



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104302776 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201380025709. 0

(22) 申请日 2013. 05. 16

(30) 优先权数据

61/648, 109 2012. 05. 17 US

61/786, 860 2013. 03. 15 US

61/786, 844 2013. 03. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 11. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/041339 2013. 05. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/173576 EN 2013. 11. 21

(71) 申请人 国际壳牌研究有限公司

地址 荷兰海牙

(72) 发明人 C·W·雷德特克 P·G·汉密尔顿

K·M·克莱特曼

(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 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12P 7/06 (2006. 01)

C12P 7/10 (2006. 01)

D21C 3/06 (2006. 01)

D21C 1/02 (2006. 01)

B01D 1/14 (2006. 01)

C12N 9/00 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书37页

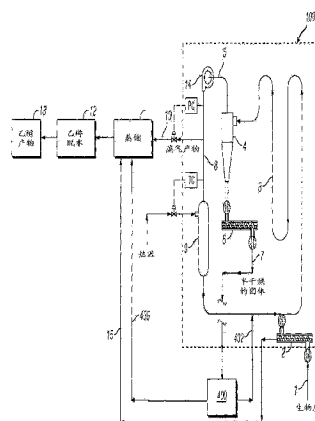
序列表44页 附图5页

(54) 发明名称

处理生物质材料的方法和系统

(57) 摘要

本发明的实施方式提供用于挥发性有机化合物和烃的有效和经济的产生和回收。一实施方式包含使生物质材料的固体组分与被适应于辅助糖化的溶液接触, 及使所述至少一种可发酵的糖与能利用至少一种可发酵的糖产生烃的微生物接触。固体组分通过如下步骤产生: 将生物质材料导入无溶剂回收系统的隔室, 其中所述生物质材料含有一种或更多挥发性有机化合物; 使生物质材料与过加热的蒸气在隔室中接触, 以将生物质材料中的至少部分初始液体内容物气化; 自被加热的生物质材料分离蒸气组分和固体组分; 及保留至少部分气体组分用作过加热的蒸气流的部分。



1. 处理生物质材料的方法,其包括:
 - (i) 将生物质材料导入无溶剂回收系统的隔室,其中所述生物质材料含有一种或更多挥发性有机化合物;
 - (ii) 使生物质材料与过加热的蒸气在隔室中接触,以将生物质材料中的至少部分初始液体内容物气化,所述过加热的蒸气包含至少一种挥发性有机化合物;
 - (iii) 自被加热的生物质材料分离蒸气组分和固体组分,所述蒸气组分包含至少一种挥发性有机化合物;保留至少部分气体组分用作过加热的蒸气的部分;
 - (iv) 自无溶剂回收系统排出固体组分,其中所述固体组分包含木质纤维素材料;
 - (v) 自木质纤维素材料产生至少一种可发酵的糖;以及
 - (vi) 使所述至少一种可发酵的糖与能利用至少一种可发酵的糖产生烃的微生物接触。
2. 权利要求1的方法,其中使所述微生物适应于表达下列中的至少一种:脂肪酸还原酶,脂肪醛合成酶,脂肪酰基转移酶,及醛脱羧基酶。
3. 权利要求2的方法,其中所述微生物包含至少一种编码选自下列的氨基酸序列之一或更多的核酸:SEQ ID NO:1 ~ SEQ ID NO:4。
4. 权利要求3的方法,其中所述微生物是酵母或细菌。
5. 权利要求4的方法,其中所述酵母是啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),且所述细菌是大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)。
6. 权利要求2的方法,其中所述微生物还被适应于表达酰基-ACP 硫酯酶。
7. 权利要求6的方法,其中所述微生物是被遗传修饰以表达外源酰基-ACP 硫酯酶的遗传修饰的微生物。
8. 权利要求7的方法,其中所述微生物包含至少一种编码 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的核酸。
9. 权利要求2的方法,其中所述微生物还被适应于表达 3-酮脂肪酰-ACP 合酶 III。
10. 权利要求9的方法,其中所述宿主细胞包含编码 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的至少一种核酸。
11. 权利要求2的方法,其中所述微生物还被适应于表达支链酮基脱氢酶复合物。
12. 权利要求11的方法,其中所述微生物包含至少一种编码选自下列的氨基酸序列之一或更多的核酸:SEQ ID NO:7 ~ SEQ ID NO:10。
13. 权利要求1的方法,其中使所述微生物适应于表达醛-产生酰基-ACP 还原酶和脂肪醛脱羧基酶。
14. 权利要求1的方法,其中被导入所述隔室的所述生物质材料从收获的作物的发酵过程得到。
15. 权利要求14的方法,其中所述作物选自:高粱,甘蔗,玉米,热带玉米,甜菜,能源蔗及其任何组合。
16. 权利要求1的方法,其中所述隔室包含内有过加热的蒸气流动的环形的圆筒形体。
17. 权利要求1的方法,其中所述分离步骤通过使用偶联于隔室的旋风分离部件完成,其中所述旋风分离部件被配置为自隔室排出分离的固体组分。
18. 权利要求1的方法,所述生物质通过如下步骤产生:

向生物质添加至少一种添加的添加剂,其中所述至少一种添加剂包含微生物,且任选地包含酸和 / 或酶;及

在储存设备中储存制备的生物质材料至少约 24 小时,以允许自至少部分糖产生至少一种挥发性有机化合物。

19. 处理生物质材料的方法,其包括:

使生物质材料的固体组分与被适应于辅助糖化的溶液接触,以及

使所述至少一种可发酵的糖与能利用至少一种可发酵的糖产生烃的微生物接触。

其中所述固体组分由包括下列步骤的方法产生:

将生物质材料导入无溶剂回收系统的隔室,其中所述生物质材料含有一种或更多挥发性有机化合物;

使生物质材料与过加热的蒸气流在隔室中接触,以将生物质材料中的至少部分初始液体内容物气化,所述过加热的蒸气流包含至少一种挥发性有机化合物;

自被加热的生物质材料分离蒸气组分和固体组分,所述蒸气组分包含至少一种挥发性有机化合物;

保留至少部分气体组分用作过加热的蒸气流的部分;

自无溶剂回收系统排出固体组分。

处理生物质材料的方法和系统

【0001】 【相关申请的交叉引用】

【0002】 本申请要求 2012 年 5 月 17 日提交的美国临时申请 No. 61/648, 109, 2013 年 3 月 15 日提交的美国临时申请 No. 61/786, 844 和 2013 年 3 月 15 日提交的美国临时申请 No. 61/786, 860 的优先权, 它们的公开内容以它们整体通过引用在本文合并。

【技术领域】

【0003】 本发明的实施方式总的涉及生物质材料的处理和更特别涉及使用容易可利用的可发酵的糖和来自生物质材料中的木质纤维素材料的进一步处理的可发酵的糖生产及回收挥发性有机化合物和烃化合物。

【背景技术】

【0004】 此部分旨在介绍可相关于本发明的例示实施方式的本领域的各方面。此讨论被认为辅助提供辅助本发明的特定方面的更佳理解的框架。因此, 需知, 此部分应这么理解, 且不必承认是任何现有技术。

【0005】 随着世界的石油供给持续减少, 对于可代替各种石油产品, 特别是运输燃料的替代性的材料有增长的需求。显著量的努力已被投入开发自化石燃料之外的资源提供能量的新方法和系统。目前, 对于自可更新的生物质材料产生生物乙醇和其他运输燃料和化学品进行了诸多努力。一种类型的生物质是植物生物质, 其含有高量的碳水化合物, 包括糖, 淀粉, 纤维素, 木质纤维素, 半纤维素。努力已特别聚焦于来自容易可利用的可发酵的糖的乙醇和来自纤维素材料的乙醇。

【0006】 自玉米使用容易可利用的可发酵的糖的常规乙醇产生一般与有价值的食品资源竞争, 其可还被越来越更严重的气候条件, 诸如旱和涝放大, 其负面地冲击每年收获的作物量。来自常规乙醇产生的竞争可抬高食品价格。尽管其他作物已作为用于乙醇产生的生物质材料, 它们通常由于该作物的气候需求而不适合于全球实现。例如, 乙醇也可自甘蔗有效产生, 但仅在世界的特定地区, 诸如巴西, 具有可支持接近 - 全年收获的气候。

【0007】 而且, 另外的可发酵的糖可游离自木质纤维素生物质, 其包含半纤维素, 纤维素和更小部分的木质素和蛋白。纤维素包含当它们自细胞壁和含有它们的聚合物释放时可转变为燃料和有价值的化学品的糖。

【0008】 旨在处理木质纤维素生物质的目前的方法限于包括未加工的生物质材料或城市固体废弃物 (MSW) 的原料。未加工的生物质包括甘蔗蔗渣, 森林资源, 作物残留物和湿 / 干收获的能源作物。这些常规原料源在它们可被导入木质纤维素材料的进一步处理之前需要储存, 运输, 粒径减小, 及另外的前端处理。例如, 生物质捆是昂贵的和可导致危害, 诸如起火, 鼠害, 粉尘, 不需要的碎片 (诸如石) 和汉坦病毒。而且, 捆及森林资源相比更密的材料在运输上更昂贵, 和相比粒径已减少及不需求进一步格式化的材料在操作上更昂贵。MSW 还具有与可贡献于差燃料质量的风险以及健康和安全性风险的受调控的危险的金属的混杂相关的挑战。森林资源, 诸如树, 运输起来麻烦。而且, 森林资源需要剥树皮, 切成期望厚度

的木片,及洗涤,以去除任何残留的土,污泥等。因此,对克服这些挑战的生物质仍有需求。

[0009] 【发明概述】

[0010] 本发明的实施方式可克服上述挑战以及提供其他优势和特征。在一实施方式中,原料可来自从挥发性有机化合物回收系统出来的固体组分。在该实施方式中,原料已可在加工的系统中流动,其允许原料直接进入反应器而根据期望产生另外的可发酵的糖。本发明的实施方式可提供用于挥发性有机化合物回收设备,以自发酵相回收产物和位置彼此接近的木质纤维素材料设备的进一步处理。进一步处理可产生可转化为烃和/或其他化学品的另外的可发酵的糖。该实施方式可允许自发酵产生挥发性有机化合物和木质纤维素材料的进一步处理,其在其可进入木质纤维素材料的进一步处理的生产流之前减小与其他原料关联的储存,操作及运输成本。该实施方式也可提供已格式化的原料(与常常需要在用于处理木质纤维素材料的生物质设备或在到达用于处理木质纤维素材料的生物质设备之前储存,运输和/或格式化的常规原料成对比)的连续供给,其减少特定关联的成本。

[0011] 当其被运输到用于处理木质纤维素材料的其他位置时,特定实施方式的原料也可具有更低操作及运输成本。不像其他常规原料源,诸如森林资源,特定实施方式的原料以粒子-尺寸减小的预格式化的方式从挥发性有机化合物回收系统出来,其可在原料可进入木质纤维素材料的处理之前减少或消除前端处理成本。本发明的特定实施方式的原料的预格式化的粒度分布相比其他常规原料源处于更密的形式,其可减少运输成本,由于每体积可运输更多这些实施方式的原料。本发明的实施方式可提供不依赖于收获时期而全年可利用的原料供给,特定是由此减少进一步处理植物的储存需求和成本的生物质材料,及不与对于人有价值的食品源竞争。

[0012] 在一实施方式中,制备生物质材料,以产生挥发性有机化合物。通过如下步骤从制备的生物质材料回收挥发性有机化合物:将制备的生物质材料导入无溶剂回收系统的隔室;使生物质材料与过加热的蒸气在隔室中接触,以气化制备的生物质材料中的至少部分初始液体内容物,所述过加热的蒸气包含至少一种挥发性有机化合物;自被加热的生物质材料分离蒸气组分和固体组分,其中蒸气组分包含至少一种挥发性有机化合物;及保留至少部分气体组分用作过加热的蒸气的部分。蒸气组分中的化合物可通过适当的蒸馏过程进一步纯化。将至少部分固体组分进一步处理而产生另外的可发酵的糖。在一实施方式中,进一步处理包含接至少部分固体组分与被适应于辅助糖化的溶液接触而产生另外的可发酵的糖。在一实施方式中,通过使用1种或更多微生物发酵来将另外地产生的可发酵的糖转化为至少一种烃化合物。

[0013] 在一实施方式中,1种或更多生物是适应于产生烃的重组宿主细胞(或微生物),如由PCT申请PCT/EP2013/053600公开,其公开内容通过引用以其整体合并。例如,在一实施方式中,将重组宿主细胞适应于表达下列中的至少一种:脂肪酸还原酶,脂肪醛合成酶,脂肪酰基转移酶,及醛脱羧基酶,其中至少一种脂肪酸还原酶,至少一种脂肪醛合成酶,及至少一种脂肪酰基转移酶形成脂肪酸还原酶复合物。脂肪酸底物与脂肪醛合成酶的接触形成脂肪酸醛。脂肪酸醛与至少一种醛脱羧基酶的接触形成烃。

[0014] 脂肪酸底物可为脂肪酸,脂肪酰基-ACP(脂肪酰基-酰基载体蛋白)或脂肪酰基-CoA或这些之任何的混合物。脂肪酸还原酶复合物可包含具有酶学委员会(EC) No. 1.2.1.50,例如与SEQ ID NO:1(发冷光杆菌(*Photobacterium luminescens*)蛋白LuxC)

具有至少 50% 序列同一性的脂肪酸还原酶多肽。另外地或独立地, 脂肪酸还原酶复合物可包含具有 EC No. 6. 2. 1. 19, 例如与 SEQ ID NO: 2 (发冷光杆菌 (*P. luminescens*) 蛋白 LuxE) 具有至少 50% 序列同一性的脂肪醛合成酶多肽。另外地或独立地, 脂肪酸还原酶复合物可包含在 EC 类 2. 3. 1. - 中, 例如与 SEQ ID NO: 3 (发冷光杆菌 (*P. luminescens*) 蛋白 LuxD) 具有至少 50% 序列同一性的脂肪酰基转移酶多肽。另外地或独立地, 醛脱羧基酶可在 EC 类 4. 1. 99. 5 中, 例如其可为与 SEQ ID NO: 4 (点形念珠藻 (*Nostoc punctiforme*) 醛脱羧基酶蛋白) 具有至少 50% 序列同一性的多肽。在例示实施方式中, 使用具有序列 SEQ ID NO: 1 ~ 4 的全部酶。

[0015] 在一实施方式中, 制备的生物质通过如下步骤产生: 向生物质添加至少一种添加的添加剂, 其中所述至少一种添加剂包含微生物, 且任选地包含酸和 / 或酶; 及在储存设备中储存制备的生物质材料至少约 24 小时, 以允许自至少部分糖产生至少一种挥发性有机化合物。

[0016] 除了上述特征之外, 本发明的实施方式通过克服挑战, 诸如储存和运输成本, 短收获窗, 糖的快速降解, 及设备中的大投资, 允许自含有可发酵的糖的植物替代性的燃料, 诸如乙醇, 其他挥发性有机化合物, 烃和其他化学品的经济的产生。本文所述的实施方式的方面可应用于任何生物质材料, 诸如含有可发酵的糖的植物。本发明的实施方式的特征允许各种植物经济的使用, 以产生替代性的燃料和化学品及不限于高粱和遭受类似挑战的其他植物。在本文凸显该挑战性的作物, 因为其他方法和系统未能经济上使用这些挑战性的作物产生燃料和化学品。像这样, 特别提及高粱不旨在限制, 而是例证本发明的实施方式的一个特定应用。

[0017] 本发明的实施方式允许回收设备以受控制的方式不依赖于收获窗全年连续运行, 由此增宽放置回收设备和 / 或处理木质纤维素材料的设备可利用的地理位置, 包括具有相对短收获窗的地区。

[0018] 本发明的实施方式的其他优势和特征会自以下详述显而易见。但是, 应明白, 详述和特定实施例仅指示本发明的优选的实施方式, 仅以例证方式给出, 由于本发明的精神和范围之内的各种变化和修饰会自此详述对于本领域技术人员而言是显而易见的。

【附图说明】

[0019] 这些图例证本发明的实施方式的一些特定方面, 不应用于限制或限定本发明。

[0020] 图 1 是根据本发明的特定方面处理生物质材料的一实施方式的图。

[0021] 图 2 是根据本发明的特定方面处理生物质材料的另一实施方式的图。

[0022] 图 3 是根据本发明的方面的固体组分的糖化的特定实施方式的图。

[0023] 图 4 是根据本发明的特定方面的导入大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 细胞的遗传元件 (实线) 的局部详示意图;

[0024] 图 5 显示根据本发明的特定方面获得的各种大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 培养物的生长曲线。

[0025] 【发明详述】

[0026] 本发明的实施方式可提供从固体生物质材料以及用于进一步处理木质纤维素材料而产生用于转变进一步发酵的可发酵的糖的原料的乙醇或其他挥发性有机化合物, 诸如

乙醇和乙酸的有效和经济的产生和回收,包括烃化合物的产生。根据本发明的一方面,制备生物质材料而产生挥发性有机化合物。挥发性有机化合物通过如下步骤回收自制备的生物质材料:将制备的生物质材料导入无溶剂回收系统的隔室;使生物质材料与过加热的蒸汽流在隔室中接触,以气化制备的生物质材料中的至少部分初始液体内容物,所述过加热的蒸汽流包含至少一种挥发性有机化合物;自被加热的生物质材料分离蒸气组分和固体组分,其中蒸气组分包含至少一种挥发性有机化合物;及保留至少部分气体组分用作过加热的蒸汽流的部分。将至少部分固体组分进一步处理而产生另外的可发酵的糖。在一实施方式中,进一步处理使至少部分固体组分与被适应于辅助糖化的溶液接触。在一实施方式中,将另外地产生的可发酵的糖发酵而产生烃。

【0027】 【生物质制备】

【0028】 如本文所用,术语“固体生物质”或“生物质”至少指称生物学物质自活,或最近活体。固体生物质包括可转变为纤维或其他工业化学品,包括生物燃料的植物或动物物质。固体生物质可源于多种类型的植物或树,包括芒,柳枝稷,大麻,玉米,热带杨,柳,高粱,甘蔗,甜菜,及任何能源蔗,及各种树物种,从桉到油棕(棕榈油)。在一实施方式中,固体生物质包含产生至少一种可发酵的糖的植物。固体生物质可包含2种或更多不同植物类型,包括产生可发酵的糖的植物。在优选的实施方式中,不旨在限制本发明的范围,选择高粱,由于其在低产陆地上的高-产率和高糖含量。

【0029】 术语“可发酵的糖”指称可由微生物在厌氧和/或耗氧条件下用作碳源(例如,戊糖和己糖)而产生有机产物诸如醇,有机酸,酯和醛的寡糖和单糖。该有机产物的产生可通常被称为发酵。产生至少一种可发酵的糖的植物在其生长循环期间的一个时点含有溶解于植物材料的水相的可发酵的糖。产生可发酵的糖的植物的非限制性例包括高粱,甘蔗,甜菜,及能源蔗。尤其是,甘蔗,能源蔗,及当它们接近或在它们的最大潜在可发酵的糖生产(例如,最大可发酵的糖浓度)时,高粱一般在水相中含有约5%~约25%可溶性糖 w/w,及具有基于湿重的约60%和约80%之间的水份含量。

【0030】 术语“基于湿重”至少指称包括水作为质量的部分的质量百分率。在优选的实施方式中,糖产生植物是高粱。可使用提供碳水化合物微生物转变为挥发性有机化合物(VOC)的任何物种或各种属高粱。对于使用高粱的实施方式,植物提供特定益处,包括有效利用水,以及旱和热-耐受。这些性质使作物适合于许多地区,包括各种跨陆地区,诸如中国,非洲,澳大利亚及美国,诸如高原,湿地,及跨南德克萨斯的部分。

【0031】 在使用高粱的实施方式中,高粱可包括可收获更高浓度的可发酵的糖的任何变种或变种的组合。具有优选的性质的特定种高粱有时被称为“甜高粱”。高粱可包括可含或不含有对于支持甘蔗碾磨机操作中的榨汁过程足够的水份的变种。在优选的实施方式中,固体生物质包括由 Advanta 商业上产生的 Sugar T 高粱变种和/或 Sugar T 的雄性亲本(其也是 Advanta 的可商购的产物)。在优选的实施方式中,使用的作物具有约5~约25白利糖度,优选约10~约20白利糖度,及更优选约12~约18白利糖度。术语“白利糖度”至少在本文指称水溶液中葡萄糖,果糖和蔗糖的含量,其中一度白利糖度是100g的溶液中1g的葡萄糖,果糖和/或蔗糖,及表示以重量百分率计(% w/w)的溶液强度。在另一优选的实施方式中,使用的作物的水份含量是约50%~80%,优选至少60%。

【0032】 在一实施方式中,作物是具有约18的白利糖度值和约67%的水份含量的 Sugar T

的雄性亲本。在另一实施方式中,作物是约 12 的白利糖度值和约 73%的水份含量的 Sugar T。在这些特定实施方式中,白利糖度和水份含量值通过手持式屈光计测定。

[0033] 在将至少一种添加剂(微生物,任选地,酸和/或酶)加入固体生物质之后,其成为制备的生物质材料,其中至少一种添加剂辅助可发酵的糖转变为 VOC(诸如乙醇)。如上所述和以下进一步描述,制备的生物质材料可储存特定时间,以允许更多 VOC 通过转变过程产生。至少一种挥发性有机化合物然后回收自制备的生物质材料。挥发性有机化合物为本领域技术人员所知。美国 EPA 提供挥发性有机化合物(VOC)的描述,其中之一是任何碳的化合物,排除一氧化碳,二氧化碳,碳酸,金属碳化物或碳酸盐,及碳酸铵,其参与大气光化学反应,除了由 EPA 指定为具有可忽略光化学反应性的那些之外(见 <http://www.epa.gov/iaq/voc2.html#definition>)。挥发性有机化合物或 VOC 的另一描述是其组成使它们可能在正常温度和压力的室内大气条件下蒸发的任何有机化合物。此是用于科学文献的 VOC 的一般定义,及与为室内空气质量使用的定义一致。正常温度和压力的室内大气条件指称通常见于人生活的建筑物的条件范围,由此可依赖于建筑物的类型及其地理位置而改变。一个例示正常室内大气条件由国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)和国家标准和技术学会(NIST)提供。IUPAC 的标准是 0°C (273.15K, 32 °F) 的温度和 100kPa (14.504psi) 的绝对压力,及 NIST 的定义是 20°C (293.15K, 68 °F) 的温度和 101.325kPa (14.696psi) 的绝对压力。

[0034] 由于化合物沸点温度越低,其挥发性通常越高,有机化合物的挥发性有时由它们的沸点定义及分类。因此,VOC 可由其沸点描述。VOC 是具有在约 101.3kPa 的标准大气压力测量的约 50°C ~ 260°C 的沸点范围的任何有机化合物。可从自本发明的实施方式回收的 VOC 回收和/或进一步处理的许多挥发性有机化合物应用于香料及调味工业。该化合物的例可为酯,酮,醇,醛,烃和萜烯。以下表 1 还提供可从自制备的生物质材料回收的 VOC 回收和/或进一步处理的挥发性有机化合物的非限制性例。

[0035] 表 1

[0036]

甲醇	乙酸乙酯	乙醛	二乙酰
2, 3- 戊二酮	苹果酸	丙酮酸	琥珀酸
丁酸	甲酸	乙酸	丙酸
异丁酸	缬草酸	异缬草酸	2- 甲基丁酸
己酸	庚酸	辛酸	壬酸
癸酸	丙醇	异丙醇	丁醇
异丁醇	异戊基醇	己醇	酪醇
色氨酸醇	苯乙基醇	2, 3- 丁二醇	甘油

富马酸	乙醇	戊基醇	1, 2- 丙醇
1- 丙醇	2- 丁醇	乙酸甲酯	乙酸乙酯
乙酸丙酯	乳酸乙酯	乳酸丙酯	丙酮
甲酸乙酯	n- 丙基醇	2- 甲基 -1- 丙醇	2- 丙烯 -1- 醇
2, 3- 甲基 -1- 丁醇	3- 丁烯 -2- 醇		

[0037] 乙醇是优选的挥发性有机化合物。像这样,许多例特别提及乙醇。但是,此特定提及不旨在限制本发明。需知,本发明的方面也等同应用于其他挥发性有机化合物。另一优选的挥发性有机化合物是乙酸。

[0038] 本发明的实施方式提供固体生物质材料的长期储存而无制备的生物质材料中含有的挥发性有机化合物的显著降解,及它们保证糖保存,以允许 VOC 的持续的产生。如在此情景中使用,“显著”至少指称当测量制备的生物质材料中挥发性有机化合物的量或浓度时在误差界限之内。在一实施方式中,误差界限是约 0.5%。

[0039] 因此,本发明的实施方式允许不依赖于收获时长而连续产生 VOC,由此消除或最小化传统实时收获和回收过程中回收植物的时间。像这样,本发明的实施方式允许无对于延长收获季节一般做的妥协(诸如稍微更早收获和晚于峰时间)地在其峰收获作物。即,本发明的实施方式允许以高田地产率和高糖浓度收获,诸如当选择的作物达到了其可转变为挥发性有机化合物的可发酵的糖的峰糖浓度或量时,即便此导致较短收获时期。在一实施方式中,当其是其最大势可发酵的糖浓度的约 80%,约 85%,约 90%,约 95%或约 100%时,收获或制备固体生物质。像这样,本发明的实施方式,特别是回收期,可无来自担心固体生物质和其中含有的 VOC 的酸败的时间压力地全年连续操作。本发明的实施方式允许接近或在其最大糖产生潜力时收获固体生物质,而固体生物质材料可在认为含有适合的量的糖的任何时点收获。而且,收获窗依赖于作物类型和地理位置改变。例如,在北美洲高粱的收获窗可跨约 1 ~ 7 个月。但是,在巴西和其他赤道及接近赤道地区,收获窗可达 12 个月。

[0040] 在使用植物作为固体生物质的实施方式中,固体生物质可使用本领域技术人员知道的任何适合的手段自现场收集或收获。在一实施方式中,固体生物质包含植物的茎组分和叶组分。在另一实施方式中,固体生物质还包含谷粒组分。在优选的实施方式中,固体生物质用饲草或青贮饲料收获机(饲草或青贮饲料切割机)收获。青贮饲料或饲草收获机指称用来制造青贮饲料(其是已切成小块,及在储存筒仓,青贮饲料贮藏器或在青贮饲料袋中压实在一起的草,玉米或其他植物)的农场设备。青贮饲料或饲草收获机具有切割机构,诸如鼓(刀具头)或有许多刀固定于其的飞轮,其切断及将切断物质转移到容具,所述容具连接到收获机或连接到侧驱动的另一运载体。优选饲草收获机,因为其提供超过甘蔗收获机或干捆的系统的益处。例如,饲草收获机相比甘蔗收获机提供更高密度物质,由此允许收获的物质更有效运输。在一实施方式中,使用饲草收获机相比用甘蔗收获机收获的具有约 300kg/m³ 的密度的甘蔗,及对于用甘蔗收获机收获的具有约 200kg/m³ 的密度的高粱,产生具有约 400kg/m³ 的堆密度的收获的高粱。一般而言,更高堆密度物质运输起来更廉价,其趋向于限制可获得蔗-收获的作物的地理区域。

[0041] 由此,饲草收获机总体是对于收获选择的生物质,诸如高粱而言,相比蔗收获机或干捆的系统欠昂贵的方式。不被理论束缚,相信节省成本部分是由于由饲草收获机收获的固体生物质的更高物质通量和更高堆密度。固体生物质可切成任何长度。在一实施方式中,收获机的切断长度可为设置为约 3mm ~ 约 80mm,优选约 3mm ~ 约 20mm 范围,例如约 3mm ~ 约 13mm 切断长度最优选。以这些优选的切断长度,在饲草收获机中有观察不到的水分排出,如此损失最小。当选择切断长度时,收获机提供具有约选择的切断长度的平均尺寸或长度分布的生物质。在一实施方式中,从回收系统出来的固体组分的平均粒度分布可根据期望调整,这可通过调整收获机的切断长度来进行。

[0042] 将至少一种添加剂加入固体生物质,以辅助和 / 或加快适当的碳水化合物转变为挥发性有机化合物。在已添加选择的添加剂之后,固体生物质可称为制备的生物质材料。在一实施方式中,制备的生物质材料可包含以上所列的产生可发酵的糖的植物的至少一种或任何组合。在优选的实施方式中,选择的添加剂可通过使用收获机在收获期间便利地添加。

[0043] 在一实施方式中,在基于特定地区的生长条件的特定收获窗,诸如在北美洲对于高粱是约 1 ~ 7 个月产生至少约 700 吨,优选至少约 1 百万吨,诸如至少 1.2 百万吨,或更优选约至少 5 百万吨的制备的生物质材料。

[0044] 可在收获过程期间和 / 或之后的任何时点添加至少一种添加剂。在使用饲草收获机的优选的实施方式中,在收获过程期间将添加剂加入固体生物质而产生制备的生物质材料。尤其是,饲草收获机被设计用于在收获期间有效添加固体和液体添加剂。如上所述,添加的添加剂包含至少微生物(例如酵母),及任选地,酸和 / 或酶。在优选的实施方式中,选择的添加剂作为溶液添加。下文还提供潜在添加剂的另外的细节。

[0045] 对于使用饲草收获机或类似设备的实施方式而言,选择的添加剂可在全部期收获期间,诸如在摄入供给辊之前,在摄入期间,在切断时,在切断之后,通过风机,在风机之后,在加速器中,在吊杆(或出料槽)中,和 / 或在吊杆之后添加。在一添加酸和酶的实施方式中,酸在接近摄入供给辊添加,及将微生物和酶加入吊杆。在特定实施方式中,使用具有约 30ft 宽头部的 V12 发动机的 Krone Big X 饲草收获机。在使用 Krone 系统的一实施方式中,通过就在供给辊前排出溶液的柔性的管道添加酸作为溶液。以此方式,可视觉监测液体流,其显示酸溶液和固体生物质在切断室之内快速混合。在另一实施方式中,酸的添加也展示为使用 Case New Holland FX 58 饲草收获机的有活力的实践。在特定实施方式中,使用的饲草收获机可包括用于含有添加剂的机载架,至少待在收获期间添加的选择的添加剂。在另一实施方式中,待在收获期间添加的选择的添加剂可在拖车上拖在收获机之后。例如,在一实施方式中展示,可采用最小干扰收获机的正常操作的装备含有酵母,酶和酸的添加剂溶液的箱的改良的实用拖车,由此基本上维持收获过程的预期的成本和持续时间。例如,当在一实施方式中装备上述特定添加剂时,采用以约 4 英里 / 小时行进的青贮饲料收获机的正常收获构型和生物质产率维持约 4 英里 / 小时的近似收集速度。

[0046] 在本发明的实施方式中,制备的生物质材料最终运输到储存设备,其中其储存一定时间,以允许自固体生物质的至少部分可发酵的糖产生至少一种挥发性有机化合物。下文进一步提供储存期的细节。在特定实施方式中,选择的添加剂也可在储存设备添加。例如,在一实施方式中,选择的添加剂可在卸载期间或在固体生物质已在储存设备被卸载之后添加。在一实施方式中,用输送系统辅助在储存设备添加选择的添加剂。在储存设备添

加到固体生物质的添加剂可为未曾添加的或另外的量的之前添加的。因此,选择的添加剂可因此在自收获过程起始至在储存区或设备储存制备的生物质材料之前的任何点,诸如在材料转移的点添加。

[0047] 如上所述,用于本发明的实施方式的添加剂包含至少微生物和任选地,酸和 / 或酶。可将选择的添加剂以任何顺序加入固体生物质。在优选的实施方式中,在添加微生物之前将酸加入固体生物质,以引发材料为微生物提供有吸引力的生长环境。

[0048] 在优选的实施方式中,将酸加入,以减小固体生物质的 pH 至辅助和 / 或加快选择的本土或添加的微生物生长的范围,其增加乙醇和 / 或挥发性有机化合物的产生。酸也可停止或减慢消耗旨在随后 VOC 生产的可发酵的糖的植物呼吸。在一实施方式中,添加酸,直到固体生物质的 pH 在约 2.5 和约 5.0 之间,优选在约 3.7 ~ 约 4.3 范围,及更优选约 4.2。使用的酸可包括已知道的酸,诸如硫酸,甲酸或磷酸。以下表 2 提供可个别或组合使用的酸的非限制性例。

[0049] 表 2

[0050]

硫酸	甲酸	丙酸	苹果酸
磷酸	马来酸	叶酸	柠檬酸

[0051] 在优选的实施方式中,在固体生物质随酸的添加达到了期望的 pH 之后,添加微生物。在添加剂情景中,微生物至少指称能冲击或影响制备的生物质材料的添加到固体生物质的活体。来自添加的微生物一例示冲击或效应包括提供从各种源,包括纤维素材料的可发酵的糖转变为乙醇或其他挥发性有机化合物的发酵或其他代谢。另一例示冲击或效应可为辅助制备的生物质材料中的纤维素解构为可代谢为乙醇或其他 VOC 的可发酵的糖的特定酶的产生。由微生物提供的仍另一例示冲击或效应包括可改善可作为动物饲料的最后副产品的质量,由此价值的化合物诸如维生素,辅因子和蛋白的产生。而且,微生物活动为堆提供热。微生物细胞壁或其他分解代谢物或组成代谢物的部分也可提供可由回收单元回收的增值的化学品。这些冲击和效应也可由对于固体生物质天然的微生物提供。

[0052] 可添加能冲击或影响制备的生物质材料的任何微生物。在优选的实施方式中,微生物可包括青贮饲料,动物饲料,葡萄酒和工业乙醇发酵应用中使用的微生物。在一实施方式中,选择的微生物根据待制造的有机分子的应用和期望的特征包括酵母,真菌和细菌。在优选的实施方式中,酵母是选择的微生物。在另一实施方式中,可加入细菌来制造乳酸或乙酸。也可加入特定真菌来制造这些酸。例如,可加入醋酸醋酸杆菌 (*Acetobacterium acetii*) 来产生乙酸;可加入乳杆菌属 (*Lactobacillus*),嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 来产生乳酸;可加入产琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*),产琥珀酸曼氏杆菌 (*Mannheimia succiniciproducens*) 和 / 或产琥珀酸厌氧螺菌 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*) 来产生琥珀酸;可加入丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 来产生丙酮和丁醇;和 / 或可加入产气气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) 来产生丁二醇。

[0053] 以下表 3 提供可个别或组合使用的优选的微生物的非限制性例。

[0054] 表 3

[0055]

啤酒糖酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	日本糖酵母 (<i>Saccharomyces japonicas</i>)	贝糖酵母 (<i>Saccharomyces bayanus</i>)	发酵性糖酵母 (<i>Saccharomyces fermentati</i>)
少孢糖酵母 (<i>Saccharomyces exiguus</i>)	薛瓦糖酵母 (<i>Saccharomyces chevalieri</i>)	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)	糖化淀粉丁基丙基梭菌 (<i>Clostridium amylosaccharobutylpropylicum</i>)
丙基丁基梭菌 (<i>Clostridium propyl-butylicum</i>)	胶质梭菌 (<i>Clostridium viscifaciens</i>)	丙酸梭菌 (<i>Clostridium propionicum</i>)	气杆菌属 (<i>Aerobacter</i>) 物种
产气气杆菌 (<i>Aerobacter aerogenes</i>)	运动发酵单胞菌 (<i>Zymomonas mobilis</i>)	发酵单胞属 (<i>Zymomonas</i>) 物种	梭菌属 (<i>Clostridium</i>) 物种
糖酵母属 (<i>Saccharomyces</i>) 物种	芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>) 物种	热纤维梭菌 (<i>Clostridium thermocellum</i>)	布赫纳乳杆菌 (<i>Lactobacillus buchneri</i>)
植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	屎肠球菌 (<i>Enterococcus faecium</i>)	片球菌属 (<i>Pediococcus</i>) 物种	丙酸杆菌属 (<i>Propionibacteria</i>)
醋酸醋酸杆菌 (<i>Acetobacterium acetii</i>)	嗜热链球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	副干酪乳杆菌 (<i>Lactobacillus paracasei</i>)	乳杆菌属 (<i>Lactobacillus</i>) 物种
产琥珀酸放线杆菌 (<i>Actinobacillus succinogenes</i>)	产琥珀酸曼氏杆菌 (<i>Mannheimia succiniciproducens</i>)	产琥珀酸厌氧螺菌 (<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>)	

[0056] 优选的微生物也包括可耐受高乙醇浓度且在其相应微生物群落中是强竞争者的啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 株。微生物可为嗜中温菌或嗜热菌。嗜热菌是在约 45℃ 以上温度最佳生长, 且见于全部 3 个生命界: 细菌, 古细菌和真核菌的生物。嗜中温菌通常在约 20℃ 和 45℃ 之间是有活性的。在使用啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 株的一实施方式中, 株可来自可商购的源诸如自 Lesaffre 的 Biosaf, 自 Phibro 的乙醇红, 及 Lallamand 活化的液体酵母。如果微生物从商业源得到, 微生物可根据提供者建议的率添加, 其一般基于预期的糖含量每湿吨 (水包括在质量计算中)。术语“湿吨”至少指称包括水的质量单位。可根据反应条件调整建议的量。添加的微生物可包含 1 株或多株的特定微生物。在一实施方式中, 微生物以达 500mL 每湿吨固体生物质的比率添加。在使用可商购的酵母的特定实施方式中, 添加约 300mL 的 Lallamand 酵母制备物每湿吨固体生物质。在另一实施方式中, 可添加另外的酵母株。例如, 可以约 0.001kg/ 湿吨~约 0.5kg/ 湿吨之间, 特别约 0.1kg/ 湿吨的比率添加乙醇红。在仍另一实施方式中, 另一酵母株, 例如, Biosaf, 可以约 0.001kg/ 湿吨~约 0.5kg/ 湿吨之间, 特别约 0.1kg/ 湿吨的比率添加。需知, 可添加其他量的任何酵母株。例如, 可添加约 10%, 约 20%, 约 30%, 约 40%, 约 50%, 约 60%, 约 70%, 约 80%, 约 90%, 约 1.5 倍, 约 2 倍, 约 2.5 倍, 或约 3 倍的提供的量的微生物。

[0057] 在特定实施方式中,还添加酶。酶可为辅助自对于微生物代谢更难的植物材料,诸如不同纤维素材料产生可发酵的糖,和/或改善最后副产物作为动物饲料的价值,诸如通过制造更可消化的饲料的酶。酶也可作为抗生素,诸如下文进一步讨论的溶菌酶。添加的酶可包括一种类型的酶或许多类型的酶。酶可来自可商购的酶制备物。辅助使特别难代谢的植物材料转变为可发酵的糖的酶的非限制性例包括纤维素酶,半纤维素酶,阿魏酸酯酶,和/或蛋白酶。另外的例也包括提供或辅助保障自原料产生可发酵的糖,或增加最后供给副产物的价值的其他酶。

[0058] 在特定实施方式中,辅助特别难代谢的植物材料转变为可发酵的糖的酶可由植物本身,例如在植物中产生。可产生可在生长植物中产生的纤维素酶,半纤维素酶和其他植物-聚合物降解酶的植物的例描述于专利公开和专利 W02011057159, W02007100897, W09811235 和 US6818803,这显示,用于解聚合植物细胞壁的酶可在植物中产生。在另一实施方式中,饲料青贮可用于活化该植物产生的酶以及调和生物质用于进一步处理。一例描述于专利公开 W0201096510。如果使用,该转基因植物可以任何量包括在收获中。例如,特定实施方式可通过使用特定转基因植物作为唯一原料,或在相同或不同作物之中以散在的方式合并转基因植物来采用在植物中产生的植物中酶。

[0059] 在包括该植物-聚合物降解酶的特定实施方式中,可从植物的纤维素级分产生乙醇。在特定实施方式中,当将 Novazymes CTEC2 酶以相对于建议的量过量(建议的量的约 100 倍)加入高粱储存系统时,达到基于初始游离的糖含量约 152% 的理论乙醇转变效率。尽管该量的酶可通过使用可商购的制剂添加,但这么做是昂贵的。另一方面,该量的酶可通过生长在生物质作物之中至少散在地产生这些酶的转基因植物来以更成本有效方式获得。

[0060] 自纤维素的乙醇产生在储存期期间(例如,在青贮饲料中)发生,及稳定储存约 102 天,之后实验终止。此展示,在特定实验条件下,过量该酶活性导致使用可发酵的糖自纤维素至少约 52% 乙醇产生。不旨在被理论束缚,对于特定实施方式,在实验中在收获期间酸的立即添加可降低 pH,由此潜在地诱导酶活性,其如果产生,另外可损伤植物,尽管植物仍生长。

[0061] 在优选的实施方式中,如果添加酶,酶可为纤维素酶制备物的任何家族。在一实施方式中,使用的纤维素制备物是 Novozymes Cellic CTec 2 或 CTec 3。在另一实施方式中,使用纤维溶解酶制备物,特别是, Liquicell 2500。如果使用,为降解种植聚合物添加的酶量可为达到期望的植物材料转变为可发酵的糖的任何量,诸如建议的量。在特定实施方式中,添加约 80,000FPU ~ 约 90,000,000FPU,优选约 400,000FPU ~ 约 45,000,000FPU,更优选约 800,000FPU ~ 约 10,000,000FPU 的酶每湿吨生物质。术语“FPU”指称滤纸单位,其至少指称于 50°C、在大致 pH4.8,在 1 小时内自 50mg Whatman No. 1 过滤纸块释放 2mg 的还原糖(例如,葡萄糖)需要的酶量。

[0062] 在特定其他实施方式中,选择的添加的添加剂可包括能减缓或控制细菌生长的其他物质。这些其他物质的非限制性例包括抗生素(包括抗生素酶),诸如 Lysovin(溶菌酶)和 **Lactrol®**(维吉霉素,细菌抑制物)。细菌生长的控制可允许适当的微生物加快和/或提供挥发性有机化合物的产生。抗生素是抑制或杀灭生命的某物的一般术语。抗生素的一例是细菌抑制物。在一实施方式中,使用旨在影响细菌,而非其他微生物的选择性抗生素。选择性抗生素的一例是 Lactrol,其影响细菌、但不影响酵母。

[0063] 在特定实施方式中,如果使用,Lactrol 可以约百万分之 1~百万分之 20 (ppm) w/v (重量 Lactrol 每体积液体) 的比率添加,如溶解于制备的生物质材料的水相,例如以约 5ppm w/v。在使用酶控制细菌生长的一实施方式中,优选使用溶菌酶。溶菌酶可来自商业源。例示可商购的溶菌酶制备物是 Lysovin,其是已被宣告容许在食品,诸如葡萄酒中使用的溶菌酶的制备物。

[0064] 酶和 / 或其他抗生素物质,如果使用,可独立地或结合另一个和 / 或随微生物添加。在特定实施方式中,也可添加辅助和 / 或提供挥发性有机化合物产生的作为微生物的营养的其他化合物作为添加剂。以下表 4 提供其他物质的非限制性例,包括抗生素,其可加入固体生物质。

[0065] 表 4

[0066]

偏亚硫酸氢钾	碳酸氢钾	FermaSure® (自 Dupont™) -氧氯产物包括亚氯酸盐	Lysovin
硫胺素	硫酸镁	泛酸钙	二铵磷酸盐
氨	抗生素	Lactrol	生物素

[0067] 个别,作为小聚集物或生物膜附接于固体的酵母和其他微生物已显示增加了对抑制性化合物的耐受性。不旨在被理论束缚,长期发酵的部分可为可能的或被该微生物与固体结合增强。像这样,包括对于微生物结合优化的微生物的制备的生物质材料以及可结合微生物的添加剂可经历更大程度的发酵和 / 或发酵效率。提供和 / 或辅助长期发酵的物质不同于增加发酵速度的物质。在特定实施方式中,发酵速度增加不如长期发酵 (特别是经许多周或月的时期的) 那么重要因子。

[0068] 以下提供应用于一个特定实施方式的添加剂的特定量。如果使用,添加酸的比率和量随添加特定酸的特定固体生物质的缓冲能力而改变。在使用硫酸的特定实施方式中,以达约 101/吨湿生物质,例如约 3.81/吨湿生物质的比率添加 9.3w/w% 硫酸,以达到约 4.2 的 pH。在其他实施方式中,比率会依赖于酸的浓度和类型,液体和其他内容物及特定固体生物质的缓冲能力,和 / 或期望的 pH 而改变。在此特定实施方式中,以约 3.2g/湿吨固体生物质的比率添加 Lactrol。酵母或其他微生物根据自提供者建议的比率,诸如根据预期的糖含量每湿吨添加。在一特定实施方式中,Lallemand 稳定化的液体酵母以约 18fl 盎司每湿吨添加,及 Novozymes Cellic CTec2 以约 20fl 盎司每湿吨添加。

[0069] 在优选的实施方式中,在收获期间,根据本发明的上述方面将选择的添加剂加入固体生物质流,以产生制备的生物质材料。优选地,将制备的生物质材料运输到储存设备,以允许制备的生物质材料的碳水化合物转变为期望的量的挥发性有机化合物和 / 或等待挥发性有机化合物的回收。可使用任何适合的运输方法和 / 或装置,诸如汽车,火车,等和将制备的生物质材料放置到运输手段的任何适合的方法。可用于运输生物质材料的汽车的非限制性例包括末端 - 卸载自卸货车,侧方 - 卸载自卸货车,及自身 - 卸载青贮饲料货车。在优选的实施方式中,使用青贮饲料货车。在使用饲草收获机收集生物质的实施方式中,该固体生物质的运输相比由常规手段收集的物质的运输更有效,诸如甘蔗坯,因为用饲草收获机切割的固体生物质中堆密度更高。即,切断为更小块的物质相比坯中的物质更稠密地填充。在一实施方式中,青贮饲料货车中堆密度的范围在约 150kg/m³ 和约 350kg/m³ 之间变

化,例如约 256kg/m³。因为在特定实施方式中,全部选择的添加剂在收获期间添加,优选到收获机上,微生物可在运输期间与生物质开始相互作用,且以此方式,运输不对总体过程有害。

[0070] 将生物质,无论制备的或非制备的,递送到至少一个储存区或设备。储存设备可位于离收获位点任何距离。如果未曾添加过或如果需要进一步添加另外的量或类型,可添加选择的添加剂而产生制备的生物质材料。在优选的实施方式中,制备的生物质储存在制备的表面上至少一堆一定时间。设备可合并人造或天然的地形。人造结构可在未起初指定用于青贮饲料的位点包括既有结构,诸如水道和水处理塘。制备的表面的非限制性例包括混凝土,沥青,飞灰,或土壤表面。至少一堆可具有任何尺寸或形状,其可依赖于操作条件,诸如可利用的空间,生物质量,期望的储存持续时间,等。

[0071] 可发酵的糖的转变过程是放热反应。但是,过多热可有害于转变过程,如果温度在制备的生物质材料中微生物的致死范围。但是,在使用约 700 湿吨生物质及堆达约 12 英尺的一实施方式中,乙醇产生和稳定性是令人满意的。因此更大堆可能不会受扰于过热。在一实施方式中,对于全部类型的微生物,包括嗜热菌,堆的内部部分维持约 20℃~约 60℃ 范围的温度。在不采用嗜热菌的一实施方式中,堆的内部部分维持约 35℃~约 45℃ 范围的温度。

[0072] 在储存设备储存为至少一堆的制备的生物质材料也可称为湿储存的生物质聚集物。在添加选择的添加剂之后,至少部分固体生物质转化为挥发性有机化合物,诸如糖发酵为乙醇。在一实施方式中,制备的生物质材料储存对于达到厌氧环境足够的时间。在优选的实施方式中,厌氧环境在约 24 小时内达到。在另一实施方式中,厌氧环境在多于约 4 小时内达到。在仍另一实施方式中,厌氧环境在达约 72 小时内达到。

[0073] 堆可为独立式的或以另一结构形成,诸如被设计为接受青贮饲料的青贮饲料贮藏器,包括收集水径流和浸出液的设备,在生物质上方布置防水布,及辅助有效初始青贮饲料货车卸载到贮藏器以及全年生物质移出。个体贮藏器尺寸可为约支持约 700 湿吨~10,000,000 湿吨或更多的每年原料需求的尺寸。例如,储存设备可具有 50 个贮藏器,其中各个体贮藏器可就总最大约 5 百万湿吨的储存的材料,在任何一次接受 100,000 湿吨的制备的生物质材料。在乙醇是选择的挥发性有机化合物的优选的实施方式中,每 1 湿吨的制备的生物质材料回收约 14 加仑~约 16 加仑的乙醇。提供的数是例示的及不旨在限制储存设备可调节的制备的生物质材料的量。

[0074] 在特定实施方式中,储存堆还包括浸出液收集系统。在一实施方式中,收集系统用于移出自储存堆收集的浸出液。例如,浸出液收集系统可适应于在储存时期期间,在特定点自堆移出液体。在另一实施方式中,浸出液收集系统适应于在储存堆中循环液体。例如,循环可涉及取至少部分回收的液体及使其回到堆中,优选在或接近顶部部分。该再循环允许堆中液体的特定部分的更长滞留时间,甚至随制备的生物质材料的回收期开始及制备的生物质材料的非-液体组分的部分被发送到回收单元。更长滞留时间导致更长微生物反应时间,及因此,更高浓度的有机挥发性化合物,诸如乙醇。

[0075] 可如描述采用本领域技术人员知道的任何适合的浸出液收集系统。在特定实施方式中,浸出液收集系统沿着堆的底部,优选位于接近储存堆或贮藏器(如果被使用)的中部包含至少一个槽,其中储存堆以设计为将液体自制备的生物质材料导向槽及出到期望的收

集容具或到其他应用的级制备。

[0076] 在另一实施方式中,浸出液收集系统包含一个或更多穿孔的导管,优选由聚氯乙烯(PVC)制造的管,其沿着堆的底部运行,以允许导管中收集的液体自堆导离。

[0077] 在一实施方式中,随制备的生物质材料被加入贮藏器或搁放在制备的表面的上部,在堆上重复驱动拖拉机或其他重器械,以辅助填充。在一实施方式中,制备的生物质材料的填充跨约 $7\text{lb}/\text{ft}^3 \sim \text{约} 50\text{lb}/\text{ft}^3$ 每立方英尺。在优选的实施方式中,填充约 $30\text{lb}/\text{ft}^3 \sim \text{约} 50\text{lb}/\text{ft}^3$,特别约 $44\text{lb}/\text{ft}^3$ 。在一实施方式中,堆中制备的生物质材料的压实辅助和/或允许在上述优选的时期达到厌氧环境。在另一实施方式中,在实施填充之后或在实施填充期间,将不透空气的膜(一般适合用途的塑料防水布)放置在堆上。在特定实施方式中,尽可实施地快地将防水布放置在堆上。例如,在24小时时期之内将防水布放置在堆上。

[0078] 在一实施方式中,制备的生物质材料储存至少约24小时和优选至少约72小时(或3天),以允许产生挥发性有机化合物,诸如乙醇。在一实施方式中,制备的生物质材料储存约3天,优选10天,更优选大于10天。在一实施方式中,制备的生物质的储存时期是约1天 $\sim$ 约700天,优选约10 $\sim$ 700天。在另一实施方式中,生物质材料储存达约3年。在一实施方式中,制备的生物质材料储存对于允许至少约95%的理论产生效率(如通过关联生物化学通路的化学计量评定计算的)的糖向至少一种挥发性有机化合物的转变效率足够的时期。在另一实施方式中,制备的生物质材料储存对于允许至少约100%的糖向至少一种挥发性有机化合物的计算的转变效率足够的时期。在仍另一实施方式中,制备的生物质材料用特定添加剂,诸如酶制备,其允许基于可利用的可发酵的糖的初始量达约150%的理论值的糖向至少一种挥发性有机化合物的计算的转变效率。不旨在被理论束缚,认为,以100%或100%以上的效率,挥发性有机化合物从起初可利用的可发酵的糖和来自制备的生物质材料中的纤维素或其他聚合物材料的可发酵的糖产生,其可通过由应用于生物质的特定添加剂辅助的酶促水解或酸水解达到。

[0079] 产生的挥发性有机产物,诸如乙醇,在储存的制备的生物质材料中f保持稳定储存时期的持续时间。尤其是,制备的生物质材料可储存达700天而无挥发性有机化合物的显著降解。“显著”在此情景中至少指称当测量制备的生物质材料中挥发性有机化合物的量或浓度时在误差界限之内。在一实施方式中,误差界限是0.5%。已显示,在至少约330天后,乙醇在堆中保持稳定而未观察到显著乙醇损失。本发明的实施方式的此方面是重要的,因为其保障至少8个月的稳定的储存,其用仅约4个月的收获窗致使全年VOC产生和回收。本发明的实施方式相比仅能在4个月收获窗/年期间操作的常规实时处理提供显著优势。即,本发明的实施方式允许使用仅4个月收获窗全年操作植物,由此对于与为实时处理使用的相同的尺寸的植物减少资本成本。

[0080] 而且,在采用防水布的一实施方式中,考虑在防水布边缘周围及防水布边缘上放置土壤或其他培养基,以(1)提供压下防水布的重量;及也(2)发挥自堆过滤废气的生物滤器的作用。在该一实施方式中,生物滤器对于有机物和一氧化碳解毒/降解有效。制备的生物质材料也可储存为压缩的模块,驱过堆,贮藏器,筒仓,袋,管或包住的捆或其他厌氧储存系统。

[0081] 在一实施方式中,监测来自制备的生物质材料的堆的废气流,及发现,存在仅小水平的有机物,及也非常低水平的氧化氮。例如,以下表5.1,5.2和5.3显示在本发明的特定

实施方式的一个实现的储存期期间收集的各种废气样品的分析。指定“BDL”指称可检测的限以下的量。Summa 和 Tedlar 指称可商购的气体采样容器。

[0082] 表 5.1

[0083]

容器类型	容器 ID	% H ₂	% O ₂	% N ₂	% CH ₄	% CO ₂	% H ₂ O	标准化的 CO ₂
Tedlar 袋	A	BDL	1.72	7.84	BDL	95.90	5.23	85.21
Tedlar 袋	B	BDL	2.30	9.12	BDL	89.97	5.97	82.62
Tedlar 袋	C	BDL	0.71	3.57	BDL	97.45	5.54	90.18
Tedlar 袋	D	BDL	0.72	3.18	BDL	97.50	5.97	90.14
Tedlar 袋	E	BDL	1.86	7.24	BDL	91.75	7.64	83.26
Summa 容器	EQ#8	0.01	5.74	22.14	0.07	73.74	5.28	66.84
Summa 容器	EQ#13	0.09	3.28	12.89	0.33	84.48	5.66	78.18
Summa 容器	EQ#16	0.12	3.30	13.01	0.12	84.65	4.99	78.70

[0084] 表 5.2

[0085]

容器类型	容器 ID	% O ₂	ppmv CO	% CO ₂	ppmv HC	ppmv NO	ppmv NO ₂	ppmv NO _x	ppmv SO ₂
Tedlar 袋	A	1.6	13	72.7	104	3.8	1.90	5.70	BDL
Tedlar 袋	B	4.4	19	66.2	739	2.5	122.90	125.40	6
Tedlar 袋	C	0.6	29	75.3	158	8.9	27.20	36.10	4
Tedlar 袋	D	0.6	35	75.7	222	7.9	56.50	64.40	5
Tedlar 袋	E	4.1	35	66.8	423	3.0	20.30	23.90	4

[0086] 表 5.3

[0087]

容器类型	容器 ID	ppmv CH ₂ O	ppmv C ₂ H ₄ O	ppmv 甲醇	ppmv 2-丙醇	ppmv 乙醇	ppmv 丙醇
Tedlar 袋	A	386	870	63.4	0.593	78.5	BDL
Tedlar 袋	B	BDL	1299	678	0.186	1065	15.2
Tedlar 袋	C	18.2	590	89.2	2.784	171	6.098
Tedlar 袋	D	BDL	941	170	3.031	264	7.648
Tedlar 袋	E	BDL	819	389	2.512	634	11.3

[0088] 本发明的实施方式, 尽管相对未含在贮藏器中, 应是环境上良性的。即使如此, 本发明的特定方面与使用土壤或其他培养基作为在贮藏器周围及贮藏器上放置的生物滤器

良好拟合,因为气体自防水布下逃逸性质是辐射状的。像这样,蒸气具有与堆的边缘接触的更高量表面积。在使用生物滤器的实施方式中,蒸气相在进入气氛之前经过接近边缘团放置的生物滤器(诸如土壤或堆肥)释放。生物滤器保留许多潜在环境污染物和由储存堆释放的气味,及其消除或大大减少自储存堆释放的潜在有害废气。

[0089] 在一实施方式中,制备的生物质材料储存直到其含有不多于约 80wt% 液体。储存制备的生物质材料直到其相比初始含量含有至少约 4~约 5% 更高。在此阶段,湿储存的生物质聚集物仍不被认为是“啤酒”,由于其仍含有超过约 20% 固体。在一实施方式中,储存制备的生物质材料直到其含有约 2wt% 和约 50wt% 之间的乙醇,及优选约 4wt% 和约 10wt% 之间的乙醇。液体的平衡主要是水,但可含有许多其他有机化合物,诸如乙酸,乳酸,等。

[0090] 本发明的实施方式允许以相比典型甘蔗榨汁操作更短得多的收获窗收获固体生物质,其允许:

- [0091] (1) 可放置设备的更大得多的地区,
- [0092] (2) 当作物具有其最高产生潜力时收获作物,
- [0093] (3) 在其最高糖浓度潜力收获作物,
- [0094] (4) 较短收获窗仍经济,以及
- [0095] (5) 去掉自用于发酵的生物质取汁的需求。

[0096] **【VOC 回收】**

[0097] 一旦制备的生物质材料已被储存期望的量的时间和 / 或含有期望的浓度的挥发性有机化合物,诸如乙醇,其可流入用于特定挥发性有机化合物的回收的 VOC 回收系统。回收系统和储存设备可位于离另一个任何距离。本文所述的系统和方法的实施方式允许二者的地理位置和它们相对于彼此的位置上有弹性。在特定实施方式中,回收系统位于离储存设备约 0.5~约 2 英里。任何适合的方法和 / 或设备可用于将制备的生物质材料自储存设备转移到回收系统。在一实施方式中,使用进料斗。在一实施方式中,青贮饲料铰,前端装载机或运输装载机,刮扫式输送螺旋或其他螺旋钻系统可用于将制备的生物质材料放进进料斗。材料可直接放入进料斗或其可由输送器系统,诸如带式系统转移到进料斗。含有制备的生物质材料的进料斗可然后被驱动到回收系统。

[0098] 回收系统是无溶剂及使用过加热的蒸气流将制备的生物质材料中的液体气化为气体组分,其可然后收集。超-加热的蒸气是以操作压力被加热到其饱和度温度以上的蒸气。在优选的实施方式中,在回收系统达到稳定状态之后,过加热的蒸气流仅包含之前自制备的生物质材料蒸发的蒸气,从而无其他气体导入,由此减少挥发性有机化合物燃烧和 / 或挥发性有机化合物的回收的产物流稀释的风险。部分蒸气作为产物移出和余部被再循环回用于将热转移到新鲜收入的制备的生物质材料。余下固体组分自系统排出和可具有各种随后用途。固体组分在特定实例中也可被称为固体产物。超-加热的蒸气直接接触生物质,转移能量及气化那里存在的液体。热或热能源不直接接触制备的生物质材料。由此,VOC 回收系统也可被描述为提供“间接”加热接触。

[0099] 为了提供挥发性有机化合物的无溶剂回收,回收系统包含允许过加热的蒸气以连续方式流动,即,作为流的隔室。在一实施方式中,隔室具有环形状。在另一实施方式中,隔室包含旋转鼓。隔室具有制备的生物质材料可进入的入口。在一实施方式中,入口包含耐压旋转阀,螺纹塞或其他类似装置,其可辅助分离制备的生物质材料,以增加暴露于过加热

的蒸气流的表面积。

[0100] 在仍另一实施方式中,系统包含在液体气化之前移出制备的生物物质材料中的至少部分液体的脱水机构。液体移出可在制备的生物物质材料进入隔室之前和/或与此同时发生。来自制备的生物物质材料的液体含有至少一种挥发性有机化合物,其可由进一步处理液体,诸如将液体供给到蒸馏柱来回收。液体可直接流向进一步处理单元,诸如蒸馏柱。替代性地或附加性地,系统还包括收集自制备的生物物质材料移出的液体的收集单元。收集的液体的任何部分可然后进一步处理。

[0101] 在一实施方式中,脱水机构包含适应于自制备的生物物质材料挤压液体的元件。在该一实施方式中,挤压可在制备的生物物质材料被供给进隔室的同时实施。例如,入口可包含挤压机构,以自制备的生物物质材料随其被导入隔室而挤压液体。替代性地或附加地,挤压可在制备的生物物质材料进入隔室之前独立地实施。该挤压机构的非限制性例是螺纹塞供给器。

[0102] 在一实施方式中,液体移出机构包含机械压缩机。机械压缩机的类型的非限制性例包括带式压滤机,V-型压缩机,环式压缩机,螺旋压缩机和鼓式压缩机。在带式压滤机的特定实施方式中,制备的生物物质材料被夹入2个多孔带之间,其在辊上及下经过,以将水份挤压出。在另一特定实施方式中,鼓式压缩机包含针对穿孔的鼓对材料施压的在其之内具有旋转压缩机卷的穿孔的鼓。在仍另一实施方式中,在碗式离心机中,材料进入圆锥,旋转碗,在其中固体在周界蓄积。

[0103] 隔室提供过加热的蒸气可接触制备的生物物质材料而气化来自制备的生物物质材料的液体的空间。至少部分液体的气化提供制备的生物物质材料的气体组分和固体组分。系统还包含分离单元,其中制备的生物物质材料的固体组分可从气体组分分离,如此各组分可根据期望移出而用于进一步处理。在一实施方式中,分离单元包含离心收集器。该离心收集器的一例是高效旋风分离设备。在优选的实施方式中,分离单元也作为固体组分的出口。例如,分离单元可自无溶剂回收系统排出固体组分。有气体组分用分离出口,气体组分可自那里从系统出来而用于进一步处理,诸如蒸馏。在一实施方式中,分离单元还偶联于第2耐压旋转阀等而挤出或排出固体组分。在一实施方式中,过加热的蒸气由偶联于热源的热交换元件维持在其饱和温度以上的期望的温度,其中过加热的蒸气不接触热源。热源和系统之间的热转移经向过加热的蒸气的对流发生。在一实施方式中,热源可包括电元件或通过适当的热交换器的热蒸气。在一实施方式中,操作压力在约1psig~约120psig范围。在优选的实施方式中,操作压力在约3psig~约40psig范围。在特别优选的实施方式中,系统以约60psig的操作压力加压而自系统赶出蒸气组分。

[0104] 在一实施方式中,在回收系统起始时,制备的生物物质材料被经入口导入隔室。蒸气起初被用作过加热的蒸气,而起初气化制备的生物物质材料中的液体。过加热的蒸气连续移动通过隔室。当制备的生物物质材料进入过加热的蒸气时,其变得流化,其中其如流体般流动通过隔室。随制备的生物物质材料导入,其与过加热的蒸气接触。来自过加热的蒸气的热转移到制备的生物物质材料及气化制备的生物物质材料中的至少部分液体及从固体组分分离,其可仍含有水份。气体组分含有在制备的生物物质材料中产生的挥发性有机化合物。在优选的实施方式中,随来自制备的生物物质材料的液体开始气化,至少部分气化的液体可随过加热的流体在系统中再循环。即,在任何一个循环期间,至少部分气化的液体保持在隔室中作

为过加热的蒸气,代替被收集用于进一步处理,直到下一循环,其中更多制备的生物质材料被补给进系统。

[0105] 在优选的实施方式中,在初始起始过程期间,过加热的流体可根据需要净化,优选连续(间歇性地或恒定地),直到达到稳定状态,其中过加热的蒸气仅包含制备的生物质材料的气化的液体。气体组分和固体组分可经相应出口收集。可经偶联于热源的热交换器向系统连续(间歇性地或恒定)加热,以维持过加热的蒸气的温度,在系统中维持期望的操作压力,或维持目标气化速度。可将系统的各种条件,诸如过加热的蒸气流的流速,压力和温度,调至达到期望的液体和/或挥发性有机化合物移出速度。

[0106] 在一实施方式中,将收集的气体组分冷凝而用于进一步处理,诸如转移到纯化过程,以获得更高浓度的选择的挥发性有机化合物。在优选的实施方式中,收集的气体组分直接补给进蒸馏柱,其提供未用于冷凝气体组分的能量的保存。在另一实施方式中,将气体组分冷凝及作为液体供给到下一纯化步骤。

[0107] 在一实施方式中,在进入回收期之前,制备的生物质材料具有基于生物质材料约至少 10wt%和达约 80wt%的初始液体含量。在特定实施方式中,初始液体含量是基于生物质材料至少约 50wt%。在一实施方式中,初始液体含量包含基于初始液体含量约 2~50wt%,及优选约 4~10wt%乙醇。

[0108] 在一实施方式中,收集的固体组分含有约 5wt%~约 70wt%,及优选约 30wt%~约 50wt%液体,依赖于乙醇移出目标。在另一组分中,收集的气体组分含有约 1wt%和约 50wt%之间乙醇,优选约 4wt%和约 15wt%之间乙醇。在一实施方式中,回收系统回收制备的生物质材料中含有的挥发性有机化合物的约 50%~约 100%。制备的生物质的驻留时间基于许多因素改变,包括挥发性有机化合物移出目标。在一实施方式中,隔室中制备的生物质材料的驻留时间在约 1~约 10s 范围。在一实施方式中,回收系统可操作约 0.06barg 和约 16barg 之间。术语“barg”指称巴规格,如本领域普通技术人员明白,及 1 巴等于 0.1 兆帕。在一实施方式中,回收系统中的气体具有约 100℃~约 375℃,特别约 104℃~约 372℃范围的温度,及从系统出来的固体组分具有小于约 50℃的温度。收集的固体组分可用于其他应用。非限制性例包括动物饲料,用于生物质燃烧器的供料,以供给处理能量或产生电,或还利用纤维素乙醇过程(在青贮饲料堆中再发酵,或供给到预处理单元而用于任何纤维素乙醇过程)转变为乙醇,或用于需要木质纤维素生物质的任何其他生物-燃料过程的供料。

[0109] 无溶剂回收系统的操作条件包括温度,压力,流速,及驻留时间中的至少一个。可控制这些条件之任何一个或组合而达到目标或期望的移出目标,诸如移出的初始液体内容物的量或从回收系统出来的分离的液体组分余下的液体的量。在一实施方式中,控制至少一个操作条件,以达到将初始液体内容物的约 10~90wt%,优选约 45~65wt%,及更优选约 50wt%移出。

[0110] 在优选的实施方式中,以恒定压力增加系统温度会导致生物质中的液体更快速气化,由此经给定驻留时间会导致生物质中更高百分率的液体蒸发。需控制从系统出来的蒸气流速,以匹配来自生物质的液体气化速度,以便达到稳定状态和也可用作控制系统压力的机理。增加系统压力会导致更多能量储存在系统中的蒸气相,其可然后用于辅助进一步处理或辅助蒸气移动到下一个下游处理单元。增加系统中生物质驻留时间导致更多热自蒸

气相转移到生物质,导致更多液体气化。

[0111] 在特定例示实施方式中,回收系统包含闭环气动过加热的蒸气干燥器,其可从可商购的源得到。在一实施方式中,闭环气动过加热的蒸气干燥器是 GEA Barr-Rosin Inc 的 SSD™ 模型。其他适合的可商购的设备包括来自 GEA Barr-Rosin Inc 的过加热的蒸气处理器,SSP™,自几个公司(包括 GEA Barr-Rosin Inc. 和 Dupps)的环式干燥器;自 Dupps 的真空干燥器;自 DuppsEvactherm™ 的 QuadPass™ 旋转鼓干燥器,自 Eirich 的真空过加热的蒸气干燥器;自瑞士 Combi Ecodry 的使用过加热的蒸气的旋转鼓干燥器;及自 Ceramic Drying System Ltd. 的真空干燥器。

[0112] 可作为用于此过程的挥发性有机物回收单元的仍其他类型的间接干燥器是批托架干燥器,间接-接触旋转干燥器,旋转批真空干燥器,及搅拌的干燥器。这些干燥器的基本原理是它们会包括及附接于真空系统而随它们产生自固体移出蒸气(也通过真空降低压力,挥发物更容易移出)。湿固体接触热表面诸如托架或桨,热被转移到湿固体,导致液体蒸发,如此它们可在真空系统中收集及冷凝。

[0113] 图 1 例证采用过加热的蒸气干燥器的例示 VOC 回收系统和过程,参考系统 100。在特定实施方式中,过加热的蒸气干燥可从 GEA Barr-Rosin Inc 得到。在图 1 中,将在青贮饲料堆中固态发酵后含有乙醇和/或其他 VOC 的制备的生物质材料 1 通过输入 2 补给到隔壁 3。在显示的特定实施方式中,输入 2 包含螺旋挤出机。如显示于图 1,制备的生物质材料 1 的至少部分液体在进入隔壁 3 之前被移出。脱水机构可为制备的生物质材料 1 所经过的螺纹塞供料器。自生物质材料 1 移出的至少部分液体可经流 15 直接流向蒸馏步骤 11 而不通过回收系统 100。任选地,可偶联于脱水机构的输出的破碎机可用于辅助将脱水的生物质材料导入隔壁 3。

[0114] 如图 1 所示,回收系统 100 包含隔壁 3,其可被加压,显示为具有适当的直径,长度和形状的导管,其适应于提供期望的操作条件,诸如制备的生物质材料 1 的驻留时间,向过加热的蒸气热转移,及操作压力和温度。在进入隔壁 3 之后,在稳定状态操作期间,制备的生物质材料 1 通过系统 100,在期望的温度接触过加热的蒸气流及变得流化。如上所述,在优选的实施方式中,过加热的蒸气或其至少部分是自之前供给到用于 VOC 回收的系统 100 的制备的生物质材料获得的蒸气组分。流化的生物质以目标流速流动通过隔壁 3 及保持与过加热的蒸气接触对于自制备的生物质材料 1 蒸发期望的量的液体足够的目标驻留时间。在显示的实施方式中,过加热的蒸气及制备的生物质材料 1 流动通过系统 100 由系统风扇 14 辅助。系统 100 可具有 1 个或更多风扇。过加热的蒸气和生物质材料 1 的流速或速度可由系统风扇 14 控制。生物质材料 1 流动通过隔壁 3 及达到分离单元 4,其优选是旋风分离分隔器,在这里生物质材料的蒸气组分和固体组分 1 彼此分离。如显示,蒸气组分经塔顶馏出物流 5 自固体组分流离,和生物质材料 1 的余下部分被认为是固体组分,其自分离单元 4 作为固体组分 7,优选由螺旋挤出机 6 排出。至少部分排出的固体组分 7 可用作动物饲料,燃烧器燃料或用于其他生物-燃料过程的生物质原料。例如,至少部分固体组分 7 可作为用于进一步处理固体组分 7 中含有的木质纤维素材料的处理 400 的原料。处理 400 示于图 3 和相应地还在下文讨论。参照图 1,部分蒸气组分,指示为流 8,被保留及作为用来气化新导入的制备的生物质材料的过加热的蒸气的部分再循环。在显示的实施方式中,流 8 中的保留的蒸气组分流动通过加热交换器 9 而将其加热到目标操作温度。热源可包括蒸气,电,

热烟道气或本领域技术人员知道的其他任何可应用的加热源。

[0115] 在优选的实施方式中,控制温度,使得系统中的压力维持到目标及存在充足的能量以蒸发期望的量的液体。压力也可由过加热的蒸汽流的流速和向热交换器 9 的热输入控制。优选地,回收系统 100 连续操作,其中制备的生物质材料 1 以期望的速度连续补给,及蒸气组分 10 和固体组分 6 以连续速度连续移出。在优选的实施方式中,来自一次运行的“新鲜”蒸气组分 8 以待用作用于下一运行的过加热的蒸汽流的目标速度连续保留。任何这些速度是可调整的,以达到期望的操作条件。如提及,系统风扇 14 使过加热的蒸汽流循环通过系统 100,和可被调节而获得目标流速或速度。

[0116] 参照图 1,蒸气组分流 5 的余下部分(表示为数字 10)流向蒸馏步骤 11。依赖于蒸馏构型,蒸气组分部分 10 在进一步纯化之前可冷凝或优选作为蒸气直接供给到蒸馏柱。在优选的实施方式中,自蒸馏步骤 11 的蒸馏产物具有约 95.6wt%乙醇(乙醇/水共沸物)的乙醇含量,其可使用常见的乙醇脱水技术进一步纯化到约 99wt%以上,其显示为步骤 12。最终乙醇产物 13 然后一般将用作用于与汽油混合的生物燃料。

[0117] 图 2 例证采用过加热的蒸气干燥器的另一例示回收系统和过程,参考系统 200,其是由各种生产商提供的环式干燥器的代表。将制备的生物质材料 201 通过输入 202 补给到系统 200,其优选包含螺旋挤出机。在一实施方式中,制备的生物质材料 201 的至少部分液体在进入系统 200 之前移出。脱水机理可为制备的生物质材料 201 所经过的螺纹塞供料器。自生物质材料 201 移出的至少部分液体可经流 215 直接流向蒸馏步骤 211 而不通过回收系统 200。任选地,可用可偶联于脱水机构的输出的破碎机辅助将脱水的生物质材料导入隔室 203。

[0118] 参照图 2,回收系统 200 包含隔室 203,其优选包含旋转鼓,所述旋转鼓提供用于 VOC 回收的目标操作条件,包括制备的生物质材料 201 的驻留时间,向过加热的蒸气的热转移,及操作压力和温度。在进入隔室 203 之后,在稳定状态操作期间,制备的生物质材料 201 通过系统 200,以操作温度和流速接触过加热的蒸汽流,及变得流化。如上所述,在优选的实施方式中,过加热的蒸气或其至少部分是自之前供给到用于 VOC 回收的系统 200 的制备的生物质材料获得的蒸气组分。流化的生物质以目标流速流动通过隔室 203 及保持与过加热的蒸气接触目标驻留时间而达到来自生物质的液体的目标气化。流化的生物质然后达到分离单元 204,其优选是旋风分离分隔器,在这里蒸气组分和固体组分彼此分离。如显示,蒸气组分通过塔顶馏出物流 205 自固体组分流离,及固体组分 207 自分离单元 204 排出。如显示,固体组分 207 经挤出机 206 从系统 100 出来,和其至少部分可作为用于处理 400 的原料,其进一步处理固体组分 207 中含有的木质纤维素材料。处理 400 示于图 3 和相应地在下文进一步讨论。固体组分 207 可直接流向处理 400。附加地或替代性地,固体组分 207 可被运输而被补给到处理 400。部分蒸气组分,指示为流 208,被保留及作为用来气化新导入的制备的生物质材料的部分过加热的蒸气而被再循环。如显示,保留的蒸气组分 208 流动通过加热交换器 209 而将其加热到期望的温度。热源或热能源可包括蒸气,电,热烟道气或任何其他期望的加热源。如显示,使用热烟道气。控制温度,使得系统中的压力维持在目标压力及存在充足的能量以蒸发期望的量的液体。压力也可由过加热的蒸汽流的流速和向热交换器 209 的热输入控制。

[0119] 参照图 2,蒸气组分流 205 的余下部分,表示为数字 210 流向蒸馏步骤。依赖于蒸

馏构型,蒸气组分部分 210 可在进一步纯化之前冷凝或优选作为蒸气直接供给到蒸馏柱。来自蒸馏步骤的产物可还通过使用已知道的过程浓缩。

[0120] 优选地,回收系统 200 连续操作,其中制备的生物质材料 201 以期望的速度连续补给,及蒸气组分 210 和固体组分 206 以连续速度连续移出。在优选的实施方式中,自一次运行的“新鲜”蒸气组分 208 以目标速度连续保留而用作用于下一运行的过加热的蒸气。全部这些速度可调整而达到期望的操作条件。系统风扇 214 创建过加热的蒸气流的循环环和可被调节而获得目标流速。

[0121] 通过根据本发明的方面使用无溶剂回收系统,系统中热转移的点,即,向系统添加热和向制备的生物质材料热转移,在优选的实施方式中在蒸气相中发生,其提供导致在制备的生物质材料中蒸气相热转移(对流)相比固相热转移(传导)更有效的优势,其是差的导体,因为其具有绝缘性质。如上所述,在特定实施方式中,一旦稳定状态达到,自制备的生物质材料的液体气化的之外,无蒸气在系统中接触制备的生物质材料的固体组分和气体组分,这防止或减少会来自处理蒸气或其他蒸气的添加的稀释,以补加过加热的蒸气。收集的气体组分可直接补给到用于期望的挥发性有机化合物的分离的蒸馏柱,其可提供显著能量保存。此系统的优势是接触湿固体的蒸气仅是已之前自固体移出的那些蒸气,从而无稀释或爆炸风险,等。

[0122] 【木质纤维素材料的进一步处理】

[0123] 参照图 1 和 2,至少部分固体组分,诸如自回收系统,诸如系统 100 和 200 排出的固体组分 7 和组分 207,可作为进一步处理系统 400 的原料及进一步处理而产生可发酵的糖。作为进一步处理系统 400 的原料的固体组分可指“基于生物的原料”,“固体组分原料”,或“生物质原料”。进一步处理系统 400 处理固体组分中的木质纤维素材料而产生可用于随后反应,诸如另外的发酵的可发酵的糖。在优选的实施方式中,进一步处理系统,诸如系统 400,位于接近 VOC 回收系统,诸如系统 100 或 200,及偶联于 VOC 回收系统,从而自回收系统排出的至少部分固体组分作为原料直接流向进一步处理系统 400,其优选以连续或半-连续流模式操作。在该优选的实施方式中,固体组分原料处于夹带的加工系统,在那里其已在加工的系统中流动,代替需要机构而自储存提取及将其导入进一步处理系统。而且,将 VOC 回收系统偶联于进一步处理系统的实施方式可允许在一个位点,自各种源,例如,容易可利用的可发酵的糖和木质纤维素材料产生挥发性有机化合物,其减少与其他原料源关联的储存,操作及运输成本,其并非已在夹带的系统中。该实施方式也可提供原料的连续供给,该原料粒径已相比常常需要在用于木质纤维素材料的另外的处理的设备或在到达用于木质纤维素材料的另外的处理的设备之前储存,运输和/或尺寸减小的常规原料减少,这减少特定关联的成本。替代性地或附加地,固体组分可运输到位于不同位置的其他进一步处理系统。固体组分可被压粒或进一步格式化而辅助运输和/或减少运输成本。在本发明的实施方式中,固体组分粒径已减小,这相比其他原料源减少粒化或其他格式化过程的成本和困难。

[0124] 在特定实施方式中,进一步处理包含使至少部分固体组分接触被适应于辅助糖化的溶液。术语“糖化”具有其普通含义,至少指称使复杂的碳水化合物(诸如淀粉或纤维素)转变为简单或可发酵的糖的过程。可使用任何糖化过程或糖化过程的任何组合,诸如化学和/或酶促的。图 3 提供木质纤维素材料的 2 个例示糖化途径:一

个经浓酸水解和另一个经预处理和酶促水解。在优选的实施方式中,糖化过程包含为随后酶促水解而预处理固体组分原料。需知,固体组分原料的预处理也可导致部分或至少一些糖化。预处理优选因为木质纤维素对于酶促水解是顽固性的,因为其结构复杂性。固体组分原料的预处理可一般通过移出半纤维素及使纤维素更可接近纤维素酶来改善其酶促可消化性。各种化学和机械预处理方法涵盖,包括但不限于,稀释酸,热-水,氨,碱,SPORL,蒸气爆炸,离子液体,organosolv,等,其已良好描述于文献(见,例如 .Zhu and Pan(2010),Bioresource Technology,101:4992-5002;Hendriks and Zeeman(2009),Bioresource Technology,100:10-18,为全部目的,两个文章的公开内容通过引用以它们的整体在本文合并)。

[0125] 例如,在一实施方式中,预处理包含使用约 170°C~约 200°C 的热水。在另一实施方式中,预处理包含使用高温,稀释-硫酸过程,其将生物质的半纤维素部分有效水解为可溶性糖及暴露纤维素,从而酶促糖化可成功。在一实施方式中,用稀释酸溶液预处理的温度跨约 140°C~约 170°C。为控制稀释酸预处理条件可采用的参数包括时间,温度和酸负荷。这些常常在被称为组合的严重性因素的数学方程中组合。一般而言,采用越高酸负荷,可在预处理中采用越低温度。相反,使用越低温度,需越长预处理过程。

[0126] 在一实施方式中,进一步处理系统 400 还包括使至少部分预处理的产物经历酶促水解而产生另外的可发酵的糖。下文还提供关于酶促水解的附加信息。在特定实施方式中,自木质纤维素材料的进一步处理的可发酵的糖可然后通过使用本文所述的各种微生物发酵。例如,使用适应于产生烃的微生物。此可通常指木质纤维素发酵。

[0127] 参照图 1 和 2,在一实施方式中,自木质纤维素发酵的至少部分液体(其含有 VOC)可经流 430 流向蒸气组分 10 或 210 和/或上述使用无溶剂回收系统 100 或 200 自制备的生物物质 1 或 201 回收的液体产物 15 或 215 的接合蒸馏处理 11 或 211。同样,在进一步处理 400 中来自木质纤维素发酵的至少部分任何固体材料中的 VOC 可通过使用无溶剂回收系统 100 或 200 回收,如由流 432 指示。因此,本发明的特定实施方式可提供自生物物质中的容易可利用的可发酵的糖产生 VOC,那些 VOC 的回收,处理来自第 1 轮发酵和回收的木质纤维素材料,自木质纤维素材料产生另外的 VOC,及回收该另外的 VOC 的整合的总体系统。该系统在那些实施方式中不需要另外的设备成本,由此资本投资,其中相同的设备可用于全部 VOC 产生。

[0128] 在特别优选的实施方式中,使用包含至少一种 α -羟基磺酸的酸溶液。 α -羟基磺酸对于将生物物质以更低温,例如,约 100°C(对于 α -羟基甲磺酸或 α -羟基乙烷磺酸)水解为可发酵的糖如戊糖诸如木糖有效,在该过程中产生少至无糠醛。部分纤维素也已显示在这些比较弱条件下水解。已发现,其他多糖诸如淀粉也容易由 α -羟基磺酸水解为组分糖。而且, α -羟基磺酸是可逆的而容易可移出的和可再循环的物质,不像无机酸诸如硫酸,磷酸或盐酸。生物物质处理中采用的更低温度和压力导致更低设备成本。以此方式预处理的生物物质已显示对于另外的糖化,尤其酶介导的糖化高度灵敏。

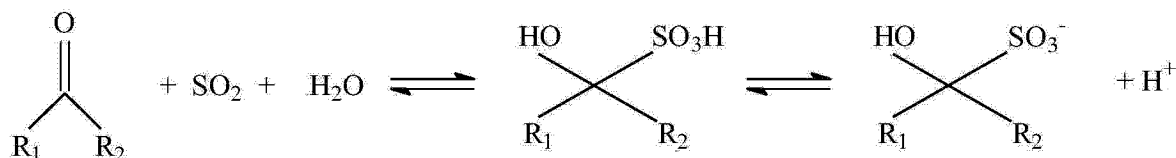
[0129] 以下通式的 α -羟基磺酸:

[0130]



[0131] 其中 R_1 和 R_2 个是氢或具有达约 9 个碳原子的烃基（可含或可不含有氧），其可在本发明的处理中使用。 α -羟基磺酸可为上述的酸的混合物。酸可通常通过使至少一种羰基化合物或羰基化合物的前体（例如，三噁烷和多聚甲醛）与二氧化硫或二氧化硫的前体（例如，硫和氧化剂，或三氧化硫和还原剂）和水，根据以下一般方程 1 反应来制备。

[0132]



[0133] 其中 R_1 和 R_2 个是氢或具有达约 9 个碳原子的烃基或其混合物。

[0134] 对于制备 α -羟基磺酸有用的羰基化合物的例证性例包括：

[0135] $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{H}$ (甲醛)

[0136] $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}_3$ (乙醛)

[0137] $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ (丙醛)

[0138] $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (n- 丁醛)

[0139] $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (i- 丁醛)

[0140] $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CH}_2\text{OH}$ (羟乙醛)

[0141] $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{CHOHCH}_2\text{OH}$ (甘油醛)

[0142] $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{C}(=\text{O})\text{H}$ (乙二醛)

[0143] $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \begin{array}{c} \text{CCHCHCHO} \\ \boxed{\hspace{1.5cm}} \end{array}$ (糠醛)

[0144] $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \begin{array}{c} \text{C}(\text{CH}_3)_4\text{C}(\text{OH}) \\ \boxed{\hspace{1.5cm}} \end{array}$ (水杨醛)

[0145] $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \begin{array}{c} \text{C}(\text{CH}_3)_4\text{CH} \\ \boxed{\hspace{1.5cm}} \end{array}$ (苯甲醛)

[0146] $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CH}_3$ (丙酮)

[0147] $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{OH}, \text{R}_2 = \text{CH}_3$ (丙酮醇)

[0148] $\text{R}_1 = \text{CH}_3, \text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ (甲基乙基酮)

[0149] $\text{R}_1 = \text{CH}_3, \text{R}_2 = \text{CHC}(\text{CH}_3)_2$ (三甲苯基氧化物)

[0150] $\text{R}_1 = \text{CH}_3, \text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (甲基 i- 丁基酮)

[0151] $\text{R}_1, \text{R}_2 = (\text{CH}_2)_5$ (环己酮) 或

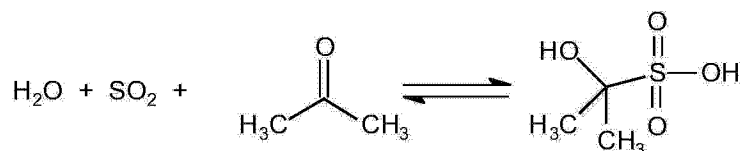
[0152] $\text{R}_1 = \text{CH}_3, \text{R}_2 = \text{CH}_2\text{Cl}$ (氯丙酮)

[0153] 羰基化合物和其前体可为上述化合物的混合物。例如，混合物可为羰基化合物或前体诸如，例如，已知在提升的温度热回复为甲醛的三噁烷或可通过由任何知道的方法醇向醛的脱氢而转变为醛的醇。该自醇转变为醛的一例在以下描述。羰基化合物源的一例可为羟基乙醛和自快热解油产生的其他醛和酮的混合物，诸如描述于“Fast Pyrolysis and

Bio-oil Upgrading, Biomass-to-Diesel Workshop”, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington, September 5-6, 2006。羰基化合物和其前体也可作为酮和 / 或醛与或不与可转化为酮和 / 或醛的醇的混合物, 优选在 1 ~ 7 个碳原子范围。

[0154] 通过组合有机羰基化合物, SO_2 和水的 α -羟基磺酸的制备是一般反应及示于用于丙酮的方程 2。

[0155]



[0156] α -羟基磺酸呈现如 HCl 般强 (如果不更强), 由于加合物的水溶液已被报道与 NaCl 反应而游离更弱的酸, HCl (见 US 3, 549, 319)。方程 1 的反应是真平衡, 其导致酸的轻易的可逆性。即, 当加热时, 平衡移向起始羰基, 二氧化硫和水 (组分形式)。如果允许挥发性组分 (例如二氧化硫) 经气化或其他方法离开反应混合物, 酸反应完全颠倒和溶液成为有效中性。由此, 通过增加温度和 / 或降低压力, 二氧化硫可被馏出和反应由于 Le **Châtelier** 氏原理完全颠倒, 羰基化合物的命运依赖于采用的物质的性质。如果羰基也是挥发物 (例如乙醛), 此物质也容易在蒸气相中移出。羰基化合物诸如苯甲醛, 其在水中略溶, 可形成第 2 有机相及由机械手段分离。由此, 羰基可由常规手段, 例如热和 / 或真空, 蒸气和氮剥离, 溶剂洗涤, 离心, 等的持续的应用移出。因此, 这些酸的形成是随温度升高而可反转的, 二氧化硫和 / 或醛和 / 或酮可自混合物闪蒸及冷凝或在别处吸收, 以便再循环。已发现这些可反转的酸, 其大致如强无机酸般强, 在生物质处理反应中有效。已发现这些处理反应产生非常少的不期望的副产物, 糠醛, 由其他常规无机酸产生的。此外, 由于酸通过处理, 用碱中和和盐的形成自反应混合物有效移出而基本上避免了复杂下游处理。逆转及再循环这些酸的能力也允许使用相比会另外经济上或环境上实践性的浓度更高浓度。作为直接结果, 可降低生物质处理中采用的温度, 以减少副产物诸如糠醛或羟甲基糠醛的形成。

[0157] 在一些实施方式中, 描述的反应在任何适合的设计的系统中实施, 所述系统包括系统包含连续-流 (诸如 CSTR 和插塞流反应器), 批, 半-批或多-系统容器和反应器和填充床流通反应器。为严格经济活力的原因, 本发明通过使用连续-流系统以稳定-状态平衡实行是优选的。与残留的酸留在反应混合物中 (<1wt% 硫酸) 的稀释酸预处理反应成对比, 所述过程的一优势是通过使用这些酸 (10 ~ 20wt%) 采用的更低温度导致基本上反应器中更低压力, 导致潜在地欠昂贵的处理系统, 诸如衬塑料的反应器, 双联不锈钢反应器, 及 2205 型反应器。

[0158] 在一实施方式中 (不显示的), 可还使处理的木质纤维素材料的至少部分产物流经历酶促水解而产生另外的可发酵的糖。下文还提供关于酶促水解的附加信息。在特定实施方式中, 来自木质纤维素材料的进一步处理的可发酵的糖可然后通过使用上述各种微生物发酵而产生多个挥发性有机化合物, 包括可转化为烃的烃前体化合物。此可通常被称为木质纤维素发酵。

[0159] 在一些实施方式中, 可用多个反应器容器实施水解反应。这些容器可具有能实施水解反应的任何设计。适合的反应器容器设计可包括, 但不限于, 批, 滴流床, 顺流, 逆流, 搅

拌箱,或流化床反应器。可采用反应器分期,以达到最佳或期望的经济的溶液。余下生物质原料固体可然后任选地自液体流分离,以允许顽固性固体的更剧烈的处理或直接通入液体流,以进一步处理,其可包括酶促水解,发酵,提取,蒸馏和/或氢化。在另一实施方式中,可随增加的温度特征使用一系列反应器容器,从而在各容器中提取期望的糖级分。各容器的出口可然后在组合流之前冷却,或流可个别补给到用于转变的下一反应。

[0160] 适合的反应器设计可包括,但不限于,可采用反向混合反应器(例如,搅拌箱,气泡柱,和/或喷射混合的反应器),如果部分消化的基于生物原料和液体反应培养基的粘度和特征足以在方案中操作,其中基于生物原料固体悬浮于过量液相(与堆叠的堆消化器相反)。也想得到的是,可随作为固定相有在的生物质和经过该材料的 α -羟基磺酸溶液采用滴流床反应器。

[0161] 处理反应产物含有适宜于进一步处理的可发酵的糖或单糖,诸如戊糖和/或己糖。

[0162] 在一实施方式中,流来自任何预处理过程的产物可由其他方法进一步水解,例如由酶将生物质进一步水解成含有戊糖和己糖(例如,葡萄糖)的糖产物及发酵而产生醇,诸如公开于US公开No. 2009/0061490和US专利No. 7,781,191,其公开内容通过引用在此合并。

[0163] 方法可用任何类型的纤维素酶(无论它们的来源)实施。可使用的纤维素酶的非限制性例包括获自如下来源的那些:曲霉属(*Aspergillus*),腐质霉属(*Humicola*)和木霉属(*Trichoderma*),毁丝霉属(*Myceliophthora*),金孢子菌属(*Chrysosporium*)的真菌及芽孢杆菌属(*Bacillus*),热双歧菌属(*Thermobifida*)和栖热袍菌属(*Thermotoga*)的细菌。在一些实施方式中,丝状真菌宿主细胞是支顶孢属(*Acremonium*),曲霉属(*Aspergillus*),短梗霉属(*Aureobasidium*),纤孔菌属(*Bjerkandera*),拟蜡菌属(*Ceriporiopsis*),金孢子菌属(*Chrysosporium*),鬼伞属(*Coprinus*),革盖菌属(*Coriolus*),隐球菌属(*Cryptococcus*),线黑粉菌属(*Filibasidium*),镰孢属(*Fusarium*),腐质霉属(*Humicola*),稻瘟菌属(*Magnaporthe*),毛霉属(*Mucor*),毁丝霉属(*Myceliophthora*),新丽鞭毛菌属(*Neocallimastix*),链孢霉属(*Neurospora*),拟青霉属(*Paecilomyces*),青霉属(*Penicillium*),白腐真菌属(*Phanerochaete*),射脉菌属(*Phlebia*),梨囊鞭菌属(*Pyromyces*),侧耳属(*Pleurotus*),裂褶菌属(*Schizophyllum*),踝节菌属(*Talaromyces*),嗜热子囊菌属(*Thermoascus*),草根霉属(*Thielavia*),弯颈霉属(*Tolypocladium*),栓菌属(*Trametes*)或木霉属(*Trichoderma*)细胞。

[0164] 选择纤维素酶剂量,以将预处理的原料的纤维素转变为葡萄糖。例如,适当的纤维素酶剂量可为约0.1~约40.0滤纸单位(FPU或IU)每克纤维素,或它们之间的任何量。术语滤纸单元指称自50mg块的Whatman No. 1过滤纸,于50℃,在大致pH4.8,在1小时内释放2mg的还原糖(例如,葡萄糖)需要的酶量。

[0165] 在实践中,水解可在水解系统中实施,其可包括一系列水解反应器。系统中水解反应器的数依赖于反应器的成本,水性浆的体积,及其他因素。用纤维素酶酶促水解产生水性糖流(水解产物),其包含葡萄糖,未转化的纤维素,木质素和其他糖组分。水解可以2阶段实施(见美国专利No. 5,536,325,其通过引用在本文合并),或可以单阶段实施。

[0166] 在一实施方式中,包含可发酵的糖的处理的固体组分可然后由1种或更多微生物

发酵而产生包含期望的化学品的发酵肉汤。在木质纤维素发酵系统中,许多知道的微生物之任何一种可用于将糖转变为期望的发酵产物。微生物将存在于处理的固体组分或水解产物中的糖,包括但不限于葡萄糖、甘露糖和半乳糖转变为发酵产物。特定发酵产物是烃。但是,可通过添加适当的生物产生其他化合物。

[0167] 在一实施方式中,木质纤维素发酵包含使用适应于产生烃的微生物。该微生物的一例公开于 PCT 申请 PCT/EP2013/053600,其公开内容通过引用并入本文。

[0168] 在一实施方式中,使重组宿主细胞,诸如重组微-生物适应于表达以下酶之至少一种:脂肪酸还原酶(LuxC),脂肪酰基转移酶(LuxD),脂肪醛合成酶(LuxE),及醛脱羧基酶。脂肪酸还原酶,脂肪醛合成酶,脂肪酰基转移酶,及醛脱羧基酶酶的共表达可合称为 CEDDEC。至少一种脂肪酸还原酶,至少一种脂肪醛合成酶,及至少一种脂肪酰基转移酶形成脂肪酸还原酶复合物。脂肪酸底物与脂肪醛合成酶的接触形成脂肪酸醛。脂肪酸醛与至少一种醛脱羧基酶的接触形成烃。宿主细胞可为重组体和可,例如,是表达以下这些酶之至少一种,及优选全部的遗传修饰的微生物:脂肪酸还原酶,脂肪醛合成酶,脂肪酰基转移酶,及醛脱羧基酶。这些酶可各由重组宿主细胞,在相同的宿主细胞或分开的宿主细胞之内表达。烃可分泌自其所形成的宿主细胞。产生的烃可包括用于柴油或航空燃料的适当的链长度的烷和烯烃,即十三烷,十五烷,十五碳烯,十六碳烯,十七烷和十七碳烯。

[0169] 在一实施方式中,脂肪酸底物之至少一些可通过使脂肪酰基-ACP 与至少一种酰基-ACP 硫酯酶接触来获得。术语酰基-ACP 硫酯酶是 EC 类 3.1.2.14,能催化自脂肪酰基-ACP 释放游离的脂肪酸的酶。酰基-ACP 硫酯酶可为,例如,与 SEQ ID NO:5(自樟树(*Cinnamomum camphora*)的硫酯酶蛋白)具有至少 50%序列同一性的多肽。

[0170] 在一实施方式中,脂肪酰基-ACP 的至少一些可通过使酮基酰基 CoA 和丙二酰-ACP 与至少一种 3-酮脂肪酰-ACP 合酶 III(KASIII)接触来获得。此是 EC 类 2.3.1.180,能催化酮基酰基 CoA 和丙二酰-ACP 反应形成脂肪酰基-ACP 的酶。3-酮脂肪酰-ACP 合酶 III 可为与 SEQ ID NO:6(枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)酶 KASIII)具有至少 50%序列同一性的多肽。

[0171] 在此实施方式中,酮基酰基-CoA 的至少一些可通过使酮酸与支链酮基脱氢酶复合物接触获得。此是能催化酮酸转变为酮基酰基-CoA 的酶或酶的复合物。例如,支链酮基脱氢酶复合物可包含 EC 类 1.2.4.4 的多肽(例如与 SEQ ID NO:7;枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)BCKD 亚基 E1 α 具有至少 50%序列同一性)和还包含 EC 类 1.2.4.4 多肽(例如与 SEQ ID NO:8;枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)BCKD 亚基 E1 β 具有至少 50%序列同一性)和 EC 类 2.3.1.168 多肽(例如与 SEQ ID NO:9;枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)BCKD 亚基 E2 具有至少 50%序列同一性)和 EC 类 1.8.1.4 多肽(例如与 SEQ ID NO:10;枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)BCKD 亚基 E3 具有至少 50%序列同一性)。在一实施方式中,支链酮基脱氢酶复合物是包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7~10 之全部的单多肽。

[0172] 本文所述的这些其他酶(即,酰基-ACP 硫酯酶和/或 3-酮脂肪酰-ACP 合酶 III 和/或支链酮基脱氢酶复合物)也可由微-生物表达。优选地,酶是外源的,即,在修饰之前不存在于细胞中,已通过使用诸如在本文所述的微生物方法导入。此外,酶可各由重组宿主细胞,在相同的宿主细胞或分离宿主细胞之内表达。烃可分泌自其所形成的宿主细胞。

[0173] 宿主细胞可由本领域技术人员知道适宜于此目的的任何方式遗传修饰。此包括在

可能在宿主细胞之内繁殖的质粒或粘粒或其他表达载体上导入感兴趣的基因。或者,可使质粒或粘粒 DNA 或质粒或粘粒 DNA 的部分或线性 DNA 序列整合进宿主基因组,例如由同源重组。为了实施遗传修饰,DNA 可由天然的摄取或由熟知的过程诸如电穿孔介导的导入或转化进细胞。遗传修饰可涉及在导入的启动子控制下基因的表达。导入的 DNA 可编码可发挥酶的作用或可调控其他基因的表达的蛋白。

[0174] 在一实施方式中,该宿主细胞可包含编码脂肪酸还原酶和 / 或脂肪醛合成酶和 / 或脂肪酰基转移酶和 / 或醛脱羧基酶和 / 或酰基 -ACP 硫酯酶和 / 或 3- 酮脂肪酰 -ACP 合酶 III 和 / 或支链酮基脱氢酶复合物的核酸序列。编码酶的核酸序列可为外源的,即,不天然存在于宿主细胞中。

[0175] 因此,在一实施方式中,有重组宿主细胞,诸如微 - 生物,其包含至少种多肽,所述多肽是 EC 类 1. 2. 1. 50 的脂肪酸还原酶,例如,具有与 SEQ ID NO:1 具有至少 50% 同一性的氨基酸序列 (例如,SEQ ID NO:1, 28 或 29),及包含至少一种多肽,所述多肽是 EC 类 6. 2. 1. 19 的脂肪醛合成酶,例如,具有与 SEQ ID NO:2 具有至少 50% 同一性的氨基酸序列 (例如,SEQ ID NO:2, 32 或 33),及包含至少一种多肽,所述多肽是 EC 类 2. 3. 1. - 的脂肪酰基转移酶,例如,具有与 SEQ ID NO:3 具有至少 50% 同一性的氨基酸序列 (例如,SEQ ID NO:3, 30 或 31)。细胞也可包含至少一种多肽,所述多肽是 EC 类 4. 1. 99. 5 的醛脱羧基酶,例如,具有与 SEQ ID NO:4 具有至少 50% 同一性的氨基酸序列,或这些序列之任何的功能变体或片段。重组宿主细胞可包含多肽,所述多肽包含 SEQ ID NO:1 ~ 4 之全部和 / 或与 SEQ ID NO:1 ~ 3 之全部具有至少 50% 同一性的氨基酸序列 (例如,选自 SEQ ID NO:28 ~ 33 的氨基酸序列,如上所述) 和与 SEQ ID NO:4 具有至少 50% 同一性的氨基酸序列。重组宿主细胞可包含多核苷酸序列 SEQ ID NO:11 ~ 14 和 / 或序列 SEQ ID NO:13 和 15 和 / 或序列 SEQ ID NO:13 ~ 16 和 / 或这些特定组合的任何组合。

[0176] 重组宿主细胞可还包含:至少一种 EC 类 3. 1. 2. 14 的酰基 -ACP 硫酯酶 (例如,具有与 SEQ ID NO:5 或其功能变体或片段之任何具有至少 50% 同一性的氨基酸序列);和 / 或至少一种 EC 类 2. 3. 1. 180 的 3- 酮脂肪酰 -ACP 合酶 III (例如,具有与 SEQ ID NO:6 或其功能变体或片段之任何具有至少 50% 同一性的氨基酸序列);和 / 或至少一种支链酮基脱氢酶复合物,所述酶复合物包含 EC 类 1. 2. 4. 4, 2. 3. 1. 168 和 1. 8. 1. 4 的酶 (例如,包含 1 种或更多各与 SEQ ID NO:7 ~ 10 或其功能变体或片段之任何具有至少 50% 同一性的氨基酸序列);和 / 或至少一种编码这些酶和 / 或这些的功能片段或变体中的至少一种的多核苷酸。细胞也可修饰为产生增加的水平的可由脂肪酸还原酶和脂肪醛合成酶和脂肪酰基转移酶用作底物而形成脂肪醛 (其可然后由脱羧基酶转化为烃) 的脂肪酸。重组宿主细胞也可包含一种或更多将烃运出细胞的运输蛋白。

[0177] 图 4 是示意图,其详示导入大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 细胞而产生预定烷的遗传元件 (实线),它们与内源性基因 (虚线) 和新代谢通路的关系 (箱表示基因而圆形表示代谢中间体。代谢物的关键字:ILV, 异亮氨酸, 亮氨酸和缬氨酸;MDHLA, 甲基 - 丁烷 / 丙酰 - 二氢硫辛酰胺 -E。基因的关键字:ilvE, 内源性支链氨基酸氨基转移酶;E1 α 和 E1 β , 来自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的支链 α 酮基酸脱羧酶 / 脱氢酶 E1 α 和 β 亚基;E2, 来自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的二氢硫辛酰转酰酶;E3, 来自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的二氢硫辛酰胺脱氢酶 (为由 E1 亚基使用而环化硫辛酰胺 -E);KASIII, 来自枯草芽孢

杆菌 (*B. subtilis*) 的酮基-酰基合酶 III (FabH2); *accA* 至 *accD*, 内源性乙酰-CoA 羧基化酶基因; *fabH*, 内源性 β -酮脂酰-ACP 合酶 III; *tesA*, 内源性长链硫酯酶; 硫酯酶, 来自樟树 (*C. camphora*) 的肉豆蔻酰-酰基载体蛋白硫酯酶; *luxD*, 来自发冷光杆菌 (*P. luminescens*) 的酰基转移酶; *luxC* 和 *luxE*, 来自发冷光杆菌 (*P. luminescens*) 的脂肪酸还原酶和酰基-蛋白合成酶; *AD*, 来自点形念珠藻 (*N. punctiforme*) 的醛脱羧基酶)。

[0178] PCT/EP2013/053600 展示了本文所述的烃的产生的特定方面, 包括经蓝细菌烷生物合成通路使外源脂肪酸转变为烷, 经 FAR/NpAD 通路产生烷和烯烃; 大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 中樟脑 *FatB1* 硫酯酶基因的表达增加十四酸的库尺寸, 大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 细胞中十三烷的产生; 大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 中分支的脂肪酸的产生, 及大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 细胞中分支的十五烷的产生。

[0179] 可将适合的多核苷酸由同源重组导入细胞和/或可形成包含多核苷酸序列 SEQ ID NO:11 ~ 25 或其补体中的至少一种的表达载体的部分。该表达载体形成本发明的第 3 方面。用于构建该表达载体的适合的载体为本领域所熟知 (例是以上提及的) 和可排列以包含可操作地连接于 1 个或更多表达控制序列的多核苷酸, 由此对于在宿主细胞, 上述例如微生物中表达需要的酶有用。

[0180] 在一些实施方式中, 重组体或遗传修饰的宿主细胞, 如贯穿此说明书提及的, 可为选自下列的任何微生物或微生物的部分: 真菌 (诸如糖酵母属 (*Saccharomyces*) 的成员), 原生生物, 藻, 细菌 (包括蓝细菌) 和古细菌。细菌可包含革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌和/或可选自: 埃希氏菌属 (*Escherichia*), 芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 乳杆菌属 (*Lactobacillus*), 红球菌属 (*Rhodococcus*), 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 或链霉菌属 (*Streptomyces*)。蓝细菌可选自: 细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*), 集胞藻属 (*Synechocystis*), 海洋原绿球藻 (*Prochlorococcus marinus*), 多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*), 点形念珠藻 (*Nostoc punctiforme*), 青紫粘杆菌 (*Gloeobacter violaceus*), 蓝丝菌属 (*Cyanothece* sp.) 和聚球藻属 (*Synechococcus* sp.)。适合的微生物 (或其他表达系统) 的选择在本领域技术人员的常规能力之内。特别适合的微生物包括例如大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 和啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

[0181] 在本发明的相关的实施方式中, 脂肪酸还原酶和/或脂肪酰合成酶和/或脂肪酰基转移酶和/或醛脱羧基酶和/或酰基-ACP 硫酯酶和/或 3-酮脂酰-ACP 合酶 III 和/或支链酮基脱氢酶复合物或这些之任何的功能变体或功能片段可在非-微生物细胞中表达, 所述非-微生物细胞诸如培养的哺乳动物细胞或植物细胞或昆虫细胞。哺乳动物细胞可包括 CHO 细胞, COS 细胞, VERO 细胞, BHK 细胞, HeLa 细胞, Cv1 细胞, MDCK 细胞, 293 细胞, 3T3 细胞和/或 PC12 细胞。

[0182] 重组宿主细胞或微生物可用于表达上述酶, 然后由本文提及的标准方法获得无细胞的提取物。常规方法和技术解释详见, 例如, Sambrook 等人 (参考号 17, 见下文)。

[0183] 本说明书中提到的氨基酸和核苷酸序列利于说明书结束部分的表 7。术语“多核苷酸”, “多核苷酸序列”和“核酸序列”在本文互换使用。术语“多肽”, “多肽序列”和“氨基酸序列”也同样在本文互换使用。由本发明包括的其他序列提供于序列列表。

[0184] 酶研究委员会 (EC) 编号 (也在本文被称为“类”), 贯穿此说明书, 在其可利用的资源“酶命名法” (1992, 包括 Supplements 6-17), 例如, <http://www.chem.qmul.ac.uk/>

iubmb/enzyme/, 根据国际生物化学与分子生物学联合会 (NC-IUBMB) 的命名委员会称呼。这是基于由各酶类催化的化学反应的数值分类方案 (参考文献 19)。

[0185] 术语“脂肪酸还原酶复合物”表示能催化游离的脂肪酸, 脂肪酰基 -ACP 或脂肪酰基 -CoA 转变为脂肪醛的酶复合物。一般而言, 复合物包含脂肪酸还原酶和脂肪醛合成酶和脂肪酰基转移酶。术语“脂肪醛合成酶”表示 EC 类 6. 2. 1. 19, 能催化酰基 - 蛋白硫酯自脂肪酸和蛋白形成的酶。术语“脂肪酸还原酶”表示 EC 类 1. 2. 1. 50 酶, 能催化长链醛自脂肪酰基 -AMP (脂肪酰基 - 一磷酸腺苷) 或脂肪酰基 -CoA 形成的酶。脂肪酰基 -AMP 是在此偶联的反应中由脂肪醛合成酶形成的中间体。脂肪酸还原酶的一例是具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的多肽; 脂肪醛合成酶的一例是具有氨基酸序列 SEQ ID NO:2 的多肽。其他适合的脂肪酸还原酶多肽具有与 SEQ ID NO:1 具有至少 50% 同一性的氨基酸序列, 例如, SEQ ID NO:28 或 29; 其他适合的脂肪醛合成酶多肽具有与 SEQ ID NO:2 具有至少 50% 同一性的氨基酸序列, 例如, SEQ ID NO:32 或 33。

[0186] 术语“脂肪酰基转移酶”表示 EC 类 2. 3. 1. -, 能催化脂肪酰基 -ACP, 酰基 -CoA 和其他活化的酰基供体的酰基部分转移到在转移酶上的丝氨酸的羟基的酶, 之后酯通过水解转变为脂肪酸。脂肪酰基转移酶的一例是具有氨基酸序列 SEQ ID NO:3 的多肽。其他适合的脂肪酰基转移酶多肽具有与 SEQ ID NO:3 具有至少 50% 同一性的氨基酸序列, 例如 SEQ ID NO:30 或 31。

[0187] 术语“醛脱羧基酶”表示 EC 类 4. 1. 99. 5, 能催化脂肪醛转变为烃, 例如烷, 烯烃或其混合物的酶。醛脱羧基酶的一例是具有氨基酸序列 SEQ ID NO:4 或与 SEQ ID NO:4 具有至少 50% 同一性的氨基酸序列的多肽。

[0188] 脂肪酸是具有长的未分支的或分支的脂肪尾的羧酸。脂肪酸可包含饱和的脂肪酸和 / 或含有 1, 2, 3 个或更多双键的不饱和的脂肪酸。1 种或更多脂肪酸, 脂肪酰基 -ACP 或脂肪酰基 -CoA 可, 例如, 包含 4 个或更多碳原子, 例如, 8 个或更多碳原子, 10 个或更多碳原子, 12 个或更多碳原子, 或 14 个或更多碳原子。脂肪酸也可包含, 例如, 30 个或更少碳原子, 例如, 26 个或更少碳原子, 25 个或更少碳原子, 23 个或更少碳原子, 或 20 个或更少碳原子。脂肪酸可, 例如, 源于三酰基甘油或磷脂, 或可由细胞, 和 / 或由在本文别处描述的机理新制造。

[0189] 在特定实施方式中, 可使用本文所述的多肽的变体。如本文所用, “变体”是指序列之内的 1 个或更多氨基酸被其他氨基酸代替而不同于其所来源的碱基序列的氨基酸序列的多肽。例如, SEQ ID NO:1 的变体可具有与 SEQ ID NO:1 具有至少约 50% 同一性的氨基酸序列, 例如, 至少约 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 或约 100% 同一性的氨基酸序列。变体和 / 或片段是与具有本文所述的非 - 变体氨基酸序列的酶具有类似或相同功能酶活性特征的变体序列的功能变体 / 片段 (且这是贯穿此说明书使用的术语“功能变体”的含义)。

[0190] 例如, SEQ ID NO:1 的功能变体与 SEQ ID NO:1 具有类似或同一脂肪酸还原酶特征, 由上述 NC-IUBMB 的酶命名法分类进酶 EC 类 1. 2. 1. 50。一例可为, 由 SEQ ID NO:1 的功能变体, 在非变体 SEQ ID NO:2 的存在下, 将游离的脂肪酸转变为脂肪醛的转变率可与当使用具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的酶, 在非变体 SEQ ID NO:2 的存在下达到的相同的或近似, 例如至少约 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 或至少约 100% 转变

率。转变率可当使用变体多肽时改善,从而达到大于100%非变体转变率的转变率。可对本文提及的其他酶同样进行百分率序列同一性和比较性功能变体活性的相当的分析。

[0191] 例如,脂肪酰基转移酶 SEQ ID NO:3 的变体可具有与 SEQ ID NO:3 具有至少约 50% 同一性的氨基酸序列,是被分类进 EC 2.3.1.- 的功能变体;脂肪酰基-ACP,酰基-CoA 和其他活化的酰基供体的酰基部分转移到转移酶上丝氨酸的羟基,之后酯通过水解转变为脂肪酸的率,可为相同的或近似,例如当使用 SEQ ID NO:3 时达到的至少约 60%,70%,80%,90%或 95%率。

[0192] SEQ ID NO:28 和 29 可为 SEQ ID NO:1 的功能变体的例,如本文定义。SEQ ID NO:32 和 33 可为 SEQ ID NO:2 的功能变体的例,如本文定义。SEQ ID NO:30 和 31 可为 SEQ ID NO:3 的功能变体的例,如本文定义。

[0193] 本文提及的酶的 NC-IUBMB 分类总地列于下表 6。

[0194] 表 6

[0195]

序列的描述	SEQ ID NO	EC 号
发冷光杆菌 (<i>Photorhabdus luminescens</i>) LuxC 氨基酸序列	1	1.2.1.50
发冷光杆菌 (<i>P. luminescens</i>) LuxE 氨基酸序列	2	6.2.1.19
发冷光杆菌 (<i>P. luminescens</i>) LuxD 氨基酸序列	3	2.3.1.-
点形念珠藻 (<i>Nostoc punctiforme</i>) 醛脱羧基酶氨基酸序列	4	4.1.99.5
樟树 (<i>Cinnamomum camphora</i>) 硫酯酶氨基酸序列	5	3.1.2.14
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) KasIII (3-酮脂肪酰-ACP 合酶 III) 氨基酸序列	6	2.3.1.180
枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E1 α 氨基酸序列	7	1.2.4.4
枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E1 β 氨基酸序列	8	1.2.4.4
枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E2 氨基酸序列	9	2.3.1.168
枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E3 氨基酸序列	10	1.8.1.4

[0196] 因此,本文以上提及的 SEQ ID NO 氨基酸序列或基因之任何的功能变体或片段是保持在与表 1 的非-变体序列相同的酶类别(即,具有相同的 EC 数)的任何氨基酸序列。本领域技术人员熟知确定是否酶落入特定类别之内的方法,本领域技术人员无需使用发明的技能即可确定酶类别。适合的方法可,例如,从国际生物化学与分子生物学联合会得到。

[0197] 氨基酸被具有广泛地类似性质的不同氨基酸取代时,该氨基酸取代可被认为是“保守性的”。氨基酸被不同类型的氨基酸取代是非-保守性取代。

[0198] “保守性取代”是指氨基酸被相同的类的另一氨基酸取代,其中类被定义如下:

[0199]

类	氨基酸例
非极性的	A, V, L, I, P, M, F, W
不带电的极性的	G, S, T, C, Y, N, Q

酸性的	D, E
碱性的	K, R, H。

[0200] 如本领域技术人员所熟知,由保守性取代改变多肽的一级结构可不显著地改变该多肽的活性,因为被插入序列的氨基酸的侧链可能与已被取代出的氨基酸侧链形成类似键和接触。这在取代在确定多肽的构象中是关键的区中时甚至也是如此。

[0201] 只要这些不间断多肽的酶活性,非-保守性取代也是可能的,如在本文别处定义。酶的取代的版本必需保留使得它们保持与处于非-取代的酶相同的酶类的特征,如通过使用以上讨论的 NC-IUBMB 命名法确定。

[0202] 广泛地讲,只要不改变多肽的生物学活性,相比保守性取代更少的非-保守性取代也是可能的。任何取代(及,的确,任何氨基酸缺失或插入)效应的确定在本领域技术人员的整体常规能力之内,本领域技术人员可容易确定是否变体多肽保留本发明的酶活性。例如,当确定是否多肽的变体落入本发明的范围之内(即,是“以上定义的功能变体或片段”)时,本领域技术人员会确定是否变体或片段保留参照在本文别处提及的 NC-IUBMB 命名法定义的底物转变酶活性。全部该变体在本发明的范围之内。

[0203] 除了本文公开的那些之外,使用标准遗传密码,本领域技术人员可容易想出及生产编码多肽的其他核酸序列。核酸序列可为 DNA 或 RNA,且其中其是 DNA 分子,其可例如包含 cDNA 或基因组 DNA。核酸可含在表达载体之内,如在本文别处描述。

[0204] 根据本发明的另一方面,发酵产生烃包括使用适应于表达产生醛的酰基-ACP 还原酶和脂肪醛脱羧基酶中的至少一种的重组微生物。产生醛的酰基-ACP 还原酶和脂肪醛脱羧基酶酶的基因优选来自蓝细菌,诸如点形念珠藻(*Nostoc punctiforme*)。产生醛的酰基-ACP 还原酶和脂肪醛脱羧基酶的非-限制例描述于 Schirmer A, et al., *Microbial biosynthesis of alkanes*. *Science* 329(5991):559-562(2010),其公开内容通过引用以其整体在本文合并。共表达产生醛的酰基-ACP 还原酶和脂肪醛脱羧基酶酶可通常指称 NpARAD 或 NpAR/NpAD。

[0205] 本发明的实施方式包括编码本文所述的多肽的变体核酸序列。关于核酸序列,术语“变体”是指任何自或向多核苷酸序列 1 个或多个核苷酸的取代,变异,修饰,取代,缺失或添加,提供得到的由多核苷酸编码的多肽序列,呈现至少与由碱基序列编码的多肽相同或近似的酶促性质。术语包括等位基因变体和也包括与在本文描述的多核苷酸序列基本上杂交的多核苷酸(“探针序列”)。该杂交可在低和高严格度条件或在低和高严格度条件之间发生。总而言之,低严格度条件可定义为洗涤步骤在比探针序列的计算的或实际熔解温度(T_m)(例如,约环境实验室温度至约 55℃)低约 40~48℃ 的温度,在 0.330~0.825M NaCl 缓冲溶液中发生的杂交,而高严格度条件涉及在比探针序列的计算的或实际 T_m (例如,约 65℃)低约 5~10℃ 的温度,在 0.0165~0.0330M NaCl 缓冲溶液中洗涤。缓冲溶液可为,例如,SSC 缓冲剂(0.15M NaCl 和 0.015M 柠檬酸三钠),低严格度洗涤在 3×SSC 缓冲剂中发生,和高严格度洗涤在 0.1×SSC 缓冲剂中发生。核酸序列的杂交中涉及的步骤已描述于例如 Sambrook 等人。

[0206] 一般而言,核酸序列变体与本发明的核酸序列具有约 55%或更多共同的核苷酸,更一般具有 60%,65%,70%,80%,85%或甚至 90%,95%,98%或 99%或更大序列同一

性。

[0207] 本发明的变体核酸可为就在特定宿主细胞中表达密码子 - 优化的。

[0208] 氨基酸序列之间的序列同一性可通过比较使用自美国生物技术信息中心 (NCBI), Bethesda, Maryland, USA, 例如经 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 可利用的 Needleman-Wunsch 全局序列比对工具, 使用默认参数设置 (对于蛋白比对, 空位值存在: 11, 延伸: 1) 的序列比对来确定。此说明书中提及的序列比较和百分率同一性已通过使用此软件确定。当比较与, 例如, SEQ ID NO:1 的序列同一性水平, 这一般应相对于 SEQ ID NO:1 的全长进行 (即, 使用全局比对方法), 以避免导致高总体同一性评定的高同一性重叠的短区。例如, 具有, 例如, 5 个氨基酸的短多肽片段可与在 SEQ ID NO:1 的全体之内的 5 个氨基酸区具有 100% 同一序列, 但此不提供 100% 氨基酸同一性, 除非该片段形成在相当于 SEQ ID NO:1 中的位置的其他位置也具有同一氨基酸的更长序列的部分。当比较的序列中的相当的位置被相同的氨基酸占据, 则分子在该位置同一。将比对作为同一性百分率评分是在由比较的序列共享的位置同一氨基酸数的函数。当比较序列时, 最佳比对可需要将间隔导入一个或更多序列, 以考虑序列中可能的插入和缺失。序列比较方法可采用空位罚分, 从而, 被比较序列中相同数的同一分子, 序列比对具有尽可能的少的间隔, 反映 2 个比较的序列之间更高亲缘关系, 会达到相比具有许多间隔的更高的分值。最大百分率同一性的计算涉及最佳比对的产生, 考虑空位罚分。如上所述, 百分率序列同一性可通过使用 Needleman-Wunsch 全局序列比对工具, 使用默认参数设置确定。Needleman-Wunsch 算法公开于 J. Mol. Biol. (1970) vol. 48:443-53。

[0209] 在本文描述的方法, 载体和宿主细胞中使用的多肽和多核苷酸序列显示于序列表。

[0210] 表 7: 本申请中包括的序列的鉴定

[0211]

SEQ ID NO	序列的描述
1	发冷光杆菌 (<i>Photorhabdus luminescens</i>) LuxC 氨基酸序列
2	发冷光杆菌 (<i>P. luminescens</i>) LuxE 氨基酸序列
3	发冷光杆菌 (<i>P. luminescens</i>) LuxD 氨基酸序列
4	点形念珠藻 (<i>Nostoc punctiforme</i>) 醛脱羧基酶氨基酸序列
5	樟树 (<i>Cinnamomum camphora</i>) 硫酯酶氨基酸序列
6	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) KasIII (3-酮脂肪酰-ACP 合酶 III) 氨基酸序列
7	枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E1 α 氨基酸序列
8	枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E1 β 氨基酸序列
9	枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E2 氨基酸序列
10	枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E3 氨基酸序列
11	发冷光杆菌 (<i>P. luminescens</i>) LuxC 密码子-优化的核苷酸序列
12	发冷光杆菌 (<i>P. luminescens</i>) LuxE 密码子-优化的核苷酸序列
13	点形念珠藻 (<i>N. punctiforme</i>) 醛脱羧基酶密码子-优化的核苷酸序列
14	发冷光杆菌 (<i>P. luminescens</i>) LuxD 密码子-优化的核苷酸序列
15	发冷光杆菌 (<i>P. luminescens</i>) LuxCDE 操纵子密码子-优化的核苷酸序列
16	pACYC LuxCDE
17	樟树 (<i>C. camphora</i>) 硫酯酶密码子-优化的核苷酸序列
18	pETDuet-1 硫酯酶
19	枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) KasIII 密码子-优化的核苷酸序列
20	枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E1 α 密码子-优化的核苷酸序列
21	枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E1 β 密码子-优化的核苷酸序列
22	枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E2 密码子-优化的核苷酸序列
23	枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) BCKD 亚基 E3 密码子-优化的核苷酸序列
24	KasIII/BCKD 操纵子密码子-优化的核苷酸序列
25	pETDuet-1 KasIII/BCKD
26	扩增引物
27	扩增引物
28	哈氏弧菌 (<i>Vibrio harveyi</i>) LuxC 氨基酸序列
29	费希尔弧菌 (<i>Vibrio fischeri</i>) ES114 LuxC 氨基酸序列
30	哈氏弧菌 (<i>Vibrio harveyi</i>) LuxD 氨基酸序列
31	费希尔弧菌 (<i>Vibrio fischeri</i>) MJ11 LuxD 氨基酸序列
32	哈氏弧菌 (<i>Vibrio harveyi</i>) LuxE 氨基酸序列
33	费希尔弧菌 (<i>Vibrio fischeri</i>) ES114 LuxE 氨基酸序列

[0212] 为了辅助对本发明的实施方式的更佳理解,给出一些实施方式的特定方面的下列实施例。下列实施例绝不应被认为限制或限定本发明的整个范围。

【实施例】

[0213] 下列实施例全部使用如以下描述获得的固体组分。

[0214] 【生物质制备】

[0215] 在此例中,将各种新鲜切断的高粱样品与表 8 中列出的各种添加的组分混合及储存于青贮饲料袋中约 20 天。特定添加剂和相应添加率显示于表 9。

[0216] 表 8

[0217]

2011 实验	含酸
实验 #	1
估计的质量	450kg
水份含量	76 %
储存方法	青贮饲料袋
酵母	Lallemand 液体酵母
细菌抑制物	Lactrol
纤维素至葡萄糖	Novozymes Cellic CTec2
切割尺寸	3mm
结果（加仑乙醇 / 初始干度量 tonne）	50
储存天数	~ 20

[0218] 表 9

[0219]

添加剂	添加率
LACTROL	3.2g/ 湿吨
Lallemand 稳定化的液体酵母	18fl 盎司 / 湿吨
Novozymes Cellic CTec2	20fl 盎司 / 湿吨
9.3%浓硫酸	3.8L/ 湿吨

[0220] 【VOC 回收】

[0221] 通过使用 GEA SSD™ 作为无溶剂回收单元回收自此实施例的制备的生物质材料的 VOC。下表 10 提供下列特定性质：(i) 供给进无溶剂回收单元的制备的生物质材料，(ii) 从无溶剂回收单元出来的固体组分，及 (iii) 无溶剂回收单元的操作条件。

[0222] 表 10

[0223]

	样品
	供给组合物

供给中的液体 (%)	80.2%
	固体组分
固体组分 (产物) 中的液体 (%)	31.4%
固体组分 (产物) 温度 (F)	90
	操作条件
加热器温度 (F)	516
供给速度 (lb/min.)	5.30
蒸发速度 (lb/min)	3.93
饱和度温度 (F)	287
固体组分生产率 (lb/min.)	1.03
在入口的蒸气温度 (F)	428
排气温度 (F)	370
操作压力 (psig)	40

[0224] 【进一步处理：糖化】

[0225] 向 41 瓶添加 2160.02g 的去离子水和混合 540.12g 的 40wt% HESA 而形成 8.5wt% HESA 溶液。向 1 加仑装备 DiComp IR 探针的 Parr Instruments C276 高压釜放置 433.82g 的实施例 C 的固体组分。固体组分估计具有 289.67g 的骨干燥的生物物质 (BDBM)。酸溶液轻轻倾倒在反应器中的湿生物物质上。反应器含有包含与 7.3wt% HESA 溶液接触的大致 9.53wt% 干生物物质的混合物 (基于总反应器内容物)。

[0226] 将反应混合物加热到 120°C 及保持所述的时间。起初以 100rpm 搅拌反应器内容物,但随反应热至 120°C,内容物变稀,及搅拌速度是增加到 250,然后 400rpm。将反应器于 120°C 保持 1 小时。中止加热。将反应器用慢氮流净化几分钟,以消除气顶中的任何二氧化硫。反应器冷却到室温及再用氮净化一次。

[0227] 将反应器内容物转移到 Buchner 漏斗,和在 Whatman 541 硬化的无灰 185mm 过滤纸上真空过滤。从反应器内容物除去尽可能多的液体。获得移出的滤出液和液体的累积重量。然后将滤出液由 HPLC 分析和通过与存在于生物物质中的前体的量比较计算自生物物质的物质的回收。基于生物物质中可利用的葡萄糖的理论量,回收的葡萄糖的%是 11.3%。基于生物物质中可利用的木糖的理论量,回收的木糖的%是 91%。

[0228] 还使处理的样品经历酶促水解。将来自 HESA 处理的 144g 的物质用 500mL 去离子水洗涤 3 次。在第 1 次洗涤之后,将物质的 pH 调至 10。然后排出液体,及添加水,及将 pH 调至 5.6。在 1L 的水中添加约 144g 的洗涤的物质,50g 的 CTEC2 纤维素酶。将溶液于 53°C

振摇 3 天,在该时间含量被测量为:纤维二糖:1.93g/L,葡萄糖:52.6g/L,木糖:6.12g/L,阿拉伯糖:0g/L,甘油:1.4g/L,乙酸:0.92g/L,乙醇:0.0g/L。

[0229] 【发酵】

[0230] 然后发酵水解混合物(或水解产物),其中将水解产物加入生长各种大肠埃希氏菌(*E. coli*)培养物的培养基中,以取代葡萄糖含量。将大肠埃希氏菌(*E. coli*)培养物适应于共表达脂肪酸还原酶,脂肪醛合成酶,脂肪酰基转移酶,及醛脱羧基酶酶(CEDDEC)或NpARAD。作为参照,无这些外源基因(BL21)的大肠埃希氏菌(*E. coli*)宿主细胞也生长。

[0231] 使携带 pACYCDuet NpAR/AD, pACYCDuet CEDDEC 的大肠埃希氏菌(*E. coli*) BL21*(DE3) 细胞或无载体对照在含 34 μ g/mL 氯霉素作为可选择的标志物的 LB 培养基中,于 37°C,自甘油浓储物,伴随恒定振摇(225rpm)生长过夜。自大肠埃希氏菌(*E. coli*) BL21*(DE3) 对照细胞略去氯霉素。用 200 μ L 的过夜起始培养物接种 20mL 的含有指示的抗生素,及如下制备的以下培养基:修饰的最小培养基,不含酵母提取物*及含 3% 葡萄糖碳源,用滤器灭菌的水解混合物取代至 1% 的最终,总碳(纤维二糖+葡萄糖+木糖+甘油+乙酸)浓度。此可指标准 LB 培养基。此外,将携带 pACYCDuet CEDDEC 的大肠埃希氏菌(*E. coli*) BL21*(DE3) 细胞接种于含酵母提取物(MYE)及含 3% 葡萄糖碳源的修饰的最小培养基作为阳性对照。使各处理的 3 个重复生长。此可指 LB-MYE 培养基。

[0232] 【FAR/NpAD(CEDDEC) 质粒的构建】

[0233] 列于下表 2 的氨基酸序列经逆翻译及为在大肠埃希氏菌(*E. coli*)中表达而密码子-优化,提供也显示于表 2 的核酸序列:

[0234] 表 11

[0235]

GenBank ** 登录号 No.	序列名称	SEQ ID NO	密码子-优化的核酸 SEQ ID NO
AAD05355.1	脂肪酸还原酶	1	11
AAD05359.1	LuxE E	2	12
P19197.1	LUXD1_PHOLU	3	13

[0236] ** 序列可自 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 检索。GenBank 是 NIH 遗传序列数据库。Genbank 位于美国生物技术信息中心,美国国家医学图书馆,8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA。

[0237] 在插入 pACYCDuet-1(商业上可获自 Merck, 具有序列 SEQ ID NO:16 的最终构建体)的 3- 基因操纵子(SEQ ID NO: 15) 中合成为大肠埃希氏菌(*E. coli*) 密码子-优化的 luxC, luxE 和 luxD 基因,随后用限制酶 NcoI 和 NotI(商业上可获得)消化,并连接到 pCDFDuet-1MCS1(商业上可获自 Merck)。

[0238] 从点形念珠藻(*N. punctiforme*),使用 FAST-DNA SPIN 试剂盒(商业上可获自 MP Biomedicals)提取基因组 DNA。将培养物,以 4500rpm,于 4°C 离心 2min,使 120mg 的沉淀重悬浮于 1ml 的缓冲剂细胞裂解/DNA 增溶溶液(CLS-Y)。将样品用 MP Biomedicals FastPrep-24(FASTPREP 是商标)仪器,使用裂解基质 A(也 MP Biomedicals),以 6.0m/s 的速度设置均质化 40s。根据生产商的使用说明实施全部随后步骤。在此过程后,将基因组

DNA 用苯酚-氯仿提取（使用三（羟甲基）氨基甲烷、pH7.5 缓冲的 50% 苯酚、48% 氯仿、2% 异戊醇溶液）进一步纯化，随后用乙醇和乙酸钠进行 DNA 沉淀。最后的 DNA 样品调整（使用水）到 8 纳克/微升 (ng/ μ l) 的浓度。将编码 NpAD(醛脱羧酶) 的基因，采用 8ng 的蓝细菌基因组 DNA 作为模板，用 PHUSION 高保真 DNA 聚合酶 (PHUSION 是商标，可商购自 New England Biolabs) 扩增。

[0239] 使用的引物是 CATATGCAGCAGCTTACAGACCAAT (SEQ ID NO:26) 和 CTCGAGTTAAGCACC TATGAGTCCGTAGG (SEQ ID NO:27)，允许使用 NdeI 和 XhoI 位点（加下划线的）直接克隆进 MCS2 (MCS 是多克隆位点的缩写)。

[0240] 将质粒使用生产流程（如上为在大肠埃希氏菌 (E. coli) 中重组酶的表达所述）转化进 TOP10 感受态大肠埃希氏菌 (E. coli) 细胞（商业上可获自 Invitrogen），通过使用 Qiagen miniprep 试剂盒（纯化的质粒）纯化，及由聚合酶链反应 (PCR) 或限制消化研究插入。由纯化的质粒的 DNA 测序（商业上可获自 Geneservice, U.K.）确认编码 NpAD 的核酸序列 SEQ ID NO:13 存在于 pACYCDuet-1 luxCED 和 pCDFDuet-1 luxCED 中。

[0241] 用类似技术构建 NpARAD 表达质粒。使含有 FAR/NpAD (CEDDEC) 表达质粒，NpARAD 表达质粒，或无表达质粒 (BL21) 的大肠埃希氏菌 (E. coli) 培养物接种及生长于标准 LB 培养基至少 6 小时。此外，使含有 FAR/NpAD (CEDDEC) 的大肠埃希氏菌 (E. coli) 培养物也生长于 LB-MYE 培养基至少 6 小时。下表 12 显示在细菌培养物的生长期间，在各时间点，在 OD600nm 处的光学读数。

[0242] 表 12

[0243]

接种后 hr	CEDDEC	NpARAD	BL21	CEDDEC (MYE)
2	0.24	0.24	0.33	0.03
3.5	0.95	0.93	1.13	0.31
6				0.73

[0244] 图 5 显示这些不同大肠埃希氏菌 (E. coli) 培养物的生长曲线：CEDDEC, NpARAD, BL21 和 CEDDEC (MYE)，其是在 LB-MYE 培养基中生长的含有 CEDDEC 表达质粒的大肠埃希氏菌 (E. coli)。如所示，含有 FAR/NpAD (CEDDEC) 和 NpARAD 表达质粒的大肠埃希氏菌 (E. coli) 培养物的生长相当地稳健，与无任何表达质粒的标准培养物基本上相同。此显示，在水解混合物中的葡萄糖可被微生物利用，且水解混合物对于微生物不是毒性的。

[0245] 尽管未为烃提取和检测收获培养物，基于由含有 FAR/NpAD (CEDDEC) 和 NpARAD 表达质粒的大肠埃希氏菌 (E. coli) 培养物产生烃的 PCT/EP2013/053600 所证实，特别是鉴于该稳健的生长，预期此实施例的培养物会提供类似结果。烃可由以下方法提取及检测。

[0246] 可将 8ml 的细菌培养物与 8ml 的乙酸乙酯混合，及于室温（约 20℃）和 480rpm 温育 2 小时，以辅助烃提取。在提取之后，样品可于室温（约 20℃），700x 重力离心 5 分钟而导致相分离，及可将 6ml 的顶相转移到新鲜管形瓶。可在氮流下干燥乙酸乙酯，和随后可将残留物溶于 225ml 二氯甲烷 (DCM)。可通过使用装备 ZB1-MS 柱的追踪气相色谱-质谱仪 (GC/MS) 2000 (Thermo Finnigan)（商业上可获自 Zebron）实施烃和挥发性化合物的分离和

鉴定。

[0247] 本领域技术人员考虑本说明书后会明晰本发明的各种方面的进一步修饰和替代性的实施方式。因此,本说明书应解释为仅是例证性的及旨在教导本领域技术人员实施本发明的一般方式。需知,在本文中显示的及描述的本发明的形式应被认为是目前优选的实施方式。要素和材料可用在本文例证的及描述的那些代替,部分和过程可逆转,及本发明的特定特征可独立地利用,全部对于看到本发明的此描述的本领域技术人员会是显而易见的。可在本文所述的要素中进行改变而不脱离本发明的精神和范围,如描述于以下权利要求。

[0001]

序列表

<110> Shell Oil Company
 Radtke, Corey
 Hamilton, Phillip
 Kreitman, Keith

<120> 处理生物质材料的方法和系统

<130> SP0211 US NP

<150> 61/648,109
 <151> 2012-05-17

<150> 61/786,844
 <151> 2012-03-15

<150> 61/786,860
 <151> 2012-03-15

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> 发冷光杆菌 (*Photorhabdus luminescens*)

<400> 1

Met Asn Lys Lys Ile Ser Phe Ile Ile Asn Gly Arg Val Glu Ile Phe
 1 5 10 15

Pro Glu Ser Asp Asp Leu Val Gln Ser Ile Asn Phe Gly Asp Asn Ser
 20 25 30

Val His Leu Pro Val Leu Asn Asp Ser Gln Val Lys Asn Ile Ile Asp
 35 40 45

Tyr Asn Glu Asn Asn Glu Leu Gln Leu His Asn Ile Ile Asn Phe Leu
 50 55 60

Tyr Thr Val Gly Gln Arg Trp Lys Asn Glu Glu Tyr Ser Arg Arg Arg
 65 70 75 80

Thr Tyr Ile Arg Asp Leu Lys Arg Tyr Met Gly Tyr Ser Glu Glu Met
 85 90 95

Ala Lys Leu Glu Ala Asn Trp Ile Ser Met Ile Leu Cys Ser Lys Gly
 100 105 110

Gly Leu Tyr Asp Leu Val Lys Asn Glu Leu Gly Ser Arg His Ile Met
 115 120 125

Asp Glu Trp Leu Pro Gln Asp Glu Ser Tyr Ile Arg Ala Phe Pro Lys
 130 135 140

Gly Lys Ser Val His Leu Leu Thr Gly Asn Val Pro Leu Ser Gly Val
 145 150 155 160

Leu Ser Ile Leu Arg Ala Ile Leu Thr Lys Asn Gln Cys Ile Ile Lys
 165 170 175

Thr Ser Ser Thr Asp Pro Phe Thr Ala Asn Ala Leu Ala Leu Ser Phe

[0002]

180	185	190
Ile Asp Val Asp Pro His His Pro Val Thr Arg Ser Leu Ser Val Val 195	200	205
Tyr Trp Gln His Gln Gly Asp Ile Ser Leu Ala Lys Glu Ile Met Gln 210	215	220
His Ala Asp Val Val Val Ala Trp Gly Gly Glu Asp Ala Ile Asn Trp 225	230	235
Ala Val Lys His Ala Pro Pro Asp Ile Asp Val Met Lys Phe Gly Pro 245	250	255
Lys Lys Ser Phe Cys Ile Ile Asp Asn Pro Val Asp Leu Val Ser Ala 260	265	270
Ala Thr Gly Ala Ala His Asp Val Cys Phe Tyr Asp Gln Gln Ala Cys 275	280	285
Phe Ser Thr Gln Asn Ile Tyr Tyr Met Gly Ser His Tyr Glu Glu Phe 290	295	300
Lys Leu Ala Leu Ile Glu Lys Leu Asn Leu Tyr Ala His Ile Leu Pro 305	310	315
Asn Thr Lys Lys Asp Phe Asp Glu Lys Ala Ala Tyr Ser Leu Val Gln 325	330	335
Lys Glu Cys Leu Phe Ala Gly Leu Lys Val Glu Val Asp Val His Gln 340	345	350
Arg Trp Met Val Ile Glu Ser Asn Ala Gly Val Glu Leu Asn Gln Pro 355	360	365
Leu Gly Arg Cys Val Tyr Leu His His Val Asp Asn Ile Glu Gln Ile 370	375	380
Leu Pro Tyr Val Arg Lys Asn Lys Thr Gln Thr Ile Ser Val Phe Pro 385	390	395
Trp Glu Ala Ala Leu Lys Tyr Arg Asp Leu Leu Ala Leu Lys Gly Ala 405	410	415
Glu Arg Ile Val Glu Ala Gly Met Asn Asn Ile Phe Arg Val Gly Gly 420	425	430
Ala His Asp Gly Met Arg Pro Leu Gln Arg Leu Val Thr Tyr Ile Ser 435	440	445
His Glu Arg Pro Ser His Tyr Thr Ala Lys Asp Val Ala Val Glu Ile 450	455	460
Glu Gln Thr Arg Phe Leu Glu Glu Asp Lys Phe Leu Val Phe Val Pro 465	470	475
		480

<210> 2

[0003]

<211> 370
 <212> PRT
 <213> 发光杆菌 (*Photorhabdus luminescens*)
 <400> 2
 Met Thr Ser Tyr Val Asp Lys Gln Glu Ile Thr Ala Ser Ser Glu Ile
 1 5 10 15
 Asp Asp Leu Ile Phe Ser Ser Asp Pro Leu Val Trp Ser Tyr Asp Glu
 20 25 30
 Gln Glu Lys Ile Arg Lys Lys Leu Val Leu Asp Ala Phe Arg His His
 35 40 45
 Tyr Lys His Cys Gln Glu Tyr Arg His Tyr Cys Gln Ala His Lys Val
 50 55 60
 Asp Asp Asn Ile Thr Glu Ile Asp Asp Ile Pro Val Phe Pro Thr Ser
 65 70 75 80
 Val Phe Lys Phe Thr Arg Leu Leu Thr Ser Asn Glu Asn Glu Ile Glu
 85 90 95
 Ser Trp Phe Thr Ser Ser Gly Thr Asn Gly Leu Lys Ser Gln Val Pro
 100 105 110
 Arg Asp Arg Leu Ser Ile Glu Arg Leu Leu Gly Ser Val Ser Tyr Gly
 115 120 125
 Met Lys Tyr Ile Gly Ser Trp Phe Asp His Gln Met Glu Leu Val Asn
 130 135 140
 Leu Gly Pro Asp Arg Phe Asn Ala His Asn Ile Trp Phe Lys Tyr Val
 145 150 155 160
 Met Ser Leu Val Glu Leu Leu Tyr Pro Thr Ser Phe Thr Val Thr Glu
 165 170 175
 Glu His Ile Asp Phe Val Gln Thr Leu Asn Ser Leu Glu Arg Ile Lys
 180 185 190
 His Gln Gly Lys Asp Ile Cys Leu Ile Gly Ser Pro Tyr Phe Ile Tyr
 195 200 205
 Leu Leu Cys Arg Tyr Met Lys Asp Lys Asn Ile Ser Phe Ser Gly Asp
 210 215 220
 Lys Ser Leu Tyr Ile Ile Thr Gly Gly Gly Trp Lys Ser Tyr Glu Lys
 225 230 235 240
 Glu Ser Leu Lys Arg Asn Asp Phe Asn His Leu Leu Phe Asp Thr Phe
 245 250 255
 Asn Leu Ser Asn Ile Asn Gln Ile Arg Asp Ile Phe Asn Gln Val Glu
 260 265 270
 Leu Asn Thr Cys Phe Phe Glu Asp Glu Met Gln Arg Lys His Val Pro
 275 280 285

[0004]

Pro Trp Val Tyr Ala Arg Ala Leu Asp Pro Glu Thr Leu Lys Pro Val
 290 295 300
 Pro Asp Gly Met Pro Gly Leu Met Ser Tyr Met Asp Ala Ser Ser Thr
 305 310 315 320
 Ser Tyr Pro Ala Phe Ile Val Thr Asp Asp Ile Gly Ile Ile Ser Arg
 325 330 335
 Glu Tyr Gly Gln Tyr Pro Gly Val Leu Val Glu Ile Leu Arg Arg Val
 340 345 350
 Asn Thr Arg Lys Gln Lys Gly Cys Ala Leu Ser Leu Thr Glu Ala Phe
 355 360 365
 Gly Ser
 370
 <210> 3
 <211> 307
 <212> PRT
 <213> 发冷光杆菌 (Photorhabdus luminescens)
 <400> 3
 Met Glu Asn Glu Ser Lys Tyr Lys Thr Ile Asp His Val Ile Cys Val
 1 5 10 15
 Glu Gly Asn Lys Lys Ile His Val Trp Glu Thr Leu Pro Glu Glu Asn
 20 25 30
 Ser Pro Lys Arg Lys Asn Ala Ile Ile Ile Ala Ser Gly Phe Ala Arg
 35 40 45
 Arg Met Asp His Phe Ala Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Ser Arg Asn Gly
 50 55 60
 Phe His Val Ile Arg Tyr Asp Ser Leu His His Val Gly Leu Ser Ser
 65 70 75 80
 Gly Thr Ile Asp Glu Phe Thr Met Ser Ile Gly Lys Gln Ser Leu Leu
 85 90 95
 Ala Val Val Asp Trp Leu Thr Thr Arg Lys Ile Asn Asn Phe Gly Met
 100 105 110
 Leu Ala Ser Ser Leu Ser Ala Arg Ile Ala Tyr Ala Ser Leu Ser Glu
 115 120 125
 Ile Asn Ala Ser Phe Leu Ile Thr Ala Val Gly Phe Val Asn Leu Arg
 130 135 140
 Tyr Ser Leu Glu Arg Ala Leu Gly Phe Asp Tyr Leu Ser Leu Pro Ile
 145 150 155 160
 Asn Glu Leu Pro Asn Asn Leu Asp Phe Glu Gly His Lys Leu Gly Ala
 165 170 175

[0005]

Glu Val Phe Ala Arg Asp Cys Leu Asp Phe Gly Trp Glu Asp Leu Ala
 180 185 190
 Ser Thr Ile Asn Asn Met Met Tyr Leu Asp Ile Pro Phe Ile Ala Phe
 195 200 205
 Thr Ala Asn Asn Asp Asn Trp Val Lys Gln Asp Glu Val Ile Thr Leu
 210 215 220
 Leu Ser Asn Ile Arg Ser Asn Arg Cys Lys Ile Tyr Ser Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Ser Ser His Asp Leu Ser Glu Asn Leu Val Val Leu Arg Asn Phe Tyr
 245 250 255
 Gln Ser Val Thr Lys Ala Ala Ile Ala Met Asp Asn Asp His Leu Asp
 260 265 270
 Ile Asp Val Asp Ile Thr Glu Pro Ser Phe Glu His Leu Thr Ile Ala
 275 280 285
 Thr Val Asn Glu Arg Arg Met Arg Ile Glu Ile Glu Asn Gln Ala Ile
 290 295 300
 Ser Leu Ser
 305
 <210> 4
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 点形念珠藻 (Nostoc punctiforme)
 <400> 4
 Met Gln Gln Leu Thr Asp Gln Ser Lys Glu Leu Asp Phe Lys Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Tyr Lys Asp Ala Tyr Ser Arg Ile Asn Ala Ile Val Ile Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Glu Ala His Glu Asn Tyr Ile Thr Leu Ala Gln Leu Leu Pro
 35 40 45
 Glu Ser His Asp Glu Leu Ile Arg Leu Ser Lys Met Glu Ser Arg His
 50 55 60
 Lys Lys Gly Phe Glu Ala Cys Gly Arg Asn Leu Ala Val Thr Pro Asp
 65 70 75 80
 Leu Gln Phe Ala Lys Glu Phe Phe Ser Gly Leu His Gln Asn Phe Gln
 85 90 95
 Thr Ala Ala Ala Glu Gly Lys Val Val Thr Cys Leu Leu Ile Gln Ser
 100 105 110
 Leu Ile Ile Glu Cys Phe Ala Ile Ala Ala Tyr Asn Ile Tyr Ile Pro
 115 120 125

[0006]

Val Ala Asp Asp Phe Ala Arg Lys Ile Thr Glu Gly Val Val Lys Glu
 130 135 140
 Glu Tyr Ser His Leu Asn Phe Gly Glu Val Trp Leu Lys Glu His Phe
 145 150 155 160
 Ala Glu Ser Lys Ala Glu Leu Glu Leu Ala Asn Arg Glu Asn Leu Pro
 165 170 175
 Ile Val Trp Lys Met Leu Asn Gln Val Glu Gly Asp Ala His Thr Met
 180 185 190
 Ala Met Glu Lys Asp Ala Leu Val Glu Asp Phe Met Ile Gln Tyr Gly
 195 200 205
 Glu Ala Leu Ser Asn Ile Gly Phe Ser Thr Arg Asp Ile Met Arg Leu
 210 215 220
 Ser Ala Tyr Gly Leu Ile Gly Ala
 225 230
 <210> 5
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> 樟树 (Cinnamomum camphora)
 <400> 5
 Met Leu Glu Trp Lys Pro Lys Pro Asn Pro Pro Gln Leu Leu Asp Asp
 1 5 10 15
 His Phe Gly Pro His Gly Leu Val Phe Arg Arg Thr Phe Ala Ile Arg
 20 25 30
 Ser Tyr Glu Val Gly Pro Asp Arg Ser Thr Ser Ile Val Ala Val Met
 35 40 45
 Asn His Leu Gln Glu Ala Ala Leu Asn His Ala Lys Ser Val Gly Ile
 50 55 60
 Leu Gly Asp Gly Phe Gly Thr Thr Leu Glu Met Ser Lys Arg Asp Leu
 65 70 75 80
 Ile Trp Val Val Lys Arg Thr His Val Ala Val Glu Arg Tyr Pro Ala
 85 90 95
 Trp Gly Asp Thr Val Glu Val Glu Cys Trp Val Gly Ala Ser Gly Asn
 100 105 110
 Asn Gly Arg Arg His Asp Phe Leu Val Arg Asp Cys Lys Thr Gly Glu
 115 120 125
 Ile Leu Thr Arg Cys Thr Ser Leu Ser Val Met Met Asn Thr Arg Thr
 130 135 140
 Arg Arg Leu Ser Lys Ile Pro Glu Glu Val Arg Gly Glu Ile Gly Pro
 145 150 155 160
 Ala Phe Ile Asp Asn Val Ala Val Lys Asp Glu Glu Ile Lys Lys Pro

[0007]

165	170	175
Gln Lys Leu Asn Asp Ser Thr Ala Asp Tyr Ile Gln Gly Gly Leu Thr 180	185	190
Pro Arg Trp Asn Asp Leu Asp Ile Asn Gln His Val Asn Asn Ile Lys 195	200	205
Tyr Val Asp Trp Ile Leu Glu Thr Val Pro Asp Ser Ile Phe Glu Ser 210	215	220
His His Ile Ser Ser Phe Thr Ile Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Thr Met 225	230	235
Asp Ser Val Leu Gln Ser Leu Thr Thr Val Ser Gly Gly Ser Ser Glu 245	250	255
Ala Gly Leu Val Cys Glu His Leu Leu Gln Leu Glu Gly Gly Ser Glu 260	265	270
Val Leu Arg Ala Lys Thr Glu Trp Arg Pro Lys Leu Thr Asp Ser Phe 275	280	285
Arg Gly Ile Ser Val Ile Pro Ala Glu Ser Ser Val 290	295	300
<210> 6		
<211> 325		
<212> PRT		
<213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)		
<400> 6		
Met Ser Lys Ala Lys Ile Thr Ala Ile Gly Thr Tyr Ala Pro Ser Arg 1	5	10
Arg Leu Thr Asn Ala Asp Leu Glu Lys Ile Val Asp Thr Ser Asp Glu 20	25	30
Trp Ile Val Gln Arg Thr Gly Met Arg Glu Arg Arg Ile Ala Asp Glu 35	40	45
His Gln Phe Thr Ser Asp Leu Cys Ile Glu Ala Val Lys Asn Leu Lys 50	55	60
Ser Arg Tyr Lys Gly Thr Leu Asp Asp Val Asp Met Ile Leu Val Ala 65	70	75
Thr Thr Thr Ser Asp Tyr Ala Phe Pro Ser Thr Ala Cys Arg Val Gln 85	90	95
Glu Tyr Phe Gly Trp Glu Ser Thr Gly Ala Leu Asp Ile Asn Ala Thr 100	105	110
Cys Ala Gly Leu Thr Tyr Gly Leu His Leu Ala Asn Gly Leu Ile Thr 115	120	125
Ser Gly Leu His Gln Lys Ile Leu Val Ile Ala Gly Glu Thr Leu Ser 130	135	140

[0008]

Lys Val Thr Asp Tyr Thr Asp Arg Thr Thr Cys Val Leu Phe Gly Asp
 145 150 155 160
 Ala Ala Gly Ala Leu Leu Val Glu Arg Asp Glu Glu Thr Pro Gly Phe
 165 170 175
 Leu Ala Ser Val Gln Gly Thr Ser Gly Asn Gly Gly Asp Ile Leu Tyr
 180 185 190
 Arg Ala Gly Leu Arg Asn Glu Ile Asn Gly Val Gln Leu Val Gly Ser
 195 200 205
 Gly Lys Met Val Gln Asn Gly Arg Glu Val Tyr Lys Trp Ala Ala Arg
 210 215 220
 Thr Val Pro Gly Glu Phe Glu Arg Leu Leu His Lys Ala Gly Leu Ser
 225 230 235 240
 Ser Asp Asp Leu Asp Trp Phe Val Pro His Ser Ala Asn Leu Arg Met
 245 250 255
 Ile Glu Ser Ile Cys Glu Lys Thr Pro Phe Pro Ile Glu Lys Thr Leu
 260 265 270
 Thr Ser Val Glu His Tyr Gly Asn Thr Ser Ser Val Ser Ile Val Leu
 275 280 285
 Ala Leu Asp Leu Ala Val Lys Ala Gly Lys Leu Lys Lys Asp Gln Ile
 290 295 300
 Val Leu Leu Phe Gly Phe Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Thr Gly Leu Leu
 305 310 315 320
 Ile Lys Trp Gly Met
 325

<210> 7
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)
 <400> 7

Met Ser Thr Asn Arg His Gln Ala Leu Gly Leu Thr Asp Gln Glu Ala
 1 5 10 15
 Val Asp Met Tyr Arg Thr Met Leu Leu Ala Arg Lys Ile Asp Glu Arg
 20 25 30
 Met Trp Leu Leu Asn Arg Ser Gly Lys Ile Pro Phe Val Ile Ser Cys
 35 40 45
 Gln Gly Gln Glu Ala Ala Gln Val Gly Ala Ala Phe Ala Leu Asp Arg
 50 55 60
 Glu Met Asp Tyr Val Leu Pro Tyr Tyr Arg Asp Met Gly Val Val Leu
 65 70 75 80

[0009]

Ala Phe Gly Met Thr Ala Lys Asp Leu Met Met Ser Gly Phe Ala Lys
85 90 95

Ala Ala Asp Pro Asn Ser Gly Gly Arg Gln Met Pro Gly His Phe Gly
100 105 110

Gln Lys Lys Asn Arg Ile Val Thr Gly Ser Ser Pro Val Thr Thr Gln
115 120 125

Val Pro His Ala Val Gly Ile Ala Leu Ala Gly Arg Met Glu Lys Lys
130 135 140

Asp Ile Ala Ala Phe Val Thr Phe Gly Glu Gly Ser Ser Asn Gln Gly
145 150 155 160

Asp Phe His Glu Gly Ala Asn Phe Ala Ala Val His Lys Leu Pro Val
165 170 175

Ile Phe Met Cys Glu Asn Asn Lys Tyr Ala Ile Ser Val Pro Tyr Asp
180 185 190

Lys Gln Val Ala Cys Glu Asn Ile Ser Asp Arg Ala Ile Gly Tyr Gly
195 200 205

Met Pro Gly Val Thr Val Asn Gly Asn Asp Pro Leu Glu Val Tyr Gln
210 215 220

Ala Val Lys Glu Ala Arg Glu Arg Ala Arg Arg Gly Glu Gly Pro Thr
225 230 235 240

Leu Ile Glu Thr Ile Ser Tyr Arg Leu Thr Pro His Ser Ser Asp Asp
245 250 255

Asp Asp Ser Ser Tyr Arg Gly Arg Glu Glu Val Glu Glu Ala Lys Lys
260 265 270

Ser Asp Pro Leu Leu Thr Tyr Gln Ala Tyr Leu Lys Glu Thr Gly Leu
275 280 285

Leu Ser Asp Glu Ile Glu Gln Thr Met Leu Asp Glu Ile Met Ala Ile
290 295 300

Val Asn Glu Ala Thr Asp Glu Ala Glu Asn Ala Pro Tyr Ala Ala Pro
305 310 315 320

Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Val Tyr Ala Lys
325 330

<210> 8
<211> 327
<212> PRT
<213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

<400> 8

Met Ser Val Met Ser Tyr Ile Asp Ala Ile Asn Leu Ala Met Lys Glu
1 5 10 15

[0010]

Glu Met Glu Arg Asp Ser Arg Val Phe Val Leu Gly Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Arg Lys Gly Gly Val Phe Lys Ala Thr Ala Gly Leu Tyr Glu Gln Phe
 35 40 45
 Gly Glu Glu Arg Val Met Asp Thr Pro Leu Ala Glu Ser Ala Ile Ala
 50 55 60
 Gly Val Gly Ile Gly Ala Ala Met Tyr Gly Met Arg Pro Ile Ala Glu
 65 70 75 80
 Met Gln Phe Ala Asp Phe Ile Met Pro Ala Val Asn Gln Ile Ile Ser
 85 90 95
 Glu Ala Ala Lys Ile Arg Tyr Arg Ser Asn Asn Asp Trp Ser Cys Pro
 100 105 110
 Ile Val Val Arg Ala Pro Tyr Gly Gly Gly Val His Gly Ala Leu Tyr
 115 120 125
 His Ser Gln Ser Val Glu Ala Ile Phe Ala Asn Gln Pro Gly Leu Lys
 130 135 140
 Ile Val Met Pro Ser Thr Pro Tyr Asp Ala Lys Gly Leu Leu Lys Ala
 145 150 155 160
 Ala Val Arg Asp Glu Asp Pro Val Leu Phe Phe Glu His Lys Arg Ala
 165 170 175
 Tyr Arg Leu Ile Lys Gly Glu Val Pro Ala Asp Asp Tyr Val Leu Pro
 180 185 190
 Ile Gly Lys Ala Asp Val Lys Arg Glu Gly Asp Asp Ile Thr Val Ile
 195 200 205
 Thr Tyr Gly Leu Cys Val His Phe Ala Leu Gln Ala Ala Glu Arg Leu
 210 215 220
 Glu Lys Asp Gly Ile Ser Ala His Val Val Asp Leu Arg Thr Val Tyr
 225 230 235 240
 Pro Leu Asp Lys Glu Ala Ile Ile Glu Ala Ala Ser Lys Thr Gly Lys
 245 250 255
 Val Leu Leu Val Thr Glu Asp Thr Lys Glu Gly Ser Ile Met Ser Glu
 260 265 270
 Val Ala Ala Ile Ile Ser Glu His Cys Leu Phe Asp Leu Asp Ala Pro
 275 280 285
 Ile Lys Arg Leu Ala Gly Pro Asp Ile Pro Ala Met Pro Tyr Ala Pro
 290 295 300
 Thr Met Glu Lys Tyr Phe Met Val Asn Pro Asp Lys Val Glu Ala Ala
 305 310 315 320

[0011]

Met Arg Glu Leu Ala Glu Phe
325

<210> 9
<211> 424
<212> PRT
<213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

<400> 9

Met Ala Ile Glu Gln Met Thr Met Pro Gln Leu Gly Glu Ser Val Thr
1 5 10 15

Glu Gly Thr Ile Ser Lys Trp Leu Val Ala Pro Gly Asp Lys Val Asn
20 25 30

Lys Tyr Asp Pro Ile Ala Glu Val Met Thr Asp Lys Val Asn Ala Glu
35 40 45

Val Pro Ser Ser Phe Thr Gly Thr Ile Thr Glu Leu Val Gly Glu Glu
50 55 60

Gly Gln Thr Leu Gln Val Gly Glu Met Ile Cys Lys Ile Glu Thr Glu
65 70 75 80

Gly Ala Asn Pro Ala Glu Gln Lys Gln Glu Gln Pro Ala Ala Ser Glu
85 90 95

Ala Ala Glu Asn Pro Val Ala Lys Ser Ala Gly Ala Ala Asp Gln Pro
100 105 110

Asn Lys Lys Arg Tyr Ser Pro Ala Val Leu Arg Leu Ala Gly Glu His
115 120 125

Gly Ile Asp Leu Asp Gln Val Thr Gly Thr Gly Ala Gly Gly Arg Ile
130 135 140

Thr Arg Lys Asp Ile Gln Arg Leu Ile Glu Thr Gly Gly Val Gln Glu
145 150 155 160

Gln Asn Pro Glu Glu Leu Lys Thr Ala Ala Pro Ala Pro Lys Ser Ala
165 170 175

Ser Lys Pro Glu Pro Lys Glu Glu Thr Ser Tyr Pro Ala Ser Ala Ala
180 185 190

Gly Asp Lys Glu Ile Pro Val Thr Gly Val Arg Lys Ala Ile Ala Ser
195 200 205

Asn Met Lys Arg Ser Lys Thr Glu Ile Pro His Ala Trp Thr Met Met
210 215 220

Glu Val Asp Val Thr Asn Met Val Ala Tyr Arg Asn Ser Ile Lys Asp
225 230 235 240

Ser Phe Lys Lys Thr Glu Gly Phe Asn Leu Thr Phe Phe Ala Phe Phe
245 250 255

Val Lys Ala Val Ala Gln Ala Leu Lys Glu Phe Pro Gln Met Asn Ser

[0012]

	260	265	270
	Met Trp Ala Gly Asp Lys Ile	Ile Gln Lys Lys Asp Ile Asn Ile Ser	
	275	280	285
	Ile Ala Val Ala Thr Glu Asp Ser Leu Phe Val Pro Val Ile Lys Asn		
	290	295	300
	Ala Asp Glu Lys Thr Ile Lys Gly Ile Ala Lys Asp Ile Thr Gly Leu		
	305	310	315
	Ala Lys Lys Val Arg Asp Gly Lys Leu Thr Ala Asp Asp Met Gln Gly		
	325	330	335
	Gly Thr Phe Thr Val Asn Asn Thr Gly Ser Phe Gly Ser Val Gln Ser		
	340	345	350
	Met Gly Ile Ile Asn Tyr Pro Gln Ala Ala Ile Leu Gln Val Glu Ser		
	355	360	365
	Ile Val Lys Arg Pro Val Val Met Asp Asn Gly Met Ile Ala Val Arg		
	370	375	380
	Asp Met Val Asn Leu Cys Leu Ser Leu Asp His Arg Val Leu Asp Gly		
	385	390	395
	Leu Val Cys Gly Arg Phe Leu Gly Arg Val Lys Gln Ile Leu Glu Ser		
	405	410	415
	Ile Asp Glu Lys Thr Ser Val Tyr		
	420		
<210>	10		
<211>	474		
<212>	PRT		
<213>	枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)		
<400>	10		
	Met Ala Thr Glu Tyr Asp Val Val Ile Leu Gly Gly Gly Thr Gly Gly		
	1	5	10
	Tyr Val Ala Ala Ile Arg Ala Ala Gln Leu Gly Leu Lys Thr Ala Val		
	20	25	30
	Val Glu Lys Glu Lys Leu Gly Gly Thr Cys Leu His Lys Gly Cys Ile		
	35	40	45
	Pro Ser Lys Ala Leu Leu Arg Ser Ala Glu Val Tyr Arg Thr Ala Arg		
	50	55	60
	Glu Ala Asp Gln Phe Gly Val Glu Thr Ala Gly Val Ser Leu Asn Phe		
	65	70	75
	Glu Lys Val Gln Gln Arg Lys Gln Ala Val Val Asp Lys Leu Ala Ala		
	85	90	95
	Gly Val Asn His Leu Met Lys Lys Gly Lys Ile Asp Val Tyr Thr Gly		
	100	105	110

[0013]

Tyr Gly Arg Ile Leu Gly Pro Ser Ile Phe Ser Pro Leu Pro Gly Thr
 115 120 125
 Ile Ser Val Glu Arg Gly Asn Gly Glu Glu Asn Asp Met Leu Ile Pro
 130 135 140
 Lys Gln Val Ile Ile Ala Thr Gly Ser Arg Pro Arg Met Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Leu Glu Val Asp Gly Lys Ser Val Leu Thr Ser Asp Glu Ala Leu Gln
 165 170 175
 Met Glu Glu Leu Pro Gln Ser Ile Ile Ile Val Gly Gly Gly Val Ile
 180 185 190
 Gly Ile Glu Trp Ala Ser Met Leu His Asp Phe Gly Val Lys Val Thr
 195 200 205
 Val Ile Glu Tyr Ala Asp Arg Ile Leu Pro Thr Glu Asp Leu Glu Ile
 210 215 220
 Ser Lys Glu Met Glu Ser Leu Leu Lys Lys Lys Gly Ile Gln Phe Ile
 225 230 235 240
 Thr Gly Ala Lys Val Leu Pro Asp Thr Met Thr Lys Thr Ser Asp Asp
 245 250 255
 Ile Ser Ile Gln Ala Glu Lys Asp Gly Glu Thr Val Thr Tyr Ser Ala
 260 265 270
 Glu Lys Met Leu Val Ser Ile Gly Arg Gln Ala Asn Ile Glu Gly Ile
 275 280 285
 Gly Leu Glu Asn Thr Asp Ile Val Thr Glu Asn Gly Met Ile Ser Val
 290 295 300
 Asn Glu Ser Cys Gln Thr Lys Glu Ser His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp
 305 310 315 320
 Val Ile Gly Gly Leu Gln Leu Ala His Val Ala Ser His Glu Gly Ile
 325 330 335
 Ile Ala Val Glu His Phe Ala Gly Leu Asn Pro His Pro Leu Asp Pro
 340 345 350
 Thr Leu Val Pro Lys Cys Ile Tyr Ser Ser Pro Glu Ala Ala Ser Val
 355 360 365
 Gly Leu Thr Glu Asp Glu Ala Lys Ala Asn Gly His Asn Val Lys Ile
 370 375 380
 Gly Lys Phe Pro Phe Met Ala Ile Gly Lys Ala Leu Val Tyr Gly Glu
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Phe Val Lys Ile Val Ala Asp Arg Asp Thr Asp Asp Ile
 405 410 415

[0014]

Leu Gly Val His Met Ile Gly Pro His Val Thr Asp Met Ile Ser Glu
420 425 430

Ala Gly Leu Ala Lys Val Leu Asp Ala Thr Pro Trp Glu Val Gly Gln
435 440 445

Thr Ile His Pro His Pro Thr Leu Ser Glu Ala Ile Gly Glu Ala Ala
450 455 460

Leu Ala Ala Asp Gly Lys Ala Ile His Phe
465 470

<210> 11
<211> 1443
<212> DNA
<213> 发冷光杆菌 (Photorhabdus luminescens)

<400> 11
atgaacaaga aaatcagctt catcatcaac gtcgcgtag aaatttttcc ggagtctgat 60
gacctgggtc aaagcaicac ttitgggtgac aatagcggtc acctgcccgt gctgaacgat 120
agccaagtga aaaacattat cgaactataat gagaataatg agctgcaact gcacaatata 180
attaactttc tgtataccgt cggtcagcgc tggaaaaacg aagaatacag ccgtcgtcgt 240
acctatattc gcgacttgaa gcgttatatg ggtacacgag aggaatggc gaaactggaa 300
gccaatggga ttagcatgat tctgtgctct aaagggtgtt tgtacgatct ggtgaaaaat 360
gagctgggca gccgcacac tatggacgaa tggctgcccg aagacgaaag ctacatccgt 420
gccttcccga aaggcaagag cgttcacttg ctgaccggtg atgtcccgtt gtcgggcgtg 480
ctgtccatcc tgcgcgcat tctgaccaag aaccagtga tcattaagac gagcagcagc 540
gatccittca cggcgaatgc gctggcgtg agcttcacgt acgttgaccc acatcacccg 600
gtgaccggtg gcctgtctgt cgtttattgg cagcaccgag gtgacatcag cttggcgaaa 660
gagattatgc agcacgccga tgtggctgtt gccctgggtg gtgaggatgc aattaactgg 720
gggtttaaac aegcaccgcc ggatacgac gtcataaaat tgggtccgaa aaagagcttc 780
tgcacattg acaaccgggt tgaattggtt agcgcagcga ccggcgagc acacgacgtc 840
tgtttttacg atcagcagc atgcttttag acgcagaaca tctactacat gggtcccat 900
tacgaggagt ttaagctggt ttgatcgaa aaactgaatc tgtatgcaca taccctgctt 960
aacaccaaga aggatctcga cgaaggga gcttattcct tgggtcaaaa ggagtgtctg 1020
ttcgcgggtt tgaaagtga agttgacgtt catcaacgct ggaatggtat tgaatccaat 1080
gctggcgttg agctgaacca gccgctgggt cgttgtgtgt acttgcata cgtggataac 1140
atcgagcaga ttttgccgta tgtgcgtaag aacaaaaccc agacgattag cgtgtttccg 1200
tgggaggtcg cgctgaagta ccgcgacttg ctggccctga aaggcgcgga gcgtattgtt 1260
gaggcgggta tgaataacat ttccgtgtg ggtggtgcgc acgatggcat gcgtccgtg 1320
caacgcctgg tcaattacat tagccacgag cgtccgagcc attacaccgc gaaggacgtc 1380
gggtcgaaa tgaacagac gcgtttcttg gaaggagaca agttcctggt gtttgttcca 1440
taa 1443

<210> 12

[0015]

<211>	1113	
<212>	DNA	
<213>	发冷光杆菌 (<i>Photorhabdus luminescens</i>)	
<400>	12	
atgactagct acgtcgacaa acaggaaatc accgcgagca gcgagatiga cgacctgac	60	
ttttccagcg atccgttgggt gtggctctat gatgagcaag aaaagattcg caagaaactg	120	
gtcctggatg cgttcgccca ccaactacaag cactgtcaag agtaccgta ttattgcca	180	
gccataaag tcgacgataa cattacggaa atigacgata tcccggtttt cccgacctct	240	
gttttcaagt tcacccgtct gctgacctcc aacgagaatg agattgagag ctggtttact	300	
togagcggtt ccaatggctt gaaaagccaa gtcccgcgtg atcgtctgag cattgaacgt	360	
ctgctgggca gcgtgagcta cggcatgaag tacatcggtt cgtggtttga ccaicaaatg	420	
gagctgggtt aettgggtcc ggatcgcttt aatgcccaca acatttgggt caagtacgtt	480	
atgagcctgg ttgagctggt gtatccgacg agcttcaccg tgacggaaga gcacatcgac	540	
ttcgtgcaga cgtgaacag cctggaacgc attaacatc agggcaaaga catttgtctg	600	
atcgtttctc cgtatttcat ctatctgctg tgccgttaca tgaaggacaa gaacatcagc	660	
tttagcgggt acaagagcct gtatatcacc accggtggcg gttggaaaag ctacgaaaa	720	
gagtcctga agcgtaatga cttaatacac ctgttgttcg atacgttcaa tctgagcaac	780	
attaaccaga tccgtgacat cttaaccag gtogaactga atacctgtti ctttgaggac	840	
gagatgcagc gcaaacacgt cccgcgctgg gtatacgcgc gtgcgctgga tcctgaaace	900	
ttgaaaccgg ttccagatgg catgccctgg ctgatgagct atatggatgc tagctctacg	960	
agctaccagg catttatcgt gaccgacgat attggtatta tcagccgcga gtacggctca	1020	
tatccggggc tgctgggtga aattctgcgt cgtgtgaata cccgcaagca gaaaggctgc	1080	
gcgttgtctc tgacggagge attcggttcc taa	1113	
<210>	13	
<211>	699	
<212>	DNA	
<213>	点形念珠藻 (<i>Nostoc punctiforme</i>)	
<400>	13	
atgcagcagc ttacagacca atctaaagaa ttagatttca agagcgaaac atacaaagat	60	
gcttatagcc ggattaatgc gatcgtgatt gaagggaac aagaagccca tgaaaattac	120	
atcacactag cccaactgct gccagaatct catgatgaat tgattcgctt atccaagatg	180	
gaaagccgcc ataagaaagg atttgaagct tgtgggcgca atttagctgt taccacagat	240	
ttgeaatittg ccaagagatt ttctccggc ctacacaaaa attttcaaac agctgcgcga	300	
gaagggaag tggttacttg tctgttgatt cagtctttaa ttattgaatg ttttgcgac	360	
gcagcatata acatttacat ccccggtgcc gacgatttcg cccgtaaaat tactgaagga	420	
gtagttaaag aagaatacag ccacctcaat ttgggagaag ttgggttgaa agaacacttt	480	
gcagaatcca aagctgaact tgaacttgcg aatcgccaga acctacccat cgtctggaaa	540	
atgctcaacc aagtagaagg tgatgccac acaatggcaa tggaaaaaga tgccttggta	600	
gaagaettca tgattcagta tggtagaaga ttgagtaaca ttggtttttc gactcgcgat	660	
attatgcgct tctcagccta cggactcata ggtgcttaa	699	
<210>	14	

[0016]

<211> 924
 <212> DNA
 <213> 发光杆菌 (*Photorhabdus luminescens*)
 <400> 14
 atggaaaacg agagcaagta caaaacgacg gaccacgtaa tctgcgtgga gggttaacaaa 60
 aagattcacg tgtgggagac ttigccagaa gagaacagcc cgaaacgcaa aaacgcaatc 120
 attatcgga gcggtttcgc acgccgcgat gatcattttg cgggectggc cgaatacctg 180
 agcagtaacg gcttcacagt tatccgttat gacagcttgc atcacgtcgg cctgtcgtct 240
 ggtaaccatg acgagttcac gatgagcacc ggcaagcaaa gcctgttggc ggttgttgat 300
 tggctgacca cgcgtaagat caacaatttt ggtatgctgg ctccagccct gtccgcacgc 360
 attgcgtacg ctctctgag cgagattaat gccagcttgc tgatcacccg cgtgggtttc 420
 gtcaatctgc gttatagcct ggagcgtgcg ctgggtttcg attacttgag cctgccgatt 480
 aacgagctgc cgaataatct ggactttgaa ggccataagt tgggtgcgga ggtctttgcg 540
 cgtgattgcc tggattttgg ttgggaagat ctggcaccga cgattaacaa tatgatgtat 600
 ctggatatcc cgtttattgc ttacacggcg aataacgaca attgggttaa gcaagacgag 660
 gttatcaccg tgcgtcttaa cattcgttcc aatcgtctga aaatctatag ctgtctgggc 720
 agcagccacg acttgagcga aaatctggtc gtctctgcga acttctacca gagegtgacc 780
 aaagcagcga ttgcaatgga taacgaccac ctggacattg acgtggatai caccgaaccg 840
 agcttcgaac atctgaccat cgcgaccgtt nacgaacgtc gtatgcgtat tgagattgag 900
 aatcaggcca ttccctgag ctaa 924
 <210> 15
 <211> 3588
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 密码子优化的操纵子
 <400> 15
 catgggaagg agatatagat atgaacaaga aaatcagctt catcatcaac gtcgcgtag 60
 aaatttttcc ggagtcfgat gacctgggtc aaagcatcaa ttttggtgac aaatagcgtcc 120
 acctgccggt gtgaacgat agccaagtga aaaacattat cgactataat gagaataatg 180
 agctgcaact gcacaatata attaactttc tgtataccgt cggtcagcgc tggaaaaacg 240
 aagaatacag ccgtcgtcgt acctatattc gcgatctgaa gcgttatatg ggctacagcg 300
 aggaatggc gaaactggaa gccaatggga ttagcatgat tctgtgctct aaagtggtt 360
 tgtacgatct ggtgaaaaat gagctgggca gccgtcacat tatggacgaa tggctgccgc 420
 aagacgaaag ctacatccgt gccttccga aaggcaagag cgttcattct ctgaccggta 480
 atgtcccgct gtcgggcgtg ctgtccatcc tgcgcgcgat tctgaccaag aaccagtcca 540
 tcattaaagc gacgagcacg gatcctttca cggcgaaatg gctggcgtg agcttcacgc 600
 acgttgaccc acatcacccg gtgaccgcta gcctgtctgt cgtttatttg cagcaccaag 660
 gtgacatcag cttggcgaaa gagattatgc agcacgccga tgtggctggt gcctgggggtg 720
 gtgaggatgc aattaactgg gcggttaaac acgcaccgcc ggatategac gtcatgaaat 780
 tcggtecgaa aaagagcttc tgcateattg acaacccggt tgacttggtt agcgcagcga 840
 ccggcgcage acacgacgtc tgtttttaeg atcagcagge atgctttage aegcagaaca 900

[0017]

tctactacat gggtcccat tacgaggagt tfaagctggc ttgatcgaa aaactgaatc	960
tgtatgcaca taicctgcct aacaccaaga aggatttcga cgaaaaggca gcttatccct	1020
tggigcaaaa ggagtgtctg ttcgcccgtt tgaagtgga agttgacgtt catcaacgt	1080
ggatggttat tgaatccaat gctggcgttg agctgaacca gccgtgggt cgttgtgtgt	1140
acttgcata cgtggataac atcgagcaga ttttgccgta tgtcgtaag aacaaaaccc	1200
agacgattag cgtgtttccg tgggaggtg cgtgaagta ccgcatctg ctggccctga	1260
aaggcgcgga gcgtattgtt gaggcgggta tgaataacat ttcccggtg ggtggtcgc	1320
acgatggcat gcgtccgtg caacgcctgg tcacttacat tagccaagag cgtccgagcc	1380
attacaccgc gaaggacgtc gcgtcgaaa tcgaacagac gcgtttctg gaaggagaca	1440
agttcctgtt gtttgttcca taagaattct aacactgtat aacattaaga aggaggtaaa	1500
agatatgact agctacgtc aaaaacagga aatcacccgc agcagcgaga ttgacgacct	1560
gafcttttcc agcgtaccgt tgggtgtgtc ctatgatgag caagaaaaga ttcgcaagaa	1620
actgttctg gatgcgttcc gccaccacta caagcactgt caagagtacc gtcattattg	1680
ccaagcccat aaagtgcag ataacattac ggaaatgac gatatcccg ttttcccgac	1740
ctctgtttt aagttcaccc gtctgtgac ctccaacgag aatgagattg agagctggtt	1800
tacttcgagc ggtaaccaat gtctgaaaag ccaagtcctg cgtgatcgtc tgagcatga	1860
acgtctgtg ggcagcgtg getacggcat gaagtacatc ggttcgtgtt ttgaccatca	1920
aatggagctg gtttaacttg gtccgcatc ctttaatgcc cacaacattt ggttcaagta	1980
cgttatgagc ctggttgagc tgtgtatcc gacgagctt accgtgacgg aagagcacat	2040
cgacttcgig cagacgtga acagccigga acgattaaa catcagggca aagacatttg	2100
tctgateggt tctccgtatt tcatctatct gctgtgccgt tacatgaagg acaagaacat	2160
cagcttttagc ggigacaaga gccgttatat catcacccgt gccggttgga aaagctacga	2220
aaaagagtcc ctgaagcgtg atgactttaa tcaccgttg ttgatagct tcaatctgag	2280
caacatttanc cagatccgtg acatctttaa ccaggtcgaa ctgaatacct gtttctttga	2340
ggacgagatg cagcgcaaac acgtcccgc gtgggtatac gcgcgtgcgc tggatctga	2400
aaccttgaaa ccggttccag atggcatgcc tggctgatg agctatatgg atgctagctc	2460
tacgagctac ccggcattta tctgaccca cgatattgtt attatcagcc gcgagtacgg	2520
tcaatatecg gccgtgctgg ttgaaattct gcgtcgtgtg aatacccgca agcagaaagg	2580
ctgcgcgttg tctctgacgg aggcattcgg ttctaaaang ctttaaacct gtataacatt	2640
aagaaggagg taaatataat ggaaaacgag agcaagtaca aaacgatega ccacgtaate	2700
tgcgtggagg gtaacaaaa gattcacgtg tgggagactt tgcagaaga gaacagccc	2760
aaacgcaaaa acgcaatcat tatcgcgagc ggtttcgac gccgcatgga tcattttgcg	2820
ggcctggccg aatacctgag ccgtaacggc ttccacgtta tccgttatga cagccctgat	2880
cacgtcgccc tgtgtctgg taccatcgac gatttcaaga tgagcatcgg caagcaaaagc	2940
ctgttgccgg ttgttgattg gctgaccacg cgtaatgaca acaatttttg tatgtggct	3000
tccagcctgt ccgcacgcat tgcgtacgtc tctctgagcg agattaatgc cagctttctg	3060
atcaccgcgc tgggtttcgt caatctgcgt tatagcctgg agcgtgcgt gggtttcgat	3120
tacttgagcc tgccgattaa cgagctgccg aataatcttg actttgaagg ccataagttg	3180

[0018]

ggtagcggagg tcittgcgcg tgattgcctg gatttttggtt gggaagatct ggcatcgacg 3240
 attaacaata tgatgtatct ggataccccg tttattgctt tcacggcgaa taacgacaat 3300
 tgggttaagc aagacgaggt tatcaccctg ctgtctaaaca ttctgtccaa tcgtgtaaa 3360
 atctatagct tctgtggcag cagccacgac ttgagcgaaa atctgtgctg gctgcgcaac 3420
 ttctaccaga gcgtgaccaa agcagcgatt gcaatggata acgaccacct ggacattgac 3480
 gtggatatca ccgaaccgag ctctgaacat ctgaccatcg cgaccgttaa cgaacgtcgt 3540
 atgcgtattg agattgagaa tcagcccatc tccctgagct aagcggcc 3588

<210> 16
 <211> 7511
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 表达载体

<400> 16
 aacattatg caggcagctt ccacagcaat ggcatcctgg tcatccagcg gatagttaat 60
 gatcagccca ctgacgcgtt gcgcgagaag attgtgcacc gccgctttac aggccttcgac 120
 gccgcttcgt tctaccatcg acaccaccac gctggcacc agttgatcgg cgcgagattt 180
 aatcgccgcg acaatttgcg acggcgcggt cagggccaga ctggagggtg caacgccaat 240
 cagcaacgac tgtttgccg ccagttgttg tgccacgcgg ttgggaatgt aattcagctc 300
 cgccatcgcc gcttcactt ttcccgctt ttccgagaa acgtggctgg cctggttcac 360
 caccgaggaa acggtctgat aagagacacc gccatactct gcgacatcgt ataacgttac 420
 tgggttcaca ttaccaccc tgaattgact ctcttcgggg cgtatcatg ccataccgcg 480
 aaaggttttg cgccattcga tgggtgccg gatctcgacg ctctccctta tgcgactcct 540
 gcattaggaa attaatacga ctactatag gggaattgtg agcggataac aattccccctg 600
 tagaaataat ttgttttaac ttaataaagg agatafacca tgggaaggag atatagatat 660
 gaacaagaaa atcagettca tcatcaacgg tcgcgtagaa attttccgg agtctgatga 720
 cctggttcaa agcatcaatt ttggtgacaa tagcgtccac ctgccgtgc tgaacgatag 780
 ccaagtga aaacattatcg actataatga gaataatgag ctgcaactgc acaatatcat 840
 taaetttctg tataccgtcg gtcagcgctg gaaaaacgaa gaatacagcc gtcgtcgtac 900
 ctatactcgc gatctgaagc gttatatggg ctacagcgag gaaatggcga aactggaagc 960
 caattggatt agcatgattc tgtgcctaa aggtgggttg tacgatcttg tgaaaaatga 1020
 gctgggcagc cgtcacatta tggacgaatg gctgccgcaa gacgaaagct acatccgtgc 1080
 ctcccgaaa ggcaagagcg ttcatctgt gaccggtaat gtcccgctgt cgggcgtgct 1140
 gtccatcctg cgcgcgailc tgaccaagaa ccagtgcatc attagacga gcagcacgga 1200
 tccitttcacg gcgaatgcgc tggcgtgag ctccatcgac gttgacccac atcaccoggt 1260
 gaccctagc ctgtctgtcg tttattggca gcaccaaggt gacatcagct tggcgaaaga 1320
 gattatgcag cagcccgatg tggctgttc ctgggttgtt gaggatgcaa ttaactgggc 1380
 gggttaaacac gcaccgcgg atatcgacgt catgaaatc ggtccgaaaa agagctcttg 1440
 catcattgac aaccgggtt acttggttag cgcagcgacc ggcgagcac acgacgtctg 1500
 tttttacgat cagcaggcat gctttagcac gcagaacatc tactacatgg gtccccatta 1560

[0019]

cgaggagttt aagctggctt tgaicgaaaa actgaatctg taigcacata tccigcctaa	1620
caccaagaag gatttcgacg aaaaggcagc ttattccctg gtgcaaaagg agtgtctgtt	1680
cgccggttig aaagtgaag ttgacgtica tcaacgctgg atggttattg aatccaatgc	1740
tggcgttag ctgaaccagc cgtcgggtcg ttgtgtgtac ttgcaicacg tggataacat	1800
cgagcagatt ttgccgtatg tgcgtaagaa caaaaccag acgattagcg tgtttccgtg	1860
ggaggetcgc ctgaagtacc gcgactctgt ggccctgaaa ggcgcggagc gtattgttga	1920
ggcgggtatg aataacattt tccgtgtggg tggcgcgcac gatggcattc gtccgctgca	1980
acgcctggtc acttacatta gccacgagcg tccgagccat tacaccgca aggacgtcgc	2040
ggtcgaaatc gaacagacgc gttttctgga agaggacaag ttccctggtg ttgttccata	2100
agaattctaa cactgtataa cattaaagaag gaggtaaaag atatgactag ctacgtcgac	2160
aaacaggaatc tcaccgcgag cagcgagatt gacgacctga tcttttcag cgatccgttg	2220
gtgtgtctct atgatgagca agaaaagatt cgcaagaaac tggctcctgga tgcgttccgc	2280
caccactaca agcactgtca agagtaccgt cattattgcc aagcccataa agtcgacgat	2340
aacattacgg aaattgacga tatcccggtt tcccgacct ctgttttcaa gttcacccgt	2400
ctgctgacct ccaacgagaa tgagattgag agctggttta ctccgagcgg taccaatggt	2460
ctgaaaagcc aagtcgccgc tgategtctg agcattgaac gtctgtctgg cagcgtgagc	2520
tacggcatga agtacatcgg ttctgtggtt gaccatcaaa tggagctggt taacttgggt	2580
ccggatcgct ttaatgccca caacatttgg tteaagtacg ttatgagcct ggttgagctg	2640
ttgtatccga cgagcttcac cgtgacggaa gagcacatcg acttcgtgca gacgtgaac	2700
agcctggaac geattaaaca tcagggcaaa gacatttgc tgategggtc tccgtatttc	2760
atctatctgc tgtgccgtta catgaaggac aagaacatca gctttagcgg tgacaagage	2820
ctgtatatca tcaccggtgg cggttggaaa agctacgaaa aagagtcctt gaagcgtaat	2880
gactttaatc acctgttgtt cgatacgttc aatctgagca acattaaaca gatccgtgac	2940
atctttaacc aggtcgaact gaatacctgt ttctttgagg acgagatgca gcgcaaacac	3000
gtcccgcctg gggatatcgc gcgtgcgctg gatcctgaaa ccttgaaacc ggttccagat	3060
ggcatgcctg gtctgatgag ctatatggat gctagctcta cgagetacc ggcatattac	3120
gtgaccgacg atattggtat tatcagccgc gactacggtc aatatccggg cgtgctggtt	3180
gaaattctgc gtctgtgaa taccgcgaag cagaaaggct gcgcgtgtgc tctgacggag	3240
gcattcggtt cctaaaagct ttaacactgt ataacattaa gaaggaggta aatataatgg	3300
aaaacgagag caagtacaaa acgatcgacc acgtaatctg cgtggagggt aacaaaaaga	3360
ttcacgttig ggagactttg ccagaagaga acagcccgaa acgcaaaaac gcaatcatta	3420
tgcgagcgg tticgcacgc cgcatggatc attttcggg cctggccgaa tacctgagcc	3480
gtaacggctt ccacgttate cgttatgaca gcctgcatca cgtcgccctg tctcttggtt	3540
ccatcgacga gttcacgatg agcatcgcca agcaanagcct gttggcgggt gttgattggc	3600
tgaccacgcg taagatcaac aattttggta tgctggcttc cagcctgtcc gcacgcattg	3660
cgtacgttic tctgagcgag aitaatgcca gctttctgat caccgcctg ggtttctgca	3720
atctgcgtta tagcctggag cgtgcgctgg gtttcgatta cttgagcctg ccgattaacg	3780
agctgccgaa taatctggac ttigaaggcc ataagttggg tgcggaggtc ttgcgcgtg	3840

[0020]

attgcctgga ttttggttgg gaagatctgg catcgacgat taacaatatg atgtatctgg	3900
atatcecggt taitgcttte acggcgaata acgacaattg ggttaagcaa gacgaggtta	3960
tcacccgtgt gtctaacatt cgttccaatc gctgtaaaat ctatagcttg ctgggcagca	4020
gccacgactt gagegaaaat cgggtcgtgc tgcgcaactt ctaccagagc gtgaccaaag	4080
cagcgattgc aatggataac gaccacctgg acattgacgt ggataacacc gaaccgagct	4140
tcgaacatct gaccatcgcg accgttaacg aacgtcgtat gcgtattgag attgagaatc	4200
agggcatttc cctgagctaa gcggccgcat aatgcttaag tcgaacagaa agtaatcgta	4260
ttgtacacgg ccgcataatc gaaattaata cgactcacta taggggaatt gtgagcggat	4320
aacaattccc catcttagta taittagtia gtataagaag gagatataca tatggcagat	4380
ctcaattgga tatcgccggg ccacgcgacg gctgacgtcg gtaccctcga gtcgtgtaaa	4440
gaaaccgctg ctgcgaaatt tgaacgccag cacatggact cgtctactag cgcagcttaa	4500
ttaacctagg ctgctgccac cgcctgagca taactagcat aacccttgg gcctctctaaa	4560
cgggtcttga ggggtttttt gctgaaacct caggeatttg agaagcacac ggtcacactg	4620
cttccggtag tcaataaacc ggtaaaccag caatagacat aagcggetat ttaacgacct	4680
tgccttgaac cgacgaccgg gtctgaattg ctctcgaatt tctgccattc atccgcttat	4740
tatcaattat tcaggcgtag caccaggcgt ttaangggcgc caataactgc cttaaaaaaa	4800
ttacgccceg ccttgcactc catcgagta ctgttgtaat tcattaaagca ttctgccgac	4860
atggaagcca tcacagacgg catgatgaac ctgaatcgcc agcggcatca gcaecttgtc	4920
gccttgcgta taatatattg ccatagtgaa aacgggggcg aagaagtgtt ccatattggc	4980
cacgttttaa tcaaaactgg tgaactcac ccagggtatt gctgagaaga aaaacatatt	5040
ctcaataaac cctttaggga aataggccag gttttcaccg taacacgcca catcttgcga	5100
atatatgtgt agaaactgcc ggaatcgctc gtggtattca ctccagagcg atgaaaacgt	5160
ttcagtttgc tcatgaaaaa cgggtgaaca aggttgaaca ctatccata tcaccagctc	5220
accgtcttcc attgccatac ggaactccgg atgagcattc atcaggcggg caagaatgtg	5280
aataaaggcc ggataaaact tgtgcttatt ttcttttacg gtctttaaaa aggccgtaat	5340
atccagctga acggtctggt tataggtaca ttgagcaact gactgaaatg cctcaaaatg	5400
ttctttacga tgccattggg atatatcaac ggtggtatat ccagtgattt tttctccat	5460
tttagcttcc ttagctcctg aaaatctcga taactcaaaa aatagccccg gtagtgatct	5520
tatttcatta tgggtgaaat tggaaacctc tacgtgccga tcaacgtctc attttcgcca	5580
aaagttagcc cagggtctcc cgggtatcac agggacacca ggatttattt attctgcgaa	5640
gtgatcttcc gtcacaggta ttatttcggc gcaaagtgcg tcgggigatg ctgccaaactt	5700
acigattttag tgatgatgg tggtttttag gtgttcacgt ggcttcigtt tctatcagct	5760
gtccctccgt ttcagctact gacggggtgg tgcgtaacgg caaaagcacc gccggacatc	5820
agcgttagcg gagtgtatcc tggttacta tgttggcaat gatgagggtg tcagtgaagt	5880
gtttcatgtg gcaggagaaa aaaggctgca ccggtcgtc agcagaatat gtgatacagg	5940
atataatccg ctctctcgct cactgactcg ctacgtcggc tegtctgact gcggcgagcg	6000
gaaatggett acgaacgggg cggagatttc ctggaagatg ccaggaagat acttaacagg	6060
gaagtgagag ggcccgggca aagccgtttt tccataggct cggccccctt gacaagcate	6120

[0021]

acgaaatctg acgctcaaat cagtggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg 6180
 cgtttccctt ggcggctccc tcgtgcgtc tcctgttctt gcctttcggg ttaccgggtg 6240
 cattccgctg ttatggccgc gttgtctca ttccacgctt gacactcagt tccgggtagg 6300
 cagttcgtc caagctggac tgtatgcacg aacccccgtt tcagtccgac cgctgcctt 6360
 tatecggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggaaagaca tgcaaaagca ccactggcag 6420
 cagccactgg taattgattt agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg ttaaggctaa 6480
 actgaaagga caagttttgg tgactgcgtt cctccaagcc agttacctg gttcaaagag 6540
 ttggtagctc agagaacctt cgaanaaccg cctgcaagg cggttttttt gtttcagag 6600
 caagagatta cgcgcagacc aaaacgactt caagaagatc atcttattaa tcagataaaa 6660
 tattctatga ttacagtga atttatctt tcaaatgtag cactgaagt cagccccata 6720
 cgataaagt tgtaattctc atgttagtca tgcctccgac ccaccggaag gagctgactg 6780
 gggtgaaggc tctcaagggc atcggctcag atcccggtgc ctaatgagtg agctaaacta 6840
 cattaattgc gttgcgtcct ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtc tgccagctgc 6900
 attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc cagggtggtt 6960
 tttcttttca ccagtggagc gggcaacagc tgattgccct tcaccgctg gccctgagag 7020
 agttgcagca agcggctccac gcctggttgc cccagcaggc gaaaatcctg ttgatgggtg 7080
 gttaacggcg ggatafaaca tgagctgtct tcggtatcgt cgtatccac taccgagatg 7140
 tccgcaccaa cgcgcagccc ggactcggta atggcgcgca ttgcgccag cgccatctga 7200
 tcgttgcaa ccagcctgc agtgggaacg atgccctcat tcagcatttg catggtttgt 7260
 tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgctt tccgttccg ctatcggtg aatttgattg 7320
 cgagtggat attatgcca gccagccaga cgcagacgc ccagacaga acttaattgg 7380
 cccctaaaca gcgcgattg ctggtgacct aatgcgacca gatgtccac gccagtcgc 7440
 gtaccgtctt catgggagaa aataatactg ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga 7500
 aataacgccg g 7511

<210> 17
 <211> 906
 <212> DNA
 <213> 樟树 (Cinnamomum camphora)

<400> 17
 atgggtctgg aatggaaacc gaagccgaat cgcacacaac tgcctgatga tcatttcggt 60
 ccgcacggcc tggctcttcg cgttaccttc gcaatccgta gctatgaggt tggcccgga 120
 cgcagcacgt ctatcgtggc tgttatgaat cacctgcaag aggcctgttt gaacctgcg 180
 aaaagcgtcg gcattctggg cgtatgcttc ggtaccactt tggaaatgag caagcgcgat 240
 ctgatctggg tggttaaacg tacgcacgtt gccgtggaac gttaccgggc gtgggtgat 300
 accgtagaag ttgagtgtc ggtcggcgca agcggtaata acggtcccg tcacgacttt 360
 ctggctggct actglaaaac cggigaaate ttgacgcgtt gtaccagctt gagegttatg 420
 atgaacacce gcacgcgtc tetgtccaag attctgaag aggtccgtg tgagatttgt 480
 ccggcgttca tcgacaacgt ggccgttaag gacgaagaga ttaagaagcc gcagaaattg 540
 aatgactcta cggcggatta cattcagggt ggtctgacgc cgcgttgga tgaacctggac 600

[0022]

attaaccagc acgtgaacaa tatcaaatat gtctgattgga ttcttggaac cgtgccggac 660
 agcatttttg agtcgcatca catcagcagc ttaccattg agtaccgtcg cgagtgcacg 720
 atggatagcg ttctgcaaag cctgaccact gtgagcggcg gtagctctga gccgggtctg 780
 gtgtgcgagc atctgctgca gctggagggt gccagcgaag ttctgcgtgc aaaaaccgag 840
 tggcgctcga agctgaccga ctcccttcgt gccatctccg tcatcccagc ggaaagcagc 900
 gtctaa 906

<210> 18
 <211> 6291
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 表达载体

<400> 18
 ggggaatttg gagcgataa caattccctt ctagaataaa ttttgtttta ctttaagaag 60
 gagatatacc atgggtcttg aatggaaacc gaagccgaat cccacacaac tgcctgatga 120
 tcatttcggt ccgcacggcc tggctcttcg ccgtaccttc gcaatccgta gctatgaggt 180
 tggcccgagc cgcagcagct ctatcgtggc tgttatgaat caccctgaag aggccgcttt 240
 gaaccatgcg aaaagcgtcg gcattctggg cgatggcttc ggtaccactt tggaaatgag 300
 caagcgcgat ctgatctggg tggttaaac tacgcacgtt gccgtggaac gttaccggc 360
 gtgggtgat accgtagaag ttgagtctg gtcggcgca agcggtaata acggtcgccg 420
 tcacgacttt ctggtgcgtg actgtaaaac cggtgaaac ttgaecgct gtaccagcct 480
 gagcgttatg atgaacacc gcacgcgtcg tctgtccaag attcctgaag aggtccgtgg 540
 tgagatttgt ccggcgttca tcgacaacgt gcccgtaag gacgaagaga ttaagaagcc 600
 gcagaaattg aatgactcta ccggcgatta caticagggt ggtctgacgc cgcgttgaa 660
 tgacctggac attaaccagc acgtgaacaa tatcaaatat gtcgattgga ttcttggaac 720
 cgtgccggac agcatttttg agtcgcatca catcagcagc ttaccattg agtaccgtcg 780
 cgagtgcacg atggatagcg ttctgcaaag cctgaccact gtgagcggcg gtagctctga 840
 gccgggtctg gtgtgcgagc atctgctgca gctggagggt gccagcgaag ttctgcgtgc 900
 aaaaaccgag tggcgctcga agctgaccga ctcccttcgt gccatctccg tcatcccagc 960
 ggaaagcagc gtctaaggat ccgaattcga gctcggcgcg cctgcaggtc gacaagcttg 1020
 cggccgcata atgcttaagt cgaacagaaa gtaatcgtaf tgtacacggc cgcataatcg 1080
 aaattaatac gactcactat aggggaattg tgagcggata acaattcccc atcttagtat 1140
 attagttaag tataagaagg agatatacat atggcagatc tcaattggat atcgccggc 1200
 cacgcgatcg ctgacgtcgg taccctcgag tctggtaaag aaaccgctgc tgcgaaattt 1260
 gaacgccagc acatggactc gtctactagc gcagcttaat taacctagge tgetgcaacc 1320
 gctgagcaat aactagcata accccttggg gcctcfaaac ggtcttgag gggltttttg 1380
 ctgaaaggag gaactatata cggattggcg aatgggacgc gccctgtagc ggcgatttaa 1440
 gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgetac acttgccagc gccctagcgc 1500
 ccgtctcttt cgttttcttc cttctcttc tgcacagtt cgcggcttt cccgtcaag 1560
 ctctaaatcg ggggtccctt ttagggttcc gatttagtgc tttaaggcac ctgacccca 1620

[0023]

aaaaacttga ttagggtgaf ggttcacgta gtgggccate gccctgatag acggtttttc	1680
gcccttttgac gttaggagtc acgtttctta atagtggact ctgtttccaa acfpgaacaa	1740
cactcaaccc tatctcggtc tttcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct	1800
attgggttaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa	1860
cgtttacaat ttctggcggc acgatggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat	1920
ccitttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atataatgag aaacttggtc	1980
tgacagttaac caatgcttaa tcagttaggc acctatctca gcgactctgc tatttcgttc	2040
atccatagtt gctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc	2100
tggecccgat gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggtccag atttatcagc	2160
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgtt cctgcaactt tatccgcctc	2220
catccagtct attaatgttt gcggggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatatgtt	2280
gcgcaacgtt gtggccattg ctacaggcat cgtgggtgca cgtctcgtct ttggtatggc	2340
ttcattcagc tccgttccc aacgatcaag gcgagttaaa tgatccccc tggttgcaaa	2400
aaaagcgggt agctctctcg gtctctcgat cgttgtcaga agtaagttag ccgcagtgtt	2460
atcactcatg gttaatggcag cactgcataa ttctcttact gtcattgcat ccgtaagatg	2520
cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc	2580
gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa	2640
agtgcctcgc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt	2700
gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt	2760
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gcgcgaaaa agggaataag	2820
ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact ctctctttt caatcatgat tgaagcattt	2880
atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa	2940
taggtcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta	3000
gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa	3060
acaaaaaaac caaccgtacc agcgggtggt tgtttgcgg atcaagagct accaactctt	3120
tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag	3180
ccgtagttag gccaccact caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgtctgcta	3240
atcctgttac cagtggctgc tgccagtgcc gataagtcgt gtcttaaccg gttggactca	3300
agacgatagt taccgataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag	3360
cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa	3420
agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga	3480
acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtctgtc	3540
gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga ttttfgtgat gctcgtcagg ggggcggagc	3600
ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt	3660
gtcacatgt tctttctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt	3720
gagttagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcagctc agtgagcgag	3780
gaagcgaag agcgcctgat gcggtatttt ctccctacgc atctgtcggg tatttcacac	3840
cgcataatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagtata	3900

[0024]

cactecgcta tcgtacgtg actgggtcat ggtgcgcgc cgacaccgc caacaccgc	3960
tgacgcgcgc tgacgggctt gtctgtccc ggcaccgct tacagacaag ctgtgaccgt	4020
ctccgggagc tgcatgtgtc agaggtttt accgtcatca ccgaaacgc cgaggcagct	4080
ggcgtaaagc tcatcagcgt ggtcgtgaag cgatteacag atgtctgcct gttcatccgc	4140
gtccagctcg ttgagtttct ccagaagcgt taatgtctgg ctctgataa agcgggccat	4200
gttaaggcgc gttttttctt gtttggtcac tgatgcctcc gtgtaagggg gatttctgtt	4260
catgggggta atgataccga tgaacgaga gaggatgctc acgatacggg ttacigtatga	4320
tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga gggtaaacaa ctggcggtat gcatgcggcg	4380
ggaccagaga aaaatcactc agggccaatg ccagcgttc gttaatcacg atgtagggtg	4440
tcacagggt agccagcagc atcctgcgat gcagatccgg aacataatgg tgcaggcgcc	4500
tgacttccgc gtttccagac ttacgaaac acggaaccg aagaccattc atgttgttgc	4560
tcaggtcgca gacgttttgc agcagcagtc gcttcacgtt cgtcgcgta tcggtgatc	4620
attctgctaa ccagtaaggc aaccccgcca gcctagccgg gtcctcaacg acaggagcac	4680
gacatgcta gtcatcccc gcgccaccg gaaggagctg actgggttga aggctctcaa	4740
gggcacgggt cgagatcccg gtgcctaag agtgagctaa ctacattaa ttgcgttgcg	4800
ctcactgcc gctttccagt cgggaacct gtctgccag ctgcattaat gaatcgcca	4860
acgcgcggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgccagggt ggtttttctt ttaccagtg	4920
agacgggcaa cagctgattg ccttcaccg cctggccctg agagagtgc agcaagcgtt	4980
ccacgtggt ttgccccagc aggcgaaaat cctgtttagt ggtggttaac ggcgggatat	5040
aacatgagct gtcttcggta tcgtctatc ccaactaccg gatgtccga ccaacgcga	5100
gcccggactc ggtaatggcg cgcattgcgc ccagcggcat ctgatcgtt gcaaccagca	5160
tcgcagtggt aacgatgcc tcattcagca ttgcatggt ttgttgaaaa ccggacatgg	5220
cactccagtc gccttccgt tccgtatcg gctgaattg attgcagtg agatatttat	5280
gccagccagc cagacgcaga cgcgccgaga cagaacttaa tgggcccgct aacagcgca	5340
tttgetggt acccaatgc accagatgct ccacggccag tcgctaccg tcttcatggg	5400
agaaaataat actgttgatg ggtgtctggt cagagacatc aagaaataac gccggaacat	5460
tagtgagcgc agcttccaca gcaatggcat cctggtcac cagcgatag ttaatgatea	5520
gcccactgac gcgttgcgc agaagattgt gcaccgccgc ttacaggct tcgacgccgc	5580
ttcgtttac catcgacacc accacgttgg caaccagtig atcggcgcga gatttaatcg	5640
ccgcgacaat ttgcgacgc gcgtgcagg ccagactgga ggtggcaacg ccaatcagca	5700
acgactgtt gcccgccagt tttgtgcca cgcggttggg aatgtaattc agctccgcca	5760
tcgcgccttc caettttcc cgcgttttcg cagaaacgtg gctggccttg ttaccacgc	5820
gggaaacggt ctgataagag acaccggcat actctgcac atcgtataac gttactggtt	5880
tcacattcac caccctgaat tgactctctt cgggcgcta tcatgccata ccgcgaaagg	5940
ttttgcgcca ttcatgggtg tcgggatctf cgacgtctc cttatgcga ctctgcatt	6000
aggaagcagc ccagtagtag gttgagccg ttgagccg ccgcgcgaag gaatggtgca	6060
tgcaaggaga tggcgcccaa cagtccccc gccacgggga ctgccacat acccagccg	6120
aaacaagcgc tcatgagccc gaagtggcga gccgatctt cccatcggt gatgtcggcg	6180

[0025]

atatagggcgc cagcaaccgc acctgtggcg ccggtgatgc eggccacgat gcgtccggcg	6240
tagagatcgc agatcgatct cgatcccgcg aaattaatac gactcactat a	6291
<210> 19	
<211> 978	
<212> DNA	
<213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)	
<400> 19	
atgagcaagg cgaaaatcac ggcaatcggc acctacgcac caagccgfcg tctgaccaat	60
gcggtatctgg agaagattgt tgacacctct gatgaatgga tegtccaacg tacgggtatg	120
egtgaacgtc gtattgccga cgaacatcag ttacagctcg atctgtgcat cgaagccgtt	180
aagaacctga aaagccgtta caaaggcacg ctggaigacg ttgacatgat cctgggtgca	240
accacgacct ctgactatgc ttttcgagc accgcttgct gtgtgcagga gtatttcggc	300
tgggaatcca ctggtgcgct ggatatcaat gccacctgtg cgggtctgac ctacggtctg	360
cacctggcca atggcctgat taccagcggc ctgcataaaa agattctggt tattgcgggc	420
gaaacgctga gcaaagttac cgattacacc gatcgacga cctgcgtttt gtttggcgac	480
gcagcgggtg cactgctggt tgagcgcgat gaggaacgc caggtttctt ggcgagcgtc	540
cagggcacta gcggtaacgg tggtagatc ctgtaccgtg caggctctcg taacgagatt	600
aacggtgtgc agctggtggg ctctggcaag atggtgcaaa atggccgtga ggtttacaag	660
tgggtcgcgc gcactgttcc gggcgagttc gagcgctgc tgcaaaaagc aggtctgagc	720
agcgacgacg tggactggtt tgtgcgcac agcgccaaac tgcgtatgat cgagagcctc	780
tgcgaaaaga cgcggttccc aatcgaaaag accttgacga gcgtggagca ttacggtaat	840
accagctccg tgtctattgt cctggcgtg gacttggcag tgaaggcagg caaaactgaaa	900
aaggatcaga tegtctgct gtttgcctc ggtggggct tgacctaac gggcctgctg	960
atcaaatggg gtatgtaa	978
<210> 20	
<211> 993	
<212> DNA	
<213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)	
<400> 20	
atgggcacga accgccacca agcaactgggc ctgaccgacc aagaggcggg tgatatgtac	60
cgcacgatgc tgctggcgcg caagattgat gagcgatgt gctgttgaa tcttccggc	120
aagattccat ttgtgatttc ttgccagggc caagaggcag cacaagttgg tgcagcgttc	180
gcgctggatc gtgagatgga ttacgtgctg ccgtactacc gtgatatggg tgtgggtctg	240
gcattcggtg tgaccgaaa agatctgat atgtctggt ttgcanaagc ggcggaccca	300
aacagcggcg gtcgccagat gccaggtcac ttgggtcaga agaagaatcg tattgtcacc	360
ggtagcagcc cggttacgac gcaggttccg cagcgggtg gtattgcgt gcccggtcgt	420
atggaaaaga aagatatgc cgcgttcgt acgtttggcg agggtagcag caatcagggt	480
gactttcatg agggtgccaa ctctcgtcgc gtccataaac tgccggtcat ctcatgtgc	540
gaaaacaaca aglaegceat tagcgltccg tagcacaagc aggttgcctt cgagaacatc	600
agcgaccgcg cgatcggtta tggtagcgc ggtgtgacgg tcaacggcaa cgatccgctg	660
gaggtttata aagcggtaaa agaagcgcgc gagcgtgccc gtccgggtga ggggtccgacg	720

[0026]

ttgatcgaaa ccatttcccta tcgtctgacg cctcacagca gcgatgatga tgacagcagc 780
 taaccgtggtc gtgaagaggt cgaagaggcc aaaaagagcg acccgctgct gacctaccaa 840
 gcgtatctga aagaaacggg tctgctgagc gacgagattg agcaaaccat gctggacgag 900
 atcatggcaa tcgtgaatga ggcaaccgac gagggcgaga acgcgcgta tgcggcaccg 960
 gaaagcgac tggattatgt ctacgcgaag taa 993

<210> 21
 <211> 984
 <212> DNA
 <213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

<400> 21
 atgagcgtaa tgagctacat cgatgcaatc aacctggcca tgaaagaaga aatggaacgc 60
 gacagccgcg tttttgtttt gggtagggac gtcggctcgca aaggtggtgt gttcaaagcc 120
 accgcgggtt tgtacgagca atttggcgaa gagegtgtca tggatacgcc gctggccgaa 180
 agecgtattg caggcgctcg categgctcg gctatgtatg gtatgcgtcc gatcgctgaa 240
 atgcaatttg cagactttat catgccagcc gtcaaccaga tcacagcgga ggcagcgaaa 300
 atccgttata gtagcaacaa cgattggagc tglccgacg ttgtccgtgc cccgtatggt 360
 ggtggtgttc acggcgact giatcatagc cagagcggtg aagcgatttt cgcaaaccaa 420
 cctggtctga aatcgttat gccaaagcacc ccgtacgatg cgaagggttt gctgnaagcg 480
 gcggtgctcg atgaagatcc ggtgctgttc ttcgagcaca agcgtgcgta ccgtctgatt 540
 aaaggcgagg tcccggcaga cgaactacgtc ttgccgatcg gtaaagcgga tgtaagcgt 600
 gaaggtgatg atatcacglt gateacglac ggcttglcg tgcactlccg cctgcaagcg 660
 gccgaacgcc tggagaagga cggcatcagc gcacacgttg tagacctcg taccgtctac 720
 ccgttgata aagaagccat catcgaggcg gcgagcaaaa ccggcaaggt gctgtgtgtc 780
 acggaagata ccaaagaagg tagcatcatg agcgaggttg cagccatcat tagcgagcac 840
 tgtttgttcg acttggtatg gccgattaa cgtctggcgg gtccagatat cccggccatg 900
 ccgtacgcac cgacgatgga gaaatacttt atgggtcaacc cggataaggt ggaagcgccc 960
 atcgtgagc tggcggagtt ctac 984

<210> 22
 <211> 1275
 <212> DNA
 <213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

<400> 22
 atggccatcg agcaaatgac catgccgcaa ctgggcgaga gcgtaacgga aggcaccatt 60
 tccaaatggc tggttgctce aggtgataaa gtcaacaagt atgaaccgat cgtgaggtt 120
 atgaccgata aggtgaacgc ggaggttccg tctcttttca ctggcaccat taccgaactg 180
 gtcggcgaag aggggtcaaac gctgcaagtc ggcgagatga tctgtaagat tgaaacggag 240
 ggtgctaate cggctgaaca aaagcaggag caaccggcag cgtctgaagc ggcagaaaa 300
 ccagtcgga agagcgcggg tgccgcagat caaccgaaca aaaagcgtta cagcccggca 360
 gttttgcgc tggctgggtg gcacgcgac gacctggatc aagtgaactg tacgggcgca 420
 ggtggccgca ttaccgtaa ggacatccaa cgcttgattg aaacgggtgg tgtccaggaa 480
 cagaacccgg aggagctgaa aaccgcgcga ccggcaccga aaagcgcgag caaacggag 540

[0027]

```

ccgaaggaag aaacctctta cccggcgicc gctgcgggcg ataaggagat tccggttact 600
ggcgttcgca aggccatcgc tagcaatatg aagcgagca agactgagat cccgcacgca 660
tggacgatga tggaggatga tctgaccaac atggttagcat accgtaatag catcaaggat 720
agcttcaaaa agaccgaagg ttccaacctg acgtttcttg ccttctttgt gaaggccgtt 780
gcacaggcac tgaagagatt tccgcaaatg aacagcatgt gggctggcga caagattatt 840
caaaagaagg atateaacat tagcatgca gtcgccaccg aggacagcct gtctgtgccg 900
gtaatcaaaa atgctgatga aaagactatc aaaggtattg caaaggacat caccggcctg 960
gcgaagaaag ttgcgcagcg taagctgacc gcagatgaca tgcagggttg caccittacg 1020
gtcaacaaca cgggcagctt tggcagcgtc cagagcatgg gtattatcaa ctatccgag 1080
gcggcaattc tgcaagtga atccatcgtg aaacgcccgg ttgttatgga caacggcatg 1140
attgcagttc gtgacatggt aaacttggt ctagccttgg accacccgct tcctggacggc 1200
ctggtctgcg gtcttttctt ggcccggtgt aaacagatcc tggagagcat tgatgagaaa 1260
acgagcgtgt attaa 1275

```

<210> 23
 <211> 1425
 <212> DNA
 <213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

```

<400> 23
atggcancgg agtacgacgt agtgattttg ggcgggtggca cgggagggtta cgtggcggcc 60
attcgtgcgg cgcaattggg cctgaaaacg gccgtggtcg aaaaagaaaa actgggcggc 120
acctgccctc acaagggttg tatcccgagc aaagccctgt tgcgttccgc ggaggtgtac 180
cgtaccgctc gtgaagcggg ccaattcggc ggggaaaccg egggtgtgtc cctgaacttt 240
gagaaagtcc agcagcgtaa acagcggtg gtggacaaac tgcttgcggg tgtaaatcac 300
ctgatgaaga aggtgaaat cgtgtgtat accggttatg gccgcatect gggtcgagc 360
attttcagcc cgtgcgggg tactatttcc gtggaacgtg gcaacggtga agaaaacgac 420
atgttgatcc ctaaacaggt gatcatcgcg accggtagcc gtccgcgcac gctgccaggt 480
ctggaagtgt acggtaaaag cgtgctgacc agcgatgagg cgtctcaaat ggaggagtgt 540
ccgcagagca tcatcattgt aggtggcggc gtcattggca ttgagtgggc gagcatgtg 600
catgattttg gcgtcaaatg cactgtgac gagtacgccg accgtattct gccgacggag 660
gatttggaga ttccaaga aatggaaagc ctgctgaaaa agaaaggat ccaattcatt 720
accggtgcta aggttcttgc ggacacgatg accaaaaacta gcgacgatat cagcattcaa 780
gcagaaaaag atggcgaaac ggtcacctac agcgcggaga aaatgttggg gagcatcgtt 840
cgtcaggcga atatcgaggg tattgtctg gaaaacaccg acattgttac cgagaatggt 900
atgatctccg tcaacgagag ctgccaacg aaagagtcgc acatctatgc catcggtgac 960
gtcatcggtg gcctgcaatt ggcccacgtc gcaagccatg aggttatcat cgcagtagaa 1020
catttcgccc gtctgaatcc gcaccgctg gaccggaetc tggteccaa gtgtatctac 1080
tccagcccgg aagccgctag ctaggtctg accgaagatg aggctaagge gaatggccac 1140
aacgtcaaga ttggcaagtt cccgtttatg gctattggta aggcgcgggt gtatggcgag 1200
agcgacgggt ttgtcaagat ttagctgat cgtgataccg acgatatctt ggggtgtcac 1260
atgatcggtc cgcactgac cgacatgatt agcgaagcag gctctgceaa agtactggac 1320

```

[0028]

gcgacccccgt gggaagtagg ccagaccatt caccgcacac cfacgctgag cgaagcgatt	1380
ggtgaggcgg caittggccgc agacggtaaa gctatccact tctaa	1425
<210> 24	
<211> 5862	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 密码子优化的操纵子	
<400> 24	
ccatgggaag gagatatacc atgggcacga accgccacca agcactgggc ctgaccgacc	60
aagaggcggg tgatatgtac cgcacgatgc tgcctggcgc caagattgat gagcgtatgt	120
ggctgttgaa tcgttcgcgc aagattccat ttgtgatttc ttgccagggc caagaggcag	180
cacaagttag tgcagcgttc gcgctggatc gtgagatgga ttacgtgctg ccgtactacc	240
gtgatatggg ttgtgtgctg gcattcggta tgaccgcaaa agatctgatg atgtctggct	300
ttgcaaaagc ggccgaccca aacagcggcg gtcgccagat gccaggtaac ttgtgtcaga	360
agaagaatcg tattgtcacc ggtagcagcc cggttacgac gcagggtccg caccgggttg	420
gtattgcgct ggccggctgt atggaaaaga aagataicgc cgcgttcgtc acgtttggcg	480
agggtagcag caatcagggt gactttcatg aggggtgcaa ctctcgtcgc gtccataaac	540
tgccggctcat ctctatgtgc gaaaacaaca agtacgccat tagcgttcgc tacgacaagc	600
agggttcttg cgagaacatc agcgcaccgc cgateggcta tggatgccc ggtgtgacgg	660
tcaacggcaa cgatccgctg gaggtttatc aagcggtaaa agaagcgcgc gagcgtgccc	720
gtcgcgggtga gggtccgacg ttgatcgaaa ccatttecta tcgtctgacg cctcacagca	780
gcgatgatga tgacagcagc taccgtggte gtgaagaggt cgaagaggcc aaaaagagcg	840
acccgctgct gacctaccaa gcgtatctga aagaaacggg tctgctgagc gacgagattg	900
agcaaaacat gctggacgag atcatggcaa tcgtgaatga ggcaaccgac gaggcggaga	960
acgcgccgta tgcggcaccg gaaagcgac tggattatgt ctacgcgaag taaggatccc	1020
actgtataac attaagaagg aggtaaaaaa aatgagcgta atgagctaca tcgatgcaat	1080
caacctggcc atgaaagaag aaatggaacg cgacagccgc gtttttgttt tgggtgagga	1140
cgtcggctgc aaaggtgggt tgttcaaagc caccgcggtt ttgtacgagc aattttggcga	1200
agagcgtgtc atggatagc cgctggccga aagcgtatt gcaggcgtcg gcacgggtgc	1260
ggetatgtat ggtatgcgtc cgatecgtga aatgcaattt gcagacttta tcatgccagc	1320
cgtaaccag atcatcagcg aggcagcgaa aatccgitat cgtagcaaca acgattggag	1380
ctgtccgacg gttgtccgtg ccccgatagg tgggtgggtt caccggcgac tgtatcatag	1440
ccagagcggt gaagcgattt tcgcaaaeca accgggctg aaaaatcgta tgccaagcac	1500
cccgtagcat gcgaagggtt tgcgtgaaagc ggccgtgcgc gatgaagatc cgggtgctgtt	1560
cttcgagcac aagcgtgctt accgtctgat taaaggcgag gtcceggcag acgaactacgt	1620
cttgcggatc ggtaaagcgg atgttaagcg tgaagtgat gatatacccg tgateacgta	1680
cggccgtgtc gtgcacttcg cccgtcaagc ggccgaacgc ctggagaagg acggcatcag	1740
cgcacacgtt gtagacctgc gtaccgtcta cccgttgat aaagaagcca tcatcgaggc	1800
ggcgagcaaa accggcaagg tgcgtctggt cacggaagat accaaagaag gtagcatcat	1860

[0029]

gagcgagggt gcagccatca ttagcgagca ctgtttgttc gacttggatg cgccgattaa	1920
gcgtctggcg ggtccagata tcccggccat gccgtacgca ccgacgatgg agaaatactt	1980
tatggicaac ccggataagg tggaagcggc catcggtgag ctggcggagt tetaaggatc	2040
cgaattcaact gtataacatt aagaaggagg taataaaaaat ggccatcgag caaatgacca	2100
tgccgcaact gggcgagagc gtaacggaag gcaaccatttc caaatggctg gttgctccag	2160
gtgataaagt caacaagtat gacccgatcg ctgaggttat gaccgataag gtgaacgcgg	2220
aggttcctgct ctttttcaact ggcaccatta ccgaaactggt cggcgaagag ggtcaaacgc	2280
tgcaagtcgg cgagatgatc tgtaagattg aaacggaggg tgctaatecg gctgaacaaa	2340
agcaggagca accgcgagcg tctgaagcgg cagaaaaatcc agtcgcgaag agcgcgggtg	2400
ccgcagatca accgaacaaa aagcggtaca gcccggcagt ttgctgctg gctggtgagc	2460
acggcatcga cctggatcaa gtgactggta cggcgcgagg tggccgcatt acccgtaagg	2520
acatccaacg ctgtattgaa acgggtgggt tccaggaaca gaaccggag gagctgaaaa	2580
ccgccgcacc ggcaccgaaa agcgcgagca aaccggagcc gaaggaagaa acctcttacc	2640
cggcttcctc tgcggcgcat aaggagattc cgtttactgg cgttcgaag gccatcgcta	2700
gcaatatgaa gcgcagcaag actgagatcc cgcacgatg gacgatgatg gaggtggatg	2760
tgaaccaatc ggtagcatac cgtaatagca tcaaggatag cttcaaaaag accgaagggt	2820
tcaacctgac gttctttgcc ttctttgtga aggccgttgc acaggcactg aaagagtttc	2880
cgc aaatgaa cagcatgtgg gctggcgaca agattattca aaagaaggat atcaacatta	2940
gcattgcagt cgcaccgag gacagcctgt tctgtccggt aatcaaaaat gctgatgaaa	3000
agactatcaa aggtattgca aaggacatca ccggcctgga gaagaaagt cgcgacggta	3060
agctgaccgc agatgacatg cagggtggca cctttacggt caacaacacg ggcagctttg	3120
gcagcgtcca gagcatgggt attatcaact atccgcaggc ggcaattctg caagtgaat	3180
ccatcgtgaa acgcccgggt gttatggaca acggeatgat tgcagttcgt gacatggtaa	3240
acttgtgtct gagcttgac caccgcgttc tggacggcct ggtctgcggt cgtttcttgg	3300
gccgtgtgaa acagatcctg gagagcattg atgagaaaac gagcgtgtat taagaattcg	3360
agctcactgt ataacattaa gaaggaggta aaaaaaatgg caacggagta cgacgtagt	3420
attttggcg gtggcacggg cgtttacgtg gcggccattc gtgcggcgca attggscctg	3480
aaaacggcgg tggtcgaaaa agaaaaactg ggcggcacct gccctgcaca gggttgtatt	3540
ccgagcaaa cctgtttgcg ttccgcggag gtgtaccgta ccgctcgtga agcggaccaa	3600
ttcggcgtgg aaaccgcggg tgtgtccctg aaetttgaga aagtcagca gcgtaaacag	3660
gcggtgggtg aaaaactggc tgcgggtgtc aatcaccitga tgaagaaggg taaaatcgat	3720
gtgtataacc gttatggcg calccctgggt ccgagcattt ccagcccgct gccggglact	3780
atttccttgg aacctggcaa cggtaagaa aacgacatgt tgatecctaa acaggtgatc	3840
atcgcgaccg gtacccgtcc ggcctgctg ccaggtctgg aagttgacgg taaaagcgtg	3900
ctgaccagcg atgagcgct gcaaatggag gagttccgc agagcatcat cattgtaggt	3960
ggcggcgtca ttggcattga gtggcgagc atgtcgtatg attttggctt caaagtcact	4020
gtgatcgagt acgcgaccg tattctgccg acggaggatt tggagatttc caaagaaatg	4080
gaaagcctgc tga aaaagaa aggtatccaa ttcatcaccg gtgctaagggt tctgccggac	4140

[0030]

acgatgacca aaactagcga cgatatacgc attcaagcag aaaaagatgg cgaaacggtc 4200
 acctacagcg cggagaaaat gttggtagc atcggtagtc aggcgaatat cgagggtatt 4260
 ggtctggaaa acaccgacat tgtfaccgag aatggtaga tctcgtcaa cgagagctgc 4320
 caaacgaaag agtcgcacat ctatgccatc ggtgacgtca tcggtaggctt gcaattggcc 4380
 cagctcgcaa gccatgaggg tateatcgca gtagaacatt tcgcgggtct gaateccgac 4440
 ccgctggacc cgactciggt ccctaaggtt atctactcca gcccggaagc cgtagcgta 4500
 ggtctgaccg aagatgaggg taaggcgaat ggccacaacg tcaagattgg caagttccc 4560
 tttatggcta ttggttaaggc gctggtgtat ggcgagagcg acggttttgt caagattgta 4620
 gctgacgtg ataccgacga tattctgggt gtgcacatga tcggtagcga cgtgaccgac 4680
 atgattagcg aagcaggtct ggccaaagta ctggacgca ccccgtagga agtaggccag 4740
 accattcacc cgcattctac gctgagcgaa gcgattggtg aggcggcatt ggccgcagac 4800
 ggtaaagcta tccacttcta agagctcgtc gaccactgta taacattaag aaggaggtaa 4860
 aaaaaatgag caaggcgaaa atcacggcaa tggcaccta cgcaccaagc cgtcgtctga 4920
 ccaatcgga tcaggagaag attgttgaca cctctgatga atggatcgtt caacgtacgg 4980
 gtatcgctga acgtcgtatt gccgacgaac atcagttcac gtctgatctg tgcacgaag 5040
 ccgttaagaa cctgaaaagc cgttacaag gcacgttgga tgacgttgac atgatctgg 5100
 ttgcaaccac gaactctgac tatgcttttc cgagcaccgc ttgtcgtgtg caggagtatt 5160
 tcggtggga atccactggt gcgtggata tcaatgccac ctgtgcgggt ctgacctacg 5220
 gtctgcacct ggccaatgac ctgattacca gggcctgca tcaaaagatt ctggttattg 5280
 cgggcgaaac gctgagcaaa gttaccgatt acaccgatcg cagcactgc gttttgtttg 5340
 gcgacgcagc gggtagcactg ctggttagc gcgatgagga aacgccaggt ttcctggcga 5400
 gcgtccagg cactagcgtt aacggtggtg acatcctgta ccgtgcaggt ctgcgtaacg 5460
 agaitaacgg tgtgcagctg gtgggtctg gcaagatggt gcaaaatggc cgtgaggttt 5520
 acaagtgggc tgccgcact gttecgggcg agttegagcg cctgtgcac aaagcaggtc 5580
 tgagcagcga cgtctggac tggtttgtc cgcacagcgc caacctcgt atgacgaga 5640
 gcactctgca aaagacgcc ttccaatcg aaaagacctt gacgagcgtg gagcattacg 5700
 gtaataccag ctccgtgtct attgtcctgg cgttgactt ggcagtgaag gcaggcaaac 5760
 tgaaaaagga tcagatcgtt ctgctgtttg gcttcggtgg tggcttgacc tacacgggcc 5820
 tgetgatcaa atgggtatg taatgagtc acgggccgc gc 5862

<210> 25
 <211> 11200
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 表达载体

<400> 25
 ggggaattgt gagcgataa caattcccct ctagaataa tttgttttaa cttaagaag 60
 gagatatacc atgggaagga gatataccat gggeacgaac cgcaccaag cactgggctt 120
 gaccgacca gaggggttg atatgtaccg cagatgctg ctggcgcca agattgatga 180
 gcgtatgtgg ctgttgaatc gttccggcaa gattccattt gtgatttctt gccaggcca 240

[0031]

agaggcagca caagtgggtg cagcgctcgc gctggatcgt gagatggatt acgtgctgcc	300
gtactacegt gatatgggtg tggctcgtgc attcggtatg accgcaaaag atotgatgat	360
gtctggcttt gcaaaagcgg cggacccaaa cagcgcggtt cgcagatgc caggtcactt	420
tggtcagaag aagaatcgta tigtacccgg tagcagcccg gttacgacgc aggttcogca	480
cgcggttggt attgcctgg cggctcgtat ggaaaagaaa gatatcgccg cgttcgtcac	540
gtttggcgag ggtagcagca atcagggtga ctttcattgag ggtgccaaat tcgtcgcgtt	600
ccataaactg cggctcatct tcatgtgcga aaacaacaag tacgccatta gcgttcctga	660
cgaacaagcag gtgtcttgcg agaacatcag cgaccgcgcg atcggtatg gtatgccggg	720
tgtgacggtc aacggcaacg atccgctgga gttttatcaa gcggttaaag aagcgcgcga	780
gcgtgcccgt cgcggtgagg gtccgacgtt gatcgaaacc atttcctatc gtctgacgcc	840
tcacagcagc gatgatgat acagcagcta ccgtggctgt gaagaggctg aagaggccaa	900
aaagagcgac ccgtctctga cctaccaagc gtatctgaaa gaaacgggtc tgcctgagcga	960
cgagatttag caaacatgc tggacgagat catggcaatc gtgaatgagg caaccgacga	1020
ggcggagaac gcgccgatg cggcaccgga aagcgcactg gattatgtct acgcgaagta	1080
aggatcccaac tgtataacat taagaaggag gtaaaaaaaaa tgagcgtaat gagctacatc	1140
gaigcaatca acctggccat gaaagaagaa atggaacgcg acagccgcgt ttttgttttg	1200
ggtaggagac tcggctgcga aggtgggtgt ttcaaagcca ccgcgggttt gtacgagcaa	1260
tttggcgaag agcgtgtcat ggatacgccg ctggccgaaa gcgtattgc aggcgtcggc	1320
atcggtgcgg ctatgtatgg tatgcgtccg atcgctgaaa tgcaatttgc agactttatc	1380
atgccagccg tcaaccagat catcagcgag gcagcgaaaa tccgttatcg tagcaacaac	1440
gattggagct gtccgatcgt tgtccgtgcc ccgtatggtg gtggtgttca cggcgcactg	1500
tatcatagcc agagcgttga agcgattttc gcaaaccaac ctggtctgaa aatcgttatg	1560
ccaagcacc cgtacgatgc gaagggtttg ctgaaagcgg cggctgcgca tgaagatccg	1620
gtgtgtttct tcgagcaca gctgcgtac cgtctgatta aaggcgaggt cccggcagac	1680
gactacgtct tgcgatcgg taaagcgat gttaaagctg aaggtgatga tatcaccgtg	1740
atcacgtacg gcctgtgcgt gcacttcgcc ctgcaagcgg ccgaacgcct ggagaaggac	1800
ggcatcagcg cacacgttgt agacctgcgt accgtctacc cgttgataa agaagccatc	1860
atcgaggcgg cgagcaaaac cggcaagggt ctgctggtca cggaagatac caaagaaggt	1920
agcatcatga gcgaggttgc agccatcatt agcgagcaat gtttgttga cttggatgcg	1980
ccgattaagc gtctggcggg tccagatata ccggccatgc cgtacgcacc gacgatggag	2040
aaatacttia tggtaaccc ggataagggt gaagcggcca tgcgtgagct ggccgagttc	2100
taaggatccg aatcacigt ataacaliaa gaaggaggla aaaaaatgg ccatcgagca	2160
aatgaccatg ccgcaactgg gcgagagcgt aacggaaggc accatttcca aatggctggt	2220
tgtccagggt gataaagtca acaagtatga cccgatcgt gaggttatga ccgataaggt	2280
gaacgcggag gtccgtcctt ctttcaactgg caccattacc gaactggctg gcgaagaggg	2340
tcaaacgtg caagtcggcg agatgatctg taagattgaa acggagggtg ctaatccgce	2400
tgaacaaaag caggagcaac cggcagcgtc tgaagcggca gaaaatccag tcgcgaagag	2460
cgcgggtgcc gcagatcaac cgaacaaaa gcgttacagc ccggcagttt tgcgcctgce	2520

[0032]

tgggtgagcac	ggcatcgacc	tggatcaagt	gactgggtacg	ggcgcagggtg	gccgcattac	2580
ccgtaaggac	atccaacgct	tgattgaaac	gggtgggtgc	caggaacaga	acccggaggga	2640
gctgaaaacc	gccgcaccgg	caccgaaaag	cgcagcaaaa	ccggagccga	aggaagaaac	2700
ctcttaccgg	gcgtccgctg	cgggcgataa	ggagattccg	gttaetggcg	ttcgcaaggc	2760
catcgctagc	aatatgaagc	gcagcaagac	tgagatcccg	caagcatgga	cgaigatgga	2820
gggtgatgtg	accaacatgg	tagcataccg	taatagcatc	aaggatagct	tcaaaaagac	2880
cgaaggtttc	aacctgaagt	tctttgacct	ctttgtgaag	gccgttgca	aggaactgaa	2940
agagtttccg	caaatgaaca	gcattgtggc	tgccgacaag	attattcaaa	agaaggatat	3000
caacattagc	attgcagtcg	ccaccgagga	cagccctgtc	gtcccgttaa	tcaaaaatgc	3060
tgatgaaaag	actatcaaag	gtattgcaaa	ggacatcacc	ggcctggcga	agaaagttcg	3120
cgacggtaag	ctgaccgcag	atgacatgca	gggtggcacc	tttacggfca	acaacacggg	3180
cagctttggc	agcgtccaga	gcattgggtat	tatcaactat	ccgcaggcgg	caattctgca	3240
agttgaaatc	atcgtgaaac	gcccggttgt	tatggacaac	ggcatgattg	cagttctgta	3300
catggtaaac	ttgtgtctga	gcttggaaca	cccggttctg	gacggcctgg	tctgcggtcg	3360
tttcttgggc	cgtgtgaaac	agatccctgga	gagcatigat	gagaaaaaga	gcgtgtatta	3420
agaaftcgag	ctcactgtat	aacattaaga	aggaggtaaa	aaaaatggca	acggagtacg	3480
acgtagtgat	tttggcgggt	ggcaccggcg	gttacgtggc	ggccattcgt	gcggcgcaat	3540
tgggcctgaa	aacggccgtg	gtcgaaaaag	aaaaactggg	cggcacctgc	ctgcacaagg	3600
gttgtattcc	gagcaaaagc	ctgttgcggt	ccgcggagggt	gtaccgtacc	gctcgtgaag	3660
cggaccaait	cggcgtggaa	accgcgggtg	gtccctgaa	ctttgagaaa	gtccagcagc	3720
gtaaacaggc	gggtgtggac	aaactggctg	cgggtgtcaa	tcacctgatg	aagaagggtta	3780
aaatcgatgt	gtataccggt	tatggccgca	tcctgggtcc	gagcattttc	agcccgtcgc	3840
cgggtactat	ttccgtggaa	cgtggcaaac	gtgaagaaaa	cgacaigtig	atccctaaac	3900
aggtgatcat	cgcgaaccgt	agccgtccgc	gcattgctcc	aggtctgtaa	gttgacggta	3960
aaagcgtgct	gaccagcgat	gaggcgtcgc	aaatggagga	gttgcccgag	agcatcatca	4020
ttgtagggtg	cggcgtcatt	ggcattgagt	gggcgagcat	gctgcatgat	tttggcgtea	4080
aagtcactgt	gatcgagtac	gccgaccgta	ttctgccgac	ggaggatttg	gagatttcca	4140
aagaaatgga	aagcctgctg	aaaaagaaag	gtatccaatt	cattaccggt	gctaagggtc	4200
tgccggacac	gatgaccaaa	actagcgacg	atatcagcat	tcaagcagaa	aaagatggcg	4260
aaacggctac	ctacagcgcg	gagaaaatgt	tggtagcat	cggctcgtcag	gcgaatatcg	4320
agggtaattg	tctggaaaac	accgacattg	ttaccgagaa	tggtatgata	tccgtcaacg	4380
agagctgccca	aacgaaagag	tgcacacatc	atgccatcgg	tgacgtcacc	gggtggccgc	4440
aatggcccca	cgtcgcaagc	catgagggtta	tcattgcagc	agaacatttc	gccggtctga	4500
atccgcaccc	gctggaccgg	actctgggtc	ctaagtgtat	ctactccagc	ccggaagccg	4560
ctagcgtagg	tctgaccgaa	gatgaggcta	aggcgaatgg	ccacaacgtc	aagattggca	4620
agttcccggt	tatggetatt	ggtaaggcgc	tgggtgtaig	cagagcgac	ggttttctga	4680
agattgtagc	tgategtgat	accgacgata	ttctgggtgt	gcacatgata	ggtccgcacg	4740
tgaccgacat	gattagcgaa	gcaggctctg	ccaaagtact	ggacgcgacc	ccgtgggaag	4800

[0033]

taggccagac caitcacccg catcctacgc tgagcgaagc gattggtgag gcggcattgg	4860
ccgcagacgg taaagctatc cacttctaag agctcgtcga ccaactgtata acattaagaa	4920
ggaggtaaaa aaaatgagca aggcgaaaat cacggcaatc ggcacctacg caccaagccg	4980
tctcttgacc aatgcggatc tggagaagat tgttgacacc tetgatgaat ggatcgttca	5040
acgtacgggt atgcgtgaac gtctgtattgc cgacgaacat cagttcacgt ctgatctgtg	5100
catcgaagcc gtttaagaacc tgaanaagcc ttacaaaggc acgttgatg acgttgacat	5160
gatactggtt gcaaccacga cctctgacta tctttttccg agcacccgtt gtctgtgca	5220
ggagtatttc ggctgggaat ccaactggtc gctggatata aatgccacct gtgcgggtct	5280
gacctacggt ctgcacctgg ccaatggcct gattaccagc ggctgcacg aaaagattct	5340
ggttatttgc ggcgaaacgc tgagcaaagt taccgattac accgatcgca cgacctgcgt	5400
tttgttttgc gacgcagcgg gtgcactgct ggttgagcgc gatgaggaaa cgccaggttt	5460
cctggcgagc gtccagggca ctacgggtaa cgggtgtgac atcctgtacc gtgcaggctt	5520
gcgtaacgag attaacgggtg tgcagctggt ggctctggc aagatggtgc aaaatggccg	5580
tgaggtttac aagtggtctg cgcgcactgt tccggcgag ttcgagcgcc tgcgcacaa	5640
agcaggtctg agcagcgacg atctggactg gtttgtgcc cacagcgcca acctgcgtat	5700
gatcgagagc atctcgaaa agacgcggtt cccaatcgaa aagaccttga cgagcgtgga	5760
gcattacggt aataccagct ccgtgtctat tctctggcg ctggacttgg cagtgaaggc	5820
aggeaaactg aaaaaggatc agatcgttct gctgtttggc ttcggtggtg gcttgacct	5880
cacgggcctg ctgatcaaat ggggtatgta atgagtcgac gcggccgcgc ggccgcataa	5940
tgtttaagtc gaacagaaag taatcgtatt gtacacggcc gcataatcga aattaatacg	6000
actactata ggggaattgt gagcgataa caattcccca tcttagtata ttagttaagt	6060
ataagaagga gatatacata tggcagatct caattggata tcggccggcc acgcgatcgc	6120
tgactcgggt accctcgagt ctggtaaaga aaecgtgct gcgaaatttg aacgccagca	6180
catggactcg tctactagcg cagcttaatt aacctaggct gctgcaccg ctgagcaata	6240
actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg ggttttttgc tgaaaggagg	6300
aactatatac ggattggcga atgggacgcg cctgttagcg gcgcattaag cgcggcgggt	6360
glggtggtta cgcgcagcgt gaccgttaca ctlgccagcg ccttagcgcc cgtctcttcc	6420
gctttcttcc ctctcttctc cgccacgttc gccgcttcc cccgtcaagc tctaaatcgg	6480
gggctccctt tagggttccg atttagtget ttaeggcacc tcgaccccaa aaacttgat	6540
taggggtatg gtacacgtag tgggccaatc cctgataga cggtttttgc ccccttgacg	6600
ttggagtcca cgttctttta tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaacct	6660
atctcggctc attcttttga ttataaagg attttgccga ttteggccta ttggttaaaa	6720
aatgagctga ttttaaaaa atttaacgcg aattttaaca aatatattaac gtttacaatt	6780
tctggcgcca cgatggcatg agattatcaa aaaggatctt cacttagatc cttttaaatt	6840
aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc	6900
aatgcttaat cagttaggca cctatctcag egatctgtct atttegttca tccatagtgg	6960
cctgactccc cgtctgttag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg	7020
ctgcaatgat accgcgagac ccacgtcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc	7080

[0034]

cagccggaag ggccgagcgc agaagtggc cfcgaacttt atccgcctcc atccagtccta	7140
ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gtccgccagt taatagtgtg cgcaacgttg	7200
ttgccattgc tacaggcacc ggggtgtcac gctcgtcgtt tggtaiggtt tcattcagct	7260
ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccct gttgtgcaaa aaagcggtta	7320
gctccttcgg tcttcgacc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtaa tcactcatgg	7380
ttatggcagc acfgcataat tctcttactg tcatgccacc cgtagaatgc tttctgtga	7440
ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt	7500
gcccgcgctc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca	7560
ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgtgttg agatccagtt	7620
cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat ctccagcacc ttttactttc accagcgttt	7680
ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga	7740
aatgttgaat actcactc tctctttt aatcatgatt gaagcattta tcagggttat	7800
tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggtcatgac	7860
caaaatccct taacgtgagt ttctgttcca cfcagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa	7920
aggatcttct tgagatcctt ttttctgcg cgtaatctgc tgettgcata caaaaaaac	7980
accgtacca gcgggtggtt gtttgcggga tcaagagcta ccaactctt ttcgaaggt	8040
aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtacc cgtagttagg	8100
ccaacccttc aagaactctg tagcacgcgc tacatacctc gctctgctaa tctgttaacc	8160
agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt	8220
accggataag gcgcagcggg cgggtgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga	8280
gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gccccagct	8340
tcccgaagg agaaaggcgg acaggtatcc ggttaagcgc aggttcgga caggagagcg	8400
cacgagggag ctccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtccgtcgc ggtttcgcca	8460
cctctgactt gagcgtcgat tttgtgatg ctctcaggg ggccggagcc tatgaaaaa	8520
cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccctttgc tggcctttg ctcacatggt	8580
cttctctgcg ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgctttg agtgagctga	8640
taccgctgc cgcagccgaa cgaccgagc cagcgagica gtcagcagg aagcgggaaga	8700
gcgcctgatg cggatattt tcttaccga tctgtcgggt atttcacacc gcataatatg	8760
tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat	8820
cgtacgtgta ctgggtcatg gtgcgcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgccct	8880
gacgggcttg tctgtcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct	8940
gcatgtgtca gaggttttca cgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct	9000
catcagcgtg gtctgaagc gattcacaga tctctgctg ttcattccgcg tccagctcgt	9060
tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaaggcgg	9120
tttttctctg ttgtgtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa	9180
tgataccgat gaaacgagag aggatgtca cgatacgggt tactgatgat gaacatcccc	9240
ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa	9300
aatcactca ggttcaatgc cagcgtctcg ttaatacaga ttaggtgtt ccacagggt	9360

[0035]

```

gccagcagca tctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg 9420
tttcagact ttacgaaaca cggaaccga agaccattca tgttgttget caggtcgcag 9480
acgtttttgca gcagcagtcg cttaecgttc gctcgcttat cgggtattca ttctgctaac 9540
cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcagc atcatgctag 9600
tcatgccccg cgcccaccgg aaggagctga ctgggttgaa ggctctcaag ggcatcggtc 9660
gagatccccg tgcctaata gtagagctaac ttacattaat tgcgttcgc tcactgcccc 9720
ctttccagtc gggaaacctg tctgtccagc tgcattaatg aatcgccaa cgcgcgggga 9780
gaggcggttt gcgtattggg cgccagggtg gtttttctt tcaccagtga gacgggcaac 9840
agctgattgc ccttcaccgc ctggccctga gagagtigca gcaagcggtc cagctgggtt 9900
tgccccagca ggcgaaaatc ctgtttgatg gtggttaacg ggggatata acatgagctg 9960
tcttcgggat cgtcgtatcc cactaccgag atgtccgcac caacgcgcag cccggaetcg 10020
gtaatggcgc gcatigccc cagcggcctc tgatcgttgg caaccagcat cgcagtggga 10080
acgatgccct catfcagcat ttgcatggtt tgttgaaaac cggacatggt actccagtcg 10140
ccttccggtt ccgtatcgg ctgaatttga ttgcagtgga gataattatg ccagccagcc 10200
agacgcagac gcgccgagac agaacttaac gggcccgcta acagcgcat ttgttggtga 10260
cccaatgcga ccagatgctc cagcggcagt cgcgtaccgt cttcatggga gaaaataata 10320
ctgttgatgg gtgtctggtc agagacatca agaaataacg ccggaacatt agtgcaggca 10380
gtttccacag caatggcctc ctggctatcc agcggatagt taatgatcag cccactgacg 10440
cgttgcgcga gaagattgtg caccgcctt ttacaggctt cgacgccgt tcgttctacc 10500
atcgacacca ccacgttggc acccagtiga tcggcgcgag atttaatgc cgcgacaatt 10560
tgcgacggcg cgtgcaggcg cagactggag gtggcaacgc caatcagcaa cgactgtttg 10620
cccgcagtt gttgtgccac gcggttggga atgtaattca gctccgcat cggcgcttcc 10680
actttttccc gctttttcgc agaaacgtgg ctggcctggt tcaccacgcg ggaaacggtc 10740
tgataagaga caccggcata ctctgcgaca tcgtataacg ttactggttt cacattcacc 10800
accctgaatt gactctcttc cgggcgctat catgccatcc cgcgaaaggt tttgcgcat 10860
tcgatggtgt ccgggatctc gacgtctctc ctatgcgac tectgcatta ggaagcagcc 10920
cagtagtagg ttgagggcgt tgagcaccgc cggcgcaagg aatgggtcat gcaaggagat 10980
ggcgcccaac agtcccccg ccaeggggce tgccaccata cccacgcga aacaagcgt 11040
catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc cccatcggtg atgtcgcgca tataggcgcc 11100
agcaaccgca cctgtggcgc cggatgatgc gccacgatg cgtccggcgt agaggatcga 11160
gatcgatctc gatccgcga aattaatacg actcactata 11200

```

<210> 26
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物序列

<400> 26
 catatgcagc agcttacaga ccaat

25

[0036]

<210> 27
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物序列

<400> 27
 ctcgagttaa gcacctatga gtcgtagg

29

<210> 28
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> 哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)

<400> 28

Met Glu Lys His Leu Pro Leu Ile Val Asn Gly Gln Ile Ile Ser Thr
 1 5 10 15

Glu Glu Asn Arg Phe Glu Ile Ser Phe Glu Glu Lys Lys Val Lys Ile
 20 25 30

Asp Ser Phe Asn Asn Leu His Leu Thr Gln Met Val Asn His Asp Tyr
 35 40 45

Leu Asn Asp Leu Asn Ile Asn Asn Ile Ile Asn Phe Leu Tyr Thr Thr
 50 55 60

Gly Gln Arg Trp Lys Ser Glu Glu Tyr Ser Arg Arg Arg Ala Tyr Ile
 65 70 75 80

Arg Ser Leu Ile Thr Tyr Leu Gly Tyr Ser Pro Gln Met Ala Lys Leu
 85 90 95

Glu Ala Asn Trp Ile Ala Met Ile Leu Cys Ser Lys Ser Ala Leu Tyr
 100 105 110

Asp Ile Ile Asp Thr Glu Leu Gly Ser Thr His Ile Gln Asp Glu Trp
 115 120 125

Leu Pro Gln Gly Glu Cys Tyr Val Arg Ala Phe Pro Lys Gly Arg Thr
 130 135 140

Met His Leu Leu Ala Gly Asn Val Pro Leu Ser Gly Val Thr Ser Ile
 145 150 155 160

Leu Arg Gly Ile Leu Thr Arg Asn Gln Cys Ile Val Arg Met Ser Ala
 165 170 175

Ser Asp Pro Phe Thr Ala His Ala Leu Ala Met Ser Phe Ile Asp Val
 180 185 190

Asp Pro Asn His Pro Ile Ser Arg Ser Ile Ser Val Leu Tyr Trp Pro
 195 200 205

His Ala Ser Asp Thr Thr Leu Ala Glu Glu Leu Leu Ser His Met Asp
 210 215 220

Ala Val Val Ala Trp Gly Gly Arg Asp Ala Ile Asp Trp Ala Val Lys

[0037]

225	230	235	240
His Ser Pro Ser His	Ile Asp Val Leu Lys Phe Gly Pro Lys Lys Ser		
245	250	255	
Phe Thr Val Leu Asp His Pro Ala Asp Leu Glu Glu Ala Ala Ser Gly			
260	265	270	
Val Ala His Asp Ile Cys Phe Tyr Asp Gln Asn Ala Cys Phe Ser Thr			
275	280	285	
Gln Asn Ile Tyr Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Glu Glu Phe Lys Leu Lys			
290	295	300	
Leu Val Glu Lys Leu Asn Leu Tyr Gln Glu Val Leu Pro Lys Ser Lys			
305	310	315	320
Gln Ser Phe Asp Asp Glu Ala Leu Phe Ser Met Thr Arg Leu Glu Cys			
325	330	335	
Gln Phe Ser Gly Leu Lys Val Ile Ser Glu Pro Glu Asn Asn Trp Met			
340	345	350	
Ile Ile Glu Ser Glu Pro Gly Val Glu Tyr Asn His Pro Leu Ser Arg			
355	360	365	
Cys Val Tyr Val His Lys Ile Asn Lys Val Asp Asp Val Val Gln Tyr			
370	375	380	
Ile Glu Lys His Gln Thr Gln Thr Ile Ser Phe Tyr Pro Trp Glu Ser			
385	390	395	400
Ser Lys Lys Tyr Arg Asp Ala Phe Ala Ala Lys Gly Val Glu Arg Ile			
405	410	415	
Val Glu Ser Gly Met Asn Asn Ile Phe Arg Ala Gly Gly Ala His Asp			
420	425	430	
Ala Met Arg Pro Leu Gln Arg Leu Val Arg Phe Val Ser His Glu Arg			
435	440	445	
Pro Tyr Asn Phe Thr Thr Lys Asp Val Ser Val Glu Ile Glu Gln Thr			
450	455	460	
Arg Phe Leu Glu Glu Asp Lys Phe Leu Val Phe Val Pro			
465	470	475	
<210> 29			
<211> 479			
<212> PRT			
<213> 费希尔弧菌 (Vibrio fischeri)			
<400> 29			
Met Ile Lys Cys Ile Pro Met Ile Ile Lys Gly Val Val Gln Asp Phe			
1	5	10	15
Asp Asn Asn Ala Cys Lys Glu Ile Asn Leu Asp Ser Gly Asn Lys Ile			
20	25	30	

[0038]

Lys Leu Ser Leu Leu Thr Glu Asp Ser Val Leu Arg Ser Leu Asn Ser
 35 40 45
 Lys Glu Lys Val Asp Leu Asn Leu Asn Gln Ile Val Asn Phe Leu Tyr
 50 55 60
 Thr Val Gly Gln Arg Trp Lys Asn Glu Glu Tyr Asn Arg Arg Arg Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Arg Glu Leu Lys Lys Tyr Leu Gly Tyr Ser Asp Glu Met Ala
 85 90 95
 Arg Leu Glu Ala Asn Trp Ile Ala Met Leu Leu Cys Ser Lys Ser Ala
 100 105 110
 Leu Tyr Asp Ile Val Asn Tyr Asp Leu Gly Ser Ile His Val Leu Asp
 115 120 125
 Glu Trp Leu Pro Arg Gly Asp Cys Tyr Val Lys Ala Gln Ala Lys Gly
 130 135 140
 Val Ser Ile His Leu Leu Ala Gly Asn Val Pro Leu Ser Gly Val Thr
 145 150 155 160
 Ser Ile Leu Arg Ala Ile Leu Thr Lys Asn Glu Cys Ile Ile Lys Thr
 165 170 175
 Ser Ser Ser Asp Pro Phe Thr Ala Thr Ala Leu Ala Ser Ser Phe Ile
 180 185 190
 Asp Val Asn Ala Glu His Pro Ile Thr Lys Ser Met Ser Val Met Tyr
 195 200 205
 Trp Pro His Asn Glu Asp Met Thr Leu Pro Gln Arg Ile Met Asn His
 210 215 220
 Ala Asp Ile Val Ile Ala Trp Gly Gly Glu Glu Ala Ile Lys Trp Ala
 225 230 235 240
 Ala Lys His Ser Pro Pro His Ala Asp Val Leu Lys Phe Gly Pro Lys
 245 250 255
 Lys Ser Leu Ser Ile Ile Glu Glu Pro Glu Asp Met Glu Glu Ala Ala
 260 265 270
 Met Gly Val Ala His Asp Ile Cys Phe Tyr Asp Gln Gln Ala Cys Phe
 275 280 285
 Ser Thr Gln Asp Val Tyr Tyr Ile Gly Glu His Leu Pro Leu Phe Leu
 290 295 300
 Ser Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asp Arg Tyr Ala Lys Ile Leu Pro Lys
 305 310 315 320
 Gly Leu Lys Asn Phe Asp Glu Lys Ala Ala Phe Ser Leu Thr Glu Arg
 325 330 335

[0039]

Glu Gly Ile Phe Ala Gly Tyr Asp Val Lys Lys Gly Asp Asn Gln Ala
 340 345 350
 Trp Leu Met Ile Ile Ser Pro Thr Asn Ser Ser Gly Asn Gln Pro Leu
 355 360 365
 Ser Arg Ser Val Tyr Ile His Gln Val Ser Asp Ile Asn Glu Val Leu
 370 375 380
 Pro Phe Val Asn Lys Asn Ser Thr Gln Thr Val Ser Ile Tyr Pro Trp
 385 390 395 400
 Glu Ala Ser Leu Lys Tyr Arg Asp Lys Leu Ala Met Ser Gly Ala Glu
 405 410 415
 Arg Ile Val Glu Ser Gly Met Asn Asn Ile Phe Arg Val Gly Gly Ala
 420 425 430
 His Asp Ser Leu Ser Pro Leu Gln Tyr Leu Val Arg Phe Thr Ser His
 435 440 445
 Glu Arg Pro Phe His Tyr Thr Thr Lys Asp Val Ala Val Glu Ile Glu
 450 455 460
 Gln Thr Arg Tyr Leu Glu Glu Asp Lys Phe Leu Val Phe Val Pro
 465 470 475
 <210> 30
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> 哈氏弧菌 (Vibrio harveyi)
 <400> 30
 Met Asn Asn Gln Cys Lys Thr Ile Ala His Val Leu Arg Val Asn Asn
 1 5 10 15
 Gly Gln Glu Leu His Val Trp Glu Thr Pro Pro Lys Glu Asn Val Pro
 20 25 30
 Ser Lys Asn Asn Thr Ile Leu Ile Ala Ser Gly Phe Ala Arg Arg Met
 35 40 45
 Asp His Phe Ala Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Ser Glu Asn Gly Phe His
 50 55 60
 Val Phe Arg Tyr Asp Ser Leu His His Val Gly Leu Ser Ser Gly Ser
 65 70 75 80
 Ile Asp Glu Phe Thr Met Thr Thr Gly Lys Asn Ser Leu Cys Thr Val
 85 90 95
 Tyr His Trp Leu Gln Thr Lys Gly Thr Gln Asn Ile Gly Leu Ile Ala
 100 105 110
 Ala Ser Leu Ser Ala Arg Val Ala Tyr Glu Val Ile Ser Asp Leu Glu
 115 120 125

[0040]

Leu Ser Phe Leu Ile Thr Ala Val Gly Val Val Asn Leu Arg Asp Thr
 130 135 140
 Leu Glu Lys Ala Leu Gly Phe Asp Tyr Leu Ser Leu Pro Ile Asp Glu
 145 150 155 160
 Leu Pro Asn Asp Leu Asp Phe Glu Gly His Lys Leu Gly Ser Glu Val
 165 170 175
 Phe Val Arg Asp Cys Phe Glu His His Trp Asp Thr Leu Asp Ser Thr
 180 185 190
 Leu Asp Lys Val Ala Asn Thr Ser Val Pro Leu Ile Ala Phe Thr Ala
 195 200 205
 Asn Asn Asp Asp Trp Val Lys Gln Glu Glu Val Tyr Asp Met Leu Ala
 210 215 220
 His Ile Arg Thr Gly His Cys Lys Leu Tyr Ser Leu Leu Gly Ser Ser
 225 230 235 240
 His Asp Leu Gly Glu Asn Leu Val Val Leu Arg Asn Phe Tyr Gln Ser
 245 250 255
 Val Thr Lys Ala Ala Ile Ala Met Asp Gly Gly Ser Leu Glu Ile Asp
 260 265 270
 Val Asp Phe Ile Glu Pro Asp Phe Glu Gln Leu Thr Ile Ala Thr Val
 275 280 285
 Asn Glu Arg Arg Leu Lys Ala Glu Ile Glu Ser Arg Thr Pro Glu Met
 290 295 300
 Ala
 305
 <210> 31
 <211> 307
 <212> PRT
 <213> 费希尔弧菌 (*Vibrio fischeri*)
 <400> 31
 Met Lys Asp Glu Ser Ala Leu Phe Thr Ile Asp His Ile Ile Lys Leu
 1 5 10 15
 Asp Asn Gly Gln Ser Ile Arg Val Trp Glu Thr Leu Pro Lys Lys Asn
 20 25 30
 Val Pro Glu Lys Lys Asn Thr Ile Leu Ile Ala Ser Gly Phe Ala Arg
 35 40 45
 Arg Met Asp His Phe Ala Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Ser Thr Asn Gly
 50 55 60
 Phe His Val Ile Arg Tyr Asp Ser Leu His His Val Gly Leu Ser Ser
 65 70 75 80

[0041]

Gly Cys Ile Asn Glu Phe Thr Met Ser Ile Gly Lys Asn Ser Leu Leu
 85 90 95
 Thr Val Val Asp Trp Leu Thr Asp His Gly Val Glu Arg Ile Gly Leu
 100 105 110
 Ile Ala Ala Ser Leu Ser Ala Arg Ile Ala Tyr Glu Val Val Asn Lys
 115 120 125
 Ile Lys Leu Ser Phe Leu Ile Thr Ala Val Gly Val Val Asn Leu Arg
 130 135 140
 Asp Thr Leu Glu Lys Ala Leu Glu Tyr Asp Tyr Leu Gln Leu Pro Ile
 145 150 155 160
 Ser Glu Leu Pro Glu Asp Leu Asp Phe Glu Gly His Asn Leu Gly Ser
 165 170 175
 Glu Val Phe Val Thr Asp Cys Phe Lys His Asp Trp Asp Thr Leu Asp
 180 185 190
 Ser Thr Leu Asn Ser Val Lys Gly Leu Ala Ile Pro Phe Ile Ala Phe
 195 200 205
 Thr Ala Asn Asp Asp Ser Trp Val Lys Gln Ser Glu Val Ile Glu Leu
 210 215 220
 Ile Asp Ser Ile Glu Ser Ser Asn Cys Lys Leu Tyr Ser Leu Ile Gly
 225 230 235 240
 Ser Ser His Asp Leu Gly Glu Asn Leu Val Val Leu Arg Asn Phe Tyr
 245 250 255
 Gln Ser Val Thr Lys Ala Ala Leu Ala Leu Asp Asp Gly Leu Leu Asp
 260 265 270
 Leu Glu Ile Asp Ile Ile Glu Pro Arg Phe Glu Asp Val Thr Ser Ile
 275 280 285
 Thr Val Lys Glu Arg Arg Leu Lys Asn Glu Ile Glu Asn Glu Leu Leu
 290 295 300
 Glu Leu Ala
 305
 <210> 32
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> 哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)
 <400> 32
 Met Asp Val Leu Ser Ala Val Lys Gln Glu Asn Ile Ala Ala Ser Thr
 1 5 10 15
 Glu Ile Asp Asp Leu Ile Phe Met Gly Thr Pro Gln Gln Trp Ser Leu
 20 25 30
 Gln Glu Gln Lys Gln Leu Thr Ser Arg Leu Val Lys Gly Ala Tyr Gln

[0042]

35	40	45
Tyr His Tyr His Asn Asn Asp Asp Tyr Arg Gln Phe Cys Glu Arg Leu 50 55 60		
Gly Val Gly Glu Val Val Glu Asp Leu Asn Asp Ile Pro Val Phe Pro 65 70 75 80		
Thr Ser Ile Phe Lys Leu Lys Thr Leu Leu Thr Leu Asp Asp Asp Glu 85 90 95		
Val Glu Asn Arg Phe Thr Ser Ser Gly Thr Ser Gly Ile Lys Ser Ile 100 105 110		
Val Ala Arg Asp Arg Leu Ser Ile Glu Arg Leu Leu Gly Ser Val Asn 115 120 125		
Phe Gly Met Asn Tyr Val Gly Asp Trp Phe Asp His Gln Met Glu Leu 130 135 140		
Val Asn Leu Gly Pro Asp Arg Phe Asn Ala Asn Asn Ile Trp Phe Lys 145 150 155 160		
Tyr Val Met Ser Leu Val Glu Leu Leu Tyr Pro Thr Ala Phe Thr Val 165 170 175		
Thr Glu Asp Glu Ile Asp Phe Glu Ala Thr Leu Ala Asn Met Asn Arg 180 185 190		
Ile Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Cys Leu Ile Gly Pro Pro Tyr Phe 195 200 205		
Ile Tyr Leu Leu Cys Cys Phe Met Arg Glu Gln Gly Gln Thr Phe Asn 210 215 220		
Gly Gly Arg Asp Leu Tyr Ile Ile Thr Gly Gly Gly Trp Lys Lys His 225 230 235 240		
Gln Asp Gln Ser Leu Asp Arg Asp Glu Phe Asn Gln Leu Leu Cys Glu 245 250 255		
Thr Phe Thr Leu Glu Ser Pro Glu Gln Ile Arg Asp Thr Phe Asn Gln 260 265 270		
Val Glu Leu Asn Thr Cys Phe Phe Glu Asp Thr Glu His Lys Lys Arg 275 280 285		
Val Pro Pro Trp Val Phe Ala Arg Ala Leu Asp Pro Lys Thr Leu Lys 290 295 300		
Pro Leu Pro His Gly Gln Pro Gly Leu Met Ser Tyr Met Asp Ala Ser 305 310 315 320		
Ala Val Ser Tyr Pro Cys Phe Leu Val Thr Asp Asp Ile Gly Ile Val 325 330 335		
Arg Glu Glu Glu Gly Asp Arg Pro Gly Thr Thr Val Glu Ile Val Arg		

[0043]

	340		345		350
Arg Val Lys Thr Arg Gly Met Lys Gly Cys Ala Leu Ser Met Ser Gln					
	355		360		365
Ala Phe Thr Ala Lys Ser Glu Gly Gly Asn					
	370		375		
<210>	33				
<211>	376				
<212>	PRT				
<213>	费希尔弧菌 (Vibrio fischeri)				
<400>	33				
Met Thr Asn His Ile Glu Tyr Lys Lys Asn Gln Ile Ile Ala Ser Ser					
1	5		10		15
Glu Ile Asp Asp Leu Ile Phe Met Ser Ala Pro Gln Glu Trp Ser Leu					
	20		25		30
Glu Glu Gln Lys Glu Ile Gln Asp Lys Leu Val Arg Glu Ala Phe His					
	35		40		45
Phe His Tyr Asn Arg Asn Glu Lys Tyr Arg Asn Tyr Cys Ile Ser Gln					
	50		55		60
His Ile Asn Glu Asn Leu His Ser Ile Asp Glu Ile Pro Val Phe Pro					
	65		70		75
Thr Ser Ile Phe Lys His Met Lys Phe His Thr Val Ser Met Gly Asp					
	85		90		95
Ile Glu Asn Trp His Thr Ser Ser Gly Thr Gln Gly Ile Lys Ser Cys					
	100		105		110
Ile Ala Arg Asp Arg Leu Ser Ile Glu Arg Leu Leu Gly Ser Val Asn					
	115		120		125
Phe Gly Met Lys Tyr Val Gly Asn Trp Phe Glu His Gln Met Glu Leu					
	130		135		140
Val Asn Leu Gly Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Asn Val Trp Phe Lys					
	145		150		155
Tyr Val Met Ser Leu Val Glu Leu Leu Tyr Pro Thr Val Phe Thr Val					
	165		170		175
Asn Asn Asp Lys Ile Asp Phe Glu Glu Thr Val Asn His Leu Tyr Arg					
	180		185		190
Ile Asn Asn Ser Asn Lys Asp Ile Cys Leu Ile Gly Pro Pro Phe Phe					
	195		200		205
Val Ser Leu Leu Cys Gln Tyr Met Lys Glu Asn Asn Ile Glu Phe Lys					
	210		215		220
Gly Glu Asn Arg Leu His Val Ile Thr Gly Gly Gly Trp Lys Ser Asn					
	225		230		235
					240

[0044]

Glu Asn Ser Ser Leu Asn Arg Gln Asp Phe Asn Gln Leu Ile Met Asp	
245	250 255
Thr Phe Gln Leu Asp Asn Val Asn Gln Ile Arg Asp Thr Phe Asn Gln	
260	265 270
Val Glu Leu Asn Thr Cys Phe Phe Glu Asp Glu Phe Gln Arg Lys His	
275	280 285
Val Pro Pro Trp Val Tyr Ala Arg Ala Leu Asp Pro Glu Thr Leu Lys	
290	295 300
Pro Val Ala Asp Gly Glu Leu Gly Leu Leu Ser Tyr Met Asp Ala Ser	
305	310 315 320
Ser Thr Ala Tyr Pro Ala Phe Ile Val Thr Asp Asp Ile Gly Ile Val	
325	330 335
Arg Glu Ile Arg Glu Pro Asp Pro Tyr Pro Gly Val Thr Val Glu Ile	
340	345 350
Val Arg Arg Leu Asn Thr Arg Ala Gln Lys Gly Cys Ala Leu Ser Met	
355	360 365
Ala Ser Phe Ile Gln Ser Thr Ile	
370	375

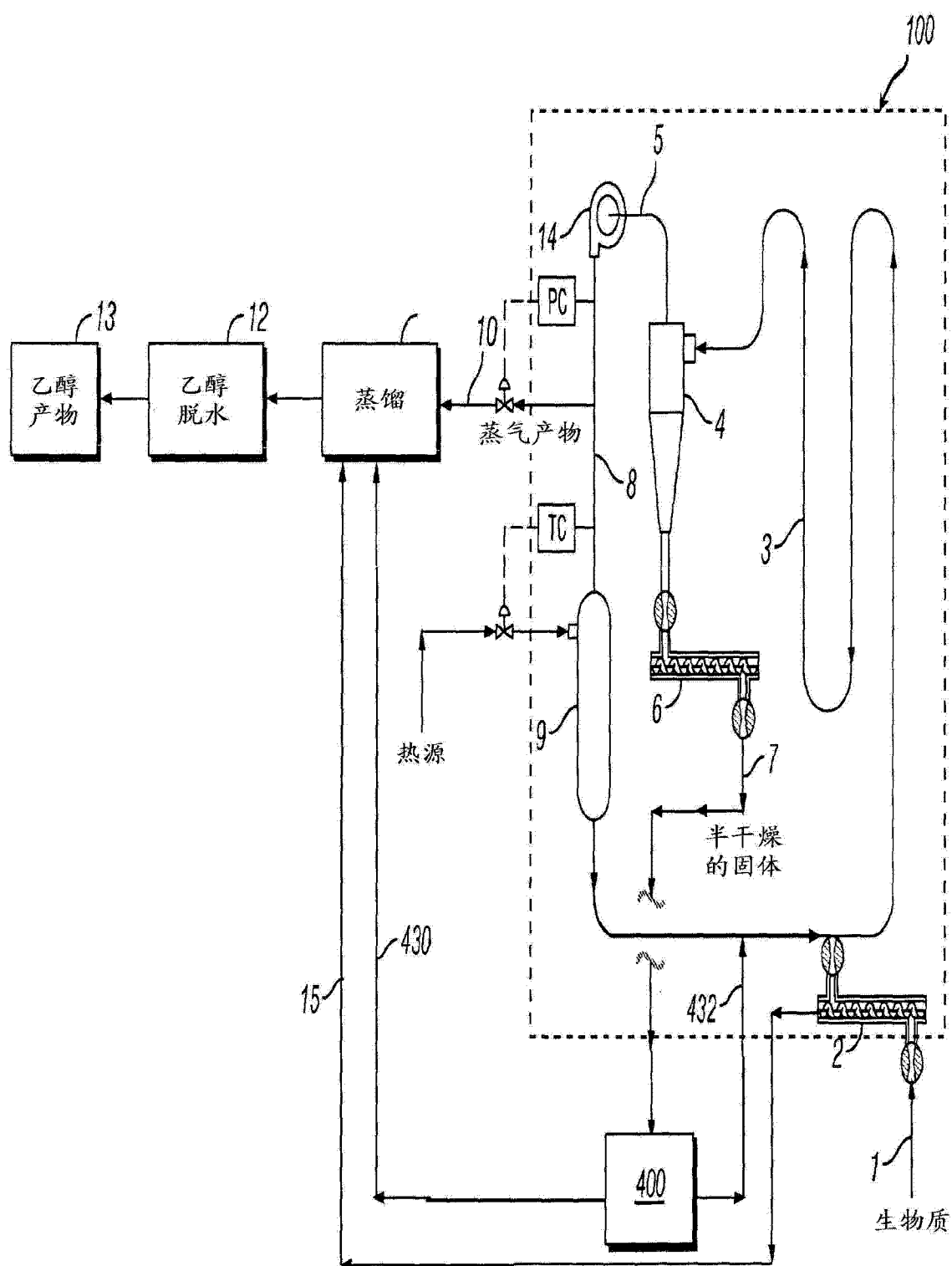


图 1

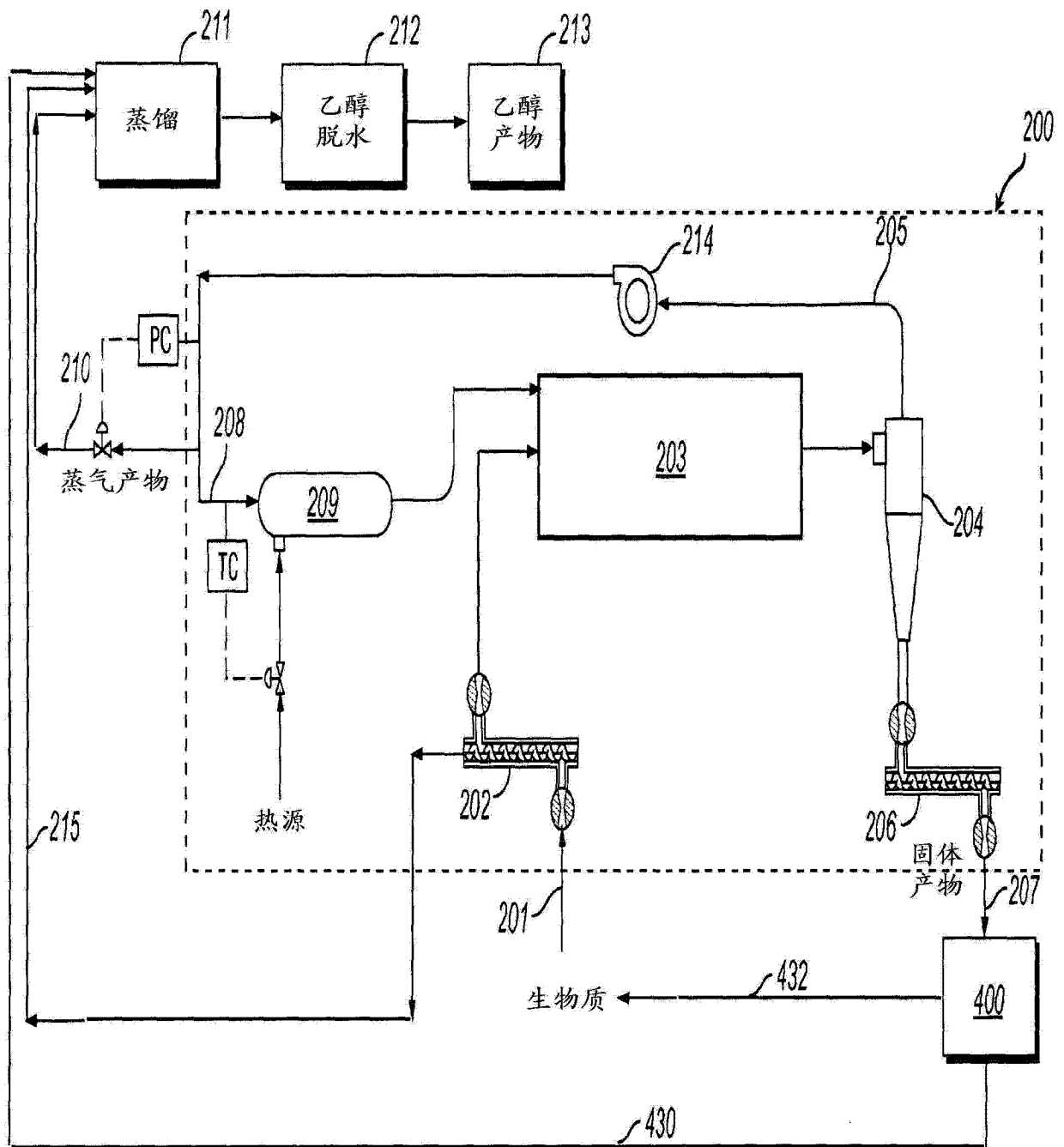


图 2

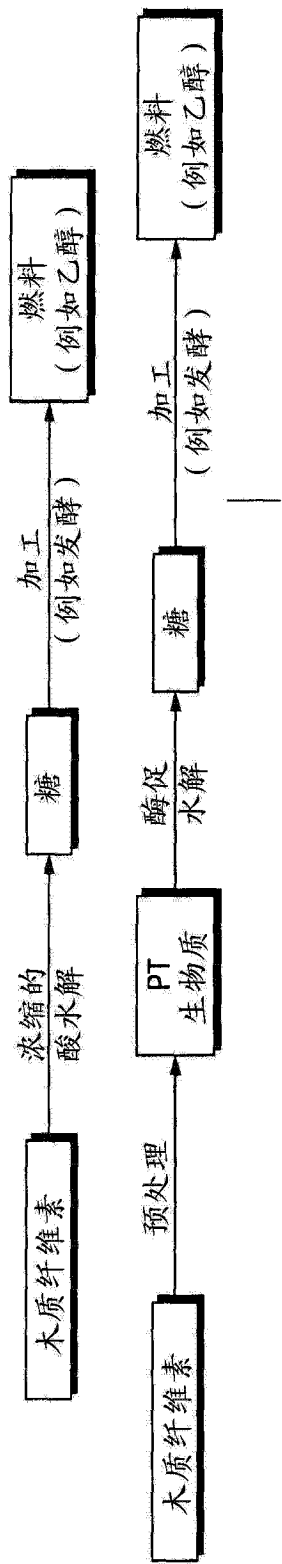


图 3

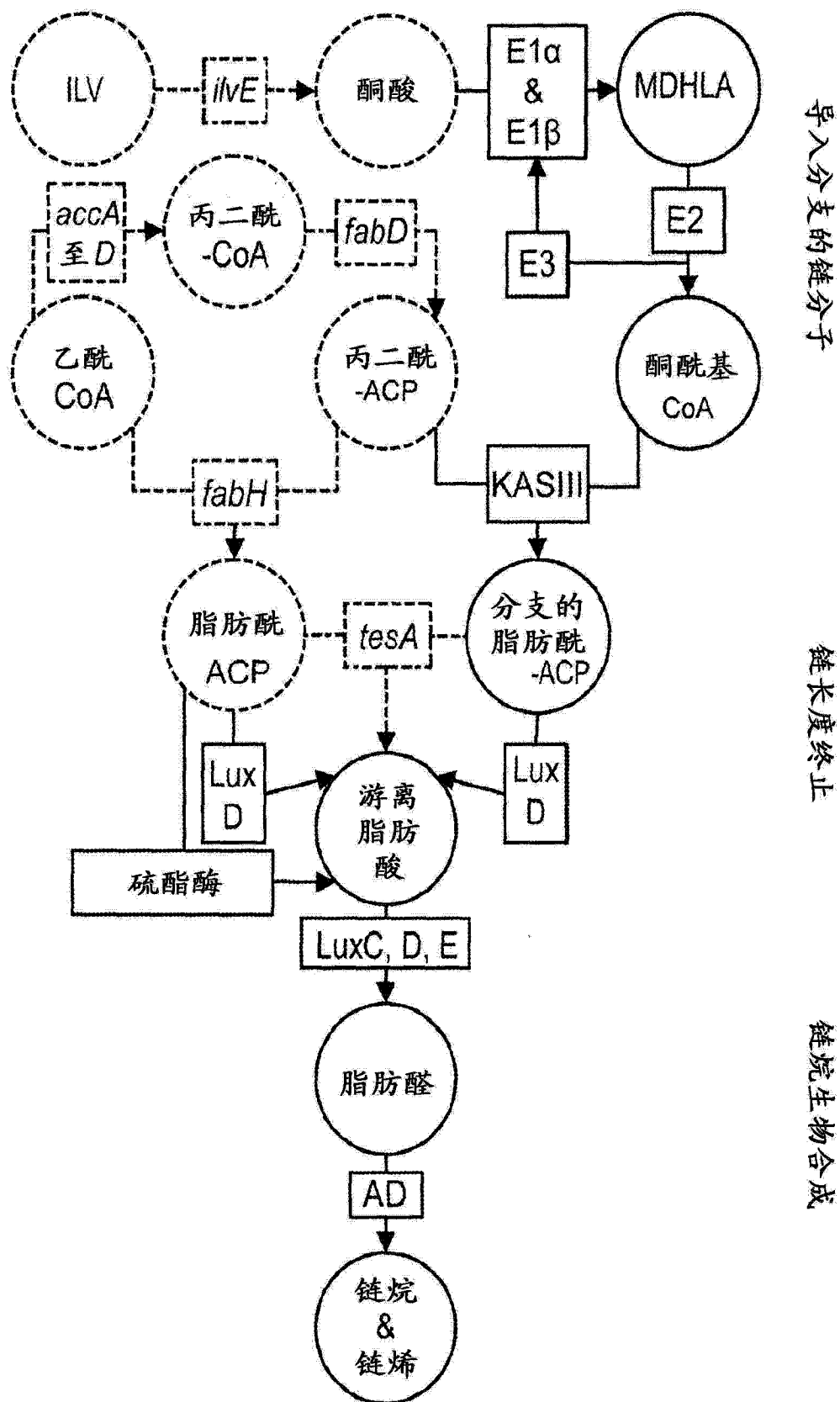


图 4

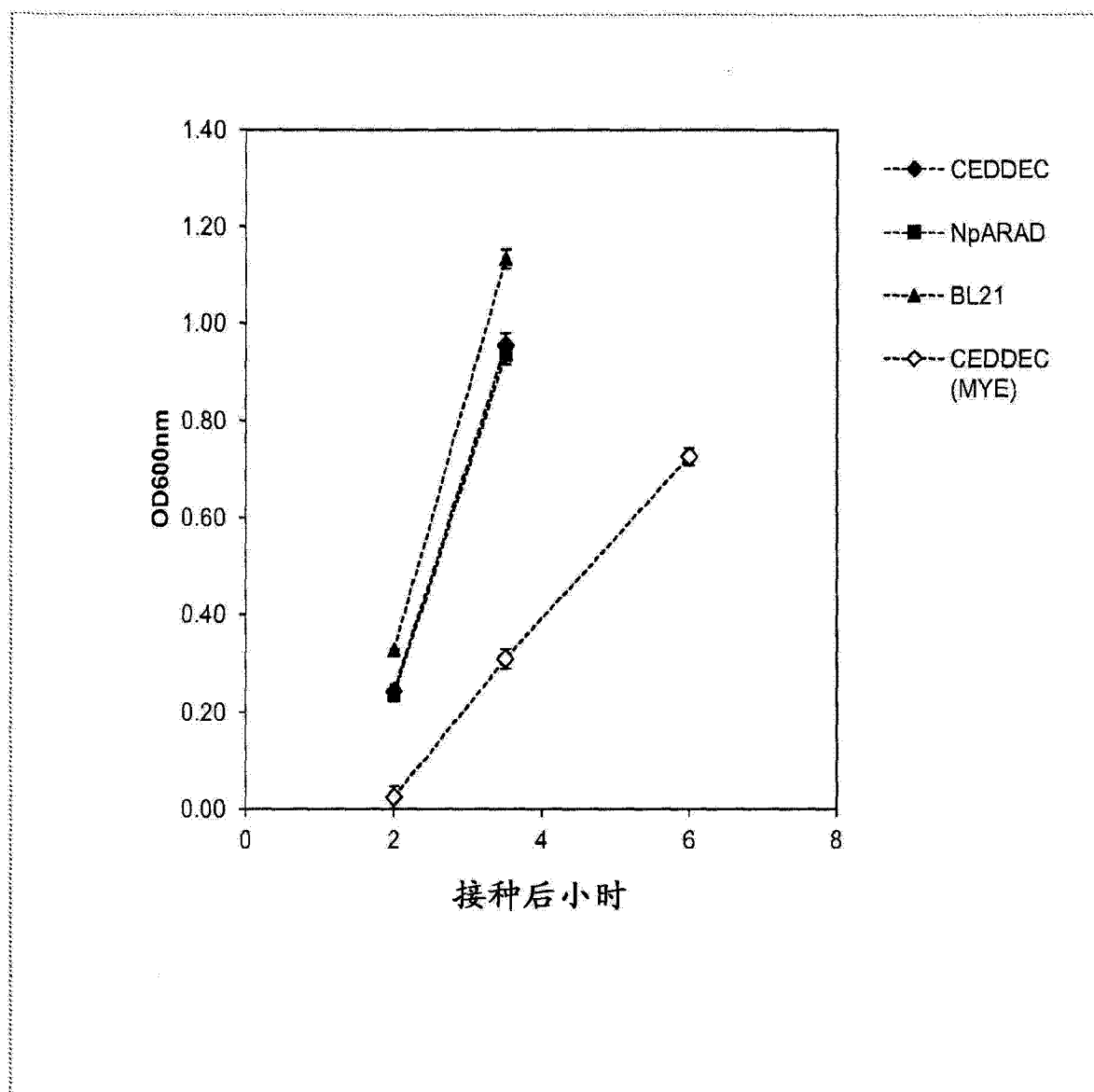


图 5