



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105050400 B

(45)授权公告日 2018.04.24

(21)申请号 201480016081.2

A01N 37/10(2006.01)

(22)申请日 2014.03.14

A01N 37/36(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A01N 37/40(2006.01)

申请公布号 CN 105050400 A

C12P 7/06(2006.01)

A01P 1/00(2006.01)

(43)申请公布日 2015.11.11

(30)优先权数据

13/834,259 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.09.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/027675 2014.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/152734 EN 2014.09.25

(73)专利权人 索理思科技开曼公司

地址 瑞士沙夫豪森

(72)发明人 C·E·科恩萨洛 J·S·查普曼

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 李振东 过晓东

(56)对比文件

US 2006/0204551 A1,2006.09.14,第4页.

CN 1652701 A,2005.08.10,说明书第20页.

US 2011/0027387 A1,2011.02.03,说明书第2页.

US 3600198 A,1971.08.17,第4栏.

US 2011/0054024 A1,2011.03.03,摘要,第5,7页.

Gabriele Aquilina et al..Scientific Opinion on safety and efficacy of sodium benzoate, propionic acid and sodium propionate for pigs, poultry, bovines, sheep, goats, rabbits, horses EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP).《EFSA Journal》.2011,第9卷(第9期),第1-17页.

审查员 南艳

(51)Int.Cl.

A01N 37/02(2006.01)

A01N 37/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

(54)发明名称

在工业过程中用于防治微生物的有机酸的协同组合

(57)摘要

本发明涉及包含两种有机酸或其盐的混合物的协同抗微生物的组合物,其中至少一种有机酸选自以下组中:柠檬酸、苯甲酸、丙酸、酒石酸、乙酸、苯磺酸、草酸、苹果酸、水杨酸、乳酸葡萄糖酸、羟基乙酸及它们的盐;所述酸以由32:1至1:32的比例混合。本发明还涉及在发酵过程中使用任意两种有机酸的组合选择性防治非期望的微生物的方法。

CN 105050400 B

1. 控制在发酵过程中使用的含水系统中非期望的微生物浓度的方法, 该方法包括以下步骤:

(a) 将可发酵碳水化合物引入水溶液中;

(b) 将至少一种酵母引入所述溶液中;

(c) 将至少一种第一有机酸和至少一种第二有机酸引入所述含水系统中,

其中所述第一有机酸是柠檬酸或其盐, 所述第二有机酸是丙酸或其盐, 所述至少一种第一有机酸或其盐与所述至少一种第二有机酸或其盐的比例为由32:1至1:32。

2. 根据权利要求1的方法, 其中在所处理的含水系统中所述第一有机酸的浓度为至少100ppm。

3. 根据权利要求1的方法, 其中在所处理的含水系统中所述第一有机酸的浓度为至少100ppm且最高12500ppm。

4. 根据权利要求1的方法, 其中柠檬酸与丙酸的比例为由32:1至1:16, 在待处理的含水系统中所述第一有机酸的量为由100至12500ppm。

5. 控制在发酵过程中使用的流体水溶液中非期望的微生物浓度的方法, 该方法包括以下步骤:

(a) 将可发酵碳水化合物引入水溶液中;

(b) 将至少一种能够发酵碳水化合物的期望的微生物引入所述水溶液中;

(c) 将至少一种第一有机酸和至少一种第二有机酸引入所述含水系统中,

其中所述第一有机酸是柠檬酸或其盐, 所述第二有机酸是丙酸或其盐, 所述至少一种第一有机酸或其盐与所述至少一种第二有机酸或其盐的比例为由32:1至1:32。

6. 防治在发酵液或工业发酵过程或系统中非期望的微生物生长的方法, 该方法包括将包含以下成分的含水组合物添加至发酵液或工业发酵过程或系统的步骤:

(a) 至少一种第一有机酸, 及

(b) 至少一种第二有机酸,

其中第一有机酸不同于第二有机酸; 所述第一有机酸是柠檬酸或其盐; 所述第二有机酸是丙酸或其盐; 所述至少一种第一有机酸或其盐与所述至少一种第二有机酸或其盐的比例为由32:1至1:32。

7. 根据权利要求6的方法, 其中在含水系统中所述第一有机酸的浓度为至少100ppm。

8. 根据权利要求6的方法, 其中在所处理的含水系统中所述第一有机酸的浓度为至少100ppm且最高12500ppm。

9. 根据权利要求6的方法, 其中柠檬酸与丙酸的比例为由32:1至1:16, 在待处理的含水系统中所述第一有机酸的量为由100至12500ppm。

## 在工业过程中用于防治微生物的有机酸的协同组合

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗微生物剂的协同组合及其在工业过程、材料或产品中用于防治微生物的方法。

### 背景技术

[0002] 微生物,如酵母、真菌和细菌,用于生产许多种发酵产品,如工业级乙醇、白酒、啤酒、葡萄酒、药物和保健食品(提供健康益处的食品、如强化食品和膳食补充剂)、烘焙工业和工业化学品。

[0003] 酵母通常用于发酵过程。一种常用的酵母是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、主要用于烘焙和发酵的物种。非酵母菌属酵母也称作非传统酵母,也用于生产许多种商业产品。

[0004] 其他微生物也可用于生产发酵产品。例如,纤维素乙醇生产,由纤维素生物质生产乙醇,是使用真菌和细菌。这些分解纤维素真菌的例子包括里氏木霉(*Trichoderma reesei*)和绿色木霉(*Trichoderma viride*)。用于纤维素乙醇生产的细菌的一个例子是永达尔梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)。

[0005] 大多数用于酿酒厂和燃料乙醇厂的酵母购自特殊酵母的生产商。该酵母是通过繁殖过程生产的。繁殖涉及由小实验室酵母培养生长大量的酵母。在繁殖期间,向酵母供应通过有氧呼吸最佳生长所需或所期望的氧、氮、糖、蛋白质、脂质和离子。

[0006] 以前在酿酒厂,可以对酵母进行调理(conditioning)。调理与繁殖的区别在于其不涉及由小实验室培养大量生长。在调理期间,提供条件以使酵母再水合,将其由冬眠唤醒,并允许最大的厌氧生长和增殖。繁殖和调理的目的均是以高的存活率、高的出芽率及低水平的被其他微生物的侵染向发酵罐供应大体积的酵母。

[0007] 在繁殖和/或调理之后,酵母进入发酵过程。酵母在水溶液中与可发酵糖相结合。酵母消耗糖,将其转化成脂肪醇,如乙醇。

[0008] 发酵过程以可发酵碳水化合物的制备开始。在乙醇生产中,玉米是一种可能的可发酵碳水化合物。也可以代替其他碳水化合物,包括谷粒和含有纤维素-淀粉的材料,如小麦或西非高粱。也可以使用纤维素生物质,如麦秆和玉米秸秆。近年来,纤维素乙醇生产受到关注,因为其使用容易获得的非食物生物质以形成有价值的燃料。

[0009] 繁殖、调理和发酵过程可以采用分批或连续方法实施。分批过程用于小规模生产。每个批次完成后,开始一个新的批次。连续发酵法用于大规模生产,因为其实现连续供应,无需每次重启。

[0010] 在繁殖、调理或发酵过程中,醪液或发酵混合物可能变得被其他微生物如腐败菌污染。这些微生物与期望种的酵母竞争可发酵糖及其他可发酵碳水化合物,及延缓所期望的生物化学反应,由此降低产率。它们还会产生非期望的化学副产物,其会导致整个发酵批次酸败。

[0011] 乙醇生产者尝试增加由一蒲式耳谷粒(约56磅(25.4千克))产生乙醇的量。被微生

物污染会降低酵母的功效,从而难以达到或超过每蒲式耳2.8至2.9加仑乙醇(0.42至0.44升每千克)的所期望的水平。降低微生物的浓度会促进酵母繁殖和/或调理及提高酵母功效,从而能够达到和超过这些所期望的水平。

[0012] 在这三个过程任一期间,酵母会变得被非期望的酵母,细菌或其他非期望的微生物污染。这会在用于繁殖、调理或发酵的许多容器之一中发生。This包括但不限于繁殖罐、调理罐、发酵剂罐、发酵罐以及在这些单元之间的管线和热交换器。

[0013] 细菌或微生物污染以三种主要的方式降低发酵产率。首先,可用于酵母生产酒精的糖被细菌或其他非期望的微生物消耗及偏离酒精生产,降低产率。其次,细菌代谢的最终产物如乳酸和乙酸抑制酵母生长及酵母发酵/呼吸,这导致较低效率的酵母生产。最后,细菌或其他非期望的微生物与酵母竞争除糖以外的营养素。

[0014] 在发酵系统或容器变得被细菌或其他非期望的微生物污染之后,这些细菌或其他微生物的生长可以远远快于所期望的酵母。该细菌或其他微生物与酵母竞争可发酵糖,及延缓所期望的生物化学反应,由此降低产率。细菌还产生非期望的化学副产物,其会导致整个发酵批次酸败。去除这些细菌或其他非期望的微生物允许所期望的酵母茁壮成长,这产生更高的生产效率。

[0015] 乙醇产率仅降低百分之一也是对燃料乙醇工业特别重要的。在较大的设备中,这样的效率下降会导致每年1百万至3百万美元的收入减少。

[0016] 在繁殖、调理和发酵期间减少细菌或其他非期望的微生物的一些方法的优点在于酵母相对于其他微生物具有更高的温度和pH耐受性。这是通过施加热量或降低酵母溶液的pH实现的。然而,这些方法对于延缓细菌生长不是完全有效的。此外,所期望的酵母微生物在存活期间被压制,不被认为是有活力或健康的。因此,酵母也不能发挥作用。

[0017] 在乙醇工业中主要趋势是在发酵开始时降低醪液(原料)的pH至小于4.5。降低醪液的pH会减少一些种的细菌的种群数量。然而减少成问题的细菌的功效明显更低,如乳酸生成菌。由于用于乙醇生产的酵母被压制,也显然降低乙醇产率。

[0018] 另一个方法涉及用磷酸洗涤酵母。该方法不能有效地杀灭细菌及其他微生物。也会压制用于乙醇生产的酵母,从而降低其功效。

[0019] 另一个方法是在批次之间通过加热或使用苛性化学品以对工艺设备进行杀菌。这在生产期间对于杀灭酵母混合物中的细菌和其他微生物是无效的。

[0020] 在另一个方法中,将抗生素添加至酵母繁殖、调理或发酵批次,以使细菌失效。发酵工业典型地将抗生素用于调理、繁殖和发酵过程。抗生素剂量率在0.1至3.0mg/L之间的范围内,一般不超过6mg/L。然而,在调理、繁殖和发酵中使用抗生素仍然存在问题。抗生素价格昂贵,并且会大幅增加大规模生产的成本。此外,抗生素并不是对所有的细菌菌株都有效,如细菌的抗生素耐药性菌株。过度使用抗生素会导致产生细菌的抗生素耐药性菌株的额外的变体。

[0021] 抗生素残留及产生抗生素耐药性菌株是全球性的问题。这些考虑可能会导致将来出台反对使用抗生素的监管行动。一个方面的考虑是用于动物饲料的酒糟。酒糟是发酵过程的粮渣。欧洲国家不允许乙醇厂的副产物作为动物饲料销售,若在设备中使用抗生素。酒糟销售占乙醇厂收益的高达20%。副产物中的抗生素浓度可以在由1至3重量%的范围内,因此丧失了这一重要的收入来源。

[0022] 此外,在使用抗生素时还要考虑其他问题。抗生素的混合物应当频繁地加以平衡和改变,以避免单独使用,这会导致抗生素耐药性菌株。有时不能将有效量的抗生素添加至发酵混合物。例如,使用超过2mg/L的维吉尼霉素会抑制发酵,但是要求超过25mg/L以抑制融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*)的生长,其是新出现的成问题的细菌菌株。过度剂量或过度使用抗生素会压制酵母,及损害功效,或导致不符合规定。

[0023] 将发酵用于饮料的工业在历史上将酒花酸用于繁殖和发酵以防治与酵母竞争营养素的非期望的微生物。随着近年来燃料乙醇的扩展,以较低的程度使用酒花酸,以针对非期望的革兰氏阳性微生物。在酵母与非期望的微生物之间的竞争导致燃料乙醇的产率损失,这是因为非期望的微生物主要是乳杆菌(*Lactobacillus*)及醋杆菌(*Acetobacter*)降低发酵的功效。在饮料中,竞争微生物不仅降低功效,而且可以改变最终产品的美观和味道。

[0024] 有机酸具有许多应用,包括用作酸化剂、缓冲剂、抗氧化剂、螯合剂、增效剂、膳食补充剂、调味剂、防腐剂和抗微生物剂。有机酸由于其对细菌的作用而用作防腐剂。有机酸的作用模式是不溶解的酸通过被动扩散渗透穿过细菌细胞壁,及以两种方式破坏细胞的正常生理:酸溶解,因此降低内部pH,其在正常情况下接近中性,损害细菌的功能。酸的阴离子部分无法以其溶解形式离开细胞,在其中累积,破坏代谢功能及提高渗透压。

[0025] 因为乙醇产率的小幅下降也是对燃料乙醇工业特征重要的,所以乙醇生产者总是寻找提高功效的途径。使用抗微生物剂以消除、减少或控制含水系统中微生物的数量。然而,使用抗微生物剂总是会增加运行和产品的成本。此外,一些抗微生物剂可能在其抗微生物作用范围方面具有缺陷或者在其施用方式方面具有操作限制,如缺乏温度稳定性或者易于由于环境或化学因素而灭活。

[0026] 已知在工业水系统中存在微生物是工业过程中的一个重大的问题,导致降低产率和产品品质的问题。其中一个特别的例子是从玉米至乙醇的生物精炼,其中通过玉米秸秆将乳酸菌引入该过程。在发酵期间,这些细菌与产生乙醇的酵母竞争培养基和营养素,这降低了乙醇产率。目前,几乎所有的美国生物精炼厂使用抗菌剂,其中许多使用抗生素如维吉尼霉素。玉米生物精炼的一种重要产品是用作动物饲料的干酒糟,不含抗生素的饲料谷物的市场在增长。预计FDA很快会出台减少或消除在动物饲料中使用抗生素的规定。加拿大类似地关注酒糟中的抗生素其大多数生产用于出口。欧洲已经禁止在生产酒糟用于动物饲料的乙醇厂使用抗生素。在巴西,在生产用于出口的酵母提取物的工厂以不含抗生素的方式操作是强制性的。

[0027] 防治微生物对于许多工业而言是非常重要的,主要的策略是用抗微生物剂进行处理。使用抗微生物剂以消除、减少或控制含水系统中微生物的数量。然而,使用大多数抗微生物剂会增加运行和产品的成本,因此寻找实现微生物防治的更有效的途径。此外,许多抗微生物剂在其抗微生物作用范围方面具有缺陷或者在其施用方式方面具有操作限制,如缺乏温度稳定性或者易于由于环境或化学因素而灭活。

[0028] 因此,可以使用抗微生物剂的组合,特别优选为抗微生物剂的协同组合。抗微生物剂的协同组合可提供的抗微生物效应大于单种抗微生物剂之和,因此与仅是抗微生物功效方面的添加剂的组合相比,可以提供提高的性能价格比。

## 发明内容

[0029] 出于本说明书的目的,“微生物”和“微生物”的含义包括但不限于细菌、真菌、藻类、原生动物和病毒。本发明的组合物对其有效的优选的微生物是细菌。非期望的细菌的例子包括但不限于乳酸生成菌、乙酸生成菌及其他污染乙醇发酵过程的细菌。还应当理解,含水系统中的微生物可以位于或悬浮在流体中(例如浮游)或者位于与含水系统接触的表面上(例如生物膜)。词语和短语“防治”、“微生物防治”、“防治”及“抗微生物功效”在其含义中应当解释为包括但不限于抑制微生物生长、杀微生物、灭菌、保存、消毒或防止微生物二次生长。

[0030] 作为在此使用的ppm是作为单位体积的重量测量的,或者1ppm等于每升1mg(活性物质)。剂量是指在所处理的含水系统中组分的浓度。

[0031] 作为在此使用的术语“有机酸”还涉及其盐。

[0032] 本发明提供协同抗微生物的含水组合物,包括至少一种第一有机酸和至少一种第二有机酸的组合,及使用至少一种第一有机酸和至少一种第二有机酸的组合的方法。有机酸可以其酸的形式或其盐的形式使用。至少一种第一有机酸优选为柠檬酸。这些组合可用于防治含水系统和产品中的微生物。本发明能够在工业过程、材料或产品中在其存在被认为非期望时显著减少污染菌的数量。

[0033] 本发明的发明人发现,使用至少两种有机酸或它们的盐的组合,在含水系统中提供协同微生物防治。因此,组分的组合改善了抗微生物功效,超出基于其单独的抗微生物功效之和的预期。该出人意料地观察到的协同作用允许在工业过程中如生物精炼或期望的材料中使用减少的量的抗微生物剂以实现可接受的微生物防治。

[0034] 第一有机酸或第一组分以及作为与第一酸或第一组分不同的酸的第二有机酸或第二组分可用于本发明。适当地,可用于本发明的有机酸的非限制性例子包括但不限于柠檬酸、苯甲酸、丙酸、酒石酸、乙酸、苯磺酸、草酸、苹果酸、水杨酸、乳酸葡萄糖酸、羟基乙酸及它们的盐。出于本发明的目的,所述有机酸不是酒花酸。优选的第一有机酸或组分包括柠檬酸、丙酸及苯甲酸或它们的盐。更优选的有机酸是柠檬酸。优选的第二有机酸或组分包括丙酸、苯甲酸或它们的盐,其条件是:第一有机酸和第二有机酸是不同的酸。仅出于举例的目的,若柠檬酸或其盐是第一组分,则柠檬酸或其盐不可以是第二组分。有机酸在用于本发明时可以是其酸的形式或其盐的形式。

[0035] 本发明的一个实施方案是柠檬酸作为第一酸,连同至少一种第二有机酸,特别是第二有机酸可以是丙酸或苯甲酸或它们的盐。

[0036] 其中可使用所述组合物的含水系统的例子是生物精炼过程、工业发酵、冷却水、锅炉水、纸浆和造纸厂水、油气田注射水和采出水、油气管道和储存系统、燃料、压载水、废水、巴氏灭菌器、其他工业工艺用水、金属调理液、胶乳、聚合物、油漆、涂料、粘合剂、油墨、个人护理和家用产品、反渗透系统、电化学沉积系统、用于矿物提取的流体、矿浆、农产品调理、生物精炼水以及使用它们的系统。此外,所述组合物可用于其他发生含水系统的微生物污染的领域。

[0037] 在工业过程中不需要或非期望的微生物由于其物理存在或代谢活性而损害该过程的功效或产率。因此,例如在热交换器的表面上生长的微生物损害其在传热时的功效(由于其生物体及各种胞外聚合物的绝热性质),同时非期望的是微生物将过程的组分用作食物来源(例如制浆操作中的纤维素)或者通过分泌有机酸(代谢副产物)而改变过程的pH。非

期望的细菌的非限制性例子包括乳酸生成菌 (LAB) 及乙酸生成菌, 其中乳杆菌 (Lactobacillus) 及醋杆菌 (Acetobacter) 是突出的代表。

[0038] 这些有机酸的组合可用于生物精炼工业和发酵系统。

[0039] 待处理的含水系统的pH一般为由3至11, 或由3至7, 或由4至9, 或由4至8, 或由4至6.5, 或由4.5至6。一般而言, 有机酸在如下系统中功效最大, 其中该系统的pH小于该酸或其盐的至少一个pKa值。

[0040] 该组合物的组分可以相继地添加至待处理的含水系统, 或者先组合, 然后添加至待处理的系统。有机酸可以添加至含水侧系统 (aqueous side systems), 包含其他添加剂, 例如但不必然限制于表面活性剂、阻垢和防腐化合物、离子或非离子聚合物、pH调节剂及其他用于改变或修饰含水系统的化学性质的添加剂。将有机酸以第一酸与第二酸的由64:1直至1:32的比例、或由32:1至1:32的比例、或由32:1至1:16的比例、或由8:1至1:32的比例、或由8:1至1:16的比例、或由8:1至1:8的比例添加至待处理的系统。

[0041] 本领域技术人员能够容易地确定所需的组合物的浓度, 以实现可接受的微生物防治, 该浓度取决于基质。在待处理的系统中第一有机酸的使用量可以为由12500ppm低至100ppm。在待处理的含水系统中第一有机酸的使用量可以为由6250低至100ppm, 或由4000低至100ppm, 或由4000低至200ppm。一般使用至少100ppm、或至少200ppm、或至少300ppm的第一有机酸。第一有机酸与第二有机酸的比例可以为由64:1至1:32, 或由32:1至1:32, 或由8:1至1:32。在所处理的系统中使用的两种有机酸的总量一般小于20,000ppm, 或小于15,000ppm, 或小于11,000ppm。在所处理的系统中使用的两种有机酸的总量一般为至少200ppm或至少400ppm。

[0042] 在一个实施方案中, 第一有机酸是柠檬酸, 柠檬酸与第二有机酸的比例可以为由32:1至1:32, 或由8:1至1:32, 或由8:1至1:16。第二有机酸选自丙酸、苯甲酸或它们的盐。在待处理的含水系统中柠檬酸的使用量可以为由12500ppm低至100ppm。在待处理的含水系统中柠檬酸的使用量可以为由6250低至200ppm, 或由4000低至200ppm, 或由4000低至300ppm。在待处理的含水系统中一般使用至少100ppm、或至少200ppm、或至少300ppm的柠檬酸或其盐。

[0043] 在本发明的一个实施方案中, 至少一种第一有机酸包括柠檬酸, 至少一种第二有机酸包括丙酸或其盐, 其中柠檬酸与丙酸的比例为由64:1至1:16, 在待处理的含水系统中第一有机酸的量为由200至1000ppm。

[0044] 在本发明的一个实施方案中, 至少一种第一有机酸包括柠檬酸, 至少一种第二有机酸包括苯甲酸或其盐, 其中柠檬酸与苯甲酸的比例为由8:1至1:32, 在待处理的含水系统中第一有机酸的量为由200至1000ppm。

[0045] 可使用本发明的非期望的细菌的例子包括乳酸生成菌或乙酸生成菌。其包括但不限于乳杆菌 (Lactobacillus) 及醋杆菌 (Acetobacter)。

[0046] 在用于发酵系统中时, 所述酸可以在发酵系统的不同位置添加, 例如可以在发酵过程中的单个或多个位置添加, 包括一个或多个浆料罐、烹煮器、醪液冷却器、繁殖器及发酵罐。本领域技术人员也可以确定其他的添加位置。

[0047] 在采用本发明方法的发酵系统中, 可以降低细菌及其他非期望的微生物的浓度, 同时促进所期望的微生物的繁殖和/或调理。本发明的发明人发现, 第一有机酸连同至少一

种第二有机酸有效地降低了非期望的细菌及其他非期望的微生物的浓度,同时促进所期望的微生物的繁殖和/或调理。有机酸的组合提供协同的抗微生物处理,无需使用抗生素。

[0048] 在含水系统中用于降低非期望的微生物浓度、促进所期望的微生物繁殖及提高所期望的微生物功效的本发明方法的一个非限制性的实施方案包括:

[0049] (a) 将可发酵碳水化合物引入含水系统中,

[0050] (b) 将至少一种酵母或所期望的微生物引入所述含水系统中,及

[0051] (c) 使至少一种第一有机酸和至少一种第二有机酸与可发酵碳水化合物和/或酵母接触。

[0052] 优选的有机酸包括柠檬酸、丙酸及苯甲酸或它们的盐,更优选为柠檬酸。这些步骤可以相继地实施或以不同的顺序实施。第一有机酸和第二有机酸可以与酵母或者与发酵碳水化合物接触;或者可以将酵母和可发酵碳水化合物组合,然后将第一有机酸和第二有机酸引入酵母和碳水化合物的组合。第一有机酸和第二有机酸可以混合在一起,然后添加至含水系统,或者可以将它们分离地添加至含水系统。该含水系统可以在连续过程中,或者在分批过程的情况下可以是一个罐。

[0053] 在含水系统中用于降低非期望的微生物浓度、促进酵母繁殖及提高酵母功效的本发明方法的另一个非限制性的实施方案包括

[0054] (a) 将一定量的可发酵碳水化合物引入含水系统中,

[0055] (b) 将一定量的酵母引入所述含水系统中,及

[0056] (c) 使第一有机酸和第二有机酸与可发酵碳水化合物和/或酵母接触。

[0057] 优选的有机酸包括柠檬酸、丙酸及苯甲酸或它们的盐,更优选为柠檬酸。这些步骤可以相继地实施或以不同的顺序实施。第一有机酸和第二有机酸可以混合在一起,然后添加至含水系统,或者可以将它们分离地添加至含水系统。

[0058] 在前述方法中,有意要减少的“非期望的”微生物与促进所期望的发酵过程的所期望的微生物竞争营养素。在此,在本发明方法中使用的第一有机酸和第二有机酸优选不会不利地影响所期望的促进发酵的微生物的生长和存活率,但是要消除或抑制干扰发酵过程的非期望的微生物的生长。此外,非期望的微生物的消除或抑制有利地影响所期望的微生物的生长和存活率。

[0059] 通过酵母发酵生产燃料乙醇用作其中可以使用本发明的一个例子。可以使用第一有机酸、优选柠檬酸连同第二有机酸、优选丙酸或苯甲酸的组合的其他发酵产品可以包括白酒、啤酒、葡萄酒、药物、药物中间体、烘焙产品、保健食品(提供健康益处的食品、如强化食品和膳食补充剂)、保健食品中间体、化工原料及酶。本发明方法也可用于处理在烘焙工业中使用的酵母。

[0060] 酵母并不是唯一有益的在发酵中使用的微生物。也可以使用额外的所期望的发酵微生物,并受益于本发明,如典型地用于纤维素乙醇生产的真菌和细菌。所期望的发酵微生物的一些非限制性例子包括但不限于里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、绿色木霉(*Trichoderma viride*)和永达尔梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)。

[0061] 至少一种第一有机酸可以连同至少一种第二有机酸一起在不同位置加入繁殖、调理和/或发酵过程。第一有机酸优选柠檬酸可以连同第二有机酸一起添加至烹煮容器、发酵罐、繁殖罐、调理罐、发酵剂罐或者在液化期间。第一有机酸也可以连同第二有机酸一起直



接添加至玉米醪。第一有机酸也可以连同第二有机酸一起添加至级间的热交换系统或热交换器。第一有机酸也可以连同第二有机酸一起添加至在这些单元或热交换器之间的管线。

[0062] 第一有机酸可以连同第二有机酸一起直接添加至发酵混合物中。这可以例如在SSF(同时糖化和发酵)阶段中通过将第一有机酸和第二有机酸连同酵母或其他期望的微生物和可发酵碳水化合物一起添加而实现。在200与10000ppm之间或200与5000ppm之间的第一有机酸剂量以及在200与10000ppm之间或200与5000ppm之间的第二有机酸剂量可以直接加入发酵混合物中。剂量是在所处理的系统中的浓度。优选的有机酸包括柠檬酸、丙酸及苯甲酸或它们的盐,更优选为柠檬酸。

[0063] 第一有机酸也可以连同第二有机酸一起在发酵过程之前添加至醪液。在200与10000ppm之间或200与5000ppm之间的第一有机酸剂量以及在200与10000ppm之间或200与5000ppm之间的有机酸剂量可以在发酵之前添加至醪液。

[0064] 第一有机酸也可以连同第二有机酸一起在繁殖和/或调理期间进行添加。例如第一有机酸和第二有机酸可以添加至酵母泥,代替酸洗步骤。

[0065] 第一有机酸可以连同第二有机酸一起用于在纤维素乙醇生产中实现改善的结果。与在基于碳水化合物生产乙醇的过程中使用的糖和淀粉不同,纤维素乙醇是一种由纤维素生产的乙醇。纤维素存在于非传统的生物质来源中,如柳枝稷、玉米秸秆和林业。由于大量可用的纤维素来源,此类乙醇生产是特别有吸引力的。纤维素乙醇由于原材料的特别性质而将更高水平的污染物及竞争微生物引入发酵过程中。所用的第一有机酸连同第二有机酸一起可以用于纤维素乙醇生产以防治非期望的微生物。优选的有机酸包括柠檬酸、丙酸及苯甲酸或它们的盐,更优选为柠檬酸。

[0066] 有两种由纤维素生产醇的基本方法。一种方法是使用诸如里氏木霉(*Trichoderma reesei*)和/或绿色木霉(*Trichoderma viride*)的真菌的水解法。另一种是使用诸如永达尔梭菌(*Clostridium Ijungdahlii*)的细菌的气化法。第一有机酸可以连同第二有机酸一起用于任一种方法。

[0067] 在发酵过程之前,在水解过程中纤维素链破碎成五碳糖和六碳糖。这是通过化学方式和酶的方式实现的。

[0068] 在化学水解方法中,纤维素可以在高的温度和压力下用稀酸处理或者在较低温度和大气压下用浓酸处理。在化学水解过程中,纤维素与酸和水反应生成单个糖分子。然后中和这些糖分子,及采用酵母发酵以生产乙醇。第一有机酸可以连同第二有机酸一起在该方法的酵母发酵部分中使用。

[0069] 可以采用两种方法进行酶解。第一种称作微生物直接转化法(DMC)。DMC法使用单一的微生物以将纤维素生物质转化成乙醇。乙醇和所需的酶是通过相同的微生物产生的。第一有机酸可以连同第二有机酸一起在使用该专用生物的繁殖/调理或发酵步骤中使用。

[0070] 第二方法称作酶解法。在该方法中,使用纤维素酶破碎纤维素链。这些酶典型地存在于反刍动物如牛和羊的胃中,以破碎它们吃下的纤维素。酶法典型地在四或五个阶段中进行。对纤维素进行预处理,以使原材料如木材或麦秆更容易发生水解。接着使用纤维素酶将纤维素分子破碎成可发酵糖。在水解之后,将糖从残余物料中分离出并添加至酵母。使用酵母使水解产物糖发酵成乙醇。最后通过蒸馏回收乙醇。替代性地,可以通过使用能够完成这两个过程的特殊的细菌或真菌,一起实施水解和发酵。在这两个步骤一起实施时,该方法

称作相继的水解和发酵 (SHF)。

[0071] 为了微生物功效,第一有机酸和第二有机酸可以在酶解法中的不同位置引入。第一有机酸可以连同第二有机酸一起用于通过木霉菌 (*Trichoderma*) 及其他真菌菌株产生的纤维素酶的生产、制造和发酵。第一有机酸和第二有机酸可以加入纤维素同时糖化和发酵阶段 (SSF) 中。第一有机酸和第二有机酸可以引入相继的水解和发酵 (SHF) 阶段中。它们也可以在通过产生纤维素酶的分解纤维素真菌的发酵之前、期间或之后的位置引入。替代性地,第一有机酸和第二有机酸可以在酵母发酵阶段中添加,如上所述。

[0072] 气化过程不会将纤维素链破碎成糖分子。首先,纤维素中的碳在部分燃烧反应中被转化成一氧化碳、二氧化碳和氢。然后将一氧化碳、二氧化碳和氢引入使用能够消耗一氧化碳、二氧化碳和氢以产生乙醇和水的微生物如永达尔梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*) 的特殊发酵罐中。最终在蒸馏步骤中从水中分离出乙醇。第一有机酸可以连同第二有机酸一起在涉及能够消耗一氧化碳、二氧化碳和氢以产生乙醇和水的微生物如永达尔梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*) 的发酵步骤中用作抗菌剂。

[0073] 在一个非限制性的实施方案中,将至少一种第一有机酸和至少一种第二有机酸添加至罐中并以预定的比例稀释至预定的浓度。优选的有机酸包括柠檬酸、丙酸和苯甲酸或它们的盐,更优选为柠檬酸。在该罐中,将第一有机酸和第二有机酸溶解在水中,以形成第一有机酸和第二有机酸的混合物。批料罐中的第一有机酸和第二有机酸的浓度可以跨越一个宽的范围改变。然后将第一有机酸和第二有机酸通过出口以给定的剂量率由批料罐排出,以产生具有所期望的浓度的溶液。

## 具体实施方式

[0074] 实施例

[0075] 在以下实施例中报告的协同系数使用下式,其首先报告于 F.C.Kull, P.C.Eisman, H.D.Sylwestrowka, and R.L.Mayer, Letts. In *Applied Microbiology* 9:538-541, 1961:

[0076] 协同系数 =  $Q_a / (Q_a + Q_b / Q_B)$

[0077] 其中,

[0078]  $Q_a$  是抗微生物剂 A 在连同抗微生物剂 B 使用时实现测试微生物生长的完全抑制所需的浓度;

[0079]  $Q_A$  是抗微生物剂 A 在单独使用时实现测试微生物生长的完全抑制所需的浓度;

[0080]  $Q_b$  是抗微生物剂 B 在连同抗微生物剂 A 使用时实现测试微生物生长的完全抑制所需的浓度;

[0081]  $Q_B$  是抗微生物剂 B 在单独使用时实现测试微生物生长的完全抑制所需的浓度。

[0082] 协同系数 (SI) 为 1 表明两种抗微生物剂之间的相互作用仅仅是相加的, SI 大于 1 表明两种抗微生物剂彼此是对抗性的, SI 小于 1 表明两种抗微生物剂以协同方式相互作用。

[0083] 本领域技术人员已知各种不同的方法用于测量抗微生物剂活性水平,在以下实施例中所用的终点称作最小抑制浓度 (Minimal Inhibitory Concentration, 或 MIC)。其是实现生长的完全抑制的一种或多种物质的最小浓度。

[0084] 为了确定最小抑制浓度,构建抗微生物剂的 2 倍倍比稀释系列,稀释物在生长培养基中制备。在 96 孔微滴定板中制备稀释物,因而每个孔具有最终体积为 280  $\mu$ l 的培养基和抗

微生物剂。第一孔例如具有浓度为1000ppm的抗微生物剂,第二为500ppm,第三为250ppm,以此类推,行中的最后的第12孔根本不具有抗微生物剂,用作正的生长对照。在制定稀释系列之后,孔接收悬浮在生长培养基中的微生物的接种物,因而孔中微生物的最终浓度为约 $5 \times 10^5$ cfu/ml。在这些实施例中,所用的测试微生物是植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。将培养物在37℃下孵育18至24小时,基于外观检查混浊的孔,评定孔是正的还是负的生长,混浊是生长的指示。完全抑制生长的抗微生物剂的最小浓度(例如清澈的孔)被指定为最小抑制浓度。

[0085] 为了确定两种抗微生物剂之间的相互作用对于目标微生物是相加的,还是对抗性的,还是协同的,使用96孔微滴定板采用称作“棋盘”法的改变的MIC法。为了构建棋盘孔板,使用用于构建MIC孔板的2倍倍比系列稀释法布置第一抗微生物剂,区别在于每8行是相同的稀释系列,其在第8列后结束。通过相对于第一系列以直角添加相同体积的2倍倍比稀释系列布置第二抗微生物剂。结果是8×8孔正方形的每个孔具有不同的抗微生物剂浓度组合,共实现64种不同的组合。第9和第10列根本不接收抗微生物剂,分别用作正和负的生长对照。在构建棋盘微滴定板之后,用植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 接种,在37℃下孵育,如针对MIC法所述进行评定。

[0086] 实施例1:柠檬酸与丙酸钠的协同作用

[0087] 针对柠檬酸和丙酸钠在pH为6时使用上述规则测定最小抑制浓度,使用植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 作为测试微生物。如所述构建棋盘协同孔板,对孔进行接种直至约 $5 \times 10^5$ cfu/ml的最终浓度,孵育18至24小时,然后通过外观评定生长/未生长。根据Kull等人所述的公式计算协同系数。该实施例表明,柠檬酸和丙酸钠组合的作用大于单独的抗微生物剂的作用。抑制细菌生长所需的柠檬酸的量减少多于一个数量级,由100,000ppm下降到3,125至6,250ppm。丙酸钠的浓度减少至少50%,由100,000ppm下降到12,500至50,000ppm的范围。

[0088]

单独使用		组合使用			
柠檬酸 MIC (QA) ppm	丙酸 MIC (QB) ppm	柠檬酸 MIC (Qa) ppm	丙酸 MIC (Qb) ppm	柠檬酸:丙酸钠比例	协同系数
100000	100000	6250	12500	1:2	0.19
100000	100000	3125	50000	1:16	0.53

[0089] 实施例2:柠檬酸与丙酸钠的协同作用

[0090] 针对柠檬酸和丙酸钠在pH为5时使用上述规则测定最小抑制浓度,使用植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 作为测试微生物。采用不同的pH进行测试,因为这些弱有机酸具有影响其功效的不同的pKa值。在pH为5时,柠檬酸的MIC由100,000ppm (pH为6)降低至25,000ppm。如所述构建棋盘协同孔板,对孔进行接种直至约 $5 \times 10^5$ cfu/ml的最终浓度,孵育18至24小时,然后通过外观评定生长/未生长。根据Kull等人所述的公式计算协同系数。该实施例表明,柠檬酸和丙酸钠组合的作用大于单独的抗微生物剂的作用。抑制细菌生长

所需的柠檬酸的量减少50%或更多,由25,000ppm下降到3,125至12,500ppm。丙酸钠的浓度减少50%或更多,由100,000ppm下降到391至50,000ppm的范围。

[0091]

表 2						
	单独使用		组合使用			
	柠檬酸 MIC (QA) ppm	丙酸钠 MIC (QB) ppm	柠檬酸 MIC (Qa) ppm	丙酸钠 MIC (Qb) ppm	柠檬酸:丙酸钠比例	协同系数
2a	25000	100000	25000	391	64:1	1.00
2b	25000	100000	12500	391	32:1	0.50
2c	25000	100000	6250	25000	1:4	0.50
2d	25000	100000	3125	50000	1:16	0.63

[0092] 实施例3:柠檬酸与苯甲酸钾的协同作用

[0093] 针对柠檬酸和苯甲酸钾在pH为6时使用上述规则测定最小抑制浓度,使用植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)作为测试微生物。如所述构建棋盘协同孔板,对孔进行接种直至约 $5 \times 10^5$ cfu/ml的最终浓度,孵育18至24小时,然后通过外观评定生长/未生长。根据Kull等人所述的公式计算协同系数。该实施例表明,柠檬酸和苯甲酸钾组合的作用大于单独的抗微生物剂的作用。抑制细菌生长所需的柠檬酸的量由100,000ppm下降到390至6,250ppm。苯甲酸钾的浓度由100,000ppm下降到780至12,500ppm的范围。

[0094]

表 3						
	单独使用		组合使用			
	柠檬酸 MIC (QA) ppm	苯甲酸钾 MIC (QB) ppm	柠檬酸 MIC (Qa) ppm	苯甲酸钾 MIC (Qb) ppm	柠檬酸:苯甲酸钾比例	协同系数
3a	100000	100000	6250	780	8:1	0.07
3b	100000	100000	3125	3125	1:1	0.06
3c	100000	100000	1563	6250	1:4	0.08
3d	100000	100000	780	12500	1:16	0.13
3e	100000	100000	390	12500	1:32	0.13

[0095] 实施例4:柠檬酸与苯甲酸钾的协同作用

[0096] 针对柠檬酸和苯甲酸钾在pH为5时使用上述规则测定最小抑制浓度,使用植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)作为测试微生物。采用不同的pH进行测试,因为这些弱有机酸具有影响其功效的不同的pKa值。苯甲酸盐的pKa是。在pH为5时,柠檬酸的MIC由100,000ppm(pH为6)降低至25,000ppm。在培养基的pH降低至5时,苯甲酸钾的MIC由100,000ppm降低至3,125ppm。如所述构建棋盘协同孔板,对孔进行接种直至约 $5 \times 10^5$ cfu/ml的最终浓

度, 孵育18至24小时, 然后通过外观评定生长/未生长。根据Ku11等人所述的公式计算协同系数。该实施例表明, 柠檬酸和苯甲酸钾组合的作用大于单独的抗微生物剂的作用。抑制细菌生长所需的柠檬酸的量由25,000ppm下降到3,125至12,500ppm。苯甲酸钾的浓度由3,125ppm下降到391至1,563ppm的范围。

[0097]

单独使用		组合使用			
柠檬酸 MIC (QA) ppm	苯甲酸钾 MIC (QB) ppm	柠檬酸 MIC (Qa) ppm	苯甲酸钾 MIC (Qb) ppm	柠檬酸:苯甲酸钠比例	协同系数
25000	3125	12500	391	32:1	0.63
25000	3125	6250	391	16:1	0.38
25000	3125	3125	1563	2:1	0.63
25000	3125	1563	6250	1:4	2.06
25000	3125	781	6250	1:8	2.03
25000	3125	391	6250	1:16	2.02