоны, гидролизаты казеина, гидролизаты сывороточного протеина, гидролизаты соевого белка, гидролизаты мясного белка, приматон, гидролизованные сухие вещества злаков и/или дрожжевые экстракты; источники витаминов и минералов, такие как дрожжевые экстракты, кукурузный настой и/или другие компоненты среды, такие как твин/олеиновая кислота, минеральные соли, пеногасители и/или буферы.

[231] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество, кофактор или компонент, включая, помимо прочего, один или несколько из следующих компонентов: липидов; полисахаридов; сахаридов; ПГБ; ПГА; ПГВ; нуклеиновых кислот; витаминов; минералов, включены в состав среды, которая включает другие компоненты среды, включая, помимо прочего, один или несколько из следующих компонентов: сахара, такие как моносахариды (*например*, глюкоза, фруктоза), дисахариды (*например*, лактоза, сахароза, мальтоза), декстрины и/или мальтодекстрины; источники белка, такие как обезжиренное сухое молоко, сыворотка и/или концентраты сывороточного белка; гидролизаты или лизаты белка, такие как пептоны, гидролизаты казеина, гидролизаты сывороточного протеина, гидролизаты соевого белка, гидролизаты мясного белка, гидролизованные сухие вещества злаков и/или дрожжевые экстракты; источники витаминов и/или минералов, такие как дрожжевые экстракты и/или кукурузный настой, и/или другие компоненты среды, такие как твин/олеиновая кислота, минеральные соли, пеногасители и/или буферы.

[232] В некоторых вариантах осуществления один или несколько хемоавтотрофных микроорганизмов культивируют совместно с одним или несколькими гетеротрофными организмами, при этом указанные хемоавтотрофные микроорганизмы секретируют питательные вещества, такие как, помимо прочего, аминокислоты, в культуральный бульон, и при этом гетеротрофные организмы поглощают и/или используют питательные вещества, такие как, помимо прочего, аминокислоты, для роста и/или продуцирования. В некоторых вариантах осуществления хемоавтотрофные микроорганизмы включают микроорганизм *Cupriavidus*, например, *Cupriavidus necator* и/или *Cupriavidus metallidurans*. В некоторых таких вариантах осуществления хемоавтотрофные микроорганизмы включают микроорганизмы *Cupriavidus necator*, включая *Cupriavidus necator* DSM 531 и/или DSM 541, и/или *Cupriavidus metallidurans*, включая *Cupriavidus metallidurans* DSM 2839. В некоторых вариантах осуществления хемоавтотрофные микроорганизмы лизируются и/или употребляются; и/или

хемоавтотрофно синтезированные белки гидролизуют одним или несколькими другими организмами в совместной культуре.

[233] Определенные аспекты композиций и способов, описанных в настоящем документе, относятся к питательным потребностям клеточных культур и использованию гидролизатов белка и/или других экстрактов при ферментации и/или росте клеточных культур. Некоторые аспекты относятся к средам, используемым для ферментации и/или роста клеточных культур. Некоторые аспекты относятся к росту молочнокислых бактерий (МКБ) и среде, используемой для такого роста. Некоторые аспекты относятся к положительным эффектам гидролизатов специфических белков на рост и выживание клеточных культур, включая, помимо прочего, культур, включающих МКБ.

[234] В некоторых вариантах осуществления в среду с определенным химическим составом (ОХС) добавляют низкомолекулярные пептиды (НМП), полученные, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления НМП включает пептиды с молекулярной массой (ММ) ≤ 3000 Да. В некоторых вариантах осуществления большинство или все или практически все НМП имеют ММ ≤ 3000 Да. В некоторых вариантах осуществления, когда ОХС, дополненная указанным НМП, предложена для выращивания другого штамма (*например*, штамма или вида микроорганизма, который отличается от микроорганизма, из которого получены НМП), количество клеток увеличивается по меньшей мере в 1,3 раза в сравнение с ростом другого штамма только на ОХС (*т.е.* без добавки НМП). В некоторых вариантах осуществления указанный другой штамм представляет собой штамм *Lactobacillus*, а в некоторых неограничивающих вариантах осуществления, *L. helveticus*.

[235] В некоторых вариантах осуществления применение гидролизата белка в культуральной среде позволяет культивировать клетки животных без включения некоторых или каких-либо компонентов животного происхождения, таких как гидролизаты белков животного происхождения, аминокислоты или сыворотка, в культуральную среду. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток в культуральной среде, не содержащей сыворотки, к которой добавлена композиция гидролизата белка по изобретению. Например, клетки можно культивировать в среде без эмбриональной телячьей сыворотки, лошадиной сыворотки, козьей сыворотки или любой другой сыворотки животного происхождения путем предоставления гидролизата белка по настоящему изобретению в культуральной среде. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток в культуральной среде, содержащей композицию гидролизата белка, без каких-либо

компонентов животного происхождения, таких как альбумин сывороточного происхождения, трансферрин, инсулин, факторы роста и/или другие факторы.

[236] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество, кофактор или компонент, полученные, как описано в настоящем документе, улучшают жизнеспособность штамма в культуре с течением времени. В некоторых вариантах осуществления это помогает поддерживать окислительно-восстановительный потенциал в культуре. Жизнеспособность штамма с течением времени можно измерить, например, в единицах КОЕ/г (колониеобразующие единицы на грамм культуры).

[237] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество или кофактор получают согласованным и воспроизводимым способом, независимо от региона, времени года или климата. В некоторых вариантах осуществления различия между партиями лизата, и/или гидролизата белка, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции, и/или другого питательного вещества или кофактора меньше, чем у сопоставимого гидролизата животного или растительного происхождения.

[238] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, используют для получения одного или нескольких из: стартовых культур; дополнительных культур и/или одного или несколько пробиотиков. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, используют для выращивания промышленной стартовой культуры, например, для промышленной ферментации стартовой культурой. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество, полученное, как описано в настоящем документе, включают в состав ферментационной среды, используемой при получении стартовой культуры. В некоторых вариантах осуществления указанная промышленная стартовая культура включает МКБ. В некоторых вариантах осуществления стартовую культуру извлекают из раствора и превращают в концентрированную замороженную или лиофилизированную форму для хранения, транспортировки и/или продажи. В некоторых вариантах осуществления в отношении стартовой культуры используют одну или несколько из следующих последующих стадий процесса: концентрирование; добавление криопротекторов; заморозка; и/или лиофильная сушка. В некоторых вариантах осуществления

пробиотические штаммы, выращенные на питательных веществах, произведенных, как описано в настоящем документе, используют в качестве компонентов стартовых культур для кисломолочных продуктов и/или в качестве нутрицевтических продуктов, для которых они могут быть приготовлены в виде свободных и/или инкапсулированных лиофилизированных материалов. Коммерческие концентраты стартовой культуры иногда доступны в виде «bulk-наборов» (набор Redi) или «наборов для прямого внесения» (DVS, англ.: direct vat sets). «Bulk-наборы» используют для приготовления промежуточных стартовых культур, которые затем инокулируют в производственный чан для приготовления конечного продукта. Эти культуры доступны в замороженном (около 70 мл) или лиофилизированном виде (около 5–10 г упаковки) и предназначены для инокуляции 100–1000 л материала. Культуры DVS действуют как прямой инокулят в конечной производственной культуре. Они доступны в виде замороженных или лиофилизированных культур, где около 500 г замороженной культуры используется для инокуляции 2500–5000 л материала, в зависимости от типа культуры и области применения. В некоторых вариантах осуществления стартовую культуру, полученную, как описано в настоящем документе, готовят в виде bulk-культуры или культуры DVS.

[239] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество, полученные, как описано в настоящем документе, используют для выращивания одного или нескольких штаммов, которые дополняют основную стартовую культуру и/или способствовать повышению ценности конечного ферментированного продукта. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию по настоящему изобретению добавляют к традиционной ферментации пищевых продуктов. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция обеспечивают питательные вещества для роста и/или жизнеспособности МКБ и/или пробиотических культур. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты белка, полученные, как описано в настоящем документе, используют для получения молочных и/или мясных стартовых культур. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты белка, полученные, как описано в настоящем документе, удовлетворяют потребности видов МКБ в азоте. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, как описано в настоящем документе, вводят в культуру, которая включает виды бактерий, обычно используемые в качестве стартовой культуры,

и/или ароматизирующей, и/или вспомогательной культуры. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, как описано в настоящем документе, вводят в культуру, включающую МКБ и/или другие пробиотики, включая, помимо прочего, один или несколько из: *лактококки*; *лактобациллы*; *стрептококки*; *педиококки* и/или *бифидобактерии*.

[240] Важным параметром, влияющим на качество биомассы, является состав и состояние клеточной стенки организма, что определяет выживаемость клеток при последующей обработке. Хотя прочность клеточной стенки может зависеть от вида и даже от штамма, на нее также будет влиять состав среды, условия роста и физиологическое состояние клеток во время сбора. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество или кофактор, полученные, как описано в настоящем документе, влияют на одно или несколько из следующего: толщина клеточной стенки; удлинение клеток; и/или деление клеток.

[241] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество или кофактор, полученные, как описано в настоящем документе, вводят в культуру, включающую один или несколько из следующих микроорганизмов: *Lactococcus lactis*; *Leuconostoc* spp.; *Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus* spp., в том числе, помимо прочего, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. plantarum*; *Pediococcus* spp., в том числе, помимо прочего, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*; и/или *Bifidobacterium* spp., в том числе, помимо прочего, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. infantis*. В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы включают один или более требовательных к питательным веществам штаммов. В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы включают один или несколько пробиотиков.

[242] В некоторых вариантах осуществления цельноклеточную биомассу, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, и/или другое питательное вещество или кофактор, полученные, как описано в настоящем документе, вводят одному или нескольким микроорганизмам и/или макроорганизмам, которые считаются «общеизвестными безопасными» (GRAS) и/или традиционно (*например*, исторически) использовались при приготовлении пищи для

человека и продуктов ферментации. В некоторых вариантах осуществления цельноклеточную биомассу, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, и/или другое питательное вещество или кофактор, полученные, как описано в настоящем документе, вводят одному или нескольким другим организмам (*например*, одному или нескольким организмам, отличным от микроорганизма, из которого получена цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество или кофактор), включая, помимо прочего, одно или несколько из следующего: дрожжи, такие как *Candida humilis*, *Candida milleri*, *Debaryomyces hansenii*, *Kazachstania exigua* (*Saccharomyces exiguous*), *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces florentinus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Trichosporon beigelli*; грибы, такие как *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus luchuensis*, *Fusarium venenatum* A3/5, *Neurospora intermedia* var. *oncomensis*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*; бактерии, такие как *Acetobacter aceti*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium animalis* (*lactis*), *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Glucanacetobacter xylinus* (*Komagataeibacter xylinus*), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii* (*Brevibacterium vermiforme*), *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactococcus lactis* (*Streptococcus lactis*; *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*), *Leuconostoc* sp., *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus* sp., *Propionibacterium freudenreichii*, *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus xylosus*. В некоторых вариантах осуществления организмы существуют в совместной культуре, консорциуме или симбиотической культуре бактерий и дрожжей (SCOBY). В некоторых вариантах осуществления совместная культура, консорциум или SCOBY включает один или несколько хемоавтотрофных микробных штаммов.

[243] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество, полученные, как описано в настоящем документе, вводят в мезофильную или термофильную молочную культуру.

[244] Микроорганизмы используют в производстве широкого спектра

ферментированных продуктов. Использование микроорганизмов для ферментации пищевых продуктов появилось намного раньше, чем стало известно об их существовании. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество, полученное, как описано в настоящем документе, вводят культуре, которая используется для производства одного или нескольких из следующих продуктов питания, напитков или кормов: кисломолочные продукты, включая, помимо прочего, простокваша, кефир, пахта; сметана; сыры, включая, помимо прочего, сливочный сыр, мягкие сыры, сыр чеддер, сыры континентального типа, полутвердые сыры, твердые сыры, чеддер, швейцарский, гауда, моцарелла, эмменталь, пармезан, романо, проволоне, ярлсберг, лердаммер, маасдам; ферментированные мясные продукты, колбасы, соусы, саями; хлеб на закваске; доша; ферментированные овощи и/или растительные материалы, включая, помимо прочего, маринованные овощи, соленые огурцы, квашеную капусту, огурцы, кимчи, цукэмоно, темпе, соевый соус, мисо, пасту из ферментированных бобов, красный онком, натто, оливки и оливковый рассол, какао; ферментированные напитки, включая, помимо прочего, чай, чайный гриб, джун, имбирное пиво; пищевые дрожжи; хлеб; пиво; вино; мескаль; колонш; текила; сидр; мирин; сок плодов земляничного дерева; сок из сахарного тростника; уксус; нутрицевтики; пробиотики, включая напитки, порошки, добавки и капсулы; текитлатль; дихе; силос.

[245] В некоторых вариантах осуществления лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция обеспечивают аминокислоты и/или пептиды, которые микроорганизм МКБ имеет ограниченную способность синтезировать или не может синтезировать. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты заменяют или дополняют аминокислоты или пептиды, обычно получаемые из молока, и/или из гидролизованных белков, полученных из молока, животных или растений.

[246] Чтобы использовать доступные белки, пептиды и/или свободные аминокислоты в качестве строительных блоков для синтеза новых белков, включая ферменты, но не ограничиваясь ими, они должны перемещаться через клеточную мембрану в клетку. Если белки и пептиды слишком велики, чтобы их могла обрабатывать система поглощения клетки, их необходимо дополнительно гидролизовать до более мелких пептидов или свободных аминокислот. Некоторые МКБ способны синтезировать и секретировать внеклеточные протеазы, которые расщепляют белки на пептиды и

аминокислоты, делая их доступными для транслокации. Например, *L. lactis* имеет протеолитическую систему, включающую локализованную в клеточной оболочке протеиназу, три системы транспорта пептидов, набор внутриклеточных пептидаз и девять различных систем транспорта аминокислот, которые совместно расщепляют молочные белки и снабжают клетку необходимыми и стимулирующими рост пептидами и аминокислотами (Poolman, B., Juillard, V., Kunji, E. R. S., Hagting, A., & Konings, W. N. (1996) Casein-breakdown by *Lactococcus lactis*. In *Lactic Acid Bacteria* (pp. 303–326). Springer.; Kunji, E. R. S. (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. In *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/BF00395933>; Mierau, I., Venema, G., Kok, J., & Kunji, E. R. S. (1997) Casein and peptide degradation in lactic acid bacteria. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. <https://doi.org/10.1080/02648725.1997.10647945>). В некоторых вариантах осуществления биомасса или цельноклеточный продукт, или клеточный лизат, или другая композиция, которая включает цельные белки или крупные пептиды, полученные, как описано в настоящем документе, предоставляют микроорганизму, который способен синтезировать и секретировать одну или несколько внеклеточных протеаз и/или включает одну или несколько протеолитических систем, которые способны гидролизовать белки в пептиды и/или аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм представляет собой микроорганизм *Lactococcus*, например, *L. lactis*. В некоторых вариантах осуществления пептиды и/или аминокислоты вводят микроорганизму или организму, имеющему транспортную систему для пептидов и/или аминокислот, который может быть или не быть тем же организмом, что и микроорганизм, обеспечивающий внеклеточную(ые) протеазу(ы) и/или протеолитическую(ие) систему(ы). В некоторых вариантах осуществления микроорганизм, который способен синтезировать и секретировать одну или несколько внеклеточных протеаз и/или имеет одну или несколько протеолитических систем, тем не менее, получает гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию для того, чтобы сэкономить потребление клеточной энергии, необходимой для производства ферментов, и, таким образом, улучшить рост клеток и/или выход продуктов. Кроме того, когда незаменимые аминокислоты слишком медленно высвобождаются из белковых питательных веществ внеклеточной(ыми) протеазой(ами) и/или протеолитической(ими) системой(ами) микроорганизма для поддержания оптимального роста и/или продукции, в некоторых вариантах осуществления эти незаменимые аминокислоты предоставляют и/или добавляют в

форме гидролизата белка, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции, и/или свободных аминокислот, полученных, как описано в настоящем документе.

[247] В некоторых МКБ отсутствуют протеолитические системы, и им требуется среда с основными строительными блоками, такими как аминокислоты и аммиак, в качестве источников азота. В некоторых вариантах осуществления предусмотрена совместная культура, которая включает первый микроорганизм, который способен синтезировать и секретировать внеклеточные протеазы и/или имеет протеолитическую систему, второй, другой микроорганизм, который не имеет протеолитической системы и/или нуждается в среде с основными строительными блоками, такими как аминокислоты и аммиак, в качестве источников азота. В некоторых вариантах осуществления первый микроорганизм представляет собой микроорганизм *Lactococcus*, такой как *L. lactis*, и/или второй микроорганизм представляет собой МКБ.

[248] МКБ обычно не обладают функциональным циклом трикарбоновых кислот (ТКА), что делает их пути генерации энергии относительно неэффективными. Гомоферментативные микроорганизмы, такие как *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus acidophilus* получают энергию посредством гликолитического пути (Эмбдена-Мейерхоффа-Парнаса-ЭМП), где на моль потребленной гексозы образуется два моля АТФ. *Leuconostoc sp.* генерирует энергию посредством гетероферментативного пути, и на моль потребленной гексозы образуется только один моль АТФ. Кроме того, АТФ может образовываться в результате хемиосмотического энергетического процесса, например, оттока лактата. Кроме того, МКБ обычно не продуцируют никаких эндогенных соединений для накопления энергии, таких как гликоген, полифосфат и поли- β -гидроксibuтират, за исключением небольшого количества пула фосфоенолпирувата. Единственным исключением являются *Bifidobacterium bifidum*, которые во время стационарной фазы образуют запасные соединения, такие как гликоген и полифосфаты. Следовательно, для поддержки анаболических процессов и роста клеток культур МКБ в культуральную среду обычно необходимо подавать энергию и другие источники питательных веществ.

[249] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество или кофактор, полученные, как описано в настоящем документе, вводят в культуру МКБ, что компенсирует незавершенный цикл трикарбоновых кислот (ТКК). В

некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество или кофактор, полученные, как описано в настоящем документе, подают в культуру МКБ, что экономит энергию в культуре, которая в противном случае будет расходоваться на синтез биохимических веществ (*например*, органических соединений) посредством анаболических путей, питаемых неэффективным метаболизмом МКБ, таким образом сохраняя и/или более эффективно используя источники углерода, такие как лактоза или глюкоза, и/или АТФ. В некоторых вариантах осуществления биохимические вещества, синтезированные анаболическими путями, включают, помимо прочего, одно или несколько из следующего: аминокислоты; пептиды; липиды; сахараиды; полисахариды; нуклеиновые кислоты; витамины; и/или кофакторы.

[250] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество или кофактор, полученные, как описано в настоящем документе, служат для пополнения пула фосфоенолпирувата (ФЕП) и/или увеличения концентрации ФЕП в пуле микробной культуры, такой как, помимо прочего, культура МКБ.

[251] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат белка, и/или экстракт, полученные, как описано в настоящем документе, обеспечивают одно или несколько из следующих свойств для культуры, такой как культура МКБ: ингредиенты клеточной стенки, такие как липиды, тейхоевая кислота и/или пептидогликаны; и/или предшественники РНК и/или ДНК, такие как пуриновые и пиримидиновые основания. В некоторых вариантах осуществления введение этих добавок в среду сохраняет сахар и/или АТФ, расходуемые культурой при синтезе биохимических веществ.

[252] *Lactococci* являются основными компонентами молочных культур, используемых для производства многих твердых и полутвердых сыров, кисломолочных продуктов и сливок, которые утратили свои сильные характеристики протеолитической активности и приобрели ауксотрофность по большинству аминокислот (Bringel, F., & Hubert, J. C. (2003) Extent of genetic lesions of the arginine and pyrimidine biosynthetic pathways in *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, and *L. casei*: Prevalence of CO₂-dependent auxotrophs and characterization of deficient arg genes in *L. plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2674-2683.2003>; Morishita, S., & Tarui, S. (1981). Lactic acidosis. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 39(11), 3459–3465), в связи с их длительной адаптацией к молоку, являющемуся достаточно питательной средой для роста. Известно, что потребности в аминокислотах

и транспортные системы являются факторами, ограничивающими рост *Lactococci* (Poolman and Konings 1988). В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, полученные, как описано в настоящем документе, вводят в культуру, которая включает микроорганизм, утративший свою протеолитическую активность и/или приобретший ауксотрофию аминокислот в результате эволюции на молочных субстратах. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм, утративший протеолитическую активность и/или приобретший ауксотрофию аминокислот, представляет собой штамм *лактококков*.

[253] Молочные *Lactococcus lactis subsp. lactis* является ауксотрофным как минимум по семи аминокислотам: Gln, Met, Leu, Ile, Val, Arg и His (Law et al. (1976)). Штаммы *L. lactis ssp. cremoris*, как сообщается, даже более требовательны, чем *L. lactis ssp. lactis* и часто требуют дополнительных Tyr, Asn и Ala. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты включают, помимо прочего, одну или несколько из следующих: Gln; Met; Leu; Ile; Val; Arg; His; Tyr; Asn; и/или Ala, полученные, как описано в настоящем документе, вводят другому штамму микроорганизма, который является ауксотрофным по одной или нескольким из этих аминокислот. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная композиция или композиция белковых добавок вводят ауксотрофному штамму в форме одной или нескольких из: свободных аминокислот; пептидов; гидролизата белка; белка; лизата и/или цельноклеточной биомассы. В некоторых вариантах осуществления ауксотрофный штамм представляет собой молочный *Lactococcus lactis subsp. lactis* и/или *L. lactis ssp. cremoris*. В некоторых вариантах осуществления среда для выращивания была дополнена аминокислотами, полученными, как описано в настоящем документе, в одной или нескольких из следующих форм: свободные аминокислоты; пептиды; гидролизат белка; белок; лизат; и/или цельноклеточная биомасса, вызывает повышенную скорость роста штамма микроорганизма, такого как ауксотрофный штамм, как описано в настоящем документе, по сравнению со скоростью его роста на молоке. В некоторых вариантах осуществления аминокислотную или белковую добавку вводят в количестве до около 4% (масс./об.) или до около 2,5% (масс./об.) в среду. В некоторых вариантах осуществления использование аминокислотной или белковой добавки составляет от около 0,5% (масс./об.) до около 2,5% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления аминокислотную добавку вводят в количествах, превышающих около 4% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная или белковая добавка включает, помимо прочего, одну или несколько из следующих аминокислот: Leu; Phe и/или Glu. В некоторых вариантах

осуществления скорость роста на среде с добавками по меньшей мере на около 10%, 20% или 40% выше, чем скорость роста на молоке.

[254] Было обнаружено, что пролин (Pro) стимулирует рост штаммов *L. lactis*, независимо от их способности синтезировать эту аминокислоту (Smid and Konings (1990)). Хотя в молоке много пролина, эта аминокислота, как сообщается, не всегда доступна, поскольку у некоторых штаммов отсутствует транспортная система пролина. Пролин может транспортироваться в клетку только путем пассивной диффузии или транспорта пролинсодержащих пептидов (Smid and Konings, *supra*). В некоторых вариантах осуществления Pro, полученный, как описано в настоящем документе, вводят в другую культуру (например, культуру микроорганизмов, отличных от микроорганизма(ов), из которого(ых) получен Pro). В некоторых вариантах осуществления Pro вводят в виде свободной аминокислоты и/или в составе Pro-содержащих пептидов и/или белков. В некоторых вариантах осуществления культура, содержащая указанную форму добавки Pro, содержит один или несколько штаммов *L. lactis*. В некоторых вариантах осуществления штамм микроорганизма, для которого продуцируется Pro, как описано в настоящем документе, демонстрирует более высокую скорость роста, чем идентичная культура, которой Pro не вводят. В некоторых вариантах осуществления штамм микроорганизма представляет собой штамм *L. lactis*, например, один или несколько из: *Lactococcus lactis subsp. lactis* и/или штаммы *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

[255] Для *L. lactis* были разработаны многочисленные среды с определенным химическим составом. Стандартная синтетическая среда (MCD, англ.: standard synthetic medium), разработанная Otto et al. (1983) и модифицированный Poolman и Konings (1988), *supra*, содержит 47 компонентов, включая 18 аминокислот и 14 витаминов. В некоторых вариантах осуществления подучают одну или несколько аминокислот и/или витаминов, включенных в среду с определенным химическим составом для другого микроорганизма (*например*, микроорганизма, отличного от микроорганизма, из которого получены аминокислоты и/или витамины), как описано в данном документе. В некоторых таких вариантах осуществления аминокислота(ы) и/или витамин(ы) получают из CO₂ в качестве единственного источника углерода. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм, получающий аминокислоту(ы) и/или витамин(ы), представляет собой микроорганизм *Lactococcus*, *например*, *L. lactis*. В некоторых вариантах осуществления в культуральную среду, полученную, как описано в настоящем документе, вводят одну или более аминокислот, при этом исключение аминокислот(ы) приведет к снижению

скорости роста по меньшей мере на около 75% и/или по меньшей мере на около 50% более низкий выход биомассы для культуры при условии, что среда не включала аминокислоту(ы).

[256] Несколько видов *Lactobacilli* используются в качестве компонентов стартовых культур для производства йогурта (*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) и различных видов сыров (*L. helveticus*, *L. paracasei*), а также в качестве пробиотиков в кисломолочных продуктах и/или нутрицевтиках (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*). Потребности в питательных веществах и азоте значительно различаются от одного вида к другому и даже между штаммами одного и того же вида/подвида. Было проведено несколько исследований с целью выяснить общие потребности питания *Lactobacillus* sp.. Elli, et al. (2000) and Chervaux, et al. (2000) описали потребности в питательных веществах 22 штаммов *Lactobacillus* с использованием среды с определенным химическим составом, которая содержит 21 аминокислоту и другие питательные вещества, включая 60 компонентов. В общем, для оптимального роста и жизнеспособности этим *Lactobacilli* требовалась среда для ферментации, обогащенная обильными источниками углерода и азота, витаминами, микро- и макроэлементами и нуклеотидными основаниями. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из следующего: биомасса; белки; лизаты; гидролизаты белка; пептидные композиции; аминокислотные композиции; и/или другие экстракты, полученные, как описано в настоящем документе, используются для обеспечения одного или нескольких из следующих элементов в культуре, включающей один или несколько штаммов *Lactobacillus*: источник(и) углерода; источник(и) азота; витамин(ы); макроэлемент(ы); микроэлемент(ы); и/или нуклеотидное(ые) основание(я).

[257] Сообщается, что *L. helveticus* имеет более высокие потребности в аминокислотах, чем большинство других штаммов *Lactobacillus* или *Lactococcus*. Morishita, et al. (1981), *supra*, указали, что штамм ATCC15009 является ауксотрофным по 14 аминокислотам, четырем витаминам и урацилу, в то время как штамм CRL 1062 требует 13 аминокислот (Hebert et al, 2000). В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из следующего: аминокислоты; витамины; и/или основания РНК, и/или ДНК, такие как урацил, полученные, как описано в данном документе, вносят в культуру, содержащую ауксотроф по одной или нескольким аминокислотам; витаминам; и/или азотистым основаниям, таким как, помимо прочего, урацил. В некоторых вариантах осуществления ауксотроф представляет собой штамм *L. helveticus*.

[258] Сообщается, что пробиотическая *Lactobacillus acidophilus* (ЛА) требует наличия

Pro, Arg, Glu (Morishita, et al. (1981), *supra*, ароматических аминокислот и His (Hebert, et al. (2000), *supra*) для роста. Потребность в ароматических аминокислотах и His, как сообщается, связана с ЛА, которая не обладает полностью функциональным пентозофосфатным путем. Однако также сообщается, что ЛА сильно стимулируется почти всеми 18 типами аминокислот. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты, полученные, как описано в настоящем документе, включая, помимо прочего, одну или несколько из: Pro, Arg, Glu, ароматических аминокислот и/или His, вносят одному или нескольким другим штаммам (*например*, штамму микроорганизма, который отличается от микроорганизма, из которого получена аминокислота(ы)). В некоторых таких вариантах осуществления штамм(ы) нуждаются в одном или нескольких из: Pro, Arg, Glu, ароматических аминокислотах и/или His для роста. В некоторых таких вариантах осуществления эти аминокислоты (*т.е.* Pro, Arg, Glu, ароматические аминокислоты и/или His), полученные в соответствии с настоящим изобретением, вносят одному или нескольким микроорганизмам, которые не обладают полностью функциональным пентозофосфатным путем. В некоторых таких вариантах осуществления другой штамм(ы) включает штамм ЛА.

[259] Несмотря на то, что это не считается необходимым, Arg, как сообщается, стимулирует рост штаммов *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Pediococcus pentosaceus* и *Streptococcus thermophilus*. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления Arg вносят одному или нескольким другим штаммам, *например*, штамму микроорганизма, который отличается от микроорганизма, из которого получают Arg, как описано в настоящем документе, рост которого стимулируется Arg. В некоторых вариантах осуществления Arg вводят в культуру, которая включает один или несколько из следующих микроорганизмов: штам(ы) *L. bulgaricus*; *L. acidophilus*; *L. reuteri*; *Pediococcus pentosaceus* и/или *S. thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления все 20 протеогенных аминокислот, которые кодируются непосредственно триплетными кодонами, продуцируются, как описано в настоящем документе, и вносятся одному или нескольким другим штаммам (*например*, штамм(ы) микроорганизма, который отличается от микроорганизма, из которого получена аминокислота(ы)). В некоторых вариантах осуществления рост одного или нескольких других штаммов стимулируется введением одной или нескольких из 20 аминокислот, полученных в соответствии с настоящим изобретением и предложенных, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления другой штамм(ы) включает штамм ЛА и/или штамм *Lactobacillus reuteri*.

[260] Известно, что *Lactobacillus reuteri* является особенно прихотливым организмом, которому для роста требуются аминокислоты Met, Glu, Tyr, Trp, His, Leu, Val и Ala, и который имеет сниженную скорость роста, когда другие аминокислоты не поступают в организм. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты, продуцируемые, как описано в настоящем документе, включая, помимо прочего, одну или несколько из: Met, Glu, Tyr, Trp, His, Leu, Val и/или Ala, вводят одному или нескольким другим штаммам, например, штамму микроорганизма, который отличается от микроорганизма, из которого получают аминокислоты, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления указанный другой(ие) штамм(ы) нуждается в одном или нескольких из: Met, Glu, Tyr, Trp, His, Leu, Val и/или Ala для роста. В некоторых вариантах осуществления указанный другой(ие) штамм(ы) включает *Lactobacillus reuteri*. В некоторых вариантах осуществления дополнительные аминокислоты помимо Met, Glu, Tyr, Trp, His, Leu, Val и Ala, полученные, как описано в настоящем документе, также вносят для *Lactobacillus reuteri*.

[261] В некоторых вариантах осуществления все двадцать протеиногенных аминокислот, которые кодируются непосредственно триплетными кодонами в генетическом коде и известны как «стандартные» аминокислоты, продуцируются, как описано в настоящем документе, и их вносят одному или нескольким другим штаммам и/или организмам, например, штамму микроорганизма и/или организму, который отличается от микроорганизма, из которого получены аминокислоты, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления все 22 протеиногенные («белково-строительные») аминокислоты, которые кодируются непосредственно триплетными кодонами в генетическом коде и известны как «стандартные» аминокислоты, продуцируются, как описано в настоящем документе, и их вносят одному или нескольким другим штаммам и/или организмам, например, штамму микроорганизма и/или организму, который отличается от микроорганизма, из которого получены аминокислоты, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из примерно 500 известных природных аминокислот продуцируются, как описано в настоящем документе, и их вносят одному или нескольким другим штаммам и/или организмам, например, штамму микроорганизма и/или организму, который отличается от микроорганизма, из которого получены аминокислоты, как описано в настоящем документе.

[262] Штаммы *Streptococcus thermophilus* (СТ) являются важными компонентами йогуртовых культур и некоторых сырных культур. Помимо молочной кислоты,

некоторые штаммы продуцируют экзополисахариды (ЭПС), которые влияют на консистенцию ферментированного молока и могут повысить выход некоторых видов сыра (Petersen, et al. (2000)). Для роста *S. thermophilus* требуется источник азота в среде. Молоко содержит азот, пригодный для роста *S. thermophilus*. Однако природного запаса аминокислот и небелкового азота, присутствующих в молоке, недостаточно для поддержания роста *S. thermophilus* до большого количества клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения питательное(ые) вещество(а), такое как продукт цельноклеточный биомассы, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное вещество, кофактор или компонент, вводят культуре, которая продуцирует полисахарид, такой как ЭПС и/или молочная кислота, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления питательное(ые) вещество(а) при введении *S. thermophilus* приводят к увеличению образования ЭПС и/или более крупных капсул. В некоторых вариантах осуществления питательное(ые) вещество(а) улучшает текстуру ферментированного молока и/или повышает выход сыра. В некоторых вариантах осуществления указанное(ые) питательное(ые) вещество(а) служит(ат) источником азота для *S. thermophilus* или дополнительным источником азота для *S. thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления добавление в молоко питательного(ых) веществ(а) или замена молока питательным(и) веществом(ами) приводит к росту штамма микроорганизма до более высокого числа клеток по сравнению с ростом только на молоке. В некоторых вариантах осуществления штамм, выращенный до более высокого числа клеток, представляет собой *S. thermophilus*.

[263] *S. Thermophilus* использует протеиназы, связанные с клеточной стенкой, для переваривания цельных белков или растет на гидролизатах белка в качестве источника аминокислот, пептидов и олигопептидов. В некоторых вариантах осуществления питательные вещества, такие как цельноклеточная биомасса и/или лизат, и/или целые белки, полученные, как описано в настоящем документе, вводят *S. thermophilus*, и его нативные протеиназы используются для преобразования этих питательных веществ в аминокислоты, пептиды и /или олигопептиды, необходимые для роста и/или продукции ЭПС и/или молочной кислоты.

[264] Для *S. thermophilus* незаменимыми аминокислотами считаются Gln и Glu, наряду с серосодержащими аминокислотами. Кроме того, путь биосинтеза аминокислот с разветвленной цепью (BCAA, англ.: branched chain amino acid) является функциональным, но недостаточным для обеспечения оптимального роста *S.*

thermophilus в отсутствие дополнительных ВСАА (Garault et al. (2000)). Поэтому обычно добавляют ВСАА. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты, полученные, как описано в настоящем документе, свободные или связанные внутри пептидов и/или белков, включая, помимо прочего, одну или несколько из: Gln; Glu; серосодержащие аминокислоты; и/или ВСАА, вводят одному или нескольким другим штаммам или организмам, *например*, штамму микроорганизма и/или организму, который отличается от микроорганизма, из которого получают аминокислоты, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления штамм представляет собой *S. thermophilus*.

[265] Сообщается, что гидролизаты белка в сочетании с дрожжевым экстрактом могут обеспечить подходящий источник азота для оптимального получения *S. thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, смешивают с дрожжевым экстрактом в среде для выращивания микроорганизма, такого как, помимо прочего, *S. thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления дрожжевой экстракт заменяют лизатом, гидролизатом и/или другим экстрактом, полученным, как описано в настоящем документе, в среде, предназначенной для микроорганизма, такой как, помимо прочего, *S. thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления один или несколько компонентов бульона Элликера (также известного как бульон для молочнокислых бактерий) заменены биомассой цельных клеток, и/или лизатом, и/или гидролизатом белка, и/или пептидной композицией, и/или аминокислотной композицией, и/или другим питательным(и) веществом(ами) и/или кофактором(ами), полученными, как описано в настоящем документе, с получением модифицированного бульона Элликера. В некоторых вариантах осуществления компоненты, заменяемые в модифицированном бульоне Элликера, включают, помимо прочего, гидролизат казеина и/или дрожжевой экстракт. В некоторых вариантах осуществления бульона Элликера дополнен биомассой цельных клеток, и/или лизатом, и/или гидролизатом белка, и/или пептидной композицией, и/или аминокислотной композицией, и/или другим питательным(и) веществом(ами) и/или кофактором(ами), полученными, как описано в настоящем документе, с получением дополненного бульона Элликера. В некоторых вариантах осуществления модифицированный и/или дополненный бульон Элликера используют для культивирования стрептококков и/или лактобацилл.

[266] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, вводят в культуральную среду в концентрации от около

5 г/л до около 20 г/л, или от около 5 г/л до около 25 г/л, или от около 20 г/л до около 25 г/л. Сообщается, что добавление гидролизатов казеина и сыворотки к молоку увеличивает скорость роста и ацидификации *S. thermophilus* ST-7, тем самым сокращая время ферментации йогурта (Lucas, et al.). В некоторых вариантах осуществления гидролизат, полученный, как описано в настоящем документе, усиливает рост и/или скорость ацидификации другой культуры. В некоторых вариантах осуществления культура содержит или состоит из *S. thermophilus* ST-7. Сообщалось, что добавление 2% кислого гидролизата казеина и цистеина к молоку улучшало жизнеспособность *S. thermophilus* WJ7 в течение 12 недель при тестировании в замороженном молочном десерте (Ravula and Shah, 1998). В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, полученный, как описано в настоящем документе, добавляют в культуральную среду в концентрации около 2% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления вместо гидролизата казеина и/или цистеина используется композиция гидролизата белка и/или аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка и/или аминокислотная композиция, полученные, как описано в настоящем документе, улучшает жизнеспособность микроорганизма, например, культуры *S. thermophilus*.

[267] Виды *Bifidobacterium* используют как в качестве компонентов стартовой культуры для кисломолочных продуктов, так и в качестве инкапсулированного лиофилизированного материала. Все бифидобактерии могут утилизировать лактозу, что позволяет им расти в молоке, хотя рост часто бывает слабым из-за низкой протеолитической активности (Klaver, et al., 1993; Collins and Hall, 1984). Однако, как сообщается, такие виды, как *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium Teenis*, продуцируют внутриклеточные и внеклеточные протеазы. Большинство штаммов содержат лейцинаминопептидазу, а некоторые — валинаминопептидазу (Desjardins, et al., 1990). Большинство бифидобактерий способны использовать соли аммония в качестве единственного источника азота (Azaola, et al., 1999), но добавление пептидов и аминокислот считается требованием для экономичного получения этих штаммов. Конкретные потребности в азоте зависят от штамма, но типичными источниками азота являются пептиды/аминокислоты, цистеин и соли аммония. Сообщается, что бифидобактерии имеют относительно высокий спрос на факторы роста и витамины, включая биотин и пантотенат кальция (Kurmann and Rasic, 1991). В молоке образуются некоторые белковые стимуляторы роста, такие как дисульфид/сульфгидрилсодержащие пептиды, лактоферрин со связанными металлами (Fe, Cu, Zn), α -лактальбумин и α -лактоглобулин (Petschow and Talbott, 1991). В некоторых вариантах осуществления

питательные вещества, такие как цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или протеолитический гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное(ые) вещество(а), и/или кофактор(ы), полученные, как описано в настоящем документе, смешивают с молоком и/или культуральной средой, содержащей лактозу, которую затем вводили другой культуре, *например*, культуре микроорганизма, который является микроорганизмом, отличным от микроорганизма, из которого получена цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или протеолитический гидролизат, и/или пептидная композиция и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное(ые) вещество(а) и/или кофактор(ы). В некоторых вариантах осуществления цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или протеолитический гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное(ые) вещество(а), и/или кофактор(ы), которые можно комбинировать с другими компонентами среды, такими как лактоза, используются вместо молока. В некоторых вариантах осуществления культура включает один или несколько штаммов *Bifidobacterium*.

[268] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию вводят культуре микроорганизмов, проявляющих медленный рост на субстрате, таком как молоко, *например*, из-за низкой протеолитической активности. В некоторых вариантах осуществления культура включает один или несколько штаммов *Bifidobacterium*. В некоторых вариантах осуществления питательное вещество, добавка или состав среды (*например*, содержащие гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, полученную, как описано в настоящем документе), вводят в культуру, которая включает один или несколько штаммов *Bifidobacterium*, причем наблюдается более быстрый рост, чем у той же культуры, выращенной только на молоке.

[269] В некоторых вариантах осуществления культура, содержащая микроорганизмы, продуцирующие внутриклеточные и/или внеклеточные протеазы, получает питательные вещества, продуцируемые, как описано в настоящем документе, *например*, включая цельноклеточную биомассу, и/или лизат, и/или белковый концентрат, и/или белковый изолят, и/или целые белки, и микроорганизм, продуцирующий протеазу, способен расщеплять питательные вещества до пептидов и/или свободных аминокислот, которые могут использоваться микроорганизмом, а также другими микроорганизмами для роста и производства биомассы и/или биопродукта(ов). В некоторых вариантах

осуществления микроорганизм, продуцирующий протеазу, может представлять собой, помимо прочего, *Bifidobacterium bifidum* и/или *Bifidobacterium adolescentis*.

[270] В некоторых вариантах осуществления в культуру добавляют пептиды и/или аминокислоты, полученные, как описано в настоящем документе, для экономичного производства культуры и/или продуктов культуры. В некоторых вариантах осуществления культура включает один или несколько штаммов *Bifidobacterium*. В некоторых вариантах осуществления состав источника азота включает пептиды и/или аминокислоты, включая, помимо прочего, цистеин, полученный, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления источник азота также включает неорганические формы азота, включая, помимо прочего, соли аммония. В некоторых вариантах осуществления источник азота вводят другой культуре, *например*, культуре микроорганизма, который является микроорганизмом, отличным от микроорганизма, из которого получен источник азота, такой как, помимо прочего, культура, которая включает один или более штаммов *Bifidobacterium*.

[271] Сообщается, что небольшие пептиды являются лучшим источником аминокислот, чем свободные аминокислоты, для некоторых штаммов *Bifidobacterium* (Proulx, et al., 1994). В некоторых вариантах осуществления гидролиз белков, полученных, как описано в настоящем документе, предназначен для максимального увеличения количества небольших пептидов и минимального количества свободных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления используют ферментативный гидролиз для предотвращения образования высоких концентраций свободных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептиды с низким или нулевым или практически нулевым содержанием свободных аминокислот вводят другой культуре, *например*, культуре микроорганизма, который является микроорганизмом, отличным от микроорганизма, из которого получены пептиды, такой как, помимо прочего, культура, которая включает один или более штаммов *Bifidobacterium*. Сообщается, что выбор протеиназы влияет на ценность гидролизата белка в качестве стимулятора роста. Сообщается, что пептиды из расщепленного трипсином казеина обладают лучшим стимулирующим действием на рост *Bifidobacterium longum* и *Bifidobacterium infantis*, чем ферментные гидролизаты Alcalase® или химотрипсина (Proulx et al., 1994, *supra*). В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка получают ферментативно из белка, полученного, как описано в настоящем документе (*например*, хемоавтотрофно, например, из соединения C1, такого как CO₂, CO и/или CH₄, и вводят в другую культуру, такую как, помимо прочего, культура микроорганизмов,

которая включает один или более из *B. longum* и/или *B. infantis*.

[272] Сообщалось, что экстракт *Escherichia coli*, используемый в комплексной среде, приводил к значительному эффекту стимуляции роста *B. longum* (Ibrahim and Bezkorovainy, 1994). В некоторых вариантах осуществления экстракт хемоавтотрофного микроорганизма, например, выращенного на субстрате C1, таком как, помимо прочего, CO₂, CO и/или CH₄, вносят другому организму. В некоторых вариантах осуществления добавление экстракта в среду для выращивания приводит к эффекту стимуляции роста другого организма, такого как, помимо прочего, микроорганизм *Bifidobacterium*, например, *B. longum*.

[273] В некоторых вариантах осуществления питательные вещества, полученные, как описано в настоящем документе, включают факторы роста и витамины, такие как, помимо прочего, биотин и/или пантотенат кальция. В некоторых вариантах осуществления факторы роста и/или витамины вводят в другую культуру, например, культуру другого организма и/или микроорганизма, отличного от микроорганизма, из которого получены факторы роста и/или витамины. В некоторых воплощениях витамины включают биотин и/или пантотенат кальция, а культура, в которую введены эти питательные вещества, включает один или несколько штаммов *Bifidobacterium*.

[274] В некоторых вариантах осуществления питательные вещества, полученные, как описано в настоящем документе, включают белковые стимуляторы роста, такие как, помимо прочего, дисульфид/сульфгидрилсодержащие пептиды. В некоторых вариантах осуществления белковые промоторы роста, полученные, как описано в настоящем документе, комбинируют с одним или несколькими промоторами роста, такими как лактоферрин со связанными металлами (например, Fe, Cu, Zn), κ -лактальбумином и/или κ -лактоглобулином из другого субстрата, например, молока. В некоторых вариантах осуществления один или более из вышеупомянутых белковых промоторов роста вводят в другую культуру, например, культуру другого организма и/или микроорганизма, отличного от микроорганизма, из которого получены белковые стимуляторы роста, такие как, помимо прочего, культура, включающая один или несколько штаммов *Bifidobacterium*.

[275] D-глюкозамин, который является строительным блоком пептидогликановых единиц N-ацетилглюкозамина и мурамовой кислоты и, следовательно, является важным компонентом клеточной стенки, необходим для *Bifidobacterium sp.* (Poupard, et al. (1973), *supra*). Состав и прочность клеточной стенки влияют на выживаемость бифидобактерий во время последующей обработки. Молоко содержит N-ацетил-глюкозамин в форме

олигосахаридов, и его чаще всего используют в качестве источника глюкозамина (Exterkate and Veerkamp, 1969). В некоторых вариантах осуществления продукт цельноклеточный биомассы и/или лизат, и/или гидролизат, и/или экстракт, полученные, как описано в настоящем документе, включают пептидогликан и/или пептидогликановые единицы, такие как одно или несколько из: D-глюкозамина; N-ацетилглюкозамина и/или мурамовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления пептидогликан и/или пептидогликановые единицы вводят другой культуре, *например*, культуре другого организма и/или микроорганизма, отличного от микроорганизма, из которого получены пептидогликан и/или пептидогликановые единицы. В некоторых вариантах осуществления пептидогликан и/или пептидогликановые единицы используют для замены или дополнения пептидогликановых и/или пептидогликановых единиц, таких как N-ацетилглюкозамин, из другого источника, такого как растительно-животный источник, такой как молоко. В некоторых вариантах осуществления культура нуждается в пептидогликане и/или пептидогликановых единицах для образования клеточной стенки и/или роста организма, *например*, микроорганизма. В некоторых вариантах осуществления введение пептидогликана и/или пептидогликановых единиц в качестве компонента среды и/или добавки улучшает состав и прочность клеточных стенок микроорганизмов в культуре и/или улучшает выживаемость микроорганизмов в культуре во время последующей обработки. В некоторых вариантах осуществления культура содержит один или несколько штаммов *Bifidobacterium*.

[276] Помимо сложных потребностей питания, культивирование бифидобактерий также требует учета чрезвычайной чувствительности этих штаммов к кислороду. Эта проблема обычно решается путем добавления веществ, которые могут поддерживать низкий окислительно-восстановительный потенциал. Для этой цели часто используют цистеин, аскорбиновую кислоту или сульфит натрия. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько питательных веществ и/или биохимических веществ (*например*, органических соединений), полученных, как описано в настоящем документе, помогают поддерживать низкий окислительно-восстановительный потенциал в культуральной среде и/или культуральной окружающей среде, в которую они добавляются. В некоторых вариантах осуществления компонент(ы), снижающий(ие) окислительно-восстановительный потенциал, полученный(ые), как описано в настоящем документе, включают, помимо прочего, цистеин и/или аскорбиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления компонент(ы), снижающий(ие) окислительно-восстановительный потенциал, вводят в культуру,

которая включает один или несколько штаммов *Bifidobacterium*.

[277] В некоторых вариантах осуществления культуру, выращенную на одном или нескольких питательных веществах и/или питательных средах, описанных в настоящем документе, используют в качестве стартовой культуры для ферментированного продукта, такого как ферментированный пищевой продукт, *например*, ферментированное молоко, и/или далее перерабатывают в инкапсулированные лиофилизированные материалы.

[278] Педиококки используются в качестве компонентов стартовых культур для традиционных ферментированных колбас. В отличие от молока, мясо перед инокуляцией стартовых культур не пастеризуют и оно по-прежнему содержит большое количество естественной микрофлоры. Для получения *Pediococcus sp.* в качестве источников энергии и углерода используют глюкозу или сахарозу. Сообщалось, что добавление ацетата уменьшает лаг-фазу и стимулирует рост организма, хотя это и не обязательно. В некоторых вариантах осуществления питательные вещества, такие как цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или протеолитический гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другое питательное(ые) вещество(а), и/или кофактор(ы), полученные, как описано в настоящем документе, объединяют с глюкозой и/или сахарозой в культуральной среде, которую затем вводят другой культуре, *например*, культуре другого организма и/или микроорганизма, отличного от микроорганизма, из которого получены питательные вещества, такие как цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или протеолитический гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или другие питательные вещества и/или кофакторы, полученные как описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления культура включает один или несколько штаммов *Pediococcus*. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда дополнительно включает ацетат. В некоторых вариантах осуществления ацетат получают хемоавтотрофно, *например*, из субстрата С1, такого как, помимо прочего, CO₂, СО и/или СН₄. В некоторых вариантах осуществления один или несколько штаммов *Pediococcus* ферментируют на белковом субстрате, отличном от мяса. В некоторых вариантах осуществления белковый субстрат включает цельноклеточную биомассу, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или протеолитический гидролизат, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, и/или другое питательное(ые) вещество(а) или кофактор(ы), полученные, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления

субстрат не пастеризовали перед инокуляцией стартовыми культурами, такими как, помимо прочего, один или несколько штаммов *Pediococcus*, и поэтому он может содержать естественную микрофлору.

[279] Сообщается, что *Pediococcus pentosaceus* имеет следующие потребности в аминокислотах: Val, Ala, Met, Pro, Arg, Glu, Cys, Tyr и His, в то время как другие аминокислоты, как сообщается, обладают стимулирующим эффектом. Сообщается, что цис-гидрохлорид оказывает стимулирующее действие, но часть его стимулирующего эффекта может быть связана с его функцией поглотителя кислорода. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты, продуцируемые, как описано в настоящем документе, включая, помимо прочего, одну или несколько из: Val, Ala, Met, Pro, Arg, Glu, Cys, Tyr и His, вводят одному или нескольким другим штаммам, *например*, организм и/или микроорганизм, отличный от микроорганизма, из которого получены аминокислоты, в форме свободных аминокислот и/или аминокислот, связанных внутри пептидов и/или белков. В некоторых таких вариантах осуществления штамм(ы) нуждаются в одном или нескольких из: Val, Ala, Met, Pro, Arg, Glu, Cys, Tyr и/или His для роста. В некоторых вариантах осуществления штамм(ы) включает один или несколько микроорганизмов *Pediococcus*, таких как, помимо прочего, *Pediococcus pentosaceus*.

[280] *Сообщается, что Pediococcus acidilactici* способен гидролизовать мясные белки. В некоторых вариантах осуществления цельноклеточная биомасса, лизат и/или целые белки, полученные, как описано в настоящем документе, вводят другому организму, *например*, другому организму и/или микроорганизму, отличному от микроорганизма, из которого получена цельноклеточная биомасса, лизат и/или целые белки, способные их гидролизовать. В некоторых вариантах осуществления полученные в результате гидролиза пептиды и/или аминокислоты затем используются самим организмом для питания или используются другими организмами для питания. В некоторых вариантах осуществления полученные в результате гидролиза пептиды и/или аминокислоты входят в состав конечного продукта питания или корма. В некоторых вариантах осуществления организм или организмы, осуществляющие гидролиз белков, включают один или несколько штаммов *Pediococcus*, *таких как Pediococcus acidilactici*, но не ограничиваясь ими.

[281] Даже когда штамм микроорганизма обладает адекватной протеолитической системой для данного белкового субстрата, рост на определенных белках, таких как казеин, может быть ограничен из-за низкого уровня определенных аминокислот, таких

как His, Leu, Gln, Val и Met на примере казеина (Kunji, et al., 1995). В некоторых вариантах осуществления данный белковый субстрат дополнен одним или несколькими из следующего в качестве источника аминокислот: свободные аминокислоты; пептиды; гидролизат белка; белок; лизат; и/или цельноклеточная биомасса, полученные, как описано в настоящем документе, которые содержат аминокислоты, дефицитные в белковом субстрате. В некоторых вариантах осуществления обеспечение дефицитными аминокислотами снимает ограничение роста культуры. В некоторых вариантах осуществления добавляемый белковый субстрат представляет собой молочный белок, такой как казеин. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты, которые добавляют за счет предоставления источника аминокислот, полученного, как описано в настоящем документе, включают, помимо прочего, одно или несколько из следующего: His; Leu; Gln; Val и/или Met.

[282] Несколько видов *Lactobacilli* (*L. johnsonii*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*) не способны синтезировать пурины и пиримидины de novo (Elli et al., 2000). Молоко и гидролизаты, полученные из молока, не содержат предшественников пуринов и пиримидинов. В некоторых вариантах осуществления пурины и/или пиримидины, полученные, как описано в настоящем документе, вводят одному или нескольким штаммам микроорганизмов, которые не способны синтезировать пурины и/или пиримидины de novo. В некоторых вариантах осуществления штамм(ы) включает виды *Lactobacillus*, включая, помимо прочего, один или несколько из: *L. johnsonii*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* и/или *L. helveticus*. В некоторых вариантах осуществления пурины и/или пиримидины, полученные, как описано в настоящем документе, вводят в культуру, выращенную на молоке или гидролизатах, полученных из молока. В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная, как описано в настоящем документе, которая включает пурины и/или пиримидины, используется для замены другого типичного источника пуринов и/или пиримидинов, используемых в культуральных средах, таких как, помимо прочего, дрожжевой экстракт.

[283] В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, как описано в настоящем документе, добавленные к питательной среде, усиливают пролиферацию клеток, и/или биологическую продукцию, и/или клеточная плотность клетки, выращенной в питательной среде. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления композиция лизата, и/или гидролизата, и/или пептида, и/или аминокислотная композиция, как описано в

настоящем документе, улучшает плотность жизнеспособных клеток, и/или размножение биомассы, и/или выход продукта по сравнению с той же клеткой, выращенной в идентичной среде, которая не включает лизат, и/или гидролизат, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию. В некоторых вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, как описано в настоящем документе, при включении в питательную среду увеличивает плотность клеток. В других вариантах осуществления лизат, и/или гидролизат, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, как описано в настоящем документе, улучшают как плотность клеток, так и выход продукта, а в еще других вариантах осуществления подавляют рост клеток, но повышают выход одного или нескольких биопродуктов. В некоторых вариантах осуществления композиция лизата, и/или гидролизата, и/или пептида, как описано в настоящем документе, содержит олигопептиды, которые действуют как внешние молекулярные сигналы, влияющие на рост и гибель клеток. В некоторых вариантах осуществления олигопептиды, полученные, как описано в настоящем документе, стимулируют рост клеток, что приводит к увеличению продукции биомассы, и/или стимулируют продукцию секретируемых белков, и/или повышают плотность жизнеспособных клеток в культуре. В некоторых вариантах осуществления олигопептиды, полученные, как описано в настоящем документе, действуют как агенты, отсрочивающие апоптозную гибель в клеточных культурах. В некоторых вариантах осуществления пептиды, полученные, как описано в настоящем документе, вызывают длительные сдвиги в метаболизме клеточной культуры и/или изменения экспрессии генов и/или клеточной пролиферации. В некоторых вариантах осуществления сдвиги и/или изменения длятся несколько дней. В некоторых вариантах осуществления изменяется распределение фаз клеточного цикла в культуральной среде, которая включает пептиды, полученные, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления пептиды, полученные, как описано в настоящем документе, регулируют пролиферацию культивируемых клеток животных и/или каскады передачи сигнала и/или активируют или подавляют гены. В некоторых вариантах осуществления пептиды, полученные, как описано в настоящем документе, вводят в культуру клеток в концентрации, превышающей или равной около 1 мМ.

[284] В некоторых вариантах осуществления хроматографические фракции лизата, и/или гидролизата, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции проявляют различную активность в клеточных культурах, в которые их вводят. В

некоторых вариантах осуществления композиция лизата, и/или гидролизата, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, как описано в настоящем документе, служит не только источником пригодных для использования аминокислот, но также источником пептидов, оказывающих специфическое воздействие на рост и/или продуктивность клеток. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из следующих параметров культуры улучшают за счет применения лизата, и/или гидролизата, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции: плотность жизнеспособных клеток; долгосрочная жизнеспособность и/или выход одного или более биопродуктов. В некоторых вариантах осуществления концентрированная смесь аминокислот и/или других питательных веществ, полученная, как описано в настоящем документе, увеличивает выход одного или нескольких биопродуктов в культуре, в которую вводят аминокислоты и/или другие питательные вещества.

[285] В некоторых вариантах осуществления композицию гидролизата белка добавляют в культуральную среду в концентрации около 0,001% масс./об. или более, *например*, около 0,01% масс./об. или более, около 0,05% масс./об. или более, около 0,1% масс./об. или более, включая около 1% масс./об. или более (измеряется по сухой массе композиции гидролизата белка). В некоторых вариантах осуществления композицию гидролизата белка добавляют в культуральную среду в количестве от около 0,001% масс./об. до около 5% масс./об., *например*, от около 0,01% масс./об. до около 2% масс./об., от около 0,05% масс./об. до около 1% масс./об., включая от около 0,1% масс./об. до около 1% масс./об. (измеряется по сухой массе композиции гидролизата белка). Количество композиции гидролизата белка, добавляемой в культуральную среду, может варьироваться в зависимости от одного или нескольких факторов, таких как тип клеток, рост, размножение, продуктивность, дифференцировка и т. д. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда предназначена для культуры клеток животных.

[286] В некоторых вариантах осуществления пептиды добавляют в культуральную среду в концентрации от около 1 мМ, около 2 мМ, около 3 мМ, около 4 мМ, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, от около 1 мМ до около 7 мМ, от около 7 мМ до около 10 мМ или больше около 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления олигопептиды, полученные, как описано в настоящем документе, добавляют в культуральную среду в концентрации от около 1 мМ, около 2 мМ, около 3 мМ, около 4 мМ, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, от около 1 мМ до около 7 мМ, от около 7 мМ до около 10 мМ или больше около 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда

предназначена для культуры клеток животных.

[287] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка, добавляемая в культуральную среду, включает биостимулирующий полиэстер. Биостимулирующий полиэстер может представлять собой полимер ПГА, такой как ПГБ и/или ПГВ. Биостимулятор может быть мономером, таким как гидроксibuтират (ГБ), или олигомером. Композиция гидролизата белка при добавлении в культуральную среду обеспечивает эффективное количество биостимулирующего полиэстера, *например*, ПГА, такого как ПГБ и/или ПГВ, в культуральную среду для стимуляции роста и/или развития культивируемых клеток.

[288] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка, добавленная в культуральную среду, включает витамин, такой как витамин В₁, витамин В₂ и/или витамин В₁₂, и/или их витамеры. Композиция гидролизата белка при добавлении в культуральную среду обеспечивает эффективное количество витамина в культуральной среде для стимуляции роста и/или развития культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка включает витамин В₁₂ и/или один или несколько его витамеров (*например*, цианокобаламин, гидроксокобаламин, аденозилкобаламин и/или метилкобаламин).

[289] В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка получают из биомассы, которая была получена из субстрата С1, такого как СО₂, СО и/или СН₄, и которая содержит витамин В₁₂ в концентрации относительно сухой массы биомассы от около 2 мкг/100 г сухой биомассы до около 6,5 мкг/100 г сухой биомассы. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда, полученная из субстрата С1, содержит витамин В₁₂, *например*, в концентрации по отношению к сухой массе биомассы от около 6,5 мкг/100 г сухой биомассы до около 13 мкг/100 г сухой биомассы или более около 13 мкг/100 г сухой биомассы.

[290] В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток в культуральной среде, которая включает один или несколько гидролизатов белка, полученных из растений или дрожжей, в дополнение к микроорганизму, *например*, композицию гидролизата белка, полученного из хемоавтотрофных микроорганизмов, как описано в настоящем документе. Подходящие гидролизаты белка растительного происхождения включают гидролизаты, полученные из сои, риса, картофеля или кукурузы, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток в культуральной среде, которая включает гидролизат белка растительного происхождения и микроорганизм, *например*, композицию

гидролизата белка, полученную из хемоавтотрофного микроорганизма, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток в культуральной среде, которая включает гидролизат белка из дрожжей и микроорганизм, например, композицию гидролизата белка, полученного из хемоавтотрофного микроорганизма, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток в культуральной среде, которая включает гидролизат белка из дрожжей, гидролизат белка растительного происхождения и микроорганизм, *например*, композицию гидролизата белка, полученного из хемоавтотрофного микроорганизма, как описано в настоящем документе. Подходящие гидролизаты белка растительного происхождения и/или из дрожжей описаны, *например*, в патенте США № 8093045 и публикации PCT № WO 1999057246, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[291] Гидролизат белка растительного происхождения или из дрожжей может быть добавлен в культуральную среду в любом подходящем количестве. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка растительного происхождения или из дрожжей добавляют в культуральную среду в концентрации около 0,001% масс./об. или более, *например*, около 0,01% масс./об. или более, около 0,05% масс./об. или более, около 0,1% масс./об. или более, включая около 1% масс./об. или более. В некоторых вариантах осуществления гидролизат белка растительного происхождения или из дрожжей добавляют в культуральную среду в количестве от около 0,001% масс./об. до около 5% масс./об., *например*, от около 0,01% масс./об. до около 2% масс./об., от около 0,05% масс./об. до около 1% масс./об., включая от около 0,1% масс./об. до около 1% масс./об.

[292] Клетки можно культивировать в культуральной среде с микроорганизмом, *например*, композицией гидролизата белка, полученной из хемоавтотрофного микроорганизма, как описано в настоящем документе, в течение любого подходящего периода времени. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют непрерывно в течение всего периода роста и размножения в присутствии гидролизата белка в культуральной среде. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в культуральной среде, содержащей гидролизат белка, полученного из хемоавтотрофных микроорганизмов, в течение около одного часа или более, *например*, около 5 часов или более, около 12 часов или более, около 24 часов или более, около 5 дней или более, около 2 недель или более, около 6 недель или более, около 3 месяцев или более, около 6 месяцев или более, включая около один год или более. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в культуральной среде, содержащей

гидролизат белка, полученного из хемоавтотрофных микроорганизмов, в течение периода от около 1 часа до около 3 лет, *например*, от около 5 часов до около 1 года, от около 12 часов до около 6 месяцев, от около 24 часов до около 3 месяцев, включая от около 5 дней до около 6 недель.

[293] В некоторых вариантах осуществления микроорганизм, например, гидролизат белка, полученный из хемоавтотрофного микроорганизма, временно присутствует в культуральной среде во время культивирования клеток. Когда клетки выращивают в отсутствие гидролизата белка микроорганизма в культуральной среде, в культуральной среде могут присутствовать другие добавки к среде, такие как гидролизат белка растительного происхождения или из дрожжей.

[294] Любые подходящие клетки можно культивировать с использованием способа по изобретению. Клетки могут быть получены из млекопитающего, птицы, рыбы, насекомого или другого животного происхождения. Клетки могут быть стволовыми клетками. Клетки могут быть грибковыми, растительными, эукариотическими или прокариотическими. Клетки могут быть пробиотическими. Культивируемые клетки могут быть первичными клетками, иммортализованными клеточными линиями, гибридами, прижившимися клеточными линиями, клетками, полученными из стволовых клеток, или генетически сконструированными клетками, такими как рекомбинантные клетки, экспрессирующие гетерологичный полипептид или белок. Клетки могут быть отдельными клетками, тканями, органами. Подходящие клетки животных, не относящихся к млекопитающим, включают клетки насекомых, клетки птиц (включая клетки куриц) и клетки рыб. Подходящие клетки включают клетки млекопитающих человеческого или нечеловеческого происхождения. Подходящие клетки млекопитающих включают, помимо прочего, клетки крупного рогатого скота, свиньи, овцы, зайцеобразных или лошади. Культивируемые клетки могут представлять собой клетки почек обезьяны, клетки почек крупного рогатого скота, клетки почек собак, клетки почек свиней, клетки почек кроликов, клетки почек мышей, клетки почек крыс, клетки почек овец, клетки почек хомяков, клетки яичников китайского хомячка или клетку животного, полученного из любой ткани. Подходящие клетки млекопитающих включают, помимо прочего, клетки CHO, клетки COS, клетки VERO, клетки HeLa, клетки 293, клетки HEK-293, клетки HEK, клетки PER.C6, клетки K562, клетки MOLT-4, клетки M1, клетки NS0, клетки NS-1, клетки COS-7, клетки MDBK, клетки MDCK, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки WENI, клетки SP2/0, клетки BHK, стволовые клетки и их производные. Подходящие клетки не млекопитающих включают, помимо

прочего, клетки AGE1.CR, клетки EB66, клетки *Sf9*, стволовые клетки и их производные. В некоторых вариантах осуществления культуральные клетки, выращенные на компонентах среды, полученных, как описано в настоящем документе, были трансфицированы экзогенной нуклеиновой кислотой.

[295] В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование миоцитов в культуральной среде, содержащей микроорганизм, например, хемоавтотрофный микроорганизм, полученный лизат, и/или гидролизат белка, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток в культуральной среде для получения и поддержания миоцитов. Подходящие клетки для образования миоцитов включают, помимо прочего, эмбриональные стволовые клетки, сателлитные клетки и миобласты. В некоторых вариантах осуществления клетки включают адипоциты. В некоторых вариантах осуществления клетки включают фибробласты. В некоторых вариантах осуществления любые два или более миоцитов, адипоцитов и фибробластов культивируют вместе в культуральной среде, содержащей микроорганизм, *например*, композицию гидролизата белка, полученную из хемоавтотрофных микроорганизмов, как описано в настоящем документе.

[296] Клетки можно культивировать любым подходящим способом. Клетки можно выращивать в суспензии, роллерных флаконах, колбах и т.п. Также включены крупномасштабные подходы, такие как биореакторы, включающие рост прикрепленных клеток к микроносителям в ферментерах с перемешиванием. В некоторых вариантах осуществления клетки выращивают в суспензии. Если клетки выращивают на микроносителях, то микроноситель можно выбрать из группы микроносителей на основе декстрана, коллагена, пластика, желатина и целлюлозы и других. В некоторых вариантах осуществления микроносители могут содержать ПГА (например, ПГБ и/или ПГВ), полученные из микроорганизмов, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления системы поддержки микроносителей могут использоваться в псевдосуспензионных культурах в биореакторах с перемешиванием.

[297] В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток на трехмерной подложке или каркасе. Каркас может обеспечивать микроокружение, подходящее для поддержания пролиферации, поддержания, развития и/или дифференцировки клеток в присутствии микроорганизма, *например*, композиции гидролизата белка, полученного из хемоавтотрофных микроорганизмов, в

культуральной среде. В некоторых вариантах осуществления трехмерная опора или каркас являются пористыми. В некоторых вариантах осуществления трехмерная подложка или каркас включает ПГА (например, ПГБ и/или ПГВ), полученный из микроорганизмов, как описано в настоящем документе.

[298] Трехмерная подложка или каркас могут быть изготовлены из любого материала, подходящего для выращивания на них культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления каркас является биоразлагаемым. В некоторых вариантах осуществления каркас изготовлен из биоразлагаемого материала, такого как биоразлагаемый полиэстер или гидрогель. В некоторых вариантах осуществления каркас изготовлен из полимера ПГА, такого как, помимо прочего, ПГБ. В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемый полиэстер, такой как ПГА или ПГБ, продуцируется микроорганизмом, *например*, хемоавтотрофным микроорганизмом. В некоторых вариантах осуществления каркас является пригодным к употреблению, *например*, пригодным к употреблению человеком. Пригодная к употреблению подложка или каркас могут быть изготовлены, помимо прочего, из желатиновой камеди, альгината, пектина или целлюлозы. В некоторых вариантах осуществления каркас напечатан на 3D-принтере.

[299] Клетки можно культивировать при подходящей температуре и pH. Клетки млекопитающих обычно культивируют в клеточном инкубаторе при около 37°C, при этом культуральная среда имеет оптимальный pH в диапазоне от около 6,8 до 7,6, в том числе от 7,0 до 7,3. В некоторых вариантах осуществления для клеток в периодической культуре полная смена среды может происходить примерно каждые 2-3 дня или чаще или реже, если это необходимо. Клетки в перфузионной культуре (*например*, в биореакторе или ферментере) могут иметь замену среды свежей на основе непрерывной рециркуляции.

[300] В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток животных для получения продукта, подходящего для употребления человеком, такого как мясной продукт. Таким образом, в настоящем документе предложены способы выращивания мяса с использованием культуральной среды, содержащей микроорганизм, *например*, хемоавтотрофный микроорганизм, полученный лизат и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, как описано в настоящем документе, для культивирования миоцитов, с другими клетками (такими как адипоциты или фибробласты) или без них. Когда культуральная среда представляет собой бессывороточную среду или среду, не содержащую компонентов животного происхождения, способ по изобретению обеспечивает

гуманный способ получения мясных продуктов. В некоторых вариантах осуществления в среде используется сыворотка животного происхождения; однако некоторая часть аминокислот или гидролизата белка получена из описанного в данном документе микроорганизма.

[301] В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка, полученного из микроорганизмов, включает компоненты, которые улучшают вкус выращиваемого пищевого продукта, *например*, выращиваемого мяса. В некоторых вариантах осуществления композиция гидролизата белка стимулирует развитие элементов, усиливающих вкус, в выращиваемом пищевом продукте, *например*, в выращиваемом мясе. Как используется в данном документе, усиление вкуса пищевого продукта включает в себя придание продукту более приятного вкуса или придание одного или нескольких вкусовых компонентов, которые содержатся в натуральном аналоге выращиваемого продукта.

[302] В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование миоцитов в бессывороточной культуральной среде, которая содержит микроорганизм, *например*, хемоавтотрофный микроорганизм, полученную цельноклеточную биомассу, и/или лизат, и/или экстракт, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток-предшественников миоцитов в бессывороточной культуральной среде, которая содержит микроорганизм, *например*, хемоавтотрофный микроорганизм, полученную цельноклеточную биомассу и/или экстракт, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию и/или аминокислотную композицию, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток-предшественников миоцитов в культуральной среде, которая включает сыворотку животного происхождения, но которая также содержит микроорганизм, *например*, хемоавтотрофный микроорганизм, полученный белок, цельноклеточную биомассу и/или экстракт, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток-предшественников миоцитов в культуральной среде, которая включает сыворотку животного происхождения, но которая также содержит микроорганизм, *например*, хемоавтотрофный микроорганизм, полученную цельноклеточную биомассу и/или экстракт, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, как описано в данном

документе. Клетки-предшественники миоцитов можно культивировать в условиях, достаточных для стимулирования размножения клеток-предшественников в культуральной среде. В некоторых вариантах осуществления клетки-предшественники миоцитов можно культивировать в условиях, достаточных для индуцирования дифференцировки клеток-предшественников в миоциты. Клетки-предшественники могут представлять собой любые подходящие клетки, которые можно индуцировать для образования миоцитов. Подходящие клетки-предшественники включают, помимо прочего, сателлитные клетки, эмбриональные стволовые клетки и миобласты. Таким образом, настоящий способ включает добавление эффективного количества гидролизата белка, полученного из хемоавтотрофных микроорганизмов, в культуральную среду для стимуляции пролиферации, поддержания, развития и/или дифференцировки миоцитов.

[303] В некоторых вариантах осуществления миоциты культивируют с одним или несколькими другими типами клеток. Подходящие клетки для совместного культивирования с миоцитами включают, помимо прочего, адипоциты и фибробласты или их предшественники. Таким образом, способ по изобретению может включать культивирование клеток в культуральной бессывороточной среде или в культуральной среде, содержащей сыворотку животного происхождения, которая содержит микроорганизм, *например*, хемоавтотрофный микроорганизм, полученную цельноклеточную биомассу и/или лизат, и/или экстракт, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, как описано в настоящем документе, для получения набора мышечных клеток, жировых клеток и соединительной ткани. Клетки можно культивировать в условиях, достаточных для индукции миогенеза или образования мышечных волокон. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление эффективного количества микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, полученной цельноклеточной биомассы, и/или лизата, и/или экстракта, и/или гидролизата белка, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции, к питательной среде для стимуляции пролиферации, поддержания, развития и/или дифференцировки адипоцитов и/или фибробластов. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление эффективного количества микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, полученной цельноклеточной биомассы, и/или лизата, и/или экстракта, и/или гидролизата белка, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции, к культуральной среде для индукции, поддержания и/или стимулирования миогенеза.

[304] В некоторых вариантах осуществления миоциты (с адипоцитами и/или

фибробластами, или без них) культивируют на трехмерной подложке или каркасе. Каркас в некоторых случаях может быть пористым. Каркас может быть изготовлен из любого подходящего материала для поддержания роста клеток и/или миогенеза. Каркас может быть биоразлагаемым и/или пригодным к употреблению. В некоторых вариантах осуществления каркас включает биоразлагаемый полиэстер или биоразлагаемый гидрогель. В некоторых вариантах осуществления каркас включает полимер ПГА, такой как ПГБ и/или ПГВ. В некоторых вариантах осуществления каркас изготовлен из материала, полученного из микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма. В некоторых вариантах осуществления каркас включает биоразлагаемый полиэстер, такой как ПГА, *например*, ПГБ и/или ПГВ, устойчиво продуцируемый путем роста, например, хемоавтотрофного роста микроорганизма.

[305] В некоторых вариантах осуществления в культуральную среду добавляют эффективное количество микроорганизма, *например*, хемоавтотрофного микроорганизма, полученной цельноклеточной биомассы, и/или лизата, и/или экстракта, и/или гидролизата белка, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции, как описано в настоящем документе, чтобы обеспечить источник витаминов для растущих клеток. Цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или экстракт, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция могут быть источником витаминов, таких как, помимо прочего, витамин В₁, витамин В₂ и /или витамин В₁₂, *например*, для миоцитов и/или других клеток. Цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или экстракт, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция могут быть источником одного или нескольких витаминов, включая, помимо прочего: витамин А, бета-каротин, лютеин, зеаксантин, тиамин (В₁), рибофлавин (В₂), ниацин (В₃), пантотеновая кислота (В₅), витамин В₆, фолат (В₉), витамин В₁₂, холин, витамин С, витамин D, витамин Е, витамина К, *например*, для миоцитов и/или других клеток. Цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или экстракт, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция могут быть источником одного или нескольких минералов, включая, помимо прочего: кальций, железо, магний, марганец, фосфор, калий, натрий, цинк, *например*, для миоцитов и/или других клеток.

[306] В некоторых вариантах осуществления цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или экстракт, и/или гидролизат белка, полученные, как описано в настоящем документе, служат источником одной или нескольких из: аминокислот; олигопептидов; липидов и/или железа для культуры клеток, которые представляют собой клетки,

отличные от клеток микроорганизмов, из которых получены аминокислоты, олигопептиды, липиды и/или железо.

[307] В некоторых вариантах осуществления пищевой продукт (например, но не ограничиваясь этим, мясной продукт или мясоподобный продукт), полученный описанным в данном документе способом, может быть питательным источником витаминов, таких как витамин В₁, витамин В₂ и/или витамин В₁₂. В некоторых вариантах осуществления пищевой продукт содержит витамины, такие как витамин В₁, витамин В₂ и/или витамин В₁₂. В некоторых указанных вариантах осуществления витамин В₁, витамин В₂ и/или витамин В₁₂ получают из цельноклеточной биомассы, и/или лизата, и/или гидролизата белка, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции, и/или других экстрактов, полученных, как описано в настоящем документе, добавленных к культуральной среде для культивируемых клеток, которые используют для получения по меньшей мере части пищевого продукта. В некоторых вариантах осуществления пищевой продукт содержит один или несколько витаминов, включая, помимо прочего: витамин А; бета-каротин, лютеин, зеаксантин, тиамин (В₁), рибофлавин (В₂), ниацин (В₃), пантотеновую кислоту (В₅), витамин В₆, фолиевую кислоту (В₉), витамин В₁₂, холин, витамин С, витамин D, витамин Е, и/или витамин К, некоторые или все из которых могут быть в конечном счете получены из микроорганизмов, из которых получена цельноклеточная биомасса, и/или лизат, и/или гидролизат белка, и/или пептидная композиция, и/или аминокислотная композиция, и/или экстракт. В некоторых вариантах осуществления витамины вводят через цельноклеточную биомассу, и/или лизат, и/или экстракт, и/или гидролизат белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, добавленную в культуральную среду для культивируемых клеток, которые используют для получения по меньшей мере части пищевого продукта.

[308] В некоторых вариантах осуществления пищевой продукт (*например*, мясо или мясоподобный продукт), полученный способом, описанным в настоящем документе, может быть питательным источником минералов, включая, помимо прочего, один или несколько из: кальция, железа, магния, марганца, фосфора, калия, натрия и/или цинка. В некоторых вариантах осуществления минералы получают из цельноклеточной биомассы, и/или лизата, и/или гидролизата белка, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции, и/или других экстрактов, полученных, как описано в настоящем документе, добавляемых в культуральную среду для культивируемых клеток, которые используют для получения пищевого продукта. В некоторых вариантах

осуществления содержание железа в цельноклеточной биомассе, и/или лизате, и/или экстракте, и/или гидролизате белка, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции включает железо в форме гема.

[309] В некоторых вариантах осуществления предложен состав, который включает цельноклеточную биомассу, и/или лизат, и/или экстракт, и/или гидролизаты белка, и/или пептидную композицию, и/или аминокислотную композицию, и/или другие питательные вещества или кофакторы, полученные как описано в настоящем документе, в сочетании с другими ингредиентами, включая, помимо прочего, биомассу, и/или целые клетки, и/или концентрат белка, и/или изолят белка, и/или гидролизат белка, и/или экстракт из одного или нескольких из следующих источников: мясо; молочные продукты; яйцо; соя; пшеница; рис; горох; другие растительные белки; дрожжи; пробиотики; МКБ и/или другие микро- или макроорганизмы GRAS. В некоторых вариантах осуществления йогуртовая смесь дополнена одним или несколькими из: цельноклеточной биомассы, и/или лизатов, и/или гидролизатов белка, и/или пептидных композиций, и/или аминокислотных композиций, и/или других питательных веществ или кофакторов, полученных, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления состав не включает белки или другие компоненты биомассы из мясных и/или соевых источников. В некоторых вариантах осуществления состав не включает белки, гидролизаты белков и/или другие компоненты биомассы молочного и/или несоевого растительного происхождения. В некоторых случаях состав не включает генетически модифицированные микроорганизмы (*m. e.* не содержит ГМО). В некоторых случаях состав не содержит мяса и/или молочных продуктов. В некоторых вариантах осуществления состав используют в пищевых продуктах, кормах или напитках. В некоторых вариантах осуществления пищевой продукт, корм или напиток являются вегетарианскими или веганскими. В некоторых вариантах осуществления состав считается GRAS для потребления человеком.

[310] В некоторых вариантах осуществления культура клеток, выращенная на цельноклеточной биомассе, и/или лизате, и/или экстракте, и/или гидролизате белка, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции, как описано в настоящем документе, секретирует белковый продукт. В некоторых вариантах осуществления процессы очистки белка используют для извлечения и/или очистки белкового продукта. Любой подходящий способ очистки белка, хорошо известный в данной области техники, может быть использован для извлечения и/или очистки белкового продукта.

[311] В некоторых вариантах осуществления после получения продуктов с использованием цельноклеточной биомассы, и/или лизата, и/или экстракта, и/или гидролизата белка, и/или пептидной композиции, и/или аминокислотной композиции в качестве компонента(ов) культуральной среды, как описано в данном документе, осуществляют удаление цельноклеточной биомассы, и/или лизата, и/или экстракта, и/или гидролизата белка, и/или пептидной композиции, и/или материала аминокислотной композиции из культуральной среды или ферментационного бульона и/или продуктов. В некоторых случаях такие удаленные питательные вещества возвращают обратно на одну или несколько предшествующих стадий для более полного использования и/или используют в качестве побочного продукта.

[312] Следующие примеры предназначены для иллюстрации, но не ограничения изобретения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1: Гидролизат белка, полученный из культуры *Cupriavidus necator*

[313] Штамм *Cupriavidus necator* культивировали хемоавтотрофно в ростовой среде с минеральными солями с CO₂ в качестве источника углерода и H₂ в качестве донора электронов. После роста цельноклеточную биомассу выделяли из питательной среды центрифугированием и высушивали лиофилизацией. Высушенную биомассу обрабатывали следующим образом.

[314] Обезжиривание цельноклеточной биомассы. Цельноклеточную биомассу обезжиривали (липиды экстрагировали) гидроксидом аммония и метанолом (1:1:0,4, WCV:NH₄OH:MeOH) путем перемешивания смеси в течение часа в вытяжном шкафу в плотно закрытой контейнере. Смесь фильтровали под вакуумом с использованием фильтровальной бумаги Whatman 4. Фильтрат содержал экстрагированные липиды. Концентратом на фильтре была обезжиренная биомасса, которую сушили при 40°C в инкубаторе в течение ночи.

[315] Гидролиз белка с помощью NH₄OH и нейтрализация с помощью CO₂: Твердую загрузку 2% обезжиренной высушенной массы на стадию гидролиза готовили регидратацией с требуемым количеством деионизированной (ДИ) воды. Суспензию хорошо перемешивали с помощью Turret Stick при 15000 об/мин в течение 1 мин. pH реакционной смеси повышали до 10,85 с помощью 28%-30%-ного раствора NH₄OH (предварительно приготовленного) в вытяжном шкафу. Смесь переносили в пробирку под давлением (размер: 120 мл) с рабочим объемом 50 мл. Затем смесь автоклавировали

при 110°C, 10 мин, медленно охлаждали. рН раствора после автоклавирования составлял 10,82. Затем рН снижали до рН 9 барботированием CO₂ через канюлю/иглу 18G, введенную в раствор на 10-20 мин. Затем проводили ферментативное расщепление при рН 9 с помощью бактериальной щелочной протеазы при 55°C, 110 об/мин в течение ночи. Супернатант, содержащий растворимые гидролизованные белки, отделяли от неочищенного осадка, богатого ПГБ, центрифугированием при 20000×g, 20 мин, 5С. Супернатант гидролизата белка затем лиофилизировали. Содержание золы, измеренное для этого гидролизата белка (ГБ), составило 5%. Содержание золы измеряли, помещая минимум 300 мг порошка гидролизата белка в тарированный тигель и запуская цикл получения золы в муфельной печи. Это также было независимо измерено с помощью анализа во внешней лаборатории (SGS, Северная Америка) с использованием метода АОАС 942.05. Общее содержание аминокислот в ГБ и аминокислотный профиль также определяли в SGS, Северная Америка, с использованием метода АОАС 994.12. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. NH₄OH/CO₂ с низким содержанием золы ГБ

% общего количества аминокислот	84,96
Форма образец	Сухой порошок
% золы	4,99
Аминокислота	% общего сухого веса (масс./масс.)
Цистеин	0,13
Метионин	1,62
Триптофан	0,95
Аланин	7,7
Аргинин	6,19
Аспарагиновая кислота	6,1
Глутаминовая кислота	10,34

Глицин	5,11
Гистидин	1,59
Изолейцин	3,04
Лейцин	7,36
Лизин	6,28
Фенилаланин	4,95
Пролин	3,77
Серин	6,1
Треонин	3,8
Тирозин	4,41
Валин	5,52

ПРИМЕР 2: Гидролизат белка, полученный из культуры *Cupriavidus necator*

[316] ПГБ-негативный мутантный штамм *Cupriavidus necator* (DSM 541) культивировали хемоавтотрофно в неорганической минеральной питательной среде на CO_2 в качестве источника углерода и H_2 в качестве донора электронов. После роста цельноклеточную биомассу выделяли из питательной среды центрифугированием и высушивали лиофилизацией. Высушенную биомассу обрабатывали следующим образом.

[317] Обезжиривание цельноклеточной биомассы. Сухую цельноклеточную биомассу обезжиривали путем обработки гидроксидом аммония и этанолом (1:4:0,5 масс./об.). Суспензию биомассы и растворителя перемешивали в течение 30 минут в плотно закрытой стеклянной бутылки перед вакуумной фильтрацией через фильтровальную бумагу Whatman 4 в вытяжном шкафу. Фильтрат содержал липидную фракцию. Обезжиренный концентрат, извлеченный из фильтра, сушили на воздухе в течение ночи перед сушкой при 40°C в инкубаторе в течение 4-6 часов.

[318] Гидролиз белка на обезжиренной биомассе с помощью $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и нейтрализация с помощью H_3PO_4 : Высушенную обезжиренную биомассу ресуспендировали в

деионизированной воде до конечной концентрации 2%. Раствор биомассы смешивали с ИКА Ultra-Turax при 15000 об/мин до полного и однородного ресуспендирования. Раствор биомассы доводили до pH 11 добавлением $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Раствор переносили в стеклянную бутылку со средой и автоклавировали при 110°C в течение десяти минут, а затем охлаждали до комнатной температуры. Раствор нейтрализовали до pH 9, используя H_3PO_4 . К раствору добавляли бактериальную щелочную протеазу (Sigma P8038) в концентрации 2,6 активных единиц/г биомассы. Раствор биомассы помещали на водяную баню со встряхиванием при 55°C на ночь. После 16-24-часового расщепления фермент инактивировали путем инкубации суспензии на водяной бане при 95°C в течение десяти минут. Суспензию биомассы затем охлаждали до комнатной температуры и гидролизат белка (фракция надосадочной жидкости) отделяли центрифугированием при 26000×g в течение 30 минут при 7°C. Полученный раствор гидролизата белка замораживали в морозильной камере при температуре -80°C перед лиофилизацией. Определяли влажность, зольность и содержание азота в высушенном порошке и анализировали белковый профиль с помощью анализа SDS-PAGE. В гидролизате белка не было белков с молекулярной массой выше 2000 дальтон, а полученная зольность составила 10,5%. Общее содержание аминокислот в ГБ и аминокислотный профиль также определяли в SGS, Северная Америка, с использованием метода АОАС 994.12. Минеральный профиль определяли методом АОАС 968.08. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Аминокислотный анализ Результат % общего сухого веса (масс./масс.) или частей на миллион)

Общее количество аминокислот	69,92%
Цистеин	0,25%
Метионин	1,57%
Триптофан	0,65%
Аланин	5,99%
Аргинин	4,96%

Аспарагиновая кислота	7,35%
Глутаминовая кислота	8,88%
Глицин	4,01%
Гистидин	1,41%
Изолейцин	2,8%
Лейцин	5,86%
Лизин	5,33%
Фенилаланин	3,23%
Пролин	4,52%
Серин	2,73%
Треонин	3,55%
Тирозин	2,28%
Валин	4,55%
Кальций	1,43%
Медь	3,36 частей на миллион
Железо	28,62 частей на миллион
Калий	1,29%
Магний	0,13%
Марганец	н.о.
Натрий	1,18%
Фосфор	1,17%
Цинк	н.о.

ПРИМЕР 3: Состав гидролизата белка.

[319] Для различных процессов расщепления (кислотный или щелочной, ферментативный гидролиз или автолиз), выбора ферментов (очищенных или смесей экзогенных животных/растительных/микробных ферментов и/или эндогенных ферментов), которые имеют различную ферментативную специфичность, и параметров процесса (рН, температура и время инкубации/обработки) проводят анализ полученного

гидролизата белка, полученного из хемоавтотрофной биомассы. Осуществляют высвобождение пептидов и определяют размер пептидов, представленный в виде пептидного профиля. Определяют среднюю молекулярную массу (ММ) пептидов (Да). Измеряют отношение аминного азота к общему азоту (соотношение АА/ОА) и степень гидролиза (СГ%), а также уровни свободных аминокислот. Действие различных гидролизующих агентов сравнивают на основе СГ% и профилей распределения пептидов и аминокислот. Сравнение гидролизатов белка, полученных, как описано в настоящем документе, также проводят с обычными и/или коммерческими источниками гидролизатов белка, включая, помимо прочего, гидролизаты молочного, мясного и/или соевого белка и/или дрожжевые экстракты, полученные различными методами гидролиза, включая ферментативный, кислотный, щелочной и/или автолиз. Это сравнение проводят на основе общего профиля аминокислот, соотношений АА/ОА, а также всех других параметров и характеристик, указанных выше.

[320] Сравнение также выполняют на основе показателей роста культуры при использовании данного гидролизата белка. Эта тестовая культура может включать одну или несколько МКБ. МКБ может включать штамм *L. helveticus*. Гидролизаты белка для сравнения могут включать казитон-панкреатический перевар казеина (казитон) - пептон, полученный в результате переваривания казеина поджелудочной железой. Показатели производительности роста культуры включают количество клеток, измеренное с течением времени, и удельную скорость роста. Одним из отрицательных контролей для теста может быть основная культуральная среда без каких-либо добавок гидролизата белка. Другим отрицательным контролем может быть культуральная среда без каких-либо добавок гидролизата белка или каких-либо аминокислотных компонентов среды. Другое экспериментальное испытание и сравнение проводят между различными гидролизатами белка, включая гидролизаты, приготовленные, как описано в настоящем документе, в среде, где гидролизаты белка представляют собой единственный источник аминокислот (*m.e.* никакие другие аминокислотные компоненты не включены в среду). В дополнение к сравнениям с другими гидролизатами белка, сравнения также проводят со средами без добавок гидролизата белка, но со свободными аминокислотными композициями, такими как казаминовые кислоты, или с целыми белками, такими как казеин.

ПРИМЕР 4: Тестирование действия цельноклеточной биомассы, лизата и гидролизата на полезный гриб *Trichoderma atroviride*.

[321] *Trichoderma atroviride* — сапрофитный гриб, обитающий в ризосфере и почве в широком диапазоне температур и рН-условий почвы. Он полезен для многих различных культур благодаря своей способности противодействовать фитопатогенным грибам, включая *Rhizoctonia solani* и *Botrytis cinerea*, которые вызывают заболевания у сотен сельскохозяйственных культур, включая томаты, фасоль, огурцы, клубнику, хлопок и виноград. Он также увеличивает поглощение микроэлементов растениями и связан со стимуляцией роста корней. *Trichoderma atroviride* в основном используют в качестве микробного инокулянта в системах сельскохозяйственного земледелия.

[322] Цель этого эксперимента *in vitro* заключалась в оценке стимулирующей активности семи различных лизатов и гидролизатов белка, а также цельноклеточной биомассы (ЦКБ), полученной, как описано в настоящем документе, из биомассы *Cupriavidus necator*, выращенной автотрофно на CO₂ в качестве источника углерода с использованием H₂ в качестве донора электронов. Эти семь продуктов биомассы сравнивали с двумя коммерческими биостимуляторами; один содержит ГБ растительного происхождения, а другой - ГБ животного происхождения.

[323] Различные образцы ЦКБ, лизата и ГБ оценивали на их способность стимулировать рост *Trichoderma atroviride* AT10 в стерильном субстрате. Чистую культуру *Trichoderma atroviride* AT10 выращивали на культуральной среде с картофельно-декстрозным агаром (PDA, англ.: potato dextrose agar) в качестве контроля и на среде PDA с добавлением 3 мл/л девяти образцов ЦКБ, лизата и ГБ в течение 24 часов при 25°C в темноте.

[324] Среду PDA, обогащенную продуктами лизата и ГБ, готовили путем растворения необходимого количества каждого органического продукта в деионизированной воде. Полученные растворы фильтровали с использованием фильтра 0,25 мкм в стерильные флаконы, содержащие PDA, при 45°C. Субстраты осторожно перемешивали, а затем разливали в отдельные чашки Петри диаметром 9 см. Когда субстраты в чашках остыли и затвердели, в центр каждой чашки Петри помещали 5-мм диски мицелия *Trichoderma atroviride* AT10, взятые с края чистой культуры после 4-дневного роста, и инкубировали при 25°C. Радиальный рост мицелия измеряли через 24 часа инкубации. На одну обработку приходилось двенадцать чашек Петри. Все данные были подвергнуты статистическому анализу с помощью SPSS v. 21 (IBM Corp., Армонк, штат Нью-Йорк, США). Критерий множественных диапазонов Дункана был выполнен при P = 0,05 для каждой из измеряемых значимых переменных. В таблице 3 за средними значениями следуют стандартные ошибки. Различные буквы в каждом столбце указывают на

значительные различия в соответствии с критерием множественных диапазонов Дункана $P = 0,05$.

Таблица 3

Обработка	Радиальный рост мицелия (мм)	
Контроль	9,08	$\pm 0,19$ cd
ГБ, полученный из <i>S. necator</i>	11,00	$\pm 0,44$ a
ГБ животного происхождения	8,00	$\pm 0,44$ e
ГБ растительного происхождения	10,33	$\pm 0,56$ ab

[325] Установлено, что субстрат PDA, обогащенный органическими продуктами, может существенно влиять на радиальный рост мицелия *Trichoderma* после 24 часов инкубации. Самый высокий рост *Trichoderma* был зарегистрирован для ГБ, полученного из *S. necator* путем обработки основанием с последующей обработкой протеазой. Коммерческий биостимулятор на основе ГБ растительного происхождения имеет более низкий средний рост, но существенно не отличается. ГБ, полученный из *S. necator* путем обработки основанием с последующей обработкой протеазой, вызывал значительно больший рост, чем контроль и коммерческий биостимулятор на основе ГБ животного происхождения. Визуально после обработки *S. necator* ГБ наблюдается значительно более плотное образование спор по сравнению с контролем (Фиг. 5), при этом споры являются средством размножения и размножения *Trichoderma*.

[326] Результаты этого предварительного испытания показали, что ГБ, полученный из *S. necator* путем обработки основанием с последующей обработкой протеазой, может усиливать рост *Trichoderma in vitro*. ГБ из *S. necator* можно наносить на корневую зону сельскохозяйственных культур для стимуляции роста корней и поглощения питательных веществ, а также для увеличения популяции в почве встречающихся в природе или искусственно инокулированных видов *Trichoderma*.

ПРИМЕР 5: Тестирование добавления белковой биомассы *Cupriavidus necator* к субстрату для ферментации темпе

[327] Цель состояла в том, чтобы проверить, можно ли использовать биомассу с высоким содержанием белка из *Cupriavidus necator*, выращенного на CO_2 , в качестве

дополнения к растительному субстрату, используемому для производства темпе.

[328] Приобретена коммерческая стартовая культура *Rhizopus oryzae*.

[329] Нут замачивали на ночь в стерилизованной воде (кипяченой), а затем варили в скороварке при нормальном давлении в течение одной минуты. Приготовленный нут был достаточно нежным и мягким, чтобы его можно было прокусить. Затем нут быстро осушили, пока он еще горячий. Затем нут подсушивали, раскладывая тонким слоем на бумажном полотенце. Бобы были очищены от шелухи.

[330] Затем нут разделили на два плоских пластиковых контейнера с широким горлышком. Контейнер №1 служил контролем, куда добавляли только нут. В контейнер №2 добавляли нут вместе с высушенной цельноклеточной биомассой *Cupriavidus necator*, которая составляла 10% от исходной массы нута.

[331] В оба контейнера постепенно добавляли уксус и хорошо перемешивали, чтобы довести исходный pH до 3,5.

[332] Субстрат посыпали 1 чайной ложкой стартовой культуры *Rhizopus oryzae* на фунт сухой массы приготовленных бобов. Затем нут + культуру хорошо перемешивали шпателем так, чтобы культура равномерно прилипла ко всему субстрату.

[333] Оба пластиковых контейнера с широким горлышком (*m. e.* контрольный образец нута и экспериментальный нут + *C. necator*) имели крышку с отверстиями, пробитыми на расстоянии 0,3–0,5 дюйма друг от друга, и крышка неплотно удерживалась сверху. Контейнеры переносили в инкубатор при 30,5°C и инкубировали в течение 48-72 часов.

[334] Рост белого мицелия *R. oryzae* начинался через 20-24 часа инкубации, после чего ферментационный субстрат переносили из инкубатора в комнатную температуру. Полный рост мицелия *R. oryzae* наблюдался через 48-72 часа.

[335] Было замечено, что *R. oryzae* одинаково хорошо растет с равномерным ростом белого мицелия на нуте с добавлением или без добавления биомассы *C. necator*. Таким образом, темпе можно дополнить белком и другими питательными веществами (*например*, витаминами группы B), обеспечиваемыми *C. necator*.

[336] Дальнейший анализ проводится для изучения любых композиционных или питательных различий между темпе с добавками и без добавок.

[337] Аналогичные эксперименты могут быть проведены для тестирования других штаммов съедобных грибов, используемых для производства темпе или других ферментированных продуктов, таких как мисо или соевый соус, таких как *Aspergillus oryzae* (NRRL 3485), *Rhizopus oligosporus* (NRRL 2710) и *Rhizopus oryzae* (NRRL 3613). Также можно протестировать дополнительные субстраты для ферментации, такие как

белый рис, ячмень, бобы мунг, мука из окары и соевые бобы.

ПРИМЕР 6: Анализ роста молочнокислых бактерий на гидролизатах белка и изолятах белка

[338] Молочнокислые бактерии (МКБ) GRAS тестируются на питательных веществах, полученных из белковой биомассы *Cupriavidus necator*, полученной из CO₂. Подлежащие анализу питательные вещества белкового происхождения включают: щелочной гидролизат белка (ГБ), полученный путем обработки основанием NH₄OH с последующей нейтрализацией CO₂ и ферментативным гидролизом с использованием бактериальной щелочной протеазы (БЩФ); кислый гидролизат белка, полученный кислотной обработкой H₃PO₄ с последующей нейтрализацией Ca(OH)₂ и затем ферментативным гидролизом БЩФ; и изолят белка (ИБ), полученный обработкой биомассы ультразвуком с последующим центрифугированием, удалением осадка, выделением и сушкой богатого белком супернатанта.

[339] Эти и другие продукты, полученные из белков, тестируют на штаммах молочнокислых бактерий, включая, помимо прочего, *S. Thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *L. Acidophilus* и *Bifidobacterium lactis*. Штаммы МКБ будут тестировать индивидуально, а также в совместных культурах, смешанных культурах и консорциумах. Среда для выращивания, используемая в контроле, представляет собой обычное коровье молоко в одном типе контроля и бульон Элликера (Sigma № 17123) в другом типе контроля. Состав бульона Элликера: 0,5 г/л аскорбиновой кислоты; 20 г/л ферментативного гидролизата казеина; 5 г/л декстрозы; 2,5 г/л желатина; 5 г/л лактозы; 5 г/л сахарозы; 1,5 г/л ацетата натрия; 4 г/л хлорида натрия; 5 г/л дрожжевого экстракта.

[340] Случай-контроль йогурта из молока производят следующим образом: 1-2 литра пастеризованного цельного молока нагревают до 180°F, а затем охлаждают до 115°F. Молоко наливают в стеклянную емкость и добавляют один пакет коммерческой стартовой культуры для йогурта, включающей *S. Thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *L. acidophilus* и *Bifidobacterium lactis* и тщательно перемешивают. Затем молочную культуру накрывают и инкубируют при температуре 105-112°F в течение приблизительно 8 часов в мультиварке в режиме йогурта. Культуру проверяют, осторожно наклоняя банку. Когда йогурт отходит от стенок банки одной массой, а не поднимается вверх по стенкам, культивирование завершено. Как только йогурт застынет, его накрывают и дают остыть в течение 2 часов при комнатной температуре, а затем охлаждают.

[341] Случай-контроль роста МКБ на бульоне Элликера выглядит следующим образом: суспендируйте 48,5 граммов бульона Элликера в одном литре дистиллированной воды. Перемешивают и кипятят до полного растворения среды, а затем стерилизуют автоклавированием при 121°C в течение 15 минут. Раствор среды имеет цвет от светло-янтарного до средне-янтарного и имеет рН от 6,6 до 7. Охладите раствор до 115°F и инокулируйте один пакет культуры коммерческой стартовой культуры для йогурта, включающей *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *L. acidophilus* и *Bifidobacterium lactis*, на 1-2 литра среды. Затем среду накрывают и культивируют при температуре 105-112°F в течение приблизительно от 24 до 48 часов. Оптическую плотность при 600 нм (OD₆₀₀) культуры МКБ в бульоне Элликера будут контролировать с течением времени.

[342] Один эксперимент, который тестируется в сравнении с контрольным молоком, включает смешивание ГБ или ИБ, полученного из *C. necator*, с молоком в соотношении 1:1 азота (N) *C. necator* к азоту молока, а затем проведение тех же этапов ферментации йогурта, которые описаны выше.

[343] Другой эксперимент, который проверяют в сравнении с контрольным бульоном Элликера, включает замену ферментативного гидролизата казеина в бульоне Элликера на количество тестируемого субстрата (ГБ/ИБ), обеспечивающее такое же содержание азота в бульоне, как и ферментативный гидролизат казеина с концентрацией 20 г/л. Остальная часть состава среды остается прежней. Показатели роста МКБ на экспериментальном бульоне сравнивают с контрольным бульоном Элликера с точки зрения скорости роста и конечного титра. Аналогичные эксперименты включают замену как ферментативного гидролизата казеина, так и желатина в бульоне Элликера на экспериментальные ГБ и/или ИБ на основе равного количества азота; и замену ферментативного гидролизата казеина, желатина и дрожжевого экстракта в бульоне Элликера на ферментативный гидролизат казеина и желатин, замененные на основе равного количества азота, и дрожжевой экстракт, замененный на основе равного количества витамина В или нуклеотида.

ПРИМЕР 7: Анализ влияния гидролизата белка на жизнеспособность клеток и другие показатели эффективности.

[344] Осуществляют воздействие лизата и/или гидролизата белка, приготовленного, как описано в настоящем документе, из CO₂ в качестве единственного источника углерода, входящего в производственный процесс, на культуру клеток, которая снабжена лизатом

и/или гидролизатом белка. Определяют влияние на жизнеспособность штамма ЛА добавления 2% (масс./об.) кислотного гидролизата белков, полученного, как описано в настоящем документе, к молочному субстрату. Жизнеспособность штамма ЛА через 12 недель в пересчете на колониеобразующие единицы (КОЕ)/грамм определяют как для опытов, так и для контролей. Отрицательным контролем может быть только молочный субстрат. Положительный контроль может включать добавление 2% кислотного гидролизата казеина (КГК) и цистеина. Другие контроли, положительные и отрицательные, могут включать добавление только цистеина, только КГК, сухой сыворотки (СС), концентрата сывороточного белка (КСБ), триптона (триптический гидролизат казеина), гидролизатов соевого белка, включая, помимо прочего, коммерческие соевые ГБ, такие как NZ Soy-BL, Ну-soy и Amisoy, или цельный соевый белок. Другие штаммы, в том числе *S. thermophilus* и *Bifidobacteria sp.*, проверяют на жизнеспособность, а также другие показатели эффективности. В дополнение к жизнеспособности клеток или вместо нее другие показатели культуры, которые измеряют, тестируют и сравнивают, включают удельную скорость роста, время ферментации, необходимое для достижения рН 4,50, и титр молочной кислоты (г/л).

ПРИМЕР 8: Оценка роста и продукции кислоты для пробиотического штамма, выращенного с использованием гидролизата белка.

[345] Рост и продукцию кислоты штаммом *B. lactis* оценивают с использованием среды, дополненной одним или несколькими гидролизатами белка, полученными, как описано в настоящем документе. Положительный контроль для сравнения может включать овечье и козье молоко в качестве среды с добавлением гидролизата молочного белка (ГМБ), приготовленного с использованием коммерческой протеазы (*например*, протеазы 2A *Aspergillus sp.* Amano Pharmaceutical, Nagoya, Japan) (Gomes and Malcata 1998). Свободные аминокислоты из различных источников, включая свободную аминокислоту, полученную, как описано в настоящем документе (*например*, посредством хемоавтотрофной конверсии CO₂), также можно использовать в качестве добавки для обогащения азотом в экспериментальных и контрольных случаях. Концентраты свободных аминокислот вносят в культуральную среду в пропорции 25–50 мл/л. Измеряют и сравнивают жизнеспособные количества *B. lactis* в экспериментальных и контрольных образцах.

ПРИМЕР 9: Оценка продукции стартовой культуры с использованием

гидролизата белка и/или белка.

[346] *P. pentosaceus* выращивают на субстрате. Положительные контроли сравнивают с белками и/или гидролизатами белков, полученными, как описано в данном документе, в качестве источников азота для получения *P. pentosaceus*, включая: казеиновый пептон (гидролизированный казеин); приматон (гидролизированные мясные белки) и/или дрожжевую пасту. Измеряют показатели производительности, включая время ферментации и/или выход биомассы. Определяют оптимальное соотношение азот/углерод (N/C).

[347] Эффекты различной цельноклеточной биомассы, лизата и цельных белков, полученных, как описано в настоящем документе, сравнивают с различными высушенными и замороженными мясными бульонами (1-5%) в качестве стимуляторов роста *Pediococcus acidilactici*.

ПРИМЕР 10: Оценка эффективности роста различных клеточных линий на библиотеке лизатов, гидролизатов, пептидных композиций и/или аминокислотных композиций.

[348] Библиотеку множества лизатов, гидролизатов, пептидных композиций и/или аминокислотных композиций, полученных с использованием различного сырья и способов, как описано в настоящем документе, оценивают с помощью анализа состава и в соответствии с показателями роста различных модельных типов клеток на средах, содержащих элементы библиотеки.

[349] Композиционный анализ и характеристика лизатов, гидролизатов, пептидных композиций и/или аминокислотных композиций включает: % α -аминного азота (АА); % общего азота (ОА); соотношение (АА/ОА); свободные аминокислоты (% от общего количества аминокислот); диапазоны размеров пептидов, например 100-200 Да (%); 200-500 Да (%); 500-1000 Да (%); > 1000 Да (%); среднюю ММ; пепел (%); влага (%); рН; натрий (%); калий (%); кальций (мг/г); магний (мг/г); хлорид (мг/г); сульфат (мг/г); фосфат (мг/г); содержание аминокислот, т.е. аланин (мг/г), аргинин (мг/г), аспарагиновая кислота (мг/г), цистеин (мг/г), глутаминовая кислота (мг/г), глицин (мг/г), гистидин (мг/г), изолейцин (мг/г), лейцин (мг/г), лизин (мг/г), метионин (мг/г), фенилаланин (мг/г), пролин (мг/г), серин (мг/г), треонин (мг/г), триптофан (мг/г), тирозин (мг/г), валин (мг/г) и общее количество аминокислот (мг/г).

[350] Пролиферацию типов клеток тестируют на среде с добавлением одного или нескольких лизатов, гидролизатов, пептидных композиций и/или аминокислотных

композиций, полученных, как описано в данном документе. Три модельных типа клеток, которые можно использовать в таком анализе роста: клетки High Five™, полученные из совки ни, и клетки Sf9 и Sf21, полученные из кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*). Каждую клеточную линию культивируют в бессывороточной среде, дополненной (*например*, в концентрации 0,6% масс./об.) тестируемым лизатом, гидролизатом, пептидной композицией и/или аминокислотной композицией перед количественной оценкой эффективности. Рост на дополненной среде сравнивают с ростом на стандартной среде для каждого соответствующего типа клеток.

ПРИМЕР 11: Состав сред для культивирования клеток, не содержащих белков животного происхождения.

[351] Лизаты, гидролизаты, пептидные композиции и/или аминокислотные композиции, полученные, как описано в данном документе, исследуют в качестве добавок к основной среде. Композиции титруют в основную среду. Рост клеток в каждой дополненной среде сравнивают с соответствующей средой без добавок (отрицательный контроль) или средой с добавлением ФБС (положительный контроль). Рост оценивают по среднему количеству клеток на 25 см² колбу по трем субкультурам. Клеточная линия, выращенная на экспериментальной и контрольной средах, может представлять собой клетки Vero (почки африканской зеленой обезьяны). Рост клеток Vero исследуют в прототипе бессывороточного состава, дополненного различными источниками гидролизатов, и сравнивают рост после трех адаптивных пассажей относительно эталонной среды E-MEM с добавлением 5% (об./об.) ФБС. Каждый лизат, гидролизат, пептидную композицию и аминокислотную композицию добавляют в среду в количестве 200 мг/л. Сравнение проводят по среднему количеству клеток по сравнению с эталонными материалами с добавлением ФБС.

[352] Также исследуют сравнительный выход целевых модельных вирусов, полученных из культур клеток Vero, поддерживаемых и инфицированных либо в бессывороточные гидролизаты белка, полученные, как описано в настоящем документе, либо в контроли с добавлением сыворотки. Титры вируса Синдбис, полиовируса 1, вируса псевдобешенства и реовируса, продуцируемые клетками VERO, выращенными в бессывороточной среде, дополненной гидролизатом белка, полученным, как описано в настоящем документе, сравнивают с продукцией вируса клетками VERO, выращенными в E-MEM с 2% сыворотки в качестве контроля. Сравнение производят на основе бляшкообразующих единиц (БОЕ).

[353] Рост клеток MDCK (Мадин-Дарби почек собаки) и продукция собачьего аденовируса или вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (IBR, англ.: infectious bovine rhinotracheitis) в бессывороточной среде с добавлением гидролизата белка, полученного, как описано в настоящем документе, сравнивают с ростом и продукцией на E-MEM плюс 5% ФБС. Рост клеток РК-15 (свиной почки) и продукцию вируса псевдобешенства в бессывороточной среде с добавлением гидролизата белка, полученного, как описано в настоящем документе, сравнивают с ростом и продукцией в тестовой среде E-MEM плюс 5% ФБС. Сравнение проводят на основе подсчета клеток и 50% инфекционной дозы тканевой культуры (TCID₅₀).

ПРИМЕР 12: Продукция рекомбинантного белка клетками СНО.

[354] Сравнительный эксперимент по росту рекомбинантных клеток СНО проводят в бессывороточной среде с добавлением гидролизата белка, полученного, как описано в настоящем документе, по сравнению с ростом и продукцией в контрольной сыворотке. Рост сравнивают с точки зрения пиковой плотности клеток и устойчивой жизнеспособности клеток. Сравняют удельные уровни продукции белка и объемная продуктивность.

ПРИМЕР 13: Пептидные добавки протестированы на модельных клетках.

[355] Активность пептидной добавки, полученной, как описано в настоящем документе, тестируют на модельной мышинной гибридоме ME-750, продуцирующей антитело IgG2a. Безбелковая культуральная среда представляет собой DMEM/F12/RPMI 1640 (3:1:1) с добавлением 0,4 мМ HEPES и 2,0 г/л бикарбоната натрия (Franeek, et al., 1992). Контроль дополнительно дополняют аминокислотами базальной среды Игла (BME, англ.: Basal Medium Eagle), 2,0 мМ глутамина, аминокислотами, способствующими выживанию (Franeek and Šrámková, 1996a), и богатой железом стимулирующей рост смесью, содержащей 0,4 мМ цитрата железа (Franeek, et al., 1992, *supra*). В экспериментах, сравниваемых с контролем, заменяют одну или несколько из следующих добавок: аминокислоты базальной среды Игла (BME), 2,0 мМ глутамина, аминокислот, способствующих выживанию (Franeek and Šrámková, 1996a, см. *выше*), и/или богатой железом стимулирующей рост смеси, содержащей 0,4 мМ цитрата железа (Franeek, et al., 1992, см. *выше*) на лизат, гидролизат белка, пептидную композицию и/или аминокислотную композицию, полученные, как описано в настоящем документе. В другом эксперименте, который сравнивают с контролем, используют полную среду,

включающую добавки, предоставленные для контроля, как указано выше, а затем дополнительно добавляют в эту среду лизат, гидролизат белка, пептидную композицию и/или аминокислотную композицию, полученные, как описано в настоящем документе. Концентрация лизата, гидролизата белка, пептидной композиции и/или аминокислотной композиции при инокуляции составляет 0,1%, 0,2% или 0,3% (масс./об.).

[356] В другом наборе экспериментов тестируют периодические культуры с подпиткой. В контроле ежедневно добавляли 0,25 мл питательной смеси, включающей DMEM, обогащенную 10-кратным количеством аминокислот BME, 10-кратным количеством витаминов BME и 20 мМ глутамина. В экспериментах, сравниваемых с контролем, заменяют одну или несколько из следующих добавок: 10-кратное количество аминокислот BME; 10-кратное количество витаминов BME; и/или 20 мМ глутамина на лизат, гидролизат белка, пептидную композицию и/или аминокислотную композицию, полученные, как описано в настоящем документе

[357] Как периодические культуры, так и периодически культуры с подпиткой выращивают в Т-колбах 25 см² при 37°C во увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Объем культуры составляет 6,0 мл.

[358] Концентрации моноклональных антител определяют с помощью иммунотурбидиметрии с использованием калибровочной кривой. Количество апоптотических клеток в культурах определяют путем микроскопического подсчета клеток, демонстрирующих апоптотическую морфологию - сморщенные клетки с гофрированными мембранами. Соотношение фаз клеточного цикла определяют по пермеабилитации и окрашиванию йодидом пропидия.

[359] Эксперименты с периодической культурой и периодической культурой с подпиткой сравнивают с соответствующими контролями на основе: жизнеспособных клеток/мл; жизнеспособности культуры (%); концентрации моноклонального антитела (мг/л). Сравнение проводят по значению этих параметров через шесть дней после инокуляции.

ПРИМЕР 14: Получение масел с омега-7 из CO₂ в двухстадийном процессе с использованием как промежуточного продукта гидролизата белка

[360] На первой стадии процесса белок и/или полигидроксибутират (ПГБ) получают на CO₂ и H₂ с использованием *Cupriavidus necator*. На второй стадии микроорганизм, продуцирующий омега-7, *Rhodococcus opacus*, выращивают на гидролизованном белке

и/или ПГБ, полученном на первой стадии, и из биомассы *Rhodococcus opacus* экстрагируют масло.

[361] Исследование было сосредоточено на второй стадии процесса с использованием тестовых субстратов, которые, как известно, аналогичны тем, которые могут быть получены из биомассы *Cupriavidus necator* путем гидролиза, чтобы продемонстрировать способность *Rhodococcus opacus* продуцировать масло, содержащее омега-7. Для предварительного скрининга были выбраны различные репрезентативные субстраты. Триптон сам по себе или в сочетании с гидроксibuтиратом давал наивысший титр *Rhodococcus opacus*. Триптон, служивший заменителем ГБ, полученного из *C. necator* с использованием гидролиза трипсином, был выбран для получения масла.

[362] *Rhodococcus opacus* выращивали в 300-литровом биореакторе на триптоне в качестве источника углерода и азота и получали 560 граммов высушенной биомассы. Фракция омега-7 от общих липидов, исходя из анализа аликвоты биомассы перед сушкой, составила 15,7% (включая 4% пальмитолеиновой и 9% вакценовой кислот). Общее содержание липидов в биомассе составляло 19%, с 9-10% нейтральных липидов. Масло из биомассы экстрагировали смесью растворителей. Этот процесс разделит нейтральные и полярные липиды. Было экстрагировано около 100 мл масла.

ПРИМЕР 15: Гидролизаты белка из хемоавтотрофных источников, замещающие триптон в микробиологических средах

[363] Оценивают ряд гидролизатов белка, полученных из хемоавтотрофных источников (*например*, полученных из белков, биосинтезированных из источников углерода C1, таких как CO₂, CO и/или CH₄). Триптон в бульоне Лурия-Бертани (ЛБ) заменен равным количеством этих чередующихся гидролизатов белка (ГБ). Замену триптона, присутствующего в ЛБ-среде с различными значениями pH, оценивают по скорости роста и выходу рекомбинантного штамма *Escherichia coli*. Кроме того, оценивают стабильность плазмиды, индуцируемость и активность кодируемой плазмидой \square -галактозидазы в рекомбинантном штамме, выращенном в присутствии различных гидролизатов белка.

Бактериальный штамм

[364] Используемый штамм представляет собой *Escherichia coli* ATCC 39114, несущий плазмиду POP(UV-5)-3. Эта плаزمида содержит ген *lacZ* и экспрессирует \square -галактозидазу на очень высоком уровне (до 15% общего клеточного белка).

Среда

[365] Для рутинного выращивания культуры используют агар ЛБ и бульон ЛБ. Среда ЛБ содержит 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта и 10 г хлорида натрия на л дистиллированной воды.

[366] Культуру хранят в глицеризированном бульоне ЛБ при -80°C . Тетрациклин применяют в концентрации 20 мкг/мл. ИПТГ (изопропил- β -D-тиогалактопиранозид) используют в концентрации 0,5 мМ.

[367] Различные гидролизаты белка заменяют триптон в среде ЛБ. Концентрация каждого применяемого гидролизата белка составляет 10 г/л (масс./об.).

Исследования роста

[368] Посевные культуры выращивают в аэробных условиях в 5 мл ЛБ-бульона, находящегося в пробирках при 37°C . 1% инокулята используют для инокуляции 20 мл среды, содержащейся в колбах с боковым отводом на 500 мл, и выращивания при перемешивании со скоростью 250 об/мин при 37°C . Рост измеряют по оптической плотности при 600 нм.

Анализ β -галактозидазы

[369] Одиночную колонию культуры инокулируют в 5 мл каждой соответствующей среды (экспериментальные ГБ и положительный контроль ЛБ), содержащей тетрациклин (20 мкг/мл), содержащейся в пробирках, и инкубируют при 250 об/мин при 37°C . Через 8-12 ч 1% инокулят переносят в 5 мл свежей среды того же состава и выращивают в аэробных условиях при встряхивании в течение ночи. После выращивания в течение ночи 1% инокулята переносят в 20 мл свежей среды, содержащейся в колбе Эрленмейера на 125 мл, и продолжают выращивать до тех пор, пока не будут достигнуты оптические плотности 0,35 и 0,7 единиц, соответственно. β -галактозидазу индуцируют добавлением ИПТГ в конечной концентрации 0,5 мМ. Культуру индуцируют в течение 30 мин при 37°C при встряхивании при 250 об/мин. Клетки, выращенные, как описано выше, анализируют на активность β -галактозидазы и рассчитывают единицы, как описано в Miller (1992).

Стабильность плазмиды

[370] Для определения стабильности плазмиды на различных средах одиночную колонию культуры инокулируют в 5 мл ЛБ-бульона, находящегося в пробирках, и инкубируют при 250 об/мин и 37°C . После выращивания в течение ночи 1% инокулята переносят в 20 мл различных сред (экспериментальная среда с ГБ и контроль ЛБ), содержащихся в колбах Эрленмейера на 125 мл, и выращивают при 250 об/мин и 37°C . Культуру выращивают до OD 1,4. Отбирают образцы (100 мкл), разбавляют и высевают

на различные среды в присутствии и в отсутствие тетрациклина. Чашки инкубируют при 37°C в течение 12 ч и подсчитывают колонии.

Свойства гидролизатов белка

[371] Химические свойства гидролизатов, такие как содержание белка (%), общий аминокислотный состав и профиль, общий азот (ОА) (%), аминный азот (АА) (%), отношение аминного азота к общему азоту АА/ОА, рН, зольность (%) и содержание влаги (%) измеряют для экспериментальной среды и контроля ЛБ. Определены процентное содержание и абсолютный аминокислотный состав Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr и Val в различных средах.

[372] Настоящее изобретение не ограничивается в своем применении деталями конструкции и расположением компонентов, изложенными в описании. Варианты осуществления настоящего изобретения можно применять на практике или выполнять различными способами. Также используемая в данном документе фразеология и терминология применяется только для описания и не должна восприниматься как ограничивающая. Подразумевается, что использование в данном документе терминов «включающий», «содержащий» или «имеющий», «привлекающий» и их вариаций включает элементы, перечисляемые после них, и их эквиваленты, а также дополнительные элементы.

[373] Хотя вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно посредством иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, специалистам в данной области техники будет очевидно, что некоторые изменения и модификации могут быть реализованы на практике без отклонения от сущности и объема изобретения, которое описано в прилагаемой формуле изобретения. Следовательно, описание не следует рассматривать как ограничивающее объем изобретения.

[374] Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в настоящем документе, настоящим полностью включены в качестве ссылки для всех целей и в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и отдельно указаны как включенные в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения культуральной среды для культивирования микроорганизмов или клеток, включающий:

культивирование первого микроорганизма с получением таким образом биомассы;

обработку биомассы, полученной от первого культивируемого микроорганизма, с получением композиции гидролизата белка; и

добавление композиции гидролизата белка в культуральную среду для второй культуры, содержащей второй микроорганизм или клетки, при этом композиция гидролизата белка служит источником питательных веществ для роста второго микроорганизма или клеток.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что обработка включает обработку биомассы одним или несколькими из повышенной температуры, повышенного давления и протеазы.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что обработка включает повышение рН суспензии, содержащей биомассу.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что обработка включает снижение рН суспензии, содержащей биомассу.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что композиция гидролизата белка содержит полигидроксиалканоат (ПГА).

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что ПГА содержит полигидроксибутират (ПГБ).

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что композиция гидролизата белка содержит витамин.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что витамин включает один или более из витамина В₁, витамина В₂ и витамина В₁₂.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что общее органическое содержание композиции гидролизата белка обогащено белками, пептидами и/или аминокислотами.
10. Способ по п. 1, в котором указанная вторая культура содержит клетки животных.
11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что культуральная среда для клеток животных представляет собой бессывороточную культуральную среду.
12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что культуральная среда для клеток животных представляет собой культуральную среду, не содержащую компонентов животного происхождения.
13. Способ по п. 10, отличающийся тем, что композиция гидролизата белка служит добавкой для культивирования рекомбинантных клеток животных.
14. Способ по п. 10, отличающийся тем, что композиция гидролизата белка служит добавкой для выращивания мяса.
15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что первый микроорганизм представляет собой хемоавтотрофный микроорганизм, и при этом культивирование первого микроорганизма включает культивирование хемоавтотрофного микроорганизма в автотрофных условиях.
16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что автотрофные условия включают предоставление газообразного субстрата для выращивания хемоавтотрофного микроорганизма.
17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что газообразный субстрат содержит один или несколько из CO_2 , CO и CH_4 в качестве источника углерода.
18. Способ по п. 16 или п. 17, отличающийся тем, что газообразный субстрат содержит один или несколько из H_2 , CO и CH_4 в качестве донора электронов.

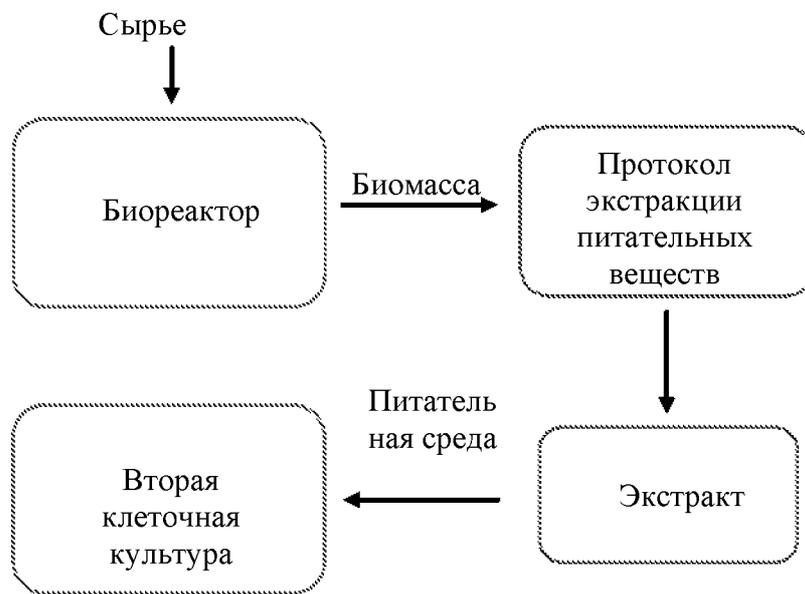
19. Способ по п. 16, отличающийся тем, что газообразный субстрат содержит пиролизный газ, генераторный газ, синтез-газ, природный газ или биогаз.
20. Способ по п. 15, отличающийся тем, что хемоавтотрофный микроорганизм представляет собой водородокисляющий (knallgas) микроорганизм.
21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что хемоавтотрофный микроорганизм выбран из одного или нескольких из: *Aquifex* sp.; *Cupriavidus* sp.; *Corynebacterium* sp.; *Gordonia* sp.; *Nocardia* sp.; *Rhodopseudomonas* sp.; *Rhodobacter* sp.; *Rhodospirillum* sp.; *Rhodococcus* sp.; *Rhizobium* sp.; *Thiocapsa* sp.; *Pseudomonas* sp.; *Hydrogenomonas* sp.; *Hydrogenobacter* sp.; *Hydrogenophilus* sp.; *Hydrogenovibrio* sp.; *Hydrogenothermus* sp.; *Helicobacter* sp.; *Xanthobacter* sp.; *Hydrogenophaga* sp.; *Bradyrhizobium* sp.; *Ralstonia* sp.; *Alcaligenes* sp.; *Amycolata* sp.; *Aquaspirillum* sp.; *Arthrobacter* sp.; *Azospirillum* sp.; *Variovorax* sp.; *Acidovorax* sp.; *Bacillus* sp.; *Calderobactenum* sp.; *Derxia* sp.; *Flavobacterium* sp.; *Microcycilus* sp.; *Mycobacterium* sp.; *Paracoccus* sp.; *Persephonella* sp.; *Renobacter* sp.; *Seliberia* sp.; *Streptomyces* sp.; *Thermocrinis* sp.; *Wautersia* sp.; *Anabaena* sp.; *Arthrospira* sp.; *Scenedesmus* sp.; *Chlamydomonas* sp.; *Ankistrodesmus* sp.; и *Rhaphidium* sp.
22. Способ по п. 15, отличающийся тем, что хемоавтотрофный микроорганизм является генетически модифицированным.
23. Добавка к среде для культивирования клеток, содержащая композицию гидролизата белка, полученную из микроорганизма.
24. Добавка к среде по п. 23, отличающаяся тем, что микроорганизм представляет собой хемоавтотрофный микроорганизм.
25. Добавка к среде по п. 23, отличающаяся тем, что композиция гидролизата белка содержит витамин.
26. Добавка к среде по п. 25, отличающийся тем, что витамин включает один или более из витамина В₁, витамина В₂ и витамина В₁₂.

27. Добавка к среде по п. 23, отличающаяся тем, что композиция гидролизата белка содержит ФГА.
28. Добавка к среде по п. 27, отличающийся тем, что ФГА представляет собой ПГБ.
29. Добавка к среде по п. 23, отличающаяся тем, что общее органическое содержание добавки обогащено белками, пептидами и/или аминокислотами.
30. Способ культивирования клеток животных, включающий:
добавление добавки к среде по любому из пп. 23-29 в бессывороточную культуральную среду; и
культивирование клеток животных в бессывороточной культуральной среде.
31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что бессывороточная культуральная среда представляет собой культуральную среду, не содержащую компонентов животного происхождения.
32. Способ по п. 30, отличающийся тем, что культуральная среда содержит композицию гидролизата белка растительного происхождения и/или из дрожжей.
33. Способ по п. 30, отличающийся тем, что клетки животных включают рекомбинантные клетки.
34. Способ по п. 30, отличающийся тем, что клетки животных включают стволовые клетки.
35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что клетки животных включают миобласты и/или миоциты.
36. Способ по п. 30, отличающийся тем, что клетки животных включают адипоциты и/или фибробласты.
37. Способ по п. 30, отличающийся тем, что культивирование включает приведение клеток животных в контакт с биоразлагаемым и/или пригодным к употреблению

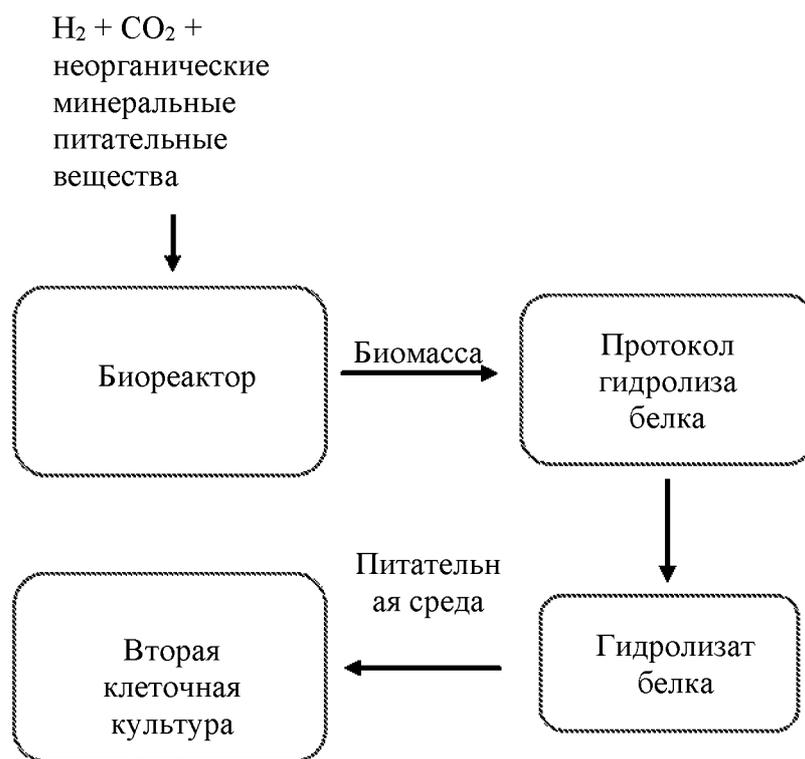
каркасом в условиях, достаточных для роста клеток на каркасе.

38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что каркас содержит полимер ПГА.
39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что полимер ПГА содержит ПГБ.
40. Способ по п. 38 или п. 39, отличающийся тем, что полимер ПГА получают из хемоавтотрофного микроорганизма.
41. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанная композиция гидролизата белка служит добавкой для роста и/или дифференцировки клеток животных.
42. Добавка к среде по п. 23, где добавка приготовлена для применения в качестве добавки к среде для культуры клеток животных.

ФИГ. 1



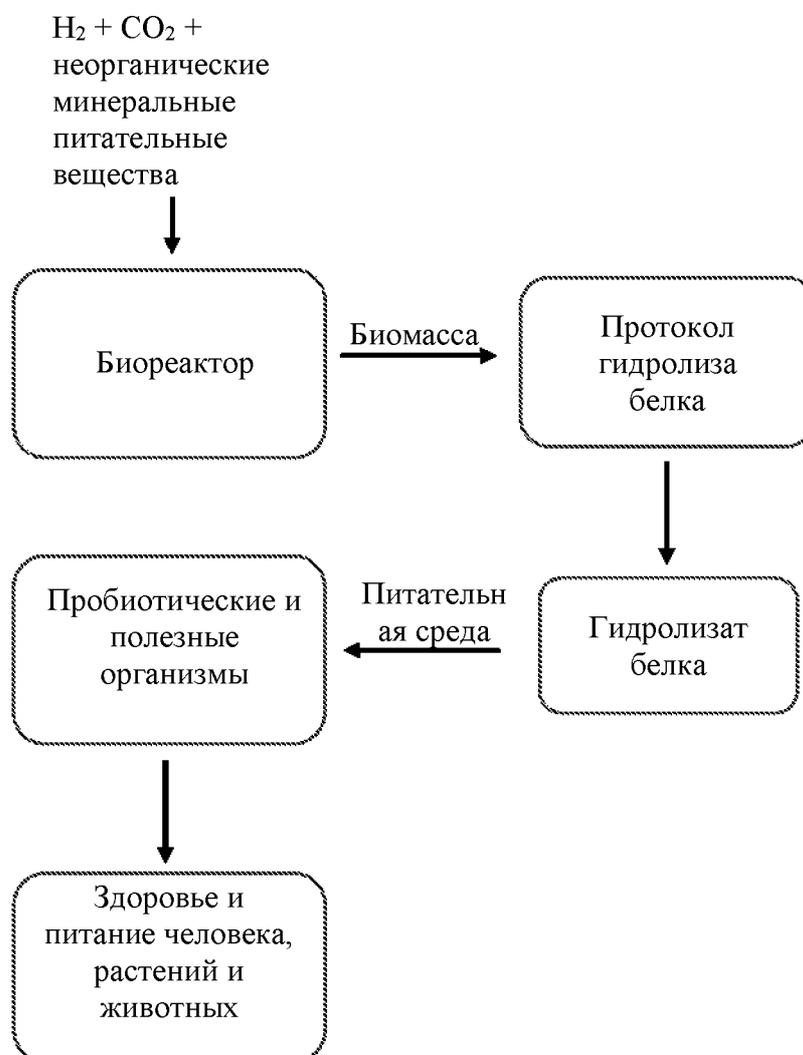
ФИГ. 2



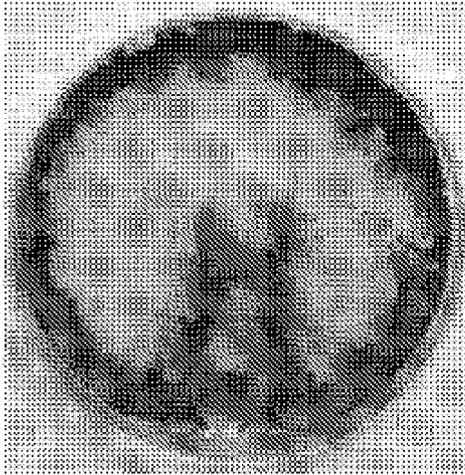
ФИГ. 3



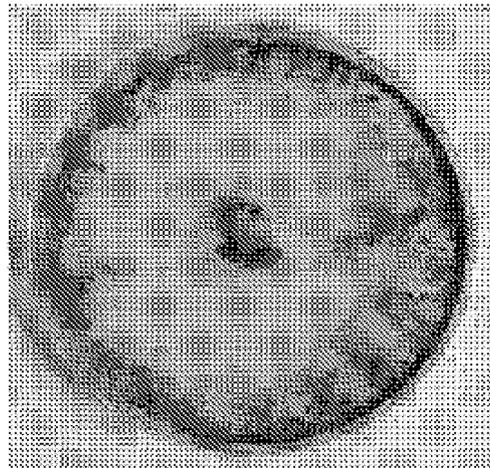
ФИГ. 4



ФИГ. 5



Культура *Trichoderma atroviride* с обработкой гидролизатом белка



Контроль роста культуры *Trichoderma atroviride*