



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105209630 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 30

(21) 申请号 201480026819. 3

(22) 申请日 2014. 05. 15

(30) 优先权数据

61/824, 082 2013. 05. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/038181 2014. 05. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/186565 EN 2014. 11. 20

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 X·李 B·埃姆 L·帕特南

M·T·史密斯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 史悦

(51) Int. Cl.

C12P 19/14(2006. 01)

权利要求书5页 说明书39页

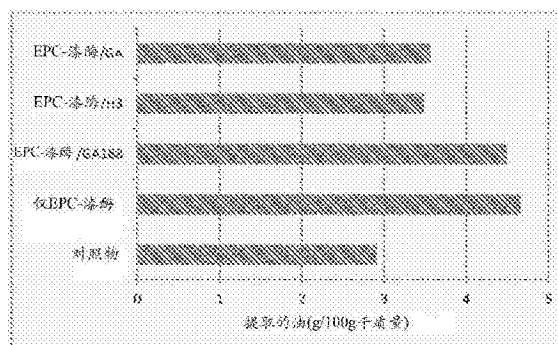
序列表24页 附图2页

(54) 发明名称

对预处理的纤维素材料进行预调节的方法

(57) 摘要

本发明涉及在酚氧化酶和葡萄糖淀粉酶的组合的存在下对预处理的纤维素材料进行预调节的方法。本发明还涉及生产糖和发酵产物的方法, 这些方法包括预调节步骤。最后, 本发明涉及一种适合于预调节的组合物。



1. 一种对预处理的纤维素材料进行预调节的方法,包括用酚氧化酶和葡糖淀粉酶孵育该预处理的纤维素材料。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中该酚氧化酶是一种漆酶。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中该葡糖淀粉酶来源于一种曲霉菌属菌株,如黑曲霉,例如此处 SEQ ID NO:13 中的黑曲霉葡糖淀粉酶,或者如米曲霉。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,进一步地其中 β -葡糖苷酶是在预调节过程中存在的或添加的。

5. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中该 β -葡糖苷酶来源于一种曲霉菌属菌株,例如黑曲霉、烟曲霉、或米曲霉。

6. 如权利要求 1-4 中任一项所述的方法,进一步地其中 α -淀粉酶是在预调节过程中存在的或添加的。

7. 如权利要求 5 所述的方法,其中该 α -淀粉酶来源于一种曲霉菌属菌株,例如黑曲霉或米曲霉。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的方法,进一步地其中半纤维素酶是在预调节过程中存在的或添加的,该半纤维素酶是例如一种半纤维素分解酶制剂,比如半纤维素分解酶制剂 H3。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其中该半纤维素酶是一种木聚糖酶和 / 或一种 β -木糖苷酶。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其中该木聚糖酶来源于曲霉属,比如烟曲霉,例如示于此的 SEQ ID NO:8 中的烟曲霉木聚糖酶,或者棘孢曲霉,例如示于此的 SEQ ID NO:6 中的棘孢曲霉木聚糖酶。

11. 如权利要求 9 所述的方法,其中该 β -木糖苷酶来源于曲霉属,比如烟曲霉,例如示于此的 SEQ ID NO:9 中的烟曲霉 β -木糖苷酶。

12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的方法,其中该预处理的纤维素材料是稀酸预处理的或自水解的。

13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的方法,其中该预处理的纤维素材料是未洗涤的。

14. 如权利要求 1-13 中任一项所述的方法,其中该预处理的纤维素材料是未解毒的。

15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的方法,其中该纤维素材料是洗涤的、未解毒的或未洗涤的预处理的玉米纤维,玉米秸秆 (PCS),玉米芯,麦秸,稻秸和 / 或柳枝稷,油料种子,例如包括高粱、油菜籽、大豆、棕榈、向日葵、棉籽、花生、亚麻仁、亚麻籽、红花、棕榈仁、椰子和橄榄。

16. 如权利要求 1-15 中任一项所述的方法,其中预调节发生在 5% -50% TS (总固体),例如 10% -40% TS,例如 15% -35% TS。

17. 如权利要求 1-16 中任一项所述的方法,其中预调节孵育发生持续至少 30 分钟,例如至少 1 小时、至少 2 小时、至少 4 小时、至少 8 小时、至少 12 小时、或至少 24 小时,例如从 30 分钟到 24 小时。

18. 如权利要求 1-17 中任一项所述的方法,其中预调节孵育发生在 20°C -70°C 之间,例如 40°C -60°C 之间的温度下。

19. 如权利要求 1-18 中任一项所述的方法,其中该酚氧化酶装载,尤其漆酶装载,是

1 μ g-500 μ g EP/g 纤维素之间,例如 5 μ g-100 μ g EP/g 纤维素。

20. 如权利要求 1-19 中任一项所述的方法,其中该漆酶装载是 0.005mg 和 20mg 酶类蛋白质 (EP)/g 纤维素之间,例如 0.1mg-1mg EP/g 纤维素。

21. 如权利要求 1-19 中任一项所述的方法,其中该葡糖淀粉酶装载是 0.01mg 和 20mg EP/g 纤维素之间,例如 0.1mg-1mg EP/g 纤维素。

22. 如权利要求 1-19 中任一项所述的方法,其中该 β -葡糖苷酶装载是 0.01mg 和 20mg EP/g 纤维素之间,例如 0.1mg-1mg EP/g 纤维素。

23. 如权利要求 1-19 中任一项所述的方法,其中该 α -淀粉酶装载是 0.001mg 和 20mg EP/g 纤维素之间,例如 0.01mg-1mg EP/g 纤维素。

24. 如权利要求 1-19 中任一项所述的方法,其中该半纤维素酶装载是 0.01mg 和 20mg EP/g 纤维素之间,例如 0.1mg-1mg EP/g 纤维素。

25. 如权利要求 1-24 中任一项所述的方法,其中在预调节之前将该预处理的纤维素材料进行稀酸预处理或自水解。

26. 如权利要求 1-25 中任一项所述的方法,其中与当不进行预调节时相比释放出增加的油量。

27. 一种从预处理的纤维素材料中回收油的方法,该方法包括:

- (i) 用一种酚氧化酶预调节该纤维素材料;
- (ii) 用一种纤维素分解酶制剂使该预调节的材料糖化;
- (iii) 从步骤 (ii) 中糖化的材料中回收油。

28. 如权利要求 28 所述的方法,其中该酚氧化酶是一种漆酶。

29. 如权利要求 27 或 28 所述的方法,其中该预调节根据在权利要求 1-26 任一项中所定义的进行。

30. 如权利要求 27-29 中任一项所述的方法,其中该纤维素分解酶制剂是真菌起源的,例如源自于木霉属(例如里氏木霉)。

31. 如权利要求 27-30 中任一项所述的方法,其中糖化是在包括选自下组的酶活性的一种纤维素分解酶制剂的存在下进行的,该组包括:内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β -葡糖苷酶(例如烟曲霉 β -葡糖苷酶,比如示于 SEQ ID NO:5 中的烟曲霉 β -葡糖苷酶,或米曲霉 β -葡糖苷酶)。

32. 如权利要求 27-31 中任一项所述的方法,进一步地其中糖化是在一种具有纤维素分解增强活性的多肽的存在下进行的,例如, GH61 多肽,例如,橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽,比如示于 SEQ ID NO:4 中的橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽,或者埃默森青霉菌 GH61 多肽,比如示于 SEQ ID NO:7 中的埃默森青霉菌 GH61 多肽。

33. 如权利要求 27-32 中任一项所述的方法,进一步地其中糖化是使用选自半纤维素酶、棒曲霉素、酯酶、漆酶、木质素分解酶、果胶酶、过氧化物酶、蛋白酶、以及膨胀素中的一种或多种酶进行。

34. 如权利要求 33 所述的方法,其中该半纤维素酶选自木聚糖酶(例如,棘孢曲霉木聚糖酶,例如示于 SEQ ID NO:6 中的棘孢曲霉木聚糖酶,或者烟曲霉木聚糖酶,例如示于 SEQ ID NO:8 中的烟曲霉木聚糖酶)和木糖苷酶(例如,烟曲霉 β -木糖苷酶,例如示于 SEQ ID NO:9 中的烟曲霉 β -木糖苷酶)。

35. 如权利要求 27-34 中任一项所述的方法, 其中该纤维素分解酶制剂是纤维素分解酶制剂 C3。

36. 如权利要求 27-35 中任一项所述的方法, 其中与当不进行预调节时相比释放出增加的油量。

37. 一种从纤维素材料生产发酵产物的方法, 该方法包括:

- (a) 用一种酚氧化酶预调节该纤维素材料;
- (b) 用一种纤维素分解酶制剂使该预调节的材料糖化;
- (c) 用一种发酵生物对该糖化的材料进行发酵;
- (d) 任选地从步骤 (b) 中的糖化的材料和 / 或步骤 (c) 中的发酵的材料中回收油。

38. 如权利要求 37 所述的方法, 其中该酚氧化酶是一种漆酶。

39. 如权利要求 37 或 38 所述的方法, 其中该预调节根据在权利要求 1-26 任一项中所定义的进行。

40. 如权利要求 37-39 中任一项所述的方法, 其中该发酵产物是在步骤 (c) 中的发酵之后进行回收。

41. 如权利要求 37-40 中任一项所述的方法, 其中步骤 (b) 中的糖化和步骤 (c) 中的发酵是作为分开水解和发酵 (SHF)、同时糖化和发酵 (SSF)、同时糖化和共发酵 (SSCF)、杂合的水解和发酵 (HHF)、分开水解和共发酵 (SHCF)、杂合的水解和共发酵 (HHCF), 以及直接微生物转化 (DMC) 进行的。

42. 如权利要求 37-41 中任一项所述的方法, 其中该纤维素分解酶制剂是真菌起源的。

43. 如权利要求 37-42 中任一项所述的方法, 其中该纤维素分解酶制剂源自于木霉属 (例如里氏木霉)。

44. 如权利要求 37-43 中任一项所述的方法, 其中糖化是在包括选自下组的酶活性的一种纤维素分解酶制剂的存在下进行的, 该组包括: 内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β -葡萄糖苷酶 (例如烟曲霉 β -葡萄糖苷酶, 例如示于 SEQ ID NO:5 中的烟曲霉 β -葡萄糖苷酶, 或者米曲霉 β -葡萄糖苷酶)。

45. 如权利要求 37-44 中任一项所述的方法, 进一步地其中糖化是在一种具有纤维素分解增强活性的多肽 (例如, 橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽, 例如示于 SEQ ID NO:4 中的橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽, 或者埃默森青霉菌 GH61 多肽, 例如示于 SEQ ID NO:7 中的埃默森青霉菌 GH61 多肽) 的存在下进行的。

46. 如权利要求 37-45 中任一项所述的方法, 进一步地其中糖化是使用选自半纤维素酶、棒曲霉素、酯酶、漆酶、木质素分解酶、果胶酶、过氧化物酶、蛋白酶、以及膨胀素中的一种或多种酶进行。

47. 如权利要求 46 所述的方法, 其中该半纤维素酶选自木聚糖酶 (例如, 棘孢曲霉木聚糖酶, 比如示于 SEQ ID NO:6 中的棘孢曲霉木聚糖酶, 或者烟曲霉木聚糖酶, 比如示于 SEQ ID NO:8 中的烟曲霉木聚糖酶) 和木糖苷酶 (例如, 烟曲霉 β -木糖苷酶, 例如示于 SEQ ID NO:9 中的烟曲霉 β -木糖苷酶)。

48. 如权利要求 37-47 中任一项所述的方法, 其中该发酵产物是醇 (例如乙醇或丁醇)、有机酸、酮、氨基酸、或气体。

49. 如权利要求 37-48 中任一项所述的方法, 其中该方法导致与当不进行预调节时相

比增加的糖化速率。

50. 如权利要求 37-49 中任一项所述的方法,其中与当不进行预调节时相比释放出增加的油量。

51. 如权利要求 37-50 中任一项所述的方法,其中该纤维素分解酶制剂是纤维素分解酶制剂 C3。

52. 一种从预处理的纤维素材料生产糖的方法,该方法包括:

- (i) 用一种酚氧化酶预调节该纤维素材料;
- (ii) 用一种纤维素分解酶制剂使该调节的材料糖化;
- (iii) 任选地从步骤 (ii) 中的糖化的材料中回收油。

53. 如权利要求 52 所述的方法,其中该酚氧化酶是一种漆酶。

54. 如权利要求 52 或 53 所述的方法,其中该预调节根据在权利要求 1-26 任一项中所定义的进行。

55. 如权利要求 52-54 中任一项所述的方法,进一步包括从来自步骤 (ii) 中的糖化的材料中回收糖。

56. 如权利要求 52-55 中任一项所述的方法,其中将这些获得或回收的糖用在用于生产糖浆(例如高果糖玉米糖浆)和木质纤维素衍生的塑料(例如聚乙烯、聚苯乙烯以及聚丙烯)、聚乳酸(例如用于生产 PET)的方法中。

57. 如权利要求 52-56 中任一项所述的方法,其中该纤维素分解酶制剂是真菌起源的。

58. 如权利要求 52-57 中任一项所述的方法,其中该纤维素分解酶制剂源自于木霉属(例如里氏木霉)。

59. 如权利要求 52-58 中任一项所述的方法,其中糖化是在包括选自下组的酶活性的一种纤维素分解酶制剂的存在下进行的,该组包括:内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β -葡萄糖苷酶(例如烟曲霉 β -葡萄糖苷酶,比如披露于 SEQ ID NO:5 中的烟曲霉 β -葡萄糖苷酶;或米曲霉 β -葡萄糖苷酶)。

60. 如权利要求 52-59 中任一项所述的方法,进一步地其中糖化是在一种具有纤维素分解增强活性的多肽(例如,橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽,比如示于 SEQ ID NO:4 中的橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽,或者埃默森青霉菌 GH61 多肽,比如示于 SEQ ID NO:7 中的埃默森青霉菌 GH61 多肽)的存在下进行的。

61. 如权利要求 52-60 中任一项所述的方法,进一步地其中糖化是使用选自半纤维素酶、棒曲霉素、酯酶、漆酶、木质素分解酶、果胶酶、过氧化物酶、蛋白酶、以及膨胀素中的一种或多种酶进行。

62. 如权利要求 61 所述的方法,其中该半纤维素酶选自木聚糖酶(例如,棘孢曲霉木聚糖酶,比如示于 SEQ ID NO:6 中的棘孢曲霉木聚糖酶,或者烟曲霉木聚糖酶,比如示于 SEQ ID NO:8 中的烟曲霉木聚糖酶)、乙酰木聚糖酯酶、阿魏酸酯酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、木糖苷酶(例如,烟曲霉 β -木糖苷酶,比如示于 SEQ ID NO:9 中的烟曲霉 β -木糖苷酶)、以及葡萄糖醛酸糖苷酶。

63. 如权利要求 52-61 中任一项所述的方法,其中该纤维素分解酶制剂是纤维素分解酶制剂 C3。

64. 一种包含酚氧化酶和葡萄糖淀粉酶的组合物。

65. 如权利要求 64 所述的组合物, 其中该酚氧化酶是一种漆酶。

66. 如权利要求 64 或 65 所述的组合物, 其中该葡萄糖淀粉酶来源于一种曲霉菌属菌株, 例如黑曲霉或米曲霉。

67. 如权利要求 64-66 中任一项所述的组合物, 进一步地其中该组合物包含一种 β -葡萄糖苷酶。

68. 如权利要求 67 中所述的组合物, 其中该 β -葡萄糖苷酶来源于一种曲霉菌属菌株, 例如黑曲霉、烟曲霉、或米曲霉。

69. 如权利要求 64-68 中任一项所述的组合物, 进一步地其中该组合物包含一种 α -淀粉酶。

70. 如权利要求 69 所述的组合物, 其中该 α -淀粉酶来源于一种曲霉菌属菌株, 例如米曲霉。

71. 如权利要求 64-70 中任一项所述的组合物, 进一步地其中该组合物包含一种半纤维素酶。

72. 如权利要求 71 所述的组合物, 其中该半纤维素酶是一种木聚糖酶和 / 或一种 β -木糖苷酶。

73. 如权利要求 72 所述的组合物, 其中该木聚糖酶来源于曲霉属, 比如烟曲霉, 例如示于在此的 SEQ ID NO:8 中的烟曲霉木聚糖酶, 或者棘孢曲霉, 例如示于在此的 SEQ ID NO:6 中的棘孢曲霉木聚糖酶。

74. 如权利要求 72 所述的组合物, 其中该 β -木糖苷酶来源于曲霉属, 比如烟曲霉, 例如示于在此的 SEQ ID NO:9 中的烟曲霉 β -木糖苷酶。

对预处理的纤维素材料进行预调节的方法

[0001] 对序列表的引用

[0002] 本申请包含一个计算机可读形式的序列表, 将其通过引用结合在此。

发明领域

[0003] 本发明涉及对预处理的纤维素分解材料进行的方法以及预调节对油回收 / 提取、发酵产物生产和糖生产过程的影响。

[0004] 背景

[0005] 纤维素材料作为一种用于燃料乙醇生产的低成本原料能以足够的量获得。纤维素材料 (包括玉米纤维和高粱) 包含油。从例如玉米纤维中提取油的方法在本领域是众所周知的。

[0006] US 5,843,499 涉及一种制备玉米纤维油的方法, 该方法是通过从玉米籽粒中分离玉米纤维, 干燥该玉米纤维, 研磨该玉米纤维, 借助一种有机溶剂和超临界流体萃取从该研磨的玉米纤维中提取油, 并从该有机溶剂中分离该提取的玉米纤维油。

[0007] 本发明的一个目的是提供改进的对预处理的纤维素材料进行预调节的方法以及提供改进的回收 / 提取油、从预处理的木质纤维素材料中生产发酵产物和糖的方法。

[0008] 概述

[0009] 此处说明了对预处理的纤维素材料进行预调节以改善酶促糖化 (水解) 的方法。还说明了从预处理 (含油) 的纤维素分解材料中回收油的方法。还涉及从含木质纤维素的材料中生产发酵产物 (如乙醇) 或糖的方法。还说明了适合在本发明的方法和 / 或工艺中使用的组合物。

[0010] 在第一方面中, 本发明涉及对预处理的纤维素材料进行预调节的方法, 包括用酚氧化酶和葡糖淀粉酶孵育预处理的纤维素材料。

[0011] 在一个优选的实施例中, 该酚氧化酶是一种漆酶, 例如一种来自嗜热毁丝霉 (MtL) (WO 95/33836) 的漆酶, 例如此处 SEQ ID NO:12 中所示的漆酶。在一个实施例中, 该葡糖淀粉酶来源于一种曲霉菌属菌株, 如黑曲霉 (例如, SEQ ID NO:13 中那一种) 或米曲霉。

[0012] 在一个实施例中, β -葡糖苷酶是在预调节过程中存在的或添加的。该 β -葡糖苷酶可以来源于一种曲霉菌属菌株, 例如黑曲霉、烟曲霉、或米曲霉。

[0013] 在一个实施例中, α -淀粉酶是在预调节过程中存在的或添加的。在一个实施例中, 该 α -淀粉酶来源于一种曲霉菌属菌株, 例如黑曲霉或米曲霉。

[0014] 在一个实施例中, 一种包含葡糖淀粉酶、 β -葡糖苷酶和 α -淀粉酶的酶制剂是在预调节过程中存在的或添加的。在一个实施例中, 这种酶制剂来源于一种曲霉菌属菌株, 例如黑曲霉。在一个具体实施例中, 该酶制剂是葡糖淀粉酶 188 (见“材料 & 方法”部分)。

[0015] 在一个实施例中, 一种半纤维素酶 (例如, 一种半纤维素分解酶制剂 (例如, 半纤维素分解酶制剂 H3) (见“材料 & 方法”部分)) 是在预调节过程中存在的或添加的。

[0016] 该纤维素材料可以是任何纤维素材料, 例如以下“纤维素材料”部分中那些材料。在一个优选的实施例中, 该纤维素材料是玉米纤维, 该玉米纤维可以被稀酸预处理的或自

水解。在一个实施例中,该纤维素材料是油料种子。

[0017] 在一个实施例中,该预处理的纤维素材料是未洗涤的。在一个实施例中,该预处理的纤维素材料是未解毒的。在一个实施例中,该纤维素材料是洗涤的、未解毒的或未洗涤的预处理的玉米纤维、玉米秸秆 (PCS)、玉米芯、麦秸、稻秸和 / 或柳枝稷。

[0018] 在一个实施例中,预调节发生在 5% -50% TS (总固体),例如 10% -40% TS,例如 15% -35% TS。在一个实施例中,预调节孵育发生持续例如至少 30 分钟,例如至少 1 小时、至少 2 小时、至少 4 小时、至少 8 小时、至少 12 小时、或至少 24 小时,例如从 30 分钟到 24 小时。在一个实施例中,预调节孵育发生在 20℃ -70℃ 之间,例如 40℃ -60℃ 之间的温度下。根据本发明,与当不进行预调节时相比,在预调节的纤维素分解材料的糖化之后,释放出以及可以回收的油量增加。

[0019] 在一个第二方面,本发明涉及从预处理的纤维素材料中回收油的工艺,包括:

[0020] (i) 用一种酚氧化酶预调节该纤维素材料;

[0021] (ii) 用一种纤维素分解酶制剂使该预调节的材料糖化;

[0022] (iii) 从步骤 (ii) 中糖化的材料中回收油。

[0023] 在一个优选的实施例中,该酚氧化酶是一种漆酶,例如一种来自嗜热毁丝霉 (MtL) (WO 95/33836) 的漆酶,例如此处 SEQ ID NO:12 中所示的漆酶。在一个实施例中,根据本发明的预调节方法进行预调节步骤 (i)。

[0024] 在一个实施例中,用于步骤 (ii) 中糖化的纤维素分解酶制剂是真菌起源的,例如来源于木霉属 (例如,里氏木霉)。该纤维素分解酶制剂还可以来源于如以下“纤维素分解酶制剂:— 部分中所描述的其他真菌。

[0025] 一种半纤维素酶也可以是在糖化过程中存在或添加。在一个实施例中,糖化步骤 (ii) 是在包括选自下组的酶活性的一种纤维素分解酶制剂的存在下进行的,该组包括:内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β -葡萄糖苷酶 (例如烟曲霉 β -葡萄糖苷酶 (例如示于在此的 SEQ ID NO:5 中的 β -葡萄糖苷酶)、或米曲霉 β -葡萄糖苷酶)。在一个实施例中,糖化步骤 (ii) 是在一种具有纤维素分解增强活性的多肽的存在下进行的,例如, GH61 多肽 (例如,橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽 (例如示于在此的 SEQ ID NO:4 中的多肽) 或埃默森青霉菌 GH61 多肽 (例如示于在此的 SEQ ID NO:7 中的多肽))。在一个实施例中,糖化步骤 (ii) 是在选自半纤维素酶、棒曲霉素、酯酶、漆酶、木质素分解酶、果胶酶、过氧化物酶、蛋白酶、以及膨胀素中的一种或多种酶的存在下进行的。

[0026] 在一个实施例中,该半纤维素酶可以选自下组:木聚糖酶 (例如,一种棘孢曲霉木聚糖酶 (例如示于在此的 SEQ ID NO:6 中的木聚糖酶)、或烟曲霉木聚糖酶 (例如示于在此的 SEQ ID NO:8 中的木聚糖酶)) 和一种木糖苷酶 (例如,烟曲霉 β -木糖苷酶 (例如示于在此的 SEQ ID NO:9 中的木糖苷酶))。

[0027] 在一个优选的实施例中,在糖化过程中存在或添加的纤维素分解酶制剂是一种来源于里氏木霉的纤维素分解酶制剂,进一步包括具有纤维素分解增强活性的 GH61A 多肽 (该多肽来源于埃默森青霉菌菌株 (WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:7))、披露于 WO 2012/044915 中的烟曲霉 β -葡萄糖苷酶 (WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:5) 变体 F100D、S283G、N456E、F512Y;做为在此的 SEQ ID NO:10 和 WO2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:6 的烟曲霉 Ce17A CBH1 以及做为在此的 SEQ ID

NO:11) 或 WO 2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:18 的烟曲霉 CBH II。此外,该纤维素分解酶制剂可以进一步补充有 10% 半纤维素分解酶制剂,该半纤维素分解酶制剂包含一种来自里氏木霉的纤维素分解酶制剂,进一步包含烟曲霉木聚糖酶(在此的 SEQ ID NO:8) 和烟曲霉 β -木糖苷酶(在此的 SEQ ID NO:9)。

[0028] 本发明的一种工艺导致与当不进行预调节时相比释放出的油量增加。

[0029] 在一个第三方面,本发明涉及从纤维素材料生产一种发酵产物的工艺,包括:

[0030] (a) 用一种酚氧化酶预调节该纤维素材料;

[0031] (b) 用一种纤维素分解酶制剂使该预调节的材料糖化;

[0032] (c) 用一种发酵生物对该糖化的材料进行发酵

[0033] (d) 任选地从步骤 (b) 中的糖化材料和 / 或步骤 (c) 中的发酵材料中回收油。

[0034] 在一个实施例中,该酚氧化酶是一种漆酶,例如一种来自嗜热毁丝霉 (MtL) (WO 95/33836) 的漆酶,例如此处 SEQ ID NO:12 中所示的漆酶。在一个实施例中,根据本发明进行预调节步骤 (a)。在一个实施例中,该发酵产物是在步骤 (c) 中的发酵之后回收。根据本发明,糖化步骤 (b) 和发酵步骤 (c) 可以按分开水解和发酵 (SHF)、同时糖化和发酵 (SSF)、同时糖化和共发酵 (SSCF)、杂合的水解和发酵 (HHF)、分开水解和共发酵 (SHCF)、杂合的水解和共发酵 (HHCF),以及直接微生物转化 (DMC) 进行。

[0035] 在一个实施例中,在糖化过程中存在或添加的纤维素分解酶制剂是真菌起源的。在一个优选实施例中,该纤维素分解酶制剂源自于木霉属(例如里氏木霉)。

[0036] 在一个实施例中,糖化步骤 (b) 是在包括选自下组的酶活性的一种纤维素分解酶制剂的存在下进行的,该组包括:内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β -葡糖苷酶(例如烟曲霉 β -葡糖苷酶(例如示于在此的 SEQ ID NO:5 中的 β -葡糖苷酶、或米曲霉 β -葡糖苷酶))。

[0037] 在一个实施例中,糖化是在一种具有纤维素分解增强活性的多肽(例如,橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽(例如示于在此的 SEQ ID NO:4 中的多肽)或埃默森青霉菌 GH61 多肽(例如示于在此的 SEQ ID NO:7 中的多肽))的存在下进行的。

[0038] 在一个实施例中,糖化步骤 (b) 是在选自半纤维素酶、棒曲霉素、酯酶、漆酶、木质素分解酶、果胶酶、过氧化物酶、蛋白酶、以及膨胀素中的一种或多种酶的存在下进行的。

[0039] 在一个实施例中,该半纤维素酶选自木聚糖酶(例如,棘孢曲霉木聚糖酶(例如示于在此的 SEQ ID NO:6 中的木聚糖酶)、或烟曲霉木聚糖酶(例如示于在此的 SEQ ID NO:8 中的木聚糖酶)) 和木糖苷酶(例如,烟曲霉 β -木糖苷酶(例如示于在此的 SEQ ID NO:9 中的木糖苷酶))。

[0040] 在一个实施例中,该发酵产物是醇(例如乙醇或丁醇)、有机酸、酮、氨基酸、或气体。在一个优选的实施例中,该发酵产物是乙醇。本发明的一种工艺可以导致与当不进行预调节时相比增加的糖化速率。同样,本发明的一种工艺导致与当不进行预调节时相比释放出的油量增加。

[0041] 在一个优选的实施例中,在糖化过程中存在或添加的纤维素分解酶制剂是一种来源于里氏木霉的纤维素分解酶制剂,进一步包括具有纤维素分解增强活性的 GH61A 多肽(该多肽来源于埃默森青霉菌菌株 (WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:7))、披露于 WO 2012/044915 中的烟曲霉 β -葡糖苷酶 (WO 2005/047499 中的 SEQ ID

NO:2 或在此的 SEQ ID NO:5) 变体 F100D、S283G、N456E、F512Y; WO2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:6 的和在此的 SEQ ID NO:10 的烟曲霉 Ce17A CBH1 以及 WO 2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:18 的烟曲霉 CBH II。此外,该纤维素分解酶制剂可以进一步补充有 10% 半纤维素酶酶组合物,该半纤维素酶酶组合物来源于里氏木霉,进一步包含烟曲霉木聚糖酶 III(在此的 SEQ ID NO:8) 和烟曲霉 β -木糖苷酶(在此的 SEQ ID NO:9)。

[0042] 在一个方面,本发明涉及从预处理的纤维素材料生产糖的工艺,包括:

[0043] (i) 用一种酚氧化酶预调节所述纤维素材料;

[0044] (ii) 用一种纤维素分解酶制剂使该调节的材料糖化;

[0045] (iii) 任选地从步骤 (ii) 中糖化的材料中回收/提取油。

[0046] 在一个优选的实施例中,该酚氧化酶是一种漆酶,例如一种来自嗜热毁丝霉 (MtL) (WO 95/33836) 的漆酶,例如此处 SEQ ID NO:12 中所示的漆酶。

[0047] 在一个实施例中,根据本发明的预调节方法进行步骤 (i) 中的预调节。在一个实施例中,该工艺进一步包括从来自步骤 (ii) 中的糖化的材料中回收糖。

[0048] 根据本发明,可根据本发明获得或回收的糖用于例如生产糖浆(例如高果糖玉米糖浆)和木质纤维素衍生的塑料(例如聚乙烯、聚苯乙烯以及聚丙烯)、聚乳酸(例如用于生产 PET) 的过程中。

[0049] 在一个实施例中,该纤维素分解酶制剂是真菌起源的。在一个优选实施例中,该纤维素分解酶制剂源自于木霉属(例如里氏木霉)。在一个实施例中,糖化步骤 (ii) 是在包括选自下组的酶活性的一种纤维素分解酶制剂的存在下进行的,该组包括:内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β -葡糖苷酶(例如烟曲霉 β -葡糖苷酶(例如披露于在此的 SEQ ID NO:5 中的 β -葡糖苷酶)、或米曲霉 β -葡糖苷酶)。

[0050] 在一个实施例中,糖化步骤 (ii) 是在一种具有纤维素分解增强活性的多肽(例如,橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽(例如示于在此的 SEQ ID NO:4 中的多肽)或埃默森青霉菌 GH61 多肽(例如示于在此的 SEQ ID NO:7 中的多肽))的存在下进行的。

[0051] 在一个实施例中,糖化步骤 (ii) 是使用选自半纤维素酶、棒曲霉素、酯酶、漆酶、木质素分解酶、果胶酶、过氧化物酶、蛋白酶、以及膨胀素中的一种或多种酶进行的。

[0052] 在一个实施例中,该半纤维素酶选自木聚糖酶(例如,棘孢曲霉木聚糖酶(例如示于在此的 SEQ ID NO:6 中的木聚糖酶)、或烟曲霉木聚糖酶(例如示于在此的 SEQ ID NO:8 中的木聚糖酶))、乙酰木聚糖酯酶、阿魏酸酯酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、木糖苷酶(例如,烟曲霉 β -木糖苷酶(例如示于在此的 SEQ ID NO:9 中的木糖苷酶))、以及葡糖醛酸糖苷酶。

[0053] 在一个优选的实施例中,在糖化过程中存在或添加的纤维素分解酶制剂是一种来源于里氏木霉的纤维素分解酶制剂,进一步包括具有纤维素分解增强活性的 GH61A 多肽(该多肽来源于埃默森青霉菌菌株(WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:7))、披露于 WO 2012/044915 中的烟曲霉 β -葡糖苷酶(WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:5) 变体 F100D、S283G、N456E、F512Y; WO2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:6 的和在此的 SEQ ID NO:10 的烟曲霉 Ce17A CBH1 以及 WO 2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:18 的烟曲霉 CBH II。此外,该纤维素分解酶制剂可以进一步补充有 10% 半纤维素酶酶组合物,该半纤维素酶酶组合物来源于里氏木霉,进一步包含烟曲霉木聚糖酶 III(在此的 SEQ ID NO:8) 和烟曲霉 β -木糖苷酶(在此的 SEQ ID NO:9)。

[0054] 在一个最终方面中,本发明涉及含有酚氧化酶和葡糖淀粉酶的组合物。在一个实施例中,该酚氧化酶是一种漆酶,例如一种来自嗜热毁丝霉 (MtL) (WO 95/33836) 的漆酶,例如 SEQ ID NO:12 中所示的漆酶。

[0055] 在一个实施例中,该组合物包含来源于一种曲霉属的菌株 (例如,黑曲霉或米曲霉) 的葡糖淀粉酶。

[0056] 在一个实施例中,该组合物进一步包含 β -葡糖苷酶。在一个实施例中,该 β -葡糖苷酶来源于一种曲霉菌属菌株,例如黑曲霉、烟曲霉、或米曲霉。在一个实施例中,该组合物包含 α -淀粉酶。在一个实施例中,该 α -淀粉酶来源于一种曲霉菌属菌株,例如黑曲霉或米曲霉。

[0057] 在一个实施例中,本发明的组合物进一步包括半纤维素酶。

[0058] 在一个优选实施例中,该半纤维素酶是木聚糖酶和 / 或 β -木糖苷酶。在一个实施例中,木聚糖酶来源于曲霉属,如烟曲霉 (例如示于在此的 SEQ ID NO:8 中的木聚糖酶)、或棘孢曲霉 (例如示于在此的 SEQ ID NO:6 中的木聚糖酶)。在一个实施例中, β -木糖苷酶来源于曲霉属,如烟曲霉 (例如示于在此的 SEQ ID NO:9 中的 β -木糖苷酶)。

[0059] 定义

[0060] 酶:

[0061] 纤维素分解酶制剂、纤维素分解组合物或纤维素酶:术语“纤维素分解酶制剂”、“纤维素分解组合物”或“纤维素酶”意指一种或多种 (例如,若干种) 水解纤维素材料的酶。这类酶包括一种或多种内切葡聚糖酶、一种或多种纤维二糖水解酶、一种或多种 β -葡糖苷酶、或其组合。用于测量纤维素分解活性的两种基本方法包括:(1) 测量总纤维素分解活性,以及(2) 测量单独的纤维素分解活性 (内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β -葡糖苷酶),如在张 (Zhang) 等人,纤维素酶改进的展望:筛选和选择策略 (Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies), 2006, 生物技术进展 (Biotechnology Advances) 24:452-481 中所综述的。通常使用不溶性底物,包括沃特曼 (Whatman) No 1 滤纸、微晶纤维素、细菌纤维素、藻类纤维素、棉花、预处理的木质纤维素等,测量总纤维素分解活性。最常用的总纤维素分解活性测定是使用沃特曼 No 1 滤纸作为底物的滤纸测定。该测定是由国际纯粹与应用化学联合会 (International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)) (高斯 (Ghose), 1987, 纤维素酶活性的测量 (Measurement of cellulase activities), 纯粹与应用化学 (Pure Appl. Chem.) 59:257-68) 确立的。

[0062] 通过测量在以下条件下由一种或多种纤维素分解酶进行的纤维素材料水解的增加来测定纤维素分解酶活性:1-50mg 纤维素分解酶蛋白 /g 预处理的玉米秸秆 (“PCS”) 中的纤维素 (或其他预处理的纤维素材料), 在适合的温度 (例如 50°C、55°C、或 60°C) 下持续 3-7 天, 与未添加纤维素分解酶蛋白的对照水解相比。典型条件为:1ml 反应, 洗涤或未洗涤的 PCS, 5% 不溶性固体, 50mM 乙酸钠 (pH 5), 1mM MnSO_4 , 50°C、55°C、或 60°C, 72 小时, 通过 AMINEX® HPX-87H 柱 (伯乐实验室有限公司, 美国加州赫拉克勒斯) 进行糖分析。

[0063] 家族 61 糖苷水解酶:术语“家族 61 糖苷水解酶”或“家族 GH61”或“GH61”意指根据亨利萨特 (Henrissat) B., 1991, 基于氨基酸序列相似性的糖基水解酶的分类 (A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities), 生物化学杂志 (Biochem. J.) 280:309-316; 和亨利萨特 B. 和贝洛赫

(Bairoch)A.,1996,修正糖基水解酶的基于序列的分类 (Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases),生物化学杂志 316:695-696 属于糖苷水解酶家族 61 的多肽。这个家族中的酶最初基于在一个家族成员中测量到的非常弱的内切-1,4- β -D 葡聚糖酶活性而被分类为糖苷水解酶家族。这些酶的结构和作用模式是不规范的,并且它们不能被视为真正的糖苷酶。然而,基于它们在与纤维素酶或纤维素酶的混合物结合使用时增强木质纤维素分解的能力,它们被保留在 CAZy 分类中。

[0064] 具有纤维素分解增强活性的多肽:术语“具有纤维素分解增强活性的多肽”意指催化具有纤维素分解活性的酶对纤维素材料的水解的增强的 GH61 多肽。出于本发明的目的,通过在以下条件下测量来自自由纤维素分解酶水解纤维素材料的还原糖的增加或纤维二糖与葡萄糖总量的增加来测定纤维素分解增强活性:1-50mg 总蛋白/g PCS 中的纤维素,其中总蛋白包括 50% -99.5% w/w 的纤维素分解酶蛋白和 0.5% -50% w/w 的具有有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽的蛋白,在合适的温度(例如 50°C、55°C 或 60°C)以及 pH(例如 5.0 或 5.5)下,持续 1-7 天,与不具有纤维素分解增强活性的相等总蛋白装载的对照水解(1-50mg 纤维素分解蛋白/g PCS 中的纤维素)相比较。在一个方面,使用在总蛋白质重量的 2% -3% 的米曲霉 β -葡萄糖苷酶(根据 WO 02/095014 在米曲霉中重组产生)或总蛋白质重量的 2% -3% 的烟曲霉 β -葡萄糖苷酶(如 WO 2002/095014 中所描述在米曲霉中重组产生)的纤维素酶蛋白负载量存在的情况下 CELLUCLAST® 1.5L(诺维信 A/S),丹麦巴格斯瓦尔德(Bagsvaerd, Denmark)的混合物作为纤维素分解活性的来源。

[0065] 具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽通过将达到相同的水解程度所需要的纤维素分解酶的量降低优选至少 1.01 倍,例如,至少 1.05 倍、至少 1.10 倍、至少 1.25 倍、至少 1.5 倍、至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、或至少 20 倍,来增强由具有纤维素分解活性的酶催化的纤维素材料的水解。

[0066] β -葡萄糖苷酶:术语“ β -葡萄糖苷酶”意指一种 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶(E.C.3.2.1.21),其催化末端非还原性 β -D-葡萄糖残基的水解,并释放 β -D-葡萄糖。

[0067] 出于本发明的目的,根据文丘里(Venturi)等人,2002,来自嗜热毛壳菌嗜粪变种的胞外 β -D-葡萄糖苷酶:产生、纯化以及一些生物化学特性(Extracellular beta-D-glucosidase from Chaetomium thermophilum var. coprophilum: production, purification and some biochemical properties),基础微生物学杂志(J. Basic Microbiol.)42:55-66 的程序使用对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷作为底物来测定 β -葡萄糖苷酶活性。一个单位的 β -葡萄糖苷酶定义为在 25°C、pH 4.8 下,在含有 0.01% **TWEEN® 20**(聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯)的 50mM 柠檬酸钠中从作为底物的 1mM 对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷每分钟产生 1.0 微摩尔的对硝基苯酚阴离子。

[0068] 纤维二糖水解酶:术语“纤维二糖水解酶”(“CBH”)意指一种 1,4- β -D-葡聚糖纤维二糖水解酶(E.C.3.2.1.91),其催化纤维素、纤维寡糖、或任何含有 β -1,4-连接葡萄糖的聚合物中的 1,4- β -D-糖苷键的水解,从而从链的还原性或非还原性末端释放纤维二糖(泰里(Teeri),1997,结晶纤维素降解:对纤维二糖水解酶的功能的新认识(Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases),生物技术趋势(Trends in Biotechnology)15:160-167;泰里等人,1998,里氏木霉纤维二糖

水解酶：对结晶纤维素为何如此有效？(Trichoderma reesei cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose?), 生物化学学会会刊 (Biochem. Soc. Trans.) 26:173-178)。

[0069] 根据里弗 (Lever) 等人, 1972, 分析生物化学 (Anal. Biochem.) 47:273-279; 范·帝伯赫 (van Tilbeurgh) 等人, 1982, 欧洲生化学会联合会快报 (FEBS Letters), 149:152-156; 范·帝伯赫和克莱森斯 (Claeyssens), 1985, 欧洲生化学会联合会快报, 187:283-288; 以及汤美 (Tomme) 等人, 1988, 欧洲生物化学杂志 (Eur. J. Biochem.) 170:575-581 所描述的程序来测定纤维二糖水解酶活性。在本发明中, 汤美等人的方法可以用于测定纤维二糖水解酶活性。

[0070] 内切葡聚糖酶：术语“内切葡聚糖酶”(“EG”) 意指一种内切 -1, 4-(1, 3; 1, 4)- β -D- 葡聚糖 4- 葡聚糖水解酶 (E. C. 3. 2. 1. 4), 其催化纤维素、纤维素衍生物 (如羧甲基纤维素和羟乙基纤维素)、地衣多糖中的 1, 4- β -D- 糖苷键和混合 β -1, 3 葡聚糖如谷类 β -D- 葡聚糖或木葡聚糖以及含有纤维素组分的其他植物材料中的 β -1, 4 键的内切水解。

[0071] 可以通过测量底物粘度的降低或通过还原糖测定所确定的还原性末端的增加来确定内切葡聚糖酶活性 (张 (Zhang) 等人, 2006, 生物技术进展 (Biotechnology Advances) 24:452-481)。为了本发明的目的, 使用羧甲基纤维素 (CMC) 作为底物, 根据在 Ghose, 1987, 纯粹与应用化学 (Pure and Appl. Chem.) 59:257-268 中所述的过程, 在 pH 5、40°C 下, 确定内切葡聚糖酶的活性。

[0072] 半纤维素分解酶、半纤维素分解酶制剂或半纤维素酶：术语“半纤维素分解酶”、“半纤维素分解酶制剂”或“半纤维素酶”意指一种或多种 (例如, 数种) 水解半纤维素材料的酶。参见例如, 沙洛姆 (Shallom), D. 和肖汉姆 (Shoham), Y. 微生物半纤维素酶 (Microbial hemicellulases), 微生物学新见 (Current Opinion In Microbiology), 2003, 6(3):219-228)。半纤维素酶是在植物生物质的降解中的关键组分。半纤维素酶的实例包括但不限于, 乙酰基甘露聚糖酯酶、乙酰基木聚糖酯酶、阿拉伯聚糖酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、香豆酸酯酶、阿魏酸酯酶、半乳糖苷酶、葡糖醛酸糖苷酶、葡糖醛酸酯酶、甘露聚糖酶、甘露糖苷酶、木聚糖酶以及木糖苷酶。这些酶的底物即半纤维素是支链和线性多糖的异质群体, 这些多糖经由氢与植物细胞壁中的纤维素微纤维键合, 从而将它们交联成一个稳固网络。半纤维素还共价衔接至木质素, 从而与纤维素一起形成高度复杂的结构。半纤维素的可变结构和组织要求许多酶的协同作用以使其完全降解。半纤维素酶的催化模块是水解糖苷键的糖苷水解酶 (GH), 或是水解乙酸或阿魏酸侧基的酯键的碳水化合物酯酶 (CE)。这些催化模块基于它们一级序列的同源性, 可以被分配到 GH 和 CE 家族中。具有总体相似的折叠的一些家族可以进一步被分组为以字母标记的氏族 (例如, GH-A)。这些和其他碳水化合物活性酶的最具信息性和最新的分类可在碳水化合物活性酶 (Carbohydrate-Active Enzymes) (CAZy) 数据库中获得。可根据 Ghose 和 Bisaria, 1987, 《纯粹与应用化学》(Pure & Appl. Chem.) 59:1739-1752 中所述的方法在合适的温度 (例如 50°C、55°C 或 60°C) 和 pH (例如 5.0 或 5.5) 下对半纤维素分解酶的活性进行测定。

[0073] α -淀粉酶 (α -1, 4- 葡聚糖 4- 葡聚糖水解酶, EC 3. 2. 1. 1) 是催化淀粉以及其他直链和支链 1, 4- 葡糖苷寡糖 - 和多糖的水解的一组酶。

[0074] 葡糖淀粉酶（葡聚糖 1, 4- α -葡糖苷酶, EC 3. 2. 1. 3）是催化末端（1 $\rightarrow$ 4）-连接的 α -D-葡萄糖残基依次从链的非还原端水解并释放 β -D-葡萄糖的一组酶。

[0075] 其他定义：

[0076] 等位基因变体：术语“等位基因变体”意指占用同一染色体位点的一种基因的两个或更多个（若干个）替代形式中的任一种。等位基因变异由突变天然产生，并且可以导致群体内的多态性。基因突变可以是沉默的（在所编码的多肽中没有改变）或可编码具有改变的氨基酸序列的多肽。多肽的等位基因变体是由基因的等位基因变体编码的多肽。

[0077] cDNA：术语“cDNA”意指可以通过得自真核或原核细胞的成熟的、剪接的 mRNA 分子的反转录而制备的 DNA 分子。cDNA 缺乏可以存在于对应基因组 DNA 中的内含子序列。早先的初始 RNA 转录本是 mRNA 的前体，其在呈现为成熟的剪接的 mRNA 之前要经一系列的步骤进行加工，包括剪接。

[0078] 纤维素材料：术语“纤维素材料”意指含有纤维素的任何材料。生物质的初生细胞壁中的主要多糖是纤维素，第二丰富的是半纤维素，而第三丰富的是果胶。细胞停止生长后产生的次生细胞壁也包含多糖，并且它通过与半纤维素共价交联的聚合木质素得到强化。纤维素是脱水纤维二糖的均聚物，因此是一种线性 β -(1-4)-D-葡聚糖，而半纤维素包括多种化合物，如具有一系列取代基以复杂支链结构存在的木聚糖、木葡聚糖、阿拉伯糖基木聚糖、以及甘露聚糖。尽管纤维素一般为多态的，但发现其在植物组织中主要以平行葡聚糖链的不溶性晶体基质存在。半纤维素通常氢键合至纤维素以及其他半纤维素，这有助于稳定细胞壁基质。纤维素通常见于例如植物的茎、叶、壳、皮、以及穗轴，或树的叶、枝、以及木材中。纤维素材料可以是但不限于农业废弃物、草本材料（包括能源作物）、城市固体废物、纸浆和造纸厂废弃物、废纸、和木材（包括林业废弃物）（参见例如维塞劳格（Wiselugel）等人，1995，生物乙醇手册（Handbook on Bioethanol）（查尔斯 E. 怀曼（Charles E. Wyman），编著），第 105-118 页，泰勒-弗朗西斯出版集团（Taylor&Francis），华盛顿特区；怀曼（Wyman），1994，生物资源技术（Bioresource Technology）50:3-16；林德（Lynd），1990，应用生物化学与生物技术（Applied Biochemistry and Biotechnology）24/25:695-719；马塞尔（Mosier）等人，1999，“木质纤维素的生物转化的最近进展”，生物化学工程/生物技术进展（Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology），斯卡皮尔（T. Scheper），总编辑，第 65 卷，第 23-40 页，施普林格出版公司（Springer-Verlag），纽约）。在此应该理解的是，纤维素可以处于木素纤维素，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。在一个优选方面中，该纤维素材料是任何生物质材料。在另一个优选方面中，该纤维素材料是木质纤维素，该木质纤维素包括纤维素、半纤维素、以及木质素。

[0079] 编码序列：术语“编码序列”意思指这样一种多核苷酸，该多核苷酸直接地指定了多肽的氨基酸序列。编码序列的边界一般由一个开放阅读框架决定，该开放阅读框架从一个起始密码子（如 ATG、GTG 或 TTG）开始并且以一个终止密码子（如 TAA、TAG 或 TGA）结束。编码序列可以是一种基因组 DNA、cDNA、合成 DNA 或其组合。

[0080] 片段：术语“片段”意指从成熟多肽主要部分的氨基和/或羧基末端缺失一个或多个（例如，若干个）氨基酸的多肽；其中该片段具有酶活性。在一个方面中，片段包含酶的成熟多肽的至少 85%，例如至少 90%或至少 95%的氨基酸残基。

[0081] 成熟多肽：术语“成熟多肽”意指在翻译和任何翻译后修饰如 N-末端加工、C-末端截短、糖基化作用、磷酸化作用等之后处于其最终形式的多肽。例如，基于 SignalP 程序（尼尔森 (Nielsen) 等, 1997, 《蛋白质工程》(Protein Engineering) 10:1-6）（其预测此处 SEQ ID NO:10 的氨基酸 10 至 26 是信号肽），该烟曲霉纤维二糖水解酶 I 的成熟多肽是此处 SEQ ID NO:10 的氨基酸 27 至 532。在另一个方面，基于预测此处 SEQ ID NO:11 的氨基酸 1 至 19 是信号肽的 SignalP 程序，该烟曲霉纤维二糖水解酶 II 的成熟多肽是此处 SEQ ID NO:11 的氨基酸 20 至 454。在另一个方面，基于预测此处 SEQ ID NO:5 的氨基酸 1 至 19 是信号肽的 SignalP 程序，该烟曲霉 β -葡萄糖苷酶的成熟多肽是此处 SEQ ID NO:5 的氨基酸 20 至 863。在另一个方面，基于预测此处 SEQ ID NO:7 的氨基酸 1 至 25 是信号肽的 SignalP 程序，该青霉属 GH61 多肽的成熟多肽是此处 SEQ ID NO:7 的氨基酸 26 至 253。

[0082] 在本领域中已知的是，宿主细胞可以产生由相同多核苷酸表达的两种或更多种不同成熟多肽（即，具有不同的 C-末端和 / 或 N-末端氨基酸）的混合物。

[0083] 成熟多肽编码序列：术语“成熟多肽编码序列”意指编码具有酶活性的成熟多肽的一种多核苷酸。

[0084] 亲本酶：术语“亲本”意指对其作出改变以产生变体的酶。亲本可以是天然存在的（野生型）多肽或其变体。

[0085] 预处理的玉米秸秆：术语“PCS”或“预处理的玉米秸秆”意指通过用热和稀硫酸处理、碱预处理、或中性预处理从玉米秸秆得到的纤维素材料。

[0086] 序列一致性：两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性由参数“序列一致性”描述。

[0087] 出于本发明的目的，使用如在 EMBOSS 包 (EMBOSS: 欧洲分子生物学开放软件套件 (The European Molecular Biology Open Software Suite), 赖斯 (Rice) 等人, 2000, 遗传学趋势 (Trends Genet.) 16:276-277)（优选 5.0.0 版或更新版本）的尼德尔 (Needle) 程序中所实施的尼德尔曼 - 翁施 (Needleman-Wunsch) 算法 (Needleman (尼德尔曼) 和 Wunsch (翁施), 1970, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 48:443-453) 来确定两个氨基酸序列之间的序列一致性。所使用的参数是空位开放罚分 10, 空位延伸罚分 0.5, 以及 EBLOSUM62 (BLOSUM62 的 EMBOSS 版本) 取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出（使用 - 非简化选项获得）被用作百分比一致性，并且如下计算：

[0088] $(\text{一致的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0089] 出于本发明的目的，使用如在 EMBOSS 包 (EMBOSS: 欧洲分子生物学开放软件套件, 赖斯 (Rice) 等人, 2000, 见上文)（优选 5.0.0 版或更新版本）的尼德尔程序中所实施的尼德尔曼 - 翁施算法（尼德尔曼 (Needleman) 和翁施 (Wunsch), 1970, 见上文）来确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列一致性。所使用的参数是空位开放罚分 10, 空位延伸罚分 0.5, 和 EDNAFULL (NCBI NUC4.4 的 EMBOSS 版) 取代矩阵。尼德尔标注的“最长的一致性”的输出（使用 - 非简化选项获得）被用作百分比一致性，并且如下计算：

[0090] $(\text{一致的脱氧核糖核苷酸} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0091] 子序列：术语“子序列”意指使一个或多个（例如，若干个）核苷酸从成熟多肽编码序列的 5' 端和 / 或 3' 端缺少的多核苷酸，其中该子序列编码具有酶活性的一个片段。在一个方面中，子序列包含酶的成熟多肽编码序列的至少 85%，例如至少 90% 或至少 95% 的

核苷酸。

[0092] 变体：术语“变体”意指在一个或多个（例如，若干个）位置处包含改变，即取代、插入和/或缺失的具有酶或酶增强活性的多肽。取代意指占据一个位置的氨基酸替换不同的氨基酸；缺失意指去除占据一个位置的氨基酸；并且插入意指在邻接并且紧随占据一个位置的氨基酸之后添加一个氨基酸。

[0093] 野生型酶：术语“野生型”酶意指由见于自然界中的一种天然存在的微生物（如一种细菌、酵母或丝状真菌）表达的一种酶。

[0094] 在此提及“约”一个数值或参数包括指向那个数值或参数本身的方面。例如，提及“约 X”的描述包括方面“X”。

[0095] 如在此和所附权利要求书中所使用，单数形式“一种/个”、“或”以及“该”包括复数指示物，除非上下文以另外的方式清楚表明。应该理解的是在此描述的本发明的这些方面包括“由方面组成”和/或“基本由方面组成”。

[0096] 除非另外定义或由背景清楚指示，否则本文中所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

附图说明

[0097] 图 1 示出酶促预调节对从玉米纤维水解产物中提取/回收油的作用。

[0098] 对照物：用纤维素分解酶制剂 C3 糖化；

[0099] 仅 EPC-漆酶：仅用漆酶 A 预调节，然后用纤维素分解酶制剂 C3 水解；

[0100] EPC-Lacc H3：用漆酶 A 和半纤维素分解酶制剂 H3 预调节，然后用纤维素分解酶制剂 C3 水解；

[0101] EPC-Lacc/GA188：用漆酶 A 和葡萄糖淀粉酶 188 预调节，然后用纤维素分解酶制剂 C3 水解。

[0102] EPC-Lacc/GA：用漆酶 A 和葡萄糖淀粉酶 GA 预调节，然后用纤维素分解酶制剂 C3 水解。

[0103] 图 2 示出酶促预调节对玉米纤维水解产物中葡萄糖产率的作用：

[0104] 对照物：用纤维素分解酶制剂 C3 糖化；

[0105] 仅 EPC-漆酶：仅用漆酶 A 预调节，然后用纤维素分解酶制剂 C3 水解；

[0106] EPC-Lacc H3：用漆酶 A 和半纤维素分解酶制剂 H3 预调节，然后用纤维素分解酶制剂 C3 水解；

[0107] EPC-Lacc/GA188：用漆酶 A 和葡萄糖淀粉酶 188 预调节，然后用纤维素分解酶制剂 C3 水解。

[0108] 图 3 示出酶促预调节对玉米纤维水解产物中葡萄糖产率的作用：

[0109] 对照物：用纤维素分解酶制剂 C3 糖化；

[0110] EPC-Lacc/GA：用漆酶 A 和葡萄糖淀粉酶 GA 预调节，然后用纤维素分解酶制剂 C3 糖化。

[0111] 详细说明

[0112] 此处说明了对预处理的纤维素材料进行预调节以改善酶促糖化（水解）的方法。还说明了从预处理（含油）的纤维素分解材料中回收油的方法。还涉及从含木质纤维素的

材料中生产发酵产物（如乙醇）或糖的方法。还说明了适合在本发明的方法和 / 或工艺中使用的组合物。

[0113] 诸位发明人已出人意料地发现,在用纤维素分解酶制剂进行糖化（即水解）之前,用漆酶和葡糖淀粉酶的组合对稀酸预处理的含油玉米纤维材料进行酶促预调节导致在糖化之后与当不进行预调节时相比增加的油回收。此外,还发现了与当不进行预调节时相比可以获得增加的糖化速率。这描述于实例 1 中。

[0114] 预调节在糖化（即水解）之前进行,糖在糖化中产生。这些糖可被转化为多种产物,包括发酵产物（例如乙醇或丁醇）,或被转化为糖浆（例如高果糖玉米糖浆（HFCS））以及木质纤维素衍生的塑料,包括聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯）。其他终产物包括乳酸,可充当一种原料用于生产聚乳酸（PLA）以替代石油化学的包装材料（例如 PET）。

[0115] 对预处理的纤维素材料进行预调节的方法

[0116] 在第一方面中,本发明涉及对预处理的纤维素材料进行预调节的方法,包括用酚氧化酶和葡糖淀粉酶孵育预处理的纤维素材料。

[0117] 该酚氧化酶可属于以下 EC 类中的任一种,该 EC 类包括:漆酶 (EC 1.10.3.2)、儿茶酚氧化酶 (EC 1.10.3.1)、*o*-氨基酚氧化酶 (1.10.3.4)、以及单酚单加氧酶 (1.14.18.1)。在一个优选的实施例中,该酚氧化酶是一种漆酶,例如一种来自嗜热毁丝霉 (MtL) 的漆酶,例如此处 SEQ ID NO:12 中所示的漆酶。在一个实施例中,该漆酶与披露于 WO 95/33836 中的或 SEQ ID NO:12 的嗜热毁丝霉漆酶具有至少 60%,至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 的序列一致性。其他适合的漆酶在以下的“漆酶”部分中提出。在一个实施例中,该酚氧化酶（尤其漆酶）装载是 1-500 μ g 之间,例如 5-100 μ g EP/g 纤维素。在一个实施例中,该漆酶装载是 0.005mg 和 20mg 酶类蛋白质 (EP)/g 纤维素之间,例如 0.1-1mg EP/g 纤维素。

[0118] 在一个实施例中,该葡糖淀粉酶来源于一种曲霉菌属菌株,如黑曲霉（例如,此处 SEQ ID NO:13 中所示的葡糖淀粉酶）或米曲霉。

[0119] 在一个实施例中,该葡糖淀粉酶与此处 SEQ ID NO:13 中所示的成熟序列具有至少 60%,至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或甚至 100% 的序列一致性。

[0120] 在一个实施例中,该葡糖淀粉酶装载是 0.01mg 和 20mg EP/g 纤维素之间,例如 0.1mg-1mg EP/g 纤维素。其他适合的葡糖淀粉酶在以下的“葡糖淀粉酶”部分中提出。

[0121] 在一个实施例中, β -葡糖苷酶是在预调节过程中存在的或添加的。该 β -葡糖苷酶可以来源于一种曲霉菌属菌株,例如黑曲霉、烟曲霉、或米曲霉。在一个实施例中,该 β -糖苷酶装载是 0.01mg 和 20mg EP/g 纤维素之间,例如 0.1mg-1mg EP/g 纤维素。其他适合的 β -葡糖苷酶在以下的“ β -葡糖苷酶”部分中提出。

[0122] 在一个实施例中, α -淀粉酶是在预调节过程中存在的或添加的。在一个实施例中,该 α -淀粉酶来源于一种曲霉菌属菌株,例如黑曲霉或米曲霉。在一个实施例中,该 α -淀粉酶装载是 0.001mg 和 20mg EP/g 纤维素之间,例如 0.01mg-1mg EP/g 纤维素。其他适合的 α -淀粉酶在以下的“ α -淀粉酶”部分中提出。

[0123] 在一个实施例中,一种半纤维素酶（例如,一种半纤维素分解酶制剂（例如,半纤维素分解酶制剂 H3）（见实例））是在预调节过程中存在的或添加的。

[0124] 在一个实施例中,该半纤维素酶是一种半纤维素分解酶制剂。在一个优选的实施例中,该半纤维素分解酶制剂包含一种来自里氏木霉的纤维素分解酶制剂,进一步包含烟曲霉木聚糖酶(在此的 SEQ ID NO:8)和烟曲霉 β -木糖苷酶(在此的 SEQ ID NO:9)。

[0125] 在一个实施例中,该半纤维素酶装载是 0.01mg 和 20mg EP/g 纤维素之间,例如 0.1mg-1mg EP/g 纤维素。在以下“半纤维素酶”部分中提出了其他适合的半纤维素酶。

[0126] 可以使用任何适合的方法预处理该预处理的纤维素材料。在以下“预处理”部分中列出了适合的预处理方法。在一个优选的实施例中,在预调节之前,该预处理的纤维素材料已经被稀酸预处理或自水解。根据本发明,该纤维素材料可以是预处理的玉米纤维、预处理的玉米秸秆(PCS)、预处理的玉米芯、预处理的麦秸、预处理的稻秸或预处理的柳枝稷。在一个优选的实施例中,该纤维素材料是稀酸预处理的玉米纤维。考虑到的纤维素材料的其他实例可以在以下“纤维素材料”部分中找到。

[0127] 在另一个实施例中,该预处理的纤维素材料是未洗涤的。在一个实施例中,该预处理的纤维素材料是未解毒的。在一个实施例中,该纤维素材料是洗涤的、未解毒的或未洗涤的预处理的玉米纤维、玉米秸秆(PCS)、玉米芯、麦秸、稻秸和/或柳枝稷。在一个实施例中,预调节发生在 5% -50% TS(总固体),例如 10% -40% TS,例如 15% -35% TS。在一个实施例中,预调节孵育发生持续例如至少 30 分钟,例如至少 1 小时、至少 2 小时、至少 4 小时、至少 8 小时、至少 12 小时、或至少 24 小时,例如从 30 分钟到 24 小时。在一个实施例中,预调节孵育发生在 20°C -70°C 之间,例如 40°C -60°C 之间的温度下。

[0128] 本发明的一种方法导致与当不进行预调节时相比释放出的油量增加。

[0129] 从预调节的预处理的纤维素材料中回收/提取油的工艺

[0130] 在一个第二方面,本发明涉及从预处理的纤维素材料中回收油的工艺,包括:

[0131] (i) 用一种酚氧化酶预调节该纤维素材料;

[0132] (ii) 用一种纤维素分解酶制剂使该预调节的材料糖化;以及

[0133] (iii) 从步骤(ii)的糖化的材料中回收油。

[0134] 在一个实施例中,根据本发明的预调节方法进行预调节步骤(a)(如以上“对预处理的纤维素材料进行预调节的方法”部分中所描述的)。

[0135] 根据本发明的适合的纤维素材料和预处理纤维素材料的方法分别描述于以下“纤维素材料”部分和“预处理”部分中。

[0136] 糖化

[0137] 在糖化步骤(即水解步骤)中,将该预处理的预调节的纤维素材料水解,以将纤维素和/或半纤维素分解成可发酵糖,如葡萄糖、纤维二糖、木糖、木酮糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、和/或可溶性寡糖。该糖化是使用一种纤维素分解酶制剂酶促地执行的。

[0138] 糖化(即水解)可以在适合的含水环境中在可以由本领域技术人员容易确定的条件下进行。在一个方面中,糖化在适于纤维素分解酶制剂的活性,优选地对于纤维素分解酶制剂最佳的条件下进行。糖化可以以进料分批过程或连续过程进行,其中将该预调节的未洗涤的预处理的纤维素材料(基质)逐渐进料至水解溶液中。

[0139] 糖化通常在受控的 pH、温度以及混合条件下在搅拌釜反应器或发酵罐中进行。适合的处理时间、温度以及 pH 条件可以由本领域技术人员容易地确定。例如,糖化可以持续长达 200 小时,例如约 12 至约 96 小时,约 16 至约 72 小时或约 24 至约 48 小时。在一方面,

糖化发生持续例如 12 小时,例如 24 小时、36 小时、48 小时、60 小时、或 72 小时。

[0140] 糖化期间的温度可以在约 25℃ 至约 75℃,例如约 30℃ 至约 70℃、约 35℃ 至约 65℃、或约 40℃ 至 60℃、或约 45℃ 至 55℃、或约 50℃ 的范围中。

[0141] 糖化期间的 pH 可以在约 3.0 至 7.0,例如 3.5 至 6.5、4.0 至 6.0、4.5 至 5.5 或约 5.0 的范围中。

[0142] 在一些方面,糖化期间的干固体 (DS) 含量 (例如该纤维素材料中的总固体) 是少于约 25wt%、20wt%、15wt%、10wt%、7.5wt%、5wt%、2.5wt%、2wt%、1wt%、或 0.5wt%。

[0143] 在一个实施例中,可以将从糖化步骤 (ii) 中获得糖进行发酵。

[0144] 在一个实施例中,在步骤 (ii) 中使用的纤维素分解酶制剂可以是真菌起源的。在一个优选实施例中,该纤维素分解酶制剂源自于木霉属 (例如里氏木霉)。在一个优选实施例中,糖化 (水解) 是在包括选自下组的酶活性的一种纤维素分解酶制剂的存在下进行的,该组包括:内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β -葡糖苷酶 (例如烟曲霉或米曲霉 β -葡糖苷酶)。在一个优选实施例中,糖化是使用一种具有纤维素分解增强活性的多肽 (例如一种橙色嗜热子囊菌或埃默森青霉菌纤维素分解增强多肽) 进行。

[0145] 在一个实施例中,糖化是进一步使用选自半纤维素酶、棒曲霉素、酯酶、漆酶、木质素分解酶、果胶酶、过氧化物酶、蛋白酶、以及膨胀素中的一种或多种酶进行。

[0146] 在一个实施例中,该半纤维素酶可以是一种木聚糖酶 (例如一种棘孢曲霉或烟曲霉木聚糖酶)、一种木糖苷酶 (例如烟曲霉 β -木糖苷酶)。

[0147] 在一个实施例中,产生的发酵产物是醇 (例如乙醇或丁醇)、有机酸、酮、氨基酸、或气体。

[0148] 在一个优选的实施例中,该酚氧化酶是一种漆酶,例如一种来自嗜热毁丝霉 (MtL) (WO 95/33836) 的漆酶,例如此处 SEQ ID NO:12 中所示的漆酶。在一个实施例中,根据本发明的预调节方法进行预调节步骤 (i)。

[0149] 在一个实施例中,用于步骤 (ii) 中糖化的纤维素分解酶制剂是真菌起源的,例如来源于木霉属 (例如,里氏木霉)。一种半纤维素酶也可以是在糖化过程中存在或添加。在一个实施例中,糖化步骤 (ii) 是在包括选自下组的酶活性的一种纤维素分解酶制剂的存在下进行的,该组包括:内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β -葡糖苷酶 (例如烟曲霉 β -葡糖苷酶 (例如示于在此的 SEQ ID NO:5 中的 β -葡糖苷酶)、或米曲霉 β -葡糖苷酶)。在一个实施例中,糖化步骤 (ii) 是在一种具有纤维素分解增强活性的多肽的存在下进行的,例如,GH61 多肽 (例如,橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽 (例如示于在此的 SEQ ID NO:4 中的多肽) 或埃默森青霉菌 GH61 多肽 (例如示于在此的 SEQ ID NO:7 中的多肽))。

[0150] 在一个实施例中,糖化步骤 (ii) 是在选自半纤维素酶、棒曲霉素、酯酶、漆酶、木质素分解酶、果胶酶、过氧化物酶、蛋白酶、以及膨胀素中的一种或多种酶的存在下进行的。

[0151] 在一个实施例中,半纤维素酶 (例如,半纤维素分解酶制剂) 是在糖化 (和 / 或发酵) 过程中存在的或添加的。在一个优选的实施例中,该半纤维素分解酶制剂包含一种来自里氏木霉的纤维素分解酶制剂,进一步包含烟曲霉木聚糖酶 (在此的 SEQ ID NO:8) 和烟曲霉 β -木糖苷酶 (在此的 SEQ ID NO:9)。

[0152] 适合的纤维素分解酶制剂的实例可在以下的“纤维素分解酶制剂”部分中找到。

[0153] 在一个优选实施例中,该纤维素分解酶制剂源自于木霉属 (例如里氏木霉),包括

内切葡聚糖酶 (EG)、纤维二糖水解酶 (CBH)、以及 β -葡糖苷酶 (BG), 并且进一步包括具有纤维素分解增强活性的一种多肽 (例如一种橙色嗜热子囊菌或埃默森青霉菌纤维素分解增强多肽)、 β -葡糖苷酶 (例如烟曲霉或米曲霉 β -葡糖苷酶)。

[0154] 纤维素分解酶制剂的实例可在以下的“纤维素分解酶制剂”部分中找到。

[0155] 在一个优选的实施例中, 在糖化过程中存在或添加的纤维素分解酶制剂是一种来源于里氏木霉的纤维素分解酶制剂, 进一步包括具有纤维素分解增强活性的 GH61A 多肽 (该多肽来源于埃默森青霉菌菌株 (WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:7))、披露于 WO 2012/044915 中的烟曲霉 β -葡糖苷酶 (WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:5) 变体 F100D、S283G、N456E、F512Y; WO2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:6 的和在此的 SEQ ID NO:10 的烟曲霉 Cel7A CBH1 以及 WO 2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:18 的烟曲霉 CBH II。此外, 该纤维素分解酶制剂可以进一步补充有 10% 半纤维素分解酶制剂, 该半纤维素分解酶制剂包含一种来自里氏木霉的纤维素分解酶制剂, 进一步包含烟曲霉木聚糖酶 (在此的 SEQ ID NO:8) 和烟曲霉 β -木糖苷酶 (在此的 SEQ ID NO:9)。

[0156] 本发明的一种工艺导致与当不进行预调节时相比释放出的油量增加。

[0157] 从预调节的预处理的纤维素材料中生产发酵产物

[0158] 在一个第三方面, 本发明涉及从纤维素材料生产一种发酵产物的工艺, 包括:

[0159] (a) 用一种酚氧化酶预调节该纤维素材料;

[0160] (b) 用一种纤维素分解酶制剂使该预调节的材料糖化;

[0161] (c) 用一种发酵生物对该糖化的材料进行发酵; 以及

[0162] (d) 任选地从步骤 (b) 中的糖化材料和 / 或步骤 (c) 中的发酵材料中回收油。

[0163] 在一个实施例中, 根据本发明的预调节方法进行预调节步骤 (a) (如以上“对预处理的纤维素材料进行预调节的方法”部分中所描述的)。

[0164] 在一个实施例中, 糖化步骤 (b) 如以上“从预调节的预处理的纤维素材料中回收 / 提取油的工艺”部分中所描述的进行。

[0165] 在一个实施例中, 该发酵产物是在步骤 (c) 中的发酵之后回收。

[0166] 在一个实施例中, 在糖化过程中存在或添加的纤维素分解酶制剂是真菌起源的。在一个优选实施例中, 该纤维素分解酶制剂源自于木霉属 (例如里氏木霉)。

[0167] 在一个实施例中, 糖化步骤 (b) 是在包括选自下组的酶活性的一种纤维素分解酶制剂的存在下进行的, 该组包括: 内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β -葡糖苷酶 (例如烟曲霉 β -葡糖苷酶 (例如示于在此的 SEQ ID NO:5 中的 β -葡糖苷酶)、或米曲霉 β -葡糖苷酶)。

[0168] 在一个实施例中, 糖化是在一种具有纤维素分解增强活性的多肽 (例如, 橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽 (例如示于在此的 SEQ ID NO:4 中的多肽) 或埃默森青霉菌 GH61 多肽 (例如示于在此的 SEQ ID NO:7 中的多肽)) 的存在下进行的。

[0169] 在一个实施例中, 糖化步骤 (b) 是在选自半纤维素酶、棒曲霉素、酯酶、漆酶、木质素分解酶、果胶酶、过氧化物酶、蛋白酶、以及膨胀素中的一种或多种酶的存在下进行的。

[0170] 在一个实施例中, 该半纤维素酶选自木聚糖酶 (例如, 棘孢曲霉木聚糖酶 (例如示于在此的 SEQ ID NO:6 中的木聚糖酶)、或烟曲霉木聚糖酶 (例如示于在此的 SEQ ID NO:8

中的木聚糖酶)) 和木糖苷酶 (例如, 烟曲霉 β -木糖苷酶 (例如示于此的 SEQ ID NO:9 中的木糖苷酶))。

[0171] 在一个实施例中, 该发酵产物是醇 (例如乙醇或丁醇)、有机酸、酮、氨基酸、或气体。在一个优选的实施例中, 该发酵产物是乙醇。本发明的一种工艺导致与当不进行预调节时相比增加的糖化速率。同样, 本发明的一种工艺导致与当不进行预调节时相比释放出的油量增加。

[0172] 在一个实施例中, 在预调节过程中使用的酚氧化酶是一种漆酶, 例如一种来自嗜热毁丝霉 (MtL) (WO 95/33836) 的漆酶, 例如此处 SEQ ID NO:12 中所示的漆酶。在一个实施例中, 葡糖淀粉酶是在预调节过程中存在的或添加的。该葡糖淀粉酶可以来源于一种曲霉菌菌株, 如黑曲霉 (例如, 此处 SEQ ID NO:13 中所示的葡糖淀粉酶) 或米曲霉。所使用的预调节方法和适合的酶和条件描述于以上“对预处理的纤维素材料进行预调节的方法”中。

[0173] 在一个优选的实施例中, 在糖化过程中存在或添加的纤维素分解酶制剂是一种来源于里氏木霉的纤维素分解酶制剂, 进一步包括具有纤维素分解增强活性的 GH61A 多肽 (该多肽来源于埃默森青霉菌菌株 (WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:7))、披露于 WO 2012/044915 中的烟曲霉 β -葡糖苷酶 (WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:5) 变体 F100D、S283G、N456E、F512Y; WO2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:6 的和在此的 SEQ ID NO:10 的烟曲霉 Cel7A CBH1 以及 WO 2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:18 的烟曲霉 CBH II。此外, 该纤维素分解酶制剂可以进一步补充有 10% 半纤维素酶酶组合物, 该半纤维素酶酶组合物来源于里氏木霉, 进一步包含烟曲霉木聚糖酶 (在此的 SEQ ID NO:8) 和烟曲霉 β -木糖苷酶 (在此的 SEQ ID NO:9)。

[0174] 发酵:

[0175] 从该纤维素材料的糖化 (水解) 获得的糖可以通过能够将这些糖直接或间接发酵成所希望的发酵产物 (例如乙醇) 的一种或多种 (若干种) 发酵微生物体进行发酵。

[0176] “发酵”或“发酵过程”是指任何发酵过程或包括发酵步骤的任何过程。发酵方法还包括用于消费性醇工业 (例如啤酒和葡萄酒)、乳品工业 (例如发酵的乳制品)、皮革工业和烟草工业的发酵方法。发酵条件取决于所希望的发酵产物和发酵生物, 并且可以由本领域的普通技术人员容易地确定。

[0177] 通过一种发酵生物 (例如酵母) 将从预调节的预处理的纤维素材料的糖化获得的糖发酵为一种产物, 例如乙醇。如上所述, 糖化 (水解) 和发酵可以是分开的或同时的。

[0178] 分开或同时的糖化 (水解) 和发酵包括但不限于: 分开糖化 (水解) 和发酵 (SHF)、同时糖化和发酵 (SSF)、同时糖化和共发酵 (SSCF)、杂合的水解和发酵 (HHF)、分开水解和共发酵 (SHCF)、杂合的水解和共发酵 (HHCF), 以及直接微生物转化 (DMC)。SHF 使用分开的处理步骤以首先将纤维素材料糖化 (水解) 为可发酵糖, 例如, 葡萄糖、纤维二糖、纤维三糖、以及戊糖, 并且然后将这些可发酵糖发酵成乙醇。在 SSF 中, 纤维素材料的酶水解和糖发酵成乙醇被组合在一个步骤中 (菲利皮迪斯 • G. P. (Philippidis, G. P.), 1996, 纤维素生物转化技术 (Cellulose bioconversion technology), 生物乙醇手册: 生产和利用 (Handbook on Bioethanol: Production and Utilization), 怀曼 • C. E. (Wyman, C. E.) 编辑, 泰勒-弗朗西斯出版集团 (Taylor & Francis), 华盛顿特区 (Washington, DC), 179-212)。SSCF 涉及多种糖的共发酵 (希恩 • J. (Sheehan, J.) 和希

默尔·M. (Himmel, M.), 1999, 酶、能量与环境 : 美国能源部研究和开发生物乙醇活性的战略性观点 (Enzymes, energy and the environment: A strategic perspective on the U. S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol), 生物技术进展 (Biotechnol. Prog.) 15:817-827)。HHF 涉及一个分开的水解步骤, 并且另外涉及一个同时糖化和水解步骤, 这些步骤可以在同一反应器中进行。HHF 过程中的步骤可以在不同的温度下进行, 即高温酶糖化, 接着在发酵菌株能够耐受的更低温度下进行 SSF。DMC 将全部三个过程 (酶生产、水解、和发酵) 组合在一个或多个 (若干个) 步骤中, 其中使用了相同的生物体来产生用于转化纤维素材料为可发酵糖并且用于转化可发酵糖为终产物的酶 (林德 (Lynd) 等人, 2002, 微生物纤维素利用 : 基本原理和生物技术 (Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology), 微生物学与分子生物学评论 (Microbiol. Mol. Biol. Reviews) 66:506-577)。在此应理解的是, 本领域中已知的包括预处理、酶水解 (糖化)、发酵、或其组合的任何方法, 可以用于实施本发明的方法。

[0179] 根据本发明工艺的适合的发酵生物描述于以下“发酵生物”部分中

[0180] 发酵生物

[0181] “发酵生物”是指适合在发酵过程中使用以产生所希望的发酵产物的任何微生物, 包括细菌生物和真菌生物。发酵生物可以是己糖 (即 C_6) 和 / 或戊糖 (C_5) 发酵生物、或其组合。己糖和戊糖发酵生物二者均是本领域中所熟知的。适合的发酵生物能够将糖 (如葡萄糖、木糖、木酮糖、阿拉伯糖、麦芽糖、甘露糖、半乳糖、和 / 或寡糖) 直接或间接地发酵 (即, 转化) 成所希望的发酵产物。

[0182] 由林 (Lin) 等人, 2006, 《应用微生物学与生物技术》(Appl. Microbiol. Biotechnol.) 69:627-642 描述了产生乙醇的细菌和真菌发酵生物的实例。

[0183] 能够发酵 C_6 糖的发酵微生物的实例包括细菌生物和真菌生物, 如酵母。优选的酵母包括酵母属菌株, 优选酿酒酵母。

[0184] 能够发酵 C_5 糖的发酵生物的实例包括细菌生物和真菌生物, 如酵母。优选的 C_5 发酵酵母包括毕赤酵母属的菌株, 优选树干毕赤酵母, 例如树干毕赤酵母 CBS 5773; 假丝酵母属的菌株, 优选博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*)、芸薹假丝酵母 (*Candida brassicae*)、休哈塔假丝酵母 (*Candida sheatae*)、迪丹斯假丝酵母 (*Candida diddensii*)、假热带假丝酵母 (*Candida pseudotropicalis*)、或产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)。

[0185] 其他发酵生物包括发酵单胞菌属的菌株, 例如运动发酵单胞菌; 汉逊酵母属, 例如异常汉森酵母; 克鲁维酵母属, 例如马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*)、乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*)、以及脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*); 裂殖酵母属, 例如粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*); 大肠杆菌, 尤其已被遗传修饰以提高乙醇产率的大肠杆菌菌株; 梭菌属, 例如丙酮丁醇梭菌、热纤维梭菌 (*Chlostridium thermocellum*)、以及 *Chlostridium phytofermentans*; 土芽孢杆菌属 (*Geobacillus* sp.); 热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter*), 例如解糖热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter saccharolyticum*); 以及芽孢杆菌属, 例如凝结芽孢杆菌; 假丝酵母属, 例如萨纳瑞西斯假丝酵母 (*C. sonorensis*)、*C. methanosorbosa*、迪丹斯假丝酵母 (*C. diddensiae*)、近平滑假丝酵母 (*C. parapsilosis*)、*C. naedodendra*、布朗克假丝酵母 (*C. blankii*)、嗜虫假丝酵母 (*C. entomophilia*)、芸薹假丝酵母、假热带假丝酵母、博伊丁假丝酵母、产朊假丝酵母、以及

休哈塔假丝酵母；克雷伯氏菌属，例如产酸克雷伯氏菌 (*K. oxytoca*)。

[0186] 在一个方面中，酵母是酵母属物种。在另一个方面中，酵母是酿酒酵母。在另一个方面中，酵母是糖化酵母。在另一个方面中，酵母是葡萄汁酵母。在另一个方面中，酵母是克鲁维酵母属物种。在另一个方面中，酵母是马克斯克鲁维酵母。在另一个方面中，酵母是脆壁克鲁维酵母。在另一个方面中，酵母是假丝酵母属物种。在另一个方面中，酵母是博伊丁假丝酵母。在另一个方面中，酵母是芸蓼假丝酵母。在另一个方面中，酵母是迪丹斯假丝酵母。在另一个方面中，酵母是假热带假丝酵母。在另一个方面中，酵母是产朊假丝酵母。在另一个方面中，酵母是棒孢酵母属物种。在另一个方面中，酵母是葡萄牙棒孢酵母 (*Clavispora lusitaniae*)。在另一个方面中，酵母是仙人掌棒孢酵母 (*Clavispora opuntiae*)。在另一方面，酵母是管囊酵母属。在另一个方面中，酵母是嗜鞋管囊酵母。在另一个方面中，酵母是毕赤酵母属物种。在另一方面，酵母是树干毕赤酵母。在另一个方面中，酵母是酒香酵母属物种。在另一方面，酵母是克劳森酒香酵母 (菲利皮迪斯·G.P. (Philippidis, G.P.), 1996, 纤维素生物转化技术 (Cellulose bioconversion technology), 生物乙醇手册：生产和利用 (Handbook on Bioethanol: Production and Utilization), 怀曼·C.E (Wyman, C.E.) 编辑, 泰勒-弗朗西斯出版集团 (Taylor&Francis), 华盛顿特区 (Washington, DC), 179-212))。

[0187] 能够有效地将己糖和戊糖发酵成乙醇的细菌包括，例如，运动发酵单胞菌、丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)、热纤维梭菌 (*Clostridium thermocellum*)、*Clostridium phytofermentans*、土芽孢杆菌属种、解糖热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter saccharolyticum*)、以及凝结芽孢杆菌 (菲利皮迪斯, 1996, 见上文)。

[0188] 在一个方面中，细菌是发酵单胞菌属物种。在一个方面中，细菌是运动发酵单胞菌。在另一个方面中，细菌是梭菌属物种。在另一方面，细菌是丙酮丁醇梭菌。在另一方面，细菌是 *Clostridium phytofermentans*。在另一个方面中，细菌是热纤维梭菌。在另一个方面中，细菌是土芽孢杆菌属物种。在另一个方面中，细菌是解糖热厌氧杆菌。在另一个方面中，细菌是凝结芽孢杆菌。

[0189] 适于乙醇生产的可商购的酵母包括，例如乙醇红酵母 (ETHANOL RED™ yeast) (可从富酶泰斯/乐斯富 (Fermentis/Lesaffre), USA 获得)、FALI™ (可从弗莱施曼酵母 (Fleischmann's Yeast), USA 获得)、SUPERSTART™ 和 THERMOSACC™ 新鲜酵母 (可从乙醇技术 (Ethanol Technology), WI, USA)、BIOFERM AFT 和 XR (可从 NABC- 北美生物产品公司 (North American Bioproducts Corporation), GA, USA 获得)、GERT STRAND™ (可从 Gert Strand AB, 瑞典获得)、以及 FERMIOL (可从帝斯曼食品配料部 (DSM Specialties) 获得)。

[0190] 在一个方面，发酵微生物已经经过遗传修饰，以提供发酵戊糖的能力，如利用木糖的微生物、利用阿拉伯糖的微生物、以及共同利用木糖和阿拉伯糖的微生物。

[0191] 将异源基因克隆到不同发酵微生物中已经构建出能够将己糖和戊糖转化成乙醇 (共发酵) 的生物体 (陈 (Chen) 和霍 (Ho), 1993, 酿酒酵母中毕赤酵母木糖还原酶基因的克隆和改善表达 (Cloning and improving the expression of *Pichia stipitis* xylose reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae*), 应用生物化学与生物技术 (Appl. Biochem. Biotechnol.) 39-40:135-147; 霍等人, 1998, 能够有效共发酵葡萄糖和木糖的遗传工程化的酵母菌属酵母 (Genetically engineered *Saccharomyces* yeast

capable of effectively cofermenting glucose and xylose),应用与环境微生物学 64:1852-1859;科特 (Kotter) 和西拉塞 (Ciriacy),1993,酿酒酵母发酵木糖 (Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*),应用微生物学与生物技术 (Appl. Microbiol.Biotechnol.)38:776-783;维尔福森 (Walfridsson) 等人,1995,过表达编码戊糖磷酸途径酶转酮醇酶和转醛醇酶的 TKL1 和 TAL1 基因的木糖代谢酿酒酵母菌株 (Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase),应用与环境微生物学 61:4184-4190;凯珀 (Kuyper) 等人,2004,用于有效厌氧木糖发酵的酿酒酵母的最小代谢工程化:原理的证实 (Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation:a proof of principle),欧洲微生物学会联合会酵母研究 (FEMS Yeast Research)4:655-664;比尔 (Beall) 等人,1991,通过重组大肠杆菌从木糖和其他糖产生乙醇的参数研究 (Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*),生物技术与生物工程 (Biotech. Bioeng.)38:296-303;英格拉姆 (Ingram) 等人,1998,用于乙醇产生的细菌的代谢工程化 (Metabolic engineering of bacteria for ethanol production),生物技术与生物工程 58:204-214;张 (Zhang) 等人,1995,产生乙醇的运动发酵单胞菌中戊糖代谢途径的代谢工程化 (Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*),科学 (Science)267:240-243;狄安妲 (Deanda) 等人,1996,通过代谢途径工程化开发发酵阿拉伯糖的运动发酵单胞菌菌株 (Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering),应用与环境微生物学 62:4465-4470;WO 2003/062430,木糖异构酶)。

[0192] 在一方面,遗传修饰的发酵生物是酿酒酵母。在另一方面,遗传修饰的发酵生物是运动发酵单胞菌。在另一方面,遗传修饰的发酵生物是大肠杆菌。在另一方面,遗传修饰的发酵生物是产酸克雷伯氏菌。在另一方面,遗传修饰的发酵生物是克鲁维酵母属。

[0193] 本领域中熟知的是,以上所描述的生物还可以用于产生其他物质,如在此所描述。

[0194] 典型地向降解的纤维素材料或水解物中添加发酵生物,并且进行发酵持续约 8 至约 96 小时,例如约 24 至约 60 小时。温度典型地在约 26℃至约 60℃之间,具体地约 32℃或 50℃,并且在约 pH 3 至约 pH 8,例如 pH 4 至 5、6、或 7 左右。

[0195] 在一方面,可以对降解的纤维素材料施用酵母和 / 或另一种生物,并且进行发酵持续约 12 小时至约 96 小时,例如 24 至 60 小时。在一个方面中,温度在约 20℃至约 60℃之间,例如约 25℃至约 50℃或约 32℃至约 50℃,并且 pH 通常是从约 pH 3 至约 pH 7,例如 pH 4-7 左右,例如约 pH 5。然而,一些发酵生物 (例如细菌) 具有更高的最适发酵温度。酵母或另一种微生物优选以每 mL 发酵液约 10^5 至 10^{12} ,例如从约 10^7 至 10^{10} ,特别是约 2×10^8 个活细胞计数的量施用。关于使用酵母进行发酵的进一步指南可以见于例如“醇教材”(“The Alcohol Textbook”)(K·雅克 (K. Jacques)、T.P. 里昂 (T.P. Lyons) 以及 D.R. 凯尔索尔 (D.R. Kelsall) 编辑,诺丁汉大学出版社 (Nottingham University Press), 联合王国 (United Kingdom) 1999), 将其通过引用结合在此。

[0196] 对于乙醇生产,在发酵之后,可蒸馏发酵的浆料以萃取乙醇。根据本发明的工艺获

得的乙醇可用作例如燃料乙醇、饮用乙醇,即可饮用的酒精,或工业乙醇。

[0197] 发酵刺激剂

[0198] 发酵刺激剂可以用在在此所描述的过程中,以进一步改进发酵,并且特别是改进发酵生物的性能,例如速率增加和产物产率(例如乙醇产率)。“发酵刺激剂”是指用于发酵生物(特别是酵母)生长的刺激剂。用于生长的优选发酵刺激剂包括维生素和矿物质。维生素的实例包括多种维生素、生物素、泛酸、烟酸、内消旋肌醇、硫胺素、吡哆醇、对氨基苯酸、叶酸、核黄素、以及维生素 A、B、C、D 和 E。例如参见阿尔弗雷多(Alfenore)等人,通过在进料分批方法过程中的一种维生素进料策略改进乙醇产生和酿酒酵母的存活力(Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisia* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process),施普林格(2002),其通过引用结合在此。矿物质的实例包括可以供应包含 P、K、Mg、S、Ca、Fe、Zn、Mn 和 Cu 营养素的矿物质和矿物盐。

[0199] 发酵产物

[0200] 根据本发明,(所希望的)发酵产物可以是由发酵得到的任何物质。该发酵产物可以是(不限制)一种醇(例如,阿拉伯糖醇、丁醇、乙醇、丙三醇(glycerol)、甲醇、1,3-丙二醇、山梨醇、以及木糖醇);一种有机酸(例如,乙酸、醋酸、己二酸、抗坏血酸、柠檬酸、2,5-二酮-D-葡萄糖酸、甲酸、反丁烯二酸、葡萄糖二酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、戊二酸、3-羟基丙酸、衣康酸、乳酸、苹果酸、丙二酸、草酸、草酰乙酸、丙酸、丁二酸、以及木糖酸);一种酮(例如,丙酮);一种氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、赖氨酸、丝氨酸、以及苏氨酸);一种烷烃(例如,戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、十一烷、以及十二烷);一种环烷烃(例如,环戊烷、环己烷、环庚烷、以及环辛烷);一种烯烃(例如,戊烯、己烯、庚烯、以及辛烯);以及一种气体(例如,甲烷、氢气(H₂)、二氧化碳(CO₂)、以及一氧化碳(CO))。发酵产物还可以是作为高价值产物的蛋白。

[0201] 在一个方面中,发酵产物是一种醇。应理解的是,术语“醇”涵盖包含一个或多个羟基部分的物质。在一个方面中,醇是阿拉伯糖醇。在另一个方面中,醇是丁醇。在另一个方面中,醇是乙醇。在另一个方面中,醇是甘油。在另一个方面中,醇是甲醇。在另一方面,该醇是 1,3-丙二醇。在另一个方面中,醇是山梨醇。在另一个方面中,醇是木糖醇。参见,例如,贡·C. S. (Gong, C. S.)、卡奥·N. J. (Cao, N. J.)、杜·J (Du, J.)、以及曹·G. T. (Tsao, G. T.), 1999, 由可再生资源生产乙醇,生物化学工程/生物技术的进展,舍佩尔·T. 编辑,施普林格,德国海德堡柏林,65:207-241;西尔韦拉·M. M. (Silveira, M. M.) 和乔纳斯 R. (Jonas, R.), 2002, 山梨醇的生物技术生产(The biotechnological production of sorbitol),应用微生物学与生物技术 59:400-408;尼加姆(Nigam)和辛格(Singh), 1995, 用于木糖醇-一种糖替代品的发酵生产工艺(Processes for fermentative production of xylitol-a sugar substitute),加工生物化学(Process Biochemistry) 30(2):117-124;伊泽吉(Ezeji)等人, 2003, 通过拜季林斯基羧菌 BA101 生产丙酮、丁醇和乙醇并且通过气提原位回收(Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping),微生物与生物技术世界杂志(World Journal of Microbiology and Biotechnology) 19(6):595-603。

[0202] 在另一个方面中,发酵产物是一种有机酸。在一个方面中,有机酸是乙酸。在另一个方面中,有机酸是醋酮酸。在另一个方面中,有机酸是己二酸。在另一个方面中,有机酸是抗坏血酸。在另一个方面中,有机酸是柠檬酸。在另一个方面中,有机酸是 2, 5- 二酮 -D- 葡萄糖酸。在另一个方面中,有机酸是甲酸。在另一个方面中,有机酸是富马酸。在另一个方面中,有机酸是葡萄糖二酸。在另一个方面中,有机酸是葡萄糖酸。在另一个方面中,有机酸是葡萄糖醛酸。在另一个方面中,有机酸是戊二酸。在另一个方面中,有机酸是 3- 二羟基丙酸。在另一个方面中,有机酸是衣康酸。在另一个方面中,有机酸是乳酸。在另一个方面中,有机酸是苹果酸。在另一个方面中,有机酸是丙二酸。在另一个方面中,有机酸是草酸。在另一个方面中,有机酸是丙酸。在另一个方面中,有机酸是琥珀酸。在另一方面,该有机酸是木糖酸。参见例如陈 (Chen) 和李 (Lee), 1997, 用于从纤维素生物质生产乳酸的膜介导的抽提发酵 (Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass) 《应用生物化学与生物技术》 (Appl. Biochem. Biotechnol.), 63-65:435-448。

[0203] 在另一个方面中,发酵产物是一种酮。应理解的是,术语“酮”涵盖包含一个或多个酮部分的物质。在另一个方面中,酮是丙酮。参见,例如,库雷希和布拉舍克, 2003, 见上文。

[0204] 在另一个方面中,发酵产物是一种氨基酸。在一个方面中,氨基酸是天冬氨酸。在另一个方面中,氨基酸是谷氨酸。在另一个方面中,氨基酸是甘氨酸。在另一个方面中,氨基酸是赖氨酸。在另一个方面中,氨基酸是丝氨酸。在另一个方面中,氨基酸是苏氨酸。参见例如理查德 (Richard) 和马加里蒂 (Margaritis) 用于聚 (谷氨酸) 生产和其他微生物生物聚合物的分批发酵动力学的实验建模 (Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers), 生物技术和生物工程 (Biotechnology and Bioengineering) 87(4):501-515。

[0205] 在另一个方面中,发酵产物是一种烷烃。该烷烃可以是非支链或支链烷烃。在一个方面中,烷烃是戊烷。在另一个方面中,烷烃是己烷。在另一个方面中,烷烃是庚烷。在另一个方面中,烷烃是辛烷。在另一个方面中,烷烃是壬烷。在另一个方面中,烷烃是癸烷。在另一个方面中,烷烃是十一烷。在另一个方面中,烷烃是十二烷。

[0206] 在另一个方面中,发酵产物是一种环烷烃。在另一个方面中,环烷烃是环戊烷。在另一个方面中,环烷烃是环己烷。在另一个方面中,环烷烃是环庚烷。在另一个方面中,环烷烃是环辛烷。

[0207] 在另一个方面中,发酵产物是一种烯烃。该烯烃可以是非支链或支链烯烃。在一个方面中,烯烃是戊烯。在另一个方面中,烯烃是己烯。在另一个方面中,烯烃是庚烯。在另一个方面中,烯烃是辛烯。

[0208] 在一个方面中,发酵产物是异戊二烯。在另一个方面中,发酵产物是聚酮化合物。

[0209] 在另一个方面中,发酵产物是一种气体。在一个方面中,气体是甲烷。在另一个方面中,气体是 H_2 。在另一个方面中,气体是 CO_2 。在另一个方面中,气体是 CO 。参见例如片冈 (Kataoka) 等人,关于通过产氢气厌氧细菌的连续培养系统的氢气生产的研究 (Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria), 水科学与技术 (Water Science and

Technology) 36(6-7):41-47; 以及古那森兰 (Gunaseelan), 1997, 生物质与生物能源 (Biomass and Bioenergy) 13, (1-2):83-114, 用于甲烷生产的厌氧消化: 一篇综述 (Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review)。

[0210] 从预调节的预处理的纤维素材料中生产糖

[0211] 在一个方面, 本发明涉及从预处理的纤维素材料生产糖的工艺, 包括:

[0212] (i) 用一种酚氧化酶预调节该纤维素材料;

[0213] (ii) 用一种纤维素分解酶制剂使该调节的材料糖化;

[0214] (iii) 任选地从步骤 (ii) 中糖化的材料中回收油。

[0215] 在一个优选的实施例中, 该酚氧化酶是一种漆酶, 例如一种来自嗜热毁丝霉 (MtL) (WO 95/33836) 的漆酶, 例如此处 SEQ ID NO:12 中所示的漆酶。

[0216] 在一个实施例中, 根据本发明的预调节方法进行步骤 (i) 中的预调节。

[0217] 在一个实施例中, 糖化步骤 (ii) 如以上“从预调节的预处理的纤维素材料中回收/提取油的工艺”部分中所描述的进行。

[0218] 在一个实施例中, 该工艺进一步包括从来自步骤 (ii) 中的糖化的材料中回收糖。

[0219] 根据本发明, 可根据本发明获得或回收的糖用于例如生产糖浆 (例如高果糖玉米糖浆) 和木质纤维素衍生的塑料 (例如聚乙烯、聚苯乙烯以及聚丙烯)、聚乳酸 (例如用于生产 PET) 的过程中。

[0220] 在一个实施例中, 该纤维素分解酶制剂是真菌起源的。在一个优选实施例中, 该纤维素分解酶制剂源自于木霉属 (例如里氏木霉)。在一个实施例中, 糖化步骤 (ii) 是在包括选自下组的酶活性的一种纤维素分解酶制剂的存在下进行的, 该组包括: 内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β -葡萄糖苷酶 (例如烟曲霉 β -葡萄糖苷酶 (例如披露于在此的 SEQ ID NO:5 中的 β -葡萄糖苷酶)、或米曲霉 β -葡萄糖苷酶)。

[0221] 在一个实施例中, 糖化步骤 (ii) 是在一种具有纤维素分解增强活性的多肽 (例如, 橙色嗜热子囊菌 GH61 多肽 (例如示于在此的 SEQ ID NO:4 中的多肽) 或埃默森青霉菌 GH61 多肽 (例如示于在此的 SEQ ID NO:7 中的多肽)) 的存在下进行的。

[0222] 在一个实施例中, 糖化步骤 (ii) 是使用选自半纤维素酶、棒曲霉素、酯酶、漆酶、木质素分解酶、果胶酶、过氧化物酶、蛋白酶、以及膨胀素中的一种或多种酶进行的。

[0223] 在一个实施例中, 该半纤维素酶选自木聚糖酶 (例如, 棘孢曲霉木聚糖酶 (例如示于在此的 SEQ ID NO:6 中的木聚糖酶)、或烟曲霉木聚糖酶 (例如示于在此的 SEQ ID NO:8 中的木聚糖酶))、乙酰木聚糖酯酶、阿魏酸酯酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、木糖苷酶 (例如, 烟曲霉 β -木糖苷酶 (例如示于在此的 SEQ ID NO:9 中的木糖苷酶))、以及葡萄糖醛酸糖苷酶。

[0224] 在一个优选的实施例中, 在糖化过程中存在或添加的纤维素分解酶制剂是一种来源于里氏木霉的纤维素分解酶制剂, 进一步包括具有纤维素分解增强活性的 GH61A 多肽 (该多肽来源于埃默森青霉菌菌株 (WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:7))、披露于 WO 2012/044915 中的烟曲霉 β -葡萄糖苷酶 (WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:5) 变体 F100D、S283G、N456E、F512Y; WO2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:6 的和在此的 SEQ ID NO:10 的烟曲霉 Ce17A CBH1 以及 WO 2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:18 的烟曲霉 CBH II。此外, 该纤维素分解酶制剂可以进一步补充有 10% 半纤维素酶酶组合物, 该半纤维素酶酶组合物来源于里氏木霉, 进一步包含烟曲霉木聚糖酶

III(在此的 SEQ ID NO:8)和烟曲霉 β -木糖苷酶(在此的 SEQ ID NO:9)。

[0225] 在一个最终方面中,本发明涉及含有酚氧化酶和葡糖淀粉酶的组合物。在一个实施例中,该酚氧化酶是一种漆酶,例如一种来自嗜热毁丝霉(MtL)(WO 95/33836)的漆酶,例如 SEQ ID NO:12 中所示的漆酶。

[0226] 在一个实施例中,该组合物包含来源于一种曲霉菌属菌株,如黑曲霉(例如,此处 SEQ ID NO:13 中的)或米曲霉的葡糖淀粉酶。

[0227] 在一个实施例中,该组合物进一步包含 β -葡糖苷酶。在一个实施例中,该 β -葡糖苷酶来源于一种曲霉菌属菌株,例如黑曲霉、烟曲霉、或米曲霉。在一个实施例中,该组合物包含 α -淀粉酶。在一个实施例中,该 α -淀粉酶来源于一种曲霉菌属菌株,例如黑曲霉或米曲霉。

[0228] 在一个实施例中,本发明的组合物进一步包括半纤维素酶。

[0229] 在一个优选实施例中,该半纤维素酶是木聚糖酶和/或 β -木糖苷酶。在一个实施例中,木聚糖酶来源于曲霉属,如烟曲霉(例如示于在此的 SEQ ID NO:8 中的木聚糖酶)、或棘孢曲霉(例如示于在此的 SEQ ID NO:6 中的木聚糖酶)。在一个实施例中, β -木糖苷酶来源于曲霉属,如烟曲霉(例如示于在此的 SEQ ID NO:9 中的 β -木糖苷酶)。

[0230] 本发明的一种工艺导致与当不进行预调节时相比更高的葡萄糖产率。

[0231] 纤维素材料

[0232] 如此处使用的,术语“纤维素材料”是指包括纤维素(β -(1-4)-D-葡聚糖(包括 β (1-4) 连接的 D-葡萄糖单元的聚合物)的一种化学上异质的寡糖或多糖)的任何木质纤维素材料。尽管纤维素一般为多态的,但可发现其在植物组织中主要以平行葡聚糖链的不溶性晶体基质存在。纤维素通常见于例如植物的茎、叶、壳、皮和穗轴或树叶、树枝和树木中。纤维素材料可以是,但不限于:草本材料、农业废弃物、林业废弃物、城市固体废物、废纸、以及纸浆和造纸厂废弃物(参见,例如,维色洛戈尔(Wiselogel)等人,1995,于生物乙醇手册(Handbook on Bioethanol)(查尔斯·E·怀曼(Charles E. Wyman)编辑),第 105-118 页,泰勒弗朗西斯出版集团(Taylor&Francis),华盛顿特区(Washington D.C.);怀曼(Wyman),1994,生物资源技术(Bioresource Technology)50:3-16;林德(Lynd),1990,应用生物化学与生物技术(Applied Biochemistry and Biotechnology)24/25:695-719;莫思尔(Mosier)等人,1999,木质纤维素的生物转化的最近进展(Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics),生物化学工程/生物技术的进展(Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology),T·谢伯(T. Scheper)主编,第 65 卷,第 23-40 页,纽约斯普林格出版社(Springer-Verlag, New York)。纤维素材料包括任何形式的纤维素,例如降解或水解为寡糖的多糖。在此应理解的是,纤维素可以是呈以下形式:木质纤维素的一个组分、包括木质素的植物细胞壁材料、纤维素、以及混合基质中的半纤维素。

[0233] 在一个方面中,纤维素材料是草本材料(包括能源作物)。在另一个方面中,纤维素材料是农业废弃物。在另一个方面中,纤维素材料是木材(包括林业废弃物)。在另一个方面中,该纤维素材料是城市固体废物。在另一个方面中,该纤维素材料是废纸。在另一个方面中,该纤维素材料是纸浆和造纸厂废弃物。

[0234] 在另一个方面中,该纤维素材料是玉米秸秆。在另一个方面中,纤维素材料是小麦

秸秆。在另一个方面中,纤维素材料是甘蔗渣。在另一个方面中,纤维素材料是玉米芯。在另一个方面中,纤维素材料是柳枝稷。在另一个方面中,纤维素材料是玉米纤维。在另一个方面中,纤维素材料是稻秸。在另一个方面中,纤维素材料是芒草。在另一个方面中,纤维素材料是芦竹。在另一个方面中,纤维素材料是竹子。在另一个方面中,纤维素材料是橘皮。在另一个方面中,纤维素材料是杨树。在另一个方面中,纤维素材料是松树。在另一个方面中,纤维素材料是白杨。在另一个方面中,纤维素材料是冷杉。在另一个方面中,纤维素材料是云杉。在另一个方面中,纤维素材料是柳树。在另一个方面中,纤维素材料是桉树。

[0235] 在另一个方面中,纤维素材料是微晶纤维素。在另一个方面中,纤维素材料是细菌纤维素。在另一个方面中,纤维素材料是海藻纤维素。在另一个方面中,纤维素材料是棉短绒。在另一个方面中,纤维素材料是无定形磷酸处理的纤维素。在另一个方面中,纤维素材料是滤纸。

[0236] 在另一个方面中,纤维素材料是一种水生生物质(aquatic biomass)。如在此所用的,术语“水生生物质”是指在水生环境中通过光合作用过程产生的生物质。该水生生物质可以是藻类、沉水植物、挺水植物、以及浮叶植物。

[0237] 在一个优选的实施例中,纤维素材料是油料种子。油料种子包括高粱、油菜籽、大豆、棕榈、向日葵、棉籽、花生、亚麻仁(flaxseed)、亚麻籽(linseed)、红花、棕榈仁、椰子和橄榄。

[0238] 可以通过分馏获得纤维(例如,玉米或小麦纤维)。这些分馏技术是本领域熟知的。

[0239] 例如,玉米籽粒包括三个主要组分:麸、胚乳、和胚原基。玉米糠保留纤维、籽粒的硬外层。胚乳包含大部分的淀粉,发现于籽粒的内部。胚原基在籽粒的中心底部顶帽附近,包含丰富的蛋白质和油。

[0240] 在本发明的一个实施例中,该纤维素材料是纤维(例如,玉米纤维或小麦纤维)。可以通过湿磨法获得该纤维。在另一个实施例中,该纤维素材料是通过干燥研磨方法中的湿式分馏获得的纤维(参见,例如,王(Wang)等人,谷物化学(Cereal Chem.)82(6):734-738)。

[0241] 预处理

[0242] 预处理的纤维素材料可以是例如通过一种化学预处理、一种物理预处理、或一种化学预处理和一种物理预处理而被预处理的,如以下所述的。在一个方面中,预处理的纤维素材料已通过一种化学预处理被预处理。在另一个方面中,预处理的纤维素材料已通过物理预处理而被预处理。在另一个方面中,预处理的纤维素材料已通过一种化学的预处理和一种物理的预处理被预处理。

[0243] 可以使用本领域已知的任何适合的预处理工艺来破坏纤维素材料的植物细胞壁组分(参见,例如钱德拉(Chandra)等人,2007,底物预处理:木质纤维素的有效酶水解的关键?(Substrate pretreatment:The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?),生物化学工程/生物技术的进展(Adv.Biochem.Engin./Biotechnol.)108:67-93;盖博(Galbe)和小林(Zacchi),2007,用于高效生物乙醇生产的木质纤维素材料的预处理(Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production),生物化学工程/生物技术的进展 108:41-65;亨德

里克斯 (Hendriks) 和季曼 (Zeeman), 2009, 用以增强木质纤维素生物质的消化性的预处理 (Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass), 生物资源技术 (Bioresource Technol.) 100:10-18; 莫热 (Mosier) 等人, 2005, 用于木质纤维素生物质的预处理的有前景技术的特征 (Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass), 生物资源技术 96:673-686; 塔希尔扎德 (Taherzadeh) 和卡里米 (Karimi), 2008, 预处理木质纤维素废弃物以改善乙醇和生物气体产生: 综述 (Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review), 分子科学国际杂志 (Int. J. of Mol. Sci.) 9:1621-1651; 杨 (Yang) 和怀曼, 2008, 预处理: 释放低成本纤维素乙醇的关键 (Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol), 生物燃料、生物产品与生物精炼 (Biofuels Bioproducts and Biorefining-Biofpr.) 2:26-40)。

[0244] 纤维素材料也可以在预处理之前使用本领域中已知的方法进行颗粒粒度减小、预浸泡、润湿。

[0245] 常规预处理包括但不限于: 蒸汽预处理 (伴随或不伴随爆炸)、稀酸预处理、热水预处理、碱预处理、石灰预处理、湿氧化、湿爆炸、氨纤维爆炸、有机溶剂预处理、以及生物预处理。另外的预处理包括氨渗滤、超声、电穿孔、微波、超临界 CO_2 、超临界 H_2O 、臭氧、以及 γ 辐射预处理。在一个优选实施例中, 该纤维素材料 (例如未洗涤的玉米秸秆) 是稀酸预处理的。

[0246] 在糖化 (水解) 和 / 或发酵之前, 但在预调节之后对纤维素材料进行预处理。

[0247] 蒸汽预处理: 在蒸汽预处理中, 加热纤维素材料以破坏植物细胞壁组分, 包括木质素、半纤维素、以及纤维素, 以使酶可接触纤维素和其他级分, 例如, 半纤维素。使纤维素材料经过或通过反应容器, 其中注入蒸汽以将温度增加至所需的温度和压力, 并且在其中保持所希望的反应时间。蒸汽预处理可以在 140°C - 230°C , 例如 160°C - 200°C 、或 170°C - 190°C 下执行, 其中最佳温度范围取决于化学催化剂的任意添加。蒸汽预处理的停留时间可以是 1-15 分钟, 例如 3-12 分钟、或 4-10 分钟, 其中最佳停留时间取决于温度范围和化学催化剂的任意添加。蒸汽预处理允许相对较高的固体加载量, 这样使得纤维素材料在预处理过程中通常仅变得潮湿。蒸汽预处理经常与预处理后的材料的爆炸放料组合, 这被称为蒸汽爆炸, 即, 快速闪变至大气压和材料湍流, 以通过破碎增加可及的表面积 (达夫 (Duff) 和默里 (Murray), 1996, 生物资源技术 (Bioresource Technology) 855:1-33; 盖博 (Galbe) 和小林 (Zacchi), 2002, 应用微生物学与生物技术 (Appl. Microbiol. Biotechnol.) 59:618-628; 美国专利申请号 2002/0164730)。在蒸汽预处理过程中, 半纤维素乙酰基被裂解, 并且所得到的酸自催化半纤维素部分地水解成变得更增溶的半纤维素单糖和半纤维素寡糖。仅在有限的程度上去除木质素。所得的液体主要包含溶解的半纤维素材料 (例如半纤维素单糖和半纤维素寡糖), 而余下的固体主要由纤维素材料组成。

[0248] 经常在蒸汽预处理之前添加一种催化剂 (例如 H_2SO_4 或 SO_2) (典型地是 0.3 至 3% w/w), 该催化剂减少时间并降低温度、增加回收率、并改进酶水解 (巴列斯特罗斯 (Ballesteros) 等人, 2006, 应用生物化学与生物技术 129-132:496-508; 瓦尔加 (Varga) 等人, 2004, 应用生物化学与生物技术 113-116:509-523; 塞斯尼尔 (Sassner) 等人, 2006, 酶与微生物技术 (Enzyme Microb. Technol.) 39:756-762)。

[0249] **化学预处理**：术语“化学处理”是指促进纤维素、半纤维素、和 / 或木质素的分离和 / 或释放的任何化学预处理。适合的化学预处理方法的实例包括：(例如) 稀酸预处理、石灰预处理、湿氧化、氨纤维 / 冷冻爆炸 (AFEX)、氨渗滤 (APR)、以及有机溶剂预处理。

[0250] 在稀酸预处理中，纤维素材料与稀酸 (典型地是 H_2SO_4) 和水混合，以形成浆料，由蒸汽加热至希望的温度，并且在停留时间后闪变至大气压。可以用许多反应器设计来进行稀酸预处理，例如，活塞流反应器、逆流反应器、或连续逆流收缩床反应器 (达夫和默里，1996，见上文，舍尔 (Schell) 等人，2004，生物资源技术 91:179-188；李 (Lee) 等人，1999，生物化学工程与生物技术的进展 65:93-115)。在一个实施例中，预处理是低深度预处理，例如在 $160^\circ C$ 下使用 3% H_2SO_4 (w/w) 进行稀酸预处理 5 分钟。

[0251] 还可以使用碱性条件下的几种预处理方法。这些碱性预处理包括但不限于：石灰预处理、湿氧化、氨渗滤 (APR)、以及氨纤维 / 冷冻爆炸 (AFEX)。

[0252] 用碳酸钙、氢氧化钠、或氨，在 $85^\circ C$ - $150^\circ C$ 的低温下进行石灰预处理，并且停留时间为从 1 小时到几天 (怀曼 (Wyman) 等人，2005，生物资源技术 (Bioresource Technol.) 96:1959-1966；莫热 (Mosier) 等人，2005，生物资源技术 96:673-686)。WO 2006/110891、WO 2006/110899、WO 2006/110900 以及 WO 2006/110901 披露了使用氨的预处理方法。

[0253] 湿氧化是一种热预处理，其典型地在添加氧化剂 (如过氧化氢或过压氧) 的情况下在 $180^\circ C$ - $200^\circ C$ 下持续 5-15 分钟进行 (施密特 (Schmidt) 和汤姆森 (Thomsen)，1998，生物资源技术 (Bioresource Technol.) 64:139-151；帕罗内 (Palonen) 等人，2004，应用生物化学与生物技术 (Appl. Biochem. Biotechnol.) 117:1-17；瓦尔加等人，2004，生物技术与生物工程 (Biotechnol. Bioeng.) 88:567-574；马丁 (Martin) 等人，2006，化学技术与生物技术杂志 (J. Chem. Technol. Biotechnol.) 81:1669-1677)。预处理优选以 1% 至 40% 干物质，更优选 2% 至 30% 干物质，并且最优选 5% 至 20% 干物质进行，并且经常通过添加碱如碳酸钠来增加初始 pH。

[0254] 被称为湿爆炸 (湿氧化和蒸汽爆炸的组合) 的湿氧化预处理方法的修改方案能够处理高达 30% 的干物质。在湿爆炸中，在某一停留时间后，在预处理期间引入氧化剂 (oxidizing agent)。然后通过急骤蒸发至大气压结束预处理 (WO 2006/03228)。

[0255] 氨纤维爆炸 (AFEX) 涉及在如 $90^\circ C$ - $100^\circ C$ 的中等温度和如 17 至 20 巴的高压下，用液体或气态氨处理纤维素材料 5 至 10 分钟，其中干物质含量可以高达 60% (格拉帕里 (Gollapalli) 等人，2002，应用生物化学与生物技术 (Appl. Biochem. Biotechnol.) 98:23-35；俊达瓦特 (Chundawat) 等人，2007，生物技术与生物工程 (Biotechnol. Bioeng.) 96:219-231；阿里扎德 (Alizadeh) 等人，2005，应用生物化学与生物技术 121:1133-1141；泰莫里 (Teymouri) 等人，2005，生物资源技术 (Bioresource Technol.) 96:2014-2018)。AFEX 预处理导致纤维素的解聚和半纤维素的部分水解。木质素 - 碳水化合物复合物被裂解。

[0256] 有机溶剂预处理通过使用含水乙醇 (40% - 60% 乙醇) 在 $160^\circ C$ - $200^\circ C$ 下萃取 30-60 分钟而将纤维素材料脱木质素 (潘 (Pan) 等人，2005，生物技术与生物工程 (Biotechnol. Bioeng.) 90:473-481；潘等人，2006，生物技术与生物工程 94:851-861；库拉比 (Kurabi) 等人，2005，应用生物化学与生物技术 (Appl. Biochem.

Biotechnol.)121:219-230)。通常加入硫酸作为催化剂。在有机溶剂预处理中,大部分半纤维素被去除。

[0257] 适合的预处理方法的其他实例由谢尔 (Schell) 等人,2003,应用生物化学与生物技术 (Appl.Biochem. and Biotechnol.)105-108:69-85,和马塞尔 (Mosier) 等人,2005,生物资源技术 (Bioresource Technology)96:673-686,以及美国专利申请 2002/0164730 进行描述。

[0258] 在一个方面中,化学预处理是作为酸处理进行,例如持续稀酸和 / 或弱酸处理。该酸可以是硫酸,但也可以使用其他酸,如乙酸、柠檬酸、硝酸、磷酸、酒石酸、琥珀酸、氯化氢、或其混合物。弱酸处理优选在 1-5,更优选 1-4,并且最优选 1-3 的 pH 范围内进行。在一个方面,该酸浓度在优选从 0.01 至 20wt% 酸,更优选 0.05 至 10wt% 酸,甚至更优选 0.1 至 5wt% 酸,并且最优选 0.2 至 2.0wt% 酸的范围中。使酸与纤维素材料相接触,并在优选 160℃ -220℃,并且更优选 165℃ -195℃ 范围内的温度下保持从几秒到几分钟,例如 1 秒至 60 分钟范围内的时间。

[0259] 在另一个方面中,预处理是作为氨纤维爆炸步骤 (AFEX 预处理步骤) 进行。

[0260] 在另一个方面中,预处理在水性浆料中进行。在一个方面,在预处理过程中纤维素材料以优选在 10-80wt% 之间,例如 20-70wt% 之间或 30-60wt% 之间,例如约 50wt% 的量存在。预处理的纤维素材料可以不洗涤或使用本领域已知的任何方法洗涤,例如,用水洗涤。

[0261] 机械预处理或物理预处理:术语“机械预处理”或“物理预处理”是指促进颗粒粒度减小的任何预处理。例如,这种预处理可以涉及各种类型的研磨或碾磨 (例如,干磨、湿磨、或振动球磨)。

[0262] 纤维素材料可以物理地 (机械地) 且化学地预处理。机械或物理预处理可以与以下相结合:蒸汽 / 蒸汽爆炸、水热解 (hydrothermolysis)、稀酸或弱酸处理、高温、高压处理、辐射 (例如微波辐射) 或其组合。在一个方面中,高压意指在优选约 100 至约 400psi,更优选约 150 至约 250psi 范围中的压力。在另一个方面中,高温意指在约 100℃ 至约 300℃,优选约 140℃ 至约 200℃ 范围内的温度。在一个优选方面中,机械或物理预处理在分批过程中使用蒸汽枪水解器系统,例如从顺智公司 (Sunds Defibrator AB),瑞典可获得的顺智水解器 (Sunds Hydrolyzer) 来进行,该系统使用如上所定义的高压和高温。这些物理预处理和化学预处理可以根据需要顺序地进行或同时进行。

[0263] 因此,在一个优选方面中,使纤维素材料经受物理 (机械) 或化学预处理、或其任何组合,以促进纤维素、半纤维素和 / 或木质素的分离和 / 或释放。

[0264] 生物预处理:术语“生物预处理”是指促进纤维素、半纤维素、和 / 或木质素从木质纤维素材料中分离和 / 或释放的任何生物预处理。生物预处理技术可以涉及应用溶解木质素的微生物 (参见,例如,舒 • T. -A. (Hsu, T. -A.), 1996,生物质的预处理 (Pretreatment of biomass),生物乙醇手册:生产和利用,怀曼 • C.E. 编辑,泰勒 - 弗朗西斯出版集团,华盛顿特区,179-212;高希 (Ghosh) 和辛格 (Singh),1993,用于纤维素生物质的酶 / 微生物转化的物理化学与生物处理 (Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of cellulosic biomass),应用微生物学进展 (Adv. Appl. Microbiol.)39:295-333;麦克米兰 • J.D. (McMillan, J.D.), 1994,预处理木质纤

纤维素物质:综述 (Pretreating lignocellulosic biomass:a review),用于燃料生产的生物质的酶转化 (Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production),希默尔·M.E.、贝克·J.O.、以及奥弗伦·R.P. (Overend, R. P.) 编辑,美国化学学会讨论会系列 566 (ACS Symposium Series 566),美国化学学会 (American Chemical Society),华盛顿特区,第 15 章;贡·C.S. (Gong, C. S.)、卡奥 N. J. (Cao, N. J.)、杜·J. (Du, J.)、以及曹·G. T. (Tsao, G. T.),1999,由可再生资源生产乙醇 (Ethanol production from renewable resources),生物化学工程/生物技术的进展,舍佩尔·T. 编辑,施普林格出版社德国海德堡柏林 (Berlin Heidelberg, Germany),65:207-241;奥尔森 (Olsson) 和哈恩-哈格达尔 (Hahn-Hagerdal),1996,用于乙醇生产的木质纤维素水解物的发酵 (Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production),酶与微生物技术 (Enz. Microb. Tech.) 18:312-331;以及瓦蓝德 (Vallander) 和埃里克松 (Eriksson),1990,由木质纤维素材料生产乙醇:技术现状 (Production of ethanol from lignocellulosic materials:State of the art),生物化学工程/生物技术的进展 42:63-95)。

[0265] 回收

[0266] 根据本发明,可以使用任何本领域熟知的适合方法(例如,使用一种溶剂(如己烷))从糖化材料(水解产物)和/或发酵材料中提取/回收油。

[0267] 根据本发明,可以使用本领域已知的任何方法,任选地在发酵之后回收发酵产物,这些方法包括但不限于:色谱法、电泳程序、差别溶解度、蒸馏、或萃取。例如,从发酵的材料分离醇,并且通过蒸馏的常规方法进行纯化。例如,可以获得纯度高达约 96 体积%的乙醇,其可以用作(例如)燃料乙醇、饮用乙醇,即,饮用中性酒、或工业乙醇。

[0268] 酶

[0269] 以下部分说明了可以根据本发明的方法和工艺使用的多肽、酶和酶制剂。

[0270] 酚氧化酶

[0271] 根据本发明在预调节过程中存在或添加的酚氧化酶可以是任何酚氧化酶。该酚氧化酶可以是任何起源的,但优选真菌或细菌起源的。

[0272] 这一种或多种酚氧化酶可属于以下 EC 类中的任一种,该 EC 类包括:漆酶 (EC 1. 10. 3. 2)、儿茶酚氧化酶 (EC 1. 10. 3. 1)、o- 氨基酚氧化酶 (1. 10. 3. 4)、以及单酚单加氧酶 (1. 14. 18. 1)。漆酶是优选的。

[0273] 漆酶

[0274] 根据本发明,漆酶可以是在预调节过程中存在或添加的。漆酶 (EC 1. 10. 3. 2.) 是含多拷贝的酶,该酶催化酚类化合物的氧化。漆酶是由植物、细菌以及广泛多样的真菌产生,这些真菌包括子囊菌纲,例如曲霉属、脉孢菌属、以及柄孢壳菌属;半知菌纲,包括葡萄孢属;以及担子菌纲,例如金钱菌属、层孔菌属、香菇属、侧耳属、栓菌属、以及完全形式的丝核菌属。已经分离了多种真菌漆酶。例如,崔 (Choi) 等人 (分子植物-微生物相互作用 (Mol. Plant-Microbe Interactions) 5:119-128, 1992) 说明了栗疫病真菌的编码漆酶的基因的分子特性和克隆。小島 (Kojima) 等人 (生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 265:15224-15230, 1990; JP 2-238885) 提供了白腐担子菌毛革盖菌的两种等位基因形式的漆酶。杰曼 (Germann) 和勒奇 (Lerch) (经验 (Experientia) 41:801, 1985; PNAS USA 83:8854-8858, 1986) 已报道了粗糙脉孢菌漆酶基因的克隆和部分测序。萨洛黑

莫 (Saloheimo) 等人 (应用微生物学杂志 (J. Gen. Microbiol.) 137:1537-1544, 1985 ; W0 92/01046) 已披露来自真菌射脉菌的漆酶基因的结构分析。

[0275] 尤其考虑到的漆酶包括源自于以下的菌株的那些:多孔菌属, 优选匹斯特斯多孔菌 (*Polyporus pinsitus*); 白丝菌属 (*Melanocarpus*), 优选热白丝菌 (*Melanocarpus albomyces*); 蚀丝霉属, 优选嗜热丝霉 (*Myceliophthora thermophila*); 鬼伞属, 优选灰盖鬼伞; 丝核菌属, 优选立枯丝核菌或草地丝核菌 (*Rhizoctonia praticola*); 革节孢属, 优选嗜热革节孢 (*Scytalidium thermophilum*); 梨孢属, 优选稻梨孢。

[0276] 在一个实施例中, 该漆酶源自于漆树 (吉田 (Yoshida), 1883, 漆的化学 (Chemistry of Lacquer (Urushi)) 第 1 部分, 化学学会会刊 (J. Chem. Soc.) 43, 472-486。

[0277] 在另一个实施例中, 该漆酶源自于匹斯特斯多孔菌, 例如 W0 96/00290 (诺维信) 中所述的一种。

[0278] 强森 (Jönsson) 等人, 1998, 应用微生物学和生物技术 (Appl. Microbiol. Biotechnol.) 49, 691-697 也披露了一种源自于云芝的适合的漆酶。

[0279] 其他漆酶包括例如穆拉利克里希纳 (Muralikrishna) 等人, 1995, 应用与环境微生物学 (Appl. Environ. Microbiol.) 61(12):4374-4377 中关注的源自于稻梨孢的漆酶, 或披露于美国化学学会论文第 209 卷, 第 1-2 期, 1995 的摘要中的源自于嗜热革节孢的漆酶。

[0280] 该漆酶还可以是一种源自于灰盖鬼伞的漆酶, 例如施耐德 (Schneider) 等人, 1999, 酶与微生物技术 (Enzyme and Microbial Technology) 25:502-508 中关注的那种。

[0281] 其他适合的漆酶包括在威尔伊司内尔 (Waleithner) 等人, 1996, 当代遗传学 (Curr. Genet.) 29:395-403 中关注的源自于立枯丝核菌的、或纪斯基内恩 (Kiiskinen) 等人, 2004, 微生物学 (Microbiology) 150:3065-3074 中关注的源自于热白丝菌的那些。

[0282] 适合的细菌漆酶包括源自于天蓝链霉菌的那些, 例如由马赫印斯基 (Machczynski) 等人, 2004, 蛋白质科学 (Protein Science) 13:2388-2397 披露的。

[0283] 在一个优选的实施例中, 该漆酶源自于嗜热毁丝霉, 例如在 W0 95/33836 (诺维信) 中描述的在此处 SEQ ID NO:12 中所示的。

[0284] 考虑到的漆酶还包括含与 W0 95/33836 以及此处 SEQ ID NO:12 中披露的嗜热毁丝霉漆酶或以上提到的漆酶中的任一种具有至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 一致性, 至少 97%、至少 98%、至少 99% 序列一致性的氨基酸序列的那些。

[0285] 葡糖淀粉酶

[0286] 根据本发明, 葡糖淀粉酶可以是在预调节过程中存在或添加的。葡糖淀粉酶 (葡聚糖 1,4- α -葡糖苷酶, EC 3.2.1.3) 可以来源于任何适合的来源, 例如来源于微生物或植物。优选的葡糖淀粉酶是真菌或细菌源的, 选自下组, 该组由以下各项组成: 曲霉属葡糖淀粉酶, 特别是黑曲霉 G1 或 G2 葡糖淀粉酶 (博埃尔 (Boel) 等人, 1984, 欧洲分子生物学学会杂志 3(5):1097-1102), 或其变体, 例如披露于 W0 92/00381、W0 00/04136 和 W0 01/04273 中的那些 (来自诺维信, 丹麦); 披露于 W0 84/02921 中的泡盛曲霉葡糖淀粉酶, 米曲霉葡糖淀粉酶 (哈塔 (Hata) 等人, 1991, 农业、生物学与化学 (Agric. Biol. Chem.) 55(4):941-949), 或其变体或片段。其他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(陈 (Chen) 等人,1996,蛋白质工程 (Prot. Eng.) 9:499-505);D257E 和 D293E/Q(陈等人,1995,蛋白质工程 8:575-582);N182(陈等人,1994,生物化学杂志 (Biochem. J.) 301:275-281);二硫键, A246C(费艾洛伯 (Fierobe) 等人,1996,生物化学 35:8698-8704);以及在位置 A435 和 S436 中引入 Pro 残基(李 (Li) 等人,1997,蛋白质工程 (Protein Eng.) 10:1199-1204)。

[0287] 其他葡糖淀粉酶包括罗耳阿太菌(以前命名为罗尔伏革菌)葡糖淀粉酶(参见美国专利号 4,727,026 和长坂 (Nagasaka) 等人,1998,应用微生物学与生物技术 (Appl. Microbiol. Biotechnol.) 50:323-330),踝节菌属葡糖淀粉酶,特别是来源于 *Talaromyces duponti*、埃默森踝节菌 (WO 99/28448)、*Talaromyces leycettanus*(美国专利登记号 32,153) 以及嗜热踝节菌(美国专利号 4,587,215)。

[0288] 其他葡糖淀粉酶包括来自以下各项的葡糖淀粉酶:梭菌属(特别是嗜热解淀粉梭菌 (*C. thermoamylolyticum*) (EP 135138) 和嗜热解硫化氢梭菌 (*C. thermohydrosulfuricum*) (WO 86/01831)),瓣环栓菌 (*Trametes cingulata*),纸质厚孢孔菌 (*Pachykytospora papyracea*) 以及大白桩菇 (*Leucopaxillus giganteus*),全部披露于 WO 2006/069289 中;或披露于 PCT/US 2007/066618 中的红边隔孢伏革菌 (*Peniophora rufomarginata*);或其混合物。可以在本发明中使用杂合葡糖淀粉酶。杂合葡糖淀粉酶的实例披露于 WO 2005/045018 中。具体实例包括披露于实例 1 的表 1 和 4 中的杂合葡糖淀粉酶(这些杂合体通过引用而特此结合)。

[0289] 该葡糖淀粉酶可以是与任何上述葡糖淀粉酶具有高度序列一致性的那种,即与此处 SEQ ID NO:13 中所示的成熟酶序列或上述另一种葡糖淀粉酶序列具有至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或甚至 100% 一致性。

[0290] 可商购的葡糖淀粉酶组合物包括 AMG 200L;AMG 300L;SAN SUPER, SAN EXTRA L, SPIRIZYME PLUS, SPIRIZYME FUEL, SPIRIZYME B4U, SPIRIZYME ULTRA™, SPIRIZYME ULTRA™ 和 AMG E(来自诺维信公司,丹麦);OPTIDEX 300, GC480™ 和 GC147™(来自杰能科国际公司 (Genencor Int.), 美国);AMIGASE 和 AMIGASE PLUS(来自 DSM);G-ZYME G900, G-ZYME™ 和 G990ZR(来自杰能科国际公司)。

[0291] 优选地,以 0.01mg EP/g 和 20mg EP/g 纤维素之间,例如 0.1mg EP/g-1mg EP/g 纤维素的浓度添加葡糖淀粉酶。

[0292] α-淀粉酶

[0293] 根据本发明,α-淀粉酶可以是在预调节过程中存在或添加的。根据本发明,可以使用任何 α-淀粉酶,例如真菌、细菌或植物源的。在一个优选实施例中,该 α-淀粉酶是一种酸性 α-淀粉酶,例如酸性真菌 α-淀粉酶或酸性细菌 α-淀粉酶。

[0294] 在一个实施例中,α-淀粉酶是酸性 α-淀粉酶。术语“酸性 α-淀粉酶”意指以有效量添加,在 3 至 7、优选从 3.5 至 6 或更优选从 4-5 的范围内的 pH 下具有最适活性的一种 α-淀粉酶 (EC 3.2.1.1)。在一个实施例中,该 α-淀粉酶是一种真菌 α-淀粉酶(例如,一种酸性真菌 α-淀粉酶)。

[0295] 真菌 α-淀粉酶包括来源于曲霉属的菌株的 α-淀粉酶,例如白曲霉、黑曲霉和米曲霉 α-淀粉酶。

[0296] 一种优选的酸性真菌 α -淀粉酶是与在 WO 96/23874 中示为 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的成熟部分展现出高度一致性,即至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或甚至 100% 一致性的 α -淀粉酶。

[0297] 另一种优选的酸性 α -淀粉酶来源于黑曲霉的菌株。在一个优选实施例中,该酸性真菌 α -淀粉酶是在 Swiss-prot/TrEMBL 数据库中在主入藏号 P56271 下披露为“AMYA_ASPNG”并且描述于 WO 89/01969(实例 3-通过引用而结合)中的黑曲霉 α -淀粉酶。来源于黑曲霉的可商购的酸性真菌 α -淀粉酶是 SP288(从丹麦诺维信公司可获得的)。

[0298] 其他野生型 α -淀粉酶包括来源于亚灰树花菌属 (*Meripilus*) 和根毛霉属的菌株,优选大型亚灰树花菌或微小根毛霉的菌株的那些 (WO 2004/055178, 将其通过引用结合在此)。

[0299] 在一个优选实施例中,该 α -淀粉酶来源于白曲霉(金子 (Kaneko) 等人, 1996, 发酵与生物工程杂志 (J. Ferment. Bioeng.) 81:292-298:“编码来自白曲霉的酸稳定的 α -淀粉酶的一种基因的核苷酸序列的分子克隆和测定 (Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*)”;并且进一步被披露为 EMBL:#AB008370)。

[0300] 该真菌 α -淀粉酶还可以是一种包含一个淀粉结合结构域 (SBD) 和一个 α -淀粉酶催化结构域的野生型酶或其变体。

[0301] 在一个实施例中,该真菌酸性 α -淀粉酶是一种杂合 α -淀粉酶。真菌杂合 α -淀粉酶的实例包括披露于 WO 2005/003311、美国专利申请公开号 2005/0054071(诺维信公司)和 WO 2006/069290(诺维信公司)(通过引用而特此结合)中的 α -淀粉酶。杂合 α -淀粉酶可以包括一个 α -淀粉酶催化结构域 (CD) 和一个碳水化合物结合结构域/模块 (CBM)(例如一个淀粉结合结构域 (SBD)) 以及任选地一个接头。

[0302] 杂合 α -淀粉酶的实例包括披露于 WO 2006/069290 中的实例的表 1 至 5 中的那些,包括具有催化结构域 JA118 和罗耳阿太菌 (*Athelia rolfsii*) SBD 的变体 (WO 2006/069290 中的 SEQ ID NO:100)、具有罗耳阿太菌 AMG 接头和 SBD 的微小根毛霉 α -淀粉酶 (WO 2006/069290 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(作为 WO 2006/069290 的表 5 中的 V039 披露)、以及具有罗耳阿太菌葡糖淀粉酶接头和 SBD 的大型亚灰树花菌 α -淀粉酶 (WO 2006/069290 中的 SEQ ID NO:102)。其他杂合 α -淀粉酶列于 WO 2006/069290(将其通过引用而特此结合)的实例 4 的表 3、4、5 以及 6 中。

[0303] 杂合 α -淀粉酶的其他实例包括披露于美国专利申请公开号 2005/0054071 中的那些,包括披露于第 15 页上表 3 中的那些,例如具有白曲霉接头和淀粉结合结构域的黑曲霉 α -淀粉酶。

[0304] 其他 α -淀粉酶与任何上述 α -淀粉酶展现出高度的序列一致性,即与上面披露的成熟酶序列展现出至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或甚至 100% 一致性。

[0305] 包含 α -淀粉酶的商用组合物包括 MYCOLASE™ (DSM)、BAN™、TERMAMYL SC、FUNGAMYL™、LIQUOZYME X、LIQUOZYME SC 和 SAN SUPER、SAN EXTRA L(诺维信公司)以及

CLARASE L-40,000、DEX-LO™、SPEZYME FRED、SPEZYME AA、SPEZYME DELTA AA、GC358、GC980、和 SPEZYME™ RSL(丹尼斯克公司(Danisco)),以及以商标名 SP288 销售的酸性真菌 α -淀粉酶(可获得自诺维信公司,丹麦)。

[0306] 优选地,以 0.001mg EP/g 和 20mg EP/g 纤维素之间,例如 0.01mg EP/g-1mg EP/g 纤维素的浓度添加 α -淀粉酶。

[0307] 半纤维素酶

[0308] 根据本发明,半纤维素酶可以是在预调节或糖化过程中存在或添加的。该半纤维素酶可以是任何半纤维素酶。该半纤维素酶可以呈半纤维素分解酶制剂的形式。该半纤维素酶可以是任何起源的,但优选真菌或细菌起源的。

[0309] 术语“半纤维素酶”或“半纤维素分解酶”意指一种或多种(若干种)水解半纤维素材料的酶。参见例如沙勒姆(Shallom)和肖汉姆(Shoham),2003,微生物半纤维素酶(Microbial hemicellulases),医学病毒学评论(Current Opinion In Microbiology)6(3):219-228 中所述的。半纤维素酶是在植物生物质的降解中的关键组分。半纤维素酶的实例包括但不限于,乙酰基甘露聚糖酯酶、乙酰基木聚糖酯酶、阿拉伯聚糖酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、香豆酸酯酶、阿魏酸酯酶、半乳糖苷酶、葡萄糖醛酸糖苷酶、葡萄糖醛酸酯酶、甘露聚糖酶、甘露糖苷酶、木聚糖酶以及木糖苷酶。半纤维素酶的催化模块是水解糖苷键的糖苷水解酶(GH),或是水解乙酸或阿魏酸侧基的酯键的碳水化合物酯酶(CE)。这些催化模块基于它们一级序列的同源性,可以通过数字进行标记而被分配到 GH 和 CE 家族中。具有总体相似的折叠的一些家族可以进一步被分组为以字母标记的氏族(例如,GH-A)。这些和其他碳水化合物活性酶的最具信息性和最新的分类可在碳水化合物活性酶(Carbohydrate-Active Enzymes)(CAZy)数据库中获得。可以根据高斯和比萨拉(Bisaria),1987,纯粹与应用化学(Pure&AppI. Chem.)59:1739-1752 测量半纤维素分解酶活性。

[0310] 在一个实施例中,在预调节和/或糖化过程中存在或添加的半纤维素酶是半纤维素分解酶制剂。在一个实施例中,半纤维素分解酶制剂是来自里氏木霉的纤维素分解酶制剂,进一步包含木聚糖酶和/或 β -木糖苷酶。在一个优选的实施例中,该半纤维素分解酶制剂是一种来自里氏木霉的纤维素分解酶制剂,进一步包含烟曲霉木聚糖酶(在此的 SEQ ID NO:8)和烟曲霉 β -木糖苷酶(在此的 SEQ ID NO:9)。

[0311] 优选地,可以 0.01mg EP/g 和 20mg EP/g 纤维素之间,例如 0.1mg EP/g-1mg EP/g 纤维素的浓度添加半纤维素酶或半纤维素分解酶制剂。

[0312] 木聚糖酶

[0313] 在一个优选的实施例中,半纤维素酶是木聚糖酶或半纤维素分解酶制剂包含木聚糖酶。术语“木聚糖酶”意指一种 1,4- β -D-木聚糖-木糖水解酶(E.C.3.2.1.8),其催化木聚糖中的 1,4- β -D-木糖苷键的内切水解。出于本发明的目的,在 37℃下,在 0.01% TRITON® X-100 和 200mM 磷酸钠(pH 6)中用 0.2% AZCL-阿拉伯糖基木聚糖作为底物来测定木聚糖酶活性。一个单位的木聚糖酶活性定义为在 37℃、pH 6 下在 200mM 磷酸钠(pH 6)缓冲液中从作为底物的 0.2% AZCL-阿拉伯糖基木聚糖每分钟产生 1.0 μ 摩尔天青蛋白。

[0314] 特别考虑到的木聚糖酶的实例包括 GH10 木聚糖酶,例如源自于曲霉属的菌株的

一种,例如来自烟曲霉的菌株的,例如在 WO 2006/078256 中披露为 Xyl III 的一种,或来自棘孢曲霉的菌株的,例如在 WO 94/21785 中披露为 SEQ ID NO:5(Xyl II) 的一种。

[0315] 木聚糖酶可包括在一种纤维素分解酶制剂(其进一步包括一种木聚糖酶)中。在一个实施例中,半纤维素酶是一种纤维素分解酶制剂,该制剂进一步包括一种木聚糖酶,优选一种 GH10 木聚糖酶,例如源自于曲霉属的菌株的一种,例如来自烟曲霉的菌株的,例如在 WO 2006/078256 中披露为 Xyl III 的那种,或来自棘孢曲霉的菌株的,例如在 WO 94/21785 中披露为 SEQ ID NO:5(Xyl II) 的那种。

[0316] 在一个实施例中,木聚糖酶来源于棘孢曲霉(例如示于在此的 SEQ ID NO:6 中的木聚糖酶)。在一个优选的实施例中,木聚糖酶来源于烟曲霉(例如示于在此的 SEQ ID NO:8 中的木聚糖酶)。

[0317] 考虑到的木聚糖酶还包括含与 WO 2006/078256 中的如在此的 SEQ ID NO:8 所示的烟曲霉木聚糖酶或 WO 94/21785 中披露为 SEQ ID NO:5(Xyl II) 的或此处为 SEQ ID NO:6 的棘孢曲霉木聚糖酶具有至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 一致性,至少 97%、至少 98%、至少 99% 一致性的氨基酸序列的那些。

[0318] β -木糖苷酶

[0319] 在一个优选的实施例中,用在本发明的方法或工艺中的半纤维素酶是一种 β -木糖苷酶、或该半纤维素分解酶制剂包含一种 β -木糖苷酶。术语“ β -木糖苷酶”意指一种 β -D-木糖苷木糖水解酶(E.C. 3. 2. 1. 37),其催化短 β (1 $\rightarrow$ 4)-木寡糖的外水解,以从非还原性末端去除连续的 D-木糖残基。出于本发明的目的,一个单位的 β -木糖苷酶定义为在 40°C、pH 5 下在含有 0.01% **TWEEN®** 20 的 100mM 柠檬酸钠中从作为底物的 1mM 对硝基苯基- β -D-木糖苷每分钟产生 1.0 微摩尔的对硝基苯酚阴离子。

[0320] 特别考虑到的 β -木糖苷酶的实例包括源自于曲霉属的菌株的一种 β -木糖苷酶,例如烟曲霉的菌株,例如在 WO 2013/028928(实例 16 和 17)中披露的,或源自于木霉属的菌株,例如里氏木霉的菌株,例如在 WO 2011/057140 中为 SEQ ID NO:58 的成熟多肽。

[0321] 在预调节过程中使用的 β -木糖苷酶可包括在一种纤维素分解酶制剂中。在一个实施例中,该半纤维素酶是一种纤维素分解酶制剂,该制剂进一步包括一种 β -木糖苷酶,例如源自于曲霉属的菌株的一种 β -木糖苷酶,例如烟曲霉的菌株(例如披露于 WO 2011/057140 中的),例如在 WO 2013/028928(实例 16 和 17)中披露的,或源自于木霉属的菌株,例如里氏木霉的菌株,例如在 WO 2011/057140 中 SEQ ID NO:58 的成熟多肽。

[0322] 考虑到的 β -木糖苷酶还包括含与 WO 2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:206 的烟曲霉 β -木糖苷酶或此处 SEQ ID NO:9 或此处提到的 β -木糖苷酶中的任一种具有至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 一致性,至少 97%、至少 98%、至少 99% 一致性的氨基酸序列的那些。

[0323] 用于预调节的半纤维素酶是或可包括一种商业半纤维素酶产品。商业半纤维素酶产品的实例包括:例如 **SHEARZYME™**(诺维信 A/S)、**CELLIC HTec**(诺维信 A/S)、**CELLIC HTec2**(诺维信 A/S)、**CELLIC HTec3**(诺维信 A/S)、**VISCOZYME®**(诺维信 A/S)、**ULTRAFLO®**(诺维信 A/S)、**PULPZYME® HC**(诺维信 A/S)、**MULTIFECT®** 木聚糖酶(杰能科)、**ECOPULP® TX-200A**(AB 酶(AB Enzymes))、**HSP 6000** 木聚糖酶

(帝斯曼 (DSM))、DEPOL 333P(生物催化剂有限公司 (Biocatalysts Limit), 英国威尔士 (Wales, UK))、DEPOL 740L。(生物催化剂有限公司, 英国威尔士) 以及 DEPOL 762P(生物催化剂有限公司, 英国威尔士)。

[0324] β -葡糖苷酶

[0325] 根据本发明, 葡糖淀粉酶可以是在预调节或糖化过程中存在或添加的。此外, 在一个实施例中, 根据本发明使用的纤维素分解酶制剂可以包括一种或多种 β -葡糖苷酶。在一个实施例中, 该 β -葡糖苷酶可以是源自于曲霉属 (例如黑曲霉或米曲霉) 的一种, 例如 WO 2002/095014 中披露的那种或具有 β -葡糖苷酶活性的披露于 WO 2008/057637 中的融合蛋白, 或源自于烟曲霉, 例如披露于 WO 2005/047499 或此处 SEQ ID NO:5 中的, 或烟曲霉 β -葡糖苷酶变体, 例如 WO 2012/044915 中披露的, 例如具有以下取代: F100D、S283G、N456E、F512Y 的一种。

[0326] 在另一个实施例中, 该 β -葡糖苷酶源自于青霉属的菌株, 例如披露于 WO 2007/019442 中的巴西青霉 (*Penicillium brasilianum*) 的菌株, 或木霉属的菌株, 例如里氏木霉的菌株。

[0327] 在一个实施例中, β -葡糖苷酶是一种选自下组的烟曲霉 β -葡糖苷酶或其同系物, 该组由以下各项组成:

[0328] (i) 一种 β -葡糖苷酶, 包括在此的 SEQ ID NO:5 的成熟多肽;

[0329] (ii) 一种 β -葡糖苷酶, 包括以下氨基酸序列, 该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:5 的成熟多肽具有至少 70%, 例如, 至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 序列一致性。

[0330] 在一个实施例中, β -葡糖苷酶是一种变体, 该变体在对应于在此的 SEQ ID NO:5 的成熟多肽的位置 100、283、456 以及 512 的一个或多个 (若干个) 位置处包括取代, 其中该变体具有 β -葡糖苷酶活性。

[0331] 在一个实施例中, 变体的亲本 β -葡糖苷酶是 (a) 一种多肽, 包括在此的 SEQ ID NO:5 的成熟多肽; (b) 与此处 SEQ ID NO:5 的成熟多肽具有至少 80% 序列一致性的一种多肽或 (c) 此处 SEQ ID NO:5 的成熟多肽的片段, 该片段具有 β -葡糖苷酶活性。

[0332] 在一个实施例中, 该 β -葡糖苷酶变体与亲本 β -葡糖苷酶的氨基酸序列具有至少 80%, 例如, 至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 但低于 100% 序列一致性。

[0333] 在一个实施例中, 该 β -葡糖苷酶变体与此处 SEQ ID NO:5 的成熟多肽具有至少 80%, 例如至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 但小于 100% 的序列一致性。

[0334] 在一个实施例中, 该 β -葡糖苷酶来自曲霉属的菌株, 例如烟曲霉菌株, 例如烟曲霉 β -葡糖苷酶 (在此的 SEQ ID NO:5), 该 β -葡糖苷酶包括一个或多个选自下组的取代, 该组由以下各项组成: L89M、G91L、F100D、I140V、I186V、S283G、N456E 以及 F512Y; 例如具有以下取代的其变体:

[0335] -F100D+S283G+N456E+F512Y ;

[0336] -L89M+G91L+I186V+I140V ;

[0337] -I186V+L89M+G91L+I140V+F100D+S283G+N456E+F512Y。

[0338] 在一个实施例中,取代的数目在 1 与 10 之间,例如 1 与 8 之间,例如 1 与 6 之间,例如 1 与 4 之间,例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个取代。

[0339] 在一个实施例中,变体在对应于位置 100 的位置处包括取代、在对应于位置 283 的位置处包括取代、在对应于位置 456 的位置处包括取代和 / 或在对应于位置 512 的位置处包括取代。

[0340] 在一个优选的实施例中,该 β -葡萄糖苷酶变体包括以下取代:此处 SEQ ID NO:5 中的 Phe100Asp、Ser283Gly、Asn456Glu、Phe512Tyr。

[0341] 具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽

[0342] 在一个实施例中,根据本发明所使用的纤维素分解酶制剂可包括一种或多种具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽。在一个实施例中,该酶组合物包括一种具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽,例如源自于嗜热子囊菌属的,例如橙色嗜热子囊菌的菌株,例如在 WO 2005/074656 描述为 SEQ ID NO:2,或此处为 SEQ ID NO:4 的;或源自于梭孢壳菌属的,例如土生梭孢壳的菌株,例如在 WO 2005/074647 描述为 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8、和在此处为 SEQ ID NO:2 的;或源自于曲霉属的菌株的,例如烟曲霉的菌株,例如在 WO 2010/138754 描述为 SEQ ID NO:2;或源自于源于青霉属的菌株的,例如埃默森青霉菌的菌株,例如 WO 2011/041397 中披露的或此处的 SEQ ID NO:7 的。

[0343] 在一个实施例中,具有纤维素分解增强活性的青霉属 GH61 多肽或其同系物选自下组,该组由以下各项组成:

[0344] (i) 一种具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽,包括在此的 SEQ ID NO:7 的成熟多肽;

[0345] (ii) 一种具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽,包括以下氨基酸序列,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:7 的成熟多肽具有至少 70%,例如,至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 序列一致性。

[0346] 纤维二糖水解酶 I

[0347] 在一个实施例中,根据本发明使用的纤维素分解酶制剂可以包括一种或多种 CBH I (纤维二糖水解酶 I)。在一个实施例中,该纤维素分解组合物包括一种纤维二糖水解酶 I (CBH I),例如来源于曲霉属的菌株,例如烟曲霉的菌株,例如披露在 WO 2011/057140 的 SEQ ID NO:6 或在此的 SEQ ID NO:10 中的 Cel7A CBHI,或来源于木霉属的菌株,例如里氏木霉的菌株。

[0348] 在一个实施例中,烟曲霉纤维二糖水解酶 I 或其同系物选自下组,该组由以下各项组成:

[0349] (i) 一种纤维二糖水解酶 I,包括在此的 SEQ ID NO:10 的成熟多肽;

[0350] (ii) 一种纤维二糖水解酶 I,包括以下氨基酸序列,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:10 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%,例如,至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少

98%或至少 99%序列一致性。

[0351] 纤维二糖水解酶 II

[0352] 在一个实施例中,根据本发明使用的纤维素分解酶制剂可以包括一种或多种 CBH II (纤维二糖水解酶 II)。在一个实施例中,纤维二糖水解酶 II (CBHII) 是如来源于以下项的纤维二糖水解酶 II:曲霉属种的菌株(如烟曲霉的菌株),如在此的 SEQ ID NO:11 中的纤维二糖水解酶 II,或木霉属种的菌株,如里氏木霉,或梭孢壳霉属种的菌株,如土生梭孢壳霉的菌株,如来自土生梭孢壳霉的纤维二糖水解酶 II CEL6A。

[0353] 在一个实施例中,烟曲霉纤维二糖水解酶 II 或其同系物选自下组,该组由以下各项组成:

[0354] (i) 一种纤维二糖水解酶 II,包括在此的 SEQ ID NO:11 的成熟多肽;

[0355] (ii) 一种纤维二糖水解酶 II,包括以下氨基酸序列,该氨基酸序列与在此的 SEQ ID NO:11 的成熟多肽具有至少 60%、至少 70%、例如,至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致性。

[0356] 内切葡聚糖酶

[0357] 术语“内切葡聚糖酶”意指一种内切 -1, 4-(1, 3 ;1, 4)- β -D- 葡聚糖 4- 葡聚糖水解酶 (E. C. 3. 2. 1. 4),其催化纤维素、纤维素衍生物(如羧甲基纤维素和羟乙基纤维素)、地衣多糖中的 1, 4- β -D- 糖苷键和混合的 β -1, 3 葡聚糖如谷类 β -D- 葡聚糖或木葡聚糖以及含有纤维素组分的其他植物材料中的 β -1, 4 键的内切水解。可以通过测量底物粘度的降低或通过还原糖测定所确定的还原性末端的增加来确定内切葡聚糖酶活性(张(Zhang)等人,2006,生物技术进展(Biotechnology Advances)24:452-481)。为了本发明的目的,使用羧甲基纤维素(CMC)作为底物,根据在 Ghose,1987,纯粹与应用化学(Pure and Appl. Chem.)59:257-268 中所述的过程,在 pH 5、40°C 下,确定内切葡聚糖酶的活性。

[0358] 纤维素分解酶制剂

[0359] 根据本发明,纤维素分解酶制剂是在糖化过程中存在的或添加的。纤维素分解酶制剂是包含水解纤维素材料的一种或多种(例如若干种)酶的一种制剂。此类酶包括内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、 β - 葡萄糖苷酶、或其组合。

[0360] 用于测量纤维素分解活性的两种基本方法包括:(1) 测量总纤维素分解活性,以及(2) 测量单独的纤维素分解活性(内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、以及 β - 葡萄糖苷酶),如在张(Zhang)等人,纤维素酶改进的展望:筛选和选择策略(Outlook for cellulase improvement:Screening and selection strategies),2006,生物技术进展(Biotechnology Advances)24:452-481 中所综述的。通常使用不溶性底物,包括沃特曼(Whatman) No 1 滤纸、微晶纤维素、细菌纤维素、藻类纤维素、棉花、预处理的木质纤维素等,测量总纤维素分解活性。最常用的总纤维素分解活性测定是使用沃特曼 No 1 滤纸作为底物的滤纸测定。该测定是由国际纯粹与应用化学联合会(International Union of Pure and Applied Chemistry(IUPAC))(高斯(Ghose),1987,纤维素酶活性的测量(Measurement of cellulase activities),纯粹与应用化学(Pure Appl. Chem.)59:257-68)确立的。

[0361] 出于本发明的目的,通过测量在以下条件下由一种或多种纤维素分解酶进行的纤维素材料水解的增加来确定例如针对一种纤维素分解酶制剂的纤维素分解酶活性:1-50mg

纤维素分解酶蛋白 /gPCS 中的纤维素（或其他预处理的纤维素材料），在适合的温度（例如 50℃、55℃、60℃、或 65℃）下持续 3-7 天，与未添加纤维素分解酶蛋白的对照水解相比。典型条件为：1ml 反应，洗涤或未洗涤的 PCS，5% 不溶性固体，50mM 乙酸钠（pH 5），1mM MnSO_4 ，50℃、55℃、60℃ 或 65℃，72 小时，通过 AMINEX® HPX-87H 柱（伯乐实验室有限公司，赫拉克勒斯，加州，美国）进行糖分析。

[0362] 如以上所述的在本发明的一种工艺中用于糖化（水解）的一种纤维素分解酶制剂典型地包括一种或多种内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶和 / 或 β - 葡萄糖苷酶。

[0363] 在一个实施例中，该纤维素分解酶制剂源自于木霉属的菌株，例如里氏木霉的菌株；腐质霉属的菌株，例如特异腐质霉的菌株，和 / 或金孢子菌属的菌株，例如拉克淖金孢子菌（*Chrysosporium lucknowense*）的菌株。在一个优选实施例中，该纤维素分解酶制剂源自于里氏木霉的菌株。

[0364] 该纤维素分解酶制剂可进一步包括以下多肽（例如酶）中的一种或多种：具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽、 β - 葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 β - 木糖苷酶、CBHI、CBHII，或其两种、三种、四种、五种或六种的混合物。

[0365] 该另外的一种或多种多肽（例如 GH61 多肽）和 / 或一种或多种酶（例如 β - 葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 β - 木糖苷酶、CBH I 和 / 或 CBH II）对于该纤维素分解酶制剂生产生物体（例如里氏木霉）可以是外来的。

[0366] 在一个实施例中，该纤维素分解酶制剂包括一种具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽和一种 β - 葡萄糖苷酶。

[0367] 在另一个实施例中，该纤维素分解酶制剂包括一种具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽、一种 β - 葡萄糖苷酶、以及一种 CBHI。

[0368] 在另一个实施例中，该纤维素分解酶制剂包括一种具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽、一种 β - 葡萄糖苷酶、一种 CBHI 以及一种 CBHII。

[0369] 其他酶（例如内切葡聚糖酶）还可包括在该纤维素分解酶制剂中。

[0370] 如以上提到的，该纤维素分解酶制剂可包括多种不同的多肽，包括酶。

[0371] 在一个实施例中，该纤维素分解酶制剂包括一种里氏木霉纤维分解制剂，其进一步包括具有纤维素分解增强活性的橙色嗜热子囊菌 GH61A 多肽（例如，WO 2005/074656）、以及米曲霉 β - 葡萄糖苷酶融合蛋白（例如，WO 2008/057637）。

[0372] 在另一个实施例中，该纤维素分解酶制剂包括一种里氏木霉纤维素分解酶制剂，其进一步包括具有纤维素分解增强活性的橙色嗜热子囊菌 GH61A 多肽（WO 2005/074656 中的 SEQ ID NO:2 或此处的 SEQ ID NO:4）、以及烟曲霉 β - 葡萄糖苷酶（WO 2005/047499 的 SEQ ID NO:2 或此处的 SEQ ID NO:5）。

[0373] 在另一个实施例中，该纤维素分解酶制剂包括一种里氏木霉纤维素分解酶制剂，其进一步包括具有纤维素分解增强活性的埃默森青霉菌 GH61A 多肽（披露于 WO 2011/041397 或此处的 SEQ ID NO:7）、以及烟曲霉 β - 葡萄糖苷酶（WO 2005/047499 的 SEQ ID NO:2 或此处的 SEQ ID NO:5）。

[0374] 在另一个实施例中，该纤维素分解酶制剂包括一种里氏木霉纤维素分解酶制剂，其进一步包括具有纤维素分解增强活性的埃默森青霉菌 GH61A 多肽（披露于 WO 2011/041397），以及烟曲霉 β - 葡萄糖苷酶（WO 2005/047499 的 SEQ ID NO:2）或变体（披露

于 WO 2012/044915 (通过引用结合在此)), 具有以下取代: F100D、S283G、N456E、F512Y。

[0375] 在一个实施例中, 该纤维素分解酶制剂来源于里氏木霉, 进一步包括具有纤维素分解增强活性的 GH61A 多肽 (该多肽来源于埃默森青霉菌菌株 (WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:7))、披露于 WO 2012/044915 中的烟曲霉 β -葡萄糖苷酶 (WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:5) 变体 F100D、S283G、N456E、F512Y; WO2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:6 的和此处 SEQ ID NO:10 中的烟曲霉 Cel7A CBH I 以及 WO 2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:18 的或此处 SEQ ID NO:11 中的烟曲霉 CBH II。

[0376] 在一个优选的实施例中, 来自里氏木霉的纤维素分解酶制剂进一步包括半纤维素酶或半纤维素分解酶制剂, 例如, 烟曲霉木聚糖酶 (例如, 在此的 SEQ ID NO:8) 和烟曲霉 β -木糖苷酶 (例如, 在此的 SEQ ID NO:9)。

[0377] 在一个实施例中, 该纤维素分解酶制剂还包括一种木聚糖酶 (例如源自于棘孢曲霉或烟曲霉) 和 / 或一种 β -木糖苷酶 (例如源自于烟曲霉)。

[0378] 在一个实施例中, 该纤维素分解酶制剂包括一种里氏木霉纤维分解制剂, 其进一步包括具有纤维素分解增强活性的橙色嗜热子囊菌 GH61A 多肽 (WO 2005/074656)、米曲霉 β -葡萄糖苷酶融合蛋白 (WO 2008/057637)、以及棘孢曲霉木聚糖酶 (WO 94/21785 中的 Xyl II)。

[0379] 在另一个实施例中, 该纤维素分解酶制剂包括一种里氏木霉纤维分解制剂, 其进一步包括具有纤维素分解增强活性的橙色嗜热子囊菌 GH61A 多肽 (WO 2005/074656 中的 SEQ ID NO:2)、烟曲霉 β -葡萄糖苷酶 (WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2)、以及棘孢曲霉木聚糖酶 (披露于 WO 94/21785 的或此处 SEQ ID NO:6 中的 Xyl II)。

[0380] 在另一个实施例中, 该纤维素分解酶制剂包括一种里氏木霉纤维分解制剂, 其进一步包括具有纤维素分解增强活性的橙色嗜热子囊菌 GH61A 多肽 (WO 2005/074656 中的 SEQ ID NO:2)、烟曲霉 β -葡萄糖苷酶 (WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2)、以及棘孢曲霉木聚糖酶 (披露于 WO 94/21785 或此处 SEQ ID NO:6 中的 Xyl II)。

[0381] 在另一个实施例中, 该纤维素分解酶制剂包括一种里氏木霉纤维分解制剂, 其进一步包括具有纤维素分解增强活性的埃默森青霉菌 GH61A 多肽 (披露于 WO 2011/041397 中)、烟曲霉 β -葡萄糖苷酶 (WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2)、以及烟曲霉木聚糖酶 (WO 2006/078256 中的 Xyl III)。

[0382] 在另一个实施例中, 该纤维素分解酶制剂包括一种里氏木霉纤维分解制剂, 其进一步包括具有纤维素分解增强活性的埃默森青霉菌 GH61A 多肽 (披露于 WO 2011/041397 中)、烟曲霉 β -葡萄糖苷酶 (WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2)、烟曲霉木聚糖酶 (WO 2006/078256 中的 Xyl III) 以及在 WO 2011/057140 中被披露为 SEQ ID NO:2 的来自烟曲霉的 Cel7A CBH I。

[0383] 在另一个实施例中, 该纤维素分解酶制剂包括一种里氏木霉纤维分解制剂, 其进一步包括具有纤维素分解增强活性的埃默森青霉菌 GH61A 多肽 (披露于 WO 2011/041397 中)、烟曲霉 β -葡萄糖苷酶 (WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2)、烟曲霉木聚糖酶 (WO 2006/078256 中的 Xyl III) 以及在 WO 2011/057140 中被披露为 SEQ ID NO:2 的来自烟曲霉的 Cel7A CBH I 以及在 WO 2011/057140 中被披露为 SEQ ID NO:2 的来自烟曲霉的 Cel7A CBH I, 以及在 WO 2013/028928 中被披露的源自于烟曲霉的 CBH II。

[0384] 在另一个实施例中,该纤维素分解酶制剂包括一种里氏木霉纤维素分解制剂,其进一步包括具有纤维素分解增强活性的埃默森青霉菌 GH61A 多肽(披露于 WO 2011/041397),烟曲霉 β -葡萄糖苷酶(WO 2005/047499 的 SEQ ID NO:2)或变体,具有以下取代:F100D、S283G、N456E、F512Y;烟曲霉木聚糖酶(WO 2006/078256 中 Xyl III)、在 WO 2011/057140 中被披露为 SEQ ID NO:2 的来自烟曲霉的 Cel7A CBH I,以及在 WO 2013/028928 中被披露的源自于烟曲霉的 CBH II。

[0385] 也考虑到披露于 WO 2013/028928 的所有纤维素分解酶制剂并通过引用结合在此。

[0386] 该纤维素分解酶制剂包括或可进一步包括选自下组的一种或多种(若干种)蛋白质,该组由以下各项组成:纤维素酶、具有纤维素分解增强活性的 GH61 多肽、半纤维素酶、棒曲霉素、酯酶、漆酶、木质素分解酶、果胶酶、过氧化物酶、蛋白酶、以及膨胀素。

[0387] 在一个实施例中,该纤维素分解酶制剂是或包括一种商业纤维素分解酶制剂。

[0388] 适用于在本发明中使用的商业化纤维素分解酶制剂的实例包括例如 CELLIC CTec(诺维信 A/S)、CELLIC Ctec2(诺维信 A/S)、CELLIC Ctec3(诺维信 A/S)、CELLUCLAST™(诺维信 A/S)、CELLUZYME™(诺维信 A/S)、CEREFLO™(诺维信 A/S)、以及 ULTRAFLO™(诺维信 A/S)、ACCELERASE™(杰能科公司(Genencor Int.))、LAMINEX™(杰能科公司)、SPEZYME CP(杰能科公司)、ROHAMENT 7069W(罗姆公司(Röhm GmbH))、FIBREZYME® LDI(并矢国际公司(Dyadic International, Inc.))、FIBREZYME® LBR(并矢国际公司)、或 VISCOSTAR® 150L(并矢国际公司)。

[0389] 在糖化期间可以按从约 0.001 至约 5.0wt% 的固体(TS),更优选从约 0.025 至约 4.0wt% 的固体,并且最优选从约 0.005 至约 2.0wt% 的固体(TS)的有效量存在或添加该纤维素分解酶制剂。

[0390] 通过以下实例进一步描述本发明,这些实例不应当解释为限制本发明的范围。

[0391] 材料 & 方法

[0392] 材料:

[0393] 漆酶 A(“L”):源自于嗜热毁丝霉(MtL)在 WO 95/33836 中被披露的并可从丹麦的诺维信 A/S 获得的漆酶。

[0394] 纤维素分解酶制剂 C3(“C3”):来源于里氏木霉的纤维素分解酶制剂,进一步包括具有纤维素分解增强活性的 GH61A 多肽(该多肽来源于埃默森青霉菌菌株(WO 2011/041397 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:7))、披露于 WO 2012/044915 中的烟曲霉 β -葡萄糖苷酶(WO 2005/047499 中的 SEQ ID NO:2 或在此的 SEQ ID NO:5)变体 F100D、S283G、N456E、F512Y;WO2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:6 的和此处 SEQ ID NO:10 中的烟曲霉 Cel7A CBH1 以及 WO 2011/057140 中披露为 SEQ ID NO:18 的和此处 SEQ ID NO:11 中的烟曲霉 CBH II。此外,纤维素分解酶制剂 C3 进一步包含 10% 半纤维素分解酶制剂 H3。

[0395] 半纤维素分解酶制剂 H3(“H3”):来自里氏木霉的纤维素分解酶制剂,进一步包含烟曲霉木聚糖酶(在此的 SEQ ID NO:8)和烟曲霉 β -木糖苷酶(在此的 SEQ ID NO:9)。

[0396] 葡糖淀粉酶 GA(“GA”):来源于黑曲霉的葡糖淀粉酶,示于在此的 SEQ ID NO:13 中。

[0397] 葡糖淀粉酶制剂 188 (“GA188”):黑曲霉酶制剂包含 57% 葡糖淀粉酶、27% β - 葡糖苷酶和 16% α - 淀粉酶 (蛋白含量基底)。

[0398] 在此描述的和要求的本发明并非是要用在此公开的特定方面来限定范围,因为这些方面的用意是要作为本发明若干方面的说明。预期任何等效方面都处于本发明的范围内。实际上,除在此所示和描述的那些之外,本发明的不同修改对于本领域普通技术人员而言从前述描述将变得清楚。此类修改也旨在落入所附权利要求书的范围内。在发生冲突的情况下,以包括定义的本披露为准。

[0399] 实例

[0400] 实例 1

[0401] 预调节对油提取 / 回收和糖化之后葡萄糖产率的作用

[0402] 低深度稀酸预处理的 (160°C, 3% H_2SO_4 (w/w) 持续 5 分钟) 干燥部分玉米纤维在一个罐式反应器中在 50°C 下以约 23% Ts (总固体) 通过与以下各项高度混合进行 6 小时预调节:

[0403] -0.015mg 漆酶 A/g 纤维素;

[0404] -0.2mg 半纤维素分解酶制剂 H3/g 纤维素;

[0405] -0.114mg 葡糖淀粉酶 GA/g 纤维素;

[0406] -0.2mg 葡糖淀粉酶制剂 188/g 纤维素)。

[0407] - 无预调节 (对照物)

[0408] 在预调节之后,添加 1.8mg 纤维素分解酶制剂 C3/g 纤维素并且在 50°C 以 20% TS 进行 5 天水解。在 5 天水解之后,将 25 克全浆料水解产物添加至一个 50ml 试管中,然后添加 3.13mL 的 95% 正己烷 (飞世尔科技 (Fisher Scientific))。将该水解产物 / 正己烷混合物良好混合,然后在落地式离心机 (赛默科技 (Thermo Scientific), 传奇 RT+ 离心 (Legeng RT+centrigure)) 中以 3000G 离心 10 分钟。在离心之后,将上层通过正位移移液管 (positive displacement pipettes) 转移至一个 3ml 试管中。测量转移液体的重量。使用光密度计测定油含量和密度并记录。再次从该水解产物中提取油,并且记录所有数据,并且最终提取的油计算如下:

[0409] 提取的油 = (第一次提取的油 + 第二次提取的油) (g) / 总干水解产物 (g) 并且结果示于图 1。

[0410] 使用具有 Aminex HPX-87H 柱的 HPLC 确定葡萄糖产率。结果示于图 2 中。

[0411] 实例 2

[0412] 预调节对糖化之后葡萄糖产率的作用

[0413] 重复实例 1,除了预调节过程中的干燥部分玉米纤维约为 17% TS。用 0.015mg 漆酶 A/g 纤维素和 0.114mg 葡糖淀粉酶 GA,接着用 2.0mg 纤维素分解酶制剂 C3 糖化完成预调节。作为对照物,不进行预调节重复该过程。

[0414] 确定了葡萄糖产率。结果示于图 3 中。

[0001]

序列表

<110> 诺维信 A/S
李, 新 (Li, Xin)
埃姆, 布兰登 科里 (Emme, Brandon Cory)
帕特南, 罗琳 (Putnam, Lorraine)
托里史密斯, 马斯彼得 (Torry Smith, Mads Peter)

<120> 对预处理的纤维素材料进行预调节的方法

<130> 12600-WO-PCT

<150> US 61/824,082
<151> 2013-05-16

<160> 13

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 797
<212> PRT
<213> 里氏木霉

<400> 1

Met Val Asn Asn Ala Ala Leu Leu Ala Ala Leu Ser Ala Leu Leu Pro
1 5 10 15

Thr Ala Leu Ala Gln Asn Asn Gln Thr Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Gln
20 25 30

Gly Gln Pro Asp Leu Tyr Pro Glu Thr Leu Ala Thr Leu Thr Leu Ser
35 40 45

Phe Pro Asp Cys Glu His Gly Pro Leu Lys Asn Asn Leu Val Cys Asp
50 55 60

Ser Ser Ala Gly Tyr Val Glu Arg Ala Gln Ala Leu Ile Ser Leu Phe
65 70 75 80

Thr Leu Glu Glu Leu Ile Leu Asn Thr Gln Asn Ser Gly Pro Gly Val
85 90 95

Pro Arg Leu Gly Leu Pro Asn Tyr Gln Val Trp Asn Glu Ala Leu His
100 105 110

Gly Leu Asp Arg Ala Asn Phe Ala Thr Lys Gly Gly Gln Phe Glu Trp
115 120 125

Ala Thr Ser Phe Pro Met Pro Ile Leu Thr Thr Ala Ala Leu Asn Arg
130 135 140

Thr Leu Ile His Gln Ile Ala Asp Ile Ile Ser Thr Gln Ala Arg Ala
145 150 155 160

Phe Ser Asn Ser Gly Arg Tyr Gly Leu Asp Val Tyr Ala Pro Asn Val
165 170 175

Asn Gly Phe Arg Ser Pro Leu Trp Gly Arg Gly Gln Glu Thr Pro Gly
180 185 190

Glu Asp Ala Phe Phe Leu Ser Ser Ala Tyr Thr Tyr Glu Tyr Ile Thr
195 200 205

[0002]

Gly Ile Gln Gly Gly Val Asp Pro Glu His Leu Lys Val Ala Ala Thr
 210 215 220
 Val Lys His Phe Ala Gly Tyr Asp Leu Glu Asn Trp Asn Asn Gln Ser
 225 230 235 240
 Arg Leu Gly Phe Asp Ala Ile Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ser Glu Tyr
 245 250 255
 Tyr Thr Pro Gln Phe Leu Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Lys Ser Arg Ser
 260 265 270
 Leu Met Cys Ala Tyr Asn Ser Val Asn Gly Val Pro Ser Cys Ala Asn
 275 280 285
 Ser Phe Phe Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Ser Trp Gly Phe Pro Glu
 290 295 300
 Trp Gly Tyr Val Ser Ser Asp Cys Asp Ala Val Tyr Asn Val Phe Asn
 305 310 315 320
 Pro His Asp Tyr Ala Ser Asn Gln Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Leu
 325 330 335
 Arg Ala Gly Thr Asp Ile Asp Cys Gly Gln Thr Tyr Pro Trp His Leu
 340 345 350
 Asn Glu Ser Phe Val Ala Gly Glu Val Ser Arg Gly Glu Ile Glu Arg
 355 360 365
 Ser Val Thr Arg Leu Tyr Ala Asn Leu Val Arg Leu Gly Tyr Phe Asp
 370 375 380
 Lys Lys Asn Gln Tyr Arg Ser Leu Gly Trp Lys Asp Val Val Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Ala Trp Asn Ile Ser Tyr Glu Ala Ala Val Glu Gly Ile Val Leu
 405 410 415
 Leu Lys Asn Asp Gly Thr Leu Pro Leu Ser Lys Lys Val Arg Ser Ile
 420 425 430
 Ala Leu Ile Gly Pro Trp Ala Asn Ala Thr Thr Gln Met Gln Gly Asn
 435 440 445
 Tyr Tyr Gly Pro Ala Pro Tyr Leu Ile Ser Pro Leu Glu Ala Ala Lys
 450 455 460
 Lys Ala Gly Tyr His Val Asn Phe Glu Leu Gly Thr Glu Ile Ala Gly
 465 470 475 480
 Asn Ser Thr Thr Gly Phe Ala Lys Ala Ile Ala Ala Ala Lys Lys Ser
 485 490 495
 Asp Ala Ile Ile Tyr Leu Gly Gly Ile Asp Asn Thr Ile Glu Gln Glu
 500 505 510

[0003]

Gly Ala Asp Arg Thr Asp Ile Ala Trp Pro Gly Asn Gln Leu Asp Leu
 515 520 525
 Ile Lys Gln Leu Ser Glu Val Gly Lys Pro Leu Val Val Leu Gln Met
 530 535 540
 Gly Gly Gly Gln Val Asp Ser Ser Ser Leu Lys Ser Asn Lys Lys Val
 545 550 555 560
 Asn Ser Leu Val Trp Gly Gly Tyr Pro Gly Gln Ser Gly Gly Val Ala
 565 570 575
 Leu Phe Asp Ile Leu Ser Gly Lys Arg Ala Pro Ala Gly Arg Leu Val
 580 585 590
 Thr Thr Gln Tyr Pro Ala Glu Tyr Val His Gln Phe Pro Gln Asn Asp
 595 600 605
 Met Asn Leu Arg Pro Asp Gly Lys Ser Asn Pro Gly Gln Thr Tyr Ile
 610 615 620
 Trp Tyr Thr Gly Lys Pro Val Tyr Glu Phe Gly Ser Gly Leu Phe Tyr
 625 630 635 640
 Thr Thr Phe Lys Glu Thr Leu Ala Ser His Pro Lys Ser Leu Lys Phe
 645 650 655
 Asn Thr Ser Ser Ile Leu Ser Ala Pro His Pro Gly Tyr Thr Tyr Ser
 660 665 670
 Glu Gln Ile Pro Val Phe Thr Phe Glu Ala Asn Ile Lys Asn Ser Gly
 675 680 685
 Lys Thr Glu Ser Pro Tyr Thr Ala Met Leu Phe Val Arg Thr Ser Asn
 690 695 700
 Ala Gly Pro Ala Pro Tyr Pro Asn Lys Trp Leu Val Gly Phe Asp Arg
 705 710 715 720
 Leu Ala Asp Ile Lys Pro Gly His Ser Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ile
 725 730 735
 Pro Val Ser Ala Leu Ala Arg Val Asp Ser His Gly Asn Arg Ile Val
 740 745 750
 Tyr Pro Gly Lys Tyr Glu Leu Ala Leu Asn Thr Asp Glu Ser Val Lys
 755 760 765
 Leu Glu Phe Glu Leu Val Gly Glu Glu Val Thr Ile Glu Asn Trp Pro
 770 775 780
 Leu Glu Glu Gln Gln Ile Lys Asp Ala Thr Pro Asp Ala
 785 790 795
 <210> 2
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 土生梭孢壳

[0004]

<400> 2

```

Met Leu Ala Asn Gly Ala Ile Val Phe Leu Ala Ala Ala Leu Gly Val
1           5           10           15

Ser Gly His Tyr Thr Trp Pro Arg Val Asn Asp Gly Ala Asp Trp Gln
20          25          30

Gln Val Arg Lys Ala Asp Asn Trp Gln Asp Asn Gly Tyr Val Gly Asp
35          40          45

Val Thr Ser Pro Gln Ile Arg Cys Phe Gln Ala Thr Pro Ser Pro Ala
50          55          60

Pro Ser Val Leu Asn Thr Thr Ala Gly Ser Thr Val Thr Tyr Trp Ala
65          70          75          80

Asn Pro Asp Val Tyr His Pro Gly Pro Val Gln Phe Tyr Met Ala Arg
85          90          95

Val Pro Asp Gly Glu Asp Ile Asn Ser Trp Asn Gly Asp Gly Ala Val
100         105         110

Trp Phe Lys Val Tyr Glu Asp His Pro Thr Phe Gly Ala Gln Leu Thr
115         120         125

Trp Pro Ser Thr Gly Lys Ser Ser Phe Ala Val Pro Ile Pro Pro Cys
130         135         140

Ile Lys Ser Gly Tyr Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Gln Ile Gly Leu His
145         150         155         160

Val Ala Gln Ser Val Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Ile Ser Cys Ala Gln
165         170         175

Leu Ser Val Thr Gly Gly Gly Ser Thr Glu Pro Pro Asn Lys Val Ala
180         185         190

Phe Pro Gly Ala Tyr Ser Ala Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile
195         200         205

Tyr Tyr Pro Val Pro Thr Ser Tyr Gln Asn Pro Gly Pro Ala Val Phe
210         215         220

Ser Cys Met Leu Ala Asn Gly Ala Ile Val Phe Leu Ala Ala Ala Leu
225         230         235         240

Gly Val Ser Gly His Tyr Thr Trp Pro Arg Val Asn Asp Gly Ala Asp
245         250         255

Trp Gln Gln Val Arg Lys Ala Asp Asn Trp Gln Asp Asn Gly Tyr Val
260         265         270

Gly Asp Val Thr Ser Pro Gln Ile Arg Cys Phe Gln Ala Thr Pro Ser
275         280         285

Pro Ala Pro Ser Val Leu Asn Thr Thr Ala Gly Ser Thr Val Thr Tyr
290         295         300

```

[0005]

Trp Ala Asn Pro Asp Val Tyr His Pro Gly Pro Val Gln Phe Tyr Met
 305 310 315 320
 Ala Arg Val Pro Asp Gly Glu Asp Ile Asn Ser Trp Asn Gly Asp Gly
 325 330 335
 Ala Val Trp Phe Lys Val Tyr Glu Asp His Pro Thr Phe Gly Ala Gln
 340 345 350
 Leu Thr Trp Pro Ser Thr Gly Lys Ser Ser Phe Ala Val Pro Ile Pro
 355 360 365
 Pro Cys Ile Lys Ser Gly Tyr Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Gln Ile Gly
 370 375 380
 Leu His Val Ala Gln Ser Val Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Ile Ser Cys
 385 390 395 400
 Ala Gln Leu Ser Val Thr Gly Gly Gly Ser Thr Glu Pro Pro Asn Lys
 405 410 415
 Val Ala Phe Pro Gly Ala Tyr Ser Ala Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile
 420 425 430
 Asn Ile Tyr Tyr Pro Val Pro Thr Ser Tyr Gln Asn Pro Gly Pro Ala
 435 440 445
 Val Phe Ser Cys
 450
 <210> 3
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 烟曲霉
 <400> 3
 Met Lys Ser Phe Thr Ile Ala Ala Leu Ala Ala Leu Trp Ala Gln Glu
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala His Ala Thr Phe Gln Asp Leu Trp Ile Asp Gly Val Asp
 20 25 30
 Tyr Gly Ser Gln Cys Val Arg Leu Pro Ala Ser Asn Ser Pro Val Thr
 35 40 45
 Asn Val Ala Ser Asp Asp Ile Arg Cys Asn Val Gly Thr Ser Arg Pro
 50 55 60
 Thr Val Lys Cys Pro Val Lys Ala Gly Ser Thr Val Thr Ile Glu Met
 65 70 75 80
 His Gln Gln Pro Gly Asp Arg Ser Cys Ala Asn Glu Ala Ile Gly Gly
 85 90 95
 Asp His Tyr Gly Pro Val Met Val Tyr Met Ser Lys Val Asp Asp Ala
 100 105 110
 Val Thr Ala Asp Gly Ser Ser Gly Trp Phe Lys Val Phe Gln Asp Ser

[0006]

115	120	125
Trp Ala Lys Asn Pro Ser Gly Ser Thr Gly Asp Asp Asp Tyr Trp Gly 130 135 140		
Thr Lys Asp Leu Asn Ser Cys Cys Gly Lys Met Asn Val Lys Ile Pro 145 150 155 160		
Glu Asp Ile Glu Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Val Ile Ala 165 170 175		
Leu His Val Ala Ala Ser Ser Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Met Ser Cys 180 185 190		
Tyr Gln Leu Thr Val Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Pro Ser Thr Val 195 200 205		
Asn Phe Pro Gly Ala Tyr Ser Ala Ser Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn 210 215 220		
Ile His Ala Pro Met Ser Thr Tyr Val Val Pro Gly Pro Thr Val Tyr 225 230 235 240		
Ala Gly Gly Ser Thr Lys Ser Ala Gly Ser Ser Cys Ser Gly Cys Glu 245 250 255		
Ala Thr Cys Thr Val Gly Ser Gly Pro Ser Ala Thr Leu Thr Gln Pro 260 265 270		
Thr Ser Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly 275 280 285		
Cys Thr Ala Ala Lys Tyr Gln Gln Cys Gly Gly Thr Gly Tyr Thr Gly 290 295 300		
Cys Thr Thr Cys Ala Ser Gly Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Pro Pro 305 310 315 320		
Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu 325		
<210> 4 <211> 250 <212> PRT <213> 橙色嗜热子囊菌		
<400> 4		
Met Ser Phe Ser Lys Ile Ile Ala Thr Ala Gly Val Leu Ala Ser Ala 1 5 10 15		
Ser Leu Val Ala Gly His Gly Phe Val Gln Asn Ile Val Ile Asp Gly 20 25 30		
Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Tyr Leu Val Asn Gln Tyr Pro Tyr Met Ser 35 40 45		
Asn Pro Pro Glu Val Ile Ala Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly 50 55 60		

[0007]

Phe Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Thr Pro Asp Ile Ile Cys His Arg
 65 70 75 80
 Gly Ala Lys Pro Gly Ala Leu Thr Ala Pro Val Ser Pro Gly Gly Thr
 85 90 95
 Val Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His Gly Pro Val
 100 105 110
 Ile Asn Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asp Cys Ser Thr Val Asp Lys
 115 120 125
 Thr Gln Leu Glu Phe Phe Lys Ile Ala Glu Ser Gly Leu Ile Asn Asp
 130 135 140
 Asp Asn Pro Pro Gly Ile Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile Ala Ala Asn
 145 150 155 160
 Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Thr Thr Ile Ala Pro Gly Asn Tyr
 165 170 175
 Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gln Asn Gln Asp
 180 185 190
 Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Leu Gln Val Thr Gly Gly
 195 200 205
 Gly Ser Asp Asn Pro Ala Gly Thr Leu Gly Thr Ala Leu Tyr His Asp
 210 215 220
 Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile Tyr Gln Lys Leu Ser Ser Tyr
 225 230 235 240
 Ile Ile Pro Gly Pro Pro Leu Tyr Thr Gly
 245 250
 <210> 5
 <211> 863
 <212> PRT
 <213> 烟曲霉
 <400> 5
 Met Arg Phe Gly Trp Leu Glu Val Ala Ala Leu Thr Ala Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Ala Asn Ala Gln Glu Leu Ala Phe Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser Pro
 20 25 30
 Trp Ala Asp Gly Gln Gly Glu Trp Ala Asp Ala His Arg Arg Ala Val
 35 40 45
 Glu Ile Val Ser Gln Met Thr Leu Ala Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr
 50 55 60
 Gly Thr Gly Trp Glu Met Asp Arg Cys Val Gly Gln Thr Gly Ser Val
 65 70 75 80
 Pro Arg Leu Gly Ile Asn Trp Gly Leu Cys Gly Gln Asp Ser Pro Leu

[0008]

85							90							95							
Gly	Ile	Arg	Phe	Ser	Asp	Leu	Asn	Ser	Ala	Phe	Pro	Ala	Gly	Thr	Asn						
100							105							110							
Val	Ala	Ala	Thr	Trp	Asp	Lys	Thr	Leu	Ala	Tyr	Leu	Arg	Gly	Lys	Ala						
115							120							125							
Met	Gly	Glu	Glu	Phe	Asn	Asp	Lys	Gly	Val	Asp	Ile	Leu	Leu	Gly	Pro						
130							135							140							
Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Gly	Lys	Tyr	Pro	Asp	Gly	Gly	Arg	Ile	Trp	Glu						
145							150							155							160
Gly	Phe	Ser	Pro	Asp	Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Leu	Phe	Ala	Glu	Thr						
165							170							175							
Ile	Lys	Gly	Ile	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Ala	Lys	His	Tyr						
180							185							190							
Ile	Leu	Asn	Glu	Gln	Glu	His	Phe	Arg	Gln	Val	Gly	Glu	Ala	Gln	Gly						
195							200							205							
Tyr	Gly	Tyr	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Asp	Lys						
210							215							220							
Thr	Met	His	Glu	Leu	Tyr	Leu	Trp	Pro	Phe	Ala	Asp	Ala	Val	Arg	Ala						
225							230							235							240
Gly	Val	Gly	Ala	Val	Met	Cys	Ser	Tyr	Asn	Gln	Ile	Asn	Asn	Ser	Tyr						
245							250							255							
Gly	Cys	Gln	Asn	Ser	Gln	Thr	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Lys	Ala	Glu	Leu						
260							265							270							
Gly	Phe	Gln	Gly	Phe	Val	Met	Ser	Asp	Trp	Ser	Ala	His	His	Ser	Gly						
275							280							285							
Val	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Asp	Met	Ser	Met	Pro	Gly	Asp	Ile						
290							295							300							
Ser	Phe	Asp	Asp	Gly	Leu	Ser	Phe	Trp	Gly	Thr	Asn	Leu	Thr	Val	Ser						
305							310							315							320
Val	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Pro	Ala	Trp	Arg	Val	Asp	Asp	Met	Ala	Val						
325							330							335							
Arg	Ile	Met	Thr	Ala	Tyr	Tyr	Lys	Val	Gly	Arg	Asp	Arg	Leu	Arg	Ile						
340							345							350							
Pro	Pro	Asn	Phe	Ser	Ser	Trp	Thr	Arg	Asp	Glu	Tyr	Gly	Trp	Glu	His						
355							360							365							
Ser	Ala	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Trp	Thr	Lys	Val	Asn	Asp	Phe	Val	Asn						
370							375							380							
Val	Gln	Arg	Ser	His	Ser	Gln	Ile	Ile	Arg	Glu	Ile	Gly	Ala	Ala	Ser						
385							390							395							400

[0009]

Thr Val Leu Leu Lys Asn Thr Gly Ala Leu Pro Leu Thr Gly Lys Glu
 405 410 415
 Val Lys Val Gly Val Leu Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Pro Trp Gly
 420 425 430
 Ala Asn Gly Cys Pro Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met
 435 440 445
 Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu
 450 455 460
 Gln Ala Ile Gln Arg Glu Val Ile Ser Asn Gly Gly Asn Val Phe Ala
 465 470 475 480
 Val Thr Asp Asn Gly Ala Leu Ser Gln Met Ala Asp Val Ala Ser Gln
 485 490 495
 Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Phe
 500 505 510
 Ile Ser Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp
 515 520 525
 Lys Asn Gly Glu Ala Val Ile Asp Thr Val Val Ser His Cys Asn Asn
 530 535 540
 Thr Ile Val Val Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Arg Trp
 545 550 555 560
 Tyr Asp Asn Pro Asn Val Thr Ala Ile Ile Trp Ala Gly Leu Pro Gly
 565 570 575
 Gln Glu Ser Gly Asn Ser Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn
 580 585 590
 Pro Ser Ala Lys Thr Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr
 595 600 605
 Gly Ala Pro Leu Leu Thr Glu Pro Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln
 610 615 620
 Asp Asp Phe Asn Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys
 625 630 635 640
 Arg Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly His Gly Leu Ser Tyr Thr
 645 650 655
 Thr Phe Gly Tyr Ser His Leu Arg Val Gln Ala Leu Asn Ser Ser Ser
 660 665 670
 Ser Ala Tyr Val Pro Thr Ser Gly Glu Thr Lys Pro Ala Pro Thr Tyr
 675 680 685
 Gly Glu Ile Gly Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gly Leu Lys
 690 695 700

[0010]

Arg Ile Thr Lys Phe Ile Tyr Pro Trp Leu Asn Ser Thr Asp Leu Glu
 705 710 715 720
 Asp Ser Ser Asp Asp Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Glu Tyr Ile
 725 730 735
 Pro Glu Gly Ala Arg Asp Gly Ser Pro Gln Pro Leu Leu Lys Ala Gly
 740 745 750
 Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Thr Leu Tyr Gln Asp Leu Val Arg Val
 755 760 765
 Ser Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Tyr Glu Val Pro
 770 775 780
 Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Arg Val Val Leu
 785 790 795 800
 Arg Lys Phe Asp Arg Ile Phe Leu Ala Pro Gly Glu Gln Lys Val Trp
 805 810 815
 Thr Thr Thr Leu Asn Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Glu Ala
 820 825 830
 Gln Asp Trp Val Ile Thr Lys Tyr Pro Lys Lys Val His Val Gly Ser
 835 840 845
 Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Arg Ala Pro Leu Pro Arg Val Tyr
 850 855 860
 <210> 6
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> 棘孢曲霉
 <400> 6
 Met Val Gly Leu Leu Ser Ile Thr Ala Ala Leu Ala Ala Thr Val Leu
 1 5 10 15
 Pro Asn Ile Val Ser Ala Val Gly Leu Asp Gln Ala Ala Val Ala Lys
 20 25 30
 Gly Leu Glu Tyr Phe Gly Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Thr Asp
 35 40 45
 Ile Pro Tyr Val Thr Gln Leu Asn Asn Thr Ala Asp Phe Gly Gln Ile
 50 55 60
 Thr Pro Gly Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly
 65 70 75 80
 Thr Phe Thr Phe Thr Lys Gly Asp Val Ile Ala Asp Leu Ala Glu Gly
 85 90 95
 Asn Gly Gln Tyr Leu Arg Cys His Thr Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Trp Val Thr Ser Gly Thr Trp Thr Asn Ala Thr Leu Thr Ala

[0011]

115	120	125
Ala Leu Lys Asn His Ile Thr Asn Val Val Ser His Tyr Lys Gly Lys 130	135	140
Cys Leu His Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr 145	150	155 160
Tyr Arg Thr Asn Ile Phe Tyr Thr Thr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro 165	170	175
Ile Ala Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asp Ala Lys Leu Phe 180	185	190
Tyr Asn Asp Tyr Asn Leu Glu Tyr Gly Gly Ala Lys Ala Ala Ser Ala 195	200	205
Arg Ala Ile Val Gln Leu Val Lys Asn Ala Gly Ala Lys Ile Asp Gly 210	215	220
Val Gly Leu Gln Ala His Phe Ser Val Gly Thr Val Pro Ser Thr Ser 225	230	235 240
Ser Leu Val Ser Val Leu Gln Ser Phe Thr Ala Leu Gly Val Glu Val 245	250	255
Ala Tyr Thr Glu Ala Asp Val Arg Ile Leu Leu Pro Thr Thr Ala Thr 260	265	270
Thr Leu Ala Gln Gln Ser Ser Asp Phe Gln Ala Leu Val Gln Ser Cys 275	280	285
Val Gln Thr Thr Gly Cys Val Gly Phe Thr Ile Trp Asp Trp Thr Asp 290	295	300
Lys Tyr Ser Trp Val Pro Ser Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Ala Ala Leu 305	310	315 320
Pro Trp Asp Glu Asn Leu Val Lys Lys Pro Ala Tyr Asn Gly Leu Leu 325	330	335
Ala Gly Met Gly Val Thr Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala 340	345	350
Thr Ala Thr Gly Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Ser Thr 355	360	365
Gly Thr Thr Ala Ala His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Leu Asn Trp Ser 370	375	380
Gly Pro Thr Ala Cys Ala Thr Gly Tyr Thr Cys Thr Tyr Val Asn Asp 385	390	395 400
Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu 405		
<210> 7		
<211> 253		

[0012]

<212> PRT
 <213> 埃默森青霉菌
 <400> 7
 Met Leu Ser Ser Thr Thr Arg Thr Leu Ala Phe Thr Gly Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Ser Ala Pro Leu Val Lys Ala His Gly Phe Val Gln Gly Ile
 20 25 30
 Val Ile Gly Asp Gln Phe Tyr Ser Gly Tyr Ile Val Asn Ser Phe Pro
 35 40 45
 Tyr Glu Ser Asn Pro Pro Pro Val Ile Gly Trp Ala Thr Thr Ala Thr
 50 55 60
 Asp Leu Gly Phe Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Gly Pro Asp Ile Ile
 65 70 75 80
 Cys His Arg Asn Ala Thr Pro Ala Pro Leu Thr Ala Pro Val Ala Ala
 85 90 95
 Gly Gly Thr Val Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His
 100 105 110
 Gly Pro Val Ile Thr Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asn Cys Ser Thr
 115 120 125
 Val Asp Lys Thr Thr Leu Glu Phe Phe Lys Ile Asp Gln Gln Gly Leu
 130 135 140
 Ile Asp Asp Thr Ser Pro Pro Gly Thr Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile
 145 150 155 160
 Ala Asn Asn Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Asn Ser Val Ala Pro
 165 170 175
 Gly Asn Tyr Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Asn
 180 185 190
 Asn Lys Asp Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Ile Glu Val
 195 200 205
 Thr Gly Gly Gly Ser Asp Ala Pro Glu Gly Thr Leu Gly Glu Asp Leu
 210 215 220
 Tyr His Asp Thr Asp Pro Gly Ile Leu Val Asp Ile Tyr Glu Pro Ile
 225 230 235 240
 Ala Thr Tyr Thr Ile Pro Gly Pro Pro Glu Pro Thr Phe
 245 250
 <210> 8
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> 烟曲霉
 <400> 8
 Met Val His Leu Ser Ser Leu Ala Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Leu

[0013]

1	5	10	15
Val Tyr Gly Ala Gly Leu Asn Thr Ala Ala Lys Ala Lys Gly Leu Lys	20	25	30
Tyr Phe Gly Ser Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Thr Asp Ser Ala Tyr	35	40	45
Val Ala Gln Leu Ser Asn Thr Asp Asp Phe Gly Gln Ile Thr Pro Gly	50	55	60
Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Asn Ser Phe Ser	65	70	75
Phe Ala Asn Gly Asp Ala Val Val Asn Leu Ala Asn Lys Asn Gly Gln	85	90	95
Leu Met Arg Cys His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Asn Trp	100	105	110
Val Ser Ser Gly Ser Trp Thr Asn Ala Thr Leu Leu Ala Ala Met Lys	115	120	125
Asn His Ile Thr Asn Val Val Thr His Tyr Lys Gly Lys Cys Tyr Ala	130	135	140
Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Glu Asp Gly Thr Phe Arg Asn	145	150	155
Ser Val Phe Tyr Gln Ile Ile Gly Pro Ala Tyr Ile Pro Ile Ala Phe	165	170	175
Ala Thr Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asp Val Lys Leu Tyr Tyr Asn Asp	180	185	190
Tyr Asn Ile Glu Tyr Ser Gly Ala Lys Ala Thr Ala Ala Gln Asn Ile	195	200	205
Val Lys Met Ile Lys Ala Tyr Gly Ala Lys Ile Asp Gly Val Gly Leu	210	215	220
Gln Ala His Phe Ile Val Gly Ser Thr Pro Ser Gln Ser Asp Leu Thr	225	230	235
Thr Val Leu Lys Gly Tyr Thr Ala Leu Gly Val Glu Val Ala Tyr Thr	245	250	255
Glu Leu Asp Ile Arg Met Gln Leu Pro Ser Thr Ala Ala Lys Leu Ala	260	265	270
Gln Gln Ser Thr Asp Phe Gln Gly Val Ala Ala Ala Cys Val Ser Thr	275	280	285
Thr Gly Cys Val Gly Val Thr Ile Trp Asp Trp Thr Asp Lys Tyr Ser	290	295	300
Trp Val Pro Ser Val Phe Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Leu Pro Trp Asp	305	310	315
			320

[0014]

Glu Asn Tyr Val Lys Lys Pro Ala Tyr Asp Gly Leu Met Ala Gly Leu
 325 330 335
 Gly Ala Ser Gly Ser Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr
 340 345 350
 Thr Thr Gly Gly Thr Asp Pro Thr Gly Val Ala Gln Lys Trp Gly Gln
 355 360 365
 Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr
 370 375 380
 Thr Cys Gln Lys Leu Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
 385 390 395
 <210> 9
 <211> 792
 <212> PRT
 <213> 烟曲霉
 <400> 9
 Met Ala Val Ala Lys Ser Ile Ala Ala Val Leu Val Ala Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Leu Ala Gln Ala Asn Thr Ser Tyr Val Asp Tyr Asn Val Glu
 20 25 30
 Ala Asn Pro Asp Leu Thr Pro Gln Ser Val Ala Thr Ile Asp Leu Ser
 35 40 45
 Phe Pro Asp Cys Glu Asn Gly Pro Leu Ser Lys Thr Leu Val Cys Asp
 50 55 60
 Thr Ser Ala Arg Pro His Asp Arg Ala Ala Ala Leu Val Ser Met Phe
 65 70 75 80
 Thr Phe Glu Glu Leu Val Asn Asn Thr Gly Asn Thr Ser Pro Gly Val
 85 90 95
 Pro Arg Leu Gly Leu Pro Pro Tyr Gln Val Trp Ser Glu Ala Leu His
 100 105 110
 Gly Leu Asp Arg Ala Asn Phe Thr Asn Glu Gly Glu Tyr Ser Trp Ala
 115 120 125
 Thr Ser Phe Pro Met Pro Ile Leu Thr Met Ser Ala Leu Asn Arg Thr
 130 135 140
 Leu Ile Asn Gln Ile Ala Thr Ile Ile Ala Thr Gln Gly Arg Ala Phe
 145 150 155 160
 Asn Asn Val Gly Arg Tyr Gly Leu Asp Val Tyr Ala Pro Asn Ile Asn
 165 170 175
 Ala Phe Arg Ser Ala Met Trp Gly Arg Gly Gln Glu Thr Pro Gly Glu
 180 185 190

[0015]

Asp Ala Tyr Cys Leu Ala Ser Ala Tyr Ala Tyr Glu Tyr Ile Thr Gly
 195 200 205
 Ile Gln Gly Gly Val Asp Pro Glu His Leu Lys Leu Val Ala Thr Ala
 210 215 220
 Lys His Tyr Ala Gly Tyr Asp Leu Glu Asn Trp Asp Gly His Ser Arg
 225 230 235 240
 Leu Gly Asn Asp Met Asn Ile Thr Gln Gln Glu Leu Ser Glu Tyr Tyr
 245 250 255
 Thr Pro Gln Phe Leu Val Ala Ala Arg Asp Ala Lys Val His Ser Val
 260 265 270
 Met Cys Ser Tyr Asn Ala Val Asn Gly Val Pro Ser Cys Ala Asn Ser
 275 280 285
 Phe Phe Leu Gln Thr Leu Leu Arg Asp Thr Phe Gly Phe Val Glu Asp
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Ser Asp Cys Asp Ser Ala Tyr Asn Val Trp Asn Pro
 305 310 315 320
 His Glu Phe Ala Ala Asn Ile Thr Gly Ala Ala Ala Asp Ser Ile Arg
 325 330 335
 Ala Gly Thr Asp Ile Asp Cys Gly Thr Thr Tyr Gln Tyr Tyr Phe Gly
 340 345 350
 Glu Ala Phe Asp Glu Gln Glu Val Thr Arg Ala Glu Ile Glu Arg Gly
 355 360 365
 Val Ile Arg Leu Tyr Ser Asn Leu Val Arg Leu Gly Tyr Phe Asp Gly
 370 375 380
 Asn Gly Ser Val Tyr Arg Asp Leu Thr Trp Asn Asp Val Val Thr Thr
 385 390 395 400
 Asp Ala Trp Asn Ile Ser Tyr Glu Ala Ala Val Glu Gly Ile Val Leu
 405 410 415
 Leu Lys Asn Asp Gly Thr Leu Pro Leu Ala Lys Ser Val Arg Ser Val
 420 425 430
 Ala Leu Ile Gly Pro Trp Met Asn Val Thr Thr Gln Leu Gln Gly Asn
 435 440 445
 Tyr Phe Gly Pro Ala Pro Tyr Leu Ile Ser Pro Leu Asn Ala Phe Gln
 450 455 460
 Asn Ser Asp Phe Asp Val Asn Tyr Ala Phe Gly Thr Asn Ile Ser Ser
 465 470 475 480
 His Ser Thr Asp Gly Phe Ser Glu Ala Leu Ser Ala Ala Lys Lys Ser
 485 490 495
 Asp Val Ile Ile Phe Ala Gly Gly Ile Asp Asn Thr Leu Glu Ala Glu

[0016]

500	505	510
Ala Met Asp Arg Met Asn Ile Thr Trp Pro Gly Asn Gln Leu Gln Leu 515	520	525
Ile Asp Gln Leu Ser Gln Leu Gly Lys Pro Leu Ile Val Leu Gln Met 530	535	540
Gly Gly Gly Gln Val Asp Ser Ser Ser Leu Lys Ser Asn Lys Asn Val 545	550	555
Asn Ser Leu Ile Trp Gly Gly Tyr Pro Gly Gln Ser Gly Gly Gln Ala 565	570	575
Leu Leu Asp Ile Ile Thr Gly Lys Arg Ala Pro Ala Gly Arg Leu Val 580	585	590
Val Thr Gln Tyr Pro Ala Glu Tyr Ala Thr Gln Phe Pro Ala Thr Asp 595	600	605
Met Ser Leu Arg Pro His Gly Asn Asn Pro Gly Gln Thr Tyr Met Trp 610	615	620
Tyr Thr Gly Thr Pro Val Tyr Glu Phe Gly His Gly Leu Phe Tyr Thr 625	630	635
Thr Phe His Ala Ser Leu Pro Gly Thr Gly Lys Asp Lys Thr Ser Phe 645	650	655
Asn Ile Gln Asp Leu Leu Thr Gln Pro His Pro Gly Phe Ala Asn Val 660	665	670
Glu Gln Met Pro Leu Leu Asn Phe Thr Val Thr Ile Thr Asn Thr Gly 675	680	685
Lys Val Ala Ser Asp Tyr Thr Ala Met Leu Phe Ala Asn Thr Thr Ala 690	695	700
Gly Pro Ala Pro Tyr Pro Asn Lys Trp Leu Val Gly Phe Asp Arg Leu 705	710	715
Ala Ser Leu Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Met Thr Ile Pro Val Thr 725	730	735
Ile Asp Ser Val Ala Arg Thr Asp Glu Ala Gly Asn Arg Val Leu Tyr 740	745	750
Pro Gly Lys Tyr Glu Leu Ala Leu Asn Asn Glu Arg Ser Val Val Leu 755	760	765
Gln Phe Val Leu Thr Gly Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Trp Pro Val 770	775	780
Glu Gln Gln Gln Ile Ser Ser Ala 785	790	
<210> 10		
<211> 532		

[0017]

<212> PRT
 <213> 烟曲霉
 <400> 10
 Met Leu Ala Ser Thr Phe Ser Tyr Arg Met Tyr Lys Thr Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Leu Leu Gly Ser Gly Gln Ala Gln Gln Val Gly Thr Ser
 20 25 30
 Gln Ala Glu Val His Pro Ser Met Thr Trp Gln Ser Cys Thr Ala Gly
 35 40 45
 Gly Ser Cys Thr Thr Asn Asn Gly Lys Val Val Ile Asp Ala Asn Trp
 50 55 60
 Arg Trp Val His Lys Val Gly Asp Tyr Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn
 65 70 75 80
 Thr Trp Asp Thr Thr Ile Cys Pro Asp Asp Ala Thr Cys Ala Ser Asn
 85 90 95
 Cys Ala Leu Glu Gly Ala Asn Tyr Glu Ser Thr Tyr Gly Val Thr Ala
 100 105 110
 Ser Gly Asn Ser Leu Arg Leu Asn Phe Val Thr Thr Ser Gln Gln Lys
 115 120 125
 Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Met Met Lys Asp Asp Ser Thr Tyr Glu
 130 135 140
 Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Val Ser
 145 150 155 160
 Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ala Met Asp
 165 170 175
 Ala Asp Gly Gly Met Ser Lys Tyr Pro Thr Asn Lys Ala Gly Ala Lys
 180 185 190
 Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe
 195 200 205
 Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp Gln Pro Ser Ser Asn Asp
 210 215 220
 Ala Asn Ala Gly Thr Gly Asn His Gly Ser Cys Cys Ala Glu Met Asp
 225 230 235 240
 Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala Phe Thr Pro His Pro Cys
 245 250 255
 Asp Thr Pro Gly Gln Val Met Cys Thr Gly Asp Ala Cys Gly Gly Thr
 260 265 270
 Tyr Ser Ser Asp Arg Tyr Gly Gly Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp
 275 280 285

[0018]

Phe Asn Ser Phe Arg Gln Gly Asn Lys Thr Phe Tyr Gly Pro Gly Met
 290 295 300
 Thr Val Asp Thr Lys Ser Lys Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Ile Thr
 305 310 315 320
 Asp Asp Gly Thr Ser Ser Gly Thr Leu Lys Glu Ile Lys Arg Phe Tyr
 325 330 335
 Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Asn Ser Glu Ser Thr Trp Thr Gly
 340 345 350
 Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu Tyr Cys Thr Ala Gln Lys Ser
 355 360 365
 Leu Phe Gln Asp Gln Asn Val Phe Glu Lys His Gly Gly Leu Glu Gly
 370 375 380
 Met Gly Ala Ala Leu Ala Gln Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp
 385 390 395 400
 Asp Asp His Ser Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Asn Tyr Pro Thr
 405 410 415
 Thr Ala Ser Ser Thr Thr Pro Gly Val Ala Arg Gly Thr Cys Asp Ile
 420 425 430
 Ser Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ala Asn His Pro Asp Ala Tyr
 435 440 445
 Val Val Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly Pro Ile Gly Ser Thr Phe Asn
 450 455 460
 Ser Gly Gly Ser Asn Pro Gly Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 465 470 475 480
 Gln Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Gly Asn Pro Gly Gly Thr Gly
 485 490 495
 Val Ala Gln His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro
 500 505 510
 Thr Thr Cys Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Lys Leu Asn Asp Tyr Tyr
 515 520 525
 Ser Gln Cys Leu
 530
 <210> 11
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 烟曲霉
 <400> 11
 Met Lys His Leu Ala Ser Ser Ile Ala Leu Thr Leu Leu Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 Val Gln Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp
 20 25 30

[0019]

```

Ser Gly Pro Thr Ser Cys Val Ala Gly Ala Ala Cys Ser Thr Leu Asn
  35              40              45

Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Ala Thr Ser Thr Thr
  50              55              60

Leu Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ser Gln Thr Thr Thr Lys
  65              70              75              80

Pro Thr Thr Thr Gly Pro Thr Thr Ser Ala Pro Thr Val Thr Ala Ser
              85              90              95

Gly Asn Pro Phe Ser Gly Tyr Gln Leu Tyr Ala Asn Pro Tyr Tyr Ser
  100              105              110

Ser Glu Val His Thr Leu Ala Met Pro Ser Leu Pro Ser Ser Leu Gln
  115              120              125

Pro Lys Ala Ser Ala Val Ala Glu Val Pro Ser Phe Val Trp Leu Asp
  130              135              140

Val Ala Ala Lys Val Pro Thr Met Gly Thr Tyr Leu Ala Asp Ile Gln
  145              150              155              160

Ala Lys Asn Lys Ala Gly Ala Asn Pro Pro Ile Ala Gly Ile Phe Val
  165              170              175

Val Tyr Asp Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ala Ala Leu Ala Ser Asn Gly
  180              185              190

Glu Tyr Ser Ile Ala Asn Asn Gly Val Ala Asn Tyr Lys Ala Tyr Ile
  195              200              205

Asp Ala Ile Arg Ala Gln Leu Val Lys Tyr Ser Asp Val His Thr Ile
  210              215              220

Leu Val Ile Glu Pro Asp Ser Leu Ala Asn Leu Val Thr Asn Leu Asn
  225              230              235              240

Val Ala Lys Cys Ala Asn Ala Gln Ser Ala Tyr Leu Glu Cys Val Asp
  245              250              255

Tyr Ala Leu Lys Gln Leu Asn Leu Pro Asn Val Ala Met Tyr Leu Asp
  260              265              270

Ala Gly His Ala Gly Trp Leu Gly Trp Pro Ala Asn Leu Gly Pro Ala
  275              280              285

Ala Thr Leu Phe Ala Lys Val Tyr Thr Asp Ala Gly Ser Pro Ala Ala
  290              295              300

Val Arg Gly Leu Ala Thr Asn Val Ala Asn Tyr Asn Ala Trp Ser Leu
  305              310              315              320

Ser Thr Cys Pro Ser Tyr Thr Gln Gly Asp Pro Asn Cys Asp Glu Lys
  325              330              335

```

[0020]

Lys Tyr Ile Asn Ala Met Ala Pro Leu Leu Lys Glu Ala Gly Phe Asp
 340 345 350
 Ala His Phe Ile Met Asp Thr Ser Arg Asn Gly Val Gln Pro Thr Lys
 355 360 365
 Gln Asn Ala Trp Gly Asp Trp Cys Asn Val Ile Gly Thr Gly Phe Gly
 370 375 380
 Val Arg Pro Ser Thr Asn Thr Gly Asp Pro Leu Gln Asp Ala Phe Val
 385 390 395 400
 Trp Ile Lys Pro Gly Gly Glu Ser Asp Gly Thr Ser Asn Ser Thr Ser
 405 410 415
 Pro Arg Tyr Asp Ala His Cys Gly Tyr Ser Asp Ala Leu Gln Pro Ala
 420 425 430
 Pro Glu Ala Gly Thr Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu Thr
 435 440 445
 Asn Ala Asn Pro Ser Phe
 450
 <210> 12
 <211> 620
 <212> PRT
 <213> 嗜热毁丝霉
 <400> 12
 Met Lys Ser Phe Ile Ser Ala Ala Thr Leu Leu Val Gly Ile Leu Thr
 1 5 10 15
 Pro Ser Val Ala Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Glu Gln Arg Asp Leu
 20 25 30
 Leu Val Pro Ile Thr Glu Arg Glu Glu Ala Ala Val Lys Ala Arg Gln
 35 40 45
 Gln Ser Cys Asn Thr Pro Ser Asn Arg Ala Cys Trp Thr Asp Gly Tyr
 50 55 60
 Asp Ile Asn Thr Asp Tyr Glu Val Asp Ser Pro Asp Thr Gly Val Val
 65 70 75 80
 Arg Pro Tyr Thr Leu Thr Leu Thr Glu Val Asp Asn Trp Thr Gly Pro
 85 90 95
 Asp Gly Val Val Lys Glu Lys Val Met Leu Val Asn Asn Ser Ile Ile
 100 105 110
 Gly Pro Thr Ile Phe Ala Asp Trp Gly Asp Thr Ile Gln Val Thr Val
 115 120 125
 Ile Asn Asn Leu Glu Thr Asn Gly Thr Ser Ile His Trp His Gly Leu
 130 135 140
 His Gln Lys Gly Thr Asn Leu His Asp Gly Ala Asn Gly Ile Thr Glu

[0021]

145	150	155	160
Cys Pro Ile Pro Pro Lys Gly Gly Arg Lys Val Tyr Arg Phe Lys Ala	165	170	175
Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Trp Tyr His Ser His Phe Ser Ala Gln Tyr	180	185	190
Gly Asn Gly Val Val Gly Ala Ile Gln Ile Asn Gly Pro Ala Ser Leu	195	200	205
Pro Tyr Asp Thr Asp Leu Gly Val Phe Pro Ile Ser Asp Tyr Tyr Tyr	210	215	220
Ser Ser Ala Asp Glu Leu Val Glu Leu Thr Lys Asn Ser Gly Ala Pro	225	230	235
Phe Ser Asp Asn Val Leu Phe Asn Gly Thr Ala Lys His Pro Glu Thr	245	250	255
Gly Glu Gly Glu Tyr Ala Asn Val Thr Leu Thr Pro Gly Arg Arg His	260	265	270
Arg Leu Arg Leu Ile Asn Thr Ser Val Glu Asn His Phe Gln Val Ser	275	280	285
Leu Val Asn His Thr Met Cys Ile Ile Ala Ala Asp Met Val Pro Val	290	295	300
Asn Ala Met Thr Val Asp Ser Leu Phe Leu Gly Val Gly Gln Arg Tyr	305	310	315
Asp Val Val Ile Glu Ala Asn Arg Thr Pro Gly Asn Tyr Trp Phe Asn	325	330	335
Val Thr Phe Gly Gly Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Arg Asn Pro Tyr	340	345	350
Pro Ala Ala Ile Phe His Tyr Ala Gly Ala Pro Gly Gly Pro Pro Thr	355	360	365
Asp Glu Gly Lys Ala Pro Val Asp His Asn Cys Leu Asp Leu Pro Asn	370	375	380
Leu Lys Pro Val Val Ala Arg Asp Val Pro Leu Ser Gly Phe Ala Lys	385	390	395
Arg Ala Asp Asn Thr Leu Asp Val Thr Leu Asp Thr Thr Gly Thr Pro	405	410	415
Leu Phe Val Trp Lys Val Asn Gly Ser Ala Ile Asn Ile Asp Trp Gly	420	425	430
Arg Ala Val Val Asp Tyr Val Leu Thr Gln Asn Thr Ser Phe Pro Pro	435	440	445
Gly Tyr Asn Ile Val Glu Val Asn Gly Ala Asp Gln Trp Ser Tyr Trp	450	455	460

[0022]

Leu Ile Glu Asn Asp Pro Gly Ala Pro Phe Thr Leu Pro His Pro Met
 465 470 475 480
 His Leu His Gly His Asp Phe Tyr Val Leu Gly Arg Ser Pro Asp Glu
 485 490 495
 Ser Pro Ala Ser Asn Glu Arg His Val Phe Asp Pro Ala Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Leu Leu Ser Gly Ala Asn Pro Val Arg Arg Asp Val Ser Met Leu
 515 520 525
 Pro Ala Phe Gly Trp Val Val Leu Ser Phe Arg Ala Asp Asn Pro Gly
 530 535 540
 Ala Trp Leu Phe His Cys His Ile Ala Trp His Val Ser Gly Gly Leu
 545 550 555 560
 Gly Val Val Tyr Leu Glu Arg Ala Asp Asp Leu Arg Gly Ala Val Ser
 565 570 575
 Asp Ala Asp Ala Asp Asp Leu Asp Arg Leu Cys Ala Asp Trp Arg Arg
 580 585 590
 Tyr Trp Pro Thr Asn Pro Tyr Pro Lys Ser Asp Ser Gly Leu Lys His
 595 600 605
 Arg Trp Val Glu Glu Gly Glu Trp Leu Val Lys Ala
 610 615 620
 <210> 13
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉
 <220>
 <221> 信号
 <222> (1).. (18)
 <220>
 <221> 成熟肽
 <222> (19).. (640)
 <400> 13
 Met Ser Phe Arg Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gly Leu Val Cys Thr Gly
 -15 -10 -5
 Leu Ala Asn Val Ile Ser Lys Arg Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser
 -1 1 5 10
 Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala
 15 20 25 30
 Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser
 35 40 45
 Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser
 50 55 60

[0023]

Gly	Leu	Val	Leu	Lys	Thr	Leu	Val	Asp	Leu	Phe	Arg	Asn	Gly	Asp	Thr	65	70	75
Ser	Leu	Leu	Ser	Thr	Ile	Glu	Asn	Tyr	Ile	Ser	Ala	Gln	Ala	Ile	Val	80	85	90
Gln	Gly	Ile	Ser	Asn	Pro	Ser	Gly	Asp	Leu	Ser	Ser	Gly	Ala	Gly	Leu	95	100	105
Gly	Glu	Pro	Lys	Phe	Asn	Val	Asp	Glu	Thr	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ser	Trp	115	120	125
Gly	Arg	Pro	Gln	Arg	Asp	Gly	Pro	Ala	Leu	Arg	Ala	Thr	Ala	Met	Ile	130	135	140
Gly	Phe	Gly	Gln	Trp	Leu	Leu	Asp	Asn	Gly	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	145	150	155
Asp	Ile	Val	Trp	Pro	Leu	Val	Arg	Asn	Asp	Leu	Ser	Tyr	Val	Ala	Gln	160	165	170
Tyr	Trp	Asn	Gln	Thr	Gly	Tyr	Asp	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	175	180	185
Ser	Phe	Phe	Thr	Ile	Ala	Val	Gln	His	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	195	200	205
Ala	Phe	Ala	Thr	Ala	Val	Gly	Ser	Ser	Cys	Ser	Trp	Cys	Asp	Ser	Gln	210	215	220
Ala	Pro	Glu	Ile	Leu	Cys	Tyr	Leu	Gln	Ser	Phe	Trp	Thr	Gly	Ser	Phe	225	230	235
Ile	Leu	Ala	Asn	Phe	Asp	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly	Lys	Asp	Ala	Asn	Thr	240	245	250
Leu	Leu	Gly	Ser	Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Cys	Asp	Asp	255	260	265
Ser	Thr	Phe	Gln	Pro	Cys	Ser	Pro	Arg	Ala	Leu	Ala	Asn	His	Lys	Glu	275	280	285
Val	Val	Asp	Ser	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asp	Gly	Leu	Ser	290	295	300
Asp	Ser	Glu	Ala	Val	Ala	Val	Gly	Arg	Tyr	Pro	Glu	Asp	Thr	Tyr	Tyr	305	310	315
Asn	Gly	Asn	Pro	Trp	Phe	Leu	Cys	Thr	Leu	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Leu	320	325	330
Tyr	Asp	Ala	Leu	Tyr	Gln	Trp	Asp	Lys	Gln	Gly	Ser	Leu	Glu	Val	Thr	335	340	345
Asp	Val	Ser	Leu	Asp	Phe	Phe	Lys	Ala	Leu	Tyr	Ser	Asp	Ala	Ala	Thr	355	360	365

[0024]

Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala	370	375	380
Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala	385	390	395
Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu	400	405	410
Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr	415	420	425
Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr	435	440	445
Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly	450	455	460
Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr	465	470	475
Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr	480	485	490
Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Ser Thr	495	500	505
Ser Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp	515	520	525
Leu Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser	530	535	540
Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser	545	550	555
Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr	560	565	570
Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser	575	580	585
Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val	595	600	605
Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg	610	615	620

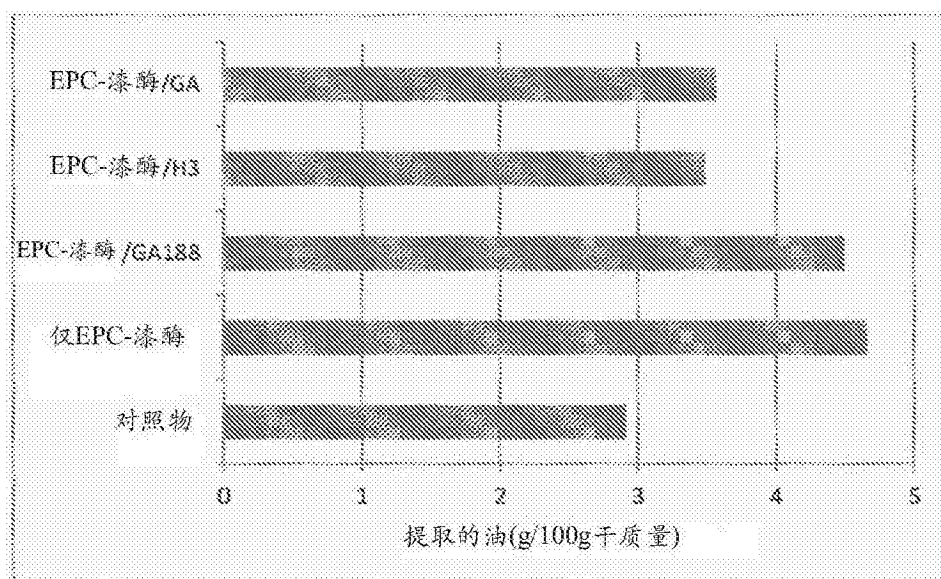


图 1

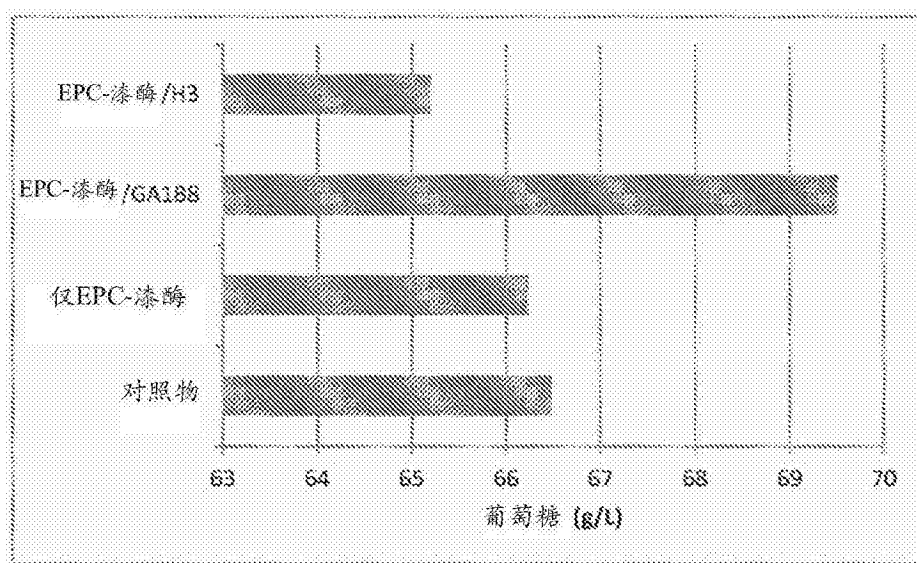


图 2

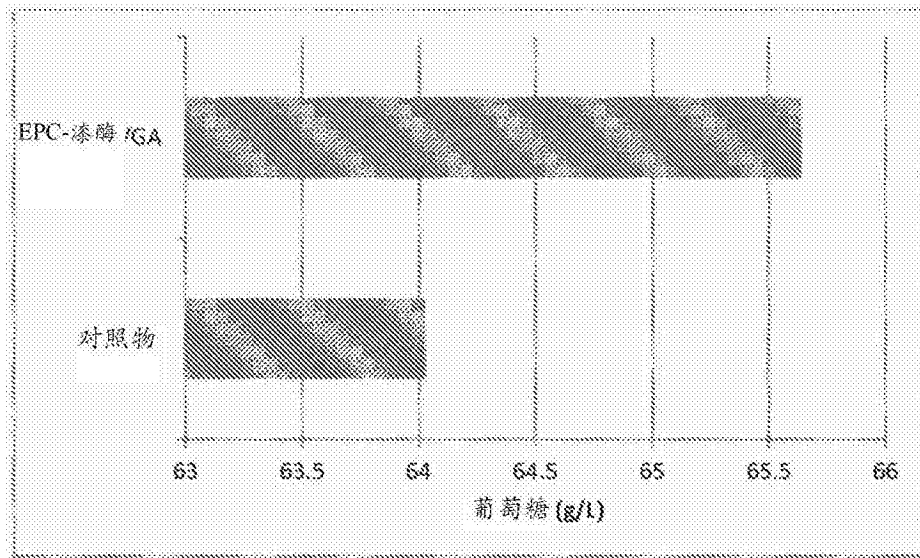


图 3