



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I860980 B

(45) 公告日：中華民國 113 (2024) 年 11 月 11 日

(21) 申請案號：107130371

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 08 月 30 日

(51) Int. Cl. :            *A23L31/00*    (2016.01)            *A23L29/00*    (2016.01)  
                               *A23J3/22*    (2006.01)            *C12N1/14*    (2006.01)  
                               *C12M1/04*    (2006.01)

(30) 優先權：2017/08/30      美國                            62/552,093  
                               2018/08/23      美國                            62/722,074

(71) 申請人：美商芬德集團公司 (美國) THE FYNDER GROUP, INC. (US)  
                               美國伊利諾州芝加哥市西柏欣路 815 號 4 室

(72) 發明人：科左貝爾 馬克 A KOZUBAL, MARK A. (US)；馬可爾 理查德 E MACUR,  
                               RICHARD E. (US)；艾維尼爾 兩維爾 C AVNIEL, YUVAL C. (US)；漢彌爾頓  
                               麥錫彌李安 達文 HAMILTON, MAXIMILIAN DEVANE (US)

(74) 代理人：陳長文

(83) 生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC930188 2017 年 06 月 20 日

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：39 項      圖式數：23      共 77 頁

(54) 名稱

可食用食品及生物反應器設計

(57) 摘要

本發明提供產生可食用絲狀真菌生物墊調配物之方法作為食品中之獨立蛋白質源及/或蛋白質成分以及自給自足的生物膜-生物墊反應器之單次使用或重複使用，該自給自足的生物膜-生物墊反應器包含具有至少一個隔室之容器及置放於該(該等)隔室內之原料、真菌接種物、透氣膜及視需要的液體營養培養基。

Methods of production of edible filamentous fungal biomat formulations are provided as standalone protein sources and/or protein ingredients in foodstuffs as well as a one-time use or repeated use self-contained biofilm-biomat reactor comprising a container with at least one compartment and placed within the compartment(s), a feedstock, a fungal inoculum, a gas- permeable membrane, and optionally a liquid nutrient medium.

指定代表圖：

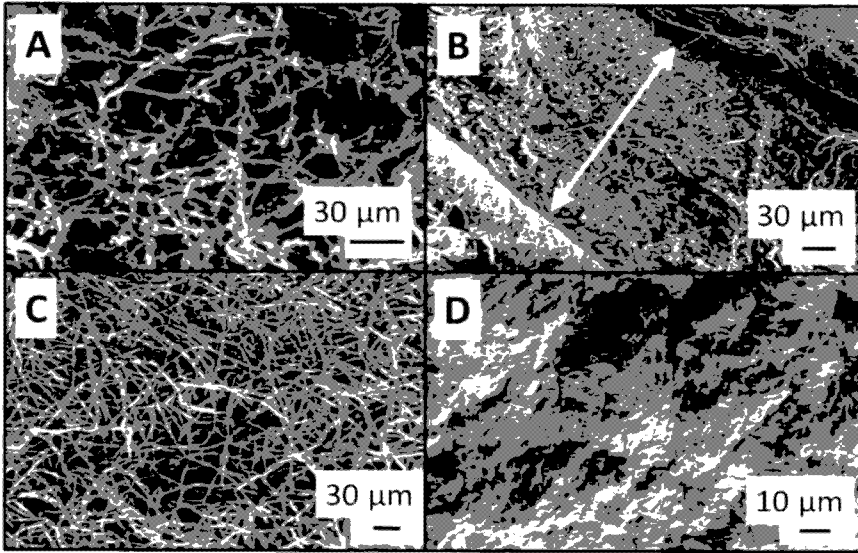


圖9

【發明摘要】

【中文發明名稱】 可食用食品及生物反應器設計

【英文發明名稱】 EDIBLE FOODSTUFFS AND BIO REACTOR DESIGN

【中文】

本發明提供產生可食用絲狀真菌生物墊調配物之方法作為食品中之獨立蛋白質源及/或蛋白質成分以及自給自足的生物膜-生物墊反應器之單次使用或重複使用，該自給自足的生物膜-生物墊反應器包含具有至少一個隔室之容器及置放於該（該等）隔室內之原料、真菌接種物、透氣膜及視需要的液體營養培養基。

【英文】

Methods of production of edible filamentous fungal biomat formulations are provided as standalone protein sources and/or protein ingredients in foodstuffs as well as a one-time use or repeated use self-contained biofilm-biomat reactor comprising a container with at least one compartment and placed within the compartment(s), a feedstock, a fungal inoculum, a gas- permeable membrane, and optionally a liquid nutrient medium.

【指定代表圖】 圖9

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

**【發明說明書】**

**【中文發明名稱】** 可食用食品及生物反應器設計

**【英文發明名稱】** EDIBLE FOODSTUFFS AND BIO REACTOR DESIGN

**【技術領域】**

**【0001】** 本申請案係關於可食用真菌且提供製備用於食品中之可食用真菌、可食用真菌之液體及固體調配物之方法，以及與其相關的用途及方法、含有可食用真菌之食品及其方法及用途。

**【先前技術】**

**【0002】** 聯合國在2017年8月列出世界人口為75億且預測該數字在2023年增長至80億且在2056年增長至100億。在相關報導中，聯合國糧農組織（Food and Agricultural Organization of the United Nations, FAO）估計，若截至2050年全球人口達到91億，則世界食物產量將需要提高70%且在發展中國家世界加倍。儘管能源成本不斷上升、地下含水層資源不斷減少、農業用地因城市擴張而減少及歸因於氣候變化（例如溫度升高、乾旱多發、洪水多發）天氣逐漸惡劣，食物產量仍將需要提高。此對於諸如非洲（根據2009年數據，已出現蛋白質攝入不足）之國家及諸如中國、印度、巴基斯坦及印度尼西亞之國家（處於蛋白質攝入不足之風險下）而言尤其是個挑戰。另外，據預測，2040年對肉類之全球需求提高60%且對乳製品之全球需求提高50%。

**【0003】** 但並非所有蛋白質源同樣產生。動物類食品（肉類、蛋類、乳製品）提供「完全」蛋白質，因為其含有所有必需胺基酸；亦即，甲硫胺酸、白胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸、纈胺酸、蘇胺酸、組胺酸、色胺酸及離胺酸。儘管含有一些必需胺基酸，植物類食品一般缺乏全套。舉例而言，澱粉根中發

現之蛋白質不具有必需胺基酸離胺酸，其必須隨後自飲食中之另一食物獲得。豆類及豆科植物含有較高含量離胺酸，但其不具有必需胺基酸甲硫胺酸。儘管有可能藉由成對植物食物構建完全蛋白質，確保營養學上平衡之飲食在完全蛋白質之情況下容易得多。

**【0004】** 完全蛋白質之一種非動物來源獲自可食用絲狀真菌，諸如鐮孢黴 (*Fusarium venenatum*) (以前分類及禾穀鐮刀菌 (*Fusarium graminearum*))。然而，迄今為止，此等來源之蛋白質產量已在能量資源及生產設備，諸如資本密集型生物反應器及離心機方面已有所需大量投資。仍需要生長、採集及食品生產方法，該等方法需要較低能量、消耗極少天然資源且成本較低。本發明解決此等問題。

**【0005】** 另外，與對應於自然災害相關的物流供應減少之一個區域、後勤隔離的環境或軍事及/或太空/地球外任務為生命維持環，尤其碎屑流之閉合，同時提供任務關鍵產物，諸如營養及開胃食物、燃料、代謝物表現平台、建築材料及/或微生物工廠。時常，此等類型環境無法進入無菌設施或進入無菌設施受限及/或需要密封無菌系統以完全含有所產生之碎屑流及/或食物、燃料及材料。舉例而言，歐洲太空總署 (European Space Agency) 之著作 (Expeditions 25-28, Growth and Survival of Colored Fungi in Space (CFS-A)) 展現，真菌可在太空站內部生長且可在潮濕條件下分解食物及其他有機材料；此處，真菌系統之安全殼對於阻止其他供應及表面之無意污染物而言為最重要的。除了在太空旅行之發展區域中需要分解食物及廢棄物之外，當處理自然自然災害、戰場軍事操作、荒野操作、第三世界中之情境 (其中衛生及冷藏不可靠、空間受限、後勤保障困難之競技場) 及一些農業/工業操作時此等需要亦存在。需要在最小空間、能量及維持之情況下高效運作之自給自足的無菌系統。

**【0006】** 能夠將廣泛多種碎屑流轉化成多種有價值的產物之穩固且有效

的便攜式自給自足的生物膜-生物墊反應器系統解決此等問題。當前揭示內容描述一種簡單無菌生物反應器平台，其在醱酵（溫度控制除外）期間不需要攪動、不需要主動通氣、不需要能量源，產生極少至無廢棄殘餘物，幾乎不需要水，且產生稠密容易採集的質地化生物墊。另外，對於較大更集中任務及/或群體而言，自給自足的生物膜-生物墊反應器系統可為便攜式及/或可調式的。

### 【發明內容】

**【0007】** 本發明提供可食用絲狀真菌之調配物。使可食用絲狀真菌在表面醱酵條件下生長於液體培養基上以產生絲狀真菌生物墊。在一個具體實例中，提供一種用於可食用真菌生物墊之表面醱酵生產之方法，該方法包含用浮游及/或小分生孢子真菌細胞接種含有碳源之液體合成生長培養基，在室溫下培育經接種之生長培養基且採集真菌產生之黏性生物墊。在一些具體實例中，經接種之生長培養基在敞口盤中或至少一種半無菌環境中所含有之敞口盤中培育。

**【0008】** 在另一具體實例中，用於表面醱酵可食用真菌生物墊生產之產生方法允許採集生物墊之部分，同時維持殘留生物墊之生長潛能。

**【0009】** 在另一具體實例中，絲狀真菌為尖鏟孢菌（*Fusarium oxysporum*）品系MK7（美國典型培養物保藏中心（American Type Culture Collection）寄存之ATCC PTA-10698，美國弗吉尼亞州馬納薩斯1081大學大街（1081 University Boulevard, Manassas, Virginia, USA）），其具有46-51%完全蛋白質含量與較高含量所有必需胺基酸，尤其42-43%必需胺基酸及4-21%BCAA，其高於蛋類。另外，尖鏟孢菌品系MK7具有8-10%礦物及灰含量，包括較高含量鈣（1.3 mg/100 g一份）、鐵（5.5 mg/100 g一份）、1-2%核酸及6-11%脂質，其中85%為不飽和的。

【0010】 在另一具體實例中，絲狀真菌為鐮孢黴或藤倉鐮刀菌 (*Fusarium fijiikuroi*)。

【0011】 在再一具體實例中，絲狀真菌選自由以下者所組成之群：雙孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) (大褐菇 (crimini) 及白色蘑菇)、美味牛肝菌 (*Boletus edulis*) (牛肝菌 (porcinini))、雞油菌 (*Cantarellus cibarius*) (雞油菇 (chantrelle))、禿馬勃 (*Calvatia gigantea*) (大禿馬勃 (giant puffball))、茶樹菇 (*Cyclocybe aegerita*) (絲絨菇 (velvet piopinni))、赤芝 (*Ganoderma lucidum*) (靈芝 (Reishi))、灰樹花 (*Grifola frondosa*) (舞菇 (maitake))、羊肚菌屬物種 (*Morchella species*) (羊肚菌 (Morel))、玉蕈離褶傘 (*Hypsizygus tessellatus*) (蛤殼 (clamshell))、榆幹玉蕈 (*Hypsizygus ulmarius*) (榆耳 (elm oyster))、硫磺菌屬物種 (*Laetiporus species*) (硫色絢孔菌 (chicken of the woods))、香菇 (*Lentinula edodes*) (香蕈 (shiitake))、杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*) (皇家小號菇 (trumpet royale))、帝王菇 (king oyster)、禿馬勃 (*Calvatia gigantean*) (大禿馬勃)、糙皮側耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) (珍珠耳 (pearl oyster))、黃白側耳 (*Pleurotus ostreatus* var. *columbinus*) (藍耳 (blue oyster)) 及其他側耳屬物種 (*Pleurotus* sp.) (例如金頂側耳 (*P. citrinopileatus*)、虎奶菇 (*tuberregium*))、榆幹玉蕈 (榆耳)、小孢鱗傘 (*Pholiota microspora*) (森林滑子菇 (forest nameko))、繡球菌 (*Sparassis crispa*) (花椰菜 (cauliflower)) 及塊菌屬物種 (*Tuber species*) (松露 (truffles))。

【0012】 在另一具體實例中，碳源為糖 (例如蔗糖、麥芽糖、葡萄糖、果糖、稀少糖等)、糖醇 (例如丙三醇、多元醇等)、澱粉 (例如玉米澱粉等)、澱粉衍生物、澱粉水解產物、氫化澱粉水解產物、木質纖維素漿或原料 (例如甜菜漿、農業漿、板材漿、乾酒粕、釀造廢棄物等)、玉米浸液、酸乳

清、甜乳清、牛乳乳清、小麥浸液、產業水液（industrial liquor）、食物加工產物/碎屑流及/或其組合。

**【0013】** 在又一具體實例中，提供一種用於自子實體或絲狀真菌孢子起始之可食用絲狀真菌生物墊之表面醱酵生產之方法。對於自子實體起始之生物墊，該方法包含使真菌子實體表面滅菌，減小真菌之滅菌子實體之尺寸，使減少的真菌子實體表面滅菌，用滅菌減少的真菌子實體細胞接種含有碳源之合成液體生長培養基，在室溫下培育經接種之生長培養基，且採集真菌產生之黏性絲狀生物墊。對於自絲狀真菌孢子起始之生物墊，該方法包含用無菌孢子接種含有碳源之合成液體生長培養基，在室溫下培育經接種之生長培養基，且採集真菌孢子產生之黏性絲狀生物墊。

**【0014】** 在一些具體實例中，絲狀真菌之子實體或孢子選自由以下者所組成之群：雙孢蘑菇（大褐菇及白色蘑菇）、美味牛肝菌（牛肝菌）、雞油菌（雞油菇）、禿馬勃（大禿馬勃）、茶樹菇（絲絨菇）、赤芝（靈芝）、灰樹花（舞菇）、羊肚菌屬物種（羊肚菌）、玉蕈離褶傘（蛤殼）、榆幹玉蕈（榆耳）、硫磺菌屬物種（硫色絢孔菌）、香菇（香蕈）、杏鮑菇屬（皇家小號菇）、糙皮側耳菌（珍珠耳及藍耳）、小孢鱗傘（森林滑子菇）、繡球菌（花椰菜）及塊菌屬物種（松露）。絲狀真菌之無菌孢子獲自商業供應商，諸如 Myco Direct（Huntley, Illinois）。

**【0015】** 在再一具體實例中，由浮游細胞、小分生孢子細胞、尺寸減小的子實體或絲狀真菌孢子產生之絲狀生物墊包含小於5 mm長菌絲體及/或菌絲聚集體。在又一具體實例中，尺寸減小的絲狀生物墊包含大於5 mm長之聚集體。

**【0016】** 在另一具體實例中，子實體細胞接種之生長培養基之pH 具有約4.0-4.1之pH。

【0017】 在另一其他具體實例中，用於合成子實體及/或細胞生長之生長培養基之碳源包含丙三醇、澱粉、玉米浸液、酸乳清或其組合及/或培育期為約2-10天或更長。

【0018】 另一具體實例係關於一種可食用真菌絲狀生物墊調配物，其包含與經由合成液體培養基上之表面醱酵生長之可食用真菌絲狀生物墊隔離的可食用真菌絲狀生物墊粒子。

【0019】 其他具體實例係關於呈液體、固體或凝膠形式之調配物。

【0020】 又更多具體實例係關於為糊狀物、細粉、多孔/通氣塊狀物及/或堅硬塊狀物之調配物。

【0021】 又一具體實例係關於包含可食用真菌絲狀生物墊、具有或不具有其他成分之調配物之食品。

【0022】 額外具體實例係關於由調配物製成之食品，諸如肉類替代物、飲品、飲料、優格、甜點、糖食或糖果。

【0023】 另一具體實例係關於由調配物製成之食品，亦即，慕斯或冷凍甜點，諸如不在室溫下熔融之冰淇淋類似物。

【0024】 其他具體實例係關於使用調配物作為強化及/或模仿食品中之肉類（例如漢堡、香腸、熱狗、雞塊或火雞塊及/或魚排）之質地及/或提高食品蛋白質含量之成分。又其他具體實例係關於使用液體分散液調配物作為牛乳替代物及/或提高牛乳、乳製品及/或牛乳替代產物之蛋白質含量。

【0025】 又一具體實例係關於自可食用絲狀真菌生物墊分離油。

【0026】 本發明亦提供一種自給自足的生物膜-生物墊反應器。在一個具體實例中，自給自足的生物膜-生物墊反應器包含容器及置放於容器內之原料、真菌接種物、透氣膜及視需要的液體營養培養基。在一些具體實例中，反應器為單次使用反應器，而在其他具體實例中，可再使用反應器。

【0027】 典型地，各種具體實例中之容器能夠密封且可包括除密封件外之容器蓋。在一些具體實例中，容器為有蓋盤。在其他具體實例中，容器為有蓋皮氏培養皿（petrie dish）或其他類型之有蓋容器。在又其他具體實例中，容器為袋。在又其他具體實例中，容器為具有由透氣膜（2）製成之上部部分之管道（參見圖23）。在一些具體實例中，容器由複數個生長隔室構成。在一些具體實例中，容器具有歧管設計及/或折流系統。在一些具體實例中，容器完全或部分用一或多種可消耗的原料製造。

【0028】 在一些具體實例中，原料接種有子囊菌真菌菌株，諸如鐮刀菌（*Fusarium*），其實例為尖鐮孢菌品系MK7（美國典型培養物保藏中心寄存之ATCC PTA-10698，美國弗吉尼亞州馬納薩斯1081大學大街）、鐮孢黴及燕麥鐮刀菌（*Fusarium avenaceum*）、徒長病菌（*Fusarium fujikuroi*）、根黴菌屬物種（*Rhizopus species*）、曲黴菌屬物種（*Aspergillus species*）及/或其組合。

【0029】 在其他具體實例中，原料接種有擔子菌真菌菌株，諸如雙孢蘑菇（大褐菇及白色蘑菇）、美味牛肝菌（牛肝菌）、雞油菌（雞油菇）、禿馬勃（大禿馬勃）、茶樹菇（絲絨菇）、赤芝（靈芝）、灰樹花（舞菇）、羊肚菌屬物種（羊肚菌）、玉蕈離褶傘（蛤殼）、榆幹玉蕈（榆耳）、硫磺菌屬物種（硫色絢孔菌）、香菇（香蕈）、杏鮑菇（皇家小號菇）、糙皮側耳菌（珍珠耳及藍耳）、小孢鱗傘（森林滑子菇）、繡球菌（花椰菜）及塊菌屬物種（松露）。

【0030】 在一些具體實例中，原料為廢產物，諸如天然存在之尿液及/或糞便，以及食物廢棄物及副產物、工業廢料及/或副產物、農業廢棄物及副產物、植物材料及/或其組合。在其他具體實例中，原料可為合成或製造替代物，諸如替代人類尿液。相對於為植物材料或包括植物材料之原料，植物材料典型地為木質纖維素。木質纖維素原料選自由以下者所組成之群：農作物殘餘物

(例如小麥秸稈、大麥秸稈、水稻秸稈、豌豆、燕麥、小粒穀類秸稈、玉米秸稈、玉米纖維(例如玉米纖維膠(CFG)、乾酒粕(DDG)、玉米蛋白粗粉(CGM)、柳枝稷、紫花苜蓿乾草、甘蔗渣、非農業生物質(例如藻類生物質、藍綠菌生物質、城市樹殘餘物)、蔬菜(例如胡蘿蔔、椰菜、大蒜、馬鈴薯、甜菜、花椰菜)、森林產物及工業殘餘物(例如軟木一次/二次研磨殘餘物、硬性軟木一次/二次研磨殘餘物、再循環紙漿污泥、厭氧消化液)、含有木質纖維素之廢棄物(例如新聞紙、廢紙、釀造穀物、用過橡膠輪胎(URT)、城市有機廢棄物、碼頭廢棄物、臨床有機廢棄物、糖、澱粉、廢油、橄欖油、橄欖油處理廢棄物、蟋蟀排泄物及在生物燃料(例如經處理之藻類生物質、丙三醇)生產期間產生之廢棄物及其組合。典型地，透氣膜與容器中存在之一或多種原料、視需要選用之液體培養基及接種物之表面直接接觸且密封於其上。在一些具體實例中，存在視需要選用之培養基。

**【0031】** 在一些具體實例中，透氣膜由聚合材料構成，該聚合材料諸如聚丙烯、聚乙烯、聚四氟乙烯、聚碳酸酯、聚醯胺、聚吡喃(polypyrrolone)、聚(醯胺基胺)樹狀體複合物、乙酸纖維素、丁二烯-丙烯腈、TeflonAF2400及耐綸。在一些具體實例中，透氣膜之孔徑在0.05-1.5  $\mu\text{m}$ ，諸如0.2  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 及1.0  $\mu\text{m}$ 範圍內。在一些具體實例中，透氣膜呈無菌織物類材料形式，而在其他具體實例中，膜呈紙類材料形式。在一些具體實例中，表面質地光滑，在其他具體實例中，表面質地粗糙。在一些具體實例中，氣體擴散路徑為基本上直達的，而在其他具體實例中，路徑為迂曲的。

**【0032】** 在一些具體實例中，反應器產生用作食物來源，諸如蛋白質源及/或油來源之生物膜-生物墊。在其他具體實例中，生物膜-生物墊用作皮革類似物及/或生物塑膠。在另其他具體實例中，生物膜-生物墊用作生物燃料前體之來源或自身作為生物燃料。在又其他具體實例中，生物膜-生物墊用以產生有

機產物，諸如有機酸、抗生素、酶、激素、脂質、黴菌毒素、維生素、色素及重組異源蛋白質。

### 【圖式簡單說明】

【0033】 圖1.在最初4天生物墊形成階段之後每日更新之營養培養基中尖鏟孢菌品系MK7生物墊之生長。

【0034】 圖2.在每日更新（在第4天之後）之液體營養培養基中形成之尖鏟孢菌品系MK7之三公分厚生物墊。顯示生物墊下方之耐綸網篩且用於將生物墊提舉及移動至新鮮培養基。

【0035】 圖3.經設計以連續地饋入尖鏟孢菌品系MK7生物墊生長且自培養基移除養分之連續流系統。自接種時間生長7天之後通道中之顯示之白色生物墊。

【0036】 圖4.在自接種時間生長10天之後生長的生物墊（在連續流下6天+在靜止/靜態條件下4天）。

【0037】 圖5.生物墊之半連續生產，顯示（A）在第12天移除生物墊之最成熟部分。在盤下端採集1/3最成熟生物墊之後，在箭頭方向上以物理方式向下移動殘留的生物墊直至生物墊邊緣觸碰盤末端（B）。移動生物墊在盤之上端產生新鮮敞口空間，在其中形成新生物墊。

【0038】 圖6.使用半連續生產方法生物質隨時間推移之累積產量。虛線為第5天至第19天之線性回歸線（ $y=0.57x-1.52$ ， $r^2=0.973$ ）誤差條為三個重複盤之平均值標準差。當小於資料點符號時，誤差條不可見。

【0039】 圖7.生物墊之連續產量，顯示移除右側之生物墊之最成熟部分。當連續地採集盤右側之最成熟生物墊時，在能夠使得新生物墊形成之盤左側產生新鮮敞口空間。盤中之液體培養基可視需要或連續地補充及/或強化。

【0040】 圖8.在用UVB光照射四小時之後尖鏟孢菌品系MK7生物墊之橙色色素沉著（右側之兩個切下盤）。非照射對照生物墊之兩個切下盤顯示於左側。

【0041】 圖9.使用具有丙三醇、玉米澱粉及玉米浸液之MK7-1培養基（描述於PCT/US2017/020050中）產生之4天大尖鏟孢菌品系MK7生物墊之場發射掃描電子顯微鏡檢查。影像A、B及C顯示具有藉由乙醇洗滌移除之EPS基質之生物墊。A）具有氣生菌絲之生物墊之頂部表面視圖。B）稠密底層之橫截面，其中箭頭描繪該層。藉由用剃刀片切割生物墊產生截面視圖。生物墊底部顯示在影像左下角且在右上角顯示稠密底層上方之不良黏著過渡層。C）生物墊之底部表面視圖。D）在適當的位置具有EPS基質之生物墊之底部表面視圖（亦即，EPS不用乙醇洗滌移除）。

【0042】 圖10.在丙三醇、澱粉及玉米浸液上生長之生物墊之透射光顯微鏡影像（100倍）。氣生菌絲層之左側影像揭示長絲之主要接近垂直取向。右側影像顯示稠密底層及相鄰過渡層。

【0043】 圖11.A：左側為雞胸肉且右側為在丙三醇上生長之具有類似質地之新鮮生物墊。B：有名主廚Brooks Headley使用真菌生物墊製備之「MycoBurger」。

【0044】 圖12.使用所揭示之方法產生之生物墊。A：靈芝蘑菇；B：珍珠耳蘑菇；C：藍耳蘑菇；D：花椰菜蘑菇；E：榆耳蘑菇；G：大禿馬勃蘑菇。

【0045】 圖13.A.由在丙三醇、澱粉及玉米浸液之混合物上生長之尖鏟孢菌品系MK7生物墊產生之雞塊。B.由在麥芽培養基001（40 g麥芽、4 g蛋白腴、1.2 g酵母萃取物、20滴/1 ml菜籽油、4 g經研磨之燕麥、1000 mL水）上生長之大禿馬勃生物墊產生之雞塊。

【0046】 圖14.使用A.25% MK7液體分散液:75%全牛乳、B.50%MK7液體分散液:50%全牛乳及C.100%MK7液體分散液由活優格培養物製備之優格。此等培養物中使用之MK7液體分散液由在酸乳清上生長之尖鏟孢菌品系MK7生物墊製備。

【0047】 圖15.由尖鏟孢菌品系MK7生物墊產生之素食冰淇淋類似物。

【0048】 圖16.囊封反應器中形成生物膜-生物墊在細胞附著至透氣膜（其中氧容易獲得）時開始。隨時間推移，生物膜-生物墊向下生長且最終填充反應器之空間，消耗所有液體及養分。

【0049】 圖17.在五天內在靜態條件下在覆蓋有用（A）-（C）聚丙烯及（D）聚碳酸酯構建之半透膜之皮氏培養皿中生長之尖鏟孢菌品系MK7生物墊。基本上無游離液體殘留於皮氏培養皿中且所有養分併入生物墊中。反應器之空隙/液體體積基本上填充有生物墊。

【0050】 圖18.藉由透氣膜與液體培養基分隔開之附著袋用於供應及捕集氣體。整合式多官能膜允許氧進入及CO<sub>2</sub>及其他產生的氣體離開。下部液體隔室中生長之真菌生物質（黃色）將原料及養分轉化成隨著其生長填充隔室之生物墊。稠密固結生物墊可容易地藉由打開反應器封閉系統（例如Zip-lock®類型）採集且自袋移除。

【0051】 圖19.基本氣密反應器（1）。顯示多個通道（4）與共用壁/擋板（9）、前閥門（6）及後閥門（8）及透氣膜（2）。

【0052】 圖20.具有單個氣體採集腔室（14）之基本氣密反應器（1）。

【0053】 圖21.具有通道化氣體採集腔室（15、20）之基本氣密反應器（1）。

【0054】 圖22.具有通道化氣體採集腔室（15）之基本氣密反應器（1），其具有氣體特定通道（30、40）與特定透氣膜（2、50）。

【0055】 圖23.具有柱形通道（4）、壁/擋板（9）、前閥門（6）及後閥門（8）及透氣膜（2）之基本氣密反應器（1）。

#### 【實施方式】

【0056】 可食用絲狀真菌可用作單獨或併入食品中之蛋白質源。舉例而言，珍珠耳蘑菇之蛋白質含量為27.25%，藍耳蘑菇之蛋白質含量為24.65%，靈芝蘑菇之蛋白質含量為15.05%（Stamets (2005) Int J Medicinal Mushrooms 7:103-110），大禿馬勃之蛋白質含量為27.3%（Agrahar-Murugkar and Subbulakshmi (2005) Food Chem 89:599-603），且花椰菜蘑菇之蛋白質含量為32.61%（Kimura (2013) BioMed Res. Int. Article ID 982317）。

【0057】 但當擔子菌門絲狀真菌之子實體（諸如雙孢蘑菇（大褐菇及白色蘑菇）、美味牛肝菌（牛肝菌）、雞油菌（雞油菇）、赤芝（靈芝）、羊肚菌屬物種（羊肚菌）、玉蕈離褶傘（蛤殼）、糙皮側耳菌（珍珠耳及藍耳）、杏鮑菇（皇家小號菇）、小孢鱗傘（森林滑子菇）、繡球菌（花椰菜）、榆幹玉蕈（榆耳）、茶樹菇（絲絨菇）、灰樹花（舞菇）、香菇（香蕈）、硫磺菌屬物種（硫色絢孔菌）、禿馬勃（大禿馬勃）及塊菌屬物種（松露））常用於食品中時，存在極少的主要包含擔子菌門或子囊菌門絲狀真菌之營養菌絲體之產物。此部分地歸因於典型地為地下的或主要不可與其上生長之物質分離之菌絲體。

【0058】 然而，在特定條件下，絲狀真菌可經由表面醱酵在厭氧、微好氧或好氧條件或其組合下形成真菌生物墊。此處，絲狀真菌生物墊包含真菌物質及/或其菌株及/或後代，主要呈菌絲體、菌絲體片段、菌絲、菌絲片段形式，且在較小程度上含有分生孢子、小分生孢子、大分生孢子或任何及其所有組合，且在一些情況下亦可含有分生孢子器及厚垣孢子。

【0059】 典型地，絲狀生物墊主要由菌絲體構成；亦即，交織營養菌絲長絲之複雜網狀結構。生物墊內未斷裂長絲之平均長度一般為至少0.1 mm，諸如在0.1 mm-0.5 mm，0.5 mm-50 cm，0.6 mm-40 cm，0.7 mm-30 cm，0.8 mm-25 cm，1.0 mm-20 cm，1.4 mm-15 cm，1.6 mm-10 cm，1.7 mm-8 cm，1.8 mm-6 cm，2.5 mm-4 cm，及5 mm-2 cm，2 cm-25 cm，4 cm-30 cm，5 cm-40 cm，6 cm-50 cm，8 cm-60 cm，10 cm-100 cm之間。

【0060】 絲狀真菌生物墊之生長可經由表面醱酵實現。此涉及用絲狀真菌細胞接種含有碳源及氮源之液體培養基。適合的碳源為糖（例如蔗糖、麥芽糖、葡萄糖、果糖、日本稀少糖等）、糖醇（例如丙三醇、多元醇等）、澱粉（例如玉米澱粉等）、澱粉衍生物（例如麥芽糊精、環糊精、葡萄糖糖漿、水解產物及經改質之澱粉）、澱粉水解產物、氫化澱粉水解產物（HSH；例如氫化葡萄糖糖漿、麥芽糖醇糖漿、山梨糖醇糖漿等）、木質纖維素漿或原料（例如甜菜漿、農業漿、板材漿、乾酒粕、釀造廢棄物等）、玉米浸液、酸乳清、甜乳清、牛乳乳清、小麥浸液、碳水化合物、食物廢棄物、橄欖油處理廢棄物、木質纖維素材料水解產物及/或其組合。絲狀真菌細胞生成位於生長培養基表面上之生物墊；亦即，其基本上漂浮於生長培養基頂上。

【0061】 在許多情況下，尤其對於子囊菌門真菌，用包含浮游絲狀真菌細胞之接種物接種生長培養基。高品質接種物由浮游細胞（其定義為不凝集或聚集在一起之單細胞，較佳與指數生長階段隔離）構成，且可包括小分生孢子。理想地，接種物細胞漂浮於生長培養基之表面上，諸如具有較高脂質含量之彼等細胞，且產生提高的生長速率。浸沒於生長培養基內之細胞或細胞凝集塊不利地影響漂浮於表面上之細胞及其形成之生物墊。具體言之，由含有顯著大量凝集浸沒細胞之生長培養基產生之生物墊典型地變色且往往不會生長均勻稠密墊。

**【0062】** 對於擔子菌門孢子接種，約2 cc懸浮於來自孢子注射器（例如 MycoDirect，Fluntley，IL）之去離子水中之無菌孢子用於在較小Pyrex盤中接種約75 mL生長培養基。或者，使用標準無菌條件，將1 cc懸浮於來自孢子注射器之去離子水中之孢子接種於具有麥芽萃取物瓊脂培養基+CF（30 g乾燥麥芽萃取物、20 g瓊脂、1000 mL水+0.01%氯黴素）之容器上。用封口膜密封容器且在室溫下培育直至菌絲體完全覆蓋瓊脂表面。隨後將切割成楔形之約2 cm寬度來自瓊脂製劑之菌絲體節段分割成轉移至具有生長培養基之管之前可能的最小尺寸。密封液體培養物管，在室溫下培育，且手動震盪或藉由機械手段震盪（亦即，連續震盪或連續攪拌槽反應器）約1分鐘，每天至少五（5）次，以使菌絲體儘可能地破碎。培育液體培養物直至肉眼渾濁，典型地三天或多於三天。液體培養物隨後用於在盤中以總生長培養基體積之10%或15%接種生長培養基。

**【0063】** 擔子菌門子實體亦用於生成用於起始絲狀生物墊之接種物。在一些情況下，接種物藉由以下步驟製備：（a）例如在5%漂白溶液中使子實體表面滅菌，（b）用無菌培養基沖洗，（c）在無菌條件下研磨至小於5 mm長聚集體或大於5 mm聚集體，視最終用途而定，（d）例如在5%漂白溶液中使經研磨之蘑菇生物質表面滅菌，且用無菌培養基再次沖洗。5公克經研磨之表面滅菌子實體生物質直接用作接種物。在其他實例中，使用衍生自子實體之純培養物。此處，將約3 mm<sup>3</sup>子實體部分置放於含有0.01%氯黴素之瓊脂培養基上且在室溫下培育。在生長2-5天之後，將菌絲轉移至新鮮瓊脂+氯黴素培養基上且再生長3-7天。藉由萃取及純化DNA（FastDNA旋轉套組，MP Biomedicals），對16S rRNA序列及/或ITS區域進行測序及使用Blast（NCBI資料庫）進行序列之譜系學分類來確認培養物純度。在確認後，菌絲用於接種50 mL無菌液體培養基且在185 rpm下攪動/旋轉約5天，之後以約7.5%接種物與92.5%液體培養基之比

率用作接種物。

【0064】 儘管可使用多種不同培養基，一些培養基不經充分調適用於絲狀真菌生物墊之生長，諸如漢森培養基（Hansen's media）（每公升=1.0 g 蛋白胍、0.3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.0 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5.0 g 葡萄糖，其中C:N比率為26.9），在其上不產生全部黏性生物墊。表現尤其良好之彼等培養基包括MK7A、MK7-1、MK7-3（全部描述於WO 2017/151684中）以及下文所呈現之培養基。

【0065】 麥芽培養基001（C:N比率為19.1）

成分	量	等級
淡皮爾森麥芽（Light Pilsner Malt）	40.0 g	食物
蛋白胍	4.0 g	研究
酵母萃取物粉末	1.2 g	研究
菜籽油	1.0 mL	食物
經研磨之燕麥	4.0 g	食物
自來水 $\text{H}_2\text{O}$	1000 mL	N/A

【0066】 MK-7 SF培養基（C:N比率為7.5）

成分	量	等級
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	7.553 g	ACS
脲	2.548 g	USP
$\text{CaCl}_2$	2.000 g	試劑
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.000 g	USP
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7.500 g	試劑
痕量*	2.000 mL	*
丙三醇	0.075 Kg	食物/USP
酵母萃取物	1.750 g	研究
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.020 g	試劑
DI $\text{H}_2\text{O}$	0.940 L	N/A

痕量組分*		
微量養分*	mg/L	等級
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	9.98	ACS
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	4.4	USP/FCC
MnCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	1.01	試劑
CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0.32	試劑
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0.31	技術
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	0.22	ACS
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.23	ACS
EDTA，游離酸	78.52	電泳

**【0067】** 補充有NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>之麥芽培養基001（C:N比率為7.5）

成分	量	等級
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5.0 g	ACS
淡皮爾森麥芽	40.0 g	食物
蛋白腓	4.0 g	研究
酵母萃取物粉末	1.2 g	研究
菜籽油	1.0 mL	食物
經研磨之燕麥	4.0 g	食物
自來水 H <sub>2</sub> O	1000 mL	N/A

**【0068】** 藉由無菌移除250 μL培養基且使用能夠達到5000 mOsm之最近經校準之滲透計（型號3250 SN：17060594）獲取滲透壓讀數。獲取三個讀數且提供以下結果：漢森=39、39、38；麥芽001=169、168、169；MK-7 SF=1389、1386、1387；麥芽001+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>=288、287、286。

**【0069】** 另外，吾等方法中所使用之培養基可限定所得生物墊之蛋白質含量。舉例而言，儘管藍耳蘑菇之子實體之天然蛋白質含量報導為24.65%（Stamets (2005) Int J Medicinal Mushrooms 7:103-110），根據吾等方法在麥芽001培養基上生長之藍耳生物墊具有29.82%之較高濕氣校正蛋白質含量，蛋白質含量提高5.71%。更驚人地，大禿馬勃之子實體之蛋白質含量報導為27.3%（Agrahar-Murugkar及Subbulakshmi (2005) Food Chem 89:599-603），但用吾等方法在麥芽001培養基上生長之大禿馬勃生物墊具有32.04%之濕氣校正蛋白質含量，而MK7-1 SF培養基產生46.33%之濕氣校正蛋白質含量，且麥芽

001+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>培養基產生46.88%之濕氣校正蛋白質含量，在Agrahar-Murugkar及Subbulakshmi報導內蛋白質含量基本上提高19.85%。

【0070】 生物墊採集典型地在生長2-3天之後進行，但在一些情況下，需要更長生長時間段，諸如當需要/要求更厚或更稠密生物墊時。舉例而言，可能需要3.5-4天、3-5天、4-6天、5-7天、6-9天、7-10天、19-21天或甚至長達2個月之生長時間段。歸因於在PCT/US2017/020050及本文中描述之表面醱酵條件下生長之絲狀生物墊之黏性結構，絲狀生物墊具有足夠的拉伸強度以在生長時間段結束時自培養基表面基本上完整提舉。表1呈現所量測之一些實例拉伸強度。

**表1-一些絲狀真菌生物墊之平均拉伸強度**

生物體	C 源	厚度 (cm)	寬度 (cm)	平均斷裂重量 (g)	平均拉伸強度 (g/cm <sup>2</sup> )
大禿馬勃	麥芽	0.13	1.2	47.12	314.13
	丙三醇	0.10-1.3	1.2	29.05	214.85
	MK7-1SF	0.25-0.35	0.65-0.8	30.67	263.98
	麥芽+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.09-0.10	0.9-1.1	27	281.15
花椰菜	麥芽	0.15-2.0	1.0-1.2	101.05	507.38
	丙三醇	0.09-0.20	1.2	202.17	242.91
靈芝	麥芽	0.5	1.0-1.2	101.05	1854.54
藍耳	麥芽	0.5	1.2	43.40	72.74
	丙三醇	0.4	1.3	19.04	37.27
珍珠耳	麥芽	0.5	1.0-1.2	56.7	98.96
榆耳	麥芽	0.35	1.2	50.28	143.67
尖鏟孢菌品系 MK7	丙三醇	0.5-0.8	1.0	>742	>570

【0071】 表面醱酵可在各種條件下進行，包括靜態培養基條件（如PCT/US2017/020050中所描述）、半靜態培養基條件及連續培養基流動條件。

【0072】 在半靜態培養基條件下生長意謂在採集絲狀真菌生物墊之前替換培養基之至少一部分。此等條件允許第4天至第18天之線性乾燥生物質產量（ $r^2=0.995$ ），其後生物質重量穩定在約2.5 Kg乾燥/m<sup>2</sup>下。

【0073】 生物墊亦可在連續培養基流動條件下產生，其中生物墊生長受限於生長培養基表面，其中墊下方之培養基連續地更新或半連續地更新。

**【0074】** 然而，在一些情況下，需要在半連續基礎上採集生長生物墊。此處，移除生物墊之一些部分且隨後其餘部分以物理方式移動至藉由移除部分生物墊產生之培養基之敞口區域。此可藉由以物理方式抓握生物墊且拉動其直至其觸碰表面醱酵容器末端或藉由其他機械手段實現。所得敞口區域隨後可用於新生物墊生長，而無需單獨或額外接種步驟，因為培養基已含有有活力的真菌細胞。當更新培養基或再引入有限養分時，此方法可週期性地重複，其可為尤其適用的。

**【0075】** 生物墊採集亦可在連續基礎上進行。連續移除可藉由多種機制促進。一個此類實例為連接至生物墊之成熟末端之滾輪（參見圖7）。滾輪緩慢轉動且採集成熟生物墊，且同時產生在表面醱酵容器之另一末端生長新生物墊之敞口培養基。典型的採集速率為1.56 cm/天，但此可針對特定需要或按使用者需要進行改變。

**【0076】** 在膜囊封/氣密密封式生物反應器條件下生長涉及囊封液體生長培養基，其中在適當的系統/容器中無氣體頂部空間。適當的系統/容器為例如盤、培養皿或具有相對較大表面積與深度比之任何容器。將透氣膜直接置放於液體培養基表面上且緊密地密封至系統/容器。適當的膜包括例如聚丙烯膜（例如KC100 Kimguard，Kimberly-Clark，Roswell，GA）、聚酯膜、聚碳酸酯膜、聚矽氧膜、聚醯胺膜、纖維素膜及陶瓷膜，僅列舉少數。生長生物墊與周圍氣氛之間的氣體交換經由半透膜單獨進行。

**【0077】** 在一些情況下，UVB光（290-320 nm）可藉由絲狀真菌觸發色素產生，諸如對於尖鏟孢菌品系MK7，產生著色生物墊。除了可適用於產生各種食物功效之顏色變化之外，用UVB處理將真菌細胞膜中存在之麥角固醇轉化成維生素D2且提高類胡蘿蔔素，諸如β胡蘿蔔素及蝦青素產量。因此，用UVB照射絲狀真菌，諸如尖鏟孢菌品系MK7可用於提高所得生物墊中之維生素D2及

類胡蘿蔔素。

【0078】 在一些情況下，所形成之絲狀真菌生物墊由外觀均勻的細胞層構成，絲狀生物墊之一個表面與空氣接觸且一個表面與合成培養基接觸。在其他情況下，存在至少兩個不同層：頂部表面處之氣生菌絲層及與合成培養基接觸之稠密多細胞底層。時常存在三個不同層：(a) 頂部表面處之氣生菌絲層、(b) 稠密底層及(c) 頂部與底部層之間的過渡層。過渡層可僅鬆散地連接至稠密底層，在彼等情況下，能夠使得底層與生物墊之其餘部分容易分離。過渡層之長絲密度在略微小於區域（其中兩層相接）中之底層之密度至與接近生物墊頂部之氣生菌絲相當之密度範圍內。

#### *絲狀真菌生物墊不活化*

【0079】 不活化方法以在培養之後採集至少2天之生物墊開始。儘管可沖洗生物墊以移除過量生長培養基，不要求生物墊沖洗，但在一些情況下，移除生長培養基或過量生長培養基較佳。類似地，可擠壓生物墊以移除過量生長培養基，同樣不要求，但對於一些應用，其可為較佳的。

【0080】 在一些情況下，諸如使用生物墊作為食品中之獨立蛋白質源或蛋白質成分，需要細胞活力之消除及進一步生物墊生長之潛能。此可藉由加熱、照射及/或汽蒸實現。

【0081】 對於加熱過程，可根據例如WO 95/23843或英國專利第1,440,642號處理絲狀真菌生物墊，或在破壞生物體之RNA之絕大部分，而不會不利地影響生物體之蛋白質組合物之溫度下培育。

【0082】 在照射時，絲狀真菌生物墊曝露能量，諸如藉由<sup>60</sup>Co（或偶爾藉由<sup>137</sup>Cs）放射性同位素產生之能量，藉由在低於5 MeV之標稱能量下操作之機器產生之X射線，及藉由在低於10 MeV之標稱能量下操作之機器產生之加速電子。

**【0083】** 汽蒸為使一些絲狀真菌生物墊不活化之較佳方法，諸如藉由尖鏟孢菌品系MK7及鏟孢黴產生，因為若產生彼等代謝物，則汽蒸亦可自生物墊構建體移除一些特定代謝物。此處，置放生物墊以使得生物墊排出液體及冷凝蒸汽可容易地自生物墊滴走。適合的生物墊固持系統包括多孔塑膠篩網及多孔盤。其他生物墊固持系統包括（但不限於）在垂直位置中固定生物墊之系統，諸如具有夾鉗機構之系統，該夾鉗機構夾鉗生物墊之至少一個末端，而生物墊之剩餘末端自該夾鉗懸掛；及夾鉗生物墊之至少兩個側面之篩網系統，僅列舉少數。

**【0084】** 生物墊安置於蒸鍋內以使得經加熱之蒸汽，諸如溫度大於85°C，例如95°C之蒸汽與生物墊接觸。在將多個盤置放於單個蒸鍋中之彼等情況下，例如一個盤在另一個上，較佳保護較低位置的生物墊避開較高位置的生物墊之滴液。保護應呈允許蒸汽接觸生物墊之形式，由此使生物墊活力去活化，且亦偏斜生物墊排出液體及在蒸鍋中較高水平處由接觸位於蒸鍋中較低水平處之生物墊所產生的冷凝蒸汽。在一個具體實例中，錐體安置於上盤與下盤之間以實現此結果。在其他具體實例中，上盤與下盤之間的分隔亦包括至少一種其他幾何形狀，諸如圓柱體、立方體及/或長方體、角錐、球體、圓環體及/或其他正多面體。在又一具體實例中，使用至少一個圓柱體、立方體及/或長方體、角錐、球體、圓環體、其他正多面體或其組合分隔盤。

**【0085】** 將生物墊至少汽蒸至生物墊活力降低之點以使得在生物墊內進一步生物墊生長及/或細胞繁殖為可忽略的。生物墊活力隨初始菌糠、生物墊發展、蒸汽/熱傳遞特徵、蒸鍋中之生物墊位置及相對於逸出蒸汽之生物墊定向變化。作為實例，在丙三醇或酸乳清菌糠上生長之尖鏟孢菌品系MK7生物墊在5分鐘之後為非活性的，且在一些情況下小於5分鐘汽蒸。可沖洗及/或擠壓汽蒸墊以移除墊排出物及冷凝蒸汽。

【0086】 不活化可食用絲狀真菌生物墊可在例如製備主要與豆腐、培根及肉乾相當之食品時直接用作蛋白質源，僅列舉少數。

【0087】 不活化可食用絲狀真菌生物墊亦可尺寸減小以適用作食品中之蛋白質源。尺寸減小可藉由機械手段，諸如切割、切削、切碎、研磨、摻合等或經由音波處理進行且在與其他成分或液體混合之前執行。尺寸減小的粒子尺寸可為均勻或不同的。典型地，尺寸減小的粒子之長度在0.05-500 mm之間，寬度在0.03-7 mm之間，且高度在0.03-1.0 mm之間。舉例而言，細粉類型粒子典型地在0.03 mm與0.4 mm之間的範圍內，肉乾類型粒子在100 mm與500 mm之間的範圍內等。可產生較大尺寸粒子，生物墊已在可膨脹庫（直徑66"）中生長，產生直徑66"且完全圓形之單個生物墊。更大容器可用於生長甚至更大的墊。

【0088】 每生物墊產生之尺寸減小的粒子之數目視最初生物墊尺寸及將使用生物墊尺寸減小的粒子之目的而定。

【0089】 視食品而定，尺寸減小的粒子含有至少0.1 mm，諸如在0.1 mm-2.0 mm，0.5 mm-10 cm，0.5 mm-30 cm，0.8 mm-25 cm，1.0 mm-20 cm，1.4 mm-15 cm，1.6 mm-10 cm，1.7 mm-8 cm，1.8 mm-6 cm，2.5 mm-4 cm，5 mm-2 cm，0.5-2.5 mm，0.5-1.8 mm，0.5-1.7 mm，0.5-1.6 mm，0.5-1.4 mm，0.5-1.0 mm，0.5-0.8 mm，0.5-0.6 mm，0.6-2.5 mm，0.6-1.8 mm，0.6-1.7 mm，0.6-1.6 mm，0.6-1.4 mm，0.6-1.0 mm，0.6-0.8 mm，0.8-2.5 mm，0.8-1.8 mm，0.8-1.7 mm，0.8-1.6 mm，0.8-1.4 mm，0.8-1.0 mm，1.0-2.5 mm，1.0-1.8 mm，1.0-1.7 mm，1.0-1.6 mm，1.0-1.4 mm，1.4-2.5 mm，1.4-1.8 mm，1.4-1.7 mm，1.4-1.6 mm，1.6-2.5 mm，1.6-1.8 mm，1.6-1.7 mm，1.7-2.5 mm，1.7-1.8 mm或1.8-2.5 mm之間的平均未斷裂長絲長度，以及諸如在0.1-1.0 cm，0.5-2.0 cm，1.0-5.0 cm，2.0-7.0 cm，5.0-10.0 cm，7.0-20 cm，10.0-50.0 cm及15.0-100.0 cm之間的較大尺寸分佈。

【0090】 絲狀真菌生物墊之尺寸減小的粒子亦含有斷裂長絲，且在一些情況下，主要存在斷裂長絲，諸如100%斷裂長絲、99%斷裂長絲、98%斷裂長絲、97%斷裂長絲、96%斷裂長絲及95%斷裂長絲。再次，針對所產生之最終食品，選擇斷裂長絲之尺寸。平均斷裂長絲長度可在至少0.01 mm，諸如0.01-0.10 mm，0.05-0.20 mm，0.1-1.0 mm，0.50-2.5 mm，1.0-5.0 mm，2.0-10.0 mm，5.0 mm-15.0 mm，10.0 mm-1.0 cm，1.0 cm-5.0 cm，5.0 cm-10.0 cm，0.3 mm-30 cm，0.8 mm-25 cm，1.0 mm-20 cm，1.4 mm-15 cm，1.6 mm-10 cm，1.7 mm-8 cm，1.8 mm-6 cm，2.5 mm-4 cm，5 mm-2 cm，0.3-2.0 mm，0.3-1.8 mm，0.3-1.7 mm，0.3-1.6 mm，0.3-1.4 mm，0.3-1.0 mm，0.3-0.8 mm，0.3-0.6 mm，0.3-0.5 mm，0.6-2.5 mm，0.6-1.8 mm，0.6-1.7 mm，0.6-1.6 mm，0.6-1.4 mm，0.6-1.0 mm，0.6-0.8 mm，0.8-2.5 mm，0.8-1.8 mm，0.8-1.7 mm，0.8-1.6 mm，0.8-1.4 mm，0.8-1.0 mm，1.0-2.5 mm，1.0-1.8 mm，1.0-1.7 mm，1.0-1.6 mm，1.0-1.4 mm，1.4-2.5 mm，1.4-1.8 mm，1.4-1.7 mm，1.4-1.6 mm，1.6-2.5 mm，1.6-1.8 mm，1.6-1.7 mm，1.7-2.5 mm，1.7-1.8 mm或1.8-2.5 mm之間的範圍內。

【0091】 在一些情況下，絲狀真菌生物墊之減小的粒子中之平均斷裂長絲長度為小於1  $\mu\text{m}$ ，諸如小於950 nm，小於900 nm，小於850 nm，小於800 nm，小於750 nm，小於700 nm，小於650 nm，小於600 nm，小於550 nm，小於500 nm，或小於400 nm。

【0092】 絲狀真菌生物墊之減小的粒徑可作為蛋白質源添加以強化食品之蛋白質含量或可為唯一蛋白質組分。對於完全由絲狀真菌生物墊構成之食物，尺寸減小的粒子可針對特定質地、口感及咀嚼感進行優化。舉例而言，經定形及調味而類似漢堡包之絲狀真菌生物墊食物可具有90%長度小於1.5 mm之粒子且大部分長度為1 mm或小於1 mm，寬度小於1 mm，且深度小於0.75 mm。此類型食物表徵為在口腔中具有較高感知密度，更易於咀嚼，提供奶油般口感

及更精細的食物體驗。已將經高度處理之生物墊粒子與優良餐廳中可見之漢堡類型進行比較。為了與漢堡餐館或BBQ中通常可見之製備的漢堡類型類似的更豐盛的食物體驗，90%粒子具有4 mm與10 mm之間的長度，1.0 mm至3 mm之寬度及小於0.75 mm之深度。改變質地、口感及咀嚼感之能力允許定製以適應具有特定膳食需要之個體，諸如咀嚼困難之彼等者或要求/需要更軟的食物同時仍提供相同營養及口味體驗的彼等者或需要具有更多質地、更多口感及更多咀嚼之彼等者。由於容易控制粒徑之能力，用絲狀真菌生物墊強化或單獨由絲狀真菌生物墊製得之食物具有與其所模仿之標準蛋白質食物極其類似的質地，如表2中可見。

表2-穩定微系統TA XT加上質地分析儀之結果

食物	平均最大硬度	平均面積 (g/mm)	平均中值 (g)	參數
<b>魚條</b>				測試前速度：2.00 mm/sec 測試速度：4.00 mm/sec 測試後速度：10.00 mm/sec 目標模式：距離 力：100.0 g 距離：20.000 mm 應變：10.0% 觸發類型：自動（力） 觸發力：5.0 g 探針：HDP/WBV Warner Bratzler V 狹槽葉片
市售魚條	3654 ± 1774	17868 ± 5674	894 ± 284	
MK7 魚條	1618 ± 180	19990 ± 610	1000 ± 100	
<b>雞塊</b>				
市售雞塊	3838 ± 56.8	27329 ± 3663	1367 ± 183	
Quorn 雞塊	4013 ± 1066.3	27751 ± 1346.4	1415 ± 111.4	
MK7 小粒子	3127 ± 19.7	33065 ± 3458	1654 ± 173	
MK7 中粒子	2514 ± 663	27217 ± 6437	1361 ± 322	
MK7 大粒子	3461 ± 77.8	34591 ± 2971.2	1730 ± 14.6	
<b>漢堡</b>				
100%牛肉漢堡	4326 ± 714	12350 ± 46.1	1727 ± 14.1	
90%牛肉，10% MK7	5011	14048	1929	
80%牛肉，20% MK7	2615 ± 199	10641 ± 511	1456 ± 46	
70%牛肉，30% MK7	2240 ± 262	9859 ± 2947	1291 ± 300	
60%牛肉，40% MK7	2094 ± 156	8118 ± 1088	1155 ± 180	
100% MK7，切 碎（經高度處 理）	2228 ± 1988	5079 ± 964	1089 ± 70.6	
<b>食物</b>	<b>硬度 (g)</b>			

巧克力慕斯				測試前速度：1.00 mm/sec
Nestle 巧克力慕斯	182.45			測試速度：1.00 mm/sec
MK7 巧克力慕斯	135.09			測試後速度：10.00 mm/sec
				目標模式：距離
				T.A.變量號：5: 0.0 g
				距離：10.000 mm
				應變：10.0%
				觸發類型：自動（力）
				觸發力：5.0 g
				探針：P/25；25 mm DIA
				圓柱體鋁

【0093】 在具有或不具有添加調味劑之情況下可僅使用粒徑減小的絲狀真菌生物墊產生及/或可用粒徑減小的生物墊強化之食物之實例為肉類產品（諸如碎牛肉、碎雞肉、碎火雞肉、雞塊、魚條或肉餅、肉乾、點心（例如薯片）、湯、冰沙、飲料、牛乳類似物、麵包、義大利麵、麵條、餃子、酥皮點心（例如泡芙麵團）、甜餅、蛋糕、餡餅、甜品、冷凍甜品、冰淇淋類似物、優格、糖食及糖果。

【0094】 用粒徑減小的絲狀真菌生物墊強化之食物可明顯提高蛋白質含量，此對於素食飲食之後的個體而言尤其重要。舉例而言，用68.1 g MK7液體分散液（亦即，1份MK7至3份水）加上8.5 g蛋白質強化一杯湯（227 g）及用136 g MK7液體分散液加上17 g蛋白質強化一碗湯（340 g）。諸如在素食湯、飲品、冰沙等中使用MK7液體分散液作為主要成分進一步提高此等食物之蛋白質含量。改變MK7與水比率將轉而改變蛋白質強化程度。

【0095】 無論粒徑減小的生物墊係用於強化食物之蛋白質含量，抑或係用作唯一蛋白質組分，在一些情況下，黏合劑有助於實現所需質地。設想審批通過的食品黏合劑，諸如蛋白、麩質、鷹嘴豆細粉、素食黏合劑、竹芋粉、明膠、果膠、瓜爾豆膠、角叉菜膠、黃原膠、乳清、鷹嘴豆水、碎亞麻籽、素蛋粉、麵粉、奇亞籽（Chia seed）、洋車前（psyllium）等，其可單獨或組合使用。除了食品黏合劑之外，粒徑減小的絲狀真菌生物墊亦可與審批通過的調味

劑、香辛料、風味增強劑、脂肪、脂肪替代品、防腐劑、甜味劑、顏色添加劑、養分、乳化劑、穩定劑、增稠劑、pH控制劑、酸化劑、膨鬆劑、防結塊劑、保濕劑、酵母養分、麵團強化劑、麵團調節劑、硬化劑、酶製劑、氣體及其組合混合。典型地，選擇黏合劑、調味劑、香辛料等以滿足特定群體之需求。舉例而言，不使用牛乳及/或牛乳固體以適應乳製品過敏/敏感的個體，可不使用小麥粉以適應麩質過敏/敏感的彼等者等。

**【0096】** 在一些應用中，粒徑減小的絲狀真菌生物墊用於模仿雞塊、火雞肉、豬肉、魚肉、漢堡、香腸、肉乾、培根及其類似者之食品中。此處，可使用單個類型之粒徑減小的絲狀真菌生物墊或多種減小的粒徑。類似地，減小的粒徑可來自絲狀真菌生物墊之單個來源或來自不同來源絲狀真菌生物墊之組合；例如單獨MK7或MK7+大禿馬勃生物墊。

**【0097】** 在一些應用中，粒徑減小的絲狀真菌生物墊經乾燥，研磨至足夠小的粒徑且用作產生強化蛋白質烘烤製品，諸如麵包、麵包卷、松餅、蛋糕、甜餅、餡餅等之細粉。

**【0098】** 將蛋白質引入食品中之一個態樣為使用由絲狀真菌生物墊製成之液體分散液作為牛乳或牛乳類似物之替換成分。液體分散液可以多種菜譜形式使用，包括湯、冰淇淋、優格、冰沙、焦軟糖及糖果，諸如焦糖及松露。在一些情況下，由不同原料/碳源產生之絲狀真菌生物墊產生具有不同口味之液體分散液。舉例而言，當原料/碳源為丙三醇時，由尖鏟孢菌品系MK7產生之所得液體分散液較甜，而由生長於酸乳清原料/碳源上之尖鏟孢菌品系MK7產生液體分散液往往會較酸。絲狀真菌，例如尖鏟孢菌品系MK7之天然甜味或酸味傳遞至最終食品。舉例而言，酸乳清液體分散液適用於優格，而丙三醇液體分散液往往適用於慕斯、焦糖或焦軟糖。

**【0099】** 可調節絲狀真菌生物墊:水比率以產生具有適當稠度及密度之液

體分散液。比率可為1:2至10:1，其中較佳比率為1:3、1:4及7:3。舉例而言，1:3之相對密度比率適合於冰淇淋類似物、飲料及優格。

【0100】 在一些情況下，絲狀真菌生物墊可用作油源，例如由塊菌屬物種之表面醱酵可食用真菌生物墊產生之松露油。

【0101】 在過去已採用絲狀真菌作為有價值的微生物廠，但一般要求大量基礎設施及/或設備、能量需求、昂貴試劑及/或大量人力資源。已熟知，絲狀真菌具有地球上所有微生物中最大的代謝多樣性，包括產生廣泛的有機酸、抗生素、酶、激素、脂質、黴菌毒素、維生素、有機酸、色素及重組異源蛋白質之能力（Wiebi (2002) *Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. Appl Microbiol Biotechnol 58, 421-427* ; El- Enshasy (2007) 第9章 - Filamentous Fungal Cultures - Process Characteristics, Products, and Applications. In. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. 編者：Shang-Tian Yang. Elsevier ; Gibbs等人(2000) *Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. Crit. Rev. Biotechnol. 20, 17-48* ) 以及使多種類型難降解材料，諸如木質纖維素及土壤中之腐植物質降解之能力。

【0102】 儘管使用廣泛，但浸沒醱酵產量之顯著挑戰仍存在，且包括重要因素，諸如歸因於有限氧可用性及攪動產生之過度剪切力的生長限制（Gibbs等人(2000) *Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. Crit. Rev. Biotechnol. 20, 17-48* ）。因為在泥土表面條件下氧水溶性為約8 mg/L，其在浸沒培養物中快速生長期間容易地耗盡。因此，需要使用複雜昂貴且能量密集型通氣及攪動系統進行連續通氣以維持較高生長速率。培養絲狀真菌甚至更加具有挑戰性，因為絲狀形態賦予非牛頓流變性行為，其進一步抑制氧傳遞至溶液（Nørregaard等人(2014) *Filamentous Fungi Fermentation. In*

Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells, H.- P. Meyer及D.R. Schmidhalter 編(Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA),第130頁至第162頁)。隨著培養物密度提高，通氣及混合培養物所需的能量之量非線性地提高以及通氣稠密培養物之能量需求極高。對於多種絲狀物質，培養物之劇烈攪動及通氣不利於菌絲生長且因此顯著降低生長速率。絲狀微生物浸沒醱酵之此等及其他挑戰需要創新的解決方案來有效地以航天器及地球外工作站中可獲得的有限資源利用此等生物體。

**【0103】** 所揭示之氣密反應器系統(1)解決此等問題且具有以下優點：

-不需要主動通氣或攪動液體培養物

-生物質原位聚集至具有顯著拉伸強度(>0.1 kg/cm生物墊寬度)之單個連貫墊中容易採集

-質地化生物墊可用於廣泛多種任務關鍵產品(亦即，食物、生物塑膠、生物燃料、營養補充劑，且作為多種藥劑之表現平台

-用水極少以及極少及/或無殘餘廢水或過程養分，同時維持較高生物質產量(80-120 g/m<sup>2</sup>/d或0.55 g/L/h)

-生長速率可轉換為少至2天內完全形成之生物墊之產量或可進一步擴展超過10天

-較高生物質密度(生物墊典型地為100-180 g/L)

-可生長具有針對不同製程之特定優點之多種絲狀真菌(包括極端微生物)

-規模放大或縮小相對直接且不會導致生產率下降。

-製程可使用由自然災害及/或太空任務產生之極寬泛多種富含C及N之廢棄菌糠。

**【0104】** 所揭示之氣密反應器系統(1)提供一種自給自足的生物膜-生物墊反應器，其包含容器及置放於該容器內之原料、真菌接種物、透氣膜

(2) 及視需要的液體營養培養基。視需要而定，反應器可為單次使用反應器或可重複使用反應器。

**【0105】** 典型地，容器能夠密封且除密封件外可包括容器蓋。一些容器實例為有蓋盤、有蓋皮氏培養皿、另一類型的有蓋容器或袋。對於一些用途或在一些環境中，容器具有複數個生長腔室，例如在歧管設計及/或折流系統之後。為了使一些環境條件下之效率最大化，容器由一或多種原料產生；此等原料可或不與置放於容器內之原料相同。

**【0106】** 原料用真菌菌株，諸如子囊菌或擔子菌真菌菌株接種。子囊菌菌株之實例為尖鏟孢菌品系MK7（美國典型培養物保藏中心寄存之ATCC PTA-10698，美國弗吉尼亞州馬納薩斯1081大學大街）、鏟孢黴、燕麥鏟刀菌及/或其組合。原料接種可在將原料置放於容器內時進行或有時可在原料已置放之後進行。亦即，氣密反應器（1）可用在與原料接觸後復活之冷凍乾燥絲狀真菌接種物預塗底，或原料可直接在置放於氣密反應器通道（4）中之後接種，或可接種原料且隨後置放於氣密反應器通道中。

**【0107】** 相對於反應器中使用之原料，原料可為廢棄產物，諸如天然存在之尿液及/或糞便、食物廢棄物、植物材料；工業廢料，諸如丙三醇；及廢棄副產物、澱粉及/或澱粉水解副產物、酸乳清、糖醇及/或其組合。亦可使用合成或製造之廢棄代替物，諸如替代人類尿液。植物材料原料典型地為木質纖維素。木質纖維素原料之一些實例為農作物殘餘物（例如小麥秸稈、大麥秸稈、水稻秸稈、小粒穀類秸稈、玉米秸稈、玉米纖維（例如玉米纖維膠（CFG）、乾酒粕（DDG）、玉米蛋白粗粉（CGM）、柳枝稷、甜菜漿、棕櫚油生產碎屑流、紫花苜蓿乾草、甘蔗渣、非農業生物質（例如藻類生物質、藍綠菌生物質、城市樹殘餘物）、森林產物及工業殘餘物（例如軟木一次/二次研磨殘餘物、硬性軟木一次/二次研磨殘餘物、再循環紙漿污泥）、含有木質纖維素之廢

棄物（例如新聞紙、廢紙、釀造穀物、用過橡膠輪胎（URT）、城市有機廢棄物及副產物、碼頭廢棄物及副產物、臨床有機廢棄物及副產物及在生物燃料（例如經處理之藻類生物質、丙三醇）生產期間產生之廢棄物及副產物及其組合。

**【0108】** 透氣膜（**2**）允許圖19-22中所說明之若干不同方法中之系統之最佳化。儘管圖式中所說明之氣密反應器系統具有總共九條通道（**4**），熟習此項技術者瞭解，可存在任何數目之通道（**4**），自單個通道（**4**）至多個通道（**4**），視可用於置放氣密反應器（**1**）之空間而定。類似地，通道（**4**）之形狀不限於矩形稜柱或圓柱體且可呈適合裝配、可用於氣密反應器（**1**）之任何形狀。

**【0109】** 在一些情況下，使膜（**2**）與容器中存在之原料、視需要選用之液體培養基及接種物之表面直接接觸，如圖16中所示。膜亦可與原料表面密封接觸，例如藉由使其附著至具有整合式橡膠襯墊之塑膠框架。

**【0110】** 在其他實例中，膜懸浮於原料上方，以使得隨著真菌生長及氧消耗，膜下降至該墊或於位於膜與原料之間的折流系統上，允許氣生菌絲生長。此類系統顯示於圖19中。此處，氣密反應器（**1**）由多個通道（**4**）構成，該等通道在反應器前部（**7**）處之進口閥（**6**）處起始，在反應器後部（**5**）處之出口閥（**8**）處終止，且由擋板/壁（**9**）分隔開。透氣膜（**2**）形成反應器之頂部。反應器底部（**3**）可由任何適合的物質形成，包括（但不限於）硬性及軟性塑膠兩者，諸如聚對苯二甲酸伸乙酯、高密度聚乙烯、聚氯乙烯、聚乳酸、聚碳酸酯、丙烯酸、縮醛、耐綸、丙烯腈丁二烯苯乙烯、玻璃、金屬（諸如鋁、鈦、不鏽鋼等）及/或其組合。擋板/壁（**9**）可由類似材料製成。適合的前部（**6**）及後部（**8**）閥門包括（但不限於）單向閥、雙向閥、球閥、蝶形閥、閘閥、塞閥、球閥、夾緊閥、圓盤止回閥、附著閥、脫離閥及/或其組合。

進口閥（6）用以提供腔室（4）入口以用於將原料/培養基遞送至腔室，而出口閥（8）允許移除耗盡原料及/或絲狀真菌生物墊。透氣膜（2）可由聚合材料構成，該聚合材料諸如聚丙烯、聚乙烯、聚四氟乙烯、聚碳酸酯、聚醯胺、聚吡嚨、聚(醯胺基胺)樹狀體複合物、乙酸纖維素、丁二烯-丙烯腈、TeflonAF2400及耐綸。儘管透氣膜（2）之孔徑典型地在0.05-1.5  $\mu\text{m}$ 範圍內，諸如0.2  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ 及1.0  $\mu\text{m}$ ，膜（2）可呈無菌織物類材料形式或紙類材料形式。對於一些用途，膜表面質地光滑，對於其他用途，表面質地粗糙。另外，氣體擴散路徑可在基本上徑直至之後更迂曲的路徑之範圍內變化。

**【0111】** 在其他情況下，該膜有助於氧進入及真菌生長期間產生之其他氣體離開（圖18）。在此情況下，氣密反應器（1）具有緊靠著在透氣膜（2）頂上之氣體採集腔室（14）（參見圖20）。氣體採集腔室（14）可由與用於壁/擋板（9）或反應器底部（3）之彼等者類似的材料製成；亦即硬性及軟性塑膠兩者，諸如聚對苯二甲酸仲乙酯、高密度聚乙烯、聚氯乙烯、聚乳酸、聚碳酸酯、丙烯酸、縮醛、耐綸、丙烯腈丁二烯苯乙烯、玻璃、金屬（諸如鋁、鈦、不鏽鋼等）及/或其組合。或者，氣體採集腔室由通道（15）（其可鏡射氣密反應器（1）之通道（4）或其涵蓋多於一個氣密反應器通道（20））構成（參見圖21）。

**【0112】** 在又其他系統中，單獨透氣膜用於氣體進入及離開。圖22說明此類系統。在此情況下，將兩種不同透氣膜（2、50）饋入單獨氣體採集通道（30、40）中且存在於單個反應器通道（4）內。此類型系統允許不同適用的氣體進入、離開及/或採集及/或分離。作為實例，一種膜可能經校準用於氧通過且第二膜經校準用於二氧化碳或氫通過或其他相關氣體系統。

**【0113】** 反應器（1）產生用作食物來源，諸如蛋白質源及/或油源之生物膜-生物墊。然而，生物膜-生物墊亦可充當皮革類似物、生物塑膠、生物燃

料前體來源、生物燃料及/或其組合。在又其他具體實例中，生物膜-生物墊用以產生有機產物，諸如有機酸、抗生素、酶、激素、脂質、黴菌毒素、維生素、色素及重組異源蛋白質。

**【0114】** 所揭示之生物膜-生物墊反應器醱酵技術實現標準以及極端原料及培養基，諸如人類廢棄物（尿液/糞便）上之生長，且產生高度固結及質地化產物，而不需要分離或濃縮步驟。在不需要主動通氣或攪動之情況下實現相對較高生物質生產率（0.55 g/L/h乾燥生物質）及較高培養物密度（100-180 g/L）。垂直地、水平地及/或超過兩個尺寸之系統規模放大簡單且不會導致生產率下降。所產生之生物膜-生物墊典型地為0.2至2.5 cm厚，其中乾物質含量為10-30%，且可容易地用於任務關鍵需求，諸如肉類替代物、多種其他開胃食物及建築材料。

**【0115】** 所揭示之反應器系統中生長之真菌生物膜-生物墊描述為薄膜，其在多種方法中與表面上生長之微生物生物膜類似，但懸浮於氣體-液體界面處之液體培養物中。舉例而言，生物膜內之細菌細胞已顯示耐受次氯酸鈉（漂白）及氫氧化鈉（Corcoran, 2013）之極端滅菌處理。所揭示之反應器系統利用生物膜結構，使得能夠在可在極端條件下產生之惡劣的人類及工業廢物及副產物，諸如太空任務或自然災害產生之其他惡劣條件產生之彼等者上生長。

**【0116】** 所揭示之反應器設計併有直接位於液體表面上或恰好懸浮於液體表面上方之透氣膜。囊封反應器設計允許與外部氣氛氣體交換，但為氣密密封的以防止污染物進入或氣體/液體逃出。囊封反應器設計亦可藉助於透氣膜實現可消耗的氣體與逸出氣體分隔開。為了實現此，在一些情況下，具有相同或不同特性之閥門及/或額外多孔膜用來在一或多種原料之各種態樣與視需要選用之液體培養基之間形成不同層。

**【0117】** 使用所揭示之反應器設計之快速生物膜-生物墊生長已展現具有

多種透氣膜材料。圖17顯示約7 mm厚在反應器中生長之生物墊，其中該容器為覆蓋有直接置於原料/液體培養基表面上之聚丙烯膜之皮氏培養皿。最初生物膜藉由直接附著至膜形成且隨時間推移向下生長至液體培養基中（參見圖16）。截至五天生長時間段結束，基本上所有原料/液體培養基耗盡且稠密生物質完全填充膜下方之體積。

**【0118】** 所產生之生物墊僅適度地黏著至該膜且容易藉由僅自該膜剝掉生物墊採集（參見圖17A-D）。聚碳酸酯膜之額外實驗產生類似結果（資料未示出）。因此，可高效地利用總反應器體積以產生稠密、容易採集的生物質。

**【0119】** 所揭示之反應器中通常產生之生物膜-生物墊固結（110-180 g/L），且視真菌及生長條件而定，展現纖維質地。生產纖維生物質可為某些任務關鍵產物，諸如需要質地以模仿肉類之食物以及模仿皮革及木材之纖維材料而言為關鍵的。生物質之固結性質亦實現簡單採集，而不需要濃縮步驟（例如離心、過濾）。

#### 在零重力下使用生物膜-生物墊反應器

**【0120】** 控制所揭示之反應器中之生物膜-生物墊之形成及生長的主要物理力附著至膜。不受理論束縛，據相信，所揭示之反應器中之生長將不受太空飛行期間經歷之零重力條件影響。重力驅動方向生長或藉由物理混合或流動控制之生長不為該系統中之置換因素，因為其往往會在重力環境中。太空中之先前實驗成功地展現真菌生長（European Space Agency, Expeditions 25-28, Growth and Survival of Colored Fungi in Space (CFS-A)），提供所揭示之反應器系統將在太空環境中起作用之額外置信度量度。

**【0121】** 為了太空任務及易於部署，可在反應器中預裝載冷凍乾燥接種物及必需成分以支持在特定原料（若需要）上生長。宇航員及太空旅行者可隨後製備原料、接種物及任何培養基組分。培育時間視原料、微生物菌株及其他

生長參數，諸如pH、溫度及水含量而定。培育條件為簡單的，因為醱酵在靜態條件下執行，其中反應器僅在適當的位置培育。稠密固結生物墊藉由僅打開反應器封閉件（例如ziplock®類型）及移除墊採集。

## 實施例

### 實施例1：菌株尖鏟孢菌品系MK7及其他真菌在靜態盤反應器中之生長。

【0122】 使絲狀嗜酸尖鏟孢菌品系MK 7、赤芝（靈芝；圖12A）、糙皮側耳菌（珍珠耳，圖12B；及藍耳，圖12C）、繡球菌（花椰菜；圖12D）、榆幹玉蕈（榆耳；圖12E）、禿馬勃（大禿馬勃；圖12F）及鏟孢黴生物墊在較淺靜態盤反應器中生長，如PCT/US2017/020050中所描述。

### 實施例2.尖鏟孢菌品系MK7生物墊在每日更新之營養培養基上之生長（半靜態條件）。

【0123】 在21天內在每日更新之營養培養基上使約3 cm厚稠密尖鏟孢菌品系MK7生物墊生長。在12.7×17.8 cm Pyrex®玻璃盤中，使用含有7.5%丙三醇（在pH 3.0下）無菌MK7-1液體培養基（PCT/US2017/020050中所描述）產生生物墊。為了開始實驗，在晚期指數生長階段中，用5%（體積/體積）尖鏟孢菌品系MK7培養物接種200 mL營養培養基，如先前在PCT/US2017/020050中所描述。將200 mL經接種之培養基添加至內襯有無菌粗粒耐綸篩網之三個無菌盤中之每一者中。培養物在室溫（約22°C）下不受干擾培育4天以允許液體表面處形成之最初生物墊層發展。在4天生長之後，使用耐綸篩網將生物墊輕輕地提舉離開盤且以45度角度傾斜以允許自墊排出液體。在此位置中使生物墊排水直至每五秒滴出小於一滴液體。平均在約3分鐘之後，發生足夠的瀝乾。將其篩網中之滴乾生物墊置放於含有200 mL新鮮MK7-丙三醇培養基之新鮮預稱重之12.7×17.8 cm Pyrex®盤中（描述於PCT/US2017/020050中）。再稱重具有生物墊之盤。在約每日基礎上重複將生物墊移動至含有新鮮培養基之另一盤之過程持

續額外17天。生物墊中之一者之取樣在第12天、第15天及第21天發生且測定此等生物墊之濕氣含量。生物墊之平均水分含量為17.3%（標準偏差=0.7）且此值用於計算實驗持續時間內之乾燥生物質產量。乾燥生物質產量自第4天至第18天為線性的（ $r=0.995$ ），其後生物質重量穩定在約2.5 Kg乾燥/m<sup>2</sup>下（圖1，y軸標準化至每m<sup>2</sup>基礎，在第0天與第4天之間生長典型地為指數的）。線性生長之此時間段內之平均生長速率為6.04 g/m<sup>2</sup>/h。圖2顯示在使用此方法生長總共21天之後產生的約3 cm厚生物墊。

### 實施例3.生物墊在連續流動條件下之生長。

【0124】 製成連續流生物反應器系統以表明生物墊在流動的液體培養基之表面上之生長。該系統由2.44 m長透明塑膠屋頂面板與用作流動通道之一系列波紋製成（圖3）。中之每一者通道之末端用矽（100%聚矽氧，DAP Products公司, Baltimore, MD）擋起，使得液體能夠保持在通道內。藉由將液體培養基經由蠕動泵遞送至通道一端來促進流體通過通道，其中液體退出通道底部中之通道通孔之另一末端。整個塑膠屋頂面板系統以每1 m回合升高1 cm之角度傾斜以使得約500 mL液體保持在各通道中且隨液體之量及傾角之角度變化的一致流。

【0125】 面板系統經消毒且包裹在Saran®類塑膠包裹物中以將該系統與周圍空間環境隔離。無菌空氣在塑膠包裹物下以400 mL/min之速率泵送，對該系統產生正壓。為了在開始流動之前使生物墊開始發展，每通道添加用所需絲狀真菌接種之500 mL體積營養培養基且使其在靜止/靜態條件下培育4天。在4天之後，蠕動泵遞送400 mL/d之連續脈衝流以「饋入」生物墊（在2.016 mL/min下開啟49分鐘39秒；關閉5小時10分鐘21秒）。兩個單獨實驗用使用兩個單獨流動通道作為複本之各實驗執行（圖3）

【0126】 固結生物墊在營養培養基上生長10天（4天在靜止/靜態條件

下，繼而6天在連續流下；圖4）之後採集。所產生之生物質之平均乾重為重複流動通道之平均2.38 g。在連續流時間段（第4天至第10天）期間，藉由使生物墊生長之流動液體培養基之C及N平均移除速率分別為11.9及1.2 mg/L/h。液體培養基之C及N移除速率藉由量測液體體積及使用Costech總C及N分析器（ECS 4010，Costech Analytical Technologies，Valencia，CA）自生物反應器系統之總C及N輸入及輸出測定。因此，連續流系統支持在表面處之生物墊生長。實驗亦充當用於連續饋入尖鏟孢菌品系MK7生物墊生長及固結生物墊生產之實驗室規模論證。應注意，其他原料、流動速率及所得生長速率可用此類型系統實現。舉例而言，在MK7-1培養基（描述於PCT/US2017/020050中）中之10%丙三醇在pH 2.8下之情況下，預期產率大於40公克乾燥生物質/天/m<sup>2</sup>。

#### **實施例4.尖鏟孢菌品系MK7生物墊之半連續及連續生產。**

**【0127】** 在半連續基礎上在19天之時間段內使稠密尖鏟孢菌品系MK7生物墊生長且採集。使用酸乳清作為調節至pH 4.0之補充有½強度MK7-1培養基鹽（描述於PCT/US2017/020050中）之原料/碳源產生生物墊。為了開始實驗，在晚期指數生長階段中，將用尖鏟孢菌品系MK7（5%體積/體積）接種之200 mL營養培養基添加至12.7×17.8 cm Pyrex®滅菌玻璃盤中，其隨後覆蓋有Saran®包裹物且在室溫下培育。在5天生長之後，藉由切割及移除5.9×12.7 cm生物墊部分自盤一端移除1/3生物墊（圖5A）。殘留的2/3生物墊隨後以物理方式越過藉由移除1/3生物墊部分產生之培養基之開放區域。藉由以物理方式用無菌戴手套的手指抓握其且靠邊拉動生物墊直至其觸碰盤末端至敞口培養基（其中在盤之另一末端無形成的生物墊）來轉換生物墊（圖5B）。週期性重複採集生物墊最成熟部分之1/3部分且隨後在開放區域內移動殘留的2/3生物墊之過程。每4天自盤無菌移除50 mL培養基且用50 mL新鮮無菌培養基（具有½強度MK7-1之酸乳清）替換以補給藉由移除生物墊自液體培養基移除之養分。使用此方法之乾燥

生物質生產產生0.57 g/天/盤或在第5天與第19天之間25.2 g/d/m<sup>2</sup>（圖6）。因此，展現半連續生產系統，由此生物墊之最成熟末端以1.56 cm/天之平均速率採集，且新鮮生物墊生長在盤之另一末端處之培養基之開放區域中起始。

**【0128】** 該系統亦適合於生物墊之連續採集及生長，由此藉由連接至生物墊之成熟末端之滾輪促進連續移除（圖7）。滾輪緩慢轉動且採集成熟生物墊，且同時在盤之另一末端處產生用於新生物墊生長之敞口培養基。滾輪以1.56 cm/天之速率轉動且採集生物墊以使上文所描述之半連續系統再生。合乎需要的是，液體培養基中之養分以藉由生物墊移除養分之速率補充。

#### **實施例5.膜囊封生物反應器。**

**【0129】** 稠密尖鏟孢菌品系MK7生物墊在囊封於不具有氣體頂部空間之生物反應器系統中之液體生長培養基中生長。用含有8%丙三醇之57 mL經接種之MK7-1培養基（描述於PCT/US2017/020050中）將無菌皮氏培養皿底部（55 mm直徑）填充至邊緣。將聚丙烯及聚碳酸酯之氣體可滲透/半透膜直接置放於液體培養基之表面上且緊密地用橡膠帶密封。在生長時間段開始時不提供氣體頂部空間。

**【0130】** 在接種培養基及密封膜之後，使生物反應器靜置直至採集。圖8顯示分別在五天内直接在聚丙烯（圖17A-C）及聚碳酸酯（圖17D）膜下方生長之約5 mm及約1 mm厚尖鏟孢菌品系MK7生物墊。生物墊適度地黏著至膜且可容易地藉由僅自膜剝掉生物墊採集（圖17）。

#### **實施例6：藉由用UVB照射尖鏟孢菌MK7生物墊生產色素及維生素D2**

**【0131】** 藉由尖鏟孢菌品系MK7生物墊，UVB光（290-320 nm）用於觸發色素產生。在3天內在7.5%丙三醇MK7-1培養基（描述於PCT/US2017/020050中）上產生之尖鏟孢菌品系MK7生物墊用UVB光照射4小時之時間段。UVB光自50 W燈泡（Slimline Desert 50 UVB T8螢光燈泡，46 cm；Zilla, Franklin, WI）

發射，置放於生物墊上方10 cm處。在0.5小時照射之後以肉眼偵測到橙色色素沉著且在4小時照射之後變得明顯（圖9）。另外，尚未曝露於UVB光之生物墊具有小於50 IU/100 g生物墊之維生素D2含量，而在UVB光曝露約12小時之後，維生素D2含量提高至約120萬IU/100 g生物墊。

### **實施例7：在丙三醇、澱粉及玉米浸液之混合物上生長之尖鏟孢菌品系MK7生物墊**

**【0132】** 尖鏟孢菌品系MK7生物墊在少至4天內由丙三醇、澱粉、玉米浸液及MK7-1鹽之混合物（描述於PCT/US2017/020050中）產生。丙三醇購自Duda Energy有限責任公司（Decatur, AL；99.7%純度；USP等級；批次號466135376340）；由Argo食品公司（Memphis, TN）製造之100%Argo玉米澱粉購自Bozeman, MT之Albertson超級市場，且玉米浸液購自Santa Cruz生物技術公司（Dallas, TX；批次號B0116）。生長培養基為7.5%丙三醇（重量/重量）、2.5%澱粉及2.5%玉米浸液與MK7-1鹽之混合物。藉由添加適量HCl將混合物調節至pH 3.3且在適合的容器中沸騰15分鐘。在冷卻至室溫之後，混合物之pH再調節至3.3，且隨後用如PCT/US2017/020050中所製備之5%尖鏟孢菌品系MK7接種物（體積/體積）接種。將1.5 L接種培養基之等分試樣添加至三個經消毒之0.25 m<sup>2</sup>聚丙烯盤中，置放於完全覆蓋有鋁箔之經消毒之盤機架系統中以產生黑暗條件，且在23°C±1°C下培育。在培養基表面處生長之絲狀真菌生物墊在4天之後僅藉由自盤提舉生物墊採集。

**【0133】** 三個盤中之殘餘液體之平均最終pH為4.45（標準差=0.14）。切出三個56.7 cm<sup>2</sup>環形部分且在隨機位置處自生物墊中之每一者移除且此等部分在50°C下乾燥48小時以獲得乾燥重量。平均生物質乾重（標準差）為124.6 g/0.25 m<sup>2</sup>（43.4）或498.4 g/m<sup>2</sup>（173.6）。潮濕生物墊之平均厚度為7.5 mm且以乾重計平均密度為0.66 g/cm<sup>3</sup>。

【0134】 為了曝露生物墊長絲及藉由場發射掃描電子顯微鏡檢查（FE-SEM）實現檢驗，長絲之間的細胞外聚合物質（EPS）藉由用乙醇洗滌移除。為了實現此，緊接著在採集之前用剃刀片切下1 cm<sup>2</sup>生物墊部分（1 cm×1 cm），且藉由在如下40 mL乙醇混合物中依次浸沒樣品持續指定時間來使切下部分經受乙醇洗滌/脫水系列：25%乙醇、75%去離子H<sub>2</sub>O，持續20分鐘；50%乙醇、50%去離子H<sub>2</sub>O，持續20分鐘；75%乙醇、25%去離子H<sub>2</sub>O，持續20分鐘；95%乙醇、5%去離子H<sub>2</sub>O，持續20分鐘；100%乙醇、0%去離子H<sub>2</sub>O，持續60分鐘。100%乙醇處理重複額外2次，之後將樣品儲存於100%乙醇中。

【0135】 為了保留FE-SEM之生物墊之微結構完整性，根據製造商說明書（Tousimis Samdri-795操作手冊；Tousimis，Rockville，MD），進行乙醇洗滌/脫水，繼而使用Tousimis Samdri-795關鍵點乾燥器進行點乾燥。在關鍵點乾燥之後，樣品直接安裝於鋁短柱上或在安裝之前用剃刀片切成<0.3 mm厚部分。樣品隨後塗佈有銨（20 μm，EMITECH K575X，電子顯微法科學，Hatfield，PA）且用使用1 keV之入射光束能量用JEOL 6100 FE-SEM檢驗（JEOL美國公司，Peabody，MA）。

【0136】 FE-SEM成像揭示，交織菌絲長絲之複雜網狀結構（圖10）與藉由光顯微術如PCT/US2017/020050中報導之丙三醇上生長之生物墊所揭示之結構極其類似。觀測到三個不同層：（a）頂部表面處之氣生菌絲層、（b）稠密底層及（c）頂部與底部層之間的過渡層。過渡層僅鬆散地連接至稠密底層，因此能夠使得底層與生物墊之其餘部分容易分離。過渡層之長絲密度在略微小於區域（其中兩層相接）中之底層之密度至與接近生物墊頂部之氣生菌絲相當之密度範圍內。

【0137】 亦藉由以下文所示順序及時間緩慢浸漬於以下溶液中製備用於光顯微術之切下樣品：

【0138】 二甲苯，3分鐘；二甲苯，3分鐘；100%乙醇，3分鐘；100%乙醇，3分鐘；95%乙醇，3分鐘；95%乙醇，3分鐘；70%乙醇，3分鐘；去離子水，3分鐘；蘇木精1，1.5分鐘；自來水沖洗，1分鐘；澄清劑溶液，1分鐘；自來水沖洗，1分鐘；塗藍溶液，1分鐘；自來水沖洗，1分鐘；70%乙醇，30次浸蘸；95%乙醇，30次浸蘸；95%乙醇，30次浸蘸；100%乙醇，30次浸蘸；100%乙醇，30次浸蘸；100%乙醇，30次浸蘸；二甲苯，30次浸蘸；二甲苯，30次浸蘸；二甲苯，30次浸蘸；施加蓋玻片。

【0139】 上述程序之後為在100倍放大率下光顯微鏡（B400B，Amscope，Irvine，CA）顯現（圖11）。

【0140】 緊接著在採集之前用剃刀片自新鮮生物墊切下尺寸約2 cm<sup>2</sup>之生物墊部分。此等部分且隨後浸沒於50 mL錐形底部離心管中之35 mL去離子水中。對管進行音波處理（CP200T Ultrasonic Cleaner, Crest Ultrasonics, Ewing, NJ）0、40、90或150秒以將長絲分散於液體中且實現顯微鏡觀測。將來此此等管之液體等分試樣（約100 μL）置放於覆蓋有蓋玻片之玻璃載片上，且在100倍放大率下用光顯微鏡（B400B, Amscope, Irvine, CA）進行觀測。量測未斷裂長絲之平均長度（標準偏差），且對於0、40、90及160秒音波處理處理，分別測定為1.1（0.6）、1.2（0.4）、1.0（0.4）及1.2（0.2）mm。各處理中觀測到之最大長絲長度分別為2.5、1.4、1.8及1.4 mm。相比於尖鏟孢菌品系MK7在浸沒的搖瓶培養物中之生長，此等長絲長度明顯更長，其中平均長度小於0.02 mm。

**實施例8：使用在丙三醇、澱粉及玉米浸液之混合物上生長之尖鏟孢菌品系MK7生物墊產生雞塊**

【0141】 如上文所描述產生之尖鏟孢菌品系MK7生物墊用於產生雞塊。潮濕生物墊在罐蒸鍋中在97°C下汽蒸0.5小時，冷卻至室溫且用作產生雞塊之基

料。將汽蒸潮濕生物墊（200 g）切削成小於0.5 mm長碎片且與4%（重量/重量；8 g）雞基料及4%蛋白色蛋白質（8 g）均質化。所得混合物包含超過90%尖鏟孢菌品系MK7生物墊。此生物墊混合物之部分（約30 g）形成為圓塊形狀且在罐蒸鍋中汽蒸。所製備之圓塊藉由塗佈在蛋白中裹麵包屑，且隨後在油炸之前與黏著至表面之麵包屑混合。所製備之圓塊展現雞肉類質地（圖13A）且散發典型的雞肉香味。根據口味及質地，5人評味測試認為圓塊緊密模仿含有雞塊之實際雞。

#### **實施例9：生產尖鏟孢菌品系MK7生物墊萃取物。**

**【0142】** 高度濃縮及黏稠萃取物由尖鏟孢菌品系MK7生物墊產生。沖洗及汽蒸如先前所描述培養4-16天之後採集的生物墊，在多孔塑膠篩網上滴乾5分鐘，且置放於塑膠袋中並密封。在初始密封袋中在60°C培育箱培育48小時之前，在殘留的培養基液體pH調節至pH 4-6之間之後，將密封袋在-20°C或-80°C下冷凍24小時。在熱處理之後，按壓生物墊通過<1.5 mm孔徑過濾器且採集所得液體。使所採集之液體在不反應容器中沸騰10分鐘，隨後在60°C下乾燥直至水含量為約6-8%，形成黏性糊狀萃取物。萃取物之營養值與汽蒸生物墊及由汽蒸生物墊製成之細粉之營養值類似。

#### **實施例10.自生長於酸乳清上之尖鏟孢菌品系MK7生物墊產生優格。**

**【0143】** 尖鏟孢菌品系MK7生物墊直接用於產生優格。使生物墊在盤中在作為希臘優格製造副產物產生之酸乳清原料/碳源上生長，6天後採集且在採集20分鐘內汽蒸。將200 g冷卻潮濕生物質與600 g飲用品質自來水摻合在一起以產生稱為「MK7液體分散液」之牛乳類懸浮液。MK7液體分散液用作成分本身或與牛乳組合以產生優格。

**【0144】** 製備含有不同比率MK7液體分散液與全牛乳之三個混合物：  
1) 25% MK7液體分散液:75%全牛乳，2) 50% MK7液體分散液:50%全牛乳，

及3) 100% MK7液體分散液。藉由將各混合物加熱至83°C且在持續攪拌下在該溫度下保持14分鐘，使用混合物製得三個批次之優格。使混合物冷卻至43°C，且隨後添加活優格培養物作為接種物。在44°C下在優格製造機（型號YM80；EuroCuisine，加利福尼亞州洛杉磯（Los Angeles，CA））中培育所得混合物8小時。所有所得混合物具有優格之外觀及質地（圖14）以及與典型的優格類似之氣味及口味。

### 實施例11：蘑菇生物墊在丙三醇上之生長。

【0145】 使用丙三醇作為主要碳源（原料），在少至10天內產生由Baby Bella Brown大褐菇（雙孢蘑菇）及白色蘑菇構成之生物質生物墊。此等共同可食用蘑菇購自Bozeman，MT之Albertson超級市場且儲存於4°C下。用於使蘑菇生長之培養基由1 L 7.5%丙三醇與MK7-1鹽（描述於PCT/US2017/020050中）組成，其沸騰10分鐘，繼而冷卻至室溫（約23°C）。將混合物之pH調節至2.7且將200 mL pH經調節之混合物倒入兩個無菌12.7×17.8 cm Pyrex®盤中。接種物由添加至各盤中之培養基中之5 g經摻合之表面滅菌大褐菇或白色蘑菇組成。蘑菇接種物製備如下：1) 將10 g潮濕大褐菇或白色蘑菇添加至200 mL 5%漂白溶液中且攪拌懸浮液2分鐘以使蘑菇表面滅菌，2) 隨後藉由轉移至200 mL無菌丙三醇/MK7-1鹽培養基（描述於PCT/US2017/020050中）中沖洗蘑菇且攪拌2分鐘，3) 在已藉由與70%乙醇沖洗滅菌之咖啡研磨機中摻合表面滅菌蘑菇30秒，4) 再次藉由用經研磨之生物質重複步驟1及2使經研磨之蘑菇生物質（<5 mm長聚集體）表面滅菌，5) 在Pyrex®盤中將5公克經研磨之蘑菇生物質添加至液體培養基中（在添加蘑菇之後，最終pH =4.0-4.1），及6) 覆蓋盤且在室溫（22±2°C）下在暗處培育。

【0146】 在3天培育之後，觀測到生物墊在培養基之表面上發展，且在生長10天之後採集固結生物墊。在盤中大褐菇之生物墊覆蓋液體培養基之整個表

面，而白色蘑菇之生物墊生長覆蓋約1/2液體培養基作為五個漂浮生物墊島。生物墊之平均厚度為1.5 mm（對於大褐菇）及1.7 mm（對於白色蘑菇）。生物質生物墊在50°C下乾燥48小時，且分別對於大褐菇或白色蘑菇，每盤產生之乾燥重量為1.14 g及2.12 g。分別對於大褐菇或白色蘑菇，乾燥生物質生物墊以乾重計之密度為0.033及0.111 g/cm<sup>3</sup>。

**【0147】** 顯微鏡影像揭示生物墊之菌絲性質。分別對於大褐菇或白色蘑菇生物墊，平均菌絲厚度為25.2 μm（標準偏差=6.2）及18.7 μm（4.0）。

**【0148】** [148]所產生之大褐菇生物墊用於產生雞塊。生物墊在97°C下汽蒸0.5小時，冷卻至室溫且用作產生基料之雞塊。將汽蒸潮濕生物質（2.5 g）與3%（重量/重量；75 mg）Better Than Bouillon雞基料（Southeastern Mills公司 Rome, GA）及3% Eggwhite蛋白質（75 mg；Now Foods, Bloomingdale, IL）混合且使用剃刀片切削成小於2 mm長碎片。混合物形成為圓塊且汽蒸0.5小時。所製備之圓塊提供具有輕微蘑菇芳香之典型的雞肉香味。當品嚐時，圓塊具有雞肉至中性香味。

### **實施例12. 蘑菇生物墊在麥芽及丙三醇培養基上之生長。**

**【0149】** 在少至5天內使用麥芽萃取物培養基001、丙三醇培養基002、漢森培養基、MK7-SF培養基、麥芽萃取物+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>培養基003（表3）產生由禿馬勃（大禿馬勃）、糙皮側耳菌（珍珠耳）、黃白側耳（藍耳）、榆幹玉蕈（榆耳）、繡球菌（花椰菜）及赤芝（靈芝）構成之生物質生物墊。所有最終培養基含有0.01%氯黴素。

**【0150】** 表3. 添加至去離子或飲用品質自來水中以製備養分培養基之成分。

麥芽萃取物培養基 001					
成分	量	等級	批次號	供應商	地點
淡皮爾森麥芽	40.0 g	食物	180526B	Homebrewstuff.com	Boise, ID
蛋白腴	4.0 g	研究	44984-57374	Research Products International	Mt. Prospect, IL
酵母萃取物粉末	1.2 g	研究	53852-66581	Research Products International	Mt. Prospect, IL
菜籽油	1.0 mL	食物	SEP/25/19 CA S3283	Better Living 有限責任公司	Pleasanton, CA
經研磨之燕麥	4.0 g	食物	Jan 25, 2020 I2M 06:36	Walmart-Stores 公司	Bentonville, AR
自來水 H <sub>2</sub> O	1000 mL	N/A	N/A	N/a	Bozeman, MT

丙三醇培養基 002					
成分	量	等級	批次號	供應商	地點
丙三醇	40.0 g	食物/USP	20149018137001	Duda Energy 有限責任公司	Decatur, AL
蛋白腴	4.0 g	試劑	44984-57374	Research Products International	Mt. Prospect, IL
酵母萃取物粉末	1.2 g	試劑	53852-66581	Research Products International	Mt. Prospect, IL
菜籽油	1.0 mL	食物	SEP/25/19 CA S3283	Better Living 有限責任公司	Pleasanton, CA
經研磨之燕麥	4.0 g	食物	Jan 25 2020 I2M 06:36	Walmart-Stores 公司	Bentonville, AR
自來水 H <sub>2</sub> O	1000 mL	N/A	N/A	N/a	Bozeman, MT

漢森培養基					
成分	量	等級	批次號	供應商	地點
蛋白腴	1-0 g	試劑	44984-57374	Research Products International	Mt. Prospect, IL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	*0.3 g	試劑	製造商不使用批次號	Eisen-Golden Laboratories	Dublin, CA
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	2.0 g	USP	81721	San Francisco Salt 公司	San Leandro, CA
葡萄糖	5.0 g	試劑	0435C235	Fisher Scientific	Denver, CO
自來水 H <sub>2</sub> O	1000 mL	N/A	N/A	N/a	Bozeman, MT

MK7-SF 培養基					
成分	量	等級	批次號	供應商	地點
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	7.553 g	ACS	A0390194	Acros Organics	Somerville, NJ
脲	2.548 g	USP	30570-67229	Research Products International	Mt. Prospect, IL
CaCl <sub>2</sub>	2.000 g	試劑	102615	Fritz Pro Aquatics	Mesquite, TX
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	2.000 g	USP	81721	San Francisco Salt 公司	San Leandro, CA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.500 g	試劑	製造商不使用批 次號	Eisen-Golden Laboratories	Dublin, CA
痕量*	2.000 mL	*	*	*	*
丙三醇	0.075 Kg	食物/USP	20149018137001	Duda Energy 有限 責任公司	Decatur, AL
酵母萃取物	1.750 g	研究	53852-66581	Research Products International	Mt. Prospect, IL
FeCl <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	0.020 g	試劑	951164	Fisher Scientific	Fair Lawn, NJ
DI H <sub>2</sub> O	0.940 L	N/A	N/A	N/A	Bozeman, MT

痕量組分*					
微量養分*	mg/L	等級	批次號	供應商	地點
FeSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	9.98	ACS	3562C398	Amresco	Solon, OH
ZnSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	4.4	USP/FCC	61641	Fisher	Waltham, MA
MnC12•4 H <sub>2</sub> O	1.01	試劑	13446-34-9	Fisher	Waltham, MA
CoC12•6 H <sub>2</sub> O	0.32	試劑	7791-13-1	Fisher	Waltham, MA
CuSO <sub>4</sub> •5 H <sub>2</sub> O	0.31	技術	114675	Fisher	Waltham, MA
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> •4 H <sub>2</sub> O	0.22	ACS	68H0004	Sigma	St. Louis, MO
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.23	ACS	103289	Fisher	Waltham, MA
EDTA，游離酸	78.52	電泳	46187	Fisher	Waltham, MA

麥芽萃取物+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 培養基 003					
成分	量	等級	批次號	供應商	地點
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5.0 g	ACS	A0390194	Acros Organics	Somerville, NJ
淡皮爾森麥芽	40.0 g	食物	180526B	Homebrewstuff.com	Boise, ID
蛋白腓	4.0 g	研究	44984-57374	Research Products International	Mt. Prospect, IL
酵母萃取物粉末	1.2 g	研究	53852-66581	Research Products International	Mt. Prospect, IL
菜籽油	1.0 mL	食物	SEP/25/19 CAS3283	Better Living 有限責任公司	Pleasanton, CA
經研磨之燕麥	4.0 g	食物	Jan 25, 2020 I2M 06:36	Walmart-Stores 公司	Bentonville, AR
自來水 H <sub>2</sub> O	1000 mL	N/A	N/A	N/A	Bozeman, MT

【0151】 表3中之上述菜譜藉由將指定成分混合入特定體積水中用於在2 L Pyrex®瓶子或8 L不鏽鋼罐中製備培養基，視所需培養基體積而定。將成分添加至水中，同時用攪拌棒或勺子連續地攪拌液體。在添加下一組分之前，將培養基之各組分充分混合至液體中，將MK7-SF培養基之pH調節至5.0，且對溶液進行高壓處理。所有其他pH僅由混合成分產生。在20 psi及121°C下高壓處理培養基及容器至少20分鐘。液體之滲透壓使用Advanced Instruments公司滲透計型號3250（Two Technology Way, Norwood, MA）量測。

【0152】 在高壓處理之後，使培養基冷卻至室溫且用顯示於表4中之蘑菇屬物種（mushroom species）接種個別容器。

【0153】 表4.蘑菇孢子（10 cc針筒）購自MycoDirect（12172 Route 47, Ste 199 Huntley, IL 60142）且在8/2/2018接受。榆耳孢子購自Everything Mushrooms（1004 Sevier Ave Knoxville, TN 37920）且在8/3/2018接受。

	批次	公司生產日期
藍耳	3-P7	2-2018
珍珠耳	9P8	12-2017
大禿馬勃	N/A	3-2018
花椰菜蘑菇	N/A	4-2018
榆耳（1cc 乾燥）	N/A	10-2017

【0154】 使用以下應用方法，使用無菌技術預先形成生長培養基之接

種。此等實驗中之所有無菌作用在II類生物安全櫥櫃中進行。在此前經高壓處理之12.7×17.8 cm Pyrex®玻璃盤中，孢子針筒用於直接接種約75 mL生長培養基。此藉由將液體培養基無菌轉移至經高壓處理之Pyrex®盤中進行且用2 cc孢子注射器中所含有之懸浮液接種。盤覆蓋有無菌鋁箔，且隨後輕輕地打漩以混合經接種之培養基。

【0155】 藉由高壓處理MEA，冷卻至50°C，且將約25 mL倒入100×15 mm無菌皮氏培養皿中以無菌方式製備麥芽萃取物瓊脂（MEA；表5）培養板。

【0156】 表5.用於製備麥芽萃取物瓊脂之成分

麥芽萃取物培養基（MEA）					
成分	量	等級	批次號	供應商	地點
淡皮爾森麥芽	30.0 g	食物	180526B	Homebrewstuff.com	Boise, ID
瓊脂	20.0 g	微生物	2170501	BD	Sparks, MD
自來水 H <sub>2</sub> O	1000 mL	N/A	N/A	N/A	Bozeman, MT

【0157】 藉由將1 cc來自孢子注射器內所含有之懸浮液之液體等分至培養板上來接種MEA培養板。隨後用Parafilm®密封瓊脂培養板且在室溫下置放於純暗色抽屜中。

【0158】 在菌絲體已覆蓋MEA培養板之整個表面之後，其用於2 L具有擋板的震盪器燒瓶中之1.5 L培養基之接種。用無菌剃刀片自培養板切下約2 cm<sup>2</sup>表面上具有菌絲體之瓊脂培養基部分，且分割成約2 mm<sup>2</sup>部分，其隨後添加至含有1.5 L麥芽萃取物001培養基之兩個燒瓶中。在室溫（23±1°C）下培育培養基3天，同時手動間歇震盪（手動劇烈震盪燒瓶1分鐘，每天最少五次）。

【0159】 震盪器燒瓶中之培養物隨後用作6 L麥芽萃取物培養基001及6 L麥芽萃取物+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 003培養基之接種物。培養基接種有15%（體積）接種物培養物且充分混合。將兩升經接種之培養基倒入三個置放於盤機架中之0.25 m<sup>2</sup>塑膠盤中之每一者中。機架包裹於Saran®中且培育6天。相對稠密生物墊在4天內覆蓋整個表面且6天後採集生物墊。

【0160】 藉由自盤提舉生物墊且輕輕地手動擠壓來採集12.7×17.8 cm Pyrex®玻璃盤及0.25 m<sup>2</sup>塑膠盤之生物墊。在固定於廚房烘箱爐頭上之罐蒸鍋中在沸水（高於水表面約5 cm）內汽蒸生物墊部分（3-50 g）20分鐘。在汽蒸之後，使生物質冷卻至室溫且緊接著袋裝在Ziploc®袋中且傳送至Eurofins（Des Moines，IA）以用於蛋白質分析（N，藉由燃燒，測試編碼QD252）。

【0161】 表6.在盤中在各種類型的培養基中生長之一系列大禿馬勃之結果

培養基	盤尺寸 (m <sup>2</sup> )	pH 初始培養基	C:N	離子強度 (mmol/L)	滲透壓 (mOsm)	時間 (天)	最終 pH 游離液體	蛋白質 (%)	每表面積生物質 (g/m <sup>2</sup> )	密度 (g/cm <sup>3</sup> )	濕生物墊拉伸強度 (g/cm <sup>3</sup> )
麥芽001	0.022	6.28	19	33.1	169	5.7	5.62	32.03	71.4	0.057	314.1
丙三醇002	0.022	6.96	30	13.6	505	5.7	5.54	N/A	40	0.04	214.9
漢森MK7-SF	0.022	8.81	27	30.7	39	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
麥芽001	0.25	6.96	19	33.1	169	6.2	6.25	32.04	111.1	0.037	264.0
麥芽+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 003	0.25	6.88	7.5	145.1	287	5.8	N/A	46.88	108.3	0.11	281.1

### 實施例13.尖鏟孢菌品系MK7雞塊

【0162】 雞肉味尖鏟孢菌品系MK7為包括具有或不具有麵包屑之雞塊、亞洲風味雞肉或作為雞肉替換物之其他雞肉菜肴之多種菜譜之基本成分。由不同原料/碳源產生之尖鏟孢菌品系MK7生物墊產生略微不同的雞肉風味。丙三醇雞更甜且酸乳清雞肉往往會有點酸。

【0163】 食物處理之量及所使用之葉片（亦即，尖銳金屬葉片、較鈍金屬葉片、塑膠葉片）產生不同雞塊質地。另外，可接受的雞塊可由廣泛多種生物質尺寸產生。亦即，生物質可用刀具切割，輕輕地進行食物處理或高度食物處理且仍產生可接受的雞肉類似物。

【0164】 在具有或不具有約66.6%之尖鏟孢菌品系MK7:脂肪比率之情況下，使用50-20:1:1之尖鏟孢菌品系MK7:雞肉備料:黏合劑比率。適合的脂肪包

括鴨肉脂肪、椰子脂及可可脂。在混合之後，汽蒸混合物約30分鐘以固定黏合劑；然而，一些黏合劑可能需要更多或更少時間。可隨後添加額外麵包屑且所得圓塊如此類食品典型地經處理。

#### **實施例14：早餐香腸及/或熱狗及/或漢堡**

**【0165】** 按需要將適當的香辛料混合物添加至尺寸減小的尖鏟孢菌品系MK7生物墊中以產生所需風味，其可在10 wt.%香辛料混合物至高達20%之尖鏟孢菌品系MK7數量之間，時常為10尖鏟孢菌品系MK7:1香辛料混合物之比率，具有或不具有額外成分，諸如洋蔥、黏合劑及脂肪，諸如可可脂。隨後油炸混合物以移除適量濕氣。可隨後在成形為所需形狀及蒸煮之前添加額外成分，諸如碾碎的乾小麥、植物培養液、馬鈴薯等。

#### **實施例15：冰淇淋及慕斯**

**【0166】** 產生粒徑具有小於900微米之平均長絲長度之約1:3尖鏟孢菌品系MK7生物墊:水之比率。輕輕地加熱此混合物直至不再存在真菌氣味，且隨後用腰果，視需要的適量黃原膠及/或調味劑以約4:1比率使用，以產生可視需要加熱且隨後冷卻形成慕斯之混合物。對於冷凍甜點，隨後將混合置放於冰淇淋攪拌器中，且在攪拌之後，冷凍形成非可熔冷凍甜點（圖14）。

#### **實施例16：由松露生物墊產生松露油**

**【0167】** 油萃取物可由如上文所描述生長之松露（塊菌屬物種）生物墊製備。在一種情況下，松露生物墊在盤中在少至7天內使用麥芽萃取物、葡萄糖及蛋白腴作為主要碳源（原料）生長。可食用松露蘑菇購自Amazon Marketplace之IGB Trading有限責任公司且儲存於4°C下。藉由將約3 mm<sup>3</sup>松露部分（用無菌剃刀片切割）置放於麥芽萃取物瓊脂+0.01%氯黴素（用於抑制細菌生長）上，由購買的松露製備塊菌屬物種真菌之純培養物。A藉由將20 g麥芽萃取物、20 g葡萄糖、1 g蛋白腴及20 g瓊脂於1 L去離子水中混合，之後高壓處理

30分鐘且冷卻至50°C，之後添加0.01%氯黴素來製備麥芽萃取物瓊脂。隨後將無菌混合物倒入9 cm直徑皮氏培養板中且使其冷卻及凝固。

**【0168】** 3天後觀測到真菌在盤上生長。在生長4天之後，用無菌微生物環管挑取菌絲且劃線接種於新鮮組麥芽萃取物瓊脂+氯黴素培養板上。使真菌在該等培養板上生長5天，其後用微生物環管挑取菌絲且用於藉由DNA定序確認培養物純度。藉由萃取及純化DNA（FastDNA旋轉套組，MP Biomedicals）及對宏基因組之ITS區域進行測序，繼而使用Blast（NCBI資料庫）進行序列之譜系學分類來實現確認。

**【0169】** 藉由將20 g麥芽萃取物、20 g葡萄糖及1 g蛋白胍於1 L去離子水中混合且滅菌來製備麥芽萃取物培養液。用微生物環管輕刮菌絲亦用於在用無菌紗布材料封蓋之無菌具有擋板的震盪器燒瓶中接種50 mL無菌麥芽萃取物培養液。使用無菌紗布，因為其允許氣體交換進入及離開震盪器燒瓶。震盪器燒瓶隨後在185 rpm下旋轉5天。隨後在無菌12.7×17.8 cm Pyrex®玻璃盤中使用經旋轉之培養物接種350 mL無菌麥芽萃取物培養液。此培養基之接種物密度為7.5%接種物與92.5%培養液。在盤中生長7天之後，藉由自液體培養基提舉生物墊採集表面上形成之絲狀生物墊。在40°C下乾燥採集生物墊48小時。藉由機械按壓或藉由使用己烷之溶劑萃取來萃取來自此等採集生物墊之脂質/油，但亦可使用其他萃取方法。亦可使用Yuval將發送之另一萃取方法。

### **實施例17：MK7細粉。**

**【0170】** 如上文所描述產生之尖鏟孢菌品系MK7生物墊用於產生粒徑及粒徑分佈與標準烘烤麵粉類似之乾粉。此處，在罐蒸鍋中在97°C下汽蒸潮濕生物墊0.5小時，冷卻至室溫且在Cuisinart脫水器（型號DHR-20）中脫水2-8小時，其中平均脫水時間為4小時。脫水時間隨裝載至脫水器中之生物質之量、影響脫水器中之氣流之脫水器中之生物墊分佈及生物墊水含量（平均水含量約

75%)及室溫變化。脫水後水含量在4與14%之間變化，其中脫水後平均水含量低於12%。脫水生物質使用咖啡研磨機(KRUPS，電咖啡及香辛料研磨機，不鏽鋼葉片F2034251)減小尺寸直至細粉狀。經研磨之生物質細粉之平均粒子尺寸在75微米至120微米範圍內。小部分較大粒子(約5 wt%)具有大於180微米之粒徑。小部分較小粒子(約5 wt%)具有小於75微米之粒徑。該等較小粒子不規定尺寸，其使得較小粒子能夠殘留較長時間段承載之空氣。藉由在具有180 μm、120 μm及75 μm開口之篩網中篩分100克尺寸減小的生物質之樣品5分鐘來測定粒徑。脫水後且尺寸減小後水含量低於6%為較佳的，因為較高水含量可能導致經乾燥及研磨之生物質結塊。

**【0171】** 生物質細粉隨後用作其他標準麵粉(King Arthur麵粉，Bob's Red研磨麵粉及Bob's Red研磨小麥粉)及其中製備之多種烘烤製品之添加物。生物質細粉以5 wt%、10 wt%、20 wt%及30 wt%裝載量，而對最終烘烤良好口味、升高、質地、外觀或氣味無不利影響。產物展現包括麵包(7種穀物，白色及小麥)、糕點(泡芙麵團)、甜餅、意面及餃子。所得產物在評味測試中表現良好且MK7細粉的包括對於品嚐產物者而言是不可偵測的。

#### **實施例18：MK7補充劑**

**【0172】** 如上文所描述產生之尖鏟孢菌品系MK7生物質用於產生用作肉類及魚類補充劑添加物之生物質粒子(亦即，藉由將MK7添加至其他排放食品來提高總食品之量)。在罐蒸鍋中在97°C下汽蒸潮濕生物質0.5小時，冷卻至室溫。生物質尺寸減小(亦即，用刀具切削或在食物處理器中處理食物)至所需粒徑分佈。隨後將尺寸減小的生物質添加至不同食物產品中以擴大肉類(在肉類補充劑之情況下)或魚類(在魚類補充劑之情況下)之量。作為肉類補充部分之實例。將10%、20%、30%、40%及50%尺寸減小的生物質添加物添加至漢堡包肉類中。在多種不同尺寸分佈下評估生物質之尺寸減小。較小粒徑往往會

產生更稠密且更加乳脂狀之質地。較大粒子往往會產生具有更多質地、更多口感且在吞咽之前需要更多咀嚼之產物。經補充之肉類隨後經處理，即使未添加生物質。在漢堡包補充之情況下，可視需要添加香辛料或黏合劑且經補充之肉類形成為肉餅或肉丸且蒸煮直至肉類烹熟至消費品所需溫度。蒸煮方法包括爐面烹製、烘箱、油炸及燒烤。評味測試顯示在所有裝載水準下產生之可接受的食物產品及所添加之生物質之所有尺寸分佈。亦在類似裝載水準下嘗試雞肉及豬肉補充，其具有類似蒸煮及評味結果。

**【0173】** 亦在10%、20%、30%及40%裝載量下展現魚肉補充。魚排及魚丸藉由添加在較小粒子（小於1.0 mm）至較大粒子（大於2 mm）範圍內之多種不同尺寸分佈下之經處理之MK7產生，而對口味、顏色、氣味或整個進食體驗無不利影響。在較小粒徑添加物之情況下，所得食品具有更加乳脂狀之質地。在較大粒徑添加物之情況下，所得食品具有特徵為在吞咽之前需要更多咀嚼之較大粒子的更堅硬質地。評味測試顯示，在所有測試裝載量及尺寸分佈含量下均產生可接受的食物產品。

### **實施例19：MK7肉乾**

**【0174】** 如上文所描述產生之尖鏟孢菌品系MK7生物墊用於產生外觀及口味與肉類肉乾（亦即，牛肉乾、水牛肉乾、豬肉乾、雞肉肉乾、火雞肉乾等）類似之真菌肉乾。在罐蒸鍋中在97°C下汽蒸潮濕生物墊0.5小時，冷卻至室溫。生物墊尺寸減小至符合肉乾產品中通常可見之尺寸。尺寸減小的生物墊碎片在一些情況下經調味且在Cuisinart脫水器（型號DHR-20）中脫水20-200分鐘，其中平均脫水時間為40-120分鐘。脫水時間隨裝載至脫水器中之生物質之量、影響脫水器中之氣流之脫水器中之生物墊分佈、生物墊水含量（平均水含量約75%）、室溫及最終產物中之所需水含量變化。脫水後水含量在8%與12%之間改變，視所需產物特徵而定。在一些情況下，在脫水之前穿透生物質產生

更容易撕成較小碎片，由此便於攝取之產物。生物質穿孔藉由使用叉子、刀具或軟骨工具進行，該工具使生物質穿孔以及破壞長絲網狀結構以使得其更易於撕開。評估各種各樣的香辛料混合物（亦即，卡真（Cajun）、乳酪、大豆、醋、香草、酸奶油及洋蔥、煙熏液、素肉調味劑等）。香辛料混合物在脫水前及脫水後評估。與脫水後經處理之彼等樣品相比，脫水前調過味之彼等樣品提供更多口味及對生物質之更佳黏著性。在評味測試中所得肉乾均表現良好。

### **實施例20：真菌薯片**

**【0175】** 如上文所描述產生之尖鏟孢菌品系MK7生物墊用於產生外觀及口味與馬鈴薯片或玉米薯片類似之薯片。在罐蒸鍋中在97°C下汽蒸潮濕生物墊0.5小時，冷卻至室溫。生物墊尺寸減小至符合薯片產品中通常可見之尺寸以及高度處理成糊狀物且形成為薯片類幾何結構。隨後將真菌薯片置於具有熱油（溫度約等於380°F）之煎鍋中直至棕色。烹煮時間隨生物質幾何結構變化，但烹煮極其快速，通常不超過15秒。所產生之油炸薯片經證實極其可口且能夠提供廣泛多種口味體驗，視添加至生物質預油炸物中或塗佈於生物質預油炸物上之香辛料而定。

### **實施例21：氣密密封生物反應生物墊**

**【0176】** Pyrex®玻璃盤12.7×17.8 cm以及100×15 mm皮氏培養皿用作基底盤。玻璃盤裝載有與液體營養培養基（必要時）及接種物混合之200 mL原料。盤有蓋且用連接至具有整合式橡膠襯墊之塑膠框架之透氣膜密封。密封系統在膜與玻璃盤之間提供有效無菌密封且實現簡單組裝以及用於取樣及採集目的之反應器打開/關閉。

**【0177】** 具有不同厚度、孔徑及質地（表面粗糙度）之一套不同透氣膜材料用作氣體液體界面之材料。起初，使用八（8）種聚合材料，包括聚丙烯、聚乙烯、聚四氟乙烯、聚碳酸酯、聚醯胺、聚吡嚨、聚(醯胺基胺)樹狀體

複合物及乙酸纖維素（例如Specialty Silicone Products公司，Corporate Technology Park, NY; Thermo-Fisher, Waltham, MA; Merck Millipore, Burlington, MA）。材料使用三種孔徑（0.2、0.45、1.0  $\mu\text{m}$ ），其有助於氣體傳遞以及氣體直接擴散通過聚合物自身，同時排除微生物。另外，使用具有不同粗糙表面質地及迂曲的氣體擴散路徑之無菌織物類材料。大量此類材料可購自其他公司來源，包括3M、Solvay、Ube Industry及Saint-Gobain。

**【0178】** 為了分析及測定不同環境及任務條件之參數，盤反應器裝備有感測器以監測隨盤深度變化之溫度、溶解氧及pH。用於感測器及電線跨越膜進入反應器中之孔口用聚矽氧、環氧樹脂及/或黏著劑密封，視膜材料而定。整合至膜中之隔板用作樣品孔口，其用於採集GC-MS、ICP-MS、IC及總C/N分析之液體樣品。標準以及微電極用來按規則時間間隔（例如6、12、24、36、48小時）量測整個透氣膜中及生物墊內實時pH及電子受體通量（ $\text{O}_2$ ）。通量資訊對於匹配即時代謝需求與膜透氣性及改變最佳生長及原料轉化所需要的電子供體（有機物）及養分（無機物）之濃度及分佈而言為重要的。

#### **實施例22：未儀器化（un-instrumented）反應器**

**【0179】** 未儀器化反應器用於作為模型絲狀生物體之真菌品系尖鏟孢菌MK7之生長研究。品系MK7為已顯示在包括人類廢棄物、食物廢棄物、藍綠菌及海藻生物質及木質纖維素材料之廣泛多種原料上茁壯成長之嗜極真菌。品系MK7生物墊亦已顯示，具有較高脲含量（至少26 g/L）以及較高溶解有機碳及滲透壓（300 g/L丙三醇）耐受性。

**【0180】** 原料測試包括：1）替代人類尿液作為主要氮源；2）替代食物廢棄物（狗糧）作為主要碳源；及3）植物材料（木質纖維素）作為額外碳源。廣泛地分析所有原料之有機及無機成分、pH及生物需氧量。替代人類尿液使用NASA科學家或涉及研究任務廢棄物之其他科學家所建議之培養基組合物

製備。

**【0181】** 不同透氣膜之效果藉由進行比較性生物膜-生物墊生長研究來量測，其中將不同膜密封於含有各種原料及MK7接種物之盤及皮氏培養皿之表面上。使膜與液相直接接觸且為氣體/蒸氣外部環境與生物膜-生物墊/液體培養基之間的氣體交換之唯一通道。相消地取樣反應器以量測隨時間推移之生長（乾燥生物質重量、生物墊厚度）。與無膜之對照盤之生長速率進行比較。測試由原料及膜組合組成之因子實驗設計以提供原料及膜之最佳匹配。亦評估包括最初原料pH及無機養分添加物之額外變量。另外，實驗追蹤原料隨時間變化之有活力的細菌細胞計數以對與生物墊生長相關的滅菌動力學進行定量。

### **實施例23：**

**【0182】** 最佳表現膜/原料組合用於額外實驗。首先對通過所選透氣膜之氣體之通量進行定量且藉由非生物實驗建模。自反應器外部蒸氣相進入液相之O<sub>2</sub>通量使用初始斜率方法且使用溶解氧探針及起初缺氧的培養基來量測。自二氧化碳飽和液相進入蒸氣相之二氧化碳通量亦使用初始斜率方法且藉由總無機碳分析及pH探針量測（碳酸之量度）。溶解的無機碳相起初為0%、0.5%及5%二氧化碳。將資料整合至移動的前部真菌生長模型中以產生更精確參數。

**【0183】** 觀測到之最佳表現膜/原料組合隨後用於真菌生長模型輔助的詳細生物最佳化實驗。使用玻璃盤及皮氏培養皿兩者。較小皮氏培養皿有助於隨時間推移生物質及液體分析之密集相消取樣。鑑別其中在極少廢棄物之情況幾乎所有添加碳及養分均轉化成生物質之產生條件。此處，藉由量測每個電子供體產生之生物質及每個電子受體產生之生物質評估碳及電子通量及反應器條件。生物質之元素組成使用市售服務（例如Microanalysis公司, Wilmington DE）來量測以完成質量平衡。相關參數包括液相體積及可獲得的原料及養分（碳源物、氮源、無機養分、氧）之濃度。所得資料用於真菌墊生長之移動前部數學

模型，其有助於定量比較及生長條件之最終最佳化。

## 【符號說明】

- 1：反應器
- 2：透氣膜
- 3：底部
- 4：通道
- 5：後部
- 6：閥門
- 7：前部
- 8：閥門
- 9：壁/擋板
- 14：氣體採集腔室
- 15：氣體採集腔室
- 20：氣體採集腔室
- 30：氣體採集通道
- 40：氣體採集通道
- 50：透氣膜

## 【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

TW 中華民國 財團法人食品工業發展研究所 2017/06/20 BCRC930188

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

US 美國 美國典型培養物保藏中心 2010/03/02 PTA-10698

## 【發明申請專利範圍】

### 【請求項1】

一種絲狀真菌之可食用調配物，其包含分離自黏性絲狀真菌生物墊之可食用絲狀真菌粒子，其中該絲狀真菌生物墊為不活化的，其中該調配物為液體且包含真菌粒子之水性液體分散液。

### 【請求項2】

如請求項1之可食用調配物，其中該調配物係作為牛乳替代物。

### 【請求項3】

如請求項1或2之可食用調配物，其中該等絲狀真菌粒子與水間的比率範圍為約1:4至約10:1。

### 【請求項4】

如請求項1或2之可食用調配物，其中該等絲狀真菌粒子與水間的比率為選自1:4、1:3、1:2及7:3。

### 【請求項5】

一種絲狀真菌之可食用調配物，其包含分離自黏性絲狀真菌生物墊之可食用絲狀真菌粒子，其中該絲狀真菌生物墊為不活化的，其中該調配物為固體且包含具有平均粒徑為約75-120微米 ( $\mu\text{m}$ )之絲狀真菌粒子。

### 【請求項6】

如請求項5之可食用調配物，其中該調配物為細粉。

### 【請求項7】

如請求項5或6之可食用調配物，其中約5 wt%之該等絲狀真菌粒子具有  $> 180 \mu\text{m}$ 的粒徑，且約5 wt%之該等絲狀真菌粒子具有  $< 75 \mu\text{m}$ 的粒徑。

### 【請求項8】

如請求項5至6中任一項之可食用調配物，其中該等絲狀真菌粒子具有 < 14%之水分含量。

**【請求項9】**

一種絲狀真菌之可食用調配物，其包含分離自黏性絲狀真菌生物墊之可食用絲狀真菌粒子，其中該絲狀真菌生物墊為不活化的，其中該調配物為固體且包含具有粒子長度為約0.4 mm至約500 mm、粒子寬度為約0.4 mm至約7 mm及粒子高度為約0.03 mm至約1.0 mm之該等絲狀真菌粒子。

**【請求項10】**

如請求項9之可食用調配物，其中該等絲狀真菌粒子具有介於約4 mm至10 mm之粒子長度、約1.0 mm至3 mm之粒子寬度及<0.75 mm之粒子高度。

**【請求項11】**

如請求項9或10之可食用調配物，其中該等絲狀真菌粒子具有 <1.5 mm之粒子長度、<1 mm之粒子寬度及<0.75 mm之粒子高度。

**【請求項12】**

如請求項11之可食用調配物，其中該等絲狀真菌粒子具有 <1 mm之平均粒子長度。

**【請求項13】**

如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物，其中該生物墊具有至少約37 g/cm<sup>2</sup>的拉伸強度。

**【請求項14】**

如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物，其中該等絲狀真菌粒子為非活性的。

**【請求項15】**

如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物，其中該等絲狀真菌粒子包含所有的必需胺基酸。

**【請求項16】**

如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物，其中該等絲狀真菌粒子包含至少約46%的蛋白質。

**【請求項17】**

如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物，其中該絲狀真菌為尖鏟孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 品系MK7 (ATCC寄存編號PTA-10698；財團法人食品工業發展研究所寄存編號BCRC930188)。

**【請求項18】**

如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物，其中該絲狀真菌為鏟孢黴 (*Fusarium venenatum*)。

**【請求項19】**

如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物，其中該絲狀真菌係選自由以下者所組成之群：徒長病菌 (*Fusarium fujikuroi*)、雙孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) (大褐菇 (crimini) 及白色蘑菇)、美味牛肝菌 (*Boletus edulis*) (牛肝菌 (porcinini))、雞油菌 (*Cantarellus cibarius*) (雞油菇 (chantrelle))、禿馬勃 (*Calvatia gigantea*) (大禿馬勃 (giant puffball))、茶樹菇 (*Cyclocybe aegerita*) (絲絨菇 (velvet piopinni))、赤芝 (*Ganoderma lucidum*) (靈芝 (Reishi))、灰樹花 (*Grifola frondosa*) (舞菇 (maitake))、羊肚菌屬物種 (*Morchella species*) (羊肚菌 (Morel))、玉蕈離褶傘 (*Hypsizyugus tessellatus*) (蛤殼 (clamshell))、榆幹玉蕈 (*Hypsizyugus ulmarius*) (榆耳 (elm oyster))、硫磺菌屬物種 (*Laetiporus*

*species*) ( 硫色絢孔菌 (*chicken of the woods*) )、香菇 (*Lentinula edodes*) ( 香蕈 (*shiitake*) )、杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*) ( 皇家小號菇 (*trumpet royale*) )、糙皮側耳菌 (*Pleurotus ostreatus*) ( 珍珠耳 (*pearl oyster*) )及藍耳 (*blue oyster*) )、小孢鱗傘 (*Pholiota microspora*) ( 森林滑子菇 (*forest nameko*) )、繡球菌 (*Sparassis crispa*) ( 花椰菜 (*cauliflower*) )及塊菌屬物種 (*Tuber species*) ( 松露 (*truffles*) )。

**【請求項20】**

如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物，其中該調配物基於用於生長該絲狀真菌生物墊所使用的不同原料/碳源會具有不同的口味。

**【請求項21】**

一種食品，其包含如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用絲狀真菌調配物。

**【請求項22】**

如請求項21之食品，其中該等絲狀真菌粒子強化該食品之總蛋白質含量。

**【請求項23】**

如請求項21之食品，其中該等絲狀真菌粒子包含該唯一蛋白質組分。

**【請求項24】**

如請求項21之食品，其中該食品係素食。

**【請求項25】**

如請求項21至24中任一項之食品，其中該食品係選自由以下者所組成之群：碎牛肉、碎雞肉、碎火雞肉、雞塊、魚條或肉餅、肉乾、點心、湯、冰沙、飲料、牛乳類似物、麵包、義大利麵、麵條、餃子、酥皮點心、甜餅、蛋

糕、餡餅、甜品、冷凍甜品、冰淇淋類似物、優格、糖食及糖果。

**【請求項26】**

如請求項21至24中任一項之食品，其包含如請求項1至4中任一項所定義的液體調配物，其中該食品係選自由以下者所組成之群：湯、冰淇淋、優格、冰沙、焦軟糖、慕斯及糖果。

**【請求項27】**

如請求項21至24中任一項之食品，其包含如請求項5至8中任一項所定義的固體調配物，其中該食品係選自由以下者所組成之群：麵包、麵包卷、松餅、蛋糕、甜餅、餡餅、意面及餃子。

**【請求項28】**

如請求項21至24中任一項之食品，其包含如請求項9至12中任一項所定義的固體調配物，其中該食品係選自由以下者所組成之群：肉類產品、雞塊、魚條或肉餅、熱狗、香腸及肉乾。

**【請求項29】**

一種製備食品的方法，其包含i)使如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物與一或多種其他成分接觸；ii)使用如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物將蛋白質加入該食品中；及/或iii)將如請求項1或2之液體調配物用作為牛乳或牛乳類似物之替換成分。

**【請求項30】**

一種製備如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物之方法，其包含：

(a) 用可食用絲狀真菌之小分生孢子、孢子或菌絲體接種含有碳源之液體生長培養基；

- (b) 在室溫下培育經接種之生長培養基；
- (c) 經由表面醱酵在該經接種之生長培養基上生長出黏性絲狀真菌生物墊；
- (d) 採集該黏性絲狀真菌生物墊；及
- (e) 減小該絲狀真菌生物墊之尺寸以產生至少兩種可食用絲狀真菌粒子。

**【請求項31】**

如請求項30之方法，其中該黏性絲狀真菌生物墊之採集係在連續基礎上進行。

**【請求項32】**

如請求項30之方法，其進一步包含在偶發或連續基礎上在培育步驟期間替換該液體生長培養基。

**【請求項33】**

如請求項30至32中任一項之方法，其中該碳源為丙三醇、澱粉、玉米浸液、酸乳清、牛乳乳清、甜乳清、氫化澱粉水解產物、澱粉衍生物、小麥浸液（wheat steep liquor）、產業水液（industrial liquor）、食物加工產物/碎屑流或其組合。

**【請求項34】**

一種製備如請求項1、2、5、6、9及10中任一項之可食用調配物之方法，其包含：

- (a) 使該絲狀真菌之子實體表面滅菌；
- (b) 減小該絲狀真菌經滅菌之子實體的尺寸；
- (c) 使該絲狀真菌之該經尺寸減小的子實體表面滅菌；

(d) 視需要重複步驟 (b) 及 (c) ；

(e) 用該絲狀真菌之該經滅菌經尺寸減小的子實體接種含有碳源之液體生長培養基；

(f) 在室溫下培育該經接種之生長培養基；

(g) 生長出黏性絲狀真菌生物墊；

(h) 採集該黏性絲狀真菌生物墊；及

(i) 減小該絲狀真菌生物墊之尺寸以產生至少兩種可食用絲狀真菌粒子。

**【請求項35】**

如請求項34之方法，其中該經尺寸減小的絲狀真菌生物墊包含小於5 mm 的長菌絲聚集體。

**【請求項36】**

如請求項34或35之方法，其中該經接種之生長培養基具有約4.0-4.1之 pH。

**【請求項37】**

如請求項34或35之方法，其中該碳源係選自由以下者所組成之群：丙三醇、澱粉、玉米浸液、酸乳清或其組合。

**【請求項38】**

如請求項34或35之方法，其中其中該培育期為2-10天。

**【請求項39】**

如請求項34或35之方法，其中其中該培育期為10-20天。

【發明圖式】

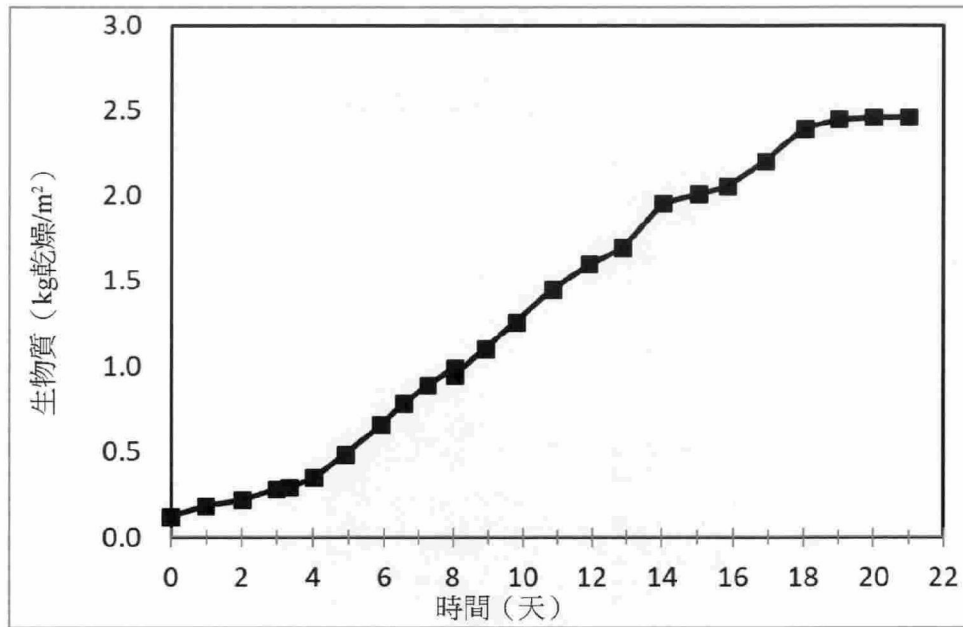


圖1



圖2

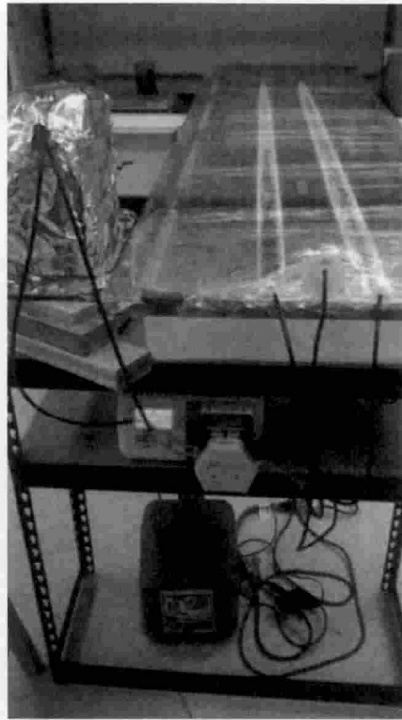


圖3



圖4

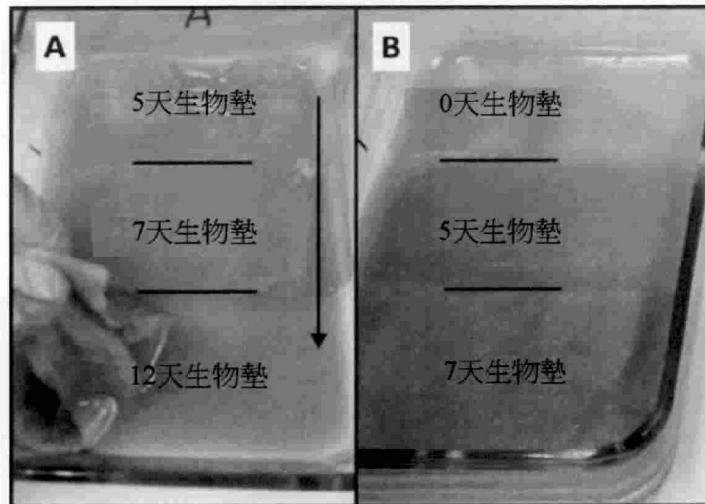


圖5

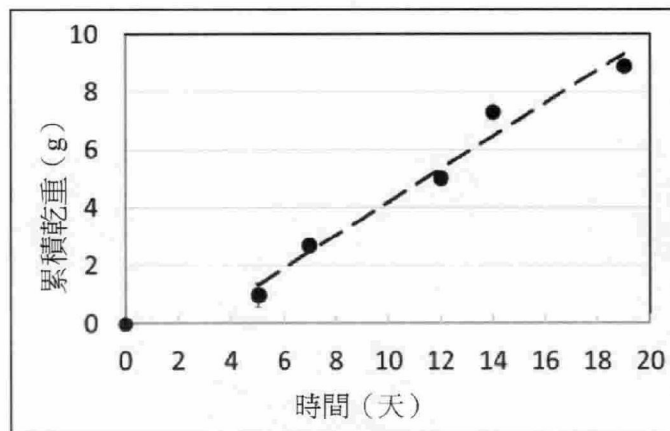


圖6

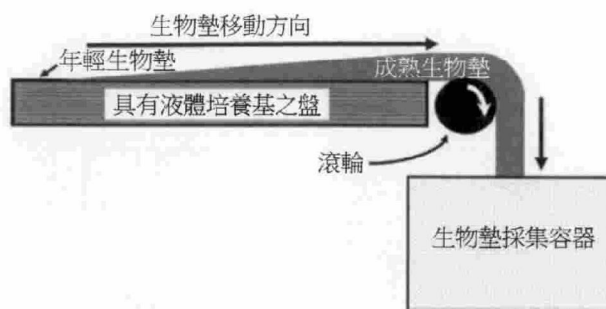


圖7

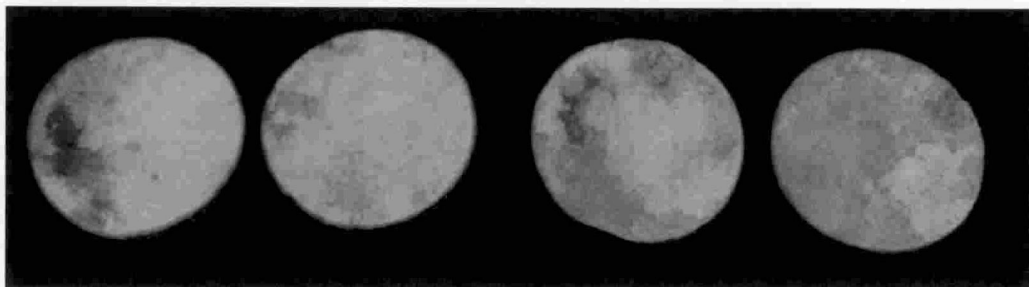


圖8

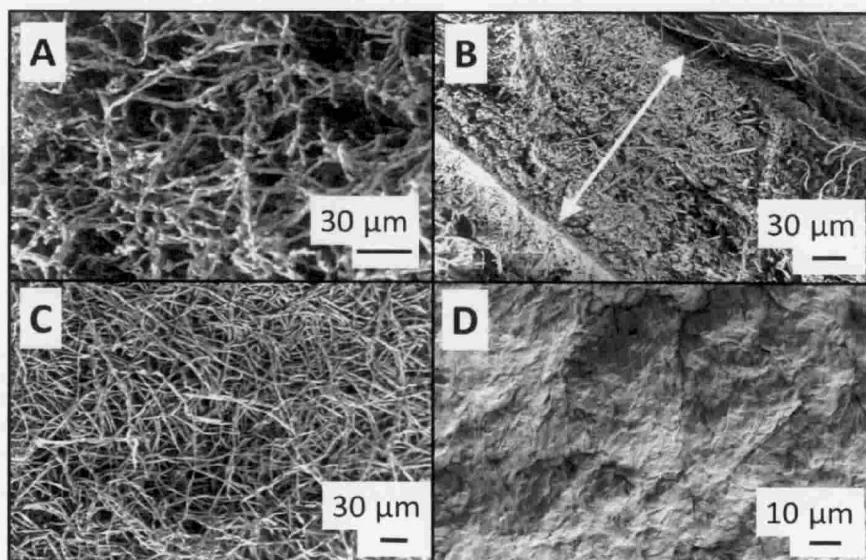


圖9

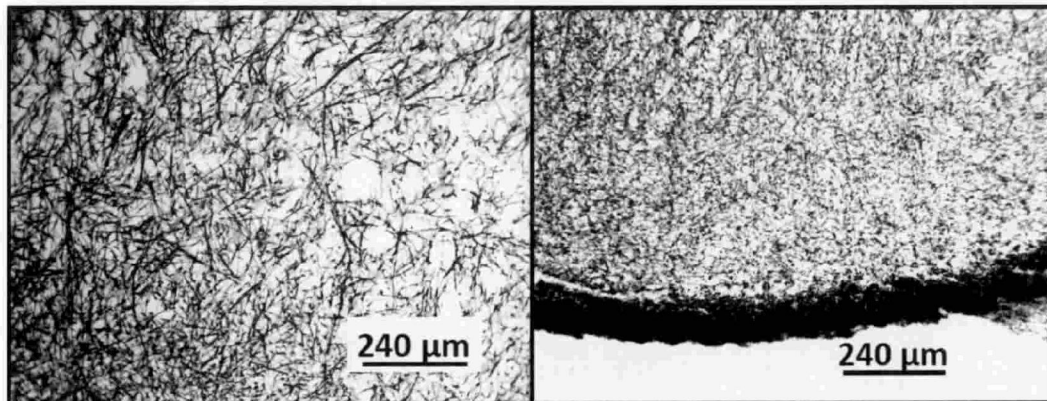


圖10

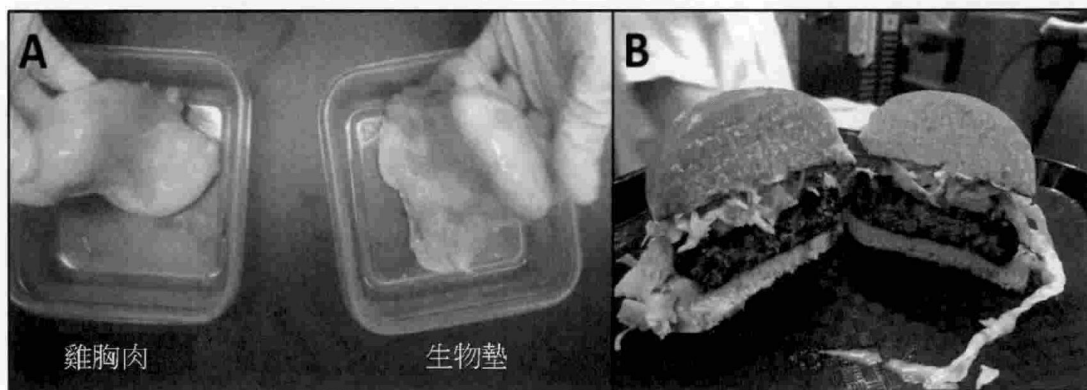


圖11

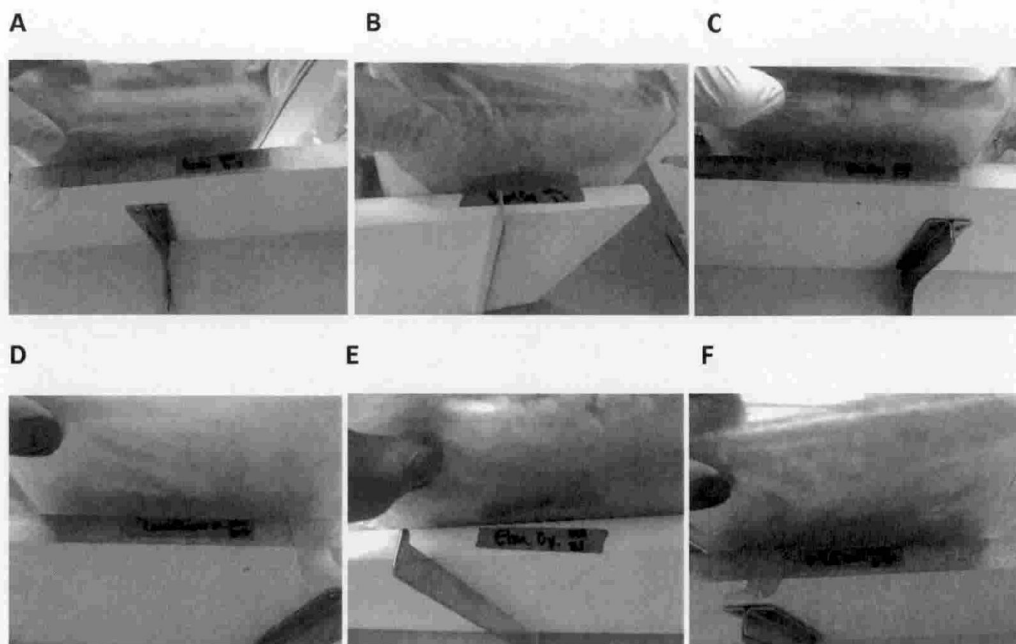


圖12



圖13

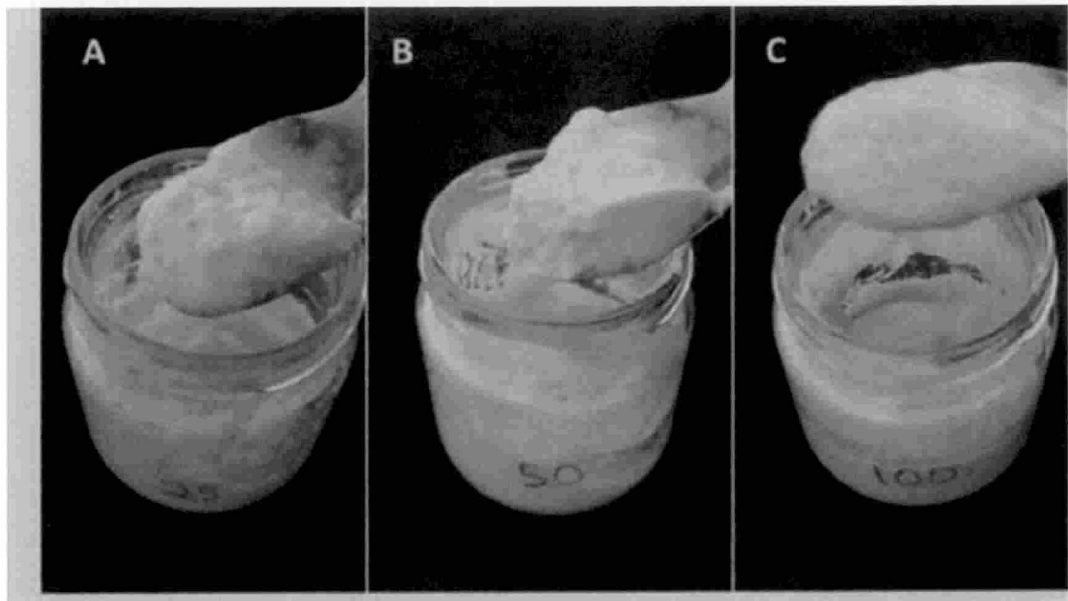


圖14



圖15

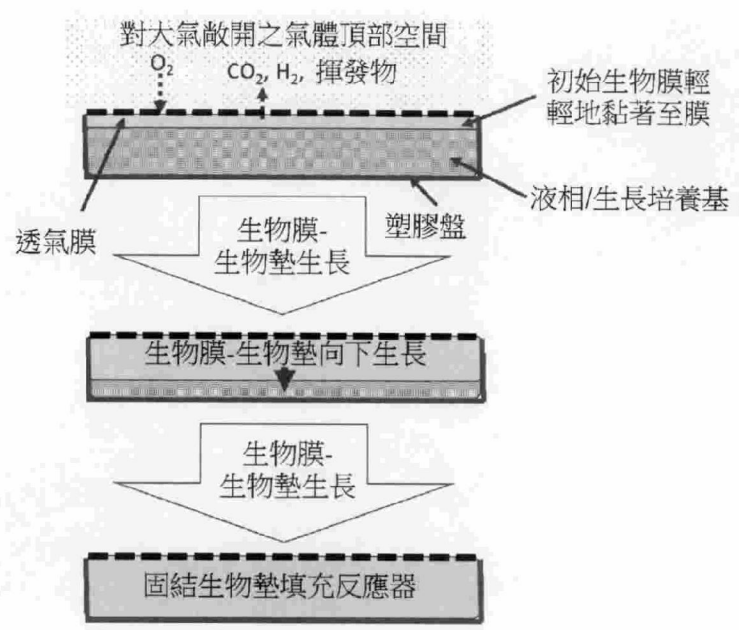


圖16

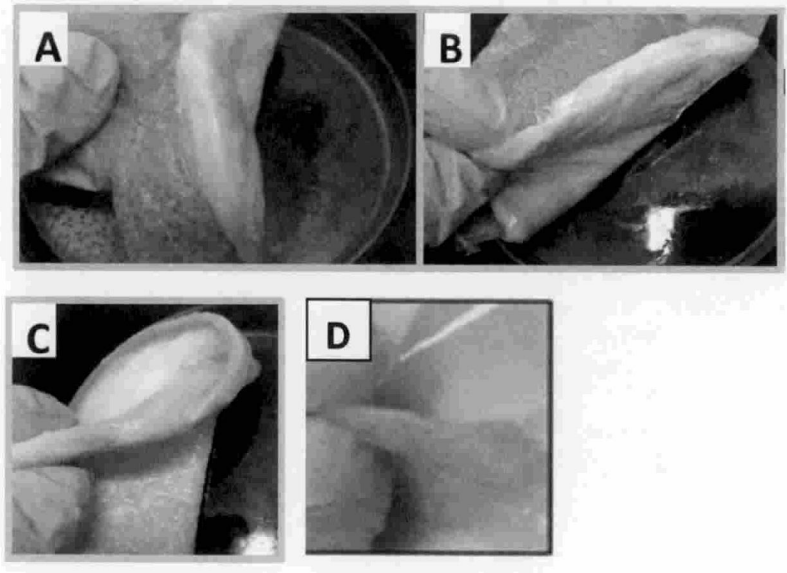


圖17

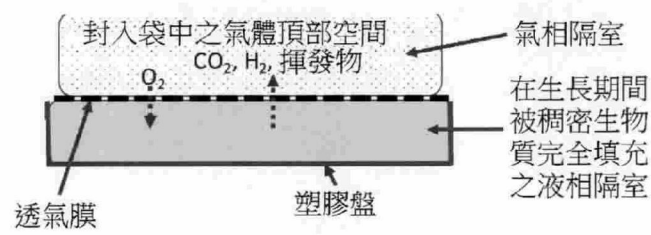


圖18

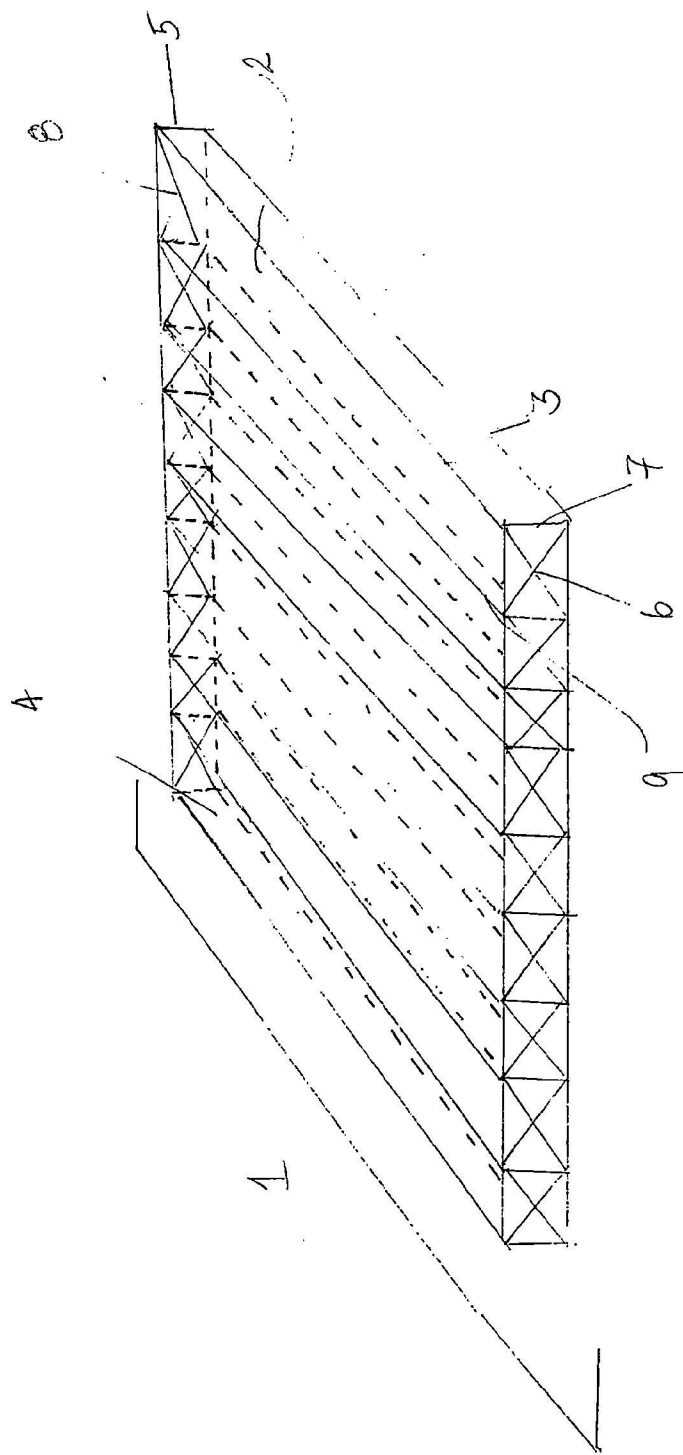


圖19

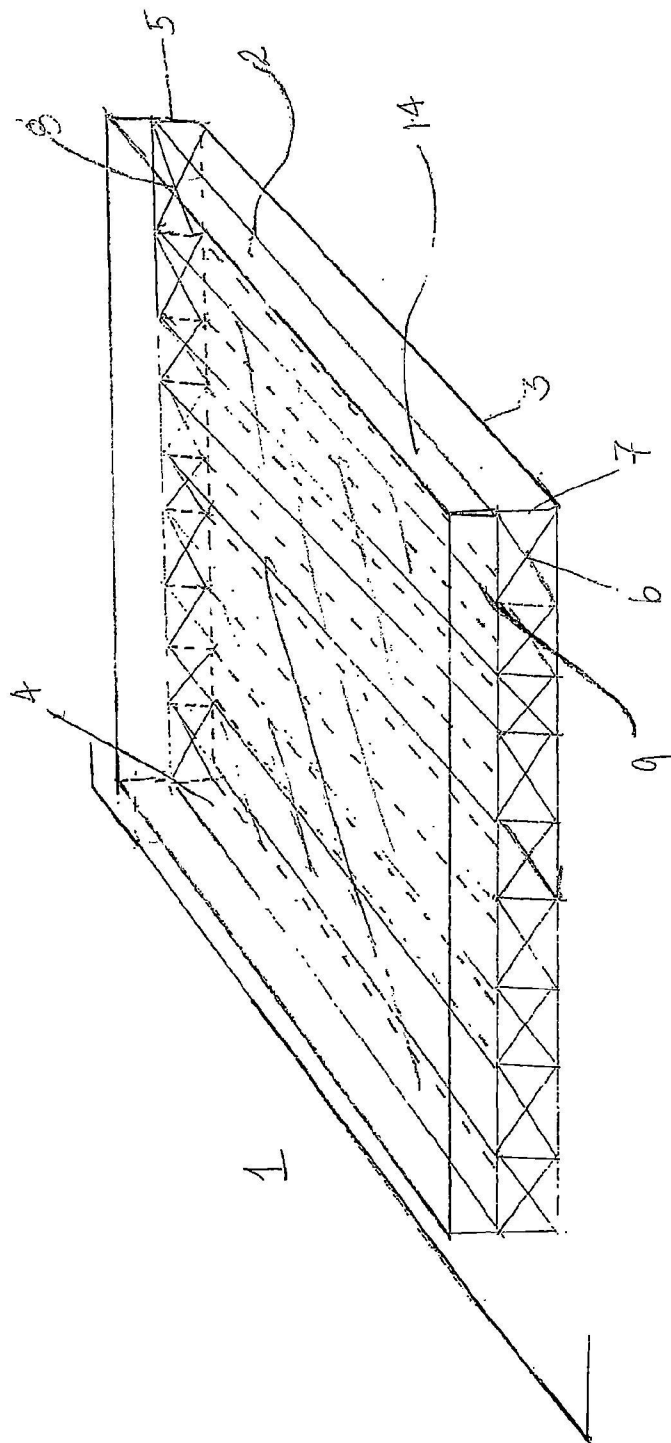


圖20

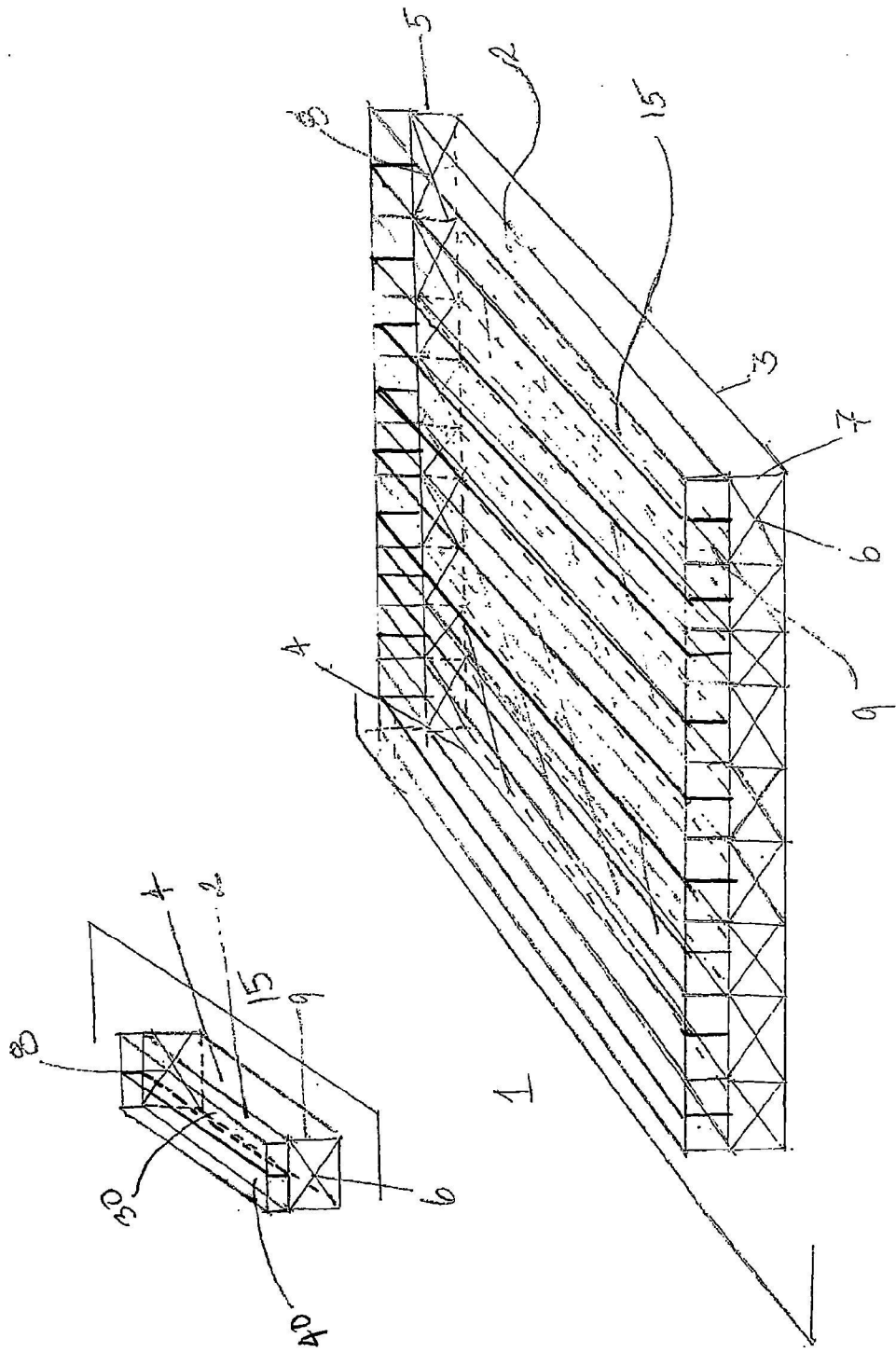


圖21

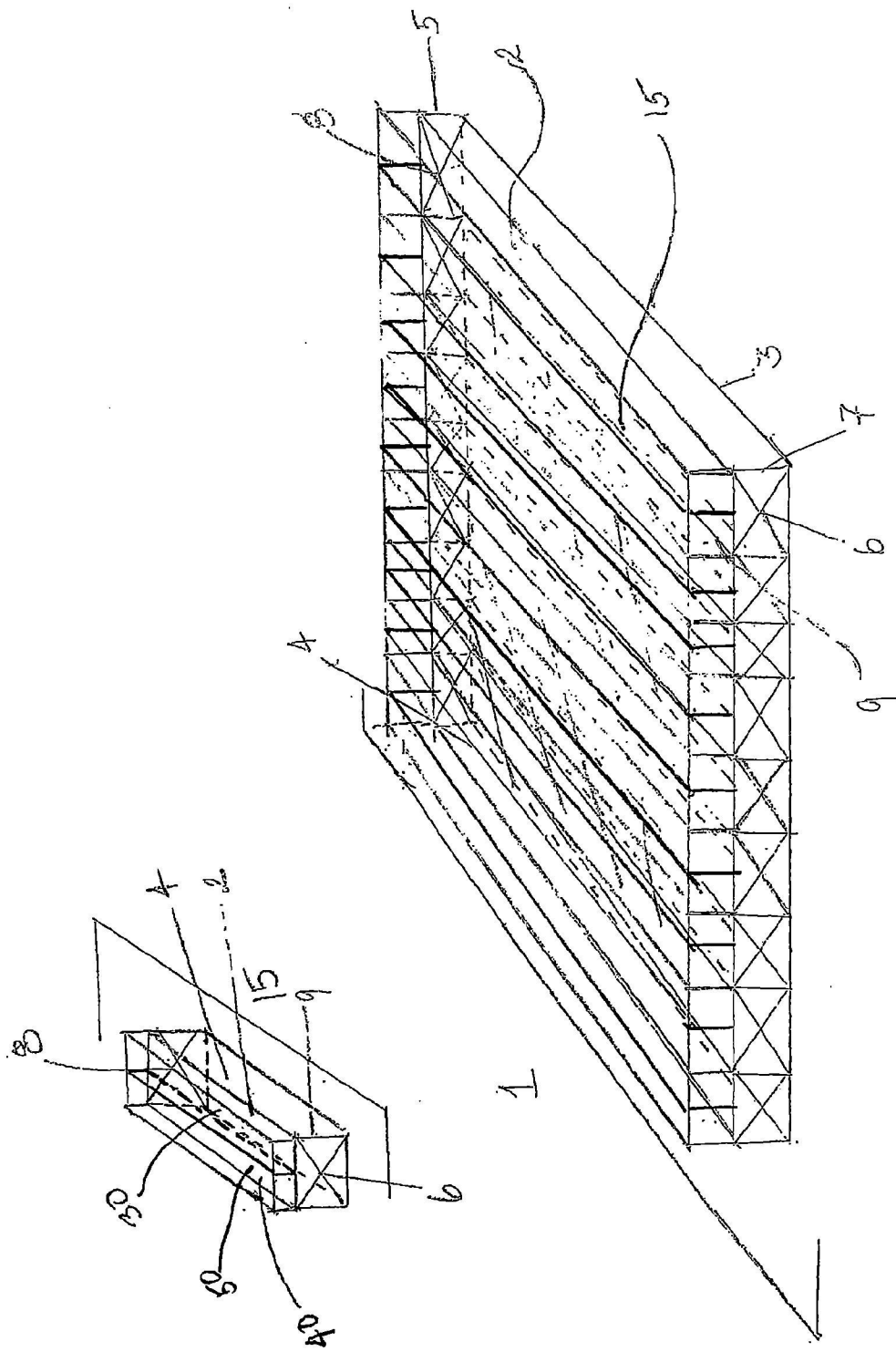


圖22

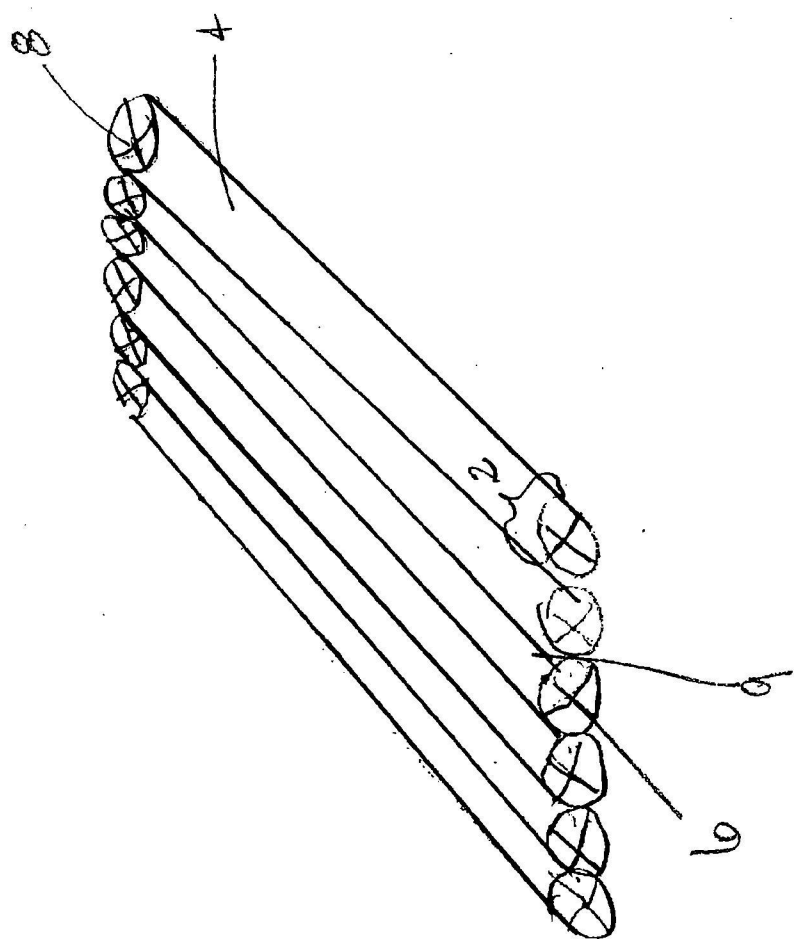


圖23