



# (12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104232548 B

(45)授权公告日 2017.05.24

(21)申请号 201410509328.6

(22)申请日 2014.09.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104232548 A

(43)申请公布日 2014.12.24

(83)生物保藏信息

CGMCC NO.9651 2014.09.12

(73)专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市市中区南辛庄  
西路336号

(72)发明人 李强 李玉梅 杨敏 曲衍洪

宋冬雪 郝大魁 胡志恒 王艺伟

(74)专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司 37219

代理人 朱家富

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12P 19/04(2006.01)

C02F 1/56(2006.01)

C12R 1/38(2006.01)

(56)对比文件

CN 103352017 A,2013.10.16,

CN 103031262 A,2013.04.10,

CN 103031262 A,2013.04.10,

邱忠平等.微生物絮凝剂产生菌的筛选及其絮凝特性.《环境工程学报》.2009,第3卷(第7期),

Jian-Dong Cui等.Production of Extracellular Water-Insoluble Polysaccharide from Pseudomonas sp..《J. Agric. Food Chem.》.2012,第60卷

Jian-Dong Cui等.Production of Extracellular Water-Insoluble Polysaccharide from Pseudomonas sp..《J. Agric. Food Chem.》.2012,第60卷

Jian-Dong Cui等.Production of Extracellular Water-Insoluble Polysaccharide from Pseudomonas sp..《J. Agric. Food Chem.》.2012,第60卷

李明源等.细菌胞外多糖的特性及应用研究.《生物技术通报》.2014,(第6期),

罗平等.胞外多糖生物絮凝剂RL-2的性能研究.《水处理技术》.2005,第31卷(第6期),

审查员 白鸽

权利要求书1页 说明书6页

序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一株假单胞菌产生的胞外多糖及培养方法与应用

(57)摘要

本发明涉及一株假单胞菌产生的胞外多糖及培养方法与应用。一株假单胞菌(Pseudomonas sp.)QL212,已于2014年9月12日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏编号:CGMCC NO.9651。本发明所述的假单胞菌(Pseudomonas sp.)QL212,合成的凝胶多糖为胞外多糖,经发酵条件优化,凝胶多糖产量可达5.94g/L,产量高于现有已知的假

单胞菌凝胶多糖的最高产量。

1. 一株假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) QL212, 2014年9月12日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 地址: 北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所, 保藏编号: CGMCC NO.9651。

2. 权利要求1所述的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) QL212的培养方法, 其特征在于, 步骤如下:

(1) 将假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) QL212接种于固体斜面培养基上, 在28~32℃活化培养20~28h, 制得活化菌体;

(2) 将步骤(1)制得的活化菌体接种于种子培养基中, 在28~32℃、150~300 rpm 条件下培养20~28h, 制得种子液;

(3) 将步骤(2)制得的种子液按体积百分比8~12%的比例接种至发酵培养基中, 在28~32℃、150~300 rpm 条件下发酵培养5~8天, 即得发酵液;

所述步骤(1)中的固体斜面培养基, 组分如下, 均为重量百分比:

1~1.2%蔗糖、0.5~0.7%酵母粉、1.5~1.6%琼脂、余量水;

所述步骤(2)中的种子培养基, 每升组分如下:

蔗糖 10~12g, 酵母粉 5~7g, CaCO<sub>3</sub> 1~1.2g, 水定容至1L, pH 7.0;

所述步骤(3)中的发酵培养基,

蔗糖10~12g, 酵母粉 5~7g, CaCO<sub>3</sub> 1~1.2g, 水定容至1L, pH 7.0。

3. 权利要求1所述假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) QL212在发酵生产微生物胞外多糖絮凝剂中的应用。

4. 如权利要求3所述的应用, 其特征在于, 步骤如下:

取所述假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) QL212的发酵液, 经离心, 取上清, 加入3~4倍体积的无水乙醇, 搅拌后, 静置过夜, 收集沉淀, 用体积百分比为80%的乙醇洗涤沉淀, 烘干至恒重, 制得微生物胞外多糖絮凝剂。

5. 如权利要求4所述的应用, 其特征在于, 所述的离心, 条件为: 8000 rpm冷冻离心20 min。

6. 如权利要求4所述的应用, 其特征在于, 所述的烘干, 温度为60℃。

## 一株假单胞菌产生的胞外多糖及培养方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一株假单胞菌产生的胞外多糖及培养方法与应用,特别涉及一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) QL212及其培养方法与在发酵生产微生物胞外多糖絮凝剂中的应用,属于微生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 微生物胞外多糖是由某些细菌、真菌在各种碳源上生长过程中合成的,并分泌到细胞外的水溶性或水不溶性多糖物质。凝胶多糖是微生物发酵产生的直链同型 $\beta$ -1,3-葡聚糖,因其独特的理化性质,使它在很多领域都具有广泛的应用开发前景。迄今为止,细菌中只报道了土壤杆菌属和产碱杆菌属能够生产同型直链的 $\beta$ -1,3-葡聚糖。热凝胶多糖(Curdlan)是继黄原胶、结冷胶之后,被美国FDA(食品药品监督管理局)批准使用的第三种微生物发酵产生的食用多糖。

[0003] 根据絮凝剂的组成,大致分为三大类:无机絮凝剂、有机絮凝剂和生物絮凝剂。无机絮凝剂能够提供大量的络合离子,因而具有较好的絮凝效果,且价格便宜,但是对人类健康和生态环境会产生不利影响;合成高分子絮凝剂虽然成本低,用法简单,但是用量大,效果差,会造成二次污染;生物絮凝剂能够弥补其它两种絮凝剂的缺点,是一类由微生物或其分泌物产生的代谢产物,通过微生物发酵、产品提取、精制而得。生物絮凝剂对人体无害,可以被生物降解,对生态环境也不存在不良影响,较之常用的聚合铝絮凝剂和聚丙烯酰胺絮凝剂要更为安全。它主要由微生物代谢产生的各种多聚糖类、蛋白质,或是蛋白质和糖类参与形成的高分子化合物,能产生生物絮凝剂的微生物大量存在于土壤、活性污泥和沉积物中。

[0004] 目前国内外有文献报道*Pseudomonas* sp.能够合成凝胶多糖,但其凝胶多糖的最大产量仅为2.35g/L(Cui JD,Qiu JQ,Production of extracellular water-insoluble polysaccharide from *Pseudomonas* sp.J Agric Food Chem,2012,60(19):4865-71.),无法满足工业生产的需求。

### 发明内容

[0005] 本发明针对现有技术的不足,提供一株假单胞菌产生的胞外多糖及培养方法与应用,并进一步提供该絮凝剂在高岭土、黄河水、印染污水和果汁等的絮凝和脱色方面的应用。

[0006] 本发明采用的技术方案如下:

[0007] 一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) QL212,2014年9月12日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏编号:CGMCC NO.9651。

[0008] 上述假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) QL212的培养方法,步骤如下:

[0009] (1)将假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) QL212接种于固体斜面培养基上,在28~32℃

活化培养20~28h,制得活化菌体;

[0010] (2) 将步骤(1)制得的活化菌体接种于种子培养基中,在28~32℃、150~300rpm条件下培养20~28h,制得种子液;

[0011] (3) 将步骤(2)制得的种子液按体积百分比8~12%的比例接种至发酵培养基中,在28~32℃、150~300rpm条件下发酵培养5~8天,即得发酵液;

[0012] 所述步骤(1)中的固体斜面培养基,组分如下,均为重量百分比:

[0013] 1~1.2%蔗糖、0.5~0.7%酵母粉、1.5~1.6%琼脂、余量水;

[0014] 所述步骤(2)中的种子培养基,每升组分如下:

[0015] 蔗糖10~12g,酵母粉5~7g,  $\text{CaCO}_3$  1~1.2g,水定容至1L, pH 7.0;

[0016] 所述步骤(3)中的发酵培养基,

[0017] 蔗糖10~12g,酵母粉5~7g,  $\text{CaCO}_3$  1~1.2g,水定容至1L, pH 7.0。

[0018] 上述假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) QL212在发酵生产微生物胞外多糖絮凝剂中的应用。

[0019] 上述应用,步骤如下:

[0020] 取上述发酵液,经离心,取上清,加入3~4倍体积的无水乙醇,搅拌后,静置过夜,收集沉淀,用体积百分比为80%的乙醇洗涤沉淀,烘干至恒重,制得微生物胞外多糖絮凝剂。

[0021] 根据本发明优选的,所述的离心,条件为:8000rpm冷冻离心20min。

[0022] 根据本发明优选的,所述的烘干,温度为60℃。

[0023] 制得的微生物胞外多糖絮凝剂,是由菌株经好氧发酵分泌到胞外产生的一种微生物多糖,其只由一种单体葡萄糖构成且其间不存在 $\alpha$ 键,所以此假单胞菌QL212所产的胞外多糖是 $\beta$ -葡萄糖,胞外多糖经过冷冻干燥后呈白色粉末状,能溶于水,多角度激光散射测得的分子量为618KDa。经检测,发酵液的絮凝剂产量为5.92g/L。

[0024] 上述微生物胞外多糖絮凝剂在液体絮凝和/或脱色处理中的应用。

[0025] 根据本发明优选的,所述液体为:高岭土悬液、黄河水、印染污水或果汁。

[0026] 有益效果

[0027] 1、本发明所述的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) QL212,合成的凝胶多糖为胞外多糖,经发酵条件优化,凝胶多糖产量可达5.94g/L,产量高于现有已知的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 凝胶多糖的最高产量;

[0028] 2、本发明制得的凝胶多糖为胞外多糖,对高岭土悬液、黄河水、印染污水及果汁等液体絮凝效果良好;此外,本发明所述的凝胶多糖具有较好水溶性,且凝胶多糖不存在使用的安全性问题,适宜在水处理中使用;

[0029] 3、本发明制得的凝胶多糖为胞外多糖,处理模拟废水或者实际的工业废水时,均具有较高的悬浊悬浮颗粒絮凝活性、染料色素脱色活性;在生活、工业等废水处理方面极具潜在用途,尤其在污水的预处理过程中可以极大简化后续处理步骤、降低后续处理成本。

## 附图说明

[0030] 图1微生物胞外多糖絮凝剂处理高岭土悬液前后的对照照片;

[0031] 图2微生物胞外多糖絮凝剂处理黄河水前后的对照照片;

- [0032] 图3微生物胞外多糖絮凝剂处理印染污水前后的对照照片；
- [0033] 图4微生物胞外多糖絮凝剂处理果汁前后的对照照片；
- [0034] 图5实施例5采用红外光谱检测纯化的微生物胞外多糖絮凝剂的检测结果图；
- [0035] 图6实施例5采用多角度激光散射检测纯化的微生物胞外多糖絮凝剂的检测结果图；
- [0036] 其中：横坐标为时间，纵坐标为相对比例(relative scale)。
- [0037] 图7实施例5采用电镜检测纯化的微生物胞外多糖絮凝剂的检测结果图；

### 具体实施方式

[0038] 下面结合实施例对本发明的技术方案做进一步描述，但本发明所保护范围并不仅限于此。

#### [0039] 实施例1

[0040] 本发明提供的菌株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) QL212, 从济南大学逸夫科技楼附近潮湿空地采集土样, 采用平板划线法和苯胺蓝特异性染色法对菌株进行分离, 经鉴定具有产生物多糖絮凝剂的性能。

[0041] 所述胞外多糖菌株为一种假单胞菌, 其16S rDNA测序结果如SEQ ID NO.1所示。测序得到的碱基数为1209 bp。

[0042] 本发明提供的菌株在含1%蔗糖、0.5%酵母粉、1.6%琼脂的固体培养基上30℃培养24h后其菌落边缘光滑整齐, 表面湿润, 乳白色不透明。

[0043] 将上述假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) QL212, 2014年9月12日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 地址: 北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所, 保藏编号: CGMCC NO.9651。

#### [0044] 实施例2

[0045] 上述假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) QL212的培养方法, 步骤如下:

[0046] (1) 将假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) QL212接种于固体斜面培养基上, 在30℃活化培养24h, 制得活化菌体;

[0047] (2) 将步骤(1)制得的活化菌体接种于种子培养基中, 在30℃、200rpm条件下培养20~28h, 制得种子液;

[0048] (3) 将步骤(2)制得的种子液按体积百分比10%的比例接种至发酵培养基中, 在30℃、200rpm条件下发酵培养6天, 即得发酵液;

[0049] 所述步骤(1)中的固体斜面培养基, 组分如下, 均为重量百分比:

[0050] 1%蔗糖、0.5%酵母粉、1.6%琼脂、余量水, pH 7.0;

[0051] 所述步骤(2)中的种子培养基, 每升组分如下:

[0052] 蔗糖10g, 酵母粉5g, CaCO<sub>3</sub> 1g, 水定容至1L, pH 7.0;

[0053] 所述步骤(3)中的发酵培养基,

[0054] 蔗糖10g, 酵母粉5g, CaCO<sub>3</sub> 1g, 水定容至1L, pH 7.0。

#### [0055] 实施例3

[0056] 取实施例2制得的发酵液, 经8000rpm冷冻离心20min, 取上清, 加入3倍体积的无水乙醇, 搅拌均匀后, 静置过夜, 收集沉淀, 用体积百分比为80%的乙醇洗涤沉淀, 60℃烘干至

恒重,制得微生物胞外多糖絮凝剂。

[0057] 经检测,每升发酵液可获得微生物胞外多糖絮凝剂(干重)5.92g。

[0058] 实施例4

[0059] 胞外多糖絮凝剂的提取纯化制备工艺

[0060] 取实施例2制得的发酵液1L,8000rpm冷冻离心20min,取上清;上清液与Sevag试剂(氯仿、正丁醇按体积比为5:1的混合液)以5:1的体积比混合,磁力搅拌30~60min后,9600rpm离心30min,小心取出分界面上层清液,重复此操作8~10次,直至分界面处无沉淀为止,向制得的上层清液中加入3L无水乙醇,搅拌30分钟,4℃恒温过夜,制得脱蛋白的凝胶多糖;

[0061] 将脱蛋白的凝胶多糖溶于适量三蒸水中,装于透析袋内用三蒸水透析36h,每8h更换一次三蒸水,用硫酸-苯酚法测定透析液中是否有糖存在,旋转蒸发仪浓缩,冷冻干燥得凝胶多糖,将凝胶多糖溶于三蒸水中,冷冻离心,取上清液备用;

[0062] CM-Sephrose Fast Flow:层析柱(1×20cm),填料为CM-Sephrose Fast Flow,上样前OD<sub>490</sub>=1.655,上样量2mL,流速为0.15mL/min,1.5mL/管分部收集,先用蒸馏水冲洗两个柱体积,再用0~1mol/L的NaCl梯度洗脱两个柱体积,测定每管收集液的含糖量。收集峰尖位置的组分,制得初纯化凝胶多糖。

[0063] Sephacryl S-500凝胶过滤层析:将离子交换层析后的初纯化凝胶多糖在三蒸水中透析除盐24h,真空冷冻干燥使其浓缩,层析柱(φ1×100 cm),填充料为Sephacryl S-500,上样量800μL,流速0.1mL/min,1.5mL/管分部收集,测定每管收集液的含糖量。收集洗脱液中的含糖量高的活性峰组分,制得纯化后的凝胶多糖溶液。

[0064] 将纯化后的凝胶多糖溶液在8000rpm冷冻离心20min,取沉淀,经真空干燥,制得纯化的微生物胞外多糖絮凝剂。

[0065] 实施例5

[0066] 絮凝剂理化性质分析

[0067] 1、絮凝剂的薄层层析:

[0068] 样品处理:取20mg实施例4制得的纯化的微生物胞外多糖絮凝剂加4mL 1mol/L硫酸溶液,100℃水解2h后加碳酸钙中和至无气泡,离心,取上清液,真空冷冻干燥使其浓缩10倍备用;

[0069] 展层剂:正丁醇:乙醇:水的体积比为5:3:2

[0070] 点样:点样间隔至少1cm,点样量1μL,展层约30min;

[0071] 晾干后,喷雾(20wt%硫酸+0.5wt%苔黑酚),喷雾不宜过多,喷遍即可,后用吹风机吹干层析板。

[0072] 2、絮凝剂的红外光谱分析:将凝胶多糖样品充分干燥,取一定量的凝胶多糖与KBr混匀压片,用傅里叶红外光谱仪对其红外吸收光谱进行测定,检测结果如图5所示。该红外光谱显示:在3600cm<sup>-1</sup>~3200cm<sup>-1</sup>出现一种-OH伸缩振动的宽峰,这是糖类物质共有的特征;在890cm<sup>-1</sup>处有β键的特质吸收峰,在840cm<sup>-1</sup>处没有吸收峰,说明凝胶多糖不存在α键,因此假单胞菌QL212所产的胞外多糖是β-葡聚糖。

[0073] 3、絮凝剂的分子量测定:利用多角度激光光散射仪对样品凝胶多糖的重均分子量M<sub>w</sub>进行测定。用流动相将样品配制成浓度为2.5mg/mL的溶液,并通过0.22μm的微孔滤膜对

其进行过滤。样品浓度、样品在不同角度的光散射强度通过示差检测器和激光检测器分别记录,利用处理软件对数据进行计算,从而获得样品的重均分子量 $M_w$ ;检测结果如图6所示;由该结果可以得出,假单胞菌QL212所产的胞外多糖重均分子量为618KDa。

[0074] 4、絮凝剂的电镜分析:将纯化后的凝胶多糖样品充分干燥,取一定量进行SEM扫描电镜观察,检测结果如图7所示。

[0075] 实施例6

[0076] 微生物胞外多糖絮凝剂在液体絮凝和/或脱色处理中的应用,步骤如下:

[0077] 将90mL污水加入100mL量筒中,用6mol/L NaOH调节污水pH至10.0,再加入质量体积分数(g/mL)为1%的 $\text{CaCl}_2$  5mL及实施例3制得的微生物胞外多糖絮凝剂配制的质量浓度为0.03%水溶液,轻轻摇匀1min,静置5min,利用722N型可见分光光度计在550nm处测80mL刻度处水样吸光度 $\text{OD}_{550}$ ,记为B。重复以上操作,用去离子水作对照代替发酵液, $\text{OD}_{550}$ 记为A。即絮凝活性 =  $(A-B)/A \times 100\%$ 。

[0078] 结果:微生物胞外多糖絮凝剂配制的溶液对高岭土悬液、印染污水、黄河水、果汁的絮凝率都达到90%以上。用可见分光光度计测高岭土悬液絮凝前在550nm处的吸光度为0.472,絮凝后为0.011,絮凝率为97.67%;用同样的方法测黄河水的絮凝前的吸光度为0.556,絮凝后为0.033,絮凝率为94.17%;印染水絮凝前的吸光度为1.175,絮凝后为0.072,絮凝率为93.87%;果汁絮凝前的吸光度为1.08,絮凝后为0.065,絮凝率为93.98%,结果如表1和图1~4所示。

[0079] 表1 凝胶多糖对污水的絮凝效果

[0080]

样品	絮凝前 $\text{OD}_{550}$	絮凝后 $\text{OD}_{550}$	絮凝率(%)
高岭土悬液	0.472	0.011	97.67
黄河水	0.566	0.033	94.17
印染废水	1.175	0.072	93.87
果汁	1.08	0.065	93.98

[0081] 水样COD的测定:

[0082] 采用重铬酸钾标准法测定水样的COD值,具体方法如下:

[0083] 向水样中加入定量的重铬酸钾和催化剂硫酸银,在强酸性的介质中加热回流2h,待冷却后,用100mL蒸馏水冲洗冷凝管管壁,然后取下锥形瓶。溶液冷却后,向锥形瓶中滴加3滴试亚铁灵指示液,采用硫酸亚铁铵标准溶液进行滴定,待黄色溶液呈现红褐色时即达到滴定终点,记录硫酸亚铁铵的用量。

[0084] 将90mL污水加入100mL量筒中,用6mol/L NaOH调节污水pH至10.0,再加入质量体积分数(g/mL)为1%的 $\text{CaCl}_2$  5mL及实施例3制得的微生物胞外多糖絮凝剂配制的0.03%水溶液,轻轻摇匀1min,静置5min。取絮凝后水样测定COD。

[0085] 结果:印染污水样品经多糖发酵液处理后,产生絮凝现象,并且化学需氧量都显著地降低,印染污水的COD值下降地更加明显。没有经过凝胶多糖发酵液处理过的印染污水COD值为46400mg/L,处理后的COD值为92mg/L,COD去除率达99%以上,结果如表2所示。

[0086] 表2 凝胶多糖对印染污水的絮凝效果

[0087]

样品	絮凝前 COD(mg/L)	絮凝后 COD550(mg/L)	COD 去除率(%)
印染污水	46400	92	大于 99

[0088] 结论:本发明所述假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) QL212菌株未纯化的发酵液或者是其发酵后经纯化的胞外多糖絮凝剂,对高岭土、黄河水、印染污水及果汁4种样品均有较好的絮凝效果,絮凝率到达90%以上。以上结论表明,凝胶多糖可以作为微生物絮凝剂,并且絮凝效果良好,并且由于凝胶多糖已被美国FDA确定作为一种安全的胞外多糖产品,在生活、工业等废水处理领域具有重要应用前景,有望将其应用于对水质要求比较高的水处理技术中。



[0001]

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 济南大学

&lt;120&gt; 一株假单胞菌产生的胞外多糖及培养方法与应用

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1209

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pseudomonas sp.

&lt;400&gt; 1

```

ggggcgacga cgcagtgccg gcttgcattg ctgcaggtcg acgattagag ttgatcctg      60
gctcagattg aacgctggcg gcaggcctaa cacatgcaag tcgagcggta gagaggtgct      120
tgcacctctt gagagcggcg gacgggtgag taaagcctag gaatctgcct ggtagtgggg      180
gataacgctc ggaaacggac gctaataccg catacgtcct acgggagaaa gcaggggacc      240
ttcgggcctt gcgctatcag atgagcctag gtcggattag ctagttgggtg aggtaatggc      300
tcaccaaggc gacgatccgt aactggctctg agaggatgat cagtcacact ggaactgaga      360
cacggtccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tggacaatgg gcgaaagcct      420
gatccagcca tgccgcgtgt gtgaagaagg tcttcgattt gtaaagcact ttaagttggg      480
aggaagggca ttaacctaat acgttagtgt ttgacgtta ccgacagaat aagcaccggc      540
taactctgtg ccagcagccg cggtaataca gagggtgcaa gcgttaatcg gaattactgg      600
gcgtaaagcg cgcgtaggtg gttcgttaag ttggatgtga aatccccggg ctcaacctgg      660
gaactgcatt caaaactgtc gagctagagt atggtagagg gtggtgggat ttctgtgtga      720
gcggtgaaat gcgtagatat aggaaggaac accagtggcg aaggcgacca cctggactga      780
tactgacact gaggtgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca      840
cgccgtaaac gatgtcaact agccgttggg agccttgagc tcttagtggc gcagctaacg      900
cattaagtgt accgcctggg gactacggcc gcaagggtta aactcaaatg aattgacggg      960
ggcccgacac agcgggtggg catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga acctttacca     1020
gggccttgac atccaatgaa ctttcagag atgggattgg tgccctttca ggaacatttg     1080
agacaggtgc tgcattgggt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggg atagtccccg     1140
ttacgagcgc aacccttggg catagttaca agcaacgttc tgggtgggca cctcttaagg     1200
gaagacctt                                     1209

```

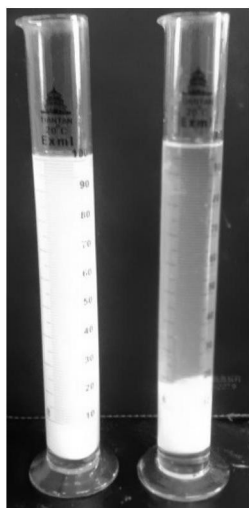


图1

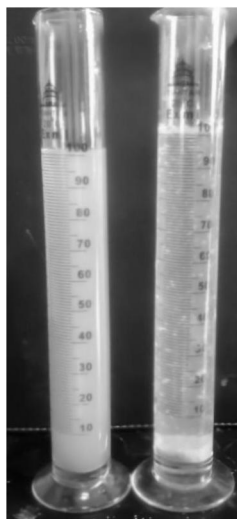


图2

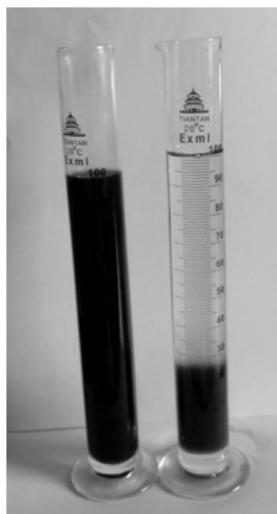


图3

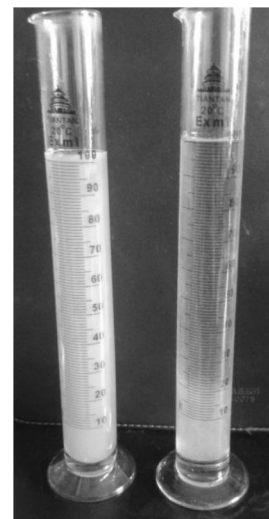


图4

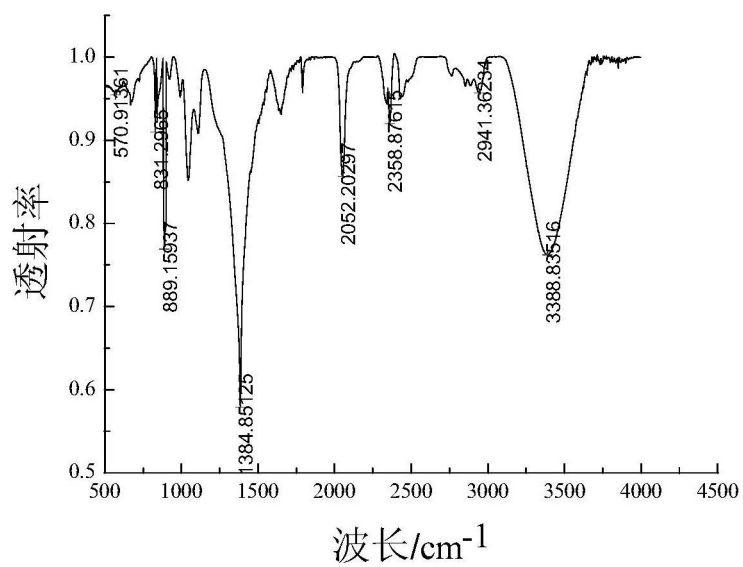


图5

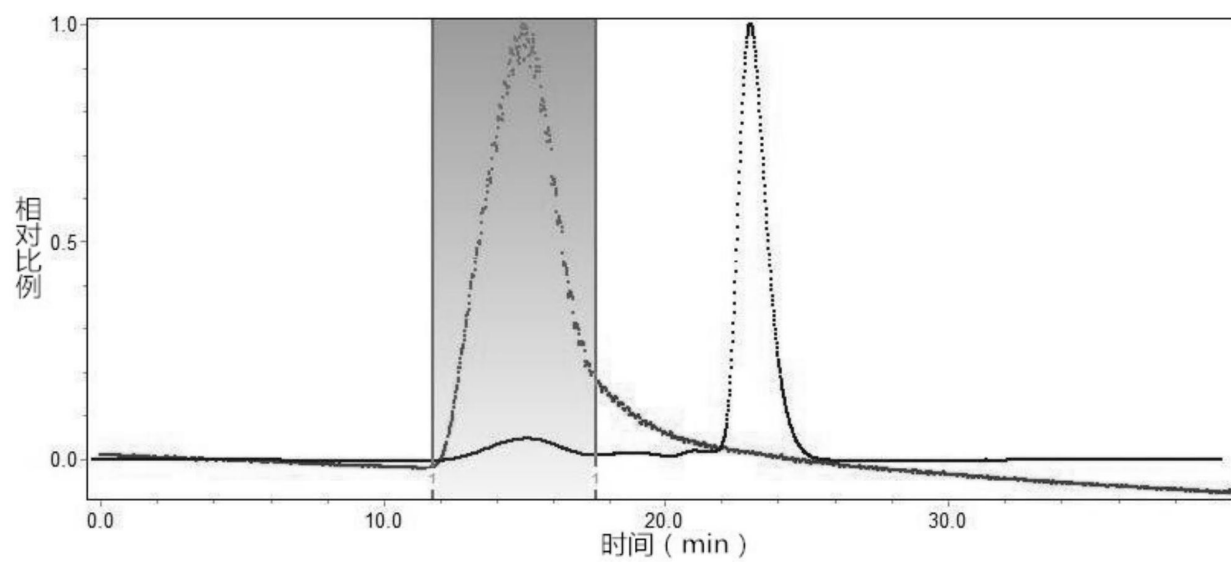


图6

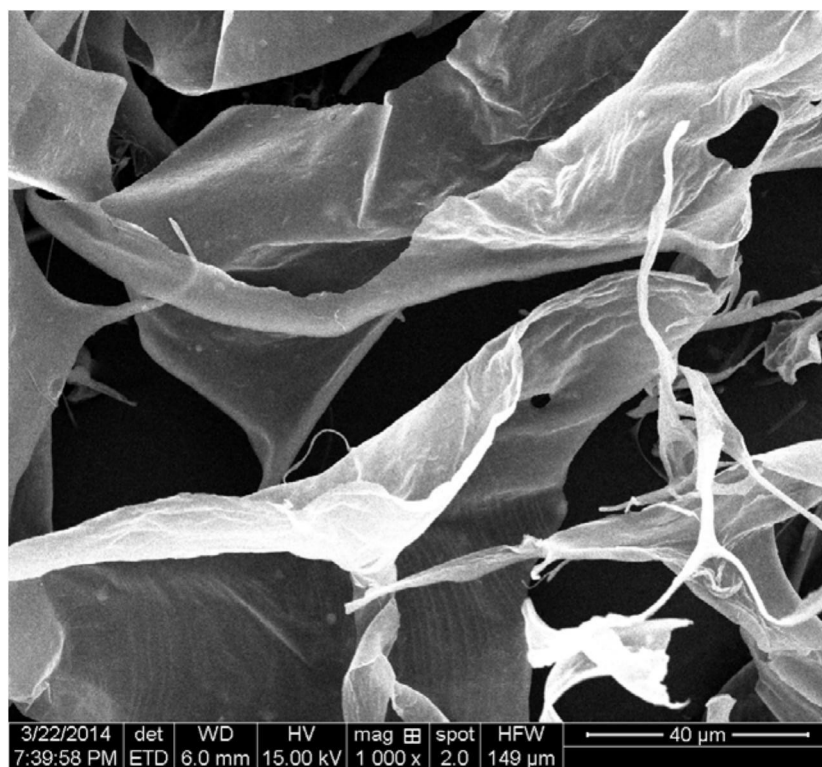


图7