



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105104432 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201510245360. 2

*A01C 1/00*(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 04. 27

*A01N 37/02*(2006. 01)

*A01N 37/36*(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/214, 752 2009. 04. 27 US

61/257, 319 2009. 11. 02 US

61/315, 611 2010. 03. 19 US

(62) 分案原申请数据

201080028766. 0 2010. 04. 27

(71) 申请人 简耐而生物表面活性剂有限公司

地址 美国威斯康星州

(72) 发明人 加里·A·斯特罗贝尔 N·R·甘迪

维多利亚·帕尔默·斯科巴

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 吴小瑛 张福根

(51) Int. Cl.

*A01N 63/02*(2006. 01)

*A01P 1/00*(2006. 01)

*A01P 7/00*(2006. 01)

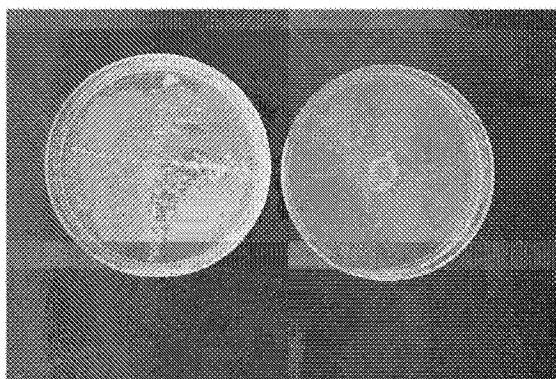
权利要求书2页 说明书41页 附图7页

(54) 发明名称

抗微生物组合物及相关的应用方法

(57) 摘要

本发明提供了一种抗微生物组合物,其包含通常被视为可供人安全使用的一种或多种化合物组分,以及该抗微生物组合物相关的应用方法,所述组合物和方法可广泛用于农业、工业、建筑、制药和/或个人护理产品 and 应用中。



1. 一种抗微生物组合物,其包含选自  $C_2$  至  $C_5$  的酸,其盐及其组合的酸组分 ; $C_2$  至  $C_5$  的酸酯组分 ; $C_3$  至  $C_5$  的酮组分 ;和可分离自生长在马铃薯葡萄糖琼脂上的 *Muscodor crispans* 的分离培养物的挥发性副产物的至少两种  $C_2$  至  $C_5$  的组分,所述组合物的病原活性谱不同于分离的培养的 *Muscodor crispans*、其挥发性副产物或所述挥发性副产物的合成混合物的病原活性谱。

2. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述酸组分选自异丁酸、丙酸、异丁酸的盐及其组合。

3. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述酸酯组分选自乙酸酯、丙酸酯、异丁酸酯及所述酯的组合。

4. 如权利要求 1 所述的组合物,其包括 8-10 种所述可分离自 *Muscodor crispans* 的挥发性副产物的组分。

5. 如权利要求 1 所述的组合物,其包含鼠李糖脂组分。

6. 一种抗微生物组合物,其包括选自  $C_2$  至  $C_5$  的酸,其盐及其组合的酸组分 ; $C_2$  至  $C_5$  的酸酯组分 ; $C_3$  至  $C_5$  的酮组分 ;和可分离自生长在马铃薯葡萄糖琼脂上的 *Muscodor crispans* 的分离培养物的挥发性副产物的至少两种  $C_2$  至  $C_5$  的组分,所述组合物不含萘和萘衍生物化合物。

7. 如权利要求 6 所述的组合物,其中所述酸组分选自异丁酸、丙酸、异丁酸的盐及其组合。

8. 如权利要求 7 所述的组合物,其中所述酸组分选自异丁酸及其钾盐。

9. 如权利要求 6 所述的组合物,其中所述酯组分选自乙酸酯、丙酸酯、异丁酸酯及所述酯的组合。

10. 如权利要求 6 所述的组合物,其包含 8-10 种所述可分离自 *Muscodor crispans* 的挥发性副产物的组分。

11. 如权利要求 6 所述的组合物,其包含鼠李糖脂组分。

12. 一种制造物品,其包含选自权利要求 1 所述的组合物、权利要求 8 所述的组合物及其组合的组合物。

13. 如权利要求 12 所述的制造物品,其选自人类食品、动物食品、包装产品、固体载体组分、个人护理产品、产品加工设备和医疗器械。

14. 如权利要求 13 所述的制造物品,其中所述人类食品是肉。

15. 如权利要求 13 所述的制造物品,其中所述动物食品是宠物食物。

16. 如权利要求 13 所述的制造物品,其中所述包装产品为膜。

17. 如权利要求 13 所述的制造物品,其中所述个人护理产品为皮肤洗剂。

18. 如权利要求 13 所述的制造物品,其中所述产品加工设备为用于加工人类食物的装置。

19. 如权利要求 13 所述的制造物品,其中所述器械选自医疗器具和医疗植入物。

20. 如权利要求 13 所述的制造物品,其中所述人类食品是饮料产品。

21. 如权利要求 20 所述的制造物品,其中所述饮料产品是水果饮料。

22. 如权利要求 13 所述的制造物品,其中所述器械选自牙科器具和牙科植入物。

23. 如权利要求 13 所述的制造物品,其中所述固体载体组分是颗粒。

24. 如权利要求 23 所述的制造物品,其中所述颗粒包含粘土。
25. 如权利要求 24 所述的制造物品,其中所述颗粒包含膨润土。
26. 一种组合物,其选自权利要求 1 所述的组合物、权利要求 8 所述的组合物及其组合的组合物,其中所述组合物应用于植物基质。
27. 如权利要求 26 所述的组合物,其中所述基质选自用于农作物的种子。
28. 如权利要求 26 所述的方法,其中所述基质选自植物茎和叶。
29. 如权利要求 26 所述的组合物,其中所述基质选自收成前的水果、蔬菜和坚果,以及收成后的水果、蔬菜和坚果。
30. 如权利要求 29 所述的组合物,其中所述基质选自柑橘类水果、马铃薯和花生。

## 抗微生物组合物及相关的应用方法

[0001] 本申请是申请日为2010年4月27日,申请号为:201080028766.0,名称为:“抗微生物组合物及相关的应用方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求于2009年4月27日提交的申请序号为No. 61/214,752,2009年11月2日提交的申请序号为No. 61/257,319和2010年3月19日提交的申请序号为No. 61/315,611的优先权,各申请均通过引用全文并入本文。

### 背景技术

[0003] 用于控制各种霉变和植物疾病等的生物杀灭剂的鉴定和研发取得了很大进展。然而,使用中的大多数商业生物杀灭剂和杀虫剂是归类为致癌物质或对野生动植物和其他非目标物种有毒的化合物。例如,甲基溴广泛用作土壤熏剂和收成后微生物感染的处理。对人具有毒性和对环境有害最终将导致终止使用甲基溴和其他各种合成的生物杀灭剂/杀虫剂。因此,目前的工作集中于鉴定和研发天然的或显示相似抗微生物或杀虫效果的生物模拟组合物。

[0004] 此类方法之一涉及植物内生菌(endophytes)和相关的挥发性副产物。本领域中植物内生菌定义为驻留在存活植物组织的组织间隙空间,但通常不被认为是寄生的微生物。特别地,由于其挥发性副产物的抗菌特性,对结合雨林植物发现的植物内生菌产生了相当大的兴趣。现已发现Muscodor属的多个成员(即,M. albus、M. roseus和M. vitigenus)产生了显示抗菌或杀虫特性的挥发性副产物。然而,各物种的代表性副产物包括多种萘和/或萹(azulene)衍生物。此类化合物与其他副产物组分一起可能有毒或不利于健康,并且相应的混合物被认为对多种最终应用(end-use applications)为不合适。因此,本领域仍在继续寻找以确定出天然组合物,以及研发对人应用安全且显示有效抗微生物特性的不含上述化合物的生物模拟组合物。

### 发明内容

[0005] 参考以上内容,本发明的目标是提供具有抗微生物组合物的调料(flavorings)和/或及其应用方法,从而克服现有技术的多种缺陷和不足,包括上文所述的那些。本领域技术人员应理解,本发明的一个或多个方面可满足某些目的,而一个或其他方面可满足某些其他目的。每个目的不可能在其所有方面等同地应用本发明的每个方面。因此,可参考以下目的以替换本发明的任何一个方面。

[0006] 本发明的目的是提供Muscodor物种(Muscodor species)及其挥发性副产品,其不含与萘和萹(非GRAS化合物)相关的化合物,以及提供用于防止、抑制和/或根除微生物感染的方法。

[0007] 本发明的另一个目的是提供用于对抗微生物感染的系统,所述系统包含此物种或其菌株和相关的挥发性副产物,以及非固有(non-indigenous)介质(medium)或基质(substrate)。

[0008] 本发明的另一个目的是提供该系统和/或相关的应用方法,其用于人类和动物食

物、产品 (produce)、植物、植物部分、种子、农作物和其他有机材料、包装材料、建筑材料、纤维、织物、被服物品和制药和 / 医疗用途领域中,但不限于此。

[0009] 本发明的另一个目的是提供作为代替或与其结合,显示与此类 *Muscodor* 物种具有相似的抗微生物活性的一系列生物模拟人工组合物。

[0010] 本发明的目的是提供可食用或对人应用和使用安全的组分的一种或多种组合物。

[0011] 本发明的目的是提供包含与介质或基质结合的此类非天然、生物模拟组合物的系统、复合物或物品 (article) 以防止、抑制和 / 或根除微生物感染。本发明的另一个目的是提供此类系统、复合物和 / 或物品以用于上文所述那些或本文他处说明的应用。

[0012] 本发明的目的还在于提供用于抗微生物和 / 或杀虫处理的方法,其包括此类组合物,但对介质、载体或基质没有限制。

[0013] 本发明的其他目的、特征、益处和优点将体现于本发明内容和以下具体实施方式的描述,并且对于具有多种抗微生物组合物和相关处理的知识的本领域技术人员而言是简单可见的。单独结合所附实施例、数据和附图及其所有合理的推论,或考虑与并入本文的参考文献,此类目的、特征、益处和优点将是显而易见的。

[0014] 一方面,本发明可涉及包含至少一种 *M. crispans* 菌株、其挥发性副产物或此类挥发性副产物的蒸汽和非固有介质或基质的系统。此类介质或基质可以如本文所述,或如本领域技术人员所理解。无论如何,此菌株可以生物纯培养物的形式提供,任选地与适合用于介质 / 基质接触或最终应用的载体组分结合,此类培养物的存活足以产生挥发性副产物。根据本发明,*M. crispans* 的副产物或副产物修饰物或其相应的蒸汽在成分上如本文他处所述。

[0015] 因此,本发明还涉及使用此类系统和 / 或其挥发性真菌副产物以提供抗微生物作用。此类方法可包括提供能够支持微生物活性或生长的非固有基质或介质;和使所述基质或介质与 *M. crispans* 菌株的培养物、其挥发性副产物和 / 或此副产物的蒸汽接触。在某些实施方式中,此类接触可包括所述菌株在所述介质或基质上、附近或临近的接触。在某些其他实施方式中,*M. crispans* 的副产物或副产物修饰物或其相应的蒸汽可注入或接触此类介质或基质。

[0016] 不受任何此类系统或方法的限制,此类基质可选自:食物或其产物、用于食物和其他易腐烂物品的包装组分、纤维、织物或被服物品、建筑或建设组分、植物、植物表面、土壤、垃圾或废物。此类接触可以对存在的微生物具有生物活性和 / 或可具疾病预防性 (prophylactic)。

[0017] 一方面,本发明可涉及非天然存在的抗微生物组合物,无论其组分是天然来源、化学合成或其组合。此类组合物可包含选自生物模拟 *Muscodor* sp. 副产物组合物的醇、醛、酮、酸和 / 或酸酯组分的化合物,此组合物可不含稠环芳族化合物、取代的稠环芳族化合物和此类化合物的氢化衍生物 (hydro derivatives)。在某些非限定性实施方式中,此组合物可包含选自乙酸、异丁酸、丙酸及其组合的酸组分。

[0018] 在某些实施方式中,本发明可涉及天然来源的抗微生物组合物,其包含  $C_2$  至约  $C_5$  的酸组分; $C_2$  至约  $C_5$  的酯组分;和可分离自 *Muscodor crispans* 的分离的培养物的挥发性副产物的至少两种  $C_2$  至约  $C_5$  组分,所述组合物的病原活性谱可不同于分离的培养的 *Muscodor* sp.、其挥发性副产物和 / 或此挥发性副产物的合成混合物的病原活性谱。此类

酸组分可选自异丁酸、丙酸及其组合。独立地,此类酯组分可选自 C<sub>4</sub>乙酸酯、C<sub>5</sub>乙酸酯及其组合。

[0019] 在某些实施方式中,此组合物可包含约 8 至约 10 种可分离自 *M. crispans* 的挥发性副产物的组分,但不限于此。在某些此类实施方式中,此组合物的每种组分均可分离自挥发性副产物。由于此组合物可源自天然,每种此类组分均可可是发酵产物,且发酵可选自细菌、酵母和 / 或真菌发酵。无论如何,根据美国联邦规章典集 (United States Code of Federal Regulations) 第 21 章及其相关的章节和 / 或规定,此组合物的每种此类组分均通常被认为可供人安全使用。

[0020] 无论如何,在某些非限定性实施方式中,此类可分离组分可以是异丁酸。在某些此类实施方式中,可由丙酸替代至少部分异丁酸。在此类或其他非限定实施方式中,此类可分离组分可以是 2- 丁酮。在某些此类实施方式中,可由乙酸、丙酸或其组合替代至少部分 2- 丁酮。在此类或其他非限定实施方式中,此类可分离组分可以是乙醇。在某些此类实施方式中,可由乙酸替代至少部分乙醇。无论任何此类酸组分、酯组分和 / 或可分离组分的身份或量,此类天然来源的组合物可包含表面活性剂组分。在某些此类实施方式中,可在其中加入生物表面活性剂。生物表面活性剂可以是选自单鼠李糖脂、双鼠李糖脂及其组合的鼠李糖脂组分,但不限于此。

[0021] 或者,本发明也可涉及合成的非天然来源的抗微生物组合物。此类组合物可包含 C<sub>2</sub>至约 C<sub>5</sub>的酸组分 ;C<sub>2</sub>至约 C<sub>5</sub>的酯组分 ;和可分离自 *Muscodor crispans* 的分离的培养物的挥发性副产物的至少两种 C<sub>2</sub>至约 C<sub>5</sub>组分,所述组合物的病原活性谱可不同于分离的培养的 *Muscodor sp.* 或其挥发性副产物的病原活性谱。此类酸类、酯类和 / 或可分离组分可如上文所述或如本文他处的说明。无论如何,所述抗微生物组合物均可包含表面活性剂组分。在某些此类非限定实施方式中,此表面活性剂可以是选自单鼠李糖脂、双鼠李糖脂及其组合的鼠李糖脂组分。

[0022] 一方面,本发明可涉及生物模拟抗微生物组合物,其包含选自 C<sub>2</sub>至约 C<sub>5</sub>的醇、醛、酮、酸和酸酯及其组合和亚组合的化合物的液体混合物,此组合物不是从 *Muscodor sp.* 分离。如本文他处所述,此类液体混合物可在室温和 / 或环境温度下具有挥发性。如本领域技术人员的理解,在有关此类组合物及其化合物的方面,术语“约”可表示仅受限于具有一个或多个其他组分、化合物的混合物和所得组合物的至少部分室温 / 环境温度挥发性的具有相应分子量和 / 或结构同分异构体的碳和 / 或亚甲基同系物。在某些非限定性实施方式中,此组合物可包含选自下文所述那些生物模拟 *M. crispans* 副产物组合物的组分的醇、醛、酮、酸和酸酯化合物。此类组合物可包含化学合成的化合物、从细菌发酵分离的化合物以及此类化合物的组合。在某些非限定性实施方式中,此组合物可包含选自乙酸、异丁酸、丙酸及其组合的酸组分。

[0023] 一方面,本发明还可涉及非天然存在的,无论是天然来源和 / 或化学合成的抗微生物组合物,其包含选自 C<sub>2</sub>至约 C<sub>5</sub>的醇、醛、酮、酸和酸酯及其组合和亚组合的化合物,所选的化合物通常被视为可供人安全使用 (“GRAS”),此命名提供在美国联邦规章典集第 21 章及其相关的章节和 / 或规定。在某些非限定性实施方式中,此化合物可选自生物模拟 *M. crispans* 副产物组合物的醇、酮、酸和 / 或酸酯组分。在某些实施方式中,其微生物活性 / 死亡率谱不同于 *M. crispans* 或 *M. albus*、其挥发性副产物和 / 或其相应的合成副产物组

合物的微生物活性 / 死亡率谱。无论如何,在某些此类实施方式中,此组合物可包含选自乙酸、异丁酸、丙酸及其组合的酸组分。

[0024] 一方面,本发明可包括包含本发明组合物、表面活性剂组分的组合物;此类表面活性剂组分是单独的或可加入到载体组分中。在某些实施方式中,此表面活性剂可以是生物表面活性剂,此类生物表面活性剂可以是选自单鼠李糖脂、双鼠李糖脂及其组合的鼠李糖脂组分。

[0025] 一方面,本发明还可涉及包含本发明组合物和基质或介质组分的系统或复合物。此类组合物可如上文所述或如本文他处的说明。基质可选自:食物或其产物、用于食物和其他易腐烂物品的包装组分(例如,膜或包装材料)、纤维、织物或被服物品、建筑或建设组分、人组织、植物、植物表面、土壤、垃圾或废物,但不限于此。在某些实施方式中,此类组合物,无论其为液体或气体,均可加入到或接触此类介质、基质或基质表面。

[0026] 因此,本发明也可涉及微生物或虫(insect)的处理、预防、抑制、消除和/或影响微生物或虫活性的方法。此类方法可包括:提供本发明的组合物,包括但不限于本文所述的一种或多种组合物,并使微生物或虫或能够支持微生物或虫活性的物品/基质与至少足以部分影响微生物或虫活性的量的此类组合物接触。此类微生物(例如,真菌、细菌或病毒)或虫可以在上文所述的那些介质中、基质表面上或附近。因此,此类接触可以是直接接触和/或在此类组合物的挥发时接触。无论如何,此类处理可以对存在的微生物或虫具有活性和/或具有疾病预防性。如本文他处所示,处理可被认为是在微生物或虫死亡和/或抑制生长或活性的领域。

[0027] 根据本发明的某些实施方式,包含某些食物和风味化合物(FFCs)的组合物特别是对于某些病原真菌、细菌和农业、医药或商业或工业方面的其他微生物具有抑制性和/或致死性。此类组合物可区别于包含生物来源化合物的任何现有混合物:例如,本发明的组合物不包含任何萜或萜(非 GRAS 化合物)衍生的物质。相反,此类组合物可包含有机化合物的混合物,其中每种均被视为食物或风味物质(即 GRAS)。

[0028] 本发明证明此类组合物的性质、其制备和应用多种物品(例如但不限于食物、纤维、器具和建筑物表面)以保存其完整性并防止其受到各种真菌(霉和其他微生物)破坏。此类组合物也可应用于建筑结构、植物部分,乃至服装产品的保存。此外,如下文所证实,此类组合物可对导致结核的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)具有不良影响,所述结核分枝杆菌包括至少三种耐药性菌株。

## 附图说明

[0029] 图 1:说明在接触 2 天后 FFC 对耐药性结核分枝杆菌临床培养物的灭杀作用的照片。

[0030] 图 2:说明通过采用 FFC 的多个方法防止奶酪上真菌生长(发霉)的一系列照片。

[0031] 图 3:说明在 0.2ml FFC 组合物存在下贮存 2 天后 FFC 对山药的保护作用。10 天后对山药进行拍照(左侧为测试;右侧为对照)。

[0032] 图 4:FFC 在 10 天中防止保持在 30°C 的垃圾腐败的保护作用。

[0033] 图 5:证实对抗番茄腐烂/枯萎的作用,左侧是密执安棍状杆菌(*C. michiganense*)的对照平板,右侧是使用 20 微升本发明的 FFC 组合物处理的平板。

[0034] 图 6 :证实加入到皮肤乳剂产品 (skin cream product) 中的本发明 FFC 组合物的作用。

[0035] 图 7A-B 和图 8 说明了根据本发明的某些非限定性实施方式,多种非限定性、代表性单鼠李糖脂和二鼠李糖脂化合物的结构。

[0036] 图 9 :根据本发明的某些非限定实施方式,提供了鼠李糖脂组分的两个实施方式,基于单鼠李糖脂结构和二鼠李糖脂结构分别命名为 R1 和 R2,如以下多个实施例中所述,其可单独使用或彼此组合使用。

### 具体实施方式

[0037] 如多个非限定性实施方式所述,本发明涉及新 Muscodor 物种和 / 或其挥发性副产物的应用,以及非天然、实验室制备的生物模拟组合物,所述组合物包含常见的食物和风味化合物,其在加入到多种介质、应用于表面、或加入到环境气氛 (atmosphere)、空间或容积时,对不良、有害和 / 或病原性微生物,包括植物真菌和结核病的致病剂 (causal agent) 的所需表面介质或容积带来净化作用 (decontamination)。本发明对现代农业、人用药物、食物科学和工业具有极其重要的意义和应用。由于其中任一种单独成分本身不具有生物活性,因此本发明的组合物具有抗微生物特性是非显而易见的。组分成分的协同组合显示了完全潜在的抗微生物活性。

[0038] 关于此类 Muscodor 物种、其挥发性副产物或包含 FFC 的非天然存在生物模拟组合物的应用,所述接触可以是直接接触或通过暴露于与此类物种、生物模拟组合物的副产物的相关蒸气的接触。如下文所述,在某些实施方式中,尽管蒸气接触能够抑制生长,但可能需要与微生物直接接触以使细菌或真菌死亡。

[0039] 无论是何种接触方式,本发明的组合物都可以是由实验室制备的,其包含化学合成的组分、天然来源的组分或此合成和天然组分的组合。无论如何,此组合物可以模拟 Muscodor 副产物对特定细菌和真菌物种的生物作用。或者,此类组合物可通过其任一种或多种 FFC 组分的相对浓度或选择而显示与 Muscodor 真菌副产物相比改变或增强的抗微生物活性。

[0040] 在某些此类实施方式中,此类组合物可位于基质或介质上,或者可应用于基质或介质,其中所述基质或介质包含可以、能够或确实支持微生物生长的蛋白质或纤维质组分。某些实施方式可包含植物、植物组分 (例如,根、茎、叶或叶子 (leaves 或 foliage) 及果实 (produce) 等) 和任何原发 (originating) 芽或种子,但不限于此。具体地,此组合物可位于任何植物产品上,无论其为水果、蔬菜、块茎 (tuber)、花、种子还是坚果,无论其在收成前还是收成后,但不限于此。在本领域中,某些此类植物和 / 或其产品被单独地或统称为农作物。因此,在某些实施方式中,本发明的组合物可在发育、收成前和 / 或收成后的任何时间期间位于或应用于此类作物上。同样,本发明的组合物可应用于或加入到能够或确实支持微生物生长的饮料、食物 (例如,人、宠物和 / 或动物) 产品或制造物品中。

[0041] 在本发明的某些其他实施方式中,此类组合物可位于或应用于支持或可支持微生物 (例如,酵母和 / 或真菌、细菌和 / 或病毒) 生长的基质或表面上。因此,此类基质或表面可包含可以、能够或确实支持微生物生长的任何材料。此类基质包括但不限于木材、陶器、瓷器、石材、石膏、干式墙、水泥、织物、皮革和塑料等。

[0042] 在某些其他实施方式中,本发明的各种组合物可位于、接触或应用或施用到基质或表面上,所述基质或表面包括用于处理或防止微生物生长或感染的药学或个人护理或卫生制剂领域中的哺乳动物或人组织,包括但不限于,指甲、毛发、牙齿或口腔,皮肤和其他细胞材料。下文描述了至少部分可应用于一个或多个其他实施方式的典型组合物。

[0043] 从生长在玻利维亚亚马逊区的野生凤梨植物(迷你凤梨(*Ananas ananassoides*))的组织内部采集植物内生真菌。最终,其显示产生具有抗微生物活性的挥发性化合物的混合物。使用分子技术,发现所述真菌具有与 *Muscodor* 属成员类似的序列。已知这些真菌产生能够充当有效对抗人和植物病原的抗微生物剂的挥发性有机化合物。已经使用例如利用 18S rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 序列分析的进化特征制图(Phylogenetic character mapping)的方法鉴定出 *Muscodor* 物种的成员。使用 BLAST 在 GenBank 中检索将在本发明的真菌和其他 *Muscodor* spp. 中发现的序列,并与其他真菌进行比较(Bruns et al., 1991; Reynolds and Taylor 1993; Mitchell et al., 1995; Guarro et al., 1999; Taylor et al., 1999)。最终确定这些分离物与炭角菌(*Xylaria*)相关(Worapong et al., 2001a&b)。属于 *Muscodor* 的所有分离的分类(isolated taxa)均具有类似的特征,例如生长相对缓慢、具有毛毡样的菌丝体、产生具有生物活性的挥发性化合物,并且不对其原始驻留的植物有害。最后,其各自共有非常相似的 rDNA 序列(Ezra et al., 2004)。

[0044] 尽管本发明的真菌具有上述所有的相同的共有特征,但也有多个方面不同于所述分类,从而使其区别于所有其他 *Muscodor* 物种和分离物。如以下实施例中更完整地说明,这些独特的特征支持本发明的真菌成为一个新的物种。建议将此新的植物内生真菌命名为 *Muscodor crispans*。

[0045] 通过 GC/MS 分析,生长在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)上时,分离的真菌在气相中产生了醇、酯和小分子量酸。如下表 1 中所示,此类化合物包括丙酸, 2-甲基-, 1-丁醇, 3-甲基-, 乙酸酯; 1-丁醇和乙醇。生长在 PDA 上时,此生物不产生萜或萜衍生物(非 GRAS 化合物),从而使其区别于目前研究的所有其他 *Muscodor* 物种(*Muscodor* spp.)。由所述真菌产生的气味在约 1 周后变明显,并且似乎在至少 3 周内随时间增加。如下所示,使用标准生物分析技术,此真菌的挥发物对多种植物和人病原具有抑制性和致死性生物活性(Strobel et al., 2001)。

[0046] 表 1.

[0047]

| 保留时间(分钟) | 化合物           | MW     |
|----------|---------------|--------|
| 2:05     | 乙醛            | 44.03  |
| 3:40     | 乙酸乙酯          | 88.05  |
| 3:51     | 2-丁酮          | 72.06  |
| 4:08     | 丙酸, 2-甲基-, 甲酯 | 102.07 |
| 4:18     | 乙醇            | 46.04  |

|       |                                      |        |
|-------|--------------------------------------|--------|
| 5:29  | 乙酸, 2- 甲基丙酯                          | 116.08 |
| 6:39  | 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丙酯                 | 144.12 |
| 6:46  | 1- 丙醇, 2- 甲基 -                       | 74.07  |
| 6:52  | 2- 丁烯醛, 2- 甲基 -, (E)-                | 84.06  |
| 7:12  | 1- 丁醇, 3- 甲基 -, 乙酸酯                  | 130.10 |
| 8:18  | 己烷, 2, 3- 二甲基 -                      | 114.14 |
| 8:21  | 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丁酯                 | 158.13 |
| 8:31  | 1- 丁醇, 3- 甲基 -                       | 88.09  |
| 13:37 | 丙酸, 2- 甲基 -                          | 88.05  |
| 14:41 | 甲酰胺, N-(1- 甲基丙基) -                   | 101.08 |
| 16:44 | 乙酸, 2- 苯基乙酯                          | 164.08 |
| 20:44 | 环己烷, 1, 2- 二甲基 -3, 5- 二 (1- 甲基乙烯基) - | 192.19 |

[0048] 如上文所述,本发明包括 *M. crispans* 和 / 或其挥发性副产物结合非固有介质、基质和 / 或容积以用于抗微生物作用的应用。此类用途和 / 或应用可如本文所述,或如本领域技术人员理解,包括但不限于美国专利 No. 6, 911, 338 中所述的那些用途和应用,该专利通过引用全文并入本文。

[0049] 或者,如一个或多个实施方式所证实,也可使用多种具有相似或增强作用的天然和合成的生物模拟组合物以提供迄今尚不曾通过使用真菌或其挥发性副产物而获得的结果。与现有技术和 *M. crispans* 的副产物不同,此类抗微生物组合物可包含通常被视为对人应用和使用安全的食物和风味化合物。下表 2 ~ 7 中提供了作为代表的多个非限定性生物模拟组合物。多种其他组合物可包含选自表 2 ~ 7 中任意一个或多个的化合物。或者,任何此类组合物均可包含所列出任意化合物之外或取代所列出任意化合物的化合物组分以增强挥发性或改进任何其他最终用途或性能性质。在某些此类组合物中,此取代或添加的化合物可具有 GRAS 命名和 / 或根据其不同阶段的使用而命名。或者,此类组合物也能够包含见于 *M. crispans* 的挥发性副产物中的组分和 / 或不存在于另一种 *Muscodor* sp. 的挥发性副产物中的组分。

[0050] 每种此类化合物均可以在有效浓度或百分比范围内提供,并且可商购或可由本领域技术人员制备。对于后者,可使用发酵技术以通过天然方式制备和分离此类化合物。或者,此类化合物也可以通过化学方式合成。关于本发明的多个非限定性实施方式,表 2 ~ 7 的每种化合物均可作为发酵产物获得,此类产物和对应的组合物可来自于威斯康星州 Saukville 的 Jeneil Biotech, Inc, 商标为 Flavorzon。

[0051] 表 2 :本发明的生物模拟组合物,其包含 :

[0052]

|                    |
|--------------------|
| 化合物                |
| 乙醛                 |
| 乙酸乙酯               |
| 2- 丁酮              |
| 丙酸,2- 甲基 -, 甲酯     |
| 乙醇                 |
| 乙酸,2- 甲基丙酯         |
| 丙酸,2- 甲基 -,2- 甲基丙酯 |
| 1- 丙醇,2- 甲基 -      |
| 1- 丁醇,3- 甲基 -, 乙酸酯 |
| 丙酸,2- 甲基 -,2- 甲基丁酯 |
| 1- 丁醇,3- 甲基 -      |
| 丙酸                 |
| 乙酸,2- 苯基乙酯         |

[0053] 表 3. 本发明的生物模拟组合物,其包含 :

[0054]

|                |
|----------------|
| 化合物            |
| 乙醛             |
| 乙酸乙酯           |
| 2- 丁酮          |
| 丙酸,2- 甲基 -, 甲酯 |
| 乙醇             |
| 乙酸,2- 甲基丙酯     |

|                      |
|----------------------|
| 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丙酯 |
| 1- 丙醇, 2- 甲基 -       |
| 1- 丁醇, 3- 甲基 -, 乙酸酯  |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丁酯 |
| 1- 丁醇, 3- 甲基 -       |
| 丙酸, 2- 甲基 -          |
| 乙酸, 2- 苯基乙酯          |
| 丙酸                   |

[0055] 表 4. 本发明的生物模拟组合物, 其包含 :

[0056]

|                      |
|----------------------|
| 化合物                  |
| 乙醛                   |
| 乙酸乙酯                 |
| 2- 丁酮                |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 甲酯      |
| 乙酸                   |
| 乙酸, 2- 甲基丙酯          |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丙酯 |
| 1- 丙醇, 2- 甲基 -       |
| 1- 丁醇, 3- 甲基 -, 乙酸酯  |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丁酯 |
| 1- 丁醇, 3- 甲基 -       |
| 丙酸, 2- 甲基 -          |
| 乙酸, 2- 苯基乙酯          |

[0057] 表 5. 本发明的生物模拟组合物, 其包含 :

[0058]

|                      |
|----------------------|
| 化合物                  |
| 乙醛                   |
| 乙酸乙酯                 |
| 乙酸                   |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 甲酯      |
| 乙醇                   |
| 乙酸, 2- 甲基丙酯          |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丙酯 |
| 1- 丙醇, 2- 甲基 -       |
| 1- 丁醇, 3- 甲基 -, 乙酸酯  |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丁酯 |
| 1- 丁醇, 3- 甲基 -       |
| 丙酸, 2- 甲基 -          |
| 乙酸, 2- 苯基乙酯          |

[0059] 表 6. 本发明的生物模拟组合物, 其包含:

[0060]

|                      |
|----------------------|
| 化合物                  |
| 乙醛                   |
| 乙酸乙酯                 |
| 丙酸                   |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 甲酯      |
| 乙醇                   |
| 乙酸, 2- 甲基丙酯          |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丙酯 |

|                      |
|----------------------|
| 1- 丙醇, 2- 甲基 -       |
| 1- 丁醇, 3- 甲基 -, 乙酸酯  |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丁酯 |
| 1- 丁醇, 3- 甲基 -       |
| 丙酸, 2- 甲基 -          |
| 乙酸, 2- 苯基乙酯          |

[0061] 表 7. 本发明的生物模拟组合物, 其包含选自以下化合物的各种化合物组合或包含以下化合物:

[0062]

| %            | 化合物                  |
|--------------|----------------------|
| 约 0.1 - 约 10 | 乙醛                   |
| 约 0.5 - 约 25 | 乙酸乙酯                 |
| 约 0.1 - 约 15 | 2- 丁酮                |
| 约 4 - 约 99   | 丙酸, 2- 甲基 -, 甲酯      |
| 约 1.5 - 约 40 | 乙醇                   |
| 约 0.1 - 约 10 | 乙酸, 2- 甲基丙酯          |
| 约 0.1 - 约 15 | 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丙酯 |
| 约 0.1 - 约 10 | 1- 丙醇, 2- 甲基 -       |
| 约 0.5 - 约 25 | 1- 丁醇, 3- 甲基 -, 乙酸酯  |
| 约 0.5 - 约 25 | 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丁酯 |
| 约 2 - 约 50   | 1- 丁醇, 3- 甲基 -       |
| 约 10 - 约 99  | 丙酸, 2- 甲基 -          |
| 约 0.1 - 约 10 | 乙酸, 2- 苯基乙酯          |

[0063] 关于本发明的任意 FFC 组合物, 认为其任意化合物组分, 包括本文引用的或本文推断的任意化合物组分 (例如但不限于表 1 ~ 7 和表 10 中的任何组分及其结构异构体和 / 或碳和亚甲基同系物) 均可以独立于任何其他组成组分的量或范围存在。因此, 根据增量变化 (incremental variation), 每种此类化合物组分的存在量或范围

可以是约 0.1wt. %, (或更少), 约 0.2wt. %, 约 0.3wt. %, 或约 0.4wt. %……或 / 至约 1.0wt. %, 约 1.1wt. %, 约 1.2wt. %, 约 1.3wt. %, 或约 1.4wt. %……或 / 至约 2.0wt. %, 约 2.1wt. %, 约 2.2wt. %, 约 2.3wt. %, 或约 2.4wt. %……或 / 至约 3.0wt. %, 约 3.1wt. %, 约 3.2wt. %, 约 3.3wt. %, 或约 3.4wt. %……或 / 至约 4.0wt. %, 约 4.1wt. %, 约 4.2wt. %, 约 4.3wt. %, 或约 4.4wt. %……或 / 至 5.0wt. %, 约 5.1wt. %, 约 5.2wt. %, 约 5.3wt. %, 或约 5.4wt. %……或 / 至约 6.0wt. %, 约 6.1wt. %, 约 6.2wt. %, 约 6.3wt. %, 或约 6.4wt. %……或 / 至约 7.0wt. %, 约 7.1wt. %, 约 7.2wt. %, 约 7.3wt. %, 或约 7.4wt. %……或 / 至约 8.0wt. %, 约 8.1wt. %, 约 8.2wt. %, 约 8.3wt. %, 或约 8.4wt. %……或 / 至约 9.0wt. %, 约 9.1wt. %, 约 9.2wt. %, 约 9.3wt. %, 或约 9.4wt. %……或 / 至约 10.0wt. %; 和, 或 / 至约 10.1wt. %……或 / 至约 20.0wt. %, ; 根据增量变化, 或 / 至约 20.1wt. %……或 / 至约 30.0wt. %; 根据增量变化, 或 / 至约 30.1wt. %……或 / 至约 40.0wt. %; 根据增量变化, 或 / 至约 40.1wt. %……或 / 至约 50.0wt. %; 根据增量变化, 或 / 至约 50.1wt. %……或 / 至约 60.0wt. %; 根据增量变化, 或 / 至约 60.1wt. %……或 / 至约 70.0wt. %; 根据增量变化, 或 / 至约 70.1wt. %……或 / 至约 80.0wt. %; 根据增量变化, 或 / 至约 80.1wt. %……或 / 至约 90.0wt. %; 根据增量变化, 或 / 至约 90.1wt. %……或 / 至约 99.9wt. % (或更多), 但不限于此。同样, 无论任何具体化合物组分或组合的身份或量如何, 本发明的任意组合物均可以增量变化的量 (wt. %) 或 wt. % 范围存在, 如上文所述, 将 0.1wt. % 至 99.9wt. % 的任意组合物或介质 (例如, 在约 0.1wt. % 至约 1.0wt. %, 约 2.0wt. %, , 约 4.0wt. % 或至约 10.0wt. %) 加入到物品或基质中或应用于物品或基质上, 但不限于此。

[0064] 除非另有说明, 在所有情况下, 本说明书和权利要求书中使用的表示组分或成分的量、浓度或数量、诸如分子量的性质、反应条件等均应理解为由术语“约”修饰。因此, 除非有相反的指示, 本说明书和附属权利要求书中列出的数值参数是可依赖于本发明追求获得的期望性质而可改变的近似值。最后, 每个数值参数都应至少根据所述有效数的数字并通过应用常规舍入技术来限定, 而非试图限制等同原则应用于权利要求的范围。

[0065] 尽管列出本发明宽广范围的所述数值范围和参数是近似值, 但是所列出的数值和实施例都是尽可能准确的记录。然而, 任何数值均可能自然地包含由见于各自测试测量法中的标准偏差而导致的某些误差。

[0066] 本发明的组合物和方法可适合地包含其量 / 浓度如本文所公开、引用或推断的任何化合物组分、或由所述化合物组分组成或基本由其组成, 所述化合物组分包括但不限于表 1 ~ 7 和 10 中的任何化合物组分, 及其任何结构异构体、任何此类醇组分、醛组分、酮组分、酸组分和 / 或酯组分的碳和 / 或亚甲基同系物, 无论为其酸衍生和 / 或醇衍生部分。无论其量 / 浓度如何, 每种此化合物组分或其部分 / 取代基都具有组成上的差异和特征上的差别, 并且能够以独立于另一种此类组分的量 / 浓度或另一种化合物组分 (或部分 / 取代基) 或量 / 浓度方式用于本发明的组合物和方法。因此, 应理解, 如本文公开的说明, 本发明的组合物和 / 或方法能够在缺失任何一种组分化合物 (或其部分和 / 或取代基) 时改变量或浓度而实施或利用, 此类化合物 (或其部分和 / 或取代基), 或其量 / 浓度可以是或不是本文中所具体公开、提及或推测的, 其改变或缺失可以是或不是本文中所具体公开、提及或推测的。

[0067] 在优选实施方式中,此类 FFC 的生物有效组合物(制备成液体混合物)易于在室温下挥发并且在封闭空间充分扩散以有效地抑制和/或灭杀需要不含此类有害微生物的表面上的不良污染真菌(霉)。此混合物可作为喷雾(例如成分在压力下)或简单地放置在容器中并允许其在封闭容器或密封袋中挥发而应用。

[0068] 无论如何,可将本发明的 FFC 组合物加入到多种最终用途组合物(仅限受于其应用)中。此类组合物包括但不限于涉及人类/动物食物或营养品、个人卫生、健康护理、农业、工业、居住、医疗和服用应用。在某些非限定性实施方式中,存在的 FFC 组合物和/或其组分可以是具体最终用途组合物的约 0.1wt. %或更少至约 99.9wt. %或更多。此加入水平仅受限于期望的抗微生物作用和/或制剂因素。

[0069] 本发明的 FFC 组合物在有效剂量水平下可有效灭杀能够导致食物腐败的很多植物病原、真菌,能够导致主要人类疾病的微生物,以及能够污染工作表面、家居和其他建筑物的微生物。此类应用的不穷举的列表如下:

[0070] 1. 用于处理贮存中或制备中的奶酪以控制表面的难看的霉菌污染和奶酪块的最终腐败。

[0071] 2. 用于处理贮存中的各种植物部分,包括根、块茎、茎、种子和最终可用于食物制备,或用于栽培和再种植或农业目的的其他器官(organs)。

[0072] 3. 用于净化具有发霉表面或受侵染而可能发生霉菌问题的建筑物。

[0073] 4. 用于保存从一个港口至另一个港口的长距离海上运输的垃圾,该垃圾最终发酵成与能量相关的产品。

[0074] 5. 用于净化可带有潜在植物病原微生物的土壤。

[0075] 6. 用于治疗患有结核和其他分支杆菌感染的患者。

[0076] 7. 用于处理以控制鼻部感染并清洁鼻道。

[0077] 8. 用于结合可用于包装并由此保存材料(包括食物、纤维和需要较长期安全贮存的其他物品)的专门设计聚合物。

[0078] 更一般地,本发明的组合物可用于选自真菌、细菌、微生物和一系列其他微生物或害虫组成的组的生物以抑制其生长或将其灭杀。可使用本领域技术人员熟知的方法,将其量至少部分有效灭杀或抑制所述生物生长的此类组合物与所述生物接触。或者,其可用于处理人类或动物废料,例如作为废水组分,或用于固体废物管理或处理。此类组合物也可用于净化人类和动物废物,例如减少或去除细菌和真菌污染。另一方面,通过以其有效量或其蒸气接触建筑物、建筑材料或建筑材料之间的空间,此类组合物可用于处理或防止建筑材料或建筑物内发霉。仅出于说明的目的,有效量的此类组合物可在室内或在熏蒸整个建筑物期间单独使用或与其他熏剂或活性剂组合使用。

[0079] 在农业应用中使用,本发明提供了通过使微生物接触有效量的本文所述的一种或多种此类组合物来处理或保护果实、种子、植物或植物周围土壤以使其免于被诸如真菌或细菌的生物感染的方法。

[0080] 如上文所述,本发明提供了用于防止、处理、抑制和灭杀细菌、真菌、病毒和/或其他微生物感染的方法。此类方法可包括向具有此类感染或生长或能够支持此类感染或生长的物品、动物/哺乳动物或植物基质施用单独的或可加入到组合物或制剂中的有效量的本发明组合物。因此,本发明提供了用于制药、个人护理(例如,但不限于化妆品)、工业和/

或农业应用的一种或多种组合物。

[0081] 微生物处理可通过使细菌、真菌、病毒和 / 或其他微生物接触有效量的本发明组合物而完成。接触可在体外或在体内发生。“接触”是指以足以防止、抑制和 / 或消除微生物感染和 / 或生长的方式将本发明的组合物和此类微生物聚集在一起。可根据经验确定对此类处理有效的此类组合物的量,并且进行此确定是在本领域技术人员能力范围之内。抑制包括减少和消除微生物的生长 / 活性。

[0082] 可通过任何适合的途径,包括但不限于口服或经鼻(例如,用于制药或个人护理应用)和局部方式,例如通过粉末、颗粒、液体、喷雾、药膏、洗剂或乳剂施用本发明的组合物或使其与人类、动物或物品基质表面接触。因此,本发明的组合物可包含各自与一种或多种可接受的载体和任选地与一种或多种其他化合物或其他材料混合的组分化合物。此类载体应当在与制剂的其他组分 / 成分相容以及对所期望作用或应用无不良影响方面是“可接受的”。

[0083] 无论所选的递送、处理或施用途径如何,均可通过本领域技术人员已知的常规方法配制本发明组合物以提供可接受的浓度或剂型。带有或没有载体的任何此类组合物或其组分的量或浓度将依赖于所处理的目标微生物 / 基质 / 物品、施用 / 递送的具体模式以及所有上述其他因素而变化。与载体材料结合的量通常可以是此类组合物提供可有效产生期望抗微生物作用的最低或最小浓度的量。

[0084] 如下文实施例中所证实,本发明组合物中 FFC 组合物与组合物中另一种任选组分的相对量或浓度可在有效范围内广泛地改变。优选选择所用浓度和 / 或剂量以实现比单独的现有技术组分个体增强或提高的活性和 / 或使所述组合物在最低有效组分浓度下的活性最大化。因此,产生此增强活性的重量比和 / 或百分比浓度不仅依赖于所用的具体 FCC 组合物,而且还依赖于所述组合物的具体最终应用,包括但不限于气候、土壤组成、待处理的基质、物品和 / 或微生物宿主的性质和 / 或与具体微生物的潜在接触。

[0085] 用于制备制剂或组合物的方法包括使本发明的组合物或一种或多种组分化合物与载体和任选的一种或多种辅助成分结合的步骤。通常,通过使此类组合物 / 组分与载体(例如,液体或细分的固体载体)结合,并且根据需要使产品成型,来制备所述制剂。

[0086] 无论是本发明的组合物,还是加入此类组合物的任何制造物品,与本发明相关的制剂可以是胶囊、扁囊剂(cachets)、丸剂、片剂、粉末、颗粒、软膏(paste)的形式,或作为含水或不含水液体中的溶液或悬剂,或作为水包油或油包水液体乳剂,或作为西也剂(elixir)或糖浆,或作为锭剂(使用惰性基材,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯树胶)等,其中每种包含预定量的本发明组合物或其组分。

[0087] 在其他固体的此类制剂(例如,胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末和颗粒等)中,可将本发明的组合物与一种或多种其他活性成分和 / 或可接受的载体,例如柠檬酸钠或磷酸氢钙,和 / 或任何以下物质混合:(1) 填料或增补剂(extendors),例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和 / 或硅酸;(2) 粘合剂,例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和 / 或阿拉伯树胶;(3) 保湿剂,例如甘油;(4) 崩解剂,例如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5) 溶液阻滞剂(solution retarding agents),例如石蜡;(6) 吸收促进剂,例如季铵化合物;(7) 润湿剂,例如十六醇和单硬脂酸甘油酯;(8) 吸收剂,例如高岭土和膨润土;(9) 润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固

体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物；和 (10) 着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，所述组合物还可包含缓冲剂。相似类型的固体组合物还可作为填充物用于软和硬填充的明胶胶囊中，所述胶囊使用例如乳糖 (lactose 或 milk sugar) 以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂。

[0088] 可任选地使用一种或多种辅助成分，通过压片或模制来制备片剂。可使用粘合剂（例如明胶或羟丙基甲基纤维素）、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂（例如，羟基乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠）、表面活性剂或分散剂制备压制片剂。可将由惰性液体稀释剂润湿的粉末活性成分的混合物在适合的机器中模制来制备模制片剂。

[0089] 此类组合物的片剂和其他固体形式或加入了此类组合物的物品，例如糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒可任选地划易折线 (scored) 或制备有包衣或外壳，例如肠溶包衣和制剂领域中熟知的其他包衣。可使用例如提供期望释放谱的不同浓度羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基体、脂质体和 / 或微球将其配制，从而提供其中活性成分的缓释或控释。这些组合物还可任选地包含遮光剂，并且可以是仅或优先在胃肠道的特定部分，且任选地以延迟的方式释放活性成分的组合物。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。活性成分也可以是微包封的形式。

[0090] 用于使用或施用本发明的液体形式包括药学或其他方面可接受的乳剂、混合物、微乳剂、溶液（包括蒸馏水或纯净水中的那些溶液）、悬剂、喷雾、糖浆和西也剂。在本发明组合物或其化合物组分之外，液体形式可包含惰性或本领域常用的其他稀释剂，例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂，例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油（特别地，棉子油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯，及其混合物。

[0091] 在惰性稀释剂之外，此类组合物和 / 或相关的物品还可包含助剂，例如但不限于润湿剂、乳化剂和悬浮剂（例如，用于农业应用的粘结剂 (sticker) 和展着剂 (spreader agent)）、着色剂、加香剂和一种或多种其他防腐剂。悬剂可包含悬浮剂，例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和山梨聚糖酯，微晶纤维素、偏氢氧化铝 (aluminum metahydroxide)、斑脱土、琼脂和黄芪胶，及其混合物。

[0092] 在本发明中，用于基质或局部（例如，在个人护理或卫生产品领域）施用 / 递送的本发明组合物的制剂和 / 或加入了本发明组合物的物品或产品包括粉末、喷雾、药膏 (ointment)、软膏、乳剂、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。在本发明组合物之外，此类药膏、软膏、乳剂和凝胶可包含赋形剂，例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶和其他胶质、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、斑脱土、硅酸、滑石和氧化锌，或其混合物。同样，粉末和喷雾可包含赋形剂，例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末，或这些物质的混合物。喷雾可额外地包含常规推进剂，例如挥发性无取代烃，例如丁烷和丙烷，或在正气压下递送。

[0093] 可用于本发明组合物的合适的含水和不含水载体的实例包括水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇和聚乙二醇等）及其适合的混合物、植物油，例如橄榄油，和有机酯类，例如油酸乙酯。例如，可通过使用包衣材料（例如卵磷脂）、在分散剂的情况下，通过保持所需的粒径、和通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。

[0094] 可通过在例如聚交酯 - 聚乙交酯的可生物降解聚合物中形成活性成分的微包封

基体来制备加入了本发明组合物的贮存型 (depot form) 物品或产品。可根据活性成分与聚合物的比例以及所用特定聚合物的性质来控制活性成分的释放速率。其他可生物降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。也可通过将活性成分包封到与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备贮存型可注射制剂。

[0095] 此外,如本领域技术人员所熟知,本发明的组合物和/或加入此类组合物的物品或产品还可包含具有相似和/或不同作用模式的其他化学和/或生物的、多位点和/或单位点杀真菌或抗真菌、抗细菌和抗微生物剂。此类试剂可包括但不限于碳酸氢钾、硅石、铜或硫化化合物和/或植物油(例如印度楝树油)。此外,此类试剂可包括,但不限于唑类;多烯,例如两性霉素B和制霉菌素;嘌呤或嘧啶核苷酸抑制剂,例如氟胞嘧啶;多氧菌素,例如日光霉素;其他几丁质抑制剂,延长因子抑制剂,例如粪壳菌素(sordarin)及其类似物;线粒体呼吸抑制剂、固醇生物合成抑制剂和/或本领域技术人员已知适合用于处理或防止植物、其他基质、动物和/或人类,或可见于任何制造物品上或内部的酵母或真菌、细菌、病毒和/或其他微生物感染的任何其他杀真菌或生物杀灭剂组合物。

[0096] 在某些实施方式中,加入本发明组合物的制造物品或产品还可包含本领域已知的一种或多种防腐剂,包括但不限于山梨酸或苯甲酸;苯甲酸、山梨酸、羟甲基甘醇酸和丙酸的钠、钾、钙和铵盐;甲基、乙基、丙基和丁基安息香酸酚酯(paraben)及其组合。

[0097] 本发明的组合物可含有包含酸性或碱性官能团,并由此能够与药学或其他方面可接受的酸和碱形成药学或其他方面可接受盐的化合物。术语“药学可接受的盐”是指此类化合物的相对无毒的,无机和有机酸和碱加成盐。无论如何,可通过将此类化合物与适合的酸或碱反应而制备此类盐。适合的碱包括如可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐、氨(ammonia)或如可接受的有机伯胺、仲胺、叔胺。代表性的碱或碱土盐包括锂、钠、钾、钙、镁和铝盐等。可用于形成碱加成盐的代表性有机胺包括乙胺、二乙胺、乙撑二胺、乙醇胺、二乙醇胺和哌嗪等。代表性的酸加成盐包括氢溴化物、氢氯化物、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘二甲酸盐(napthalate)、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐(glucoheptonate)、乳糖酸盐和月桂基磺酸盐等。

[0098] 由于可在使用前稀释(例如,水或其他流体组分),本发明的组合物可作为含水分散剂或乳剂使用,并可以包含高比例FFC(带有或没有表面活性剂)组合物的浓缩物形式获得。可通过将本发明的组合物与任何其他期望的活性成分一起溶解在任选包含润湿剂或乳化剂的溶剂中,随后将所述混合物加入也可包含润湿剂或乳化剂的水中以制备可乳化的浓缩物或乳剂。适合的有机溶剂包括醇类和乙二醇醚。这些浓缩物应优选能够耐受长期贮存,并且在此贮存后能够由水稀释以形成在足够时间内保持均匀的含水制剂以使其能够通过常规的喷雾装置应用。

[0099] 如本领域技术人员熟知,依赖于最终应用的类型,加入本发明组合物的物品或产品还可包含任何其他所需的组分,包括但不限于,促进应用的固体或液体载体;包括生物表面活性剂的表面活性剂;保护性胶体、胶粘剂、增稠剂、触变剂、渗透剂、稳定剂、螯合剂、结构改进剂、调味剂(例如,用于收成前或经加工食物/饮料应用)、糖、着色剂等。

[0100] 例如,此类组合物和/或相关物品或产品可用于农业目的并使用此类载体或稀释剂配制。经配制或未经配制的所述组合物可直接应用于植物的叶、种子或其他介质(植物

在其中正在生长或待栽种),或可将其喷施、撒或作为乳剂或软膏制剂应用,或者可将其作为蒸气或作为缓释颗粒应用。可应用至植物的任何部分或附近,包括叶、茎、枝或根,或根周围的土壤、水果或蔬菜(收成前或收成后),或栽种前的种子,或大致应用至土壤,或灌溉水,或溶液培养的系统(hydroponic culture system)。还可将本发明的组合物注射到植物中或使用低容量或压力或电力学喷施技术或本领域或工业中已知的任何其他处理方法喷施到植被(包括水果和蔬菜)。

[0101] 在某些实施方式中,无论是否与农业或食品加工相关,加入本发明组合物的组合物和/或物品或产品都可以是可粉尘化(dustable)的粉末或颗粒的形式,所述粉末或颗粒包含固体稀释剂或载体,例如填料(也例如动物褥草或猫砂, animal 或 cat litter)、高岭土、斑脱土、硅藻土(kieselguhr)、白云石、碳酸钙、滑石、粉末氧化镁、漂白土、石膏、硅藻土(Diatomaceous earth)和陶土。此类颗粒可以是适合不经进一步处理即应用的预制颗粒(preformed granules)。可通过使用本发明的组合物或其他活性成分浸透填料颗粒,或通过粒化活性成分和粉末填料的混合物而制备这些颗粒。例如,用于拌种(seed dressing)的组合物可包含辅助所述组合物粘附到所述种子的试剂(例如矿物油);或者可使用有机溶剂配制活性成分以用于拌种。所述组合物还可以是包含润湿剂或分散剂的可润湿粉末或水可分散性颗粒的形式,以促进其在液体中的分散。所述粉末和颗粒也可包含填料和悬浮剂。或者,所述组合物可以微包封形式使用。也可将其配制成可生物降解的聚合制剂以获得活性物质的受控缓慢释放。

[0102] 无论如何,包含本发明组合物的此类固体制剂能够以不同的形式、形状或成型(molding)提供多种产品或物品,包括但不限于圆柱体、棒状、块状、胶囊、片剂、丸剂、小颗粒(也例如,宠物食物)、条带和穗状等。或者,可将粒化或粉末化的材料压制成片剂或用于填充多种胶囊或外壳。如上文所述,本发明的此类组合物,无论是否经过配制,均可单独使用,应用至基质或加入到用于多种不同的最终应用(包括但不限于制药、个人护理、工业和农业组合物)的产品或物品及相关的使用方法中。

#### [0103] 本发明的实施例

[0104] 以下非限定性实施例和数据说明了与本发明的组合物和/或方法相关的各个方面和特征,包括包含如本文所述各种组分化合物的抗微生物组合物的制备和应用。与现有技术相比,本发明的组合物和方法提供了令人惊叹的、意想不到且与其相反的结果和数据。尽管通过使用可用于本发明的多种组合物和组分化合物说明了本发明的实用性,但本领域技术人员可以理解,可使用与本发明范围相称的多种其他组合物和组分化合物获得相似的结果。

#### [0105] 实施例 1a

[0106] 真菌的分离:在2007年3月,从生长在玻利维亚亚马逊地区的植物采集多个迷你凤梨(*Ananas ananassoides*)的小茎干。其采自于12° 40' 07"S和68° 41' 58"W处临近雨林的热带稀树草原区域,并被立即转送用于分析。从茎干切出多个小块(2-5英寸),并于层流净化罩(laminar flow hood)下在70%乙醇中放置30秒。使用无菌镊子将茎干单独地保持在火焰中以除去过量的醇。切出内部组织(树皮)下小块,并将其放置在其上正活跃生长有*M. albus*分离物620的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)上,所述马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)置于一侧中心孔被切除的平板(plate)上。此技术可用于有效地选择其他的*Muscodor*分

离物 (Worapong et al., 2001a&b)。在为期两周的温育期间,定期检查培养皿 / 板 (Petri plates) 中的任何真菌生长。一旦观察到菌丝,在无菌条件下从琼脂切出菌丝尖端并放置在新鲜 PDA 上。以此方式检查所述分离物。使用多个培养板 (PDA) 来测定所述真菌是否产生挥发性抗生素。此方法包括:从平板中间除去 1 英寸的琼脂部分,将一小段 (a plug of) 分离物涂布 (plating) 在一侧并使其生长数天,随后在缺口 (gap) 的另一侧涂布测试生物。

[0107] 实施例 1b

[0108] 真菌的分类:真菌在本质上与迷你凤梨 (*A. ananassoides*) 相关,并且是属于无孢菌群 (mycelia sterilia) 的不全菌 (deuteromycete)。在缺乏直射阳光的条件培养时,在所有培养基上检测到发白的真菌菌落 (Fungal colonies)。在放置到直射阳光下时,在所有培养基上检测到略带桃色的真菌菌落。在任何条件下均未观察到孢子 (Spores) 或其他子实体 (fruiting bodies)。菌丝 (Hyphae) ( $0.6\text{--}2.7\ \mu\text{m}$ ) 通常通过分支生长,有时形成完整的螺旋 (ca.  $40\ \mu\text{m}$ ) 并且带有与其相连的花菜样实体 ( $3.5\text{--}14\ \mu\text{m}$ )。所有检测的培养基在所有条件下观察时,新发育的菌丝均以波浪状模式 (undulating pattern) 生长。PDA 上的菌丝体 (Mycelium) 覆盖平板 3-4 周并产生水果的气味。

[0109] 正模标本 (Holotype):迷你凤梨上的植物内生菌 (Endophytic)。在玻利维亚亚马逊地区的 Heath River 区域中进行收集。正模标本来自唯一一块迷你凤梨茎干 (自 Heath River country 收集)。Muscodor crispans 以活培养物保藏在蒙大拿州立大学存活真菌保藏中心 (Montana State University mycological collection), 保藏号 2347 (2/29/2008)。M. crispans (B-23) 的 18S rDNA 和 ITS 序列二者均已提交至 GenBank, 登录序号为 EU195297。

[0110] 完全世代 (Telomorph):基于 GenBank 数据库中 M. crispans 与炭角菌科 (Xylariaceae) 之间的 18S rDNA 基因序列数据相似性,可在炭角菌科中找到此真菌的完全世代 (Bruns et al., 1991; Reynolds and Taylor 1993; Mitchell et al., 1995; Guarro et al., 1999; Taylor et al., 1999)。来自 M. crispans 18S rDNA 基因序列的分子数据显示了与 M. albus 分离物 620100% 的同源性。

[0111] 词源学 (Etymology):属名 Muscodor 来自拉丁文,其含义为发霉的 (musty)。这与此属中最初三个分离物产生的气味的性质相符。种名 crispans 来自拉丁文,含义为“卷曲的,波浪状的”。菌丝以规则的波浪状模式生长。

[0112] 实施例 2a

[0113] 扫描电子显微镜检查法:在 Castillo et al. (2005) 所述流程后,对实施例 1 的分离物进行扫描电子显微镜检查。将琼脂块和支持真菌生长的宿主植物块放置在滤纸包上,随后放入含 2% 戊二醛的 0.1M 二甲胍酸钠缓冲液 (pH 7.2-7.4) (含润湿剂 Triton X 100) 中,抽吸 (aspirated) 5 分钟并静置过夜。次日,在水缓冲液 1:1 中将其清洗 6 次,每次 15 分钟,随后在 10% 乙醇中清洗 15 分钟、30% 乙醇中清洗 15 分钟、50% 乙醇中清洗 15 分钟,在 70% 乙醇中清洗 5 次,每次 15 分钟,随后在 70% 乙醇中静置过夜或更长时间。随后,在 95% 乙醇中清洗 6 次,每次 15 分钟,随后在 100% 乙醇中清洗 3 次,每次 15 分钟,随后在丙酮中清洗 3 次,每次 15 分钟。将微生物材料在临界点干燥,金溅射包被 (gold sputtercoated), 并使用 Everhart-Thornley 检测器,在高真空模式中由 XL30ESEM FEG 记录图像。使用可在线使用的 Image J 软件测量菌丝。

[0114] 实施例 2b

[0115] 真菌的生物学:真菌在水基培养基上产生白色菌丝体。在任何实验室条件下均未发现任何类型的子实体结构或孢子。菌丝倾向于缠绕形成螺旋。Muscodor 的其他物种也具有这种倾向 (Worapong et al., 2001a)。新发育的菌丝倾向于以波浪状方式 (undulating fashion) 生长,而不是典型的垂直方式,并且通常缠绕形成绳状结构。可证明此生长模式是用于在体内接种研究中鉴定此生物的诊断工具。此真菌还产生似乎通过小线段 (strands) 与菌丝相连的花菜样结构。这些实体在任何条件下均不发芽,因此似乎不是孢子。此观察结果似乎是 Muscodor spp. 所特有,且目前大体上没有在任何其他真菌物种中注意到。

[0116] 实施例 3a

[0117] 真菌的生长和贮存:经测定,在将数片康乃馨叶放置在正活跃生长的分离物的顶部以促进孢子产生时,所述分离物没有产生孢子或任何其他子实体,并且在 23℃ 温育一周后也没有观察到此类结构。另将真菌涂布 (plated) 在包括纤维素琼脂 (CA)、麦芽琼脂 (MA) 和玉米粉琼脂 (CMA) 在内的多种不同培养基上以测定是否显示孢子产生。除了在一些培养基上的生长速率较慢,没有发现其他不同的真菌特征,并且没有观察到子实体或孢子。

[0118] 使用多种方法贮存纯培养物形式的分离真菌,其中之一是滤纸技术。还使真菌在 PDA 上生长,随后将其切成小方块,放入包含 15% 甘油的小瓶中并在 -70℃ 贮存。还使用蒸馏水代替甘油,通过类似的方法将真菌贮存在 4℃。然而,最有效的贮存方法是在 -70℃ 贮存于滋生的无菌大麦种子上。

[0119] 实施例 3b

[0120] 还检查了分离的 *M. crispans* 的其他更典型的特征,并与 *M. albus*. 进行比较。除非将其放置在直射阳光下 (导致菌丝体显示出淡粉色),*Muscodor crispans* 在所有测试培养基上均产生了缓慢生长、致密的白色菌丝体。与此不同,*M. albus* 在所有类似的培养基和测试条件下均产生发白的菌丝体 (Worapong et al., 2001a)。早期的菌丝也以波浪状的方式生长,而不是对 *M. albus* 常见的典型直链样方式 (Strobel et al., 2001)。在包括含有宿主植物材料或康乃馨叶的培养基在内的任何培养基上都没有形成孢子。菌丝的直径不同 (0.8-3.6  $\mu\text{m}$ ),并常缠绕以产生更复杂的结构,甚至菌丝螺旋 (图 1-3)。这些菌丝通常比 *M. albus* 的菌丝更大 (Worapong et al., 2001a)。

[0121] 实施例 4

[0122] 挥发物的定性分析:用于分析培养板中 10 日龄菌丝体培养物上方空域中的气体的方法与用于 *M. albus* cz-620 株原始分离物的类似 (Strobel et al., 2001)。首先,经由在培养板支持 (sporting) 真菌生长的一侧中钻探的小孔放置经烘烤“固相微萃取”注射器 (Supelco),所述注射器由置于稳定弹性纤维 (flex fiber) 上的聚二甲基硅氧烷上的 50/30 二乙烯基苯 /carburen 构成。使纤维在真菌的气相中暴露 45 分钟。随后,将注射器插入到包含膜厚 0.50mm 的 30m $\times$ 0.25mm I.D. ZB Wax 毛细管柱的 Hewlett Packard 6890 气相色谱仪的无分流注射口中。柱的温度按照以下编排:30℃ 2 分钟,随后以 5℃ / 分钟升温至 220℃。载气为超高纯氮 (地区经销商),初始柱头压力为 50kPa。在捕获挥发物之前,将纤维在氮气流下于 240℃ 调节 20 分钟。使用 30 秒的注射时间以将样品纤维加入到 GC 中。气相色谱仪连接到以单位分辨操作的 Hewlett Packard 5973 质量选择检测器 (质谱仪)。在 Hewlett Packard ChemStation 软件系统上进行数据获取和数据加工。通过使用 NIST

数据库的文库比较进行真菌挥发混合物中化合物的初始鉴定。

[0123] 实施例 5a

[0124] 真菌 DNA 分离和获取 ITS-5.8S rDNA 序列信息: 使用快速均一化: 植物叶 DNA 扩增试剂盒 (Cartagen; Washington, USA), 将在 25℃ 温育后生长在 PDA 上的本发明真菌的 10 日龄培养物作为 DNA 源。所使用的一些技术类似于来自澳大利亚的其他 *M. albus* 分离物的遗传表征的那些技术 Ezra et al., 2004)。从一周龄培养物切出培养菌丝体的方块 (0.5cm<sup>2</sup>)。从块底部刮下琼脂以除去尽可能多的琼脂。将小块放入 1.5ml 的 Eppendorf 管, 并在约 -80℃ 温育约 10 分钟。随后, 根据试剂盒制造商的说明提取 DNA。将提取的 DNA 稀释在双蒸无菌水中 (1:9), 并使用 1 μl 样品进行 PCR 扩增。使用引物 ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGGG) 和 ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), 通过聚合酶链式反应扩增 ITS1, 5.8S ITS2rDNA 序列。在包含 1 μl 从真菌培养物提取的 DNA (1:9 稀释)、0.5 μl 引物 ITS1 和 0.5 μl 引物 ITS4、7 μl RedMix<sup>TM</sup> 和 PCR 混合物, 以及 1.5mM MgCl<sub>2</sub> (GeneChoice, Inc., Maryland, USA) 和 5 μl PCR 级 ddH<sub>2</sub>O (Fisher Scientific, Wembley, Western Australia, Australia) 的 14 μl 反应混合物中进行 PCR 程序。在 Biometra personal cyclet (Goettingen, Germany) 中进行 PCR 扩增: 96℃ 5 分钟, 随后为 95℃ 45 秒、50℃ 45 秒和 72℃ 45 秒的 35 个循环, 随后在 72℃ 循环 5 分钟。使用 TAE 缓冲液 (来自 Labnet International, Inc., (Woodbridge, NJ, USA) 的 GelXL Ultra V-2) 或来自 Wealtec Inc., (Georgia, USA) 的 Wealtec GES 细胞系统, 以 100V 在 1.3% 琼脂糖凝胶上使用凝胶电泳 30 分钟来检测 PCR 产物。将凝胶在 0.5 μg ml<sup>-1</sup> 溴乙锭溶液中浸泡 5 分钟, 随后用蒸馏水清洗 5 分钟。在生物成像系统 (model 202D; DNR-Imaging Systems, Kiryat Anavim, Israel) 中的 UV 光下进行凝胶成像。使用 UltraClean PCR Clean Up DNA 纯化试剂盒 (MO BIO Laboratories, Inc., California, USA) 纯化 ~500bp 的 PCR 产物。对纯化产物进行直接 PCR 测序。使用 ITS1 和 ITS4 引物在 PCR 产物的双链进行测序。在 MegaBAC<sup>TM</sup>1000 分析系统 (Danyel Biotech Ltd., Rehovot, Israel) 上, 使用 DYEnamic ET 终止子进行测序。将序列提交到 NCBI 网站上的 GenBank。使用 NCBI 网站上的 BLAST 软件, 将在此研究获得的序列与 GenBank 数据库进行比较。

[0125] 实施例 5b

[0126] Muscador crispans 的分子生物学: 已经证明 18S rDNA、ITS1、5.8S 和 ITS2 的部分序列是 DNA 的高度保守区, 并且因此在生物分类学中非常有用 (Mitchell et al., 1995)。获得 *M. crispans* 的这些分子上的区别部分序列, 并与 GenBank 中的数据比较。在检索 18S rDNA 序列后, 对 *M. crispans* 的 525bp 序列进行高级 BLAST 检索。结果显示与 *M. albus* 的 525bp (AF324337) 具有 100% 的同一性。对 *M. crispans* 的部分 ITS 1&2 和 5.8S rDNA 序列的比较分析显示分别与 *M. albus* (AF324336)、*M. roseus* (AY034664)、肠白炭角菌 (*X. enteroleuca*) CBS 651.89 (AF163033)、*X. arbuscula* CBS 452.63 (AF163029) 和裂型炭团菌 (*Hypoxylon fragiform*) (HFR246218) 的 ITS 1 和 2 具有 95%、95%、90%、90% 和 91% 的同源性。

[0127] 实施例 5c

[0128] 尽管本发明的部分描述与分离的新真菌相关, 但如本领域所理解, 此真菌的变体和突变体也包含在本发明内容之内。术语“变体”和“突变体”可按照美国专利 No. 6, 911, 338 中提供的定义, 该专利通过引用全文并入本文。因此, 本发明可涉及 *M. crispans* 的变体或

突变株及其相应的组合物。

#### [0129] 实施例 6a

[0130] *M. crispans* 对抗植物病原体的生物鉴定测试。按照此前文献中描述,使用相对简单的测试检测 *M. crispans* 的挥发性副产物蒸气的微生物抑制活性 (Strobel, et al., 2001)。取出标准 PDA 培养板中的琼脂条 (2cm 宽),接种 *M. crispans* 并使其在平板一侧上生长约一周。随后,使用用于真菌的小琼脂塞将测试真菌或细菌接种在培养板的另一侧。将细菌和酵母划入 (streaked) 到琼脂上 (1.5cm 长)。随后,使用一片石蜡膜覆盖平板,并在 23℃ 温育 48 小时。首先,通过检验接种处是否存在生长来鉴定 *M. crispans* 对测试生物生长的影响。如果观察到生长,则测量两个位置处真菌菌丝的直径。通过评估对照平板上真菌和酵母的生长的受影响程度 (生长百分比) 来评定蒸气对真菌和酵母的生物活性 (Strobel et al., 2001)。如果没有观察到生长,则在接触蒸气后的一些时间点,在无菌条件下,将测试生物从测试平板取出并接种到新鲜 PDA 平板上以确定测试生物的存活性。

[0131] 使用上述的方法,证明当 *M. crispans* 在 23℃ 的 PDA 上生长 7-10 天时,真菌的挥发性副产物对多种真菌和细菌是致死的。使用革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌,以及酵母和每一种主要类型的真菌作为测试生物。大多数测试生物被 100% 抑制,并在接触 *M. crispans* 副产物 2 天后死亡 (参见表 8)。一些测试生物在接触 *M. crispans* 的挥发物 2 天后没有死亡,但其生长显著受到挥发性副产物抑制,并且在接触 4 天后死亡。此类生物包括: 萎地青霉 (*Penicillium roquefortii*)、麦根腐平脐蠕孢 (*Bipolaris sorokiniana*)、壳色多隔孢 (*Stagonospora* sp.,) 和尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 等。

[0132] 表 8: *M. crispans* 挥发性副产物对多种植物真菌病原和一些杂细菌 (assorted bacteria) 的影响。此抑制值计算为与未处理的对照测试生物相比的生长抑制%。测试重复了至少 3 次,结果相似。记录接触真菌和挥发性真菌副产物蒸气 48 小时后对测试生物的抑制。

#### [0133]

| 测试生物                                     | 接触 48 小时后<br>的抑制(%) | 接触 48 小时<br>后是否存活 | 接触 96 小时<br>后是否存活 |
|------------------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| 向日葵链格孢菌( <i>Alternaria helianthi</i> )   | 100                 | N                 | N                 |
| 烟曲霉( <i>Aspergillus fumigatus</i> )      | 100                 | Y                 | N                 |
| 枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )*      | 100                 | N                 | N                 |
| 麦根腐平脐蠕孢菌( <i>Bipolaris sorokiniana</i> ) | 100                 | Y                 | N                 |

#### [0134]

| 测试生物                                                                   | 接触 48 小时后<br>的抑制(%) | 接触 48 小时<br>后是否存活 | 接触 96 小时<br>后是否存活 |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| 葡萄孢菌( <i>Botrytis cinerea</i> )                                        | 100                 | N                 | N                 |
| 白色念珠菌( <i>Candida albicans</i> )*                                      | 100                 | N                 | N                 |
| 禾谷头孢霉( <i>Cephalosporium gramineum</i> )                               | 100                 | N                 | N                 |
| 榆梢枯长喙壳霉( <i>Ceratocystis ulmi</i> )                                    | 100                 | Y                 | N                 |
| 玉米旋孢腔菌( <i>Cochliobolus carbonum</i> )                                 | 100                 | N                 | N                 |
| 葫芦科刺盘孢菌( <i>Colletotrichum lagenarium</i> )                            | 100                 | N                 | N                 |
| 新月弯孢菌( <i>Curvularia lunata</i> )                                      | 100                 | Y                 | N                 |
| 大麦网斑内脐蠕孢菌( <i>Drechslera teres</i> )                                   | 100                 | N                 | N                 |
| 小麦德氏霉菌( <i>Drechslera tritici-repentis</i> )                           | 100                 | N                 | N                 |
| <i>Drechslera portulacae</i>                                           | 100                 | N                 | N                 |
| 大肠杆菌( <i>Escherichia coli</i> )*                                       | 100                 | N                 | N                 |
| 燕麦镰刀菌( <i>Fusarium avenaceum</i> )                                     | 100                 | N                 | N                 |
| 黄色镰刀菌( <i>Fusarium culmorum</i> )                                      | 100                 | N                 | N                 |
| 尖孢镰刀菌( <i>Fusarium oxysporum</i> )                                     | 100                 | Y                 | N                 |
| 茄腐镰刀菌( <i>Fusarium solani</i> )                                        | 50                  | Y                 | Y                 |
| 灵芝菌( <i>Ganoderma</i> sp.)                                             | 100                 | Y                 | N                 |
| 产脂肪酶菌( <i>Geotrichum candidum</i> )                                    | 100                 | Y                 | N                 |
| 斐济球腔菌( <i>Mycosphaerella fijiensis</i> )                               | 100                 | N                 | N                 |
| 娄地青霉( <i>Penicillium roquefortii</i> )                                 | 100                 | Y                 | N                 |
| 樟疫霉( <i>Phytophthora cinnamomi</i> )                                   | 100                 | N                 | N                 |
| 棕榈疫霉( <i>Phytophthora palmivora</i> )                                  | 100                 | N                 | N                 |
| 终极腐霉( <i>Pythium ultimum</i> )                                         | 100                 | N                 | N                 |
| 立枯丝核菌( <i>Rhizoctonia solani</i> )                                     | 100                 | N                 | N                 |
| 酿酒酵母( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )*                               | 90-95               | N                 | N                 |
| 核盘菌( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> )                                 | 100                 | N                 | N                 |
| 壳多孢菌( <i>Stagonospora</i> sp.)                                         | 100                 | Y                 | N                 |
| <i>Tapesia yallundae</i>                                               | 100                 | N                 | N                 |
| 绿色木霉( <i>Trichoderma viridae</i> )                                     | 10                  | Y                 | Y                 |
| 大丽轮枝菌( <i>Verticillium dahliae</i> )                                   | 100                 | Y                 | N                 |
| 地毯草黄单胞杆菌柑橘致病变种<br>( <i>Xanthomonas axonipodis</i> p.v. <i>citri</i> )* | 100                 | N                 | N                 |

[0135] \* 注意 : 将这些生物划入测试平板, 如果最终出现菌落发育则表明生长。在适当地接触 *M. crispans* 的挥发性副产品后, 将划线区域与对照平板上的生长进行比较并评估抑制%。最后, 将每种生物重新划入到 PDA 平板上以检测存活性。

[0136] 实施例 6b

[0137] 参考表 8, *M. crispans* 的挥发性副产物蒸气对葡萄孢属 (*Botrytis*), 特别是导致多种植物灰霉病 (gray mold) 的灰葡萄孢菌 (*B. cinerea*) 的作用特别显著。所述抑制和杀灭作用也适用于导致洋葱灰霉颈腐病的葱腐葡萄孢菌 (*Botrytis allii*)。此结果表明, 本发明可有效地改变收成后的产品表面或贮存环境, 从而防止发霉和相关的事件, 但不限于此。同样, 此结果还支持本发明的 FFC 组合物在处理洋葱 (例如, 维达利亚大葱, *Vidalia onions*)、葱和大蒜产品以防止或控制真菌生长中的应用。

[0138] 实施例 6c

[0139] 来自 *M. crispans* 挥发物的蒸气还有效地对抗很多导致腐败的真菌和生长于谷物 (例如, 玉米、小麦、大麦、大米等) 上的真菌, 并且本发明还能够与在收成前后、贮存或运输中的多种水果和蔬菜, 例如土豆、甜菜、胡萝卜、甘薯, 例如谷物、水果或蔬菜连用。因此, 本发明的组合物和方法可应用于农业和食品加工领域中与大部分真菌相关的一些范畴中, 并能够用于目标生物, 例如但不限于交链孢霉 (*Alternaria*)、枝孢菌 (*Cladosporium*)、曲霉菌 (*Aspergillus*)、青霉菌 (*Penicillium*)、二孢菌 (*Diplodia*)、镰刀菌 (*Fusarium*) 和赤霉菌 (*Gibberella*)。(参见例如表 8。)

[0140] 实施例 6d

[0141] 来自 *M. crispans* 副产物的蒸气有效地对抗了斐济球腔菌 (*Mycosphaerella fijiensis*) 真菌 (参见表 8)。因此, 本发明可用于治疗香蕉和车前草的与真菌相关的叶斑病 (Black Sigatoka disease)。

[0142] 实施例 6e

[0143] 柑橘溃疡病 (Citrus canker disease) 威胁到美国柑橘产业的存亡。如表 8 所示, 来自 *M. crispans* 副产物的蒸气有效地灭杀了导致溃疡病的病原地毯草黄单胞杆菌柑橘致病变种 (*Xanthomonas axonipodis* p.v.citri)。此结果表明本发明的 FFC 组合物和相关方法能够有效地用于处理种子、苗、果园、设备或器械 (包括, 例如工人的设备和服装) 和 / 或收成的果实以防止、抑制或控制溃疡病。

[0144] 实施例 7

[0145] 继实施例 6 的试验和结果后, 进行 *M. crispans* 挥发性副产物的蒸气对抗多种其他植物和人病原真菌和细菌的生物测定 (参见下表 9)。所述真菌生长在四分之一圆带有 PDA 的 X- 平板上, 并在接种一种或更多种测试生物前, 在室温下温育 3-5 天。在接种的同时制备对照平板, 并在对于测试生物个体最优的相同培养基上生长。测试生物, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* 6538)、霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis* 10708)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* 11229)、金黄色葡萄球菌 ATCC 43300 (MRSA) 和霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae* ATCC 14035) 生长在 X 平板剩余的四分之三圆中的胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 上。使每种生物的三个平板和适当的对照在室温下接触真菌副产物的蒸气约 2、4 和 6 天。为了检测测试微生物的存活性, 随后, 通过物理方式取出真菌, 将对照和测试平板在  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  的温育箱放置至少 3 ~ 4 天, 但将分支杆菌 (*Mycobacterium* spp.) 再温育约一个月。这是为了确定副产物的蒸气是否已抑制或灭杀了测试生物, 并评估所述生物的存活性。对鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*) 和炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 进行相同的程序, 但将接触时间变为 3 天和 5 天, 且在接触真菌后, 将鼠疫耶尔森氏菌在  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的条件下

温育。使用上文所述的程序,将海洋分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum* ATCC 927) 生长在 7H11 琼脂 (Difco Co) 的剩余四分之三圆中,并在  $33 \pm 1^\circ\text{C}$  培养。每种生物在测试中的所有三个重复表现完全相同。

[0146] 对于同样生长在 7H11 上的所有结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 菌株,从平板取出部分琼脂,并插入 (在 PDA 上的) B-23 真菌。随后,向平板接种肉汤培养物。同样接种不存在真菌的对照平板。在每个指定的时间间隔,从平板取出部分琼脂,转移到单独的空平板,并放置在  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  的温育箱中,以测定微生物的存活性。将平板放入带有湿纸巾的塑料袋中以防止干燥。

[0147] 绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa* 15442) 和泰国伯克氏菌 (*Burkholderia thailandensis* 70038) 均生长在 TSA 琼脂上。将其保持在室温以获得所述生物的最佳生长温度,随后转移到  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  的温育箱并进行观察。注意,使用人病原的所有测试均在严格且联邦政府认可的生物安全条件下进行。对人病原的所有测试重复至少两次。

[0148] 表 9 :*M. crispans* 挥发性副产物对多种革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌物种的影响。接触时间随具体目标生物而变化,并在所述时期后测定测试生物的存活性 (标记为生长或无生长)。

[0149]

| 生物                                           | 细胞壁类型             | 接触时间         | 生长/无生长                     | 注释                             |
|----------------------------------------------|-------------------|--------------|----------------------------|--------------------------------|
|                                              |                   |              | (在 <i>M. crispans</i> 存在下) |                                |
| 金黄色葡萄球菌<br>( <i>S. aureus</i> 6538)          | 革兰氏阳性             | 2、4 和 6 天    | 无生长                        |                                |
| 霍乱沙门氏菌<br>( <i>S. choleraesuis</i> 10708)    | 革兰氏阴性             | 2、4 和 6 天    | 无生长                        |                                |
| 铜绿假单胞菌<br>( <i>P. aeruginosa</i> 15442)      | 革兰氏阴性             | 2 天          | 生长                         | 接触平板和对照平板之间没有可视差别              |
| 海洋分支杆菌<br>( <i>M. marinum</i> ATCC 927)      | 抗酸<br>(Acid-fast) | 2、4 和 6 天    | 无生长                        |                                |
| 泰国伯克氏菌<br>( <i>B. thailandensis</i> 70038)   | 革兰氏阴性             | 2 天          | 生长                         | 接触平板和对照平板之间没有可视差别              |
| 金黄色葡萄球菌( <i>S. aureus</i> ATCC 43300) (MRSA) | 革兰氏阳性             | 2、4 和 6 天    | 生长                         | 没有形成真实的菌落，只有轻微薄膜状生长            |
| 大肠杆菌<br>( <i>E. coli</i> 11229)              | 革兰氏阴性             | 2、4 和 6 天    | 生长                         | 接触平板和对照平板之间没有可视差别              |
| 霍乱弧菌<br>( <i>V. cholerae</i> ATCC 14035)     | 革兰氏阴性             | 2、4 和 6 天    | 生长                         | 在接触第 4 和第 6 天生长，与对照平板相比，显示略受抑制 |
| 鼠疫耶尔森菌<br>( <i>Y. pestis</i> 91-3365)        | 革兰氏阴性             | 3 和 5 天      | 无生长                        |                                |
| 炭疽杆菌<br>( <i>B. anthracis</i> A2084)         | 革兰氏阳性             | 3 和 5 天      | 生长                         | 在接触后仅留下少数菌落且在温育时有更多生长          |
| 结核分枝杆菌( <i>M. tuberculosis</i> 3081，异烟肼抗性)   | 抗酸                | 2、4、7 和 14 天 | 无生长                        |                                |

[0150]

| 生物                                                   | 细胞壁类型 | 接触时间         | 生长/无生长<br>(在 <i>M. crispans</i> 存在下) | 注释 |
|------------------------------------------------------|-------|--------------|--------------------------------------|----|
| 结核分枝杆菌( <i>M. tuberculosis</i> 50001106, 链霉素抗性)      | 抗酸    | 2、4、7 和 14 天 | 无生长                                  |    |
| 结核分枝杆菌( <i>M. tuberculosis</i> 59501228, 链霉素/乙胺丁醇抗性) | 抗酸    | 2、4、7 和 14 天 | 无生长                                  |    |
| 结核分枝杆菌( <i>M. tuberculosis</i> 59501867, 敏感型)        | 抗酸    | 2、4、7 和 14 天 | 无生长                                  |    |

[0151] 如表 9 中所示,在接触正活跃生长的 *M. crispans* (6-10 日龄的培养物) 2、4、7 和 14 天后,所有四种抗酸菌(结核分支杆菌菌株)均被灭杀。在接触 *M. crispans* 至少 2 天后被灭杀的其他细菌为:金黄色葡萄球菌 6538、海洋分枝杆菌、鼠疫耶尔森氏菌和霍乱沙门氏菌。受 *M. crispans* 接触影响相对较小或完全不受影响的为以下:绿脓杆菌、泰国伯克氏菌、金黄色葡萄球菌 (MRSA)、大肠杆菌、霍乱弧菌和炭疽杆菌。然而,金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的生长仅为小粘膜而不是任何明显的菌落,因此,其受到了 *M. crispans* 的 VOC 的影响。此外,炭疽杆菌平板在接触平板上仅留有几个菌落,但在去除 *M. crispans* 并继续温育后长出更多的菌落。因此,今人怀疑 *M. crispans* 副产物的蒸气仅对炭疽杆菌的营养细胞 (vegetative cells) 有效,但不作用于孢子。在最后观察时间 (14 天) 后一个月,在接触真菌的任何平板上都没有观察到生长,但在所有对照平板上都观察到生长。

[0152] 以下实施例的试验说明了本发明组合物的多个实施方式及其实用性。表 10 中提供了一种代表性的组合物,但没有限定成分的量、浓度或比例。在某些实施方式中,异丁酸的量可替换成等量或近似水平的丙酸。在某些此类或其他实施方式中,可将乙醇替换成乙酸和/或将 2-丁酮替换成乙酸或丙酸。此外,还可将多种酯替换成所列出酯的异构体或同系物(例如将丙酸的 3-甲基丁基酯替换成其 2-甲基丁基酯,但不限于此)。以下实施例中观察到的结果是由表 10 中列出化合物的组合物获得的。与此相符,可使用多种其他组合物获得相似的效果。

[0153] 表 10 :可用于控制有害微生物的食物和风味化合物的组合物

[0154]

|                |
|----------------|
| FFCs 系列中的化合物 * |
| 乙醛             |
| 乙酸乙酯           |
| 2-丁酮           |

|                      |
|----------------------|
| 丙酸, 2- 甲基, 甲酯        |
| 乙醇                   |
| 乙酸, 2- 甲基丙酯          |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丙酯 |
| 1- 丙醇, 2- 甲基 -       |
| 1- 丁醇, 3- 甲基 -, 乙酸酯  |
| 丙酸, 2- 甲基 -, 2- 甲基丁酯 |
| 1- 丁醇, 3- 甲基 -       |
| 丙酸, 2 甲基             |
| 乙酸, 2- 苯基乙酯          |

[0155] \* 这些化合物的每一种在室温下均为液体, 且当中的一种可与另一种一起使用以提供易于在室温或允许挥发的温度和压力下挥发的液体组合物。

[0156] 用于控制植物疾病的 FFC 组合物

[0157] 实施例 8a

[0158] 测量了 FFC 抑制和灭杀测试生物的相对能力。按照表 10 中给出的相对比例, 通过将化合物放入小瓶制备测试溶液。将测试混合物 (20 微升) 放入位于包含 PDA 的培养板中心的预消毒小杯 (4x6mm) 中。在不使用时, 将混合物贮存在 0℃。将新生长并切离到 3mm<sup>3</sup> 琼脂块 (每种测试真菌至少 3 个琼脂块) 上的测试生物 (如表 9 中所述) 放置在距离小杯 2-3cm 处, 并使用两层石蜡膜缠绕平板。在给定时间段后, 测量来自琼脂块边缘的菌丝体生长。然而, 在白地霉 (*Geotrichum candidum*) 的情况下, 将其划线培养, 并且通过从经接种的琼脂板原始区域重新划线检查新的可见生长和存活性。还设置适当的对照, 其中在小杯中没有放置测试溶液。对 20 μl FFC 混合物进行了至少两次测试, 并获得了相似的结果。

[0159] 实施例 8b

[0160] 通过无菌条件下除去小琼脂块, 将其放置在 PDA 平板上, 并观察 1-3 天后的生长, 或者通过将白地霉重新划线到新鲜 PDA 平板上, 来检测测试微生物的存活性。可通过这种方式评估微生物的存活性。表 11a 中显示的结果表明以下列出的生物都受到具体 FFC 组合物的抑制, 并且在大多数情况下通过接触所述 FFC 组合物而被灭杀。这些生物包括: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、奶酪上的青霉菌 (*Penicillium* sp.)、甜菜生尾孢菌 (*Cercospora beticola*)、大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*)、终极腐霉 (*Pythium ultimum*)、棕榈疫霉 (*Phytophthora palmivora*)、斐济球腔菌 (*Mycophaeella fijiensis*)、T 立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、白地霉 (*Geotrichum candidum*)、绿色木霉 (*Trichoderma viridi*)、灵芝菌 (*Ganoderma* sp.)、弯孢菌 (*Curvularia* sp.) 和葱腐葡萄孢菌 (*Botrytis alli*)。因此, 在适当应用时, FFC 组

合物具有控制这些病原微生物的能力。此结果表明通过此混合物可抑制或灭杀很多其他的病原微生物。

[0161] 表 11a :多种植物病原微生物及其对本发明代表性 FFC 组合物的敏感性的简要目录,其中在石蜡膜密封的培养板内的马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 上于 23℃ 接触 20 微升混合物 2 天。最后,在取出并放置在 PDA 的正常培养板上后,检测带有测试微生物的琼脂塞的存活性。

[0162]

| 测试生物    | 对生长的影响 | 48 小时后存活或死亡 |
|---------|--------|-------------|
| 黑曲霉     | 无生长    | 死亡          |
| 奶酪上的青霉菌 | 95%抑制  | 存活          |
| 甜菜生尾孢菌  | 无生长    | 死亡          |
| 大丽轮枝菌   | 无生长    | 死亡          |
| 终极腐霉    | 无生长    | 死亡          |
| 棕榈疫霉    | 无生长    | 死亡          |
| 斐济球腔菌   | 无生长    | 死亡          |
| 立枯丝核菌   | 无生长    | 死亡          |
| 烟曲霉     | 无生长    | 死亡          |
| 白地霉     | 无抑制    | 存活          |
| 绿色木霉    | 60%抑制  | 存活          |
| 灵芝菌     | 无生长    | 死亡          |
| 弯孢菌     | 无生长    | 存活          |

[0163]

| 测试生物   | 对生长的影响 | 48 小时后存活或死亡 |
|--------|--------|-------------|
| 葱腐葡萄孢菌 | 无生长    | 死亡          |

[0164] 实施例 8c

[0165] 参考表 11a 的数据,所用 FFC 组合物的活性谱表明了多种情况下,与 *M. crispans* 及其挥发性副产物的蒸汽相比不同和 / 或增强的抗微生物作用。

[0166] 实施例 8d

[0167] 参考以上实施例,并使用相似的技术和程序,使用丙酸蒸气处理相同的病原。对比

结果显示在下表 11b 中,其中将表 11a 的数据重显在列 A 和 B 中,列 C 中提供了观察到的单独丙酸的作用。在 20  $\mu$ l, 丙酸的量与本发明具体实施方式中的丙酸水平相当。丙酸是现有技术已知具有某些抗微生物效果的多种单独化合物的代表。然而,如表 11b 的比较数据所示,本发明组合物提供的新协同结果高于且超出了预期由本发明内容之外的单独现有技术组分独立产生的结果。如表所示,现有技术最多仅为抑制性,而本发明组合物消除(即灭杀)了很多测试病原。通过与其他此类单独的现有技术化合物/组合物比较获得了类似的结果。

[0168] 表 11b :显示高于丙酸的抗微生物活性的比较结果

[0169]

| 测试生物    | 对生长的影响<br>(A) | 48 小时后存活或死亡<br>(B) | 20 $\mu$ l 单独的丙酸<br>24 小时后(C) |
|---------|---------------|--------------------|-------------------------------|
| 黑曲霉     | 无生长           | 死亡                 | 0% 存活                         |
| 奶酪上的青霉菌 | 95%抑制         | 存活                 |                               |
| 甜菜生尾孢菌  | 无生长           | 死亡                 | 75% 存活                        |
| 大丽轮枝菌   | 无生长           | 死亡                 |                               |
| 终极腐霉    | 无生长           | 死亡                 | 80% 存活                        |
| 棕榈疫霉    | 无生长           | 死亡                 | 100% ND*                      |
| 斐济球腔菌   | 无生长           | 死亡                 |                               |
| 立枯丝核菌   | 无生长           | 死亡                 | 80% 存活                        |
| 烟曲霉     | 无生长           | 死亡                 | 0% 存活                         |
| 白地霉     | 无抑制           | 存活                 | 0% 存活                         |
| 绿色木霉    | 60%抑制         | 存活                 |                               |

[0170]

| 测试生物   | 对生长的影响<br>(A) | 48 小时后存活或死亡<br>(B) | 20 $\mu$ l 单独的丙酸<br>24 小时后(C) |
|--------|---------------|--------------------|-------------------------------|
| 灵芝菌    | 无生长           | 死亡                 |                               |
| 弯孢菌    | 无生长           | 存活                 |                               |
| 葱腐葡萄孢菌 | 无生长           | 死亡                 | 0% 存活                         |

[0171] \*100%抑制,但未测定存活性 (ND)。

[0172] FFC 组合物用于治疗肺结核和其他人病原的应用

[0173] 实施例 9a

[0174] 四临床耐药株的结核分支杆菌分离物 (5901867、50001106、59501228 和 3081) 接触 FFC 组合物。对每种分离物,将 10  $\mu$ l 培养物放置在 7H11 琼脂平板中间,并使用无菌塑料环均匀地扩散到平板的整个表面。切下 0.65ml 微离心管的盖(小盖),并在带有螺旋盖的耐高压加热管中于 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 分钟。使用无菌钳除去小盖,其放置在接种平板的中心。对照平板(每种分离物一个)不放入小盖。对每种分离物制备三个平板,并在各平板的三个小盖中的每一个中放入 5  $\mu$ l、10  $\mu$ l 或 20  $\mu$ l 的 FFC。随后,将平板放入带有湿纸

中的拉链锁 (zip-lock) 塑料袋中,并在  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  温育约 28 天。在接触约 48 小时后,取出并弃去小盖,并将平板放回温育箱。时常检查纸巾,并重新润湿以防止培养基脱水。所有对照平板都有生长。接触  $5\ \mu\text{L}$  和  $10\ \mu\text{L}$  挥发物的所有平板都有生长。只有一个接触  $20\ \mu\text{L}$  挥发物的分离物 (50001106) 有生长。注意到每种结核分支杆菌分离物都是此生物的临床耐药株。所有试验均在美国政府认可的生物安全实验室条件下进行。

[0175] 对照平板和接触  $5\ \mu\text{L}$  和  $10\ \mu\text{L}$  挥发物的平板在 08 年 4 月 14 日铺板。接触  $20\ \mu\text{L}$  挥发物的平板在 08 年 4 月 22 日铺板。所有平板均检查多次。末次检查在 08 年 5 月 19 日进行,并且没有存活的那些生物在表 12 中标记为 “--”。

[0176] 表 12 :FFC 对耐药结核分支杆菌生长的抑制作用

[0177]

| 结核分支杆菌的分离物 | $5\ \mu\text{L}$ | $10\ \mu\text{L}$ | $20\ \mu\text{L}$ |
|------------|------------------|-------------------|-------------------|
| 5901867    | +                | +                 | --                |
| 50001106   | +                | +                 | +                 |
| 59501228   | +                | +                 | --                |
| 3081       | +                | +                 | --                |

[0178] 图 1 中显示了本发明 FFC 组合物对另一种 TB 菌株的实际作用 :FFC 对耐药结核分支杆菌菌株 (110107) 的灭杀作用。左侧的平板是未经 20 微升 FFC 处理 48 小时的对照平板,右侧的平板经处理 48 小时,随后,将两个平板在  $36^{\circ}\text{C}$  温育 28 天。根据这些试验,显然 FFC 能够灭杀 3/4 的结核分支杆菌耐药性分离物。目前,存在使用此 FFC 组合物在动物中治疗结核并最终进行人试验的前景。

[0179] 实施例 9b

[0180] 与此前实施例的数据相符,可证实本发明的广泛一面。使用本领域技术人员熟知的材料和技术制备存活培养物和适合的培养基。例如,接触本发明的 FFC 组合物 (例如,通过直接接触液体组合物或其蒸气) 能够导致以下大肠杆菌状细菌 (革兰氏菌株和形态学) 的生长抑制或死亡:大肠杆菌 (革兰氏阳性、棒状)、肠炎沙门菌 (*Salmonella enteritidis*, 革兰氏阴性、棒状)、绿脓杆菌 (革兰氏阴性、棒状)、金黄色葡萄球菌 (革兰氏阳性、球菌) 和单核细胞增多性李斯特菌 (革兰氏阳性、棒状)。

[0181] 同样,证明使用多种其他革兰氏阴性和 / 或革兰氏阳性细菌,例如,但不限于蜡样芽孢杆菌 (革兰氏阳性、棒状) 和肉毒梭菌 (革兰氏阳性、棒状) 也可获得此类结果。

[0182] 实施例 10

[0183] 计算一些测试生物对模拟 *M. crispans* 的挥发性副产物的人工组合物的  $\text{IC}_{50}$  (参见表 1)。参考表 12,使用  $15\ \mu\text{L}$  人工混合物 100% 抑制了所有测试生物,并且使用少至  $10\ \mu\text{L}$  即灭杀了其中数种。即便使用最大体积的混合物 ( $30\ \mu\text{L}$ ),大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*)、灰葡萄孢菌 (*Botryis cinerea*) 和烟曲菌 (*Aspergillus fumigatus*) 也没有被灭杀,但这三种菌均被  $10\ \mu\text{L}$  或  $15\ \mu\text{L}$  的测试混合物 100% 抑制。最敏感的生物是终极腐霉,其在  $10\ \mu\text{L}$  被灭杀并且在  $2.5\ \mu\text{L}$  下被 100% 抑制,事实上,由于终极腐霉和灰葡萄孢菌

实质上具有相同的  $IC_{50}$ , 但其中之一被灭杀而另一种没有 (表 13), 因此,  $IC_{50}$  值不一定反应了挥发物的灭杀活性。

[0184] 表 13 : *M. crispans* 挥发性副产物组分的人工混合物对多种植物病原的  $IC_{50}$ 。向测试平板中央内的无菌塑料管添加量范围在 1  $\mu$ L 至 30  $\mu$ L 的混合物, 并将病原生物放置在平板边缘附近。在 48 小时后评估存活性, 并与没有添加混合物但在适当位置具有无菌管的对照平板进行比较。认定在所述时段后没有显示生长的任何生物为 100% 抑制, 且将在 48 小时后没有显示生长且在 48 小时评估之后立即分离到 PDA 上没有生长的认定为死亡。通过由导致 50% 抑制所需的人工混合物的量 ( $\mu$ L) 除以培养板中的总气隙 (50mL) 确定  $IC_{50}$  的计算值。

[0185]

| 测试生物                                   | 导致 100%抑制的<br>最小体积( $\mu$ L) | 导致死亡的<br>体积( $\mu$ L) | $IC_{50}$<br>( $\mu$ L mL <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|
| 终极腐霉                                   | 2.0                          | 10.0                  | 0.030 $\pm$ 0.004                         |
| 樟疫霉( <i>Phytophthora cinnamomi</i> )   | 5.0                          | 30.0                  | 0.056 $\pm$ 0.009                         |
| 核盘菌( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ) | n/a                          | >30                   | 0.15 $\pm$ 0.016                          |
| 灰葡萄孢菌                                  | 10.0                         | >30                   | 0.035 $\pm$ 0.004                         |
| 立枯丝核菌                                  | 20.0                         | 15.0                  | 0.039 $\pm$ 0.006                         |
| 烟曲菌                                    | 2.0                          | 20                    | 0.031 $\pm$ 0.003                         |
| 大丽轮枝菌                                  | 5.0                          | >30                   | 0.062 $\pm$ 0.004                         |
| 棕榈疫霉                                   | 1.0                          | 5.0                   | <0.02                                     |

[0186] FFC 组合物用于处理垃圾以控制微生物腐败的应用

[0187] 实施例 11

[0188] 将常被视为垃圾的物品的人工混合物装入两个弹药盒 (ammo cartridge boxes) 中。这些物品由废料谷物、花部分、肉类废料、新闻纸纤维和各种其他废物组成。在一个盒中放入包含 0.2ml 上述 FFC 组合物的小烧杯。在另一个盒中放入不含 FFC 的烧杯。将两个盒在 80 °F 温育 10 天。在所述时间结束时, 打开盒子并进行检测。在带有 FFC 的盒中显然没有发生腐败。另一方面, 对照盒已经完全转化成大量的腐败物。FFC 组合物在垃圾处理中的应用是保持垃圾在运输时完整免于腐败, 以促进世界范围内将垃圾发酵成能源相关产品 (例如甲烷) 的机会。图 4 显示了 FFC 组合物在此试验条件下保护垃圾使其免受微生物腐败。

[0189] FFC 组合物用于处理奶酪以控制真菌腐败的应用

[0190] 实施例 12

[0191] 将包含上述 FFC 组合物的小瓶放入和 / 或用于浸泡透明塑料 **Saran®** 包装材料块 10x 10 英寸。将塑料包装材料在 FFC 组合物中浸泡 6 天, 沥干, 随后作为充分接种青霉菌 (*Penicillium* sp.) 奶酪菌株的奶酪片外的包装材料。在另一个试验中, 向所述奶酪片接种真菌, 随后由正常 **Saran®** 包装材料缠绕, 随后注射 10 微升的 FFC。如上所述准备适合的对照, 其中仅有青霉菌、仅有经处理的包装材料, 仅有单独的 FFC 和对照 (无处理)。所述试验

奶酪片在室温下培育 1 周,随后由实验室人员对每块奶酪部分进行品尝检测。注意,在与曾在冰箱贮存的奶酪的新鲜切片相比时,按照此方式的贮存对奶酪的味道没有不良影响。被真菌完全滋生的奶酪块没有被食用。由图 2 明显可见,在包装材料下使用 FFC 组合物或使用经处理的包装材料实际上彻底保护奶酪块免于由青霉菌导致的奶酪腐败和菌落化。在经处理的包装材料和普通 Saran 包装的单独奶酪下注射 10 微升 FFC 中出现相同情况。

[0192] FFC 组合物用于处理食物和植物部分(例如植物产品)以控制真菌腐败的应用

[0193] 实施例 13a

[0194] 获取多个山药进行这些试验。认为最终导致腐败的表面污染微生物的量足以进行接种。因此,将两块山药放置在带盖的塑料盒中,并在包含 0.2ml FFC 的小烧杯存在下将其密封。对照盒包含没有 FFC 的烧杯。随后,将密封的盒在室温下保持 10 天,随后检测。如图 3 所示,显然经处理的山药块没有表面和更深的污染发育,而对照山药发育了多个区域的表面污点和早期腐烂(insipient decay):未经处理的山药在左侧,而由 FFC 处理的在右侧。注意,左侧山药顶部末端上大面积的真菌腐败。

[0195] 实施例 13b

[0196] 作为相关的最终应用,可将 FFC 组合物和/或其组分应用于收成的水果或蔬菜产品以补偿其上任何天然、蜡质或保护涂层的去除。例如,可使用 FFC 组合物(例如,喷涂)处理收成的南瓜和类似的产品以控制/抑制微生物生长,改进可销售性并延长货架期。

[0197] 实施例 14

[0198] 本发明的合成 FFC 组合物(根据表 2~7 和表 10 中所述的那些组合物)顺利地与应用活 *M. albus* 控制由终极腐霉、水稻立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* AG 2-2)和黑腐丝囊霉(*Aphanomyces cochlioides*)导致的甜菜(*Beta vulgaris* L.)苗期病害以及番茄(*Lycopersicon esculentum*)上的根结线虫病(南方根结线虫, *Meloidogyne incognita*)的应用进行比较。合成组合物对所有三种甜菜病原提供了与活真菌的淀粉基制剂相等的立枯病(damping off)控制,并且显著降低了番茄根上根结虫瘿数量。使用 FFC 组合物的速率研究显示浓度为  $2 \mu\text{l}/\text{cm}^3$  和  $0.75 \mu\text{l}/\text{cm}^3$  的土壤载体/培养基组分分别对甜菜的立枯丝核菌和腐霉菌立枯病提供良好的控制。浓度为  $5 \mu\text{l}/\text{cm}^3$  的砂在 24 小时内对南方根结线虫提供了 100% 死亡率。通过比较,使用体外研究,生物合理剂(biorational)的此相同速率提供了比应用  $5 \mu\text{l}/\text{cm}^3$  砂的 *M. albus* 滋生的碾碎大麦制剂更少的根结虫瘿。

[0199] 实施例 15

[0200] 密西根棒状杆菌(*Corynebacterium michiganense*)通过组织枯萎和腐烂导致严重的番茄损失。将此细菌的可信培养物划入营养肉汤琼脂,并且在平板中心放入小杯。在杯中放入 20 微升的人工实验室制备的本发明 FFC 组合物。对照平板不含 FFC 组合物。将平板培养 24 小时,随后进行检测。经 FFC 处理的平板上没有细菌生长(参见图 5)。这样,本发明的 FFC 组合物可用于处理番茄种子、植物或产物,但不限于此。或者,可将 FFC 组合物与水混合作为预先床土壤润湿(pre-bed soil drench)。

[0201] 实施例 16

[0202] 参考前文并与此前的多个实施例相符,本发明 FFC 组合物可作预防疾病使用,或以用于治疗活性疾病状态,此类疾病包括但不限于影响甜菜、番茄、洋葱、谷类、香蕉和车前草,以及柑橘类作物等的疾病。

[0203] 更广泛地,无论是预防疾病还是在真菌或细菌微生物的存在下,也无论感染生命周期阶段(例如,游动孢子等)、发育、生长或程度,本发明的组合物和方法均可用于处理并提高种子、植物、产物和/或相关食品的存活性。因此,本领域技术人员可理解,此组合物可以任何形式(例如,粉末、颗粒、液体、喷雾、悬液、蒸气、软膏、凝胶、涂层等)包含和/或应用到种子、苗或植物(例如根、茎、叶等)或其产品(例如收成前或收成后)的表面或与其接触。

[0204] 实施例 17

[0205] 可将单独或加入到各种其他组合物的 FFC 组合物和/或其组分用于家禽、产品和相关食品加工工业中的多种最终应用中。以下实施例提供了多种此类非限定性应用。

[0206] 实施例 17a

[0207] 使用本发明的 FFC 组合物(如表 2~7 和表 10 中所述的)处理一系列的蛋产品,包括但不限于全蛋和液态全蛋,加添加剂的全蛋(fortified whole egg)和加添加剂的液态全蛋、盐全蛋和液态盐全蛋、糖全蛋和液态糖全蛋,以及此类产品的混合物(无论其是否为液态,是否含糖、糖浆固体、糖浆、葡萄糖和糊精和/或胶质和增稠剂),以及混合的蛋混合物和混合的液体蛋混合物、胆固醇减少的蛋产品及其液体产品和混合物,和包含小于约 10% 蛋固体的相关产品、带壳蛋和蛋组分,包括但不限于去胆固醇的蛋黄。此类术语可由本领域技术人员理解,并根据所在工业和调整的应用而具有标准的含义。

[0208] 实施例 17b

[0209] 同样,可将本发明的多种 FFC 组合物,包括但不限于利用丙酸至少部分替换异丁酸的那些,用于制备和/或包装货架期延长(ESL)的液体蛋产品,包括但不限于全蛋、混合的混合物、蛋黄和蛋白液体产品。

[0210] 实施例 17c

[0211] 同样,本发明的多种 FFC 组合物也可用于粉碎的空蛋壳的加工。本领域可理解,使用可得的技术和加工设备,单独或作为另一组合物部分的 FFC 组合物和/或其组分可在进一步加工(例如加工成保健食品)前施用(喷涂)于空壳。同样,可使用本领域中已知的装置和技术将本发明的一种或多种组合物施用于或加入到或用于处理禽类屠体(carass)、肉或相关的肉产品。通过延伸,本领域技术人员可理解,本发明也可用于其他类型的动物屠体、肉、加工的肉产品和所有其他形式的动物肉(例如,哺乳动物、鸟、鱼、蜗牛、蛤、甲壳类、海鲜和其他可食用物种),如通过下面的一个或多个实施例所说的。

[0212] 实施例 17d

[0213] 作为此前实施例的延伸,此 FFC 组合物可加入到加工的保健食品(例如,草药和香料胶囊或片剂)以抑制细菌/真菌生长。

[0214] 实施例 17e

[0215] 尽管此前的实施例说明了多种下游加工应用,本发明还可更广泛地应用于蛋和禽类生产领域。可将本发明的 FFC 组合物或相关组分加入至任何禽类或蛋生产设施和/或应用于与其相关的任何设备或机械。例如,鸡舍或生长/产卵设施的空气或表面处理能够控制、减少和/或抑制空气传播和表面沉积的污染物以及其后在其上的微生物生长。

[0216] 实施例 18

[0217] 可将 FFC 组合物或其一种或多种组分加入到多种其他加工的食品,包括具有水活

性或支持微生物生长的食品。例如,此组合物或组分可加入到腐殖质(humus)、花生酱和其他此类涂料(spread)、蘸料和混合物中。与花生生长和加工工业相关,本发明的组合物和相关组分可施用于脱壳前后的花生、初始清洗后的花生,或相关的加工产品(例如,花生酱)和/或包装设备和包装材料。

[0218] 实施例 19

[0219] 同样,本发明的 FFC 组合物/组分(例如,上文表 2~7 和 10 的一种或多种组合物,或其中描述的类型变体)可用作或加入到多种皮肤护理或处理产品,而与剂型(例如,洗剂、药膏、乳剂等)无关。

[0220] 实施例 19a

[0221] 例如,痤疮通常是由侵入皮肤毛孔的一种或多种细菌物种导致的。为了进一步证实本发明的应用,可制备本发明由丙酸替换的 FFC 组合物的含水制剂,并将其用于治疗带有年龄相关痤疮的青春期的男性受试者。通过目测观察,三周内每三天施用一次显著减少了痤疮损伤的数量和程度。

[0222] 实施例 19b

[0223] 为了证明本发明在使用和/或健康护理产品领域中的另一种应用,将本发明的 FFC 组合物加入(约 2 重量%)到代表性的柜台皮肤乳剂(counter skin cream preparation)。参考图 6,制备 PDA 平板,并与左上方对照乳剂(不含 FFC 组分或组合物)、右上方由细菌细胞污染的对照乳剂;左下方带有 FFC 组合物的“经处理”乳剂和右下方带有细菌污染的经处理的乳剂一起温育一天。如图所示,在此类皮肤护理产品中的细菌生长受到适度浓度(modest concentration)的本发明 FFC 组合物加入的抑制。

[0224] 实施例 20

[0225] 同样,本发明能够与一系列的口腔卫生、护理和治疗产品结合使用。以下实施例证明上文所述的由丙酸替换的 FFC 组合物的此类应用,但不限于此。或者,也可使用以上如表 2~7 和 10 中所述的多种其他 FFC 组合物或其在本文中所述的变体。

[0226] 实施例 20a

[0227] 例如,以一种此类口腔护理/卫生产品为例,使用约 1%的此类 FFC 组合物配制嗽口剂/清洗产品。通过将此类 FFC 组合物添加到可商购的现成的嗽口剂/清洗产品中制备此类产品。无论其浓度或剂量水平,本发明的 FFC 组合物也可以加入到牙膏/凝胶或相关的牙龈、口、口腔或牙科护理产品中。

[0228] 实施例 20b

[0229] 扁平苔藓(Lichen planus, LP)是皮肤的自免疫疾病,其可发生在口或其他粘膜内。由于膜变得不稳定,细菌或真菌可在这些区域驻留,并且导致组织疼痛、发红、感染、流血和肿胀。为了减少外源细菌参与此疾病的成因,制备包含 1%此类 FFC 组合物的水溶液的嗽口剂产品。每天清洗患者的口腔 2~3 次,每次至少 3-4 分钟,随后吐出。在进行治疗前和治疗 3 周后拍照。3 周后,结果显示牙龈发红几乎完全减少,并且伴随口腔和牙龈疼痛的几乎完全减少,牙龈和其他粘膜颜色恢复接近正常的颜色。患者自诉疼痛/流血几乎停止,并且与此前经历相比,LP 得到最大减轻。

[0230] 实施例 20c

[0231] 将在现成嗽口剂中的 1%上述 FFC 组合物用于减少牙菌斑并治疗由与口腔问题相

关的细菌引起的其他问题。每天使用 3 ~ 4 次漱口剂连续两个月后,几乎没有或没有形成牙菌斑。最初的牙龈记录为红色、肿胀以及易于导致流血(来自牙医的实际记录),目前变为颜色正常且在使用“探测器”仪器探测后没有流血。

[0232] 实施例 20d

[0233] 为了确认此 FFC 组合物的功效,将由上文实施例获得的口腔唾液放置在营养琼脂平板的一侧,将无 FFC 的商购漱口剂的唾液放置在相同平板的另一侧,且无漱口剂的唾液放置在另一个平板上。随后,将唾液温育 2 天。通过比较,无漱口剂的唾液具有高细菌负载;无 FFC 的漱口剂唾液如期地具有降低的细菌负载,但 FFC 漱口剂唾液不具有可检出的细菌。

[0234] 实施例 20e

[0235] 在另一个实施例中,口腔外科医生在口腔外科手术前测试 FFC 组合物(例如,为 1% 的商业嗽口 / 清洗产品形式)。患者将未处理的唾液放在琼脂平板(营养琼脂)上,使用 FFC 漱口剂溶液漱口并将唾液放在另一块琼脂平板上。在温育 2 ~ 3 天后,在 FCC 漱口剂处理的平板上没有细菌菌落,说明在口腔外科手术前后治疗或抑制牙齿或其他口腔感染的应用。

[0236] 实施例 21

[0237] 奶牛乳腺炎是由与 utter 相关的综合细菌导致的。根据本发明的多个非限定实施方式,可将下文所述的那些 FFC 组合物或鼠李糖脂修饰的 FFC 组合物在挤奶时施用于 utter 以减少细菌感染和污染乳产品的机会。

[0238] 实施例 22

[0239] 本发明的多种 FFC 组合物也可用于减少工业 / 医学重要性生物膜(biofilm)上的微生物负载。关于后者,从牙科假体到人工关节的物品均可在手术植入前用本发明的 FFC 组合物处理。

[0240] 实施例 23

[0241] 本发明的 FFC 组合物可用于控制衣物的真菌和细菌腐败,特别是那些接触潮湿环境的衣物(即,皮革、鞋、靴、皮带、领带、腰带)。例如,上文所述的 0.2m11% FFC 组合物的应用为放置在全湿的靴子上。将靴子放入封套以保持所得蒸气数小时,随后接触干燥空气。结果显示没有腐败,靴子干燥后没有残余的霉味。

[0242] 实施例 24

[0243] 本发明的组合物可包含多种 FFC 组分,并且本领域技术人员可在理解本发明的基础上配制本发明的组合物。无论最终应用或处理,可将一种或多种本发明 FFC 组分和 / 或相关的组合物加入到多种抗菌或抗真菌组合物中,但不限于此。此类组合物可包含单独或与本领域已知的此类抗细菌和 / 或抗真菌组分组合的鼠李糖脂表面活性组分。对于后者,此类组合物可包含丁香霉素和 / 或假单胞霉素组分。

[0244] 更具体地,本领域技术人员可以理解,鼠李糖脂组分可包括美国专利 No. 5, 455, 232 和 No. 5, 767, 090 所述的一种或多种化合物,上述每篇专利均通过引用全文并入本文。本领域技术人员还可以理解,此类鼠李糖脂化合物,无论是目前本领域已知的还是今后分离和 / 或表征的,可具有其中公开的结构或变化的结构。例如,无论是合成衍生还是天然存在(例如,来自假单胞菌物种或其菌株)的酸形式和 / 或作为相应的酸盐,此类化合物可以在一个或多个的糖羟基位点具有烷基 - 和 / 或酰基 - 取代(例如,分别为甲基和

/或乙酰基,及其更高级的同系物)。同样,无论单-和/或二鼠李糖形式,此类化合物均可通过疏水部分被改变。作为非限定性实例,参考图 7A 和图 7B, m 和 n 可以独立地在约 4 至约 20 的范围,无论此部分是否饱和,单不饱和还是多不饱和,无论疏水部分是质子化的,作为带有任何反荷离子的共轭碱存在,还是其他衍生化。与本发明的较宽范围相符,可用于此组合物的鼠李糖脂在结构上仅受所获得的表面活性功能和/或与本发明 FFC 组合物结合的抗微生物作用的限制。因此,国际公开 W0 99/43334 所述的那些结构变体也视为本发明的内容,此公开通过引用全文并入本文。还可参见图 8~9 的非限定性鼠李糖脂组分/结构。

[0245] 不考虑抗微生物或鼠李糖脂的身份,本发明组合物的载体组分可包含选自但不限于水、醇、油、气体及其组合的流体。例如,尽管此组合物对于抗微生物或鼠李糖脂数量的量或浓度(例如,wt.%)没有限制,但可使用包含水和/或醇的载体以有利于期望的制剂、运输、贮存和/或应用性质,以及有效浓度和所得活性。

[0246] 此类鼠李糖脂表面活性组分、抗真菌组分和/或相关组合物包括但不限于共同待审申请 No. 11/351,572,特别是其实施例 9-15 中所述的那些,此申请于 2006 年 2 月 10 日提交并且通过引用全文并入本文。此类鼠李糖脂表面活性组分、抗真菌组分和/或相关组合物可加入到或与本发明的一种或多种 FFC 组分和/或 FFC 组合物结合使用。此类抗细菌和/或抗真菌组分是本领域技术人员已知且可商购的。各种鼠李糖脂组分和相关表面活性组合物可来自于 Jeneil Biosurfactant, LLC, 商标为 Zonix。

#### [0247] 实施例 25

[0248] 例如,为了说明此类鼠李糖脂相关的变体,可使用一种或多种鼠李糖脂组分和一种或多种本发明的 FFC 组合物(和/或其一种或多种 FFC 组分)制备一系列组合物,以用作或与收成后清洗或处理结合用于多种水果和蔬菜。在此组合物中,鼠李糖脂组分(例如,如上述'572 申请中所述)的存在量可在约 0.1wt.%至约 99.9wt.%的范围,且 FFC 组合物/组分(例如,上文表 2~7 和 10 的组合物)的存在量可在约 99.9wt.%至约 0.1wt.%的范围,但不限于此。参考可适用的 EPA 规则,对上述 Zonix 鼠李糖脂表面活性剂没有容许界限(tolerance limit)。同样,对本发明的 FFC 组合物/组分也没有容许界限。因此,使用此类鼠李糖脂/FFC 组合物处理的食物可不经清洗直接食用。

#### [0249] 实施例 25a

[0250] 根据上文所述,鼠李糖脂/FFC 组合物可用于清洗柑橘果实。使用 8.5%鼠李糖脂溶液(水中)和 5%FFC 溶液(例如,表 10 组合物的水溶液)配制一种此类清洗/泡洗组合物。将一加仑的 95:5(v/v)混合物稀释至 425 加仑。使用本领域已知的程序方案,或可适用状态或联邦法规所需的程序方案,使用所述组合物有效地清洗并渗透橘皮,以灭杀表面和内部的细菌和真菌。尽管有效结果在柑橘果实中得到证实,但是此组合物以及相关的鼠李糖脂/FFC 组合物也可相似地与任何水果或蔬菜(例如但不限于:蓝莓、番茄、葡萄、洋葱、甜菜、甘薯、苹果、梨、凤梨和多种其他热带产品,例如但不限于诺丽果(noni)和腰果等)的收成后清洗或处理结合使用。使用本实施例的 FFC 组合物清洗或处理的水果/蔬菜可被视为对人食用安全且卫生的。

#### [0251] 实施例 25b

[0252] 无论是否具有加入的鼠李糖脂组分,本发明的各种 FFC 组合物均可用于在包装或装罐之前或之后处理各种水果和蔬菜(例如但不限于梨、桃、苹果、番茄、杏、芒果等)以减

少细菌 / 真菌负载。

**[0253] 实施例 26**

**[0254] FFC 组分化合物的来源:**用于本发明组合物的组分化合物可通过商业途径获得, 或使用熟知的或文献中描述的那些合成技术制备。(参见, 例如美国专利 No. 6, 911, 338, 其全文通过引用并入本文)。

**[0255]** 或者, 由于结合某些实施方式可以为优选的, 包括但不限于动物和人类食物和饮料物品, 个人护理和化妆品产品和相关的加工和制造技术、本发明 GRAS 组分化合物和相关的 FFC 组合物可通过发酵技术天然衍生, 并可得自于威斯康星州 Saukville 的 Jeneil Biotech, Inc, 商标为 Flavorzon。因此, 取决于最终使用或应用, 本发明的多种组合物可包含衍生自细菌发酵的化合物、化学合成的化合物和发酵及合成来源的化合物的各种混合物。

**[0256]** 参考上文, 以下实施例说明了本发明一种或多种组合物的非限定性应用或加入, 例如本领域技术人员理解本发明和多个现有专利内容中的描述而理解的此类应用或加入, 通过引用并入本文所述每篇专利仅出于证实本领域技术人员可理解本发明所述应用或加入的目的。

**[0257] 实施例 27**

**[0258]** 说明其它实施方式, 可配制本发明的各种组合物以用作水果饮料的添加剂, 如并入的美国专利申请 No. 6, 566, 349 中所述。例如, 本发明的组合物可与类黄酮化合物和 / 或抗氧化剂组合, 或作为类黄酮化合物和 / 或抗氧化剂的替代物加入至果汁中, 或可在加工前预加入至水果和蔬菜中以提高产品货架期。本领域技术人员明白, 可修饰 '349 专利的这类组合物以包括本发明的一种或多种组合物, 所述组合物对于任何最终应用的含量可以直接的方式来确定而无需过多实验。

**[0259] 实施例 28**

**[0260]** 可配制本发明的组合物以用于保存茶和茶 / 水果混合物饮料, 如并入的美国专利 No. 5, 866, 182 中所述。例如, 本发明的组合物可与山梨酸钾和 / 苯甲酸钠、抗坏血酸和二碳酸二甲酯组合使用, 或作为山梨酸钾和 / 苯甲酸钠、抗坏血酸和二碳酸二甲酯的替代物使用。本领域技术人员明白, 可修饰 '182 专利 (如其实施例 1) 的这类饮料以包括本发明的一种或多种组合物, 所述组合物对于任何特定用途的含量可以直接的方式来确定而无需过多实验。

**[0261] 实施例 29**

**[0262]** 可配制本发明的组合物以用于保存和 / 或提高止汗剂和除臭剂的抗微生物效果, 如并入的美国专利 No. 5, 176, 903 中所述。例如, 本发明的组合物可与尼泊金酯、咪唑烷基脲、季铵盐 -15、苯甲醇、苯氧基乙醇和各种其它适合的防腐剂 (如其实施例 1-3 所述) 组合使用, 或作为尼泊金酯、咪唑烷基脲、季铵盐 -15、苯甲醇、苯氧基乙醇和各种其它适合的防腐剂 (如其实施例 1-3 所述) 的替代物使用, 并加入此类止汗剂和除臭剂中以防止降解, 延长货架期和 / 或提高效率, 本领域技术人员可以直接的方式来确定一种或多种组合物的含量而无需过多实验。

**[0263] 实施例 30**

**[0264]** 也可配制本发明的组合物以用在止汗剂, 如并入的美国专利 No. 4, 548, 808 中所

述。例如,可将有效量的本发明的一种或多种组合物加入如'808 专利(如其实施例 1-6)所述的基本上无水的不含酒精的止汗剂产品中,以延长货架期并提高抗微生物效果,本领域技术人员可容易地确定所述有效量而无需过多实验。

**[0265] 实施例 31**

**[0266]** 也可配制本发明的组合物以用在动物/宠物食物如狗食物中,如并入的美国专利 No. 3, 119, 691 中所述。本领域技术人员明白可将本发明的一种或多种组合物加入至低水合(low hydration)狗食品、高水分(high moisture)狗食品和复水(rehydratable)狗食品(如本文所述的产品制剂),以延长'691 专利所述产品的货架期,此类组合物的含量很容易被确定而无需过多实验。

**[0267] 实施例 32**

**[0268]** 也可配制本发明的组合物以用在猫砂,如并入的美国专利 5, 060, 598 号和美国专利 No. 4, 721, 059 中所述。各种吸附材料,包括如粘土、苜蓿(alfalfa)、木屑和锯末以及更高吸附性材料包括粘土类填料('059 专利)和泥煤('598 专利)可用于吸附尿并控制气味。本发明的一种或多种组合物可与这些材料结合使用(如喷雾到这些材料上或加入这些材料中)以在猫砂使用后降低或消除微生物活性并控制气味,此类组合物的含量很容易被确定而无需过多实验。

**[0269] 实施例 33**

**[0270]** 也可配制本发明的组合物以用在喷雾消毒剂应用,如并入的美国专利 No. 6, 250, 511 中所述。'511 专利描述了包含处理液的喷雾瓶,包括约 25%至 75%的至少一种二醇类化合物、0.2%至 60%的抗微生物组分、约 5%至 45%的表面活性剂和任选的有效量的芳香剂、染料和其它添加剂(在其第 3 栏)。例如,本发明的一种或多种组合物可作为抗微生物组分的替代品与'511 专利的消毒剂结合使用,或作为添加剂加入,此类组合物的含量很容易被确定而无需过多实验。

**[0271] 实施例 34**

**[0272]** 也可配制本发明的组合物以用于清洁和/或消毒食物和饮料加工设备,如并入的美国专利 No. RE 40, 050 中所述。'050Reissue 教导了卤素氧化物组合物,本领域技术人员可修饰此类制剂以替代本发明的一种或多种组合物,此类组合物的含量很容易被确定而无需过多实验,将此类组合物使用如'050Reissue 中所述的装置和技术(如其 3-4 栏所述)来接触或应用至此类加工设备。

**[0273] 实施例 35**

**[0274]** 也可配制本发明的组合物以用于木材防腐,如并入的美国专利 No. 4, 988, 576 中所述(以及用于木质纤维素基组合物,如并入的美国专利 No. 7, 449, 130 中所述)。'576 专利教导将木材浸入防腐组合物的溶液中,所述防腐组合物的溶液包含木质磺酸酯的接枝共聚物、羟基苯甲醇和金属盐或金属盐的混合物、或者木质磺酸酯的接枝共聚物的至少一种金属盐,共聚物为木质磺酸酯和丙烯酸单体的反应产品。例如,本发明的一种或多种组合物可单独使用,或与'576 专利(或'130 专利)(分别描述在实施例 1-4 和 1-2 中)教导的此类防腐剂组合使用,以浸泡和保存木材,本领域技术人员很容易确定此类组合物的含量而无需过多实验。

**[0275] 实施例 36**

[0276] 也可配制本发明的组合物以用于消毒和 / 或杀菌拭布 (wipes), 如并入的美国专利 No. 4, 575, 891 中所述, 此专利教导了用消毒剂部分饱和的衬垫 (如其第 2 栏)。'891 专利描述了醇溶液和其它防腐溶液形式的适合的消毒剂。例如, 本发明的一种或多种组合物可单独使用, 或与此类消毒剂组合使用, 且加入至此类拭布材料中, 本领域技术人员很容易确定此类组合物的含量并将其并入而无需过多实验。

[0277] 实施例 37

[0278] 也可配制本发明的组合物以与洗手消毒液一起使用, 如并入的美国专利 No. 6, 187, 327 中所述。例如, 可配制本发明的一种或多种组合物以加入至 '327 专利的洗剂并与此洗剂结合使用, 或替代此洗剂中的任何活性成分以改进抗微生物效果。'327 专利也公开了各种其它已知的洗手消毒液 (如两性 - 阳离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、润湿剂和非离子退化剂 (regressing agent))。然而, 本发明的组合物可作为替代物加入任何此类洗手消毒液的任何活性成分中或与此类洗手消毒液的任何活性成分结合使用, 此类组合物的含量可很容易被确定而无需过多实验。

[0279] 实施例 38

[0280] 也可配制本发明的组合物以用于处理可食用的或农作物种子, 如并入的美国专利 No. 4, 581, 238 中所述, 此专利教导了将种子接触其中分散有山梨酸酯的蒸汽 (如其第 2-5 栏)。例如, 使用本文公开的技术和装置, 可将本发明的一种或多种组合物挥发或应用至此类种子, 本领域技术人员很容易确定此类组合物的含量并将其并入而无需过多实验。

[0281] 实施例 39

[0282] 也可配制本发明的组合物以用于预防或抑制腐败生物的生长, 如并入的美国专利 No. 4, 356, 204 中所述, 此专利教导了将食物接触有效生长抑制量的酮己酸 (如其第 2-3 栏)。本发明的一种或多种组合物可单独使用或与此酮己酸一起使用以进一步抑制和 / 或杀死腐败生物。同样, 并入的美国专利 No. 2, 711, 976 提示使用氨基酸来增加奶油冻食物对腐败生物和葡萄球菌物种的抗性。而且, 本发明的一种或多种组合物可单独使用或与此氨基酸组合使用, 或作为此氨基酸的替代物。同样, 并入的美国专利 No. 2, 866, 819 提示使用山梨酸作为食物中的防腐剂。而且, 本发明的一种或多种组合物可单独使用或与此山梨酸组合使用, 或作为此山梨酸的替代物。同样, 并入的美国专利 No. 2, 910, 368 提示使用 EDTA 和山梨酸来提高蔬菜的货架期。而且, 本发明的一种或多种组合物可单独使用或与此 EDTA 和 / 或山梨酸组合使用。在每种情况中, 本发明的此类组合物可以本领域技术人员容易确定的量使用而无需过多实验。

[0283] 实施例 40

[0284] 也可配制本发明的组合物以用于处理水果、种子、谷物和豆科植物, 如并入的美国专利 No. 5, 273, 769 中所述, 此专利教导了将任何待处理的物品置于容器中, 随后加入二氧化碳和氨。例如, 本领域技术人员明白, 使用本文所述的装置和技术 (如实施例 1-4), 本发明的一种或多种组合物可有效地使用, 而无需过多实验。

[0285] 实施例 41

[0286] 也可配制本发明的组合物以用于处理牙科和医疗物品 / 装置和植入物, 后者更详细地描述在并入的美国专利 No. 6, 812, 217 中, 此专利教导了将抗微生物聚合物膜施用至可植入的医疗装置的外表面。例如, 使用本文所述的技术, 本发明的一种或多种组合物也可

沉积或加入此类装置或物品（无论是医疗或牙科）或聚合物膜上（如第 5-6 栏所述），以提供抗微生物效果，本领域技术人员容易确定此类组合物的量而无需过多实验。

[0287] 实施例 42

[0288] 也可配制本发明的组合物以用于织物的处理，如并入的美国专利 No. 5, 968, 207 中所述，此专利教导了通过扩散或浸泡将三氯生酯施用至织物纤维或织品。例如，本发明的一种或多种组合物可单独配制使用或与此类化合物组合使用以改进（人造、天然或混合的）织物或其纤维的抗微生物性质（如 '207 专利第 2-3 栏所述），本领域技术人员容易确定此类组合物的量而无需过多实验。

[0289] 实施例 43

[0290] 可配制本发明的组合物以用于处理食物加工设备、相关装置和食物的表面，如并入的美国专利 No. 7, 575, 744 中所述。例如，使用本文所述的技术和装置，可配制本发明的一种或多种组合物，并置于大范围食物加工设备的装置或食物表面上，以降低或消除微生物活性，此类设备 / 装置包括但不限于小吃、家禽、柑橘、花生和相关食物加工设备 / 装置（参见如第 20 栏）。此类组合物可以本领域技术人员容易确定的量使用而无需过多实验。

[0291] 实施例 44

[0292] 也可配制本发明的组合物以用于治疗耕畜和牲畜中与微生物相关的疾病（即乳腺炎、口蹄疫等），并抑制微生物在农作物、植物、谷类和其它食物上的生长，如并入的美国专利 No. 7, 192, 575 中所述，此专利教导了包括丁香花蕾油、桉油、熏衣草油、茶树油和桔子油的组合物和应用。例如，本发明的一种或多种组合物可单独配制使用或与 '575 的组合物组合使用（如其实施例 1-2），本领域技术人员容易确定此类组合物的量而无需过多实验。

[0293] 实施例 45

[0294] 也可配制本发明的组合物以用于保存食物，如调味品、调味汁、腌泡汁、佐料、涂抹料 (spreads)、黄油、人造黄油、基于乳的食物等以抗微生物腐败，如并入的美国专利 No. 6, 156, 362 中所述，此专利教导了抗微生物组分的组合。本发明的一种或多种组合物可单独配制使用或与 '362 的组分组合使用（如其实施例 1-4），本领域技术人员容易确定此类组合物或其量而无需过多实验。

[0295] 实施例 46

[0296] 可配制本发明的组合物以用于加入多种不同的水基和有机基颜料、染料和相关表面涂料，如并入的美国专利 No. 7, 659, 326 和其中引用的文章（如，Kirk-Othmer-Paint；pp. 1046-1049, Vol. 17；1996, by Arthur A. Leman，其公开通过援引加入并入本文）所述。例如，本发明的一种或多种组合物可单独配制使用或与 '326 专利实施例 1 和 3 中详述的其它抗微生物组分组合使用，本领域技术人员容易确定此类组合物的量而无需过多实验。

[0297] 实施例 47

[0298] 也可配制本发明的组合物以用于剃后产品或加入到剃后产品中，如并入的美国专利 No. 6, 231, 845 所述。例如，本发明的一种或多种组合物可与 '845 专利实施例 1-6 所述的组分结合使用，以向此现有技术的此剃后产品提供抗微生物效果。此组合物可以本领域技术人员容易确定的量存在而无需过多实验。

[0299] 实施例 48

[0300] 也可配制本发明的组合物以用于或加入到畜体、肉或肉产品（如哺乳动物、鸟、

鱼、蛤、甲壳类和 / 或其它海产品以及其它可食用物种) 中以对其进行处理, 如并入的美国专利 No. 7, 507, 429 中所述的。例如, 本发明的一种或多种组合物可单独配制使用或与其它抗微生物组分组合使用, 以并入 '429 专利中所述的产品中。此组合物可以本领域技术人员容易确定的量存在而无需过多实验, 且对应产品可通过 '429 专利所述的技术和方法或理解本发明的本领域技术人员来使用或利用 (参见如 '429 专利说明书描述的肉加工、喷雾、浸泡和处理, 以及组合物和组分部分)。

**[0301] 实施例 49**

**[0302]** 也可配制本发明的组合物以用于或加入用于食品的材料 (如用于包衣或其它加入的材料) 中, 此产品包括但不限于小吃食物、谷类食物或其它食物组分, 如并入的美国专利 No. 7, 163, 708 所述的小吃和谷类食物和材料。不限于如何应用此材料, 本发明的一种或多种组合物可单独使用或与此类材料的一种或多种抗微生物或防腐组分结合使用, 如 '708 专利的食品和包衣材料的详述中所述。因此, 本领域技术人员明白, 此组合物可以本领域技术人员容易确定的量存在而无需过多实验。

**[0303] 实施例 50**

**[0304]** 可配制本发明的组合物以与各种可食用的涂抹料组合物一起加入, 此可食用的涂抹料组合物 (spread composition) 包括但不限于花生黄油组合物, 如并入的美国专利 No. 7, 498, 050 所述。例如, 本领域技术人员明白本发明的一种或多种组合物可与此可食用的涂抹料产品结合使用, 以提供或增强抗微生物效果, 如 '050 专利的实施例 1-2 所述, 此组合物可以本领域技术人员容易确定的量存在而无需过多实验。

**[0305] 实施例 51**

**[0306]** 可配制本发明的组合物以与多种不同的害虫控制组合物一起加入, 如并入的美国专利 No. 6, 720, 450 所述 (如其详细描述的第 2-3 节)。例如, 本发明的一种或多种组合物可单独配制使用或与其它抗害虫组分组合使用, 如 '450 专利所述。同样, 本发明的一种或多种组合物可按照本文所述与适合的载体组分进行配制, 以用于抗各种吸血昆虫, 包括但不限于各种蚊子和农作物的昆虫害虫。如本文所述, 本发明的组合物可直接接触、抑制和 / 或消除蚊子, 包括其卵、幼虫和 / 或成虫形式。或者, 本发明的组合物可用于和 / 或配制用于趋避 (repellent action)。然而, 此组合物可以本领域技术人员容易确定的量存在而无需过多实验, 且任选地包括表面活性剂组分。此类表面活性剂可为生物表面活性剂。此类生物表面活性剂可选自单鼠李糖脂、二鼠李糖脂及其组合, 但不限于此。

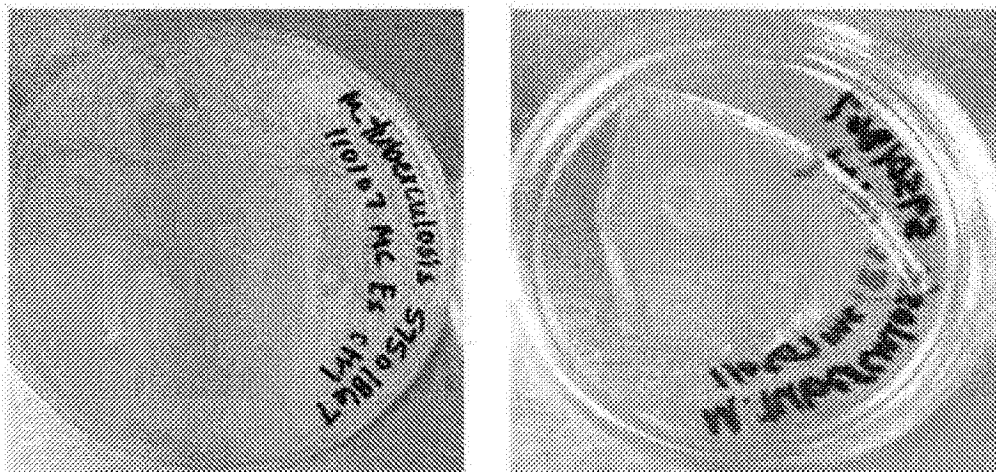


图 1

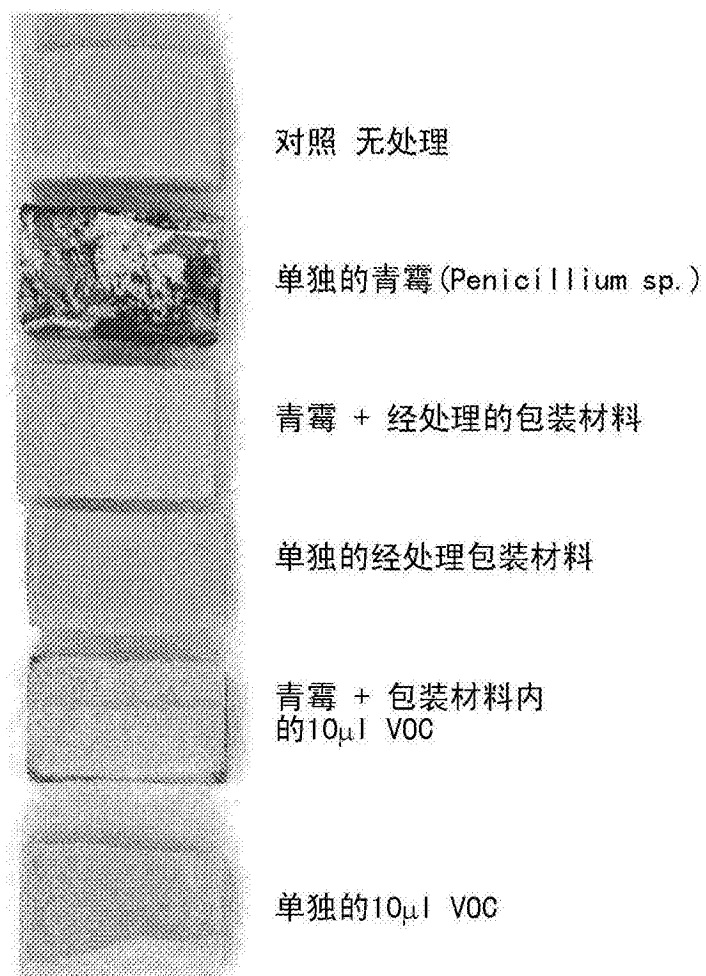


图 2

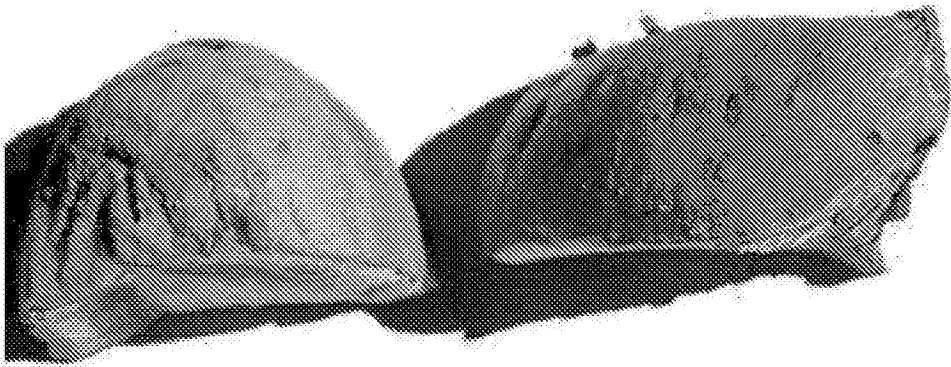


图 3



图 4

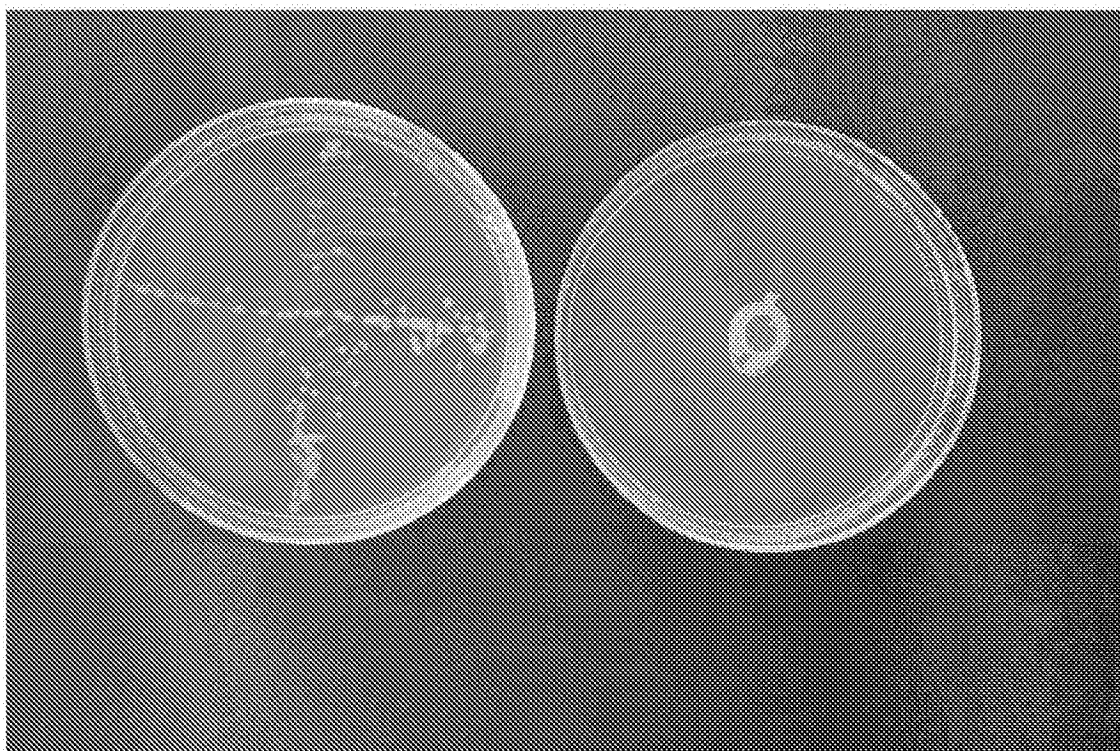


图 5

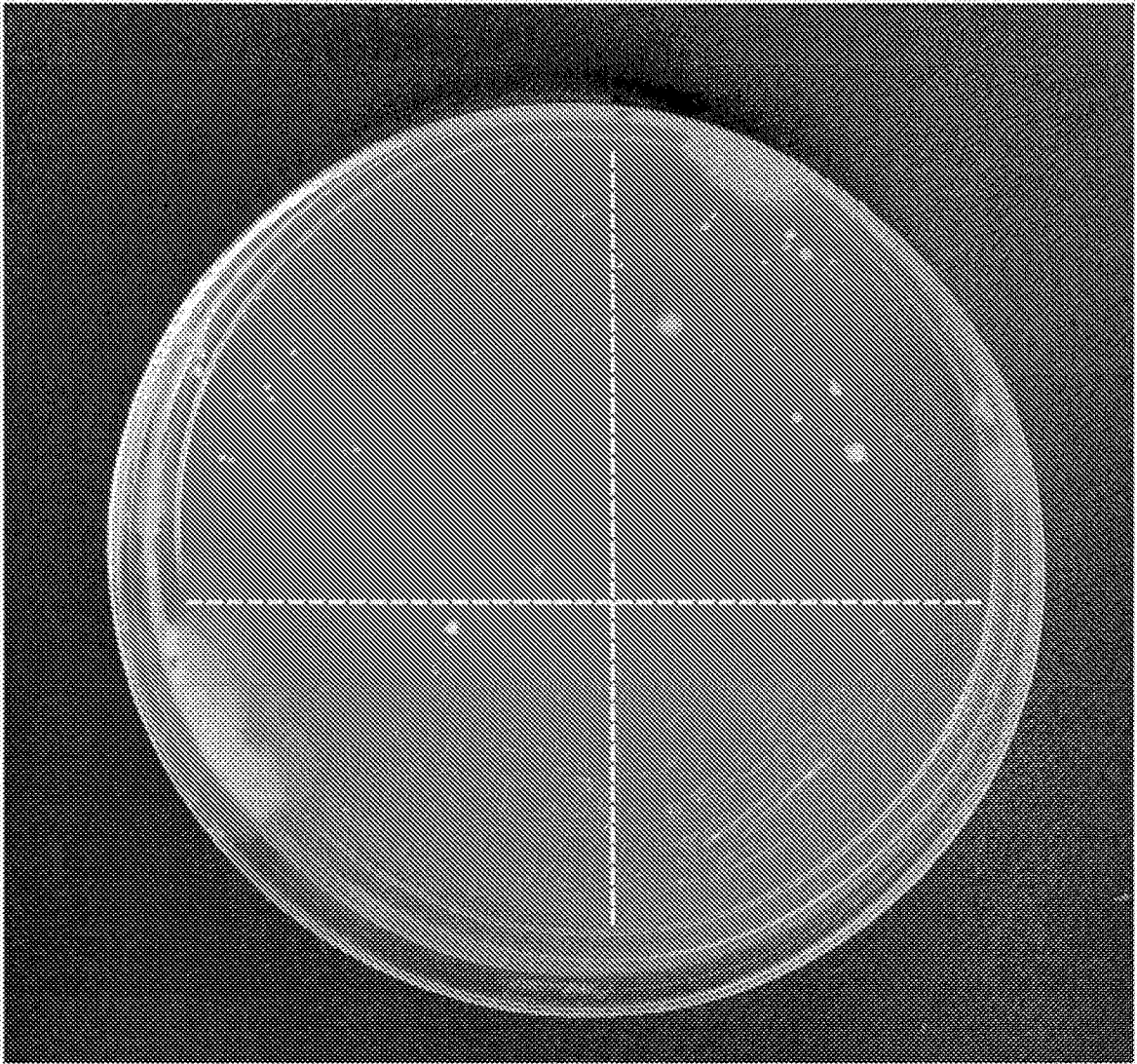


图 6

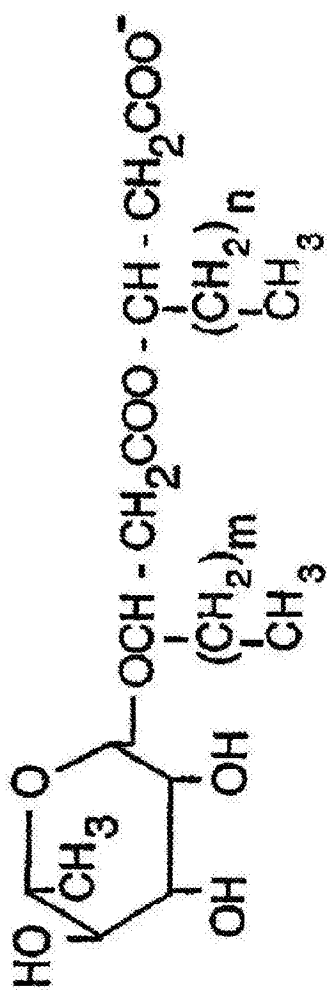


图 7A

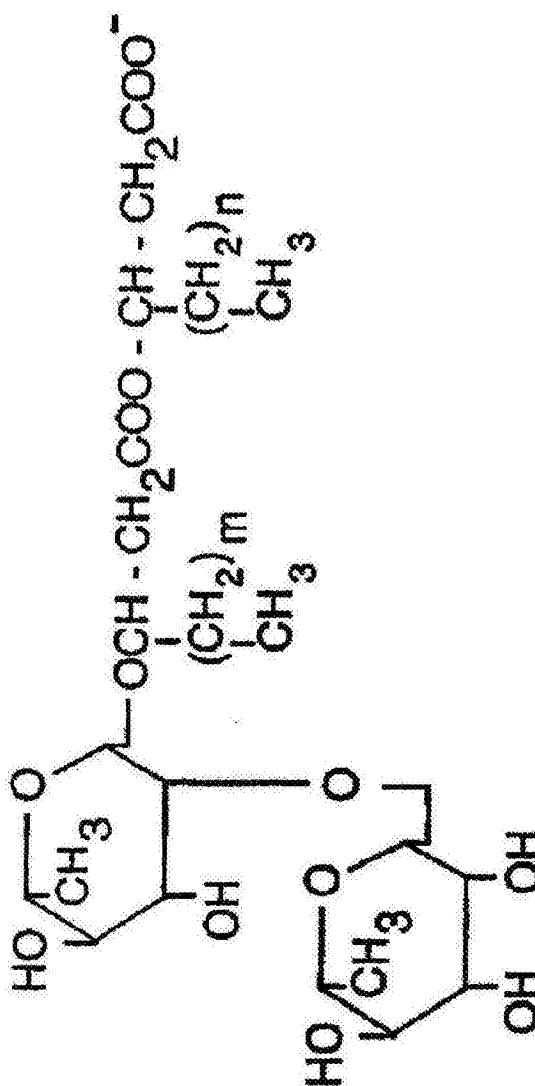
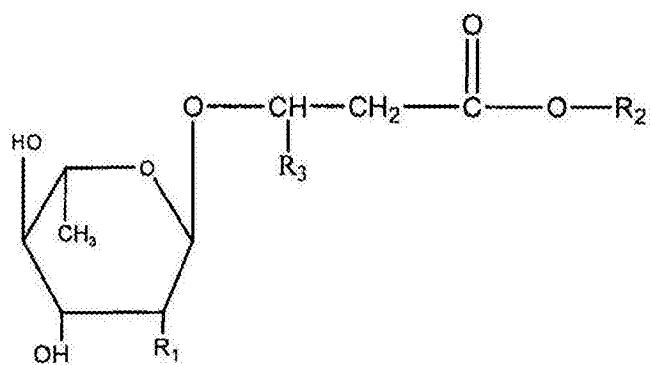


图 7B



$R_1 = \text{H, OH, } \alpha\text{-L-吡喃鼠李糖基}$

$R_2 = \text{H, } \begin{array}{c} \text{---CH---CH}_2\text{---COOH} \\ | \\ \text{R}_4 \end{array}$

$R_3 = (\text{C}_5\text{--C}_{20})\text{-饱和、单不饱和多不饱和烷基}$

$R_4 = (\text{C}_5\text{--C}_{20})\text{-饱和、单不饱和多不饱和烷基}$

图 8

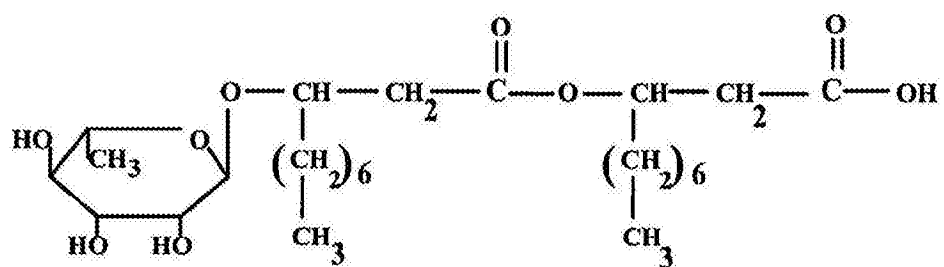
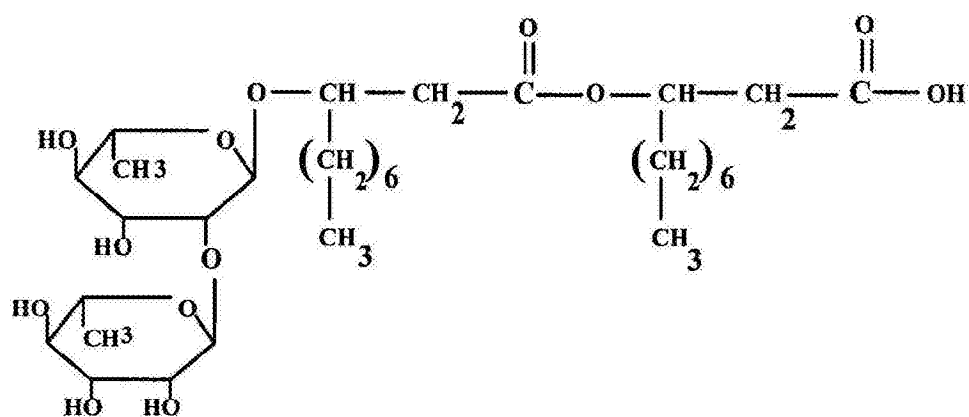
R1— $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖基- $\beta$ -羟癸酰基- $\beta$ -羟癸酸酯R2—2-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖基- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖基- $\beta$ -羟癸酰基- $\beta$ -羟癸酸酯

图 9

## **Abstract**

Antimicrobial compositions comprising one or more compound components generally recognized as safe for human consumption, and related methods of use, such compositions and methods as can be employed in a wide range of agricultural, industrial, building, pharmaceutical and/or personal care products and applications.