



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105229155 B

(45) 授权公告日 2020.11.03

(21) 申请号 201480014532.9

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2014.03.12

C12P 7/08 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105229155 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2016.01.06

WO 2011159915 A1, 2011.12.22

(30) 优先权数据

WO 2012071657 A1, 2012.06.07

13/798,617 2013.03.13 US

WO 2012100187 A1, 2012.07.26

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Bjorn Alriksson et al.. Cellulase Production from Spent Lignocellulose Hydrolysates by Recombinant Aspergillus niger..《APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY》.2009, 第75卷(第8期), 2366-2374.

2015.09.11

Linda Davis et al.. Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant Zymomonas mobilis..《BIOMASS AND BIOENERGY》.2005, 49-59.

(86) PCT国际申请的申请数据

Youngmi Kim et al.. Effect of compositional variability of distillers' grains on cellulosic ethanol production..《BIORESOURCE TECHNOLOGY》.2010, (第101期), 5385-5393.

PCT/US2014/024014 2014.03.12

审查员 马驰

(87) PCT国际申请的公布数据

权利要求书2页 说明书9页 附图5页

W02014/159529 EN 2014.10.02

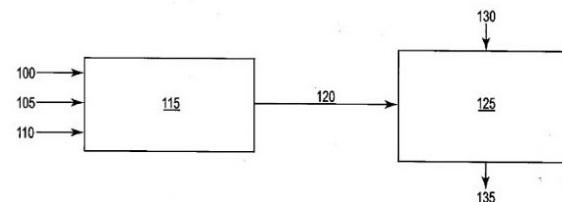
(73) 专利权人 波特研究公司

地址 美国南达科塔

(72) 发明人 尼拉康塔姆·V·纳雷德拉纳斯

(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



(54) 发明名称

繁殖生物体及相关方法和组合物

(57) 摘要

本发明涉及在繁殖培养基中利用包括木糖(例如,来自预处理木质纤维素原料的木糖糖浆)的碳源和/或包括酒糟成分(例如,从玉米制乙醇过程中获得的稀酒糟)的营养源繁殖一种或多种生物体的方法。该生物体包括通过发酵可以将一种或多种单糖转化成醇的那些生物体,比如酵母。本发明还涉及相关的组合物。

1. 一种繁殖生物体的方法,所述生物体能够将一种或多种单糖转化为生化物质,所述方法包括:

提供所述生物体的第一细胞团,其中所述生物体包括一种或多种产乙醇菌;

提供碳源,所述碳源能够支持所述生物体的第一细胞团的生长,其中所述碳源包括木糖;

提供营养源,所述营养源能够支持所述生物体的第一细胞团的生长,其中所述营养源包括酒糟成分,且其中所述酒糟成分包括稀酒糟,所述稀酒糟为发酵谷物的副产物;

至少将所述碳源与所述营养源结合,以形成用于繁殖所述生物体的培养基,其中木糖和稀酒糟固体的重量比为0.5至2.5;以及

将所述生物体的第一细胞团与所述碳源和所述营养源结合,其中包括产乙醇菌的培养基在有氧条件下通气以在一时间段内繁殖所述生物体的第一细胞团,从而形成所述生物体的第二细胞团。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述第一细胞团以每升培养基少于1.0克产乙醇菌的数量存在。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述第一细胞团以每升培养基少于0.1克产乙醇菌的数量存在。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,在12至48小时的时间段范围内,所述产乙醇菌的第二细胞团以每升培养基1至20克产乙醇菌的数量存在,其中,当所述产乙醇菌的第一细胞团与所述碳源和所述营养源结合以繁殖所述产乙醇菌的第一细胞团时,所述时间段开始。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,该一种或多种产乙醇菌包括至少能将木糖代谢成乙醇的酵母。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述酵母包括至少能将木糖代谢成乙醇的、基因修饰的酵母。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述基因修饰的酵母包括基因修饰的酿酒酵母。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述谷物包括整个玉米籽粒的至少一部分。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述酒糟成分包括稀酒糟,并且所述稀酒糟的提供量为每升培养基5至35克固体。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述木糖的提供量为培养基重量的0.1%至10%。

11. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述生物体的第一细胞团与所述碳源和所述营养源结合以繁殖所述生物体的第一细胞团,从而按分批过程形成所述生物体的第二细胞团。

12. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述碳源包括木糖溶液,所述木糖溶液为至少用水对木质纤维素底物进行预处理的副产物。

13. 根据权利要求12所述的方法,其特征在于,经过预处理的该木质纤维素底物来自玉米芯,玉米秆,或其组合。

14. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在所述时间段的至少一部分中,所述生物体暴露于有氧条件。

15. 一种繁殖生物体的方法,所述生物体能够将一种或多种单糖转化成生化物质,所述方法包括:

提供所述生物体的第一细胞团,其中所述生物体包括一种或多种产乙醇菌;

提供碳源,所述碳源能够支持所述生物体的第一细胞团的生长,其中所述碳源包括木糖;

提供营养源,所述营养源能够支持所述生物体的第一细胞团的生长,其中所述营养源包括酒糟成分,且其中所述酒糟成分包括稀酒糟,所述稀酒糟为发酵谷物的副产物;

至少将所述碳源与所述营养源结合,以形成用于繁殖所述生物体的培养基;其中所述第一细胞团以每升培养基少于1.0克生物体的数量存在,且其中木糖和稀酒糟固体的重量比为0.5至2.5;以及

将所述生物体的第一细胞团与所述碳源和所述营养源结合,其中包括产乙醇菌的培养基在有氧条件下通气以在一时间段内繁殖所述生物体的第一细胞团,从而形成所述生物体的第二细胞团。

16. 根据权利要求15所述的方法,其特征在于,所述生物体包括基因修饰的酿酒酵母。

繁殖生物体及相关方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年3月13日提交的、申请号为13/798,617且名称为“PROPAGATING AN ORGANISM AND RELATED METHODS AND COMPOSITIONS”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] 本发明涉及繁殖一种或多种生物体，该生物体可以通过发酵将一种或多种单糖转化为醇，比如乙醇。

背景技术

[0004] 可以将一种或多种单糖转化成一种或多种生化物质的，比如生物燃料，的生物体是众所周知的。例如，基因修饰(被称为GM)的酵母和非转基因修饰(被称为非GM)的酵母都是可以通过发酵将糖转化为醇，比如乙醇和丁醇的众所周知的生物体。

[0005] 通常，这样的生物体由制造商，例如，乙醇制造商，繁殖以产生用户想要的细胞团。但是，相比其它生物体，许多生物体是相当昂贵的。例如，比起非GM酵母，许多GM酵母可能是相对非常昂贵的。因此，在一些情况下，购买尽可能少的GM酵母，然后其可以使该酵母再生，以提供足够用于发酵的数量，对于乙醇制造商来说在经济上可能是可取的。

[0006] 但是，繁殖酵母可能具有挑战性。例如，当在葡萄糖上生长时，即使在高度通气的条件下，如果培养基中葡萄糖浓度过高(例如，每升超过5克)，一些生物体(比如，酿酒酵母)易受众所周知的“克勒勃屈利效应(Crabtree effect)”的影响。如果葡萄糖水平变得过高，酵母可以开始通过发酵途径制造乙醇，而非通过呼吸途径产生更多酵母(即，高水平葡萄糖抑制呼吸)。为了帮助防止克勒勃屈利效应，酵母制造商通常通过分批补料使酵母生长或放慢进料过程，其中以避免过度生产乙醇的速率引入生产酵母生物质的碳源(葡萄糖)。但是，分批补料系统可以是相当昂贵的，对乙醇制造商的控制和管理构成挑战。

[0007] 由于控制分批处理可能相对更简单并且可能更能忍受处理参数的变化(例如，相对于碳源的变化水平和克勒勃屈利效应)，需要发展利用分批处理协议而非分批补料处理协议繁殖生物体(比如，酵母)的方法。此外，需要利用可选择的、更易于使用的、和/或繁殖培养基所用的更经济的成分(例如，碳源、营养源等等)。

发明内容

[0008] 本发明涉及使用营养源繁殖生物体的方法，该营养源包括酒糟成分(例如，稀酒糟)，优选来自玉米制乙醇过程的酒糟成分。令人惊讶地，包括酒糟成分作为繁殖培养基的营养源的一部分(或全部)可以提供像常规营养源(比如，酵母提取物)一样好，或比常规营养源的结果。此外，已经发现，非常低量的初始细胞团可以用于繁殖生物体，比如，酵母(例如，每升培养基低至1.0克酵母，每升培养基低至0.02克酵母，或甚至更低)

[0009] 此外，在繁殖培养基的营养成分中包括酒糟成分允许在木质纤维素乙醇过程中使

用来自玉米制乙醇过程的副产物。在两个过程在同一位置的情况下,这可以是特别方便的。

[0010] 进一步地,本发明涉及使用营养源和碳源繁殖生物体的方法,该营养源包括酒糟成分(例如,稀酒糟),该碳源具有木糖。对于可以使用木糖代替葡萄糖,或除了葡萄糖之外,使用木糖进行繁殖的生物体,使用木糖可以避免使用葡萄糖观察到的克勒勃屈利效应。例如,木糖水平可以在广泛的范围变化(例如,包括与会引起克勒勃屈利效应的葡萄糖水平对应的水平),但是通过有氧呼吸途径的繁殖会继续,而不转变成厌氧发酵途径从而过度生产乙醇。可以以这种方式使用木糖的生物体包括一些基因修饰的酵母。有利地,使用木糖可以防止“污染物”酵母(比如,野生型酿酒酵母)与目标为繁殖的生物体竞争。

[0011] 进一步地,因为利用木糖可以避免克勒勃屈利效应,可以利用分批处理进行繁殖。

[0012] 最后,在碳源中包括木糖可以有利地使酵母适应预期的发酵环境,这可以帮助酵母更有效地进行发酵。

[0013] 根据本发明的一个方面,一种繁殖生物体的方法,该生物体可以将一种或多种单糖转化成生化物质,该方法包括:

[0014] 提供该生物体的第一细胞团;

[0015] 提供碳源,该碳源可以支持生物体的第一细胞团的生长,其中该碳源至少包括木糖;

[0016] 提供营养源,该营养源可以支持该生物体的第一细胞团的生长,其中该营养源包括酒糟成分;

[0017] 至少使该碳源和该营养源结合以形成用于繁殖该生物体的培养基;以及

[0018] 使该生物体的第一细胞团与该碳源和该营养源结合,以在一段时间繁殖该生物体的第一细胞团,从而形成生物体的第二细胞团。

[0019] 根据本发明的另一方面,一种繁殖生物体的方法,该生物体可以将一种或多种单糖转化成生化物质,该方法包括:

[0020] 提供该生物体的第一细胞团;

[0021] 提供碳源,该碳源可以支持生物体的第一细胞团的生长,其中该碳源包括至少一种或多种单糖;

[0022] 提供营养源,该营养源可以支持该生物体的第一细胞团的生长,其中该营养源包括酒糟成分;

[0023] 至少使该碳源和该营养源结合以形成用于繁殖该生物体的培养基;其中该第一细胞团以每升培养基少于1.0克生物体的数量存在;以及

[0024] 使该生物体的第一细胞团与该碳源和该营养源结合,以在一段时间繁殖该生物体的第一细胞团,从而形成生物体的第二细胞团。

[0025] 根据本发明的另一方面,一种组合物包括:

[0026] 生物体的第一细胞团,所述生物体可以将一种或多种单糖转化成生化物质,其中该生物体以每升组合物少于1.0克生物体的数量存在。

[0027] 木糖,数量范围为所述组合物重量的0.1%至10%;以及

[0028] 酒糟成分,数量范围为每升组合物5克至35克。

[0029] 在优选的实施例中,该生物体包括基因修饰的酿酒酵母,特别是可以将木糖和葡萄糖转化为乙醇的基因修饰的酿酒酵母。

附图说明

[0030] 图1展示了根据本发明的用于繁殖可以将一种或多种单糖转化为生化物质的生物体的繁殖系统的流程图。

[0031] 图2展示了在木质纤维素乙醇系统与玉米谷物制乙醇系统在同一位置的背景下，根据本发明的用于繁殖可以将一种或多种单糖转化为生化物质的生物体的繁殖系统的流程图。

[0032] 图3A和3B分别展示了酿酒酵母的基因修饰菌株在培养基中生产的乙醇的表和图，该培养基含有各种水平的木糖，且补充酵母提取物，蛋白胨或稀酒糟作为营养源。

[0033] 图4A和4B分别展示了由酿酒酵母的基因修饰菌株在培养基中发酵后生产的乙醇的表和图，该培养基具有11 w/v%木糖，且补充各种水平的稀酒糟。

[0034] 图5A展示了使用纯木糖作为碳源和来自玉米-乙醇生物精炼厂的稀酒糟作为营养源的酿酒酵母的基因修饰菌株的细胞生长的图。

[0035] 图5B展示了酿酒酵母的基因修饰菌株使用来自稀酸预处理的木质纤维素生物质的木糖溶液作为碳源和来自玉米制乙醇生物精炼厂的稀酒糟作为营养源的细胞生长的图。

具体实施方式

[0036] 本发明涉及繁殖可以将一种或多种单糖转化为生化物质的生物体。繁殖这样的生物体在许多情况下是有用的。例如，繁殖可以用于使生物体的初始(例如，起始物)群落再生，从而产生足以用于发酵的更大的生物体群落以制造发酵产物。图1展示了典型的处理流程图。如图1所示，生物体100的第一细胞团、碳源105，和营养源110在繁殖系统115中结合，使得第一细胞团100可以再生并且形成第二细胞团120。接着，第二细胞团可以用于发酵系统125，从而将一种或多种单糖(例如，来自预处理的木糖纤维素生物体)130转化成包括生化物质比如生物燃料(例如，乙醇、丁醇，等等)的发酵产物135。

[0037] 可以将一种或多种单糖转化为生化物质的生物体是众所周知的，并且包括，例如，细菌和/或真菌，比如，酵母。生产的生化物质可以根据所提供的条件而变化。在许多实施例中，该生化物质包括生物燃料，比如，乙醇、丁醇，等等。在优选的实施例中，该生物体包括一种或多种产乙醇的生物体(即，“产乙醇菌(ethanologens)”)。在此使用的“产乙醇菌”指的是可以将一种或多种单糖(例如，葡萄糖、木糖，等等)至少转化成乙醇的微生物。产乙醇的生物体可以是原核生物和/或真核生物，比如，大肠杆菌(*Escherichia coli*)、产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)、运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)、热纤维梭菌(*Clostridium thermocellum*)、酿酒酵母，和/或毕赤酵母(*Pichia stipitis*)。在优选实施例中，产乙醇菌包括至少能将木糖代谢为乙醇的酵母。可以至少将木糖代谢为乙醇的酵母的例子包括基因修饰的重组酵母。在优选实施例中，这样的基因修饰的酵母包括基因修饰的重组酿酒酵母。根据一个实施例，产乙醇菌为改变成将木糖和葡萄糖转化成乙醇的酿酒酵母的菌株(即，从专利号为7,622,284的美国专利中所述的生物体获得的基因修饰的酵母)。

[0038] 在此使用的“碳源”指的是包括至少一个碳原子并且可以被生物体比如产乙醇菌利用以生长和/或再生，从而增加产乙醇菌的细胞团的一种或多种化合物。典型的碳源包括，但不限于：单糖，比如，葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露糖、木糖，等等；二糖，比如，乳糖、麦芽

糖、蔗糖、纤维二糖，等等；低聚糖；多糖，比如，纤维素、半纤维素、淀粉、木聚糖，等等；仅包括一个碳原子的单碳底物，比如，甲醇；和多元醇，比如甘油。

[0039] 在优选实施例中，该碳源至少包括木糖。在一些实施例中，该碳源基本上可以包括全部木糖，几乎没有葡萄糖。用于本发明的木糖可以从许多不同来源获得。优选地，根据本发明的繁殖产乙醇菌的方法中所用的至少部分木糖包括从处理原料（比如，将由产乙醇菌发酵以制造乙醇的木质纤维素原料）获得的木糖溶液。以产生木糖溶液的方式处理木质纤维素原料是众所周知的并且公布于，例如，申请日为2010年3月3日的美国系列号12/717,002，专利号为5,424,417的美国专利（Torget等人），专利号为6,022,419的美国专利（Torget等人），所述文献的全部内容通过引用结合在本文中用于所有目的。

[0040] 结合图2描述处理木质纤维素原料以提供根据本发明的繁殖生物体所用的木糖。图2展示了生物精炼厂的流程图，该生物精炼厂包括与基于玉米的乙醇生产设备（该基于玉米的乙醇生产设备由包含在玉米粒中的淀粉生产乙醇）在同一位置的木质纤维素乙醇生产设备（该木质纤维素乙醇生产设备由预处理木质纤维素材料获得的糖生产乙醇）。使两个乙醇生产设备在同一位置可以共享某些工厂系统，例如，用于脱水、储存、乙醇的变性和运输的系统，能量/燃料-能量生成系统、工厂管理和控制系统，及其它系统。玉米纤维（玉米粒的成分，当在基于玉米的乙醇生产设备中通过研磨（例如，通过分馏法）制备玉米粒时可以获得该玉米纤维）可以供应至木质纤维素乙醇生产设备作为原料。燃料或能源，比如，来自该木质纤维素乙醇生产设备的甲烷或木质素可以用于向在同一位置的两个设备或任何一个设备供电。根据其它可替换的实施例，生物精炼厂（例如，木质纤维素乙醇生产设备）可以与其它类型的工厂和设备，例如，发电厂、废物处理设备、木材厂、处理农产品的造纸厂或设备在同一位置。

[0041] 如图2所示，在系统265中对木质纤维素260进行预处理，从而产生木糖溶液270，木糖溶液270可以用于根据本发明的繁殖系统115中。

[0042] 典型的原料260包括所有类型的生物质，比如，来自一种或多种谷物和/或一种或多种木质纤维素底物的纤维材料，比如硬木材、草、软木材、废纸和纸浆、城市废物、农业废物如稻草、玉米芯、玉米秆，及其混合物。木质纤维素原料是众所周知的并且包括纤维素、半纤维素和木质素。在优选的实施例中，用于生产木糖的原料包括来自玉米植物的植物材料。比如，玉米芯、玉米皮、叶和茎。例如，按重量计算，该植物材料包括高达100%芯；高达100%皮/叶；约50%芯和约50%皮/叶；约30%芯和约50%皮/叶，以及约20%茎；以及来自玉米植物的芯、皮/叶和茎的其它任何组合。典型地，玉米茎包括茎的上半部或四分之三部分。根据可替换的实施例，木质纤维素植物材料可以包括来自玉米粒的纤维（例如，与其它植物材料的一些组合）。在典型的实施例中，（来自玉米植物的）生物质的木质纤维素植物材料包括（按重量计算）约30%至55%的纤维素、约20%至50%的半纤维素，和约10%至25%的木质素。在一些实施例中，该生物质的木质纤维素植物材料（来自玉米植物的芯、皮/叶和茎部分）包括（按重量计算）约35%至45%的纤维素、约24%至42%的半纤维素，和约12%至20%的木质素。

[0043] 预处理系统265可以包括一个或多个用于制备和对原料260进行预处理的子系统。制备生物质的子系统可以包括用于接收/卸载生物质、清洁（例如去除杂质）、碾磨（例如研磨、还原或致密化）、运输并转移至工厂进行加工的装置。根据典型的实施例，玉米芯和秆形式的生物质可以递送至生物精炼厂并贮藏（例如，以成捆、成堆或成箱等形式），并进行管理

以在设备中使用。根据其它典型的实施例，生物精炼厂的制备子系统可以被配置成制备各种类型的生物质(例如，植物材料)，以在工厂中处理和加工成乙醇和其他副产物。根据优选实施例，在制备子系统(未示出)制备并净化包括来自玉米植物的植物材料的生物质。

[0044] 制备后，可以根据众所周知的技术对生物质进行预处理以产生C5和/或C6糖。例如，生物质可以与水混合成浆料以促进该生物质(例如，通过水解)分解成C5和/或C6糖。在一些实施例中，预处理系统265可以包括将酸加入制备好的生物质中，从而促进该生物质分解，以分离成液体成分(C5流，可回收供发酵的C5糖)和固体成分(C6流，可得到供发酵C6糖)。

[0045] 根据优选实施例，可以在确定的操作条件下(即，酸浓度、pH、温度、时间、压力、固体负载、流速、加工用水或蒸汽的供应等)将酸施加于反应容器中的生物质中，并且可以在反应容器中搅拌/混合该生物质，以促进生物质的分解。根据典型实施例，可以将酸(比如，硫酸、盐酸、硝酸等等，或酸的制剂/混合物)施加至该生物质。根据特别优选的实施例，将硫酸施加至预处理的生物质中。

[0046] 在典型实施例中，液体成分(C5流)包括水、可以用于发酵成乙醇和/或产乙醇菌的繁殖的已溶解的糖(比如，木糖、阿拉伯糖和葡萄糖)、酸和其它从半纤维素中回收的可溶成分。根据典型实施例，该液体成分可以包括大约5%至大约7%固体成分(即，悬浮/残留固体，比如部分水解的半纤维素、纤维素和木质素)。根据特别优选的实施例，该液体成分会包括至少2%至4%木糖(按重量计算)。根据其它实施例，该液体成分包括不少于1%至大约2%的木糖(按重量计算)。在一些实施例中，生物质的预处理会产生液体成分和固体成分，该液体成分包括(按重量计算)不少于1.0%的木糖，该固体成分包括不少于40%的纤维素(从该纤维素可以获得葡萄糖)。

[0047] 系统265中产生的至少部分木糖可以通过流270转移至繁殖系统115，并且用作繁殖生物体的在此所述的碳源。如图2所示，在系统275中可选地处理来自预处理系统265的木糖流270，从而，例如，移除和/或回收副产物，比如，固体、有机酸、糠醛、和/或类似物。

[0048] 在许多实施例中，系统265中产生的一些木糖与系统265中产生的至少一部分C6糖一起转移至发酵系统125中，并且通过系统115中生产的生物质转化成乙醇。

[0049] 接着，来自发酵系统125的发酵产物供应至蒸馏系统280，其中回收乙醇。

[0050] 再次参见图1，可以提供木糖作为一部分(所有的)碳源105，其数量能够有助于在所需时间内使所需数量生物体的再生(繁殖)。所提供的木糖的数量可以取决于下面的因素：比如，所存在的其它碳源的种类和数量、所存在的营养源的种类和数量、pH、温度、繁殖所需的时间段，等等。在一些实施例中，木糖的数量范围占培养基重量的0.1%至10%，优选占培养基重量的0.5%至5%(下文将讨论培养基)。

[0051] 除了碳源之外，还包括营养源，以帮助繁殖生物体，比如产乙醇菌。在此使用的“营养源”指的是可以被生物体，比如产乙醇菌利用以生长和/或再生，从而增加产乙醇菌的细胞团的一种或多种材料。营养源的常规来源是众所周知的并且包括，例如，酵母提取物。可以用于繁殖生物体，比如酵母的常规营养可以通过商业途径从Scott Laboratories Ltd, Pickering, ON, Canada的商品GO-FERM获得。

[0052] 根据本发明，该营养源包括酒糟成分。酒糟是众所周知的并且是蒸馏发酵产物的副产物。例如，制备酒糟的众所周知的过程是玉米谷物制乙醇过程，结合图2，进行解释。如

图2所示,在系统205中制备谷物比如玉米、大麦、小麦,和/或高粱200,从而使其可以在系统205中发酵成发酵产物,该发酵产物包括一种或多种生化物质,比如乙醇。可以使用全谷物或仅使用谷物的一个部分或多个部分。例如,系统205可以研磨用于发酵的全谷物或在研磨之前将谷物分离成一个或多个分离的部分。还可以从已经发酵且蒸馏的木质纤维素原料获得酒糟,并且在此被称为“纤维素的全酒糟”。优选至少部分从一种或多种谷物来源,比如,玉米粒,获得的酒糟。研磨之后,研磨好的谷物可以进一步加工以使多糖和/或低聚糖分解成可以通过,例如,酵母发酵的一种或多种单糖,比如葡萄糖。将多糖(比如,淀粉)分解成葡萄糖的方法是众所周知的,并且包括,例如,热水(比如,包括添加酸如硫酸的热水)和/或酶预处理。在发酵210之后,在系统215中蒸馏发酵产物,在蒸馏塔中将乙醇220从发酵液中移除。移除乙醇220之后,移除剩下的残余物作为酒糟残余物230。酒糟残余物230被称为“全酒糟”。全酒糟230可选地由一个或多个系统240进一步加工,从而在被递送至繁殖系统115之前,提炼该全酒糟。例如,全酒糟230可以进行固体-液体分离处理,从而生产残余物的固体流(也称为湿滤饼)和残余物的液体流(也称为稀酒糟)。该稀酒糟可以进一步加工以通过蒸发提高固体浓度,得到浓缩的可溶性酒糟或糖浆。另外,通过离心从该稀酒糟中移除至少一部分悬浮固体可以进一步提炼该稀酒糟,从而生产“澄清的”稀酒糟。注意,在许多常规玉米乙醇过程中,糖浆与分离的固体流或湿滤饼混合,且投入到转筒烘干机中以移除剩余的水分。所得的干燥固体通常被称为可溶性干酒糟(Dried Distillers Grains and Solubles)或“DDGS”,并且可以作为动物饲料出售。

[0053] 但是,根据本发明,来自谷物制乙醇生产过程的酒糟残余物,包括全酒糟、稀酒糟,和/或糖浆,可以形成酒糟成分,从而用作繁殖生物体(比如,酵母)的至少部分营养源。相比,例如,酵母提取物,使用至少一种酒糟成分提供可替换的或另外的营养源,且通过利用来自一个过程的至少一部分副产物(全酒糟)作为其它过程的投入,可以从在同一位置的谷物制乙醇和木质纤维素乙醇过程中得到好处。申请人已经发现,利用酒糟成分可以繁殖酵母以及,甚至比其它营养源,比如酵母提取物更好。

[0054] 在一些实施例中,该营养源包括酒糟成分,该酒糟成分包括全酒糟、稀酒糟、从稀酒糟获得的糖浆,及其任何组合。优选地,该酒糟成分包括从稀酒糟获得的糖浆、稀酒糟,或其组合。

[0055] 所提供的酒糟成分可以为任何数量以有助于在给定时间内再生(繁殖)且产生所需数量的生物体(例如,产乙醇菌)。所提供的酒糟成分的数量可以取决于如下因素,比如所存在的其它营养源种类和数量、所存在的碳源的种类和数量、pH、温度、繁殖所需时间段,等等。在一些实施例中,该营养源包括从全玉米谷物获得的稀酒糟,数量范围为每升培养基5至35克固体(下文将讨论培养基)。

[0056] 下文将结合产乙醇菌,比如用于由预处理木质纤维素材料获得的材料制备乙醇的基因修饰的酵母,描述繁殖根据本发明的可以将一种或多种单糖转化为生化物质的生物体。但是,如上文所解释,本发明不限于繁殖这种酵母。

[0057] 如图1所示,繁殖产乙醇菌包括至少结合碳源105和营养源110以形成培养基,从而促进接种(即,待供应的产乙醇菌种菌)到发酵系统125中所用的足量的产乙醇菌(即,产乙醇菌团)的生长。可以在培养基形成时、培养基形成后,或在培养基形成时和培养基形成后加入该生物体(例如,产乙醇菌)100的第一细胞团。

[0058] 根据典型实施例,用于繁殖系统115的生长培养基包括水、具有酒糟成分(例如,稀酒糟)的营养源110、具有木糖的碳源105,以及,可选地,一种或多种另外的试剂(未示出)。

[0059] 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,供应给产乙醇菌的试剂,比如,抗生素、额外的酶或辅酶、用于调节和保持pH的材料、向生物体提供营养或其它的好处的营养或其它成分。可选的另外的营养包括,例如,酵母提取物、尿素、磷酸二铵、硫酸镁、硫酸锌或其它盐,等等。

[0060] 选择营养源和碳源的比率,以使生物体的所需细胞团(比如,大小足以用于发酵的酵母细胞团)在木质纤维素乙醇过程中生长。选择营养源和碳源的比率的因素包括营养源的种类和数量、碳源的种类和数量、附加的生长培养基试剂的种类和数量、生物体的种类和起始数量、目的用于使生物体生长的时间段、pH、温度,等等。另外的考虑因素包括是否想要在繁殖期间使生物体适应发酵期间的预期环境。使生物体适应发酵环境可以有利于帮助该生物体更有效地工作(例如,将糖转化成乙醇)。

[0061] 在典型实施例中,该酒糟残余物包括稀酒糟并且木糖和酒糟固体的重量比范围为0.05至20,优选0.1至10,更优选0.2至5,甚至更优选0.5至2.5.

[0062] 当生物体存在于生长培养基,并且存在想要的条件时,可以开始繁殖该生物体。考虑用于繁殖生物体(比如,产乙醇菌)的条件包括,例如,组分的数量、pH、生物体生长的时间段、搅拌速度(如果存在搅拌)、暴露于氧气(通气)、温度,等等。

[0063] 在优选的实施例中,该生物体的第一细胞团(例如,起始细胞团)的数量为每升培养基少于10.0克产乙醇菌,优选每升培养基少于5.0克产乙醇菌,并且甚至更优选每升培养基少于0.1克产乙醇菌。

[0064] 取决于条件,该细胞团可以繁殖一段时间以生产想要的细胞团。通常,想要的细胞团的大小足够在经济上的理想时间段内使糖发酵为醇(例如,乙醇)。典型的时间段包括12-48小时,或甚至16-24小时。在典型实施例中,在8至48小时范围的时间段内,想要的(第二或最终的)产乙醇菌细胞团的数量范围为每升培养基0.5至40克产乙醇菌,其中当产乙醇菌的第一细胞团与碳源和营养源结合以繁殖产乙醇菌的第一细胞团时,该时间段开始。优选地,在12至48小时范围的时间段内,想要(第二或最终的)产乙醇菌细胞团的数量范围为每升培养基1至20克产乙醇菌,其中当产乙醇菌的第一细胞团与碳源和营养源结合以繁殖产乙醇菌的第一细胞团时,该时间段开始。

[0065] 根据生物体包括酵母的实施例,即使存在其它酵母(例如,作为污染物),该繁殖系统优先用于可以利用木糖作为碳源的酵母的选择性生长(即,将在包括木糖的培养基中繁殖的酵母);在将木糖作为唯一碳源的培养基中(即,不含有大量的葡萄糖的培养基),能利用木糖作为碳源繁殖的酵母会繁殖,且不可以利用木糖作为碳源繁殖的其它/污染物酵母(比如,在含有葡萄糖的培养基中繁殖的更普通形式的酵母)不会以相同比率繁殖(或根本不繁殖)。

[0066] 生长培养基的pH可以为这样的pH,其有助于在所需时间内再生(繁殖)和产生所需数量的生物体(例如,产乙醇菌)。在一些实施例中,该pH在4和8之间,优选在5和7之间,且更优选在5和6之间。调节和保持用于繁殖生物体(比如,产乙醇菌)的生长培养基的pH的技术是众所周知的,并且包括,例如,添加一种或多种酸性材料和/或添加一种或多种碱性材料。

[0067] 生长培养基的温度可以为有助于在所需时间内再生(繁殖)且产生所需数量的生

物体(例如,产乙醇菌)的温度。在一些实施例中,该温度范围为15°C至50°C,优选地为20°C至40°C,并且更优选地从25°C至40°C。

[0068] 可以根据连续处理、分批进料处理、分批处理,或其组合进行根据本发明的生物体(例如,酿酒酵母)繁殖。优选地,分批处理具有与其相关的特定好处。在一些实施例,比如繁殖酿酒酵母的实施例,作为碳源的木糖的数量使得不用担心众所周知“克勒勃屈利效应”,从而可以进行分批处理,而不生产过量的乙醇。即,在一些实施例中,与葡萄糖不同,相当高水平的木糖不会引起繁殖过程从呼吸途径转变成厌氧途径,从而产生乙醇而非再生和增加细胞团。分批处理可以是高度可取的,因为相比连续或分批进料处理,该分批处理可以相对更容易控制和管理。

[0069] 在优选实施例中,在至少部分繁殖过程中对该生长培养基通气和/或搅动(搅拌),从而有助于在该培养基中提供足够的氧气水平,促进有氧呼吸,以及,因此,使生物体再生,而不是,例如,进行厌氧发酵生产乙醇。在一些实施例中,如果没有向繁殖培养基提供足够的氧气,该过程可以转变成厌氧途径并且促进发酵,从而过度生产醇。优选地,在整个繁殖期间,进行通气。通气和搅拌的方法是众所周知的。典型的混合速度包括100至750rpms。典型的通气速率包括每体积单位的培养基每分钟(vvm)0.5至1体积单位的空气。在一些实施例中,如果不利用通气,该繁殖容器比发酵容器小约10倍。在一些实施例中,如果利用通气,该繁殖容器比发酵容器小约20至30倍。

[0070] 根据生物体包括酵母的典型实施例,为了使酵母在繁殖系统中生长(接种),在至少12小时内,该温度可以保持在约28至32摄氏度的范围,并且pH范围为约5.2至5.8。例如,可以在如下条件下接种酵母种菌:温度为约30摄氏度,并且pH为约5.5,保持约17小时。

[0071] 根据本发明的繁殖系统可以以一个或多个阶段进行。例如,在待繁殖生物体为酵母的情况下,该繁殖系统可以包括至少两个阶段。在第一阶段,酵母培养物可以生长成初始酵母种菌。在第一繁殖阶段,将该初始酵母种菌引入容器中并且稀释(例如,稀释250倍)。在该容器中,初始酵母种菌和一部分碳源(例如,包括木糖和/或其它糖的液体成分)、一部分营养源(例如,稀酒糟),以及水可以与可选的试剂(如上文所述)一起供应。根据典型实施例,温度保持在约26至37度的范围,并且pH在约3.5和6.5的范围,保持至少24小时。例如,在如下条件下,酵母可以在该第一繁殖阶段生长:温度为约30摄氏度,并且pH为约5.5,保持约24小时。

[0072] 在第二繁殖阶段,通常在将酵母种菌转移至另一容器之后,稀释(例如,稀释10倍)来自第一繁殖阶段的酵母种菌。在该容器中,来自第一繁殖阶段的酵母种菌和一部分碳源(即,包括木糖和/或其它糖的液体成分)、一部分营养源(例如,稀酒糟),和水与可选的试剂(如上文所述)一起供应。根据典型实施例,温度保持在约26至37度的范围,并且pH在约3.5和6.5的范围,保持至少24小时。例如,在如下条件下,酵母可以在该第二繁殖阶段生长:温度为约30摄氏度,并且pH为约5.5,保持约24小时。

[0073] 根据特别优选实施例,在第一阶段,酵母细胞团增长约200至500倍,而在第二阶段增长约20至40倍。

[0074] 在繁殖之后,向发酵系统,比如系统125提供产乙醇菌细胞团,从而使生物质(比如,预处理的木质纤维素材料)发酵,并且生产乙醇。

[0075] 下文结合实施例,进一步描述本发明。

[0076] 实施例1

[0077] 在该实施例中使用酵母生长和发酵系统以评价稀酒糟代替酵母提取物作为营养源的效果。该实施例测量由酿酒酵母的基因修饰菌株在补充酵母提取物,蛋白胨或稀酒糟作为营养源的含有各种水平的木糖的培养基中生产的乙醇。产乙醇菌为基因修饰的酵母(菌株编号:RN1016,从荷兰海尔伦的DSM获得)。试验在125ml爱伦美氏烧瓶中进行。每个烧瓶含有50ml试验用培养基:灭菌的酵母提取物,蛋白胨(YP)培养基或稀酒糟培养基。从坐落在SD苏格兰的BPX™过程干磨玉米乙醇生物精炼厂收集所使用的稀酒糟。将各种量的50 w/w%木糖溶液加入灭菌的YP培养基(酵母提取物和蛋白胨,每种物质的终浓度为10g/L),以得到所观察到的木糖浓度。另外,将各种量的50 w/w%木糖溶液加入含有稀酒糟的不同组的烧瓶中,以得到所观察到的木糖浓度。将木糖加入反应器中之后,每个反应器的pH调节到5.5。为了防止细菌污染,将通过商业途径从Lallemand Ethanol Technology of Milwaukee, WI公司获得的抗菌产品Lactoside247加入该反应器中,终浓度为8ppm。以62.5 mg/L (~1.04 mM) 将尿素加入含稀酒糟的反应器中。烧瓶中的培养基以每升0.5 - 0.6 g (干酵母) 接种制备好的培养物,并且在32摄氏度,以大约150rpm速率运行的水浴摇床中培养该烧瓶。定期取出样品,并且用高压液相色谱(HPLC)分析糖、有机酸&乙醇组合物。实施例1的数据如图3A的表和图3B的图所示。

[0078] 实施例2

[0079] 在实施例2中,确定稀酒糟的最优水平。该实施例测量酿酒酵母的基因修饰菌株和残余的木糖在具有11 w/v%木糖、补充各种水平的稀酒糟的培养基中发酵之后生产的乙醇。这些值为重复发酵的平均值。产乙醇菌为基因修饰的酵母(菌株编号:RN1016,从荷兰海尔伦的DSM获得)。木糖保持不变,为约11 w/v%,而稀酒糟的水平是变化 - 0%、20%、40%、60%和80%。在木糖与补充水在125ml爱伦美氏烧瓶中结合之后,调节烧瓶中培养基pH为5.5。将抗菌Lactoside247和尿素分别以8 ppm和62.5 mg/L加入烧瓶中。烧瓶中的培养基以每升0.5 - 0.6 g (干酵母) 接种制备好的培养物,并且在32摄氏度,速率大约150rpm的水浴摇床中培养该烧瓶。定期取出样品,并且用HPLC分析糖、有机酸&乙醇的组合物。实施例2的数据如图4A的表和图4B的图所示。

[0080] 实施例3

[0081] 在该实施例中使用酵母繁殖系统以展示繁殖能代谢C5糖(比如,木糖)的基因修饰酵母所用的培养基。产乙醇菌为基因修饰的酵母(菌株编号:RN1016,从荷兰海尔伦的DSM获得)。酵母培养物在补充2 % w/v葡萄糖和1 % w/v 木糖的YP(12.5 g/L酵母提取物& 10 g/L蛋白胨)培养基中30° C过夜生长。在17h之后,该培养物以0.02 g (干酵母)/L的比率转移至Bioflo310反应器中的1500ml酵母繁殖培养基(大约来自玉米-乙醇生物精炼厂的15g干固体/L的稀酒糟、纯木糖,或来自稀酸预处理的稀释成2 % w/v木糖的木质纤维素生物质的木糖溶液,以及0.24 g/L尿素)中。如果用氢氧化铵调节繁殖培养基的pH,则不需要尿素。使用标准繁殖协议对酵母进行24小时有氧繁殖(起始pH为5.5;搅拌,450rpm;通气,0.5vvm;温度,31.1 °C)。接着,繁殖的内容物转移至发酵罐中。图5A和图5B展示了实施例3的数据,其中图5A以纯木糖作为碳源,图5B以来自稀酸预处理的木质纤维素生物质的木糖溶液作为碳源。

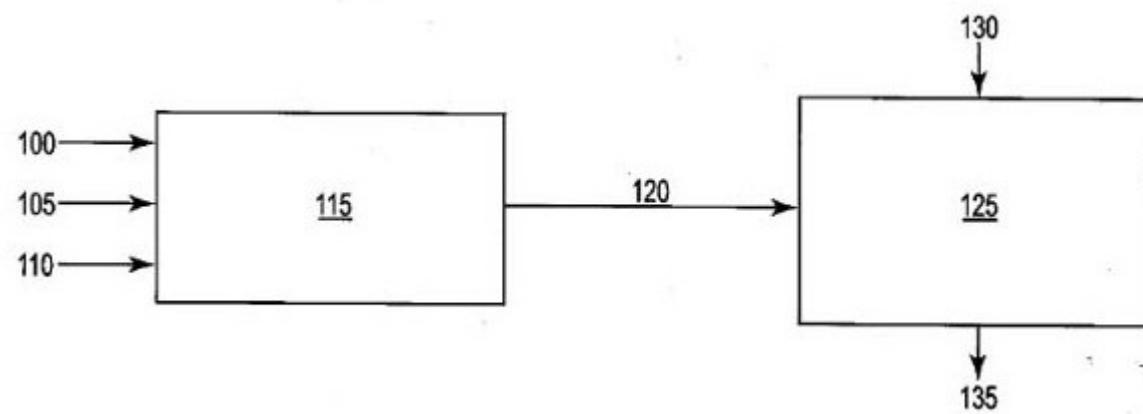


图1

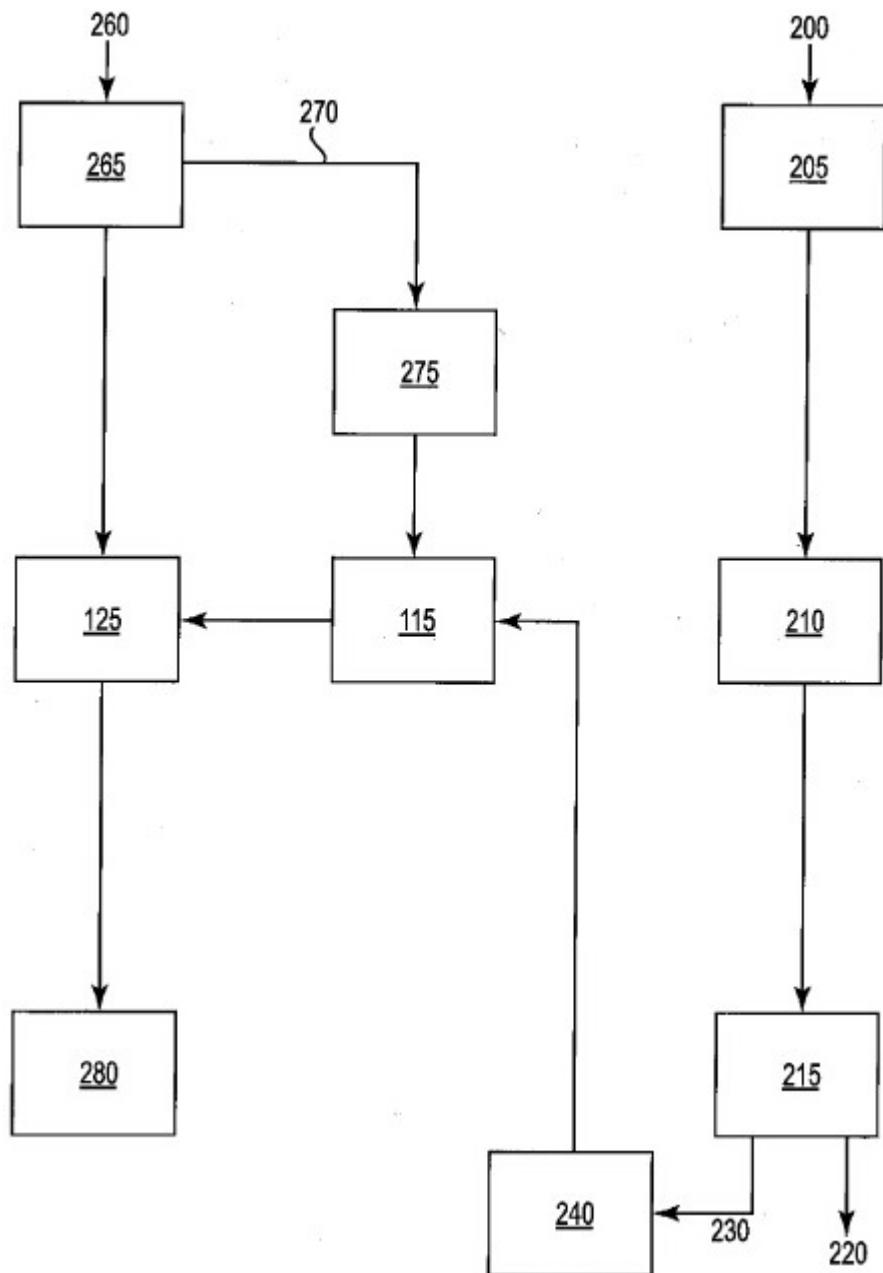


图2

| 木糖 (% W/V) | 乙醇 (% V/V) | |
|---------------|------------|------|
| | YP 培养基 | 稀酒糟 |
| 2.30 | 1.28 | 1.32 |
| 4.53 | 2.64 | 2.53 |
| 6.76 | 3.93 | 3.66 |
| 9.06 | 4.98 | 4.86 |
| 11.29 | 6.12 | 5.67 |
| 13.61 | 1.90 | 0.31 |
| 15.77 | ND | 0.00 |
| 17.61 | ND | NT |

ND- 未检测到 NT- 未进行测试

图3A

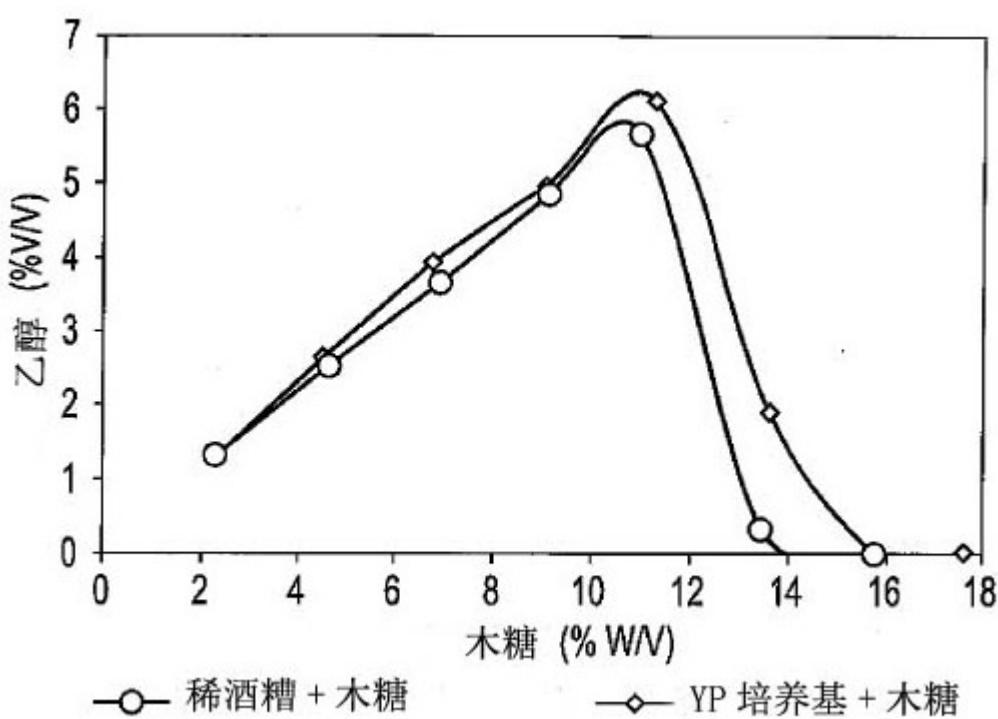


图3B

| 补充水中的 稀酒糟 % | 乙醇 (% W/V) | 残余木糖 (% W/V) |
|----------------|---------------|-----------------|
| 0 | 0 | 9.48 |
| 20 | 2.48 | 5.55 |
| 40 | 6.17 | 0.13 |
| 60 | 6.35 | 0.00 |
| 80 | 6.38 | 0.01 |

图4A

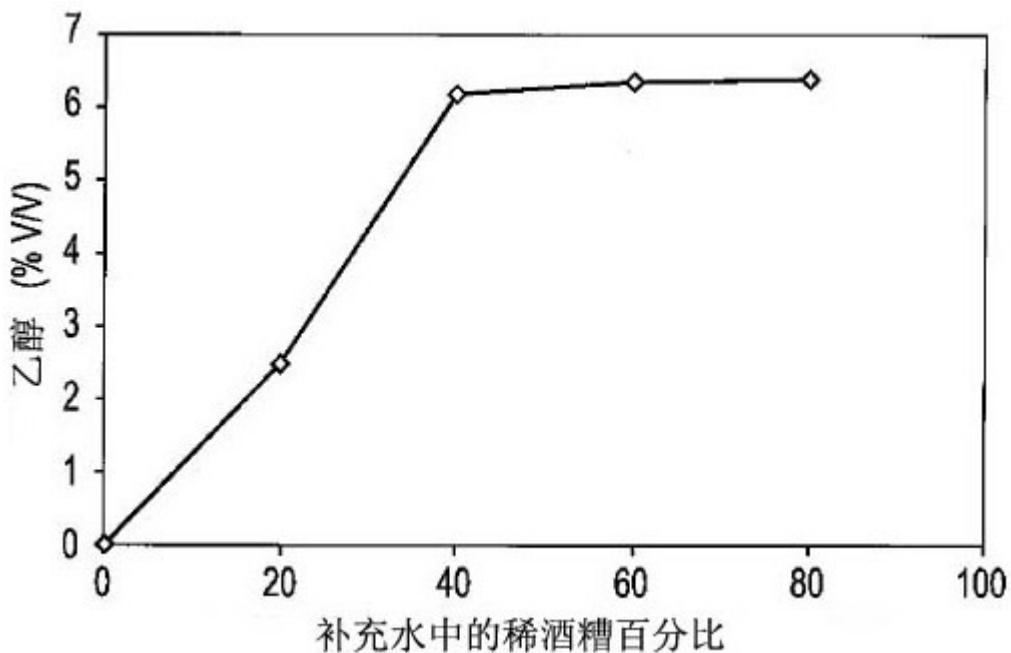


图4B

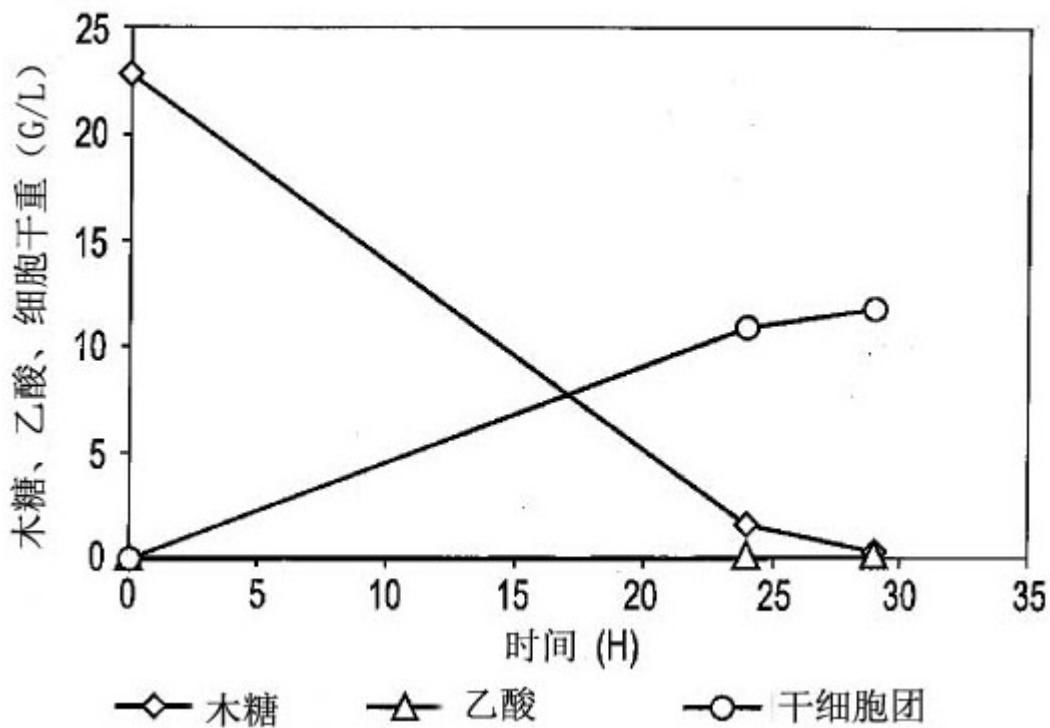


图5A

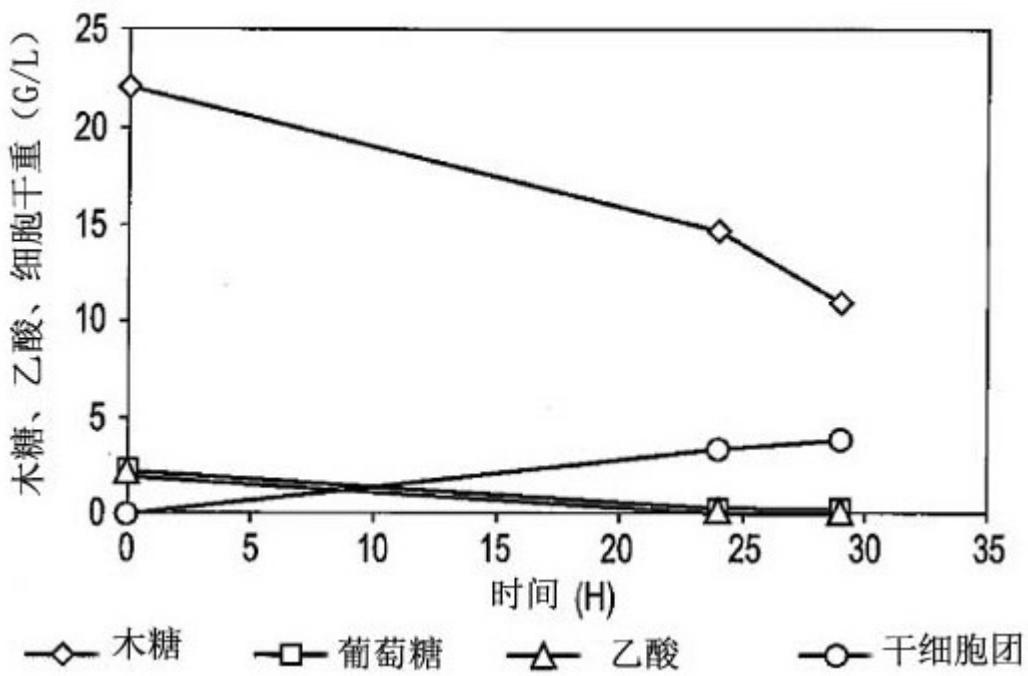


图5B