



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 125876

(13) C2

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/42 (2006.01)

C12P 13/20 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2019 02672	(72) Винахідник(и):	Отто Рул (NL), Рамірез Алдана Маріел (NL), Елдерінк Єнні (NL)
(22) Дата подання заявки:	05.09.2017	(73) Володілець (володільці):	ПУРАК БІОКЕМ БВ, Arkelsedijk 46, 4206 AC Gorinchem, The Netherlands (NL)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	30.06.2022	(74) Представник:	Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	16187414.4	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment-derived bacterium / Schumacher R.W., Talmage St.C., Miller S.A. et al. // Journal of natural. – 2003. - Vol. 66 (9). – P. 1291-1293 Rückle L. Hop acids can efficiently replace antibiotics in ethanol production / Rückle L. // International sugar journal. – 2006. - Vol. 108 (1287). – P. 139-147 Alternative antimicrobial compounds to control potential Lactobacillus contamination in bioethanol fermentations / Limayem A., Hanning I.B., Muthaiyan A. et al. // Journal of Environmental Science and Health. – 2011. – Vol. 46 (8). – P. 709-714 WO 0106877 A1, 01.02.2001 WO 2013169231 A1, 14.11.2013 US 3883669 A, 13.05.1975 CA 2660863 A1, 28.02.2008
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	06.09.2016		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	27.05.2019, Бюл.№ 10		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	29.06.2022, Бюл.№ 26		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2017/072249, 05.09.2017		

(54) ЕСТЕРИ ЖИРНИХ КИСЛОТ ПРОТИ ІНФЕКЦІЙ У ФЕРМЕНТАЦІЇ**(57) Реферат:**

Винахід стосується ферментаційного середовища, яке містить інокулянт, що містить культуру грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів, де зазначені дріжджі вибрані з родів *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera* і *Pichia*, субстрат для мікробного росту; та як антимікробний агент містить лактилатну сполуку та складний ефір гліцерину. Також винахід стосується інокулянту для ферментаційного середовища, застосування антибактеріального агента для пригнічення росту грампозитивних забруднюючих бактерій в культивуванні грамнегативних бактерій, або цвілі, або дріжджів, способу запобігання або зниження мікробних інфекцій, викликаних грампозитивними бактеріями в культурі ферментера грамнегативних бактерій, способу отримання продукту ферментації.

UA 125876 C2

Технічна галузь винаходу.

Винахід стосується способу пригнічення росту грампозитивних бактерій в культивуванні грамнегативних бактерій, цвілі та дріжджів. Зокрема, винахід стосується антибактеріальних агентів, які містять лактилат, естер гліцерину або їх суміш, та застосування таких агентів в культурах ферментерах.

Передумови створення винаходу.

Небезпека інфікування іншими мікроорганізмами є однією з проблем, що є спільною для всіх мікробіологічних процесів, в яких використовуються чисті культури. Ця небезпека стосується, зокрема, великих промислових процесів ферментації, де ризик забруднення іншими мікроорганізмами є більшим через масштаб процесу в порівнянні з процесами в лабораторних ферментерах.

При ферментації дріжджів працівники прагнуть зменшити ризик бактеріального забруднення з використанням агентів бактеріального контролю. Дані агенти включають, наприклад, (природні) антибіотики та сульфіти в концентрації, яка не впливає на життєздатність дріжджів, але яка запобігає росту забруднюючих бактерій. Деталі таких агентів розкриті в: Ruckle et al., Hop acids as natural anti-bacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production, International Sugar Journal 108: 139-147 (2006); та. Limayem et al., Alternative antimicrobial spulung to control potential Lactobacillus contamination in bioethanol fermentations, Journal of Environmental Science and Health, Part B 46(8): 709-714. (2011).

В даний час генетично модифіковані бактерії часто використовуються як штам для виробництва низки ферментаційних продуктів. Прикладом є використання *Escherichia coli*, здатного продукувати R-молочну кислоту, як описано в Chang et al. Homo-fermentative production of D(-) or L(+) lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1, Applied and Environmental Microbiology 65(4): 1384-1389 (1999). Хоча цей організм продемонстрував ріст на порівняно простому та дешевому, хімічно визначеному середовищі, неодноразово спостерігалось, що культури цього організму можуть легко ставати інфікованими. Забруднювачі, як виявилось, є мікроорганізмами, які утворюють спори, або грампозитивними мікроорганізмами. Серед забруднюючих грампозитивних бактерій також є патогенні бактерії, такі як: *Enterococcus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus*, різні *Bacillus species*, та *Streptococcus*. Забруднювачі є небажаними, оскільки вони можуть серйозно погіршити оптичну чистоту молочної кислоти, та вони можуть продукувати інші продукти ферментації та тим самим знижувати вихід ферментації. Тому існують вагомі причини для пригнічення росту даних мікроорганізмів.

Завданням представленого винаходу є стабілізація процесу виробництва та, зокрема, виходу продукту ферментації, який викликає зацікавленість.

На даний час було встановлено, що додавання лактилатів га/або естерів гліцерину жирних кислот середнього ланцюга специфічно інгібує розростання грампозитивних бактерій при культивуванні грамнегативних бактерій або цвілі та дріжджів. Після додавання ефективного кількості лактилата, естеру гліцерину або їх суміші, мікроорганізми- продуценти продовжують рости у ферментері, але ріст забруднюючих грампозитивних бактерій запобігається або пригнічується. Це гарантує те, що процес ферментації не порушується розростанням небажаних мікроорганізмів, небажаних побічних продуктів та неефективним використанням джерел енергії. Крім того, це зменшує необхідну додаткову кількість агентів, які контролюють бактеріальне забруднення, таких як антибіотики.

Лактилат відноситься до сполуки, яка має ацильную групу жирної кислоти, приєднаної до однієї (монолактилати) або декількох молекул молочної кислоти (дилактилати, тощо), та протон (H +) або інший катіон, приєднаний до термінального карбоксилата. Фрагмент жирної кислоти зазвичай складається з вуглеводневого ланцюга, приєднаної до карбоксильної групи на кінці. Вуглеводневий ланцюг може містити різну кількість атомів карбону, та зв'язки між атомами карбону можуть бути насиченими або ненасиченими.

Лактилати є відомими поверхнево-активними речовинами. Дані поверхнево-активні речовини отримують шляхом взаємодії R-молочної кислоти або S-молочної кислоти або будь-якої суміші даних двох з жирною кислотою та одночасно нейтралізують основою. Лактилати є добре відомими в харчовій промисловості та використовуються в засобах особистої гігієни для покращення відчуття шкіри, м'якості та зволоження шкіри, а також для зменшення липкості під час переходу від вологого до сухого після застосування продукту. Відомо, що деякі лактилати демонструють антимікробні властивості. US2007/010856 (Cohen et al.) описує шви, оброблені, серед іншого, лактилатом як антимікробною сполукою. US2006/062832 (Lopes) описує композицію для протирання, яка містить лактипат як антимікробну сполуку. WO2004/037177 (Eveready Battery Inc.) описує антибактеріальну піну для гоління або гелеву композицію, яка містить лактилат як антимікробну сполуку.

WO01/06877 (Rhodia) описує застосування лактилатів у комбінації з кислотами хмелю в харчових продуктах; кислоти хмелю мають активність щодо грампозитивних бактерій, та лактилати пропонуються як один з можливих допоміжних інгредієнтів серед дуже широкого діапазону емульгаторів харчового класу (стор. 6). Конкретне застосування лактилатів не ілюструється, та той факт, що лактилати мають індивідуальну активність щодо грампозитивних бактерій, не визнається в даному посиланні.

Слід зазначити, що WO 2004/107877 (Purac Biochem BV) описує антимікробну композицію, яка містить суміш молочної кислоти або її похідної та неорганічної кислоти, Композиція описується зазвичай як антимікробна. Зазначається застосування проти *Salmonella* та *Escherichia coli*. Незважаючи на те, що лактилати згадуються як можливі похідні молочної кислоти, їх застосування ще не є з'ясованим. Не існує нічого такого в цьому посиланні, що б навчало або припускало особливу ефективність лактилатів щодо грампозитивних бактерій в порівнянні з грамнегативними бактеріями.

Викладення винаходу.

Відповідно до першого аспекту представленого винаходу, передбаченим є ферментаційне середовище, яке містить:

субстрат для мікробного росту; та,

як екзогенний, доданий інгредієнт, антимікробний агент, вибраний з:

i) лактилата відповідно до формули 1,

$(R-(O-CH(CH_3)-CO)_a O)_b M$ (Формула 1);

ii) естера гліцерину відповідно до формули 2,

$CH_2OR_1CHOR_2-CH_2OR_3$ (Формула 2); та,

iii) суміші таких сполук,

де:

R є C4-C18 ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

R₁, R₂ та R₃ кожен незалежно є H або C4-C18 ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим, за умови, що щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є H, та щонайменше один з R₁, R₂, або R₃ є ацильною групою;

M - протон (H⁺) або протикатіон, вибраний з групи з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію або заміщеного амонію, який має один або декілька (C1-4)алкілів, необов'язково заміщених одним або декількома гідрокси; а є цілим числом від 1 до 3; та, b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

Для завершеності, термін "суміш таких сполук" як використовується в даному документі означає, що антибактеріальний агент може містити: дві або більше сполук, які відповідають Формулі 1; дві або більше сполук які відповідають Формулі 2; або, суміші сполук як визначено у Формулі 1 та Формулі 2.

Ферментаційне середовище може містити антибактеріальний агент в кількості від 0,001 до 0,5 мас. %, переважно від 0,025 до 0,5 мас. %, виходячи з загальної маси середовища. В альтернативному визначенні, ферментаційне середовище може містити антибактеріальний агент в концентрації від 0,1 від 1000 мг/л, переважно від 0,5 до 500 мг/л та більш переважно від 1 до 100 мг/л ферментаційного середовища.

Ферментаційне середовище може додатково містити інокулянт, який включає культуру грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів. При формуванні такого середовища антибактеріальний агент може бути доданий до середовища до, після або разом з культурою грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів. Дані режими додавання не є взаємовиключними та представлений винахід не виключає додавання антибактеріального агента при більше ніж одній стадії ферментації.

Однак, в переважному варіанті здійснення ферментаційне середовище отримують шляхом: контактування субстрату для мікробного росту із зазначеним антибактеріальним агентом протягом періоду від 1 хвилини до 48 годин, переважно від 1 до 24 годин, перед інокуляцією ферментаційного середовища ферментуючим мікроорганізмом,

В альтернативному або додатковому варіанті здійснення ферментаційне середовище може бути отримано шляхом додавання зазначеного антибактеріального агента до водного, рециклізованого технологічного потоку, який є потоком, що отримують від продукту ферментації, але який рециклізується як вхідний потік в ферментаційне середовище для, серед іншого водного балансу.

Відповідно до другого аспекта винаходу, передбаченим є інокулянт для ферментаційного середовища, яке містить:

культуру грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів; та, антибактеріальний агент, вибраний з:

- i) лактилат відповідно до Формули 1,
(R-(O-CH(CH₃)-CO)_aO)_b M (Формула 1);
- ii) естер гліцерину відповідно до Формули 2,
CH₂OR₁CHOR₂-CH₂OR₃ (Формула 2); та,
- iii) суміші таких сполук,

де:

R є C4-C18 ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

R₁, R₂ та R₃ кожен незалежно є H або C4-C18 ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим, за умови, що щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є H, та щонайменше один з R₁, R₂, або R₃ є ацильною групою;

M - протон (H⁺) або протикатіон, вибраний з групи з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію або заміщеного амонію, який має один або декілька (C1-4)алкілів, необов'язково заміщених одним або декількома гідрокси;

a є цілим числом від 1 до 3; та,

b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

Даний другий аспект винаходу запобігає забрудненню інокулянта грампозитивними бактеріями. Після інокуляції ферментаційного середовища антибактеріальний агент стає диспергованим в такому середовищі, де він може продовжувати пригнічувати або запобігати росту грампозитивних бактерій, які можуть вводитися як забруднювачі середовища.

Представлений винахід також передбачає застосування антибактеріального агента для пригнічення росту грампозитивних забруднюючих бактерій при культивуванні грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів, причому зазначений антибактеріальний агент є вибраним з: лактилата відповідно до формули 1, як визначено в даному документі вище; естеру гліцерину відповідно до формули 2, як визначено в даному документі вище; або, суміші таких сполук.

Відповідно до наступного аспекту представленого винаходу, передбаченим є спосіб запобігання або зниження мікробних інфекцій, викликаних грампозитивними бактеріями в культурі ферментера з грамнегативними бактеріями, причому зазначений спосіб включає додавання до культури ефективного кількості антимікробного агента, вибраного з: лактилата відповідно до формули 1, як визначено в даному документі вище; естеру гліцерину відповідно до формули 2, як визначено вище; та, суміші таких сполук.

Та, відповідно до кінцевого аспекта винаходу, передбаченим є спосіб отримання продукту ферментації, причому зазначений спосіб є визначеним у Формулі винаходу, яка додається, та який включає стадії: забезпечення ферментаційного середовища; та, введення в зазначене середовище інокулянта, який містить культуру грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів.

Визначення.

Термін "який містить", як використовується в даному документі, як матиметься на увазі, означає, що перелік, наведений нижче, не є вичерпним, та може включати або може не включати будь-які інші додаткові прийнятні елементи, наприклад, одну або більше додаткову(их) ознаку(и), компонент(ів), інгредієнт(ів) та / або замісник(ів), відповідно.

Активність або агент, який є "антибактеріальним", означає в даному документі активність або агент, який здатний знищувати та/або інгібувати ріст бактерій.

Термін мікробний ріст використовується в даному документі відповідно до свого стандартного значення; як такого, "мікробний ріст" стосується збільшення кількості та/або метаболічної активності мікробних клітин, включаючи бактерії, плісняви, гриби та водорості.

Термін "ферментаційне середовище". як використовується в даному документі, означає трифазну (тверда речовина-рідина-газ) систему, яка зберігається всередині ферментаційної ємності. Рідка фаза містить воду, розчинені поживні речовини, розчинені субстрати для росту мікроорганізмів та розчинені метаболіти; джерело води не обмежується та включає, зокрема, технологічні води, такі як зворотна та/або фільтрат барди, скруберна вода, конденсат з випарника або дистиллят, вода з бічної відпарної колонки дистиляції або інший продукт ферментації рослинної технологічної води. Тверда фаза містить індивідуальні клітини, гранули, нерозчинні субстрати для мікробного росту та осажені продукти метаболізму.

В контексті мікробного росту термін "субстрат" стосується будь-якої речовини або сполуки, яка перетворюється або призначена для перетворення в іншу сполуку під дією ферменту. Термін "субстрат" охоплює не тільки сполуки, які забезпечують джерело карбону, прийнятне для використання як вихідного матеріалу, наприклад, будь-який вуглевод, отриманий з біомаси, але

також проміжні метаболіти, які використовуються в метаболічному шляху, пов'язаному з мікроорганізмом. Ферментаційне середовище зазвичай може включати як субстрат один або більше здатних для ферментації вуглеводів, таких як цукри.

Ферментаційне середовище, включаючи субстрат ферментації та іншу сировину, яка використовується в процесі ферментації за винаходом, може бути оброблено - подрібненням, зрідженням, оцукрюванням або подібним чином - перед або одночасно з процесом ферментації. Відповідно, ферментаційне середовище може стосуватися середовища до додавання ферментуючого мікроорганізму, такого як середовище, що утворюється в результаті зрідження та / або оцукрювання, яке містить ферментуючий організм, таке як середовище, яке використовують при одночасному оцукрюванні та ферментації (SSF) або в одностадійних процесах ферментації. Для завершеності, в такому варіанті здійснення, як зазначено вище, коли антибактеріальний агент додають до ферментаційного середовища перед інокуляцією мікроорганізму, це включає додавання зазначеного агента під час зрідження та / або оцукрювання.

Термін "ферментаційна ємність", як використовується в даному документі, означає ємність, в якій проводиться реакція ферментації. Термін "ферментер" може використовуватися взаємозамінно з ферментаційною ємністю.

Як використовується в даному документі "інокулянт" означає вихідне джерело комплексної мікробної колонії, яка є призначеною для додавання в ферментаційну ємність, але який не обмежує кінцевий склад мікробної колонії; кінцевий склад визначається робочими умовами та продуктивністю ферментаційної ємності. Інокулянт зазвичай утворюється шляхом розмноження бажаного(их) мікроорганізму(ів) у відповідному резервуарі для розмноження, причому резервуар є набагато меншим, ніж ферментаційна ємність.

Інокулянт зазвичай включає культуру одного або декількох "виробничих штамів" мікроорганізмів, які можуть бути адаптовані природним відбором або біотехнологічними засобами для отримання продукту ферментації, який викликає зацікавленість. Ілюстративний, але не обмежуючий, інокулянт містить культуру дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для виробництва етанолу.

Термін "культура" використовують в способі, відомому в даній галузі техніки для позначення розмноження мікробних організмів, зокрема, виробничих штамів, в попередньо визначених культуральних середовищах, які сприяють їх росту. Як використовується в даному документі термін "культура ферментера" стосується розмноження одного або декількох виробничих штамів мікроорганізмів, присутніх у зазначеному ферментаційному середовищі або в межах інокулянта, прийнятого для зазначеного ферментаційного середовища.

Не існує наміру обмежувати грамнегативні бактерії, які можуть бути культивованими та використаними в представленому винаході, як виробничі штами. Ілюстративні, але не обмежуючі, грамнегативні бактерії включають: *Escherichia coli*; *Acinetobacter*; *Bordetella*; *Brucella*; *Campylobacter*; *Cyanobacteria*; *Enterobacter*; *Erwinia*; *Francisella*; *Helicobacter*; *Klebsiella*; *Legionella*; *Moraxella*; *Neisseria*; *Pantoea*; *Pasteurellaceae*, особливо бактерії роду *Actinobacillus*, роду *Hemophilus* та роду *Pasteurella*; *Pseudomonas*; *Proteus*; *Salmonella*; *Selenomonadales*, особливо бактерії роду *Propionispira*, *Propionispora* та *Schwartzia*; *Serratia*; *Shigella*; *Treponema*; *Vibrio*; *Yersinia*; та *Zygomonas*. У варіанті

здійснення, що викликає зацікавленість, культура ферментера або ферментаційне середовище містить одну або більше грамнегативних бактерій, вибраних з групи, яка складається з f: *Escherichia coli*; *Pseudomonas species*; та *Pasteurellaceae species*.

Ілюстративними цвілями, які можуть бути згадані, є цвілі з родів: *Aspergillus*, зокрема *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* та *Aspergillus niger*, *Rhizopus*, наприклад, *Rhizopus oligosporus* та *Rhizopus oryzae*; *Fusarium*, такий як *Fusarium oxysporum*; *Mucor*, такий як *Mucor racemosus*; *Cladosporium*, такий як *Cladosporium herb arum*; *Penicillium*, такий як *Penicillium expansum*; та *Trichoderma*, такий як *Trichoderma harzianum*.

Необмежуючі приклади дріжджових родів, які можуть бути використані у винаході включають: *Breffanomyces*; *Candida*; *Dekkera*; *Pichia*; та *Saccharomyces*.

Вуглеводи, які можуть ферментувати специфічні мікроорганізми, або є широко відомими фахівцям в даній галузі, або є легко доступними в опублікованій літературі. Для повноти загальні вуглеводи, які можуть ферментуватися мікроорганізмами, які продукують молочну кислоту, включають, але не обмежуються ними: C₅ цукри, такі як арабіноза, ксилоза та рибоза; C₆ цукри, такі як глюкоза, фруктоза, галактоза, рамноза та маноза; та C₂цукрів, такі як сахароза, мальтоза та ізомальтоза.

Здатні до ферментування вуглеводи отримують насамперед із сировини на основі крохмалю або на основі цукру. Приклади сировини включають, але не обмежуються цим: кукурудзу,

пшеницю, тритикале, ячмінь, маніоку, жито, сортований крохмальний потік з вищезазначеної сировини, цукровий очерет, цукровий буряк, патоку, рисову соломку, картопляні відходи, деревні відходи, просо прутковидне, сосну та інші похідні деревини, міські відходи, харчові відходи та промислові відходи напоїв (алкогольних та безалкогольних). Ілюстративна, але не обмежуючі, сировина для ферментації *Saccharomyces cerevisiae* є меласою. Якщо бажано, вміст здатних до ферментування вуглеводів у біомасі може бути визначений за способами, відомими в даній галузі техніки. Особливо корисним розкриттям є Milne et al., Sourcebook of Methods of Analysis for Biomass Conversion and Biomass Conversion Processes. SERI/SP-220-3548. Golden, CO: Solar Energy Research Institute, February 1990.

Як ілюстративний, але не обмежуючий, перелік продуктів ферментації, які можуть бути одержані грамнегативними бактеріями, цвіллю та дріжджами, такі як згадані вище мікроорганізми, може бути зазначений далі: етанол; 1,3-пропандіол; гліцерин; бутанол; 1,4-бутандіол; арабіт; ксиліт; сорбіт; мانی; ацетоїн; оцтова кислота; пропіонова кислота; 3-гідроксипропіонова кислота; молочна кислота; бурштинова кислота; фурандикарбонова кислота; фумарова кислота; яблучна кислота; адипінова кислота; лимонна кислота; аконітна кислота; глутамінова кислота; ітаконова кислота; левулінова кислота; глутарова кислота; аспарагінова кислота; малінова кислота; гліцин; серин; треонін; лізин; ізопрен; та полігидроксипропіонат. У варіанті здійснення, ферментаційне середовище, яке містить антибактеріальний агент, як визначено в представленому винаході може бути для виробництва: етанолу; 1,3-пропандіолу; гліцерину; бутанолу; 1,4-бутандіолу; арабіту; ксиліту; сорбіту; маніту; оцтової кислоти; пропіонової кислоти; 3-гідроксипропіонової кислоти; молочної кислоти; бурштинової кислоти; 2,5-фурандикарбонової кислоти; фумарової кислоти; яблучної кислоти; адипінової кислоти; лимонної кислоти; аконічної кислоти; глутамінової кислоти; ітаконової кислоти; левулінової кислоти; глутарової кислоти; аспарагінової кислоти; малінової кислоти; та їх суміші.

Були отримані гарні результати, де антибактеріальний агент був доданий до ферментаційного середовища для виробництва: 1,4-бутандіолу; пропіонової кислоти; 3-гідроксипропіонової кислоти; молочної кислоти; бурштинової кислоти; 2,5-фурандикарбонової кислоти; фумарової кислоти; яблучної кислоти; або ітаконової кислоти. Найбільш переважним є використання зазначеного антибактеріального агента в ферментаційному середовищі для виробництва: пропіонової кислоти; молочної кислоти; бурштинової кислоти; 1,4-бутандіолу; або 2,5-фурандикарбонової кислоти. Для завершеності, коли молочна кислота є отриманою як продукт ферментації, представлений винахід також охоплює: димеризацію цієї молочної кислоти для отримання лактиду; синтез полімолочної кислоти шляхом поліконденсації цієї молочної кислоти; та синтез полімолочної кислоти шляхом полімеризації лактиду, отриманого з цієї молочної кислоти.

Буде зрозуміло, що бажаний(і) продукт(и) ферментації, згадані в даному документі та які можуть одержуватися з використанням ферментації субстрату здатного до ферментації з відповідним мікроорганізмом, буде продукуватися як компонент композиції, яка зазвичай додатково містить: сліди здатного до ферментування субстрату; інші речовини, які продукуються мікроорганізмом; та сліди самого мікроорганізму, такого як клітинний дебрис та / або клітинні компоненти. Термін "продукт ферментації" є призначеним для охоплення як неочищеного продукту, так і продукту після його освітлення, очищення та / або концентрування, ілюстративні, але не обмежуючі способи очищення включають один або більше з: фільтрації, включаючи мікро- і ультрафільтрацію; дистиляції; (пере)кристалізації; екстракції; хімічної обробки, наприклад, підкислення; іонного обміну; обробки активованим вугіллям; та електродіалізу.

Як відомо в даній галузі техніки, грампозитивні бактерії фарбуються темно-синім або фіолетовим забарвленням за Грамом, головним чином за рахунок високої кількості пептидоглікану в їх клітинній стінці. Представлений винахід стосується пригнічення або запобігання росту таких бактерій в культурах ферментера. Винахід, зокрема, стосується пригнічення або запобігання росту грампозитивних бактерій, які включають: *Enterococci*; *Clostridium*, зокрема *Clostridium perfringens* та *Clostridium pasteurianum*; *Listeria*, зокрема *Listeria monocytogenes* та *Listeria innocua*; *Staphylococcus*, зокрема *Staphylococcus aureus*, various *Bacillus species*, зокрема *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* та *Bacillus subtilis*; та *Streptococcus*.

Як використовується в даному документі, термін "ацильна група" означає функціональну групу, отриману від видалення гідроксильної групи з карбонової кислоти та яка має формулу R_xCO- , де R_x є алкільною групою або алкенільною групою, яка є приєднаною до групи CO з простим зв'язком. Один або більше ненасичених зв'язків можуть бути присутніми в алкенільній групі. Таким чином, загальна кількість атомів карбону в ацильному ланцюзі є кількістю атомів

карбону в R_x ланцюзі +1. Термін (C4-C18)ацил означає ацильну групу, яка має 4-18 атомів карбону.

Як використовується в даному документі естер гліцерину, який несе тільки один бічний ланцюг C4-C18 ацильної групи, називається моноестером (C4-C18)гліцерину, естер гліцерину, який несе дві C4-C18 ацильні групи називається діестером (C4-C15)гліцерину. Суміш зазначених естерів може називатися моно-/діестерами (C4-C18)гліцерину або моно/ді (C4-C18)гліцерином.

Ілюстративні ацильні групи включають; C6 ацильні групи, такі як ізо-гексаноїльні групи; C8 ацильні групи, такі як ізооктаноїльні групи; C10 ацильні групи, такі як деканоїльні групи; C12 ацильні групи, такі як лаурил (додеканоїл); C14 ацильні групи, такі як міристильні (тетрадеканоїльні) групи; C16 ацильні групи, такі як цетилові та пальмітилові (гексадеканоїльні) групи; та, C18 ацильні групи, такі як октадеканоїльні групи.

Детальний опис винаходу.

Загалом, сполуки, визначені в Формулі 1 та Формулі 2 вище, використовують для пригнічення росту грампозитивних забруднюючих бактерій в культивуванні грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів шляхом додавання однієї або більше з даних сполук в культуральне середовище. При пригніченні росту грампозитивних забруднюючих бактерій, можливим є покращити продукування бажаного продукту ферментації.

Представлений винахід не виключає додавання, як антибактеріального агента, двох або більше сполук, які відповідають Формулі 1, або двох або більше сполук, які відповідають Формулі 2. Крім того, суміші сполук як визначено у Формулі 1 та Формулі 2 можуть також бути використаними.

Загальна кількість антибактеріального агента, яка вводиться в ферментаційне середовище, інокулят або культуру ферментера, є такою, яка є ефективною для пригнічення, запобігання або зменшення забруднень, викликаних грампозитивними бактеріями. Точна кількість антибактеріального агента буде залежати від низки чинників, таких як конкретний агент, який використовується, виробний штам, який культивується, тип середовища та джерело енергії. Однак, у більшості варіантів здійснення, ферментаційне середовище або інше культуральне середовище буде містити від 0,001 до 0,5 мас. %, переважно від 0,025 до 0,5 мас. %, та більш переважно від 0,1 до 0,5 мас. % виходячи з загальної маси середовища, визначеного антибактеріального агента.

На додаток до вищезазначеного антибактеріального агента на основі лактилатів та і або естеру гліцерину, ферментаційне середовище може містити щонайменше один допоміжний антимікробний інгредієнт, який має ефективність щодо грампозитивних бактерій, але який суттєво не впливає на грамнегативні бактерії. Такі допоміжні інгредієнти можуть бути додані безпосередньо до ферментаційного середовища, як екзогенний інгредієнт Додатково або альтернативно, допоміжні інгредієнти можуть бути включені в інокулянт для ферментаційного середовища.

У варіанті здійснення, ферментаційне середовище, інокулянт або культура ферментера може містити до 1 мас. %, виходячи з загальної маси середовища, допоміжного антимікробного агента, вибраного з групи, яка складається з: лізоциму; нізину; педіюцину; ε-полілізину; протаміну; хмелевих бета-кислот; каніфольних кислот; пімелінової кислоти; бензойної кислоти; п-гідроксибензойної кислоти; саліцилової кислоти; коричної кислоти; лимонної кислоти; насичених жирних кислот з довжиною ланцюга від 8 до 16 атомів карбону; естери цукру насичених жирних кислот з довжиною ланцюга від 8 до 16 атомів карбону; та їх сумішей. В альтернативному визначенні, ферментаційне середовище може містити до 2000 мг/л зазначеного допоміжного антимікробного агента.

Формула 1.

Лактилати, які застосовуються в представленому винаході мають структуру відповідно до формули 1 в даному документі нижче:

$(R-(O-CH(CH_3)-CO)_a O)_b M$ (Формула 1);

R є C4 - C18 ацильною групою, переважно C8 - C14 ацильну групу, більш переважно C10 - C14 ацильну групу та найбільш переважно C12 - C14 ацильну групу.

M - протон (H⁺) або протикатіон, вибраний з групи Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію або заміщеного амонію, який має один або декілька (C1-4)алкілів, необов'язково заміщених однією або декількома гідроксильними групами. Переважно M є вибраним з групи, яка складається з Na, K, Ca та Mg. Більш переважно, M - Na.

Група (O-CH(CH₃)-CO)O є лактильним радикалом або R, або S конфігурації (як визначено в розділі E в редакції 1979 IUPAC Nomenclature of Organic Chemistry), отриманий з R- або S-молочної кислоти. Група може також є сумішшю таких стереоізомерних конфігурацій.

Значення b дорівнює валентності M " b " тим самим досягає значення 1, якщо M - протон (H^+) або одновалентний катіон, такий як Na , K , Ag , амоній (NH_4) або заміщений амоній. " b " досягає значення 2, де M - двовалентний катіон, такий як Ca , Mg , Zn , Mn , $Fe(II)$ або Cu .

Значення " a " може становити від 1 до 3, причому 1 є переважним. Лактилати, в яких " a " є 1, називаються "монолактилатами"; сполуки, в яких " a " є 2, називаються "дилактилатами"; та сполуки, в яких " a " є 3 називаються "трилактилатами". Монолактилати ($a=1$) є переважними для використання в даному документі. Однак, слід зазначити, що коли монолактилат є включеним в антимікробний агент, це не виключає присутності в ньому слідових кількостей дилактилатів та трилактилатів; види вищого порядку можуть виникати в процесі синтезу монолактилату.

Ілюстративні лактилати Формули 1, які знаходять застосування як антибактеріальні агенти в представленому винаході, включають, але не обмежуються цим: додеканоїл-лактилат (C12-лактилат); тетрадеканоїл-лактилат (C14-лактилат); гексадеканоїл-лактилат (C16-лактилат); октадеканоїл-лактилат (C18:0-лактилат) та октадек-9-еноїл-лактилат (C18:1-лактилат).

Способи синтезу таких лактилатів є відомим в даній галузі техніки. Згаданими можуть бути: патент США № 3,883,669 (Tsen et al.); патент США № 4,146,548 (Forsythe); Elliger, A convenient preparation of pure stearyl-2-lactylic acid, Journal of Agricultural and Food Chemistry 27: 527 (1979); та WO 2012/036693 (Caravan Ingredients Inc.). Крім того, неочищені лактилати, отримані в таких способах синтезу, можуть бути очищені загальноприйнятими способами, включаючи, але не обмежуючись цим: фільтрацію; центрифугування; дистиляцію; кристалізацію; екстракцію; та хроматографію.

Формула 2.

Естери гліцерину, прийнятні для застосування як антибактеріальних агентів в представленому винаході є визначеними у Формулі 2: $CH_2OR_1-CHOR_2CH_2OR_3$

(Формула 2)

R_1 , R_2 та R_3 кожен незалежно є H або C4-C18 ацильною групою за умови, що щонайменше один з R_1 , R_2 або R_3 є H , та щонайменше один з R_1 , R_2 , або R_3 є ацильною групою.

В першому варіанті здійснення один або два з R_1 , R_2 або R_3 є C6-C14 ацильною групою, та залишкові R_n групи є H . Переважно, один або два з R_1 , R_2 та R_3 є C8 ацильними групами, та залишкові R_n групи є H .

Зазначено, що винахід не виключає застосування суміші гліцеринових моно- та діестерів в межах антибактеріального агента. Наприклад, гарні результати були отримані при застосуванні моно-/ді-естерів (C8)гліцерину.

Способи синтезу таких моно- та діестерів є відомими в даній галузі. Наприклад, комерційний синтез C4-C18 естерів гліцерину зазвичай здійснюють двома різними шляхами: безпосередньою етерифікацією жирної кислоти з гліцерином (гліцериноліз), яка каталізується гомогенною кислотою, такою як сірчана або сульфенова кислоти; або шляхом переетерифікації тригліцеридів та поліспиртів, яка каталізується гідроксидами лужних металів, такими як $NaOH$. KOH або $Ca(OH)_2$ та солями натрію з низькомолекулярними спиртами, такими як метанол. Посилання також може бути зроблене на: Mostafa et al. Production of mono-, di- and triglycerides from waste fatty acids through esterification with glycerol Advances in Bioscience and Biotechnology, 2013, 4, 900-907; Hyun et al. A single step non-catalytic esterification of palm fatty acid distillate (PFAD) for biodiesel production. Fuel, 93, 373-380 (2012). Крім того, неочищені естери гліцерину, отримані в таких способах синтезу, можуть бути очищені загальноприйнятими способами, включаючи, але не обмежуючись цим: фільтрацію; центрифугування; дистиляцію; кристалізацію; екстракцію; та хроматографію.

Далі винахід ілюструється наступними прикладами, які демонструють переваги даного винаходу, без обмеження даного винаходу ними.

Приклади.

AMCET 200C: C8-гліцерин моно- та діестерна суміш, придбана у Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.

AMCET 3400E: Суміш деканоїл-лактилату (C10-лактилат) та додеканоїл-лактилату (C12-лактилату), придбана у Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.

AMCET 4530E: Суміш додеканоїл-лактилату (C12-лактилат) та тетрадеканоїл-лактилату (C14-лактилат), придбана у Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.

ATCC: Американська колекція типових культур, Manassas, Virginia, U.S.A.

Bioscreen C: Культуральна система, доступна від Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsinki, Finland. The Bioscreen C кінетично вимірює розвиток каламутності (росту) з використання вертикальної фотометрії в аж до 200 лунках одночасно.

EMPLEX: C18-лактилат, придбаний у Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.

MIC: Мінімальна інгібіторна концентрація, як вимірюється в дослідженні оптичної густини, є

найнижчою концентрацією, при якій збільшення абсорбції культури не перевищувало порогове значення, яке було визначено як середнє збільшення значення абсорбції порожніх проб плюс триразове стандартне відхилення.

5 Olacta: Октадеcanoїл-лактилат (C18:1-лактилат), придбаний у Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.

Rationis 122A: Суміш двох лактилатів, зокрема натрію деканоїл-лактилата (натрій-капроїллактилата) та натрію додеканоїл-лактилата (солі лауроїллактилата) в мольному співвідношенні 1,3: 1. придбана у Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.

10 Приклад 1: Ефект тетрадеканоїл-лактилату (C14-лактилат) на змішані культури *Escherichia coli* та *Clostridium pasteurianum*

Для того, щоб визначити чи може тетрадеканоїл-лактилат (C14-лактилат) запобігати росту *Clostridium pasteurianum* JEG2 (NCCB 100154, NCCB: Netherlands Culture Collection of Bacteria, Utrecht, Netherlands) в культурі біоінженерної гомолактичної R-молочної кислоти, яка продукується *Escherichia coli* TG128 (NRRL B-30962, NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, U.S.A.), три різні ферментації відбуваються та здійснюються одночасно. Даними ферментаціями були:

i) Ферментер 1: Ферментація чистої культури *Escherichia coli* TG128;

ii) Ферментер 2. *Escherichia coli* TG128 змішана з *Clostridium pasteurianum* JEG2;

20 iii) Ферментер 3. *Escherichia coli* TG128 змішана з *Clostridium pasteurianum* JEG2 з додаванням 0,05 % (мас./об.) тетрадеcanoїл-лактилату (C14-лактилат: Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.).

Всі три ферментації здійснювали в стерильних 7-літрових ферментерах. Ферментер 1, 2 та 3 отримували 3,5 л стерильного середовища для росту наступного складу: 3,25 л демінералізованої води, 385 г моногідрату глюкози, 12,25 г діамонію фосфату, 17,75 г калію гідрофосфату, 12,25 г калію дигідрофосфату, 3,5 мл 1 М розчину бетаїн-гідрохлориду, 5,25 мл 1 М розчину $MgSO_4$ (магнію сульфату), 3,5 мл 1 М розчину $CaCl_2$ (кальцію хлорид) та 5,25 мл розчину металевих мікроелементів. Розчин мікроелементів містить на 1 літр: 1,6 г $FeCl_3$ (феруму (III) хлориду), 0,2 г $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (кобальту хлориду), 0,1 г $CuCl_2$ (купруму хлориду), 0,2 г $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$ (цинку хлориду) 0,2 г $NaMoO_4$ (натрію молібдату), H_3BO_3 (борну кислоту) та 10 мл 37 % (мас./мас.) HCl (гідрохлоридної кислоти). Ферментер 3 отримував 0,05 % (мас./об.) тетрадеканоїл-лактилату (C14-лактилат).

Всі три ферментери були оснащені pH-зондом. Значення pH ферментації контролювали на значенні 6,5 за рахунок додавання суспензії $Ca(OH)_2$ в демінералізованій воді. Концентрація суспензії $Ca(OH)_2$ становила приблизно 220 г/л. Температуру ферментерів підтримували постійною при значенні 37 °C.

35 Кожен ферментер (1, 2 та 3) інокулювали 80 мл культури *Escherichia coli* TG128, яка активно росла протягом ночі. Ферментери 2 та 3 також інокулювали 1 мл культури *Clostridium pasteurianum* JEG2, яка росте на бульйоні із серцево-мозковим екстрактом. В залежності від протікання ферментації культури в ферментерах функціонували протягом 25-35 годин, після чого їх аналізували. Результати (хімічних) аналізів узагальнено в Таблиці 1 в даному документі нижче:

Таблиця 1

	Ферментер 1	Ферментер 2	Ферментер 3
Компонент (г/л)	Escherichia coli TG128	Escherichia coli TG128 + Clostridium pasteurianum NCCB 100154	Escherichia coli TG128+Clostridium pasteurianum NCCB 100154 + Тетрадеканоїл-лактилат
R-лактат	82,6	28,2	81,8
S-лактат	0	2	0,3
% енантімерний надлишок: (R-S)/(R+S)	100	86,8	99,3
Етанол	0,07	0,4	0,08
глюкоза	1,9	14,4	2,3
Мурашина кислота	<0,2	2	<0,2
Оцтова кислота	0,2	2,3	0,3
Пропіонова кислота	<0,1	<0,1	<0,1
Масляна кислота	<0,1	6,6	0,1
Піровиноградна кислота	<0,1	<0,1	<0,1
2-гідроксимасляна кислота	<0,1	<0,1	<0,1
Гліколева кислота	<0,5	< 0,5	<0,5
Щавелева кислота	<0,2	<0,2	<0,2
Сорбінова кислота	<0,1	<0,1	<0,1
Фумарова кислота	<0,2	<0,2	<0,2
Бурштинова кислота	0,1	<0,1	<0,1
Бензойна кислота	<0,3	<0,3	<0,3
Малеїнова кислота	<0,2	<0,2	<0,2
Яблучна кислота	<0,5	<0,5	<0,5
Лимонна кислота	<0,5	< 0,5	<0,5

Через 12 годин після інокуляції спостерігали, що ферментер 2 почав виробляти великий об'єм піни та гнильний запах. Мікроскопічне дослідження культурального бульйону виявило присутність великої кількості клітин, які несуть ендоспори. Дане явище спостерігається, коли Clostridium pasteurianum JEG2 необмежено росте.

Ферментер 3, який також інокулювали змішаною культурою Escherichia coli TG128 та Clostridium pasteurianum JEG2, але також отримували 0,05 % (мас./об.) тетрадеканоїл-лактилату (C¹⁴-лактилат), не викликав ніякої піни або гнильного запаху. Більш того, мікроскопічне дослідження культурального бульйону, взятого з ферментера 3, показало, що він не містив клітин, які несуть ендоспори.

Продуктивність ферментера 3 була у всіх відношеннях схожа на продуктивність ферментера 1, який був інокульований чистою культурою Escherichia coli TG128. Крім того, хімічний аналіз ферментаційного бульйону (таблиця 1) показав, що не існує ніякої різниці в профілі домішок між стандартною ферментацією Escherichia coli TG128 (Ферментер 1) та культурою Escherichia coli і Clostridium pasteurianum JEG2, змішаною з тетрадеканоїл-лактилатом (Ферментер 3). Відсоток енантімерного надлишку лактату, продукованого у ферментерах 1 та 3 є близьким до 100 та тільки невелика кількість S-лактату була виявлена у ферментері 3, ймовірно, введена через сапоніфікацію лактилатного естера.

Відсоток енантімерного надлишку у ферментері 2, з іншого боку, був значно нижчим через необмежений ріст Clostridium pasteurianum JEG2. Крім того, загальна кількість молочної кислоти, виробленої у ферментері 2, також була значно нижчою. Відсоток енантімерного надлишку визначають як: $((R-S)/(R+S)) \cdot 100$ та, де R та S є відповідними фракціями енантімерів в R- та S-лактаті, які містять ферментаційний бульйон.

Точно такі самі результати були отримані, коли ферментер 3 був збагачений 0,025 % (мас./об.) тетрадеканоїл-лактилат (C¹⁴-лактилат) замість 0,05 % (мас./об.).

Приклад 2: Вплив сумішей деканоїл-лактилату (C¹⁰-лактилату) та додеканоїл-лактилату

(C12-лактилату) або сумішей додеканоїл-лактилату (C12-лактилату) та тетрадеканоїл-лактилату (C14-лактилату) на змішані культури *Escherichia coli* та *Clostridium pasteurianum*

В ідентичній експериментальній установці, як описано в Прикладі 1, досліджували ефективність 0,05 % (мас./об.) AMCET 3400E та 0,05 % (мас./об.) AMCET 4530E щодо пригнічення росту *Clostridium pasteurianum* JEG2 в культурі *Escherichia coli* TG128.

Продуктивність ферментера 3 з або AMCET 3400E, або AMCET 4530E була у всіх відношеннях схожа на продуктивність ферментера 1, який був інокульований чистою культурою *Escherichia coli* TG128. Крім того, хімічний аналіз ферментаційного бульйону показав, що не існує різниці в профілі домішок між стандартною ферментацією *Escherichia coli* TG128 (Ферментер 1) та культурою *Escherichia coli* / *Clostridium pasteurianum* JEG2, змішаною з AMCET 3400E або AMCET 4530E (Ферментер 3). Відсоток енантіомерного надлишку лактату, продукованого в ферментері 1 та 3 є близьким до 100 для AMCET 3400E та AMCET 4530E.

Приклад 3: Дослідження *in vitro* л акти латів проти *Clostridium perfringens*.

Ефективність лактилатів, як визначено у Формулі 1, та естерів гліцерину, як визначено у Формулі 2, для інгібування росту досліджували проти *Clostridium perfringens* ATCC 13124 в системі культивування Bioscreen C.

Оптичну густину культур автоматично вимірювали за фіксованими інтервалами часу при 420-580 нм з використанням широкосмугового фільтра. Швидкість росту досліджуваних організмів визначали при 30 °C. Для того, щоб забезпечити низькі кисневі умови Bioscreen був поміщений в анаеробний кабінет, обладнаний датчиком кисню типу M-12 (In Vivo₂ 400 гіпоксична робоча станція, Biotrace International Pic, Bridgend, United Kingdom). Тиск кисню регулювали на 0 % кисню з використанням модуля газового змішувача Ruskinn (Biotrace International Pic).

Бульйон із серцево-мозковим екстрактом готували з різними кількостями різних лактилатів та естерів гліцерину, як зазначено в таблиці 2 в даному документі нижче.

Досліджували наступні сполуки: октаноїл-лактилат (C8-лактилат), деканоїл-лактилат (C10-лактилат), додеканоїл-лактилат (C12-лактилат), тетрадеканоїл-лактилат (C14-лактилат), гексадеканоїл-лактилат (C16-лактилат), Olacta (октадеценіол-лактилат, C18:1-лактилат), AMCET 3400E, AMCET 4530E, моно-/ди- C8-гліцерин, моно-/ди- C10-гліцерин, моно-/ди- C12-гліцерин, моно-/ди- C14-гліцерин, тетрадеканоїнова кислота (міристинова кислота) та натрію тетрадецилсульфат (натрію міристилсульфат).

Таблица 2

Види	Діапазон концентрації % (мас./об.)	Розмір кроку концентрації % (мас./об.)
Октаноїл-лактилат (C8-лактилат)	0-0,5	0,1
Деканоїл-лактилат (C10-лактилат)	0-0,1	0,02
Додеканоїл-лактилат (C12-лактилат)	0-0,01	0,002
Тетрадеканоїл-лактилат (C14-лактилат)	0-0,01	0,001
Гексадеканоїл-лактилат (C16-лактилат)	0-0,01	0,002
Olacta (Октадеценіол-лактилат, C18:1-лактилат)	0-0,11	0,02
AMCET 3400E (C10/C12- лактилат)	0-0,01	0,001
AMCET 4530E (C12/C14- лактилат)	0-0,01	0,001
моно-/ди- C8- гліцерин	0-0,5	0,05
моно-/ди- C10- гліцерин	0-0,1	0,01
моно-/ди- C12- гліцерин	0-0,01	0,001
моно-/ди- C14- гліцерин	0-0,01	0,001
Тетрадеканоїнова кислота (міристинова кислота)	0-0,01	0,001
Натрію тетрадецилсульфат (Натрію міристилсульфат)	0-0,01	0,001

Тетрадеканоїнова кислота (міристинова кислота), натрію тетрадецилсульфат (Натрію міристилсульфат) були придбані у Sigma-Aldrich.

Значення pH середовищ регулювали до 6,0, використовуючи 9 М сульфатну кислоту, застосовуючи pH-метр Handylab pH 12, обладнаний (мікро) зондом Bluefine 16 pH (No. 285129163). Всі середовища стерилізували фільтруванням з використанням ацетатцелюлозних фільтрів 0,45 мкм (Minisart шприцевий фільтр, стерильний та непірогенний, по. 16555, Sartorius, Gottingen, Germany) (9). 300 мкл кожного середовища переносили на панель стерильного 100 лункового планшета Bioscreen Honeycombe (Thermo electron Oy,

Vantaa, Finland). Планшети із заповненими лунками зберігали при - 30 °С до подальшого застосування. Лункові планшети інокулювали 3 мкл насінневої культури з використанням стерильного автоматичного диспенсера Гамільтона (Hamilton, Bonaduz, Switzerland). Рідкі насінневі культури *Clostridium perfringens* ATCC 13124 готували в пробірках з кришкою, що загвинчується (100×16 мм)_p які містять 10 мл бульйону із серцево-мозковим екстрактом (Oxoid CM225, Basingstoke, United Kingdom) протягом 24 годин при 30 °С.

У Таблиці 3 показано значення MIC лактилатів, естерів гліцерину, тетрадеканоїнової кислоти (міристинової кислоти) та натрію тетрадецилсульфат (натрію міристилсульфат) для *Clostridium perfringens* ATCC 13124 в бульйоні із серцево-мозковим екстрактом. В дужках вказано кількість повторів.

Таблиця 3

Значення MIC різних похідних жирних кислот щодо *Clostridium perfringens* ATCC 13124 в бульйоні із серцево-мозковим екстрактом.

Види	Значення MIC % (мас./об.)
Октаноїл-лактат (C8-лактат)	0,05 (2)
Деканоїл-лактат (C10-лактат)	0,04 (2)
Додеканоїл-лактат (C12-лактат)	0,002 (2)
Тетрадеканоїл-лактат (C14-лактат)	0,001 (2)
Гексадеканоїл-лактат (C16-лактат)	0,002 (2)
Олакта (Октадеценіол-лактат, C 18:1-лактат)	0,02 (2)
АМСЕТ 3400Е (C10/C12-лактат)	0,02 (3)
АМСЕТ 4530Е (C12/C14-лактат)	0,001 (3)
Моно-/ди- C8- гліцерин	0,1 (3) 0,2 (4)
Моно-/ди- C10- гліцерин	0,02 (2) 0,04 (2)
Моно-/ди- C12- гліцерин	>0,01 (2)
Моно-/ди- C14- гліцерин	>0,01 (4)
Тетрадеканоїнова кислота (міристинова кислота)	>0,01 (3)
Натрію тетрадецилсульфат (натрію міристилсульфат)	0,001 (3)

Кількість повторів представлено в дужках.

Виявляється, що навіть при дуже низькій концентрації лактилати та естери гліцерину є здатними пригнічувати ріст *Clostridium perfringens* ATCC 13124.

Приклад 4: Антимікробні властивості деяких лактилатів та моно-/діестерів C8-гліцерину.

Ефективність вибраного числа різних лактилатів, як визначено у Формулі 1, та моно-/діестерів C8-гліцерину (каприловий моно-/ди-), як визначено у Формулі 2, щодо інгібування росту була досліджена стосовно вибору грампозитивних та грамотришечних бактерій в культуральній системі Bioscreen C. Оптичну густину культур автоматично вимірювали у фіксовані інтервали часу на 420-580 нм з використанням ширококутового фільтра. Швидкість росту досліджуваних організмів визначали при 30 °С.

Бульйон із серцево-мозковим екстрактом готували з різними кількостями лактилатів або моно-/діестерів C8-гліцерину (каприловий моно-/ди-). Досліджували наступні сполуки: АМСЕТ 3400Е; АМСЕТ 4530Е; ЕМПЛЕХ; та АМСЕТ 200С.

Значення рН середовищ регулювали до 6,0, використовуючи 9 М сульфатну кислоту, застосовуючи рН-метр Handylab рН 12, обладнаний (мікро) зондом BlueLine 16 рН (No. 285129163). Всі середовища стерилізували фільтруванням з використанням ацетатцелюлозних фільтрів 0,45 мкм (Minisart шприцевий фільтр, стерильний та непірогенний, по. 16555, Sartorius, Gottingen, Germany). 300 мкл кожного середовища переносили на панель стерильного 100 лункового планшета Bioscreen Honeycombe (Thermo electron Oy, Vantaa, Finland). Планшети із заповненими лунками зберігали при 4 °С до подальшого застосування. Лункові планшети інокулювали 3 мкл відповідної досліджуваної культури з використанням стерильного автоматичного диспенсера Гамільтона (Hamilton, Bonaduz, Switzerland).

В даному дослідженні використовували рідкі насінневі культури з наступних культур: *Escherichia coli* серотип 0157:H7 (ATCC 700728);

- Escherichia coli (ATCC 8739);
 Staphylococcus aureus (ATCC 6538P);
 Listeria monocytogenes (F2399);
 Listeria monocytogenes (ATCC 7644);
 5 Listeria monocytogenes NFPA 83 (Seman, D. L., A. C. Borger, et al. (2002) Journal of Food Protection 65(4): 651-658);
 Listeria monocytogenes LCDC 861 (Seman, D. L., A. C. Borger, et al. (2002) Journal of Food Protection 65(4): 651-658);
 Listeria innocua (ATCC 33090);
 10 Listeria innocua TNO штам (TNO, Zeist, The Netherlands);
 Salmonella enterica (ATCC 13076, S. Enteritidis);
 Sa/monef/a enfenca (ATCC 13311, S. Typhimurium);
 Salmonella enterica JAVA (NCTC 8458, NCTC: National Collection of Type Культуру, Porton Down, Salisbury, United Kingdom);
 15 Lactobacillus sakei (DSMZ 20017, DSMZ:Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany);
 Lactobacillus plantarum (DSMZ 20174);
 Lactobacillus curvatus (DSMZ 20019);
 Bacillus cereus (ATCC 11778);
 20 Pseudomonas lundensis (LMG 13517, LMG: Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/ LMG Bacteria Collection. Gent, Belgium); та Pseudomonas fragi (LMG 2191).
 Рідкі насіннєві культури Clostridium perfringens ATCC 13124 готували в пробірках з кришкою, що загвинчується (100×16 мм), які містять 10 мл бульйону із серцево-мозковим екстрактом (Oxoid CM225, Basingstoke, United Kingdom) протягом 24 годин при 30 °C.
 25 Всі культури переносили щодня у пробірки з кришкою, що загвинчується (100×16 мм), які містять 10 мл бульйону із серцево-мозковим екстрактом (Oxoid CM0225, Basingstoke, UK). Види Lactobacillus були перенесені в бульйон MRS (Oxoid CM0359). Всі культури інкубували при 30 °C та без перемішування.
 Ми вивчили вплив різних концентрацій AMCET 3400E, AMCE1 4530E, EMPLEX та AMCET 30 200C.
 Дані, які узагальнені в таблицях 4 та 5 в даному документі нижче, показують, що грамположитивні бактерії є більш сприйнятливими до даних сполук, ніж грамнегативні види. Дані, наведені в таблиці 5, також показують, що AMCET 200C є активним щодо набагато більш широкого кола організмів, ніж лактилати, та охоплює також грамнегативні бактерії. Ефективна 35 концентрація AMCET 200C (моно-/ди- C8-гліцерин) щодо грамнегативних бактерій становить 0,5-1 % (мас./мас.).

Таблиця 4

Вплив AMCET 3400E, AMCET 4530E, EMPLEX та AMCET 200C на різні грамположитивні та грамнегативні бактерії.

Штам	AMCET 3400E (C10/C12- лактилат)	AMCET 4530E (C12/C14- лактилат)	Emplex	AMCET 200C (моно-/ди-C8- гліцерин)
Listeria monocytogenes L.CDC 861	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)
Listeria monocytogenes NFPA 83	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)
Listeria monocytogenes ATCC 7644	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)
Bacillus cereus ATCC 11778	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)
Staphylococcus aureus ATCC 6538P	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)
Lactobacillus plantarum DSM 20174	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)
Lactobacillus curvatus DSM 20019	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)
Lactobacillus sakei DSM 20017	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)
Escherichia coli ATCC 8739	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Escherichia coli 0157:H7 ATCC 700728	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Salmonella enterica ATCC 13311	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Salmonella enterica ATCC 13076	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Salmonella enterica JAVA штам	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Pseudomonas lundensis LMG 13517	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Pseudomonas frag i LMG 2191	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)

Досліджували два діапазони концентрацій: 0-0,1 % (мас./мас.) та 0-0,01 % (мас./мас.).

В таблиці 4, результати для діапазону концентрацій 0-0,01 % показані в дужках. Знак “+” вказує на інгібування. Грампозитивні організми є *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* та *Lactobacillus*.

Таблиця 5

Вплив AMCET 3400E, AMCET 4530E, EMPLEX та AMCET 200C на грампозитивні та грамнегативні бактерії.

Штам	AMCET 3400E (C10/C12- лактилат)	AMCET 4530E (C12/C14- лактилат)	Emplex	AMCET 200C (моно/ди-С8- гліцерин)
<i>Listeria monocytogenes</i> F2399	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> LCDC 861	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> NFPA 83	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	+	+	+	+
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	+	+	+	+
<i>Listeria innocua</i> TNO штам	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	+	+	+	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20019	NT	NT	NT	+
<i>Lactobacillus sakei</i> DSM 20017	NT	NT	NT	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	NT	NT	NT	+
<i>Escherichia coli</i> 0157 H7 ATCC 700728	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> JAVA штам	-	-	-	+
<i>Pseudomonas lundensis</i> LMG 13517	NT	NT	NT	-
<i>Pseudomonas fragi</i> LMG 2191	NT	NT	NT	-

Досліджували діапазон концентрацій: 0-1 % (мас./мас.). В таблиці 5, знак “+” вказує на інгібування, NT: не досліджувалось. Грампозитивні організми є *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* та *Lactobacillus*.

Приклад 5: Ферментація етанолом з *Saccharomyces cerevisiae*

Даний приклад описує вплив низької концентрації лактилатної суміші в процесі ферментації етанолом з *Saccharomyces cerevisiae*. зазначена ферментація, яка проходить на мелясі цукрової тростини та є навмисно забрудненою змішаною культурою *Lactobacillus* видів.

Культури та культуральні умови.

Saccharomyces cerevisiae MUCL30115 був отриманий з Mycotheque de l'Universite Catholique de Louvain (BCCM/MUCL, Louvain-la-Neuve, Belgium) та попередньо культивували в дріжджовому пептон-глюкозному бульйоні (YPG). YPG-бульйон містив на літр демінералізованої води: 40 г моногідрату глюкози; 10 г Bacto™ Peptone (Becton, Dickinson та Company, Sparks, Maryland, USA); та 5 г Bacto™ екстракту дріжджів (Becton, Dickinson та Company, Sparks, Maryland, USA). рН середовища регулювали до 6,0-7,0, використовуючи 1N HCl. Культури інкубували в колбах, які струшуються, при кімнатній температурі.

Lactobacillus brevis LMG11438 був отриманий від Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (BCCM/LMG, Gent, Belgium). *Lactobacillus fermentum* AR748 та *Lactobacillus fructivorans* AR742 були отримані від Corbion Purac B.V., Gorinchem, The Netherlands. Всі штами попередньо культивували на MRS-бульйоні (de Man et al (1960.) A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriology 23(1): 130-135) та інкубували при 30 °C в стаціонарних колбах з кришками, які загвинчуються. Змішану культуру готували шляхом змішування рівних об'ємів трьох культур *Lactobacillus*.

Всі експерименти з ферментації проводили в 3-літрових скляних ферментерах з сорочкою, що містять 0,5 л рідкого середовища, яке має наступний склад: 50 г меляси цукрової тростини (85°Brix); та 450 мл демінералізованої води. Температуру кожної ферментації контролювали при 30 °C, використовуючи циркуляційну водяну баню, та рН контролювали на 5,5 з використанням 1N NaOH.

Кожен з двох первинних ферментерів (А, В) інокулювали 50 мл активної ферментаційної

культури *Saccharomyces*: обидві дані культури також отримували 10 мл змішаної культури *Lactobacillus*. До одного з даних ферментерів (А) додавали 0,5 мл розчину, який містить 10 % (мас./мас.) Pationic 122A з метою вивчення впливу лактилатів на нього.

Після 24 годин ферментації з кожного ферментера (А, В) видаляли 9-10 об. % інокулюму, та, відповідно, переносили на наступні ферментери (А', В'), які містять свіже середовище: ферментації в первинних ферментерах (А, В) давали продовжуватись. Використовуючи дану техніку зворотного розкриття, виконували від шести до восьми подальших перенесень інокулята, кожне через 24 години ферментації у вихідному ферментері.

Аналітичні способи.

Кількості L(+)молочної кислоти, D(-)молочної кислоти та залишкової глюкози визначали з використанням ферментативних процедур. Конкретно та кожен у відповідності з наданим протоколом виробника: глюкозу аналізували з використанням набору K-Gluc, доступного від Megazyme International; D-молочну кислоту аналізували, використовуючи набір K-Date, доступний від Megazyme International; та, L-молочну кислоту аналізували, використовуючи набір L-Date, доступний від Megazyme International.

Органічні кислоти та етанол визначали газохроматографічним аналізом.

Результати.

У Таблиці 6 нижче показано визначені кількості L(+)молочної кислоти, D(-)молочної кислоти та етанолу ферментаціях, які були забруднені змішаною культурою *Lactobacillus species*. В тих ферментаційних культурах *Saccharomyces cerevisiae*, які також містять Pationic 122A, показано значне зниження стоячих концентрацій L(+) та, зокрема, D(-)молочної кислоти в порівнянні з культурами, які не містять лактилатну суміш. Більш того, концентрація етанолу в культурах *Saccharomyces cerevisiae*, які містять Pationic 122A, значно підвищується над даними культурами, в яких лактилатна суміш відсутня. Позитивні ефекти Pationic 122A могли зберігатися протягом щонайменше 6-8 послідовних переносів.

Таблиця 6

Ферментація з мелясою з *Saccharomyces cerevisiae*, забрудненою змішаною культурою LAB

№ переносу	Pationic 122A присутність	L(+) молочна кислота (г/л)	D(*)молочна кислота (г/л)	Етанол (% мас./мас.)
2	Ні	1,40	6,80	¹ 1,20
3	Ні	1,18	6,50	1,30
4	Ні	1,28	6,79	1,60
5	Ні	1,16	3,15	1,30
6	Ні	1,42	3,31	1,60 П
Середнє значення		1,29	5,31	1,40

Ферментація з мелясою з *Saccharomyces cerevisiae*, забрудненою змішаною культурою LAB та в присутності Pationic 122A

№ переносу	Pationic 122A присутність	L(+) молочна кислота (г/л)	D(-) молочна кислота (г/л)	Етанол (% мас./мас.)
2	Так	0,15	2,10	1,30
3	Так	0,16	0,90	2,10
4	Так	0,15	0,98	2,20
5	Так	0,21	0,97	2,20
6	Так	0,23	1,33	1,80
Середнє значення		0,18	1,25	1,92

Кваліфікованому фахівцю в даній галузі буде зрозуміло при розгляді опису, що в розкритих варіантах здійснення можуть бути зроблені різні модифікації, не виходячи за межі обсягу винаходу. Тому передбачається, що варіанти здійснення та приклади, які розглядаються, є тільки ілюстративними, причому справжній обсяг винаходу визначається наступною формулою винаходу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Ферментаційне середовище, яке містить:

інокулянт, що містить культуру грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів, де зазначені дріжджі вибрані з родів *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera* і *Pichia*;

субстрат для мікробного росту; та

як екзогенний, доданий, інгредієнт антимікробний агент, що складається з:

i) щонайменше одного лактилату відповідно до Формули 1

$(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$, (Формула 1)

5 де:

R є C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

M - це протон (H⁺) або протикатіон, вибраний з групи, яка складається з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію та заміщеного амонію, який має один або декілька (C₁₋₄)алкілів, де

10 зазначений C₍₁₋₄₎алкіл необов'язково заміщений одним або декількома гідрокси;

a є цілим числом від 1 до 3; та

b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

2. Ферментаційне середовище, яке містить:

інокулянт, що містить культуру грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів, де зазначені

15 дріжджі вибрані з родів *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera* і *Pichia*;

субстрат для мікробного росту; та

як екзогенний, доданий, інгредієнт антимікробний агент, що складається з:

i) щонайменше одного лактилату відповідно до Формули 1

$(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$, (Формула 1) та

20 ii) щонайменше одного естеру гліцерину відповідно до Формули 2

CH₂OR₁-CHOR₂-CH₂OR₃, (Формула 2)

де:

R є C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

25 R₁, R₂ та R₃ кожен незалежно є H або C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим, за умови, що щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є H та щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є ацильною групою;

M є протоном (H⁺) або протикатіоном, вибраним з групи, яка складається з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію та заміщеного амонію, який має один або декілька (C₁₋₄)алкілів, де

30 зазначений (C₁₋₄)алкіл необов'язково заміщений одним або декількома гідрокси;

a є цілим числом від 1 до 3; та

b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

3. Ферментаційне середовище за п. 1 або 2, в якому R є ацильною групою з лінійним або розгалуженим ланцюгом, який містить від 4 до 18 атомів карбону.

35 4. Ферментаційне середовище за п. 3, в якому R є ацильною групою з лінійним або розгалуженим ланцюгом, який містить від 12 до 14 атомів карбону.

5. Ферментаційне середовище за п. 4, в якому "a" в Формулі 1 є 1.

6. Ферментаційне середовище за п. 2, в якому один або два з R₁, R₂ та R₃ є ацильними групами

40 з 8 атомами карбону та інший(i) є H.

7. Ферментаційне середовище за будь-яким одним з пп. 1-6, в якому кількість антибактеріального агента становить від 0,001 до 0,5 масових %, виходячи із загальної маси середовища.

8. Ферментаційне середовище за п. 7, в якому кількість антибактеріального агента становить від

45 0,025 до 0,5 масових %, виходячи з загальної маси середовища.

9. Ферментаційне середовище за будь-яким одним з пп. 1-8 для виробництва: етанолу; 1,3-пропандіолу; гліцерину; бутанолу; 1,4-бутандіолу; арабіту; ксиліту; сорбіту; маніту; оцтової кислоти; пропіонової кислоти; 3-гідроксипропіонової кислоти; молочної кислоти; бурштинової кислоти; 2,5-фурандिकарбонової кислоти; фумарової кислоти; яблучної кислоти; адипінової

50 кислоти; лимонної кислоти; аконітної кислоти; глутамінової кислоти; ітаконової кислоти; левулінової кислоти; глутарової кислоти; аспарагінової кислоти; маленової кислоти та їх сумішей.

10. Ферментаційне середовище за будь-яким одним з пп. 1-8 для виробництва: 1,4-бутандіолу; пропіонової кислоти; 3-гідроксипропіонової кислоти; молочної кислоти; бурштинової кислоти;

55 2,5-фурандिकарбонової кислоти; фумарової кислоти; яблучної кислоти або ітаконової кислоти.

11. Інокулянт для ферментаційного середовища, який містить:

культуру грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів, де зазначені дріжджі вибрані з родів *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera* і *Pichia*; та

антибактеріальний агент, що складається з:

60 i) щонайменше одного лактилату відповідно до Формули 1

(R-(O-CH(CH₃)-CO)_aO)_bM, (Формула 1)

де:

R є C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

5 M є протоном (H⁺) або протикатіоном, вибраним з групи, що складається з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію та заміщеного амонію, який має один або декілька (C₁₋₄)алкілів, де зазначений (C₁₋₄)алкіл необов'язково заміщений одним або декількома гідрокси;

a є цілим числом від 1 до 3; та

b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

10 12. Інокулянт для ферментаційного середовища, який містить:

культуру грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів, де зазначені дріжджі вибрані з родів *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera* і *Pichia*; та

антибактеріальний агент, що складається з:

i) щонайменше одного лактилату відповідно до Формули 1

15 (R-(O-CH(CH₃)-CO)_aO)_bM, (Формула 1) та

ii) щонайменше одного естеру гліцерину відповідно до Формули 2

CH₂OR₁-CHOR₂-CH₂OR₃, (Формула 2)

де:

20 R є C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

R₁, R₂ та R₃ кожен незалежно є H або C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим, за умови, що щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є H та щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є ацильною групою;

25 M є протоном (H⁺) або протикатіоном, вибраним з групи, яка складається з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію та заміщеного амонію, який має один або декілька (C₁₋₄)алкілів, де зазначений (C₁₋₄)алкіл необов'язково заміщений одним або декількома гідрокси;

a є цілим числом від 1 до 3; та

b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

30 13. Застосування антибактеріального агента для пригнічення росту грампозитивних забруднюючих бактерій в культивуванні грамнегативних бактерій або цвілі, або дріжджів, де антибактеріальний агент складається з:

i) щонайменше одного лактилату відповідно до Формули 1

35 (R-(O-CH(CH₃)-CO)_aO)_bM, (Формула 1)

де:

R є C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

40 M є протоном (H⁺) або протикатіоном, вибраним з групи, яка складається з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію та заміщеного амонію, який має один або декілька (C₁₋₄)алкілів, де зазначений (C₁₋₄)алкіл необов'язково заміщений одним або декількома гідрокси;

a є цілим числом від 1 до 3; та

b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

45 14. Застосування антибактеріального агента для пригнічення росту грампозитивних забруднюючих бактерій в культивуванні грамнегативних бактерій або цвілі, або дріжджів, де антибактеріальний агент складається з:

i) щонайменше одного лактилату відповідно до Формули 1

(R-(O-CH(CH₃)-CO)_aO)_bM, (Формула 1) та

ii) щонайменше одного естеру гліцерину відповідно до Формули 2

CH₂OR₁-CHOR₂-CH₂OR₃, (Формула 2)

50 де:

R є C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

55 R₁, R₂ та R₃ кожен незалежно є H або C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим, за умови, що щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є H та щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є ацильною групою;

M є протоном (H⁺) або протикатіоном, вибраним з групи, яка складається з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію та заміщеного амонію, який має один або декілька (C₁₋₄)алкілів, де зазначений (C₁₋₄)алкіл необов'язково заміщений одним або декількома гідрокси;

60 a є цілим числом від 1 до 3; та

b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

15. Спосіб запобігання або зниження мікробних інфекцій, викликаних грамполозитивними бактеріями в культурі ферментера грамнегативних бактерій, який включає додавання до культури ефективноі кількості антимікробного агента, що складається з:

5 i) щонайменше одного лактилату відповідно до Формули 1

$(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$, (Формула 1)

де:

R є C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

10 M є протоном (H⁺) або протикатионом, вибраний з групи, яка складається з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію та заміщеного амонію, який має один або декілька (C₁₋₄)алкілів, де зазначений (C₁₋₄)алкіл необов'язково заміщений одним або декількома гідрокси;

a є цілим числом від 1 до 3; та

b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

15 16. Спосіб запобігання або зниження мікробних інфекцій, викликаних грамполозитивними бактеріями в культурі ферментера грамнегативних бактерій, який включає додавання до культури ефективноі кількості антимікробного агента, що складається з:

i) щонайменше одного лактилату відповідно до Формули 1

$(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$, (Формула 1); та

20 ii) щонайменше одного естеру гліцерину відповідно до Формули 2

CH₂OR₁-CHOR₂-CH₂OR₃, (Формула 2);

де:

R є C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

25 R₁, R₂ та R₃ кожен незалежно є H або C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим, за умови, що щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є H та щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є ацильною групою;

30 M є протоном (H⁺) або протикатионом, вибраним з групи, яка складається з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію та заміщеного амонію, який має один або декілька (C₁₋₄)алкілів, де зазначений (C₁₋₄)алкіл необов'язково заміщений одним або декількома гідрокси;

a є цілим числом від 1 до 3; та

b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

17. Спосіб отримання продукту ферментації, який полягає в:

35 забезпеченні ферментаційного середовища; та

введенні в зазначене середовище інокулянту, який містить культуру грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів, з метою одержання продукту ферментації; і

освітлення, очищення та/або концентрування зазначеного продукту ферментації,

який **відрізняється** тим, що зазначене ферментаційне середовище містить:

40 субстрат для мікробного росту; та

як екзогенний, доданий, інгредієнт антимікробний агент, що складається з:

i) щонайменше одного лактилату відповідно до Формули 1

$(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$, (Формула 1)

де:

45 R є C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

M є протоном (H⁺) або протикатионом, вибраним з групи, яка складається з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію та заміщеного амонію, який має один або декілька (C₁₋₄)алкілів, де зазначений (C₁₋₄)алкіл необов'язково заміщений одним або декількома гідрокси;

50 a є цілим числом від 1 до 3; та

b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

18. Спосіб отримання продукту ферментації, який полягає в:

забезпеченні ферментаційного середовища; та

55 введенні в зазначене середовище інокулянту, який містить культуру грамнегативних бактерій, цвілі або дріжджів, з метою одержання продукту ферментації; і

освітлення, очищення та/або концентрування зазначеного продукту ферментації,

який **відрізняється** тим, що зазначене ферментаційне середовище містить:

субстрат для мікробного росту; та

як екзогенний, доданий, інгредієнт антимікробний агент, що складається з:

60 i) щонайменше одного лактилату відповідно до Формули 1

(R-(O-CH(CH₃)-CO)_aO)_bM, (Формула 1); та

ii) щонайменше одного естеру гліцерину відповідно до Формули 2

CH₂OR₁-CHOR₂-CH₂OR₃, (Формула 2)

де:

5 R є C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим;

R₁, R₂ та R₃ кожен незалежно є H або C₄-C₁₈ацильною групою, причому ацильна група має алкільний або алкенільний ланцюг, який може бути розгалуженим або нерозгалуженим, за умови, що щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є H та щонайменше один з R₁, R₂ або R₃ є ацильною групою;

10 M є протоном (H⁺) або протикатионом, вибраним з групи, яка складається з Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, амонію та заміщеного амонію, який має один або декілька (C₁₋₄)алкілів, де зазначений (C₁₋₄)алкіл необов'язково заміщений одним або декількома гідрокси;

а є цілим числом від 1 до 3; та

15 b є 1 або 2, що дорівнює валентності M.

19. Спосіб за пп. 17-18, в якому зазначений інокулянт містить грамнегативні бактерії, вибрані з групи, яка складається з: *Escherichia coli*; *Acinetobacter*; *Bordetella*; *Brucella*; *Campylobacter*; *Cyanobacteria*; *Enterobacter*; *Erwinia*; *Franciscella*; *Helicobacter*; *Klebsiella*; *Legionella*; *Moraxella*; *Neisseria*; *Pantoea*; *Pasteurellaceae*; *Pseudomonas*; *Proteus*; *Salmonella*; *Selenomonadales*; *Serratia*; *Shigella*; *Treponema*; *Vibrio*; *Yersinia*; *Zynomonas* та їх комбінації.

20. Спосіб за пп. 17-18, в якому зазначений інокулянт містить одну або більше грамнегативних бактерій, вибраних з групи, яка складається з: *Escherichia coli*; виду *Pseudomonas* та виду *Pasteurellaceae*.

21. Спосіб за п. 20, в якому зазначений інокулянт включає одну або більше грамнегативних бактерій, вибраних із групи, що складається з видів роду *Actinobacillus*, роду *Hemophilus* та роду *Pasteurella*.

22. Спосіб за пп. 17-18, в якому зазначений інокулянт містить одну або більше цвілей, вибраних з родів *Aspergillus* та *Rhizopus*.

23. Спосіб за п. 22, де зазначений інокулянт включає одну або більше цвілей, вибраних з *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*; *Rhizopus oligosporus* та *Rhizopus oryzae*.

24. Спосіб за пп. 17-18, в якому зазначений інокулянт містить одні або більше дріжджів, вибраних з родів: *Brettanomyces*; *Candida*; *Dekkera*; *Pichia* та *Saccharomyces*.

25. Спосіб за будь-яким з пп. 17-24 для отримання продукту ферментації, вибраного із групи, що складається з: етанолу; 1,3-пропандіолу; гліцерину; бутанолу; 1,4-бутандіолу; арабітолу; ксиліту; сорбіту; манітолу; ацетоїну; оцтової кислоти; пропіонової кислоти; 3-гідроксипропіонової кислоти; молочної кислоти; бурштинової кислоти; фурандिकарбонової кислоти; фумарової кислоти; яблучної кислоти; адипінової кислоти; лимонної кислоти; аконітової кислоти; глутамінової кислоти; ітаконової кислоти; левулінової кислоти; глутарової кислоти; аспарагінової кислоти; малонової кислоти; гліцину; серину; треоніну; лізину; ізопрену; полігідроксибутирату та їх суміші.

26. Спосіб за будь-яким одним з пп. 17-24, в якому отримують продукт ферментації, вибраний з групи, яка складається з: етанолу; 1,3-пропандіолу; гліцерину; бутанолу; 1,4-бутандіолу; арабіту; ксиліту; сорбіту; маніту; оцтової кислоти; пропіонової кислоти; 3-гідроксипропіонової кислоти; молочної кислоти; бурштинової кислоти; 2,5-фурандिकарбонової кислоти; фумарової кислоти; яблучної кислоти; адипінової кислоти; лимонної кислоти; аконітової кислоти; глутамінової кислоти; ітаконової кислоти; левулінової кислоти; глутарової кислоти; аспарагінової кислоти; малонової кислоти та їх сумішей.

27. Спосіб за будь-яким одним з пп. 17-24, в якому отримують продукт ферментації, вибраний з групи, яка складається з: пропіонової кислоти; молочної кислоти; бурштинової кислоти; 1,4-бутандіолу та 2,5-фурандिकарбонової кислоти.