



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118345** (13) **C2**  
(51) МПК (2018.01)

**A01N 37/02** (2006.01)

**A01N 37/04** (2006.01)

**A01N 37/10** (2006.01)

**A01N 37/36** (2006.01)

**A01N 37/40** (2006.01)

**C12P 7/06** (2006.01)

A01P 1/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2015 09823**

(22) Дата подання заявки: **14.03.2014**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.01.2019**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **13/834,259**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **15.03.2013**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **10.12.2015, Бюл.№ 23**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.01.2019, Бюл.№ 1**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ **PCT/US2014/027675, 14.03.2014**

(72) Винахідник(и):  
**Консало Корінн Е. (US),  
Чепмен Джон С. (US)**

(73) Власник(и):  
**СОЛЕНІС ТЕХНОЛОДЖИС КАЙМАН, Л.П.,  
Rheinweg 11, CH-8200 Schaffhausen,  
Switzerland (CH)**

(74) Представник:  
**Петров Андрій Володимирович, реєстр.  
№139**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:

US2004033289, A1, 19.02.2004

US2011054024, A1, 03.03.2011

WO2007149450, A2, 27.12.2007

US2006204551, A1, 14.09.2006

US2003203004, A1, 30.10.2003

US2011027387, A1, 03.02.2011

US3600198, A, 17.08.1971

SAITHONG P ET AL, "Prevention of bacterial contamination using acetate-tolerant Schizosaccharomyces pombe during bioethanol production from molasses", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 108, no. 3, pages 216 - 219

"Energaid-Pulver zur Herstellung einer Lösung zum Eingeben für Kälber", (20090901), page 1, URL:

<http://www.pharmazie.com/graphic/A/42/8-00342.pdf>, (20140724), XP055131527 [X] 1-6 \* paragraphs [0002] , [ 4.2] \*

ARTO VISTI ET AL, "Preparation of fermentable lingonberry juice through removal of benzoic acid by Saccharomyces cerevisiae yeast", FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, (20030101), vol. 36, no. 6, doi:10.1016/S0963-9969(03)00007-3, ISSN 0963-9969, pages 597 - 602, XP055073540 [X] 1-6 \* page 601; tables 1, 3 \* [Y] 8-18

"Scientific Opinion on safety and efficacy of sodium benzoate, propionic acid and sodium propionate for pigs EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)", EFSA JOURNAL EFSA JOURNAL, (20110901), vol. 2357, doi:10.2903/j.efsa.2011.2357, pages 1 - 17, XP055131535 [X] 1,2 \* page 7, paragraph 2.1 \*

UA66561, U, 10.01.2012

UA50921, U, 25.06.2010

UA 118345 C2

**(54) СИНЕРГЕТИЧНА КОМБІНАЦІЯ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ, КОРИСНА ДЛЯ БОРОТЬБИ З МІКРООРГАНІЗМАМИ У ПРОМИСЛОВИХ ПРОЦЕСАХ**

---

**(57) Реферат:**

Даний винахід забезпечує спосіб боротьби з бактеріальною контамінацією при використанні синергетичних взаємодій антимікробних засобів. Винахід використовує комбінацію органічних кислот, поєднаний антимікробний ефект яких є синергетичним.

## Галузь винаходу

Даний винахід відноситься до синергетичних комбінацій антимікробних агентів та способів їх застосування для контролю мікроорганізмів у промислових процесах, у матеріалах або продуктах.

## 5 Передумови створення винаходу

Мікроорганізми такі, дріжджі, гриби та бактерії, використовуються для одержання ряду продуктів ферментації таких, як етанол промислової марки, дистильовані спирти, пиво, вино, фармацевтичні препарати та нутрицевтики (харчові продукти, які забезпечують переваги стосовно здоров'я, такі, як вітамінізовані продукти харчування та біологічно активні добавки), у

10 хлібобулочній промисловості та у виробництві хімічних препаратів.

Дріжджі традиційно використовуються у ферментаційних процесах. Один з традиційних видів дріжджів являє собою *Saccharomyces cerevisiae*, вид, який, головним чином, використовується у хлібобулочній промисловості та у ферментації. Дріжджі, відмінні від *Saccharomyces*, що є відомими як нетрадиційні дріжджі, також використовуються для створення

15 ряду комерційних продуктів.

Інші мікроорганізми також можуть бути корисними в одержанні ферментаційних продуктів. Наприклад, при виробництві етанолу з целюлози, одержанні етанолу з целюлозної біомаси використовуються гриби та бактерії. Приклади таких целюлолітичних грибів включають *Trichoderma reesei* та *Trichoderma viride*. Один з прикладів бактерій, які використовуються при

20 одержанні етанолу з целюлози являє собою *Clostridium ljungdahlii*.

Більшість грибів, що використовуються на спиртогорілчаних заводах та на фабриках з виробництва паливного етанолу, закупаються від виробників спеціальних грибів. Гриби одержують при використанні процесу розмноження. Розмноження передбачає вирощування великої кількості грибів з невеликої лабораторної культури гриба. Під час розмноження гриби

25 забезпечуються киснем, азотом, цукрами, білками, ліпідами та іонами, які є необхідними або бажаними для оптимального росту шляхом аеробного дихання.

Після перегонки дріжджі можуть проходити процедуру кондиціонування. Кондиціонування, на відміну від розмноження, полягає у тому, що воно не передбачає вирощування великої кількості грибів з невеликої лабораторної культури. Під час кондиціонування створюються умови

30 для повторної регідратації дріжджів, виведення їх із періоду спокою та забезпечення максимального анаеробного відтворення та розмноження. Метою як розмноження, так і кондиціонування, є доставка великого об'єму дріжджів до ферментаційного резервуару з високою життєздатністю, високою здатністю до брунькування та низьким рівнем інфекції іншими мікроорганізмами.

35 Після розмноження та/або кондиціонування дріжджі поступають у процес бродіння. Дріжджі поєднуються у водному розчині зі здатними до бродіння цукрами. Дріжджі споживають цукри, перетворюючи їх на аліфатичні спирти такі як, етанол.

Процес ферментації починається з отримання здатних до бродіння вуглеводів. У виробництві етанолу кукурудза являє собою здатний до ферментації вуглевод. Інші вуглеводи, у тому числі зернові культури та матеріали, що містять целюлозу та крохмаль, такі як, пшениця

40 або сорго, також можуть замінювати вказані вище джерела ферментації. Целюозна біомаса така, як солома та стебла кукурудзи, також може використовуватися. Одержанню етанолу з целюлози зараз приділяється велика увага, оскільки воно використовує легко доступну непродуктову біомасу для отримання цінного палива.

45 Процеси розмноження, кондиціонування та ферментації можуть здійснюватися з використанням періодичного або безперервного способів. Періодичний процес використовується для дрібносерійного виробництва. Кожна партія завершується перед початком нової. Безперервний спосіб ферментації використовується для великомасштабного виробництва, оскільки він забезпечує безперервну подачу без повторного запуску кожного разу.

50 Під час процесу розмноження, кондиціонування або ферментації сусло або ферментаційна суміш може стати забрудненою іншими мікроорганізмами такими, як бактерії, що викликають псування. Ці мікроорганізми конкурують з бажаними видами дріжджів за ферментацію цукрів та інших здатних до ферментації вуглеводів та сповільнюють бажану біохімічну реакцію, що призводить до зниження виходу продукту. Вони також можуть виробляють небажані хімічні

55 побічні продукти, які можуть викликати псування цілих партій ферментації.

Виробники етанолу зробили спробу збільшити кількість етанолу, отриманого від одного бушеля зернових культур (приблизно 56 фунтів (25,4 кілограма)). Забруднення бактеріями знижує ефективність дріжджів, що ускладнює можливість досягнення або перевищення бажаних

60 рівні 2,8-2,9 галонів етанолу на бушель (42-44 літри на кілограм). Зниження концентрації мікроорганізмів буде сприяти розмноженню дріжджів та/або кондиціонуванню та підвищенню

ефективності дріжджів, що уробить можливим досягнення та перевищення цих бажаних рівнів.

Під час одного з цих трьох процесів дріжджі можуть бути забруднені небажаними дріжджами, бактеріями або іншими небажаними мікроорганізмами. Це може статися в одному з багатьох резервуарів, які використовуються у розмноженні, кондиціонуванні або ферментації. Такі включають, але без обмеження, резервуар для розмноження, резервуар для кондиціонування, стартові резервуари, чани для ферментації та систему трубопроводів та теплообмінників між цими одиницями.

Бактеріальна або мікробіальна контамінація знижує вихід продукту ферментації у трьох основних напрямках. По-перше, цукри, які можуть бути доступними для дріжджів при виробництві спирту, споживаються бактеріями або іншими небажаними мікроорганізмами і перенаправляються у напрямку від продукції спирту, знижуючи вихід продукції. По-друге, кінцеві продукти метаболізму бактерій або інших небажаних мікроорганізмів такі, як молочна кислота та оцтова кислота, пригнічують ріст дріжджів та дріжджове бродіння/дихання, що призводить до менш ефективного виробництва дріжджів. І на завершення, бактерії конкурують з дріжджами за поживні речовини, відмінні від цукру.

Після того як система ферментації або резервуар будуть забруднені бактеріями або іншими небажаними мікроорганізмами, ці бактерії або інші мікроорганізми можуть рости набагато швидше, ніж бажані дріжджі. Бактерії конкурують з дріжджами за ферментацію цукрів і сповільнюють бажану біохімічну реакцію, що призводить до зниження виходу продукту. Бактерії також виробляють небажані побічні хімічні продукти, які можуть викликати псування цілих партій ферментації. Видалення цих бактерій або інших небажаних мікроорганізмів дозволяє бажаним дріжджам розвиватися, що приводить до більш високої ефективності виробництва.

Навіть один відсоток зменшення виходу етанолу є досить істотним для промисловості паливного етанолу. На великих об'єктах таке зниження ефективності буде знижувати дохід від 1 мільйона до 3 мільйонів доларів на рік.

Деякі способи зниження вмісту бактерій або інших небажаних мікроорганізмів при розмноженні, кондиціонуванні та ферментації використовують толерантність дріжджів до застосування більш високої температури і рН у порівнянні з іншими мікроорганізмами. Це здійснюють шляхом застосування підвищеної температури або зниження значення рН розчину дріжджів. Проте ці процеси не є достатньо ефективними щодо уповільнення бактеріального росту. Крім того, бажані дріжджові мікроорганізми при виживанні піддаються стресу та не є ефективними та здоровими. Таким чином, дріжджі не можуть також здійснювати свою функцію.

Переважним напрямком у промисловості виробництва етанолу є зниження значення рН сусла (затору) (вихідної сировини) до меншого за 4,5 на початку ферментації. Зниження рН сусла зменшує чисельність популяції деяких видів бактерій. Проте це є набагато менш ефективним у зменшенні чисельності проблемних бактерій таких, як бактерії, що продукують молочну кислоту. Це також значно зменшує вихід етанолу, оскільки дріжджі, що використовуються для виробництва етанолу, піддаються стресу.

Інший підхід включає промивання дріжджів фосфорною кислотою. Цей спосіб не є ефективним щодо знищення кількості бактерій та інших мікроорганізмів. Він може також піддавати стресу дріжджі, які використовуються для виробництва етанолу, знижуючи тим самим їх ефективність.

Ще один спосіб полягає у використанні тепла або агресивних хімічних речовин для стерилізації технологічного обладнання між партіями. Він не є ефективним щодо знищення бактерій та інших мікроорганізмів у суміші дріжджів під час виробництва.

Ще в одному способі до системи розмноження дріжджів, кондиціонування або ферментації додають антибіотики, щоб нейтралізувати бактерії. Ферментаційна промисловість типово використовує антибіотики у процесах кондиціонування, розмноження та ферментації. Рівні дозування антибіотиків коливаються від 0,1 до 3,0 мг/л та в загальному випадку не перевищують 6 мг/л. Проте існують проблеми при використанні антибіотиків у процесах кондиціонування, розмноження та ферментації. Антибіотики є дорогими та можуть значним чином підвищувати затрати при великомасштабному виробництві. Крім того, антибіотики не є ефективними проти усіх штамів бактерій, таких, як резистентні до антибіотиків штами бактерій. Надмірне застосування антибіотиків може приводити до створення додаткових варіантів стійких до антибіотиків штамів бактерій. Залишки антибіотиків та створення стійких до антибіотиків штамів є глобальною проблемою. Ці занепокоєння можуть призвести до майбутніх регуляторних заходів проти застосування антибіотиків. Однією з проблем, що викликає занепокоєння, є зернова барда, що використовується для корму тварин. Зернова барда – це залишок зерна від процесу ферментації. Європейські країни не дозволяють продавати побічні продукти рослини етанолу як корм для тварин, якщо антибіотики використовуються на об'єкті.

Продаж зернової барди на зерновому складі складає 20 % від заробітку заводу з виробництва етанолу. Концентрація антибіотиків у побічному продукті може становити від 1-3 мас. %, тим самим заперечуючи це важливе джерело доходу.

Залишки антибіотиків та утворення стійких до антибіотиків штамів є глобальною проблемою.

Ці проблеми, які викликають занепокоєння, можуть призвести у майбутньому до нормативних дій, спрямованих проти використання антибіотиків. Одне з питань, що викликає занепокоєння, являє собою зернову барду, що використовується для тваринних кормів. Європейські країни не дозволяють здійснювати продаж побічних продуктів підприємств, що виробляють етанол, як тваринних кормів, якщо у процесі використовуються антибіотики. Продаж зернової барди складає аж до 20 % доходу підприємства, що виробляє етанол. Концентрація антибіотику в побічному продукті може коливатися від 1 до 3 % за вагою, що, таким чином, зводить нанівець це важливе джерело доходу.

Крім того, є й інші питання, які слід враховувати при використанні антибіотиків. Суміші антибіотиків мають бути збалансованими і часто змінюватися, щоб уникнути використання одного антибіотика, що призведе до утворення штамів, стійких до антибіотиків. Іноді ефективна кількість антибіотика не може додаватися до ферментаційної суміші. Наприклад, використання більше 2 мг/л віргініаміцину буде інгібувати ферментацію, проте для того, щоб інгібувати ріст *Weissella confusa*, проблемного штаму бактерій, що формується, необхідно є концентрація більше 25 мг/л. Передозування або зловживання антибіотиками може піддавати стресу дріжджі та справляти негативний вплив на їх ефективність або спричинювати невідповідність нормативним вимогам.

Галузі, які використовують ферментацію для одержання напоїв, історично застосовується кислоти хмелю при розмноженні та ферментації для контролю небажаних мікроорганізмів, які конкурують з дріжджами за поживні речовини. У зв'язку із розширенням застосування паливного етанолу кислоти хмелю використовуються в незначній мірі для вирішення проблеми небажаних грамполозитивних мікроорганізмів. Конкуренція між дріжджами та небажаними мікроорганізмами призводить до втрати виходу паливного етанолу, оскільки небажані мікроорганізми, в першу чергу, *Lactobacillus* та *Acetobacter*, знижують ефективність ферментації. У напоях забруднюючі мікроорганізми не тільки знижують ефективність, але й також змінюють естетику та смак кінцевого продукту.

Органічні кислоти мають багато застосувань, у тому числі використовуються як підкислювальні агенти, буфери, антиоксиданти, хелатувальні агенти, синергісти, дієтичні добавки, ароматизатори, консерванти та протимікробні препарати. Органічні кислоти використовувалися як консерванти завдяки своєму впливу на бактерії. Механізм дії органічної кислоти полягає у тому, що недисоційовані кислоти проникають у клітинну стінку бактерій за допомогою пасивної дифузії та порушують нормальну фізіологію клітини двома способами: Кислоти піддаються дисоціації і тому знижують внутрішнє значення рН, яке зазвичай є близьким до нейтрального, порушуючи, таким чином, функцію бактерій. Аніонна частина кислоти, яка не може залишити клітину у своїй дисоційованій формі, накопичується всередині, порушуючи метаболічні функції та підвищуючи осмотичний тиск.

Оскільки невелике зниження виходу етанолу є дуже істотним для галузі виробництва паливного етанолу, виробники етанолу постійно шукають способи підвищення ефективності. Протимікробні засоби використовуються для усунення, зменшення або іншого контролю кількості мікроорганізмів у водних системах. Проте використання більшості антимікробних препаратів буде підвищувати вартість операцій і продуктів, а, отже, необхідно шукати більш ефективні шляхи досягнення контролю мікроорганізмів. Крім того, багато протимікробних препаратів мають недоліки або у своєму спектрі антимікробної активності, або в експлуатаційних обмеженнях способу їх застосування такі, як відсутність температурної стабільності або чутливість до інактивації факторами навколишнього середовища або хімічними факторами.

Є відомим, що присутність мікроорганізмів у промислових водних системах може являти собою значну проблему у промислових процесах, спричиняючи при цьому проблеми, пов'язані із зниженням виходу продукту та якості продукту.

Один специфічний приклад цього являє собою біологічну переробку кукурудзи на етанол, де молочнокислі бактерії вводяться у процес при використанні соломи кукурудзи. Під час ферментації ці бактерії конкурують з дріжджами, які виробляють етанол за субстрат та поживні речовини, що знижує вихід етанолу. У даний час у США майже всі заводи з біологічної переробки використовують протимікробний засіб, і багато з них використовують такий антибіотик, як віргініаміцин. Важливим продуктом рослин кукурудзи, які піддають переробці, є висушена барда, що використовується як корм для тварин, і ринок вільного від антибіотиків

фуражного зерна зростає. Очікується, що Управління з контролю за продуктами харчування та лікарськими засобами США (FDA) скоро створить правила, що передбачають скорочення або усунення застосування антибіотиків в кормах для тварин. Канада має аналогічні побоювання щодо антибіотиків у барді та більшість їх продукції йде на експорт. Європа вже заборонила використання антибіотиків на рослинах, які використовуються для одержання етанолу, де спиртова барда виробляються для тваринних кормів. У Бразилії використання вільних від антибіотиків рослин на підприємствах, що виробляють дріжджовий екстракт для експорту, є обов'язковим.

Контроль мікроорганізмів є дуже важливим для багатьох інших галузей промисловості, а також переважною стратегією є обробка при використанні протимікробних препаратів. Протимікробні засоби використовуються для усунення, зменшення або іншого контролю кількості мікроорганізмів у водних системах. Проте використання більшості антимікробних препаратів буде підвищувати вартість операцій і продуктів, а, отже, необхідно шукати більш ефективні шляхи досягнення контролю мікроорганізмів. Крім того, багато протимікробних препаратів мають недоліки або у своєму спектрі антимікробної активності, або в експлуатаційних обмеженнях способу їх застосування такі, як відсутність температурної стабільності або чутливість до інактивації факторами навколишнього середовища або хімічними факторами.

Таким чином, можуть використовуватися комбінації антимікробних агентів та, зокрема, є бажаними синергетичні комбінації антимікробних засобів. Синергетичні комбінації антимікробних засобів можуть забезпечити протимікробний ефект, який є вищим, ніж сума ефектів окремих протимікробних препаратів і, таким чином, можуть забезпечити поліпшені характеристики щодо витрат у порівнянні з комбінаціями, які є просто адитивними за своєю протимікробною ефективністю.

#### Опис винаходу

Для цілей даного опису значення "мікроорганізми" та "мікроби" включає, але без обмеження, бактерії, гриби, найпростіші та віруси. Переважні мікроорганізми, проти яких композиції у відповідності з даним винаходом є ефективними, являють собою бактерії. Приклади небажаних бактерій включають, але не обмежені такими, як молочнокислі бактерії, оцтовокислі бактерії та інші бактерії, які забруднюють процеси етанольної ферментації. Слід також розуміти, що мікроорганізми у водних системах можуть знаходитися або бути суспендованими у рідині (наприклад, є планктонними) або можуть розміщуватися на поверхні у контакті з водною системою (наприклад, у біоплівках). Слова та фрази "боротьба", "боротьба з мікроорганізмами", "контроль" та "антимікробна ефективність" слід трактувати так, щоб включати в їх значення, але без обмеження, інгібування росту мікроорганізмів, знищення мікроорганізмів, дезінфекцію, запобігання розмноженню мікроорганізмів, санітарну обробку або запобігання повторного росту мікроорганізмів.

Як використовується у даній заявці част. на млн вимірюються як маса на об'єм, або 1 част. на млн дорівнює 1 мг (активної сполуки) на літр. Дозування визначається як концентрація компонента у водній системі, яку піддають обробці.

Як використовується в даній заявці, термін "органічна кислота" є також посиланням на її сіль.

Даний винахід забезпечує синергетичні антимікробні водні композиції, які включають принаймні одну першу органічну кислоту та принаймні одну другу органічну кислоту, та спосіб застосування комбінацій принаймні однієї першої органічної кислоти та принаймні однієї другої органічної кислоти. Принаймні одна перша органічна кислота бажано являє собою лимонну кислоту. Ці комбінації є корисними для боротьби з мікроорганізмами у водних системах і продуктах. Даний винахід забезпечує значне зменшення кількості забруднюючих бактерій в промислових процесах, матеріалах або продуктах, де їх присутність вважається небажаною.

Було виявлено, що при використанні комбінацій принаймні двох органічних кислот або їх солей забезпечується синергетичний контроль мікроорганізмів у водних системах. Таким чином, комбінація компонентів приводить до поліпшеної антимікробної ефективності додатково до тієї, яку можна було б очікувати на основі суми їх індивідуальних антибактеріальних ефективностей. Цей несподівано виявлений синергізм дозволяє зменшувати кількості протимікробних препаратів, які будуть використовуватися для досягнення прийнятного контролю мікроорганізмів у промислових процесах таких, як біологічна переробка, або у матеріалах, де це є бажаним.

Перша органічна кислота або перший компонент та друга органічна кислота або другий компонент, який не є такою самою кислотою, що й перша кислота або перший компонент, є корисними у даному винаході. Прийнятні необмежувальні приклади органічних кислот, корисних

у даному винаході, включають, але не обмежуються такими, як лимонна кислота, бензойна кислота, пропіонова кислота, винна кислота, оцтова кислота, бензолсульфонова кислота, щавлева кислота, яблучна кислота, саліцилова кислота, молочна кислота, глюконова кислота, гліколева кислота та їх солі. Для цілей даного винаходу органічна кислота не є кислотою хмелю.

5 Бажані перші органічні кислоти або компоненти включають лимонну кислоту, пропіонову кислоту та бензойну кислоту та їх солі. Найбільш бажаною органічною кислотою є лимонна кислота. Бажана друга органічна кислота або компонент включає пропіонову кислоту та бензойну кислоту та їх солі, за умови, що перша органічна кислота та друга органічна кислота є різними солями. Тільки як приклад можна сказати, що якщо лимонна кислота або її сіль являє собою перший компонент, то лимонна кислота або її сіль не можуть бути другим компонентом. 10 Органічні кислоти можуть знаходитися у формі кислоти або у формі своєї солі, коли використовуються у даному винаході.

Один з варіантів реалізації винаходу включає лимонну кислоту як першу органічну кислоту у комбінації принаймні з однією другою органічною кислотою, зокрема, друга органічна кислота 15 може являти собою пропіонову кислоту або бензойну кислоту або їх солі.

Приклади водних систем, в яких композиції є корисними, являють собою воду для системи біологічної переробки, системи охолодження води, воду для бойлерів, воду для целюлозно-паперової промисловості, воду для закачування у нафтові і газові родовища та воду, що 20 видобувається разом з нафтою, воду для систем нафто- і газопроводів та систем зберігання, воду для паливних теплообмінників, водний баласт, стічні води, воду для пастеризаторів, інші види промислової технічної води, мастильно-охолоджувальні рідини, воду для процесів виробництва латексу, полімерів, фарб, покриттів, клеїв, чорнил, засобів особистої гігієни та господарчих товарів, воду для систем зворотного осмосу, електрохімічних систем осадження, рідин, що використовуються у видобутку корисних копалин, для процесів обробки мінеральних 25 шламів, переробки сільськогосподарської продукції, воду для біологічної переробки і систем, які їх використовують. Крім того, композиції можуть використовуватися в інших галузях, де може виникати мікробна контамінація водних систем.

Небажані мікроорганізми у промислових процесах являють собою такі, які шляхом своєї фізичної присутності або метаболічної активності знижують ефективність або вихід цього процесу. Таким чином, наприклад, мікроорганізми, що ростуть на поверхні теплообмінників, порушують їх ефективність щодо передачі тепла (завдяки ізоляційним властивостям їх організму та різноманітним екзополімерам), у той час як мікроорганізми, які використовують 30 компоненти процесу як джерело живлення (наприклад, у процесі подрібнення целюлози) або змінюють значення pH в процесі шляхом виділення органічних кислот (метаболічний побічний продукт), є небажаними. Необмежувальні приклади небажаних бактерій включають молочнокислі бактерії (LAB) та оцтовокислі бактерій, з яких *Lactobacillus* та *Acetobacter* є найбільш відомими представниками.

Ці комбінації органічних кислот можуть використовуватися у промисловості біологічної переробки та у ферментаційних системах.

40 Значення pH водної системи, що піддається обробці, як правило, складає від 3 до 11 або від 3 до 7, або від 4 до 9, або від 4 до 8, або від 4 до 6,5, або від 4,5 до 6. У загальному випадку, органічні кислоти найкраще працюють в системах, де pH системи є меншим, ніж принаймні одне із значень pKa кислоти або її солі.

Компоненти композиції можуть додаватися до водної системи, яка піддається обробці, 45 послідовно або можуть поєднуватися та потім додаватися до системи, що піддається обробці. Органічні кислоти можуть додаватися до водних побічних систем з іншими добавками, такими як, але без обмеження, поверхнево-активні речовини, сполуки для контролю утворення накипу та корозії, іонні або неіонні полімери, агенти для контролю pH та інші добавки, які використовуються для зміни або модифікації хімічного складу води або водної системи.

50 Органічні кислоти додають до систем, які піддаються обробці, у співвідношеннях першої кислоти до другої кислоти від 64:1 аж до 1:32, або у співвідношеннях від 32:1 до 1:32, або у співвідношеннях від 32:1 до 1:16, або у співвідношеннях від 8:1 до 1:32, або у співвідношеннях від 8:1 до 1:16 або у співвідношеннях від 8:1 до 1:8.

Кваліфікований спеціаліст у даній галузі техніки може легко визначити концентрацію композиції, яка є необхідною для досягнення прийнятного контролю мікроорганізмів, та ця концентрація є залежною від матриксу. Перша органічна кислота може використовуватися у кількості від 12500 част. на млн до 100 част. на млн у системі, що піддається обробці. Перша органічна кислота може використовуватися у кількості від 6250 до 100 част. на млн у водній системі, що піддається обробці, або від 4000 до 100 част. на млн, або від 4000 до 200 част. на 60 млн. У загальному випадку використовується принаймні 100 част. на млн або принаймні 200

част. на млн, або принаймні 300 част. на млн першої органічної кислоти. Співвідношення першої органічної кислоти до другої органічної кислоти може складати від 64:1 до 1:32 або від 32:1 до 1:32, або від 8:1 до 1:32. Зазвичай загальна сума двох органічних кислот, які використовуються у системі, яка піддається обробці, складає менше ніж 20000 част. на млн або менше ніж 15000 част. на млн, або менше ніж 11000 част. на млн. Зазвичай загальна сума двох органічних кислот, які використовуються у системі, яка піддається обробці, складає принаймні 200 част. на млн або принаймні 400 част. на млн.

В одному варіанті реалізації даного винаходу перша органічна кислота являє собою лимонну кислоту та співвідношення лимонної кислоти до другої органічної кислоти може складати від 32:1 до 1:32 або від 8:1 до 1:32, або від 8:1 до 1:16. Друга органічна кислота є вибраною з пропіонової кислоти, бензойної кислоти або їх солей. Лимонна кислота може використовуватися у кількостях від 12500 част. на млн до 100 част. на млн у водній системі, що піддається обробці. Лимонна кислота може використовуватися у кількості від 6250 до 200 част. на млн або від 4000 до 200 част. на млн, або від 4000 до 300 част. на млн у водній системі, що піддається обробці. У загальному випадку принаймні 100 част. на млн або принаймні 200 част. на млн, або принаймні 300 част. на млн лимонної кислоти або її солей використовують у водній системі, що піддається обробці.

В одному варіанті реалізації даного винаходу принаймні одна перша органічна кислота включає лимонну кислоту, принаймні одна друга органічна кислота включає пропіонову кислоту або її солі, де співвідношення лимонної кислоти до пропіонової кислоти складає від 64:1 до 1:16, а кількість першої органічної кислоти у водній системі, що піддається обробці, складає від 200 до 1000 част. на млн.

В одному варіанті реалізації даного винаходу принаймні одна перша органічна кислота включає лимонну кислоту, а принаймні одна друга органічна кислота включає бензойну кислоту або її сіль, де співвідношення лимонної кислоти до бензойної кислоти складає від 8:1 до 1:32, а кількість першої органічної кислоти у водній системі, що піддається обробці, складає від 200 до 1000 част. на млн.

Приклади небажаних бактерій, для яких є корисним даний винахід, включають молочнокислі бактерії або оцтовокислі бактерії. Такі включають, але без обмеження такими, як *Lactobacillus* та *Acetobacter*.

При використанні в системі ферментації кислоти можуть додаватися в різних точках системи ферментації, включаючи шламонакопичувач(и), підігрівачі ферментера, охолоджувальні пристрої для сусли, біологічний термостат для вирощування мікроорганізмів та резервуари для ферментації. Фахівець у даній галузі техніки також може визначити інші точки додання.

У системах ферментації, що використовують даний спосіб, концентрація бактерій та інших небажаних мікроорганізмів може бути зменшена, у той час як розмноження та/або кондиціонування бажаних мікроорганізмів стимулюється. Було виявлено, що перша органічна кислота у поєднанні принаймні з однією другою органічною кислотою є ефективною при зниженні концентрації небажаних бактерій та інших небажаних мікроорганізмів, одночасно сприяючи розмноженню та/або кондиціонуванню бажаних мікроорганізмів. Комбінація органічних кислот забезпечує синергетичн, протимікробну обробку без застосування антибіотиків.

Один необмежувальний варіант реалізації даного способу для зниження концентрації небажаних мікроорганізмів, сприяння розмноженню бажаних мікроорганізмів та підвищення ефективності бажаних мікроорганізмів у водній системі включає:

(а) введення здатного до ферментації вуглеводу у водну систему,

(б) введення принаймні одного виду дріжджів або бажаного мікроорганізму у водну систему, та

(в) приведення у контакт принаймні однієї першої органічної кислоти та принаймні однієї другої органічної кислоти зі здатним до ферментації вуглеводом та або дріжджами.

Бажані органічні кислоти включають лимонну кислоту, пропіонову кислоту та бензойну кислоту та їх солі, найбільш бажаною є лимонна кислота.

Етапи можуть здійснюватися послідовно або у будь-якому порядку. Перша органічна кислота та друга органічна кислота можуть приводитися у контакт з дріжджами або зі здатним до ферментації вуглеводом, або дріжджі та здатний до ферментації вуглевод можуть поєднуватися, а потім перша органічна кислота та друга органічна кислота вводяться у комбінацію дріжджів та вуглеводу. Перша органічна кислота та друга органічна кислота можуть змішуватися разом та потім додаватися у водну систему, або вони можуть додаватися окремо до водної системи. Водна система може являти собою таку для безперервного процесу або може являти собою резервуар у разі періодичного процесу.



Інший необмежувальний варіант здійснення даного способу для зниження концентрації небажаних мікроорганізмів, сприяння розмноженню дріжджів та підвищення ефективності дріжджів у водній системі включає:

- (а) введення деякої кількості здатного до ферментації вуглеводу у водну систему,
- (б) введення деякої кількості дріжджів у водну систему, та
- (в) приведення у контакт першої органічної кислоти та другої органічної кислоти зі здатним до ферментації вуглеводом та або дріжджами.

Бажані органічні кислоти включають лимонну кислоту, пропіонову кислоту та бензойну кислоту та їх солі, найбільш бажаною є лимонна кислота. Етапи можуть здійснюватися послідовно або у будь-якому порядку. Перша органічна кислота та друга органічна кислота можуть перемішуватися разом, а потім додаватися до водної системи, або вони можуть додаватися окремо до водної системи.

В описаному вище способі "небажані" мікроорганізми, концентрацію яких передбачається зменшити, є такими, які конкурують за поживні речовини з бажаними мікроорганізмами, які сприяють бажаним процесам ферментації. У зв'язку із цим перша органічна кислота та друга органічна кислота, що використовуються у даному способі, переважно не виявляють шкідливого впливу на ріст та життєздатність бажаних мікроорганізмів, що сприяють процесу ферментації, проте усувають або пригнічують ріст небажаних мікроорганізмів, які заважають процесу ферментації. Крім того, усунення або пригнічення небажаних мікроорганізмів має сприятливий вплив на ріст і життєздатність бажаних мікроорганізмів.

Виробництво паливного етанолу при використанні дріжджової ферментації використовується як приклад того, де даний винахід може бути використаний. Інші продукти ферментації, які можуть використовувати комбінацію першої органічної кислоти, бажано лимонної кислоти, у поєднанні з другою органічною кислотою, переважно пропіоновою кислотою або бензойною кислотою, можуть включати спирт-ректифікат, пиво, вино, фармацевтичні препарати, фармацевтичні проміжні сполуки, хлібобулочні продукти, нутрицевтики (харчові продукти, які забезпечують переваги для здоров'я, такі, як збагачені вітамінами продукти харчування та біологічно активні добавки), проміжні сполуки нутрицевтиків, промислову хімічну сировину та ферменти. Даний спосіб може також використовуватися для обробки дріжджів, які застосовують в хлібобулочній промисловості.

Дріжджі є не єдиним корисним мікроорганізмом, що використовується в процесі ферментації. Додаткові бажані мікроорганізми для ферментації також можуть використовуватися та забезпечувати переваги для даного винаходу, наприклад, можна застосовувати гриби та бактерії, що звичайно використовуються у виробництві целюлозного етанолу. Деякі необмежувальні приклади бажаних мікроорганізмів для ферментації включають, але не обмежуються такими, як *Trichoderma reesei*, *Trichoderma* та *Clostridium ljungdahlii*.

Принаймні одна перша органічна кислота у поєднанні з принаймні однією другою органічною кислотою можуть додаватися в різних точках при процесах розмноження, кондиціонування та/або ферментації. Перша органічна кислота, бажано лимонна кислота, у поєднанні з другою органічною кислотою може додаватися до колб для одержання культури, ферментаційних чанів, резервуарів для розмноження, чанів для кондиціонування, стартерних резервуарів або під час зрідження. Перша органічна кислота у поєднанні з другою органічною кислотою може також додаватися безпосередньо до кукурудзяного сусла. Перша органічна кислота у поєднанні з другою органічною кислотою може також додаватися до проміжної теплообмінної системи або теплообмінників. Перша органічна кислота у поєднанні з другою органічною кислотою може також додаватися до трубопроводу, що з'єднує ці одиниці, або до системи теплообмінників.

Перша органічна кислота у поєднанні з другою органічною кислотою може додаватися безпосередньо до ферментаційної суміші. Цього можна досягти шляхом додання першої органічної кислоти та другої органічної кислоти у поєднанні з дріжджами у поєднанні з дріжджами або іншими бажаними мікроорганізмами та здатним до ферментації вуглеводом, наприклад, на етапі SSF (одночасне оцукрювання та ферментація). Дози першої органічної кислоти від 200 та 10000 част. на млн або від 200 до 5000 част. на млн, та дози другої органічної кислоти від 200 до 10000 част. на млн або від 200 до 5000 част. на млн можуть додаватися безпосередньо у ферментаційну суміш. Дози являють собою концентрацію у системі, яка піддається обробці. Переважні органічні кислоти включають лимонну кислоту, пропіонову кислоту та бензойну кислоту та їх солі, найбільш бажаною є лимонна кислота

Перша органічна кислота у поєднанні з другою органічною кислотою може додаватися до сусла перед здійсненням процесу ферментації. Дози першої органічної кислоти від 200 до 10000 част. на млн або від 200 до 5000 част. на млн та дози другої органічної кислоти від 200 до 10000 част. на млн або від 200 до 5000 част. на млн можуть додаватися до сусла перед

здійсненням процесу ферментації.

Перша органічна кислота у поєднанні з другою органічною кислотою можуть також додаватися під час розмноження та/або кондиціонування. Наприклад, перша органічна кислота та друга органічна кислота можуть додаватися до суспензії дріжджів, замінюючи етап

кислотного промивання. Перша органічна кислота у поєднанні з другою органічною кислотою можуть використовуватися для досягнення поліпшених результатів у виробництві целюлозного етанолу. Целюлозний етанол є одним з видів етанолу, який виробляється з целюлози, на відміну від цукру і крохмалю, які використовуються у виробництві етанолу на основі вуглеводів. Целюлоза є присутньою в нетрадиційних джерелах біомаси, таких, як просо, кукурудзяна солома та продукти лісівництва. Цей тип виробництва етанолу є особливо привабливим через велику доступність джерел целюлози. Целюлозний етанол завдяки самій природі сировинного матеріалу має більш високі рівні забруднюючих речовин та конкурентних мікроорганізмів у процесі ферментації. Перша органічна кислота, що використовується у поєднанні з другою органічною кислотою, може використовуватися у виробництві целюлозного етанолу для контролю небажаних мікроорганізмів. Бажані органічні кислоти включають лимонну кислоту, пропіонову кислоту та бензойну кислоту або їх солі, найбільш бажаною є лимонна кислота.

Існує два основних процеси виробництва спирту з целюлози. Один процес являє собою процес гідролізу, який використовує гриби такі, як, наприклад, *Trichoderma reesei* та/або *Trichoderma viride*. Інший являє собою процес газифікації при використанні бактерій таких, як *Clostridium ljungdahlii*. Перша органічна кислота у поєднанні з другою органічною кислотою можуть використовуватися у будь-якому з цих процесів.

У процесі гідролізу ланцюги целюлози розкладаються з утворенням п'ятивуглецевих та шестивуглецевих цукрів до початку процесу ферментації. Це здійснюється хімічно та ферментативно.

У способі хімічного гідролізу целюлозу можна піддавати обробці при використанні розведеної кислоти при високій температурі та тиску або при використанні концентрованої кислоти при більш низькій температурі та атмосферному тиску. У процесі хімічного гідролізу целюлоза реагує з кислотою і водою з утворенням окремих молекул цукру. Ці молекули цукру потім нейтралізують, та використовують дріжджову ферментацію для виробництва етанолу. Перша органічна кислота у поєднанні з другою органічною кислотою може використовуватися під час ферментаційної частини цього способу.

Ферментативний гідроліз може здійснюватися при використанні двох способів. Перший є відомим як безпосередня мікробна конверсія (DMC). Спосіб DMC використовує один мікроорганізм для перетворення целюлозної біомаси на етанол. Етанол та необхідні ферменти виробляються тим самим мікроорганізмом. Перша органічна кислота у поєднанні з другою органічною кислотою можуть використовуватися під час етапів розмноження/кондиціонування або ферментації при використанні цього спеціалізованого організму.

Другий спосіб є відомим як спосіб ферментативного гідролізу. У цьому способі ланцюги целюлози розриваються за допомогою целюлазних ферментів. Ці ферменти, як правило, є присутніми у шлунках жуйних тварин таких, як корови та вівці, щоб розкласти целюлозу, яку вони поїдають. Ферментативний спосіб, як правило, здійснюють у чотири або п'ять етапів. Целюлозу піддають попередній обробці для того, щоб зробити сировину таку, як деревина або солома, більш придатною для гідролізу. Далі використовуються целюлазні ферменти для розщеплення молекул целюлози до здатного до ферментації цукру. Після гідролізу цукри відокремлюють від залишкових матеріалів та додають до дріжджів. Гідролізат цукрів піддають ферментації з одержанням етанолу при використанні дріжджів. На завершення, відновлюють етанол шляхом дистиляції. Альтернативно, гідроліз і ферментацію можна проводити разом при використанні спеціальних бактерій або грибів, які здійснюють обидва процеси. Коли обидва етапи виконуються сумісно, то процес називається послідовним гідролізом та ферментацією (SHF).

Перша органічна кислота та друга органічна кислота можуть бути введені для мікробіологічної ефективності в різних точках ферментативного способу гідролізу. Перша органічна кислота та друга органічна кислота можуть використовуватися при одержанні, виробництві та ферментації з використанням целюлазних ферментів, які виробляються *Trichoderma* та іншими штамами грибів. Перша органічна кислота та друга органічна кислота можуть додаватися у целюлозу одночасного з етапом оцукрювання та ферментації (SSF). Перша органічна кислота та друга органічна кислота можуть бути введені на етапі послідовного гідролізу та ферментації (SHF). Вони також можуть вводитися у момент часу до, під час або після ферментації при використанні целюлозолітичних грибів, які продукують целюлазні

ферменти. Альтернативно, перша органічна кислота та друга органічна кислота можуть додаватися на етапі ферментації дріжджів, як обговорювалося вище.

Процес газифікації не розриває ланцюг целюлози у молекулах цукру. Спочатку вуглець у целюлозі перетворюється на монооксид вуглецю, двоокис вуглецю і водень у частковій реакції горіння. Після цього монооксид вуглецю, двоокис вуглецю і водень подають у спеціальній ферментер, який використовує мікроорганізм такий, як *Clostridium ljungdahlii*, що є здатним споживати монооксид вуглецю, двоокис вуглецю та водень з утворенням етанолу та води. На завершення, етанол відокремлюється від води на етапі дистиляції. Перша органічна кислота у поєднанні з другою органічною кислотою можуть використовуватися як антимікробний агент на стадії ферментації за участю таких мікроорганізмів, як *Clostridium ljungdahlii*, які є здатними споживати монооксид вуглецю, двоокис вуглецю та водень з утворенням етанолу та води.

В одному необмежувальному варіанті здійснення винаходу принаймні одну першу органічну кислоту та принаймні одну друга органічна кислота додають дорезервуару та розводять до попередньо визначеної концентрації при попередньо визначеному співвідношенні. Переважні органічні кислоти включають лимонну кислоту, пропіонову кислоту та бензойну кислоту та їх солі, найбільш бажаною є лимонна кислота. У чані перша органічна кислота та друга органічна кислота розчиняються у воді з утворенням суміші першої органічної кислоти та другої органічної кислоти. Концентрація першої органічної кислоти та другої органічної кислоти у дозувальному резервуарі може варіювати в широкому діапазоні. Першу органічну кислоту та другу органічну кислоту потім випускають з дозувального резервуару через випускний отвір при вказаній швидкості дозування з утворенням розчину бажаної концентрації.

#### Приклади

Для одержання індексів синергізму, наведених у прикладах, що приведені нижче, використовують наступну формулу, яка вперше були представлена у F.C. Kull, P.C. Eisman, H.D. Sylwestrowka, and R.L. Mayer, Letts. In *Applied Microbiology* 9: 538-541, 1961.

Індекс синергізму =  $Qa/QA+Qb/QB$

де Qa являє собою концентрацію антимікробного агенту A, яка є необхідною для досягнення повного інгібування росту тест-мікроорганізму при використанні у поєднанні з антимікробним препаратом B;

QA являє собою концентрацію антимікробного агенту A, яка є необхідною для досягнення повного інгібування росту тест-мікроорганізму при використанні антимікробного агенту, узятим окремо;

Qb означає концентрацію антимікробного агенту B, яка є необхідною для досягнення повного інгібування росту тест-мікроорганізму при використанні у поєднанні з протимікробним препаратом A;

QB являє собою концентрацію антимікробного агенту B, яка є необхідною для досягнення повного інгібування росту тест-мікроорганізму при використанні антимікробного агенту, узятим окремо;

Індекс синергізму (SI) 1 вказує на те, що взаємодії між антимікробними агентами є просто адитивними, SI більше одиниці вказує на те, що протимікробні агенти є антагоністами один по відношенню до іншого, а SI менше одиниці вказує на те, що протимікробні агенти взаємодіють синергетичним чином.

Незважаючи на те, що існують різні способи, відомі фахівцям у даній галузі техніки для вимірювання рівнів антимікробної активності, у наведених нижче прикладах використовувалася критична точка, що є відомою як мінімальна інгібувальна концентрація, або MIC. Вона являє собою найбільш низьку концентрацію речовини або речовин, за якої можна досягти повного інгібування росту.

Для того щоб визначити мінімальну інгібувальну концентрацію здійснюють двократні серійні розведення у ростовому середовищі. Розведення проводять у мікропланшетах на 96 комірок так, що кожна комірка містить заключний об'єм 280 мкл середовища та протимікробний агент. Перша комірка має, наприклад, концентрацію 1000 част. на млн протимікробного агенту, друга - 500 част. на млн, третя - 250 част. на млн і так далі, з 12-ою та останньою коміркою у тому ж ряді, що не мають антимікробного агенту взагалі і служать як позитивний контроль росту. Після проведення серійних розведень у комірки вносять інокулянт мікроорганізмів, суспендований у ростовому середовищі, так, що заключна концентрація мікроорганізмів у комірці складає  $\sim 5 \times 10^5$  КУО/мл. У цих прикладах використовуваний тест-мікроорганізм являє собою *Lactobacillus plantarum*.

Культури інкубують при температурі 37 °C протягом 18-24 годин, і комірки оцінюють як позитивні або негативні за ростом на основі візуальної перевірки на помутніння для комірок, при цьому помутніння виступає як індикатор росту. Найнижча концентрація антимікробного засобу,

яка повністю інгібує ріст (наприклад, вміст комірки є прозорим), позначається як мінімальна інгібувальна концентрація.

Для того щоб визначити, чи є взаємодія між трьома антимікробними агентами адитивною, антагоністичною або синергетичною стосовно цільового мікроорганізму використовується модифікація MIC способу, відома як спосіб "шахової дошки" із застосуванням мікропланшетів на 96 комірок. Для конструювання шахового планшету перший протимікробний препарат вводять у дослід при використанні способу двократних серійних розведень для створення MIC планшету, за винятком того, що кожний з восьми рядків являв собою ідентичні серії розведення, які закінчуються після восьмої колонки. Другий антимікробний засіб вводять у дослід шляхом додання ідентичних об'ємів серій двократного розведення у правих кутах до перших серій. В результаті цього кожна комірка сітки  $8 \times 8$  має різні комбінації концентрацій антимікробних агентів, що забезпечує одержання загальної кількості 64 різних комбінацій. 9-а та 10-а колонки кожного планшету не містять протимікробного агента взагалі, тільки середовище, і служать позитивним та негативним контролюми росту, відповідно. Після того, як було сконструйовано шаховий мікропланшет, його засівали *Lactobacillus plantarum*, інкубували при  $37^\circ\text{C}$  та оцінювали так, як описано у способі MIC.

Приклад 1: Синергізм лимонної кислоти з пропіонатом натрію

Мінімальні інгібувальні концентрації визначали як для лимонної кислоти, так і для пропіонату натрію при pH 6 при використанні пропису, описаного вище, застосовуючи *Lactobacillus plantarum* як тест-мікроорганізм. Планшети типу "шахова дошка" для вивчення синергізму конструювали так, як описано вище, комірки інокулювали до одержання заключної концентрації  $\sim 5 \times 10^5$  КУО/мл, інкубували протягом 18-24 годин та потім оцінювали візуально на ріст/відсутність росту. Індeksi синергізму розраховували у відповідності з формулою так, як описано Kull та ін. Цей приклад демонструє, що ефект поєднання лимонної кислоти та пропіонату натрію є більшим, ніж ефект кожного з цих антимікробних агентів, узятих окремо. Кількість лимонної кислоти, яка є необхідною для інгібування бактеріального росту, знижується більше, ніж на порядок, з 100000 част. на млн до 3125-6250 част. на млн. Концентрація пропіонату натрію зменшується принаймні на 50 процентів, з 100000 част. на млн до інтервалу 12500-50000 част. на млн.

Таблиця 1

Використовується окремо		Використовується у комбінації			
MIC (QA) для лимонної кислоти, част. на млн	MIC (QB) для пропіонової кислоти, част. на млн	MIC (Qa) для лимонної кислоти, част. на млн	MIC (Qb) для пропіонової кислоти, част. на млн	Співвідношення лимонна кислота: пропіонат натрію	Індекс синергізму
100000	100000	6250	12500	1:2	0,19
100000	100000	3125	50000	1:16	0,53

Приклад 2: Синергізм лимонної кислоти з пропіонатом натрію

Мінімальні інгібувальні концентрації визначали як для лимонної кислоти, так і для пропіонату натрію при pH 5 при використанні пропису, описаного вище, застосовуючи *Lactobacillus plantarum* як тест-мікроорганізм. Використовували різні значення pH для аналізу, оскільки слабкі органічні кислоти мають різні значення рКа, що впливає на їх ефективність. При pH 5 значення MIC лимонної кислоти знижувалося з 100000 част. на млн (pH 6) до 25000 част. на млн. Планшети типу "шахова дошка" для вивчення синергізму конструювали так, як описано вище, комірки інокулювали до одержання заключної концентрації  $\sim 5 \times 10^5$  КУО/мл, інкубували протягом 18-24 годин та потім оцінювали візуально на ріст/відсутність росту. Індeksi синергізму розраховували у відповідності з формулою так, як описано Kull та ін. Цей приклад демонструє, що ефект поєднання лимонної кислоти та пропіонату натрію є більшим, ніж ефект кожного з цих антимікробних агентів, узятих окремо. Кількість лимонної кислоти, яка є необхідною для інгібування бактеріального росту, знижувалася на 50 % або більше, з 25000 част. на млн до 3125-12500 част. на млн. Концентрація пропіонату натрію зменшувалася на 50 % або більше, з 10000 част. на млн до інтервалу 391-50000 част. на млн.

Таблиця 2

	Використовується окремо		Використовується у комбінації			
	MIC (QA) для лимонної кислоти, част. на млн	MIC (QB) для пропіонату натрію, част. на млн	MIC (Qa) для лимонної кислоти, част. на млн	MIC (Qb) для пропіонату натрію, част. на млн	Співвідношення лимонна кислота: пропіонат натрію	Індекс синергізму
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

## Приклад 3: Синергізм лимонної кислоти з бензоатом калію

- Мінімальні інгібувальні концентрації визначали як для лимонної кислоти, так і для бензоату калію, при pH 6 при використанні пропису, описаного вище, застосовуючи *Lactobacillus plantarum* як тест-мікроорганізм. Планшети типу "шахова дошка" для вивчення синергізму конструювали так, як описано вище, комірки інокулювали до одержання заключної концентрації  $\sim 5 \times 10^5$  КУО/мл, інкубували протягом 18-24 годин та потім оцінювали візуально на ріст/відсутність росту. Індокси синергізму розраховували у відповідності з формулою так, як описано Kull та ін. Цей приклад демонструє, що ефект поєднання лимонної кислоти та бензоату калію є більшим, ніж ефект кожного із цих антимікробних агентів, узятих окремо. Кількість лимонної кислоти, яка є необхідною для інгібування росту бактерій, знижувалася з 100000 част. на млн до 390-6250 част. на млн. Концентрація бензоату калію знижувалася з 100000 част. на млн до інтервалу 780-12500 част. на млн.

Таблиця 3

	Використовується окремо		Використовується у комбінації			
	MIC (QA) для лимонної кислоти, част. на млн	MIC (QB) для бензоату калію, част. на млн	MIC (Qa) для лимонної кислоти, част. на млн	MIC (Qb) для бензоату калію, част. на млн	Співвідношення лимонна кислота: бензоат калію	Індекс синергізму
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

## Приклад 4: Синергізм лимонної кислоти з бензоатом калію

- Мінімальні інгібувальні концентрації визначали як для лимонної кислоти, так і для бензоату калію при pH 5 при використанні пропису, описаного вище, застосовуючи *Lactobacillus plantarum* як тест-мікроорганізм. Використовували різні значення pH для аналізу, оскільки слабкі органічні кислоти мають різні значення рКа, що впливає на їх ефективність. рКа бензоату було при значення pH 5, значення MIC лимонної кислоти знижувалося з 100000 част. на млн (pH 6) до 25000 част. на млн. Значення MIC бензоату калію знижувалося з 100000 част. на млн до 3125 част. на млн, коли pH середовища знижувалося до 5. Планшети типу "шахова дошка" для вивчення синергізму конструювали так, як описано вище, комірки інокулювали до одержання заключної концентрації  $\sim 5 \times 10^5$  КУО/мл, інкубували протягом 18-24 годин та потім оцінювали візуально на ріст/відсутність росту. Індокси синергізму розраховували у відповідності з формулою так, як описано Kull та ін. Цей приклад демонструє, що ефект поєднання лимонної кислоти та бензоату калію є більшим, ніж ефект кожного з цих антимікробних агентів, узятих окремо. Кількість лимонної кислоти, яка є необхідною для інгібування бактеріального росту, знижувалося з 25000 част. на млн до 3125-12500 част. на млн. Концентрація бензоату калію зменшувалася з 3125 част. на млн до інтервалу 391-1563 част. на млн.

Таблиця 4

Використовується окремо		Використовується у комбінації			
MIC (QA) для лимонної кислоти, част. на млн	MIC (QB) для бензоату калію, част. на млн	MIC (Qa) для лимонної кислоти, част. на млн	MIC (Qb) для бензоату калію, част. на млн	Співвідношення лимонна кислота: бензоат калію	Індекс синергізму
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

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Водна композиція для боротьби з концентрацією небажаного мікроорганізму, яка включає:
  - (a) першу органічну кислоту або її сіль та
  - (b) другу органічну кислоту або її сіль;
 де перша органічна кислота є відмінною від другої органічної кислоти; де перша органічна кислота являє собою лимонну кислоту або її сіль, а друга органічна кислота являє собою пропіонову кислоту або її сіль; та де співвідношення першої органічної кислоти або її солі і другої органічної кислоти або її солі складає від 32:1 до 1:32.
2. Композиція за п. 1, де перша органічна кислота має концентрацію принаймні 100 част. на млн у водній системі.
3. Композиція за п. 1, де перша органічна кислота має концентрацію принаймні від 100 част. на млн до приблизно 12500 част. на млн у водній системі, що піддається обробці.
4. Композиція за п. 1, де перша органічна кислота являє собою лимонну кислоту або її сіль, друга органічна кислота являє собою пропіонову кислоту або її сіль, де співвідношення лимонної кислоти і пропіонової кислоти складає від 32:1 до 1:16, а кількість першої органічної кислоти у водній системі, що піддається обробці, складає від 100 до 12500 част. на млн.
5. Спосіб боротьби з концентрацією небажаного мікроорганізму у водній системі, що використовується у ферментаційному процесі, де спосіб включає етапи:
  - (a) введення здатного до ферментації вуглеводу у водний розчин;
  - (b) введення принаймні одного виду дріжджів у вказаний розчин;
  - (в) введення першої органічної кислоти та другої органічної кислоти у вказану водну систему;
 де перша органічна кислота являє собою лимонну кислоту або її сіль, а друга органічна кислота являє собою пропіонову кислоту або її сіль; та де співвідношення першої органічної кислоти або її солі і другої органічної кислоти або її солі складає від 32:1 до 1:32.
6. Спосіб за п. 5, де перша органічна кислота має концентрацію принаймні 100 част. на млн у водній системі, що піддається обробці.
7. Спосіб за п. 5 або 6, де перша органічна кислота має концентрацію від принаймні 100 част. на млн до приблизно 12500 част. на млн у водній системі, що піддається обробці.
8. Спосіб за п. 5, де перша органічна кислота являє собою лимонну кислоту або її сіль, а друга органічна кислота являє собою пропіонову кислоту або її сіль, де співвідношення лимонної кислоти і пропіонової кислоти складає від 32:1 до 1:16, а кількість першої органічної кислоти у водній системі, що піддається обробці, складає від 100 до 12500 част. на млн.
9. Спосіб боротьби з концентрацією небажаного мікроорганізму у водному рідкому розчині, що використовується у ферментаційному процесі, де спосіб включає етапи:
  - (a) введення здатного до ферментації вуглеводу у водний розчин;
  - (b) введення принаймні одного бажаного мікроорганізму, який є здатним до ферментації вуглеводу, у вказаний водний розчин;
  - (c) введення першої органічної кислоти та другої органічної кислоти у вказану водну систему;
 де перша органічна кислота являє собою лимонну кислоту або її сіль, а друга органічна кислота являє собою пропіонову кислоту або її сіль; та де співвідношення першої органічної кислоти або її солі і другої органічної кислоти або її солі складає від 32:1 до 1:32.
10. Спосіб боротьби з небажаним ростом мікроорганізмів у ферментаційному бульйоні або у промислових ферментаційних процесах або системах, де спосіб включає етап додання до ферментаційного бульйону або ферментаційного процесу або системи композиції у відповідності з будь-яким з пунктів 1-4.

---

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601