

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03805102.8

[51] Int. Cl.

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 12 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100564534C

[22] 申请日 2003.2.6 [21] 申请号 03805102.8

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 8 [33] US [31] 60/355,180

[86] 国际申请 PCT/US2003/003670 2003.2.6

[87] 国际公布 WO2003/066826 英 2003.8.14

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.2

[73] 专利权人 金克克国际有限公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 O·J·小兰特罗

[56] 参考文献

CA1143677A 1983.3.29

CN1069768A 1993.3.10

CN1065487A 1992.10.21

CN87103681A 1987.12.9

审查员 汪建斌

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 程 泳

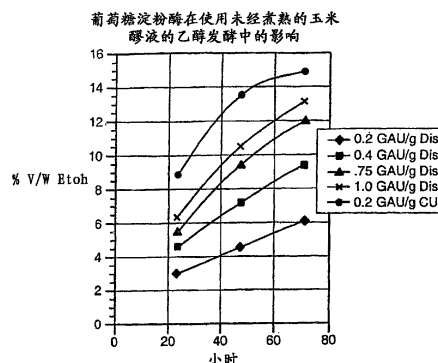
权利要求书 2 页 说明书 46 页 附图 7 页

[54] 发明名称

以碳底物生产乙醇的方法

[57] 摘要

本发明提供通过以生物质为基础的原料底物的体外和/或体内生物转化而生产目的终产物的方法，这些底物包括(但不限于)这些材料，如淀粉和纤维素。在特别优选的实施方案中，本发明的方法无需底物的胶凝化和/或液化。在特别优选的实施方案中，本发明提供生产乙醇的方法。



1. 生产乙醇终产物的方法，包括步骤：将包含颗粒淀粉的以植物为基础的底物与具有颗粒淀粉水解活性的淀粉水解酶接触，以产生包含葡萄糖的中间物，并且在同一反应容器中，将所述中间物与能将所述中间物生物转化为乙醇的产生乙醇的微生物接触，其中所述葡萄糖的转化速率足以保持浓度低于 0.25%，并且其中生成的乙醇量至少为 10% v/v。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述淀粉水解酶在 72 小时内将至少 50% 的所述淀粉转变为所述中间物。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述淀粉水解酶在 72 小时内将至少 90% 的所述淀粉转变为所述中间物。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述葡萄糖的转化速率足以保持浓度低于 0.10%。

5. 权利要求 1 的方法，进一步包括回收乙醇。

6. 权利要求 1 的方法，其中生成的乙醇量至少为 15% v/v。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述淀粉水解酶以无细胞抽提物的形式提供。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述淀粉水解酶来源于与产生乙醇的微生物不同种的微生物。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述含有颗粒淀粉的以植物为基础的底物得自玉米、小麦、大麦、买罗高粱、黑麦、大米及其组合。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述以植物为基础的底物得自玉米。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述以植物为基础的底物是玉米固体。

12. 权利要求 1 的方法，其中所述以植物为基础的底物以浆状物的形式使用，所述浆状物中淀粉的百分比在大约 10% 至 35% 之间。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述接触步骤在 pH 4.0-6.0 进行。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述接触步骤在 25-35℃ 的温度下进行。

15. 权利要求 1 的方法, 其中具有颗粒淀粉水解活性的所述淀粉水解酶为葡糖淀粉酶。

16. 权利要求 15 的方法, 其中所述葡糖淀粉酶得自曲霉属、根霉属或腐质霉属微生物。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述葡糖淀粉酶得自根霉属。

18. 权利要求 16 的方法, 其中所述葡糖淀粉酶得自腐质霉属。

19. 权利要求 1 的方法, 进一步包括使所述以植物为基础的底物在同一反应容器中与其它的酶接触, 所述其它的酶选自葡糖淀粉酶、 α 淀粉酶、蛋白酶、支链淀粉酶及其组合。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述其它的酶是 α 淀粉酶。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所述 α 淀粉酶得自芽孢杆菌。

22. 权利要求 20 的方法, 其中所述 α 淀粉酶得自曲霉属。

23. 权利要求 19 的方法, 其中所述其它的酶是得自曲霉属菌株的葡糖淀粉酶。

24. 权利要求 1 的方法, 其中所述产生乙醇的微生物是酵母。

以碳底物生产乙醇的方法

发明领域

本发明提供通过以生物质为基础的原料底物的体外和/或体内生物转化而生产目的终产物的方法，这些底物包括（但不限于）这些材料，如淀粉和纤维素。在特别优选的实施方案中，本发明的方法无需底物的胶凝化和/或液化。在特别优选的实施方案中，本发明提供生产乙醇的方法。

发明背景

工业发酵主要使用葡萄糖作为生产蛋白质、酶和化学物质的原料。这些发酵通常采用分批式、补料分批式或连续式，并在限制底物和产生最少副产物的条件下进行。本领域的人员知道，在发酵过程中有一些关键操作条件必须加以控制，以便获得优化的发酵时间、得率和效率。

葡萄糖是一种天然的以碳为基础的化合物，它被大量用于化学和生物的合成中作为起始底物。然而，含有葡萄糖纯度水平高于90%的糖浆相对昂贵。另外，高葡萄糖浓度的存在增加了发酵系统对微生物污染的敏感性，因此为生产效率带来了反作用。另一个不利条件则是，即使当发酵缸里的葡萄糖浓度处于较低到中等水平时，也会产生不利于葡萄糖转化为目的终产物的效果，例如对酶的抑制和/或代谢物阻遏，和/或微生物的生长。结果，已经进行了各种各样的尝试来降低工业发酵的成本，特别是利用比葡萄糖更廉价的底物。然而，尽管发展了许多方法，仍然需要用于发酵的既经济又有效利用的底物。事实上，本领域大大需要有能够利用比葡萄糖更廉价的起始底物进行更为有效生产目的终产物的方法。

发明概述

本发明提供通过以生物质为基础的原料底物的体外和/或体内生物转化而生产目的终产物的方法，这些底物包括（但不限于）这些材料，如淀粉和纤维素。在特别优选的实施方案中，本发明的方法无需底物的胶凝化和/或液化。在特别优选的实施方案中，本发明提供生产乙醇的方法。在一些特别优选的实施方案中，本发明提供直接从颗粒淀粉生产乙醇的方法，其中涉及改变的代谢物阻遏。

在一些实施方案中，本发明提供生产乙醇的方法，其中转化培养基的葡萄糖浓度保持在低浓度水平，最好是低于引发代谢物阻遏和/或酶抑制的阈值，因此能够通过避免酶将淀粉转化成乙醇的过程中的葡萄糖的代谢物阻遏和/或酶抑制效果，而提高方法的效率。

在附加的实施方案中，本发明提供生产乙醇的方法，包括步骤：将至少一种碳底物与至少一种底物转化酶相接触以产生至少一种中间物，然后在反应容器中将至少一种中间物与至少一种中间物转化酶相接触，其中至少一种中间物被中间物转化酶基本完全生物转化为终产物。在一些优选的实施方案中，使用微生物来完成此生物转化。通过保持中间物在转化培养基中的低浓度，中间物的代谢物阻遏和/或酶抑制效果被改变了（如被降低了）。本发明提供各种水平的中间物浓度、底物、中间物和将中间物转化为乙醇的步骤。

本发明提供生产醇为终产物的方法，包括步骤：将碳底物与至少一种底物转化酶相接触以产生中间物，将中间物与至少一种中间物转化酶相接触，其中中间物被中间物转化酶基本完全转化为醇。在一些优选的实施方案中，中间物转化酶是微生物酶。在可选的优选实施方案中，转化中间物的微生物酶的产生是通过微生物与中间物的接触。在进一步的实施方案中，底物转化酶是微生物酶。在一些优选的实施方案中，底物转化微生物酶的产生是通过微生物与底物的接触。还在其它优选的实施方案中，中间物转化酶和底物转化酶都是同种微生物产生的。在替代的实施方案中，中间物转化酶和底物转化酶由不同种微生物产生。还在进一步的实施方案中，在将中间物转化为终产物的

过程中，中间物的浓度水平保持在低于引发代谢物阻遏效果的水平。在附加的实施方案中，在将中间物转化为终产物的过程中，中间物的浓度保持在低于引发酶抑制效果的水平。在一些优选的实施方案中，中间物转化为终产物的速率足以保持其浓度低于 0.25 %。而在另一些实施方案中，底物选自生物质和淀粉。在一些优选的实施方案中，生物质包括玉米固体。在一些特别优选的实施方案中，中间物选自己糖和戊糖。在一些实施方案中，己糖是葡萄糖。在一些实施方案中，底物在被用于本发明之前要先经过煮，而在另一些实施方案中，底物在被用于本发明之前不经过煮。

还在另一些的实施方案中，将底物与底物转化酶相接触的步骤进一步包括生物转化底物以产生中间物。在最优选的实施方案中，醇终产物是乙醇。还在进一步的实施方案中，将底物与至少一种底物转化酶相接触的步骤进一步包括：提供一定数量的底物转化酶，其浓度使得产生的中间物浓度小于或等于被至少一种中间物转化酶所转变的中间物的数量。在一些附加的实施方案中，至少一种底物转化酶在 72 小时内将至少 50 % 的底物转变为中间物，而在另一些实施方案中，至少一种底物转化酶在 72 小时内将至少 90 % 的底物转变为中间物，在一些优选的实施方案中，至少一种底物转化酶在 72 小时内将至少 95 % 的底物转变为中间物。还在进一步的实施方案中，至少一种底物转化酶和至少一种中间物转化酶得自选自根霉和曲霉的微生物。在附加的一些实施方案中，底物转化酶和中间物转化酶以无细胞抽提物的形式提供。在一些优选的实施方案中，接触步骤发生在反应容器内，包括（但不限于）缸、瓶、烧瓶、袋子、生物反应器、以及任何其它适合操作本发明方法的容器。

本发明进一步提供生产醇为终产物的方法，包括步骤：将碳底物与至少一种底物转化酶相接触，产生中间物，将此中间物与至少一种中间物转化酶相接触，其中中间物被中间物转化酶基本完全转化为醇类终产物，并且其中终产物的出现并不抑制醇类终产物的进一步产生。在一些优选的实施方案中，中间物转化酶是微生物酶。在另选的优选

实施方案中，转化中间物的微生物酶是通过微生物与该中间物的接触而分泌的。在进一步优选的实施方案中，底物转化酶是微生物酶。还在进一步的实施方案中，底物转化微生物酶是通过微生物与底物相接触分泌的。在一些实施方案中，中间物转化酶和底物转化酶是由同种微生物产生的。而在另一些实施方案中，中间物转化酶和底物转化酶是由不同种微生物产生的。而在另一些实施方案中，底物选自生物质和淀粉。在一些优选的实施方案中，生物质包含玉米固体。在一些特别优选的实施方案中，中间物选自己糖和戊糖。在一些实施方案中，己糖是葡萄糖。在一些实施方案中，底物在被用于本发明之前先要经过煮，而在另一些实施方案中，底物在被用于本发明之前不经过煮。在一些特别优选的实施方案中，醇类终产物是乙醇。还在进一步的实施方案中，将底物与至少一种底物转化酶相接触的步骤进一步包括：提供一定数量的底物转化酶，其浓度使得产生的中间物浓度小于或等于被至少一种中间物转化酶所转变的中间物的量。在一些附加的实施方案中，至少一种底物转化酶在 72 小时内将至少 50 % 的底物转变为中间物，而在另一些实施方案中，至少一种底物转化酶在 72 小时内将至少 90 % 的底物转变为中间物，在一些优选的实施方案中，至少一种底物转化酶在 72 小时内将至少 95 % 的底物转变为中间物。还在进一步的实施方案中，至少一种底物转化酶和至少一种中间物转化酶得自选自根霉和曲霉的微生物。在附加的一些实施方案中，底物转化酶和中间物转化酶以无细胞抽提物的形式提供。在一些优选的实施方案中，接触步骤发生在反应容器内，包括（但不限于）缸、瓶、烧瓶、袋子、生物反应器、以及任何其它适合操作本发明方法的容器。

本发明进一步提供生产醇类终产物的方法，包括步骤：将碳底物与至少一种底物转化酶相接触，产生中间物，将此中间物与至少一种中间物转化酶相接触，其中中间物被中间物转化酶基本完全转化为醇类终产物，并且其中底物的出现并不抑制醇类终产物的进一步产生。在一些优选的实施方案中，中间物转化酶是微生物酶。在可选的优选实施方案中，转化中间物的微生物酶是通过微生物与该中间物的接触

而分泌的。在进一步优选的实施方案中，底物转化酶是微生物酶。还在进一步的实施方案中，底物转化微生物酶是通过微生物与底物相接触而分泌的。在一些实施方案中，中间物转化酶和底物转化酶是由同种微生物产生的。而在另一些实施方案中，中间物转化酶和该底物转化酶是由不同种微生物产生的。而在另一些实施方案中，底物选自生物质和淀粉。在一些优选的实施方案中，生物质包含玉米固体。在一些特别优选的实施方案中，中间物选自己糖和戊糖。在一些实施方案中，己糖是葡萄糖。在一些实施方案中，底物在被用于本发明之前要先被煮，而在另一些实施方案中，底物在被用于本发明之前不被煮。在一些特别优选的实施方案中，醇类终产物是乙醇。还在进一步的实施方案中，将底物与至少一种底物转化酶相接触的步骤进一步包括：提供一定数量的底物转化酶，其浓度使得产生的中间物浓度小于或等于被至少一种中间物转化酶所转变的中间物的量。在一些附加的实施方案中，至少一种底物转化酶在 72 小时内将至少 50 % 的底物转变为中间物，而在另一些实施方案中，至少一种底物转化酶在 72 小时内将至少 90 % 的底物转变为中间物，在一些优选的实施方案中，至少一种底物转化酶在 72 小时内将至少 95 % 的底物转变为中间物。还在进一步的实施方案中，至少一种底物转化酶和至少一种中间物转化酶得自选自根霉和曲霉的微生物。在附加的一些实施方案中，底物转化酶和中间物转化酶以无细胞抽提物的形式提供。在一些优选的实施方案中，接触步骤发生在反应容器内，包括（但不限于）缸、瓶、烧瓶、袋子、生物反应器、以及任何其它适合操作本发明方法的容器。

附图简述

图 1 提供图表表示实施例 1 中描述实验的乙醇结果。

图 2 图表 A、B 和 C 提供图示表示使用 M1 (图 A)，CU (图 B) 和 M1 以及 DISTILLASE® (图 C) 的来自未经煮过的玉米粉发酵的乙醇结果。

图 3 图表 A、B 和 C 提供图示表示实施例 3 中描述实验的乙醇结

果。

图 4 表示乙醇对以两种醪液(mash)类型加入的釜馏物 (Stillage) 的数量的反应。

图 5 表示实施列 4 所描述的发酵 72 小时之后的葡萄糖曲线。

图 6 表示经 72 小时发酵之后的二糖和所加的釜馏物的曲线(见实施例 4)。

图 7 表示更高级糖的水平 (即高于二糖的寡聚糖) (见实施例 4)。

图 8 表示经 72 小时发酵之后的乳酸水平 (见实施例 4)。

图 9 总结 72 小时发酵之后的甘油水平 (见实施例 4)。

发明描述

本发明提供体外和/或体内生物转化以生物质为基础的原料底物成为目的终产物的生产方法, 这些底物包括 (但不限于) 淀粉和纤维素之类的材料。在特别优选的实施方案中, 本发明方法无需底物的胶凝化和/或液化。在特别优选的实施方案中, 本发明提供生产乙醇的方法。在一些特别优选的实施方案中, 本发明提供了直接从颗粒淀粉生产乙醇的方式, 其中涉及代谢物阻遏的改变。

特别是, 本发明提供生产乙醇的方式具有改变的代谢物阻遏和酶抑制水平的特征, 因此增加了方法的效率。本发明的方法包括步骤: 将碳底物与底物转化酶相接触以产生中间物, 然后在反应容器中将中间物与中间物产生酶相接触, 其中中间物被生产目的产物的微生物基本完全生物转化。通过保持中间物在转化培养基中的低浓度, 此过程中中间物的代谢物阻遏和/或酶抑制效果被改变了。

本发明也提供使用淀粉或生物质和水解酶将淀粉或纤维素转变为葡萄糖的方法。另外, 本发明提供以一定速率供给底物的方法, 使得淀粉转化为葡萄糖的速率与各发酵产物形成所需要的葡萄糖原料供给速率相匹配。因此本发明提供关键的限制葡萄糖的发酵条件, 也避免了许多代谢调节和抑制。

在一些优选的实施方案中, 本发明提供制造目的终产物的方式,

这种方式在控制速率的条件下连续提供葡萄糖,并具有降低原料成本,降低粘度,提供用于代谢效率的氧的传递,提高生物转化效率,提高得率,改变代谢抑制和酶抑制的水平,降低整个制造成本的好处。

如上所指出的,本领域极其需要有能够利用比葡萄糖更廉价的起始底物进行有效生产目的终产物的方法。如在此所更为详细的描述,本发明所提供的方法涉及这些底物,包括淀粉(例如玉米和小麦淀粉)和生物质。

淀粉是以植物为基础的发酵碳源。玉米和小麦淀粉是比用于发酵的葡萄糖碳原料更为便宜的碳源。在本领域中已知液化淀粉向葡萄糖的转化,其通常是使用酶来进行,如 α -淀粉酶、支链淀粉酶、葡萄糖淀粉酶。将液化淀粉转变为单糖即葡萄糖的大量过程已经被描述。葡萄糖有自身的价值,也可以作为其它糖的前体,如果糖。另外,葡萄糖可以被发酵成乙醇或其它发酵产品。然而,酶将第一碳源转变为中间物(特别是葡萄糖)的能力,将会由于中间物的存在而受损。

例如,日本米酒酿造和醇类生产的典型方法使用未经煮过的淀粉。然而,这些技术需要某些专门的操作,如醪液的酸化(pH 3.5),以阻止有害微生物的污染。除此之外,这些方法需要比本发明更长的糖化和发酵时间。另外,这些方法需要复杂的操作步骤,例如透析发酵液,太为麻烦,以至于在通常的经由发酵的产品生产中难以利用。

使用糊精和葡萄糖作为发酵的原料有各种各样的缺点,包括加工成本高,以及与粘度和氧的传递相关的难题。另外,与本发明相比,这些方法产生较低的目的产物得率,具有更多的与副产物形成相关的发酵难题。事实上,将淀粉或生物质转变为糊精的成本是显著的,涉及高能量的投入、分离的反应罐、更多的时间、详细的生物工艺操作、不完全的糖化、逆反应以及与典型的预发酵糖化步骤相关的酶。这些难题导致了许多提供在一个反应容器或器皿内,并在较低的温度下直接转化为淀粉的方法的尝试。在 US Pat. No. 5,599, 689 (Haynie, 等人)中描述了在混合培养基中将碳水化合物源变为 1,3-丙二醇的生物转化。Haynie 等人描述的方法涉及产生甘油(即一种中间物)的生物与

产生二醇的生物（即一种终产物）混合，向混合的培养基中加入碳底物，孵育混合的培养基，以产生目的终产物 1,3-丙二醇。在 U. S. Patent No. 4,514, 496 中，Yoshizuma 描述了这样的方法，其在浆状物中保持原料相对于醪液的浓度，未经煮熟即在糖化之前未经高温液化而发酵生产醇类。但是这些方法与本发明相比，缺乏效率和经济优势。

本发明提供生产目的终产物的方法，提供包括有机酸（如葡糖酸、抗坏血酸中间物、琥珀酸、柠檬酸、乙酸、葡糖酸和乳酸）、氨基酸、抗生素、酶和有机溶剂（如 1,3-丙二醇，丁二醇和丙酮）、甘油、乙醇。在一些优选的实施方案，其方法包括这些步骤：将至少一种碳底物与至少一种底物转化酶相接触产生至少一种中间物；将至少一种中间物与一种产生中间物的酶接触，其中至少一种中间物被基本完全转化为终产物。在一些优选的实施方案中，生物转化由微生物来完成。通过保持中间物在转化培养基中的低浓度，中间物的代谢物阻遏和/或酶抑制效果被改变了（如被降低了）。本发明提供各种水平的中间物浓度、底物、中间物和将中间物转化为目的终产物（如乙醇）的步骤。

定义

除非另有说明，否则这里所使用的所有技术和科学术语与在本发明所属领域具有普通技能的人的通常理解具有相同意义。各种参考文献（见，例如 Singleton 等人 **DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY**, 2D ED., John Wiley and Sons, New York [1994]；和 Hale 和 Marham, **THE HARPERCOLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY**, Harper Perennial, NY[1991]）提供许多这里使用术语的一般定义。除此以外，这里所涉及的所有专利和出版物，包括这些专利和出版物所公布的所有序列，都明确引用作为参考。

虽然与这里所描述相似或相同的任何方法和材料被发现可使用在本发明的实践中，这里描述了优选的方法和材料。数字范围包含定义此范围的数字。除非另有说明，否则核酸从左到右以 5'到 3'的方向写出，氨基酸从左到右以氨基到羧基的方向写出。应该理解，本发明并

不限于所描述的特定方法、流程和试剂，因为这些是可以变动的。

这里提供的标题并不限制本发明的各个面或实施方案，它们应通过参考整个说明书而得出。此外，以下所定义的术语通过参考整个说明书而得到更充分的定义。

这里使用的术语“碳底物”指的是含有至少一个碳原子的物质，能够被酶转化成中间物，并随后被转化成目的碳终产物。碳底物的例子包括（但不限于）：生物质、淀粉、糊精和糖。

这里使用的“生物质”是指含有纤维素和/或淀粉的原料，包括（但不限于）：碎木片、玉米秸秆、大米、草、草料、perrie-草、马铃薯、茎、根、全玉米粉(whole ground corn)、玉米穗、谷物(grain)、小麦、大麦、黑麦、买罗高粱、糠、谷类(cereal)、含糖原料（例如糖蜜、水果材料、甘蔗或糖用甜菜），木头、植物残渣。事实上，本发明无意限制任何一种特定的材料用作生物质。在本发明优选的实施方案中，原料是含淀粉的原料，（如玉米穗、全玉米粉、玉米、谷物、买罗高粱和/或谷类和它们的混合物）。在特别优选的实施方案中，此术语指的是最初来自于任何植物来源的任何含淀粉的材料。

这里使用的“淀粉”是指任何含淀粉的材料。特别的是，此术语指的是各种以植物为基础的材料，包括但不限于小麦、大麦、马铃薯、甘薯、木薯粉、玉米、黄玉米(maize)、木薯、买罗高粱、黑麦和糠。事实上，本发明无意限制任何一种淀粉的特定类型和/或来源。一般而言，此术语指的是任何含有植物多糖碳水化合物复合物的材料，含有直链淀粉和支链淀粉，具有公式 $(C_6H_{10}O_5)_x$ ，其中的“X”可以为任何数字。

这里使用的“纤维素”是指任何含纤维素的材料。特别的是，此术语指的是葡萄糖（或“纤维二糖”）的聚合物，具有公式 $(C_6H_{10}O_5)_x$ ，其中的“X”可以为任何数字。纤维素是植物细胞壁的主要成分，是自然界最丰富的有机物。纤维素中是 β -糖苷连接，淀粉中是 α -糖苷连接。与木质素相结合，纤维素成为“木质素纤维素”。

这里使用的术语“玉米固体”指来自玉米的磨碎材料，包括但不

限于玉米粒，糠和玉米穗。

这里使用的“中间物”是指一种复合物，其至少含有一个经过酶转变碳底物而来的碳原子。中间物的例子包括但不限于：戊糖（如木糖、阿拉伯糖、来苏糖、核糖、核酮糖、木酮糖）；己糖（如葡萄糖、阿洛糖、阿卓糖、甘露糖、古洛糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖、阿洛酮糖、果糖、山梨糖、塔格糖）和其有机酸。

这里使用的术语“酶转化”是指通过将底物或中间物与酶接触而将底物修改为中间物或将中间物修改为终产物。在一些实施方案中接触是直接将底物或中间物暴露于适当的酶。在另一些实施方案中，接触包含将底物或中间物暴露于一种生物体，该生物体能表达和/或分泌这种酶，和/或分别将目的底物和/或中间物代谢为目的中间物和/或终产物。

这里使用的术语“淀粉水解酶”，是指任何一种能将淀粉转变为糖中间物（如己糖或戊糖）的酶。

这里使用的“单糖”，是指任何具有经验式 $(CH_2O)_n$ 的化合物，其中 n 是 3-7，优选为 5-7。在一些实施方案中，术语“单体糖”是指由单一的多羟基醛或酮单元所组成。此术语包括但不限于这些化合物，如葡萄糖、半乳糖和果糖。

这里使用的“二糖”，是指任何包含两个共价连接的单糖单元的化合物。此术语包括但不限于这些化合物，如蔗糖、乳糖和麦芽糖。

这里使用的“寡糖”，是指任何具有 2-10 个以糖苷键连接起来的单糖单元的化合物。在一些优选的实施方案中，此术语是指以共价键连接起来的单糖单元的短链。

这里使用的“多糖”，是指任何具有许多单糖单元连接成直链或支链的化合物。在一些优选的实施方案中，此术语是指具有上百或上千个单糖单元的长链。一些多糖，如纤维素具有直链，而另一些（如糖原）具有支链。最丰富的多糖是淀粉和纤维素，由重复的葡萄糖单元所组成（虽然这些化合物的不同在于葡萄糖单元如何连接）。

这里使用的“培养”，是指在反应容器内由碳底物到目的终产物的

发酵生物转化。在特别优选的实施方案中，培养涉及微生物在适宜条件下的生长，以便产生目的终产物。

这里使用的“糖化”，是指将不能直接使用多糖转变为用于生物转化或发酵生物转化的有用的糖原料。

这里使用的术语“发酵”是指有机物质被微生物酶解和厌氧降解成更简单的有机产物。在优选的实施方案中，发酵是指微生物（如细菌）对碳水化合物的利用，涉及发生在厌氧条件下的氧化-还原代谢过程，在这一过程中有机底物作为最终的氢受体（而不是氧）。虽然发酵发生在厌氧条件下，但是此术语并无意被仅仅限制在严格的厌氧条件下，因为发酵也发生在氧存在的条件下。

这里使用的术语“基本完全消耗”和“基本完全氧化”是指在转化培养基中保持中间物的低水平，以抵消中间物（如己糖）对酶的抑制、氧的传递、得率、副产物最小化或代谢物阻遏效果的影响，以提高中间物转化酶将中间物转变为终产物或别的中间物的能力和/或底物转化酶将底物转变为中间物的能力。

这里使用的术语“生物转化”是指在将碳底物或中间物分别转变为中间物或终产物的条件下，将碳底物或中间物与微生物接触。在一些实施方案中，此术语用于描述另一种介入中间物(intervening intermediate)的体外生产方法，其中只使用了生物催化。在一些优选的实施方案中，此术语包括通过微生物的代谢和/或表达或分泌完成目的转化的酶。

这里使用的术语“转化培养基”指的是酶和碳底物、中间物和终产物在其中彼此发生接触的培养基。这些术语包括但不限于：发酵培养基、溶解或悬浮酶和碳底物、中间物和终产物的有机和/或水培养基。在一些实施方案中，培养基是复合培养基，而在另一些优选的实施方案中，培养基是合成培养基。

这里使用的术语“终产物”是指任何来自碳源的分子产物，它是从中间物酶转变而来。在特别优选的实施方案中，本发明使用的方法是为了产生“目的终产物”（即通过使用这些方法意图生成的产物）。在特

别优选的实施方案中，该术语指醇，特别是乙醇。

这里使用的“低浓度”是指一种化合物的浓度水平低于它存在时可能导致有害作用产生的浓度。在特别优选的实施方案中，此术语用于指一特定中间物低于观测代谢物阻遏和/或酶抑制的有害效果的浓度。在一些实施方案中，此术语指一特定中间物的浓度水平，高于此浓度时即由底物和/或产物引发代谢物阻遏和/或酶抑制。

这里使用的短语“保持低于引发代谢物阻遏效果的水平”是指保持一中间物的浓度低于引发代谢物阻遏的水平。

这里使用的术语“减小代谢物阻遏”是指产生代谢物阻遏效果的条件。在优选的实施方案中，此术语指中间物浓度低于引发代谢物阻遏效果的阈值的条件。

这里使用的术语“减小酶抑制”是指与通常标准的条件下酶的抑制相比，能减小对此酶抑制的条件。在本发明优选的实施方案中，此术语是指中间物、底物和/或酶反应产物的浓度低于引发酶抑制的阈值的条件。

这里使用的术语“底物转化酶”是指任何将底物（如颗粒淀粉）转变为中间物（如葡萄糖）的酶。底物转化酶包括但不限于： α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、支链淀粉酶、淀粉水解酶和它们的各种组合。

这里使用的术语“中间物转化酶”是指任何将中间物（如 D-葡萄糖、D-果糖等）转变为目的终产物的酶。在优选的实施方案中，这一转化通过水解来完成，而在另一些实施方案中，此转化涉及通过微生物的由中间物到终产物的代谢。然而，本发明无意被限制于任何特定的酶或转化方式。事实上，意图在本发明的各种实施方案中使用任何恰当的酶。

这里使用的“得率”是指使用本发明的方法产生的中间物或终产物的量。在一些优选的实施方案中，使用本发明的方法产生的得率高于用本领域已知的方法得到的得率。在一些实施方案中，得率是指终产物或中间物的体积，而在另一些实施方案中，此术语用来指终产物或中间物在组合物中的浓度。

这里使用的“副产物形成”指的是产生不需要的产物。在一些优选的实施方案中，本发明提供与本领域已知的方法相比能避免或减少副产物产生的方法。

这里使用的术语“酶的抑制”指的是通过对酶物理或化学的作用而使酶的活力丧失。在一些实施方案中，抑制来自于通过酶活力形成的产物的影响。而在另一些实施方案中，抑制来自于底物或中间物对酶的作用。

这里使用的“酶活力”指的是酶对其底物的作用。在一些实施方案中，酶的活力使用测定底物向中间物的转化的方式来定量，而另一些实施方案中，测定的是底物向终产物的转化，而还在进一步的实施方案中，测定的是中间物向终产物的转化。

这里使用的“酶单位”指的是在最佳分析条件下每分钟转变一微摩尔底物成为底物产物的酶量（除非另有说明）。在一些实施方案中，可以通过商业获得的酶（如 SPEZYME[®]、DISTALLASE[®]、OPTIMAX[®]、Genencor International）被用于本发明的方法中。

这里使用的术语“葡萄糖淀粉酶单位”（GAU）的定义是在 40℃ 和 pH 5.0 的分析条件下或者在 25℃ 和 pH 7.0 的分析条件下每分钟产生一微摩尔葡萄糖所需要的酶量。

这里使用的术语“葡萄糖氧化酶单位”（GOU）的定义是在 25℃ 和 pH 7.0 的分析条件下每分钟氧化一微摩尔葡萄糖成为葡糖酸所需要的酶量。

这里使用的术语“过氧化氢酶单位”（CU）的定义是在 25℃ 和 pH 7.0 的分析条件下每分钟分解一微摩尔过氧化氢所需要的酶量。

这里使用的一 AG 单位（AGU）是在 25℃ 和 pH 4.3 时每分钟分解一微摩尔麦芽糖所需要的酶量。在本发明的一些实施方案中，使用了可通过商业获得的每毫升具有 400 GAU 活力的葡萄糖淀粉酶液体（OPTIDEX[®] L-400; Genencor International）。在可选的实施方案中，可以使用商业获得的每 ml 具有 150 AGU 活力的液体形式的葡萄糖淀粉酶（AMG NOVO 150）。

这里使用的术语“淀粉水解单位”和“原料淀粉水解单位”(RHU)的定义是在 25°C 和 pH 5.0 的测试条件下,每分钟从淀粉产生 1g 葡萄糖所需的酶量。

这里使用的“碳终产物”意指产生于碳中间物的任何碳产物,其中底物至少含有一个碳原子(即碳底物)。

这里使用的“碳中间物”是指在含碳底物向碳终产物转化的过程中产生的含碳化合物。

这里使用的“酶控制”意指通过改变用于反应的酶量或活力来调节产自碳底物的碳中间物的数量。

这里使用的“微生物”指具有通常被认为是微观的细胞的任何生物,包括细菌、真菌(酵母和霉菌)、立克次氏体和原生动物之类的生物。本发明并不意图限制于任何特定的微生物或微生物种,因为各种微生物和微生物酶适合用于本发明。本发明也不意图限制于野生型微生物,因为利用重组 DNA 技术生成的微生物和微生物酶也可用于本发明。

这里所用的“微生物酶”指由微生物产生的任何酶。这里所用的“中间体转化微生物酶”是把中间体转化为终产物的酶,而“底物转化微生物酶”是把底物转化为中间物或者把底物直接转化为终产物(即没有中间体化合物)的酶。

这里使用的“产生乙醇的微生物”是指能够将糖或寡糖转变成乙醇的微生物。本领域已知的产生乙醇的微生物包括乙醇产生细菌。产生乙醇的微生物事实上是通过它们合成一种或多种能独立或一起将糖转变为乙醇的酶来生产乙醇的。

这里使用的术语“乙醇生产者”和“乙醇生产生物体”是指任何能从己糖或戊糖生产乙醇的生物体或细胞。一般而言,生产乙醇的细胞含有醇脱氢酶和丙酮酸脱羧酶。

这里使用的“抗菌剂”是指任何能杀死或抑制微生物生长的化合物。

这里使用的术语“耦合培养”(linked culture)是指发酵系统使用至

少两种细胞培养物，其中培养物被依次加入。在大多数的耦合系统的实施方案中，最初的培养物或最初的一套培养物是在最佳的发酵条件下生长，以生产目的中间物（即中间物被释放到培养基中，产生“条件培养基”）。在初级培养物的发酵之后，条件培养基被暴露于次级培养物。次级培养物再将条件培养基中的中间物转变为目的终产物。在本发明的一些实施方案中，典型的初级培养物是甘油生产者，次级培养物是 1,3-丙二醇生产者。

这里使用的“混合培养”是指在同一培养物中不同种微生物的各类组合的存在。在一些优选的实施方案中，混合培养物生长在一个反应容器内，其条件使得混合生物体各自的代谢过程发生彼此反应，从而产生单个的生物体所不能产生的产物。本发明无意被限制于包含特定数目的微生物种类的混合培养。

这里使用的“条件培养基”是指已经被补充了微生物生长的有机副产物的任何适合微生物生长的发酵培养基。在本发明优选的实施方案中，条件培养基产生于耦合培养的发酵过程中，其中生产甘油的细胞将甘油分泌到发酵培养基中，用于随后转化成 1,3-丙二醇。

这里使用的“氧吸收率”（“OUR”）是指在反应容器内，氧特定消耗的度量。氧的消耗可以通过本领域已知的各种即时测量法来测定。在一实施方案中，OUR (mmol/(升*小时))通过以下公式测定：
$$\left(\left(\text{气流 (标准升/分钟)} / \text{发酵重量 (发酵液的重量(kg))} \right) \times \text{O}_2 \text{ 供给} \times \text{发酵液密度} \times (\text{校正常数, 用于校正到 21.1C 而不是标准的 20.0C 的气流}) \right) - \left([\text{气流/发酵重量}] \times [\text{废气 O}_2/\text{废气 N}_2] \times \text{N}_2 \text{ 供给} \times \text{发酵液密度} \times \text{常数} \right)。$$

这里使用的“碳演化率”（“CER”）是指在发酵过程中，反应容器内产生 CO₂ 量的度量。通常，因为在最初或后来都没有向反应容器内加入 CO₂，容器内的任何 CO₂ 都被假定为是在发酵过程中产生的。“废气 CO₂”是指反应容器内测得的 CO₂ 的数量，通常使用本领域已知的质谱法。

这里使用的“增加的”，是指目的蛋白质产生的提高。在优选的实施方案中，本发明提供增加的（即提高的）目的蛋白质的产生和分泌。

在这些实施方案中，当与宿主（如野生型细胞）正常的生产水平相比，“增加的”生产被提高了。然而，对于异源蛋白质而言，基本上任何表达都是增加的，因为细胞正常情况下并不产生这种蛋白质。

这里使用的术语“分离的”和“纯化的”是指去除掉至少一种与其天然结合的组分的核酸或氨基酸。

发明详述

本发明提供通过以生物质为基础的原料底物的体外和/或体内生物转化而生产目的终产物的方法，这些底物包括（但不限于）这些材料，如淀粉和纤维素。在特别优选的实施方案中，本发明的方法无需底物的胶凝化和/或液化。在特别优选的实施方案中，本发明提供生产乙醇的方法。在一些特别优选的实施方案中，本发明提供直接从颗粒淀粉生产乙醇的方法，其中涉及改变的代谢物阻遏。

在优选的实施方案中，本发明强烈改善将通常可用的碳底物（如生物质和/或淀粉）转变成中间物的过程，优选是易于被转变成大量目的终产物的中间物，包括醇类如乙醇。在特别优选的实施方案中，本发明强烈改善将颗粒淀粉直接转变为葡萄糖之过程，其中葡萄糖是一种易于被转变成乙醇的中间物。

在可选的实施方案中，本发明强烈改善将淀粉或纤维素转变为葡萄糖之过程，其中葡萄糖接着被转变为目的终产物。通过保持中间物在转化培养基中以低浓度存在，整个生产效率被提高了。在一些实施方案中，酶的抑制和/或代谢物阻遏，氧的需求和/或副产物的形成被降低了。在附加的优选实施方案中，本发明提供强烈改善无需煮熟而将颗粒淀粉转化为葡萄糖的方法，随后葡萄糖再被转变为目的终产物。

在一些优选的实施方案中，最小中间物浓度的保持是通过将中间物浓度保持在低的浓度而实现的。在一些实施方案中，中间物浓度低于或等于培养基重量体积比的25%（例如0.25%到0.00001%的重量体积比）。在另一些实施方案中，中间物浓度低于或等于重量体积比

的 0.20%, 0.10%, 0.05% 或 0.01% (例如分别为 0.20% 到 0.00001%, 0.10% 到 0.00001%, 0.05% 到 0.00001%, 0.01% 到 0.00001%)。或者中间物在转化培养基中的浓度保持在低于或等于 2.0 μmolar 。在另一个实施方案中, 浓度保持在低于或等于 1.0 μmolar 。还在另一个实施方案中, 中间物浓度保持在低于或等于 0.75 μmolar 。在任何情况下, 保持低浓度意味着保持中间物的浓度低于导致酶抑制 (即酶抑制效应)、代谢物阻遏 (即代谢物阻遏效应) 的阈值。

在进一步的实施方案中, 最小浓度的保持是通过保持底物向中间物的转化速率低于或等于中间物向终产物的转化速率而实现的。已知底物向中间物的转化速率必然会限制中间物向终产物的转化, 通过提供充足的中间物转化酶将第一个酶转化底物形成的中间物基本完全转化, 从而中间物被基本完全转变为终产物的速度与起始底物被转变的速度一样快, 以最小化中间物在转化培养基中的存在。提供如此过量的中间物转化的方法包括提供过量的中间物转化酶, 增加中间物转化酶的酶活力和/或降低底物转化酶的活力, 从而使中间物到终产物的转变与其来自底物的转变一样快。因为预期实际的转化速率会因产生的具体目的终产物而变化, 因而也预期在量和确定这些量的实验上会有一些变化。然而, 这里提供了确定这些量的指导。

在一些实施方案中, 中间物转化和消耗的速率通过计算混合培养基中生物体的量来测定, 同时参考混合培养基中的其它物理参数, 并将该数量乘以由通常已知的转化速率。由此得出中间物 (如葡萄糖) 向终产物的转化速率。在一些实施方案中, 中间物向目的产物的转化是通过天然产生的生物体或一种能提供这种生物转化的突变体来完成这种由中间物向终产物的转化或生物转化。另一个由中间物向终产物转化的实施方案涉及利用已知的获得目的终产物的酶并使用已知的酶转化方法来进行酶转化。例如, 在一些实施方案中, 葡萄糖向目的终产物 (如丙二醇、琥珀酸、葡糖酸、乳酸、氨基酸、抗菌剂、乙醇、抗坏血酸中间物和/或抗坏血酸) 的转化是通过加入一定量的已知将葡萄糖转变为所需特定目的终产物的酶来完成的。

一旦中间物向目的终产物的转化速率被确定,则碳底物向中间物的转化限制可以以同样的方式来确定。通过计算中间物到终产物转化的上限,碳底物向中间物转化的转化速率就能被确定,主要考虑的是在转化培养基中中间物的浓度水平保持在一足够低的水平,以抵消通常中间物的代谢物阻遏/酶抑制效应。在一个实施方案中,这是通过保持中间物向终产物的转化速率超过或等于碳底物向中间物的转化速率来完成。因此,本发明提供提高终产物的转化速率和限制碳底物向中间物转化的方法。

另一个确定中间物向终产物转化的速率是否高于或等于碳底物产生中间物的方法是测定中间物在反应容器内的重量百分率。中间物在反应容器中存在的数量可以通过各种已知的方法来测定,包括但不限于直接的或间接的测量中间物在反应容器中存在的量的方法。直接的测量可以通过使用已知的鉴定容器中中间物或终产物量的分析方法,定期的分析反应容器中的内容物。另外,直接的测量反应容器中的中间物的量的方法包括本领域已知的即时气、液分析和/或高效液相色谱法。间接的测量产生的中间物或终产物的水平可以通过使用本领域已知的方法(如测定氧的吸收率和/或二氧化碳的演化率)来测量氧的吸收或二氧化碳的产生,从而得以评估。

底物

本发明的底物是能够被酶转变为中间化合物的以碳为基础的化合物。合适的底物包括但不限于包含能被转变为糖的成份的被加工过的材料(如纤维生物质、糖原、淀粉和它们的各种形式,例如玉米淀粉、小麦淀粉、玉米固体和小麦固体)。在发展本发明时使用玉米淀粉和小麦淀粉获得了良好的结果,但是其它资源,包括来自谷物和块茎的淀粉(如甘薯、马铃薯、大米和木薯淀粉)也发现可用于本发明。各种淀粉都是商业上可获得的。例如玉米淀粉可以从 Cerestar、Sigma 和 Katayama 化学工业公司(日本)获得;小麦淀粉可以从 Sigma 获得;甘薯淀粉可以从 Wako Pure 化学工业公司(日本)获得;马铃薯淀粉

可以从 Nakari 化学药物公司（日本）获得。特别有用的碳底物是玉米淀粉。在本发明的一些实施方案中，颗粒淀粉被用于淀粉比例占大约 20% 到大约 35% 的浆中。优选地，淀粉的浓度介于约 10% 到约 35%。在一些特别优选的实施方案中，淀粉百分数的范围是介于 30% 到 32%。除了颗粒淀粉，其它一些碳底物资源也发现可用于本发明，包括但不限于生物质、多糖和其它能被酶转变为中间物的以碳为基础的材料。

可发酵糖能够从广泛的各种来源获得，包括木质素纤维素材料。木质素纤维素材料可以从木质素纤维素废产物（如植物残渣和废纸）中获得。合适的植物残渣的例子包括但不限于茎、叶、壳、皮、玉米穗之类，还有玉米秸秆、begasses、木头、木片、木浆和锯末。废纸的例子包括但不限于各种类型的废弃的纸（如影印纸、计算机打印纸、笔记本纸、记事本纸、打印机纸之类），还有报纸、杂志、纸板和纸质包装材料。本领域已知将糖转变为乙醇的条件。通常温度介于约 25°C 到 35°C（如介于 25°C 到 35°C 之间，更特别的是在 30°C）。转化培养基使用的 pH 范围是介于约 4.0 到 6.0、4.5 到 6.0 和 pH 5.5 到 5.8。但是本发明无意被限于任何特定的温度和/或 pH 条件，因为这些条件依赖于涉及的底物、酶、中间物和/或终产物。

酶

在本发明的一些优选的实施方案中，底物转化酶（即能首先将碳底物转变为中间物的酶）和中间物转化酶（即能将产生的中间物转变为介入中间物和/或目的终产物的酶）都被发现可用于本发明。在本发明的一些实施方案中，用于将碳底物转变为中间物的酶包括但不限于 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、淀粉水解葡萄糖淀粉酶和支链淀粉酶。用于将中间物转化为终产物的酶很大程度上依赖于实际所需目的终产物。例如用于将糖转化为 1,3-丙二醇的酶包括但不限于大肠杆菌和其它微生物产生的酶。例如用于将糖转化为乳酸的酶包括但不限于乳杆菌和发酵单胞菌产生的酶。用于将糖转化为乙醇的酶包括但不限于醇脱氢酶和丙酮酸脱羧酶。用于将糖转化为抗坏血酸中间物的酶包括但

不限于葡萄糖脱氢酶、葡糖酸脱氢酶、2,5-二酮-D-葡糖酸还原酶和各种其它的酶。用于将糖转化为葡糖酸的酶包括但不限于葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶。

在一些优选的实施方案中，用于本发明的某些方法的 α -淀粉酶通常是具有随机切割淀粉中 α -(1-4)糖苷键效果的酶。在大多数的实施方案中， α -淀粉酶选自具有E.C.编号为E.C. 3.2. 1.1,特别是编号为E.C. 3.2. 1. 1-3的微生物酶。在一些优选的实施方案中， α -淀粉酶是耐热细菌的 α -淀粉酶。在多数特别优选的实施方案中， α -淀粉酶得自或来自芽孢杆菌物种。事实上，在本发明的发展过程中，使用来自于地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) (Genencor)的SPEZYME[®] α -淀粉酶获得了良好的结果。在另一些实施方案中，用于从淀粉(如玉米和木薯)中未经预煮进行醇类发酵的black-koji淀粉酶可用于本发明。

作为本领域的共识，本发明方法中使用的 α -淀粉酶的量依赖于 α -淀粉酶的酶活力和终产物转换器对产生的葡萄糖的转化速率。例如，通常0.001-2.0ml的 α -淀粉酶溶液被加入到1000g原料中，但是在一些实施方案中，该溶液的加入量为0.005-1.5ml。在一些优选的实施方案中，该溶液的加入量为0.1-1.0ml。在进一步的实施方案中，使用了其它的量。例如，通常0.01-1.0kg的SPEZYME[®] FRED (Genencor)被加入到1公吨淀粉中。在一些实施方案中，酶的加入量为0.4到0.6公斤，而另一些实施方案中它的加入量为每公吨淀粉0.5到0.6公斤的SPEZYME[®] FRED。

在本发明优选的实施方案中，葡萄糖淀粉酶是一种从淀粉非还原端连续除去葡萄糖单元的酶。此酶能水解淀粉、直链淀粉和支链淀粉的直链和支链的糖苷键。在多数实施方案中，用于本发明方法的葡萄糖淀粉酶是微生物酶。在一些优选的实施方案中，葡萄糖淀粉酶是一种耐热的真菌葡萄糖淀粉酶，例如曲霉葡萄糖淀粉酶。事实上，在本发明的发展过程中，使用来自黑曲霉(*Aspergillus niger*)的DISTALLASE[®]葡萄糖淀粉酶(Genencor)获得了良好的结果。从黑曲霉制备的葡萄糖淀粉酶制剂在未经预煮就已被使用(见Ueda等人，

Biotechnol. Bioeng., 23: 291 [1981])。三种从 *Aspergillus awamori* var. *kawachi* 中分离到的葡萄糖淀粉酶已被选来用于水解淀粉 (见 Hayashida, Agr. Biol. Chem., 39: 2093-2099 [1973])。未经煮过的甘薯经 *Endomycopsis fibuligoeu* 葡萄糖淀粉酶的醇类发酵已被描述了 (Saha 等人, Biotechnol. Bioeng., 25: 1181-1186 [1983])。可使用于本发明的另一种酶是葡萄糖淀粉酶(E. C. 3.2. 1.3), 一种从非还原末端逐步水解 α -1,4-糖苷链的酶。此酶也水解 α -1,6-糖苷链。葡萄糖淀粉酶是从曲霉属中分泌, 根霉和毛霉也可用于本发明的方法中。这些酶被进一步发现可用于葡萄糖的生产以及糖原和淀粉的定量中。从 *E.fibuligera* 中制备的葡萄糖淀粉酶(IFO 0111)被用来与甘薯淀粉接触, 进行醇类发酵 (见 Saha 等人, Biotechnol. Bioeng., 25:1181-1186[1983])。这个酶的一个主要应用是从淀粉材料生产乙醇时作为糖化试剂。但是与这里描述的其它葡萄糖淀粉酶一样, 此酶也可使用于本发明的方法中。

本发明的方法中使用的其它葡萄糖淀粉酶包括从根霉属和腐质霉属获得的酶, 其特征是具有特别高的生产力和酶活力。此外, 与来自其它生物体的葡萄糖淀粉酶相比, 来自根霉的葡萄糖淀粉酶对淀粉具有很强的作用, 它的酶学和化学特性 (包括最适 pH) 特别适合谷类淀粉的糖化。因为这些特点, 来自根霉的葡萄糖淀粉酶被认为是最适合利用不煮或低温煮过的淀粉进行醇类生产的酶 (见 U. S. Pat. No. 4,514, 496 和 4,092, 434)。已引起注意的是, 当根霉葡萄糖淀粉酶与玉米淀粉原料孵育并结合使用根霉 α -淀粉酶时, 会加速葡萄糖淀粉酶对淀粉的降解。本发明无意限于任何特定的机制或理论, 但是认为根霉葡萄糖淀粉酶比同样含有 α -淀粉酶的黑曲霉葡萄糖淀粉酶制品具有更强的降解活力 (见 Yamamoto 等人, Denpun Kagaku, 37: 129-136 [1990])。用于本发明的一种商业制品是从 Shin Nippo Chemical Co., Ltd.获得的来自于雪白根霉(*Rhizopus niveus*)菌株 Koji 培养物的葡萄糖淀粉酶制品。用于本发明的另一种商业制品是从印度班加罗尔的 Biocon India 获得的商用淀粉水解组合物 M1。

作为本领域的共识,本发明方法中使用的葡萄糖淀粉酶的量依赖于葡萄糖淀粉酶的酶活力(例如 **DISTILLASE[®] L-400**)。通常,0.001到2毫升的葡萄糖淀粉酶溶液被加入到450 gm调节到含20-35%干固体的浆状物中,其中浆状物是糖化过程中液化的醪液和/或发酵过程中水解的淀粉和糖。在一些实施方案中,葡萄糖淀粉酶加入的量为0.005到1.5 ml的这种溶液。在一些优选的实施方案中,此酶加入的量为0.01到1.0 ml的这种溶液。

如以上所表明的,支链淀粉酶也可使用于本发明的方法中。这些酶水解 α -1,6-糖苷键。因此,在液化淀粉的糖化过程中,支链淀粉酶从淀粉的非还原端连续的除去葡萄糖单元。这些酶能够水解淀粉、直链淀粉、支链淀粉的直链和支链糖苷连接。

本发明的方法中使用的其它的酶包括淀粉水解酶(RSH),其中包括腐质霉 RSH 葡萄糖淀粉酶制品(见 U. S. Patent No. 4,618, 579)。这一腐质霉 RSH 酶制品在 pH 5.0 到 7.0,特别是在 5.5 到 6.0 的范围表现出最大的活力。此外,此酶制品在温度范围为 50℃到 60℃时表现出最大的活力。因此,在本发明使用这一酶的每一步中,酶对淀粉的溶解优选在这些 pH 和温度范围内进行。

在一些实施方案中,来自真菌生物体 *Humicola grisea* var. *thermoidea* 菌株的腐质霉 RSH 酶制品可使用于本发明的方法中。在一些特别优选的实施方案中,这些腐质霉 RSH 酶选自 ATCC (American Type Culture Collection) 16453, NRRL (USDA Northern Regional Research Laboratory) 15219, NRRL 15220, NRRL 15221, NRRL 15222, NRRL 15223, NRRL 15224 和 NRRL 15225,和来自于这些酶的遗传改变种类。

另外,可于本发明方法中使用的 RSH 葡萄糖淀粉酶包括根霉 RSH 葡萄糖淀粉酶制品。在一些实施方案中,使用了商品名为“**CU CONC**””并从 Shin Nippo Chemical Co., Ltd. (日本 Ahjyo) 获得的来自于雪白根霉 *Koji* 菌株的酶。另一种有用的酶制品来自 Amano Pharmaceutical, 商品名为“**GLUCZYME**”,是消化根霉制成的商品

(见, Takahashi 等人, J. Biochem., 98:663-671[1985])。其它的酶包括三种形式的根霉葡萄糖淀粉酶 (EC 3.2. 1.3), 即“Gluc1”(MW 74,000), “Gluc2”(MW 58,600)和“Gluc 3”(MW 61,400)。Gluc1 被发现效用比 Gluc2 或 Gluc3 高出 22-25 倍。因此, 虽然在本发明中可使用 Gluc2 和 Gluc3, 但是由于 Gluc1 与淀粉紧密结合并具有 4.5 的最佳 pH 值, 因此在本发明中可见到 Gluc1 被特别使用。使用于本发明的另一额外的 RSH 葡萄糖淀粉酶制品包括以“M1”出售的酶制品, 从 Biocon India Ltd. Bangalore, India 获得。M1 是一种多用途酶的组合物或混合物, 如图 1 的高效液相层析色谱和图 2 的 SDS 凝胶所表明的。

如上所述, 在多数实施方案中, 腐质霉 RSH 葡萄糖淀粉酶酶制品具有葡萄糖淀粉酶活力, 和溶解淀粉的强化因子。在其它 RSH 酶制品中强化因子和葡萄糖淀粉酶活力的比例可能有一定的变化。但是本发明中使用的 RSH 葡萄糖淀粉酶酶制品, 通常具有与葡萄糖淀粉酶组分一并产生的充足的强化因子。因此, RSH 葡萄糖淀粉酶酶制品的活力是以它们的葡萄糖淀粉酶活力来定义的。

对于 RSH 酶制品或常规的葡萄糖淀粉酶, 在 10D.E.单位内的酶活力都可以根据本发明的意图而被测定。“10D.E.单位”是所述两种类型的酶中的任一种在测试条件下每分钟产生 1 微摩尔的葡萄糖所需要的酶量。根据本发明的意图测定酶活力, 含有 0.06 单位至 1.1 单位的十分之一毫升的酶制品 (必要时进行稀释) 被加到 0.9ml 在 50℃预加热 5 分钟的底物溶液中。底物溶液包含 40 份体积的 0.25M 醋酸钠缓冲液 (pH5.5) 和 50 份体积的 4wt% 的 10 D. E.麦芽糖糊精水溶液。在酶溶液加入之前, 底物溶液在 50℃保持 5 分钟。10 分钟后, 通过注入一 16mm 预加热的试管, 并在 100℃水浴加热 6 分钟而终止反应。葡萄糖浓度通过任何常规的方法测定 (如 Sigma Chemical Co 的葡萄糖试剂盒 No.15-UV 或使用如 Technicon Autoanalyzer 之类的仪器)。

特别有用的酶组合物包括葡萄糖淀粉酶 (如 DISTILLASE®) 和 RSH (如 M1) 的混合物。用于这一混合物的葡萄糖淀粉酶量处于每克颗粒固体 0.2 到约 1.0 GAU 单位葡萄糖淀粉酶的范围。更为有用的

葡萄糖淀粉酶量是介于每克固体 0.75 到 0.5GAU 之间。在此混合物中存在的淀粉水解酶 (M1) 的范围处于每克固体 0.2 淀粉水解单位 (RSHU) 到约 1.0 RSHU 的范围。一特别有用的混合物包括约每克玉米固体 0.6 GAU DISTILLASE®和每克玉米固体 0.2 RSHU M1。

除了使用含有以上描述的酶的酶组合物以外, 本发明还提供将微生物暴露于底物并利用底物生产目的终产物的方法。因此, 在一些实施方案中, 将底物与生产目的终产物的真菌、细菌或其它微生物相接触, 来将底物或中间物转变成目的中间物或终产物。

在本发明优选的实施方案中, 一旦碳源被酶转变为中间物, 它就会被适当的方法转变为目的终产物。转变由任何适合的方法 (如酶或化学的方法) 完成。在一个优选的实施方案中, 转化是通过将中间物与微生物接触并通过中间物的生物转化来完成。在替换的优选实施方案中, 底物转化酶和中间物转化酶各自被置于与底物和/或中间物直接接触。在一些实施方案中, 酶以分离的、纯化的或浓缩的制品被提供。

在进一步的实施方案中, 底物和/或中间物被置于直接与分泌或代谢各自底物或中间物的微生物 (如细菌或真菌) 接触。因此本发明提供将底物生物转化为终产物的方法。在一些实施方案中, 该转化过程中至少产生一种中间物化合物。

在一些实施方案中, 利用被遗传修饰后表达野生型生物体正常情况下不产生的酶的微生物。在一些特别优选的实施方案中, 生物体被修饰来过量表达野生型生物体正常产生的酶。

事实上, 本发明的方法中使用的商业可获得的 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶具有经济实用的酶浓度。虽然通常使用的发酵条件并不利用最佳温度, 但发酵的 pH 条件却紧密相应于商业获得的糖化酶 (即葡萄糖淀粉酶) 的最佳 pH。在本发明的一些实施方案中, 颗粒淀粉的逐渐溶解促进了其完全糖化成葡萄糖。假定酶始终暴露于低浓度的糊精。另外, 在发酵过程中不断撤走葡萄糖, 保持发酵培养基中的低葡萄糖含量。因此, 葡萄糖淀粉酶被暴露于低浓度的葡萄糖。结果, 葡萄糖淀粉酶被如此有效的利用, 以至本发明的方法适合使用经济有效的葡

葡萄糖淀粉酶剂量水平（即葡萄糖淀粉酶的剂量为每克淀粉 0.05-10.0 GAU，优选为每克淀粉 0.2-2.0 GAU）。

以上提供的葡萄糖淀粉酶剂量只是发酵液中酶糖化活力的近似有效浓度，因为糖化活力的附加部分由 α -淀粉酶贡献。虽然本发明无意被限于任何特定的机制或理论，但据认为， α -淀粉酶进一步拓宽了葡萄糖淀粉酶在淀粉颗粒上打出的缺口（见 Yamamoto 等人，同上）。典型的是，商业上可获得的 α -淀粉酶的使用会导致大量的糖的产生，如葡萄糖和麦芽糖。

向麦芽汁中加入来自于米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的 α -淀粉酶（如 FUNGAMYL）已经被建议用于酿造工业，这一特定酶将糊精糖化为麦芽三糖和麦芽糖。因此，虽然 α -淀粉酶的目的是液化淀粉，它的糖化趋向也使 α -淀粉酶成为糖化酶成分的一部分。 α -淀粉酶被认为存在于 M1 组合物中。

预计，在酿造工业中也可向麦芽汁中加入来自于米曲霉的 α -淀粉酶（如 CLARASE[®] L (Genencor International Inc.)）。这一特定酶将糊精糖化为麦芽三糖和麦芽糖。因此，虽然 α -淀粉酶的目的是液化淀粉，它的糖化趋向也使 α -淀粉酶成为糖化酶成分的一部分。

除此以外，一些商业可获得的葡萄糖淀粉酶包含一些 α -淀粉酶活力。因此，可以（虽然通常并不实际）在只有葡萄糖淀粉酶存在的情况下发酵颗粒淀粉。但是，并无意将这类实施方案排除于本发明。因此，可预计商购获得的淀粉水解酶也可用于本发明中作为酶混合物的一部分，所述酶混合物包括淀粉水解酶、 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶。

在本发明方法的多数实施方案中，有效数量的 α -淀粉酶被加入颗粒淀粉的浆中。本领域技术人员知道除了葡萄糖淀粉酶所提供的不确定的 α -淀粉酶活力量以外， α -淀粉酶有效的活力可能与厂商提供的单位活力值十分不同。 α -淀粉酶的活力依赖于 pH，在选择用来发酵的不同 pH 范围（即相对于厂商报道单位活力值所使用的测试条件），其活力可能不同。因此，为了确立最有效的 α -淀粉酶剂量，设计一些初始的实验（包括那些在这里没有明确描述，但在本发明的方法中可使用

的实验), 有时是必要的。

在一些最优选的实施方法中, α -淀粉酶的剂量范围, 就真菌 α -淀粉酶而言是每克淀粉 0.02 GAU 到 2.0 FAU (真菌 α -淀粉酶单位), 虽然在一些特别优选的实施方法中, 此范围是 0.05-0.6 FAU/g。1“FAU”是在一套标准的条件下每小时降解 5260 mg 淀粉的酶量, 近似相应于 25 SKB 单位 (见 Cerial Chem., 16 : 712-723 [1939])。在多数实施方法中, 使用芽孢杆菌 α -淀粉酶, 其范围是 0.01 KNU/g 到 0.6 KNU/g, 优选是 0.05 到 0.15 KNU/g, 其中 NU (或 Novo Unit) 是在一套标准的条件下每小时降解 5.26 mg 淀粉的酶量。1 KNU 相当于 1000NU。

由于葡萄糖淀粉酶和 α -淀粉酶在发酵浆中真正活力的不确定, 预计需要在一些实施方法的实践中引入预先的实验。优化考虑包括在葡萄糖淀粉酶恒定的含量下增加 α -淀粉酶的剂量, 提高发酵速率。另外则是, 在 α -淀粉酶恒定的含量中增加葡萄糖淀粉酶的剂量, 提高发酵速率。控制酶的剂量不变和/或增加发酵浆中的淀粉含量, 也能提高发酵速率。事实上, 在某些实施方法中, 预计最佳 α -淀粉酶剂量将超过目前推荐的用于液化淀粉的剂量; 最佳葡萄糖淀粉酶剂量可能超过推荐的用于糖化糖浆的剂量。然而, 酶的剂量不应该与酶的应用相混淆。加入到淀粉浆中的酶有相当部分可以从发酵液中重新获得, 并用于新的颗粒淀粉发酵。

在发酵温度下使用酶的进一步考虑是, 虽然酶表现出较低的相对活力 (如来自地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶在所处发酵温度中的活力不超过最大活力的 25%), 低的相对活力被延长的发酵时间 (48-120 小时) 和延长的不经受更高温度的酶的半衰期所平衡。事实上, 经证实在发酵 72 小时后, 酶仍然保持了 90% 以上的活力。还值得注意的是, 使用 M1 导致 72 小时之后至少 50% 的淀粉固体被水解, 至少 90% 被水解, 在一些情况中, 至少 95% 被水解。

地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶 (SPEZYME® AA 和 SPEZYME® FRED enzymes; Genencor International Inc.) 足以稳定地抵抗短暂的暴露于蒸馏釜温度 (pot temperature)。因此, 循环蒸馏可以作为一种回收 α -

淀粉酶的方式。但是，从循环蒸馏中回收酶需要小心，以免让发酵液达到乙醇的脱离温度(stripping temperature)，而使酶失效。例如，醇类可能从发酵液中真空逃逸，这种循环蒸馏回收酶适合用于其后的反应。

然而，如先前描述的，一些 RSHs 葡萄糖淀粉酶（如获得自根霉的酶）可以用于在低于煮沸的温度将淀粉转变为葡萄糖，减少了将酶组合物暴露于蒸馏釜温度的需要。这降低了将碳底物转变为目的终产物的能源成本，因此降低了整个生产成本。因此，在本发明的方法中可以特别使用这些酶。

在本发明优选的实施方案中，一旦碳源被酶转变为中间物，它就会被适当的方法转变为目的终产物。转化由任何适合的方法（如酶或化学的方法）完成。在一个优选的实施方案中，转化是通过将中间物与微生物接触并通过中间物的生物转化来完成。在替换的优选实施方案中，底物转化酶和中间物转化酶被置于与各自底物和/或中间物直接接触。在一些实施方案中，酶以分离的、纯化的或浓缩的制品被提供。

目的终产物可以是酶将底物转化为终产物可能产生的任何产物。在一些优选的实施方案中，底物首先被转变为至少一种中间物，然后中间物被转变为终产物。例如，己糖可以被生物转变为许多产物，如抗坏血酸中间物、乙醇、1,3-丙二醇和葡糖酸。抗坏血酸中间物包括但不限于 2,5-二酮葡糖酸，2 KLG（2-酮-L-葡糖酸），和 5-KDG（5-酮-D-葡糖酸）。通过将葡萄糖与葡萄糖脱氢酶（GDH）接触，可以将葡萄糖转变为葡糖酸。另外，通过将葡糖酸与 GDH 接触，可以将葡糖酸转变为 2-KDG（2-酮-D-葡糖酸）。此外，通过将 2-KDG 与 2-KDGH 接触，可以将 2-KDG 转变为 2,5-DKG。通过将葡糖酸与 2KR 接触也能将葡糖酸转变为 2-KDG。通过将葡萄糖与大肠杆菌接触也能将葡萄糖转变为 1,3-丙二醇。另外，通过将葡萄糖与大肠杆菌接触能将葡萄糖转变为琥珀酸。

本发明也提供这里描述的附加的实施方案。在本发明的一特别优选的实施方案中，终产物是乙醇。在一些实施方案中，葡萄糖是一种

中间物，它通过与产生乙醇的微生物接触而被转变为乙醇。在中间物与中间物转化酶接触时，计划将分离和/或纯化的酶置于与中间物接触。而在另一些实施方案中，中间物与生物转变试剂如吸收中间物并产生目的终产物的细菌、真菌或其它生物体相接触。在一些实施方案中，生物体是野生型，而在另一些实施方案中，它是突变型。

优选的产生乙醇的微生物的例子包括表达醇脱氢酶和丙酮酸脱羧酶的产生乙醇的细菌，例如能够从运动发酵单胞菌（*Zymomonas mobilis*）中分离得到的细菌（见例如，U. S. Pat. Nos. 5,028,539; 5,000,000; 5,424,202; 5,487,989; 5,482,846; 5,554,520; 5,514,583 和共同未决申请：1994 年 12 月 27 日提交的 U. S. Ser. No. 08/363,868, 1995 年 6 月 7 日提交的 U. S. Ser. No. 08/475,925 和 1994 年 3 月 28 日提交的 U. S. Ser. No. 08/218,914，这些文献都以其整体引用作为参考。

在附加的实施方案中，产生乙醇的微生物表达木糖还原酶和木糖醇脱氢酶（将木糖转变为木酮糖的酶）。在进一步的实施方案中，木糖异构酶被用来将木糖转变为木酮糖。在附加的实施方案中，产生乙醇的微生物也表达木酮糖激酶，其为一种催化木糖醇转变为木酮糖-5-磷酸的酶。参与完成此路径的其它的酶包括转醛酶和转酮酶。这些酶能够得自或源于大肠杆菌、产酸克雷伯氏菌（*Klebsiella oxytoca*）和欧文氏菌属物种（见例如 U. S. Pat. No. No. 5,514, 583）。

在一些特别优选的实施方案中，利用了一种能够将戊糖和己糖都发酵成乙醇的微生物。例如在一些实施方案中，天然具有一套酶，并经遗传工程而具有另一套补充的酶的重组生物体被使用了（见例如 U. S. Pat. Nos. 5,000,000; 5,028,539; 5,424,202; 5,482,846; 5,514,583 和 WO95/13362）。在一些实施方案中，特别优选的微生物包括产酸克雷伯氏菌 P2 和大肠杆菌 KO11。

在一些实施方案中，补充物被加入到营养培养基（即培养培养基），包括但不限于维生素、大量营养素和微量营养素。维生素包括但不限于氯化胆碱、尼克酸、硫胺·HCL，维生素 B₁₂、对氨基苯酸、生物素、泛酸钙、叶酸、维生素 B₆·HCL 和核黄素。大量营养素包括但不限于

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2HPO_4 、 NaCl 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。微量营养素包括但不限于 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、钼酸(tech)、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 H_3BO_3 。

培养基和碳底物

本发明的转化培养基必须含有合适的碳底物，合适的碳底物包括但不限于生物质、单糖（如葡萄糖和果糖）、二糖（如乳糖和蔗糖）、寡聚糖、多糖（如淀粉和纤维素），还有它们的混合物和来自可回收原料的不纯的混合物，如干酪乳清渗透物、玉米浸泡液、糖用甜菜糖蜜和大麦麦芽。在附加的实施方案中，碳底物包含具有一个碳的碳底物如二氧化碳或甲醇，它们向关键生化中间物转化的代谢已经被证明了。

虽然预计以上提到的所有碳底物及其混合物都可用于本发明的方法中，优选的碳底物包括单糖、二糖、寡糖、多糖和一碳底物。更优选的实施方案中，碳底物选自葡萄糖、果糖、蔗糖和一碳底物，例如甲醇和二氧化碳。在最优选的实施方案中，底物是葡萄糖。

本领域已知，除了合适的碳源以外，发酵培养基必须含有合适的氮源，矿物质、盐、辅助因子、缓冲液和其它一些适合培养物生长并促进生产目的终产物（如甘油）所必需的酶途径的成分。在一些实施方案中，(II)盐和/或维生素 B_{12} 或它的前体可用于本发明。

培养条件

通常细胞生长在大约 30°C 的适当的培养基中。本发明利用的优选的生长培养基包括普通的商业制备培养基，如 Luria Bertani (LB) 液体培养基、Sabouraud Dextrose (SD) 液体培养基或麦芽酵母提取物(YM) 液体培养基。然而，其它合成的生长培养基，只要适合，也可能被使用。适当的培养条件在本领域已众所周知。

在一些实施方案中，已知直接或间接调节代谢物阻遏的试剂（如环腺苷 $2':3'$ -单磷酸盐或环腺苷 $2':5'$ -单磷酸盐）被加入到反应培养基中。相似的，也可使用导致甘油产量提高的调节酶活力的试剂（如

亚硫酸盐、亚硫酸氢盐和碱金属), 其与遗传操作连用或作为一种替代的方法。

发酵适合的 pH 范围介于 pH 5.0 到 pH 9.0; 而 pH 6.0 到 pH 8.0 的范围特别适合反应系统的初始条件。此外, 反应可以在好氧、微好氧或厌氧的条件下进行, 只要适合所用的生物体。

分批式和连续发酵

在一些优选的实施方案中, 本发明使用分批式发酵方法。经典的分批式发酵是一封闭的系统, 其中培养基的组成在发酵的一开始即被固定, 在发酵过程中不进行人为改变。因此, 在发酵的开始时培养基被接种目的生物体。在这种方法中, 发酵被允许在不向系统中添加任何成分的情况下进行。典型的分批式发酵根据碳源的加入定义为“分批式”, 并常常试图控制某些因素, 例如 pH 和氧浓度。分批式系统的代谢物和生物质组成随时间恒定变化, 直到发酵结束为止。在分批式培养物中, 细胞稳健的通过静止对数阶段到高速生长的对数阶段, 最终到达稳定阶段(stationary phase), 在此阶段生长率被减小或停止了。如果不被处理, 在稳定阶段的细胞会最终死亡。通常, 处于对数阶段的细胞负责终产物或中间物的大量产生。

标准分批式系统的一个改变是“补料分批式发酵”系统, 该系统也用于本发明。在这一对典型分批式系统的改变中, 底物的加入随发酵的进行而增加。当代谢物阻遏易于抑制细胞的代谢, 以及在培养基中需要底物数量有限时, 补料分批式系统就有用。在补料分批式系统中很难测量实际的底物浓度, 因此, 其以可测量因子的变化为基础进行估计, 如 pH、溶解氧和废气(如 CO_2) 的分压。在本领域分批式和补料分批式发酵既普通又众所周知。

预计本发明的方法也适用于连续发酵方法。连续发酵是一开放的系统, 其中合成发酵培养基被连续加到一生物反应器中, 等量的条件培养基被同时移走, 并进行处理。连续发酵通常保持培养物在一恒定的高密度, 其中细胞主要处于对数生长阶段。

连续的发酵允许调节影响细胞生长和/或终产物浓度的一种因子和任何数量的因子。例如，在一个实施方案中，限制性营养成分，例如碳源或氮水平，被保持在一固定的比率，所有其它参数允许被调节。在其它系统中，影响生长的一些因素可以被连续改变，而通过培养基混浊度测定的细胞浓度保持不变。连续系统努力保持生长条件的稳定状态。因此，由于培养基的撤出而导致的细胞丢失必须依靠发酵中细胞的生长速率来平衡。在工业微生物学领域，调节连续发酵过程中营养成分和生长因子的方法，以及使产物形成速率最大化的技术，已众所周知。

在一些实施方案中，本发明使用分批式方法，而在另一些实施方案中，使用补料分批式或连续方法，以及任何其它合适的发酵方式。另外，在一些实施方案中，细胞被固定于基质上作为全细胞催化剂，并处于适合终产物产生的发酵条件之下。

终产物的鉴定和纯化

在本领域已知从发酵培养基中纯化终产物的方法。例如，细胞培养基在被有机溶剂抽提之后，再经蒸馏和柱层析(见例如 U. S. Pat. No. 5,356,812)可以得到丙二醇。对这一过程特别好的有机溶剂是环己烷(见 U. S. Pat. No. 5,008,473)。

在一些实施方案中，通过将培养基直接进行高压液相层析(HPLC)分析，而使终产物得以鉴定。本发明的一个方法涉及在分析型离子交换柱上用等度洗脱的方式使用 0.01N 的硫酸作为流动相来分析发酵培养基。

酶的鉴定和纯化

培养基中酶的水平可以通过对酶的分析来测定。例如，在 1,3-丙二醇的生产中，蛋白质 G3PDH 和 G3P 磷酸酶的表达水平通过酶分析被测量。在 DHAP 转化为 G-3-P 的过程中，G3PDH 活力分析依赖于共底物 NADH 的光谱特性。NADH 具有本能的 UV/vis 吸收，它的消

耗可以使用 340nm 的分光光度测定法监控。G3P 磷酸酶活力可以通过任何测定反应中释放的无机磷酸盐的方法测定。使用的最普通的测定方法使用了可见分光光度法测定蓝色磷钼酸铵复合物。

因此,虽然本领域已知的方法与本发明的方法有许多表面的相似之处,本发明提供了通过大量详细特征所反映的更为全面的目的 (objectives),这些特征被认为是本发明的实践所独有的,包括可观的酶循环、生物质和淀粉循环。

回收

总的来说,在循环蒸馏中回收酶需要小心,以避免转化培养基达到使酶失活的温度。例如,为了乙醇的回收,醇类从发酵液中真空脱离之后,再循环蒸馏以回收酶。在一些实施方案中,酶被超滤或电渗装置回收,并循环。

方法考虑

如上所述,颗粒淀粉浆的发酵与糖浆的发酵具有完全不同的特点。通常溶液中具有 20% 的固体被认为是发酵液中最大的糖含量,因为更高的浓度会在发酵开始和结束时带来困难。然而,在淀粉浆的发酵中却没有相似的限制存在。浆中的淀粉浓度可以是 10-35%,在发酵起始时没有明显的后果。增加淀粉浓度(如酶量恒定)会加速生物转化速率,或者降低达到既定的生物转化速率所需的酶量。在任何情况下,发酵直至培养液含有 7-10% 醇(这在发酵领域中是普遍的)是可能的。过量的(即剩余的)颗粒淀粉可以和相当数量的酶一起被回收,并用于新的发酵。因此,控制淀粉浓度是本发明实践的主要方法参数。

在优选的实施方案中,提供了淀粉占 10-35% 重量的颗粒淀粉浆的生物转化和发酵。在一些优选的实施方案中,使用大肠杆菌发酵 10-35% 的淀粉浆,导致当发酵进行到有机酸或 1,3-丙二醇含量达到预设的水平时有剩余淀粉产生。然而,该反应依赖于使用的生物体和生物过程的条件,因此,当剩余的淀粉被再次发酵时,出现了在淀粉颗

粒上的酶的再循环。然而，在优选的实施方案中，即使 25- 35%的淀粉浆被发酵，在淀粉颗粒完全消失之前发酵已经被停止了，颗粒用于下次发酵。因此，回收淀粉是一种回收酶以便再利用的简便方法。

在替代的实施方案中，提供了 25-25wt%颗粒淀粉浆的发酵方法。用普通的面包酵母发酵 25-35%的淀粉浆，当发酵进行到所需的醇含量水平时（例如 7-10%）必定会产生残余淀粉，其取决于所用的微生物。当残余淀粉被再次发酵时，淀粉颗粒上的酶就得到了再循环。但是本发明无意限制于这一范围，因为依赖于本发明中所用的底物和/或酶系统，其它重量百分率也可用于本发明中。例如，在一些实施方案中，10-35wt%的颗粒淀粉浆是优选的。特别有用的微生物是对该方法产生的酶类具有抗性的。

在本发明一个优选的实施方案中，（颗粒）淀粉和微生物被同时撤走（如通过离心或过滤）。被撤走的淀粉和微生物与新的颗粒淀粉混合，必要时还会加入部分酶，以制成用于另一次发酵运转的发酵装料。

在另一实施方案中，提供了纤维素占 10-35%重量的玉米秸秆浆的生物转化和发酵。在一个实施方案中，使用大肠杆菌发酵 10-35%的纤维素浆，导致当发酵进行到有机酸或 1,3-丙二醇含量达到预设的水平时有剩余的纤维素。该反应依赖于使用的生物体和生物过程的条件。如上，当剩余的玉米秸秆被再次发酵时，出现了在玉米秸秆上的酶的再循环。然而，在优选的实施方案中，即使 25-35%的纤维素浆被发酵，在秸秆完全消失之前发酵已经被停止了，用于下次发酵。因此，回收秸秆是一种回收酶以便再利用的简便方法。

在另一个优选的实施方案中，颗粒淀粉或玉米秸秆和微生物被同时撤走（如通过离心或过滤）。被撤走的颗粒淀粉或玉米秸秆和微生物与新的玉米秸秆混合，必要时还会加入部分酶，以制成用于另一次发酵运转的发酵装料。

作为本领域技术人员的共识，为达到最佳的操作细节，折中的工程方案(trade-offs)被设计了。这些折中的方案会依赖于各特定的情况而变化。虽然如此，这里提供的方法为设计获得最佳过程的折中方案

提供了必要的教程。例如，为达到合理的最快发酵，指出使用高淀粉或纤维素含量和高的酶剂量。但是，随后的迅速发酵会减少营养物的产生，此时指示要回收营养物，或者要么使发酵停止于终产物（如醇）处于相对较低的含量时。然而，在相对低的发酵速率可接受的情况下，（使用高淀粉含量浆）酶剂量相对较低，营养物的损失保持在迄今为止发酵领域所能接受的水平。在首要目标是获得终产物（如醇）最大得率的情况下，低淀粉含量浆、适度的 α -淀粉酶剂量和高葡萄糖淀粉酶剂量可用于本发明。然而，本发明并无意被限于任何特定的方法设计。

如这里所述的，本发明节省了相当的热能。但是，正如起始底物（如淀粉）从未经受过用于液化的热条件，因此底物未经热灭菌。因此，一些实施方案预计起始底物（如颗粒淀粉）向发酵培养基中加入了污染微生物。因此，在一些实施方案中，在发酵培养基中接种大量的与回收底物（如淀粉）相关的产生产物的微生物是有利的。通过数量上大大超过污染物，回收的微生物压倒任何污染微生物，因而主导发酵，导致目的终产物的产生。因此，在一些实施方案中，涉及用大量可能伴随回收的颗粒淀粉的生产乙醇的微生物接种发酵培养基。通过他们的巨大数量，回收的微生物压倒任何污染微生物，因而主导发酵，当然，这是所需要的。

在一些实施方案中，最初装入发酵缸的酵母的数量与以前用于乙醇发酵的技术实践相一致，并且可能会有大范围的变化，因为在发酵的过程中酵母细胞会扩增。酵母细胞的回收虽然可以进行，但不是必要的。在一些实施方案中，在回收淀粉颗粒之前，酵母从剩余的淀粉颗粒中被除去。但是，应再次说明的是，本发明的实践无需淀粉的热处理（即加热灭菌淀粉的热条件）。

因此对于细菌，在本发明的一些实施方案中，建议在发酵中装入相对大比例的酵母细胞，以帮助克服（不小心）被污染的可能性。另外，在一些实施方案中，抗菌剂被加入到发酵培养基中以抑制污染微生物的生长。在进一步的实施方案中，低温灭菌技术被用来处理方法

中涉及的材料。

在多数优选的实施方案中，本发明的实践通过控制的速率向微生物（即酵母）释放可代谢的糖，以及将中间物（如葡萄糖）的浓度保持在不引发酶抑制和代谢物阻遏的水平，从而来控制发酵速率。此方法与本发明之前的做法非常不同。事实上，先前的技术建议在发酵之前用酶处理固体淀粉和/或在发酵培养基中包含酶以节省能源和/或提高发酵效率。然而，这些教导并没有改变发酵的特征以避免代谢物阻遏和/或酶抑制的不利作用。本发明也提供了方法来抵消葡萄糖所产生的不需要的副产物的不利影响。本发明也提供了节省能源的方法，特别是与现有技术的高温淀粉液化相比。事实上，本发明提供比别的方法节省更多热能的方法。本发明提供以高发酵效率运转的方法，部分是因为由淀粉凝沉(retrogradation)、不完全糖化和可发酵物的不完全发酵导致的产物损失被降低了。此外，通过控制淀粉浓度，以及控制酶含量和比例来调节发酵速率的能力包括了制造具有最小碳水化合物含量的发酵培养液产品的能力。

如上所述，在一些实施方案中，最初装入发酵缸或生物反应器的微生物和酶的量与以前用于发酵各种产物的技术实践和/或转化相一致。由于发酵过程中微生物细胞进行繁殖，这些数量会发生变化，而用于生物转化的酶将有一有限的半衰期。虽然，在一些实施方案中利用了回收的微生物，在许多实施方案中，并不需要本发明的这一实践。相反，在特别优选的实施方案中，再生酶是适合的（虽然本发明并无意被限于需要再生酶的方法。）

因此，在一些实施方案中，在回收淀粉或生物质之前先从残余淀粉或生物质颗粒上除掉微生物。然而，值得再次注意的是，本发明的实践无需起始底物（如淀粉）的热处理。因此，在一些实施方案中，起始底物被热灭菌，而在另一些实施方案中，却没有。因此，在一些实施方案中，发酵/生物转化在相对大比例的微生物存在的条件下进行，以克服任何污染的影响。在选择性的实施方案中，抗菌剂被加入到发酵微生物中以抑制污染微生物的生长。在附加的实施方案中，低

温灭菌技术、UV 照射、65℃巴氏灭菌法被用来灭菌起始材料（如底物）。然而，关于发酵缸或生物反应器的灭菌，生物质并没有带来难题。

使用淀粉作为起始材料不仅克服了目前现有技术方法的以上缺点，而且具有以下三点重要的好处：玉米淀粉对 D-葡萄糖的原料成本、底物或产物对生物转化中使用酶的抑制的降低和伴随的对高酶剂量需求的明显减少。

对于对本领域熟练的人来说，在读完此公开内容之后，任何不背离本发明精神和范围的各种其它实施例及对本说明书和实施例的修改都是显而易见的。所有这类实施例或修改被意图包含于附加的权利要求的范围内。这里参考的所有出版物和专利以其整体引入作为参考。

实验

提供以下的实施例是为了说明和进一步解释某些优选的实施方案和本发明的若干方面，不能理解为是对其范围的限制。事实上，预期这些教义将被发现可用于这里所描述的方法系统的进一步优化。

在以下的实验中，使用了以下简写：wt% (重量百分数)；℃(摄氏度)；rpm (每分钟转数)；H₂O(水)；dH₂O (去离子水)；HCl (盐酸)；aa (氨基酸)；bp (碱基对)；kb (千碱基对)；kD (千道尔顿)；gm (克)；μg (微克)；mg (毫克)；ng (纳克)；μl(微升)；ml (毫升)；mm (毫米)；nm (纳米)；um (微米)；M (摩尔/升)；mM (毫摩尔/升)；uM (微摩尔/升)；U (单位)；V (伏特)；MW (分子量)；psi (磅每平方英寸)；sec (秒)；min (s) (分)；hr (s)(小时)；Q. S.和 q. s. (补足量)；OD (光密度)；OD₂₈₀(在 280nm 的光密度)；OD₆₀₀ (在 600nm 的光密度)；PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳)；PBS (磷酸盐缓冲溶液 [150 mM NaCl, 10 mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.2])；Cerestar (Cerestar, Inc., Cargill Inc., 公司, Minneapolis, MN)；SDS (十二烷基硫酸钠)；Tris (三(羟甲基)氨基甲烷)；w/v (重量比体积)；v/v (体积比体积)；ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)；Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI)；GIBCO BRL 或 Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)；Genencor

(Genencor International, Inc., Palo Alto, CA); Shin Nihon (Shin Nihon, Japan); BioRad (BioRad Laboratories, Hercules, CA); 和 LeSaffre (LeSaffre Yeast Corporation, Milwaukee, WI)。

在以下的实施例中，使用了附加的各种本领域人士已知的培养基和缓冲液，包括如下：

实施例 1

未煮过的玉米醪液的发酵

在此实施例中，描述了比较淀粉水解酶和葡萄糖淀粉酶对于未经煮过的淀粉的活力的实验。

发酵实验在 30℃ 摇床水浴孵育的 250ml 烧瓶内进行。对于此实验，含有 0.5% 干玉米浸泡液的 112gm、32.1% 磨碎玉米浆被置于 250ml 烧瓶中。浆状物的 pH 约为 5.7，无需进一步调整。所需的酶（DISTILLASE® 或 Sumizyme CU; Shin Nihon）与 0.37gm Red Star 活性干酵母（LeSaffre）一起被加入，以起始糖化和发酵。在发酵过程中，啤酒样品被离心，0.5ml 上清被加到含有 0.05ml 1.1N H₂SO₄ 和 5% 戊二醛的试管中，以终止发酵和酶反应。样品随后被 5ml 水稀释，然后经 HPLC 在 Bio Rad HPX-87H 柱上分析。结果显示在以下的表 1。

表 1

比较 Sumizyme CU 和 Distillase 对未经煮的玉米粉的发酵

发酵在 30℃ 进行，酶剂量为 GAU/g 玉米

烧瓶	酶	小时	% W/V % DP>2	% W/V DP-2	% W/V DP-1	% W/V 乳酸	% W/V 甘油	% V/V 乙醇
1	0.20 GAU/g CU	24	0.27	0	0.02	0.12	0.66	8.91
		48	0.29	0	0	0.06	0.71	13.68
		72	0.30	0	0	0.02	0.59	15.07
2	0.20 GAU/g Dist	24	0.25	0	0	0.13	0.28	3.05
		48	0.20	0	0	0.37	0.26	4.59
		72	0.19	0	0	0.49	0.24	6.10
3	0.40 GAU/g Dist	24	0.20	0	0	0.09	0.34	4.59
		48	0.21	0	0	0.12	0.38	7.24
		72	0.17	0	0	0.11	0.38	9.45
4	0.75 GAU/g Dist	24	0.22	0	0	0.08	0.40	5.51
		48	0.20	0	0	0.06	0.44	9.54
		72	0.21	0	0	0.03	0.45	12.13
5	1.00 GAU/g Dist	24	0.24	0	0	0.11	0.49	6.38
		48	0.22	0	0	0.13	0.41	10.64
		72	0.18	0	0	0.07	0.61	13.29

CU= 来自 Shin Nihon 的 Sumizyme CU

Dist= Distillase L-400

如表 1 所指出的, 在啤酒中几乎不能发现葡萄糖, 这说明当淀粉被水解后, 它被酵母迅速的转变成乙醇。图 1 提供了表明各种实验的乙醇含量的曲线。

这些结果能够表明淀粉水解酶能够比 DISTILLASE®更为有效的转变未煮的淀粉。发酵的速率似乎与 RSU 活力更相关。0.2 GAU/gm 水平的 CU 相当于 0.5% RHU/gm, 而 1.0 GAU/gm 水平的 DISTILLASE®仅相当于 0.108 RHU/gm。DISTILLASE®的 RHU/GAU 比例是 0.54, 而 CU 的 RHU/GAU 比例是 2.98, 这表明具有高 RHU/GAU 比例的酶能够更好的水解未煮的淀粉。

实施例 2

玉米粉浆的发酵

在这些实验中, 使用了与实施例 1 的实验相同的程序, 不同的是: 使用 35.9% 的玉米粉浆 (代替玉米醪液), 并且在发酵起始之前, 浆被置于 65℃ 的水中 1 小时, 作为巴氏灭菌法的步骤。没有可见的浆状物胶凝化被观测到。测试的酶是 Sumizyme CU (实施例 1)、来自 Biocon 的根霉葡萄糖淀粉酶制品 (M1) (178 GAU/gm 和 277 RHU/gm) 以及 DISTILLASE® L-400 (Dist.) (361 GAU/gm 和 196 RHU/gm)。表 2 提供了用于此研究的条件和结果总结。

表 2

使用分开和组合的酶进行未煮淀粉的发酵

样品	酶	水平	酶	水平	小时	% W/V DP>2	% W/V DP-2	% W/V DP-1	% W/V 乳酸	% W/V 甘油	% V/V 乙醇
1	M1	.20 GAU/g			24	0.40	0.04	0.02	0.17	0.67	8.66
1					48	0.35	0.02	0.00	0.10	0.74	12.28
1					72	0.36	0.01	0.00	0.04	0.76	14.02
2	M1	.50 GAU/g			24	0.42	0.03	0.01	0.13	0.80	11.91
2					48	0.41	0.04	0.00	0.04	0.82	15.24
2					72	0.54	0.03	0.00	0.02	0.84	15.23
3	M1	.75 GAU/g			24	0.42	0.03	0.01	0.12	0.86	12.43
3					48	0.53	0.02	0.01	0.06	0.91	15.30
3					72	0.55	0.03	0.01	0.03	0.94	15.43
4	CU	.20 GAU/g			24	0.34	0.03	0.10	0.14	0.92	10.59
4					48	0.35	0.07	0.05	0.09	1.03	14.96
4					72	0.40	0.04	0.04	0.04	1.04	15.63
5	CU	.50 GAU/g			24	0.37	0.13	0.80	0.13	0.96	12.20
5					48	0.45	0.24	1.15	0.08	1.05	14.96
5					72	0.45	0.25	1.46	0.07	1.08	14.96
6	CU	.75 GAU/g			24	0.43	0.16	1.15	0.13	0.97	12.69
6					48	0.51	0.30	2.19	0.08	1.05	14.90
6					72	0.51	0.33	2.67	0.07	1.08	14.83
7	M1	.20 GAU/g	Dist	.2 GAU/g	24	0.41	0.04	0.02	0.14	0.71	9.19
7					48	0.35	0.01	0.00	0.07	0.75	13.06
7					72	0.40	0.02	0.00	0.02	0.78	15.20
8	M1	.20 GAU/g	Dist	.6 GAU/g	24	0.33	0.04	0.03	0.15	0.77	9.56
8					48	0.39	0.02	0.00	0.09	0.84	13.56
8					72	0.38	0.03	0.00	0.04	0.86	15.02
9	M1	.20 GAU/g	Dist	2.0 GAU/g	24	0.30	0.03	0.03	0.13	0.82	10.46
9					48	0.33	0.02	0.01	0.08	0.89	14.66
9					72	0.38	0.03	0.01	0.03	0.90	15.74

来自 M1 和 CU 发酵的乙醇结果被绘于图 2A 和 2B。乙醇产生的速率和得率在 0.2GAU/gm 水平的 M1 时比在 0.5 和 0.75 水平的 M1 时的小，表明 0.2 水平是酶限制的。0.5 和 0.75 水平的 M1 似乎获得非常相似的结果，表明酶不再是限制性的了。来自 CU 的结果类似的表明 0.2 酶水平在一定程度上限制了发酵，但是快于用 2 GAU/gm 的 M1 获得的结果。

这表明 RHU 活力是更好的指示未煮淀粉水解的参数。每 GAU CU 具有两倍于 M1 的 RHU 活力，并且在相似的 GAU 水平，CU 看起来水解未煮淀粉更快。在 0.5 和 0.75 GAU/gm 剂量观测到了过量的葡萄糖水平，特别是在更高的酶水平时。事实上，看来是淀粉的水解速率快于发酵速率。这些结果也表明，在乙醇为大约 15% 时，乙醇变的似乎对酵母有毒，因为发酵似乎停止了。

图 2 表 C 提供的曲线表明来自 DISTILLASE® 中加入 M1 的发酵

的乙醇结果。如结果所示，向低水平的 M1 (2 GAU/gm) 加入 DISTILLASE[®]，速率和乙醇的得率都提高了，改善了 M1 的性能。这些结果表明通过向 GSH 比例低于 0.6 的 DISTILLASE[®] 中加入 GSH 比例高于 1.5 的葡萄糖淀粉酶制品，能够水解未煮的淀粉，以致于可以使用不经预煮的方法来制造乙醇。

实施例 3

煮过和未煮过玉米醪液的比较

在这些实验中，发酵的进行与实施例 1 所描述的相似，除了将 83gm 的 28.9% 的玉米粉浆置于 250ml 含有一磁棒的瓶中。瓶子被置于浸没于 30℃ 水浴的磁力搅拌器上，以便在发酵过程中醪液能被温和的混合。对 DISTILLASE[®] 和 M1 组合的测试如表 3 所示。这些发酵起始于 0.27gm 干酵母。发酵之后，啤酒在 65℃ 通风炉中干燥，以获得所认为的 DDGS (Distillers Dry Grains Plus the Solubles)。通过这种方式获得了 DDGS 的定量估计，通过淀粉分析技术得到了 DDGS 的淀粉含量。表 3 还显示了发酵的 HPLC 特征。

表 3:

试验	M1 GAU/g	Dist. GAU/g	小时	HPLC 特性					
				% W/V DP>2	% W/V DP-2	% W/V DP-1	% W/V 乳酸	% W/V 甘油	% V/V 乙醇
1	0.10	0.00	24	0.23	0	0	0.08	0.28	3.40
1			48	0.26	0	0	0.46	0.56	5.66
1			72	0.27	0	0	0.62	0.33	6.95
2	0.10	0.20	24	0.24	0	0	0.11	0.41	5.70
2			48	0.27	0	0	0.09	0.46	9.21
2			72	0.32	0	0	0.04	0.48	11.44
3	0.10	0.40	24	0.19	0	0	0.14	0.52	8.87
3			48	0.26	0	0	0.12	0.61	10.87
3			72	0.27	0	0	0.05	0.63	12.98
4	0.10	0.60	24	0.22	0	0	0.15	0.59	7.79
4			48	0.26	0	0	0.12	0.67	11.93
4			72	0.29	0	0	0.05	0.69	13.63
5	0.10	1.00	24	0.18	0	0.01	0.15	0.69	9.07
5			48	0.23	0	0	0.10	0.76	12.74
5			72	0.29	0	0	0.05	0.79	14.14
6	0.20	0.00	24	0.22	0	0	0.12	0.42	5.64
6			48	0.27	0	0	0.08	0.43	8.86
6			72	0.32	0	0	0.03	0.46	11.33
7	0.20	0.20	24	0.23	0	0	0.15	0.54	7.29
7			48	0.25	0	0	0.13	0.53	11.15
7			72	0.22	0	0	0.07	0.66	13.09
8	0.20	0.40	24	0.21	0	0	0.15	0.62	8.46
8			48	0.25	0	0	0.13	0.70	12.38
8			72	0.27	0	0	0.06	0.53	13.65
9	0.20	0.60	24	0.25	0	0	0.14	0.63	9.43
9			48	0.21	0	0	0.08	0.72	13.15
9			72	0.29	0	0	0.03	0.73	14.40
10	0.20	1.00	24	0.24	0	0.02	0.14	0.75	10.32
10			48	0.25	0	0	0.08	0.78	14.12
10			72	0.31	0	0.01	0.04	0.80	14.31
11	0.40	0.00	24	0.26	0	0	0.16	0.56	8.00
11			48	0.31	0	0	0.10	0.64	12.04
11			72	0.27	0	0	0.04	0.67	13.77
12	0.40	0.20	24	0.22	0	0	0.14	0.62	9.24
12			48	0.29	0	0	0.09	0.69	13.55
12			72	0.28	0	0	0.03	0.70	14.01
13	0.40	0.40	24	0.25	0	0	0.15	0.69	10.15
13			48	0.29	0	0	0.09	0.75	13.64
13			72	0.33	0	0	0.05	0.77	14.40
14	0.40	0.60	24	0.24	0	0.02	0.14	0.73	10.89
14			48	0.31	0	0	0.09	0.79	13.84
14			72	0.34	0	0	0.04	0.78	14.19
15	0.40	1.00	24	0.26	0	0.02	0.13	0.76	11.35
15			48	0.32	0	0	0.08	0.82	14.30
15			72	0.29	0	0	0.05	0.83	14.54

如图 3, 图表 A、B 和 C 所示, 在 M1 被测试的每一个水平, DISTILLASE®的加入提高发酵速率和乙醇产率。

DDGS 的淀粉分析显示于表 4。根据这些分析和 DDGS 的数量, 估计了发酵桶中剩余的未被转变的淀粉量。这些结果表明, 向 M1 中加入 DISTILLASE®有助于提高未煮淀粉的水解。

表 4

试验	M1 GAU/g	Dist. GAU/g	% V/V 乙醇	DDGS		%未利用 的淀粉
				gm DS	% 淀粉	
1	0.10	0.00	6.95	13.93	52.37	46.75
2	0.10	0.20	11.44	8.88	26.84	15.29
3	0.10	0.40	12.98	7.29	15.60	7.29
4	0.10	0.60	13.63	6.74	9.53	4.12
5	0.10	1.00	14.14	6.68	5.60	2.40
6	0.20	0.00	11.33	9.51	33.64	20.51
7	0.20	0.20	13.09	7.53	16.84	8.13
8	0.20	0.40	13.65	6.72	8.88	3.83
9	0.20	0.60	14.40	6.37	3.75	1.53
10	0.20	1.00	14.31	6.36	2.50	1.02
11	0.40	0.00	13.77	7.00	9.43	4.23
12	0.40	0.20	14.01	6.78	8.57	3.73
13	0.40	0.40	14.40	6.38	3.12	1.28
14	0.40	0.60	14.19	6.44	2.02	0.83
15	0.40	1.00	14.54	6.41	1.61	0.66

因此，这些实施例所获得的这些结果表明通过向 GSH 比例低于 0.6 的葡萄糖淀粉酶中加入 GSH 比例高于 1.5 的葡萄糖淀粉酶制品，能够水解未煮的淀粉，以致于乙醇发酵可以在未经煮过的醪液上进行。这些结果表明，高 GSH 比例的葡萄糖淀粉酶对低 GSH 比例葡萄糖淀粉酶的百分组成低达 9%，对于水解未煮淀粉是非常有效的。

实施例 4

釜馏物对煮过和未煮过醪液发酵的影响

此实施例描述了设计来评估含有各种釜馏物(Stillage)水平的液化玉米醪液发酵的实验，与之相比的是含有各种釜馏物水平的未煮玉米醪液的发酵。用于发酵的酶不同。FERMENZYME®被用于液化醪液的发酵，它是与商业上使用的相似的制品。对于未经煮过的醪液发酵，DISTILLASE®与 RSH 酶 M1 的混合物被使用了。

设计实验使得玉米固体保持恒定而来自釜馏物的固体变化。这意味着当釜馏物增加时发酵桶中的总固体增加了。稀釜馏物(thin stillage)得自于当地的一干磨乙醇厂。稀釜馏物被真空旋转蒸发浓缩到 44% 的固体。浓缩稀釜馏物是必要的，以便发酵桶中的总固体易于操作。每一发酵桶的醪液组成见于表 5。

表 5: 发酵桶醪液组成

pH5.0 的 31%液化玉米, 0.25 克酵母, 总重 150 克 0.4GAU/gm Fermentzyme				
No	液化釜糖浆 gm	水 gm	醪液 % DS	
1	130	0	20.0	31.1
2	130	2	18.0	31.7
3	130	5	15.0	32.5
4	130	10	10.0	34.0
5	130	15	5.0	35.5
6	130	20	0.0	36.9

pH5.0 的 31%小于 30 目的未煮玉米, 0.25 克酵母, 总重 150 克 .6 GAU/gm Distillase + .19 RHU/gmM1 + GC106 equivalent				
No	玉米 gm	釜糖浆 gm	水 gm	醪液 % DS
7	52.4	0	97.1	30.9
8	52.4	2	95.1	31.5
9	52.4	5	92.1	32.4
10	52.4	10	87.1	33.9
11	52.4	15	82.1	35.3
12	52.4	20	77.1	36.8
13	52.4	25	72.1	38.3
14	52.4	30	67.1	39.7

用于液化玉米醪液的酶是每克液化玉米 0.4 GAU 的 **FERMENZYME®**。FERMENZYME®是 **DISTILLASE®**和真菌蛋白酶的特定混合物, 用于发酵玉米醪液, 它可以从 Genencor 商购获得。对于未经煮过的发酵物, **DISTILLASE®**和 M1 的混合物与用于液化玉米醪液测试运作的 **FERMENZYME®**中等价量的蛋白酶一起被使用。如表 5 所指出的, 发酵桶中的固体是变化的 (醪液 % DS)。发酵的结果见如下表 6。

表 6: 发酵过程中的 HPLC 特性

Ferm	醪液	釜馏物 gm	酶	小时	% W/V DP>2	% W/V DP-2	% W/V DP-1	% W/V 乳酸	% W/V 甘油	% V/V 乙醇
1	Liq	0	Fermentzyme	24	4.93	3.63	1.66	0.69	0.60	8.74
1				48	1.50	0.56	2.17	0.88	0.83	14.08
1				72	0.71	0.56	0.17	0.84	0.85	16.28
2	Liq	2	Fermentzyme	24	5.34	3.94	1.72	0.82	0.79	9.33
2				48	1.77	0.61	4.06	0.99	1.03	12.85
2				72	0.90	0.61	3.14	0.99	1.04	14.04
3	Liq	5	Fermentzyme	24	5.75	4.40	1.80	0.98	1.07	9.35
3				48	2.07	0.65	4.66	1.13	1.27	11.92
3				72	1.14	0.68	3.26	1.16	1.35	13.54
4	Liq	10	Fermentzyme	24	5.74	4.31	1.55	1.15	1.28	9.41
4				48	2.28	0.72	5.21	1.36	1.56	11.80
4				72	1.35	0.75	4.73	1.36	1.59	12.88
5	Liq	15	Fermentzyme	24	6.26	4.65	1.64	1.47	1.56	9.66
5				48	2.56	0.87	5.50	1.59	1.82	11.56
5				72	1.57	0.84	4.71	1.58	1.83	12.58
6	Liq	20	Fermentzyme	24	6.16	1.67	1.67	1.64	1.81	9.30
6				48	2.75	0.91	5.79	1.77	2.05	11.57
6				72	1.83	1.00	6.48	1.82	2.00	11.63
7	g. com	0	Distillase + M1 + GC106	24	0.34	0	0.01	0.14	0.67	11.86
7				48	0.36	0	0	0.17	0.78	15.65
7				72	0.39	0	0	0.18	0.86	17.48
8	g. com	2	Distillase + M1 + GC107	24	0.35	0	0.02	0.23	0.77	11.96
8				48	0.40	0	0	0.25	0.88	16.09
8				72	0.38	0	0	0.19	0.95	17.56
9	g. com	5	Distillase + M1 + GC108	24	0.40	0	0.02	0.38	0.88	12.07
9				48	0.42	0	0	0.38	0.99	15.99
9				72	0.43	0	0	0.31	1.07	18.03
10	g. com	10	Distillase + M1 + GC109	24	0.54	0	0.03	0.65	1.02	11.31
10				48	0.53	0	0	0.66	1.18	15.95
10				72	0.52	0	0	0.65	1.24	17.69
11	g. com	15	Distillase + M1 + GC110	24	0.70	0	0	0.83	1.18	10.22
11				48	0.66	0	0.10	0.87	1.40	15.53
11				72	0.62	0	0	0.83	1.42	17.14
12	g. com	20	Distillase + M1 + GC111	24	0.82	0	0	1.15	1.47	10.04
12				48	0.78	0	0	1.09	1.52	14.32
12				72	0.78	0	0	1.04	1.70	17.24
13	g. com	25	Distillase + M1 + GC112	24	1.04	0	0	1.48	1.78	7.71
13				48	1.01	0	0	1.40	1.77	11.40
13				72	0.99	0	0	1.42	1.97	14.72
14	g. com	30	Distillase + M1 + GC113	24	1.17	0	0	1.74	2.02	7.68
14				48	1.18	0	0	1.70	2.06	11.61
14				72	1.12	0	0	1.65	2.18	14.58

在商业实践中,一定量的釜馏物被回收用于酵母营养成分,并帮助工厂的水平衡。因此,在工业发酵工厂中非常渴望受釜馏物影响低的发酵系统。这些实验的结果表明,釜馏物对液化醪液发酵的影响大于对未煮醪液的影响。

图 4 表示乙醇对加入至两种类型醪液的釜馏物量的反应。在两种情况下,增加釜馏物固体会降低乙醇水平。但是如图 4 所示,未煮过

的醪液的敏感性远低于煮过的醪液。

图 5 表示发酵 72 小时之后的葡萄糖曲线，结果非常令人吃惊。在煮过的醪液中，当釜馏物固体增加时，更多的葡萄糖未被发酵，而在未煮过的醪液中，在所有水平的釜馏物情况中，基本上都没有可检测水平的葡萄糖。这一观察结果非常重要，因为当淀粉被水解后，它立即被酵母转变为乙醇。葡萄糖累积的这一水平非常不同寻常。就酵母而言这一观察也特别重要，因为即使葡萄糖水平极低，发酵中的酵母仍然保持非常活跃。相反，在煮过的醪液中，即使葡萄糖被充足提供，酵母也不能发酵葡萄糖。

图 6 是发酵 72 小时后二糖相对于所加釜馏物的曲线。对于未煮的醪液，在釜馏物被加入的整个范围下，基本上没有可检测的二糖水平。但是对于煮过的醪液而言，当釜馏物水平增加时，二糖也增加。

如图 7 所指出的，更高级的糖（即大于二糖的寡糖）提供了某种程度上相似的图形，因为当釜馏物加入后，煮过的醪液的高级糖水平高于未煮醪液。

图 8 表示了发酵 72 小时后的乳酸水平。如所指出的，煮过的醪液的乳酸水平高于未煮醪液。对乳酸的一个考虑是，它是污染物的一个度量。虽然本发明无意限于任何特定的理论或机制，但是由于在未煮过的醪液中葡萄糖和二糖的水平始终非常低，所以污染微生物只有非常少的底物可利用。

图 9 提供了发酵 72 小时后甘油水平的总结。如所指出的，在各自釜馏物的加入水平，未煮醪液的水平再次低于煮过的醪液。在利用酵母发酵的过程中，甘油形成的一个贡献因素是酵母所处的压力(stress)。通常，酵母所处的压力越大，形成的甘油越多。图 9 的结果表明，在相似的釜馏物水平，在未煮过的醪液中酵母处于较低的压力。但是，即使在与煮过的醪液一起运转的更高的釜馏物水平下，更高水平的甘油被形成了。在未煮过的醪液中，即使具有更高的甘油水平，酵母也能产生更多的乙醇。因此，看来酵母似乎在非煮过的醪液中发酵比在煮过的醪液中发酵更加有效。

对于本领域技术人员来说，在读完此公开内容之后，任何不背离本发明精神和范围的各种其它实施例以及对前述描述和实施例的修改都是显而易见的。所有这类实施例或修改被意图包含于附加的权利要求的范围内。这里参考的所有出版物和专利都以其整体引入作为参考。

葡萄糖淀粉酶在使用未经煮熟的玉米
 醪液的乙醇发酵中的影响

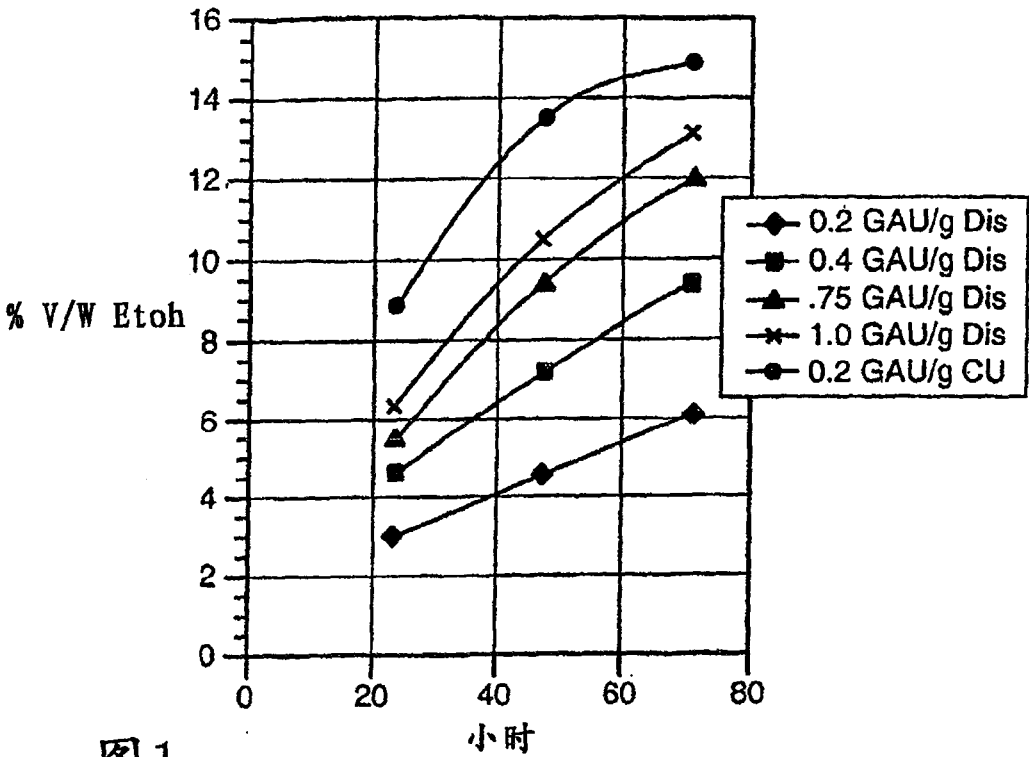


图1

使用M1的未煮熟
 玉米粉的发酵

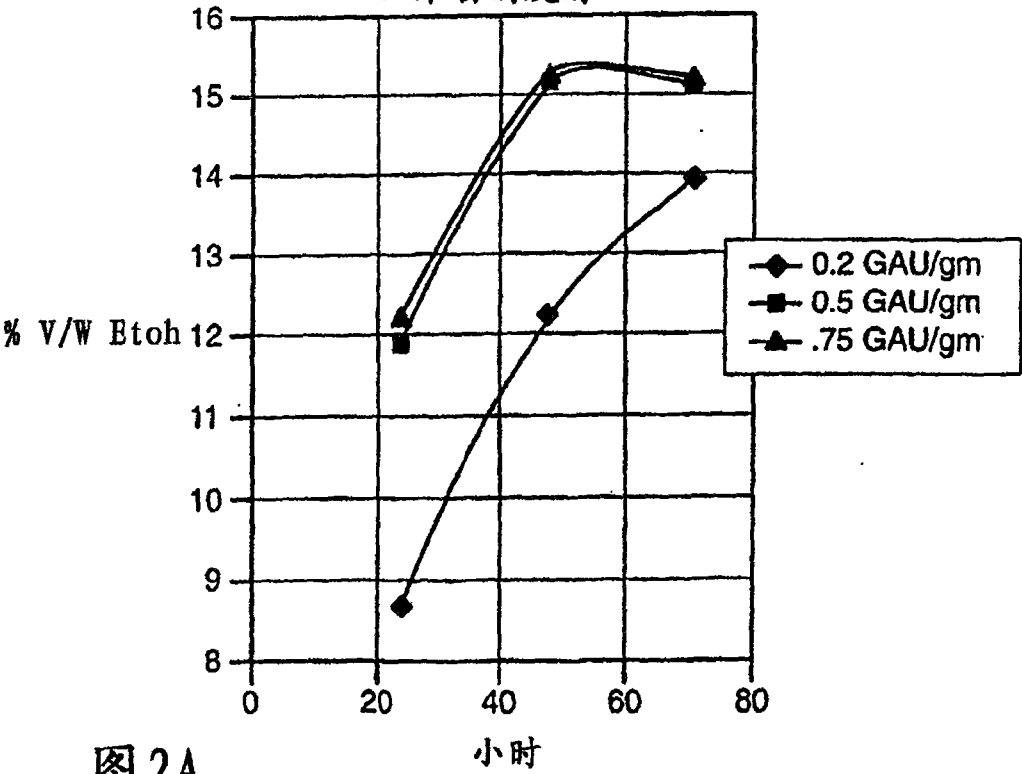


图2A

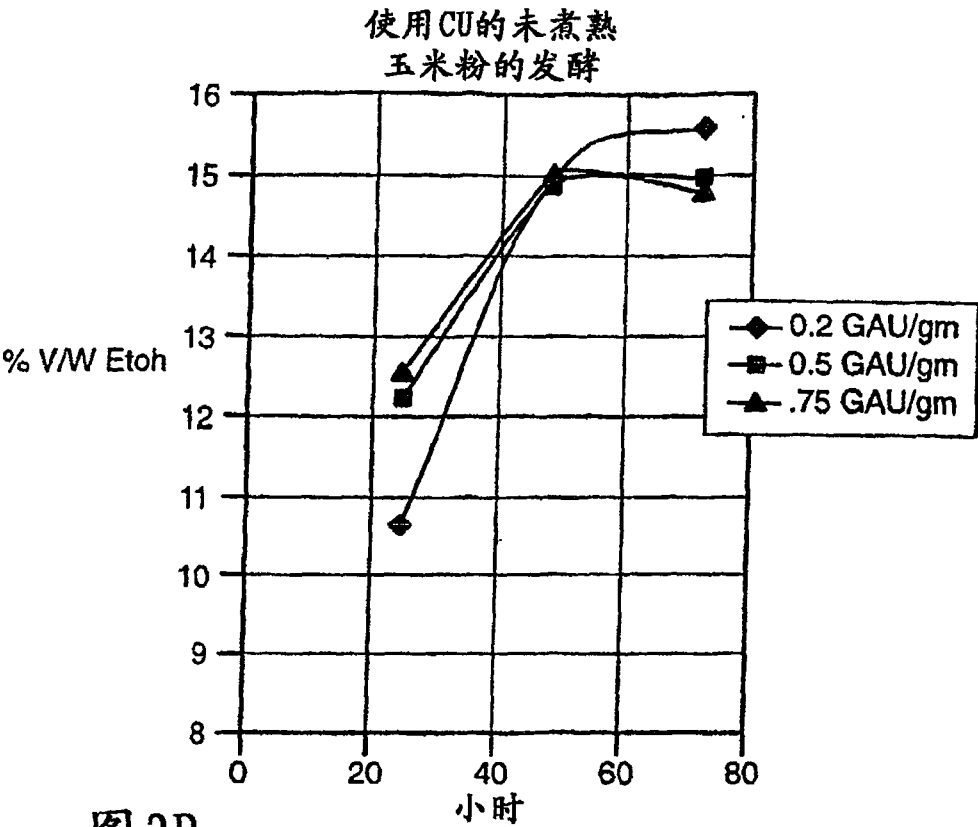


图 2B

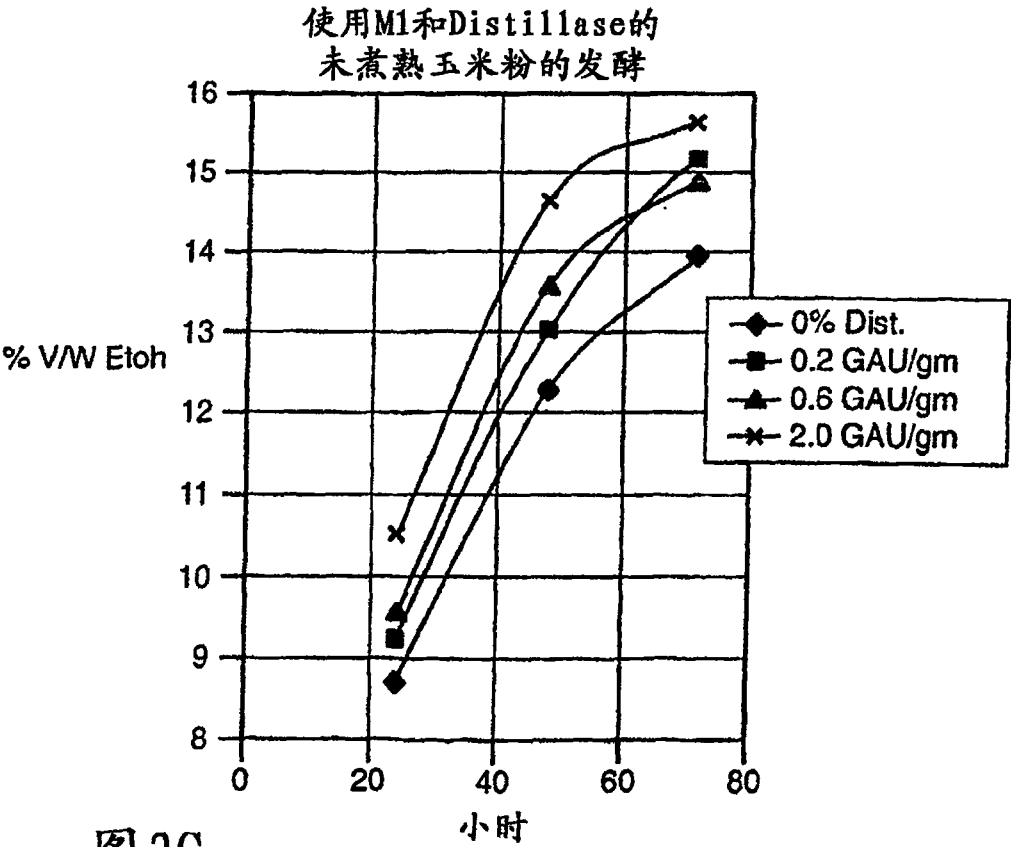
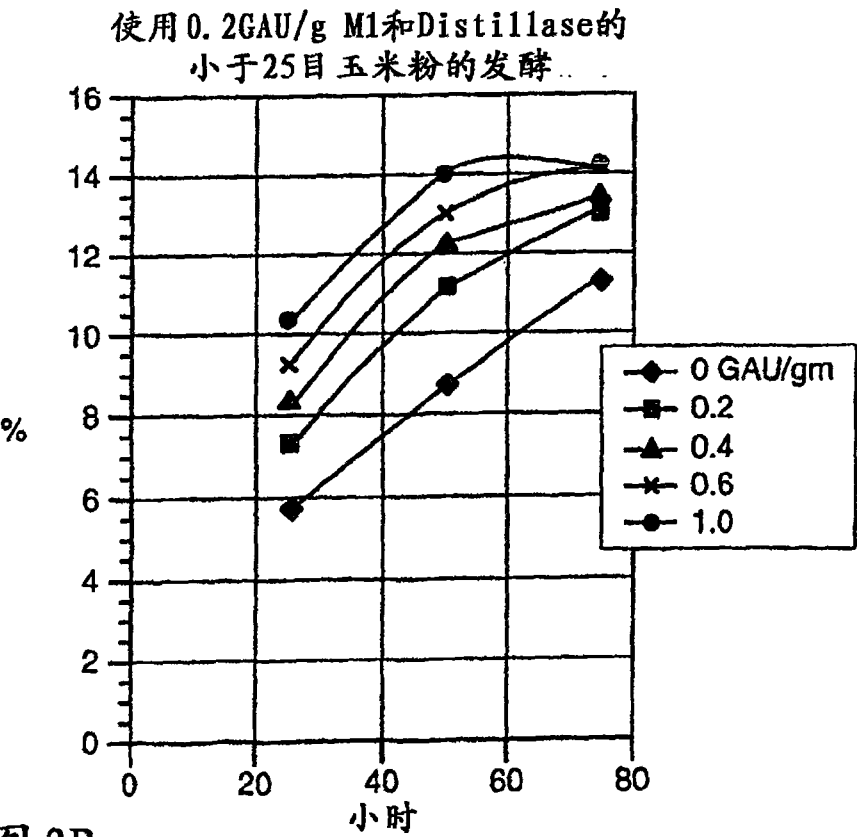
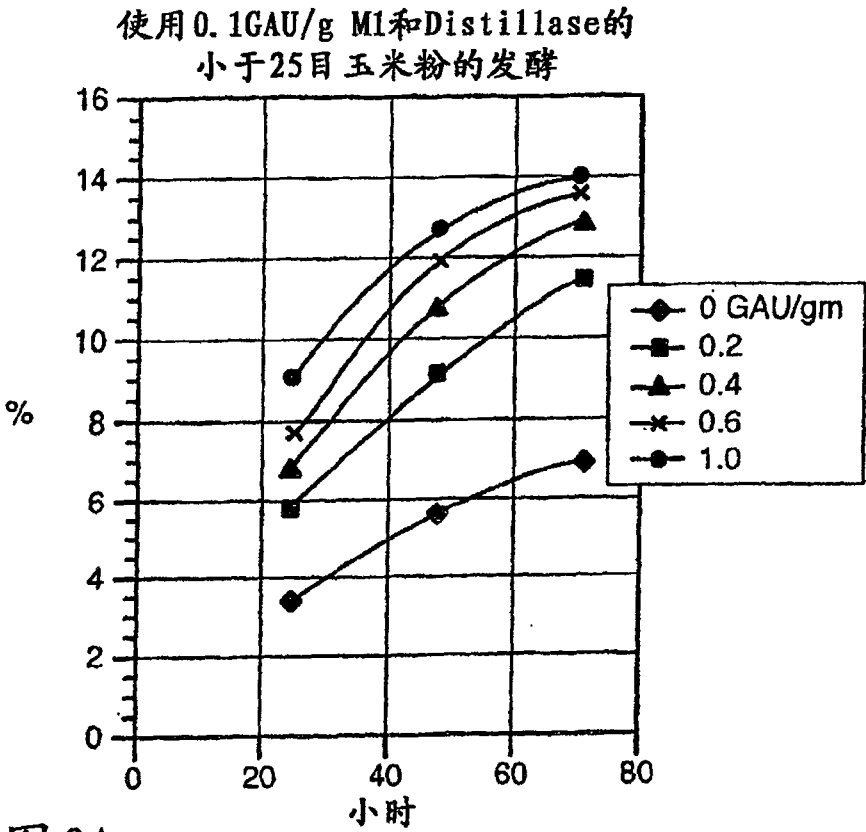


图 2C



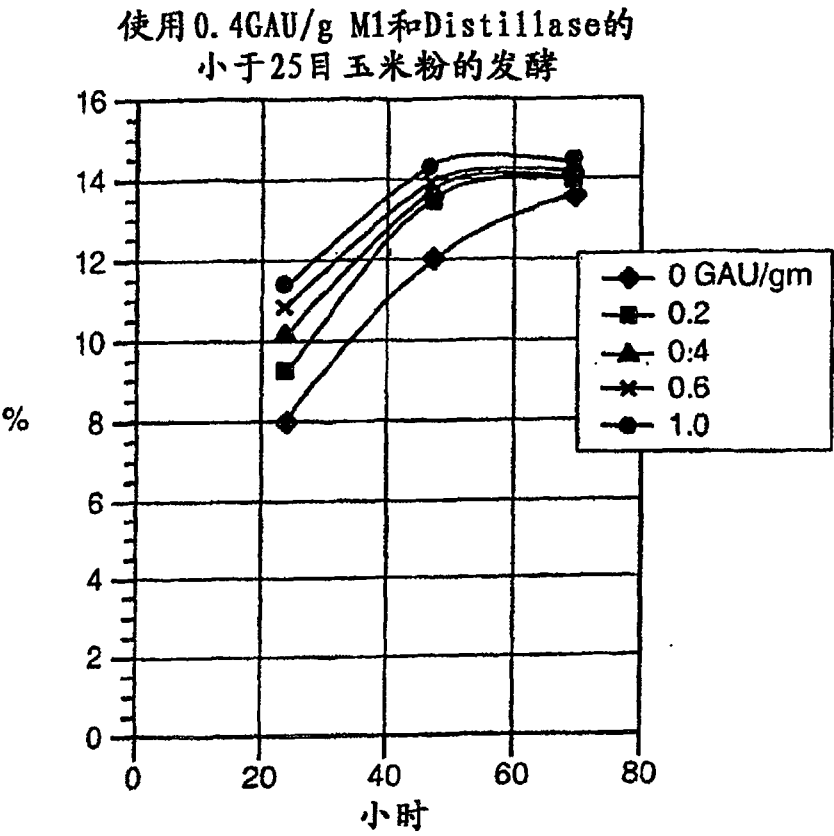


图 3C

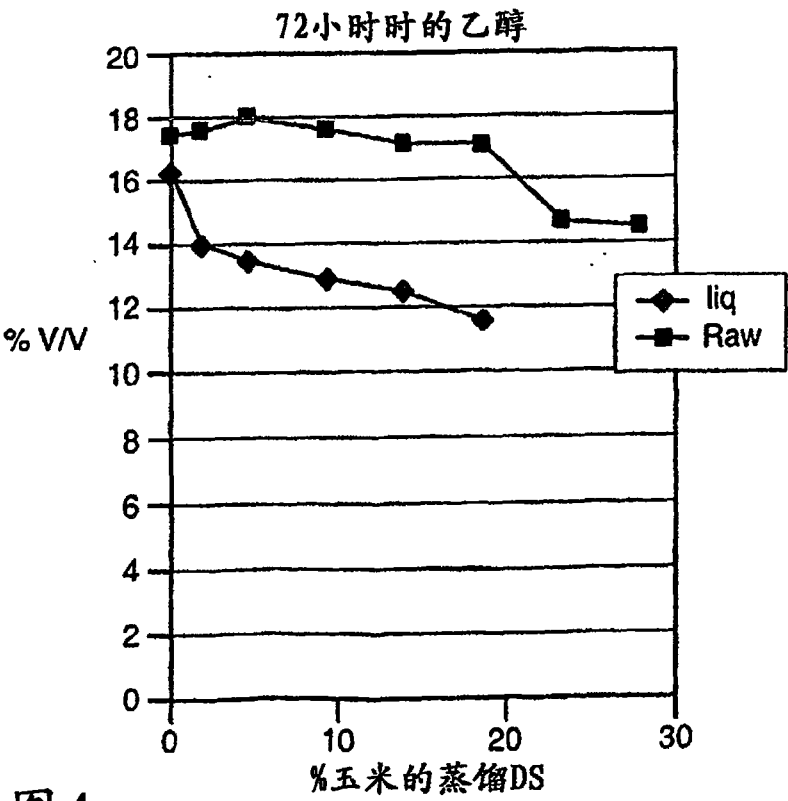


图 4

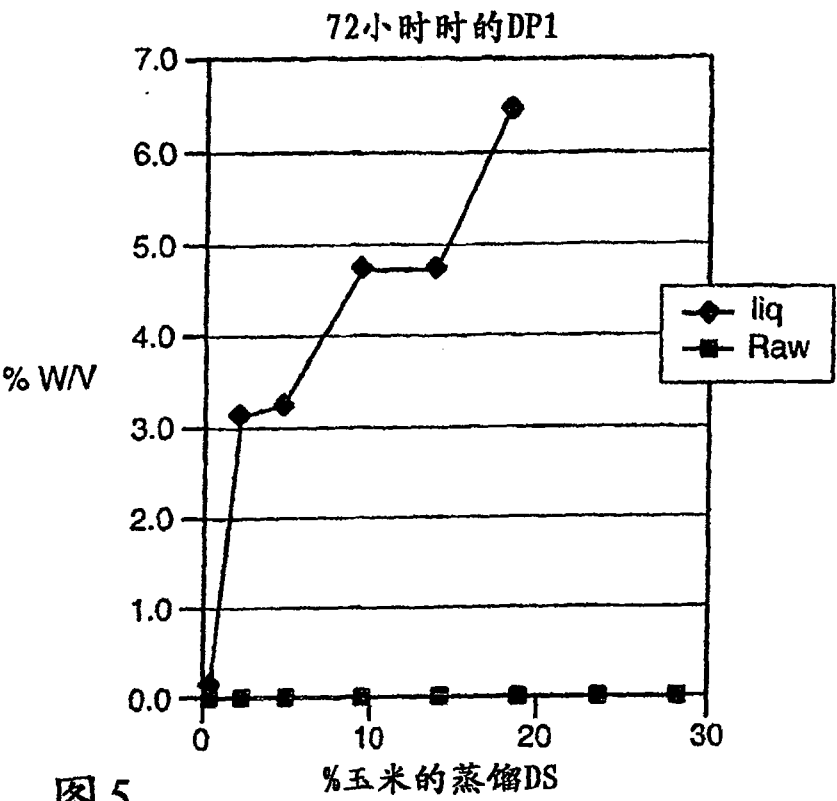


图 5

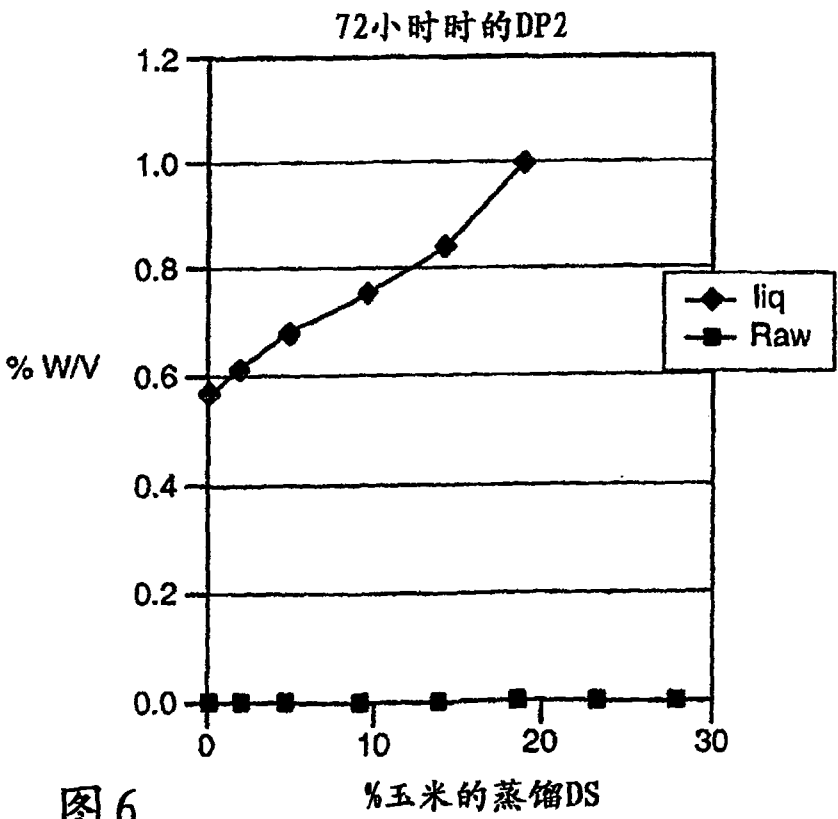


图 6

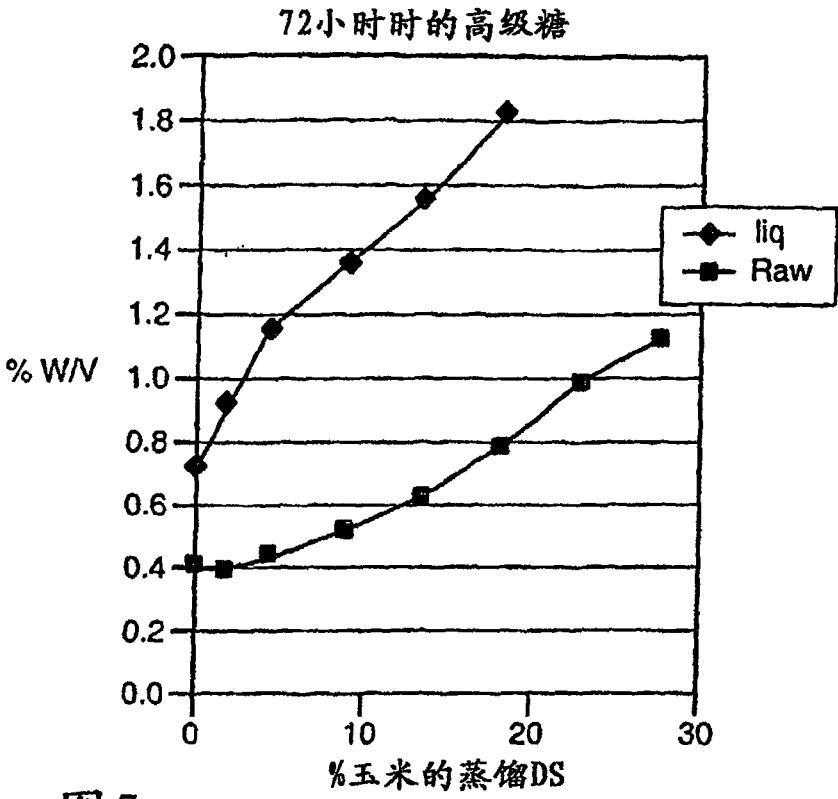


图 7

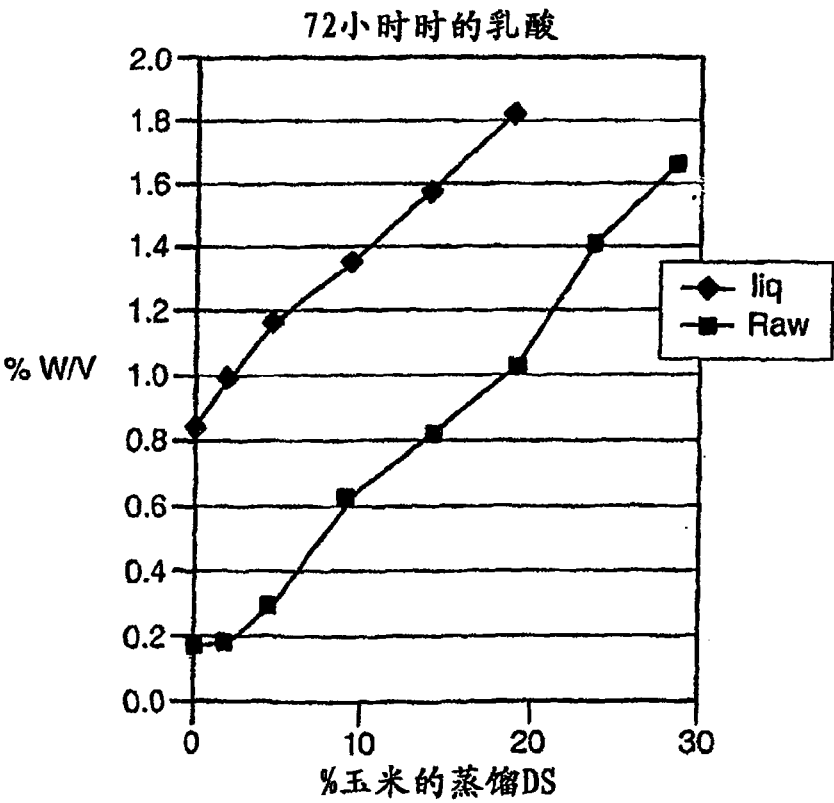


图 8

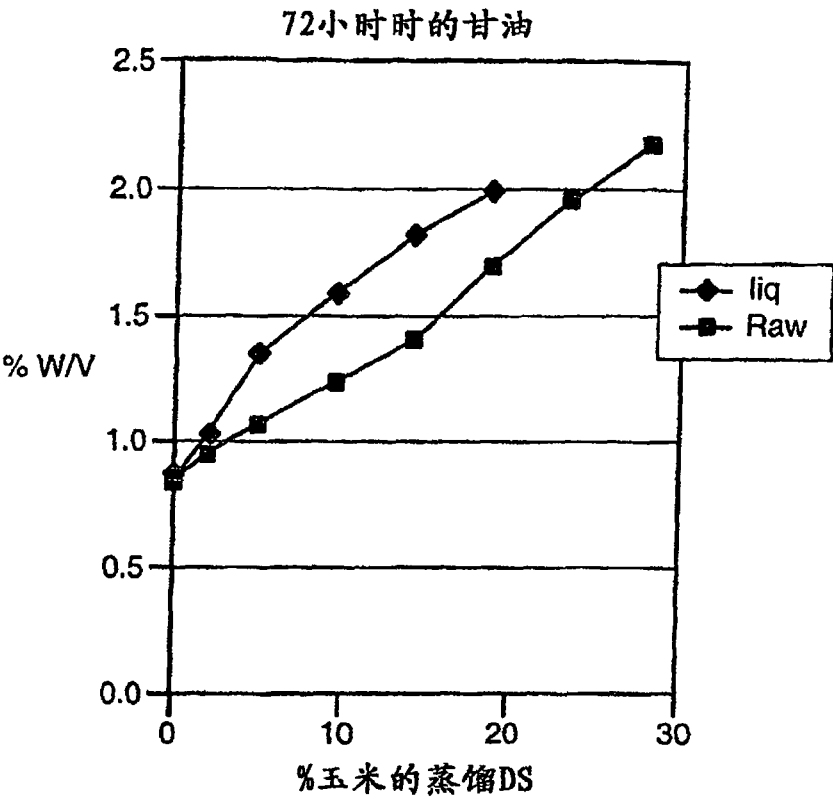


图9