



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105264062 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201480015399. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 13

C12N 1/16(2006. 01)

(30) 优先权数据

13/804, 364 2013. 03. 14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/025990 2014. 03. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/160184 EN 2014. 10. 02

(71) 申请人 波特研究公司

地址 美国南达科塔

(72) 发明人 尼拉康塔姆·V·纳雷德拉纳斯

斯蒂芬·M·路易斯

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

代理人 刘培培 黎艳

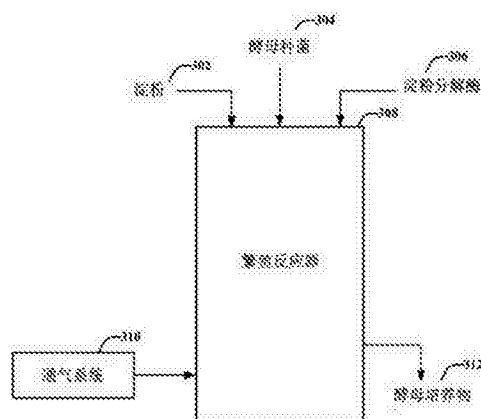
权利要求书2页 说明书10页 附图5页

(54) 发明名称

用于酵母繁殖的系统和方法

(57) 摘要

本发明涉及繁殖酵母的系统和方法,所述方法利用原料比如淀粉和一种或多种酶(例如,酶混合物)从而将原料以足够的速率分解成一种或多种单糖,使得所述酵母可以利用上述单糖作为碳源,生产更多的酵母细胞而不生产过量的醇。



1. 一种繁殖酵母的方法,包括:

i) 提供组合物,该组合物包括:

繁殖培养基,其包括:营养源;碳源,该碳源包括具有一种或多种多糖和/或一种或多种低聚糖的原料;以及一种或多种酶,所述一种或多种酶能够将所述一种或多种多糖和/或一种或多种低聚糖的至少一部分转化成一种或多种单糖;和

酵母的第一细胞团,其中所述酵母能够利用所述一种或多种单糖的至少一部分,使所述酵母的第一细胞团生长一时间段,从而形成酵母的第二细胞团;以及

ii) 使所述酵母的第一细胞团生长一时间段,以形成酵母的第二细胞团,所述酵母的第二细胞团比所述酵母的第一细胞团更大。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,存在一定量的所述一种或多种酶并且存在一定量的所述一种或多种多糖和/或一种或多种低聚糖,使得在所述时间段的至少一部分中,酵母基本上不生产乙醇。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,在整个生长时间段,酵母基本上不生产乙醇。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,存在一定量的所述一种或多种酶并且存在一定量的所述一种或多种多糖和/或一种或多种低聚糖,以生产一定量的所述一种或多种单糖,从而使酵母的第二细胞团在所述时间段内生长。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述一种或多种单糖包括葡萄糖,并且在24小时时间段内生产的葡萄糖的量少于75g/L。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,进一步包括在发酵过程提供酵母的第二细胞团。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述原料包括淀粉原料。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述淀粉原料包括玉米粉、磨碎的玉米胚乳、高粱粉、大豆粉、小麦粉、生物质来源淀粉,和大麦粉。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述淀粉材料的数量范围为每升繁殖培养基15至75克淀粉材料。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,提供至所述繁殖培养基的所述酵母的第一细胞团的数量范围为每升繁殖培养基0.02至5克干酵母。

11. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述一种或多种酶包括一种或多种淀粉分解酶。

12. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述一种或多种酶包括葡萄糖淀粉酶,所述葡萄糖淀粉酶的量:繁殖培养基中每克干固体内0.25至30个葡萄糖淀粉酶单位(AGUs)。

13. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述一种或多种酶包括真菌 α 淀粉酶,所述真菌 α 淀粉酶的量:繁殖培养基中每克干固体内0.03至4个真菌 α 淀粉酶单位(FAU-F)。

14. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述一种或多种酶包括在繁殖培养基中每克干固体内0.25至30个葡萄糖淀粉酶单位(AGUs)和在繁殖培养基中每克干固体内0.03至4个真菌 α 淀粉酶单位(FAU-F)。

15. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述酵母包括基因修饰的酿酒酵母,所述基因修饰的酿酒酵母至少能将葡萄糖和 / 或木糖转化为乙醇。

16. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述生长在 25 至 37 摄氏度的温度范围进行。

17. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述生长在 12 至 24 小时的时间段范围内进行。

18. 一种用于繁殖酵母的系统,包括:

i) 繁殖反应容器,其包括组合物,所述组合物包括:

繁殖培养基,其包括:营养源;碳源,该碳源包括具有一种或多种多糖和 / 或一种或多种低聚糖的原料;以及一种或多种酶,所述一种或多种酶能够将所述一种或多种多糖和 / 或一种或多种低聚糖的至少一部分转化成一种或多种单糖;和

酵母的第一细胞团,其中所述酵母可以利用所述一种或多种单糖的至少一部分,使所述酵母的第一细胞团生长一时间段,从而形成酵母的第二细胞团,所述酵母的第二细胞团比所述酵母的第一细胞团更大;以及

ii) 通气装置,其连接至所述繁殖反应容器以使所述组合物通气。

用于酵母繁殖的系统和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 14 日提交的、申请号为 13/804,364, 且名称为“SYSTEMS AND METHODS FOR YEAST PROPAGATION”的美国非临时专利申请的权益, 该申请的全部内容以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及种植酵母, 比如酿酒酵母。更特别地, 本发明涉及利用原料, 比如, 淀粉和一种或多种酶(例如, 酶混合物)种植酵母。

背景技术

[0004] 乙醇生产者经常从酵母供应商购买用于发酵的酵母(例如, 干燥形式, 和/或作为乳霜悬浮液)。对于许多乙醇生产者, 酵母可以构成较大的运营成本, 因此许多乙醇生产者在发酵过程增加最低限度的酵母。

[0005] 但是, 在发酵中增加酵母负载可能有若干好处。例如, 一个显著的好处是降低发酵的时间段, 从而有效增加给定的乙醇生产设施的产量。增加酵母负载的另一个主要好处是可以减少与乳酸菌污染相关的损失。较高的酵母负载可能意味着污染物不能与主要的酵母群竞争, 从而保证了更清洁的操作。不幸的是, 考虑到酵母的成本, 增加发酵的接种经常导致成本过高。

[0006] 如果乙醇生产设施能以划算的方式种植自己的酵母, 则可以将更大剂量的酵母加入发酵罐中。这可以产生多种好处, 包括降低酵母成本、加快发酵速度(有效地提升工厂产能), 和/或降低微生物污染风险(由于乳酸菌被更大酵母群挤出竞争)。

[0007] 但是, 种植(繁殖)酵母, 比如, 酿酒酵母具有挑战性。例如, 即使在高度通气的条件下, 如果酵母种植在过高浓度的葡萄糖中, 酵母可以从有氧代谢途径转变为生产乙醇的厌氧代谢。如果目的是产生大量的酵母细胞, 这种转变, 在繁殖酵母的时候一般是不可取的。即使在高度通气的条件下, 如果在繁殖培养基中葡萄糖浓度超过约 5g/L, 酵母, 酿酒酵母, 有时可以开始制造乙醇(发酵途径)。这被称为“克勒勃屈利”效应(高葡萄糖抑制呼吸)。同样地, 当没有足够的氧气存在时, 代谢可能会转变成发酵途径。

[0008] 为了帮助避免克勒勃屈利效应, 酿酒酵母通常由酵母供应商种植在充分通气的酵母繁殖罐中, 并且紧紧监测葡萄糖进料(在补料分批过程中通常使用糖蜜原料), 以帮助确保葡萄糖水平保持足够低, 从而保持有氧代谢。

[0009] 不幸的是, 对于绝大多数的乙醇生产者, 保持种植自己的酵母所需的条件可能在经济上和/或在技术上不可行。产生相当可观的体积的酵母所需的设备和专业的技术的风险和成本往往过大, 因此他们必须经常依赖酵母供应商。例如, 由于批次间糖蜜变化, 由乙醇生产者仔细计量葡萄糖流在技术上是困难的, 并且如果不恰当处理与酵母短缺相关的设施停机, 会招致较多危险。此外, 美国(北美)的乙醇生产设施通常不使用糖蜜, 并且递送糖蜜所需的物流往往是由乙醇生产者种植酵母的主要障碍。

[0010] 提供替代的系统和方法,例如,不要求严格的糖蜜计量系统的系统和方法,以繁殖酵母将是有利的。这种系统和方法可以使乙醇发酵中酵母配量更优选。

发明内容

[0011] 本发明涉及使用原料和一种或多种酶种植酵母(例如,酶混合物)种植酵母,所述酶能够以足够的速率将原料中的多糖和/或低聚糖分解成一种或多种单糖,使得酵母可以将所述单糖用作碳源,生产更多的酵母细胞,而不是生产过量的醇。通过选择原料的种类和数量,以及酶的种类和数量,可以以理想速率产生单糖。

[0012] 以这种方式提供单糖相对简单、稳健并且容易。例如,可以根据简单的分批过程进行根据本发明的酵母繁殖,并且不需要分批进料过程。

[0013] 此外,许多乙醇生产设施,特别是那些使用淀粉制造乙醇的乙醇生产设施,可以根据本发明的系统和方法种植自己的酵母群,而且往往不会大量增加成本。使用根据本发明的系统和方法具有这样的潜能:有效地降低用于燃料工业的乙醇的整体成本,并最终能够协助使用酵母,特别是修饰的酵母产生其它生物产品。

[0014] 另外,根据本发明的系统和方法可以使乙醇生产者能以显著降低的成本在原位产生酵母培养物。这不仅可以节省资金,而且还可以提高乙醇生产者在发酵中增加酵母负载能力以便增加产量,降低微生物污染的风险,使生产的酵母适应生产培养基,和/或使淀粉分解酶表达酵母,比如酿酒酵母适应,以产生适于乙醇生产用原料的酶

[0015] 根据本发明的一个方面,一种繁殖酵母的方法,包括:

[0016] i) 提供组合物,该组合物包括:

[0017] 繁殖培养基,其包括:营养源;碳源,该碳源包括具有一种或多种多糖和/或一种或多种低聚糖的原料;以及一种或多种酶,所述一种或多种酶能够将所述一种或多种多糖和/或一种或多种低聚糖的至少一部分转化成一种或多种单糖;和

[0018] 酵母的第一细胞团,其中所述酵母能够利用所述一种或多种单糖的至少一部分,使所述酵母的第一细胞团生长一段时间段,从而形成酵母的第二细胞团;以及

[0019] ii) 使所述酵母的第一细胞团生长一段时间段,以形成酵母的第二细胞团,所述酵母的第二细胞团比所述酵母的第一细胞团更大。

[0020] 根据本发明的另一方面,一种用于繁殖酵母的系统,包括:

[0021] i) 繁殖反应容器,其包括组合物,所述组合物包括:

[0022] 繁殖培养基,其包括:营养源;碳源,该碳源包括具有一种或多种多糖和/或一种或多种低聚糖的原料;以及一种或多种酶,所述一种或多种酶能够将所述一种或多种多糖和/或一种或多种低聚糖的至少一部分转化成一种或多种单糖;和

[0023] 酵母的第一细胞团,其中所述酵母可以利用所述一种或多种单糖的至少一部分,使所述酵母的第一细胞团生长一段时间段,从而形成酵母的第二细胞团,所述酵母的第二细胞团比所述酵母的第一细胞团更大;以及

[0024] ii) 通气装置,其连接至所述繁殖反应容器以使所述组合物通气。

[0025] 在优选实施例中,所述一种或多种酶包括葡萄糖淀粉酶和/或真菌 α -淀粉酶。

[0026] 在优选实施例中,所述一种或多种多糖和/或一种或多种低聚糖包括淀粉材料,比如玉米粉。

附图说明

- [0027] 图 1 展示了包括乙醇生产设施的生物精炼厂的透视图。
- [0028] 图 2A 和 2B 展示了在基于谷物的乙醇生产设施中产生乙醇所用的步骤的典型流程图。
- [0029] 图 3 展示了根据本发明的繁殖系统的典型方块图。
- [0030] 图 4 展示了根据实施例 4 的变化的发酵条件下生产的乙醇的图。
- [0031] 图 5A 展示了实施例 1 的表 1。
- [0032] 图 5B 展示了实施例 1 的表 2。
- [0033] 图 6A 展示了实施例 2 的表 3。
- [0034] 图 6B 展示了实施例 2 的表 4。
- [0035] 图 7A 展示了实施例 3 的表 5。
- [0036] 图 7B 展示了实施例 3 的表 6。

具体实施方式

[0037] 下面将引用如附图所示的数个实施例,对本发明进行详细说明。下文中列举了许多具体细节,用于提供对本发明的实施例的透彻理解。但显然,对于本领域技术人员而言,可以在无需一些或全部所述具体细节的情况下实施这些实施例。在其他一些实施例中,为了避免使本发明变得不必要地含糊不明,省略了一些众所周知的工艺步骤和结构的详细细节。通过附图和以下说明,可以更好地理解实施例的特征和优势。

[0038] 根据本发明繁殖酵母包括提供一种组合物,所述组合物包括繁殖培养基和酵母的第一细胞团。用于繁殖酵母的繁殖培养基通常包括:至少一个营养源,碳源,和水,以形成这样的培养基:可以促进足够用于接种至发酵系统的数量的酵母细胞团的生长。可以在培养基形成时,或培养基形成后,加入酵母的起始细胞团;或者在培养基形成时和培养基形成后都加入酵母的起始细胞团。

[0039] 营养源可以包括的典型的组分包括酵母提取物、尿素、磷酸二铵、硫酸镁、硫酸锌或其它盐,等等中的一种或多种。

[0040] 除了营养源之外,根据本发明的繁殖培养基还包括碳源,所述碳源包括原料和一种或多种酶。至少一部分原料包括一种或多种多糖和/或一种或多种低聚糖。在繁殖期间,所述一种或多种多糖和/或一种或多种低聚糖可以(例如,通过酶水解)分解成一种或多种单糖,并且充当碳源,用于使酵母生产更多的酵母细胞。典型的多糖和/或低聚糖包括可以分解成 C6 单糖的那些多糖和/或低聚糖。在优选实施例中,多糖包括淀粉,并且对应的单糖包括葡萄糖。

[0041] 典型的原料可以从一种或多种谷物,比如玉米、大豆、高粱/蜀黍、大麦、小麦等,或这些谷物的组合制备。在一些实施例中,原料优选从整个谷物玉米或分离的玉米的一部分或多部分制备。

[0042] 优选将原始原料,比如玉米粒制备成使所述一种或多种酶可以使用所述原料,从而使所述酶可以将所述多糖和/或低聚糖以理想速率分解为一种或多种单糖。如在此所述,理想的单糖(例如,葡萄糖)生产速率包括这样的速率:在理想时间段(例如,24 小时)

生产足够的葡萄糖以繁殖酵母,但避免通过克勒勃屈利效应生产过量的乙醇。将原料中的多糖和 / 或低聚糖水解成一种或多种单糖的理想速率可以包括这样的速率:在分批进料繁殖系统中模拟常规使用的速率以手动供给含材料(例如,糖蜜)的葡萄糖。制备用于根据本发明的繁殖培养基的原料的典型的方法包括在与图 2A 和 2B 中的制备系统相连的下文所述的乙醇工艺中制备酶水解所用的原料的方法(例如,研磨)。

[0043] 在一些实施例中,该原料包括玉米粉、磨碎的玉米胚乳、高粱粉、大豆粉、小麦粉、生物质衍生的淀粉,和大麦粉中的一种或多种。

[0044] 可以包括的原料的数量为:如在此所述通过酶水解可以提供足量的单糖(例如,葡萄糖)以在理想时间段内支持想要数量的酵母生长。繁殖培养基中可以包括的典型数量(在约 12-48 小时内可以支持商用乙醇发酵系统生产足够的酵母)的原料包括的淀粉的范围为每升繁殖培养基 15-75 克干粉。

[0045] 除了在此描述的原料之外,根据本发明的繁殖培养基还包括一种或多种酶,所述一种或多种酶可以将所述一种或多种多糖和 / 或一种或多种低聚糖的至少一部分通过水解转化为一种或多种单糖,并且充当碳源支持酵母细胞的再生。水解的速度取决于如下因素,比如酶负载水平、酶活性,和繁殖培养基的 pH 和温度。在优选实施例中,所述一种或多种酶包括一种或多种淀粉分解酶。典型的淀粉分解酶包括 α -淀粉酶(例如,真菌 α -淀粉酶)、葡萄糖淀粉酶,其它淀粉酶和淀粉葡萄糖苷酶中的一种或多种。

[0046] 在一些实施例中,所述一种或多种酶可以包括葡萄糖淀粉酶,其数量范围为在繁殖培养基中每克干固体 0.25 至 30 个葡萄糖淀粉酶单位 (AGUs) (优选在繁殖培养基中每克干固体 0.75 至 30 个葡萄糖淀粉酶单位 (AGUs));真菌 α -淀粉酶,其数量范围为在繁殖培养基中每克干固体 0.03 至 4 个真菌 α -淀粉酶单位 (FAU-F) (优选在繁殖培养基中每克干固体 0.05 至 4 个真菌 α -淀粉酶单位 (FAU-F));及其组合。酶,比如可以降解根据本发明的原料的酶,是众所周知的,并且可以通过商业途径,从,例如,Novozymes®, Bagsvaerd Denmark 获得。

[0047] 优选地,由于可能被任何特定的酵母繁殖所需要(通常取决于所利用的原料 / 淀粉供给),繁殖培养基中可以包括一种或多种另外的酶,比如,蛋白酶、植酸酶、纤维素酶和半纤维素酶,用于繁殖酵母的可选的另外的试剂是众所周知的,并且包括,例如,与酵母一起供给的试剂,比如,抗生素、额外的酶或辅酶、用于调节和保持 pH 的材料、向酵母提供营养或其它的好处的营养或其它成分。

[0048] 对于种植许多类型的酵母,在此描述的繁殖方法可能是可取的。在许多实施例中,所述酵母包括在这样的培养基中繁殖可以受益的酵母:通过原料的酶水解以相对受控的方式引入碳源(比如,葡萄糖)使得酵母可以再生,但不通过发酵生产过量的醇(例如,由于克勒勃屈利效应抑制呼吸)。典型的酵母包括酿酒酵母,其可以至少利用葡萄糖作为碳源进行繁殖。在一些实施例中,所述酵母可以包括非基因修饰的酵母,比如,非基因修饰的酿酒酵母。在其它实施例中,所述酵母可以包括基因修饰的酵母,比如,基因修饰的重组酿酒酵母。

[0049] 可以引入任何起始数量的酵母进行繁殖。通常,基于如下考虑因素确定起始数量:比如,完成繁殖的理想时间段和繁殖结束时的理想细胞数、营养源、包括原料的碳源、酶、温度、pH,等等。在一些实施例中,向繁殖培养基提供的酵母的数量范围为每升繁殖培养基

0.01 至 10 克干酵母,优选每升繁殖培养基 0.02 至 5 克干酵母。

[0050] 如上所述,根据本发明的繁殖酵母的方法包括提供组合物,所述组合物包括繁殖培养基和酵母的第一细胞团;以及,接着在一时间段内种植酵母的第一细胞团以形成酵母的第二细胞团,所述酵母的第二细胞团比所述酵母的第一细胞团更大。

[0051] 根据本发明,选择一种或多种酶和原料的种类和数量使得所述酶通过酶水解作用将所述原料的多糖和/或低聚糖分解为单糖,从而以相对受控的方式引入所述单糖(例如,葡萄糖)作为酵母的碳源,使得酵母可以在理想时间段内再生,但不通过发酵生产过量的醇(例如,由于克勒勃屈利效应抑制呼吸)。

[0052] 优选地,存在一定量的一种或多种酶并存在一定量的所述原料,使得在所述时间段的至少一部分中,酵母基本上不生产乙醇。优选地,在整个种植时间段,酵母基本上不生产乙醇。在此使用的“基本上不生产乙醇”意为所生产的乙醇的水平为 1% v/v 或更少,优选 0.5% v/v 或更少,优选 0.05% v/v 或更少。

[0053] 优选地,存在一定量的一种或多种酶的数量并存在一定量的所述原料,以生产一定量的一种或多种单糖从而在理想时间段内种植酵母的第二细胞团。例如,目标单糖的生产速率可以包括在 24 小时的时间段内生产 0.1% v/v 至 5% v/v 的葡萄糖,优选在 24 小时的时间段内生产 0.5% v/v 至 3% v/v 的葡萄糖。优选地,在 24 小时的时间段内生产的葡萄糖的数量少于 75g/L,优选 30g/L 或更少。

[0054] 也可以选择其它条件以促进理想酵母生长,比如繁殖培养基的温度、繁殖培养基的氧气水平(通气)、搅拌/搅动条件、繁殖培养基的 pH,等等。

[0055] 当存在足够的氧气的时候,使酵母在繁殖时间段的至少一部分,并且优选整个繁殖时间段,通过有氧呼吸生产更多酵母,并且不通过厌氧发酵途径生产过量的醇(例如,乙醇)。适用于呼吸的氧气的量是众所周知的并且可以通过任何众所周知的通气装置,比如空气鼓泡系统提供至繁殖反应容器中。

[0056] 此外,可以通过搅拌繁殖培养基促进充分通气。搅拌是众所周知的并且可以通过,例如,机械搅动提供。

[0057] 繁殖培养基的温度可以是这样的温度:使繁殖培养基的内容物适当地起作用,比如使酶将原料分解成糖并且使酵母再生。典型的温度范围为 15℃ 至 50℃,优选 20℃ 至 40℃,甚至更优选 25℃ 至 37℃。典型的 pH 值范围为 2-8,优选 3 至 7.5,并且甚至更优选 3.5 至 6.5。

[0058] 一旦在繁殖培养基中存在所述酵母,所述酵母可以在任何理想时间段种植。通常,在一定的条件下种植所述酵母以提供足量的酵母细胞从而通过发酵进行乙醇生产。此外,通常在有经济效率的时间段种植酵母细胞。典型的时间段包括 30 分钟至 72 小时,优选 10 至 48 小时,并且更优选 12 至 24 小时。

[0059] 通过以此所述的方式繁殖酵母,所述酶可以与原料(比如,淀粉)相互作用,以便在理想时间段将足量但不过多的淀粉水解成葡萄糖。此外,可以控制在此所述的条件以确保维持足够低的葡萄糖以使酵母保持呼吸模式。在该方式中,乙醇设施可以依附温度、酶配量和酵母接种准则,而不需要监测反应器中的葡萄糖水平,或用表计量进入反应器的葡萄糖/糖蜜流。现在结合图 3,描述典型的发酵系统。如图 3 所示,可以将包括淀粉流 302 的原料通过传送装置加入繁殖反应器 308 中。繁殖反应器是众所周知的并且包括搅拌罐以

及其它反应器。

[0060] 除了淀粉 302 之外,加入酵母的起始种菌 304 和一定剂量的淀粉分解酶(“酶混合物”)306。可选地,可以在酵母生长的停滞期出现之后的稍后阶段加入一种或多种酶(例如,淀粉分解酶的酶混合物)。例如,可以使用测量系统(未示出)将所述酶混合物加入反应器 308 中。如在此所述,酶分解淀粉所产生的糖(葡萄糖)充当部分或全部碳源以繁殖酵母。虽然图 3 中没有示出,但可以将营养源以及众所周知用于酵母繁殖培养基的任何可选的试剂加入反应器 308 中。

[0061] 在高氧气浓度下,酵母种菌 304 能够在反应器 308 中繁殖规定的时间段。可以通过通气系统 310 提供氧气,通气系统 310 可以经由反应器 308 喷入空气,并且还可以包括机械搅拌。

[0062] 繁殖之后,可以收集得到的酵母培养物 312,并且,例如,递送至下游应用系统。

[0063] 在一些实施例中。如下文结合图 1, 2A 和 2B 所述,可以在乙醇生产设施内使用繁殖反应器 308 用于酵母的当场繁殖。

[0064] 例如,在完成繁殖之后,酵母培养物 312 可以从反应器 308 中移除,并且供应至发酵,比如发酵系统 222,或另外为储存做准备。在许多情况下,在使用位置种植所述酵母,繁殖物反应器 308 的内容物可以全部供应至发酵。在其它实施例中,可能希望将酵母细胞分开和 / 或洗涤来自繁殖培养基的酵母。

[0065] 为了展示可以如何在乙醇生产设施当场使用根据本发明的繁殖系统,描述图 1、2A 和 2B。图 1 为包括乙醇生产设施的典型的生物精炼厂 100 的透视图,所述乙醇生产设施被配置成由玉米(或其它淀粉来源)生产乙醇。所述生物精炼厂 100 包括区域 102,在该区域递送并制备玉米(或其它合适的材料包括,但不限于,生物质、糖,和其它淀粉产品)以供应至乙醇生产设施。所述乙醇生产设施包括用于将玉米制备和处理(例如,研磨)成适于在发酵系统 106 中发酵成发酵产物的玉米粉的装置 104。所述乙醇生产设施包括蒸馏系统 108,发酵产物在该蒸馏系统中蒸馏并且脱水成乙醇。在一些实施例中,该生物精炼厂 100 还可以包括副产物处理系统(例如,离心机、干燥机,和 / 或蒸发器)。

[0066] 在一些实施例中,该生物精炼厂 100 可以称为“分离式”乙醇生产设施,其中,在研磨前将玉米籽粒分离成其三个组成部分。这包括外壳(玉米糠,主要是纤维材料)、淀粉填充的胚乳,和富含蛋白质的胚芽部。分离的好处是,如果需要,可以将低淀粉成分吸入不同的工艺流,从而确保只有高淀粉胚乳进行液化、发酵和蒸馏。这在操作上可以更有效、对酵母和酶要求低,并且生产每加仑乙醇的能量消耗低。最后,玉米糠和胚芽的成分可以作为另外的副产品出售给饲料工业,或可以进一步加工以产生较高价值的副产品。

[0067] 虽然下文大部分论述与整个籽粒类生物精炼厂连接在一起,但是,可以认为,在本发明的范围内,分离植物也能够适合包括酵母当场繁殖的设施。另外,请注意,本文所公开的任何乙醇生产设施,在其加工玉米籽粒以外的其它原料、或者除了加工玉米籽料之外还加工其它原料时,可以进行改造,这些改造也包括在本发明的范围之内。

[0068] 图 2A 和 2B 为展示在乙醇生产设施中产生乙醇所用的步骤的流程图。在乙醇生产过程中,可以在制备系统 204 中进一步处理,从而制备玉米 202(或其它合适的原料)。如图 2B 所示,制备系统 204 可以包括分离系统 206 以将玉米籽粒分离成其三个组成部分,如上文所述。分离可以采用研磨、体积排阻和密度分离,以便奏效。可以移除糠和胚芽成分 210

以作为原材料进一步加工或销售。在一些情况下,可以在分离之前或之后进行筛选过程,移除外来杂质,比如岩石、泥土、沙子、玉米芯和秆,及其它不可发酵材料(例如,被移除的成分)。

[0069] 分离之后,可以通过研磨 208 降低胚乳粒径,以便于进一步加工。将磨碎的玉米与水、酶和试剂 218 和浆,以促进淀粉转化为糖(如葡萄糖),比如在第一处理系统 216 中。在“传统”的玉米制乙醇设施中,通常在喷射式蒸煮锅中加热粉浆以使淀粉转化为糖。使用酶法,无需任何外部加热,实现“冷煮”过程。冷煮受益于所需能量减少、整体成本降低,以及对胚乳粉的淀粉和蛋白质热损伤最小。当然,酵母在涉及热煮的常规乙醇设施中繁殖可能也是有利的,如同其在冷煮设施中繁殖一样。

[0070] 在发酵系统 222 中由产乙醇菌(例如,酵母或其它试剂 224)将糖(例如,经处理的成分)转化为乙醇。酵母 224 可以包括来自繁殖反应器 308 的酵母培养物 312。反应器 308 可以是在当场的或坐落在乙醇制造厂的另一个设施。

[0071] 发酵的产物(发酵产物)一般称为“啤酒”,并包括液体成分和固体成分,液体成分包括乙醇和水及可溶成分,固体成分包括未发酵的微粒物质(除其它外)。所述发酵产物能够可选地用第二处理系统 228 中的试剂 230 进行处理。

[0072] 通常优化酵母负载,以保证合理的发酵时间,减轻乳酸菌污染风险,和尽可能低的剂量(鉴于其必须从供应商处购买致使酵母成本高)。在采用酵母繁殖的设施中,起始负载水平可以是动态增加的(以 10-100x 数量级的负载水平),从而显著地缩短发酵,使微生物污染风险非常低,并且与从供应商购买酵母相比,显著降低总成本。

[0073] 在所示的标准设施中,经处理的发酵产物被输送至蒸馏系统 232。在蒸馏系统 232 中,(经处理的)发酵产物被蒸馏且脱水成为乙醇 234。在一些实施例中,被移除的成分 236(例如,全酒糟),包括水、可溶性成分、油和未发酵的固体(例如,基本上移除了所有乙醇的啤酒的固体成分),其可以在第三处理系统(在该第三处理系统,可以用试剂处理被移除的成分)被干燥成干酒糟(DDG)并作为动物饲料产品出售。也可以从酒糟中回收其它共同产物,例如,糖浆(和包含在糖浆中的油)。

[0074] 实施例

[0075] 结合下面的实施例,进一步描述本发明。

[0076] 实施例 1

[0077] 在实验中使用类似于图 3 所示的系统以利用经酶处理的淀粉浆料测试酵母繁殖的效果。在该实施例中,将酿酒酵母菌株从 YPD 琼脂板转移至补充了 3% w/v 葡萄糖的 50mL 灭菌酵母提取物-蛋白胨(YE)培养基中。使培养物在 30℃ 过夜生长(大约 17 小时),从而使 600nm 光密度达到至少 7.5。

[0078] 用于繁殖的生长培养基以玉米粉作为唯一的碳源,以 30g/L(25.6g 干重/L)玉米粉与大约 15g/L 澄清稀酒糟和 0.24g/L 尿素结合。澄清稀酒糟为液相,以 4900x g 离心 20 分钟得到 7% 总固体稀酒糟。液体层几乎不含固体悬浮物。

[0079] 将所需量的澄清稀酒糟、尿素和水加入 5L 反应器中并且在 110℃ 高压蒸煮 6min。一旦冷却至 31.1℃,加入终浓度为 5ppm 的 Lactoside247™(通过商业途径从 Lallemand Ethanol Technology, Milwaukee, WI 公司获得)以避免细菌污染。以过夜的酵母培养物接种该生长培养基,接种比率为 0.1g(干酵母)/L。在接种酵母之前,加入玉米粉并且使用

氢氧化铵或硫酸将 pH 调节至 5.0。以 450rpm 搅拌反应器,气流调节为每分钟 0.8 标准升 (SLPM), (每分钟每体积培养基 (vvm)0.5 体积空气) 以确保充分通气。

[0080] 每克玉米固体中加入 0.016mL 酶混合物 (包括真菌 α 淀粉酶和真菌葡萄糖淀粉酶) (19AGU/g DS; 1.8FAU-F/g DS)。在整个研究中 (24 小时) 反应器的温度保持 31.1°C。从反应器中定期取出样品,并且分析生长、葡萄糖消耗和乙醇生产。并监测反应器中溶解氧的含量和 pH (不保持)。

[0081] 从图 5A 的表 1 可见,显然,在 24 小时周期结束时,没有生产乙醇。此外,酵母消耗了由酶和其它成分,比如,乳酸,乙酸和甘油产生的所有葡萄糖以生产酵母细胞团。

[0082] 在相同的研究中,另一反应器仅包括生长培养基和所述酶混合物,但没有酵母,仅用于观察在有氧生长条件下由酶生产的葡萄糖。如图 5B 的表 2 所证实,生产了超过 2% w/v 的葡萄糖。基于 24 小时后所生产的葡萄糖和存在的悬浮固体,可以计算出在该繁殖期间大约生产了 12g 干酵母 /L。

[0083] 可见,该研究显示,在高通气条件下测试的菌株生产更多的细胞团并且没有生产乙醇。这表明,即使在这样的培养基中也可以繁殖酵母,具有缓慢释放葡萄糖以避免克勒勃屈利效应的合适的淀粉分解酶的基于淀粉的培养基。

[0084] 实施例 2

[0085] 在该第二实施例中,利用多种酵母系证实实施例 1 的发现。种菌制备和繁殖步骤与实施例 1 相同。但是,在该研究中,设定两个繁殖反应器:(i) 基因修饰的酵母;以及(ii) 非基因修饰的酵母。在两个反应器中,以 0.12g/L 接种酵母。

[0086] 图 6A 的表 3 和图 6B 的表 4 展示了该研究的结果。该研究中获得的结果表明,该协议可以用于繁殖任何数量的基因修饰和非基因修饰 (野生型) 的酿酒酵母菌株。在任何一种菌株中没有观察到乙醇生产。

[0087] 实施例 3

[0088] 在该第三实施例中,进行研究以确认在葡萄糖上生产乙醇和在基于淀粉的培养基上生产细胞生物质的概念。在该研究中,玉米固体增加至 86g 干玉米固体 /L (以在淀粉水解之后得到大约 60g/L 的葡萄糖)。处理包括:(i) 86g/L 玉米、剂量为 6.1AGU/g 干固体和 0.6FAU-F/g 干固体的酶混合物 (在酵母接种后 3 小时加入)、0.12g/L 酵母 (表 5);以及(ii) 大约 60g/L 葡萄糖、没有酶,和 0.12g/L 酵母 (表 6)。种菌制备和繁殖协议与实施例 1 使用的相似。图 7A 中的表 6 和图 7B 中的表 7 表明了这些样品的结果。在乙醇生产方面,结果是类似的。但是,酵母对其它代谢物,比如,甘油、乳酸和乙酸的摄取表明所使用的两个底物之间的生长模式的差异。最终,通过优化酶剂量的水平,淀粉生长样品的葡萄糖含量可保持足够低,从而不生产乙醇 (如实施例 1 可见)。酶剂量会根据淀粉装载量、温度、繁殖的长度、酶表达菌株、酶活性、淀粉来源,和酵母菌株而变化。此外,在一些实施方案中,在繁殖一段时间之后,加入较高水平的酶,使得葡萄糖生产与增加的正在繁殖的细胞匹配可能是可取的。

[0089] 实施例 4

[0090] 在该实施例中,进行研究,将实施例 3 中生长的酵母细胞用于接种标准实验室冷煮发酵。如图 4 可见,通过在基于玉米的培养基中繁殖酵母菌株并接种到冷煮发酵中,发酵中的外源糖化酶剂量可以减少 60%。

[0091] 在该实施例图 400 中,水平轴 404 显示了该酶负载水平,竖直轴 402 显示了乙醇产量。在低酶剂量下,在淀粉培养基上繁殖酵母基本上比在葡萄糖上种植酵母进行得更好。这表明在繁殖阶段,表达酶的基因修饰的酵母菌株生产一些淀粉分解酶。

[0092] 实施例 5

[0093] 在该实施例中,修改协议,在将酵母种菌加入繁殖反应器中 3 小时之后,加入淀粉分解酶。酶的延迟加入有助于在酵母开始生长之前不产生另外的葡萄糖。也使用优选的酶剂量。可以加入活性干燥形式或稳定的液体乳霜形式的酵母或来自生长在实验室,补充有葡萄糖的无菌酵母提取物、蛋白胨培养基中的冷冻小瓶的酵母。繁殖培养基由磨碎的玉米粉和来自玉米乙醇生物精炼厂的 20g 干固体 /L 的稀酒糟组成,磨碎的玉米粉的剂量水平为能在反应器中提供干重约 3% 淀粉。以 0.24g/L (~ 4mM) 加入尿素。加入终浓度为 5ppm 的 Lactoside247™ (通过商业途径从 Lallemand Ethanol Technology, Milwaukee, WI 公司获得) 以防止细菌污染。接着,用氢氧化铵将该培养基的 pH 调节到 5.0。繁殖温度设定为 31.1℃ (88° F)。将内容物充分混合和以 0.1g (干酵母) /L 接种酵母。打开空气并且通气设定为每分钟每体积培养基 1 体积空气 (vvm), 并且搅拌设定为 450rpm。在酵母接种 3 小时之后,掺入酶,加入 BPX10.5。基于所使用的酶剂量真菌 α 淀粉酶和葡萄糖淀粉酶的对活性分别为 0.07FAU-F/g 干固体 0.74AGU/g 杆固体。连续繁殖 16 小时之后,获得增加大约 100 倍的酵母。下文的表 7 和 8 展示了重复试验的酵母有氧生长 16h 之后的糖、有机酸和乙醇。

[0094] 酵母在稀酒糟作为营养源的基于淀粉的培养基中有氧生长 16h 之后的糖、有机酸和乙醇

[0095]

时间(h)	麦芽糖 (% w/v)	葡萄糖 (% w/v)	乳酸 (ppm)	乙酸 (ppm)	乙醇 (% v/v)	甘油 (% w/v)
0	0.069	0.138	426.779	147.631	0.058	0.291
3	0.019	0.047	431.82	162.749	0.154	0.298
16	0.01	0.016	35.382	9.664	0.04	0.139

[0096] 表 7

[0097]

时间 (h)	麦芽糖 (% w/v)	葡萄糖 (% w/v)	乳酸 (ppm)	乙酸 (ppm)	乙醇 (% v/v)	甘油 (% w/v)
0	0.067	0.137	426.747	147.831	0.058	0.289
3	0.018	0.045	427.024	162.981	0.154	0.296
16	0.013	0.011	25.804	ND	0.012	0.097

[0098] 表 8

[0099] ***

[0100] 本申请 (包括附图和实施例) 中所公开和描述的实施例,其目的在于对本发明进行解释和说明。还可以对所公开的实施例,例如所用 (或将要使用的) 仪器和工艺以及所

用（或将要使用的）组合物和处理进行改进和变形；所有此类改进和变形均应当涵盖在本发明的范围之内。

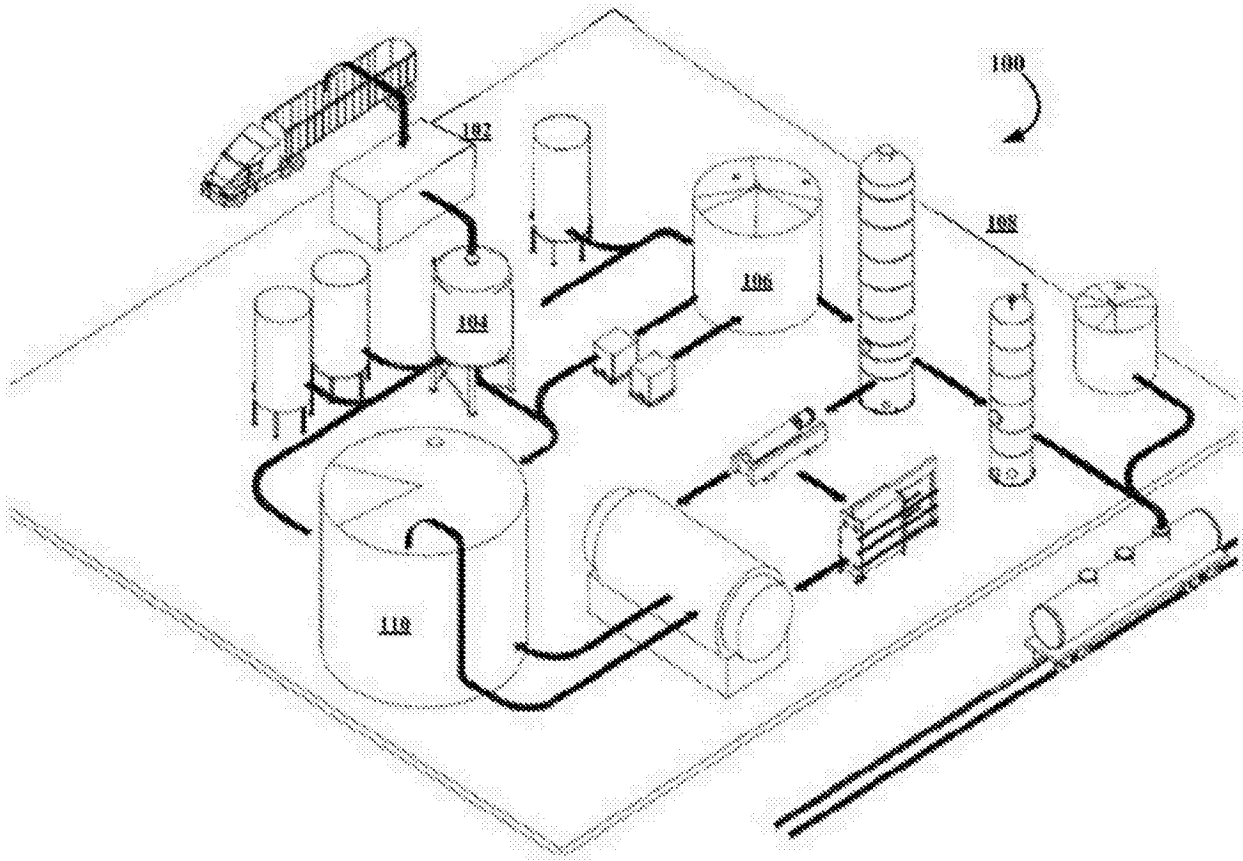


图 1

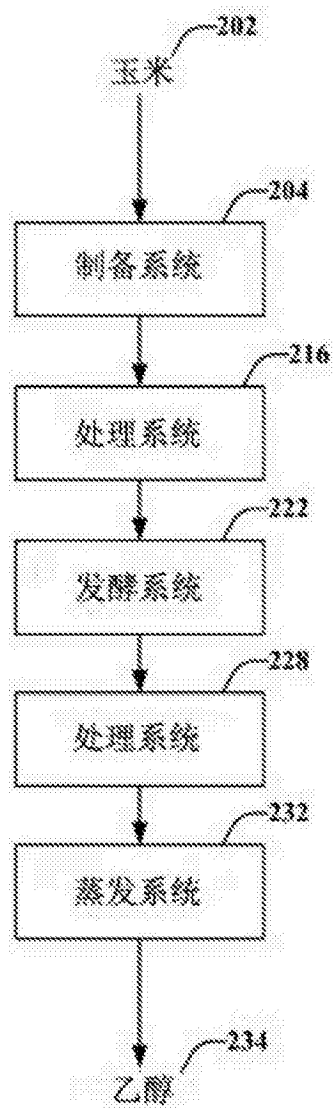


图 2A

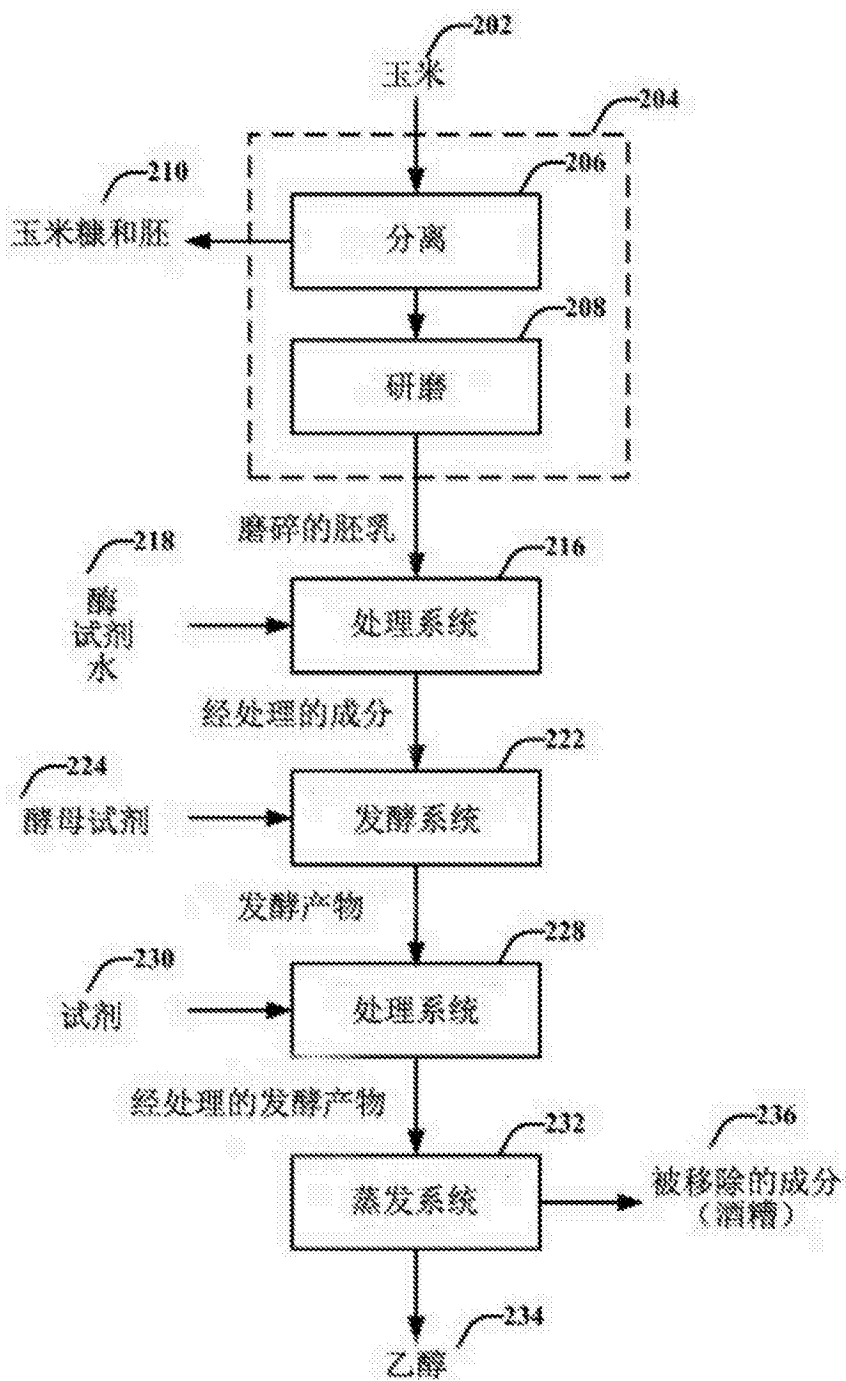


图 2B

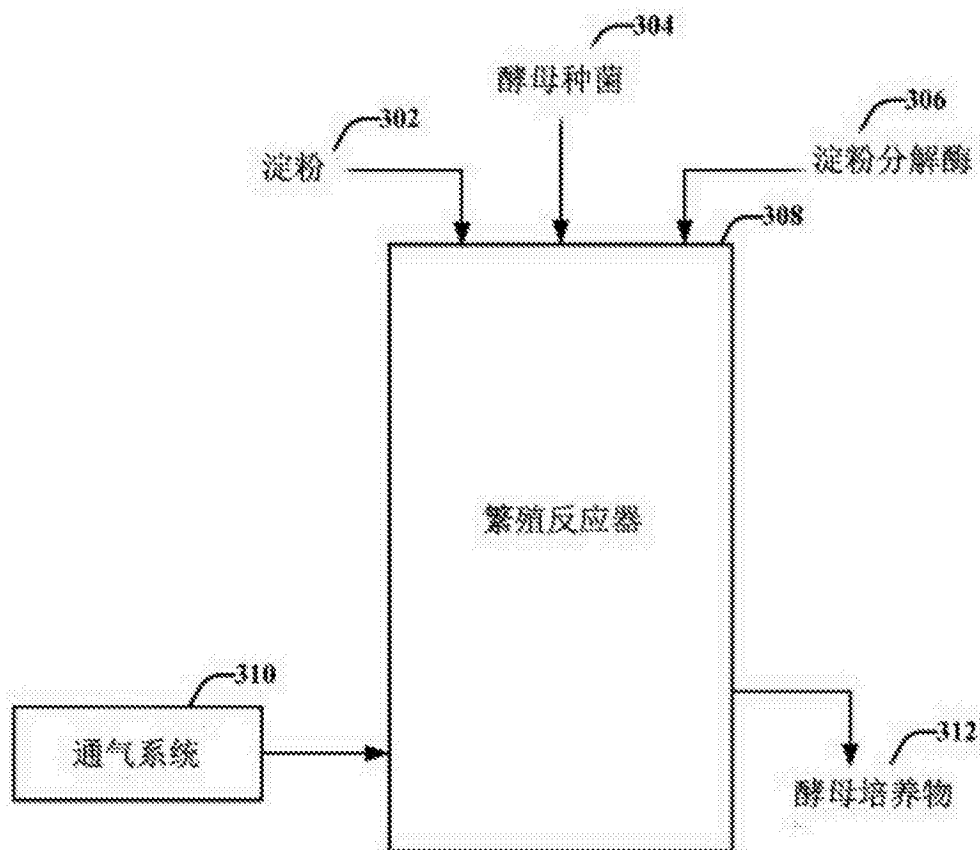


图 3

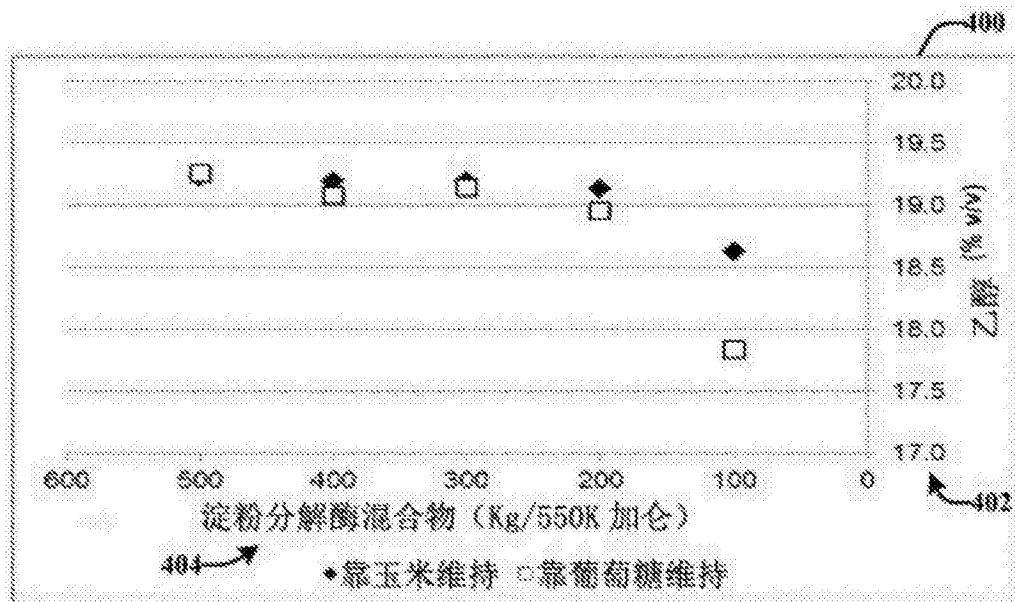


图 4

酿酒酵母在基于淀粉的培养基上有氧生长 24 小时后的糖、有机酸和乙醇

时间 (h)	麦芽糖 (% w/v)	葡萄糖 (% w/v)	乳酸 (ppm)	乙酸 (ppm)	乙醇 (% v/v)	甘油 (% w/v)
0	0.10	0.276	719.283	214.207	0.11	0.553
6	0.07	0.022	701.436	211.126	0.89	0.57
24	0.00	0.005	ND	ND	0.01	0.01

表 1

在基于淀粉的培养基上培养 24 小时后的糖、有机酸和乙醇

时间 (h)	麦芽糖 (% w/v)	葡萄糖 (% w/v)	乳酸 (ppm)	乙酸 (ppm)	乙醇 (% v/v)	甘油 (% w/v)
0	0.10	0.27	705.77	222.328	0.05	0.546
6	0.09	1.541	729.008	201.166	0.05	0.55
24	0.08	2.168	735.03	94.267	0.09	0.56

表 2

修饰的酿酒酵母在基于淀粉的培养基上有氧生长 24 小时后的糖、有机酸和乙醇

时间 (h)	麦芽糖 (% w/v)	葡萄糖 (% w/v)	乳酸 (ppm)	乙酸 (ppm)	乙醇 (% v/v)	甘油 (% w/v)
0	0.06	0.346	446.196	217.639	0.06	0.487
6	0.06	0.242	461.507	242.191	0.75	0.50
24	0.01	0.007	39.653	26.637	0.01	0.01

表 3

未修饰的酿酒酵母在基于淀粉的培养基上有氧生长
24 小时后的糖、有机酸和乙醇

时间 (h)	麦芽糖 (% w/v)	葡萄糖 (% w/v)	乳酸 (ppm)	乙酸 (ppm)	乙醇 (% v/v)	甘油 (% w/v)
0	0.09	0.358	447.575	216.911	0.01	0.489
6	0.07	1.194	451.015	172.904	0.19	0.50
24	0.01	0.007	47.746	33.221	0.01	0.01

表 4

酿酒酵母在基于淀粉的培养基上有氧生长
24 小时后的糖、有机酸和乙醇

时间 (h)	麦芽糖 (% w/v)	葡萄糖 (% w/v)	乳酸 (ppm)	乙酸 (ppm)	乙醇 (% v/v)	甘油 (% w/v)
0	0.22	0.173	524.912	232.386	0.06	0.556
5.5	0.05	1.429	455.891	204.152	0.71	0.55
21	0.01	ND	45.043	69.374	1.63	0.15
24	0.01	ND	65.925	87.183	1.34	0.06

表 5

酿酒酵母在基于葡萄糖的培养基上有氧生长
24 小时后的葡萄糖、有机酸和乙醇

时间 (h)	葡萄糖 (% w/v)	乳酸 (ppm)	乙酸 (ppm)	乙醇 (% v/v)	甘油 (% w/v)
0	6.138	404.575	170.39	0.04	0.477
5.5	4.8	413.131	224.094	0.80	0.52
21	0.007	28.556	73.778	1.658	0.205
24	ND	33.948	73.793	1.30	0.119

表 6