



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.13

(51) Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01)

(21) Номер заявки
201990496

(22) Дата подачи заявки
2017.09.05

(54) СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРОТИВ БАКТЕРИАЛЬНОГО
ИНФИЦИРОВАНИЯ ПРИ ФЕРМЕНТАЦИИ

(31) 16187414.4

(32) 2016.09.06

(33) EP

(43) 2019.08.30

(86) PCT/EP2017/072249

(87) WO 2018/046500 2018.03.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПУРАК БИОКЕМ БВ (NL)

(72) Изобретатель:
Отто Рул, Рамирез Алдана Марил,
Элдеринк Энни (NL)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнагьев
А.В., Билык А.В. (RU)

(56) ROBERT W. SCHUMACHER ET AL.:
"Isolation and Structure Determination of an
Antimicrobial Ester from a Marine Sediment-Derived
Bacterium", JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS,

vol. 66, № 9, 1 September 2003 (2003-09-01), pages
1291-1293, XP055316157, US, ISSN: 0163-3864,
DOI: 10.1021/np020594e, page 1291, left-hand
column - page 1293, right-hand column; figure 1;
tables 1, 2

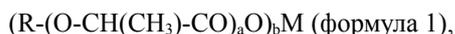
RÜCKLE L. ET AL.: "Hop acids can
efficiently replace antibiotics in ethanol production",
INTERNATIONAL SUGAR JOURNAL, AGRA
INFORMA LTD, TUNBRIDGE WELLS, GB, vol.
108, № 1287, 1 March 2006 (2006-03-01), pages
139-147, XP008084823, ISSN: 0020-8841, abstract

ALYA LIMAYEM ET AL.: "Alternative
antimicrobial compounds to control potential
Lactobacillus contamination in bioethanol
fermentations", Journal of Environmental Science
and Health, part B, 31 August 2011 (2011-08-31),
31 August 2011 (2011-08-31), pages 709-714,
XP055316122, retrieved from the Internet:
URL: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03601234.2011.594411?needAccess=true> [retrieved on
2016-11-03], abstract

WO-A1-0106877

WO-A1-2013169231

(57) Изобретение относится к ферментационной среде, содержащей инокулянт, содержащий культуру грамотрицательных бактерий, плесневых грибов или дрожжей; субстрат для микробного роста; и в качестве экзогенного добавляемого ингредиента антибактериальный агент для подавления роста грамположительных загрязняющих бактерий, состоящий из по меньшей мере одного лактилата формулы



где R представляет собой C₄-C₁₈-ацильную группу, имеющую алкильную или алкенильную цепь, которая может быть разветвленной или неразветвленной; M представляет собой протон (H⁺) или противоион, выбранный из группы, состоящей из Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, аммония и замещенного аммония, имеющего один или более чем один (C₁₋₄)алкил, возможно замещенный одним или более чем одним гидроксигруппами; а представляет собой целое число от 1 до 3; и b равен 1 или 2, соответствуя валентности M. Кроме того, предложены инокулянт для ферментационной среды, способ предотвращения или уменьшения микробных инфекций, вызванных грамположительными бактериями, в ферментируемой культуре грамотрицательных бактерий и способ получения продукта ферментации, в которых использован указанный выше антибактериальный агент, а также его применение для подавления роста грамположительных загрязняющих бактерий при культивировании грамотрицательных бактерий, или плесневых грибов, или дрожжей.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способу подавления роста грамположительных бактерий при культивировании грамотрицательных бактерий, плесневых грибов и дрожжей. В частности, настоящее изобретение относится к антибактериальным агентам, которые содержат лактилат, сложный эфир глицерина или их смесь, и применению таких агентов в ферментируемых культурах.

Предшествующий уровень техники

Опасность инфицирования другими микроорганизмами представляет собой одну из проблем, которая является общей для всех микробиологических процессов, в которых используются чистые культуры. Эта опасность относится в особенности к процессам крупномасштабного промышленного ферментирования, где риск контаминации другими микроорганизмами больше из-за масштаба процесса по сравнению с процессами в лабораторном ферментаторе.

При дрожжевой ферментации персонал пытается уменьшить риск бактериальной контаминации путем использования агентов, контролирующих бактерии. Эти агенты включают, например (природные) антибиотики и сульфит в концентрации, которая не влияет на жизнеспособность дрожжей, но которая предотвращает рост контаминирующих бактерий. Подробная информация о таких агентах раскрыта в Ruckle et al., *Hop acids as natural anti-bacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production*, *International Sugar Journal*, 108: 139-147 (2006); и Limayem et al., *Alternative antimicrobial compounds to control potential Lactobacillus contamination in bioethanol fermentations*, *Journal of Environmental Science and Health, part B*, 46(8): 709-714 (2011).

В настоящее время генетически модифицированные бактерии часто используются в качестве штамма-продуцента для множества продуктов ферментирования. В качестве примера можно привести применение *Escherichia coli*, способной продуцировать R-молочную кислоту, как описано в Chang et al., *Homo-fermentative production of D(-) or L(+) lactate in metabolically engineered Escherichia coli RR1*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4): 1384-1389 (1999). Хотя было продемонстрировано, что этот микроорганизм растет на относительно простой и дешевой химически определенной среде, неоднократно наблюдали, что культуры этого организма могут легко инфицироваться. Загрязняющими агентами оказались спорообразующие микроорганизмы или грамположительные микроорганизмы. Среди загрязняющих грамположительных бактерий имеются также патогенные такие бактерии как *Enterococcus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus*, различные виды *Bacillus* и *Streptococcus*. Присутствие таких загрязняющих агентов является нежелательным, поскольку они могут серьезно нарушать оптическую чистоту молочной кислоты и могут продуцировать другие продукты ферментации и, таким образом, уменьшать выход ферментации. Таким образом, существуют серьезные основания для подавления роста этих микроорганизмов.

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы стабилизировать процесс продуцирования и, в частности, выход представляющего интерес продукта ферментации.

В настоящее время обнаружено, что добавление лактилатов и/или сложных эфиров глицерина с жирными кислотами со средней длиной цепей специфическим образом подавляет рост грамположительных бактерий при культивировании грамотрицательных бактерий или плесневых грибов и дрожжей. После добавления эффективного количества лактилата, сложного эфира глицерина или их смеси микроорганизмы-продуценты продолжают расти в ферментаторе, а рост загрязняющих грамположительных бактерий предотвращается или подавляется. Это позволяет добиться того, что процесс ферментации не нарушается вследствие роста нежелательных микроорганизмов, из-за нежелательных побочных продуктов и неэффективного использования источников энергии. Кроме того, это уменьшает требуемое дополнительное количество агентов, контролирующих бактериальное загрязнение, таких как антибиотики.

Лактилат означает соединение, имеющее ацильную группу из жирной кислоты, присоединенную к одной (монолактилаты) или нескольким молекулам молочной кислоты (дилактилаты и т.п.) и протон (H⁺) или другой катион, присоединенный по концевому карбоксилату. Группировка жирной кислоты, как правило, состоит из углеводородной цепи, присоединенной к карбоксильной группе на конце. Углеводородная цепь может содержать разное количество атомов углерода, и связи между атомами углерода могут быть насыщенными или ненасыщенными.

Лактилаты представляют собой известные поверхностно-активные вещества. Эти поверхностно-активные вещества получают путем взаимодействия R-молочной кислоты или S-молочной кислоты или любой их смеси с жирной кислотой и одновременной нейтрализацией основанием. Лактилаты хорошо известны в пищевой индустрии и используются в сфере персонального ухода для улучшения состояния кожи, мягкости кожи и увлажнения, и для уменьшения липкости во время перехода от увлажнения к высушиванию после нанесения продукта. Известно, что некоторые лактилаты обладают антимикробными свойствами. В US 2007/010856 (Cohen et al.) описаны швы, обработанные, среди прочего, лактилатом в качестве антимикробного соединения. В US 2006/062832 (Lopes) описана очищающая композиция, содержащая лактилат в качестве антимикробного соединения. В WO 2004/037177 (Eveready Battery Inc.) описана антибактериальная пена для бритвы или гелевая композиция, которая содержит лактилат в качестве антимикробного соединения.

В WO 01/06877 (Rhodia) описано применение лактилатов в комбинации с хмелевыми кислотами в

пищевых продуктах; хмелевые кислоты обладают активностью против грамположительных бактерий, а лактилаты предложены в качестве одного из возможных дополнительных ингредиентов среди очень широкого диапазона пищевых эмульгаторов (с. 6). Пример конкретного использования лактилатов не приведен, и тот факт, что лактилаты обладают индивидуальной активностью против грамположительных бактерий, не признается в данном источнике.

Следует отметить, что в WO 2004/107877 (Purac Biochem BV) описана антимикробная композиция, содержащая смесь молочной кислоты или ее производного и неорганической кислоты. Композиция в целом описана как антимикробная. Описано применение против *Salmonella* и *Escherichia coli*. Хотя лактилаты упомянуты как возможные производные молочной кислоты, их применение дополнительно не выявлено. Ничего в этом источнике не указывает или не свидетельствует о конкретной эффективности лактилатов против грамположительных бактерий по сравнению с грамотрицательными бактериями.

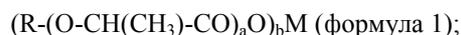
Краткое изложение сущности изобретения

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предложена ферментационная среда, содержащая

субстрат для микробного роста; и

в качестве экзогенного добавляемого ингредиента антимикробный агент, выбранный из

1) лактилата формулы 1



2) сложного эфира глицерина формулы 2



3) смеси этих соединений,

где R представляет собой C₄-C₁₈-ацильную группу, имеющую алкильную или алкенильную цепь, которая может быть разветвленной или неразветвленной;

каждый из R₁, R₂ и R₃ независимо представляет собой H или C₄-C₁₈-ацильную группу, имеющую алкильную или алкенильную цепь, которая может быть разветвленной или неразветвленной, при условии, что по меньшей мере один из R₁, R₂ или R₃ представляет собой H и по меньшей мере один из R₁, R₂ или R₃ представляет собой ацильную группу;

M представляет собой протон (H⁺) или противоион, выбранный из группы Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, аммония или замещенного аммония, имеющего один или более чем один (C₁₋₄)алкил, возможно замещенный одним или более чем одним гидроксидом;

a представляет собой целое число от 1 до 3; и

b равен 1 или 2, соответствуя валентности M.

Для завершенности используемый здесь термин "смесь этих соединений" означает, что антибактериальный агент может содержать

два или более соединений, которые соответствуют формуле 1;

два или более соединений, которые соответствуют формуле 2; или

смеси соединений формулы 1 и формулы 2.

Ферментационная среда может содержать антибактериальный агент в количестве от 0,001 до 0,5 мас.%, предпочтительно от 0,025 до 0,5 мас.%, на основе общей массы среды. В альтернативном выражении ферментационная среда может содержать антибактериальный агент в концентрации от 0,1 до 1000 мг/л, предпочтительно от 0,5 до 500 мг/л и более предпочтительно от 1 до 100 мг/л ферментационной среды.

Ферментационная среда может дополнительно содержать инокулянт, содержащий культуру грамотрицательных бактерий, плесневых грибов или дрожжей. При приготовлении такой среды антибактериальный агент может быть добавлен в среду до, после или вместе с этой культурой грамотрицательных бактерий, плесневых грибов или дрожжей. Эти варианты добавления не являются взаимоисключающими, и настоящее изобретение не препятствует добавлению антибактериального агента на более чем одной стадии ферментирования.

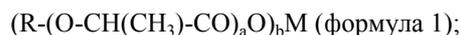
Тем не менее в предпочтительном воплощении ферментационную среду готовят путем приведения в контакт субстрата для микробного роста с указанным антибактериальным агентом в течение периода от 1 мин до 48 ч, предпочтительно от 1 до 24 ч, до инокулирования ферментационной среды ферментирующим микроорганизмом.

В альтернативном или дополнительном воплощении ферментационная среда может быть приготовлена путем добавления указанного антибактериального агента в водный рециркулируемый технологический поток, т.е. поток, который идет от продукта ферментирования, но который подвергается рециркуляции в качестве поступающего в ферментационную среду для, среди прочего, водного баланса.

В соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения предложен инокулянт для ферментационной среды, содержащий

культуру грамотрицательных бактерий, плесневых грибов или дрожжей; и антибактериальный агент, выбранный из

1) лактилата формулы 1



2) сложного эфира глицерина формулы 2

$\text{CH}_2\text{OR}_1\text{-CHOR}_2\text{-CH}_2\text{OR}_3$ (формула 2); и

3) смеси этих соединений,

где R представляет собой $\text{C}_4\text{-C}_{18}$ -ацильную группу, имеющую алкильную или алкенильную цепь, которая может быть разветвленной или неразветвленной;

каждый из R_1 , R_2 и R_3 независимо представляет собой H или $\text{C}_4\text{-C}_{18}$ -ацильную группу, имеющую алкильную или алкенильную цепь, которая может быть разветвленной или неразветвленной, при условии, что по меньшей мере один из R_1 , R_2 или R_3 представляет собой H и по меньшей мере один из R_1 , R_2 или R_3 представляет собой ацильную группу;

M представляет собой протон (H^+) или противоион, выбранный из группы Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, аммония или замещенного аммония, имеющего один или более чем один (C_{1-4})алкил, возможно замещенный одним или более чем одним гидроксидом;

a представляет собой целое число от 1 до 3; и

b равен 1 или 2, соответствуя валентности M.

Этот второй аспект изобретения предотвращает загрязнение инокулянта грамположительными бактериями. После инокулирования ферментационной среды антибактериальный агент диспергируют в той среде, в которой он может продолжать подавлять или предотвращать рост грамположительных бактерий, которые могли бы быть внесены в среду в виде загрязняющих агентов.

В настоящем изобретении также предложено применение антибактериального агента для подавления роста грамположительных загрязняющих бактерий при культивировании грамотрицательных бактерий, плесневых грибов или дрожжей, где указанный антибактериальный агент выбран из

лактилата формулы 1, как определено выше;

сложного эфира глицерина формулы 2, как определено выше; или

смеси этих соединений.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предложен способ предотвращения или уменьшения микробных инфекций, вызванных грамположительными бактериями, в ферментационной культуре грамотрицательных бактерий, включающий добавление к культуре эффективного количества антимикробного агента, выбранного из

лактилата формулы 1, как определено выше;

сложного эфира глицерина формулы 2, как определено выше; и

смеси этих соединений.

И в соответствии с заключительным аспектом изобретения предложен способ получения продукта ферментации, как он определен в прилагаемой формуле изобретения, включающий стадии приготовления ферментационной среды и введения в указанную среду инокулянта, содержащего культуру грамотрицательных бактерий, плесневых грибов или дрожжей.

Определения

Используемый здесь термин "содержащий" следует понимать как подразумевающий то, что следующая далее перечень не является исчерпывающим и может включать или может не включать какие-либо дополнительные подходящие сущности, например одно или более чем одно дополнительное свойство(а), компонент(ы), ингредиент(ы) и/или заместитель(и), как целесообразно.

Активность или агент, который является "антибактериальным", означает здесь активность или агент, который способен уничтожать и/или ингибировать рост бактерий.

Термин "микробный рост" используется здесь в соответствии с его стандартным значением: как таковой "микробный рост" относится к увеличению количества и/или метаболической активности микробных клеток, включая бактерии, плесневые грибы, грибы и водоросли.

Используемый здесь термин "ферментационная среда" означает трехфазную (твердое вещество-жидкость-газ) систему, которая сохраняется внутри ферментационного сосуда. Жидкая фаза содержит воду, растворенные питательные вещества, растворенные субстраты для микробного роста и растворенные метаболиты; источник воды не ограничен и включает, в частности, технологическую воду, такую как отработанная и/или разбавленная отфильтрованная барда, воду скрубберного цикла, конденсат или дистиллят после выпаривания, воду выводной отпарной колонны после перегонки или иную воду технологического процесса ферментации продукта. Твердая фаза содержит отдельные клетки, осадки, нерастворимые субстраты для микробного роста и выпавшие в осадок метаболические продукты.

В контексте микробного роста термин "субстрат" относится к любому веществу или соединению, которое превращается или собирается превращаться в другое соединение под действием фермента. Термин "субстрат" предназначен охватывать не только соединения, которые обеспечивают источник углерода, подходящий для применения в качестве исходного вещества, такой как любой углевод, происходящий из биомассы, но также промежуточные метаболиты, используемые в метаболическом пути, ассоциированном с микроорганизмом. Ферментационная среда может, как правило, содержать в качестве субстрата один или более чем один ферментируемый углевод, такой как сахара.

Ферментационная среда, включая ферментируемый субстрат и другие сырьевые материалы, используемые в процессе ферментации в соответствии с изобретением, могут быть обработаны путем измельчения, оживления, осахаривания и т.п. перед процессом ферментации или одновременно с ним. Со-

ответственно ферментационная среда может относиться к среде до добавления ферментирующего микроорганизма, такой как среда оживления и/или осахаривания или среда, возникающая в результате оживления и/или осахаривания, а также среда, которая содержит ферментирующий организм, такая как среда, используемая в одновременном осахаривании и ферментировании (SSF) или одностадийных процессах ферментирования. И наконец, в том упомянутом выше воплощении, где антибактериальный агент добавляют в ферментационную среду перед инокулированием микроорганизма, такое добавление включает добавление указанного агента во время оживления и/или осахаривания.

Используемый здесь термин "ферментационный сосуд" означает сосуд, в котором осуществляется ферментационная реакция. Термин "ферментатор" может быть использован взаимозаменяемо с ферментационным сосудом.

Используемый здесь термин "инокулянт" обозначает оригинальный источник сложного микробного сообщества, который предназначен для добавления в ферментационный сосуд, но который не ограничивает окончательный состав микробного сообщества; окончательный состав определяется рабочими условиями и производительностью ферментационного сосуда. Инокулянт, как правило, получают путем размножения желаемого(ых) микроорганизма(ов) в подходящем реакторе для размножения, который гораздо меньше чем ферментационный сосуд.

Инокулянт, как правило, включает культуру одного или более чем одного "продуцирующего штамма" микроорганизмов, который может быть адаптирован путем естественной селекции или при помощи биотехнологических методов для продуцирования представляющего интерес продукта ферментирования. Не ограничивающий пример инокулянта содержит культуру дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для продуцирования этанола.

Термин "культура" используют в смысле, известном в области техники, для обозначения размножения микроорганизмов, в частности продуцирующих штаммов, в определенных заранее культуральных средах, благоприятных для их роста. Используемый здесь термин "ферментирующая культура" относится к размножению одного или более чем одного продуцирующего штамма микроорганизмов, присутствующего в указанной ферментационной среде или в инокулянте, подходящем для указанной ферментационной среды.

Нет намерения ограничивать грамотрицательные бактерии, которые могут быть культивированы и использованы в настоящем изобретении в качестве продуцирующих штаммов. Не ограничивающие примеры грамотрицательных бактерий включают *Escherichia coli*, *Acinetobacter*, *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Cyanobacteria*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Franciscella*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Pantoea*, *Pasteurellaceae*, в особенности бактерии рода *Actinobacillus*, рода *Nemophilus* и рода *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Selenomonadales*, в особенности бактерии родов *Propionispira*, *Propionispora* и *Schwartzia*, *Serratia*, *Shigella*, *Treponema*, *Vibrio*, *Yersinia* и *Zymomonas*. В представляющем интерес воплощении ферментирующая культура или ферментационная среда содержит одну или более чем одну грамотрицательную бактерию, выбранную из группы, состоящей из *Escherichia coli*, видов *Pseudomonas* и видов *Pasteurellaceae*.

Примерами плесневых грибов, которые могут быть упомянуты, являются плесневые грибы родов *Aspergillus*, в частности *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* и *Aspergillus niger*; *Rhizopus*, например *Rhizopus oligosporus* и *Rhizopus oryzae*; *Fusarium*, такой как *Fusarium oxysporum*; *Mucor*, такой как *Mucor racemosus*; *Cladosporium*, такой как *Cladosporium herbarum*; *Penicillium*, такой как *Penicillium expansum*; и *Trichoderma*, такой как *Trichoderma harzianum*.

Не ограничивающие примеры родов дрожжей, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera*, *Pichia* и *Saccharomyces*.

Углеводы, которые конкретный микроорганизм может ферментировать, либо хорошо известны специалисту в данной области техники, либо легко доступны из опубликованной литературы предшествующего уровня техники. Для завершенности картины, обычные углеводы, ферментируемые микроорганизмами, продуцирующими молочную кислоту, включают без ограничения ими C₅ сахара, такие как арабиноза, ксилоза и рибоза; C₆ сахара, такие как глюкоза, фруктоза, галактоза, рамноза и манноза; и C₁₂ сахара, такие как сахароза, мальтоза и изомальтоза.

Ферментируемые углеводы прежде всего происходят из сырья на основе крахмала или сахара. Примеры сырья включают без ограничения ими кукурузу, пшеницу, тритикале, ячмень, маниоку, рожь, сортированный крахмал, происходящий из вышеупомянутого сырья, сахарный тростник, сахарную свеклу, мелассу, рисовую солому, картофельные очистки, древесные отходы, просо прутьевидное, производные сосновой и другой древесины, бытовые отходы, пищевые отходы и отходы производства напитков (алкогольных и неалкогольных). Неограничивающим примером сырья для ферментации *Saccharomyces cerevisiae* являются мелассы. При желании содержание ферментируемых углеводов в биомассе может быть определено методами, известными в этой области техники. Особенно информативное описание представляет собой 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.

В качестве неограничивающего перечня продуктов ферментации, которые могут продуцироваться грамотрицательными бактериями, плесневыми грибами и дрожжами, такими как вышеупомянутые мик-

роорганизмы, могут быть упомянуты этанол, 1,3-пропандиол, глицерин, бутанол, 1,4-бутандиол, арабит, ксилит, сорбит, маннит, ацетонин, уксусная кислота, пропионовая кислота, 3-гидроксипропионовая кислота, молочная кислота, янтарная кислота, фурандикарбоновая кислота, фумаровая кислота, яблочная кислота, адипиновая кислота, лимонная кислота, аконитовая кислота, глутаминовая кислота, итаконовая кислота, левулиновая кислота, глутаровая кислота, аспарагиновая кислота, малоновая кислота, глицин, серин, треонин, лизин, изопрен и полигидроксипропанат. В одном воплощении ферментационная среда, которая содержит антибактериальный агент, как он определен в настоящем изобретении, может быть предназначена для продуцирования этанола, 1,3-пропандиола, глицерина, бутанола, 1,4-бутандиола, арабита, ксилита, сорбита, маннита, уксусной кислоты, пропионовой кислоты, 3-гидроксипропионовой кислоты, молочной кислоты, янтарной кислоты, 2,5-фурандикарбоновой кислоты, фумаровой кислоты, яблочной кислоты, адипиновой кислоты, лимонной кислоты, аконитовой кислоты, глутаминовой кислоты, итаконовой кислоты, левулиновой кислоты, глутаровой кислоты, аспарагиновой кислоты, малоновой кислоты и их смесей.

Хорошие результаты были достигнуты тогда, когда антибактериальный агент добавляли в ферментационную среду для продуцирования 1,4-бутандиола, пропионовой кислоты, 3-гидроксипропионовой кислоты, молочной кислоты, янтарной кислоты, 2,5-фурандикарбоновой кислоты, фумаровой кислоты, яблочной кислоты или итаконовой кислоты. И наиболее предпочтительно использовать указанный антибактериальный агент в ферментационной среде для продуцирования пропионовой кислоты, молочной кислоты, янтарной кислоты, 1,4-бутандиола или 2,5-фурандикарбоновой кислоты. И наконец, когда в качестве продукта ферментирования получают молочную кислоту, тогда настоящее изобретение также охватывает

димеризацию этой молочной кислоты с получением лактида;
 синтез полимолочной кислоты путем поликонденсации этой молочной кислоты; и
 синтез полимолочной кислоты путем полимеризации лактида, полученного из этой молочной кислоты.

Понятно, что упомянутый(е) здесь желаемый(е) продукт(ы) ферментации, получаемый(е) путем ферментации ферментируемого субстрата подходящим микроорганизмом, будет(ут) продуцироваться в виде компонента композиции, которая дополнительно типично включает

следы ферментируемого субстрата;
 другие вещества, продуцируемые микроорганизмом; и
 следы самого микроорганизма, такие как клеточный дебрис и/или клеточные компоненты.

Предполагается, что термин "продукт ферментации" охватывает как неочищенный продукт, так и продукт после того, как его подвергнут осветлению, очистке и/или концентрированию. Неограничивающие примеры методов очистки включают один или более чем один из фильтрования, включая микро- и ультрафильтрацию, перегонку, (пере)кристаллизацию, экстракцию, химическую обработку, такую как подкисление, ионный обмен, обработку активированным углеродом и электродиализ.

В соответствии с тем, что известно из области техники, грамположительные бактерии становятся темно-синими или фиолетовыми при окрашивании по Граму прежде всего вследствие высокого количества пептидогликана в их клеточной стенке. Настоящее изобретение относится к подавлению или предотвращению роста таких бактерий в ферментирующих культурах. В частности, изобретение относится к подавлению или предотвращению роста грамположительных бактерий, включающих *Enterococci*; *Clostridium*, в частности *Clostridium perfringens* и *Clostridium pasteurianum*; *Listeria*, в частности *Listeria monocytogenes* и *Listeria innocua*; *Staphylococcus*, в частности *Staphylococcus aureus*; различных видов *Bacillus*, в частности *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*, и *Streptococcus*.

Используемый здесь термин "ацильная группа" означает функциональную группу, полученную путем удаления гидроксильной группы из карбоновой кислоты, которая имеет формулу R_xCO- , где R_x представляет собой алкильную группу или алкенильную группу, присоединенную к группе CO посредством простой связи. В алкенильной группе может присутствовать одна или более чем одна ненасыщенная связь. Таким образом, общее количество атомов углерода в ацильной цепи представляет собой количество атомов углерода в цепи $R_x + 1$. Термин (C_4-C_{18}) ацил обозначает ацильную группу, имеющую 4-18 атомов углерода.

Как он используется здесь, сложный эфир глицерина, несущий только одну боковую цепь в виде C_4-C_{18} -ацильной группы, называется (C_4-C_{18}) моноэфир глицерина; сложный эфир глицерина, который несет две C_4-C_{18} -ацильные группы, называется (C_4-C_{18}) диэфир глицерина. Смеси указанных сложных эфиров могут называться (C_4-C_{18}) моно/ди-эфиры глицерина или (C_4-C_{18}) моно/ди-глицерин.

Примеры ацильных групп включают C_6 -ацильные группы, такие как изогексаноильные группы; C_8 -ацильные группы, такие как изооктаноильные группы; C_{10} -ацильные группы, такие как деканоильные группы; C_{12} -ацильные группы, такие как лаурил (додеканоил); C_{14} -ацильные группы, такие как миристильные (тетрадеканоильные) группы; C_{16} -ацильные группы, такие как цетильные и палмитильные (гексадеканоильные) группы; и C_{18} -ацильные группы, такие как октадеканоил.

Подробное описание изобретения

В широком смысле соединения, определенные в вышеприведенных формуле 1 и формуле 2, используют для подавления роста грамположительных загрязняющих бактерий при культивировании грамотрицательных бактерий, плесневых грибов или дрожжей путем добавления одного или более чем одного из этих соединений в культуральные среды. Путем подавления роста грамположительных загрязняющих бактерий можно улучшить продуцирование желаемого продукта ферментации.

Настоящее изобретение не исключает добавление в качестве антибактериального агента двух или более соединений, которые соответствуют формуле 1, или двух или более соединений, которые соответствуют формуле 2. Кроме того, также могут быть использованы смеси соединений, определенных в формуле 1 и формуле 2.

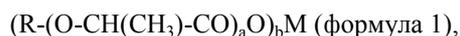
Общее количество антибактериального агента, вводимого в ферментационную среду, инокулом или ферментирующую культуру, является таким, чтобы эффективно подавлять, предотвращать или уменьшать загрязнение, вызванное грамположительными бактериями. Точное количество антибактериального агента будет зависеть от множества факторов, таких как конкретный используемый агент, культивируемый продуцирующий штамм, тип среды и источник энергии. Тем не менее в большинстве воплощений ферментационная среда или другая культуральная среда содержит от 0,001 до 0,5 мас.%, предпочтительно от 0,025 до 0,5 мас.% и более предпочтительно от 0,1 до 0,5 мас.% на основе общей массы среды определенного антибактериального агента.

Дополнительно к вышеупомянутому антибактериальному агенту на основе лактилатов и/или сложного эфира глицерина ферментационная среда может содержать по меньшей мере один вспомогательный антимикробный ингредиент, обладающий эффективностью против грамположительных бактерий, но который по существу не оказывает действия против грамотрицательных бактерий. Такие вспомогательные ингредиенты могут быть добавлены непосредственно в ферментационную среду в качестве экзогенного ингредиента. Дополнительно или альтернативно вспомогательные ингредиенты могут быть включены в инокулянт для ферментационной среды.

В одном воплощении ферментационная среда, инокулянт или ферментирующая культура может содержать вплоть до 1 мас.%, на основе общей массы среды вспомогательного антимикробного агента, выбранного из группы, состоящей из лизоцима; низина; педиоцина; ϵ -полилизина; протамина; Нор бета-кислот; смоляных кислот; пимелиновой кислоты; бензойной кислоты; n -гидроксибензойной кислоты; салициловой кислоты; коричной кислоты; лимонной кислоты; насыщенных жирных кислот, имеющих длину цепи от 8 до 16 атомов углерода; сахарных эфиров насыщенных жирных кислот, имеющих длину цепи от 8 до 16 атомов углерода; и их смесей. В альтернативном выражении ферментационная среда может содержать до 2000 мг/л указанного дополнительного антимикробного агента.

Формула 1.

Лактилаты, используемые в настоящем изобретении, обладают структурой в соответствии с формулой 1, приведенной ниже:



где R обозначает C_4 - C_{18} -ацильную группу, предпочтительно C_8 - C_{14} -ацильную группу, более предпочтительно C_{10} - C_{14} -ацильную группу и наиболее предпочтительно C_{12} - C_{14} -ацильную группу.

M представляет собой протон (H^+) или противоион, выбранный из группы Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, аммония или замещенного аммония, имеющего один или более чем один (C_{1-4}) алкил, возможно замещенного одной или более чем одной гидроксильной группой. Предпочтительно M выбран из группы, состоящей из Na, K, Ca и Mg. Более предпочтительно M представляет собой Na.

Группа $(O-CH(CH_3)-CO)O$ представляет собой лактильный радикал, имеющий конфигурацию R или S (определенный в разделе E в издании 1979 IUPAC (Международный союз фундаментальной и прикладной химии) Nomenclature of Organic Chemistry), полученный из R- или S-молочной кислоты. Группа также может представлять собой смесь таких стереоизомерных конфигураций.

Величина b равна валентности M. Таким образом, "b" получает значение 1, если M представляет собой (H^+) или одновалентный катион, такой как Na, K, Ag, аммоний (NH_4) или замещенный аммоний. "b" получает значение 2, когда M представляет собой двухвалентный катион, такой как Ca, Mg, Zn, Mn, Fe(II) или Cu.

Величина "a" может составлять от 1 до 3, причем 1 является предпочтительной. Лактилаты, в которых "a" равно 1, называются монолактилатами; соединения, где "a" равно 2, называются дилактилатами; и соединения, где "a" равно 3, называются трилактилатами. Мополактилаты ($a=1$) являются предпочтительными для использования в данном изобретении. Тем не менее отмечается, что когда монолактилат включен в антимикробный агент, тогда последнее не исключает присутствия в нем следовых количеств дилактилатов и трилактилатов; частицы более высокого порядка могут возникать в процессе синтеза монолактилата.

Примеры лактилатов формулы 1, которые используются в качестве антибактериальных агентов в настоящем изобретении, включают без ограничения додеcanoил-лактилат (C_{12} -лактилат); тетрадеcanoил-лактилат (C_{14} -лактилат); гексадеcanoил-лактилат (C_{16} -лактилат); октадеcanoил-лактилат ($C_{18,0}$ -лактилат) и октадец-9-еноил-лактилат ($C_{18,1}$ -лактилат).

Способы синтеза таких лактилатов известны в области техники. Можно упомянуть патент США № 3883669 (Tsen et al.); патент США № 4146548 (Forsythe); Elliger, A convenient preparation of pure stearyl-2-lactic acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 527 (1979); и WO 2012/036693 (Caravan Ingredients Inc.). Кроме того, неочищенные лактилаты, полученные в таких способах синтеза, могут быть очищены при помощи обычных способов, включающих без ограничения фильтрование, центрифугирование, перегонку, кристаллизацию, экстракцию и хроматографию.

Формула 2.

Сложные эфиры глицерина, подходящие для использования в качестве антибактериальных агентов в настоящем изобретении, определены в формуле 2



Каждый из R_1 , R_2 и R_3 независимо обозначает H или C_4 - C_{18} -ацильную группу при условии, что по меньшей мере один из R_1 , R_2 или R_3 представляет собой H и по меньшей мере один из R_1 , R_2 или R_3 представляет собой ацильную группу.

В первом воплощении один или два из R_1 , R_2 или R_3 представляют собой C_6 - C_{14} -ацильные группы, а оставшиеся группы R_n представляют собой H.

Предпочтительно один или два из R_1 , R_2 и R_3 представляют собой C_8 -ацильные группы, а оставшиеся группы R_n представляют собой H.

Отмечается, что настоящее изобретение не исключает использование смеси моно- и диэфиров глицерина в антибактериальном агенте. Например, хорошие результаты получаются при использовании моно/диэфиров (C_8)глицерина.

Способы синтеза таких моно- и диэфиров известны в области техники. Например, коммерческий синтез C_4 - C_{18} сложных эфиров глицерина как правило осуществляют при помощи двух отличающихся путей:

прямая этерификация жирной кислоты глицерином (глицеролиз), катализируемая однородной кислотой, такой как серная или сульфоновая кислоты; или

путем трансэтерификации триглицеридов и полиспирта, катализируемой гидроксидами щелочных металлов, такими как NaOH, KOH или $\text{Ca}(\text{OH})_2$, и натриевыми солями низкомолекулярных спиртов, таких как метанол.

Можно сослаться на Mostafa et al., Production of mono-, di-, and triglycerides from waste fatty acids through esterification with glycerol, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2013, 4, 900-907; Hyun et al., A single step non-catalytic esterification of palm fatty acid distillate (PFAD) for biodiesel production, *Fuel*, 93, 373-380 (2012). Кроме того, неочищенные сложные эфиры глицерина, полученные при помощи таких способов синтеза, могут быть очищены при помощи обычных способов, включающих без ограничения фильтрование, центрифугирование, перегонку, кристаллизацию, экстракцию и хроматографию.

Изобретение далее проиллюстрировано при помощи следующих примеров, которые демонстрируют достоинства изобретения, не ограничивая изобретение.

Примеры

AMCET 200C: смесь моно и диэфира C_8 -глицерина приобретена в Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.

AMCET 3400E: смесь деканоил-лактилата (C_{10} -лактилат) и додеканоил-лактилата (C_{12} -лактилат) приобретена в Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.

AMCET 4530E: смесь додеканоил-лактилата (C_{12} -лактилат) и тетрадеканоил-лактилата (C_{14} -лактилат) приобретена в Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.

ATCC: Американская коллекция типовых культур, Manassas, Virginia, U.S.A.

Bioscreen C: культуральная система, доступная от Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsinki, Finland, Bioscreen C кинетически измеряет развитие мутности (рост) путем вертикальной фотометрии одновременно вплоть до 200 лунок.

EMPLEX: C_{18} -лактилат приобретен в Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.

MIC: минимальная ингибирующая концентрация, как измерено в тесте оптической плотности, представляет собой самую низкую концентрацию, при которой увеличение поглощения культуры не превышает пороговой величины, определенной как среднее увеличение величины поглощения холостых образцов плюс трехкратное стандартное отклонение.

Olacta: октадеценил-лактилат ($C_{18:1}$ -лактилат) приобретен в Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.

Rationis 122A: смесь двух лактилатов, в частности деканоиллактилата натрия (капроиллактилата натрия) и додеканоиллактилата натрия (лауроиллактилата натрия) в мольном отношении 1,3: 1, приобретенная в Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.

Пример 1. Действие тетрадеканоил-лактилата (C_{14} -лактилата) на смешанные культуры *Escherichia coli* и *Clostridium pasteurianum*.

Для определения того, может ли тетрадеканоил-лактилат (C_{14} -лактилат) предотвращать рост *Clostridium pasteurianum* JEG2 (NCCB 100154, NCCB: Коллекция культур бактерий Нидерландов, Utrecht, Netherlands) в культуре созданной путем биоинженерии гомоферментативной молочнокислой продуцирующей R-молочную кислоту *Escherichia coli* TG128 (NRRL B-30962, NRRL: Коллекция культур службы

сельскохозяйственных исследований, Национальный центр исследований утилизации сельскохозяйственных отходов, Peoria, Illinois, U.S.A.) готовили три различные ферментации и осуществляли их одновременно. Эти ферментации представляли собой

- 1) ферментатор 1: ферментирование чистой культуры *Escherichia coli* TG128;
- 2) ферментатор 2. *Escherichia coli* TG128, смешанная с *Clostridium pasteurianum* JEG2;
- 3) ферментатор 3. *Escherichia coli* TG128, смешанная с *Clostridium pasteurianum* JEG2 с добавлением 0,05% (мас./об.) тетрадеcanoил-лактата (C_{14} -лактата: Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.).

Все три ферментации осуществляли в стерильных ферментаторах объемом 7 литров. В ферментаторы 1, 2 и 3 загружали по 3,5 л стерильной ростовой среды, имевшей следующий состав: 3,25 л деминерализованной воды, 385 г моногидрата глюкозы, 12,25 г диаммония фосфата, 17,75 г гидрофосфата дикалия, 12,25 г дигидрофосфата калия, 3,5 мл 1 М раствора бетаин-хлоридрата, 5,25 мл 1 М раствора $MgSO_4$ (сульфат магния), 3,5 мл 1 М раствора $CaCl_2$ (хлорид кальция) и 5,25 мл раствора микроколичеств металлов. Раствор микроколичеств элементов содержит на литр 1,6 г $FeCl_3$ (хлорид железа(III)), 0,2 г $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (хлорид кобальта), 0,1 г $CuCl_2$ (хлорид меди), 0,2 г $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$ (хлорид цинка) 0,2 г $NaMoO_4$ (молибдат натрия), H_3BO_3 (борная кислота) и 10 мл 37% (мас./мас.) HCl (соляная кислота). В ферментатор 3 загружали 0,05% (мас./об.) тетрадеcanoил-лактата (C_{14} -лактата).

Все три ферментатора были оборудованы датчиком pH. pH в ферментаторах контролировали на уровне 6,5 путем добавления суспензии $Ca(OH)_2$ в деминерализованной воде. Концентрация суспензии $Ca(OH)_2$ составляла приблизительно 220 г/л. Температуру в ферментаторах поддерживали постоянной на уровне 37°C.

Каждый ферментатор (1, 2 и 3) инокулировали 80 мл активно растущей ночной культурой *Escherichia coli* TG128. Ферментаторы 2 и 3 также инокулировали 1 мл культуры *Clostridium pasteurianum* JEG2, растущей на бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой. В зависимости от протекания ферментаций ферментируемые культуры подвергали процессу в течение 25-35 ч, после чего их анализировали. Результаты (химических) анализов обобщены в табл. 1, приведенной ниже.

Таблица 1

	Ферментатор 1	Ферментатор 2	Ферментатор 3
Компонент (г/л)	<i>Escherichia coli</i> TG128	<i>Escherichia coli</i> TG128 + <i>Clostridium pasteurianum</i> NCCB 100154	<i>Escherichia coli</i> TG128 + <i>Clostridium pasteurianum</i> NCCB 100154 + тетрадеcanoил-лактат
R-лактат	82,6	28,2	81,8
S-лактат	0	2	0,3
% энантиомерный избыток: (R-S)/(R+S)	100	86,8	99,3
Этанол	0,07	0,4	0,08
Глюкоза	1,9	14,4	2,3
Муравьиная кислота	< 0,2	2	< 0,2
Уксусная кислота	0,2	2,3	0,3
Пропионовая кислота	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Масляная кислота	< 0,1	6,6	0,1
Пировиноградная кислота	< 0,1	< 0,1	< 0,1
2-гидрокси масляная кислота	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Гликолевая кислота	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Щавелевая кислота	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Сорбиновая кислота	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Фумаровая кислота	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Янтарная кислота	0,1	< 0,1	< 0,1
Бензойная кислота	< 0,3	< 0,3	< 0,3

Маленновая кислота	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Яблочная кислота	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Лимонная кислота	< 0,5	< 0,5	< 0,5

Через 12 ч после инокулирования обнаружили, что ферментатор 2 начал продуцировать большой объем пены и гнилостный запах. Микроскопическое исследование культурального бульона выявило присутствие большого количества клеток, несущих эндоспоры. Это явление обнаруживали тогда, когда *Clostridium pasteurianum* JEG2 выращивали без ограничений.

Ферментатор 3, который также инокулировали смешанной культурой *Escherichia coli* TG128 и *Clostridium pasteurianum* JEG2, а также в который загружали 0,05% (мас./об.) тетрадеcanoил-лактилата (C₁₄-лактилат), не приводил к образованию пены или гнилостного запаха. Кроме того, микроскопическое исследование культурального бульона, отобранного из ферментатора 3, продемонстрировало, что в нем отсутствовали клетки, несущие эндоспоры.

Производительность ферментатора 3 во всех отношениях была близка производительности ферментатора 1, который инокулировали чистой культурой *Escherichia coli* TG128. Кроме того, химический анализ ферментируемого бульона (табл. 1) продемонстрировал, что отсутствует различие в профиле загрязнений между стандартной ферментацией *Escherichia coli* TG128 (ферментатор 1) и смешанной культурой *Escherichia coli*/*Clostridium pasteurianum* JEG2 с тетрадеcanoил-лактилатом (ферментатор 3). Процент энантиомерного избытка лактата, продуцируемого в ферментаторах 1 и 3, близок к 100, и только небольшое количество S-лактата обнаруживали в ферментаторе 3, возможно введенного в результате омыления лактилатного эфира.

С другой стороны, процент энантиомерного избытка в ферментаторе 2 был значительно ниже вследствие неограниченного роста *Clostridium pasteurianum* JEG2. Кроме того, общее количество молочной кислоты, продуцируемой в ферментаторе 2, также было значительно ниже. Процент энантиомерного избытка определяют следующим образом: $((R-S)/(R+S)) \times 100$, где R и S представляют соответствующие фракции энантиомеров в ферментируемом бульоне, содержащем R- и S-лактат.

Те же самые результаты обнаружены тогда, когда ферментатор 3 обогащали 0,025% (мас./об.) тетрадеcanoил-лактилата (C₁₄-лактилат) вместо 0,05% (мас./об.).

Пример 2. Действие смеси деканойл-лактилата (C₁₀-лактилата) и додеканойл-лактилата (C₁₂-лактилата) или смеси додеканойл-лактилата (C₁₂-лактилата) и тетрадеканойл-лактилата (C₁₄-лактилата) на смешанные культуры *Escherichia coli* и *Clostridium pasteurianum*.

В идентичном эксперименте, проводимом, как описано в примере 1, тестировали эффективность 0,05% (мас./об.) АМСЕТ 3400Е и 0,05% (мас./об.) АМСЕТ 4530Е в отношении подавления роста *Clostridium pasteurianum* JEG2 в культуре *Escherichia coli* TG128.

Производительность ферментатора 3 с АМСЕТ 3400Е или АМСЕТ 4530Е была во всех отношениях похожа на производительность ферментатора 1, который инокулировали чистой культурой *Escherichia coli* TG128. Кроме того, химический анализ ферментируемого бульона продемонстрировал, что отсутствует различие в профиле загрязнений между стандартной ферментацией *Escherichia coli* TG128 (ферментатор 1) и смешанной культурой *Escherichia coli*/*Clostridium pasteurianum* JEG2 с АМСЕТ 3400Е или АМСЕТ 4530Е (ферментатор 3). Процент энантиомерного избытка лактата, продуцируемого в ферментаторах 1 и 3, близок к 100 для АМСЕТ 3400Е и АМСЕТ 4530Е.

Пример 3. Тесты *in vitro* лактилатов против *Clostridium perfringens*.

Эффективность лактилатов, определенных в формуле 1, и сложных эфиров глицерина, определенных в формуле 2, в отношении подавления роста тестировали против *Clostridium perfringens* ATCC 13124 в культуральной системе Bioscreen C.

Оптическую плотность культур автоматически измеряли через фиксированные временные интервалы при 420-580 нм с использованием широкополосного фильтра. Скорость роста тестируемых организмов определяли при 30°C. Для гарантии условий с низким содержанием кислорода Bioscreen располагали внутри анаэробного кабинета, оборудованного датчиком кислорода типа M-12 (In Vivo 400 hypoxia workstation, Biotrace International Plc, Bridgend, United Kingdom). Парциальное давление кислорода регулировали при 0% кислорода с использованием смешивающего газа модуля Ruskinn (Biotrace International Plc).

Бульон с сердечно-мозговой вытяжкой готовили с различными количествами различных лактилатов и сложных эфиров глицерина, как указано в табл. 2, приведенной ниже.

Тестировали следующие соединения: октаноил-лактилат (C₈-лактилат), деканойл-лактилат (C₁₀-лактилат), додеканойл-лактилат (C₁₂-лактилат), тетрадеканойл-лактилат (C₁₄-лактилат), гексадеканойл-лактилат (C₁₆-лактилат), olacta (октадеcanoил-лактилат, C_{18:1}-лактилат), АМСЕТ 3400Е, АМСЕТ 4530Е, моно/ди C₈-глицерин, моно/ди C₁₀-глицерин, моно/ди C₁₂-глицерин, моно/ди C₁₄-глицерин, тетрадекановую кислоту (миристиновую кислоту) и тетрадецилсульфат натрия (миристилсульфат натрия).

Таблица 2

Вещества	Диапазон концентраций % (мас./об.)	Размер шага концентраций % (мас./об.)
Октоноил-лактат (C8-лактат)	0 – 0,5	0,1
Деканоил-лактат (C10-лактат)	0 – 0,1	0,02
Додеканоил-лактат (C12-лактат)	0 – 0,01	0,002
Тетрадеканоил-лактат (C14-лактат)	0 – 0,01	0,001
Гексадеканоил-лактат (C16-лактат)	0 – 0,01	0,002
Олакта (Октадеценил-лактат, C18:1-лактат)	0 – 0,1	0,02
АМСЕТ 3400Е (C10/C12-лактат)	0 – 0,01	0,001
АМСЕТ 4530Е (C12/C14-лактат)	0 – 0,01	0,001
моно/ди C8-глицерин	0 – 0,5	0,05
моно/ди C10-глицерин	0 – 0,1	0,01
моно/ди C12-глицерин	0 – 0,01	0,001
моно/ди C14-глицерин	0 – 0,01	0,001
Тетрадекановая кислота (миристиновая кислота)	0 – 0,01	0,001
Тетрадецилсульфат натрия (мирицилсульфат натрия)	0 – 0,01	0,001

Тетрадекановую кислоту (миристиновая кислота), тетрадецилсульфат натрия (мирицилсульфат натрия) приобретены в Sigma-Aldrich.

pH сред корректировали на уровне 6,0 при помощи 9 М серной кислоты с использованием pH-метра HandyLab pH 12, оборудованного pH (микро) зондом BlueLine 16 (№ 285129163). Все среды стерилизовали путем фильтрования с использованием 0,45 мкм фильтров из ацетата целлюлозы (шприцевой фильтр для Minisart, стерильный и апиногенный, № 16555, Sartorius, Göttingen, Germany) (9). По 300 мкл каждой среды переносили в панель стерильного 100-луночного планшета Bioscreen Honeycomb (Thermo electron Oy, Vantaa, Finland). Планшеты с заполненными лунками хранили при -30°C до последующего использования. Лунки планшетов инокулировали 3 мкл посевной культуры с использованием стерильного автоматического диспенсера Hamilton (Hamilton, Bonaduz, Switzerland). Жидкие посевные культуры *Clostridium perfringens* ATCC 13124 готовили в пробирках с закручивающимися крышками (100×16 мм), содержащих 10 мл бульона с сердечно-мозговой вытяжкой (Oxoid CM225, Basingstoke, United Kingdom) в течение 24 ч при 30°C.

В табл. 3 представлены величины MIC для лактилатов, сложных эфиров глицерина, тетрадекановой кислоты (миристиновой кислоты) и тетрадецилсульфата натрия (мирицилсульфата натрия) для *Clostridium perfringens* ATCC 13124 в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой. В скобках приведено количество повторов.

Таблица 3

Величины МИС для различных производных жирных кислот для *Clostridium perfringens* ATCC 13124 в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой (количество повторов приведено в скобках)

Вещества	Величина МИС % (мас./об.)
Октаноил-лактат (C8-лактат)	0,05 (2)
Деканоил-лактат (C10-лактат)	0,04 (2)
Додеканоил-лактат (C12-лактат)	0,002 (2)
Тетрадеканоил-лактат (C14-лактат)	0,001 (2)
Гексадеканоил-лактат (C16-лактат)	0,002 (2)
Олакта (Октадеценил-лактат, C18:1-лактат)	0,02 (2)
АМСЕТ 3400Е (C10/C12-лактат)	0,02 (3)
АМСЕТ 4530Е (C12/C14-лактат)	0,001 (3)
моно/ди C8-глицерин	0,1 (3) 0,2 (4)
моно/ди C10-глицерин	0,02 (2) 0,04 (2)
моно/ди C12-глицерин	>0,01 (2)
моно/ди C14-глицерин	>0,01 (4)
Тетрадекановая кислота (Миристиновая кислота)	>0,01 (3)
Тетрадецилсульфат натрия (Мирицилсульфат натрия)	0,001 (3)

По-видимому, даже при очень низкой концентрации лактилатов и сложные эфиры глицерина способны подавлять рост *Clostridium perfringens* ATCC 13124.

Пример 4. Антимикробные свойства некоторых лактилатов и моно/диэфиров C₈-глицерина.

Эффективность выбранного количества различных лактилатов, определенных в формуле 1, и моно/диэфира C₈-глицерина (моно/ди каприлового), определенного в формуле 2, в отношении подавления роста, тестировали против набора грамположительных и грамотрицательных бактерий в культуральной системе Bioscreen C. Оптическую плотность культур автоматически измеряли через фиксированные временные интервалы при 420-580 нм с использованием широкополосного фильтра. Скорость роста тестируемых организмов определяли при 30°C.

Бульон с сердечно-мозговой вытяжкой готовили с различными количествами лактилатов или моно/диэфиров C₈-глицерина (моно/ди каприлового). Тестировали следующие соединения: АМСЕТ 3400Е, АМСЕТ 4530Е, EMPLEX и АМСЕТ 200С.

pH сред корректировали на уровне 6,0 при помощи 9 М серной кислоты с использованием pH-метра HandyLab pH 12, оборудованного pH (микро) зондом BlueLine 16 (№ 285129163). Все среды стерилизовали путем фильтрования с использованием 0,45 мкм фильтров из ацетата целлюлозы (шприцевой фильтр для Minisart, стерильный и апиригенный, № 16555, Sartorius, Göttingen, Germany). 300 мкл каждой среды переносили в панель стерильного 100-луночного планшета Bioscreen Honeycomb (Thermo electron Oy, Vantaa, Finland). Планшеты с заполненными лунками хранили при 4°C до последующего использования. Лунки планшетов инокулировали 3 мкл соответствующей тестируемой культуры с использованием стерильного автоматического диспенсера Hamilton (Hamilton, Bonaduz, Switzerland). Жидкие посевные культуры готовили из следующих культур, используемых в данном исследовании:

Escherichia coli серотип O157:H7 (ATCC 700728);

Escherichia coli (ATCC 8739);

Staphylococcus aureus (ATCC 6538P);

Listeria monocytogenes (F2399);

Listeria monocytogenes (ATCC 7644);

Listeria monocytogenes NFPA 83 (Seman, D. L., A. C. Borger, et al. (2002) Journal of Food Protection 65(4): 651-658);

Listeria monocytogenes LCDC 861 (Seman, D. L., A. C. Borger, et al. (2002) Journal of Food Protection 65(4): 651-658);

Listeria innocua (ATCC 33090);

Listeria innocua штамм TNO (TNO, Zeist, The Netherlands);

Salmonella enterica (ATCC 13076, *S. Enteritidis*);
Salmonella enterica (ATCC 13311, *S. Typhimurium*);
Salmonella enterica JAVA (NCTC 8458, NCTC: Национальная коллекция типовых культур, Porton Down, Salisbury, United Kingdom);
Lactobacillus sakei (DSMZ 20017, DSMZ:Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany);
Lactobacillus plantarum (DSMZ 20174);
Lactobacillus curvatus (DSMZ 20019);
Bacillus cereus (ATCC 11778);
Pseudomonas lundensis (LMG 13517, LMG: Бельгийские координированные коллекции микроорганизмов/ коллекция бактерий LMG, Gent, Belgium); и,
Pseudomonas fragi (LMG 2191).

Все культуры переносили ежедневно в пробирки с закручивающимися крышками (100×16 мм), держащие 10 мл бульона с сердечно-мозговой вытяжкой (Oxoid CM0225, Basingstoke, UK). Виды *Lactobacillus* переносили в бульоне MRS (Oxoid CM0359). Все культуры инкубировали при 30°C и без встряхивания.

Авторы изобретения исследовали действия различных концентраций АМСЕТ 3400Е, АМСЕТ 4530Е, ЕМПЛЕХ и АМСЕТ 200С.

Данные, которые обобщены в табл. 4 и 5, приведенных ниже, демонстрируют, что грамположительные бактерии более чувствительны к этим соединениям по сравнению с грамотрицательными видами. Данные в табл. 5 также демонстрируют, что АМСЕТ 200С активен против гораздо более широкого диапазона организмов, чем лактилаты, и он охватывает также грамотрицательные бактерии. Эффективная концентрация АМСЕТ 200С (С₈-глицерин моно/ди) против грамотрицательных бактерий составляет 0,5-1% (мас./мас.).

Таблица 4
 Действие АМСЕТ 3400Е, АМСЕТ 4530Е, ЕМПЛЕХ и АМСЕТ 200С
 на различные грамположительные и грамотрицательные бактерии

Штамм	АМСЕТ 3400Е (C10/C12- лактилат)	АМСЕТ 4530Е (C12/C14- лактилат)	Emplex	АМСЕТ 200С (C8-глицерин моно/ди)
<i>Listeria monocytogenes</i> LCDC 861	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Listeria monocytogenes</i> NFPA 83	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	+ (-)	+ (-)	- (-)	- (-)
<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20019	+ (-)	+ (-)	- (-)	- (-)
<i>Lactobacillus sakei</i> DSM 20017	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)

<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Salmonella enterica</i> JAVA strain	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Pseudomonas lundensis</i> LMG 13517	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Pseudomonas fragi</i> LMG 2191	(-)	(-)	(-)	(-)

Тестировали два диапазона концентраций: 0-0,1% (мас./мас.) и 0-0,01% (мас./мас.). В табл. 4 результаты для диапазона концентраций 0-0,01% представлены в скобках. Значок "+" указывает на подавление. Грамположительные организмы представляют собой *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* и *Lactobacillus*.

Таблица 5

Действие АМСЕТ 3400Е, АМСЕТ 4530Е, ЕМРЕХ и АМСЕТ 200С на различные грамположительные и грамотрицательные бактерии

Штамм	АМСЕТ 3400Е (С10/С12-лактилат)	АМСЕТ 4530Е (С12/С14-лактилат)	Emplex	АМСЕТ 200С (С8-глицерин моно/ди)
<i>Listeria monocytogenes</i> F2399	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> LCDC 861	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> NFPA 83	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	+	+	+	+
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	+	+	+	+
<i>Listeria innocua</i> штамм TNO	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	+	+	+	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20019	НТ	НТ	НТ	+
<i>Lactobacillus sakei</i> DSM 20017	НТ	НТ	НТ	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	НТ	НТ	НТ	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> штамм JAVA	-	-	-	+
<i>Pseudomonas lundensis</i> LMG 13517	НТ	НТ	НТ	-
<i>Pseudomonas fragi</i> LMG 2191	НТ	НТ	НТ	-

Тестируемые диапазоны концентраций представляли собой: 0-1% (мас./мас.). В табл. 5 значок "+" указывает на подавление, НТ: не тестировали. Грамположительные организмы представляют собой *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* и *Lactobacillus*.

Пример 5. Этанольная ферментация с *Saccharomyces cerevisiae*.

В этом примере документировано действие низкой концентрации лактилатной смеси в этанольной ферментации с *Saccharomyces cerevisiae*, где указанную ферментацию осуществляли на мелассах тростниково-сахарного производства, и ее искусственно загрязняли смешанной культурой видов *Lactobacillus*.

Культуры и условия выращивания культур.

Saccharomyces cerevisiae MUCL30115 получали из Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (BCCM/MUCL, Louvain-la-Neuve, Belgium) и предварительно выращивали в дрожжевом-пептоновом-глюкозном бульоне (YPG). Бульон YPG содержал на литр деминерализованной воды: 40 г моногидрата глюкозы; 10 г пептона Vacto™ (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA); и 5 г дрожжевого экстракта Vacto™ (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA). pH среды доводили до 6,0-7,0 при помощи 1 н. HCl. Культуры инкубировали во встряхиваемых колбах при комнатной температуре.

Lactobacillus brevis LMG11438 получали из Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (BCCM/LMG, Gent, Belgium). *Lactobacillus fermentum* AR748 и *Lactobacillus fructivorans* AR742 получали из Corbion Purac B.V., Gorinchem, The Netherlands. Все штаммы предварительно выращивали на бульоне

MRS (de Man et al. (1960), A medium for the cultivation of lactobacilli, J. Appl. Bacteriology, 23(1): 130-135) и инкубировали при 30°C в стационарных колбах с закручивающимися крышками. Смешанную культуру готовили путем смешивания равных объемов трех культур *Lactobacillus*.

Все эксперименты по ферментированию осуществляли в стеклянных ферментаторах с рубашкой объемом 3 л, содержащих 0,5 литров жидкой среды, имеющей следующий состав: 50 г меласс тростниково-сахарного производства (85°Brix); и 450 мл деминерализованной воды. Температуру в каждой ферментации контролировали на уровне 30°C с использованием циркуляторной водяной бани, а pH контролировали на уровне 5,5 при помощи 1 н. NaOH.

В каждый из двух первичных ферментаторов (А, В) инокулировали по 50 мл активно ферментируемой культуры *Saccharomyces*: в обе эти культуры также вводили по 10 мл смешанной культуры *Lactobacillus*. В один из этих ферментаторов (А) добавляли 0,5 мл раствора, содержащего 10% (мас./мас.) Pationic 122А, для исследования действия на него лактилатов.

После 24 ч ферментирования 9-10 об.% инокулюма извлекали из каждого ферментера (А, В) и соответственно переносили в дополнительные ферментаторы (А', В'), содержащие свежую среду: ферментирование в первичных ферментаторах (А, В) продолжалось. С использованием этого способа обратного выбрасывания осуществляли от шести до восьми дополнительных переносов инокулюма, каждый после 24 ч ферментирования в ферментаторе-источнике.

Аналитические способы.

Количества L(+)-молочной кислоты, D(-)-молочной кислоты и остаточной глюкозы определяли с использованием ферментативных процедур. В особенности каждый осуществляли в соответствии с приведенным производителем протоколом: глюкозу исследовали с использованием набора K-Gluc, имеющегося в продаже от Megazyme International; D-молочную кислоту исследовали с использованием набора K-Date, имеющегося в продаже от Megazyme International; и L-молочную кислоту исследовали с использованием набора L-Date, имеющегося в продаже от Megazyme International.

Органические кислоты и этанол определяли при помощи анализа путем газовой хроматографии.

Результаты.

В табл. 6 ниже указаны определенные количества L(+)-молочной кислоты, D(-)-молочной кислоты и этанола в ферментациях, загрязненных смешанной культурой видов *Lactobacillus*. В тех ферментируемых культурах *Saccharomyces cerevisiae*, которые также содержали Pationic 122А, продемонстрировано значительное уменьшение постоянных концентраций L(+) и особенно D(-)-молочной кислоты по сравнению с культурами, не содержащими лактилатную смесь. Кроме того, концентрация этанола в культурах *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих Pationic 122А, значительно увеличивалась по сравнению с культурами, в которых лактилатная смесь отсутствовала. Положительные действия Pationic 122А могут под держиваться в течение по меньшей мере 6-8 последовательных переносов.

Таблица 6

Ферментация мелассы <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , контаминированными смешанной культурой LAB				
Перенос №	Присутствие Pationic 122А	L(+)-молочная кислота (г/л)	D(-)-молочная кислота (г/л)	Этанол (% мас./мас.)
2	Нет	1,40	6,80	1,20
3	Нет	1,18	6,50	1,30
4	Нет	1,28	6,79	1,60
5	Нет	1,16	3,15	1,30
6	Нет	1,42	3,31	1,60
Среднее значение		1,29	5,31	1,40

Ферментация мелассы <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , загрязненными смешанной культурой LAB и в присутствии Pationic 122A				
Перенос №	Присутствие Pationic 122A	L(+)-молочная кислота (г/л)	D(-)-молочная кислота (г/л)	Этанол (% мас./мас.)
2	Да	0,15	2,10	1,30
3	Да	0,16	0,90	2,10
4	Да	0,15	0,98	2,20
5	Да	0,21	0,97	2,20
6	Да	0,23	1,33	1,80
Среднее значение		0,18	1,25	1,92

При изучении описания специалисту в данной области техники понятно, что различные модификации могут быть осуществлены в раскрытых воплощениях без выхода за пределы объема изобретения. Таким образом, предполагается, что воплощения и примеры можно рассматривать исключительно как иллюстративные, при этом истинный объем изобретения определяется следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

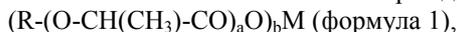
- Ферментационная среда, содержащая инокулянт, содержащий культуру грамотрицательных бактерий, плесневых грибов или дрожжей; субстрат для микробного роста; и в качестве экзогенного добавляемого ингредиента антибактериальный агент для подавления роста грамположительных загрязняющих бактерий, состоящий из по меньшей мере одного лактилата формулы 1 $(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$ (формула 1), где R представляет собой C_4-C_{18} -ацильную группу, имеющую алкильную или алкенильную цепь, которая может быть разветвленной или неразветвленной; M представляет собой протон (H^+) или противоион, выбранный из группы, состоящей из Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, аммония и замещенного аммония, имеющего один или более чем один (C_{1-4})алкил, возможно замещенный одним или более чем одним гидроксидом; a представляет собой целое число от 1 до 3; и b равен 1 или 2, соответствующая валентности M.
- Ферментационная среда по п.1, где R представляет собой ацильную группу, имеющую прямую или разветвленную цепь, состоящую из 8-14 атомов углерода.
- Ферментационная среда по п.2, где R представляет собой ацильную группу с прямой или разветвленной цепью, состоящую из 12-14 атомов углерода.
- Ферментационная среда по п.3, где "a" в формуле 1 равен 1.
- Ферментационная среда по любому из пп.1-4, где количество антибактериального агента составляет от 0,001 до 0,5 мас.% на основе общей массы среды.
- Ферментационная среда по п.5, где количество антибактериального агента составляет от 0,025 до 0,5 мас.% на основе общей массы среды.
- Ферментационная среда по любому из пп.1-6 для продуцирования этанола, 1,3-пропандиола, глицерина, бутанола, 1,4-бутандиола, арабита, ксилита, сорбита, маннита, уксусной кислоты, пропионовой кислоты, 3-гидроксипропионовой кислоты, молочной кислоты, янтарной кислоты, 2,5-фурандикарбоновой кислоты, фумаровой кислоты, яблочной кислоты, адипиновой кислоты, лимонной кислоты, аконитовой кислоты, глутаминовой кислоты, итаконовой кислоты, левулиновой кислоты, глутаровой кислоты, аспарагиновой кислоты, малоновой кислоты и их смесей.
- Ферментационная среда по любому из пп.1-6 для продуцирования 1,4-бутандиола, пропионовой кислоты, 3-гидроксипропионовой кислоты, молочной кислоты, янтарной кислоты, 2,5-фурандикарбоновой кислоты, фумаровой кислоты, яблочной кислоты или итаконовой кислоты.
- Инокулянт для ферментационной среды, содержащий культуру грамотрицательных бактерий, плесневых грибов или дрожжей; и антибактериальный агент для подавления роста грамположительных загрязняющих бактерий, состоящий из по меньшей мере одного лактилата формулы 1 $(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$ (формула 1), где R представляет собой C_4-C_{18} -ацильную группу, имеющую алкильную или алкенильную цепь, которая может быть разветвленной или неразветвленной; M представляет собой протон (H^+) или противоион, выбранный из группы, состоящей из Li, Na, K,

Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, аммония и замещенного аммония, имеющего один или более чем один (C₁₋₄)алкил, возможно замещенный одним или более чем одним гидроксидом;

a представляет собой целое число от 1 до 3; и

b равен 1 или 2, соответствуя валентности M.

10. Применение антибактериального агента для подавления роста грамположительных загрязняющих бактерий при культивировании грамотрицательных бактерий, или плесневых грибов, или дрожжей, где указанный антибактериальный агент состоит из по меньшей мере одного лактилата формулы 1



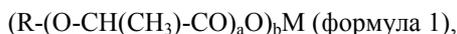
где R представляет собой C₄-C₁₈-ацильную группу, имеющую алкильную или алкенильную цепь, которая может быть разветвленной или неразветвленной;

M представляет собой протон (H⁺) или противоион, выбранный из группы, состоящей из Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, аммония и замещенного аммония, имеющего один или более чем один (C₁₋₄)алкил, возможно замещенный одним или более чем одним гидроксидом;

a представляет собой целое число от 1 до 3; и

b равен 1 или 2, соответствуя валентности M.

11. Способ предотвращения или уменьшения микробных инфекций, вызванных грамположительными бактериями, в ферментируемой культуре грамотрицательных бактерий, включающий добавление в культуру эффективного количества антибактериального агента, состоящего из по меньшей мере одного лактилата формулы 1



где R представляет собой C₄-C₁₈-ацильную группу, имеющую алкильную или алкенильную цепь, которая может быть разветвленной или неразветвленной;

M представляет собой протон (H⁺) или противоион, выбранный из группы, состоящей из Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, аммония и замещенного аммония, имеющего один или более чем один (C₁₋₄)алкил, возможно замещенный одним или более чем одним гидроксидом;

a представляет собой целое число от 1 до 3; и

b равен 1 или 2, соответствуя валентности M.

12. Способ получения продукта ферментации, включающий стадии

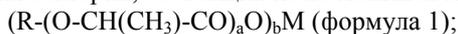
обеспечения ферментационной среды; и

введения в указанную среду инокулянта, содержащего культуру грамотрицательных бактерий, плесневых грибов или дрожжей,

отличающийся тем, что указанная ферментационная среда содержит

субстрат для микробного роста; и

в качестве экзогенного добавляемого ингредиента антибактериальный агент для подавления роста грамположительных загрязняющих бактерий, состоящий из по меньшей мере одного лактилата формулы 1



где R представляет собой C₄-C₁₈-ацильную группу, имеющую алкильную или алкенильную цепь, которая может быть разветвленной или неразветвленной;

M представляет собой протон (H⁺) или противоион, выбранный из группы, состоящей из Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, аммония и замещенного аммония, имеющего один или более чем один (C₁₋₄)алкил, возможно замещенный одним или более чем одним гидроксидом;

a представляет собой целое число от 1 до 3; и

b равен 1 или 2, соответствуя валентности M.

13. Способ по п.12, где указанный инокулянт содержит грамотрицательные бактерии, выбранные из группы, состоящей из *Escherichia coli*, *Acinetobacter*, *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Cyanobacteria*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Francisella*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Pantoea*, *Pasteurellaceae*, *Pseudomonas*, *Proteus*; *Salmonella*, *Selenomonadales*, *Serratia*, *Shigella*, *Treponema*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Zygomonas* и их комбинаций.

14. Способ по п.12, где указанный инокулянт содержит одну или более чем одну грамотрицательную бактерию, выбранную из группы, состоящей из *Escherichia coli*, видов *Pseudomonas* и видов *Pasteurellaceae*.

15. Способ по п.14, где указанный инокулянт содержит одну или более чем одну грамотрицательную бактерию, выбранную из группы, состоящей из видов рода *Actinobacillus*, *Hemophilus* и *Pasteurella*.

16. Способ по п.12, где указанный инокулянт содержит один или более чем один плесневый гриб, выбранный из родов *Aspergillus* и *Rhizopus*.

17. Способ по п.16, где указанный инокулянт содержит один или более чем один плесневый гриб, выбранный из *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oligosporus* и *Rhizopus oryzae*.

18. Способ по п.12, где указанный инокулянт содержит один или более чем один род дрожжей, выбранный из родов *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera*, *Pichia* и *Saccharomyces*.

19. Способ по любому из пп.12-18 для получения продукта ферментации, выбранного из группы, состоящей из этанола, 1,3-пропандиола, глицерина, бутанола, 1,4-бутандиола, арабита, ксилита, сорбита,

маннита, ацетоина, уксусной кислоты, пропионовой кислоты, 3-гидроксипропионовой кислоты, молочной кислоты, янтарной кислоты, фурандикарбоновой кислоты, fumarовой кислоты, яблочной кислоты, адипиновой кислоты, лимонной кислоты, аконитовой кислоты, глутаминовой кислоты, итаконовой кислоты, леулиновой кислоты, глутаровой кислоты, аспарагиновой кислоты, малоновой кислоты, глицина, серина, треонина, лизина, изопрена, полигидроксипропионата и их смесей.

20. Способ по любому из пп.12-18 для получения продукта ферментации, выбранного из группы, состоящей из этанола, 1,3-пропандиола, глицерина, бутанола, 1,4-бутандиола, арабита, ксилита, сорбита, маннита, уксусной кислоты, пропионовой кислоты, 3-гидроксипропионовой кислоты, молочной кислоты, янтарной кислоты, 2,5-фурандикарбоновой кислоты, fumarовой кислоты, яблочной кислоты, адипиновой кислоты, лимонной кислоты, аконитовой кислоты, глутаминовой кислоты, итаконовой кислоты, леулиновой кислоты, глутаровой кислоты, аспарагиновой кислоты, малоновой кислоты и их смесей.

21. Способ по любому из пп.12-18 для получения продукта ферментации, выбранного из пропионовой кислоты, молочной кислоты, янтарной кислоты, 1,4-бутандиола и 2,5-фурандикарбоновой кислоты.

