



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109642206 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201780053659.5

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司  
72003

(22)申请日 2017.09.05

代理人 于磊

(30)优先权数据

16187414.4 2016.09.06 EP

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/072249 2017.09.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/046500 EN 2018.03.15

(71)申请人 普拉克生化公司

地址 荷兰霍林赫姆

(72)发明人 R·奥托 A·M·拉米雷兹

J·埃尔德林克

权利要求书4页 说明书18页

(54)发明名称

发酵中抗感染的脂肪酸酯

(57)摘要

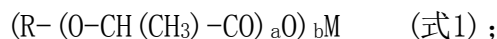
本发明涉及抗菌剂在培养革兰氏阴性细菌或霉菌或酵母中抑制革兰氏阳性污染细菌生长的用途。抗菌剂选自：i)根据通式 $(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$  (式1)的乳酸盐；根据通式 $CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$  (式2)的甘油酯；及其混合物。在所述通式中：R代表C4-C18酰基，该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链； $R_1$ 、 $R_2$ 和 $R_3$ 各自独立地选自H或C4-C18酰基，该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链，条件是 $R_1$ 、 $R_2$ 或 $R_3$ 中的至少一个是H，并且 $R_1$ 、 $R_2$ 或 $R_3$ 中的至少一个是酰基；M代表质子( $H^+$ )或选自Li、Na、K、Ca、Mg、Zn、Fe(II)、Cu、Mn、Ag、铵或具有一个或多个任选地被一个或多个羟基取代的(C1-4)烷基的取代铵的抗衡阳离子；a是1到3的整数；并且b是1或2，等于M的化合价。

1. 一种发酵培养基, 包含:  
用于微生物生长的底物; 和  
作为外源添加成分的抗微生物剂, 其选自:
  - i) 根据式1的乳酸盐,  
 $(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$  (式1);
  - ii) 根据式2的甘油酯,  
 $CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$  (式2); 和
  - iii) 这些化合物的混合物,其中:  
R代表C4-C18酰基, 该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链;  
R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>各自独立地代表H或C4-C18酰基, 该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链, 条件是R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>或R<sub>3</sub>中的至少一个是H, 并且R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>或R<sub>3</sub>中的至少一个是酰基;  
M代表质子(H<sup>+</sup>)或选自Li、Na、K、Ca、Mg、Zn、Fe(II)、Cu、Mn、Ag、铵或具有一个或多个任选地被一个或多个羟基取代的(C1-4)烷基的取代铵的抗衡阳离子;  
a是1到3的整数; 并且  
b是1或2, 等于M的化合价。
2. 根据权利要求1所述的发酵培养基, 还包含:  
接种物, 其包含革兰氏阴性细菌、霉菌或酵母的培养物。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的发酵培养基, 其中抗菌剂是根据式1的乳酸盐或其盐。
4. 根据权利要求3所述的发酵培养基, 其中R代表具有由4至18个碳原子组成的直链或支链的酰基。
5. 根据权利要求4所述的发酵培养基, 其中R代表具有由12至14个碳原子组成的直链或支链的酰基。
6. 根据权利要求5所述的发酵培养基, 其中式1中的“a”为1。
7. 根据权利要求1或权利要求2所述的发酵培养基, 其中抗菌剂是根据式2的甘油酯。
8. 根据权利要求7所述的发酵培养基, 其中R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中的一个或两个是具有8个碳原子的酰基, 并且其他是H。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的发酵培养基, 其中基于培养基的总重量, 抗菌剂的量为0.001至0.5重量%。
10. 根据权利要求9所述的发酵培养基, 其中基于培养基的总重量, 抗菌剂的量为0.025至0.5重量%。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的发酵培养基, 用于生产: 乙醇; 1,3-丙二醇; 甘油; 丁醇; 1,4-丁二醇; 阿拉伯糖醇; 木糖醇; 山梨醇; 甘露醇; 乙酸; 丙酸; 3-羟基丙酸; 乳酸; 琥珀酸; 2,5-呋喃二甲酸; 富马酸; 苹果酸; 己二酸; 柠檬酸; 乌头酸; 谷氨酸; 衣康酸; 乙酰丙酸; 戊二酸; 天冬氨酸; 丙二酸; 及其混合物。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的发酵培养基, 用于生产: 1,4-丁二醇; 丙酸; 3-羟基丙酸; 乳酸; 琥珀酸; 2,5-呋喃二甲酸; 富马酸; 苹果酸; 或衣康酸。
13. 一种用于发酵培养基的接种物, 其包含:

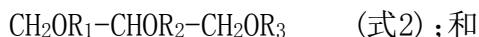
革兰氏阴性细菌、霉菌或酵母的培养物；和

抗菌剂，选自：

i) 根据式1的乳酸盐，



ii) 根据式2的甘油酯，



iii) 这些化合物的混合物，

其中：

R代表C4-C18酰基，该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链；

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>各自独立地代表H或C4-C18酰基，该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链，条件是R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>或R<sub>3</sub>中的至少一个是H，并且R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>或R<sub>3</sub>中的至少一个是酰基；

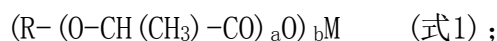
M代表质子(H<sup>+</sup>)或选自Li、Na、K、Ca、Mg、Zn、Fe(II)、Cu、Mn、Ag、铵或具有一个或多个任选地被一个或多个羟基取代的(C1-4)烷基的取代铵的抗衡阳离子；

a是1到3的整数；并且

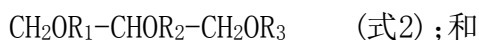
b是1或2，等于M的化合价。

14. 抗菌剂在培养革兰氏阴性细菌或霉菌或酵母中抑制革兰氏阳性污染细菌生长的用途，所述抗菌剂选自：

根据式1的乳酸盐，



根据式2的甘油酯，



这些化合物的混合物，

其中：

R代表C4-C18酰基，该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链；

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>各自独立地代表H或C4-C18酰基，该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链，条件是R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>或R<sub>3</sub>中的至少一个是H，并且R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>或R<sub>3</sub>中的至少一个是酰基；

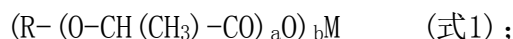
M代表质子(H<sup>+</sup>)或选自Li、Na、K、Ca、Mg、Zn、Fe(II)、Cu、Mn、Ag、铵或具有一个或多个任选地被一个或多个羟基取代的(C1-4)烷基的取代铵的抗衡阳离子；

a是1到3的整数；并且

b是1或2，等于M的化合价。

15. 一种用于防止或减少革兰氏阴性细菌的发酵罐培养物中由革兰氏阳性细菌引起的微生物感染的方法，所述方法包括向该培养物中加入有效量的抗微生物剂，该抗微生物剂选自：

根据式1的乳酸盐，



根据式2的甘油酯，



这些化合物的混合物，

其中：

R代表C4-C18酰基,该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链;

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>各自独立地代表H或C4-C18酰基,该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链,条件是R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>或R<sub>3</sub>中的至少一个是H,并且R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>或R<sub>3</sub>中的至少一个是酰基;

M代表质子(H<sup>+</sup>)或选自Li、Na、K、Ca、Mg、Zn、Fe(II)、Cu、Mn、Ag、铵或具有一个或多个任选地被一个或多个羟基取代的(C1-4)烷基的取代铵的抗衡阳离子;

a是1到3的整数;并且

b是1或2,等于M的化合价。

16.一种获得发酵产物的方法,所述方法包括以下步骤:

提供发酵培养基;和

向所述培养基中引入包含革兰氏阴性细菌、霉菌或酵母的培养物的接种物,

所述方法的特征在于所述发酵培养基包含:

用于微生物生长的底物;和

作为外源添加成分的抗菌剂,其选自:

i) 根据式1的乳酸盐,

$(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$  (式1);

ii) 根据式2的甘油酯,

$CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$  (式2);和

iii) 这些化合物的混合物,

其中:

R代表C4-C18酰基,该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链;

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>各自独立地代表H或C4-C18酰基,该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链,条件是R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>或R<sub>3</sub>中的至少一个是H,并且R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>或R<sub>3</sub>中的至少一个是酰基;

M代表质子(H<sup>+</sup>)或选自Li、Na、K、Ca、Mg、Zn、Fe(II)、Cu、Mn、Ag、铵或具有一个或多个任选地被一个或多个羟基取代的(C1-4)烷基的取代铵的抗衡阳离子;

a是1到3的整数;并且

b是1或2,等于M的化合价。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述接种物包含选自以下的革兰氏阴性细菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*);不动杆菌属(*Acinetobacter*);鲍特氏菌属(*Bordetella*);布鲁氏菌属(*Brucella*);弯曲杆菌属(*Campylobacter*);蓝细菌(*Cyanobacteria*);肠杆菌属(*Enterobacter*);欧文氏菌属(*Erwinia*);弗朗西斯菌属(*Franciscella*);螺杆菌属(*Helicobacter*);克雷伯氏菌属(*Klebsiella*);军团杆菌属(*Legionella*);莫拉氏菌属(*Moraxella*);奈瑟氏菌属(*Neisseria*);泛菌属(*Pantoea*);巴氏杆菌科(*Pasteurellaceae*);假单胞菌属(*Pseudomonas*);变形杆菌属(*Proteus*);沙门氏菌属(*Salmonella*);月牙单胞菌目(*Selenomonadales*);沙雷菌属(*Serratia*);志贺氏菌属(*Shigella*);密螺旋体属(*Treponema*);弧菌属(*Vibrio*);耶尔森氏菌属(*Yersinia*);发酵单胞菌属(*Zymomonas*);及其组合。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述接种物包含一种或多种选自以下的革兰氏阴性细菌:大肠杆菌;假单胞菌属物种;和巴氏杆菌科物种,特别是以下属的物种:放线杆菌属(*Actinobacillus*)、嗜血杆菌属(*Hemophilus*)和巴氏杆菌属(*Pasteurella*)。

19. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述接种物包含一种或多种选自曲霉属 (*Aspergillus*) 和根霉属 (*Rhizopus*) 的霉菌, 优选一种或多种选自米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、寡孢根霉 (*Rhizopus oligosporus*) 和米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 的霉菌。

20. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述接种物包含一种或多种选自以下属的酵母: 酒香酵母属 (*Brettanomyces*); 假丝酵母属 (*Candida*); 德克拉酵母属 (*Dekkera*); 毕赤酵母属 (*Pichia*); 和酵母属 (*Saccharomyces*)。

21. 根据权利要求16至20中任一项所述的方法, 用于获得选自以下的发酵产物: 乙醇; 1,3-丙二醇; 甘油; 丁醇; 1,4-丁二醇; 阿拉伯糖醇; 木糖醇; 山梨醇; 甘露醇; 乙酸; 丙酸; 3-羟基丙酸; 乳酸; 琥珀酸; 2,5-呋喃二甲酸; 富马酸; 苹果酸; 己二酸; 柠檬酸; 乌头酸; 谷氨酸; 衣康酸; 乙酰丙酸; 戊二酸; 天冬氨酸; 丙二酸; 及其混合物。

22. 根据权利要求16至21中任一项所述的方法, 用于获得选自以下的发酵产物: 丙酸; 乳酸; 琥珀酸; 1,4-丁二醇; 和2,5-呋喃二甲酸。

## 发酵中抗感染的脂肪酸酯

### 技术领域

[0001] 本发明涉及在培养革兰氏阴性细菌、霉菌和酵母中抑制革兰氏阳性细菌生长的方法。具体地,本发明涉及包含乳酸盐(lactylate)、甘油酯或其混合物的抗菌剂,以及这些抗菌剂在发酵罐培养物中的用途。

### 背景技术

[0002] 被其他微生物感染的危险是使用纯培养物的所有微生物过程中常见的问题之一。这种危险尤其适用于大型工业发酵过程,其中由于该过程的规模,与实验室发酵罐过程相比,被其他微生物污染的风险更大。

[0003] 在酵母发酵中,工作人员试图通过使用细菌控制剂来降低细菌污染的风险。这些剂包括例如(天然)抗生素和亚硫酸盐,其浓度不影响酵母的活力,但可防止污染细菌的生长。这些剂的细节公开在:Rückle et al.,Hop acids as natural anti-bacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production,International Sugar Journal 108:139-147(2006));和Limayem et al.,Alternative antimicrobial compounds to control potential Lactobacillus contamination in bioethanol fermentations,Journal of Environmental Science and Health,Part B46(8):709-714,(2011)。

[0004] 如今,经常使用基因修饰细菌作为许多发酵产物的生产菌株。一个实例是使用能够产生R-乳酸的大肠杆菌(*Escherichia coli*),如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)所述。尽管证明该生物在相对简单且便宜的化学成分确定的培养基上生长,但是反复观察到该生物的培养物很容易被感染。污染物似乎是孢子形成微生物或革兰氏阳性微生物。在革兰氏阳性污染细菌中还有致病细菌,例如:肠球菌属(*Enterococcus*)、梭菌属(*Clostridium*)、李斯特菌属(*Listeria*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、各种芽孢杆菌属(*Bacillus*)物种和链球菌属(*Streptococcus*)。污染物是不期望的,因为它们会严重损害乳酸的光学纯度,并且它们可以产生其他发酵产物,从而降低发酵产率。因此有充分理由抑制这些微生物的生长。

[0005] 本发明的一个目的是稳定生产过程,特别是目标发酵产物的产率。

[0006] 现已发现,当培养革兰氏阴性细菌或霉菌和酵母时,添加中链脂肪酸的乳酸盐和/或甘油酯特异性地抑制革兰氏阳性细菌的生长。在加入有效量的乳酸盐、甘油酯或其混合物后,生产者微生物在发酵罐中继续生长,但是革兰氏阳性污染细菌的生长被阻止或抑制。这确保了发酵过程不会受到不期望的微生物的生长、不期望的副产物和能源的低效使用的干扰。它还减少了所需的细菌污染控制剂如抗生素的添加量。

[0007] 乳酸盐是指具有来自与一个(单乳酸盐)或几个乳酸分子(二乳酸盐等)连接的脂肪酸的酰基和与末端羧酸酯连接的质子(H<sup>+</sup>)或另一阳离子的化合物。脂肪酸部分通常由与末端羧基连接的烃链组成。烃链可含有不同数量的碳原子,并且碳原子之间的键可以是饱

和的或不饱和的。

[0008] 乳酸盐是已知的表面活性剂。这些表面活性剂通过使R-乳酸或S-乳酸或这两者的任何混合物与脂肪酸反应并同时用碱中和而制备。乳酸盐在食品工业中是公知的,并且用于个人护理应用中以改善皮肤感觉、皮肤柔软性和保湿,并且在产品应用后降低湿润至干燥过渡期间的粘性。已知某些乳酸盐具有抗微生物特性。US2007/010856 (Cohen et al.) 描述了尤其用乳酸盐作为抗微生物化合物处理的缝合线。US2006/062832 (Lopes) 描述了一种擦拭物组合物,其包含乳酸盐作为抗微生物化合物。W02004/037177 (Eveready Battery Inc.) 描述了一种抗菌剃须泡沫或凝胶制剂,其含有乳酸盐作为抗微生物化合物。

[0009] W001/06877 (Rhodia) 描述了乳酸盐和酒花酸(hop acid)的组合在食品中的用途;酒花酸具有抗革兰氏阳性细菌的活性,并且乳酸盐被提出为非常广泛的食物级乳化剂中的一种可能的辅助成分(第6页)。没有举例说明乳酸盐的具体用途,并且在该参考文献中没有认识到乳酸盐单独具有抗革兰氏阳性细菌的活性的事实。

[0010] 应注意,W0 2004/107877 (Purac Biochem BV) 描述了包含乳酸或其衍生物和无机酸的混合物的抗微生物组合物。该组合物在大体上被描述为抗微生物剂。具体指出了抗沙门氏菌(Salmonella)和大肠杆菌的用途。尽管提及乳酸盐作为可能的乳酸衍生物,但并未进一步阐明其用途。该参考文献中没有教导或暗示与革兰氏阴性细菌相比,乳酸盐对革兰氏阳性细菌的具体功效。

## 发明内容

[0011] 根据本发明的第一方面,提供了一种发酵培养基,包含:

[0012] 用于微生物生长的底物;和,

[0013] 作为外源添加成分的抗菌剂,其选自:

[0014] i) 根据式1的乳酸盐(lactylate),

[0015]  $(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$  (式1);

[0016] ii) 根据式2的甘油酯,

[0017]  $CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$  (式2);和

[0018] iii) 这些化合物的混合物,

[0019] 其中:

[0020] R代表C4-C18酰基,该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链;

[0021]  $R_1$ 、 $R_2$ 和 $R_3$ 各自独立地代表H或C4-C18酰基,该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链,条件是 $R_1$ 、 $R_2$ 或 $R_3$ 中的至少一个是H,并且 $R_1$ 、 $R_2$ 或 $R_3$ 中的至少一个是酰基;

[0022] M代表质子( $H^+$ )或选自Li、Na、K、Ca、Mg、Zn、Fe(II)、Cu、Mn、Ag、铵或具有一个或多个任选地被一个或多个羟基取代的(C1-4)烷基的取代铵的抗衡阳离子;

[0023] a是1到3的整数;并且

[0024] b是1或2,等于M的化合价。

[0025] 为了完整起见,本文所用的术语“这些化合物的混合物”表示抗菌剂可以含有:两种或更多种符合式1的化合物;两种或更多种符合式2的化合物;或,如式1和式2中所定义的化合物的混合物。

[0026] 发酵培养基可以包含基于培养基的总重量,0.001至0.5重量%、优选0.025至0.5

重量%的抗菌剂。在另一种表达中,发酵培养基可以包含浓度为0.1至1000mg/L、优选0.5至500mg/L、更优选1至100mg/L发酵培养基的抗菌剂。

[0027] 发酵培养基可以进一步包含接种物,其包括革兰氏阴性细菌、霉菌或酵母的培养物。在形成这样的培养基时,可以在该革兰氏阴性细菌、霉菌或酵母的培养物之前、之后或与之一起将抗菌剂加入培养基中。这些添加方式不是相互排斥的,本发明并不排除在多于一个发酵阶段添加抗菌剂。

[0028] 然而,在一个优选的实施方案中,发酵培养基通过以下获得:在用发酵微生物接种发酵培养基之前,使用于微生物生长的底物与所述抗菌剂接触1分钟至48小时,优选1至24小时。

[0029] 在一个替代或另外的实施方案中,发酵培养基可以通过以下获得:将所述抗菌剂添加到再循环的水性工艺流中,所述再循环的水性工艺流是来自于发酵产物但尤其是为了水平衡而作为输入再循环到发酵培养基中的流。

[0030] 根据本发明的第二方面,提供了一种用于发酵培养基的接种物,其包含:

[0031] 革兰氏阴性细菌、霉菌或酵母的培养物;和

[0032] 抗菌剂,选自:

[0033] i) 根据式1的乳酸盐,

[0034]  $(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$  (式1);

[0035] ii) 根据式2的甘油酯,

[0036]  $CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$  (式2);和

[0037] iii) 这些化合物的混合物,

[0038] 其中:

[0039] R代表C4-C18酰基,该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链;

[0040]  $R_1$ 、 $R_2$ 和 $R_3$ 各自独立地代表H或C4-C18酰基,该酰基具有可以是支链或非支链的烷基或烯基链,条件是 $R_1$ 、 $R_2$ 或 $R_3$ 中的至少一个是H,并且 $R_1$ 、 $R_2$ 或 $R_3$ 中的至少一个是酰基;

[0041] M代表质子( $H^+$ )或选自Li、Na、K、Ca、Mg、Zn、Fe(II)、Cu、Mn、Ag、铵或具有一个或多个任选地被一个或多个羟基取代的(C1-4)烷基的取代铵的抗衡阳离子;

[0042] a是1到3的整数;并且

[0043] b是1或2,等于M的化合价。

[0044] 本发明的该第二方面防止了接种物被革兰氏阳性细菌污染。在接种发酵培养基后,抗菌剂分散在该培养基中,在此它可以继续抑制或阻止可能作为培养基污染物引入的革兰氏阳性细菌的生长。

[0045] 本发明还提供抗菌剂在培养革兰氏阴性细菌、霉菌或酵母中抑制革兰氏阳性污染细菌生长的用途,所述抗菌剂选自:如上所定义的根据式1的乳酸盐;如上所定义的根据式2的甘油酯;或这些化合物的混合物。

[0046] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于防止或减少革兰氏阴性细菌的发酵罐培养物中由革兰氏阳性细菌引起的微生物感染的方法,所述方法包括向培养物中加入有效量的抗微生物剂,该抗微生物剂选自:如上所定义的根据式1的乳酸盐;如上所定义的根据式2的甘油酯;和这些化合物的混合物。

[0047] 并且,根据本发明的最后一个方面,提供了一种获得发酵产物的方法,所述方法在



所附权利要求中限定,并且包括以下步骤:提供发酵培养基;以及,向所述培养基中引入包含革兰氏阴性细菌、霉菌或酵母的培养物的接种物。

[0048] 定义

[0049] 本文所用的术语“包含”将被理解为表示其后列出的是非穷尽的,并且可以包括或可以不包括任何其他合适的项目,例如适当时一个或多个其他特征、组分、成分和/或取代基。

[0050] “抗菌”活性或“抗菌”剂在本文中是指能够杀死细菌和/或抑制细菌生长的活性或物质。

[0051] 术语“微生物生长”在本文中根据其标准含义使用:因此,“微生物生长”是指微生物细胞(包括细菌、霉菌、真菌和藻类)的数量和/或代谢活性的增加。

[0052] 本文所用的术语“发酵培养基”是指保留在发酵容器内的三相(固-液-气)系统。液相含有水、溶解的营养物、溶解的用于微生物生长的底物和溶解的代谢物;水的来源不受限制,并且具体包括工艺用水,例如涡流和/或稀釜馏物、洗涤水、蒸发器冷凝液或馏出液、来自蒸馏的侧流汽提器水或其他发酵产物工厂工艺用水。固相包含个体细胞、沉淀、用于微生物生长的不溶性底物和沉淀的代谢产物。

[0053] 在微生物生长的背景下,术语“底物”是指通过酶的作用转化或意图转化为另一种化合物的任何物质或化合物。术语“底物”旨在不仅包括提供适合用作起始材料的碳源的化合物,例如任何生物质衍生的碳水化合物,还包括在与微生物相关的代谢途径中使用的中间代谢物。发酵培养基通常可以包含一种或多种可发酵的碳水化合物(例如糖)作为底物。

[0054] 在发酵过程之前或同时,可以通过研磨、液化、糖化等处理发酵培养基,包括本发明发酵过程中使用的发酵底物和其他原料。因此,发酵培养基可以指添加发酵微生物之前的培养基(例如液化和/或糖化中的培养基或来自液化和/或糖化的培养基),以及包含发酵生物的培养基,例如同步糖化和发酵(SSF)或一步发酵过程中使用的培养基。为了完整起见,在上述的其中在接种微生物之前将抗菌剂加入发酵培养基的实施方案中,这包括在液化和/或糖化过程中加入所述剂。

[0055] 本文所用的术语“发酵容器”是指在其中进行发酵反应的容器。术语“发酵罐”可与发酵容器互换使用。

[0056] 本文所用的“接种物”是指复杂微生物群落的原始来源,其旨在被添加到发酵容器中但不限制微生物群落的最终组成;最终组成由发酵容器的操作条件和生产能力决定。通常通过在合适的繁殖槽中繁殖期望的微生物来形成接种物,该槽比发酵容器小得多。

[0057] 接种物通常包括微生物的一种或多种“生产菌株”的培养物,其可以通过自然选择或通过生物技术手段进行调整以生产目标发酵产物。示例性但非限制性的接种物含有用于生产乙醇的酵母酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的培养物。

[0058] 术语“培养”以本领域已知的方式使用,以表示微生物(特别是生产菌株)在有助于其生长的预定培养基中的繁殖。本文所用的术语“发酵罐培养”是指存在于所述发酵培养基内或适合于所述发酵培养基的接种物内的微生物的一种或多种生产菌株的繁殖。

[0059] 无意限制可以在本发明中培养和利用的作为生产菌株的革兰氏阴性细菌。示例性但非限制性革兰氏阴性细菌包括:大肠杆菌(*Escherichia coli*);不动杆菌属(*Acinetobacter*);鲍特氏菌属(*Bordetella*);布鲁氏菌属(*Brucella*);弯曲杆菌属

(*Campylobacter*) ; 蓝细菌 (*Cyanobacteria*) ; 肠杆菌属 (*Enterobacter*) ; 欧文氏菌属 (*Erwinia*) ; 弗朗西斯菌属 (*Franciscella*) ; 螺杆菌属 (*Helicobacter*) ; 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) ; 军团杆菌属 (*Legionella*) ; 莫拉氏菌属 (*Moraxella*) ; 奈瑟氏菌属 (*Neisseria*) ; 泛菌属 (*Pantoea*) ; 巴氏杆菌科 (*Pasteurellaceae*) , 特别是放线杆菌属 (*Actinobacillus*) 、嗜血杆菌属 (*Hemophilus*) 和巴氏杆菌属 (*Pasteurella*) 的细菌 ; 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) ; 变形杆菌属 (*Proteus*) ; 沙门氏菌属 (*Salmonella*) ; 月牙单胞菌目 (*Selenomonadales*) , 特别是丙酸螺菌属 (*Propionispira*) 、*Propionispora* 属和施瓦茨氏菌属 (*Schwartzia*) 的细菌 ; 沙雷菌属 (*Serratia*) ; 志贺氏菌属 (*Shigella*) ; 密螺旋体属 (*Treponema*) ; 弧菌属 (*Vibrio*) ; 耶尔森氏菌属 (*Yersinia*) ; 和发酵单胞菌属 (*Zymomonas*) 。在一个令人感兴趣的实施方案中, 发酵罐培养物或发酵培养基包含一种或多种选自以下的革兰氏阴性细菌 : 大肠杆菌 ; 假单胞菌属物种 ; 和巴氏杆菌科物种。

[0060] 可以提到的示例性霉菌是以下属的霉菌 : 曲霉属 (*Aspergillus*) , 特别是米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 、土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ; 根霉属 (*Rhizopus*) , 例如寡孢根霉 (*Rhizopus oligosporus*) 和米根霉 (*Rhizopus oryzae*) ; 镰刀菌属 (*Fusarium*) , 如尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) ; 毛霉属 (*Mucor*) , 如总状毛霉 (*Mucor racemosus*) ; 枝孢菌属 (*Cladosporium*) , 如多主枝孢 (*Cladosporium herbarum*) ; 青霉属 (*Penicillium*) , 如扩展青霉 (*Penicillium expansum*) ; 以及, 木霉属 (*Trichoderma*) , 如哈茨木霉 (*Trichoderma harzanium*) 。

[0061] 可用于本发明的酵母属的非限制性实例包括 : 酒香酵母属 (*Brettanomyces*) ; 假丝酵母属 (*Candida*) ; 德克拉酵母属 (*Dekkera*) ; 毕赤酵母属 (*Pichia*) ; 和酵母属 (*Saccharomyces*) 。

[0062] 特定微生物可以发酵的碳水化合物是本领域技术人员公知的, 或者在公开的背景文献中容易获得的。为了完整起见, 产乳酸的微生物可发酵的常见碳水化合物包括但不限于 :  $C_5$  糖, 如阿拉伯糖、木糖和核糖 ;  $C_6$  糖, 如葡萄糖、果糖、半乳糖、鼠李糖和甘露糖 ; 和  $C_{12}$  糖, 如蔗糖、麦芽糖和异麦芽糖。

[0063] 可发酵碳水化合物主要源自淀粉基或糖基原料。原料的实例包括但不限于 : 玉米、小麦、黑小麦、大麦、木薯、黑麦、由上述原料制成的分级淀粉流、甘蔗、甜菜、糖蜜、稻草、马铃薯废料、木材废料、柳枝稷、松树和其他木材衍生物、城市废物、食物废物和饮料 (酒精和非酒精) 工业废物。用于由酿酒酵母发酵的示例性但非限制性的原料是糖蜜。需要时, 生物质中的可发酵碳水化合物的含量可通过本领域已知的方法测定。一个具体指导性公开物是 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。

[0064] 作为可以由革兰氏阴性细菌、霉菌和酵母 (例如上述微生物) 产生的发酵产物的示例性但非限制性的列表, 可以提及 : 乙醇 ; 1,3-丙二醇 ; 甘油 ; 丁醇 ; 1,4-丁二醇 ; 阿拉伯糖醇 ; 木糖醇 ; 山梨醇 ; 甘露醇 ; 乙偶姻 ; 乙酸 ; 丙酸 ; 3-羟基丙酸 ; 乳酸 ; 琥珀酸 ; 呋喃二甲酸 ; 富马酸 ; 苹果酸 ; 己二酸 ; 柠檬酸 ; 乌头酸 ; 谷氨酸 ; 衣康酸 ; 乙酰丙酸 ; 戊二酸 ; 天冬氨酸 ; 丙二酸 ; 甘氨酸 ; 丝氨酸 ; 苏氨酸 ; 赖氨酸 ; 异戊二烯 ; 和聚羟基丁酸酯。在一个实施方案中, 包含如在本发明中定义的抗菌剂的发酵培养基可以用于生产 : 乙醇 ; 1,3-丙二醇 ; 甘油 ; 丁醇 ; 1,

4-丁二醇;阿拉伯糖醇;木糖醇;山梨醇;甘露醇;乙酸;丙酸;3-羟基丙酸;乳酸;琥珀酸;2,5-呋喃二甲酸;富马酸;苹果酸;己二酸;柠檬酸;乌头酸;谷氨酸;衣康酸;乙酰丙酸;戊二酸;天冬氨酸;丙二酸;及其混合物。

[0065] 在已将抗菌剂加入用于生产以下产物的发酵培养基中的情况下,已经获得了良好的结果:1,4-丁二醇;丙酸;3-羟基丙酸;乳酸;琥珀酸;2,5-呋喃二甲酸;富马酸;苹果酸;或衣康酸。并且最优选在用于生产以下产物的发酵培养基中使用所述抗菌剂:丙酸;乳酸;琥珀酸;1,4-丁二醇;或2,5-呋喃二甲酸。为了完整起见,在获得作为发酵产物的乳酸的情况下,本发明还包括:使该乳酸二聚化以获得丙交酯;通过该乳酸的缩聚合成聚乳酸;和通过由该乳酸得到的丙交酯的聚合合成聚乳酸。

[0066] 应当认识到,本文提到的并且通过用合适的微生物发酵可发酵底物可获得的期望发酵产物将作为组合物的组分生产,该组合物通常还包含:痕量的可发酵底物;微生物产生的其他物质;以及痕量的微生物本身,如细胞碎片和/或细胞组分。术语“发酵产物”旨在包括粗产物和其经过澄清、纯化和/或浓缩后的产物。示例性但非限制性的纯化方法包括以下的一种或多种:过滤,包括微滤和超滤;蒸馏;(重)结晶;萃取;化学处理,如酸化;离子交换;活性炭处理;和电渗析。

[0067] 如本领域所知,革兰氏阳性细菌通过革兰氏染色染成深蓝色或紫色,这主要是由于其细胞壁中有大量的肽聚糖。本发明涉及抑制或防止此类细菌在发酵罐培养物中的生长。本发明特别涉及抑制或防止革兰氏阳性细菌的生长,所述革兰氏阳性细菌包括:肠球菌(*Enterococci*);梭菌属,特别是产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)和巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*);李斯特菌属,特别是产单核细胞李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和无害李斯特菌(*Listeria innocua*);葡萄球菌属,特别是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*);各种芽孢杆菌属物种,特别是炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);和链球菌属。

[0068] 如本文所用,术语“酰基”是指衍生自从羧酸除去羟基并且具有式 $R_xCO-$ 的官能团,其中 $R_x$ 是通过单键与CO基团连接的烷基或烯基。在烯基中可以存在一个或多个不饱和键。因此,酰基链中的碳原子总数是 $R_x$ 链中的碳原子数+1。术语(C4-C18)酰基是指具有4-18个碳原子的酰基。

[0069] 如本文所用,仅带有一个C4-C18酰基侧链的甘油酯被称为(C4-C18)甘油单酯,带有两个C4-C18酰基的甘油酯称为(C4-C18)甘油二酯。所述酯的混合物可称为(C4-C18)甘油单/二酯((C4-C18) glycerol mono/di-ester)或(C4-C18)甘油单/二酯((C4-C18) glycerol mono/di)。

[0070] 示例性酰基包括:C6酰基,如异己酰基;C8酰基,如异辛酰基;C10酰基,如癸酰基;C12酰基,如月桂基(十二烷酰基);C14酰基,如肉豆蔻基(十四烷酰基);C16酰基,如鲸蜡基和棕榈基(十六酰基);和C18酰基,如十八烷酰基。

[0071] 发明详述

[0072] 宽泛地说,通过向培养基中加入上文式1和式2中定义的化合物中的一种或多种,这些化合物被用于在培养革兰氏阴性细菌、霉菌或酵母中抑制革兰氏阳性污染细菌的生长。在抑制革兰氏阳性污染细菌的生长中,可以改善期望发酵产品的生产。

[0073] 本发明不排除添加两种或更多种符合式1的化合物或两种或更多种符合式2的化合物作为抗菌剂。此外,还可以使用如式1和式2中所定义的化合物的混合物。

[0074] 施用于发酵培养基、接种物或发酵罐培养物的抗菌剂的总量使得其有效抑制、防止或减少由革兰氏阳性细菌引起的污染。抗菌剂的精确量取决于许多因素,例如所用的特定试剂、培养的生产菌株、培养基的类型和能量来源。然而,在大多数实施方案中,发酵培养基或其他培养基将含有基于培养基的总重量,0.001至0.5重量%、优选0.025至0.5重量%、更优选0.1至0.5重量%的所定义的抗菌剂。

[0075] 除了上述基于乳酸盐和/或甘油酯的抗菌剂之外,发酵培养基还可包含至少一种辅助抗微生物成分,其具有抗革兰氏阳性细菌的功效,但基本上不影响革兰氏阴性细菌。这些辅助成分可以作为外源成分直接添加到发酵培养基中。另外或可替代地,辅助成分可以包含在用于发酵培养基的接种物中。

[0076] 在一个实施方案中,发酵培养基、接种物或发酵罐培养物可包含基于培养基的总重量,多达1重量%的辅助抗微生物剂,其选自:溶菌酶;乳酸链球菌素;片球菌素; $\epsilon$ -聚赖氨酸;鱼精蛋白(Protamin);酒花- $\beta$ -酸;松香酸;庚二酸;苯甲酸;对羟基苯甲酸;水杨酸;肉桂酸;柠檬酸;链长为8-16个碳原子的饱和脂肪酸;链长为8-16个碳原子的饱和脂肪酸的糖酯;及其混合物。在另一种表达中,发酵培养基可包含多达2000mg/L的所述辅助抗微生物剂。

[0077] 式1

[0078] 本发明中使用的乳酸盐具有下述式1的结构:  $(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$  (式1);

[0079] R代表C4-C18酰基,优选C8-C14酰基,更优选C10-C14酰基,最优选C12-C14酰基。

[0080] M代表质子( $H^+$ )或选自Li、Na、K、Ca、Mg、Zn、Fe(II)、Cu、Mn、Ag、铵或具有一个或多个任选地被一个或多个羟基取代的(C1-4)烷基的取代铵的抗衡阳离子。优选地,M选自Na、K、Ca和Mg。更优选地,M是Na。

[0081] 基团  $(O-CH(CH_3)-CO)O$  代表从R-或S-乳酸衍生的R或S构型的乳酰基(如在1979年版的IUPAC有机化学命名法中的E部分中所定义的)。该基团也可能代表这些立体异构构型的混合物。

[0082] b的值等于M的化合价。如果M是质子( $H^+$ )或一价阳离子,如Na、K、Ag、铵( $NH_4$ )或取代铵,则“b”的值因此为1。如果M是二价阳离子,如Ca、Mg、Zn、Mn、Fe(II)或Cu,则“b”的值为2。

[0083] “a”的值可以是1至3,优选1。其中“a”为1的乳酸盐被称为单乳酸盐;“a”为2的化合物被称为二乳酸盐;“a”为3的化合物被称为三乳酸盐。对于在本文中使用,单乳酸盐( $a=1$ )是优选的。然而,应注意,当抗微生物剂中包括单乳酸盐时,这并不排除其中存在痕量的二乳酸盐和三乳酸盐;在合成单乳酸盐的过程中可以产生更高阶的物质。

[0084] 在本发明中可用作抗菌剂的式1的示例性乳酸盐包括但不限于:十二烷酰基-乳酸盐(C12-乳酸盐);十四烷酰基-乳酸盐(C14-乳酸盐);十六烷酰基-乳酸盐(C16-乳酸盐);十八烷酰基乳酸盐(C18:0-乳酸盐)和十八碳-9-烯酰基-乳酸盐(C18:1-乳酸盐)。

[0085] 这些乳酸盐的合成方法是本领域已知的。可以提及:美国专利号3,883,669(Tsen et al.);美国专利号4,146,548(Forsythe);Elliger, A convenient preparation of pure stearyl-2-lactylic acid, Journal of Agricultural and Food Chemistry 27: 527 (1979); 和W02012/036693(Caravan Ingredients Inc.)。此外,在这些合成方法中获得

的粗乳酸盐可以通过常规方法纯化,包括但不限于:过滤;离心;蒸馏;结晶;萃取;和色谱法。

[0086] 式2

[0087] 适合用作本发明的抗菌剂的甘油酯在式2中定义:  $\text{CH}_2\text{OR}_1-\text{CHOR}_2-\text{CH}_2\text{OR}_3$  (式2)

[0088]  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 和 $\text{R}_3$ 各自独立地表示H或C4-C18酰基,条件是 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 或 $\text{R}_3$ 中的至少一个是H,并且 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 或 $\text{R}_3$ 中的至少一个是酰基。

[0089] 在第一个实施方案中, $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 或 $\text{R}_3$ 中的一个或两个是C6-C14酰基,其余的 $\text{R}_n$ 基团是H。优选地, $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 和 $\text{R}_3$ 中的一个或两个是C8酰基,并且其余的 $\text{R}_n$ 基团是H。

[0090] 应注意,本发明不排除在抗菌剂内使用甘油单酯和二酯的混合物。例如,使用(C8)甘油单/二酯获得了良好的结果。

[0091] 这些单酯和二酯的合成方法是本领域已知的。例如,甘油的C4-C18酯的商业合成通常通过两种不同的途径进行:由均相酸如硫酸或磷酸催化,使脂肪酸与甘油直接酯化(甘油解);或者,通过碱性氢氧化物(如NaOH、KOH或 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )和低分子量醇(如甲醇)的钠盐催化,使甘油三酯和多元醇发生酯交换反应。还可以参考: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)。此外,在这些合成方法中获得的粗甘油酯可以通过常规方法纯化,包括但不限于:过滤;离心;蒸馏;结晶;萃取;和色谱法。

[0092] 通过以下实施例进一步说明本发明,这些实施例显示了本发明的发明优点,但本发明不限于此或由此限制本发明。

## 实施例

[0093] AMCET 200C: C8-甘油单酯和二酯混合物,购自Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.。

[0094] AMCET 3400E: 癸酰基-乳酸盐(C10-乳酸盐)和十二烷酰基-乳酸盐(C12-乳酸盐)的混合物,购自Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.。

[0095] AMCET 4530E: 十二烷酰基-乳酸盐(C12-乳酸盐)和十四烷酰基-乳酸盐(C14-乳酸盐)的混合物,购自Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.。

[0096] ATCC: 美国标准培养物保藏中心(American Type Culture Collection), Manassas, Virginia, U.S.A.。

[0097] Bioscreen C: 可从Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsinki, 芬兰获得的培养系统。Bioscreen C通过垂直光度测定法在多达200个孔中同时动态测量浊度(生长)的发展。

[0098] EMPLEx: C18-乳酸盐,购自Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.。

[0099] MIC: 在光密度测试中测量的最小抑制浓度是培养物吸光度增加不超过阈值的最低浓度,其定义为空白吸光度值的平均增加加上标准偏差的三倍。

[0100] Olacta: 十八碳烯酰基-乳酸盐(C18:1-乳酸盐) 购自Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.。

[0101] Pationic122A:两种乳酸盐具体是癸酰基乳酰乳酸钠(sodium decanoyl lactylate)(己酰基乳酰乳酸钠(sodium caproyl lactylate))和十二烷酰基乳酰乳酸钠(sodium dodecanoyl lactylate)(月桂酰基乳酰乳酸钠(sodium lauroyl lactylate))以1.3:1的摩尔比的混合物,购自Corbion Caravan,Lenexa,Kansas,U.S.A.。

[0102] 实施例1:十四烷酰基-乳酸盐(C14-乳酸盐)对大肠杆菌和巴氏梭菌的混合培养物的影响

[0103] 为了确定十四烷酰基-乳酸盐(C14-乳酸盐)是否可以防止巴氏梭菌JEG2(NCCB 100154,NCCB:荷兰细菌保藏中心(Netherlands Culture Collection of Bacteria),Utrecht,荷兰)在生物工程化的产同型乳酸R-乳酸大肠杆菌TG128(NRRL B-30962,NRRL:国家农业应用研究中心农业研究菌种保藏中心(Agricultural Research Service Culture Collection,National Center for Agricultural Utilization Research),Peoria,Illinois,U.S.A.)的培养物中生长,设置了三种不同的发酵,并同时进行。这些发酵是:

[0104] i) 发酵罐1:大肠杆菌TG128纯培养物发酵;

[0105] ii) 发酵罐2:大肠杆菌TG128与巴氏梭菌JEG2混合;

[0106] iii) 发酵罐3:大肠杆菌TG128与巴氏梭菌JEG2混合,并添加0.05% (w/v) 十四烷酰基-乳酸盐(C14-乳酸盐:Corbion Caravan,Lenexa,Kansas,U.S.A.)。

[0107] 所有三种发酵均在无菌7升发酵罐中进行。发酵罐1、2和3接受3.5L无菌生长培养基,其组成如下:3.25L去离子水、385g葡萄糖一水合物、12.25g磷酸二铵、17.75g磷酸氢二钾、12.25g磷酸二氢钾、3.5ml的1M甜菜碱-盐酸盐溶液、5.25ml的1M  $\text{MgSO}_4$  (硫酸镁) 溶液、3.5ml的1M  $\text{CaCl}_2$  (氯化钙) 溶液和5.25ml的微量元素溶液。微量元素溶液每升含有:1.6g  $\text{FeCl}_3$  (氯化铁(III))、0.2g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (氯化钴)、0.1g  $\text{CuCl}_2$  (氯化铜)、0.2g  $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (氯化锌)、0.2g  $\text{NaMoO}_4$  (钼酸钠)、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  (硼酸) 和10ml 37% (w/w)  $\text{HCl}$  (盐酸)。发酵罐3接受0.05% (w/v) 十四烷酰基-乳酸盐(C14-乳酸盐)。

[0108] 所有三个发酵罐都配有pH探针。通过加入 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 在去离子水中的浆液将发酵的pH值控制在6.5。 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 浆液的浓度为约220g/l。发酵罐的温度值保持恒定在37℃。

[0109] 每个发酵罐(1、2和3)接种80ml大肠杆菌TG128的活跃生长的过夜培养物。发酵罐2和3还接种1ml在脑心浸出液肉汤(brain heart infusion broth)上生长的巴氏梭菌JEG2培养物。根据发酵的进程,使发酵器培养物操作25-35小时,之后对它们进行分析。(化学)分析的结果总结在下表1中:

[0110] 表1

[0111]

	发酵罐 1	发酵罐 2	发酵罐 3
组分(g/l)	大 肠 杆 菌 TG128	大肠杆菌 TG128 + 巴 氏 梭 菌 NCCB 100154	大肠杆菌 TG128 +巴氏 梭菌 NCCB 100154 +十 四烷酰基-乳酸盐
R-乳酸盐	82,6	28,2	81,8
S-乳酸盐	0	2	0,3
% 对映体过 量: (R-S)/(R+S)	100	86.8	99.3
乙醇	0,07	0,4	0,08
葡萄糖	1,9	14,4	2,3
甲酸	< 0,2	2	< 0,2
乙酸	0,2	2,3	0,3
丙酸	< 0,1	< 0,1	< 0,1
丁酸	< 0,1	6,6	0,1
丙酮酸	< 0,1	< 0,1	< 0,1
2-羟基丁酸	< 0,1	< 0,1	< 0,1
乙醇酸	< 0,5	< 0,5	< 0,5
草酸	< 0,2	< 0,2	< 0,2
山梨酸	< 0,1	< 0,1	< 0,1
富马酸	< 0,2	< 0,2	< 0,2
琥珀酸	0,1	< 0,1	< 0,1
苯甲酸	< 0,3	< 0,3	< 0,3
马来酸	< 0,2	< 0,2	< 0,2
苹果酸	< 0,5	< 0,5	< 0,5
柠檬酸	< 0,5	< 0,5	< 0,5

[0112] 接种后12小时,观察到发酵罐2开始产生大量泡沫和腐臭味。培养肉汤的显微镜检查显示存在大量携带内生孢子的细胞。当巴氏梭菌JEG2不受限制地生长时,观察到这种现

象。

[0113] 发酵罐3也用大肠杆菌TG 128和巴氏梭菌JEG2的混合培养物接种,但其还接受0.05% (w/v) 十四烷酰基-乳酸盐 (C<sub>14</sub>-乳酸盐),其不产生泡沫或腐臭味。此外,从发酵罐3中取出的培养肉汤的显微镜检查显示它不含有携带内生孢子的细胞。

[0114] 发酵罐3的性能在每个方面与发酵罐1的性能相似,发酵罐1接种了大肠杆菌TG128的纯培养物。此外,发酵肉汤的化学分析(表1)显示,大肠杆菌TG128标准发酵(发酵罐1)与含有十四烷酰基-乳酸盐的大肠杆菌/巴氏梭菌JEG2混合培养物(发酵罐3)之间的杂质谱没有差异。在发酵罐1和3中产生的乳酸盐的对映体过量百分比接近100,并且在发酵罐3中仅检测到少量的S-乳酸盐,可能是通过乳酸酯的皂化引入的。

[0115] 另一方面,由于巴氏梭菌JEG2不受限制地生长,发酵罐2中的对映体过量百分比明显较低。此外,发酵罐2中产生的乳酸总量也明显较低。对映体过量百分比定义为:  $((R-S)/(R+S)) \times 100$ ,其中R和S代表含R-和S-乳酸盐的发酵肉汤中对映体各自的分数。

[0116] 当发酵罐3用0.025% (w/v) 十四烷酰基-乳酸盐 (C<sub>14</sub>-乳酸盐)代替0.05% (w/v) 强化时,获得完全相同的结果。

[0117] 实施例2:癸酰基-乳酸盐 (C<sub>10</sub>-乳酸盐)和十二烷酰基-乳酸盐 (C<sub>12</sub>-乳酸盐)的混合物或十二烷酰基-乳酸盐 (C<sub>12</sub>-乳酸盐)和十四烷酰基-乳酸盐 (C<sub>14</sub>-乳酸盐)的混合物对大肠杆菌和巴氏梭菌的混合培养物的影响

[0118] 在与实施例1所述的相同实验设置中,测试了0.05% (w/v) AMCET 3400E和0.05% (w/v) AMCET 4530E在大肠杆菌TG128培养物中抑制巴氏梭菌JEG2生长的功效。

[0119] 具有AMCET 3400E或AMCET 4530E的发酵罐3的性能在每个方面与用大肠杆菌TG128的纯培养物接种的发酵罐1的性能相似。此外,发酵肉汤的化学分析表明,大肠杆菌TG128标准发酵(发酵罐1)与具有AMCET 3400E或AMCET 4530E的大肠杆菌/巴氏梭菌JEG2混合培养物(发酵罐3)之间的杂质谱没有差异。对于AMCET 3400E和AMCET 4530E,发酵罐1和3中产生的乳酸盐的对映体过量百分比接近100。

[0120] 实施例3:乳酸盐抗产气荚膜梭菌的体外试验

[0121] 在Bioscreen C培养系统中,针对产气荚膜梭菌ATCC 13124,测试如式1定义的乳酸盐和如式2定义的甘油酯抑制生长的功效。

[0122] 使用宽带滤光器在420-580nm下以固定时间间隔自动测量培养物的光密度。测试生物的生长速率在30℃下测定。为了确保低氧条件,将Bioscreen置于配备有M-12型氧传感器(In Vivo<sub>2</sub> 400低氧工作站,Biotrace International Plc,Bridgend,United Kingdom)的厌氧柜内。使用Ruskinm气体混合器模块(Biotrace International Plc)将氧张力调节为0%氧气。

[0123] 如下表2中所示,用不同量的不同乳酸盐和甘油酯制备脑心浸出液肉汤。

[0124] 测试以下化合物:辛酰基-乳酸盐 (C<sub>8</sub>-乳酸盐)、癸酰基-乳酸盐 (C<sub>10</sub>-乳酸盐)、十二烷酰基-乳酸盐 (C<sub>12</sub>-乳酸盐)、十四烷酰基-乳酸盐 (C<sub>14</sub>-乳酸盐)、十六烷酰基-乳酸盐 (C<sub>16</sub>-乳酸盐)、O<sub>lacta</sub> (十八碳烯酰基-乳酸盐,C<sub>18:1</sub>-乳酸盐)、AMCET 3400E、AMCET 4530E、C<sub>8</sub>-甘油单/二酯、C<sub>10</sub>-甘油单/二酯、C<sub>12</sub>-甘油单/二酯、C<sub>14</sub>-甘油单/二酯、十四烷酸(肉豆蔻酸)和十四烷基硫酸钠(肉豆蔻基硫酸钠)。

[0125] 表2



[0126]

物质	浓度范围 % (w/v)	浓度步长 % (w/v)
辛酰基-乳酸盐(C8-乳酸盐)	0 – 0.5	0.1
癸酰基-乳酸盐(C10-乳酸盐)	0 – 0.1	0.02
十二烷酰基-乳酸盐(C12-乳酸盐)	0 – 0.01	0.002
十四烷酰基-乳酸盐(C14-乳酸盐)	0 – 0.01	0.001
十六烷酰基-乳酸盐(C16-乳酸盐)	0 – 0.01	0.002
Olacta (十八碳烯酰基-乳酸盐, C18:1-乳酸盐)	0 – 0.1	0.02
AMCET 3400E (C10/C12- 乳酸盐)	0 – 0.01	0.001

[0127]

AMCET 4530E (C12/C14-乳酸盐)	0 – 0.01	0.001
C8-甘油单/二酯	0 – 0.5	0.05
C10-甘油单/二酯	0 – 0.1	0.01
C12-甘油单/二酯	0 – 0.01	0.001
C14-甘油单/二酯	0 – 0.01	0.001
十四烷酸(肉豆蔻酸)	0 – 0.01	0.001
十四烷基硫酸钠(肉豆蔻基硫酸钠)	0 – 0.01	0.001

[0128] 十四烷酸(肉豆蔻酸)、十四烷基硫酸钠(肉豆蔻基硫酸钠) 购自Sigma-Aldrich。

[0129] 使用配备有BlueLine 16pH(微) 探针(编号285129163)的Handylab pH 12pH计,用9M硫酸将培养基的pH调节至6.0。通过使用0.45μm乙酸纤维素滤器(Minisart注射过滤器, 无菌且无热原,编号16555,Sartorius, Göttingen,德国) (9) 过滤,对所有培养基灭菌。将300μl的每种培养基转移至一组无菌Bioscreen Honeycombe 100孔板(Thermo electron Oy, Vantaa, 芬兰)。将完成的孔板储存在-30℃直至进一步使用。使用无菌Hamilton重复分配器(Hamilton, Bonaduz, 瑞士),用3μl种菌培养物接种孔板。在含有10ml脑心浸出液肉汤(Oxoid CM225, Basingstoke, 英国)的螺旋盖管(screw-capped tube, 100×16mm) 中在30℃下制备产气荚膜梭菌ATCC 13124的液体种菌培养物,持续24小时。

[0130] 表3显示了脑心浸出液肉汤中乳酸盐、甘油酯、十四烷酸(肉豆蔻酸)和十四烷基硫酸钠(肉豆蔻基硫酸钠)对产气荚膜梭菌ATCC 13124的MIC值。在括号中给出了重复次数。

[0131] 表3. 在脑心浸出液肉汤中不同脂肪酸衍生物对产气荚膜梭菌ATCC 13124的MIC值。(重复次数在括号中提供。)

	物质	MIC 值
		% (w/v)
[0132]	辛酸基-乳酸盐(C8-乳酸盐)	0.05 (2)
	癸酰基-乳酸盐(C10-乳酸盐)	0.04 (2)
	十二烷酰基-乳酸盐(C12-乳酸盐)	0.002 (2)
	十四烷酰基-乳酸盐(C14-乳酸盐)	0.001 (2)
	十六烷酰基-乳酸盐(C16-乳酸盐)	0.002 (2)
	Olacta (十八碳烯酰基-乳酸盐, C18:1-乳酸盐)	0.02 (2)
[0133]	AMCET 3400E (C10/C12-乳酸盐)	0.02 (3)
	AMCET 4530E (C12/C14-乳酸盐)	0.001 (3)
	C8-甘油单/二酯	0.1 (3) 0.2 (4)
	C10-甘油单/二酯	0.02 (2) 0.04 (2)
	C12-甘油单/二酯	>0.01 (2)
	C14-甘油单/二酯	>0.01 (4)
	十四烷酸(肉豆蔻酸)	>0.01 (3)
	十四烷基硫酸钠(肉豆蔻基硫酸钠)	0.001 (3)

[0134] 显示出即使在非常低的浓度下,乳酸盐和甘油酯也能够抑制产气荚膜梭菌ATCC 13124的生长。

[0135] 实施例4:一些乳酸盐和C8-甘油单/二酯的抗微生物性质

[0136] 在Bioscreen C培养系统中,针对选择的革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌,测试了选定数量的如式1定义的不同乳酸盐和如式2定义的C8-甘油单/二酯(辛酸单/二酯)抑制生长的功效。使用宽带滤光器在420-580nm下以固定时间间隔自动测量培养物的光密度。测试生物的生长速率在30℃下测定。

[0137] 用不同量的乳酸盐或C8-甘油单/二酯(辛酸单/二酯)制备脑心浸出液肉汤。测试下列化合物:AMCET 3400E;AMCET 4530E;EMPLEX;和AMCET 200C。

[0138] 使用配备有Blueline 16pH(微)探针(编号285129163)的Handylab pH 12pH计,用9M硫酸将培养基的pH调节至6.0。通过使用0.45μm乙酸纤维素滤器(Minisart注射过滤器,无菌且无热原,编号16555,Sartorius, Göttingen,德国)过滤,对所有培养基进行灭菌。将300μl的每种培养基转移至一组无菌Bioscreen Honeycombe 100孔板(Thermo electron Oy, Vantaa, 芬兰)。将完成的孔板储存在4℃直至进一步使用。使用无菌Hamilton重复分配

器 (Hamilton, Bonaduz, 瑞士), 用3μl合适的测试培养物接种孔板。

[0139] 在本研究中使用由以下培养物制备的液体种菌培养物:

[0140] 大肠杆菌血清型0157:H7 (ATCC 700728);

[0141] 大肠杆菌 (ATCC 8739);

[0142] 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538P);

[0143] 产单核细胞李斯特菌 (F2399);

[0144] 产单核细胞李斯特菌 (ATCC 7644);

[0145] 产单核细胞李斯特菌 NFPA 83 (Seman, D.L., A.C. Borger, et al. (2002) Journal of Food Protection 65 (4):651-658);

[0146] 产单核细胞李斯特菌 LCDC 861 (Seman, D.L., A.C. Borger, et al. (2002) Journal of Food Protection 65 (4):651-658);

[0147] 无害李斯特菌 (ATCC 33090);

[0148] 无害李斯特菌 TNO 菌株 (TNO, Zeist, 荷兰);

[0149] 肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) (ATCC 13076, 肠炎沙门氏菌 (*S. Enteritidis*));

[0150] 肠道沙门氏菌 (ATCC 13311, 鼠伤寒沙门氏菌 (*S. Typhimurium*));

[0151] 肠道沙门氏菌 JAVA (NCTC 8458, NCTC: 国家典型菌种保藏中心 (National Collection of Type Cultures), Porton Down, Salisbury, 英国);

[0152] 米酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*) (DSMZ 20017, DSMZ: 德国微生物菌种保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig, 德国);

[0153] 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) (DSMZ 20174);

[0154] 弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*) (DSMZ 20019);

[0155] 蜡状芽孢杆菌 (ATCC 11778);

[0156] 隆德假单胞菌 (*Pseudomonas lundensis*) (LMG13517, LMG: 比利时微生物协作保藏中心 (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms) / LMG 细菌保藏中心 (LMG Bacteria Collection), Gent, 比利时); 和

[0157] 莓实假单胞菌 (*Pseudomonas fragi*) (LMG 2191)。

[0158] 每天将所有培养物转移到含有10ml 脑心浸出液肉汤 (Oxoid CM0225, Basingstoke, UK) 的螺旋盖管 (100×16mm) 中。将乳杆菌转移到MRS肉汤 (Oxoid CM0359) 中。将所有培养物在30℃孵育并且不搅拌。

[0159] 我们研究了不同浓度的AMCET 3400E、AMCET 4530E、EMPLEX和AMCET 200C的效果。

[0160] 数据总结在下面的表4和5中, 表明革兰氏阳性细菌比革兰氏阴性菌对这些化合物更敏感。表5中的数据还显示AMCET 200C比乳酸盐针对更为广泛的生物具有活性, 并且它还包括革兰氏阴性细菌。AMCET 200C (C8-甘油单/二酯) 对革兰氏阴性细菌的有效浓度为0.5-1% (w/w)。

[0161] 表4. AMCET 3400E、AMCET 4530E、EMPLEX和AMCET 200C对不同革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的影响。

[0162]

菌株	AMCET 3400E (C10/C12- 乳酸盐)	AMCET 4530E (C12/C14- 乳酸盐)	Emplex	AMCET 200C (C8-甘油 单/二酯)
产单核细胞李斯特菌 LCDC 861	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
产单核细胞李斯特菌 NFPA 83	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
产单核细胞李斯特菌 ATCC 7644	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
蜡状芽孢杆菌 ATCC 11778	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
金黄色葡萄球菌 ATCC 6538P	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
植物乳杆菌 DSM 20174	+ (-)	+ (-)	- (-)	- (-)
弯曲乳杆菌 DSM 20019	+ (-)	+ (-)	- (-)	- (-)
米酒乳杆菌 DSM 20017	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
大肠杆菌 ATCC 8739	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
大肠杆菌 O157:H7 ATCC 700728	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
肠道沙门氏菌 ATCC 13311	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
肠道沙门氏菌 ATCC 13076	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)

[0163]

肠道沙门氏菌 JAVA 菌株	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
隆德假单胞菌 LMG 13517	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
莓实假单胞菌 LMG 2191	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)

[0164] 测试两个浓度范围：0-0.1% (w/w) 和0-0.01% (w/w)。在表4中，对于0-0.01%浓度范围的结果显示在括号中。“+”号表示抑制。革兰氏阳性生物是李斯特菌属、杆菌属、葡萄球菌属和乳杆菌属。

[0165] 表5.AMCET 3400E、AMCET 4530E、EMPLEX和AMCET 200C对不同革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的影响。

[0166]

菌株	AMCET 3400E (C10/C12- 乳酸盐)	AMCET 4530E (C12/C14- 乳酸盐)	Emplex	AMCET 200C (C8-甘油 单/二酯)
产单核细胞李斯特菌 F2399	+	+	+	+
产单核细胞李斯特菌 LCDC 861	+	+	+	+
产单核细胞李斯特菌 NFPA 83	+	+	+	+
产单核细胞李斯特菌 ATCC 7644	+	+	+	+
无害李斯特菌 ATCC 33090	+	+	+	+
无害李斯特菌 TNO 菌株	+	+	+	+
蜡状芽孢杆菌 ATCC 11778	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌 ATCC 6538P	+	+	+	+
弯曲乳杆菌 DSM 20019	NT	NT	NT	+
米酒乳杆菌 DSM 20017	NT	NT	NT	+
大肠杆菌 ATCC 8739	NT	NT	NT	+
大肠杆菌 O157:H7 ATCC 700728	-	-	-	+
肠道沙门氏菌 ATCC 13311	-	-	-	+
肠道沙门氏菌 ATCC 13076	-	-	-	+

[0167]

肠道沙门氏菌 JAVA 菌株	-	-	-	+
隆德假单胞菌 LMG 13517	NT	NT	NT	-
莓实假单胞菌 LMG 2191	NT	NT	NT	-

[0168] 测试的浓度范围是：0-1% (w/w)。在表5中，“+”号表示抑制，NT：未测试。革兰氏阳性生物是李斯特菌属、杆菌属、葡萄球菌属和乳杆菌属。

[0169] 实施例5：用酿酒酵母进行乙醇发酵

[0170] 本实施例记载了在用酿酒酵母进行乙醇发酵中低浓度的乳酸盐混合物的作用，所述发酵在蔗糖糖蜜上运行，并且故意被乳杆菌属物种的混合培养物污染。

[0171] 培养和培养条件

[0172] 酿酒酵母MUCL30115获自Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (BCCM/MUCL, Louvain-la-Neuve, 比利时) 并在酵母-蛋白胨-葡萄糖肉汤 (YPG) 中预培养。

YPG肉汤在每升去离子水中含有:40g葡萄糖一水合物;10g Bacto™蛋白胨(Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA);和5g Bacto™酵母提取物(Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA)。用1N HCl将培养基的pH调节至6.0-7.0。将培养物在室温下在摇瓶中孵育。

[0173] 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) LMG11438获自Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (BCCM/LMG, Gent, 比利时)。发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) AR748和食果糖乳杆菌 (*Lactobacillus fructivorans*) AR742获自Corbion Purac B.V., Gorinchem, 荷兰。将所有菌株在MRS-肉汤上预培养(de Man et al(1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriology 23 (1):130-135)并在30℃下在固定的螺旋盖烧瓶中孵育。通过混合等体积的三种乳杆菌培养物制备混合培养物。

[0174] 所有发酵实验均在含有0.5升具有下列组成的液体培养基的3升夹套玻璃发酵罐中进行:50g蔗糖糖蜜(85°白利糖度);和450ml去离子水。使用循环水浴将每次发酵的温度控制在30℃,并用1N NaOH将pH控制在5.5。

[0175] 两个主发酵罐(A,B)各自接种50ml的主动发酵酵母属培养物:这两种培养物还接受10ml混合的乳杆菌属培养物。向这些发酵罐之一(A)中加入0.5ml含有10%(w/w) Pationic122A的溶液,以研究乳酸盐对其的作用。

[0176] 发酵24小时后,从每个发酵罐(A,B)中取出9-10体积%的接种物,并分别转移到含有新鲜培养基的其他发酵罐(A',B')中:允许在主发酵罐(A,B)中的发酵继续进行。使用这种后倾技术(back slopping technique),进行六至八次接种物的进一步转移,每一次在源发酵罐中发酵24小时后进行。

[0177] 分析方法

[0178] 使用酶促程序测定L(+)乳酸、D(-)乳酸和残余葡萄糖的量。具体而言,并且各自根据给定的制造商的方案:使用获自Megazyme International的K-Gluc试剂盒测定葡萄糖;使用获自Megazyme International的K-Date试剂盒测定D-乳酸;并且使用获自Megazyme International的L-Date试剂盒测定L-乳酸。

[0179] 通过气相色谱分析测定有机酸和乙醇。

[0180] 结果

[0181] 下表6表示在已经被乳杆菌属物种的混合培养物污染的发酵中L(+)乳酸、D(-)乳酸和乙醇的测定量。在那些还含有Pationic122A的酿酒酵母的发酵培养物中,显示与不含该乳酸盐混合物的培养物相比,L(+)乳酸以及特别是D(-)乳酸的现存浓度(standing concentration)显著降低。此外,含有Pationic122A的酿酒酵母培养物的乙醇浓度显著高于那些没有乳酸盐混合物的培养物。Pationic122A的积极作用可以维持至少6-8次连续转移。

[0182] 表6

[0183]

用被 LAB 混合培养物污染的酿酒酵母进行的糖蜜发酵				
转移数	Pationic 122A 是否存在	L(+)乳酸 (g/l)	D(-)乳酸 (g/l)	乙醇 (% w/w)
2	否	1.40	6.80	1.20
3	否	1.18	6.50	1.30

[0184]

4	否	1.28	6.79	1.60
5	否	1.16	3.15	1.30
6	否	1.42	3.31	1.60
平均		<b>1.29</b>	<b>5.31</b>	<b>1.40</b>
用被 LAB 混合培养物污染并存在 Pationic 122A 的酿酒酵母进行的糖蜜发酵				
转移数	Pationic 122A 是否存在	L(+)乳酸 (g/l)	D(-)乳酸 (g/l)	乙醇 (% w/w)
2	是	0.15	2.10	1.30
3	是	0.16	0.90	2.10
4	是	0.15	0.98	2.20
5	是	0.21	0.97	2.20
6	是	0.23	1.33	1.80
平均		<b>0.18</b>	<b>1.25</b>	<b>1.92</b>

[0185] 在考虑说明书后,对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的范围的情况下,可以在所公开的实施方案中进行各种修改。因此,旨在将实施方案和实施例仅视为说明性的,本发明的真实范围由所附权利要求指示。