



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112368392 A

(43) 申请公布日 2021.02.12

(21) 申请号 201980040872.1

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

(22) 申请日 2019.06.14

代理人 柴云峰 张莹

(30) 优先权数据

62/686,807 2018.06.19 US

(51) Int.Cl.

C12P 7/04 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/037157 2019.06.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/245895 EN 2019.12.26

(71) 申请人 英威达纺织(英国)有限公司

地址 英国曼彻斯特

(72) 发明人 加里·史密斯 保罗·S·珀尔曼

格雷戈里·S·柯比

权利要求书3页 说明书14页

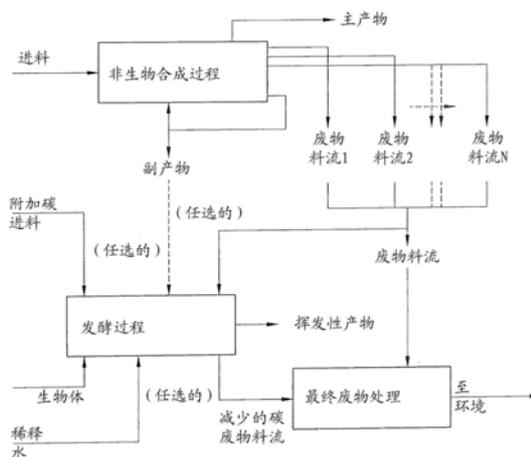
序列表11页 附图5页

(54) 发明名称

用于由非生物合成料流合成碳产物的方法

(57) 摘要

本发明提供了使用来自生物合成过程中的非生物合成过程的一种或多种含碳物质的至少一部分来生产至少一种轻沸型挥发性有机产物的方法、系统和组合物。这些方法、系统和组合物可用于减少含碳化学过程废物料流的废物处理负载。



总体工艺概念

1. 一种用于由得自非生物合成过程的废物料流的含碳物质生物合成产物的方法,所述方法包括:

(a) 将所述含碳物质引入生物合成发酵过程;

(b) 向所述生物合成发酵过程添加经基因修饰以生物合成所述产物或相对于相应的野生型生物体的产物的生物合成增加所述产物的生物合成的生物体,其中所述生物体能够利用所述含碳物质中的碳,并且其中所述生物体选自贪铜菌属(Cupriavidus)或罗尔斯通氏菌属(Ralstonia)的物种或具有与其类似的特性的生物体;

(c) 在适用于所述产物的生物合成的条件下培养所述生物体;以及

(d) 生物合成所述产物,其中所述产物为轻沸型挥发性有机化合物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法是废物增值过程,并且其中所述产物作为增值产物回收或用于产生热和/或功率。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述产物经由利用所述产物和所述发酵过程的发酵液之间的挥发性差异的方法进行分离和/或回收。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述产物经由蒸馏进行分离和/或回收。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述生物合成发酵过程与所述非生物合成过程整合或作为预处理阶段与废物处理过程整合。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述生物合成发酵过程与所述非生物合成过程整合,或经由热和/或发电作为预处理阶段与废物处理过程整合。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述生物体经基因修饰或物理适应以具有改善的代谢来自所述非生物合成过程的废物料流的含碳物质的能力和/或具有改善的对在所述废物料流中生长的耐受性。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述生物体具有减少的聚羟基链烷酸酯合成。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述废物料流来自化学过程,所述废物料流选自下列中的一者:来自环己烷氧化过程的非挥发性残余物(NVR)、来自环己烷氧化过程的富钠料流(SRS)、来自对苯二甲酸过程的纯化的对苯二甲酸(PTA)残余物、来自甲苯氧化过程的苯甲酸废物或来自间二甲苯经由氧气氧化的过程的间苯二甲酸废物。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述含碳物质为脂族的或芳族的。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述含碳物质为下列中的至少一种:羧酸、二羧酸、羟基酸、醛、酯、醇、甲酚、腈或与其相关的相应的盐或衍生物。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述废物料流还包含无机化合物。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述无机化合物包括含金属的无机化合物。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法还包括添加辅助碳源作为所述生物体的原料的步骤。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述生物合成发酵过程以连续、分批、补料分批或固定床模式操作。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述生物合成发酵过程包括氮、磷酸盐和/或氧限制。

17. 一种整合系统,所述整合系统包括:

利用来源于废物流的一种或多种含碳物质的非生物合成过程；  
生物合成发酵过程；以及

经基因修饰以生物合成产物或相对于相应的野生型生物体的产物的生物合成增加产物的生物合成的生物体，

其中所述生物体能够利用所述一种或多种含碳物质中的碳，并且选自贪铜菌属或罗尔斯通氏菌属的物种或具有与其类似的特性的生物体，并且

其中所述产物是由来源于所述非生物合成过程的废物流的所述含碳物质产生的轻沸型挥发性有机化合物。

18. 根据权利要求17所述的整合系统，其中所述产物作为增值产物回收或用于产生热和/或功率。

19. 根据权利要求17或权利要求18所述的整合系统，其中所述发酵过程与所述非生物合成过程整合，或者作为预处理阶段与废物处理过程整合。

20. 根据权利要求19所述的整合系统，其中所述发酵过程与所述非生物合成过程整合，或者经由热和/或发电作为预处理阶段与废物处理过程整合。

21. 根据权利要求17至20中任一项所述的整合系统，其中所述非生物合成过程包括来自化学过程的废物流，所述废物流选自下列中的一者：来自环己烷氧化过程的非挥发性残余物(NVR)、来自环己烷氧化过程的富钠料流(SRS)、来自对苯二甲酸过程的纯化的对苯二甲酸(PTA)残余物、来自甲苯氧化过程的苯甲酸废物或来自间二甲苯经由氧气氧化的过程的间苯二甲酸废物。

22. 根据权利要求17至21中任一项所述的整合系统，其中所述含碳物质为脂族的或芳族的。

23. 根据权利要求22所述的整合系统，其中所述含碳物质为下列中的至少一种：羧酸、二羧酸、羟基酸、醛、酯、醇、甲酚、腈或与其相关的相应的盐或衍生物。

24. 根据权利要求17至23中任一项所述的整合系统，其中所述废物流还包含无机化合物。

25. 根据权利要求24所述的整合系统，其中所述无机化合物为含金属的无机化合物。

26. 一种容纳在生物反应器中的组合物，所述组合物包含：

经基因修饰以生物合成产物或相对于相应的野生型生物体的产物的生物合成增加产物的生物合成的生物体，

其中所述生物体能够利用得自非生物合成过程的废物流的含碳物质中的碳，并且

其中所述生物体选自贪铜菌属或罗尔斯通氏菌属的物种或具有与其类似的特性的生物体；

得自非生物合成过程的废物流的含碳物质；以及

来自由所述生物体对所述含碳物质的生物合成的发酵衍生产物，所述含碳物质得自所述非生物合成过程的废物流，

其中所述发酵衍生产物为轻沸型挥发性有机化合物。

27. 一种用于制备异丙醇和/或丙酮的方法，所述方法包括：

(a) 将得自非生物合成过程的废物流的含碳物质引入生物合成发酵过程；

(b) 向所述生物合成发酵过程添加经基因修饰以生物合成异丙醇和/或丙酮或相对于

相应的野生型生物体的异丙醇和/或丙酮的生物合成增加异丙醇和/或丙酮的生物合成的生物体,其中所述生物体能够利用一种或多种含碳物质中的碳,并且其中所述生物体选自贪铜菌属或罗尔斯通氏菌属的物种或具有与其类似的特性的生物体;

(c) 在适用于异丙醇和/或丙酮的生物合成的条件下培养所述生物体;以及

(d) 生物合成所述异丙醇和/或丙酮。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述生物体经基因修饰以:

编码与SEQ ID NO:1、3、5、7和/或9具有至少50%序列同一性的多核苷酸或其功能片段;或者

包含与SEQ ID NO:2、4、6、8和/或10具有至少50%序列同一性的多肽或其功能片段。

## 用于由非生物合成料流合成碳产物的方法

[0001] 本专利申请要求2018年6月19日提交的美国临时申请序列号62/686,807的优先权权益,该美国临时申请的教导内容全文以引用方式并入。

### 技术领域

[0002] 本发明教导了材料和方法,其尤其是用于整合一种或多种生物合成过程(包括发酵过程),与一种或多种非生物合成过程(诸如化学过程),以在一种或多种得自非生物合成过程的一种或多种废物料流的含碳物质中利用碳。本发明包括适合与本发明一起使用的一种整合系统,所述整合系统包括非生物合成过程和生物合成发酵过程。

### 背景技术

[0003] 包括受污染物质在内的各种类型的材料可通过称为生物修复的方法进行处理。生物修复使用微生物以代谢或分解受污染物质,其通过使用所述物质作为原料,从而将受污染物质降解成有害较小、毒性较小或无毒的物质。堆肥和废水处理设施是长期建立的用于分解一些物质的微生物过程。

[0004] 与降解此类受污染物质相比,有可能利用包含“废物”组分,和/或来自商业和工业来源(诸如食品工业、纸浆和纸张工业、生物柴油和生物乙醇生产工业、使用生物合成方法生产化学品和/或生物聚合物)的料流中的副产物的物质(Koutinas等人, Chem.Soc.Rev.2014 43:2587)。Koutinas等人提出,可能通过在现有工业工厂中整合新技术来支持基于生物的化学品和材料的局部或区域生产,其中废物或副产物料流可用作可再生原料,这表明下游分离过程在此类系统中的重要性(Chem.Soc.Rev.2014 43:2587)。例如,已经公开了生物柴油炼制厂和发酵过程的整合以生产琥珀酸(Vlysidis等人, Energy 2011 36:4671-4683)。

[0005] 在标准化学过程中,将原料加入所述过程,并且合成一种或多种化学产品。一旦已合成了主产物和任何副产物,“回收”步骤就允许某些元素再循环并重新进入该化学过程。然而,来自化学过程的废料必须在废料处理设施中被处理掉。例如,含有由化学过程产生的废料的料流常常在垃圾掩埋地中燃烧或处理掉,并且显著的成本通常与化学过程废物料流的处置相关联。示例为非挥发性残余物(NVR),其为来自例如环己烷氧化过程的废化学品料流。NVR废物通常在垃圾掩埋场中处理掉或在专用焚化炉中燃烧。另一示例是得自来自己内酰胺和/或己二酸制造过程的环己烷氧化过程的富钠盐(SRS)料流。此类废物料流需要在垃圾掩埋地中处理掉,因为燃烧SRS料流导致在焚烧炉中的不希望的沉积物。又一示例是得自对苯二甲酸过程的纯化的对苯二甲酸(PTA)废物残余物。PTA废物已被报道为在热氧化炉中焚烧,但该废物料流现在在一些情况下被再处理以回收化学组分,诸如有机酸和金属元素。

[0006] 与化学过程废物废料的处理相关的成本表明,期望部署减少来自化学过程的废物料流的废物处理负载的方法以降低处置这些化学过程废物料流的成本。

[0007] Ramory等人公开了使用NVR作为某些工业发酵过程(诸如聚- $\beta$ -羟基丁酸的生产)的原料,并且NVR主要包含小羧酸、醇、醛、酯和其他有机化合物(Applied and

Environmental Microbiology 1986 52 (:1) 152-156)。Harder等人报道了某些生物体,包括富养罗尔斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*),所述生物体适用于在有限数目的工业过程中,代谢NVR组分,利用它们作为原料(Applied and Environmental Microbiology 1986 52 (:1) 152-156)。

[0008] 需要改善的材料和方法,所述材料和方法利用来自生物合成发酵过程中的非生物合成化学过程的废物流以产生一种或多种可销售的产物,所述产物易于从发酵液中分离,同时实现可接受的产量和资本成本(资本效率)。

## 发明内容

[0009] 本发明提供了材料和方法,所述材料和方法适用于代谢得自非生物合成过程(诸如发酵过程)的废物流的含碳物质中的碳,以产生至少一种轻沸型挥发性有机化合物,所述化合物可销售并易于从发酵液分离。本发明的一个方面涉及与非生物合成过程的初始废物流相比,来自发酵过程的残余废物流的减少的废物处理负载。

[0010] 因此,本发明的一个方面涉及一种用于由得自非生物合成过程的废物流的含碳物质生物合成产物的方法。该方法包括将含碳物质引入生物合成发酵过程。还将经基因修饰以生物合成产物或相对于相应的野生型生物体的产物的生物合成增加该产物的生物合成的生物体添加到生物合成发酵过程。添加的经基因修饰的生物体能够利用含碳物质中的碳,并且选自贪铜菌属(*Cupriavidus*)或罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)的物种或具有与其类似的特性的生物体。然后在适用于产物的生物合成的条件下培养生物体。根据该方法制备的产物为轻沸型挥发性有机化合物。

[0011] 在一个非限制性实施方案中,该方法提供了废物增值过程,其中所述产物作为增值产物回收或用于产生热和/或功率。

[0012] 在一个非限制性实施方案中,该方法还包括经由利用发酵过程的产物和发酵液之间的挥发性差异的方法分离和/或回收产物。

[0013] 在一个非限制性实施方案中,经由蒸馏分离和/或回收产物。

[0014] 在一个非限制性实施方案中,生物合成发酵过程与非生物合成过程整合。

[0015] 在一个非限制性实施方案中,经由热和/或发电将生物合成发酵过程与非生物合成过程整合。

[0016] 在一个非限制性实施方案中,生物合成发酵过程作为预处理阶段与废物处理过程一起提供。

[0017] 在一个非限制性实施方案中,经由热和/或发电,将生物合成发酵过程作为预处理阶段与废物处理过程一起提供。

[0018] 在一个非限制性实施方案中,所述生物体经基因修饰或物理适应以具有改善的代谢来自所述非生物合成过程的废物流的含碳物质的能力和/或具有改善的对在该废物流中生长的耐受性。

[0019] 在一个非限制性实施方案中,所述生物体减少的聚羟基链烷酸酯合成。

[0020] 可从其中得到产物的废物流的非限制性示例包括选自下列的化学过程:来自环己烷氧化过程的非挥发性残余物(NVR)、来自环己烷氧化过程的富钠料流(SRS)、来自对苯二甲酸过程的纯化的对苯二甲酸(PTA)残余物、来自甲苯氧化过程的苯甲酸废物和来自间

二甲苯经由氧气氧化的过程的间苯二甲酸废物。

[0021] 废物流中的含碳物质的非限制性示例包括含脂族碳和芳族碳的物质。废物流还可包含无机化合物,其包括含金属的无机化合物。

[0022] 在一个非限制性实施方案中,含碳物质为下列中的至少一种:羧酸、二羧酸、羟基酸、醛、酯、醇、甲酚、腈或与其相关的相应的盐或衍生物。

[0023] 在一个非限制性实施方案中,该方法还包括添加辅助碳源作为生物体的原料。

[0024] 在一个非限制性实施方案中,生物合成发酵过程以连续、分批、补料分批或固定床模式操作。

[0025] 在一个非限制性实施方案中,生物合成发酵过程包括氮、磷酸盐和/或氧限制。

[0026] 本发明的另一方面涉及整合系统,该整合系统包括利用来源于废物流的含碳物质的非生物合成过程、生物合成发酵过程和经基因修饰以生物合成产物或相对于相应的野生型生物体的产物的生物合成增加产物的生物合成的生物体。

[0027] 可用于该整合系统中的生物体能够利用一种或多种含碳物质中的碳,并且选自贪铜菌属或罗尔斯通氏菌属的物种或具有与其类似的特性的生物体。

[0028] 由该系统产生的产物包括由来源于非生物合成过程的废物流的含碳物质产生的轻沸型挥发性有机化合物。

[0029] 在一个非限制性实施方案中,经由整合系统产生的产物作为增值产物回收或用于产生热和/或功率。

[0030] 在一个非限制性实施方案中,发酵过程与非生物合成过程整合。

[0031] 在一个非限制性实施方案中,经由热和/或发电将发酵过程与非生物合成过程整合。

[0032] 在一个非限制性实施方案中,发酵过程作为预处理阶段与废物处理过程一起提供。

[0033] 在一个非限制性实施方案中,经由热和/或发电,将生物合成发酵过程作为预处理阶段与废物处理过程一起提供。

[0034] 可从其中得到产物的废物流的非限制性示例包括选自下列的化学过程:来自环己烷氧化过程的非挥发性残余物(NVR)、来自环己烷氧化过程的富钠料流(SRS)、来自对苯二甲酸过程的纯化的对苯二甲酸(PTA)残余物、来自甲苯氧化过程的苯甲酸废物和来自间二甲苯经由氧气氧化的过程的间苯二甲酸废物。

[0035] 废物流中的含碳物质的非限制性示例包括含脂族碳和芳族碳的物质。废物流还可包含无机化合物,其包括含金属的无机化合物。

[0036] 在一个非限制性实施方案中,含碳物质为下列中的至少一种:羧酸、二羧酸、羟基酸、醛、酯、醇、甲酚、腈或与其相关的相应的盐或衍生物。

[0037] 本发明的另一方面涉及一种容纳在生物反应器中的组合物。所述组合物包含经基因修饰以生物合成产物或相对于相应的野生型生物体的产物的生物合成增加产物的生物合成的生物体,得自非生物合成过程的废物流的含碳物质,以及来自由生物体对含碳物质的生物合成的发酵衍生产物,所述含碳物质得自非生物合成过程的废物流。该组合物的生物体能够利用得自非生物合成过程的废物流的含碳物质中的碳并且选自贪铜菌属或罗尔斯通氏菌属的物种或具有与其类似的特性的生物体。该组合物的发酵衍生产物包括

轻沸型挥发性有机化合物。

[0038] 本发明的另一方面涉及一种用于产生异丙醇和/或丙酮的方法。所述方法包括将得自非生物合成过程的废物料流的含碳物质引入生物合成发酵过程。还将经基因修饰以生物合成异丙醇和/或丙酮或相对于相应的野生型生物体的异丙醇和/或丙酮的生物合成增加异丙醇和/或丙酮的生物合成的生物体添加到生物合成发酵过程中。该过程的生物体能够利用一种或多种含碳物质中的碳,并且选自贪铜菌属或罗尔斯通氏菌属的物种或具有与其类似的特性的生物体。该方法还包括在适用于异丙醇和/或丙酮的生物合成的条件下培养生物体,使得异丙醇和/或丙酮产生。

[0039] 在一个非限制性实施方案中,生物体经基因修饰以编码与SEQ ID NO:1、3、5、7和/或9具有至少50%序列同一性的多核苷酸或其功能片段。

[0040] 在一个非限制性实施方案中,生物体经基因修饰以包含与SEQ ID NO:2、4、6、8和/或10具有至少50%序列同一性的多肽或其功能片段。

## 附图说明

[0041] 图1提供了化学过程的阶段的概述。

[0042] 图2A提供了化学过程的阶段的大概述。

[0043] 图2B提供了与根据本发明的发酵过程整合的化学过程的阶段的概述。

[0044] 图2C提供了与根据本发明的最终废物处理设施整合的化学处理的阶段的概述。

[0045] 图3示出在SRS或1%果糖中的异丙醇和丙酮生产,其分别支持包含IPA途径的菌株和空载体对照菌株的生长。误差条表示每种条件下三次重复的2个标准偏差。

## 具体实施方式

[0046] 本发明提供了使用得自非生物合成过程的一个或多个废物料流的一种或多种含碳物质作为发酵过程中的原料以生产可销售且易于分离的产物的方法。在标准发酵过程中,将空气、培养基、水和原料加入发酵过程中。本发明的方法使用废料作为发酵过程的原料,所述废料可来自化学过程。在本发明中,可销售的并且易于分离的产物是随后被纯化的粗制轻沸型挥发性化合物。一旦从发酵液中分离出该挥发性产物,就对废发酵液进行水回收步骤,其中去除固体以允许水再循环并再次用于发酵过程中。同时,与来自非生物合成过程的初始废物料流相比,使用这些方法,来自发酵过程的残余废物料流的废物处理负载减少。

[0047] 出于本发明的目的,当术语“一个”或“一种”在本文中用于指代产物、废物料流、含碳物质或无机化合物时,它们意在包括一种或多种产物、一种或多种废物料流、一种或多种含碳物质和/或一种或多种有机化合物。

[0048] 本发明的方法包括将得自非生物合成过程的一个或多个废物料流的一种或多种含碳物质添加到发酵过程。在一个非限制性实施方案中,非生物合成过程为化学过程。

[0049] 在本发明方法的一个非限制性实施方案中,其中所述含碳物质处于化学过程废物料流中,将该化学过程废物料流的全部或至少一部分进料至发酵过程。因此,发酵过程可被构造用于任何方便的规模,包括但不限于生产能力,并且可将该生产能力所需的化学过程废物料流的适当部分进料至发酵过程。在其中仅将化学过程废物料流的至少一部分进料至

发酵过程的本发明实施方案中,将化学过程废物流的剩余部分继续进料至常规废物处理系统/废物处置系统,但与原始化学过程废物流相比,在该系统上的负载减少。

[0050] 一种或多种废物流通常具有低经济价值或无经济价值,是不希望的、无用的或不充分的,否则将被丢弃。一种或多种废物流可包含副产物或代表来自非生物合成过程的任何不希望的料流。一种或多种废物流通常被送至废物处置工厂,诸如垃圾掩埋地、深井地或专用焚烧炉。一种或多种废物流可用作混合料流或可用作生物合成发酵过程中的单独的废物流。一种或多种废物流通常为液体。

[0051] 一种或多种废物流可来自非生物合成过程,诸如化学过程,该废物流选自下列中的一种:来自环己烷氧化过程的非挥发性残余物(NVR)、来自环己烷氧化过程的富钠料流(SRS)、来自对苯二甲酸过程的纯化的对苯二甲酸(PTA)残余物、来自甲苯氧化过程的苯甲酸废物或来自间二甲苯经由氧气氧化的过程的间苯二甲酸废物。

[0052] 一种或多种废物流可来自一种非生物合成过程,或者可以为来自多于一种非生物合成过程的混合废物流。一种或多种废物流包含一种或多种含碳物质。一种或多种废物流还可包含一种或多种无机化合物。无机化合物可包括金属。在生长期间,金属可被生物体多价螯合或可被固定在发酵过程的生物质中。

[0053] 一种或多种废物流中的一种或多种含碳物质能够由生物体代谢。在一个非限制性实施方案中,一种或多种含碳物质可为脂族或芳族的。一种或多种含碳物质可以为选自下列中的至少一种:羧酸、二羧酸、羟基酸、醛、酯、醇、甲酚、腈或与其相关的相应的盐或衍生物。除了一种或多种能够被生物体代谢的含碳物质之外,还可将一种或多种辅助碳源添加到生物合成发酵过程中作为生物体的原料。在一个非限制性实施方案中,一种或多种辅助碳源可以气体或液体料流的形式进料到生物合成发酵过程中。在一个非限制性实施方案中,一种或多种辅助碳源可为气体诸如二氧化碳或氢气;糖,诸如葡萄糖、木糖或果糖;糖酸,诸如葡糖酸盐;脂肪酸或脂肪/油,羧酸诸如丙酸、乳酸和甲酸;氨基酸,芳族化合物诸如苯酚和苯甲酸,和/或醇诸如甘油。

[0054] 出于本发明的目的,所谓的“衍生物及与其相关的化合物”意在涵盖衍生自与这些化合物相同的底物和/或酶促反应的化合物、这些酶促反应的副产物和具有类似的化学结构的化合物,包括但不限于其中该化合物的一个或多个取代基被另选的取代基取代的结构类似物。

[0055] 有机化合物中的至少一种是可发酵的。例如,在PTA中,主要组分是羧酸和二元羧酸;在NVR中,主要组分为脂肪酸;并且在SRS料流中,主要组分是短链脂肪酸。除了羧酸和二羧酸以及钴、锰、钠和溴化物之外,料流还可包含无机盐、含金属的无机盐、卤化物和金属,例如PTA洗涤流出物。

[0056] 该方法还包括将能够代谢来自非生物合成过程的一种或多种含碳物质的至少一部分碳的生物体添加到发酵过程中。可在添加含碳物质之前、期间或之后添加生物体。可以有效用于构建的发酵过程的量添加生物体。

[0057] 所添加的生物体是来自贪铜菌属或罗尔斯通氏菌属的物种的生物体或具有与其类似的特性的生物体,该生物体能够利用一种或多种含碳物质中的碳。该生物体经基因修饰以生物合成产物或相对于相应的野生型生物体的产物的生物合成增加产物的生物合成。该产物为轻沸型挥发性有机化合物。在一个非限制性实施方案中,通过插入一个或多个外

源基因对生物体进行基因修饰,以允许合成特定产物。

[0058] 该生物体可经基因修饰或物理适应以具有改善的代谢一种或多种含碳物质的能力,所述含碳物质得自非生物合成过程的一个或多个废物流和/或具有改善的对在一个或多个废物流中生长的耐受性。在另一非限制性实施方案中,生物体可经基因修饰或以其他方式适应以使其更好地利用原料和/或在原料中生长。在一个非限制性实施方案中,通过插入一个或多个外源基因对生物体进行基因修饰,以允许合成特定产物。

[0059] 出于本发明的目的,所谓“修饰(“modification”、“modifying”或“modify”)”意指基因缺失、突变、过表达或衰减。

[0060] 在某些方面,通过改变、工程化或在生物体内引入一个或多个核酸序列来修饰生物体。核酸序列的更改或修饰可例如但不限于经由基因工程,通过适应性突变或通过天然存在的突变株的选择性分离来进行。

[0061] 在一些非限制性实施方案中,生物体的一种或多种酶或核酸经由非直接或合理的酶设计方法进行修饰,目的是改善活性、改善特异性、减少反馈抑制、减少抑制、改善酶溶解度、改变立体特异性或改变辅因子特异性。在一些实施方案中,本文概述的途径中的酶可经由附加体或染色体整合方法被基因投配(即,通过在宿主生物中具有基因的多个拷贝来过表达)到所得的经基因修饰的生物体中。在一些非限制性实施方案中,可利用基因组级系统生物学技术诸如通量平衡分析来设计用于引导碳通量的基因组级衰减或敲除策略。衰减策略包括但不限于使用转座子、同源重组(双交叉方法)、诱变、酶抑制剂和RNA干扰(RNAi)。在一些实施方案中,通量组学、代谢组学和转录组学数据可用于通知或支持基因组级系统生物学技术,从而在指导碳通量时设计基因组级衰减或敲除策略。在一些实施方案中,宿主微生物对高浓度细胞外产物的耐受性可通过在选择性环境中连续培养来改善。

[0062] 生物体的经修饰的核酸序列可包括例如一种或多种酶、一种或多种启动子、一种或多种转录因子、或它们的组合。修饰可以是对编码多肽或其功能片段的核酸的修饰。这些修饰可以是对不直接参与编码多肽或其功能片段,而是通过生物体的互连代谢网络和代谢控制策略间接影响多肽的核酸的修饰。核酸序列的修饰可包括一个或多个缺失、一个或多个置换、一个或多个插入、或它们的组合。

[0063] 具有置换的酶通常将具有不超过50个(例如,不超过1个、不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个、不超过10个、不超过12个、不超过15个、不超过20个、不超过25个、不超过30个、不超过35个、不超过40个或不超过50个)氨基酸置换(例如保守或非保守置换)。这适用于本文所述的酶和其功能片段中的任一者。保守置换是一个氨基酸被另一个具有类似的特征的氨基酸置换。保守置换包括下列组内的置换:缬氨酸、丙氨酸和甘氨酸;亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸;天冬氨酸和谷氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;丝氨酸、半胱氨酸和苏氨酸;赖氨酸和精氨酸;以及苯丙氨酸和酪氨酸。非极性疏水性氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。可以认为上文提及的极性、碱性或酸性基团中的一个成员被同一组中的另一个成员的任何置换是保守置换。相比之下,非保守置换是一个氨基酸被另一个具有相异特征的氨基酸置换。

[0064] 缺失变体可例如缺乏(两个或更多个氨基酸的)1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个氨基酸片段或不连续的单个氨基酸。

[0065] 在一个非限制性实施方案中,通过等位基因交换进行生物体的修饰。在该实施方案中,基因组编辑通过等位基因交换(allele exchange)(也称为等位交换(allelic exchange))在具有扰动的PHB合成的贪铜菌属或罗尔斯通氏菌属生物体中或在具有与其类似的特性的生物体中进行。在一个非限制性实施方案中,该生物体是使用等位基因交换生成的 $\Delta$  phaCAB H16钩虫贪铜菌(*C.necator*)菌株。

[0066] 术语“等位基因”通常与术语“基因”互换使用,更一般地,并且是指限定的基因组基因座。在等位基因交换中,将生物体的基因组中的特定DNA序列段(即天然等位基因)照字面意义交换为重组、突变或合成的DNA序列段(即重组等位基因)。根据重组等位基因的性质,这种等位基因交换可导致基因缺失、基因置换或基因插入。

[0067] 在一个非限制性实施方案中,重组/合成的等位基因可经由基因合成和/或标准分子生物学技术构建。然后将这些等位基因克隆到质粒载体中,该质粒载体用于转移到生物体中并执行等位基因交换程序。

[0068] 在一些非限制性实施方案中,将生物体修饰成包括一个或多个外源核酸序列。

[0069] 如本文所用,关于核酸(或蛋白)和生物体的术语“外源”是指并不会像自然界中存在的那样存在于该特定类型的细胞中(并且无法从其中获得)的核酸或由此类核酸编码的蛋白。因此,非天然存在的核酸一旦进入宿主就被认为对宿主是外源的。重要的是需注意,非天然存在的核酸可含有存在于自然界中的核酸亚序列或核酸序列的片段,前提是该核酸就整体而论不存在于自然界中。例如,在表达载体内含有基因组DNA序列的核酸分子是非天然存在的核酸,因此一旦引入宿主中就对宿主细胞是外源的,因为该核酸分子整体(基因组DNA加载体DNA)不存在于自然界中。因此,作为整体不存在于自然界中的任何载体、自主复制质粒或病毒(例如,逆转录病毒、腺病毒或疱疹病毒)被认为是非天然存在的核酸。因此,认为通过PCR或限制性内切核酸酶处理产生的基因组DNA片段以及cDNA是非天然存在的核酸,因为它们作为不存在于自然界中的单独分子存在。因此,任何含有在自然界中不存在的排列的启动子序列和多肽编码序列(例如cDNA或基因组DNA)的核酸是非天然存在的核酸。天然存在的核酸对于特定宿主微生物而言可以是外源的。例如,一旦将从酵母x的细胞分离的整条染色体引入酵母y的细胞中,该染色体就是相对于酵母y的细胞的外源核酸。

[0070] 相比之下,如本文所用,关于核酸(例如,基因)(或蛋白)和宿主的术语“内源性的”是指会像自然界中存在的那样存在于该特定宿主中(并且可从其中获得)的核酸(或蛋白)。此外,“内源性表达”核酸(或蛋白)的细胞会像自然界中存在的相同特定类型的宿主那样表达该核酸(或蛋白)。此外,“内源性产生”或“内源性生产”核酸、蛋白或其他化合物的宿主会像自然界中存在的相同特定类型的宿主那样产生该核酸、蛋白或化合物。

[0071] 在一些非限制性实施方案中,生物体能够代谢含碳物质中的多于一种有机化合物。在一个非限制性实施方案中,生物体能够利用来自多于一种含碳物质的碳。

[0072] 在一个非限制性实施方案中,所述生物体耐受对用于生产产物(诸如大肠杆菌(*E.coli*)、耶氏酵母属(*Yarrowia*)和酵母的传统生物体)有毒性的化合物或组分,并且能够在来自非生物合成过程的废物流(诸如化学过程废物流)和那些料流的条件下生长。在

一个非限制性实施方案中,生物体为选自属贪铜菌属或罗尔斯通氏菌属的非病原性成员的微生物。可根据本公开使用的贪铜菌属或罗尔斯通氏菌属的物种的非限制性示例包括钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)、耐金属贪铜菌(*Cupriavidus metallidurans*)、台湾贪铜菌(*Cupriavidus taiwanensis*)、*Cupriavidus pinatubonensis*、巴塞尔贪铜菌(*Cupriavidus basilensis*)和皮氏罗尔斯通氏菌(*Ralstonia pickettii*)。在一个非限制性实施方案中,微生物为钩虫贪铜菌,其先前也被称为真养氢单胞菌(*Hydrogenomonas eutrophus*)、真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutropha*)、富养罗尔斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*)和真养沃特氏菌(*Wautersia eutropha*),其为 $\beta$ -变形杆菌纲的革兰氏阴性、鞭毛状土壤细菌。这种氢氧化细菌能够在无氧环境和有氧环境的界面处生长,并且容易在异养生活方式和自养生活方式之间适应。该细菌的能量来源包括有机化合物和氢气两者。钩虫贪铜菌的附加特性包括微需氧性、抗铜性(Makar和Casida,1987)、细菌捕食(Byrp等人,1985;Sillman和Casida,1986;Zeph和Casida,1986)和聚羟基丁酸酯(PHB)合成。此外,已报道这些细胞能够进行有氧生长或硝酸盐依赖型厌氧生长。

[0073] 所谓“具有与其类似的特性的生物体”,意指具有钩虫贪铜菌的上述特性中的一种或多种的生物体。

[0074] 可用于本发明的钩虫贪铜菌生物体的非限制性示例是钩虫贪铜菌H16菌株。在一个非限制性实施方案中,使用钩虫贪铜菌H16菌株的宿主,其中phaC1AB1基因座的至少一部分被敲除( $\Delta$  phaCAB),如美国专利申请序列号15/717,216中所述,该美国专利申请的教导内容以引用方式并入本文。

[0075] 在一个非限制性实施方案中,可将钩虫贪铜菌H16菌株的宿主进一步修饰以消除编码内切核酸酶的A0006-9操纵子,从而改善转化效率,如美国专利申请序列号15/717,216中所述,该美国专利申请的教导内容以引用方式并入本文。

[0076] 在一个实施方案中,该生物体已消除聚羟基链烷酸酯(PHA)合成。消除的聚羟基链烷酸酯(PHA)合成可以是消除的聚羟基丁酸酯(PHB)合成。PHB合成的天然机制不利于获得高生产率和/或产物收率。因此,需要减弱或消除PHA合成,以便使产生期望产物的效率最大化。

[0077] 出于本发明的目的,所谓“消除”或“消除的”聚羟基丁酸酯合成,意指改变生物体以与相同物种的未改变的野生型生物体相比,合成更少的聚羟基丁酸酯。与相同物种的未受扰动的野生型生物体相比,本公开中使用的生物体可表现出减少至少20%、25%、30%、40%、50%或甚至更多的聚羟基丁酸酯合成。

[0078] 在一个非限制性实施方案中,生物体经基因修饰以合成异丙醇和/或丙酮,并且编码选自SEQ ID NO:1、3、5、7和/或9的多核苷酸或其功能片段,或与SEQ ID NO:1、3、5、7和/或9具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的多核苷酸或其功能片段。在一个非限制性实施方案中,该多核苷酸经密码子优化以在钩虫贪铜菌中表达。

[0079] 在一个非限制性实施方案中,生物体经基因修饰以合成异丙醇和/或丙酮,并且包含选自SEQ ID NO:2、4、6、8和/或10的多肽或其功能片段,或与SEQ ID NO:2、4、6、8和/或10具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的多肽或其功能片段。

[0080] 如本文所公开的两条氨基酸序列之间的百分比同一性(同源性)可如下测定。首先,使用来自含有BLASTP版本2.9.0的BLAST独立版本的BLAST 2序列(B12seq)程序对氨基酸序列进行比对。该独立版本的BLAST可从美国政府的国家生物技术信息中心网站(www,扩展名为ncbi.nlm.nih.gov)获得。解释如何使用B12seq程序的说明可见于BLASTZ随附的自述文件中。B12seq使用BLASTP算法在两条氨基酸序列之间进行比较。为了比较两条氨基酸序列,B12seq的选项如下设置:-i被设定为含有要比较的第一氨基酸序列的文件(例如,C:\seq1.txt);-j设为含有要比较的第二氨基酸序列的文件(例如C:\seq2.txt);-p设为blastp;-o设为任何期望的文件名(例如,C:\output.txt);并且所有其他选项都设为其默认设置。例如,可使用以下命令来生成包含两条氨基酸序列之间的比较的输出文件:C:\B12seq-i c:\seq1.txt-j c:\seq2.txt-p blastp-o c:\output.txt。如果两条比较的序列具有同源性(同一性),则指定的输出文件会以经比对序列的形式呈现那些同源性区域。如果两条比较的序列不具有同源性(同一性),则指定的输出文件不会呈现经比对的序列。对于核酸序列可遵循类似的程序,不同的是使用blastn。

[0081] 一旦进行了比对,就通过对两条序列中都存在的相同氨基酸残基的位置的数目进行计数来确定匹配数目。同一性(同源性)百分比通过将匹配数目除以全长多肽氨基酸序列的长度,然后将所得值乘以100来确定。需注意,同一性(同源性)百分比值四舍五入至最接近的小数点后第一位。例如,90.11、90.12、90.13和90.14向下舍入至90.1,而90.15、90.16、90.17、90.18和90.19向上舍入至90.2。还需注意,长度值始终为整数。

[0082] 应当理解,多种核酸可编码具有特定氨基酸序列的多肽。遗传密码的简并性是本领域熟知的;即,对于许多氨基酸,存在多于一个核苷酸三联体用作氨基酸的密码子。例如,可修饰给定酶的编码序列中的密码子,使得使用该物种的适当密码子偏倚表在特定物种(例如细菌或真菌)中获得最佳表达。

[0083] 本文所述的多肽或核酸序列中的任一者的功能片段也可用于本文所公开的方法和生物体中。如本文所用,术语“功能片段”是指多肽的肽片段或者编码多肽的肽片段的核酸序列片段,其具有对应成熟、全长多肽的至少约25%(例如,至少:30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、100%或甚至大于100%)的活性。功能片段通常可(但不总是)由多肽的连续区域构成,其中该区域具有功能活性。

[0084] 然后在适用于生物合成一种或多种轻沸型挥发性有机化合物的条件下培养生物体。

[0085] 生物合成发酵过程可以以下模式中的任一种操作:连续、分批、补料分批或固定床模式。这些不同模式的具体操作条件将在技术人员的知识范围内。

[0086] 在营养限制的条件下,在许多细菌中发生被称为溢流代谢(也被称为能量溢出、解耦或外溢)的现象(Russell,2007年)。在其中碳源相对过量并且其他营养物质(例如磷、氮和/或氧)正在抑制细胞生长的生长条件下,溢流代谢导致该过剩能量(或碳)不用于生物形成,而是用于代谢物(通常为有机酸)的排泄。在钩虫贪铜菌中,发生了溢流代谢的改性形式,其中过量的碳在细胞内沉入储藏碳水化合物聚羟基丁酸酯(PHB)中。在缺乏PHB合成的钩虫贪铜菌菌株中,这种溢流代谢可导致细胞外溢流代谢物的产生。已在PHB缺陷型钩虫贪铜菌菌株中检测到的代谢物的范围包括乙酸盐、丙酮、丁酸盐、顺乌头酸盐、柠檬酸盐、乙醇、延胡索酸盐、3-羟基丁酸盐、丙-2-醇、苹果酸盐、甲醇、2-甲基-丙酸盐、2-甲基-丁酸盐、

3-甲基-丁酸盐、2-氧戊二酸盐、内消旋-2,3-丁二醇、乙偶姻、DL-2,3-丁二醇、2-甲基丙-1-醇、丙-1-醇、乳酸盐、2-氧代-3-甲基丁酸盐、2-氧代-3-甲基戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、甲酸和丙酮酸盐。在特定发酵中产生的溢流代谢物的范围可取决于所应用的限制(例如氮、磷酸盐、氧、碳)、限制的程度和所提供的碳源(Schlegel和Vollbrecht,1980;Steinbuchel和Schlegel,1989;Vollbrecht等人,1978和1979;Vollbrecht和Schlegel,1978和1979)。因此,在限定的发酵条件下应用合适的营养限制可导致通过特定代谢节点的通量增大。将该知识应用于经基因修饰以经由相同代谢节点产生期望化学产物的钩虫贪铜菌菌株可导致期望产物的产量增加。

[0087] 在本文所述的生物合成发酵过程中,可使用发酵策略,所述发酵策略需要厌氧、微有氧或有氧培养连同营养物质限制,诸如氮、氧或磷限制或它们的梯度以及它们的任何组合。

[0088] 在一个非限制性示例中,使用陶瓷中空纤维膜的细胞保留策略可用于在发酵期间实现和维持高细胞密度。

[0089] 生物体在发酵罐内的各种工程条件和物理条件下生长,诸如搅拌、混合、曝气、压力、剪切、温度和pH。通过调节化学过程废物流的pH,或通过调节发酵过程中发酵液的pH,或通过它们的组合,将根据本发明的发酵过程中的pH保持在适用于发酵过程的生物体的pH范围内,诸如但不限于4至9的pH,或诸如5.5至7.5的pH。

[0090] 发酵液在发酵过程中的总溶质(即,总固体)浓度保持在5重量%至15重量%的范围内。在一个非限制性实施方案中,总溶质浓度为10重量%。如果来自非生物合成过程的含碳物质中的总溶质浓度较高,则可将其用水稀释以实现生物体可耐受的可接受的总溶质浓度。该稀释可在来自非生物合成过程的含碳物质被进料至发酵过程之前完成,或者可在发酵过程中发生,这是由于培养基进料,来自非生物合成过程的含碳物质的进料速率与发酵中的总稀释速率相比小的结果。使用补料分批发酵过程可增加将有机化合物的恒定浓度保持在期望范围内的容易度。

[0091] 有机化合物在来自非生物合成过程的含碳物质中的浓度必须为至少1重量%。如果来自非生物合成过程的含碳物质中的有机化合物的浓度过高,则可将其用水稀释以实现生物体可耐受的可接受的有机化合物浓度。该稀释可在来自非生物合成过程的含碳物质被进料至发酵过程之前完成,或者可在发酵过程中发生,这是由于培养基进料,来自非生物合成过程的含碳物质的进料速率与发酵中的总稀释速率相比小的结果。使用补料分批发酵工艺可增加将有机化合物的恒定浓度保持在期望范围内的容易度。

[0092] 在一个非限制性实施方案中,发酵过程的产物为轻沸型挥发性有机化合物。

[0093] 出于本发明的目的,“轻沸型挥发性有机化合物”的产物定义意在涵盖在生物修复过程的正常操作压力下具有比水更低的沸点温度的发酵液内的碳或其共沸物和其他代谢物的任何有机化合物,使得产物可容易地通过闪蒸分离、蒸发、蒸馏、以及本领域技术人员熟知的利用产物和发酵液之间的挥发性差异的其他分离技术与发酵液分离。使用产物和发酵液之间的挥发性差异的此类分离技术允许基于产物的较低挥发性进行分离。在一个非限制性实施方案中,该产物可为液体或其共沸物,诸如下列中的一种:异丙醇、丙酮、异戊二烯、乙醇、正丙醇、乙醛或乙酸乙酯。在一个非限制性实施方案中,产物可以为气体,诸如异丁烯和丁二烯中的一种。为了避免疑问,产物定义不包括一氧化碳、二氧化碳、碳酸、金属碳

化物或碳酸盐和碳酸铵。在一个非限制性实施方案中,产物作为增值产物回收或用于产生热和/或功率。

[0094] 用于生物合成各种轻沸型挥发性有机化合物的非限制性方法和用于此类化合物的生物合成生产方法的经基因修饰的生物体的非限制性示例示于美国专利10,294,496;9,663,801;9,920,339;10,273,518;9,862,973;10,167,487;和9,777,295以及美国专利申请序列号15/238,225;15/717,065;16/023,055;和16/022,878中,所述文献的教导内容全文以引用方式并入本文。

[0095] 所谓增值生产,其意指产物经由废物增值过程获得,所述废物增值过程重复使用、再循环或堆肥处理废料并将它们转化成更有用的产品,所述产品包括材料、化学品、燃料或其他能源。由于自然资源的快速消耗和废物产生的增加,“废物向能量转化”方面变得更加突出。参见aiche处的美国化学工程师协会(AIChE)的网站,其中万维网的扩展名为:[.org/cei/topics/energy/waste-valorization](http://www.aiche.org/cei/topics/energy/waste-valorization)。

[0096] 在一个非限制性示例中,副产物可伴随产物的形成。发酵过程的此类副产物可包括二氧化碳(在废气流中)和生物质(在排放流中)。二氧化碳可适合用作另一种化学或生物过程的碳进料源。在一个非限制性示例中,生物质可被灭活、浓缩成粘稠的固体料流,并进料至固体废物处置过程。

[0097] 本发明的方法还可包括从生物体回收产生的产物。一旦产生,就可使用任何方法将这些产物或与其相关的衍生物或化合物分离。

[0098] 一种或多种产物的分离可涉及通常已知适用于至少部分地分离和/或隔离来自反应或生物合成发酵过程的材料的一种或多种下游过程。收集可例如涉及离心、细胞破碎、浓缩、沉淀、提取、过滤、结晶、蒸馏、化学转化、或它们的组合。可从培养物的液相或固相,或从存在于生物反应器的顶部空间中的气相或废气收集一种或多种生物合成产物。

[0099] 在一个非限制性实施方案中,生物合成发酵过程与非生物合成过程整合或作为预处理阶段与废物处理过程整合。生物合成发酵过程与非生物合成过程的整合允许由来自非生物合成过程的一个或多个废物流生物合成增值产物。此外,生物合成发酵过程与非生物合成过程的整合消除了将来自非生物合成过程的一个或多个废物流传送到生物合成发酵过程的需要。作为预处理阶段的生物合成发酵过程与废物处理过程的整合允许在一个或多个废物流传递到最终废物处理过程之前生物合成增值产物。有利的是,这减少了最终废物处理过程的负载,从而降低了成本和资源的使用。

[0100] 在一个另选的实施方案中,生物合成发酵过程与非生物合成过程整合,或经由热和/或发电作为预处理阶段与废物处理过程整合。

[0101] 在一个非限制性实施方案中,生物合成发酵过程与非生物合成过程物理整合或作为预处理阶段与废物处理过程整合。

[0102] 因此,本发明还提供了包括非生物合成过程和发酵过程的整合系统,其用于由得自非生物合成过程的一种或多种含碳物质生物合成产物。在一个非限制性实施方案中,发酵过程与非生物合成过程整合。在一个非限制性实施方案中,经由热和/或发电将发酵过程与非生物合成过程整合。在其中非生物合成过程为化学过程的非限制性实施方案中,整合发酵过程以代谢化学废物流可导致有价值的产物产生和废物流的总负载减少。

[0103] 本发明还提供了容纳在生物反应器中的组合物,所述组合物如本文所述包含选自

贪铜菌属或罗尔斯通菌属的物种的生物体或具有与其类似的特性的生物体；得自非生物合成过程的一种或多种废物料流的一种或多种含碳物质；以及来自由生物体对一种或多种含碳物质的生物合成的发酵衍生产物，该生物体能够利用一种或多种得自非生物合成过程的一种或多种废物料流的含碳物质中的碳并且经基因修饰以生物合成产物或相对于相应的野生型生物体的产物的生物合成增加产物的生物合成，所述含碳物质得自非生物合成过程的一种或多种废物料流。该产物为轻沸型挥发性有机化合物。

[0104] 此外，本发明提供了由本文所述的方法、生物体、系统和组合物中的任一种制备的生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的产物。在一个非限制性实施方案中，该产物可以为组合物，所述组合物包含至少一种生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的化合物或它们的任何组合。在一个非限制性实施方案中，所述产物可以为生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的聚合物，所述生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的聚合物包含生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的组合物或化合物，或它们的任何组合。在一个非限制性实施方案中，该产物可以为生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的顺式聚异戊二烯橡胶、反式聚异戊二烯橡胶、或液体聚异戊二烯橡胶，其包含生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的化合物，或生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的组合物或它们的任何组合，或生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的聚合物或它们的任何组合。在一个非限制性实施方案中，该产物可为通过模塑生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的聚合物、或生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的橡胶、或它们的任何组合获得的塑造物质。在一个非限制性实施方案中，该产物可以为生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的制剂，所述生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的制剂包含生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的组合物或化合物，生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的聚合物，生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的橡胶，或生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的塑造物质，或它们的任何组合。在一个非限制性实施方案中，该产物可以为生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的半固体或非半固体料流，所述生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的半固体或非半固体料流包含生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的组合物或化合物，生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的聚合物，生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的橡胶，生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的制剂，或生物衍生的、基于生物的和发酵衍生的塑造物质，或它们的任何组合。

[0105] 以下部分提供了本发明的方法和组合物的进一步说明。这些工作实施例仅是说明性的，并且不旨在以任何方式限制本发明的范围。

#### [0106] 实施例

##### [0107] 实施例1：使用来自化学过程的废SRS作为原料制备异丙醇 (IPA)

[0108] 富钠料流 (SRS) 源自己内酰胺和/或己二酸过程中的环己烷氧化。这些废物料流在垃圾掩埋地中处理掉或在专用焚烧炉中燃烧，从而导致与化学过程相关联的不希望的成本。该实施例描述了SRS废物料流的重复使用以制备异丙醇 (IPA/C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) 以及丙酮。

[0109] 异丙醇是具有多种用途的挥发性、可销售的产物，包括作为多种工业 (诸如但不限于油漆剥除和实验室化学品的萃取) 中的溶剂，作为诸如用于 (例如但不限于) 医院和实验室的表面消毒剂，作为用于 (例如但不限于) 洗手液中的防腐剂，作为样品防腐剂，以及用于制备 (例如但不限于) 丙酮、甘油和乙酸异丙酯的制造方法。

##### [0110] SRS原料培养基的制备

[0111] SRS由浓度为至多100g/L的具有各种碳链长度(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)的多种有机酸盐组成。这些用作SRS原料培养基中有机碳的唯一形式,其以浓缩形式制备并使用高压釜灭菌的蒸馏水和2X浓缩的过滤灭菌的基本培养基(根据需要包含氮、磷酸盐和痕量元素源)稀释至工作浓度。

[0112] 菌株制备

[0113] 将钩虫贪铜菌H16菌株修饰以消除参与聚羟基异丁酸酯(PHB)产生和编码内切核酸酶的A0006-9的phaCAB,从而改善转化效率,如美国专利申请序列号15/717,216中所述,该专利申请的教导内容以引用方式并入本文。

[0114] 质粒制备

[0115] 使用标准克隆技术构建包含5个基因的表达载体。表1示出了用于组装构建体的基因,然而表2示出了多肽功能。所使用的五种基因的核苷酸和氨基酸序列在附录中作为SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10提供。

[0116] 表1

SEQ ID NO	基因名称	宿主来源	针对钩虫贪铜菌进行密码子优化
1	H16_A1445	钩虫贪铜菌	否
[0117] 3	H16_A1331	钩虫贪铜菌	否
5	H16_A1332	钩虫贪铜菌	否
7	824_CA_P1065*	丙酮丁醇梭菌	是
9	CbeAF157307*	拜氏梭菌	是

[0118] \*基因824CA\_P1065和CbeAF157307获自Grousseau,E.,Lu,J.,Gorret,N.等人,  
[0119] Appl Microbiol Biotechnol (2014) 98:4277。

[0120] 表2

SEQ ID NO:	描述	Unitprot 标识符
2	β-酮硫解酶, BktB, EC 2.3.1.16、 EC 2.3.1.9	Q0KBP1
[0121] 4	琥珀酰-CoA:3-酮酸-辅酶 A 转移酶 亚基 A, EC 2.8.3.5	Q0KC00
6	琥珀酰-CoA:3-酮酸-辅酶 A 转移酶 亚基 B, EC 2.8.3.5	Q0KBZ9
8	乙酰乙酸脱羧酶	P23670
10	醇脱氢酶	P25944

[0122] 用于异丙醇(IPA)制备实验的细胞培养物的制备

[0123] 在选择性、基于果糖的基本培养基中制备表达IPA途径的菌株和空载体对照菌株的预培养物。将培养物在30℃下振荡培养并持续至多36小时,并在后续使用之前进行洗涤。

[0124] 用于接种发酵罐的种子培养物

[0125] 将经洗涤的细胞悬浮液转移至基于SRS的选择性基本培养基,温育过夜,并且然后传代培养至相同培养基并进一步温育16小时。这些被用作用于发酵的直接种菌。用于基于果糖的发酵的种子培养物(对照,参见下一节)以完全相同的方式但在基于果糖的培养基中制备。

[0126] 发酵条件

[0127] Sartorius Ambr15f平台用于以分批操作模式筛选途径菌株。表达IPA的菌株和等空的载体对照两者均在果糖(对照)和基于SRS的培养基上运行。所有发酵均在30°C下并在足够的透气和搅拌下,以分批模式运行,以满足10%vv的最小溶解氧需求。发酵过程运行48小时,在该时间点取样。

[0128] 用于分析的样品制备

[0129] 样品体积通常为1ml。进行光密度测量,并且然后将它们在4000rpm下离心20分钟。然后通过GC-MS对澄清的上清液进行的IPA和丙酮的分析。在自生物合成发酵过程起48小时的时间点处取样,并且数据示于图3中。结果示出,在该实施例中使用的钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)菌株能够使用来自化学过程的废SRS生产异丙醇(和丙酮)。在Ambr-15f中,产生平均60.5ppm IPA和78.7ppm丙酮(合并为139.2ppm),与来自果糖的475ppm IPA和317ppm丙酮(合并为792ppm;图3)相比。当将数据归一化为OD<sub>600</sub>物质读数时,推断果糖作为唯一碳源的利用递送比SRS多大约5.7倍的产物,尽管两种样品中的总可用碳大致相等(对于SRS1:20为0.33%,并且在1%果糖的情况下为0.4%)。与果糖相比,SRS中较低的总体IPA和丙酮收率可部分地由关于两种底物的预期理论收率来解释。值得注意的是,果糖向IPA的转化理论上是基于摩尔对摩尔的(即,一摩尔果糖产生一摩尔乙酰-CoA,其继而产生一摩尔IPA(或丙酮))。相比之下,SRS产生相对较少的IPA/丙酮。

## 序列表

<110>	INVISTA NORTH AMERICA S. A. R. L. Smith, Gary Pearlman, Paul Kirby, Gregory	
<120>	用于由非生物合成过程和料流合成碳产物的材料和方法	
<130>	INV0209W0	
<150>	US 62/686,807	
<151>	2018-06-19	
<160>	10	
<170>	PatentIn版本3.5	
<210>	1	
<211>	1185	
<212>	DNA	
<213>	钩虫贪铜菌	
<400>	1	
[0001]	atgacgcgtg aagtggtagt ggtaagcggg gtccgtaccg cgatcgggac ctttggcggc	60
	agcctgaagg atgtggcacc ggcggagctg ggcgcactgg tgggtgcgcga ggcgctggcg	120
	cgcgcgccagg tgcggggcga cgatgtcggc cacgtggtat tcggcaacgt gatccagacc	180
	gagccgcgcg acatgtatct gggccgcgtc gcggccgtca acggcggggg gacgatcaac	240
	gccccgcgcg tgaccgtgaa ccgctgtgac ggctcggggc tgcaggccat tgtcagcgcc	300
	gcgcagacca tctgtctggg cgataccgac gtcgccatcg gcggcggcgc gaaagcatg	360
	agccgcgcac cgtacctggc gccggcagcg cgctggggcg cacgcatggg cgacgccggc	420
	ctggctgaca tgatgtctggg tgcgctgcac gateccttc atcgcatcca catgggcgtg	480
	accgccgaga atgtgccea ggaatacgac atctcgcgcg cgcagcagga cgaggccgcg	540
	ctggaatcgc accgccgcgc ttcggcagcg atcaaggccg gctacttcaa ggaccagatc	600
	gtcccgggtg tgagcaaggg ccgcaagggc gacgtgacct tcgacaccga cgagcacgtg	660
	cgccatgacg ccaccatcga cgacatgacc aagctcagge cggctcttct caaggaaaac	720
	ggcacggtea cggccggcaa tgctcgggc ctgaacgacg ccgccgcgcg ggtggtgatg	780
	atggagcgcg ccgaagccga gcgccgcggc ctgaagccgc tggcccgcct ggtgtcttac	840
	ggccatgccg gcgtggacc gaaggccatg ggcatcggcc cggtgccggc gacgaagatc	900
	gcgctggage gcgccggcct gcaggtgtcg gacctggacg tgatcgaagc caacgaagcc	960
	tttgccgcac aggcgtgcgc cgtgaccaag gcgctcggtc tggaccggc caaggttaac	1020

ccgaacggct cgggcatctc gctgggccac ccgatcggcg ccaccggtgc cctgatcacg 1080  
 gtgaaggcgc tgcattgagct gaaccgcgtg cagggccgct acgcgctggt gacgatgtgc 1140  
 atcggcgggcg ggcagggcat tgccgccatc ttcgagcgta tctga 1185

<210> 2  
 <211> 394  
 <212> PRT  
 <213> 钩虫贪铜菌

<400> 2

Met Thr Arg Glu Val Val Val Val Ser Gly Val Arg Thr Ala Ile Gly  
 1 5 10 15

Thr Phe Gly Gly Ser Leu Lys Asp Val Ala Pro Ala Glu Leu Gly Ala  
 20 25 30

Leu Val Val Arg Glu Ala Leu Ala Arg Ala Gln Val Ser Gly Asp Asp  
 35 40 45

Val Gly His Val Val Phe Gly Asn Val Ile Gln Thr Glu Pro Arg Asp  
 50 55 60

[0002]

Met Tyr Leu Gly Arg Val Ala Ala Val Asn Gly Gly Val Thr Ile Asn  
 65 70 75 80

Ala Pro Ala Leu Thr Val Asn Arg Leu Cys Gly Ser Gly Leu Gln Ala  
 85 90 95

Ile Val Ser Ala Ala Gln Thr Ile Leu Leu Gly Asp Thr Asp Val Ala  
 100 105 110

Ile Gly Gly Gly Ala Glu Ser Met Ser Arg Ala Pro Tyr Leu Ala Pro  
 115 120 125

Ala Ala Arg Trp Gly Ala Arg Met Gly Asp Ala Gly Leu Val Asp Met  
 130 135 140

Met Leu Gly Ala Leu His Asp Pro Phe His Arg Ile His Met Gly Val  
 145 150 155 160

Thr Ala Glu Asn Val Ala Lys Glu Tyr Asp Ile Ser Arg Ala Gln Gln  
 165 170 175

Asp Glu Ala Ala Leu Glu Ser His Arg Arg Ala Ser Ala Ala Ile Lys  
 180 185 190

Ala Gly Tyr Phe Lys Asp Gln Ile Val Pro Val Val Ser Lys Gly Arg  
 195 200 205

Lys Gly Asp Val Thr Phe Asp Thr Asp Glu His Val Arg His Asp Ala  
 210 215 220

Thr Ile Asp Asp Met Thr Lys Leu Arg Pro Val Phe Val Lys Glu Asn  
 225 230 235 240

Gly Thr Val Thr Ala Gly Asn Ala Ser Gly Leu Asn Asp Ala Ala Ala  
 245 250 255

Ala Val Val Met Met Glu Arg Ala Glu Ala Glu Arg Arg Gly Leu Lys  
 260 265 270

Pro Leu Ala Arg Leu Val Ser Tyr Gly His Ala Gly Val Asp Pro Lys  
 275 280 285

[0003]

Ala Met Gly Ile Gly Pro Val Pro Ala Thr Lys Ile Ala Leu Glu Arg  
 290 295 300

Ala Gly Leu Gln Val Ser Asp Leu Asp Val Ile Glu Ala Asn Glu Ala  
 305 310 315 320

Phe Ala Ala Gln Ala Cys Ala Val Thr Lys Ala Leu Gly Leu Asp Pro  
 325 330 335

Ala Lys Val Asn Pro Asn Gly Ser Gly Ile Ser Leu Gly His Pro Ile  
 340 345 350

Gly Ala Thr Gly Ala Leu Ile Thr Val Lys Ala Leu His Glu Leu Asn  
 355 360 365

Arg Val Gln Gly Arg Tyr Ala Leu Val Thr Met Cys Ile Gly Gly Gly  
 370 375 380

Gln Gly Ile Ala Ala Ile Phe Glu Arg Ile  
 385 390

<210> 3  
 <211> 702  
 <212> DNA  
 <213> 钩虫贪铜菌  
  
 <400> 3  
 atgaacaagg tctacgccag cgccgcagaa gcgcttgacag gcgtcgtccg cgacggccag 60  
 acgatcgccg tgggcggttt cggcctgtgc ggcatccccg aggcgctgat tgccgcgctg 120  
 cgcgacagcg gcgccaagca gctgacctgt atctccaaca acgccggcgt cgatggettc 180  
 ggcttgggcc tgctgctggc cacgcgccag atcagcaaga tgatctcgtc ctacgtgggc 240  
 gagaacaagg agttcgagcg ccagtacctg gcgggcgaac ttgagctgga attcaccccg 300  
 caaggcacgc tggccgagaa gctgcgcgcc ggccgctcgg gcatccccgc cttcttcacc 360  
 aagaccggtg tcggcaccat cgtcgcggaa ggcaaggaaa tccggaatt cgacggccag 420  
 cagtacgtga tggagcgttc gctgaccgcc gacgtggcgc tggtaaggc atacaagct 480  
 gacaaggccg gcaacctggt gttccgccgc accgcgcgca acttcaacc gatgtgcgcc 540  
 atggcgggca aggtcaccat cgccgaggtc gagcatatcg tcgagaccgg cgagctggac 600  
 ccggatgaaa tccacctggc cgcatcttc gtgaagcgc tgggtctgaa caccacccc 660  
 [0004] gagaaacgca tcgagcagcg caccgtgcgc gcggccagct aa 702

<210> 4  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> 钩虫贪铜菌

<400> 4  
 Met Asn Lys Val Tyr Ala Ser Ala Ala Glu Ala Leu Ala Gly Val Val  
 1 5 10 15  
 Arg Asp Gly Gln Thr Ile Ala Val Gly Gly Phe Gly Leu Cys Gly Ile  
 20 25 30  
 Pro Glu Ala Leu Ile Ala Ala Leu Arg Asp Ser Gly Ala Lys Gln Leu  
 35 40 45  
 Thr Cys Ile Ser Asn Asn Ala Gly Val Asp Gly Phe Gly Leu Gly Leu  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Thr Arg Gln Ile Ser Lys Met Ile Ser Ser Tyr Val Gly  
 65 70 75 80

Glu Asn Lys Glu Phe Glu Arg Gln Tyr Leu Ala Gly Glu Leu Glu Leu  
85 90 95

Glu Phe Thr Pro Gln Gly Thr Leu Ala Glu Lys Leu Arg Ala Gly Gly  
100 105 110

Ser Gly Ile Pro Ala Phe Phe Thr Lys Thr Gly Val Gly Thr Ile Val  
115 120 125

Ala Glu Gly Lys Glu Ile Arg Glu Phe Asp Gly Gln Gln Tyr Val Met  
130 135 140

Glu Arg Ser Leu Thr Ala Asp Val Ala Leu Val Lys Ala Tyr Lys Ala  
145 150 155 160

Asp Lys Ala Gly Asn Leu Val Phe Arg Arg Thr Ala Arg Asn Phe Asn  
165 170 175

Pro Met Cys Ala Met Ala Gly Lys Val Thr Ile Ala Glu Val Glu His  
180 185 190

[0005]

Ile Val Glu Thr Gly Glu Leu Asp Pro Asp Glu Ile His Leu Ala Gly  
195 200 205

Ile Phe Val Lys Arg Leu Val Leu Asn Thr Thr Pro Glu Lys Arg Ile  
210 215 220

Glu Gln Arg Thr Val Arg Ala Ala Ser  
225 230

<210> 5

<211> 639

<212> DNA

<213> 钩虫贪铜菌

<400> 5

atggcatgga cacgtgacga aatggccgcg cgcgccgcca cagagctgca ggacggtttc 60

tacgtcaacc tggcatcgg cctgccgacg ctggtggcca actgggtgcc cgaaggcatg 120

gaagtgtggc tgcagtccga gaacggactg ctgggcatcg gcccgttccc gaccgaggac 180

gaagtcgaag ccgacatgat caacgccggc aagcaaaccg tgacgacgct gccgggetcg 240

tcgatcttct cgtcggccga ctcgttcgcg atgatccgcg gcggccacat caacctggcg 300

atcctgggtg cgatgcaggt cagcgaaaag ggcgacctgg ccaactggat gatccccggc 360  
 aagatggtca agggcatggg cggecgatg gacctggctg cggcgctcgg ccgagtggtg 420  
 gtgctgatgg aacacaccgc caagaagaag gatggcaccg aggacatcaa gatcctgaag 480  
 gactgcaacc tgccgctgac cggegtgggc gtggtcaacc gcatcattac cgacctgggc 540  
 gtgatcgacg tgaccgacga aggcctgaag ctggtggaaa cggtcccggg tgtcagccgc 600  
 gaggaaatcc aggccaagac tggcgtccg ctgctgtaa 639

<210> 6  
 <211> 211  
 <212> PRT  
 <213> 钩虫贪铜菌

<400> 6

Met Ala Trp Thr Arg Asp Glu Met Ala Ala Arg Ala Ala Thr Glu Leu  
 1 5 10 15

Gln Asp Gly Phe Tyr Val Asn Leu Gly Ile Gly Leu Pro Thr Leu Val  
 20 25 30

[0006]

Ala Asn Trp Val Pro Glu Gly Met Glu Val Trp Leu Gln Ser Glu Asn  
 35 40 45

Gly Leu Leu Gly Ile Gly Pro Phe Pro Thr Glu Asp Glu Val Asp Ala  
 50 55 60

Asp Met Ile Asn Ala Gly Lys Gln Thr Val Thr Thr Leu Pro Gly Ser  
 65 70 75 80

Ser Ile Phe Ser Ser Ala Asp Ser Phe Ala Met Ile Arg Gly Gly His  
 85 90 95

Ile Asn Leu Ala Ile Leu Gly Ala Met Gln Val Ser Glu Lys Gly Asp  
 100 105 110

Leu Ala Asn Trp Met Ile Pro Gly Lys Met Val Lys Gly Met Gly Gly  
 115 120 125

Ala Met Asp Leu Val Ala Gly Val Gly Arg Val Val Val Leu Met Glu  
 130 135 140

Thr Ala Lys Lys Lys Asp Gly Thr Glu Asp Ile Lys Ile Leu Lys Asp  
 145 150 155 160

Cys Asn Leu Pro Leu Thr Gly Val Gly Val Val Asn Arg Ile Ile Thr  
 165 170 175

Asp Leu Gly Val Ile Asp Val Thr Asp Glu Gly Leu Lys Leu Val Glu  
 180 185 190

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

Pro Leu Leu  
 210

- <210> 7
- <211> 735
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成

[0007] <400> 7  
 atgctgaagg acgaagtcac caagcagatc tcgaccccg tgacgagccc ggcgttcccg 60  
 cgcggcccggt acaagttcca caaccgcgaa tacttcaaca tcgtgtaccg caccgacatg 120  
 gacgcgctgc gcaaggtggt cccggagccg ctggaaatcg acgagccgct ggtccgcttc 180  
 gaaatcatgg cgatgcacga caccagcggc ctgggctgct acacggagag cggccaggcc 240  
 atcccgggtg cgttcaacgg cgtcaagggc gactacctgc atatgatgta cctggacaac 300  
 gaaccggcca tcgcggtggg ccgcgagctg agcgcctacc cgaagaagct gggctaccgg 360  
 aagctgttcg tggactcgga caccctggtc ggcacgctgg actacggcaa gctgcgcgtg 420  
 gccaccgcca cgatgggcta caagcacaag gccctggacg cgaacgaggc caaggaccag 480  
 atctgccgcc cgaactacat gctgaagatc atcccgaact acgacggctc gccgcgcatc 540  
 tgccaactga tcaacgcgaa gatcaccgac gtcacggctc acgaggcctg gaccggcccc 600  
 acgcgctgc agctgttcga ccatgccatg gcgccgctga acgacctgcc ggtgaaggaa 660  
 atcgtgtcgt cgtcgcatac cctggcggac atcctcctgc cgcgcgcaga ggtgatctac 720  
 gactacctga agtga 735

- <210> 8

<211> 244  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 8

Met Leu Lys Asp Glu Val Ile Lys Gln Ile Ser Thr Pro Leu Thr Ser  
 1 5 10 15

Pro Ala Phe Pro Arg Gly Pro Tyr Lys Phe His Asn Arg Glu Tyr Phe  
 20 25 30

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

Glu Pro Leu Glu Ile Asp Glu Pro Leu Val Arg Phe Glu Ile Met Ala  
 50 55 60

Met His Asp Thr Ser Gly Leu Gly Cys Tyr Thr Glu Ser Gly Gln Ala  
 65 70 75 80

[0008]

Ile Pro Val Ser Phe Asn Gly Val Lys Gly Asp Tyr Leu His Met Met  
 85 90 95

Tyr Leu Asp Asn Glu Pro Ala Ile Ala Val Gly Arg Glu Leu Ser Ala  
 100 105 110

Tyr Pro Lys Lys Leu Gly Tyr Pro Lys Leu Phe Val Asp Ser Asp Thr  
 115 120 125

Leu Val Gly Thr Leu Asp Tyr Gly Lys Leu Arg Val Ala Thr Ala Thr  
 130 135 140

Met Gly Tyr Lys His Lys Ala Leu Asp Ala Asn Glu Ala Lys Asp Gln  
 145 150 155 160

Ile Cys Arg Pro Asn Tyr Met Leu Lys Ile Ile Pro Asn Tyr Asp Gly  
 165 170 175

Ser Pro Arg Ile Cys Glu Leu Ile Asn Ala Lys Ile Thr Asp Val Thr  
 180 185 190

Val His Glu Ala Trp Thr Gly Pro Thr Arg Leu Gln Leu Phe Asp His  
 195 200 205

Ala Met Ala Pro Leu Asn Asp Leu Pro Val Lys Glu Ile Val Ser Ser  
 210 215 220

Ser His Ile Leu Ala Asp Ile Ile Leu Pro Arg Ala Glu Val Ile Tyr  
 225 230 235 240

Asp Tyr Leu Lys

<210> 9  
 <211> 1056  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 9

[0009] atgaagggtc tcgcatgct gggcatcaac aagctgggct ggatcgaaaa ggaacgcccg 60

gtcgccggtc cgtacgacgc catcgtgcgc ccgctggccg tgtcgccgtg caccagcgac 120

atccacacgg tgttcgaggg cgccctgggc gaccgcaaga acatgatcct gggccatgag 180

gcggtggggc aggtggtcga agtcggcagc gaagtgaagg acttcaagcc gggcgaccgc 240

gtcatcgtgc cgtgcaccac gccggactgg cgctcgctgg aggtgcaggc cggettccag 300

cagcacagca acggcatgct ggcgggctgg aagttctcga acttcaagga cggcgtcttc 360

ggcgaatact tccatgtgaa cgacgccgac atgaacctgg cgatcctgcc gaaggacatg 420

ccgctggaga acgccgtgat gatcaccgac atgatgacca cgggcttcca cggcgccgaa 480

ctggcggaca tccagatggg ctctcggtg gtcgtgatcg gcatcggcgc cgtgggcctg 540

atgggcatcg ccggcgcgaa gctgcgcggc gcgggcccga tcatcggcgt cggcagcccg 600

ccgatctgcg tggaggccgc gaagttctac ggcgcgaccg acatcctgaa ctacaagaac 660

ggccacatcg tcgaccaggt gatgaagctg accaacggca agggcgtcga ccgcgtgatc 720

atggccggcg gcggtcggga aacgctgagc caggcgggtc cgatggtgaa gccgggcggc 780

atcatcagca acatcaacta ccacggctcg ggcgacgcc tgctgatccc gcgcgtggag 840

tggggctgcg gcatggcgca taagaccatc aaggcgggcc tgtgcccggg cggccgcctg 900

cgcgccgaaa tgctgcgcga catggtcgtg tacaaccgcg tggacctgtc gaagctgggt 960

accacgtgt accatggctt cgaccacatc gaggaagccc tgctgctgat gaaggacaag 1020  
ccgaaggacc tgatcaaggc ggctcgtgatc ctgtga 1056

<210> 10  
<211> 351  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成

<400> 10

Met Lys Gly Phe Ala Met Leu Gly Ile Asn Lys Leu Gly Trp Ile Glu  
1 5 10 15

Lys Glu Arg Pro Val Ala Gly Ser Tyr Asp Ala Ile Val Arg Pro Leu  
20 25 30

Ala Val Ser Pro Cys Thr Ser Asp Ile His Thr Val Phe Glu Gly Ala  
35 40 45

[0010] Leu Gly Asp Arg Lys Asn Met Ile Leu Gly His Glu Ala Val Gly Glu  
50 55 60

Val Val Glu Val Gly Ser Glu Val Lys Asp Phe Lys Pro Gly Asp Arg  
65 70 75 80

Val Ile Val Pro Cys Thr Thr Pro Asp Trp Arg Ser Leu Glu Val Gln  
85 90 95

Ala Gly Phe Gln Gln His Ser Asn Gly Met Leu Ala Gly Trp Lys Phe  
100 105 110

Ser Asn Phe Lys Asp Gly Val Phe Gly Glu Tyr Phe His Val Asn Asp  
115 120 125

Ala Asp Met Asn Leu Ala Ile Leu Pro Lys Asp Met Pro Leu Glu Asn  
130 135 140

Ala Val Met Ile Thr Asp Met Met Thr Thr Gly Phe His Gly Ala Glu  
145 150 155 160

Leu Ala Asp Ile Gln Met Gly Ser Ser Val Val Val Ile Gly Ile Gly  
165 170 175

Ala Val Gly Leu Met Gly Ile Ala Gly Ala Lys Leu Arg Gly Ala Gly  
180 185 190

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

Phe Tyr Gly Ala Thr Asp Ile Leu Asn Tyr Lys Asn Gly His Ile Val  
210 215 220

Asp Gln Val Met Lys Leu Thr Asn Gly Lys Gly Val Asp Arg Val Ile  
225 230 235 240

Met Ala Gly Gly Gly Ser Glu Thr Leu Ser Gln Ala Val Ser Met Val  
245 250 255

[0011] Lys Pro Gly Gly Ile Ile Ser Asn Ile Asn Tyr His Gly Ser Gly Asp  
260 265 270

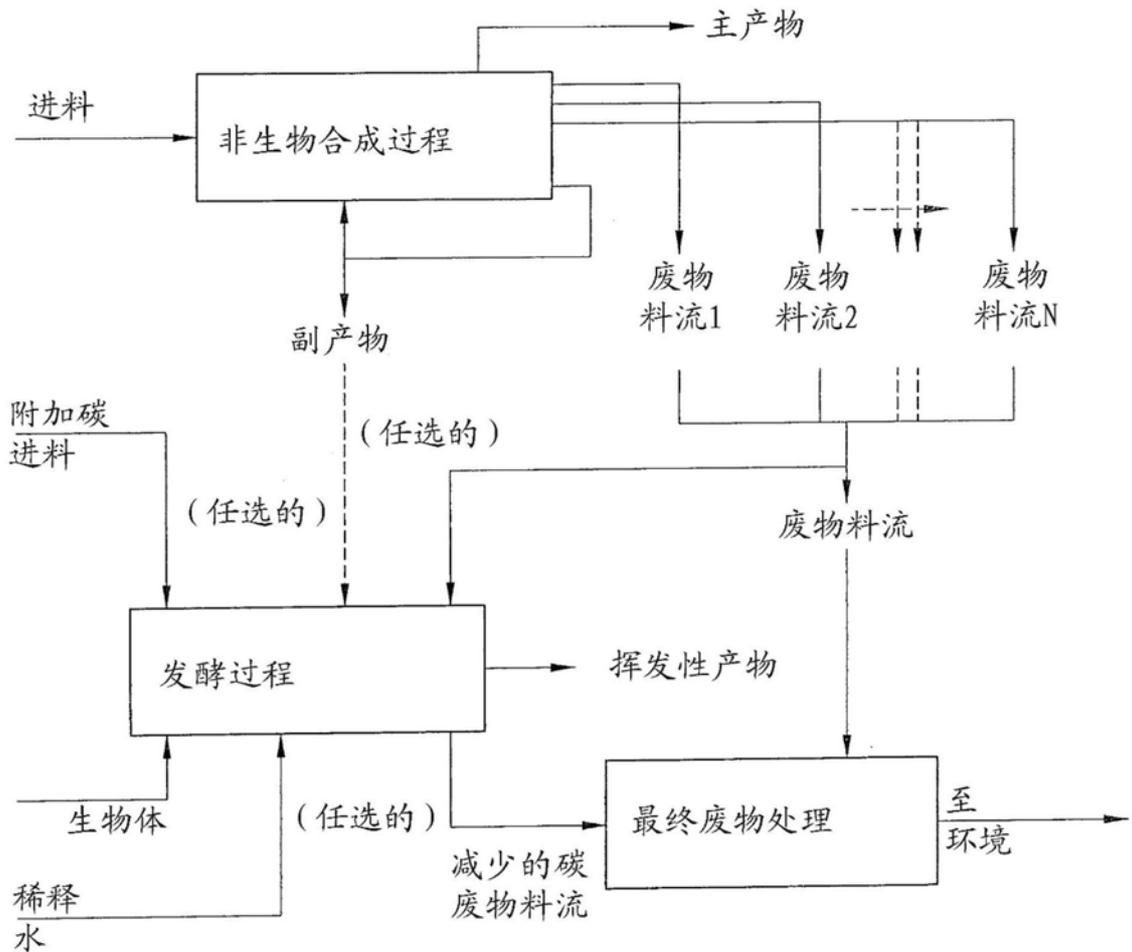
Ala Leu Leu Ile Pro Arg Val Glu Trp Gly Cys Gly Met Ala His Lys  
275 280 285

Thr Ile Lys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Gly Arg Leu Arg Ala Glu Met  
290 295 300

Leu Arg Asp Met Val Val Tyr Asn Arg Val Asp Leu Ser Lys Leu Val  
305 310 315 320

Thr His Val Tyr His Gly Phe Asp His Ile Glu Glu Ala Leu Leu Leu  
325 330 335

Met Lys Asp Lys Pro Lys Asp Leu Ile Lys Ala Val Val Ile Leu  
340 345 350



总体工艺概念

图1

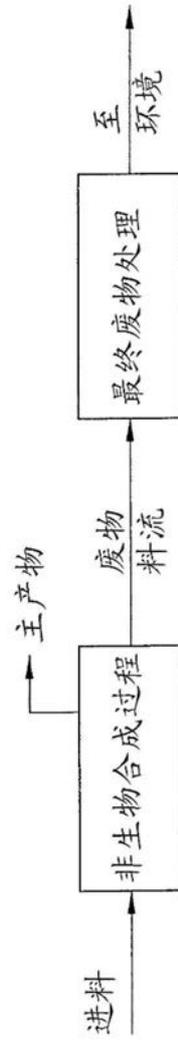


图2A

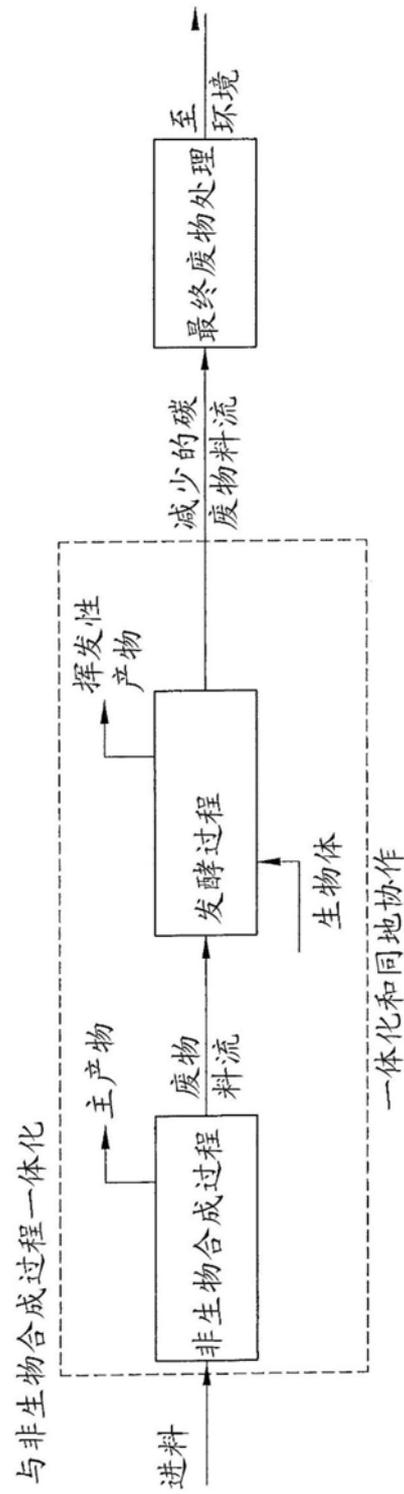


图2B

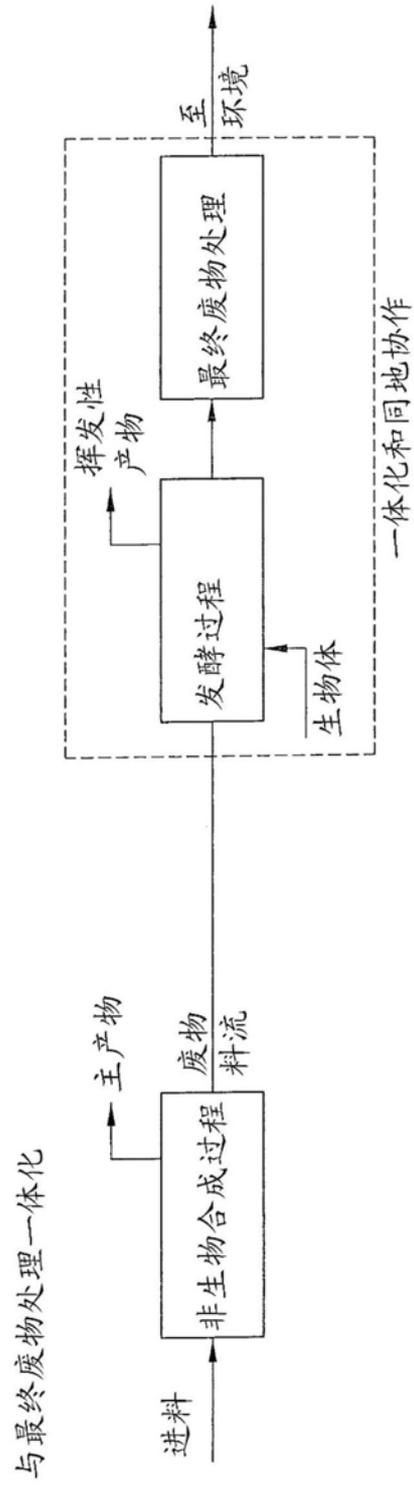


图2C

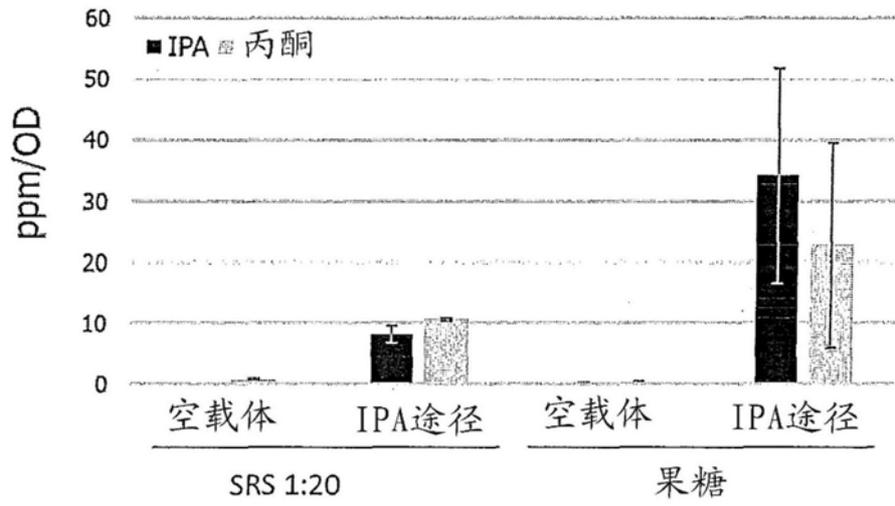


图3