



(10)授权公告号 CN 106232811 B

(45)授权公告日 2020.07.24

(21)申请号 201580021225.8

(22)申请日 2015.04.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106232811 A

(43)申请公布日 2016.12.14

(30)优先权数据
1450484-9 2014.04.23 SE
1450851-9 2014.07.04 SE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.10.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/SE2015/050456 2015.04.23

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/163814 EN 2015.10.29

(83)生物保藏信息
CBS 137333 2014.02.18
CBS 137663 2014.04.15
CBS 137664 2014.04.15
CBS 137665 2014.04.15
CBS 137666 2014.04.15

(73)专利权人 斯堪的纳维亚科技集团公司
地址 瑞典隆德

(72)发明人 尼克拉斯·博南德

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 王玮玮 郑霞

(51)Int.Cl.
C12N 15/04(2006.01)
C12P 7/06(2006.01)
C12N 1/18(2006.01)
C12R 1/865(2006.01)

(56)对比文件
WO 2012067571 A1,2012.05.24,
CN 103403155 A,2013.11.20,
CN 103354836 A,2013.10.16,
Akinori Matsushika等.Bioethanol
Production from Xylose by Recombinant
Saccharomyces cerevisiae Expressing
Xylose Reductase,NADP+-dependent Xylitol
Dehydrogenase, and Xylulokinase.《JOURNAL
OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING》.2008,第
105卷(第3期),第296-299页.
Jeffries TW等.登录号:XP_001385181.
《GenBank》.2010,第1-318位.

审查员 严金波

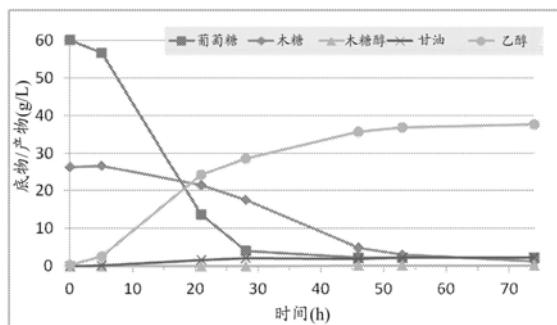
权利要求书2页 说明书14页
序列表1页 附图15页

(54)发明名称
酿酒酵母菌株

(57)摘要

本发明涉及制备具有发酵木糖的能力的糖发酵酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株的方法,其中所述方法包括不同的程序步骤。该方法包括使第一形成孢子的酿酒酵母菌株与第二酿酒酵母单倍体菌株接合。其后,进行筛选接合的细胞,生长此类接合的细胞,和通过显微镜检查验证展现基本的形态学的接合的细胞。其后,进行产生接合的细胞的混合物,使混合物经受连续恒化器木质纤维素培养和进行获得具有

发酵木糖的能力的糖发酵酿酒酵母细胞。本发明还包括通过所述方法获得的菌株。



1. 一种酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的制备方法, 所述酿酒酵母包含在其基因组中的编码木酮糖激酶的至少一个天然XKS1基因、在其基因组中的编码木糖醇脱氢酶的至少一个天然XDH1基因和在其基因组中的至少一个modGre3基因, 所述modGre3基因编码具有木糖还原酶活性的SEQ ID NO 1的氨基酸序列, 所述方法通过以下步骤进行:

- a) 使第一酿酒酵母菌株形成孢子用于提供所述菌株的至少20个四分体,
- b) 将从*Scheffersomyces stipitis*获得的编码木糖还原酶和木糖醇脱氢酶的DNA和从酿酒酵母获得的编码木酮糖激酶的DNA引入第二酿酒酵母菌株, 其中所述第二酿酒酵母单倍体菌株从以下保藏的酵母菌株获得: 具有保藏号CBS102679的Taurus 01、具有保藏号CBS128138的Taurus 03、具有保藏号CBS128139的Taurus 04、具有保藏号CBS128140的Taurus 07、具有保藏号CBS128141的Taurus 10, 所述菌株已经移除了 β -内酰胺酶基因, 是单倍体并被演化工程化,
- c) 通过以下使第一形成孢子的酿酒酵母菌株与针对木糖演化的和处于单倍体状态的第二酿酒酵母菌株接合以提供接合的细胞: 在YPD琼脂平板上将所述酿酒酵母单倍体菌株的细胞与在步骤a) 中获得的每个四分体混合,
- d) 在木糖和遗传霉素琼脂平板上筛选接合的细胞,
- e) 在含有15-25g/L木糖的最小限定木糖液体培养基中生长来自步骤d) 的接合的细胞,
- f) 通过显微镜检查证实接合的细胞表现出出芽酵母的基本形态学特征, 并选择具有基本形态学特征的此类接合的细胞,
- g) 以等量从步骤f) 产生具有基本形态学特征的接合的细胞的混合物,
- h) 使混合物经受连续恒化器培养, 所述连续恒化器培养最初在微需氧环境中和随后在厌氧环境中, 所述连续恒化器培养使用以下供料策略: 在数小时的循环时间范围中以供料和中断供料的循环以至少 0.08h^{-1} 为限定木糖培养基供料, 且随后以至少 0.13h^{-1} 为恒定供料,
- i) 在厌氧环境中使混合物经受连续恒化器培养, 所述连续恒化器培养用来自步骤h) 的细胞, 使用木质纤维素, 在数小时的循环时间范围中以供料和中断供料的循环以至少 0.08h^{-1} 为木糖培养基供料, 且以至少 0.13h^{-1} 为恒定供料速率供料,
- j) 通过从恒化器反应器收集具有发酵木糖的能力的糖发酵酿酒酵母细胞, 获得所述细胞,
- k) 将来自步骤j) 的细胞稀释到水中, 然后将细胞平铺在YPD琼脂平板上以获得单菌落, 并在 30°C 孵育持续至少4天。

2. 根据权利要求1所述的制备方法, 其中用于提供所述菌株的至少20个四分体的所述第一酿酒酵母菌株是具有保藏号CBS102678的酿酒酵母USM21。

3. 根据权利要求1-2的任一项所述的制备方法, 其中所述木糖和遗传霉素琼脂平板包括50-150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 遗传霉素和15-25g/L木糖。

4. 根据权利要求3所述的制备方法, 其中所述木糖和遗传霉素琼脂平板包括约100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 遗传霉素和20g/L木糖。

5. 根据权利要求1-4的任一项所述的制备方法, 其中步骤e) 中的所述最小限定木糖液体培养基含有20g/L木糖。

6. 根据权利要求1-5的任一项所述的制备方法, 其中步骤a) 在至少室温进行至少1周,

且步骤b)在至少室温进行至少1周,且步骤c)在至少室温进行至少1个月。

7.根据权利要求1-6的任一项所述的制备方法,其中步骤g)中正常接合的细胞的等量是在 1×10^6 细胞/ml- 1×10^8 细胞/ml的范围中。

8.根据权利要求7所述的制备方法,其中步骤g)中正常接合的细胞的等量是约 0.5×10^7 细胞/ml。

9.一种酿酒酵母菌株,其中所述菌株是具有保藏号CBS137333的Taurus 13、具有保藏号CBS137663的Taurus 14、具有保藏号CBS137664的Taurus 15、具有保藏号CBS137665的Taurus 16、或具有保藏号CBS137666的Taurus 17。

10.根据权利要求9所述的酿酒酵母菌株用于发酵含糖水解产物为乙醇的用途,其中所述糖选自下组:蔗糖、葡萄糖、木糖、果糖、甘露糖和半乳糖或其组合。

11.根据权利要求10所述的用途,其中所述含糖水解产物的pH在4-6的范围中,且温度是在至少室温多达35℃。

12.根据权利要求10或11所述的用途,其中所述含糖水解产物是木质纤维素水解产物。

13.根据权利要求10或11所述的用途,其中所述含糖水解产物包含>100g/L的糖浓度。

14.根据权利要求10-13的任一项所述的用途,其中所述发酵以分批发酵、分批补料发酵、连续发酵、同步糖化发酵(SSF)程序、同步糖化共发酵(SSCF)程序或预水解和同步糖化发酵(PSSF)程序进行。

15.根据权利要求12所述的用途,其中所述木质纤维素水解产物选自农业或森林残留物。

16.根据权利要求10-15的任一项所述的菌株的用途,其中所述菌株产生35-51g乙醇/100g消耗的木糖和葡萄糖、1-2g木糖醇/100g消耗的木糖和1-8g甘油/100g消耗的木糖和葡萄糖。

17.根据权利要求10-16的任一项所述的菌株的用途,其中糖水解产物的所述发酵在选自糠醛、羟甲基糠醛(HMF)、甲酸、乙酰丙酸、乙酸和酚类的至少一种抑制剂的存在下进行。

酿酒酵母菌株

[0001] 发明技术领域

[0002] 本发明涉及制备具有发酵木糖的能力的糖发酵酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的菌株的方法、如通过所述方法获得的酿酒酵母菌株和本发明的所述制备的菌株用于发酵含糖生物质的水解产物为乙醇的用途。

背景技术

[0003] 酵母属 (*Saccharomyces*) 菌株广泛用于酿造、蒸馏、烘烤、生物乙醇生产以及多种其他应用的工业中。鉴于酿酒酵母将糖 (诸如葡萄糖、果糖、甘露糖、麦芽糖和蔗糖) 转化为细胞物质并且将这些糖发酵为乙醇的能力, 酿酒酵母是工业应用中使用最广泛的微生物之一。鉴于酿酒酵母菌株迅速地将糖类转化成乙醇的能力, 酿酒酵母菌株被用于燃料工业中。酿酒酵母与细菌和其他酵母种类相比对发酵抑制剂和乙醇具有更好的耐受性。

[0004] 与细菌和若干酵母种类不同, 野生型酿酒酵母不能使用戊糖 (诸如木糖和阿拉伯糖) 作为碳源。酿酒酵母在丰富碳源 (诸如来自其他过程的侧流物和残留材料, 诸如来自例如玉蜀黍和甘蔗渣的农业残留材料以及来自例如造纸的残留材料) 上生长的能力具有巨大的环境价值以及还具有经济价值。农业残留材料和硬木衍生流物包含相当大部分的半纤维素, 该半纤维素由许多不同的糖单体构成。举例来说, 除葡萄糖以外, 这些糖单体还可以包括木糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖以及阿拉伯糖。葡萄糖和木糖是以最大量存在的糖单体并且因此代表一种用于使用酵母制造乙醇的重要碳源, 提供了巨大的经济和环境优点。所提到的材料中木糖的丰度和使用酵母诸如酿酒酵母以利用木糖作为碳源产生乙醇的可能性, 已经在这一技术领域内导致密集的研究。然而, 木糖的转化有时是差的, 导致差的乙醇生产。此外, 副产物木糖醇的产生已经是相当大的。

[0005] 编码提供使用木糖作为碳源的能力的酶的基因先前已被引入酿酒酵母中。

[0006] 利用blast搜索将来自 *Scheffersomyces stipitis* 的氨基酸序列 Xyl1 (木糖还原酶) 和 Xyl2 (木糖醇脱氢酶) 与酿酒酵母中的所有蛋白比较显示, 与 Xyl1 最接近的近同源物是 Gre3p (Sc) E-值: $3E-100$, 且 Xyl2 最接近于 Sor1p、Sor2 E-值 $1.4E-86$ 至 $1E-77$ 。E 值越小, 基因的同源性越大。因此, 观察到序列之间的大同源性。

[0007] EP 1 282 686 公开了具有被并入的针对酶类木糖还原酶、木糖醇脱氢酶以及木酮糖激酶的基因并且已经经受特定突变的重组酿酒酵母菌株。所述菌株具有将木质纤维素原料发酵为乙醇的能力。EP 1 282 686 中所保藏的菌株是 CBS 102679 (TMB3400, Taurus01) 并且在现有技术中总体上被认为是有效的。由菌株 CBS 102679 产生的乙醇与其他现有技术重组酵母相比已被认为是非常好的, 但还产生不希望的副产物木糖醇。因此, 在本领域内仍需要提供具有甚至更好的乙醇生产、更好的木糖转化以及更低的木糖醇生产的新型酿酒酵母菌株。

[0008] W02012/067572 公开了以下酿酒酵母菌株: 具有保藏号 CBS128138 的 Taurus03、具有保藏号 CBS 128139 的 Taurus04、具有保藏号 CBS128140 的 Taurus07、具有保藏号 CBS128141 的 Taurus10, 其都是产生有益乙醇产率的木糖发酵酵母菌株。

[0009] β -内酰胺酶基因被包括在至少如以上提到的菌株Taurus01、Taurus04和Taurus07中。鉴于 β -内酰胺酶基因遗传转移到另一生物体(随后其潜在地可获得抗生素抗性)的风险,美国的监管机构不允许在较大生产设施中使用包含 β -内酰胺酶基因的酿酒酵母菌株。

[0010] 在本技术领域中对提供稳健的酿酒酵母菌株存在需要,所述菌株提供从5-和6-碳糖的高乙醇产率且另外表现出低的例如木糖醇的副产物产率。尤其需要在基因组中不具有以上提到的 β -内酰胺酶基因的酿酒酵母菌株。

[0011] 发明概述

[0012] 鉴于以上,本发明涉及通过如以下描述的方法制备的有效的酿酒酵母菌株。所制备的菌株鉴于发酵介质例如生物质水解产物中存在的糖的总量在糖发酵期间达到的乙醇产率接近于可能的理论值。

[0013] 在一个方面,本发明涉及一种酿酒酵母菌株,所述菌株包含在其基因组中的编码木酮糖激酶的至少一个天然XKS1基因、在其基因组中的编码木糖醇脱氢酶的至少一个天然XDH1基因、和在其基因组中的至少一个modGre3基因,所述modGre3基因编码具有木糖还原酶活性的SEQ ID NO 1的氨基酸序列或编码具有木糖还原酶活性的所述氨基酸序列的片段,其中所述菌株通过以下步骤可获得:

[0014] a) 使第一酿酒酵母菌株形成孢子用于提供所述菌株的至少20个四分体,

[0015] b) 将从Scheffersomyces stipitis获得的编码木糖还原酶和木糖醇脱氢酶的DNA和从酿酒酵母获得的编码木酮糖激酶的DNA引入第二酿酒酵母菌株,

[0016] c) 通过以下使第一形成孢子的酿酒酵母菌株与针对木糖演化的和处于单倍体状态的第二酿酒酵母菌株接合以提供接合的细胞:在YPD琼脂平板上将所述酿酒酵母单倍体菌株的细胞与在步骤a)中获得的每个四分体混合,

[0017] d) 在木糖和遗传霉素琼脂平板上筛选接合的细胞,

[0018] e) 在最小限定木糖液体培养基中生长来自步骤d)的接合的细胞,

[0019] f) 通过显微镜检查证实接合的细胞表现出出芽酵母的基本形态学特征,并选择具有基本形态学特征的此类接合的细胞,

[0020] g) 以等量从步骤f)产生具有基本形态学特征的接合的细胞的混合物,

[0021] h) 使混合物经受连续恒化器培养,所述连续恒化器培养最初在微需氧环境中随后在厌氧环境中,所述连续恒化器培养使用以下供料策略:在数小时的循环时间范围中以供料和中断供料的循环以至少 0.08h^{-1} 为限定木糖培养基供料,且随后以至少 0.13h^{-1} 为恒定供料,

[0022] i) 在厌氧环境中使混合物经受连续恒化器培养,所述连续恒化器培养用来自步骤h)的细胞,使用木质纤维素,在数小时的循环时间范围中以供料和中断供料的循环以至少 0.08h^{-1} 为木糖培养基供料,且以至少 0.13h^{-1} 为恒定供料速率供料,

[0023] j) 通过从恒化器反应器收集具有发酵木糖的能力的糖发酵酿酒酵母细胞,获得所述细胞,

[0024] k) 将来自恒化器的细胞稀释到水中,然后将细胞平铺在YPD琼脂平板上以获得单菌落,并在 30°C 孵育持续至少4天。

[0025] 在又另一方面,本发明涉及为具有保藏号CBS137333的Taurus 13、具有保藏号CBS137663的Taurus 14、具有保藏号CBS137664的Taurus 15、具有保藏号CBS137665的

Taurus 16、或具有保藏号CBS137666的Taurus 17的菌株。

[0026] 在又另一方面,本发明涉及如以上所描述的可获得的酿酒酵母菌株用于发酵含糖水解产物或生物物质为乙醇的用途。

[0027] 附图简述

[0028] 图1.在基因组整合到酵母中使用的具有基因XYL1、XYL2和XKS1(红色箭头)的遗传元件,基因处在来自酿酒酵母糖酵解基因PGK1、TDH3和TPI1(为蓝色框的方形)的500nt上游启动子区域的控制下,编码基因的这些DNA区段以转录区域的终止(紫色方形)结束。用AarI消化DNA释放与基因GRE3(绿色线)的起点和终点互补的侧翼50nt核苷酸延伸段,据此利用用于将DNA转化到酵母中的DNA转化和随后的基因组整合的常用方法已经代替了酵母基因组中的GRE3基因之一,或由于与各自最接近的酵母同源物Gre3和Sor1/2的高DNA序列同源性,转化可引起Xyl1与天然Gre3和Xyl2与天然Sor1或Sor2的分别重组。DNA序列还包含许多独特的限制性酶切位点:AarI(2个位点)、AscI、AsiSI、ClaI、EcoRV、MluI、MreI、NotI、NruI、PmeI、RsrII、SbfI、SgfI、SrfI、SwaI、XbaI。

[0029] 图2.用于恒化器中有效厌氧木糖发酵的酵母的演化工程化。在第0天至第64天使用具有15g/L木糖介质的限定培养基,且从第65天至第99天使用具有30g/L木糖+0.6g/L葡萄糖的木质纤维素供料。A:OD₆₀₀(开放圆形)和g木糖醇/g消耗的木糖(十字形);B:g木糖醇/g消耗的木糖(十字形)沿着来自图2A的y轴重调比例(re-scaled),且在2B中还显示g甘油/g消耗的葡萄糖+木糖。在第一时间段中,获得减少的木糖醇产生(0-30天),其后,在第31天到第40天期间,发生代谢调整且酵母能够更有效地代谢木糖以产生更多生物物质,如在第30-35天在600nm(OD₆₀₀)的更高光密度观察到。此外,在整个恒化器培养期间发生的甘油产生存在减少,从而<0.3%的糖被转化为副产物木糖醇和甘油。

[0030] 图3.使用Taurus13,本发明的菌株在使用100g/L葡萄糖和75g/L木糖的限定培养基中在需氧和厌氧条件期间在限定培养基中的细胞繁殖行为。葡萄糖在24h内被消耗且木糖在50h前被消耗。需氧和厌氧繁殖分别在0.1和1.5的光密度处开始。

[0031] 图4.使用Taurus13,在pH 5在小麦秸秆水解产物中,葡萄糖和木糖通过本发明的菌株的厌氧发酵。葡萄糖发酵阶段在~3h开始,此时抑制剂HMF(0.1g/L)、糠醛(2.0g/L)已被代谢,培养基还含有2.6g/L乙酸盐。葡萄糖在8h内被发酵,且木糖在60h被完全发酵。在发酵结束时仅有1.2g/L甘油和0.6g/L木糖醇,对应<3%的发酵的糖的非常低的副产物形成。

[0032] 图5.使用Taurus13,在pH 5在甘蔗渣水解产物中,葡萄糖和木糖通过本发明的菌株的厌氧发酵。葡萄糖发酵阶段在3h开始,此时抑制剂HMF(0.1g/L)、糠醛(1.8g/L)已被代谢,培养基还含有9.5g/L乙酸盐。葡萄糖在10h内被发酵,且木糖在50h被完全发酵。在发酵结束时仅有0.7g/L甘油和0.25g/L木糖醇,对应发酵的糖的4%甘油和发酵的木糖的2%木糖醇的副产物形成。

[0033] 图6.使用Taurus13,在pH 6.0在桦木水解产物中,葡萄糖和木糖通过本发明的菌株的厌氧发酵。葡萄糖发酵阶段在2h开始,此时抑制剂HMF(0.1g/L)和糠醛(1.6g/L)已被代谢,培养基还含有9.5g/L乙酸盐。葡萄糖在11h内被发酵,且木糖在整个60h实验期间被持续发酵。在发酵结束时仅有1.2g/L甘油和0.4g/L木糖醇,对应<1%的发酵的糖的非常低的副产物形成。

[0034] 图7.使用Taurus13,在pH 5在玉米秸秆水解产物中,葡萄糖和木糖通过本发明的

菌株的厌氧发酵。葡萄糖在28h内被发酵,且木糖在52h被完全发酵。在发酵结束时仅有3g/L甘油和0.2g/L木糖醇,对应<3%的发酵的糖的非常低的副产物形成。

[0035] 图8.使用Taurus13,在pH 5.5在硬木水解产物中,葡萄糖和木糖通过本发明的菌株的厌氧发酵。葡萄糖和木糖在24h内被发酵。培养基还含有2.1g/L乙酸盐。在发酵结束时含有1.2g/L甘油和0.2g/L木糖醇,甘油的副产物形成是发酵的糖的4%和发酵的木糖的2%木糖醇。

[0036] 图9.在pH 5.0在小麦秸秆中,使用本发明的Taurus13,葡萄糖和木糖通过菌株的厌氧SSF发酵。抑制剂HMF (0.15g/L) 和糠醛 (1.3g/L) 存在并在3h内已被代谢,培养基还含有1.2g/L乙酸盐。在时间24h,来自预处理的小麦秸秆的10%WIS连同10FPU/g WIS的纤维素降解酶混合物被加入。在55h,乙醇产生以高产率发生,且仅存在副产物木糖醇和甘油的微小形成。该菌株在高浓度抑制剂存在下达到高乙醇产率。SSF=同步糖化发酵 (Simultaneous Saccharification and Fermentation)。

[0037] 图10.在pH 5.0在玉米芯中,使用Taurus13,葡萄糖和木糖通过本发明菌株的厌氧SSF发酵。抑制剂HMF (0.1g/L) 和糠醛 (1.5g/L) 存在并在3h内已被代谢,培养基还含有3.5g/L乙酸盐。在时间24h,来自预处理的小麦秸秆的10%WIS连同10FPU/g WIS的纤维素降解酶混合物被加入。在56h,乙醇产生以高产率发生,且仅存在副产物木糖醇和甘油的微小形成。该菌株在高浓度抑制剂存在下达到高乙醇产率。SSF=同步糖化发酵。

[0038] 图11.在pH 5.5在玉米秸秆水解产物中,使用Taurus13,葡萄糖和木糖通过本发明菌株的厌氧分批补料发酵 (fed-batch fermentation)。葡萄糖和木糖发酵在24h完成,培养基还含有1.7g/L乙酸盐。在24.5h,加入108g/L葡萄糖且这一补料使体积增加67%,加入的葡萄糖在30h内完全发酵。在发酵结束时存在8.3g/L甘油,对应6%的发酵的葡萄糖的副产物形成。

[0039] 图12.在pH 6在最小限定培养基中,使用Taurus13,葡萄糖和木糖通过本发明菌株的厌氧发酵。葡萄糖发酵在20h完成,且木糖在40小时后完全发酵,培养基还含有8g/L乙酸盐。在发酵结束时存在2g/L甘油和0.7g/L木糖醇,对应<1.2%的发酵的糖的副产物形成。

[0040] 图13-16.在限定最小培养基中通过本发明菌株的厌氧发酵:图和菌株如下:图13中的Taurus14;图14中的Taurus15;图15中的Taurus16;图16中的Taurus17。葡萄糖和木糖在25小时内发酵。存在副产物木糖醇和甘油 (g/L) 的最小形成,构成<3%的g/L发酵的糖。在发酵开始和结束时的细胞干重 (CDW, g/L显示为圆圈x10) 分别是0.5 (± 0.1) 和6.2 (± 0.7)。

[0041] 图17.在pH 6在玉米秸秆水解产物中,使用Taurus14,葡萄糖和木糖通过本发明菌株的厌氧发酵。葡萄糖在28h内发酵,且>90%的木糖在96h发酵。在发酵结束时仅存在3g/L甘油和0.6g/L木糖醇,对应<3%的发酵的糖的非常低的副产物形成。

[0042] 图18.在pH 6在玉米秸秆水解产物中,使用Taurus15,葡萄糖和木糖通过本发明菌株的厌氧发酵。葡萄糖在28h内发酵,且>90%的木糖在96h发酵。在发酵结束时仅存在3g/L甘油和0.1g/L木糖醇,对应<3%的发酵的糖的非常低的副产物形成。

[0043] 图19.在pH 6在玉米秸秆水解产物中,使用Taurus16,葡萄糖和木糖通过本发明菌株的厌氧发酵。葡萄糖在28h内发酵,且>90%的木糖在96h发酵。在发酵结束时仅存在3g/L甘油和0.1g/L木糖醇,对应<3%的发酵的糖的非常低的副产物形成。

[0044] 图20.在pH 6在玉米秸秆水解产物中,使用Taurus17,葡萄糖和木糖通过本发明菌

株的厌氧发酵。葡萄糖在28h内发酵,且>90%的木糖在96h发酵。在发酵结束时仅存在3.5g/L甘油和0.2g/L木糖醇,对应<4%的发酵的糖的非常低的副产物形成。

[0045] 图21.在pH 5在玉米芯水解产物中,使用Taurus13,葡萄糖和木糖通过本发明菌株的厌氧发酵。尿素、 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 分别以如下的量加入:5g/L、6g/L和1g/L。葡萄糖在40h内发酵,且大多数木糖在96h发酵。在发酵结束时仅有3.5g/L甘油和1.5g/L木糖醇,对应<2%的发酵的糖的非常低的副产物形成。

[0046] 图22.在pH 5在甘蔗渣水解产物中,使用Taurus13,葡萄糖和木糖通过本发明菌株的厌氧发酵。尿素、 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 分别以如下的量加入:5g/L、6g/L和1g/L。葡萄糖在45h内发酵,且大多数木糖在96h发酵。在发酵结束时仅有3.5g/L甘油和1.2g/L木糖醇,对应<2%的发酵的糖的非常低的副产物形成。

[0047] 图23.在pH5在玉米醪(corn mash)中,使用Taurus13葡萄糖和木糖通过本发明菌株的厌氧发酵。尿素、 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 分别以如下的量加入:5g/L、6g/L和1g/L。葡萄糖和木糖在30h内发酵。在发酵结束时仅有11g/L甘油。

[0048] 图24.modGre3的氨基酸序列。带有modGre3的本发明的菌株与包含Gre3的USM21(CBS102678)相比具有>5倍更高的体外木糖还原酶活性。粗体氨基酸是 NADP^+ 相互作用且加灰色阴影的氨基酸是具有与核苷酸相互作用和对以折叠的3D结构的催化作用重要的保守氨基酸的两个主要多肽段。

[0049] 图25.具有葡萄糖+无抗生素(A)或木糖+抗生素(B)的限定培养基平板。上部是形成孢子的USM21菌株(本发明的步骤a),而下部是能够进行缓慢木糖发酵的演化的木糖发酵单倍体菌株(本发明的步骤c)。中部是形成孢子的USM21菌株与单倍体木糖发酵菌株混合。在30℃孵育数天后,图A显示,两种细胞类型如预期地在葡萄糖限定培养基平板上生长。在具有木糖培养基的(B)中,USM21菌株被证实不能在木糖上生长,而单倍体木糖发酵菌株不能够应付加入的抗生素的毒性。因此,本发明设计的方法仅允许从两种菌株获得有益性状的二倍体接合的菌株生长,且因此这一新菌株在抗生素的存在下在木糖上交叉生长。

[0050] 图26公开表1,其展示在水解产物和最低限度培养基(minimal medium)的厌氧发酵期间以g/L计的细胞外底物/产物的浓度、乙醇、木糖醇、甘油的产率。培养基中无其他代谢物的积累。还显示了在发酵开始时乙酸盐(HAc)、HMF(羟甲基糠醛)和糠醛的g/L含量。
1.TS=总糖(g/L葡萄糖+g/L木糖);2.Y是从消耗的葡萄糖和木糖的乙醇和甘油的产率(g/g):乙醇、木糖醇或甘油;3.Y是从消耗的木糖的木糖醇产率(g/g);cons.Xylose=消耗的木糖;cons.TS=消耗的总糖;n.d.=未检测到~0-0.05g/L。

[0051] 发明详述

[0052] 在本发明的一个实施方案中,提供了制备具有发酵木糖的能力的糖发酵酿酒酵母菌株的方法,其中所述方法包括不同的重要程序步骤。酿酒酵母菌株天然发酵葡萄糖,并通过本发明的方法已被制备为还以高速率发酵木糖。其他糖类通过根据本发明的菌株也被发酵,例如葡萄糖和半乳糖。

[0053] 在一个方面,本发明涉及制备具有发酵木糖的能力的糖发酵酿酒酵母菌株的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0054] a)使第一酿酒酵母菌株形成孢子用于提供所述菌株的至少20个四分体,

[0055] b)将从Scheffersomyces stipitis获得的编码木糖还原酶和木糖醇脱氢酶的DNA

和从酿酒酵母获得的编码木酮糖激酶的DNA引入第二酿酒酵母菌株，

[0056] c) 通过以下使第一形成孢子的酿酒酵母菌株与针对木糖演化的和处于单倍体状态的第二酿酒酵母菌株接合以提供接合的细胞：在YPD琼脂平板上将所述酿酒酵母单倍体菌株的细胞与在步骤a)中获得的每个四分体混合，

[0057] d) 在木糖和遗传霉素琼脂平板上筛选接合的细胞，

[0058] e) 在最小限定木糖液体培养基中生长来自步骤d)的接合的细胞，

[0059] f) 通过显微镜检查证实接合的细胞表现出出芽酵母的基本形态学特征，并选择具有基本形态学特征的此类接合的细胞，

[0060] g) 以等量从步骤f)产生具有基本形态学特征的接合的细胞的混合物，

[0061] h) 使混合物经受连续恒化器培养，所述连续恒化器培养最初在微需氧环境中随后在厌氧环境中，所述连续恒化器培养使用以下供料策略：在数小时的循环时间范围中以供料和中断供料的循环以至少 0.08h^{-1} 为限定木糖培养基供料，且随后以至少 0.13h^{-1} 为恒定供料，

[0062] i) 在厌氧环境中使对混合物经受连续恒化器培养，所述连续恒化器培养用来自步骤h)的细胞，使用木质纤维素，在数小时的循环时间范围中以供料和中断供料的循环以至少 0.08h^{-1} 为木糖培养基供料，且以至少 0.13h^{-1} 为恒定供料速率供料，

[0063] j) 通过从恒化器反应器收集具有发酵木糖的能力的糖发酵酿酒酵母细胞，获得所述细胞，

[0064] k) 将来自恒化器的细胞稀释到水中，然后将细胞平铺在YPD琼脂平板上以获得单菌落，并在 30°C 孵育持续至少4天。

[0065] l) 确定用于最大化木糖发酵的任何保留的和/或演化的酶的DNA序列。

[0066] 通过如以上描述的本发明的创造性方法获得的酵母包含新基因Gre3 (YHR104w)，称为modGre3基因，其在与天然Gre3的成对氨基酸序列比对中呈现 $>60\%$ 相同。如此，获得的酵母不编码来自*Scheffersomyces stipitis*的Xyl1 (编码木糖还原酶) 和Xyl2 (编码木糖醇脱氢酶)。如本文定义的新基因modGre3基因是编码如在图24和序列表中定义的氨基酸序列 (Seq Id No1) 的新基因。包含modGre3基因的本发明的菌株与包含天然Gre3基因的酿酒酵母菌株USM21 (CBS102678) 相比具有 >5 倍更高的体外木糖还原酶活性。

[0067] 本发明的菌株中用于木糖转化的上调的酶促活性是来自modGre3的木糖还原酶和天然木糖醇脱氢酶酶类Xdh1和Sor1/2以及用于形成木酮糖-5-磷酸形成的木酮糖激酶XKS1。至少一个拷贝的木酮糖激酶XKS1处于强的糖酵解启动子诸如磷酸丙糖异构酶启动子的+500nt区域的控制下。此外，已经证实了来自*Scheffersomyces stipitis*的重组木糖还原酶和木糖醇脱氢酶的不存在。如此，已经进行了分离根据本发明的菌株，所述菌株在以NADH/NADPH或NAD⁺作为共底物、监测在340nm的吸光度变化的酶促联合测定中具有 >5 倍的木糖还原酶和木糖醇脱氢酶的酶促活性的增加。

[0068] 如此，根据本发明，已经提供了一种酿酒酵母菌株，所述菌株包含在其基因组中的编码木酮糖激酶的至少一个天然XKS1基因、在其基因组中的编码木糖醇脱氢酶的至少一个天然XDH1基因、和在其基因组中的至少一个modGre3基因，所述modGre3基因编码具有木糖还原酶活性的SEQ ID NO 1的氨基酸序列或编码具有木糖还原酶活性的所述氨基酸序列的片段。

[0069] 获得本发明的创造性菌株的方法包括以下步骤。

[0070] 步骤a) 涉及使第一酿酒酵母菌株形成孢子用于提供所述菌株的至少20个四分体, 其中该步骤在至少室温进行至少1周。在20-30℃的范围中的温度提供期望结果。使酿酒酵母形成孢子根据其在在本技术领域内的普通含义进行。

[0071] 步骤b) 涉及将从*Scheffersomyces stipitis*获得的编码木糖还原酶和木糖醇脱氢酶的与各自最接近的酵母同源物Gre3和Sor1/2具有高DNA序列同源性的DNA和从酿酒酵母获得的编码木酮糖激酶的DNA引入第二酿酒酵母菌株。

[0072] 步骤c) 涉及通过以下使第一形成孢子的酿酒酵母菌株与针对木糖演化的和处于单倍体状态的第二酿酒酵母菌株接合以提供接合的细胞: 在YPD琼脂平板上将所述酿酒酵母单倍体菌株的细胞与在步骤a) 中获得的每个四分体混合, 其中该步骤在至少室温进行至少1周。在20-30℃的范围中的温度提供期望的接合结果。

[0073] 步骤d) 涉及在木糖和遗传霉素琼脂平板上筛选接合的细胞, 其中该木糖和遗传霉素琼脂平板包括50-150μg/ml遗传霉素、优选地约100μg/ml遗传霉素, 和15-25g/L木糖、优选地20g/L木糖。在本发明的一个实施方案中, 第一酿酒酵母菌株是USM21 (CBS102678) 且第二酿酒酵母菌株来源于*Taurus 1* (CBS102679), 具有另外拷贝的XYL1、XYL2和XKS1、已经移除了β-内酰胺酶基因和已经为了有效木糖发酵被演化和处于单倍体状态。

[0074] 演化的木糖发酵单倍体菌株, 可在木糖上生长, 但不耐受遗传霉素抗生素, 而USM21不能在木糖上生长但耐受遗传霉素。因此, 只有接合的细胞能够在遗传霉素+木糖平板上生长。USM21的抗性不是来自遗传霉素抗性基因的转化。USM21在遗传霉素上生长的抗性通过某种细胞机制获得。

[0075] 步骤e) 涉及在最小限定木糖液体培养基中生长来自步骤d) 的接合的细胞, 其中该最小限定木糖液体培养基是例如在范围15-25g/L内的木糖、优选地约20g/L木糖的限定培养基液体培养物。进行该步骤以定量地增加细胞的量。

[0076] 步骤f) 涉及通过显微镜检查证实接合的细胞表现出出芽酵母的基本形态学特征, 并选择具有基本形态学特征的此类接合的细胞。对于本领域技术人员而言, 清楚哪种类型的接合的细胞表现出出芽酵母的基本形态学特征, 从并且能够从显微镜检查选择出。

[0077] 步骤g) 涉及以等量从步骤f) 产生具有基本形态学特征的接合的细胞的混合物, 其中该步骤中基本、接合的细胞的等量通常是在 1×10^6 细胞/ml- 1×10^8 细胞/ml的范围中、尤其是在约 0.5×10^7 - 2×10^7 细胞/ml的范围中。

[0078] 步骤h) 涉及使混合物经受连续恒化器培养, 所述连续恒化器培养最初在微需氧环境中随后在厌氧环境中, 所述连续恒化器培养使用以下供料策略: 在数小时的循环时间范围中以供料和中断供料的循环以至少 0.08 h^{-1} 为限定木糖培养基供料, 且随后以至少 0.13 h^{-1} 为恒定供料。稀释速率(h^{-1}) 可被调整以获得具有正确特征的细胞。

[0079] 步骤i) 涉及在厌氧环境中使混合物经受连续恒化器培养, 所述连续恒化器培养来自步骤h) 的细胞, 使用木质纤维素, 在数小时的循环时间范围中以供料和中断供料的循环以至少 0.08 h^{-1} 为木糖培养基供料, 且以至少 0.13 h^{-1} 为恒定供料速率供料。

[0080] 步骤j) 涉及通过从恒化器反应器收集具有发酵木糖的能力的糖发酵酿酒酵母细胞, 获得所述细胞, 且步骤k) 涉及将来自恒化器的细胞稀释到水中, 然后将细胞平铺在YPD琼脂平板上以获得单菌落, 并在30℃孵育4天。

[0081] 公知的是,野生型酵母不能发酵木糖为乙醇,尤其是葡萄糖和(<0.5g/h/CWD)的木糖向乙醇的高比例厌氧转化对于包括酵母目(Saccharomycetales)非酵母物种的任何其他真菌尚未被记载。发酵木糖的所有非酵母要求至少微需氧条件,但随后还从木糖形成显著量甚至主要的木糖醇。在本发明的方法中提供了技术的组合,所述技术如使二倍体菌株形成孢子以形成四分体、演化工程化和不同菌株之间的同源重组。使用新技术,抑制耐受必需的性状(例如表型特征)已与木糖发酵性状接合,其中仅二倍体接合的菌株能够生长。在本发明之前从未报道过,可能在琼脂平板上在混合两个单倍体菌株后直接选择二倍体接合的菌株,即如以上描述的步骤d)。然后在以下步骤中在仔细监测的程序中使二倍体菌株适应有效木糖发酵,其中关键的可观察量是最低可能的木糖醇和甘油形成,同时使木糖摄取最大化。在最后>40代中是在木质纤维素和葡萄糖和木糖的存在下进行的菌株适应。没有其他现有技术出版物已经演化工程化了与野生型酿酒(wine)菌株(即USM21,CBS 102678)杂交的缓慢发酵木糖菌株,其中仅接合的细胞在起始细胞群中。来自野生型非木糖发酵菌株的遗传性状已经被确定存在于杂交的木糖发酵菌株中,从而遗传上证实细胞接合真正地发生了。而且,演化工程化以新的仔细监测的方法进行,其中关键参数是使木糖醇和甘油副产物形成最小化同时维持或增加生物质产率和/或乙醇形成二者。在选择更高的木糖摄取比率方面存在逐步增加,首先在需氧木糖限定培养基中,然后在厌氧限定培养基,随后供料木质纤维素培养基,其中葡萄糖和木糖二者存在。

[0082] 本发明还涉及通过如以上描述的方法可获得的酿酒酵母菌株。

[0083] 除了其通常发酵的糖即葡萄糖和蔗糖等以外,细胞有效地发酵木糖。

[0084] 在本发明的一个实施方案中,第二酿酒酵母二倍体菌株从在荷兰微生物菌种保藏中心(Uppsalalaan 8,3584CT Utrecht,the Netherlands)(Centraalbureau voor Schimmelcultures,Uppsalalaan 8,3584CT Utrecht,the Netherlands)保藏的以下保藏酵母菌株获得:2000年5月1日保藏的具有保藏号CBS 102679的Taurus01、2010年10月26日保藏的具有保藏号CBS 128138的Taurus03、2010年10月26日保藏的具有保藏号CBS 128139的Taurus04、2010年10月26日保藏的具有保藏号CBS 128140的Taurus07、2010年11月2日保藏的具有保藏号CBS 128141的Taurus10。在根据本发明的方法中使用的以上菌株已经去除了 β -内酰胺酶基因,并为了使用恒化器培养和以限定的木糖培养基和木质纤维素二者的重复批次的增加的木糖摄取比例而演化工程化。

[0085] 在本发明的一个实施方案中,第一酿酒酵母菌株(所述第一酿酒酵母菌株用于提供所述菌株的至少20个四分体)是在荷兰代尔夫特市的荷兰微生物菌种保藏中心(CBS)保藏的具有保藏号CBS102678的酿酒酵母USM21。在本发明的另一实施方案中,酿酒酵母菌株通过如以上描述的方法可获得。

[0086] 在产生稳健的木糖发酵酵母菌株中,需要进行多个步骤以调整酵母代谢来适应有效和快速的厌氧木糖发酵。尝试使用陈述的接合程序诱导更高比例的木糖发酵的此前和现有技术未能证明实际的接合已发生,参见例如W02005121337和W02009155633,且当酵母在需氧环境中繁殖时木糖被消耗。如在W02009/155633中公开的,在木质纤维素的厌氧发酵中,仅葡萄糖和半乳糖被发酵为乙醇,且仅<20%的木糖被转化,但然后被转化为木糖醇。如在例如W02005121337和W02009155633中公开的,在木质纤维素的厌氧发酵中,仅葡萄糖和半乳糖被发酵为乙醇,且仅<20%的木糖被转化,主要被转化为木糖醇。如在W02006/115455

中公开的,在木质纤维素的厌氧发酵中,葡萄糖、半乳糖和木糖被发酵为低的总量<18g/L的乙醇,但~20%的木糖被转化为木糖醇。

[0087] 如以上陈述的,根据如本文描述的方法已经获得一种酿酒酵母菌株,所述菌株包含在其基因组中的编码木酮糖激酶的至少一个XKS1基因、在其基因组中的编码木糖醇脱氢酶的至少一个天然XDH1基因、和在其基因组中的至少一个modGre3基因,所述modGre3基因编码具有木糖还原酶活性的SEQ ID NO 1的氨基酸序列或编码具有木糖还原酶活性的所述氨基酸序列的片段。除了如在酿酒酵母中存在的天然基因以外,以上提到的基因在酿酒酵母菌株中存在。在关于乙醇产生和小的副产物形成诸如木糖醇两方面,非常有效的菌株已经根据本发明提供。

[0088] 在本发明的一个实施方案中,以上提及的XKS1和/或XDH1和/或modGre3的特定基因在酿酒酵母中以所述基因的一个拷贝或更多,例如一个、两个或更多个拷贝存在。此外,以上提到的基因可与存在的也编码木酮糖激酶活性、木糖醇脱氢酶活性和木糖还原酶活性的其他天然基因一起存在。应理解的是,XKS1基因和XDH1基因的变体也被本发明涵盖,只要酶活性木酮糖激酶活性和木糖醇脱氢酶活性被编码。

[0089] 在本发明的一个实施方案中,所述氨基酸序列的片段与SEQ ID NO 1的序列具有至少85%同一性或至少90%同一性,例如91%、92%、93%、94%或95%同一性或96%、97%、98%或99%,并具有木糖还原酶活性。只要SEQ ID NO 1的片段具有木糖还原酶活性,它就被本发明涵盖。本领域技术人员将认识到,哪些氨基酸可被交换而不影响从modGre3基因编码的氨基酸序列的木糖还原酶活性。本领域技术人员知晓哪些氨基酸是相似的并可被彼此交换而不影响木糖还原酶活性。

[0090] 此外,在确定SEQ ID NO 1的片段与SEQ ID NO 1之间的氨基酸相似性方面,技术人员还可考虑所谓的“保守”氨基酸取代,如技术人员将清楚的。保守氨基酸取代是指具有相似侧链的残基的可交换性。例如,具有脂肪族侧链的一组氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸是丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的一组氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的一组氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的一组氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;和具有含硫侧链的一组氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。可能的保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、和天冬酰胺-组氨酸-谷氨酰胺。本文公开的氨基酸序列的取代变体是其中公开的序列中至少一个残基已经被移除并且不同的残基插入其位置的那些变体。对于每一种天然存在的氨基酸,可能的保守取代如下:Ala至ser;Arg至lys;Asn至Gln或his;Asp至glu;Cys至ser或ala;Gln至asn;Glu至asp;Gly至pro;His至asn或gin;Ile至leu或val;Leu至ile或val;Lys至arg;Gln或glu;Met至leu或ile;Phe至met、leu或tyr;Ser至thr;Thr至ser;Trp至tyr;Tyr至trp或phe;和Val至ile或leu。

[0091] 本发明还涵盖编码如序列表中描述的氨基酸序列或如以上描述的具有木糖还原酶活性的其片段的核酸序列。

[0092] 如本文讨论的片段,是具有与SEQ ID NO 1的氨基酸序列的部分而非全部完全相同的氨基酸序列的多肽。片段可以是“独立的(free-standing)”或被包括在更大的多肽内,所述片段形成所述更大的多肽的部分或区域。如此,片段可比SEQ ID NO 1的全长序列短,

或如果被包括在更大的肽中,则可以比SEQ ID NO 1的全长序列长。

[0093] 在本发明的一个实施方案中,根据如以上描述的方法获得的示例性菌株是2014年2月18日在荷兰微生物菌种保藏中心(Uppsalalaan 8,3584CT Utrecht,the Netherlands)保藏的具有保藏号CBS137333的酿酒酵母Taurus 13。其他示例性菌株是具有保藏号CBS137663的酿酒酵母Taurus 14、具有保藏号CBS137664的酿酒酵母Taurus 15、具有保藏号CBS137665的酿酒酵母Taurus 16、或具有保藏号CBS137666的酿酒酵母Taurus 17,其都在2014年4月15日在荷兰微生物菌种保藏中心(Uppsalalaan 8,3584CT Utrecht,the Netherlands)保藏。如以上提到的所有酿酒酵母菌株包括如在SEQ ID NO 1中公开的氨基酸序列。

[0094] 在另一实施方案中,本发明涉及如以上示例的和根据以上描述的方法制备的酿酒酵母菌株用于发酵含糖水解产物为乙醇的用途,其中所述糖选自下组:蔗糖、葡萄糖、木糖、果糖、甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖或其任何组合。水解产物可包含以上提到的糖的一种或更多种和未在此具体提到的其他糖。所述含糖水解产物的pH优选地在4-6的范围中,但水解产物的发酵也可在低于或高于范围4-6的pH起作用。在本发明的一个实施方案中,含糖水解产物是木质纤维素水解产物。水解产物通常是液体。本发明的菌株是非常稳健和营养缺陷型的,并可在无营养物供应下发酵木质纤维素流。在不存在任何营养物供应下使用本发明的菌株获得许多发酵结果。水解产物的组成决定哪些营养物是否需要被加入。然而,如已在实验部分显示的,在所有情形中其不是必需的,这从经济角度是有益的。常用和非限制性的营养物供应是0.2-1g/L尿素、硫酸镁和玉米浆。营养物可被加入到发酵中,但根据本发明其并不总是必需的。通过排除营养物供应,本发明的方法将是成本有效的。根据本发明的菌株还可发酵水解的固体材料,诸如预处理的生物质或任何其他含糖固体材料,例如小麦淀粉和玉米糝。

[0095] 在本技术领域中存在可获得的许多不同的含糖水解产物和木质纤维素水解产物,且任何此类水解产物可与如根据本发明的方法制备的酿酒酵母一起使用。木质纤维素水解产物可选自任何农业或森林残留物,诸如能量作物和完整作物。此类木质纤维素水解产物的实例是能源草水解产物、甘蔗渣水解产物、秸秆水解产物例如小麦秸秆水解产物、玉米芯水解产物、甘蔗水解产物、硬木水解产物、软木水解产物例如桦木水解产物、玉米秸秆水解产物、和其任何组合。以上列表是非穷举性的。通过本发明的发现结果,木糖,例如木质纤维素水解产物中存在的木糖,被还原为木糖醇且进一步氧化为D-木酮糖并代谢为丙酮酸盐。如本文公开的期望的终产物是乙醇,但也可以是另一终产物诸如酸、3-羟基-丙酸、丙烯酸、琥珀酸和柠檬酸或任何其他平台的化学物,只要宿主菌株包含用于此类转化的其他代谢性状。

[0096] 由本发明的菌株产生的乙醇的量是范围为35-51g乙醇/100g消耗的木糖和葡萄糖,例如35g、40g、45g或50g或在35-51乙醇/100g消耗的木糖和葡萄糖之间的任何特定值,1-2g木糖醇/100g消耗的木糖和1-8g甘油/100g消耗的木糖和葡萄糖,例如2、3、4、5、6、7g甘油/100g消耗的木糖和葡萄糖。

[0097] 含糖水解产物通过根据本发明的菌株的发酵可以以分批发酵、分批补料发酵、连续发酵、同步糖化发酵(SSF)程序、同步糖化共发酵(SSCF)程序或预水解和同步糖化发酵(PSSF)程序进行。

[0098] 在本发明的一个实施方案中,使用如制备的菌株,当发酵含糖水解产物时产生高的乙醇产率。当 $[Glc]<60\text{g/L}$ 时菌株共消耗葡萄糖和木糖,且葡萄糖以比木糖高3-10倍的速率被消耗,且木糖消耗率依赖于剩余的葡萄糖浓度。并因此,如果 $[Glc]$ 是3至80g/L (x) 且 $[Xyl]$ 是5至37g/L (y),对本发明的菌株获得的是等式 $y=-0.12+7.2x$ (图7、14-17)。即,在40g/L的剩余葡萄糖浓度时,在24g/L葡萄糖被消耗的同时,消耗了 $(-0.12*40\text{g/L}+7.2)=2.4\text{g/L}$ 木糖。而在 $[Glc]=17\text{g/L}$ 时,在16g/L葡萄糖被消耗的同时,消耗了 $(-0.12*17+7.2)=5.2\text{g/L}$ 木糖。

[0099] 已经显示,本发明的菌株可处理高和低浓度二者的木糖和葡萄糖二者。

[0100] 在用于通过本发明的菌株的厌氧发酵的培养基中,糖(优选地木糖和葡萄糖)的量是 $>100\text{g/L}$,例如 $>200\text{g/L}$,或其间的任何值。150-250g/L糖的范围,例如160、170、180、190、200、210、220、230、240g/L糖或所述区间中的任何特定值可通过使用本发明的菌株发酵。在本发明的一个实施方案中,木糖的浓度是 $>10\text{g/L}$ 木糖和/或葡萄糖的浓度是 $>10\text{g/L}$ 。被发酵的糖类可以是葡萄糖、木糖、半乳糖和阿拉伯糖,其存在于木质纤维素水解产物中。

[0101] 在本发明的另一实施方案中,当发酵含糖水解产物时,即使在抑制剂诸如糠醛、HMF、甲酸、乙酰丙酸、乙酸和酚类的存在下,使用如制备的菌株产生高的乙醇产率。

[0102] 如此,根据本发明,已经获得了稳健的酿酒酵母菌株,其即使在高浓度抑制剂的存在下提供高的乙醇产率、低的副产物产率诸如木糖醇。如此,已经提供了一种菌株,所述菌株以35-51克乙醇/100克消耗的木糖和葡萄糖的产率发酵木质纤维素材料中除了存在的其他糖之外,木糖。根据本发明的菌株具有接近葡萄糖消耗率的高的木糖消耗率,这是高度期望的。根据本发明的菌株可以以 $\mu=0.25\text{h}^{-1} (+0.02)$ 的比生长速率在限定木糖培养基中繁殖。

[0103] 本发明的菌株不含 β -内酰胺酶基因,所述 β -内酰胺酶基因是在为了获得新性状对酵母遗传工程化时常引入的一种抗生素抗性基因。

[0104] 已经清楚地显示,根据本发明的菌株可在5种不同类型的水解产物(甘蔗渣、桦木、小麦秸秆、玉米秸秆和硬木)中在木糖的厌氧发酵中表现良好。

[0105] 本发明的菌株转化仅1-2%消耗的木糖为木糖醇,参见图4-23。

[0106] 此外,根据本发明的菌株能够发酵 $>98.5\%$ 可得的木糖。

[0107] 本申请中使用的所有技术术语具有普通技术人员通常所理解的含义。

[0108] 本发明的菌株可以从工业酵母菌株以及实验室酵母菌株制备,尽管工业酵母菌株为优选的。工业菌株与实验室菌株相比更不好确定,因为它具有每一条染色体的若干个拷贝。因此,如已根据本发明进行的操作工业菌株是一项更大的挑战。

[0109] 实验描述

[0110] 实验1

[0111] 用于构建根据本发明的菌株的方法描述。

[0112] USM21 (CBS102678) 的菌株形成孢子和与来源于CBS102679和CBS128139的演化的单倍体木糖发酵菌株的接合。

[0113] 第1天:将酵母菌株USM21 (CBS102678) 在YPD琼脂平板上划线并在30°C孵育3天。将另一酵母菌株在20g/L木糖琼脂平板上划线并在30°C将平板孵育4天,所述另一酵母菌株具有引入的DNA从而导致酵母(酿酒酵母)获得从*Scheffersomyces stipitis*获得的编码木糖

还原酶和木糖醇脱氢酶和从酿酒酵母获得的编码木酮糖激酶的第二组基因并为了木糖发酵演化,是单倍体(此外称为演化的菌株)。

[0114] 第5天:将USM21细胞转移到2%KAc琼脂平板上,并在30℃放置4天和在室温放置3天。菌株届时已经形成孢子,且通过在30℃用具有1mM EDTA的10mM Tris pH 7.5中的1mg/ml溶细胞酶(Lyticase)处理40min将单独的孢子从彼此消化。使用剥离装置将单独的孢子移到YPD平板上并与演化的菌株的1至数个细胞混合。制备多于20个此类混合物。还将来自USM21的4个孢子放置在YPD平板上而无来自演化的木糖菌株的细胞。在30℃孵育平板5天。

[0115] 第10天:在已经放置混合物USM21和演化的木糖菌株处出现菌落,这些潜在地包含新接合的细胞。在仅放置剥离的USM21孢子处也存在菌落。挑取的这两种类型的菌落以及来自带有演化的菌株的木糖琼脂平板的单独菌落在液体YPD培养基中生长过夜,然后得到 $OD_{600}=2-5$ 。将等量的具有接合的USM21+演化的菌株培养物的细胞混合,并通过稀释到水中,将OD设置到0.1、0.01和0.001。然后将50 μ l不同OD混合物放置到木糖-遗传霉素平板上。在相同的平板上还放置对应滴的单独的原始菌落(USM21和演化的菌落)。将平板在30℃孵育5天。

[0116] 第15天:菌落仅在其中 $OD=0.1$ 的具有接合的USM21和演化的木糖菌株细胞滴被放置处的滴中出现。仅新剥离的USM21细胞或加入的演化的菌株的细胞无生长。利用剥离装置挑取到带有20g/L葡萄糖的YPD平板上的数十个单独的菌落的菌株杂交。然后在30℃孵育带有杂交的菌株的YPD平板持续4天。

[0117] 第19天:然后在显微镜中检查数十个菌落,并仅使用来自包含表现像典型出芽酵母(如一个小的和一个大的卵在一起)的细胞类型的菌落的那些细胞。将20个不同菌落在单独小瓶中生长过夜,每个小瓶中带有15ml 20g/L葡萄糖最低限度培养基。在10ml中加入等量细胞制备细胞的混合物以使得 $OD=2.0$,对应 1×10^8 细胞。然后将这一混合物在30℃以130rpm在摇瓶中100ml体积中在木糖上需氧地生长2周,随后在25-30℃,以 $\mu=0.05h^{-1}$ 的稀释度和pH 4.5-5.5,在向反应器中供料限定培养基15g/L木糖的条件下,以300rpm在搅拌摇瓶中在恒化器培养中半需氧生长2周。

[0118] 第47天:然后使微需氧恒化器中的细胞厌氧地生长9周,所述生长使用15g/L木糖限定培养基,供料速率为 $\mu=0.12h^{-1}$,但泵关6h随后开6h。pH和温度分别维持在pH 5和33℃。来自消耗的木糖的木糖醇产率在前35天下降,且供料继续另外的30天(图2A)。在第65天将限定培养基与水解产物混合,产生包含30g/L木糖+0.6g/L葡萄糖,其使用34天并直到木糖醇和甘油产率 $<0.01g/克$ 消耗的木糖,参见图2B。在第75天后使用恒定供料。在99天后将恒化器中的细胞划线到YPD平板上。将细胞在YPD平板上划线,并在30℃4天后挑取一个单菌落,并划线到新的YPD平板上,并再次在30℃静置4天。然后,使用单菌落细胞并在带有3%葡萄糖的限定培养基中生长过夜,且细胞冷冻作为甘油储备液且其后被保藏并称为以下各菌株:Taurus13、Taurus14、Taurus15、Taurus16和Taurus17。使用木质纤维素材料的厌氧发酵从在YPD平板上的单菌落的细胞或从作为30%甘油储备液储存的细胞开始。

[0119] 实验2

[0120] 水解产物(pH):水解产物(pH):小麦秸秆水解产物pH 5.0;甘蔗渣水解产物pH 5.0;桦木水解产物pH 6.0;玉米秸秆水解产物pH 5.0,硬木水解产物pH 5.5;玉米秸秆pH 5.5分批供料;SSF 10%WIS小麦秸秆pH 5;SSF 10%WIS玉米芯pH 5。淀粉介质(pH):玉米醪

pH 5.0。

[0121] 在图4-23中,所有水解产物被厌氧发酵,在加入酵母之前除了用于设置pH的数滴浓碱/酸无任何物质添加。在图17-23中,向玉米秸秆加入各1g/L的尿素、 KH_2PO_4 和玉米浆。

[0122] 制备琼脂平板的描述,以2%木糖琼脂平板(0.5L)示例:将两个单独的烧瓶高压灭菌,0.25L带有15g木糖且0.25L带有2.5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1.5g KH_2PO_4 、0.25g MgSO_4 、0.85g酵母氮基和10g琼脂。烧瓶之一中包括搅拌棒。高压灭菌后,将烧瓶设置为在室温冷却10min,将溶液在实验室台上混合,搅拌5min,倒入平板,每个90mm直径平板中25ml培养基,将平板静置以固化1h。将平板在4℃储存持续多达3个月。

[0123] 按照在2%木糖琼脂平板描述中的相同程序、和将糖类单独高压灭菌,使用的平板的成分描述。YPD琼脂平板:20g/L葡萄糖、20g/L细菌蛋白胨、10g/L酵母提取物、20g/L琼脂;2%KAc琼脂平板:20g/L KAc、20g/L琼脂;2%木糖琼脂平板:20g/L木糖、1.3g/L YNB、5g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、3g/L KH_2PO_4 、0.2g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、20g/L琼脂。

[0124] 带有15g/L木糖的最低限度培养基(1L):分别在2个烧瓶中高压灭菌,1个烧瓶带有0.5L H_2O ,混合有15g木糖,1个烧瓶带有5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、3g KH_2PO_4 、0.5g MgSO_4 (基盐)。高压灭菌后,混合溶液并静置以冷却10min,且然后加入2ml微量元素溶液和1ml维生素溶液(Verdyun等.Yeast, 8:501-517, 1992)。20x基盐的储备溶液(1L):100g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、60g/L KH_2PO_4 、4g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

[0125] 用于厌氧发酵的方法描述

[0126] 第1天:预培养:从冷冻甘油储备物取出50μl酵母细胞或从YPD平板取出单菌落到15ml 30g/L葡萄糖中并以175rpm和30℃生长24h。

[0127] 第2天:培养以获得酵母生物质:在24h后且当 $\text{OD}_{600}=2-4$ 时,将15ml预培养物加入到带有加入的7.5ml 20x基盐的150ml 30%过滤的木质纤维素材料pH 6中。加入来自400g/L储备溶液的葡萄糖和木糖以在培养基中获得30g/L葡萄糖和30g/L木糖。将培养物以130rpm和30℃放置20h。

[0128] 第3天:将摇瓶中的细胞转移到预称重的瓶中,并以4000xg旋转5min。使用 $\text{CDW}=2\text{g/L}$,来自150ml培养物的细胞对于以木质纤维素的4x50ml厌氧发酵是足够的。在离心后倒掉培养基,且剩余的1-2ml残留液体用微量移液管取出。称重带有细胞团的瓶,且空的和含有细胞团的离心管之间的差异提供获得的细胞量的估值。

[0129] 然后将0.4g湿细胞加入到带有气塞的150ml厌氧烧瓶中的50ml体积。图4-16中的培养物在30℃以130rpm孵育达25-72小时,此时葡萄糖和木糖的发酵完成。对于72小时的总时间,每3至24小时获取样品。图17-23中展示的来自培养物的结果在35℃孵育96h的总时间。通过从厌氧室抽吸而不打开气塞来获取样品。在发酵期间,气塞玻璃筒装有4ml 30%甘油溶液。

[0130] 木质纤维素液体的处理。利用碱加入,将pH设置到特定值pH 5、5.5或6。然后使用通过0.2μm尼龙滤器抽吸过滤溶液,其然后为厌氧发酵实验准备好。

[0131] 样品收集和分析:在发酵期间始终收集样品,将各0.5-1ml液体的样品通过0.2μm尼龙滤器过滤并然后将溶液储存在-20℃,直到收集数个样品用于HPLC分析。为了分析样品,将这些在室温解冻30min,并且对于3x稀释,然后将0.2ml样品与0.4ml 5mM H_2SO_4 混合,随后上样到HPLC柱。具有高葡萄糖/木糖(>70g/L)和/或乙醇(>40g/L)的一些样品以6x稀释

使用,将0.1ml样品与0.5ml 5mM H₂SO₄混合。糖类和代谢物的分析使用HPLC系统(Ultimate 3000,Dionex,Sunnyvale,US)进行。葡萄糖、木糖、乙醇、木糖醇、甘油、乙酸、HMF和糠醛使用“RESEX ROA-Organic Acids H⁺(Phenomenex)”柱(Bio-Rad Laboratories,München, Germany)分离,以5mM H₂SO₄作为洗脱液。柱在80℃和以0.8mL min⁻¹的流速操作。乙醇、木糖醇、甘油和乙酸用折光率检测器Shodex RI-101(Showa Denko,New York,NY)检测,而HMF和糠醛使用UV检测器在210nm(Dionex,Sunnyvale,US)检测。

[0132] 酶测定

[0133] 木糖还原酶活性在37℃在包含100mM三乙醇胺pH 7.0、1.75mM木糖、10mM NADPH和适当量的无细胞提取物的反应混合物中测定。木糖醇脱氢酶活性在37℃在包含甘氨酸/MgCl₂ 20/10mM pH 9、300mM木糖醇和3mM NAD⁺和适当量的无细胞提取物的反应混合物中测定。形成的木糖醇或木酮糖的量分别通过在340nm监测NADPH氧化和NAD⁺还原来确定(Bettiga等,2009,MCF,8:40)。比活性表示为单位/mg蛋白。蛋白用Bradford测定来确定,以牛γ-球蛋白作为标准品。木糖还原酶活性的单位(U)在本文定义为每分钟产生1nmol木糖醇或木酮糖的酶的量。

[0134] 用于确定modGre3的氨基酸序列的方法描述。

[0135] 将本发明的菌株Taurus13、Taurus14、Taurus15、Taurus16、Taurus17在YPD-2%葡萄糖平板上划线,然后在30℃孵育3天,将来自每种菌株的单菌落转移到15ml最低限度培养基3%葡萄糖中并置于200rpm、30℃过夜。第二天离心细胞,并制备基因组DNA。然后将10ng纯化的基因组DNA放入50μl聚合酶链式反应中,modGre3基因在标准30个循环的反应中以侧翼引物扩增。纯化扩增的1kb PCR片段DNA并使用侧翼引物进行DNA测序。modGre3基因在所有所述菌株Taurus13、Taurus14、Taurus15、Taurus16、Taurus17中被鉴定。

序列表

<110> 斯堪的纳维亚科技集团公司
 <120> 酿酒酵母菌株
 <130> 21075859
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)
 <400> 1

Met Pro Gln Val Gly Phe Gly Cys Trp Lys Ser Thr Thr Thr Cys Ala
 1 5 10 15
 Asp Gln Ile Tyr Asn Ala Ile Lys Val Gly Tyr Arg Leu Phe Asp Gly
 20 25 30
 Ala Glu Asp Tyr Gly Asn Glu Lys Glu Val Gly Asp Gly Ile Lys Arg
 35 40 45
 Ala Ile Asp Glu Gly Leu Val Ala Arg Asp Glu Leu Phe Val Val Ser
 50 55 60
 Lys Leu Trp Asn Asn Phe His His Pro Asp Asn Val Glu Lys Ala Leu
 65 70 75 80
 Asp Arg Thr Leu Ser Asp Leu Lys Val Asp Tyr Leu Asp Leu Phe Leu
 85 90 95
 [0001] Ile His Phe Pro Ile Ala Phe Lys Phe Val Pro Phe Asp Glu Lys Tyr
 100 105 110
 Pro Pro Gly Phe Tyr Cys Gly Asp Gly Asp Lys Phe Ile Tyr Glu Asp
 115 120 125
 Val Pro Leu Leu Ser Thr Trp Lys Lys Leu Glu Glu Met Val Lys Lys
 130 135 140
 Gly Lys Val Arg Ser Ile Gly Ile Ser Asn Phe Cys Gly Gly Leu Ile
 145 150 155 160
 Gln Asp Leu Leu Arg Gly Ala Glu Ile Pro Pro Ala Val Leu Gln Ile
 165 170 175
 Glu His His Pro Tyr Leu Gln Gln Pro Arg Leu Val Lys Trp Val Gln
 180 185 190
 Ser Lys Gly Ile Ala Ile Thr Ala Tyr Ser Ser Phe Gly Pro Gln Ser
 195 200 205
 Phe Val Glu Leu Asp His Pro Lys Val Asp Asn Cys Val Thr Leu Phe
 210 215 220
 Lys His Glu Asp Ile Val Ser Ile Ala Glu Asn His Lys Lys Ser Thr
 225 230 235 240
 Ala Gln Val Leu Leu Arg Trp Ala Thr Gln Arg Gly Leu Ala Val Ile
 245 250 255
 Pro Lys Ser Asn Gln Thr Glu Arg Leu Val Ala Asn Leu Thr Val Asn
 260 265 270
 Asp Phe Asp Leu Thr Asn Glu Glu Ile Glu Thr Ile Ser Lys Leu Asp
 275 280 285

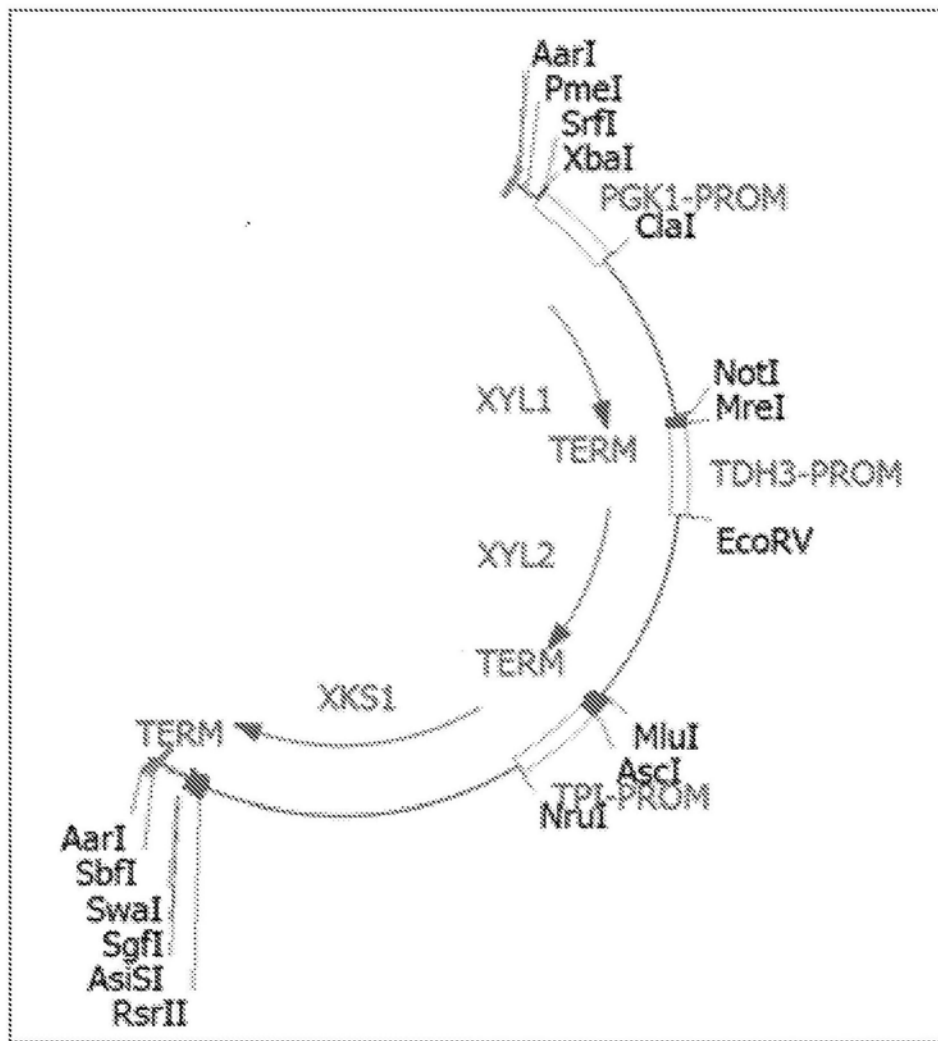


图1

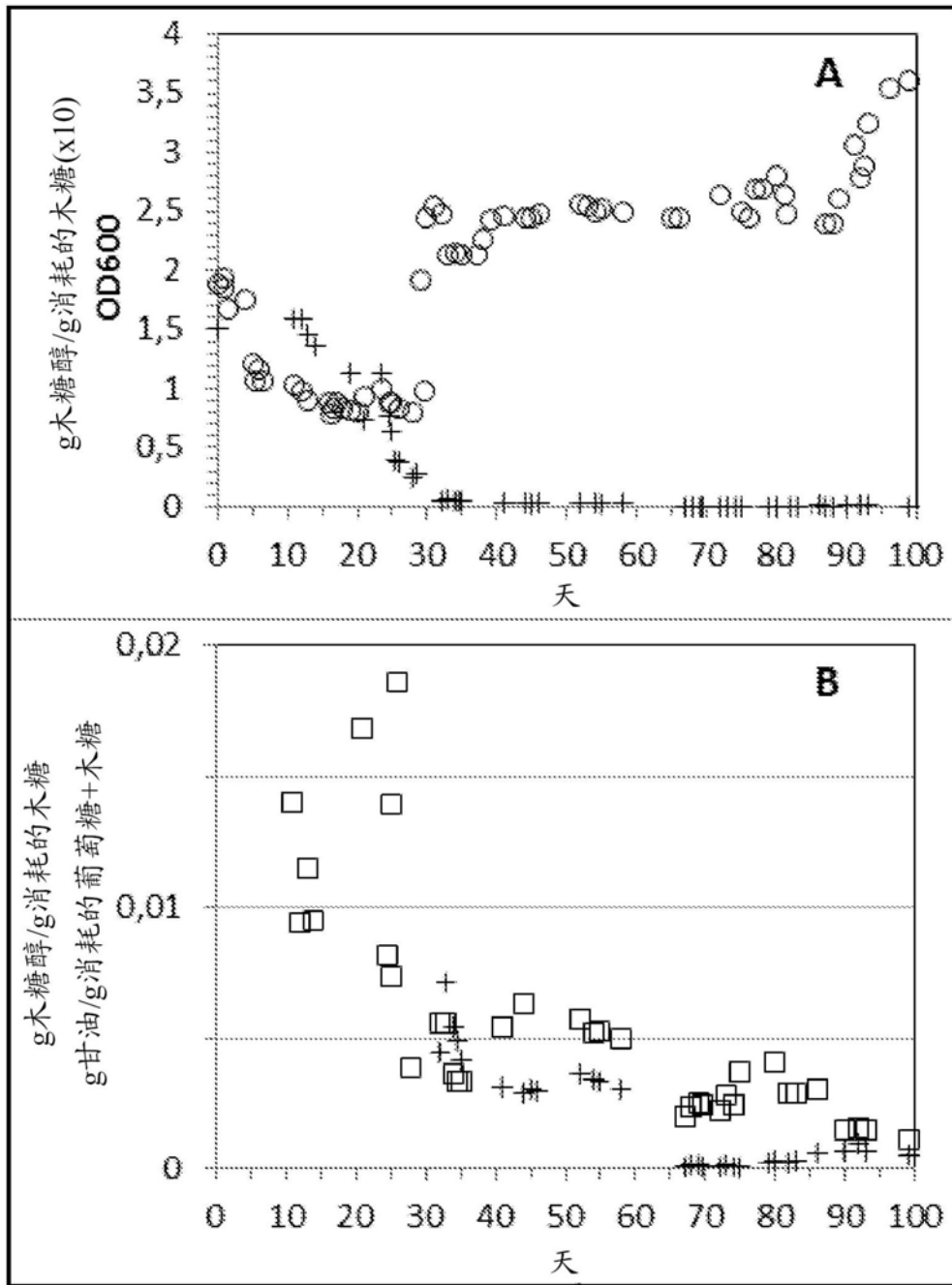


图2A和2B

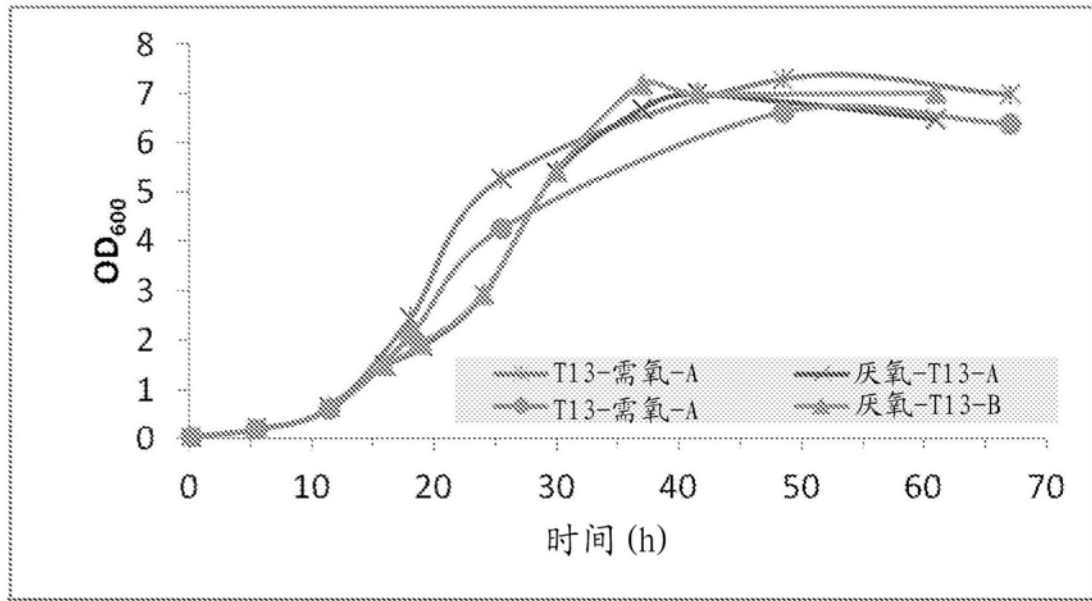


图3

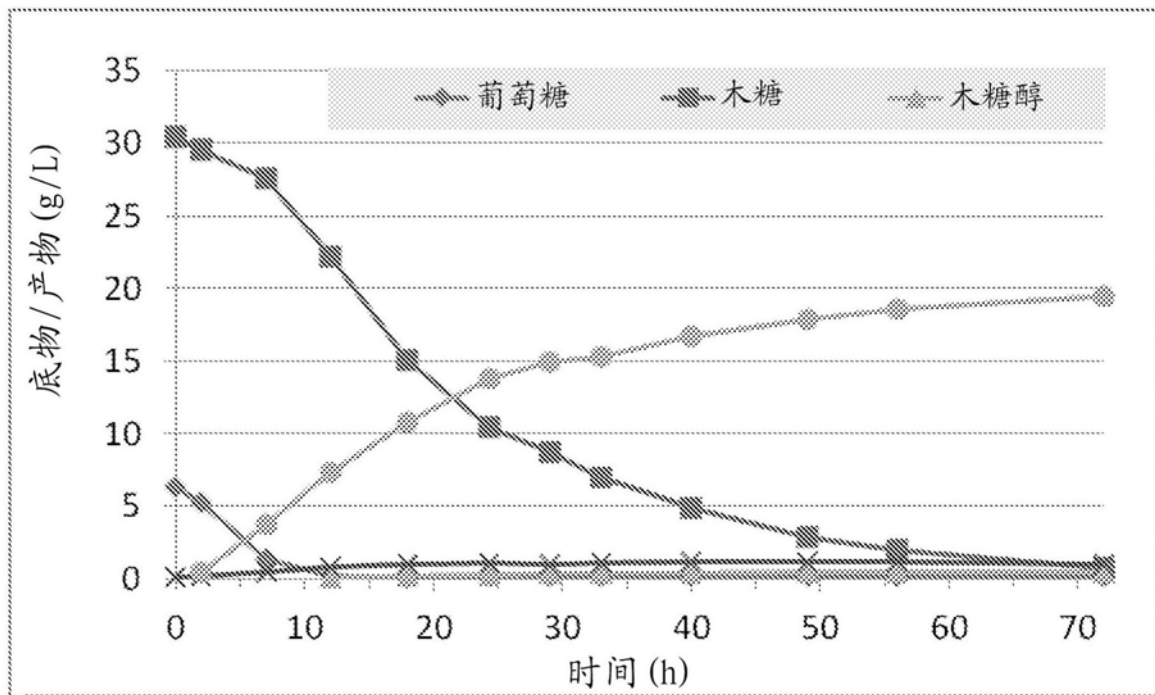


图4

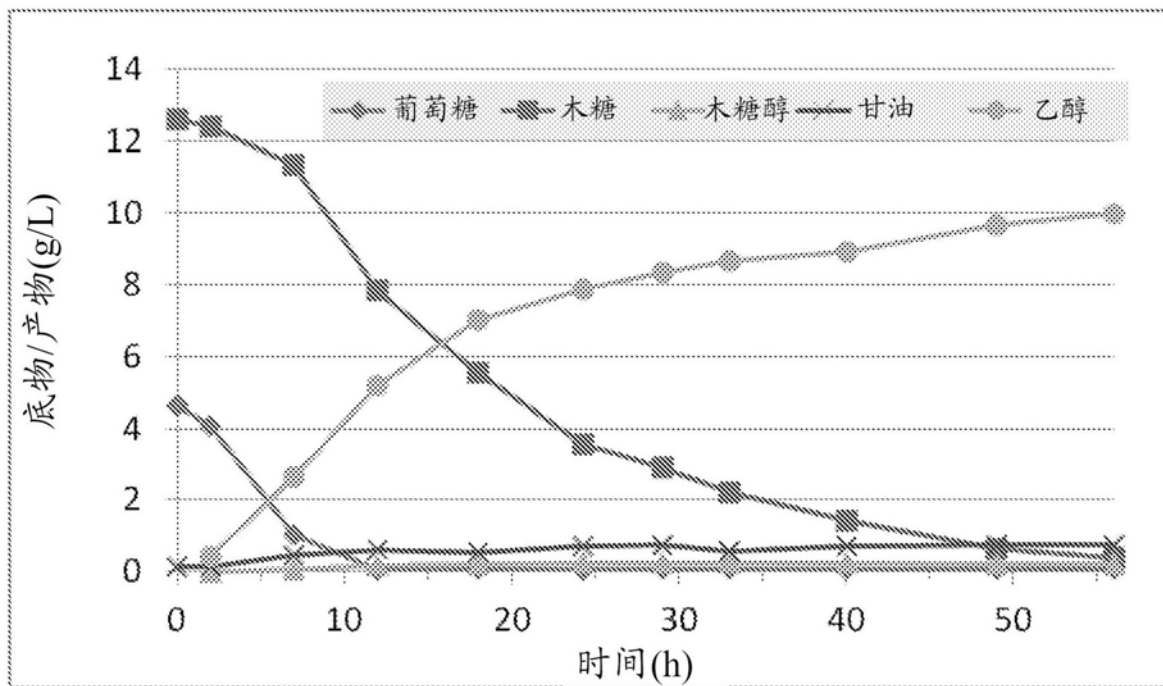


图5

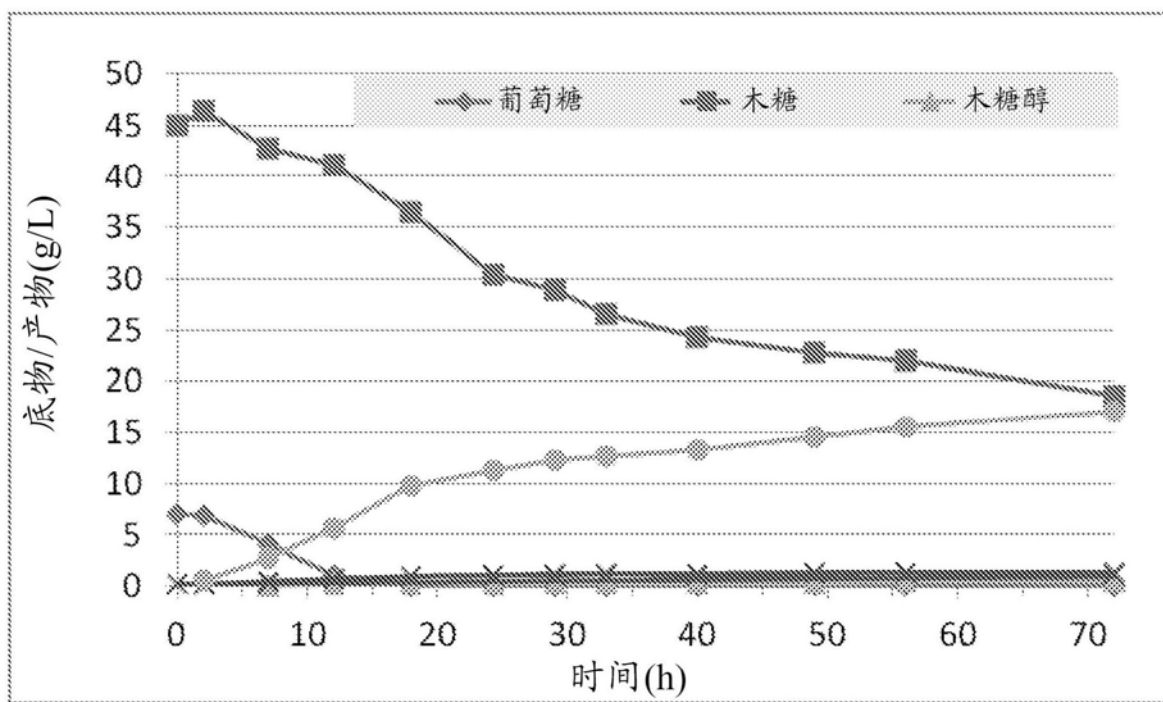


图6

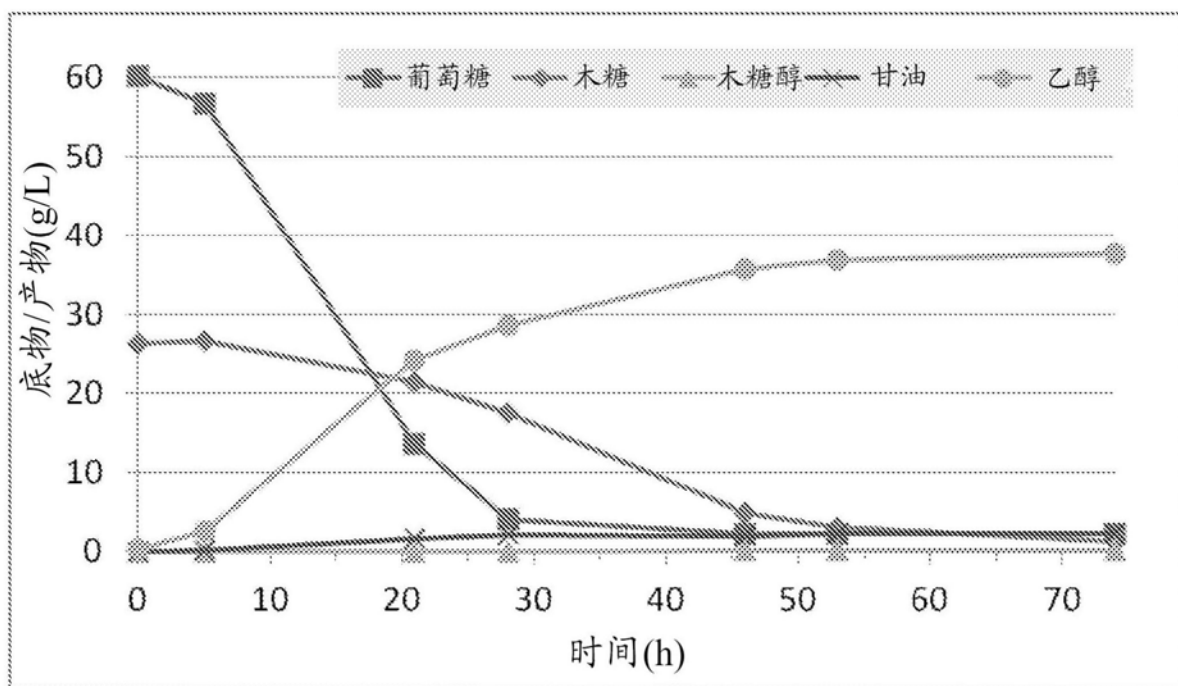


图7

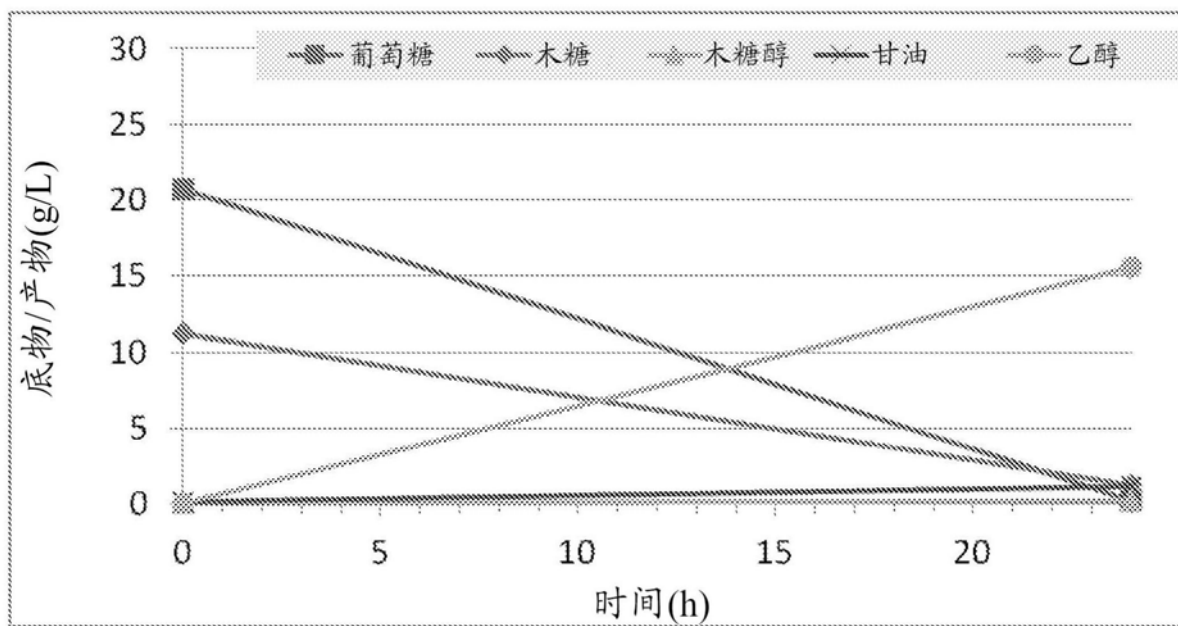


图8

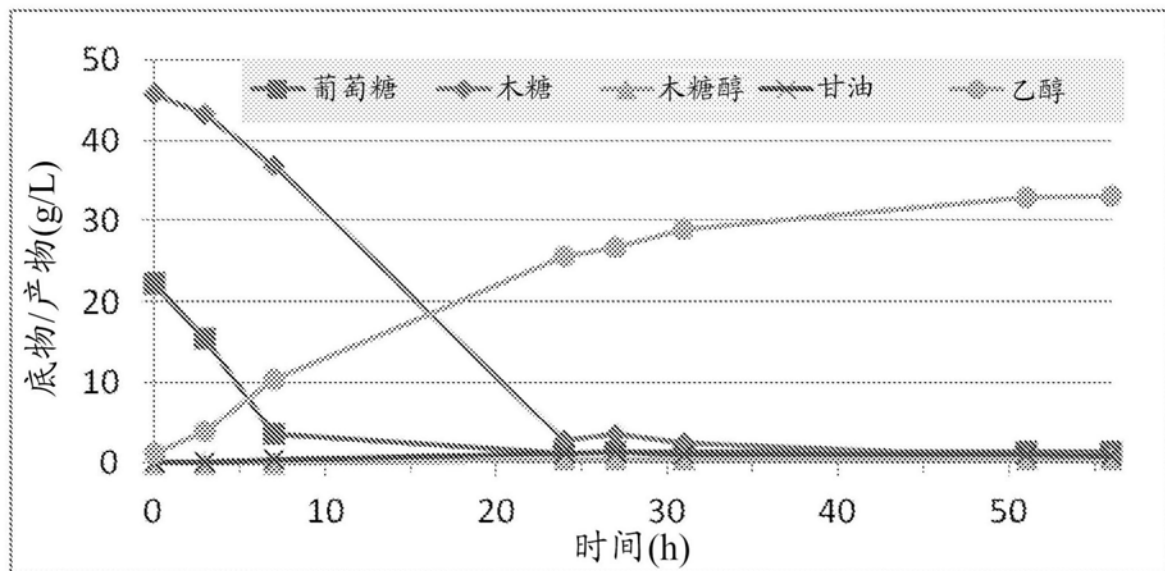


图9

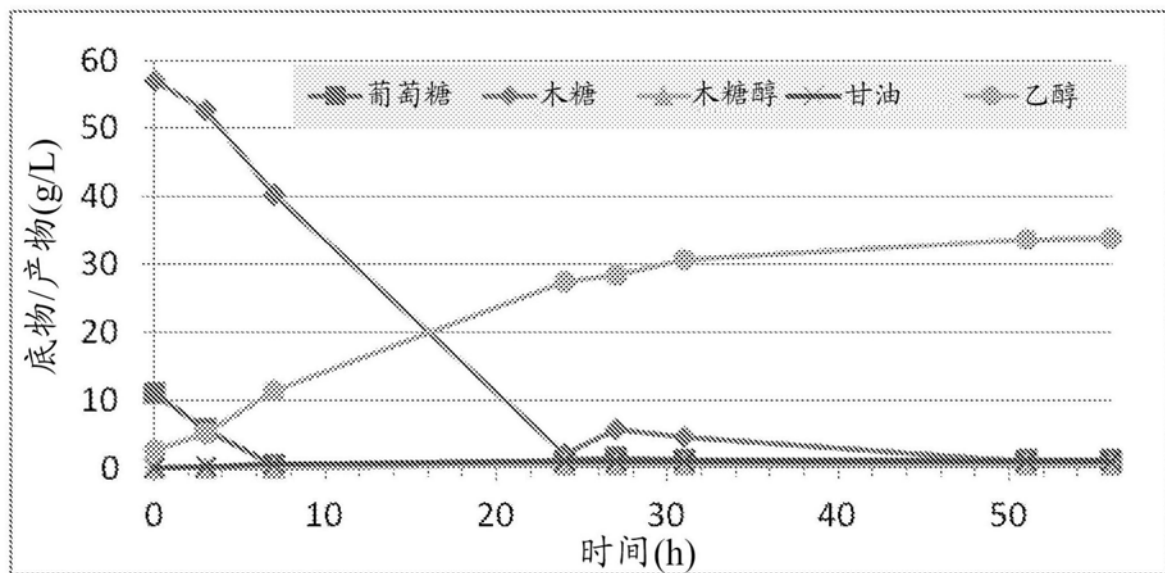


图10

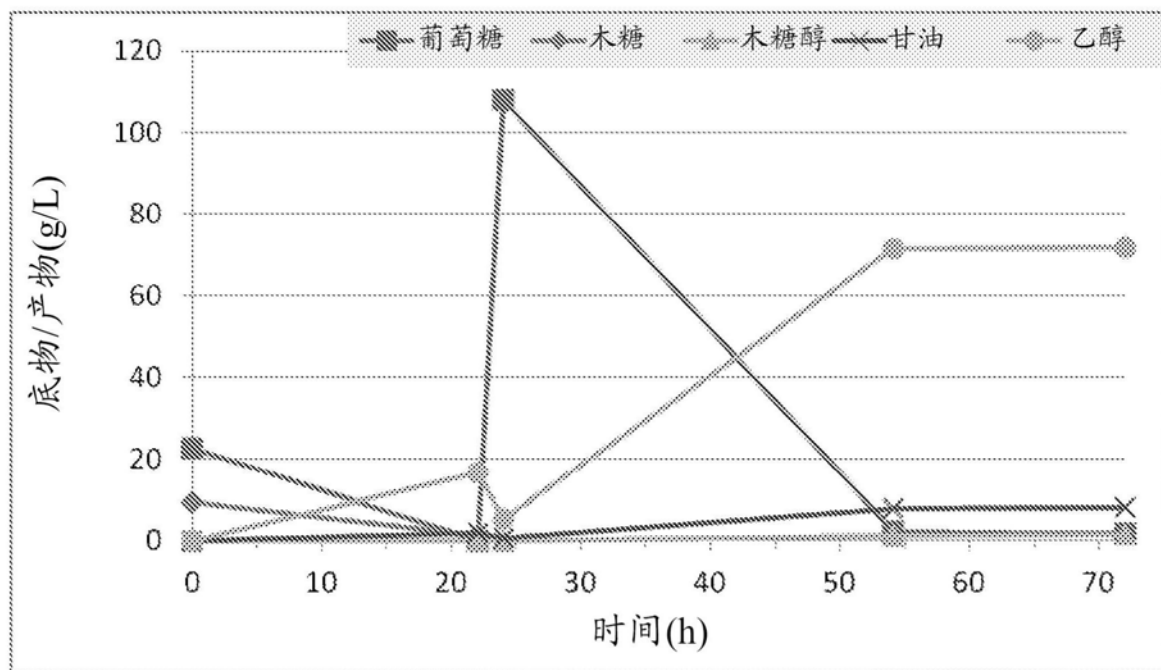


图11

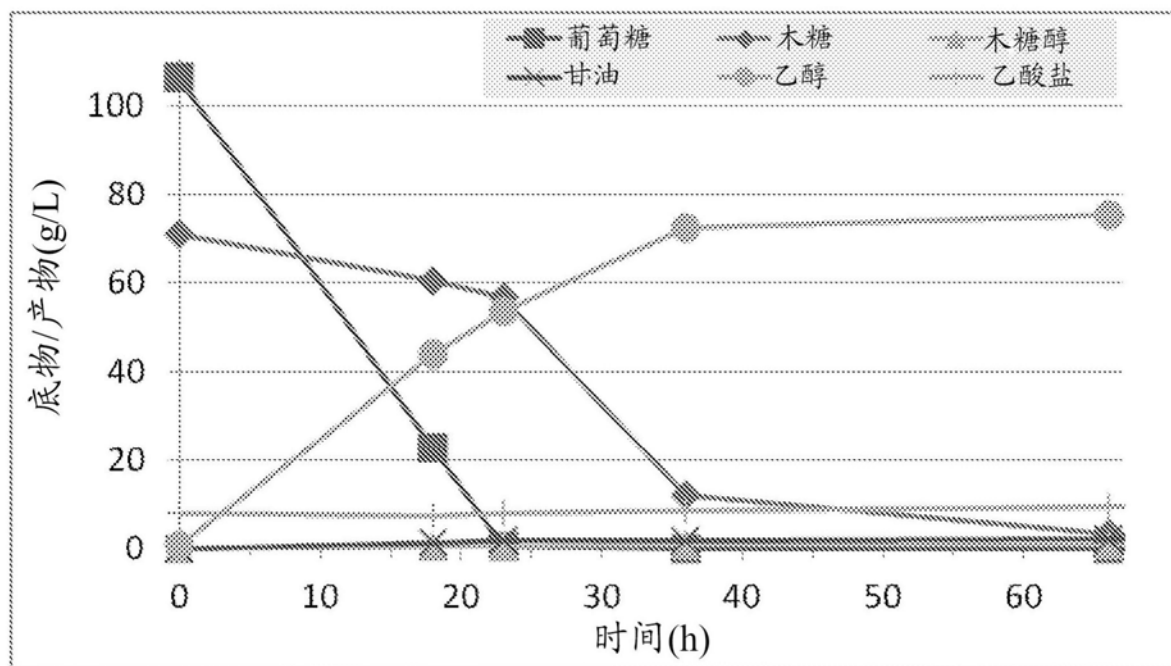


图12

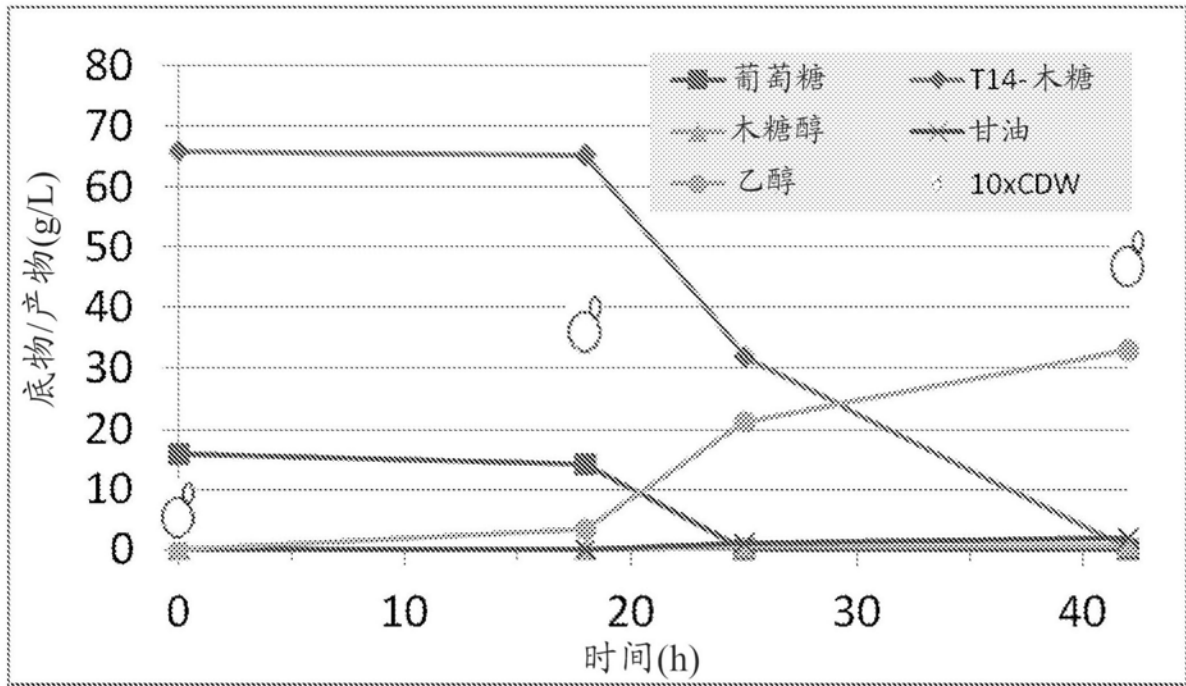


图13

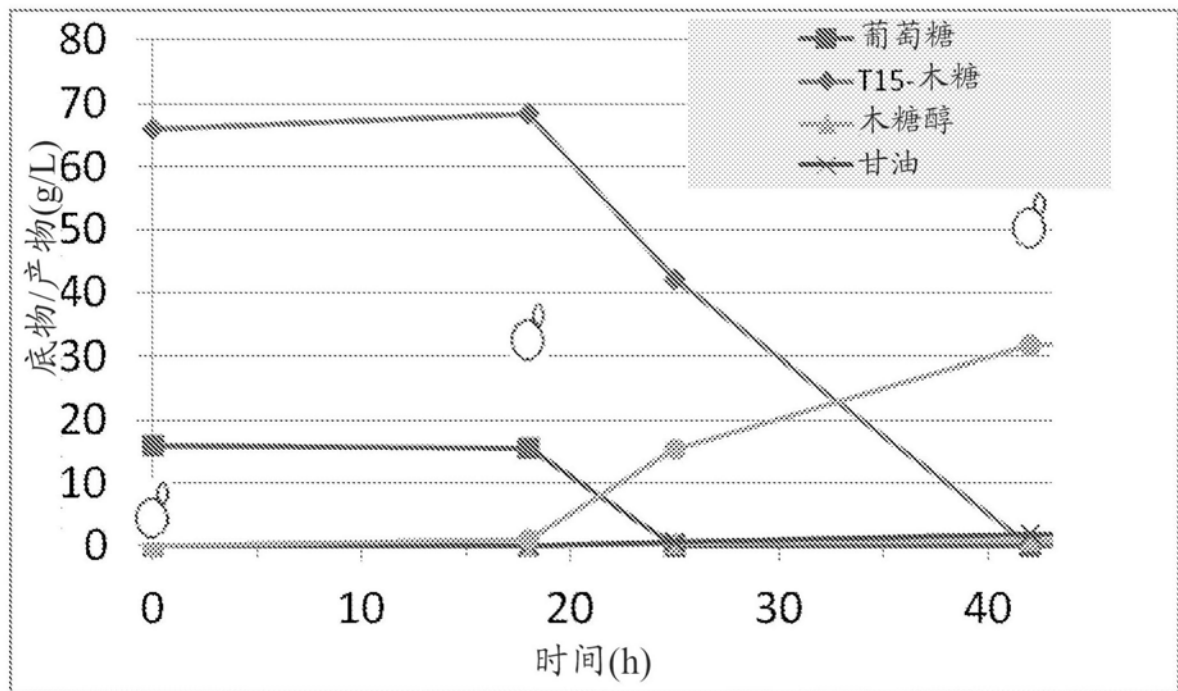


图14

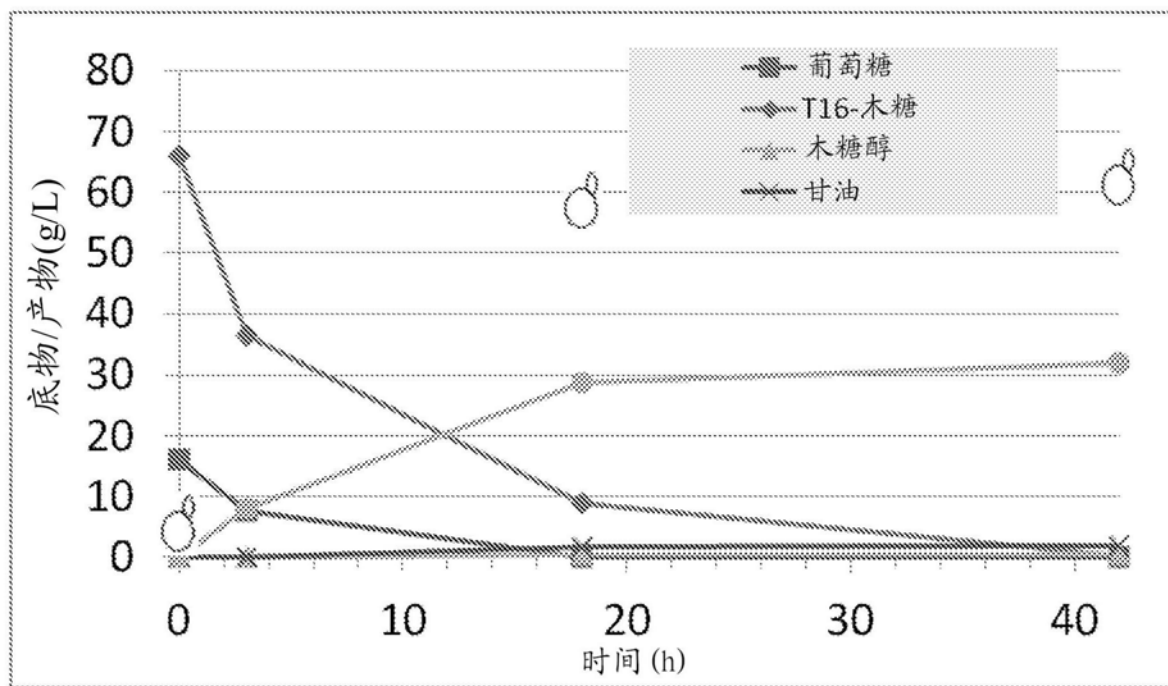


图15

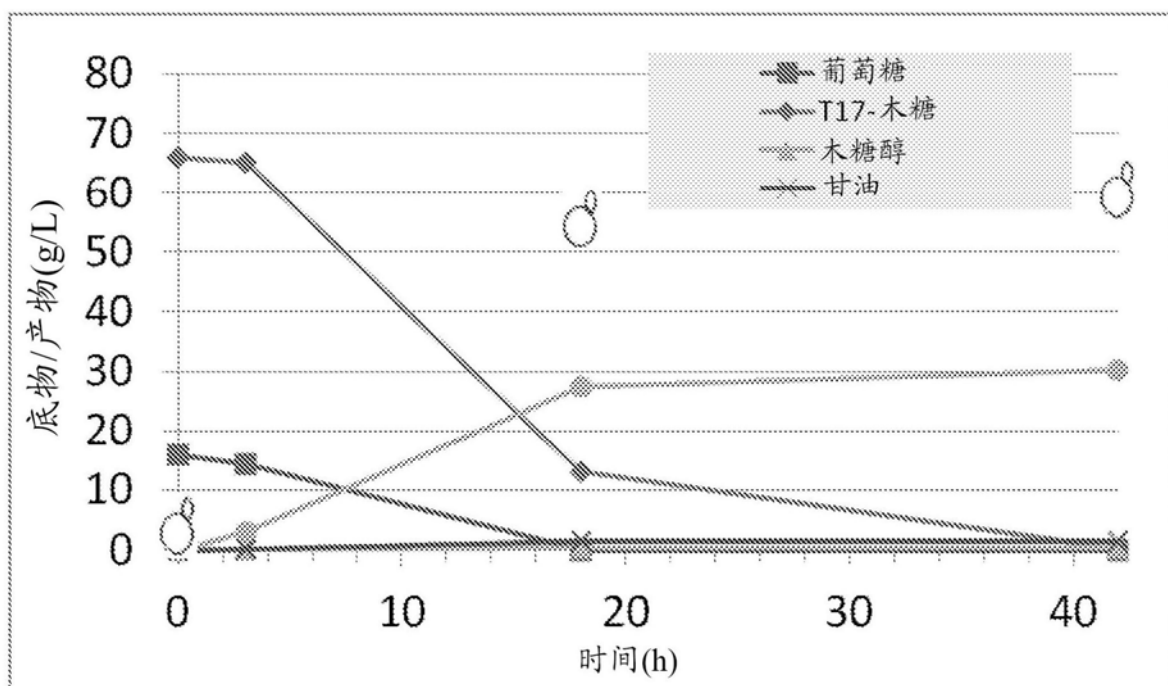


图16

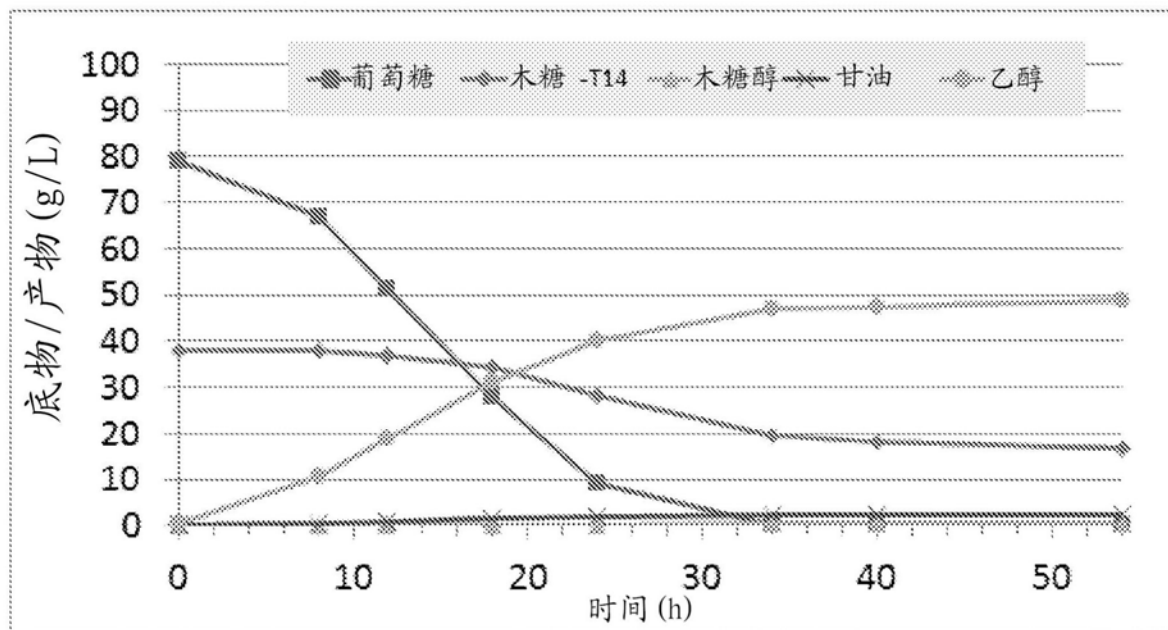


图17

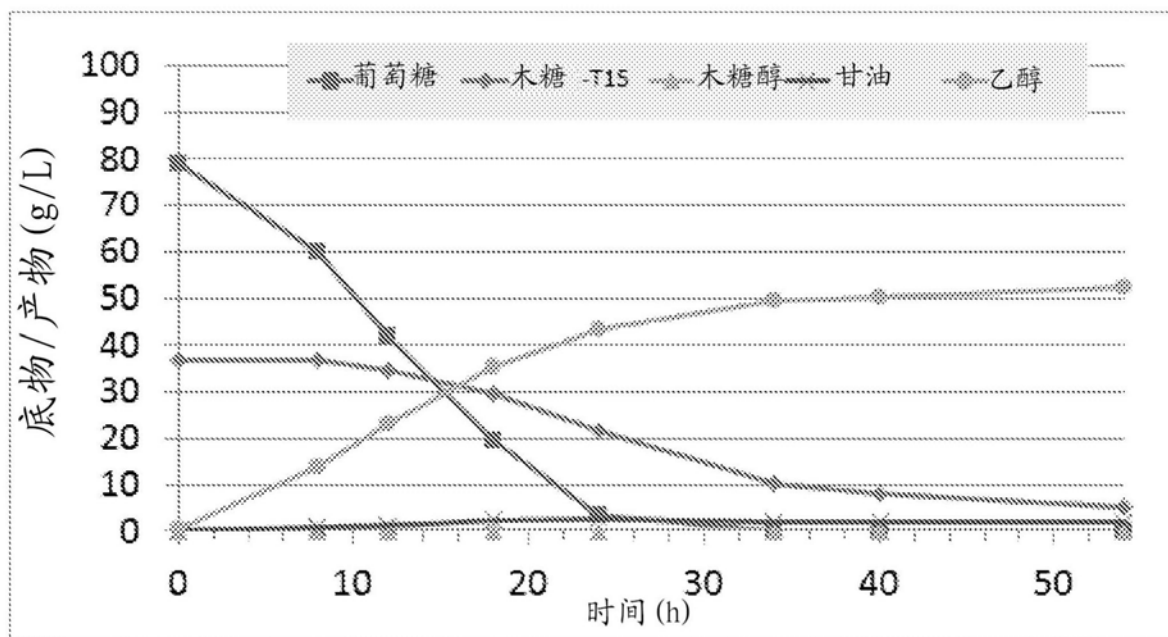


图18

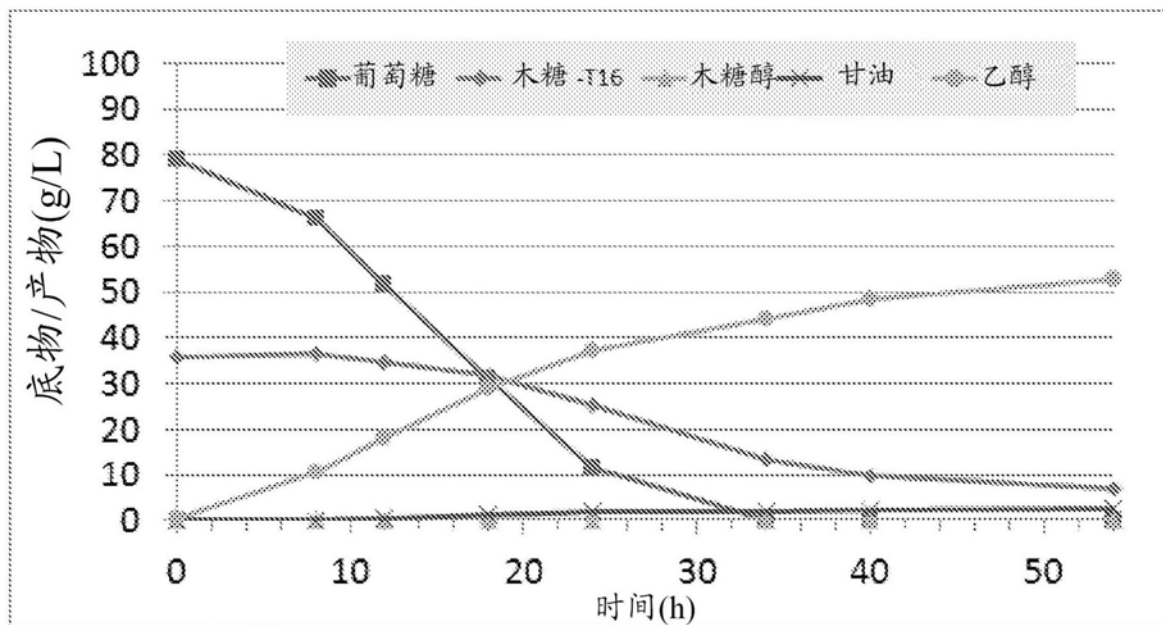


图19

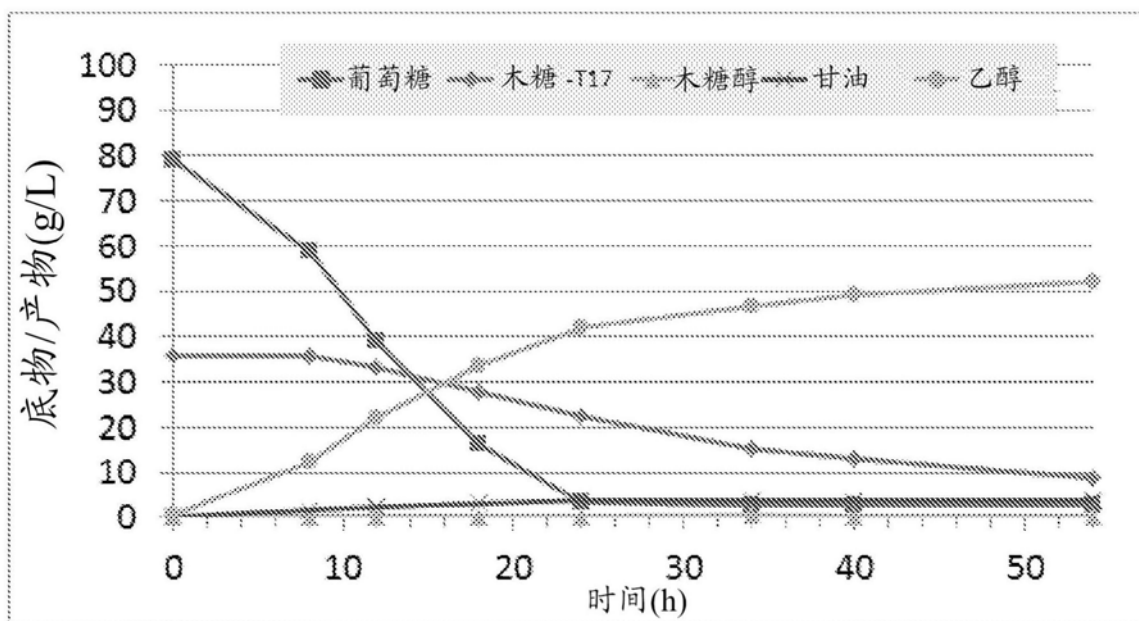


图20

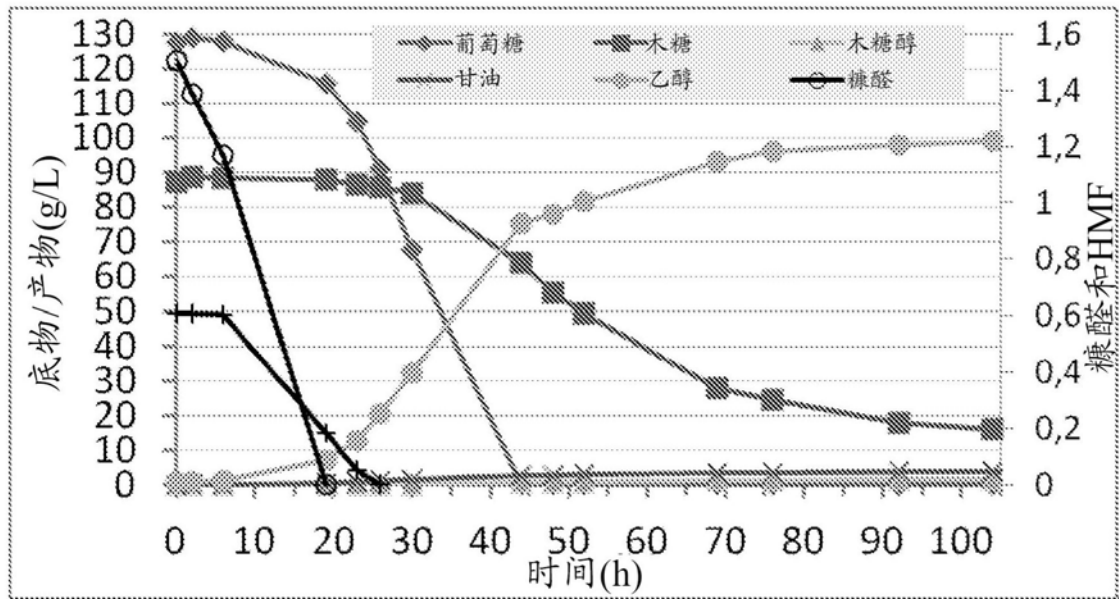


图21

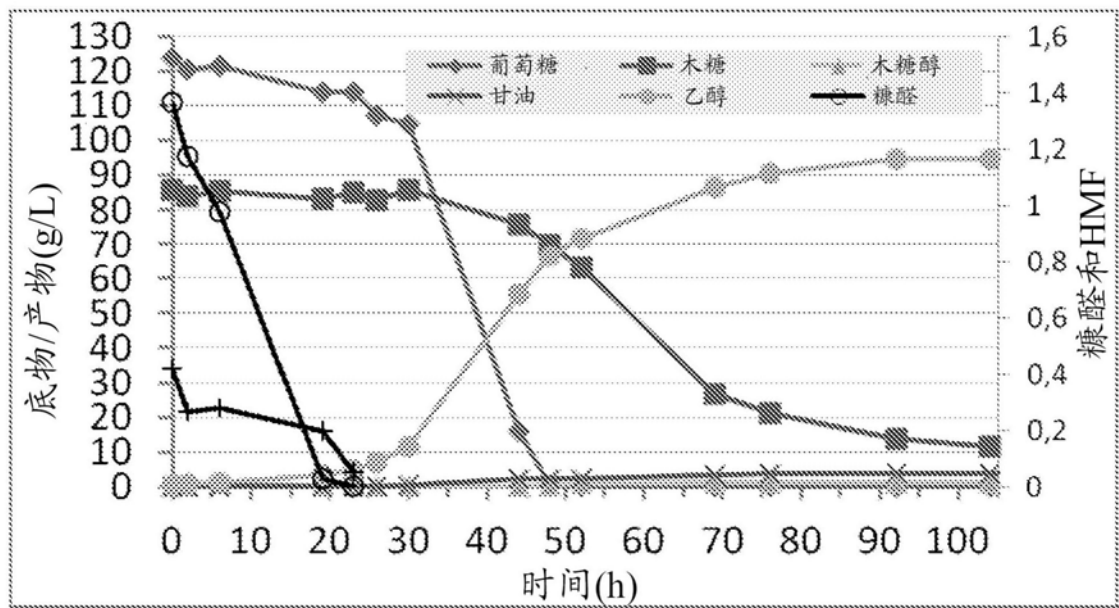


图22

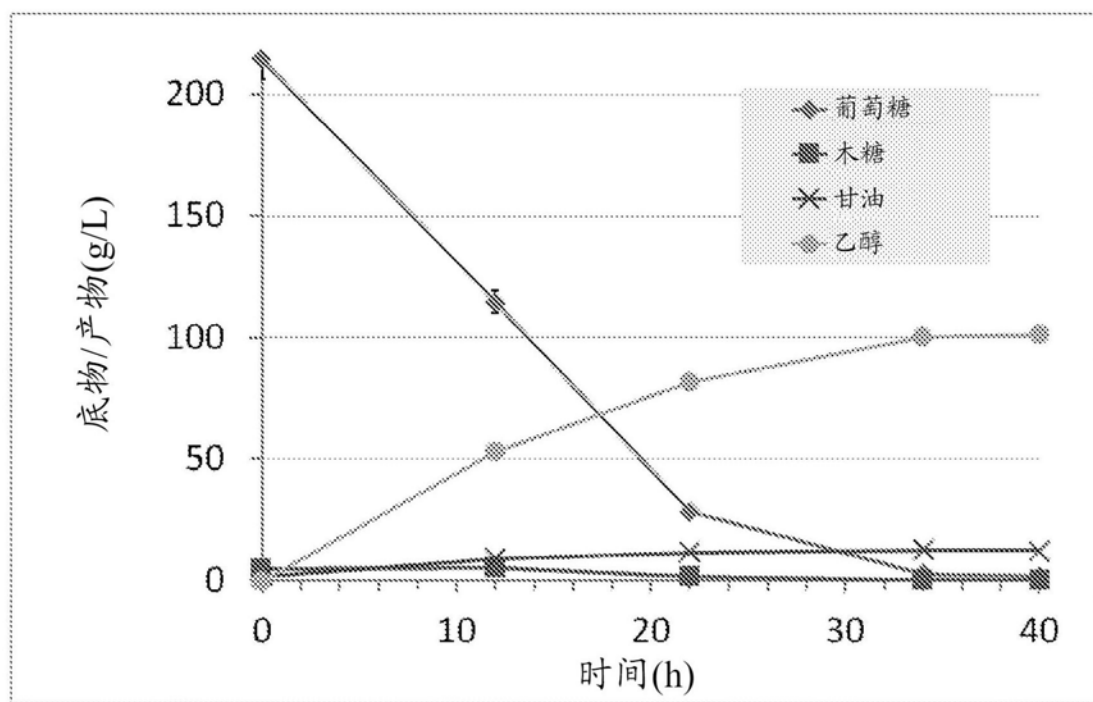


图23

MSSIKLNSGYDMPQVGFG**GC**WKSTTTCADQIYNAIKVGYRLFDGAED**YG**NEKEVGDGIK
 RAIDGLVARDELFVVSK**LW**NNFHHPDNVEKALDRTLSDLKVDYLDLFLI**HF**PIAFKF
 VPFDEKYPPGFYCGDGDKFIYEDVPLLSTWKKLEEMVKKGKVRSIGI**SN**FCCGLIQDL
 LRGAEIPPAVLQIEHHPYLQQPRLVKWVQSKGIAITAY**SS**FG**QS**FVELDHPKVDNCV
 TLFKHEDIVSIAENHKKSTA**AQ**VLLRWATQ**RG**LAV**IP**KS**NQ**TERLVANLTV**N**DFDLTNE
 ELETISKLDINLRF**ND**PWDWDKIPFV

图24

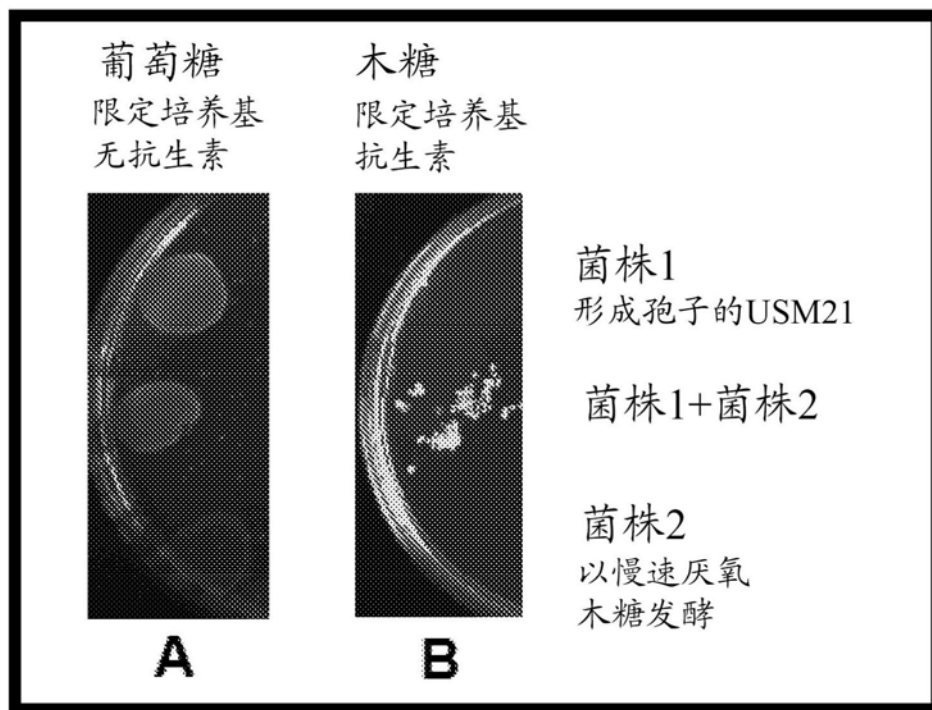


图25

培养基	图/菌株	葡萄糖	木糖	TS ¹	Y ² _{EtOH} /TS	Y ³ _{木糖醇} /消耗的木糖	Y _{甘油} /TS	HAC	HMF	糠醛
小麦秸秆	4/T13	6	30	36	0,51	0,02	0,03	2,6	0,1	2
甘蔗渣	5/T13	6	12	16	0,51	0,02	0,04	9,5	0,1	1,8
桦木	6/T13	7	46	53	0,51	0,01	0,02	9,5	0,1	1,6
玉米秸秆	7/T13	60	27	87	0,51	0,01	0,08	0,9	0,1	n.d.
硬木	8/T13	21	10	31	0,5	0,02	0,04	2,1	0,06	n.d.
SSF小麦秸秆	9/T13	22	45	67	0,5	<0,1	<0,1	1,2	0,08	1,5
SSF玉米芯	10/T13	11	57	68	0,5	<0,1	<0,1	3,5	0,08	1,4
玉米秸秆补料分批	11/T13	108	0	108	0,45	<0,1	0,08	1,7	0,2	n.d.
最低限度培养基	12/T13	106	71	177	0,44	0,01	0,01	8	0	0
最低限度培养基	13/T14	66	16	82	0,4	<0,01	0,02	1,2	0	0
最低限度培养基	14/T15	66	16	82	0,39	<0,01	0,02	1,2	0	0
最低限度培养基	15/T16	66	16	82	0,41	<0,01	0,02	1,2	0	0
最低限度培养基	16/T17	66	16	82	0,37	<0,01	0,02	1,2	0	0
玉米秸秆	17/T14	94	40	134	0,4	<0,01	0,02	1,2	0,1	n.d.
玉米秸秆	18/T15	94	40	134	0,4	<0,01	0,02	1,2	0,1	n.d.
玉米秸秆	19/T16	94	40	134	0,41	<0,01	0,02	1,2	0,1	n.d.
玉米秸秆	20/T17	94	40	134	0,39	<0,01	0,02	1,2	0,1	n.d.
玉米芯	21/T13	128	88	216	0,49	<0,01	0,02	3,2	0,6	1,5
甘蔗渣	22/T13	124	85	209	0,49	<0,01	0,015	2,0	0,3	1,2
玉米醪	23/T13	215	6	221	0,46	<0,01	0,06	>0,5	0	0

图26