(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110358686 A
(43)申请公布日 2019.10.22

(21)申请号 201910636096.3

(22)申请日 2013.04.18

(30)优先权数据
61/635,285 2012.04.18 US
61/639,838 2012.04.27 US
61/655,469 2012.06.04 US
61/672,196 2012.07.16 US
61/679,026 2012.08.02 US
61/715,998 2012.10.19 US
61/769,678 2013.02.26 US
61/778,963 2013.03.13 US
61/809,213 2013.04.05 US

(62)分案原申请数据
201380031877.0 2013.04.18

(71)申请人 柯碧恩生物技术公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 S·富兰克林 A·索曼奇
G·鲁登科 R·巴特 X·赵
R·邦德 W·莱基特斯基
A·马兰戈尼 D·布拉克斯梅耶

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 胡晨曦 黄革生

(51)Int.Cl.
C12N 1/13(2006.01)
C12P 7/64(2006.01)
C12P 33/00(2006.01)
A23D 9/013(2006.01)
C11B 1/00(2006.01)

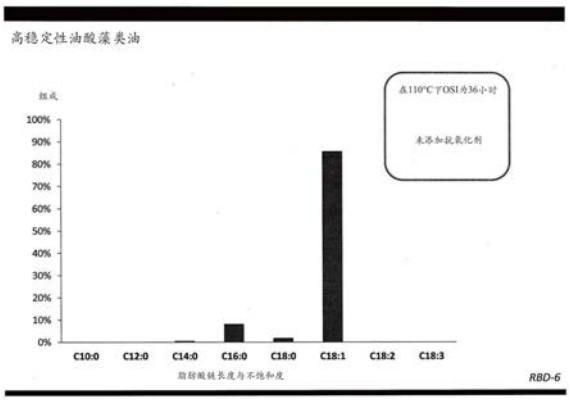
权利要求书2页 说明书241页 附图23页

(54)发明名称

定制油

(57)摘要

本发明涉及定制油。具体而言，重组DNA技术被用于制造产油重组细胞，这些细胞产生了具有所希望的脂肪酸谱和区域特异性或立体特异性谱的三酸甘油酯油。所操作的基因包括了编码硬脂酰基-ACP去饱和酶、Δ12脂肪酸去饱和酶、酰基-ACP硫酯酶、酮酰基-ACP合酶及溶血磷脂酸酰基转移酶的那些。所产生的油可以具有增强的氧化或热稳定性，或可以适用作一种油炸油、起酥油、包入起酥油、回火脂肪、可可脂替代品、作为一种润滑剂或作为不同化学工艺的一种原料。该脂肪酸谱可以富集中链谱或该油可以富集饱和-不饱和-饱和型三酸甘油酯。



CN 110358686 A

1.一种无绿藻属的产油微藻细胞，任选地包含一个外源蔗糖转化酶基因，以使得该细胞能够以蔗糖作为一种唯一碳源进行生长，该细胞包含了编码一种活性LPAAT酶的一个外源基因，该细胞产生一种包含三酸甘油酯的油，其中由于该LPAAT活性，该油：

(a)富集含中链脂肪酸的三酸甘油酯；或

(b)富集饱和-不饱和-饱和型三酸甘油酯。

2.如权利要求1所述的细胞，其中该油的三酸甘油酯包含了40％、50％、60％、70％或80％或更多的C8:0、C10:0、C12:0、C14:0或C16:0脂肪酸。

3.如权利要求1或2所述的细胞，其中该细胞另外包含了编码一种活性FATB酰基-ACP硫酯酶的一个外源基因。

4.如权利要求3所述的细胞，其中该油的三酸甘油酯由于该外源LPAAT和酰基-ACP硫酯酶的表达而使中链脂肪酸富集超过70％。

5.如权利要求1到4中任一项所述的细胞，其中该细胞另外包含了可操作以编码一种外源KAS I或KAS IV酶或减少一种内源KAS I酶的活性的重组核酸。

6.如权利要求1到5中任一项所述的细胞，其中该细胞另外包含多种核酸，这些核酸可操作以任选地经由一个可调控启动子减少一种Δ12脂肪酸去饱和酶的表达，由此产生了通过FAME GC/FID测量的亚油酸和亚麻酸的面积百分比总计为5％或更低的一种油。

7.如权利要求1所述的细胞，其中该油富集该饱和-不饱和-饱和型三酸甘油酯。

8.如权利要求7所述的细胞，其中该油富集SOS、POS和/或POP。

9.如权利要求8所述的细胞，其中该油包含了含至少50％的SOS和任选地不到10％的SSS的三酸甘油酯。

10.如权利要求8或9所述的细胞，另外包含一个硬脂酰基-ACP去饱和酶基因、FatA基因或两者的一种敲除或敲减。

11.如权利要求7到9中任一项所述的细胞，另外包含了可操作以增加β-酮酰基CoA合酶活性的重组核酸。

12.如权利要求11所述的细胞，其中这些可操作以增加β-酮酰基合酶活性的核酸包含了编码一种β-酮酰基CoA合酶的一个外源基因。

13.如权利要求7到12中任一项所述的细胞，其中油中硬脂酸酯与油酸酯的比率为3:1±20％。

14.如权利要求7到13中任一项所述的细胞，其中该油中POP、SOS及POS总计占至少30％。

15.如权利要求7到14中任一项所述的细胞，其中该油包含至少30％的POS。

16.如权利要求7到15中任一项所述的细胞，其中该油包含16％±20％的POP、38％±20％的POS及23％±20％的SOS。

17.如权利要求7到16中任一项所述的细胞，其中该油的脂肪酸谱包含1％到4％的花生酸。

18.如权利要求7到17中任一项所述的细胞，其中该细胞另外包含多种核酸，这些核酸可操作以任选地经由一个可调控启动子减少一种Δ12脂肪酸去饱和酶的表达，由此产生了亚油酸和亚麻酸的面积百分比总计为5％或更低的一种油。

19.如权利要求7到17中任一项所述的细胞，其中该油具有超过65％的SOS、不到45％的

不饱和脂肪酸、不到5%的多不饱和脂肪酸、不到1%的月桂酸及不到2%的反式脂肪酸。

20.如权利要求1到19中任一项所述的细胞，其中该LPAAT具有SEQ ID NO:78或SEQ ID NO:79的氨基酸序列或与SEQ ID NO:78或SEQ ID NO:79具有至少95%一致性的一个序列。

21.一种用于制造油的方法，包括了提供或培养一种根据权利要求1到20中任一项所述的细胞，并提取该油。

22.一种用于产生具有3.5%或更少饱和脂肪酸的油的方法，该方法包括：提供或培养一种如权利要求5到12中任一项所述的细胞，并且从该细胞提取该油。

23.一种用于制造食品的方法，该方法包括将一种通过如权利要求22所述的方法制造的油并入该食品中，其中该最终的食品具有3.5%或更少的饱和脂肪。

24.一种用于制造油的方法，该方法包括：

(a)提供或培养无绿藻属的产油微藻细胞，该细胞任选地包含一个外源蔗糖转化酶基因，以使得该细胞能够以蔗糖作为一种唯一碳源进行生长，该细胞包含了编码一种活性LPAAT酶的一个外源基因，该细胞产生一种包含三酸甘油酯的油，其中由于该LPAAT活性，该油富集饱和-不饱和-饱和型三酸甘油酯；和

(b)提取该油。

25.如权利要求24所述的方法，其中该油富集SOS、POS和/或POP。

26.如权利要求24或25所述的方法，其中该油中POP、SOS及POS总计占至少30%。

27.如权利要求24-26中任一项所述的方法，其中该油包含了含至少50%的SOS和任选地不到10%的SSS的三酸甘油酯。

28.如权利要求24-27中任一项所述的方法，其中油中硬脂酸酯与油酸酯的比率为3:1±20%。

29.如权利要求24-28中任一项所述的方法，其中该油包含至少30%的POS。

30.如权利要求24-29中任一项所述的方法，其中该油包含16%±20%的POP、38%±20%的POS及23%±20%的SOS。

31.一种用于制造食品的方法，该方法包括将一种通过如权利要求24-30中任一项所述的方法制造的油并入该食品中。

32.如权利要求24-31中任一项所述的方法，其中所述微藻细胞是桑椹型无绿藻(Prototheca moriformis)。

33.如权利要求1-20中任一项所述的细胞，其中所述微藻细胞是桑椹型无绿藻(Prototheca moriformis)。

定制油

本申请为2013年4月18日提交的发明名称为“定制油”的PCT申请PCT/US2013/037261的分案申请，所述PCT申请进入中国国家阶段日期为2014年12月17日，申请号为201380031877.0。

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请依据35USC 119(e)要求以下各案的权益：2012年4月18日提交的美国临时专利申请号61/635,285、2012年4月27日提交的美国临时专利申请号61/639,838、2012年6月4日提交的美国临时专利申请号61/655,469、2012年7月16日提交的美国临时专利申请号61/672,196、2012年8月2日提交的美国临时专利申请号61/679,026、2012年10月19日提交的美国临时专利申请号61/715,998、2013年2月26日提交的美国临时专利申请号61/769,678、2013年3月13日提交的美国临时专利申请号61/778,963及2013年4月5日提交的美国临时专利申请号61/809,213，所有这些的相关部分都通过引用结合，条件是在此术语的定义应当是完整的且控制性的定义。

序列表的引用

[0002] 本申请包括在详细说明的最后所显示的序列表。

技术领域

[0003] 本发明的实施例涉及油/脂肪、燃料、食品及油脂化学品，以及由基因工程改造的细胞的培养物对其进行的制造。具体实施例涉及具有高三酸甘油酯含量并且在甘油主链上带有呈特定区域特异性模式的脂肪酰基的油、高度稳定的油、具有高油酸或中链脂肪酸水平的油以及由这些油制造的产品。

背景技术

[0004] PCT公开WO 2008/151149、WO 2010/06032、WO 2011/150410、WO 2011/150411、WO 2012/061647及WO 2012/106560披露了多种油以及在微生物(包括微藻)中制造那些油的方法。这些公开还描述了这些油用于制备油脂化学品和燃料的用途。

[0005] 回火是通过操作脂肪或含脂肪物质的温度来将该脂肪转化成所希望的多形性形式的一种方法，常用于巧克力制造中。

[0006] 脂肪酰基-CoA延长路径的某些酶起到了延伸脂肪酰基-CoA分子的长度的作用。延长酶-复合物酶通过增加2个碳使脂肪酰基-CoA分子延伸，例如肉豆蔻酰基-CoA变为棕榈酰基-CoA、硬脂酰基-CoA变为花生酰基-CoA，或油酰基-CoA变为二十烷酰基-CoA，二十烷酰基-CoA变为芥酰基-CoA。此外，延长酶还使酰基链长度以2个碳的增量延伸。KCS酶使酰基-CoA分子与来自丙二酰基-CoA的两个碳缩合以形成β-酮酰基-CoA。KCS和延长酶可以对于使具有特定碳长度的酰基底物缩合、修饰(如羟基化)或饱和程度显示出特异性。举例来说，已经证实，荷荷巴(油蜡树)β-酮酰基-CoA合酶偏好单不饱和及饱和C18-CoA和C20-CoA底物以提高转基因植物中芥酸的产量(拉丝纳(Lassner)等，《植物细胞》(Plant Cell)，1996，第8(2)卷，第281-292页)，而布氏锥虫的特定延长酶则对延长短链和中链饱和CoA底物显示出

偏好(李(Lee)等,《细胞》(Cell),2006,第126(4)卷,第691-9页)。

[0007] II型脂肪酸生物合成路径采用了由多种可溶性蛋白质催化的一系列反应,其中间物在多种酶之间穿梭,如酰基载体蛋白(ACP)的硫酯。相比之下,I型脂肪酸生物合成路径使用了单一较大的多功能多肽。

[0008] 产油的非光合作用藻类桑椹型无绿藻在营养碳供应过量的条件下储存大量的三酰基甘油酯,但由于其他必需养分的限制,细胞分裂受到抑制。碳链长度多达C18的脂肪酸的大量生物合成是在质体中发生;然后,脂肪酸被输出到内质网,相信(如果它发生的话)在其中发生了延长超过C18以及结合到三酰基甘油酯(TAG)中。脂质被储存在较大的胞质细胞器中,称为脂质体,直到环境条件变为有利于生长,此时,它们被动员起来以为合成代谢提供能量和碳分子。

发明内容

[0009] 在一个方面,本发明提供一种产油的微藻细胞,该细胞任选地包含与SEQ ID NO:76具有至少65%核苷酸序列一致性的23S rRNA,任选地为专性异养的,并且任选地包含一个外源蔗糖转化酶基因,以使得该细胞能够以蔗糖作为唯一碳源进行生长,其中该细胞包含了编码一种活性LPAAT酶的一个外源基因,并且该细胞产生一种包含三酸甘油酯的油,其中由于该LPAAT活性,该油:(a)富集了含中链脂肪酸的三酸甘油酯;或(b)富集了饱和-不饱和-饱和型三酸甘油酯。

[0010] 在一些情形中,该油的三酸甘油酯包含了40%、50%、60%、70%或80%或更多的C8:0、C10:0、C12:0、C14:0或C16:0脂肪酸。在一些情形中,该细胞另外包含了编码一种活性FATB酰基-ACP硫酯酶的一个外源基因。在一些情形中,该油的三酸甘油酯由于该外源LPAAT和酰基-ACP硫酯酶的表达而使中链脂肪酸富集超过70%。在一些情形中,该细胞另外包含了可操作以编码一种外源KAS I或KAS IV酶的重组核酸,用以减少一种内源KAS I酶的活性。在一些情形中,该细胞另外包含多种核酸,这些核酸可操作以任选地经由一个可调控启动子减少一种Δ12脂肪酸去饱和酶的表达,由此产生了亚油酸和亚麻酸的面积百分比总计为5%或更低(通过FAME GC/FID)的一种油。在一些情形中,该油富集该饱和-不饱和-饱和型三酸甘油酯。在一些情形中,该油富集SOS、POS和/或POP。在一些情形中,该油包含了含至少50%的SOS和任选地不到10%的SSS的三酸甘油酯。

[0011] 在一些情形中,该细胞另外包含一种硬脂酰基-ACP去饱和酶基因、FatA基因或两者的敲除或敲减。在一些情形中,该细胞另外包含了可操作以增加β-酮酰基CoA合酶活性的重组核酸。在一些情形中,这些可操作以增加β-酮酰基活性的核酸包含了编码一种β-酮酰基CoA合酶的一个外源基因。

[0012] 在一些情形中,油中硬脂酸酯与油酸酯的比率为3:1±20%。在一些情形中,该油中POP、SOS及POS总计占至少30%。在一些情形中,该油包含至少30%的POS。在一些情形中,该油包含16%±20%的POP、38%±20%的POS及23%±20%的SOS。在一些情形中,该油的脂肪酸谱包含1%到4%的花生酸。

[0013] 在一些情形中,该细胞另外包含多种核酸,这些核酸可操作以任选地经由一个可调控启动子减少一种Δ12脂肪酸去饱和酶的表达,由此产生了亚油酸和亚麻酸的面积百分比总计为5%或更低的一种油。在一些情形中,该油具有超过65%的SOS、不到45%的不饱和

脂肪酸、不到5％的多不饱和脂肪酸、不到1％的月桂酸及不到2％的反式脂肪酸。

[0014] 在一些情形中，该LPAAT具有SEQ ID NO:78或SEQ ID NO:79的氨基酸序列或与SEQ ID NO:78或SEQ ID NO:79具有至少95％一致性的一个序列。

[0015] 在另一个方面，本发明提供了一种用于制造油的方法，包括了提供或培养一种如以上所论述的细胞，并提取该油，其中该细胞任选地进行异养培养。

[0016] 在另一个方面，本发明提供了一种通过以上论述的方法制造的油，该油包含三酸甘油酯。在一些情形中，该油包含以下各项中的一种或多种：至少10％的麦角固醇；麦角固醇和b-谷固醇，其中麦角固醇与b-谷固醇的比率超过25:1；麦角固醇和菜籽固醇；麦角固醇、菜籽固醇及多孔固醇，并且该油任选地不含以下各项中的一种或多种：β-谷固醇、菜油固醇及豆固醇。

[0017] 在一些情形中，该油形成β多形性晶体。在一些情形中，这些晶体具有一种2L的层状结构。在一些情形中，这些晶体具有一种3L的层状结构。

[0018] 在一些情形中，该油形成β’多形性晶体。在一些情形中，这些晶体具有一种2L的层状结构。在一些情形中，这些晶体具有一种3L的层状结构。

[0019] 在一些情形中，其中该油的三酸甘油酯具有一种脂肪酸谱，其特征在于，硬脂酸酯和棕榈酸酯的百分含量的总和等于油酸酯的百分含量乘以2.0+/-40％。在一些情形中，该油具有超过65％的SOS三酸甘油酯、不到45％的不饱和脂肪酸、不到5％的不饱和脂肪酸、不到1％的月桂酸及不到2％的反式脂肪酸。在一些情形中，该油的脂肪酸谱中硬脂酸酯和棕榈酸酯的百分比的总和是油酸酯的百分含量的两倍，±20％。在一些情形中，该油的sn-2谱具有至少40％的油酸酯。在一些情形中，该油为至少40％、50％、60％、70％、80％或90％的SOS。

[0020] 在一些情形中，该油是一种包入(roll-in)起酥油，具有一种介于30℃与40℃之间的熔融温度。在一些情形中，该油包含β’多形性晶体。在一些情形中，该油在35℃具有一种不到15％的固体脂肪含量。在一些情形中，该油包含15％到20％的C8到C14脂肪酸、45％-50％的C16和更高级脂肪酸，和/或30％-25％的不饱和脂肪酸。

[0021] 在另一个方面，本发明提供一种使用以上论述的油制造的食品、燃料或化学产品。

[0022] 在另一个方面，本发明提供了一种天然油或由一种天然制造的RBD油，其中该油包含3.5％或更少的饱和脂肪酸，并且任选地包含超过50％的油酸和/或超过1％的棕榈油酸。在一些情形中，该油具有介于0.1％与3.5％之间的饱和脂肪酸。在一些情形中，该油包含至少90％的油酸。在一些情形中，该油包含至少3％的多不饱和脂肪酸。

[0023] 在另一个方面，本发明提供一种产油细胞，该细胞任选地包含与SEQ ID NO:76具有至少65％核苷酸序列一致性的23S rRNA，并且任选地为专性异养的，其中该细胞产生了一种包含3.5％或更少饱和脂肪酸的油。

[0024] 在一些情形中，该细胞是一种任选地属于无绿藻属的微藻细胞。在一些情形中，该细胞另外包含一种FATA的敲除或敲减。在一些情形中，该细胞包含一个外源基因，该基因编码一种具有使棕榈酰基(palmitoyl)-CoA去饱和成为棕榈油酰基(plamitoyl)-CoA的活性的酶。在一些情形中，该外源基因是一个PAD基因。在一些情形中，该外源基因是一个对棕榈酰基-ACP具有去饱和酶活性的SAD基因。在一些情形中，该细胞另外包含一种过表达的KAS II酶。

[0025] 在一些情形中，该细胞另外包含多种核酸，这些核酸可操作以任选地经由一个可调控启动子减少一种Δ12脂肪酸去饱和酶的表达，由此产生了亚油酸和亚麻酸的面积百分比总计为5％或更低的一种油。

[0026] 在另一个方面，本发明提供了一种由以上论述的细胞产生的油，该油任选地进行精炼、漂白并且除臭，其中该油包含以下各项中的一种或多种：至少10％的麦角固醇；麦角固醇和b-谷固醇，其中麦角固醇与b-谷固醇的比率超过25:1；麦角固醇和菜籽固醇；以及麦角固醇、菜籽固醇及多孔固醇，并且其中该油任选地不含以下各项中的一种或多种：β-谷固醇、菜油固醇及豆固醇。

[0027] 在另一个方面，本发明提供了一种用于制造具有3.5％或更少饱和脂肪酸的油的方法，其中该方法包括了提供或培养一种如以上或在此所论述的细胞，并且从该细胞提取该油。

[0028] 在另一个方面，本发明提供了一种用于制造食品的方法，其中该方法包括了将由以上或在此所论述的方法制造的一种油并入该食品中，其中最终的食品具有3.5％或更少的饱和脂肪。

[0029] 在另一个方面，本发明提供一种重组产油细胞，该细胞任选地包含与SEQ ID NO:76具有至少65％核苷酸序列一致性的23S rRNA，并且任选地为专性异养的，其中该细胞包含了编码一种活性酮酰基-CoA合酶的一个外源基因。

[0030] 在一些情形中，该细胞产生了一种包含超过20％的芥酸的油。在一些情形中，该细胞产生了一种包含超过60％的芥酸的油。在一些情形中，该油包含至少40％的油。在一些情形中，该细胞属于无绿藻属，并且任选地属于桑椹型无绿藻种类。在一些情形中，由该细胞产生的油包含以下各项中的一种或多种：至少10％的麦角固醇；麦角固醇和b-谷固醇，其中麦角固醇与b-谷固醇的比率超过25:1；麦角固醇和菜籽固醇；及麦角固醇、菜籽固醇及多孔固醇，并且该油任选地不含以下各项中的一种或多种：β-谷固醇、菜油固醇及豆固醇。

[0031] 在另一个方面，本发明提供了一种由以上论述的油制造的化学品。

[0032] 在另一个方面，本发明提供了一种用于制造油的方法，其中该方法包括了提供或培养一种如以上所论述的细胞，并且从该细胞提取一种油。

[0033] 在另一个方面，本发明提供了一种重组产油细胞，该细胞包含多种重组核酸，这些核酸可操作以抑制一种Δ12脂肪酸去饱和酶基因产物的活性，以使得该细胞产生了具有不到5％亚油酸的一种三酰基甘油谱的一种油。在一些情形中，该细胞产生了具有不到3％亚油酸的一种三酰基甘油谱的一种油。在一些情形中，该细胞产生了具有不到2％亚油酸的一种三酰基甘油谱的一种油。

[0034] 在一些情形中，该细胞为一种亚油酸营养缺陷体或该Δ12脂肪酸去饱和酶的活性可以经由环境条件进行抑制，由此产生该油。在一些情形中，归因于与该Δ12脂肪酸去饱和酶基因可操作连接的一个可调控启动子，该Δ12脂肪酸去饱和酶是经由环境条件可调控的。在一些情形中，该可调控启动子是通过培养基pH或氮水平的改变可调控的。

[0035] 在一些情形中，该细胞另外包含了可操作以表达一种外源KAS II、LPAAT或FATB酶的重组核酸。在一些情形中，该细胞另外包含了可操作以使一种硬脂酰基ACP去饱和酶的表达敲除或敲减的重组核酸。在一些情形中，该细胞另外包含了可操作以使一种内源FatA编码的酰基-ACP硫酯酶的表达敲除或敲减的重组核酸。

[0036] 在一些情形中，该油在110℃下是稳定的，以使得在AOCS Cd12b-92兰奇马特测试(Rancimat test)的条件下，到20小时的时候仍未到达电导率的拐点。在一些情形中，该油在110℃下是稳定的，以使得当向该油中添加1050ppm的生育酚和500pm的抗坏血酸棕榈酸酯时，在该AOCS Cd12b-92兰奇马特测试条件下，到5天时仍未到达电导率的拐点。

[0037] 在另一个方面，本发明提供了一种方法，包括：(a)提供一种重组产油细胞，该细胞任选地包含与SEQ ID NO:76具有至少65％的核苷酸序列一致性的23S rRNA，任选地为专性异养的，其中该细胞包含了多种重组核酸，这些核酸可操作以响应于一种环境条件的一种变化而改变由该细胞产生的一种脂肪酸的量；(b)在容许该脂肪酸的合成的一种第一环境条件下培养该细胞，由此允许细胞分裂并增加细胞数量；(c)在一种第二环境条件下培养该细胞，由于这些重组核酸，该条件使该脂肪酸合成减少并由此使由该细胞产生的一种油中脂肪酸的量减少；并且(d)从该细胞提取该油。

[0038] 在一些情形中，该细胞包含多种外源核酸，这些核酸可操作以降低一种Δ12脂肪酸去饱和酶的活性，由此减少该油中亚油酸的量。在一些情形中，该油中亚油酸减少至少50％、60％、70％、80％或90％。

[0039] 在一些情形中，该细胞是异养地培养的。在一些情形中，这种细胞是一种微藻细胞。在一些情形中，该细胞产生了以干细胞重量计至少40％、50％、60％、70％、80％或90％的油。

[0040] 在一些情形中，该第一环境条件是一种第一pH的培养用培养基并且该第二环境条件是一种第二pH的培养用培养基。

[0041] 在一些情形中，当从该细胞提取时，该油在110℃下是稳定的，以使得在AOCS Cd 12b-92兰奇马特测试的条件下，到20小时的时候仍未到达电导率的拐点。在一些情形中，当从该细胞提取时，该油在110℃下是稳定的，以使得当向该油中添加1050ppm的生育酚和500pm的抗坏血酸棕榈酸酯时，在该AOCS Cd 12b-92兰奇马特测试条件下，到5天时仍未到达电导率的拐点。

[0042] 在一些情形中，该细胞包含了编码一种KAS II酶的一种外源基因并且任选地具有一个FatA基因的敲除或敲减。在一些情形中，可操作以改变该细胞所产生的一种脂肪酸的量的这些重组核酸包含了靶向一个FAD基因的一种抑制性RNA，该抑制性RNA的产生是处于一个可调控启动子的控制下。

[0043] 在一些情形中，该油以具有超过60％的油酸和不到3％的多不饱和物的一种脂肪酸谱为特征。在一些情形中，该油以具有超过70％的油酸和不到2％的多不饱和物的一种脂肪酸谱为特征。在一些情形中，该油以具有超过80％的油酸和不到1％的多不饱和物的一种脂肪酸谱为特征。

[0044] 在另一个方面，本发明提供了一种通过以上论述的方法制造的油。在一些情形中，该油包含0.01％到2％的亚油酸以及(i)80％到95％的油酸或(ii)超过40％的C8、C10、C12、C14或C16脂肪酸。在一些情形中，该油另外包含以下各项中的一种或多种：至少10％的麦角固醇；麦角固醇和β-谷固醇，其中麦角固醇与β-谷固醇的比率超过25:1；麦角固醇和菜籽固醇；以及麦角固醇、菜籽固醇及多孔固醇。

[0045] 在另一个方面，本发明提供了一种由以上论述的油制造的产品。在一些情形中，该产品为一种食品、燃料或化学品。在一些情形中，该产品是一种油炸油、润滑油、清洁溶剂、

表面活性剂、泡沫材料或润滑剂。在一些情形中，该产品是一种油酸二聚物。

[0046] 在另一个方面，本发明提供了一种构建体、载体、染色体或宿主细胞，包含了编码与SEQ ID NO:77到79具有至少90％一致性的一种蛋白质的核酸。在一些情形中，这些核酸编码与SEQ ID NO:77到79具有至少95％一致性的一种蛋白质。在一些情形中，这些核酸编码与SEQ ID NO:77到79具有至少98％一致性的一种蛋白质。在一些情形中，这些核酸由于遗传密码的简并性而与SEQ ID NO:80-85或等效序列具有至少80％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列一致性。

[0047] 本发明的这些以及其他方面与实施例于附图(简要说明紧随其后)、本发明的详细描述以及实例中进行了描述和/或举例说明。上文讨论和贯穿本申请的任何或所有特征可以在本发明的多种实施例中组合。

附图说明

[0048] 图1-14示出了经过精炼、漂白并且除臭的由经过遗传工程改造的桑椹型无绿藻品系产生的油的脂肪酸谱和熔融曲线，如实例4中所论述；

[0049] 图15示出了不同油的稳定性随抗氧化剂浓度的变化，如实例5中所论述；

[0050] 图16示出了根据本发明一个实施例，具有极低多不饱和脂肪酸水平的天然油的不同特性；并且

[0051] 图17示出了如下所示的不同油的固体脂肪含量％的曲线：(a)未进行脂质路径工程改造的桑椹型无绿藻RBD油；(b)巴西可可脂+25％乳脂；(c)由表达发夹核酸的品系得到的桑椹型无绿藻RBD油的三个重复试样，这些核酸使SAD等位基因水平降低，由此减少TAG谱中的油酸并增加硬脂酸；(d)由过表达内源OTE(油酰基酰基-ACP硫酯酶，参看实例45)的品系得到的桑椹型无绿藻RBD油；(e)马拉西亚可可脂+25％乳脂；及(f)马拉西亚可可脂。该可可脂和可可脂乳脂值是文献值(《贝雷工业油与脂肪产品》(Bailey's Industrial Oils and Fat Products)，第6版)。

[0052] 图18示出了与大豆甲基酯对照样品相比较，针对由异养地生长的产油微藻制备的高油酸(HO)和高稳定性高油酸(HSAO)三酸甘油酯油所制备的甲基化油进行的热稳定性测试的结果。

[0053] 图19示出了高油酸和高稳定性高油酸藻类油的不同特性。

[0054] 图20示出了来自烧瓶和发酵罐生物质的S4495、S5665及S5675油的TAG组成。La＝月桂酸酯(C12:0)，M＝肉豆蔻酸酯(C14:0)，P＝棕榈酸酯(C16:0)，Po＝棕榈油酸酯(C16:1)，S＝硬脂酸酯(C18:0)，O＝油酸酯(C18:1)，L＝亚油酸酯(C18:2)，Ln＝α-亚麻酸酯(C18:3)，A＝花生酸酯(C20:0)，B＝山嵛酸酯(C22:0)，Lg＝木蜡酸酯(C24:0)，Hx＝二十六烷酸酯(C26:0)，S-S-S是指全部三个脂肪酸都饱和的TAG的总和。在条形的每个区块中，这些品系是以该图底部处所说明的次序示出。

[0055] 图21示出了来自摇瓶生物质的S5774、S5775及S5776油的TAG组成。La＝月桂酸酯(C12:0)，M＝肉豆蔻酸酯(C14:0)，P＝棕榈酸酯(C16:0)，Po＝棕榈油酸酯(C16:1)，S＝硬脂酸酯(C18:0)，O＝油酸酯(C18:1)，L＝亚油酸酯(C18:2)，Ln＝α-亚麻酸酯(C18:3)，A＝花生酸酯(C20:0)，B＝山嵛酸酯(C22:0)，Lg＝木蜡酸酯(C24:0)，Hx＝二十六烷酸酯(C26:0)。S-S-S是指全部三个脂肪酸都饱和的TAG的总和。在条形的每个区块中，这些品系是以该图底

部处所说明的次序示出。

[0056] 图22示出了经过精炼、漂白并且除臭的由遗传工程改造的桑椹型无绿藻品系产生的富含肉豆蔻酸酯的脂肪酸谱和固体脂肪含量，如实例52中所论述。

[0057] 图23示出了在Z品系中表达的异源FAE蛋白的成对比对。

发明的详细说明

I.定义

[0058] “等位基因”是与一种性状或特征相关的基因的一种或多种替代形式中的任一种。

[0059] “天然油”或“天然脂肪”应当是指从有机体获得的主要含三酸甘油酯的油，其中该油未经历与另一种天然油或合成油掺混，或分馏以实质上改变该三酸甘油酯的脂肪酸谱。结合一种包含了具有特定区域特异性的三酸甘油酯的油，该天然油或天然脂肪未经历酯交换或其他合成工艺以致未获得该区域特异性三酸甘油酯谱，而是由一个细胞或细胞群天然地产生区域特异性。结合天然油或天然脂肪，并且如本披露通篇总体上所使用，术语油和脂肪可互换地使用，除非另作注释。因此，“油”或“脂肪”取决于该物质的组成和其他条件，在室温下可以是液体、固体或部分固体的。在此，术语“分馏”表示以相对于由有机体所产生的谱而改变其脂肪酸谱的方式来从该油去除物质，不管用何种方法完成。术语“天然油”和“天然脂肪”包括如从有机体获得的油，其中该油已经历最低限度的不实质上改变其三酸甘油酯谱的加工，包括精炼、漂白和/或脱胶。天然油还可以是“非酯交换的天然油”，表示该天然油未经历这样一种加工，其中脂肪酸与甘油的酰基连接被重新分布且基本上保持了与从有机体中回收时相同的构型。

[0060] “外源基因”应当是指已经被引入到细胞中(例如通过转化/转染)的编码RNA和/或蛋白质的表达的一种核酸，并且还被称为“转基因”。包含外源基因的细胞可以被称为重组细胞，可以向其中引入另外的外源基因。相对于正在转化的细胞，外源基因可以来自不同的物种(并因此是异源的)，或来自相同的物种(并因此是同源的)。因此，外源基因相对于该基因的内源副本，可以包括占据了细胞基因组中不同位置或处于不同控制下的同源基因。外源基因可以在细胞中以多于一个副本存在。外源基因可以在细胞中作为基因组(核或质体)中的插入序列或作为游离型分子来维持。

[0061] “脂肪酸”应当是指甘油脂中的游离脂肪酸、脂肪酸盐或脂肪酰基部分。应了解的是，甘油脂的脂肪酰基可以根据三酸甘油酯水解或皂化时产生的羧酸或羧酸阴离子来描述。

[0062] “固定碳源”是在环境温度和压力下以固体或液体形式存在于培养基中的含碳分子，典型地是有机分子，它可以被该培养基中所培养的微生物利用。因此，二氧化碳不是固定碳源。

[0063] “处于可操作连接”是在两个核酸序列(如控制序列(典型地是启动子)和连接的序列(典型地是编码蛋白质的序列，也称作编码序列))之间的功能性连接。如果一个启动子可以介导外源基因的转录，则该启动子与这个基因处于可操作连接。

[0064] “微藻”是含有叶绿体或其他质体并且任选地能够进行光合作用的微生物有机体，或能够进行光合作用的原核微生物有机体。微藻包括不能代谢固定碳源作为能量的专性光能自养生物，以及能够仅以固定碳源为生的异养生物。微藻包括在细胞分裂后不久与姊妹细胞分开的单细胞有机体，如衣藻属，以及微生物，如例如，团藻属，它是由两种不同细胞类

型构成的简单多细胞光合微生物。微藻包括细胞例如小球藻属、杜氏藻属以及无绿藻属。微藻还包括了展现出细胞-细胞粘附的其他微生物光合有机体，例如阿格门氏藻属(Agmenellum)、鱼腥藻属、以及桑椹藻属(Pyrobotrys)。微藻还包括专性异养微生物，它们已经丧失进行光合作用的能力，如某些双鞭甲藻属(dinoflagellate)藻类和无绿藻属种类。

[0065] 与重组细胞相关的术语敲减是指就基因所编码的蛋白质的产生或活性来说，该基因已部分地受抑制(例如，约1％-95％)。

[0066] 另外，与重组细胞相关的术语敲除是指就基因所编码的蛋白质的产生或活性来说，该基因已完全或几乎完全地(例如，>95％)受抑制。敲除物可以通过将非编码序列同源重组于编码序列中、基因缺失、突变或其他方法来制备。

[0067] “产油”细胞是能够天然地或通过重组或经典品系改良而产生以干细胞重量计至少20％的脂质的一种细胞。“产油微生物(oleaginous microbe)”或“产油微生物(oleaginous microorganism)”是一种微生物，包括产油的微藻。产油细胞还涵盖已经去除其一部分或全部脂质或其他内含物的细胞，并且涵盖活细胞和死细胞。

[0068] “订制油”或“订制脂肪”是形成的晶体主要具有指定的多形性结构的油或脂肪。举例来说，订制油或订制脂肪可以具有超过50％、60％、70％、80％或90％的β或β’多形性形式的晶体。

[0069] 与天然油有关的“谱”是在该油内特定种类或三酸甘油酯或脂肪酰基的分布。“脂肪酸谱”是在不参考与甘油主链的连接的情况下，该油的三酸甘油酯中脂肪酰基的分布。脂肪酸谱典型地是通过转化成脂肪酸甲酯(FAME)，随后进行气相色谱(GC)分析与火焰离子化检测(FID)来确定。脂肪酸谱可以表示为由一种脂肪酸的曲线下面积测定的总脂肪酸信号中该脂肪酸的一个或多个百分比。FAME-GC-FID测量值近似为这些脂肪酸的重量百分含量。“sn-2谱”是在油中三酰基甘油酯的sn-2位置处所见的脂肪酸的分布。“区域特异性谱”是在参考酰基连接到甘油主链的位置而不参考立体特异性的情况下三酸甘油酯的分布。换句话说，区域特异性谱描述了在sn-1/3处相对于在sn-2处的酰基连接。因此，在区域特异性谱中，POS(棕榈酸酯-油酸酯-硬脂酸酯)和SOP(硬脂酸酯-油酸酯-棕榈酸酯)是进行相同地处理。“立体特异性谱”描述了在sn-1、sn-2及sn-3处酰基的连接。除非另作指示，否则三酸甘油酯(如SOP和POS)应被视为等效的。“TAG谱”是在参考与甘油主链的连接，但不参考这些连接的区域特异性的性质的情况下在三酸甘油酯中所见的脂肪酸的分布。因此，在TAG谱中，该油中的SSO百分比是SSO与SOS的总和，而在区域特异性谱中，SSO的百分比是在不包括该油中的SOS种类的情况下计算。与FAME-GC-FID分析的重量百分比相比，三酸甘油酯的百分含量典型地以摩尔百分含量给出；也就是在TAG混合物中给定TAG分子的百分比。

[0070] “重组体”是因引入外源核酸或改变天然核酸而已经被修饰的细胞、核酸、蛋白质或载体。因此，例如，重组细胞可以表达在天然(非重组)形式的细胞内没有发现的基因，或以与非重组细胞表达这些基因不同的方式表达天然基因。重组细胞可以但不限于包括编码基因产物或抑制元件(如降低细胞中的活性基因产物的水平的突变、敲除、反义、干扰RNA(RNAi)或dsRNA)的重组核酸。“重组核酸”是最初在体外形成(总体来说，通过操作核酸，例如使用聚合酶、连接酶、核酸外切酶及核酸内切酶)、使用化学合成的核酸，或另外地呈通常未见于自然界中的形式。可以产生重组核酸，例如，以使两个或更多个核酸处于可操作连

接。因此，出于本发明的目的，分离的核酸或通过连接通常在自然界中不接合的DNA分子在体外形成的表达载体均被认为是重组体。出于本发明的目的，一旦产生重组核酸并将其引入宿主细胞或有机体中，这种核酸即可以使用宿主细胞的体内细胞机器(cellular machinery)进行复制；然而，这样的核酸一旦以重组的方式产生，虽然随后在细胞内复制，但其仍被认为是重组体。类似地，“重组蛋白”是使用重组技术，即，通过表达重组核酸所产生的蛋白质。

[0071] 如本领域中所知，术语“三酸甘油酯”、“三酰基甘油酯”及“TAG”可互换地使用。

II.综述

[0072] 本发明的说明性实施例的特征在于产油细胞，这些细胞产生改变的脂肪酸谱和/或甘油脂中改变的脂肪酸区域特异性分布；以及由这些细胞产生的产物。产油细胞的实例包括了具有II型脂肪酸生物合成路径的微生物细胞，包括质体产油细胞，如产油藻类的那些。细胞的具体实例包括绿藻门，四胞藻纲，小球藻目或小球藻科的异养或专性异养微藻。产油微藻的实例还提供于公开的PCT专利申请WO 2008/151149、WO 2010/06032、WO 2011/150410及WO 2011/150411中，包括了小球藻属和无绿藻属(一种包含专性异养生物的属)的种类。产油细胞可以例如能够产生以细胞重量计25％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、85％或约90％的油，±5％。任选地，所产生的这些油可以具有较少的高度不饱和脂肪酸，如DHA或EPA脂肪酸。举例来说，这些油可以包含不到5％、2％或1％的DHA和/或EPA。以上提到的公开案还披露了用于培养这些细胞并提取油(尤其是从微藻细胞提取)的方法；这些方法适用于在此披露的细胞并且有关这些传授内容通过引用结合。当使用微藻细胞时，它们可以自养地(如果不是专性异养生物的话)或使用糖(例如葡萄糖、果糖和/或蔗糖)在暗处培养。在此描述的任何实施例中，这些细胞可以是包含外源转化酶基因的异养细胞，由此使这些细胞能够由蔗糖原料产生油。作为替代方案，或此外，这些细胞可以由纤维素原料代谢木糖。举例来说，这些细胞可以被遗传工程改造成表达一个或多个木糖代谢基因，如编码活性木糖转运蛋白、木酮糖-5-磷酸转运蛋白、木糖异构酶、木酮糖激酶、木糖醇脱氢酶及木糖还原酶的那些。参看2012年11月15日公开的WO 2012/154626，“经过遗传工程改造的代谢木糖的微生物(GENETICALLY ENGINEERED MICROORGANISMS THAT METABOLIZE XYLOSE)”。

[0073] 产油细胞表达一个或多个编码脂肪酸生物合酶的外源基因。因此，一些实施例的特征在于从非植物或非种子油无法获得或根本无法获得的天然油。

[0074] 产油细胞产生一种储存油，该油主要是三酰基甘油酯并且可以被储存在细胞的储存体中。可以由细胞，通过破坏细胞并分离出油来获得粗油。WO 2008/151149、WO 2010/06032、WO 2011/150410及WO 2011/1504披露了异养培养和油分离技术。举例来说，可以通过提供或培养这些细胞，进行干燥并压榨来获得油。如本领域中所知或如WO 2010/120939中所描述，所产生的油可以进行精炼、漂白并除臭(RBD)。粗油或RBD油可以被用于多种食品、化学品、以及工业产品或工艺中。在回收油之后，有价值的残留生物质保留下来。该残留生物质的用途包括了制造纸、塑料、吸收剂、吸附剂、钻井液、作为动物饲料、用于人类营养或用于肥料。

[0075] 在此处给出三酸甘油酯(又称为“三酰基甘油酯”或“TAG”)细胞油的脂肪酸谱的情况下，应了解的是，这是指从细胞提取的储存油的未分馏样品，该样品在已经去除磷脂的条件下或用实质上对磷脂的脂肪酸不敏感的分析方法(例如，使用色谱法和质谱法)进行分

析。该油可以经历RBD工艺以去除磷脂，游离脂肪酸和气味对于该油中三酸甘油酯的脂肪酸谱仅具有微小或可忽略的改变。由于这些细胞是产油的，故在一些情形中，储存油将构成该细胞中全部TAG的大部分。以下实例1、2及8给出了用于测定TAG脂肪酸组成和区域特异性结构的分析方法。

[0076] 从广义上分类，本发明的某些实施例包括(i)特定脂肪酸的营养缺陷体；(ii)产生了具有较低多不饱和脂肪酸浓度的油的细胞，包括不饱和脂肪酸营养缺陷型细胞；(iii)由于编码将脂肪酸转移到甘油或甘油酯的酶的一个或多个外源基因的表达而产生了具有较高特定脂肪酸浓度的细胞；(iv)产生区域特异性油的细胞；及(v)对从正萼距花PSR23新发现的编码LPAAT酶的基因进行编码的基因构建体或细胞(参看实例43)。这些实施例还涵盖由这些细胞产生的油；在提取油之后来自这些细胞的残留生物质；由这些油制造的油脂化学品、燃料及食品；以及培养这些细胞的方法。

[0077] 在以下任何实施例中，所用细胞任选地为具有II型脂肪酸生物合成路径的细胞，如微藻细胞，包括异养或专性异养微藻细胞，包括归类为绿藻门，四胞藻纲，小球藻目，小球藻科或绿藻纲的细胞，或使用合成生物学工具工程改造成具有II脂肪酸生物合成路径(即，将II型脂肪酸生物合成的遗传机器移植到缺乏此类路径的有机体中)的细胞。在具体实施例中，该细胞属于桑椹型无绿藻、克鲁加尼无绿藻(Prototheca krugani)、斯塔格诺拉无绿藻(Prototheca stagnora)或饶氏无绿藻，或具有与SEQ ID NO:76具有至少65％、70％、75％、80％、85％、90％或95％核苷酸一致性的23S rRNA序列。通过在暗处或使用专性异养生物培养，所产生的天然油可以具有较少叶绿素或其他着色剂。举例来说，该天然油在未实质上纯化的情况下可以具有不到100、50、10、5、1、0.0.5ppm的叶绿素。

[0078] 稳定碳同位素值δ13C是相对于标准品(例如PDB，来自美国南卡罗来纳州皮迪组(Peedee formation)的箭石的化石骨架的天然焦)的$^{13}C/^{12}C$的比率的一种表示。油的稳定碳同位素值δ13C(‰)可以与所用原料的δ13C值相关。在一些实施例中，这些油衍生自异养地生长于衍生自C4植物(如玉米或甘蔗)的糖上的产油有机体。在一些实施例中，油的δ13C(‰)是从-10到-17‰或从-13到-16‰。

[0079] 在以下论述的具体实施例和实例中，一个或多个脂肪酸合成基因(例如，编码酰基ACP硫酯酶、酮酰基ACP合酶、LPAAT、硬脂酰基ACP去饱和酶或在此描述的其他酶)被合并到微藻中。已经发现，对于某些微藻来说，植物脂肪酸合成基因产物是在相应植物酰基载体蛋白(ACP)不存在下起作用，甚至当该基因产物是需要结合ACP来起作用的酶(如酰基-ACP硫酯酶)时。因此，任选地，微藻细胞可以利用这些基因来制备所希望的油，而不共表达植物ACP基因。

III.脂肪酸营养缺陷体/在产油阶段期间降低脂肪酸水平至生长抑制性条件

[0080] 在一个实施例中，对细胞进行遗传工程改造以使得脂质路径基因的所有等位基因都被敲除。作为替代方案，这些等位基因的基因产物的量或活性被敲减，由此需要补充脂肪酸。可以产生一种带有与该基因的一个或多个等位基因同源的供体序列的第一转化构建体。可以引入这种第一转化构建体并且随后进行选择方法，以获得以一个或多个等位基因破坏为特征的分离品系。作为替代方案，可以产生一种第一品系，该品系被工程改造成通过插入第一等位基因中来表达可选择标记物，由此使该第一等位基因失活。这一品系可以用作宿主以进一步进行遗传工程改造以使脂质路径基因的其余等位基因敲除或敲减。可以通

过带有最初除去了活性的内源基因的另外的转化构建体的工程改造的表达，或通过适合异源基因的表达，来实现内源基因的补充。补充基因的表达可以组成性地调控或通过可调控的控制进行调控，藉此允许将表达调谐到所希望的水平，从而容许生长或产生任意营养缺陷型条件。在一个实施例中，使用了脂肪酸营养缺陷型细胞群来筛选或选择补充基因；例如，通过用外源脂肪合成中的酶的特定基因候选物，或相信含有这些候选物的核酸库进行转化。

[0081] 所希望的基因的所有等位基因的敲除以及敲除的基因的补充无需依序进行。所关注内源基因的破坏以及通过适合补充基因的组成性或可诱导表达进行的其补充可以按若干方式进行。在一种方法中，这可以通过多种适合构建体的共转化来实现，一种破坏所关注基因，并且另一种在适合的替代性基因座处提供补充。在另一种方法中，靶基因的除去可以通过在可诱导启动子控制下用适合基因直接代替该靶基因来实现。以这种方式，被靶向的基因的表达现处于可调控启动子的控制下。一种另外的方法是用外源的可诱导基因表达系统代替一个基因的内源调控元件。依据这样一种方案，现可以取决于特定需要而开启或关闭所关注基因。又另一种方法是产生第一品系以表达能够补充所关注基因的外源基因，然后对这种第一品系中的所关注基因的所有等位基因进行敲除或敲减。多等位基因敲减或敲除方法以及用外源基因补充可以用于改变工程改造的细胞的脂肪酸谱、区域特异性谱、sn-2谱或TAG谱。

[0082] 在一个具体实施例中，重组细胞包含多种核酸，这些核酸可操作以降低内源酰基-ACP硫酯酶的活性；例如，优先水解长度C18(例如硬脂酸酯(C18:0)或油酸酯(C18:1))或C8:0-C16:0脂肪酸的脂肪酰基-ACP链的FatA或FatB酰基-ACP硫酯酶。可以通过敲除或敲减法来降低内源酰基-ACP硫酯酶的活性。敲减可以通过使用一个或多个RNA发夹构建体、通过启动子劫持(用更低活性或可诱导启动子取代内源基因的天然启动子)或通过基因敲除与在可诱导启动子控制下类似或相同基因的引入相结合来实现。实例34描述了已经敲除内源脂肪酰基-ACP硫酯酶(FATA1)的两个等位基因的无绿藻属品系的工程改造。通过外源硫酯酶的表达来补充桑椹型无绿藻FATA1的活性。实例36详述了RNA发夹构建体在减少无绿藻属中FATA1的表达方面的用途。

[0083] 因此，产油细胞，包括具有II型脂肪酸生物合成路径的有机体的那些，可以具有编码酰基-ACP-硫酯酶的等位基因敲除或敲减达到如在脂肪酸补充或基因补充不存在下消除或严重限制这些细胞的活力的程度。这些品系可以用于对表达酰基-ACP-硫酯酶转基因的转化子进行选择。作为替代方案，或此外，这些品系可以用于完全地移植外源酰基-ACP-硫酯酶，以得到由这些细胞产生的明显不同的脂肪酸谱。举例来说，可以完全或几乎完全地消除FATA表达并且用产生中链脂肪酸的FATB基因代替。在具体实施例中，这些转化子产生了具有超过50％、60％、70％、80％或90％的辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸或棕榈酸，或具有链长度不超过18个碳的总脂肪酸的天然油。这些细胞可能需要用更长链的脂肪酸(如硬脂酸或油酸)进行补充，或在调控FatA基因的可诱导启动子情形中在容许生长与限制性状态之间的环境条件转变。

[0084] 在一个实施例中，对产油细胞进行培养。这些细胞关于一种或多种类型的脂肪酸是完全或部分营养缺陷型的(即，致命性或合成疾病的)。在补充脂肪酸情况下培养这些细胞，由此增加细胞数量，然后使细胞能积累油(例如，以干细胞重量计达到至少40％)。作为

替代方案，细胞包含一个可调控脂肪酸合成基因，该基因可以基于环境条件以及在第一、细胞分裂、有利于产生脂肪酸阶段期间的环境条件和在第二、油积累、不利于产生脂肪酸阶段期间的环境条件来转变活性。在可诱导基因的情形中，可以(不限于)经由环境pH(例如，通过使用AMT3启动子，如实例中所描述)来介导可诱导基因的调控。

[0085] 由于应用了这些补充或调控方法，可以从具有较少量的最佳细胞繁殖必需的一种或多种脂肪酸的细胞获得细胞油。可以获得的油的具体实例包括较少硬脂酸、亚油酸和/或亚麻酸的那些。

[0086] 这些细胞和方法是结合以下紧接着的部分中的较低的多不饱和油以及在结合具有较低多不饱和脂肪酸的油的实例6(脂肪酸去饱和酶营养缺陷型)中和实例34(酰基-ACP硫酯酶营养缺陷型)中说明。

[0087] 同样，脂肪酸营养缺陷型可以在其他脂肪酸合成基因中制造，包括了编码SAD、FAD、KASIII、KASI、KASII、KCS、延长酶、GPAT、LPAAT、DGAT或AGPAT或PAP的那些。这些营养缺陷型可以用于选择补充基因或消除这些基因的天然表达以利于所希望的外源基因，以便改变由产油细胞产生的天然油的脂肪酸谱、区域特异性谱或TAG谱。

[0088] 因此，在本发明的一个实施例中，存在一种用于制造油/脂肪的方法。该方法包括在生长阶段中，在容许细胞分裂的第一组条件下培养重组产油细胞，由此因脂肪酸的存在而增加细胞数量；在油产生阶段中，在限制细胞分裂但容许耗尽脂肪酸的油产生的第二组条件下培养该细胞；并且从该细胞提取该油，其中该细胞具有突变或外源核酸，这些核酸可操作以抑制脂肪酸合成中的酶的活性，该酶任选地为硬脂酰基-ACP去饱和酶、Δ12脂肪酸去饱和酶或酮酰基-ACP合酶。由该细胞产生的油可以使脂肪酸减少至少50％、60％、70％、80％或90％。该细胞可以异养地培养。该细胞可以是异养地或自养地培养的微藻细胞，并且可以产生以干细胞重量计至少40％、50％、60％、70％、80％或90％的油。

IV.低多不饱和天然油

[0089] 在本发明的一个实施例中，由该细胞产生的天然油具有极低的多不饱和脂肪酸水平。因此，该天然油可以具有改良的稳定性，包括氧化稳定性。该天然油在室温下可以为液体或固体，或液体与固体油的掺混物，包括区域特异性或立体特异性油、高硬脂酸酯油，或以下所描述的高中链油。氧化稳定性可以在确定的温度下，使用AOCS Cd 12b-92标准测试通过兰奇马特方法测量。举例来说，OSI(氧化稳定性指数)测试可以在介于110℃与140℃之间的温度下执行。通过对遗传工程改造成降低一种或多种脂肪酸去饱和酶的活性的细胞进行培养(例如，以上或在此别处所提到的任何质体微生物细胞)来产生油。举例来说，可以对细胞进行遗传工程改造，以降低一种或多种负责将油酸(18:1)转化成亚油酸(18:2)的脂肪酰基Δ12去饱和酶和/或一种或多种负责将亚油酸(18:2)转化成亚麻酸(18:3)的脂肪酰基Δ15去饱和酶的活性。可以使用不同方法来抑制该去饱和酶，包括在编码或调控区中编码该去饱和酶的基因的一个或多个等位基因的敲除或突变；该酶的RNA转录或翻译的抑制，包括RNAi、siRNA、miRNA、dsRNA、反义及发夹RNA技术。也可以使用本领域中已知的其他技术，包括了引入一种产生抑制性蛋白质或对该去饱和酶具有特异性的其他物质的外源基因。

[0090] 在一个具体实施例中，使细胞中脂肪酸去饱和酶(例如Δ12脂肪酸去饱和酶)活性降低到一定程度，该程度使得该细胞不能进行培养或难以培养(例如，细胞分裂率降低超过10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、97％或99％)。实现这些条件可

能涉及该去饱和酶的多个基因副本(例如2、3、4或更多)或其基因产物的敲除或其活性有效抑制。一个具体实施例包括在补充有脂肪酸或脂肪酸混合物的完全或部分脂肪酸营养缺陷体的细胞培养物中进行培养,由此增加细胞数量,然后使细胞积累油(例如,达到以细胞重量计至少40%)。作为替代方案,这些细胞包含一种可调控的脂肪酸合成基因,该基因的活性可以转变。举例来说,该调控可以基于环境条件以及在第一、细胞分裂、有利于产生脂肪酸的阶段期间的环境条件和在第二、油积累、不利于产生油的阶段期间的环境条件。举例来说,可以使用培养基pH作为一种环境控制以将脂质路径基因的表达转变成产生具有高或低合酶活性的状态。这些细胞的实例描述于实例7中。

[0091] 在一个具体实施例中,使用细胞内亚油酸水平的调节来培养细胞。确切地说,通过在由于亚油酸的存在而容许细胞数量增加的第一条件下培养细胞,并且然后在以亚油酸饥饿并由此抑制细胞分裂,但仍容许油积累为特征的第二条件下培养这些细胞,来产生天然油。举例来说,这些细胞的种子培养物可以在培养基中添加的亚油酸存在下产生。举例来说,在由于除去脂肪酰基Δ12去饱和酶的两个等位基因而缺乏亚油酸产生的无绿藻属品系(即,亚油酸营养缺陷体)的种子培养物中添加0.25g/L亚油酸足以支持细胞分裂至与野生型细胞分裂相当的水平。任选地,然后,该亚油酸可以被细胞消耗,或以其他方式去除或稀释。然后,将这些细胞转变至产油阶段(例如,如WO 2010/063032中所描述,在氮限制性条件下供应糖)。意外的是,已经发现,油产生甚至在不存在亚油酸产生或补充的情况下也可发生,如在专性异养产油微藻无绿藻属中所证实,而且总体上适用于其他产油微藻、微生物或甚至是多细胞有机体(例如,培养的植物细胞)。在这些条件下,细胞的油含量可以增加到以干细胞重量计为约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高,而所产生的油可以具有占该油中总三酰基甘油脂肪酸百分比为5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.3%、0.2%、0.1%、0.05%或更低的多不饱和脂肪酸(例如亚油酸+亚麻酸)谱。举例来说,该细胞的油含量以干细胞重量计可以为50%或更高,并且该油的三酸甘油酯产生不到3%的多不饱和脂肪酸。

[0092] 通过使用产生亚油酸的细胞机器,但主要或仅在细胞分裂阶段期间使用,这些油的制造也无需向培养物补充亚油酸(或需求减少)。产亚油酸细胞机器可以是可调控的,由此在产油阶段期间产生实质上更少的亚油酸。该调控可以经由去饱和酶基因的转录调节进行。举例来说,脂肪酸Δ12去饱和酶活性的大部分并且优选全部可以处于一个可调控启动子控制下,该启动子被调控以在细胞分裂阶段中表达去饱和酶,但在油积累阶段期间减少或关闭。该调控可以与细胞培养条件相关联,如pH和/或氮水平(如在此实例中所描述),或其他环境条件。实际上,可以通过添加或去除物质(例如,质子,经由添加酸或碱实现)或通过允许细胞消耗物质(例如,供应氮的养分)来调节该条件,从而在去饱和酶活性调控中实现所希望的转变。

[0093] 用于调控去饱和酶活性的其他遗传或非遗传方法也可以使用。举例来说,可以按一定方式将去饱和酶抑制剂添加到培养基中,该方式有效地抑制在产油阶段期间产生多不饱和脂肪酸。

[0094] 因此,在本发明的一个具体实施例中,存在一种方法,包括了提供一种重组细胞,该细胞具有一个可调控的Δ12脂肪酸去饱和酶基因,该基因处于经由一种环境条件进行的重组调控元件的控制下。在有利于细胞倍增的条件下培养细胞。在达到给定的细胞密度之

后，改变细胞培养基，通过养分限制(例如减少可用氮)使细胞转变到产脂质模式。在产脂质阶段期间，环境条件应使得Δ12脂肪酸去饱和酶的活性下调。然后，收集细胞并且任选地提取油。由于在产脂质阶段期间Δ12脂肪酸去饱和酶的水平较低，故该油具有更少的多不饱和脂肪酸并且具有改良的氧化稳定性。任选地，对这些细胞进行异养地培养并且这些细胞任选地为微藻细胞。

[0095] 使用这些去饱和酶调控方法中的一种或多种，有可能获得一种天然油，据信该天然油是先前无法获得的，尤其是在生物反应器中进行大规模培养(例如，超过1000L)时。该油具有的多不饱和脂肪酸水平可以占该油中总三酰基甘油脂肪酸百分比的5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.3%、0.2%或更少。

[0096] 具有如此低的多不饱和物水平的一个后果是油对于氧化特别地稳定。事实上，在一些情形中，这些油可以比任何先前已知的天然细胞油更稳定。在具体实施例中，该油在110℃下稳定，无需添加抗氧化剂，以使得在AOCS Cd 12b-92条件下，到10小时、15小时、20小时、30小时、40小时、50小时、60小时或70小时的时候仍未达到电导率的拐点。就兰奇马特测试来说，考虑到对于非常稳定的油，由于在如此长的测试时间段内发生的蒸发，可能需要在此类测试中补给水(参看实例5)。举例来说，该油在110℃下在不添加抗氧化剂情况下可以具有并且40-50小时或41-46小时的OSI值。当添加抗氧化剂(适于食品或其他)时，所测量的OSI值可以进一步增加。举例来说，如通过兰奇马特测试所测量，在添加生育酚(100ppm)和抗坏血酸棕榈酸酯(500ppm)或PANA和抗坏血酸棕榈酸酯情况下，此类油在110℃下可以具有超过100或200小时的氧化稳定性指数(OSI值)。在另一个实例中，将1050ppm的混合生育酚和500pm的抗坏血酸棕榈酸酯添加到包含了不到1%的亚油酸或不到1%的亚油酸+亚麻酸的油中；因此，该油在110℃下稳定1、2、3、4、5、6、7、8或9、10、11、12、13、14、15或16、20、30、40或50天，5到15天、6到14天、7到13天、8到12天、9到11天、约10天或约20天。该油还可以在130℃下稳定1、2、3、4、5、6、7、8或9、10、11、12、13、14、15或16、20、30、40或50天，5到15天、6到14天、7到13天、8到12天、9到11天、约10天或约20天。在一个具体实例中，发现此类油可稳定超过100小时(如所观察的，约128小时)。在另一个实施例中，在不添加抗氧化剂情况下该天然油在120℃下的OSI值超过15小时或20小时，或在10-15、15-20、20-25或25-50小时，或50-100小时范围内。

[0097] 在一个实例中，使用这些方法，微藻细胞的油含量以干细胞重量计介于40%与约85%之间，并且该油的脂肪酸谱中的多不饱和脂肪酸在该油的脂肪酸谱的介于0.001%与3%之间，并且任选地在不添加抗氧化剂情况下在110℃下得到OSI诱导时间为至少20小时的天然油。在又另一个实例中，存在一种通过对来自产油细胞的天然油进行RBD处理所制造的天然油，该油包含介于0.001%与2%之间的多不饱和脂肪酸并且在不添加抗氧化剂情况下在110℃下具有超过30小时的OSI诱导时间。在又另一个实例中，存在一种通过对来自产油细胞的天然油进行RBD处理所制造的天然油，该油包含介于0.001%与1%之间的多不饱和脂肪酸并且在不添加抗氧化剂情况下在110℃下具有超过30小时的OSI诱导时间。

[0098] 在另一个具体实施例中，存在一种由以上描述的方法制造的具有降低的多不饱和物水平的油。将该油与如PANA和抗坏血酸棕榈酸酯等抗氧化剂组合。举例来说，发现当将此类油与0.5%PANA和500ppm抗坏血酸棕榈酸酯组合时，该油具有的OSI值在130℃下为约5天或在110℃下为21天。这些值得注意的结果表明，不仅该油特别地稳定，而且这两种抗氧化

剂是三酸甘油酯油的特别有效的稳定剂，并且这些抗氧化剂的组合可以具有普遍的适用性，包括制造稳定的生物可降解润滑剂(例如喷气式发动机润滑剂)。在具体实施例中，脂肪酸Δ12去饱和酶的基因操作使得OSI(例如，在110℃下)相对于在无该操作情况下的品系增加2到30，或5到25，或10到20倍。可以通过抑制细胞中去饱和酶活性(包括如以上所描述)来产生油。

[0099] 适用于本发明的油的抗氧化剂包括α、δ及γ生育酚(维生素E)、生育三烯酚、抗坏血酸(维生素C)、谷胱甘肽、硫辛酸、尿酸、β-胡萝卜素、番茄红素、叶黄素、视黄醇(维生素A)、泛醌(辅酶Q)、褪黑激素、白藜芦醇、类黄酮、迷迭香提取物、没食子酸丙酯(PG)、叔丁基氢醌(TBHQ)、丁基化羟基苯甲醚(BHA)及丁基化羟基甲苯(BHT)、N,N'-二-2-丁基-1,4-亚苯基二胺、2,6-二-叔丁基-4-甲基苯酚、2,4-二甲基-6-叔丁基苯酚、2,4-二甲基-6-叔丁基苯酚、2,4-二甲基-6-叔丁基苯酚、2,6-二-叔丁基-4-甲基苯酚、2,6-二-叔丁基苯酚及苯基-α-萘胺(PANA)。

[0100] 除去饱和酶修饰外，在相关实施例中，可以进行其他基因修饰以进一步订制该油的特性(如通篇所描述)，包括了具有改变的链长度特异性的酰基-ACP硫酯酶的引入或取代和/或编码KAS、SAD、LPAAT或DGAT基因的内源或外源基因的过表达。举例来说，产生升高的油酸水平的品系还可以产生低水平多不饱和物。这些基因修饰可以包括通过引入外源SAD基因来增加硬脂酰基-ACP去饱和酶(SAD)的活性；通过引入外源KASII基因来增加延长酶活性，和/或对FATA基因进行敲减或敲除。

[0101] 在一个具体实施例中，可以产生具有较少的多不饱和物的高油酸天然油。举例来说，该油可以具有一种含超过60％、70％、80％、90％或95％的油酸和不到5％、4％、3％、2％或1％的多不饱和物的脂肪酸谱。在相关实施例中，通过一种具有重组核酸的细胞来产生天然油，这些重组核酸可操作以降低脂肪酸Δ12去饱和酶活性并且任选地减少脂肪酸Δ15去饱和酶，由此产生了具有低于或等于3％的多不饱和脂肪酸并且超过60％的油酸、低于2％的多不饱和脂肪酸和超过70％的油酸、低于1％的多不饱和脂肪酸和超过80％的油酸，或低于0.5％的多不饱和脂肪酸和超过90％的油酸的油。已经发现，增加油酸的一种方式是使用重组核酸，这些重组核酸可操作以减少FATA酰基-ACP硫酯酶的表达并且任选地过表达KASII基因；此类细胞可以产生一种具有大于或等于75％的油酸的油。作为替代方案，可以使用KASII的过表达，而不对FATA进行敲除或敲减。通过使用以上方法降低Δ12脂肪酸去饱和酶活性，由此减少被转化成不饱和亚油酸和亚麻酸的油酸的量，来进一步增加油酸水平。因此，所产生的油可以具有一种含至少75％的油酸和至多3％、2％、1％或0.5％的亚油酸的脂肪酸谱。在一个相关实例中，该油具有介于80％与95％之间的油酸和约0.001％到2％的亚油酸、0.01％到2％的亚油酸或0.1％到2％的亚油酸。这些油将具有较低凝固点和优良的稳定性并且可用于食品、用于油炸、燃料或化学应用中。另外，这些油可以随时间展现出降低的变色倾向。在一种说明性化学应用中，使用了高油酸油来制造化学品。该油中三酸甘油酯的油酸基团的油酸双键可以被环氧化或羟基化以制备多元醇。该环氧化或羟基化的油可以被用于多种应用中。一种此类应用是经由该羟基化三酸甘油酯与异氰酸酯的缩合反应来制造聚氨基甲酸酯(包括聚氨基甲酸酯泡沫)，如已经用羟基化大豆油或蓖麻油所实践的。有关羟基化和聚氨基甲酸酯缩合反应化学的实例，参见例如US 2005/0239915、US 2009/0176904、US 2005/0176839、US 2009/0270520及美国专利号4,264,743，以及泽拉坦克

(Zlatanic)等,《生物大分子》(Biomacromolecules)2002,3,1048-1056(2002)。适合的羟基形成反应包括脂肪酸的一个或多个双键的环氧化,随后在水(用以形成二醇)、醇(用以形成羟基醚)或酸(用以形成羟基酯)存在下进行的酸催化的环氧化物开环反应。在制造生物基聚氨基甲酸酯中使用高油酸/低多不饱和的油有许多益处:(1)可以改良聚氨基甲酸酯泡沫的保存期限、颜色或气味;(2)由于没有由多不饱和物引起的不想要的副反应,使得可以改良产物的再现性;(3)由于没有多不饱和物,可以发生更高程度的羟基化反应,并且聚氨基甲酸酯产物的结构特征可以相应地得到改良。

[0102] 在此描述的低多不饱和或高油酸/低多不饱和的油适宜被用于不希望发黄的化学应用中。举例来说,在由衍生自三酸甘油酯的三酸甘油酯脂肪酸制造的油漆或涂料中,发黄将是不希望的。发黄可以由涉及多不饱和脂肪酸和生育三烯酚和/或生育酚的反应所引起。因此,在具有较低生育三烯酚水平的产油微生物中产生高稳定性油对于提高使用该油制造的化学组合物的高颜色稳定性可为有益的。与常用的植物油相比,通过适当选择产油微生物,这些实施例的天然油可以具有1g/L或更低水平的生育酚和生育三烯酚。在一个具体实施例中,天然油具有一种含不到2%的多不饱和脂肪酸的脂肪酸谱和不到1g/L的生育酚、生育三烯酚或生育酚与生育三烯酚的总和。在另一个具体实施例中,天然油具有一种含不到1%的多不饱和脂肪酸的脂肪酸谱和不到0.5g/L的生育酚、生育三烯酚或生育酚与生育三烯酚的总和。

[0103] 任何高稳定性(低多不饱和物)天然油或其衍生物都可以用于配制食品、药物、维生素、营养医学食品、个人护理或其他产品,并且尤其适用于氧化敏感性产品。举例来说,可以使用高稳定性天然油(例如低于或等于3%、2%或1%的多不饱和物)来配制防晒面霜(例如具有阿伏苯宗、胡莫柳酯、水杨酸辛酯、奥克立林或二苯甲酮中的一种或多种的组合物)或类维生素A面霜,该面霜因不存在与多不饱和脂肪酸相关的自由基反应而具有增加的保存期限。举例来说,就颜色、气味、感官特性或在54℃下加速降解4周之后保留的活性化合物%来说,可以增加保存期限。高稳定性油还可以被用作具有优良高温稳定性的润滑剂。除稳定性外,这些油可以是生物可降解的,这是多种特性的一个罕见组合。

[0104] 在另一个相关实施例中,通过另外的基因修饰,例如通过短链到中链偏好的酰基-ACP硫酯酶或此处描述的其他修饰使天然油的脂肪酸谱中的C8到C16脂肪酸升高。根据这些实施例的低多不饱和油可以被用于不同工业产品、食品或消费品,包括需要改良的氧化稳定性的那些。在食品应用中,这些油可以用于在高温下油炸而具有延长的寿命,或具有延长的保存期。

[0105] 在使用该油进行油炸的情况下,该油的高稳定性可以允许在不添加抗氧化剂和/或消泡剂(例如硅酮)情况下进行油炸。作为省去消泡剂的结果,油炸的食品可以吸收更少的油。在用于燃料应用的情况下,作为三酸甘油酯或被加工成生物柴油或可再生的柴油(参看例如,WO 2008/151149、WO 2010/063032及WO 2011/150410),高稳定性可以促进长期储存,或允许在升高的温度下使用。举例来说,由高稳定性油制造的燃料可以被储存用于后备发电机中超过一年或超过5年。油炸用油可以具有超过200℃的发烟点和低于0.1%的游离脂肪酸。

[0106] 低多不饱和油可以与食用油掺混,包括结构化脂肪,如形成β或β'晶体的那些,包括如以下所描述制造的那些。这些油还可以与液体油掺混。如果与具有亚油酸的油(如玉米

油)混合,那么该掺混物的亚油酸水平可以接近如高油酸向日葵油等高油酸植物油的亚油酸水平(例如约80％油酸和8％亚油酸)。

[0107] 低多不饱和天然油的掺混物可以与其他油发生酯交换。举例来说,该油可以进行化学或酶促酯交换。在一个具体实施例中,根据本发明的一个实施例的低多不饱和油在其脂肪酸谱中具有至少10％的油酸和不到5％的多不饱和物,并且使用对sn-1和sn-2三酰基甘油位置具有特异性的一种酶使其与一种高饱和度油(例如氢化大豆油或具有高硬脂酸酯水平的其他油)进行酶促酯交换。结果是包括一种硬脂酸酯-油酸酯-硬脂酸酯(SOS)的油。用于酯交换的方法是本领域中已知的;参看例如,“《脂质交换中的酶》(Enzymes in Lipid Modification),”尤维T.博恩斯彻(Uwe T.Bornschuer)编,威立出版社(Wiley_VCH),2000,ISBN 3-527-30176-3。

[0108] 高稳定性油可以被用作喷雾用油。举例来说,可以用一种具有不到5％、4％、3％、2％或1％多不饱和物的高稳定性油喷洒干燥的水果,如葡萄干。结果是,所使用的喷嘴将因喷嘴中可能另外由于多不饱和物的存在所引起的聚合或氧化产物累积而变得不太频繁地堵塞。

[0109] 在另一个实施例中,可以通过Δ12脂肪酸去饱和酶的敲减或调控来改良高SOS的油(如以下所描述的那些)的稳定性。

V.具有外源酰基转移酶的细胞

[0110] 在本发明的不同实施例中,可以将一个或多个编码酰基转移酶(负责使一种脂肪酸与甘油或甘油衍生物缩合形成酰基甘油的一种酶)的基因引入产油细胞(例如,质体微藻细胞)中,由此改变由该细胞产生的天然油的脂肪酸组成。这些基因可以编码以下各项中的一种或多种:甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT);溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT),又称为1-酰基甘油-3-磷酸酰基转移酶(AGPAT);磷脂酸磷酸酶(PAP);或二酰基甘油酰基转移酶(DGAT),它将一个酰基转移到DAG的sn-3位置,藉此产生TAG。

[0111] 重组核酸可以整合到一个质粒或细胞的染色体中。作为替代方案,该基因编码脂质路径中通过与以上分开的不依赖于脂肪酰基-CoA的途径产生TAG前体分子的一种酶。酰基-ACP可以作为质体GPAT和LPAAT酶和/或线粒体GPAT和LPAAT酶的底物。在能够并入酰基(例如来自膜磷脂)以产生TAG的另外的酶中有磷脂二酰基甘油酰基转移酶(PDAT)。磷脂合成以及可能影响三酸甘油酯组成的重建中涉及又另外的酰基转移酶,包括溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶(LPCAT)、溶血磷脂酰丝氨酸酰基转移酶(LPSAT)、溶血磷脂酰乙醇胺酰基转移酶(LPEAT)及溶血磷脂酰肌醇酰基转移酶(LPIAT)。

[0112] 外源基因可以编码对于转移包含特定数量碳原子和/或特定饱和度的酰基底物具有优先特异性的酰基转移酶,将该基因引入产油细胞中,由此产生富含指定区域特异性三酸甘油酯的油。举例来说,已经证实椰子(椰)溶血磷脂酸酰基转移酶对于C12:0-CoA底物的偏好高于其他酰基-CoA底物(克努顿(Knutzon)等,《植物生理学》(Plant Physiology),第120卷,1999,第739-746页),而成熟红花种子的1-酰基-sn-3-甘油-3-磷酸酯酰基转移酶显示对于亚油酰基-CoA和油酰基-CoA底物的偏好高于其他酰基-CoA底物,包括硬脂酰基-CoA(市原(Ichihara)等,《欧洲生物化学杂志》(European Journal of Biochemistry),第167卷,1989,第339-347页)。另外,酰基转移酶蛋白质可以对一种或多种短链、中链或长链酰基-CoA或酰基-ACP底物展现优先特异性,但该优先选择只能在溶血磷脂酸供体底物的sn-1

或sn-3位置中存在特定(例如中链)酰基的情况下碰到。作为外源基因的结果,可以由在sn-2位置处发现的特定脂肪酸超过20%、30%、40%、50%、60%、70%、90%或90%为TAG分子的细胞来产生TAG油。

[0113] 在本发明的一些实施例中,细胞制造出富含饱和-不饱和-饱和(sat-unsat-sat)TAG的油。Sat-unsat-sat TAG包括1,3-二-十六烷酰基-2-(9Z-十八烷酰基)-甘油(称为1-棕榈酰基-2-油酰基-甘油-3-棕榈酰基)、1,3-二-十八烷酰基-2-(9Z-十八烷酰基)-甘油(称为1-硬脂酰基-2-油酰基-甘油-3-硬脂酰基)及1-十六烷酰基-2-(9Z-十八烷酰基)-3-十八烷酰基-甘油(称为1-棕榈酰基-2-油酰基-甘油-3-硬脂酰基)。这些分子对应地更常称为POP、SOS及POS,其中'P'表示棕榈酸,'S'表示硬脂酸并且'O'表示油酸。饱和-不饱和-饱和TAG的另外的实例包括MOM、LOL、MOL、COC及COL,其中'M'表示肉豆蔻酸、'L'表示月桂酸,并且'C'表示癸酸(C8:0)。三饱和物,即具有三个饱和脂肪酰基的三酸甘油酯,常常因其结晶速率高于其他类型三酸甘油酯而被探索用于食品应用。三饱和物的实例包括PPM、PPP、LLL、SSS、CCC、PPS、PPL、PPM、LLP及LLS。此外,TAG中脂肪酸的区域特异性分布是在消化和吸收期间膳食脂肪代谢命运的一个重要决定因素。

[0114] 根据本发明的某些实施例,用重组核酸转化产油细胞,作为引入了重组核酸的结果,由此产生了包含升高的量的指定区域特异性三酸甘油酯(例如,1-酰基-2-油酰基-甘油-3-酰基或1-酰基-2-月桂酰基-甘油-3-酰基,其中油酸或月桂酸对应地在sn-2位置)的天然油。作为替代方案,辛酸、癸酸、肉豆蔻酸或棕榈酸可以在sn-2位置处。相较于由不含重组核酸的微生物所产生的天然油,该天然油中存在的指定区域特异性三酸甘油酯的量可以增加超过5%、超过10%、超过15%、超过20%、超过25%、超过30%、超过35%、超过40%、超过50%、超过60%、超过70%、超过80%、超过90%、超过100%-500%,或超过500%。因此,该细胞三酸甘油酯的sn-2谱可以具有超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的特定脂肪酸。

[0115] 在甘油脂中位于截然不同的立体特异性或区域特异性位置处的酰基链的身份可以通过本领域中已知的一种或多种分析方法(参看鲁迪(Luddy)等,《美国油类化学家协会》(J.Am.Oil Chem.Soc.),41,693-696(1964);布罗克霍夫(Brockerhoff),《脂质研究杂志》(J.Lipid Res.),6,10-15(1965);安格斯(Angers)和艾瑞(Aryl),《美国油类化学家协会》,第76:4卷,(1999);布奇格博(Buchgraber)等,《欧洲类脂物科学与技术杂志》(Eur.J.Lipid Sci.Technol.),106,621-648(2004)),或根据以下给出的实例1、2及8进行评价。

[0116] 三酸甘油酯分子中脂肪酸的位置分布会受到酰基转移酶的底物特异性以及可用酰基部分的浓度和类型影响。适于改变重组微生物中产生的三酸甘油酯的区域特异性的酶的非限制性实例列于表1-4中。本领域普通技术人员可以鉴别出另外的适合蛋白质。

[0117] 表1.甘油-3-膦酸酰基转移酶和基因库(GenBank)登记号。

甘油-3-磷酸酰基转移酶	*拟南芥*	BAA00575
甘油-3-磷酸酰基转移酶	*莱氏衣藻*	EDP02129
甘油-3-磷酸酰基转移酶	*莱氏衣藻*	Q886Q7
酰基-(酰基-载体蛋白):甘油-3-磷酸酰基转移酶	*南瓜*	BAB39688
甘油-3-磷酸酰基转移酶	*油棕*	AAF64066
甘油-3-磷酸酰基转移酶	*山竹*	ABS86942
甘油-3-磷酸酰基转移酶	*陆地棉*	ADK23938
甘油-3-磷酸酰基转移酶	*麻疯树*	ADV77219
质体甘油-3-磷酸酰基转移酶	*麻疯树*	ACR61638
质体甘油-磷酸酰基转移酶	*蓖麻*	EEF43526
甘油-3-磷酸酰基转移酶	*蚕豆*	AAD05164
甘油-3-磷酸酰基转移酶	*玉米*	ACG45812

[0118] 适合于供本发明的微生物和方法使用的溶血磷脂酸包括但不限于，表2中列出的那些。

[0119] 表2.溶血磷脂酸酰基转移酶和基因库登记号。

1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶	*拟南芥*	AEE85783
1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶	*芥菜*	ABQ42862
1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶	*芥菜*	ABM92334
1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶	*油菜*	CAB09138
溶血磷脂酸酰基转移酶	*莱氏衣藻*	EDP02300
溶血磷脂酸酰基转移酶	*绣线菊*	AAC49185
1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶（推定的）	*荷包蛋花*	CAA88620
酰基-CoA:sn-1-酰基甘油-3-磷酸酰基转移酶	*荷包蛋花*	ABD62751
1-酰基甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶	*荷包蛋花*	CAA58239
1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶	*蓖麻*	EEF39377

[0120] 适合于供本发明的微生物和方法使用的二酰基甘油酰基转移酶包括但不限于，表3中列出的那些。

[0121] 表3.二酰基甘油酰基转移酶和基因库登记号。

二酰基甘油酰基转移酶	拟南芥	CAB45373
二酰基甘油酰基转移酶	芥菜	AAY40784
推定的二酰基甘油酰基转移酶	油棕	AEQ94187
推定的二酰基甘油酰基转移酶	油棕	AEQ94186
酰基CoA:二酰基甘油酰基转移酶	大豆	AAT73629

二酰基甘油酰基转移酶	向日葵	ABX61081
酰基-CoA:二酰基甘油酰基转移酶1	油橄榄	AAS01606
二酰基甘油酰基转移酶	蓖麻	AAR11479

[0122] 适合于供本发明的微生物和方法使用的磷脂二酰基甘油酰基转移酶包括但不限于,表4中列出的那些。

[0123] 表4.磷脂二酰基甘油酰基转移酶和基因库登记号。

磷脂:二酰基甘油酰基转移酶	*拟南芥*	AED91921
推定的磷脂:二酰基甘油酰基转移酶	*油棕*	AEQ94116
类磷脂:二酰基甘油酰基转移酶 1	*大豆*	XP_003541296
磷脂:二酰基甘油酰基转移酶	*麻疯树*	AEZ56255
磷脂:二酰基甘油酰基转移酶	*蓖麻*	ADK92410
磷脂:二酰基甘油酰基转移酶	*蓖麻*	AEW99982

[0124] 在本发明的一个实施例中,将已知或新颖的LPAAT基因转化到产油细胞中,由此改变由那些细胞产生的三酸甘油酯的脂肪酸谱,最值得注意的是改变这些三酸甘油酯的sn-2谱。举例来说,由于在产油细胞中表达外源活性的LPAAT,在sn-2位置处不饱和脂肪酸的百分比增加10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高。举例来说,细胞可以产生在sn-2位置处具有30%不饱和物(它们可能主要为18:1和18:2以及18:3脂肪酸)的三酸甘油酯。在这一实例中,引入该LPAAT活性使sn-2位置处的不饱和物增加了20%,以使得36%的三酸甘油酯在sn-2位置处包含不饱和物。作为替代方案,可以使用外源LPAAT来增加在sn-2位置处的中链脂肪酸,包括饱和中链脂肪酸,如C8:0、C10:0、C12:0、C14:0或C16:0部分。结果是,总脂肪酸谱中的中链水平可能增加。实例43和44描述了改变产油微生物中的sn-2和脂肪酸谱。如可以从那些实例可以看出,LPAAT基因的选择很重要,因为不同的LPAAT会引起sn-2和脂肪酸谱向不同酰基链长度或饱和水平转变。举例来说,实例43的LPAAT增加了C10-C14脂肪酸并且实例44的LPAAT引起C16和C18脂肪酸的增加。如在这些实例中,外源LPAAT的引入可以与外源酰基-ACP硫酯酶的引入组合。已经发现,组合中链偏好的LPAAT和中链偏好的FatB可提供加和效应;脂肪酸谱在外源LPAAT和FatB基因都存在时向中链脂肪酸的转变比仅存在外源FatB基因时更强。在一个具体实施例中,由包含外源中链特异性LPAAT和(任选地)外源FatB酰基-ACP硫酯酶基因的细胞产生的油可以具有的脂肪酸谱含40%、50%、60%、70%、80%或更多的C8:0、C10:0、C12:0、C14:0或C16:0脂肪酸(分开地或总计)。

[0125] 本发明的具体实施例是一种核酸构建体、一种包含该核酸构建体的细胞、一种培养该细胞以产生三酸甘油酯的方法,以及所产生的三酸甘油酯油,其中该核酸构建体具有可操作地连接到一个新颖LPAAT编码序列的一个启动子。该编码序列可以在上游具有一个起始密码子并且在下游具有一个终止密码子随后是一个3UTR序列。在一个特定具体实施例中,LPAAT基因具有与SEQ ID NO:80到85的任何cDNA具至少80%、85%、90%、95%或98%序列一致性的一个编码序列,或其功能片段,包括由遗传密码的简并性产生的等效序列。也可以将内含子插入该序列中。作为替代方案,LPAAT基因编码SEQ ID NOs 77-79的氨基酸序

列,或其功能片段。表达新颖LPAAT的植物清楚地包括在这些实施例中并且可以使用已知的遗传工程改造技术产生。

VI.具有外源延长酶或延长酶复合酶的细胞

[0126] 在本发明的不同实施例中,可以将编码延长酶或脂肪酰基-CoA延长复合物的组分的一种或多种基因引入产油细胞(例如质体微藻细胞)中,由此改变该细胞或由该细胞产生的天然油的脂肪酸组成。这些基因可以编码β-酮酰基-CoA合酶(又称为3-酮酰基合酶、β-酮酰基合酶或KCS)、酮酰基-CoA还原酶、羟酰基-CoA脱水酶、烯酰基-CoA还原酶或延长酶。由这些基因编码的酶在延长由酰基-ACP硫酯酶释放的酰基-CoA分子方面具有活性。重组核酸可以整合到一个质粒或细胞的染色体中。在一个具体实施例中,该细胞属于绿藻门,包括异养细胞,如无绿藻属的那些。

[0127] 适合于供本发明的微生物和方法使用的β-酮酰基-CoA合酶和延长酶包括但不限于,表5中列出的那些。

[0128] 表5.以基因库登记号列出的β-酮酰基-CoA合酶和延长酶。

布氏锥虫延长酶 3（基因库登记号 AAX70673）、地钱（基因库登记号 AAP74370）、推定的克氏锥虫脂肪酸延长酶（基因库登记号 EFZ33366）、
微拟球藻脂肪酸延长酶（基因库登记号 ACV21066.1）、推定的杜氏利什曼原虫脂肪酸延长酶（基因库登记号 CBZ32733.1）、类大豆 3-酮酰基-CoA 合酶 11（基因库登记号 XP_003524525.1）、蒺藜苜蓿 β-酮酰基-CoA 合酶（基因库登记号 XP_003609222）、玉米脂肪酸延长酶（基因库登记号 ACG36525）、陆地棉 β-酮酰基-CoA 合酶（基因库登记号 ABV60087）、向日葵 β-酮酰基-CoA 合酶（基因库登记号 ACC60973.1）、酿酒酵母 ELO1（基因库登记号 P39540）、油蜡树 β-酮酰基-CoA 合酶（基因库登记号 AAC49186）、旱金莲的推定的脂肪酸延长酶（基因库登记号 AAL99199、油菜脂肪酸延长酶（基因库登记号 AAA96054）

[0129] 在本发明的一个实施例中,将编码对于延长一种包含特定数量碳原子和/或特定酰基链饱和度的酰基底物具有优先特异性的β-酮酰基-CoA合酶或延长酶的外源基因引入产油细胞中,由此产生了富集具有指定链长度和/或饱和的的脂肪酸的细胞或油。实例40描述了无绿藻属品系的工程改造,其中已经对优先选择延伸中链脂肪酰基-CoA的外源延长酶进行过表达以增加硬脂酸酯的浓度。实例42和54描述了无绿藻属的工程改造,其中对优先选择延伸单不饱和和饱和C18-CoA和C20-CoA底物的外源延长酶或β-酮酰基-CoA合酶进行过表达以增加芥酸的浓度。

[0130] 在具体实施例中，产油细胞产生了包含超过0.5％、1％、2％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％或80％芥酸和/或二十碳烯酸的油。作为替代方案，该细胞产生了包含0.5％-5％、5％-10％、10％-15％、15％-20％、20％-30％、30％-40％、40％-50％、50％-60％、60％-70％、70％-80％、80％-90％或90％-99％的芥酸或二十碳烯酸的油。该细胞可以包含以上结合高油酸油描述的重组酸，其中另外引入了在延长油酰基-CoA方面具有活性的外源β-酮酰基-CoA合酶。作为该外源β-酮酰基-CoA合酶表达的结果，由该细胞天然产生的芥酸或二十碳烯酸可以增加超过2、3、4、5、10、20、30、40、50、70、100、130、170或200倍。高芥酸和/或二十碳烯酸油也可以是一种更高稳定性油；例如，包含不到5％、4％、3％、2％或1％的多不饱和物的油。在一个具体实施例中，该细胞是一种任选异养地培养的微藻细胞。与在其他实施例中相同，可以通过质体细胞(包括绿藻门，四胞藻纲，小球藻目或小球藻科的异养微藻)的遗传工程改造来产生脂肪。优选地，该细胞是产油的并且能够积累以干细胞重量计至少40％的油。该细胞可以是专性异养的，如无绿藻属种类，包括桑椹型无绿藻或饶氏无绿藻。

VII.区域特异性和立体特异性油/脂肪

[0131] 在一个实施例中，重组细胞产生了具有指定区域特异性构成的天然脂肪或油。因此，该细胞可以产生多种倾向于形成具有指定多形性形式的晶体的三酸甘油酯脂肪；例如，当加热到高于该脂肪的熔融温度并且然后冷却到低于熔融温度时。举例来说，该脂肪在回火或不回火情况下可能倾向于形成β或β’形式的晶体多形物(例如，如通过X射线衍射分析所测定)。这些脂肪可能为订制的脂肪。在具体实施例中，脂肪在冷却时可能直接地形成β或β’晶体；作为替代方案，该脂肪可以由β形式变为β’形式。此类脂肪可以被用作食品应用的结构化层叠或涂覆脂肪。天然脂肪可以被并入蜜饯、黑或白巧克力、巧克力味的糖果、冰淇淋、人造黄油或其他抹酱、奶油糖膏馅、软点心或其他食品中。任选地，这些脂肪可以为半固体，但不含人工地制造的反式脂肪酸。此类脂肪还可以用于皮肤护理和其他消费品或工业产品中。

[0132] 与在其他实施例中相同，可以通过质体细胞(包括绿藻门，四胞藻纲，小球藻目或小球藻科的异养微藻)的遗传工程改造来产生脂肪。优选地，该细胞是产油的并且能够积累以干细胞重量计至少40％的油。该细胞可以是专性异养的，如无绿藻属种类，包括桑椹型无绿藻或饶氏无绿藻。还可以在自养藻类或植物中产生脂肪。任选地，该细胞能够使用蔗糖产生油并且可以引入重组转化酶基因以使蔗糖代谢，如PCT公开WO 2008/151149、WO 2010/06032、WO 2011/150410、WO 2011/150411；以及国际专利申请PCT/US 12/23696中所描述。该转化酶可以经过密码子优化并且被整合到细胞染色体中，并且在此提到的所有基因也可以进行此操作。

[0133] 在一个实施例中，天然脂肪具有至少30％、40％、50％、60％、70％、80％或90％的具一般结构[饱和脂肪酸(sn-1)-不饱和脂肪酸(sn-2)-饱和脂肪酸(sn-3)]的脂肪。这在以下称为Sat-Unsat-Sat脂肪。在一个具体实施例中，这一结构中的饱和脂肪酸优选地为硬脂酸酯或棕榈酸酯并且该不饱和脂肪酸优选地为油酸酯。因此，该脂肪可以主要形成β或β’多形性晶体，或这些的混合物，并且具有相应的物理特性，包括用于食品或个人护理产品所希望的那些。举例来说，该脂肪可以在口腔温度(对于食品来说)或在皮肤温度(对于乳膏、洗液或其他个人护理产品来说)下熔融(例如，熔融温度为30℃到40℃，或32℃到35℃)。任选

地，这些脂肪可以具有2L或3L的层状结构(例如，如通过X射线衍射分析所测定)。任选地，该脂肪可以在不回火的情况下形成这一多形性形式。

[0134] 在一个具体的相关实施例中，天然脂肪三酸甘油酯具有高浓度SOS(即，在末端sn-1和sn-3位置处具有硬脂酸酯并且在甘油主链的sn-2位置处具有油酸酯的三酸甘油酯)。举例来说，该脂肪可以具有的三酸甘油酯包含至少50％、60％、70％、80％或90％的SOS。在一个实施例中，该脂肪具有的三酸甘油酯含至少80％的SOS。任选地，至少50％、60％、70％、80％或90％的sn-2连接的脂肪酸是不饱和脂肪酸。在一个具体实施例中，至少95％的sn-2连接的脂肪酸是不饱和脂肪酸。此外，SSS(三-硬脂酸酯)水平可以低于20％、10％或5％，和/或C20:0脂肪酸(花生酸)水平可以低于6％，并且任选地高于1％(例如从1％到5％)。举例来说，在一个具体实施例中，由重组细胞产生的天然脂肪具有至少70％SOS三酸甘油酯，其中至少80％的sn-2为不饱和脂肪酰基部分。在另一个具体实施例中，由重组细胞产生的天然脂肪具有含至少80％SOS三酸甘油酯并且具有至少95％的sn-2不饱和脂肪酰基部分的TAG。在又另一个具体实施例中，由重组细胞产生的天然脂肪具有含至少80％SOS、至少95％的sn-2不饱和脂肪酰基部分及介于1％到6％之间的C20脂肪酸的TAG。

[0135] 在又另一个具体实施例中，该天然脂肪的脂肪酸谱中硬脂酸酯和棕榈酸酯百分比的总和是油酸酯百分含量的两倍，±10％、20％、30％或40％[例如，(％P+％S)/％O＝2.0±20％]。任选地，这一脂肪的sn-2谱为至少40％并且优选地至少50％、60％、70％或80％的油酸酯。另外任选地，这一脂肪可以为至少40％、50％、60％、70％、80％或90％的SOS。任选地，该脂肪包含介于1％到6％之间的C20脂肪酸。

[0136] 在这些实施例中的任一个中，高SatUnsatSat脂肪可能倾向于形成β’多形性晶体。与先前可用的植物脂肪(如可可脂)不同，由细胞产生的SatUnsatSat脂肪可以在不回火的情况下形成β’多形性晶体。在一个实施例中，在加热到熔融温度以上并且冷却到低于该熔融温度，保持3、2、1或0.5小时之后，形成该多形物。在一个相关实施例中，在加热到60℃以上并且冷却到10℃，保持3、2、1或0.5小时之后，形成该多形物。

[0137] 在不同实施例中，该脂肪当加热到熔融温度以上并且冷却到低于熔融温度，并且任选地在5、4、3、2、1、0.5小时或更短时间内进行到至少50％多形性平衡时，当加热到熔融温度以上并且然后在10℃下冷却时形成β形式、β’形式或两种形式的多形物。该脂肪形成β’晶体的速率可能比可可脂快。

[0138] 任选地，这些脂肪中任一种可以具有不到2摩尔％的二酰基甘油，或总计不到2摩尔％的单酰基甘油和二酰基甘油。

[0139] 在一个实施例中，该脂肪可以具有的熔融温度在30℃-60℃、30℃-40℃、32℃到37℃、40℃到60℃或45℃到55℃之间。在另一个实施例中，该脂肪可以在20℃下具有40％到50％、15％到25％，或低于15％的固体脂肪含量(SFC)和/或在35℃下具有低于15％的SFC。

[0140] 用于制备脂肪的细胞可以包括多种可操作以改变细胞三酸甘油酯中脂肪酸的饱和物与不饱和物比率，以便有利于形成SatUnsatSat脂肪的重组核酸。举例来说，可以使用硬脂酰基-ACP去饱和酶(SAD)基因的敲除或敲减而相对于油酸酯有利于形成硬脂酸酯，或外源中链偏好的酰基-ACP硫酯酶的表达可以增加中链饱和物的水平。作为替代方案，编码SAD酶的基因可以过表达以增加不饱和物。

[0141] 在一个具体实施例中，该细胞具有了可操作以提高细胞中硬脂酸酯水平的重组核

酸。因此，可以增加SOS的浓度。实例9证实，重组微生物的区域特异性谱由于过表达油菜C18:0偏好的硫酯酶而富集SatUnsatSat三酸甘油酯POP、POS及SOS。增加细胞硬脂酸酯的另外一种方式是降低油酸酯水平。对于具有高油酸酯水平(例如，超过硬脂酸酯水平一半)的细胞来说，还可以采用可操作以降低油酸酯水平的重组核酸或经典基因突变。举例来说，该细胞可以具有一个或多个编码一种释放油酸酯的酰基-ACP硫酯酶的FATA等位基因，和/或一个或多个编码一种硬脂酰基ACP去饱和酶(SAD)的等位基因的敲除、敲减或突变。实例35描述了在桑椹型无绿藻(UTEX 1435)中使用发夹RNA抑制SAD2基因产物表达以产生含37％硬脂酸酯的脂肪酸谱，而野生型品系产生不到4％的硬脂酸酯，由此得到超过9倍的改良。此外，尽管实例35的品系被工程改造成降低SAD活性，但保留了足够的SAD活性以产生足够的油酸酯来制备SOS、POP及POS。参看实例47的TAG谱。在具体实例中，可以敲除多个编码SAD的等位基因之一和/或使用如反义、RNAi或siRNA、发夹RNA或其组合等抑制技术下调一个或多个等位基因。在不同实施例中，该细胞产生的TAG可以具有20％-30％、30％-40％、40％-50％、50％-60％、60％-70％、70％-80％、80％-90％，或90％到约100％的硬脂酸酯。在其他实施例中，这些细胞产生的TAG可以为20％-30％、30％-40％、40％-50％、50％-60％、60％-70％、70％-80％、80％-90％，或90％到约100％的SOS。任选地，或除基因修饰外，可以化学地抑制硬脂酰基ACP去饱和酶；例如，在油产生期间通过向细胞培养物中添加苹婆酸。

[0142] 意外的是，已经发现，敲除单一FATA等位基因可增加微藻中产生的C18脂肪酸的存在。通过敲除一个等位基因，或以其他方式抑制FATA基因产生(例如使用发夹)RNA的活性，同时还抑制硬脂酰基-ACP去饱和酶活性(使用在此披露的技术)，可以增加细胞中的硬脂酸酯水平。

[0143] 增加硬脂酸酯水平的另一种基因修饰包括了增加细胞中酮酰基ACP合酶(KAS)活性，由此增加硬脂酸酯产生的速率。已经发现的是，增加KASII活性结合在降低SAD活性方面有效的重组DNA有效地增加了C18的合成并且特别有效地提高了细胞三酸甘油酯中的硬脂酸酯水平。也可以将可操作以增加KASII的重组核酸(例如外源KasII基因)与FatA基因的敲除或敲减组合，或与FatA基因和SAD基因)的敲除或敲减组合。

[0144] 任选地，该细胞可以包括一种释放外源硬脂酸酯的酰基-ACP硫酯酶，作为唯一修饰或与一种或多种其他增加硬脂酸酯的基因修饰组合。举例来说，可以对该细胞进行工程改造以过表达一种优先选择裂解C18:0-ACP的酰基-ACP硫酯酶。实例9描述了外源C18:0偏好型酰基-ACP硫酯酶的表达，由此使桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的脂肪酸谱中的硬脂酸酯从约3.7％增加到约30.4％。实例41提供了用以提高无绿藻属中C18:0水平的C18:0偏好型酰基-ACP硫酯酶功能的另外的实例。该硫酯酶的引入可以与一个或多个内源酰基-ACP硫酯酶等位基因的敲除或敲减组合。该硫酯酶的引入还可以与一种延长酶或β-酮酰基-CoA合酶的过表达组合。此外，可以经由环境条件(例如，通过与可调控启动子呈可操作的连接放置)来调控一个或多个外源基因(例如编码SAD或KASII)。在一个具体实例中，使用了pH和/或氮水平来调控amt03启动子。然后，可以调节环境条件以调谐该细胞产生所希望的量的在细胞三酸甘油酯中出现的硬脂酸酯(例如，达到油酸酯浓度的两倍)。作为这些操作的结果，该细胞可以展现出硬脂酸酯增加至少5、10、15或20倍。

[0145] 作为单独或与其他硬脂酸酯增加性修饰组合的另外的修饰，该细胞可以包含可操作以表达延长酶或β-酮酰基-CoA合酶的重组核酸。举例来说，可以将C18:0偏好型酰基-ACP

硫酯酶的过表达与中链延伸性延长酶或KCS的过表达组合以增加重组细胞中硬脂酸酯的产生。可以经由环境条件(例如,通过与可调控启动子呈可操作的连接放置)来调控一个或多个外源基因(例如,编码硫酯酶、延长酶或KCS)。在一个具体实例中,使用了pH和/或氮水平来调控amt03启动子。然后,可以调节环境条件以调谐该细胞产生所希望的量的在细胞三酸甘油酯中出现的硬脂酸酯(例如,达到油酸酯浓度的两倍)。作为这些操作的结果,该细胞可以展现出硬脂酸酯增加至少5、10、15或20倍。除硬脂酸酯外,还可以产生花生酸、山嵛酸、木蜡酸及蜡酸。

[0146] 在具体实施例中,由于对细胞进行的增加硬脂酸酯水平的基因操作,使得由该细胞产生的油中硬脂酸酯与油酸酯的比率为3:1±30%(即,在2.7:1到3.3:1范围内)、3:1±20%或3:1±10%。

[0147] 作为替代方案,该细胞可以进行工程改造以有利于形成SatUnsatSat,其中Sat是棕榈酸酯或棕榈酸酯与硬脂酸酯的混合物。在这一情形中,释放外源棕榈酸酯的酰基-ACP硫酯酶的引入可以促进棕榈酸酯形成。在这一实施例中,该细胞可以产生含至少30%、40%、50%、60%、70%或80%POP的三酸甘油酯,或POP、SOS及POS的总和占细胞三酸甘油酯至少30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的三酸甘油酯。在其他相关实施例中,该POS水平占由该细胞产生的三酸甘油酯的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0148] 在一个具体实施例中,该油的熔融温度类似于可可脂的熔融温度(约30℃-32℃)。POP、POS及SOS水平可以接近可可脂,对应地为约16%、38%及23%。举例来说,POP可以为16%±20%,POS可以为38%±20%并且SOS可以为23%±20%。或者,POP可以为16%±15%,POS可以为38%±15%,SOS可以为23%±15%。或者,POP可以为16%±10%,POS可以为38%±10%,SOS可以为23%±10%。

[0149] 作为增加硬脂酸酯的重组核酸的结果,脂肪酸谱中的一部分可以是花生酸。举例来说,该脂肪酸谱可以为0.01%到5%、0.1%到4%,或1%到3%的花生酸。此外,区域特异性谱可以具有0.01%到4%、0.05%到3%,或0.07%到2%的AOS,或可以具有0.01%到4%、0.05%到3%,或0.07%到2%的AOA。据信在包含本发明的脂肪的糖果中,AOS和AOA可以减少起霜和脂肪迁移,以及其他潜在的益处。

[0150] 除被设计成增加硬脂酸酯和/或棕榈酸酯,并且改变SatUnsatSat水平的操作外,还可以通过降低Δ12脂肪酸去饱和酶活性(例如,如由Fad基因所编码)并且任选地补充生长培养基或调控FAD表达来抑制多不饱和物的水平,包括如以上所描述。已经发现的是,在微藻(如通过对无绿藻属品系进行研究证实的)中,多不饱和物优先地被添加到sn-2位置。因此,为了提高在sn-2位置处具有油酸酯的三酸甘油酯的百分比,可以抑制由细胞产生的亚油酸。可以结合高氧化稳定性油应用在此描述的用于抑制或除去脂肪酸去饱和酶(FAD)基因或基因产物的技术,通过减少在sn-2位置处的多不饱和物而获得倾向产生SatUnsatSat油的良好作用。作为一个附加的益处,这些油可以具有改良的氧化稳定性。也如在此所描述,脂肪可以分两个阶段产生,其中在脂肪产生阶段期间于缺乏多不饱和物的第一个阶段中供应或由细胞产生多不饱和物。所产生的脂肪具有的脂肪酸谱可以具有低于或等于15%、10%、7%、5%、4%、3%、2%、1%或0.5%的多不饱和物。在一个具体实施例中,由细胞产生的油/脂肪具有超过50%的SatUnsatSat,以及任选地超过50%的SOS,还具有不到3%的多不饱和物。任选地,在脂肪酸谱中,多不饱和物可以接近亚油酸和亚麻酸面

积%的总和。

[0151] 在一个实施例中，天然脂肪是具有65%到95%SOS和任选地0.001到5%SSS的牛油树硬脂精代用品。在一个相关实施例中，该脂肪具有含65%到95%的SOS、0.001%到5%的SSS及任选地0.1%到8%花生酸的三酸甘油酯。在另一个相关实施例中，该脂肪具有65%到95%的SOS并且SSS和SSO的总和低于10%或低于5%。

[0152] 细胞的区域特异性偏好可以使用以下描述的分析方法(实例1-2、8)进行了解。尽管如以上所描述，饱和物与不饱和物达到平衡，但可能的情形是细胞酶无法将不饱和脂肪酸放在sn-2位置处。在这一情形中，遗传操作可以通过(i)降低内源sn-2特异性酰基转移酶(例如LPAAT)和/或(ii)引入一种具有所希望的特异性的外源LPAAT(即，在sn-2处引入油酸酯)来赋予所希望的区域特异性。在引入外源LPAAT的情况下，优选地编码该LPAAT的基因被整合到宿主染色体中并且被靶向内质网。在一些情形中，宿主细胞可以同时具有特异性和非特异性LPAAT等位基因并且抑制这些等位基因之一的活性(例如通过基因敲除)将赋予所希望的特异性。举例来说，可以使用多种编码SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79的LPAAT或与这些序列中任一个包含至少90%、95%、98%或99%氨基酸一致性的LPAAT的基因来将油酸酯添加到sn-2位置，以便增大SatUnsatSat TAG水平。这些基因可以因遗传密码的简并性而与SEQ ID NO:80到85或等效序列中任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%核苷酸一致性。这些基因可以表示为重组核酸构建体、载体、染色体或包含这些序列或其功能片段的宿主细胞形式，它们可以通过使用已知技术使来自这些序列的核酸系统性缺失来发现。作为这些基因表达的结果，宿主细胞中sat-unsat-sat TAG，如SOS、POS、POP，或在sn-2位置处具有C8到C16脂肪酸的三酸甘油酯的量可以得到增加。

[0153] 在一个实施例中，使用了由根据本发明的细胞产生的脂肪来制造糖果、蜜饯涂层或其他食品。因此，食品(如巧克力或块状糖)可以具有与使用可可脂制造的类似产品的“噼啪声”(例如当断裂时)。所用脂肪可以呈β多形性形式或倾向于为β多形性形式。在一个实施例中，一种方法包括将此类脂肪添加到糖果中。任选地，该脂肪依照EEC规范可以为可可脂的等效物，具有超过65%的SOS，低于45%的不饱和脂肪酸、低于5%的多不饱和脂肪酸、低于1%的月桂酸及低于2%的反式脂肪酸。这些脂肪还可以被用作可可脂增量剂、改良剂、替代剂或防起霜剂，或作为牛油树油脂替代剂，包括在食品和个人护理产品中。使用在此披露的细胞和方法产生的高SOS脂肪可以被用于要求牛油树油脂或牛油树部分的任何应用或配制物。然而，与牛油树油脂不同，由本发明的实施例产生的脂肪可以具有较少量的未皂化物；例如低于7%、5%、3%或2%的未皂化物。此外，牛油树油脂因存在二酰基甘油酯而倾向于迅速地降解，而由本发明的实施例产生的脂肪可以具有较少量的二酰基甘油；例如低于5%、4%、3%、2%、1%或0.5%的二酰基甘油。

[0154] 在本发明的一个实施例中，存在一种适合作为起酥油并且确切地说，包入起酥油的天然脂肪。因此，可以使用该起酥油来制造软点心或其他多层食品。该起酥油可以使用在此披露的用于产生工程改造的有机体并且尤其是异养微藻的方法来制造。在一个实施例中，该起酥油具有介于40℃到60℃之间并且优选地介于45℃-55℃之间的熔融温度，并且可以具有含15%到20%中链脂肪酸(C8到C14)、45%-50%长链饱和脂肪酸(C16和更高)及30%-35%不饱和脂肪酸(优选具有的油酸多于亚油酸)的三酸甘油酯谱。起酥油可以任选地不通过β多形性形式而形成β’多形性晶体。起酥油可以为触变性的。起酥油在35℃下可以

具有低于15％的固体脂肪含量。在一个具体实施例中，存在一种通过重组微藻产生的适合作为包入起酥油的天然油，其中该油具有介于400与700或500与600Pa之间的屈服应力以及大于1×10^5Pa或1×10^6Pa的储能模量。(参见实例46)

[0155] 可以使用结构化油，通过将其与在室温下呈液体的油(例如，三硬脂精或三油精较高的油)掺混来制造结构化固体-液体脂肪系统。掺混的系统可以适合用于食用抹酱、蛋黄酱、调味品、起酥油中；即，通过形成油-水-油乳液。根据在此描述的实施例的结构化脂肪，并且尤其是SOS较高的那些，可以与其他油/脂肪掺混以制备可可脂等效物、替代剂或增量剂。举例来说，可以将具有超过65％SOS的天然脂肪与棕榈油中间馏分掺混以制备可可脂等效物。

[0156] 总体来说，这种高Sat-Unsat-Sat脂肪或脂肪系统可以被用于多种其他产品中，包括植脂鲜奶油、人造黄油、抹酱、沙拉酱、烘焙物品(例如，面包、饼干、脆点心、松饼及软点心)、奶酪、奶油干酪、蛋黄酱等。

[0157] 在一个具体实施例中，使用了以上描述的Sat-Unsat-Sat脂肪来制造人造黄油、抹酱等。举例来说，可以使用美国专利号7118773、6171636、4447462、5690985、5888575、5972412、6171636，或国际专利公开WO 9108677 A1中所发现的食谱或方法中的任一种由脂肪来制造黄油。

[0158] 在一个实施例中，脂肪包含了任选地与另一种脂肪掺混的一种天然(例如来自微藻细胞)脂肪并且适用于制造抹酱或人造黄油，或其他食品，该脂肪是由遗传工程改造过的细胞产生并且具有衍生自脂肪酸的三酸甘油酯，这些脂肪酸包含：

(a)至少10重量％的C18到C24饱和脂肪酸，

(b)这些脂肪酸包含硬脂酸和/或花生酸和/或山嵛酸和/或木蜡酸，以及(c)油酸和/或亚油酸，同时

(d)饱和C18酸/饱和(C20+C22+C24)-酸的比率≥1，优选地≥5，更优选地≥10，

这些三酸甘油酯含有：

(e)以总脂肪酸重量计算，≤5重量％的亚麻酸

(f)以总脂肪酸重量计算，≤5重量％的反式脂肪酸

(g)以总脂肪酸重量计算，≤75重量％，优选地≤60重量％的在sn-2位置处的油酸：这些三酸甘油酯以总甘油酯重量计含有

(h)≥8重量％HOH+HHO三酸甘油酯

(i)≤5重量％的三饱和三酸甘油酯，以及任选地具有以下特性中的一种或多种：

(j)在10℃下固体脂肪含量>10％

(k)在35℃下固体脂肪含量≤15％，

(l)在10℃下固体脂肪含量>15％并且在35℃下固体脂肪含量≤25％，

(m)(HOH+HHO)和(HLH+HHL)三酸甘油酯的比率>1，并且优选地>2，

其中H代表C18-C24饱和脂肪酸，O代表油酸，并且L代表亚油酸。

[0159] 任选地，脂肪的固体含量(％SFC)在10℃下为11到30，在20℃下为4到15，在30℃下为0.5到8并且在35℃下为0到4。作为替代方案，该脂肪的％SFC在10℃下为20到45，在20℃下为14到25，在30℃下为2到12并且在35℃下为0到5。在相关实施例中，该脂肪的％SFC在10℃下为30到60，在20℃下为20到55，在30℃下为5到35并且在35℃下为0到15。C12-C16脂肪

酸含量可以≤15重量%。该脂肪可以具有≤5重量%的二饱和二酸甘油酯。

[0160] 在相关实施例中，存在一种用天然油或天然油掺混物制造的抹酱、人造黄油或其他食品。举例来说，可以使用天然脂肪来制造一种可食用的W/O乳液抹酱，该抹酱包含了分散于30重量%-80重量%的脂肪相中的70重量%-20重量%的水相，该脂肪相是50重量%-99重量%的植物三酸甘油酯油A与1重量%-50重量%的结构化三酸甘油酯脂肪B的混合物，该脂肪由5重量%-100重量%的硬原料脂肪C和多达95重量%的脂肪D组成，其中至少45重量%的硬原料脂肪C三酸甘油酯由SatOSat三酸甘油酯组成并且其中Sat表示一个具有饱和C18-C24碳链的脂肪酸残基，并且O表示油酸残基，其中限制条件是通过该脂肪的分馏、氢化、酯化或酯交换获得的任何硬原料脂肪C不包括在内。该硬原料脂肪可以是根据在此披露的方法由细胞产生的一种天然脂肪。因此，该硬原料脂肪可以是一种具有含至少50%、60%、70%、80%或90%SOS的区域特异性谱的脂肪。该W/O乳液可以根据本领域中已知的方法(包括美国专利号7,118,773中的方法)制备。

[0161] 在一个相关实施例中，细胞还表达一种产生蓖麻油酸的内源水解酶。因此，所产生的油(例如，液体油或结构化脂肪)可以更容易地乳化成人造黄油、抹酱或者其他食品或非食品产品。举例来说，所产生的油可以使用不添加乳化剂或使用更少量的此类乳化剂来进行乳化。美国专利申请号13/365,253披露了用于在微藻和其他细胞中表达这些羟化酶的方法。在具体实施例中，天然油包含至少1%、2%或5%的SRS，其中S是硬脂酸酯，并且R是蓖麻油酸。

[0162] 在一个替代性实施例中，如以上所描述的作为可可脂模拟物的天然油可以经过分馏以去除三饱和物(例如，三硬脂精和三棕榈精，SSP和PPS)。举例来说，已经发现，被工程改造成降低SAD活性以增加SOS浓度的微藻制造出的油可以经过分馏以去除三饱和物。参见实例47。在具体实施例中，经过分馏的天然油的熔融温度类似于可可脂的熔融温度(约为30℃-32℃)。POP、POS及SOS水平可以接近可可脂，对应地为约16%、38%及23%。举例来说，POP可以为16%±20%，POS可以为38%±20%并且SOS可以为23%±20%。或者，POP可以为16%±15%，POS可以为38%±15%，SOS可以为23%±15%。或者，POP可以为16%±10%，POS可以为38%±10%，SOS可以为23%±10%。此外，三硬脂精水平可以为低于5%的三酰基甘油酯。

VIII.高中链油

[0163] 在本发明的一个实施例中，细胞具有了可操作以提高该细胞中或该细胞的油中的中链脂肪酸(例如，C8:0、C10:0、C12:0、C14:0或C16:0脂肪酸)水平的重组核酸。增加细胞中或细胞的油中的中链脂肪酸水平的一种方式是对细胞进行工程改造以表达一种对中链脂肪酰基-ACP底物具有活性的外源酰基-ACP硫酯酶(例如，由FabB基因编码的酶)，作为唯一修饰或与一种或多种其他基因修饰组合。增加细胞或细胞的油中的中链脂肪酸水平的另外一种基因修饰是编码一种活性溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)的一种外源溶血磷脂酸酰基转移酶基因的表达，该酶催化中链脂肪酰基转移到被取代的酰基甘油酯的sn-2位置。在一个具体的相关实施例中，外源酰基-ACP硫酯酶和LPAAT在细胞中都稳定地表达。在一个实施例中，将重组核酸引入产油细胞(并且尤其是质体微生物细胞)中，由此引起外源中链特异性硫酯酶以及催化中链脂肪酰基转移到被取代的酰基甘油酯的sn-2位置的外源LPAAT的表达。结果是，可以使该细胞增加它所产生的TAG中的中链脂肪酸的百分比10、20、30、40、50、

60、70、80、90倍或更高倍数。与仅引入外源中链偏好的酰基-ACP硫酯酶相比较，引入外源LPAAT可以使sn-2位置处的中链脂肪酸增加1.2、1.5、1.7、2、3、4倍或更高倍数。在一个实施例中，该中链脂肪酸占由细胞产生的TAG脂肪酸超过30％、40％、50％60％、70％、80％或90％。在不同实施例中，该中链脂肪酸为月桂酸、肉豆蔻酸或棕榈酸。实例3、43及44描述了微藻细胞中植物LPAAT的表达以及由此引起的脂肪酸谱的改变。如在这些实例中，这些细胞还可以表达一种优先选择指定脂肪酰基-ACP链长度的外源酰基-ACP硫酯酶(该酶也可以来自一种植物)。举例来说，微藻细胞可以包含多个编码优先地对C8、C10、C12、C14、C8-C12或C8-C10脂肪酸进行裂解的LPAAT和酰基-ACP硫酯酶的外源基因。在一个具体实施例中，此类细胞能够产生一种脂肪酸谱包含10％-20％、20％-30％、30％-40％、40％-50％、50％-60％、60％-70％、70％-80％、80％-90％或90％-99％、>20％、>30％、>40％、>50％、>60％、>70％、>80％或>90％的C8、C10、C12、C14、C8-C12或C8-C10脂肪酸的天然油。其他LPAAT可以优先地裂解C16或C18脂肪酸(参看实例44)。脂肪酸去饱和酶路径(例如，如下文所描述)的另外的基因操作可以增加这些油的稳定性。

[0164] 这些天然油中的任一种都可以进行酯交换。酯交换可以例如用于降低油的熔融温度或倾注点。在一个具体实施例中，该天然油包含至少50％的辛酸与癸酸的总和并且可以进行酯交换以降低倾注点和/或运动粘度。此类油(天然的或经过酯交换的)可以任选地为一种包含例如低于2％的多不饱和脂肪酸的高稳定性油。

[0165] 作为替代方案，或除外源外源LPAAT外，细胞可以包含多个重组核酸，这些核酸可操作以表达外源KASI或KASIV酶并且任选地降低或消除KASII活性，这在表达中链偏好的酰基-ACP硫酯酶时特别有益。实例37描述了对无绿藻属细胞进行工程改造以过表达KASI或KASIV酶结合中链偏好的酰基-ACP硫酯酶一起产生了多种品系，其中C10-C12脂肪酸的产量占总脂肪酸约59％。也可以通过抑制KASI和/或KASII活性(例如使用敲除或敲减)来增加中链的产生。实例38详述了桑椹型无绿藻(UTEX 1435)KASI的不同等位基因的染色体敲除结合中链偏好的酰基-ACP硫酯酶的过表达一起实现了约76％或84％C10-C14脂肪酸的脂肪酸谱。实例39提供了以KASI RNA发夹多核苷酸的表达所引起的中链脂肪酸增多为特征的重组细胞和油。除这些修饰中的任一种外，还可以抑制不饱和或多不饱和脂肪酸产生，(例如通过敲除或敲减)SAD或FAD酶。

[0166] 在一个特定实施例中，重组细胞产生了具有40％或更多月桂酸的TAG。在另一个相关实施例中，重组细胞产生了具有含40％或更多肉豆蔻酸、辛酸、癸酸或棕榈酸的脂肪酸谱的TAG。举例来说，产油重组绿藻细胞可以产生含40％月桂酸或肉豆蔻酸的油，该油占细胞干重的40％、50％或60％或更高百分比。

[0167] 在一个具体实施例中，重组细胞包含了可操作以对编码一种催化将中链脂肪酰基转移到被取代的酰基甘油酯的sn-2位置的溶血磷脂酸酰基转移酶的一种外源基因的产物进行表达的核酸，以及可操作以对编码一种催化中链脂肪酸从ACP裂解的活性酰基-ACP硫酯酶的一种酰基-ACP硫酯酶外源基因的产物进行表达的核酸。因此，在一个实施例中，所产生的油可以通过这些重组核酸引起的C10和C12脂肪酸增多以及C16、C18及C18:1脂肪酸减少的脂肪酸谱来表征。参看实例3，其中赖特蓖距花酰基-ACP硫酯酶和椰LPAAT基因的过表达使C12脂肪酸的百分含量从未转化细胞中的约0.04％增加到约46％并且使C10脂肪酸的百分含量从未转化细胞中的约0.01％增加到约11％。在相关实施例中，中链脂肪酸产量增

加超过70％、从75％到85％、从70％到90％、从90％到200％、从200％到300％、从300％到400％、从400％到500％或超过500％。

[0168] 还可以通过C18特异性酰基-ACP的过表达来减小平均链长度。可操作以过表达C18或其他酰基-ACP硫酯酶的重组核酸可以单独使用或与在此描述的另外减小平均链长度的其他构建体组合使用。在使用中，所产生的油可以被用作可可脂/乳脂代用品。参看实例45和图17的论述。在一个实施例中，对以上描述的高中链产生细胞之一进一步工程改造，通过敲除或敲减一种或多种脂肪酰基去饱和酶来产生较少多不饱和油，如以上在第IV节中所描述的。因此，所产生的油可以具有在该节中或在相应实例中所提到的高稳定性特征。在一个具体实施例中，细胞产生了一种包含超过30％的中链脂肪酸和5％或更少的多不饱和物的油。在一个相关实施例中，细胞产生了一种包含超过40％的中链脂肪酸和4％或更少的多不饱和物的油。在另一个相关实施例中，细胞产生了一种包含超过50％的中链脂肪酸和3％或更少的多不饱和物的油。

[0169] 高中链油或衍生自这些油的水解的脂肪酸可以特别适用于食品、燃料和油化学应用中，包括制造润滑剂和表面活性剂。举例来说，衍生自这些细胞的脂肪酸可以被酯化、裂化、还原成醛或醇、氨化、硫酸化、磺酸化或经历本领域中已知的其他化学过程。

[0170] 在一些实施例中，天然油进行酯交换并且经过酯交换的天然油的运动粘度在40℃下小于30、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1厘泊。在一些实施例中，该运动粘度在40℃下小于3厘泊。在一些实施例中，经过酯交换的天然油的倾注点低于5℃、0℃、-10℃、-12℃、-15℃、-20℃、-25℃、-30℃、-35℃、-40℃、-45℃或-50℃。在一些实施例中，该倾注点低于-10℃。在一些实施例中，该倾注点低于-20℃。

[0171] 实例53描述了在藻类中使用植物FatB基因以在微藻中产生具有超过60％的肉豆蔻酸酯的油。在一个实施例中，使用了编码一种与SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:89具有至少90％、95％、96％、97％、98％或99％氨基酸一致性的蛋白质的一种基因，任选地组合了如以上所描述的中链偏好的LPAAT。

IX.高油酸/棕榈酸油

[0172] 在另一个实施例中，存在一种具有约60％的油酸、25％的棕榈酸及任选地5％或更少的多不饱和物的高油酸油。该高油酸油可以使用美国专利申请号13/365,253(该案通过引用以相关部分结合)中所披露的方法进行制造。举例来说，细胞可以具有多种可操作以抑制酰基-ACP硫酯酶(例如，敲除或敲减一种编码FATA的基因)，同时还表达一种增加KASII活性的基因的核酸。该细胞可以具有另外的修饰，以抑制Δ12脂肪酸去饱和酶的表达，包括了控如以上所描述的基因表达。因此，多不饱和物可以小于或等于5、4、3、2或1面积％。

X.低饱和物油

[0173] 在一个实施例中，天然油是由一种重组细胞产生的。所产生的油具有一种具有低于4％、3％、2％、1％(面积％)的饱和脂肪酸的脂肪酸谱。在一个具体实施例中，该油具有0.1％到3.5％的饱和脂肪酸。某些此类油可以被用于制造一种具有可忽略的量的饱和脂肪酸的食品。任选地，这些油具有的脂肪酸谱可以包含至少90％的油酸或至少90％的油酸和至少3％的多不饱和脂肪酸。在一个实施例中，由重组细胞产生的天然油包含至少90％的油酸、至少3％的亚油酸与亚麻酸的总和并且具有不到3.5％的饱和脂肪酸。在一个相关实施例中，由重组细胞产生的天然油包含至少90％的油酸、至少3％的亚油酸与亚麻酸的总和并

且具有不到3.5%的饱和脂肪酸,这些饱和脂肪酸中大部分包含链长度10到16。这些油可以由重组产油细胞产生,包括但不限于,在此以及美国专利申请号13/365,253中所描述的那些。举例来说,在具有高活性SAD的细胞中KASII酶的过表达可以产生一种具有低于或等于3.5%的饱和物的高油酸油。任选地,油酸酯特异性酰基-ACP硫酯酶也被过表达和/或具有对低于C18的酰基链进行水解的倾向的内源硫酯酶被敲除或抑制。该油酸酯特异性酰基-ACP硫酯酶可以是一种对ACP-棕榈酸酯和ACP-硬脂酸酯具有低活性的转基因,以使得所产生的油的脂肪酸谱中油酸相对于棕榈酸和硬脂酸的总和的比率大于3、5、7或10。作为替代方案,或此外,如以下实例36中一样,可以敲除或敲减FATA基因。FATA基因可以被敲除或敲减并且外源KASII过表达。另一种可选的修饰是增加KASI和/或KASIII活性,这可以进一步抑制更短链的饱和物的形成。任选地,对于将不饱和脂肪酰基部分转移到被取代的甘油具有特异性的一种或多种酰基转移酶(例如LPAAT)也被过表达和/或内源酰基转移酶被敲除或衰减。一种另外的可选修饰是使对于延长不饱和脂肪酸具有特异性的KCS酶的活性增加和/或使对于延长饱和脂肪酸具有特异性的内源KCS敲除或衰减。任选地,通过敲除或敲减Δ12脂肪酸去饱和酶,在损害亚油酸酯产生的情况下增加油酸酯;例如,使用本专利申请第IV节的技术。

[0174] 如实例51中所描述,还可以通过使棕榈酸去饱和成为棕榈油酸的一种外源基因的引入来降低饱和脂肪的水平。用于产油细胞的适合基因的实例见于植物中,包括猫爪藤(Macfadyena unguis/Cat's claw)、澳洲胡桃(澳大利亚坚果)及沙棘(Hippophae rhamnoides/sea buckthorn)。使棕榈酰基-ACP去饱和的变体外源或内源SAD也可以使用并且于实例51中进一步论述。任选地,PAD或SAD基因与实例51中所描述的基因产物具有至少95%的氨基酸序列一致性。这一修饰可以单独使用,或与增加油酸酯的修饰组合施用,如以上在第IX节中及实例中刚刚描述的那些,包括一个或多个内源FATA等位基因的敲除或敲减和/或KASII的过表达。在一个实施例中,产油细胞(如产油微藻)具有以下各项的组合:(i)FATA敲除或敲减和(ii)外源PAD基因的表达(这也可以是具有PAD活性的变体SAD,参看实例55)和/或内源SAD基因的突变以得到PAD活性。此类细胞可以另外包含一种过表达的内源或外源KASII基因。根据本发明的这些实施例中的任一个,产油细胞产生了具有的脂肪酸谱含1-2、2-3、3-4、5-6、7-8、9-10、10-15、15-20、20-30、30-40、40-60、60-70、70-80、80-90或90-100面积百分比的棕榈油酸的一种油。在一个具体实施例中,该细胞产生了超过50%的油酸、超过1%的棕榈油酸及3.5面积%或更少的饱和脂肪酸。

[0175] 除以上基因修饰外,低饱和物油因少量的多不饱和脂肪酸而可以为高稳定性油。高稳定性、低多不饱和油的方法和表征描述于以上题为低多不饱和油一节中,包括了降低内源Δ12脂肪酸去饱和酶活性的方法。在一个具体实施例中,通过具有II型脂肪合成路径的产油微生物细胞来产生油,并且该油具有不超过3.5%的饱和脂肪酸并且还具有不超过3%的多不饱和脂肪酸。在另一个具体实施例中,该油具有不超过3%的饱和脂肪酸并且还具有不超过2%的多不饱和脂肪酸。在另一个具体实施例中,该油具有不超过3%的饱和脂肪酸并且还具有不超过1%的多不饱和脂肪酸。

[0176] 低饱和物和/或低饱和物/高稳定性油可以与不太昂贵的油掺混以在更低费用下达到靶向的饱和脂肪酸水平。举例来说,含1%饱和脂肪酸的油可以与具有7%饱和脂肪的油(例如,高油酸向日葵油)掺混以得到一种具有3%饱和脂肪的油。

[0177] 根据本发明的实施例产生的油可以用在运输燃料、油脂化学品、和/或食品以及化妆品工业等应用中。举例来说，脂质的转酯作用可以产生作为生物柴油有用的长链脂肪酸酯。可以定制其他酶促和化学过程以产生脂肪酸、醛、醇、烷烃及烯烃。在一些应用中，产生了可再生柴油、喷气燃料、或其他烃化合物。本披露还提供了培养微藻的方法，该微藻用于增加生产力以及增加脂质产率，和/或用于更具成本效益地制造在此所描述的组合物。此处描述的方法允许从质体细胞大规模(例如1000、10,000、100,000升或更大)制造油。

在一个实施例中，从细胞提取的油具有3.5％、3％、2.5％或2％或更少的饱和脂肪，并且被合并到食品中。完成的食品具有3.5％、3％、2.5％或2％或更少的饱和脂肪。

XI.可可脂/乳脂掺混物模拟物

[0178] 在某些实施例中，细胞产生了一种具有温度依赖性固体脂肪含量(“SFC曲线”)的天然油，它接近可可脂与乳脂的掺混物。这些油可以用于能够使用可可脂/乳脂掺混物的情形；例如，在巧克力其他糖果、冰淇淋或其他冷冻甜品、软点心或面团，包括速发面包或其他烘焙物品中。这些油可以抑制起霜，增进风味，增加纹理或降低成本。在一个具体实例中，该天然油接近。因此，本发明的一个实施例使用了一种由重组微藻细胞产生的天然油来代替配方中的可可脂/乳脂掺混物。在一个相关实施例中，

[0179] 图17示出了如下所示的不同油的固体脂肪含量％的曲线：(a)未进行脂质路径工程改造的桑椹型无绿藻RBD油；(b)巴西可可脂+25％乳脂；(c)由表达发夹核酸的品系得到的桑椹型无绿藻RBD油的三个重复试样，这些核酸使SAD等位基因水平降低，由此减少TAG谱中的油酸并增加硬脂酸；(d)由过表达内源OTE(油酰基酰基-ACP硫酯酶，参看实例45)的品系得到的桑椹型无绿藻RBD油；(e)马拉西亚可可脂+25％乳脂；及(f)马拉西亚可可脂。可可脂和可可脂乳脂值是文献值(《贝雷工业油与脂肪产品》，第6版)。

[0180] 在本发明的一个实施例中，通过以上描述的微藻或其他细胞来产生热特性类似于75％可可脂/25％乳脂掺混物的天然油。该细胞包含了多个重组核酸，这些核酸可操作以改变由细胞产生的三酸甘油酯的脂肪酸谱以使得该油具有的固体脂肪含量(例如，如通过NMR所测定)在20℃下为38％±30％，在25℃下为32％±30％，在30℃下为17％±30％并且在35℃下低于5％±30％。为清楚起见，±10％是指SFC百分比的百分比(例如，5％SFC的30％为1.5％SFC，因此，该范围在35℃下为3.5％到6.5％SFC)。在相关实施例中，该油具有的固体脂肪含量(例如，如通过NMR所测定)在20℃下为38％±20％，在25℃下为32％±20％，在30℃下为17％±20％并且在35℃下低于5％±20％，或该油具有的固体脂肪含量(例如，如通过NMR所测定)在20℃下为38％±10％，在25℃下为32％±10％，在30℃下为17％±10％并且在35℃下低于5％±10％。

XII.微量油组分

[0181] 根据以上方法制造的油在一些情形中是使用微藻宿主细胞制造。如以上所描述，微藻可以(不限于)属于绿藻门，四胞藻纲，小球藻目，小球藻科或绿藻纲。已经发现，四胞藻纲的微藻基于其固醇谱而可以与植物油相区别。发现由原始小球藻产生的油可制造固醇，当通过GC-MS检测时，这些固醇看来为菜籽固醇、麦角固醇、菜油固醇、豆固醇及β-谷固醇。然而，据信由小球藻产生的所有固醇都具有C24β立体化学。因此，据信被检测为菜油固醇、豆固醇及β-谷固醇的分子实际上对应地为22,23-二氢菜籽固醇、多孔固醇及穿贝海绵甾醇。因此，由以上描述的微藻产生的油因具有C24β立体化学的固醇的存在以及所存在的固

醇中C24α立体化学的不存在而可以与植物油相区分。举例来说，所产生的油可以含有22,23-二氢菜籽固醇，而缺乏菜油固醇；含有穿贝海绵甾醇，而缺乏β-谷固醇；和/或含有多孔固，而缺乏豆固醇。作为替代方案，或此外，这些油可以含有大量的Δ^7-多孔固醇。

[0182] 在一个实施例中，在此提供的这些油不是植物油。植物油是从植物和植物种子提取的油。植物油可以基于其油含量而与在此提供的非植物油相区分。用于分析油含量的多种方式都可以用于确定该油的来源或在此提供的油是否掺杂了具有不同(例如植物)起源的油。该确定可以基于分析方法之一或组合来作出。这些测试包括但不限于以下各项中一种或多种的分析：游离脂肪酸、脂肪酸谱、总三酰基甘油含量、二酰基甘油含量、过氧化物值、光谱特性(例如UV吸收)、固醇谱、固醇降解产物、抗氧化剂(例如生育酚)、颜料(例如叶绿素)、d13C值及感官分析(例如，味道、气味及口感)。许多此类测试已经针对商业油进行标准化，如食品法典有关可食用脂肪和油的标准。

[0183] 固醇谱分析是一种特别众所周知的用于确定有机物质的生物来源的方法。菜油固醇、b-谷固醇及豆固醇是常见的植物固醇，其中b-谷固醇是一种主要的植物固醇。举例来说，在某些种子油的分析中发现b-谷固醇是最丰富的，在玉米种接近64％，在油菜籽中为29％，在向日葵中为64％，在棉籽中为74％，在大豆中为26％并且在橄榄油中为79％(古尔(Gul)等，《细胞和分子生物学杂志》(J.Cell and Molecular Biology)5:71-79,2006)。

[0184] 从桑椹型无绿藻品系UTEX1435分离的油单独地被澄清(CL)，精炼并漂白(RB)，或精炼，漂白并除臭(RBD)并且根据JAOCS第60卷，第8期，1983年8月中所描述的程序针对固醇含量进行测试。分析结果示于下(单位mg/100g)：

	固醇	粗品	经过澄清	经过精炼并漂白	精炼、漂白并除臭
1	麦角固醇	384 (56%)	398 (55%)	293 (50%)	302 (50%)
2	5,22-二烯胆固-24-甲基-3-醇（菜籽固醇）	14.6 (2.1%)	18.8 (2.6%)	14 (2.4%)	15.2 (2.5%)
3	24-甲基胆固-5-烯-3-醇（菜油固醇或22,23-二氢菜籽固醇）	10.7 (1.6%)	11.9 (1.6%)	10.9 (1.8%)	10.8 (1.8%)
4	5,22-二烯胆固-24-乙基-3-醇（豆固醇或多孔固醇）	57.7 (8.4%)	59.2 (8.2%)	46.8 (7.9%)	49.9 (8.3%)
5	24-乙基胆固-5-烯-3-醇（ β-谷固醇或穿贝海绵甾醇）	9.64 (1.4%)	9.92 (1.4%)	9.26 (1.6%)	10.2 (1.7%)
6	其他固醇	209	221	216	213
	总固醇	685.64	718.82	589.96	601.1

[0185] 这些结果显示出三个显著特征。第一，发现麦角固醇是所有固醇中最丰富的，占总固醇约50％或更高。麦角固醇的量高于菜油固醇、β-谷固醇与豆固醇的组合的量。麦角固醇是常见于真菌中的类固醇并且不常见于植物中，并且它的特别大量的存在用作非植物油的一种有用标记物。第二，发现该油含有菜籽固醇。除油菜籽油外，菜籽固醇不常见于基于植物的油中。第三，发现存在不到2％的β-谷固醇。β-谷固醇是不常见于微藻中的一种重要的植物固醇，并且它的特别大量的存在用作植物起源的油的一种有用标记物。概括起来，已经发现桑椹型无绿藻品系UTEX1435以总固醇内含物的百分含量计含有大量的麦角固醇和仅痕量的β-谷固醇。因此，麦角固醇:β-谷固醇的比率或与菜籽固醇的存在组合可以被用于将这一油与植物油相区分。

[0186] 在一些实施例中，在此提供的油的油内含物以占总固醇的百分含量计含有低于20％、15％、10％、5％、4％、3％、2％或1％的β-谷固醇。在其他实施例中，该油不含β-谷固醇。

[0187] 在一些实施例中，该油不含以下各项中的一种或多种:β-谷固醇、菜油固醇或豆固醇。在一些实施例中，该油不含β-谷固醇、菜油固醇及豆固醇。在一些实施例中，该油不含菜油固醇。在一些实施例中，该油不含豆固醇。

[0188] 在一些实施例中，在此提供的油的油内含物以占总固醇的百分含量计包含低于20％、15％、10％、5％、4％、3％、2％或1％的24-乙基胆固-5-烯-3-醇。在一些实施例中，该24-乙基胆固-5-烯-3-醇是穿贝海绵甾醇。在一些实施例中，在此提供的油的油内含物以占总固醇的百分含量计包含至少1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％或10％的穿贝海绵甾醇。

[0189] 在一些实施例中，在此提供的油的油内含物以占总固醇的百分含量计含有低于20％、15％、10％、5％、4％、3％、2％或1％的24-甲基胆固-5-烯-3-醇。在一些实施例中，该24-甲基胆固-5-烯-3-醇为22,23-二氢菜籽固醇。在一些实施例中，在此提供的油的油内含物以占总固醇的百分含量计包含至少1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％或10％的22,23-二氢菜籽固醇。

[0190] 在一些实施例中，在此提供的油的油内含物以占总固醇的百分含量计含有低于20％、15％、10％、5％、4％、3％、2％或1％的5,22-二烯胆固-24-乙基-3-醇。在一些实施例中，该5,22-二烯胆固-24-乙基-3-醇为多孔固醇。在一些实施例中，在此提供的油的油内含物以占总固醇的百分含量计包含至少1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％或10％的多孔固醇。

[0191] 在一些实施例中，在此提供的油的油内含物含有麦角固醇或菜籽固醇或二者的组合。在一些实施例中，该油内含物以占总固醇的百分含量计含有至少5％、10％、20％、25％、35％、40％、45％、50％、55％、60％或65％的麦角固醇。在一些实施例中，该油内含物以占总固醇的百分含量计含有至少25％的麦角固醇。在一些实施例中，该油内含物以占总固醇的百分含量计含有至少40％的麦角固醇。在一些实施例中，该油内含物以占总固醇的百分含量计含有至少5％、10％、20％、25％、35％、40％、45％、50％、55％、60％或65％的麦角固醇与菜籽固醇的组合。

[0192] 在一些实施例中，该油内含物以占总固醇的百分含量计含有至少1％、2％、3％、4％或5％的菜籽固醇。在一些实施例中，该油内含物以占总固醇的百分含量计含有低于10％、9％、8％、7％、6％或5％的菜籽固醇。

[0193] 在一些实施例中，麦角固醇与菜籽固醇的比率为至少5:1、10:1、15:1或20:1。

[0194] 在一些实施例中，该油内含物以占总固醇的百分含量计含有至少5％、10％、20％、25％、35％、40％、45％、50％、55％、60％或65％的麦角固醇和低于20％、15％、10％、5％、4％、3％、2％或1％的β-谷固醇。在一些实施例中，该油内含物以占总固醇的百分含量计含有至少25％的麦角固醇和低于5％的β-谷固醇。在一些实施例中，该油内含物另外包含菜籽固醇。

XIII.燃料和化学品

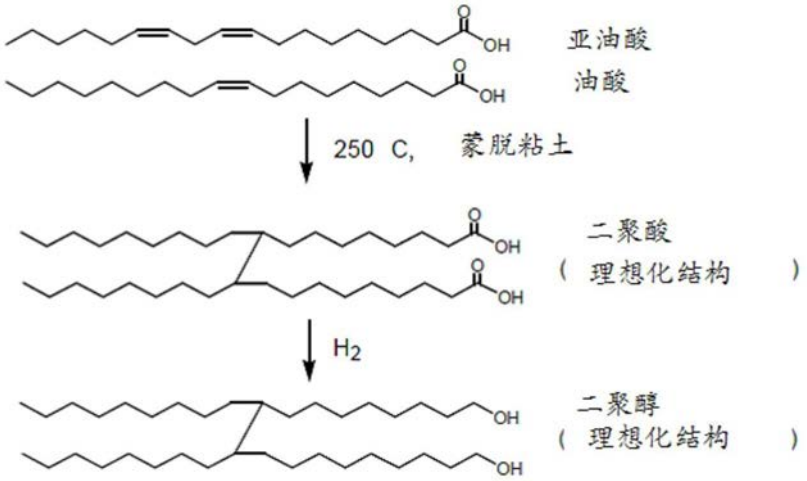
[0195] 以上单独或组合论述的油可用于制造食品、燃料及化学品(包括塑料、泡沫、膜等)。这些油、三酸甘油酯、来自这些油的脂肪酸可以经历C-H活化、氢氨基甲基化反应、甲氧基-碳酸化反应、臭氧分解、酶促转化、环氧化反应、甲基化反应、二聚合反应、硫醇化反应、复分解反应、氢烷基化反应、内酯化反应或其他化学过程。

[0196] 这些油可以被转化成烷烃(例如，可再生柴油)或酯(例如，由转酯化反应产生甲基或乙基酯以用于生物柴油)。这些烷烃或酯可以用作燃料、溶剂或润滑剂，或用作化学原料。用于制造可再生柴油和生物柴油的方法是本领域中充分确定的。参看例如WO 2011/

150411。

[0197] 在本发明的一个具体实施例中，以上描述的高油酸或高油酸高稳定性油被酯化。举例来说，这些油可以用甲醇进行转酯化，得到富含油酸甲酯的油。如实例49中所描述，已经发现这些配制物有利地与来自大豆油的油酸甲酯相比较。

[0198] 在另一个具体实例中，该油被转化成C36二酸或C36二酸的产物。从该油制造的脂肪酸可以聚合以得到富含C36二聚酸的组合物。在一个具体实例中，使高油酸油分离以得到一种高油酸脂肪酸材料，该材料聚合以得到一种富含C36二聚酸的组合物。任选地，该油是高油酸高稳定性油(例如，超过60％的油酸和低于3％的多不饱和物、超过70％的油酸和低于2％的多不饱和物，或超过80％的油酸和低于1％的多不饱和物)。据信，使用一种高油酸、高稳定性起始物质将得到更少量的环状产物，这在一些情形中可能为希望的。在使该油水解之后，获得了高浓度油酸。在制备二聚酸的过程中，高油酸物流将转化成一种“更清洁的”C36二聚酸并且不产生因C18:2和C18:3酸的存在而获得的三聚酸(C54)及其他更复杂的环状副产物。举例来说，该油可以被水解成脂肪酸并且这些脂肪酸被纯化并在蒙脱粘土存在下在250℃下二聚合。参看《SRI天然脂肪酸》(SRI Natural Fatty Acid)，2009年3月。回收到富含油酸的C36二聚物的产物。



[0199] 另外，这些C36二聚酸可以酯化并氢化以得到二醇。这些二醇可以通过催化脱水进行聚合。还可以通过二聚物二醇与碳酸二甲酯的转酯化反应来产生聚合物。

[0200] 为了根据本发明的方法制造燃料，通过任何方便的手段收获或以其他方式收集由本发明的细胞产生的脂质。可以通过全细胞提取分离脂质。首先破坏细胞，并且然后可以如通过使用离心从细胞团中分离细胞内脂质和细胞膜/细胞壁结合的脂质以及细胞外烃。在一些实施例中，产油细胞中产生的细胞内脂质是在使细胞溶解之后提取。一旦被提取，就对这些脂质进一步精炼以制造油、燃料或油脂化学品。

[0201] 不同方法可用于分离脂质与细胞溶解产物。举例来说，脂质和脂质衍生物(如脂肪醛、脂肪醇)及烃(如烷烃)可以用疏水性溶剂(如己烷)提取(参看弗伦兹(Frenz)等，1989，《酶与微生物技术》(Enzyme Microb.Technol.)，11:717)。脂质和脂质衍生物还可以使用液化(参看例如，泽山(Sawayama)等，1999，《生物质与生物能源》(Biomass and Bioenergy)17:33-39；和井上(Inoue)等，1993，《生物质与生物能源》6(4):269-274)；油液化(参看例如，箕轮(Minowa)等，1995，《燃料》(Fuel)74(12):1735-1738)；及超临界CO_2提取(参看例如，蒙德斯(Mendes)等，2003，《无机化学学报》(Inorganica Chimica Acta)356:328-334)

进行提取。苗(Miao)和吴(Wu)描述了从原始小球藻培养物回收微藻脂质的方案,其中将细胞通过离心收获、用蒸馏水洗涤并且通过冷冻干燥法干燥。在研钵中粉碎所得到的细胞粉末并且然后用正己烷提取。苗和吴,《生物资源技术》(Biosource Technology)(2006)97:841-846。

[0202] 脂质和脂质衍生物可以通过用有机溶剂提取来回收。在一些情形中,优选的有机溶剂是己烷。典型地,将有机溶剂直接添加至溶解产物中,而不事先分离溶解产物组分。在一个实施例中,使通过以上描述的一种或多种方法产生的溶解产物与有机溶剂接触足以允许脂质和/或烃组分与有机溶剂形成溶液的一段时间。在一些情形中,然后可以进一步精炼溶液以回收特定的所希望的脂质或烃组分。己烷提取法是本领域众所周知的。

[0203] 如在此描述的在体内由细胞产生或在体外酶促修饰的脂质可以任选地通过常规手段进一步加工。加工可以包括“裂化”以使大小减小,并且因此增加烃分子的氢:碳比率。催化裂化和热裂化方法常规地用于烃和三酸甘油酯油加工中。催化方法涉及使用催化剂,如固态酸催化剂。该催化剂可以是二氧化硅-氧化铝或沸石,这引起碳-碳键的异裂性或不对称断裂,产生碳阳离子和氢阴离子。这些活性中间体随后经历重排或与另一种烃发生氢离子转移。反应可以因此使这些中间体再生以引起自增殖链机制。也可以加工烃以减少其中碳-碳双键或三键的数目,任选地至零。也可以加工烃以去除或消除其中的环或环状结构。还可以加工烃以增加氢:碳比率。这可以包括加氢(“氢化”)和/或烃“裂化”成更小的烃。

[0204] 热方法涉及使用升高的温度和压力来减小烃的大小。可以使用约800℃的升高的温度以及约700kPa的升高的压力。这些条件产生“轻质(light)”烃,这一术语有时用来指富氢烃分子(如与光子通量相区别),同时还通过缩合产生氢相对耗尽的更重的烃分子。该方法论提供了均裂断裂或对称断裂并且产生烯烃,这些烯烃可以任选地如以上所描述进行酶促饱和。

[0205] 催化方法和热方法是工厂中用于烃加工和油精炼的标准方法。因此可以经由常规手段收集并且加工或精炼由在此所描述的细胞产生的烃。参看海伦(Hillen)等(《生物技术与生物工程》(Biotechnology and Bioengineering),第XXIV卷:193-205(1982))有关微藻产生的烃的氢裂化的报告。在替代性实施例中,将馏分用另一种催化剂处理,如有机化合物、热和/或无机化合物。为了将脂质加工为生物柴油,在这一节中使用了如以下描述的转酯化方法。

[0206] 经由本发明的方法产生的烃在多种工业应用中是有用的。举例来说,制造直链烷基苯磺酸盐(LAS)(一种在几乎所有类型的去污剂以及清洁制剂中使用的阴离子表面活性剂)利用了一般包含10-14个碳原子的链的烃。参看例如,美国专利号:6,946,430、5,506,201、6,692,730、6,268,517、6,020,509、6,140,302、5,080,848及5,567,359。表面活性剂(如LAS)可以用于制造个人护理组合物和去污剂,如以下美国专利号中所描述的那些:5,942,479、6,086,903、5,833,999、6,468,955及6,407,044。

[0207] 日益增长的兴趣指向生物起源的烃组分在燃料(如生物柴油、可再生柴油以及喷气燃料)中的用途,因为可以代替衍生自化石燃料的起始物质的可再生的生物起始物质是可获得的,并且其使用是令人希望的。对从生物材料制造烃组分的方法存在迫切需要。本发明通过以下满足了这一需要:提供了使用通过在此描述的方法产生的脂质作为生物材料制造生物柴油、可再生柴油以及喷气燃料的方法,从而制造生物柴油、可再生柴油以及喷气燃

料。

[0208] 传统的柴油燃料是富含石蜡烃的石油馏出物。它们具有宽至370°F到780°F的沸程，适合在压燃式发动机中燃烧，如柴油发动机车辆。根据该沸程，连同可允许范围的其他燃料特性，如十六烷值、浊点、闪点、粘度、苯胺点、含硫量、含水量、灰分含量、铜片腐蚀以及碳渣，美国试验与材料协会(American Society of Testing and Materials;ASTM)建立了柴油的等级。技术上，衍生自生物质或以其他方式满足适当的ASTM规范的任何烃馏出物材料可以定义为柴油燃料(ASTM D975)、喷气燃料(ASTM D1655)，或如果它是脂肪酸甲酯则定义为生物柴油(ASTM D6751)。

[0209] 在提取之后，可以使从在此描述的微生物生物质回收的脂质和/或烃组分经受化学处理以制造在柴油车辆或喷气发动机中使用的燃料。

[0210] 生物柴油是一种颜色取决于制造原料而在金色与深棕色之间变化的液体。它与水几乎不混溶，具有高沸点和低蒸汽压。生物柴油是指供在柴油发动机车辆中使用的等同柴油的加工燃料。生物柴油是可生物降解的并且是无毒的。生物柴油胜过常规柴油燃料的一个另外的益处是更低的发动机磨损。典型地，生物柴油包含C14-C18烷基酯。不同方法将生物质或如在此描述而产生并分离的脂质转变为柴油燃料。制造生物柴油的一种优选方法是借助于如在此描述的脂质的转酯化反应。用作生物柴油的一种优选烷基酯是甲酯或乙酯。

[0211] 在大多数现代柴油发动机车辆中，通过在此描述的方法制造的生物柴油可以单独使用或以任何浓度与常规柴油燃料掺混使用。当与常规柴油燃料(石化柴油)掺混使用时，存在的生物柴油可以从约0.1％至约99.9％。世界上许多地方使用被称为“B”因子的系统来说明生物柴油在任何燃料混合物中的量。举例来说，含有20％生物柴油的燃料被标识为B20。纯生物柴油被称为B100。

[0212] 生物柴油可以通过包含在富油生物质中的三酸甘油酯的转酯化来制造。因此，在本发明的另一个方面中提供了一种用于制造生物柴油的方法。在一个优选实施例中，用于制造生物柴油的方法包括以下步骤：(a)使用在此披露的方法培养含脂质微生物，(b)溶解含脂质微生物以产生一种溶解产物，(c)从该溶解的微生物分离脂质，并且(d)对该脂质组合物进行转酯化，由此产生了生物柴油。用于微生物生长、溶解微生物以产生溶解产物、在包含有机溶剂的介质中处理该溶解产物以形成异质混合物以及将该处理的溶解产物分离为脂质组合物的方法已经描述于上文并且也可以在制造生物柴油的方法中使用。生物柴油的脂质谱通常与原料油的脂质谱高度类似。

[0213] 脂质组合物可以经受转酯化以产生适用作生物柴油的长链脂肪酸酯。优选的转酯化反应概述于下并且包括碱催化的转酯化和使用重组脂肪酶的转酯化。在碱催化的转酯化方法中，在碱性催化剂(典型地是氢氧化钾)的存在下使三酰甘油酯与醇(如甲醇或乙醇)反应。这一反应形成甲酯或乙酯以及作为副产物的丙三醇(甘油)。

[0214] 如以上所论述，也已经使用一种酶(如脂肪酶)代替碱来进行转酯化。可以在例如介于室温与80℃之间的温度以及大于1:1(优选约3:1)的TAG与低级醇的摩尔比下进行脂肪酶催化的转酯化。适合在转酯化中使用的脂肪酶包括但不限于，在表9中列出的那些。对于转酯化有用的脂肪酶的其他实例见于例如美国专利号4,798,793、4,940,845、5,156,963、5,342,768、5,776,741以及WO 89/01032中。这样的脂质肪酶包括但不限于由以下微生物产生的脂肪酶：根霉属、曲霉属、假丝酵母属、毛霉属、假单胞菌属、根毛霉属、假丝酵母属以及

腐质霉属,以及胰脂肪酶。

[0215] 如果将在特别冷的温度中使用生物柴油,还可以使用后续过程。这样的过程包括冬化和分馏。两种过程都被设计为通过降低浊点(生物柴油开始结晶的温度)来改良燃料的冷流和冬季性能。存在使生物柴油冬化的若干途径。一种途径是将生物柴油与石化柴油掺混。另一种途径是使用能够降低生物柴油的浊点的添加剂。另一种途径是通过混入添加剂并且允许饱和物结晶,并且然后过滤出晶体来不加选择地去除饱和的甲酯。分馏选择性地将甲酯分离成单独的组分或馏分,从而允许去除或者纳入特定的甲酯。分馏方法包括尿素分馏、溶剂分馏及热蒸馏。

[0216] 由本发明的方法提供的另一种有价值的燃料是可再生柴油,它包含烷烃,如C10:0、C12:0、C14:0、C16:0以及C18:0并且因此是与生物柴油是可区别的。高质量的可再生柴油符合ASTM D975标准。由本发明的方法产生的脂质可以用作制造可再生柴油的原料。因此,在本发明的另一个方面中提供了一种用于制造可再生柴油的方法。可以通过至少三种方法来制造可再生柴油:氢热处理(氢化处理)、加氢处理以及间接液化。这些方法产生非酯馏出物。在这些方法期间,如在此描述所产生并分离的三酰甘油酯被转化成烷烃。

[0217] 在一个实施例中,用于制造可再生柴油的方法包括(a)使用在此披露的方法培养含脂质微生物,(b)将微生物溶解以产生溶解产物,(c)从该溶解的微生物分离脂质,以及(d)对该脂质进行脱氧并氢化处理以产生烷烃,由此产生可再生柴油。适合于制造可再生柴油的脂质可以经由使用有机溶剂(如己烷)从微生物生物质提取,或经由其他方法(如描述于美国专利5,928,696中的那些)获得。一些适合的方法可以包括机械压制和离心。

[0218] 在一些方法中,首先对微生物脂质进行裂化连同氢化处理以对应地减少碳链长度并使双键饱和。然后使该材料异构化,同时也对其进行氢化处理。然后通过蒸馏去除石脑油(naptha)部分,随后进行另外的蒸馏以蒸发并蒸馏柴油燃料中所希望的组分以符合ASTM D975标准,同时留下比所希望的组分更重的组分以便符合D975标准。对油(包括三酸甘油酯油)进行化学改性的氢化处理、加氢裂化、脱氧以及异构化方法在本领域中是众所周知的。参看例如欧洲专利申请EP 1741768(A1)、EP 1741767(A1)、EP 1682466(A1)、EP 1640437(A1)、EP 1681337(A1)、EP 1795576(A1)、以及美国专利7,238,277、6,630,066、6,596,155、6,977,322、7,041,866、6,217,746、5,885,440、6,881,873。

[0219] 在用于制造可再生柴油的方法的一个实施例中,产生烷烃的脂质处理是通过脂质组合物的氢化处理来进行的。在氢热处理中,典型地,生物质是在升高的温度和压力下在水中发生反应以形成油和残留固体。转化温度典型地是300°F到660°F,并且压力足以保持水主要为液态,100到170个标准大气压(atm)。反应时间是约15到30分钟。在反应完成之后,从水中分离有机物。由此产生了适合于柴油的馏出物。

[0220] 在制造可再生柴油的一些方法中,处理三酸甘油酯的第一步骤是加氢处理以使双键饱和,接着是在氢和催化剂存在下在升高的温度进行脱氧。在一些方法中,氢化和脱氧在同一个反应中发生。在其他方法中,脱氧在氢化之前发生。然后任选地进行异构化,同样是在氢和催化剂的存在下进行。优选通过蒸馏去除石脑油组分。例如,参看美国专利5,475,160(三酸甘油酯的氢化);5,091,116(脱氧、氢化以及脱气);6,391,815(氢化);以及5,888,947(异构化)。

[0221] 一种用于三酸甘油酯的氢化的适合方法包括了制备铜、锌、镁以及镧盐的水溶液

以及另外的碱金属溶液，或优选碳酸铵溶液。这两种溶液可以被加热至约20℃到约85℃的温度并且以使得沉淀容器中的pH维持在5.5与7.5之间的速率一起计量放入该沉淀容器中，以便形成一种催化剂。另外的水可以最初用于该沉淀容器中或者与该盐溶液和沉淀溶液同时添加。然后，可以对所得沉淀彻底地洗涤，干燥，在约300℃下煅烧并在从约100℃到约400℃范围内的温度下在氢中进行活化。然后可以在反应器中，使一种或多种三酸甘油酯在以上描述的催化剂存在下与氢接触并反应。该反应器可以是滴流床反应器、固定床气-固反应器、填充的鼓泡塔反应器、连续搅拌槽反应器、浆液反应器或在本领域内已知的任何其他适合的反应器类型。该过程可以分批或以连续方式进行。反应温度典型地在从约170℃至约250℃的范围内，同时反应压力典型地在从约300psig至约2000psig的范围内。此外，在本发明的该过程中的氢与三酸甘油酯的摩尔比典型地在从约20:1至约700:1的范围内。该过程典型地是在范围从约0.1hr^{-1}至约5hr^{-1}的重量时空速度(WHSV)下进行。本领域的普通技术人员将认识到，反应所需要的时间段将根据所使用的温度、氢与三酸甘油酯的摩尔比以及氢分压而变化。通过这样的氢化过程产生的产物包括脂肪醇、甘油、痕量的石蜡以及未反应的三酸甘油酯。典型地通过常规手段将这些产物分离，如例如蒸馏、萃取、过滤、结晶，等等。

[0222] 石油精炼厂使用加氢处理以便通过用氢处理进料来去除杂质。加氢处理转化温度典型地是300°F至700°F。压力典型地是40至100个大气压。反应时间典型地是约10分钟至60分钟。采用了固体催化剂来增加某些反应速率，改良对于某些产物的选择性并且优化氢消耗。

[0223] 用于油的脱氧的适合方法包括将一种油加热至约350°F至约550°F范围的温度并且在至少范围从约大气压至大气压以上的压力下使该加热的油连续地与氮接触至少约5分钟。

[0224] 用于异构化的适合方法包括使用碱异构化以及本领域内已知的其他油异构化。

[0225] 氢化处理和加氢处理最终导致三酸甘油酯进料的分子量减小。三酸甘油酯分子在加氢处理条件下被还原为四个烃分子：一个丙烷分子以及三个更重的烃分子，典型地在C8至C18的范围内。

[0226] 因此，在一个实施例中，对本发明的脂质组合物进行的一种或多种化学反应的产物是包含ASTM D975可再生柴油的烷烃混合物。由微生物产生烃评述于米特格(Metzger)等，《应用微生物学与生物技术》(Appl Microbiol Biotechnol)(2005)66:486-496;和《美国能源部水生物种计划回顾：由藻类得到的生物柴油》(A Look Back at the U.S.Department of Energy's Aquatic Species Program:Biodiesel from Algae)，NREL/TP-580-24190，约翰夏汗(John Sheehan)，特瑞度纳罕(Terri Dunahay)，约翰本曼(John Benemann)及保罗罗斯勒(Paul Roessler)(1998)中。

[0227] 根据T10-T90(对应地在10％与90％蒸馏体积下的温度)描述柴油燃料的蒸馏特性。实例13中产生的材料的T10-T90为57.9℃。可以采用在此披露的油的氢化处理、异构化及其他共价改性方法，以及在此披露的蒸馏和分馏方法(如冷过滤)，使用根据在此披露的方法制造的三酸甘油酯油来产生具有其他T10-T90范围(如20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、60℃以及65℃)的可再生柴油组合物。

[0228] 可以采用在此披露的油的氢化处理、异构化及其他共价改性方法，以及在此披露的蒸馏和分馏方法(如冷过滤)来产生具有其他T10值(如在180与295之间、在190与270之

间、在210与250之间、在225与245之间、以及至少290的T10)的可再生柴油组合物。

[0229] 可以采用在此披露的油的氢化处理、异构化及其他共价改性方法,以及在此披露的蒸馏和分馏方法(如冷过滤)来产生具有其他T90值(如在280与380之间、在290与360之间、在300与350之间、在310与340之间、以及至少290的T90)的可再生柴油组合物。

[0230] 实例13中产生的材料的FBP为300℃。可以采用在此披露的油的氢化处理、异构化及其他共价改性方法,以及在此披露的蒸馏和分馏方法(如冷过滤)来产生具有其他FBP值(如在290与400之间、在300与385之间、在310与370之间、在315与360之间、以及至少300的FBP)的可再生柴油组合物。

[0231] 由本发明的方法和组合物提供的油可以经受氢化处理、异构化及其他共价改性的组合,包括了具有多种脂质谱的油,这些脂质谱包括(a)至少1%-5%,优选地至少4%的C8-C14;(b)至少0.25%-1%,优选地至少0.3%的C8;(c)至少1%-5%,优选地至少2%的C10;(d)至少1%-5%,优选地至少2%的C12;及(3)至少20%-40%,优选地至少30%的C8-C14。

[0232] 可以通过两步法从任何形式的生物质制造传统的超低硫柴油。首先,将该生物质转化为一种合成气,合成气是一种富含氢气和一氧化碳的气体混合物。然后,将该合成气催化转化为液体。典型地,使用费歇尔-托罗普希(Fischer-Tropsch;FT)合成来完成液体的产生。这一技术适用于煤、天然气以及重油。因此,在用于制造可再生柴油的方法的又另一个优选实施例中,产生烷烃的脂质组合物处理是通过对该脂质组合物进行间接液化来进行的。

[0233] 本发明还提供了制造喷气燃料的方法。喷气燃料是澄清至稻草色的。最常见的燃料是一种基于无铅/石蜡油的、被分类为飞机A-1(Aeroplane A-1)的燃料,它是按照一套国际标准化的规范制造。喷气燃料是大量不同烃的混合物,这些烃可能多达一千种或更多。它们的大小范围(分子量或碳数)受到对产品的要求的限制,例如凝固点或发烟点。煤油型(Kerosone-type)飞机燃料(包括喷气A(Jet A)以及喷气A-1(Jet A-1))具有在约8与16碳数之间的碳数分布。宽馏或石脑油类型的飞机燃料(包括喷气B)典型地具有在约5与15个碳之间的碳数分布。

[0234] 在本发明的一个实施例中,喷气燃料是通过将藻类燃料与现有喷气燃料掺混而制造的。由本发明的方法制造的这些脂质可以用作制造喷气燃料的原料。因此,在本发明的另一个方面中提供了一种用于制造喷气燃料的方法。同此提供了由通过本发明的方法制造的脂质来制造喷气燃料的两种方法:流化催化裂化(FCC)以及加氢脱氧(HDO)。

[0235] 流化催化裂化(FCC)是一种用于从重质粗馏分制造烯烃,尤其是丙烯的方法。通过本发明的方法制造的脂质可以转化为烯烃。该方法涉及使所产生的脂质流动通过FCC区并且收集由烯烃组成的产物流,它适用作喷气燃料。使所产生的脂质在裂化条件下与裂化催化剂接触以提供适用作喷气燃料的包含烯烃和烃的产物流。

[0236] 在一个实施例中,用于制造喷气燃料的方法包括(a)使用在此披露的方法培养含脂质微生物,(b)将该含脂质微生物溶解以产生溶解产物,(c)从该溶解产物分离脂质,并且(d)处理该脂质组合物,由此产生喷气燃料。在用于制造喷气燃料的方法的一个实施例中,可以使该脂质组合物流动通过一个流体催化裂化区,在一个实施例中,这包括使该脂质组合物在裂化条件下与裂化催化剂接触以提供一种包含C_2-C_5烯烃的产物流。

[0237] 在这种方法的某些实施例中,可能希望的是去除可能存在于该脂质组合物中的任

何污染物。因此，在使该脂质组合物流动通过液体催化裂化区之前，对该脂质组合物进行预处理。预处理可以涉及使该脂质组合物与一种离子交换树脂接触。该离子交换树脂是一种酸性离子交换树脂，如Amberlyst TM-15，并且可以在反应器中用作供该脂质组合物流动通过(向上流动或向下流动)的床。其他预处理可以包括通过使该脂质组合物与酸(如硫酸、乙酸、硝酸或盐酸)接触而进行的温和酸洗。接触通常是在环境温度和大气压下用稀酸溶液完成的。

[0238] 任选地使预处理过的脂质组合物流到FCC区，在此这些含烃组分被裂化为烯烃。催化裂化是通过使该脂质组合物在反应区中与由精细分散的微粒材料组成的催化剂接触来完成的。与加氢裂化相对，该反应是催化裂化并且是在不添加氢气或无氢气消耗下进行的。随着该裂化反应的进行，大量的焦炭沉积在催化剂上。通过在一个再生区内燃烧来自该催化剂的焦炭在高温下再生该催化剂。含焦炭的催化剂(在此称为“积炭催化剂”)从反应区连续地输送至再生区以进行再生并且被来自再生区的基本上无焦炭的再生催化剂代替。不同气体流对这些催化剂颗粒的流化允许催化剂在反应区与再生区之间输送。用于在流化的催化剂流中使烃(如在此描述的脂质组合物中的那些)裂化、在反应区与再生区之间输送催化剂、以及在再生器中燃烧焦炭的方法对于FCC过程领域内的技术人员是众所周知的。示范性FCC应用和适用于使脂质组合物裂化以产生C_2-C_5烯烃的催化剂描述于美国专利号6,538,169、7,288,685中，它们通过引用以全文结合。

[0239] 适合的FCC催化剂一般包含至少两种组分，它们可以在或可以不在相同基质上。在一些实施例中，两种组分都可以循环遍及整个反应容器。第一组分一般包括在流化催化裂化领域内使用的任何众所周知的催化剂，如活性无定形粘土型催化剂和/或高活性结晶分子筛。分子筛催化剂可以是比无定形催化剂更优选的，这是因为它们对于所希望的产物的大大改良的选择性。在一些优选的实施例中，沸石可以用作FCC过程中的分子筛。优选地，该第一催化剂组分包括大孔沸石，如Y型沸石、活性氧化铝材料、粘合剂材料，包括二氧化硅或氧化铝以及惰性填料(如高岭土)。

[0240] 在一个实施例中，使本发明的脂质组合物裂化发生在FCC区的提升管段(riser section)或作为替代方案，上升段(lift section)。通过一个喷嘴将脂质组合物引入该提升管，引起脂质组合物的迅速蒸发。在接触催化剂之前，脂质组合物通常将具有约149℃至约316℃(300°F至600°F)的温度。催化剂从掺混容器流到提升管，在此它与脂质组合物接触约2秒或更少的时间。

[0241] 然后将掺混的催化剂和反应的脂质组合物蒸气从提升管的顶部通过一个出口排出并且分离成包括烯烃的裂化产物蒸气流以及一批覆盖有大量焦炭并且一般被称为“积炭催化剂”的催化剂颗粒。在尝试使脂质组合物与催化剂的接触时间减到最少(可以促进所希望的产物另外转化为不希望的其他产物)时，可以使用任何分离器安排(如涡旋臂安排)从产物流中迅速去除积炭催化剂。该分离器，例如涡旋臂分离器，被定位在一个腔的上部分，该腔具有一个汽提区位于该腔的下部分。通过该涡旋臂安排而分离的催化剂下落到该汽提区中。包含裂化的烃(包括轻烯烃)的裂化产物蒸气流和某一催化剂经由一个管道从该腔排出，该管道与旋风分离器连通。这些旋风分离器从该产物蒸气流去除剩余的催化剂颗粒以将颗粒浓度降低至极低水平。然后该产物蒸气流从分离容器的顶部排出。使通过这些旋风分离器分离的催化剂返回到分离容器并且然后到达汽提区。汽提区通过与物流逆流接触将

来自催化剂表面的吸附的烃去除。

[0242] 较低的烃分压起作用以有利于轻烯烃的产生。因此，提升管压力被设置在约172至241kPa(25至35psia)，具有约35至172kPa(5至25psia)的烃分压，其中优选的烃分压为约69至138kPa(10至20psia)。这种相对较低的烃分压是通过使用物流作为稀释剂实现，就这一点来说，该稀释剂是脂质组合物的10wt-％至55wt-％并且优选是脂质组合物的约15wt-％。其他稀释剂，如干燥气体，可以用来达到等同的烃分压。

[0243] 在提升管出口处的裂化物流的温度将是约510℃至621℃(950°F至1150°F)。然而，566℃(1050°F)以上的提升管出口温度产生更多的干燥气体和更多的烯烃。然而，566℃(1050°F)以下的提升管出口温度产生更少的乙烯和丙烯。因此，在约566℃至约630℃的优选温度、约138kPa至约240kPa(20至35psia)的优选压力下执行FCC方法是优选的。用于该方法的另一个条件是催化剂与脂质组合物的比率，该比率可以在从约5至约20并且优选在从约10至约15间变化。

[0244] 在用于制造喷气燃料的方法的一个实施例中，脂质组合物被引入FCC反应器的上升段。上升段的温度会非常热并且范围是从约700℃(1292°F)至约760℃(1400°F)，具有约100至约150的催化剂与脂质组合物比率。预期的是，将脂质组合物引入上升段将产生大量的丙烯和乙烯。

[0245] 在使用脂质组合物或如在此描述所产生的脂质制造喷气燃料的方法的另一个实施例中，该脂质组合物或脂质的结构是通过一种被称为加氢脱氧(HDO)的方法破坏的。HDO表示借助于氢来去除氧，即，在破坏该材料的结构的同时去除氧。烯属双键被氢化并且任何硫和氮化合物被去除。硫去除被称作加氢脱硫(HDS)。原材料(脂质组合物或脂质)的预处理和纯度有助于催化剂的使用寿命。

[0246] 一般在HDO/HDS步骤中，将氢与原料(脂质组合物或脂质)混合并且然后使该混合物作为并向流(作为单相或两相原料)通过催化剂床。在HDO/MDS步骤之后，对产物馏分进行分离并且传送到一个单独的异构化反应器。用于生物起始物质的异构化反应器在文献(FI 100 248)中被描述为一种并流反应器(co-current reactor)。

[0247] 通过使烃进料(例如，在此的脂质组合物或脂质)氢化来制造燃料的方法还可以通过以下方式进行：使该脂质组合物或脂质与氢气作为并流通过一个第一氢化区，并且其后通过使氢气作为相对于烃流出物的逆流经过一个第二氢化区来使该烃流出物在该第二氢化区中进一步氢化。示范性HDO应用和适用于使脂质组合物裂化以产生C_2-C_5烯烃的催化剂描述于美国专利号7,232,935中，该案通过引用以其全文结合。

[0248] 典型地，在加氢脱氧步骤中，生物组分(如在此的脂质组合物或脂质)的结构被分解，氧、氮、磷及硫化合物、以及呈气体形式的轻烃被去除，并且烯属键被氢化。在该方法的第二个步骤中，即，在所谓的异构化步骤中，进行异构化以使烃链分支化并且改良石蜡在低温下的性能。

[0249] 在该裂化方法的第一个步骤(即，HDO步骤)中，将氢气以及有待氢化的在此的脂质组合物或脂质作为并流或逆流传送到HDO催化剂床系统，所述催化剂床系统包括一个或多个催化剂床，优选地1-3个催化剂床。该HDO步骤典型地是以并流方式操作的。在HDO催化剂床系统包括两个或更多个催化剂床的情况下，可以使用逆流原理对这些床中的一个或多个进行操作。在该HDO步骤中，压力在20巴与150巴之间、优选在50巴与100巴之间变化，并且温

度是在200℃与500℃之间、优选在300℃-400℃的范围内变化。在该HDO步骤中，可以使用含有来自周期系统第VII族和/或第VIB族金属的已知的氢化催化剂。优选地，这些氢化催化剂负载有Pd、Pt、Ni、NiMo或CoMo的催化剂，载体是氧化铝和/或二氧化硅。典型地，使用了$NiMo/Al_2O_3$和$CoMo/Al_2O_3$催化剂。

[0250] 在该HDO步骤之前，可以任选地通过在更温和的条件下预氢化来处理在此的脂质组合物或脂质，由此避免双键的副反应。这种预氢化是在预氢化催化剂存在下，在50℃-400℃的温度以及1-200巴的氢气压力(优选在150℃与250℃之间的温度和在10巴与100巴之间的氢气压力)下进行的。该催化剂可以含有来自周期系统第VIII族和/或第VIB族的金属。优选地，该预氢化催化剂是负载有Pd、Pt、Ni、NiMo或CoMo的催化剂，载体是氧化铝和/或二氧化硅。

[0251] 对来自该HDO步骤的含有氢的气体流进行冷却并且然后从其中去除一氧化碳、二氧化碳、氮、磷以及硫化合物、气态轻烃以及其他杂质。在压缩之后，使纯化的氢或再循环的氢返回至该第一催化剂床和/或这些催化剂床之间以补偿退出的气流。去除冷凝的液体中的水。将该液体传送到该第一催化剂床或这些催化剂床之间。

[0252] 在该HDO步骤之后，使产物经受异构化步骤。对于该过程而言重要的是在烃与异构化催化剂接触之前尽可能完全地去除杂质。该异构化步骤包括一个可选的汽提步骤，其中可以通过用水蒸气或适合的气体(如轻烃、氮气或氢气)进行汽提而纯化来自该HDO步骤的反应产物。该可选的汽提步骤是以逆流方式在异构化催化剂上游的一个单元中进行的，其中气体与液体彼此接触，或者在利用逆流原理的分开的汽提单元中的实际异构化反应器之前进行。

[0253] 在该汽提步骤之后，将氢气和在此的氢化脂质组合物或脂质，以及任选地n-石蜡混合物传送到包括一个或若干个催化剂床的反应性异构化单元。该异构化步骤的这些催化剂床可以按并流或逆流方式进行操作。

[0254] 对于该过程而言重要的是逆流原理在该异构化步骤中适用。在该异构化步骤中，这是通过以逆流方式进行该可选的汽提步骤或该异构化反应步骤或两者来完成的。在该异构化步骤中，压力在20-150巴范围内、优选地在20-100巴范围内变化，温度是在200℃与500℃之间、优选地在300℃与400℃之间变化。在该异构化步骤中，可以使用在本领域内已知的异构化催化剂。适合的异构化催化剂含有分子筛和/或来自第VII族的金属和/或载体。优选地，该异构化催化剂含有SAPO-11或SAPO41或ZSM-22或ZSM-23或镁碱沸石，以及Pt、Pd或Ni和Al_2O_3或SiO_2。典型的异构化催化剂为例如$Pt/SAPO-11/Al_2O_3$、$Pt/ZSM-22/Al_2O_3$、$Pt/ZSM-23/Al_2O_3$及$Pt/SAPO-11/SiO_2$。该异构化步骤和该HDO步骤可以在同一个压力容器中或在分开的压力容器中进行。可选的预氢化可以在分开的压力容器中或在同一个压力容器中进行，如同HDO和异构化步骤一样。

[0255] 因此，在一个实施例中，一个或多个化学反应的产物是包含HRJ-5的烷烃混合物。在另一个实施例中，一个或多个化学反应的产物是包含ASTM D1655喷气燃料的烷烃混合物。在一些实施例中，符合ASTM 1655喷气燃料的规范的组合物具有低于10ppm的含硫量。在其他实施例中，符合ASTM 1655喷气燃料的规范的组合物具有低于205℃的蒸馏曲线T10值。在另一个实施例中，符合ASTM 1655喷气燃料的规范的组合物具有低于300℃的最终沸点(FBP)。在另一个实施例中，符合ASTM 1655喷气燃料的规范的组合物具有至少38℃的闪点。

在另一个实施例中，符合ASTM 1655喷气燃料的规范的组合物具有介于775K/M^3与840K/M^3之间的密度。在又另一个实施例中，符合ASTM 1655喷气燃料的规范的组合物具有低于-47℃的凝固点。在另一个实施例中，符合ASTM 1655喷气燃料的规范的组合物具有至少42.8MJ/K的净燃烧热。在另一个实施例中，符合ASTM 1655喷气燃料的规范的组合物具有至少13.4质量％的氢含量。在另一个实施例中，符合ASTM 1655喷气燃料的规范的组合物具有热稳定性，如在260℃下通过定量重量分析JFTOT在低于3mm Hg下所测试的。在另一个实施例中，符合ASTM 1655喷气燃料的规范的组合物具有低于7mg/dl的实际胶质。

[0256] 因此，本发明披露了多种方法，其中进行微藻脂质的化学改性以产生适用于多种工业和其他应用的产物。用于对由在此披露的方法产生的油进行改性的方法的实例包括但不限于，油的水解、油的加氢处理及油的酯化。微藻脂质的其他化学改性包括而不限于，环氧化、氧化、水解、硫酸盐化、磺化、乙氧基化、丙氧基化、酰胺化及皂化。微藻油的改性产生基本油脂化学品，这些化学品可以针对所希望的功能进一步改性成所选择的衍生油脂化学品。按以上参考燃料制造方法所描述类似的方式，也可以对从在此描述的微生物培养物产生的油进行这些化学改性。基础油脂化学品的实例包括但不限于，肥皂、脂肪酸、脂肪酯、脂肪醇、脂肪氮化合物、脂肪酸甲酯、以及甘油。衍生油脂化学品的实例包括但不限于，脂肪腈、酯类、二聚酸、季铵化合物、表面活性剂、脂肪烷醇酰胺、脂肪醇硫酸酯、树脂、乳化剂、脂肪醇、烯烃、钻井泥浆、多元醇、聚氨基甲酸酯、聚丙烯酸酯、橡胶、蜡烛、化妆品、金属皂、肥皂、α-磺化甲酯、脂肪醇硫酸酯、脂肪醇乙氧基化物、脂肪醇醚硫酸盐、咪唑啉、表面活性剂、去污剂、酯类、季铵化合物、臭氧分解产物、脂肪胺、脂肪烷醇酰胺、乙氧基硫酸盐、单酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯(包括中链三酸甘油酯)、润滑剂、液压流体、油脂、介电流体、脱模剂、金属加工液、传热流体、其他功能性流体、工业化学品(例如，清洁剂、纺织加工助剂、增塑剂、稳定剂、添加剂)、表面涂层、涂料以及清漆、电气布线绝缘材料、以及更高级烷烃。

[0257] 来自通过本发明的方法产生的甘油脂的脂肪酸组分水解产生游离脂肪酸，这些脂肪酸可以被衍生化以产生其他有用的化学品。水解在水和催化剂(可以是酸或碱)的存在下发生。释放的游离脂肪酸可以被衍生化以产生多种产物，如以下所报道：美国专利号5,304,664(高度硫酸化的脂肪酸)；7,262,158(清洁组合物)；7,115,173(织物软化剂组合物)；6,342,208(用于治疗皮肤的乳液)；7,264,886(防水组合物)；6,924,333(涂料添加剂)；6,596,768(富含脂质的反刍动物原料)；及6,380,410(用于去污剂和清洁剂的表面活性剂)。

[0258] 在一些方法中，化学改性的第一步可以是加氢处理以使双键饱和，接着是在氢和催化剂存在下在升高的温度下进行脱氧。在其他方法中，氢化和脱氧可以在同一反应中发生。在又其他方法中，脱氧在氢化之前发生。然后可以任选地进行异构化，同样在氢和催化剂的存在下进行。最后，如果希望的话，可以去除气体和石脑油。举例来说，参看美国专利5,475,160(三酸甘油酯的氢化)、5,091,116(脱氧、氢化以及脱气)、6,391,815(氢化)以及5,888,947(异构化)。

[0259] 在本发明的一些实施例中，三酸甘油酯油被部分或完全脱氧。这些脱氧反应形成所希望的产物，包括但不限于，脂肪酸、脂肪醇、多元醇、酮以及醛。一般来说，在不受任何特定理论限制的情况下，脱氧反应涉及各种不同反应路径的组合，包括不限于：氢解、氢化、连续的氢化-氢解、连续的氢解-氢化以及组合的氢化-氢解反应，使得氧从脂肪酸或脂肪酸酯部分去除，从而产生反应产物，如脂肪醇，这些产物可以通过进一步加工容易地转化成所希

望的化学品。举例来说，在一个实施例中，可以通过FCC反应将脂肪醇转化为烯烃或通过缩合反应转化为高级烷烃。

[0260] 一种此类化学改性是氢化，氢化是将氢加成至甘油脂脂肪酸组分或游离脂肪酸中的双键。氢化过程允许液体油转化成半固体或固体脂肪，它们更适合于特定应用。

[0261] 由在此描述的方法产生的油的氢化可以与在此提供的一种或多种方法和/或材料结合进行，如在以下文献中报道：美国专利号7,288,278(食品添加剂或药剂)、5,346,724(润滑产品)、5,475,160(脂肪醇)、5,091,116(食用油)、6,808,737(用于人造黄油和抹酱的结构化脂肪)、5,298,637(卡路里降低的脂肪代用品)、6,391,815(氢化催化剂以及硫吸附剂)、5,233,099及5,233,100(脂肪醇)、4,584,139(氢化催化剂)、6,057,375(泡沫抑制剂)以及7,118,773(可食用乳液抹酱)。

[0262] 本领域的普通技术人员将认识到，可以使用不同方法将碳水化合物氢化。一种适合的方法包括使碳水化合物在氢化反应器中与氢或混有适合气体的氢和催化剂在足以形成氢化产物的条件下接触。氢化催化剂一般可以包括Cu、Re、Ni、Fe、Co、Ru、Pd、Rh、Pt、Os、Ir以及其合金或任何组合，它可以是单独的或与促进剂(如W、Mo、Au、Ag、Cr、Zn、Mn、Sn、B、P、Bi以及其合金或任何组合)结合。其他有效的氢化催化剂材料包括负载型镍或用铼改性的钌。在一个实施例中，取决于所希望的催化剂的功能性，该氢化催化剂还包括任何一种载体。可以通过本领域的普通技术人员已知的方法来制备这些氢化催化剂。

[0263] 在一些实施例中，氢化催化剂包括负载型第VIII族金属催化剂和金属海绵材料(例如，海绵镍催化剂)。雷尼镍(Raney nickel)提供了适合于在本发明中使用的活化的海绵镍催化剂的一个实例。在其他实施例中，本发明的氢化反应是使用一种包含镍-铼催化剂或钨改性的镍催化剂的催化剂进行的。用于本发明的氢化反应的适合催化剂的一个实例是碳负载型镍-铼催化剂。

[0264] 在一个实施例中，适合的雷尼镍催化剂可以通过以下来制备：用碱性水溶液(例如，含有约25重量％的氢氧化钠)处理按重量计大致等量的镍和铝的合金。铝被碱性水溶液选择性地溶解，产生主要包含镍并带有少量铝的海绵状材料。最初的合金包括一定量的促进剂金属(即，钼或铬)，该量使得约1重量％至2重量％保留在所形成的海绵镍催化剂中。在另一个实施例中，使用亚硝酰硝酸钌(III)、氯化钌(III)于水中的溶液浸透适合载体材料来制备该氢化催化剂。然后将该溶液干燥以形成一种具有按重量计低于约1％的含水量的固体。然后可以将该固体在旋转球式炉中在大气压下，在氢气流中在300℃(非煅烧的)或400℃(煅烧的)下还原4小时。在冷却并用氮气使该催化剂具有惰性之后，使按体积计含5％氧的氮气在催化剂上越过，持续2小时。

[0265] 在某些实施例中，描述的催化剂包括一种催化剂载体。该催化剂载体稳定并负载该催化剂。所使用的催化剂载体的类型取决于所选择的催化剂和反应条件。用于本发明的适合载体包括但不限于，碳、二氧化硅、二氧化硅-氧化铝、氧化锆、二氧化钛、二氧化铈、氧化钒、氮化物、氮化硼、杂多酸、羟基磷灰石、氧化锌、氧化铬、沸石、碳纳米管、碳富勒烯以及其任何组合。

[0266] 可以使用本领域已知的那些常规方法来制备在本发明中使用的催化剂。适合的方法可以包括但不限于，初期润湿、蒸发浸透、化学气相沉积、洗涂、磁控溅射技术，等等。

[0267] 用于进行氢化反应的条件将基于起始物质的类型和所希望的产物而变化。得益于

本披露，本领域的普通技术人员将认识到适当的反应条件。一般来说，氢化反应是在80℃至250℃并且优选在90℃至200℃，并且最优选在100℃至150℃的温度下进行的。在一些实施例中，氢化反应是在500KPa至14000KPa的压力下进行的。

[0268] 在本发明的氢解反应中使用的氢可以包括外部氢、再循环氢、原位产生的氢以及其任何组合。如在此使用的，术语“外部氢”是指不是源自生物质反应本身而是从另一种来源添加到系统中的氢。

[0269] 在本发明的一些实施例中，希望的是将起始碳水化合物转化为一种更小的分子，该分子更容易转化为所希望的高级烃。用于这种转化的一种适合方法是通过氢解反应。已知用于进行碳水化合物的氢解的不同方法。一种适合的方法包括使碳水化合物在氢解反应器中与氢或混有适合气体的氢和氢解催化剂在足以形成包含更小的分子或多元醇的反应产物的条件下接触。如在此使用的，术语“更小的分子或多元醇”包括具有更小分子量的任何分子，该分子可以包括比起始碳水化合物更少数目的碳原子或氧原子。在一个实施例中，这些反应产物包括了包含多元醇和醇的更小的分子。本领域的普通技术人员将能够选择进行氢解反应的适当方法。

[0270] 在一些实施例中，可以使用一种氢解催化剂将5和/或6碳糖或糖醇转化为丙二醇、乙二醇以及甘油。氢解催化剂可以包括Cr、Mo、W、Re、Mn、Cu、Cd、Fe、Co、Ni、Pt、Pd、Rh、Ru、Ir、Os以及其合金或任何组合，它可以是单独的或与促进剂(如Au、Ag、Cr、Zn、Mn、Sn、Bi、B、O以及其合金或任何组合)组合。氢解催化剂还可以包括一种含有过渡金属(例如，铬、钼、钨、铼、锰、铜、镉)或第VIII族金属(例如，铁、钴、镍、铂、钯、铑、钌、铱以及锇)的含碳焦化聚合物催化剂。在某些实施例中，氢解催化剂可以包括与碱土金属氧化物结合或附着至催化活性载体上的任何以上金属。在某些实施例中，在氢解反应中的所描述的催化剂可以包括一种如以上描述的用于氢化反应的催化剂载体。

[0271] 用于进行氢解反应的条件将基于起始物质的类型和所希望产物而变化。得益于本披露，本领域的普通技术人员将认识到用来进行该反应的适当条件。一般来说，氢解反应是在110℃至300℃，并且优选在170℃至220℃，并且最优选在200℃至225℃的温度下进行的。在一些实施例中，氢解反应是在碱性条件下，优选在8至13的pH，并且甚至更优选在10至12的pH下进行的。在一些实施例中，氢解反应是在60KPa与16500KPa之间的范围内，并且优选在1700KPa与14000KPa之间的范围内，并且甚至更优选在4800KPa与11000KPa之间的范围内的压力下进行的。

[0272] 在本发明的氢解反应中使用的氢可以包括外部氢、再循环氢、原位产生的氢以及其任何组合。

[0273] 在一些实施例中，可以在缩合反应器中通过缩合反应将以上论述的反应产物转化为高级烃。在这样的实施例中，这些反应产物的缩合在一种能够形成高级烃的催化剂的存在下发生。虽然不意图受理论限制，但是据信高级烃的产生是通过逐步加成反应而进行，包括碳-碳或碳-氧键的形成。所得到的反应产物包括了含有这些部分的许多化合物，如在以下更详细描述。

[0274] 在某些实施例中，适合的缩合催化剂包括酸催化剂、碱催化剂或酸/碱催化剂。如在此所使用的，术语“酸/碱催化剂”是指具有酸和碱官能性两者的催化剂。在一些实施例中，缩合催化剂可以包括但不限于，沸石、碳化物、氮化物、氧化锆、氧化铝、二氧化硅、铝硅

酸盐、磷酸盐、氧化钛、氧化锌、氧化钒、氧化镧、氧化钇、氧化铕、氧化镁、氧化铈、氧化钡、氧化钙、氢氧化物、杂多酸、无机酸、酸改性树脂、碱改性树脂以及其任何组合。在一些实施例中，缩合催化剂还可以包括一种改性剂。适合的改性剂包括La、Y、Sc、P、B、Bi、Li、Na、K、Rb、Cs、Mg、Ca、Sr、Ba及其任何组合。在一些实施例中，缩合催化剂还可以包括一种金属。适合的金属包括Cu、Ag、Au、Pt、Ni、Fe、Co、Ru、Zn、Cd、Ga、In、Rh、Pd、Ir、Re、Mn、Cr、Mo、W、Sn、Os、合金以及其任何组合。

[0275] 在某些实施例中，在缩合反应中所描述的催化剂可以包括一种如在以上描述的用于氢化反应的催化剂载体。在某些实施例中，缩合催化剂是自负载的。如在此所使用的，术语“自负载”表示该催化剂不需要另一种材料作为载体。在其他实施例中，该缩合催化剂与一种适合于使该催化剂悬浮的分开的载体结合使用。在一个实施例中，该缩合催化剂载体是二氧化硅。

[0276] 缩合反应发生的条件将基于起始物质的类型和所希望的产物而变化。得益于本披露，本领域的普通技术人员将认识到用来进行该反应的适当条件。在一些实施例中，该缩合反应是在对于所提出的反应的热力学是有利的一种温度下进行的。缩合反应的温度将取决于特定的起始多元醇或醇而变化。在一些实施例中，缩合反应的温度是在从80℃至500℃，并且优选从125℃至450℃，并且最优选从125℃至250℃的范围内。在一些实施例中，缩合反应是在0KPa与9000KPa之间的范围内并且优选在0KPa与7000KPa之间的范围内，并且甚至更优选在0KPa与5000KPa之间的范围内的压力下进行的。

[0277] 由本发明形成的高级烷烃包括但不限于，具有从4至30个碳原子的支链或直链烷烃、具有从4至30个碳原子的支链或直链烯烃、具有从5至30个碳原子的环烷烃、具有从5至30个碳原子的环烯烃、芳基、稠和芳基、醇以及酮。适合的烷烃包括但不限于，丁烷、戊烷、戊烯、2-甲基丁烷、己烷、己烯、2-甲基戊烷、3-甲基戊烷、2,2,-二甲基丁烷、2,3-二甲基丁烷、庚烷、庚烯、辛烷、辛烯、2,2,4-三甲基戊烷、2,3-二甲基己烷、2,3,4-三甲基戊烷、2,3-二甲基戊烷、壬烷、壬烯、癸烷、癸烯、十一烷、十一烯、十二烷、十二烯、十三烷、十三烯、十四烷、十四烯、十五烷、十五烯、壬基癸烷、壬基癸烯、二十烷、二十烯、二十一烷、二十一烯、二十二烷、二十二烯、二十三烷、二十三烯、二十四烷、二十四烯、以及其异构体。这些产物中有一些可以适合用作燃料。

[0278] 在一些实施例中，这些环烷烃和环烯烃是未被取代的。在其他实施例中，这些环烷烃和环烯烃是单取代的。在又其他实施例中，这些环烷烃和环烯烃是多取代的。在包含取代的环烷烃和环烯烃的实施例中，这些取代的基团包括但不限于，具有1至12个碳原子的支链或直链烷基、具有1至12个碳原子的支链或直链亚烷基、苯基以及其任何组合。适合的环烷烃和环烯烃包括但不限于，环戊烷、环戊烯、环己烷、环己烯、甲基-环戊烷、甲基-环戊烯、乙基-环戊烷、乙基-环戊烯、乙基-环己烷、乙基-环己烯、其异构体以及任何组合。

[0279] 在一些实施例中，所形成的芳基是未取代的。在另一个实施例中，所形成的芳基是单取代的。在包含取代的芳基的实施例中，这些取代的基团包括但不限于，具有1至12个碳原子的支链或直链烷基、具有1至12个碳原子的支链或直链亚烷基、苯基以及其任何组合。用于本发明的适合芳基包括但不限于，苯、甲苯、二甲苯、乙苯、对二甲苯、间二甲苯以及其任何组合。

[0280] 在本发明中产生的醇具有从4至30个碳原子。在一些实施例中，这些醇是环状的。

在其他实施例中，这些醇是分支的。在另一个实施例中，这些醇是直链的。用于本发明的适合醇包括但不限于，丁醇、戊醇、己醇、庚醇、辛醇、壬醇、癸醇、十一醇、十二醇、十三醇、十四醇、十五醇、十六醇、庚基癸醇、辛基癸醇、壬基癸醇、二十醇、二十一醇(uneicosanol)、二十二醇(doeicosanol)、二十三醇(trieicosanol)、二十四醇(tetraeicosanol)、以及其异构体。

[0281] 本发明中产生的酮具有从4至30个碳原子。在一个实施例中，这些酮是环状的。在另一个实施例中，这些酮是分支的。在另一个实施例中，这些酮是直链的。用于本发明的适合酮包括但不限于，丁酮、戊酮、己酮、庚酮、辛酮、壬酮、癸酮、十一烷酮、十二烷酮、十三烷酮、十四烷酮、十五烷酮、十六烷酮、庚基癸酮、辛基癸酮、壬基癸酮、二十烷酮、二十一烷酮(uneicosanone)、二十二烷酮(doeicosanone)、二十三烷酮(trieicosanone)、二十四烷酮(tetraeicosanone)、以及其异构体。

[0282] 另一种这样的化学改性是酯交换。天然产生的甘油脂不具有脂肪酸组分的均匀分布。在油的情况下，酯交换是指在不同甘油脂的两个酯之间的酰基的交换。该酯交换过程提供了一种机制，通过该机制可以将甘油脂混合物的脂肪酸组分重排以改变分布模式。酯交换是一种众所周知的化学过程，并且一般包括在一种催化剂的存在下(如碱金属或碱金属烷基化物(例如，甲醇钠))将油的混合物加热(至约200℃)一段时间(例如，30分钟)。这个过程可以用来使一种油混合物的脂肪酸组分的分布模式随机化，或者可以指向产生所希望的分布模式。可以对在此提供的材料(如具有至少20％细胞干重的脂质的微生物生物质)进行脂质的这种化学改性方法。

[0283] 可以通过将油混合物维持在低于可能出现的一些TAG的熔点以下的温度来进行定向酯交换，其中寻求一种特定的脂肪酸分布模式。这使得这些TAG选择性结晶，从而在它们结晶时有效地将其从反应混合物中去除。举例来说，该过程可以继续直到油中的大多数脂肪酸已经沉淀。定向酯交换方法可以用来例如经由用更短链对应物取代更长链脂肪酸来制造一种具有更低卡路里含量的产物。定向酯交换还可以用来制造一种具有脂肪混合物的产物，该产物可以提供食品添加剂或产品(例如，人造黄油)中寻求的所希望的熔融特性和结构特征，无需借助于氢化，氢化会产生不需要的反式异构体。

[0284] 由在此描述的方法产生的油的酯交换可以与一种或多种方法和/或材料结合进行，或产生如在以下文献中报道的产品：美国专利号6,080,853(不易消化的脂肪代用品)、4,288,378(花生酱稳定剂)、5,391,383(食用喷淋油(Edible spray oil))、6,022,577(用于食品的食用脂肪)、5,434,278(用于食品的食用脂肪)、5,268,192(低卡路里坚果产品)、5,258,197(卡路里降低的食用组合物)、4,335,156(食用脂肪产品)、7,288,278(食品添加剂或药剂)、7,115,760(分馏方法)、6,808,737(结构脂肪)、5,888,947(发动机润滑剂)、5,686,131(食用油混合物)、以及4,603,188(固化的氨基甲酸乙酯组合物)。

[0285] 在根据本发明的一个实施例中，如以上描述的油的转酯化之后是转酯化的产物与多元醇的反应(如在美国专利号6,465,642中报道)以产生多元醇脂肪酸聚酯。这样一种酯化与分离过程可以包括以下步骤：在肥皂的存在下使一种低级烷基酯与多元醇反应；从产物混合物中去除残余的肥皂；水洗并且干燥产物混合物以去除杂质；漂白产物混合物用于精炼；将至少一部分未反应的低级烷基酯与产物混合物中的多元醇脂肪酸聚酯分离；并且将分离的未反应的低级烷基酯再循环。

[0286] 还可以对具有短链脂肪酸酯的微生物生物质进行转酯化，如在美国专利6,278,006中报道的。一般来说，可以通过在一种适合的催化剂存在下将一种短链脂肪酸酯添加至一种油中并且加热该混合物来进行转酯化。在一些实施例中，该油按重量计占该反应混合物的约5％至约90％。在一些实施例中，该短链脂肪酸酯按重量计占该反应混合物的约10％至约50％。催化剂的非限制性实例包括碱催化剂；甲醇钠；酸催化剂，包括无机酸(如硫酸)与酸化粘土，有机酸，如甲烷磺酸、苯磺酸以及甲苯磺酸，以及酸性树脂，如Amberlyst 15。金属(如钠与镁)以及金属氢化物也是有用的催化剂。

[0287] 另一种这样的化学改性是羟化，它涉及将水加成至双键，从而引起饱和以及羟基部分的并入。该羟化过程提供了一种用于将甘油脂的一种或多种脂肪酸组分转化为羟基脂肪酸的机制。羟化可以例如经由在美国专利号5,576,027中报道的方法来进行。羟化脂肪酸(包括蓖麻油及其衍生物)适用作若干工业应用(包括食品添加剂、表面活性剂、颜料润湿剂、消泡剂、防水添加剂、增塑剂、化妆品乳化和/或除臭剂)以及电子设备、药物、涂料、油墨、胶粘剂以及润滑剂中的组分。可以如何进行甘油酯的羟化的一个实例如下：可以加热脂肪，优选与庚烷结合加热至约30℃-50℃并且在此温度下保持三十分钟或更长；然后可以将乙酸添加至该混合物中，接着添加硫酸水溶液，再接着以较小增量经过一小时添加过氧化氢水溶液至该混合物中；在添加过氧化氢水溶液之后，然后可以将温度增加到至少约60℃并且搅拌至少六小时；在搅拌之后，使该混合物沉降并且可以将由该反应形成的下部水层去除，同时用具有约60℃的温度的热水洗涤由该反应形成的上部庚烷层；然后可以将经过洗涤的庚烷层用氢氧化钾水溶液中和至约5至7的pH并且然后通过在真空下蒸馏将其去除；然后可以将反应产物在100℃下真空干燥并且将干燥的产物在真空条件下进行蒸汽除臭，并且在约50℃至60℃下使用硅藻土过滤。

[0288] 由在此描述的方法产生的微生物油的羟化可以与一种或多种方法和/或材料结合进行，或制造如在以下文献中报道的产品：美国专利号6,590,113(油基涂层和油墨)、4,049,724(羟化方法)、6,113,971(橄榄油脂(Olive oil butter))、4,992,189(润滑剂和润滑油添加剂)、5,576,027(羟化奶)以及6,869,597(化妆品)。

[0289] 羟化甘油脂可以被转化为交内酯。交内酯由其中羟化脂肪酸组分已经被酯化为另一种脂肪酸分子的甘油脂组成。羟化甘油脂向交内酯的转化可以通过以下来进行：加温甘油脂与脂肪酸的混合物并且使该混合物与一种矿物酸接触，如由伊斯贝尔(Isbell)等，JAOCS 71(2):169-174(1994)所描述的。交内酯在多种应用中是有用的，包括但不限于在以下文献中报道的那些：美国专利号7,196,124(弹性材料与地板覆盖物)、5,458,795(用于高温应用的稠化油)、5,451,332(用于工业应用的流体)、5,427,704(燃料添加剂)、以及5,380,894(润滑剂、润滑脂、增塑剂以及印刷墨)。

[0290] 另一种这样的化学改性是烯烃复分解。在烯烃复分解中，催化剂切断烯烃(alkene/olefin)中的亚烷基碳并且通过使它们中的每一个与不同的亚烷基碳进行配对而形成新的烯。烯烃复分解反应提供了用于如以下过程的机制：通过乙烯醇分解截断烯烃上的不饱和脂肪酸烷基链，通过自我复分解经由烯键交联脂肪酸，并且通过与衍生化烯烃的交叉复分解在脂肪酸上并入新的官能团。

[0291] 结合其他反应，如酯交换和氢化，烯烃复分解可以将不饱和甘油脂转化为不同的终产物。这些产物包括用于蜡的甘油脂低聚物；用于润滑剂的短链甘油脂；用于化学品和聚

合物的同-以及异-双官能烷基链;用于生物燃料的短链酯;以及用于喷气燃料的短链烃。烯烃复分解可以例如使用美国专利号7,119,216、美国专利公开号2010/0160506及美国专利公开号2010/0145086中所报道的催化剂和方法对三酰基甘油和脂肪酸衍生物进行。

[0292] 生物油的烯烃复分解一般包括在其他烯烃存在(交叉复分解)或不存在(自我复分解)下,在惰性条件下将Ru催化剂溶液以约10至250ppm的装载量添加至不饱和脂肪酸酯中。典型地允许这些反应进行从数小时至数日并且最终产生烯烃产物的一种分布。如何进行脂肪酸衍生物的烯烃复分解的一个实例如下:将第一代格拉布催化剂(二氯[2(1-甲基乙氧基-α-O)苯基]亚甲基-α-C](三环己基-膦))在甲苯中的溶液以222ppm的催化剂装载量添加至含有经脱气并干燥的油酸甲酯的容器中。然后将该容器用约60psig的乙烯气体进行加压并且在约30℃或30℃以下维持3小时,由此可以产生约50%产率的9-癸烯酸甲酯。

[0293] 由在此描述的方法产生的油的烯烃复分解可以与一种或多种方法和/或材料结合进行,或制造如在以下文献中报道的产品:专利申请PCT/US 07/081427(α-烯烃脂肪酸)以及美国专利申请号12/281,938(石油膏)、12/281,931(彩弹枪用胶囊)、12/653,742(增塑剂和润滑剂)、12/422,096(双官能有机化合物)及11/795,052(蜡烛)。

[0294] 可以对微生物油进行的其他化学反应包括使三酰基甘油与环丙烷化剂(cyclopropanating agent)反应以增强流动性和/或氧化稳定性,如在美国专利6,051,539中报道;从三酰基甘油制造蜡,如在美国专利6,770,104中报道;以及三酰基甘油的环氧化,如在“脂肪酸组合物对环氧化的三酰基甘油的丙烯酸酯化动力学的影响”(“The effect of fatty acid composition on the acrylation kinetics of epoxidized triacylglycerols”),《美国油化学协会杂志》(Journal of the American Oil Chemists' Society),79:1,59-63,(2001)以及《自由基生物学与医学》(Free Radical Biology and Medicine),37:1,104-114(2004)中报道的。

[0295] 用于如以上描述的燃料和化学产品的含油微生物生物质的产生导致脱脂生物质粉的产生。脱脂粉是制备藻油的副产物并且适用作农场动物(例如,反刍动物、家禽、猪以及水产养殖)的动物饲料。所得到的粉虽然具有降低的油含量,但仍然含有高品质的蛋白质、碳水化合物、纤维、灰分、残油以及其他适合用于动物饲料的营养素。由于这些细胞大部分被油分离过程溶解,该脱脂粉是容易地被这些动物可消化的。脱脂粉可以任选地在动物饲料中与其他成分结合,如谷粒。由于脱脂粉具有粉状一致性(powdery consistency),故可以使用可商购的挤出机或膨胀器或另一种类型的机器将它压制成小丸。

[0296] 已经在以上详述的本发明在以下实例中进行了举例说明,提供这些实例旨在说明而不是限制要求保护的发明。

具体实施方式

XIV.实例

实例1:通过脂肪酸甲酯检测进行的脂肪酸分析

[0297] 由干燥的生物质制备脂质样品。将20-40mg的干燥生物质再悬浮于2mL含5%H_2SO_4的MeOH中,并且添加含有适量的适合内部标准品(C19:0)的200μl甲苯。将该混合物进行短暂地声波处理以分散该生物质,然后在70℃-75℃下加热3.5小时。添加2mL的庚烷以提取脂肪酸甲酯,接着添加2mL的6%K_2CO_3(水溶液)以中和酸。将该混合物剧烈搅拌,并且将一部分

上层转移至含有Na_2SO_4(无水)的小瓶中用于使用标准FAME GC/FID(脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化检测)方法进行气相色谱分析。

实例2:从油中纯化三酰基甘油酯以及三酰基甘油酯脂肪酶消化的方法

[0298] 通过将约10mg油溶解于二氯甲烷中并且将其装载到用庚烷预先调节的庞德-伊力特(Bond-Elut)氨基丙基固相提取管柱(500mg)上来分离每一油样品的三酰基甘油酯(TAG)部分。用二氯甲烷-MeOH(1:1)将TAG洗脱到收集管中,而极性脂质保留在该柱上。在氮气流下去除溶剂。将Tris缓冲液和2mg猪胰脏脂肪酶(II型,西格玛公司(Sigma),100-400个单位/毫克)添加到TAG部分中,随后添加胆汁盐和氯化钙溶液。该猪胰脏脂肪酶将sn-1和sn-3脂肪酸裂解,由此产生2-单酰基甘油和游离脂肪酸。在搅拌下,在40℃下加热这一混合物三分钟,短暂冷却,然后用6N HCl淬灭。然后用乙醚萃取混合物并用水洗涤该乙醚层,然后经硫酸钠干燥。在氮气流下去除溶剂。为了分离该单酰基甘油酯(MAG)部分,将残余物溶解于庚烷中并装载到用庚烷预处理的第二氨基丙基固相提取管柱上。用乙醚-二氯甲烷-庚烷(1:9:40)洗脱残留的TAG,用乙酸乙酯-庚烷(1:4)洗脱二酰基甘油酯(DAG),并且用二氯甲烷-甲醇(2:1)从该管柱中洗脱出MAG。然后在氮气流下,将所得MAG、DAG及TAG部分浓缩至干,并且使其经受如实例1中所描述的常规直接转酯化法GC/FID分析。

实例3:针对脂肪酸和SN-2谱对微生物进行工程改造通过外源LPAAT表达使月桂酸增加

[0299] 本实例描述了使用多种编码椰1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶(Cn LPAAT)的重组多核苷酸对一种微生物进行工程改造,其中转化的微生物的脂肪酸谱和sn-2谱已经富集月桂酸。

[0300] 根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中描述的生物射弹转化法,最初用质粒构建体pSZ1283转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的经典地诱变品系,品系A。PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696(通过引用结合于此)中所描述的pSZ1283包含赖特萼距花FATB2(CwTE2)硫酯酶(SEQ ID NO:10)的编码序列;用于整合到核基因组中的6S基因组区的5'(SEQ ID NO:1)和3'(SEQ ID NO:2)同源重组靶向序列(侧接该构建体);以及在莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)控制下表达SEQ ID NO:3中给出的蛋白质序列的酿酒酵母suc2蔗糖转化酶编码区(SEQ ID NO:4)。这种酿酒酵母suc2表达盒作为SEQ ID NO:7列出并且用作一种可选择标记物。表达SEQ ID NO:11中给出的蛋白质序列的CwTE2蛋白质编码序列在桑椹型无绿藻Amt03启动子/5'UTR(SEQ ID NO:8)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR的控制下。对CwTE2和suc2的蛋白质编码区进行密码子优化以反映桑椹型无绿藻UTEX 1435核基因中固有的密码子偏性,如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述。

[0301] 将pSZ1283转化至品系A中之后,在含有蔗糖作为唯一碳源的琼脂平板上选择阳性克隆。然后将初级转化子以克隆方式纯化并且选出单个转化子(品系B)用于进一步基因修饰。用质粒构建体pSZ2046转化这一基因工程改造过的品系以中断品系B的pLoop基因组基因座。构建体pSZ2046包含椰1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶(Cn LPAAT)(SEQ ID NO:12)的编码序列;用于整合到核基因组中的pLoop基因组区的5'(SEQ ID NO:13)和3'(SEQ ID NO:14)同源重组靶向序列(侧接该构建体);以及在莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR

(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)控制下的新霉素抗性蛋白质编码序列。这一NeoR表达盒作为SEQ ID NO:15列出并且用作一种可选择标记物。Cn LPAAT蛋白质编码序列在桑椹型无绿藻Amt03启动子/5'UTR(SEQ ID NO:8)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR的控制下。对Cn LPAAT和NeoR的蛋白质编码区进行密码子优化以反映桑椹型无绿藻UTEX 1435核基因中固有的密码子偏性,如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述。Cn LPAAT的氨基酸序列以SEQ ID NO:16提供。

[0302] 在pSZ2046转化至B品系中,由此产生C品系之后,在包含G418(遗传霉素)的琼脂平板上选择阳性克隆。个别转化子以克隆方式纯化并使其在pH 7.0下于适合产生脂质的条件下生长,如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所详述。由来自每个转化子的干燥的生物质制备脂质样品,并使用如实例1中所描述的标准脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化(FAME GC/FID)检测法分析这些样品中的脂肪酸谱。在以葡萄糖作为唯一碳源上生长的桑椹型无绿藻UTEX 1435(U1)、未转化的B品系以及五个pSZ2046阳性转化子(C品系,1-5)呈现于表6中。

[0303] 表6.LPAAT表达对包含中链偏好的硫酯酶的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的脂肪酸谱的影响。

脂肪酸面积%	U1	B品系	C-1品系	C-2品系	C-3品系	C-4品系	C-5品系
C10:0	0.01	5.53	11.37	11.47	10.84	11.13	11.12
C12:0	0.04	31.04	46.63	46.47	45.84	45.80	45.67
C14:0	1.27	15.99	15.14	15.12	15.20	15.19	15.07
C16:0	27.20	12.49	7.05	7.03	7.30	7.20	7.19
C18:0	3.85	1.30	0.71	0.72	0.74	0.74	0.74
C18:1	58.70	24.39	10.26	10.41	10.95	11.31	11.45
C18:2	7.18	7.79	7.05	6.93	7.30	6.88	7.01
C10-C12	0.50	36.57	58.00	57.94	56.68	56.93	56.79

[0304] 如表6中所示,表达CwTE2的B品系的脂肪酸谱显示相对于未转化的UTEX 1435品系,C10:0、C12:0及C14:0脂肪酸的组成增加以及C16:0、C18:0及C18:1脂肪酸减少。另外的基因修饰对于转化品系的脂肪酸谱(即,B品系中CnLPAAT的表达)的影响是C10:0和C12:0脂肪酸的组成仍进一步增加,C16:0、C18:0及C18:1脂肪酸仍进一步减少,但对C14:0脂肪酸组成无显著影响。这些数据指示,CnLPAAT在微生物宿主有机体的情形中显示出底物偏好。

[0305] 未转化的桑椹型无绿藻A品系是以包含低于0.5%的C12脂肪酸和低于1%的C10-C12脂肪酸的脂肪酸谱为特征。相比之下,表达赖特萼距花硫酯酶的B品系的脂肪酸谱包含31%的C12:0脂肪酸,并且C10-C12脂肪酸占总脂肪酸超过36%。另外,表达高级植物硫酯酶和CnLPAAT酶的C品系的脂肪酸谱包含介于45.67%与46.63%之间的C12:0脂肪酸,并且C10-C12%脂肪酸占总脂肪酸介于71%与73%之间。表达外源硫酯酶的结果是使得工程改造过的微生物中存在的C12脂肪酸的百分含量增加62倍。表达外源硫酯酶和外源LPAAT的结果是使得工程改造过的微生物中存在的C12脂肪酸的百分含量增加92倍。

[0306] 对从A、B及C品系提取的油样品的TAG部分的三酰基甘油酯的sn-2谱进行分析。如实例2中所描述来提取并加工TAG，并且如实例1和2中那样进行分析。从A、B及C品系提取的油的TAG部分的脂肪酸组成和sn-2谱(以占总脂肪酸的面积％表示)呈现于表7中。未报道的值以“n.r.”指示。

[0307] 表7.LPAAT表达对由包含中链偏好的硫酯酶的转化的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)产生的TAG的脂肪酸组成和sn-2谱的影响。

品系	A品系（未转化）		B品系（pSZ1500）		C品系（pSZ1500＋pSZ2046）	
脂肪酸面积%	FA	sn-2谱	FA	sn-2谱	FA	sn-2谱
C10:0	n.r.	n.r.	11.9	14.2	12.4	7.1
C12:0	n.r.	n.r.	42.4	25	47.9	52.8
C14:0	1.0	0.6	12	10.4	13.9	9.1
C16:0	23.9	1.6	7.2	1.3	6.1	0.9
C18:0	3.7	0.3	n.r	n.r.	0.8	0.3
C18:1	64.3	90.5	18.3	36.6	9.9	17.5
C18:2	4.5	5.8	5.8	10.8	6.5	10
C18:3	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	1.1	1.6

[0308] 如表7中所示，相对于从未转化的A品系分离的TAG的脂肪酸谱，从表达CwTE2的B品系分离的三酸甘油酯(TAG)的脂肪酸组成中C10:0、C12:0及C14:0脂肪酸增加并且C16:0和C18:1脂肪酸减少。另外的基因修饰对转化品系的脂肪酸谱(即CnLPAAT表达)的影响是C10:0和C12:0脂肪酸的组成仍进一步增加，C16:0、C18:0及C18:1脂肪酸仍进一步减少，但对C14:0脂肪酸组成无显著影响。这些数据指示，外源CnLPAAT的表达改良了转化的微生物的中链脂肪酸谱。

[0309] 未转化的桑椹型无绿藻A品系以约0.6％的C14、约1.6％的C16:0、约0.3％的C18:0或约90％的C18:1以及约5.8％的C18:2的sn-2谱为特征。相比于A品系，表达赖特蓖距花硫酯酶的B品系以更高的中链脂肪酸和更少的长链脂肪酸的sn-2谱为特征。C12脂肪酸占B品系sn-2谱的25％。另外的基因修饰对转化品系的sn-2谱(即CnLPAAT的表达)的影响是C12脂肪酸仍进一步增加(从25％到52.8％)，C18:1脂肪酸减少(从36.6％到17.5％)以及C10:0脂肪酸减少。(C14:0和C16:0脂肪酸的sn-2谱组成对于B和C品系是相对类似的。)

[0310] 这些数据证实了容许外源LPAAT表达的多核苷酸改变工程改造的微生物的脂肪酸谱并且特别是在增加微生物细胞中C10:0和C12:0脂肪酸浓度方面的效用和有效性。这些数据另外证实了容许外源硫酯酶和外源LPAAT表达的多核苷酸改变由微生物细胞产生的TAG的sn-2谱，特别是增加sn-2谱的C12组成并减少sn-2谱的C18:1组成的效用和有效性。

实例4：由重组微藻产生的油的热行为。

[0311] 图1-14包括了精炼、漂白并且除臭的由基因工程改造桑椹型无绿藻品系得到的油的脂肪酸谱和熔融曲线。在一些情形中，这些熔融曲线的改变是经由基因工程改造获得的。举例来说，所产生的一些油相对于对照微藻油(即，由缺乏指定的基因修饰的品系产生的那

些)或相对于广泛可得的植物油具有更微弱或更尖锐的熔融转变。此外,图12示出了当通过在室温下保持若干天回火时的高棕榈酸油(下部迹线)和在进行第一次扫描之后的同种油(上部迹线)的扫描热量测定。这些扫描范围从-60℃到+50℃,并且加热速率为10℃/分钟。两条迹线之间的差异表明,油回火引起该油内晶体结构的改变。

[0312] 还值得注意的是,图10和11示出了RBD-5和RBD 6的稳定性测试。很明显,如通过氧化稳定性指数(AOCS法Cd 12b-92)所测量,RBD-6(一种具有低于0.1%的0.1%18:2和18:3脂肪酸的油)甚至在110℃下加热36小时之后仍实质上稳定。

[0313] 下表8给出了图1-13中标识的品系的基因工程改造的细节。

[0314] 表8.基因工程改造的品系。

RB Z	美国榆硫酯酶
RBD-1	由 amt03 驱动的赖特萼距花 FATB2 硫酯酶
RBD-2	美国榆硫酯酶
RBD-3	带有 amt03 启动子的天然细叶萼距花 C16:0 特异性硫酯酶
RBD Y	带有 Btub 启动子的美国榆硫酯酶
RBD X	SAD2B 敲除的天然赖特萼距花 FAT2B 硫酯酶, 带有 amt03 启动子
RBD W	SAD2B 敲除的在插入位点处受 amt03 驱动的天然赖特萼距花 FATB2
RBD-4	对照品系
RBD-5	FATA-1 敲除的在插入位点处受 amt03 启动子驱动的红花属油酸 TE
RBD-6	FADc 敲除的红花油酰基硫酯酶

实例5:加工的由工程改造的微生物产生的油的特征

[0315] 用转化载体pSZ1500(SEQ ID NO:17)转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的方法和影响先前已经描述于PCT申请号PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中。

[0316] 根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法,用pSZ1500转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的经典诱变(用于产生更多油)衍生物A品系。pSZ1500包含了针对在桑椹型无绿藻UTEX 1435中表达进行密码子优化的红花油酰基-硫酯酶(CtOTE)基因的核苷酸序列。pSZ1500表达构建体包括了用于整合到核基因组中的FADc基因组区的5'(SEQ ID NO:18)和3'(SEQ ID NO:19)同源重组靶向序列(侧接该构建体)以及在莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)控制下的酿酒酵母suc2蔗糖转化酶编码区。这种酿酒酵母suc2表达盒作为SEQ ID NO:7列出并用作一种可

选择标记物。CtOTE编码区在桑椹型无绿藻Amt03启动子/5'UTR(SEQ ID NO:8)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR的控制下,并且天然转运肽被原始小球藻硬脂酰基-ACP去饱和酶转运肽(SEQ ID NO:9)代替。对CtOTE和suc2的蛋白质编码区进行密码子优化以反映桑椹型无绿藻UTEX 1435核基因固有的密码子偏性,如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述。

[0317] 将A品系的初级pSZ1500转化子在含有蔗糖作为唯一碳源的琼脂平板上进行选择,以克隆方式纯化,并且选出单个的工程改造的株系(D品系)用于分析。如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述使D品系生长。然后使用标准方法所产生的生物质中的油进行己烷提取,并且确定所得到的三酸甘油酯油不含残留己烷。PCT申请号PCT/US 2010/031108中描述了使用螺旋榨机从微藻中提取油的其他方法,特此通过引用而结合。

[0318] 使用标准植物油加工加工方法,对从D品系生物质提取的不同批次的油进行精炼,漂白并除臭。这些程序产生油样品RBD437、RBD469、RBD501、RBD 502、RBD503及RBD529,根据由美国油化学协会、美国材料与试验协会(American Society for Testing and Materials)及国际标准化组织(International Organization for Standardization)所定义的方法,使这些样品经受分析测试方案。在下表9-14中汇总了这些分析的结果。

[0319] 表9.油样品RBD469的分析结果。

方法编号	测试说明	结果	单位
AOCS Ca 3a-46	不溶性杂质	< 0.01	%
AOCS Ca 5a-40	游离脂肪酸（油酸）	0.02	%
AOCS Ca 5a-40	酸值	0.04	mg KOH/g
AOCS CA 9f-57	中性油	98.9	%
D97	浊点	-15	deg C
D97	倾点	-18	deg C
	卡尔费休湿度（Karl Fischer Moisture）	0.01	%
AOCS Cc 13d-55（修改版）	叶绿素	< 0.01	ppm
	碘值	78.3	g I_2/100 g
AOCS Cd 8b-90	过氧化物值	0.31	meq/kg
ISO 6885	对甲氧基苯胺值	0.65	
AOCS Cc 18-80	滴熔点（米特勒（Mettler））	6.2	deg C
AOCS Cd 11d-96	三酰基甘油酯	98.6	%
AOCS Cd 11d-96	单酸甘油酯	< 0.01	%
AOCS Cd 11d-96	二酸甘油酯	0.68	%
AOCS Cd 20-91	总极性化合物	2.62	%
IUPAC 2.507 和 2.508	氧化并聚合的三酰基甘油酯	17.62	%
AOCS Cc 9b-55	闪点	244	deg C
AOCS Cc 9a-48	发烟点	232	deg C
AOCS Cd 12b-92	兰奇马特氧化稳定性指数（110°C）	31.6	小时
AOCS Ca 6a-40	未皂化的物质	2.28	%

[0320] 根据AOCS法对RBD469油的痕量元素含量、固体脂肪含量及洛维邦得(Lovibond)颜色进行分析。这些分析的结果呈现在下表10、表10以及表11中。

[0321] 表10.RBD469油的ICP元素分析。

方法编号	测试说明	结果（以ppm表示）
AOCS Ca 20-99和AOCS Ca 17-01（修改版）	磷	1.09
	钙	0.1
	镁	0.04
	铁	< 0.02
	硫	28.8
	铜	< 0.05
	钾	< 0.50
	钠	< 0.50
	硅	0.51
	硼	0.06
	铝	< 0.20
	铅	< 0.20
	锂	< 0.02
	镍	< 0.20
	钒	< 0.05
	锌	< 0.02
	砷	< 0.20
	汞	< 0.20
	镉	< 0.03
	铬	< 0.02
	锰	< 0.05
	银	< 0.05
	钛	< 0.05
	硒	< 0.50
UOP779	有机氯化物	< 1
UOP779	无机氯化物	7.24
AOCS Ba 4e-93	氮	6.7

[0322] 表11.RBD469油的固体脂肪含量

方法编号	固体脂肪含量	结果
AOCS Cd 12b-93	在10°C下的固体脂肪含量	0.13%

AOCS Cd 12b-93	在 15°C 下的固体脂肪含量	0.13%
AOCS Cd 12b-93	在 20°C 下的固体脂肪含量	0.28%
AOCS Cd 12b-93	在 25°C 下的固体脂肪含量	0.14%
AOCS Cd 12b-93	在 30°C 下的固体脂肪含量	0.08%
AOCS Cd 12b-93	在 35°C 下的固体脂肪含量	0.25%

[0323] 表12.RBD469油的洛维邦得颜色分析

方法编号	颜色	结果	单位
AOCS Cc 13j-97	红	2	单位
AOCS Cc 13j-97	黄	27	单位

[0324] 使RBD469油经受转酯化以制造脂肪酸甲酯(FAME)。RBD469的所得FAME谱示出在表12中。

[0325] 表13.RBD469油的FAME谱

脂肪酸	面积%
C10	0.01
C12:0	0.04
C14:0	0.64
C15:0	0.08
C16:0	8.17
C16:1iso	0.39
C16:1	0.77
C17:0	0.08
C18:0	1.93
C18:1	85.88
C18:1iso	0.05
C18:2	0.05
C20:0	0.3
C20:1	0.06
C20:1	0.44
C22:0	0.11
C23:0	0.03
C24:0	0.1
鉴别的总FAME	99.13

[0326] 根据油稳定性指数AOCS方法Cd 12b-92分析无补充的抗氧化剂的6份RBD油样品和补充有抗氧化剂的3份RBD油样品的油稳定性指数(OSI)。示出在表14中的是使用瑞士万通873生物柴油兰奇马特(Metrohm 873Biodiesel Rancimat)在110℃下进行的OSI AOCS Cd 12b-92测试的结果。除其中用星号(*)指示之外的结果是多次OSI执行的平均值。指示(NA)未分析的那些样品。

[0327] Table 14.有和无抗氧化剂的RBD油样品在110℃下的油稳定性指数。

		每份RBD样品的OSI（小时）					
		RBD437	RBD469	RBD502	RBD501	RBD503	RBD529
添加的抗氧化剂	抗氧化剂浓度						
无	0	65.41	38.33	72.10	50.32	63.04	26.68
生育酚和抗坏血酸棕榈酸酯	35 ppm/16.7 ppm	77.72	48.60	82.67	NA	NA	NA
生育酚和抗坏血酸棕榈酸酯	140 ppm/66.7 ppm	130.27	81.54*	211.49*	NA	NA	NA
生育酚和抗坏血酸棕榈酸酯	1050 ppm/500 ppm	> 157*	> 144	242.5*	NA	NA	NA
生育酚	50 ppm	NA	46.97	NA	NA	NA	NA
TBHQ	20 ppm	63.37	37.4	NA	NA	NA	NA

[0328] 未转化的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)酸谱包含不到60％的C18:1脂肪酸和超过7％的C18:2脂肪酸。相比之下,D品系(包含pSZ1500)展现C18:1脂肪酸的组成增加(增加到超过85％)和C18:2脂肪酸的组成减少(减少到不到0.06％)的脂肪酸谱。在精炼、漂白并且脱胶之后,从由E品系制成的油制备的RBD油样品展现>26h的OSI值。通过添加抗氧化剂,由D品系的油制备的RBD油的OSI从48.60小时增加到超过242小时。在其他实验中,OSI值达到超过400小时。在图16中给出根据本发明的实施例的低多不饱和油的另外的特性。

实例6:通过脂肪酸去饱和酶和酰基-ACP硫酯酶的等位基因破坏来改良工程改造的微生物的油酸的水平。

[0329] 这一实例描述了使用转化载体来破坏先前被工程改造用于高油酸和低亚油酸产生的桑椹型无绿藻品系的FATA基因座。用于这一实例的转化盒包含可选择标记物和编码桑椹型无绿藻KASII酶以将微生物工程改造的核苷酸序列,在这些微生物中,已经改变了转化的微生物的脂肪酸谱以进一步增加油酸水平并且降低棕榈酸水平。

[0330] 在实例5和PCT/US 2012/023696中描述的D品系是随后根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法用转化构建体pSZ1500(SEQ ID NO:17)转化的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的经典地诱变(用于产生更多油)的衍生物。这一品系用作宿主以用构建体pSZ2276转化以增加KASII酶的表达同时伴随地除去内源酰基-ACP硫酯酶遗传基因座以产生E品系。pSZ2276转化构建体包括用于整合到桑椹型无绿藻核基因组中的FATA1基因组区的5'(SEQ ID NO:20)和3'(SEQ ID NO:21)同源重组靶向序列(侧接该构建体),在原始小球藻肌动蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:22)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)控制下的拟南芥THIC蛋白质编码区。这种AtTHIC表达盒作为SEQ ID NO:23列出并

且用作一种选择标记物。桑椹型无绿藻KASII蛋白质编码区在桑椹型无绿藻Amt03启动子/5'UTR(SEQ ID NO:8)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR的控制下，并且KASII酶的天然转运肽被原始小球藻硬脂酰基-ACP去饱和酶转运肽(SEQ ID NO:9)代替。包含原始小球藻S106硬脂酰基-ACP去饱和酶转运肽的、密码子优化的PmKASII序列作为SEQ ID.NO:24提供于序列表中。SEQ ID NO:25提供了SEQ ID NO:24的蛋白质翻译。对PmKASII和suc2的蛋白质编码区进行密码子优化以反映桑椹型无绿藻UTEX 1435核基因中固有的密码子偏性，如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述。

[0331] 在缺乏硫胺的琼脂平板上选择D品系的初级pSZ2276转化子，将这些转化子以克隆方式纯化，并且选出单个的工程改造株系(E品系)用于分析。如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述，在pH 5.0和pH 7.0下于异养脂质产生条件下培养E品系。由来自每个转化子的干燥的生物质制备脂质样品并且使用如实例1中所描述的标准脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化(FAME GC/FID)检测法分析这些样品中的脂肪酸谱。由用pSZ2276转化成D品系产生的转基因株系的脂肪酸谱(以占总脂肪酸的面积%表示)示出在表15中。

[0332] 表15.被工程改造以增加油酸水平并且降低亚油酸水平的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)A、D以及E品系的脂肪酸谱。

			脂肪酸面积%				
品系	转化构建体	pH	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C20:1
A品系	无	pH 5	26.6	3.3	60.5	6.7	0.07
A品系	无	pH 7	28.3	4.1	58	6.5	0.06
D品系	pSZ1500	pH 5	17	3.6	77.1	0.01	0.14
D品系	pSZ1500	pH 7	19.5	5.3	72.6	0.01	0.09
E品系	pSZ1500 + pSZ2276	pH 5	4.1	2.36	88.5	0.04	3.1
E品系	pSZ1500+ pSZ2276	pH 7	2.1	7.8	87.9	0.01	0.5

[0333] 如表15中所示，具有CtOTE表达盒的FADc等位基因的靶向中断影响转化的微生物的脂肪酸谱。D品系(包含pSZ1500转化载体)的脂肪酸谱示出相对于A品系，C18:1脂肪酸的组成增加，伴随C16:0和C18:2脂肪酸的组成伴随减少。D品系随后用pSZ2276转化以过表达桑椹型无绿藻(UTEX 1435)KASII蛋白质同时伴随地除去FATA遗传基因座(由此产生E品系)导致对转化的微生物的脂肪酸谱的再进一步影响。E品系的脂肪酸谱示出相对于A和D品系，C18:1脂肪酸的组成增加，伴随C16:0脂肪酸的组成进一步减少。E品系在pH 7下的培养条件中繁殖以诱导来自Amt03启动子的表达产生相对于在pH 5下培养的相同品系，C18:0和C18:1脂肪酸更高并且C16:0脂肪酸更低的脂肪酸谱。

[0334] 这些数据证实了多种基因修饰影响宿主生物的脂肪酸谱以增加油酸水平伴随减少亚油酸和棕榈酸水平的效用。另外，这一实例说明了使用重组多核苷酸来靶向内源FATA等位基因的基因中断以便改变宿主微生物的脂肪酸谱，该多核苷酸具有一个盒，它包含了

一个pH可调控启动子,用以控制外源KASII蛋白质编码区的表达。

实例7:脂肪酸去饱和酶的条件表达

[0335] 这一实例描述使用转化载体来条件性地表达先前被工程改造以用于在繁殖的种子和脂质生产率阶段产生高油酸和极低亚油酸的桑椹型无绿藻品系中的Δ12脂肪酸去饱和酶(FADs)。天然油中的极低亚油酸水平被寻求用于某些应用。然而,在宿主微生物的细胞分裂阶段(“种子阶段”)期间不存在亚油酸是不利的。可以将亚油酸补充到种子培养基中以促进细胞分裂并且不在产脂质期间添加,但这一添加强加不需要的成本。为了克服这一挑战,构建转化盒以用于调控表达FAD2酶以使得可以达到对于细胞分裂足够的亚油酸水平并且可以在微生物的培养物的产油阶段期间产生具有极低亚油酸水平的油。用于这一实例的转化盒包含可选择标记物、pH可调控启动子以及编码桑椹型无绿藻FAD2酶以工程改造微生物的核苷酸序列,在这些微生物中,已经改变了转化的微生物的脂肪酸谱以增加油酸产生并且可调控亚油酸产生。

[0336] 在实例5、6以及PCT/US 2012/023696中描述的D品系是随后根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法用转化构建体pSZ1500(SEQ ID NO:17)转化的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的经典地诱变(用于产生更多油)的衍生物。这一品系用作宿主以用构建体pSZ2413转化以引入pH驱动的启动子,用于调控桑椹型无绿藻FAD2酶。pSZ2413转化构建体包括用于整合到桑椹型无绿藻核基因组中的6S基因组区的5’(SEQ ID NO:1)和3’(SEQ ID NO:2)同源重组靶向序列(侧接该构建体),在原始小球藻肌动蛋白启动子/5’UTR(SEQ ID NO:22)和普通小球藻硝酸还原酶3’UTR(SEQ ID NO:6)控制下的拟南芥THIC蛋白质编码区。这种AtTHIC表达盒作为SEQ ID NO:23列出并且用作一种选择标记物。桑椹型无绿藻FAD2蛋白质编码区在桑椹型无绿藻Amt03启动子/5’UTR(SEQ ID NO:8)和普通小球藻硝酸还原酶3’UTR的控制下。桑椹型无绿藻FAD2的密码子优化的序列作为SEQ ID NO:26提供于序列表中。SEQ ID NO:27提供了SEQ ID NO:26的蛋白质翻译。y对PmKASII和suc2的蛋白质编码区进行密码子优化以反映桑椹型无绿藻UTEX 1435核基因中固有的密码子偏性,如PCT/US2009/066141、PCT/US2009/066142、PCT/US2011/038463、PCT/US2011/038464以及PCT/US2012/023696中所描述。

[0337] 在缺乏硫胺的琼脂平板上选择D品系的初级pSZ2413转化子,将这些转化子以克隆方式纯化,并且选出工程改造株系的分离株(F品系)用于分析。如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述,在pH 7.0(以使来自桑椹型无绿藻Amt03启动子的FAD2的表达活化)和pH 5.0下在异养脂质产生条件下培养这些分离株。由来自每个转化子的干燥的生物质制备脂质样品并且使用如实例1中所描述的标准脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化(FAME GC/FID)检测法分析这些样品中的脂肪酸谱。来自转基因品系F(F-1至F-9)的九个代表性分离株的C18:2脂肪酸的所得谱(以面积%形式表示)示出在表16中,该转基因品系F由用pSZ2413转化成D品系产生。

[0338] 表16.桑椹型无绿藻(UTEX 1435)A、D以及F品系的C18:2脂肪酸谱。

品系	转化构建体	C18:2 面积%	
		5.0	7.0
A	无	6.07	7.26
D	pSZ1500	0.01	0.01
F-1	pSZ1500 + pSZ2413	0.37	**5.29**
F-2	pSZ1500 + pSZ2413	0.45	**6.87**
F-3	pSZ1500 + pSZ2413	0.50	**6.79**
F-4	pSZ1500 + pSZ2413	0.57	**5.06**
F-5	pSZ1500 + pSZ2413	0.57	**7.58**
F-6	pSZ1500 + pSZ2413	0.60	**6.88**
F-7	pSZ1500 + pSZ2413	0.62	**6.52**
F-8	pSZ1500 + pSZ2413	0.63	**5.79**
F-9	pSZ1500 + pSZ2413	0.77	**4.53**

[0339] 如表16中所示,通过在不同pH水平下的品系培养实现的桑椹型无绿藻FAD2酶的调控表达的影响是转化的微生物中的C18:2脂肪酸的组成明显增加。亚油酸占A品系的脂肪酸的约6%至约7.3%。相比之下,D品系(包含pSZ1500转化载体以除去两个FAD2等位基因)以0.01%亚油酸的脂肪酸谱为特征。用pSZ2413转化D品系以产生F品系产生了重组微生物,其中亚油酸的产生由Amt03启动子调控。F品系分离株在pH 7下的培养条件中繁殖以诱导FAD2从Amt03启动子的表达产生了以约4.5%至约7.5%的亚油酸为特征的脂肪酸谱。相比之下,F品系分离株在pH 5下的培养条件中繁殖产生了以约0.33%至约0.77%的亚油酸为特征的脂肪酸谱。

[0340] 这些数据证实了容许FAD2酶的条件性表达的重组多核苷酸改变工程改造微生物的脂肪酸谱,并且特别是在调控微生物细胞中C18:2脂肪酸的产生方面的效用和有效性。

实例8:区域特异性谱的分析

[0341] 使用耦合到配备有APCI源的岛津(Shimadzu)LCMS 8030三重四极质谱仪上的岛津奈克塞拉(Nexera)超高效液相色谱系统进行LC/MS TAG分布分析,该系统包括一个SIL-30AC自动取样器、两个LC-30AD泵、一个DGU-20A5在线脱气器以及一个CTO-20A柱恒温箱。使用在CID气体(氩气)压力被设定成230kPa的阳离子模式中在1428u/sec的扫描速度下的m/z350-1050的Q3扫描采集数据。将APCI、去溶剂化管以及加热块温度对应地设定成300℃、250℃以及200℃,喷雾和干燥气体的流速对应地是3.0L/min和5.0L/min,并且接口电压是4500V。使油样品溶解在二氯甲烷-甲醇(1:1)中至5mg/mL的浓度,并且将0.8μL样品注射到维持在30℃下的岛津西姆-帕克(Shim-pack)XR-ODS III(2.2μm,2.0×200mm)上。在0.48mL/min下的、历经27分钟的、从30%二氯甲烷-2-丙醇(1:1)/乙腈到51%二氯甲烷-2-丙醇(1:1)/乙腈的线性梯度用于色谱分离。

实例9:工程改造微生物以增加SOS、POP以及POS三酰基甘油酯的产生

[0342] 这一实例描述使用编码C18:0偏好的油菜硫酯酶(BnOTE)的重组多核苷酸来工程改造微生物,其中转化的微生物的三酰基甘油酯分布已经富集SOS、POS以及POP三酰基甘油酯。

[0343] 根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US

2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法，最初用质粒构建体pSZ1358转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的经典地诱变品系，A品系。PCT/US 2012/023696(通过引用结合于此)中所描述的pSZ1358包含油菜硫酯酶(BnOTE)硫酯酶(SEQ ID NO:28)的编码序列，用于整合到核基因组中的6S基因组区的5'(SEQ ID NO:1)和3'(SEQ ID NO:2)同源重组靶向序列(侧接该构建体)，以及在莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)的控制下表达SEQ ID NO:3中给出的蛋白质序列的酿酒酵母suc2蔗糖转化酶编码区(SEQ ID NO:4)。这种酿酒酵母suc2表达盒作为SEQ ID NO:7列出并且用作一种可选择标记物。表达SEQ ID NO:29中给出的蛋白质序列的BnOTE蛋白质编码序列在桑椹型无绿藻Amt03启动子/5'UTR(SEQ ID NO:8)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR的控制下。对BnOTE和suc2的蛋白质编码区进行密码子优化以反映桑椹型无绿藻UTEX 1435核基因中固有的密码子偏性，如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述。

[0344] 将A品系的初级pSZ1358转化子在含有蔗糖作为唯一碳源的琼脂平板上进行选择，以克隆方式纯化，并且选择单个工程改造株系(G品系)用于分析。如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述，在pH 7.0(以使来自桑椹型无绿藻Amt03启动子的BnOTE的表达活化)下在异养脂质产生条件下培养G品系。使用在实例1和2中描述的方法针对脂肪酸组成分析从A品系和G品系获得的油样品，并且，使用在实例8中描述的方法针对油中的三酰基甘油酯的区域特异性分析油样品。从A和G品系中分离的TAG的脂肪酸谱示出在表17中。表18呈现存在于来自A和G品系的油样品中的POP、POS以及SOS TAG的区域特异性谱。

[0345] 表17.BnOTE表达对由转化的桑椹型无绿藻产生的TAG的脂肪酸组成和sn-2谱的影响。

	A品系	G品系 (pSZ1358)
脂肪酸面积%	FA谱	FA谱
C10:0	n.r.	0.5
C12:0	n.r.	0.5
C14:0	1.0	1.3
C16:0	23.9	25.8
C18:0	3.7	30.4
C18:1	64.3	30.2
C18:2	4.5	8.8
C18:3α	n.r.	0.4

[0346] 表18.BnOTE表达对由转化桑椹型无绿藻产生的POP、POS以及SOS TAG的区域特异性谱的影响。

	A品系（未转化）		G品系（pSZ1358）		可可脂	
TAG	面积%	归一化面积%	面积%	归一化面积%	面积%	归一化面积%
POP	13.09	76.8	10.6	23.5	17.9	22.1
POS	3.51	20.5	21.0	46.6	39.2	48.4
SOS	0.45	2.6	13.5	29.9	23.9	29.5
总计	17.05	100	45.0	100	81.1	100

[0347] 如表17中所示，相对于从未转化的A品系中分离的TAG的脂肪酸谱，表达BnOTE的从G品系中分离的TAG的脂肪酸组成对于C18:0脂肪酸来说显著增加(从3.7％到30.4％)，并且C18:1脂肪酸的脂肪酸组成减少(从64.3％到30.2％)。从A品系中分离的TAG的脂肪酸组成的特征为约23.9％的棕榈酸、3.7％的硬脂酸、以及64.3％的油酸，P:S:O的比是约6.5:1:17.4。相比之下，从G品系中分离的TAG的脂肪酸组成的特征为约25.8％的棕榈酸、30.4％的硬脂酸以及30.2％的油酸，P:O:S的比是约1:1.18:1.17。

[0348] C18:0偏好的硫酯酶的表达对由转化的微生物产生的油的POP、POS以及SOS TAG的区域特异性谱的影响是所有三种TAG以存在于油中的总TAG比例的形式增加。如表18中所示，POP+POS+SOS TAG的总和占由G品系产生的TAG的45％，而POP、POS以及SOS TAG仅共计在A品系中产生的TAG的约17％。在表18中将G品系的POP、POS以及SOS百分比与可可脂相比较。可以看出，G品系的POP、POS以及SOS的比与可可脂中观察到的比极类似。

[0349] 这些数据证实了容许外源硫酯酶表达的多核苷酸改变工程改造微生物的TAG的脂肪酸和区域特异性谱，特别是增加POP、POS以及SOS TAG的分布的效用和有效性。

实例10-33:微生物的工程改造

[0350] 以下实例10-33描述了根据本发明的不同微生物的工程改造。为了改变微生物的脂肪酸谱，可以将微生物进行基因修饰，其中将内源或外源脂质生物合成路径酶进行表达、过表达、或减弱。对一种微生物进行基因工程改造以改变其有关脂肪酸不饱和度的脂肪酸谱或者减少或增加脂肪酸链长的步骤包括:转化载体(例如，质粒)的设计和构建，用一种或多种载体转化微生物，转化的微生物(转化子)的选择，转化的微生物的生长、以及由该工程改造微生物产生的脂质的脂肪酸谱的分析。

[0351] 改变宿主生物的脂肪酸谱的转基因可以在众多真核微生物中表达。包含以下各项的真核微生物中的转基因表达的实例可以在科学文献中发现:莱氏衣藻、椭圆小球藻(Chlorella ellipsoidea)、嗜糖小球藻(Chlorella saccarophila)、普通小球藻、凯氏小球藻(Chlorella kessleri)、耐热性小球藻(Chlorella sorokiniana)、雨生红球藻(Haematococcus pluvialis)、胸状盘藻(Gonium pectorale)、强壮团藻(Volvox carteri)、杜氏盐藻(Dunaliella tertiolecta)、绿色杜氏藻(Dunaliella viridis)、盐生杜氏藻(Dunaliella salina)、极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体(Closterium peracerosum-strigosum-littorale complex)、微拟球藻属(Nannochloropsis sp.)、假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)、三角褐指藻(Phaeodactylum tricornutum)、腐生

舟形藻(Navicula saprophila)、梭形筒柱藻(Cylindrotheca fusiformis)、隐秘小环藻(Cyclotella cryptica)、微阿德瑞卡提克共生藻(Symbiodinium microadriacticum)、前沟藻属(Amphidinium sp.)、角毛藻属(Chaetoceros sp.)、高山被孢霉(Mortierella alpina)以及解脂耶罗威亚酵母(Yarrowia lipolytica)。这些表达技术可以与本发明的传授内容结合以产生具有改变的脂肪酸谱的工程改造微生物。

[0352] 改变宿主生物的脂肪酸谱或改变由宿主生物产生的甘油酯的区域特异性分布的转基因也可以在许多原核微生物中表达。转基因在包括混浊红球菌(Rhodococcus opacus)的产油微生物中的表达的实例可以在文献中找到。这些表达技术可以与本发明的传授内容结合以产生具有改变的脂肪酸谱的工程改造微生物。

[0353] 表19A-D.密码子偏好列表。

氨基酸	密码子	耐热性小球藻	普通小球藻	椭圆小球藻	凯氏小球藻	杜氏盐藻	强壮团藻	雨生红球藻
Ala	GCG	0.20	0.25	0.15	0.14	0.09	0.25	0.21
Ala	GCA	0.05	0.24	0.32	0.10	0.17	0.13	0.27
Ala	GCT	0.12	0.16	0.26	0.18	0.31	0.26	0.17
Ala	GCC	0.63	0.35	0.27	0.58	0.43	0.36	0.35
Arg	AGG	0.03	0.09	0.10	0.09	0.26	0.08	0.14
Arg	AGA	0.04	0.05	0.14	0.01	0.09	0.03	0.05
Arg	CGG	0.06	0.19	0.09	0.06	0.06	0.17	0.15
Arg	CGA	0.00	0.10	0.08	0.00	0.08	0.08	0.10
Arg	CGT	0.06	0.09	0.37	0.14	0.12	0.22	0.13
Arg	CGC	0.81	0.48	0.22	0.71	0.40	0.43	0.42
Asn	AAT	0.04	0.16	0.43	0.06	0.27	0.23	0.21
Asn	AAC	0.96	0.84	0.57	0.94	0.73	0.77	0.79
Asp	GAT	0.13	0.25	0.47	0.12	0.40	0.35	0.27
Asp	GAC	0.87	0.75	0.53	0.88	0.60	0.65	0.73
Cys	TGT	0.06	0.13	0.43	0.09	0.20	0.17	0.27
Cys	TGC	0.94	0.87	0.57	0.91	0.80	0.83	0.64
End	TGA	0.00	0.72	0.14	0.14	0.36	0.24	0.70
End	TAG	0.33	0.11	0.29	0.00	0.00	0.18	0.22
End	TAA	0.67	0.17	4.00	0.86	0.64	0.59	0.09
Gln	CAG	0.42	0.40	0.15	0.40	0.27	0.29	0.33
Gln	CAA	0.04	0.04	0.21	0.40	0.27	0.07	0.10
Glu	GAG	0.53	0.50	0.33	0.40	0.27	0.53	0.49
Glu	GAA	0.02	0.06	0.31	0.40	0.27	0.11	0.07
Gly	GGG	0.04	0.16	0.19	0.08	0.10	0.12	0.22
Gly	GGA	0.02	0.11	0.13	0.07	0.13	0.12	0.11
Gly	GGT	0.03	0.12	0.39	0.24	0.25	0.23	0.15
Gly	GGC	0.91	0.61	0.29	0.96	0.51	0.53	0.52
His	CAT	0.14	0.16	0.30	0.08	0.25	0.35	0.27
His	CAC	0.86	0.84	0.70	0.93	0.75	0.65	0.73
Ile	ATA	0.00	0.04	0.07	0.01	0.04	0.08	0.09
Ile	ATT	0.15	0.30	0.63	0.29	0.31	0.35	0.29
Ile	ATC	0.85	0.66	0.65	0.69	0.65	0.57	0.62
Leu	TTG	0.03	0.07	0.03	0.05	0.14	0.14	0.16
Leu	TTA	0.00	0.01	0.32	0.00	0.02	0.03	0.02
Leu	CTG	0.72	0.61	0.34	0.61	0.60	0.45	0.53
Leu	CTA	0.01	0.03	0.03	0.04	0.04	0.07	0.07
Leu	CTT	0.04	0.08	0.16	0.06	0.06	0.14	0.09
Leu	CTC	0.20	0.20	0.12	0.24	0.14	0.17	0.13
Lys	AAG	0.98	0.94	0.54	0.98	0.90	0.90	0.84

Lys	AAA	0.02	0.06	0.46	0.02	0.10	0.10	0.16
Met	ATG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Phe	TTT	0.28	0.32	0.42	0.31	0.24	0.27	0.35
Phe	TTC	0.72	0.68	0.58	0.69	0.76	0.73	0.65
Pro	CCG	0.18	0.31	0.09	0.07	0.04	0.34	0.15
Pro	CCA	0.06	0.17	0.36	0.07	0.04	0.20	0.24
Pro	CCT	0.10	0.14	0.25	0.17	0.04	0.19	0.29
Pro	CCC	0.66	0.38	0.29	0.69	0.04	0.27	0.32
Ser	AGT	0.03	0.04	0.14	0.02	0.08	0.08	0.07
Ser	AGC	0.27	0.38	0.18	0.18	0.31	0.27	0.31
Ser	TCG	0.12	0.14	0.08	0.10	0.02	0.19	0.10
Ser	TCA	0.03	0.08	0.14	0.08	0.09	0.09	0.14
Ser	TCT	0.09	0.11	0.26	0.18	0.19	0.14	0.13
Ser	TCC	0.47	0.24	0.20	0.44	0.30	0.24	0.24
Thr	ACG	0.11	0.20	0.13	0.05	0.12	0.27	0.19
Thr	ACA	0.01	0.20	0.32	0.07	0.20	0.12	0.23
Thr	ACT	0.12	0.13	0.29	0.12	0.24	0.20	0.18
Thr	ACC	0.76	0.47	0.26	0.76	0.44	0.41	0.40
Trp	TGG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Tyr	TAT	0.07	0.15	0.43	0.27	0.28	0.24	0.19
Tyr	TAC	0.93	0.85	0.57	0.73	0.72	0.76	0.81
Val	GTG	0.71	0.54	0.37	0.60	0.54	0.46	0.62
Val	GTA	0.00	0.05	0.25	0.03	0.09	0.07	0.09
Val	GTT	0.11	0.14	0.24	0.09	0.14	0.17	0.09
Val	GTC	0.18	0.27	0.14	0.28	0.23	0.30	0.21

氨基酸	密码子	*极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体*	*绿色杜氏藻*	*盐生杜氏藻*	*胸状盘藻*	*三角褐指藻*	*扁面角毛藻*
Ala	GCG	0.48	0.13	0.15	0.43	0.15	0.08
Ala	GCA	0.10	0.27	0.20	0.09	0.10	0.37
Ala	GCT	0.15	0.25	0.27	0.08	0.23	0.36
Ala	GCC	0.26	0.35	0.39	0.41	0.52	0.18
Arg	AGG	0.04	0.25	0.22	0.13	0.02	0.14
Arg	AGA	0.00	0.06	0.05	0.00	0.04	0.29
Arg	CGG	0.18	0.08	0.12	0.40	0.10	0.00
Arg	CGA	0.00	0.06	0.06	0.05	0.12	0.19
Arg	CGT	0.13	0.15	0.13	0.08	0.41	0.38
Arg	CGC	0.64	0.39	0.43	0.35	0.31	0.00
Asn	AAT	0.04	0.17	0.23	0.07	0.30	0.58

Asn	AAC	0.96	0.83	0.77	0.93	0.65	0.42
Asp	GAT	0.30	0.38	0.40	0.11	0.41	0.53
Asp	GAC	0.70	0.62	0.60	0.89	0.59	0.47
Cys	TGT	0.06	0.24	0.17	0.20	0.39	0.44
Cys	TGC	0.94	0.76	0.83	0.90	0.61	0.56
End	TGA	0.75	0.31	0.37	0.50	0.06	0.50
End	TAG	0.00	0.15	0.14	0.00	0.13	0.00
End	TAA	0.25	0.54	0.49	0.50	0.81	0.50
Gln	CAG	0.53	0.36	0.32	0.31	0.23	0.16
Gln	CAA	0.09	0.12	0.08	0.07	0.14	0.19
Glu	GAG	0.31	0.44	0.51	0.56	0.21	0.28
Glu	GAA	0.06	0.09	0.09	0.07	0.42	0.37
Gly	GGG	0.31	0.14	0.10	0.18	0.08	0.12
Gly	GGA	0.06	0.11	0.12	0.09	0.34	0.33
Gly	GGT	0.09	0.22	0.22	0.07	0.30	0.39
Gly	GGC	0.53	0.54	0.56	0.65	0.28	0.16
His	CAT	0.33	0.25	0.25	0.43	0.28	0.84
His	CAC	0.67	0.75	0.75	0.57	0.72	0.16
Ile	ATA	0.03	0.03	0.03	0.07	0.03	0.12
Ile	ATT	0.23	0.25	0.31	0.33	0.51	0.65
Ile	ATC	0.74	0.72	0.66	0.59	0.46	0.23
Leu	TTG	0.04	0.11	0.12	0.04	0.26	0.11
Leu	TTA	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	0.14
Leu	CTG	0.31	0.60	0.61	0.64	0.15	0.05
Leu	CTA	0.01	0.05	0.04	0.01	0.05	0.08
Leu	CTT	0.04	0.07	0.08	0.05	0.18	0.51
Leu	CTC	0.60	0.16	0.14	0.26	0.34	0.11
Lys	AAG	0.86	0.87	0.89	0.93	0.75	0.52
Lys	AAA	0.14	0.13	0.11	0.07	0.25	0.48
Met	ATG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Phe	TTT	0.09	0.25	0.29	0.10	0.44	0.65
Phe	TTC	0.91	0.75	0.71	0.90	0.56	0.35
Pro	CCG	0.28	0.10	0.08	0.53	0.29	0.05
Pro	CCA	0.15	0.10	0.17	0.09	0.12	0.45
Pro	CCT	0.12	0.10	0.30	0.04	0.20	0.33
Pro	CCC	0.44	0.10	0.45	0.34	0.40	0.17
Ser	AGT	0.04	0.09	0.06	0.02	0.12	0.14
Ser	AGC	0.05	0.31	0.32	0.20	0.12	0.07
Ser	TCG	0.22	0.04	0.06	0.42	0.19	0.08
Ser	TCA	0.16	0.08	0.10	0.09	0.06	0.31
Ser	TCT	0.05	0.17	0.15	0.07	0.15	0.23
Ser	TCC	0.47	0.31	0.30	0.20	0.35	0.18
Thr	ACG	0.30	0.16	0.13	0.42	0.23	0.10
Thr	ACA	0.06	0.21	0.18	0.03	0.13	0.38

Thr	ACT	0.22	0.18	0.23	0.08	0.19	0.27
Thr	ACC	0.42	0.46	0.46	0.47	0.45	0.25
Trp	TGG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Tyr	TAT	0.07	0.16	0.21	0.12	0.18	0.67
Tyr	TAC	0.93	0.84	0.79	0.88	0.82	0.33
Val	GTG	0.50	0.64	0.62	0.57	0.22	0.30
Val	GTA	0.02	0.03	0.05	0.04	0.09	0.27
Val	GTT	0.06	0.11	0.11	0.04	0.22	0.10
Val	GTC	0.42	0.22	0.23	0.35	0.47	0.33

氨基酸	密码子	梭形筒柱藻	强壮前沟藻	微阿德瑞卡提克共生藻	微拟球藻属	隐秘小环藻	具膜舟形藻	假微型海链藻	莱氏衣藻
Ala	GCG	0.07	0.17	0.22	0.24	0.11	0.00	0.11	0.35
Ala	GCA	0.14	0.33	0.26	0.10	0.16	0.13	0.25	0.08
Ala	GCT	0.35	0.29	0.20	0.17	0.45	0.44	0.33	0.13
Ala	GCC	0.43	0.20	0.32	0.48	0.27	0.44	0.30	0.43
Arg	AGG	0.09	0.15	0.27	0.00	0.09	0.05	0.18	0.05
Arg	AGA	0.14	0.03	0.27	0.00	0.05	0.10	0.17	0.01
Arg	CGG	0.06	0.08	0.09	0.00	0.04	0.05	0.06	0.20
Arg	CGA	0.16	0.18	0.09	0.29	0.08	0.35	0.11	0.04
Arg	CGT	0.34	0.18	0.09	0.14	0.47	0.20	0.34	0.09
Arg	CGC	0.22	0.40	0.18	0.57	0.28	0.25	0.15	0.62
Asn	AAT	0.42	0.37	0.21	0.00	0.25	0.47	0.43	0.09
Asn	AAC	0.58	0.63	0.79	1.00	0.75	0.53	0.57	0.91
Asp	GAT	0.54	0.54	0.50	0.20	0.52	0.20	0.56	0.14
Asp	GAC	0.46	0.46	0.50	0.80	0.48	0.80	0.44	0.86
Cys	TG	0.44	0.75	0.50	0.00	0.29	0.10	0.54	0.10

	T								
Cys	TGC	0.56	0.25	0.50	1.00	0.71	0.90	0.46	0.90
End	TGA	0.13	0.50	1.00	0.00	0.10	0.00	0.31	0.27
End	TAG	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	0.22
End	TAA	0.77	0.50	0.00	1.00	0.90	1.00	0.31	0.52
Gln	CAG	0.12	0.33	0.28	0.41	0.19	0.21	0.16	0.38
Gln	CAA	0.25	0.15	0.17	0.00	0.17	0.28	0.19	0.04
Glu	GAG	0.23	0.41	0.50	0.59	0.38	0.17	0.40	0.55
Glu	GAA	0.39	0.10	0.06	0.00	0.26	0.34	0.26	0.03
Gly	GGG	0.06	0.19	0.32	0.10	0.10	0.03	0.12	0.11
Gly	GGA	0.47	0.10	0.12	0.05	0.45	0.28	0.51	0.06
Gly	GGT	0.35	0.34	0.16	0.25	0.22	0.13	0.23	0.11
Gly	GGC	0.12	0.37	0.40	0.60	0.24	0.56	0.14	0.72
His	CAT	0.39	0.12	0.40	0.00	0.42	1.00	0.50	0.11
His	CAC	0.61	0.88	0.60	1.00	0.58	0.00	0.50	0.89
Ile	ATA	0.06	0.05	0.00	0.00	0.04	0.00	0.08	0.03
Ile	ATT	0.42	0.53	0.38	0.14	0.53	0.73	0.38	0.22
Ile	ATC	0.52	0.42	0.63	0.86	0.42	0.27	0.54	0.75
Leu	TTG	0.26	0.35	0.39	0.22	0.20	0.16	0.29	0.04
Leu	TTA	0.09	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	0.05	0.01
Leu	CTG	0.09	0.22	0.39	0.09	0.06	0.12	0.08	0.73
Leu	CTA	0.05	0.00	0.04	0.00	0.03	0.04	0.06	0.03
Leu	CTT	0.37	0.31	0.13	0.04	0.39	0.36	0.20	0.05
Leu	CT	0.13	0.12	0.04	0.65	0.29	0.32	0.32	0.15

	C								
Lys	AAG	0.60	0.93	0.85	1.00	0.70	0.83	0.76	0.95
Lys	AAA	0.40	0.07	0.15	0.00	0.30	0.17	0.24	0.05
Met	ATG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Phe	TTT	0.37	0.21	0.25	0.20	0.31	0.78	0.38	0.16
Phe	TTC	0.63	0.79	0.75	0.80	0.69	0.22	0.62	0.84
Pro	CCG	0.11	0.14	0.18	0.08	0.10	0.21	0.16	0.33
Pro	CCA	0.33	0.42	0.09	0.08	0.16	0.29	0.31	0.08
Pro	CCT	0.32	0.22	0.41	0.25	0.35	0.21	0.31	0.13
Pro	CCC	0.24	0.22	0.32	0.58	0.39	0.29	0.23	0.47
Ser	AGT	0.12	0.13	0.09	0.00	0.09	0.13	0.18	0.04
Ser	AGC	0.09	0.24	0.14	0.13	0.08	0.28	0.11	0.35
Ser	TCG	0.13	0.03	0.05	0.00	0.15	0.25	0.17	0.25
Ser	TCA	0.12	0.25	0.05	0.00	0.12	0.08	0.12	0.05
Ser	TCT	0.30	0.16	0.23	0.13	0.39	0.25	0.23	0.07
Ser	TCC	0.24	0.19	0.45	0.75	0.18	0.03	0.19	0.25
Thr	ACG	0.09	0.14	0.10	0.28	0.10	0.18	0.21	0.30
Thr	ACA	0.15	0.28	0.10	0.00	0.15	0.09	0.19	0.08
Thr	ACT	0.39	0.12	0.10	0.17	0.33	0.41	0.28	0.10
Thr	ACC	0.37	0.47	0.70	0.56	0.43	0.32	0.32	0.52
Trp	TGG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Tyr	TAT	0.38	0.32	0.20	0.00	0.38	0.20	0.39	0.10
Tyr	TAC	0.62	0.68	0.80	1.00	0.62	0.80	0.61	0.90
Val	GTG	0.11	0.65	0.67	0.31	0.16	0.18	0.29	0.67
Val	GT	0.06	0.05	0.00	0.00	0.09	0.09	0.16	0.03

	A								
Val	GTT	0.38	0.08	0.11	0.15	0.42	0.09	0.28	0.07
Val	GTC	0.46	0.21	0.22	0.54	0.33	0.64	0.27	0.22

氨基酸	密码子	解脂耶罗威亚酵母	高山被孢霉	混浊红球菌
Ala	GCG	0.08	0.14	0.35
Ala	GCA	0.11	0.12	0.14
Ala	GCT	0.35	0.29	0.09
Ala	GCC	0.46	0.45	0.43
Arg	AGG	0.05	0.05	0.05
Arg	AGA	0.13	0.06	0.02
Arg	CGG	0.12	0.06	0.26
Arg	CGA	0.52	0.09	0.12
Arg	CGT	0.11	0.32	0.11
Arg	CGC	0.07	0.42	0.44
Asn	AAT	0.17	0.15	0.21
Asn	AAC	0.83	0.85	0.79
Asp	GAT	0.35	0.42	0.24
Asp	GAC	0.65	0.58	0.76
Cys	TGT	0.46	0.13	0.26
Cys	TGC	0.54	0.87	0.74
End	TGA	0.16	0.05	0.72
End	TAG	0.38	0.25	0.17
End	TAA	0.46	0.70	0.11
Gln	CAG	0.33	0.36	0.28
Gln	CAA	0.08	0.06	0.06
Glu	GAG	0.44	0.49	0.45
Glu	GAA	0.14	0.09	0.22
Gly	GGG	0.05	0.03	0.18
Gly	GGA	0.28	0.29	0.15
Gly	GGT	0.32	0.32	0.20
Gly	GGC	0.34	0.36	0.48
His	CAT	0.34	0.27	0.20
His	CAC	0.66	0.73	0.80
Ile	ATA	0.03	0.01	0.05
Ile	ATT	0.44	0.33	0.14
Ile	ATC	0.53	0.66	0.81
Leu	TTG	0.09	0.27	0.09
Leu	TTA	0.02	0.00	0.01

Leu	CTG	0.37	0.26	0.41
Leu	CTA	0.05	0.02	0.03
Leu	CTT	0.18	0.12	0.06
Leu	CTC	0.29	0.32	0.40
Lys	AAG	0.84	0.91	0.80
Lys	AAA	0.16	0.09	0.20
Met	ATG	1.00	1.00	1.00
Phe	TTT	0.38	0.39	0.09
Phe	TTC	0.62	0.61	0.91
Pro	CCG	0.10	0.07	0.52
Pro	CCA	0.10	0.08	0.09
Pro	CCT	0.32	0.36	0.07
Pro	CCC	0.47	0.49	0.32
Ser	AGT	0.07	0.05	0.08
Ser	AGC	0.11	0.14	0.23
Ser	TCG	0.16	0.32	0.33
Ser	TCA	0.08	0.08	0.07
Ser	TCT	0.28	0.12	0.05
Ser	TCC	0.30	0.29	0.24
Thr	ACG	0.11	0.17	0.28
Thr	ACA	0.14	0.10	0.11
Thr	ACT	0.26	0.23	0.07
Thr	ACC	0.49	0.49	0.53
Trp	TGG	1.00	1.00	1.00
Tyr	TAT	0.18	0.20	0.18
Tyr	TAC	0.82	0.80	0.82
Val	GTG	0.33	0.22	0.37
Val	GTA	0.05	0.02	0.05
Val	GTT	0.26	0.27	0.10
Val	GTC	0.36	0.49	0.49

[0354] 表20.脂质生物合成路径蛋白。

3-酮酰基ACP合酶
天然细叶萼距花 3-酮酰基-ACP 合酶（基因库登录号 AAC68861.1）、*赖特萼距花（Cuphea wrightii）*β-酮酰基-ACP 合酶 II（基因库登录号 AAB37271.1）、*披针叶萼距花* β-酮酰基-ACP 合酶 IV（基因库登录号 CAC59946.1）、*赖特萼距花* β-酮酰基-ACP 合酶 II（基因库登录号 AAB37270.1）、*蓖麻酮酰基-ACP* 合酶（基因库登录号 XP_002516228）、*陆*

地棉酮酰基-ACP 合酶（基因库登录号 ADK23940.1）、*大豆质体 3-酮酰基-ACP* 合酶 II-A（基因库登录号 AAW88763.1）、*油棕 β-酮酰基-ACP* 合酶 II（基因库登录号 AAF26738.2）、*向日葵质体 3-酮酰基-ACP* 合酶 I（基因库登录号 ABM53471.1）、*大豆 3-酮酰基-ACP* 合酶 I（基因库登录号 NP_001238610.1）、*向日葵质体 3-酮酰基-ACP* 合酶 II（基因库登录号 ABI18155.1）、*油菜* β-酮脂酰-ACP 合成酶 2（基因库登录号 AAF61739.1）、*紫苏* β-酮酰基-ACP 合酶 II（基因库登录号 AAC04692.1）、*向日葵* β-酮酰基-ACP 合酶 II（基因库登录号 ABI18155）、*蓖麻* β-酮酰基-ACP 合酶 II（基因库登录号 AAA33872）、*雨生红球藻* β-酮酰基酰基载体蛋白合酶（基因库登录号 HM560033.1）、*麻疯树* β-酮酰基-ACP 合酶 I（基因库登录号 ABJ90468.1）、*毛果杨* β-酮酰基-ACP 合酶 I（基因库登录号 XP_002303661.1）、*芜菁* β-酮酰基-ACP 合成酶 I（基因库登录号 AAK58535.1）、*拟南芥* 3-氧酰基-[酰基-载体蛋白]合酶 I（基因库登录号 NP_001190479.1）、*酿酒葡萄* 3-氧酰基-[酰基-载体蛋白]合酶 I（基因库登录号 XP_002272874.2）

脂肪酰基-ACP 硫酯酶

*加州月桂脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAC49001）、*樟树脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 Q39473）、*加州月桂脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 Q41635）、*肉豆蔻脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAB71729）、*肉豆蔻脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAB71730）、*油棕脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 ABD83939）、*油棕脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAD42220）、*毛白杨脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 ABC47311）、*拟南芥脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 NP_172327）、*拟南芥脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 CAA85387）、

*拟南芥脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 CAA85388）、*陆地棉脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 Q9SQI3）、*披针叶萼距花脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 CAA54060）、*天然细叶萼距花脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAC72882）、*Cuphea calophylla 亚种 Mesostemon 脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 ABB71581）、*披针叶萼距花脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 CAC19933）、*油棕脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAL15645）、*天然细叶萼距花脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 Q39513）、*陆地棉脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAD01982）、*酿酒葡萄脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 CAN81819）、*山竹脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAB51525）、*芥菜脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 ABI18986）、*长叶马府油树脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAX51637）、*油菜脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 ABH11710）、*油菜脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 CAA52070.1）、*水稻（籼稻品种群）脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 EAY86877）、*水稻（粳稻品种群）脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 NP_001068400）、*水稻（籼稻品种群）脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 EAY99617）、*天然细叶萼距花脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAC49269）、*美国榆脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAB71731）、*披针叶萼距花脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 CAB60830）、*湿地萼距花脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAC49180）、*德国鸢尾脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAG43858）、*德国鸢尾脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAG43858.1）、*湿地萼距花脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAC49179）、*肉豆蔻脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAB71729）、*肉豆蔻脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAB717291.1）、*天然细叶萼距*

*花脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 U39834）、*加州月桂脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 M94159）、*樟树脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 U31813）、*蓖麻脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 ABS30422.1）、*向日葵*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 AAL79361.1）、*麻疯树*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 ABX82799.3）、*玉米油*酰基-酰基载体蛋白硫酯酶（基因库登录号 ACG40089.1）、*雨生红球藻脂肪*酰基-ACP 硫酯酶（基因库登录号 HM560034.1）

去饱和酶

亚麻脂肪酸去饱和酶 3C（基因库登录号 ADV92272.1）、推定的蓖麻 Ω-3 脂肪酸去饱和酶，内质网（基因库登录号 EEF36775.1）、油桐 Ω-3 脂肪酸去饱和酶（基因库登录号 AAF12821）、大豆叶绿体 Ω 3 脂肪酸去饱和酶同工型 2（基因库登录号 ACF19424.1）、桑椹型无绿藻 FAD-D Ω 3 去饱和酶（SEQ ID NO:35）、桑椹型无绿藻亚油酸酯去饱和酶（SEQ ID NO:36）、红花 δ12 去饱和酶（基因库登录号 ADM48790.1）、陆地棉 Ω-6 去饱和酶（基因库登录号 CAA71199.1）、大豆微粒体去饱和酶（基因库登录号 BAD89862.1）、玉米脂肪酸去饱和酶（基因库登录号 ABF50053.1）、甘蓝型油菜亚油酸去饱和酶（基因库登录号 AAA32994.1）、亚麻荠 Ω-3 去饱和酶（SEQ ID NO:37）、桑椹型无绿藻 δ12 去饱和酶等位基因 2（SEQ ID NO:38）、亚麻荠 Ω-3 FAD7-1 去饱和酶（SEQ ID NO:39）、向日葵硬脂酰基-ACP 去饱和酶（基因库登录号 AAB65145.1）、蓖麻硬脂酰基-ACP 去饱和酶（基因库登录号 AACG59946.1）、芥菜质体 δ-9-硬脂酰基-ACP 去饱和酶（基因库登录号 AAD40245.1）、大豆硬脂酰基-ACP 去饱和酶（基因库登录号 ACJ39209.1）、油橄榄硬脂酰基-ACP 去饱和酶（基因库登录号 AAB67840.1）、油桐硬脂酰基-酰基-载体蛋白去饱和酶（基因库登录号

ADC32803.1）、播娘蒿 Δ-12 脂肪酸去饱和酶（基因库登录号 ABS86964.2）、大戟属植物 δ12-油酸去饱和酶（基因库登录号 AAS57577.1）、普通小球藻 Δ12 脂肪酸去饱和酶（基因库登录号 ACF98528）、普通小球藻 Ω-3 脂肪酸去饱和酶（基因库登录号 BAB78717）、雨生红球藻 Ω-3 脂肪酸去饱和酶（基因库登录号 HM560035.1）、雨生红球藻硬脂酰基-ACP-去饱和酶（基因库登录号 EF586860.1）、雨生红球藻硬脂酰基-ACP-去饱和酶（基因库登录号 EF523479.1）

油酸酯 12-羟化酶

蓖麻油酸酯 12-羟化酶（基因库登录号 AAC49010.1），

Physaria lindheimeri 油酸酯 12-羟化酶（基因库登录号 ABQ01458.1），

Physaria lindheimeri 突变双官能油酸酯 12-羟化酶：去饱和酶（基因库登录号 ACF17571.1）、*Physaria lindheimeri* 双官能油酸酯 12-羟化酶：去饱和酶（基因库登录号 ACQ42234.1）、*Physaria lindheimeri* 双官能油酸酯 12-羟化酶：去饱和酶（基因库登录号 AAC32755.1）、琴叶拟南芥琴叶亚种（基因库登录号 XP_002884883.1）

甘油-3-磷酸酶

拟南芥甘油-3-磷酸酰基转移酶 BAA00575、莱氏衣藻甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 EDP02129）、莱氏衣藻甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 Q886Q7）、南瓜酰基-(酰基-载体蛋白)：甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 BAB39688）、油棕甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 AAF64066）、山竹甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 ABS86942）、陆地棉甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 ADK23938）、麻疯树甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 ADV77219）、麻疯树质体甘油-3-磷酸酰基转

移酶（基因库登录号 ACR61638）、蓖麻质体甘油-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 EEF43526）、蚕豆甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 AAD05164）、玉米甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 ACG45812）

溶血磷脂酸酰基转移酶

拟南芥 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 AEE85783）、芥菜 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 ABQ42862）、芥菜 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 ABM92334）、油菜 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 CAB09138）、莱氏衣藻溶血磷脂酸酰基转移酶（基因库登录号 EDP02300）、椰溶血磷脂酸酰基转移酶（基因库登录号 AAC49119）、绣线菊溶血磷脂酸酰基转移酶（基因库登录号 EDP02300）、荷包蛋花 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶（推定的）（基因库登录号 CAA88620）、荷包蛋花酰基-CoA:sn-1-酰基甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 ABD62751）、荷包蛋花 1-酰基甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶（基因库登录号 CAA58239）、蓖麻 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶（基因库登录号 EEF39377）

二酰基甘油酰基转移酶

拟南芥二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 CAB45373）、芥菜二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 AAY40784）、油棕

推定的二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 AEQ94187）、油棕

推定的二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 AEQ94186）、大豆酰基 CoA:二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 AAT73629）、向日葵二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 ABX61081）、油橄榄酰基 CoA:二酰基甘油酰基转移酶 1（基因库登录号 AAS01606）、蓖麻二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 AAR11479）

磷脂二酰基甘油酰基转移酶 拟南芥磷脂：二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 AED91921）、油棕推定的磷脂：二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 AEQ94116）、类大豆磷脂：二酰基甘油酰基转移酶 1（基因库登录号 XP_003541296）、麻疯树磷脂：二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 AEZ56255）、蓖麻磷脂：二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 ADK92410）、蓖麻磷脂：二酰基甘油酰基转移酶（基因库登录号 AEW99982）

实例10:将耐热性小球藻工程改造

[0355] 可以通过改变如在此论述的道森(Dawson)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在耐热性小球藻中的表达。简言之,道森等人,《当代微生物学》(Current Microbiology)第35卷(1997)第356-362页报道了用质粒DNA对耐热性小球藻进行稳定核转化。使用微粒轰击转化方法,道森将编码完全的普通小球藻硝酸还原酶基因(NR,基因库登录号U39931)的质粒pSV72-NRg引入到突变耐热性小球藻(NR-突变体)中。在不使用硝酸盐作为氮源的情况下,这些NR-突变体不能够生长。硝酸还原酶催化硝酸盐转化成亚硝酸盐。在转化之前,耐热性小球藻NR-突变体不能在包含硝酸盐($NO3^-$)作为唯一氮源的培养基上生长超过小集落阶段。将普通小球藻NR基因产物在NR-突变体耐热性小球藻中的表达用作为一种可选择标记物以挽救硝酸盐代谢缺陷。用pSV72-NRg质粒转化后,获得了稳定表达普通小球藻NR基因产物的NR-突变体耐热性小球藻,其能在包含硝酸盐作为唯一碳源的琼脂平板上生长超过小集落阶段。通过萨瑟恩(Southern)分析进行稳定转化子的DNA的评估并且通过RNA酶保护进行稳定转化子的RNA的评估。在包含0.2g/L $MgSO_4$、0.67g/L KH_2PO_4、3.5g/L K_2HPO_4、1.0g/L $Na_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$以及16.0g/L琼脂、适当的氮源(例如NO_3^-)、微量营养素以及碳源的琼脂平板(pH 7.4)上进行转化的耐热性小球藻(NR突变体)的选择和维持。道森还报道了耐热性小球藻和耐热性小球藻NR突变体在液体培养基中的繁殖。道森报道质粒pSV72-NRg以及普通小球藻硝酸还原酶基因的启动子和3'UTR/终止子适合于使异源基因能在耐热性小球藻NR-突变体中表达。道森还报道普通小球藻硝酸还原酶基因产物的表达适合用作耐热性小球藻NR-突变体中的可选择标记物。

[0356] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pSV72-NRg,其包含编码用作可选择标记物的普通小球藻硝酸还原酶(CvNR)基因产物的核苷酸序列,并且将其修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在耐热性小球藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的耐热性小球藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的CvNR启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的CvNR 3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与耐热性小球藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合

成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化耐热性小球藻。CvNR基因产物的活性可以用作为一种可选择标记物以挽救耐热性小球藻NR突变品系的氮同化缺陷以及选择稳定表达该转化载体的耐热性小球藻NR突变体。适合于耐热性小球藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)0.5g/L KH_2PO_4、0.5g/L K_2HPO_4、0.25g/L $MgSO_4$-7H2O,以及补充的微量营养素和适当的氮和碳源(帕特森(Patterson),《脂质》(Lipids)第5卷:7(1970),第597-600页)。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定耐热性小球藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例11:将普通小球藻工程改造

[0357] 可以通过改变如在此论述的由周(Chow)和董(Tung)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在普通小球藻中的表达。简言之,周和董等人,《植物细胞报道》(Plant Cell Reports),第18卷(1999),第778-780页报道了用质粒DNA对普通小球藻进行稳定核转化。使用电穿孔转化方法,周和董将质粒pIG121-Hm(基因库登录号AB489142)引入到普通小球藻中。pIG121-Hm的核苷酸序列包含编码β-葡糖醛酸酶(GUS)报告基因产物的序列,该序列可操作地连接到在该GUS蛋白质编码序列上游的CaMV 35S启动子并且进一步可操作地连接到在该GUS蛋白质编码序列下游的胭脂碱合酶(nos)基因的3'UTR/终止子。质粒pIG121-Hm的序列进一步包含潮霉素B抗生素抗性盒。这种潮霉素B抗生素抗性盒包含可操作地连接到编码潮霉素磷酸转移酶(hpt,基因库登录号BAH24259)基因产物的序列的CaMV 35S启动子。在转化之前,普通小球藻不能在包含50μg/ml潮霉素B的培养基中繁殖。在用pIG121-Hm质粒转化之后,获得了在包含50ug/ml潮霉素B的培养基中繁殖的普通小球藻的转化子。hpt基因产物在普通小球藻中的表达使转化的普通小球藻能在50ug/mL潮霉素B存在的情况下繁殖,由此建立了潮霉素B抗性盒作为用于普通小球藻的可选择标记物的效用。GUS报告基因的可检测活性表明,CaMV 35S启动子和nos 3'UTR适合于使异源基因能够在普通小球藻中表达。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。在包含YA培养基(琼脂和4g/L酵母提取物)的琼脂平板上进行转化的普通小球藻的选择和维持。如周和董所论述,进行普通小球藻在液体培养基中的繁殖。已经描述了普通小球藻在除了YA培养基以外的培养基中的繁殖(例如,参看查德(Chader)等人,Revue des Energies Renouvelabes,第14卷(2011),第21-26页和伊尔曼(Illman)等人,《酶与微生物技术》(Enzyme and Microbial Technology),第27卷(2000),第631-635页)。周和董报道,质粒pIG121-Hm、CaMV 35S启动子以及根癌土壤杆菌胭脂碱合酶基因3'UTR/终止子适合于使异源基因能够在普通小球藻中表达。另外,周和董报道,潮霉素B抗性盒适合用作普通小球藻中的可选择标记物。适合于使异源基因能在普通小球藻中表达的另外的质粒、启动子、3'UTR/终止子以及可选择标记物已经论述于查德等人,Revue des Energies Renouvelabes,第14卷(2011),第21-26页中。

[0358] 在本发明的一个实施例中,构建了pIG121-Hm,其包含编码用作可选择标记物的潮霉素B基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在普通小球藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的普通小球藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码

序列上游的CaMV 35S启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的根癌土壤杆菌胭脂碱合酶基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与普通小球藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括电穿孔的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化普通小球藻。潮霉素B抗性基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含潮霉素的琼脂培养基上选择用该转化载体转化的普通小球藻的标记物。适合于普通小球藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)补充有痕量金属和任选的1.5g/L NaNO3的BG11培养基(0.04g/L KH_2PO_4、0.075g/L $CaCl_2$、0.036g/L柠檬酸、0.006g/L柠檬酸铁铵、1mg/L EDTA以及0.02g/L Na_2CO_3)。如伊尔曼等人,《酶与微生物技术》,第27卷(2000),第631-635页报道,适合于培养普通小球藻用于脂质产生的另外的培养基包括例如,具有微量营养素的渡边(Watanabe)培养基(包含1.5g/L KNO_3、1.25g/L KH_2PO_4、1.25g $l^{-1}MgSO_4 \cdot 7H_2O$、20mg $l^{-1}FeSO_4 \cdot 7H_2O$)和低氮培养基(包含203mg/l $(NH_4)_2HPO_4$、2.236g/l KCl、2.465g/l $MgSO_4$、1.361g/l KH_2PO_4以及10mg/l $FeSO_4$)。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定普通小球藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例12:将椭圆小球藻工程改造

[0359] 可以通过改变如在此论述的由陈(Chen)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在椭圆小球藻中的表达。简言之,陈等人,《当代遗传学》(Current Genetics),第39:5卷(2001),第365-370页报道了用质粒DNA对椭圆小球藻进行稳定转化。使用电穿孔转化方法,陈将质粒pBinUΩNP-1引入到椭圆小球藻中。pBinUΩNP-1的核苷酸序列包含编码嗜中性粒细胞肽-1(NP-1)兔基因产物的序列,该序列可操作地连接到在NP-1蛋白质编码区的上游的玉米泛素(ubi1)基因启动子并且可操作地连接到在NP-1蛋白质编码区的下游的胭脂碱合酶(nos)基因的3'UTR/终止子。质粒pBinUΩNP-1的序列进一步包含G418抗生素抗性盒。这种G418抗生素抗性盒包含编码氨基糖苷3'-磷酸转移酶(aph 3')基因产物的序列。该aph 3'基因产物赋予对抗生素G418的抗性。在转化之前,椭圆小球藻不能在包含30ug/mL G418的培养基中繁殖。在用pBinUΩNP-1质粒转化后,获得了在包含30ug/mL G418的选择性培养基中繁殖的椭圆小球藻的转化子。aph 3'基因产物在椭圆小球藻中的表达使得转化的椭圆小球藻能够在30ug/mL G418存在的情况下繁殖,由此建立了G418抗生素抗性盒作为用于椭圆小球藻的可选择标记物的效用。NP-1基因产物的可检测活性表明,ubi1启动子和nos 3'UTR适合于使异源基因能够在椭圆小球藻中表达。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。在有15ug/mL G418(针对液体培养物)或有30ug/mL G418(针对包含1.8%琼脂的固体培养物)的克诺普(Knop)培养基(包含0.2g/L K_2HPO_4、0.2g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.12g/L KCl以及10mg/L FeCl3,pH 6.0-8.0,补充有0.1%酵母提取物和0.2%葡萄糖)上进行转化的椭圆小球藻的选择和维持。已经报道了椭圆小球藻在除了克诺普培养基以外的培养基中的繁殖(例如,参看赵(Cho)等人,《水产科学》(Fisheries Science),第73:5卷(2007),第1050-1056页,贾维斯(Jarvis)和布朗(Brown),《当代遗传学》(Current Genetics),第19卷(1991),第317-321页以及金姆(Kim)等人,《海洋生物技术》(Marine Biotechnology),第4卷(2002),第63-73页)。已经报道了适合于使异源基因能够在椭圆小球藻中表达的另外的质粒、启动子、3'UTR/终止子以及可选择标记物(参看贾维斯和布朗以及金姆等人,《海洋生物技术》,第4卷(2002),第63-73页)。陈报道了质粒pBinU

ΩNP-1、ubi1启动子以及根癌土壤杆菌胭脂碱合酶基因3'UTR/终止子适合于使外源基因能够在椭圆小球藻中表达。另外,陈报道了在pBinUΩNP-1上编码的G418抗性盒适合用作椭圆小球藻中的可选择标记物。

[0360] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pBinUΩNP-1,其包含编码用作可选择标记物的aph 3'基因产物(赋予对G418的抗性)的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在椭圆小球藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的椭圆小球藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的玉米ubi1启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的根癌土壤杆菌胭脂碱合酶基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与椭圆小球藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括电穿孔的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化椭圆小球藻。aph 3'基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含G418的Knop琼脂培养基上选择用该转化载体转化的椭圆小球藻的标记物。适合于椭圆小球藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)克诺普培养基以及由贾维斯和布朗以及金姆等人报道的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定椭圆小球藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例13:将凯氏小球藻工程改造

[0361] 可以通过改变如在此论述的由El-谢赫(El-Sheekh)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在凯氏小球藻中的表达。简言之,El-谢赫等人,Biologia Plantarium,第42:2卷(1999),第209-216页报道了用质粒DNA对凯氏小球藻进行稳定转化。使用微粒轰击转化方法,El-谢赫将质粒pBI121(基因库登录号AF485783)引入到凯氏小球藻中。质粒pBI121包含卡那霉素/新霉素抗生素抗性盒。这种卡那霉素/新霉素抗生素抗性盒包含根癌土壤杆菌胭脂碱合酶(nos)基因启动子、编码针对卡那霉素和G418抗性的新霉素磷酸转移酶II(nptII)基因产物(基因库登录号AAL92039)的序列、以及根癌土壤杆菌胭脂碱合酶(nos)基因的3'UTR/终止子。pBI121进一步包含编码β-葡糖醛酸酶(GUS)报告基因产物的序列,该序列可操作地连接到CaMV 35S启动子并且可操作地连接到nos基因的3'UTR/终止子。在转化之前,凯氏小球藻不能在包含15ug/L卡那霉素的培养基中繁殖。在用pBI121质粒转化后,获得了在包含15mg/L卡那霉素的选择性培养基中繁殖的凯氏小球藻的转化子。nptII基因产物在凯氏小球藻中的表达使得能够在15mg/L卡那霉素存在的情况下繁殖,由此建立了卡那霉素/新霉素抗生素抗性盒作为用于凯氏小球藻的可选择标记物的效用。GUS基因产物的可检测活性表明,CaMV 35S启动子和nos 3'UTR适合于使异源基因能够在凯氏小球藻中表达。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。如由El-谢赫报道,在包含YEG培养基(1%酵母提取物,1%葡萄糖)和15mg/L卡那霉素的半固体琼脂平板上进行转化的凯氏小球藻的选择和维持。El-谢赫还报道了凯氏小球藻在YEG液体培养基中的繁殖。适合于培养凯氏小球藻用于脂质产生的另外的培养基披露于佐藤(Sato)等人,《脂质的BBA分子与细胞生物学》(BBA Molecular and Cell Biology of Lipids),第1633卷(2003),第27-34页中。El-谢赫报道了质粒pBI121、CaMV启动子、以及胭脂碱合酶基

因3'UTR/终止子适合于使异源基因能够在凯氏小球藻中表达。另外,El-谢赫报道了在pBI121上编码的卡那霉素/新霉素抗性盒适合用作凯氏小球藻中的可选择标记物。

[0362] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pBI121,其包含编码用作可选择标记物的卡那霉素/新霉素抗性基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在凯氏小球藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的凯氏小球藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的CaMV 35S启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的根癌土壤杆菌胭脂碱合酶基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与凯氏小球藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化凯氏小球藻。nptII基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含卡那霉素或新霉素的YEG琼脂培养基上选择用该转化载体转化的凯氏小球藻的标记物。适合于凯氏小球藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)YEG培养基以及由佐藤等人报道的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定凯氏小球藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例14:将杜氏盐藻工程改造

[0363] 可以通过改变如在此论述的由沃克(Walker)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在杜氏盐藻中的表达。简言之,沃克等人,《应用藻类学杂志》(Journal of Applied Phycology),第17卷(2005),第363-368页报道了用质粒DNA对杜氏盐藻进行稳定核转化。使用电穿孔转化方法,沃克将质粒pDbleFLAG1.2引入到杜氏盐藻中。pDbleFLAG1.2包含编码博来霉素抗生素抗性盒的序列,该序列包含编码针对抗生素抗腐草霉素抗性的印度斯坦链异壁菌(Streptoalloteichus hindustanus)博来霉素结合蛋白(ble)的序列并且可操作地连接到杜氏盐藻核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基基因(rbcS1,基因库登录号AY530155)的启动子和3'UTR。在转化之前,杜氏盐藻不能在包含1mg/L腐草霉素的培养基中繁殖。在用pDbleFLAG1.2质粒转化后,获得了在包含1mg/L腐草霉素的选择性培养基中繁殖的杜氏盐藻的转化子。ble基因产物在杜氏盐藻中的表达使得能够在1mg/L腐草霉素存在的情况下繁殖,由此建立了博来霉素抗生素抗性盒作为用于杜氏盐藻的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。如由沃克报道,在进一步包含4.5g/L NaCl和1mg/L腐草霉素(pheomycin)的杜氏藻培养基(DM,如普罗瓦索里(Provasoli)等人,Archiv fur Mikrobiologie,第25卷(1957),第392-428页所描述)上进行转化的杜氏盐藻的选择和维持。适合于培养杜氏盐藻用于脂质产生的另外的培养基论述于高木(Takagi)等人,《生物科学与生物工程杂志》(Journal of Bioscience and Bioengineering),第101:3卷(2006),第223-226页以及马萨特(Massart)和汉斯顿(Hanston),第三届国际生物质与废弃物能源大会,会议记录,威尼斯2010(Proceedings Venice 2010,Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste)中。沃克报道了质粒pDbleFLAG1.2以及杜氏盐藻核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基基因的启动子和3'UTR适合于使在杜氏盐藻中异源表达能够实现。另外,沃克报道了在

pDbleFLAG1.2上编码的博来霉素抗性盒适合用作杜氏盐藻中的可选择标记物。

[0364] 在本发明的一个实施例中，构建了载体pDbleFLAG1.2，其包含编码用作可选择标记物的ble基因产物的核苷酸序列，并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列，由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质，每个蛋白质编码序列针对在杜氏盐藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的杜氏盐藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质，经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的rbcS1启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的rbcS1 3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与杜氏盐藻基因组同源的区域，用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括电穿孔的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化杜氏盐藻。ble基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含腐草霉素的DM培养基上选择用该转化载体转化的杜氏盐藻的标记物。适合于杜氏盐藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)DM培养基以及由高木等人以及马萨特和汉斯顿所描述的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定杜氏盐藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例15:将强壮团藻工程改造

[0365] 可以通过改变如在此论述的由霍尔曼(Hallman)和拉佩尔(Rappel)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在强壮团藻中的表达。简言之，霍尔曼和拉佩尔等人，《植物杂志》(The Plant Journal)，第17卷(1999)，第99-109页报道了用质粒DNA对强壮团藻进行稳定核转化。使用微粒轰击转化方法，霍尔曼和拉佩尔将pzeoE质粒引入到强壮团藻中。pzeoE质粒包含编码博来霉素抗生素抗性盒的序列，该序列包含编码针对抗生素吉欧霉素(zeocin)抗性的印度斯坦链异壁菌博来霉素结合蛋白(ble)的序列并且可操作地连接到强壮团藻β-微管蛋白基因(基因库登录号L24547)的启动子和3'UTR。在转化之前，强壮团藻不能在包含1.5ug/ml吉欧霉素的培养基中繁殖。在用pzeoE质粒转化后，获得了在包含超过20ug/ml吉欧霉素的选择性培养基中繁殖的强壮团藻的转化子。ble基因产物在强壮团藻中的表达使得能够在20ug/ml吉欧霉素存在的情况下繁殖，由此建立了博来霉素抗生素抗性盒作为用于强壮团藻的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。如由霍尔曼和拉佩尔报道，在有1mg/L腐草霉素的团藻培养基(VM，如普罗瓦索里和平特纳(Pintner)，《藻类生态学》(The Ecology of Algae)，特殊公开号2(1959)，泰伦(Tyron)，C.A.以及哈特曼(Hartman)，R.T.编，匹兹堡:匹兹堡大学(Pittsburgh:Univeristy of Pittsburgh)，第88-96页所描述)中进行转化的强壮团藻的选择和维持。适合于培养强壮团藻用于脂质产生的培养基也由斯塔尔(Starr)在斯塔尔R,C,.发育生物学(Dev Biol)增刊，第4卷(1970)，第59-100页)中论述。Dev Biol Suppl.,Vol.4(1970)，pp.59-100)。霍尔曼和拉佩尔报道了质粒pzeoE以及强壮团藻β-微管蛋白基因的启动子和3'UTR适合于使在强壮团藻中异源表达能够实现。另外，霍尔曼和拉佩尔报道了在pzeoE上编码的博来霉素抗性盒适合用作强壮团藻中的可选择标记物。已经报道了适合于使异源基因能够在强壮团藻中表达以及适合用作强壮团藻中的可选择标记物的另外的质粒、启动子、3'UTR/终止子、以及可选择标记物(例如参看哈拉曼(Hallamann)和萨佩尔(Sumper)，《美国科学院院报》(Proceedings of the National Academy of Sciences)，第91卷

(1994),第11562-11566页以及霍尔曼和沃德尼奥克(Wodniok),《植物细胞报道》(Plant Cell Reports),第25卷(2006),第582-581页)。

[0366] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pzeoE,其包含编码用作可选择标记物的ble基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表19中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在强壮团藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的强壮团藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的强壮团藻β-微管蛋白启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的强壮团藻β-微管蛋白3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与强壮团藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。本领域普通技术人员可以鉴别出在强壮团藻基因组序列内的这样的同源区域(引用于普罗赫尼克(Prochnik)等人的出版物《科学》(Science),第329:5988卷(2010),第223-226页中)。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化强壮团藻。ble基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含吉欧霉素的VM培养基上选择用该转化载体转化的强壮团藻的标记物。适合于强壮团藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)VM培养基以及由斯塔尔论述的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定强壮团藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例16:将雨生红球藻工程改造

[0367] 可以通过改变如在此论述的由史坦布瑞纳(Steinbrenner)和桑德曼(Sandmann)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在雨生红球藻中的表达。简言之,史坦布瑞纳和桑德曼等人,《应用与环境微生物学》(Applied and Environmental Microbiology),第72:12卷(2006),第7477-7484页报道了用质粒DNA对雨生红球藻进行稳定核转化。使用微粒轰击转化方法,史坦布瑞纳将质粒pPlat-pds-L504R引入到雨生红球藻中。质粒pPlat-pds-L504R包含达草灭抗性盒,该达草灭抗性盒包含雨生红球藻八氢番茄红素去饱和酶基因(Pds,基因库登录号AY781170)的启动子、蛋白质编码序列、以及3'UTR,其中Pds的蛋白质编码序列在位置504被修饰(由此将亮氨酸改变为精氨酸)以编码一个赋予对除草剂达草灭的抗性的基因产物(Pds-L504R)。在用pPlat-pds-L504R转化之前,雨生红球藻不能在包含5uM达草灭的培养基上繁殖。在用pPlat-pds-L504R质粒转化后,获得了在包含5uM达草灭的选择性培养基中繁殖的雨生红球藻的转化子。Pds-L504R基因产物在雨生红球藻中的表达使得能够在5uM达草灭存在的情况下繁殖,由此建立了达草灭除草剂抗性盒作为用于雨生红球藻的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。如由史坦布瑞纳报道,在包含补充有2.42g/L三乙酸盐和5mM达草灭的OHA培养基(OHM(0.41g/L KNO_3、0.03g/L Na_2HPO_4、0.246g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.11g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、2.62mg/L柠檬酸铁·H_2O、0.011mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$、0.012mg/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、0.075mg/L Cr_2O_3、0.98mg/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$、0.12mg/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$、0.005mg/L SeO_2以及25mg/L生物素、17.5mg/L硫胺以及15mg/L维生素B12))的琼脂平板上进行转化的雨生红球藻的选择和维持。史坦布瑞纳和桑德曼使用基础培养基(如由小林(Kobayashi)等人,《应用与环境微生物学》,第59卷(1993),第867-873页所描述的基础培养基)进行了雨生红球藻在液体培养中

的繁殖。史坦布瑞纳和桑德曼报道了pPlat-pds-L504R质粒以及雨生红球藻八氢番茄红素去饱和酶基因的启动子和3'UTR适合于使在雨生红球藻中异源表达能够实现。另外，史坦布瑞纳和桑德曼报道了在pPlat-pds-L504R上编码的达草灭抗性盒适合用作雨生红球藻中的可选择标记物。已经报道了适合于使异源基因能够在雨生红球藻中表达的另外的质粒、启动子、3'UTR/终止子、以及可选择标记物(参看卡斯瑞斯安(Kathiresan)等人，《藻类学杂志》(Journal of Phycology)，第45卷(2009)，第642-649页)。

[0368] 在本发明的一个实施例中，构建了载体pPlat-pds-L504R，其包含编码用作可选择标记物的Pds-L504R基因产物的核苷酸序列，并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列，由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质，每个蛋白质编码序列针对在雨生红球藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的雨生红球藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质，经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的雨生红球藻pds基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的雨生红球藻pds基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与雨生红球藻基因组同源的区域，用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化雨生红球藻。Pds-L504R基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含达草灭的OHA培养基上选择用该转化载体转化的雨生红球藻的标记物。适合于雨生红球藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)基础培养基以及由小林等人，卡斯瑞斯安等人，以及龚(Gong)和陈，《应用藻类学杂志》，第9:5卷(1997)，第437-444页所描述的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定雨生红球藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例17:将极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体工程改造

[0369] 可以通过改变如在此论述的由亚伯(Abe)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体中的表达。简言之，亚伯等人，《植物细胞生理学》(Plant Cell Physiology)，第52:9卷(2011)，第1676-1685页报道了用质粒DNA对极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体进行稳定核转化。使用微粒轰击转化方法，亚伯将质粒pSA106引入到极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体中。质粒pSA106包含编码博来霉素抗性盒，该抗性盒包含编码印度斯坦链异壁菌博来霉素结合蛋白基因(ble，基因库登录号CAA37050)的序列，该序列可操作地连接到极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体叶绿素a/b-结合蛋白基因(CAB，基因库登录号AB363403)的启动子和3'UTR。在用pSA106转化之前，极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体不能在包含3ug/ml腐草霉素的培养基上繁殖。在用pSA106转化后，获得了在包含3ug/ml腐草霉素的选择性培养基中繁殖的极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体的转化子。ble基因产物在极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体中的表达使能够在3ug/ml腐草霉素存在的情况下繁殖，由此建立了博来霉素抗生素抗性盒作为用于极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。如由亚伯报道，转化的极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体的选择和维持首先在有C培养基(0.1g/L KNO_3、0.015g/L $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H2O$、0.05g/L甘油磷酸盐-Na2、0.04g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.5g/L三(羟甲基)氨基甲烷、痕量矿物、生物素、维生素B_1以及B_{12})的顶层琼脂中进行,并且随后分离到包含补充有腐草霉素的C培养基的琼脂平板中。如亚伯报道,在C培养基中进行了极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体在液体培养物中的繁殖。适合于极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体的繁殖的另外的液体培养基由关本(Sekimoto)等人,《DNA研究》(DNA Research),10:4(2003),第147-153页论述。亚伯报道了质粒pSA106以及极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体CAB基因的启动子和3'UTR适合于使异源基因能够在极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体中表达。另外,亚伯报道了在pSA106上编码的博来霉素抗性盒适合用作极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体中的可选择标记物。已经报道了适合于使异源基因能够在极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体中表达的另外的质粒、启动子、3'UTR/终止子、以及可选择标记物(参看亚伯等人,《植物细胞生理学》,第49卷(2008),第625-632页)。

[0370] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pSA106,其包含编码用作可选择标记物的ble基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体CAB基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体CAB基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体。ble基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含腐草霉素的C培养基上选择用该转化载体转化的极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体的标记物。适合于极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体脂质产生的生长培养基包括(但不限于)C培养基以及由亚伯等人和关本等人报道的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定极锐新月藻-瘦狭新月藻-滨海新月藻复合体脂质的脂肪酸谱的评估。

实例18:将绿色杜氏藻工程改造

[0371] 可以通过改变如在此论述的由孙(Sun)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在绿色杜氏藻中的表达。简言之,孙等人,《基因》(Gene),第377卷(2006),第140-149页报道了用质粒DNA对绿色杜氏藻进行稳定核转化。使用电穿孔转化方法,孙将编码完全的绿色杜氏藻硝酸还原酶基因的质粒pDVNR引入到突变绿色杜氏藻(绿色杜氏藻NR-突变体)中。在不使用硝酸盐作为氮源的情况下,这些NR-突变体不能够生长。硝酸还原酶催化硝酸盐转化成亚硝酸盐。在转化之前,绿色杜氏藻NR-突变体不能在包含硝酸盐(NO_3^-)作为唯一氮源的培养基中繁殖。将绿色杜氏藻NR基因产物在NR-突变体绿色杜氏藻中的表达用作为一种可选择标记物以挽救硝酸盐代谢缺陷。在用pDVNR质粒转化后,获得了稳定表达绿色杜氏藻NR基因产物的NR-突变体绿色杜氏藻,其能够在包含硝酸盐作为唯一碳源的琼

脂平板上生长。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的DNA的评估。在包含5mM KNO_3的琼脂平板上进行转化的绿色杜氏藻(NR突变体)的选择和维持。孙还报道了绿色杜氏藻和绿色杜氏藻NR突变体在液体培养基中的繁殖。适合于绿色杜氏藻的繁殖的另外的培养基由戈迪略(Gordillo)等人,《应用藻类学杂志》,第10:2卷(1998),第135-144页以及由莫尔顿(Moulton)和伯福德(Burford),《水生生物学》(Hydrobiologia),第204-205:1卷(1990),第401-408页报道。孙报道了质粒pDVNR以及绿色杜氏藻硝酸还原酶基因的启动子和3'UTR/终止子使在绿色杜氏藻NR-突变体中异源表达能够实现。孙还报道了绿色杜氏藻硝酸还原酶基因产物的表达适合用作绿色杜氏藻NR-突变体中的可选择标记物。

[0372] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pDVNR,其包含编码用作可选择标记物的绿色杜氏藻硝酸还原酶(DvNR)基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在绿色杜氏藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的绿色杜氏藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的DvNR启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的DvNR 3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与绿色杜氏藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括电穿孔的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化绿色杜氏藻NR突变体。DvNR基因产物的活性可以用作为一种可选择标记物以挽救绿色杜氏藻NR突变品系的氮同化缺陷以及选择稳定表达该转化载体的绿色杜氏藻NR-突变体。适合于绿色杜氏藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)由孙等人、莫尔顿和伯福德以及戈迪略等人论述的那些。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定绿色杜氏藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例19:将盐生杜氏藻工程改造

[0373] 可以通过改变如在此论述的由耿(Geng)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在盐生杜氏藻中的表达。简言之,耿等人,《应用藻类学杂志》,第15卷(2003),第451-456页报道了用质粒DNA对盐生杜氏藻进行稳定转化。使用电穿孔转化方法,耿将质粒pUΩHBsAg-CAT引入到盐生杜氏藻中。pUΩHBsAg-CAT包含乙型肝炎表面抗原(HBsAG)表达盒,该表达盒包含编码乙型肝炎表面抗原的序列,该序列可操作地连接到HBsAG蛋白质编码区的上游的玉米ubi1启动子并且可操作地连接到HBsAG蛋白质编码区的下游的根癌土壤杆菌胭脂碱合酶基因(nos)的3'UTR/终止子。pUΩHBsAg-CAT进一步包含氯霉素抗性盒,该抗性盒包含编码赋予对抗生素氯霉素的抗性的氯霉素乙酰基转移酶(CAT)基因产物的序列,该序列可操作地连接到猿猴病毒40的启动子和增强子。在用pUΩHBsAg-CAT转化之前,盐生杜氏藻不能在包含60mg/L氯霉素的培养基上繁殖。在用pUΩHBsAg-CAT质粒转化后,获得了在包含60mg/L氯霉素的选择性培养基中繁殖的盐生杜氏藻的转化子。CAT基因产物在盐生杜氏藻中的表达使得能够在60mg/L氯霉素存在的情况下繁殖,由此建立了氯霉素抗性盒作为用于盐生杜氏藻中的可选择标记物的效用。HBsAg基因产物的可检测活性表明ubi1启动子和nos 3'UTR/终止子适合于使基因能够在盐生杜氏藻中表达。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。耿报道了在包含具有60mg/L氯霉素的约翰逊(Johnson'

s)培养基(J1,由博罗维茨卡(Borowitzka)和博罗维茨卡(编),微藻类生物技术(Microalgal Biotechnology),剑桥大学出版社(Cambridge University Press),剑桥,第460-461页所描述)的琼脂平板上进行转化的盐生杜氏藻的选择和维持。耿在有60mg/L氯霉素的J1培养基上进行了盐生杜氏藻的液体繁殖。已经论述了盐生杜氏藻在除J1培养基之外的培养基中的繁殖(参看冯(Feng)等人,《分子生物学报道》(Mol.Bio.Reports),第36卷(2009),第1433-1439页和博罗维茨卡等人,《水生生物学》,第116至117:1卷(1984),第115-121页)。已经由冯等人报道了适合于使异源基因能够在盐生杜氏藻中表达的另外的质粒、启动子、3'UTR/终止子、以及可选择标记物。耿报道了质粒pUΩHBsAg-CAT、ubi1启动子、以及根癌土壤杆菌胭脂碱合酶基因3'UTR/终止子适合于使外源基因能够在盐生杜氏藻中表达。另外,耿报道了在pUΩHBsAg-CAT上编码的CAT抗性盒适合用作盐生杜氏藻中的可选择标记物。

[0374] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pUΩHBsAg-CAT,其包含编码用作可选择标记物的CAT基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在盐生杜氏藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的盐生杜氏藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的ubi1启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的根癌土壤杆菌胭脂碱合酶基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与盐生杜氏藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括电穿孔的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化盐生杜氏藻。CAT基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含氯霉素的J1培养基中选择用该转化载体转化的盐生杜氏藻的可选择标记物。适合于盐生杜氏藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)J1培养基以及由冯等人和博罗维茨卡等人描述的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定盐生杜氏藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例20:将胸状盘藻工程改造

[0375] 可以通过改变如在此论述的由莱尔歇(Lerche)和霍尔曼等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在胸状盘藻中的表达。简言之,莱尔歇和霍尔曼等人,《BMC生物技术》(BMC Biotechnology),第9:64卷,2009报道了用质粒DNA对胸状盘藻进行稳定核转化。使用微粒轰击转化方法,莱尔歇将质粒pPmr3引入到胸状盘藻中。质粒pPmr3包含巴龙霉素抗性盒,该抗性盒包含编码针对抗生素巴龙霉素的抗性的龟裂链霉菌(Streptomyces rimosus)的氨基糖苷3'-磷酸转移酶(aphVIII)基因产物(基因库登录号AAB03856)的序列,该序列可操作地连接到aphVIII蛋白质编码区上游的强壮团藻hsp70A-rbcS3杂合启动子并且可操作地连接到aphVIII蛋白质编码区下游的强壮团藻rbcS3基因的3'UTR/终止子。在用pPmr3转化之前,胸状盘藻不能在包含0.06ug/ml巴龙霉素的培养基上增殖。在用pPmr3转化后,获得了在包含0.75ug/ml以及更高的巴龙霉素的选择性培养基中繁殖的胸状盘藻的转化子。aphVIII基因产物在胸状盘藻中的表达使得能够在0.75μg/ml以及更高的巴龙霉素存在的情况下繁殖,由此建立了巴龙霉素抗生素抗性盒作为用于胸状盘藻的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。莱尔歇和霍尔曼报道了在有

1.0ug/ml巴龙霉素的液体贾沃斯基(Jaworski's)培养基(20mg/L $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$、12.4mg/L KH_2PO_4、50mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、15.9mg/L $NaHCO_3$、2.25mg/L EDTA-FeNa、2.25mg/L EDTA Na_2、2.48g/L H_3BO_3、1.39g/L $MnCl_2.4H_2O$、1mg/L $(NH_4)_6MO_7O_24.4H_2O$、0.04mg/L维生素B12、0.04mg/L硫胺-HCl、0.04mg/L生物素、80mg/L $NaNO_3$、36mg/L $Na_4HPO_4.12H_2O$)中进行转化的胸状盘藻的选择和维持。由莱尔歇和霍尔曼进一步论述了适合于使异源基因能够在胸状盘藻中表达的另外的质粒、启动子、3'UTR/终止子、以及可选择标记物。莱尔歇和霍尔曼报道了质粒pPmr3、强壮团藻hsp70A-rbcS3杂合启动子、以及强壮团藻rbcS3基因的3'UTR/终止子适合于使外源基因能够在胸状盘藻中表达。另外,莱尔歇和霍尔曼报道了在pPmr3上编码的巴龙霉素抗性盒适合用作胸状盘藻中的可选择标记物。

[0376] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pPmr3,其包含编码用作可选择标记物的aphVIII基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在胸状盘藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的胸状盘藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的强壮团藻hsp70A-rbcS3杂合启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的强壮团藻rbcS3基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与胸状盘藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法可以实现用该转化载体稳定转化胸状盘藻。aphVIII基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含巴龙霉素的贾沃斯基培养基中选择用该转化载体转化的胸状盘藻的可选择标记物。适合于胸状盘藻脂质产生的生长培养基包括贾沃斯基培养基以及由斯坦(Stein),《美国植物学杂志》(American Journal of Botany),第45:9卷(1958),第664-672页报道的培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定胸状盘藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例21:将三角褐指藻工程改造

[0377] 可以通过改变如在此论述的由阿普特(Apt)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在三角褐指藻中的表达。简言之,阿普特等人,《分子遗传学和普通遗传学》(Molecular and General Genetics),第252卷(1996),第572-579页报道了用载体DNA对三角褐指藻进行稳定核转化。使用微粒轰击转化技术,阿普特将质粒pfcpA引入到三角褐指藻中。质粒pfcpA包含博来霉素抗性盒,该抗性盒包含编码针对抗生素腐草霉素和吉欧霉素的抗性的印度斯坦链异壁菌博来霉素结合蛋白(ble)的序列,该序列可操作地连接到ble蛋白质编码区的上游的三角褐指藻藻褐素叶绿素a结合蛋白基因(fcpA)的启动子并且可操作地连接到在3'区或ble蛋白质编码区的下游的三角褐指藻fcpA基因的3'UTR/终止子。在用pfcpA转化之前,三角褐指藻不能在包含50ug/ml吉欧霉素的培养基上繁殖。在用pfcpA转化后,获得了在包含50ug/ml吉欧霉素的选择性培养基中繁殖的三角褐指藻的转化子。ble基因产物在三角褐指藻中的表达使得能够在50ug/ml吉欧霉素存在的情况下繁殖,由此建立了博来霉素抗生素抗性盒作为用于三角褐指藻的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。阿普特报道了在包含具有50mg/L吉欧霉素的LDM培养

基(如由斯塔尔和泽库斯(Zeikus),《藻类学杂志》,第29卷,增刊,(1993)报道)的琼脂平板上进行转化的三角褐指藻的选择和维持。阿普特报道了在具有50mg/L吉欧霉素的LDM培养基中的三角褐指藻转化子的液体繁殖。已经论述了三角褐指藻在除了LDM培养基以外的培养基中的繁殖(由扎斯拉夫斯卡亚(Zaslavskaia)等人,《科学》,第292卷(2001),第2073-2075页,以及由雷多科维茨(Radokovits)等人,《代谢工程》(Metabolic Engineering),第13卷(2011),第89-95页)。已经由阿普特等人、由扎斯拉夫斯卡亚等人、以及由雷多科维茨等人在相同的报道中报道了适合于使异源基因能够在三角褐指藻中表达的另外的质粒、启动子、3'UTR/终止子、以及可选择标记物。阿普特报道了质粒pfcpA以及三角褐指藻fcpA启动子和3'UTR/终止子适合于使外源基因能够在三角褐指藻中表达。另外,阿普特报道了在pfcpA上编码的博来霉素抗性盒适合用作三角褐指藻中的可选择标记物。

[0378] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pfcpA,其包含编码用作可选择标记物的ble基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在三角褐指藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的三角褐指藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的三角褐指藻fcpA基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的三角褐指藻fcpA基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与三角褐指藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。本领域普通技术人员可以鉴别出在三角褐指藻基因组的序列内的这样的同源区域(引用于鲍勒(Bowler)等人的出版物,《自然》(Nature),第456卷(2008),第239-244页中)。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化三角褐指藻。ble基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含巴龙霉素的LDM培养基中选择用该转化载体转化的三角褐指藻的标记物。适合于三角褐指藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)如由雷多科维茨等人报道的f/2培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定三角褐指藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例22:将角毛藻属工程改造

[0379] 可以通过改变如在此论述的由山口(Yamaguchi)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在角毛藻属中的表达。简言之,山口等人,《藻类学研究》(Phycological Research),第59:2卷(2011),第113-119页报道了用质粒DNA对角毛藻属进行稳定核转化。使用微粒轰击转化方法,山口将质粒pTpfcp/nat引入到假微型海链藻中。pTpfcp/nat包含诺尔丝菌素抗性盒,该抗性盒包含编码诺尔丝菌素乙酰基转移酶(nat)基因产物(基因库登录号AAC60439)的序列,该序列可操作地连接到nat蛋白质编码区的上游的假微型海链藻藻褐素叶绿素a/c结合蛋白基因(fcp)启动子并且可操作地连接到在3'区(nat蛋白质编码序列的下游)的假微型海链藻fcp基因3'UTR/终止子。该nat基因产物赋予对抗生素诺尔丝菌素的抗性。在用pTpfcp/nat转化之前,角毛藻属不能在包含500ug/ml诺尔丝菌素的培养基上繁殖。在用pTpfcp/nat转化后,获得了在包含500ug/ml诺尔丝菌素的选择性培养基中繁殖的角毛藻属的转化子。nat基因产物在角毛藻属中的表达使得能够在500ug/ml诺尔丝菌素存在的情况下繁殖,由此建立了诺尔丝菌素抗生素抗性盒作为用于角

毛藻属的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。山口报道了在包含具有500ug/ml诺尔丝菌素的f/2培养基(如由吉拉尔(Guilard),R.R.,在培养海洋无脊椎动物中,培养浮游植物用于饲喂海洋无脊椎动物(Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates,In Culture of Marine Invertebrate Animals),史密斯(Smith)和钱理(Chanley)(编)1975,普莱南出版社(Plenum Press),纽约(New York),第26-60页报道)的琼脂平板上进行转化的角毛藻属的选择和维持。如山口所进行的,在有500mg/L诺尔丝菌素的f/2培养基中进行角毛藻属转化子的液体繁殖。已经报道了角毛藻属在另外的培养基中的繁殖(例如在纳波利塔诺(Napolitano)等人,《全球水产业学会杂志》(Journal of the World Aquaculture Society),第21:2卷(1990),第122-130页,以及福尔克曼(Volkman)等人,《实验海洋学与生态学杂志》(Journal of Experimental Marine Biology and Ecology),第128:3卷(1989),第219-240页中)。已经由山口等人在相同的报道中报道了适合于使异源基因能够在角毛藻属中表达的另外的质粒、启动子、3'UTR/终止子、以及可选择标记物。山口报道了质粒pTpfcp/nat以及假微型海链藻fcp启动子和3'UTR/终止子适合于使外源基因能够在角毛藻属中表达。另外,山口报道了在pTpfcp/nat上编码的诺尔丝菌素抗性盒适合于用作角毛藻属中的可选择标记物。

[0380] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pTpfcp/nat,其包含编码用作可选择标记物的nat基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在紧密相关的扁面角毛藻(Chaetoceros compressum)中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的扁面角毛藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的假微型海链藻fcp基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的假微型海链藻fcp基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与角毛藻属基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括微粒轰击的熟知的转化或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化角毛藻属。nat基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含诺尔丝菌素的f/2琼脂培养基中选择用该转化载体转化的角毛藻属的可选择标记物。适合于角毛藻属脂质产生的生长培养基包括(但不限于)f/2培养基、以及由纳波利塔诺等人和福尔克曼等人论述的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定角毛藻属脂质的脂肪酸谱的评估。

实例23:将梭形筒柱藻工程改造

[0381] 可以通过改变如在此论述的由波尔森(Poulsen)和克罗格(Kroger)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在梭形筒柱藻中的表达。简言之,波尔森和克罗格等人,《FEBS杂志》(FEBS Journal),第272卷(2005),第3413-3423页报道了用质粒DNA对梭形筒柱藻进行转化。使用微粒轰击转化方法,波尔森和克罗格将pCF-ble质粒引入到梭形筒柱藻中。质粒pCF-ble包含博来霉素抗性盒,该抗性盒包含编码针对抗生素吉欧霉素和腐草霉素的抗性的印度斯坦链异壁菌博来霉素结合蛋白(ble)的序列,该序列可操作地连接到ble蛋白质编码区的上游的梭形筒柱藻藻褐素叶绿素a/c结合蛋白基因(fcpA,基因库登录

号AY125580)的启动子并且可操作地连接到在3'区(ble蛋白质编码区的下游)的梭形筒柱藻fcpA基因3'UTR/终止子。在用pCF-ble转化之前,梭形筒柱藻不能在包含1mg/ml吉欧霉素的培养基上繁殖。在用pCF-ble质粒转化后,获得了在包含1mg/ml吉欧霉素的选择性培养基中繁殖的梭形筒柱藻的转化子。ble基因产物在梭形筒柱藻中的表达使得能够在1mg/ml吉欧霉素存在的情况下繁殖,由此建立了博来霉素抗生素抗性盒作为用于梭形筒柱藻的可选择标记物的效用。波尔森和克罗格报道了在包含具有1mg/ml吉欧霉素的人工海水培养基的琼脂平板上进行转化的梭形筒柱藻的选择和维持。波尔森和克罗格报道了在有1mg/ml吉欧霉素的人工海水培养基中的梭形筒柱藻转化子的液体繁殖。已经论述了梭形筒柱藻在另外的培养基中的繁殖(例如在梁(Liang)等人,《应用藻类学杂志》,第17:1卷(2005),第61-65页,以及奥克特(Orcutt)和帕特森,《脂质》,第9:12卷(1974),第1000-1003页中)。已经由波尔森和克罗格在相同的报道中报道了用于使异源基因能够在角毛藻属中表达的另外的质粒、启动子、3'UTR/终止子、以及可选择标记物。波尔森和克罗格报道了质粒pCF-ble以及梭形筒柱藻fcp启动子和3'UTR/终止子适合于使外源基因能够在梭形筒柱藻中表达。另外,波尔森和克罗格报道了在pCF-ble上编码的博来霉素抗性盒适合用作梭形筒柱藻中的可选择标记物。

[0382] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pCF-ble,其包含编码用作可选择标记物的ble基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在梭形筒柱藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的梭形筒柱藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的梭形筒柱藻fcp基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的梭形筒柱藻fcp基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与梭形筒柱藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化梭形筒柱藻。ble基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含吉欧霉素的人工海水琼脂培养基中选择用该转化载体转化的梭形筒柱藻的可选择标记物。适合于梭形筒柱藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)人工海水和由梁等人以及奥克特和帕特森报道的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定梭形筒柱藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例24:将前沟藻属工程改造

[0383] 可以通过改变如在此论述的由坦恩罗浩斯(ten Lohuis)和米勒(Miller)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在前沟藻属中的表达。简言之,坦恩罗浩斯和米勒等人,《植物杂志》,第13:3卷(1998),第427-435页报道了用质粒DNA对前沟藻属进行稳定转化。在碳化硅晶须存在的情况下使用搅拌转化技术,坦恩罗浩斯将质粒pMT NPT/GUS引入到包含新霉素抗性盒的前沟藻属pMT NPT/GUS中,该抗性盒包含编码新霉素磷酸转移酶II(nptII)基因产物(基因库登录号AAL92039)的序列,该序列可操作地连接到在nptII蛋白质编码区上游或5'的根癌土壤杆菌胭脂碱合酶(nos)基因启动子并且可操作地连接到在3'区(nptII蛋白质编码区下游)的nos基因3'UTR/终止子。nptII基因产物赋予对抗生素

G418的抗性。pMT NPT/GUS质粒进一步包含编码β-葡糖醛酸酶(GUS)报告基因产物的序列，该序列可操作地连接到CaMV 35S启动子并且进一步地可操作地连接到CaMV 35S 3'UTR/终止子。在用pMT NPT/GUS转化之前，前沟藻属不能在包含3mg/ml G418的培养基上繁殖。在用pMT NPT/GUS质粒转化后，获得了在包含3mg/ml G418的选择性培养基中繁殖的前沟藻属的转化子。nptII基因产物在前沟藻属中的表达使得能够在3mg/ml G418存在的情况下繁殖，由此建立了新霉素抗生素抗性盒作为用于前沟藻属的可选择标记物的效用。GUS报告基因的可检测活性表明，CaMV 35S启动子和3'UTR适合于使基因能够在前沟藻属中表达。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。坦恩罗浩斯和米勒报道了在包含补充有F/2富集溶液(由供应商西格玛公司提供)和3mg/ml G418的海水的培养基中的前沟藻属的液体繁殖，以及在包含补充有F/2富集溶液和3mg/ml G418的海水的琼脂培养基上的前沟藻属的选择和维持。已经报道了前沟藻属在另外的培养基中的繁殖(例如在曼苏尔(Mansour)等人，《应用藻类学杂志》，第17:4卷(2005)第287-v300页中)。已经由坦恩罗浩斯和米勒在相同的报道中报道了用于使异源基因能够在前沟藻属中表达的另外的质粒，其包含另外的启动子、3'UTR/终止子、以及可选择标记物。坦恩罗浩斯和米勒报道了质粒pMT NPT/GUS和nos的启动子和3'UTR/终止子以及CaMV 35S基因适合于使外源基因能够在前沟藻属中表达。另外，坦恩罗浩斯和米勒报道了在pMT NPT/GUS上编码的新霉素抗性盒适合于用作前沟藻属中的可选择标记物。

[0384] 在本发明的一个实施例中，构建了载体pMT NPT/GUS，其包含编码用作可选择标记物的nptII基因产物的核苷酸序列，并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列，由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质，每个蛋白质编码序列针对在前沟藻属中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的紧密相关的种类，强壮前沟藻(Amphi-dinium carterae)核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质，经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的根癌土壤杆菌胭脂碱合酶(nos)基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的nos 3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与前沟藻属基因组同源的区域，用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括硅纤维介导的显微注射的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化前沟藻属。nptII基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含G418的海水琼脂培养基上选择用该转化载体转化的前沟藻属的可选择标记物。适合于前沟藻属脂质产生的生长培养基包括(但不限于)人工海水以及由曼苏尔等人以及坦恩罗浩斯和米勒报道的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定前沟藻属脂质的脂肪酸谱的评估。

实例25:将微阿德瑞卡提克共生藻(Symbiodinium microadriacticum)工程改造

[0385] 可以通过改变如在此论述的由坦恩罗浩斯和米勒等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在微阿德瑞卡提克共生藻中的表达。简言之，坦恩罗浩斯和米勒等人，《植物杂志》，第13:3卷(1998)，第427-435页报道了用质粒DNA对微阿德瑞卡提克共生藻进行稳定转化。使用硅纤维介导的显微注射转化技术，坦恩罗浩斯将质粒pMT NPT/GUS引入到微阿德瑞卡提克共生藻中。pMT NPT/GUS包含新霉素抗性盒，该抗性盒包含编码新霉素磷

酸转移酶II(nptII)基因产物(基因库登录号AAL92039)的序列,该序列可操作地连接到nptII蛋白质编码区的上游或5'的根癌土壤杆菌胭脂碱合酶(nos)基因启动子并且可操作地连接到在3'区(nptII蛋白质编码区的下游)的nos基因3'UTR/终止子。nptII基因产物赋予对抗生素G418的抗性。pMT NPT/GUS质粒进一步包含编码β-葡糖醛酸酶(GUS)报告基因产物的序列,该序列可操作地连接到CaMV 35S启动子并且进一步地可操作地连接到CaMV 35S 3'UTR/终止子。在用pMT NPT/GUS转化之前,微阿德瑞卡提克共生藻不能在包含3mg/ml G418的培养基上繁殖。在用pMT NPT/GUS质粒转化后,获得在包含3mg/ml G418的选择性培养基中繁殖的微阿德瑞卡提克共生藻的转化子。nptII基因产物在微阿德瑞卡提克共生藻中的表达使得能够在3mg/ml G418存在的情况下繁殖,由此建立了新霉素抗生素抗性盒作为用于微阿德瑞卡提克共生藻的可选择标记物的效用。GUS报告基因的可检测活性表明CaMV 35S启动子和3'UTR适合于使基因能够在微阿德瑞卡提克共生藻中表达。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。坦恩罗浩斯和米勒报道了在包含补充有F/2富集溶液(由供应商西格玛公司提供)和3mg/ml G418的海水的培养基中的微阿德瑞卡提克共生藻的液体繁殖,以及在包含补充有F/2富集溶液和3mg/ml G418的海水的琼脂培养基中的微阿德瑞卡提克共生藻的选择和维持。已经论述了微阿德瑞卡提克共生藻在另外的培养基中的繁殖(例如在伊格莱西亚斯-普列托(Iglesias-Prieto)等人,《美国科学院院报》,第89:21卷(1992)第10302-10305页中)。已经由坦恩罗浩斯和米勒在相同报道中论述了用于使异源基因能够在微阿德瑞卡提克共生藻中表达的另外的质粒,其包含另外的启动子、3'UTR/终止子、以及可选择标记物。坦恩罗浩斯和米勒报道了质粒pMT NPT/GUS以及nos的启动子和3'UTR/终止子以及CaMV 35S基因适合于使外源基因能够在微阿德瑞卡提克共生藻.中表达。另外,坦恩罗浩斯和米勒报道了在pMT NPT/GUS上编码的新霉素抗性盒适合用作微阿德瑞卡提克共生藻中的可选择标记物。

[0386] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pMT NPT/GUS,其包含编码用作可选择标记物的nptII基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在微阿德瑞卡提克共生藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的微阿德瑞卡提克共生藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的根癌土壤杆菌胭脂碱合酶(nos)基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的nos3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与微阿德瑞卡提克共生藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括硅纤维介导的显微注射的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化微阿德瑞卡提克共生藻。nptII基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含G418的海水琼脂培养基中选择用该转化载体转化的微阿德瑞卡提克共生藻的可选择标记物。适合于微阿德瑞卡提克共生藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)人工海水以及由伊格莱西亚斯-普列托等人以及坦恩罗浩斯和米勒报道的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定微阿德瑞卡提克共生藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例26:将微拟球藻属工程改造

[0387] 可以通过改变如在此论述的由基利恩(Kilian)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在微拟球藻属W2J3B中的表达。简言之,基利恩等人,《美国科学院院报》,第108:52卷(2011)第21265-21269页报道了用一种转化构建体对微拟球藻属进行稳定核转化。使用电穿孔转化方法,基利恩将转化构建体C2引入到微拟球藻属W2J3B中。C2转化构建体包含博来霉素抗性盒,该抗性盒包含编码针对抗生素腐草霉素和吉欧霉素的抗性的印度斯坦链异壁菌博来霉素结合蛋白(ble)的序列,该序列可操作地连接到ble蛋白质编码区的上游的微拟球藻属W2J3B紫黄质/叶绿素a-结合蛋白基因VCP2的启动子并且可操作地连接到ble蛋白质编码区的下游的微拟球藻属W2J3B紫黄质/叶绿素a-结合基因VCP1的3'UTR/终止子。在用C2转化之前,微拟球藻属W2J3B不能在包含2ug/ml吉欧霉素的培养基上繁殖。在用C2转化后,获得在包含2ug/ml吉欧霉素的选择性培养基中繁殖的微拟球藻属W2J3B的转化子。ble基因产物在微拟球藻属W2J3B中的表达使得能够在2ug/ml吉欧霉素存在的情况下繁殖,由此建立了博来霉素抗生素抗性盒作为用于微拟球藻属的可选择标记物的效用。通过PCR来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。基利恩报道了在包含五倍水平的痕量金属、维生素、以及磷酸盐溶液并且进一步包含2ug/ml吉欧霉素的F/2培养基(由吉拉尔和赖瑟(Ryther),《加拿大微生物学杂志》(Canadian Journal of Microbiology),第8卷(1962),第229-239页报道)中的微拟球藻属W2J3B转化子的液体繁殖。基利恩还报道了在包含人工海水2mg/ml吉欧霉素的琼脂F/2培养基上的微拟球藻属W2J3B转化子的选择和维持。已经论述了微拟球藻属在另外的培养基中的繁殖(例如在赵(Chiu)等人,《生物资源技术》(Bioresour Technol.),第100:2卷(2009),第833-838页和巴尔(Pal)等人,《应用微生物学与生物技术》(Applied Microbiology and Biotechnology),第90:4卷(2011),第1429-1441页中)。已经由基利恩在相同的报道中描述了另外的转化构建体,这些转化构建体包含用于使异源基因能够在微拟球藻属W2J3B中表达的另外的启动子和3'UTR/终止子以及用于转化子选择的可选择标记物。基利恩报道了转化载体C2和微拟球藻属W2J3B紫黄质/叶绿素a-结合蛋白基因VCP2的启动子以及微拟球藻属W2J3B紫黄质/叶绿素a-结合蛋白基因VCP1的3'UTR/终止子适合于使外源基因能够在微拟球藻属W2J3B中表达。另外,基利恩报道了在C2上编码的博来霉素抗性盒适合用作微拟球藻属W2J3B中的可选择标记物。

[0388] 在本发明的一个实施例中,构建了转化构建体C2,其包含编码用作可选择标记物的ble基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在微拟球藻属W2J3B中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的微拟球藻属核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的微拟球藻属W2J3B VCP2基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的微拟球藻属W2J3B VCP1基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与微拟球藻属W2J3B基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括电穿孔的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化微拟球藻属W2J3B。ble基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含吉欧霉素的F/2培养基中选择用该转化载体转化的微拟球藻属W2J3B的可选择标记物。适合于微拟球藻属W2J3B脂质产生的生长培养基包括

(但不限于)F/2培养基以及由赵等人和巴尔等人报道的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定微拟球藻属W2J3B脂质的脂肪酸谱的评估。

实例27:将隐秘小环藻工程改造

[0389] 可以通过改变如在此论述的由杜纳海(Dunahay)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在隐秘小环藻中的表达。简言之,杜纳海等人,《藻类学杂志》,第31卷(1995),第1004-1012页报道了用质粒DNA对隐秘小环藻进行稳定转化。使用微粒轰击转化方法,杜纳海将质粒pACCNPT5.1引入到隐秘小环藻中。质粒pACCNPT5.1包含新霉素抗性盒,该抗性盒包含新霉素磷酸转移酶II(nptII)基因产物的编码序列,该序列可操作地连接到nptII蛋白质编码区的上游的隐秘小环藻乙酰基-CoA羧化酶(ACCase)基因(基因库登录号L20784)的启动子并且可操作地连接到在3'区(nptII编码区的下游)的隐秘小环藻ACCase基因的3'UTR/终止子。该nptII基因产物赋予对抗生素G418的抗性。在用pACCNPT5.1转化之前,隐秘小环藻不能在包含100ug/ml G418的50%人工海水培养基上繁殖。在用pACCNPT5.1转化后,获得在包含100ug/ml G418的选择性50%人工海水培养基中繁殖的隐秘小环藻的转化子。nptII基因产物在隐秘小环藻中的表达使得能够在100ug/ml G418存在的情况下繁殖,由此建立了新霉素抗生素抗性盒作为用于隐秘小环藻的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。杜纳海报道了在补充有1.07mM硅酸钠和100ug/ml G418的人工海水培养基(ASW,如由布朗(Brown),L.,《藻类学》(Phycologia),第21卷(1982),第408-410页论述)中的隐秘小环藻的液体繁殖。杜纳海还报道了在包含具有100ug/ml G418的ASW培养基的琼脂平板上的隐秘小环藻转化子的选择和维持。已经论述了隐秘小环藻在另外的培养基中的繁殖(例如在斯里哈伦(Sriharan)等人,《应用生物化学与生物技术》(Applied Biochemistry and Biotechnology),第28-29:1卷(1991),第317-326页和帕尔(Pahl)等人,《生物科学与生物工程杂志》,第109:3卷(2010),第235-239页中)。杜纳海报道了质粒pACCNPT5.1和隐秘小环藻乙酰基-CoA羧化酶(ACCase)基因的启动子适合于使外源基因能够在隐秘小环藻中表达。另外,杜纳海报道了在pACCNPT5.1上编码的新霉素抗性盒适合用作隐秘小环藻中的可选择标记物。

[0390] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pACCNPT5.1,其包含编码用作可选择标记物的nptII基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在隐秘小环藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的隐秘小环藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的隐秘小环藻ACCase启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的隐秘小环藻ACCase 3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与隐秘小环藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化隐秘小环藻。nptII基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含G418的琼脂ASW培养基中选择用该转化载体转化的隐秘小环藻的标记物。适合于隐秘小环藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)ASW培养基以及由斯里哈伦等人(1991)和帕尔等人报道的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评

定隐秘小环藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例28:将腐生舟形藻工程改造

[0391] 可以通过改变如在此论述的由杜纳海等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在腐生舟形藻中的表达。简言之,杜纳海等人,《藻类学杂志》,第31卷(1995),第1004-1012页报道了用质粒DNA对腐生舟形藻进行稳定转化。使用微粒轰击转化方法,杜纳海将质粒pACCNPT5.1引入到腐生舟形藻中。质粒pACCNPT5.1包含新霉素抗性盒,该抗性盒包含新霉素磷酸转移酶II(nptII)基因产物的编码序列,该序列可操作地连接到nptII蛋白质编码区的上游的隐秘小环藻乙酰基-CoA羧化酶(ACCase)基因(基因库登录号L20784)的启动子并且可操作地连接到在3'区(nptII编码区的下游)的隐秘小环藻ACCase基因的3'UTR/终止子。该nptII基因产物赋予对抗生素G418的抗性。在用pACCNPT5.1转化之前,腐生舟形藻不能在包含100ug/ml G418的人工海水培养基上繁殖。在用pACCNPT5.1转化后,获得在包含100ug/ml G418的选择性人工海水培养基中繁殖的腐生舟形藻的转化子。nptII基因产物在腐生舟形藻中的表达使得能够在G418存在的情况下繁殖,由此建立了新霉素抗生素抗性盒作为用于腐生舟形藻的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。杜纳海报道了在补充有1.07mM硅酸钠和100ug/ml G418的人工海水培养基(ASW,如由布朗,L.,《藻类学》,第21卷(1982),第408-410页所论述)中的腐生舟形藻的液体繁殖。杜纳海还报道了在包含具有100ug/ml G418的ASW培养基的琼脂平板上的腐生舟形藻转化子的选择和维持。已经论述了腐生舟形藻在另外的培养基中的繁殖(例如在泰卓斯(Tadros)和约翰森(Johansen),《藻类学杂志》,第24:4卷(1988),第445-452页以及斯里哈伦等人,《应用生物化学与生物技术》,第20-21:1卷(1989),第281-291页中)。杜纳海报道了质粒pACCNPT5.1和隐秘小环藻乙酰基-CoA羧化酶(ACCase)基因的启动子适合于使外源基因能够在腐生舟形藻中表达。另外,杜纳海报道了在pACCNPT5.1上编码的新霉素抗性盒适合用作腐生舟形藻中的可选择标记物。

[0392] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pACCNPT5.1,其包含编码用作可选择标记物的nptII基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在腐生舟形藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的紧密相关的具膜舟形藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的隐秘小环藻ACCase基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的隐秘小环藻ACCase基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与腐生舟形藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化腐生舟形藻。nptII基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含G418的琼脂ASW培养基中选择用该转化载体转化的腐生舟形藻的可选择标记物。适合于腐生舟形藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)ASW培养基以及由斯里哈伦等人(1989)以及泰卓斯和约翰森报道的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定腐生舟形藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例29:将假微型海链藻工程改造

[0393] 可以通过改变如在此论述的由波尔森等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在假微型海链藻中的表达。简言之,波尔森等人,《藻类学杂志》,第42卷(2006),第1059-1065页报道了用质粒DNA对假微型海链藻进行稳定转化。使用微粒轰击转化方法,波尔森将质粒pTpfcp/nat引入到假微型海链藻中。pTpfcp/nat包含诺尔丝菌素抗性盒,该抗性盒包含编码诺尔丝菌素乙酰基转移酶(nat)基因产物(基因库登录号AAC60439)的序列,该序列可操作地连接到nat蛋白质编码区的上游的假微型海链藻藻褐素叶绿素a/c结合蛋白基因(fcp)启动子并且可操作地连接到在3'区(nat蛋白质编码序列的下游)的假微型海链藻fcp基因3'UTR/终止子。该nat基因产物赋予对抗生素诺尔丝菌素的抗性。在用pTpfcp/nat转化之前,假微型海链藻不能在包含10ug/ml诺尔丝菌素的培养基上繁殖。在用pTpfcp/nat转化后,获得在包含100ug/ml诺尔丝菌素的选择性培养基中繁殖的假微型海链藻的转化子。nat基因产物在假微型海链藻中的表达使得能够在100ug/ml诺尔丝菌素存在的情况下繁殖,由此建立了诺尔丝菌素抗生素抗性盒作为用于假微型海链藻的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。波尔森报道了在包含具有100ug/ml诺尔丝菌素的改良ESAW培养基(如由哈里森(Harrison)等人,《藻类学杂志》,第16卷(1980),第28-35页所论述)的液体培养物中进行转化的假微型海链藻的选择和维持。已经论述了假微型海链藻在另外的培养基中的繁殖(例如在福尔克曼等人,《实验海洋生物学与生态学杂志》(Journal of Experimental Marine Biology and Ecology),第128:3卷(1989),第219-240页中)。已经由波尔森在相同的报道中论述了另外的质粒,其包含适合于在假微型海链藻中使用的另外的可选择标记物。波尔森报道了质粒pTpfcp/nat、假微型海链藻fcp启动子以及3'UTR/终止子适合于使外源基因能够在假微型海链藻中表达。另外,波尔森报道了在pTpfcp/nat上编码的诺尔丝菌素抗性盒适合用作假微型海链藻中的可选择标记物。

[0394] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pTpfcp/nat,其包含编码用作可选择标记物的nat基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在假微型海链藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的假微型海链藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的假微型海链藻fcp基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的假微型海链藻fcp基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与假微型海链藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。本领域普通技术人员可以鉴别出在假微型海链藻基因组的序列内的这样的同源性区域(引用于阿姆布鲁斯特(Armbrust)等人的出版物,《科学》,第306:5693卷(2004)第79-86页中)。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化假微型海链藻。nat基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含诺尔丝菌素的ESAW琼脂培养基中选择用该转化载体转化的假微型海链藻的标记物。适合于假微型海链藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)ESAW培养基以及由福尔克曼等人和哈里森等人论述的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定假微型海链藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例30:将莱氏衣藻工程改造

[0395] 可以通过改变如在此论述的由塞鲁迪(Cerutti)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在莱氏衣藻中的表达。简言之,塞鲁迪等人,《遗传学》(Genetics),第145:1卷(1997),第97-110页报道了用转化载体对莱氏衣藻进行稳定核转化。使用微粒轰击转化方法,塞鲁迪将转化构建体P[1030]引入到莱氏衣藻中。构建体P[1030]包含壮观霉素抗性盒,该抗性盒包含编码氨基糖甙3"-腺苷转移酶(aadA)基因产物的序列,该序列可操作地连接到aadA蛋白质编码区的上游的莱氏衣藻核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基基因(RbcS2,基因库登录号X04472)启动子并且可操作地连接到在3'区(aadA蛋白质编码序列的下游)的莱氏衣藻RbcS2基因3'UTR/终止子。该aadA基因产物赋予对抗生素壮观霉素的抗性。在用P[1030]转化之前,莱氏衣藻不能在包含90ug/ml壮观霉素的培养基上繁殖。在用P[1030]转化后,获得在包含90ug/ml壮观霉素的选择性培养基中繁殖的莱氏衣藻的转化子,由此建立了壮观霉素抗生素抗性盒作为用于莱氏衣藻的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩分析来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。塞鲁迪报道了在包含具有90ug/ml壮观霉素的Tris-乙酸盐-磷酸盐培养基(TAP,如由哈里斯(Harris),《衣藻属资料手册》(The Chlamydomonas Sourcebook),学术出版社(Academic Press),圣地亚哥(San Diego),1989所描述)的琼脂平板上进行转化的莱氏衣藻的选择和维持。塞鲁迪另外报道了莱氏衣藻在具有90ug/ml壮观霉素的TAP液体培养物中的繁殖。已经论述了莱氏衣藻在替代的培养基中的繁殖(例如在登特(Dent)等人,《非洲微生物学研究杂志》(African Journal of Microbiology Research),第5:3卷(2011),第260-270页以及严涛(Yantao)等人,《生物技术与生物工程》(Biotechnology and Bioengineering),第107:2卷(2010),第258-268页中)。适合用于促进异源基因在莱氏衣藻中的表达的另外的构建体(包含适合于在莱氏衣藻中使用的另外的可选择标记物以及许多调控序列(包括启动子与3'UTR))在本领域是已知的并且已经论述(为了回顾,参看拉达科维茨(Radakovits)等人,《真核细胞》(Eurkaryotic Cell),第9:4卷(2010),第486-501页)。波尔森报道了转化载体P[1030]以及莱氏衣藻启动子和3'UTR/终止子适合于使外源基因能够在莱氏衣藻中表达。另外,塞鲁迪报道了在P[1030]上编码的壮观霉素抗性盒适合用作莱氏衣藻中的可选择标记物。

[0396] 在本发明的一个实施例中,构建了载体P[1030],其包含编码用作可选择标记物的aadA基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在莱氏衣藻中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的莱氏衣藻核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的莱氏衣藻RbcS2启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的莱氏衣藻RbcS2 3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与莱氏衣藻基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。本领域普通技术人员可以鉴别出在莱氏衣藻基因组的序列内的这样的同源区域(引用于麦钱特(Merchant)等人的出版物,《科学》第318:5848卷(2007),第245-250页中)。通过包括微粒轰击的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化莱氏衣藻。aadA基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含壮观霉素的TAP琼脂培

养基上选择用该转化载体转化的莱氏衣藻的标记物。适合于莱氏衣藻脂质产生的生长培养基包括(但不限于)ESAW培养基以及由严涛等人和登特等人论述的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定莱氏衣藻脂质的脂肪酸谱的评估。

实例31:将解脂耶罗威亚酵母工程改造

[0397] 可以通过改变如在此论述的由菲克斯(Fickers)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在解脂耶罗威亚酵母中的表达。简言之,菲克斯等人,《微生物学方法杂志》(Journal of Microbiological Methods),第55卷(2003),第727-737页报道了用质粒DNA对解脂耶罗威亚酵母进行稳定核转化。使用乙酸锂转化方法,菲克斯将质粒JMP123引入到解脂耶罗威亚酵母中。质粒JMP123包含潮霉素B抗性盒,该抗性盒包含编码潮霉素B磷酸转移酶基因产物(hph)的序列,该序列可操作地连接到hph蛋白质编码区的上游的解脂耶罗威亚酵母LIP2基因启动子(基因库登录号AJ012632)并且可操作地连接到hph蛋白质编码区的下游的解脂耶罗威亚酵母LIP2基因3'UTR/终止子。在用JMP123转化前,解脂耶罗威亚酵母不能在包含100ug/ml潮霉素的培养基上繁殖。在用JMP123转化后,获得了能在包含100ug/ml潮霉素的培养基上繁殖的转化的解脂耶罗威亚酵母,由此建立了潮霉素B抗生素抗性盒作为用于解脂耶罗威亚酵母的可选择标记物的效用。在解脂耶罗威亚酵母LIP2基因的启动子和3'UTR/终止子的JMP123上提供的核苷酸序列用作将hph编码序列同源重组到LIP2基因座中的供体序列。通过萨瑟恩来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。菲克斯报道了在包含具有100ug/ml潮霉素的标准YPD培养基(酵母提取物胨葡萄糖)的琼脂平板上进行转化的解脂耶罗威亚酵母的选择和维持。在具有潮霉素的YPD培养基中进行转化的解脂耶罗威亚酵母的液体培养。已经报道了用于培养解脂耶罗威亚酵母的其他培养基和技术并且已经报道了用于解脂耶罗威亚酵母的许多其他质粒、启动子、3'UTR以及可选择标记物(例如,参看皮涅德(Pignede)等人,《应用与环境生物学》(Applied and Environmental Biology),第66:8卷(2000),第3283-3289页,庄(Chuang)等人,《新生物技术》(New Biotechnology),第27:4卷(2010),第277-282页,以及巴斯(Barth)和盖拉丁(Gaillardin),(1996),在K,W.(编),《生物技术中的非常规酵母》(Nonconventional Yeasts in Biotecnology),施普林格(Sprinter-Verlag),柏林海德堡(Berlin-Heidelber),第313-388页中)。菲克斯报道了转化载体JMP123以及解脂耶罗威亚酵母LIP2基因启动子和3'UTR/终止子适合于使异源基因能够在解脂耶罗威亚酵母中表达。另外,菲克斯报道了在JMP123上编码的潮霉素抗性盒适合用作解脂耶罗威亚酵母中的可选择标记物。

[0398] 在本发明的一个实施例中,构建了载体JMP123,其包含编码用作可选择标记物的hph基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在解脂耶罗威亚酵母中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的解脂耶罗威亚酵母核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的解脂耶罗威亚酵母LIP2基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的解脂耶罗威亚酵母LIP2基因3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与解脂耶罗威亚酵母基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以

选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。本领域普通技术人员可以鉴别出在解脂耶罗威亚酵母基因组的序列内的这样的同源区域(引用于杜军(Dujun)等人的出版物,《自然》,第430卷(2004),第35-44页中)。通过包括乙酸锂转化的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化解脂耶罗威亚酵母。hph基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含潮霉素的YPD培养基上选择用该转化载体转化的解脂耶罗威亚酵母的标记物。适合于解脂耶罗威亚酵母脂质产生的生长培养基包括(但不限于)YPD培养基和由庄等人描述的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定解脂耶罗威亚酵母脂质的脂肪酸谱的评估。

实例32:将高山被孢霉工程改造

[0399] 可以通过改变如在此论述的由麦肯齐(Mackenzie)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在高山被孢霉中的表达。简言之,麦肯齐等人,《应用与环境微生物学》,第66卷(2000),第4655-4661页报道了用质粒DNA对高山被孢霉进行稳定核转化。使用原生质体转化方法,麦肯齐将质粒pD4引入到高山被孢霉中。质粒pD4包含潮霉素B抗性盒,该抗性盒包含编码潮霉素B磷酸转移酶基因产物(hpt)的序列,该序列可操作地连接到hpt蛋白质编码区的上游的高山被孢霉组蛋白H4.1基因启动子(基因库登录号AJ249812)并且可操作地连接到hpt蛋白质编码区的下游的构巢曲霉(Aspergillus nidulans)N-(5'-磷酸核糖)邻氨基苯甲酸异构酶(trpC)基因3'UTR/终止子。在用pD4转化前,高山被孢霉不能在包含300ug/ml潮霉素的培养基上繁殖。在用pD4转化后,获得了在包含300ug/ml潮霉素的培养基上繁殖的转化的高山被孢霉,由此建立了潮霉素B抗生素抗性盒作为用于高山被孢霉的可选择标记物的效用。通过萨瑟恩来进行稳定转化子的基因组DNA的评估。麦肯齐报道了在包含潮霉素的PDA(马铃薯葡萄糖琼脂)培养基上进行转化的高山被孢霉的选择和维持。在具有潮霉素的PDA培养基或S2GYE培养基(包含5%葡萄糖、0.5%酵母提取物、0.18%NH_4SO_4、0.02%$MgSO_4$-$7H_2O$、0.0001%$FeCl_3$-$6H_2O$、0.1%痕量元素、10mM K_2HPO_4-NaH_2PO_4)中进行由麦肯齐液体培养转化的高山被孢霉。已经报道了用于培养高山被孢霉的其他培养基和技术并且已经报道了用于高山被孢霉的其他质粒、启动子、3'UTR、以及可选择标记物(例如参看安多(Ando)等人,《应用与环境生物学》,第75:17卷(2009)第5529-35页以及陆(Lu)等人,《应用生物化学与生物技术》,第164:7卷(2001),第979-90页)。麦肯齐报道了转化载体pD4以及高山被孢霉组蛋白H4.1启动子和构巢曲霉trpC基因3'UTR/终止子适合于使异源基因能够在高山被孢霉中表达。另外,麦肯齐报道了在pD4上编码的潮霉素抗性盒适合用作高山被孢霉中的可选择标记物。

[0400] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pD4,其包含编码用作可选择标记物的hpt基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在高山被孢霉中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的高山被孢霉核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白质编码序列上游的高山被孢霉组蛋白H4.1基因启动子并且可操作地连接到在3'区或蛋白质编码序列的下游的构巢曲霉trpC 3'UTR/终止子。转化构建体可以另外地包含与高山被孢霉基因组同源的区域,用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合

成路径基因的一个或多个基因组位点。本领域普通技术人员可以鉴别出在高山被孢霉基因组的序列内的这样的同源区域(引用于王(Wang)等人的出版物,公共科学图书馆·综合(PLOS One),第6:12卷(2011)中)。通过包括原生质体转化的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化高山被孢霉。hpt基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含潮霉素的PDA培养基上选择用该转化载体转化的高山被孢霉的标记物。适合于高山被孢霉脂质产生的生长培养基包括(但不限于)S2GYE培养基以及由陆等人和安多等人描述的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定高山被孢霉脂质的脂肪酸谱的评估。

实例33:将混浊红球菌PD630工程改造

[0401] 可以通过改变如在此论述的由卡尔朔伊尔(Kalscheuer)等人传授的方法和载体来完成根据本发明的重组基因在混浊红球菌PD630中的表达。简言之,卡尔朔伊尔等人,《应用与环境微生物学》,第52卷(1999),第508-515页报道了用质粒DNA对混浊红球菌进行稳定转化。使用电穿孔转化方法,卡尔朔伊尔将质粒pNC9501引入到混浊红球菌PD630中。质粒pNC9501包含硫链丝菌素抗性($thio^r$)盒,该抗性盒包含远青链霉菌(Streptomyces azureus)23S rRNA A1067甲基转移酶基因的完全核苷酸序列,包括该基因的启动子和3'终止子序列。在用pNC9501转化之前,混浊红球菌不能在包含1mg/ml硫链丝菌素的培养基上繁殖。在用pNC9501对混浊红球菌PD630转化后,获得了在包含1mg/ml硫链丝菌素的培养基上增殖的转化子,由此建立了硫链丝菌素抗性盒作为混浊红球菌PD630中的可选择标记物的用途。由卡尔朔伊尔描述的第二质粒pAK68包含抗性$thio^r$盒和真氧产碱杆菌(Ralstonia eutropha)β-酮硫解酶(phaB)、乙酰乙酰基-CoA还原酶(phaA)、以及针对聚羟基链烷酸酯生物合成的聚3-羟基链烷酸合酶(phaC)基因的基因序列,由lacZ启动子驱动。在pAK68对聚羟基链烷酸酯生物合成缺陷型混浊红球菌PD630品系转化后,获得了转化的混浊红球菌PD630,其与未转化品系相比产生更高量的聚羟基链烷酸酯。被引入的真氧产碱杆菌phaB、phaA、以及phaC酶的可检测活性表明在pAK68质粒上编码的调控元件适合于异源基因在混浊红球菌PD630中表达。卡尔朔伊尔报道了在包含硫链丝菌素的标准卢里亚(Luria)肉汤(LB)培养基、营养肉汤(NB)、或矿物盐培养基(MSM)上进行转化的混浊红球菌PD630的选择和维持。已经描述了用于培养混浊红球菌PD630的其他培养基和技术(例如参看黑泽明(Kurosawa)等人,《生物技术杂志》(Journal of Biotechnology),第147:3-4卷(2010),第212-218页和阿尔瓦雷斯(Alverez)等人,《应用微生物与生物技术》(Applied Microbial and Biotechnology),第54:2卷(2000),第218-223页)。卡尔朔伊尔报道了转化载体pNC9501和pAK68、远青链霉菌23S rRNA A1067甲基转移酶基因和lacZ基因的启动子适合于使异源基因能够在混浊红球菌PD630中表达。另外,卡尔朔伊尔报道了在pNC9501和pAK68上编码的$thio^r$盒适合用作混浊红球菌PD630中的可选择标记物。

[0402] 在本发明的一个实施例中,构建了载体pNC9501,其包含编码用作可选择标记物的$thio^r$基因产物的核苷酸序列,并且将其进行修饰以进一步包含脂质生物合成路径表达盒序列,由此产生了一种转化载体。脂质生物合成路径表达盒编码从表20中选择的一种或多种脂质生物合成路径蛋白质,每个蛋白质编码序列针对在混浊红球菌PD630中表达进行密码子优化以反映根据表19A-D的混浊红球菌核基因中固有的密码子偏性。对于表20的每种脂质生物合成路径蛋白质,经过密码子优化的基因序列可以单独地可操作地连接到在蛋白

质编码序列上游的lacZ基因启动子。转化构建体可以另外地包含与混浊红球菌PD630基因组同源的区域，用于该转化载体的靶向基因组整合。可以选择同源区域以破坏内源脂质生物合成路径基因的一个或多个基因组位点。本领域普通技术人员可以鉴别出在混浊红球菌PD630基因组的序列内的这样的同源区域(引用于霍尔德(Holder)等人的出版物，《公共科学图书馆遗传学》(PLOS Genetics)，第7:9卷(2011)中)。通过包括电穿孔的熟知的转化技术或其他已知方法实现用该转化载体稳定转化混浊红球菌PD630。远青链霉菌23S rRNA A1067甲基转移酶基因产物的活性可以用作用于在(但不限于)包含硫链丝菌素的LB培养基上选择用该转化载体转化的混浊红球菌PD630的标记物。适合于混浊红球菌PD630脂质产生的生长培养基包括(但不限于)由黑泽明等人和阿尔瓦雷斯(Alvarez)等人论述的那些培养基。可以通过在此描述的标准脂质提取和分析方法来评定混浊红球菌PD630脂质的脂肪酸谱的评估。

实例34:将脂肪酸营养缺陷型微藻工程改造

[0403] 实例3的B品系，被工程改造以表达赖特萼距花硫酯酶(CwTE2)的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)用作宿主生物，用于进一步基因修饰以使两个内源硫酯酶等位基因，FATA1-1和FATA1-2敲除。此处，产生第一转化构建体以在FATA1-1基因座处将新霉素表达盒整合到B品系中。这种构建体，pSZ2226包括核基因组的FATA1-1基因座的5'(SEQ ID NO:30)和3'(SEQ ID NO:31)同源重组靶向序列(侧接该构建体)，以及在莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)控制下的新霉素抗性蛋白质编码序列。这一NeoR表达盒作为SEQ ID NO:15列出并且用作一种可选择标记物。

[0404] 在将pSZ2226转化到B品系中之后，在包含蔗糖和G418的琼脂平板上选择个别转化子。选择单一分离株，H品系用于进一步基因修饰。产生第二转化构建体pSZ2236以在FATA1-2基因座处将使硫胺可选择标记物能够表达的多核苷酸整合到H品系中。pSZ2236转化构建体包括用于整合到桑椹型无绿藻(UTEX 1435)核基因组中的FATA1-2基因组区的5'(SEQ ID NO:32)和3'(SEQ ID NO:33)同源重组靶向序列(侧接该构建体)，在原始小球藻肌动蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:22)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)控制下的拟南芥THIC蛋白质编码区。这种AtTHIC表达盒作为SEQ ID NO:23列出并且用作一种选择标记物。在用pSZ2236转化H品系以产生I品系之后，在包含游离脂肪酸的琼脂平板上选择个别转化子。I品系能在琼脂平板上并且在缺乏硫胺并且补充有游离脂肪酸的培养基中繁殖。

实例35:将微生物工程改造以增加硬脂酸的产生

[0405] 根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法，用质粒构建体pSZ2281转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的经典地诱变品系，J品系。pSZ2281包括编码RNA发夹(SAD2hpC，SEQ ID NO:34)以下调硬脂酰基-ACP去饱和酶的表达的多核苷酸，用于整合到核基因组中的6S基因组区的5'(SEQ ID NO:1)和3'(SEQ ID NO:2)同源重组靶向序列(侧接该构建体)，以及在莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)的控制下表达SEQ ID NO:3中给出的蛋白质序列的酿酒酵母suc2蔗糖转化酶编码区(SEQ ID NO:4)。这种酿酒酵母suc2表达盒作为SEQ ID NO:7列出并且用作一种可选择标记物。编码SAD2hpC RNA发夹的多核苷酸序列在原始小球藻肌动蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:22)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)的控制下。

[0406] 在用构建体pSZ2281转化J品系，由此产生K品系之后，在含有蔗糖作为唯一碳源的琼脂平板上选择阳性克隆。将个别转化子以克隆方式纯化并且使其在适合于脂质产生的异养条件(如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中详述的那些)下繁殖。由干燥的生物质制备脂质样品并且使用如实例1中所描述(也参看PCT/US 2012/023696)的标准脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化检测方法分析这些样品。在作为唯一碳源的葡萄糖上繁殖的桑椹型无绿藻UTEX J品系和在作为唯一碳源的蔗糖上繁殖的K品系的三种代表性分离株的脂肪酸谱(以占总脂肪酸的面积%表示)呈现在表21中。

[0407] 表21.被工程改造以表达靶向硬脂酰基ACP去饱和酶基因/基因产物的发夹RNA构建体的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)细胞的脂肪酸谱。

脂肪酸	J品系	K-1品系	K-2品	K-3品	K-4品
面积%			系	系	系
C8:0					0.02
C10:0	0.01	0.00	0.02	0.02	0.04
C12:0	0.03	0.05	0.05	0.05	0.08
C14:0	1.22	0.89	0.87	0.77	1.2
C16:0	26.75	29.23	28.96	27.55	28.06
C18:0	3.06	37.39	36.76	36.41	40.82
C18:1	59.62	23.90	24.76	26.92	22.02
C18:2	7.33	5.44	5.54	5.54	4.53
C18:3					0.14
C20:0					1.43

[0408] 在表21中呈现的数据示出SAD2发夹RNA构建体的表达对转化生物的C18:0和C18:1脂肪酸谱的明显影响。包含SAD2发夹RNA构建体的K品系转化子的脂肪酸谱展现饱和C18:0脂肪酸百分比的增加，伴随不饱和C18:1脂肪酸的同时减少。未转化品系的脂肪酸谱包含大约3%C18:0。转化品系的脂肪酸谱包含大约37%C18:0。这些数据说明了能够在桑椹型无绿藻中表达SAD RNA发夹构建体的多核苷酸的成功表达和使用可改变工程改造的宿主微生物中的饱和脂肪酸的百分比，并且特别是增加微生物细胞中的C18:0脂肪酸的浓度并且减少C18:1脂肪酸。

[0409] 在表21中还示出了K-4品系具有又另一升高水平的硬脂酸酯。通过将K1-K3品系的构建体插入到SAD2B基因座中产生了K4品系。因此，通过敲除SAD基因的一个副本并且抑制在RNA水平下的其余副本，获得了油酸的进一步减少和硬脂酸酯的相应的增加。从K4品系获得的RBD油的三酸甘油酯分析示出约12%POP、27%POS以及18%SOS。

实例36:通过内源酰基-ACP硫酯酶的敲减来工程改造微生物以用于增加产生油酸

[0410] 根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法用构建体pSZ2402-pSZ2407中的每一种独立地转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的经典地诱变品系，J品系。构建体pSZ2402-pSZ2407各自包括编码靶向桑椹型无绿藻FATA1mRNA转录物的发夹RNA以下调脂肪酰基-ACP硫酯酶的表达的不同的多核苷酸，将序列靶向(侧接构建体)到6S基因组区以用

于整合到核基因组中的5'(SEQ ID NO:1)和3'(SEQ ID NO:2)同源重组,以及表达以SEQ ID NO:3形式给出的蛋白质序列、处于莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)控制下的酿酒酵母suc2蔗糖转化酶编码区(SEQ ID NO:4)。这种酿酒酵母suc2表达盒作为SEQ ID NO:7列出并且用作一种可选择标记物。与每种发夹相对应的多核苷酸的序列表一致性在表22中列出。编码每种RNA发夹的多核苷酸序列处于莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)的控制下。

[0411] 表22.用于转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)J品系的质粒构建体。

质粒构建体	发夹名称	SEQ ID NO:
pSZ2402	PmFATA-hpB	SEQ ID NO:40
pSZ2403	PmFATA-hpC	SEQ ID NO:41
pSZ2404	PmFATA-hpD	SEQ ID NO:42
pSZ2405	PmFATA-hpE	SEQ ID NO:43
pSZ2406	PmFATA-hpF	SEQ ID NO:44
pSZ2407	PmFATA-hpG	SEQ ID NO:45

[0412] 在用表22中列出的构建体中的每一种独立转化J品系之后,在含有蔗糖作为唯一碳源的琼脂平板上选择阳性克隆。将个别转化子以克隆方式纯化并且使其在适合于脂质产生的异养条件(如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中详述的那些)下繁殖。由干燥的生物质制备脂质样品并且使用如实例1中所描述(也参看PCT/US 2012/023696)的标准脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化检测方法分析这些样品。在作为唯一碳源的葡萄糖上繁殖的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)J品系和在作为唯一碳源的蔗糖上繁殖的J品系的每次转化的代表性分离株的脂肪酸谱(以占总脂肪酸的面积%表示)呈现在表23中。

[0413] 表23.被工程改造以表达靶向脂肪酰基-ACP硫酯酶基因/基因产物的发夹RNA构建体的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)细胞的脂肪酸谱。

	脂肪酸面积%						
构建体	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
未转化的J品系	0	0.05	1.32	26.66	3.1	59.07	7.39
PmFATA-hpB	0.04	0.07	1.36	24.88	2.24	61.92	6.84
	0	0.08	1.33	25.34	2.39	61.72	6.5
	0	0.07	1.29	25.44	2.26	61.7	6.69
	0	0.06	1.33	25.1	2.37	61.56	6.87
PmFATA-hpC	0	0.08	1.18	22.03	1.71	63.8	8.63
	0	0.07	1.21	24.5	2.23	62.32	7.19
	0	0.08	1.29	24.93	2.24	62.02	7.01
	0.05	0.06	1.29	25.45	2.26	61.81	6.76
PmFATA-hpD	0	0.02	0.68	15.8	1.88	72.64	6.96
	0	0.03	0.78	17.56	1.7	71.8	6.03
	0	0.03	0.92	19.04	2.03	68.82	7.05
	0	0.04	1.27	23.14	2.25	65.27	6.07
PmFATA-hpE	0	0.03	0.79	18.55	2.13	69.66	6.77
	0	0.04	1.11	21.01	1.74	65.18	8.55
	0	0.03	1.08	21.11	1.54	64.76	8.87
	0	0.03	1.17	21.93	1.71	63.89	8.77
PmFATA-hpF	0.03	0.04	0.34	8.6	1.69	78.08	8.87
	0	0.03	0.49	10.2	1.52	76.97	8.78
	0	0.03	1	20.47	2.22	66.34	7.45
	0	0.03	1.03	21.61	1.88	65.39	7.76
PmFATA-hpG	0	0.03	1.03	20.57	2.36	64.73	8.75
	0	0.03	1.2	24.39	2.47	61.9	7.49
	0	0.04	1.29	24.14	2.29	61.41	8.22

[0414] 在表23中呈现的数据示出了FATA发夹RNA构建体的表达对转化生物的C18:0和C18:1脂肪酸谱的明显影响。包含FATA发夹RNA构建体的J品系转化子的脂肪酸谱展现C18:1脂肪酸百分比的增加，伴随C16脂肪酸的同时减少。未转化的J品系的脂肪酸谱是约26.66%C16:0、3%C18:0以及约59%C18:1脂肪酸。相比之下，转化品系的脂肪酸谱包含低至8.6%的C16:0和1.54%的C18:0以及超过78%的C18:1脂肪酸。

[0415] 这些数据说明了在桑椹型无绿藻中的多核苷酸FATA RNA发夹构建体改变工程改造的微生物的脂肪酸谱，并且特别是在增加微生物细胞中的C18:1脂肪酸的浓度并且减少C18:0和C16:0脂肪酸方面的效用和成功用途。

实例37：通过KASI或KASIV过表达工程改造微生物以增加中链脂肪酸的产生

[0416] 这一实例描述使用编码KASI或KASIV酶的重组多核苷酸来工程改造微生物，其中转化微生物的脂肪酸谱已经富集月桂酸、C10:0以及总饱和脂肪酸。

[0417] 根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法，独立地使用构建体pSZD1132、pSZD1133、pSZD1134或pSZD1201中的每一个来转化实例3的B品系，被工程改造以表达赖特萼距花硫酯酶(CwTE2)的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)。以上构建体中的每一个包括

编码KASI或KASIV酶的不同的多核苷酸、用于整合到核基因组中的pLoop基因组区的5'(SEQ ID NO:13)和3'(SEQ ID NO:14)同源重组靶向序列(侧接该构建体)以及在莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)的控制下的新霉素抗性蛋白质编码序列。这一NeoR表达盒作为SEQ ID NO:15列出并且用作一种可选择标记物。对应于每个构建体的多核苷酸的序列表身份列于表20中。编码每个KAS酶的多核苷酸序列在桑椹型无绿藻UTEX 1435Amt03启动子/5'UTR(SEQ ID NO:8)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)的控制下。对KAS酶和新霉素抗性基因的蛋白质编码区进行密码子优化以反映桑椹型无绿藻UTEX 1435核基因中固有的密码子偏性,如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述。

[0418] 在将个别质粒转化到B品系中之后,在包含G418的琼脂平板上选择阳性克隆。将个别转化子以克隆方式纯化并且使其在作为唯一碳源的蔗糖上在pH 7.0下于如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中详述的适合于脂质产生的条件下生长。由来自每个转化子的干燥的生物质制备脂质样品并且使用如实例1中所描述的标准脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化(FAME GC/FID)检测法分析这些样品中的脂肪酸谱。B品系和各pSZ2046的四种阳性转化子(M-P品系,1-4)的脂肪酸谱(以占总脂肪酸的面积%表示)呈现在表24中。

[0419] 表24.用来转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)B品系的质粒构建体。

质粒构建体	KASI/KASIV 来源	转运肽	SEQ ID NO:
pSZD1134	赖特萼距花基因库登录号 U67317	天然	SEQ ID NO:46
pSZD1201	*赖特萼距花*	PmSAD	SEQ ID NO:47
pSZD1132	*Cuphea pulcherrima* 基因库登录号 AAC68860	天然	SEQ ID NO:48
pSZD1133	*天然细叶萼距花*	天然	SEQ ID NO:49

[0420] 表25.被工程改造以增加C10、月桂酸以及总饱和脂肪酸的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)B品系的脂肪酸谱。

		脂肪酸（面积%）								
质粒构建体	数量	C10	C12	C14	C16	C18:0	C18:1	C18:2	C10-C12	%饱和/总
pSZ1283		7.89	35.49	16.58	11.5	1.09	19.64	6.49	43.38	72.55
pSZ1283、pSZD1134	1	14.94	43.97	12.19	7.56	0.72	14.11	5.31	58.91	79.38
pSZ1283、pSZD1134	2	10.27	39.61	15.35	9.61	0.94	17.1	5.88	49.88	75.78
pSZ1283、pSZD1134	3	11.69	41.83	15.21	8.77	0.83	15.04	5.40	53.52	78.33
D1134-20	4	10.76	40.77	15.32	9.19	0.88	16.06	5.76	51.53	76.92
pSZ1283、pSZD1132	1	10.77	40.31	15.21	9.43	0.88	16.18	5.97	51.08	76.6
pSZ1283、pSZD1132	2	9.19	37.03	15.02	10.52	1.00	19.63	6.29	46.22	72.76
pSZ1283、pSZD1132	3	8.97	36.09	15.01	10.77	1.05	20.38	6.39	45.06	71.89
pSZ1283、pSZD1132	4	9.51	38.12	14.96	9.96	0.94	18.93	6.32	47.63	73.49
pSZ1283、pSZD1132	1	13.06	46.21	9.84	7.12	0.75	16.7	5.22	59.27	76.98
pSZ1283、pSZD1132	2	11.02	43.91	13.01	7.78	0.86	16.53	5.77	54.93	76.58
pSZ1283、pSZD1132	3	11.59	45.14	12.41	7.61	0.82	15.72	5.65	56.73	77.57
pSZ1283、pSZD1132	4	10.66	41.32	13.74	8.75	0.68	18.64	5.21	51.98	75.15
pSZ1283、pSZD1132	1	6.90	36.08	15.15	11.02	1.00	21.74	6.77	42.98	70.15
pSZ1283、pSZD1132	2	7.01	35.88	15.01	10.75	1.07	22.02	6.93	42.89	69.72
pSZ1283、pSZD1132	3	10.65	41.94	12.38	8.48	0.85	18.28	6.15	52.59	74.3
pSZ1283、pSZD1132	4	10.23	41.88	12.58	8.52	0.82	18.48	6.22	52.11	74.03

[0421] 呈现在表25中的数据示出了KASI和KASIV酶的外源表达对转化生物的C10:0和C12脂肪酸谱的明显影响。单独表达赖特萼距花硫酯酶的B品系的脂肪酸谱包含约8％C10:0和约35.5％C12:0，饱和脂肪酸占总脂肪酸的72.55％。相比之下，被工程改造以另外表达具有桑椹型无绿藻硬脂酰基ACP去饱和酶转运肽的赖特萼距花KASI的B品系的转化子以约13％C10:0和约46％C12:0的脂肪酸谱为特征。在共表达赖特萼距花KASI融合蛋白质的B品系的

转化子中，饱和脂肪酸占高达77％。类似地，被工程改造以表达具有酶的天然转运肽的赖特萼距花KASI的B品系的转化子以约15％C10:0、约44％C12以及约79％饱和脂肪酸的脂肪酸谱为特征。与B品系自身的脂肪酸谱相比，表达Cuphea pulcherrima KASIV或天然细叶萼距花KASIV的B品系的脂肪酸谱或许多转化子也显示升高的C10％和C12％水平。

[0422] 这些数据证实了使KASI和KASIV构建体能够在桑椹型无绿藻(UTEX 1435)中表达的多核苷酸改变工程改造的宿主微生物中的饱和脂肪酸的百分比，并且特别是在增加微生物细胞中的C10:0和C12:0脂肪酸的浓度方面的效用和有效性。

实例38:通过KASI敲除工程改造微生物以增加中链脂肪酸的产生

[0423] 这一实例描述使用破坏不同KASI等位基因的重组多核苷酸来工程改造微生物，其中转化微生物的脂肪酸谱已经富集C10:0和中链脂肪酸。

[0424] 根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法，使用构建体pSZ2302和pSZ2304来独立地转化实例3的B品系，被工程改造以表达赖特萼距花硫酯酶(CwTE2)的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)。pSZ2302转化构建体包括用于整合到桑椹型无绿藻核基因组中的KAS1等位基因1基因组区的5’(SEQ ID NO:50)和3’(SEQ ID NO:51)同源重组靶向序列(侧接该构建体)，在原始小球藻肌动蛋白启动子/5’UTR(SEQ ID NO:22)和普通小球藻硝酸还原酶3’UTR(SEQ ID NO:6)控制下的拟南芥THIC蛋白质编码区。pSZ2304包括用于整合到桑椹型无绿藻核基因组中的KAS1等位基因2基因组区的5’(SEQ ID NO:52)和3’(SEQ ID NO:53)同源重组靶向序列(侧接该构建体)，在原始小球藻肌动蛋白启动子/5’UTR(SEQ ID NO:22)和普通小球藻硝酸还原酶3’UTR(SEQ ID NO:6)的控制下的拟南芥THIC蛋白质编码区。这种AtTHIC表达盒作为SEQ ID NO:23列出并且用作一种选择标记物。对AtTHIC的蛋白质编码区进行密码子优化以反映桑椹型无绿藻UTEX 1435核基因中固有的密码子偏性，如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中所描述。

[0425] 在将pSZ2302和pSZ2304独立转化到B品系中，由此产生Q和R品系之后，在包含硫胺的琼脂平板上选择阳性克隆。将个别转化子以克隆方式纯化并且在作为唯一碳源的蔗糖上在pH 5.0或pH 7.0下于如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中详述的适合于脂质产生的异养条件下培养。由来自个种转化子的干燥的生物质制备脂质样品并且使用如实例1中所描述的脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化(FAME GC/FID)检测法分析这些样品中的脂肪酸谱。B品系以及阳性pSZ2302(Q品系，1-5)和pSZ2304(R品系，1-5)转化子的脂肪酸谱(以占总脂肪酸的面积％表示)呈现在表26和27中。

[0426] 表26.在pH 5.0下培养的被工程改造以增加中链脂肪酸的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)B、Q以及R品系的脂肪酸谱。

		脂肪酸（面积%）							
品系	转化质粒	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C10-C14

UTEX 1435	无	0.00	0.04	1.28	26.67	3.05	59.96	7.19	1.32
B 品系	pSZ1283	0.01	0.09	1.09	21.60	2.21	65.15	7.94	1.19
Q-1 品系	pSZ1283、pSZ2302	0.08	1.21	7.52	38.71	1.38	38.32	8.75	8.81
Q-2 品系	pSZ1283、pSZ2302	0.15	1.36	7.51	38.23	1.33	38.27	8.94	9.02
Q-3 品系	pSZ1283、pSZ2302	0.16	1.43	7.49	38.88	1.30	37.58	8.73	9.08
Q-4 品系	pSZ1283、pSZ2302	0.00	1.71	7.42	37.67	1.43	37.26	10.38	9.13
Q-5 品系	pSZ1283、pSZ2302	0.13	1.21	7.36	38.81	1.31	38.07	8.71	8.7
R-1 品系	pSZ1283、pSZ2304	0.19	1.78	8.47	40.11	1.34	33.46	9.98	10.44
R-2 品系	pSZ1283、pSZ2304	0.90	8.00	7.78	28.96	1.15	30.26	17.14	16.68
R-3 品系	pSZ1283、pSZ2304	0.26	3.58	7.77	34.98	1.56	32.86	14.60	11.61
R-4 品系	pSZ1283、pSZ2304	1.64	13.50	7.61	21.38	0.90	36.13	14.73	22.75
R-5 品系	pSZ1283、pSZ2304	1.03	9.63	7.56	25.61	1.00	31.70	18.23	18.22

[0427] 表27.在pH 7.0下培养的被工程改造以增加中链脂肪酸的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)B、Q以及R品系的脂肪酸谱

		脂肪酸（面积%）							
品系	转化质粒	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C10-C14
UTEX 1435	无	0.01	0.04	1.34	27.94	3.24	57.46	7.88	1.39
B 品系	pSZ1283	4.72	29.57	15.56	12.63	1.20	27.65	7.39	49.85
Q-1 品系	pSZ1283、pSZ2302	16.00	50.61	9.52	5.33	0.54	11.79	5.28	76.13
Q-2 品系	pSZ1283、pSZ2302	16.32	49.79	9.82	5.52	0.54	12.28	4.87	75.93
Q-3 品	pSZ1283、	15.0	47.58	10.23	5.93	0.56	15.1	4.5	72.89

系	pSZ2302	8					2	0	
Q-4 品系	pSZ1283、pSZ2302	14.27	47.30	10.44	6.17	0.56	15.50	4.59	72.01
Q-5 品系	pSZ1283、pSZ2302	14.75	47.28	10.32	6.04	0.59	15.50	4.65	72.35
R-1 品系	pSZ1283、pSZ2304	21.25	55.42	7.97	3.65	0.00	5.46	5.66	84.64
R-2 品系	pSZ1283、pSZ2304	13.00	55.05	10.88	5.78	0.28	7.90	6.29	78.93
R-3 品系	pSZ1283、pSZ2304	12.89	53.15	11.11	6.13	0.00	9.87	6.13	77.15
R-4 品系	pSZ1283、pSZ2304	12.80	51.64	13.86	6.69	0.00	7.51	6.70	78.3
R-5 品系	pSZ1283、pSZ2304	16.61	51.42	9.84	5.27	0.33	11.15	4.79	77.87

[0428] 呈现在表26和27中的数据示出了不同KASI等位基因的破坏对转化生物的脂肪酸谱的明显影响。当在pH 5.0下培养时，桑椹型无绿藻(UTEX 1435)和在pH可调控启动子的控制下表达赖特萼距花FATB2硫酯酶的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)B品系的脂肪酸谱极类似。这些谱的特征为约1％C14:0、约21％-26％C16:0、约2％-3％C18:0、约60％-65％C18:1、约7％C18:2，其中C10-C14脂肪酸占总脂肪酸约1.19％-1.3％。相比之下，当在pH 5.0下培养时，进一步工程改造以破坏KASI等位基因1(Q品系)或KASI等位基因2(R品系)的B品系展现出改变的脂肪酸谱，这些脂肪酸谱的特征为与B品系或UTEX 1435相比，C12水平增加、C14水平增加、C18水平减少以及C18:1脂肪酸水平减少。Q品系与R品系分离株的脂肪酸谱的差异在于，R品系(等位基因2敲除)分离株相对于Q品系(等位基因1敲除)具有总体上更多的C12以及更少的C16和C18:1。

[0429] 当在pH 7.0下培养时，桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的脂肪酸谱不同于在pH可调控启动子控制下表达赖特萼距花FATB2硫酯酶的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)B品系的脂肪酸谱。当在pH 7.0下培养时，B品系以C10、C12及C14脂肪酸增多的脂肪酸谱(这些占总脂肪酸约50％)为特征。当在pH 7.0下培养时，Q品系和R品系展现出相对于B品系，C10、C12及C14脂肪酸仍进一步增加并且C18:0和C18:1脂肪酸仍进一步减少的脂肪酸谱。再一次，通过相对于Q品系包含更高百分含量水平C12和更低水平C18:1的R品系谱观察到Q与R品系之间的脂肪酸谱差异。

[0430] 这些数据说明了能够在桑椹型无绿藻中表达KASI和KASIV构建体的多核苷酸的成功表达和使用可改变工程改造的宿主微生物中饱和脂肪酸的百分含量，并且特别是使微生物细胞中C10:0和C12:0脂肪酸的浓度增加并使C18:0和C18:1脂肪酸的浓度降低。此外，此处的数据指示了不同的KASI等位基因可以被破坏以引起转化的有机体的脂肪酸谱的改变。

实例39：通过KASI敲减对微生物进行工程改造以增加中链脂肪酸的产生

[0431] 本实例描述了使用多种编码RNA发夹的重组多核苷酸使KASI酶衰减以对微生物进行工程改造,其中转化的微生物的脂肪酸谱已经富集中链脂肪酸。

[0432] 根据PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法,用构建体pSZ2482-pSZ2485中的每一个独立地转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的经典诱变品系,S品系。构建体pSZ2482-pSZ2485各自包括了编码靶向桑椹型无绿藻(UTEX 1435)KASI mRNA转录物的发夹RNA以下调脂肪酰基-ACP硫酯酶的不同多核苷酸;用于整合到核基因组中的6S基因组区的5'(SEQ ID NO:1)和3'(SEQ ID NO:2)同源重组靶向序列(侧接该构建体);以及在莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)的控制下表达SEQ ID NO:3中给出的蛋白质序列的酿酒酵母suc2蔗糖转化酶编码区(SEQ ID NO:4)。这种酿酒酵母suc2表达盒作为SEQ ID NO:7列出并且用作一种可选择标记物。对应于每个KASI发夹的多核苷酸的序列表身份列于表28中。编码每个RNA发夹的多核苷酸序列在桑椹型无绿藻Amt03启动子/5'UTR(SEQ ID NO:8)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)的控制下。对suc2表达盒的蛋白质编码区进行密码子优化以反映桑椹型无绿藻UTEX 1435核基因固有的密码子偏性,如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述。

[0433] 表28.用来转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)S品系的质粒构建体。

转化构建体	发夹	SEQ ID NO:
pSZ2482	KASI发夹B	SEQ ID NO:54
pSZ2483	KASI发夹C	SEQ ID NO:55
pSZ2484	KASI发夹D	SEQ ID NO:56
pSZ2485	KASI发夹E	SEQ ID NO:57

[0434] 在用表28中所列的每个构建体独立转化S品系之后,在含有蔗糖作为唯一碳源的琼脂平板上选择阳性克隆。将个别转化子以克隆方式纯化并且使其在适合于脂质产生的异养条件(如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中详述的那些)下繁殖。由干燥生物质制备脂质样品并使用如实例1中所描述(也参看PCT/US 2012/023696)的脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化检测法进行分析。以葡萄糖作为唯一碳源繁殖的桑椹型无绿藻UTEX 1435以及以蔗糖作为唯一碳源繁殖的S品系每次转化的四种代表性分离株的脂肪酸谱(以占总脂肪酸的面积%表示)呈现于表29中。

[0435] 表29.工程改造成表达靶向KASI基因/基因产物的发夹RNA构建体的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的脂肪酸谱.

			脂肪酸（面积%）							
品系	质粒	数量	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
UTEX 1435	无	1	0.00	0.04	1.45	27.97	3.18	58.35	6.78	0.60
S品系	pSZ2482	1	0.19	0.74	8.47	38.30	2.15	36.24	9.45	1.42
		2	0.07	0.25	4.16	32.46	2.62	49.57	7.73	0.82
		3	0.03	0.10	2.68	27.48	2.65	56.40	8.14	0.55
		4	0.03	0.10	2.60	27.44	2.01	55.54	9.15	0.78
	pSZ2483	1	0.00	0.06	1.94	30.58	1.55	53.26	9.31	0.76
		2	0.20	0.05	1.76	28.01	2.31	56.61	8.70	0.60
		3	0.00	0.06	1.60	24.38	2.65	58.25	9.93	1.15
		4	0.00	0.04	1.56	26.65	2.96	60.06	6.92	0.52
	pSZ2484	1	0.72	3.71	19.15	38.03	1.68	14.22	15.00	4.21
		2	0.66	2.76	16.34	38.19	1.78	18.52	14.91	3.38
		3	0.69	2.96	16.20	37.28	1.77	19.05	15.26	3.48
		4	0.18	0.70	8.61	36.80	2.35	36.22	10.89	1.10
	pSZ2485	1	0.00	0.04	1.41	25.34	3.16	60.12	7.78	0.48
		2	0.03	0.04	1.41	23.85	2.19	61.23	8.75	0.67
		3	0.00	0.04	1.41	24.41	2.23	60.64	8.69	0.67
		4	0.00	0.04	1.41	24.51	2.16	60.85	8.91	0.66

[0436] 表29中呈现的这些数据显示了kAS发夹RNA构建体的表达明显影响转化的有机体的脂肪酸谱。包含pSZ2482或pSZ2484KASI发夹RNA构建体的S品系转化子的脂肪酸谱展现出相对于UTEX 1435的脂肪酸谱，C10、C12、C14及C16脂肪酸的百分含量增加，并伴随C18:0和C18:1脂肪酸的减少。

[0437] 这些数据说明了在桑椹型无绿藻(UTEX 1435)中的多核苷酸KASI RNA发夹构建体改变工程改造的微生物的脂肪酸谱，并且特别是在使微生物细胞中中链脂肪酸增加并使C18:0和C18:1脂肪酸减少方面的效用和成功应用。

实例40:通过延长酶过表达对微生物进行工程改造以增加硬脂酸的产生

[0438] 本实例描述了使用多种编码延长酶的重组多核苷酸对微生物进行工程改造,其中转化的微生物的脂肪酸谱已经富集硬脂酸、花生酸及二十二碳二烯酸。

[0439] 根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法,用构建体pSZ2323、pSZ2324或pSZ2328中的每一个独立地转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的经典诱变品系,J品系。每个构建体包括一种过表达延长酶的蛋白质编码区;用于整合到核基因组中的6S基因组区的5'(SEQ ID NO:1)和3'(SEQ ID NO:2)同源重组靶向序列(侧接该构建体);以及在莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)控制下表达SEQ ID NO:3中给出的蛋白质序列的酿酒酵母suc2蔗糖转化酶编码区(SEQ ID NO:4)。这种酿酒酵母suc2表达盒作为SEQ ID NO:7列出并且用作一种可选择标记物。对应于每个延长酶的多核苷酸的序列表身份列于表30中。编码每个延长酶的多核苷酸序列在桑椹型无绿藻Amt03启动子/5'UTR(SEQ ID NO:8)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)控制下。对外源延长酶和suc2表达盒的蛋白质编码区进行密码子优化以反映桑椹型无绿藻UTEX 1435核基因固有的密码子偏性,如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述。

[0440] 表30.用于转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)J品系的质粒构建体。

质粒构建体	延长酶来源	基因库登录号	SEQ ID NO:
pSZ2328	地钱	AAP74370	58,59
pSZ2324	布氏锥虫	AAX70673	60,61
pSZ2323	酿酒酵母	P39540	62,63

[0441] 在用表30中所列的构建体独立地转化J品系之后,在含有蔗糖作为唯一碳源的琼脂平板上选择阳性克隆。将个别转化子以克隆方式纯化并且使其在适合于脂质产生的异养条件(如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中详述的那些)下繁殖。由干燥生物质制备脂质样品并使用如实例1中所描述(也参看PCT/US 2012/023696)的脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化检测法进行分析。以葡萄糖作为唯一碳源繁殖的桑椹型无绿藻UTEX 1435的J品系以及以蔗糖作为唯一碳源繁殖的J品系每次转化的三个代表性分离株的脂肪酸谱(以占总脂肪酸的面积%表示)呈现于表31中。

[0442] 表31.工程改造成过表达延长酶的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)J品系细胞的脂肪酸谱。

质粒构建体	数量	脂肪酸面积%								
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3α	C20:0	C22:2n6
无	1	1.39	27.42	0.77	3.33	57.46	8.05	0.61	0.30	0.03
pSZ2328	1	1.25	19.23	0.85	8.26	57.54	9.34	0.79	0.73	0.94
pSZ232	2	1.22	17.7	0.69	7.86	60.5	9.38	0.59	0.6	0.47
8			6			6				
pSZ2328	3	1.26	18.37	0.92	7.83	58.77	10.01	0.72	0.64	0.52
pSZ2324	1	1.51	22.97	1.09	8.71	53.01	9.63	0.65	0.68	0.55
pSZ2324	2	1.29	20.6	0.92	7.53	56.97	9.92	0.73	0.64	0.43
pSZ2324	3	1.28	20.59	0.93	7.33	57.52	9.68	0.65	0.58	0.42
pSZ2323	1	1.65	27.27	0.67	3.56	56.68	8.72	0.33	0.36	0.00
pSZ2323	2	1.56	28.44	0.74	3.36	55.22	9.07	0.46	0.39	0.03
pSZ2323	3	1.64	28.7	0.75	3.34	55.29	8.59	0.49	0.36	0.02

[0443] 表31中呈现的数据显示出地钱和布氏锥虫酶的表达明显地影响转化的有机体的C14、C16、C18:0、C20:0及C22:2n6脂肪酸谱。未转化的J品系的脂肪酸谱为约27.42%的C16:0、约3%的C18:0、约57.5%的C18:1、约0.3%的C20:0及约0.03%的C22:2n6脂肪酸。相比于J品系，用表达延长酶的不同质粒构建体转化的J品系的脂肪酸谱包含更低百分含量水平的C16以及更高百分含量水平的C18:0、C20:0及C22:2n6脂肪酸。地钱延长酶过表达的结果相对于J品系的脂肪酸谱在C18:0脂肪酸百分含量水平方面有2.5倍增加，在C20:0脂肪酸的百分含量水平方面有2倍增加并且在C22:2n6脂肪酸的百分含量水平方面有约15到30倍增加。

[0444] 这些数据说明成功使用了编码在桑椹型无绿藻(UTEX 1435)中表达的延长酶的多核苷酸可改变工程改造的微生物的脂肪酸谱，并且特别是使重组微生物细胞中C18:0、C20:0及C22:2n6脂肪酸的浓度增加并使C16:0脂肪酸减少。

实例41：通过酰基-ACP硫酯酶过表达对微生物进行工程改造以增加硬脂酸的产生

[0445] 本实例描述了使用多种编码不同C18:0偏好的酰基-ACP硫酯酶的重组多核苷酸对微生物进行工程改造，其中转化的微生物的脂肪酸谱已经富集硬脂酸。

[0446] 根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法，用表32中所列的构建体独立地转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的经典诱变品系，J品系或A品系。每个构建体包括一个带有C末端3X FLAG®表位标签的过表达脂肪酰基-ACP硫酯酶的蛋白质编码区；用于整合到核基因中的6S基因组区的5'(SEQ ID NO:1)和3'(SEQ ID NO:2)同源重组靶向序列(侧

接该构建体)；以及在莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR(SEQ ID NO:5)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)的控制下表达SEQ ID NO:3中给出的蛋白质序列的酿酒酵母suc2蔗糖转化酶编码区(SEQ ID NO:4)。这种酿酒酵母suc2表达盒作为SEQ ID NO:7列出并且用作一种可选择标记物。对应于每种硫酯酶的多核苷酸的序列表身份列于表32中。编码每种硫酯酶的多核苷酸序列在桑椹型无绿藻Amt03启动子/5'UTR(SEQ ID NO:8)和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR(SEQ ID NO:6)控制下。对外源硫酯酶和suc2表达盒的蛋白质编码区进行密码子优化以反映桑椹型无绿藻UTEX 1435核基因固有的密码子偏性，如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述。

[0447] 表32.用于转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)A品系或J品系的质粒构建体。

质粒构建体	酰基-ACP 硫酯酶，基因库登录号	酰基-ACP 硫酯酶来源	转运肽来源	SEQ ID NO:
pSZD581	FATA，CAA52070	*油菜*	天然	64，65
pSZD643	FATA，CAA52070	*油菜*	UTEX 250 SAD	66，67
pSZD645	FATA，AAA33019	*红花*	UTEX 250 SAD	68，69
pSZD644	FATA，ABS30422	*蓖麻*	天然	70，71
pSZD1323	FATA，AAB51523	*山竹*	天然	72，73
pSZD1320	FATA	*可可树*	天然	74，75

[0448] 在用表32中所列的构建体独立地转化A品系或J品系之后，在含有蔗糖作为唯一碳源的琼脂平板上选择阳性克隆。将个别转化子以克隆方式纯化并且使其在适合于脂质产生的异养条件(如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464以及PCT/US 2012/023696中详述的那些)下繁殖。由干燥生物质制备脂质样品并使用如实例1中所描述(也参看PCT/US 2012/023696)的脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化检测法进行分析。以葡萄糖作为唯一碳源繁殖的桑椹型无绿藻UTEX 1435的J品系以及以蔗糖作为唯一碳源繁殖的J品系每次转化的代表性分离株的脂肪酸谱(以占总脂肪酸的面积%表示)呈现于表33中。

[0449] 表33.工程改造成过表达外源酰基-ACP硫酯酶的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)J品系细胞的脂肪酸谱。

			脂肪酸面积%					
品系	质粒构建体	数量	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3α
A	无	1	1.08	25.48	3.23	59.70	8.25	0.70
J	无	1	1.41	27.33	3.38	57.07	8.15	0.64
A	pSZD581	1	1.02	26.60	14.47	44.80	10.05	0.65
		2	1.08	28.24	13.57	43.89	10.07	0.68
		3	0.97	24.70	9.13	50.85	11.27	0.82
A	pSZD643	1	1.39	26.97	16.21	44.10	8.43	0.83
		2	1.37	27.91	11.15	48.31	8.40	0.78
A	pSZD645	1	0.90	23.39	8.35	50.69	13.34	0.96
A	pSZD644	1	1.67	19.70	4.40	59.15	12.32	1.01
J	pSZD1323	1	1.33	23.26	9.28	53.42	10.35	0.69
		2	1.47	26.84	7.36	52.78	9.29	0.64
		3	1.43	26.31	6.05	54.45	9.37	0.66
J	pSZD1320	1	1.30	24.76	3.84	60.90	6.96	0.55
		2	1.36	26.30	3.27	58.19	8.66	0.48
		3	1.39	25.51	3.18	58.78	8.85	0.45

[0450] 表33中呈现的数据显示出外源酰基-ACP酶的表达明显地影响转化的微生物的脂肪酸谱。未转化的A品系和J品系的脂肪酸谱为约25％的C16:0、约3.3％的C18:0、约57％到60％的C18:1。相比之下，用表达酰基-ACP酶的不同质粒构建体转化的A品系的脂肪酸谱包含比A品系更高百分含量水平的C18:0和更低百分含量水平的C18:1脂肪酸。A品系或J品系中来自油菜、红花、蓖麻及山竹的FATA酶的表达能够使转化有机体中硬脂酸酯水平积累。相对于A品系的脂肪酸谱，油菜酰基-ACP硫酯酶过表达的结果是在转化有机体的脂肪酸谱的C18:0脂肪酸百分含量水平方面有约2到5倍增加。工程改造成过表达山竹酰基-ACP FATA硫酯酶并具有原始小球藻SAD1转运肽的细胞的脂肪酸谱以相对于J品系的脂肪酸谱，转化有机体的脂肪酸谱在C18:0脂肪酸的百分含量水平有约2到3倍增加为特征。

[0451] 这些数据说明了编码在桑椹型无绿藻(UTEX 1435)中表达的脂肪酰基-ACP硫酯酶的多核苷酸在改变工程改造的微生物的脂肪酸谱方面，并且特别是在使重组微生物细胞中C18:0浓度增加并使C18:1脂肪酸减少方面的效用和有效应用。

实例42:通过延长酶或Β-酮酰基-COA合酶过表达对微生物进行工程改造以增加芥酸的产生

[0452] 在本发明的一个实施例中，对可操作以在任选地质体产油微生物中表达外源延长酶或β-酮酰基-CoA合酶的重组多核苷酸转化载体进行构建并采用该载体，根据如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述的生物射弹转化法转化桑椹型无绿藻(UTEX 1435)以获得芥酸产生增加的细胞。该转化载体包括一种过表达延长酶或β-酮酰基-CoA合酶的蛋白质编码区(如表5中所列的那些)；用以调控该外源基因表达的启动子和3’UTR控制序列；靶向用于整合到桑椹型无绿藻(UTEX 1435)核基因组中的重组多核苷酸的5’和3’同源重组靶向序列；以及

可操作以表达一种可选择标记物的核苷酸。对转化载体的蛋白质编码序列进行密码子优化以在桑椹型无绿藻(UTEX 1435)中表达，如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所描述。在此并且在PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中披露了编码可操作以在桑椹型无绿藻(UTEX 1435)中表达的启动子、3'UTR及可选择标记物的重组多核苷酸。

[0453] 在将转化载体转化至桑椹型无绿藻(UTEX 1435)或桑椹型无绿藻(UTEX 1435)的经典诱变品系中之后，在琼脂平板上选择阳性克隆。对个别转化子以克隆方式进行纯化并在适合脂质产生的异养条件下培养，如PCT/US 2009/066141、PCT/US 2009/066142、PCT/US 2011/038463、PCT/US 2011/038464及PCT/US 2012/023696中所详述。由来自每个转化子的干燥生物质制备脂质样品并使用如实例1中所描述的脂肪酸甲酯气相色谱火焰离子化(FAME GC/FID)检测法分析这些样品中的脂肪酸谱。作为这些操作的结果，该细胞可以展现出芥酸增加至少5、10、15或20倍。

实例43:通过正萼距花PSR23LPAAT的表达在品系UTEX1435中产生富含癸酸、月桂酸及肉豆蔻酸的油

[0454] 在先前描述的表达来自赖特萼距花的酰基ACP硫酯酶(FATB2)的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)转基因品系中测试了两种1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶(LPAATs)的表达的影响。通过分析衍生自种子RNA的CuPSR23基因组序列和转录组序列的组合来鉴别来自正萼距花PSR23(CuPSR23)的LPAAT2和LPAAT3基因。先前未描述该两种LPAAT。对这些基因进行密码子优化以反映UTEX 1435密码子用法。转化、细胞培养、脂质产生及脂肪酸分析都是如先前所描述进行。

[0455] 通过表达正萼距花PSR23 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶(LPAAT2和LPAAT3)[对应地为pSZ2299和pSZ2300]来增加B品系中癸酸、月桂酸及肉豆蔻酸的积累:在本实例中，经由用对应地编码CuPSR23LPAAT2和LPAAT3的构建体pSZ2299或pSZ2300转化来产生转基因品系。关于针对抗生素G418的抗性来选择这些转基因品系。构建体pSZ2299可以写为pLOOP5'::CrTUB2:NeoR:CvNR::PmAMT3:CuPSR23LPAAT2-1:CvNR::pLOOP3'。构建体pSZ2300可以写为pLOOP5'::CrTUB2:NeoR:CvNR::PmAMT3:CuPSR23LPAAT3-1:CvNR::pLOOP3'。转化用DNA(pSZ2299和pSZ2300)的序列提供于下。从5'-3'，该构建体中的相关限制性位点BspQI、KpnI、XbaI、Mfe I、BamHI、EcoRI、SpeI、XhoI、SacI、BspQI对应地以小写字母、粗体并加下划线指示。BspQI位点界定转化用DNA的5'和3'端。在该构建体的5'和3'端处的粗体、小写字母序列代表经由同源重组靶向整合至pLoop基因座的来自UTEX 1435的基因组DNA。沿5'到3'方向继续向前，，选择盒具有驱使NeoR基因(赋予对G418的抗性)表达的莱氏衣藻β-微管蛋白启动子和普通小球藻硝酸还原酶(NR)基因3'UTR。该启动子是以小写字母、带框文本指示。NeoR的起始子ATG和终止子TGA由大写字母斜体指示，同时编码区以小写字母斜体指示。3'UTR由小写字母加下划线文本指示。在两个盒之间的间隔子区由大写字母文本指示。含有密码子优化的来自正萼距花PSR23的LPAAT2基因(pSZ2299)或LPAAT3基因(pSZ2300)的第二盒是由桑椹型无绿藻内源AMT3启动子驱动并且具有相同的普通小球藻硝酸还原酶(NR)基因3'UTR。在这一盒中，AMT3启动子是由小写字母、带框文本指示。CuPSR23LPAAT2和LPAAT3基因的起始子ATG和终止子TGA是以大写字母斜体指示，同时编码区由小写

字母斜体指示。3'UTR由小写字母加下划线文本指示。对这些最终的构建体进行测序以确保正确的阅读框和靶向序列。

[0456] pSZ2299转化用构建体

gctcttccgctaacggaggtctgtcaccaaatggaccccgtctattgcgggaaaccacggcgatggcacgtttca
aaacttgatgaaatacaatattcagtatgtcgcgggcggcgacggcggggagctgatgtcgcgctgggtattgct
taatcgccagcttcgccccgtcttggcgcgaggcgtgaacaagccgaccgatgtgcacgagcaaatcctgaca
ctagaagggctgactcgcccggcacggctgaattacacaggcttgcaaaaataccagaatttgcacgcaccgta
ttcgcggtattttgttggacagtgaatagcgatgcggcaatggcttgtggcgttagaaggtgcgacgaaggtggt
gccaccactgtgccagccagtcctggcggctcccagggccccgatcaagagccaggacatccaaactacccac
agcatcaacgccccggcctatactcgaaccccacttgcactctgcaatggtatgggaaccacggggcagtcttgt
gtgggtcgcgcctatcgcggtcggcgaagaccgggaaggtaccctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggta
gggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccccgaagctccttcggggc
tgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagacattatagcg
agctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgcactccgcta
aggggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**tctaga**atatca*ATGatcgagcaggacggcctcc*
acgccggctcccccgccgcctgggtggagcgcctgttcggctacgactgggcccagcagaccatcggctgctccg
acgccgccgtgttccgcctgtccgcccagggccgccccgtgctgttcgtgaagaccgacctgtccggcgccctgaac
gagctgcaggacgaggccgcccgcctgtcctggctggccaccaccggcgtgccctgcgccgccgtgctggacgtg
gtgaccgaggccggccgcgactggctgctgctgggcgaggtgcccggccaggacctgctgtcctcccacctggcc
cccgccgagaaggtgtccatcatggccgacgccatgcgccgcctgcacaccctggaccccgccacctgccccttcg
accaccaggccaagcaccgcatcgagcgcgcccgcacccgcatggaggccggcctggtggaccaggacgacct

ggacgaggagcaccagggcctggcccccgccgagctgttcgcccgcctgaaggcccgcatgcccgacggcgag

gacctggtggtgacccacggcgacgcctgcctgcccaacatcatggtggagaacggccgcttctccggcttcatcg

actgcggccgcctgggcgtggccgaccgctaccaggacatcgccctggccacccgcgacatcgccgaggagctg

ggcggcgagtgggccgaccgcttcctggtgctgtacggcatcgccgcccccgactcccagcgcatcgccttctacc

*gcctgctggacgagttcttcTGA***caattg**gcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgt

gatggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatc

ttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatccccttccctcgtttcatat

cgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgca

cagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagt

agtgggatgggaacacaaatgga**ggatcc**CGCGTCTCGAACAGAGCGCGCAGAGGAAC

GCTGAAGGTCTCGCCTCTGTCGCACCTCAGCGCGGCATACACCACAATA

ACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTAGCGAAGCGTCCGG

TTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGATCGGTGG

AGCTGATGGTCGAAACGTTCACAGCCTAGGGATATC**gaattc***ggccgacaggacg*

cgcgtcaaaggtgctggtcgtgtatgccctggccggcaggtcgttgctgctgctggttagtgattccgcaaccctgattt

tggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgcccgcgagccgggccggcggcgatgcggtgccccacggctgcc

ggaatccaagggaggcaagagcgcccgggtcagttgaagggctttacgcgcaaggtacagccgctcctgcaagg

ctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccaccgcctcaccagcggacaaagcaccggtgtat

caggtccgtgtcatccactctaaagagctcgactacgacctactgatggccctagattcttcatcaaaaacgcctgag

acacttgcccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggccctgagttgttccttcccccgtggcgagctgc

cagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcaggac

agctcatgaaacgccaacaatcgcacaattcatgtcaagctaatcagctatttcctcttcacgagctgtaattgtccca

aaattctggtctaccgggggtgatccttcgtgtacgggcccttccctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtcgccg

cgcaactcgcgcgagggccgagggtttgggacgggccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcacctt

ttttgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtaggattt

cgtaatcattcgtcctgatggggagctaccgactaccctaatatcagcccgactgcctgacgccagcgtccacttttgt

gcacacattccattcgtgcccaagacatttcattgtggtgcgaagcgtccccagttacgctcacctgtttcccgacctcc

*ttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggtcgcagcc***actagt***ATGgcgatcgcggccgcggcggtg*

atcttcctgttcggcctgatcttcttcgcctccggcctgatcatcaacctgttccaggcgctgtgcttcgtcctgatccgcc

ccctgtccaagaacgcctaccgccgcatcaaccgcgtgttcgcggagctgctgctgtccgagctgctgtgcctgttcg

actggtgggcgggcgcgaagctgaagctgttcaccgaccccgagacgttccgcctgatgggcaaggagcacgcc
ctggtcatcatcaaccacatgaccgagctggactggatggtgggctgggtgatgggccagcacttcggctgcctgg
gctccatcatctccgtcgccaagaagtccacgaagttcctgcccgtgctgggctggtccatgtggttctccgagtacct
gtacctggagcgctcctgggccaaggacaagtccaccctgaagtcccacatcgagcgcctgatcgactacccccctg
cccttctggctggtcatcttcgtcgagggcacccgcttcacgcgcacgaagctgctggcggcccagcagtacgcggt
ctcctccggcctgcccgtcccccgcaacgtcctgatcccccgcacgaagggcttcgtctcctgcgtgtcccacatgcg
ctccttcgtccccgcggtgtacgacgtcacggtggcgttccccaagacgtccccccccccccacgctgctgaacctgtt
cgagggccagtccatcatgctgcacgtgcacatcaagcgccacgccatgaaggacctgcccgagtccgacgacg
ccgtcgcggagtggtgccgcgacaagttcgtcgagaaggacgccctgctggacaagcacaacgcggaggacac
gttctccggccaggaggtgtgccactccggctcccgccagctgaagtccctgctggtcgtgatctcctgggtcgtggt
gacgacgttcggcgccctgaagttcctgcagtggtcctcctggaagggcaaggcgttctccgccatcggcctgggca
tcgtcaccctgctgatgcacgtgctgatcctgtcctcccaggccgagcgctccaaccccgccgaggtggcccaggcc
*aagctgaagaccggcctgtccatctccaagaaggtgacggacaaggagaacTGAttaattaa***ctcgag**gcagc
agcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgt
gaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgc
tatttgcgaataccacccccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctg
ctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtact
gcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagctt**gagctc**
agcggcgacggtcctgctaccgtacgacgttgggcacgcccatgaaagtttgtataccgagcttgttgagcgaac
tgcaagcgcggctcaaggatacttgaactcctggattgatatcggtccaataatggatggaaaatccgaacctcg
tgcaagaactgagcaaacctcgttacatggatgcacagtcgccagtccaatgaacattgaagtgagcgaactgt
tcgcttcggtggcagtactactcaaagaatgagctgctgttaaaaatgcactctcgttctctcaagtgagtggcag
atgagtgctcacgccttgcacttcgctgcccgtgtcatgccctgcgccccaaaatttgaaaaaagggatgagatt
attgggcaatggacgacgtcgtcgctccgggagtcaggaccggcggaaaataagaggcaacacactccgcttc
ttagctcttcg（SEQ ID NO:90）

[0457] pSZ2300转化用构建体

gctcttccgctaacggaggtctgtcaccaaatggaccccgtctattgcgggaaaccacggcgatggcacgtttca
aaacttgatgaaatacaatattcagtatgtcgcgggcggcgacggcggggagctgatgtcgcgctgggtattgct
taatcgccagcttcgccccccgtcttggcgcgaggcgtgaacaagccgaccgatgtgcacgagcaaatcctgaca
ctagaagggctgactcgcccggcacggctgaattacacaggcttgcaaaaataccagaatttgcacgcaccgta

ttcgcggtattttgttggacagtgaatagcgatgcggcaatggcttgtggcgttagaaggtgcgacgaaggtggt
gccaccactgtgccagccagtcctggcggctcccagggccccgatcaagagccaggacatccaaactacccac
agcatcaacgccccggcctatactcgaaccccacttgcactctgcaatggtatgggaaccacggggcagtcttgt
gtgggtcgcgcctatcgcggtcggcgaagaccgggaaggtaccctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggta
gggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccccgaagctccttcggggc
tgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagacattatagcg
agctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgcactccgcta
agggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**tctaga**atatca*ATGatcgagcaggacggcctcc*
acgccggctcccccgccgcctgggtggagcgcctgttcggctacgactgggcccagcagaccatcggctgctccg
acgccgccgtgttccgcctgtccgcccagggccgccccgtgctgttcgtgaagaccgacctgtccggcgccctgaac
gagctgcaggacgaggccgcccgcctgtcctggctggccaccaccggcgtgccctgcgccgccgtgctggacgtg
gtgaccgaggccggccgcgactggctgctgctgggcgaggtgcccggccaggacctgctgtcctcccacctggcc
cccgccgagaaggtgtccatcatggccgacgccatgcgccgcctgcacaccctggaccccgccacctgccccttcg
accaccaggccaagcaccgcatcgagcgcgcccgcacccgcatggaggccggcctggtggaccaggacgacct
ggacgaggagcaccagggcctggcccccgccgagctgttcgcccgcctgaaggcccgcatgcccgacggcgag
gacctggtggtgacccacggcgacgcctgcctgcccaacatcatggtggagaacggccgcttctccggcttcatcg
actgcggccgcctgggcgtggccgaccgctaccaggacatcgccctggccacccgcgacatcgccgaggagctg
ggcggcgagtgggccgaccgcttcctggtgctgtacggcatcgccgcccccgactcccagcgcatcgccttctacc
*gcctgctggacgagttcttcTGA***caattg**gcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgt
gatggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatc
ttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccctttccctcgtttcatat
cgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgca
cagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagt
agtgggatgggaacacaaatgga**ggatcc**CGCGTCTCGAACAGAGCGCGCAGAGGAAC
GCTGAAGGTCTCGCCTCTGTCGCACCTCAGCGCGGCATACACCACAATA
ACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTAGCGAAGCGTCCGG
TTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGATCGGTGG
AGCTGATGGTCGAAACGTTCACAGCCTAGGGATATC**gaattc***ggccgacaggacg*
cgcgtcaaaggtgctggtcgtgtatgccctggccggcaggtcgttgctgctgctggttagtgattccgcaaccctgattt
tggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgcccgcgagccgggccggcggcgatgcggtgccccacggctgcc

ggaatccaagggaggcaagagcgcccgggtcagttgaagggctttacgcgcaaggtacagccgctcctgcaagg

ctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccaccgcctcaccagcggacaaagcaccggtgtat

caggtccgtgtcatccactctaaagagctcgactacgacctactgatggccctagattcttcatcaaaaacgcctgag

acacttgcccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggccctgagttgttccttcccccgtggcgagctgc

cagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcaggac

agctcatgaaacgccaacaatcgcacaattcatgtcaagctaatcagctatttcctcttcacgagctgtaattgtccca

aaattctggtctaccgggggtgatccttcgtgtacgggcccttccctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtcgccg

cgcaactcgcgcgagggccgagggtttgggacgggccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcacctt

ttttgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtaggattt

cgtaatcattcgtcctgatggggagctaccgactaccctaatatcagcccgactgcctgacgccagcgtccacttttgt

gcacacattccattcgtgcccaagacatttcattgtggtgcgaagcgtccccagttacgctcacctgtttcccgacctcc

*ttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggtcgcagcc***actagt***ATGgccatcgcggcggccgcggtg*

atcgtgcccctgtccctgctgttcttcgtgtccggcctgatcgtcaacctggtgcaggccgtctgcttcgtcctgatccgc

cccctgtccaagaacacgtaccgccgcatcaaccgcgtggtcgcggagctgctgtggctggagctggtgtggctga

tcgactggtgggcgggcgtgaagatcaaggtcttcacggaccacgagacgttccacctgatgggcaaggagcacg

ccctggtcatctgcaaccacaagtccgacatcgactggctggtcggctgggtcctgggccagcgctccggctgcctg

ggctccaccctggcggtcatgaagaagtcctccaagttcctgcccgtcctgggctggtccatgtggttctccgagtacc

tgttcctggagcgctcctgggccaaggacgagatcacgctgaagtccggcctgaaccgcctgaaggactacccccct

gcccttctggctggcgctgttcgtggagggcacgcgcttcacccgcgcgaagctgctggcggcgcagcagtacgcc

gcgtcctccggcctgcccgtgccccgcaacgtgctgatcccccgcacgaagggcttcgtgtcctccgtgtcccacatg

cgctccttcgtgcccgcgatctacgacgtcaccgtggccatccccaagacgtccccccccccccacgctgatccgcat

gttcaagggccagtcctccgtgctgcacgtgcacctgaagcgccacctgatgaaggacctgcccgagtccgacga

cgccgtcgcgcagtggtgccgcgacatcttcgtggagaaggacgcgctgctggacaagcacaacgccgaggaca

ccttctccggccaggagctgcaggagaccggccgccccatcaagtccctgctggtcgtcatctcctgggccgtcctg

gaggtgttcggcgccgtcaagttcctgcagtggtcctccctgctgtcctcctggaagggcctggcgttctccggcatcg

gcctgggcgtgatcaccctgctgatgcacatcctgatcctgttctcccagtccgagcgctccacccccgccaaggtgg

*ccccccgcgaagcccaagaacgagggcgagtcctccaagaccgagatggagaaggagaagTGAttaattaa***ct**

cgaggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctg

ccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgcta

gctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatcta

cgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtatt
ctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaa
gctt**gagctc**agcggcgacggtcctgctaccgtacgacgttgggcacgcccatgaaagtttgtataccgagcttgt
tgagcgaactgcaagcgcggctcaaggatacttgaactcctggattgatatcggtccaataatggatggaaaat
ccgaacctcgtgcaagaactgagcaaacctcgttacatggatgcacagtcgccagtccaatgaacattgaagtg
agcgaactgttcgcttcggtggcagtactactcaaagaatgagctgctgttaaaaatgcactctcgttctctcaag
tgagtggcagatgagtgctcacgccttgcacttcgctgcccgtgtcatgccctgcgccccaaaatttgaaaaaag
ggatgagattattgggcaatggacgacgtcgtcgctccgggagtcaggaccggcggaaaataagaggcaaca
cactccgcttcttag**ctcttcg**（SEQ ID NO:91）

[0458] 为了确定CuPSR23 LPAAT2和LPAAT3基因对中链脂肪酸积累的影响，将由UTEX 1453 AMT3启动子驱动的含有密码子优化的CuPSR23 LPAAT2或LPAAT3基因的以上构建体转化至B品系中。

[0459] 对初级转化子以克隆方式纯化并使其在pH 7.0下于标准脂质产生条件下生长(所有品系都需要在pH 7.0下生长以允许受pH调控的AMT3启动子驱动的CuPSR23 LPAAT2或LPAAT3基因的最大表达)。由来源于这些转化的一组代表性克隆得到的谱显示于下表34中。D1520表示带有CuPSR23 LPAAT2的B品系克隆并且D1521表示带有CuPSR23 LPAAT3的B品系克隆。

[0460] 表34.用pSZ2299和pSZ2300 DNA转化的B品系以及代表性转基因株的脂肪酸谱。

样品 ID	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
B 品系	4.83	28.54	15.64	12.64	1.3	27.99	7.75
样品 ID	**C10:0**	**C12:0**	**C14:0**	**C16:0**	**C18:0**	**C18:1**	**C18:2**
D1520-A	8.59	35.09	16.55	11.96	1.69	19.49	5.59
D1520-B	8.13	33.93	16.46	12.44	1.57	20.66	5.96
D1520-C	7.6	33.1	16.21	12.65	1.5	21.41	6.48
D1520-D	7.35	32.54	16.03	12.79	1.67	22.16	6.41
D1520-E	7.28	32.21	16.2	12.99	1.73	22.39	6.28
样品 ID	**C10:0**	**C12:0**	**C14:0**	**C16:0**	**C18:0**	**C18:1**	**C18:2**
D1521-A	6.14	31.5	15.98	12.96	1.96	22.52	8
D1521-B	6.17	31.38	15.98	12.87	2.08	22.54	7.92
D1521-C	5.99	31.31	15.75	12.79	2.23	22.45	8.36
D1521-D	5.95	31.05	15.71	12.84	2.48	22.69	8.32
D1521-E	5.91	30.58	15.85	13.22	1.97	23.55	7.84

[0461] 转基因CuPSR23 LPAAT2品系(D1520A-E)显示出C10:0、C12:0及C14:0脂肪酸积累的显著增加以及C18:1和C18:2的伴随减少。转基因CuPSR23 LPAAT3品系(D1521A-E)显示出C10:0、C12:0及C14:0脂肪酸积累的显著增加以及C18:1的伴随减少。这些转基因株中CuPSR23 LPAAT的表达看来直接地负责总体上中链脂肪酸并且尤其是月桂酸酯积累的增加。尽管这些转基因株显示出从更长链的脂肪酸(C16:0及以上)向中链脂肪酸的转变，但该转变主要地针对C10:0和C12:0脂肪酸并且对C14:0脂肪酸具有微小影响。所呈现的数据显示，来自正萼距花PSR23 LPAAT2和LPAAT3基因与来自赖特萼距花的FATB2的共表达(在B品系中表达)对于C12:0脂肪酸的积累具有加和效应。

[0462] 我们的结果表明,来自正萼距花PSR23的LPAAT酶在衍生自UTEX 1435的藻类品系中具有活性。这些结果还证实,该酶结合在B品系中表达的异源FatB2酰基-ACP硫酯酶(来自赖特萼距花)起作用。

实例44:通过表达正萼距花PSR23 LPAATX结合赖特萼距花FATB2来改变UTEX1435品系中的脂肪酸水平

[0463] 此处我们证实了在先前描述的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)转基因品系B品系中表达1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶(LPAAT)的影响。如以上所描述,B品系是表达来自赖特萼距花的酰基ACP硫酯酶(FATB2)的一种转基因品系,该品系积累介于40%到49%之间的C12:0脂肪酸。另外参看实例43,通过对衍生自种子RNA的CuPSR23基因组序列和转录组序列的组合进行分析来鉴别第三CuPSR23 LPAAT,LPAATx。因此,中链特异性LPAAT的表达应当使在sn-2位置处具有癸酸(C10:0脂肪酸)、月桂酸(C12:0脂肪酸)或肉豆蔻酸(C14:0脂肪酸)的TAG的百分含量增加,并且应当由此提高这些脂肪酸的总体水平。在实例43中,经显示,LPAAT2和LPAAT3可增加B品系中癸酸酯、月桂酸酯及肉豆蔻酸酯的积累。将LPAATx引入B品系中以确定它对这一品系中脂肪酸水平的影响。对LPAATx基因进行密码子优化以反映UTEX 1435密码子用法。转化、细胞培养、脂质产生及脂肪酸分析都是如先前所描述进行。

[0464] 通过表达正萼距花PSR23 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶(LPAATx)[pSZ2575]:使B品系中癸酸酯、月桂酸酯及肉豆蔻酸酯积累减少并使棕榈酸酯和硬脂酸酯积累增加在本实例中,经由用编码CuPSR23LPAATx的构建体pSZ2575转化B品系来产生转基因品系。关于针对抗生素G418的抗性来选择这些转基因品系。构建体pSZ2575可以写为pLOOP5'::CrTUB2:NeoR:CvNR::PmAMT3:CuPSR23LPAATx:CvNR::pLOOP3'。转化用DNA的序列提供于下(pSZ2575)。从5'-3',该构建体中的相关限制性位点BspQ1、KpnI、XbaI、MfeI、BamHI、EcoRI、SpeI、XhoI、SacI、BspQ1对应地以小写字母、粗体并加下划线指示。BspQI位点界定转化用DNA的5'和3'端。在该构建体的5'和3'端处的粗体、小写字母序列代表经由同源重组靶向整合至pLoop基因座的来自UTEX 1435的基因组DNA。沿5'到3'方向继续向前,,选择盒具有驱使NeoR基因(赋予对G418的抗性)表达的莱氏衣藻β-微管蛋白启动子和普通小球藻硝酸还原酶(NR)基因3'UTR。该启动子是以小写字母、带框文本指示。NeoR的起始子ATG和终止子TGA由大写字母斜体指示,同时编码区以小写字母斜体指示。3'UTR由小写字母加下划线文本指示。在两个盒之间的间隔子区由大写字母文本指示。含有密码子优化的来自正萼距花PSR23的LPAATx基因(pSZ2575)的第二盒是由桑椹型无绿藻内源AMT3启动子驱动并且具有相同的普通小球藻硝酸还原酶(NR)基因3'UTR。在这一盒中,AMT3启动子是由小写字母、带框文本指示。CuPSR23 LPAATx基因的起始子ATG和终止子TGA是以大写字母斜体指示,同时编码区由小写字母斜体指示。3'UTR由小写字母加下划线文本指示。对该最终的构建体进行测序以确保正确的阅读框和靶向序列。

[0465] pSZ2575转化用构建体

gctcttccgctaacggaggtctgtcaccaaatggaccccgtctattgcgggaaaccacggcgatggcacgtttca
aaacttgatgaaatacaatattcagtatgtcgcgggcggcgacggcggggagctgatgtcgcgctgggtattgct
taatcgccagcttcgccccccgtcttggcgcgaggcgtgaacaagccgaccgatgtgcacgagcaaatcctgaca
ctagaagggctgactcgcccggcacggctgaattacacaggcttgcaaaaataccagaatttgcacgcaccgta
ttcgcggtattttgttggacagtgaatagcgatgcggcaatggcttgtggcgttagaaggtgcgacgaaggtggt
gccaccactgtgccagccagtcctggcggctcccagggccccgatcaagagccaggacatccaaactacccac
agcatcaacgccccggcctatactcgaaccccacttgcactctgcaatggtatgggaaccacggggcagtcttgt
gtgggtcgcgcctatcgcggtcggcgaagaccgggaaggtaccctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggta
gggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgaccccccgaagctccttcggggc
tgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagacattatagcg
agctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgcactccgcta
aggggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**tctaga**atatca*ATGatcgagcaggacggcctcc*
acgccggctcccccgccgcctgggtggagcgcctgttcggctacgactgggcccagcagaccatcggctgctccg
acgccgccgtgttccgcctgtccgcccagggccgccccgtgctgttcgtgaagaccgacctgtccggcgccctgaac
gagctgcaggacgaggccgcccgcctgtcctggctggccaccaccggcgtgccctgcgccgccgtgctggacgtg
gtgaccgaggccggccgcgactggctgctgctgggcgaggtgcccggccaggacctgctgtcctcccacctggcc

cccgccgagaaggtgtccatcatggccgacgccatgcgccgcctgcacaccctggaccccgccacctgccccttcg

accaccaggccaagcaccgcatcgagcgcgcccgcacccgcatggaggccggcctggtggaccaggacgacct

ggacgaggagcaccagggcctggcccccgccgagctgttcgcccgcctgaaggcccgcatgcccgacggcgag

gacctggtggtgacccacggcgacgcctgcctgcccaacatcatggtggagaacggccgcttctccggcttcatcg

actgcggccgcctgggcgtggccgaccgctaccaggacatcgccctggccacccgcgacatcgccgaggagctg

ggcggcgagtgggccgaccgcttcctggtgctgtacggcatcgccgcccccgactcccagcgcatcgccttctacc

*gcctgctggacgagttcttcTGA***caattg**gcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgt

gatggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatc

ttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatccccttccctcgtttcatat

cgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgca

cagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagt

agtgggatgggaacacaaatgga**ggatcc**CGCGTCTCGAACAGAGCGCGCAGAGGAAC

GCTGAAGGTCTCGCCTCTGTCGCACCTCAGCGCGGCATACACCACAATA

ACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTAGCGAAGCGTCCGG

TTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGATCGGTGG

AGCTGATGGTCGAAACGTTCACAGCCTAGGGATATC**gaattc***ggccgacaggacg*

cgcgtcaaaggtgctggtcgtgtatgccctggccggcaggtcgttgctgctgctggttagtgattccgcaaccctgattt

tggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgcccgcgagccgggccggcggcgatgcggtgccccacggctgcc

ggaatccaagggaggcaagagcgcccgggtcagttgaagggctttacgcgcaaggtacagccgctcctgcaagg

ctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccaccgcctcaccagcggacaaagcaccggtgtat

caggtccgtgtcatccactctaaagagctcgactacgacctactgatggccctagattcttcatcaaaaacgcctgag

acacttgcccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggccctgagttgttccttcccccgtggcgagctgc

cagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcaggac

agctcatgaaacgccaacaatcgcacaattcatgtcaagctaatcagctatttcctcttcacgagctgtaattgtccca

aaattctggtctaccgggggtgatccttcgtgtacgggcccttccctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtcgccg

cgcaactcgcgcgagggccgagggtttgggacgggccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcaccttt

ttttgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtaggattt

cgtaatcattcgtcctgatggggagctaccgactaccctaatatcagcccgactgcctgacgccagcgtccacttttgt

gcacacattccattcgtgcccaagacatttcattgtggtgcgaagcgtccccagttacgctcacctgtttcccgacctcc

*ttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggtcgcagcc***actagt***ATGgagatccccccccactgcctgt*

gctccccctccccgcccccctcccagctgtactacaagaagaagaagcacgccatcctgcagacccagacccct
accgctaccgcgtgtcccccacctgcttcgcccccccccgcctgcgcaagcagcacccctaccccctgcccgtgctg
tgctaccccaagctgctgcacttctcccagccccgctacccccctggtgcgctcccacctggccgaggccggcgtggc
ctaccgccccggctacgagctgctgggcaagatccgcggcgtgtgcttctacgccgtgaccgccgccgtggccctg
ctgctgttccagtgcatgctgctgctgcacccccttcgtgctgctgttcgacccccttccccgcaaggcccaccacacca
tcgccaagctgtggtccatctgctccgtgtccctgttctacaagatccacatcaagggcctggagaacctgccccccc
cccactcccccgccgtgtacgtgtccaaccaccagtccttcctggacatctacaccctgctgaccctgggccgcacct
tcaagttcatctccaagaccgagatcttcctgtaccccatcatcggctgggccatgtacatgctgggcaccatccccct
gaagcgcctggactcccgctcccagctggacaccctgaagcgctgcatggacctgatcaagaagggcgcctccgt
gttcttcttccccgagggcacccgctccaaggacggcaagctgggcgccttcaagaagggcgccttctccatcgccg
ccaagtccaaggtgcccgtggtgcccatcaccctgatcggcaccggcaagatcatgcccccggctccgagctga
ccgtgaaccccggcaccgtgcaggtgatcatccacaagcccatcgagggctccgacgccgaggccatgtgcaac
*gaggcccgcgccaccatctcccactccctggacgacTGAttaattaa***ctcgag**gcagcagcagctcggatagtatc
gacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgctttt
atcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccaccc
ccagcatccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgct
cctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaaaccagc
actgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagctt**gagctcagcggcgacggtcctg**
ctaccgtacgacgttgggcacgcccatgaaagtttgtataccgagcttgttgagcgaactgcaagcgcggctcaa
ggatacttgaactcctggattgatatcggtccaataatggatggaaaatccgaacctcgtgcaagaactgagca
aacctcgttacatggatgcacagtcgccagtccaatgaacattgaagtgagcgaactgttcgcttcggtggcagt
actactcaaagaatgagctgctgttaaaaatgcactctcgttctctcaagtgagtggcagatgagtgctcacgcct
tgcacttcgctgcccgtgtcatgccctgcgccccaaaatttgaaaaaagggatgagattattgggcaatggacga
cgtcgtcgctccgggagtcaggaccggcggaaaataagaggcaacacactccgcttcttagctcttcg（SEQ
ID NO:92）

[0466] 为了确定CuPSR23 LPAATx基因对脂肪酸积累的影响，将由UTEX 1453 AMT3启动子驱动的含有密码子优化的CuPSR23 LPAATx基因的以上构建体转化至B品系中。

[0467] 对初级转化子以克隆方式纯化并使其在pH 7.0下于低氮条件下生长；这些品系需要在pH 7.0下生长以允许受pH调控的AMT3启动子驱动的CuPSR23 LPAATx和CwFATB2基因的最大表达。由来源于这些转化的一组代表性克隆得到的谱显示于下表35中。D1542表示带有CuPSR23 LPAATx的B品系克隆。

[0468] 表35.用pSZ2575转化的B品系以及代表性转基因株的脂肪酸谱。

样品 ID	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
B品系	4.77	28.63	15.48	12.65	1.28	28.20	7.57

样品 ID	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
D1542-A	1.19	13.25	10.48	21.34	4.49	32.07	14.78
D1542-B	1.15	14.01	10.62	20.61	3.99	32.12	15.24
D1542-C	1.21	13.69	10.83	20.40	3.59	33.54	15.05
D1542-D	1.56	16.83	11.51	18.44	2.94	33.97	12.74
D1542-E	2.15	18.58	11.94	18.22	3.17	32.63	11.62

[0469] 转基因CuPSR23 LPAATx品系(D1542A-E)显示出C10:0、C12:0及C14:0脂肪酸的积累相对于亲本B品系显著减少以及C16:0、C18:0、C18:1及C18:2的伴随增加。这些转基因株中CuPSR23 LPAATx基因的表达看来直接地负责中链脂肪酸(C10-C14)的积累减少以及C16:0和C18脂肪酸积累的增加,其中观察到的棕榈酸酯(C16:0)增加最明显。所呈现的数据还显示,尽管有来自赖特蓖距花的中链特异性FATB2表达(存在于B品系中),但CuPSR23 LPAATx的表达看来有利于更长链的脂肪酸并入TAG中。

[0470] 我们的结果表明,来自正蓖距花PSR23的LPAATx酶在衍生自UTEX 1435的藻类品系中具有活性。与使中链脂肪酸水平增加的正蓖距花PSR23 LPAAT2和LPAAT3相反,CuPSR23 LPAATx导致C16:0和C18:0水平增加。这些结果证实,衍生自CuPSR23的不同LPAAT(LPAAT2、LPAAT3及LPAATx)在B品系中展现不同的脂肪酸特异性(如通过它们对总体脂肪酸水平的影响所判断)。

实例45:由过表达内源微藻FATA酰基-ACP硫酯酶引起的脂肪酸谱链长度减小

[0471] 此处,我们证实了,在UTEX 1435中过表达桑椹型无绿藻内源硫酯酶FATA1引起细胞三酸甘油酯C18:0和C18:1酰基链的明显减少以及C16:0、C14:0的增加。

[0472] 用于过表达桑椹型无绿藻FATA1基因的构建体(pSZ2422,pSZ2421):为了在桑椹型无绿藻J品系中过表达PmFATA1,将密码子优化的PmFATA1基因转化至J品系中。利用酿酒酵母转化酶基因作为可选择标记物以赋予在蔗糖培养基上生长的能力。已经在J品系中表达的构建体pSZ2422可以写为:6SA::CrTUB2-ScSUC2-CvNR3':PmAMT3-Pm FATA1(opt)-CvNR3'::6SB,并且构建体pSZ2421可以写为6SA::CrTUB2-ScSUC2-CvNR3':PmAMT3-S106SADTP-Pm FATA1(opt)-CvNR3'::6SB。

[0473] 转化用DNA的序列提供于下。构建体pSZ2422中的相关限制性位点以小写字母、粗体和加下划线指示并且对应地为:5'-3'BspQ 1、Kpn I、Xba I、Mfe I、BamH I、EcoR I、Spe I、Asc I、Cla I、Sac I、BspQ I。BspQI位点界定转化用DNA的5'和3'端。粗体、小写字母序列代表来自J品系的允许经由同源重组在6s基因座处靶向整合的基因组DNA。沿5'至3'方向,

通过加框文本指示驱动酵母蔗糖转化酶基因(赋予J品系代谢蔗糖的能力)的表达的莱氏衣藻β-微管蛋白启动子。转化酶的起始子ATG和终止子TGA由大写字母、粗斜体指示,同时编码区以小写字母斜体指示。普通小球藻硝酸还原酶3'UTR由小写字母加下划线文本指示,后接由加框斜体文本指示的桑椹型无绿藻的内源amt03启动子。PmFATA1的起始子ATG和终止子TGA密码子由大写字母、粗斜体指示,同时该基因的其余部分以粗斜体指示。普通小球藻硝酸还原酶3'UTR同样由小写字母加下划线文本指示,后接由粗体小写字母文本指示的J品系6S基因组区域。

[0474] 构建体pSZ2421中的相关限制性位点与pSZ2422相同。在pSZ2421中,使PmFATA1与原始小球藻S106硬脂酰基-ACP去饱和酶转运肽融合并且该转运肽位于PmFATA1的起始子ATG与Asc I位点之间。

[0475] pSZ2422中所含转化用DNA的核苷酸序列

gctcttcgccgccgccactcctgctcgagcgcgcccgcgcgtgcgccgccagcgccttggccttttcgccgcgctc
gtgcgcgtcgctgatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccggctgagccactgcttcgtccgggcg
gccaagaggagcatgagggaggactcctggtccagggtcctgacgtggtcgcggctctgggagcgggccagca
tcatctggctctgccgcaccgaggccgcctccaactggtcctccagcagccgcagtcgccgccgaccctggcag
aggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagt
catggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctcgctgccgccgcttctcccgcacgcttc
tttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagtcggggg
aactctgatcagtctaaacccccttgcgcgttagtgttgccatcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgtgc
gccacccccacaccacctcctcccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcaga
gaggacagcagtgcccagccgctgggggttggcggatgcacgctcaggtaccctttcttgcgctatgacacttcca
gcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagc
tccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaag
acattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcg
cactccgctaaggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaactctagaatatca***ATG***ctgctgcaggc
cttcctgttcctgctggccggcttcgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgcccctgg
tgcacttcacccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtgg
cacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctggggccacgccacgtccgacg
acctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgccttctccggctcca
tggtggtggactacaacaacacctccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgcgtggccatctg

gacctacaacaccccggagtccgaggagcagtacatctcctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagta
ccagaagaaccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctcccag
aagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcctgg
aagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttcctcggctaccagtacgagtgccccggcctgatcgaggtcccca
ccgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggcgccccggccggcggctcctt
caaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcacccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttcg
gcaaggactactacgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgcgtggg
cctccaactgggagtactccgccttcgtgcccaccaacccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagttctccct
caacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagc
aacgccggcccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtc
caacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctccaagtccgtgttc
gcggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgtc
ctccttcttcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgagc
gtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacatc
ctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccctgggct
*ccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGA**ca*
attggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctg
ccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgcta
gctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatcta
cgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtatt
ctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatgga**gg**
atcccgcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacacca
caataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgagg
tggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatatc**gaattc***ggccgacaggac*
gcgcgtcaaaggtgctggtcgtgtatgccctggccggcaggtcgttgctgctgctggttagtgattccgcaaccctgat
tttggcgtcttatttttggcgtggcaaacgctggcgcccgcgagccgggccggcggcgatgcggtgccccacggctg
ccggaatccaagggaggcaagagcgcccgggtcagttgaagggctttacgcgcaaggtacagccgctcctgcaa
ggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccaccgcctcaccagcggacaaagcaccggtg
tatcaggtccgtgtcatccactctaaagaactcgactacgacctactgatggccctagattcttcatcaaaaacgcctg
agacacttgcccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggccctgagttgttccttccccccgtggcgagct

gccagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcagg

acagctcatgaaacgccaacaatcgcacaattcatgtcaagctaatcagctatttcctcttcacgagctgtaattgtcc

caaaattctggtctaccgggggtgatccttcgtgtacgggcccttccctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtcgc

cgcgcaactcgcgcgagggccgagggtttgggacgggccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcac

ctttttgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtagga

tttcgtaatcattcgtcctgatggggagctaccgactaccctaatatcagcccgactgcctgacgccagcgtccacttttt

gtgcacacattccattcgtgcccaagacatttcattgtggtgcgaagcgtccccagttacgctcacctgtttcccgacct

*ccttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggtcgcagcc***actagt***ATGgcccccacctccctgctggc*

ctccaccggcgtgtcctccgcctccctgtggtcctccgcccgctcctccgcctgcgccttccccgtggaccacgccgtg

cgcggcgcccccccagcgcccccctgcccatgcagcgccgctgcttccgcaccgtggccgtgcgcgggcgcgccgcc

gcccccgccgtggccgtgcgccccgagcccgcccaggagttctgggagcagctggagccctgcaagatggccga

ggacaagcgcatcttcctggaggagcaccgcatccgcggcaacgaggtgggcccctcccagcgcctgaccatca

ccgccgtggccaacatcctgcaggaggccgccggcaaccacgccgtggccatgtggggccgctcctccgagggc

ttcgccaccgaccccgagctgcaggaggccggcctgatcttcgtgatgacccgcatgcagatccagatgtaccgct

acccccgctggggcgacctgatgcaggtggagacctggttccagaccgccggcaagctgggcgcccagcgcgag

tgggtgctgcgcgacaagctgaccggcgaggccctgggcgccgccacctcctcctgggtgatgatcaacatccgc

acccgccgcccctgccgcatgcccgagctggtgcgcgtgaagtccgccttcttcgcccgcgagccccccgcctgg

ccctgccccccgccgtgacccgcgccaagctgcccaacatcgccaccccgccccccctgcgcggccaccgccag

gtggcccgccgcaccgacatggacatgaacggccacgtgaacaacgtggcctacctggcctggtgcctggaggc

cgtgcccgagcacgtgttctccgactaccacctgtaccagatggagatcgacttcaaggccgagtgccacgccggc

gacgtgatctcctcccaggccgagcagatcccccccccaggaggccctgacccacaacggcgccggccgcaaccc

ctcctgcttcgtgcactccatcctgcgcgccgagaccgagctggtgcgcgcccgcaccacctggtccgcccccatcg

acgcccccgccgccaagcccccccaaggcctcccacatggactacaaggaccacgacggcgactacaaggacca

cgacatcgactacaaggacgacgacgacaagTGA**atcgat**agatctcttaaggcagcagcagctcggatagtat

cgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttt

tatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacc

cccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgc

tcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaaaccag

cactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagcttaattaa**gagctcttgttttccaga**

aggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggagggggttcgaat

ttaaaagcttggaatgttggttcgtgcgtctggaacaagcccagacttgttgctcactgggaaaaggaccatcag

ctccaaaaaacttgccgctcaaaccgcgtacctctgctttcgcgcaatctgccctgttgaaatcgccaccacattc

atattgtgacgcttgagcagtctgtaattgcctcagaatgtggaatcatctgccccctgtgcgagcccatgccagg

catgtcgcgggcgaggacacccgccactcgtacagcagaccattatgctacctcacaatagttcataacagtga

ccatatttctcgaagctccccaacgagcacctccatgctctgagtggccacccccggccctggtgcttgcggag

ggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggatcccaccacccccgcgatgggaagaatctct

ccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgctggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaaatatc

cttggcatcggccctgaattccttctgccgctctgctacccggtgcttctgtccgaagcaggggttgctagggatcg

ctccgagtccgcaaacccttgtcgcgtggcggggcttgttcgagcttgaagagc（SEQ ID NO:93）

[0476] 为了确定当在J品系中过表达内源FATA1基因时对脂肪酸谱的影响，通过amt03启动子对具有天然转运肽的桑椹型无绿藻FATA1以及与原始小球藻SAD转运肽融合的PmFATA1进行驱动，并且将所得质粒独立地转化至J品系中。

[0477] 对初级转化子以克隆方式纯化并使其在pH7.0下于低氮脂质产生条件下生长(所有质粒都需要在pH 7.0下生长以当通过pH调控的amt03启动子驱动时允许最大PmFATA1基因表达)。由通过将pSZ2422和pSZ2421转化到J品系中产生的代表性克隆的谱显示于下表中。

[0478] 在下表36中，过表达天然PmFATA1的影响是使C18:1链长度明显减小并使C16:0、C14:0以及可能地C18:0增加。考虑到加工的蛋白质定位，我们还尝试将PmFATA1与原始小球藻硬脂酰基-ACP去饱和酶转运肽融合。与我们在amt03-天然PmFATA1构建体中所观察到的结果类似，C16:0和C14:0水平显著地高于亲本品系J品系。

[0479] 表36.J品系和用pSZ2422 DNA转化的衍生物转基因株的脂肪酸谱。

样品ID	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
pH 7；J 品系；T374；D1377-7 96 孔	7.69	55.00	4.92	24.94	5.19
pH 7；J 品系；T374；D1377-13 96 孔	6.39	54.11	5.85	25.91	5.76
pH 7；J 品系；T374；D1377-14 96 孔	6.57	53.55	4.68	27.18	5.74
pH 7；J 品系；T374；D1377-16 96 孔	5.29	49.93	4.24	30.76	7.27
pH 7；J 品系；T374；D1377-9 96 孔	4.76	49.10	4.75	32.36	6.77
pH 7；J 品系；T374；D1377-19 96 孔	4.28	46.06	5.14	35.87	6.69
Ctrl-pH7；J品系	1.42	27.63	3.31	57.20	8.00

[0480] 表37.J品系和用pSZ2421 DNA转化的衍生物转基因株的脂肪酸谱.

样品ID	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
pH 7；J 品系；T374；D1376-21 96 孔	6.76	57.06	4.12	23.66	6.07
pH 7；J 品系；T374；D1376-22 96 孔	6.56	54.62	5.44	25.69	5.64
pH 7；J 品系；T374；D1376-23 96 孔	4.54	48.38	4.27	33.23	7.24
pH 7；J 品系；T374；D1376-19 96 孔	4.48	47.66	4.60	34.28	6.91
pH 7；J 品系；T374；D1376-20 96 孔	4.53	47.30	4.67	34.51	6.80
pH 7；J 品系；T374；D1376-17 96 孔	3.56	42.70	4.03	39.85	7.52
Ctrl-pH7；J品系	1.42	27.63	3.31	57.20	8.00

[0481] 因此，我们得出结论，可以通过C18偏好的酰基-ACP硫酯酶的过表达来增加微藻细胞脂肪酸谱中的肉豆蔻酸和月桂酸百分比水平。

实例46：适合用作包入起酥油的天然油

[0482] 传统上，已经将可食用脂肪营养和功能特性与特定化学组成和结晶条件相关联。从一种油来源转换成另一种通常是一项困难的任务，因为脂肪的熔融行为和结构剧烈变化，导致功能的不良变化。在近代史上，我们会回想起当用棕榈油和棕榈油馏分代替部分氢化的脂肪时的痛苦岁月。我们检查了如何能将具有显著不同的化学组成的两种脂肪的屈服应力、弹性模量、多形性、微观结构及熔融曲线相匹配。由表达外源转化酶和具有原始小球藻质体靶向序列的美国榆酰基-ACP硫酯酶的桑椹型无绿藻细胞产生油A。由表达外源转化酶和细叶萼距花酰基-ACP硫酯酶的桑椹型无绿藻细胞产生油B。油A含有超过62％(w/w)的中链脂肪酸或MCT(C8:0-C14:0)、23％的(C16:0+C18:0)及9％的C18:1，而油B含有不到2％的C8:0-C14:0、54％的(C16:0+C18:0)及29％的C18:1。因此，油A是富含中链三酸甘油酯的脂肪，而油B类似棕榈油。两种油在20℃下的固体脂肪含量为约45％，并且具有极其类似的SFC对温度曲线。DSC(动态扫描热量测定法)熔融曲线示出了集中在约12℃-13℃和约28℃-35℃周围的两个主要峰。两种脂肪都呈β相多形性形式(如通过X射线衍射所测定)并且展示出具有特有特征的不对称、延长的微晶形态。油A和油B的屈服应力和储能模量(G')对应地为520-550Pa以及7×10^{6}Pa-1.8×10^{7}Pa。这一区域中的屈服应力表明了一种令人满意的塑性，该塑性与高储能模量组合产生了一种理想的包入起酥油。因此，有可能的是，改变食用油的化学组成，同时保留其分层功能。

[0483] 用于以上本发明的实施例中任一个的细胞和方法的其他适合酶包括了与以上说明中所列蛋白质之一具有至少70％氨基酸一致性并且展现出相应的所希望的酶活性的那些。在另外的实施例中，酶活性存在于与以上描述的序列之一具有至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％或者至少约99％一致性的序列中，特此将所有序列通过引用进行结合，如同完整地阐述一般。

实例47:分馏以去除定制的微生物油中的三饱和物作为可可脂模拟物

[0484] 从K4品系获得精炼、漂白并且除臭的油(参看实例35)。将该油加热到70℃并且以每分钟0.5℃冷却到36℃并在36℃下保持1小时。然后,在36℃下,以4300将约2.5ml的样品离心1小时。回收液体上清液并且使用脂肪酶和质谱法进行分析。发现该样品被耗尽三硬脂精(SSS)、SSP及PPS。发现该样品的三酰基甘油与可可脂非常类似并且液体上清液在较少三饱和物量方面甚至更接近可可脂。

[0485] 表38.在分馏之前和之后来自K4品系的油的TAG谱与可可脂的相比较。

TAG	K4 油	分馏上层(液体)	可可脂
OOL (+?)	0.12	0.12	0.00
POL	0.23	0.31	0.33
PLP	2.41	3.38	1.58
MOP	0.93	1.25	0.00
PPM (+ MMS)	0.42	0.29	0.00
OOO	0.23	0.34	0.00
SOL	0.36	0.47	0.32
OOP	0.95	1.42	2.44
PLS	5.66	7.90	2.90
POP (+ MSO)	11.80	15.20	17.93
PPP + MPS	2.22	1.07	0.36
OOS	1.19	1.68	3.02
SLS (+ PLA)	3.96	5.11	1.77
POS	27.22	32.80	40.25
PPS (+ SSM)	6.47	1.52	0.49
MaOO	0.00	0.00	0.36
SLA	0.31	0.34	0.00
SOS (+ POA)	17.84	22.50	24.93
SSP (+ PPA)	9.24	0.96	0.63
SOA (+ POB)	1.39	1.68	1.51
SSS (+ PSA)	5.25	0.23	0.33
SOB + LgOP	0.38	0.44	0.27
SSA	0.41	0.00	0.00
SOLg	0.41	0.00	0.00
PSLg + ASB	0.26	0.00	0.00
SOHx	0.12	0.51	0.00
SSLg	0.21	0.14	0.15
总计面积%	100.00	99.67	99.57

实例48:通过KASII的过表达、一个SAD等位基因敲除以及第二SAD等位基因的阻遏在产油细胞中产生高硬脂酸酯三酸甘油酯油

[0486] 产油的非光合作用藻类无色微小藻在营养碳供应过量的条件下储存大量的三酰基甘油酯油，但细胞分裂因其他必需养分的限制而受到抑制。碳链长度多达C18的脂肪酸的大量生物合成发生于质体中；然后脂肪酸被输出到内质网，相信在这里发生了延长超过C18和三酰基甘油酯(TAG)的并入。脂质被储存在称为脂质体的较大胞质细胞器中，直到环境条件变为有利于生长，此时它们被迅速地动员起来以为合成代谢提供能量和碳分子。野生型桑椹型无绿藻储存脂质主要包含约60％的油酸(C18:1)、约25％-30％的棕榈酸(C16:0)以及约5％-8％的亚油酸(C18:2)，及微量的硬脂酸(C18:0)、肉豆蔻酸(C14:0)、α-亚麻酸(C18:3α)及棕榈油酸(C16:1)。这一脂肪酸谱由内源脂肪酸生物合成路径的酶的相对活性和底物亲和力引起。桑椹型无绿藻适用于使用分子遗传工具操作脂肪酸和脂质生物合成，从而能够产生脂肪酸谱与野生型组合物极为不同的油。在此描述了多个品系，其中已经进行修饰硬脂酰基-ACP去饱和酶(SAD)和β-酮酰基-ACP合酶II(KASII)基因的表达以产生具有多达57％的硬脂酸酯和少到7％的棕榈酸酯的品系。当我们进行类似修饰与下调FATA硫酯酶和FAD2脂肪酸去饱和酶基因的表达相结合时，我们鉴别出另外的具有多达55％硬脂酸酯和少到2.4％亚油酸酯的品系。

[0487] 可溶性SAD是质体定位的二铁酶，它们催化酰基载体蛋白(ACP)结合的硬脂酸酯去饱和成为油酸酯(C18:1顺-Δ^9)。先前我们已经确定，靶向SAD1或SAD2转录物的发夹构建体使细胞RNA干扰(RNAi)机器活化，从而下调SAD活性并引起储存脂质中C18:0水平的升高。在我们破坏了编码在储存脂质生物合成期间表达的主要SAD的两个SAD2等位基因之一的品系中SAD活性也降低。脂肪酸去饱和酶2(FAD2)基因编码内质网膜相关联的去饱和酶，该去饱和酶将油酸酯转化成亚油酸酯(C18:2顺-Δ^9,cis-Δ^{12})。靶向FAD2的发夹RNAi构建体使亚油酸酯水平降低到1％-2％。KASII是特异性催化丙二酰基-ACP与棕榈酰基(C16:0)-ACP缩合形成β-酮基-硬脂酰基-ACP的一种脂肪酸合酶。我们已经显示，在桑椹型无绿藻中过表达KASII引起C16:0水平降低并伴随C18:1丰度的增加。在以下实例中，我们证实，通过使用RNAi使SAD基因表达下调，破坏该SAD2基因的等位基因并过表达KASII脂肪酸合酶，我们产生了能够积累占总脂肪酸超过50％的硬脂酸酯并且以SOS作为主要TAG种类的品系。在组合了SAD2和FAD2下调与KASII过表达的品系中，SOS水平增加到47％。

[0488] 用于在S1920中SAD2敲除/RNAi的构建体：使DNA构建体pSZ2282在S1920中同时地破坏SAD2-1等位基因并表达SAD2发夹构建体。编码蔗糖转化酶并针对在桑椹型无绿藻中表达进行密码子优化的酿酒酵母SUC2基因的变化形式被用作转化的一种可选择标记物。转化用DNA的序列紧接着在以下提供。相关限制性位点以小写字母、粗体指示并且从5’-3’对应地为BspQI、KpnI、AscI、MfeI、BamHI、AvrII、EcoRV、EcoRI、SpeI、BamHI、HinDIII及SacI。BspQI位点界定转化用DNA的5’和3’端。在该构建体的5’和3’侧翼处加下划线的序列表示能够经由在SAD2-1基因座处同源重组靶向整合转化用DNA的来自桑椹型无绿藻的基因组DNA。沿5’至3’方向，通过小写字母、加框文本指示驱动酿酒酵母SUC2基因(编码蔗糖水解活性，由此允许该品系在蔗糖上生长)表达的莱氏衣藻TUB2启动子。SUC2的起始子ATG和终止子TGA由大写字母斜体指示，同时编码区以小写字母斜体指示。普通小球藻硝酸还原酶(NR)基因的3’UTR以小体大写字母指示，后接由小写字母文本指示的间隔子区。由小写字母加框文本指示的第二莱氏衣藻TUB2启动子序列驱动SAD2发夹C序列的表达。有义链和反义链是以大写字母、粗斜体指示，并且通过桑椹型无绿藻Δ^{12}-脂肪酸去饱和酶(FAD2)内含子和FAD2

第二外显子(大写字母斜体)的前10个碱基隔开。第二普通小球藻NR 3'UTR是通过小体大写字母指示。

[0489] 来自pSZ2282的转化用DNA的核苷酸序列：

gctcttcgggtcgccgcgctgcctcgcgtcccctggtggtgcgcgcggtcgccagcgaggccccgctgggcgttccg
ccctcggtgcagcgcccctcccccgtggtctactccaagctggacaagcagcaccgcctgacgcccgagcgcctgga
gctggtgcagagcatggggcagtttgcggaggagagggtgctgcccgtgctgcaccccgtggacaagctgtggcag
ccgcaggacttttgcccgaccccgagtcgcccgacttcgaggatcaggtggcggagctgcgcgcgcgcgccaagg
acctgcccgacgagtactttgtggtgctggtgggggacatgatcacggaggaggcgctgccgacctacatggccatgc
tcaacacgctggacggcgtgcgcgacgacacgggcgcggccgaccacccgtgggcgcgctggacgcggcagtgg
gtggccgaggagaaccggcacggcgacctgctgaacaagtactgctggctgacggggcgcgtcaacatgcgggcc
gtggaggtgaccatcaacaacctgatcaagagcggcatgaacccgcagacggacaacaacccttatttggggttcgtct
acacctccttccaggagcgcgccaccaagta**ggtacc**ctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggg
ctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatggg
cgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagacattatagcgagctacca
aagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgcactccgctaaggggggc
gcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**ggcgcgcc***ATGctgctgcaggccttcctgttcctgctggccgg*
cttcgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctggtgcacttcacccccaacaa
gggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtggcacctgtacttccagtaca
acccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctggggccacgccacgtccgacgacctgaccaactgggagg
accagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgccttctccggctccatggtggtggactacaaca
acacctccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgcgtggccatctggacctacaacaccccgga
gtccgaggagcagtacatctcctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagtaccagaagaaccccgtgct

ggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctcccagaagtggatcatgaccgcg
gccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcctggaagctggagtccgcgttcg
ccaacgagggcttcctcggctaccagtacgagtgccccggcctgatcgaggtccccaccgagcaggaccccagc
aagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggcgccccggccggcggctccttcaaccagtacttcgtcggc
agcttcaacggcacccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttcggcaaggactactacgccc
tgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgcgtgggcctccaactgggagtactc
cgccttcgtgcccaccaaccccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagttctccctcaacaccgagtaccaggc
caacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagcaacgccggcccctggagc
cggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacagcaccggcaccct
ggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctccaagtccgtgttcgcggacctctccctctggtt
caagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgtcctccttcttcctggaccgcg
ggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgagcgtgaacaaccagccctc
aagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacatcctggagctgtacttcaacg
acggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccctgggctccgtgaacatgacgacgg
*gggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaagTGA***caattg**GCAGCAGCAG
CTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTT
GCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCA
AACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCT
AGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGT
TTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATC
CCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTT
TGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGC
AATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGA**ggatcc**cg
cgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacaccacaataa
ccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgaggtggca
ggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacag**cctagggatatcgaattc**ctttcttgcgctatgacact
tccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccccga
agctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgca
aagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtg
atcgcactccgctaaggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**actagt*GCGCTGGACG***

CGGCAGTGGGTGGCCGAGGAGAACCGGCACGGCGACCTGCTGAACAAGT
ACTGTTGGCTGACGGGGCGCGTCAACATGCGGGCCGTGGAGGTGACCAT
CAACAACCTGATCAAGAGCGGCATGAACCCGCAGACGGACAACAACCCTT
ACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTTCCAGGAGCGCGCGACCAAGTACAGC
CACGGCAACACCGCGCGCCTTGCGGCCGAGCA*GTGTGTTTGAGGGTTTTG*
GTTGCCCGTATCGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGGAGAAGGCGCCTGTC
*CCGCTGACCCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACG***ggat**
cc*TGCTCGGCCGCAAGGCGCGCGGTGTTGCCGTGGCTGTACTTGGTCGCG*
CGCTCCTGGAAGGAGGTGTAGACGAAGCCCAAGTAAGGGTTGTTGTCCGT
CTGCGGGTTCATGCCGCTCTTGATCAGGTTGTTGATGGTCACCTCCACGG
CCCGCATGTTGACGCGCCCCGTCAGCCAACAGTACTTGTTCAGCAGGTCG
CCGTGCCGGTTCTCCTCGGCCACCCACTGCCGCGTCCAGCGC**aagctt**GCAG
CAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGG
ACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTT
TTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGA
GTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTC
CCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCT
GCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCC
TTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAG
CACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGG
AAAGCTG**gagctc**cagccacggcaacaccgcgcgccttgcggccgagcacggcgacaagaacctgagcaa
gatctgcgggctgatcgccagcgacgagggccggcacgagatcgcctacacgcgcatcgtggacgagttcttccgcc
tcgaccccgagggcgccgtcgccgcctacgccaacatgatgcgcaagcagatcaccatgcccgcgcacctcatggac
gacatgggccacggcgaggccaacccgggccgcaacctcttcgccgacttctccgcggtcgccgagaagatcgacg
tctacgacgccgaggactactgccgcatcctggagcacctcaacgcgcgctggaaggtggacgagcgccaggtcag
cggccaggccgccgcggaccaggagtacgtcctgggcctgccccagcgcttccggaaactcgccgagaagaccgc
cgccaagcgcaagcgcgtcgcgcgcaggcccgtcgccttctcctggatctccgggcgcgagatcatggtctagggag
cgacgagtgtgcgtgcggggctggcgggagtgggacgccctcctcgctcctctctgttctgaacggaacaatcggcca
ccccgcgctacgcgccacgcatcgagcaacgaagaaaaccccccgatgataggttgcggtggctgccgggatataga
tccggccgcacatcaaagggcccctccgccagagaagaagctcctttcccagcagactcct**gaagagc** (SEQ
ID NO:94)

[0490] SAD2敲除/敲减品系的鉴别和分析如先前所描述:将衍生自pSZ2282的构建体D1283转化至S1920中。将初级转化子以克隆方式纯化并使其在pH 5下于标准脂质产生条件下生长。由通过将pSZ2282转化到S1920中所产生的代表性克隆得到的脂肪酸谱概述于下表

39中。D1283转化子以C18:1为代价积累了多达约42％的C18:0，指示SAD活性在这些品系中显著地降低。

[0491] 表39.D1283[pSZ2282]初级转化子与野生型亲本品系S1920的脂肪酸谱比较。

品系		S1920	D1283-4	D1283-7	D1283-19	D1283-27	D1283-40	D1283-24
脂肪酸面积%	C12:0	0.04	0.05	0.06	0.07	0.06	0.04	0.05
	C14:0	1.31	0.92	1.07	1.01	1.08	1.03	0.96
	C16:0	26.68	28.23	29.21	27.24	27.67	27.02	27.07
	C16:1	0.78	0.05	0.06	0.08	0.33	0.14	0.12
	C17:0	0.11	0.12	0.15	0.10	0.10	0.12	0.13
	C18:0	3.15	**41.98**	**40.94**	**34.20**	**26.26**	**23.18**	**22.82**
	C18:1	59.30	19.37	18.17	26.87	34.77	38.74	39.38
	C18:2	7.47	6.22	7.43	7.42	7.31	7.25	7.38
	C18:3α	0.57	0.93	1.03	0.75	0.71	0.72	0.51
	C20:0	0.32	1.81	1.67	1.75	1.35	1.36	1.23
	C20:1	0.00	0.10	0.00	0.12	0.00	0.12	0.11
	C22:0	0.05	0.17	0.13	0.20	0.16	0.16	0.15
	C24:0	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00
总计C18		70.49	68.5	67.57	69.24	69.05	69.89	70.09
饱和物		31.66	73.28	73.23	64.67	56.68	52.91	52.41
不饱和物		68.12	26.67	26.69	35.24	43.12	46.97	47.50

[0492] 在表39中，超过野生型水平的硬脂酸酯(C18:0)水平以粗体文本突出显示。

[0493] 确定转化子D1283-4和D1283-7的脂肪酸谱在不存在选择情况下超过30代(在蔗糖上生长)之后为稳定的。然后，在摇瓶检验中对所选品系的性能进行评价，并且脂肪酸谱和脂质滴度呈现于下表40中。S4495相对于亲本S1920具有最高水平的C18:0(约44％)和最佳的脂质滴度(约26％)并且因此被选择用于进一步发酵开发。

[0494] 表40.衍生自D1283初级转化子的SAD2敲除/敲减品系与野生型亲本品系S1920的脂肪酸谱和脂质滴度的比较。

初级转化子			T342;D1283-4			T342;D1283-7		
品系		S1920	S4490	S4491	S4492	S4493	S4494	S4495
脂肪酸面积%	C14:0	1.59	1.61	1.58	1.55	1.81	1.84	1.34
	C16:0	30.47	29.41	28.58	29.24	28.77	29.09	28.47
	C16:1	0.82	0.05	0.07	0.05	0.07	0.05	0.06
	C17:0	0.10	0.30	0.29	0.28	0.46	0.37	0.19
	C18:0	3.58	**42.85**	**41.86**	**43.38**	**39.99**	**41.41**	**44.42**
	C18:1	56.96	13.52	15.55	13.49	13.57	12.98	15.64
	C18:2	5.50	8.01	7.85	7.65	10.37	9.47	5.72
	C18:3α	0.37	0.78	0.73	0.82	0.95	0.91	0.64
	C20:0	0.22	2.06	2.11	2.11	1.98	1.98	2.32
	C22:0	0.05	0.32	0.34	0.33	0.33	0.32	0.35
	C24:0	0.03	0.43	0.42	0.44	0.49	0.49	0.37
脂质滴度（%亲本）		100	12.3	12.6	13.6	6.2	8.2	25.9

[0495] 在表40中，超过野生型水平的硬脂酸酯(C18:0)水平以粗体文本突出显示。

[0496] 我们在7L发酵中对S4495性能进行了优化，并且发现我们可以将摇瓶中获得的约44％的C18:0水平与野生型亲本的约45％的脂质生产力相匹配。代表性S4495发酵的脂肪酸谱和脂质滴度概述于下表41中。S4495在最佳条件下发酵得到约44％的C18:0，与在摇瓶检验中积累的硬脂酸酯水平类似。S4495在摇瓶和7L规模下产生高C18:0水平并且在7L发酵中具有可接受的脂质生产力；因此，这一品系被选择作为旨在增加C18:0积累的另外的修饰的一种基础品系。

[0497] 表41.S4495与对照转基因品系S2074的脂肪酸谱和脂质滴度的比较。

品系		S2074	S4495	S4495	S4495
发酵		110088F14	120489F5	120531F8	120580F1
脂肪酸面积%	C14:0	1.47	1.18	1.15	1.27
	C16:0	25.66	28.68	28.38	28.35
	C16:1	0.71	0.11	0.09	0.06
	C18:0	3.16	**41.63**	**42.40**	**43.67**
	C18:1	62.24	20.78	19.38	17.63
	C18:2	5.90	5.06	5.38	5.58
	C18:3α	0.16	0.24	0.25	0.25
	C20:0	0.24	1.36	1.99	2.11
	C22:0	0.05	0.19	0.28	0.31
	C24:0	0.05	0.34	0.29	0.31
总计C18		71.46	67.71	67.41	67.13
饱和物		30.63	73.38	74.49	76.02
不饱和物		69.01	26.19	25.10	23.52
总脂质（g/L）		930	383	539	475

[0498] 在表41中，超过对照物的硬脂酸酯(C18:0)水平以粗体文本突出显示。S2074含有

整合于6S基因座处的编码蔗糖转化酶的酿酒酵母SUC2，并且具有与野生型亲本S1920不可区分的脂肪酸谱。

[0499] 在S4495中用于KASII过表达的构建体：使DNA构建体pSZ2734在S4495中过表达密码子优化的桑椹型无绿藻KASII基因。赋予对氨基糖苷类抗生素抗性的来自转位子Tn5的neoR基因被用作转化的一种可选择标记物。转化用DNA的序列紧接着在以下提供。相关限制性位点以小写字母、粗体指示并且从5'-3'对应地为BspQI、KpnI、XbaI、MfeI、BamHI、AvrII、EcoRV、SpeI、AscI、ClaI、BglII、AflII、HinDIII及SacI。BspQI位点界定转化用DNA的5'和3'端。在该构建体的5'和3'侧翼处加下划线的序列表示能够经由在6S基因座处同源重组靶向整合转化用DNA的来自桑椹型无绿藻的基因组DNA。沿5'到3'方向继续向前，，驱动neoR(编码氨基糖苷类磷酸转移酶活性，由此允许该品系在G418上生长)表达的莱氏衣藻TUB2启动子通过小写字母，加框文本指示。neoR的起始子ATG和终止子TGA由大写字母斜体指示，同时编码区以小写字母斜体指示。普通小球藻NR基因的3'UTR以小体大写字母指示，后接由小写字母文本指示的间隔子区。以加框文本指示的桑椹型无绿藻SAD2-2启动子序列驱动密码子优化的桑椹型无绿藻KASII基因的表达。编码KASII质体靶向序列的区域是以大写字母斜体指示。编码成熟桑椹型无绿藻KASII多肽的序列以粗体、加下划线的大写字母斜体指示，而3xFLAG表位编码序列以粗斜体指示。第二普通小球藻NR 3'UTR是通过小体大写字母指示。

[0500] 来自pSZ2734的转化用DNA的核苷酸序列：

gctcttcgccgccgccactcctgctcgagcgcgcccgcgcgtgcgccgccagcgccttggccttttcgccgcgctcgt
gcgcgtcgctgatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccggctgagccactgcttcgtccgggcggcca
agaggagcatgagggaggactcctggtccagggtcctgacgtggtcgcggctctgggagcgggccagcatcatctg
gctctgccgcaccgaggccgcctccaactggtcctccagcagccgcagtcgccgccgaccctggcagaggaagaca
ggtgaggggtgtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagtcatggctttacctgga
tgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctcgctgccgccgcttctcccgcacgcttctttccagcaccgtgatggc
gcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagtcggggaactctgatcagtctaaacccc
cttgcgcgttagtgttgccatcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgtgcgccacccccccacaccacctcctccc
agaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcagagaggacagcagtgcccagccgctggggg
ttggcggatgcacgctca**ggtacc**ctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggctt
cccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgaccccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccg
ctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaa
cacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgcactccgctaaggggggcgcctcttcctcttcgt
ttcagtcacaacccgcaaac**tctaga**atatca*ATGatcgagcaggacggcctccacgccggctccccccgccgcct*
gggtggagcgcctgttcggctacgactgggcccagcagaccatcggctgctccgacgccgccgtgttccgcctgtcc
gcccagggccgccccgtgctgttcgtgaagaccgacctgtccggcgccctgaacgagctgcaggacgaggccgc
ccgcctgtcctggctggccaccaccggcgtgccctgcgccgccgtgctggacgtggtgaccgaggccggccgcga
ctggctgctgctgggcgaggtgcccggccaggacctgctgtcctcccacctggcccccgccgagaaggtgtccatc
atggccgacgccatgcgccgcctgcacaccctggaccccgccacctgccccttcgaccaccaggccaagcaccg

catcgagcgcgcccgcacccgcatggaggccggcctggtggaccaggacgacctggacgaggagcaccaggg

cctggcccccgccgagctgttcgcccgcctgaaggcccgcatgcccgacggcgaggacctggtggtgacccacgg

cgacgcctgcctgcccaacatcatggtggagaacggccgcttctccggcttcatcgactgcggccgcctgggcgtg

gccgaccgctaccaggacatcgccctggccacccgcgacatcgccgaggagctgggcggcgagtgggccgacc

gcttcctggtgctgtacggcatcgccgcccccgactcccagcgcatcgccttctaccgcctgctggacgagttcttcT

*GA***caattg**GCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGT

CGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATC

CCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGC

GCTTTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAG

CATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCT

ACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCC

TCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACC

TGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGA

ACACAAATGGA**ggatcc**cgcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgca

cctcagcgcggcatacaccacaataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcaca

cacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacag**cctagggata**

tcCTGAAGAATGGGAGGCAGGTGTTGTTGATTATGAGTGTGTAAAAGAA

AGGGGTAGAGAGCCGTCCTCAGATCCGACTACTATGCAGGTAGCCGCTC

GCCCATGCCCGCCTGGCTGAATATTGATGCATGCCCATCAAGGCAGGCA

GGCATTTCTGTGCACGCACCAAGCCCACAATCTTCCACAACACACAGCA

TGTACCAACGCACGCGTAAAAGTTGGGGTGCTGCCAGTGCGTCATGCCA

GGCATGATGTGCTCCTGCACATCCGCCATGATCTCCTCCATCGTCTCGGG

TGTTTCCGGCGCCTGGTCCGGGAGCCGTTCCGCCAGATACCCAGACGCC

ACCTCCGACCTCACGGGGTACTTTTCGAGCGTCTGCCGGTAGTCGACGA

TCGCGTCCACCATGGAGTAGCCGAGGCGCCGGAACTGGCGTGACGGAG

GGAGGAGAGGGAGGAGAGAGAGGGGGGGGGGGGGGGGATGATTAC

ACGCCAGTCTCACAACGCATGCAAGACCCGTTTGATTATGAGTACAATC

ATGCACTACTAGATGGATGAGCGCCAGGCATAAGGCACACCGACGTTG

ATGGCATGAGCAACTCCCGCATCATATTTCCTATTGTCCTCACGCCAAGC

CGGTCACCATCCGCATGCTCATATTACAGCGCACGCACCGCTTCGTGAT

CCACCGGGTGAACGTAGTCCTCGACGGAAACATCTGGCTCGGGCCTCGT

GCTGGCACTCCCTCCCATGCCGACAACCTTTCTGCTGTCACCACGACCCA

CGATGCAACGCGACACGACCCGGTGGGACTGATCGGTTCACTGCACCTG

CATGCAATTGTCACAAGCGCATACTCCAATCGTATCCGTTTGATTTCTGT

GAAAACTCGCTCGACCGCCCGCGTCCCGCAGGCAGCGATGACGTGTGCG

TGACCTGGGTGTTTCGTCGAAAGGCCAGCAACCCCAAATCGCAGGCGAT

CCGGAGATTGGGATCTGATCCGAGCTTGGACCAGATCCCCCACGATGCG

GCACGGGAACTGCATCGACTCGGCGCGGAACCCAGCTTTCGTAAATGCC

AGATTGGTGTCCGATACCTTGATTTGCCATCAGCGAAACAAGACTTCAG

CAGCGAGCGTATTTGGCGGGCGTGCTACCAGGGTTGCATACATTGCCCA

TTTCTGTCTGGACCGCTTTACCGGCGCAGAGGGTGAGTTGATGGGGTTG

GCAGGCATCGAAACGCGCGTGCATGGTGTGTGTGTCTGTTTTCGGCTGC

ACAATTTCAATAGTCGGATGGGCGACGGTAGAATTGGGTGTTGCGCTCG

CGTGCATGCCTCGCCCCGTCGGGTGTCATGACCGGGACTGGAATCCCCC

CTCGCGACCCTCCTGCTAACGCTCCCGACTCTCCCGCCCGCGCGCAGGA

TAGACTCTAGTTCAACCAATCGACA**actagt***ATGCAGACCGCCCACCAGCGC*

CCCCCCACCGAGGGCCACTGCTTCGGCGCCCGCCTGCCCACCGCCTCCCG

*CCGCGCCGTGCGCCGCGCCTGGTCCCGCATCGCCCGCG***ggcgcgcc*****GCCGCC**

GCCGCCGACGCCAACCCCGCCCGCCCCGAGCGCCGCGTGGTGATCACCG

GCCAGGGCGTGGTGACCTCCCTGGGCCAGACCATCGAGCAGTTCTACTCC

TCCCTGCTGGAGGGCGTGTCCGGCATCTCCCAGATCCAGAAGTTCGACAC

CACCGGCTACACCACCACCATCGCCGGCGAGATCAAGTCCCTGCAGCTGG

ACCCCTACGTGCCCAAGCGCTGGGCCAAGCGCGTGGACGACGTGATCAA

GTACGTGTACATCGCCGGCAAGCAGGCCCTGGAGTCCGCCGGCCTGCCC

ATCGAGGCCGCCGGCCTGGCCGGCGCCGGCCTGGACCCCGCCCTGTGCG

GCGTGCTGATCGGCACCGCCATGGCCGGCATGACCTCCTTCGCCGCCGGC

GTGGAGGCCCTGACCCGCGGCGGCGTGCGCAAGATGAACCCCTTCTGCA

TCCCCTTCTCCATCTCCAACATGGGCGGCGCCATGCTGGCCATGGACATC

GGCTTCATGGGCCCCAACTACTCCATCTCCACCGCCTGCGCCACCGGCAA

CTACTGCATCCTGGGCGCCGCCGACCACATCCGCCGCGGCGACGCCAAC

GTGATGCTGGCCGGCGGCGCCGACGCCGCCATCATCCCCTCCGGCATCG

GCGGCTTCATCGCCTGCAAGGCCCTGTCCAAGCGCAACGACGAGCCCGA

GCGCGCCTCCCGCCCCTGGGACGCCGACCGCGACGGCTTCGTGATGGGC

GAGGGCGCCGGCGTGCTGGTGCTGGAGGAGCTGGAGCACGCCAAGCGCC

GCGGCGCCACCATCCTGGCCGAGCTGGTGGGCGGCGCCGCCACCTCCGA

CGCCCACCACATGACCGAGCCCGACCCCCAGGGCCGCGGCGTGCGCCTG

TGCCTGGAGCGCGCCCTGGAGCGCGCCCGCCTGGCCCCCGAGCGCGTGG

GCTACGTGAACGCCCACGGCACCTCCACCCCCGCCGGCGACGTGGCCGA

GTACCGCGCCATCCGCGCCGTGATCCCCCAGGACTCCCTGCGCATCAACT

CCACCAAGTCCATGATCGGCCACCTGCTGGGCGGCGCCGGCGCCGTGGA

GGCCGTGGCCGCCATCCAGGCCCTGCGCACCGGCTGGCTGCACCCCAAC

CTGAACCTGGAGAACCCCGCCCCCGGCGTGGACCCCGTGGTGCTGGTGG

GCCCCCGCAAGGAGCGCGCCGAGGACCTGGACGTGGTGCTGTCCAACTC

CTTCGGCTTCGGCGGCCACAACTCCTGCGTGATCTTCCGCAAGTACGACG

AGATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGA

CTACAAGGACGACGACGACAAGTGA**atcgatagatctcttaag**GCAGCAGCAGCTC

GGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCC

GCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAAC

AGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCTAGC

TGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTC

ATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCT

CAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGG

GCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAAT

GCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGA**aagct**taatta**ag**

agctcttgttttccagaaggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggag

ggggttcgaatttaaaagcttggaatgttggttcgtgcgtctggaacaagcccagacttgttgctcactgggaaaaggac

catcagctccaaaaaacttgccgctcaaaccgcgtacctctgctttcgcgcaatctgccctgttgaaatcgccaccacatt

catattgtgacgcttgagcagtctgtaattgcctcagaatgtggaatcatctgccccctgtgcgagcccatgccaggcatg

tcgcgggcgaggacacccgccactcgtacagcagaccattatgctacctcacaatagttcataacagtgaccatatttctc

gaagctccccaacgagcacctccatgctctgagtggccacccccggccctggtgcttgcggagggcaggtcaaccg

gcatggggctaccgaaatccccgaccggatcccaccacccccgcgatgggaagaatctctccccgggatgtgggccc

accaccagcacaacctgctggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaaatatccttggcatcggccctgaattcct

tctgccgctctgctacccggtgcttctgtccgaagcaggggttgctagggatcgctccgagtccgcaaacccttgtcgcg

tggcggggcttgttcgagctt**gaagagc**（SEQ ID NO:95）

[0501] X品系中KASII的过表达：如先前所描述，将衍生自pSZ2734的构建体D1643转化至S4495中。将初级转化子以克隆方式纯化并使其在pH 5下于标准脂质产生条件下生长。由通过用D1643转化S4495所产生的代表性克隆得到的脂肪酸谱概述于下表42中。在SAD2敲除/敲减S4495背景下KASII的过表达产生了积累超过50％的C18:0并具有实质上降低的水平的C16:0的多种品系。我们还观察到KASII过表达株与S4495相比较具有更低的饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸总体比率。

[0502] 表42.D1653[pSZ2734]初级转化子与S4495基础品系和野生型亲本品系S1920的脂肪酸谱比较。

品系		S1920	S4495	D1653-89	D1653-10A	D1653-2B	D1653-5B	D1653-7A	D1653-75	D1653-90	D1653-9B	D1653-72	D1653-6B	D1653-82	D1653-66
脂肪酸面积%	C12:0	0.04	0.06	0.27	0.13	0.20	0.19	0.24	0.13	0.12	0.27	0.16	0.18	0.25	0.22
	C14:0	1.44	1.06	1.55	1.65	1.79	1.67	1.70	1.53	1.50	1.74	1.57	1.64	1.48	1.56
	C16:0	29.23	29.83	**8.16**	**11.45**	**10.68**	**10.11**	**9.27**	**11.14**	**11.08**	**9.40**	**9.78**	**9.95**	**8.12**	**8.65**
	C16:1	0.88	0.10	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.04	0.00	0.04	0.00	0.05	0.06
	C18:0	2.97	**40.17**	**54.25**	**53.87**	**53.61**	**53.46**	**53.32**	**53.32**	**53.15**	**52.43**	**52.20**	**51.23**	**50.52**	**50.02**
	C18:1	58.07	20.15	23.52	22.12	22.20	23.48	24.02	22.73	23.45	23.94	25.21	26.07	28.00	28.29
	C18:2	6.25	5.25	6.75	6.05	6.42	6.25	6.56	6.19	5.96	6.88	6.28	6.31	6.59	6.31
	C18:3α	0.50	0.68	0.79	0.88	0.78	0.79	0.79	0.85	0.82	0.86	0.78	0.78	0.78	0.83
	C20:0	0.22	1.88	3.21	2.81	3.01	2.91	3.02	2.86	2.77	3.21	2.74	2.80	2.87	2.80
	C20:1	0.02	0.07	0.19	0.21	0.34	0.27	0.28	0.12	0.11	0.41	0.14	0.30	0.28	0.26
	C22:0	0.05	0.26	0.41	0.34	0.40	0.37	0.37	0.36	0.35	0.42	0.36	0.37	0.36	0.37
	C24:0	0.04	0.27	0.49	0.38	0.42	0.41	0.45	0.38	0.36	0.46	0.39	0.37	0.41	0.41
总计C18		67.78	66.24	85.31	82.92	83.01	83.98	84.69	83.09	83.38	84.11	84.47	84.39	85.89	85.45
饱和物		33.97	73.52	68.34	70.63	70.11	69.12	68.37	69.72	69.33	67.93	67.20	***66.54***	***64.01***	***64.03***
不饱和物		65.71	26.23	31.29	29.26	29.74	30.79	31.65	29.93	30.38	32.09	32.45	***33.46***	***35.70***	***35.75***

[0503] 在表42中，超过野生型水平的硬脂酸酯(C18:0)水平以粗体文本突出显示。低于S4495或S1920的棕榈酸酯(C16:0)水平以粗体突出显示。对于三个品系，饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比率≤2:1，这些以粗体、斜体文本显示。

[0504] 从表42中所示的初级转化子分离稳定株。摇瓶培养物的脂肪酸谱和脂质滴度概述于下表43中。这些品系积累了多达55％的C18:0和低到7％的C16:0，具有与亲本S4495相当的脂质滴度。饱和物:不饱和物比率相较于S4495实质上减小。选出品系S5665和S5675用于在3L高密度发酵中进行评价。

[0505] 表43.表达KASII，由PmSAD2-2启动子驱动并靶向6S基因座的衍生自D1653的品系的摇瓶检验。

初级转化子				D1653-6B		D1653-9B	D1653-10A		D1653-72		D1653-89		
品系		S1920	S4495	S5664	S5665	S5669	S5670	S5671	S5672	S5673	S5674	S5675	S5677
脂肪酸面积%	C10:0	0.02	0.04	0.08	0.09	0.12	0.06	0.06	0.08	0.09	0.12	0.12	0.12
	C12:0	0.04	0.09	0.28	0.29	0.35	0.20	0.20	0.23	0.26	0.32	0.32	0.33
	C14:0	1.42	1.12	1.81	1.66	1.73	1.75	1.72	1.50	1.61	1.38	1.43	1.38
	C16:0	25.59	28.56	**9.39**	**8.61**	**8.44**	**9.98**	**10.11**	**8.26**	**8.95**	**6.81**	**7.21**	**6.63**
	C16:1	1.03	0.10	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03
	C18:0	2.60	**40.13**	**47.60**	**52.47**	**55.12**	**50.25**	**49.73**	**54.56**	**54.01**	**52.96**	**53.68**	**52.12**
	C18:1	62.08	20.74	27.78	23.93	21.31	25.37	25.70	22.86	22.87	24.37	23.99	25.17
	C18:2	6.16	5.83	7.98	7.52	7.72	7.55	7.64	7.20	7.24	8.11	7.83	8.04
	C18:3α	0.40	0.89	1.21	1.22	1.49	1.17	1.07	1.20	1.29	1.28	1.24	1.31
	C20:0	0.18	1.82	2.62	2.93	2.75	2.65	2.66	2.97	2.72	3.43	3.10	3.59
	C20:1	0.04	0.13	0.37	0.36	0.39	0.34	0.34	0.35	0.34	0.48	0.41	0.47
	C20:1	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	C20:1	0.15	0.08	0.11	0.09	0.11	0.10	0.10	0.09	0.10	0.12	0.10	0.12
	C22:0	0.02	0.20	0.28	0.30	0.24	0.29	0.28	0.30	0.27	0.32	0.29	0.35
	C24:0	0.00	0.03	0.16	0.29	0.00	0.03	0.15	0.16	0.02	0.05	0.04	0.07
总计C18		71.23	67.58	84.57	85.13	85.63	84.34	84.13	85.81	85.40	86.71	86.73	86.63
饱和物		29.86	71.97	***62.22***	***66.63***	68.74	***65.20***	***64.90***	68.05	67.90	***65.37***	***66.17***	***64.57***
不饱和物		69.91	27.76	***37.50***	***33.15***	31.07	***34.57***	***34.89***	31.73	31.87	***34.37***	***33.59***	***35.13***
亲本脂质滴度%		100.0	56.2	43.4	48.8	27.5	44.1	47.4	59.0	47.6	43.2	48.4	44.4

[0506] 在表43中,S4495是亲本品系;S1920是野生型基础品系。比野生型品系中高出至少两倍的硬脂酸酯(C18:0)水平以粗体突出显示。低于S1920和S4495中的棕榈酸酯水平以粗体突出显示。粗斜体指示,饱和物:不饱和物比率≤2:1。

[0507] 品系S5665和S5675的脂肪酸谱和性能量度详述于下表44中。呈现在相同发酵条件下生长的亲本品系S4495的脂肪酸谱以供比较。过表达KASII的品系积累的C18:0比亲本S4495高约11%。C16:0减少至7%-9%,并且不饱和脂肪酸水平增加4%-5%。S5665和S5675的脂质滴度与S4495相当,指示KASII过表达对脂质产生不具有不利影响。

[0508] 表44.由S4495、S5665及S5775发酵得到的生物质的终点脂肪酸谱.

品系	S4495	S5665	S5675
发酵	120580F1	130097F3	130098F4
pH	5	5	5
温度(°C)	32	32	32
[N] (mM)	300	300	300
N/P	1.4	1.4	1.4
DO%	30	30	30
糖	S70	S70	S70
Fe (μM)	557.5	557.5	557.5
C14:0	1.27	1.50	1.35
C16:0	28.35	**8.88**	**7.33**
C16:1	0.06	0.02	0.03
C18:0	**43.67**	**56.88**	**57.24**
C18:1	17.63	21.57	21.66
C18:2	5.58	6.06	6.94
C18:3α	0.25	0.29	0.22
C20:0	2.11	3.28	3.46
C22:0	0.31	0.40	0.40
C24:0	0.31	0.37	0.40
总计C18	67.13	84.80	86.06
饱和物	76.02	71.31	70.18
不饱和物	23.52	27.94	28.85
总脂质 (g/L)	475	529	418

[0509] 使用补料分批工艺将发酵物培养6天。由发酵120580F1得到的S4495脂肪酸谱呈现于表41中并且又在表44中示出以与S5665和S5675相比较。所有发酵是在32℃、pH 5、1.4的氮/磷(N/P)比率、30％的溶解氧(DO)、300mM的氮[N]及557.5μM铁下进行。糖源为70％的蔗糖(S70)。高于野生型品系中的硬脂酸酯(C18:0)以粗体指示。低于野生型中的棕榈酸酯(C16:0)水平以粗体突出显示。

[0510] 由衍生自以上描述的摇瓶和发酵的生物质制备实验室级油。这些油的TAG组成由LC/MS测定。SOS是S5665和S5675中的主要TAG种类，范围占来自摇瓶的生物质的从33％-35％，并且在高密度发酵生物质中达到37％。主要含棕榈酸酯的TAG实质上减少，并且三饱和物水平低于在S4495油中所观察到的那些的一半。这些结果证实，在高硬脂酸酯背景下过表达KASII显著地改良了SOS积累，并且使三饱和的TAG的积累减少。

[0511] 用于在S1920中FATA-1破坏、KASII过表达并且FAD2RNAi的构建体：使DNA构建体pSZ2419在S1920中同时地破坏FATA-1等位基因，过表达桑椹型无绿藻KASII并且表达FAD2发夹构建体。编码蔗糖转化酶并针对在桑椹型无绿藻中表达进行密码子优化的酿酒酵母SUC2基因的变化形式被用作转化的一种可选择标记物。转化用DNA的序列紧接着在以下提

供。相关限制性位点以小写字母、粗体指示并且从5'-3'对应地为BspQI、KpnI、AscI、MfeI、BamHI、AvrII、EcoRV、EcoRI、SpeI、AscI、ClaI、BglII、AflII、HinDIII、SacI、SpeI及XhoI。BspQI位点界定转化用DNA的5'和3'端。在该构建体的5'和3'侧翼处加下划线的序列表示能够经由在FATA-1基因座处同源重组靶向整合转化用DNA的来自桑椹型无绿藻的基因组DNA。沿5'至3'方向,通过小写字母、加框文本指示驱动酿酒酵母SUC2基因(编码蔗糖水解活性,由此允许该品系在蔗糖上生长)表达的莱氏衣藻TUB2启动子。SUC2的起始子ATG和终止子TGA由大写字母斜体指示,同时编码区以小写字母斜体指示。普通小球藻硝酸还原酶(NR)基因的3'UTR以小体大写字母指示,后接由小写字母文本指示的间隔子区。由小写字母加框文本指示的桑椹型无绿藻AMT3启动子驱动桑椹型无绿藻KASII基因的表达。编码来自原始小球藻SAD1的质体靶向肽的区域以大写字母斜体指示。编码成熟桑椹型无绿藻KASII多肽的序列以粗体、加下划线的大写字母斜体指示,而3xFLAG表位编码序列以粗斜体指示。第二普通小球藻NR 3'UTR是通过小体大写字母指示。由小写字母加框文本指示的第二莱氏衣藻TUB2启动子序列驱动桑椹型无绿藻FAD2发夹A序列的表达。有义链和反义链是以大写字母、粗斜体指示,并且通过FAD2内含子和FAD2第二外显子的前10个碱基(大写字母斜体)分开。第三普通小球藻NR 3'UTR是以小体大写字母指示,后接由小写字母文本指示的第二间隔子区。

[0512] 来自pSZ2419的转化用DNA的核苷酸序列:

gctcttcggagtcactgtgccactgagttcgactggtagctgaatggagtcgctgctccactaaacgaattgtcagcacc
gccagccggccgaggacccgagtcatagcgagggtagtagcgcgccatggcaccgaccagcctgcttgccagtact
ggcgtctcttccgcttctctgtggtcctctgcgcgctccagcgcgtgcgcttttccggtggatcatgcggtccgtggcgca
ccgcagcggccgctgcccatgcagcgccgctgcttccgaacagtggcggtcagggccgcacccgcggtagccgtcc
gtccggaacccgcccaagagttttgggagcagcttgagccctgcaagatggcggaggacaagcgcatcttcctggag
gagcaccggtgcgtggaggtccggggctgaccggccgtcgcattcaacgtaatcaatcgcatgatgatcagaggaca
cgaagtcttggtggcggtggccagaaacactgtccattgcaagggcatagggatgcgttccttcacctctcatttctcattt
ctgaatccctccctgctcactctttctcctcctccttcccgttcacgcagcattcgg**ggtacc**ctttcttgcgctatgacactt
ccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccccga
agctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgca
aagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtg
atcgcactccgctaaggggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**ggcgcgcc***ATGctgctgcag*
gccttcctgttcctgctggccggcttcgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccct
ggtgcacttcacccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagt
ggcacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctggggccacgccacgtccga
cgacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgccttctccggctc
catggtggtggactacaacaacacctccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgcgtggccatct
ggacctacaacaccccggagtccgaggagcagtacatctcctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagt
accagaagaaccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctccca
gaagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcctg

gaagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttcctcggctaccagtacgagtgccccggcctgatcgaggtcccc
accgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggcgccccggccggcggctcct
tcaaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcacccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttc
ggcaaggactactacgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgcgtgg
gcctccaactgggagtactccgccttcgtgcccaccaaccccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagttctccc
tcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcag
caacgccggcccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgt
ccaacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctccaagtccgtgtt
cgcggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgt
cctccttcttcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgag
cgtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacat
cctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccctgggc
*tccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaagTGA***ca**
attgGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGT
GTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCT
GCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCT
TTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCAT
CCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACG
CTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCG
CACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGT
AAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACA
CAAATGGA**ggatcc**cgcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctca
gcgcggcatacaccacaataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgt
gccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacag**cctagggatatcgaa**
ttcggccgacaggacgcgcgtcaaaggtgctggtcgtgtatgccctggccggcaggtcgttgctgctgctggttagtga
ttccgcaaccctgattttggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgcccgcgagccgggccggcggcgatgcggt
gccccacggctgccggaatccaagggaggcaagagcgcccgggtcagttgaagggctttacgcgcaaggtacagc
cgctcctgcaaggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccaccgcctcaccagcggacaaa
gcaccggtgtatcaggtccgtgtcatccactctaaagaactcgactacgacctactgatggccctagattcttcatcaaaa
acgcctgagacacttgcccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggccctgagttgttccttcccccgtgg

cgagctgccagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgc

aggacagctcatgaaacgccaacaatcgcacaattcatgtcaagctaatcagctatttcctcttcacgagctgtaattgtcc

caaaattctggtctaccgggggtgatccttcgtgtacgggcccttccctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtcgccg

cgcaactcgcgcgagggccgagggtttgggacgggccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcacctttttt

tgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtaggatttcgtaa

tcattcgtcctgatggggagctaccgactaccctaatatcagcccgactgcctgacgccagcgtccacttttgtgcacac

attccattcgtgcccaagacatttcattgtggtgcgaagcgtccccagttacgctcacctgtttcccgacctccttactgttct

gtcgacagagcgggcccacaggccggtcgcagcc**actagt***ATGGCCACCGCATCCACTTTCTCG*

GCGTTCAATGCCCGCTGCGGCGACCTGCGTCGCTCGGCGGGCTCCGGGCC

*CCGGCGCCCAGCGAGGCCCCTCCCCGTGCGCG***ggcgcgcc*****GCCGCCGCCGCC**

GACGCCAACCCCGCCCGCCCCGAGCGCCGCGTGGTGATCACCGGCCAGG

GCGTGGTGACCTCCCTGGGCCAGACCATCGAGCAGTTCTACTCCTCCCTG

CTGGAGGGCGTGTCCGGCATCTCCCAGATCCAGAAGTTCGACACCACCGG

CTACACCACCACCATCGCCGGCGAGATCAAGTCCCTGCAGCTGGACCCCT

ACGTGCCCAAGCGCTGGGCCAAGCGCGTGGACGACGTGATCAAGTACGT

GTACATCGCCGGCAAGCAGGCCCTGGAGTCCGCCGGCCTGCCCATCGAG

GCCGCCGGCCTGGCCGGCGCCGGCCTGGACCCCGCCCTGTGCGGCGTGC

TGATCGGCACCGCCATGGCCGGCATGACCTCCTTCGCCGCCGGCGTGGA

GGCCCTGACCCGCGGCGGCGTGCGCAAGATGAACCCCTTCTGCATCCCCT

TCTCCATCTCCAACATGGGCGGCGCCATGCTGGCCATGGACATCGGCTTC

ATGGGCCCCAACTACTCCATCTCCACCGCCTGCGCCACCGGCAACTACTG

CATCCTGGGCGCCGCCGACCACATCCGCCGCGGCGACGCCAACGTGATG

CTGGCCGGCGGCGCCGACGCCGCCATCATCCCCTCCGGCATCGGCGGCT

TCATCGCCTGCAAGGCCCTGTCCAAGCGCAACGACGAGCCCGAGCGCGC

CTCCCGCCCCTGGGACGCCGACCGCGACGGCTTCGTGATGGGCGAGGGC

GCCGGCGTGCTGGTGCTGGAGGAGCTGGAGCACGCCAAGCGCCGCGGCG

CCACCATCCTGGCCGAGCTGGTGGGCGGCGCCGCCACCTCCGACGCCCA

CCACATGACCGAGCCCGACCCCCAGGGCCGCGGCGTGCGCCTGTGCCTG

GAGCGCGCCCTGGAGCGCGCCCGCCTGGCCCCCGAGCGCGTGGGCTACG

TGAACGCCCACGGCACCTCCACCCCCGCCGGCGACGTGGCCGAGTACCG

CGCCATCCGCGCCGTGATCCCCCAGGACTCCCTGCGCATCAACTCCACCA

AGTCCATGATCGGCCACCTGCTGGGCGGCGCCGGCGCCGTGGAGGCCGT

GGCCGCCATCCAGGCCCTGCGCACCGGCTGGCTGCACCCCAACCTGAACC

TGGAGAACCCCGCCCCCGGCGTGGACCCCGTGGTGCTGGTGGGCCCCCG

CAAGGAGCGCGCCGAGGACCTGGACGTGGTGCTGTCCAACTCCTTCGGCT

TCGGCGGCCACAACTCCTGCGTGATCTTCCGCAAGTACGACGAGATGGAC

TACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGA

***CGACGACGACAAGTGA*atcgatagatctcttaag**GCAGCAGCAGCTCGGATAGTA

TCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACT

TGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAG

TGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTG

CTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCT

TGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTG

CTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCC

TGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGC

ACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGA**aagctt**aattaa**gagctc**ctttcttgc

gctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttc

gacccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggc

ccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccac

tcgagcttgtgatcgcactccgctaaggggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**actagt*ATGG***

CTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTCACGATCGGG

ACGCTGCGCAAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCG

TAGCAGCATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTCATGTCCCTGCTCTACG

TCGCGTCGACGTACATCGACCCTGCACCGGTGCCTACGTGGGTCAAGTAC

GGCATCATGTGGCCGCTCTACTGGTTCTTCCAG*GTGTGTTTGAGGGTTTTG*

GTTGCCCGTATTGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTC

*CCGCTGACCCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACG****GG***

AAGAACCAGTAGAGCGGCCACATGATGCCGTACTTGACCCACGTAGGCAC

CGGTGCAGGGTCGATGTACGTCGACGCGACGTAGAGCAGGGACATGACC

GCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGAAGCGCCGAGCGCTCGA

AACAGTGCGCGGGGATGGCCTTGCGCAGCGTCCCGATCGTGAACGGAGG
***CTTCTCCACAGGCTGCCTGTTCGTCTTGATAGCCAT*ctcgag**GCAGCAGCAG
CTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTT
GCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCA
AACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCT
AGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGT
TTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATC
CCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTT
TGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGC
AATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAaagctgtat
tgttttccagaaggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggaggggggtt
cgaagacagggtggttggctggatggggaaacgctggtcgcgggattcgatcctgctgcttatatcctccctggaagca
cacccacgactctgaagaagaaaacgtgcacacacacaacccaaccggccgaatatttgcttccttatcccgggtccaa
gagagactgcgatgccccctcaatcagcatcctcctccctgccgcttcaatcttccctgcttgcctgcgcccgcggtgc
gccgtctgcccgcccagtcagtcactcctgcacaggccccttgtgcgcagtgctcctgtacccttaccgctccttccattc
tgcgaggcccctattgaatgtattcgttgcctgtgtggccaagcgggctgctgggcgcgccgccgtcgggcagtgctc
ggcgactttggcggaagccgattgttcttctgtaagccacgcgcttgctgctttgggaagagaagggggggggtactga
atggatgaggaggagaaggaggggtattggtattatctgagttgggt**gaagagc**（SEQ ID NO:96）

[0513] FATA-1敲除、KASII过表达并且FAD2RNAi品系的鉴别和分析：如先前所描述，将衍生自pSZ2419的构建体D1358转化至S1920中。将初级转化子以克隆方式纯化并使其在pH 5下于标准脂质产生条件下生长。由通过用D1358转化S1920所产生的代表性克隆得到的脂肪酸谱概述于下表45中。桑椹型无绿藻AMT3启动子在pH 5下受到阻遏，由此观察到的表型不反映桑椹型无绿藻KASII的过表达。尽管如此，我们观察到多个品系具有实质上降低的水平的C16:0以及C18:1的10％-15％增加，表明该构建体破坏了FATA-1靶基因，从而使被内源KASII可用于延伸的棕榈酰基-ACP的量增加。选出一株D1358-13用于进一步分析。D1358-13积累了约17％的C16:0、约75％的C18:1以及小于2％的C18:2，指示我们已经在这一品系中的FATA-1处成功地进行整合并且下调了FAD2Δ^{12}-去饱和酶的活性。

[0514] 表45.D1358[pSZ2419]初级转化子与野生型亲本品系S1920的脂肪酸谱比较。

品系		S1920	D1358-13	D1358-19	D1358-11	D1358-9	D1358-30	D1358-28	D1358-6	D1358-8	D1358-10	D1358-3
脂肪酸面积%	C12:0	0.05	0.08	0.06	0.08	0.06	0.07	0.07	0.09	0.07	0.08	0.10
	C14:0	1.32	0.79	0.83	0.85	0.87	0.84	0.91	0.86	0.89	0.92	0.60
	C16:0	26.66	**17.43**	**18.84**	**20.03**	**16.27**	**18.4**	**19.1**	**18.18**	**15.6**	**16.42**	**11.24**
	C16:1	0.84	0.74	0.79	0.97	0.60	0.77	1.17	0.75	0.56	0.61	0.57
	C18:0	3.10	2.87	2.97	2.36	3.20	2.67	2.10	2.82	3.22	3.19	2.30
	C18:1	59.07	**74.78**	**69.54**	**68.78**	**71.48**	**69.55**	**69.02**	**68.93**	**70.44**	**69.64**	**75.27**
	C18:2	7.39	**1.97**	**5.47**	**5.61**	**6.22**	**6.31**	6.42	6.8	7.68	7.78	8.51
	C18:3α	0.55	0.23	0.59	0.51	0.26	0.39	0.46	0.38	0.24	0.27	0.24
	C20:0	0.24	0.22	0.20	0.13	0.32	0.20	0.03	0.20	0.33	0.31	0.22
	C20:1	0.11	0.40	0.29	0.37	0.23	0.33	0.33	0.39	0.36	0.27	0.40
	C22:0	0.11	0.09	0.08	0.07	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09	0.11	0.11
总计C18		70.11	79.85	78.57	77.26	81.16	78.92	78.00	78.93	81.58	80.88	86.32
饱和物		31.48	21.48	22.98	23.52	20.81	22.26	22.29	22.23	20.20	21.03	14.57
不饱和物		67.96	78.12	76.68	76.24	78.79	77.35	77.4	77.25	79.28	78.57	84.99

[0515] 在表45中，超过野生型水平的油酸酯(C18:1)水平以粗体文本突出显示。低于野生型的棕榈酸酯(C16:0)水平以粗体突出显示。与亲本S1920相比较降低1％或更多的亚油酸酯(C18:2)水平以粗体文本突出显示。

[0516] 确定衍生自转化子D1358-13的品系的脂肪酸谱在不存在选择情况下超过60代(在蔗糖上生长)之后为稳定的。然后，在摇瓶检验中对所选品系的性能进行评价，并且脂肪酸谱和脂质滴度呈现于下表46中。在pH 7下进行烧瓶实验，使驱动KASII转基因表达的PmAMT3启动子能够活化。与在pH 5下观察到的表型(表45)相比较，KASII过表达与FATA-1敲除的组合使得棕榈酸酯水平进一步降低并且使油酸酯积累增多。具有超过82％的C18:1、低于11％的C16:0、低于2％的C18:2及约83％的野生型脂质滴度，S5003被确定为这一组中最适当的品系以用作随后进行修饰以提高硬脂酸酯水平的一种宿主品系。DNA印迹分析显示，S5003在FATA-1基因座处具有构建体D1358[pSZ2419]的简单插入。

[0517] 表46.衍生自D1358-13初级转化子的FATA-1敲除、KASII过表达、FAD2 RNAi株与野生型亲本品系S1920的脂肪酸谱和脂质滴度的比较。

初级转化子			T389;D1358-13												
品系		S1920	S5003	S5004	S5005	S5006	S5007	S5008	S5009	S5010	S5011	S5012	S5013	S5101	S5102
脂肪酸面积%	C12:0	0.05	0.08	0.09	0.11	0.19	0.11	0.14	0.10	0.12	0.08	0.11	0.09	0.20	0.20
	C14:0	1.34	0.96	0.98	1.03	1.04	0.96	1.02	0.98	1.03	0.98	1.01	1.00	1.03	1.02
	C16:0	29.69	**10.72**	**10.47**	**8.90**	**6.99**	**9.53**	**9.27**	**10.13**	**8.99**	**10.76**	**9.58**	**10.00**	**6.64**	**6.38**
	C16:1	0.88	0.42	0.39	0.31	0.29	0.39	0.37	0.41	0.32	0.40	0.35	0.35	0.27	0.27
	C18:0	2.78	2.92	3.00	3.16	2.71	2.88	2.85	2.91	3.21	3.03	3.10	3.20	2.77	2.71
	C18:1	58.45	**82.08**	**82.24**	**83.66**	**85.49**	**83.28**	**83.38**	**82.57**	**83.51**	**82.12**	**83.10**	**82.63**	**85.88**	**86.13**
	C18:2	5.83	**1.89**	**1.88**	**1.80**	**2.01**	**1.83**	**1.89**	**1.89**	**1.77**	**1.73**	**1.75**	**1.76**	**1.94**	**1.96**
	C18:3α	0.42	0.23	0.23	0.25	0.35	0.27	0.29	0.27	0.25	0.22	0.24	0.23	0.34	0.36
	C20:0	0.17	0.15	0.16	0.17	0.15	0.15	0.16	0.16	0.17	0.14	0.16	0.16	0.15	0.15
	C20:1	0.05	0.23	0.24	0.27	0.36	0.28	0.29	0.26	0.27	0.21	0.25	0.24	0.38	0.39
总计C18		67.48	87.12	87.35	88.87	90.56	88.26	88.41	87.64	88.74	87.10	88.19	87.82	90.93	91.16
饱和物		34.03	14.83	14.70	13.37	11.08	13.63	13.44	14.28	13.52	14.99	13.96	14.45	10.79	10.46
不饱和物		65.63	84.85	84.98	86.29	88.50	86.05	86.22	85.40	86.12	84.68	85.69	85.21	88.81	89.11
脂质滴度(%亲本)		100.0	82.8	81.1	72.8	54.4	68.3	63.7	70.6	72.2	106.9	76.5	77.5	56.7	54.6

[0518] 在表46中,超过野生型水平的硬脂酸酯(C18:1)水平以粗体文本突出显示。低于野生型的棕榈酸酯(C16:0)水平以粗体文本突出显示。低于野生型的亚油酸酯(C18:2)水平以粗体文本突出显示。

[0519] 用于在S5003中SAD2敲除/RNAi的构建:使两个DNA构建体pSZ2283和pSZ2697在S5003中同时地破坏SAD2-1等位基因并表达SAD2发夹构建体。在每个构建体中,赋予对氨基糖苷类抗生素抗性的来自转位子Tn5的neoR基因被用作转化的一种可选择标记物。衍生自pSZ2283的转化用DNA的序列紧接着在以下提供。相关限制性位点以小写字母、粗体指示并且从5'-3'对应地为BspQI、KpnI、XbaI、MfeI、BamHI、AvrII、EcoRV、EcoRI、SpeI、BamHI、HinDIII及SacI。BspQI位点界定转化用DNA的5'和3'端。在该构建体的5'和3'侧翼处加下划线的序列表示能够经由在SAD2-1基因座处同源重组靶向整合转化用DNA的来自桑椹型无绿藻的基因组DNA。沿5'到3'方向继续向前,,驱动neoR(编码氨基糖苷类磷酸转移酶活性,由此允许该品系在G418上生长)表达的莱氏衣藻TUB2启动子通过小写字母,加框文本指示。neoR的起始子ATG和终止子TGA由大写字母斜体指示,同时编码区以小写字母斜体指示。普通小球藻NR基因的3'UTR以小体大写字母指示,后接由小写字母文本指示的间隔子区。由小写字母加框文本指示的第二莱氏衣藻TUB2启动子序列驱动SAD2发夹C序列的表达。有义链和反义链是以大写字母、粗斜体指示,并且通过桑椹型无绿藻FAD2内含子和FAD2第二外显子的前10个碱基(大写字母斜体)分开。第二普通小球藻NR 3'UTR是通过小体大写字母指示。

[0520] 来自pSZ2283的转化用DNA的核苷酸序列:

gctcttcgggtcgccgcgctgcctcgcgtcccctggtggtgcgcgcggtcgccagcgaggccccgctgggcgttccg
ccctcggtgcagcgcccctcccccgtggtctactccaagctggacaagcagcaccgcctgacgcccgagcgcctgga
gctggtgcagagcatggggcagtttgcggaggagagggtgctgcccgtgctgcaccccgtggacaagctgtggcag
ccgcaggacttttgcccgaccccgagtcgcccgacttcgaggatcaggtggcggagctgcgcgcgcgcgccaagg
acctgcccgacgagtactttgtggtgctggtgggggacatgatcacggaggaggcgctgccgacctacatggccatgc
tcaacacgctggacggcgtgcgcgacgacacgggcgcggccgaccacccgtgggcgcgctggacgcggcagtgg
gtggccgaggagaaccggcacggcgacctgctgaacaagtactgctggctgacggggcgcgtcaacatgcgggcc
gtggaggtgaccatcaacaacctgatcaagagcggcatgaacccgcagacggacaacaacccttatttggggttcgtct
acacctccttccaggagcgcgccaccaagta**ggtacc**ctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggg
ctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatggg
cgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagacattatagcgagctacca
aagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgcactccgctaaggggggc
gcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**tctaga**atatca*ATGatcgagcaggacggcctccacgccgg*
ctcccccgccgcctgggtggagcgcctgttcggctacgactgggcccagcagaccatcggctgctccgacgccgcc
gtgttccgcctgtccgcccagggccgccccgtgctgttcgtgaagaccgacctgtccggcgccctgaacgagctgca
ggacgaggccgcccgcctgtcctggctggccaccaccggcgtgccctgcgccgccgtgctggacgtggtgaccga
ggccggccgcgactggctgctgctgggcgaggtgcccggccaggacctgctgtcctcccacctggcccccgccga
gaaggtgtccatcatggccgacgccatgcgccgcctgcacaccctggaccccgccacctgccccttcgaccacca
ggccaagcaccgcatcgagcgcgcccgcacccgcatggaggccggcctggtggaccaggacgacctggacga
ggagcaccagggcctggcccccgccgagctgttcgcccgcctgaaggcccgcatgcccgacggcgaggacctgg

tggtgacccacggcgacgcctgcctgcccaacatcatggtggagaacggccgcttctccggcttcatcgactgcgg

ccgcctgggcgtggccgaccgctaccaggacatcgccctggccacccgcgacatcgccgaggagctgggcggcg

agtgggccgaccgcttcctggtgctgtacggcatcgccgcccccgactcccagcgcatcgccttctaccgcctgctg

*gacgagttcttcTGA***caattg**GCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGG

ACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTG

TGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGT

GTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACC

ACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCA

ACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTC

ACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTA

CTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGG

GATGGGAACACAAATGGA**ggatcc**cgcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctc

gcctctgtcgcacctcagcgcggcatacaccacaataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagc

gtccggttcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcaca

g**cctagggatatcgaattc**ctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccg

gcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgaccccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctcca

gggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacct

agatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgcactccgctaaggggggcgcctcttcctcttcgtttcagt

cacaacccgcaaac**actagt*GCGCTGGACGCGGCAGTGGGTGGCCGAGGAGAACCG***

GCACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGTTGGCTGACGGGGCGCGTCAAC

ATGCGGGCCGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGAGCGGCATGA

ACCCGCAGACGGACAACAACCCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTTC

CAGGAGCGCGCGACCAAGTACAGCCACGGCAACACCGCGCGCCTTGCGG

CCGAGCA*GTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCGTATCGAGGTCCTGGTGGC*

GCGCATGGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCCGGCTACCCTCC

*CGGCACCTTCCAGGGCGCGTACG***ggatcc*TGCTCGGCCGCAAGGCGCGCGGT***

GTTGCCGTGGCTGTACTTGGTCGCGCGCTCCTGGAAGGAGGTGTAGACGA

AGCCCAAGTAAGGGTTGTTGTCCGTCTGCGGGTTCATGCCGCTCTTGATC

AGGTTGTTGATGGTCACCTCCACGGCCCGCATGTTGACGCGCCCCGTCAG

CCAACAGTACTTGTTCAGCAGGTCGCCGTGCCGGTTCTCCTCGGCCACCC

***ACTGCCGCGTCCAGCGC*aagcttGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACAC**
ACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCT
TGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTG
ATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGC
GAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCC
AACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCT
CCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCT
CCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAA
GTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAaagctg**gagctc**cagccacggcaacaccgcgcgcct
tgcggccgagcacggcgacaagaacctgagcaagatctgcgggctgatcgccagcgacgagggccggcacgagat
cgcctacacgcgcatcgtggacgagttcttccgcctcgaccccgagggcgccgtcgccgcctacgccaacatgatgc
gcaagcagatcaccatgcccgcgcacctcatggacgacatgggccacggcgaggccaacccgggccgcaacctctt
cgccgacttctccgcggtcgccgagaagatcgacgtctacgacgccgaggactactgccgcatcctggagcacctcaa
cgcgcgctggaaggtggacgagcgccaggtcagcggccaggccgccgcggaccaggagtacgtcctgggcctgc
cccagcgcttccggaaactcgccgagaagaccgccgccaagcgcaagcgcgtcgcgcgcaggcccgtcgccttctc
ctggatctccgggcgcgagatcatggtctagggagcgacgagtgtgcgtgcggggctggcgggagtgggacgccct
cctcgctcctctctgttctgaacggaacaatcggccaccccgcgctacgcgccacgcatcgagcaacgaagaaaaccc
cccgatgataggttgcggtggctgccgggatatagatccggccgcacatcaaagggcccctccgccagagaagaagc
tcctttcccagcagactcct**gaagagc**（SEQ ID NO:97）

[0521] 衍生自pSZ2697的转化用DNA的序列紧接着在以下提供。相关限制性位点以小写字母、粗体指示并且从5’-3’对应地为NsiI、SpeI、BamHI、HinDIII、SacII、EcoRV、KpnI、XbaI、MfeI、BamHI、AvrII、EcoRV、EcoRI及XbaI。在该构建体的5’和3’侧翼处加下划线的序列表示能够经由在SAD2-1基因座处同源重组靶向整合转化用DNA的来自桑椹型无绿藻的基因组DNA。沿5’到3’方向继续向前，SAD2发夹C有义链和反义链是以大写字母、粗斜体指示，并且通过桑椹型无绿藻FAD2内含子和FAD2第二外显子的前10个碱基(大写字母斜体)分开。普通小球藻NR基因的3’UTR以小体大写字母指示。驱动neoR(编码氨基糖苷类磷酸转移酶活性，由此允许该品系在G418上生长)表达的耐热性小球藻谷氨酸脱氢酶(GDH)启动子通过小写字母，加框文本指示。neoR的起始子ATG和终止子TGA由大写字母斜体指示，同时编码区以小写字母斜体指示。第二普通小球藻NR 3’UTR是以小体大写字母指示，后接由小写字母文本指示的第二间隔子区。

[0522] 来自pSZ2697的转化用DNA的核苷酸序列：

atgcatgccggtcaccacccgcatgctcgtactacagcgcacgcaccgcttcgtgatccaccgggtgaacgtagtcct
cgacggaaacatctggttcgggcctcctgcttgcactcccgcccatgccgacaacctttctgctgttaccacgacccaca
atgcaacgcgacacgaccgtgtgggactgatcggttcactgcacctgcatgcaattgtcacaagcgcttactccaattgt
attcgtttgttttctgggagcagttgctcgaccgcccgcgtcccgcaggcagcgatgacgtgtgcgtggcctgggtgtttc
gtcgaaaggccagcaaccctaaatcgcaggcgatccggagattgggatctgatccgagtttggaccagatccgccccg
atgcggcacgggaactgcatcgactcggcgcggaacccagctttcgtaaatgccagattggtgtccgatacctggattt
gccatcagcgaaacaagacttcagcagcgagcgtatttggcgggcgtgctaccagggttgcatacattgcccatttctgt
ctggaccgctttactggcgcagagggtgagttgatggggttggcaggcatcgaaacgcgcgtgcatggtgtgcgtgtct
gttttcggctgcacgaattcaatagtcggatgggcgacggtagaattgggtgtggcgctcgcgtgcatgcctcgccccgt
cgggtgtcatgaccgggactggaatccccccctcgcgaccatcttgctaacgctcccgactctcccg**actagt*GCGC***
TGGACGCGGCAGTGGGTGGCCGAGGAGAACCGGCACGGCGACCTGCTGA
ACAAGTACTGTTGGCTGACGGGGCGCGTCAACATGCGGGCCGTGGAGGT
GACCATCAACAACCTGATCAAGAGCGGCATGAACCCGCAGACGGACAACA
ACCCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTTCCAGGAGCGCGCGACCAAG
TACAGCCACGGCAACACCGCGCGCCTTGCGGCCGAGCA*GTGTGTTTGAGG*
GTTTTGGTTGCCCGTATCGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGGAGAAGGCG
CCTGTCCCGCTGACCCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGT
*ACG***ggatcc*TGCTCGGCCGCAAGGCGCGCGGTGTTGCCGTGGCTGTACTTG***
GTCGCGCGCTCCTGGAAGGAGGTGTAGACGAAGCCCAAGTAAGGGTTGT
TGTCCGTCTGCGGGTTCATGCCGCTCTTGATCAGGTTGTTGATGGTCACC
TCCACGGCCCGCATGTTGACGCGCCCCGTCAGCCAACAGTACTTGTTCAG
CAGGTCGCCGTGCCGGTTCTCCTCGGCCACCCACTGCCGCGTCCAGCGC**a**
agcttGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGT
GTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCT

GCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCT

TTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCAT

CCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACG

CTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCG

CACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGT

AAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACA

CAAATGGAAAGCTG**gagctc**aaa**gatatc**aacttaattaaccaa**ggtacc**cgcctgcaacgcaagggc

agccacagccgctcccacccgccgctgaaccgacacgtgcttgggcgcctgccgcctgcctgccgcatgcttgtgctg

gtgaggctgggcagtgctgccatgctgattgaggcttggttcatcgggtggaagcttatgtgtgtgctgggcttgcatgc

cgggcaatgcgcatggtggcaagagggcggcagcacttgctggagctgccgcggtgcctccaggtggttcaatcgc

ggcagccagagggatttcagatgatcgcgcgtacaggttgagcagcagtgtcagcaaaggtagcagtttgccagaatg

atcggttcagctgttaatcaatgccagcaagagaaggggtcaagtgcaaacacgggcatgccacagcacgggcaccg

gggagtggaatggcaccaccaagtgtgtgcgagccagcatcgccgcctggctgtttcagctacaacggcaggagtca

tccaacgtaaccatgagctgatcaacactgcaatcatcgggcgggcgtgatgcaagcatgcctggcgaagacacatgg

tgtgcggatgctgccggctgctgcctgctgcgcacgccgttgagttggcagcaggctcagccatgcactggatggcag

ctgggctgccactgcaatgtggtggataggatgcaagtggagcgaataccaaaccctctggctgcttgctgggttgcat

ggcatcgcaccatcagcaggagcgcatgcgaagggactggccccatgcacgccatgccaaaccggagcgcaccga

gtgtccacactgtcaccaggcccgcaagctttgcagaaccatgctcatggacgcatgtagcgctgacgtcccttgacgg

cgctcctctcgggtgtgggaaacgcaatgcagcacaggcagcagaggcggcggcagcagagcggcggcagcagc

ggcgggggccacccttcttgcggggtcgcgccccagccagcggtgatgcgctgatcccaaacgagttcacattcattt

gcatgcctggagaagcgaggctggggcctttgggctggtgcagcccgcaatggaatgcgggaccgccaggctagca

gcaaaggcgcctcccctactccgcatcgatgttccatagtgcattggactgcatttgggtggggcggccggctgtttcttt

cgtgttgcaaaacgcgccagctcagcaacctgtcccgtgggtcccccgtgccgatgaaatcgtgtgcacgccgatcag

ctgattgcccggctcgcgaagtaggcgccctcctttctgctcgccctctctccgtcccgcc**tctaga**atatca*ATGatc*

gagcaggacggcctccacgccggctccccgccgcctgggtggagcgcctgttcggctacgactgggcccagca

gaccatcggctgctccgacgccgccgtgttccgcctgtccgcccagggccgccccgtgctgttcgtgaagaccgacc

tgtccggcgccctgaacgagctgcaggacgaggccgcccgcctgtcctggctggccaccaccggcgtgccctgcg

ccgccgtgctggacgtggtgaccgaggccggccgcgactggctgctgctgggcgaggtgcccggccaggacctg

ctgtcctcccacctggcccccgccgagaaggtgtccatcatggccgacgccatgcgccgcctgcacaccctggacc

ccgccacctgccccttcgaccaccaggccaagcaccgcatcgagcgcgcccgcacccgcatggaggccggcctg
gtggaccaggacgacctggacgaggagcaccagggcctggcccccgccgagctgttcgcccgcctgaaggccc
gcatgcccgacggcgaggacctggtggtgacccacggcgacgcctgcctgcccaacatcatggtggagaacggc
cgcttctccggcttcatcgactgcggccgcctgggcgtggccgaccgctaccaggacatcgccctggccacccgcg
acatcgccgaggagctgggcggcgagtgggccgaccgcttcctggtgctgtacggcatcgccgcccccgactccc
*agcgcatcgccttctaccgcctgctggacgagttcttcTGA***caattg**GCAGCAGCAGCTCGGATAG
TATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACA
CTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTC
AGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTG
TGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCG
CTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGC
TGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCG
CCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGAT
GCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGA**ggatcc**cgcgtctcgaacagag
cgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacaccacaataaccacctgacgaatg
cgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcg
gtggagctgatggtcgaaacgttcacag**cctagggatatcgaattc**cgggtcgccgcgctgcctcgcgtcccctggt
ggtgcgcgcggtcgccagcgaggccccgctgggcgttccgccctcggtgcagcgcccctccccgtggtctactcca
agctggacaagcagcaccgcctgacgcccgagcgcctggagctggtgcagagcatggggcagtttgcggaggaga
gggtgctgcccgtgctgcaccccgtggacaagctgtggcagccgcaggacttttgcccgaccccgagtcgcccgact
tcgaggatcaggtggcggagctgcgcgcgcgcgccaaggacctgcccgacgagtactttgtggtgctggtgggggga
catgatcacggaggaggcgctgccgacctacatggccatgctcaacacgctggacggcgtgcgcgacgacacgggc
gcggccgaccacccgtgggcgcgctggacgcggcagtgggtggccgaggagaaccggcacggcgacctgctgaa
caagtactgctggctgacggggcgcgtcaacatgcgggccgtggaggtgaccatcaacaacctgatcaagagcggc
atgaacccgcagacggacaacaacccttatttggggttcgtctacacctccttccaggagcgcgccaccaagta**tctag**
a（SEQ ID NO:98）

[0523] 在S5003背景中SAD2敲除/敲减品系的鉴别和分析：如先前所描述，将衍生自pSZ2697的构建体D1639和衍生自pSZ2283的D1682转化至S5003中。将初级转化子以克隆方式纯化并使其在pH 7下于标准脂质产生条件下生长。由转化所产生的代表性克隆得到的脂肪酸谱概述于下表47中。D1639转化子积累了多达56％的C18:0，并且D1682转化子积累了最大约35％的C18:0。硬脂酸酯的增加主要以C18:1为代价，指示在这些品系中通过SAD2敲除/RNAi构建体使SAD活性显著降低。C16:0水平在6％到14％间变化；C18:2范围从2％-5％。大多数品系维持了亲本S5003的低C16:0和C18:2表型。这些脂肪酸谱证实，在具有破坏的FATA-1、KASII过表达及FAD2RNAi的背景下使用敲除/RNAi构建体下调SAD2表达产生了具有高C18:0、低C16:0及低C18:2表型的品系。这些品系将适用于产生高稳定性、高硬脂酸酯、高

油酸油以及具有高SOS含量的油。

[0524] 表47.D1639[pSZ2697]和D1682[pSZ2283]初级转化子与野生型品系S1920和S5003亲本基础品系的脂肪酸谱比较。

品系		S1920	S5003	D1682-4	D1682-17	D1682-7	D1682-6	D1639-2	D1639-5	D1639-10	D1639-19
脂肪酸面积%	C12:0	0.04	0.11	0.14	0.10	0.32	0.31	0.00	0.19	0.17	0.00
	C14:0	1.29	0.98	1.03	0.94	1.11	1.15	1.64	1.39	1.61	1.02
	C16:0	27.50	**7.75**	**8.68**	**10.41**	**5.70**	**5.96**	**7.54**	**9.90**	**14.39**	**12.02**
	C16:1	0.71	0.30	0.06	0.07	0.07	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00
	C18:0	3.28	3.60	**35.46**	**29.92**	**24.66**	**22.30**	**55.96**	**53.38**	**43.46**	**37.30**
	C18:1	57.80	**84.14**	48.39	52.49	61.04	63.60	23.70	26.79	32.93	42.81
	C18:2	7.90	**2.09**	**2.37**	**2.36**	**3.03**	**2.88**	**5.09**	**3.50**	**3.22**	**2.79**
	C18:3α	0.57	0.32	0.50	0.65	0.66	0.58	1.59	0.98	1.01	0.85
	C20:0	0.28	0.23	2.07	1.87	1.75	1.51	3.04	2.73	2.29	2.22
	C20:1	0.18	0.35	0.54	0.49	0.78	0.83	0.37	0.33	0.30	0.40
	C22:0	0.06	0.02	0.27	0.27	0.23	0.20	0.43	0.36	0.29	0.29
	C24:0	0.09	0.02	0.33	0.26	0.34	0.26	0.64	0.45	0.32	0.31
总计C18		69.55	90.14	86.72	85.42	89.39	89.36	86.34	84.65	80.62	83.75
饱和物		32.54	12.70	47.98	43.77	34.11	31.69	69.25	68.40	62.53	53.16
不饱和物		67.16	87.21	51.86	56.06	65.58	67.99	30.75	31.60	37.46	46.85

[0525] 在表47中,超过野生型水平的硬脂酸酯(C18:0)水平以粗体文本突出显示。高于野生型中的油酸酯(C18:1)水平以粗体文本突出显示。低于野生型水平的棕榈酸酯(C16:0)水平以粗体突出显示。相较于野生型水平降低的亚油酸酯(C18:2)以粗体文本突出显示。

[0526] 从众多D1639和D1682转化子分离稳定株。进行摇瓶检验以评价衍生自D1639-5的四个株的性能。由该生物质得到的脂肪酸谱和相对脂质滴度示于下表48中。

[0527] 表48.受CrTUB2启动子驱动来表达SAD2hpC的靶向SAD2-1基因座的衍生自D1639-5的品系的摇瓶检验。

初级转化子				T530;D1639-5			
品系		S1920	S5003	S5774	S5775	S5776	S5777
脂肪酸面积%	C10:0	0.01	0.00	0.07	0.08	0.05	0.04
	C12:0	0.02	0.11	0.19	0.22	0.25	0.23
	C14:0	1.52	1.10	1.35	1.32	1.30	1.43
	C16:0	31.61	**9.59**	**9.28**	**8.44**	**7.74**	**9.46**
	C16:1	1.04	0.34	0.03	0.02	0.01	0.01
	C17:0	0.10	0.11	0.10	0.10	0.10	0.09
	C18:0	2.98	4.36	**53.01**	**53.52**	**55.32**	**52.09**
	C18:1	54.81	**80.84**	27.26	27.52	27.42	28.06
	C18:2	6.88	**2.42**	**3.55**	**3.52**	**2.38**	**3.45**
	C18:3α	0.53	0.33	0.97	1.03	0.82	1.06
	C20:0	0.26	0.31	2.88	2.94	3.15	2.72
	C20:1	0.05	0.34	0.38	0.38	0.40	0.37
	C22:0	0.03	0.06	0.36	0.37	0.39	0.35
	C24:0	0.07	0.08	0.53	0.54	0.53	0.60
总计C18		65.19	87.95	84.79	85.58	85.94	84.66
饱和物		36.59	15.70	67.76	67.52	68.82	66.99
不饱和物		63.30	84.26	32.19	32.46	31.02	32.95
野生型脂质滴度%		100.0	70.3	34.8	33.7	31.4	35.3

[0528] 在表48中,S5003是亲本品系;S1920是野生型基础品系。高于野生型品系中的硬脂酸酯(C18:0)以粗体指示。粗体文本指示与野生型相比较,在S5003中油酸酯(C18:1)水平增加。低于野生型中的棕榈酸酯(C16:0)水平以粗体突出显示。低于野生型中的亚油酸酯(C18:2)水平以粗体指示。

[0529] 由从S5774、S5775及S5776摇瓶收集的生物质制备实验室级油。通过LC/MS测定这些油的TAG组成,并示于图21中。在这些品系中,SOS积累量范围从42%-47%。POS是第二大最丰富的TAG,为16%-17%。与以上所描述的S5665和S5675油相比较,含亚油酸酯的TAG减少超过50%。S5774-S5776油含有12%-13%的三饱和的TAG(S-S-S),类似于在S5665和S5775油中积累的量。在油产生期间调节SAD活性以防止饱和脂肪酸的过量产生可能有助于减少三饱和物的积累。

实例49:高油酸微藻油中油酸甲酯的特性。

[0530] 富含油酸甲酯的酯化油适用于多种应用中,如机器的清洁和润滑。对于这些应用中的一些,希望的是高热稳定性。对通过如以上所描述异养生长产油微藻所制备的高油酸油和高稳定性-高油酸三酸甘油酯油所制备的甲基化油进行热稳定性测试。在甲基化之前,对这些油进行漂白并除臭。使用可商购的大豆甲酯作为对照物。

[0531] 高油酸(HO)油是通过用一种质粒转化桑椹型无绿藻的高油产率品系来制备,该质

粒可以描述为FatA1_Btub:inv:nr::amt03-CwTE2:nr_FatA1。这一质粒被设计成在FATA1染色体位点中进行同源重组，由此消除了FATA酰基-ACP硫酯酶染色体等位基因，同时在pH可调控amt3启动子控制下表达来自赖特萼距花的外源酰基-ACP硫酯酶(CwTE2，SEQ ID NO:11)。可以通过在油产生期间在pH 5下培养使CwTE2基因下调，以进一步提高油酸酯产量。还表达蔗糖转化酶作为一种选择标记物并允许以蔗糖作为唯一碳源培养该品系。3'UTR序列来自普通小球藻硝酸还原酶基因。所得HO品系称为Q品系。由Q品系产生的油的脂肪酸谱列于下表49中。

[0532] 表49.由Q品系得到的高油酸油的脂肪酸谱

脂肪酸	面积%
C10	0.01
C12:0	0.03
C14:0	0.43
C15:0	0.03
C16:0	7.27
C16:1 iso	0.81
C16:1	0.689
C17:0	0.06
C18:0	1.198
C18:1	80.15
C18:1 iso	0.08
C18:2	8.38
C18:3 α	0.25
C20:0	0.02
C20:1	0.38
C22:0	0.04
C24:0	0.03

[0533] 高稳定性-高油酸油(HSAO)也是通过用一种质粒转化桑椹型无绿藻的高油产量品系来制备，该质粒可以描述为FADc5'_Btub:inv:nr::btub-CpSAD_CtOTE:nr_FADc3'。所得品系(R品系)表达蔗糖转化酶作为一种选择标记物并且允许以蔗糖作为唯一碳源进行培养。此外，FAD等位基因(对负责将油酸酯转化成亚油酸酯的脂肪酸去饱和酶进行编码)被破坏并且与来自原始小球藻的SAD基因的转运肽融合的油酸酯特异性酰基-ACP硫酯酶(红花OTE，参看实例5)在β微管蛋白启动子控制下得以表达。3'UTR序列来自普通小球藻硝酸还原酶基因。由R品系在异养培养之后产生的油的脂肪酸谱列于下表50中。该脂肪酸谱具有超过85％的油酸酯，几乎没有主要多饱和物亚油酸和亚麻酸。

[0534] 表50.由R品系得到的高油酸油的脂肪酸谱

脂肪酸	面积%
C10	0.02
C12:0	0.07
C14:0	0.09
C15:0	0.05
C16:0	7.28
C16:1	0.70
C17:0	0.08
C18:0	2.15
C18:1	86.32
C20:0	0.30
C20:1	0.46
C22:0	0.08
C23:0	0.01
C24:0	0.06

[0535] 通过已知生物柴油制造技术对HO和HSAO油进行甲基化以制得甲基-HO和甲基-HSAO酯。然后,根据以下程序对这些甲基酯进行热测试:

1.准备设备(如图1中所示)。

2.向试管中添加1升水并使其在热板上达到活跃沸腾。

3.向每种测试产物中添加50ppm的钴(含0.083g 6%的萘酸钴的100.0克样品)并彻底混合。

4.在表面皿中称出7.0g的100%纱布(50号粗棉布)。

5.将14.0g如步骤3中所制备的测试产物均匀地分配到该纱布上。

6.穿过15号塞子的中心放置热电偶(温度计)。将棉布缠绕在该热电偶周围。

7.将缠绕的棉布放入24目的线框圆筒中,以使得它占据上部4 $^{1}/_{2}$英寸。

8.将缠绕有纱布的圆筒放入1L高型烧杯中。确保该烧杯在沸水中并开始记录温度随时间的增加。

9.持续监测温度2小时,或直到观察到10度温度降低。

10.在图上绘制温度对时间曲线。

11.显示温度在1小时内超过100摄氏度或在2小时内超过200摄氏度的任何样品都应当被视为有危险的氧化风险或可能自发燃烧的样品。

[0536] 结果:如通过温度升高所证实,HO和HSAO甲酯未展现自氧化。对照大豆甲酯样品未展现自氧化的可能。时间-温度曲线示于图18中。

[0537] 此外,还发现来自Q品系产生的油的甲基化脂肪酸具有以下特征:

- 182℃闪点(ASTM D93)
- 非VOC
- 53.5的贝壳杉脂丁醇值(ASTM D1133)
- 在40℃下4.57mm2/s的粘度(ASTM D445)
- 0.17mg KOH/g的酸值(ASTM D664)

• 325℃-362℃的沸点范围分布(ASTM D2887)。

实例50:高油酸(HO)和高稳定性-高油酸(HSAO)微藻油的另外的特性。

[0538] 高油酸油和高稳定性高油酸藻类油可以具有图19中所示的特性或这些值±20%(对于所测量的参数)。

[0539] 在一个实验中,在含0.5%苯基-α-萘胺(PANA)和500ppm的抗坏血酸棕榈酸酯(AP)的抗氧化剂存在下,通过OSI在110℃下所测量,HSAO微藻油显示出512小时的稳定性(使用130℃数据估计)。

实例51:通过将棕榈酸转化成棕榈油酸酯来产生低饱和度油。

[0540] 如以上实例中所描述,微藻的基因操作可以降低饱和脂肪的水平,尤其是通过增加油酸的产量。然而,在一些情形中,在产油细胞中表达的酰基-ACP硫酯酶释放更多的所希望的量的棕榈酸酯。此处,我们描述了通过对棕榈酰基-ACP去饱和酶(PAD)基因进行过表达来讲棕榈酸酯(16:0)转化成棕榈油酸酯(16:1)的方法。可以从天然来源(如猫爪藤、澳洲胡桃(澳大利亚坚果)、沙棘)或通过使硬脂酰基-ACP去饱和酶突变以具有16:1活性来产生PAD,从而获得PAD基因。猫爪藤去饱和酶称为(MuPAD)。

[0541] 用带有PAD基因的质粒DNA构建体以生物射弹方式转化桑椹型无绿藻的高油产量品系(Z品系)。举例来说,实例6、36或49中所描述的高油酸品系之一可以另外包含一个外源PAD基因。这些构建体包含作为一种可选择标记物的蔗糖转化酶以及具有L118W突变以将底物特异性向棕榈酸酯转变的MuPAD或SAD基因(例如,油橄榄硬脂酰基-ACP去饱和酶,基因库登录号AAB67840.1)。参看卡霍恩(Cahoon)等,《植物生理学》(Plant Physoil)(1998)117:593-598。使用了amt3和β微管蛋白(Btub)启动子。此外,可以用已知在微藻中有效的转运肽(例如,来自绿球藻SAD基因的转运肽)来交换植物PAD基因的天然转运肽。

[0542] 该PAD基因可以在多种品系中表达,包括了具有FATA敲除或敲减和/或KASII敲入(knockin)以产生高油酸油的那些。任选地,这些品系还可以通过FAD(Δ12脂肪酸去饱和酶)敲除、敲减,或通过使FAD基因表达处于可调控启动子控制下并在下调FAD的条件下产生油来产生高稳定性(低多不饱和物)油。此外,用于引入PAD基因活性的有用的基础品系还可能包括多种具有KASII敲除和FATA敲入的品系,由此使C16:0棕榈酸酯水平升高。

[0543] 结果是,由于这被转化成顺-棕榈油酸和顺-异油酸,而在微藻油的脂肪酸谱中发现更低的棕榈酸水平。在一些情形中,饱和脂肪酸的总面积百分比小于等于3.5%、3%或2.5%。

[0544] 用于过表达猫爪藤C16:0去饱和酶(MuPAD)的构建体如下:

[0545] 1)pSZ3142:6S::CrTUB2:ScSUC2:CvNR::PmAMT3:CpSADtp:MuPAD:CvNR::6S

构建体pSZ31426S::CrTUB2:ScSUC2:CvNR::PmAMT3:CpSADtp:MuPAD:CvNR::6S中的相关限制性位点以小写字母、粗体并加下划线指示,并且5'-3'对应地为BspQ 1、Kpn I、Xba I、Mfe I、BamH I、EcoR I、Spe I、Asc I、Cla I、Sac I、BspQ I。BspQI位点界定转化用DNA的5'和3'端。粗体、小写字母序列代表来自允许经由同源重组在6s基因座处靶向整合的基因组DNA。沿5'至3'方向,通过加框文本指示驱动酵母蔗糖转化酶基因(赋予Z品系代谢蔗糖的能力)的表达的莱氏衣藻β-微管蛋白启动子。转化酶的起始子ATG和终止子TGA由大写字母、粗斜体显示,同时编码区以小写字母斜体显示。普通小球藻硝酸还原酶3'UTR由小写字母加下划线文本显示,后接由加框斜体文本指示的桑椹型无绿藻内源性amt03启动子。MuPAD的

起始子ATG和终止子TGA密码子由大写字母、粗斜体指示，同时该基因的其余部分以粗斜体指示。原始小球藻S106硬脂酰基-ACP去饱和酶转运肽位于起始子ATG与Asc I位点之间。普通小球藻硝酸还原酶3'UTR再次由小写字母加下划线文本显示，后接由粗体小写字母文本指示的6S基因组区域。

[0546] pSZ3142中所含转化用DNA的核苷酸序列：

gctcttcgccgccgccactcctgctcgagcgcgcccgcgcgtgcgccgccagcgccttggccttttcgccgcgctc
gtgcgcgtcgctgatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccggctgagccactgcttcgtccgggcg
gccaagaggagcatgagggaggactcctggtccagggtcctgacgtggtcgcggctctgggagcgggccagca
tcatctggctctgccgcaccgaggccgcctccaactggtcctccagcagccgcagtcgccgccgaccctggcag
aggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagt
catggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctcgctgccgccgcttctcccgcacgcttc
tttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagtcggggg
aactctgatcagtctaaacccccttgcgcgttagtgttgccatcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgtgc
gccacccccacaccacctcctcccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcaga
gaggacagcagtgcccagccgctgggggttggcggatgcacgctcaggtaccctttcttgcgctatgacacttcca
gcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccccgaagc
tccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaag
acattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcg
cactccgctaagggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaactctagaatatca***ATG***ctgctgcaggc
cttcctgttcctgctggccggcttcgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgcccccctgg
tgcacttcacccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtgg

cacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctggggccacgccacgtccgacg

acctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgccttctccggctcca

tggtggtggactacaacaacacctccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgcgtggccatctg

gacctacaacaccccggagtccgaggagcagtacatctcctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagta

ccagaagaaccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctcccag

aagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcctgg

aagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttcctcggctaccagtacgagtgccccggcctgatcgaggtcccca

ccgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggcgccccggccggcggctcctt

caaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcacccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttcg

gcaaggactactacgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgcgtggg

cctccaactgggagtactccgccttcgtgcccaccaaccccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagttctccct

caacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagc

aacgccggcccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtc

caacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctccaagtccgtgttc

gcggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgtc

ctccttcttcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaaccccctacttcaccaaccgcatgagc

gtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacatc

ctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccctgggct

*ccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGA**ca*

attggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctg

ccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgcta

gctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatcta

cgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtatt

ctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatgga**gg**

atcccgcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacacca

caataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgagg

tggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatatc**gaattc***ggccgacaggac*

gcgcgtcaaaggtgctggtcgtgtatgccctggccggcaggtcgttgctgctgctggttagtgattccgcaaccctgat

tttggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgcccgcgagccgggccggcggcgatgcggtgccccacggctg

ccggaatccaagggaggcaagagcgcccgggtcagttgaagggctttacgcgcaaggtacagccgctcctgcaa

ggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccaccgcctcaccagcggacaaagcaccggtg

tatcaggtccgtgtcatccactctaaagaactcgactacgacctactgatggccctagattcttcatcaaaaacgcctg

agacacttgcccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggccctgagttgttccttcccccgtggcgagct

gccagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcagg

acagctcatgaaacgccaacaatcgcacaattcatgtcaagctaatcagctatttcctcttcacgagctgtaattgtcc

caaaattctggtctaccgggggtgatccttcgtgtacgggcccttccctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtcgc

cgcgcaactcgcgcgagggccgagggtttgggacgggccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcac

ctttttgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtagga

tttcgtaatcattcgtcctgatggggagctaccgactaccctaatatcagcccgactgcctgacgccagcgtccacttttt

gtgcacacattccattcgtgcccaagacatttcattgtggtgcgaagcgtccccagttacgctcacctgtttcccgacct

*ccttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggtcgcagcc***actagt***ATGgccaccgcatccactttctcg*

gcgttcaatgcccgctgcggcgacctgcgtcgctcggcgggctccgggccccggcgcccagcgaggcccctcccc

gtgcgcgggcgcgccgccaccctgcgctccggcctgcgcgacgtggagaccgtgaagaagaccttctcccccgcc

cgcgaggtgcacgtgcaggtgacccactccatggcccccagaagatcgagatcttcaaggccatggaggactgg

gccgagaacaacatcctggtgcacctgaagaacgtggagaagtgcccccagccccaggacttcctgcccgaccc

cgcctccgacgagttccacgaccagatcaaggagctgcgcgagcgcgccaaggagatccccgacgactacttcgt

ggtgctggtgggcgacatgatcaccgaggaggccctgcccacctaccagaccatgctgaacacctgggacggcgt

gcgcgacgagaccggcgcctcccccacctcctgggccatctggacccgcgcctggaccgccgaggagaaccgcc

acggcgacccccctgaacaagtacctgtacctgtccggccgcgtggacatgaagcagatcgagaagaccatccagt

acctgatcggctccggcatggacccccgcaccgagaactcccccctacctgggcttcatctacacctccttccaggag

cgcgccaccttcatctcccacggcaacaccgcccgcctggcccgcgaccacggcgacttcaagctggcccagatct

gcggcaccatcgcctccgacgagaagcgccacgagaccgcctacaccaagatcgtggagaagctgttcgagatc

gaccccgacggcaccgtgctggccttcggcgacatgatgaagaagaagatctccatgcccgaccacttcatgtacg

acggccgcgacgacaacctgttcgaccacttctcctccgtggcccagcgcctgggcgtgtacaccgccaaggacta

cgccgacatcctggagcacctggtgggccgctggaaggtggagaagctgaccggcctgtccgccgagggccaga

aggcccaggactacgtgtgcggcctgccccccgcatccgccgcctggaggagcgcgcccagatccgcgccaag

caggcccccgcctgcccttctcctggatctacgaccgcgaggtgcagctgatggactacaaggaccacgacggc

gactacaaggaccacgacatcgactacaaggacgacgacgacaagTGA**atcgat**agatctcttaaggcagcag

cagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgtga

atatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgcta

tttgcgaataccacccccagcatccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgct atccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtactg caacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagcttaattaa**gagctcttgttttccagaaggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgt ggaggggttcgaatttaaaagcttggaatgttggttcgtgcgtctggaacaagcccagacttgttgctcactggg aaaaggaccatcagctccaaaaaacttgccgctcaaaccgcgtacctctgctttcgcgcaatctgccctgttgaa atcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagtctgtaattgcctcagaatgtggaatcatctgccccctgtgc gagcccatgccaggcatgtcgcgggcgaggacacccgccactcgtacagcagaccattatgctacctcacaata gttcataacagtgaccatatttctcgaagctccccaacgagcacctccatgctctgagtggccacccccggccct ggtgcttgcggagggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggatcccaccacccccgcgat gggaagaatctctccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgctggcccaggcgagcgtcaaaccata ccacacaaatatccttggcatcggccctgaattccttctgccgctctgctacccggtgcttctgtccgaagcaggg gttgctagggatcgctccgagtccgcaaacccttgtcgcgtggcggggcttgttcgagcttgaagagc**（SEQ ID NO:99）

[0547] 2）pSZ3145：6S::CrTUB2:ScSUC2:CvNR::PmAMT3:MuPAD:CvNR::6S

构建体pSZ31456S::CrTUB2:ScSUC2:CvNR::PmAMT3:MuPAD:CvNR::6S中的相关限制性位点以小写字母、粗体并加下划线指示，并且5’-3’对应地为BspQ 1、Kpn I、Xba I、Mfe I、BamH I、EcoR I、Spe I、Cla I、Sac I、BspQ I。BspQI位点界定转化用DNA的5’和3’端。粗体、小写字母序列代表来自允许经由同源重组在6s基因座处靶向整合的基因组DNA。沿5’至3’方向，通过加框文本指示驱动酵母蔗糖转化酶基因(赋予Z品系代谢蔗糖的能力)的表达的莱氏衣藻β-微管蛋白启动子。转化酶的起始子ATG和终止子TGA由大写字母、粗斜体显示，同时编码区以小写字母斜体显示。普通小球藻硝酸还原酶3’UTR由小写字母加下划线文本显示，后接由加框斜体文本指示的桑椹型无绿藻内源性amt03启动子。MuPAD的起始子ATG和终止子TGA密码子由大写字母、粗斜体指示，同时该基因的其余部分以粗斜体指示。普通小球藻硝酸还原酶3’UTR再次由小写字母加下划线文本显示，后接由粗体小写字母文本指示的6S基因组区域。

[0548] pSZ3145中所含转化用DNA的核苷酸序列：

gctcttcgccgccgccactcctgctcgagcgcgcccgcgcgtgcgccgccagcgccttggccttttcgccgcgctc
gtgcgcgtcgctgatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccggctgagccactgcttcgtccgggcg
gccaagaggagcatgagggaggactcctggtccagggtcctgacgtggtcgcggctctgggagcgggccagca
tcatctggctctgccgcaccgaggccgcctccaactggtcctccagcagccgcagtcgccgccgaccctggcag
aggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagt
catggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctcgctgccgccgcttctcccgcacgcttc
tttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagtcgggg
aactctgatcagtctaaaccccccttgcgcgttagtgttgccatcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgtgc
gccacccccacaccacctcctcccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcaga
gaggacagcagtgcccagccgctgggggttggcggatgcacgctcaggtaccctttcttgcgctatgacacttcca
gcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccccgaagc
tccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaag
acattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcg
cactccgctaaggggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaactctagaatatca***ATG***ctgctgcaggc
cttcctgttcctgctggccggcttcgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctgg
tgcacttcacccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtgg
cacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctggggccacgccacgtccgacg
acctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgccttctccggctcca
tggtggtggactacaacaacacctccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgcgtggccatctg
gacctacaacaccccggagtccgaggagcagtacatctcctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagta
ccagaagaaccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctcccag
aagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcctgg
aagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttcctcggctaccagtacgagtgccccggcctgatcgaggtcccca
ccgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggcgccccggccggcggctcctt
caaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcacccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttcg

gcaaggactactacgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgcgtggg

cctccaactgggagtactccgccttcgtgcccaccaaccccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagttctccct

caacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagc

aacgccggcccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtc

caacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctccaagtccgtgttc

gcggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgtc

ctccttcttcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgagc

gtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacatc

ctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccctgggct

*ccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGA**ca*

attggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctg

ccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgcta

gctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatcta

cgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtatt

ctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatgga**gg**

atcccgcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacacca

caataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgagg

tggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatatc**gaattc***ggccgacaggac*

gcgcgtcaaaggtgctggtcgtgtatgccctggccggcaggtcgttgctgctgctggttagtgattccgcaaccctgat

tttggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgcccgcgagccgggccggcggcgatgcggtgccccacggctg

ccggaatccaagggaggcaagagcgcccgggtcagttgaagggctttacgcgcaaggtacagccgctcctgcaa

ggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccaccgcctcaccagcggacaaagcaccggtg

tatcaggtccgtgtcatccactctaaagaactcgactacgacctactgatggccctagattcttcatcaaaaacgcctg

agacacttgcccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggccctgagttgttccttcccccgtggcgagct

gccagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcagg

acagctcatgaaacgccaacaatcgcacaattcatgtcaagctaatcagctatttcctcttcacgagctgtaattgtcc

caaaattctggtctaccgggggtgatccttcgtgtacgggcccttccctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtcgc

cgcgcaactcgcgcgagggccgagggtttgggacgggccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcac

ctttttgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtagga

tttcgtaatcattcgtcctgatggggagctaccgactaccctaatatcagcccgactgcctgacgccagcgtccacttt

gtgcacacattccattcgtgcccaagacatttcattgtggtgcgaagcgtccccagttacgctcacctgtttcccgacct

*ccttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggtcgcagcc***actagt*** ***ATGgccctgaagctgaacgcca***

tcaacttccagtcccccaagtgctcctccttcggcctgccccccgtggtgtccctgcgctcccccaagctgtccgtggc

cgccaccctgcgctccggcctgcgcgacgtggagaccgtgaagaagaccttctcccccgcccgcgaggtgcacgt

gcaggtgacccactccatggcccccccagaagatcgagatcttcaaggccatggaggactgggccgagaacaaca

tcctggtgcacctgaagaacgtggagaagtgcccccagccccaggacttcctgcccgaccccgcctccgacgagtt

ccacgaccagatcaaggagctgcgcgagcgcgccaaggagatccccgacgactacttcgtggtgctggtgggcg

acatgatcaccgaggaggccctgcccacctaccagaccatgctgaacacctgggacggcgtgcgcgacgagacc

ggcgcctcccccacctcctgggccatctggacccgcgcctggaccgccgaggagaaccgccacggcgacccccct

gaacaagtacctgtacctgtccggccgcgtggacatgaagcagatcgagaagaccatccagtacctgatcggctc

cggcatggacccccgcaccgagaactcccctacctgggcttcatctacacctccttccaggagcgcgccaccttca

tctcccacggcaacaccgcccgcctggcccgcgaccacggcgacttcaagctggcccagatctgcggcaccatcg

cctccgacgagaagcgccacgagaccgcctacaccaagatcgtggagaagctgttcgagatcgaccccgacggc

accgtgctggccttcggcgacatgatgaagaagaagatctccatgcccgaccacttcatgtacgacggccgcgacg

acaacctgttcgaccacttctcctccgtggcccagcgcctgggcgtgtacaccgccaaggactacgccgacatcctg

gagcacctggtgggccgctggaaggtggagaagctgaccggcctgtccgccgagggccagaaggcccaggact

acgtgtgcggcctgcccccccgcatccgccgcctggaggagcgcgcccagatccgcgccaagcaggcccccgc

ctgcccttctcctggatctacgaccgcgaggtgcagctgatggactacaaggaccacgacggcgactacaaggac

cacgacatcgactacaaggacgacgacgacaagTGA**atcgat**agatctcttaaggcagcagcagctcggatagt

atcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgc

ttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaatacca

cccccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgct

gctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaaacc

agcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagcttaattaa**gagctc**ttgttttcca

gaaggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggagggggttcg

aatttaaaagcttggaatgttggttcgtgcgtctggaacaagcccagacttgttgctcactgggaaaaggaccat

cagctccaaaaaacttgccgctcaaaccgcgtacctctgctttcgcgcaatctgccctgttgaaatcgccaccaca

ttcatattgtgacgcttgagcagtctgtaattgcctcagaatgtggaatcatctgccccctgtgcgagcccatgcca

ggcatgtcgcgggcgaggacacccgccactcgtacagcagaccattatgctacctcacaatagttcataacagt

gaccatatttctcgaagctccccaacgagcacctccatgctctgagtggccacccccccggccctggtgcttgcgg

agggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggatcccaccacccccgcgatgggaagaatct

ctccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgctggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaaata

tccttggcatcggccctgaattccttctgccgctctgctacccggtgcttctgtccgaagcaggggttgctagggat

cgctccgagtccgcaaacccttgtcgcgtggcggggcttgttcgagcttgaagagc（SEQ ID NO:100）

[0549] 3)pSZ3137:6S::CrTUB2:ScSUC2:CvNR::CrTUB2:CpSADtp:MuPAD:CvNR::6S

构建体pSZ31376S::CrTUB2:ScSUC2:CvNR::CrTUB2:CpSADtp:MuPAD:CvNR::6S中的相关限制性位点以小写字母、粗体并加下划线指示，并且5'-3'对应地为BspQ 1、Kpn I、Xba I、Mfe I、BamH I、EcoR I、Spe I、Asc I、Cla I、Sac I、BspQ I。BspQI位点界定转化用DNA的5'和3'端。粗体、小写字母序列代表来自允许经由同源重组在6s基因座处靶向整合的基因组DNA。沿5'至3'方向，通过加框文本指示驱动酵母蔗糖转化酶基因(赋予Z品系代谢蔗糖的能力)的表达的莱氏衣藻β-微管蛋白启动子。转化酶的起始子ATG和终止子TGA由大写字母、粗斜体显示，同时编码区以小写字母斜体显示。普通小球藻硝酸还原酶3'UTR是由小写字母加下划线文本指示，后接由加框斜体文本指示的莱氏衣藻β-微管蛋白启动子。MuPAD的起始子ATG和终止子TGA密码子由大写字母、粗斜体指示，同时该基因的其余部分以粗斜体指示。原始小球藻S106硬脂酰基-ACP去饱和酶转运肽位于起始子ATG与Asc I位点之间。普通小球藻硝酸还原酶3'UTR再次由小写字母加下划线文本显示，后接由粗体小写字母文本指示的6S基因组区域。

[0550] pSZ3137中所含转化用DNA的核苷酸序列：

gctcttcgccgccgccactcctgctcgagcgcgcccgcgcgtgcgccgccagcgccttggccttttcgccgcgctc

gtgcgcgtcgctgatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccggctgagccactgcttcgtccgggcg

gccaagaggagcatgagggaggactcctggtccagggtcctgacgtggtcgcggctctgggagcgggccagca

tcatctggctctgccgcaccgaggccgcctccaactggtcctccagcagccgcagtcgccgccgaccctggcag

aggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagt

catggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctcgctgccgccgcttctcccgcacgcttc
tttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagtcgggg
aactctgatcagtctaaaccccccttgcgcgttagtgttgccatcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgtgc
gccacccccacaccacctcctcccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcaga
gaggacagcagtgcccagccgctgggggttggcggatgcacgctcaggtaccctttcttgcgctatgacacttcca
gcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagc
tccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaag
acattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcg
cactccgctaaggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaactctagaatatca***ATG***ctgctgcaggc
cttcctgttcctgctggccggcttcgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctgg
tgcacttcacccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtgg
cacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctggggccacgccacgtccgacg
acctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgccttctccggctcca
tggtggtggactacaacaacacctccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgcgtggccatctg
gacctacaacaccccggagtccgaggagcagtacatctcctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagta
ccagaagaaccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctcccag
aagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcctgg
aagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttcctcggctaccagtacgagtgccccggcctgatcgaggtcccca
ccgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggcgccccggccggcggctcctt
caaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcacccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttcg
gcaaggactactacgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgcgtggg
cctccaactgggagtactccgccttcgtgcccaccaaccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagttctcct
caacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagc
aacgccggcccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtc
caacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctccaagtccgtgttc
gcggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgtc
ctccttcttcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgagc
gtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacatc
ctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccctgggct
ccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag***TGA***ca

attggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctg

ccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgcta

gctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatcta

cgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtatt

ctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatgga**gg**

atcccgcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacacca

caataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgagg

tggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatatc**gaattc***ctttcttgcgctatg*

acacttccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgac

cccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggccc

ccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggcc

*actcgagcttgtgatcgcactccgctaaggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac***actagt*AT**

Ggccaccgcatccactttctcggcgttcaatgcccgctgcggcgacctgcgtcgctcggcgggctccgggccccgg

cgcccagcgaggcccctccccgtgcgcgggcgcgccgccaccctgcgctccggcctgcgcgacgtggagaccgt

gaagaagaccttctccccgcccgcgaggtgcacgtgcaggtgacccactccatggcccccccagaagatcgagat

cttcaaggccatggaggactgggccgagaacaacatcctggtgcacctgaagaacgtggagaagtgcccccagc

cccaggacttcctgcccgaccccgcctccgacgagttccacgaccagatcaaggagctgcgcgagcgcgccaag

gagatccccgacgactacttcgtggtgctggtgggcgacatgatcaccgaggaggccctgcccacctaccagacc

atgctgaacacctgggacggcgtgcgcgacgagaccggcgcctcccccacctcctgggccatctggacccgcgcc

tggaccgccgaggagaaccgccacggcgacccccctgaacaagtacctgtacctgtccggccgcgtggacatgaa

gcagatcgagaagaccatccagtacctgatcggctccggcatggacccccgcaccgagaactcccctacctgggg

cttcatctacacctccttccaggagcgcgccaccttcatctcccacggcaacaccgcccgcctggcccgcgaccacg

gcgacttcaagctggcccagatctgcggcaccatcgcctccgacgagaagcgccacgagaccgcctacaccaag

atcgtggagaagctgttcgagatcgaccccgacggcaccgtgctggccttcggcgacatgatgaagaagaagatc

tccatgcccgaccacttcatgtacgacggccgcgacgacaacctgttcgaccacttctcctccgtggcccagcgcct

gggcgtgtacaccgccaaggactacgccgacatcctggagcacctggtgggccgctggaaggtggagaagctga

ccggcctgtccgccgagggccagaaggcccaggactacgtgtgcggcctgccccccgcatccgccgcctggag

gagcgcgcccagatccgcgccaagcaggcccccgcctgcccttctcctggatctacgaccgcgaggtgcagctg

atggactacaaggaccacgacggcgactacaaggaccacgacatcgactacaaggacgacgacgacaagTG

***A*atcgat**agatctcttaaggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttg

ccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgc
gcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcc
caaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggttt
gggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgg
gaacacaaatggaaagcttaattaa**gagctcttgttttccagaaggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcg**
ataacctccaaagccgctctaattgtggagggggttcgaatttaaaagcttggaatgttggttcgtgcgtctggaa
caagcccagacttgttgctcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttgccgctcaaaccgcgtacctct
gctttcgcgcaatctgccctgttgaaatcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagtctgtaattgcctcag
aatgtggaatcatctgccccctgtgcgagcccatgccaggcatgtcgcgggcgaggacacccgccactcgtaca
gcagaccattatgctacctcacaatagttcataacagtgaccatatttctcgaagctccccaacgagcacctccat
gctctgagtggccacccccggccctggtgcttgcggagggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatcccc
gaccggatcccaccacccccgcgatgggaagaatctctccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgct
ggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaaatatccttggcatcggccctgaattccttctgccgctctgctac
ccggtgcttctgtccgaagcaggggttgctagggatcgctccgagtccgcaaacccttgtcgcgtggcggggctt
gttcgagcttgaagagc（SEQ ID NO:101）

实例52:通过对湿地萼距花硫酯酶进行过表达所产生的富含肉豆蔻酸酯的油

[0551] 此处,我们证实,过表达湿地萼距花硫酯酶(Cpal FATB1,登录号AAC49180)UTEX1435引起C14:0的大幅增加。

[0552] 如在此所描述,针对在桑椹型无绿藻中表达来对用于过表达Cpal FATB1基因的构建体进行密码子优化。该构建体可以写为6SA::CrTUB2-ScSUC2-CvNR:PmAMT3-CpSAD1tpExt_CpalFATB2FLAG_ExtA-CvNR::6SB。

[0553] 在这一高肉豆蔻酸酯品系中,肉豆蔻酸酯含量为65.70%,如下表51中所示。这相对于由基础品系(它具有约1%的肉豆蔻酸酯含量)产生的野生型油的肉豆蔻酸酯含量是一个极大增加。

[0554] 表51.高肉豆蔻酸酯品系的脂肪酸谱。

C10:0	0.04
C12:0	1.19
C14:0	65.7
C16:0	13.55

C18:0	0.57
C18:1	12.2
C18:2	5.13
C20:0	0.05
C22:0	0.01
C24:0	0.01

[0555] 图22显示,在25℃下,固体脂肪含量超过80%。在25℃下,该基础品系油不具有或

具有可忽略的固体脂肪。作为一种比较，重现了如图4中所示的经过精炼、漂白、除臭的油(RBD-3)的固体脂肪含量。RBD-3是来自工程改造成产生较高量C16:0的桑椹型无绿藻品系的油。用于高C16:0产量品系的构建体可以写为6SA-bTub-Inv-nr::Amt03-Native Ch16TE-nr-6SB。这一构建体编码一种C16:0偏好的细叶蓼距花硫酯酶。

实例53：通过对湿地蓼距花硫酯酶进行过表达所产生的富含肉豆蔻酸酯的油

[0556] 此处，我们证实，在UTEX1435中过表达湿地蓼距花硫酯酶(Cpal FATB1，登录号AAC49180)引起C14:0产量的大幅增加(超过脂肪酸谱的60％)。

[0557] 如在此所描述，针对在桑椹型无绿藻中表达来对用于过表达Cpal FATB2基因的构建体进行密码子优化。湿地蓼距花FATB2是一种C14偏好的硫酯酶。制备两种构建体，它们都编码Cpal FATB2基因。第一构建体pSZ2479可以写为6SA::CrTUB2-ScSUC2-CvNR:PmAMT3-CpSAD1tpExt-CpalFATB2ExtA-CvNR::6SB。FatB2编码序列以SEQ ID NO:86给出并且氨基酸序列以SEQ ID NO:87给出。第二构建体pSZ2480可以写为6SA::CrTUB2-ScSUC2-CvNR:PmAMT3-CpSAD1tpExt_CpalFATB2FLAG_ExtA-CvNR::6SB。核酸序列和氨基酸序列以SEQ ID NO:88和SEQ ID NO:89给出。

[0558] 用pSZ248转化的桑椹型无绿藻产生较高水平的肉豆蔻酸。肉豆蔻酸酯含量为65.70％。在与由基础品系(它具有约1％的肉豆蔻酸酯含量)产生的野生型油的肉豆蔻酸酯含量相比较时，这是一个极大增加。

[0559] 高肉豆蔻酸酯品系的脂肪酸谱示于下表52中。

[0560] 表52.高肉豆蔻酸酯品系的脂肪酸谱。

脂肪酸	％
C10:0	0.04
C12:0	1.19
C14:0	65.7
C16:0	13.55
C18:0	0.57
C18:1	12.2
C18:2	5.13
C20:0	0.05
C22:0	0.01
C24:0	0.01

实例54：二十碳烯酸和芥酸脂肪酸的制造

[0561] 在本实例中，我们证实了来自海甘蓝(CaFAE，登录号AY793549)、银扇草(LaFAE，ACJ61777)及希腊碎米荠(Cardamine graeca)(CgFAE，ACJ61778)的异源脂肪酸延长酶(FAE)，又称为3-酮酰基-CoA合酶(KCS)基因的表达导致在UTEX 1435的经典诱变衍生物Z品系中产生极长链单不饱和脂肪酸，如二十碳烯酸(20:1Δ11)和芥酸(22:1Δ13)。另一方面，来自旱金莲(TmFAE，ABD77097)的一个推定的FAE基因以及来自油菜(BnFAE1，AAA96054；和BnFAE2，AAT65206)的两个FAE基因在引起二十碳烯酸(20:1Δ11)的适度增加的同时，在Z品系中不产生可检测的芥酸。有趣的是，通过在Z品系中BnFAE1的异源表达所获得的不饱和脂肪酸谱引起二十二碳二烯酸(22:2n6)的明显增加。对所有这些基因进行密码子优化以反映

UTEX 1435密码子用法。这些结果表明，CaFAE、LaFAE或CgFAE基因编码了利用单不饱和和饱和酰基底物生物合成极长链所涉及的缩合酶，并且该酶对于改良二十碳烯酸和芥酸含量具有特定能力。

[0562] 用于在桑椹型无绿藻(UTEX 1435品系Z品系)中表达海甘蓝脂肪酸延长酶(CaFAE)的构建体-[pSZ3070]：在本实例中，产生了用构建体pSZ3070转化的Z品系，这些品系表达蔗糖转化酶(允许它们在含有蔗糖的培养基上进行选择并生长)和海甘蓝FAE基因。被引入以在Z品系中表达的构建体pSZ3070可以写为6S::CrTUB2-ScSUC2-Cvnr:PmAmt03-CaFAE-Cvnr::6S。

[0563] 转化用DNA的序列在以下提供。该构建体中的相关限制性位点以小写字母粗体指示，并且从5'-3'对应地为BspQI、KpnI、XbaI、MfeI、BamHI、EcoRI、SpeI、AflII、SacI、BspQI。BspQI位点界定转化用DNA的5'和3'端。粗体、小写字母序列代表来自Z品系的允许经由同源重组在6S基因座处靶向整合的基因组DNA。沿5'至3'方向，通过小写字母、加框文本指示驱动酿酒酵母SUC2基因(编码蔗糖水解活性，由此允许该品系在蔗糖上生长)表达的莱氏衣藻β-微管蛋白启动子。SUC2的起始子ATG和终止子TGA由大写字母斜体指示，同时编码区以小写字母斜体指示。普通小球藻硝酸还原酶(NR)基因3'UTR由小写字母加下划线文本指示，后接由加框斜体文本指示的桑椹型无绿藻的内源AMT3启动子。CaFAE的起始子ATG和终止子TGA密码子由大写字母、粗斜体指示，同时该基因的其余部分以粗斜体指示。普通小球藻硝酸还原酶3'UTR同样由小写字母加下划线文本指示，后接由小写字母粗体文本指示的Z品系6S基因组区域。对最终构建体进行测序以确保正确的阅读框和靶向序列。

[0564] 质粒pSZ3070中所含转化用DNA的核苷酸序列：

gctcttcgccgccgccactcctgctcgagcgcgcccgcgcgtgcgccgccagcgccttggccttttcgccgcgctc
gtgcgcgtcgctgatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccggctgagccactgcttcgtccgggcg
gccaagaggagcatgagggaggactcctggtccagggtcctgacgtggtcgcggctctgggagcgggccagca
tcatctggctctgccgcaccgaggccgcctccaactggtcctccagcagccgcagtcgccgccgaccctggcag

aggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagt
catggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctcgctgccgccgcttctcccgcacgcttc
tttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagtcgggg
aactctgatcagtctaaaccccccttgcgcgttagtgttgccatcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgtgc
gccacccccccacaccacctcctcccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcaga
gaggacagcagtgcccagccgctgggggttggcggatgcacgctcaggtaccctttcttgcgctatgacacttcca
gcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagc
tccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaag
acattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcg
cactccgctaaggggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**tctaga**atatca***ATG***ctgctgcagg
ccttcctgttcctgctggccggcttcgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctg
gtgcacttcacccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtg
gcacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctggggccacgccacgtccgac
gacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgccttctccggctcc
atggtggtggactacaacaacacctccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgcgtggccatct
ggacctacaacaccccggagtccgaggagcagtacatctcctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagt
accagaagaaccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctccca
gaagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcctg
gaagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttcctcggctaccagtacgagtgccccggcctgatcgaggtcccc
accgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggcgccccggccggcggctcct
tcaaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcacccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttc
ggcaaggactactacgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgcgtgg
gcctccaactgggagtactccgccttcgtgcccaccaaccccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagttctccc
tcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcag
caacgccggcccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgt
ccaacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctccaagtccgtgtt
cgcggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgt
cctccttcttcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaaccccctacttcaccaaccgcatgag
cgtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacat
cctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccctgggc

*tccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGA**ca*

attggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctg

ccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgcta

gctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatcta

cgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtatt

ctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatgga**gg**

atcccgcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacacca

caataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgagg

tggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatatc**gaattc***ggccgacaggac*

gcgcgtcaaaggtgctggtcgtgtatgccctggccggcaggtcgttgctgctggttagtgattccgcaaccctgat

tttggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgcccgcgagccgggccggcggcgatgcggtgccccacggctg

ccggaatccaagggaggcaagagcgcccgggtcagttgaagggctttacgcgcaaggtacagccgctcctgcaa

ggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccaccgcctcaccagcggacaaagcaccggtg

tatcaggtccgtgtcatccactctaaagaactcgactacgacctactgatggccctagattcttcatcaaaaacgcctg

agacacttgcccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggccctgagttgttccttcccccgtggcgagct

gccagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcagg

acagctcatgaaacgccaacaatcgcacaattcatgtcaagctaatcagctatttcctcttcacgagctgtaattgtcc

caaaattctggtctaccgggggtgatccttcgtgtacgggccctccctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtcgc

cgcgcaactcgcgcgagggccgagggtttgggacgggccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcac

ctttttgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtagga

tttcgtaatcattcgtcctgatggggagctaccgactaccctaatatcagcccgactgcctgacgccagcgtccacttttt

gtgcacacattccattcgtgcccaagacatttcattgtggtgcgaagcgtccccagttacgctcacctgtttcccgacct

*ccttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggtcgcagcc***actagt*** ***ATGacctccatcaacgtgaagct***

gctgtaccactacgtgatcaccaacctgttcaacctgtgcttcttccccctgaccgccatcgtggccggcaaggcctcc

cgcctgaccatcgacgacctgcaccacctgtactactcctacctgcagcacaacgtgatcaccatcgcccccctgttc

gccttcaccgtgttcggctccatcctgtacatcgtgacccgccccaagcccgtgtacctggtggagtactcctgctacc

tgccccccacccagtgccgctcctccatctccaaggtgatggacatcttctaccaggtgcgcaaggccgacccccttcc

gcaacggcacctgcgacgactcctcctggctggacttcctgcgcaagatccaggagcgctccggcctgggcgacg

agacccacggccccgagggcctgctgcaggtgcccccccgcaagaccttcgccgccgcccgcgaggagaccga

gcaggtgatcgtgggcgccctgaagaacctgttcgagaacaccaaggtgaaccccaaggacatcggcatcctggt

ggtgaactcctccatgttcaaccccacccccctccctgtccgccatggtggtgaacaccttcaagctgcgctccaacgt
gcgctccttcaacctgggcggcatgggctgctccgccggcgtgatcgccatcgacctggccaaggacctgctgcac
gtgcacaagaacacctacgccctggtggtgtccaccgagaacatcacctacaacatctacgccggcgacaaccgc
tccatgatggtgtccaactgcctgttccgcgtgggcggcgccgccatcctgctgtccaacaagccccgcgaccgccg
ccgctccaagtacgagctggtgcacaccgtgcgcacccacaccggcgccgacgacaagtccttccgctgcgtgca
gcagggcgacgacgagaacggcaagaccggcgtgtccctgtccaaggacatcaccgaggtggccggccgcacc
gtgaagaagaacatcgccaccctgggcccccctgatcctgcccctgtccgagaagctgctgttcttcgtgaccttcatg
gccaagaagctgttcaaggacaaggtgaagcactactacgtgcccgacttcaagctggccatcgaccacttctgca
tccacgccggcggccgcgccgtgatcgacgtgctggagaagaacctgggcctggcccccatcgacgtggaggcct
cccgctccaccctgcaccgcttcggcaacacctcctcctcctccatctggtacgagctggcctacatcgaggccaag
ggccgcatgaagaagggcaacaaggtgtggcagatcgccctgggctccggcttcaagtgcaactccgccgtgtgg
gtggccctgtccaacgtgaaggcctccaccaactccccctgggagcactgcatcgaccgctaccccgtgaagatcg
actccgactccgccaagtccgagacccgcgcccagaacggccgctccTGA**cttaag**gcagcagcagctcggat
agtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgc
cgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaata
ccacccccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagc
gctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaa
accagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagcttaattaa**gagctcttgtttt**
ccagaaggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggagggggt
tcgaatttaaaagcttggaatgttggttcgtgcgtctggaacaagcccagacttgttgctcactgggaaaaggac
catcagctccaaaaaacttgccgctcaaaccgcgtacctctgctttcgcgcaatctgccctgttgaaatcgccacc
acattcatattgtgacgcttgagcagtctgtaattgcctcagaatgtggaatcatctgccccctgtgcgagcccatg
ccaggcatgtcgcgggcgaggacacccgccactcgtacagcagaccattatgctacctcacaatagttcataac
agtgaccatatttctcgaagctccccaacgagcacctccatgctctgagtggccacccccggccctggtgcttgc
ggagggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggatcccaccacccccgcgatgggaagaa
tctctccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgctggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaa
atatccttggcatcggccctgaattccttctgccgctctgctacccggtgcttctgtccgaagcaggggttgctagg
gatcgctccgagtccgcaaacccttgtcgcgtggcggggcttgttcgagcttgaagagc (SEQ ID
NO:102)

[0565] 用于在Z品系中表达来自高级植物的FAE基因的构建体:除CaFAE基因(pSZ3070)外,已经对来自银扇草的LaFAE(pSZ3071)、来自希腊碎米荠的CgFAE(pSZ3072)、来自旱金莲的TmFAE(pSZ3067)以及来自油菜的BnFAE1(pSZ3068)和BnFAE2(pSZ3069)基因进行构建以在Z品系中表达。这些构建体可以描述为:

pSZ3071-6S::CrTUB2-ScSUC2-Cvnr:PmAmt03-LaFAE-Cvnr::6S

pSZ3072-6S::CrTUB2-ScSUC2-Cvnr:PmAmt03-CgFAE-Cvnr::6S

pSZ3067-6S::CrTUB2-ScSUC2-Cvnr:PmAmt03-TmFAE-Cvnr::6S

pSZ3068-6S::CrTUB2-ScSUC2-Cvnr:PmAmt03-BnFAE1-Cvnr::6S

pSZ3069-6S::CrTUB2-ScSUC2-Cvnr:PmAmt03-BnFAE2-Cvnr::6S

[0566] 所有这些构建体具有与pSZ3070相同的载体主链、可选择标记物、启动子以及3'utr，差别仅在于对应的FAE基因。这些构建体中的相关限制性位点也与pSZ3070中相同。LaFAE、CgFAE、TmFAE、BnFAE1及BnFAE2的序列显示于下。以粗体文本显示的包括SpeI和AflII在内的相关限制性位点以5'-3'对应地显示。

[0567] pSZ3071中所含LaFAE的核苷酸序列：

actagt*ATGacctccatcaacgtgaagctgctgtaccactacgtgatcaccaacttcttcaacctgtgcttcttccccc*
tgaccgccatcctggccggcaaggcctcccgcctgaccaccaacgacctgcaccacttctactcctacctgcagca
caacctgatcaccctgaccctgctgttcgccttcaccgtgttcggctccgtgctgtacttcgtgacccgccccaagccc
gtgtacctggtggactactcctgctacctgcccccccagcacctgtccgccggcatctccaagaccatggagatcttct
accagatccgcaagtccgacccccctgcgcaacgtggccctggacgactcctcctccctggacttcctgcgcaagatc
caggagcgctccggcctgggcgacgagacctacggccccgagggcctgttcgagatcccccccccgcaagaacct
ggcctccgcccgcgaggagaccgagcaggtgatcaacggcgccctgaagaacctgttcgagaacaccaaggtg
aaccccaaggagatcggcatcctggtggtgaactcctccatgttcaaccccacccccctccctgtccgccatggtggtg
aacaccttcaagctgcgctccaacatcaagtccttcaacctgggcggcatgggctgctccgccggcgtgatcgccat
cgacctggccaaggacctgctgcacgtgcacaagaacacctacgccctggtggtgtccaccgagaacatcaccca
gaacatctacaccggcgacaaccgctccatgatggtgtccaactgcctgttccgcgtgggcggcgccgccatcctgc
tgtccaacaagcccggcgaccgccgccgctccaagtaccgcctggcccacaccgtgcgcacccacaccggcgcc
gacgacaagtccttcggctgcgtgcgccaggaggaggacgactccggcaagaccggcgtgtccctgtccaagga
catcaccggcgtggccggcatcaccgtgcagaagaacatcaccaccctgggccccctggtgctgccccctgtccga
gaagatcctgttcgtggtgaccttcgtggccaagaagctgctgaaggacaagatcaagcactactacgtgcccgac
ttcaagctggccgtggaccacttctgcatccacgccggcggccgcgccgtgatcgacgtgctggagaagaacctgg
gcctgtcccccatcgacgtggaggcctcccgctccaccctgcaccgcttcggcaacacctcctcctcctccatctggt
acgagctggcctacatcgaggccaagggccgcatgaagaagggcaacaaggcctggcagatcgccgtgggctc
cggcttcaagtgcaactccgccgtgtgggtggccctgcgcaacgtgaaggcctccgccaactcccccctgggagcac
tgcatccacaagtaccccgtgcagatgtactccggctcctccaagtccgagacccgcgcccagaacggccgctcc
TGActtaag（SEQ ID NO:103）

[0568] pSZ3072中所含CgFAE的核苷酸序列：

actagtATGacctccatcaacgtgaagctgctgtaccactacgtgctgaccaacttcttcaacctgtgcctgttcccc
ctgaccgccttccccgccggcaaggcctcccagctgaccaccaacgacctgcaccacctgtactcctacctgcacc
acaacctgatcaccgtgaccctgctgttcgccttcaccgtgttcggctccatcctgtacatcgtgacccgccccaagcc
cgtgtacctggtggactactcctgctacctgcccccccgccacctgtcctgcggcatctcccgcgtgatggagatcttct
acgagatccgcaagtccgaccctcccgcgaggtgcccttcgacgacccctcctccctggagttcctgcgcaagatc
caggagcgctccggcctgggcgacgagacctacggccccagggcctggtgcacgacatgcccctgcgcatgaa
cttcgccgccgcccgcgaggagaccgagcaggtgatcaacggcgccctggagaagctgttcgagaacaccaag
gtgaacccccgcgagatcggcatcctggtggtgaactcctccatgttcaaccccaccccctccctgtccgccatggtg
gtgaacaccttcaagctgcgctccaacatcaagtccttctccctgggcggcatgggctgctccgccggcatcatcgcc
atcgacctggccaaggacctgctgcacgtgcacaagaacacctacgccctggtggtgtccaccgagaacatcacc
cactccacctacaccggcgacaaccgctccatgatggtgtccaactgcctgttccgcatgggcggcgccgccatcct
gctgtccaacaaggccggcgaccgccgccgctccaagtacaagctggcccacaccgtgcgcacccacaccggc
gccgacgaccagtccttccgctgcgtgcgccaggaggacgacgaccgcggcaagatcggcgtgtgcctgtccaa
ggacatcaccgccgtggccggcaagaccgtgaccaagaacatcgccaccctgggccccctggtgctgccctgtc
cgagaagttcctgtacgtggtgtccctgatggccaagaagctgttcaagaacaagatcaagcacacctacgtgccc
gacttcaagctggccatcgaccacttctgcatccacgccggcggccgcgccgtgatcgacgtgctggagaagaac
ctggccctgtccccgtggacgtggaggcctcccgctccaccctgcaccgcttcggcaacacctcctcctcctccatct
ggtacgagctggcctacatcgaggccaagggccgcatgaagaagggcaacaaggtgtggcagatcgccatcgg
ctccggcttcaagtgcaactccgccgtgtgggtggccctgtgcaacgtgaagccctccgtgaactccccctgggagc
actgcatcgaccgctaccccgtggagatcaactacggctcctccaagtccgagacccgcgcccagaacggccgct
ccTGActtaag（SEQ ID NO:104）

[0569] pSZ3067中所含TmFAE的核苷酸序列：

actagtATGtccggcaccaaggccacctccgtgtccgtgcccctgcccgacttcaagcagtccgtgaacctgaagt
acgtgaagctgggctaccactactccatcacccacgccatgtacctgttcctgacccccctgctgctgatcatgtccgc
ccagatctccaccttctccatccaggacttccaccacctgtacaaccacctgatcctgcacaacctgtcctccctgatc
ctgtgcatcgccctgctgctgttcgtgctgaccctgtacttcctgacccgccccaccccctgtacctgctgaacttctcc
tgctacaagcccgacgccatccacaagtgcgaccgccgccgcttcatggacaccatccgcggcatgggcacctac
accgaggagaacatcgagttccagcgcaaggtgctggagcgctccggcatcggcgagtcctcctacctgccccccc
accgtgttcaagatcccccccccgcgtgtacgacgccgaggagcgcgccgaggccgagatgctgatgttcggcgcc
gtggacggcctgttcgagaagatctccgtgaagcccaaccagatcggcgtgctggtggtgaactgcggcctgttca
accccatcccctccctgtcctccatgatcgtgaaccgctacaagatgcgcggcaacgtgttctcctacaacctgggcg
gcatgggctgctccgccggcgtgatctccatcgacctggccaaggacctgctgcaggtgcgccccaactcctacgc
cctggtggtgtccctggagtgcatctccaagaacctgtacctgggcgagcagcgctccatgctggtgtccaactgcct
gttccgcatgggcggcgccgccatcctgctgtccaacaagatgtccgaccgctggcgctccaagtaccgcctggtgc
acaccgtgcgcacccacaagggcaccgaggacaactgcttctcctgcgtgacccgcaaggaggactccgacggc
aagatcggcatctccctgtccaagaacctgatggccgtggccggcgacgccctgaagaccaacatcaccaccctg
ggccccctggtgctgcccatgtccgagcagctgctgttcttcgccaccctggtgggcaagaaggtgttcaagatgaa
gctgcagccctacatccccgacttcaagctggccttcgagcacttctgcatccacgccggcggccgcgccgtgctgg
acgagctggagaagaacctgaagctgtcctcctggcacatggagccctcccgcatgtccctgtaccgcttcggcaa
cacctcctcctcctccctgtggtacgagctggcctactccgaggccaagggccgcatcaagaagggcgaccgcgtg
tggcagatcgccttcggctccggcttcaagtgcaactccgccgtgtggaaggccctgcgcaacgtgaaccccgccg
aggagaagaacccctggatggacgagatccacctgttccccgtggaggtgcccctgaacTGActtaag（SEQ ID NO:105）

[0570] pSZ3068中所含BnFAE1的核苷酸序列：

actagtATGacctccatcaacgtgaagctgctgtaccactacgtgatcaccaacctgttcaacctgtgcttcttcccc
ctgaccgccatcgtggccggcaaggcctacctgaccatcgacgacctgcaccacctgtactactcctacctgcagc
acaacctgatcaccatcgcccccctgctggccttcaccgtgttcggctccgtgctgtacatcgccacccgccccaagc
ccgtgtacctggtggagtactcctgctacctgcccccccacccactgccgctcctccatctccaaggtgatggacatctt
cttccaggtgcgcaaggccgacccctcccgcaacggcacctgcgacgactcctcctggctggacttcctgcgcaag
atccaggagcgctccggcctgggcgacgagacccacggccccgagggcctgctgcaggtgcccccccgcaaga
ccttcgcccgcgcccgcgaggagaccgagcaggtgatcatcggcgccctggagaacctgttcaagaacaccaac

gtgaaccccaaggacatcggcatcctggtggtgaactcctccatgttcaaccccacccccctccctgtccgccatggtg
gtgaacaccttcaagctgcgctccaacgtgcgctccttcaacctgggcggcatgggctgctccgccggcgtgatcgc
catcgacctggccaaggacctgctgcacgtgcacaagaacacctacgccctggtggtgtccaccgagaacatcac
ctacaacatctacgccggcgacaaccgctccatgatggtgtccaactgcctgttccgcgtgggcggcgccgccatcc
tgctgtccaacaagccccgcgaccgccgccgctccaagtacgagctggtgcacaccgtgcgcacccacaccggc
gccgacgacaagtccttccgctgcgtgcagcagggcgacgacgagaacggccagaccggcgtgtccctgtccaa
ggacatcaccgacgtggccggccgcaccgtgaagaagaacatcgccaccctgggccccctgatcctgccctgtc
cgagaagctgctgttcttcgtgaccttcatgggcaagaagctgttcaaggacgagatcaagcactactacgtgcccg
acttcaagctggccatcgaccacttctgcatccacgccggcggcaaggccgtgatcgacgtgctggagaagaacct
gggcctggcccccatcgacgtggaggcctcccgctccaccctgcaccgcttcggcaacacctcctcctcctccatctg
gtacgagctggcctacatcgagcccaagggccgcatgaagaagggcaacaaggtgtggcagatcgccctgggct
ccggcttcaagtgcaactccgccgtgtgggtggccctgaacaacgtgaaggcctccaccaactccccctgggagca
ctgcatcgaccgctaccccgtgaagatcgactccgactccggcaagtccgagacccgcgtgcccaacggccgctc
cTGActtaag（SEQ ID NO:106）

[0571] pSZ3069中所含BnFAE2的核苷酸序列：

actagtATGgagcgcaccaactccatcgagatggaccaggagcgcctgaccgccgagatggccttcaaggact
cctcctccgccgtgatccgcatccgccgccgcctgcccgacttcctgacctccgtgaagctgaagtacgtgaagctg
ggcctgcacaactccttcaacttcaccaccttcctgttcctgctgatcatcctgcccctgaccggcaccgtgctggtgca
gctgaccggcctgaccttcgagaccttctccgagctgtggtacaaccacgccgcccagctggacggcgtgacccgc
ctggcctgcctggtgtccctgtgcttcgtgctgatcatctacgtgaccaaccgctccaagcccgtgtacctggtggactt
ctcctgctacaagcccgaggacgagcgcaagatgtccgtggactccttcctgaagatgaccgagcagaacggcgc
cttcaccgacgacaccgtgcagttccagcagcgcatctccaaccgcgccggcctgggcgacgagacctacctgcc
ccgcggcatcacctccacccccccccaagctgaacatgtccgaggcccgcgccgaggccgaggccgtgatgttcgg
cgccctggactccctgttcgagaagaccggcatcaagcccgccgaggtgggcatcctgatcgtgtcctgctccctgtt
caaccccacccccctccctgtccgccatgatcgtgaaccactacaagatgcgcgaggacatcaagtcctacaacctg
ggcggcatgggctgctccgccggcctgatctccatcgacctggccaacaacctgctgaaggccaaccccaactcct
acgccgtggtggtgtccaccgagaacatcaccctgaactggtacttcggcaacgaccgctccatgctgctgtgcaac
tgcatcttccgcatgggcggcgccgccatcctgctgtccaaccgccgccaggaccgctccaagtccaagtacgagc
tggtgaacgtggtgcgcacccacaagggctccgacgacaagaactacaactgcgtgtaccagaaggaggacga
gcgcggcaccatcggcgtgtccctggcccgcgagctgatgtccgtggccggcgacgccctgaagaccaacatcac

caccctgggccccatggtgctgcccctgtccggccagctgatgttctccgtgtccctggtgaagcgcaagctgctgaa

gctgaaggtgaagccctacatccccgacttcaagctggccttcgagcacttctgcatccacgccggcggccgcgcc

gtgctggacgaggtgcagaagaacctggacctggaggactggcacatggagccctcccgcatgaccctgcaccg

cttcggcaacacctcctcctcctccctgtggtacgagatggcctacaccgaggccaagggccgcgtgaaggccggc

gaccgcctgtggcagatcgccttcggctccggcttcaagtgcaactccgccgtgtggaaggccctgcgcgtggtgtc

caccgaggagctgaccggcaacgcctgggccggctccatcgagaactaccccgtgaagatcgtgcagTGActt

aag (SEQ ID NO:107)

[0572] 为了确定它们对脂肪酸谱的影响,将受PmAMT3启动子驱动的含有不同异源FAE基因的以上构建体独立地转化至Z品系中。

[0573] 对初级转化子以克隆方式纯化并且使其在pH7.0下于标准脂质产生条件下生长(所有质粒都需要在pH7.0下生长以在通过pH调控的PmAMT03启动子驱动时允许最大FAE基因表达)。由通过将pSZ3070、pSZ3071、pSZ3072、pSZ3067、pSZ3068以及pSZ3069转化至Z品系中产生的一组代表性克隆得到的谱对应地显示于下表53-58中。

[0574] 表达异源FAE基因的所有转基因Z品系都显示C20:1和C22:1脂肪酸积累增加(参看表53-58)。二十碳烯酸(20:$1^{\Delta 11}$)和芥酸(22:$1^{\Delta 13}$)水平相对于野生型的增加始终地高于野生型水平。另外地,通过在Z品系中BnFAE1的异源表达所获得的不饱和脂肪酸谱引起二十二碳二烯酸(C22:2n6)的明显增加。在Z品系中表达的以上提到的FAE的蛋白质比对示于图23中。

[0575] 表53.Z品系和用pSZ3070(CaFAE)DNA转化的代表性衍生物转基因株的不饱和脂肪酸谱。

样品 ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:1	C22:2n6	C22:5
Z 品系; T588; D1828-20	51.49	9.13	0.65	**4.35**	**1.24**	0.11	0.00
Z 品系; T588; D1828-23	55.59	7.65	0.50	**3.78**	**0.85**	0.00	0.13
Z 品系; T588; D1828-43	54.70	7.64	0.50	**3.44**	**0.85**	0.09	0.00
Z 品系; T588; D1828-12	52.43	7.89	0.59	**2.72**	**0.73**	0.00	0.00
Z 品系; T588; D1828-19	56.02	7.12	0.52	**3.04**	**0.63**	0.10	0.11
对照 Z 品系, pH 7	57.99	6.62	0.56	0.19	0.00	0.06	0.05
对照 Z 品系, pH 5	57.70	7.08	0.54	0.11	0.00	0.05	0.05

[0576] 表54.Z品系和用pSZ3071(LaFAE)DNA转化的代表性衍生物转基因株的不饱和脂肪酸谱。

样品 ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:1	C22:2n6	C22:5
Z 品系；T588；D1829-36	54.66	7.04	0.52	**1.82**	**0.84**	0.12	0.09
Z 品系；T588；D1829-24	56.27	6.72	0.51	**1.70**	**0.72**	0.09	0.00
Z 品系；T588；D1829-11	56.65	8.36	0.54	**2.04**	**0.67**	0.00	0.00
Z 品系；T588；D1829-35	55.57	7.71	0.53	**0.10**	**0.66**	0.00	0.00
Z 品系；T588；D1829-42	56.03	7.06	0.54	**1.54**	**0.51**	0.06	0.08
对照 Z 品系，pH 7	57.70	7.08	0.54	0.11	0.00	0.06	0.05
对照 Z 品系，pH 5	57.99	6.62	0.56	0.19	0.00	0.05	0.05

[0577] 表55.Z品系和用pSZ3072(CgFAE)DNA转化的代表性衍生物转基因株的不饱和脂肪酸谱。

样品 ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:1	C22:2n6	C22:5
Z 品系；T588；D1830-47	57.74	7.79	0.52	**1.61**	**0.25**	0.11	0.05
Z 品系；T588；D1830-16	58.06	7.39	0.55	**1.64**	**0.22**	0.07	0.06
Z 品系；T588；D1830-12	57.77	6.86	0.51	**1.34**	**0.19**	0.09	0.00
Z 品系；T588；D1830-37	58.45	7.54	0.49	**1.65**	**0.19**	0.06	0.00
Z 品系；T588；D1830-44	57.10	7.28	0.56	**1.43**	**0.19**	0.07	0.00
对照 Z 品系，pH 7	57.70	7.08	0.54	0.11	0.00	0.06	0.05
对照 Z 品系，pH 5	57.99	6.62	0.56	0.19	0.00	0.05	0.05

[0578] 表56.Z品系和用pSZ3070(TmFAE)DNA转化的代表性衍生物转基因株的不饱和脂肪酸谱。对于这些转基因株未报道可检测的芥酸(22:1)峰。

样品 ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:2n6	C22:5
Z 品系；T588；D1825-47	59.97	7.44	0.56	**0.57**	0.00	0.00
Z 品系；T588；D1825-35	58.77	7.16	0.51	**0.50**	0.09	0.11
Z 品系；T588；D1825-27	60.40	7.82	0.47	**0.44**	0.07	0.07
Z 品系；T588；D1825-14	58.07	7.32	0.54	**0.41**	0.05	0.05
Z 品系；T588；D1825-40	58.66	7.74	0.46	**0.39**	0.08	0.00
对照 Z 品系，pH 7	57.99	6.62	0.56	0.19	0.05	0.05
对照 Z 品系，pH 5	57.70	7.08	0.54	0.11	0.06	0.05

[0579] 表57.Z品系和用pSZ3068(BnFAE1)DNA转化的代表性衍生物转基因株的不饱和脂肪酸谱。对于这些转基因株未报道可检测的芥酸(22:1)峰。

样品 ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:2n6	C22:5
Z 品系；T588；D1826-30	59.82	7.88	0.55	**0.32**	**0.17**	0.10
Z 品系；T588；D1826-23	59.32	8.02	0.58	**0.27**	**0.18**	0.07
Z 品系；T588；D1826-45	59.63	7.49	0.55	**0.27**	**0.19**	0.08
Z 品系；T588；D1826-24	59.35	7.78	0.57	**0.26**	**0.23**	0.00
Z 品系；T588；D1826-34	59.14	7.61	0.57	**0.25**	**0.22**	0.05
对照 Z 品系，pH 7	57.81	7.15	0.59	0.19	0.04	0.06
对照 Z 品系，pH 5	58.23	6.70	0.58	0.18	0.05	0.06

[0580] 表58.Z品系和用pSZ3069(BnFAE2)DNA转化的代表性衍生物转基因株的不饱和脂肪酸谱。对于这些转基因株未报道可检测的芥酸(22:1)峰。

样品 ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:2n6	C22:5
Z 品系；T588；D1827-6	60.59	8.20	0.57	**0.34**	0.00	0.07
Z 品系；T588；D1827-42	59.62	6.44	0.52	**0.30**	0.07	0.00
Z 品系；T588；D1827-48	59.71	7.99	0.59	**0.30**	0.06	0.00
Z 品系；T588；D1827-43	60.66	8.21	0.59	**0.29**	0.04	0.00
Z 品系；T588；D1827-3	60.26	7.99	0.57	**0.28**	0.04	0.00
对照 Z 品系，pH 7	57.81	7.15	0.59	0.19	0.04	0.06
对照 Z 品系，pH 5	58.23	6.70	0.58	0.18	0.05	0.06

实例55:通过表达异源去饱和酶基因来提高总不饱和脂肪酸水平

[0581] 产生“零饱和脂肪”(例如,总不饱和脂肪酸为97％或更高/低于或等于3％的饱和脂肪)品系的方法之一是在高油酸品系(如N品系)中表达去饱和酶基因,我们发现该品系在多轮发酵中产生约85％的C18:1并且总不饱和物为约93％。我们预期通过在N品系中表达去饱和酶基因将使总饱和物进一步减少。

[0582] 在以下实例中,我们证实了通过对异源硬脂酰基-ACP去饱和酶基因(包括来自油橄榄、蓖麻及原始小球藻的去饱和酶)进行过表达来降低在野生型品系UTEX1435中硬脂酸和棕榈酸水平的能力。

[0583] 用于表达油橄榄硬脂酰基-ACP去饱和酶的构建体:为了将油橄榄硬脂酰基-ACP去饱和酶(登录号:AAB67840.1)引入UTEX1435的A品系中,利用酿酒酵母转化酶基因作为可选择标记物以赋予在蔗糖培养基上生长的能力。已经在UTEX1435的A品系中表达的构建体可以写为6SA::CrTUB2:ScSUC2:CvNR::CrTUB2:CpSADtp:OeSAD:CvNR::6SB并且称为pSZ1377。

[0584] 构建体pSZ1377中的相关限制性位点以小写字母、粗体并加下划线指示并且5’-3’对应地为BspQ 1、Kpn I、Xba I、Mfe I、BamH I、EcoR I、Spe I、Asc I、Cla I、Sac I、BspQ I。BspQI位点界定转化用DNA的5’和3’端。粗体、小写字母序列代表允许经由同源重组在6s基因座处靶向整合的基因组DNA。沿5’到3’方向继续向前,驱动酵母蔗糖转化酶基因表达的莱氏衣藻β-微管蛋白启动子以加框文本指示。转化酶的起始子ATG和终止子TGA由大写字母、粗斜体显示,同时编码区以小写字母斜体显示。普通小球藻硝酸还原酶3’UTR由小写字母加下划线文本指示,后接由加框斜体文本指示的驱动OeSAD表达的第二莱氏衣藻β-微管蛋白启动子。OeSAD的起始子ATG和终止子TGA密码子由大写字母、粗斜体指示,同时硬脂酰基-ACP去饱和酶编码区的其余部分以粗斜体指示。原始小球藻硬脂酰基-ACP去饱和酶转运肽位于起始子ATG与Asc I位点之间。普通小球藻硝酸还原酶3’UTR再次由小写字母加下划线文本显示,后接由粗体小写字母文本指示的6S基因组区域。

[0585] pSZ1377中所含转化用DNA的核苷酸序列：

gctcttcgccgccgccactcctgctcgagcgcgcccgcgcgtgcgccgccagcgccttggccttttcgccgcgctc
gtgcgcgtcgctgatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccggctgagccactgcttcgtccgggcg
gccaagaggagcatgagggaggactcctggtccagggtcctgacgtggtcgcggctctgggagcgggccagca
tcatctggctctgccgcaccgaggccgcctccaactggtcctccagcagccgcagtcgccgccgaccctggcag
aggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagt
catggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctcgctgccgccgcttctcccgcacgcttc
tttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagtcgggg
aactctgatcagtctaaaccccccttgcgcgttagtgttgccatcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgtgc
gccacccccccacaccacctcctcccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcaga
gaggacagcagtgcccagccgctgggggttggcggatgcacgctcaggtacc**ctttcttgcgctatgacacttcca
gcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccccgaagc
tccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaag
acattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcg
cactccgctaaggggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**tctaga**atatca***ATG****ctgctgcagg*
ccttcctgttcctgctggccggcttcgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctg
gtgcacttcacccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtg
gcacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctggggccacgccacgtccgac
gacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgccttctccggctcc
atggtggtggactacaacaacacctccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgcgtggccatct
ggacctacaacaccccggagtccgaggagcagtacatctcctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagt
accagaagaaccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctccca
gaagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcctg
gaagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttcctcggctaccagtacgagtgccccggcctgatcgaggtcccc
accgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggcgccccggccggcggctcct
tcaaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcacccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttc

ggcaaggactactacgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgcgtgg

gcctccaactgggagtactccgccttcgtgcccaccaaccccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagttctccc

tcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcag

caacgccggcccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgt

ccaacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctccaagtccgtgtt

cgcggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgt

cctccttcttcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgag

cgtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacat

cctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccctgggc

*tccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGA**ca*

attggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctg

ccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgcta

gctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatcta

cgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtatt

ctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatgga**gg**

atcccgcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacacca

caataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgagg

tggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatatc**gaattc***ctttcttgcgctatg*

acacttccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgac

ccccccgaagctccttcgggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaaatagccaggccc

ccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggcc

*actcgagcttgtgatcgcactccgctaaggggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac***actagt***AT***

Ggccaccgcatccactttctcggcgttcaatgcccgctgcggcgacctgcgtcgctcggcgggctccgggccccgg

cgcccagcgaggcccctccccgtgcgcgggcgcgccgaggtgcacgtgcaggtgacccactccctggcccccga

gaagcgcgagatcttcaactccctgaacaactgggcccaggagaacatcctggtgctgctgaaggacgtggacaa

gtgctggcagccctccgacttcctgcccgactccgcctccgagggcttcgacgagcaggtgatggagctgcgcaag

cgctgcaaggagatccccgacgactacttcatcgtgctggtgggcgacatgatcaccgaggaggccctgcccacct

accagaccatgctgaacaccctggacggcgtgcgcgacgagaccggcgcctccctgacccccctgggccatctgg

acccgcgcctggaccgccgaggagaaccgccacggcgacctgctgaacaagtacctgtacctgtccggccgcgt

ggacatgaagcagatcgagaagaccatccagtacctgatcggctccggcatggacccccgcaccgagaacaac

ccctacctgggcttcatctacacctccttccaggagcgcgccaccttcatctcccacggcaacaccgcccgcctggcc
aaggagcacggcgacctgaagctggcccagatctgcggcatcatcgccgccgacgagaagcgccacgagaccg
cctacaccaagatcgtggagaagctgttcgagatcgaccccgacggcaccgtgctggccctggccgacatgatgc
gcaagaaggtgtccatgcccgcccacctgatgtacgacggccaggacgacaacctgttcgagaacttctcctccgt
ggcccagcgcctgggcgtgtacaccgccaaggactacgccgacatcctggagttcctggtgggccgctgggacat
cgagaagctgaccggcctgtccggcgagggccgcaaggcccaggactacgtgtgcaccctgccccccccgcatcc
gccgcctggaggagcgcgcccagtcccgcgtgaagaaggcctccgccacccccttctcctggatcttcggccgcga
gatcaacctgatggactacaaggaccacgacggcgactacaaggaccacgacatcgactacaaggacgacgac
gacaagTGA**atcgat**agatctcttaaggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtga
tggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttg
tgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccccttccctcgtttcatatcg
cttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcaca
gccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtag
tgggatgggaacacaaatgg**aaagcttaattaa*****gagctc*****ttgttttccagaaggagttgctccttgagcctttcattct**
cagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggagggggttcgaatttaaaagcttggaatgttggttcgtgc
gtctggaacaagcccagacttgttgctcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttgccgctcaaaccg
cgtacctctgctttcgcgcaatctgccctgttgaaatcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagtctgtaat
tgcctcagaatgtggaatcatctgccccctgtgcgagcccatgccaggcatgtcgcgggcgaggacacccgcca
ctcgtacagcagaccattatgctacctcacaatagttcataacagtgaccatatttctcgaagctccccaacgagc
acctccatgctctgagtggccacccccggccctggtgcttgcggagggcaggtcaaccggcatggggctaccg
aaatccccgaccggatcccaccacccccgcgatgggaagaatctctccccgggatgtgggcccaccaccagca
caacctgctggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaaatatccttggcatcggccctgaattccttctgcc
gctctgctacccggtgcttctgtccgaagcaggggttgctagggatcgctccgagtccgcaaacccttgtcgcgtg
gcggggcttgttcgagctt***gaagagc*** (SEQ ID NO:108)

[0586] 用于表达蓖麻硬脂酰基-ACP去饱和酶的构建体:为了将蓖麻硬脂酰基-ACP去饱和酶(登录号:AAA74692.1)引入UTEX1435的A品系中,利用酿酒酵母转化酶基因作为可选择标记物以赋予在蔗糖培养基上生长的能力。已经在UTEX1435的A品系中表达的构建体可以写为6SA::CrTUB2:ScSUC2:CvNR::PmAMT03:CpSADtp:RcSAD:CvNR::6SB并且称为pSZ1454。

[0587] 构建体pSZ1454中的相关限制性位点以小写字母、粗体并加下划线指示并且5'-3'对应地为BspQ 1、Kpn I、Xba I、Mfe I、BamH I、EcoR I、Spe I、Asc I、Cla I、Sac I、BspQ I。BspQI位点界定转化用DNA的5'和3'端。粗体、小写字母序列代表允许经由同源重组在6s基因座处靶向整合的基因组DNA。沿5'到3'方向继续向前,驱动酵母蔗糖转化酶基因表达的莱氏衣藻β-微管蛋白启动子以加框文本指示。转化酶的起始子ATG和终止子TGA由大写字母、粗斜体显示,同时编码区以小写字母斜体显示。普通小球藻硝酸还原酶3'UTR是以小写字母加下划线文本指示,后接由加框斜体文本指示的驱动RcSAD表达的内源AMT03启动子。

RcSAD的起始子ATG和终止子TGA密码子由大写字母、粗斜体指示，同时硬脂酰基-ACP去饱和酶编码区的其余部分以粗斜体指示。原始小球藻硬脂酰基-ACP去饱和酶转运肽位于起始子ATG与Asc I位点之间。普通小球藻硝酸还原酶3'UTR再次由小写字母加下划线文本显示，后接由粗体小写字母文本指示的6S基因组区域。

[0588] pSZ1454中所含转化用DNA的核苷酸序列：

gctcttcgccgccgccactcctgctcgagcgcgcccgcgcgtgcgccgccagcgccttggccttttcgccgcgctc
gtgcgcgtcgctgatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccggctgagccactgcttcgtccgggcg
gccaagaggagcatgagggaggactcctggtccagggtcctgacgtggtcgcggctctgggagcgggccagca
tcatctggctctgccgcaccgaggccgcctccaactggtcctccagcagccgcagtcgccgccgaccctggcag
aggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagt
catggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctcgctgccgccgcttctcccgcacgcttc
tttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagtcgggg
aactctgatcagtctaaacccccttgcgcgttagtgttgccatcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgtgc
gccacccccacaccacctcctcccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcaga
gaggacagcagtgcccagccgctgggggttggcggatgcacgctca**ggtacc**ctttcttgcgctatgacacttcca
gcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccccgaagc

tccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaag

acattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcg

cactccgctaaggggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**tctaga**atatca***ATG***ctgctgcagg

ccttcctgttcctgctggccggcttcgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctg

gtgcacttcacccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtg

gcacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctggggccacgccacgtccgac

gacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgccttctccggctcc

atggtggtggactacaacaacacctccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgcgtggccatct

ggacctacaacaccccggagtccgaggagcagtacatctcctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagt

accagaagaaccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctccca

gaagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcctg

gaagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttcctcggctaccagtacgagtgccccggcctgatcgaggtcccc

accgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggcgccccggccggcggctcct

tcaaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcacccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttc

ggcaaggactactacgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgcgtgg

gcctccaactgggagtactccgccttcgtgcccaccaaccccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagttctccc

tcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcag

caacgccggcccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgt

ccaacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctccaagtccgtgtt

cgcggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgt

cctccttcttcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgag

cgtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacat

cctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccctgggc

*tccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGA**ca*

attggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctg

ccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgcta

gctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatcta

cgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtatt

ctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatgga**gg**

atcccgcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacacca

caataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgagg

tggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatatc**gaattc***ggccgacaggac*

gcgcgtcaaaggtgctggtcgtgtatgccctggccggcaggtcgttgctgctgctggttagtgattccgcaaccctgat

tttggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgcccgcgagccgggccggcggcgatgcggtgccccacggctg

ccggaatccaagggaggcaagagcgcccgggtcagttgaagggctttacgcgcaaggtacagccgctcctgcaa

ggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccaccgcctcaccagcggacaaagcaccggtg

tatcaggtccgtgtcatccactctaaagaactcgactacgacctactgatggccctagattcttcatcaaaaacgcctg

agacacttgcccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggccctgagttgttccttcccccgtggcgagct

gccagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcagg

acagctcatgaaacgccaacaatcgcacaattcatgtcaagctaatcagctatttcctcttcacgagctgtaattgtcc

caaaattctggtctaccgggggtgatccttcgtgtacgggcccttccctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtcgc

cgcgcaactcgcgcgagggccgagggtttgggacgggccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcac

ctttttgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtagga

tttcgtaatcattcgtcctgatggggagctaccgactaccctaatatcagcccgactgcctgacgccagcgtccacttttt

gtgcacacattccattcgtgcccaagacatttcattgtggtgcgaagcgtccccagttacgctcacctgtttcccgacct

*ccttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggtcgcagcc***actagt***ATG***gccaccgcatccactttctcg***

gcgttcaatgcccgctgcggcgacctgcgtcgctcggcgggctccgggccccggcgcccagcgaggcccctcccc

gtgcgcgggcgcgccgcctccaccctgaagtccggctccaaggaggtggagaacctgaagaagcccttcatgccc

ccccgcgaggtgcacgtgcaggtgacccactccatgccccccccagaagatcgagatcttcaagtccctggacaact

gggccgaggagaacatcctggtgcacctgaagcccgtggagaagtgctggcagccccaggacttcctgcccgac

cccgcctccgacggcttcgacgagcaggtgcgcgagctgcgcgagcgcgccaaggagatccccgacgactactt

cgtggtgctggtgggcgacatgatcaccgaggaggccctgcccacctaccagaccatgctgaacaccctggacgg

cgtgcgcgacgagaccggcgcctcccccacctcctgggccatctggacccgcgcctggaccgccgaggagaacc

gccacggcgacctgctgaacaagtacctgtacctgtccggccgcgtggacatgcgccagatcgagaagaccatcc

agtacctgatcggctccggcatggacccccgcaccgagaactcccctacctgggcttcatctacacctccttccag

gagcgcgccaccttcatctcccacggcaacaccgcccgccaggccaaggagcacggcgacatcaagctggccc

agatctgcggcaccatcgccgccgacgagaagcgccacgagaccgcctacaccaagatcgtggagaagctgttc

gagatcgaccccgacggcaccgtgctggccttcgccgacatgatgcgcaagaagatctccatgcccgcccacctg

atgtacgacggccgcgacgacaacctgttcgaccacttctccgccgtggcccagcgcctgggcgtgtacaccgcca

aggactacgccgacatcctggagttcctggtgggccgctggaaggtggacaagctgaccggcctgtccgccgagg

gccagaaggcccaggactacgtgtgccgcctgccccccccgcatccgccgcctggaggagcgcgcccagggccg

cgccaaggaggccccccaccatgcccttctcctggatcttcgaccgccaggtgaagctgatggactacaaggaccac

***gacggcgactacaaggaccacgacatcgactacaaggacgacgacgacaagTGA*atcgat**agatctcttaag

gcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctgccttg

acctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctg

cttgtgctatttgcgaataccacccccagcatccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgct

gtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtattctcct

ggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagcttа

attaa**gagctcttgttttccagaaggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctct**

aattgtggaggggggttcgaatttaaaagcttggaatgttggttcgtgcgtctggaacaagcccagacttgttgctc

actgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttgccgctcaaaccgcgtacctctgctttcgcgcaatctgccct

gttgaaatcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagtctgtaattgcctcagaatgtggaatcatctgcccc

ctgtgcgagcccatgccaggcatgtcgcgggcgaggacacccgccactcgtacagcagaccattatgctacctc

acaatagttcataacagtgaccatatttctcgaagctccccaacgagcacctccatgctctgagtggccacccccc

ggccctggtgcttgcggagggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggatcccaccacccc

cgcgatgggaagaatctctccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgctggcccaggcgagcgtcaa

accataccacacaaatatccttggcatcggccctgaattccttctgccgctctgctacccggtgcttctgtccgaag

caggggttgctagggatcgctccgagtccgcaaacccttgtcgcgtggcggggcttgttcgagcttgaagagc

（SEQ ID NO:109）

[0589] 用于表达原始小球藻硬脂酰基-ACP去饱和酶的构建体：为了将原始小球藻硬脂酰基-ACP去饱和酶引入UTEX1435的Z品系中，利用酿酒酵母转化酶基因作为可选择标记物以赋予在蔗糖培养基上生长的能力。已经在UTEX1435的Z品系中表达的构建体可以写为6SA::CrTUB2:ScSUC2:CvNR::PmAMT03:CpSAD1:CvNR::6SB并且称为pSZ3144。

[0590] 构建体pSZ3144中的相关限制性位点以小写字母、粗体并加下划线指示并且5’-3’对应地为BspQ 1、Kpn I、Xba I、Mfe I、BamH I、EcoR I、Spe I、Cla I、Sac I、BspQ I。BspQI位点界定转化用DNA的5’和3’端。粗体、小写字母序列代表允许经由同源重组在6s基因座处靶向整合的基因组DNA。沿5’到3’方向继续向前，驱动酵母蔗糖转化酶基因表达的莱氏衣藻β-微管蛋白启动子以加框文本指示。转化酶的起始子ATG和终止子TGA由大写字母、粗斜体显示，同时编码区以小写字母斜体显示。普通小球藻硝酸还原酶3’UTR是以小写字母加下划线文本指示，后接由加框斜体文本指示的驱动CpSAD1表达的内源AMT03启动子。CpSAD1的起始子ATG和终止子TGA密码子由大写字母、粗斜体显示，同时硬脂酰基-ACP去饱和酶编码区的其余部分以粗斜体显示。普通小球藻硝酸还原酶3’UTR再次由小写字母加下划线文本显示，后接由粗体小写字母文本指示的6S基因组区域。

[0591] pSZ3144中所含转化用DNA的核苷酸序列：

gctcttcgccgccgccactcctgctcgagcgcgcccgcgcgtgcgccgccagcgccttggccttttcgccgcgctc
gtgcgcgtcgctgatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccggctgagccactgcttcgtccgggcg
gccaagaggagcatgagggaggactcctggtccagggtcctgacgtggtcgcggctctgggagcgggccagca
tcatctggctctgccgcaccgaggccgcctccaactggtcctccagcagccgcagtcgccgccgaccctggcag
aggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagt
catggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctcgctgccgccgcttctcccgcacgcttc
tttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagtcgggg
aactctgatcagtctaaaccccccttgcgcgttagtgttgccatcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgtgc
gccacccccccacaccacctcctcccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcaga
gaggacagcagtgcccagccgctgggggttggcggatgcacgctcaggtaccctttcttgcgctatgacacttcca
gcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccccgaagc
tccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaag
acattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcg
cactccgctaaggggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**tctaga**atatca***ATG***ctgctgcagg
ccttcctgttcctgctggccggcttcgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgcccccctg
gtgcacttcacccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtg
gcacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctggggccacgccacgtccgac
gacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgccttctccggctcc

atggtggtggactacaacaacacctccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgcgtggccatct
ggacctacaacaccccggagtccgaggagcagtacatctcctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagt
accagaagaaccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctccca
gaagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcctg
gaagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttcctcggctaccagtacgagtgccccggcctgatcgaggtcccc
accgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggcgccccggccggcggctcct
tcaaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcacccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttc
ggcaaggactactacgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgcgtgg
gcctccaactgggagtactccgccttcgtgcccaccaaccccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagttctccc
tcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcag
caacgccggcccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgt
ccaacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctccaagtccgtgtt
cgcggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgt
cctccttcttcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaaccccctacttcaccaaccgcatgag
cgtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacat
cctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccctgggc
*tccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGA**ca*
attggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctg
ccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgcta
gctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatcta
cgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtatt
ctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatgga**gg**
atcccgcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacacca
caataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgagg
tggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatatc**gaattc***ggccgacaggac*
gcgcgtcaaaggtgctggtcgtgtatgccctggccggcaggtcgttgctgctgctggttagtgattccgcaaccctgat
tttggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgcccgcgagccgggccggcggcgatgcggtgccccacggctg
ccggaatccaagggaggcaagagcgcccgggtcagttgaagggctttacgcgcaaggtacagccgctcctgcaa
ggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccaccgcctcaccagcggacaaagcaccggtg
tatcaggtccgtgtcatccactctaaagaactcgactacgacctactgatggccctagattcttcatcaaaaacgcctg

agacacttgcccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggccctgagttgttccttcccccgtggcgagct

gccagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcagg

acagctcatgaaacgccaacaatcgcacaattcatgtcaagctaatcagctatttcctcttcacgagctgtaattgtcc

caaaattctggtctaccgggggtgatccttcgtgtacgggcccttccctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtcgc

cgcgcaactcgcgcgagggccgagggtttgggacgggccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcac

ctttttgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtagga

tttcgtaatcattcgtcctgatggggagctaccgactaccctaatatcagcccgactgcctgacgccagcgtccacttttt

gtgcacacattccattcgtgcccaagacatttcattgtggtgcgaagcgtccccagttacgctcacctgtttcccgacct

*ccttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggtcgcagcc***actagt***ATGgccaccgcctccaccttctc*

cgccttcaacgcccgctgcggcgacctgcgccgctccgccggctccggcccccgccgccccgcccgccccctgcc

cgtgcgcgccgccatcgcctccgaggtgcccgtggccaccacctcccccccgccccggccccaccgtgtactccaag

ctggacaaggcccacaccctgacccccgagcgcatggagctgatcaacggcatgtccgccttcgccgaggagcg

catcctgcccgtgctgcagcccgtggagaagctgtggcagccccaggacctgctgcccgaccccgagtcccccga

cttcctggaccaggtggccgagctgcgcgcccgcgccgccaacgtgcccgacgactacttcgtggtgctggtgggc

gacatgatcaccgaggaggccctgcccacctacatggccatgctgaacaccctggacggcgtgcgcgacgagac

cggcgccgccgaccacccctggggccgctggacccgccagtgggtggccgaggagaaccgccacggcgacctg

ctgaacaagtactgctggctgaccggccgcgtgaacatgaaggccatcgaggtgaccatccagaacctgatcggc

tccggcatgaaccccaagaccgagaacaaccccctacctgggcttcgtgtacacctccttccaggagcgcgccacc

aagtactcccacggcaacaccgcccgcctggccgcccagtacggcgacgccaccctgtccaaggtgtgcggcgtg

atcgccgccgacgagggccgccacgagatcgcctacacccgcatcgtggaggagttcttccgcctggaccccgag

ggcgccatgtccgcctacgccgacatgatgcgcaagcagatcaccatgcccgcccacctgatggacgaccagca

gcacggcacccgcaacaccggccgcaacctgttcgccgacttctccgccgtgaccgagaagctggacgtgtacga

cgccgaggactactgcaagatcctggagcacctgaactcccgctggaagatcgccgaccgcaccgtgtccggcga

cgccggcgccgaccaggagtacgtgctgcgcctgccctcccgcttccgcaagctggccgagaagtccgccgccaa

gcgcgccaagaccaagcccaagcccgtggccttctcctggctgtccggccgcgaggtgatggtgTGA**atcgat**a

gatctcttaaggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccaca

cttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcga

gttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaa

cttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccg

cctgtattctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaa

atggaaagcttaattaa**gagctcttgttttccagaaggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctc**
caaagccgctctaattgtggagggggttcgaatttaaaagcttggaatgttggttcgtgcgtctggaacaagccc
agacttgttgctcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttgccgctcaaaccgcgtacctctgctttcg
cgcaatctgccctgttgaaatcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagtctgtaattgcctcagaatgtgg
aatcatctgccccctgtgcgagcccatgccaggcatgtcgcgggcgaggacacccgccactcgtacagcagacc
attatgctacctcacaatagttcataacagtgaccatatttctcgaagctccccaacgagcacctccatgctctga
gtggccacccccggccctggtgcttgcggagggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccgg
atcccaccacccccgcgatgggaagaatctctccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgctggccca
ggcgagcgtcaaaccataccacacaaatatccttggcatcggccctgaattccttctgccgctctgctacccggtg
cttctgtccgaagcaggggttgctagggatcgctccgagtccgcaaacccttgtcgcgtggcggggcttgttcga
gcttgaagagc（SEQ ID NO:110）

[0592] 结果：对初级转化子以克隆方式进行纯化并取决于驱动去饱和酶基因的表达的启动子，使其在pH 5.0或pH 7.0下于低氮脂质产生条件下生长。由于启动子的性质以及桑椹型无绿藻在pH 5.0下产生更多脂质的事实，在pH 5.0的脂质产生培养基中检验通过用pSZ1377(D583)转化得到的转基因株。在pH 7.0下，对由pSZ1454(D648)和pSZ3144(D1923)转化产生的转基因株进行检验，以在通过pH调控的PmAMT3启动子驱动时允许最大去饱和酶基因表达。由通过用D583、D648及D1923转化产生的代表性克隆得到的谱对应地显示于下表59、60及61中。OeSAD和CpSAD1基因的表达使C18:0链长度明显减小并且C18:1增加。我们还注意到，C16:1水平存在微小增加，指示这些硬脂酰基-ACP去饱和酶可能具有广泛特异性。由RcSAD基因表达产生的转化子也使C18:0水平降低，并且C16:1升高。然而，C18:1脂肪酸水平也存在一定下降并且C18:2增加，这可能是由这些转基因株的生长缺陷所引起。将对在高油酸品系S5587中这些去饱和酶基因的影响进行确定。

[0593] 表59.通过用D583(pSZ1377)DNA转化产生的代表性克隆的脂质谱

样品ID	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
D583-25	19.20	1.53	1.15	64.08	11.76
D583-10	21.86	0.99	1.77	61.43	11.42
D583-3	21.94	0.95	1.85	62.22	10.53
D583-33	20.76	0.95	1.85	61.76	12.17
D583-26	20.18	0.92	1.89	62.56	11.97
D583-1	21.28	0.95	1.90	62.63	10.94
S1331	25.48	0.71	3.23	59.70	8.25

[0594] 表60.通过用D648(pSZ1454)DNA转化产生的代表性克隆的脂质谱

样品ID	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
D648-9	26.92	2.30	1.12	54.27	11.30
D648-28	26.54	2.50	1.32	52.58	12.90
D648-15	29.47	1.68	1.48	51.74	11.48
D648-12	27.39	1.41	1.66	54.45	11.58
D648-43	29.74	1.52	1.68	52.59	10.85
D648-7	26.98	1.62	1.69	54.51	11.39
S1331-pH7	25.86	0.96	2.84	58.33	9.16

[0595] 表61.通过用D1923(pSZ3144)DNA转化产生的代表性克隆的脂质谱

样品ID	C14:0	C14.1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
第2批；E2；pH 7；Z品系；T613；D1923-2	1.46	0.11	20.74	2.54	0.86	63.99	9.03
第2批；G12；pH 7；Z品系；T613；D1923-36	1.52	0.10	25.20	1.97	1.67	61.10	7.38
第2批；E8；pH 7；Z品系；T613；D1923-8	1.48	0.09	26.41	1.78	1.54	60.54	7.01
第2批；F3；pH 7；Z品系；T613；D1923-15	1.50	0.07	25.87	1.75	1.62	61.25	6.94
第2批；F9；pH 7；Z品系；T613；D1923-21	1.47	0.07	27.02	1.73	1.84	60.15	6.55
第2批；F4；pH 7；Z品系；T613；D1923-16	1.44	0.07	24.30	1.71	1.41	62.79	7.29
pH 7；Z品系	1.47	0.00	28.25	0.82	3.16	58.27	6.72

[0596] 本发明所描述的实施例仅旨在示例，并且许多变化以及修改对于本领域的普通技术人员来说应该是显而易见的。所有这些变化和修改都意图处于本发明的范围之内。举例来说，可以针对中链和长链脂肪酸的混合物定制不同三酸甘油酯油，以便调整如极性、溶解能力及这些油的泡沫高度或由这些油制成的化学品等参数。此外，在要求基因敲除的情况下，可以使用敲减技术(包括如RNAi或反义等抑制性物质的突变和表达)来达到相当的结果。

序列表

SEQ ID NO:1

6S 5’基因组供体序列

GCTCTTCGCCGCCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCGCCTTGGCCTTTTCGCCGCG
CTCGTGCGCGTCGCTGATGTCCATCACCAGGTCCATGAGGTCTGCCTTGCGCCGGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGG
CGGCCAAGAGGAGCATGAGGGAGGACTCCTGGTCCAGGGTCCTGACGTGGTCGCGGCTCTGGGAGCGGGCCAGCATC
ATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCGCCTCCAACTGGTCCTCCAGCAGCCGCAGTCGCCGCCGACCCTGGCAGAGGAA
GACAGGTGAGGGGGGTATGAATTGTACAGAACAACCACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATGGCTTT
ACCTGGATGACGGCCTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCTCGCTGCCGCCGCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCCAGCAC
CGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCACGCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTGAGGACAGTCGGGGAACTCTGATCAGT
CTAAACCCCCTTGCGCGTTAGTGTTGCCATCCTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTTGTTGTGCGCCACCCCCCACA
CCACCTCCTCCCAGACCAATTCTGTCACCTTTTTGGCGAAGGCATCGGCCTCGGCCTGCAGAGAGGACAGCAGTGCC
CAGCCGCTGGGGGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACC

SEQ ID NO:2

6S 3’基因组供体序列

GAGCTCCTTGTTTTCCAGAAGGAGTTGCTCCTTGAGCCTTTCATTCTCAGCCTCGATAACCTCCAAAGCCGCT
CTAATTGTGGAGGGGGTTCGAATTTAAAAGCTTGGAATGTTGGTTCGTGCGTCTGGAACAAGCCCAGACTTGTTGCT
CACTGGGAAAAGGACCATCAGCTCCAAAAAACTTGCCGCTCAAACCGCGTACCTCTGCTTTCGCGCAATCTGCCCTG
TTGAAATCGCCACCACATTCATATTGTGACGCTTGAGCAGTCTGTAATTGCCTCAGAATGTGGAATCATCTGCCCCC
TGTGCGAGCCCATGCCAGGCATGTCGCGGGCGAGGACACCCGCCACTCGTACAGCAGACCATTATGCTACCTCACAA
TAGTTCATAACAGTGACCATATTTCTCGAAGCTCCCCAACGAGCACCTCCATGCTCTGAGTGGCCACCCCCCGGCCC
TGGTGCTTGCGGAGGGCAGGTCAACCGGCATGGGGCTACCGAAATCCCCGACCGGATCCCACCACCCCCGCGATGGG
AAGAATCTCTCCCCGGGATGTGGGCCCACCACCAGCACAACCTGCTGGCCCAGGCGAGCGTCAAACCATACCACACA
AATATCCTTGGCATCGGCCCTGAATTCCTTCTGCCGCTCTGCTACCCGGTGCTTCTGTCCGAAGCAGGGGTTGCTAG
GGATCGCTCCGAGTCCGCAAACCCTTGTCGCGTGGCGGGGCTTGTTCGAGCTTGAAGAGC

SEQ ID NO:3

酿酒酵母转化酶蛋白质序列

MLLQAFLFLLAGFAAKISASMTNETSDRPLVHFTPNKGWMNDPNGLWYDEKDAKWHLYFQYNPNDTVWGTPLF
WGHATSDDLTNWEDQPIAIAPKRNDSGAFSGSMVVDYNNTSGFFNDTIDPRQRCVAIWTYNTPESEEQYISYSLDGG
YTFTEYQKNPVLAANSTQFRDPKVFWYEPSQKWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGFLGYQYECPGL
IEVPTEQDPSKSYWVMFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQSRVVDFGKDYYALQTFFNTDPTYGSALG
IAWASNWEYSAFVPTNPWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKAEPILNISNAGPWSRFATNTTLTKANSYNVD
LSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFADLSLWFKGLEDPEEYLRMGFEVSASSFFLDRGNSKVKFVKENPYFTNRM
SVNNQPFKSENDLSYYKVYGLLDQNILELYFNDGDVVSTNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKFQVREVK

SEQ ID NO:4

针对在桑椹型无绿藻(UTEX 1435)中表达进行密码子优化的酿酒酵母转化酶蛋白质编码序列

ATGctgctgcaggccttcctgttcctgctggccggcttcgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgag
acgtccgaccgccccctggtgcacttcacccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacg
agaaggacgccaagtggcacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctgggg
ccacgccacgtccgacgacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggc
gccttctccggctccatggtggtggactacaacaacacctccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagc

gctgcgtggccatctggacctacaacaccccggagtccgaggagcagtacatctcctacagcctggacggcggcta
caccttcaccgagtaccagaagaaccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctgg
tacgagccctcccagaagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacg
acctgaagtcctggaagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttcctcggctaccagtacgagtgccccggcct
gatcgaggtccccaccgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggcgccccg
gccggcggctccttcaaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcacccacttcgaggccttcgacaaccagtccc
gcgtggtggacttcggcaaggactactacgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgccct
gggcatcgcgtgggcctccaactgggagtactccgccttcgtgcccaccaaccctggcgctcctccatgtccctc
gtgcgcaagttctccctcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccga
tcctgaacatcagcaacgccggcccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaa
cgtcgacctgtccaacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctcc
aagtccgtgttcgcggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcg
aggtgtccgcgtcctccttcttcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcac
caaccgcatgagcgtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctg
gaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccggga
acgccctgggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggt
caagTGA

SEQ ID NO:5

莱氏衣藻TUB2(B-tub)启动子/5'UTR

CTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAAC
ACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGT
TTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACC
ACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAAC
CCGCAAAC

SEQ ID NO:6

普通小球藻硝酸还原酶3'UTR

GCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGC
TGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTG
CGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCC
CAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCT
TGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAG
TGGGATGGGAACACAAATGGAAAGCTT

SEQ ID NO:7

具有酿酒酵母suc2基因以及莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5'UTR和普通小球藻硝酸还原酶3'UTR的密码子优化的表达盒的核苷酸序列

CTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAAC
ACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGT
TTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACC
ACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAAC

CCGCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCTTCCTGTTCCTGCTGGCCGGCTTCGCCGCCAAGATCAGCGCCTCCA
TGACGAACGAGACGTCCGACCGCCCCCTGGTGCACTTCACCCCCAACAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTG
TGGTACGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAACGACACCGTCTGGGGGACGCCCTT
GTTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAACTGGGAGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACG
ACTCCGGCGCCTTCTCCGGCTCCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCAACGACACCATCGACCCG
CGCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCCTACAGCCTGGACGG
CGGCTACACCTTCACCGAGTACCAGAAGAACCCCGTGCTGGCCGCCAACTCCACCCAGTTCCGCGACCCGAAGGTCT
TCTGGTACGAGCCCTCCCAGAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGTCCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACTCCTCC
GACGACCTGAAGTCCTGGAAGCTGGAGTCCGCGTTCGCCAACGAGGGCTTCCTCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCGG
CCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCCAGCAAGTCCTACTGGGTGATGTTCATCTCCATCAACCCCGGCGCCC
CGGCCGGCGGCTCCTTCAACCAGTACTTCGTCGGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCTTCGACAACCAGTCC
CGCGTGGTGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTCAACACCGACCCGACCTACGGGAGCGCCCT
GGGCATCGCGTGGGCCTCCAACTGGGAGTACTCCGCCTTCGTGCCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCG
TGCGCAAGTTCTCCCTCAACACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGAAGGCCGAGCCGATC
CTGAACATCAGCAACGCCGGCCCCTGGAGCCGGTTCGCCACCAACACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGT
CGACCTGTCCAACAGCACCGGCACCCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATCTCCAAGT
CCGTGTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCCGAGGAGTACCTCCGCATGGGCTTCGAGGTG
TCCGCGTCCTCCTTCTTCCTGGACCGCGGGAACAGCAAGGTGAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCACCAACCG
CATGAGCGTGAACAACCAGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCCTACTACAAGGTGTACGGCTTGCTGGACCAGA
ACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTCGTGTCCACCAACACCTACTTCATGACCACCGGGAACGCCCTG
GGCTCCGTGAACATGACGACGGGGGTGGACAACCTGTTCTACATCGACAAGTTCCAGGTGCGCGAGGTCAAGTGACA
ATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGC
TGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTG
CGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCC
CAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCT
TGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAG
TGGGATGGGAACACAAATGGAGGATCC

SEQ ID NO:8

桑椹型无绿藻(UTEX 1435)Amt03启动子

GGCCGACAGGACGCGCGTCAAAGGTGCTGGTCGTGTATGCCCTGGCCGGCAGGTCGTTGCTGCTGCTGGTTAG
TGATTCCGCAACCCTGATTTTGGCGTCTTATTTTGGCGTGGCAAACGCTGGCGCCCGCGAGCCGGGCCGGCGGCGAT
GCGGTGCCCCACGGCTGCCGGAATCCAAGGGAGGCAAGAGCGCCCGGGTCAGTTGAAGGGCTTTACGCGCAAGGTAC
AGCCGCTCCTGCAAGGCTGCGTGGTGGAATTGGACGTGCAGGTCCTGCTGAAGTTCCTCCACCGCCTCACCAGCGGA
CAAAGCACCGGTGTATCAGGTCCGTGTCATCCACTCTAAAGAGCTCGACTACGACCTACTGATGGCCCTAGATTCTT
CATCAAAAACGCCTGAGACACTTGCCCAGGATTGAAACTCCCTGAAGGGACCACCAGGGGCCCTGAGTTGTTCCTTC
CCCCCGTGGCGAGCTGCCAGCCAGGCTGTACCTGTGATCGAGGCTGGCGGGAAAATAGGCTTCGTGTGCTCAGGTCA
TGGGAGGTGCAGGACAGCTCATGAAACGCCAACAATCGCACAATTCATGTCAAGCTAATCAGCTATTTCCTCTTCAC
GAGCTGTAATTGTCCCAAAATTCTGGTCTACCGGGGGTGATCCTTCGTGTACGGGCCCTTCCCTCAACCCTAGGTAT
GCGCGCATGCGGTCGCCGCGCAACTCGCGCGAGGGCCGAGGGTTTGGGACGGGCCGTCCCGAAATGCAGTTGCACCC

GGATGCGTGGCACCTTTTTTGCGATAATTTATGCAATGGACTGCTCTGCAAAATTCTGGCTCTGTCGCCAACCCTAG
GATCAGCGGCGTAGGATTTCGTAATCATTCGTCCTGATGGGGAGCTACCGACTACCCTAATATCAGCCCGACTGCCT
GACGCCAGCGTCCACTTTTGTGCACACATTCCATTCGTGCCCAAGACATTTCATTGTGGTGCGAAGCGTCCCCAGTT
ACGCTCACCTGTTTCCCGACCTCCTTACTGTTCTGTCGACAGAGCGGGCCCACAGGCCGGTCGCAGCC

SEQ ID NO:9

针对在桑椹型无绿藻中表达进行密码子优化的原始小球藻(UTEX 250)硬脂酰基ACP去饱和酶转运肽cDNA序列

ACTAGTATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATGCCCGCTGCGGCGACCTGCGTCGCTCGGCGGGCT
CCGGGCCCCGGCGCCCAGCGAGGCCCCTCCCCGTGCGCGGGCGCGCC

SEQ ID NO:10

赖特萼距花FatB2硫酯酶核酸序列;基因库登录号U56104

ATGGTGGTGGCCGCCGCCGCCAGCAGCGCCTTCTTCCCCGTGCCCGCCCCCCGCCCCACCCCCAAGCCCGGCA
AGTTCGGCAACTGGCCCAGCAGCCTGAGCCAGCCCTTCAAGCCCAAGAGCAACCCCAACGGCCGCTTCCAGGTGAAG
GCCAACGTGAGCCCCCACGGGCGCGCCCCCAAGGCCAACGGCAGCGCCGTGAGCCTGAAGTCCGGCAGCCTGAACAC
CCTGGAGGACCCCCCCCAGCAGCCCCCCCCCCCGCACCTTCCTGAACCAGCTGCCCGACTGGAGCCGCCTGCGCACCG
CCATCACCACCGTGTTCGTGGCCGCCGAGAAGCAGTTCACCCGCCTGGACCGCAAGAGCAAGCGCCCCGACATGCTG
GTGGACTGGTTCGGCAGCGAGACCATCGTGCAGGACGGCCTGGTGTTCCGCGAGCGCTTCAGCATCCGCAGCTACGA
GATCGGCGCCGACCGCACCGCCAGCATCGAGACCCTGATGAACCACCTGCAGGACACCAGCCTGAACCACTGCAAGA
GCGTGGGCCTGCTGAACGACGGCTTCGGCCGCACCCCCGAGATGTGCACCCGCGACCTGATCTGGGTGCTGACCAAG
ATGCAGATCGTGGTGAACCGCTACCCCACCTGGGGCGACACCGTGGAGATCAACAGCTGGTTCAGCCAGAGCGGCAA
GATCGGCATGGGCCGCGAGTGGCTGATCAGCGACTGCAACACCGGCGAGATCCTGGTGCGCGCCACCAGCGCCTGGG
CCATGATGAACCAGAAGACCCGCCGCTTCAGCAAGCTGCCCTGCGAGGTGCGCCAGGAGATCGCCCCCCACTTCGTG
GACGCCCCCCCCGTGATCGAGGACAACGACCGCAAGCTGCACAAGTTCGACGTGAAGACCGGCGACAGCATCTGCAA
GGGCCTGACCCCCGGCTGGAACGACTTCGACGTGAACCAGCACGTGAGCAACGTGAAGTACATCGGCTGGATTCTGG
AGAGCATGCCCACCGAGGTGCTGGAGACCCAGGAGCTGTGCAGCCTGACCCTGGAGTACCGCCGCGAGTGCGGCCGC
GAGAGCGTGGTGGAGAGCGTGACCAGCATGAACCCCAGCAAGGTGGGCGACCGCAGCCAGTACCAGCACCTGCTGCG
CCTGGAGGACGGCGCCGACATCATGAAGGGCCGCACCGAGTGGCGCCCCAAGAACGCCGGCACCAACCGCGCCATCA
GCACCTGA

SEQ ID NO:11

赖特萼距花FatB2硫酯酶氨基酸序列;基因库登录号U56104

MVVAAAASSAFFPVPAPRPTPKPGKFGNWPSSLSQPFKPKSNPNGRFQVKANVSPHPKANGSAVSLKSGSLN
TLEDPPSSPPPRTFLNQLPDWSRLRTAITTVFVAAEKQFTRLDRKSKRPDMLVDWFGSETIVQDGLVFRERFSIRS
YEIGADRTASIETLMNHLQDTSLNHCKSVGLLNDGFGRTPEMCTRDLIWVLTKMQIVVNRYPTWGDTVEINSWFSQ
SGKIGMGREWLISDCNTGEILVRATSAWAMMNQKTRRFSKLPCEVRQEIAPHFVDAPPVIEDNDRKLHKFDVKTGD
SICKGLTPGWNDFDVNQHVSNVKYIGWILESMPTEVLETQELCSLTLEYRRECGRESVVESVTSMNPSKVGDRSQY
QHLLRLEDGADIMKGRTEWRPKNAGTNRAISTSEQ ID NO:12

来自pSZ2046的密码子优化的椰C12:0偏好的LPAAT的编码区

ATGGACGCCTCCGGCGCCTCCTCCTTCCTGCGCGGCCGCTGCCTGGAGTCCTGCTTCAAGGCCTCCTTCGGCT
ACGTAATGTCCCAGCCCAAGGACGCCGCCGGCCAGCCCTCCCGCCGCCCCGCCGACGCCGACGACTTCGTGGACGAC

GACCGCTGGATCACCGTGATCCTGTCCGTGGTGCGCATCGCCGCCTGCTTCCTGTCCATGATGGTGACCACCATCGT
GTGGAACATGATCATGCTGATCCTGCTGCCCTGGCCCTACGCCCGCATCCGCCAGGGCAACCTGTACGGCCACGTGA
CCGGCCGCATGCTGATGTGGATTCTGGGCAACCCCATCACCATCGAGGGCTCCGAGTTCTCCAACACCCGCGCCATC
TACATCTGCAACCACGCCTCCCTGGTGGACATCTTCCTGATCATGTGGCTGATCCCCAAGGGCACCGTGACCATCGC
CAAGAAGGAGATCATCTGGTATCCCCTGTTCGGCCAGCTGTACGTGCTGGCCAACCACCAGCGCATCGACCGCTCCA
ACCCCTCCGCCGCCATCGAGTCCATCAAGGAGGTGGCCCGCGCCGTGGTGAAGAAGAACCTGTCCCTGATCATCTTC
CCCGAGGGCACCCGCTCCAAGACCGGCCGCCTGCTGCCCTTCAAGAAGGGCTTCATCCACATCGCCCTCCAGACCCG
CCTGCCCATCGTGCCGATGGTGCTGACCGGCACCCACCTGGCCTGGCGCAAGAACTCCCTGCGCGTGCGCCCCGCCC
CCATCACCGTGAAGTACTTCTCCCCCATCAAGACCGACGACTGGGAGGAGGAGAAGATCAACCACTACGTGGAGATG
ATCCACGCCCTGTACGTGGACCACCTGCCCGAGTCCCAGAAGCCCCTGGTGTCCAAGGGCCGCGACGCCTCCGGCCG
CTCCAACTCCTGA

SEQ ID NO:13

pLoop 5’基因组供体序列

gctcttcgctaacggaggtctgtcaccaaatggaccccgtctattgcgggaaaccacggcgatggcacgttt
caaaacttgatgaaatacaatattcagtatgtcgcgggcggcgacggcggggagctgatgtcgcgctgggtattgc
ttaatcgccagcttcgcccccgtcttggcgcgaggcgtgaacaagccgaccgatgtgcacgagcaaatcctgacac
tagaagggctgactcgcccggcacggctgaattacacaggcttgcaaaaataccagaatttgcacgcaccgtattc
gcggtattttgttggacagtgaatagcgatgcggcaatggcttgtggcgttagaaggtgcgacgaaggtggtgcca
ccactgtgccagccagtcctggcggctcccagggccccgatcaagagccaggacatccaaactacccacagcatca
acgccccggcctatactcgaaccccacttgcactctgcaatggtatgggaaccacggggcagtcttgtgtgggtcg
cgcctatcgcggtcggcgaagaccgggaaggtacc

SEQ ID NO:14

pLoop 3’基因组供体序列

gagctcagcggcgacggtcctgctaccgtacgacgttgggcacgcccatgaaagtttgtataccgagcttgt
tgagcgaactgcaagcgcggctcaaggatacttgaactcctggattgatatcggtccaataatggatggaaaatcc
gaacctcgtgcaagaactgagcaaacctcgttacatggatgcacagtcgccagtccaatgaacattgaagtgagcg
aactgttcgcttcggtggcagtactactcaaagaatgagctgctgttaaaaatgcactctcgttctctcaagtgag
tggcagatgagtgctcacgccttgcacttcgctgcccgtgtcatgccctgcgccccaaaatttgaaaaaagggatg
agattattgggcaatggacgacgtcgtcgctccgggagtcaggaccggcggaaaataagaggcaacacactccgct
tcttagctcttcc

SEQ ID NO:15

包括莱氏衣藻β-微管蛋白启动子/5’UTR和普通小球藻硝酸还原酶3’UTR的NeoR表达盒

ctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgat

gatgcttcgaccccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaata

gccaggcccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacac

aggccactcgagcttgtgatcgcactccgctaaggggggcgcctcttcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaactctag

aatatca*ATGatcgagcaggacggcctccacgccggctcccccgccgcctgggtggagcgcctgttcggctacga*

ctgggcccagcagaccatcggctgctccgacgccgccgtgttccgcctgtccgcccagggccgccccgtgctgttcg

tgaagaccgacctgtccggcgccctgaacgagctgcaggacgaggccgcccgcctgtcctggctggccaccacc

ggcgtgccctgcgccgccgtgctggacgtggtgaccgaggccggccgcgactggctgctgctgggcgaggtgccc

ggccaggacctgctgtcctcccacctggcccccgccgagaaggtgtccatcatggccgacgccatgcgccgcctgc

acaccctggaccccgccacctgccccttcgaccaccaggccaagcaccgcatcgagcgcgcccgcacccgcatg

gaggccggcctggtggaccaggacgacctggacgaggagcaccagggcctggccccgccgagctgttcgccc

gcctgaaggcccgcatgcccgacggcgaggacctggtggtgacccacggcgacgcctgcctgcccaacatcatg

gtggagaacggccgcttctccggcttcatcgactgcggccgcctgggcgtggccgaccgctaccaggacatcgccc

tggccacccgcgacatcgccgaggagctgggcggcgagtgggccgaccgcttcctggtgctgtacggcatcgccg

*ccccgactcccagcgcatcgccttctaccgcctgctggacgagttcttcTGA*caattggcagcagcagctcggata

gtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgcc

gcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaatac

caccccagcatcccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcg

ctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaaa

ccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggatcc

SEQ ID NO:16

椰1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶(LPAAT)

MDASGASSFLRGRCLESCFKASFGYVMSQPKDAAGQPSRRPADADDFVDDDRWITVILSVVRIAACFLSMMVT
TIVWNMIMLILLPWPYARIRQGNLYGHVTGRMLMWILGNPITIEGSEFSNTRAIYICNHASLVDIFLIMWLIPKGTV
TIAKKEIIWYPLFGQLYVLANHQRIDRSNPSAAIESIKEVARAVVKKNLSLIIFPEGTRSKTGRLLPFKKGFIHIAL
QTRLPIVPMVLTGTHLAWRKNSLRVRPAPITVKYFSPIKTDDWEEEKINHYVEMIHALYVDHLPESQKPLVSKGRDA
SGRSNS

SEQ ID NO:17

pSZ1500

GGGCTGGTCTGAATCCTTCAGGCGGGTGTTACCCGAGAAAGAAAGGGTGCCGATTTCAAAGCAGACCCATGTG
CCGGGCCCTGTGGCCTGTGTTGGCGCCTATGTAGTCACCCCCCCTCACCCAATTGTCGCCAGTTTGCGCACTCCATA
AACTCAAAACAGCAGCTTCTGAGCTGCGCTGTTCAAGAACACCTCTGGGGTTTGCTCACCCGCGAGGTCGACGCCCA
GCATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTCACGATCGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCCC

GCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGCATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTCATGTCCCTGCTCTA
CGTCGCGTCGACGTACATCGACCCTGCACCGGTGCCTACGTGGGTCAAGTACGGCATCATGTGGCCGCTCTACTGGT
TCTTCCAGGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTC
CCGCTGACCCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCCTTCGGCACGGGTGTCTGGGTGTGCGCGCACGAG
TGCGGCCACCAGGCCTTTTCCTCCAGCCAGGCCATCAACGACGGCGTGGGCCTGGTGTTCCACAGCCTGCTGCTGGT
GCCCTACTACTCCTGGAAGCACTCGCACCGGGTACCCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGG
CTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGG
GCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTAC
CAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGG
GGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACTCTAGAATATCAATGCTGCTGCAGGCCTTCCTGTTCC
TGCTGGCCGGCTTCGCCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGCCCCCTGGTGCACTTCACC
CCCAACAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTGTGGTACGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCA
GTACAACCCGAACGACACCGTCTGGGGGACGCCCTTGTTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAACTGGG
AGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCGGCGCCTTCTCCGGCTCCATGGTGGTGGACTACAAC
AACACCTCCGGCTTCTTCAACGACACCATCGACCCGCGCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCGGA
GTCCGAGGAGCAGTACATCTCCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTCACCGAGTACCAGAAGAACCCCGTGCTGG
CCGCCAACTCCACCCAGTTCCGCGACCCGAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTCCCAGAAGTGGATCATGACCGCGGCC
AAGTCCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACTCCTCCGACGACCTGAAGTCCTGGAAGCTGGAGTCCGCGTTCGCCAA
CGAGGGCTTCCTCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCGGCCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCCAGCAAGTCCT
ACTGGGTGATGTTCATCTCCATCAACCCCGGCGCCCCGGCCGGCGGCTCCTTCAACCAGTACTTCGTCGGCAGCTTC
AACGGCACCCACTTCGAGGCCTTCGACAACCAGTCCCGCGTGGTGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGAC
CTTCTTCAACACCGACCCGACCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCCTCCAACTGGGAGTACTCCGCCTTCG
TGCCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGCGCAAGTTCTCCCTCAACACCGAGTACCAGGCCAACCCG
GAGACGGAGCTGATCAACCTGAAGGCCGAGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCCTGGAGCCGGTTCGCCAC
CAACACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTCGACCTGTCCAACAGCACCGGCACCCTGGAGTTCGAGCTGG
TGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATCTCCAAGTCCGTGTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAG
GACCCCGAGGAGTACCTCCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCCTCCTTCTTCCTGGACCGCGGGAACAGCAAGGT
GAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCACCAACCGCATGAGCGTGAACAACCAGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACC
TGTCCTACTACAAGGTGTACGGCTTGCTGGACCAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTCGTGTCC
ACCAACACCTACTTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAACATGACGACGGGGGTGGACAACCTGTTCTA
CATCGACAAGTTCCAGGTGCGCGAGGTCAAGTGACAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGAC
GCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAG
CCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCC
AGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGC
TGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTG
TAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGGATCCCGCGTCTCGAACAG
AGCGCGCAGAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTCGCACCTCAGCGCGGCATACACCACAATAACCACCTGACGAA
TGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTAGCGAAGCGTCCGGTTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATG
ATCGGTGGAGCTGATGGTCGAAACGTTCACAGCCTAGGGATATCGAATTCGGCCGACAGGACGCGCGTCAAAGGTGC

TGGTCGTGTATGCCCTGGCCGGCAGGTCGTTGCTGCTGCTGGTTAGTGATTCCGCAACCCTGATTTTGGCGTCTTAT
TTTGGCGTGGCAAACGCTGGCGCCCGCGAGCCGGGCCGGCGGCGATGCGGTGCCCCACGGCTGCCGGAATCCAAGGG
AGGCAAGAGCGCCCGGGTCAGTTGAAGGGCTTTACGCGCAAGGTACAGCCGCTCCTGCAAGGCTGCGTGGTGGAATT
GGACGTGCAGGTCCTGCTGAAGTTCCTCCACCGCCTCACCAGCGGACAAAGCACCGGTGTATCAGGTCCGTGTCATC
CACTCTAAAGAACTCGACTACGACCTACTGATGGCCCTAGATTCTTCATCAAAAACGCCTGAGACACTTGCCCAGGA
TTGAAACTCCCTGAAGGGACCACCAGGGGCCCTGAGTTGTTCCTTCCCCCCGTGGCGAGCTGCCAGCCAGGCTGTAC
CTGTGATCGAGGCTGGCGGGAAAATAGGCTTCGTGTGCTCAGGTCATGGGAGGTGCAGGACAGCTCATGAAACGCCA
ACAATCGCACAATTCATGTCAAGCTAATCAGCTATTTCCTCTTCACGAGCTGTAATTGTCCCAAAATTCTGGTCTAC
CGGGGGTGATCCTTCGTGTACGGGCCCTTCCCTCAACCCTAGGTATGCGCGCATGCGGTCGCCGCGCAACTCGCGCG
AGGGCCGAGGGTTTGGGACGGGCCGTCCCGAAATGCAGTTGCACCCGGATGCGTGGCACCTTTTTTGCGATAATTTA
TGCAATGGACTGCTCTGCAAAATTCTGGCTCTGTCGCCAACCCTAGGATCAGCGGCGTAGGATTTCGTAATCATTCG
TCCTGATGGGGAGCTACCGACTACCCTAATATCAGCCCGACTGCCTGACGCCAGCGTCCACTTTTGTGCACACATTC
CATTCGTGCCCAAGACATTTCATTGTGGTGCGAAGCGTCCCCAGTTACGCTCACCTGTTTCCCGACCTCCTTACTGT
TCTGTCGACAGAGCGGGCCCACAGGCCGGTCGCAGCCACTAGTATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATG
CCCGCTGCGGCGACCTGCGTCGCTCGGCGGGCTCCGGGCCCCGGCGCCCAGCGAGGCCCCTCCCCGTGCGCGGGCGC
GCCGCCACCGGCGAGCAGCCCTCCGGCGTGGCCTCCCTGCGCGAGGCCGACAAGGAGAAGTCCCTGGGCAACCGCCT
GCGCCTGGGCTCCCTGACCGAGGACGGCCTGTCCTACAAGGAGAAGTTCGTGATCCGCTGCTACGAGGTGGGCATCA
ACAAGACCGCCACCATCGAGACCATCGCCAACCTGCTGCAGGAGGTGGGCGGCAACCACGCCCAGGGCGTGGGCTTC
TCCACCGACGGCTTCGCCACCACCACCACCATGCGCAAGCTGCACCTGATCTGGGTGACCGCCCGCATGCACATCGA
GATCTACCGCTACCCCGCCTGGTCCGACGTGATCGAGATCGAGACCTGGGTGCAGGGCGAGGGCAAGGTGGGCACCC
GCCGCGACTGGATCCTGAAGGACTACGCCAACGGCGAGGTGATCGGCCGCGCCACCTCCAAGTGGGTGATGATGAAC
GAGGACACCCGCCGCCTGCAGAAGGTGTCCGACGACGTGCGCGAGGAGTACCTGGTGTTCTGCCCCCGCACCCTGCG
CCTGGCCTTCCCCGAGGAGAACAACAACTCCATGAAGAAGATCCCCAAGCTGGAGGACCCCGCCGAGTACTCCCGCC
TGGGCCTGGTGCCCCGCCGCTCCGACCTGGACATGAACAAGCACGTGAACAACGTGACCTACATCGGCTGGGCCCTG
GAGTCCATCCCCCCCGAGATCATCGACACCCACGAGCTGCAGGCCATCACCCTGGACTACCGCCGCGAGTGCCAGCG
CGACGACATCGTGGACTCCCTGACCTCCCGCGAGCCCCTGGGCAACGCCGCCGGCGTGAAGTTCAAGGAGATCAACG
GCTCCGTGTCCCCCAAGAAGGACGAGCAGGACCTGTCCCGCTTCATGCACCTGCTGCGCTCCGCCGGCTCCGGCCTG
GAGATCAACCGCTGCCGCACCGAGTGGCGCAAGAAGCCCGCCAAGCGCATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTA
CAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGAATCGATAGATCTCTTAAGGCAGCAGCAGCTCGGA
TAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATC
CCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTG
CTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGC
TGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTA
TTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGG
AAAGCTTAATTAAGAGCTCCCGCCACCACTCCAACACGGGGTGCCTGGACAAGGACGAGGTGTTTGTGCCGCCGCAC
CGCGCAGTGGCGCACGAGGGCCTGGAGTGGGAGGAGTGGCTGCCCATCCGCATGGGCAAGGTGCTGGTCACCCTGAC
CCTGGGCTGGCCGCTGTACCTCATGTTCAACGTCGCCTCGCGGCCGTACCCGCGCTTCGCCAACCACTTTGACCCGT
GGTCGCCCATCTTCAGCAAGCGCGAGCGCATCGAGGTGGTCATCTCCGACCTGGCGCTGGTGGCGGTGCTCAGCGGG
CTCAGCGTGCTGGGCCGCACCATGGGCTGGGCCTGGCTGGTCAAGACCTACGTGGTGCCCTACCTGATCGTGAACAT

GTGGCTCGTGCTCATCACGCTGCTCCAGCACACGCACCCGGCGCTGCCGCACTACTTCGAGAAGGACTGGGACTGGC
TGCGCGGCGCCATGGCCACCGTGGACCGCTCCATGGGCCCGCCCTTCATGGACAACATCCTGCACCACATCTCCGAC
ACCCACGTGCTGCACCACCTCTTCAGCACCATCCCGCACTACCACGCCGAGGAGGCCTCCGCCGCCATCAGGCCCAT
CCTGGGCAAGTACTACCAGTCCGACAGCCGCTGGGTCGGCCGCGCCCTGTGGGAGGACTGGCGCGACTGCCGCTACG
TCGTCCCGGACGCGCCCGAGGACGACTCCGCGCTCTGGTTCCACAAGTGAGTGAGTGA

SEQ ID NO:18

5'FADc基因组区供体DNA

GGGCTGGTCTGAATCCTTCAGGCGGGTGTTACCCGAGAAAGAAAGGGTGCCGATTTCAAAGCAGACCCATGTG
CCGGGCCCTGTGGCCTGTGTTGGCGCCTATGTAGTCACCCCCCCTCACCCAATTGTCGCCAGTTTGCGCACTCCATA
AACTCAAAACAGCAGCTTCTGAGCTGCGCTGTTCAAGAACACCTCTGGGGTTTGCTCACCCGCGAGGTCGACGCCCA
GCATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTCACGATCGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCCC
GCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGCATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTCATGTCCCTGCTCTA
CGTCGCGTCGACGTACATCGACCCTGCACCGGTGCCTACGTGGGTCAAGTACGGCATCATGTGGCCGCTCTACTGGT
TCTTCCAGGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTC
CCGCTGACCCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCCTTCGGCACGGGTGTCTGGGTGTGCGCGCACGAG
TGCGGCCACCAGGCCTTTTCCTCCAGCCAGGCCATCAACGACGGCGTGGGCCTGGTGTTCCACAGCCTGCTGCTGGT
GCCCTACTACTCCTGGAAGCACTCGCACCG

SEQ ID NO:19

3'FADc基因组区供体DNA

CCGCCACCACTCCAACACGGGGTGCCTGGACAAGGACGAGGTGTTTGTGCCGCCGCACCGCGCAGTGGCGCA
CGAGGGCCTGGAGTGGGAGGAGTGGCTGCCCATCCGCATGGGCAAGGTGCTGGTCACCCTGACCCTGGGCTGGCCG
CTGTACCTCATGTTCAACGTCGCCTCGCGGCCGTACCCGCGCTTCGCCAACCACTTTGACCCGTGGTCGCCCATCT
TCAGCAAGCGCGAGCGCATCGAGGTGGTCATCTCCGACCTGGCGCTGGTGGCGGTGCTCAGCGGGCTCAGCGTGCT
GGGCCGCACCATGGGCTGGGCCTGGCTGGTCAAGACCTACGTGGTGCCCTACCTGATCGTGAACATGTGGCTCGTG
CTCATCACGCTGCTCCAGCACACGCACCCGGCGCTGCCGCACTACTTCGAGAAGGACTGGGACTGGCTGCGCGGCG
CCATGGCCACCGTGGACCGCTCCATGGGCCCGCCCTTCATGGACAACATCCTGCACCACATCTCCGACACCCACGT
GCTGCACCACCTCTTCAGCACCATCCCGCACTACCACGCCGAGGAGGCCTCCGCCGCCATCAGGCCCATCCTGGGC
AAGTACTACCAGTCCGACAGCCGCTGGGTCGGCCGCGCCCTGTGGGAGGACTGGCGCGACTGCCGCTACGTCGTCC
CGGACGCGCCCGAGGACGACTCCGCGCTCTGGTTCCACAAGTGAGTGAGTGASEQ ID NO:20

桑椹型无绿藻FATA1敲除同源重组靶向构建体的5'供体DNA序列

GCTCTTCGGAGTCACTGTGCCACTGAGTTCGACTGGTAGCTGAATGGAGTCGCTGCTCCACTAAACGAATTGT
CAGCACCGCCAGCCGGCCGAGGACCCGAGTCATAGCGAGGGTAGTAGCGCGCCATGGCACCGACCAGCCTGCTTGCC
AGTACTGGCGTCTCTTCCGCTTCTCTGTGGTCCTCTGCGCGCTCCAGCGCGTGCGCTTTTCCGGTGGATCATGCGGT
CCGTGGCGCACCGCAGCGGCCGCTGCCCATGCAGCGCCGCTGCTTCCGAACAGTGGCGGTCAGGGCCGCACCCGCGG
TAGCCGTCCGTCCGGAACCCGCCCAAGAGTTTTGGGAGCAGCTTGAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGACAAGCGCATC
TTCCTGGAGGAGCACCGGTGCGTGGAGGTCCGGGGCTGACCGGCCGTCGCATTCAACGTAATCAATCGCATGATGAT
CAGAGGACACGAAGTCTTGGTGGCGGTGGCCAGAAACACTGTCCATTGCAAGGGCATAGGGATGCGTTCCTTCACCT
CTCATTTCTCATTTCTGAATCCCTCCCTGCTCACTCTTTCTCCTCCTCCTTCCCGTTCACGCAGCATTCGGGGTACC

SEQ ID NO:21

桑椹型无绿藻FATA1敲除同源重组靶向构建体的3'供体DNA序列

GACAGGGTGGTTGGCTGGATGGGGAAACGCTGGTCGCGGGATTCGATCCTGCTGCTTATATCCTCCCTGGAAG
CACACCCACGACTCTGAAGAAGAAAACGTGCACACACACAACCCAACCGGCCGAATATTTGCTTCCTTATCCCGGGT
CCAAGAGAGACTGCGATGCCCCCCTCAATCAGCATCCTCCTCCCTGCCGCTTCAATCTTCCCTGCTTGCCTGCGCCC
GCGGTGCGCCGTCTGCCCGCCCAGTCAGTCACTCCTGCACAGGCCCCTTGTGCGCAGTGCTCCTGTACCCTTTACCG
CTCCTTCCATTCTGCGAGGCCCCCTATTGAATGTATTCGTTGCCTGTGTGGCCAAGCGGGCTGCTGGGCGCGCCGCC
GTCGGGCAGTGCTCGGCGACTTTGGCGGAAGCCGATTGTTCTTCTGTAAGCCACGCGCTTGCTGCTTTGGGAAGAGA
AGGGGGGGGGTACTGAATGGATGAGGAGGAGAAGGAGGGGTATTGGTATTATCTGAGTTGGGTGAAGAGC

SEQ ID NO:22

原始小球藻肌动蛋白启动子/5'UTR

agtttaggtccagcgtccgtgggggggggacgggctgggagcttgggccgggaagggcaagacgatgcagtccctct
ggggagtcacagccgactgtgtgtgttgcactgtgcggcccgcagcactcacacgcaaaatgcctggccgacaggca
ggccctgtccagtgcaacatccacggtccctctcatcaggctcaccttgctcattgacataacggaatgcgtaccgctcttt
cagatctgtccatccagagaggggagcaggctccccaccgacgctgtcaaacttgcttcctgcccaaccgaaaacatta
ttgtttgaggggggggggggggggcagattgcatggcgggatatctcgtgaggaacatcactgggacactgtggaa
cacagtgagtgcagtatgcagagcatgtatgctaggggtcagcgcaggaaggggggcctttcccagtctcccatgccac
tgcaccgtatccacgactcaccaggaccagcttcttgatcggcttccgctcccgtggacaccagtgtgtagcctctggac
tccaggtatgcgtgcaccgcaaaggccagccgatcgtgccgattcctggggtggaggatatgagtcagccaacttggg
gctcagagtgcacactggggcacgatacgaaacaacatctacaccgtgtcctccatgctgacacaccacagcttcgctc
cacctgaatgtgggcgcatgggcccgaatcacagccaatgtcgctgctgccataatgtgatccagaccctctccgc
ccagatgccgagcggatcgtgggcgctgaatagattcctgtttcgatcactgtttgggtcctttcctttcgtctc
ggatgcgcgtctcgaaacaggctgcgtcgggctttcggatccctttgctccctccgtcaccatcctgcgcgcggg
caagttgcttgaccctgggctgtaccagggttggagggtattaccgcgtcaggccattcccagcccggattcaatt
caaagtctgggccaccaccctccgccgctctgtctgatcactccacattcgtgcatacactacgttcaagtcctga
tccaggcgtgtctcgggacaaggtgtgcttgagtttgaatctcaaggacccactccagcacagctgctggttgacc
ccgccctcgcaa

SEQ ID NO:23

包含原始小球藻肌动蛋白启动子/5'UTR、针对在桑椹型无绿藻中表达进行密码子优化的拟南芥THIC蛋白质编码序列,以及普通小球藻硝酸还原酶3'UTR的AtTHIC表达盒

agtttaggtccagcgtccgtgggggggggacgggctgggagcttgggccgggaagggcaagacgatgcagtccctct

ggggagtcacagccgactgtgtgtgttgcactgtgcggcccgcagcactcacacgcaaaatgcctggccgacaggca

ggccctgtccagtgcaacatccacggtccctctcatcaggctcaccttgctcattgacataacggaatgcgtaccgctcttt

cagatctgtccatccagagaggggagcaggctccccaccgacgctgtcaaacttgcttcctgcccaaccgaaaacatta

ttgtttgaggggggggggggggggggcagattgcatggcgggatatctcgtgaggaacatcactgggacactgtggaa

cacagtgagtgcagtatgcagagcatgtatgctaggggtcagcgcaggaaggggggcctttcccagtctcccatgccac

tgcaccgtatccacgactcaccaggaccagcttcttgatcggcttccgctcccgtggacaccagtgtgtagcctctggac

tccaggtatgcgtgcaccgcaaaggccagccgatcgtgccgattcctggggtggaggatatgagtcagccaacttggg

gctcagagtgcacactggggcacgatacgaaacaacatctacaccgtgtcctccatgctgacacaccacagcttcgctc

cacctgaatgtgggcgcatgggcccgaatcacagccaatgtcgctgctgccataatgtgatccagaccctctccgccca

gatgccgagcggatcgtgggcgctgaatagattcctgtttcgatcactgtttgggtcctttccttttcgtctcggatgcgcgt

ctcgaaacaggctgcgtcgggctttcggatccctttgctccctccgtcaccatcctgcgcgcgggcaagttgcttgacc

ctgggctgtaccagggttggagggtattaccgcgtcaggccattcccagcccggattcaattcaaagtctgggccacca

ccctccgccgctctgtctgatcactccacattcgtgcatacactacgttcaagtcctgatccaggcgtgtctcgggacaag

gtgtgcttgagtttgaatctcaaggacccactccagcacagctgctggttgaccccgccctcgcaatctagaATGgcc

gcgtccgtccactgcaccctgatgtccgtggtctgcaacaacaagaaccactccgcccgccccaagctgcccaact

cctccctgctgcccggcttcgacgtggtggtccaggccgcggccacccgcttcaagaaggagacgacgaccaccc

gcgccacgctgacgttcgacccccccacgaccaactccgagcgcgccaagcagcgcaagcacaccatcgaccc

ctcctcccccgacttccagcccatcccctccttcgaggagtgcttccccaagtccacgaaggagcacaaggaggtg

gtgcacgaggagtccggccacgtcctgaaggtgcccttccgccgcgtgcacctgtccggcggcgagcccgccttcg

acaactacgacacgtccggccccccagaacgtcaacgcccacatcggcctggcgaagctgcgcaaggagtggatc

gaccgccgcgagaagctgggcacgccccgctacacgcagatgtactacgcgaagcagggcatcatcacggagg

agatgctgtactgcgcgacgcgcgagaagctggaccccgagttcgtccgctccgaggtcgcgcggggccgcgcc

atcatcccctccaacaagaagcacctggagctggagcccatgatcgtgggccgcaagttcctggtgaaggtgaac

gcgaacatcggcaactccgccgtggcctcctccatcgaggaggaggtctacaaggtgcagtgggccaccatgtgg

ggcgccgacaccatcatggacctgtccacgggccgccacatccacgagacgcgcgagtggatcctgcgcaactc

cgcggtccccgtgggcaccgtccccatctaccaggcgctggagaaggtggacggcatcgcggagaacctgaact

gggaggtgttccgcgagacgctgatcgagcaggccgagcagggcgtggactacttcacgatccacgcgggcgtg

ctgctgcgctacatccccctgaccgccaagcgcctgacgggcatcgtgtcccgcggcggctccatccacgcgaagt

ggtgcctggcctaccacaaggagaacttcgcctacgagcactgggacgacatcctggacatctgcaaccagtacg

acgtcgccctgtccatcggcgacggcctgcgccccggctccatctacgacgccaacgacacggcccagttcgccg

agctgctgacccagggcgagctgacgcgccgcgcgtgggagaaggacgtgcaggtgatgaacgagggccccg

gccacgtgcccatgcacaagatccccgagaacatgcagaagcagctggagtggtgcaacgaggcgcccttctac

accctgggcccccctgacgaccgacatcgcgcccggctacgaccacatcacctccgccatcggcgcggccaacatc

ggcgccctgggcaccgccctgctgtgctacgtgacgcccaaggagcacctgggcctgcccaaccgcgacgacgt

gaaggcgggcgtcatcgcctacaagatcgccgcccacgcggccgacctggccaagcagcacccccacgcccag

gcgtgggacgacgcgctgtccaaggcgcgcttcgagttccgctggatggaccagttcgcgctgtccctggaccccat

gacggcgatgtccttccacgacgagacgctgcccgcggacggcgcgaaggtcgcccacttctgctccatgtgcggc

cccaagttctgctccatgaagatcacggaggacatccgcaagtacgccgaggagaacggctacggctccgccga

ggaggccatccgccagggcatggacgccatgtccgaggagttcaacatcgccaagaagacgatctccggcgagc

*agcacggcgaggtcggcggcgagatctacctgcccgagtcctacgtcaaggccgcgcagaagTGA*caattggc

agcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctgccttgac

ctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgctt

gtgctatttgcgaataccacccccagcatccccttccctcgtttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgt

cctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtattctcctg

gtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggatcc

SEQ ID NO:24

ATGgccaccgcatccactttctcggcgttcaatgcccgctgcggcgacctgcgtcgctcggcgggctccggg
ccccggcgcccagcgaggcccctccccgtgcgcgggcgcgccgccgccgccgccgacgccaaccccgcccgccccg
agcgccgcgtggtgatcaccggccagggcgtggtgacctccctgggccagaccatcgagcagttctactcctccct
gctggagggcgtgtccggcatctcccagatccagaagttcgacaccaccggctacaccaccaccatcgccggcgag
atcaagtccctgcagctggacccctacgtgcccaagcgctgggccaagcgcgtggacgacgtgatcaagtacgtgt

acatcgccggcaagcaggccctggagtccgccggcctgcccatcgaggccgccggcctggccggcgccggcctgga
ccccgccctgtgcggcgtgctgatcggcaccgccatggccggcatgacctccttcgccgccggcgtggaggccctg
acccgcggcggcgtgcgcaagatgaaccccttctgcatcccccttctccatctccaacatgggcggcgccatgctgg
ccatggacatcggcttcatgggccccaactactccatctccaccgcctgcgccaccggcaactactgcatcctggg
cgccgccgaccacatccgccgcggcgacgccaacgtgatgctggccggcggcgccgacgccgccatcatcccctcc
ggcatcggcggcttcatcgcctgcaaggccctgtccaagcgcaacgacgagcccgagcgcgcctcccgcccctggg
acgccgaccgcgacggcttcgtgatgggcgagggcgccggcgtgctggtgctggaggagctggagcacgccaagcg
ccgcggcgccaccatcctggccgagctggtgggcggcgccgccacctccgacgcccaccacatgaccgagcccgac
ccccagggccgcggcgtgcgcctgtgcctggagcgcgccctggagcgcgcccgcctggcccccgagcgcgtgggct
acgtgaacgcccacggcacctccacccccgccggcgacgtggccgagtaccgcgccatccgcgccgtgatccccca
ggactccctgcgcatcaactccaccaagtccatgatcggccacctgctgggcggcgccggcgccgtggaggccgtg
gccgccatccaggccctgcgcaccggctggctgcaccccaacctgaacctggagaaccccgcccccggcgtggacc
ccgtggtgctggtgggcccccgcaaggagcgcgccgaggacctggacgtggtgctgtccaactccttcggcttcgg
cggccacaactcctgcgtgatcttccgcaagtacgacgagatggactacaaggaccacgacggcgactacaaggac
cacgacatcgactacaaggacgacgacgacaagTGA

SEQ ID NO:25

MATASTFSAFNARCGDLRRSAGSGPRRPARPLPVRGRAAAAADANPARPERRVVITGQGVVTSLGQTIEQFYS
SLLEGVSGISQIQKFDTTGYTTTIAGEIKSLQLDPYVPKRWAKRVDDVIKYVYIAGKQALESAGLPIEAAGLAGAGL
DPALCGVLIGTAMAGMTSFAAGVEALTRGGVRKMNPFCIPFSISNMGGAMLAMDIGFMGPNYSISTACATGNYCILG
AADHIRRGDANVMLAGGADAAIIPSGIGGFIACKALSKRNDEPERASRPWDADRDGFVMGEGAGVLVLEELEHAKRR
GATILAELVGGAATSDAHHMTEPDPQGRGVRLCLERALERARLAPERVGYVNAHGTSTPAGDVAEYRAIRAVIPQDS
LRINSTKSMIGHLLGGAGAVEAVAAIQALRTGWLHPNLNLENPAPGVDPVVLVGPRKERAEDLDVVLSNSFGFGGHN
SCVIFRKYDEMDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

SEQ ID NO:26

密码子优化的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)FAD2蛋白质编码序列

ATGgccatcaagaccaaccgccagcccgtggagaagccccccttcaccatcggcaccctgcgcaaggccatc
cccgcccactgcttcgagcgctccgccctgcgctcctccatgtacctggccttcgacatcgccgtgatgtccctgc
tgtacgtggcctccacctacatcgaccccgcccccgtgcccacctgggtgaagtacggcgtgatgtggcccctgta
ctggttcttccagggcgccttcggcaccggcgtgtgggtgtgcgcccacgagtgcggccaccaggccttctcctcc
tcccaggccatcaacgacggcgtgggcctggtgttccactccctgctgctggtgccctactactcctggaagcact
cccaccgccgccaccactccaacaccggctgcctggacaaggacgaggtgttcgtgcccccccaccgcgccgtggc
ccacgagggcctggagtgggaggagtggctgcccatccgcatgggcaaggtgctggtgaccctgaccctgggctgg
cccctgtacctgatgttcaacgtggcctcccgcccctaccccccgcttcgccaaccacttcgaccccctggtccccca
tcttctccaagcgcgagcgcatcgaggtggtgatctccgacctggccctggtggccgtgctgtccggcctgtccgt
gctgggccgcaccatgggctgggcctggctggtgaagacctacgtggtgccctacctgatcgtgaacatgtggctg
gtgctgatcaccctgctgcagcacacccaccccgccctgccccactacttcgagaaggactgggactggctgcgcg
gcgccatggccaccgtggaccgctccatgggcccccccttcatggacaacatcctgcaccacatctccgacaccca
cgtgctgcaccacctgttctccaccatcccccactaccacgccgaggaggcctccgccgccatccgccccatcctg
ggcaagtactaccagtccgactcccgctgggtgggccgcgccctgtgggaggactggcgcgactgccgctacgtgg

tgcccgacgcccccgaggacgactccgccctgtggttccacaagTAG

SEQ ID NO:27

桑椹型无绿藻FAD2的氨基酸序列

MAIKTNRQPVEKPPFTIGTLRKAIPAHCFERSALRSSMYLAFDIAVMSLLYVASTYIDPAPVPTWVKYGVMWP
LYWFFQGAFGTGVWVCAHECGHQAFSSSQAINDGVGLVFHSLLLVPYYSWKHSHRRHHSNTGCLDKDEVFVPPHRAV
AHEGLEWEEWLPIRMGKVLVTLTLGWPLYLMFNVASRPYPRFANHFDPWSPIFSKRERIEVVISDLALVAVLSGLSV
LGRTMGWAWLVKTYVVPYLIVNMWLVLITLLQHTHPALPHYFEKDWDWLRGAMATVDRSMGPPFMDNILHHISDTHV
LHHLFSTIPHYHAEEASAAIRPILGKYYQSDSRWVGRALWEDWRDCRYVVPDAPEDDSALWFHK

SEQ ID NO:28

来自pSZ1358的密码子优化的油菜C18:0偏好的硫酯酶的编码区

ACTAGTATGCTGAAGCTGTCCTGCAACGTGACCAACAACCTGCACACCTTCTCCTTCTTCTCCGACTCCTCCC
TGTTCATCCCCGTGAACCGCCGCACCATCGCCGTGTCCTCCGGGCGCGCCTCCCAGCTGCGCAAGCCCGCCCTGGAC
CCCCTGCGCGCCGTGATCTCCGCCGACCAGGGCTCCATCTCCCCCGTGAACTCCTGCACCCCCGCCGACCGCCTGCG
CGCCGGCCGCCTGATGGAGGACGGCTACTCCTACAAGGAGAAGTTCATCGTGCGCTCCTACGAGGTGGGCATCAACA
AGACCGCCACCGTGGAGACCATCGCCAACCTGCTGCAGGAGGTGGCCTGCAACCACGTGCAGAAGTGCGGCTTCTCC
ACCGACGGCTTCGCCACCACCCTGACCATGCGCAAGCTGCACCTGATCTGGGTGACCGCCCGCATGCACATCGAGAT
CTACAAGTACCCCGCCTGGTCCGACGTGGTGGAGATCGAGACCTGGTGCCAGTCCGAGGGCCGCATCGGCACCCGCC
GCGACTGGATCCTGCGCGACTCCGCCACCAACGAGGTGATCGGCCGCGCCACCTCCAAGTGGGTGATGATGAACCAG
GACACCCGCCGCCTGCAGCGCGTGACCGACGAGGTGCGCGACGAGTACCTGGTGTTCTGCCCCCGCGAGCCCCGCCT
GGCCTTCCCCGAGGAGAACAACTCCTCCCTGAAGAAGATCCCCAAGCTGGAGGACCCCGCCCAGTACTCCATGCTGG
AGCTGAAGCCCCGCCGCGCCGACCTGGACATGAACCAGCACGTGAACAACGTGACCTACATCGGCTGGGTGCTGGAG
TCCATCCCCCAGGAGATCATCGACACCCACGAGCTGCAGGTGATCACCCTGGACTACCGCCGCGAGTGCCAGCAGGA
CGACATCGTGGACTCCCTGACCACCTCCGAGATCCCCGACGACCCCATCTCCAAGTTCACCGGCACCAACGGCTCCG
CCATGTCCTCCATCCAGGGCCACAACGAGTCCCAGTTCCTGCACATGCTGCGCCTGTCCGAGAACGGCCAGGAGATC
AACCGCGGCCGCACCCAGTGGCGCAAGAAGTCCTCCCGCATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCA
CGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGAATCGAT

SEQ ID NO:29

油菜C18:0偏好的硫酯酶的氨基酸序列(登录号CAA52070.1)

MLKLSCNVTNNLHTFSFFSDSSLFIPVNRRTIAVSSSQLRKPALDPLRAVISADQGSISPVNSCTPADRLRAG
RLMEDGYSYKEKFIVRSYEVGINKTATVETIANLLQEVACNHVQKCGFSTDGFATTLTMRKLHLIWVTARMHIEIYK
YPAWSDVVEIETWCQSEGRIGTRRDWILRDSATNEVIGRATSKWVMMNQDTRRLQRVTDEVRDEYLVFCPREPRLAF
PEENNSSLKKIPKLEDPAQYSMLELKPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQEIIDTHELQVITLDYRRECQQDDI
VDSLTTSEIPDDPISKFTGTNGSAMSSIQGHNESQFLHMLRLSENGQEINRGRTQWRKKSSR

SEQ ID NO:30

桑椹型无绿藻FATA1等位基因1的5'同源供体区

GGAGTCACTGTGCCACTGAGTTCGACTGGTAGCTGAATGGAGTCGCTGCTCCACTAAACGAATTGTCAGCACC
GCCAGCCGGCCGAGGACCCGAGTCATAGCGAGGGTAGTAGCGCGCCATGGCACCGACCAGCCTGCTTGCCAGTACTG
GCGTCTCTTCCGCTTCTCTGTGGTCCTCTGCGCGCTCCAGCGCGTGCGCTTTTCCGGTGGATCATGCGGTCCGTGGC
GCACCGCAGCGGCCGCTGCCCATGCAGCGCCGCTGCTTCCGAACAGTGGCGGTCAGGGCCGCACCCGCGGTAGCCGT

CCGTCCGGAACCCGCCCAAGAGTTTTGGGAGCAGCTTGAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGACAAGCGCATCTTCCTGG
AGGAGCACCGGTGCGTGGAGGTCCGGGGCTGACCGGCCGTCGCATTCAACGTAATCAATCGCATGATGATCAGAGGA
CACGAAGTCTTGGTGGCGGTGGCCAGAAACACTGTCCATTGCAAGGGCATAGGGATGCGTTCCTTCACCTCTCATTT
CTCATTTCTGAATCCCTCCCTGCTCACTCTTTCTCCTCCTCCTTCCCGTTCACGCAGCATTCGG

SEQ ID NO:31

桑椹型无绿藻FATA1等位基因1的3'同源供体区

GACAGGGTGGTTGGCTGGATGGGGAAACGCTGGTCGCGGGATTCGATCCTGCTGCTTATATCCTCCCTGGAAG
CACACCCACGACTCTGAAGAAGAAAACGTGCACACACACAACCCAACCGGCCGAATATTTGCTTCCTTATCCCGGGT
CCAAGAGAGACTGCGATGCCCCCCTCAATCAGCATCCTCCTCCCTGCCGCTTCAATCTTCCCTGCTTGCCTGCGCCC
GCGGTGCGCCGTCTGCCCGCCCAGTCAGTCACTCCTGCACAGGCCCCTTGTGCGCAGTGCTCCTGTACCCTTTACCG
CTCCTTCCATTCTGCGAGGCCCCCTATTGAATGTATTCGTTGCCTGTGTGGCCAAGCGGGCTGCTGGGCGCGCCGCC
GTCGGGCAGTGCTCGGCGACTTTGGCGGAAGCCGATTGTTCTTCTGTAAGCCACGCGCTTGCTGCTTTGGGAAGAGA
AGGGGGGGGGTACTGAATGGATGAGGAGGAGAAGGAGGGGTATTGGTATTATCTGAGTTGGGT

SEQ ID NO:32

桑椹型无绿藻FATA1等位基因2的5'同源供体区

AATGGAGTCGCTGCTCCACTAATCGAATTGTCAGCACCGCCAGCCGGCCGAGGACCCGAGTCATAGCGAGGGT
AGTAGCGCGCCATGGCACCGACCAGCCTGCTTGCCCGTACTGGCGTCTCTTCCGCTTCTCTGTGCTCCTCTACGCGC
TCCGGCGCGTGCGCTTTTCCGGTGGATCATGCGGTCCGTGGCGCACCGCAGCGGCCGCTGCCCATGCAGCGCCGCTG
CTTCCGAACAGTGGCTGTCAGGGCCGCACCCGCAGTAGCCGTCCGTCCGGAACCCGCCCAAGAGTTTTGGGAGCAGC
TTGAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGACAAGCGCATCTTCCTGGAGGAGCACCGGTGCGCGGAGGTCCGGGGCTGACCG
GCCGTCGCATTCAACGTAATCAATCGCATGATGATCACAGGACGCGACGTCTTGGTGGCGGTGGCCAGGGACACTGC
CCATTGCACAGGCATAGGAATGCGTTCCTTCTCATTTCTCAGTTTTCTGAGCCCCTCCCTCTTCACTCTTTCTCCTC
CTCCTCCCCTCTCACGCAGCATTCGTGG

SEQ ID NO:33

桑椹型无绿藻FATA1等位基因2的3'同源供体区

CACTAGTATCGATTTCGAACAGAGGAGAGGGTGGCTGGTAGTTGCGGGATGGCTGGTCGCCCGTCGATCCTGC
TGCTGCTATTGTCTCCTCCTGCACAAGCCCACCCACGACTCCGAAGAAGAAGAAGAAAACGCGCACACACACAACCC
AACCGGCCGAATATTTGCTTCCTTATCCCGGGTCCAAGAGAGACGGCGATGCCCCCCTCAATCAGCCTCCTCCTCCC
TGCCGCTCCAATCTTCCCTGCTTGCATGCGCCCGCGAGAGGCTGTCTGCGCGCCCCGTCAGTCACTCCCCGTGCAGA
CGCCTCGTGCTCGGTGCTCCTGTATCCTTTACCGCTCCTTTCATTCTGCGAGGCCCCCTGTTGAATGTATTCGTTGC
CTGTGTGGCCAAGCGCGCTGCTGGGCGCGCCGCCGTCGGGCGGTGCTCGGCGACTCTGGCGGAAGCCGGTTGTTCTT
CTGTAAGCCACGCGCTTGCTGCTTTTGGAAAAGAGGGGGGTTTACTGAATGGAGGAGGAGCAGGATAATTGGTAGTA
TCTGAGTTGTTG

SEQ ID NO:34

SAD2发夹C

actagtGCGCTGGACGCGGCAGTGGGTGGCCGAGGAGAACCGGCACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGTTG
GCTGACGGGGCGCGTCAACATGCGGGCCGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGAGCGGCATGAACCCGCAG
ACGGACAACAACCCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTTCCAGGAGCGCGCGACCAAGTACAGCCACGGCAACA
CCGCGCGCCTTGCGGCCGAGCAGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCGTATCGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGG

GAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGggatccTGCTCGG
CCGCAAGGCGCGCGGTGTTGCCGTGGCTGTACTTGGTCGCGCGCTCCTGGAAGGAGGTGTAGACGAAGCCCAAGTA
AGGGTTGTTGTCCGTCTGCGGGTTCATGCCGCTCTTGATCAGGTTGTTGATGGTCACCTCCACGGCCCGCATGTTG
ACGCGCCCCGTCAGCCAACAGTACTTGTTCAGCAGGTCGCCGTGCCGGTTCTCCTCGGCCACCCACTGCCGCGTCC
AGCGCaagctt

SEQ ID NO:35

MSIQFALRAAYIKGTCQRLSGRGAALGLSRDWTPGWTLPRCWPASAAATAPPRARHQERAIHLTSGRRRHSA
LASDADERALPSNAPGLVMASQANYFRVRLLPEQEEGELESWSPNVRHTTLLCKPRAMLSKLQMRVMVGDRVIVTA
IDPVNMTVHAPPFDPLPATRFLVAGEAADMDITVVLNKADLVPEEESAALAQEVASWGPVVLTSTLTGRGLQELER
QLGSTTAVLAGPSGAGKSSIINALARAARERPSDASVSNVPEEQVVGEDGRALANPPPFTLADIRNAIPKDCFRKS
AAKSLAYLGDLSITGMAVLAYKINSPWLWPLYWFAQGTMFWALFVVGHDCGHQSFSTSKRLNDALAWLGALAAGTW
TWALGVLPMLNLYLAPYVWLLVTYLHHHGPSDPREEMPWYRGREWSYMRGGLTTIDRDYGLFNKVHHDIGTHVVHH

SEQ ID NO:36

MFWALFVVGHDCGHQSFSTSKRLNDAVGLFVHSIIGVPYHGWRISHRTHHNNHGHVENDESWYPPTESGLKAM
TDMGRQGRFHFPSMLFVYPFYLFWRSPGKTGSHFSPATDLFALWEAPLIRTSNACQLAWLGALAAGTWALGVLPMLN
LYLAPYVISVAWLDLVTYLHHHGPSDPREEMPWYRGREWSYMRGGLTTIDRDYGLFNKVHHDIGTHVVHHLFPQIPH
YNLCRATKAAKKVLGPYYREPERCPLGLLPVHLLAPLLRSLGQDHFVDDAGSVLFYRRAEGINPWIQKLLPWLGGAR
RGADAQRDAAQ

SEQ ID NO:37

亚麻荠ω-3FAD7-2

MANLVLSECGIRPLPRIYTTPRSNFVSNNNKPIFKFRPFTSYKTSSSPLACSRDGFGKNWSLNVSVPLTTTTP
IVDESPLKEEEEEKQRFDPGAPPPFNLADIRAAIPKHCWVKNPWKSMSYVLRDVAIVFALAAGASYLNNWIVWPLYW
LAQGTMFWALFVLGHDCGHGSFSNNPRLNNVVGHLLHSSILVPYHGWRISHRTHHQNHGHVENDESWHPMSEKIYQS
LDKPTRFFRFTLPLVMLAYPFYLWARSPGKKGSHYHPESDLFLPKEKTDVLTSTACWTAMAALLICLNFVVGPVQML
KLYGIPYWINVMWLDFVTYLHHHGHEDKLPWYRGKEWSYLRGGLTTLDRDYGVINNIHHDIGTHVIHHLFPQIPHYH
LVEATEAVKPVLGKYYREPDKSGPLPLHLLGILAKSIKEDHYVSDEGDVVYYKADPNMYGEIKVGAD

SEQ ID NO:38

桑椹型无绿藻Δ12去饱和酶等位基因2

MAIKTNRQPVEKPPFTIGTLRKAIPAHCFERSALRSSMYLAFDIAVMSLLYVASTYIDPAPVPTWVKYGIMWP
LYWFFQGAFGTGVWVCAHECGHQAFSSSQAINDGVGLVFHSLLLVPYYSWKHSHRRHHSNTGCLDKDEVFVPPHRAV
AHEGLEWEEWLPIRMGKVLVTLTLGWPLYLMFNVASRPYPRFANHFDPWSPIFSKRERIEVVISDLALVAVLSGLSV
LGRTMGWAWLVKTYVVPYMIVNMWLVLITLLQHTHPALPHYFEKDWDWLRGAMATVDRSMGPPFMDSILHHISDTHV
LHHLFSTIPHYHAEEASAAIRPILGKYYQSDSRWVGRALWEDWRDCRYVVPDAPEDDSALWFHK

SEQ ID NO:39

亚麻荠ω-3FAD7-1

MANLVLSECGIRPLPRIYTTPRSNFVSNNNKPIFKFRPLTSYKTSSPLFCSRDGFGRNWSLNVSVPLATTTPI
VDESPLEEEEEEEKQRFDPGAPPPFNLADIRAAIPKHCWVKNPWKSMSYVLRDVAIVFALAAGAAYLNNWIVWPLYW
LAQGTMFWALFVLGHDCGHGSFSNNPRLNNVVGHLLHSSILVPYHGWRISHRTHHQNHGHVENDESWHPMSEKIYQS
LDKPTRFFRFTLPLVMLAYPFYLWARSPGKKGSHYHPESDLFLPKEKTDVLTSTACWTAMAALLICLNFVVGPVQML

KLYGIPYWINVMWLDFVTYLHHHGHEDKLPWYRGKEWSYLRGGLTTLDRDYGVINNIHHDIGTHVIHHLFPQIPHYH
LVEATEAVKPVLGKYYREPDKSGPLPLHLLGILAKSIKEDHYVSDEGDVVYYKADPNMYGEIKVGAD

SEQ ID NO:40

PmFATA-hpB

actagtCATTCGGGGCAACGAGGTGGGCCCCTCGCAGCGGCTGACGATCACGGCGGTGGCCAACATCCTGCA
GGAGGCGGCGGGCAACCACGCGGTGGCCATGTGGGGCCGGAGCGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCGTATTGAG
GTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGG
CGCGTACGggatccGCTCCGGCCCCACATGGCCACCGCGTGGTTGCCCGCCGCCTCCTGCAGGATGTTGGCCACCG
CCGTGATCGTCAGCCGCTGCGAGGGGCCCACCTCGTTGCCCCGAATGaagctt

SEQ ID NO:41

PmFATA-hpC

actagtGGAGGGTTTCGCGACGGACCCGGAGCTGCAGGAGGCGGGTCTCATCTTTGTGATGACGCGCATGCA
GATCCAGATGTACCGCTACCCGCGCTGGGGCGACCTGATGCAGGTGGAGACCTGGTTCCAGAGTGTGTTTGAGGGT
TTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCCGGCTACC
CTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGggatccTCTGGAACCAGGTCTCCACCTGCATCAGGTCGCCCCAGCGCGG
GTAGCGGTACATCTGGATCTGCATGCGCGTCATCACAAAGATGAGACCCGCCTCCTGCAGCTCCGGGTCCGTCGCG
AAACCCTCCaagctt

SEQ ID NO:42

PmFATA-hpD

actagtCGGCGGGCAAGCTGGGCGCGCAGCGCGAGTGGGTGCTGCGCGACAAGCTGACCGGCGAGGCGCTGG
GCGCGGCCACCTCGAGCTGGGTCATGATCAACATCCGCACGCGCCGGCCGTGCCGCATGCCGGGTGTGTTTGAGGG
TTTTGGTTGCCCGTATCGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCCGGCTAC
CCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGggatccCCGGCATGCGGCACGGCCGGCGCGTGCGGATGTTGATCATGA
CCCAGCTCGAGGTGGCCGCGCCCAGCGCCTCGCCGGTCAGCTTGTCGCGCAGCACCCACTCGCGCTGCGCGCCCAG
CTTGCCCGCCGaagcttSEQ ID NO:43

PmFATA-hpE

actagtGTCCGCGTCAAGTCGGCCTTCTTCGCGCGCGAGCCGCCGCGCCTGGCGCTGCCGCCCGCGGTCACG
CGTGCCAAGCTGCCCAACATCGCGACGCCGGCGCCGCTGCGCGGGCACCGCCAGGTCGCGCGCCGCACCGACATGG
ACATGAACGGGCACGTGAACAACGTGGCCTACCTGGCCTGGTGCCTGGAGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCGT
ATTGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTT
CCAGGGCGCGTACGggatccTCCAGGCACCAGGCCAGGTAGGCCACGTTGTTCACGTGCCCGTTCATGTCCATGTC
GGTGCGGCGCGCGACCTGGCGGTGCCCGCGCAGCGGCGCCGGCGTCGCGATGTTGGGCAGCTTGGCACGCGTGACC
GCGGGCGGCAGCGCCAGGCGCGGCGGCTCGCGCGCGAAGAAGGCCGACTTGACGCGGACaagctt

SEQ ID NO:44

PmFATA-hpF

actagtCCGTGCCCGAGCACGTCTTCAGCGACTACCACCTCTACCAGATGGAGATCGACTTCAAGGCCGAGT
GCCACGCGGGCGACGTCATCTCCTCCCAGGCCGAGCAGATCCCGCCCCAGGAGGCGCTCACGCACAACGGCGCCGG
CCGCAACCCCTCCTGCTTCGTCCATAGCATTCTGCGCGCCGAGACCGAGCGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCG
TATCGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCT

TCCAGGGCGCGTACGggatccGCTCGGTCTCGGCGCGCAGAATGCTATGGACGAAGCAGGAGGGGTTGCGGCCGGC
GCCGTTGTGCGTGAGCGCCTCCTGGGGCGGGATCTGCTCGGCCTGGGAGGAGATGACGTCGCCCGCGTGGCACTCG
GCCTTGAAGTCGATCTCCATCTGGTAGAGGTGGTAGTCGCTGAAGACGTGCTCGGGCACGGaagctt

SEQ ID NO:45

PmFATA-hpG

actagtTCGTCCGCGCGCGAACCACATGGTCGGCCCCCATCGACGCGCCCGCCGCCAAGCCGCCCAAGGCGA
GCCACTGAGGACAGGGTGGTTGGCTGGATGGGGAAACGCTGGTCGCGGGATTCGATCCTGCTGCTTATATCCTCGT
GTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACC
CCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGggatccGAGGATATAAGCAGCAGGATCGAATCCCGCG
ACCAGCGTTTCCCCATCCAGCCAACCACCCTGTCCTCAGTGGCTCGCCTTGGGCGGCTTGGCGGCGGGCGCGTCGA
TGGGGGCCGACCATGTGGTTCGCGCGCGGACGAaagctt

SEQ ID NO:46

密码子优化的赖特葶距花KASAI

ATGGCCGCCGCCGCCAGCATGGTGGCCAGCCCCTTCTGCACCTGGCTGGTGGCCAGCTGCATGAGCACCAGCT
TCGACAACGACCCCCGCAGCCCCAGCGTGAAGCGCTTCCCCCGCCGCAAGCGCGTGCTGAGCCAGCGCGGCAGCACC
TACGTATTCCAGTGCCTGGTGGCCAGCTGCATCGACCCCTGCGACCAGTACCGCAGCAGCGCCAGCCTGAGCTTCCT
GGGCGACAACGGCTTCGCCAGCCTGTTCGGCAGCAAGCCCTTCATGAGCAACCGCGGCCACCGCCGCCTGCGCCGCG
CCAGCCACAGCGGCGAGGCCATGGCCGTGGCCCTGCAGCCCGCCCAGGAGGCCGGCACCAAGAAGAAGCCCGTGATC
AAGCAGCGCCGCGTGGTGGTGACCGGCATGGGCGTGGTGACCCCCCTGGGCCACGAGCCCGACGTGTTCTACAACAA
CCTGCTGGACGGCGTGAGCGGCATCAGCGAGATCGAGACCTTCGACTGCACCCAGTTCCCCACCCGCATCGCCGGCG
AGATCAAGAGCTTCAGCACCGACGGCTGGGTGGCCCCCAAGCTGAGCAAGCGCATGGACAAGTTCATGCTGTACCTG
CTGACCGCCGGCAAGAAGGCCCTGGCCGACGGCGGCATCACCGACGAGGTGATGAAGGAGCTGGACAAGCGCAAGTG
CGGCGTGCTGATCGGCAGCGGCATGGGCGGCATGAAGGTGTTCAACGACGCCATCGAGGCCCTGCGCGTGAGCTACA
AGAAGATGAACCCCTTCTGCGTGCCCTTCGCCACCACCAACATGGGCAGCGCCATGCTGGCCATGGACCTGGGCTGG
ATGGGCCCCAACTACAGCATCAGCACCGCCTGCGCCACCAGCAACTTCTGCATCCTGAACGCCGCCAACCACATCAT
CCGCGGCGAGGCCGACATGATGCTGTGCGGCGGCAGCGACGCCGTGATCATCCCCATCGGCCTGGGCGGCTTCGTGG
CCTGCCGCGCCCTGAGCCAGCGCAACAGCGACCCCACCAAGGCCAGCCGCCCCTGGGACAGCAACCGCGACGGCTTC
GTGATGGGCGAGGGCGCCGGCGTGCTGCTGCTGGAGGAGCTGGAGCACGCCAAGAAGCGCGGCGCCACCATCTACGC
CGAGTTCCTGGGCGGCAGCTTCACCTGCGACGCCTACCACATGACCGAGCCCCACCCCGAGGGCGCCGGCGTGATCC
TGTGCATCGAGAAGGCCCTGGCCCAGGCCGGCGTGAGCAAGGAGGACGTGAACTACATCAACGCCCACGCCACCAGC
ACCAGCGCCGGCGACATCAAGGAGTACCAGGCCCTGGCCCGCTGCTTCGGCCAGAACAGCGAGCTGCGCGTGAACAG
CACCAAGAGCATGATCGGCCACCTGCTGGGCGCCGCCGGCGGCGTGGAGGCCGTGACCGTGGTGCAGGCCATCCGCA
CCGGCTGGATTCACCCCAACCTGAACCTGGAGGACCCCGACAAGGCCGTGGACGCCAAGCTGCTGGTGGGCCCCAAG
AAGGAGCGCCTGAACGTGAAGGTGGGCCTGAGCAACAGCTTCGGCTTCGGCGGCCACAACAGCAGCATCCTGTTCGC
CCCCTGCAACGTGTGA

SEQ ID NO:47

具有桑椹型无绿藻SAD转运肽的密码子优化的赖特葶距花KASAI

ATGGGCCGCGGTGTCTCCCTTCCCCGGCCCAGGGTCGCGGTGCGCGCCCAGTCGGCGAGTCAGGTTTTGGAG
AGCTGTATTCCAGTGCCTGGTGGCCAGCTGCATCGACCCCTGCGACCAGTACCGCAGCAGCGCCAGCCTGAGCTTC

CTGGGCGACAACGGCTTCGCCAGCCTGTTCGGCAGCAAGCCCTTCATGAGCAACCGCGGCCACCGCCGCCTGCGCC
GCGCCAGCCACAGCGGCGAGGCCATGGCCGTGGCCCTGCAGCCCGCCCAGGAGGCCGGCACCAAGAAGAAGCCCGT
GATCAAGCAGCGCCGCGTGGTGGTGACCGGCATGGGCGTGGTGACCCCCCTGGGCCACGAGCCCGACGTGTTCTAC
AACAACCTGCTGGACGGCGTGAGCGGCATCAGCGAGATCGAGACCTTCGACTGCACCCAGTTCCCCACCCGCATCG
CCGGCGAGATCAAGAGCTTCAGCACCGACGGCTGGGTGGCCCCCAAGCTGAGCAAGCGCATGGACAAGTTCATGCT
GTACCTGCTGACCGCCGGCAAGAAGGCCCTGGCCGACGGCGGCATCACCGACGAGGTGATGAAGGAGCTGGACAAG
CGCAAGTGCGGCGTGCTGATCGGCAGCGGCATGGGCGGCATGAAGGTGTTCAACGACGCCATCGAGGCCCTGCGCG
TGAGCTACAAGAAGATGAACCCCTTCTGCGTGCCCTTCGCCACCACCAACATGGGCAGCGCCATGCTGGCCATGGA
CCTGGGCTGGATGGGCCCCAACTACAGCATCAGCACCGCCTGCGCCACCAGCAACTTCTGCATCCTGAACGCCGCC
AACCACATCATCCGCGGCGAGGCCGACATGATGCTGTGCGGCGGCAGCGACGCCGTGATCATCCCCATCGGCCTGG
GCGGCTTCGTGGCCTGCCGCGCCCTGAGCCAGCGCAACAGCGACCCCACCAAGGCCAGCCGCCCCTGGGACAGCAA
CCGCGACGGCTTCGTGATGGGCGAGGGCGCCGGCGTGCTGCTGCTGGAGGAGCTGGAGCACGCCAAGAAGCGCGGC
GCCACCATCTACGCCGAGTTCCTGGGCGGCAGCTTCACCTGCGACGCCTACCACATGACCGAGCCCCACCCCGAGG
GCGCCGGCGTGATCCTGTGCATCGAGAAGGCCCTGGCCCAGGCCGGCGTGAGCAAGGAGGACGTGAACTACATCAA
CGCCCACGCCACCAGCACCAGCGCCGGCGACATCAAGGAGTACCAGGCCCTGGCCCGCTGCTTCGGCCAGAACAGC
GAGCTGCGCGTGAACAGCACCAAGAGCATGATCGGCCACCTGCTGGGCGCCGCCGGCGGCGTGGAGGCCGTGACCG
TGGTGCAGGCCATCCGCACCGGCTGGATTCACCCCAACCTGAACCTGGAGGACCCCGACAAGGCCGTGGACGCCAA
GCTGCTGGTGGGCCCCAAGAAGGAGCGCCTGAACGTGAAGGTGGGCCTGAGCAACAGCTTCGGCTTCGGCGGCCAC
AACAGCAGCATCCTGTTCGCCCCCTGCAACGTGTGASEQ ID NO:48

密码子优化的Cuphea pulcherrimaKASIV

ATGCCCGCGGCCAGCTCGCTGCTGGCGTCCCCCCTGTGCACCTGGCTGCTGGCCGCGTGCATGAGCACCTCGT
TCCACCCCTCCGACCCCCTGCCCCCCAGCATCTCGTCCCCCCGCCGCCGCCTGAGCCGCCGCCGCATCCTGTCGCAG
TGCGCCCCCCTGCCCTCCGCGAGCTCGGCCCTGCGCGGCTCCAGCTTCCACACCCTGGTGACCTCGTATCTGGCGTG
CTTCGAGCCCTGCCACGACTATTATACCAGCGCCTCCCTGTTCGGCTCGCGCCCCATCCGCACCACCCGCCGCCACC
GCCGCCTGAACCGCGCGAGCCCCTCGCGCGAGGCGATGGCGGTCGCCCTGCAGCCCGAGCAGGAGGTGACCACCAAG
AAGAAGCCCTCCATCAAGCAGCGCCGCGTCGTGGTCACCGGCATGGGCGTGGTCACCCCCCTGGGCCACGACCCCGA
CGTGTTCTATAACAACCTGCTGGACGGCACCAGCGGCATCTCGGAGATCGAGACCTTCGACTGCGCGCAGTTCCCCA
CCCGCATCGCCGGCGAGATCAAGTCCTTCAGCACCGACGGCTGGGTCGCGCCCAAGCTGTCGAAGCGCATGGACAAG
TTCATGCTGTATATGCTGACCGCCGGCAAGAAGGCGCTGACCGACGGCGGCATCACCGAGGACGTGATGAAGGAGCT
GGACAAGCGCAAGTGCGGCGTCCTGATCGGCTCCGCGATGGGCGGCATGAAGGTGTTCAACGACGCGATCGAGGCCC
TGCGCATCAGCTATAAGAAGATGAACCCCTTCTGCGTGCCCTTCGCGACCACCAACATGGGCTCGGCCATGCTGGCG
ATGGACCTGGGCTGGATGGGCCCCAACTATTCCATCAGCACCGCCTGCGCGACCTCGAACTTCTGCATCATGAACGC
GGCCAACCACATCATCCGCGGCGAGGCGGACGTCATGCTGTGCGGCGGCTCCGACGCCGTGATCATCCCCATCGGCA
TGGGCGGCTTCGTCGCGTGCCGCGCCCTGAGCCAGCGCAACTCGGACCCCACCAAGGCGTCCCGCCCCTGGGACAGC
AACCGCGACGGCTTCGTGATGGGCGAGGGCGCCGGCGTCCTGCTGCTGGAGGAGCTGGAGCACGCGAAGAAGCGCGG
CGCCACCATCTATGCGGAGTTCCTGGGCGGCTCGTTCACCTGCGACGCCTATCACATGACCGAGCCCCACCCCGACG
GCGCCGGCGTGATCCTGTGCATCGAGAAGGCGCTGGCCCAGTCCGGCGTCAGCCGCGAGGACGTGAACTATATCAAC
GCGCACGCCACCTCGACCCCCGCGGGCGACATCAAGGAGTATCAGGCCCTGATCCACTGCTTCGGCCAGAACCGCGA
GCTGAAGGTCAACTCCACCAAGAGCATGATCGGCCACCTGCTGGGCGCGGCGGGCGGCGTGGAGGCGGTCTCGGTGG

TCCAGGCCATCCGCACCGGCTGGATCCACCCCAACATCAACCTGGAGAACCCCGACGAGGGCGTGGACACCAAGCTG
CTGGTGGGCCCCAAGAAGGAGCGCCTGAACGTCAAGGTGGGCCTGTCCAACAGCTTCGGCTTCGGCGGCCACAACTC
GTCCATCCTGTTCGCGCCCTATATCTGA

SEQ ID NO:49

密码子优化的细叶萼距花KASIV

ATGGTGGCCGCCGCCGCCTCCAGCGCCTTCTTCCCCGTGCCCGCCCCCGGCGCCTCCCCCAAGCCCGGCAAGT
TCGGCAACTGGCCCTCCAGCCTGAGCCCCTCCTTCAAGCCCAAGTCCATCCCCAACGGCGGCTTCCAGGTGAAGGCC
AACGACAGCGCCCACCCCAAGGCCAACGGCTCCGCCGTGAGCCTGAAGAGCGGCAGCCTGAACACCCAGGAGGACAC
CTCCTCCAGCCCCCCCCCCCGCACCTTCCTGCACCAGCTGCCCGACTGGAGCCGCCTGCTGACCGCCATCACCACCG
TGTTCGTGAAGTCCAAGCGCCCCGACATGCACGACCGCAAGTCCAAGCGCCCCGACATGCTGGTGGACAGCTTCGGC
CTGGAGTCCACCGTGCAGGACGGCCTGGTGTTCCGCCAGTCCTTCTCCATCCGCTCCTACGAGATCGGCACCGACCG
CACCGCCAGCATCGAGACCCTGATGAACCACCTGCAGGAGACCTCCCTGAACCACTGCAAGAGCACCGGCATCCTGC
TGGACGGCTTCGGCCGCACCCTGGAGATGTGCAAGCGCGACCTGATCTGGGTGGTGATCAAGATGCAGATCAAGGTG
AACCGCTACCCCGCCTGGGGCGACACCGTGGAGATCAACACCCGCTTCAGCCGCCTGGGCAAGATCGGCATGGGCCG
CGACTGGCTGATCTCCGACTGCAACACCGGCGAGATCCTGGTGCGCGCCACCAGCGCCTACGCCATGATGAACCAGA
AGACCCGCCGCCTGTCCAAGCTGCCCTACGAGGTGCACCAGGAGATCGTGCCCCTGTTCGTGGACAGCCCCGTGATC
GAGGACTCCGACCTGAAGGTGCACAAGTTCAAGGTGAAGACCGGCGACAGCATCCAGAAGGGCCTGACCCCCGGCTG
GAACGACCTGGACGTGAACCAGCACGTGTCCAACGTGAAGTACATCGGCTGGATCCTGGAGAGCATGCCCACCGAGG
TGCTGGAGACCCAGGAGCTGTGCTCCCTGGCCCTGGAGTACCGCCGCGAGTGCGGCCGCGACTCCGTGCTGGAGAGC
GTGACCGCCATGGACCCCAGCAAGGTGGGCGTGCGCTCCCAGTACCAGCACCTGCTGCGCCTGGAGGACGGCACCGC
CATCGTGAACGGCGCCACCGAGTGGCGCCCCAAGAACGCCGGCGCCAACGGCGCCATCTCCACCGGCAAGACCAGCA
ACGGCAACTCCGTGTCCATGTGA

SEQ ID NO:50

桑椹型无绿藻(UTEX 1435)KAS1等位基因1的5’供体序列

gctcttcctcaccgcgtgaattgctgtcccaaacgtaagcatcatcgtggctcggtcacgcgatcctggatc
cggggatcctagaccgctggtggagagcgctgccgtcggattggtggcaagtaagattgcgcaggttggcgaaggg
agagaccaaaaccggaggctggaagcgggcacaacatcgtattattgcgtatagtagagcagtggcagtcgcattt
cgaggtccgcaacggatctcgcaagctcgctacgctcacagtaggagaaaggggaccactgcccctgccagaatgg
tcgcgaccctctccctcgccggccccgcctgcaacacgcagtgcgtatccggcaagcgggctgtcgccttcaaccg
cccccatgttggcgtccgggctcgatcaggtgcgctgaggggggtttggtgtgcccgcgcctctgggcccgtgtcg
gccgtgcggacgtggggccctgggcagtggatcagcagggtttgcgtgcaaatgcctataccggcgattgaatagc
gatgaacgggatacggttgcgctcactccatgcccatgcgaccccgtttctgtccgccagccgtggtcgcccgggc
tgcgaagcgggaccccacccagcgcattgtgatcaccggaatgggcgtgggtacc

SEQ ID NO:51

桑椹型无绿藻(UTEX 1435)KAS1等位基因1的3’供体序列

gagctccacctgcatccgcctggcgctcgaggacgccggcgtctcgcccgacgaggtcaactacgtcaacgc
gcacgccacctccaccctggtgggcgacaaggccgaggtgcgcgcggtcaagtcggtctttggcgacatgaagggc
atcaagatgaacgccaccaagtccatgatcgggcactgcctgggcgccgccggcggcatggaggccgtcgccacgc
tcatggccatccgcaccggctgggtgcaccccaccatcaaccacgacaaccccatcgccgaggtcgacggcctgga

cgtcgtcgccaacgccaaggcccagcacaaaatcaacgtcgccatctccaactccttcggcttcggcgggcacaac
tccgtcgtcgcctttgcgcccttccgcgagtaggcggagcgagcgcgcttggctgaggagggaggcggggtgcgag
ccctttggctgcgcgcgatactctccccgcacgagcagactccacgcgcctgaatctacttgtcaacgagcaaccg
tgtgttttgtccgtggccattcttattatttctccgactgtggccgtactctgtttggctgtgcaagcaccgaaga
gcc

SEQ ID NO:52

桑椹型无绿藻(UTEX 1435)KAS1等位基因2的5'供体序列

gctcttcgcgcaagctcgctacgctcacagtaggagataggggaccactgcccctgccagaatggtcgcgac
cctgtccctcgccggccccgcctgcaacacgcagtgcgtatccagcaagcgggttgtcgccttcaaccgcccccat
gttggcgtccgggctcgatcaggtgcgctgaggggggtttggtgggcccgcgcctctgggcccgtgtcggccgtgc
ggacgtggggcccggggtagtggatcagcaggggttgcatgcaaatgcctataccggcgattgaatagcgatgaac
gggatacggttgcgctcactccatgcccatgcgaccccgtttctgtccgccagccgtggtcgcccgagctgcgaag
cgggaccccacccagcgcattgtgatcaccggaatgggcgtggcctccgtgtttggcaacgatgtcgagacctttt
acgacaagcttctggaaggaacgagcggcgtggacctgatttccaggtgcgtaggtccttggatgaatgcgtctag
gttgcgaggtgactggccaggaagcagcaggcttggggtttggtgttctgatttctggtaatttgaggtttcatta
taagattctgtacggtcttgtttcggggtacc

SEQ ID NO:53

桑椹型无绿藻(UTEX 1435)KAS1等位基因2的3'供体序列

gagctccacctgcatccgcctggcgctcgaggacgccggcgtctcgcccgacgaggtcaactacgtcaacgc
gcacgccacctccaccctggtgggcgacaaggccgaggtgcgcgcggtcaagtcggtctttggcgacatgaagggc
atcaagatgaacgccaccaagtccatgatcgggcactgcctgggcgccgccggcggcatggaggccgtcgccacgc
tcatggccatccgcaccggctgggtgcaccccaccatcaaccacgacaaccccatcgccgaggtcgacggcctgga
cgtcgtcgccaacgccaaggcccagcacaaaatcaacgtcgccatctccaactccttcggcttcggcgggcacaac
tccgtcgtcgcctttgcgcccttccgcgagtaggcggagcgagcgcgcttggctgaggagggaggcggggtgcgag
ccctttggctgcgcgcgatactctccccgcacgagcagactccacgcgcctgaatctacttgtcaacgagcaaccg
tgtgttttgtccgtggccattcttattatttctccgactgtggccgtactctgtttggctgtgcaagcaccgaaga
gcc

SEQ ID NO:54

桑椹型无绿藻(UTEX 1435)KASI-发夹B

actagtcaTGGTCGCCCGGGCTGCGAAGCGGGACCCCACCCAGCGCATTGTGATCACCGGAATGGGCGTGGC
CTCCGTGTTTGGCAACGATGTCGAGACCTTTTACAgtgtgtttgagggttttggttgcccgtattgaggtcctggt
ggcgcgcatggaggagaaggcgcctgtcccgctgacccccccggctaccctcccggcaccttccagggcgcgtacg
gatccTGTAAAAGGTCTCGACATCGTTGCCAAACACGGAGGCCACGCCCATTCCGGTGATCACAATGCGCTGGGT
GGGGTCCCGCTTCGCAGCCCGGGCGACCAaagctt

SEQ ID NO:55

桑椹型无绿藻(UTEX 1435)KASI-发夹C

actagtcaTTGACATCTCCGAGTTCCCGACCAAGTTTGCGGCGCAGATCACCGGCTTCTCCGTGGAGGACTG
CGTGGACAAGAAGAACGCGCGGCGGTACGACGACGCGCTGTCGTACGCGATGGTGGCCTCCAAGAAGGCCCTGCGC
CAGGCGGGACTGGAGAAGGACAAGTGCCCCGAGGGCTACGGAGgtgtgtttgagggttttggttgcccgtattgag

gtcctggtggcgcgcatggaggagaaggcgcctgtcccgctgacccccccggctaccctcccggcaccttccagggcgcgtacgggatccCTCCGTAGCCCTCGGGGCACTTGTCCTTCTCCAGTCCCGCCTGGCGCAGGGCCTTCTTGGAGGCCACCATCGCGTACGACAGCGCGTCGTCGTACCGCCGCGCGTTCTTCTTGTCCACGCAGTCCTCCACGGAGAAGCCGGTGATCTGCGCCGCAAACTTGGTCGGGAACTCGGAGATGTCAAaagctt

SEQ ID NO:56

桑椹型无绿藻(UTEX 1435)KASI-发夹D

actagtcaTGGGCGTGAGCACCTGCATCCGCCTGGCGCTCGAGGACGCCGGCGTCTCGCCCGACGAGGTCAACTACGTCAACGCGCACGCCACCTCCACCCTGGTGGGCGACAAGGCCGAGGTGCGCGCGGTCAAGTCGGTCTTTGGCGACATGAAGGGCATCAAGATgtgtgtttgagggttttggttgcccgtattgaggtcctggtggcgcgcatggaggagaaggcgcctgtcccgctgacccccccggctaccctcccggcaccttccagggcgcgtacgggatccATCTTGATGCCCTTCATGTCGCCAAAGACCGACTTGACCGCGCGCACCTCGGCCTTGTCGCCCACCAGGGTGGAGGTGGCGTGCGCGTTGACGTAGTTGACCTCGTCGGGCGAGACGCCGGCGTCCTCGAGCGCCAGGCGGATGCAGGTGCTCACGCCCAaagctt

SEQ ID NO:57

桑椹型无绿藻(UTEX 1435)KASI-发夹E

actagtcaCAACCATCAACCACGACAACCCCATCGCCGAGGTCGACGGCCTGGACGTCGTCGCCAACGCCAAGGCCCAGCACAAAATCAACGTCGCCATCTCCAACTCCTTCGgtgtgtttgagggttttggttgcccgtattgaggtcctggtggcgcgcatggaggagaaggcgcctgtcccgctgacccccccggctaccctcccggcaccttccagggcgcgtacgggatccCGAAGGAGTTGGAGATGGCGACGTTGATTTTGTGCTGGGCCTTGGCGTTGGCGACGACGTCCAGGCCGTCGACCTCGGCGATGGGGTTGTCGTGGTTGATGGTaagcttSEQ ID NO:58

密码子优化的地钱FAE3(基因库登录号AAP74370)

ATGgactcccgcgcccagaaccgcgacggcggcgaggacgtgaagcaggagctgctgtccgccggcgacgac
ggcaaggtgccctgccccaccgtggccatcggcatccgccagcgcctgcccgacttcctgcagtccgtgaacatgaa
gtacgtgaagctgggctaccactacctgatcacccacgccatgttcctgctgaccctgcccgccttcttcctggtggccg
ccgagatcggccgcctgggccacgagcgcatctaccgcgagctgtggacccacctgcacctgaacctggtgtccatc
atggcctgctcctccgccctggtggccggcgccaccctgtacttcatgtcccgcccccgcccgtgtacctggtggagtt
cgcctgctaccgccccgacgagcgcctgaaggtgtccaaggacttcttcctggacatgtcccgccgcaccggcctgttc
tcctcctcctccatggacttccagaccaagatcacccagcgctccggcctgggcgacgagacctacctgccccccgcc
atcctggcctcccccccccaaccccctgcatgcgcgaggcccgcgaggaggccgccatggtgatgttcggcgccctgga
cgagctgttcgagcagaccggcgtgaagcccaaggagatcggcgtgctggtggtgaactgctccctgttcaaccccac
cccctccatgtccgccatgatcgtgaaccactaccacatgcgcggcaacatcaagtccctgaacctgggcggcatggg
ctgctccgccggcctgatctccatcgacctggcccgcgacctgctgcaggtgcacggcaacacctacgccgtggtggt
gtccaccgagaacatcaccctgaactggtacttcggcgacgaccgctccaagctgatgtccaactgcatcttccgcatg
ggcggcgccgccgtgctgctgtccaacaagcgccgcgagcgccgccgcgccaagtacgagctgctgcacaccgtg
cgcacccacaagggcgccgacgacaagtgcttccgctgcgtgtaccaggaggaggactccaccggctccctgggcg
tgtccctgtcccgcgagctgatggccgtggccggcaacgccctgaaggccaacatcaccaccctgggcccccctggtg
ctgcccctgtccgagcagatcctgttcttcgcctccctggtggcccgcaagttcctgaacatgaagatgaagccctacat
ccccgacttcaagctggccttcgagcacttctgcatccacgccggcggccgcgccgtgctggacgagctggagaaga
acctggacctgaccgagtggcacatggagccctcccgcatgaccctgtaccgcttcggcaacacctcctcctcctcct
gtggtacgagctggcctacaccgaggcccagggccgcgtgaagcgcggcgaccgcctgtggcagatcgccttcggc
tccggcttcaagtgcaactccgccgtgtggcgcgcgctgcgcaccgtgaagcccccgtgaacaacgcctggtccga
cgtgatcgaccgcttccccgtgaagctgccccagttc**TGA**

SEQ ID NO:59

地钱FAE3(基因库登录号AAP74370)

MDSRAQNRDGGEDVKQELLSAGDDGKVPCPTVAIGIRQRLPDFLQSVNMKYVKLGYHYLITHAMFLLTLPAFF
LVAAEIGRLGHERIYRELWTHLHLNLVSIMACSSALVAGATLYFMSRPRPVYLVEFACYRPDERLKVSKDFFLDMSR
RTGLFSSSSMDFQTKITQRSGLGDETYLPPAILASPPNPCMREAREEAAMVMFGALDELFEQTGVKPKEIGVLVVNC
SLFNPTPSMSAMIVNHYHMRGNIKSLNLGGMGCSAGLISIDLARDLLQVHGNTYAVVVSTENITLNWYFGDDRSKLM
SNCIFRMGGAAVLLSNKRRERRRAKYELLHTVRTHKGADDKCFRCVYQEEDSTGSLGVSLSRELMAVAGNALKANIT
TLGPLVLPLSEQILFFASLVARKFLNMKMKPYIPDFKLAFEHFCIHAGGRAVLDELEKNLDLTEWHMEPSRMTLYRF
GNTSSSSLWYELAYTEAQGRVKRGDRLWQIAFGSGFKCNSAVWRALRTVKPPVNNAWSDVIDRFPVKLPQF

SEQ ID NO:60

布氏锥虫ELO3(基因库登录号AAX70673)

ATGctgatgaacttcggcggctcctacgacgcctacatcaacaacttccagggcaccttcctggccgagtggatgc

tggaccacccctccgtgccctacatcgccggcgtgatgtacctgatcctggtgctgtacgtgcccaagtccatcatgg

cctcccagccccccctgaacctgcgcgccgccaacatcgtgtggaacctgttcctgaccctgttctccatgtgcggcg

cctactacaccgtgccctacctggtgaaggccttcatgaaccccgagatcgtgatggccgcctccggcatcaagctg

gacgccaacacctcccccatcatcacccactccggcttctacaccaccacctgcgccctggccgactccttctacttc

aacggcgacgtgggcttctgggtggccctgttcgccctgtccaagatccccgagatgatcgacaccgccttcctggtg

ttccagaagaagcccgtgatcttcctgcactggtaccaccacctgaccgtgatgctgttctgctggttcgcctacgtgc

agaagatctcctccggcctgtggttcgcctccatgaactactccgtgcactccatcatgtacctgtactacttcgtgtgc

gcctgcggccaccgccgcctggtgcgccccttcgcccccatcatcaccttcgtgcagatcttccagatggtggtgggc

accatcgtggtgtgctacacctacaccgtgaagcacgtgctgggccgctcctgcaccgtgaccgacttctccctgcac

accggcctggtgatgtacgtgtcctacctgctgctgttctcccagctgttctaccgctcctacctgtccccccgcgacaa

ggcctccatcccccacgtggccgccgagatcaagaagaaggag***TGA***

SEQ ID NO:61

布氏锥虫ELO3(基因库登录号AAX70673)

MYPTHRDLILNNYSDIYRSPTCHYHTWHTLIHTPINELLFPNLPRECDFGYDIPYFRGQIDVFDGWSMIHFTS
SNWCIPITVCLCYIMMIAGLKKYMGPRDGGRAPIQAKNYIIAWNLFLSFFSFAGVYYTVPYHLFDPENGLFAQGFYS
TVCNNGAYYGNGNVGFFVWLFIYSKIFELVDTFFLLIRKNPVIFLHWYHHLTVLLYCWHAYSVRIGTGIWFATMNYS
VHSVMYLYFAMTQYGPSTKKFAKKFSKFITTIQILQMVVGIIVTFAAMLYVTFDVPCYTSLANSVLGLMMYASYFVL
FVQLYVSHYVSPKHVKQE

SEQ ID NO:62

密码子优化的酿酒酵母ELO1(基因库登录号P39540)

ATGgtgtccgactggaagaacttctgcctggagaaggcctcccgcttccgccccaccatcgaccgccccttcttca

acatctacctgtgggactacttcaaccgcgccgtgggctgggccaccgccggccgcttccagcccaaggacttcga

gttcaccgtgggcaagcagcccctgtccgagccccgccccgtgctgctgttcatcgccatgtactacgtggtgatcttc

ggcggccgctccctggtgaagtcctgcaagcccctgaagctgcgcttcatctcccaggtgcacaacctgatgctgac

ctccgtgtccttcctgtggctgatcctgatggtggagcagatgctgcccatcgtgtaccgccacggcctgtacttcgcc

gtgtgcaacgtggagtcctggacccagcccatggagaccctgtactacctgaactacatgaccaagttcgtggagtt

cgccgacaccgtgctgatggtgctgaagcaccgcaagctgaccttcctgcacacctaccaccacggcgccaccgc

cctgctgtgctacaaccagctggtgggctacaccgccgtgacctgggtgcccgtgaccctgaacctggccgtgcac

gtgctgatgtactggtactacttcctgtccgcctccggcatccgcgtgtggtggaaggcctgggtgacccgcctgcag

atcgtgcagttcatgctggacctgatcgtggtgtactacgtgctgtaccagaagatcgtggccgcctacttcaagaac

gcctgcaccccccagtgcgaggactgcctgggctccatgaccgccatcgccgccggcgccgccatcctgacctcct

acctgttcctgttcatctccttctacatcgaggtgtacaagcgcggctccgcctccggcaagaagaagatcaacaag

aacaac***TGA***

SEQ ID NO:63

酿酒酵母ELO1(基因库登录号P39540)

MVSDWKNFCLEKASRFRPTIDRPFFNIYLWDYFNRAVGWATAGRFQPKDFEFTVGKQPLSEPRPVLLFIAMYY
VVIFGGRSLVKSCKPLKLRFISQVHNLMLTSVSFLWLILMVEQMLPIVYRHGLYFAVCNVESWTQPMETLYYLNYMT
KFVEFADTVLMVLKHRKLTFLHTYHHGATALLCYNQLVGYTAVTWVPVTLNLAVHVLMYWYYFLSASGIRVWWKAWV
TRLQIVQFMLDLIVVYYVLYQKIVAAYFKNACTPQCEDCLGSMTAIAAGAAILTSYLFLFISFYIEVYKRGSASGKK
KINKNN

SEQ ID NO:64

具有3X FLAG标签的密码子优化的油菜酰基-ACP硫酯酶(基因库登录号CAA52070)

ATGctgaagctgtcctgcaacgtgaccaacaacctgcacaccttctccttcttctccgactcctccctgttc
atccccgtgaaccgccgcaccatcgccgtgtcctccgggcgcgcctcccagctgcgcaagcccgccctggaccccc
tgcgcgccgtgatctccgccgaccagggctccatctcccccgtgaactcctgcacccccgccgaccgcctgcgcgc
cggccgcctgatggaggacggctactcctacaaggagaagttcatcgtgcgctcctacgaggtgggcatcaacaag
accgccaccgtggagaccatcgccaacctgctgcaggaggtggcctgcaaccacgtgcagaagtgcggcttctcca
ccgacggcttcgccaccaccctgaccatgcgcaagctgcacctgatctgggtgaccgcccgcatgcacatcgagat
ctacaagtaccccgcctggtccgacgtggtggagatcgagacctggtgccagtccgagggccgcatcggcacccgc
cgcgactggatcctgcgcgactccgccaccaacgaggtgatcggccgcgccacctccaagtgggtgatgatgaacc
aggacacccgccgcctgcagcgcgtgaccgacgaggtgcgcgacgagtacctggtgttctgcccccgcgagccccg
cctggccttccccgaggagaacaactcctccctgaagaagatccccaagctggaggaccccgcccagtactccatg
ctggagctgaagccccgccgcgccgacctggacatgaaccagcacgtgaacaacgtgacctacatcggctgggtgc
tggagtccatcccccaggagatcatcgacacccacgagctgcaggtgatcaccctggactaccgccgcgagtgcca
gcaggacgacatcgtggactccctgaccacctccgagatccccgacgaccccatctccaagttcaccggcaccaac
ggctccgccatgtcctccatccagggccacaacgagtcccagttcctgcacatgctgcgcctgtccgagaacggcc
aggagatcaaccgcggccgcacccagtggcgcaagaagtcctcccgcATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTA
CAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGA

SEQ ID NO:65

具有3X FLAG标签的油菜酰基-ACP硫酯酶(基因库登录号CAA52070)

MLKLSCNVTNNLHTFSFFSDSSLFIPVNRRTIAVSS***GRA***SQLRKPALDPLRAV
ISADQGSISPVNSCTPADRLRAGRLMEDGYSYKEKFIVRSYEVGINKTATVE
TIANLLQEVACNHVQKCGFSTDGFATTLTMRKLHLIWVTARMHIEIYKYPA
WSDVVEIETWCQSEGRIGTRRDWILRDSATNEVIGRATSKWVMMNQDTRR
LQRVTDEVRDEYLVFCPREPRLAFPEENNSSLKKIPKLEDPAQYSMLELKPR
RADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQEIIDTHELQVITLDYRRECQQDDIVDS
LTTSEIPDDPISKFTGTNGSAMSSIQGHNESQFLHMLRLSENGQEINRGRTQ
WRKKSSR**MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

SEQ ID NO:66

具有UTEX 250硬脂酰基-ACP去饱和酶(SAD)叶绿体转运肽和3X FLAG标签的密码子优化的油菜酰基-ACP硫酯酶(基因库登录号CAA52070)

ATGgccaccgcatccactttctcggcgttcaatgcccgctgcggcgacctgcgtcgctcggcgggctccgggcccc
ggcgcccagcgaggcccctccccgtgcgcgggcgcgcctcccagctgcgcaagcccgccctggacccccctgcgcg
ccgtgatctccgccgaccagggctccatctcccccgtgaactcctgcacccccgccgaccgcctgcgcgccggccgc
ctgatggaggacggctactcctacaaggagaagttcatcgtgcgctcctacgaggtgggcatcaacaagaccgccacc
gtggagaccatcgccaacctgctgcaggaggtggcctgcaaccacgtgcagaagtgcggcttctccaccgacggctt
cgccaccaccctgaccatgcgcaagctgcacctgatctgggtgaccgcccgcatgcacatcgagatctacaagtaccc
cgcctggtccgacgtggtggagatcgagacctggtgccagtccgagggccgcatcggcacccgccgcgactggatc
ctgcgcgactccgccaccaacgaggtgatcggccgcgccacctccaagtgggtgatgatgaaccaggacacccgcc
gcctgcagcgcgtgaccgacgaggtgcgcgacgagtacctggtgttctgcccccgcgagccccgcctggccttcccc
gaggagaacaactcctccctgaagaagatccccaagctggaggaccccgcccagtactccatgctggagctgaagcc
ccgccgcgccgacctggacatgaaccagcacgtgaacaacgtgacctacatcggctgggtgctggagtccatccccc
aggagatcatcgacacccacgagctgcaggtgatcaccctggactaccgccgcgagtgccagcaggacgacatcgtg
gactccctgaccacctccgagatccccgacgaccccatctccaagttcaccggcaccaacggctccgccatgtcctcca
tccagggccacaacgagtcccagttcctgcacatgctgcgcctgtccgagaacggccaggagatcaaccgcggccgc
acccagtggcgcaagaagtcctcccgcATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACA
AGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGA

SEQ ID NO:67

具有UTEX 250硬脂酰基-ACP去饱和酶(SAD)叶绿体转运肽和3XFLAG®标签的油菜酰基-ACP硫酯酶(基因库登录号CAA52070)

MATASTFSAFNARCGDLRRSAGSGPRRPARPLPVR***GRA***SQLRKPALDPLRA
VISADQGSISPVNSCTPADRLRAGRLMEDGYSYKEKFIVRSYEVGINKTATV
ETIANLLQEVACNHVQKCGFSTDGFATTLTMRKLHLIWVTARMHIEIYKYP
AWSDVVEIETWCQSEGRIGTRRDWILRDSATNEVIGRATSKWVMMNQDTR
RLQRVTDEVRDEYLVFCPREPRLAFPEENNSSLKKIPKLEDPAQYSMLELKP
RRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQEIIDTHELQVITLDYRRECQQDDIVD
SLTTSEIPDDPISKFTGTNGSAMSSIQGHNESQFLHMLRLSENGQEINRGRTQ
WRKKSSR**MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

SEQ ID NO:68

具有UTEX 250硬脂酰基-ACP去饱和酶(SAD)叶绿体转运肽和3XFLAG®标签的密码子优化的红花FATA(基因库登录号AAA33019)

ATGgccaccgcatccactttctcggcgttcaatgcccgctgcggcgacctgcgtcgctcggcgggctccgggccc

cggcgcccagcgaggcccctccccgtgcgcg***ggcgcgcc***gccaccggcgagcagccctccggcgtggcctccct

gcgcgaggccgacaaggagaagtccctgggcaaccgcctgcgcctgggctccctgaccgaggacggcctgtcct

acaaggagaagttcgtgatccgctgctacgaggtgggcatcaacaagaccgccaccatcgagaccatcgccaac

ctgctgcaggaggtgggcggcaaccacgcccagggcgtgggcttctccaccgacggcttcgccaccaccaccacc

atgcgcaagctgcacctgatctgggtgaccgcccgcatgcacatcgagatctaccgctaccccgcctggtccgacgt

gatcgagatcgagacctgggtgcagggcgagggcaaggtgggcacccgccgcgactggatcctgaaggactac

gccaacggcgaggtgatcggccgcgccacctccaagtgggtgatgatgaacgaggacacccgccgcctgcaga

aggtgtccgacgacgtgcgcgaggagtacctggtgttctgcccccgcaccctgcgcctggccttccccgaggagaa

caacaactccatgaagaagatccccaagctggaggaccccgccgagtactcccgcctgggcctggtgccccgcc

gctccgacctggacatgaacaagcacgtgaacaacgtgacctacatcggctgggccctggagtccatccccccg

agatcatcgacacccacgagctgcaggccatcaccctggactaccgccgcgagtgccagcgcgacgacatcgtg

gactccctgacctcccgcgagcccctgggcaacgccgccggcgtgaagttcaaggagatcaacggctccgtgtcc

cccaagaaggacgagcaggacctgtcccgcttcatgcacctgctgcgctccgccggctccggcctggagatcaac

cgctgccgcaccgagtggcgcaagaagcccgccaagcgc*ATGGACTACAAGGACCACGACGG*

*CGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAG****TGA***

SEQ ID NO:69

具有UTEX 250硬脂酰基-ACP去饱和酶(SAD)叶绿体转运肽的红花FATA(基因库登录号AAA33019)

MATASTFSAFNARCGDLRRSAGSGPRRPARPLPVR***GRA***ATGEQPSGVASLR

EADKEKSLGNRLRLGSLTEDGLSYKEKFVIRCYEVGINKTATIETIANLLQE

VGGNHAQGVGFSTDGFATTTTMRKLHLIWVTARMHIEIYRYPAWSDVIEIE

TWVQGEGKVGTRRDWILKDYANGEVIGRATSKWVMMNEDTRRLQKVSD

DVREEYLVFCPRTLRLAFPEENNNSMKKIPKLEDPAEYSRLGLVPRRSDLD

MNKHVNNVTYIGWALESIPPEIIDTHELQAITLDYRRECQRDDIVDSLTSREP

LGNAAGVKFKEINGSVSPKKDEQDLSRFMHLLRSAGSGLEINRCRTEWRKK

PAKR**MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

SEQ ID NO:70

具有3xFLAG表位标签的密码子优化的蓖麻FATA(基因库登录号ABS30422)

ATGctgaaggtgccctgctgcaacgccaccgaccccatccagtccctgtcctcccagtgccgcttcctgacccactt
caacaaccgcccctacttcacccgccgcccctccatccccaccttcttctcctccaagaactcctccgcctccctgcag
gccgtggtgtccgacatctcctccgtggagtccgccgcctgcgactccctggccaaccgcctgcgcctgggcaagct
gaccgaggacggcttctcctacaaggagaagttcatcgtggggcgcgcccgctcctacgaggtgggcatcaacaa
gaccgccaccgtggagaccatcgccaacctgctgcaggaggtgggctgcaaccacgcccagtccgtgggcttctc
caccgacggcttcgccaccaccacctccatgcgcaagatgcacctgatctgggtgaccgcccgcatgcacatcga
gatctacaagtaccccgcctggtccgacgtggtggaggtggagacctggtgccagtccgagggccgcatcggcac
ccgccgcgactggatcctgaccgactacgccaccggccagatcatcggccgcgccacctccaagtgggtgatgat
gaaccaggacacccgccgcctgcagaaggtgaccgacgacgtgcgcgaggagtacctggtgttctgccccgcg
agctgcgcctggccttccccgaggagaacaaccgctcctccaagaagatctccaagctggaggaccccgcccagt
actccaagctgggcctggtgccccgccgcgccgacctggacatgaaccagcacgtgaacaacgtgacctacatcg
gctgggtgctggagtccatcccccaggagatcatcgacacccacgagctgcagaccatcaccctggactaccgcc
gcgagtgccagcacgacgacatcgtggactccctgacctccgtggagccctccgagaacctggaggccgtgtccg
agctgcgcggcaccaacggctccgccaccaccaccgccggcgacgaggactgccgcaacttcctgcacctgctg
cgcctgtccggcgacggcctggagatcaaccgcggccgcaccgagtggcgcaagaagtccgcccgc*ATGGA*
CTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGA
*CGACGACGACAAG****TGA***

SEQ ID NO:71

具有3xFLAG®表位标签的蓖麻FATA(基因库登录号ABS30422)

MLKVPCCNATDPIQSLSSQCRFLTHFNNRPYFTRRPSIPTFFSSKNSSASLQA
VVSDISSVESAACDSLANRLRLGKLTEDGFSYKEKFIV***GRA***RSYEVGINKTA
TVETIANLLQEVGCNHAQSVGFSTDGFATTTSMRKMHLIWVTARMHIEIYK
YPAWSDVVEVETWCQSEGRIGTRRDWILTDYATGQIIGRATSKWVMMNQ
DTRRLQKVTDDVREEYLVFCPRELRLAFPEENNRSSKKISKLEDPAQYSKLG
LVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQEIIDTHELQTITLDYRRECQHDD
IVDSLTSVEPSENLEAVSELRGTNGSATTTAGDEDCRNFLHLLRLSGDGLEI
NRGRTEWRKKSAR**MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

SEQ ID NO:72

具有3X FLAG®表位标签的密码子优化的山竹FATA1(基因库登录号AAB51523)

ATGctgaagctgtcctcctcccgctccccccctggcccgcatccccacccgcccccgccccaactccatcccccccc

gcatcatcgtggtgtcctcctcctcctccaaggtgaacccccctgaagaccgaggccgtggtgtcctccggcctggccg

accgcctgcgcctgggctccctgaccgaggacggcctgtcctacaaggagaagttcatcgtgcgctgctacgaggt

gggcatcaacaagaccgccaccgtggagaccatcgccaacctgctgcaggaggtgggctgcaaccacgcccagt

ccgtgggctactccaccggcggcttctccaccacccccaccatgcgcaagctgcgcctgatctgggtgaccgcccg

catgcacatcgagatctacaagtaccccgcctggtccgacgtggtggagatcgagtcctggggccagggcgaggg

caagatcggcacccgccgcgactggatcctgcgcgactacgccaccggccaggtgatcggccgcgccacctcca

agtgggtgatgatgaaccaggacacccgccgcctgcagaaggtggacgtggacgtgcgcgacgagtacctggtg

cactgcccccgcgagctgcgcctggccttccccgaggagaacaactcctccctgaagaagatctccaagctggag

gacccctcccagtactccaagctgggcctggtgccccgccgcgccgacctggacatgaaccagcacgtgaacaac

gtgacctacatcggctgggtgctggagtccatgccccaggagatcatcgacacccacgagctgcagaccatcacc

ctggactaccgccgcgagtgccagcacgacgacgtggtggactccctgacctcccccgagccctccgaggacgcc

gaggccgtgttcaaccacaacggcaccaacggctccgccaacgtgtccgccaacgaccacggctgccgcaacttc

ctgcacctgctgcgcctgtccggcaacggcctggagatcaaccgcggccgcaccgagtggcgcaagaagcccac

ccgc*ATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACT*

*ACAAGGACGACGACGACAAG****TGA***

SEQ ID NO:73

具有3XFLAG®表位标签的密码子优化的山竹FATA1(基因库登录号AAB51523)

MLKLSSSRSPLARIPTRPRPNSIPPRIIVVSSSSSKVNPLKTEAVVSSGLADRLR

LGSLTEDGLSYKEKFIVRCYEVGINKTATVETIANLLQEVGCNHAQSVGYST

GGFSTTPTMRKLRLIWVTARMHIEIYKYPAWSDVVEIESWGQGEGKIGTRR

DWILRDYATGQVIGRATSKWVVMMNQDTRRLQKVDVDVRDEYLVHCPREL

RLAFPEENNSSLKKISKLEDPSQYSKLGLVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWV

LESMPQEIIDTHELQTITLDYRRECQHDDVVDSLTSPEPSEDAEAVFNHNGT

NGSANVSANDHGCRNFLHLLRLSGNGLEINRGRTEWRKKPTR**MDYKDHD**

GDYKDHDIDYKDDDDK

SEQ ID NO:74

具有3XFLAG®表位标签的密码子优化的可可树FATA1

ATGctgaagctgtcctcctgcaacgtgaccgaccagcgccaggccctggcccagtgccgcttcctggcccccccc

gccccctctccttccgctggcgcaccccctggtggtgtcctgctcccccctcctcccgccccaacctgtcccccctgca

ggtggtgctgtccggccagcagcaggccggcatggagctggtggagtccggctccggctccctggccgaccgcct

gcgcctgggctccctgaccgaggacggcctgtcctacaaggagaagttcatcgtgcgctgctacgaggtgggcatc

aacaagaccgccaccgtggagaccatcgccaacctgctgcaggaggtgggctgcaaccacgcccagtccgtggg

ctactccaccgacggcttcgccaccacccgcaccatgcgcaagctgcacctgatctgggtgaccgcccgcatgcac

atcgagatctacaagtaccccgcctggtccgacgtgatcgagatcgagacctggtgccagtccgagggccgcatcg

gcacccgccgcgactggatcctgaaggacttcggcaccggcgaggtgatcggccgcgccacctccaagtggggtg

atgatgaaccaggacacccgccgcctgcagaaggtgtccgacgacgtgcgcgaggagtacctggtgttctgcccc

cgcgagctgcgcctggccttccccgaggagaacaacaactccctgaagaagatcgccaagctggacgactccttc

cagtactcccgcctgggcctgatgccccgccgcgccgacctggacatgaaccagcacgtgaacaacgtgacctac

atcggctgggtgctggagtccatgccccaggagatcatcgacacccacgagctgcagaccatcaccctggactac

cgccgcgagtgccagcaggacgacgtggtggactccctgacctcccccgagcaggtggagggcaccgagaagg

tgtccgccatccacggcaccaacggctccgccgccgcccgcgaggacaagcaggactgccgccagttcctgcac

ctgctgcgcctgtcctccgacggccaggagatcaaccgcggccgcaccgagtggcgcaagaagcccgcccgcA

TGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAA

GGACGACGACGACAAG***TGA***

SEQ ID NO:75

具有3X FLAG®表位标签的可可树FATA1

MLKLSSCNVTDQRQALAQCRFLAPPAPFSFRWRTPVVVSCSPSSRPNLSPLQ

VVLSGQQQAGMELVESGSGSLADRLRLGSLTEDGLSYKEKFIVRCYEVGIN

KTATVETIANLLQEVGCNHAQSVGYSTDGFATTRTMRKLHLIWVTARMHI

EIYKYPAWSDVIEIETWCQSEGRIGTRRDWILKDFGTGEVIGRATSKWVMM

NQDTRRLQKVSDDVREEYLVFCPRELRLAFPEENNNSLKKIAKLDDSFQYS

RLGLMPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESMPQEIIDTHELQTITLDYRREC

QQDDVVDSLTSPEQVEGTEKVSAIHGTNGSAAAREDKQDCRQF**LHLLRLS**

SDGQEINRGRTEWRKKPARMDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

SEQ ID NO:76

UTEX 1439、UTEX 1441、UTEX 1435、UTEX 1437桑椹型无绿藻

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAAAATAAATGGCAGGCTAAGAGAATTAATAACTCGAAACCTAAGCGAAA
GCAAGTCTTAATAGGGCGCTAATTTAACAAAACATTAAATAAAATCTAAAGTCATTTATTTTAGACCCGAACCTGAG
TGATCTAACCATGGTCAGGATGAAACTTGGGTGACACCAAGTGGAAGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCG
GATGAACTGTGGTTAGTGGTGAAATACCAGTCGAACTCAGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAG
CAATATATCTCGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTATGAAAATGGTACCAAATCGTGGCAAACT
CTGAATACTAGAAATGACGATATATTAGTGAGACTATGGGGGATAAGCTCCATAGTCGAGAGGGAAACAGCCCAGAC

CACCAGTTAAGGCCCCAAAATGATAATGAAGTGGTAAAGGAGGTGAAAATGCAAATACAACCAGGAGGTTGGCTTAG
AAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:77

Cu PSR23 LPAAT2-1

MAIAAAAVIFLFGLIFFASGLIINLFQALCFVLIRPLSKNAYRRINRVFAELLLSELLCLFDWWAGAKLKLFT
DPETFRLMGKEHALVIINHMTELDWMVGWVMGQHFGCLGSIISVAKKSTKFLPVLGWSMWFSEYLYLERSWAKDKST
LKSHIERLIDYPLPFWLVIFVEGTRFTRTKLLAAQQYAVSSGLPVPRNVLIPRTKGFVSCVSHMRSFVPAVYDVTVA
FPKTSPPPTLLNLFEGQSIMLHVHIKRHAMKDLPESDDAVAEWCRDKFVEKDALLDKHNAEDTFSGQEVCHSGSRQL
KSLLVVISWVVVTTFGALKFLQWSSWKGKAFSAIGLGIVTLLMHVLILSSQAERSNPAEVAQAKLKTGLSISKKVTD
KEN

SEQ ID NO:78

CuPSR23LPAAT3-1

MAIAAAAVIVPLSLLFFVSGLIVNLVQAVCFVLIRPLSKNTYRRINRVVAELLWLELVWLIDWWAGVKIKVFT
DHETFHLMGKEHALVICNHKSDIDWLVGWVLGQRSGCLGSTLAVMKKSSKFLPVLGWSMWFSEYLFLERSWAKDEIT
LKSGLNRLKDYPLPFWLALFVEGTRFTRAKLLAAQQYAASSGLPVPRNVLIPRTKGFVSSVSHMRSFVPAIYDVTVA
IPKTSPPPTLIRMFKGQSSVLHVHLKRHLMKDLPESDDAVAQWCRDIFVEKDALLDKHNAEDTFSGQELQETGRPIK
SLLVVISWAVLEVFGAVKFLQWSSLLSSWKGLAFSGIGLGVITLLMHILILFSQSERSTPAKVAPAKPKNEGESSKT
EMEKEK

SEQ ID NO:79

CuPSR23LPPATx的氨基酸序列：

MEIPPHCLCSPSPAPSQLYYKKKKHAILQTQTPYRYRVSPTCFAPPRLRKQHPYPLPVLCYPKLLHFSQPRYP
LVRSHLAEAGVAYRPGYELLGKIRGVCFYAVTAAVALLLFQCMLLLHPFVLLFDPFPRKAHHTIAKLWSICSVSLFY
KIHIKGLENLPPPHSPAVYVSNHQSFLDIYTLLTLGRTFKFISKTEIFLYPIIGWAMYMLGTIPLKRLDSRSQLDTL
KRCMDLIKKGASVFFFPEGTRSKDGKLGAFKKGAFSIAAKSKVPVVPITLIGTGKIMPPGSELTVNPGTVQVIIHKP
IEGSDAEAMCNEARATISHSLDD

SEQ ID NO:80

CuPSR23 LPAATx编码区的cDNA序列

ATGGAGATCCCGCCTCACTGTCTCTGTTCGCCTTCGCCTGCGCCTTCGCAATTGTATTACAAGAAGAAGAAG
CATGCCATTCTCCAAACTCAAACTCCCTATAGATATAGAGTTTCCCCGACATGCTTTGCCCCCCCCCGATTGAGGA
AGCAGCATCCTTACCCTCTCCCTGTCCTCTGCTATCCAAAACTCCTCCACTTCAGCCAGCCTAGGTACCCTCTGGT
TAGATCTCATTTGGCTGAAGCTGGTGTTGCTTATCGTCCAGGATACGAATTATTAGGAAAAATAAGGGGAGTGTGT
TTCTATGCTGTCACTGCTGCCGTTGCCTTGCTTCTATTTCAGTGCATGCTCCTCCTCCATCCCTTTGTGCTCCTCT
TCGATCCATTTCCAAGAAAGGCTCACCATACCATCGCCAAACTCTGGTCTATCTGCTCTGTTTCTCTTTTTTACAA
GATTCACATCAAGGGTTTGGAAAATCTTCCCCCACCCCACTCTCCTGCCGTCTATGTCTCTAATCATCAGAGTTTT
CTCGACATCTATACTCTCCTCACTCTCGGTAGAACCTTCAAGTTCATCAGCAAGACTGAGATCTTTCTCTATCCAA
TTATCGGTTGGGCCATGTATATGTTGGGTACCATTCCTCTCAAGCGGTTGGACAGCAGAAGCCAATTGGACACTCT
TAAGCGATGTATGGATCTCATCAAGAAGGGAGCATCCGTCTTTTTCTTCCCAGAGGGAACACGAAGTAAAGATGGG
AAACTGGGTGCTTTCAAGAAAGGTGCATTCAGCATCGCAGCAAAAAGCAAGGTTCCTGTTGTGCCGATCACCCTTA
TTGGAACTGGCAAGATTATGCCACCTGGGAGCGAACTTACTGTCAATCCAGGAACTGTGCAAGTAATCATACATAA

ACCTATCGAAGGAAGTGATGCAGAAGCAATGTGCAATGAAGCTAGAGCCACGATTTCTCACTCACTTGATGATTAA

SEQ ID NO:81

CuPSR23LPAAT 2-1编码区的cDNA序列

ATGGCGATTGCAGCGGCAGCTGTCATCTTCCTCTTCGGCCTTATCTTCTTCGCCTCCGGCCTCATAATCAATC
TCTTCCAGGCGCTTTGCTTTGTCCTTATTCGGCCTCTTTCGAAAAACGCCTACMGGAGAATAAACAGAGTTTTTGCA
GAATTGTTGTTGTCGGAGCTTTTATGCCTATTCGATTGGTGGGCTGGTGCTAAGCTCAAATTATTTACCGACCCTGA
AACCTTTCGCCTTATGGGCAAGGAACATGCTCTTGTCATAATTAATCACATGACTGAACTTGACTGGATGGTTGGAT
GGGTTATGGGTCAGCATTTTGGTTGCCTTGGGAGCATAATATCTGTTGCGAAGAAATCAACAAAATTTCTTCCGGTA
TTGGGGTGGTCAATGTGGTTTTCAGAGTACCTATATCTTGAGAGAAGCTGGGCCAAGGATAAAAGTACATTAAAGTC
ACATATCGAGAGGCTGATAGACTACCCCCTGCCCTTCTGGTTGGTAATTTTTGTGGAAGGAACTCGGTTTACTCGGA
CAAAACTCTTGGCAGCCCAGCAGTATGCTGTCTCATCTGGGCTACCAGTGCCGAGAAATGTTTTGATCCCACGTACT
AAGGGTTTTGTTTCATGTGTAAGTCACATGCGATCATTTGTTCCAGCAGTATATGATGTCACAGTGGCATTCCCTAA
GACTTCACCTCCACCAACGTTGCTAAATCTTTTCGAGGGTCAGTCCATAATGCTTCACGTTCACATCAAGCGACATG
CAATGAAAGATTTACCAGAATCCGATGATGCAGTAGCAGAGTGGTGTAGAGACAAATTTGTGGAAAAGGATGCTTTG
TTGGACAAGCATAATGCTGAGGACACTTTCAGTGGTCAAGAAGTTTGTCATAGCGGCAGCCGCCAGTTAAAGTCTCT
TCTGGTGGTAATATCTTGGGTGGTTGTAACAACATTTGGGGCTCTAAAGTTCCTTCAGTGGTCATCATGGAAGGGGA
AAGCATTTTCAGCTATCGGGCTGGGCATCGTCACTCTACTTATGCACGTATTGATTCTATCCTCACAAGCAGAGCGG
TCTAACCCTGCGGAGGTGGCACAGGCAAAGCTAAAGACCGGGTTGTCGATCTCAAAGAAGGTAACGGACAAGGAAAA
CTAG

SEQ ID NO:82

CuPSR23LPAAx 3-1编码区的cDNA序列

ATGGCGATTGCTGCGGCAGCTGTCATCGTCCCGCTCAGCCTCCTCTTCTTCGTCTCCGGCCTCATCGTCAATC
TCGTACAGGCAGTTTGCTTTGTACTGATTAGGCCTCTGTCGAAAAACACTTACAGAAGAATAAACAGAGTGGTTGCA
GAATTGTTGTGGTTGGAGTTGGTATGGCTGATTGATTGGTGGGCTGGTGTCAAGATAAAAGTATTCACGGATCATGA
AACCTTTCACCTTATGGGCAAAGAACATGCTCTTGTCATTTGTAATCACAAGAGTGACATAGACTGGCTGGTTGGGT
GGGTTCTGGGACAGCGGTCAGGTTGCCTTGGAAGCACATTAGCTGTTATGAAGAAATCATCAAAGTTTCTCCCGGTA
TTAGGGTGGTCAATGTGGTTCTCAGAGTATCTATTCCTTGAAAGAAGCTGGGCCAAGGATGAAATTACATTAAAGTC
AGGTTTGAATAGGCTGAAAGACTATCCCTTACCCTTCTGGTTGGCACTTTTTGTGGAAGGAACTCGGTTCACTCGAG
CAAAACTCTTGGCAGCCCAGCAGTATGCTGCCTCTTCGGGGCTACCTGTGCCGAGAAATGTTCTGATCCCGCGTACT
AAGGGTTTTGTTTCTTCTGTGAGTCACATGCGATCATTTGTTCCAGCCATATATGATGTTACAGTGGCAATCCCAAA
GACGTCACCTCCACCAACATTGATAAGAATGTTCAAGGGACAGTCCTCAGTGCTTCACGTCCACCTCAAGCGACACC
TAATGAAAGATTTACCTGAATCAGATGATGCTGTTGCTCAGTGGTGCAGAGATATATTCGTCGAGAAGGATGCTTTG
TTGGATAAGCATAATGCTGAGGACACTTTCAGTGGCCAAGAACTTCAAGAAACTGGCCGCCCAATAAAGTCTCTTCT
GGTTGTAATCTCTTGGGCGGTGTTGGAGGTATTTGGAGCTGTGAAGTTTCTTCAATGGTCATCGCTGTTATCATCAT
GGAAGGGACTTGCATTTTCGGGAATAGGACTGGGTGTCATCACGCTACTCATGCACATACTGATTTTATTCTCACAA
TCCGAGCGGTCTACCCCTGCAAAAGTGGCACCAGCAAAGCCAAAGAATGAGGGAGAGTCCTCCAAGACGGAAATGGA
AAAGGAAAAGTAG

SEQ ID NO:83

针对桑椹型无绿藻进行密码子优化的CuPSR23 LPAATx编码区的cDNA序列

ATGgagatccccccccactgcctgtgctccccctcccccgcccccctcccagctgtactacaagaagaagaagcac
gccatcctgcagacccagacccccctaccgctaccgcgtgtcccccacctgcttcgcccccccccgcctgcgcaagc
agcacccctaccccctgcccgtgctgtgctaccccaagctgctgcacttctcccagccccgctacccccctggtgcgct
cccacctggccgaggccggcgtggcctaccgccccggctacgagctgctgggcaagatccgcggcgtgtgcttcta
cgccgtgaccgccgccgtggccctgctgctgttccagtgcatgctgctgctgcacccccttcgtgctgctgttcgacccct
tcccccgcaaggcccaccacaccatcgccaagctgtggtccatctgctccgtgtccctgttctacaagatccacatca
agggcctggagaacctgccccccccccactcccccgccgtgtacgtgtccaaccaccagtccttcctggacatctac
accctgctgaccctgggccgcaccttcaagttcatctccaagaccgagatcttcctgtaccccatcatcggctgggcc
atgtacatgctgggcaccatcccccctgaagcgcctggactcccgctcccagctggacaccctgaagcgctgcatgg
acctgatcaagaagggcgcctccgtgttcttcttccccgagggcacccgctccaaggacggcaagctgggcgcctt
caagaagggcgccttctccatcgccgccaagtccaaggtgcccgtggtgcccatcaccctgatcggcaccggcaa
gatcatgccccccggctccgagctgaccgtgaaccccggcaccgtgcaggtgatcatccacaagcccatcgaggg
ctccgacgccgaggccatgtgcaacgaggcccgcgccaccatctcccactccctggacgacTGA

SEQ ID NO:84

针对桑椹型无绿藻进行密码子优化的CuPSR23LPAAT 2-1编码区的cDNA序列

ATGgcgatcgcggccgcggcggtgatcttcctgttcggcctgatcttcttcgcctccggcctgatcatcaacctgttcc
aggcgctgtgcttcgtcctgatccgccccctgtccaagaacgcctaccgccgcatcaaccgcgtgttcgcggagctg
ctgctgtccgagctgctgtgcctgttcgactggtgggcgggcgcgaagctgaagctgttcaccgaccccgagacgtt
ccgcctgatgggcaaggagcacgccctggtcatcatcaaccacatgaccgagctggactggatggtgggctgggt
gatgggccagcacttcggctgcctgggctccatcatctccgtcgccaagaagtccacgaagttcctgcccgtgctgg
gctggtccatgtggttctccgagtacctgtacctggagcgctcctgggccaaggacaagtccaccctgaagtcccac
atcgagcgcctgatcgactacccccctgcccttctggctggtcatcttcgtcgagggcacccgcttcacgcgcacgaag
ctgctggcggcccagcagtacgcggtctcctccggcctgcccgtcccccgcaacgtcctgatcccccgcacgaagg
gcttcgtctcctgcgtgtcccacatgcgctccttcgtccccgcggtgtacgacgtcacggtggcgttccccaagacgtc
ccccccccccacgctgctgaacctgttcgagggccagtccatcatgctgcacgtgcacatcaagcgccacgccatg
aaggacctgcccgagtccgacgacgccgtcgcggagtggtgccgcgacaagttcgtcgagaaggacgccctgct
ggacaagcacaacgcggaggacacgttctccggccaggaggtgtgccactccggctcccgccagctgaagtccct
gctggtcgtgatctcctgggtcgtggtgacgacgttcggcgccctgaagttcctgcagtggtcctcctggaagggcaa
ggcgttctccgccatcggcctgggcatcgtcaccctgctgatgcacgtgctgatcctgtcctcccaggccgagcgctc
caaccccgccgaggtggcccaggccaagctgaagaccggcctgtccatctccaagaaggtgacggacaaggag
aacTGA

SEQ ID NO:85

针对桑椹型无绿藻进行密码子优化的CuPSR23LPAAx 3-1编码区的cDNA序列

ATGgccatcgcggcggccgcggtgatcgtgcccctgtccctgctgttcttcgtgtccggcctgatcgtcaacctggtg
caggccgtctgcttcgtcctgatccgccccctgtccaagaacacgtaccgccgcatcaaccgcgtggtcgcggagct
gctgtggctggagctggtgtggctgatcgactggtgggcgggcgtgaagatcaaggtcttcacggaccacgagacg
ttccacctgatgggcaaggagcacgccctggtcatctgcaaccacaagtccgacatcgactggctggtcggctggg
tcctgggccagcgctccggctgcctgggctccaccctggcggtcatgaagaagtcctccaagttcctgcccgtcctgg
gctggtccatgtggttctccgagtacctgttcctggagcgctcctgggccaaggacgagatcacgctgaagtccggc
ctgaaccgcctgaaggactacccccctgcccttctggctggcgctgttcgtggagggcacgcgcttcacccgcgcgaa
gctgctggcggcgcagcagtacgccgcgtcctccggcctgcccgtgccccgcaacgtgctgatcccccgcacgaa
gggcttcgtgtcctccgtgtcccacatgcgctccttcgtgcccgcgatctacgacgtcaccgtggccatccccaagac
gtccccccccccacgctgatccgcatgttcaagggccagtcctccgtgctgcacgtgcacctgaagcgccacctga
tgaaggacctgcccgagtccgacgacgccgtcgcgcagtggtgccgcgacatcttcgtggagaaggacgcgctgc
tggacaagcacaacgccgaggacaccttctccggccaggagctgcaggagaccggccgccccatcaagtccctg
ctggtcgtcatctcctgggccgtcctggaggtgttcggcgccgtcaagttcctgcagtggtcctccctgctgtcctcctg
gaagggcctggcgttctccggcatcggcctgggcgtgatcaccctgctgatgcacatcctgatcctgttctcccagtcc
gagcgctccacccccgccaaggtggcccccgcgaagcccaagaacgagggcgagtcctccaagaccgagatg
gagaaggagaagTGA

SEQ ID NO:86

在构建体D1481[pSZ2479]中编码了含有来自原始小球藻的延伸的异源转运肽和衍生自天然Cpal FATB2序列的41个氨基酸的N末端延伸的14:0-ACP硫酯酶湿地萼距花(Cpal FATB2,登录号AAC49180)的核酸序列

GCGCACCCCAAGGCGAACGGCAGCGCGGTGTCGCTGAAGTCGGGCTCCCTGGAGACCCAGGAGGACAAGACGA
GCAGCTCGTCCCCCCCCCCCCCGCACGTTCATCAACCAGCTGCCCGTGTGGAGCATGCTGCTGTCGGCGGTGACCACG
GTCTTCGGCGTGGCCGAGAAGCAGTGGCCCATGCTGGACCGCAAGTCCAAGCGCCCCGACATGCTGGTCGAGCCCCT
GGGCGTGGACCGCATCGTCTACGACGGCGTGAGCTTCCGCCAGTCGTTCTCCATCCGCAGCTACGAGATCGGCGCCG
ACCGCACCGCCTCGATCGAGACGCTGATGAACATGTTCCAGGAGACCTCCCTGAACCACTGCAAGATCATCGGCCTG
CTGAACGACGGCTTCGGCCGCACGCCCGAGATGTGCAAGCGCGACCTGATCTGGGTCGTGACCAAGATGCAGATCGA
GGTGAACCGCTACCCCACGTGGGGCGACACCATCGAGGTCAACACGTGGGTGAGCGCCTCGGGCAAGCACGGCATGG
GCCGCGACTGGCTGATCTCCGACTGCCACACCGGCGAGATCCTGATCCGCGCGACGAGCGTCTGGGCGATGATGAAC
CAGAAGACCCGCCGCCTGTCGAAGATCCCCTACGAGGTGCGCCAGGAGATCGAGCCCCAGTTCGTCGACTCCGCCCC
CGTGATCGTGGACGACCGCAAGTTCCACAAGCTGGACCTGAAGACGGGCGACAGCATCTGCAACGGCCTGACCCCCC
GCTGGACGGACCTGGACGTGAACCAGCACGTCAACAACGTGAAGTACATCGGCTGGATCCTGCAGTCGGTCCCCACC
GAGGTGTTCGAGACGCAGGAGCTGTGCGGCCTGACCCTGGAGTACCGCCGCGAGTGCGGCCGCGACTCCGTGCTGGA
GAGCGTCACGGCCATGGACCCCTCGAAGGAGGGCGACCGCTCCCTGTACCAGCACCTGCTGCGCCTGGAGGACGGCG
CGGACATCGTGAAGGGCCGCACCGAGTGGCGCCCCAAGAACGCCGGCGCCAAGGGCGCCATCCTGACGGGCAAGACC

AGCAACGGCAACTCGATCTCCTGA

SEQ ID NO:87

由构建体D1481[pSZ2479]编码的含有来自原始小球藻的延伸的异源转运肽和衍生自天然Cpal FATB2序列的41个氨基酸的N末端延伸的14:0-ACP硫酯酶湿地萼距花(Cpal FATB2,登录号AAC49180)的氨基酸序列

AHPKANGSAVSLKSGSLETQEDKTSSSSPPPRTFINQLPVWSMLLSAVTTVFGVAEKQWPMLDRKSKRPDMLVEPLGVDRIVYDGVSFRQSFSIRSYEIGADRTASIETLMNMFQETSLNHCKIIGLLNDGFGRTPEMCKRDLIWVVTKMQIEVNRYPTWGDTIEVNTWVSASGKHGMGRDWLISDCHTGEILIRATSVWAMMNQKTRRLSKIPYEVRQEIEPQFVDSAPVIVDDRKFHKLDLKTGDSICNGLTPRWTDLDVNQHVNNVKYIGWILQSVPTEVFETQELCGLTLEYRRECGRDSVLESVTAMDPSKEGDRSLYQHLLRLEDGADIVKGRTEWRPKNAGAKGAILTGKTSNGNSIS

SEQ ID NO:88

在构建体D1482[pSZ2480]中编码了含有来自原始小球藻的延伸的异源转运肽、衍生自天然Cpal FATB2序列的41个氨基酸的N末端延伸以及C末端FLAG表位标签的14:0-ACP硫酯酶湿地萼距花(Cpal FATB2,登录号AAC49180)的核酸序列

GCGCACCCCAAGGCGAACGGCAGCGCGGTGTCGCTGAAGTCGGGCTCCCTGGAGACCCAGGAGGACAAGACGAGCAGCTCGTCCCCCCCCCCCCCGCACGTTCATCAACCAGCTGCCCGTGTGGAGCATGCTGCTGTCGGCGGTGACCACGGTCTTCGGCGTGGCCGAGAAGCAGTGGCCCATGCTGGACCGCAAGTCCAAGCGCCCCGACATGCTGGTCGAGCCCCTGGGCGTGGACCGCATCGTCTACGACGGCGTGAGCTTCCGCCAGTCGTTCTCCATCCGCAGCTACGAGATCGGCGCCGACCGCACCGCCTCGATCGAGACGCTGATGAACATGTTCCAGGAGACCTCCCTGAACCACTGCAAGATCATCGGCCTGCTGAACGACGGCTTCGGCCGCACGCCCGAGATGTGCAAGCGCGACCTGATCTGGGTCGTGACCAAGATGCAGATCGAGGTGAACCGCTACCCCACGTGGGGCGACACCATCGAGGTCAACACGTGGGTGAGCGCCTCGGGCAAGCACGGCATGGGCCGCGACTGGCTGATCTCCGACTGCCACACCGGCGAGATCCTGATCCGCGCGACGAGCGTCTGGGCGATGATGAACCAGAAGACCCGCCGCCTGTCGAAGATCCCCTACGAGGTGCGCCAGGAGATCGAGCCCCAGTTCGTCGACTCCGCCCCCGTGATCGTGGACGACCGCAAGTTCCACAAGCTGGACCTGAAGACGGGCGACAGCATCTGCAACGGCCTGACCCCCCGCTGGACGGACCTGGACGTGAACCAGCACGTCAACAACGTGAAGTACATCGGCTGGATCCTGCAGTCGGTCCCCACCGAGGTGTTCGAGACGCAGGAGCTGTGCGGCCTGACCCTGGAGTACCGCCGCGAGTGCGGCCGCGACTCCGTGCTGGAGAGCGTCACGGCCATGGACCCCTCGAAGGAGGGCGACCGCTCCCTGTACCAGCACCTGCTGCGCCTGGAGGACGGCGCGGACATCGTGAAGGGCCGCACCGAGTGGCGCCCCAAGAACGCCGGCGCCAAGGGCGCCATCCTGACGGGCAAGACCAGCAACGGCAACTCGATCTCCatggactacaaggaccacgacggcgactacaaggaccacgacatcgactacaaggacgacgacgacaagtga

SEQ ID NO:89

由构建体D1482[pSZ2480]编码的含有来自原始小球藻的延伸的异源转运肽、衍生自天然Cpal FATB2序列的41个氨基酸的N末端延伸以及C末端FLAG表位标签的14:0-ACP硫酯酶湿地萼距花(Cpal FATB2,登录号AAC49180)的氨基酸序列序列

AHPKANGSAVSLKSGSLETQEDKTSSSSPPPRTFINQLPVWSMLLSAVTTVFGVAEKQWPMLDRKSKRPDMLVEPLGVDRIVYDGVSFRQSFSIRSYEIGADRTASIETLMNMFQETSLNHCKIIGLLNDGFGRTPEMCKRDLIWVVTKMQIEVNRYPTWGDTIEVNTWVSASGKHGMGRDWLISDCHTGEILIRATSVWAMMNQKTRRLSKIPYEVRQEIEPQFVDSAPVIVDDRKFHKLDLKTGDSICNGLTPRWTDLDVNQHVNNVKYIGWILQSVPTEVFETQELCGLTLEYRRECGRDSVLESVTAMDPSKEGDRSLYQHLLRLEDGADIVKGRTEWRPKNAGAKGAILTGKTSNGNSISMDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

样品油谱：低至高油酸含量

	富含癸酸	富含月桂酸	肉豆蔻酸-棕榈酸	高棕榈酸	平衡的	硬脂酸-棕榈酸-油酸	混合的棕榈酸-油酸	混合的棕榈酸-油酸-2	高油酸	高稳定性油酸
油	*RB Z*	*RBD-1*	*RBD-2*	*RBD-3*	*RBD Y*	*RBD X*	*RBD W*	*RBD-4*	*RDB-5*	*RBD-6*
C8:0	4.5	0.2	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C10:0	29.3	16.8	13.2	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C12:0	4.4	47.2	2.8	0.2	0.9	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0
C14:0	23.6	11.3	24.8	6.0	15.3	0.7	2.0	1.7	0.5	0.6
C16:0	21.5	5.1	31.6	49.1	35.9	24.0	28.7	25.0	6.9	8.2
C16:1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.3	0.2	0.4	1.0	0.7	0.8
C18:0	2.3	0.9	4.8	5.1	3.5	21.4	9.5	3.6	1.4	1.9
C18:1	**8.5**	**12.8**	**13.9**	**28.7**	**29.6**	**43.5**	**48.9**	**59.4**	**79.5**	**85.9**
C18:2	4.6	4.2	4.8	8.3	10.3	7.8	8.0	7.4	8.9	0.05
C18:3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.0

图1

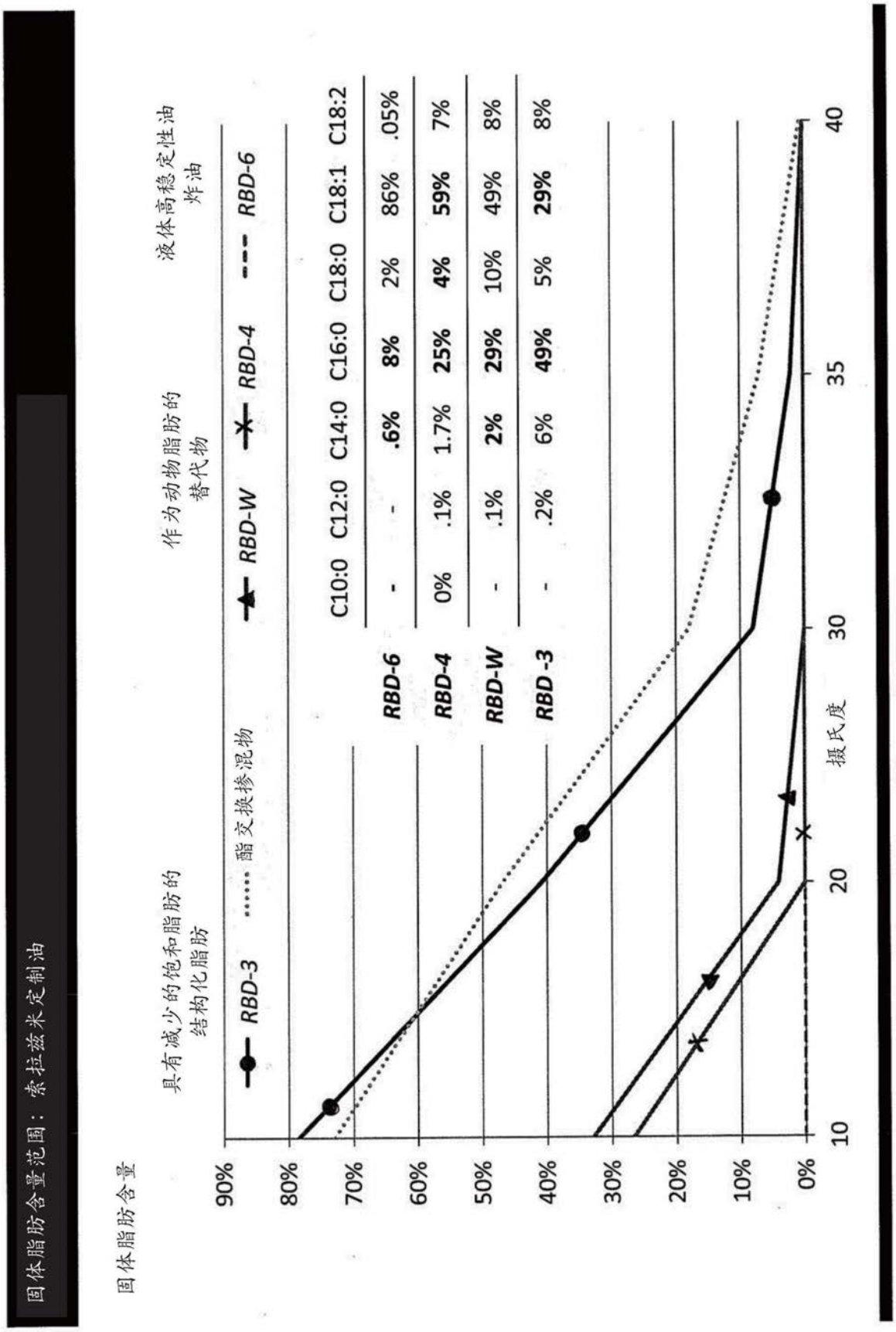

固体脂肪含量范围：索拉兹米定制油
固体脂肪含量
具有减少的饱和脂肪的结构化脂肪
作为动物脂肪的替代物
液体高稳定性油炸油
RBD-3
酯交换掺混物
RBD-W
RBD-4
RBD-6
C10:0 C12:0 C14:0 C16:0 C18:0 C18:1 C18:2
RBD-6 - - .6% 8% 2% 86% .05%
RBD-4 0% .1% 1.7% 25% 4% 59% 7%
RBD-W - .1% 2% 29% 10% 49% 8%
RBD-3 - .2% 6% 49% 5% 29% 8%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
10
20
30
35
40
摄氏度

图2

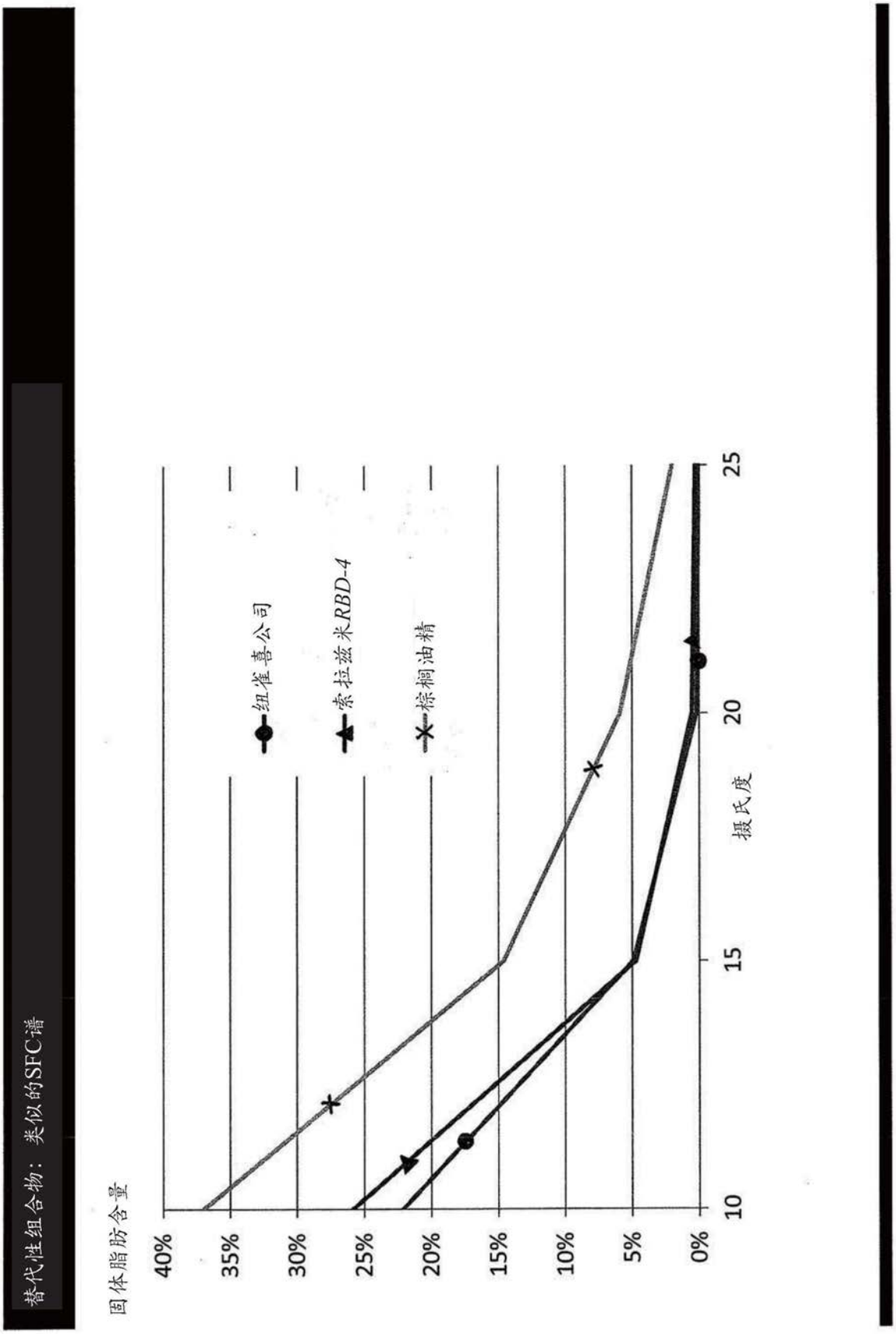

替代性组合物：类似的SFC谱
固体脂肪含量
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
10
15
20
25
摄氏度
纽雀喜公司
索拉兹米RBD-4
棕榈油精

图3

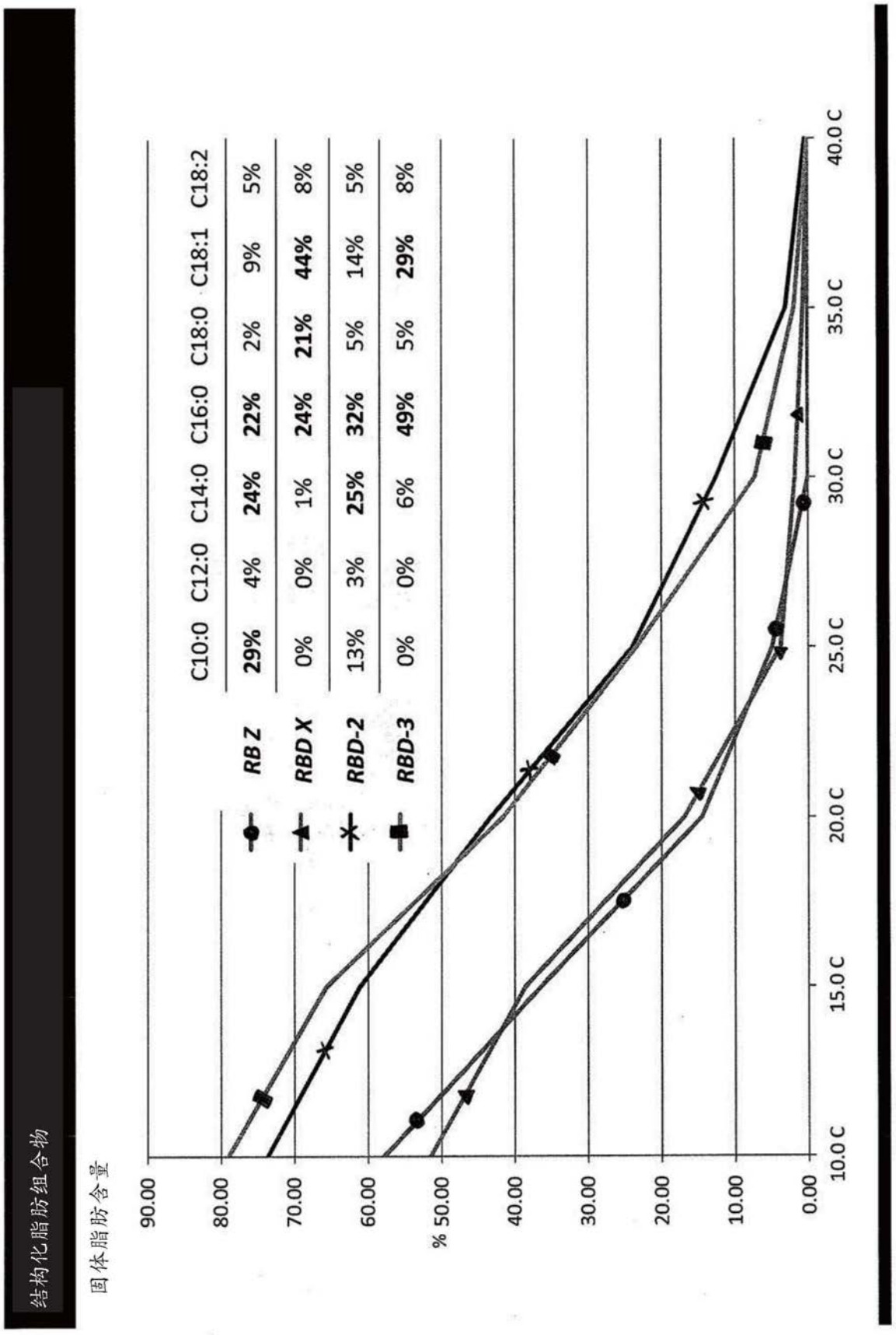

结构化脂肪组合物
固体脂肪含量
% 90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
10.0 C
15.0 C
20.0 C
25.0 C
30.0 C
35.0 C
40.0 C
C10:0 C12:0 C14:0 C16:0 C18:0 C18:1 C18:2
RB Z 29% 4% 24% 22% 2% 9% 5%
RBD X 0% 0% 1% 24% 21% 44% 8%
RBD-2 13% 3% 25% 32% 5% 14% 5%
RBD-3 0% 0% 6% 49% 5% 29% 8%

图4

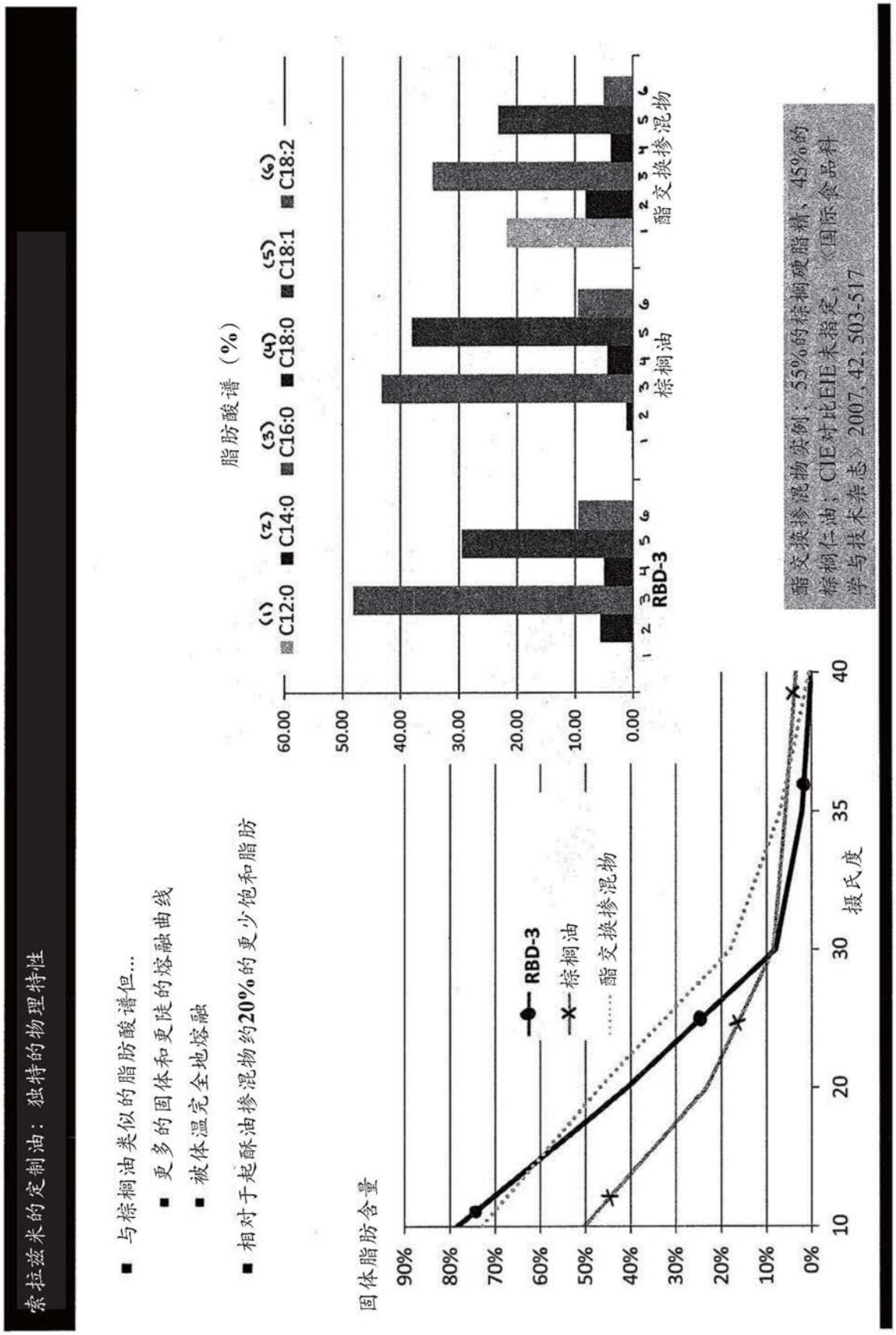

索拉兹来的定制油：独特的物理特性
与棕榈油类似的脂肪酸谱但...
更多的固体和更陡的熔融曲线
被体温完全地熔融
相对于起酥油掺混物约20%的更少饱和脂肪
脂肪酸谱（%）
(1) C12:0
(2) C14:0
(3) C16:0
(4) C18:0
(5) C18:1
(6) C18:2
RBD-3
棕榈油
酯交换掺混物
固体脂肪含量
摄氏度
酯交换掺混物实例：55%的棕榈硬脂精、45%的棕榈仁油；CIE对比EIE未指定，《国际食品科学与技术杂志》2007,42,503-517

图5

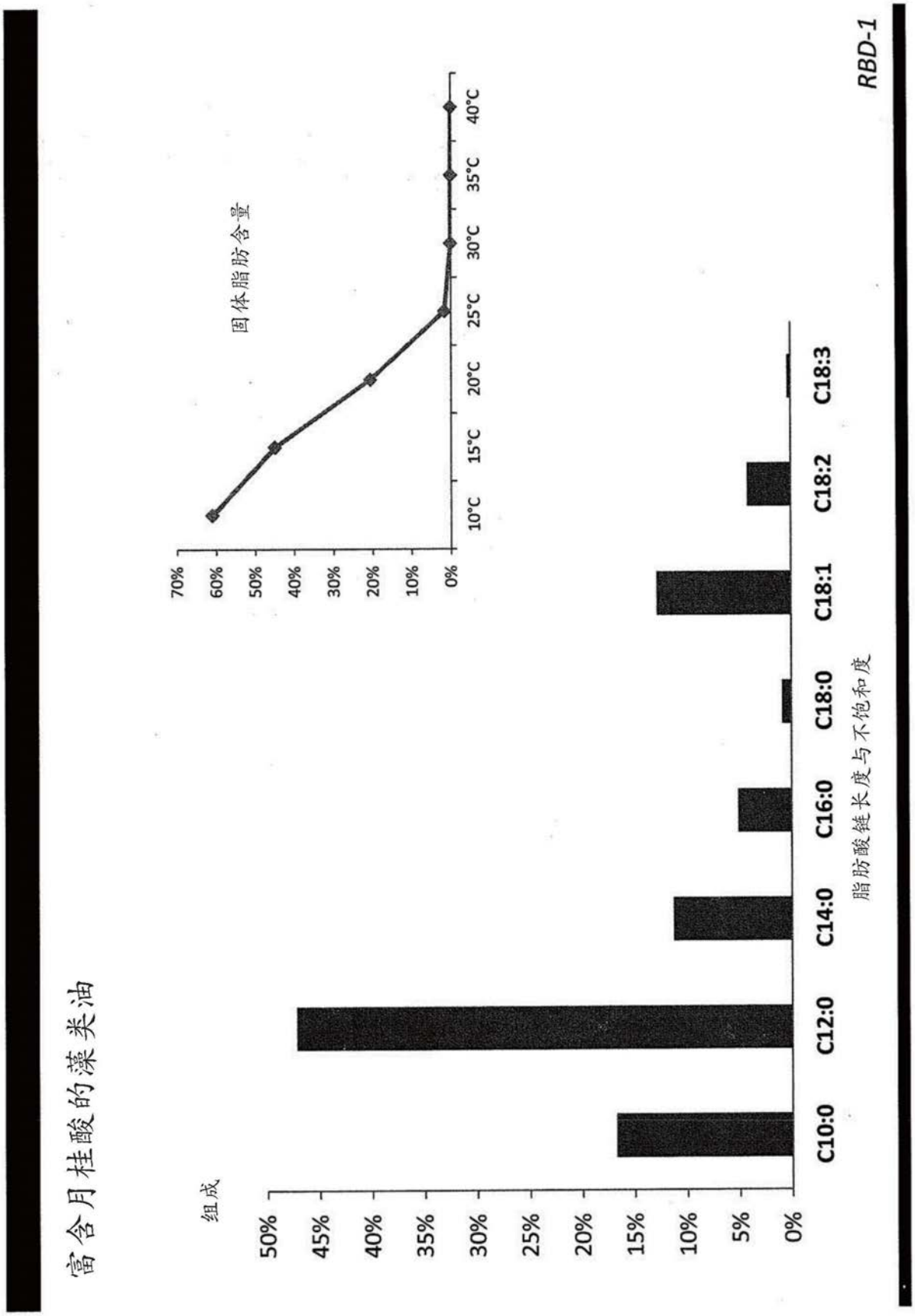

富含月桂酸的藻类油
组成
50%
45%
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
C10:0
C12:0
C14:0
C16:0
C18:0
C18:1
C18:2
C18:3
脂肪酸链长度与不饱和度
RBD-1
固体脂肪含量
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
10°C
15°C
20°C
25°C
30°C
35°C
40°C

图6

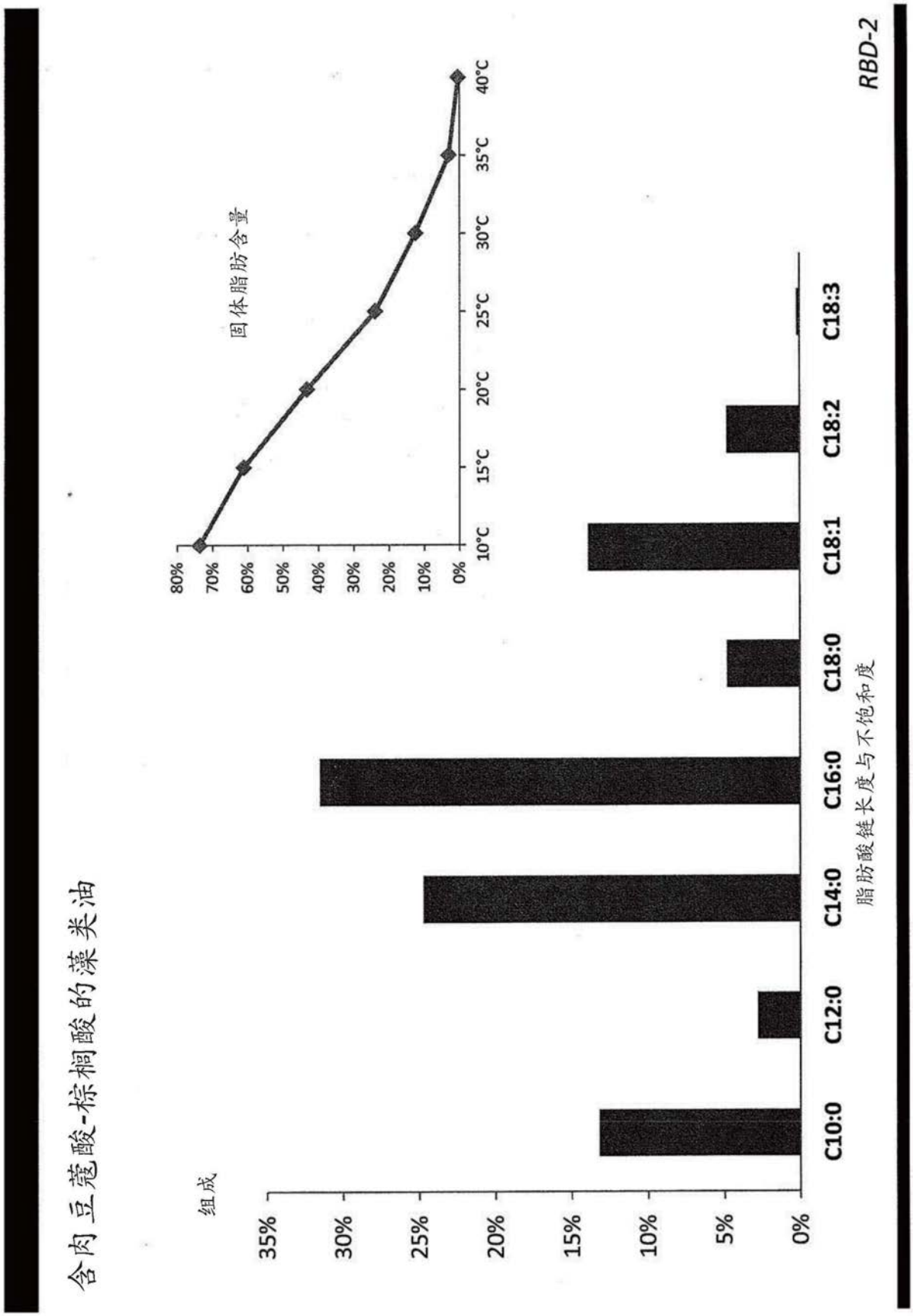

含肉豆蔻酸-棕榈酸的藻类油
RBD-2
组成
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
C10:0
C12:0
C14:0
C16:0
C18:0
C18:1
C18:2
C18:3
脂肪酸链长度与不饱和度
固体脂肪含量
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
10°C
15°C
20°C
25°C
30°C
35°C
40°C

图7

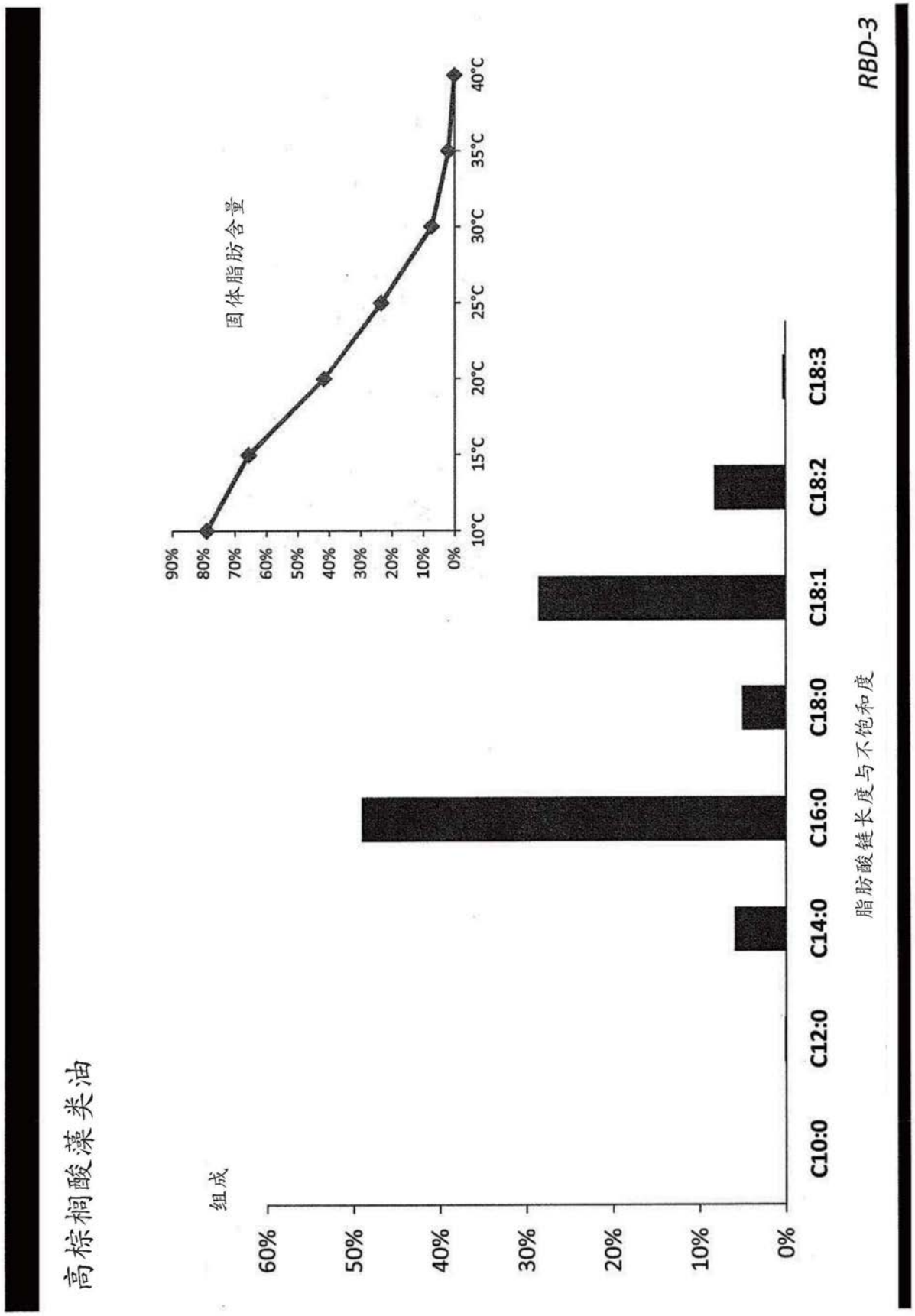

高棕榈酸藻类油
组成
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
C10:0
C12:0
C14:0
C16:0
C18:0
C18:1
C18:2
C18:3
脂肪酸链长度与不饱和度
RBD-3
固体脂肪含量
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
10°C
15°C
20°C
25°C
30°C
35°C
40°C

图8

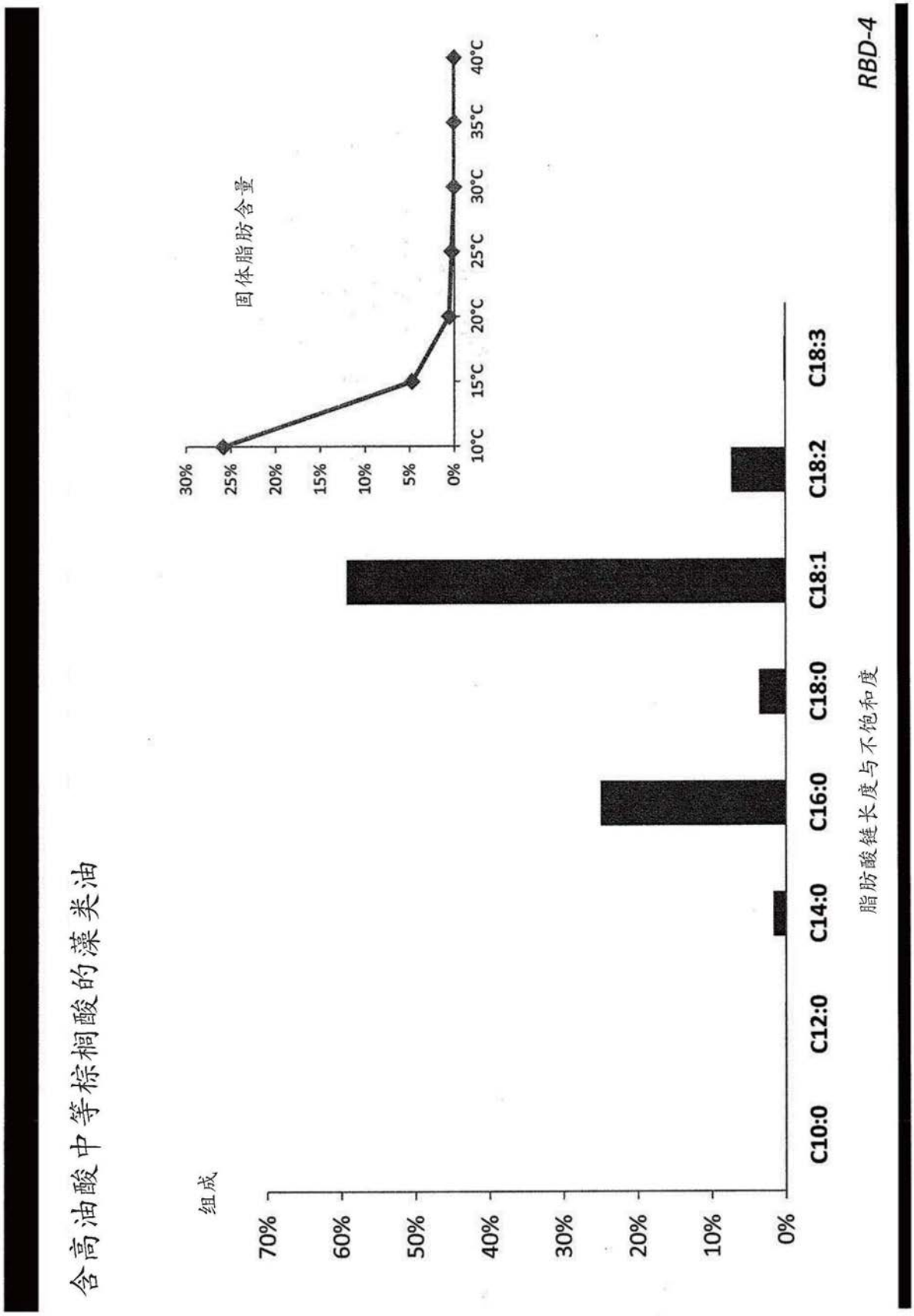

含高油酸中等棕榈酸的藻类油
组成
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
C10:0
C12:0
C14:0
C16:0
C18:0
C18:1
C18:2
C18:3
脂肪酸链长度与不饱和度
RBD-4
固体脂肪含量
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
10°C
15°C
20°C
25°C
30°C
35°C
40°C

图9

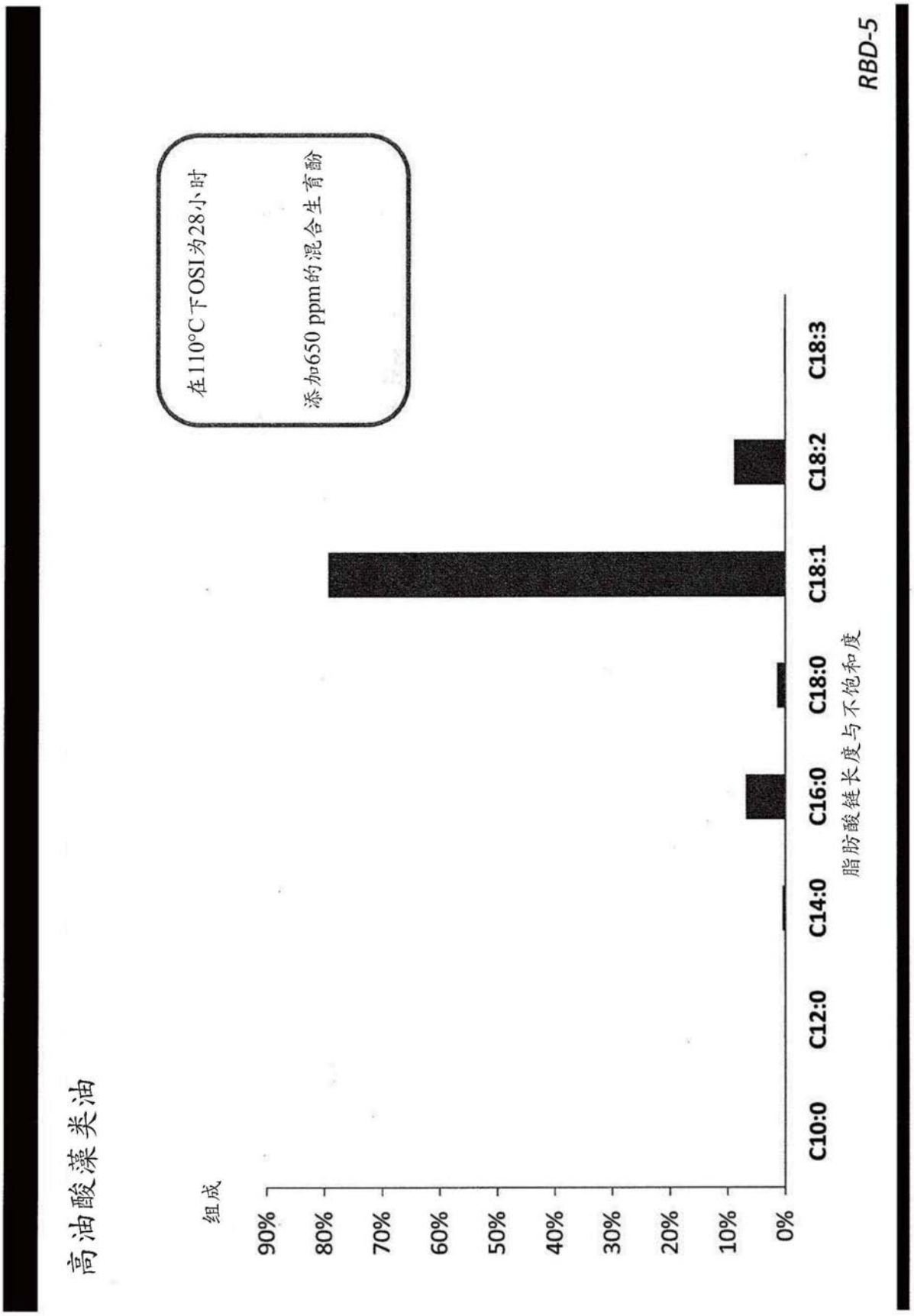

高油酸藻类油
在110°C下OSI为28小时
添加650 ppm的混合生育酚
组成
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
C10:0
C12:0
C14:0
C16:0
C18:0
C18:1
C18:2
C18:3
脂肪酸链长度与不饱和度
RBD-5

图10

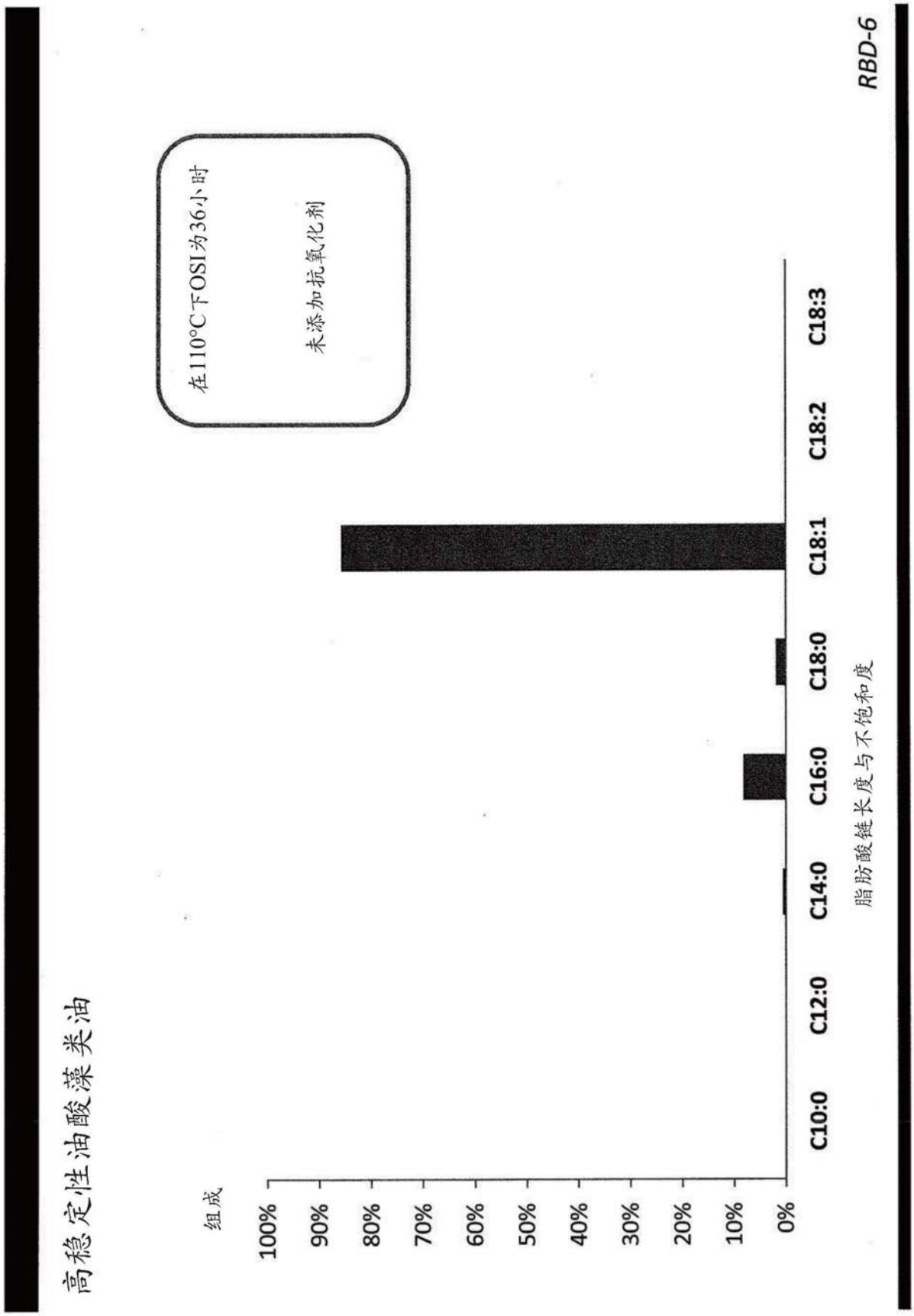

高稳定性油酸藻类油
在110°C下OSI为36小时
未添加抗氧化剂
组成
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
C10:0
C12:0
C14:0
C16:0
C18:0
C18:1
C18:2
C18:3
脂肪酸链长度与不饱和度
RBD-6

图11

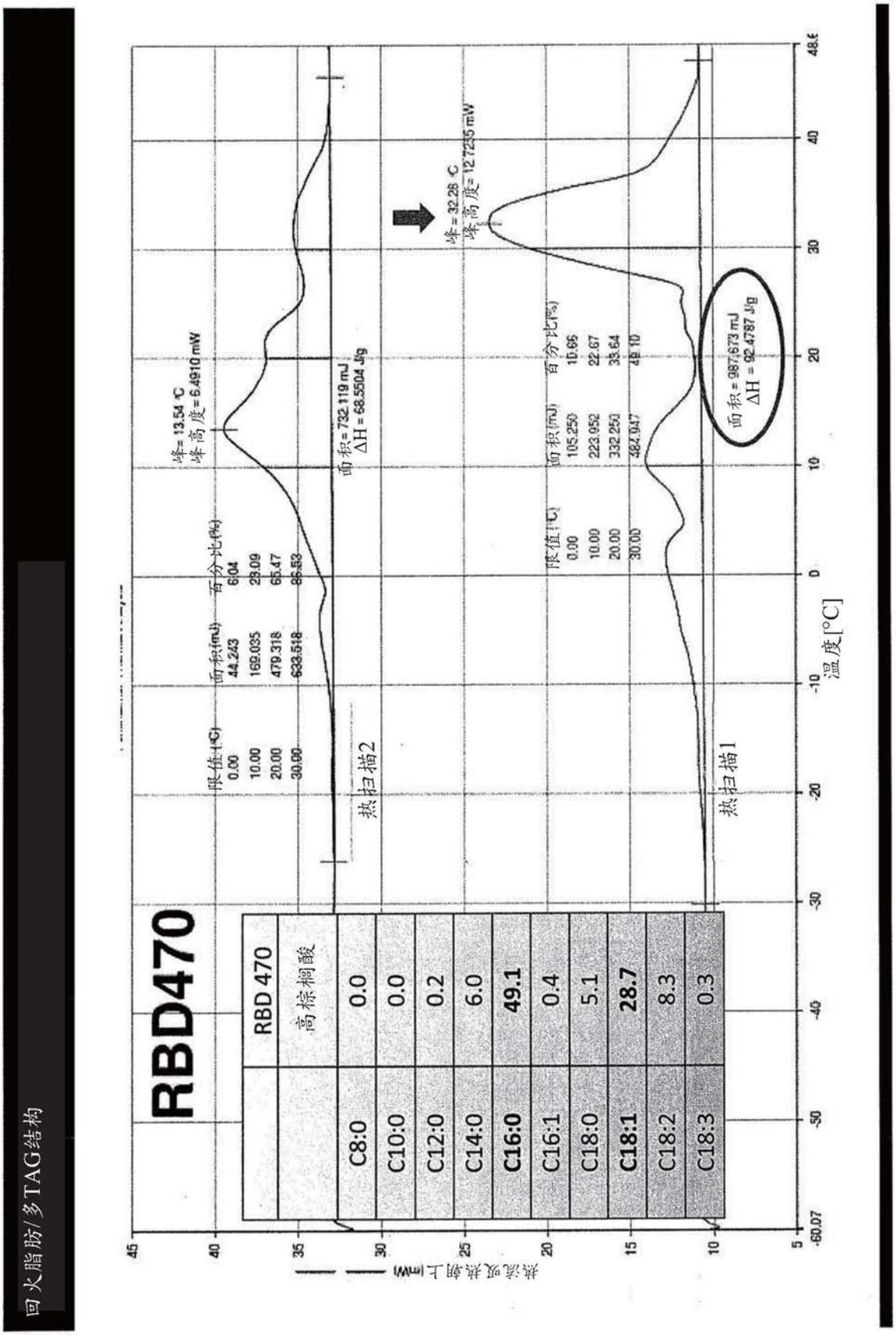

回火脂肪/多TAG结构
RBD470
RBD 470
高棕榈酸
C8:0 0.0
C10:0 0.0
C12:0 0.2
C14:0 6.0
C16:0 49.1
C16:1 0.4
C18:0 5.1
C18:1 28.7
C18:2 8.3
C18:3 0.3
热流[mW]
温度[°C]
热扫描1
热扫描2
峰= 13.54 °C
峰高度= 6.4910 mW
面积= 732.119 mJ
ΔH = 68.5504 J/g
峰= 32.28 °C
峰高度= 12.7255 mW
面积= 987.673 mJ
ΔH = 92.4787 J/g

图12

批号	名称	特征	益处
RBD-6	高稳定性富含油酸	极低水平的多不饱和物（<.1%）结合极高水平的单不饱和物（油酸；>85%）	极低水平的多不饱和产生可能最稳定的富含油酸的天然油，该油在世界上任何地方可获得以用于工业和食品应用。 突出的稳定性和低（氧化）反应性理想地用于点心或食品的喷涂应用。低倾注点和氧化稳定性的组合是如生物基功能性流体和润滑剂等工业应用所关注的。显著的稳定性使得对于向油中添加抗氧化剂的需求减到最少。
RBD-5	高油酸向日葵油模拟物	较低水平的多不饱和物（<10%）结合较高水平的单不饱和物（油酸；约80%）	具有优良GHG谱的糖衍生的高油酸向日葵油替代物（巴西制造）。用于烹饪和油炸的理想用油；在稳定性与多不饱和物的健康益处间达到平衡。更高水平的多不饱和物（高于高稳定性藻类油）使食品和工业应用（例如功能性流体）的倾注点降低。
RBD-1	棕榈仁油、椰子油的富含月桂酸的替代物	较高水平的中链长度饱和脂肪酸（C_{10}-C_{14}）	用于油脂化学品和食品工业的糖衍生的棕榈仁油和椰子油替代物，具有增强的耐久性和脂肪酸谱。增大的中链脂肪酸（C10-C14）浓度将产生适于糖果涂覆应用的具有更陡熔融曲线的脂肪，并且具有用于肥皂的有效起泡特性。达到椰子油特性的富含月桂酸的油也是值得关注的食用油，因为月桂酸对心脏健康无影响；用于烘焙和/或糖果的固体脂肪。

图13

批号	名称	特征	益处
RBD-3	高棕榈酸/低油酸	50%棕榈酸和30%油酸；与用于在食品中产生结构的专用棕榈油中间馏分类似的谱	用于食品的极其有效的结构化脂肪使结构化最大，同时使饱和脂肪含量最低。较陡的熔融曲线使得对于食品的感官特性的负面影响减到最少。食品中专用棕榈油馏分的替代品；相较于棕榈油有增强的耐久性谱
RBD-2	富含肉豆蔻酸/棕榈酸	比任何现有的油更高的肉豆蔻酸水平	独特地高浓度肉豆蔻酸结合桑酸和棕榈酸产生了较陡的熔融曲线并且在低温下具有比棕榈油高的固体脂肪含量；相较于棕榈油有增强的耐久性谱。极其独特的固体脂肪含量谱
RBD-4	高油酸中等棕榈酸	60%油酸和25%棕榈酸；比棕榈油更高的油酸和更低的棕榈酸水平	高油酸含量结合中等棕榈酸水平产生了极为稳定的油，其固体脂肪含量使其成为一种优良的油炸油替代物：通过降低液体油吸收可以积极地影响食品纹理。30%饱和脂肪在起酥油应用的范围内。含反式脂肪的油的潜在地良好替代物。

图14

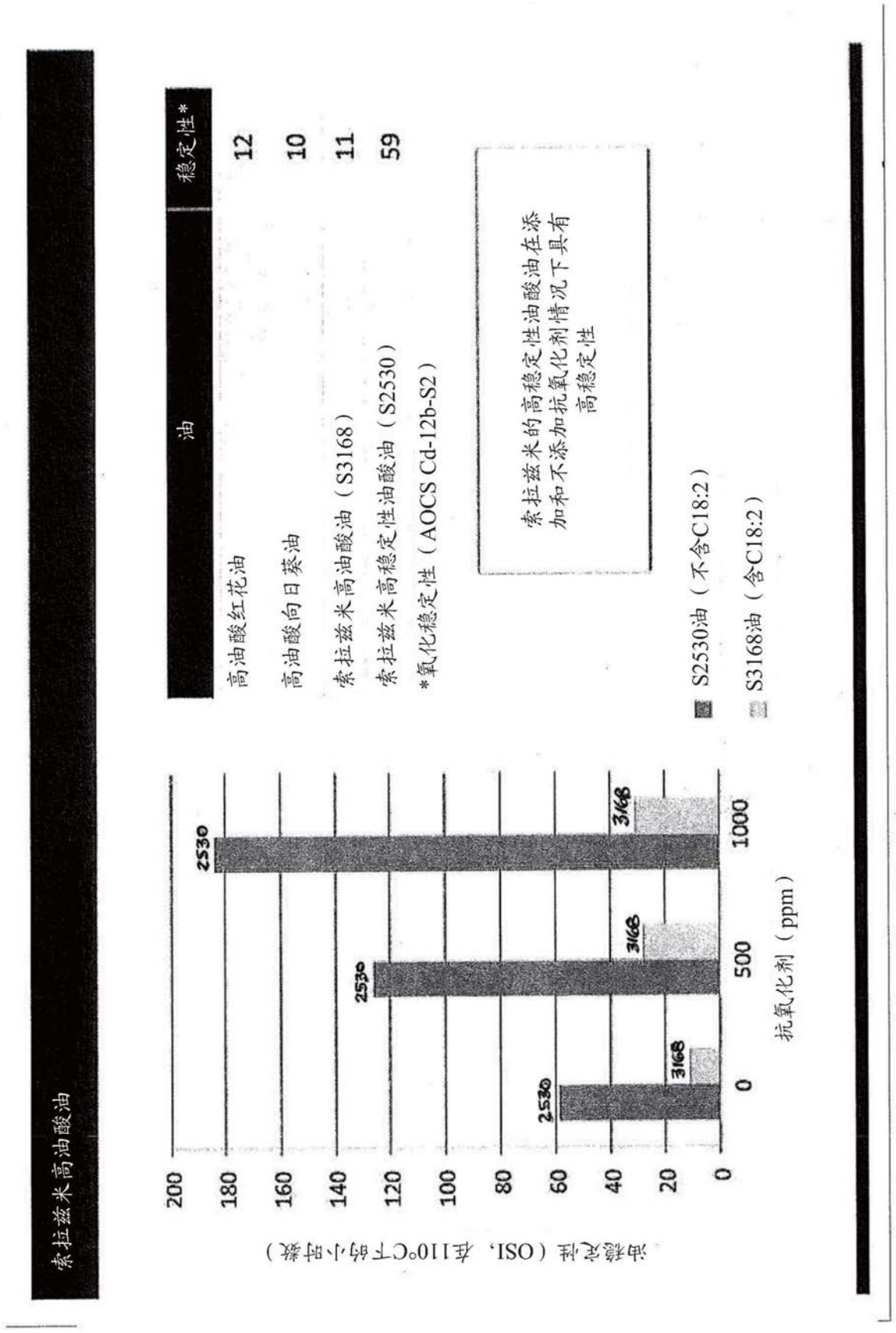

索拉兹米高油酸油
油
稳定性*
高油酸红花油
12
高油酸向日葵油
10
索拉兹米高油酸油（S3168）
11
索拉兹米高稳定性油酸油（S2530）
59
*氧化稳定性（AOCS Cd-12b-S2）
索拉兹米的高稳定性油酸油在添加和不添加抗氧化剂情况下具有高稳定性
S2530油（不含C18:2）
S3168油（含C18:2）
油稳定性（OSI，在110°C下的小时数）
抗氧化剂（ppm）
2530
3168

图15

测试	所测试的RBD油	结果	测试方案
OSI	RBD 502	当前最大值：在110°C下242小时	AOCS法Cd 12b-92（修改版）
倾注点	RBD 437	-19.5 °C	D97
浊点	RBD 437	7.5 °C	AOCS Cc 6-25
闪点	RBD 437	245 °C	AOCS Cc 9b-55
粘度	RBD 437和RBD 469的平均值	41.6 cSt	在40°C下的粘度（D445）
粘度指数	"	195.5	粘度指数（D445）
颜色	RBD 437	2.0红色，18.0黄色	洛维邦得颜色分析AOCS Cc 13j-97（5 1/4英寸池）
颜色（转化的）	RBD 437	87.3, -8.7, 32.3	亨特透射率：L、a、b
生物可降解性		最终生物降解*	OECD 301 B

图16

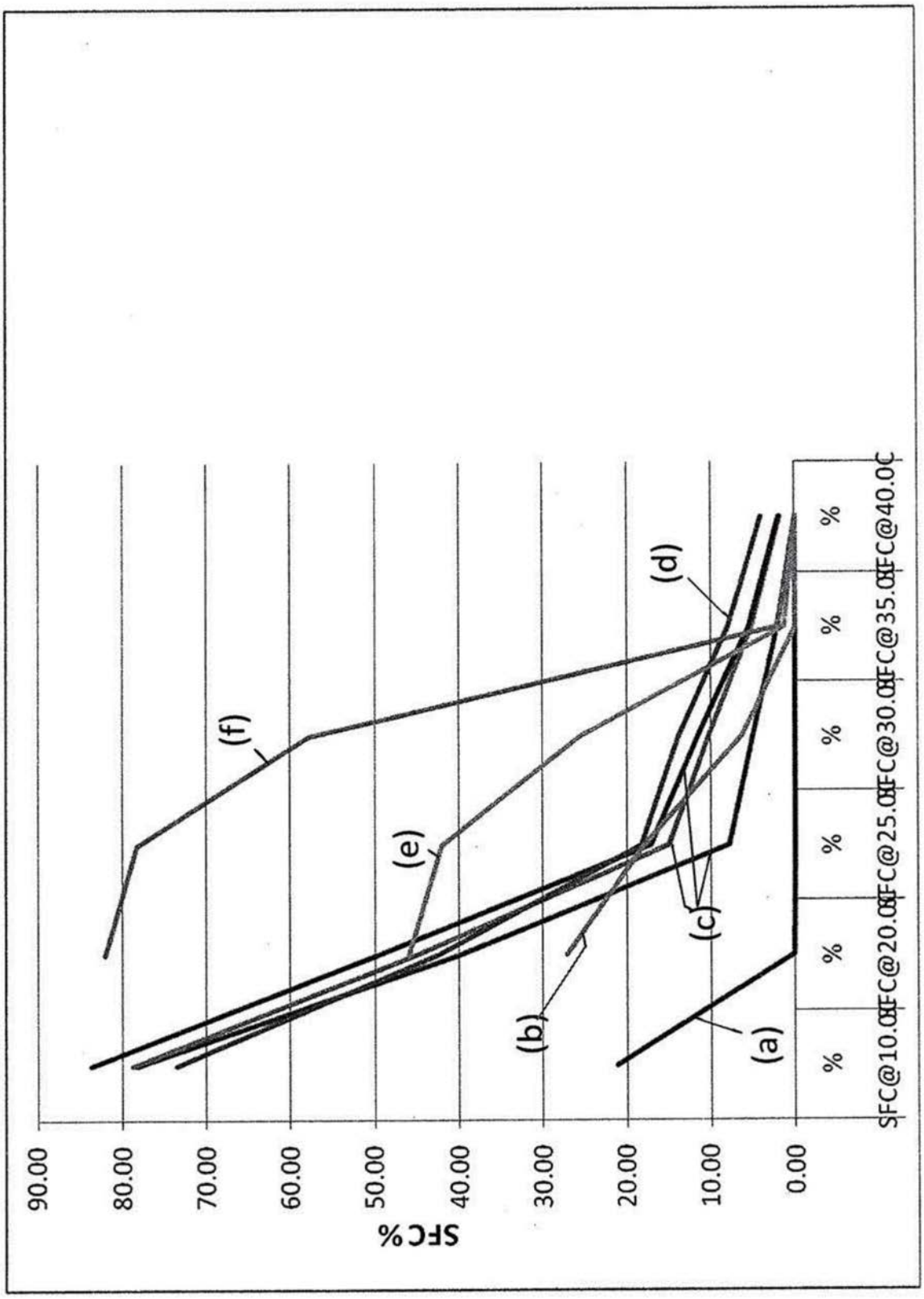

SFC%
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
SFC@10.0℃
SFC@20.0℃
SFC@25.0℃
SFC@30.0℃
SFC@35.0℃
SFC@40.0℃
%
%
%
%
%

图17

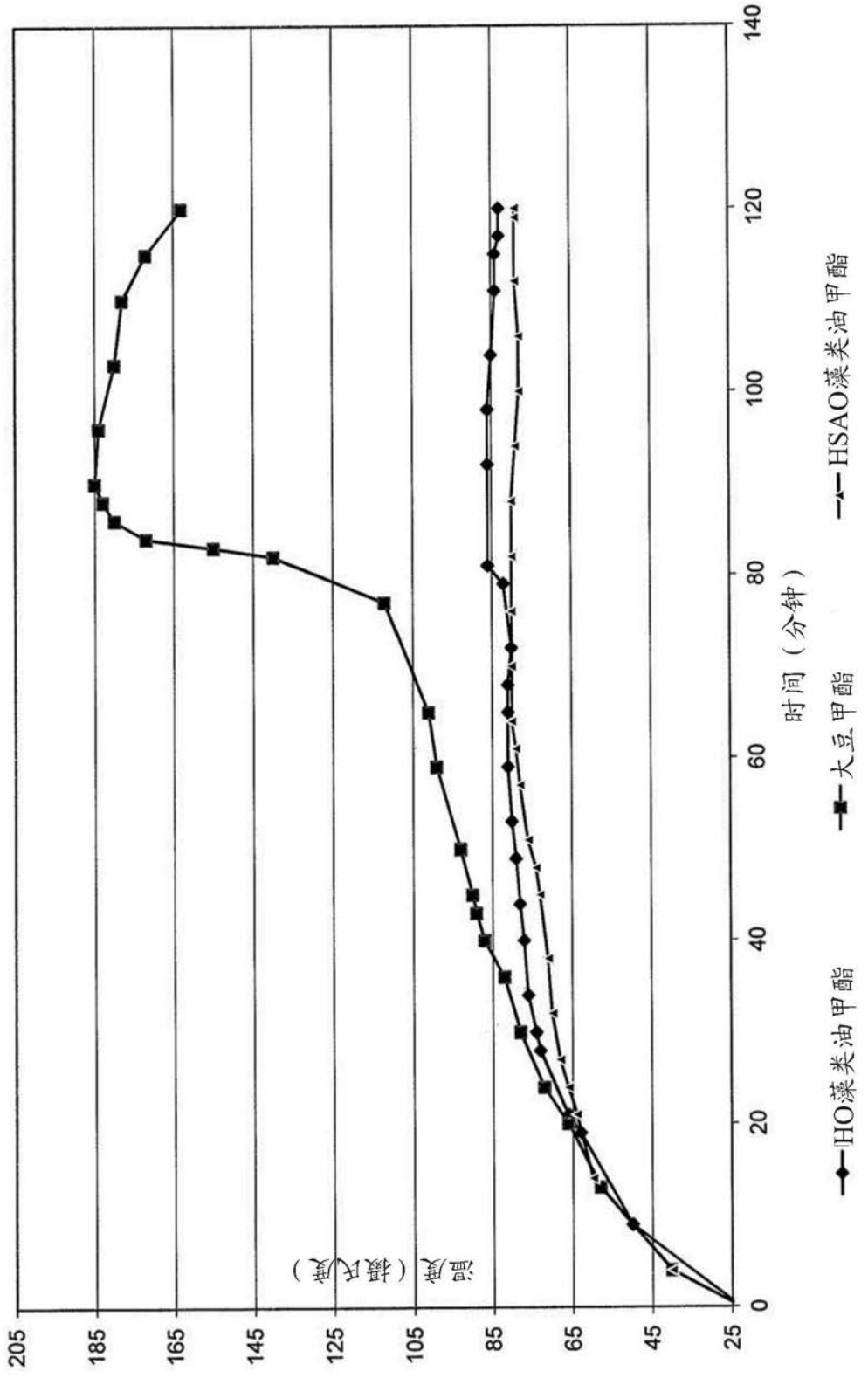

205
185
165
145
125
105
85
65
45
25
0
20
40
60
80
100
120
140
浊度（损尺度）
时间（分钟）
HO藻类油甲酯
大豆甲酯
HSAO藻类油甲酯

图18

测试	测试方案	高稳定性藻类油	高油酸藻类油	有关高稳定性藻类油的评述
在110 °C下的OSI	AOCS法Cd 12b-92	41.0-56.6小时（纯净） 242小时（天然抗氧化剂）	14.4小时（纯净） --	HSAO胜过具有相同添加剂的基于天然植物的油
RPVOT	ASTM D2272	33分钟（纯净） 500分钟（初步配制物）	30分钟（纯净） --	纯净油胜过纯净PAO; HSAO胜过具有相同添加剂的基于天然植物的油
4球磨损测试	在40 kg下；未系统阐述	0.64 mm	0.60 mm	
铜片腐蚀	ASTMD130，24小时	1A	1A	
倾注点	ASTM D6749/D97; 未系统阐述	-19.5°C（纯净） -29°C（含pp降凝剂）	-21°C（纯净） --	低倾注点和高氧化稳定性
浊点	ASTM D7683/D2500	-14 °C	-18 °C	
闪点	D92克利夫兰开杯法	315 °C	330 °C	胜过矿物油
粘度	在40°C下的粘度（D445）	41.6 cSt	38.6 cSt	
粘度指数	粘度指数（D445）	196	202	
VOCs	ASTM E1868-10	0.37%（接近零）	nm	胜过矿物油
生物可降解性	OECD 301 B	最终生物降解：到28天时96%降解	最终生物降解：到28天时94%降解	胜过矿物油

图19

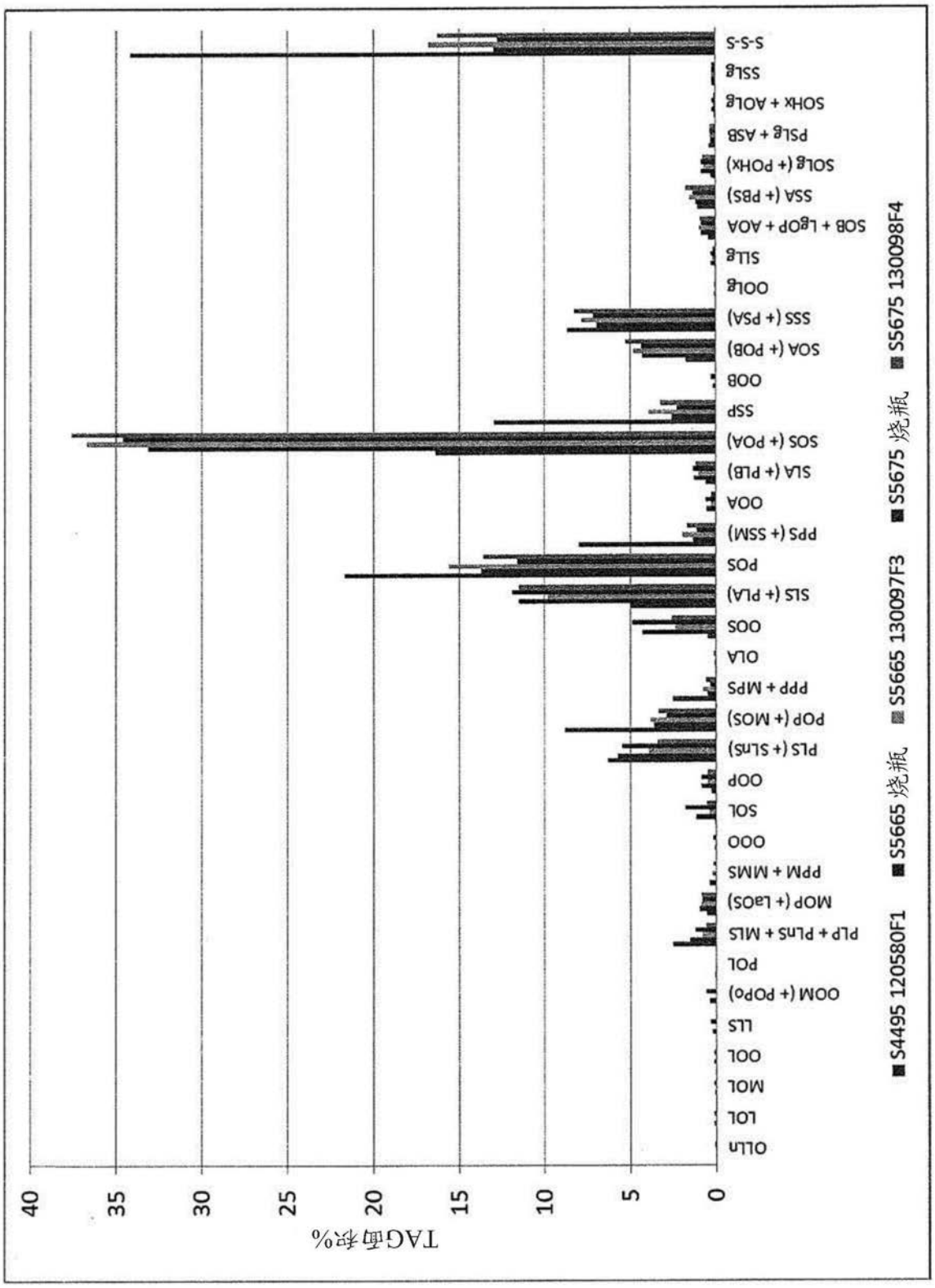

TAG面积%
0
5
10
15
20
25
30
35
40
OLLn
LOL
MOL
OOL
LLS
OOM (+ POPo)
POL
PLP + PLnS + MLS
MOP (+ LaOS)
PPM + MMS
OOO
SOL
OOP
PLS (+ SLnS)
POP (+ MOS)
PPP + MPS
OLA
OOS
SLS (+ PLA)
POS
PPS (+ SSM)
OOA
SLA (+ PLB)
SOS (+ POA)
SSP
OOB
SOA (+ POB)
SSS (+ PSA)
OOLg
SLLg
SOB + LgOP + AOA
SSA (+ PBS)
SOLg (+ POHx)
PSLg + ASB
SOHx + AOLg
SSLg
S-S-S
S4495 120580F1
S5665 烧瓶
S5665 130097F3
S5675 烧瓶
S5675 130098F4

图20

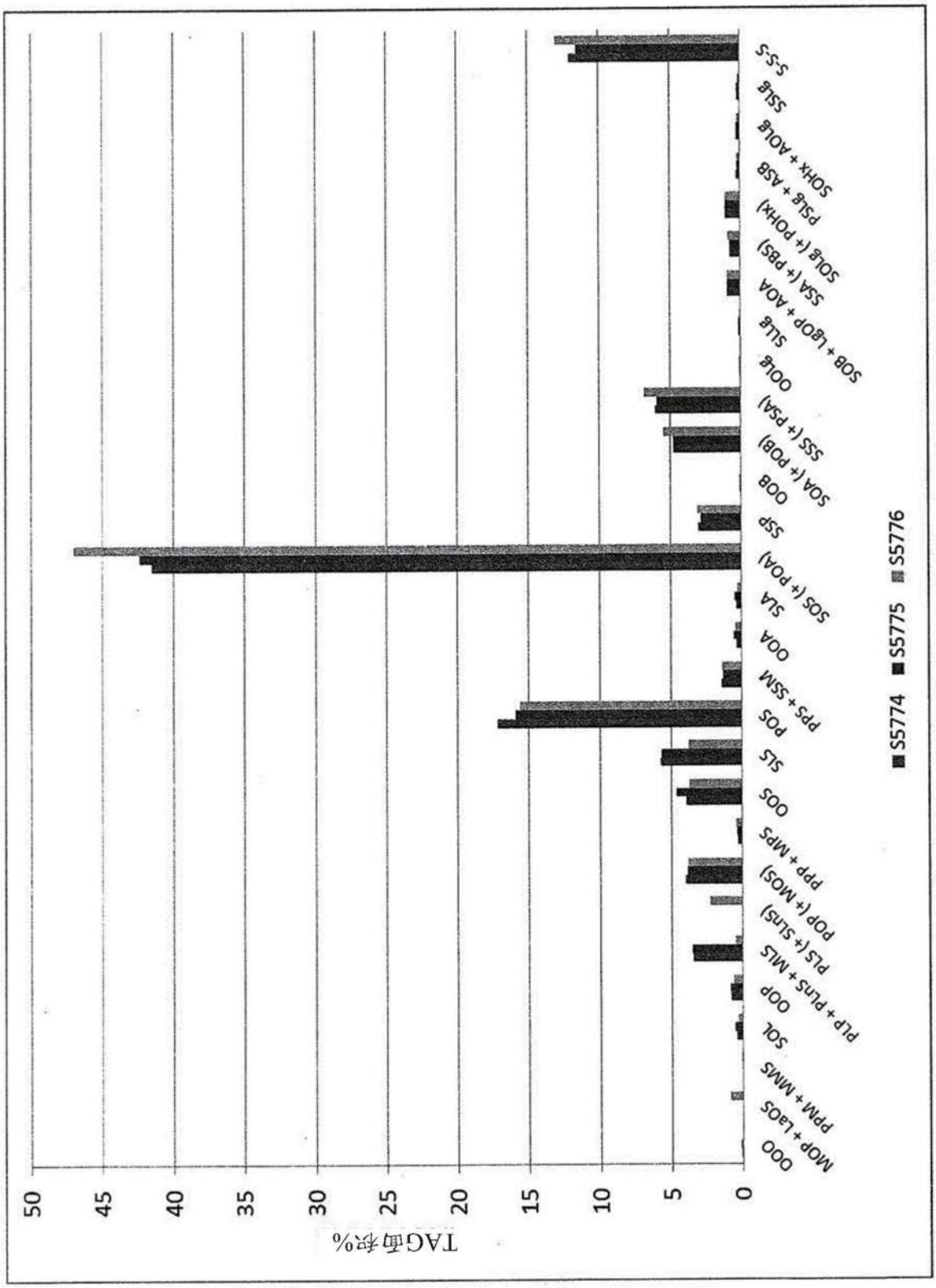

TAG百分%
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
S5774
S5775
S5776
S-S-S
SSLg
SOHx + AOLg
PSLg + ASg
SOLg (+ POHx)
SSA (+ PBS)
SOg + LgOP + AOA
SLLg
OOLg
SSS (+ PSA)
SOA (+ POg)
OOg
SSp
SOS (+ POA)
SLA
OOA
PPS + SSM
POS
SLS
OOS
PPP + MPS
POP (+ MOS)
PLS (+ SLnS)
PLP + PLnS + MLS
OOP
SOL
PPM + MMS
MOP + LaOS
OOO

图21

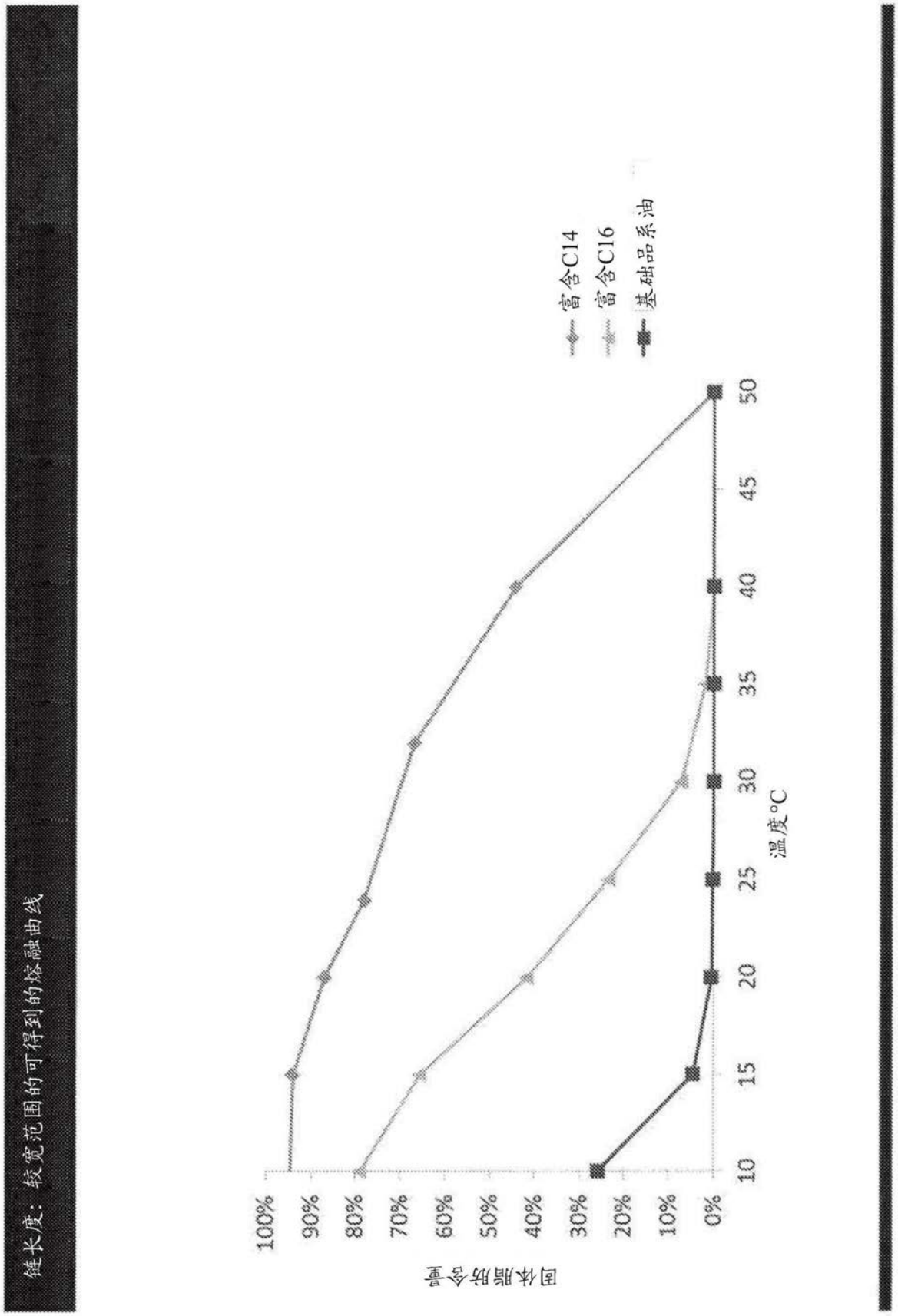

链长度：较宽范围的可得到的熔融曲线
富含C14
富含C16
基础品系油
固体脂肪含量
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
10
15
20
25
30
35
40
45
50
温度°C

图22

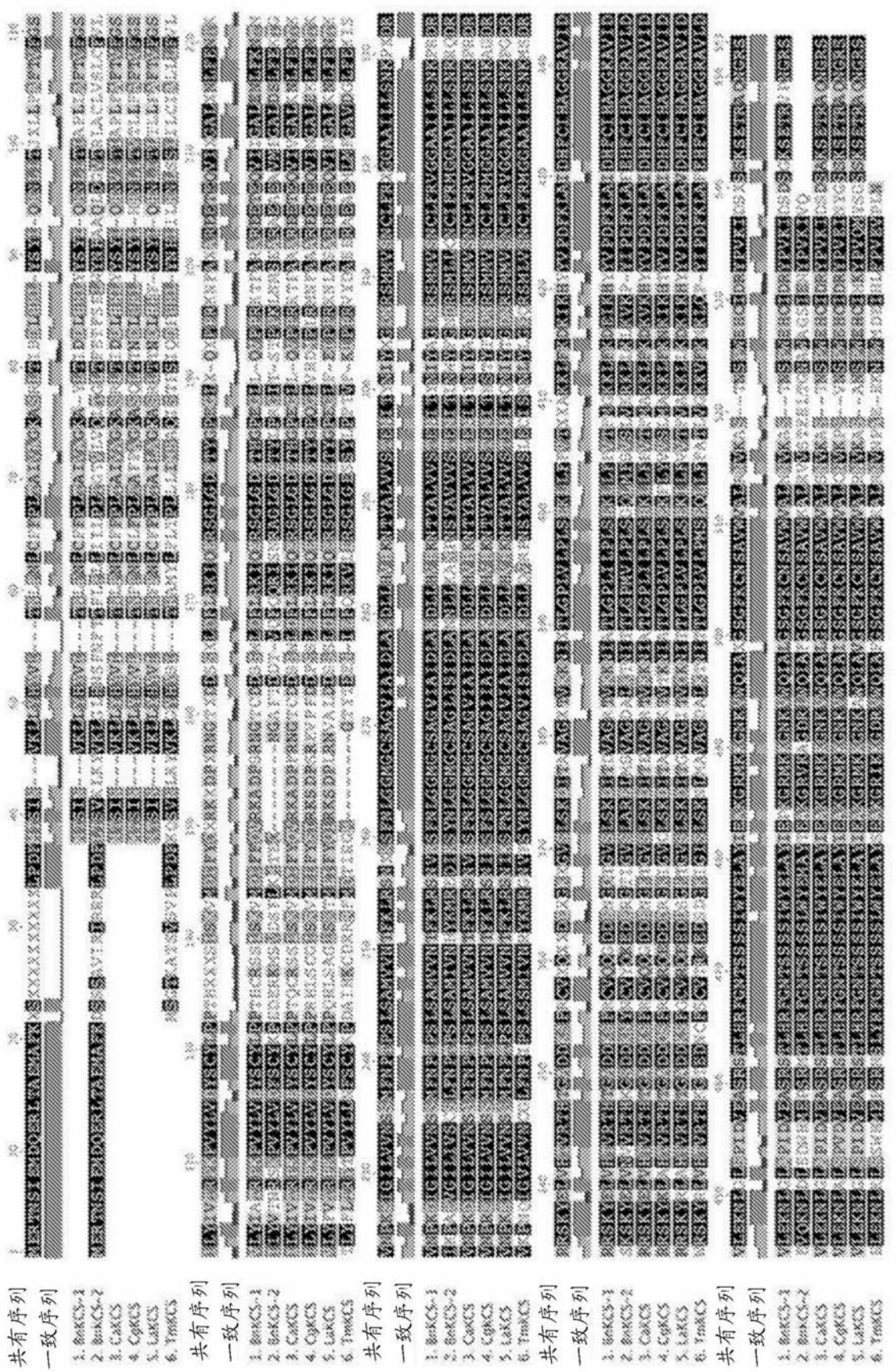


图23