



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105063099 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201510512871. 6

C12R 1/865(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 06. 27

C12R 1/84(2006. 01)

(30) 优先权数据

60/946, 521 2007. 06. 27 US

60/952, 685 2007. 07. 30 US

(62) 分案原申请数据

200880021367. 4 2008. 06. 27

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 马兹. T. 史密斯

吉勒莫. 科沃德-凯利 丹. 尼尔森

康正芳 普拉尚特. 艾耶

兰迪. 戴因哈默

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

C12P 7/10(2006. 01)

权利要求书3页 说明书34页 附图5页

(54) 发明名称

产生发酵产物的方法

(57) 摘要

本发明涉及从含木质纤维素材料产生发酵产物的方法,包括:i) 预处理含木质纤维素材料;ii) 使经预处理的含木质纤维素材料水解;iii) 使用发酵生物体发酵;其中在以下条件下开始并进行发酵:a) 发酵生物体细胞计数在 $10-250 \times 10^{10}$ 个细胞/L 发酵培养基的范围内;或b) 发酵生物体浓度在2-90g 干重发酵生物体/L 发酵培养基的范围内。

1. 从含木质纤维素材料产生发酵产物的方法,其中该方法包括:
 - i) 预处理含木质纤维素材料;
 - ii) 使经预处理的含木质纤维素材料水解;
 - iii) 使用发酵生物体发酵;其中所述水解步骤 ii) 和发酵步骤 iii) 作为单独的水解和发酵步骤进行,其中在以下条件下开始并进行发酵:
发酵生物体浓度在 10-50g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基的范围内,其中所述发酵作为补料分批发酵进行,其中 C6 和 C5 糖的发酵同时进行。
2. 权利要求 1 的方法,其中在发酵前或发酵过程中除去不溶性固体。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中在步骤 i) 中预处理含木质纤维素材料后除去不溶性固体。
4. 权利要求 1-3 任一项的方法,其中在步骤 ii) 中使该经预处理的含木质纤维素材料水解后除去不溶性固体。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述发酵在 10-40g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基范围内的发酵生物体浓度下进行。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述发酵在 10-30g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基范围内的发酵生物体浓度下进行。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述发酵生物体是固定化的。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述发酵生物体在发酵后回收。
9. 权利要求 1 的方法,其中所述发酵生物体通过将发酵生物体与发酵培养基分离而回收。
10. 权利要求 1 的方法,其中所述发酵生物体在发酵后回收并再使用。
11. 权利要求 8-10 任一项的方法,其中所述发酵生物体通过使用压滤机过滤或通过离心从发酵培养基回收。
12. 权利要求 1 的方法,其中在水解过程中使用木糖异构酶。
13. 权利要求 1 的方法,其中在发酵或水解前使所述含木质纤维素材料解毒。
14. 权利要求 1 的方法,其中所述含木质纤维素材料是未解毒的。
15. 权利要求 1- 的方法,其中所述含木质纤维素材料已进行化学、机械或生物预处理。
16. 权利要求 1 的方法,其中所述含木质纤维素材料已通过用一种或多种纤维素酶或半纤维素酶或其组合处理而水解。
17. 权利要求 16 的方法,进一步其中在水解过程中存在一种或多种具有纤维素分解增强活性的多肽。
18. 权利要求 17 的方法,其中具有纤维素分解增强活性的多肽为家族 GH61A 多肽。
19. 权利要求 18 的方法,其中所述家族 GH61A 多肽源自嗜热子囊菌属 (*Thermoascus*) 的菌株。
20. 权利要求 19 的方法,其中所述嗜热子囊菌属的菌株为桔橙嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*)。
21. 权利要求 18 的方法,其中所述家族 GH61A 多肽源自梭孢壳属 (*Thielavia*) 的菌株。
22. 权利要求 21 的方法,其中所述梭孢壳属的菌株为土生梭孢霉 (*Thielavia*

terrestris)。

23. 权利要求 18 的方法,其中所述家族 GH61A 多肽源自木霉属 (*Trichoderma*) 的菌株。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述木霉属的菌株为里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)。

25. 权利要求 1 的方法,其中在水解过程中存在一种或多种 β -葡糖苷酶。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述 β -葡糖苷酶源自曲霉属 (*Aspergillus*) 的菌株。

27. 权利要求 26 的方法,其中所述曲霉属的菌株为米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)。

28. 权利要求 25 的方法,其中所述 β -葡糖苷酶源自木霉属的菌株。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述木霉属的菌株为里氏木霉。

30. 权利要求 16 的方法,其中用于水解的纤维素酶为源自木霉属的菌株的纤维素分解制备物。

31. 权利要求 30 的方法,其中所述木霉属的菌株为里氏木霉的菌株。

32. 权利要求 1 的方法,其中在水解步骤 ii) 中使用纤维素酶制备物 A。

33. 权利要求 1 的方法,其中将经预处理的含木质纤维素材料用选自下组的一种或多种淀粉降解酶进一步处理:糖-产生酶、 α -淀粉酶及其组合。

34. 权利要求 33 的方法,其中所述糖-源产生酶选自下组:葡糖淀粉酶、 β -淀粉酶、产麦芽糖淀粉酶、及其两种或多种的混合物。

35. 权利要求 1 的方法,其中所述发酵产物为乙醇。

36. 权利要求 1 的方法,其中使用 C6 或 C5 发酵生物体进行所述发酵。

37. 权利要求 1 的方法,其中所述发酵生物体为酵母,优选酵母属 (*Saccharomyces*) 的菌株,优选酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述酵母选自下组:酿酒酵母和树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*)。

39. 权利要求 1 的方法,其中所述含木质纤维素材料源自玉米秸、玉米纤维、硬木、软木、谷类茎秆、柳枝稷、芒属、稻壳、城市固体废物、工业有机废物、办公纸张、或其混合物。

40. 权利要求 1 的方法,其中引入所述发酵培养基中的所述含木质纤维素材料是未洗涤的。

41. 权利要求 1 的方法,其中引入所述发酵培养基中的所述含木质纤维素材料是未洗涤的且预处理的,而且所述含木质纤维素材料选自下组:玉米秸、玉米穗轴、玉米纤维、木材、柳枝稷、甘蔗渣和谷类茎秆。

42. 权利要求 1 的方法,其中所述发酵产物在发酵后回收。

43. 权利要求 1 的方法,其中水解进行 12-120 小时。

44. 从含木质纤维素材料产生发酵产物的方法,其中该方法包括:

i) 预处理含木质纤维素材料;

ii) 使经预处理的含木质纤维素材料水解;

iii) 使用发酵生物体发酵;

其中所述水解步骤 ii) 和发酵步骤 iii) 作为单独的水解和发酵步骤进行,

其中在以下条件下开始并进行发酵:

发酵生物体浓度在 10-50g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基的范围内,其中所述发酵作为补料分批发酵进行,其中 C6 和 C5 糖的发酵同时进行,和其中所述发酵生物体在发酵后回

收,且在一个或多个另外的发酵循环中再使用。

45. 权利要求 44 的方法,其中所述发酵生物体通过将发酵生物体与发酵培养基分离而回收。

产生发酵产物的方法

[0001] 本发明是基于申请日为 2008 年 6 月 27 日,申请号为“200880021367.4”(国际申请号为 PCT/US2008/068575),发明名称为“产生发酵产物的方法”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及使用一种或多种发酵生物体从含木质纤维素材料中产生发酵产物的方法。

背景技术

[0003] 由于化石燃料的有限储量和关于温室气体排放的担忧,对于使用可再生能源有越来越多的关注。

[0004] 从含木质纤维素材料中产生发酵产物是本领域已知的,且包括将含木质纤维素材料预处理、水解和发酵。

[0005] 发酵步骤使用能够将可发酵糖转化为期望的发酵产物的发酵生物体进行。在将发酵生物体接种到发酵培养基中后,它经过许多阶段。起始阶段称作“迟滞期”且为其中未产生显著量的发酵产物的适应期。在接下来的生长增加的称作“指数期”和作为在最大生长后的阶段的称作“稳定期”的两个阶段中,产生显著量的发酵产物。发酵循环通常可进行多至 96 小时或更长,使得每个循环耗时且昂贵。

[0006] 从含木质纤维素材料或纤维素“生物质”中产生发酵产物的工艺还受到发酵生物体对在发酵工艺中所使用的粗水解物中发现的许多毒素的耐受性的限制。从水解物中除去毒素是困难、耗时且昂贵的。为了避免昂贵的毒素去除步骤,在水解物中固体的百分比常规地保持低于 10%总固体(w/w),由此使毒素对发酵生物体的影响最小。不幸地,总固体浓度的限制意味着较少可用的发酵底物和每批次较低的发 酵产物产率(yield)。

[0007] 因此,高度期望利用具有高总固体浓度的粗水解物和降低从含木质纤维素材料中产生期望的发酵产物所需的发酵时间。

发明内容

[0008] 本发明涉及使用一种或多种发酵生物体从含木质纤维素材料中产生发酵产物的方法。

[0009] 本发明涉及从含木质纤维素材料中产生发酵产物的方法,其中该方法包括:

[0010] i) 预处理含木质纤维素材料;

[0011] ii) 使经预处理的含木质纤维素材料水解;

[0012] iii) 使用发酵生物体发酵;

[0013] 其中在以下条件下开始并进行发酵:

[0014] a) 发酵生物体细胞计数在 $10\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞/L 发酵培养基的范围内;或

[0015] b) 发酵生物体浓度在 2-90g 干重发酵生物体/L 发酵培养基的范围内。

[0016] 本发明具体涉及:

- [0017] 1. 从含木质纤维素材料产生发酵产物的方法,其中该方法包括:
- [0018] i) 预处理含木质纤维素材料;
- [0019] ii) 使经预处理的含木质纤维素材料水解;
- [0020] iii) 使用发酵生物体发酵;
- [0021] 其中在以下条件下开始并进行发酵:
- [0022] a) 发酵生物体细胞计数在 $10\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞 /L 发酵培养基的范围内;或
- [0023] b) 发酵生物体浓度在 $2\text{--}90\text{g}$ 干重发酵生物体 /L 发酵培养基的范围内。
- [0024] 2. 项 1 的方法,其中在发酵前或发酵过程中除去不溶性固体。
- [0025] 3. 项 1 或 2 的方法,其中在步骤 i) 中预处理含木质纤维素材料后除去不溶性固体。
- [0026] 4. 项 1-3 任一项的方法,其中在步骤 ii) 中使该经预处理的含木质纤维素材料水解后除去不溶性固体。
- [0027] 5. 项 1-4 任一项的方法,其中所述发酵在 $20\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞 /L 发酵培养基的发酵生物体细胞计数范围内进行。
- [0028] 6. 项 1-5 任一项的方法,其中所述发酵在 $50\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞 /L 发酵培养基的发酵生物体细胞计数范围内进行。
- [0029] 7. 项 1-6 任一项的方法,其中所述发酵在 $100\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞 /L 发酵培养基的发酵生物体细胞计数范围内进行。
- [0030] 8. 项 1-7 任一项的方法,其中所述发酵在 $200\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞 /L 发酵培养基的发酵生物体细胞计数范围内进行。
- [0031] 9. 项 1-8 任一项的方法,其中所述发酵在 $3\text{--}90\text{g}$ 干重发酵生物体 /L 发酵培养基范围内的发酵生物体浓度下进行。
- [0032] 10. 项 1-9 任一项的方法,其中所述发酵在 $3\text{--}50\text{g}$ 干重发酵生物体 /L 发酵培养基范围内的发酵生物体浓度下进行。
- [0033] 11. 项 1-10 任一项的方法,其中所述发酵在 $4\text{--}50\text{g}$ 干重发酵生物体 /L 发酵培养基范围内的发酵生物体浓度下进行。
- [0034] 12. 项 1-11 任一项的方法,其中所述发酵在 $10\text{--}50\text{g}$ 干重发酵生物体 /L 发酵培养基范围内的发酵生物体浓度下进行。
- [0035] 13. 项 1-12 任一项的方法,其中所述发酵在 $10\text{--}40\text{g}$ 干重发酵生物体 /L 发酵培养基范围内的发酵生物体浓度下进行。
- [0036] 14. 项 1-13 任一项的方法,其中所述发酵在 $10\text{--}30\text{g}$ 干重发酵生物体 /L 发酵培养基范围内的发酵生物体浓度下进行。
- [0037] 15. 项 1-14 任一项的方法,其中所述发酵生物体是固定化的。
- [0038] 16. 项 1-15 任一项的方法,其中所述发酵生物体在发酵后回收。
- [0039] 17. 项 1-16 任一项的方法,其中所述发酵生物体通过将发酵生物体与发酵培养基分离而回收。
- [0040] 18. 项 1 的方法,其中所述发酵生物体在发酵后回收并再使用。
- [0041] 19. 项 1 的方法,其中所述发酵生物体在发酵后与发酵培养基分离并再使用于项 1 的方法中。

[0042] 20. 项 16-19 任一项的方法,其中所述发酵生物体通过使用压滤机过滤或通过离心从发酵培养基回收。

[0043] 21. 项 1-20 任一项的方法,其中所述水解步骤 ii) 和发酵步骤 iii) 作为 SSF、HHF 或 SHF 进行。

[0044] 22. 项 1-21 任一项的方法,其中在水解过程中使用木糖异构酶。

[0045] 23. 项 1-22 任一项的方法,其中发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0046] a) 源自预处理步骤 i) 或水解步骤 ii) 的 C6 糖的发酵;

[0047] b) 回收和再循环 C6 发酵生物体;

[0048] c) 使 C5 糖发酵;

[0049] d) 回收和再循环 C6 发酵生物体。

[0050] 24. 项 1-22 任一项的方法,其中所述水解步骤 ii) 和发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0051] 1) 源自预处理步骤 i) 的 C6 糖的同时水解和发酵;

[0052] 2) 使 C5 糖发酵。

[0053] 25. 项 1-22 任一项的方法,其中所述水解步骤 ii) 和发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0054] 1) 源自预处理步骤 i) 的 C6 糖的同时水解和发酵;

[0055] 2) 除去不溶性固体;

[0056] 3) 使 C5 糖发酵;

[0057] 4) 回收和再循环发酵生物体。

[0058] 26. 项 1-22 任一项的方法,其中所述发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0059] a) 源自预处理步骤 i) 或水解步骤 ii) 的 C5 和 C6 糖的同时发酵;

[0060] b) 回收和再循环发酵生物体。

[0061] 27. 项 1-22 任一项的方法,其中所述水解步骤 ii) 和发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0062] 1) 源自预处理步骤 i) 的 C5 和 C6 糖的同时水解和同时发酵。

[0063] 28. 项 1-22 任一项的方法,其中所述水解步骤 ii) 和发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0064] 1) 源自预处理步骤 i) 的 C5 和 C6 糖的同时水解和发酵;

[0065] 2) 回收和再循环发酵生物体。

[0066] 29. 项 1-28 任一项的方法,其中在发酵或水解前使所述含木质纤维素材料解毒。

[0067] 30. 项 1-29 任一项的方法,其中所述含木质纤维素材料是未解毒的。

[0068] 31. 项 1-30 任一项的方法,其中所述含木质纤维素材料已进行化学、机械或生物预处理。

[0069] 32. 项 1-31 任一项的方法,其中所述含木质纤维素材料已通过用一种或多种纤维素酶或半纤维素酶或其组合处理而水解。

[0070] 33. 项 32 的方法,进一步其中在水解过程中存在一种或多种具有纤维素分解增强活性的多肽。

[0071] 34. 项 32 或 33 的方法,其中具有纤维素分解增强活性的多肽为家族 GH61A 多肽。

[0072] 35. 项 34 的方法,其中所述家族 GH61A 多肽源自嗜热子囊菌属 (*Thermoascus*) 的菌株。

[0073] 36. 项 35 的方法,其中所述嗜热子囊菌属的菌株为桔橙嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*)。

- [0074] 37. 项 36 的方法,其中所述 GH61A 多肽为公开在 WO 2005/074656 中的多肽。
- [0075] 38. 项 34 的方法,其中所述家族 GH61A 多肽源自梭孢壳属 (*Thielavia*) 的菌株。
- [0076] 39. 项 38 的方法,其中所述梭孢壳属的菌株为土生梭孢霉 (*Thielavia terrestris*)。
- [0077] 40. 项 39 的方法,其中所述 GH61A 多肽为公开在 WO 2005/074656 中的多肽。
- [0078] 41. 项 34 的方法,其中所述家族 GH61A 多肽源自木霉属 (*Trichoderma*) 的菌株。
- [0079] 42. 项 41 的方法,其中所述木霉属的菌株为里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)。
- [0080] 43. 项 42 的方法,其中所述 GH61A 多肽为公开在 US 2007/0077630 中的多肽。
- [0081] 44. 项 1-43 任一项的方法,其中在水解过程中存在一种或多种 β -葡糖苷酶。
- [0082] 45. 项 44 的方法,其中所述 β -葡糖苷酶源自曲霉属 (*Aspergillus*) 的菌株。
- [0083] 46. 项 45 的方法,其中所述曲霉属的菌株为米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)。
- [0084] 47. 项 44 的方法,其中所述 β -葡糖苷酶源自木霉属的菌株。
- [0085] 48. 项 47 的方法,其中所述木霉属的菌株为里氏木霉。
- [0086] 49. 项 1-48 任一项的方法,其中用于水解的纤维素酶为源自木霉属的菌株的纤维素分解制备物。
- [0087] 50. 项 49 的方法,其中所述木霉属的菌株为里氏木霉的菌株。
- [0088] 51. 项 1-50 任一项的方法,其中在水解步骤 ii) 中使用纤维素酶制备物 A。
- [0089] 52. 项 1-51 任一项的方法,其中将经预处理的含木质纤维素材料用选自下组的一种或多种淀粉降解酶进一步处理:糖-产生酶、 α -淀粉酶及其组合。
- [0090] 53. 项 52 的方法,其中所述糖-源产生酶选自下组:葡糖淀粉酶、 β -淀粉酶、产麦芽糖淀粉酶、及其两种或多种的混合物。
- [0091] 54. 项 1-53 任一项的方法,其中所述发酵产物为乙醇。
- [0092] 55. 项 1-54 任一项的方法,其中使用 C6 或 C5 发酵生物体进行所述发酵。
- [0093] 56. 项 1-55 任一项的方法,其中所述发酵生物体为酵母,优选酵母属 (*Saccharomyces*) 的菌株,优选酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。
- [0094] 57. 项 56 的方法,其中所述酵母选自下组:酿酒酵母和树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*)。
- [0095] 58. 项 1-57 任一项的方法,其中步骤 ii) 或步骤 iii) 在 25°C 至 40°C 的温度进行。
- [0096] 59. 项 58 的方法,其中步骤 ii) 或步骤 iii) 在 29°C 至 35°C 的温度进行。
- [0097] 60. 项 58 的方法,其中步骤 ii) 或步骤 iii) 在 30°C 至 34°C 的温度进行。
- [0098] 61. 项 58 的方法,其中步骤 ii) 或步骤 iii) 在约 32°C 的温度进行。
- [0099] 62. 项 1-61 任一项的方法,其中在发酵过程中的 pH 为 3 至 7。
- [0100] 63. 项 62 的方法,其中在发酵过程中的 pH 为 4 至 6。
- [0101] 64. 项 1-63 任一项的方法,其中所述发酵进行 1-48 小时。
- [0102] 65. 项 64 的方法,其中所述发酵进行 1-24 小时。
- [0103] 66. 项 1-65 任一项的方法,其中所述含木质纤维素材料源自玉米秸、玉米纤维、硬木、软木、谷类茎秆、柳枝稷、芒属、稻壳、城市固体废物、工业有机废物、办公纸张、或其混合物。
- [0104] 67. 项 1-66 任一项的方法,其中引入所述发酵培养基中的所述含木质纤维素材料

是未洗涤的。

[0105] 68. 项 1-67 任一项的方法,其中引入所述发酵培养基中的所述含木质纤维素材料是未洗涤的且预处理的,而且所述含木质纤维素材料选自下组:玉米秸、玉米穗轴、玉米纤维、木材、柳枝稷、甘蔗渣和谷类茎秆。

[0106] 69. 项 1-68 任一项的方法,其中所述发酵是分批发酵。

[0107] 70. 项 1-68 任一项的方法,其中所述发酵是补料分批发酵。

[0108] 71. 项 1-71 任一项的方法,其中所述发酵产物在发酵后回收。

[0109] 72. 项 1-72 任一项的方法,其中在发酵过程中的 pH 大于 pH 5.0。

附图说明

[0110] 图 1 表明各种量的糖溶液和经过滤的预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物对在两种不同的酵母菌株中在 96 小时后的分批发酵乙醇产生的影响。

[0111] 图 2 表明高细胞密度的 RED STAR™对在各种起始酵母细胞浓度的经过滤的预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物的乙醇分批发酵的影响。

[0112] 图 3 表明高细胞密度的酵母 RWB218 对在各种起始酵母细胞浓度的预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物的乙醇分批发酵的影响。

[0113] 图 4 表明高细胞密度的 RED STAR™和在 pH5 的细胞再循环对在 40g/L 的起始酵母细胞浓度的经过滤的预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物的分批发酵乙醇产生的影响。

[0114] 图 5 表明高细胞密度的 RED STAR™和在 pH 6 的细胞再循环对在 40g/L 的起始酵母细胞浓度的经过滤的预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物的分批发酵乙醇产生的影响。

[0115] 图 6a 表明高细胞密度的酵母 RWB218 和细胞再循环对在 20g/L 的酵母细胞浓度的经离心的预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物的补料分批发酵乙醇产生的影响。

[0116] 图 6b 表明高细胞密度的酵母 RWB218 对在 20g/L 的酵母细胞浓度从 0 至 24 小时的经离心的预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物的补料分批发酵乙醇产生的影响。

[0117] 图 7 表明高密度的酵母 RWB218 对在各种起始酵母细胞浓度对预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物用各种预处理方法预处理的玉米秸 (CS) 的分批发酵乙醇产生的影响。

具体实施方式

[0118] 本发明涉及使用一种或多种发酵生物体从含木质纤维素材料中产生发酵产物的方法。

[0119] 根据本发明,可通过在整个发酵中在非常高细胞计数进行发酵而显著缩短发酵时间。即使每发酵生物体的发酵速度可以不高于在常规发酵工艺中的速度,在整个发酵中发酵生物体的绝对数量高的事实也导致期望的发酵产物的快速产生(以每时间单位的发酵产物的绝对量确定)。

[0120] 此外,根据本发明,发酵生物体可如下所述回收和再使用。与常规方法相比,缩短的发酵时间和发酵生物体的任选的再使用降低了本发明方法的总成本。

[0121] 因此,本发明涉及从含木质纤维素材料中产生发酵产物的方法,其中该方法包括:

[0122] i) 预处理含木质纤维素材料;

[0123] ii) 使经预处理的含木质纤维素材料水解；

[0124] iii) 使用发酵生物体发酵；

[0125] 其中在以下条件下开始并进行发酵：

[0126] a) 发酵生物体细胞计数在 $10\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞 /L 发酵培养基的范围内；或

[0127] b) 发酵生物体浓度在 2–90g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基的范围内。

[0128] 在一个优选的实施方式中，在发酵前除去不溶性固体（包括木质素和未转化的多糖）。例如，可在步骤 i) 中预处理含木质纤维素材料后除去不溶性固体。根据本发明，然后可使已除去不溶性固体的源自预处理的木质纤维素的材料发酵。在另一实施方式中，可在步骤 ii) 中使该预处理的含木质纤维素材料水解后除去不溶性固体。根据本发明，然后可使已除去不溶性固体的源自水解的预处理的木质纤维素的材料发酵。

[0129] 待发酵的源自木质纤维素的可发酵糖为来自预处理或水解步骤 i) 或 ii) 或来自步骤 i) 和 ii) 两者的液体形式（例如，滤出液）。在一个优选的实施方式中，步骤 ii) 中的水解和步骤 iii) 中的发酵作为单独的水解和发酵步骤 (SHF)、作为混合的水解和发酵步骤 (HHF) 或作为同时的水解和发酵步骤 (SSF) 进行。SSF、HHF 和 SHF 步骤是本领域公知的。

[0130] 在一个优选的实施方式中，发酵可在 $20\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞 /L 发酵培养基的范围内，更优选在 $50\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞 /L 发酵培养基的范围内，更优选在 $100\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞 /L 发酵培养基的范围内，更优选在 $150\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞 /L 发酵培养基的范围内，例如在 $200\text{--}250 \times 10^{10}$ 个细胞 /L 发酵培养基的范围内进行。

[0131] 在一个优选的实施方式中，发酵可在 3–90g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基、3–50g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基的范围内，优选在 4–50g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基的范围内，优选在 5–50g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基的范围内，更优选在 10–50g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基的范围内，更优选在 10–40g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基的范围内，特别地在 10–30g 干重发酵生物体 /L 发酵培养基的范围内进行。

[0132] 根据本发明，发酵生物体可为固定化的。例如，发酵生物体可固定在惰性的表面积的支持物上，该支持物悬浮在发酵罐 / 容器中，通过该发酵罐 / 容器供给 (feed) 待发酵的源自水解和 / 或预处理的木质纤维素的材料。根据本发明可使用任何固定化技术。用于固定化发酵生物体的技术是本领域公知的。合适的固定化技术的实例可在例如以下中找到：Kesava 等，1996，“Ethanol production by immobilized whole cells of *Zymomonas mobilis* in a continuous flow expanded bed bioreactor and a continuous flow stirred tank bioreactor”，*Journal of Industrial Microbiology* 17:11–14；Gough 等，1998，“Production of ethanol from molasses at 45 degrees C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate gels and poly(vinyl alcohol) cryogel”，*Bioprocess Engineering* 19:87–90；Love 等，1998，“Continuous ethanol fermentation at 45degrees C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in Calcium alginate and kissiris”，*Bioprocess Engineering* 18:187–189；Abbi 等，1996，“Bioconversion of pentose sugars to ethanol by free and immobilized cells of *Candida shehatae* (NCL-3501): Fermentation behaviour” *Process Biochemistry* 31:555–560；Krishnan 等，2000，“Ethanol production from glucose and xylose by immobilized

Zymomonas mobilis CP4(pZB5)”, Applied Biochemistry And Biotechnology 84-6:525-541 ;Chibata 等 ,1981, Ann. Rev. Microphys. Bioeng 10:197-216 ;Fukui 等 ,1982, Ann. Rev. Microbial 36:145-172 ;John F. Kennedy, 1982, Nature, 299:777-778 (全部文献通过引用并入本文)。

[0133] 在一个实施方式中,发酵生物体可有利地回收和再使用。例如,发酵生物体可通过在发酵罐 / 容器中将它们与发酵培养基分离而回收。或者,发酵生物体可通过在发酵后将它们与发酵培养基分离而回收。包含发酵产物的发酵培养基的部分 (fraction) 可进一步处理或回收,例如通过蒸馏。回收的发酵生物体可再循环至同一发酵罐 / 容器或一个或多个其它发酵罐 / 容器。换句话说,根据本发明,发酵生物体可回收和再循环至发酵培养基,且这样在一个或多个另外的发酵循环中再使用。其中可使用再循环的发酵生物体的发酵循环的数目可取决于许多因素,所述因素包括但不限于, pH、发酵生物体的类型、发酵产物浓度如乙醇浓度、或总固体 (TS) 的浓度。本领域技术人员可根据本发明改变这些因素以优化再循环事件 (event) 的数目。

[0134] 在另一实施方式中,增殖步骤可添加到回收和再循环发酵生物体的工艺中。例如,在将回收的发酵生物体再循环或再使用于随后的发酵循环之前,可使其增殖一段时间。

[0135] 任何技术可用于回收发酵生物体。本领域中公知的合适技术包括过滤 (例如使用压滤机) 和离心。

[0136] 根据优选的实施方式,能够将木糖转化为木酮糖的酶可存在于水解和 / 或发酵的过程中。在一个优选的实施方式中,这种木糖向木酮糖的转化酶可为木糖异构酶 (有时称为葡萄糖异构酶)。合适的木糖异构酶的实例可在以下的“木糖异构酶”部分中找到。将木糖转化为木酮糖是有利的,因为这容许一些通常使用的 C6 发酵生物体例如酿酒酵母将木酮糖转化为期望的发酵产物例如乙醇,同时发酵 C6 糖,例如特别是葡萄糖。

[0137] 在一个实施方式中,C6 和 C5 可发酵糖的发酵同时进行。C5 和 C6 糖的同时发酵可如下进行:

[0138] 发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0139] a) 源自预处理步骤 i) 或水解步骤 ii) 的 C5 和 C6 糖的同时发酵;

[0140] b) 回收和再循环发酵生物体。

[0141] 或者,在另一实施方式中,水解步骤 ii) 和发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0142] 1) 源自预处理步骤 i) 的 C5 和 C6 糖的同时水解和同时发酵。

[0143] 在另一实施方式中,水解步骤 ii) 和发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0144] 1) 源自预处理步骤 i) 的 C5 和 C6 糖的同时水解和同时发酵;

[0145] 2) 回收和再循环发酵生物体。

[0146] 或者,在另一实施方式中,C5 可发酵糖的发酵在 C6 可发酵糖的发酵之后进行。C5 和 C6 糖的相继发酵可如下进行:

[0147] 发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0148] a) 源自预处理步骤 i) 或水解步骤 ii) 的 C6 糖的发酵;

[0149] b) 回收和再循环 C6 发酵生物体;

[0150] c) 发酵 C5 糖;

[0151] d) 回收和再循环 C5 发酵生物体。

[0152] 或者,在另一实施方式中,水解步骤 ii) 和发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0153] 1) 源自预处理步骤 i) 的 C6 糖的同时水解和发酵;

[0154] 2) 发酵 C5 糖。

[0155] 或者,在另一实施方式中,水解步骤 ii) 和发酵步骤 iii) 进一步包括:

[0156] 1) 源自预处理步骤 i) 的 C6 糖的同时水解和发酵;

[0157] 2) 除去不溶性固体;

[0158] 3) 发酵 C5 糖;

[0159] 4) 回收和再循环发酵生物体。

[0160] 在一个实施方式中,可使含木质纤维素材料解毒 (detoxify)。在一个实施方式中,在水解和 / 或发酵之前洗涤该材料。在另一实施方式中,含木质纤维素材料可为未解毒的,例如未洗涤的。

[0161] 含木质纤维素材料

[0162] “木质纤维素”或“含木质纤维素材料”是指主要由纤维素、半纤维素和木质素构成的材料。这种材料经常称作“生物质”。

[0163] 木质纤维素生物质为纤维素纤维包裹在木质素和半纤维素鞘 (sheath) 中的复合结构。木质纤维素的结构使得其对于酶水解不敏感。为了增强酶水解,木质纤维素必须进行预处理,例如通过在适当的压力和温度条件下的酸水解进行,以打破木质素的封闭、使半纤维素糖化和溶解、并破坏纤维素的晶体结构。然后可使纤维素进行酶水解,例如通过纤维素分解酶处理来进行,以将糖聚合物转化为可发酵糖,该可发酵糖可发酵为期望的发酵产物如乙醇。也可采用半纤维素分解酶处理以使在预处理生物质中的任何残留的半纤维素水解。

[0164] 含木质纤维素材料可为任何含木质纤维素的材料。在一个优选的实施方式中,含木质纤维素材料包含至少 30 重量%,优选至少 50 重量%,更优选至少 70 重量%,甚至更优选至少 90 重量%的木质纤维素。应理解,含木质纤维素材料也可包括其它组成部分如蛋白质材料、淀粉和糖如可发酵或不可发酵糖,或其混合物。

[0165] 含木质纤维素材料通常在例如植物的茎、叶、壳、荚和穗轴或树的叶、枝和木质中得到。含木质纤维素材料包括,但不限于,草本材料、农业残余物、林业残余物、城市固体废物、废纸、以及纸浆厂和造纸厂残余物。应理解,含木质纤维素材料可为在混合基质中包含木质素、纤维素和半纤维素的植物细胞壁材料的形式。

[0166] 在一个优选的实施方式中,含木质纤维素材料选自如下的一种或多种:玉米纤维、稻草、松木、木片、杨树、甘蔗渣、以及纸和纸浆加工废物。

[0167] 合适的含木质纤维素材料的其它实例包括玉米秸、玉米穗轴、硬木如杨树和桦树、软木、谷类茎秆如麦秸、柳枝稷 (switch grass)、芒属 (Miscanthus)、稻壳、城市固体废物 (MSW)、工业有机废物、办公纸张、或其混合物。

[0168] 在一个优选的实施方式中,含木质纤维素材料为玉米秸或玉米穗轴。在另一优选的实施方式中,含木质纤维素材料为玉米纤维。在另一优选的实施方式中,含木质纤维素材料为柳枝稷。在另一优选的实施方式中,含木质纤维素材料为甘蔗渣。

[0169] 预处理

[0170] 含木质纤维素材料可以任何合适的方式预处理。

[0171] 在水解或发酵之前进行预处理。预处理的目的是分离或释放纤维素、半纤维素和木质素且这样改善水解的速度或效率。包括湿氧化和碱预处理的预处理方法目标为木质素释放,而稀酸处理和自水解 (auto-hydrolysis) 目标为半纤维素释放。蒸汽爆炸 (steam explosion) 是目标为纤维素释放的预处理的实例。

[0172] 根据本发明,预处理步骤可为使用本领域公知技术的常规预处理步骤。在一个优选的实施方式中,预处理发生在含水浆料中。在预处理过程中,含木质纤维素材料可以 10-80 重量%,优选 20-70 重量%,特别地 30-60 重量%,例如约 50 重量%的量存在。

[0173] 化学、机械和 / 或生物预处理

[0174] 根据本发明,在水解之前或水解过程中,含木质纤维素材料可化学地、机械地、生物地、或以其任意组合进行预处理。

[0175] 优选地,在水解之前进行化学、机械或生物预处理。或者,可在水解的同时,例如在添加一种或多种纤维素分解酶或其它酶活性的同时进行化学、机械或生物预处理,以释放例如可发酵糖如葡萄糖或麦芽糖。

[0176] 在本发明的一个实施方式中,预处理的含木质纤维素材料可进行洗涤或以另外的方式解毒。但是,洗涤或解毒不是必需的。在一个优选的实施方式中,预处理的含木质纤维素材料不进行洗涤或解毒。

[0177] 化学预处理

[0178] 用语“化学预处理”是指促进纤维素、半纤维素或木质素的分离或释放的任何化学预处理。合适的化学预处理方法的实例包括用例如稀酸、石灰、碱、有机溶剂、氨、二氧化硫或二氧化碳的预处理。此外,湿氧化和 pH 受控的水热分解 (hydrothermolysis) 也被认为是化学预处理。

[0179] 在一个优选的实施方式中,化学预处理是酸处理,更优选地,连续的稀酸或弱酸 (mild acid) 处理如用硫酸、或另外的有机酸如乙酸、柠檬酸、酒石酸、琥珀酸、氯化氢或其混合物的处理。也可使用其它酸。弱酸处理是指处理 pH 在 pH 1-5、优选 pH 1-3 的范围内。在具体的实施方式中,酸浓度在 0.1-2.0 重量%酸的范围内,且优选为硫酸。酸可与含木质纤维素材料接触,并将该混合物在 160-220°C 例如 165-195°C 范围内的温度保持若干分钟至若干秒的时间,例如 1-60 分钟,如 2-30 分钟或 3-12 分钟。也可应用添加强酸如硫酸以除去半纤维素。这种添加强酸增强纤维素的可消化性。

[0180] 根据本发明还包括其它化学预处理技术。已显示纤维素溶剂处理将约 90% 纤维素转化为葡萄糖。已显示,当破坏木质纤维素结构时可大大增强酶水解。已知溶剂中的碱 H_2O_2 、臭氧、有机溶剂 (organosolv) (使用在含水醇中的路易斯酸、 $FeCl_3$ 、 $(Al)_2SO_4$)、甘油、二烷 (dioxane)、酚、或乙二醇破坏纤维素结构和促进水解 (Mosier 等, 2005, Bioresource Technology 96:673-686)。

[0181] 根据本发明还包括用碱例如 NaOH、 Na_2CO_3 和氨等的碱化学预处理。使用氨的预处理方法描述在例如 WO 2006/110891、WO 2006/11899、WO 2006/11900、WO 2006/110901 中,其通过引用并入本文。

[0182] 湿氧化技术包括使用氧化剂如基于亚硫酸盐的氧化剂等。溶剂预处理的实例包括用 DMSO (二甲亚砜) 等的处理。化学预处理通常进行 1-60 分钟,例如 5-30 分钟,但是取决于待预处理的材料可进行更短或更长的时间。

[0183] 合适的预处理方法的其它实例由 Schell 等, 2003, *Appl. Biochem and Biotechn.* Vol. 105-108, p. 69-85 和 Mosier 等, 2005, *Bioresource Technology* 96:673-686 以及美国申请公开 No. 2002/0164730 描述, 其各自通过引用并入。

[0184] 机械预处理

[0185] 用语“机械预处理”是指促进纤维素、半纤维素或木质素从含木质纤维素材料分离或释放的任何机械或物理预处理。例如, 机械预处理包括各种类型的研磨 (milling)、辐照、汽蒸 / 蒸汽爆炸、和水热处理。

[0186] 机械预处理包括粉碎, 即尺寸的机械降低。粉碎包括干磨、湿磨和振动球磨。机械预处理可涉及高压和 / 或高温 (蒸汽爆炸)。在本发明的一个实施方式中, 高压意味着在 300-600psi, 优选 400-500psi 范围内, 例如约 450psi 的压力。在本发明的一个实施方式中, 高温意味着在约 100-300°C, 优选约 140-235°C 范围内的温度。在一个优选的实施方式中, 机械预处理为使用以上限定的高压和高温的分批法蒸汽枪水解器系统。为此可使用 Sunds Hydrolyzer (可得自 Sunds Defibrator AB (瑞典))。

[0187] 化学和机械的组合预处理

[0188] 在一个优选的实施方式中, 以化学和机械两者预处理含木质纤维素材料。例如, 预处理步骤可包括稀酸或弱酸处理以及高温和 / 或高压处理。化学和机械预处理可自由地顺序或同时进行。

[0189] 因此, 在一个优选的实施方式中, 使含木质纤维素材料经历化学和机械预处理两者以促进纤维素、半纤维素或木质素的分离或释放。

[0190] 在一个优选的实施方式中, 以稀酸或弱酸蒸汽爆炸步骤进行预处理。在另一优选的实施方式中, 以氨纤维爆裂步骤 (或 AFEX 预处理步骤) 进行预处理。

[0191] 生物预处理

[0192] 用语“生物预处理”是指促进纤维素、半纤维素或木质素从含木质纤维素材料分离或释放的任何生物预处理。生物预处理技术可涉及应用木质素 - 溶解微生物。参见, 例如, Hsu, T. -A., 1996, Pretreatment of biomass, 于 *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E. 编, Taylor&Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh, P. 和 Singh, A., 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass, *Adv. Appl. Microbiol.* 39:295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, Himmel, M. E., Baker, J. O. 和 Overend, R. P. 编, ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, 第 15 章; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J. 和 Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, 于 *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T. 编, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65:207-241; Olsson, L. 和 Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates for ethanol production, *Enz. Microb. Tech.* 18:312-331; 及 Vallander, L. 和 Eriksson, K. -E. L., 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, *Adv. Biochem. Eng. /Biotechnol.* 42:63-95。

[0193] 水解

[0194] 在使预处理的含木质纤维素材料发酵前,可使其水解以将纤维素和半纤维素分解为可发酵糖。在一个优选的实施方式中,在发酵前使预处理的材料水解,优选酶水解。

[0195] 在水解过程中干固体含量可在 5-50 重量%,优选 10-40 重量%,优选 20-30 重量%的范围内。在一个优选的实施方式中,水解可作为补料分批工艺进行,其中将预处理的含木质纤维素材料(即底物)逐渐供给于例如含酶的水解溶液。

[0196] 在一个优选的实施方式中,可进行酶水解。根据本发明,预处理的含木质纤维素材料可通过一种或多种纤维素分解酶例如纤维素酶或半纤维素酶或其组合进行水解。

[0197] 在一个优选的实施方式中,使用包括一种或多种具有纤维素分解增强活性的多肽的纤维素分解酶制备物进行水解。在一个优选的实施方式中,具有纤维素分解增强活性的多肽是家族 GH61A 来源的。合适且优选的纤维素分解酶制备物和具有纤维素分解增强活性的多肽的实例在以下的“纤维素分解酶”部分和“纤维素分解增强多肽”部分中描述。

[0198] 由于含木质纤维素材料可包含除木质素、纤维素和半纤维素之外的组成部分,步骤 ii) 和 iii) 中的水解和 / 或发酵可在另外的酶活性如蛋白酶活性、淀粉酶活性、糖 - 产生酶(carbohydrate-generating enzyme) 活性、和酯酶活性如脂肪酶活性存在下进行。

[0199] 酶水解优选在合适的水相环境中在由本领域技术人员可容易地确定的条件下进行。在一个优选的实施方式中,水解在对于所述酶合适的条件,优选最佳的条件下进行。

[0200] 合适的处理时间、温度和 pH 条件可由本领域技术人员容易地确定。优选地,水解在 25-70°C,优选 40-60°C,特别是约 50°C 的温度下进行。该步骤优选在 pH 3-8,优选 pH 4-6,特别是约 pH 5 的 pH 进行。水解通常进行 12-96 小时,优选 16-72 小时,更优选 24-48 小时。

[0201] 发酵

[0202] 根据本发明,来自预处理和 / 或水解的含木质纤维素材料的可发酵糖可通过一种或多种能够将糖如葡萄糖、木糖、甘露糖和半乳糖直接或间接发酵成期望的发酵产物的发酵生物体发酵。发酵条件取决于期望的发酵产物和发酵生物体,且可由本领域普通技术人员容易地确定。

[0203] 特别是在乙醇发酵的情况下,发酵可进行 1-48 小时,优选 1-24 小时。在一个实施方式中,发酵在 20-40°C,优选 26-34°C,特别是约 32°C 的温度进行。在一个实施方式中,pH 大于 5。在另一实施方式中,pH 为 pH 3-7,优选 4-6。但是,一些发酵生物体例如细菌发酵生物体具有较高的最适发酵温度(fermentation temperature optima)。因此,在一个实施方式中,发酵在 40-60°C,例如 50-60°C 的温度进行。本领域技术人员可容易地确定合适的发酵条件。

[0204] 发明可在分批式、补料分批式或连续式反应器中进行。补料分批发酵可为固定体积或可变体积的补料分批式。在一个实施方式中,采用补料分批发酵。补料分批发酵的体积和速度取决于例如发酵生物体、可发酵糖的身份(identity)和浓度、以及期望的发酵产物。这种发酵速度和体积可由本领域普通技术人员容易地确定。

[0205] SSF、HHF 和 SHF

[0206] 在本发明的一个实施方式中,水解和发酵以同时的水解和发酵步骤(SSF)进行。通常,这意味着组合的 / 同时的水解和发酵在对于所述发酵生物体合适的,优选最佳的条件(例如,温度和 / 或 pH) 下进行。

[0207] 在另一实施方式中,水解步骤和发酵步骤以混合的水解和发酵(HHF)进行。HHF通常以单独的部分水解步骤开始并以同时的水解和发酵步骤结束。单独的部分水解步骤为酶促纤维素糖化步骤,其通常在对于所述水解酶合适的,优选最佳的条件(例如,在较高的温度)下进行。随后的同时的水解和发酵步骤通常在对于发酵生物体合适的条件(经常在比单独的水解步骤更低的温度)下进行。

[0208] 在另一实施方式中,水解和发酵步骤也可以单独的水解和发酵进行,其中在发酵开始前完成水解。这经常称作“SHF”。

[0209] 回收

[0210] 在发酵后,可任选地以任何合适的方式将发酵产物与发酵培养基分离。例如,可将培养基蒸馏以提取发酵产物,或可通过微滤技术或膜过滤技术从发酵培养基提取发酵产物。或者,发酵产物可通过汽提(stripping)回收。回收方法是本领域公知的。

[0211] 发酵产物

[0212] 本发明可用于产生任何发酵产物。优选的发酵产物包括醇(例如,乙醇、甲醇、丁醇);有机酸(例如,柠檬酸、乙酸、衣康酸、乳酸、葡糖酸);酮(例如,丙醇);氨基酸(例如,谷氨酸);气体(例如, H_2 和 CO_2);抗生素(例如,青霉素和四环素);酶;维生素(例如,核黄素、B12、 β -胡萝卜素);和激素。

[0213] 其它产物包括消耗性醇工业产品,例如啤酒和葡萄酒(wine);乳品工业产品,例如发酵乳制品;皮革工业产品和烟草工业产品。在一个优选的实施方式中,发酵产物为醇,特别是乙醇。根据本发明得到的发酵产物如乙醇可优选用作燃料醇/乙醇。但是,在乙醇的情况下,其也可用作饮用乙醇。

[0214] 发酵生物体

[0215] 用语“发酵生物体”是指适于产生期望的发酵产物的任何生物,包括细菌和真菌生物体。发酵生物体可为C6或C5发酵生物体、或其组合。C6和C5发酵生物体两者是本领域公知的。

[0216] 合适的发酵生物体能够将可发酵糖如葡萄糖、果糖、麦芽糖、木糖、甘露糖和或阿拉伯糖直接或间接发酵(即转化)为期望的发酵产物。

[0217] 发酵生物体的实例包括真菌生物体如酵母。优选的酵母包括酵母属的菌株,特别是酿酒酵母或葡萄汁酵母(*Saccharomyces uvarum*)的菌株;毕赤酵母属,优选树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)的菌株如树干毕赤酵母CBS 5773或巴斯德毕赤酵母的菌株;假丝酵母属(*Candida*)的菌株,特别是产朊假丝酵母(*Candida utilis*)、阿糖发酵假丝酵母(*Candida arabinofermentans*)、迪丹斯假丝酵母(*Candida diddensii*)、*Candida sonorensis*、休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)或博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)的菌株。其它发酵生物体包括以下的菌株:汉逊酵母属(*Hansenula*),特别是多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)或异常汉逊酵母(*Hansenula anomala*)的菌株;克鲁维酵母(*Kluyveromyces*),特别是脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)或马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*);和裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*),特别是粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)。

[0218] 优选的细菌发酵生物体包括埃希氏菌属(*Escherichia*),特别是大肠杆菌(*Escherichia coli*)的菌株;发酵单胞菌属(*Zymomonas*),特别是运动发酵单胞

菌 (*Zymomonas mobilis*) 的菌株; 发酵杆菌属 (*Zymobacter*), 特别是棕榈发酵杆菌 (*Zymobacter palmae*) 的菌株; 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*), 特别是产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 的菌株; 明串珠菌属 (*Leuconostoc*), 特别是肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 的菌株; 梭菌属 (*Clostridium*), 特别是酪酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) 的菌株; 肠杆菌属 (*Enterobacter*), 特别是产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 的菌株; 以及热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*), 特别是热厌氧杆菌 BG11 (*Appl. Microbiol. Biotech.* 77:61-86) 和乙醇热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter ethanolicus*)、热解糖热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*) 或马瑞氏热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter mathranii*) 的菌株。还预见乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 的菌株, 以及预见谷氨酸棒杆菌 R、热葡萄糖苷酶芽孢杆菌 (*Bacillus thermoglucosidaisus*) 和热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 (*Geobacillus thermoglucosidaisus*) 的菌株。

[0219] 在一个实施方式中, 发酵生物体为 C6 糖发酵生物体, 例如酿酒酵母的菌株。

[0220] 关于源自木质纤维素的材料的发酵, C5 糖发酵生物体是期望的。大部分 C5 糖发酵生物体也使 C6 糖发酵。C5 糖发酵生物体的实例包括毕赤酵母属的菌株, 如树干毕赤酵母菌种的菌株。C5 糖发酵细菌也是已知的。一些酿酒酵母菌株也使 C5 (和 C6) 糖发酵。实例是能够发酵 C5 糖的酵母属菌种的遗传修饰的菌株, 包括在例如 Ho 等, 1998, *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1852-1859 和 Karhumaa 等, 2006, *Microbial Cell Factories* 5:18, 和 Kuyper 等, 2005, *FEMS Yeast Research* 5, p. 925-934 中涉及的那些。

[0221] 一些发酵生物体的发酵性能可通过在发酵培养基中存在抑制剂而被抑制, 并由此降低乙醇产生能力。已知在生物质水解物中的化合物和高浓度的乙醇抑制一些酵母细胞的发酵能力。预适应或适应方法可降低该抑制作用。通常, 酵母细胞的预适应或适应包括在发酵前顺序地生长酵母细胞以增加酵母的发酵性能和增加乙醇产生。酵母预适应和适应的方法是本领域已知的。这些方法可包括, 例如, 在粗生物质水解物的存在下生长酵母细胞; 在抑制剂如酚化合物、呋喃甲醛 (furaldehydes) 和有机酸的存在下生长酵母细胞; 在非抑制量的乙醇的存在下生长酵母细胞; 和向酵母培养物补充乙醛。在一个实施方式中, 发酵生物体为在发酵前经历一种或多种预适应或适应方法的酵母菌株。

[0222] 一些发酵生物体如酵母需要适当的氮源用于增殖和发酵。可使用许多氮源, 且这些氮源是本领域公知的。在一个实施方式中, 使用低成本的氮源。这些低成本来源可为有机的如尿素、DDG、湿滤饼 (wet cake) 或谷物醪 (corn mash), 或无机的如氨或氢氧化铵。

[0223] 适于乙醇产生的商业上可得到的酵母包括, 例如, ETHANOL RED™ 酵母 (可得自 Fermentis/Lesaffre, USA)、FALI™ (可得自 Fleischmann's Yeast, USA)、SUPERSTART 和 THERMOSACC™ 新鲜酵母 (可得自 Ethanol Technology, WI, USA)、BIOFERM AFT 和 XR (可得自 NABC-North American Bioproducts Corporation, GA, USA)、GERT STRAND (可得自 Gert Strand AB, Sweden) 和 FERMIOL (可得自 DSM Specialties)。

[0224] 发酵培养基

[0225] 用语“发酵培养基”是指其中进行发酵的环境, 其包括发酵底物, 即, 由发酵生物体代谢的糖源, 且可包括发酵生物体。

[0226] 发酵培养基可包括用于发酵生物体的营养物和生长刺激物。营养物和生长刺激物

在发酵领域中广泛使用,且包括氮源如氨;维生素和矿物质、或其组合。

[0227] 在发酵后,发酵培养基可进一步包括发酵产物。

[0228] 酶

[0229] 即使在本发明方法或工艺的上下文中没有具体提及,也应理解酶以及其它化合物以有效量使用。

[0230] 纤维素分解活性

[0231] 本文中使用的用语“纤维素分解活性”理解为包括具有如下活性的酶:纤维二糖水解酶活性 (EC 3.2.1.91) 例如纤维二糖水解酶 I 和纤维二糖水解酶 II、以及内切葡聚糖酶活性 (EC 3.2.1.4) 和 β -葡糖苷酶活性 (EC 3.2.1.21)。

[0232] 至少三种类型的酶对于将纤维素转化为可发酵糖是重要的:内切葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4),其随机地切割纤维素链;纤维二糖水解酶 (EC 3.2.1.91),其从纤维素链末端切割纤维二糖单元;和 β -葡糖苷酶 (EC 3.2.1.21),其将纤维二糖和可溶纤维糊精转化为葡萄糖。在纤维素生物降解中所涉及的这三种类型的酶中,纤维二糖水解酶似乎是用于降解天然结晶纤维素的关键酶。

[0233] 在一个优选的实施方式中,纤维素分解活性可为真菌来源的酶的制备物的形式,该真菌来源例如来自木霉属 (*Trichoderma*) 的菌株,优选里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 的菌株;腐质霉属 (*Humicola*) 的菌株,如特异腐质霉 (*Humicola insolens*) 的菌株;或金孢子菌属 (*Chrysosporium*) 的菌株,优选 *Chrysosporium lucknowense* 的菌株。

[0234] 在一个优选的实施方式中,纤维素分解酶制备物包含以下活性的一种或多种:纤维素酶、半纤维素酶、纤维素分解酶增强活性、 β -葡糖苷酶活性、内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、或木糖异构酶。

[0235] 在一个优选的实施方式中,纤维素酶可为在 PCT/US2008/065417 中限定组合物,其通过引用并入本文。具体地,在一个实施方式中是在下述实施例 1 中使用的纤维素酶组合物(纤维素酶制备物 A)。在一个优选的实施方式中,纤维素分解酶制备物包括具有纤维素分解增强活性的多肽,优选家族 GH61A 多肽,优选在 WO 2005/074656 (Novozymes) 中公开的多肽。纤维素分解酶制备物可进一步包括 β -葡糖苷酶,如源自木霉属、曲霉属 (*Aspergillus*) 或青霉属 (*Penicillium*) 的菌株的 β -葡糖苷酶,包括在 WO 2008/057637 中公开的具有 β -葡糖苷酶活性的融合蛋白。在一个优选的实施方式中,纤维素分解酶制备物还可包括 CBH II 酶,优选土生梭孢霉 (*Thielavia terrestris*) 纤维二糖水解酶 II CEL6A。在另一优选的实施方式中,纤维素分解酶制备物还可包括纤维素分解酶,优选源自里氏木霉或特异腐质霉的纤维素分解酶。

[0236] 纤维素分解酶制备物还可包括在 WO2005/074656 中公开的具有纤维素分解增强活性的多肽 (GH61A);源自里氏木霉的纤维素分解酶和 β -葡糖苷酶(在 WO 2008/057637 中公开的融合蛋白)。

[0237] 在一个实施方式中,纤维素分解酶为可得自 Novozymes A/S, Denmark 的商业上可得到的产品 **CELLUCLAST®** 1.5L 或 CELLUZYME™、或 ACCELERASE™ 1000 (来自 Genencor Inc., USA)。

[0238] 可添加纤维素分解酶用于使预处理的含木质纤维素材料水解。纤维素分解酶的剂量可为 0.1-100FPU/克总固体 (TS),优选 0.5-50FPU/克 TS,特别是 1-20FPU/克 TS 的范围

内。在另一实施方式中,至少 0.1mg 纤维素分解酶/克总固体(TS),优选至少 3mg 纤维素分解酶/克 TS,例如 5-10mg 纤维素分解酶/克 TS 用于水解。

[0239] 内切葡聚糖酶(EG)

[0240] 术语“内切葡聚糖酶”是指内-1,4-(1,3;1,4)- β -D-葡聚糖 4-葡聚糖水解酶(E.C.No.3.2.1.4),其催化在纤维素、纤维素衍生物(例如羧甲基纤维素和羟乙基纤维素)、地衣淀粉、在混合的 β -1,3 葡聚糖如谷类 β -D-葡聚糖或木葡聚糖(xyloglucan)中的 β -1,4 键、和其它含纤维素组分的植物物质中的 1,4- β -D-糖苷键的内水解(endo-hydrolysis)。内切葡聚糖酶活性可根据 Ghose,1987,Pure and Appl. Chem. 59:257-268 的步骤使用羧甲基纤维素(CMC)水解确定。

[0241] 在一个优选的实施方式中,内切葡聚糖酶可源自:木霉属的菌株,优选里氏木霉的菌株;腐质霉属的菌株,如特异腐质霉的菌株;或金孢子菌属的菌株,优选 *Chrysosporium lucknowense* 的菌株。

[0242] 纤维二糖水解酶(CBH)

[0243] 术语“纤维二糖水解酶”是指 1,4- β -D-葡聚糖纤维二糖水解酶(E.C.3.2.1.9),其催化在纤维素、纤维寡糖或任何包含 β -1,4-连接的葡萄糖的聚合物中的 1,4- β -D-糖苷键的水解,从链的还原或非还原末端释放纤维二糖。

[0244] 纤维二糖水解酶的实例在以上提及,包括来自里氏木霉、特异腐质霉的 CBH I 和 CBH II;和来自土生梭孢霉纤维二糖水解酶(CELL6A)的 CBH II。

[0245] 纤维二糖水解酶活性可根据由在 Lever 等,1972,Anal. Biochem. 47:273-279 和 van Tilbeurgh 等,1982,FEBS Letters 149:152-156;van Tilbeurgh 和 Claeyssens,1985,FEBS Letters 187:283-288 所述的方法确定。Lever 等的方法适于评价玉米秸中纤维素的水解,和 van Tilbeurgh 等的方法适于确定荧光二糖衍生物的纤维二糖水解酶活性。

[0246] β -葡糖苷酶

[0247] 在水解过程中可存在一种或多种 β -葡糖苷酶。

[0248] 术语“ β -葡糖苷酶”是指 β -D-葡糖苷葡萄糖水解酶(E.C.3.2.1.21),其催化末端非还原 β -D-葡萄糖残基的水解,释放 β -D-葡萄糖。对于本发明来说, β -葡糖苷酶活性根据由 Venturi 等,2002,J. Basic Microbiol. 42:55-66 描述的基本方法确定,只是如本文中所述使用不同的条件。一单位的 β -葡糖苷酶活性定义为在 100mM 柠檬酸钠,0.01% **TWEEN**® 20 中由作为底物的 4mM 对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷在 50°C、pH 5 每分钟产生 1.0 微摩尔的对硝基苯酚。

[0249] 在一个优选的实施方式中, β -葡糖苷酶是真菌来源的,如木霉属、曲霉属或青霉属的菌株。在一个优选的实施方式中, β -葡糖苷酶源自里氏木霉,如由 bg11 基因编码的 β -葡糖苷酶(参见 EP 562003 的图 1)。在另一优选的实施方式中, β -葡糖苷酶源自米曲霉(根据 WO 2002/095014 在米曲霉中重组产生)、烟曲霉(根据 WO 2002/095014 的实施例 22 在米曲霉中重组产生)或黑曲霉(1981,J. Appl. Vol 3, pp 157-163)。

[0250] 半纤维素酶

[0251] 半纤维素可通过半纤维素酶和/或酸水解破坏以释放其五和六碳糖组分。

[0252] 在本发明的一个实施方式中,源自木质纤维素的材料可用一种或多种半纤维素酶

处理。

[0253] 可使用任何适用于水解半纤维素, 优选水解为木糖的半纤维素酶。优选的半纤维素酶包括木聚糖酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、乙酰基木聚糖酯酶、阿魏酸酯酶、葡糖醛酸糖苷酶、内-半乳聚糖酶、甘露聚糖酶、内或外阿拉伯糖酶、外-半乳聚糖酶、及其两种或多种的混合物。优选地, 用于本发明的半纤维素酶为外作用的半纤维素酶, 且更优选地, 半纤维素酶为具有在 pH 7 以下, 优选 pH 3-7 的酸性条件下水解半纤维素的能力的外作用的半纤维素酶。适用于本发明的半纤维素酶的实例包括 VISCOZYME™(可得自 Novozymes A/S, Denmark)。

[0254] 在一个实施方式中, 半纤维素酶为木聚糖酶。在一个实施方式中, 木聚糖酶可优选为微生物来源的, 例如真菌来源的(例如, 木霉属、多孔菌属 (*Meripilus*)、腐质霉属、曲霉属、镰孢属 (*Fusarium*)) 或来自细菌(例如, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*))。在一个优选的实施方式中, 木聚糖酶源自丝状真菌, 优选源自曲霉属例如棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 的菌株或腐质霉属优选疏棉状腐质霉 (*Hemicola lanuginosa*) 的菌株。木聚糖酶可优选为内-1, 4-β-木聚糖酶, 更优选 GH10 或 GH11 的内-1, 4-β-木聚糖酶。商业木聚糖酶的实例包括来自 Novozymes A/S, Denmark 的 SHEARZYME™和 BIOFEED WHEAT™。

[0255] 半纤维素酶可以水解半纤维素的有效量, 例如以约 0.001-0.5 重量%的总固体 (TS), 更优选 0.05-0.5 重量%的 TS 的量添加。

[0256] 木聚糖酶可以 0.001-1.0g/kg DM(干物质)底物的量, 优选以 0.005-0.5g/kg DM 底物且最优选 0.05-0.10g/kg DM 底物的量添加。

[0257] 木糖异构酶

[0258] 木糖异构酶(D-木糖酮异构酶(ketoisomerase))(E.C.5.3.1.5.)是催化D-木糖到D-木酮糖的可逆异构化反应的酶。一些木糖异构酶还转化D-葡萄糖到D-果糖的可逆异构化。因此, 木糖异构酶有时称作“葡萄糖异构酶”。

[0259] 用于本发明的方法或工艺中的木糖异构酶可为任何具有木糖异构酶活性的酶且可源自任意来源, 优选细菌或真菌来源, 例如丝状真菌或酵母。细菌木糖异构酶的实例包括属于链霉菌属(*Streptomyces*)、游动放线菌属(*Actinoplanes*)、芽孢杆菌属和黄杆菌属(*Flavobacterium*)、及栖热孢菌属(*Thermotoga*)的那些, 包括 *Thermotoga neapolitana*(Vieille 等, 1995, *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5), 1867-1875) 和海栖热孢菌(*Thermotoga maritime*)。

[0260] 真菌木糖异构酶的实例源自担子菌纲(*Basidiomycetes*)的菌种。

[0261] 优选的木糖异构酶源自:假丝酵母属酵母的菌株, 优选博伊丁假丝酵母的菌株, 特别是公开在例如 Vongsuvanlert 等, 1988, *Agric. Biol. Chem.*, 52(7):1817-1824 中的博伊丁假丝酵母木糖异构酶。木糖异构酶可优选源自公开在 Ogata 等, *Agric. Biol. Chem.*, Vol. 33, p. 1519-1520 或 Vongsuvanlert 等, 1988, *Agric. Biol. Chem.*, 52(2), p. 1519-1520 中作为 DSM 70034 和 ATCC 48180 保藏的伊丁假丝酵母菌株(*Kloeckera 2201*)。

[0262] 在一个实施方式中, 木糖异构酶源自链霉菌属的菌株, 例如源自鼠灰链霉菌(*Streptomyces murinus*)(美国专利 No. 4, 687, 742)、都公开在美国专利 No. 3, 616, 221 中的黄微绿链霉菌(*S. flavovirens*)、白色链霉菌(*S. albus*)、不产色链霉菌(*S. achromogenus*)、多刺链霉菌(*S. echinatus*)、*S. wedmorensis*。其它木糖异构酶公开

在美国专利 No. 3, 622, 463、美国专利 No. 4, 351, 903、美国专利 No. 4, 137, 126、美国专利 No. 3, 625, 828、匈牙利专利 no. 12, 415、德国专利 2, 417, 642、日本专利 no. 69, 28, 473 和 WO 2004/044129 中, 各自通过引用并入本文。

[0263] 木糖异构酶可为固定化或液体形式。优选液体形式。

[0264] 商业上可得到的木糖异构酶的实例包括来自 Novozymes A/S, Denmark 的 SWEETZYME™ T。

[0265] 可添加木糖异构酶以提供在 0.01-100IGIU/ 克总固体范围内的活性水平。

[0266] 纤维素分解增强活性

[0267] 用于“纤维素分解增强活性”在本文中定义为通过具有纤维素分解活性的蛋白质增强源自木质纤维素的材料的水解的生物活性。对于本发明, 纤维素分解增强活性通过在以下条件下测量来自源自木质纤维素的材料例如预处理的含木质纤维素材料通过纤维素分解蛋白质的水解的还原糖的增加或纤维二糖和葡萄糖的总量的增加而确定: 1-50mg 总蛋白质 /g 在 PCS(预处理的玉米秸) 中的纤维素, 其中总蛋白质由 80-99.5% w/w 的纤维素分解蛋白质 /g 在 PCS 中的纤维素和 0.5-20% w/w 的与在相同的总蛋白质负载而没有纤维素分解增强活性的对照水解 (1-50mg 纤维素分解蛋白质 /g 在 PCS 中的纤维素) 相比在 50°C 下 1-7 天的纤维素分解增强活性的蛋白质构成。

[0268] 具有纤维素分解增强活性的多肽通过降低达到相同水解程度所需的纤维素分解酶的量使由具有纤维素分解活性的蛋白质催化的源自木质纤维素的材料的水解增强优选至少 0.1 倍, 更为至少 0.2 倍, 更优选至少 0.3 倍, 更优选至少 0.4 倍, 更优选至少 0.5 倍, 更优选至少 1 倍, 更优选至少 3 倍, 更优选至少 4 倍, 更优选至少 5 倍, 更优选至少 10 倍, 更优选至少 20 倍, 甚至更优选至少 30 倍, 最优选至少 50 倍, 和甚至最优选至少 100 倍。

[0269] 在一个优选的实施方式中, 水解和 / 或发酵在纤维素分解酶和具有增强活性的多肽的组合的存在下进行。在一个优选的实施方式中, 具有增强活性的多肽是家族 GH61A 多肽。WO 2005/074647 公开了来自土生梭孢霉的具有纤维素分解增强活性的分离多肽及其多核苷酸。WO 2005/074656 公开了来自桔橙嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*) 的具有纤维素分解增强活性的分离多肽及其多核苷酸。美国申请公开 No. 2007/0077630 公开了来自里氏木霉的具有纤维素分解增强活性的分离多肽及其多核苷酸。

[0270] α -淀粉酶

[0271] 根据本发明, 可使用任何 α -淀粉酶。优选的 α -淀粉酶为微生物例如细菌或真菌来源的。哪种 α -淀粉酶最合适取决于工艺条件, 但是可由本领域技术人员容易地确定。

[0272] 在一个实施方式中, 优选的 α -淀粉酶为酸性 α -淀粉酶, 例如真菌酸性 α -淀粉酶或细菌酸性 α -淀粉酶。用语“酸性 α -淀粉酶”是指以有效量添加的、在 3-7, 优选 3.5-6, 或更优选 4-5 的范围内的 pH 具有最佳活性的 α -淀粉酶 (E. C. 3. 2. 1. 1)。

[0273] 细菌 α -淀粉酶

[0274] 在另一优选的实施方式中, α -淀粉酶为芽孢杆菌属来源的。芽孢杆菌属 α -淀粉酶可优选源自地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 或嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*) 的菌株, 还可源自其它芽孢杆菌属菌种。期望的 α -淀粉酶的具体实例包括 WO 1999/19467 中 SEQ ID NO:4 所示的地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶、WO

1999/19467 中 SEQ ID NO:5 的解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶、和 W01999/19467 中 SEQ ID NO:3 所示的嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶（所有序列通过引用并入本文）。在本发明的一个实施方式中， α -淀粉酶可为与 W01999/19467 中 SEQ ID NO:1、2 或 3 分别所示的任一序列具有至少 60%，优选至少 70%，更优选至少 80%，甚至更优选至少 90%，如至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，或至少 99% 的同一性程度的酶。

[0275] 芽孢杆菌属 α -淀粉酶还可以是变体和 / 或杂合体，特别是 W0 1996/23873、W0 1996/23874、W0 1997/41213、W0 1999/19467、W0 2000/60059 和 W0 2002/10355 中任一篇中所述的变体和 / 或杂合体（所有文献通过引用并入本文）。特别期望的 α -淀粉酶变体在美国专利 No. 6, 093, 562、6, 297, 038 或 6, 187, 576（通过引用并入本文）中公开，而且包括在位置 R179 至 G182 缺失一个或两个氨基酸的嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶（BSG α -淀粉酶）变体，优选 W0 1996/023873 中公开的双缺失—参见例如，第 20 页，第 1-10 行（通过引用并入本文），优选与 W0 1999/19467 中公开的 SEQ ID NO:3 所列的野生型 BSG α -淀粉酶氨基酸序列相比对应于 Δ (181-182)，或缺失氨基酸 R179 和 G180，使用 W0 1999/19467 中 SEQ ID NO:3 的编号（其通过引用并入本文）。甚至更优选的是芽孢杆菌属 α -淀粉酶，特别是嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶，其具有对应于 Δ (181-182) 的双缺失，而且与 W0 1999/19467 中公开的 SEQ ID NO:3 所列的野生型 BSG α -淀粉酶氨基酸序列相比，还包含 N193F 取代（也表示为 I181*+G182*+N193F）。

[0276] 细菌杂合 α -淀粉酶

[0277] 特别期望的杂合 α -淀粉酶包含（如 W0 1999/19467 中 SEQ ID NO:4 所示的）地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的 445C 末端氨基酸残基，和（如 W0 1999/194676 中 SEQ ID NO:5 所示的）源自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的 37N 末端氨基酸残基，具有一种或多种（特别是全部）下述取代：

[0278] G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S（使用在 W0 1999/19467 的 SEQ ID NO:4 中的地衣芽孢杆菌编号）。还优选的是具有一个或多个下述突变（或在其它芽孢杆菌属 α -淀粉酶骨架中的相应突变）的变体：H154Y, A181T, N190F, A209V 和 Q264S 和 / 或位置 176 和 179 之间缺失两个残基，优选缺失 E178 和 G179（使用 W0 1999/19467 中 SEQ ID NO:5 的编号方式）。

[0279] 真菌 α -淀粉酶

[0280] 真菌 α -淀粉酶包括源自曲霉属的菌株的 α -淀粉酶，如米曲霉、黑曲霉（*Aspergillus niger*）、川地曲霉（*Aspergillus kawachii*） α -淀粉酶。

[0281] 优选的酸性真菌 α -淀粉酶是 Fungamyl 样 α -淀粉酶，其源自米曲霉的菌株。根据本发明，用语“Fungamyl 样 α -淀粉酶”表示与 W0 1996/23874 中 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列的成熟部分显示高度同一性，即高于 70%，高于 75%，高于 80%，高于 85%，高于 90%，高于 95%，高于 96%，高于 97%，高于 98%，高于 99%，或者甚至 100% 同一性的 α -淀粉酶。

[0282] 另一种优选的酸性 α -淀粉酶源自黑曲霉菌株。在一个优选实施方式中，酸性真菌 α -淀粉酶是来自黑曲霉的 α -淀粉酶，其在 Swiss-prot/TrEMBL 数据库中以“AMYA_ASPNG”公开，初级登录号为 P56271，并在 W0 1989/01969（实施例 3）中进行了描述。商业上可得到的源自黑曲霉的酸性真菌 α -淀粉酶是 SP288（可从 Novozymes A/S, Denmark 获

得)。

[0283] 其它期望的野生型 α -淀粉酶包括源自根毛霉属 (*Rhizomucor*) 或多孔菌属的菌株, 优选微小根毛霉 (*Rhizomucor pusillus*) (WO 2004/055178, 通过引用并入) 或巨多孔菌 (*Meripilus giganteus*) 的菌株的那些。

[0284] 在一个优选实施方式中, α -淀粉酶源自川地曲霉, 并由 Kaneko 等, 1996, *J. Ferment. Bioeng.* 81:292-298, “Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*” 公开; 还作为 EMBL:#AB008370 公开。

[0285] 真菌 α -淀粉酶还可以是包含淀粉结合域 (SBD) 和 α -淀粉酶催化域的野生型酶 (即, 非杂合体), 或其变体。在一个实施方式中, 野生型 α -淀粉酶源自川地曲霉的菌株。

[0286] 真菌杂合 α -淀粉酶

[0287] 在一个优选实施方式中, 真菌酸性 α -淀粉酶是杂合 α -淀粉酶。真菌杂合 α -淀粉酶的优选实例包括 WO 2005/003311 或美国申请公开 No. 2005/0054071 (Novozymes) 或美国专利申请 No. 60/638, 614 (Novozymes) 中公开的 α -淀粉酶, 上述文件通过引用并入本文。杂合 α -淀粉酶可以包含 α -淀粉酶催化域 (CD) 和糖结合域 / 模块 (CBM), 如淀粉结合域, 和任选的接头。

[0288] 期望的杂合 α -淀粉酶的具体实例包括美国专利申请 No. 60/638, 614 中实施例的表 1 至 5 中公开的那些, 其包括具有催化域 JA118 和罗耳阿太菌 (*Athelia rolfsii*) SBD 的 *Fungamyl* 变体 (US 60/638, 614 中的 SEQ ID NO:100), 具有罗耳阿太菌 AMG 接头和 SBD 的微小根毛霉 (*Rhizomucor pusillus*) α -淀粉酶 (US60/638, 614 中的 SEQ ID NO:101), 具有黑曲霉葡糖淀粉酶接头和 SBD 的微小根毛霉 α -淀粉酶 (其在美国申请 No. 11/316, 535 的表 5 中作为氨基酸序列 SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:72 和 SEQ ID NO:96 的组合公开) 或作为 WO2006/069290 中表 5 的 V039, 和具有罗耳阿太菌葡糖淀粉酶接头和 SBD 的巨多孔菌 α -淀粉酶 (美国申请 No. 60/638614 中 SEQ ID NO:102)。其它特别期望的杂合 α -淀粉酶是美国申请 No. 11/316, 535 或 WO 2006/069290 (各自通过引用并入本文) 的实施例 4 中表 3、4、5 和 6 中列出的任何杂合 α -淀粉酶。

[0289] 期望的杂合 α -淀粉酶的其他具体实例包括美国申请公开 No. 2005/0054071 中公开的那些, 包括第 15 页上表 3 中公开的那些, 如具有川地曲霉接头和淀粉结合域的黑曲霉 α -淀粉酶。

[0290] 期望的还有与上述任何 α -淀粉酶显示高度同一性的 α -淀粉酶, 即与成熟酶序列显示高于 70%, 高于 75%, 高于 80%, 高于 85%, 高于 90%, 高于 95%, 高于 96%, 高于 97%, 高于 98%, 高于 99% 或者甚至 100% 同一性的 α -淀粉酶。

[0291] 根据本发明的酸性 α -淀粉酶可以 0.1-10AFU/g DS, 优选 0.10-5AFU/g DS, 特别是 0.3-2AFU/g DS 的量添加。

[0292] 商业 α -淀粉酶产品

[0293] 优选的包含 α -淀粉酶的商业组合物包括来自 DSM 的 MYCOLASE、BANTM、TERMAMYLTM SC、FUNGAMYLTM、LIQUOZYMETM X 和 SANTM SUPER、SANTM EXTRA L (Novozymes A/S) 和 CLARASETM L-40, 000、DEX-LOTM、SPEZYMETM FRED、SPEZYMETM AA 和 SPEZYMETM DELTA AA (Genencor Int.), 和以商品名 SP288 出售的酸性真菌 α -淀粉酶 (可从 Novozymes A/S, Denmark 获得)。

[0294] 糖-源产生酶

[0295] 用语“糖-源产生酶”包括葡糖淀粉酶（其为葡萄糖产生者）、 β -淀粉酶和产麦芽糖淀粉酶（其为麦芽糖产生者）。糖-源产生酶能产生糖，所述糖可由所述发酵生物体作为能量来源使用，例如，当用于产生发酵产物如乙醇的方法时。产生的糖可以直接或间接转化成期望的发酵产物，优选乙醇。根据本发明，可存在糖-源产生酶的混合物。特别期望的混合物是至少葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶（特别是酸性淀粉酶，甚至更优选酸性真菌 α -淀粉酶）的混合物。在本发明的一个实施方式中，酸性真菌 α -淀粉酶活性(AFAU)对葡糖淀粉酶活性(AGU)之间的比(AFAU/AGU)可为至少0.1，特别是至少0.16，如0.12-0.50或者更高。

[0296] 葡糖淀粉酶

[0297] 根据本发明使用的葡糖淀粉酶可以源自任何合适的来源，例如，源自微生物或植物。优选的葡糖淀粉酶是选自下组的真菌或细菌来源的：曲霉属葡糖淀粉酶，特别是黑曲霉 G1 或 G2 葡糖淀粉酶(Boel 等, (1984), EMBO J. 3(5), p. 1097-1102)，和它们的变体，如 WO 1992/00381、WO 2000/04136 和 WO 2001/04273 中所公开的那些（来自 Novozymes, Denmark）；公开在 WO 1984/02921 中的泡盛曲霉 (*A. awamori*) 葡糖淀粉酶、米曲霉葡糖淀粉酶 (*Agric. Biol. Chem.* (1991), 55(4), p. 941-949)，或其变体或片段。其它曲霉属葡糖淀粉酶变体包括具有增强的热稳定性的变体：G137A 和 G139A(Chen 等, 1996, *Prot. Eng.* 9, 499-505)；D257E 和 D293E/Q(Chen 等, 1995, *Prot. Engng.* 8, 575-582)；N182(Chen 等, 1994, *Biochem. J.* 301, 275-281)；二硫键、A246C(Fierobe 等, 1996, *Biochemistry*, 35, 8698-8704)；和在 A435 和 S436 位置引入 Pro 残基(Li 等, 1997, *Protein Engng.* 10, 1199-1204)。

[0298] 其它葡糖淀粉酶包括罗耳阿太菌（过去称作罗耳伏革菌 (*Corticium rolfsii*)）葡糖淀粉酶（参见美国专利 No. 4, 727, 026 和 (Nagasaka, Y. 等, 1998, “Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamylases from *Corticium rolfsii*, *Appl Microbiol Biotechnol* 50:323-330)、踝节菌属 (*Talaromyces*) 葡糖淀粉酶，特别地，源自埃默森踝节菌 (*Talaromyces emersonii*) (WO 1999/28448)、*Talaromyces leycettanus* (美国专利号 Re. 32, 153)、*Talaromyces duponti*、嗜热踝节菌 (*Talaromyces thermophilus*) (美国专利号 4, 587, 215)。

[0299] 期望的细菌葡糖淀粉酶包括来自梭菌属 (*Clostridium*)，特别是热解淀粉梭菌 (*C. thermoamylolyticum*) (EP 135, 138) 和热硫化氢梭菌 (*C. thermohydrosulfuricum*) (WO 1986/01831)，以及公开在 WO 2006/069289 (其通过引用并入本文) 中的环带栓菌 (*Trametes cingulata*) 的葡糖淀粉酶。

[0300] 根据本发明，杂合葡糖淀粉酶也是期望的。杂合葡糖淀粉酶的实例公开在 WO 2005/045018 中。具体实例包括公开在 WO 2005/045018 的实施例 1 的表 1 和 4 中的杂合葡糖淀粉酶，其通过引用并入本文中至教导杂合葡糖淀粉酶的程度。

[0301] 期望的还有与上述任何 α -淀粉酶显示高度同一性的 α -淀粉酶，即与成熟酶序列显示高于 70%，高于 75%，高于 80%，高于 85%，高于 90%，高于 95%，高于 96%，高于 97%，高于 98%，高于 99% 或者甚至 100% 同一性的 α -淀粉酶。

[0302] 商业上可得到的包含葡糖淀粉酶的组合物包括 AMG 200L；AMG 300L；SAN™

SUPER、SANTM EXTRA L、SPIRIZYMETM PLUS、SPIRIZYMETM FUEL、SPIRIZYMETM B4U和AMGTM E(来自Novozymes A/S);OPTIDEXTM 300(来自Genencor Int.);AMIGASETM和AMIGASETM PLUS(来自DSM);G-ZYMETM G900、G-ZYMETM和G990ZR(来自Genencor Int.)。

[0303] 在一个实施方式中,葡糖淀粉酶可以0.02-20 AGU/g DS,优选0.1-10 AGU/g DS,特别是1-5AGU/g DS,如0.5AGU/g DS的量加入。

[0304] β -淀粉酶

[0305] 术语“ β -淀粉酶”(E.C.3.2.1.2)是传统上给予外作用的(exo-acting)产麦芽糖淀粉酶的名称,其催化直链淀粉、支链淀粉和相关葡萄糖聚合物中1,4- α -糖苷键的水解。以逐步的方式接续从非还原链末端去除麦芽糖单元,直至分子降解或者,在支链淀粉的情况下,直至到达分支点。释放的麦芽糖具有 β 异头物构型,因此称为 β -淀粉酶。

[0306] 已经从各种植物和微生物中分离出 β -淀粉酶(W.M.Fogarty和C.T.Kelly,Progress in Industrial Microbiology,vol.15,pp.112-115,1979)。这些 β -淀粉酶的特征为在40℃至65℃具有最适温度和在4.5至7具有最适pH。商业上可得到的来自大麦的 β -淀粉酶是来自Novozymes A/S,Denmark的NOVOZYMTM WBA和来自Genencor Int.,USA的SPEZYMETM BBA 1500。

[0307] 产麦芽糖淀粉酶

[0308] 淀粉酶还可以是产麦芽糖 α -淀粉酶。产麦芽糖 α -淀粉酶(葡聚糖1,4- α -麦芽糖水解酶,E.C.3.2.1.133)能将直链淀粉和支链淀粉水解成 α 构型的麦芽糖。来自嗜热脂肪芽孢杆菌菌株NCIB 11837的产麦芽糖淀粉酶可从Novozymes A/S购得。在美国专利号4,598,048、4,604,355和6,162,628中描述了产麦芽糖 α -淀粉酶,其通过引用并入本文。

[0309] 在一个优选实施方式中,产麦芽糖淀粉酶可以0.05-5mg总蛋白质/g DS或0.05-5MANU/g DS的量加入。

[0310] 蛋白酶

[0311] 在步骤ii)中的水解、步骤iii)中的发酵或同时的水解和发酵过程中可添加蛋白酶。可在发酵过程中添加蛋白酶以使发酵生物体,特别是酵母抗絮凝。蛋白酶可为任何蛋白酶。在一个优选实施方式中,蛋白酶为微生物来源的酸性蛋白酶,优选真菌或细菌来源的酸性蛋白酶。优选酸性真菌蛋白酶,但也可使用其它蛋白酶。

[0312] 合适的蛋白酶包括微生物蛋白酶,例如真菌和细菌蛋白酶。优选的蛋白酶是酸性蛋白酶,即,特征为在低于pH 7的酸性条件下水解蛋白的能力的蛋白酶。

[0313] 期望的酸性真菌蛋白酶包括源自曲霉属、毛霉属(Mucor)、根霉属(Rhizopus)、假丝酵母属、革盖菌属(Coriolus)、内座壳属(Endothia)、Entomophtra、耙菌属(Irpex)、青霉属、丝核菌属(Sclerotium)和球拟酵母属(Torulopsis)的真菌蛋白酶。尤其期望的是源自黑曲霉(参见例如,Koaze等,1964,Agr. Biol. Chem. Japan, 28, 216), 斋藤曲霉(Aspergillus saitoi)(参见例如,Yoshida, 1954, J. Agr. Chem. Soc. Japan, 28, 66), 泡盛曲霉(Hayashida等, 1977, Agric. Biol. Chem., 42(5), 927-933, 棘孢曲霉(WO 1995/02044), 或米曲霉的蛋白酶,例如pepA蛋白酶;以及来自微小毛霉(Mucor pusillus)或米黑毛霉(Mucor miehei)的酸性蛋白酶。

[0314] 期望的还有中性或碱性蛋白酶,例如源自芽孢杆菌属菌株的蛋白酶。本发明期望

的具体蛋白酶源自解淀粉芽孢杆菌并且具有可在 Swissprot 以登录号 P06832 获得的序列。期望的还有与可在 Swissprot 以登录号 P06832 获得的序列具有至少 90% 同一性,例如至少 92%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或特别是至少 99% 的同一性的蛋白酶。

[0315] 进一步期望的是与在 WO 2003/048353 中公开的 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性,例如至少 92%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或特别是至少 99% 的同一性的蛋白酶。

[0316] 期望的还有木瓜蛋白酶样蛋白酶例如 E. C. 3. 4. 22. *(半胱氨酸蛋白酶) 内的蛋白酶,例如 EC 3. 4. 22. 2(木瓜蛋白酶)、EC 3. 4. 22. 6(木瓜凝乳蛋白酶)、EC 3. 4. 22. 7(萝藦蛋白酶)、EC 3. 4. 22. 14(奇异果蛋白酶)、EC 3. 4. 22. 15(组织蛋白酶 L)、EC 3. 4. 22. 25(甘氨酸内肽酶) 和 EC 3. 4. 22. 30(caricain)。

[0317] 在一个实施方式中,蛋白酶为源自曲霉属,例如米曲霉的菌株的蛋白酶制备物。在另一实施方式中,蛋白酶源自根毛霉属,优选曼赫根毛霉 (*Rhizomucor meihei*) 的菌株。在另一期望的实施方式中,蛋白酶为蛋白酶制备物,优选为源自曲霉属例如米曲霉的菌株的蛋白水解制备物和源自根毛霉属优选曼赫根毛霉的菌株的蛋白酶的混合物。

[0318] 天冬氨酸蛋白酶描述在,例如, *Hand-book of Proteolytic Enzymes*, 由 A. J. Barrett, N. D. Rawlings 和 J. F. Woessner 编, Academic Press, San Diego, 1998, 第 270 章中。天冬氨酸蛋白酶的合适实例包括,例如,在 R. M. Berka 等, *Gene*, 96, 313(1990); (R. M. Berka 等, *Gene*, 125, 195-198(1993)); 和 Gomi 等, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1095-1100(1993) 中描述的那些,其通过引用并入本文。

[0319] 商业上可得到的产品包括 **ALCALASE®**、**ESPERASE™**、**FLAVOURZYME™**、**PROMIX™**、**NEUTRASE®**、**RENNILASE®**、**NOVOZYM™FM 2.0L** 和 **NOVOZYM™ 50006** (可得自 Novozymes A/S, Denmark) 及来自 Genencor Int., Inc., USA 的 **GC106™** 和 **SPEZYME™ FAN**。

[0320] 蛋白酶可以 0.0001-1mg 酶蛋白质 /g DS, 优选 0.001-0.1mg 酶蛋白质 /g DS 的量存在。或者,蛋白酶可以 0.0001-1 LAPU/g DS, 优选 0.001-0.1 LAPU/g DS 和 / 或 0.0001-1 mAU-RH/g DS, 优选 0.001-0.1mAU-RH/g DS 的量存在。

[0321] 本文中所描述的和要求保护的本发明不限于本文所公开的具体实施方式的范围,因为这些实施方式意欲作为本发明几个方面的说明。任何等同的实施方式以及所述实施方式的一个或多个的组合意欲在本发明的范围之内。从前面的说明中,除本文所显示和描述的那些之外,本发明的多种修改对于本领域技术人员是显而易见的。这些修改也意欲落入所附的权利要求的范围之内。

[0322] 本文引用了多篇文献,其公开的内容通过引用全体并入。通过下述实施例进一步描述本发明,所述实施例不解释为限制本发明范围。

[0323] 材料与方法

[0324] 材料

[0325] 纤维素酶制备物 A: 纤维素分解组合物,其包括公开在 WO 2005/074656 中的具有纤维素分解增强活性的多肽 (GH61A); β -葡萄糖苷酶 (在 WO 2008/057637 中公开的融合蛋白) 和源自里氏木霉的纤维素分解酶制备物。纤维素酶制备物 A 公开在共同未决申请 PCT/US2008/065417 中。

[0326] 酵母:

[0327] 可得自 Red Star/Lesaffre, USA 的 RED STAR™。

[0328] RWB218 从 Royal Nedalco/The Netherlands 得到并且描述在 Kuyper 等, 2005, FEMS Yeast Research 5, p. 925-934 中。

[0329] - 未洗涤的预处理的玉米秸 (PCS): 从 The National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 得到的、经酸催化的、蒸汽爆炸的。

[0330] 方法

[0331] 同一性的确定

[0332] 通过参数“同一性”描述两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性。

[0333] 两个氨基酸序列之间的同一性程度使用具有同一性表和以下多重比对参数 (alignment parameter) 的 LASERGENE™ MEGALIGN™软件 (DNASTAR, Inc., Madison, WI) 通过 Clustal 法 (Higgins, 1989, CABIOS 5:151-153) 确定: 缺口罚分 10 和缺口长度罚分 10。配对比对参数为 K 元组 (Ktuple) = 1, 缺口罚分 = 3, 窗口 = 5 和对角线 = 5。

[0334] 两个核苷酸序列之间的同一性程度使用具有同一性表和以下多重比对参数的 LASERGENE™ MEGALIGN™软件 (DNASTAR, Inc., Madison, WI) 通过 Wilbur-Lipman 法 (Wilbur 和 Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80:726-730) 确定: 缺口罚分 10 和缺口长度罚分 10。配对比对参数为 K 元组 (Ktuple) = 3, 缺口罚分 = 3 和窗口 = 20。

[0335] 使用滤纸测定法 (FPU 测定法) 测量纤维素酶活性

[0336] 1. 方法的来源

[0337] 1.1 该方法公开在名称为“Measurement of Cellulase Activities”, Adney, B. 和 Baker, J., 1996, Laboratory Analytical Procedure, LAP-006, National Renewable Energy Laboratory (NREL) 的文件中。其是基于用于测量纤维素酶活性的 IUPAC 方法 (Ghose, T. K., Measurement of Cellulase Activities, Pure&Appl. Chem. 59, pp. 257-268, 1987)。

[0338] 2. 步骤

[0339] 2.1 该方法如 Adney 和 Baker, 1996, 见上文所述进行, 只是在显色后使用 96 孔板读取吸光率值, 如下所述。

[0340] 2.2 酶试验管:

[0341] 2.2.1 将卷起的 (rolled) 滤纸条 (strip) (#1Whatman ; 1×6cm ; 50mg) 添加到试管 (13×100mm) 的底部。

[0342] 2.2.2 向所述管添加 1.0mL 的 0.05M 柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.80)。

[0343] 2.2.3 将包含滤纸和缓冲液的所述管在循环水浴中在 50℃ (±0.1℃) 温育 5 分钟。

[0344] 2.2.4 在温育后, 向所述管添加 0.5mL 在柠檬酸盐缓冲液中的酶稀释物。酶稀释物设计为产生略微高于和低于 2.0mg 葡萄糖的目标值的值。

[0345] 2.2.5 通过轻轻涡旋 3 秒混合所述管内容物。

[0346] 2.2.6 在涡旋后, 将所述管在循环水浴中在 50℃ (±0.1℃) 温育 60 分钟。

[0347] 2.2.7 在 60 分钟温育后立即从水浴中取出所述管, 并向每个管添加 3.0mL 的 DNS

试剂以停止反应。将所述管涡旋 3 秒以混合。

[0348] 2.3 空白和对照

[0349] 2.3.1 通过向试管添加 1.5mL 柠檬酸盐缓冲液来制备试剂空白。

[0350] 2.3.2 通过将卷起的滤纸条添加到试管的底部中并添加 1.5mL 柠檬酸盐缓冲液制备底物对照。

[0351] 2.3.3 对于每个酶稀释物,通过将 1.0mL 柠檬酸盐缓冲液和 0.5mL 适当的酶稀释物混合来制备酶对照。

[0352] 2.3.4 以与酶试验管相同的方式测定试剂空白、底物对照和酶对照,并与酶试验管一起进行。

[0353] 2.4 葡萄糖标准物

[0354] 2.4.1 制备 100mL 葡萄糖的原液 (10.0mg/mL),并将 5mL 等分试样冻结。在使用前,将等分试样解冻并涡旋以混合。

[0355] 2.4.2 如下在柠檬酸盐缓冲液中进行原液的稀释:

[0356] $G1 = 1.0\text{mL 原液} + 0.5\text{mL 缓冲液} = 6.7\text{mg/mL} = 3.3\text{mg}/0.5\text{mL}$

[0357] $G2 = 0.75\text{mL 原液} + 0.75\text{mL 缓冲液} = 5.0\text{mg/mL} = 2.5\text{mg}/0.5\text{mL}$

[0358] $G3 = 0.5\text{mL 原液} + 1.0\text{mL 缓冲液} = 3.3\text{mg/mL} = 1.7\text{mg}/0.5\text{mL}$

[0359] $G4 = 0.2\text{mL 原液} + 0.8\text{mL 缓冲液} = 2.0\text{mg/mL} = 1.0\text{mg}/0.5\text{mL}$

[0360] 2.4.3 通过将 0.5mL 的各个稀释物添加到 1.0mL 柠檬酸盐缓冲液中制备葡萄糖标准物管。

[0361] 2.4.4 以与酶试验管相同的方式测定葡萄糖标准物管,并与酶试验管一起进行。

[0362] 2.5 显色

[0363] 2.5.1 在 60 分钟温育和添加 DNS 后,使所有管在水浴中一起煮沸 5 分钟。

[0364] 2.5.2 在煮沸后,将它们立即在冰 / 水浴中冷却。

[0365] 2.5.3 当冷却时,简单地涡旋所述管,并容许浆状物沉降。然后,通过将来自各个管的 50 微升添加到在 96 孔板中的 200 微升 ddH₂O 中来稀释各个管。混合各孔,并在 540nm 读取吸光度。

[0366] 2.6 计算 (实例在 NREL 文献中给出)

[0367] 2.6.1 通过将四个标准物 (G1-G4) 的葡萄糖浓度 (mg/0.5mL) 相对于 A_{540} 作图来制备葡萄糖标准曲线。这使用线性回归 (Prism Software) 拟合,并且使用用于该线的方程以确定各个酶试验管所产生的葡萄糖。

[0368] 2.6.2 制备所产生的葡萄糖 (mg/0.5mL) 相对于总的酶稀释物的曲线, Y 轴 (酶稀释物) 为对数标度。

[0369] 2.6.3 在产生刚刚大于 2.0mg 葡萄糖的酶稀释物和产生刚刚小于 2.0mg 葡萄糖的酶稀释物之间画线。从该线确定产生恰好 2.0mg 葡萄糖的酶稀释物。

[0370] 2.6.4 如下计算滤纸单位 /mL (FPU/mL):

[0371] $\text{FPU/mL} = 0.37 / \text{产生 } 2.0\text{mg 葡萄糖的酶稀释物}$ 。

[0372] 葡糖淀粉酶活性

[0373] 可以 AGI 单位或以葡糖淀粉酶单位 (AGU) 测量葡糖淀粉酶活性。

[0374] 葡糖淀粉酶活性 (AGI)

[0375] 葡糖淀粉酶（等同于淀粉葡萄糖苷酶）将淀粉转化为葡萄糖。在此通过用于活性测定的葡萄糖氧化酶方法来确定葡萄糖的量。该方法描述于来自 American Association of Cereal Chemists, 2000 ;ISBN:1-891127-12-8 的“Approved methods of the American Association of Cereal Chemists”. Vol.1-2AACC 中的 76-11 节“淀粉-葡糖淀粉酶方法及用葡萄糖氧化酶进行葡萄糖的后续测量”。

[0376] 一个葡糖淀粉酶单位 (AGI) 是在该方法的标准条件下每分钟形成 1 微摩葡萄糖的酶量。

[0377] 标准条件 / 反应条件:

[0378]

底物: 可溶性淀粉, 浓度约 16 g 干物质/L.
缓冲液: 乙酸盐(acetate), 约 0.04 M, pH=4.3

[0379]

pH: 4.3
温育温度: 60°C
反应时间: 15 分钟
反应的终止: NaOH 至约 0.2 g/L 的浓度(pH~9)
酶浓度: 0.15-0.55 AAU/mL.

[0380] 淀粉应该是 Linter 淀粉, 其为在实验室中用作比色指示剂的稀糊淀粉 (thin-boiling starch)。将天然淀粉用稀盐酸处理, 使其保持与碘生成蓝色的能力, 从而获得 Lintner 淀粉。

[0381] 葡糖淀粉酶活性 (AGU)

[0382] 将 Novo 葡糖淀粉酶单位 (AGU) 定义为在标准条件下每分钟水解 1 微摩尔麦芽糖的酶量, 所述标准条件为 37°C、pH 4.3, 底物: 麦芽糖 23.2mM, 缓冲液: 乙酸盐 0.1M, 反应时间为 5 分钟。

[0383] 可以使用自动分析器系统。向葡萄糖脱氢酶试剂中加入变旋酶 (mutarotase), 从而将存在的任何 α -D-葡萄糖转化成 β -D-葡萄糖。在上述反应中, 葡萄糖脱氢酶特异性地与 β -D-葡萄糖反应形成 NADH, 使用光度计在 340nm 处测定形成的 NADH, 作为起始葡萄糖浓度的量度。

[0384] AMG 温育:

[0385]

底物: 麦芽糖 23.2 mM
缓冲液: 乙酸盐 0.1 M
pH: 4.30 \pm 0.05
温育温度: 37°C \pm 1
反应时间: 5 分钟
酶工作范围: 0.5-4.0 AGU/mL

[0386] 显色反应:

[0387]

GlucDH:	430 U/L
变旋酶:	9 U/L
NAD:	0.21 mM
缓冲液:	磷酸盐 0.12 M; 0.15 M NaCl
pH:	7.60 ± 0.05

[0388]

温育温度:	37°C ± 1
反应时间:	5 分钟
波长:	340 nm

[0389] 更详细描述这种分析方法的文件夹 (EB-SM-0131.02/01) 可根据向 Novozymes A/S, Denmark 要求而获得, 所述文件夹通过引用并入本文。

[0390] α-淀粉酶活性

[0391] α-淀粉酶活性 (KNU)

[0392] 可使用马铃薯淀粉作为底物来确定 α-淀粉酶活性。该方法基于改性马铃薯淀粉通过酶的分解, 并通过将淀粉/酶溶液的样品与碘溶液混合来跟踪反应。起初, 形成蓝黑色, 但是在淀粉分解过程中, 蓝色变弱并逐渐变为红褐色, 其与有色的玻璃标准物相比。

[0393] 将一个 Kilo Novo α-淀粉酶单位 (KNU) 定义为在标准条件下 (即在 37°C +/- 0.05 ; 0.0003M Ca²⁺; 和 pH 5.6) 将 5260mg 淀粉干物质 Merck Amylum solubile 糊精化的酶量。

[0394] 更详细描述该分析方法的文件夹 EB-SM-0009.02/01 可根据向 Novozymes A/S, Denmark 要求而获得, 所述文件夹通过引用并入本文。

[0395] 酸性 α-淀粉酶活性

[0396] 当根据本发明使用时, 任何酸性 α-淀粉酶的活性可以 AFAU (酸性真菌 α-淀粉酶单位) 测量。可选择地, 酸性 α-淀粉酶的活性可以 AAU (酸性 α-淀粉酶单位) 测量。

[0397] 酸性 α-淀粉酶单位 (AAU)

[0398] 可以 AAU (酸性 α-淀粉酶单位) 测量酸性 α-淀粉酶活性, 这是一种绝对 (absolute) 方法。一个酸性淀粉酶单位 (AAU) 是在标准化的条件下, 每小时将 1g 淀粉 (100% 干物质) 转化为产物的酶量, 所述产物在与已知强度 (strength) 的碘溶液反应后在 620nm 处具有与颜色参照之一等同的透射 (transmission)。

[0399] 标准条件 / 反应条件:

[0400]

底物:	可溶性淀粉 浓度约 20 g DS/L.
缓冲液:	柠檬酸盐, 约 0.13 M, pH=4.2

[0401]

碘溶液:	40.176 g 碘化钾 + 0.088 g 碘/L
自来水	15°-20°dH (德国硬度(German degree hardness))
pH:	4.2
温育温度:	30°C
反应时间:	11 分钟
波长:	620 nm
酶浓度:	0.13-0.19 AAU/mL
酶工作范围:	0.13-0.19 AAU/mL

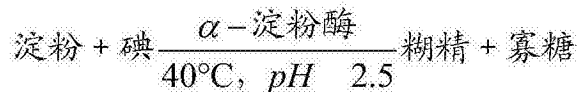
[0402] 淀粉应为 Lintner 淀粉, 其为在实验室中用作比色指示剂的稀糊淀粉。通过将天然淀粉用稀盐酸处理, 使其保持与碘生成蓝色的能力, 从而获得 Lintner 淀粉。进一步细节可以在 EP 0140410B2 中找到, 其公开内容通过引用并入本文。

[0403] 酸性 α -淀粉酶活性 (AFAU)

[0404] 可以 AFAU (酸性真菌 α -淀粉酶单位) 测量酸性 α -淀粉酶活性, 其相对于酶标准物确定。将 1AFAU 定义为在下述标准条件下每小时降解 5.260mg 淀粉干物质的酶量。

[0405] 酸性 α -淀粉酶, 一种内切 α -淀粉酶 (1,4- α -D-葡聚糖-葡聚糖水解酶, E.C. 3.2.1.1), 水解淀粉分子内部区中的 α -1,4-糖苷键以形成具有不同链长的糊精和寡糖。与碘形成的颜色的强度与淀粉浓度成正比。使用反向比色法在特定的分析条件下测定淀粉浓度的减少作为淀粉酶活性。

[0406]



[0407] $\lambda = 590\text{nm}$

[0408] 蓝 / 紫 $t = 23$ 秒 脱色

[0409] 标准条件 / 反应条件:

[0410]

底物:	可溶性淀粉 约 0.17 g/L
缓冲液:	柠檬酸盐, 约 0.03 M
碘(I ₂):	0.03 g/L
CaCl ₂ :	1.85 mM
pH:	2.50 ± 0.05
温育温度:	40°C

[0411]

反应时间:	23 秒
波长:	590 nm
酶浓度:	0.025 AFAU/mL
酶工作范围:	0.01-0.04 AFAU/mL

[0412] 更详细描述该分析方法的文件夹 EB-SM-0259.02/01 可根据向 Novozymes A/S, Denmark 要求而获得, 所述文件夹通过引用并入本文。

[0413] 木糖 / 葡萄糖异构酶测定法 (IGIU)

[0414] 1 IGIU 是在标准分析条件下以 1 微摩尔 / 分钟的起始速率将葡萄糖转化为果糖的酶量。

[0415] 标准条件:

[0416]

葡萄糖浓度:	45% w/w
pH:	7.5
温度:	60°C
Mg ²⁺ 浓度:	99 mg/l (1.0 g/l MgSO ₄ *7 H ₂ O)
Ca ²⁺ 浓度:	< 2 ppm
活化剂, SO ₂ 浓度:	100 ppm (0.18 g/l Na ₂ S ₂ O ₅)
缓冲液, Na ₂ CO ₃ 浓度:	2 mM Na ₂ CO ₃

[0417] 蛋白酶活性

[0418] 蛋白酶测定方法 (LAPU)

[0419] 1 亮氨酸氨基肽酶单位 (LAPU) 是在以下条件下每分钟分解 1 μM 底物的酶量: 26mM 作为底物的 L-亮氨酸 - 对 - 硝基酰基苯胺, 0.1M Tris 缓冲液 (pH8.0), 37°C, 10 分钟反应时间。

[0420] LAPU 描述在可根据向 Novozymes A/S, Denmark 要求而获得的 EB-SM-0298.02/01 中。

[0421] 蛋白酶测定方法 -AU (RH)

[0422] 可以用变性血红蛋白作为底物来确定蛋白水解活性。在用于确定蛋白水解活性的 Anson-Hemoglobin 方法中, 消化变性的血红蛋白, 并用三氯乙酸 (TCA) 沉淀未消化的血红蛋白。用酚试剂确定 TCA 可溶产物的量, 所述酚试剂与酪氨酸和色氨酸显蓝色。

[0423] 一个 Anson 单位 (AU (RH)) 定义为在标准条件 (即 25°C、pH 5.5 和 10 分钟反应时间) 下以起始速率消化血红蛋白, 使得每分钟释放一定量的 TCA 可溶产物的酶量, 所述可溶产物与酚试剂给出与一毫当量 (milliequivalent) 酪氨酸相同的颜色。

[0424] AU (RH) 描述在可根据向 Novozymes A/S, Denmark 要求而获得的 EAL-SM-0350 中。

[0425] 产麦芽糖淀粉酶活性 (MANU) 的确定

[0426] 一个 MANU (产麦芽糖淀粉酶 Novo 单位) 可以定义为在底物麦芽三糖 (Sigma M 8378) 浓度为 10mg/ml 的 0.1M 柠檬酸盐缓冲液, pH 5.0、在 37°C 下 30 分钟条件下, 每分钟释放一微摩尔麦芽糖所需的酶量。

[0427] 酵母干重的测量

[0428] 通过直接称量干酵母细胞粒子确定 RED STAR™的干重。通过在 600nm 用分光光度计测量细胞的光密度 (OD), 使用 OD 与干细胞重量的预定关联确定 RWB218 的干重。10D 与 0.26g/L 干细胞相关联。

[0429] 实施例

[0430] 实施例 1

[0431] 高细胞计数的乙醇产生

[0432] 通过在各种起始酵母细胞浓度下将过滤的经预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物接种来测试高酵母投料 (yeast pitch) (细胞计数) 和细胞再循环对乙醇产生的影响。在发酵开始后 24 和 48 小时, 通过离心使细胞再循环, 除去用过的 (spent) 水解物, 并加入新鲜的水解物。

[0433] 方法:

[0434] 使用 20% (w/w) 的起始可溶固体浓度和 10mg 纤维素酶制备物 A/g 纤维素在 50 °C 将未洗涤的 PCS (酸催化的、蒸汽爆炸的, The National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO) 水解 72 小时。在水解后, 将浆料在 3000rpm 下离心 10 分钟, 使用 0.45 微米 Whatman 过滤器通过过滤收集上清液。

[0435] 向 24 孔细胞培养板 (Whatman International Ltd., Florham Park, NJ) 的孔中加入范围为 1g 干细胞 /L 至 50g 干细胞 /L 的变化量的 RED STAR™酵母。向每个孔加入 4mL PCS 酶水解物, pH 5.0, 并以温和的搅动使细胞重悬。将该板密封并在干空气温育器中在 32 °C 以 150rpm 振荡进行温育。在 0、4、8 和 24 小时收集样品用于乙醇测定。将酶-偶联的微滴定板测定法用于乙醇定量 (来自 Diagnostic Chemicals Ltd., Prince Edward Island, Canada 的试剂)。在 24 小时后, 通过在 3000rpm 离心 12 分钟收集细胞, 并丢弃上清液。接着, 向每个孔加入 4mL 新鲜的 PCS 水解物, 并用玻璃搅拌棒使酵母细胞重悬。立即收集样品并在 32 °C 下再次 24 小时温育后收集样品, 在该时间后将发酵板再离心并丢弃上清液。再次向每个孔加入 4mL 新鲜的 PCS 水解物, 并重悬细胞。立即收集样品并在第三天的发酵过程中在 4、8 和 24 小时收集样品。在起始后 72 小时结束发酵, 并从每个孔取样用于标准 HPLC 分析。

[0436] 表 1 随时间的乙醇浓度 (g/L) 作为酵母细胞投料和细胞再循环的函数

[0437]

时间, 小时	酵母投料, g 干细胞/L						
	1	5	10	20	30	40	50
0	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
4	1.7	3.6	9.0	18.1	29.3	35.5	33.8
8	1.7	8.0	14.1	34.6	35.8	40.9	41.9
24	1.3	18.8	30.6	31.7	32.7	35.3	38.0
25	1.2	1.9	2.5	3.8	4.9	5.5	7.0
48	5.4	18.1	25.2	31.2	34.5	31.7	34.1
49	2.1	1.9	2.2	3.0	4.0	4.8	5.8
53	5.9	6.6	7.4	12.1	16.4	19.2	22.4
57	6.6	12.1	11.7	18.1	24.6	27.2	32.0
72	36.4	37.0	30.4	43.6	35.4	34.7	38.6

[0438] 实施例 2

[0439] 低细胞计数的乙醇产生

[0440] 测试各种量的糖溶液和过滤的经预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物对以不同的酵母菌株的分批发酵乙醇产生的影响。结果总结在图 1 中。

[0441] 方法:

[0442] 使十种不同的培养基通过 RED STAR™酵母和 RWB218(Nedalco) 分批发酵以产生乙醇。培养基 1 至 5 为补充有 0.5% (w/v) 酵母提取物和 1% (w/v) 豚的葡萄糖和木糖溶液。培养基 6 至 10 为具有不同水平的总固体的过滤的未洗涤的经预处理的玉米秸 (fuvPCS) 酶水解物。调节培养基 5 至 9 的糖水平以使木糖和葡萄糖浓度等价于在 20% 总固体的 fuvPCS 水解物中得到的浓度以测试菌株对不同水平的抑制的抗性。所有培养基是过滤除菌的。

[0443] 培养基 1: 仅 40g/L 的木糖

[0444] 培养基 2: 仅 40g/L 的葡萄糖

[0445] 培养基 3: 木糖 20g/L 和葡萄糖 20g/L (低剂量)

[0446] 培养基 4: 木糖 60g/L 和葡萄糖 80g/L (高剂量)

[0447] 培养基 5: 在木糖 40g/L 和葡萄糖 75g/L 中的 0% TS 的 fuvPCS

[0448] 培养基 6: 在木糖 40g/L 和葡萄糖 75g/L 中的 1% TS 的 fuvPCS

[0449] 培养基 7: 在木糖 40g/L 和葡萄糖 75g/L 中的 5% TS 的 fuvPCS

[0450] 培养基 8: 在木糖 40g/L 和葡萄糖 75g/L 中的 10% TS 的 fuvPCS

[0451] 培养基 9: 在木糖 40g/L 和葡萄糖 75g/L 中的 15% TS 的 fuvPCS

[0452] 培养基 10: 在木糖 40g/L 和葡萄糖 75g/L 中的 20% TS 的 fuvPCS

[0453] 将未洗涤的 PCS (酸催化的、蒸汽爆炸的, The National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO) 用水稀释并用 NaOH 调节至 pH 5.0。在水解前还加入青霉素、柠檬酸盐缓冲液和 YP 培养基 (0.5% (w/v) 酵母提取物和 1% (w/v) 豚)。将样品用纤维素酶制

备物 A 在 20% (w/w) 的总固体浓度下在 50°C 水解 96 小时。在水解后,将浆料在 3000rpm 离心 10 分钟,并将 pH 5.0 的上清液通过无菌过滤收集并用于发酵。

[0454] 在高压灭菌的 20ml 小瓶 (mini vial) 中在 30°C 进行发酵 96 小时。在如上列出的十种发酵培养基中测试两种酵母。所有测试一式三份地进行。将预培养物接种到具有约 0.25g/L 的起始细胞密度的包含在 20ml 小瓶中的 5ml 发酵培养基中。然后将小瓶在振荡器中在 150rpm 温育 4 天。在发酵结尾取样以通过 HPLC 测量乙醇、葡萄糖、木糖、乙酸和甘油水平。HPLC 准备由以下组成:通过加入 40% H₂SO₄ (1% v/v 添加) 停止反应、离心和通过 0.20 微米过滤器过滤。在 4°C 下储存样品直到分析。使用与 RI 检测器偶联的 Agilent™ 1100 HPLC 系统。分离柱为来自 BioRad™ 的 aminex HPX-87H 离子排阻柱 (300mm×7.8mm)。

[0455] 实施例 3

[0456] 高细胞计数的乙醇产生

[0457] 通过在各种起始酵母细胞浓度下将过滤的经预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物接种来测试高 RED STAR™ 酵母投料 (细胞计数) 对分批发酵乙醇产生的影响。结果总结在图 2 中。

[0458] 方法:

[0459] 使用 20% (w/w) 的起始固体浓度和 50mg 纤维素酶制备物 A/g 纤维素在 50°C、pH 5.0 将未洗涤的 PCS (来自 The National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO 的酸催化的、预处理的玉米秸) 水解 120 小时。在水解后,使用 Beckman-Coulter 台面离心机将浆料在 3000rpm 离心 10 分钟以分离固体。向所得液体水解物补充营养物:各自 5g/L 水平的酵母提取物和胨,并使用振荡温育器在 150rpm 在 32°C 的温度和 pH 5.0 在具有 150mL 工作容积的 250mL nalgene 瓶中通过从 20g/L 至 90g/L 改变 red star 干酵母的起始酵母细胞浓度进行发酵。将样品在 3、7 和 24 小时时收集并使用 HPLC 分析葡萄糖消耗和乙醇产生。

[0460] 实施例 4

[0461] 高细胞计数的乙醇产生

[0462] 通过在各种起始酵母细胞浓度下将经预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物接种来测试高 RWB218 酵母投料 (细胞计数) 对分批发酵乙醇产生的影响。结果总结在图 3 中。

[0463] 方法:

[0464] 将未洗涤的 PCS (酸催化的、蒸汽爆炸的, The National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO) 用水稀释并用 NaOH 调节至 pH 5.0。在水解前还加入青霉素和柠檬酸盐缓冲液。用纤维素酶制备物 A 在 23% (w/w) 的总固体浓度下在 50°C 将样品水解 96 小时。在水解后,将浆料在 3000rpm 离心 15 分钟,并收集上清液。在发酵前,向上清液补充 0.5% 酵母提取物 (w/v) 和 0.5% (w/v) 胨,并用 NH₄OH 调节至 pH 6.0。加入一定量的水以使水解物的最终总固体浓度为 20% (w/w)。

[0465] 在 125ml 烧瓶中在 30°C 进行发酵。各烧瓶包含 50ml 上述水解物液体,并用 RWB218 以 2、5、10、20、40 和 60g 细胞 / 升的初始细胞密度进行接种。将烧瓶在振荡器中在 150rpm 温育 24 小时。在发酵的 0、2、4、6、8、10、12、22 和 24 小时取样以通过 HPLC 测量乙醇、葡萄糖、木糖、乙酸和甘油水平。HPLC 准备由以下组成:通过加入 40% H₂SO₄ (1% v/v 添加) 停止反应、离心和通过 0.20 微米过滤器过滤。在 4°C 储存样品直到分析。使用与 RI 检测器偶联的 Agilent™ 1100 HPLC 系统。分离柱为来自 BioRad™ 的 aminex HPX-87H 离子排阻柱

(300mm×7.8mm)。

[0466] 实施例 5

[0467] 再循环的高细胞计数的乙醇产生

[0468] 通过在 40g/L 的起始酵母细胞浓度下将过滤的经预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物接种来测试高 RED STAR™酵母投料 (细胞计数) 和在 pH5 的细胞再循环对分批发酵乙醇产生的影响。在发酵开始后 24 和 48 小时时,通过离心将细胞再循环,除去用过的水解物并加入新鲜的水解物。结果总结在图 4 中。

[0469] 方法:

[0470] 使用 20% (w/w) 的起始固体浓度和 50mg 纤维素酶制备物 A/g 纤维素在 50℃、pH 5.0 将未洗涤的 PCS (来自 The National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO 的酸催化的、预处理的玉米秸) 水解 120 小时。在水解后,使用 Beckman-Coulter 台面离心机将浆料在 3000rpm 离心 10 分钟以分离固体。向所得液体水解物补充营养物:各自 5g/L 水平的酵母提取物和胨,并使用振荡温育器在 150rpm 在 32℃ 的温度和 pH 5.0 在具有 150mL 工作容积的 250mL nalgene 瓶中在 40g/L 的起始酵母细胞浓度下发酵 24 小时。每 24 小时,使用 Beckman-Coulter 台面离心机将包含液体水解物和酵母细胞的 nalgene 瓶在 3000rpm 离心 10 分钟。将包含乙醇的发酵的液体水解物倾析并加入包含营养物的新鲜水解物 (150mL 容积),将酵母细胞在同一 nalgene 瓶中重悬并如前所述在 32℃ 和 150rpm 在振荡温育器中再温育。对于每个发酵循环,在 3、7 和 23.5 小时时收集样品并使用 HPLC 分析葡萄糖消耗和乙醇产生。

[0471] 实施例 6

[0472] 再循环的高细胞计数的乙醇产生

[0473] 通过在 40g/L 的起始酵母细胞浓度下将过滤的经预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物接种来测试高 RED STAR™酵母投料 (细胞计数) 和在 pH6 下的细胞再循环对分批发酵乙醇产生的影响。在每个发酵循环开始后 12 小时时,通过离心回收细胞,除去用过的水解物并加入新鲜的水解物。结果总结在图 5 中。

[0474] 方法:

[0475] 使用 20% (w/w) 的起始固体浓度和 50mg 纤维素酶制备物 A/g 纤维素在 50℃、pH 5.0 将未洗涤的 PCS (来自 The National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO 的酸催化的、预处理的玉米秸) 水解 120 小时。在水解后,使用 Beckman-Coulter 台面离心机将浆料在 3000rpm 离心 10 分钟。向所得液体水解物补充营养物:各自 5g/L 水平的酵母提取物和胨,并使用振荡温育器在 150rpm 在 32℃ 的温度和 pH 6.0 在具有 150mL 工作容积的 250mL nalgene 瓶中在 40g/L 的起始酵母细胞浓度下发酵 12 小时。使用 10% (w/w) 氢氧化钠溶液将 pH 调节至 6.0。每 12 小时,使用 Beckman-Coulter 台面离心机将包含液体水解物和酵母细胞的 nalgene 瓶在 3000rpm 离心 10 分钟。将包含乙醇的发酵的液体水解物倾析并加入包含营养物的新鲜水解物 (150mL 容积),将酵母细胞在同一 nalgene 瓶中重悬并如前所述在 32℃ 和 150rpm 在振荡温育器中再温育。在每个发酵循环开始后 3、7 和 11.5 小时时收集样品,并使用 HPLC 分析葡萄糖消耗和乙醇产生。在 15% (w/w) 起始固体浓度下在补充有约 20g/L 葡萄糖的培养基中进行相同的试验。将细胞再循环八 (8) 次以进行总共九 (9) 个发酵循环。各发酵循环产生约 37g/L 乙醇,表明即使在 9 个发酵循环后在再循环

的酵母的发酵生产力 (fermentation productivity) 方面也没有损失。(数据未示出)

[0476] 实施例 7

[0477] 再循环的高细胞计数的乙醇产生

[0478] 通过在 20g/L 的酵母细胞浓度下将离心的、预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物接种来测试高 RWB218 酵母投料 (细胞计数) 和细胞再循环对补料分批发酵乙醇产生的影响。在每个发酵循环开始后 24 小时, 通过离心将细胞再循环, 除去用过的水解物并加入新鲜的水解物。对于各发酵循环的结果示于图 6a 中, 且第一个发酵循环的细节示于图 6b 中。

[0479] 方法:

[0480] 将未洗涤的 PCS (酸催化的、蒸汽爆炸的, The National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO) 用水稀释并用 NaOH 调节至 pH 5.0。在水解前还加入青霉素和柠檬酸盐缓冲液。用纤维素酶制备物 A 在 23% (w/w) 的总固体浓度下在 50°C 将样品水解 96 小时。在水解后, 将浆料在 3000rpm 离心 15 分钟, 并收集上清液。在发酵前, 向上清液补充 0.5% (w/v) 酵母提取物和 0.5% (w/v) 脲、或 0.1% (w/v) 尿素, 并用 NH₄OH 调节至 pH 6.0。加入水以使水解物的最终总固体浓度为 20% (w/w)。

[0481] 在 250ml Nalgene 瓶中在 30°C 进行发酵。一瓶起始包含 40ml 补充有酵母提取物和脲的上述水解物液体, 和另一瓶包含 40ml 补充有尿素的上述水解物液体。将两瓶用 RWB218 以 20g 细胞 / 升 (基于 200ml 的总工作容积) 的细胞密度进行接种。然后将瓶在振荡器中在 150rpm 温育。在 2 小时的发酵后开始补料与分批相同的水解物液体。总补料体积为 160ml, 和总补料时间为 22 至 40 小时。在完成补料后, 将包含发酵醪 (beer) 和酵母细胞的 Nalgene 瓶在 3000rpm 离心 15 分钟。倾析 160ml 包含乙醇的上清液, 并将残留在瓶中的 40ml 与酵母细胞充分混合。将该瓶如前所述在振荡器中在 30°C 和 150rpm 再温育, 并用再装有另外的 160ml 如之前相同的水解物液体的补料瓶再开始补料。在每个发酵循环的过程中收集样品以通过 HPLC 测量乙醇、葡萄糖、木糖、乙酸和甘油水平。HPLC 准备由以下组成: 通过加入 40% H₂SO₄ (1% v/v 添加) 停止反应、离心和通过 0.20 微米过滤器过滤。在 4°C 储存样品直到分析。使用与 RI 检测器偶联的 Agilent™ 1100 HPLC 系统。分离柱为来自 BioRad™ 的 aminex HPX-87H 离子排阻柱 (300mm×7.8mm)。

[0482] 实施例 8

[0483] 高细胞计数的乙醇产生

[0484] 通过在各种起始酵母细胞浓度下将经预处理的玉米秸 (PCS) 酶水解物接种来测试高 RWB218 酵母投料 (细胞计数) 对由用各种预处理方法预处理的玉米秸 (CS) 的分批发酵乙醇产生的影响。结果总结在图 7 中。

[0485] 方法:

[0486] 将未洗涤的自-预处理的玉米秸和未洗涤的苛性-预处理的玉米秸 (The National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO) 用水稀释并分别用 NaOH 或 H₂SO₄ 调节至 pH 5.0。在水解前还加入青霉素和柠檬酸盐缓冲液。用纤维素酶制备物 A 和 SHEARSYME™ 在 20% (w/w) 的总固体浓度下在 50°C 将样品水解 48 小时。在水解后, 将浆料在 3000rpm 离心 15 分钟, 并收集上清液。在发酵前, 向上清液补充 0.5% (w/v) 酵母提取物和 0.5% (w/v) 脲。

[0487] 在 125ml 烧瓶中在 30°C 进行发酵。各烧瓶包含 50ml 的上述水解物液体, 并用

RWB218 以 2、5、10、20 和 40g 细胞 / 升的初始细胞密度进行接种。将烧瓶在振荡器中在 150rpm 温育 24 小时。在发酵的 0、2、4、6、20 和 24 小时取样以通过 HPLC 测量乙醇、葡萄糖、木糖、乙酸和甘油水平。HPLC 准备由以下组成：通过加入 40% H_2SO_4 (1% v/v 添加) 停止反应、离心和通过 0.20 微米过滤器过滤。在 4°C 储存样品直到分析。使用与 RI 检测器偶联的 Agilent™ 1100 HPLC 系统。分离柱为来自 BioRad™ 的 aminex HPX-87H 离子排阻柱 (300mm×7.8mm)。

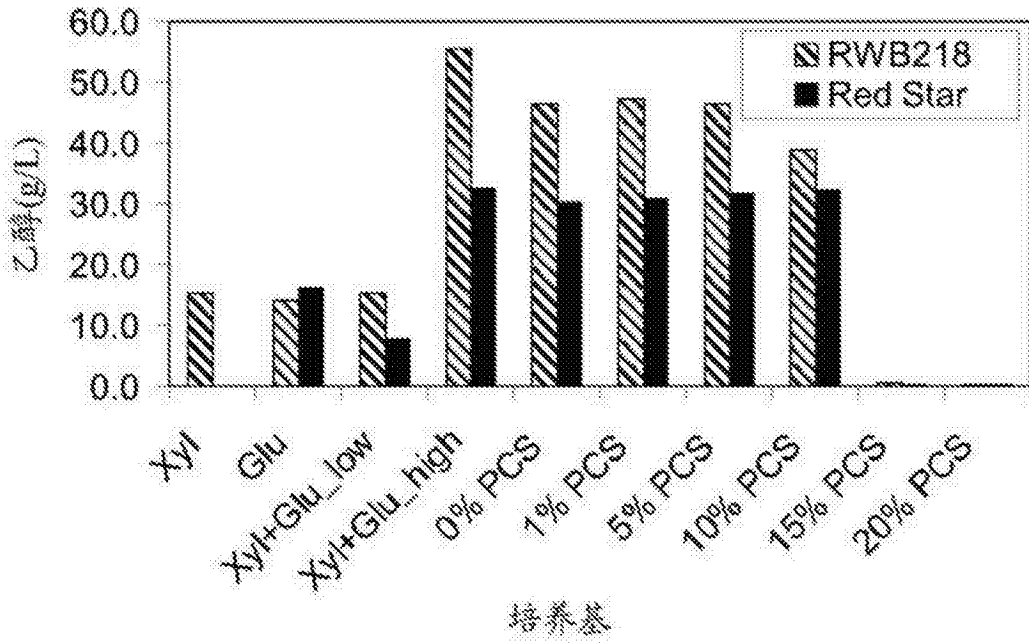


图 1

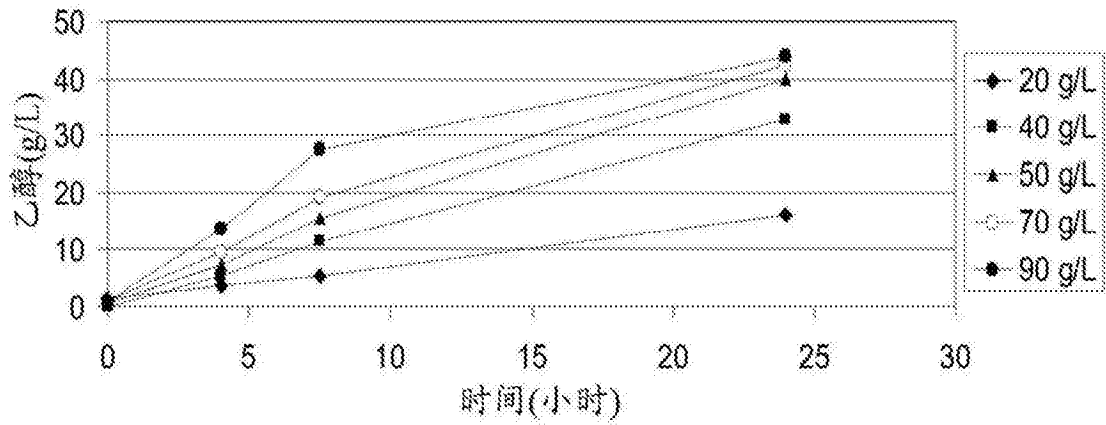


图 2

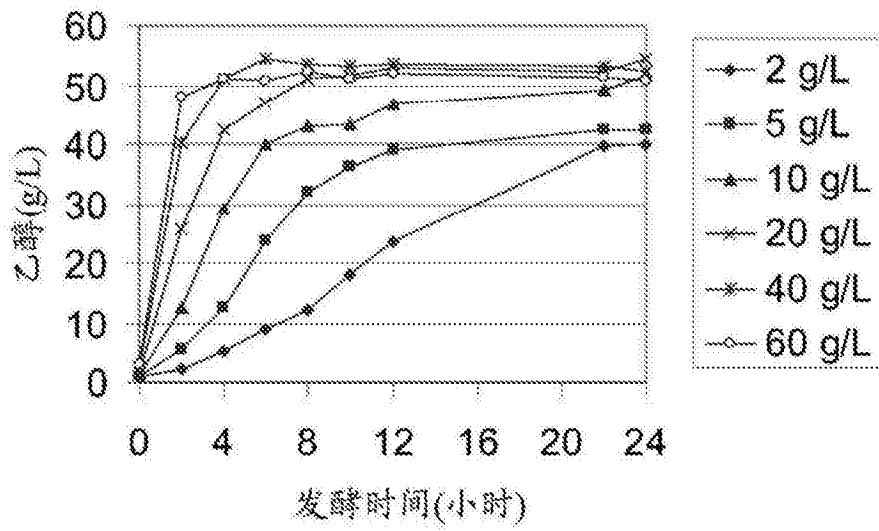


图 3

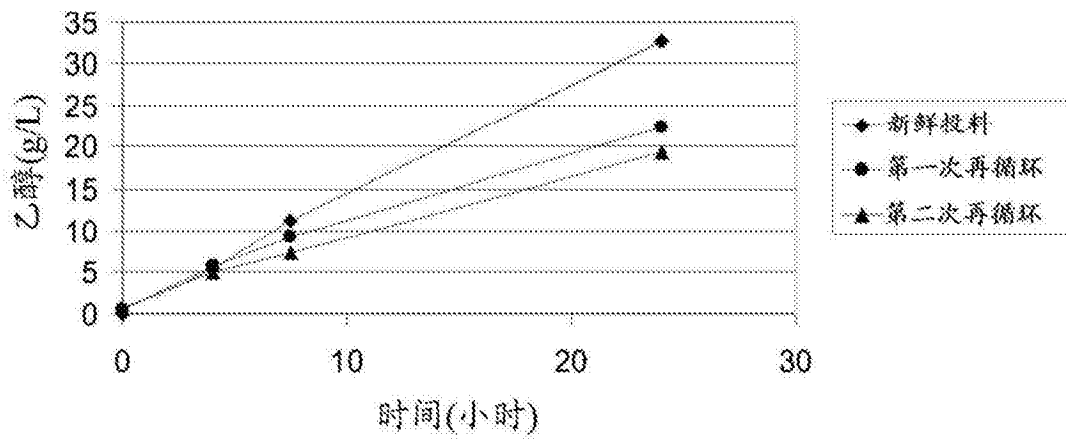


图 4

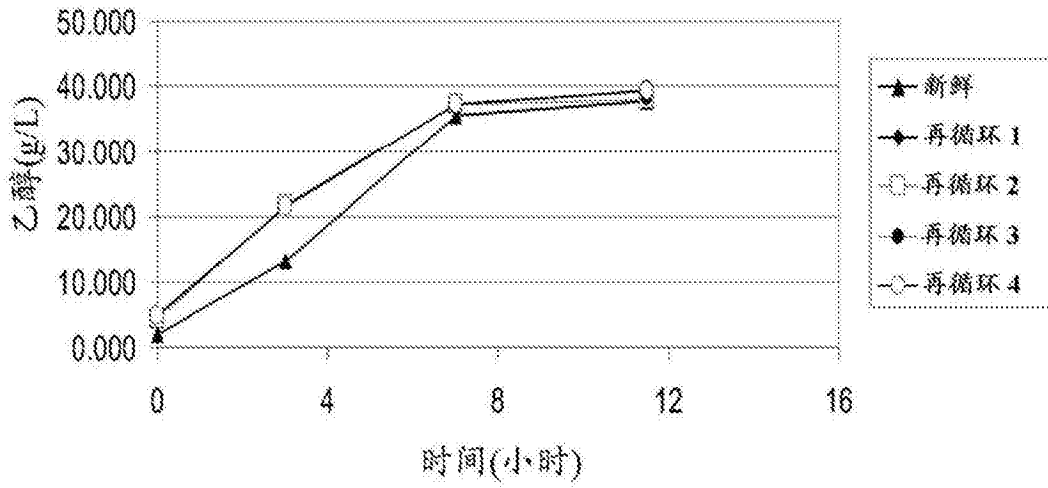


图 5

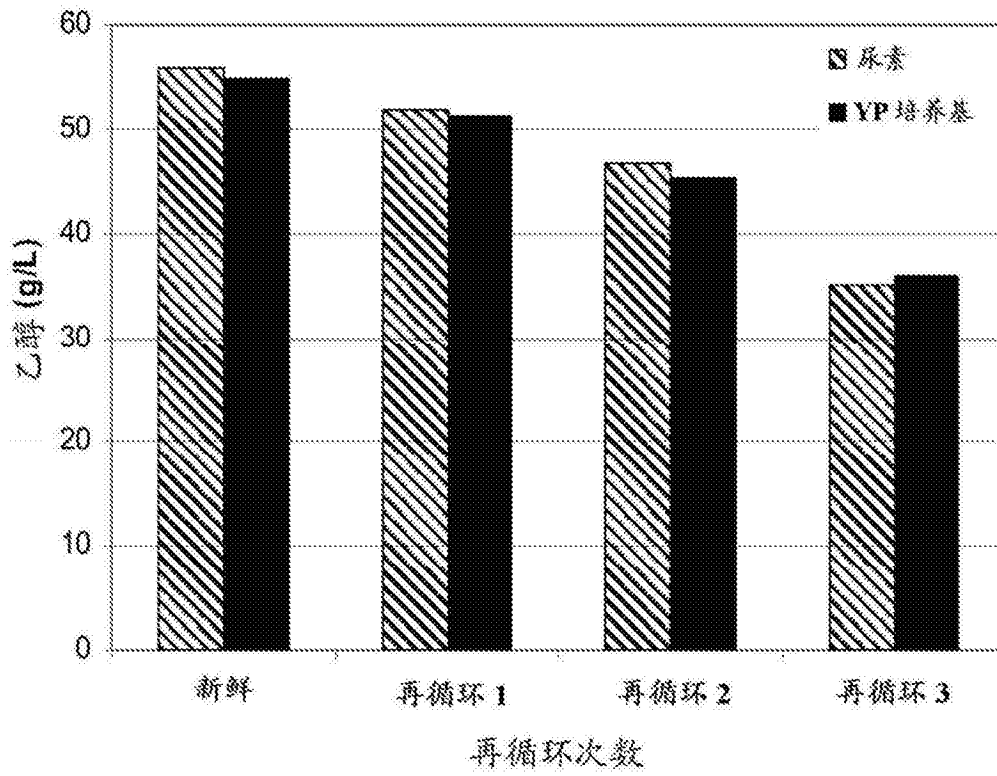


图 6a

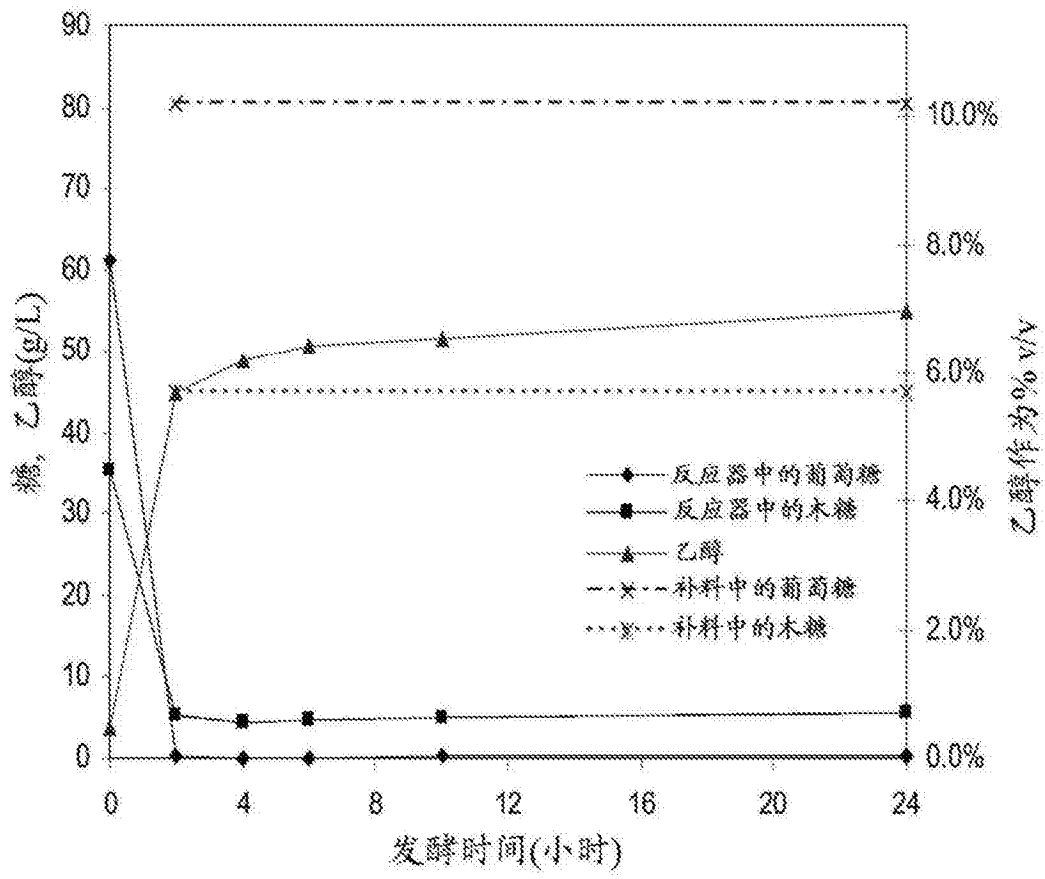


图 6b

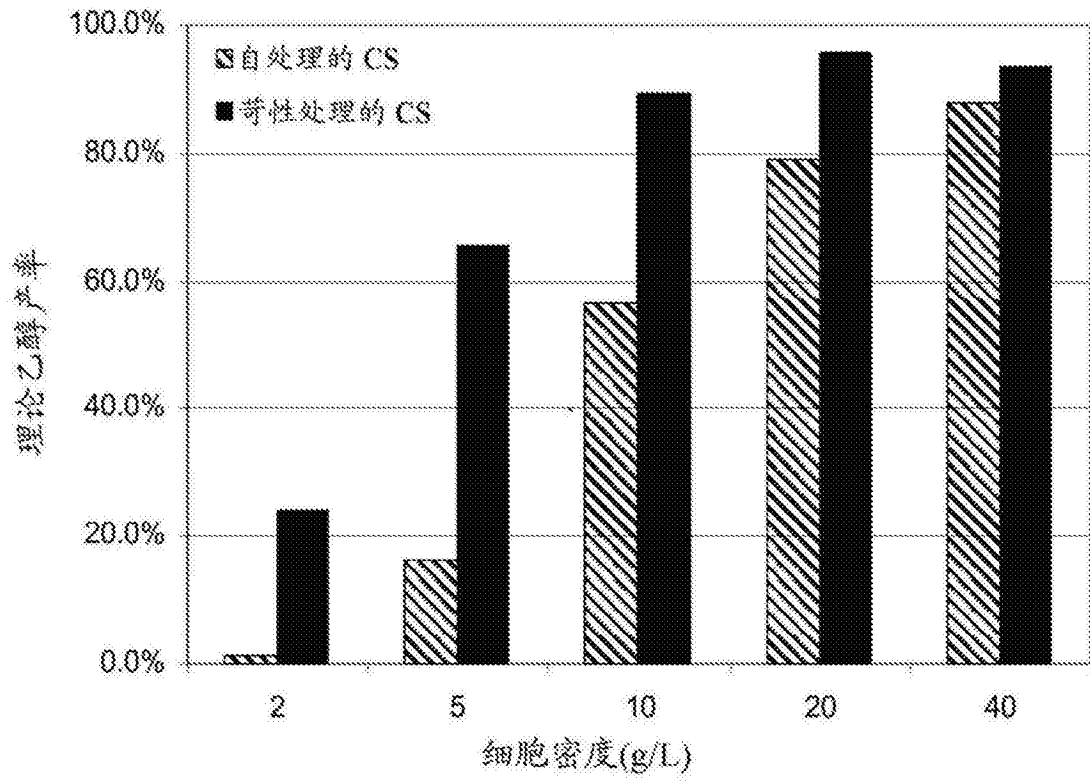


图 7