



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105555902 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 04

(21) 申请号 201480050700. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 09. 15

C09K 8/035(2006. 01)

(30) 优先权数据

C09K 8/68(2006. 01)

61/878, 224 2013. 09. 16 US

C09K 8/70(2006. 01)

61/916, 366 2013. 12. 16 US

C09K 8/88(2006. 01)

C09K 8/90(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

E21B 43/04(2006. 01)

2016. 03. 15

C09K 8/92(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/055668 2014. 09. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/039032 EN 2015. 03. 19

(71) 申请人 巴斯夫酶有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 C·波普 A·H·达文波特 Y·韩

M·J·普拉特 K·N·翁 B·张

D·任

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 张莉 黄革生

权利要求书4页 说明书28页

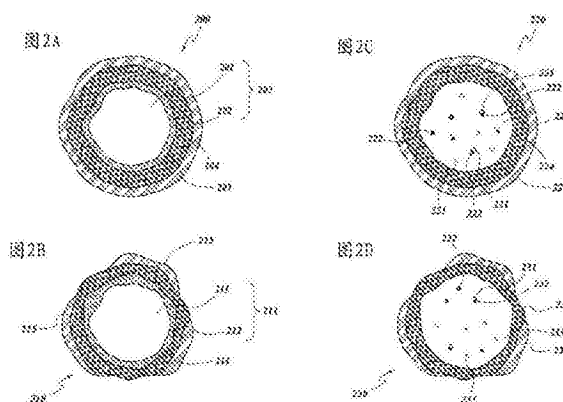
序列表19页 附图17页

(54) 发明名称

受控分解酶制剂

(57) 摘要

本发明涉及酶制剂和使用该酶制剂降低烃采收中使用的流体粘度的方法。一些实施方案提供了用于井处理的颗粒,其中所述颗粒包含共包封在壳体内的酸化剂载体和酶。所述颗粒可以,例如允许酶在高温、高压环境中延迟地或受控地释放。



1. 一种井处理颗粒,其包含
含酶核心,其中含酶核心包含酸化剂和酶;和
被配置为至少部分地包封含酶核心的壳体。
2. 根据权利要求1所述的颗粒,其中所述壳体允许酶自颗粒中受控地释放。
3. 根据权利要求1或2所述的颗粒,其中酸化剂为固体颗粒的形式,该酸化剂充当酶的载体。
4. 根据权利要求1至3任一项所述的颗粒,其中酶存在于含酶核心的外表面上。
5. 根据权利要求1至3任一项所述的颗粒,其中酶分散在含酶核心中。
6. 根据权利要求1至3任一项所述的颗粒,其中酶分散在含酶核心中和存在于含酶核心的外表面上。
7. 根据权利要求1至6任一项所述的颗粒,其中含酶核心包含粘合剂。
8. 根据权利要求7所述的颗粒,其中粘合剂包含聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、藻酸盐、聚乙二醇、蜡、黄原胶、聚乙酸乙烯、角叉菜胶、淀粉、麦芽糖糊精、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素、苯乙烯丙烯酸分散体或其任何组合。
9. 根据权利要求1至8任一项所述的颗粒,其中含酶核心包含惰性载体。
10. 根据权利要求9所述的颗粒,其中惰性载体包含纤维状和微晶纤维素、硫酸钠、氯化钠、磷酸二氢钙、磷酸氢钙、磷酸钙、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸钾、碳酸钙、硅藻土、沸石、淀粉或其任何组合。
11. 根据权利要求1至10任一项所述的颗粒,其中所述含酶核心包含稳定剂。
12. 根据权利要求11所述的颗粒,其中稳定剂包含甘露糖醇、海藻糖、山梨糖醇、木糖醇、蔗糖、微晶纤维素、淀粉、氯化钠、硫酸钠、硫酸铵或其任何组合。
13. 根据权利要求1至12任一项所述的颗粒,其中酸化剂包含轻度酸化无机盐
14. 根据权利要求13所述的颗粒,其中轻度酸化无机盐是硫酸铵、磷酸二氢钠、氯化铵、硫酸钠、硫酸钾、磷酸二氢钾、氯化镁、柠檬酸二氢铵、柠檬酸氢二铵、柠檬酸三铵、磷酸二氢铵、磷酸氢二铵、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、柠檬酸二氢钠、柠檬酸氢二钠、柠檬酸二氢钾、柠檬酸氢二钾、或其任何组合。
15. 根据权利要求1至12任一项所述的颗粒,其中酸化剂包含有机酸或其盐。
16. 根据权利要求15所述的颗粒,其中有机酸是柠檬酸、草酸、丙二酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、马来酸、天冬氨酸、异柠檬酸或其任何组合。
17. 根据权利要求1至12任一项所述的颗粒,其中所述酸化剂包含酯、内酯、聚酯、聚内酯或其任何组合。
18. 根据权利要求17所述的颗粒,其中所述酯是有机酸的酯。
19. 根据权利要求1至12任一项所述的颗粒,其中所述酸化剂包含聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、草酸二苯酯、聚羟基乙酸、聚对苯二甲酸乙二酯、聚己内酯或其任何组合。
20. 根据权利要求1至12任一项所述的颗粒,其中酸化剂包含一种或多种缓冲剂。
21. 根据权利要求20所述的颗粒,其中所述一种或多种缓冲剂中的至少一种是Tris-HCl缓冲剂、吗啉乙磺酸(MES)缓冲剂、吡啶、二甲基胍酸盐缓冲剂、二(2-羟乙基)氨基-三(羟甲基)甲烷(BIS-TRIS)缓冲剂、哌嗪-N,N'-二(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲剂、3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)缓冲剂、3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)缓冲剂、乙二胺四乙酸(EDTA)

缓冲剂、甘氨酸缓冲剂及其任何组合。

22. 根据权利要求1至21任一项所述的颗粒,其中所述壳体包含聚合物、均聚物、共聚物或其任何组合。

23. 根据权利要求1至22任一项所述的颗粒,其中所述壳体包含聚合物,所述聚合物包含选自以下的一种或多种单体:甲基丙烯酸、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酰胺、甲基丙烯腈、丙烯酸、丙烯酸酯、丙烯酰胺、丙烯腈和乙烯基单体。

24. 根据权利要求23所述的颗粒,其中乙烯基单体包含苯乙烯和 α 甲基苯乙烯。

25. 根据权利要求1至21任一项所述的颗粒,其中所述壳体包含乙基纤维素、丙烯酸树脂、塑料、甲基丙烯酸酯、丙烯酸酯、醋酸丙烯酸酯、聚偏二氯乙烯(PVDC)、硝酸纤维素、聚氨基甲酸酯、蜡、聚乙烯、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚酯、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚乳酸和聚羟基乙酸的共聚物、聚乙酸乙烯、乙酸乙烯-丙烯酸共聚物、藻酸盐、琼脂、苯乙烯-丙烯酸酯共聚物、苯乙烯/丙烯酸正丁酯共聚物、或其任何组合。

26. 根据权利要求1至25任一项所述的颗粒,其中至少一种酶是纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、黄原胶酶、甘露聚糖酶、半乳糖苷酶或淀粉酶。

27. 根据权利要求1至26任一项所述的颗粒,其中所述酶是热稳定酶或耐热酶。

28. 根据权利要求1至27任一项所述的颗粒,其中所述颗粒在壳体外面或在壳体下面包含一个或多个额外的包衣。

29. 根据权利要求28所述的颗粒,其中所述额外的包衣中的至少一个是聚合物保护性包衣。

30. 根据权利要求28所述的颗粒,其中所述额外的包衣中的至少一个是聚合物抛光包衣。

31. 根据权利要求1至30任一项所述的颗粒,其中按美国筛系列,所述颗粒大小为大约7目至大约60目。

32. 根据权利要求31所述的颗粒,其中按美国筛系列,所述颗粒大小为大约10目至大约20目。

33. 根据权利要求1至32任一项所述的颗粒,其中所述壳体基本上包封含酶核心。

34. 根据权利要求1至32任一项所述的颗粒,其中所述壳体包封整个含酶核心。

35. 根据权利要求1至34任一项所述的颗粒,其中颗粒被配置为降低并处理组合物的pH到阈值pH以下,其中在阈值pH或在阈值pH以上组合物可以复原。

36. 根据权利要求35所述的颗粒,其中阈值pH值是9.5。

37. 一种井处理组合物,其包含多数个如权利要求1至36任一项所述的颗粒。

38. 根据权利要求37所述的井处理组合物,其中所述组合物包含增稠剂和溶剂。

39. 根据权利要求38所述的井处理组合物,其中所述组合物还包含交联剂。

40. 根据权利要求37至39任一项所述的井处理组合物,其中所述组合物被配置为降低交联的井处理流体的pH到阈值pH以下,其中在阈值pH或在阈值pH以上所述流体可以复原。

41. 根据权利要求40所述的井处理组合物,其中所述的井处理流体是压裂液、砾石充填液、完井液、修井液、钻井液或其任何组合。

42. 根据权利要求40或41所述的井处理组合物,其中阈值pH值是9.5。

43. 一种处理地下地层的方法,所述方法包括:

使地下地层与井处理流体接触,其中,井处理流体包含多数个如权利要求1至36任一项所述的井处理颗粒、增稠剂和溶剂;和

允许酶降低井处理流体的粘度。

44.根据权利要求43所述的方法,其中酶降低井处理流体的粘度至少一个数量级。

45.根据权利要求43或44所述的方法,其中井处理流体是压裂液、砾石充填液、完井液、修井液、或钻井液或其任何组合。

46.根据权利要求43至45任一项所述的方法,其中井处理流体在无额外pH降低剂的情况下达成完全分解。

47.根据权利要求43至46任一项所述的方法,其中增稠剂包括瓜尔胶、取代的瓜尔胶、纤维素、衍生的纤维素、黄原胶、淀粉、多糖、明胶、聚合物、合成聚合物或其任何组合。

48.根据权利要求47所述的方法,其中取代的瓜尔胶是羟乙基瓜尔胶、羟丙基瓜尔胶、羧甲基羟乙基瓜尔胶、羧甲基羟丙基瓜尔胶(CMHPG),或衍生的纤维素是羧甲基纤维素、聚阴离子纤维素、羟乙基纤维素或其任何组合。

49.根据权利要求43至48任一项所述的方法,其中溶剂是水基的或基于有机物的。

50.根据权利要求49所述的方法,其中溶剂是淡水、海水、盐水、采出水、来自蓄水层的水、具有水溶性有机化合物的水或其任何组合。

51.一种制备井处理颗粒的方法,所述方法包括

使酶与固体酸化剂接触以形成含酶核心;和

用一个或多个壳体包封含酶核心以形成井处理颗粒,其中每个壳体都被配置为至少部分地包封含酶核心。

52.根据权利要求51所述的方法,其中接触步骤包括,通过无孔锅包衣工艺、锅包衣工艺、流化床包衣工艺、喷雾干燥工艺或其任何组合,使酶附着于固体酸化剂。

53.根据权利要求51所述的方法,其中接触步骤包括将包含酶的溶液喷雾到固体酸化剂上。

54.一种制备井处理颗粒的方法,所述方法包括

使酶与固体酸化剂混合以形成混合物;

将混合物造粒以形成含酶核心;和

用一个或多个壳体包封含酶核心以形成井处理颗粒,其中每个壳体都被配置为至少部分地包封含酶核心。

55.根据权利要求54所述的方法,所述方法还包括在用壳体包封含酶核心之前干燥含酶核心。

56.根据权利要求54或55所述的方法,其中混合物还包含粘合剂、稳定剂、惰性载体或其任何组合。

57.根据权利要求54至56任一项所述的方法,其中通过湿法造粒工艺,将混合物造粒以形成含酶核心。

58.根据权利要求57所述的方法,其中所述湿法造粒工艺包括挤出、离心挤出、滚圆、分批高剪切造粒、连续高剪切混合、盘式造粒、转鼓造粒、喷雾干燥、流化床团聚、流化床造粒和/或层式造粒、颗粒化或其任何组合。

59.根据权利要求58所述的方法,其中所述流化床造粒和/或层式造粒包括底喷、切线

喷和喷射床。

60. 根据权利要求51至59任一项所述的方法,其中通过无孔锅包衣工艺、锅包衣工艺、流化床包衣工艺、喷雾干燥工艺或其任何组合,包封含酶核心。

61. 根据权利要求52或60的方法,其中流化床包衣工艺为底喷工艺、Wurster工艺、顶喷工艺、切线喷工艺、喷射床工艺、改良的流化床包衣工艺、或连续流化床包衣工艺或其任何组合。

62. 根据权利要求51至61任一项所述的方法,其中所述的壳体包含聚合物、均聚物、共聚物或其任何组合。

63. 根据权利要求51至61任一项所述的方法,其中壳体包含聚合物,所述聚合物包含选自以下的一种或多种单体:甲基丙烯酸、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酰胺、甲基丙烯腈、丙烯酸、丙烯酸酯、丙烯酰胺、丙烯腈、和乙烯基单体。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述的乙烯基单体包含苯乙烯和 α 甲基苯乙烯。

65. 根据权利要求51至61任一项所述的方法,其中所述壳体包含乙基纤维素、丙烯酸树脂、塑料、甲基丙烯酸酯、丙烯酸酯、醋酸丙烯酸酯、聚偏二氯乙烯(PVDC)、硝酸纤维素、聚氨基甲酸酯、蜡、聚乙烯、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚酯、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚乳酸和聚羟基乙酸的共聚物、聚乙酸乙烯、乙酸乙烯-丙烯酸共聚物、藻酸盐、琼脂、苯乙烯-丙烯酸酯共聚物、苯乙烯/丙烯酸正丁酯共聚物或其任何组合。

66. 根据权利要求51至65任一项所述的方法,其中在用一个或多个壳体包封含酶核心后,固体含量的增重为大约20%至大约250%。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中增重为大约50%至150%。

68. 根据权利要求51至67任一项所述的方法,其中包封步骤包括在升高的温度下固化颗粒以促进至少一个壳体的形成。

69. 根据权利要求68的方法,其中升高的温度为大约25°C至大约80°C。

70. 根据权利要求68所述的方法,其中升高的温度为大约40°C至大约60°C。

71. 根据权利要求51至70所述的方法,其中所述一个或多个壳体是相继的壳体。

受控分解酶制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119(e)规定要求2013年9月16日提交的美国临时申请61/878224和2013年12月16日提交的美国临时申请61/916366的优先权,其全部内容均被引入本文作为参考。

[0003] 序列表引用

[0004] 本申请通过在MPEP502.05中授权和提出的USPTO EFS-WEB服务器进行电子提交,本电子申请包括电子提交的序列表;该序列表的全部内容通过引用而并入本申请说明书。序列表显示在如下电子提交的ASCII(.txt)文档中:

[0005]

文件名	创建日期	大小
Seq_List_D2650-1W0	2014年9月11日	44.0KB(45,056比特)

技术领域

[0006] 本公开涉及酶制剂、制备酶制剂的方法、以及在从地下地层采收烃的领域中使用该酶制剂从而例如以受控方式降低胶凝流体的粘度的方法。

[0007] 相关技术的描述

[0008] 水力压裂通过将加压流体(通常称作压裂液(fracturing fluid))以能够在周围地层中形成裂缝的压力注入地下地层中来实现。冻胶压裂液(gel fracturing fluids)或混合压裂液(hybrid fracturing fluids)可以含有溶剂、胶凝剂(gelling agent)(增稠剂(viscosifier))、支撑剂(proppant)、和分解剂(breaker)。胶凝剂(增稠剂)的粘性使得支撑剂可以悬浮在流体中并降低支撑剂在向岩层递送的过程中沉降出来的倾向。

[0009] 压裂地下地层需要胶凝剂(增稠剂)和分解剂之间的协调。分解胶凝压裂液(即,降低该胶凝的压裂液的粘度)通常通过在期望分解时向地下地层加入“分解剂”,即,粘度降低剂来实现。然而,已知的技术可能是不可靠的,可能导致胶凝压裂液在压裂过程完成之前过早分解,和/或导致胶凝压裂液的不完全分解。过早分解可能引起裂缝数量、所获裂缝的期望大小和几何结构、以及正确支撑剂放置的减少,从而由于储集层至井眼的减少的交流和传导而降低潜在的烃采收量。此外,不完全的分解也可以造成井传导性(conductivity)的降低和由此烃采收量的减少。

[0010] 酶已经作为有效的且环境友好的分解剂被用于地下地层的烃采收(例如石油、天然气采收等)。然而,酶分解剂在烃采收中的应用已经受限于,例如,酶活性在压裂液的碱性pH环境和/或井下(downhole)条件下的丧失。需要化学和物理上受保护的酶以允许在井下条件有效地分解胶凝的液体(例如压裂液)。

[0011] 发明概述

[0012] 一些实施方案提供井处理颗粒。一些实施方案中,颗粒包含含酶核心,其中含酶核心包含酸化剂和酶;和被配置(成形)为至少部分地包封含酶核心的壳体。

[0013] 一些实施方案中,壳体允许酶自颗粒受控地释放。一些实施方案中,酸化剂为固体

颗粒的形式,该酸化剂充当酶的载体(carrier)。酶可以存在于含酶核心的外表面上、分散在含酶核心中、或两者。

[0014] 一些实施方案中,含酶核心包含粘合剂。例如,粘合剂可以包含,或可以是,聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、藻酸盐、聚乙二醇、蜡、黄原胶、聚乙酸乙烯、角叉菜胶、淀粉、麦芽糖糊精、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素、苯乙烯丙烯酸分散体(styrene acrylic dispersions),或其任何组合。一些实施方案中,含酶核心包含惰性载体。例如,惰性载体可以包含,或可以是,纤维状和微晶纤维素、硫酸钠、氯化钠、磷酸氢钙(dicalcium phosphate)、碳酸钙、硅藻土(diatomaceous earth)、沸石、淀粉、或其任何组合。一些实施方案中,含酶核心包含稳定剂。例如,稳定剂可以包含,或可以是,甘露糖醇、海藻糖、山梨糖醇、木糖醇、蔗糖、微晶纤维素、淀粉、氯化钠、硫酸钠、硫酸铵、或其任何组合。

[0015] 一些实施方案中,酸化剂包含轻度酸化无机盐(mild acidifying inorganic salt)。例如,轻度酸化无机盐可以是,或可以包含,硫酸铵(ammonium sulfate)、磷酸二氢钠(sodium phosphate monobasic)、氯化铵(ammonium chloride)、硫酸钠(sodium sulfate)、硫酸钾(potassium sulfate)、磷酸二氢钾(potassium phosphate monobasic)、氯化镁(magnesium chloride)、柠檬酸二氢铵(ammonium citrate monobasic)、柠檬酸氢二铵(ammonium citrate dibasic)、柠檬酸三铵(ammonium citrate tribasic)、磷酸二氢铵(ammonium phosphate monobasic)、磷酸氢二铵(ammonium phosphate dibasic)、磷酸氢二钠(sodium phosphate dibasic)、磷酸氢二钾(potassium phosphate dibasic)、柠檬酸二氢钠(sodium citrate monobasic)、柠檬酸氢二钠(sodium citrate dibasic)、柠檬酸二氢钾(potassium citrate monobasic)、柠檬酸氢二钾(potassium citrate dibasic),或其任何组合。一些实施方案中,酸化剂包含有机酸或其盐。例如,有机酸可以是,或可以包含,柠檬酸、草酸、丙二酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、马来酸、天冬氨酸、异柠檬酸、或其任何组合。一些实施方案中,酸化剂包含酯、内酯、聚酯、聚内酯、或其任何组合。例如,酯可以是有机酸的酯。

[0016] 一些实施方案中,酸化剂包含聚乳酸(poly(lactic acid)),聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid)),草酸二苯酯(diphenyl oxalate),聚羟基乙酸(polyglycolic acid),聚对苯二甲酸乙二酯(poly(ethylene)terephthalates),聚己内酯(polycaprolactone)、或其任何组合。一些实施方案中,酸化剂包含一种或多种缓冲剂。例如,该一种或多种缓冲剂中的至少一种可以是,或包含,Tris-HCl缓冲剂,吗啉乙磺酸(morpholino-ethanesulphonic acid)(MES)缓冲剂,吡啶(pyridine),二甲基胍酸盐(cacodylate)缓冲剂,二(2-羟乙基)氨基-三(羟甲基)甲烷(BIS-TRIS)缓冲剂,哌嗪-N,N'-二(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲剂,3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)缓冲剂,3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)缓冲剂,乙二胺四乙酸(EDTA)缓冲剂,甘氨酸缓冲剂,及其任何组合。

[0017] 一些实施方案中,壳体包含聚合物、均聚物、共聚物、或其任何组合。一些实施方案中,壳体包含聚合物,所述聚合物包含选自以下的一种或多种单体:甲基丙烯酸、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酰胺、甲基丙烯腈、丙烯酸、丙烯酸酯、丙烯酰胺、丙烯腈、和乙烯基单体。例如,乙烯基单体包含苯乙烯和 α -甲基苯乙烯。一些实施方案中,壳体包含乙基纤维素、丙烯酸树脂、塑料、甲基丙烯酸酯、丙烯酸酯、醋酸丙烯酸酯(acrylic acetate)、聚偏二氯乙烯(PVDC)、硝酸纤维素、聚氨基甲酸酯、蜡、聚乙烯、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚酯、聚乳酸、聚羟基

乙酸、聚乳酸和聚羟基乙酸共聚物、聚乙酸乙烯、乙酸乙烯-丙烯酸共聚物、藻酸盐、琼脂、苯乙烯-丙烯酸酯共聚物、苯乙烯/丙烯酸正丁酯共聚物、或其任何组合。

[0018] 一些实施方案中,至少一种酶是纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、黄原胶酶(Xanthanase)、甘露聚糖酶(mannanase)、半乳糖苷酶、或淀粉酶。酶可以是热稳定酶或耐热酶。

[0019] 一些实施方案中,颗粒在壳体的外面或在壳体下面包含一个或多个额外的包衣。一些实施方案中,所述额外包衣中的至少一个是聚合物保护性包衣或聚合物抛光包衣(polymeric polishing coating)。

[0020] 在一些实施方案中,按美国筛系列32(U.S.Sieve Series.32),颗粒大小为大约7目至大约60目。在一些实施方案中,按美国筛系列,颗粒大小为大约10目至大约20目。

[0021] 一些实施方案中,壳体基本上包封含酶核心。一些实施方案中,壳体包封整个含酶核心。

[0022] 一些实施方案中,颗粒被配置为可以降低井处理组合物的pH到阈值pH以下,其中所述组合物在阈值pH或在阈值pH以上可以复原(reheal)。在一些实施方案中,阈值pH值是9.5。

[0023] 本文还公开包含一或多个井处理颗粒的井处理组合物。在一些实施方案中,井处理组合物包含多数个所述颗粒。在一些实施方案中,井处理组合物包含增稠剂和溶剂。一些实施方案中,井处理组合物还包含交联剂。一些实施方案中,井处理组合物被配置为可以降低交联的井处理流体的pH到阈值pH以下,其中所述流体在阈值pH或在阈值pH以上可以复原(reheal)。一些实施方案中,交联的井处理流体是压裂液、砾石充填液(gravel packing fluid)、完井液(completion fluid)、修井液(workover fluid)、钻井液(drilling fluid)、或其任何组合。在一些实施方式中,阈值pH值是9.5。

[0024] 本发明还公开了处理地下地层的方法。该方法,在一些实施方案中,可以包括:使地下地层与井处理流体接触,其中,井处理流体包含多数个井处理颗粒、增稠剂和溶剂;和允许酶降低井处理流体的粘度。

[0025] 一些实施方案中,酶使井处理流体的粘度降低至少一个数量级。一些实施方案中,井处理流体是压裂液、砾石充填液、完井液、修井液、或钻井液、或其任何组合。一些实施方案中,井处理流体在无额外pH降低剂的情况下达到完全分解。在一些实施方案中,增稠剂包括瓜尔胶、取代的瓜尔胶、纤维素、衍生的纤维素、黄原胶、淀粉、多糖、明胶、聚合物、合成聚合物、或其任何组合。在一些实施方案中,取代的瓜尔胶是羟乙基瓜尔胶、羟丙基瓜尔胶、羧甲基羟乙基瓜尔胶、羧甲基羟丙基瓜尔胶(CMHPG),或衍生的纤维素是羧甲基纤维素、聚阴离子纤维素、羟乙基纤维素、或其任何组合。在一些实施方式中,溶剂是水基溶剂或基于有机物的溶剂。一些实施方案中,溶剂是淡水、海水、盐水、采出水(produced water)、来自蓄水层(aquifer)的水、具有水溶性有机化合物的水、或其任何组合。

[0026] 一些实施方案提供制备井处理颗粒的方法。一些实施方案中,该方法包括:使酶与固体酸化剂接触以形成含酶核心;用一个或多个壳体包封含酶核心以形成井处理颗粒,其中每个壳体都被配置为至少部分地包封含酶核心。一些实施方案中,接触步骤包括,通过无孔锅包衣工艺(non-perforated pan coating process)、锅包衣工艺、流化床包衣工艺、喷雾干燥工艺、或其任何组合,使酶附着于固体酸化剂。一些实施方案中,接触步骤包括将包

含酶的溶液喷雾到固体酸化剂上。

[0027] 一些实施方案中,该方法包括:使酶与固体酸化剂混合以形成混合物;将混合物造粒以形成含酶核心;和用一个或多个壳体包封含酶核心以形成并处理颗粒,其中每个壳体都被配置为至少部分地包封含酶核心。

[0028] 一些实施方案中,用于制备并处理颗粒的方法包括:使酶与固体酸化剂混合以形成混合物;将混合物造粒以形成含酶核心;和用一个或多个壳体包封含酶核心以形成并处理颗粒,其中每个壳体都被配置为至少部分地包封含酶核心。

[0029] 一些实施方案中,该方法还包括在用壳体包封含酶核心之前干燥含酶核心。一些实施方案中,混合物还包含粘合剂、稳定剂、惰性载体或其任何组合。

[0030] 一些实施方案中,通过湿法造粒工艺,将混合物造粒以形成含酶核心。一些实施方案中,湿法造粒工艺包括挤出、离心挤出、滚圆(spheronization)、分批高剪切造粒、连续高剪切混合、盘式造粒、转鼓造粒、喷雾干燥、流化床团聚、流化床造粒和/或层式造粒(layering)、颗粒化(prilling)、或其任何组合。一些实施方案中,流化床造粒和/或层式造粒包括底喷、切线喷、和喷射床。一些实施方案中,通过无孔锅包衣工艺、锅包衣工艺、流化床包衣工艺、喷雾干燥工艺、或其任何组合,包封含酶核心。

[0031] 一些实施方案中,流化床包衣工艺为底喷工艺、Wurster工艺、顶喷工艺、切线喷工艺、喷射床工艺、改良的流化床包衣工艺、或连续流化床包衣工艺、或其任何组合。

[0032] 一些实施方案中,壳体包含聚合物、均聚物、共聚物、或其任何组合。一些实施方案中,壳体包含聚合物,所述聚合物包含选自以下的一种或多种单体:甲基丙烯酸、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酰胺、甲基丙烯腈、丙烯酸、丙烯酸酯、丙烯酰胺、丙烯腈、和乙烯基单体。一些实施方案中,乙烯基单体包含苯乙烯和 α -甲基苯乙烯。一些实施方案中,壳体包含乙基纤维素、丙烯酸树脂、塑料、甲基丙烯酸酯、丙烯酸酯、醋酸丙烯酸酯、聚偏二氯乙烯(PVDC)、硝酸纤维素、聚氨基甲酸酯、蜡、聚乙烯、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚酯、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚乳酸和聚羟基乙酸共聚物、聚乙酸乙烯、乙酸乙烯-丙烯酸共聚物、藻酸盐、琼脂、苯乙烯-丙烯酸酯共聚物、苯乙烯/丙烯酸正丁酯共聚物、或其任何组合。

[0033] 一些实施方案中,在用一个或多个壳体包封含酶核心后,固体含量的增重为大约20%至大约250%。在一些实施方式中,增重为大约50%至150%。

[0034] 一些实施方案中,包封步骤包括在升高的温度下固化(curing)颗粒以促进至少一个壳体的形成。一些实施方案中,升高的温度为大约25°C至大约80°C。一些实施方案中,升高的温度为大约40°C至大约60°C。

[0035] 在一些实施方式中,所述一个或多个壳体是相继的壳体。

[0036] 附图简述

[0037] 图1A-B描述制备并处理颗粒的方法的举例说明性实施方案。

[0038] 图2A-D描述本发明范围内的并处理颗粒的横断面视图的举例说明性实施方案(未按比例)。

[0039] 图3显示,如实施例1所述,用游离酶分解剂和酸化剂处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0040] 图4显示,如实施例2所述,在游离酶分解剂存在或不存在的条件下用酸化剂处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0041] 图5的表格显示,如实施例3所述,用硫酸铵酸化剂和游离酶分解剂处理的交联的瓜尔胶的分解条件。

[0042] 图6的表格显示,如实施例3所述,用磷酸二氢钠酸化剂和游离酶分解剂处理的交联的瓜尔胶的分解条件。

[0043] 图7的表格显示,如实施例3所述,用柠檬酸酸化剂和游离酶分解剂处理的交联的瓜尔胶的分解条件。

[0044] 图8显示,如实施例4所述,用配制的酶分解剂处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0045] 图9显示,如实施例5所述,用配制的酶分解剂处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0046] 图10显示,如实施例6所述,用配制的酶分解剂处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0047] 图11显示,如实施例7所述,用配制的酶分解剂处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0048] 图12显示,如实施例8所述,用配制的酶分解剂处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0049] 图13显示,如实施例8所述,用配制的酶分解剂处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0050] 图14显示,如实施例9所述,用不同货架期的配制的酶分解剂处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0051] 图15显示,如实施例10所述,用配制的酶分解剂处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0052] 图16显示,如实施例11所述,用未包封的纤维素酶处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0053] 图17显示,如实施例12所述,用包封的颗粒处理的交联的瓜尔胶组合物的分解曲线。

[0054] 发明详述

[0055] 在以下详述中,参考附图,其构成本详述的一部分。在附图中,除非另有指明,否则相似的符号典型地表示相似的成分。在详述、附图和权利要求书中描述的举例说明性实施方案不旨在对本发明构成限制。可以使用其它实施方案,并且可以进行其它改变,而不偏离本发明主题的精神或范围。易于明了的,本公开的各个方面,如在本文中一般性描述的以及在附图中举例说明的,可以以各种各样的不同型式安排、取代、组合和设计,其全部明确地落入本公开的考虑范围并构成本公开的一部分。

[0056] 本公开涉及用于处理地下地层的组合物和方法,例如,配制的酶分解剂、和分解在地下地层处理中使用的稠化的处理流体的方法。例如,本发明公开了井处理颗粒和包含井处理颗粒的井处理组合物。一些实施方案中,颗粒可以包括含酶核心,其中含酶核心包含酸化剂和酶;和被配置为至少部分地包封含酶核心的壳体。

[0057] 本文还公开了用于制备和使用该组合物处理地下地层的方法。

[0058] 配制的酶分解剂

[0059] 如本文公开,对于能够降低用于采收烃的一种或多种流体的粘度的酶,可以对包含该酶的组合物进行配制,以形成配制的酶分解剂,由此能够在化学上和/或物理上保护所述酶免受例如不适宜的温度、压力、或pH条件的影响。例如,可以将本文公开的配制的酶分解剂加入任何本领域已知的地下处理流体或其组合中,以降低其粘度。适宜的地下处理流体的例子包括,但不限于,钻井液(drilling fluid)、压裂液、携带液(carrier fluids)、导流液(diverting fluids)、砾石充填液(gravel packing fluid)、完井液(completion fluid)、修井液(workover fluid)、以及其它地下处理流体(在井下条件下)。

[0060] 本文公开的配制的酶分解剂组合物,在一些实施方案中,提供稠化的地下处理流体的受控分解。如本文公开的,分解稠化的处理流体是指,降低该稠化的地下处理流体的粘度。稠化的处理流体典型地通过交联型凝胶来稠化,其中所述交联型凝胶常常通过涉及胶凝剂和交联剂的交联反应来交联。

[0061] 典型地,为了交联剂有效交联胶凝的溶液,必须调整地下处理流体的pH,例如在高pH。在9.0以上,硼酸盐离子存在并可用于交联和造成胶凝。在较低pH,硼酸盐被转化为不发生电离的硼酸。

[0062] $\text{H}_3\text{BO}_3 + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{B}(\text{OH})_4^-$ 。硼酸的pKa为9.14。

[0063] 一般,当压裂液被彻底分散在地下地层中并达到最大粘度和压力(这又造成周围地层的压裂和支撑剂在所述裂缝中的沉积)时,可以获得成功的压裂。在压裂液达到最大粘度后,可以将压裂液分解到较低的粘度形式,优选达到完全分解。如本文所用,术语“完全分解”是指,使用Cambridge Viscosity的VISCOLab 4000测量,返排液(flowback)的粘度小于10cP或更小。分解交联的胶凝流体将允许缓解地下地层中的压力、以及允许粘度较低或“分解的”胶凝流体从地下地层泵出。压裂液的完全分解可以允许更完全地从压裂的地下地层中移出压裂液,导致较少的残留,而这又可以增加烃源(例如油和/或气)流出的传导性。

[0064] 降低交联的胶凝流体的粘度的一个方面是,调整环境pH以移动平衡和逆转交联反应。例如,用硼酸盐交联的瓜尔胶可以通过降低环境pH,优选低于pH9,而被逆转。通过降低环境pH,可以逆转硼酸盐交联反应,降低瓜尔胶的粘度,从而使瓜尔胶结构从交联型(三级)变为线性。线性瓜尔胶比交联型瓜尔胶具有显著更低的粘度。酸化剂可以降低环境pH,并由此改变交联型瓜尔胶和线性瓜尔胶之间的平衡,利于线性瓜尔胶的积累。然而,该交联反应的逆转尚不足以将粘度降低到水稀返排(water thin flow back),即完全分解,所要求的可接受水平。为了实现瓜尔胶的完全分解或水稀返排,必须,例如,通过酶水解,分解线性瓜尔胶的碳水化合物结构(也即,主链)。瓜尔胶交联反应的逆转通过消除空间位阻和增加扩散,可以显著地有利于酶对瓜尔胶内碳水化合物键的可及性。然后,线性瓜尔胶可以被酶水解成水稀溶液,例如,在完全分解后,并且之后该水稀溶液可以安全有效地被泵回地面。

[0065] 为了实现达到胶凝流体的最大粘度和胶凝流体的完全分解的逐步同步化,在一些实施方案中,具有“受控的分解”是有利的。例如,可以在一定的期望条件(例如环境条件)下和/或在期望量的时间中实现胶凝流体的分解。

[0066] 一些实施方案中,可能有利的是,使分解剂分布于具有支撑剂的裂缝中,从而可以使载有支撑剂的裂缝摆脱粘性胶凝流体。

[0067] 本文公开的配制的酶分解剂可以用于在油和气开采作业过程中通常见于地下地层的环境条件下,对胶凝的地下处理流体实现受控分解,优选地完全分解。

[0068] 一些实施方案中,用酸化剂载体颗粒配制的纤维素酶被包衣包封,所述包衣延缓酶和酸化剂的活性。

[0069] 本文公开的配制的酶分解剂,在一些实施方案中,包含一个或多个并处理颗粒。一些实施方案中,并处理颗粒包含含酶核心,其中含酶核心包含酸化剂和酶;和被配置为至少部分地包封含酶核心的壳体。配制的酶分解剂可以用于各种烃采收工艺中,包括但不限于,分解地下处理流体(例如,压裂液、钻井液、封堵液(blocking fluids)、携带液、导流液、砾石充填液、完井液、修井液等),和降解滤饼。

[0070] 含酶核心

[0071] 并处理颗粒的含酶核心可以,在一些实施方案中,包含一种或多种酸化剂和一种或多种酶。酸化剂可以例如充当酶的载体。本文中,“载体”是可以通过任何本领域已知手段将酶固着于其上的任何颗粒。一些实施方案中,在粘合剂存在的情况下将酶附着于颗粒。例如,可以在粘合剂存在下使酶附着于固体酸化剂。

[0072] 酶可以存在于含酶核心的表面(例如外表面)上、和/或酶可以分散在含酶核心中。本公开不受酶在含酶核心中分散方式的特别限制。一些实施方案中,酶随机地分散在含酶核心中。一些实施方案中,酶以预定的模式分散在含酶核心中。本文公开了各种实施方案,但是其它实施方案对于本领域技术人员也是易于明了的并且落入本公开的范围中。

[0073] 酸化剂

[0074] 本文中,术语“酸化剂”(acidifying agent和acidifier)可互换使用,指可以降低其所在环境的pH的任何物质。例如,酸化剂可以是有机化合物、无机化合物、或其任何组合。一些实施方案中,酸化剂包含,或是,有机酸或其盐或酯。一些实施方案中,酸化剂包含,或是,无机酸或其盐或酯。

[0075] 一些实施方案中,酸化剂包含轻度酸化无机盐、有机酸、有机酸的盐、有机酸的(聚)酯、有机缓冲剂、或其任何组合。有机缓冲剂的例子包括但不限于,Tris-HCl缓冲剂,吗啉乙磺酸(MES)缓冲剂,吡啶,二甲基胍酸盐缓冲剂,二(2-羟乙基)氨基-三(羟甲基)甲烷(BIS-TRIS)缓冲剂,哌嗪-N,N'-二(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲剂,3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)缓冲剂,3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)缓冲剂,乙二胺四乙酸(EDTA)缓冲剂,甘氨酸缓冲剂,及其任何组合。轻度酸化无机盐的实例包括,但不限于,硫酸铵、磷酸二氢钠、氯化铵、柠檬酸铵、硫酸钠、磷酸二氢钾、氯化镁、柠檬酸二氢铵、柠檬酸氢二铵、柠檬酸三铵、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、柠檬酸二氢钠、柠檬酸氢二钠、柠檬酸二氢钾、柠檬酸氢二钾,及其任何组合。有机酸的(聚)酯的非限制性实例包括,聚乳酸(poly(lactic acid)),聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid)),聚羟基乙酸、聚对苯二甲酸乙二酯(poly(ethylene)terephthalates),聚己内酯(polycaprolactone)、草酸二苯酯(diphenyl oxalate),及其任何组合。一些实施方案中,有机酸是柠檬酸、草酸、丙二酸、乙醇酸,丙酮酸,乳酸,马来酸,天冬氨酸,异柠檬酸、这些有机酸的任何盐、或其任何组合。一些实施方案中,酸化剂包含,或是,酯、内酯、聚酯、聚内酯、或其任何组合。一些实施方案中,酸化剂包含或是酯。聚酯的非限制性实例包括,固体生物可降解聚酯(SBPs),例如聚琥珀酸丁二酯(PBS)、聚(琥珀酸丁二酯-共-对苯二甲酸丁二酯)(PBBT)、聚对苯二甲酸丁二酯、聚羟基丁酸酯,及其任何组合。

[0076] 酸化剂可以是固体或液体形式。一些实施方案中,有利的是具有固体形式,例如作

为固体颗粒的酸化剂。例如,酸化剂可以是粉末形式(例如细颗粒)或粒状形式。

[0077] 颗粒中酸化剂的量可以变化。例如,颗粒中酸化剂的量可以是,或大约是,基于颗粒总重,1%,2%,5%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%,99%重量,或这些值的任何两者之间的范围(包括端点)。一些实施方案中,颗粒中酸化剂的量可以,基于颗粒总重,至少是、或至少大约是5%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,75%,80%,85%,90%,或95%重量。一些实施方案中,酸化剂的量和类型可以基于待使用的井处理流体的初始pH而变化。例如,与具有较低初始pH的井处理流体相比,具有较高初始pH的井处理流体可能要求更多的酸化剂或更强的酸化剂。

[0078] 一些实施方案中,固体酸化剂颗粒用作载体颗粒,酶可以附着于其上。一些实施方案中,使用粘合剂,使酶附着于固体酸化剂颗粒上。一些实施方案中,粘合剂包含,或是,聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、藻酸盐、聚乙二醇、蜡(例如蜂蜡和合成蜡)、黄原胶、聚乙酸乙烯、角叉菜胶、淀粉、麦芽糖糊精、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素、或其任何组合。一些实施方案中,固体酸化剂用作酶的载体。一些实施方案中,粘合剂包含,或是,本文公开的任何一种或多种包封剂。术语“载体”,在本公开中,包括可以将酶组合物固着于其上的固体颗粒。有利的是,在一些实施方案中,酸化剂在接触酶后不会减损或损害酶的活性。

[0079] 交联的胶凝溶液的碱性pH(例如pH 9.5)对于大多数酶分解剂的活性是不理想的。不受任何具体理论的束缚,据信存在于本文配制的酶分解剂中的酸化剂可以,在一些实施方案中,在释放后建立降低的pH环境,在该环境中酶可以有效地水解交联的胶凝流体,优选地达到完全分解。

[0080] 酶

[0081] 如本文所描述,含酶核心可以包含一种或多种酶。酶可以是,例如,能够降解聚合物的任何酶,所述聚合物包括但不限于,存在于滤饼、压裂和封堵胶、以及其它用于烃采收的应用/流体中的多糖。例如,酶可以是水解酶。酶的非限制性例子包括,纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、黄原胶酶、甘露聚糖酶、半乳糖苷酶、葡聚糖酶、淀粉酶、淀粉葡糖苷酶、转化酶、麦芽糖酶、内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、葡糖苷酶、木聚糖酶、木糖苷酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、寡聚物酶(oligomerase)等等,及其任何混合物。半乳糖苷酶可以是 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、或其任何组合。葡糖苷酶可以是 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、或其任何组合。淀粉酶可以是例如, α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 γ -淀粉酶、或其任何组合。一些实施方案中,酶是热稳定酶或耐热酶。

[0082] 一些实施方案中,酶是描述于PCT公布WO 2009/020459(其全部公开内容被引入本文作为参考)的源自嗜嗜热细菌和/或其非天然变体的任何纤维素酶。一些实施方案中,酶由核酸序列编码,所述核酸序列与描述在WO 2009/020459中的下列任何DNA序列具有至少70%,80%,90%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性、或落入这些值之任何二者界定的范围中的同一性。一些实施方案中,酶具有氨基酸序列,所述氨基酸序列与描述在WO 2009/020459中的下列任何蛋白序列具有至少70%,80%,90%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性、或这些值之任何二者界定的范围中的同一性。所述DNA和蛋白质序列包括:

[0083] • WO 2009/020459 SEQ ID NOS:1,2(野生型‘亲本’海栖热袍菌(*T.maritime*)纤

纤维素酶),在本文中公开为SEQ ID NOs:5和6。

[0084] • WO 2009/020459 SEQ ID NOS:3(野生型DNA,经改变以去除替代起点),在本文中公开为SEQ ID NO:7。

[0085] • WO 2009/020459 SEQ ID NOS:6,7(“7X”组合基因位点饱和诱变(“GSSM”)突变)在本文中公开为SEQ ID NOs:8和9。

[0086] • WO 2009/020459 SEQ ID NOS:8,9(“12X-6”组合GSSM突变),在本文中公开为SEQ ID NOs:3和2。

[0087] • WO 2009/020459 SEQ ID NOS:10,11(“13X-1”组合GSSM突变),在本文中公开为SEQ ID NOs:10和11。

[0088] • WO 2009/020459 SEQ ID NOS:12,13(“12X-1”组合GSSM突变),在本文中公开为SEQ ID NOs:12和13。

[0089] • WO 2009/020459 SEQ ID NOS:16,17(来自栖热袍菌属物种(*Thermotoga* sp.)的替代纤维素酶分解剂),在本文中公开为SEQ ID NOs:14和15。

[0090] • WO 2009/020459 SEQ ID NOS:18,19(用于玉米表达的海栖热袍菌纤维素酶的“7X”密码子优化版本),在本文中公开为SEQ ID NOs:16和17。

[0091] • WO 2009/020459 SEQ ID NOS:20,21(用于玉米表达的海栖热袍菌纤维素酶的“12X-6”密码子优化版本),在本文中公开为SEQ ID NOs:18和19。

[0092] • WO 2009/020459 SEQ ID NOS:22,23(用于玉米表达的海栖热袍菌纤维素酶的“13X-1”密码子优化版本),在本文中公开为SEQ ID NOs:20和21。

[0093] 除上列来自海栖热袍菌菌株MSB8的纤维素酶的野生型和进化变体的相关核苷酸和氨基酸序列外,表2和实施例5(来自WO 2009/02049)中列举的另外的突变体也被认为可用作本文所述组合物的组分和/或用于制备这些组合物的方法中。

[0094] 一些实施方案中,酶可以是公开在美国专利号5,962,258,美国专利号6,008,032,美国专利号6,245,547,美国专利号7,807,433,国际专利公布号WO 2009/020459,国际专利公布WO 2013/148163,或国际专利公布WO 2013/148167中的纤维素酶或纤维素酶变体,这些专利文献的内容特此完整地并入作为参考。一些实施方案中,纤维素酶可以是商业可得产品,包括但不限于,**PYROLASE®** 160纤维素酶,**PYROLASE®** 200纤维素酶,或**PYROLASE®** HT纤维素酶(Verenium Corp., San Diego, CA),或其任何混合物。在一些实施方式中,纤维素酶是**PYROLASE®** HT纤维素酶。

[0095] 一些实施方案中,酶由SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,或SEQ ID NO:20所示核苷酸序列编码。一些实施方案中,酶由与SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,或SEQ ID NO:20所示序列同源的核苷酸序列编码。例如,酶可以由与SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,或SEQ ID NO:20所示序列具有同一性的核苷酸序列编码,其中所述同一性为、或大约为、或小于、或大于50%,60%,70%,80%,90%,95%,96%,97%,98%,

99%,100%,或为由这些值之任何定义的范围值(包括端点),例如,90%至100%,95%至99%,等等。一些实施方案中,酶具有SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,或SEQ ID NO:21所示氨基酸序列。一些实施方案中,酶具有与SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,或SEQ ID NO:21所示序列同源的氨基酸序列。例如,酶具有与SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,或SEQ ID NO:21所示序列具有同一性的氨基酸序列,其中所述同一性为、或大约为、或小于、或大于50%,60%,70%,80%,90%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%,或为由这些值之任何定义的范围值,例如,90%至100%,95%至99%,等等。

[0096] 一些实施方案中,可能有利的是,特别地将酸化剂(例如,不会不利地影响酶活性的酸化剂)与酶配对。例如,可以特别地将固体酸化剂材料与酶配对以调整环境pH从而增强酶活性。在一些实施方式中,酸化剂是固体形式。固体酸化剂的形状或形式不受特别限制。例如,固体酸化剂可以是粒子、粉末、颗粒、晶体形式,或其任何组合。在一些实施方式中,固体酸化剂是晶体形式。在一些实施方式中,固体酸化剂本质上是球体或球状体。一些实施方案中,固体酸化剂是一种几何形状或不同几何形状的组合,包括但不限于,立方体、长方体、圆柱、圆锥、棱柱、棱锥、和任何其它多边形形状。在一些实施方式中,固体酸化剂是纤维形式。在一些实施方式中,固体酸化剂材料是粉末形式。

[0097] 本文公开的酶(例如纤维素酶)可以在160°F或180°F以上的温度水解底物聚合物(例如瓜尔胶聚合物)。一些实施方案中,酶可以在超过185°F或195°F的温度水解底物聚合物。如本领域技术人员明了的,本发明酶可以与其它酶和/或氧化分解剂组合使用,以在更广的温度和pH范围降解底物聚合物(例如瓜尔胶聚合物)。

[0098] 其它组分

[0099] 除了酶和酸化剂,含酶核心可以包括一种或多种其它成分。其它成分的非限制性实例包括粘合剂、惰性载体、稳定剂、防粘剂(anti-tacking agent)。

[0100] 本文中,术语“粘合剂”(binding agent和binder)可互换使用,指能够在各种材料(例如,酶、酸化剂、惰性载体和/或稳定剂)之间提供充足的粘附力的任何材料。例如,粘合剂可以使酶充分地附着在酸化剂上,从而该酸化剂可以充当酶的载体。一些实施方案中,通过粘合剂,将酶附着于酸化剂的外表面上。

[0101] 粘合剂可以包含,或是,但不限于,聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、藻酸盐、聚乙二醇、蜡(例如蜂蜡或合成蜡)、黄原胶、聚乙酸乙烯、角叉菜胶、淀粉、麦芽糖糊精、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素、或其任何组合。

[0102] 含酶核心中粘合剂的量可以变化。例如,含酶核心中粘合剂的量可以是,或大约是,基于含酶核心的总重,0.1%,0.5%,1%,2%,3%,4%,5%,6%,7%,8%,9%,10%,15%,20%,30%,40%,或50%重量,或这些值的任何两者之间的范围。一些实施方案中,粘合剂以基于含酶核心总重量大约0.1%至大约10%的量存在于含酶核心中。

[0103] 一些实施方案中,含酶核心包含一种或多种惰性载体。惰性载体的例子包括,但不限于,纤维状和微晶纤维素、硫酸钠、氯化钠、磷酸二氢钙、磷酸氢钙、磷酸钙、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸钾、碳酸钙、硅藻土、沸石、淀粉、和其任

何组合。

[0104] 一些实施方案中,含酶核心包含一种或多种稳定剂。稳定剂的例子包括,但不限于,甘露糖醇、海藻糖、山梨糖醇、木糖醇、蔗糖、微晶纤维素、淀粉、氯化钠、硫酸钠、硫酸铵、及其任何组合。稳定剂可以是多功能的。例如,一些实施方案中,稳定剂可以具有作为酸化剂和/或粘合剂发挥作用的性质。

[0105] 壳体

[0106] 如本文所公开,井处理颗粒可以包含被配置为至少部分地包封含酶核心的壳体。壳体可以,在一些实施方案中,允许包封在壳体中的酸化剂和/或酶立即释放、受控释放、和/或缓释。一些实施方案中,壳体允许包封在壳体中的酸化剂和/或酶受控释放。例如,壳体可以包括一种或多种在所述颗粒所在的环境(例如地下处理流体)中可分解和/或可溶解的试剂。

[0107] 壳体包封含酶核心的程度可以变化。例如,壳体可以部分地覆盖含酶核心的表面区域,或基本上覆盖含酶核心的整个表面区域。一些实施方案中,壳体覆盖含酶核心的表面区域的大约5%,10%,15%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,99%,或100%,或这些值的任何两者之间的范围(包括端点)。一些实施方案中,壳体至少或至少大约覆盖含酶核心的表面区域的5%,10%,15%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,99%,或100%。一些实施方案中,壳体覆盖含酶核心的整个表面区域。一些实施方案中,壳体基本上包封含酶核心。一些实施方案中,壳体包封整个含酶核心。

[0108] 壳体或其部分的分解和/或溶解,在一些实施方案中,可以导致含酶核心暴露于井处理颗粒所在的环境(例如,地下处理流体)。一些实施方案中,可以基于壳体的化学组成或物理性质,控制含酶核心的释放。一些实施方案中,壳体厚度与壳体的通透性相关。一些实施方案中,壳体的厚度与将壳体分解或溶解到如下程度所需的时间相关,其中所述分解或溶解的程度为允许含酶核心暴露于井处理颗粒所在环境(例如,地下处理流体)的程度。一些实施方案中,花至少大约1分钟,大约10分钟,大约30分钟,大约1小时,大约5小时,大约8小时,大约10小时,大约11小时,大约12小时,大约13小时,大约14小时,大约15小时,大约16小时,大约17小时,大约18小时,大约19小时,大约20小时,大约25小时,大约30小时,大约40小时,或大约50小时,或这些值之任何两者之间的范围、或更长时间,可以将壳体分解或溶解到允许含酶核心暴露于井处理颗粒所在的环境(例如,地下处理流体)并触发酶的活化的程度。一些实施方案中,花至少大约30分钟至大约2小时,可以将壳体分解或溶解到允许含酶核心暴露于井处理颗粒所在的环境(例如,地下处理流体)并触发酶的活化的程度。

[0109] 相比于先前已知的用于分解稠化的胶凝流体的组合物和方法,酸化剂(例如一种或多种固体酸化剂)与一种或多种酶的共包封可以是有利的。例如,与分开添加的酸化剂(其可以在浓度和分布上变化,可以导致一些区域的不完全分解)不同,酶分解剂和酸化剂的共包封可以,在一些实施方案中,允许确定酶与酸化剂的比例。此外,不同于分开添加的酸化剂和分解剂,共包封的酶和酸化剂可以,在一些实施方案中,以期望的模式(例如,等地)分布在地下地层中。一些实施方案中,由于酶和酸化剂两者被包含在相同包封材料中,由此两者可以以相似的速率并在相似的时间接触环境,从而创造一个可以导致延长的酶活性的局部环境。

[0110] 不受任何特定理论的束缚,据信本文公开的壳体可以在一些实施方案中作为含酶

核心的保护性包衣发挥作用。在一些实施方案中,有利的是,壳体是热稳定的,在开始接触并处理颗粒所在环境(例如,地下处理流体)时不发生降解。在确定酶分解剂和环境底物(例如稠化的压裂液)的接触延迟时,多种因素可以考虑。这些因素的非限制性例子包括,酶分解剂的类型、酶分解剂的化学和/或物理性质、环境条件、壳体的化学和/或物理性质、及使用浓度。

[0111] 包封剂材料完整性的最终丧失和酶分解剂与稠化的地下处理流体的接触可以通过一种或多种机制实现,包括但不限于,直接溶解(例如,酶通过不完全的包封壳体覆盖而直接溶解在周围流体中)、扩散(例如,酶分子通过壳体孔而扩散到周围流体中)、降解、生物降解(例如,包封壳体的生物降解,以允许酶暴露于周围流体)、溶胀、熔融、崩解、碎裂(例如,包封壳体的碎裂、颗粒的崩解和/或碎裂),等等。一些实施方案中,酶分解剂与稠化的压裂液的接触也可以通过酶经由小孔的扩散而不移除壳体或其部分来实现。一些实施方案中,来自周围流体的溶剂(例如水分子)可以通过孔、不完全的壳体覆盖、壳体的降解和/或生物降解、壳体的熔融,而扩散到壳体内或进入含酶核心。一些实施方案中,溶剂分子可以溶解核心的酶,溶解的酶分子可以通过壳体上的孔或其它开口扩散到周围流体中。一些实施方案中,当水扩散入壳体内时,水合的壳体和/或含酶核心可以发生溶胀,导致壳体的崩解和/或碎裂。一些实施方案中,延迟可以响应于一定事件或事件组合,例如,暴露于高温和高压(在该点可能期望降低粘度)。本领域普通技术人员将明了,可以通过与酶释放相似或不同的机制(一种或多种),将酸化剂释放到周围流体中。

[0112] 本文公开的包封的酶分解组合物可以用于在相对高的温度范围(例如,150°F至200°F)分解例如地下处理流体。例如,本文公开的配制的酶分解剂可以在如下温度分解地下处理流体,所述温度为、或大约为、或小于、或大于环境温度、80°F、100°F、120°F、140°F、160°F、170°F、180°F、190°F、195°F、200°F、205°F、210°F、215°F、220°F、230°F、或240°F,或由这些值之任何定义的范围值(包括端点),例如,140°F至180°F,120°F至160°F等等。一些实施方案中,配制的酶分解剂可以在高于大约140°F的温度分解地下处理流体。一些实施方案中,配制的酶分解剂可以在高于大约180°C的温度分解地下处理流体。一些实施方案中,配制的酶分解剂可以在高于大约195°F的温度分解地下处理流体。据信,这些温度显著高于常规包封的酶分解剂的可工作温度范围,这是一个明显的优点。

[0113] 壳体可以包含一种或多种包封剂材料。一些实施方案中,可能有利的是,使用不会不利地与酶发生相互作用或化学反应从而破坏酶用途的包封剂材料。例如,包封剂材料可以包含,或是,聚合物、均聚物、共聚物、或其任何组合。本文中,术语“共聚物”指源自一种以上单体的聚合物。共聚物的类型可以变化。共聚物的非限制性例子包括二元共聚物(即,通过两种单体共聚获得的聚合物)、三元共聚物(即,从三种单体获得的聚合物)、和四元共聚物(即,从四种单体获得的聚合物)。共聚物可以是,例如,交替共聚物、周期共聚物、统计共聚物、嵌段共聚物、或其任何组合。一些实施方案中,共聚物可以是线性聚合物、分支聚合物、具有线性部分和分支部分两者的聚合物、或其任何组合。一些实施方案中,壳体包含一种或多种均聚物、一种或多种共聚物、或其任何组合。

[0114] 一些实施方案中,包封剂材料包含,或是,乙基纤维素、丙烯酸树脂、硝酸纤维素、塑料、甲基丙烯酸酯、醋酸丙烯酸酯、聚偏二氯乙烯(PVDC)、聚氨基甲酸酯、蜡、聚乙烯、乙二醇、聚乙烯醇、聚酯、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚乳酸和聚羟基乙酸共聚物、聚乙酸乙烯、乙酸

乙烯-丙烯酸共聚物、或其任何组合。一些实施方案中,壳体包含一种或多种聚合物(均聚物或共聚物),所述聚合物包含选自以下的一种或多种单体:甲基丙烯酸、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酰胺、甲基丙烯腈、丙烯酸、丙烯酸酯、丙烯酰胺、丙烯腈、苯乙烯/丙烯酸正丁酯共聚物、和乙烯基单体。一些实施方案中,壳体包含一种或多种聚合物(均聚物或共聚物),其中所述聚合物从甲基丙烯酸、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酰胺、甲基丙烯腈、丙烯酸、丙烯酸酯、丙烯酰胺、丙烯腈、乙烯基单体、或其任何组合制备。乙烯基单体可以包括,但不限于,苯乙烯单体、 α 甲基苯乙烯单体、及其任何组合。一些实施方案中,壳体包含一种或多种聚合物(均聚物或共聚物),其中所述聚合物源自甲基丙烯酸、甲基丙烯酸酯、丙烯酸、丙烯酸酯、乙烯基单体(例如,苯乙烯和 α 甲基苯乙烯)、或其任何组合。

[0115] 包封剂材料的其它非限制性例子包括,乙烯-丙烯酸乳液、聚乙酸乙烯分散体、丙烯酸乳液聚合物、苯乙烯-丙烯酸酯共聚物的水分散体、苯乙烯/丙烯酸正丁酯共聚物的水分散体、阴离子聚氨基甲酸酯的水分散体、及其任何组合。本文中,术语“分散体”和“乳液”可互换使用。

[0116] 本文公开的配制的酶分解剂还可以包含一个或多个防粘剂。不受任何具体理论的限制,据信,一些包封剂材料在性质上是粘性的,可以导致含酶核心颗粒在包衣工艺过程中团聚(例如几个核心颗粒胶粘在一起)以形成壳。因此,可能有利的是,在一些实施方案中,在对含酶核心进行包衣的工艺工程中应用防粘剂,以使含酶核心的团聚最小化,从而每一个含酶核心都可以单独地被包被。可以使用各种技术来应用防粘材料。例如,可以在将壳体材料喷雾到含酶核心上时,添加防粘材料。另一例子,可以将防粘材料加入包封剂材料的溶液或分散体中以形成混合物,并将该混合物喷到含酶核心上形成壳体。一些实施方案中,防粘剂(一种或多种)嵌在包封壳体层中和/或存在于包封壳体层的表面上。防粘剂的例子包括,但不限于,滑石、二氧化硅、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸镁、硅藻土、高岭土、膨润土、及其任何组合。

[0117] 井处理颗粒的大小可以变化,例如按美国筛系列,从大约7目至大约60目。例如,井处理颗粒可以是大约2.8mm至大约0.25mm。例如,按美国筛系列,井处理颗粒的大小可以是大约,或是,7目(2.8mm),8目(2.4mm),10目(2mm),12目(1.7mm),14目(1.4mm),16目(1.2mm),18目(1mm),20目(0.84mm),30目(0.59mm),35目(0.5mm),40目(0.42mm),45目(0.35mm),50目(0.3mm),60目(0.25mm),或这些值之任何两者之间的值(包括端点)。一些实施方案中,按美国筛系列,多数个颗粒的平均大小是,或大约是,7目,8目,10目,12目,14目,16目,18目,20目,25目,30目,35目,40目,45目,50目,60目,或这些值之任何两者之间的值(包括端点)。一些实施方案中,按美国筛系列,颗粒的大小是,或大约是,7-60目,18-60目,20-50目,30-40目,8-40目,8-30目,8-20目,8-18目,10-30目,10-25目,10-20目,10-18目,12-30目,12-25目,12-20目,或12-18目。一些实施方案中,按美国筛系列,多数个颗粒的平均大小是7-60目,18-60目,20-50目,30-40目,8-40目,8-30目,8-20目,8-18目,10-30目,10-25目,10-20目,10-18目,12-30目,12-25目,12-20目,或12-18目。在一些实施方案中,按美国筛系列,颗粒的大小为大约7目至大约60目。在一些实施方案中,按美国筛系列,颗粒的大小为大约10目至大约20目。

[0118] 本文公开的井处理颗粒也可以在壳体外面或在壳体下面包含一个或多个额外的包衣层(例如,相继的包衣层)。可能有利的是,在一些实施方案中,具有一个或多个包衣层

以向酶提供进一步的保护作用,从而避免酶活性的降低或丢失,防止不期望的酶从颗粒的泄露。该一个或多个包衣层还可以例如作为抛光包衣发挥作用,以改善颗粒的货架期、操作的简易性,防止挤压、和/或改善外观。不同包衣层可以发挥不同功能,包括但不限于,延迟酶释放(即,释放层)、保护酶免受环境和不相容包封剂材料的影响(保护层)、和改善生产工艺和操作性质(抛光层)。例如,该额外包衣层可以用于使酸化剂和/或酶的活性延迟不同的时间段。一些实施方案中,所述额外包衣层中的至少一个是聚合物保护层。一些实施方案中,所述额外包衣层中的至少一个是聚合物抛光层。一些实施方案中,颗粒包含释放层、保护层和抛光层中的至少一个。一些实施方案中,抛光层是颗粒的最外层。一些实施方案中,抛光层在保护层和/或释放层外。一些实施方案中,保护层在释放层下方。例如,保护层可以在颗粒中位于释放层里面。

[0119] 保护层可以包含本文公开的任何一种粘合剂或粘合剂组合。一些实施方案中,保护层包含聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、藻酸盐、聚乙二醇、蜡(例如蜂蜡或合成蜡)、黄原胶、聚乙酸乙烯、淀粉、麦芽糖糊精、角叉菜胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素、或其任何组合。抛光层也可以包含本文公开的粘合剂或包封剂聚合物之任何一种或组合。在一些实施方案中,抛光层包含聚乙烯吡咯烷酮,聚乙烯醇,藻酸盐,聚乙二醇,蜡(例如,蜂蜡或合成蜡),黄原胶,聚乙酸乙烯,淀粉,麦芽糖糊精,角叉菜胶,羟丙基纤维素,羟丙基甲基纤维素,甲基纤维素,羧甲基纤维素,乙基纤维素,硝酸纤维素,丙烯酸树脂,塑料,甲基丙烯酸酯,醋酸丙烯酸酯,聚偏二氯乙烯(PVDC),聚氨基甲酸酯,聚乙烯,聚酯,聚乳酸,聚羟基乙酸,聚乳酸和聚羟基乙酸的共聚物,乙酸乙烯-丙烯酸共聚物,苯乙烯-丙烯酸酯共聚物,苯乙烯/丙烯酸正丁酯共聚物,源自甲基丙烯酸、甲基丙烯酸酯、丙烯酸、丙烯酸酯、乙烯基单体(例如,苯乙烯和 α 甲基苯乙烯)的聚合物(均聚物或共聚物),或其任何组合。

[0120] 井处理颗粒中还可以存在各种其它成分,包括,但不限于氧化剂。一种或多种氧化剂可以存在于颗粒的任何部分,例如,含酶核心、围绕含酶核心的壳体、壳体外或壳体下方的一个或多个额外包衣层中的任何一层,或其任何组合。在一些实施方案中,可能有利的是,避免酶与可以在长期储存期间降解酶和使酶失稳定的氧化剂接触。在一些实施方案中,通过不含氧化剂的至少一个包衣层或壳体,将氧化剂与含酶核心隔开。例如,颗粒可以包含被不含氧化剂的壳体包围的含酶核心、和位于该壳体外的含氧化剂包衣层。在一些实施方案中,氧化剂与酶(例如,通过包衣层)在含酶核心中被分隔开。例如,颗粒可以包含被一个或多个聚合物包衣层包被、并分散在含酶核心中和/或存在于含酶核心外表面的一种或多种氧化剂。

[0121] 不受任何特定理论的束缚,据信,在一些实施方案中,有利的是,在井处理颗粒中具有发挥不同目的的不同成分。例如,酶作为分解剂起作用,酸化剂作为pH调节剂起作用。

[0122] 制备井处理颗粒的方法

[0123] 本文还提供制备井处理颗粒的方法。

[0124] 一些实施方案中,该方法包括:使酶与固体酸化剂接触以形成含酶核心;用一个或多个壳体包封含酶核心以形成井处理颗粒,其中该一个或多个壳体每一个都被配置为至少部分地包封含酶核心。

[0125] 图1A描述落入本公开范围内的方法的举例说明性实施方案。自框101起始(酶与固

体酸化剂接触以形成含酶核心),提供酶和固体酸化剂,使其彼此接触以形成含酶核心。一些实施方案中,例如通过无孔锅包衣工艺、锅包衣工艺、流化床包衣工艺、喷雾干燥工艺、连续包衣工艺、或其任何组合,将酶附着于固体酸化剂上。流化床包衣工艺的非限制性例子包括,底喷工艺、Wurster工艺、顶喷工艺、切线喷工艺、喷射床工艺、改良的流化床包衣工艺。将酶附着于固体酸化剂上的其它方法包括,使用安装在混合机顶部或混合机中的喷嘴(一个或多个),所述混合机为例如螺条混合机(ribbon blender)。在一些实施方案中,使酶与固体酸化剂接触包括,将含酶的溶液喷雾到固体酸化剂上。酶可以是上面就井处理颗粒谈到的任何酶。例如,酶可以是纤维素酶,半纤维素酶,果胶酶,黄原胶酶,甘露聚糖酶,半乳糖苷酶,葡聚糖酶,淀粉酶,淀粉葡萄糖苷酶,转化酶,麦芽糖酶,内切葡聚糖酶,纤维二糖水解酶,葡糖苷酶,木聚糖酶,木糖苷酶,阿拉伯呋喃糖苷酶,寡聚物酶,或其任何组合。在一些实施方案中,酶可以是热稳定酶或耐热酶。酸化剂可以是上面就井处理颗粒谈到的任何酸化剂。例如,酸化剂可以包含无机酸、有机酸、或其盐或酯,或其任何组合。除了酶和酸化剂,含酶核心也可以包括一种或多种其它成分,例如粘合剂、惰性载体、稳定剂、或上面就含酶核心述及的任何其它成分。在一些实施方案中,酸化剂包含有机缓冲剂,包括但不限于,Tris-HCl缓冲剂,吗啉乙磺酸(MES)缓冲剂,吡啶,二甲基胍酸盐缓冲剂,二(2-羟乙基)氨基-三(羟甲基)甲烷(BIS-TRIS)缓冲剂,哌嗪-N,N'-二(2-乙磺酸(PIPES)缓冲剂,3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)缓冲剂,3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)缓冲剂,乙二胺四乙酸(EDTA)缓冲剂,甘氨酸缓冲剂,及其任何组合。

[0126] 在一些实施方案中,包括在含酶核心中的酸化剂、粘合剂、惰性载体、稳定剂、和/或任何其它成分,可以在组合以形成含酶核心之前、期间、或之后研磨(单独地或一起地)。如本领域普通技术人员明了的,在研磨过程中可以使用各种研磨介质,只要该研磨介质不与包括在含酶核心中的酸化剂、粘合剂、惰性载体、稳定剂、和/或任何其它成分发生反应即可。在一些实施方案中,包括在含酶核心中的酸化剂、粘合剂、惰性载体、稳定剂、和/或任何其它成分,可以在组合以形成含酶核心之前或期间过筛(单独地或一起地)。在一些实施方案中,可以根据含酶核心的大小,进一步分拣含酶核心。例如,可以将含酶核心过筛,并仅保留某些大小的含酶核心。框101可以后接框102。

[0127] 在框102(包封含酶核心以形成井处理颗粒),用一个或多个壳体包封含酶核心以形成井处理颗粒,且每个壳体都被配置为至少部分地包封该含酶核心。可以用一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个壳体层包封含酶核心。在一些实施方案中,用相继的壳体包封含酶核心。在一些实施方案中,至少两个壳体彼此重叠。

[0128] 一些实施方案中,该方法包括:使酶与固体酸化剂混合以形成混合物;将混合物造粒以形成含酶核心;和用一个或多个壳体包封含酶核心以形成井处理颗粒,其中该一个或多个壳体每个都被配置为至少部分地包封该含酶核心。

[0129] 图1B描述本公开范围内的方法的举例说明性实施方案。自框111起始(酶与固体酸化剂混合以形成混合物),提供酶和固体酸化剂,使其彼此混合以形成混合物。酶可以是上面就井处理颗粒谈到的任何酶。例如,酶可以是纤维素酶,半纤维素酶,果胶酶,黄原胶酶,甘露聚糖酶,半乳糖苷酶,葡聚糖酶,淀粉酶,淀粉葡萄糖苷酶,转化酶,麦芽糖酶,内切葡聚糖酶,纤维二糖水解酶,葡糖苷酶,木聚糖酶,木糖苷酶,阿拉伯呋喃糖苷酶,寡聚物酶,或其任何组合。在一些实施方案中,酶可以是热稳定酶或耐热酶。酸化剂可以是上面就井处理颗粒

谈到的任何酸化剂。例如,酸化剂可以包含无机酸、有机酸、其盐或酯,或其任何组合。除了酶和酸化剂,混合物可以,在一些实施方案中,包括一种或多种其它成分,例如粘合剂、惰性载体、稳定剂、或上面就含酶核心描述过的任何其它成分。

[0130] 在一些实施方案中,包括在混合物中的酸化剂、粘合剂、惰性载体、稳定剂、和/或任何所述其它成分,可以在组合以形成混合物之前、期间、或之后研磨(单独地或一起地)。如本领域普通技术人员明了的,在研磨过程中可以使用各种研磨介质,只要该研磨介质不与包括在混合物中的酸化剂、粘合剂、惰性载体、稳定剂、和/或任何其它成分发生反应即可。在一些实施方案中,包括在混合物中的酸化剂、粘合剂、惰性载体、稳定剂、和/或任何所述其它成分,可以在组合以形成混合物之前或期间过筛(单独地或一起地)。框111可以后接框112。

[0131] 在框112(混合物造粒以形成含酶核心),将混合物造粒以形成含酶核心。可以使用本领域已知的任何造粒技术,例如湿法造粒工艺,将混合物造粒。一些实施方案中,湿法造粒工艺包括挤出、离心挤出、滚圆、分批高剪切造粒、连续高剪切混合、盘式造粒、转鼓造粒、喷雾干燥、流化床团聚、流化床造粒和/或层式造粒(layering)(例如,底喷、切线喷和喷射床)、颗粒化(prilling)、或其任何组合。在一些实施方案中,可以根据含酶核心的大小,进一步分拣含酶核心。例如,可以将含酶核心过筛,并仅保留某些大小的含酶核心。框112可以后接框113。

[0132] 在框113(包封含酶核心以形成并处理颗粒),用一个或多个壳体包封含酶核心以形成并处理颗粒,其中每个壳体都被配置为至少部分地包封含酶核心。在一些实施方案中,在用一个或多个壳体包封之前,干燥含酶核心。可以用一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个壳体层包封含酶核心。在一些实施方案中,用相继的壳体包封含酶核心。在一些实施方案中,至少两个壳体彼此重叠。

[0133] 如本文所述,例如,在框102和113,可以用本领域已知的任何适宜方法,例如包封或微包封(microencapsulation)技术,用一个或多个壳体包被含酶核心。一些实施方案中,通过无孔锅包衣工艺、锅包衣工艺、流化床包衣工艺、喷雾干燥工艺、连续包衣工艺、或其任何组合,包封含酶核心。流化床包衣工艺的非限制性例子包括,底喷工艺、Wurster工艺、顶喷工艺、切线喷工艺、喷射床工艺、改良的流化床包衣工艺,或其任何组合。在一些实施方案中,使用安装在混合机顶部或混合机中的喷嘴(一个或多个),实施包封,其中所述混合机为例如螺条混合机。喷雾干燥工艺也可以用作适宜的包封技术。在一些实施方案中,用锅包衣技术,包封含酶核心。

[0134] 每个壳体都被配置为至少部分地包封含酶核心。例如,壳体可以覆盖含酶核心的基本上全部表面区域,或仅覆盖部分区域。一些实施方案中,壳体覆盖含酶核心的全部表面区域,因而完全包封住该反应材料。可以用壳体包被整个含酶核心的全部或部分。例如,每个壳体可以包被含酶核心的大约10%,大约20%,大约30%,大约40%,大约50%,大约60%,大约70%,大约80%,大约90%,大约95%,或大约100%,或这些值之任何二者之间的范围。每个壳体包封含酶核心的程度可以变化。在一些实施方案中,所有的壳体覆盖含酶核心表面区域的基本上相似部分。在一些实施方案中,至少两个壳体覆盖含酶核心表面区域的不同部分。在一些实施方案中,壳体包含乙基纤维素,丙烯酸树脂,塑料,甲基丙烯酸酯,丙烯酸酯,醋酸丙烯酸酯,聚氨基甲酸酯,聚偏二氯乙烯(PVDC),硝酸纤维素,蜡,聚乙烯,聚

乙二醇,聚乙烯醇,聚酯,聚乳酸,聚羟基乙酸,聚乳酸和聚羟基乙酸的共聚物,聚乙酸乙烯,乙酸乙烯-丙烯酸共聚物,藻酸盐,琼脂,苯乙烯-丙烯酸共聚物,苯乙烯/丙烯酸正丁酯共聚物或其任何组合。

[0135] 每个壳体在组成或厚度上可以相同或不同。在一些实施方案中,所有壳体具有相同的组成。在一些实施方案中,至少两个壳体具有不同的组成。在一些实施方案中,所有壳体具有彼此不同的组成。在一些实施方案中,所有壳体的厚度相同。在一些实施方案中,至少两个壳体具有不同的厚度。在一些实施方案中,所有壳体具有不同的厚度。

[0136] 对于由本公开的方法制备的每一颗粒,其表面上的壳体覆盖程度也可以变化。在一些实施方案中,颗粒中有大约10%,大约20%,大约30%,大约40%,大约50%,大约60%,大约70%,大约80%,大约90%,大约95%,或大约100%,或这些值中任意二者之间的范围,其基本上所有的表面区域都被壳体覆盖。在一些实施方案中,颗粒中有大约10%,大约20%,大约30%,大约40%,大约50%,大约60%,大约70%,大约80%,大约90%,大约95%,或大约100%,或这些值中任意二者之间的范围,其全部表面区域的至少大约50%,60%,70%,80%,90%,95%,99%,或更多被壳体覆盖。本领域技术人员将明了,实现包封(例如,框102和113)的技术(一种或多种)不以任何方式受到限制。在一些实施方案中,包封步骤包括喷雾和/或干燥(例如,热流干燥)。在一些实施方案中,在升高的温度固化(cure)颗粒以促进至少一个壳体形成(例如,壳体(一个或多个)的成膜)。在一些实施方案中,用于固化的升高的温度是,或大约是,25°C,30°C,35°C,40°C,45°C,50°C,55°C,60°C,65°C,70°C,75°C,80°C,或这些值的任意二者之间的范围(包括端点)。在一些实施方案中,用于固化的升高的温度是大约25°C至大约80°C。在一些实施方案中,用于固化的升高的温度是大约40°C至大约60°C。

[0137] 由包封工艺导致的含酶核心的增重可以变化。增重可以通过,例如包衣应用之后干燥的包封后产品的重量相对于原始核心的理论增加百分比来测量。不束缚于任何特定的理论,据信增重可以指示包衣厚度。例如,在水干燥掉后含酶核心的增重可以是大约10%至大约250%。在一些实施方案中,增重是,或大约是,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%,110%,120%,130%,140%,150%,160%,170%,180%,190%,200%,或这些值的任意二者之间的范围。在一些实施方案中,在水干燥掉后含酶核心的增重是大约100%。在一些实施方案中,在水干燥掉后含酶核心的增重是大约20%至大约250%,大约40%至大约200%,大约50%至大约150%,或大约80至大约120%。在一些实施方案中,干燥掉水后的增重是100%。

[0138] 由本发明公开的方法制备的颗粒的大小不以任何方式被限制。例如,按美国筛系列,颗粒的平均大小可以是,或者大约是7目,大约8目,大约10目,大约12目,大约14目,大约16目,大约18目,大约20目,大约25目,大约30目,大约35目,大约40目,大约45目,大约50目,大约60目,或这些值的任意二者之间的范围(包括端点)。在一些实施方案中,按美国筛系列,颗粒的平均大小是大约7目至大约60目,大约18目至大约60目,大约20目至大约50目,大约30目至大约40目,大约8目至大约40目,大约8目至大约30目,大约8目至大约20目,大约8目至大约18目,大约10目至大约30目,大约10目至大约25目,大约10目至20目,大约10目至大约18目,大约12目至大约30目,大约12目至大约20目,大约12目至大约25目,或大约12目至大约18目。在一些实施方案中,颗粒可进一步根据其大小分拣。例如,颗粒可以过筛,仅保

留某些大小的颗粒。在一些实施方案中,按美国筛系列,保留大小为7目至60目的颗粒。在一些实施方案中,按美国筛系列,保留大小为10目至20目的颗粒。

[0139] 图2A示出了用于井处理的颗粒200的非限制性实施方案的横断面。在颗粒200中,壳体204和任选壳体205包封含酶核心203。壳体204和205每一个都覆盖含酶核心203的基本上整个表面区域。含酶核心203包含固体酸化剂201和酶202,酶202基本上存在于含酶核心203的表面上。图2B示出了用于井处理的颗粒210的另一非限制性实施方案的横断面。在颗粒210中,壳体214和任选壳体215包封含酶核心213。壳体214覆盖含酶核心213的基本上整个表面区域,壳体215仅覆盖含酶核心213的表面区域的一部分。含酶核心213含有固体酸化剂211和酶212,酶212基本上存在于含酶核心213的表面上。

[0140] 图2C示出用于井处理的颗粒220的非限制性实施方案的横断面。在颗粒220中,壳体224和任选壳体225包封含酶核心223。壳体224和225每一个都基本上覆盖含酶核心223的整个表面区域。含酶核心223包含固体酸化剂221和酶222,酶222分散于含酶核心223内。图2D示出了用于井处理的颗粒230的另一非限制性实施方案的横断面。在颗粒230中,壳体234和任选壳体235包封含酶核心233。壳体234基本上覆盖含酶核心233的整个表面区域,壳体235仅覆盖含酶核心233的表面区域的一部分。含酶核心233含有固体酸化剂231和酶232,酶232分散于含酶核心233内。在颗粒220和230中,固体酸化剂221和231、和酶222和232中的一个或多个可随机分散或以预定模式分散在含酶核心223和233内。

[0141] 在包封工艺的一个非限制性的例子中,将含有酶和粘合剂的溶液喷雾到酸化核心颗粒上以形成含酶核心。干燥含酶核心,并用含有包封剂材料的溶液或分散体喷雾以形成部分或完全包封含酶核心的壳体。然后将所得包封的颗粒干燥,以形成包封的酶分解剂。也可以向包封的分解剂添加一个或多个额外的壳体。

[0142] 本发明还公开了包含本公开的任何井处理颗粒的组合物。组合物的形式没有特别限制。例如,组合物可以在溶液或水分散体中。在一些实施方案中,包含井处理颗粒(一个或多个)的组合物在溶液中。在一些实施方案中,包含井处理颗粒的组合物在水分散体中。

[0143] 如本文公开的,本公开的配制的酶分解剂可以包含本文公开的任何井处理颗粒,或这些颗粒的任何组合。配制的酶分解剂,例如,可以分解参与烃采收工艺的靶组合物中的底物。靶组合物的实例包括,但不限于,压裂液、钻井液、砾石充填液、完井液、修井液、滤饼和它们的任意组合。

[0144] 在一些实施方案中,配制的酶分解剂可以被配置成以受控的方式分解靶组合物中的底物。例如,配制的酶分解剂可以呈现延缓的酶释放模式。在一些实施方案中,从配制的酶分解剂与靶组合物接触时起,到存在于配制的酶分解剂中的酶有大约5%,大约10%,大约20%,大约30%,大约40%,大约50%,大约60%,大约70%,大约80%,大约90%,大约95%,大约99%,大约100%,或这些值的任意二者之间的范围,从酶分解剂释放到靶组合物中,所花费的时间可以是,或大约是,1分钟,5分钟,10分钟,15分钟,20分钟,30分钟,40分钟,50分钟,1小时,1.5小时,2小时,4小时,8小时,12小时,16小时,20小时,24小时,36小时,48小时,或这些值的任意二者之间的范围(包括端点)。在一些实施方案中,从配制的酶分解剂与靶组合物接触时起,需要至少大约30分钟,将存在于配制的酶分解剂中的酶的大约50%,大约60%,大约70%,大约80%,大约90%,大约95%,大约99%,大约100%,或这些值的任意二者之间的范围,从酶分解剂释放到靶组合物中。在一些实施方案中,从配制的酶分

解剂与靶组合物接触时起,需要至少大约1小时,将存在于配制的酶分解剂中的酶的大约50%,大约60%,大约70%,大约80%,大约90%,大约95%,大约99%,大约100%,或这些值的任意二者之间的范围,从酶分解剂释放到靶组合物中。在一些实施方案中,从配制的酶分解剂与靶组合物接触时起,需要大约15分钟至大约24小时,大约20分钟至大约8小时,大约30分钟至大约4小时,大约40分钟至大约2小时,将存在于配制的酶分解剂中的酶的大约50%,大约60%,大约70%,大约80%,大约90%,大约95%,大约99%,大约100%,或这些值的任意二者之间的范围,从酶分解剂释放到靶组合物中。本领域普通技术人员能够根据以下因素确定所期望的延迟时间,所述因素包括但不限于期望的用途、井条件、靶组合物的组成(例如,压裂液、钻井液、完井液、修井液、砾石充填液、和其任何组合),和其任何组合。

[0145] 可接受用于携带支撑剂的靶组合物(例如,压裂液,钻井液,完井液,修井液,砾石充填液,及其任何组合)的最小粘度是,或大约是100cp,150cp,180cp,或200cp。在一些实施方案中,靶组合物(例如,压裂液)的粘度是100cp以上,150cp以上,180cp以上,或200cp以上。在一些实施方案中,酶从本公开配制的酶分解剂的延迟释放允许在降低前的延迟期间靶流体的粘度维持在最小水平以上。

[0146] 在烃采收工艺(例如,地下地层的处理,压裂液的分解)中使用本公开配制的酶分解剂的温度是可以变化的。有利地是,在一些实施方案中,在大约井温度下配制的酶分解剂呈现显著的酶活性或最大酶活性。在一些实施方案中,在烃采收中、在以下或大约以下温度使用配制的酶分解剂:70°F,80°F,90°F,100°F,110°F,120°F,130°F,140°F,150°F,160°F,170°F,180°F,190°F,200°F,210°F,220°F,230°F,240°F,250°F,260°F,270°F,280°F,290°F,300°F,或这些值的任意二者之间的范围。在一些实施方案中,在烃采收中在70°F至300°F、或140°F至220°F温度下使用配制的酶分解剂。

[0147] 可以用本公开的井处理颗粒和/或配制的酶分解剂处理烃采收工艺中使用和/或产生的各种流体和物质。流体的非限制性实例包括压裂液、钻井液、完井液、修井液、砾石充填液、和其任何组合。在一些实施方案中,流体包括一种或多种能水合的聚合物。在一些实施方案中,流体包括水、盐水、醇、或其任何混合物。

[0148] 流体的pH也可以变化。例如,流体的pH可以是,或大约是5.0至12.0。在一些实施方案中,流体的pH是,或大约是5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,9.0,9.5,10.0,10.5,11.0,11.5,12.0,12.5,13.0,或这些值的任意二者之间的范围。在一些实施方案中,流体的pH大约是6.0或更高,或大约是6.5或更高。在一些实施方案中,流体的pH大约是7.0或更高,或大约7.5或更高。在一些实施方案中,流体的pH大约是8.0或更高,或大约8.5或更高。在一些实施方案中,流体的pH大于或等于9.0,或大于或等于大约9.5。

[0149] 井处理组合物和其使用方法

[0150] 本发明还提供包含本文所公开的井处理颗粒的井处理组合物。井处理组合物可包含本文所公开的任何井处理颗粒,和其任何组合。在一些实施方案中,井处理组合物包含多个所述颗粒、一种或多种增稠剂和一种或多种溶剂。该组合物可进一步包含,例如,一种或多种交联剂。

[0151] 井处理组合物可以包含,例如,任何地下处理流体(例如,压裂液、钻井液、砾石充填液、完井液、或修井液)或地下处理流体的任何组合。在一些实施方案中,井处理组合物包含稠化的流体。在一些实施方案中,井处理组合物是流体形式。

[0152] 各种增稠剂可以存在于井处理组合物(例如,井处理流体)中。例如,增稠剂可包含瓜尔胶、取代的瓜尔胶、纤维素、衍生的纤维素、黄原胶、淀粉、多糖、明胶、聚合物、合成聚合物、或其任何组合。取代的瓜尔胶的非限制性实例包括羟乙基瓜尔胶、羟丙基瓜尔胶、羧甲基羟乙基瓜尔胶、羧甲基羟丙基瓜尔胶(CMHPG)、以及其任何组合。衍生的纤维素的非限制性实例包括羧甲基纤维素、聚阴离子纤维素、羟乙基纤维素、和其任何组合。

[0153] 各种溶剂可存在于井处理组合物(例如,井处理流体)中。溶剂可以是,例如,基于水或基于有机物的。在一些实施方案中,溶剂是水(例如,淡水、海水、采出水、来自蓄水层的水、或其任何组合)、盐水、具有水溶性有机化合物的水、或其任何组合。

[0154] 在一些实施方案中,井处理组合物包含胶凝剂(增稠剂)。胶凝剂或增稠剂的非限制性例子包括羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、羟烷基瓜尔胶、羟烷基纤维素、羧烷基羟基瓜尔胶、羧烷基羟烷基瓜尔胶、淀粉、明胶,聚(乙烯醇)、聚(乙烯亚胺)、瓜尔胶、黄原胶、多糖、纤维素、合成的聚合物、其任何衍生物、以及其任何组合。在一些实施方案中,胶凝剂或增稠剂以大约15磅每一千加仑(pptg)至大约80pptg的浓度存在于井处理组合物。

[0155] 在一些实施方案中,井处理组合物包含一种或多种能水合的聚合物。能水合的聚合物可以是未衍生的瓜尔胶、衍生的瓜尔胶、或其任何组合。在一些实施方案中使用未衍生的瓜尔胶可以是有利的。衍生的瓜尔胶的实例包括但不限于,羟丙基瓜尔胶和羧甲基羟丙基瓜尔胶。

[0156] 可能有利的是,在一些实施方案中,使用于烃采收工艺中的流体(例如,压裂液、砾石充填液、完井液、修井液和钻井液)在被酶分解剂分解后保持在阈值pH值以下,以避免流体(例如,交联的井处理流体)复原(其复原可以增加分解的流体的粘度)。如本文使用的,流体复原(reheal)指,例如,流体的再胶凝或再交联。在一些实施方案中,阈值pH值可以是、或大约是9.5,9.45,9.4,9.35,9.3,9.25,9.2,9.15,9.1,9.05,9.0,8.95,8.9,或这些值的任意二者之间的范围。在一些实施方案中,阈值pH值是9.5。在一些实施方案中,文中公开的井处理颗粒和/或井处理组合物可以被配置,以使交联的井处理流体(例如,压裂液、砾石充填液、完井液、修井液、钻井液或其任何组合)的pH降低至阈值pH以下(在阈值pH,交联的井处理流体可以复原)。在一些实施方案中,颗粒或井处理组合物被配置以使交联的井处理流体的pH降低至大约9.5以下。在一些实施方案中,为了延迟和完全的分解,有利的是,交联的井处理流体的结束pH低于9.5(用文中公开的颗粒或井处理组合物处理后),以及所选择的酶至少在pH9.5的范围是活性的。与仅仅当pH降低至中性时才是活性的纤维素酶不同,文中公开的纤维素酶(例如,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:21的多肽和由SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20编码的多肽)在pH9.5的范围是活性的。该活性,结合pH降低至9.5以下(如本文所述,用共同包封的酸化剂),可以提供交联的井处理流体的完全分解。

[0157] 各种交联剂可存在于烃采收中使用的井处理组合物和流体(例如,压裂液)中。在一些实施方案中,交联剂包括硼衍生物、高碘酸钾、碘酸钾、三价铁(ferric iron)衍生物、镁衍生物、以及其任意组合。交联剂的实例包括,但不限于,硼酸根离子、锆酸根离子、钛酸根离子、和其任意组合。在一些实施方案中,交联剂(一种或多种)以大约0.5加仑每一千加

仑(gpt)至大约5gpt的浓度存在于井处理组合物中。

[0158] 在一些实施方案中,交联剂包括金属离子。例如,交联剂可以包括含铝、镓、锆和钛的化合物,硼酸盐,硼释放化合物,以及其任何组合。在一些实施方案中,交联剂包括有机钛酸盐。在一些实施方案中,交联剂是提供硼酸盐离子的材料。硼酸盐交联剂的非限制性实例包括有机硼酸盐、单硼酸盐、多硼酸盐、矿物硼酸盐、硼酸、硼酸钠,包括无水或任意的水合物、硼酸盐矿石(例如,硬硼酸钙石或钠硼解石)、以及络合有机化合物以延迟硼酸根离子释放的任何其他硼酸盐。可以是有利的,在一些实施方案中,使用硼酸盐交联剂作为交联剂。

[0159] 在一些实施方案中,本文所公开的井处理组合物也可以包括多数个支撑剂微粒。适合使用的微粒可包括适合在地下操作中使用的任何材料。对于这些微粒合适的材料包括,但不限于砂子、铝土矿、陶瓷材料、玻璃材料、聚合物材料、聚四氟乙烯材料、坚果壳碎片、含有坚果壳碎片的固化树脂微粒、种壳碎片、含有种壳碎片的固化树脂微粒、果核碎片、含有果核碎片的固化树脂微粒、木材、复合微粒、以及其任何组合。井处理组合物也可包含粘合剂和填充材料,其中适合的填充材料包括二氧化硅、氧化铝、热解碳、炭黑、石墨、云母、二氧化钛、偏硅酸盐、硅酸钙、高岭土、滑石、氧化锆、硼、飘尘、中空玻璃微球、固体玻璃、或其任意组合。按美国筛系列,平均微粒大小通常可以为大约2目至大约400目;然而,在某些情况下,其它的平均微粒尺寸可能是需要的,并将完全适于实践本文公开的方法和组合物。在一些实施方案中,可以有利的是使用按美国筛系列平均微粒大小分布范围6-12目、8-16目、12-20目、16-30目、20-40目、30-50目、40-60目、40-70目、或50-70目的微粒。应当理解的是,如在本公开中使用的术语“微粒”,包括所有已知形状的材料,包括基本上球形的材料、纤维材料、多边形材料(如立方体材料)以及其任何组合。此外,纤维材料(可以用来或可以不用来承受封闭裂缝的压力)也可以存在于本文所公开的组合物中。在一些实施方案中,微粒可以以井处理组合物体积计大约60g/L或0.5磅每加仑(“ppg”)至大约3500g/L或30ppg的含量存在于井处理组合物(例如,井处理流体)中。

[0160] 可以使用本领域常规公知的任何支撑剂,包括但不限于,石英砂粒、玻璃珠、铝球、陶瓷、塑料珠,包括聚酰胺、和超轻(ULW)微粒如坚果的研磨或粉碎的壳(像核桃、椰子、山核桃、扁桃、象牙果、巴西坚果等);水果种子的研磨和粉碎的种子壳(包括果核),如梅、橄榄、桃、樱桃、杏等;其它植物的研磨和粉碎的种子壳,如玉米(例如,玉米棒子或玉米粒)等;加工的木材材料,例如来自木材的那些,如橡树、山胡桃、胡桃、杨树、桃花心木等,包括已经通过研磨、切削、或其他形式的微粒化工艺等处理的木材。

[0161] 井处理组合物可用于处理地下地层。在一些实施方案中,处理地下地层的方法包括:使地下地层与井处理流体接触,其中,所述井处理流体包含文中公开的任何井处理颗粒、一种或多种增稠剂和一种或多种溶剂;和允许井处理颗粒中的酶降低井处理流体的粘度。

[0162] 酶可以降低井处理流体粘度的程度可以是改变的,并且可以根据用户的特定使用/目的来确定。例如,在酶处理后井处理流体的粘度可以是、或者大约是酶处理之前井处理流体粘度的0.001%,0.01%,0.1%,1%,5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,75%,或这些值的任意二者之间的范围。在一些实施方案中,酶使井处理流体粘度降低大约、或者至少大约10%,20%,30%,40%,50%,60%,65%,75%,80%,85%,90%,95%,100%,两倍,三倍,五倍,一个数量级,两个数量级,三个数量级,四个数量级,五

个数量级,六个数量级,七个数量级,或这些值的任意二者之间的范围。在一些实施方案中,酶完全分解并处理流体。在一些实施方案中,酶将并处理流体分解为自由流动的水稀流体。在一些实施方案中,酶将并处理流体的粘度降低至使用Cambridge Viscosity的VISCOLab 4000测量小于10cP的粘度。

[0163] 在一些实施方案中,除存在于并处理颗粒中的酸化剂外,并处理流体不包含任何额外的pH降低剂。在一些实施方案中,除存在于并处理颗粒中的酸化剂外,并处理流体还包含一种或多种额外的pH降低剂。在一些实施方案中,用于处理地下地层的方法包括:使额外的pH降低剂与并处理流体接触来调节并处理流体的pH值。在一些实施方案中,在没有任何额外的pH降低剂的情况下酶完全分解并处理流体。pH降低剂可以是,例如,本文所公开的任何酸化剂。

[0164] 在一些实施方案中,用于处理地下地层的方法包括:提供具有第一粘度的稠化的处理流体,其中所述稠化的处理流体包含胶凝剂、支撑剂、水基流体、本公开中的任何配制的酶分解剂;将稠化的处理流体导入地下地层;创建或增强地下地层的裂缝;和允许配制的酶分解剂释放酸化剂和酶,使稠化的处理流体的粘度降低至第二粘度。

[0165] 正如本领域的普通技术人员所理解的,包含并处理颗粒的配制的酶分解剂与稠化的处理流体混合的时间可以变化。在一些实施方案中,配制的酶分解剂在导入地下地层之前与稠化的处理流体混合。在一些实施方案中,在向地下地层导入增稠剂的同时将配制的酶分解剂混入稠化的处理流体中。在一些实施方案中,配制的酶分解剂在增稠剂导入地下地层后混入稠化的处理流体中。在一些实施方案中,稠化的处理流体还包含交联剂。稠化的流体可以是基于水的或基于有机溶剂的流体。基于水的流体可以是,例如,基于水的任何流体。基于水的流体的实例包括但不限于,海水、盐水、水等。

[0166] 在一些实施方案中,并处理流体也可以包含未包封的分解剂。未包封的分解剂的实例包括但不限于,氧化剂如过硫酸铵、过硫酸钠、亚氯酸钠、过氧化镁、氧化镁,酶和其任意组合。包封和未包封的分解剂的这种混合物,在一些实施方案中,当需要时可以加速分解过程。在一些实施方案中,并处理流体可以包含一种以上类型的包封分解剂。例如,并处理流体可以包含如本文中公开的配制的酶分解剂和一种或多种额外的包封的分解剂。额外的包封分解剂的实例包括但不限于,氧化剂(例如,过硫酸铵、过硫酸钠、亚氯酸钠、过氧化镁、氧化镁、以及其任意组合)、酶和它们的任意组合。包封其他分解剂的制剂和方法可以与本文所述的酶的包封相同、类似或不同。

[0167] 在一些实施方案中,用于处理地下地层的方法包括:提供具有第一粘度的稠化的处理流体,其中所述稠化的处理流体包含通过包括胶凝剂和交联剂的反应形成的交联的胶凝剂、支撑剂、水基流体、和包含本公开的任何并处理颗粒的配制的酶分解剂;将稠化的处理流体导入地下地层;创建或加强地下地层中的裂缝;和允许配制的酶分解剂随时间的推移将酶分解剂暴露于稠化的处理流体,以降低稠化的处理流体的粘度。在一些实施方案中,稠化的处理流体在酶处理后完全分解。

[0168] 在一些实施方案中,配制的酶分解剂在胶凝剂和交联剂已交联之后加入到稠化的处理流体中。

[0169] 本文公开的配制的酶分解剂能够在各种温度下分解流体底物(例如,压裂液),例如大约80°F至大约250°F。在一些实施方案中,流体底物被配制的酶分解剂完全分解。在一

些实施方案中,配制的酶分解剂在以下温度、或在大约以下温度分解流体底物:80°F,90°F,100°F,110°F,120°F,130°F,140°F,150°F,160°F,170°F,180°F,190°F,200°F,210°F,220°F,230°F,240°F,250°F,这些值中任何两个之间的范围。

[0170] 本文公开的配制的酶分解剂能够在不同pH水平分解流体底物(例如,压裂液),例如在大约pH 5至大约pH 11。在一些实施方案中,配制的酶分解剂可使流体底物完全分解。在一些实施方案中,配制的酶分解剂在以下pH、或在大约以下pH分解流体底物:5,5.5,6,6.5,7,7.5,8,8.5,8.6,8.7,8.8,8.9,9,9.1,9.2,9.3,9.4,9.5,9.6,9.7,9.8,9.9,10,10.5,11,或这些值中任意二者之间的范围。在一些实施方案中,配制的酶分解剂能够在没有任何额外的pH降低剂或组合物(例如酯、或酸性缓冲液)的情况下使流体底物完全分解。在一些实施方案中,配制的酶分解剂在大约80°F至250°F的温度和6-11的pH延迟分解大约20分钟至大约240分钟。在一些实施方案中,配制的酶分解剂在不存在任何额外的pH降低剂或组合物的情况下、在大约80°F至250°F的温度和6-11的pH延迟分解大约20分钟至大约240分钟。

[0171] 在一些实施方案中,酶是纤维素酶。在一些实施方案中,酶是甘露聚糖酶。所述纤维素酶或甘露聚糖酶可在温度超过160°F以及超过180°F水解瓜尔胶聚合物。实际上,所述纤维素酶可以在温度超过185°F、甚至超过195°F水解瓜尔胶聚合物。此外,所述纤维素酶或甘露聚糖酶可以与其它酶和/或氧化分解剂组合使用,以在更广泛的温度和pH范围降解瓜尔胶。

实施例

[0172] 另外的实施方案在以下实施例中进一步详细地公开,其不旨在以任何方式限制权利要求的范围。

[0173] 实施例1

[0174] 酶和各种酸化剂

[0175] 用瓜尔胶溶液进行流变学研究,其中以液体形式加入各种酸化剂(乙酰乙酸乙酯、硫酸铵、柠檬酸)和SEQ ID NO:2的纤维素酶。用瓜尔胶溶液和仅SEQ ID NO:2的酶,进行对照测定。通过剧烈搅拌,在水中水合25pptg的瓜尔胶45分钟,接着加入表面活性剂、粘土稳定剂、和pH调节剂以达到pH=10.5。一旦加入延迟的交联剂后,以下列最终浓度加入酶和酸化剂:a)6mU/mL酶+5mM酯(乙酰乙酸乙酯);b)6mU/mL酶+2.5mM硫酸铵;c)6mU/mL酶+2.5mM柠檬酸;d)(对照)25mU/mL酶,没有其他添加。使用低压粘度计、在167°F、用~15分钟的温度斜坡(temperature ramping),测量粘度。在环境温度下通过倾倒试验检测了瓜尔胶的完全分解(分解的瓜尔胶显示粘度<6cP)。该研究的结果如图3中显示。除对照以外所有溶液达到完全分解。

[0176] 实施例2

[0177] 酸化剂逆转瓜尔胶的交联,但不分解瓜尔胶至完全分解:

[0178] 为了测试酸化剂(没有酶)对瓜尔胶流变学的影响,在不存在如实施例1所述酶的情况下以2.5mM最终浓度(虚线)进行流变学研究。阳性对照(实线)是用酸化剂(2.5mM)和酶(6mU/mL)二者处理的瓜尔胶。阴性对照(灰线)是单独用酶(25mU/mL)处理的瓜尔胶。虽然酸化剂降低瓜尔胶粘度,这些样品中的瓜尔胶在不存在酶的情况下没有达到完全分解。结果

示于图4中。酸化剂使平衡从交联的瓜尔胶移向线性瓜尔胶(非交联的),原因是环境pH的变化(从初始pH~10.5至最终pH~7.2-9,见图5-7)。

[0179] 实施例3

[0180] 完全分解所需的酸化剂水平

[0181] 为了计算完全分解瓜尔胶所需的酶和酸化剂的最佳浓度,使用0.7-25mU/mL的酶浓度和0.67mM-5mM的酸化剂浓度进行了如实施例1中的研究。本实施例中使用的酸化剂是硫酸铵、磷酸二氢钠和柠檬酸。通过在环境温度下的倾倒试验检测了瓜尔胶的完全分解(分解的瓜尔胶显示粘度<6cP)。记录最终pH以建立酸化剂对瓜尔胶pH的影响。结果显示在图5、6和7。最适浓度用来设计酶和酸化剂(在包封样品中用作载体)之间的比率。

[0182] 实施例4

[0183] 无酯添加,酸化剂载体颗粒的影响

[0184] 将酶附着到酸化剂载体以及非酸化载体上,以测试在没有外在酯添加的情况下酶分解瓜尔胶的能力。

[0185] (a)酶附着到非酸化载体上:在Wurster辊筒构型(bowl configuration)中,用131,000平均MW聚乙烯醇(PVA 130)的0.75%溶液包被微晶纤维素球,所述溶液中含有200U/mL酶,以总增重0.375%。然后进一步用1.5%PVA 130包被这些加载的载体,得到0.75%增重和最终活性水平100U/g。样品在40°C(104°F)干燥。

[0186] (b)酶附着到酸化载体上:在Wurster辊筒构型中,用含有320U/ml酶的1.5%藻酸钠溶液包被粒状硫酸铵,总增重0.5625%。然后进一步用含有20%麦芽糖糊精和10%高岭土的1.5%藻酸钠溶液包被这些加载的载体,总增重11.8%和最终活性106.7U/g。样品在40°C(104°F)干燥。

[0187] 在没有或有酯(乙酰乙酸乙酯,5mM)存在的情况下将干燥样品加入到交联的瓜尔胶溶液,达到25mU/mL的终浓度。如实施例1中所描述的相同条件下进行实验,结果示于图8中。附着到酸化剂载体的酶样品和附着到非酸化剂载体的酶加酯的样品均产生了瓜尔胶溶液的完全分解,而具有附着到非酸化剂载体的酶但不含酯的样品不分解瓜尔胶。

[0188] 实施例5

[0189] 载体和包封

[0190] 含有附着到硫酸铵载体的酶(无包衣)的干燥样品进一步用保护性包衣包被,随后用不可渗透的相容性聚合化合物包被。如实施例1所述,在25mU/mL的最终酶浓度、在低压粘度计中测试样品。结果显示在图9中。

[0191] (a)包衣1:在Wurster辊筒构型中,用含有320U/ml酶的1.5%藻酸钠溶液包被粒状硫酸铵,总增重0.5625%。然后进一步用含有20%麦芽糖糊精和10%高岭土的1.5%藻酸钠溶液包被该加载的载体,在之前的组合上总增重11.8%。然后将该材料加载到包衣锅中并用55%聚偏二氯乙烯分散体包被,增重25%和最终活性86U/g。

[0192] (b)包衣2:在Wurster辊筒构型中,用含有300U/ml酶的1.5%藻酸钠溶液包被粒状硫酸铵,总增重0.6%。然后进一步用含有20%麦芽糖糊精和10%高岭土的1%藻酸钠溶液包被此加载的载体,总增重15.5%。然后将该材料加载到包衣锅中并用55%聚偏二氯乙烯分散体包被,增重50%和最终活性52U/g。

[0193] 如图9所示,向附着到硫酸铵载体的酶上添加聚合物包衣产生了酶从颗粒中释放

的延迟、以及由此在瓜尔胶分解中对有效压裂而言必要的特性。

[0194] 实施例6

[0195] 载体和使用两个相继包衣包封

[0196] 将含有附着到硫酸铵载体的酶的干燥样品包被上相继的两层聚合物包封剂材料，以改善延迟释放。如实施例1中所述，在25mU/mL的最终酶浓度、在低压粘度计中测试样品。结果示于图10。

[0197] (a)载体加酶：粒状硫酸铵的20至60目级分通过Wurster工艺包被上含67U/mL酶的1%藻酸钠，增重0.5%和最终活性50U/mL。

[0198] (b)载体加酶加丙烯酸酯：粒状硫酸铵的20至60目级分通过Wurster工艺包被上含67U/mL酶的1%藻酸钠溶液，增重0.5%。然后通过将加载的载体放入包衣锅中并喷雾55%丙烯酸聚合物分散体以进一步包被该加载的载体，增重50%和最终活性35U/g。

[0199] (c)载体加酶加PVDC：粒状硫酸铵的20至60目级分通过Wurster工艺包被上含67U/mL酶的1%藻酸钠溶液，增重0.5%。然后通过将加载的载体放入包衣锅中并喷雾55%聚偏二氯乙烯分散体以进一步包被该加载的载体，增重50%和最终活性35U/g。

[0200] (d)载体加酶加丙烯酸酯加PVDC：粒状硫酸铵的20至60目级分通过Wurster工艺包被上含67U/mL酶的1%藻酸钠溶液，增重0.5%。然后通过将加载的载体放入包衣锅中，并喷雾55%丙烯酸聚合物分散体(从原始批次大小增重50%)，然后喷雾55%聚偏二氯乙烯分散体(从原始批次大小再增重40%和最终活性25U/g)，以进一步包被该加载的载体。

[0201] 图10显示了，将酶包封在相继两层的聚合物(丙烯酸酯，随后是PVDC)中有利于增加延迟的酶活性和由此有利于分解瓜尔胶。

[0202] 实施例7

[0203] 粒状酸化剂载体和酶的耐热性

[0204] 含附着到酸化剂的酶和稳定剂的干燥颗粒用如上所述充足的聚合物包封剂层包被，以保证酶在高温下存活。在高压粘度计中、在167°、180°、195°、203°F的温度点和500psi最终压力下、在确保瓜尔胶完全分解的不同剂量下(70mU/mL-170mU/mL)，测试样品。结果显示在图11。在高剪切混合机中，使用聚乙烯吡咯烷酮作为粘合剂(直接与酶溶液混合)，使用等份的微晶纤维素、甘露糖醇和硫酸铵，实现造粒。然后将负载的载体在烘箱中干燥，并使其通过12目筛，并使用60目筛来去除任何细颗粒。然后将附着到酸化剂载体的酶的该确定大小的干燥颗粒置于包衣锅中并用丙烯酸分散体喷雾包被，从原始材料总增重100%。

[0205] 如在图11中可以看出的，包封的附着至酸化剂的酶在各温度点(167°，180°，195°，203°F)均实现了完全分解；而缺少包封的酶的样品在203°F不分解瓜尔胶。

[0206] 实施例8

[0207] 包封的酸化剂与酶的耐热性

[0208] 附着到酸化剂载体的酶的干燥样品用聚合物包封剂材料厚层包被，以确保酶在高温下的存活。将硫酸铵置于Wurster包衣机中，喷雾含有1%藻酸钠的酶溶液。然后将这些核心置于包衣锅中，喷雾丙烯酸分散体，增重200%。在高压粘度计中、在195°F-212°F和500psi的最终压力下、以在确保瓜尔胶完全分解的剂量(80mU/mL-125mU/mL)，测试样品。结果显示在图12和图13。

[0209] 实施例9

[0210] 包封的酸化剂和酶的货架期和贮存稳定性

[0211] 附着到酸化剂载体的酶的干燥样品用聚合物包封剂材料厚层包被,以确保酶在高温下的存活。将硫酸铵置于Wurster包衣机中,喷雾含有1%藻酸钠的酶溶液。然后将这些核心置于包衣锅中,喷雾丙烯酸分散体,增重200%。样品留在室温(15-25°C)保存的塑料瓶中所示时间长度,以老化。然后在高压粘度计中、在pH10.5,203°F和500psi的最终压力下、以确保瓜尔胶完全分解的剂量(~100mU/mL或13pptg),测试样品。结果显示在图14,其示出了储存不同长度时间的样本实现了一致的分解谱。

[0212] 实施例10

[0213] 包封的酸化剂与酶的剂量依赖

[0214] 附着到酸化剂载体的酶的干燥样品用两层聚合物包封剂材料包被。硫酸铵置于Wurster包衣机中,喷雾含有5%聚(乙烯吡咯烷酮)的酶溶液。然后将这些核心置于包衣锅中,喷雾苯乙烯/丙烯酸正丁酯共聚物的分散体,增重80%,然后用形成硬膜的丙烯酸乳液进行第二喷雾。在高压粘度计中、在pH10.5,203°F和500psi的最终压力下、在描述的剂量(在交联的瓜尔胶流体中4.0-13.0pptg包封的样品或66-214mU/mL最终酶浓度),测试样品。结果显示在图15。

[0215] 实施例11

[0216] 流体终pH对获得交联瓜尔胶流体的完全分解的影响

[0217] 将32mU/mL具有氨基酸序列SEQ ID NO:2的未包封纤维素酶和1pptg柠檬酸或2pptg柠檬酸施加到交联瓜尔胶流体(25pptg,pH 10.5)。用Grace粘度计,在温度165°F和500psi,进行流变学测试。结果示于图16。

[0218] 如图16所示,在环境温度,终pH 9.0(9.5以下)的瓜尔胶流体被完全分解(0cP的粘度)。虽然具有终pH9.5的瓜尔胶流体在165°F显示出0cP的粘度,但在环境温度下该交联凝胶复原(粘度>200cp)。

[0219] 实施例12

[0220] 流体终pH对获得交联瓜尔胶流体的完全分解的影响

[0221] 附着到酸化剂载体的酶的干燥样品用一厚层聚合物包封剂材料包被,以确保酶在高温下存活。为了制备酶和酸化剂核心,硫酸铵置于Wurster包衣机中,喷雾含有2.5%聚(乙烯吡咯烷酮)的酶(具有氨基酸序列SEQ ID NO:2的纤维素酶)溶液。然后将这些核心置于包衣锅中,喷雾丙烯酸分散体,增重200%。在高压粘度计中、在203°F和500psi的最终压力下、在确保完全分解瓜尔胶的剂量(167mU/mL-278mU/mL),进行获得的包封颗粒的流变学测试。交联的流体系统具有初始pH11。包封的颗粒以8pptg和13pptg加入到交联的流体。结果示于图17。

[0222] 如图17所示,具有9.27的终pH值的流体显示出完全分解。相反,具有9.63的终pH值的流体没有被完全分解,流体在环境温度下复原。

[0223] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。此处引用的所有专利、申请、公开的申请和其它出版物通过引用以其整体并入,除非另有说明。

[0224] 在至少一些前面描述的实施方案中,在一个实施方案中使用的一个或多个元件可以在另一个实施方案中互换使用,除非这样的替换是技术上不可行的。本领域技术人员将

理解,可以在不背离所要求保护主题的范围下对上述方法和结构进行各种其它省略、添加和修改。所有这些修改和改变都将落入由所附权利要求所限定的主题的范围内。

[0225] 对于本文使用的基本上任何复数和/或单数术语,本领域技术人员可以根据上下文和/或应用酌情地从复数翻译为单数和/或从单数翻译为复数。为清楚起见在此明确地述及各种单数/复数排列。

[0226] 本领域技术人员将理解的是,在一般情况下,本文使用的,特别是在所附权利要求(例如,所附权利要求的主体)中使用的术语,一般旨在作为“开放式”术语(例如,术语“包括”应被解释为“包括但不限于”,术语“具有”应该被解释为“至少具有”,术语“包括”应被解释为“包括但不限于”,等等)。本领域技术人员还将理解的是,如果意图是被引导的权利要求述及物的特定数量,则该意图会明确地记载在权利要求中,没有这样的加载则没有这样的意图。例如,作为对理解的帮助,下面所附的权利要求可以包含引导性短语“至少一个”和“一个或多个”的用法,以引导权利要求述及物。然而,使用这样的短语不应被理解为暗示:通过不定冠词“一”或“一个”引导权利要求述及物,将使得含有这样引导的权利要求述及物的任何特定权利要求被局限于包含仅一个该述及物的实施方案,即使当相同权利要求包括引导短语“一个或多个”或“至少一个”和诸如“一”或“一个”的不定冠词时也是如此(例如,“一”和/或“一个”应被解释为是指“至少一个”或“一个或多个”);这同样适用于使用定冠词引导权利要求述及物的情形。此外,即使在明确表述引导的权利要求述及物的特定数量的情况,本领域技术人员也将明了,这样的表述应解释为意味着至少该述及数(例如,仅述及“两个述及物”,没有其他修饰语,意味着至少两个述及物、或两个或两个以上述及物)。此外,在使用类似于“A,B和C等中的至少一个”的惯用语的情形中,一般这样的结构意图表示本领域技术人员理解该惯用语的含义(例如,“具有A、B和C中的至少一个的系统”将包括但不限于,具有单独的A,单独的B,单独的C,A和B一起,A和C一起,B和C一起,和/或A、B和C一起等的系统)。在使用类似于“A,B或C等中的至少一个”的惯用语的情形中,一般这样的结构意图表示本领域技术人员理解该惯用语的含义(例如,“具有A,B或C中的至少一个的系统”将包括但不限于,具有单独的A,单独的B,单独的C,A和B一起,A和C一起,B和C一起,和/或A、B和C一起等的系统)。本领域技术人员还将理解,无论在说明书、权利要求书或附图中,几乎任何给出两个或两个以上可供选择术语的连接性词语和/或短语,都应该被理解为考虑了包括术语之一、术语之任一、或两个术语的可能性。例如,短语“A或B”将被理解为包括了“A”或“B”或“A和B”的可能性。

[0227] 此外,本公开的特征或方面以马库什方式描述时,本领域技术人员将认识到,本公开内容也因此描述了该马库什组的任何单个成员或成员亚组。

[0228] 如本领域技术人员将理解的,对于任何和所有目的,如提供书面说明书方面,本文公开的所有范围还包括任何和所有可能的子范围和其子范围的组合。可以容易地理解,任何列出的范围均构成对该相同范围分为至少相等的两份、三份、四份、五份、十份等等的情形的充分支持和充分公开。作为一个非限制性实例,本文所讨论的每个范围均可容易地细分为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域技术人员也将理解的,所有表述诸如“多至”、“至少”、“大于”、“小于”等包括叙述的数字并且是指可以如以上所讨论的随后分解成子范围的范围。最后,如本领域技术人员将理解的,范围包括每个单独的成员。因此,例如,具有1-3个元素的组是指具有1,2或3个元素的组。同样地,具有1-5个元素的组是指具有

1,2,3,4或5个元素的组,等等。

[0229] 虽然本文已经公开了各种方面和实施方案,其他方面和实施方案对本领域技术人员将是显而易见的。本文所公开的各个方面和实施方案是为了举例说明的目的,而不是意在限制以下权利要求指出的真正的范围和主旨。

序列表

<110> 巴斯夫酶有限责任公司 (BASF ENZYMES LLC)

<120> 受控分解酶制剂

<130> VEREN. 078W0/D2650-1W0

<150> 61/878224

<151> 2013-09-16

<150> 61/916366

<151> 2013-12-16

<160> 21

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 954

<212> DNA

<213> 人工序列

[0001]

<220>

<223> 编码 SEQ ID NO:2 的开放阅读框, 赋予增强的蛋白表达

<400> 1

```
atgggcgtcg atccgtttga acgtaacaaa atcttgggcc gccgcattaa tatcgccaat 60
gcgctcgaag caccaaatga aggcgactgg ggagtggatg taaaagatga gttcttcgac 120
attataaaag aagccggttt ctctcatgtt cgaattccaa taagatggag tacgcacgct 180
caggcgtttc ctctttataa aatcgagcct tctttcttca aaagagtggg tgaagtata 240
aacggagccc tgaaaagagg actggtctgtt gttataaata ttcactacta cgaggagtta 300
atgaatgacg cagaagaaca caaggaaaga tttcttgctc ttgggaaaca aattgctgat 360
cgttataaag actateccga aactctatit ttgaaattc tgaatgaacc tcacggaaat 420
cttactccgg aaaaatggaa tgaactgctt gaggaagctc taaaagttaa aagatcaatt 480
gacaaaaagc acactgtgat tataggcaca gctgaatggg ggggtatata tgccttgaa 540
aaactgaggg tcccaaatg ggaaaaaaat gcgatagtta caattacta ctacaatect 600
ttcgaattta cccatcaagg agctgagtgg gtgcctggat ctgagaaatg gttgggaaga 660
aagtggggat ctccagatga tcagaaacat ttgatagaag aattcaattt tatagaagaa 720
tggtcaaaaa agaacaaaag accaattiac ataggtgagt ttggtgccta cagaaaagct 780
gaccttgaat caagaataaa atggacctcc tttgtcgttc gcgaagccga gaaaaggggg 840
tggagctggg catactggga atttgttcc ggttttgggt ttatgatcc tctgagaaaa 900
cagtgaata aagatctttt agaagcttta ataggaggag atagcattga atga 954
```

<210> 2

<211> 317

<212> PRT

<213> 海栖热袍菌(Thermotoga maritime)

<400> 2

[0002]

```

Met Gly Val Asp Pro Phe Glu Arg Asn Lys Ile Leu Gly Arg Gly Ile
  1             5             10             15
Asn Ile Gly Asn Ala Leu Glu Ala Pro Asn Glu Gly Asp Trp Gly Val
      20             25             30
Val Ile Lys Asp Glu Phe Phe Asp Ile Ile Lys Glu Ala Gly Phe Ser
      35             40             45
His Val Arg Ile Pro Ile Arg Trp Ser Thr His Ala Gln Ala Phe Pro
      50             55             60
Pro Tyr Lys Ile Glu Pro Ser Phe Phe Lys Arg Val Asp Glu Val Ile
      65             70             75             80
Asn Gly Ala Leu Lys Arg Gly Leu Ala Val Val Ile Asn Ile His His
      85             90             95
Tyr Glu Glu Leu Met Asn Asp Pro Glu Glu His Lys Glu Arg Phe Leu
      100            105            110
Ala Leu Trp Lys Gln Ile Ala Asp Arg Tyr Lys Asp Tyr Pro Glu Thr
      115            120            125
Leu Phe Phe Glu Ile Leu Asn Glu Pro His Gly Asn Leu Thr Pro Glu
      130            135            140
Lys Trp Asn Glu Leu Leu Glu Glu Ala Leu Lys Val Ile Arg Ser Ile
      145            150            155            160
Asp Lys Lys His Thr Val Ile Ile Gly Thr Ala Glu Trp Gly Gly Ile
      165            170            175
Ser Ala Leu Glu Lys Leu Arg Val Pro Lys Trp Glu Lys Asn Ala Ile
      180            185            190
Val Thr Ile His Tyr Tyr Asn Pro Phe Glu Phe Thr His Gln Gly Ala
      195            200            205
Glu Trp Val Pro Gly Ser Glu Lys Trp Leu Gly Arg Lys Trp Gly Ser
      210            215            220
Pro Asp Asp Gln Lys His Leu Ile Glu Glu Phe Asn Phe Ile Glu Glu
      225            230            235            240
Trp Ser Lys Lys Asn Lys Arg Pro Ile Tyr Ile Gly Glu Phe Gly Ala
      245            250            255
Tyr Arg Lys Ala Asp Leu Glu Ser Arg Ile Lys Trp Thr Ser Phe Val
      260            265            270
Val Arg Glu Ala Glu Lys Arg Gly Trp Ser Trp Ala Tyr Trp Glu Phe
      275            280            285
Cys Ser Gly Phe Gly Val Tyr Asp Pro Leu Arg Lys Gln Trp Asn Lys
      290            295            300
Asp Leu Leu Glu Ala Leu Ile Gly Gly Asp Ser Ile Glu

```

305 310 315

<210> 3

<211> 954

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 SEQ ID NO:2 的开放阅读框

<400> 3

atgggtgttg atccttttga aaggaacaaa atattgggaa gaggcattaa tataggaaat 60
gcgcttgaag caccaaatga gggagactgg ggagtggatga taaaagatga gttcttcgac 120
attataaaag aagccggttt ctctcatgtt cgaattccaa taagatggag tacgcacgtt 180
caggcgtttc ctctttataa aatcgagcct tctttcttca aaagagtgga tgaagtata 240
aacggagccc tgaagagagg actggcigtg gttataaata ttcatacta cgaggagta 300
atgaatgatc cagaagaaca caaggaaaga tttcttgctc ttiggaacaa aattgctgat 360
cggtataaag actatccga aactctatgt tttgaaatc tgaatgaacc tcacggaaat 420
cttactccgg aaaaatggaa tgaactgctt gaggaagctc taaaagtat aagatcaatt 480
gacaaaaagc aactgtgat tataggcaca gctgaatggg ggggtatatc tgccctigaa 540
aaactgaggg tcccaaatg ggaaaaaat gcgatagtta caattcacta ctacaatcct 600
ttcgaattta cccatcaagg agctgagtgg gtgcctggat ctgagaaatg gttgggaaga 660
aagtggggat ctccagatga tcagaaacat ttgatagaag aattcaattt tatagaagaa 720
tggtcaaaaa agaacaaaag accaatttac ataggigagt ttggtgccta cagaaaagct 780
gaccttgaat caagaataaa atggacctcc ttgtcgttc gcgaagccga gaaaaggggg 840
tggagctggg catactggga attttgttcc ggttttgggt tttatgatcc tctgagaaaa 900
cagtggaaata aagatcittt agaagcttta ataggaggag atagcattga ataa 954

[0003]

<210> 4

<211> 976

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5' 区和编码 SEQ ID NO:2 的开放阅读框，具有中等增强的表达

<400> 4

tctactagtt aggaggtaac ttatgggcgt cgatccgttt gaacgtaaca aaatcttggg 60
ccgcggcatt aatatcgga atgcgtcga agcaccacaaat gaaggcgact ggggagtggg 120
gataaaagat gatttcttcg acattataaa agaagccggt ttctctcatg ttcgaattcc 180
aataagatgg agtacgcacg ctccagcggt tctctcttat aaaatcgagc cttcttctt 240
caaaagagtg gatgaagtga taaacggagc cctgaaaaga ggactggtg ttgttataaa 300
tattcatcac tacgaggagt taatgaatga tccagaagaa cacaaggaaa gatttcttgc 360
tctttggaaa caaattgctg ategttataa agactatccc gaaactctat tttttgaaat 420

tctgaatgaa cctcacggaa atcttactcc ggaaaaatgg aatgaactgc ttgaggaagc 480
 tctaaaagtt ataagatcaa ttgacaaaaa gcacactgtg attataggca cagctgaatg 540
 ggggggtata tctgcccttg aaaaactgag ggtcccaaaa tgggaaaaaa atgcgatagt 600
 tacaattcac tactacaatc ctttcgaatt tacccatcaa ggagctgagt ggggtgcctgg 660
 atctgagaaa tggttgggaa gaaagtgggg atctccagat gatcagaaac atttgataga 720
 agaattcaat tttatagaag aatgggtcaaa aaagaacaaa agaccaattt acatagggtga 780
 gtttgggtgcc tacagaaaag ctgaccttga atcaagaata aaatggacct cctttgtctg 840
 tcgcgaagcc gagaaaaggg ggtggagctg ggcatactgg gaattttgtt ccggttttgg 900
 tgtttatgat cctctgagaa aacagtggaa taaagatcct ttagaagcct taataggagg 960
 agatagcatt gaatga 976

<210> 5

<211> 954

<212> DNA

<213> 海栖热袍菌(Thermotoga maritima)

<400> 5

[0004]

atgggtgttg atccttttga aaggaacaaa atattgggaa gaggcattaa tataggaaat 60
 gcgcttgaag caccaaatga gggagactgg ggagtgttga taaaagatga gtctctcgac 120
 attataaaag aagccggttt ctctcatgtt cgaattccaa taagatggag tacgcacgt 180
 tacgcgttct ctcttataa aatcatggat cgcttcttca aaagagtggg tgaagtgata 240
 aacggagccc tgaaaagagg actggctgtt gttataaata ttcatacta cgaggagtta 300
 atgaatgata cagaagaaca caaggaaaga tttcttgctc tttggaaaca aatigctgat 360
 cgttataaag actatccga aactctatct tttgaaatc tgaatgaacc tcacggaaat 420
 ctactccgg aaaaatggaa tgaactgctt gaggaagctc taaaagttaa aagatcaatt 480
 gacaaaaagc acactataat tataggcaca gctgaatggg ggggtatatc tgcccttgaa 540
 aaactgtctg tcccaaatg ggaaaaaat tetatagtta caattcacta ctacaatcct 600
 ttgaattta cccatcaagg agctgagtgg gtggaaggat ctgagaaatg gtgggaaga 660
 aagtggggat ctccagatga tcagaaacat ttgatagaag aattcaatct tatagaagaa 720
 tgggtcaaaa agaacaaaag accaatttac ataggtgagt ttggtgccta cagaaaagct 780
 gaccttgaat caagaataaa atggacctcc tttgtcgttc gcgaaatgga gaaaaggaga 840
 tggagctggg catactggga attttgttcc ggttttgggt tttatgatac tctgagaaaa 900
 acctggaata aagatctttt agaagcttta ataggaggag atagcattga ataa 954

<210> 6

<211> 317

<212> PRT

<213> 海栖热袍菌(Thermotoga maritima)

<220>

<221> 结构域

<222> (19)... (296)

<223> 纤维素酶 (糖基水解酶家族 5)

<400> 6
 Met Gly Val Asp Pro Phe Glu Arg Asn Lys Ile Leu Gly Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Asn Ile Gly Asn Ala Leu Glu Ala Pro Asn Glu Gly Asp Trp Gly Val
 20 25 30
 Val Ile Lys Asp Glu Phe Phe Asp Ile Ile Lys Glu Ala Gly Phe Ser
 35 40 45
 His Val Arg Ile Pro Ile Arg Trp Ser Thr His Ala Tyr Ala Phe Pro
 50 55 60
 Pro Tyr Lys Ile Met Asp Arg Phe Phe Lys Arg Val Asp Glu Val Ile
 65 70 75 80
 Asn Gly Ala Leu Lys Arg Gly Leu Ala Val Val Ile Asn Ile His His
 85 90 95
 Tyr Glu Glu Leu Met Asn Asp Pro Glu Glu His Lys Glu Arg Phe Leu
 100 105 110
 Ala Leu Trp Lys Gln Ile Ala Asp Arg Tyr Lys Asp Tyr Pro Glu Thr
 115 120 125
 Leu Phe Phe Glu Ile Leu Asn Glu Pro His Gly Asn Leu Thr Pro Glu
 130 135 140
 Lys Trp Asn Glu Leu Leu Glu Glu Ala Leu Lys Val Ile Arg Ser Ile
 145 150 155 160
 Asp Lys Lys His Thr Ile Ile Ile Gly Thr Ala Glu Trp Gly Gly Ile
 [0005] 165 170 175
 Ser Ala Leu Glu Lys Leu Ser Val Pro Lys Trp Glu Lys Asn Ser Ile
 180 185 190
 Val Thr Ile His Tyr Tyr Asn Pro Phe Glu Phe Thr His Gln Gly Ala
 195 200 205
 Glu Trp Val Glu Gly Ser Glu Lys Trp Leu Gly Arg Lys Trp Gly Ser
 210 215 220
 Pro Asp Asp Gln Lys His Leu Ile Glu Glu Phe Asn Phe Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 Trp Ser Lys Lys Asn Lys Arg Pro Ile Tyr Ile Gly Glu Phe Gly Ala
 245 250 255
 Tyr Arg Lys Ala Asp Leu Glu Ser Arg Ile Lys Trp Thr Ser Phe Val
 260 265 270
 Val Arg Glu Met Glu Lys Arg Arg Trp Ser Trp Ala Tyr Trp Glu Phe
 275 280 285
 Cys Ser Gly Phe Gly Val Tyr Asp Thr Leu Arg Lys Thr Trp Asn Lys
 290 295 300
 Asp Leu Leu Glu Ala Leu Ile Gly Gly Asp Ser Ile Glu
 305 310 315

<210> 7

<211> 954
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成产生的多核苷酸

<400> 7

```
atgggtgttg atccttttga aaggaacaaa atattgggaa gaggcattaa tataggaaat 60
gcgcttgaag caccaaatga gggcgactgg ggagtcgtga taaaagatga gttcttcgac 120
attataaaag aagccggttt ctctcatgtt cgaattccaa taagatggag tacgcacgct 180
tacgcgtttc ctctttataa aatcatggat cgtctcttca aaagagtgga tgaagtgata 240
aacggagccc tgaaaagagg actggctgtt gttataaata ttcattacta cgaggagtta 300
atgaatgata cagaagaaca caaggaaaga tttcttgctc ttiggaaaca aattgctgat 360
cggtataaag actatcccga aactctatit tttgaaattc tgaatgaacc tcacggaaat 420
cttactccgg aaaaatggaa tgaactgctt gaggaagctc taaaagttaa aagatcaatt 480
gacaaaaagc acactataat tataggcaca gctgaatggg ggggtatata tgcccttgaa 540
aaactgtctg tcccaaatg ggaaaaaaat tctatagtta caattacta ctacaatcct 600
ttcgaattta cccatcaagg agctgagtgg gtggaaggat ctgagaaatg gttgggaaga 660
aagtggggat ctccagatga tcagaaacat ttgatagaag aattcaattt tatagaagaa 720
tggtcaaaaa agaacaaaag accaatttac ataggtgagt ttggtgccta cagaaaagct 780
gaccttgaat caagaataaa atggacctcc tttgtcgttc gcgaaatgga gaaaaggaga 840
tggagctggg catactggga attttgttcc ggttttgggt ttatgatac tctgagaaaa 900
acctggaata aagatctttt agaagcttta ataggaggag atagcattga ataa 954
```

[0006]

<210> 8
 <211> 974
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成产生的多核苷酸

<400> 8

```
atgggtgttg atccttttga aaggaacaaa atattgggaa gaggcattaa tataggaaat 60
gcgcttgaag caccaaatga ggggagactgg ggagtgggtga taaaagatga gtatttcgac 120
attataaaag aagccggttt ctctcatgtt cgaattccaa taagatggag tacgcacgct 180
caggcgtttc ctctttataa aatcaggat cgtctcttca aaagagtgga tgaagtgata 240
aacggagccc tgaaaagagg actggctgtt gttataaatc agcatcacta cgaggagtta 300
atgaatgata cagaagaaca caaggaaaga tttcttgctc ttiggaaaca aattgctgat 360
cggtataaag actatcccga aactctatit tttgaaattc tgaatgaacc tcacggaaat 420
cttactccgg aaaaatggaa tgaactgctt gaggaagctc taaaagttaa aagatcaatt 480
gacaaaaagc acactataat tataggcaca gctgaatggg ggggtatata tgcccttgaa 540
aaactgaggg tcccaaatg ggaaaaaaat gcgatagtta caattacta ctacaatcct 600
```

```

ttcgaattta cccatcaagg agctgagtggt gtggaaggat ctgagaaatg gttgggaaga 660
aagtggggat ctccagatga tcagaaacat ttgatagaag aattcaattt tatagaagaa 720
tggtcaaaaa agaacaaaag accaatttiac ataggtgagt ttggtgccta cagaaaagct 780
gaccttgaat caagaataaa atggacctcc tttgtcgttc gcgaagctga gaaaaggaga 840
tggagctggg catactggga attttgttcc ggttttgggtg tttatgatac tctgagaaaa 900
acctggaata aagatctttt agaagcttta ataggaggag atagcattga ataacaccat 960
tccaagatgg cgtg 974

```

<210> 9

<211> 317

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的多肽

<400> 9

[0007]

```

Met Gly Val Asp Pro Phe Glu Arg Asn Lys Ile Leu Gly Arg Gly Ile
 1           5           10          15
Asn Ile Gly Asn Ala Leu Glu Ala Pro Asn Glu Gly Asp Trp Gly Val
          20          25          30
Val Ile Lys Asp Glu Tyr Phe Asp Ile Ile Lys Glu Ala Gly Phe Ser
          35          40          45
His Val Arg Ile Pro Ile Arg Trp Ser Thr His Ala Gln Ala Phe Pro
          50          55          60
Pro Tyr Lys Ile Glu Asp Arg Phe Phe Lys Arg Val Asp Glu Val Ile
65          70          75          80
Asn Gly Ala Leu Lys Arg Gly Leu Ala Val Val Ile Asn Gln His His
          85          90          95
Tyr Glu Glu Leu Met Asn Asp Pro Glu Glu His Lys Glu Arg Phe Leu
          100         105         110
Ala Leu Trp Lys Gln Ile Ala Asp Arg Tyr Lys Asp Tyr Pro Glu Thr
          115         120         125
Leu Phe Phe Glu Ile Leu Asn Glu Pro His Gly Asn Leu Thr Pro Glu
          130         135         140
Lys Trp Asn Glu Leu Leu Glu Glu Ala Leu Lys Val Ile Arg Ser Ile
          145         150         155         160
Asp Lys Lys His Thr Ile Ile Ile Gly Thr Ala Glu Trp Gly Gly Ile
          165         170         175
Ser Ala Leu Glu Lys Leu Arg Val Pro Lys Trp Glu Lys Asn Ala Ile
          180         185         190
Val Thr Ile His Tyr Tyr Asn Pro Phe Glu Phe Thr His Gln Gly Ala
          195         200         205
Glu Trp Val Glu Gly Ser Glu Lys Trp Leu Gly Arg Lys Trp Gly Ser

```


210	215	220	
Pro Asp Asp Gln Lys His Leu Ile Glu Glu Phe Asn Phe Ile Glu Glu			
225	230	235	240
Trp Ser Lys Lys Asn Lys Arg Pro Ile Tyr Ile Gly Glu Phe Gly Ala			
245	250	255	
Tyr Arg Lys Ala Asp Leu Glu Ser Arg Ile Lys Trp Thr Ser Phe Val			
260	265	270	
Val Arg Glu Ala Glu Lys Arg Arg Trp Ser Trp Ala Tyr Trp Glu Phe			
275	280	285	
Cys Ser Gly Phe Gly Val Tyr Asp Thr Leu Arg Lys Thr Trp Asn Lys			
290	295	300	
Asp Leu Leu Glu Ala Leu Ile Gly Gly Asp Ser Ile Glu			
305	310	315	

<210> 10

<211> 954

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的多核苷酸

[0008]

<400> 10

```

atgggtgttg atccttttga aaggaacaaa atattgggaa gaggcattaa tataggaaat 60
gcgcttgaag caccaaatga gggagactgg ggagtgtgta taaaagatga gtatttcgac 120
attataaaag aagccggttt ctctcatggt cgaattccaa taagatggag tacgcacgct 180
caggcggttc ctctttataa aatcgaggat tctttcttca aaagagtggg tgaagtgata 240
aacggagccc tgaaaagagg actggctgtt gttataaata ttcactacta cgaggagtta 300
atgaatgata cagaagaaca caaggaaaga tttcttgctc ttgggaaaca aattgctgat 360
cgttataaag actateccga aactctatit tttgaaattc tgaatgaacc tcacggaaat 420
cttactccgg aaaaatggaa tgaactgett gaggaagctc taaaagttat aagatcaatt 480
gacaaaaagc acactgtgat tataggeaca gctgaatggg ggggtatata tgeccittga 540
aaactgaggg tcccaaatg ggaaaaaaat gcgatagtta caattcacta ctacaatcct 600
ttcgaattta cccatcaagg agctgagtgg gtgcctggat ctgagaaatg gttgggaaga 660
aagtggggat ctccagatga tcagaaacat gtgatagaag aattcaattt tatagaagaa 720
tggtcaaaaa agaacaaaag accaatttac ataggtgagt ttggtgccta cagaaaagct 780
gaccttgaat caagaataaa atggacctcc tttgtcgttc gcgaagccga gaaaaggggg 840
tgagagctggg cactctggga attttgttcc ggttttggtg tttatgatcc tctgagaaaa 900
cagtggaaata aagatctttt agaagctcta ataggaggag atagcattga ataa 954

```

<210> 11

<211> 317

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的多肽

<400> 11

Met Gly Val Asp Pro Phe Glu Arg Asn Lys Ile Leu Gly Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Asn Ile Gly Asn Ala Leu Glu Ala Pro Asn Glu Gly Asp Trp Gly Val
 20 25 30
 Val Ile Lys Asp Glu Tyr Phe Asp Ile Ile Lys Glu Ala Gly Phe Ser
 35 40 45
 His Val Arg Ile Pro Ile Arg Trp Ser Thr His Ala Gln Ala Phe Pro
 50 55 60
 Pro Tyr Lys Ile Glu Asp Ser Phe Phe Lys Arg Val Asp Glu Val Ile
 65 70 75 80
 Asn Gly Ala Leu Lys Arg Gly Leu Ala Val Val Ile Asn Ile His His
 85 90 95
 Tyr Glu Glu Leu Met Asn Asp Pro Glu Glu His Lys Glu Arg Phe Leu
 100 105 110
 Ala Leu Trp Lys Gln Ile Ala Asp Arg Tyr Lys Asp Tyr Pro Glu Thr
 115 120 125
 [0009] Leu Phe Phe Glu Ile Leu Asn Glu Pro His Gly Asn Leu Thr Pro Glu
 130 135 140
 Lys Trp Asn Glu Leu Leu Glu Glu Ala Leu Lys Val Ile Arg Ser Ile
 145 150 155 160
 Asp Lys Lys His Thr Val Ile Ile Gly Thr Ala Glu Trp Gly Gly Ile
 165 170 175
 Ser Ala Leu Glu Lys Leu Arg Val Pro Lys Trp Glu Lys Asn Ala Ile
 180 185 190
 Val Thr Ile His Tyr Tyr Asn Pro Phe Glu Phe Thr His Gln Gly Ala
 195 200 205
 Glu Trp Val Pro Gly Ser Glu Lys Trp Leu Gly Arg Lys Trp Gly Ser
 210 215 220
 Pro Asp Asp Gln Lys His Val Ile Glu Glu Phe Asn Phe Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 Trp Ser Lys Lys Asn Lys Arg Pro Ile Tyr Ile Gly Glu Phe Gly Ala
 245 250 255
 Tyr Arg Lys Ala Asp Leu Glu Ser Arg Ile Lys Trp Thr Ser Phe Val
 260 265 270
 Val Arg Glu Ala Glu Lys Arg Gly Trp Ser Trp Ala Tyr Trp Glu Phe
 275 280 285
 Cys Ser Gly Phe Gly Val Tyr Asp Pro Leu Arg Lys Gln Trp Asn Lys
 290 295 300

Asp Leu Leu Glu Ala Leu Ile Gly Gly Asp Ser Ile Glu
305 310 315

<210> 12

<211> 954

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的多核苷酸

<400> 12

[0010] atgggtgttg atccttttga aaggaacaaa atattgggaa gaggcattaa tataggaaat 60
gcgcttgaag caccaaatga gggagactgg ggagtgggtga taaaagatga gttcttcgac 120
attataaaag aagccggttt ctctcatgtt cgaattccaa taagatggag tacgcacgct 180
cagcggttgc ctctttataa aatcgaggat tctttcttca aaagagtgga tgaagtgata 240
aacggagccc tgaaaagagg actggctgtt gttataaatc agcatcacta cgaggagtta 300
atgaatgac cagaagaaca caaggaaaga tttcttgctc ttgggaaaca aattgctgat 360
cgttataaag actateccga aactctatct tttgaaattc tgaatgaacc tcacggaaat 420
cttactccgg aaaaatggaa tgaactgctt gaggaagctc taaaagttaa aagatcaatt 480
gacaaaaagc acactgtgat tataggcaca gctgaatggg ggggtatata tgcccttgaa 540
aaactgaggg tcccaaaatg ggaaaaaaat gcgatagtta caattcacta ctacaatcct 600
ttcgaattta cccatcaagg agctgagtgg gtgccctgat ctgagaaatg gttgggaaga 660
aagtggggat ctccagatga tcagaaacat ttgatagaag aattcaattt tatagaagaa 720
tggtcaaaaa agaacaaaag accaatttac ataggtgagt ttggtgecta cagaaaagct 780
gaccttgaat caagaataaa atggacctcc tttgtcgttc gcgaagccga gaaaaggggg 840
tgagagctgg catactggga attttgttcc ggttttgggtg tttatgatcc tctgagaaaa 900
cagtgggaata aagatctttt agaagcttta ataggaggag atagcattga ataa 954

<210> 13

<211> 317

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的多肽

<400> 13

Met Gly Val Asp Pro Phe Glu Arg Asn Lys Ile Leu Gly Arg Gly Ile
1 5 10 15
Asn Ile Gly Asn Ala Leu Glu Ala Pro Asn Glu Gly Asp Trp Gly Val
20 25 30
Val Ile Lys Asp Glu Phe Phe Asp Ile Ile Lys Glu Ala Gly Phe Ser

35 40 45
 His Val Arg Ile Pro Ile Arg Trp Ser Thr His Ala Gln Ala Phe Pro
 50 55 60
 Pro Tyr Lys Ile Glu Asp Ser Phe Phe Lys Arg Val Asp Glu Val Ile
 65 70 75 80
 Asn Gly Ala Leu Lys Arg Gly Leu Ala Val Val Ile Asn Gln His His
 85 90 95
 Tyr Glu Glu Leu Met Asn Asp Pro Glu Glu His Lys Glu Arg Phe Leu
 100 105 110
 Ala Leu Trp Lys Gln Ile Ala Asp Arg Tyr Lys Asp Tyr Pro Glu Thr
 115 120 125
 Leu Phe Phe Glu Ile Leu Asn Glu Pro His Gly Asn Leu Thr Pro Glu
 130 135 140
 Lys Trp Asn Glu Leu Leu Glu Glu Ala Leu Lys Val Ile Arg Ser Ile
 145 150 155 160
 Asp Lys Lys His Thr Val Ile Ile Gly Thr Ala Glu Trp Gly Gly Ile
 165 170 175
 Ser Ala Leu Glu Lys Leu Arg Val Pro Lys Trp Glu Lys Asn Ala Ile
 180 185 190
 Val Thr Ile His Tyr Tyr Asn Pro Phe Glu Phe Thr His Gln Gly Ala
 195 200 205
 [0011] Glu Trp Val Pro Gly Ser Glu Lys Trp Leu Gly Arg Lys Trp Gly Ser
 210 215 220
 Pro Asp Asp Gln Lys His Leu Ile Glu Glu Phe Asn Phe Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 Trp Ser Lys Lys Asn Lys Arg Pro Ile Tyr Ile Gly Glu Phe Gly Ala
 245 250 255
 Tyr Arg Lys Ala Asp Leu Glu Ser Arg Ile Lys Trp Thr Ser Phe Val
 260 265 270
 Val Arg Glu Ala Glu Lys Arg Gly Trp Ser Trp Ala Tyr Trp Glu Phe
 275 280 285
 Cys Ser Gly Phe Gly Val Tyr Asp Pro Leu Arg Lys Gln Trp Asn Lys
 290 295 300
 Asp Leu Leu Glu Ala Leu Ile Gly Gly Asp Ser Ile Glu
 305 310 315

<210> 14

<211> 972

<212> DNA

<213> 栖热袍菌属物种 (Thermotoga sp.)

<400> 14

atggaacagt cagttgctga aagtgatagc aactcagcat ttgaatacaa caaaatggta 60

```

ggtaaaggag taaatattgg aaatgcttta gaagctcctt tcgaaggagc ttggggagta 120
agaattgagg atgaatattt tgagataata aagaaaaggg gatttgattc tgtaggatt 180
cccataagat ggtagcaca tatatccgaa aagccaccat atgatattga caggaatttc 240
ctcgaaagag ttaaccatgt tgcgatagg gctcttgaga ataatttaac agtaatcatc 300
aatacgacc accattgaaga actctatcaa gaaccggata aatacggcga tgttttgtg 360
gaaattigga gacagattgc aaaattcttt aaagattacc cggaaaatct gttcttgaa 420
atctacaacg agcctgctca gaacttgaca gctgaaaaat ggaacgcact ttatccaaaa 480
gtgctcaaag ttatcaggga gagcaatcca acccggattg tcattatcga tgctccaaac 540
tgggcacact atagcgcagt gagaagtcta aaattagtca acgacaaacg catcattgtt 600
tccttccatt actacgaacc ttccaaattc acacatcagg gtgccgaatg ggtaaatccc 660
atcccacctg ttagggttaa gtggaatggc gaggaatggg aaattaacca aatcagaagt 720
catttcaaat acgtgagtga ctgggcaaag caaaataacg taccaatctt tcttggtgaa 780
ttcggtagctt attcaaaagc agacatggac tcaagggtta agtggaccga aagtgtaga 840
aaaatggcgg aagaatttgg attttcatac gcgtattggg aattttgtgc aggatttggc 900
atatacgata gatgtgtctc aaactggatc gaaccattgg caacagctgt ggttggcaca 960
ggcaaagagt aa 972

```

<210> 15

<211> 323

<212> PRT

<213> 栖热袍菌属物种(Thermotoga sp.)

[0012]

<400> 15

```

Met Glu Gln Ser Val Ala Glu Ser Asp Ser Asn Ser Ala Phe Glu Tyr
 1             5             10             15
Asn Lys Met Val Gly Lys Gly Val Asn Ile Gly Asn Ala Leu Glu Ala
      20             25             30
Pro Phe Glu Gly Ala Trp Gly Val Arg Ile Glu Asp Glu Tyr Phe Glu
      35             40             45
Ile Ile Lys Lys Arg Gly Phe Asp Ser Val Arg Ile Pro Ile Arg Trp
      50             55             60
Ser Ala His Ile Ser Glu Lys Pro Pro Tyr Asp Ile Asp Arg Asn Phe
65             70             75             80
Leu Glu Arg Val Asn His Val Val Asp Arg Ala Leu Glu Asn Asn Leu
      85             90             95
Thr Val Ile Ile Asn Thr His His Phe Glu Glu Leu Tyr Gln Glu Pro
      100            105            110
Asp Lys Tyr Gly Asp Val Leu Val Glu Ile Trp Arg Gln Ile Ala Lys
      115            120            125
Phe Phe Lys Asp Tyr Pro Glu Asn Leu Phe Phe Glu Ile Tyr Asn Glu
      130            135            140
Pro Ala Gln Asn Leu Thr Ala Glu Lys Trp Asn Ala Leu Tyr Pro Lys
145            150            155            160
Val Leu Lys Val Ile Arg Glu Ser Asn Pro Thr Arg Ile Val Ile Ile

```

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

[0013]

<210> 16

<211> 1042

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的多核苷酸

<400> 16

```

ggatccacca tgagggtgtt gctcgttgcc ctcgtctctcc tggctctcgc tgegagcgcc 60
accagcggcg tggaccctgt cgagaggaac aagatcctgg gcaggggcat caacatcggc 120
aacgccttgg aggcctcgaa cgaggcgac tggggcgtgg tgatcaagga cgagtacttc 180
gacatcatca aggagcgcg cttcagccac gtgagaatcc ccatcaggtg gagcaccac 240
gcccagcct tcccgcgta caagatcgag gacaggttct tcaagagggt ggacgaggtg 300
atcaacggcg ccctgaagag gggcctggcc gtggtgatca accagacca ctacgaggag 360
ctgatgaacg acccgagga gcacaaggag aggttctctg ccctgtggaa gcagatcgcc 420
gacaggtaca aggactaccc ggagaccctg ttcttcgaga tctgaacga gccgcacggc 480
aacctgaccc cggagaagtg gaacgagctg ctggaggagg ccctgaaggt gatcaggagc 540
atcgacaaga agcacacat catcatcgcc accgcccagt ggggcggcat cagegccctg 600
gagaagctga gggcgccgaa gtgggagaag aacgccatcg tgaccatcca ctactacaac 660
ccgttcgagt tcaccacca gggcgccgag tgggtggagg gcagcgagaa gtggctgggc 720

```

aggaagtggg gcagcccgga cgaccagaag cacctgateg aggagttaa cttcatcgag 780
 gaggaggagca agaagaacaa gagggcgatc tacatcggcg agttcggcgc ctacaggaag 840
 gccgacctgg agagcaggat caagtggacc agcttcgtgg tgaggagggc cgagaagagg 900
 aggtggagct gggcctactg ggagttctgc agcggttcg gcgtgtacga caccctgagg 960
 aagacctgga acaaggacct gctggaggcc ctgatcggcg gcgacagcat cgagagcgag 1020
 aaggacgagc tgtgagagct ca. 1042

<210> 17

<211> 341

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的多肽

<400> 17

[0014]

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

Gly Ala Glu Trp Val Glu Gly Ser Glu Lys Trp Leu Gly Arg Lys Trp
 225 230 235 240
 Gly Ser Pro Asp Asp Gln Lys His Leu Ile Glu Glu Phe Asn Phe Ile
 245 250 255
 Glu Glu Trp Ser Lys Lys Asn Lys Arg Pro Ile Tyr Ile Gly Glu Phe
 260 265 270
 Gly Ala Tyr Arg Lys Ala Asp Leu Glu Ser Arg Ile Lys Trp Thr Ser
 275 280 285
 Phe Val Val Arg Glu Ala Glu Lys Arg Arg Trp Ser Trp Ala Tyr Trp
 290 295 300
 Glu Phe Cys Ser Gly Phe Gly Val Tyr Asp Thr Leu Arg Lys Thr Trp
 305 310 315 320
 Asn Lys Asp Leu Leu Glu Ala Leu Ile Gly Gly Asp Ser Ile Glu Ser
 325 330 335
 Glu Lys Asp Glu Leu
 340

<210> 18

<211> 1042

<212> DNA

<213> 人工序列

[0015]

<220>

<223> 合成产生的多核苷酸

<400> 18

ggatccacca tgagggtggtt gctcgttgcc ctcgctctcc tggetctcgc tgcgagcgcc 60
 accagcggcg tggacccggtt cgagaggaac aagatcctgg gcaggggcat caacatcggc 120
 aacgccttgg aggccccgaa cgaggcgac tggggcgtgg tgatcaagga cgagttcttc 180
 gacatcatca aggaggccgg cttcagccac gtgagaatcc cgatecagtg gagcaccac 240
 gccaggcct tcccgcgta caagatcgag ccgagcttct tcaagagggt ggacgagtg 300
 atcaacggcg ccctgaagag gggcctggcc gtggtgatca acatccacca ctacgaggag 360
 ctgatgaacg acccggagga gcacaaggag aggttccttg ccctgtggaa gcagatcgcc 420
 gacaggtaca aggactacce ggagaccctg ttcttcgaga tctgaacga gccgcacggc 480
 aacctgaccc cggagaagtg gaacgagctg ctggaggagg ccctgaaggt gatcaggagc 540
 atcgacaaga agcacaccgt gatcatcggc accgccgagt ggggcggcat cagegccctg 600
 gagaagctga gggtgccgaa gtgggagaag aacgccatcg tgaccatcca ctactacaac 660
 ccgttcgagt taccacacca gggcgccgag tgggtgccgg gcagcgagaa gtggctgggc 720
 aggaagtggg gcagcccgga cgaccagaag caccatgatc aggagttcaa cttcatcgag 780
 gagtggagca agaagaacaa gaggccgatc tacatcggcg agttcggcgc ctacaggaag 840
 gccgacctgg agagcaggat caagtggacc agcttcgttg tgagggagge cgagaagagg 900
 ggctggagct gggcctactg ggagttctgc agcggcttcg gcgtgtacga cccgctgagg 960
 aagcagtgga acaaggacct gctggaggcc ctgatcggcg gcgacagcat cgagagcgag 1020

aaggacgagc tgtgagagct ca

1042

<210> 19

<211> 341

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的多肽

<400> 19

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

[0016]

	260	265	270
Gly Ala Tyr Arg Lys Ala Asp Leu Glu Ser Arg Ile Lys Trp Thr Ser			
275	280	285	
Phe Val Val Arg Glu Ala Glu Lys Arg Gly Trp Ser Trp Ala Tyr Trp			
290	295	300	
Glu Phe Cys Ser Gly Phe Gly Val Tyr Asp Pro Leu Arg Lys Gln Trp			
305	310	315	320
Asn Lys Asp Leu Leu Glu Ala Leu Ile Gly Gly Asp Ser Ile Glu Ser			
325	330	335	
Glu Lys Asp Glu Leu			
340			

<210> 20

<211> 1042

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的多核苷酸

[0017]

<400> 20

```

ggatccacca tgagggtggt gctcgttgcc ctgcctctcc tggctctcgc tgcgagcgcc 60
accagcggcg tggaccggtt cgagaggaae aagatcctgg gcaggggcat caacatcggc 120
aacgccctgg aggccccgaa cgagggcgac tggggcgtgg tgatcaagga cgagtacttc 180
gacatcatca aggaggecgg cticagccac gtgagaatec cgatecagtg gacacccac 240
gccaggeect tcccgcgta caagatcgag gacagettct tcaagagggt ggacgaggtg 300
atcaacggcg ccetgaagag gggectggcc gtggtgatca acatccacca ctacgaggag 360
ctgatgaacg acccgaggga gcacaaggag aggttcctgg ccctgtggaa gcagatcgcc 420
gacaggtaca aggactaccc ggagaccctg ttcttcgaga tcctgaacga gccgcacggc 480
aacctgaccc cggagaagtg gaacgagctg ctggaggagg ccctgaaggt gatcaggagc 540
atcgacaaga agcacaccgt gatcatcggc accgccgagt ggggcggcat cagcgccctg 600
gagaagctga ggttgccgaa gtgggagaag aacgccatcg tgaccatcca ctactacaac 660
ccgttcgagt tccccacca gggcgccgag tgggtgccgg gcagcgagaa gtggctgggc 720
aggaagtggg gcagcccgga cgaccagaag cacgtgatcg aggagttaa cticacagag 780
gagtggagca agaagaacaa gaggccgatc tacatcggcg agttcggcgc ctacaggaag 840
gccgacctgg agagcaggat caagtggacc agcttcgtgg tgagggaggc cgagaagagg 900
ggctggagct gggcctactg ggagttctgc agcggttcg gcgtgtacga cccgtgagg 960
aagcagtgga acaaggacct gctggaggcc ctgatcggcg gcgacagcat cgagagcgag 1020
aaggacgagc tgtgagagct ca                                     1042

```

<210> 21

<211> 341

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的多肽

<400> 21

Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Thr Ser Gly Val Asp Pro Phe Glu Arg Asn Lys Ile Leu Gly Arg
 20 25 30
 Gly Ile Asn Ile Gly Asn Ala Leu Glu Ala Pro Asn Glu Gly Asp Trp
 35 40 45
 Gly Val Val Ile Lys Asp Glu Tyr Phe Asp Ile Ile Lys Glu Ala Gly
 50 55 60
 Phe Ser His Val Arg Ile Pro Ile Arg Trp Ser Thr His Ala Gln Ala
 65 70 75 80
 Phe Pro Pro Tyr Lys Ile Glu Asp Ser Phe Phe Lys Arg Val Asp Glu
 85 90 95
 Val Ile Asn Gly Ala Leu Lys Arg Gly Leu Ala Val Val Ile Asn Ile
 100 105 110
 His His Tyr Glu Glu Leu Met Asn Asp Pro Glu Glu His Lys Glu Arg
 115 120 125
 [0018] Phe Leu Ala Leu Trp Lys Gln Ile Ala Asp Arg Tyr Lys Asp Tyr Pro
 130 135 140
 Glu Thr Leu Phe Phe Glu Ile Leu Asn Glu Pro His Gly Asn Leu Thr
 145 150 155 160
 Pro Glu Lys Trp Asn Glu Leu Leu Glu Glu Ala Leu Lys Val Ile Arg
 165 170 175
 Ser Ile Asp Lys Lys His Thr Val Ile Ile Gly Thr Ala Glu Trp Gly
 180 185 190
 Gly Ile Ser Ala Leu Glu Lys Leu Arg Val Pro Lys Trp Glu Lys Asn
 195 200 205
 Ala Ile Val Thr Ile His Tyr Tyr Asn Pro Phe Glu Phe Thr His Gln
 210 215 220
 Gly Ala Glu Trp Val Pro Gly Ser Glu Lys Trp Leu Gly Arg Lys Trp
 225 230 235 240
 Gly Ser Pro Asp Asp Gln Lys His Val Ile Glu Glu Phe Asn Phe Ile
 245 250 255
 Glu Glu Trp Ser Lys Lys Asn Lys Arg Pro Ile Tyr Ile Gly Glu Phe
 260 265 270
 Gly Ala Tyr Arg Lys Ala Asp Leu Glu Ser Arg Ile Lys Trp Thr Ser
 275 280 285
 Phe Val Val Arg Glu Ala Glu Lys Arg Gly Trp Ser Trp Ala Tyr Trp
 290 295 300

Glu Phe Cys Ser Gly Phe Gly Val Tyr Asp Pro Leu Arg Lys Gln Trp
305 310 315 320
[0019] Asn Lys Asp Leu Leu Glu Ala Leu Ile Gly Gly Asp Ser Ile Glu Ser
325 330 335
Glu Lys Asp Glu Leu
340

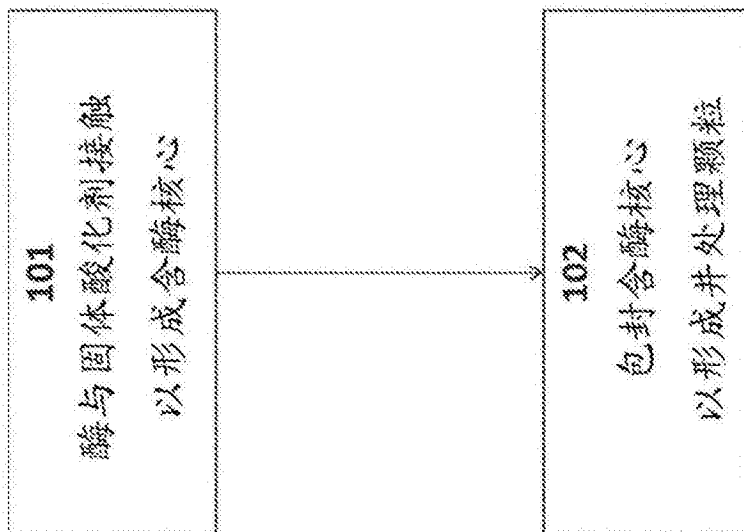


图1A

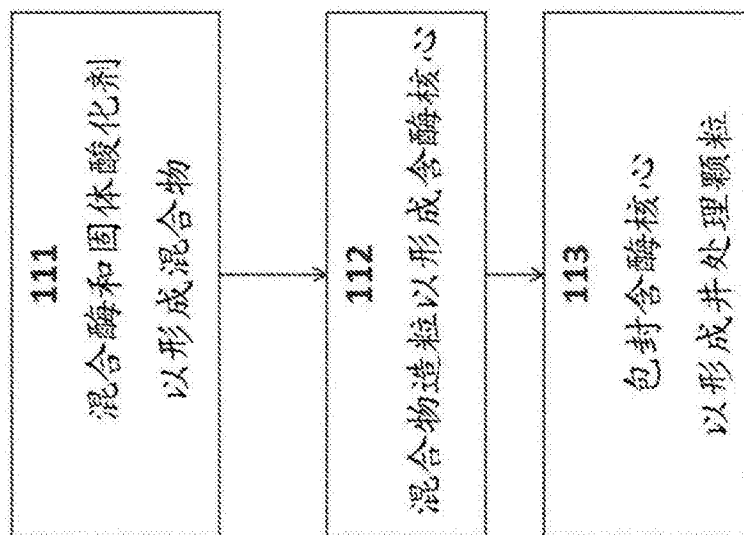


图1B

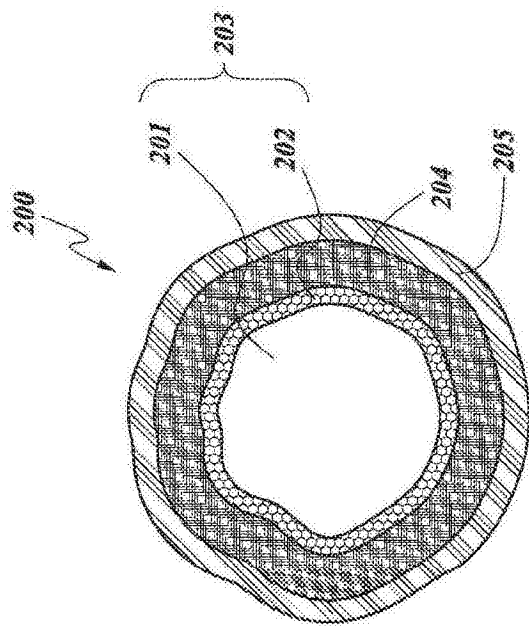


图2A

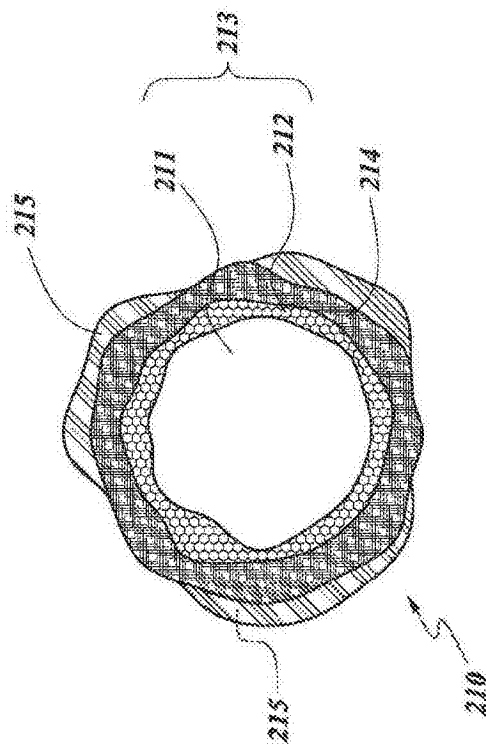


图2B

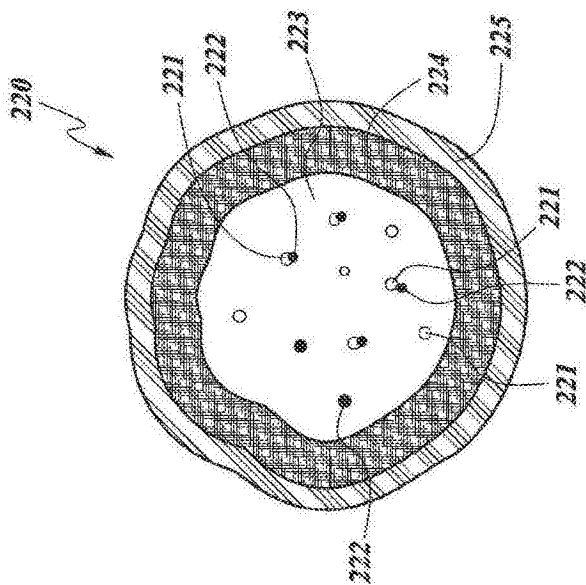


图2C

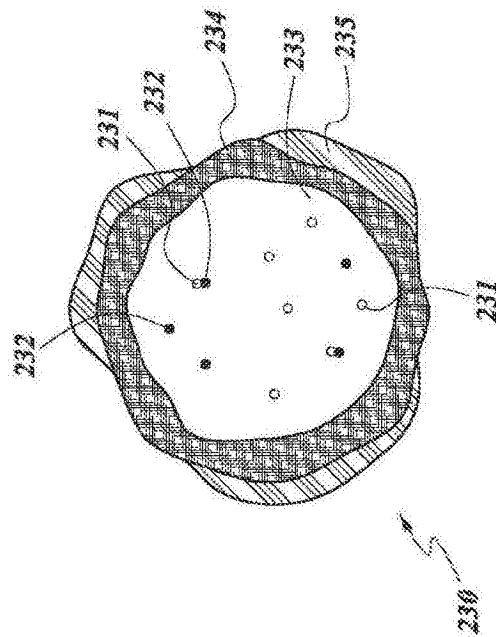


图2D

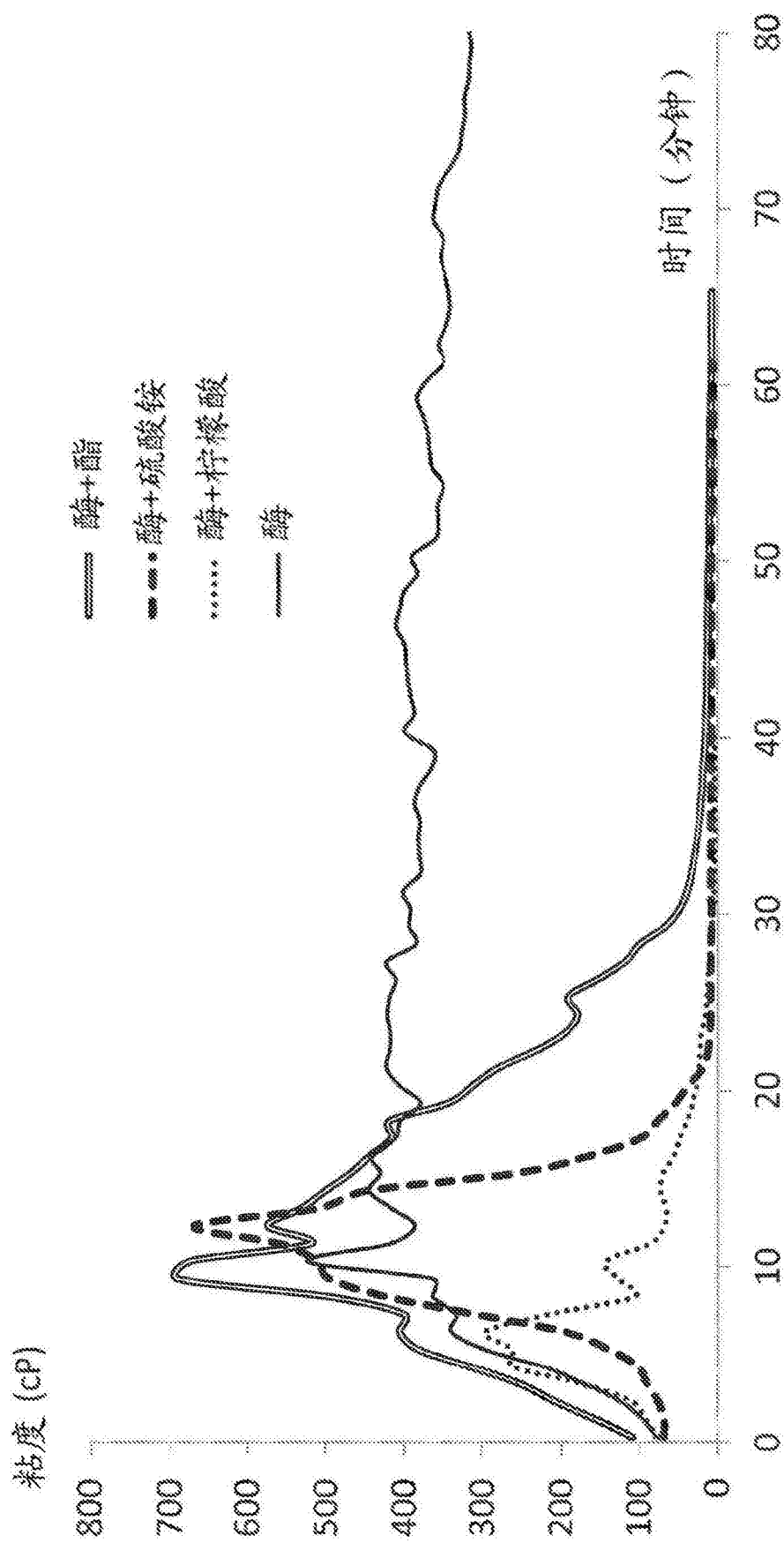


图3

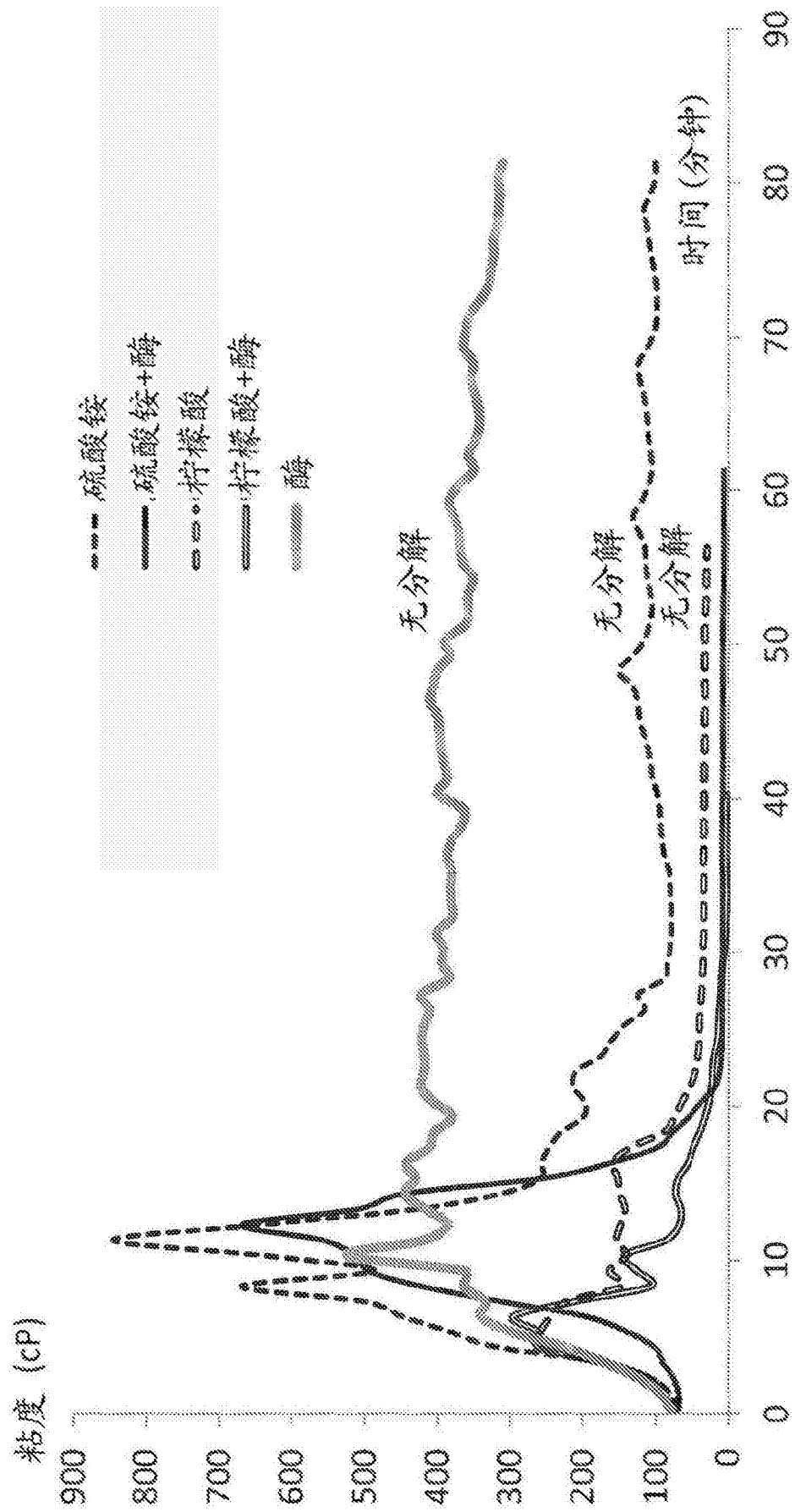


图4

KEY + = 完全分解 - = 无分解	酶 (mU/mL) SEQ ID NO. 2						
	25	12.5	6.2	3.1	1.5	0.7	最终 pH
硫酸铵 (mM)							
5	+	+	+	+	N/A	N/A	8.6
2.5	+	+	+	+	-	-	8.8
1.25	+	+	+	-	-	-	9.0
0.62	-	-	-	-	-	-	9.2

图5

KEY + = 完全分解 - = 无分解	酶 (mU/mL) SEQ ID NO. 2						
	25	12.5	6.2	3.1	1.5	0.7	最终 <i>pH</i>
磷酸二氢钠 (mM)							
2.5	+	+	+	+	+	N/A	9.0
1.25	+	+	+	+	-	-	9.2
0.62	+	+	-	-	-	-	9.3

图6

KEY + = 完全分解 - = 无分解	酶 (mU/mL) SEQ ID NO. 2							最终 pH
	25	12.5	6.2	3.1	1.5	0.7		
柠檬酸 (mM)								
2.5	+	+	+	+	+	NA		7.2
1.25	+	+	+	+	+	NA		8.8
0.62	+	+	-	-	-	-		9.1

图7

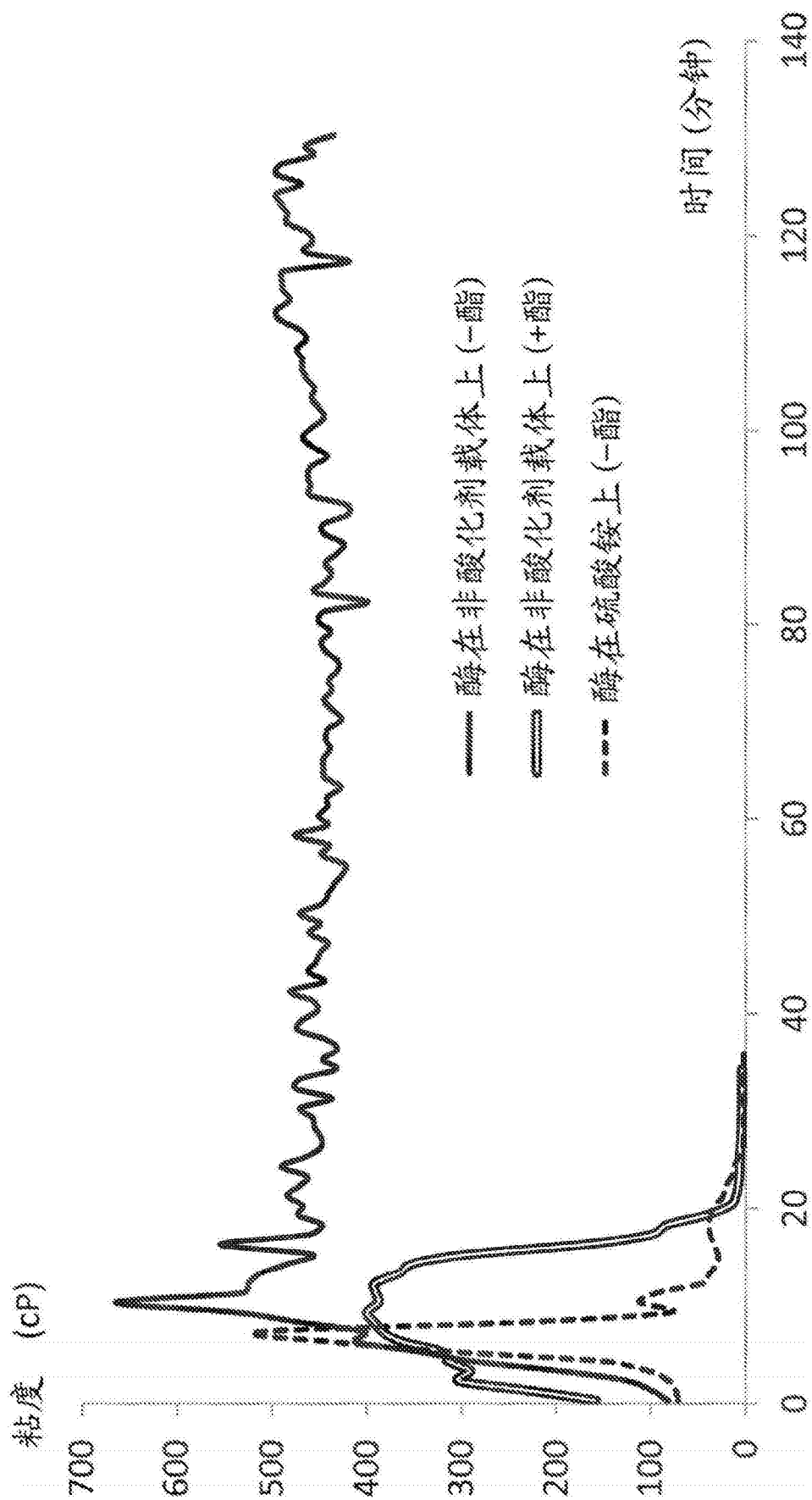


图8

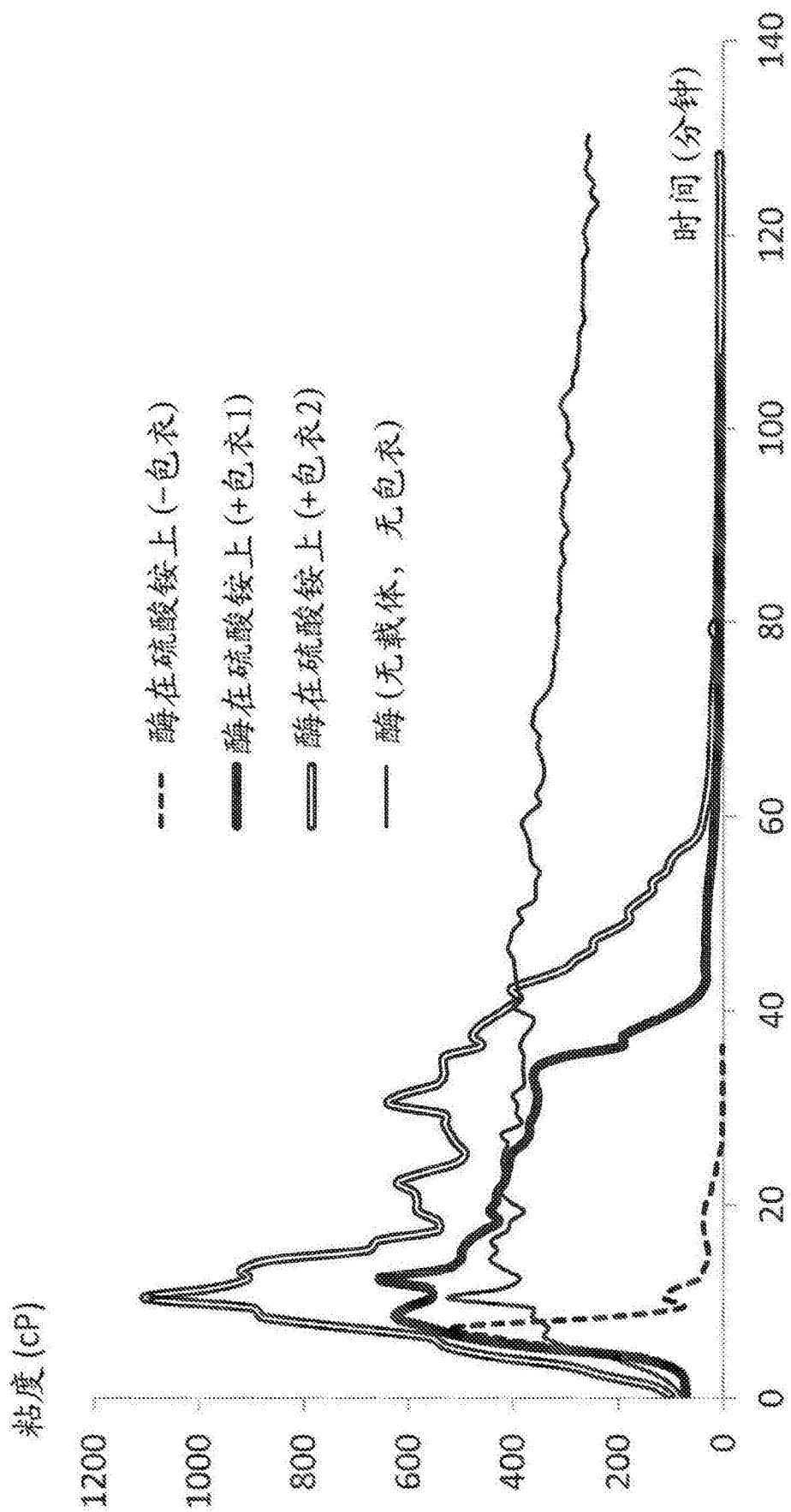


图9

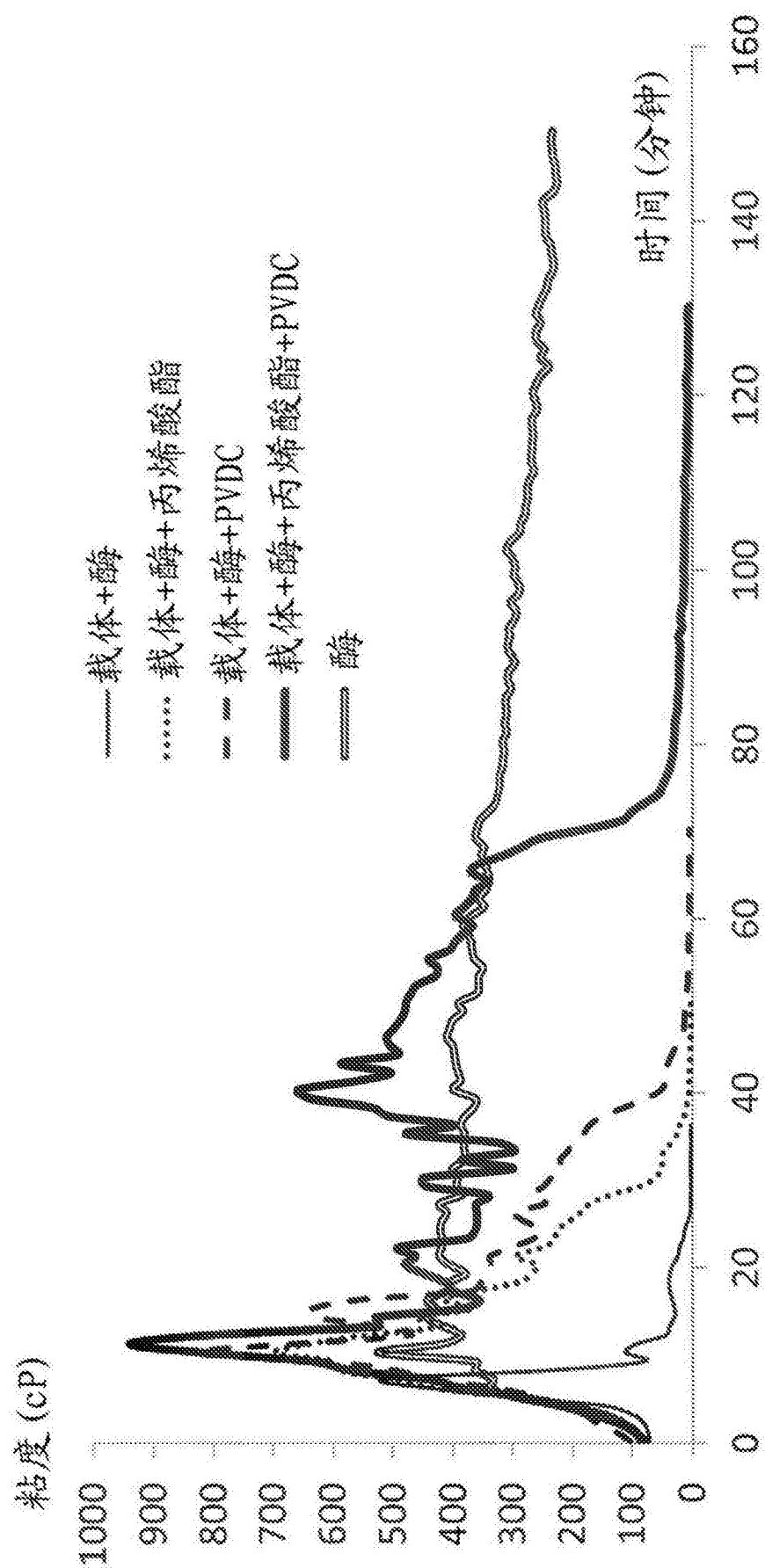


图10

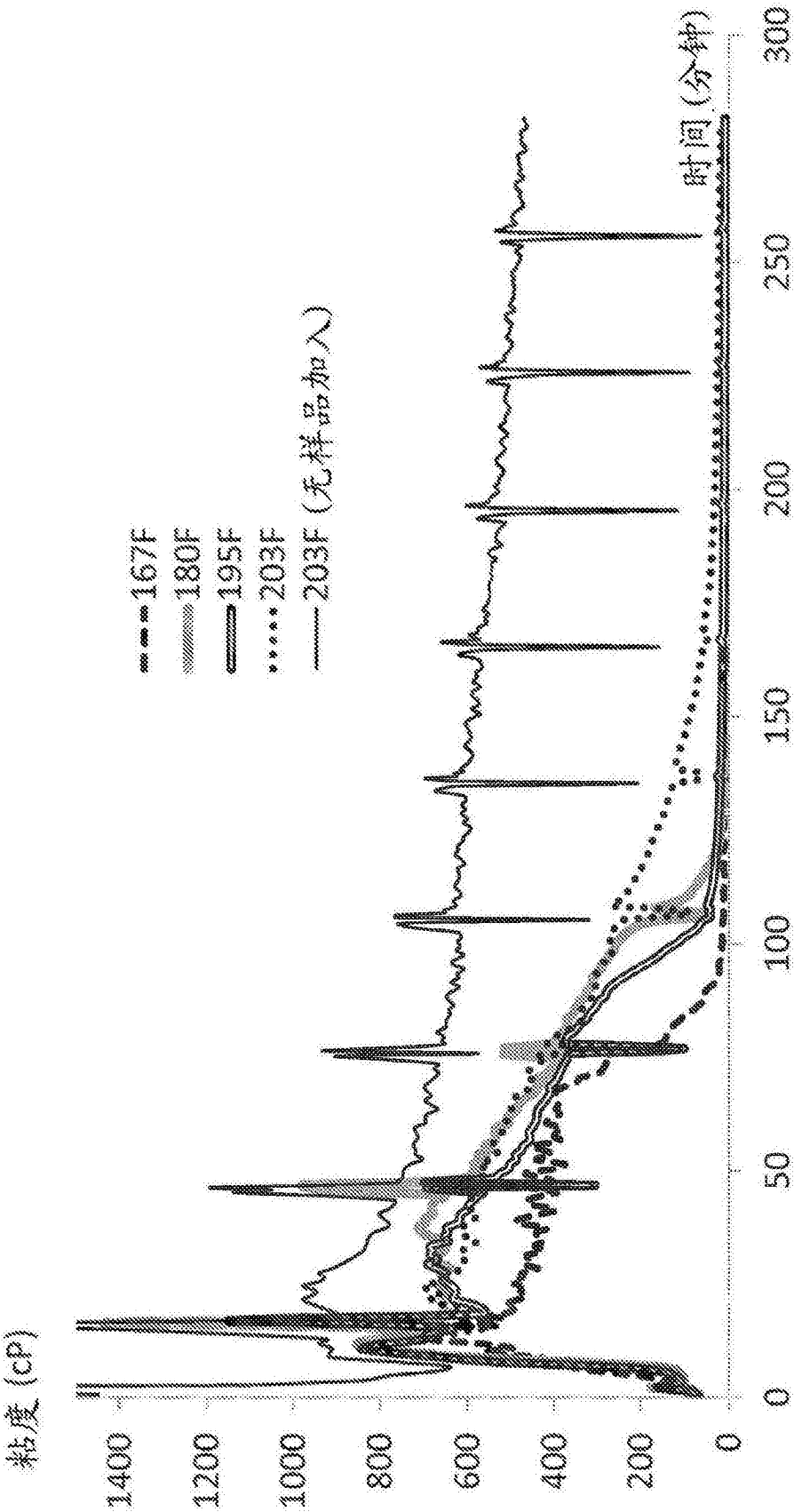


图11

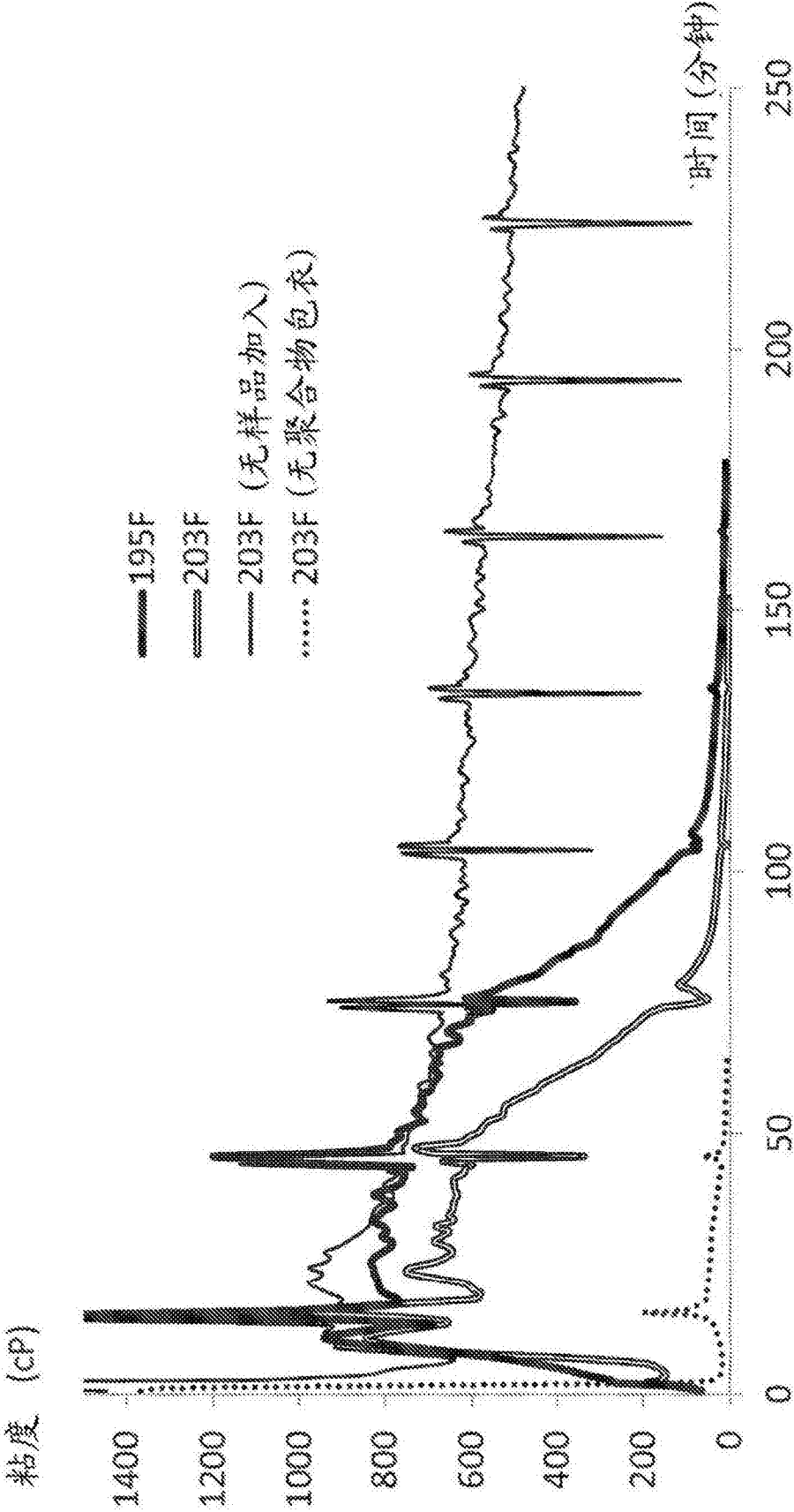


图12

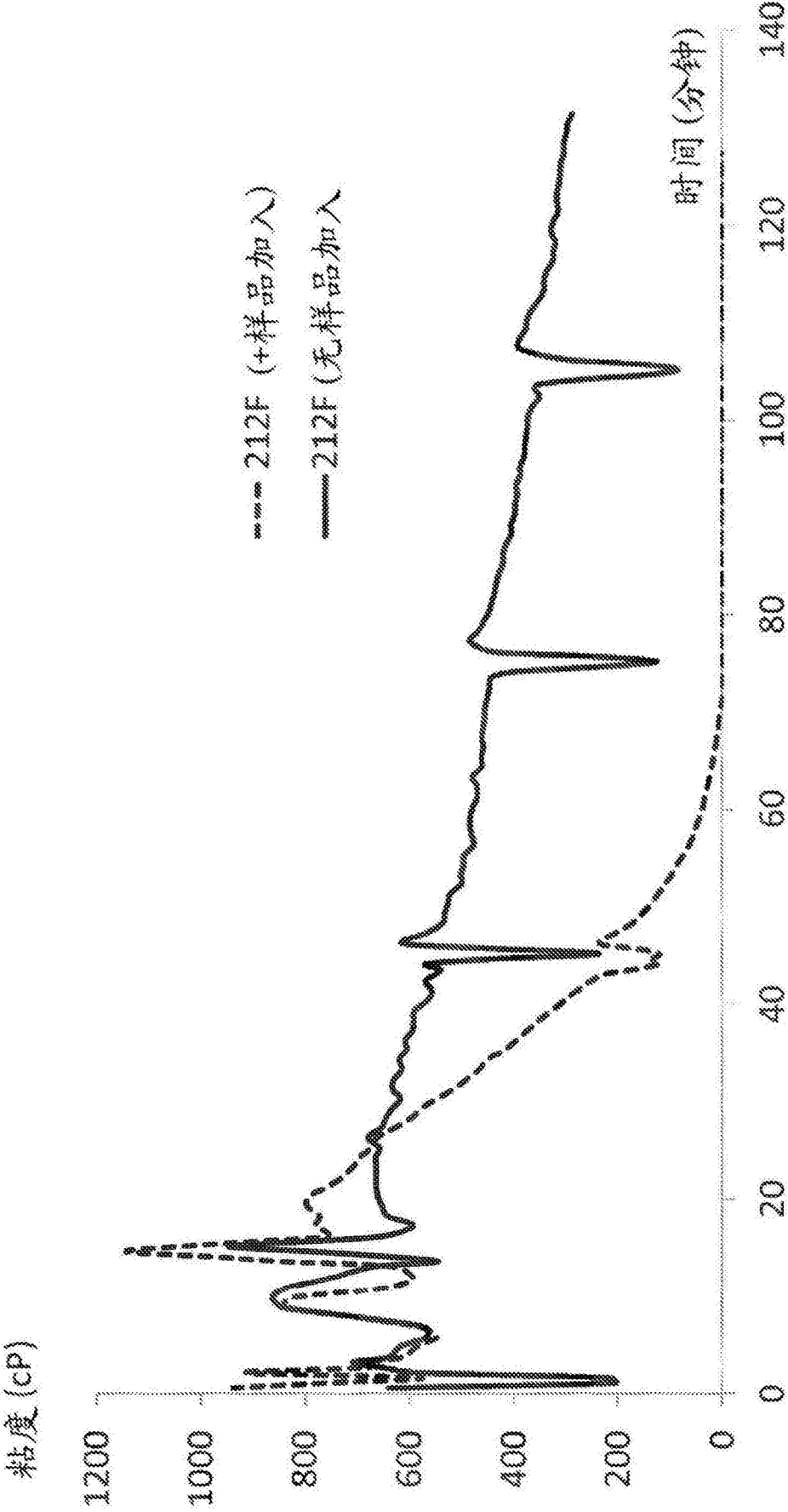


图13

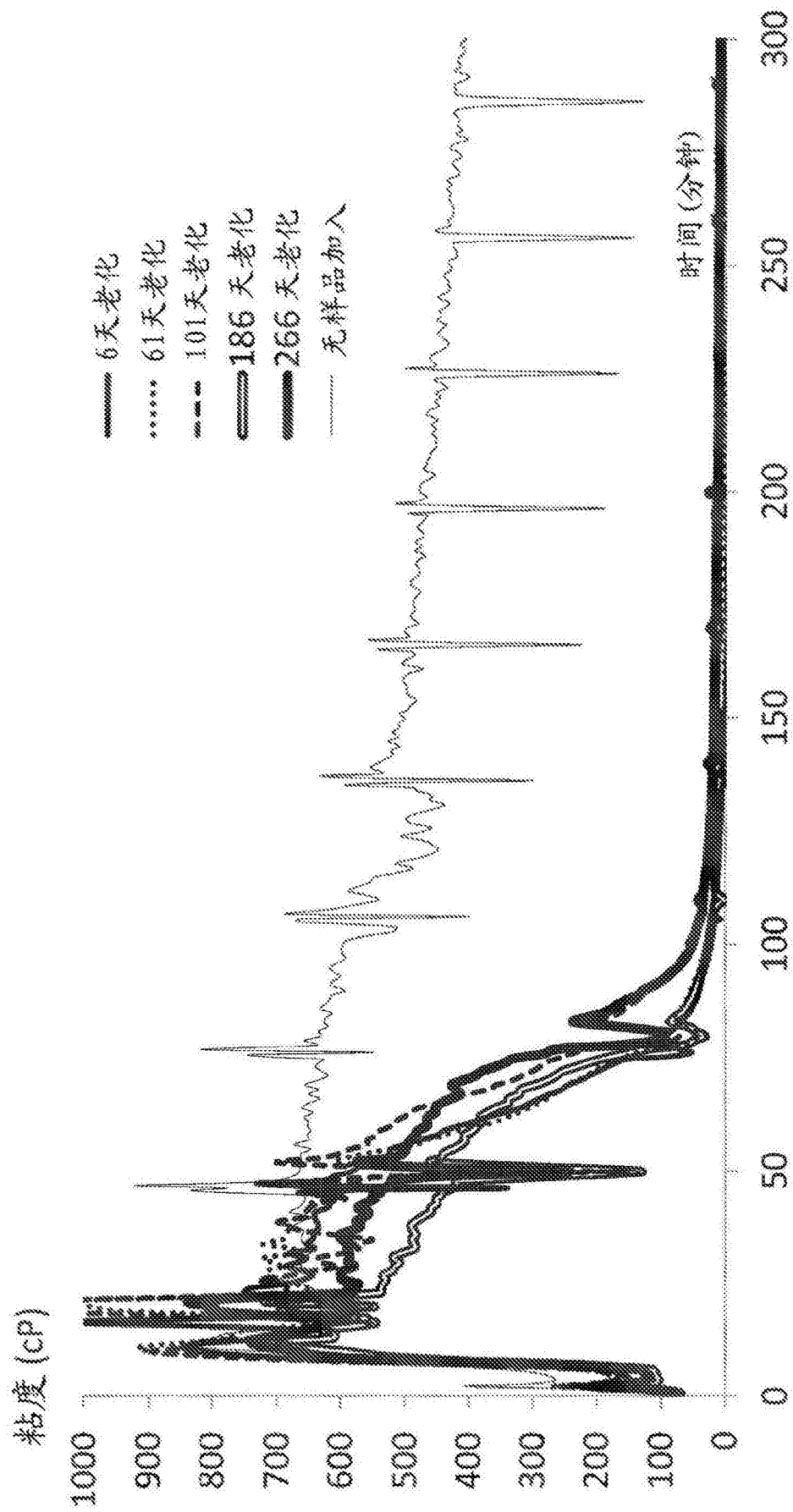


图14

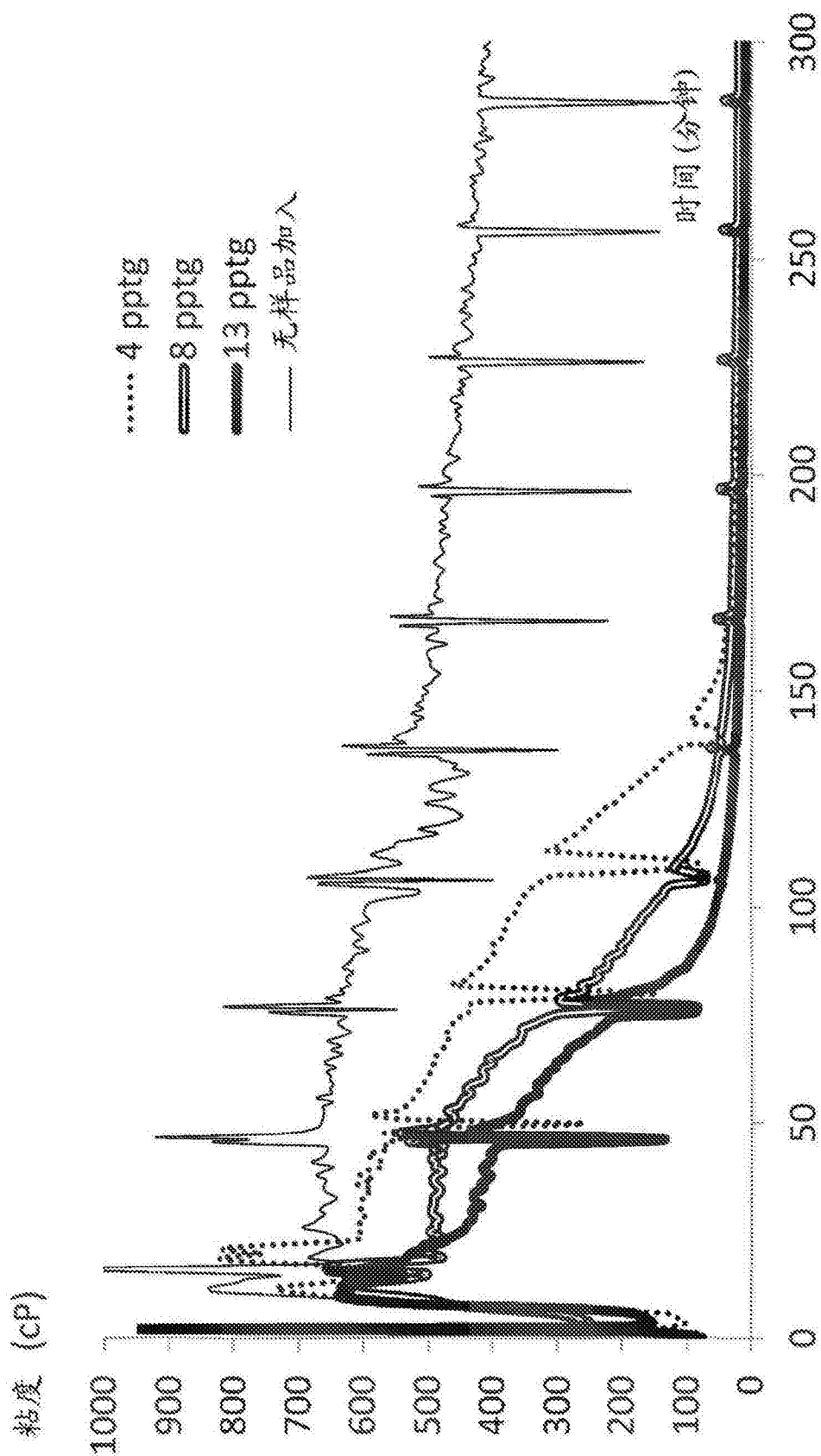


图15

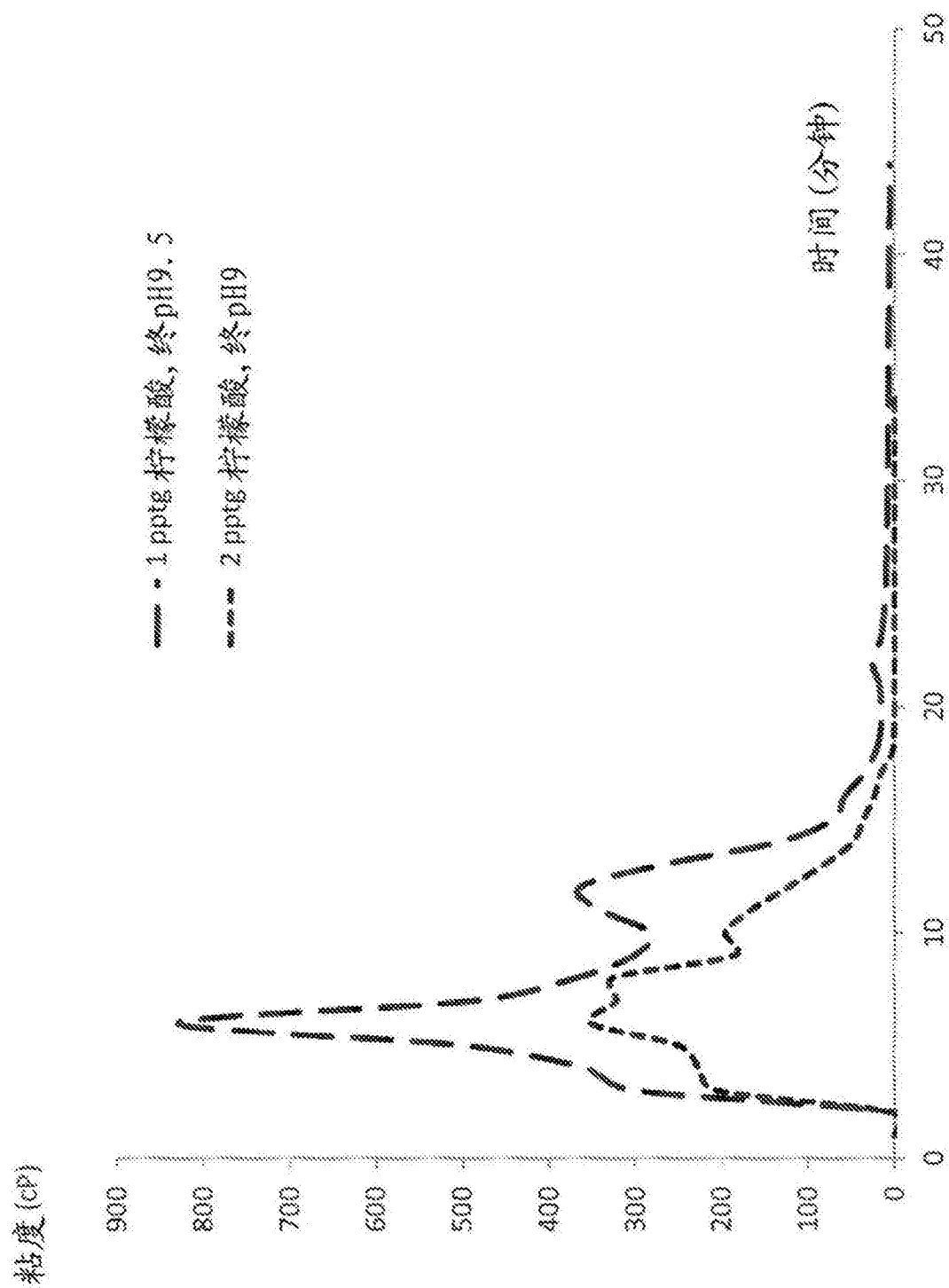


图16

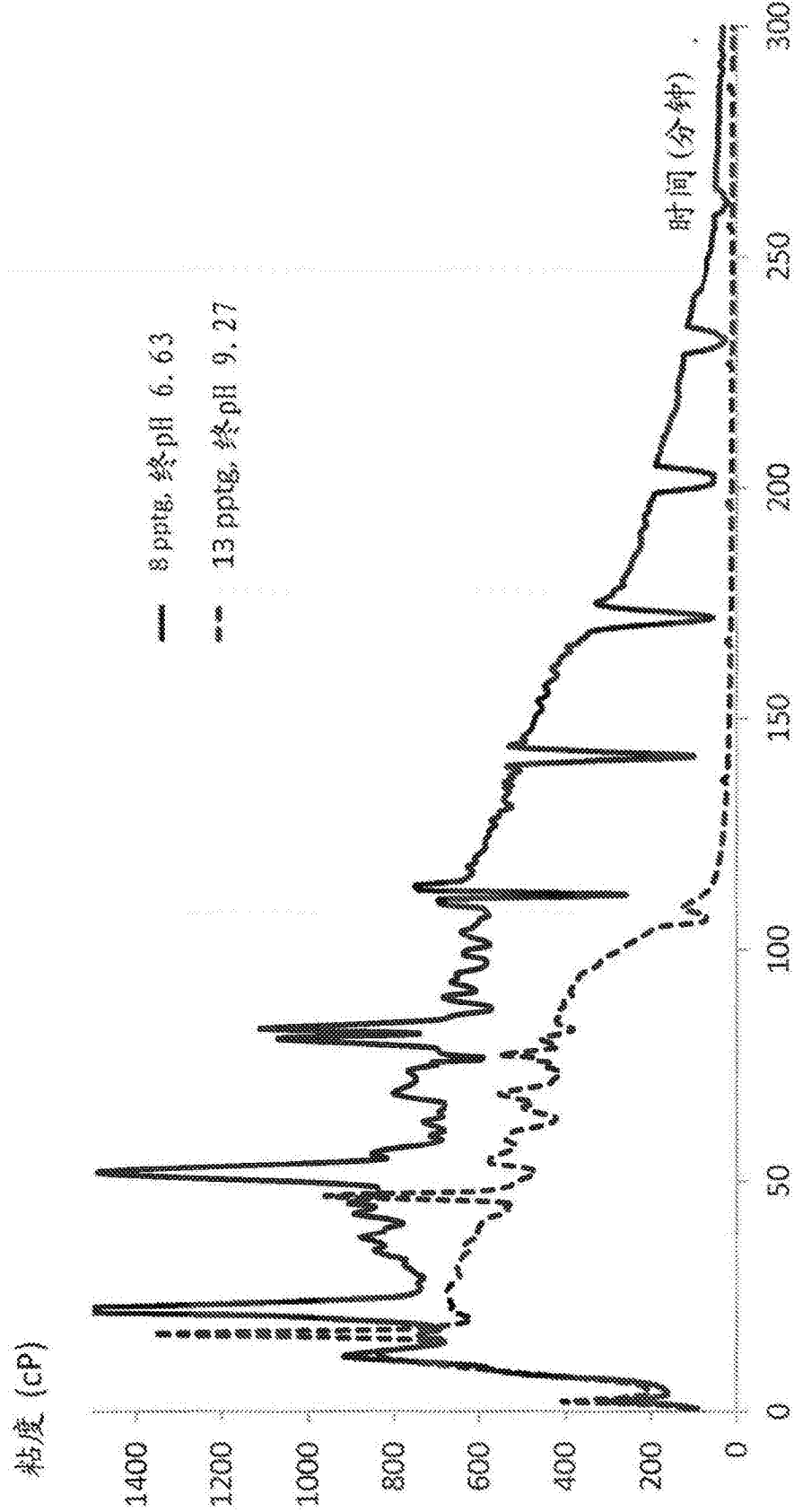


图17