



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101855320 A

(43) 申请公布日 2010.10.06

(21) 申请号 200880107392.4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.09.17

C10G 11/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

60/973394 2007.09.18 US

61/085780 2008. 08. 01 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 03. 17

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2008/076716 2008.09.17

(87) PCT申请的公布数据

W02009/039201 EN 2009. 03. 26

(71) 申请人 蓝宝石能源公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 塔尔萨大学

(72)发明人 A·阿拉瓦尼斯 J·派尔

G·普赖斯 D·克伦克莱顿

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 曹小刚 林毅斌

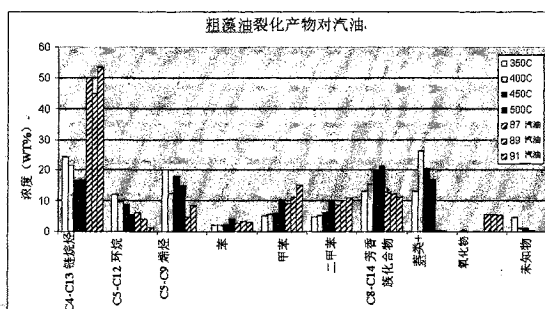
权利要求书 3 页 说明书 48 页 附图 30 页

(54) 发明名称

精炼烃原料的方法

(57) 摘要

本文描述转化包括烃的原料为包括轻质烃产物的组合物的方法。也描述产生和精炼包括可以适合作为燃料产品的、来自生物质的萘的组合物的过程和方法。



1. 裂化倍半萜的催化裂化方法,所述方法包括在催化裂化条件下将含有所述倍半萜的原料与催化组合物接触。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述倍半萜是花侧柏烯。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述方法包括产生含有重量百分比大于50%的甲苯、小于2%的苯、小于20%的二甲苯和大于30%的环己烷类和环戊烷类的组合的混合物。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述倍半萜是法呢烯。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述方法包括产生含有重量百分比大于15%的甲苯和大于10%的链烷烃的混合物。

6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述裂化条件包括加热所述原料至大于350℃,和其中所述方法包括生产含有重量百分比大于75%、辛烷值大于90的组分的混合物。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述混合物包括重量百分比大约15%至大约20%的甲苯和大约10%至大约15%的链烷烃。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中所述混合物包括重量百分比大于50%的芳香烃。

9. 裂化二萜的催化裂化方法,所述方法包括在催化裂化条件下将包含所述二萜的原料与催化组合物接触。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述二萜是植醇。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述方法包括生产含有重量百分比大于55%的C5-C9链烷烃的混合物,其中多于按重量计70%的所述链烷烃类是单甲基链烷烃。

12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述裂化条件包括加热所述原料至大于350℃,和其中所述方法包括生产含有重量百分比大于75%、辛烷值大于90的组分的混合物。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述混合物包括重量百分比大于40%的甲基丁烷。

14. 根据权利要求10所述的方法,其中所述方法包括生产含有重量百分比小于1%的C4链烷烃的混合物。

15. 裂化三萜的催化裂化方法,所述方法包括在催化裂化条件下将包含所述三萜的原料与催化组合物接触。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述三萜是角鲨烯。

17. 裂化四萜的催化裂化方法,所述方法包括在催化裂化条件下将包含所述四萜的原料与催化组合物接触。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述四萜是胡萝卜素。

19. 裂化至少包括三种萜的混合物的催化裂化方法,所述方法包括在催化裂化条件下将包含含有至少三种萜的所述混合物的原料与催化组合物接触。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述至少三种萜是倍半萜。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述原料包含姜油。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述方法生产含有重量百分比大于15%的环烷、大于20%的链烷烃、大于5%的二甲苯和大于5%的甲苯的混合物。

23. 根据权利要求19所述的方法,其中所述混合物包括至少三种不同大小的、选自以下的萜:单萜、倍半萜、二萜、三萜和四萜。

24. 根据权利要求19所述的方法,其还包括从藻类中提取包括至少三种萜的所述混合

物。

25. 裂化来自藻类的油的催化裂化方法,所述方法包括:从藻类提取油以形成包括萜的原料;在催化裂化条件下将包括所述萜的所述原料与催化组合物接触。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其还包括在所述提取油之前,基因修饰所述藻类。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中基因修饰所述藻类与没有基因修饰所述藻类相比,产生增加量的所述萜。

28. 根据权利要求 25 所述的方法,其还包括将来自藻类的所述油与燃料组分混合,然后接触所述原料。

29. 根据权利要求 28 所述的方法,其中所述燃料组分选自以下:化石燃料、石油、混合燃料的混合物、汽油、柴油、喷气式发动机燃料和它们的任何组合。

30. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述萜是倍半萜。

31. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述倍半萜是花侧柏烯。

32. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述倍半萜是法呢烯。

33. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述萜是二萜。

34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中所述二萜是植醇。

35. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述萜是三萜。

36. 根据权利要求 35 所述的方法,其中所述三萜是角鲨烯。

37. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述萜是四萜。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述四萜是胡萝卜素。

39. 根据权利要求 0、0、0、0、0 或 0 所述的方法,其中所述裂化条件包括加热所述原料至大约 100-1000°C 之间。

40. 根据权利要求 39 所述的方法,其中所述催化裂化条件包括加热所述原料至大约 180 和 580°C 之间的温度。

41. 根据权利要求 40 所述的方法,其中所述催化裂化条件包括加热所述原料至大约 200 和 400°C 之间的温度。

42. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述催化裂化条件包括加热所述原料至大约 350 和 400°C 之间的温度。

43. 根据权利要求 0、0、0、0、0 或 0 所述的方法,其中所述催化组合物包括分子筛。

44. 根据权利要求 43 所述的方法,其中所述分子筛是具有大于 6 埃的孔径大小的大孔分子筛。

45. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述大孔分子筛具有 10-15 埃的笼直径。

46. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述大孔分子筛是 12- 环沸石。

47. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述大孔分子筛是 β 、L 或 Y- 型沸石。

48. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述大孔分子筛是 LZY-72、Valfor CPS11BL-25、ELZ-L 或 T-4546。

49. 根据权利要求 43 所述的方法,其中所述分子筛是 10- 环沸石。

50. 根据权利要求 43 所述的方法,其中所述分子筛是 ZSM-5 沸石。

51. 根据权利要求 43 所述的方法,其中所述催化组合物还包括第二分子筛。

52. 根据权利要求 51 所述的方法,其中所述第二分子筛不同于所述分子筛的大小。

53. 精炼方法,其包括:在流动反应器中裂化含有角鲨烯的原料;蒸馏裂化产物;和得到具有大约 85 至 125 之间辛烷值的燃料产品。

54. 根据权利要求 53 所述的方法,其中所述辛烷值大于 90。

55. 制造燃料产品的方法,其包括:从基因修饰的无维管光合生物得到原料;和在催化裂化条件下将所述原料与催化组合物接触,由此制造燃料产品,其中所述催化组合物包括具有大于 6 埃孔径大小的大孔分子筛。

56. 根据权利要求 55 所述的方法,其中所述裂化在高至 420°C 温度下进行。

57. 根据权利要求 55 所述的方法,其中所述催化组合物是 12 环沸石。

58. 根据权利要求 55 所述的方法,其中所述燃料产品具有大约 85 至 125 之间辛烷值。

59. 根据权利要求 55 所述的方法,其中所述燃料产品具有大于 90 的辛烷值。

60. 根据权利要求 55 所述的方法,其还包括将燃料组分加至所述燃料产品,其中所述燃料组分是乙醇、喷气式发动机燃料、柴油、生物柴油或汽油。

61. 根据权利要求 55 所述的方法,其还包括将燃料添加剂加至所述燃料产品。

62. 组合物,其包括:从藻类提取的油和催化裂化组合物。

63. 组合物,其包括:萜和催化裂化组合物。

64. 根据权利要求 63 所述的组合物,其中所述萜选自以下:单萜、倍半萜、二萜、三萜、四萜、花侧柏烯、法呢烯、角鲨烯、姜油烯和胡萝卜素。

65. 组合物,其包括:姜油和催化裂化组合物。

66. 组合物,其包括:植醇和催化裂化组合物。

67. 根据权利要求 62、63、65 或 66 所述的组合物,其中所述催化裂化组合物是分子筛。

68. 根据权利要求 67 所述的组合物,其中所述分子筛是具有大于 6 埃孔径大小的大孔分子筛。

69. 根据权利要求 68 所述的组合物,其中所述大孔分子筛具有 10-15 埃的笼直径。

70. 根据权利要求 68 所述的组合物,其中所述大孔分子筛是 12- 环沸石。

71. 根据权利要求 68 所述的组合物,其中所述大孔分子筛是 β 、L 或 Y- 型沸石。

72. 根据权利要求 68 所述的组合物,其中所述大孔分子筛是 LZY-72、Valfor CP811BL-25、ELZ-L 或 T-4546。

73. 根据权利要求 67 所述的组合物,其中所述分子筛是 10- 环沸石。

74. 根据权利要求 67 所述的组合物,其中所述分子筛是 ZSM-5 沸石。

精炼烃原料的方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求美国临时专利申请第 60/973,394 号(2007 年 9 月 18 日提交)和第 61/085,780 号(2008 年 8 月 1 日提交)的权益,所述申请通过引用并入本文。

技术背景

[0003] 碳基化石燃料例如煤、石油和天然气是有限的且不可再生的资源。以目前的消耗速度,化石燃料的供应在可预见的将来将被耗尽。同时,燃烧化石原料已经引起了大气中二氧化碳浓度的上升,其被认为引起了全球气候变化。

[0004] 由于数种原因,生物燃料是化石燃料切实可行的替代物。生物燃料是由生物质——源自近来活生物的物质——产生的可再生的能源。虽然生物燃料也是碳基的,但是它们不会引起大气中二氧化碳水平显著的净增加,这是因为在燃料消耗期间释放出的二氧化碳通过新的生物生长被重新吸收。

[0005] 因为运输相关的汽油消耗代表了所有液体化石燃料使用的主要部分,用液体生物燃料补充或替换汽油预期减少我们对化石燃料的依赖和减少二氧化碳产生。目前可使用的液体生物燃料包括乙醇和类脂。乙醇一般由富含碳水化合物例如糖和淀粉的作物生产。复合糖例如纤维素和半纤维素也可以分解成糖,其随后可以通过微生物转化为乙醇。类脂基的生物燃料,也被称为生物柴油,是源于植物例如玉米、大豆、向日葵和高粱的植物油。

[0006] 然而,使用乙醇和类脂基生物燃料的能源益处有待商榷。乙醇具有比汽油低的能量含量,使得需要更多的乙醇以提供相同的能量输出。更重要地是,乙醇和类脂生产目前都通过化石燃料驱动。例如,生产乙醇的能量包括运转农业机械和进行灌溉、运输和磨碎作物、生产杀虫剂和肥料以及发酵和蒸馏乙醇。有人担心乙醇生产的能量输入可能会超过来自乙醇燃烧的能量输出。另外,乙醇和生物柴油的广泛生产和使用将要求建造新的配送管道,这是因为两者都不适合于使用现有的燃料配送基础设施进行运输。而且,作物-基燃料例如乙醇和传统的生物柴油的任意大规模的发展将与食品生产竞争相同的资源,并最终受到耕地数量的限制。

[0007] 因此,存在从可再生源生产燃料以及克服现有生物燃料缺点的需要。

[0008] 发明概述

[0009] 本文公开的是裂化倍半萜的催化裂化方法,该方法包括在催化裂化条件下将含有倍半萜的原料与催化组合物接触。例如,倍半萜可以是花侧柏烯或法呢烯。该方法可以包括生产含有重量百分比大于 50% 的甲苯、小于 2% 苯、小于 20% 的二甲苯和大于 30% 的环己烷类和环戊烷类的组合的混合物。在另一种情况下,该方法包括生产含有重量百分比大于 15% 的甲苯和大于 10% 的链烷烃(石蜡, paraffin) 的混合物。在一些情况下,裂化条件包括加热原料至高于 350°C,并且其中所述方法包括生产含有重量百分比大于 75%、辛烷值大于 90 的组分的混合物。同样,所描述的混合物可以包括重量百分比大约 15% 至大约 20% 的甲苯和大约 10% 至大约 15% 的链烷烃。混合物也可以包括重量百分比大于 50% 的芳香烃。

[0010] 另一方面,提供裂化二萜的催化裂化方法,该方法包括在催化裂化条件下将含有二萜的原料与催化组合物接触。在一种情况下,二萜是植醇。该方法可以包括生产含有重量百分比大于 55% 的 C5-C9 链烷烃的混合物,其中超过 70% 重量的链烷烃是单甲基链烷烃。在一些情况下,裂化条件包括加热原料至大于 350°C,并且其中所述方法包括生产含有重量百分比大于 75%、辛烷值大于 90 的组分的混合物。在一些情况下,该混合物包括重量百分比大于 40% 的甲基丁烷。混合物也可以包括重量百分比小于 1% 的 C4 链烷烃。

[0011] 在又一方面,本文提供裂化三萜的催化裂化方法,该方法包括在催化裂化条件下将含有三萜的原料与催化组合物接触。三萜可以是角鲨烯。

[0012] 也提供裂化四萜的催化裂化方法,该方法包括在催化裂化条件下将含有四萜的原料与催化组合物接触。四萜可以是胡萝卜素。

[0013] 在一方面,本文提供裂化包括至少三种萜的混合物的催化裂化方法,该方法包括在催化裂化条件下将包含至少三种萜的混合物与催化组合物接触。至少三种萜可以是倍半萜。在一种情况下,原料包含姜油。该方法可以生产包括重量百分比大于 15% 的环烷、大于 20% 的链烷烃、大于 5% 的二甲苯和大于 5% 的甲苯的混合物。该混合物也可以包括选自单萜、倍半萜、二萜、三萜和四萜的不同大小的至少三种萜。方法还可以包括从藻类提取含有至少三种萜的混合物。

[0014] 在另一方面,提供裂化来自藻类的油的催化裂化方法,该方法包括:从藻类提取油以形成包括萜的原料;在催化裂化条件下将包含萜的原料与催化组合物接触。在一些情况下,方法还包括在提取油之前,基因修饰所述藻类。基因修饰的藻类与没有基因修饰的藻类相比,可以产生增加量的萜。在一些情况下,该方法还包括将来自藻类的油与燃料组分混合,然后接触原料。例如,燃料组分选自以下:化石燃料、石油、混合燃料的混合物、汽油、柴油、喷气式发动机燃料和它们的任何组合。萜可以是例如倍半萜、二萜、三萜、四萜、花侧柏烯、法呢烯、植醇、角鲨烯或胡萝卜素。

[0015] 在一些情况下,催化裂化方法包括裂化条件,其中该裂化条件包括加热原料至大约 100-1000°C 之间。在进一步的情况下,催化裂化条件包括加热原料至大约 180 和 580°C 之间、或大约 200 和 400°C 之间或大约 350 和 400°C 之间的温度。

[0016] 在一些情况下,催化裂化方法包括将原料与含有分子筛的催化组合物接触。分子筛可以是具有孔径大小大于 6 埃和 / 或具有 10-15 埃的笼直径 (cage diameter) 的大孔分子筛。在一些情况下,大孔分子筛是 12- 环沸石,例如 β 型、L 型、Y 型、LZY-72、Valfor CP811BL-25、ELZ-L 或 T-4546。在其它情况下,分子筛是 10- 环沸石,例如 ZSM-5 沸石。在一些情况下,催化组合物包括多于一种分子筛。例如,催化组合物还包括可以与所述分子筛不同大小的第二分子筛。

[0017] 在一方面,本文描述包括以下步骤的精炼的方法:在流动反应器中裂化包括角鲨烯的原料;蒸馏裂化产物;和得到具有辛烷值 (octanrating) 在大约 85 至 125 之间的燃料产品。在一些情况下,辛烷值大于 90。

[0018] 本文也提供制备燃料产品的方法,其包括:从基因修饰的无维管光合生物得到原料;并且在催化裂化条件下将该原料与催化组合物接触,由此制造燃料产品,其中催化组合物包括具有孔径大小大于 6 埃的大孔分子筛。裂化可以在高至 420°C 的温度下进行。催化组合物可以是 12 环沸石。燃料产品可以具有大约 85 至 125 之间的辛烷值或可以具有大于

90 的辛烷值。在一些情况下,方法还包括加入燃料组分到燃料产品,其中燃料组分是乙醇、喷气式发动机燃料、柴油、生物柴油或汽油。在一些情况下,方法还包括加入燃料添加剂到燃料产品。

[0019] 一方面,提供组合物,其包括:从藻类提取的油和催化裂化组合物。也提供组合物,其包括:萜和催化裂化组合物,其中萜可选自以下:单萜、倍半萜、二萜、三萜、四萜、花侧柏烯、法呢烯、角鲨烯、姜油烯和胡萝卜素。本文描述的其它组合物包括含有以下的组合物:姜油和催化裂化组合物,以及包括含有以下的组合物:植醇和催化裂化组合物。催化裂化组合物是分子筛。在一些情况下,分子筛是孔径大小大于 6 埃和 / 或笼直径 10-15 埃的大孔分子筛。在一些情况下,大孔分子筛是 12- 环沸石,例如 β 型、L 型、Y 型、LZY-72、ValforCP811BL-25、ELZ-L 或 T-4546。在其它情况下,分子筛是 10- 环沸石,例如 ZSM-5 沸石。

[0020] 通过引用并入

[0021] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请在此通过引用被并入,其程度如同每一份单独的出版物、专利或专利申请被特定且单独地指明通过引用而并入。

[0022] 附图简述

[0023] 本发明的许多新特征在所附的权利要求中具体阐明。参考下面提出说明性实施方式——其中使用了许多本发明的原理——的详细描述,和附图,将使本发明的示例性特征和益处得到更好的理解,在附图中:

[0024] 图 1A 显示进行催化反应和评估产品分配的脉冲反应器。

[0025] 图 1B 是显示运行中的脉冲反应器的示意图。

[0026] 图 1C 总结对不同温度从花侧柏烯得到的各种裂化产物。

[0027] 图 2A 显示使用 SN27 催化剂在不同反应温度下花侧柏烯的裂化产物。

[0028] 图 2B 显示使用 LZY-72 催化剂在不同反应温度下花侧柏烯的裂化产物。

[0029] 图 2C、2D 和 2E 总结在三种不同温度下通过 LZY-72 催化的花侧柏烯的裂化产物的量。

[0030] 图 3A 显示使用沸石 β 催化剂在不同反应温度下的花侧柏烯的裂化产物。

[0031] 图 3B 和 3C 总结在二种不同温度下通过沸石 β 催化的花侧柏烯的裂化产物的量。

[0032] 图 4 显示使用 ELZ-L 沸石催化剂在不同反应温度下的花侧柏烯的裂化产物。

[0033] 图 5A 说明用于裂化从藻类提取的油的示例性脉冲反应器装置。

[0034] 图 5B 显示裂化粗藻油 (crude algal oil) 生成的产品。

[0035] 图 5C 显示裂化精炼的藻油生成的产品。

[0036] 图 5D 说明粗藻油和精炼的藻油的裂化产物与 87、89 和 91 辛烷石油汽油的比较。

[0037] 图 6A 显示使用 LZY-72 沸石催化剂在不同反应温度下法呢烯的裂化产物。

[0038] 图 6B 显示法呢烯裂化产物的混合辛烷值。

[0039] 图 7 显示使用 LZY-72 沸石催化剂在不同反应温度下姜精油的裂化产物。

[0040] 图 8A 使用 LZY-72 沸石催化剂在不同反应温度下角鲨烯的裂化产物。

[0041] 图 8B 显示角鲨烯裂化产物的混合辛烷值。

[0042] 图 9A 显示使用 LZY-72 沸石催化剂在不同反应温度下植醇的裂化产物。

[0043] 图 9B 和 9C 显示在植醇裂化的链烷烃产品中碳分布和支化程度。

[0044] 图 9D 显示植醇裂化产物的混合辛烷值。

[0045] 图 10A 显示与商业汽油样品的烃组分比较,商业和藻源的植醇的裂化产物的裂化产物。

[0046] 图 10B 显示与商业汽油样品比较,植醇裂化产物的混合辛烷值。

[0047] 图 11A 显示使用 Nickel(镍)/LZY-72 沸石催化剂在不同反应温度下植醇的裂化和氢化裂解产物。

[0048] 图 11B 显示植醇氢化裂解产物的混合辛烷值。

[0049] 图 12A 示意性显示适合于大规模裂化方法的装置。

[0050] 图 12B 显示裂化角鲨烯生产的气体和液体产品的组合物。

[0051] 发明详述

[0052] 可以进行精炼烃混合物使烃混合物类型、形状和大小最优化,以产生燃料产品。燃料工业中一般的精炼方法包括但不限于蒸馏、分馏、提取、溶剂萃取、加氢处理、异构化、二聚化、烷基化和裂化。裂化方法一般指例如通过碳-碳键的裂开使烃类分解成为较小烃类的方法。复杂有机分子例如类异戊二烯或重烃可通过前体中的碳-碳键的断开被裂化成为比较简单的分子(例如轻质烃)。裂化通常通过使用高温、催化剂或它们的组合进行。裂化方法的实例包括但不限于热裂化、流化床催化裂化、塞摩福流化床催化裂化、蒸汽裂化和氢化裂解。

[0053] 催化裂化方法可以包括在催化剂——一般为酸性催化剂例如二氧化硅-氧化铝催化剂或沸石——存在下有机分子的裂开。催化剂促进键的异裂(不对称)断裂,这产生相反电荷的离子对,通常为碳正离子和非常不稳定的氢阴离子。碳局部的(carbon-localized)自由基和阳离子都是高度不稳定的并经历链重排的过程,例如 β 位置中的 C-C 的裂开以及同时分子间和分子内的氢转移或氢负离子转移。在两种类型的过程中,相应的活泼中间体(自由基、离子)被永久地再生,并且因此反应可以通过自动传播的(自增长)成链历程继续。反应的链随后可以通过自由基或离子重组被最终终止。

[0054] 在一种实施方式中,催化裂化方法和催化裂化条件包括将有机分子与分子筛例如沸石接触。催化裂化条件也可以包括加热有机分子,例如 100-1000°C。在一个实施方式中,裂化条件包括加热原料至大约 100-1000°C 之间。此外,催化裂化条件包括加热原料至大约 180 和 580°C 之间。在又一个实施方式中,催化裂化条件包括加热原料至大约 200 和 400°C 之间的温度或大约 350 和 400°C 之间的温度。催化裂化条件可以包括加热原料至其中在催化剂存在下的 C-C 键裂开被促进的温度。

[0055] 在一方面,公开裂化萜的催化裂化方法,该方法包括在催化裂化条件下将含有萜的原料与催化组合物接触。

[0056] 萜是大的和各种各样类型的烃,其主要通过多种多样的光合生物产生。当萜被化学改性时,例如通过氧化或碳骨架的重排,生成的化合物一般称为萜类化合物或类异戊二烯。萜类化合物或类异戊二烯一般包括杂原子。如本文提到的术语萜可以用于描述萜类化合物或类异戊二烯。

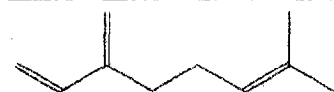
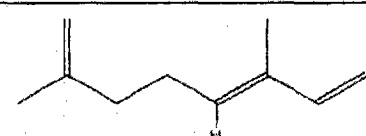
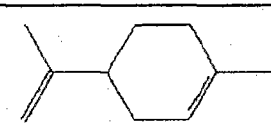
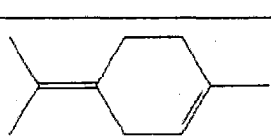
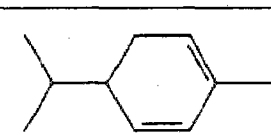
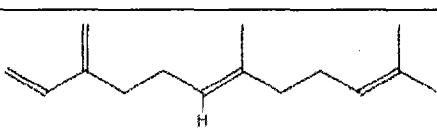
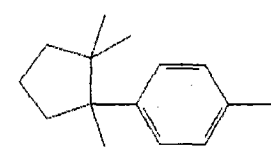
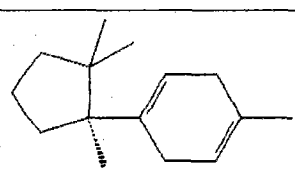
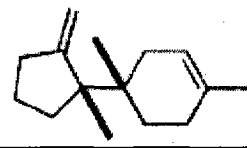
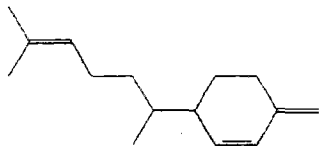
[0057] 萜可以是多种类型的植物和花的精油的主要成分。精油广泛地用作作为食品的天然调料添加剂、作为香料制造厂中的香料,以及在传统和替代医学例如芳香疗法中广泛使用。天然萜的合成变种和衍生物也大大扩展了香料制造厂中使用的香料和食品添加剂中使用

的调料。

[0058] 萜是包括多个异戊二烯(2-甲基-丁-1,3-二烯)单元的不同类型的生物合成烃,异戊二烯(2-甲基-丁-1,3-二烯)是5个碳的烃。异戊二烯单元可以连接在一起形成非环状(包括支链或直链排列的碳原子)或环状骨架。在这些当中,半萜由一个异戊二烯单元(例如异戊二烯)组成,单萜由两个异戊二烯残基组成并包括例如苧烯和月桂烯;倍半萜由三个异戊二烯残基组成并包括非环状的倍半萜(例如,法呢烯)和环状倍半萜(例如,花侧柏烯、姜黄烯、姜烯和红没药烯);和二萜由四个异戊二烯残基组成并包括例如西柏烯、紫杉二烯(taxadiene);三萜由六个异戊二烯残基组成并包括例如角鲨烯,和四萜由八个异戊二烯残基组成并包括例如胡萝卜素、非环状的番茄红素、单环的 γ -胡萝卜素和双环的 α -和 β -胡萝卜素。类异戊二烯的大小指类异戊二烯骨架的碳原子总数,类异戊二烯的大小一般为五的多倍。表1显示为适合于精炼的底物或原料的示例性萜。

[0059] 表1

[0060]

名称	结构	大小	CAS	MW
异戊二烯		5		68.1
月桂烯		10		136.2
罗勒烯		10	13877-91-3	136.2
苧烯		10		136.2
萜品油烯		10	586-62-9	136.2
水芹烯		10	99-83-2	136.2
法呢烯		15		204.3
花侧柏烯		15		202.3
叩卜任烯		15	5046-93-5	204.4
isobazzanene		15	88661-59-0	
倍半水芹烯		15	20307-83-9	204.4

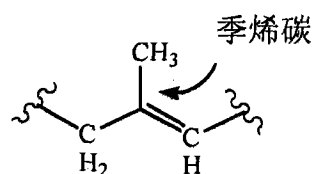
[0061]

红没药烯		15	495-61-4	204.3
姜黄烯		15	28976-68-3	202.3
姜烯		15	495-60-3	204.3
倍巴烯 (barbatene)		15	53060-59-6	204.3

[0062] 在一些实施方式中,烃具有多烯结构。如本文使用的,“多烯”指具有主要的碳基骨架的烃,其中碳原子是通过单键和双键线性连接的。主要的碳基骨架指烃结构的最长的直链和包括至少两个双键。形成骨架的一个或多个碳原子可以用烷基进一步地取代,特别是用甲基取代。多烯可以显示 E 和 Z (分别是顺式和反式) 几何异构体。在一些实施方式中,在碳基骨架的一端或两端,多烯包括末端环状结构 (例如,环己烯基或取代的环己烯基)。

[0063] 在一种实施方式中,多烯结构包括至少一个“季烯碳 (quaternaryolefinic carbon)”,季烯碳指经过 C = C 键和 C-C 键分别连接到多烯骨架的两个邻近的碳原子的多烯骨架的碳原子。季烯碳还连接到烷基取代基 (例如,甲基)。代表性季烯碳在以下显示:

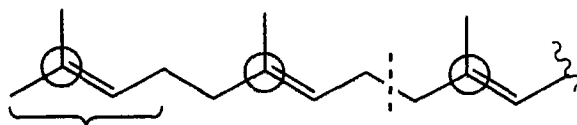
[0064]



[0065] 季烯碳一般在异戊二烯衍生物例如萜中存在。如所讨论,异戊二烯残基是生物系统中的共同结构模体。异戊二烯的多种生物衍生物例如类胡萝卜素是多个异戊二烯残基的链延伸产物。

[0066] 因此,在一些实施方式中,多烯链包括两个或多个异戊二烯残基的重复单元以提供类异戊二烯。具有三个异戊二烯残基重复单元的多烯骨架片段的示例结构在以下显示,其中季烯碳用圆圈标出。

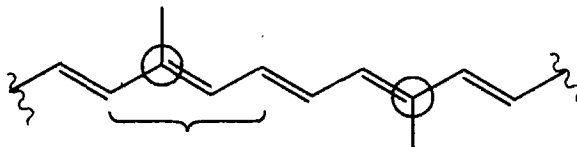
[0067]



[0068] 异戊二烯残基

[0069] 取决于异戊二烯单元如何连接,多烯链可以包括异戊二烯残基的可选的重排。如下显示,多烯片段包括交替的 C-C 键和 C = C 键,以提供共轭结构。共轭骨架片段的示例性结构在以下显示出,其中季烯碳用圆圈标出:

[0070]



[0071] 异戊二烯残基

[0072] 在一方面,裂化倍半萜的催化裂化方法,该方法包括在催化裂化条件下将含有倍半萜的原料与催化组合物接触。倍半萜可以是有机分子混合物的一部分或者可以是包括大于 75% 的倍半萜的混合物。倍半萜是包括三个异戊二烯单元的任何有机分子。倍半萜是一类由三个异戊二烯单元组成的萜并且其为 C15 分子。类似于单萜,倍半萜可以是非环状的或者包含环的,其包括多种独特的组合。生物化学改性例如氧化或重排产生称为倍半萜化合物的倍半萜。出于本公开内容的目的,术语倍半萜包括倍半萜化合物或其它包括三个异戊二烯单元及另外原子例如氧原子的有机分子。倍半萜包括,例如但不限于,花侧柏烯、法呢烯和姜烯。

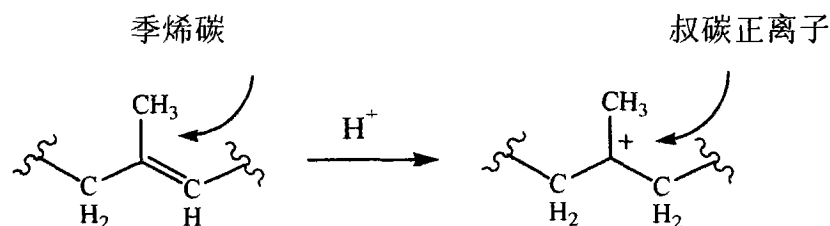
[0073] 倍半萜可以使用本文描述的方法通过在反应器中加热倍半萜或包括倍半萜的混合物而进行裂化。例如但不限于,反应器可以是脉冲反应器、活塞流反应器或连续流动反应器。催化剂例如沸石催化剂可以用气体预处理,直到获得期望的气氛和催化剂。例如,氮气(惰性气氛)、氢气(还原气氛)或氧气(氧化气氛)可以用于预处理反应器中的催化剂。在催化剂任选的预处理后,反应器可以维持在期望的反应温度,例如,裂化条件的温度。在使用脉冲反应器的示例性实施方式中,小量的倍半萜被脉冲通过催化剂穿过反应器。取决于反应使用的温度和催化剂,可以从该裂化反应产生不同产物。任选地,在反应进行后,可以通过例如气相色谱和/或质谱(GC/MS)鉴定反应产物。其它原子鉴定技术也可以使用,其对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0074] 催化组合物可以包括酸性催化剂例如分子筛。分子筛是包含精确和均匀大小孔隙的材料,其可以用作为气体和液体的吸附剂或者截留(俘获)有机分子。小到足以穿过孔隙的分子被吸附,而较大的分子不被吸附。它不同于普通的滤器,因为它在分子水平上起作用。例如,水分子可以是小到足以穿过,而较大的分子不会。在一种实施方式中,分子筛是沸石。沸石是硅铝酸盐、铝磷酸盐、硅铝磷酸盐或具有微孔或中孔结构的其他氧化物。

[0075] 裂化催化剂例如沸石一般提供许多布朗斯台酸位点。在这种酸性条件下,生物质多烯(biomass polyene)的季烯碳可以转化为叔碳正离子(方案 IV 中显示)。如本文使用的,“叔碳正离子”(或简单地“碳正离子”)指连接到三个其它碳的三价碳正离子。

[0076] 方案 IV

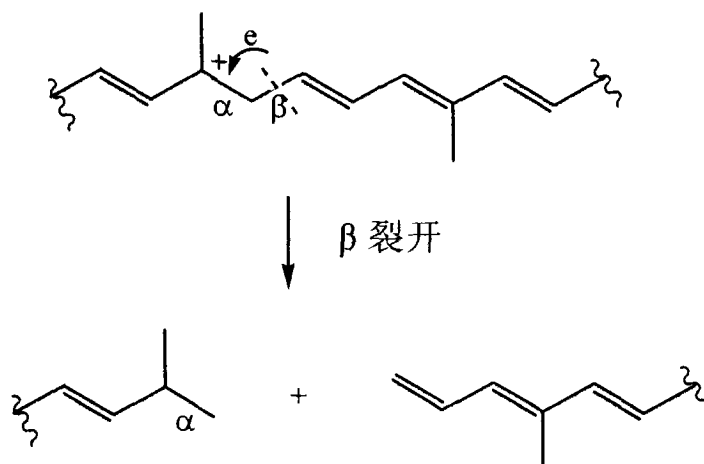
[0077]



[0078] 据认为,叔碳正离子是诱导碳-碳键裂开的活泼中间体。如在方案 V 中所显,当在碳正离子的 β 位置碳碳键断裂时,键电子中和碳正离子。

[0079] 方案 V

[0080]



[0081] 而且,活泼碳正离子也可能导致异构化和低聚反应。因此,由季烯碳生成的碳正离子中间体在转化多烯基原料成为不同的产物中起到重要作用。

[0082] 如本文更详细地讨论,沸石广泛地用于裂化方法,并且因为形状选择性,它们对于燃料的生产是特别有用的。N. Y. Chen 等, Shape Selective Catalysis in Industrial Applications, Marcel Dekker, New York, 1996。形状选择性指产生于它们精确限定的孔隙结构的沸石性质,其生成相当窄限定的分子量和结构的产物。

[0083] 一般地,催化裂开 (catalytic scission) 产生轻质烯烃或轻质烷烃,它们是多烯结构的较短片段。取决于实际结构和裂开点,轻质烯烃可以是短的非环状多烯链或可以包括环状结构 (例如,环己烯)。在不同的实施方式中,轻质烯烃包括 3 至 15 之间的碳,更典型地,在 3-12 之间的碳。

[0084] 适合于炼油厂方法中的催化裂化的任何催化剂可以与原料联合使用。虽然商业裂化催化剂包括酸处理的天然硅铝酸盐、无定形的合成二氧化硅-氧化铝组合和晶状的合成二氧化硅-氧化铝 (沸石),但是最广泛使用的商业催化裂化催化剂是沸石。

[0085] 沸石是硅铝酸盐、铝磷酸盐、硅铝磷酸盐、或其他已知为分子筛的微孔固体家族的氧化物成员。术语分子筛指这些材料的特定的性质,例如主要基于大小排出方法选择性地分类分子的能力。这是由于分子尺寸的非常规则的孔隙结构。由隧道 (通道, tunnel) 的直径控制可以进入沸石孔隙的分子或离子种类的最大尺寸。已经合成超过 1500 种沸石类型,而且已知 48 种天然出现的沸石。一般使用的沸石是来自八面沸石家族 (faujasitic family), 例如 X-、Y- 沸石、高硅沸石 (pentasil) 例如 ZSM-5、或其他沸石例如沸石 β 和沸石 L。这些沸石催化剂和它们的制造是在本领域普通技术人员的知识范围内。

[0086] 沸石（通过离子交换制备）的加氢形式（hydrogen form）是强的固态酸，并且可以促进许多酸催化的反应，例如异构化、烷基化和裂化。更具体地，沸石限制烃在小的空间中，所述小的空间使烃类改变它们的结构或活性，例如被从季烯碳转化为碳正离子中间体。

[0087] 沸石催化剂的孔径大小在动力学地和化学地控制催化反应中可能是重要的。因此，选择合适的沸石催化剂，需要考虑将被裂化的烃的大小。此外，孔径大小可以影响给定烃原料的裂化方法的选择。其它可能的酸裂化催化剂类型包括无机酸和有机酸。

[0088] 在催化裂化期间，来自烃的中间体阳离子可能比在其它裂化方法中活性更小和更稳定。这可以使阳离子在催化剂的活性位点积聚，这可以产生含碳产物——一般称为焦炭——的沉积物。这些沉积物可能需要被除去（例如通过受控燃烧），以恢复催化剂活性。

[0089] 除了催化裂化外，其它工业裂化方法例如热裂化、氢化裂解和蒸汽裂化条件也可以引起多烯结构中碳-碳裂开。这些裂化方法不必须包括碳正离子中间体；相反地，碳-碳键裂开可以沿着多烯骨架不加区别地发生，以产生轻质烯烃。

[0090] 本文描述的方法可以包括将萆例如倍半萆与沸石催化组合物接触。在一个实施方式中，沸石是孔径大小小于 6 埃的 10- 环沸石。示例性 10- 环沸石是 ZSM-5。在一个实施方式中，沸石是 SN27。

[0091] 在另一个实施方式中，方法包括将萆与大孔分子筛接触。例如，孔径大小大于 6 埃的分子大小。在一个实例中，大孔分子筛具有 10-15 埃的笼直径。大孔分子筛可以是 12- 环沸石或大于 12- 环沸石的沸石。在一个实施方式中，12- 环沸石是 β 、L 或 Y- 型沸石。对于本文描述的方法有用的沸石的实例包括但不限于 LZY-72、Valfor CP811BL-25、ELZ-L 和 T-4546。催化组合物在使用之前经过铵交换可以转化为它的完全质子化形式。在一个实施方式中，包含镍的材料可以通过质子化的沸石与 Ni(II) 乙酸盐水溶液进行交换而制备，使得由镍阳离子取代 20% 和 80% 理论的质子发生。在另一个实施方式中，催化组合物可以被离子交换以生成铵形式的沸石，当加热时，其可以通过铵的消除转化为质子形式。质子形式的沸石可以作为催化反应的强的固体酸。

[0092] 裂化萆例如倍半萆的催化裂化方法也可以包括将萆与催化组合物和第二催化组合物接触。第二催化组合物可以与第一催化组合物相同或不同。例如，如果 12- 环沸石被用作第一催化组合物，那么 10- 环或 12- 环沸石可以被用作第二催化组合物。这在多种方式中可能是有用的，例如，当裂化烃混合物时，其中烃可以是不同大小。在另一个实例中，可以使用与第一催化剂相同类型或大小的第二催化组合物，以裂化使用第一催化组合物没有裂化的任何剩余的较大的烃或者原料。

[0093] 在一方面，公开裂化花侧柏烯的催化裂化方法。花侧柏烯是倍半萆。在一个实施方式中，通过在催化裂化条件下将含有花侧柏烯的原料与催化组合物接触，完成裂化。花侧柏烯可以在反应器例如脉冲反应器或连续流动反应器中裂化。反应器可以提供包括加热反应器和花侧柏烯至催化裂化温度的催化裂化条件，所述催化裂化温度例如 100-1000℃、180-510℃、200-400℃ 或 350-400℃。例如，花侧柏烯可以流过包括催化组合物的反应器，该反应器被加热至催化裂化条件温度。接触催化组合物的花侧柏烯裂化成为比原 C15 花侧柏烯分子小的烃。催化剂实例包括本文描述的那些，例如 SN27 (ZSM-5 型)、ELZ-L (沸石 -L 型) 和 LZY-72 (沸石 -Y 型)。

[0094] 花侧柏烯具有大约 275℃ 的沸点，并且在与气相色谱柱反应后可能需要调整技术

以测量它的存在。在一个实施方式中,可以对柱进行调整,使得花侧柏烯分析不会促成不正确的质谱分析。

[0095] 在一个实施方式中,随着载气(例如氦气),花侧柏烯流过包括催化组合物的反应器。包括花侧柏烯的原料可以处于液相或气相。

[0096] 在一个实施方式中,通过将花侧柏烯与大孔分子筛例如 β 、L或Y-型沸石接触,以本文提供的方法裂化花侧柏烯。因为花侧柏烯是较大的烃(C15),所以大孔分子筛可以提供裂化花侧柏烯成为较小烃的较高的转化。

[0097] 在一些实施方式中,裂化花侧柏烯的方法产生包括重量百分比大于50%的甲苯、小于2%的苯、小于20%的二甲苯以及大于30%的环己烷类和环戊烷类的组合的混合物。在另一个实施方式中,裂化花侧柏烯的方法产生包括大于50、60或70%甲苯的混合物。甲苯是具有高辛烷值的烃,因而可以是燃料组合物的有价值的组分。在一个实施方式中,花侧柏烯的裂化产物混合或加入至基础燃料以产生燃料产品。

[0098] 在一方面,公开裂化法呢烯的催化裂化方法。法呢烯是具有三个异戊二烯单元的倍半萜家族的。在一个实施方式中,法呢烯使用本文描述的催化组合物进行裂化。例如,可以使用12-环沸石催化剂例如LZY-72裂化法呢烯。在一个实施方式中,裂化包括法呢烯的原料。原料可以包括按重量计超过50、60、70、80或90%的法呢烯。原料也可以包括其它分子和烃,例如红没药烯和姜黄烯。在一个实施方式中,法呢烯在包括大约200至大约500℃温度的裂化条件下裂化。例如,法呢烯可以在大约350℃裂化。

[0099] 裂化法呢烯的方法可以包括产生包括重量百分比大于15%的甲苯和大于10%的链烷烃的混合物。在一个实施方式中,混合物包括重量百分比大约15%至大约20%的甲苯和大约10%至大约15%的链烷烃。在另一个实施方式中,混合物包括重量百分比大于50%的芳香烃。在一个实施方式中,来自裂化法呢烯的按重量计多于50、60、70、75或80%的混合物可以包括辛烷值大于90的烃。混合物可以用作燃料产品、可以与燃料产品混合或精炼以产生燃料产品。高辛烷值混合物或燃料产品可以用作燃料产品,或者例如作为燃料产品混合入化石燃料基的燃料。

[0100] 在另一方面,本文描述裂化包括至少三种倍半萜的混合物的催化裂化方法,该方法包括在催化裂化条件下将包含含有至少三种倍半萜的混合物的原料与催化组合物接触。倍半萜的混合物可以裂化成为适当组的产生燃料产品或添加剂——例如喷气式发动机燃料、汽油或柴油——的烃。同时,通过裂化倍半萜的混合物,多种的裂化产物可能允许有完全燃料的产生。在另一个实施方式中,裂化包含所有或几乎所有的一种类型的倍半萜的混合物的方法也可以用于产生完全燃料。

[0101] 作为一个实例,包括至少三种倍半萜的混合物可以是姜油。姜油可以包括如此分子,其包含但不限于以下:姜烯、 β -倍半水芹烯、红没药烯、法呢烯、 β -水芹烯、桉树脑、姜黄烯和柠檬醛。

[0102] 通过包括加入二氧化碳以从姜油中去除姜醇的方法可以裂化姜油。完全质子化的催化剂例如12-环沸石如LZY-72可以用于在催化裂化条件下接触姜油,以开始该倍半萜的裂化过程和碳-碳键的裂开。

[0103] 在裂化姜油方法的一个实施方式中,方法产生包括重量百分比大于15%的环烷、大于20%的链烷烃、大于15%的二甲苯和大于5%的甲苯的混合物。该混合物的多种链烷

烃的可以是可具有高辛烷值的直链的链烷烃。姜油的多种高辛烷值的组分可以用作燃料产品例如汽油或汽油添加剂。

[0104] 在一方面中,本文公开包括姜油酮和重量百分比大于 15% 的环烷、大于 20% 的链烷烃、大于 5% 的二甲苯以及大于 5% 的甲苯的组合物。姜油酮是加热姜油的产物,并可以在组合物中以痕量存在。

[0105] 在另一方面中,公开裂化三萜的催化裂化方法,该方法包括在催化裂化条件下将包含三萜的原料与催化组合物接触。三萜是包括六个异戊二烯单元的 C30 萜。方法中使用的三萜的非限制性实例是角鲨烯。角鲨烯是起初主要从鲨鱼肝油得到的、用于商业目的的天然有机化合物,虽然也有植物源——包括苋菜红种子、米糠、麦胚和橄榄。很多高级生物产生角鲨烯,包括人。角鲨烯是烃和三萜。角鲨烯也可以从基因修饰的生物中产生,其中非天然产生角鲨烯的生物被修饰以产生角鲨烯,或者天然产生角鲨烯的生物被修饰以上调角鲨烯。例如,可以转化藻类细胞以生成通过 MVA 或 MEP 途径产生角鲨烯的酶,并且由藻类细胞产生的角鲨烯可以使用本文描述的方法进行裂化。

[0106] 在一个实施方式中,裂化角鲨烯的方法可以包括在催化裂化条件下将角鲨烯与催化组合物——例如质子化的 12- 环沸石——接触。

[0107] 在裂化角鲨烯的另一个实例中,精炼方法包括在流动反应器中裂化含有角鲨烯的原料;蒸馏裂化产物;和得到辛烷值在大约 85 至 125 之间的燃料产品。在一个实施方式中,燃料产品的辛烷值大于 90。角鲨烯可以在本领域普通技术人员知道的任何适当的反应器中裂化。在一个实例中,角鲨烯在包括使批量的液体以恒定、可编程速度进料至那个反应器的泵的管状反应器中裂化。泵也可以使载气或其它需要被进料至反应器的流体流动,所述流体例如氢气和氮气。在实例中,管状反应器可以使用催化组合物装填,并且将被裂化的原料进料在催化组合物上。反应器中的催化裂化条件可以被设定到由使用者确定的合适温度,例如 300–500°C。裂化的反应产物可以在反应器的出口收集,例如,通过冷凝装置。裂化产物随后可以如本文描述进行鉴定。另外,可以进行分馏例如蒸馏以进一步地精炼裂化产物。

[0108] 在又另一方面,本文公开裂化二萜的催化裂化方法,方法包括在催化裂化条件下将包含二萜的原料与催化组合物接触。二萜是包括四个异戊二烯单元的 C20 萜。作为非限制实例,植醇可以在将被裂化的原料中存在。植醇是在叶绿素的分解期间产生的天然的二萜醇。植醇可以从植物生物中提取,进行如本文描述的裂化方法。在一个实施方式中,生物被基因修饰以上调植醇产生。例如,可以基因修饰藻类细胞以上调植醇、细胞中叶绿素的量和/或细胞中叶绿素的分解。

[0109] 植醇可以使用沸石催化剂——例如 Y、L 或 β - 型沸石——进行催化裂化。在一个实施方式中,在大约 350°C 温度的条件下裂化植醇没有产生可测量的量的或产生小于按重量计 1% 的苯裂化产物。当生成燃料产品例如汽油时,由于上调,可能有利于避免苯的产生。可以如本文先前描述实现植醇裂化产物的分析,例如通过 GC/MS。

[0110] 在一个实施方式中,裂化植醇的方法包括产生含有重量百分比大于 55% 的 C5–C9 链烷烃的混合物,其中多于按重量计 70% 的链烷烃是单甲基链烷烃。在另一个实施方式中,方法包括产生含有辛烷值大于 90 的、重量百分比大于 75% 的组分的混合物。

[0111] 在一个实施方式中,裂化植醇的方法还包括从油中提取植醇。例如,使用有机溶剂从藻油 (algal oil) 中提取植醇。

[0112] 裂化植醇的方法也可以包括通过在氢化裂解条件下将植醇与催化组合物和氢源接触,氢化裂解植醇。例如,催化组合物可以包括镍离子交换沸石催化剂例如 Ni/LZY-72。氢化裂解条件包括 100-1000℃ 的温度。在进一步实施方式中,温度是 200-500℃。在实例中,植醇以 25u1 脉冲与氢气一起穿过脉冲反应器。

[0113] 在一方面中,公开包括以下的组合物:萘和催化裂化组合物。可以利用组合物进行本文描述的过程或方法。例如,组合物可以是裂化萘成为组合物或燃料产品的反应物。可以使组合物处于催化裂化条件,例如在反应器中,以便组合物反应并将萘断裂成为轻质烃。

[0114] 在一个实施方式中,萘选自以下:单萘、倍半萘、二萘、三萘、四萘、花侧柏烯、法呢烯、角鲨烯、姜油烯和胡萝卜素。萘可以是适合于催化裂化成为较小烃的任何萘,包括本文描述的那些。

[0115] 在一方面,公开包括以下的组合物:从藻类中提取的油和催化裂化组合物。在其它方面,公开包括以下的组合物:姜油和催化裂化组合物、植醇和催化裂化组合物、或角鲨烯和催化裂化组合物。示例性催化裂化组合物包括本文描述的那些,但不限于此。例如,催化裂化组合物可以是分子筛。在另一个实例中,分子筛是具有孔径大小大于 6 埃的大孔分子筛。大孔分子筛可以具有 10-15 埃的笼直径和 / 或是 12- 环沸石。示例性大孔分子筛包括但不限于 β 、L 或 Y- 型沸石,例如 LZY-72、Valfor CP811BL-25、ELZ-L 或 T-4546。在其它情况下,分子筛是 10- 环的沸石,例如 ZSM-5 沸石。

[0116] 生物质原料

[0117] 在某些实施方式中,描述适合于精炼(例如裂化)的生物质原料和转化其成为轻质烃或重排烃的方法。生物质原料可以包括从基因修饰生物源例如藻类和细菌提取的烃。一般地,油的裂化产生轻质烃或重排烃,产生的烃适合于作为燃料(例如,汽油、柴油燃料或喷气式发动机燃料)、燃料添加剂和进一步加工成为塑料、树脂、纤维、高弹体、润滑剂、凝胶等的石油化学制品。

[0118] 更具体地,某些生物质烃被选作为原料,其可以进行一种或多种精炼过程,其包括裂化和改变。在某些实施方式中,生物质烃通过碳-碳键的裂开被分解或裂化成为较小分子的烃。在其它实施方式中,生物质烃被改变(例如,通过烷基化或异构化)以形成具有某些结构的烃,例如支链烃、具有高辛烷值(例如,高于 90)的烃等等。有利地,这些生物质原料可以与现有的石油精炼方法相容,并且产生的轻质烃或重排烃可以使用现有的精炼石油的基础设施被进一步地加工或分送。

[0119] 在一些情况下,生物质原料与化石燃料或石油基的原料在精炼之前被掺和或混合。例如,从藻类中提取的原料可以与原油混合,并且随后与催化组合物接触以催化裂化该混合物。精炼的其它方法例如分馏可以在生物质原料与石油基原料掺和或混合后进行。在一些情况下,石油基的原料在与生物质原料混合前已经被精炼。例如,石油基原料可以是汽油、柴油或喷气式发动机燃料。在其它情况下,石油基原料是混合燃料的混合物,例如,当与另一种烃混合物混合时,烃混合物可以产生合适的燃料产品。混合燃料的混合物或者生物质原料或者两者在精炼之前适合作为燃料产品。在另一种情况下,混合燃料的混合物或生物质原料或两者在精炼之前不适合作为燃料产品。

[0120] 如本文使用的,“生物质烃”或“生物质原料”可以指从在最近 50 年内是活的生物得到的一种或多种有机化合物,并且其主要包括碳和氢,并且可以任选地包括杂原子例如氧、

氮和硫。不同于化石基的原油——其源于上至600百万年前的植物生命，本文描述的烃源于活的或近来为活的生物。这些可再生的生物源包括天然出现的生物及基因修饰的生物。在某些实施方式中，这些生物包括藻类或细菌。在一些情况下，生物质烃具有以下之间的碳：大约5-80个碳、10-50个碳、10-40个碳、10-60个碳、15-40个碳、15-60个碳、20-40个碳等等。在其它情况下，烃具有5、10、15、20、25、30、35或40个碳。烃分子的碳经过共价单、双或三碳-碳键连接，并且一般以直链、支链、环状结构或它们组合进行排列。

[0121] 在一些情况下，生物质烃采取萜、类异戊二烯、类脂、烷基酯、生物碱和类苯基丙烷(phenyl propanoid)形式。萜可以指包括杂原子以及纯烃的任何萜类化合物或类异戊二烯。本文描述的生物质烃可以用作为工业精炼厂中的原料。像常规的原料一样，生物质烃可以被裂化或改变。在一些实施方式中，生物质烃分解成为轻质烃，轻质烃指具有比烃原料更少碳的烃(本文所定义的)。轻质烃可以是例如精炼的生物原料的产物。一般地，轻质烃具有少于20个碳、或少于15个碳、或少于12个碳、或少于10个碳、或少于8个碳。轻质烃可以是环状的或非环状的、饱和的或不饱和的。饱和的非环状烃也称为链烷烃。饱和的环状烃也称为环烷。不饱和的烃也称为烯烃。不饱和的烃也可以是芳香族的。示例性轻质烃包括但不限于C₂-C₂₀烯烃、C₆-C₂₀芳香烃(例如，苯、甲苯、二甲苯、萘等等)、C₆-C₂₀环烷(例如，取代的或未取代的环戊烷和环己烷)、C₁-C₂₀链烷烃等。取决于蒸馏范围，轻质烃可以包括适合于作为汽油产品、柴油、煤油或喷气式发动机燃料的馏分。

[0122] 某些化学结构特征在裂化过程中可以提供特定的优势。例如，生物质烃可以具有特定取代的和位置的碳中心，该碳中心在裂化条件下(例如，催化、蒸汽、热或氢化裂解)可以转化为活泼中间体。这些活泼中间体有助于进一步的碳-碳键裂开和产生轻质烃。由于像电稳定和空间加速度那样的效应——这两种效应都与取代的碳中心相关联，支链烃特别易于碳-碳裂开。参见，例如，Ruchardt C. 等，Angew. Chem. Ed. Engl. 18, 429-440(1980)。

[0123] 在其它实施方式中，生物质原料包括低阶(低位，lower-order)的类异戊二烯，其是具有少于6个异戊二烯残基的萜。这些低阶的类异戊二烯对产生适合作为高辛烷值燃料或燃料添加剂的高度支化的烃结构是特别有用的。

[0124] 特别地，低阶的类异戊二烯包括单萜(具有二个异戊二烯残基的C₁₀萜)、倍半萜(具有三个异戊二烯残基的C₁₅萜)、二萜(具有四个异戊二烯残基的C₂₀萜)和三萜(具有六个异戊二烯残基的C₃₀萜)。异戊二烯残基以线性或环状结构排列。低阶萜或类异戊二烯的具体实例包括但不限于苧烯、花侧柏烯、月桂烯、法呢烯、香叶醇、萜品醇、法呢醇、植醇、角鲨烯等。

[0125] 这些低阶的类异戊二烯包括支链的碳中心(包括环状和非环状的碳)。因此，它们是通过裂化、异构化和/或精炼操作中一般应用的其它已知方法产生汽油范围内馏分的烃的适当前体，该馏分具有高辛烷值和其它期望性质。

[0126] 如本文使用的，“辛烷值”指与异辛烷(2,2,4-三甲基戊烷)、高度支化的C₈烃和正庚烷——直链C₇烃类——的混合物相比，点燃式内燃机燃料(a spark ignition engine fuel)的抗爆震性(knock resistance)(抗暴率(anti-knock rating))。更具体地，在内燃机中，汽油和空气的混合物在点火之前被压缩。压缩的混合物具有过早地点火而不是平稳燃烧的倾向。过早点火(或自动点火)产生爆震，该爆震以在一个或多个气缸中咔嚓咔嚓或砰的声音为特征。爆震引起峰值功率的损失。一般地，高度支化的烃具有比直链烃更

好的抗爆震性。

[0127] 辛烷值因此是汽油的抗爆震性的定量量度。辛烷值通过比较汽油与异辛烷（辛烷值 100，最小爆震）和庚烷（辛烷值 0，相当大的爆震）的特征来测定。这两个组分的线性组合一般被用于测量具体汽油的辛烷值。因此，辛烷值 91 的汽油具有与 91% 异辛烷和 9% 庚烷的混合物相同的爆震。如本文使用的，高辛烷值指 80 或更高的辛烷值，更典型地，指 90 或更高的辛烷值。

[0128] 基础汽油混合原料或直馏汽油一般具有 60 和 70 之间的辛烷值。支链的烃——包括取代的环烷（例如，甲基环戊烷、甲基环己烷）——和芳香族化合物具有高于 90 (90+) 辛烷值。具有 90+ 辛烷值的烃可以用作为燃料的添加剂以增加燃料的辛烷值。这些添加剂也称为“辛烷值提升剂 (octane boosters)”。一般的辛烷值提升剂包括例如高辛烷值的芳香烃例如甲苯（辛烷值 124）；醇例如乙醇（辛烷值 115）和甲醇（辛烷值 113）；和有机金属化合物例如四乙铅等。

[0129] 在适当的裂化条件下，低阶的类异戊二烯可以分解为更短（例如，小于 C12）且支化的烃。适合作为高辛烷燃料的馏分包括例如支链的 C8 烃、环状的 C5-C7 烃和芳香烃（例如甲苯和二甲苯）。通过蒸馏可以分离这些期望的馏分。

[0130] 除了类异戊二烯之外，其它类的生物质烃包括类脂和含氮的烃。类脂一般指脂肪酸、它们的衍生物和甾醇。游离脂肪酸一般包括以羧酸为终端的长的烃链。烃链可以是饱和的或者不饱和的，并且长度一般在 12 至 24 个碳（例如，C12-C24）的范围。脂肪酸衍生物包括脂肪酸的酯。例如，甘油酯（例如，植物油）是具有甘油（丙-1,2,3- 三醇）核心结构和一个或多个脂肪酸基团的类脂。另外的脂肪酸衍生物包括烷基酯，其是植物油的酯交换产物。一般地，甲醇可以用于产生脂肪酸的甲酯。生物碱类和类苯基丙烷是植物源的含氮烃。它们一般是氨基酸衍生物和基于细胞代谢途径建构的。

[0131] 如讨论的，生物质烃源于可再生的生物源，生物源包括天然出现的生物和基因修饰的生物。烃在许多天然出现的生物（真核的或原核的）中存在，天然出现的生物包括植物物质、真菌、藻类、细菌等。本文描述的生物质烃可以从活的生物和近来为活的生物（生物物质）中得到。

[0132] 具体地，本文描述的多烯作为植物和一些其他光合生物像藻类、一些类型的真菌和一些细菌中天然出现的有机颜料存在。类胡萝卜素例如 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素（ β ， β -胡萝卜素）和番茄红素（ γ ， γ -胡萝卜素）为已知的类异戊二烯。

[0133] 藻类代表特别适合于生物烃产生的生物物质的源，这是因为藻类依赖于光合作用进行能源产生并且可以积累高含量的胡萝卜素（例如，海藻杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*))。不像作物，藻类培养不占用耕地和不要求灌溉系统。而且，藻类是可以被基因操作以增加胡萝卜素的生物合成产量的不同微生物。

[0134] 类胡萝卜素（例如，胡萝卜素）可以从收获池 (harvesting ponds) 中生长的藻类产生。取决于藻类的类型，池可以包含淡水或盐水。藻类被收获和干燥。类胡萝卜素可以使用有机溶剂从干燥的藻类中提取。一般地，使用低沸点的溶剂。当胡萝卜素提取物被浓缩时，溶剂可以被循环（例如，经过蒸馏和冷凝）。示例性溶剂包括但不限于己烷、二硫化碳、石油醚、丙酮和它们的混合物。

[0135] 在一方面，提供裂化来自藻类的油的催化裂化方法，该方法包括：从藻类提取油以

形成含有萜的原料；在催化裂化条件下将含有倍半萜的原料与催化组合物接触。在一个实施方式中，来自藻类的油包括萜，例如，天然出现的萜例如类胡萝卜素。在另一个实施方式中，来自藻类的油包括倍半萜，例如花侧柏烯或法呢烯。

[0136] 藻油可以以各种方式提供给方法。例如，藻类可以被收获和干燥，并且随后从裂解或破坏的细胞提取油。细胞可以被化学裂解或者机械力可以用于破坏细胞壁。使用有机溶剂例如己烷可以从藻类中提取油。从藻类中提取油的其它方法也可以与本发明的方法一起使用，其对于本领域普通技术人员将是显而易见的。

[0137] 在一个实施方式中，来自藻类的油包括比链长度 C10 长和大于藻中天然出现的烃和萜。藻类的不同种类可以生成具有不同烃混合物的油。在一些实施方式中，来自藻类的油是来自多于一类藻的油的混合物。在一些实施方式中，来自藻类的油包括增加量的萜。在一些实施方式中，来自藻类的油包括不是藻类天然产生的萜。

[0138] 在一些情况下，本文方法也包括来自藻类的油与燃料组分混合，然后接触原料。例如，藻油和原油的混合物在如本文描述的方法中提供，并且与催化组合物接触。在另一个实例中，藻油和精炼的燃料例如汽油的混合物可以与催化组合物接触。例如，但不限于，燃料组分选自以下：化石燃料、石油、混合燃料的混合物、汽油、柴油、喷气式发动机燃料和它们的任何组合。

[0139] 在一个实施方式中，方法包括基因修饰藻类，然后提取油。例如，藻类的叶绿体或细胞核可以被转化，以生成有助于萜产生的酶。萜可以是藻类中天然出现的或者对藻类是异源的。在一个实施方式中，藻类被基因修饰以上调藻类中天然出现的萜的产生。以这种方式，来自藻类的油包括在方法如本文描述的方法中、在催化裂化条件下能够被裂化的更大量的萜。在另一个实施方式中，藻被基因修饰以上调藻类中非天然出现的萜的产生。例如，编码通过 MVA 或 MEP 途径生成萜的酶的基因可以被插入到藻类的叶绿体或细胞核。酶被配置成生成在生物内非天然出现的萜。通过这种方式，生物可以被设计成包括在燃料产品生产中有用的可测量的量的大烃。例如，藻类可以被基因修饰以与没有基因修饰的藻类相比，产生增加量的倍半萜。编码生成倍半萜的酶的基因转化可以被插入藻类中。在一个实施方式中，倍半萜是花侧柏烯。在另一个实施方式中，倍半萜是法呢烯。在更另一个实施方式中，倍半萜是姜烯。藻类也可以被基因修饰以生成任何大小的萜，例如单萜、二萜、三萜等。可以由基因修饰的藻类生成的萜的实例包括但不限于植醇和角鲨烯。

[0140] 在一方面，本文提供裂化来自藻类的油的催化裂化方法，该方法包括：从藻类提取油以形成含有花侧柏烯的萜；和在催化裂化条件下将包含花侧柏烯的原料与催化组合物接触。在一个实施方式中，方法还包括基因修饰藻类，然后提取油。例如，基因修饰的藻类与没有基因修饰的藻类相比，可以产生增加量的花侧柏烯。

[0141] 使用本文描述的任一催化组合物，可以进行裂化来自藻类的油。在一个实施方式中，使用沸石 β 催化剂，裂化藻油。裂化反应器可以通过泵或者注射器泵进料，以便使油流动通过催化组合物。在一个实施方式中，伴随载气例如氢气，将油注入反应器。反应的裂化产物可以通过本领域中已知的任何合适的方法鉴定，方法包括但不限于气相色谱或液相色谱和质谱。

[0142] 在一个实施方式中，来自藻类的原油可以在进行裂化过程之前被精炼。例如，粗藻油可以进行 RBD（精炼漂白脱臭）过程。在另一个实例中，粗藻油可以被分馏成期望的组分，

例如通过蒸馏。分馏可以由使用者预先确定或者可以被设定以将粗藻油分馏成期望大小、组成或形状的烃组分。

[0143] 在一方面,描述包括甘油三酯和按重量计小于 25% 的链烷烃的组合物,其中所述链烷烃包括 C11-C13 链烷烃。藻酶或其片段在组合物中可以以痕量或显著的量存在。组合物可以类似于燃料产品例如喷气式发动机燃料、汽油或柴油。在一个实施方式中,组合物源于进行包括裂化来自藻类的油的过程。在一个实施方式中,组合物包括比化石燃料基的汽油少的链烷烃。组合物也可以包括比化石燃料基的汽油中存在的尺寸更大的链烷烃,例如 C11 至 C13 的链烷烃。

[0144] 在一个实施方式中,组合物源于进行包括裂化来自藻类的油的过程,其中组合物包括轻质烷。在一个实施方式中,轻质烷包括汽油部分(馏分)。

[0145] 本文描述的组合物可以由裂化过程生成,其中包括萜的生物物质物质已经被裂化。例如,以上描述的流动反应器可以用于进行生成组合物的过程。甘油三酯在光合生物中存在并且包括脂肪酸。

[0146] 生物物质原料适合于在工业规模以及实验室规模上进行精炼。常规地,精炼过程转化含有宽范围的烃的原油成为有用物质的馏分,它们一般为以具有特定长度或结构为特征的烃。所述馏分可以通过直接蒸馏,或更有效地,通过裂化较长烃成为较短烃得到。除了物理转化原油外,某些精炼方法也可以化学转化裂化的烃为更期望的结构。例如,烷基化方法可以提供适合作为高辛烷值的燃料或燃料添加剂的高度支化的烃。参见,例如, *Petroleum Refining Technology and Economics*, Gary J. 等, Taylor & Francis Group (5th edition)。

[0147] 生物物质原料可以以类似于原油的方式精炼。因此,某些实施方式描述转化生物物质原料为一种或多种轻质烃的方法。有利地,根据轻质烃馏分的期望规格,可以选择具有特定结构特征的生物烃,并且从天然源或从经过合理的设计和生物合成路径的操作进行的基因修饰的生物得到它们。例如,高辛烷值汽油产品一般包括大约 3 至 12 个碳并且是比直链链烷烃更“紧凑”的分子,其是通过结构性质例如碳骨架支化(例如,支链的烃)、环烷特性(naphenic character)(例如,环状的非芳香结构)或芳香特性提供。基于这些说明,可以选择具有适当碳骨架性质的生物烃(例如,类胡萝卜素),以通过例如催化裂化产生期望馏分。

[0148] 一般而言,精炼方法包括裂化(例如,催化裂化、热裂化、蒸汽裂化和氢化裂解)以及异构化、改变或化学转化。

[0149] 一个实施方式提供适合于催化裂化方法的组合物,其包括生物物质原料和裂化催化剂。在具体的实施方式中,生物物质原料包括至少一种具有多烯链结构的烃,该多烯链结构包括一个或多个季烯碳。在一些情况中,生物物质原料不包括藻源。在其它情况中,生物物质原料包括来自藻类的甘油三酯。

[0150] 流化床催化裂化(FCC)是转化重烃成为更有价值的汽油和较轻产品的最广泛使用的精炼方法之一。图 1 图解显示适合于裂化生物物质原料的标准 FCC 方法。生物物质被加热并被喷入“立管(riser)”(垂直或向上倾斜的管子)的基部,其中预加热的原料在大约 1230 至 1400° F (665 至 760°C) 下与流化的沸石催化剂接触。热的催化剂使原料蒸发,并催化分解高分子量烃成为包括 LPG(液化石油气,例如 C₃-C₄ 烯烃)和非环状或环状烃(C₅-C₁₂)在内的较轻组分的裂化反应。催化剂-烃混合物向上流动仅几秒钟穿过立管,并且随后该

混合物经过旋风分离器分离。没有催化剂的烃按规定路线到从较重燃料中分离较短烃产品（例如， C_3 - C_{12} 烃）的分馏器。较短的烃——其中许多适合作为汽油产品——比较重的燃料更易挥发。较重燃料包括在大气压力下、 200°C 至 350°C 之间分级蒸馏的柴油和喷气式发动机燃料。

[0151] 在立管中上行期间，裂化催化剂被反应“消耗”，该反应沉积焦炭在催化剂上而大大降低活性和选择性。焦炭形成的过程对整个过程中是重要的，这是因为它增加气体产物的 H/C（氢与碳）比例到更适合于汽油的范围。“消耗”的催化剂被与裂化烃蒸汽分开并送至反萃取器（气提塔）（没有显示出），在反萃取器中其与蒸汽接触，以去除保留在催化剂孔隙中的烃。“消耗”的催化剂随后流入流化床再生器，在流化床再生器中空气（或在一些情况下，空气加氧气）被用于烧掉焦炭，以恢复催化剂活性并同时提供下一个反应循环的必需热量。“再生的”催化剂随后流到立管的基部，重复循环。

[0152] 也设想类似类型的裂化方法用于生物来源的原料，虽然在某些实施方式中，使用比较温和的条件，主要目的是减少总分子量，而无须去除碳或者增加产物的 H/C 的比例。可以使用称为塞摩福型流动床催化裂化的方法。

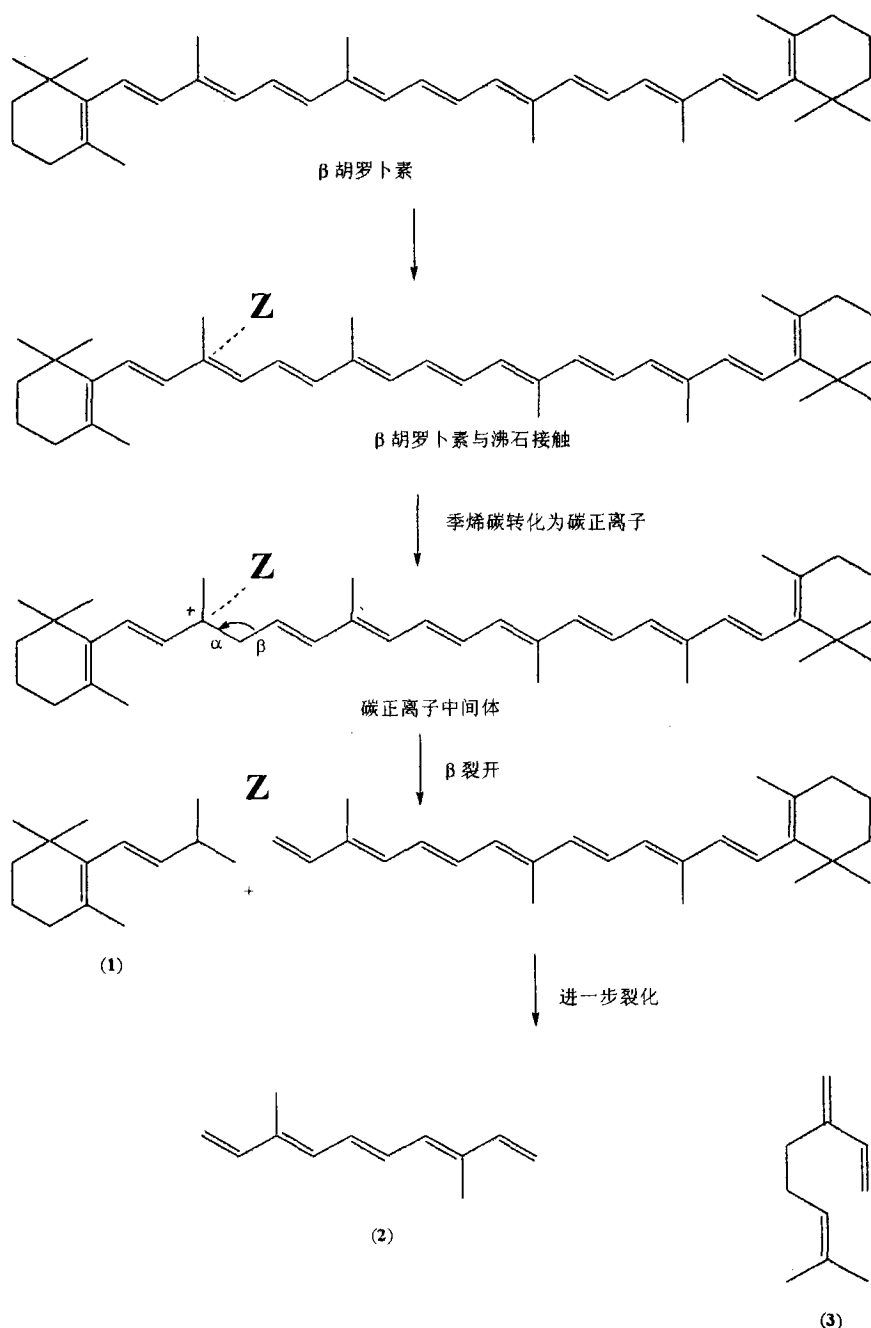
[0153] 在一个实施方式中，生物质原料包括至少一种烃化合物。在某些实施方式中，由于催化剂对生物来源的原料作用形成碳正离子，其被认为诱导碳正离子的 β 位置中的碳-碳键断裂（例如， β -裂开）。在其它实施方式中，醇盐（alkoxide）类型的中间体可以在季烯碳处形成，其也将导致 β -裂开。

[0154] 进一步的实施方式提供包括在催化裂化条件下将生物质原料与裂化催化剂接触的裂化烃的方法，所述生物质原料包括至少一种具有多烯结构的烃，所述多烯结构包括一个或多个季烯碳。

[0155] 方案 VI 显示由生物源裂化 β -胡萝卜素（3,7,12,16-四甲基-1,18-双（2,6,6-三甲基-1-环己烯基）-十八-1,3,5,7,9,11,13,15,17-壬烯）。如显示的，将 β -胡萝卜素与沸石催化剂（Z）接触，由此将季烯碳转化为碳正离子。碳正离子中间体经历碳正离子的 β -位置处的 C-C 键断裂。产生轻质烯烃（1）：3-甲基-1-双（2,6,6-三甲基-1-环己烯基）-1-丁烯。进一步裂化产生轻质烯烃（2）：3,8-二甲基-1,3,5,7,9-十五碳烯，其可以经历进一步的裂化过程。当裂化和可能的重排时，也可能产生其它较轻的萜，例如，单萜如月桂烯（3）。

[0156] 方案 VI

[0157]



[0158] 通过混合或重整,产生的轻质烯烃可以直接作为燃料添加剂。它们也可以被进一步地处理以产生许多的汽油产品。轻质烯烃也可以在石油化学加工过程中直接使用。

[0159] 在另一个实施方式中,生物质原料包括至少一种低阶的类异戊二烯,例如单萜和倍半萜。

[0160] 在其它实施方式中,生物质原料进行氢化裂解以产生轻质烷。氢化裂解方法产生饱和并较短的烷。一般地,裂化方法在升高的氢气分压存在情况下发生。通常通过双功能催化剂促进氢化裂解,所述双功能催化剂能够重排和断裂烃链以及能够将氢加成到芳香族化合物和烯烃以产生环烷和链烷。

[0161] 在其它实施方式中,生物质原料进行热裂化以产生轻质烯烃。热裂化在升高温度(大约 800℃)和压力(大约 700kPa)下进行。热能一般引起碳-碳键的均裂并产生较小的烯烃。因为均裂生成自由基,所以在热裂化期间,许多化学反应可能发生,包括加成或消

除反应。

[0162] 在其它实施方式中,生物质原料进行蒸汽裂化以产生轻质烯烃。蒸汽裂化可以通过用蒸汽稀释生物质原料进行并且在加热炉中短暂地加热(在大约 850℃)。反应中产生的产物取决于进料的组成、烃与蒸汽比例以及取决于裂化温度和加热炉停留时间。一般地,产生轻质烯烃。

[0163] 本文描述的生物质烃在一种或多种沸石催化剂存在下可以被裂化成为较轻的烃。如在实施例显示的,裂化方法一般产生温度依赖性产物分布。此外,取决于被裂化的烃的结构,产物分布可以有利于高辛烷值的轻质烃。另外,催化剂的类型在确定裂化产物的性质和分布中起到重要的作用。

[0164] 如所描述,低阶的萜(例如,花侧柏烯、法呢烯、姜油、植醇和角鲨烯)可经历催化裂化条件。裂化产物一般包括链烷烃(例如, C4-C9)、环烷(例如, C5-C9)、芳香族化合物(例如, 苯、甲苯、二甲苯、萘)。在裂化产物中,具有支链碳中心的烃例如支化链烷烃、环烷和芳香族化合物倾向于与高辛烷值(例如, 高于 91) 相关。

[0165] 在某些实施方式中,在 200℃至 500℃范围的温度下,以超过 60%的收率产生具有高辛烷值的裂化产物。取决于期望的产物,可以根据经验确定最佳温度范围,在该温度范围,高辛烷值的产物(例如,除了苯之外的芳香组化合物、环烷)被最大化,而低辛烷值的产物(例如,直链链烷烃)被最小化。一般地,温度可以在 200℃至 350℃或 350℃至 450℃的范围内。

[0166] 因此以高收率产生裂化产物,并且裂化产物是期望的和/或具有不同结构特征,这允许它们被用作燃料、燃料添加剂或者允许它们直接用作石油化学制品。因此,本文描述的生物质烃适合于精炼成为有用的物质,并且可以被用于替代或补充精炼方法中的化石燃料。

[0167] 在一方面,本文公开制造燃料产品的方法,其包括:由基因修饰的无维管光合生物得到原料;和在催化裂化条件下将原料与催化组合物接触,由此制造燃料产品,其中催化组合物包括具有孔径大小大于 6 埃的大孔分子筛。例如,原料可以是基因修饰的藻类。可以以各种方式基因修饰藻类,包括上调萜的产生那些方式。在一个实施方式中,基因修饰使生物生成生物中不天然出现的烃或萜。催化裂化条件可以是如本文描述的条件。例如,可以在上至 420℃的温度下发生裂化。与基因修饰的无维管光合生物接触的催化组合物也可以是如本文描述的任何催化组合物,或者可以是如本领域普通技术人员已知的、在催化裂化条件下将是显而易见的或者期待使用的组合物。在一些情况下,大孔分子筛是 12 环沸石。

[0168] 由本文描述的方法或过程产生的燃料产品可以具有大约 85 和 125 之间的辛烷值。燃料产品也可以具有大于 90 的辛烷值。

[0169] 在一些情况下,过程或方法还可以包括将燃料组分加入到燃料产品,其中所述燃料组分是混合的燃料,例如乙醇、喷气式发动机燃料、柴油、生物柴油或汽油。例如,燃料产品可以是大约 5-95%的包括燃料产品和燃料组分的混合物。在另一个实施方式中,燃料添加剂例如 MTBE、洗涤剂 and 氧化剂可以被加入到燃料产品。

[0170] 组合物和产品

[0171] 本文提供的是从萜产生产品和从来自生物质的萜产生产品的组合物和方法。产品的实例包括但不限于燃料产品、芳香制品和杀虫剂产品。产品可以是释放分子储存能量的

任何物质。在一种实施方式中,产品是有机分子。在另一种实施方式中,产品是烃。在一些情况下,产品不包括氢。在一些情况下,产品不包括氧。在一些情况下,产品不包括抗体或蛋白质。在一些情况下,产品不包括脂肪酸。

[0172] 燃料产品的实例包括石油化学产品和它们的前体以及可能石油化学工业中有用的所有其它物质。燃料产品包括,例如,石油产品和石油产品的前体,以及它们的石油化学制品和前体。燃料产品可以用于产生用于石油化学工业的物质或材料,包括石油产品和石油化学制品。燃料或燃料产品可以用于燃烧器如锅炉、窑炉、干燥机或加热炉。燃烧器的其它实例是内燃机如汽车引擎或发电机,包括汽油发动机、柴油发动机、喷气式发动机及其它。燃料产品也可以被用于生产塑料、树脂、纤维、高弹体、润滑剂和凝胶。

[0173] 本文考虑的产品实例包括烃产品和烃衍生物产品,烃衍生物产品可以由氢分子和碳分子以及有时一个或多个杂原子组成,其中杂原子是不是氢和碳的任何原子。杂原子的实例包括但不限于氮、氧、硫和磷。一些产品是富含烃的,其中按重量计至少 50%、60%、70%、80%、90%、95、99%的产品由碳和氢组成。在一个实施方式中,产品是按重量计 100% 的碳和氢原子。

[0174] 燃料产品如烃,可以是通常源自原油或石油的前体或产品,例如,但不限于,液态石油气、石脑油 (naptha) (轻石油)、汽油、煤油、柴油、润滑油、重瓦斯 (heavy gas)、焦炭、沥青、焦油和蜡。例如,燃料产品可以包括小的烷 (例如,1 至大约 4 个碳) 如甲烷、乙烷、丙烷或丁烷,其可以用于加热 (如在烹饪中) 或制造塑料。燃料产品也可以包括具有大约 5 至大约 9 个碳原子的碳主链的分子,如石脑油或轻石油,或它们的前体。其它的燃料产品可以是用作汽油或发动机燃料的大约 5 至大约 12 个碳原子或环烷。大约 10 至大约 18 个碳的分子或芳香族化合物如煤油或其前体,也可以是燃料产品。燃料产品也可以包括具有大于 12 个碳的分子或它们的前体,如用于润滑油。其它的燃料产品包括中重瓦斯或燃料油,或它们的前体,典型地包括烷、环烷和大约 20 至大约 70 个碳原子的芳香族化合物。燃料产品也包括来自原油的其它残余物,如焦炭、沥青、焦油和蜡,其一般包含具有大约 70 或更多个碳的多个环,和它们的前体。

[0175] 多种燃料产品可以通过许多加工进一步精炼成用于终端用户的终产品。精炼可以通过分馏发生。例如,燃料产品的混合物,如具有不同的多种链长度的不同烃的混合物可以通过分馏被分离成多种成分。

[0176] 燃料产品也可以通过在整合步骤中将它们结合进行精炼,例如,通过使用催化剂,如铂或铂-铈混合物。整合过程典型地产生氢气,其是可以用于裂化的副产品。

[0177] 燃料产品也可以通过将烃类改变或重排或重建成更小的分子来进行精炼。存在许多化学反应,其发生在本领域技术人员已知的催化重整过程中。一般而言,催化重整在催化剂和高的氢分压的存在下进行。一种普通的方法是烷基化。例如,丙烯和丁烯与催化剂如氢氟酸或硫酸混合。

[0178] 燃料产品也可以被混合或组合成混合物以获得终产物。例如,燃料产品可以被混合以形成不同等级的汽油、含有或不含添加剂的汽油、不同重量和等级的润滑油、不同等级的煤油、喷气式发动机燃料、柴油燃料、加热油 (heating oil) 和制造塑料和其它聚合物的化学品。本文描述的燃料产品的组合物可以与通过其它方法产生的燃料产品进行组合或混合。

[0179] 产生的产品可以通过宿主细胞和转化的生物（一种或多种）天然或非天然（作为转化的结果）产生。产品也可以是自然界中不存在的新分子。例如，藻类中天然产生的产物可以是萜，例如类胡萝卜素类（例如， β -胡萝卜素）。不是藻类天然产生的产品的实例可以包括非天然的萜，例如苧烯。

[0180] 在一些情况下，本文考虑的产物（如燃料产品）包括一个或多个源自无机碳源的碳。在一个实施方式中，如本文描述的，产物的碳的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%源自无机碳源。无机碳源的实例包括但不限于，二氧化碳、碳酸盐、碳酸氢盐和碳酸。产物可以是这样的有机分子，其具有来自在光合作用期间固定的无机碳源的碳。

[0181] 本文的产物可以通过其碳同位素分布 (Carbon Isotope Distribution (CID)) 进行描述。在分子水平，CID 是分子内的单个碳原子为天然存在的碳同位素（例如， ^{12}C 、 ^{13}C 或 ^{14}C ）之一的统计学可能性。在产物的批量水平，CID 可以是含有至少一个碳原子的化合物中天然存在的碳同位素（例如， ^{12}C 、 ^{13}C 或 ^{14}C ）的相对多度。虽然注意到每一种化石燃料的 CID 可以根据其来源而不同，但是 CID(fos)（例如，化石燃料如石油、天然气和煤中碳的 CID）可与 CID(atm)（例如，当前大气二氧化碳中碳的 CID）相区别。另外，CID(photo-atm) 是指近来历史中光合作用产生的碳基化合物的 CID，其中无机碳源是大气压中的二氧化碳。CID(photo-fos) 是指近来历史中光合作用产生的碳基化合物的 CID，其中基本上所有无机碳的来源都是由化石燃料（例如煤、天然气和 / 或石油）的燃烧产生的二氧化碳。

[0182] 精确分布也是下述的特征：1) 产生分子的光合生物的类型和 2) 无机碳的来源。这些同位素分布可以用于限定光合作用来源的燃料产品的组成。

[0183] 碳同位素在不同的化合物之间和之中不均匀分布并且同位素分布可以揭示碳转化所涉及的物理、化学和代谢过程的信息。光合生物组织中 ^{13}C 相对于 ^{12}C 的总多度一般小于大气二氧化碳的碳的多度，这表示碳同位素区别 (carbon isotope discrimination) 发生在二氧化碳掺入光合作用生物质时。

[0184] 一些燃料产品可以由生物质产生，这有时在精炼后，其将与现有的石油化学制品将是相同的，例如相同的结构。一些燃料产品可能与现有的石油化学制品不同。在一种实施方式中，燃料产品或组合物与现有的石油化学制品相同，除了碳同位素分布之外。例如，据认为，没有化石燃料石油化学制品具有小于 -32‰ 的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布，而本文描述的燃料产品可以具有小于 -32‰、-35‰、-40‰、-45‰、-50‰、-55‰或 -60‰ 的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布。在另一个实施方式中，燃料产品或组合物类似于现有的化石燃料石油化学制品，但不相同，并具有小于 -32‰、-35‰、-40‰、-45‰、-50‰、-55‰或 -60‰ 的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布。然而，虽然分子可能在常规的石油化学制品或精炼中不存在，但是它在这些工业中仍然是有用的。例如，可以产生在汽油沸点范围中的烃，而其可用作汽油或添加剂，即使该烃在汽油中通常不存在。燃料产品可以是包括以下的组合物：氢和碳的分子，其中氢和碳分子是组合物的原子量的至少 80%，并且其中组合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布为小于 -32‰。对于本文描述的一些燃料产品，氢和碳分子是组合物的原子量的至少 90%。例如，生物柴油或脂肪酸甲酯（其按重量计具有小于 90% 氢和碳分子）可能不是该组合物的一部分。在更其它组合物中，氢和碳分子是组合物的原子量至少 95 或 99% 的。在还其它组合物中，氢和碳分子是组合物的原子量的 100%。在一些情况下，组合物是液体。在其它情况下，组合物是燃料添加剂或燃料产品。

[0185] 本文也描述包括以下的燃料产品：包括氢和碳分子的组合物，其中氢和碳分子是组合物的原子量的至少80%，并且其中组合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布为小于-32‰；和燃料组分。在一些实施方式中，组合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布为小于大约-35‰、-40‰、-45‰、-50‰、-55‰或-60‰。在一些情况下，燃料组分是混合燃料，其可以是化石燃料、汽油、柴油、乙醇、喷气式发动机燃料或它们的任何组合。在还其它情况中，混合的燃料具有大于-32‰的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布。对于一些本文描述的燃料产品，燃料组分是燃料添加剂，燃料添加剂可以是 MTBE、抗氧化剂、抗静电剂、缓蚀剂和它们的任何组合。本文描述的燃料产品可以通过混合描述的燃料产品和燃料组分生成的产品。在一些情况下，燃料产品具有大于-32‰的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布。在其它情况中，燃料产品具有小于-32‰的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布。例如，从生物提取的组合物可以在精炼之前（例如，裂化）与燃料组分混合，以便生成本文描述的燃料产品。描述的燃料产品可以是化石燃料、或者生成燃料产品的混合的掺和物。例如，混合燃料的混合物可以是烃混合物，其适合于与另一种烃混合物混合以生成燃料产品。例如，轻质烃的混合物可能不具有适合燃料类型的某些辛烷值，但是，其可以与高辛烷值混合物混合以生成燃料产品。在实例中，具有小于-32‰的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布的组合物与用于混合燃料的烃混合物混合以生成燃料产品。在一些情况中，单独的组合物或者燃料组分不适合于作为燃料产品，然而，当组合时，它们包括燃料产品。在其它情况中，组合物或燃料组分或者两者单独都适合于作为燃料产品。在还其它情况中，燃料组分是现有的石油产品，例如汽油或喷气式发动机燃料。在还其它情况中，燃料组分源于可再生资源，例如生物乙醇、生物柴油、生物汽油等。

[0186] 生物质原料适合于生产高辛烷值烃产品。因此，一个实施方式描述形成燃料产品的方法，其包括：通过裂化生物质原料，形成一种或多种具有4至12个碳、具有80或者更高辛烷值的轻质烃；和将一种或多种具有80或更高辛烷值的烃与具有80或更小辛烷值的烃混合。一般地，具有80或更小辛烷值的烃是源于精炼原油的化石原料。在具体的实施方式中，生物质原料包括至少一种具有多烯结构的烃，多烯结构包括一个或多个季烯碳。在另一个实施方式中，生物质原料包括至少一种低阶类异戊二烯，如本文所限定的。

[0187] 生物质原料可以被修饰或者标记，以在裂化或改变的轻质烃产品中提供保存的可验证的特征，使得轻质烃产品可以被鉴定或者被追溯到其最初的原料。例如，碳同位素可以在生物质烃的生物合成期间被引进到生物质烃中。在产生的烃原料中，碳同位素被用作为标记。标记的烃原料可以进行本文描述的精炼过程，以产生碳同位素标记的轻质烃产品。同位素允许鉴定单独的或者与其它未标记的产物结合的标记产品，使得标记产品可以被追溯到它们的生物质原料。

[0188] 生物质烃生产

[0189] 本文描述的任一产品可以通过转化生物制备，以通过这种生物引起产品的生产。生物在转化之前或之后可以是光合生物。

[0190] 生物

[0191] 可使用本文所述组合物和方法转化的生物的实例包括维管和无维管生物。所述生物可以是原核生物或真核生物。所述生物可以是单细胞生物或多细胞生物。

[0192] 无维管光合生物的实例包括苔藓植物 (bryophytes)，如叶苔门 (marchantiophytes) 或角苔门 (anthocerotophytes)。在一些情况中，所述生物是蓝细菌。在一些情况中，所述生物是藻类（如大型藻 (macroalgae) 或微藻）。所述藻类可以是单细

胞或多细胞藻类。在一些情况中,所述生物是红藻门、绿藻门、不等鞭毛门、tribophyta、灰色藻门 (glaucophyte)、丝足虫门、眼虫藻、隐藻门、隐滴虫、腰鞭毛虫或浮游植物。

[0193] 例如,所述微藻莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 可用编码苧烯合酶的载体转化,以生产苧烯。在另一实施方式中,微藻类可以用编码苧烯合酶和蛋白质的一个或多个载体转化以提供苧烯的生产。

[0194] 方法可使用微藻,莱茵衣藻示例。使用微藻依照本发明的方法表达多肽或蛋白复合体提供了这样的优势——可以培养大量的微藻,包括商业地培养 (Cyanotech Corp; Kailua-Kona HI),因此允许期望产品的大量生产,以及分离——如果希望的话。然而,在任何植物的叶绿体中表达例如功能哺乳动物多肽包括蛋白复合体的能力允许这些植物的作物生产,并因此能够方便地生产大量多肽。因此,方法可以使用任何具有叶绿体的植物实施,包括,例如大型藻,如海藻和海草,以及在土壤中生长的植物。

[0195] 术语“植物”在本文被宽泛地使用,以指代含有质体 (plastids),特别是叶绿体的真核生物,并且其包括在任何发育阶段的任何这样的生物;或指代植物的部分,包括植物插条 (plant cutting)、植物细胞、植物细胞培养物、植物器官、植物种子和胚芽 (plantlet)。植物细胞是植物的结构和生理单位,其包括原生质体和细胞壁。植物细胞可以是分离的单个细胞或培养的细胞的形式,或可以是更高组成单元,如植物组织、植物器官或植物。因此,植物细胞可以是原生质体,生成配子的细胞,或一个细胞,或可以再生为整个植物的细胞集合。同样地,种子,其包含多个植物细胞并能够再生为整个植物,出于本公开的目的,被认为是植物细胞。植物组织或植物器官可以是种子、原生质体、胼胝体,或被归类进结构或功能单元的任何其它类别的植物细胞。植物特别有用的部分包括可收获部分和用于繁殖后代植物的部分。植物的可收获部分可以是植物任何有用的部分,例如花朵、花粉、幼苗 (seedling)、块茎、叶、茎、果实、种子、根等。用于繁殖的植物部分包括,例如,种子、果实、插条 (cutting)、幼苗、块茎、根茎 (rootstock) 等。

[0196] 本文描述的方法可以产生含有叶绿体的植物,所述叶绿体被基因修饰以包含稳定整合的多核苷酸 (Hager 和 Bock, Appl. Microbiol. Biotechnol. 54 :302-310, 2000)。因此,方法可以进一步提供转基因 (叶绿体转基因 (transplastomic)) 植物,如莱茵衣藻,其包括一个或多个含有多核苷酸的叶绿体,所述多核苷酸编码一个或多个异源多肽,包括与形成功能蛋白复合体特异相关的多肽。本文所述的光合生物可包含至少一种被修饰以生成产物的宿主细胞。

[0197] 表达载体和宿主细胞转化

[0198] 本文的生物 / 宿主细胞可以用表达载体转化,以改变产物 (一种或多种) 的生产,例如,提高产物 (一种或多种) 的生产。产物 (一种或多种) 可以由生物天然地或非天然地产生的。

[0199] 表达载体可以编码一个或多个同源或异源核苷酸序列 (由宿主细胞或由不同的生物产生) 和 / 或一个或多个自体的核苷酸序列 (由同一生物产生) 和 / 或编码同源或异源多肽的那些。可被转化入藻类宿主细胞的异源核苷酸序列的实例包括来自细菌、真菌、植物、光合细菌或其它藻类的基因。可被转化入藻类宿主细胞的自体核苷酸序列的实例包括类异戊二烯合成基因、内源启动子和来自 *psbA*、*atpA* 或 *rbcL* 基因的 5' UTRs。在一些情况中,异源序列在两个自体序列或同源序列的侧面。同源序列是那些具有与宿主细胞中的序

列至少 50%、60%、70%、80% 或 90% 同源性的序列。在一些实施方式中,同源序列在两个自体序列的侧面。第一和第二同源序列使异源序列能够重组进入宿主生物的基因组。第一和第二同源序列的长度都可以至少是 100、200、300、400 或 500 个核苷酸。

[0200] 表达载体可含有为在被转化生物中偏倚(偏爱)表达的密码子的核苷酸序列。普通技术人员在使用核苷酸密码子来具体指明给定氨基酸中已经了解由特定宿主细胞显示的“密码子偏倚性”。并非被理论限制,但通过使用宿主细胞优选的密码子,翻译的比率可以更高。因此,当合成用于提高在宿主细胞中表达的基因时,可期望设计这样的基因,以便其密码子使用的频率接近宿主细胞优选的密码子使用的频率。密码子一般地可以富含 A/T,如,在密码子第三核苷酸的位置上富含 A/T。典型地,富含 A/T 的密码子偏倚被用于藻类。在一些实施方式中,密码子的至少 50% 的第三核苷酸位置是 A 或 T。在其它实施方式中,密码子的至少 60%、70%、80%、90% 或 99% 的第三核苷酸位置是 A 或 T。

[0201] 构建藻类的基因改造株(genetically manipulated strain)的一个方法涉及用编码目的基因的核酸进行转化,所述核酸典型地是能够将前体转化为燃料产品或燃料产品前体的酶。在一些实施方式中,转化可将核酸引入宿主藻类细胞的任何质体(如叶绿体)。转化的细胞通常在引入外源核酸后被铺于选择性培养基中。该方法也可以包括若干筛选的步骤。开始,通常进行初级转化体(primary transformant)的筛选,以确定哪些克隆带有合适的外源核酸插入体。显示恰当整合的克隆可被修补(形成膜片,patched)并重新筛选,以确保遗传稳定性。这样的方法保证转化体含有目的基因。在多种实例中,这样的筛选通过聚合酶链反应(PCR)进行,但是,本领域已知的任何其它合适的技术也可被使用。多种不同的 PCR 方法在本领域内公知(如嵌套 PCR、实时 PCR)。虽然在本文所述的实例中使用了具体的例子;但是,本领域普通技术人员能认识到其它 PCR 技术可替代所述的具体方案。筛选带有合适的外源核酸插入体的克隆之后,通常克隆被筛选编码蛋白的存在性。蛋白表达筛选通常通过蛋白质印迹分析和/或酶活性测试进行。

[0202] 用在本发明方法中的重组核酸分子可以包含在载体中。而且,在使用第二(或更多)重组核酸分子进行该方法的情况下,第二重组核酸分子也可以包含在载体内,其可以,但不必与含有第一重组核酸分子的载体相同。所述载体可以是用于将多核苷酸引入叶绿体的任何载体,并且优选地,包含足以与叶绿体基因组 DNA 进行同源重组的叶绿体基因组 DNA 的核苷酸序列,例如,含有约 400 到 1500 或更多基本上连续的叶绿体基因组 DNA 核苷酸的核苷酸序列。叶绿体载体和选择叶绿体基因组区域用作载体的方法是公知的(参见,例如,Bock, J. Mol. Biol. 312:425-438, 2001;也参见 Staub 和 Maliga, Plant Cell 4:39-45, 1992;Kavanagh 等, Genetics 152:1111-1122, 1999, 它们中的每一个都在此通过引用并入)。

[0203] 在一些情况中,这样的载体包括启动子。启动子可来自任何来源(如病毒、细菌、真菌、原生生物、动物)。本文考虑的启动子可以对光合生物、无维管光合生物和维管光合生物(如藻类、开花植物)是特异性的。如在这里所用,术语“无维管光合生物”是指任何宏观或微观生物,包括但不限于,藻类、蓝细菌和光合细菌,其不具有如在高等植物中发现的维管系统。在一些情况中,上述核酸被插入含有光合生物如藻类的启动子的载体中。所述启动子可以是在叶绿体和/或其它质体中表达的启动子。在一些情况中,所述核酸是基于叶绿体的。考虑用于插入本文所述任何核酸到叶绿体中的启动子的实例包括美国申请

2004/0014174 中公开的那些。所述启动子可以是组成型启动子 (constitutive promoter) 或诱导型启动子。启动子通常包括接近转录起始点的必需核酸序列 (如 TATA 元件)。

[0204] 莱茵衣藻的整个叶绿体基因组在互联网上通过 URL "biology.duke.edu/chlamy_genome/-chloro.html" 对公众可用 (参见 "viewcomplete genome as text file" 链接和 "maps of the chloroplast genome" 链接), 它们每一个都在此通过引用被并入 (J. Maul, J. W. Lilly 和 D. B. Stern, 未公开的结果; 2002 年 1 月 28 日修改; 将以 GenBank 帐号 AF396929 公开)。通常, 叶绿体基因组 DNA 的核苷酸序列被这样选择, 以致其不是基因的一部分, 包括调控序列或编码序列, 特别是如果由于同源重组事件被打断, 将产生对叶绿体有害作用的基因, 例如, 用于叶绿体基因组复制, 或对含有叶绿体的植物细胞产生有害作用的基因。在这一方面, 包含莱茵衣藻叶绿体基因组序列的网站也提供了显示叶绿体基因组编码区和非编码区的图谱, 由此帮助用于构建载体的序列的选择。例如, 叶绿体载体, p322, 是从约 143.1kb 位置的 Eco (EcoRI) 位点延伸到约 148.5kb 位置的 Xho (Xho I) 位点的克隆 (参见, 互联网, 在 URL "biology.duke.edu/chlamy_genome/chloro.html", 并点击 "maps of the chloroplast genome" 链接和 "140-150kb" 链接; 也可直接通过互联网上 URL "biology.duke.edu/chlam-y/chloro/chlorol40.html" 获取)。

[0205] 在本文方法或过程的实践中使用的载体也可以含有一个或多个给予该载体期望性质的额外的核苷酸序列, 包括, 例如, 这样的序列, 诸如辅助载体操控的克隆位点, 指导该载体复制或其包含的核苷酸序列转录的调控元件, 编码选择性标记的序列等。因此, 所述载体可以包含, 例如, 一个或多个克隆位点, 如多克隆位点, 其可以但不必放置为使异源多核苷酸可以被插入该载体并且可操作地连接到期望的元件。所述载体也可以包含原核生物的复制起点 (ori), 例如, 大肠杆菌 ori 或粘粒 ori, 由此如期望, 允许该载体在原核宿主细胞, 以及在植物的叶绿体中传代。

[0206] 调控元件, 作为本文所用的术语, 广义地指调控多核苷酸转录或翻译, 或其被可操作地连接到的多肽的定位的核苷酸序列。实例包括, 但不限于 RBS、启动子、增强子、转录终止子、起始 (启动) 密码子、用于内含子剪切和正确读码框保持的剪接信号、终止密码子、琥珀密码子或赭石密码子——一种 IRES。此外, 细胞区室化信号 (例如, 将多肽靶向到细胞液、核、叶绿体膜或细胞膜的序列)。这样的信号在本领域内是公知的并已经被广泛地报导 (见例如, 美国专利号 5, 776, 689)。

[0207] 本文所述的任何表达载体可进一步包含调控序列。调控序列可包括例如, 启动子 (一个或多个)、操纵子 (一个或多个)、抑制子 (一个或多个)、增强子 (一个或多个)、转录终止序列 (一个或多个)、调控翻译的序列 (一个或多个), 或与宿主细胞相容的和控制核酸分子表达的其它调控序列 (一个或多个)。在一些情况下, 调控序列包括能够控制、调节或影响转录起始、延伸和 / 或终止的转录控制序列 (一个或多个)。例如, 调控序列可以提高生物中基因或基因产物的转录和翻译速率和 / 或效率, 其中所述基因或基因产物的表达被上调, (直接或间接地) 引起本文所述的产物的生产的提高。调控序列也可通过提高基因或基因产物的稳定性, 导致产物生产的提高。

[0208] 调控序列可以是自体或异源的 (异体的), 并且如果是异源的, 其可以具有同源性。调控序列可编码促进产物表达和生产的酶的一个或多个多肽。例如, 异源调控序列可由所述生物相同属的另一种 (如, 另一藻类种) 产生, 并在藻类中编码合酶。在另一实例中,

自体调控序列可以由表达载体将在其中表达的生物中产生。

[0209] 取决于应用,调控序列可以被用以影响诱导型或组成型表达。藻类调控序列可以被使用,并且可以是核、病毒、染色体外、线粒体或叶绿体源的。

[0210] 合适的调控序列包括与待表达核苷酸序列天然相关的那些(例如,天然地与藻类衍生的核苷酸序列可操作地连接的藻类启动子)。合适的调控序列包括与待表达的核酸分子非天然相关的调控序列(例如,与另一生物或藻类种的核苷酸序列可操作连接的一个种的藻类启动子)。后一种调控序列可以是在相同种内控制另一基因表达的序列(即,自体的),或可以从不同生物或种中得到的(即,异源的)。

[0211] 为了确定推定的调控序列是否合适,该推定的调控序列被连接到核酸分子,其通常编码产生容易检测的信号蛋白质。该构建体可随后通过标准技术插入藻类或其它生物,并且其表达被监控。例如,如果核酸分子编码显性的选择性标记,待使用的藻类或生物被测试在所述标记为其提供抗性的化合物存在的环境中生长的能力。

[0212] 在一些情况下,调控序列是启动子,如适合核苷酸序列在无维管光合生物中表达的启动子。例如,所述启动子可以是藻类启动子,例如美国公开申请号 2006/0234368 和 2004/0014174,以及 Hallmann 的 Transgenic Plant J. 1:81-98(2007) 中所述的。该启动子可以是叶绿体特异性启动子或核启动子。启动子可以是 EF1- α 基因启动子或 D 启动子。在一些实施方式中,所述合酶被可操作地连接到 EF1- α 基因启动子。在其他实施方式中,所述合酶被可操作地连接到 D 启动子。

[0213] 本文的调控序列可以在多个位置发现,包括例如,编码区域和非编码区域、5' - 未翻译区域(如,编码区域上游的区域)和 3' - 未翻译区域(如,编码区域下游的区域)。因此,在一些情况中,自体或异源的核苷酸序列可以包含一个或多个 3' 或 5' - 未翻译区域、一个或多个内含子或一个或多个外显子。

[0214] 例如,在一些实施方式中,调控序列可以包含隐秘小环藻 (*Cyclotella cryptica*) 乙酰辅酶 A 羧化酶 5' - 未翻译调控序列或隐秘小环藻乙酰辅酶 A 羧化酶 3' - 未翻译调控序列(美国专利号 5,661,017)。

[0215] 调控序列也可编码嵌合或融合多肽,如蛋白质 AB 或 SAA,其促进异源核苷酸序列和蛋白的表达。其它调控序列包括自体的内含子序列,其可促进异源序列的翻译。

[0216] 在本文的任何表达载体中使用的调控序列可以是可诱导的。可诱导的调控序列,如启动子,可以通过例如光被诱导。调控序列也可以是可自体调控的。可自体调控的调控序列的实例包括通过,例如,内源 ATP 水平或通过由生物产生的产物自体调控的那些。在一些情况中,所述调控序列可通过外源试剂诱导。其它可诱导的元件在本领域内是公知的,并且可适合于如本文的应用。

[0217] 本文所述的各种调控序列的各种组合可具体化并与本文所述的其它特征组合。在一些情况下,表达载体包含一个或多个调控序列,其被可操作地连接到编码多肽的核苷酸序列上,所述多肽影响,例如,上调本文所述产物的生产。在一些情况下,表达载体包括一个或多个调控序列,所述调控序列可操作地连接到编码影响例如上调产物生产的多肽的核苷酸序列。

[0218] 载体或其他重组核酸分子可包括编码报告多肽或其它选择性标记的核苷酸序列。术语“报道基因 (reporter)”或“选择性标记”指的是给予可检测表型的多核苷酸(或编码

的多肽)。报道基因通常编码可检测的多肽,例如,绿色荧光蛋白,或一种酶,如荧光素酶,当与合适的试剂(分别是特定波长的光或荧光素)接触时,其产生可被肉眼或使用适当的仪器检测到的信号(Giacomin, Plant Sci. 116 :59-72, 1996 ;Scikantha, J. Bacteriol. 178 :121, 1996 ;Gerdes, FEBS Lett. 389 :44-47, 1996 ;也参见 Jefferson, EMBO J. 6 :3901-3907, 1997, fl-glucuronidase)。选择性标记通常是这样的分子,当在细胞中存在或表达时,其为含有该标记的细胞提供了选择性优势(或劣势),例如,在以其他方式杀死细胞的试剂存在的情况下生长的能力。

[0219] 选择性标记可以提供获得表达该标记的原核细胞或植物细胞或两者的方法,并因此可以被用作所述载体的一个部分(参见,例如, Bock, 上文, 2001)。选择性标记的实例包括,但不限于,给予抗代谢物抗性的那些,如,二氢叶酸还原酶,其给予对甲氨喋呤的抗性(Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 :143-149, 1994) ;新霉素磷酸转移酶,其给予对氨基糖苷新霉素、卡那霉素和嘌呤霉素的抗性(Herrera-Estrella, EMBO J. 2 :987-995, 1983) ;hygro, 其给予对潮霉素的抗性(Marsh, Gene 32 :481-485, 1984) ;trpB, 其允许细胞使用吡啶替代色氨酸;hisD, 其允许细胞使用组氨醇(histinol)替代组氨酸(Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85 :8047, 1988) ;甘露糖-6-磷酸异构酶,其允许细胞使用甘露糖(WO 94/20627) ;鸟氨酸脱羧酶,其给予对鸟氨酸脱羧酶抑制剂——2-(二氟甲基)-DL-鸟氨酸的抗性(DFMO ;McConlogue, 1987, In :Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) ;和来自土曲霉(*Aspergillus terreus*)的脱氨酶,其给予对杀稻瘟素S的抗性(Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 :2336-2338, 1995)。其它选择性标记包括给予除草剂抗性的那些,例如,草胺膦乙酰转移酶基因,其给予对草胺膦的抗性(White 等, Nucl. Acids Res. 18 :1062, 1990 ;Spencer 等, Theor. Appl. Genet. 79 :625-631, 1990) ;突变 EPSPV 合酶,其给予草甘膦抗性(Hinchee 等, BioTechnology 91 :915-922, 1998) ;突变乙酰乳酸合酶,其给予咪唑啉酮或磺酰脲抗性(Lee 等, EMBO J. 7 :1241-1248, 1988) ;突变 psbA, 其给予对阿特拉津(atrazine)的抗性(Smeda 等, Plant Physiol. 103 :911-917, 1993) ;或突变前卟啉原(protoporphyrinogen)氧化酶(参见美国专利号 5,767,373) ;或给予对除草剂如草丁膦(glufosinate)的抗性的其它标记。选择性标记包括给予真核细胞二氢叶酸(DHFR)或新霉素抗性,或给予原核生物,如大肠杆菌四环素、氨基青霉素抗性 ;和植物中争光霉素、庆大霉素、草甘膦、潮霉素、卡那霉素、甲氨喋呤、腐草霉素、草胺膦(phosphinotricin)、壮观霉素、链霉素、磺酰胺和磺酰脲抗性的多核苷酸(参见,例如, Maliga 等, Methods in Plant Molecular Biology, ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1995, 第 39 页)。

[0220] 报道基因已经被成功地用在高等植物的叶绿体中,并且已经报道了高水平重组蛋白的表达。此外,报道基因已经被用在莱茵衣藻的叶绿体中,但是,在大多数情况下,产生非常少量的蛋白质。报道基因极大地增强了监控多种生物中基因表达的能力。在高等植物的叶绿体中, β -葡萄糖醛酸酶(uidA, Staub 和 Maliga, EMBO J. 12 :601-606, 1993)、新霉素磷酸转移酶(nptII, Carrer 等, Mol. Gen. Genet. 241 :49-56, 1993)、腺苷基-3-腺嘌呤转移酶(adenosyl-3-adenyltransferase)(aadA, Svab 和 Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90 :913-917, 1993) 和维多利亚发光水母(*Aequorea victoria*)GFP(Sidorov 等, Plant J. 19 :209-216, 1999) 已经被用作报道基因(Heifetz, Biochemie 82 :655-666,

2000)。这些基因中的每一个都具有使它们成为有用的叶绿体基因表达的报道基因的性质,如易于分析、敏感性或检查原位表达的能力。基于这些研究,其它异源蛋白已经在高等植物的叶绿体中表达,如,苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)Cry 毒素,其将抗性给予草食昆虫 (Kota 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 96:1840-1845,1999) 或人生长激素 (Staub 等, *Nat. Biotechnol.* 18:333-338,2000),一种可能的生物药物。若干报道基因已经在真核绿藻莱茵衣藻的叶绿体中表达,包括 *aadA* (Goldschmidt-Clermont, *Nucl. Acids Res.* 19:4083-4089,1991; Zerges 和 Rochaix, *Mol. Cell Biol.* 14:5268-5277, 1994)、*uidA* (Sakamoto 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 90:477-501,1993, Ishikura 等, *J. Biosci. Bioeng.* 87:307-314,1999)、海肾 (*Renilla*) 荧光素酶 (Minko 等, *Mol. Gen. Genet.* 262:421-425,1999) 和来自鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 的氨基糖苷磷酸转移酶 (amino glycoside phosphotransferase) *aphA6* (Bateman 和 Purton, *Mol. Gen. Genet.* 263:404-410,2000)。

[0221] 在一些情况中,载体含有诸如大肠杆菌或酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 复制起点的元件。这些特征,与适当的选择性标记结合,允许所述载体在目标宿主细胞和细菌和/或酵母细胞之间“穿梭 (shuttled)”。在第二寄主 (secondary host) 中传代穿梭载体的能力可允许对该载体特征更方便地操控。例如,含有载体和推定插入的目标多肽的反应混合物可以被转化入原核宿主细胞如大肠杆菌,被扩增并用常规方法收集,并且被检验,以鉴定含有目标插入体或构建体的载体。如果期望,该载体可以进一步被操作,例如,通过进行插入的多核苷酸的位点定向诱变,随后再次扩增并选择具有突变的目标多核苷酸的载体。穿梭载体随后可以被引入植物细胞叶绿体,其中目标多肽可以被表达,并且如果期望,根据方法进行分离。

[0222] 多核苷酸或重组核酸分子可以使用本领域已知的任何方法被引入植物叶绿体。多核苷酸可以通过多种本领域熟知的方法被引入细胞,并且部分地基于特定的宿主细胞进行选择。例如,多核苷酸可以使用直接基因转移的方法被引入植物细胞,所述方法例如电穿孔或使用粒子枪的微粒介导 (基因枪) 转化或“玻璃珠法 (glass bead method)”,或通过花粉介导的转化、脂质体介导的转化、使用损伤或酶降解的未成熟胚胎或损伤或酶降解的胚胎胚体转化 (Potrykus, *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:205-225,1991)。

[0223] 质体转化是用于将多核苷酸引入植物细胞叶绿体的一种常规和熟知的方法 (参见美国专利号 5,451,513、5,545,817 和 5,545,818;W095/16783;McBride 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 91:7301-7305,1994)。在一些实施方式中,叶绿体转化涉及引入位于期望核苷酸序列侧面的叶绿体 DNA 的区域,这允许外源 (exogenous) DNA 同源重组进入目标叶绿体基因组。在一些情况中,叶绿体基因组 DNA 侧面的 1 到 1.5kb 的核苷酸序列可以被使用。使用这种方法,在叶绿体 16S rRNA 和给予对奇霉素和链霉素的抗性的 *rps12* 基因中的点突变可以被用作转化的选择性标记 (Svab 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 87:8526-8530, 1990),并且可以以约每 100 次轰击目标叶片一个的频率,产生稳定的同质 (homoplasmic) 转化体。

[0224] 微粒介导的转化也可以被用于将多核苷酸引入植物细胞叶绿体 (Klein 等, *Nature* 327:70-73,1987)。该方法使用诸如金或钨的微粒,其被期望的多核苷酸通过与氯化钙、亚精胺或聚乙二醇沉淀而包被。微粒粒子使用诸如 BIOLISTIC PD-1000 粒子枪

(BioRad ;Hercules Calif.) 的设备高速加速进入植物组织。使用基因枪方法进行转化的方法在本领域内是公知的(参见,例如,Christou, Trends in Plant Science 1:423-431, 1996)。微粒介导的转化已经被使用,例如,用以产生多种转基因植物种类,包括棉花、烟草、玉米、杂交白杨和木瓜。重要的谷类作物,诸如小麦、燕麦、大麦、高粱和水稻也已经使用微粒介导输送被转化(Duan 等, Nature Biotech. 14:494-498, 1996 ;Shimamoto, Curr. Opin. Biotech. 5:158-162, 1994)。大多数双子叶植物的转化用上述方法是可能的。单子叶植物的转化也可以使用,例如,上述基因枪方法、原生质体转化、部分渗透细胞的电穿孔、使用玻璃纤维引入 DNA、玻璃珠搅拌(agitation) 法等进行转化。

[0225] 转化频率可通过隐性 rRNA 或 r- 蛋白抗生素抗性基因被显性选择性标记替代而提高,所述显性选择性标记包括但不限于细菌 aadA 基因(Svab 和 Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90:913-917, 1993)。转化后通常需要约 15 到 20 个细胞分裂周期以达到同质(homoplastidic) 状态。叶绿体可包含其基因组的多拷贝对本领域普通技术人员是显而易见的,并且因此,术语“同质的(homoplasmic)”或“同型异源性(homoplasmy)”指的是这样的状态——其中特定目标基因座的所有拷贝都基本相同。质体表达——其中基因通过同源重组插入每个植物细胞中存在的环状质体基因组的所有几千个拷贝中,利用了相对于核表达基因的大量拷贝数优势,以允许表达水平轻易地超过总可溶植物蛋白的 10%。

[0226] 在一些情况下,方法可以通过向叶绿体中引入重组核酸分子实施,其中所述重组核酸分子包括第一多核苷酸,其编码至少一个多肽(例如,1 个、2 个、3 个、4 个或更多)。在一些实施方式中,多肽被可操作地连接到第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十和 / 或后续多肽。例如,在烃生产途径中的若干酶可以被直接或间接地连接,以便由该途径中的一种酶产生的产物一旦产生,即与该途径中下一种酶非常靠近。

[0227] 对于叶绿体的转化,主要优势可能是包含选择性标记和一个或多个目的基因的重组核酸构建体的使用。典型地,叶绿体的转化通过用以下两种构建体共转化叶绿体实施:一种包含选择性标记且第二种包含目的基因(一种或多种)。这些转化体的筛选由于多种原因是费力且费时的。首先,培养一些转化的生物需要的时间是漫长的。其次,转化体必须针对选择性标记和目的基因(一种或多种)两者都存在进行筛选。典型地,对目的基因(一种或多种)的第二次筛选通过 DNA 印记法进行(参见,例如 PCT/US2007/072465)。

[0228] 在叶绿体中,基因表达的调控一般地在转录后并且通常在翻译起始期间发生。这种调控取决于叶绿体翻译装置,以及核编码的调控因子(参见 Barkan 和 Goldschmidt-Clermont, Biochemie 82:559-572, 2000 ;Zerges, Biochemie 82:583-601, 2000)。叶绿体翻译装置通常与细菌中的类似;叶绿体包含 70S 核糖体;具有缺少 5' 帽的 mRNA 并通常不含有 3' 多腺苷尾(Harris 等, Microbiol. Rev. 58:700-754, 1994);而且翻译在叶绿体和细菌中被诸如氯霉素的选择性试剂抑制。

[0229] 本文所述的一些方法利用了核糖体结合序列(RBS) 相对于编码序列的恰当置放。以前就已经注意到:RBS 这样的置放引起植物叶绿体中稳健的翻译(参见美国申请 2004/0014174, 在此被引入作为参考), 以及利用叶绿体中表达多肽的多肽是该多肽不穿过通常被由核基因表达的多肽穿过的细胞区室, 并因此, 不经过某些翻译后修饰, 如糖基化。同样地, 通过本发明的一些方法产生的多肽和蛋白复合体可以被预期在没有这样的翻译后修饰的情况下产生。

[0230] 编码多核苷酸的一个或多个密码子可以被偏倚,以反映叶绿体和/或核密码子的使用。大多数氨基酸由两个或多个不同的(简并的)密码子编码,并且各种生物使用某些密码子优先于其它密码子是公知的。这样优选的密码子使用——其也在叶绿体中使用,在本文指的是“叶绿体密码子使用”。莱茵衣藻的密码子偏倚性已经被报道。参见美国申请 2004/0014174。编码类异戊二烯生物合酶——其对在莱茵衣藻中表达偏倚——的核酸的实例在表 5-8 中提供。与原生序列同一性百分比(在该序列被分离的生物中)可以是约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90% 或更高。一些载体包含表 5 提供的一种或多种核酸和/或具有与其约 70% 同一性的核酸。

[0231] 术语“偏倚的”当用于指密码子时,表示多核苷酸中密码子的序列已经被改变,以至于该密码子在该偏倚(bias)用于的目标中,如藻细胞、叶绿体,是被优选地使用的一个。对叶绿体密码子使用偏倚的多核苷酸可以重新合成,或可以使用常规的重组 DNA 技术,例如,通过位点定向诱变法,进行基因修饰,以改变一个或多个密码子,以便它们针对叶绿体密码子使用是偏倚的。叶绿体密码子偏倚可以在不同植物中多种地偏斜的(不规则的,skewed),包括,例如,在藻类叶绿体中与在烟草中比较。通常,选择的叶绿体密码子偏倚性反映了用核酸转化的植物的叶绿体密码子使用。例如,在莱茵衣藻为宿主的情况下,叶绿体密码子使用被偏倚,以反映藻类叶绿体密码子使用(在第三个密码子位置约 74.6% 的 AT 偏倚)。

[0232] 本文描述的任何产物可以通过转化生物以使该产物的这种生物进行生产来制备。即使转化事件破坏或降低了转化生物的光合能力(例如,外源核酸被插入到编码光合作用需要的蛋白质的基因中),该生物也被认为是光合生物。

[0233] 修饰的途径

[0234] 本文的表达载体可以编码这样的多肽(一种或多种),所述多肽促进中间体、产物、前体以及本文描述的产物的衍生物的产生。例如,表达载体可以编码在类异戊二烯途径中促进中间体、产物、前体和衍生物的产生多肽(一种或多种)。

[0235] 类异戊二烯或萜类化合物是一组与萜有关的有机化学品。萜一般源自异戊二烯单元。异戊二烯单元是五碳单元(C5)。根据异戊二烯单元的数目对萜进行分类,如单萜(C10)、倍单萜(C15)、二萜(C20)、三萜(C30)、四萜(C40)和多萜(C_n,其中“n”等于或大于 45)。萜是这样的烃,其可以被改性(例如,氧化、除去甲基基团等)或其碳骨架被重排以形成萜的衍生物,如类异戊二烯。类异戊二烯也包括其他的类固醇以及类脂。

[0236] 萜前体被认为通过两种途径产生。甲羟戊酸途径,或 HMG-CoA 还原酶途径,产生二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)和异戊基焦磷酸(IPP),萜常见的 C5 前体。非甲羟戊酸途径是形成 DMAPP 和 IPP 的可选途径。DMAPP 和 IPP 可被缩合以形成牻牛儿基二磷酸(GPP)或其他前体,如法呢基二磷酸(FPP)、牻牛儿基牻牛儿基二磷酸(GGPP),由它们形成更高级的类异戊二烯。

[0237] 本文的表达载体可以编码在甲羟戊酸途径中具有作用的多肽(一种或多种),诸如,例如,硫解酶、HMG-CoA 合酶、HMG-CoA 还原酶、甲羟戊酸激酶、磷酸甲羟戊酸激酶(phosphomevalonate kinase)和甲羟戊酸-5-焦磷酸脱羧酶。在其他实施方式中,多肽是非甲羟戊酸途径中的酶,如 DOXP 合酶、DOXP 还原酶、4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓糖醇合酶(4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase)、4-二磷酸胞

苷-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶、2-C-甲基-D-赤藓糖醇 2,4,-环二磷酸合酶、HMB-PP 合酶、HMB-PP 还原酶或 DOXP 还原异构酶。

[0238] 在其他情况下,表达载体可以包括编码类异戊二烯途径中的多肽的核苷酸序列,诸如,例如,编码合酶的序列。合酶可以是 C10、C15、C20、C30 或 C40 合酶。在一些实施方式中,合酶是葡萄炔 (botryococcene) 合酶、苧烯合酶、1,8 桉树脑 (1,8 cineole) 合酶、 α -蒎烯合酶、茨烯合酶、(+)-桉烯合酶、月桂烯合酶、松香二烯 (abietadiene) 合酶、紫杉二烯 (taxadiene) 合酶、法呢焦磷酸合酶、紫穗槐二烯合酶、(E)- α -红没药烯合酶、diapophytoene 合酶或 diapophytoene 去饱和酶。在表 2 中描述了合酶的实例以及它们的序列。

[0239] 表 2. 合酶的实例

[0240]

合酶	来源	NCBI 蛋白质 ID
苧烯	绿薄荷 (<i>M. spicata</i>)	2ONH_A
桉树脑 (桉叶油素)	地榆 (<i>S. officinalis</i>)	AAC26016
蒎烯	巨型冷杉 (<i>A. grandis</i>)	AAK83564
茨烯	巨型冷杉	AAB70707
桉萜	地榆	AAC26018
月桂烯	巨型冷杉	AAB71084
松香二烯	巨型冷杉	Q38710
紫杉二烯	太平洋紫杉 (<i>T. brevifolia</i>)	AAK83566
FPP	原鸡 (<i>G. gallus</i>)	P08836
紫穗槐二烯	黄花蒿 (<i>A. annua</i>)	AAF61439
红没药烯	巨型冷杉	081086
Diapophytoene	金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)	
Diapophytoene 去饱和酶	金黄色葡萄球菌	

合酶	来源	NCBI 蛋白质 ID
GPPS-LSU	绿薄荷 (<i>M. spicata</i>)	AAF08793
GPPS-SSU	绿薄荷	AAF08792
GPPS	拟南芥 (<i>A. thaliana</i>)	CAC16849
GPPS	莱茵衣藻	EDP05515
FPP	大肠杆菌	NP_414955
FPP	拟南芥	NP_199588
FPP	拟南芥	NP_193452
FPP	莱茵衣藻	EDP03194
IPP 异构酶	大肠杆菌	NP_417365
IPP 异构酶	雨生红球藻 (<i>H. pluvialis</i>)	ABB80114
苧烯	薰衣草 (<i>L. angustifolia</i>)	ABB73044
单萜	番茄 (<i>S. lycopersicum</i>)	AAX69064
异松油烯	罗勒 (<i>O. basilicum</i>)	AAV63792
月桂烯	罗勒	AAV63791
姜烯	罗勒	AAV63788
月桂烯	圣栎 (<i>Q. ilex</i>)	CAC41012
月桂烯	欧洲云杉 (<i>P. abies</i>)	AAS47696
月桂烯, 罗勒烯	拟南芥	NP_179998
月桂烯, 罗勒烯	拟南芥	NP_567511
倍半萜	玉米 (<i>Z. mays</i>) ;B73	AAS88571
倍半萜	拟南芥	NP_199276
倍半萜	拟南芥	NP_193064

合酶	来源	NCBI 蛋白质 ID
倍半萜	拟南芥	NP_193066
姜黄烯	广藿香 (P. cablin)	AAS86319
法呢烯	家蝇 (M. domestica)	AAX19772
法呢烯	番红花 (C. sativus)	AAU05951
法呢烯	柑橘 (C. junos)	AAK54279
法呢烯	欧洲云杉	AAS47697
红没药烯	欧洲云杉	AAS47689
倍半萜	拟南芥	NP_197784
倍半萜	拟南芥	NP_175313
GPP 嵌合体		
GPPS-LSU+SSU 融合蛋白		
牻牛儿基牻牛儿 基还原酶	拟南芥	NP_177587
牻牛儿基牻牛儿 基还原酶	莱茵衣藻	EDP09986
叶绿素酯水解酶	莱茵衣藻	EDP01364
叶绿素酯水解酶	拟南芥	NP_564094
叶绿素酯水解酶	拟南芥	NP_199199
磷酸酶	酿酒酵母 (S. cerevisiae)	AAB64930
FPPA118W	原鸡	

[0241]

[0242]

[0243] 所述合酶也可以是 β -石竹烯合酶、大根香叶烯 A 合酶、8-表雪松醇 (8-epicedrol) 合酶、朱栾倍半萜 (valencene) 合酶、(+)- δ -杜松烯 ((+)- δ -cadinene) 合酶、大根香叶烯 C 合酶、(E)- β -法呢烯合酶、蓖麻烯 (caspene) 合酶、vetispiradiene

合酶、5-表-马兜铃烯 (5-*epi*-aristolochene) 合酶、马兜铃烯合酶、 α -葎草烯、(E,E)- α -法呢烯合酶、(-)- β -蒎烯合酶、 γ -松油烯合酶、苧烯环化酶、沉香醇合酶、(+)-冰片二磷酸合酶、左旋海松二烯合酶、异海松二烯合酶、(E)- γ -红没药烯合酶、柯巴基焦磷酸 (copalyl pyrophosphate) 合酶、贝壳杉烯 (kaurene) 合酶、长叶烯合酶、 γ -葎草烯合酶、 δ -蛇床烯合酶、 β -水芹烯合酶、异松油烯合酶、(+)-3-萜烯合酶、顺-柯巴基焦磷酸合酶、 α -松油醇合酶、顺-海松-7,15-二烯合酶、反-山达海松二烯 (sandaaracopimaradiene) 合酶、sterner-13-ene 合酶、E- β -罗勒烯、S-沉香醇合酶、牻牛儿醇合酶、 γ -松油烯合酶、沉香醇合酶、E- β -罗勒烯合酶、表-雪松醇合酶、 α -姜烯合酶、愈创木二烯 (guaiaadiene) 合酶、卡黎二烯 (cascarilladiene) 合酶、顺-穆罗拉二烯 (muuroladiene) 合酶、阿菲迪柯林-16b-醇 (aphidicolan-16b-ol) 合酶、伊丽莎白三烯 (elizabethatriene) 合酶、檀香醇合酶、广藿香醇 (patchoulol) 合酶、zinzanol 合酶、雪松醇合酶、香紫苏醇 (scareol) 合酶、柯巴醇 (copalol) 合酶或泪柏醇 (manool) 合酶。

[0244] 本文描述的方法使用的途径可以包含细胞溶胶中、质体中(如,叶绿体)或两者中存在的酶。编码某些实施方式中酶的外源核酸可被引入宿主细胞,以便编码的酶在细胞溶胶中或在质体中或在两者中都有活性。在一些实施方式中,在宿主细胞转化后,在一个细胞内区室(如,在细胞溶胶中)中存在的天然出现的酶可在不同的细胞内区域内(如在叶绿体中),或在天然出现和非天然出现的区域内表达。

[0245] 为了阐释这一概念,并且只是通过实例的方式,无维管光合微藻物种可以被基因工程化,以产生类异戊二烯,如苧烯(一种在特用化学和石油化学工业中有很高价值的分子)。苧烯是纯烃单萜,仅含有氢和碳原子。苧烯不是莱茵衣藻中天然产生的。苧烯在这些微藻中的产生可以通过工程化该微藻以在叶绿体中表达异源酶苧烯合酶而完成。苧烯合酶可以将萜前体牻牛儿基焦磷酸 (geranyl pyrophosphate) 转化成苧烯。不像苧烯,牻牛儿基焦磷酸天然存在于微藻的叶绿体中。苧烯合酶的表达可以通过插入编码苧烯合酶的异源基因到微藻的叶绿体基因组中完成。随后使微藻的修饰株成为同质的,以确保苧烯基因在所有后代的叶绿体基因组中稳定保持。当被插入的基因存在于叶绿体基因组的所有拷贝中时,微藻对于基因是同质的。叶绿体可能包含其基因组的多个拷贝对本领域普通技术人员是显而易见的,并且因此,术语“同质的 (homoplasmic)”或“同型异源性 (homoplasmy)”指的是这样的状态——其中特定目标基因座的所有拷贝都基本相同。质体表达,其中基因通过同源重组插入每个植物细胞中存在的环状质体基因组的所有数千个拷贝中,利用了相对于核表达基因的大量拷贝数优势,以允许表达水平轻易地超过总可溶植物蛋白的 10%。

[0246] 表达

[0247] 叶绿体是光合生物中生产性的细胞器和大量蛋白合成的位置。本文的任何表达载体可选择性地适合叶绿体表达。许多来自高等植物的叶绿体启动子已经在 Kung 和 Lin, Nucleic Acids Res. 13:7543-7549(1985) 中描述。基因产物可在叶绿体中由表达载体表达。由表达载体编码的基因产物也可由叶绿体靶向基因靶向到叶绿体。例如,靶向表达载体或由表达载体编码的基因产物(一种或多种)到叶绿体可进一步增强由调控序列和编码允许或提高燃料分子生产的蛋白或多肽的序列(一种或多种)提供的效果。

[0248] 本文所述的靶向叶绿体的各种组合可具体体现并与本文所述的其它特征组合。例如,编码萜合酶的核苷酸序列可被可操作地连接到编码叶绿体靶向序列的核苷酸序列。宿

主细胞可用编码靶向叶绿体的苧烯合酶的表达载体转化,并且因此,可产生比用编码苧烯合酶但没有叶绿体靶向序列的表达载体转化的宿主细胞更多的苧烯合酶。与产生较少的宿主细胞相比,增加的苧烯合酶的表达可产生更多的苧烯。

[0249] 而在另一实例中,包含编码酶的核苷酸序列的表达载体被靶向叶绿体,所述酶通过利用由生物自然产生的前体作为底物,产生该生物非自然产生的产物(例如,燃料产品、芳香制品、杀虫剂产品)。与其中酶被表达但是没有靶向叶绿体的宿主细胞相比,通过将酶靶向叶绿体,产物的生产可以增加。不被理论所束缚,这可能是由于增加了在叶绿体中产生的前体并且因此更多的产物可以通过由引入的核苷酸序列所编码的酶产生。

[0250] 方法

[0251] 产物(例如燃料产品、芳香制品、杀虫剂产品)可以通过包括下述步骤的方法生产:生长/培养由本文的一个或多个核酸转化的无维管生物。本文的方法可以进一步包括转化生物的步骤。转化可以使用本领域内已知的或本文描述的任何方法进行。本文的方法可以进一步包括收集由生物生产的产物的步骤。

[0252] 本文的方法可以进一步包括给生物提供无机碳源如烟道气的步骤。在一些情况下,无机碳源提供制造产物(例如燃料产品)必需的全部碳。生长/培养步骤优选地发生在合适的培养基如具有矿物质和/或维生素的培养基中。

[0253] 在相关的不同方面,生产产物(例如燃料产品、芳香制品、杀虫剂产品)的方法包括:用表达载体转化光合生物;生长生物;以及从该生物收集产物。表达载体一般是本文描述的表达载体,并且特别地被用于向生物增加额外的生物合成能力或改变该生物中现有的生物合成途径,意图在于提高或允许由该光合生物产生分子。

[0254] 本文的方法包括选择用于生产产物的基因,产物例如燃料、香料和杀虫剂,用这样的基因(一种或多种)转化光合生物的细胞,和在允许生产产物的合适条件下培养该生物。本文使用的生物可以在传统的发酵生物反应器中培养,其包括,但不限于,分批式(batch)、补料分批式(fed-batch)、细胞再循环和连续式发酵器。而且,它们可在光生物反应器中生长(参见,例如,美国专利公开号 20050260553;美国专利号 5,958,761;美国专利号 6,083,740)。培养也可以在摇瓶、试管、微量滴定盘(microtiter dish)和培养皿中进行。培养在适合重组细胞的温度、pH 和氧含量的条件下进行。这些培养条件在本领域普通技术人员的技术范围内。

[0255] 宿主生物也可在陆地上生长,例如,垃圾填埋场。在一些实例中,宿主生物(一种或多种)在乙醇生产工厂或在产生 CO₂ 的其它设施或区域(如,城市、高速公路等)附近生长。因此,本文的方法考虑了向乙醇工厂或产生 CO₂ 的其它设施或区域出售碳信用额(carbon credits),并同时通过在乙醇生产工厂附近培养一种或多种本文所述的修饰的生物来生产燃料的商业方法。

[0256] 而且,所述生物可在户外开放水域生长,如池塘、大洋、海、河流、水床(waterbed)、沼泽水(marsh water)、浅池、湖泊、水库等。当在水中生长时,所述生物可以被包含在由乐高积木状(lego-like)颗粒组成的光环状(halo like)物体中。所述光环状物体围绕藻类,并允许其保持来自水下方中的营养物,同时保持其在无遮挡的阳光中。

[0257] 在一些实例中,生物可以在容器中生长,其中每个容器包含 1 个或 2 个或多个生物。所述容器可以被构建为漂浮在水上。例如,容器可以由空气和水的组合填充,使得容器

和在其中的宿主生物（一种或多种）漂浮。因此，适应在淡水中生长的宿主生物可以在咸水（例如，海洋）中生长，并且反之亦然。如果容器有任何损坏，这种机制允许生物自动死亡。

[0258] 在一些实例中，多个容器可以包含在上述光环状结构中。例如，多达 100、1,000、10,000、100,000 或 1,000,000 个容器可以被安排在一平米的光环状结构中。

[0259] 在一些实施方式中，通过收获生物来收集产物（例如燃料产品、芳香制品、杀虫剂产品）。然后，可以从所述生物中提取产物。

[0260] 在一些实施方式中，所述产物（如，燃料产品、芳香制品、杀虫剂产品）的表达是可诱导的。所述产物可被诱导以表达。表达可以通过光诱导。而在其它实施方式中，所述产物的生产是可自体调控的。所述产物可形成反馈回路，其中当产物（如，燃料产品、芳香制品、杀虫剂产品）达到某个水平时，产物的表达可被抑制。在其它实施方式中，所述生物的代谢产物的水平抑制产物的表达。例如，作为能量产生提高以表达产物的结果，所述生物产生的内源 ATP 可形成反馈回路，以抑制该产物的表达。在另一实施方式中，产物的生产可被例如通过光或外源试剂诱导。例如，用于引起宿主生物中产物生产的表达载体可包含可诱导的调控序列，其被外源试剂激活或失活。

[0261] 本文描述的方法可以涉及筛选新基因 / 表达载体以产生本文描述的任何燃料产品的方法。这样的方法包括下述步骤：(1) 将核酸的候选表达载体插入光合生物，(2) 收集从其产生的推定的燃料产品，(3) 将推定的燃料产品施加到质谱仪以确定所述推定燃料产品的性质以及其是否可以用作燃料产品。在一些实施方式中，步骤 (2) 可以包括收集已知的燃料产品以及相对于不含候选表达载体的光合生物，候选表达载体是否增加了燃料产品的生产。

[0262] 本公开通过以下实施例进一步地说明，其不应该以任何方式解释为限制性的。生成显示数据的实验步骤在以下更详细地讨论。本公开以以阐述的方式进行描述，并且应该理解的是使用的术语意欲是描述性而不是限制性的。

[0263] 实施例 1

[0264] 倍半萜、花侧柏烯的裂化用本文提供的方法实现。在该实施例中，10- 环分子筛催化组合物被选择以展示花侧柏烯的催化裂化。该沸石是被称为 SN27 的 ZSM-5 材料，其相对于 ZSM-5 型沸石具有相对高的、大约 27/1 的 $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ 的氧化铝含量。该材料通过与铵阳离子交换可以被转化为质子形式，随后在使用之前，在脉冲反应器中、大约 500°C 下煅烧。

[0265] 建造脉冲反应器以研究本文描述的生物源的烃的催化反应。设计标准包括使产生可靠的结果必需的反应物的量最小化并允许进行产物和产物分布的评估。如在图 1A 中显示，脉冲反应器 10 由 30 厘米长、能够经受超过 1000°C 的石英管 20 构成。该石英管在其末端分别装备有气体入口 24 和气体出口 28。在中心它具有用于支撑催化剂样品（没有显示）的烧结盘 (fritted disk) 30。石英棉 40 放置在反应器中的催化剂的顶部和底部以保持它在适当的位置。在顶部的 O- 环形连接器 44 允许有注射器注射口 50，并且另一个在底部的 O- 环形接头 60 被用于连接可拆卸的 U 形阱 70。任选地，另一个管 80 可以连接到 O- 形接头 60 以防止产物在该 O- 形接头上冷凝。主体管 20 可以放置在管式炉中，并且温度控制器（没有显示）被连接。图 1B 是显示运行中的脉冲反应器的示意图。简单地说，一般通过压力和流量调节器提供载气的流动气流。载气流过注射器注射口、沿着该管向下、经过催化剂

样品并进入阱。该载气携带烃反应物到催化剂,以及任选地提供某些反应气氛。例如,载气可以是氦气或者氮气(惰性气氛)、氢气(还原气氛)或氧气(氧化气氛)。催化剂样品可以在任一期望的气氛中和在任何温度进行预处理,然后脉冲引入反应物。使反应器至加热炉中的期望的反应温度,并将小量的烃反应物在反应温度下注射入流动气流中,该流动气流携带这种“脉冲”到催化剂。为了收集反应产物,在底部的U形管阱70浸入装备有液氮的冷却阱中。催化反应的产物在U形管阱中冷冻,并且可以通过移去U形管阱和用溶剂(例如,甲醇)洗涤它进行回收。产物随后可以进行分析,用GC/MS定性测定产物种类和/或具有FID检测器的GC进行定量测定。在GC和GC/MS的两个系统中,使用具有相同的柱温度程控曲线(column temperature programming profiles)的相同色谱柱。这些是50-m PONA毛细管柱,在两种设备上都使用分流注射器(splitting injectors)。

[0266] 花侧柏烯是C₁₅分子,因此其具有高沸点(大约275℃),并因此可能要求色谱分析方法的调整。GC/MS系统用于裂化产物的分析。

[0267] 花侧柏烯裂化的催化裂化实验在完全质子化形式的SN27上进行。裂化条件是500℃,和用氦气载气(100cc/min)以25μL脉冲提供花侧柏烯到脉冲反应器。花侧柏烯到裂化产物的转化率接近100%,并且主要产物是甲苯、苯、二甲苯、乙基苯和重芳香族化合物。为了避免一些芳香族化合物例如苯和二甲苯,裂化也在较低温度的裂化条件下进行:450、400、350和300℃。不同温度得到的各种裂化产物的总结在图1C中显示。

[0268] 实施例2

[0269] LZY-72是Union Carbide Y-型沸石,其经常被用作裂化催化剂。在该实施例中使用的催化组合物以LZY-72碱——其通常为钠的形式——开始,由该碱与NH₄NO₃水溶液进行离子交换,以产生沸石的铵形式。当加热时,沸石铵转化为氨消除的质子形式。沸石的质子形式作为强的固体酸。Y-型沸石具有大约8.6 Å孔口的3-维孔网络(pore network),该孔口通向大约13 Å自由直径(free diameter)的更大、几乎为球形的笼。

[0270] 第二种催化剂SN27是通过德国VAW-AG制造的ZSM-5沸石原料。它具有27/1的SiO₂/Al₂O₃比例。该沸石也以钠形式提供,使用类似的铵交换步骤,然后加热以将它转化为强酸。ZSM-5沸石是以两维通道系统为特征,其为具有大约5.5 Å孔径、大体上圆柱的形状。

[0271] 在该实施例中,通过将倍半萜花侧柏烯与SN27催化剂接触,进行花侧柏烯的裂化,并且由此方法生成的产物在图2A中总结。如在图2A中图解,在高温(450–500℃)下得到高的花侧柏烯转化率,并且甲苯是主要的产物,同时有较少量的苯、二甲苯和乙基-甲苯。

[0272] 使用LZY-72催化剂,花侧柏烯在低得多的温度下裂化成为如图2B中总结的高辛烷值组分。在用LZY-72催化剂裂化花侧柏烯的所有产物中的主要组分是甲苯。二甲苯和苯衍生物在更高温物下为优先产生,类似于SN27催化剂的结果。在低温下,环戊烷和环己烷的衍生物以显著量产生,并且具有非常少的苯,这表明可以适合于混合或作为燃料产品的高辛烷值燃料产品或燃料组分。图2C、2D和2E分别图解说明在200、250和300℃下用LZY-72沸石裂化花侧柏烯得到的组合物。括号中的数字表明各种组分的辛烷值范围。

[0273] 也观察到花侧柏烯裂化产物的氢与碳(H/C)的比例。反应物花侧柏烯是C₁₅H₂₂,具有1.47的H/C比例。如果花侧柏烯正好裂化成为它的两个基本环,产物将是54.5%三甲基环戊烯C₈H₁₄和45.5%甲苯C₇H₈,并且该混合物将具有母体分子相同的1.47的H/C比

例。然而,该实施例的裂化产物混合物包含三甲基环戊烷和二甲基环己烷,而不是三甲基环戊烯。由于饱和的环烷具有比不饱和环烷高的 H/C 比例,我们可以预期总的产物含有比反应物高的 H/C 含量;因此,反应将需要氢加入。然而,图 2B 中显示的实际产物测量的 H/C 比例是 1.43,而这在没有氢加入情况下是可能的,这是因为实际甲苯重量分数(62.1%)超过 45.5%。因此,裂化产物包括高辛烷值产品,其适合于燃烧燃料产品例如汽油或喷气式发动机燃料。

[0274] 同时,与 SN27 催化剂相比,在大多数温度下,使用 LZY-52 催化剂裂化了更多的花侧柏烯,产生较少芳香族化合物。这种不同可能源于孔径的不同。SN27 具有大约 5.5 Å 的孔径,并且该孔结构已知接纳芳香环,但是花侧柏烯的大小和形状可能稍微太大而不适合该孔。用 SN27 的催化裂化似乎需要高温,但是在高温下选择性受到损害。对于大约 8.6 Å 的孔, LZY-52 似乎能够更好地容纳花侧柏烯分子。

[0275] 在实施例的另一种情况中,产物中没有可测量的烷基环戊烯或者烷基环己烯,它们可能是燃料产品例如汽油中不期望的。这些不饱和物,虽然可能可以接受,但是在汽油中大量情况下可能引起反应困难。苯,燃料产品例如汽油中另一种不期望的分子,在一些情况中也不以可测量的量存在。

[0276] 实施例 3

[0277] 沸石 β 从 PQ Catalysts(现在是 Zeolyst International 的一部分)得到。该材料被称为 Valfor CP811BL-25。它具有大约 25 的 SiO₂/Al₂O₃ 比例,并且以其酸(完全质子化的)形式提供。经过压成小球、在研钵和研杵中磨碎和筛分,沸石 β 从疏松粉末转化为 20-40 目颗粒,然后装载进入脉冲反应器。

[0278] 类似于实施例 2 中说明的沸石 Y,沸石 β 具有 12-环、三维孔系统。与沸石 Y 不一样,沸石 β 可以以更高的 SiO₂/Al₂O₃ 比例合成。这引起更低密度的质子位,但是每个单独位置一般比沸石 β 中的更强。

[0279] 在催化裂化条件和将花侧柏烯与沸石 β 接触下,在脉冲反应器中进行裂化花侧柏烯的过程。在温度低至 200℃的条件下观察到高花侧柏烯转化率,并且在所有使用温度——200 至 500℃——下甲苯是主要产物。图 3A 详述使用沸石 β (Valfour CP811BL-25) 催化剂的花侧柏烯裂化的温度灵敏度和由此得到的产物。图 3B 和 3C 图解说明在 200 和 250℃下、使用沸石 β (Valfour CP811BL-25) 催化剂,花侧柏烯裂化的产物详情。括号中的数字表明种类的辛烷值。在不同异构体将具有不同辛烷值时,指明范围。

[0280] 实施例 4

[0281] 以钾形式(Linde Molecular Sieves)开始制备 ELZ-L 沸石的铵形式。10g 的钾形式的沸石在 50cc 的水中包含 10g 的醋酸铵溶液中被调成浆。混合物升温并搅拌过夜,然后滤出溶液,并且该过程重复第二次。该材料在使用之前,在 125℃干燥过夜。微平衡脱附实验显示在 500℃下干燥后材料的强的质子含量。

[0282] 通过将花侧柏烯与 ELZ-Z 催化组合物接触,在脉冲反应器中进行花侧柏烯的裂化。通过 GC 和 GC/MS 分析裂化产物。色谱显示宽范围的裂化产物,特别是在低温下。只有面积具有色谱上最大峰面积的至少 1% 的峰被分析。被忽略的峰每个对色谱上所有峰的面积总数贡献大约 0.3%。保留的峰然后通过使用 NIST MS 指纹数据库的库检索进行鉴定。

[0283] 用 ELZ-L 催化剂裂化花侧柏烯在所有测试温度下主要产生甲苯和环烷(环烷类),

如在图 4 中显示。以环烷和一些甲苯为代价,高的裂化温度增加二甲苯(二甲基苯)和其它苯衍生物(三甲基苯、乙基苯、甲基异丙基苯)的产生。小于 1%的产物是甲苯。在 250 和 490℃下,烯烃分别只占裂化产物的 1 和 9%。没有产生显著量的萘类(C10+ 芳香族化合物)或者氧化物(oxygenates)(包含氧的分子)。

[0284] ELZ-L 催化剂产生了类似于图 2 和 3 中显示的 LZY-72 和沸石 β 催化剂的裂化产物。具体地,LZY-72 和 ELZ-L 产生相似量的甲苯和环烷。然而,在相应的温度下,LZY-72 催化剂比 ELZ-L 产生更多的二甲苯和苯,但是在 250 和 300℃下,LZY-72 也具有更高的花侧柏烯转化率。在 400 沸石℃和以下,沸石 β 比 ELZ-L 产生更多甲苯。像 LZY-72 一样,在可比较多温度下,沸石 β 也比 ELZ-L 产生更多二甲苯和苯。在 400℃和以上,沸石 β 也产生萘类,而 LZY-72 和 ELZ-L 在任何温度下都不产生显著量的萘。与沸石 β 相比,在 300℃或更低下,ELZ-L 显示更差的花侧柏烯转化率。

[0285] 通过沸石 β 、LZY-72 和 ELZ-L 的花侧柏烯裂化产生大量的甲苯;如在本实施例和实施例 2 以及实施例 3 显示,从不少于 30%,并通常为 50%或更多。在高温(450+℃)下,大约 20%的二甲苯是第二最丰富的产物。使用 LZY-72 和 ELZ-L 催化剂,降低裂化温度至 200 和 300℃之间产生大约 30%的环烷。中等温度也减少苯和烯烃的形成。裂化花侧柏烯的所有三种大孔分子筛似乎是裂化花侧柏烯成为高辛烷值燃料产品、组分或添加剂的优良的候选者。

[0286] 实施例 5

[0287] 从藻类提取的油在具有图 5A 中显示的装置的脉冲反应器中裂化。如本文描述的新沸石(fresh zeolite) β 催化剂用于每个裂化实验并在使用之前干燥。裂化实验在 500、450、400、350 和 300℃下进行。裂化产物通过 GC/MS 分析。然后,通过保留时间和使用 MIST MS 指纹数据库的库检索的组合鉴定峰。通过 MS 指纹或 GC 保留时间不能够鉴定的峰被标记为未知物。

[0288] 经过 CO_2 从藻类提取油,并将其提供为第一粗样品。一些粗藻油通过 RBD 方法被精炼,以提供第二精炼样品。每个样品在 500、450、400 和 350℃裂化条件温度下进行裂化。

[0289] 使用本文描述的方法,粗藻油裂化至如图 5B 中显示的近似等量的链烷烃、烯烃、C8-C14 芳香族化合物和萘类,其中 0.1g 粗藻油在各种温度下与 0.1g 沸石 β 接触进行裂化。C4-C13 链烷烃和萘类平均为该产物的 19%,而环烷和烯烃平均为 16%。甲基丁烷在所有温度下都是主要产物,其占产物的大约 9%。链烷烃、环烷和烯烃产生随着裂化温度增加而减少。苯、甲苯、二甲苯和 C9-C14 芳族含量随着裂化温度而增加。萘产生在 400℃下达到高峰。不确定结构的氧化物在所有温度下都小于产物的 1%。因此,预期水为重要的反应产物;然而,使用这些特定的步骤没有量化水。在 350℃下未知物产生于不能鉴定的 18 个峰,每个峰给总浓度贡献在 0.1-0.5%之间。

[0290] 图 5B 也说明取自标准汽油站的 87、89 和 91 辛烷值汽油的组分。与石油汽油相比,来自藻粗提物的产物包含显著少的链烷烃和显著多的萘类。汽油也倾向于具有比观察到的裂化藻油产物小的分子。例如,汽油中的链烷烃是 C4-C10,但是裂化产物中的链烷烃范围多至 C13。这种趋势对于环烷、烯烃和 C8-C14 芳香族化合物也适用。

[0291] 藻油的第二样品通过该实施例的方法裂化,其中第二样品通过 RBD 方法精炼,然后通过 0.1g 沸石 β 裂化 0.1g 的第二样品。图 5C 显示链烷烃是精炼藻油的主要裂化产

物,在所有温度当中其平均为 20%。所有的烯烃、C8-C14 芳香族化合物和萘类平均为大约 18%。苯在所有温度下平均为产物的 2.5%,在 400℃下为 3.8%的最大值。从裂化的精炼油中没有鉴定到氧化物,但是水是最有可能存在的。平均小于 1%的峰没有被鉴定。环烷含量随着温度增加而减少,而 C8-C14 芳族种类随着温度增加而增加。

[0292] 精炼藻油的裂化产物类似于原油裂化产物。同时,与实施例的汽油样品相比,甲苯和二甲苯含量是较低的。图 5D 比较来自粗藻油和精炼藻油的裂化产物与 87、89 和 91 的辛烷值石油汽油。平均起来,在通过裂化藻油样品得到的两组产物之间没有显著差别,这说明 RBD 精炼没有提高裂化产物。在一些情况下,裂化产物可能需要常规的分馏精炼,以便产生合适的汽油产物。在其它情况中,裂化产物可以用作为燃料产品、组分或添加剂。

[0293] 实施例 6

[0294] 倍半萜法呢烯通过将法呢烯与 LZY-72 催化剂接触进行裂化, LZY-72 催化剂是在前面花侧柏烯裂化实施例中使用的相同的铵交换形式。在 500℃下预处理过程期间,当加热时,该材料转化为酸(质子化)形式。

[0295] 通过 GC/MS 分析裂化产物。由于宽范围的裂化产物,特别是在较低温度下,色谱倾向于非常复杂。对于该报告,只有面积为该色谱上最大峰面积的至少 1%的峰被分析。较小的峰倾向于每个给色谱上所有峰的面积总数贡献大约 0.3%。然后,通过保留时间和使用 MITST MS 指纹数据库的库检索组合进行保留峰的鉴定。通过 MS 指纹或 GC 保留时间不能够鉴定的峰标记为未知物。

[0296] 通过重复注射 25uL 进入制备 GC 柱,将法呢烯浓缩至 61%,直到 2mL 浓缩的法呢烯被收集,其组成在表 3 中显示。

[0297] 表 3.

	组分	重量%
	法呢烯	61.4
	红没药烯	11.2
	未知物	10.3
	姜黄烯	7.8
	α-柏木烯	2.2
[0298]	δ-愈创木烯	2.2
	5,5-二甲基-1-丙基-1,3-环戊二烯	1.7
	2-甲基-3-(3-甲基-丁-2-烯基)-	1.6
	2-(4-甲基-戊-3-烯基)-氧杂环丁烷	
	石竹烯	1.6

[0299] 浓缩的法呢烯通过 LZY-72 催化剂裂化。

[0300] 总计,用 LZY-72 催化剂裂化法呢烯产生 60%的芳族分子、25%的环烷和 13%的链烷烃。在 200 和 300℃之间裂化主要产生环烷,并且在更高温度下主要产生芳香族化合物,如在图 6A 中所示。在 200 和 300℃之间的裂化条件下,甲基和二甲基环己烷是主要的环烷,

每个包括所有环烷的 21% 和 17%。环烷生产随着裂化温度增加而减少,如图 6A 中所示。二甲苯、C9-C10 芳香族化合物、萘和苯含量随着裂化温度而增加。三甲基苯是主要的 C9-C10 芳族分子,在所有温度下平均为 C9-C10 芳族分子的 63%。在 400°C 下,苯达到所有产物的 1.5%,当在 490°C 下裂化法呢烯时,达到峰值为 3%。甲苯和链烷烃在所有温度下以相对一致地产生,每个各自平均为 17% 和 12%。在所有温度下,没有确定结构的氧化物小于产物的 2%。没有检测到显著量的烯烃。在 485°C 下未知物增加产生于不能鉴定的四个峰,每个给总浓度贡献 1-3% 之间。

[0301] 当裂化温度增加,法呢烯裂化成为芳香制品的增加趋势与在其它倍半萜裂化实施例中所见到的趋势是一致的。一般而言,当裂化温度增加时,以环烷为代价,使用 LZY-72 裂化倍半萜产生更多二甲苯和苯。

[0302] 图 6B 显示法呢烯裂化产物中发现的类型的研究和马达 (research and motor) 混合辛烷值的平均。91+ 柱包含甲基丁烷、甲基环戊烷、甲基环己烷和除了苯之外的芳族分子。所有其他环烷和链烷烃具有更类似于基础石油汽油混合原料或直馏汽油的辛烷值,其具有 60 和 70 之间的辛烷值。

[0303] 在 350+°C 下裂化法呢烯产生超过 75% 的具有高混合辛烷值的产物,例如,90 以上。来自 350+°C 下法呢烯裂化的高辛烷值产物表明总体的混合物可能具有高辛烷值。如通过该实施例证明的,裂化法呢烯的方法和由此生成的组合物可能是有用的燃料产品、组分或添加剂,该组合物类似于基础石油汽油原料 (辛烷值 60-80) 和更高的辛烷值混合原料 (辛烷值 91+)。

[0304] 实施例 7

[0305] 裂化倍半萜混合物的示例性方法在这个实施例中进行。姜油包含大约 80% 的倍半萜。姜烯占姜油的 36%。接下来最大组分为 16%,是 β 倍半水芹烯。姜黄烯、法呢烯和红没药烯每个也以大约 10% 存在。在该实施例中裂化的姜油使用二氧化碳以最小化姜醇的量而得到,姜醇占该油的大约 6%。

[0306] 用于裂化姜精油的 LZY-72 催化剂是与在前面花侧柏烯裂化实施例中使用的相同的铵交换形式。在 500°C 下预处理过程期间,当加热时,该材料转化酸 (质子化) 形式。

[0307] 在催化裂化条件和将姜油与催化组合物接触下,姜油以类似于前面实施例中的方法在脉冲反应器中进行裂化。大约一半的姜油裂化成为链烷烃和环烷。以环烷和一些链烷烃为代价,更高的裂化温度增加芳香族化合物的产生。因此,苯形成从在 200-250°C 下的零增加至 485°C 下的大约 5%。在 200°C 下烯烃达到裂化产物的 1.5%,而在更高温度下检测不到烯烃。在任何裂化产物中没有肯定地鉴定氧化物。图 7 说明来自裂化倍半萜混合物的方法的裂化产物的组成,在该实施例中,倍半萜为姜油。在 300°C 下裂化姜精油产生多种环烷、链烷烃、二甲苯和苯衍生物。许多链烷烃是支链的并提供高的辛烷值。

[0308] 实施例 8

[0309] 角鲨烯是示例性三萜。本文描述的方法被用于裂化角鲨烯。用于裂化角鲨烯的 LZY-72 催化剂是与在前面花侧柏烯和法呢烯实施例中使用的相同的铵交换形式。在 500°C 下预处理过程期间,当加热时该材料转化酸 (质子化) 形式。裂化产物通过 GC/MS 进行分析。由于宽范围的裂化产物,特别是在较低温度下,色谱倾向于非常复杂。对于该报告,只有面积为该色谱上最大峰面积的至少 1% 的峰被分析。

[0310] 裂化产物在图 8A 中显示,并且显示类似于在前面裂化实施例中观察到的那些产物:在较低温度下更多环烷和在较高温度下更多的芳香族化合物。另外,GC/MS 结果显示只有在高温($> 450^{\circ}\text{C}$)下才有可见量的苯,和可忽略不计量的氧化物和烯烃。

[0311] 裂化产物的辛烷值在图 8B 中显示,其表明该产物的平均混合辛烷值。在较高温度下的较高混合辛烷值表示产物的较高芳族浓度。在较低温度下的较低辛烷值的较高浓度产生于低辛烷值环状化合物。

[0312] 实施例 9

[0313] 植醇是在光合生物中经常发现的二萜。植醇可以是叶绿素的降解产物。图 9A 显示链烷烃是植醇的主要的裂化产物,在所有温度中平均为 62%。环烷从 200°C 的 24%减少至 490°C 的大约 1%。裂化产物的芳族含量随着温度从所有产物的 7%增加至 42%。在 490°C 下,苯和萘浓度分别达到所有产物的 3%和 2%。从裂化植醇中没有鉴定到烯烃或氧化物。

[0314] 图 9B 和 9C 分别显示在链烷烃中的碳分布和支化程度。低的裂化温度有利于 C6-C8 链烷烃的产生,例如甲基戊烷和甲基庚烷,而较高温度主要地产生甲基丁烷。通过裂化植醇产生的多数链烷烃为单甲基,如在图 9C 中显示,虽然在 200°C 和 490°C 分别有一些形成正常和二甲基链烷烃的趋势。

[0315] 多数植醇裂化产物的混合辛烷值类似于源于法呢烯的那些。图 9D 依照研究和马达混合辛烷值的平均对分子进行分组。在 91+ 柱中的高辛烷值分子由芳族种类、甲基丁烷、甲基环戊烷和甲基环己烷组成。

[0316] 实施例 10

[0317] 用于裂化藻类植醇的 LZY-72 催化剂与在前面实施例中使用的铵交换形式相同。裂化只在 350°C 的单个温度进行,选择该温度是因为预期这些条件确保很少或没有苯的产生。裂化产物通过如在前面实施例中讨论的 GC/MS 进行分析。然后,裂化植醇的组合物与在 Tulsa, Oklahoma 的零售加油站购买的 87、89 和 91 等级汽油样品进行比较。

[0318] 在该实施例报道中研究六种样品:来源藻类的植醇的单脉冲的产物。植醇从藻类提取并被称为“藻类植醇提取物”;来源商用供应商(Sigma-Aldrich)的植醇的单脉冲的产物,和被称为“商用植醇”;商用植醇的多脉冲的产物,其被收集入大约 1/2cc 产物样品并封装在玻璃瓶中,和被称为“瓶装商用植醇(商用植醇瓶)”;87 辛烷值汽油样品;89 辛烷值汽油样品;和 91 辛烷值汽油样品。

[0319] 与如本文描述的 LZY-72 催化剂接触,植醇样品在脉冲反应器中进行裂化。植醇的裂化产物在图 10A 中显示,并且与汽油样品的分解物进行比较。和零售汽油的样品形成对比,来自植醇的裂化产物显示没有 C4 烃。C5-C9 链烷烃在植醇产物中比在零售汽油中高。在植醇产物中观察到较低浓度的甲苯、氧化物(汽油样品包含 5%的乙醇)和苯。

[0320] 350°C 裂化植醇产物的辛烷值范围与汽油样品的比较在图 10B 中显示。瓶装商用植醇是唯一与其它样品有显著不同的样品。它显示低的 91+ 辛烷值组分,主要是其较低的乙醇、苯和甲苯浓度的结果。这有可能通过调整裂化温度至 450°C 进行纠正。该瓶中较大的样品与单脉冲样品的差异可能由于可以改变产物分布的催化剂失活。

[0321] 实施例 11

[0322] 用于其它实施例的 LZY-72 催化剂与 Ni 部分离子交换以产生可以用于作为氢化裂解催化剂的 Ni/LZY-72。离子交换步骤如下:10.0g 的 LZY-72 的铵形式在 50g 的水中调成

浆,并加入醋酸Ni(II)四水合物。混合物在室温下搅拌过夜,然后溶液滤出和固体在125℃干燥过夜。催化剂例如这些同时具有由于镍的氢化活性和由于质子存在的裂化活性。对于脉冲实验,0.5g的该催化剂被放置在脉冲反应器中,并且在其使用之前,在300℃下、氢气气流中活化1小时。在250、300、350、400、450和500℃下,在氢气气流中使用25 μ l脉冲的植醇进行氢化裂解。产物在液氮中捕获(截留),然后,在GC/MS系统中分析之前,使用甲醇从阱中洗出。氢化裂解植醇的氢化裂解产物在图11A中显示。该产物的辛烷值在图11B中图解说明。

[0323] 实施例 12

[0324] 该实施例描述源于萘的燃料产品的大规模制备。简单地说,使用管式反应器成功地裂解角鲨烯以产生1.37加仑的液体产物。从这个粗的液体产物,0.95加仑的最轻的材料被蒸馏并被送去ASTM汽油分析,该分析表明产物具有91.5的辛烷值。

[0325] 在具有设置在通风厨中的大的加热炉和管式反应器的装置(设备)中进行裂化过程。该装置的简明示意图在图12A中给出。三区加热炉(three-zone furnace)100包括包括上区100和下区120——它们每个是6英寸长和600W——以及中区130,其是12英寸长和1180W。独立的热电偶140、150和160分别测量每区温度。2英尺长管式反应器170垂直安装在三区加热炉100里面。热电偶180轴向插入管式反应器170的催化剂区190,测量在催化剂床中心处的温度。基于LabVIEW的控制程序使加热炉处于等温条件和使测量的催化温度处于设定点。同一程序也允许记录包括流速、温度和压力在内的所有测量的系统参数。ISCO泵200以恒定、可编程的速度分批进料多至500cc的液体进料205至反应器170。流量控制气体210——在该情况下为氮气——可以被共同进料进入反应器170中。虽然大多数的裂化实验使用充入12g沸石 β (T-4546)压出物(Süd Chemie)的1英寸OD管式反应器;但是第一次使用500cc的角鲨烯反应物的三个实验使用装入大约57g沸石 β (T-4546)的3/4英寸OD反应器进行。如在图12A中显示,液体和气体流进入管式反应器170的底部,并且当它们流过装入玻璃珠(3mm直径)的预加热区220时进行混合。18英寸长的催化剂床230位于玻璃珠床的上面,并且该两个床通过金属网240分开。离开顶部的反应器产物流过维持在大约8℃的、卷曲的同心管热交换器250。冷却的产物离开热交换器,穿过使瞬时液体样品被收集的阀装置260(称为“管线样品(line sample)”),然后它们进入冷却分离器270。未冷凝的气体产物继续到小流被流出的点,以到达进行气体分析的微-GC280,然后到反压调节器(backpressure regulator)290、湿度试验(wet test)气体流量计300和出口310上。该反压调节器在整个实验中设置为大约5psig。

[0326] 实施例的实验通过用质量大约112g的新催化剂床装入反应器开始。该反应器随后装入加热炉,并在氮气流中,380–400℃下加热过夜,以在反应之前干燥该催化剂。第二天早晨,500cc的角鲨烯装入ISCO泵,然后当使用1”OD反应器时,氮气和角鲨烯流量分别设定为2标准升/分钟(SLM)和4cc/min,或者当使用3/4”OD反应器时,氮气和角鲨烯流量分别设定为1SLM和2cc/mi。通常,对于第一个500cc的角鲨烯,反应温度设定在380℃。对于第二个500cc批次的角鲨烯,温度升至430℃,以补偿在第一个500cc实验期间发生的催化剂活性的损失。包括合适条件被建立的早期实验在内,所有实验用在300和450℃之间的反应器温度进行,除了两个所有在380和450℃之间。收集储蓄器(含有液体产物)被定期地排放,和管线样品被定期取走,并尽可能快地通过GC分析,以确保反应物的完全转化。

[0327] 当使用具有大约 112g 催化剂的 1" 直径反应器时,一旦第二个 500cc 的角鲨烯已经被处理(总的 1000cc 或者 855g),反应器被冷却,并且催化剂被移出和替换。在具有 57g 催化剂的 3/4" 直径反应器上完成的 3 个实验情况下,在 500cc 的角鲨烯已经被裂化后,改变催化剂。需要说明的是,对于任何一个反应器,使用非常接近相同比例的处理的角鲨烯与进料的催化剂。

[0328] 当催化剂进料从反应器中移走时,在微平衡系统中使用非常小的催化剂样品以测定焦炭含量,然后消耗催化剂的残余部分被放置在水平管式炉中,以通过在 575℃ 下、80/20Ar/O₂ 中燃烧 4 小时进行再生。燃烧的催化剂随后在微平衡系统上进行正丙胺热脱附分析,以测量与沸石催化剂的结构完整性直接相关的催化剂质子含量。正丙胺热脱附分析的结果与未使用的催化剂比较,以确保催化剂仍然结构完好的和有催化活性的。在一个完全的再生循环后,没有检测到对催化剂显著的损害。然而,对于角鲨烯的所有实验使用新的催化剂而不是再生的。总计,8.5L 或大约 7268g 的角鲨烯被处理和 1.37 加仑或大约 4410g 的裂化液体产物被回收。

[0329] 进料的 7268g 的总的角鲨烯分解的总的产物在表 4 中给出。

[0330] 表 4. 总体的物料平衡。

		总 克	总的角鲨烯进	总的已知产
		数	料%	物%
[0331]	气体(不包括 N ₂)	2236	30.76	33.07
	液体	4410	60.68	65.24
	焦炭	114	1.57	1.69
	没计算在内的	508	6.99	-

[0332] 根据微-GC,气体产物的详细分析随着时间被整合以产生每种气体产物的总量,并共计给出气体而不是冷凝产物的总重。收集的液体的总重记录为 4410g。测定焦炭为按消耗催化剂重量计大约 12%,因此,这对 112g 催化剂给出 13.44g,总计使用 8.5 分开批次的催化剂,焦炭生成 114g。从 7268g 进料减去这些数产生 508g 的没计算在内的。在图 12B 中最后的柱代表实际收集的总的产物百分比,并将在进一步分析中使用。没有计算的材料最可能转到取样步骤和充入液体管线。

[0333] 液体产物的模拟蒸馏表明 58% 的液体产物是汽油馏分(例如,小于 220℃ 的沸点)。因此,裂化的液体产物在 ASTM 测试之前进行蒸馏。收集用于 ASTM 分析的加仑的产物要求沸腾产物上至 275℃、大大超过 220℃ 的汽油截止值,而这没有预期到如模拟蒸馏表明的更多的液体在汽油范围中。然而,这样做以收集一加仑作为测试要求的最小量。ASTM 样品包含最接近于汽油沸腾范围的 3070g 的裂化产物。1340g 的液体太重不能够参加剩下的汽油测试,而被称为“液体残油”。ASTM 测试显示样品的研究辛烷值是 98.5,而马达辛烷值是 84.6,其对于为在泵提供的通常辛烷值的 (R+M)/2 产生 91.5 的值。表 5 给出回收成为各种馏分的角鲨烯的馏分。蒸汽组合物的详细分析是进行的 3 个实验的平均。详细的液体组合物源于合并的液体裂化产物的小样品的 GC/MS 分析。

[0334] 表 5. 角鲨烯总的收率

[0335]		总克数	总的角鲨烯进料%
	气体(不包括 N ₂)	2236	33.07
[0336]	ASTM 样品	3070	45.41
	液体残油(>275°C)	1340	19.83
	焦炭	114	1.69

[0337] 图 12B 说明在该实施例中,当在流动反应器中裂化角鲨烯时得到的组合物。气体产物的详细分析在表 6 中说明。因为异丁烷和异戊烷分别具有 122 和 100 的混合研究辛烷值,液体产物的辛烷值的合理估计可以为将被得到的计算值,如果表 6 中出现的异丁烷和异戊烷的量被包括在液体产物中。研究辛烷值将为大约 100.8 和马达辛烷值为 88.8,产生 $(R+M)/2 = 94.8$ 。也需要说明的是,如果异丁烷(代表 5.02%的转化的角鲨烯)和异戊烷(代表 2.24%的转化的角鲨烯)被回收和加入用于 ASTM 分析回收的样品,收率将上升 7.26%至角鲨烯的 52.67%,该角鲨烯被转化为用于 ASTM 分析回收的样品。如果气相的所有的 C₄+ 组分被回收和加回至用于 ASTM 分析回收的样品,收率将增加 22.5 个百分点至 67.91%,并且由于 C₄ 和 C₅ 的混合辛烷值范围为大约 109 至 176,因此,可以实现辛烷值的进一步显著的提高,可能甚至超过 100 辛烷值。

[0338] 表 6. 详细的气体产物组成

[0339]		气体产物的重量%	角鲨烯反应物的重量%
	氢气	0.59	0.19
	甲烷	0.91	0.30
	乙烯	3.56	1.18
	乙烷	0.67	0.22
	丙烯	21.74	7.19
	丙烷	4.46	1.47
	反-2-丁烯	5.54	1.83
	1-丁烯	3.60	1.19
	异丁烯	9.67	3.20
	顺-2-丁烯	4.26	1.41
	异丁烷	15.19	5.02
	正丁烷	9.97	3.30
	反-2-戊烯	1.98	0.65
	2-甲基-2-丁烯	4.51	1.49

[0340]

1-戊烯	3.29	1.09
顺-2-戊烯	0.84	0.28
异戊烷	6.78	2.24
正戊烷	0.86	0.29
己烷及以上	1.57	0.52

[0341] 在样品中被蒸馏以最小化重裂化产物的量后,ASTM 样品送去测试。测试的结果在表 7 中给出,其也包括具有根据 2004 要求标准的柱。产物的许多性质满足零售汽油的 ASTM 标准。例如,研究辛烷值 (RON) 和马达辛烷值 (MON) 分别是 96.5 和 84.6,对于 (R+M)/2 为 91.5,所有的这些都满足要求的汽油的 91RON 和 82MON 的最小值。表 7 中黑体字表明测试样品失败。一般而言,ASTM 样品仅未能够进行蒸馏曲线 (distillation profile) 相关的实验。这些失败被预期的,因为在汽油沸点范围之外的材料不得被包括,以得到一加仑的最小样品体积。ASTM 蒸馏结果显示进行的蒸馏仅去除最高沸点组分 (例如,萘类),但是留下另外的重组分 (例如,萘类和多取代的苯)。这导致 260°C 的终馏点,其被零售汽油允许的最大值高 35°C。可驾驶指标 (drivability index) 根据 10、50 和 90% 的样品被回收的温度和当开始、空转和驾驶时,燃料进行如何的表 (gauge) 计算。如预期的,样品的可驾驶指标超过容许的最大值,这是因为蒸馏曲线超过规定的沸点。该实施例说明用于 ASTM 测试的来自角鲨烯的一加仑的液体产物。

[0342] 表 7. 角鲨烯裂化的汽油馏分的 ASTM 结果。黑体为失败实验

[0343]

参数	方法、调节参考	角鲨烯裂化产物测量	标准/调节要求 (ASTM D4814-04a)
在 60°F 下的 API 重力	ASTM D4052-02e1	35.1	
实验室外观	ASTM D4176-04e1 P1	C+B	透明&明亮
磷含量(g/gal)	ASTM D3231-07	0.891	0.005 MAX
硫含量	ASTM D5453-08a*、40 CFR、标题 40、子部分 H.	3.8 ppm	120 ppm
外观	看得见的	忽略的	
氧化稳定性	ASTM D525-05	60.52 分钟	240 分钟 MIN
原在胶(没有清洗)(mg/100mL)	ASTM D381-04e1	<0.5	5 MAX
原在胶(清洗)(mg/100mL)	ASTM D381-04e1	<0.5	5 MAX
硫醇式硫(wt %)	ASTM D3227-04a	<0.002	0.035 MAX
辛烷值-研究	ASTM D2699-07a	98.5	
辛烷值-马达	ASTM D2700-07b	84.6	82
AKI -抗爆震指数 = (RON+MON)/2		87 (常规) 89 (中级) 91+ (高级)	91.5
银腐蚀(3 小时, 在 122°F 下)	ASTM D4814-07b A1	1	
铜腐蚀(3 小时, 在 122°F 下)	ASTM D130-04e1	1B	1
Nace 腐蚀	TMO172-01	B	

[0344]

苯含量(体积 %)	ASTM D3606-07; 40 C.F.R 80.1220, 80.1230	0.34	4 MAX (在 2011 中, 将是 0.62 体积 % MAX)
氧含量 (重量 %)	ASTM D4815-04	0.08	1 MAX
MTBE (体积 %)	ASTM D4815-04	<0.1	
V/L-20°F	ASTM D4814-06a	199	20 MAX
在 100°F 下的蒸汽 (psi)	ASTM D5191-07 – EPA	2.94	7.8-15 MAX ¹
可驾驶指标 (°F)	ASTM D4814-07b	1749	1200-1250 MAX ¹
蒸馏	ASTM D86-07b		
	IBP	117.6°F (47.5°C)	
	10%	207.1°F (97.3°C)	50-70°C MAX ¹
	30%	270.3°F (132.4°C)	
	50%	324.8°F (162.7°C)	66-77°C ⇒ 110-121°C (MIN ⇒ MAX) ¹
	70%	394.8°F (201.6°C)	
	90%	463.6°F (239.8°C)	185-190°C MAX ¹
	95%	489.2°F (254.0°C)	
	终点	500.0°F (260.0°C)	225°C MAX
	回收	95.5%	
	残留物	2.3 体积%	2 vol % MAX
	损失	2.2%	

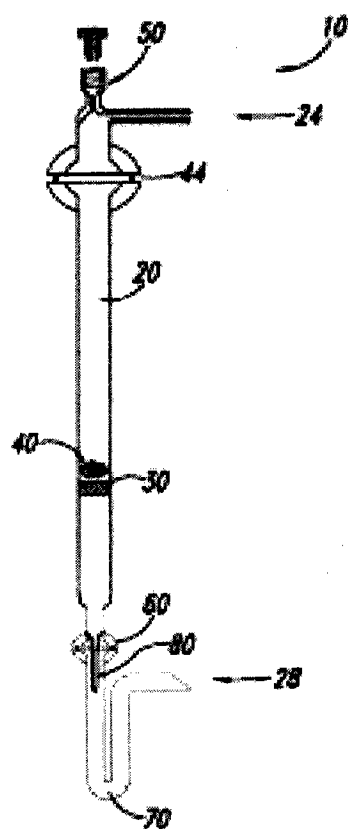


图 1A

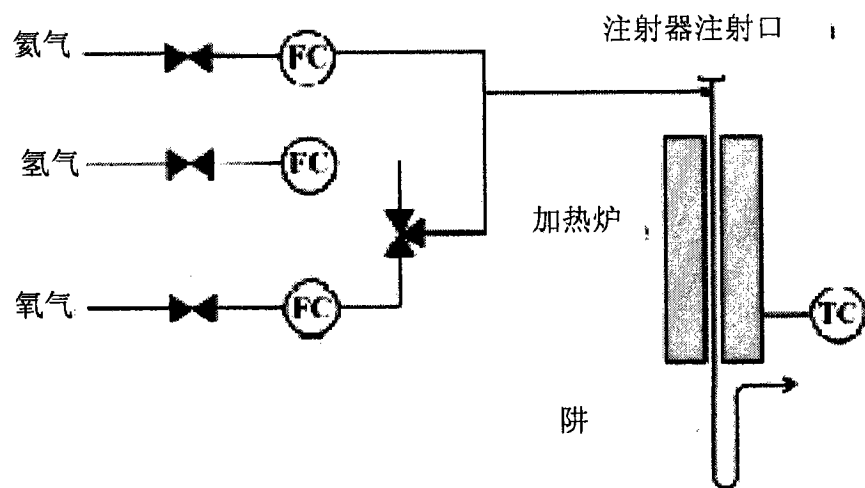


图 1B

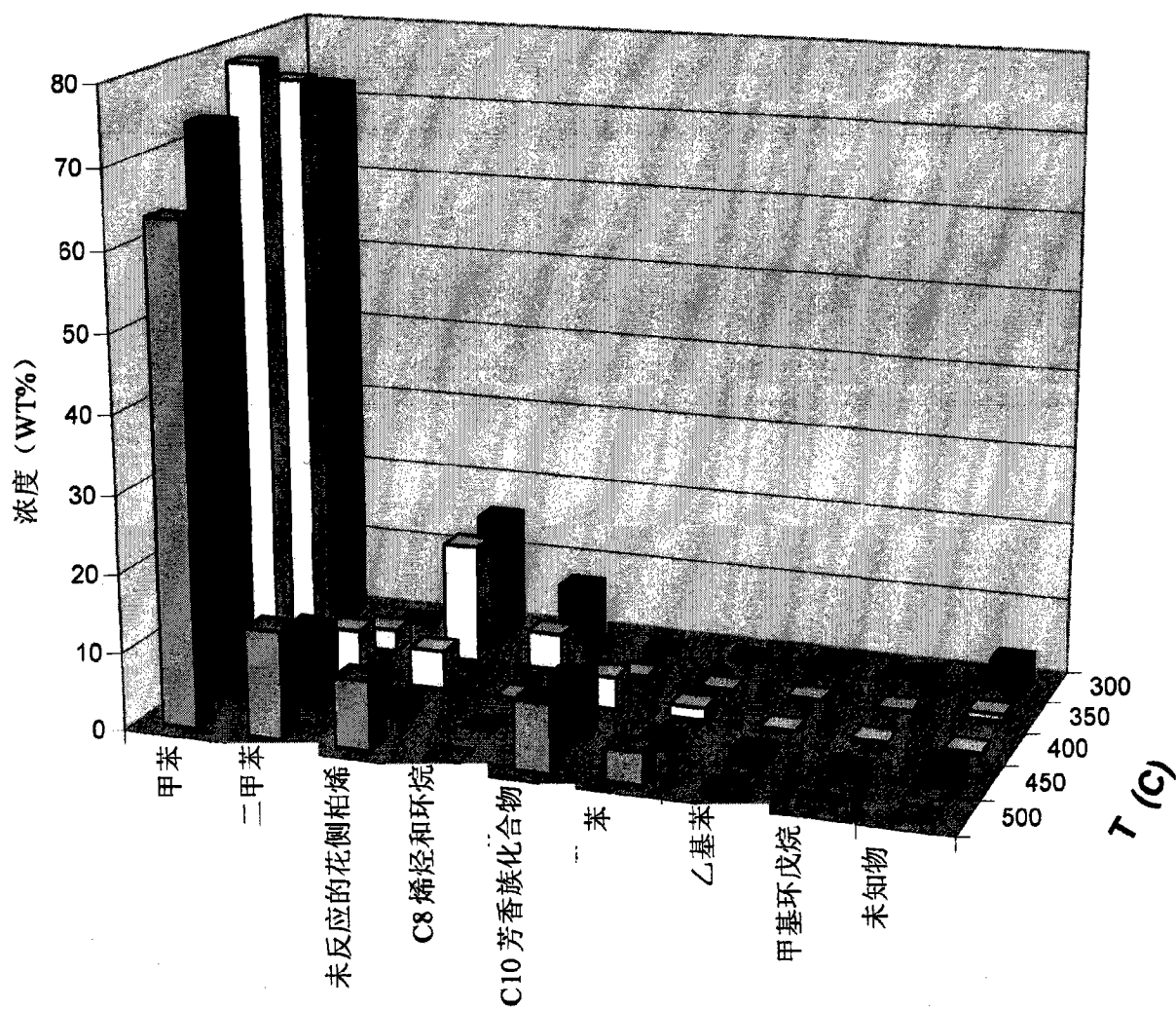


图 1C

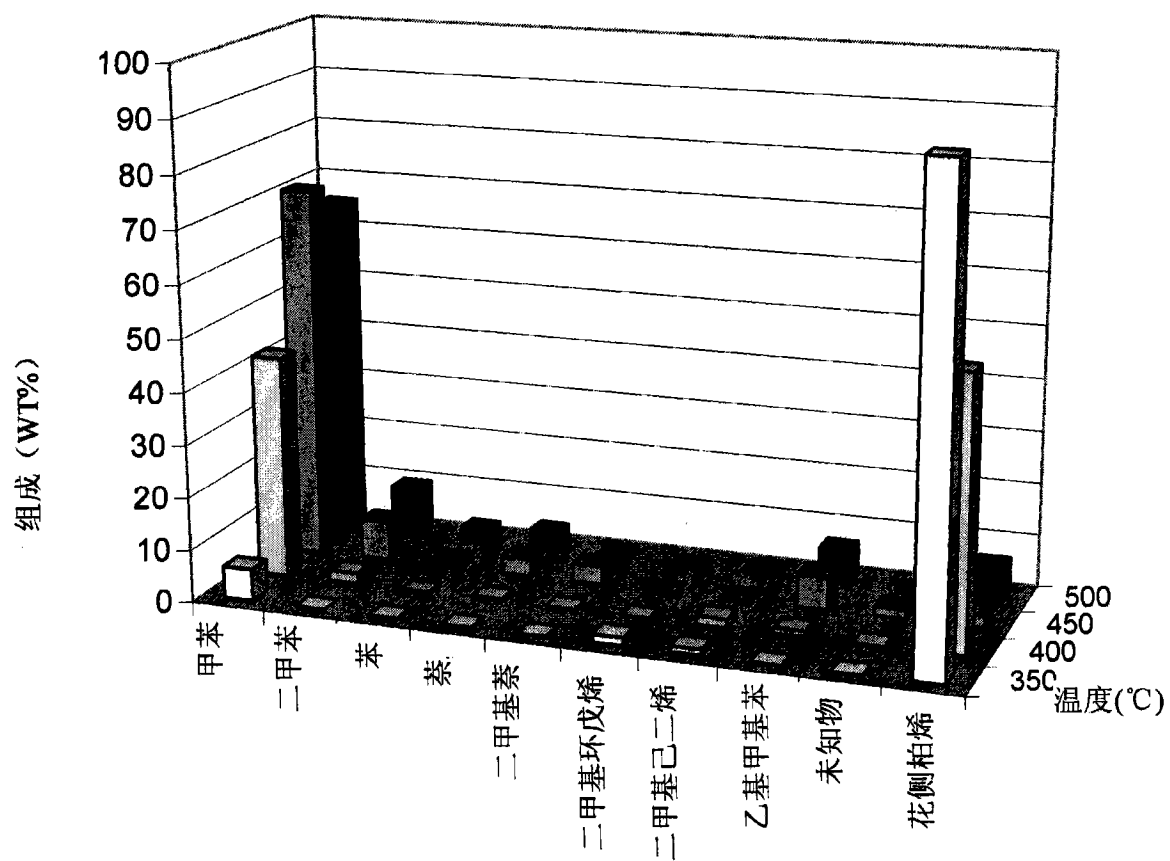


图 2A

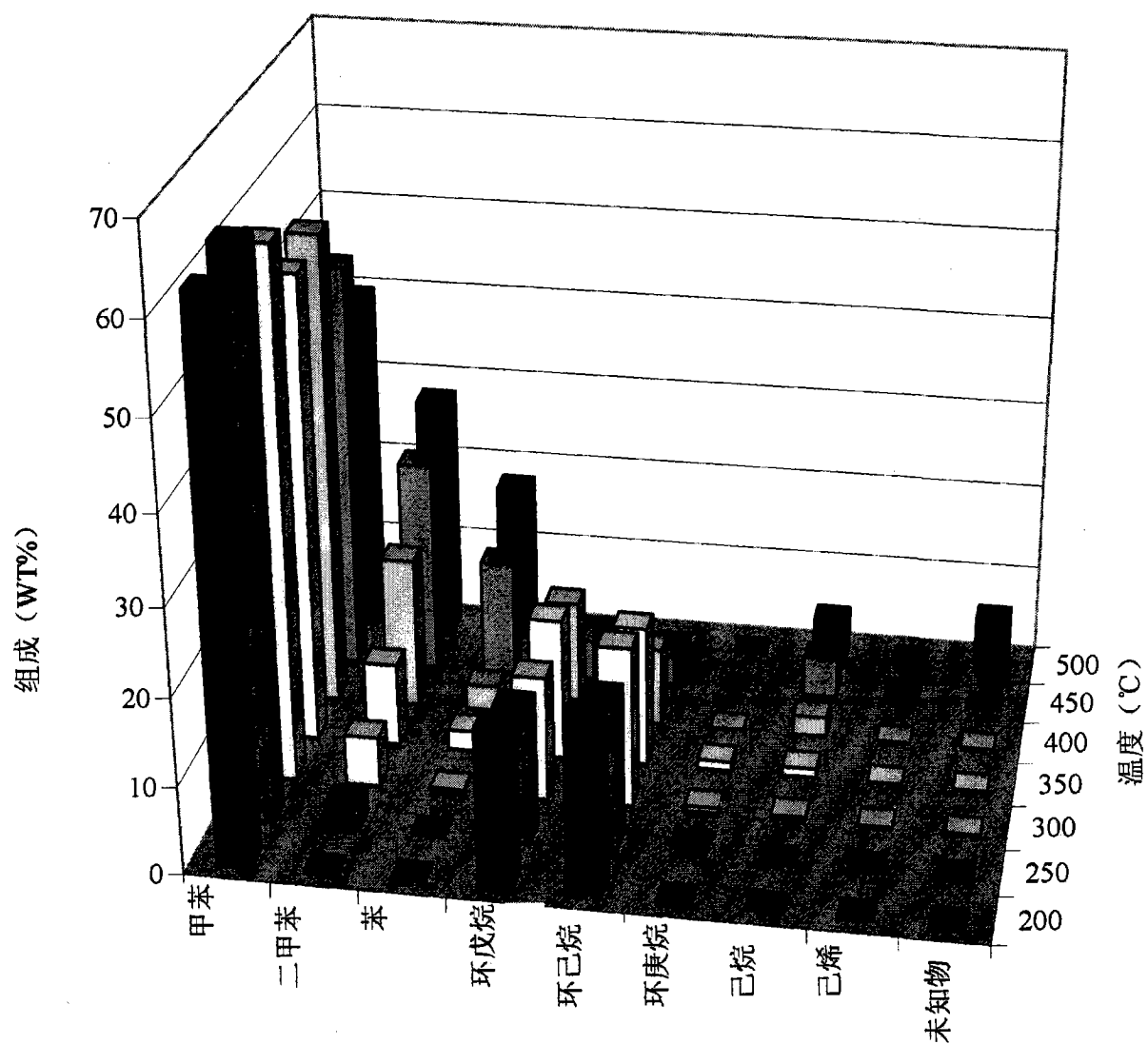


图 2B

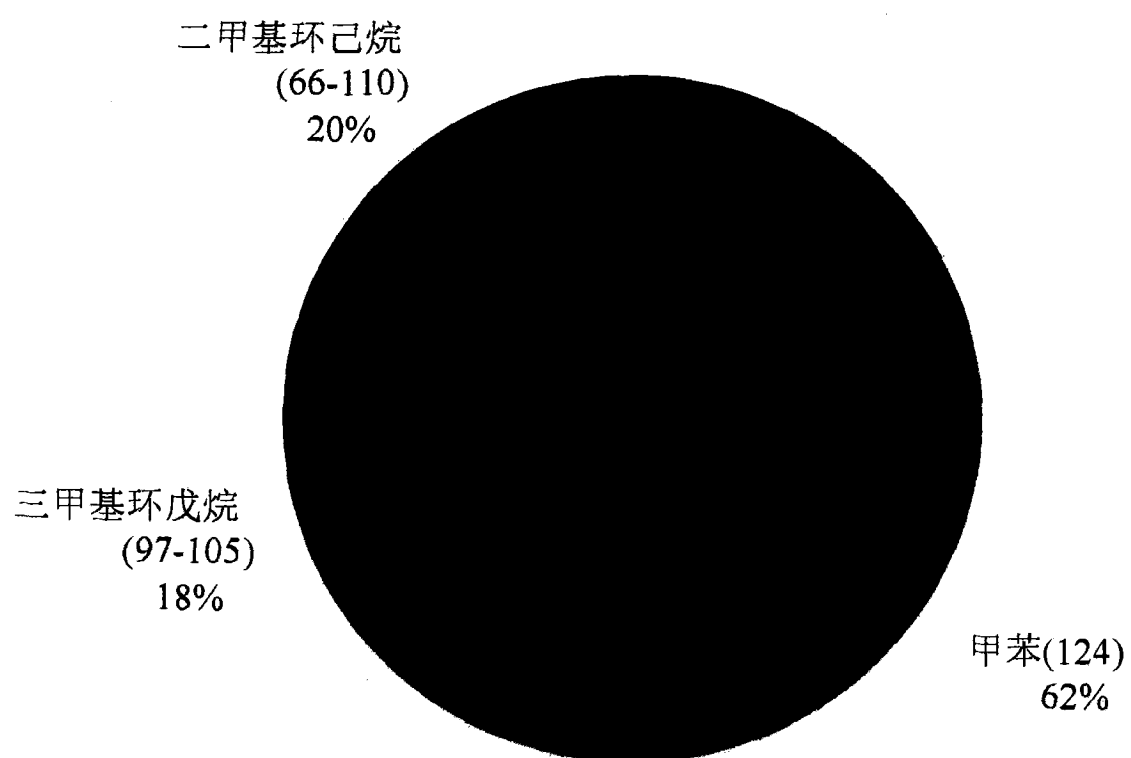


图 2C

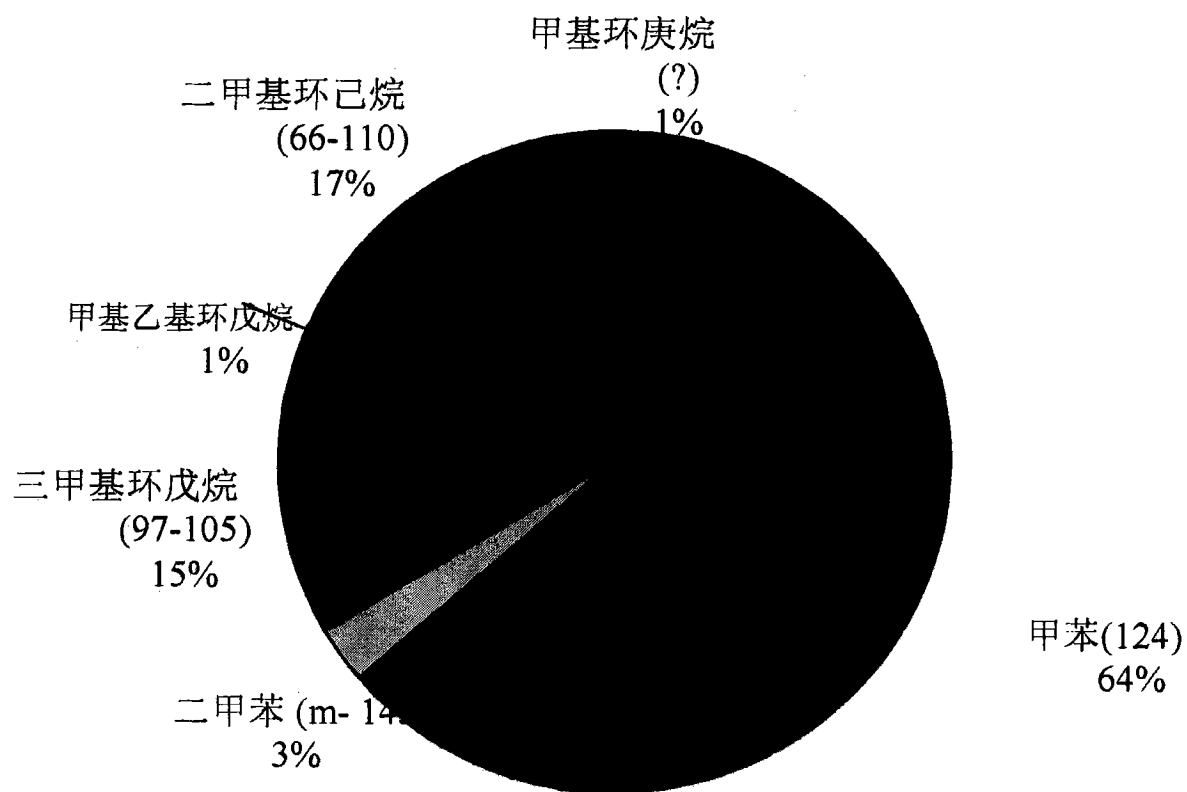


图 2D

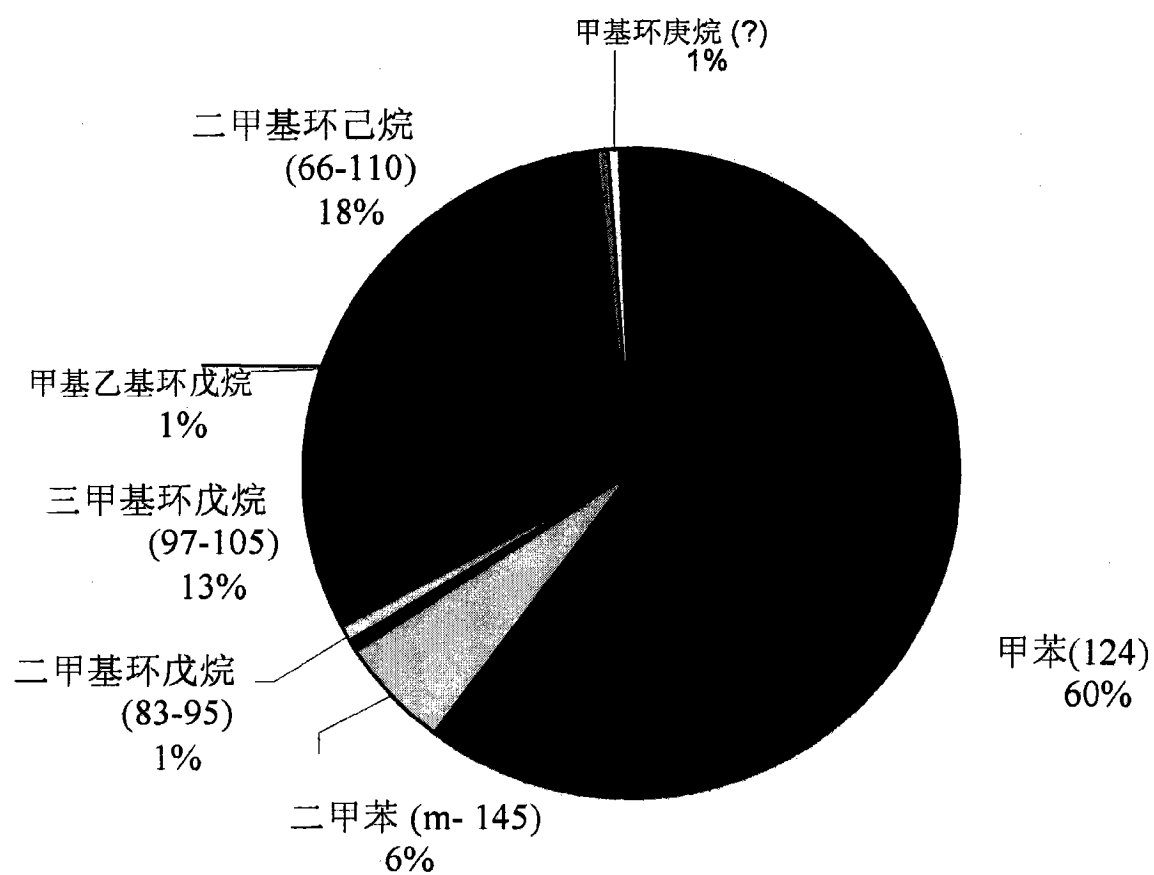


图 2E

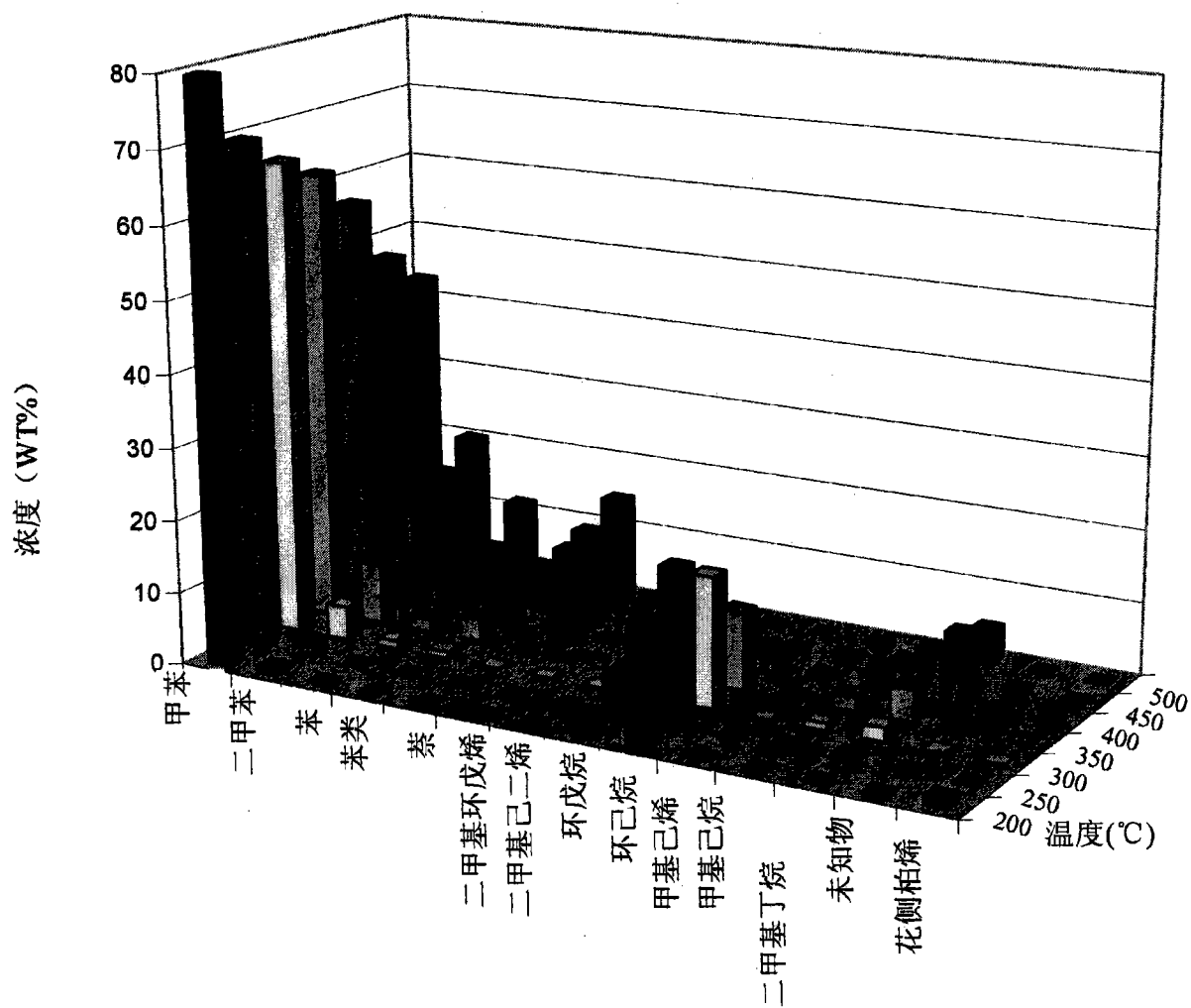


图 3A

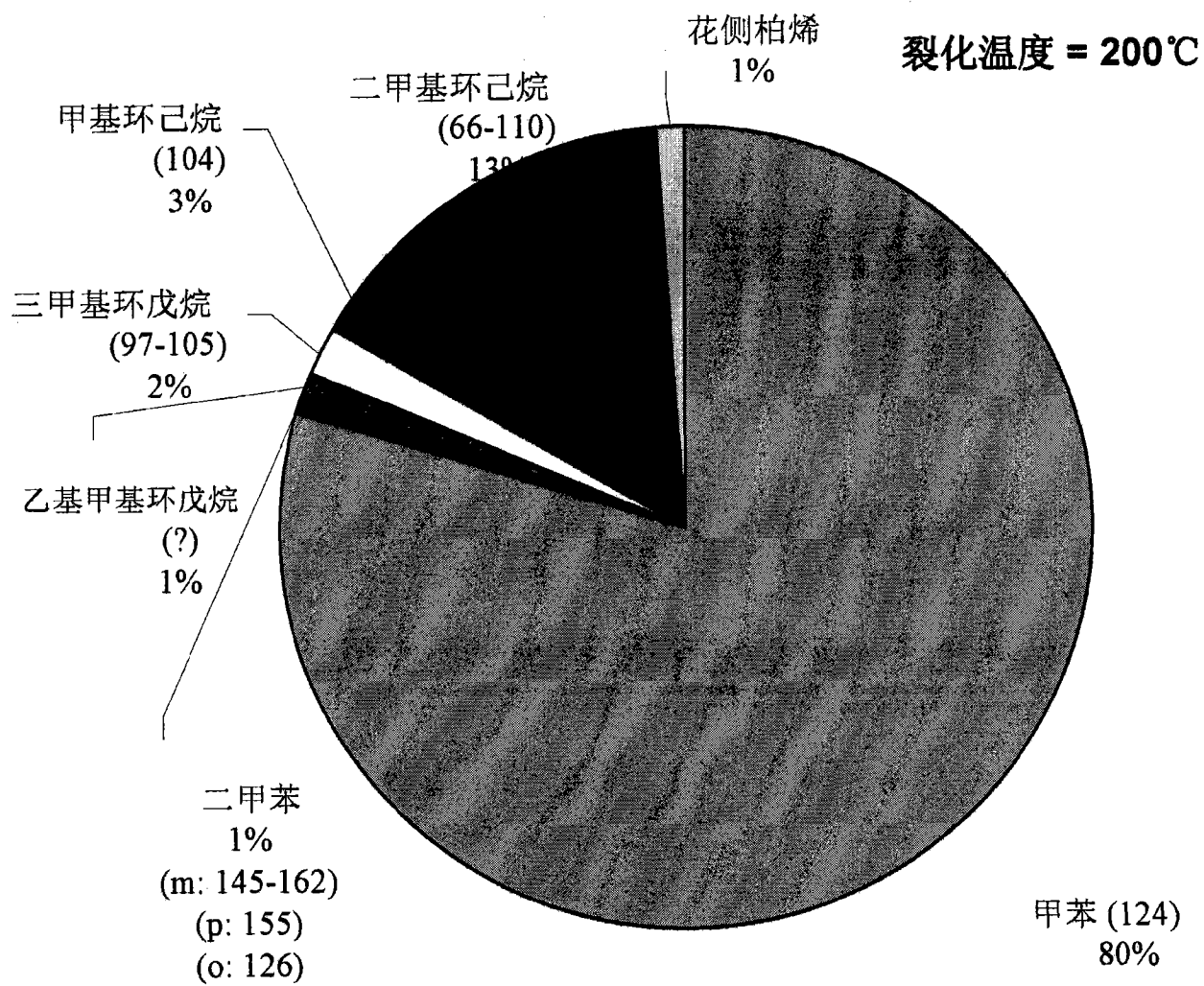


图 3B

裂化温度= 250℃

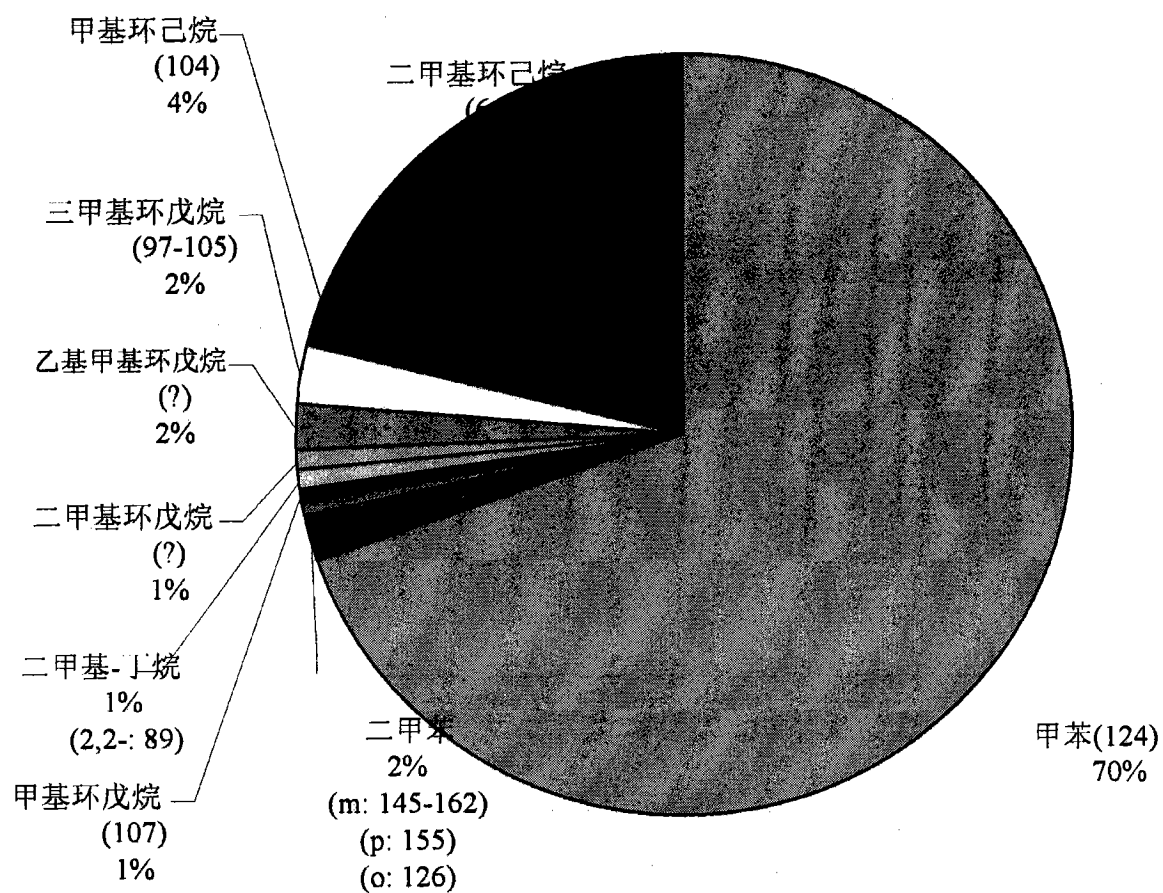


图 3C

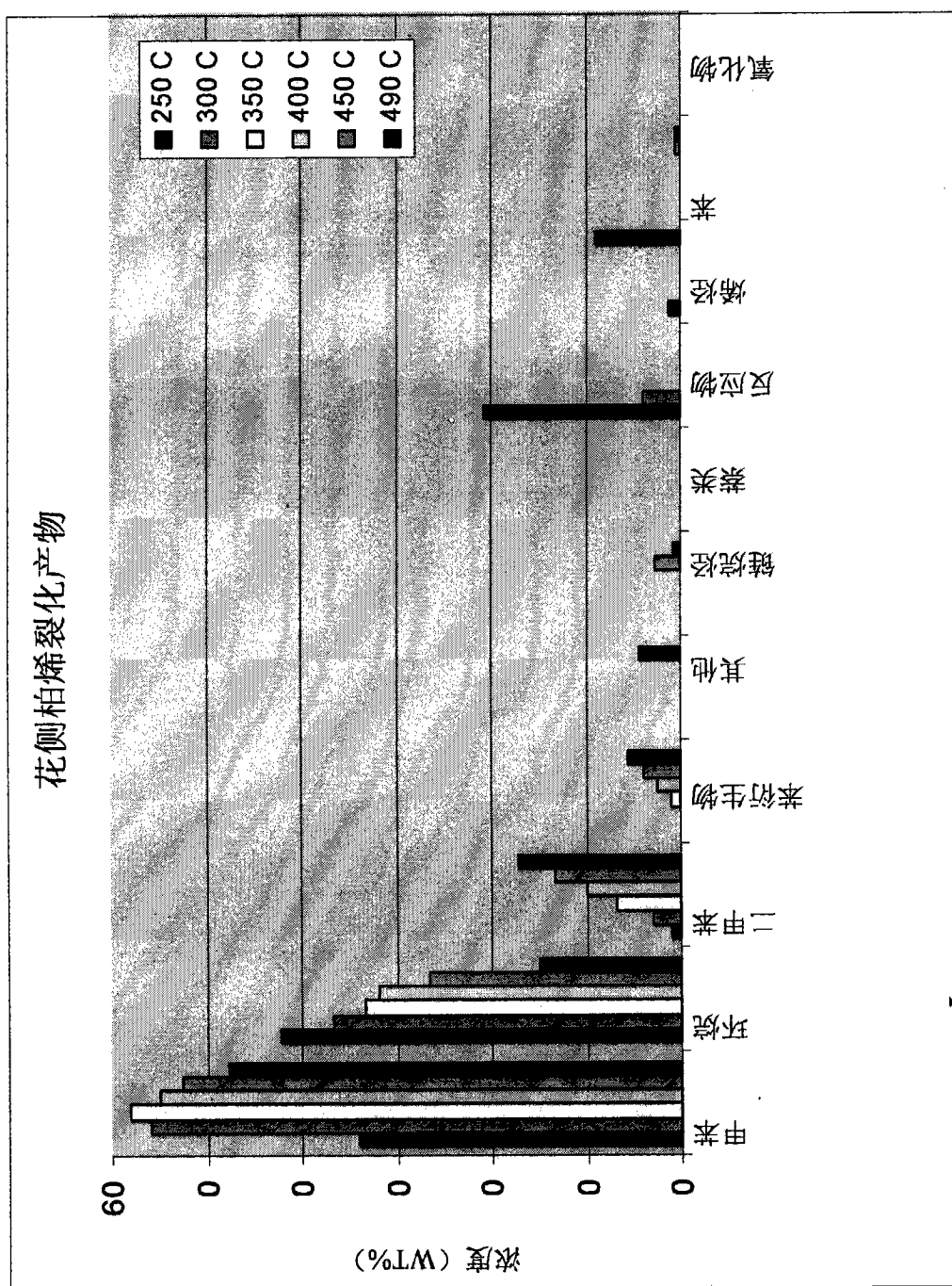


图 4

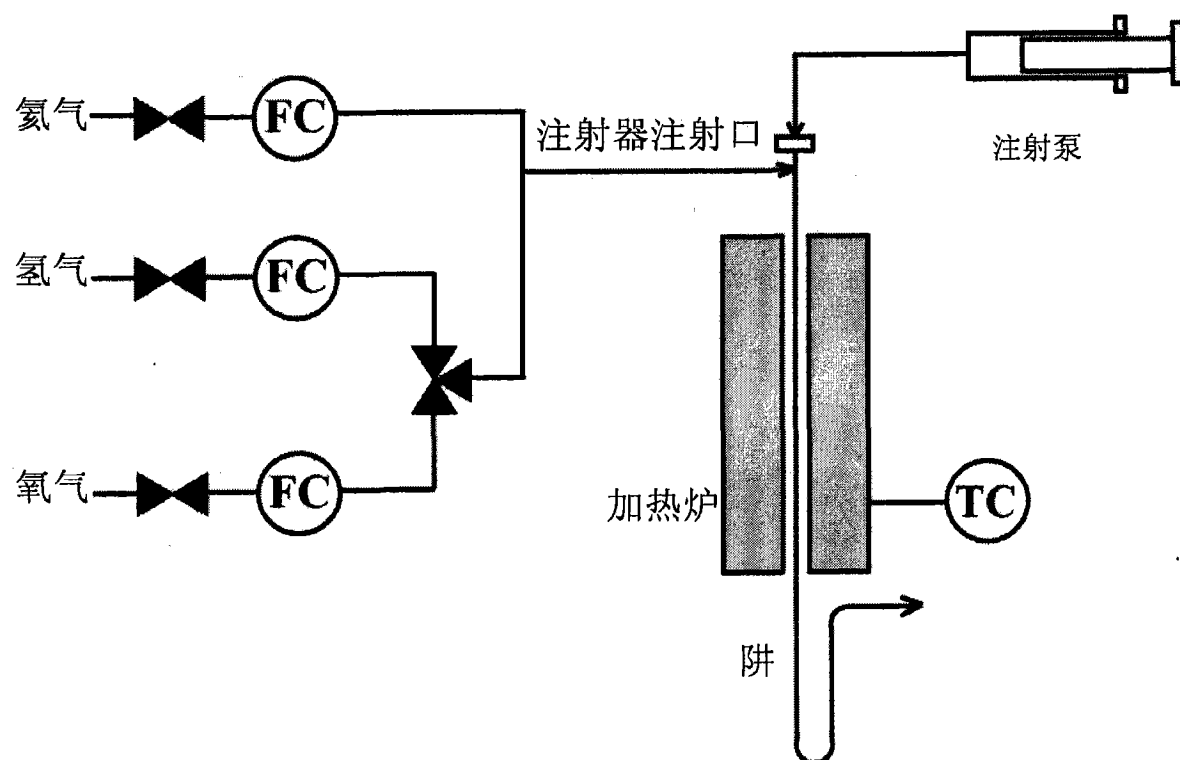


图 5A

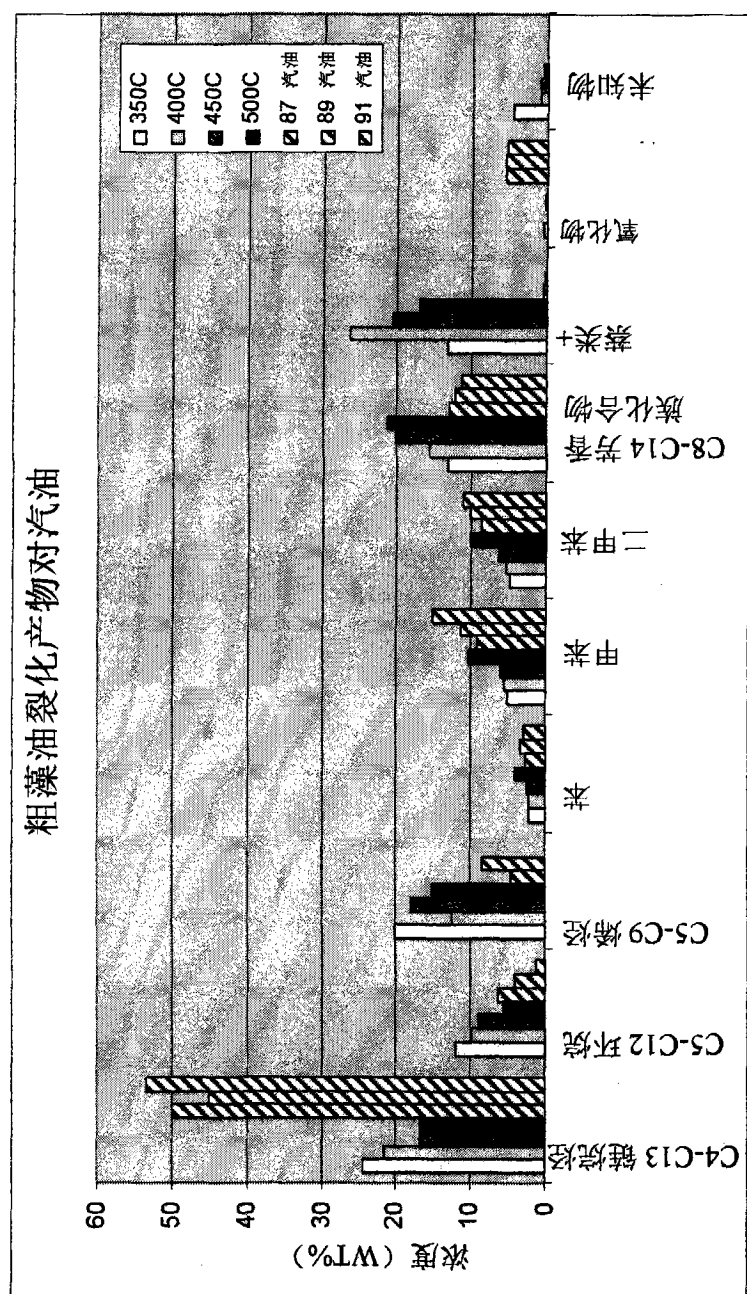


图 5B

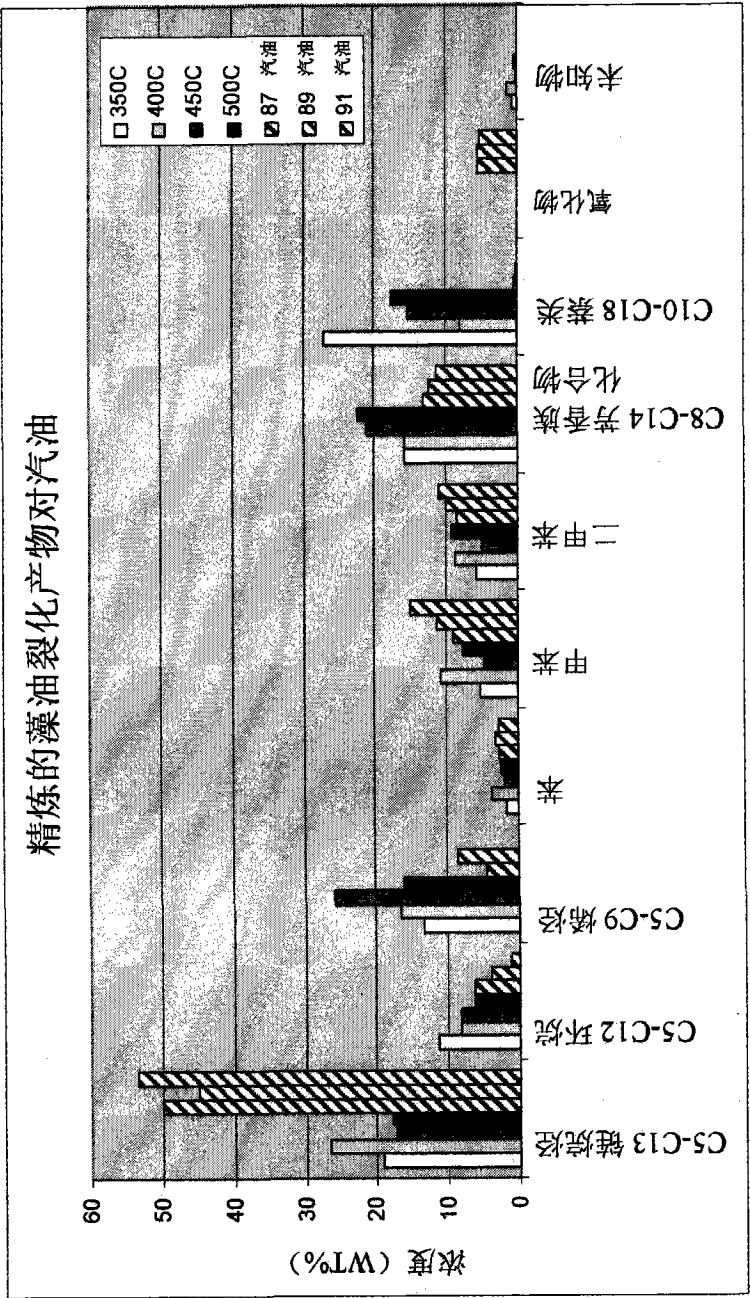


图 5C

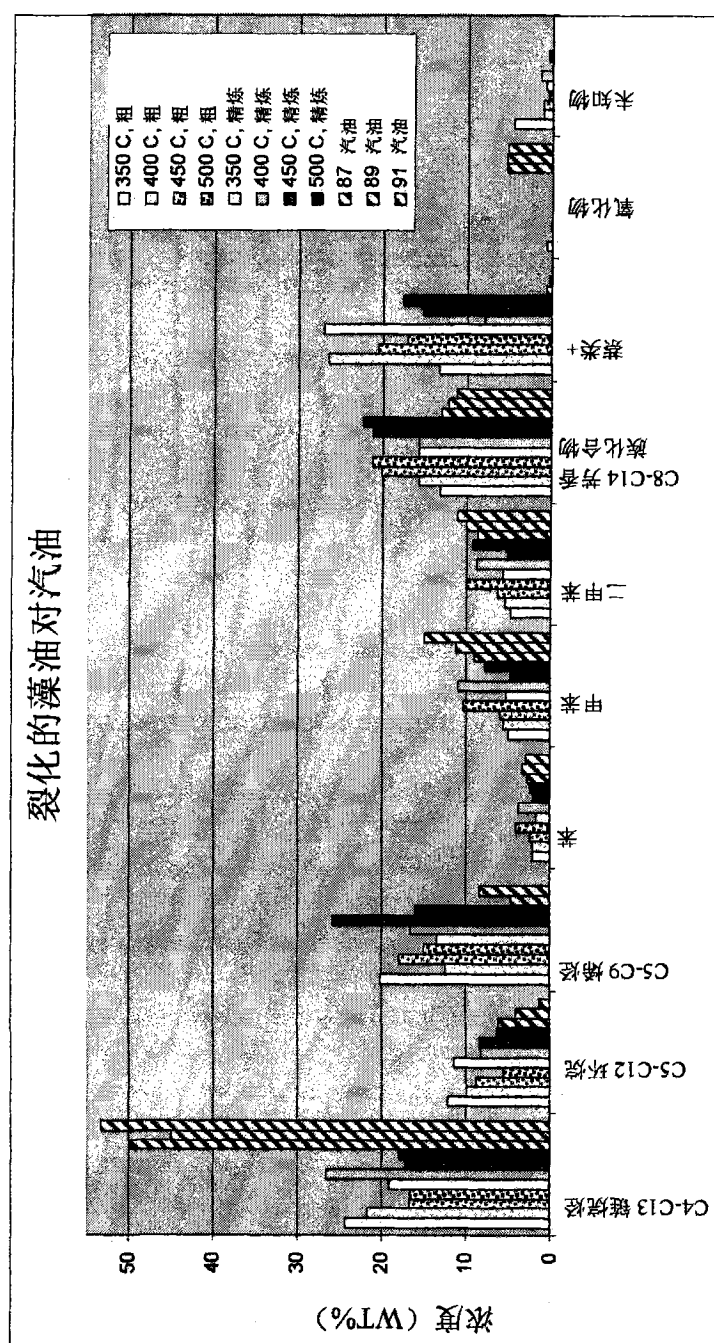


图 5D

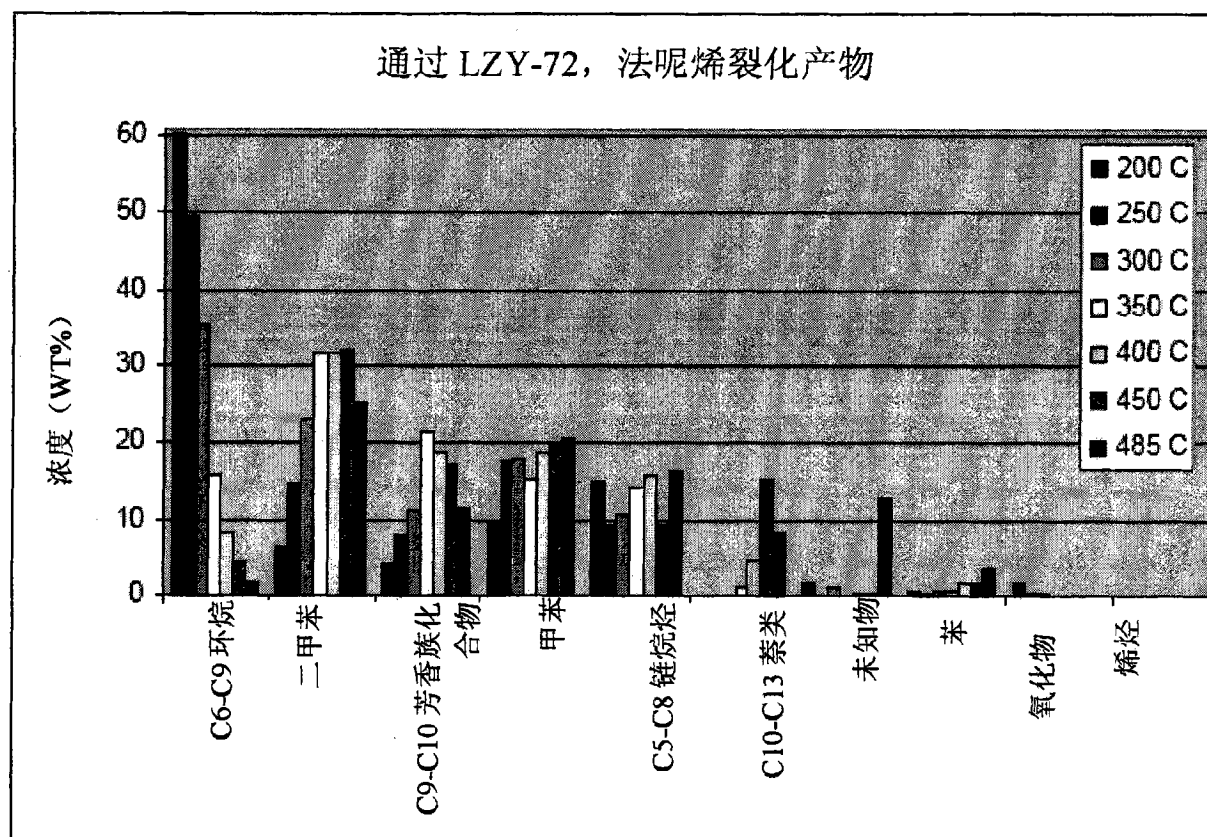


图 6A

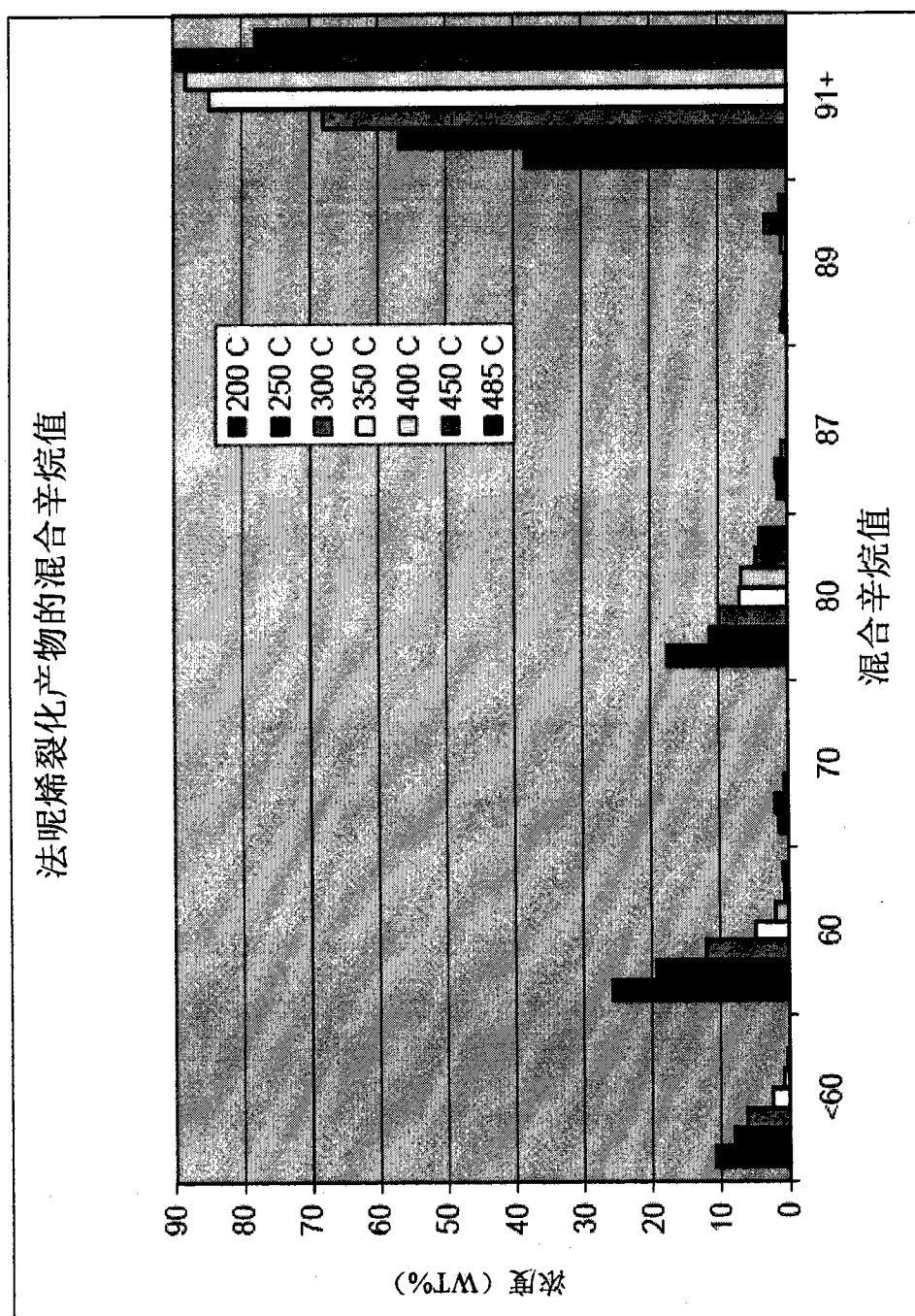


图 6B

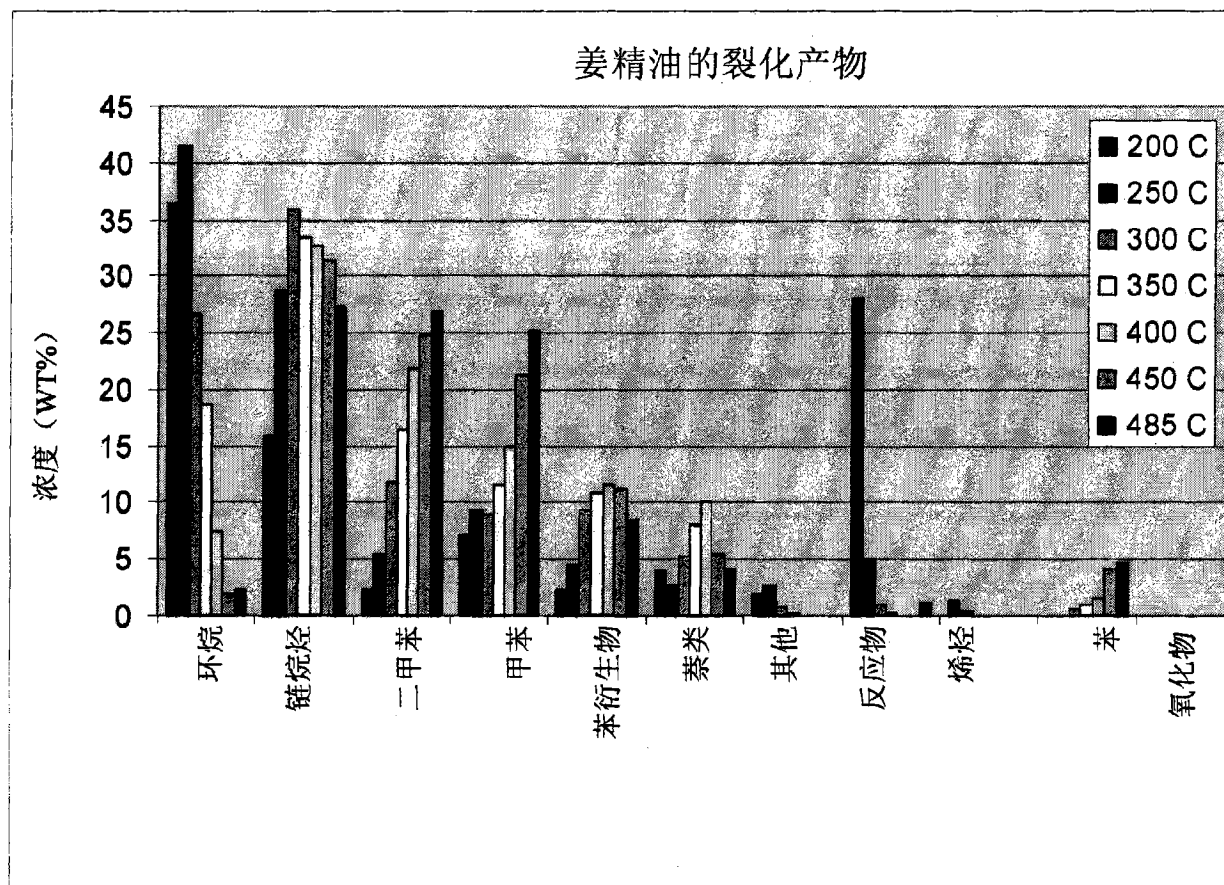


图 7

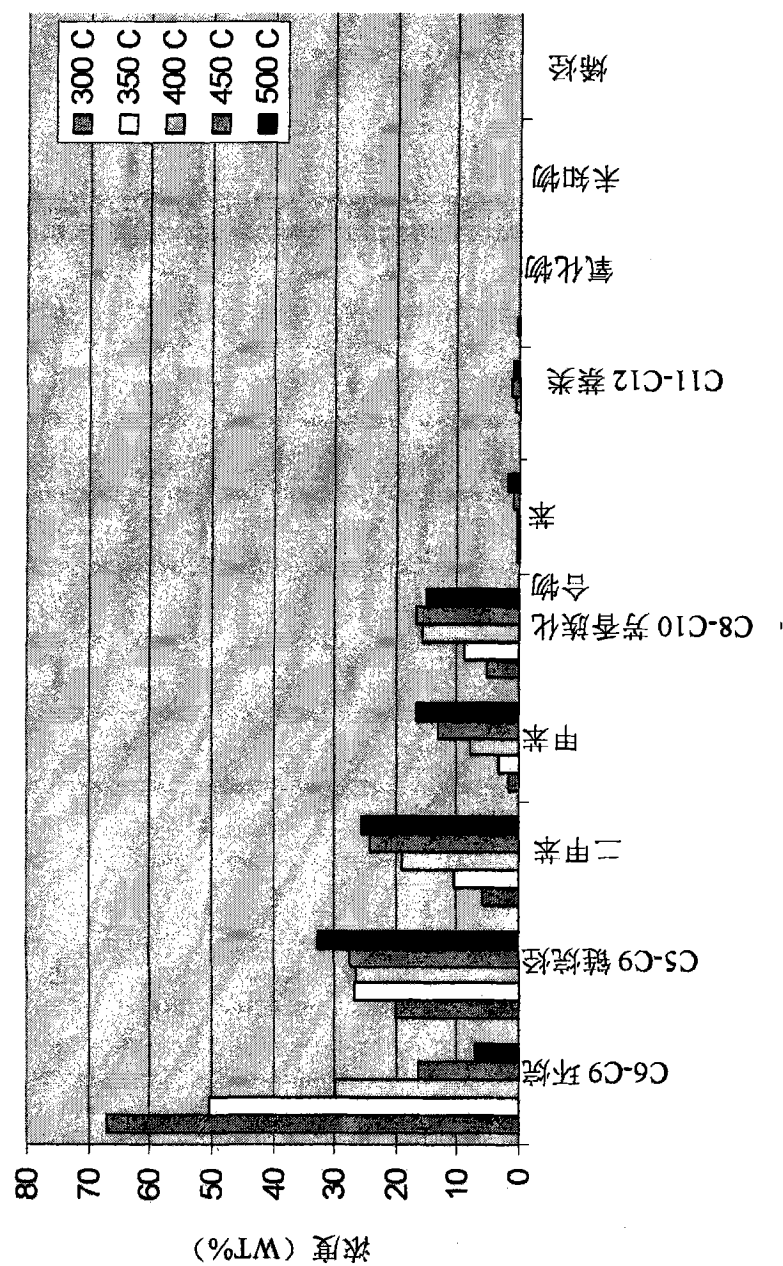


图 8A

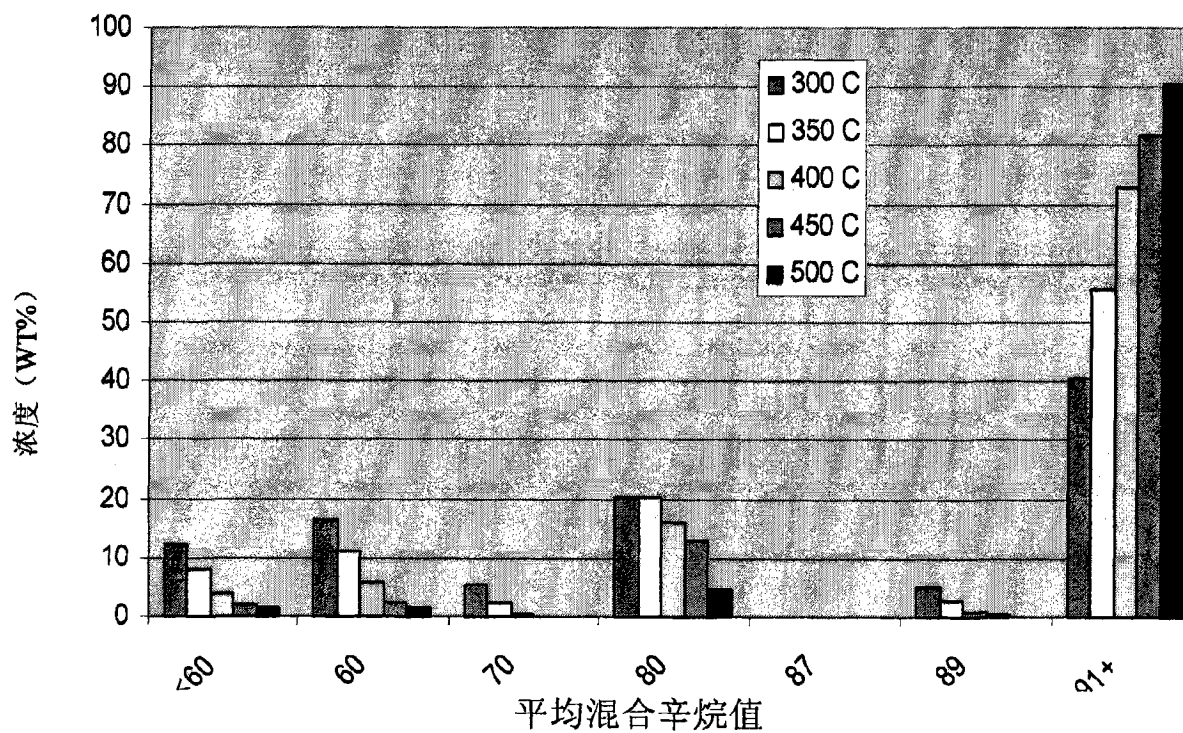


图 8B

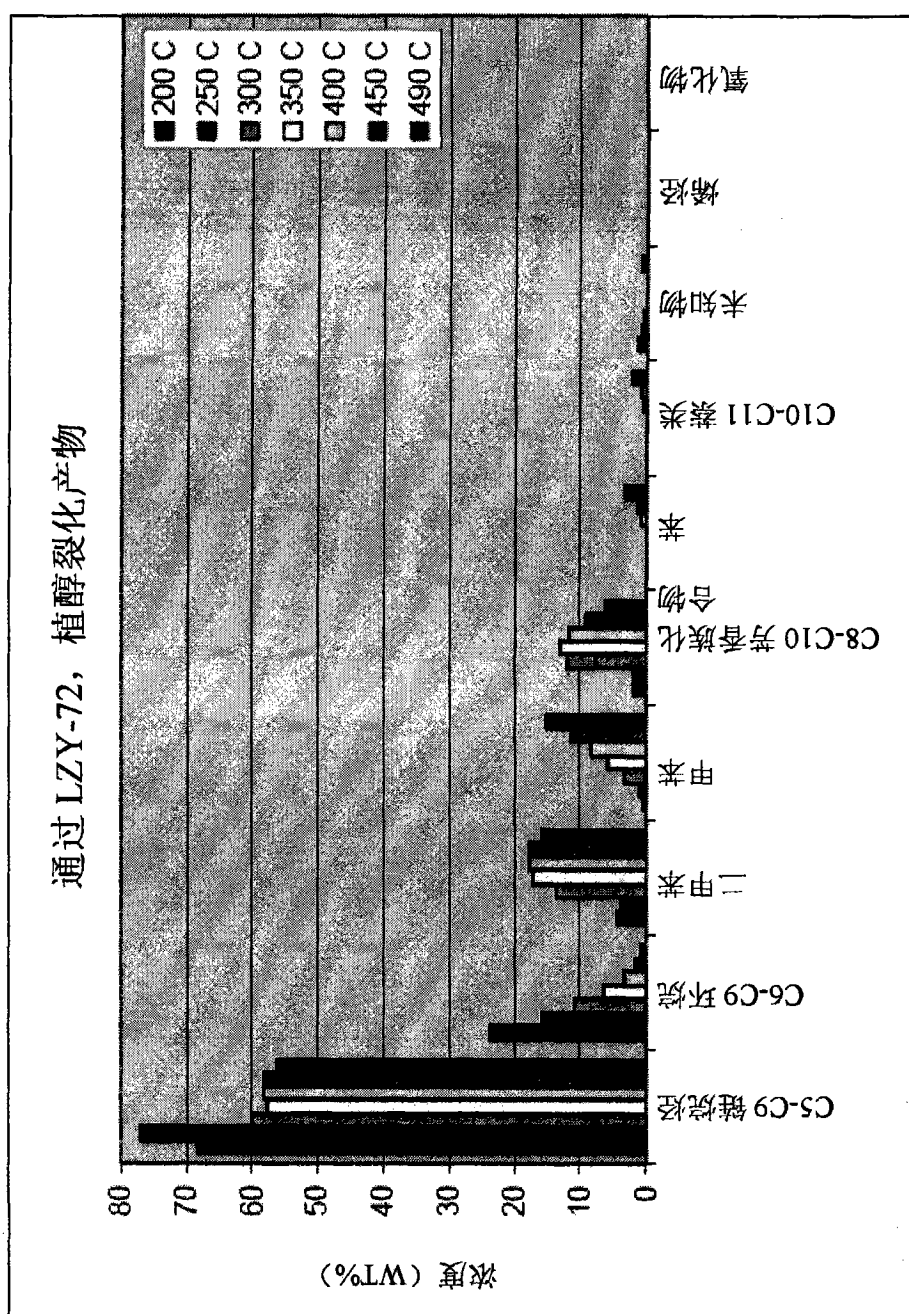


图 9A

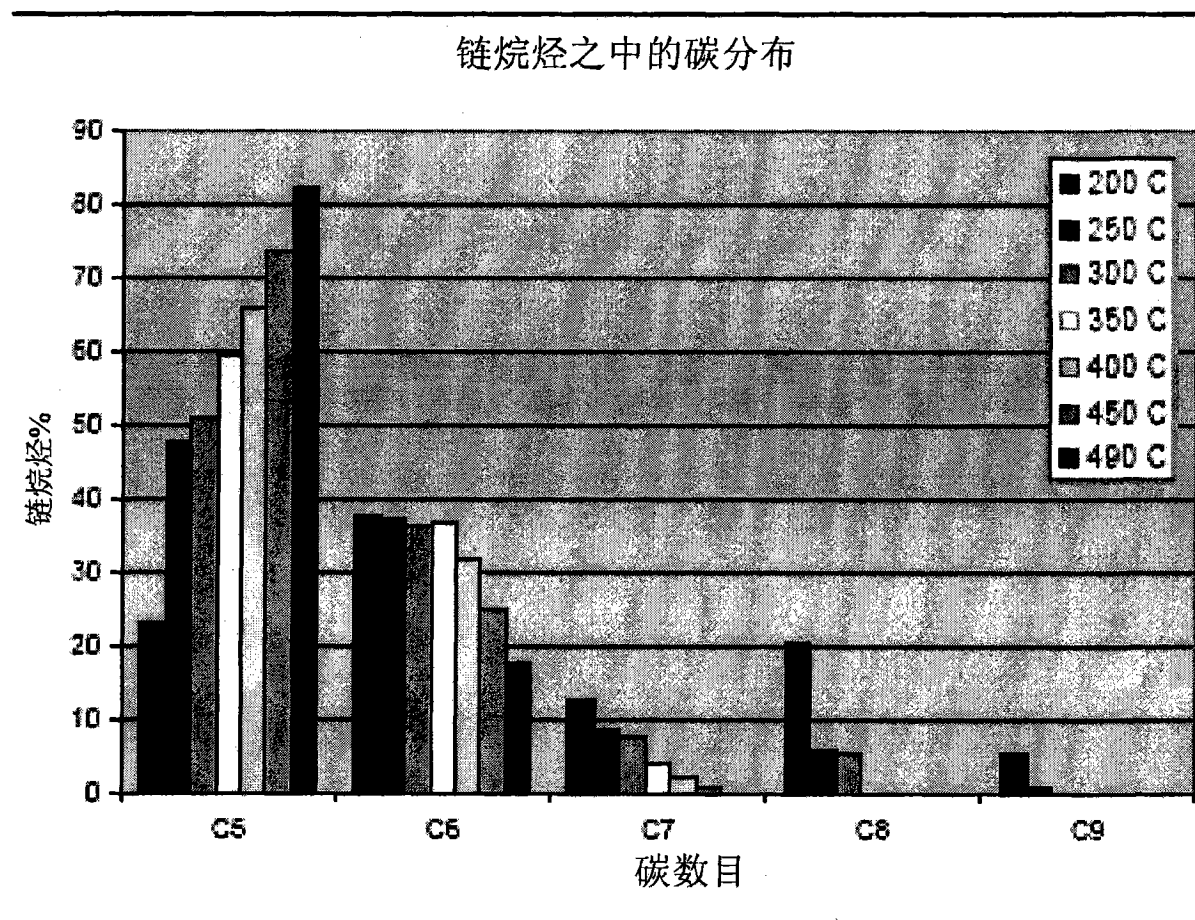


图 9B

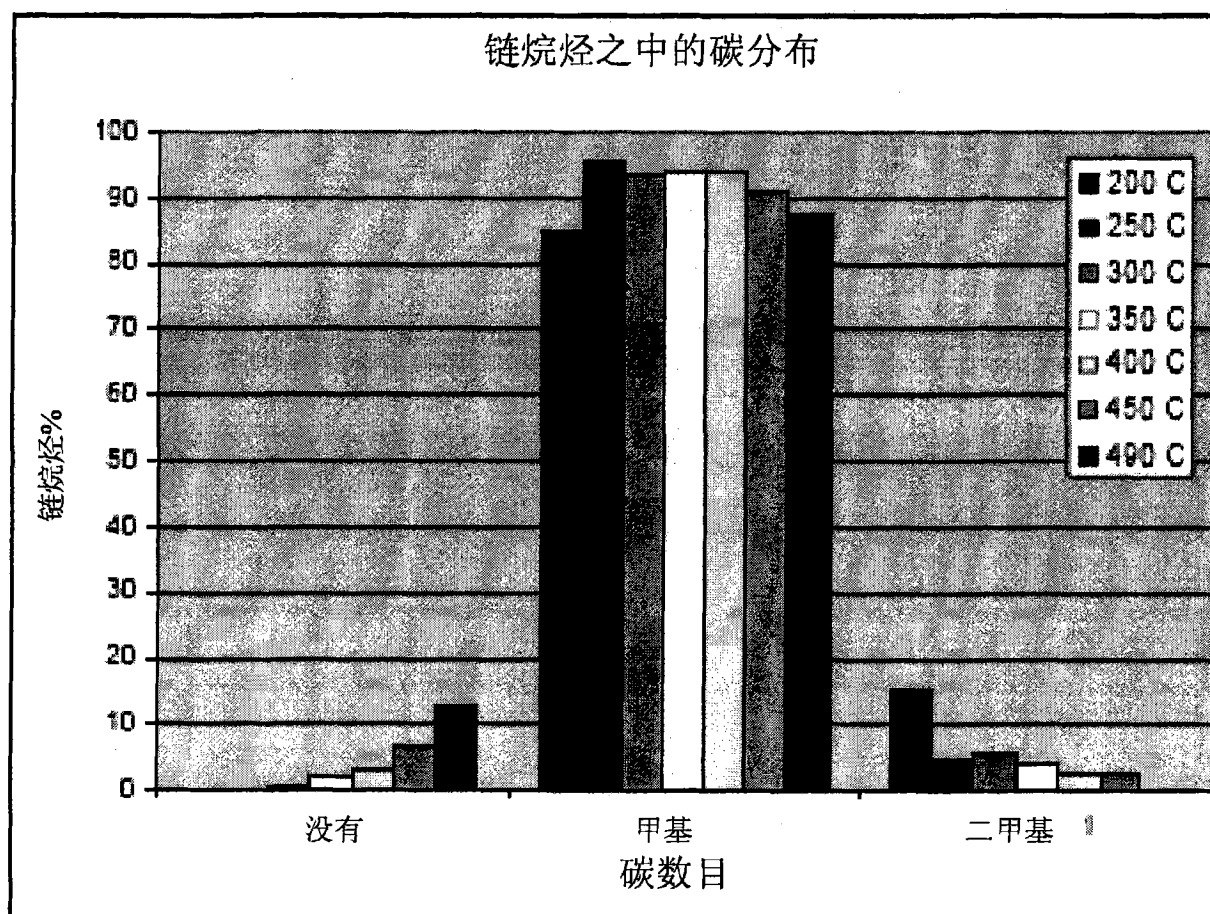


图 9C

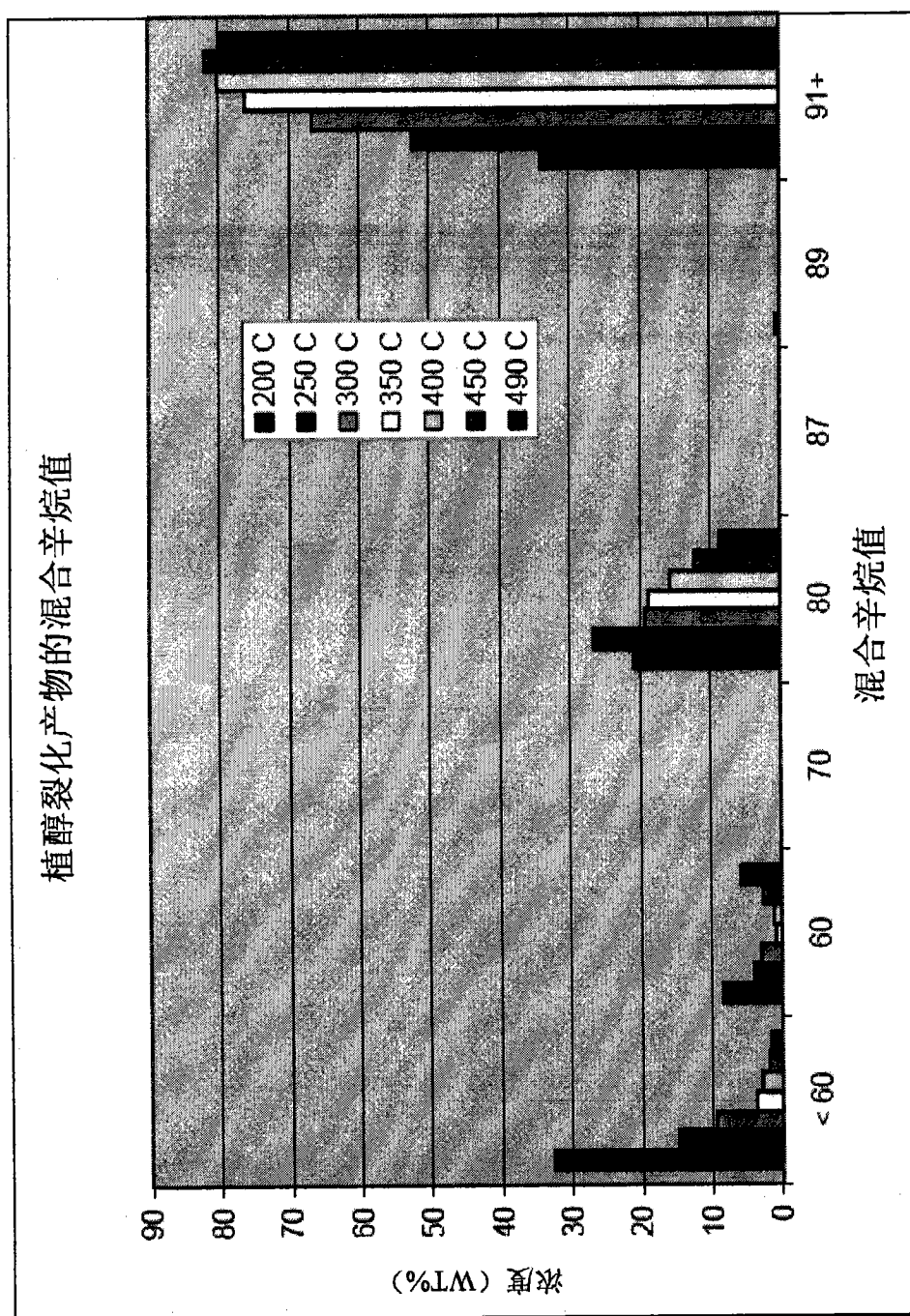


图 9D

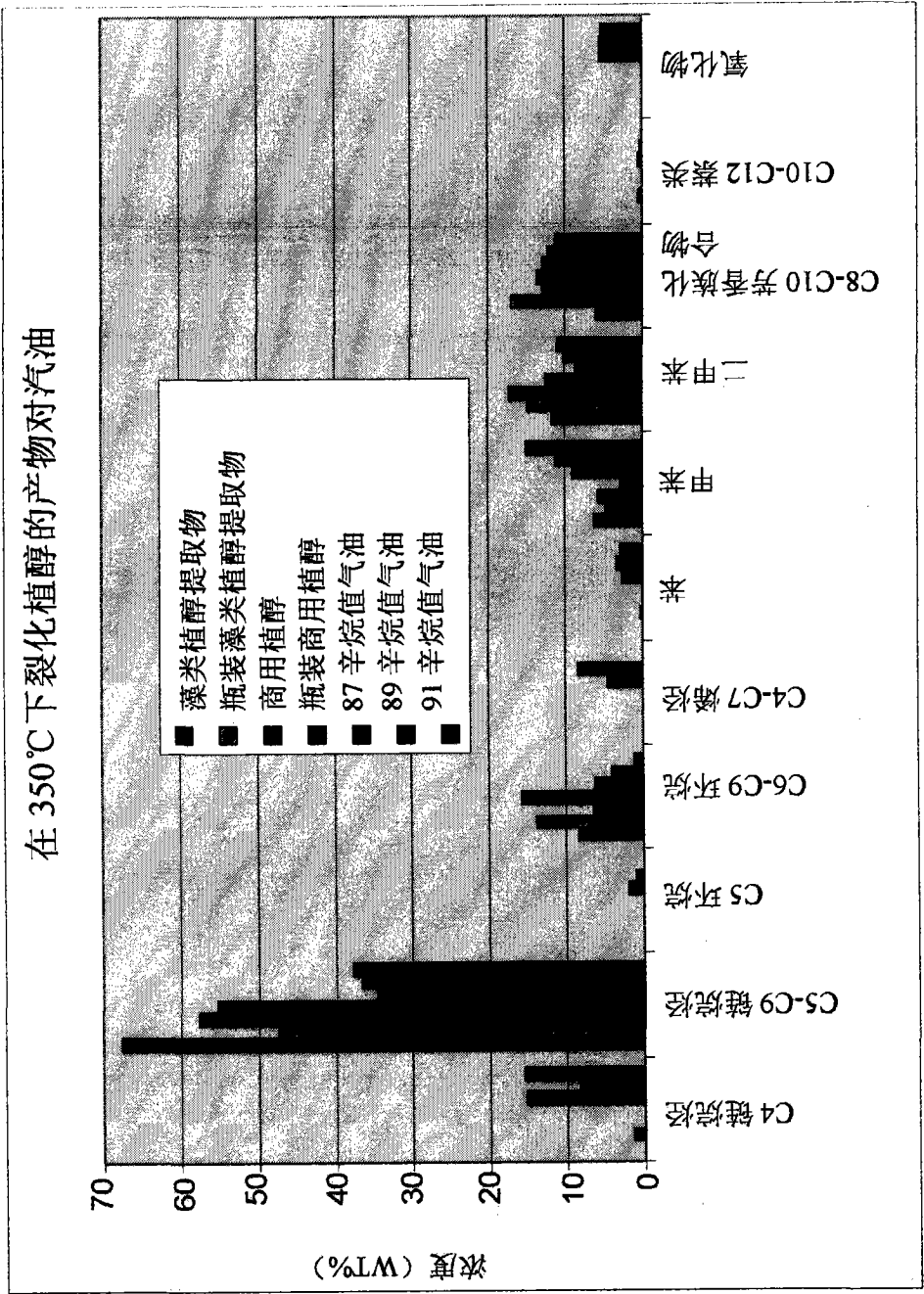


图 10A

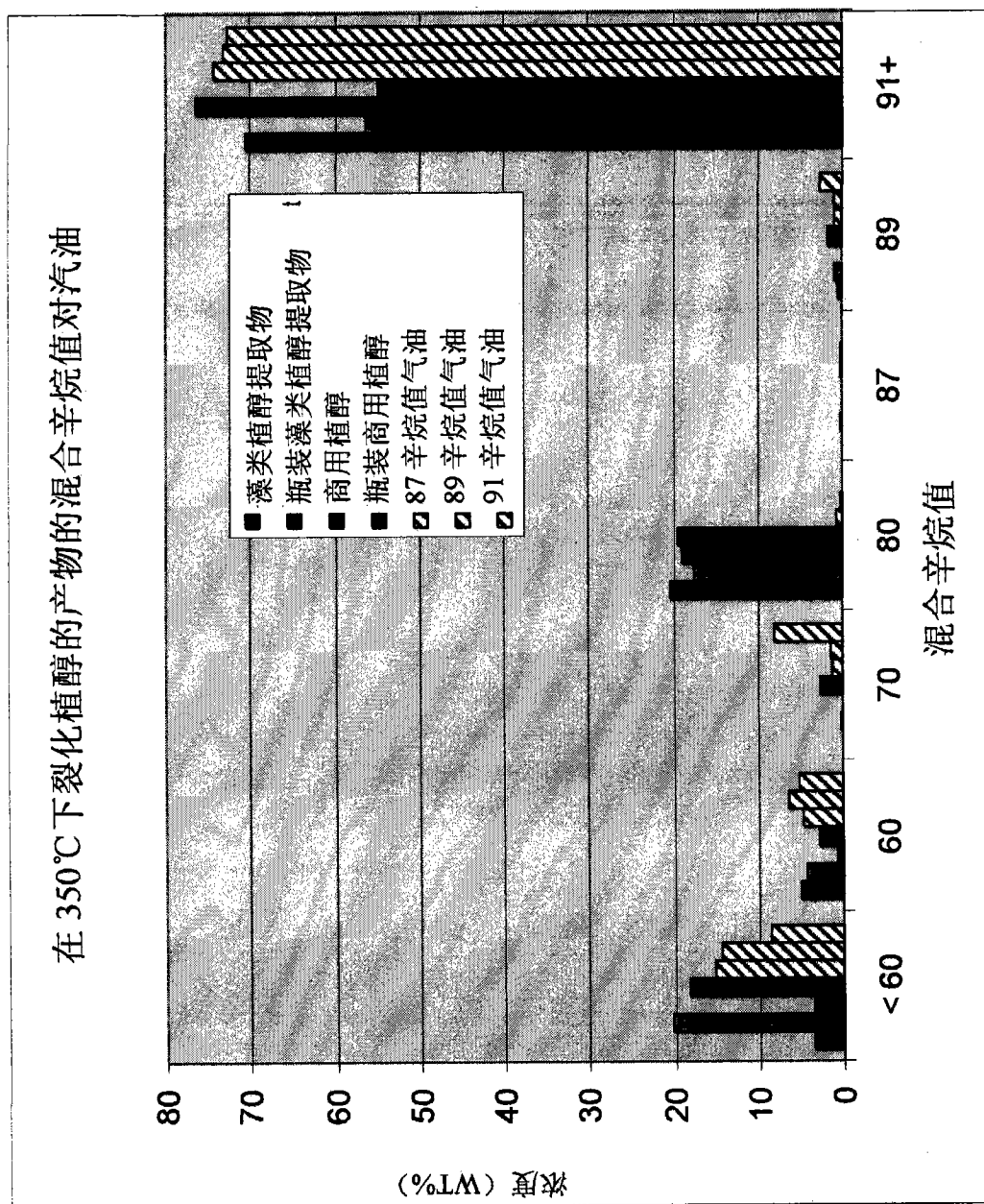


图 10B

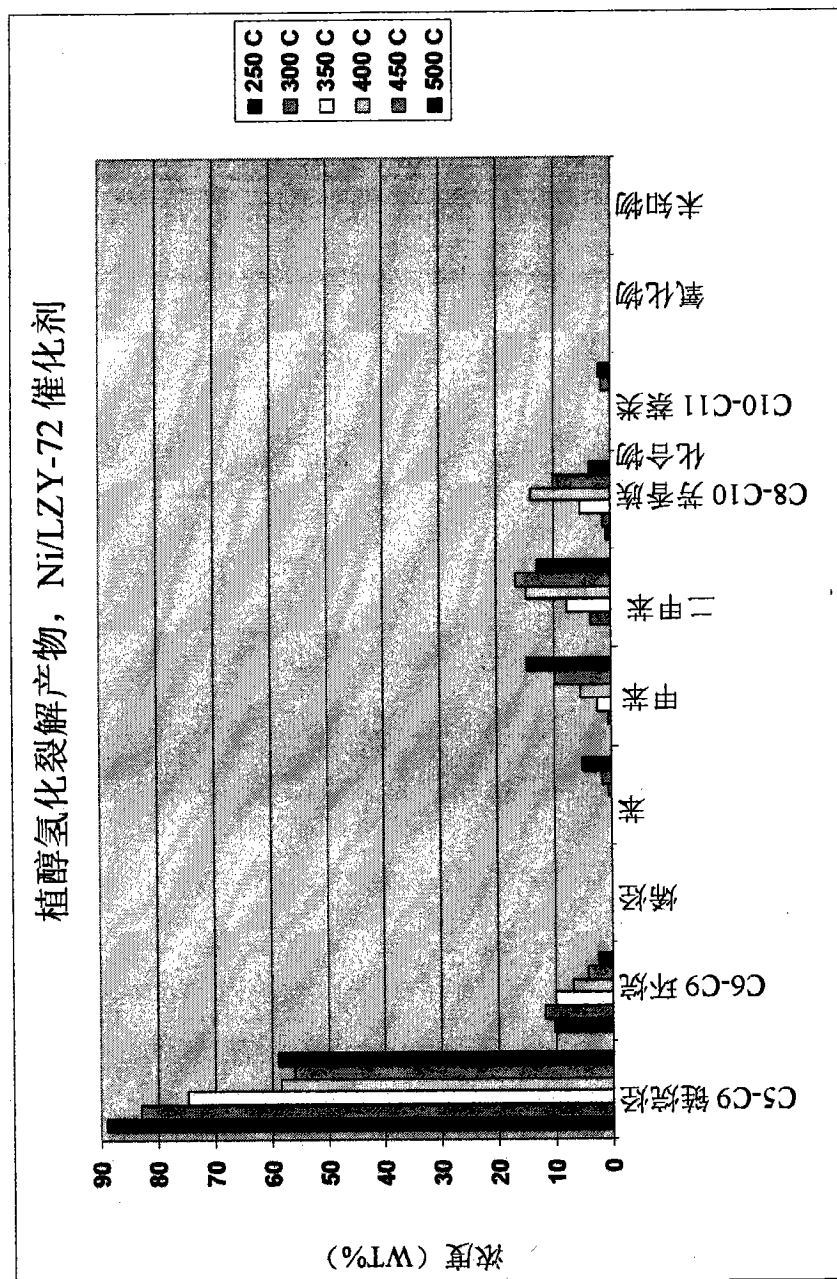


图 11A

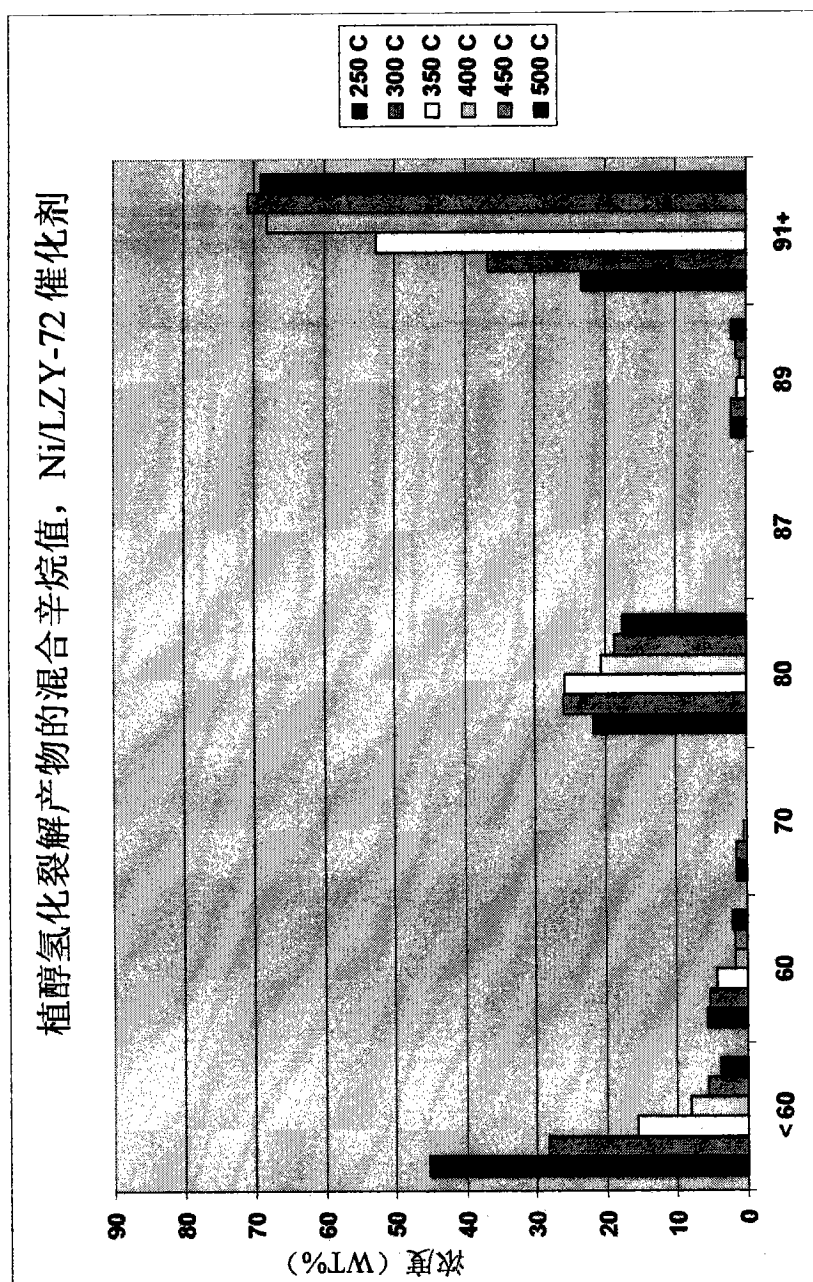


图 11B

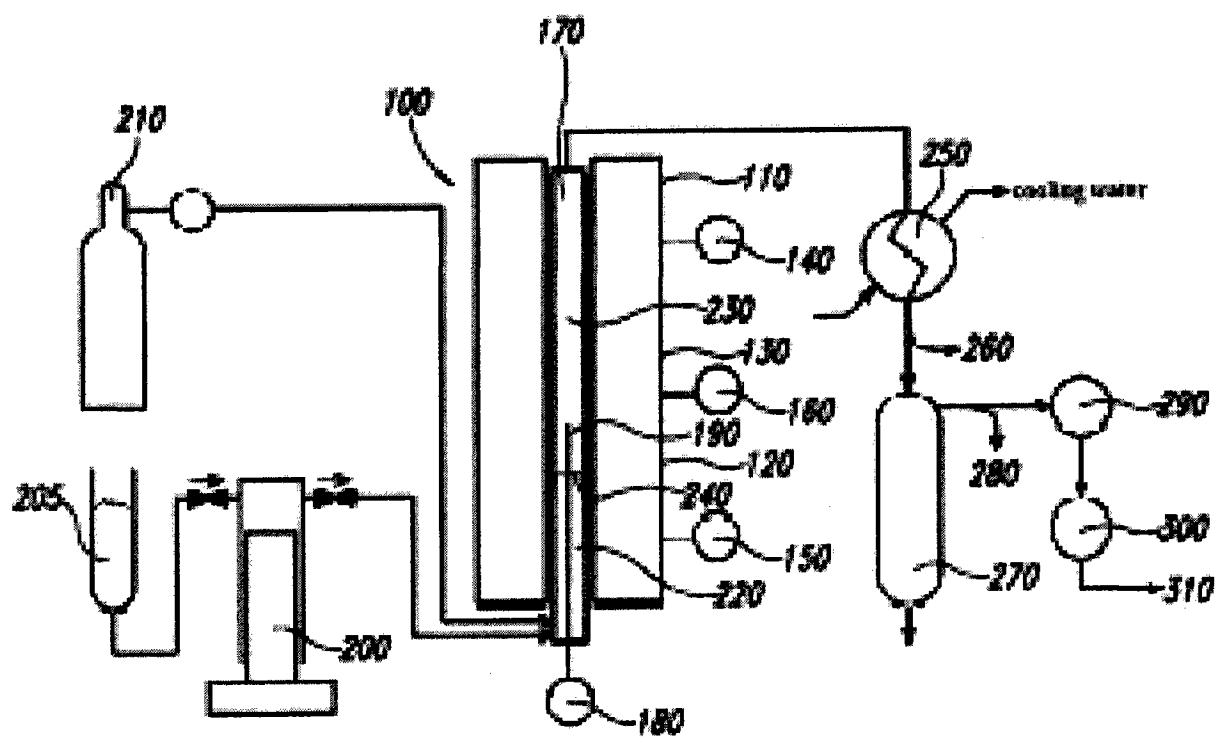


图 12A

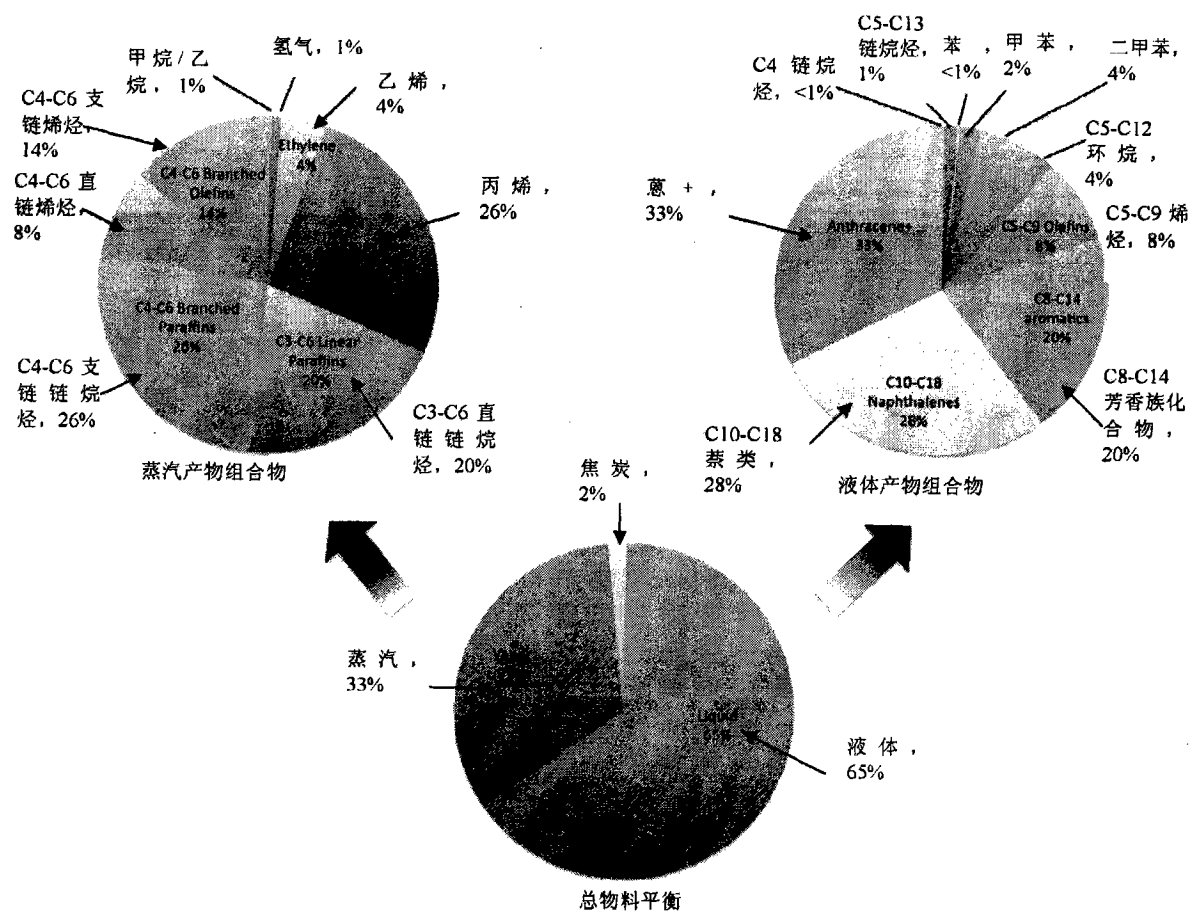


图 12B