(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110914442 B
(45)授权公告日 2025.02.18

(21)申请号 201880046757.0
(22)申请日 2018.05.17
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110914442 A
(43)申请公布日 2020.03.24
(30)优先权数据
62/507,654 2017.05.17 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.01.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/033151 2018.05.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/213554 EN 2018.11.22
(73)专利权人 普罗维维股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 M·谢泼德 T·黑尔 P·麦霍德
K·瓦姆卜勒 P·科埃略
E·伦纳德
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
C12N 1/21(2006.01)
C12P 7/04(2006.01)
C12P 7/24(2006.01)
C12P 7/6436(2022.01)
C12N 9/02(2006.01)
C12N 9/10(2006.01)
C12R 1/645(2006.01)
(56)对比文件
CN 103348008 A,2013.10.09
WO 2016159869 A1,2016.10.06
Teerawanichpan,P.等.ACCESSION No: ADI60057.1,fatty acyl-coenzyme A reductase [Euglena gracilis] .GenBank.2010,Features和Origin部分.
审查员 杨荞嘉

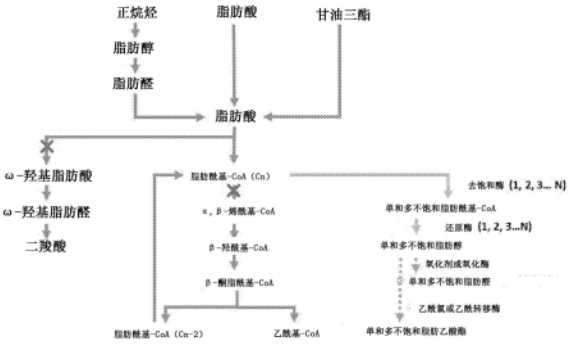
权利要求书2页 说明书264页
序列表94页 附图54页

(54)发明名称

用于产生昆虫信息素及相关化合物的微生物

(57)摘要

本申请涉及用于生物合成可用作昆虫信息素、香料、调味剂和聚合物中间体的不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯的重组微生物。该重组微生物可表达用于产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯的酶或酶变体,和/或可以经修饰以下调途径以将产生分流向不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯。本文所述的C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯可用作复分解反应的底物以扩大目标化合物和信息素的库。还提供了使用该重组微生物产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯的方法,以及包含该重组微生物和/或任选地产物醇、醛或乙酸酯中一种或多种的组合物。



CN 110914442 B

1.一种重组解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)微生物,其中该重组解脂耶氏酵母微生物包含:

a)编码并表达形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的异源核酸分子,所述形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶来自薄肌眼虫(*Euglena gracilis*)且与SEQ ID NO: 75具有至少99%序列同一性,其中所述形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。

2.根据权利要求1所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶包含SEQ ID NO: 75的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述重组解脂耶氏酵母微生物包含至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶选自SEQ ID NO: 39、54、60、62、78、79、80、95、97、99、101、103和105,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA。

4.根据权利要求1所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述重组解脂耶氏酵母微生物包含fao1基因的缺失、破坏、突变和/或降低。

5.根据权利要求1所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述重组解脂耶氏酵母微生物包含选自下列的一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:

a)一种或多种催化脂肪酰基-CoA转化为α,β-烯酰基-CoA的酶;

b)一种或多种脂肪醇脱氢酶;

c)一种或多种脂肪醇氧化酶;

d)一种或多种催化脂肪酸转化为ω-羟基脂肪酸的酶;和

e)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶。

6.根据权利要求1所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述重组解脂耶氏酵母微生物包含选自下列的一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:

(i)一种或多种酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g (POX1)、YALI0F10857g (POX2)、YALI0D24750g (POX3)、YALI0E27654g (POX4)、YALI0C23859g (POX5)、YALI0E06567g (POX6);

(ii)一种或多种脂肪醇脱氢酶,其选自YALI0F09603g (FADH)、YALI0D25630g (ADH1)、YALI0E17787g (ADH2)、YALI0A16379g (ADH3)、YALI0E15818g (ADH4)、YALI0D02167g (ADH5)、YALI0A15147g (ADH6)、YALI0E07766g (ADH7);

(iii)脂肪醇氧化酶YALI0B14014g (FAO1);

(iv)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g (ALK1)、YALI0F01320g (ALK2)、YALI0E23474g (ALK3)、YALI0B13816g (ALK4)、YALI0B13838g (ALK5)、YALI0B01848g (ALK6)、YALI0A15488g (ALK7)、YALI0C12122g (ALK8)、YALI0B06248g (ALK9)、YALI0B20702g (ALK10)、YALI0C10054g (ALK11)和YALI0A20130g (Alk12);和

(v)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g (DGA1)和YALI0D07986g (DGA2)。

7.根据权利要求1所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述重组解脂耶氏酵母微生物包含以下每种催化脂肪酰基-CoA转化为α,β-烯酰基-CoA的酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:CAA04659、CAA04660、CAA04661、CAA04662、CAA04663和CAG79214。

8.根据权利要求1所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述重组解脂耶氏酵母微生物包含FAO1酶和以下每种催化脂肪酰基-CoA转化为α,β-烯酰基-CoA的酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:CAA04659、CAA04660、CAA04661、CAA04662、CAA04663和CAG79214。

9.根据权利要求1所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇选自Z9-14:OH、Z11-14:OH、E11-14:OH、Z9-16:OH、Z11-16:OH、Z11Z13-16:OH和Z13-18:OH。

10.一种重组解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)微生物,其中该重组解脂耶氏酵母微生物包含:

a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶与SEQ ID NO:54具有至少95%序列同一性,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;和

b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶来自薄肌眼虫且与SEQ ID NO: 75具有至少99%序列同一性,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。

11.根据权利要求10所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述重组解脂耶氏酵母微生物包含选自下列的一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:

a)一种或多种脂肪醇脱氢酶;

b)一种或多种催化脂肪酸转化为ω-羟基脂肪酸的酶;和

c)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶。

12.根据权利要求10所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述重组解脂耶氏酵母微生物包含选自下列的一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:

a)一种或多种脂肪醇脱氢酶;

b)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g (ALK1)、YALI0F01320g (ALK2)、YALI0E23474g (ALK3)、YALI0B13816g (ALK4)、YALI0B13838g (ALK5)、YALI0B01848g (ALK6)、YALI0A15488g (ALK7)、YALI0C12122g (ALK8)、YALI0B06248g (ALK9)、YALI0B20702g (ALK10)、YALI0C10054g (ALK11)和YALI0A20130g (Alk12);和

c)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g (DGA1)和YALI0D07986g (DGA2)。

13.根据权利要求10所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述重组解脂耶氏酵母微生物包含以下每种催化脂肪酰基-CoA转化为α,β-烯酰基-CoA的酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:CAA04659、CAA04660、CAA04661、CAA04662、CAA04663和CAG79214。

14.根据权利要求10所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中所述重组解脂耶氏酵母微生物包含FAO1酶和以下每种催化脂肪酰基-CoA转化为α,β-烯酰基-CoA的酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:CAA04659、CAA04660、CAA04661、CAA04662、CAA04663和CAG79214。

用于产生昆虫信息素及相关化合物的微生物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年5月17日提交的美国临时申请序列号62/507,654的优先权权益,所述美国临时申请通过提述以其整体并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本格式提供以代替纸质拷贝,并且通过引用特此并入本说明书中。包含该序列表的文本文件的名称是PRVI_020_01WO_SeqList_ST25.txt。文本文件为约240KB,创建于2018年5月17日,并通过EFS-Web以电子方式提交。

技术领域

[0005] 本申请涉及用于不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯的生物合成的重组微生物,其可用作昆虫信息素、香料、调味剂和聚合物中间体。本申请还涉及使用该重组微生物产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯的方法,以及包含这些化合物中的一种或多种和/或重组微生物的组合物。

[0006] 发明背景

[0007] 随着全球对食品的需求增长,对有效控制有害生物的需求日益增加。常规的杀昆虫剂是最受欢迎的化学控制剂之一,因为它们易于获得、速效且高度可靠。然而,这些化学物质的过度使用、错用和滥用导致了抗性有害生物、自然生态的改变、以及环境破坏(在某些情况下)。

[0008] 使用昆虫信息素控制有害生物种群作为常规杀昆虫剂的一种可行、安全和环境友好的替代品越来越受欢迎。自从在20世纪50年代后期发现它们以来,这些分子已经通过多种方法显示出减少昆虫种群的功效,这些方法包括大规模捕获、吸引并杀灭以及交配干扰。后一种方法特别代表了无毒的有害生物控制手段,并利用合成信息素的能力掩盖自然存在的信息素,从而导致混乱和交配干扰。

[0009] 尽管信息素在农业昆虫控制方面具有显著的潜力,但使用现有可用技术合成信息素的成本非常高,这阻止了这种可持续技术在高价值作物之外的广泛使用。因此,现在需要开发用于昆虫信息素和相关香料、调味剂以及聚合物中间体的成本有效生产的新技术。本发明人通过开发能够从低成本原料产生宽范围的不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯(包括合成昆虫信息素)的重组微生物来解决这个需要。

[0010] 发明概述

[0011] 本申请涉及具有用于产生选自不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯的一种或多种化合物的生物合成途径的重组微生物。本文所述的重组微生物可用于产生选自不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯的至少一种化合物,如昆虫信息素、香料或调味剂。

[0012] 在一个实施方案中,该重组微生物包含用于产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醛或脂肪醇的生物合成途径。因此,在第一方面,本申请涉及一种重组微生物,其能够从饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA的内源或外源来源产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醛或脂肪醇,其中该重组微生物表达(a):至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂

肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;和(b):至少一种编码形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶催化该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛。在一些实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛是昆虫信息素。在一些实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛是香料或调味剂。在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化来自(b)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。(c)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。在一些实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇是昆虫信息素。在一些实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇是香料或调味剂。在一些实施方案中,该重组微生物还包含至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,其中该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化来自(b)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛。在一些实施方案中,该重组微生物还包含至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化来自(b)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。

[0013] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶是能够利用脂肪酰基-CoA作为底物的去饱和酶,该脂肪酰基-CoA具有6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个碳原子的链长。

[0014] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶能够在脂肪酸或其衍生物(如例如,脂肪酸CoA酯)的C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12或C13位置生成双键。

[0015] 在一个示例性实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶是Z11去饱和酶。在本文所述的各个实施方案中,Z11去饱和酶或编码它的核酸序列可以分离自物种黄地老虎(Agrotis segetum)、脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、红带卷蛾(Argyrotaenia velutiana)、蔷薇斜条卷叶蛾(Choristoneura rosaceana)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)、玉米穗蛾(Helicoverpa zea)、或假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)的生物体。另外的Z11去饱和酶或编码它们的核酸序列可以分离自家蚕(Bombyx mori)、烟草天蛾(Manduca sexta)、西南玉米螟(Diatraea grandiosella)、埃及金刚钻(Earias insulana)、翠纹金刚钻(Earias vittella)、小菜蛾(Plutella xylostella)、家蚕(Bombyx mori)或黄瓜绢野螟(Diaphania nitidalis)。在示例性实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自GenBank登录号JX679209、JX964774、AF416738、AF545481、EU152335、AAD03775、AAF81787和AY493438的序列。在一些实施方案中,对编码Z11去饱和酶的核酸序列进行密码子优化,该核酸序列来自物种黄地老虎(Agrotis segetum)、脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、红带卷蛾(Argyrotaenia velutiana)、蔷薇斜条卷叶蛾(Choristoneura rosaceana)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)、玉米穗蛾(Helicoverpa zea)、或假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)的生物体。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的核苷酸序列:来自粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)的SEQ ID NO:9、18、24和26。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自粉纹夜蛾的SEQ ID NO:49中列出的氨基酸序列。在其他实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的核苷酸序列:来自黄地老虎(Agrotis segetum)的SEQ ID NO:

10和16。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自黄地老虎的SEQ ID NO:53中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的核苷酸序列:来自假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)的SEQ ID NO:11和23。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的氨基酸序列:来自假微型海链藻的SEQ ID NO:50和51。在某些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的核苷酸序列:来自脐橙螟蛾(Amyelois transitella)的SEQ ID NO:12、17和30。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自脐橙螟蛾的SEQ ID NO:52中列出的氨基酸序列。在另外的实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的核苷酸序列:来自玉米穗蛾(Helicoverpa zea)的SEQ ID NO:13、19、25、27和31。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自玉米穗蛾的SEQ ID NO:54中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自水稻大螟(S.inferens)的SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含GenBank登录号AF416738、AGH12217.1、AII21943.1、CAJ43430.2、AF441221、AAF81787.1、AF545481、AJ271414、AY362879、ABX71630.1和NP001299594.1、Q9N9Z8、ABX71630.1和AIM40221.1中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含嵌合多肽。在一些实施方案中,完全或部分Z11去饱和酶与另一种多肽融合。在某些实施方案中,Z11去饱和酶的N末端天然前导序列被来自另一物种的油质蛋白前导序列替代。在某些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的核苷酸序列:SEQ ID NO:15、28和29。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自SEQ ID NO:61、62、63、78、79和80的氨基酸序列。

[0016] 在某些实施方案中,该Z11去饱和酶催化脂肪酰基-CoA转化为选自以下项的单或双不饱和产物:Z11-13:酰基-CoA、E11-13:酰基-CoA、(Z,Z)-7,11-13:酰基-CoA、Z11-14:酰基-CoA、E11-14:酰基-CoA、(E,E)-9,11-14:酰基-CoA、(E,Z)-9,11-14:酰基-CoA、(Z,E)-9,11-14:酰基-CoA、(Z,Z)-9,11-14:酰基-CoA、(E,Z)-9,11-15:酰基-CoA、(Z,Z)-9,11-15:酰基-CoA、Z11-16:酰基-CoA、E11-16:酰基-CoA、(E,Z)-6,11-16:酰基-CoA、(E,Z)-7,11-16:酰基-CoA、(E,Z)-8,11-16:酰基-CoA、(E,E)-9,11-16:酰基-CoA、(E,Z)-9,11-16:酰基-CoA、(Z,E)-9,11-16:酰基-CoA、(Z,Z)-9,11-16:酰基-CoA、(E,E)-11,13-16:酰基-CoA、(E,Z)-11,13-16:酰基-CoA、(Z,E)-11,13-16:酰基-CoA、(Z,Z)-11,13-16:酰基-CoA、(Z,E)-11,14-16:酰基-CoA、(E,E,Z)-4,6,11-16:酰基-CoA、(Z,Z,E)-7,11,13-16:酰基-CoA、(E,E,Z,Z)-4,6,11,13-16:酰基-CoA、Z11-17:酰基-CoA、(Z,Z)-8,11-17:酰基-CoA、Z11-18:酰基-CoA、E11-18:酰基-CoA、(Z,Z)-11,13-18:酰基-CoA、(E,E)-11,14-18:酰基-CoA或其组合。

[0017] 在另一个示例性实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶是Z9去饱和酶。在本文所述的各个实施方案中,该Z9去饱和酶或编码它的核酸序列可以分离自物种亚洲玉米螟(Ostrinia furnacalis)、欧洲玉米螟(Ostrinia nobilalis)、蔷薇斜条卷叶蛾(Choristoneura rosaceana)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、烟夜蛾(Helicoverpa assulta)或玉米穗蛾(Helicoverpa zea)的生物体。在示例性实施方案中,该Z9去饱和酶包含选自GenBank登录号AY057862、AF243047、AF518017、EU152332,AF482906和AAF81788的序列。在一些实施方案中,编码Z9去饱和酶的核酸序列经密码子优化。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自亚洲玉米螟(Ostrinia furnacalis)的SEQ ID NO:20中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自亚洲玉米螟的SEQ ID

NO:58中列出的氨基酸序列。在其他实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)的SEQ ID NO:21中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自红醋栗穿孔蛾的SEQ ID NO:59中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自玉米穗蛾(Helicoverpa zea)的SEQ ID NO:22中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自玉米穗蛾的SEQ ID NO:60中列出的氨基酸序列。本公开的其他Z9去饱和酶包括SEQ ID No:95、97、99、101、103和105。在一些实施方案中,Z9-18特定的去饱和酶的过表达可增加膜流动性以改善脂肪醇向上清液中的扩散。

[0018] 在某些实施方案中,该Z9去饱和酶催化脂肪酰基-CoA转化为选自以下项的单不饱和或多不饱和产物:Z9-11:酰基-CoA、Z9-12:酰基-CoA、E9-12:酰基-CoA、(E,E)-7,9-12:酰基-CoA、(E,Z)-7,9-12:酰基-CoA、(Z,E)-7,9-12:酰基-CoA、(Z,Z)-7,9-12:酰基-CoA、Z9-13:酰基-CoA、E9-13:酰基-CoA、(E,Z)-5,9-13:酰基-CoA、(Z,E)-5,9-13:酰基-CoA、(Z,Z)-5,9-13:酰基-CoA、Z9-14:酰基-CoA、E9-14:酰基-CoA、(E,Z)-4,9-14:酰基-CoA、(E,E)-9,11-14:酰基-CoA、(E,Z)-9,11-14:酰基-CoA、(Z,E)-9,11-14:酰基-CoA、(Z,Z)-9,11-14:酰基-CoA、(E,E)-9,12-14:酰基-CoA、(Z,E)-9,12-14:酰基-CoA、(Z,Z)-9,12-14:酰基-CoA、Z9-15:酰基-CoA、E9-15:酰基-CoA、(Z,Z)-6,9-15:酰基-CoA、Z9-16:酰基-CoA、E9-16:酰基-CoA、(E,E)-9,11-16:酰基-CoA、(E,Z)-9,11-16:酰基-CoA、(Z,E)-9,11-16:酰基-CoA、(Z,Z)-9,11-16:酰基-CoA、Z9-17:酰基-CoA、E9-18:酰基-CoA、Z9-18:酰基-CoA、(E,E)-5,9-18:酰基-CoA、(E,E)-9,12-18:酰基-CoA、(Z,Z)-9,12-18:酰基-CoA、(Z,Z,Z)-3,6,9-18:酰基-CoA、(E,E,E)-9,12,15-18:酰基-CoA、(Z,Z,Z)-9,12,15-18:酰基-CoA或其组合。

[0019] 在一些实施方案中,该重组微生物可以表达能够催化两个双键随后的去饱和的双功能去饱和酶。

[0020] 在一些实施方案中,该重组微生物可表达多于一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA。例如,该重组微生物可以表达编码Z11去饱和酶的外源核酸分子和编码Z9去饱和酶的另一种外源核酸分子。

[0021] 在一些实施方案中,该重组微生物可表达脂肪酰基缀合酶,该脂肪酰基缀合酶独立或与脂肪酰基去饱和酶一同起作用来催化饱和或单不饱和脂肪酰基-CoA转化为缀合多不饱和脂肪酰基-CoA。

[0022] 在一个实施方案中,本公开文本提供了一种重组微生物,其能够从饱和或单不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA的内源或外源来源产生多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛或脂肪醇,其中该重组微生物表达:(a)至少一种编码脂肪酰基缀合酶的外源核酸分子,该脂肪酰基缀合酶催化饱和或单不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;以及(b)至少一种编码形成脂肪醛或脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛或脂肪醇。

[0023] 在另一个实施方案中,该重组微生物表达编码脂肪酰基缀合酶的至少两种外源核酸分子,该脂肪酰基缀合酶催化饱和或单不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA。

[0024] 在另一个实施方案中,本公开文本提供了一种重组微生物,其能够从饱和或单不

饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA的内源或外源来源产生多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,其中该重组微生物表达:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子和至少一种编码脂肪酰基缀合酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶和该脂肪酰基缀合酶催化饱和或单不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;以及(b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。

[0025] 在另一个实施方案中,该重组微生物表达编码脂肪酰基去饱和酶的至少两种外源核酸分子和编码脂肪酰基缀合酶的至少两种外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶和该脂肪酰基缀合酶催化饱和或单不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA。

[0026] 在又另一个实施方案中,该脂肪酰基缀合酶是能够利用脂肪酰基-CoA作为底物的缀合酶,该脂肪酰基-CoA具有6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个碳原子的链长。

[0027] 在某些实施方案中,该缀合酶或编码它的核酸序列可以分离自物种苹果小卷蛾(Cydia pomonella)、豆荚小卷蛾(Cydia nigricana)、葡萄花翅小卷蛾(Lobesia botrana)、牛蒡筛螟(Myelois cribrella)、印度谷螟(Plodia interpunctella)、马尾松毛虫(Dendrolimus punctatus)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、斜纹夜蛾(Spodoptera litura)、脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、烟草天蛾(Manduca sexta)、家蚕(Bombyx mori)、金盏菊(Calendula officinalis)、栝楼(Trichosanthes kirilowii)、石榴(Punica granatum)、苦瓜(Momordica charantia)、凤仙花(Impatiens balsamina)以及苹浅褐卷蛾(Epiphyas postvittana)的生物体。在示例性实施方案中,该缀合酶包含以下序列,其选自GenBank登录号或Uniprot数据库:A0A059TBF5、A0A0M3L9E8、A0A0M3L9S4、A0A0M3LAH8、A0A0M3LAS8、A0A0M3LAH8、B6CBS4、XP_013183656.1、XP_004923568.2、ALA65425.1、NP_001296494.1、NP_001274330.1、Q4A181、Q75PL7、Q9FPP8、AY178444、AY178446、AF182521、AF182520、Q95UJ3。

[0028] 在本文所述的各个实施方案中,形成脂肪醇的酰基-CoA还原酶,即形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶或编码它的核酸序列可以分离自物种黄地老虎(Agrotis segetum)、海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、棉铃虫(Helicoverpa amigera)、甜菜夜蛾(Spodoptera exigua)、薄肌眼虫(Euglena gracilis)或稠李巢蛾(Yponomeuta evonymellus)的生物体。在示例性实施方案中,该还原酶包含以下序列,其选自GenBank登录号JX679210和HG423128以及UniProt登录号I3PN86。在一些实施方案中,对编码脂肪酰基还原酶的核酸序列进行密码子优化,该核酸序列来自物种黄地老虎(Agrotis segetum)、海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、棉铃虫(Helicoverpa amigera)、甜菜夜蛾(Spodoptera exigua)、薄肌眼虫(Euglena gracilis)或稠李巢蛾(Yponomeuta evonymellus)的生物体。在一些实施方案中,该还原酶包含来自黄地老虎(Agrotis segetum)的SEQ ID NO:1中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自黄地老虎(Agrotis segetum)的SEQ ID NO:55中列出的氨基酸序列。在其他实施方案中,该还原酶包含来自海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)的SEQ ID NO:2中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)的SEQ ID NO:56的中列出的

氨基酸序列。在一些实施方案中,该还原酶包含选自SEQ ID NO:3、32、40、72、74、76和81的核苷酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自黄地老虎(Agrotis segetum)的SEQ ID NO:55的中列出的氨基酸序列。在其他实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)的SEQ ID NO:56中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含选自来自棉铃虫(Helicoverpa armigera)的SEQ ID NO:41和57的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含选自来自甜菜夜蛾(Spodoptera exigua)的SEQ ID NO:73和82的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自薄肌眼虫(Euglena gracilis)的SEQ ID NO:75中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自稠李巢蛾(Yponomeuta evonymellus)的SEQ ID NO:77中列出的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,本公开教导使用多种脂肪酰基还原酶。在一些实施方案中,本公开教导包含多个拷贝的相同脂肪酰基还原酶的重组微生物。在其他实施方案中,本公开教导包含两种或更多种不同的脂肪酰基还原酶的重组微生物。在一些实施方案中,该不同的脂肪酰基还原酶利用不同的辅因子。例如,来自薄肌眼虫(Euglena gracilis)的脂肪酰基还原酶(SEQ ID NO:75)使用NADH作为还原对等物(equivalent),而不使用NADPH。在一些实施方案中,这可允许使用两种或更多种不同的还原酶进行辅因子平衡。

[0030] 在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶是突变的脂肪酰基还原酶,且包含选自SEQ ID NO:42-48的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶是突变的脂肪酰基还原酶,且包含选自SEQ ID NO:83-89的核苷酸序列。

[0031] 在某些实施方案中,形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化单或多不饱和脂肪酰基-CoA转化为选自以下项的脂肪醇产物:(Z)-3-己烯醇、(Z)-3-壬烯醇、(Z)-5-癸烯醇、(E)-5-癸烯醇、(Z)-7-十二碳烯醇、(E)-7-十二碳烯醇、(E)-8-十二碳烯醇、(Z)-8-十二碳烯醇、(Z)-9-十二碳烯醇、(E)-9-十二碳烯醇、(Z)-9-十四碳烯醇、(E)-9-十四碳烯醇、(Z)-9-十六碳烯醇、(Z)-11-十四碳烯醇、(Z)-7-十六碳烯醇、(Z)-11-十六碳烯醇、(E)-11-十六碳烯醇、(E)-11-十四碳烯醇、或(Z,Z)-11,13-十六碳二烯醇、(11Z,13E)-十六碳二烯醇、(E,E)-8,10-十二碳二烯醇、(E,Z)-7,9-十二碳二烯醇、(Z)-13-十八碳烯醇、或其组合。

[0032] 在一些实施方案中,该重组微生物可表达编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的多于一种外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化单或多不饱和C6-C24脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C6-C24脂肪醇。

[0033] 在另外的实施方案中,本公开提供重组微生物,其能够从内源或外源来源的饱和C6-C24脂肪酸产生单或多不饱和≤C18脂肪醇,其中该重组微生物包含:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C6-C24脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C6-C24脂肪酰基-CoA;(b)至少一种编码酰基-CoA氧化酶的外源核酸分子,在一个或多个连续的酰基-CoA氧化酶活性的循环后该酰基-CoA氧化酶催化来自(a)的单或多不饱和C6-C24脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和≤C18脂肪酰基-CoA,其中指定循环产生相对于此循环中的起始单或多不饱和C6-C24脂肪酰基-CoA底物具有两个碳截短的单或多不饱和C4-C22脂肪酰基-CoA中间体;和(c)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(b)的单或多不饱和≤C18脂肪脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和≤C18脂肪醇。在一些实施方案中,该

脂肪酰基去饱和酶选自红带卷蛾、斜纹夜蛾、水稻大螟、烟草天蛾、欧洲玉米螟、玉米穗蛾、蔷薇斜条卷叶蛾、黑腹果蝇(Drosophila melanogaster)、海灰翅夜蛾、红醋栗穿孔蛾、脐橙螟蛾、粉纹夜蛾、黄地老虎、亚洲玉米螟和假微型海链藻衍生的脂肪酰基去饱和酶。在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶与选自SEQ ID NO:39、49-54、58-63、78-80和GenBank登录号AF416738、AGH12217.1、AII21943.1、CAJ43430.2、AF441221、AAF81787.1、AF545481、AJ271414、AY362879、ABX71630.1、NP001299594.1、Q9N9Z8、ABX71630.1和AIM40221.1的脂肪酰基去饱和酶具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、50%或50%序列同一性。在一些实施方案中,该酰基Co-A氧化酶选自表5a。在其他实施方案中,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶选自黄地老虎、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、薄肌眼虫、稠李巢蛾和棉铃虫衍生的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶。在另外的实施方案中,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶与选自SEQ ID NO:1-3、32、41-48、55-57、73、75、77和82的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、50%或50%序列同一性。在一些实施方案中,该重组微生物是选自解脂耶氏酵母、酿酒酵母、白假丝酵母、热带假丝酵母和维斯假丝酵母的酵母。

[0034] 在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该酰基转移酶优选储存≤C18脂肪酰基-CoA。在一些实施方案中,该酰基转移酶选自甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)、甘油磷脂酰基转移酶(GPLAT)和二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)。在一些优选的实施方案中,该酰基转移酶选自表5b。

[0035] 在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含至少一种编码酰基甘油脂肪酶的内源或外源核酸分子,该酰基甘油脂肪酶优选水解>C16、>C14、>C12或>C10酰基甘油底物的酯键。在一些实施方案中,该酰基甘油脂肪酶选自表5c。

[0036] 在一些实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酶催化与用于产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的生物合成途径竞争的途径中的反应。在另外的实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酶选自:(i)一种或多种酰基-CoA氧化酶;(ii)一种或多种酰基转移酶;(iii)一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶;(iv)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶;(v)一种或多种(脂肪)醇氧化酶;和(vi)一种或多种细胞色素P450单加氧酶。

[0037] 在一些优选的实施方案中,该微生物宿主的编码酰基-CoA氧化酶的一个或多个基因被缺失或下调以消除或减少所希望脂肪酰基-CoA的截短超过所希望链长度。在一些实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源酰基-CoA氧化酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酰基-CoA氧化酶选自解脂耶氏酵母POX1(YALI0E32835g)、解脂耶氏酵母POX2(YALI0F10857g)、解脂耶氏酵母POX3(YALI0D24750g)、解脂耶氏酵母POX4(YALI0E27654g)、解脂耶氏酵母POX5(YALI0C23859g)、解脂耶氏酵母POX6(YALI0E06567g);

酿酒酵母POX1(YGL205W);假丝酵母属POX2(CaO19.1655、CaO19.9224、CTRG_02374、M18259)、假丝酵母属POX4(CaO19.1652、CaO19.9221、CTRG_02377、M12160)和假丝酵母属POX5(CaO19.5723、CaO19.13146、CTRG_02721、M12161)。

[0038] 在一些实施方案中,提供了能够从内源或外源来源的饱和C6-C24脂肪酸产生单或多不饱和≤C18脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的重组微生物,其中该重组微生物表达一种或多种酰基-CoA氧化酶,且其中该重组微生物被操作以缺失、破坏、突变一种或多种内源酰基-CoA氧化酶和/或降低一种或多种内源酰基-CoA氧化酶的活性。在一些实施方案中,被表达的一种或多种酰基-CoA氧化酶不同于被缺失或下调的一种或多种内源酰基-CoA氧化酶。在其他实施方案中,被表达的一种或多种酰基-CoA氧化酶调节该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的链长度。在其他实施方案中,被表达的一种或多种酰基-CoA氧化酶选自表5a。

[0039] 在一些实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源酰基转移酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酰基转移酶选自解脂耶氏酵母YALI0C00209g、解脂耶氏酵母YALI0E18964g、解脂耶氏酵母YALI0F19514g、解脂耶氏酵母YALI0C14014g、解脂耶氏酵母YALI0E16797g、解脂耶氏酵母YALI0E32769g和解脂耶氏酵母YALI0D07986g,酿酒酵母YBL011w、酿酒酵母YDL052c、酿酒酵母YOR175C、酿酒酵母YPR139C、酿酒酵母YNR008w和酿酒酵母YOR245c,和假丝酵母属I503_02577、假丝酵母属CTRG_02630、假丝酵母属CaO19.250、假丝酵母属CaO19.7881、假丝酵母属CTRG_02437、假丝酵母属CaO19.1881、假丝酵母属CaO19.9437、假丝酵母属CTRG_01687、假丝酵母属CaO19.1043、假丝酵母属CaO19.8645、假丝酵母属CTRG_04750、假丝酵母属CaO19.13439、假丝酵母属CTRG_04390、假丝酵母属CaO19.6941、假丝酵母属CaO19.14203和假丝酵母属CTRG_06209。

[0040] 在一些实施方案中,提供了能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的重组微生物,其中该重组微生物表达一种或多种酰基转移酶,且其中该重组微生物被操作以缺失、破坏、突变一种或多种内源酰基转移酶和/或降低一种或多种内源酰基转移酶的活性。在一些优选的实施方案中,该微生物宿主的编码GPAT、LPAAT、GPLAT和/或DGAT的一种或多种基因被缺失或下调,并被一种或多种优选储存短链脂肪酰基-CoA的GPAT、LPAAT、GPLAT或DGAT取代。在一些实施方案中,被表达的一种或多种酰基转移酶不同于被缺失或下调的一种或多种内源酰基转移酶。在其他实施方案中,被表达的一种或多种酰基转移酶选自表5b。

[0041] 在一些优选的实施方案中,该微生物宿主中的编码酰基甘油脂肪酶(单、双或三酰基甘油脂肪酶)和甾醇酯酯酶的一种或多种基因被缺失或下调,并被一种或多种优选长链酰基甘油底物的酰基甘油脂肪酶取代。在一些实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶选自解脂耶氏酵母YALI0E32035g、解脂耶氏酵母YALI0D17534g、解脂耶氏酵母YALI0F10010g、解脂耶氏酵母YALI0C14520g和解脂耶氏酵母YALI0E00528g,酿酒酵母YKL140w、酿酒酵母YMR313c、酿酒酵母YKR089c、酿酒酵母YOR081c、酿酒酵母YKL094W、酿酒酵母YLL012W和酿酒酵母YLR020C,和假丝酵母属CaO19.2050、假丝酵母属CaO19.9598、假丝酵母属CTRG_01138、假丝酵母属W5Q_03398、假丝酵母属CTRG_00057、假丝酵母属CaO19.5426、假丝酵母属CaO19.12881、假丝酵母属CTRG_06185、假丝酵母属

Ca019.4864、假丝酵母属Ca019.12328、假丝酵母属CTRG_03360、假丝酵母属Ca019.6501、假丝酵母属Ca019.13854、假丝酵母属CTRG_05049、假丝酵母属Ca019.1887、假丝酵母属Ca019.9443、假丝酵母属CTRG_01683和假丝酵母属CTRG_04630。

[0042] 在一些实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源细胞色素P450单加氧酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源细胞色素P450单加氧酶选自解脂耶氏酵母YALI0E25982g(ALK1)、解脂耶氏酵母YALI0F01320g(ALK2)、解脂耶氏酵母YALI0E23474g(ALK3)、解脂耶氏酵母YALI0B13816g(ALK4)、解脂耶氏酵母YALI0B13838g(ALK5)、解脂耶氏酵母YALI0B01848g(ALK6)、解脂耶氏酵母YALI0A15488g(ALK7)、解脂耶氏酵母YALI0C12122g(ALK8)、解脂耶氏酵母YALI0B06248g(ALK9)、解脂耶氏酵母YALI0B20702g(ALK10)、解脂耶氏酵母YALI0C10054g(ALK11)和解脂耶氏酵母YALI0A20130g(ALK12)。

[0043] 在一些实施方案中,提供了能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的重组微生物,其中该重组微生物表达一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶,且其中该重组微生物经操作以缺失、破坏、突变一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶和/或降低一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶的活性。在一些实施方案中,被表达的一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶不同于被缺失或下调的一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶。在一些实施方案中,被表达的一种或多种内源或外源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶优选水解长链酰基甘油的酯键。在其他实施方案中,被表达的一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶选自表5c。

[0044] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶催化脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和中间体,该单或多不饱和中间体选自E5-10:酰基-CoA、E7-12:酰基-CoA、E9-14:酰基-CoA、E11-16:酰基-CoA、E13-18:酰基-CoA、Z7-12:酰基-CoA、Z9-14:酰基-CoA、Z11-16:酰基-CoA、Z13-18:酰基-CoA、Z8-12:酰基-CoA、Z10-14:酰基-CoA、Z12-16:酰基-CoA、Z14-18:酰基-CoA、Z7-10:酰基-coA、Z9-12:酰基-CoA、Z11-14:酰基-CoA、Z13-16:酰基-CoA、Z15-18:酰基-CoA、E7-10:酰基-CoA、E9-12:酰基-CoA、E11-14:酰基-CoA、E13-16:酰基-CoA、E15-18:酰基-CoA、E5Z7-12:酰基-CoA、E7Z9-12:酰基-CoA、E9Z11-14:酰基-CoA、E11Z13-16:酰基-CoA、E13Z15-18:酰基-CoA、E6E8-10:酰基-CoA、E8E10-12:酰基-CoA、E10E12-14:酰基-CoA、E12E14-16:酰基-CoA、Z5E8-10:酰基-CoA、Z7E10-12:酰基-CoA、Z9E12-14:酰基-CoA、Z11E14-16:酰基-CoA、Z13E16-18:酰基-CoA、Z3-10:酰基-CoA、Z5-12:酰基-CoA、Z7-14:酰基-CoA、Z9-16:酰基-CoA、Z11-18:酰基-CoA、Z3Z5-10:酰基-CoA、Z5Z7-12:酰基-CoA、Z7Z9-14:酰基-CoA、Z9Z11-16:酰基-CoA、Z11Z13-16:酰基-CoA和Z13Z15-18:酰基-CoA。在另外的实施方案中,该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇选自E5-10:OH、Z8-12:OH、Z9-12:OH、Z11-14:OH、Z11-16:OH、E11-14:OH、E8E10-12:OH、E7Z9-12:OH、Z11Z13-16OH、Z9-14:OH,Z9-16:OH和Z13-18:OH。

[0045] 在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含至少一种编码形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶的内源或外源核酸分子,该形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪酸转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。在一些优选的实施方案中,该形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶选自醋酸钙不动杆菌(Acinetobacter calcoaceticus)A0A1C4HN78、醋酸钙不动杆菌N9DA85、醋酸钙不动杆菌R8XW24、醋酸钙不动杆菌A0A1A0GGM5、醋酸钙不动杆菌

A0A117N158和点状念珠藻(Nostoc punctiforme)YP_001865324。在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。在一些优选的实施方案中,该≤C_{18}脂肪醛选自Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0046] 在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含:至少一种编码选自醇氧化酶、醇脱氢酶的酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶、醇脱氢酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛;和至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。在一些优选的实施方案中,该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醛和≤C_{18}脂肪乙酸酯选自E5-10:Ac、Z7-12:Ac、Z8-12:Ac、Z9-12:Ac、E7Z9-12:Ac、Z9-14:Ac、Z9E12-14:Ac、E11-14:Ac、Z11-14:Ac、Z11-16:Ac、Z9-16:Ac、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0047] 在一些实施方案中,本公开提供工程化能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的微生物的方法,其中该方法包括将以下引入至微生物中:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;(b)至少一种编码酰基-CoA氧化酶的外源核酸分子,该酰基-CoA氧化酶在一个或多个连续的酰基-CoA氧化酶活性循环之后催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和≤C18脂肪酰基-CoA,其中指定循环产生相对于此循环中的起始单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA底物具有两个碳截短的单或多不饱和C_4-C_{22}脂肪酰基-CoA中间体;和(c)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(b)的单或多不饱和≤C18脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇。在一些实施方案中,该微生物为MATA ura3-302::SUC2ΔpoxlΔpox2Δpox3Δpox4Δpox5Δpox6ΔfadhΔadh1Δadh2Δadh3Δadh4Δadh5Δadh6Δadh7Δfao1::URA3。

[0048] 在一些实施方案中,本公开提供从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的方法,其包括:在含有原料的培养基中培养本文所述的重组微生物,该原料提供足以产生该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的碳源。在一些实施方案中,该方法进一步包括回收该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的步骤。在另外的实施方案中,该回收步骤包括蒸馏。在又一实施方案中,该回收步骤包括基于膜的分离。

[0049] 在一些实施方案中,使用化学方法将单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。在另外的实施方案中,该化学方法选自TEMPO-漂白、TEMPO-铜-空气、TEMPO-PhI$(OAc)_2$、斯文(Swern)氧化和贵金属-空气。在一些实施方案中,使用化学方法将该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。在另外的实施方案中,该化学方法在4-N,N-二甲氨基吡啶(DMAP)或乙酸钠的存在下利用选自乙酰氯、乙酸酐、丁酰氯、丁酸酐、丙酰氯和丙酸酐的化学剂将该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇酯化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。

[0050] 在另外的实施方案中,本公开提供能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该重组解脂耶氏酵母微生物包含:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和

C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA,且与选自SEQ ID NO:54、60、62、78、79、80、95、97、99、101、103和105的脂肪酰基去饱和酶具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、50%或50%序列同一性;和(b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,且与选自SEQ ID NO:41-48、57、73、75和77的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有95%序列同一性。

[0051] 在一些实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酶催化与用于产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的生物合成途径竞争的途径中的反应。在一些优选的实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酶选自下列:(i)一种或多种酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g(POX1)、YALI0F10857g(POX2)、YALI0D24750g(POX3)、YALI0E27654g(POX4)、YALI0C23859g(POX5)、YALI0E06567g(POX6);(ii)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶,其选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7);(iii)(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1);(iv)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g(ALK1)、YALI0F01320g(ALK2)、YALI0E23474g(ALK3)、YALI0B13816g(ALK4)、YALI0B13838g(ALK5)、YALI0B01848g(ALK6)、YALI0A15488g(ALK7)、(YALI0C12122g(ALK8)、YALI0B06248g(ALK9)、YALI0B20702g(ALK10)、YALI0C10054g(ALK11)和YALI0A20130g(Alk12);YAS1(YALI1C03349)、Yas2(YALI0E32417)、Gsy11(YALI0F18502)、HFD1(YALI0F23793)、HFD2(YALI0E15400)、HFD3(YALI0A17875)、HFD4(YALI0B01298)、SDR(YALI0A19536);和(v)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)。在其他优选的实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物包含一种或多种内源酶的缺失,该内源酶选自下列:(i)一种或多种酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g(POX1)、YALI0F10857g(POX2)、YALI0D24750g(POX3)、YALI0E27654g(POX4)、YALI0C23859g(POX5)、YALI0E06567g(POX6);(ii)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶,其选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7);(iii)(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1);(iv)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g(ALK1)、YALI0F01320g(ALK2)、YALI0E23474g(ALK3)、YALI0B13816g(ALK4)、YALI0B13838g(ALK5)、YALI0B01848g(ALK6)、YALI0A15488g(ALK7)、(YALI0C12122g(ALK8)、YALI0B06248g(ALK9)、YALI0B20702g(ALK10)、YALI0C10054g(ALK11)和YALI0A20130g(Alk12);和(v)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)。

[0052] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和中间体,该单或多不饱和中间体选自Z9-14:酰基-CoA、Z11-14:酰基-CoA、E11-14:酰基-CoA、Z9-16:酰基-CoA和Z11-16:酰基-CoA。在其他实施方案中,单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪

醇选自Z9-14:OH、Z11-14:OH、E11-14:OH、Z9-16:OH、Z11-16:OH、Z11Z13-16:OH和Z13-18:OH。

[0053] 在一些实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物进一步包含至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛。在一些实施方案中,该醇脱氢酶选自表3a。在一些实施方案中,该C_6-C_{24}脂肪醛选自Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0054] 在一些实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物进一步包含:至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛;和至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。在一些实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯选自Z9-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac、Z11-16:Ac、Z11Z13-16:Ac、Z13-18:Ac、Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0055] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶不包含包含选自SEQ ID NO:64、65、66和67的氨基酸序列的脂肪酰基去饱和酶。在其他实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶不包含选自脐橙螟蛾、灰翅夜蛾、黄地老虎或粉纹夜蛾衍生的去饱和酶的脂肪酰基去饱和酶。

[0056] 在一些实施方案中,本公开提供了一种工程化能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的解脂耶氏酵母微生物的方法,其中该方法包括将下列引入至该解脂耶氏酵母微生物中:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA,该脂肪酰基去饱和酶与选自SEQ ID NO:39、54、60、62、78、79、80、95、97、99、101、103和105的脂肪酰基去饱和酶具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、50%或50%序列同一性;和(b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶与选自SEQ ID NO:41-48、55、56、57、73、75和77的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有95%序列同一性。在一些实施方案中,该微生物为MATA ura3-302::SUC2Δpox1Δpox2Δpox3Δpox4Δpox5Δpox6Δfadh Δadh1Δadh2Δadh3Δadh4Δadh5Δadh6Δadh7Δfao1::URA3。

[0057] 在一些实施方案中,本公开提供从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的方法,其包括:在含有原料的培养基中培养本文所述的重组微生物,该原料提供足以产生该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的碳源。在一些实施方案中,该方法进一步包括回收该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的步骤。在另外的实施方案中,该回收步骤包括蒸馏。在又一实施方案中,该回收步骤包括基于膜的分离。

[0058] 在一些实施方案中,使用化学方法将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的

C_6-C_{24}脂肪醛。在另外的实施方案中,该化学方法选自TEMPO-漂白、TEMPO-铜-空气、TEMPO-$PhI(OAc)_2$、斯文氧化和贵金属-空气。在一些实施方案中,使用化学方法将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。在另外的实施方案中,该化学方法在4-N,N-二甲氨基吡啶(DMAP)或乙酸钠的存在下利用选自乙酰氯、乙酸酐、丁酰氯、丁酸酐、丙酰氯和丙酸酐的化学剂将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇酯化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。

[0059] 除了上述第一方面中描述的生物合成途径之外,本申请还提供了用于利用源自C_6-C_{24}脂肪酸的饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP中间体产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的另外的生物合成途径。因此,在第二方面,本申请涉及一种重组微生物,其能够从内源或外源来源的C_6-C_{24}脂肪酸产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,其中该重组微生物表达(a):至少一种编码酰基-ACP合成酶的外源核酸分子,该酰基-ACP合成酶催化C_6-C_{24}脂肪酸转化为相应的饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP;(b)至少一种编码脂肪酰基-ACP去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基-ACP去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP;(c)一种或多种编码脂肪酸合酶复合物的内源或外源核酸分子,该脂肪酸合酶复合物催化来自(b)的该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的相对于(b)的产物具有两个碳延长的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP;(d):至少一种编码形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶催化来自(c)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛;以及(e)至少一种编码脱氢酶的内源或外源核酸分子,该脱氢酶催化来自(d)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛C_6-C_{24}转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。在一些实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇是昆虫信息素。在一些实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇是香料或调味剂。在一些实施方案中,该重组微生物还包含至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,其中该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化来自(e)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛。在一些实施方案中,该重组微生物还包含至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化来自(e)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。

[0060] 在一些实施方案中,酰基-ACP合成酶是能够利用如下脂肪酸作为底物的合成酶,该脂肪酸具有6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个碳原子的链长。

[0061] 在本文所述的各个实施方案中,酰基-ACP合成酶或编码它的核酸可以分离自物种哈维氏弧菌(Vibrio harveyi)、粘红酵母(Rhodotorula glutinis)或解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)的生物体。

[0062] 在一些实施方案中,脂肪酰基-ACP去饱和酶是可溶性去饱和酶。在本文所述的各个实施方案中,脂肪酰基-ACP去饱和酶或编码它的核酸可以分离自物种天竺葵(Pelargonium hortorum)、叙利亚马利筋(Asclepias syriaca)或绒毛钩藤(Uncaria tomentosa)的生物体。

[0063] 在一些实施方案中,该重组微生物可表达编码脂肪酰基去饱和酶的多于一种外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP。

[0064] 如上所述,脂肪酸延长酶(即,脂肪酸合酶复合物)可以用于将单或多不饱和C_6-C_{24}

脂肪酰基-ACP的链长在α-碳上延长两个额外的碳。在一些实施方案中,该两个额外的碳源自于内源丙二酰基-CoA。在一个实施方案中,编码脂肪酸合酶复合物的一种或多种核酸分子是内源核酸分子,即该一种或多种核酸分子对于重组微生物而言是天然的。在另一个实施方案中,该一种或多种编码脂肪酸合酶复合物的核酸分子是外源核酸分子。

[0065] 在本文所述的各个实施方案中,形成脂肪醛的酰基-ACP还原酶(即,形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶)或编码它的核酸序列可以分离自物种天竺葵(Pelargonium hortorum)、叙利亚马利筋(Asclepias syriaca)以及绒毛钩藤(Uncaria tomentosa)的生物体。

[0066] 如上所述,根据第二方面的重组微生物包含至少一种编码脱氢酶的内源或外源核酸分子,该脱氢酶能够催化来自(d)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。在一个实施方案中,该脱氢酶由内源核酸分子编码。在另一个实施方案中,该脱氢酶由外源核酸分子编码。在示例性实施方案中,该编码脱氢酶的内源或外源核酸分子分离自物种酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、大肠杆菌(Escherichia coli)、解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)或热带假丝酵母(Candida tropicalis)的生物体。

[0067] 除了上述第一和第二方面中描述的生物合成途径之外,本申请还提供了用于利用源自C_6-C_{24}脂肪酸的饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP中间体产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的另外的生物合成途径。因此,在第三方面,本申请涉及一种重组微生物,其能够从内源或外源来源的C_6-C_{24}脂肪酸产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,其中该重组微生物表达(a):至少一种编码酰基-ACP合成酶的外源核酸分子,该酰基-ACP合成酶催化C_6-C_{24}脂肪酸转化为相应的饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP;(b)至少一种编码脂肪酰基-ACP去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基-ACP去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP;(c)至少一种外源脂肪酰基-ACP硫酯酶,该硫酯酶催化来自(b)的该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酸;(d)编码延长酶的一种或多种内源或外源核酸分子,该延长酶催化从来自(c)的该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酸的CoA活化衍生的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相对于(c)的产物具有两个碳或更多个碳延长的相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;以及(e):至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该脂肪酰基还原酶催化来自(d)的该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。在一些实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇是昆虫信息素。在一些实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇是香料或调味剂。在一些实施方案中,该重组微生物还包含至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,其中该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化来自(e)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛。在一些实施方案中,该重组微生物还包含至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化来自(e)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯

[0068] 在根据此第三方面的一些实施方案中,脂肪酰基-ACP硫酯酶可用于将单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酸。在一些的实施方案中,可溶性脂肪酰基-ACP硫酯酶可用于释放游离脂肪酸以再活化为CoA硫酯。可包括在实施方案中的脂肪酰基-ACP硫酯酶包括但不限于,包括Q41635、Q39473、P05521.2、AEM72519、AEM72520、AEM72521、AEM72523、AAC49784、CAB60830、EER87824、EER96252、ABN54268、AAO77182、CAH09236、ACL08376及其同系物。在一些实施方案中,单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰

基-CoA可充当延长酶的底物,该延长酶可用于将单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA的链长在α-碳上延长两个额外的碳。在一些实施方案中,该两个额外的碳源自于内源丙二酰基-CoA。

[0069] 如上所述,在一些实施方案中,根据第一、第二或第三方面的重组微生物还包含至少一种编码醇氧化酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶能够催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛。在某些实施方案中,该醇氧化酶或编码它的核酸序列可分离自物种博伊丁假丝酵母(Candida boidinii)、巴斯德毕赤酵母(Komagataella pastoris)、菊蒿(Tanacetum vulgare)、加州希蒙得木(Simmondsia chinensis)、拟南芥(Arabidopsis thaliana)、百脉根(Lotus japonicas)或热带假丝酵母(Candida tropicalis)的生物体。在示例性实施方案中,该醇氧化酶包含选自GenBank登录号Q00922、F2QY27、Q6QIR6、Q8LDP0和L7VFV2的序列。

[0070] 如上所述,在一些实施方案中,根据第一或第二方面的重组微生物还包含至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。在某些实施方案中,该乙酰基转移酶或编码它的核酸序列可以分离自物种酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、黑脉金斑蝶(Danaus plexippus)、烟芽夜蛾(Heliotis virescens)、家蚕(Bombyx mori)、小地老虎(Agrotis ipsilon)、黄地老虎(Agrotis segetum)、卫矛(Euonymus alatus)的生物体。在示例性实施方案中,该乙酰基转移酶包含选自GenBank登录号AY242066、AY242065、AY242064、AY242063、AY242062、EHJ65205、ACX53812、NP_001182381、EHJ65977、EHJ68573、KJ579226、GU594061、KTA99184.1、AIN34693.1、AY605053、XP_002552712.1、XP_503024.1、XP_505595.1和XP_505513.1的序列。

[0071] 在替代实施方案中,可以使用化学方法将脂肪醇转化为脂肪乙酸酯,例如通过利用化学试剂如乙酰氯、乙酸酐、丁酰氯、丁酸酐、丙酰氯和丙酸酐进行的化学催化。

[0072] 在一些实施方案中,可将包含用于产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的生物合成途径的重组微生物进一步工程化以表达编码在表达时对昆虫有毒性的蛋白质或多肽的一种或多种核酸。适于本公开文本的示例性毒物产生基因可以从昆虫病原生物如苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、粘质沙雷氏菌(Serratia marcescens)和链霉菌属(Streptomyces)成员获得。在一个示例性实施方案中,可将包含用于产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的生物合成途径的重组微生物进一步工程化以表达编码苏云金芽孢杆菌(“Bt”)毒素的核酸。在另外的或替代实施方案中,可将包含用于产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的生物合成途径的重组微生物进一步工程化以表达编码其他毒性蛋白如蜘蛛毒的核酸。

[0073] 在一些实施方案中,可将包含用于产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的生物合成途径的重组微生物进一步工程化以表达如下RNAi分子,该RNAi分子在表达时产生对昆虫有毒性的寡核苷酸。

[0074] 在一些实施方案中,可将包含用于产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的生物合成途径的重组微生物进一步工程化以表达如下代谢途径,该代谢途径在表达时产生对昆虫有毒性的小分子。毒性小分子的非限制性例子包括印楝素、多杀菌素、阿维菌素、除虫菊酯和各种萜类化合物。

[0075] 在本文所述的各个实施方案中,包含用于产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的生物合成途径的重组微生物可以是真核微生物,如酵母、丝状真菌或藻类,或可替代地原核微生物,如细菌。例如,合适的宿主细胞可以包括选自下组的属的细胞,该组由以下各项组成:耶氏酵母属(Yarrowia)、假丝酵母属(Candida)、酵母属(Saccharomyces)、毕赤酵母属(Pichia)、汉逊酵母属(Hansenula)、梭菌属(Clostridium)、发酵单胞菌属(Zymomonas)、埃希氏杆菌属(Escherichia)、沙门氏菌属(Salmonella)、红球菌属(Rhodococcus)、假单胞菌属(Pseudomonas)、芽孢杆菌属(Bacillus)、乳杆菌属(Lactobacillus)、肠球菌属(Enterococcus)、产碱杆菌属(Alcaligenes)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、类芽孢杆菌属(Paenibacillus)、节杆菌属(Arthrobacter)、棒状杆菌属(Corynebacterium)、短杆菌属(Brevibacterium)和链霉菌属(Streptomyces)。

[0076] 在一些实施方案中,包含用于产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的生物合成途径的重组微生物是酵母。合适的酵母的例子包括选自下组的属的酵母,该组由以下各项组成:耶氏酵母属(Yarrowia)、假丝酵母属(Candida)、酵母属(Saccharomyces)、毕赤酵母属(Pichia)、汉逊酵母属(Hansenula)、克鲁维酵母属(Kluyveromyces)、伊萨酵母属(Issatchenkia)、接合酵母属(Zygosaccharomyces)、德巴利酵母属(Debaryomyces)、裂殖酵母属(Schizosaccharomyces)、管囊酵母属(Pachysolen)、隐球酵母属(Cryptococcus)、丝孢酵母属(Trichosporon)、红酵母属(Rhodotorula)、或Myxozyma。在某些实施方案中,该酵母是产油酵母。适用于本公开文本的示例性产油酵母包括以下属的成员:耶氏酵母属(Yarrowia)、假丝酵母属(Candida)、红酵母属(Rhodotorula)、红冬孢酵母属(Rhodosporidium)、隐球酵母属(Cryptococcus)、丝孢酵母属(Trichosporon)和油脂酵母属(Lipomyces),包括但不限于以下物种:解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)、热带假丝酵母(Candida tropicalis)、圆红冬孢酵母(Rhodosporidium toruloides)、斯达油脂酵母(Lipomyces starkey)、产脂油脂酵母(L.lipoferus)、拉可夫氏假丝酵母(C.revkaufi)、铁红假丝酵母(C.pulcherrima)、产朊假丝酵母(C.utilis)、小红酵母(Rhodotorula minuta)、黑色丝孢酵母(Trichosporon pullans)、皮状丝孢酵母(T.cutaneum)、弯曲隐球酵母(Cryptococcus curvatus)、粘红酵母(R.glutinis)和禾本红酵母(R.graminis)。

[0077] 如本领域中将理解的,内源酶可将不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯生物合成途径上游或内部的关键底物和/或中间体转化为不想要的副产物。因此,在一些实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该内源酶催化与不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛、或脂肪乙酸酯生物合成途径竞争的途径中的反应。

[0078] 在一个实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该内源酶催化脂肪酸转化为ω-羟基脂肪酸。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以使选自以下项的一种或多种酶的缺失、破坏、突变和/或活性降低:XP_504406、XP_504857、XP_504311、XP_500855、XP_500856、XP_500402、XP_500097、XP_501748、XP_500560、XP_501148、XP_501667、XP_500273、BAA02041、CAA39366、CAA39367、BAA02210、BAA02211、BAA02212、BAA02213、BAA02214、AAO73952、AAO73953、AAO73954、AAO73955、AAO73956、AAO73958、AAO73959、AAO73960、AAO73961、AAO73957、XP_002546278或其同系物。在重组细菌微生物的背景下,该重组细菌

微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种酶和/或降低一种或多种酶的活性,该一种或多种酶选自:BAM49649、AAB80867、AAB17462、ADL27534、AAU24352、AAA87602、CAA34612、ABM17701、AAA25760、CAB51047、AAC82967、WP_011027348或其同系物。

[0079] 在另一个实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该内源酶催化脂肪酰基-CoA转化为α,β-烯酰基-CoA。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种酶和/或降低一种或多种酶的活性,该一种或多种酶选自:CAA04659、CAA04660、CAA04661、CAA04662、CAA04663、CAG79214、AAA34322、AAA34361、AAA34363、CAA29901、BAA04761、AAA34891或其同系物。在重组细菌微生物的背景下,该重组细菌微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种酶和/或降低一种或多种酶的活性,该一种或多种酶选自:AAB08643、CAB15271、BAN55749、CAC44516、ADK16968、AEI37634、WP_000973047、WP_025433422、WP_035184107、WP_026484842、CEL80920、WP_026818657、WP_005293707、WP_005883960或其同系物。

[0080] 在该重组微生物是酵母微生物的实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种酶和/或降低一种或多种酶的活性,该一种或多种酶涉及过氧化物酶体组装和/或过氧化物酶导入。该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种酶和/或降低一种或多种酶的活性,该一种或多种酶选自:XP_505754、XP_501986、XP_501311、XP_504845、XP_503326、XP_504029、XP_002549868、XP_002547156、XP_002545227、XP_002547350、XP_002546990、EIW11539、EIW08094、EIW11472、EIW09743、EIW08286或其同系物。

[0081] 在另一个实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源还原酶或去饱和酶和/或降低一种或多种内源还原酶或去饱和酶的活性,该一种或多种内源还原酶或去饱和酶干扰不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯,即,催化途径底物或产物转化为不想要的副产物。

[0082] 在另一个实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源醇氧化酶或醇脱氢酶和/或降低一种或多种内源醇氧化酶或醇脱氢酶的活性,该一种或多种内源醇氧化酶或醇脱氢酶催化所希望产物例如不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的不饱和C_6-C_{24}脂肪醛。

[0083] 在另一个实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该一种或多种内源酶催化与一种或多种不饱和脂肪酰基-CoA中间体的生物合成途径竞争的途径中的反应。在一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种二酰基甘油酰基转移酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种二酰基甘油酰基转移酶和/或降低一种或多种二酰基甘油酰基转移酶的活性,该一种或多种二酰基甘油酰基转移酶选自:YALI0E32769g、YALI0D07986g和CTRG_06209或其同系物。在另一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种甘油磷脂酰基转移酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变和/一种或多种甘油磷脂酰基转移酶或降低一种或多种甘油磷脂酰基转移酶的活性,该一种或多种甘油磷脂酰基转移酶选自:YALI0E16797g和CTG_04390或其同系物。在另一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种酰基-

CoA/甾醇酰基转移酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种酰基-CoA/甾醇酰基转移酶和/或降低一种或多种酰基-CoA/甾醇酰基转移酶的活性,该一种或多种酰基-CoA/甾醇酰基转移酶选自:YALI0F06578g、CTRG_01764和CTRG_01765或其同系物。

[0084] 在另一个实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该一种或多种内源酶催化氧化脂肪醛中间体的途径中的反应。在一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种脂肪醛脱氢酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种脂肪醛脱氢酶和/或降低一种或多种脂肪醛脱氢酶的活性,该一种或多种脂肪醛脱氢酶选自:YALI0A17875g、YALI0E15400g、YALI0B01298g、YALI0F23793g、CTRG_05010和CTRG_04471或其同系物。

[0085] 在另一个实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该一种或多种内源酶催化消耗脂肪乙酸酯产物的途径中的反应。在一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种甾醇酯酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种甾醇酯酶和/或降低一种或多种甾醇酯酶的活性,该一种或多种甾醇酯酶选自:YALI0E32035g、YALI0E00528g、CTRG_01138、CTRG_01683和CTRG_04630或其同系物。在另一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种三酰基甘油脂肪酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种三酰基甘油脂肪酶和/或降低一种或多种三酰基甘油脂肪酶的活性,该一种或多种三酰基甘油脂肪酶选自:YALI0D17534g、YALI0F10010g、CTRG_00057和CTRG_06185或其同系物。在另一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种单酰基甘油脂肪酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种单酰基甘油脂肪酶和/或降低一种或多种单酰基甘油脂肪酶的活性,该一种或多种单酰基甘油脂肪酶选自:YALI0C14520g、CTRG_03360和CTRG_05049或其同系物。在另一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种胞外脂肪酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种胞外脂肪酶和/或降低一种或多种胞外脂肪酶的活性,该一种或多种胞外脂肪酶选自:YALI0A20350g、YALI0D19184g、YALI0B09361g、CTRG_05930、CTRG_04188、CTRG_02799、CTRG_03052和CTRG_03885或其同系物。

[0086] 在其中重组微生物是酵母微生物的实施方案中,一种或多种外源不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯途径基因编码如下的酶,该酶定位于选自下组的酵母区室,该组由以下各项组成:细胞溶质、线粒体或内质网。在一个示例性实施方案中,一种或多种外源途径基因编码定位于内质网的酶。在另一个实施方案中,至少两种外源途径基因编码定位于内质网的酶。在又另一个实施方案中,所有外源途径基因编码定位于内质网的酶。

[0087] 在另外的实施方案中,本申请提供了使用本文所述的重组微生物产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的方法。在一个实施方案中,该方法包括在含有提供碳源的原料的培养基中培养重组微生物直至产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯并任选地回收该不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯。一旦产生,可以使用本领域已知的各种方法从发酵培养基中分离该不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯,所述方法包括

但不限于蒸馏、膜基分离气提、溶剂萃取和膨胀床吸附。

[0088] 在一些实施方案中,可以以干燥微粒形式回收并生产重组微生物,例如酵母。在涉及酵母的实施方案中,酵母可被干燥以产生粉状酵母。在一些实施方案中,用于产生粉状酵母的工艺包括在空气中喷雾干燥液体酵母组合物,任选地随后进一步干燥。在一些实施方案中,干燥时该重组微生物组合物将包含不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯。

[0089] 如本文所述,本公开文本的优选重组微生物将具有利用烷烃和脂肪酸作为碳源的能力。然而,如本领域将理解的,可以利用多种碳源,包括但不限于各种糖(例如,葡萄糖、果糖或蔗糖)、甘油、醇(例如,乙醇)、有机酸、木质纤维素、蛋白质、二氧化碳、一氧化碳、以及上述烷烃和脂肪酸。在一些实施方案中,该重组微生物将在有氧条件下将碳源转化为不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯。

[0090] 如上所强调的,本申请提供了使用本文所述的重组微生物产生一种或多种不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、醛或乙酸酯的方法。在一些实施方案中,该产物是昆虫信息素。如配备本公开文本的技术人员将认识到的,可以在重组宿主微生物中表达多种不同的外源和内源酶以产生希望的昆虫信息素。呈能够使用本文所述的重组微生物和方法生成的脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯形式的示例性昆虫信息素包括但不限于(Z)-11-十六碳烯醛、(Z)-11-十六碳烯基乙酸酯、(Z)-9-十四碳烯基乙酸酯、(Z,Z)-11,13-十六碳二烯醛、(9Z,11E)-十六碳二烯醛、(E,E)-8,10-十二碳二烯-1-醇、(7E,9Z)-十二碳二烯基乙酸酯、(Z)-3-壬烯-1-醇、(Z)-5-癸烯-1-醇、(Z)-5-癸烯基乙酸酯、(E)-5-癸烯-1-醇、(E)-5-癸烯基乙酸酯、(Z)-7-十二碳烯-1-醇、(Z)-7-十二碳烯基乙酸酯、(E)-8-十二碳烯-1-醇、(E)-8-十二碳烯基乙酸酯、(Z)-8-十二碳烯-1-醇、(Z)-8-十二碳烯基乙酸酯、(Z)-9-十二碳烯-1-醇、(Z)-9-十二碳烯基乙酸酯、(Z)-9-十四碳烯-1-醇、(Z)-11-十四碳烯-1-醇、(Z)-11-十四碳烯基乙酸酯、(E)-11-十四碳烯-1-醇、(E)-11-十四碳烯基乙酸酯、(Z)-7-十六碳烯-1-醇、(Z)-7-十六碳烯醛、(Z)-9-十六碳烯-1-醇、(Z)-9-十六碳烯醛、(Z)-9-十六碳烯基乙酸酯、(Z)-11-十六碳烯-1-醇、(Z)-13-十八碳烯-1-醇、(Z)-13-十六碳烯基乙酸酯和(Z)-13-十八碳烯基乙酸酯和(Z)-13-十八碳烯醛。

[0091] 在第本发明的另一实施方案中,可提供了包含本文所述的一种或多种产生昆虫信息素的重组微生物的组合物。在某些实施方案中,该组合物可以进一步包含由该重组微生物产生的一种或多种昆虫信息素。在另外的实施方案中,可以另外包含由该重组微生物产生的一种或多种毒性蛋白或多肽。

[0092] 附图简述

[0093] 附图示出了本公开文本的说明性实施方案,其中:

[0094] 图1示出了饱和脂肪酰基-CoA向不饱和脂肪醇的转化。

[0095] 图2示出了饱和脂肪酸向单或多不饱和脂肪醛、脂肪醇或脂肪乙酸酯的转化。

[0096] 图3示出了饱和脂肪酸转化为单或多不饱和脂肪醛、脂肪醇或脂肪乙酸酯的另外的途径

[0097] 图4示出了饱和脂肪酸转化为各种三烯、二烯、环氧化物和奇数信息素的途径。

[0098] 图5显示了从W303A和BY4742ΔPOX1产生Z11-十六碳烯醇。表达空载体(EV)的菌株,海灰翅夜蛾(S.littoralis)还原酶(FAR-SL),棉铃虫(H.amigera)还原酶(FAR-HA),黄地老虎(A.segetum)还原酶(FAR-AS)。误差条表示从N=2个生物独立样品中得出的标准偏

差。

[0099] 图6A-图6B显示了使用表达空载体的酿酒酵母(图6A)或棉铃虫(Helicoverpa armigera)醇形成还原酶(图6B)所得的Z11-十六碳烯酸的生物转化产物的样品色谱图。黑线:没有添加底物。紫色线:添加Z11-十六碳烯酸作为底物。

[0100] 图7A-图7B显示了Z11-十六碳烯醇可信化合物(图7A)和生物衍生的Z11-十六碳烯醇(图7B)的GC-MS碎片化图的比较。

[0101] 图8显示了针对W303A(野生型)和BY4742ΔPOX1(β-氧化缺失突变体)的产物分析的在收获时的生物量。表达空载体(EV)的菌株,海灰翅夜蛾(S.littoralis)还原酶(FAR-SL),棉铃虫(H.amigera)还原酶(FAR-HA),黄地老虎(A.segetum)还原酶(FAR-AS)。误差条表示从N=2个生物独立样品中得出的标准偏差。

[0102] 图9显示了使用可信标准品构建的Z11-十六碳烯醇校准曲线。使用实施例3的材料和方法中所述的萃取和分析方法生成样品。误差条表示从N=3个样品中得出的标准偏差。

[0103] 图10显示了包含延伸的OLE1启动子序列(浅黄色)、OLE1启动子(橙色)、OLE1前导序列(深灰色)、合成子如昆虫去饱和酶序列(浅灰色)和VSP13终止子序列(蓝色)的pOLE1盒。

[0104] 图11A-图11E显示了pOLE1盒的验证和补足测定。图11A:YPD+棕榈油酸;图11B:YPD-棕榈油酸;图11C:CM-Ura葡萄糖+棕榈油酸;图11D:CM-Ura葡萄糖-棕榈油酸;图11E:图11A-图11D中的菌株的图。Dasher=GFP合成子。

[0105] 图12A显示了在YPD上没有UFA的情况下ΔOLE1生长的补足。

[0106] 图12B显示了在CM-Ura葡萄糖上没有UFA的情况下ΔOLE1生长的补足。

[0107] 图13A显示了表达以下项的ΔOLE1菌株的完整脂肪酸谱:酿酒酵母OLE1去饱和酶(蓝色)、嵌合型粉纹夜蛾(T.ni)去饱和酶(红色)。

[0108] 图13B显示了表达酿酒酵母OLE1去饱和酶(红色)和嵌合型粉纹夜蛾去饱和酶(蓝色)的酿酒酵母ΔOLE1菌株在5.5分钟-8分钟保留时间内的聚焦脂肪酸谱。

[0109] 图14A-图14B显示了来自可信化合物的(图14A)和生物衍生的(图14B)的(Z)-11-十六碳烯酸的GC-MS碎片化图的比较。

[0110] 图15显示了在补充有棕榈酸和棕榈油酸的培养基中从表达各种脂肪醇途径变体的ΔOLE1产生C16脂肪醇。误差条表示代谢物量化准确度的5%不确定度。

[0111] 图16显示了当添加棕榈酸时(黑色)和当添加棕榈酸和棕榈油酸时(橙色),使用表达脂肪醇途径TN_desat-HA_reduc的酿酒酵母所得的生物转化产物C16脂肪酸的代表性色谱图。添加棕榈酸的阴性对照菌株(含有空载体)的曲线(紫色)。

[0112] 图17显示了在表达脂肪醇途径TN_desat-SL_reduc(蓝色)、SC_desat-HA_reduc(红色)、TN_desat-HA_reduc(绿色)、SC_desat-SL_reduc(粉红色)的酿酒酵母细胞沉淀中检测到(Z)-11-十六碳烯酸。

[0113] 图18显示了在仅补充有棕榈酸的培养物中从表达各种脂肪醇途径变体的ΔOLE1产生C16脂肪醇。误差条表示代谢物量化准确度的5%不确定度。

[0114] 图19A-图19C显示了(Z)-11-十六碳烯醇的检测。图19A:可信标准品的碎片化图。m/z 297.3用于后续实验以选择性地检测该醇。为了还检测内部标准,也包括了质量208和387.3。图19B:除了特定质量片段的检测外,保留时间被用作第二级确认。保留时间是6.22。

图19C:在SIM模式(297.3)用相同的方法检测时两种不同区域异构体9Z-和11Z-十六碳烯醇的比较。

[0115] 图20显示了pXICL表达盒架构。还显示了白假丝酵母OLE1前导序列-黄地老虎(A.segetum)去饱和酶融合物。

[0116] 图21A-图21D显示了mCherry对照整合。图21A:阴性(仅水)对照转化板。图21B:pPV0137 mCherry转化板。图21C:来自阴性对照克隆的斑块板。图21D:来自pPV0137克隆的斑块板。

[0117] 图22显示了作为总观察菌落的函数的整合效率。观察到没有DNA添加到转化的对照板具有350个菌落(由橙色线指示)。确认为阳性整合体的克隆分数与总菌落数呈正相关。在超过6,000个总菌落观察到急剧增加。该数据表明了阳性整合体的存在增加了观察到的背景增长。对于一些转化,该效率足够高,以至于相对于阳性整合群体,背景群体较小。

[0118] 图23显示了热带假丝酵母SPV053菌株的色谱图叠加。与mCherry(红色)对照实验相比,在6.22min时可观察到脐橙螟蛾(A.transitella)(蓝色)和玉米穗蛾(H.zea)(绿色)去饱和酶的清晰峰。因此,仅在表达活性Z11-去饱和酶的菌株中才可观察到Z-11-十六碳烯酸的形成。

[0119] 图24A-图24E显示了11Z-区域异构体的确认。图24A:仅在表达来自脐橙螟蛾(A.transitella)或玉米穗蛾(H.zea)的Z11-去饱和酶的热带假丝酵母(C.tropicalis)SPV053中观察到具有245m/z的离子片段的特异性峰。图24B:可信标准品的碎片化图。图24D:在表达来自玉米穗蛾的去饱和酶的样品中新形成的化合物的碎片化图匹配标准品的碎片化图。图24E:在表达来自脐橙螟蛾的去饱和酶的样品中新形成的化合物的碎片化图匹配标准品的碎片化图。图24C:mCherry对照的碎片化图与图24B、图24D和图24E的碎片化图显著不同。

[0120] 图25A-图25B显示了与十四烷酸甲酯孵育的不同热带假丝酵母SPV053菌株的GC-FID色谱图。图25A:总体谱。对于表达来自脐橙螟蛾和玉米穗蛾的Z11-去饱和酶的菌株,可观察到Z11-C16:1峰的出现。图25B:C14到C18区域的放大。在4.8min可见新的峰,其可能对应于Z11-C14:1。在Z9-C18:1附近的另一个峰也是可见的,其可能对应于Z11-C18:1。

[0121] 图26显示了在SPV140筛选中仅经密码子优化的玉米穗蛾去饱和酶变体产生可检测到的Z11-十六碳烯酸。对照=SPV140的pPV101整合体,天然粉纹夜蛾=具有天然密码子使用的粉纹夜蛾Z11去饱和酶(pPV195),粉纹夜蛾HS opt=具有智人密码子优化的粉纹夜蛾Z11去饱和酶(pPV196),粉纹夜蛾HS opt Y1前导序列=具有智人密码子优化和经交换的解脂耶氏酵母OLE1前导序列的粉纹夜蛾Z11去饱和酶(pPV197),天然玉米穗蛾=具有天然密码子使用的玉米穗蛾Z11去饱和酶(pPV198),玉米穗蛾HS opt=具有智人密码子优化的玉米穗蛾Z11去饱和酶(pPV199),玉米穗蛾HS opt Y1前导序列=具有智人密码子优化和经交换的解脂耶氏酵母OLE1前导序列的玉米穗蛾Z11去饱和酶(pPV200),天然脐橙螟蛾=具有天然密码子使用的脐橙螟蛾Z11去饱和酶(pPV201)。3个生物学重复的所有数据平均值。误差条代表标准偏差。

[0122] 图27显示了在SPV300筛选中仅经密码子优化的玉米穗蛾去饱和酶变体产生可检测到的Z11-十六碳烯酸。标记指示亲本菌株和去饱和酶表达盒的质粒。pPV101=hrGFP对照,pPV198=具有天然密码子使用的玉米穗蛾Z11去饱和酶,pPV199=具有智人密码子优化

的玉米穗蛾Z11去饱和酶,pPV200＝具有智人密码子优化和经交换的解脂耶氏酵母OLE1前导序列的玉米穗蛾Z11去饱和酶,pPV201＝具有天然密码子使用的脐橙螟蛾Z11去饱和酶。

[0123] 图28显示了在SPV140和SPV300背景下去饱和酶筛选的最终细胞密度。具有整合去饱和酶盒的SPV300菌株生长至更高的细胞密度。

[0124] 图29显示了表达具有智人密码子优化的玉米穗蛾Z11去饱和酶的SPV140和SPV300菌株的单独分离株Z11-十六碳烯酸滴度。

[0125] 图30显示了维斯假丝酵母(Candida viswanathii)(热带假丝酵母)的产生Z11-16OH的菌株(SPV0490)与对照菌株(SPV0488)的萃取代谢物的色谱图叠加。

[0126] 图31示出了如下的途径,其可缺失或破坏以减少或消除与产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的生物合成途径的竞争。

[0127] 图32A-图32B显示了对于pEXP克隆,在YPD(图32A)和半限定C:N＝80(图32B)培养基中的Z9-16OH和Z11-16OH滴度。将来自两种独立感受态细胞制备物(感受态细胞制备物1、感受态细胞制备物2)的在TEF启动子下表达玉米穗蛾去饱和酶以及在EXP启动子下表达棉铃虫还原酶的十个分离株与亲本阴性对照(SPV300)和仅去饱和酶的阴性对照(仅SPV459Hz_desat)进行比较。误差条表示从每种菌株和条件(N＝2)的技术重复测量的SEM(均值的标准误差)。*在半限定C:N＝80条件下来自克隆5和克隆18的一个重复在样品检查(work-up)期间损失,因此该条件的滴度是来自单个数据点(N＝1,感受态细胞制备物1克隆18和感受态细胞制备物2克隆5)。

[0128] 图33A-图33B显示了对于pEXP1克隆,在YPD(图33A)和半定义C:N＝80(图33B)培养基中的16-碳脂肪酸种类谱。将在TEF启动子下表达玉米穗蛾去饱和酶以及在EXP启动子下表达棉铃虫还原酶的5个选择克隆的16-碳脂质谱与亲本阴性对照(SPV300)和仅去饱和酶的阴性对照(仅SPV459Hz_desat)进行比较。误差条表示从每种菌株和条件(N＝2)的技术重复测量的SEM(均值的标准误差)。

[0129] 图34显示了对于pTAL1克隆,半限定C:N＝80培养基中的Z9-16OH和Z11-16OH滴度。将在TEF启动子下表达玉米穗蛾去饱和酶以及在TAL启动子下表达棉铃虫还原酶的九个分离株与亲本阴性对照(SPV300)和使用EXP启动子驱动棉铃虫FAR表达的阳性Bdr途径对照(SPV575、SPV578)进行比较。误差条表示从每种菌株和条件(N＝2)的技术重复测量的SEM(均值的标准误差)。

[0130] 图35显示了对于pTAL1克隆,半限定C:N＝80培养基中的16-碳脂肪酸种类谱。将在TEF启动子下表达玉米穗蛾去饱和酶以及在EXP启动子下表达棉铃虫还原酶的5个选择克隆的16-碳脂质谱与亲本阴性对照(SPV300)和使用EXP启动子驱动棉铃虫FAR表达的阳性Bdr途径对照(SPV575、SPV578)进行比较。误差条表示从每种菌株和条件(N＝2)的技术重复测量的SEM(均值的标准误差)。*指示在样品处理期间其中一个重复损失的克隆,N＝1。

[0131] 图36显示了在48小时的生物转化后,在半限定C:N＝80培养基中完整Bdr途径pTAL1筛选(表达玉米穗蛾Z11去饱和酶(pTEF)和棉铃虫FAR的菌株)全脂质谱。误差条表示从每种菌株和条件(N＝2)的技术重复测量的SEM(均值的标准误差)。*指示在样品处理期间其中一个重复损失的克隆,N＝1。

[0132] 图37A-图37B显示了在24小时的生物转化后,在半限定C:N＝80培养基中SPV471(表达天然解脂耶氏酵母OLE1和棉铃虫FAR的H222ΔPΔAΔF)Z9-16OH(图37A)和脂肪酸(图

37B)滴度。误差条表示从每种菌株和条件(N=2)的技术重复测量的SEM(均值的标准误差)。

[0133] 图38显示了在24小时的生物转化后,在半限定C:N=80培养基中SPV471(表达天然解脂耶氏酵母OLE1和棉铃虫FAR的H222ΔPΔAΔF)全脂质谱。

[0134] 图39A-图39B显示了SPV471(表达天然解脂耶氏酵母OLE1和棉铃虫FAR的H222ΔPΔAΔF)Z9-16OH(图39A)和Z9-16酸(图39B)滴度时间历程。使用棕榈酸甲酯(16酸)底物在半限定C:N=80培养基中进行16酸的生物转化。

[0135] 图40显示了通过由酰基-CoA氧化酶活性控制的选择性β-氧化生成的酰基-CoA中间体的实例。

[0136] 图41显示了表征的Δ11去饱和酶的Z11-14酸(肉豆蔻酸甲酯进料-14ME)和Z11-16酸(棕榈酸甲酯进料-16ME)滴度。SPV300=去饱和酶文库整合亲本。SPV298=SPV300的原养型亲本,阴性对照。SPV459=具有目前最佳的去饱和酶(玉米穗蛾,SEQ ID NO:54)的SPV300,阳性对照。DST006中的去饱和酶在遗传上等同于SPV459中表达的玉米穗蛾去饱和酶,且用作内部文库对照。

[0137] 图42显示了以棕榈酸甲酯(16ME)或肉豆蔻酸甲酯(14ME)进料的SPV298(阴性对照,亲本菌株)和SPV459(具有玉米穗蛾去饱和酶(SEQ ID NO:54)的SPV298谱系)的C14和C18产物谱。

[0138] 图43显示了棉铃虫(H.amigera)FAR酶(SEQ ID NO:41)的潜在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点的生物信息学分析。水平线类似于潜在的磷酸化的阈值。

[0139] 图44显示了一旦在酵母中表达,棉铃虫衍生的FAR酶的潜在丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点的生物信息学分析。所用的服务器(world wide web address:cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast/;Blom,N.,Gammeltoft,S.&Brunak,S.Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites1.J.Mol.Biol.294,1351-1362(1999))预测具体在酵母中的磷酸化的氨基酸。水平线类似于可能的磷酸化位点的阈值。

[0140] 图45显示了一旦在解脂耶氏酵母SPV603中表达,HaFAR突变体文库的Z9/Z11-16OH滴度的分析。*指示除亲本菌株的现有拷贝外还包含第二个HaFAR酶拷贝。

[0141] 图46显示了一旦在解脂耶氏酵母SPV603中表达,HaFAR突变体文库的Z9/Z11-16酸滴度的分析。*表示除亲本菌株中现有的拷贝外还包含第二个HaFAR酶拷贝。

[0142] 图47显示了表达HaFAR和衍生的突变体的选择的菌株的脂肪醇滴度的分析。加入10g/L棕榈酸甲酯后,在摇瓶中培养菌株72小时。*表示除亲本菌株中现有的拷贝外还包含第二个HaFAR酶拷贝。该分析基于技术性的一式四份。

[0143] 图48显示了表达HaFAR和衍生突变体的选择的菌株的脂肪酸滴度的分析。加入10g/L棕榈酸甲酯后,在摇瓶中培养菌株72小时。*表示除亲本菌株中现有的拷贝外还包含第二个HaFAR酶拷贝。该分析基于技术性的一式四份。

[0144] 图49显示了表达HaFAR和衍生突变体的选择的菌株的脂肪醇滴度的分析。加入10g/L棕榈酸甲酯后,在摇瓶中培养菌株20小时。该分析基于技术性的一式四份。

[0145] 图50显示了在摇瓶中的时程实验中选择的菌株的脂肪醇滴度的分析。将一个拷贝的酶HaFAR或HaS195A引入到菌株SPV1053(Δdga1ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP)和SPV1054(Δdga2ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-

tXPR2_loxP)中。在摇瓶中以生物学一式三份进行培养。加入10g/L棕榈酸甲酯后,在摇瓶中培养菌株72小时。

[0146] 图51显示了在摇瓶中的时程实验中选择的菌株的脂肪酸滴度的分析。将一个拷贝的酶HaFAR或HaS195A引入到菌株SPV1053(Δdga1ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP)和SPV1054(Δdga2ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP)中。在摇瓶中以生物学一式三份进行培养。加入10g/L棕榈酸甲酯后,在摇瓶中培养菌株72小时。

[0147] 图52显示了在24孔板的FAR文库筛选中新菌株的脂肪醇滴度的分析。将一个拷贝的来自表24的每种各个FAR酶引入到菌株SPV1054(Δdga2ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP)中。在24孔板中以生物学一式四份进行培养。加入10g/L棕榈酸甲酯后,培养菌株96小时。

[0148] 图53显示了在24孔板的FAR文库筛选中新菌株的脂肪酸滴度的分析。将单一拷贝的来自表24的每种各个FAR酶引入到菌株SPV1054(Δdga2ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP)中。在24孔板中以生物学一式四份进行培养。加入10g/L棕榈酸甲酯后,培养菌株96小时。

[0149] 图54显示了一种生物合成途径,其能够使用十四烷基-ACP(14:ACP)投入,以在本公开的重组微生物中产生E-和Z-十四碳烯基乙酸酯(E11-14:OAc和Z11-14:OAC)信息素的混合物。

[0150] 序列

[0151] SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:105的序列表是本申请的部分,并且通过引用并入本文。在本文末尾提供了序列表,并且以计算机可读的格式单独地提供了序列表。

[0152] 发明详述

[0153] 定义

[0154] 以下定义和缩写用于解释本公开文本。

[0155] 当在本文和附带的权利要求中使用时,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述/该(the)”包括复数指代物,除非上下文明确地指示其他的情况。因此,例如提及“信息素”包括多种这类信息素,并且提及“微生物”包括提及一种或多种微生物等。

[0156] 如本文所用,术语“包含(comprises/comprising)”、“包括(includes/including)”、“具有(has/having)”、“含有(contains/containing)”或其任何其他变化形式旨在涵盖非排他性的包括。包含一系列要素的组合物、混合物、工艺、方法、物品或设备不必仅限于那些要素,而可以包括其他未明确列出或此类组合物、混合物、工艺、方法、物品或设备所固有的要素。另外,除非明确相反地陈述,否则“或”是指包括性的“或”而不是排他性的“或”。

[0157] 本文用于修改数值的术语“约”和“左右”指示围绕该明确值的近范围。如果“X”是所述值,则“约X”或“X左右”将指示0.9X至1.1X的值,或在一些实施方案中,0.95X至1.05X的值。对“约X”或“X左右”的任何提及确切地说指示至少X、0.95X、0.96X、0.97X、0.98X、0.99X、1.01X、1.02X、1.03X、1.04X和1.05X。因此,“约X”和“X左右”旨在传授和提供对例如“0.98X”的权利要求限制的书面描述支持。

[0158] 如本文所用,术语“微生物的”、“微生物有机体”和“微生物”包括作为包括在古细

菌、细菌或真核生物的结构域内的微观细胞存在的任何生物体,后者包括酵母和丝状真菌、原生动物、藻类或更高级的原生生物。因此,该术语旨在涵盖原核或真核细胞或具有微观尺寸的生物体,并且包括所有物种的细菌、古细菌和真细菌以及真核微生物如酵母和真菌。还包括可以培养用于生产化学品的任何物种的细胞培养物。

[0159] 如本文所述,在一些实施方案中,该重组微生物是原核微生物。在一些实施方案中,该原核微生物是细菌。“细菌”或“真核生物”是指原核生物的结构域。细菌包括至少十一个不同的组,如下:(1)革兰氏阳性(gram+)细菌,其中有两个主要细分:(1)高G+C组(放线菌属(Actinomycetes)、分枝杆菌属(Mycobacteria)、微球菌属(Micrococcus)等)2)低G+C组(芽孢杆菌属(Bacillus)、梭菌属(Clostridia)、乳杆菌属(Lactobacillus)、葡萄球菌属(Staphylococci)、链球菌属(Streptococci)、支原体属(Mycoplasmas));(2)变形菌门(Proteobacteria),例如紫色光合+非光合革兰氏阴性细菌(包括大多数“常见”革兰氏阴性细菌);(3)蓝细菌(Cyanobacteria),例如产氧光养生物;(4)螺旋体和相关物种;(5)浮霉状菌属(Planctomyces);(6)拟杆菌属(Bacteroides),黄杆菌(Flavobacteria);(7)衣原体(Chlamydia);(8)绿色硫细菌;(9)绿色非硫细菌(也为厌氧光养生物);(10)抗辐射微球菌和亲缘菌;(11)热袍菌属(Thermotoga)和嗜热栖热腔菌(Thermosipho thermophiles)。

[0160] “革兰氏阴性细菌”包括球菌、非肠道杆菌和肠杆菌。革兰氏阴性菌属包括例如奈瑟氏菌(Neisseria)、螺菌属(Spirillum)、巴斯德菌属(Pasteurella)、布鲁菌属(Brucella)、耶尔森菌属(Yersinia)、弗朗西斯氏菌属(Francisella)、嗜血杆菌属(Haemophilus)、博德特氏菌属(Bordetella)、埃希氏杆菌属(Escherichia)、沙门氏菌属(Salmonella)、志贺氏菌属(Shigella)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、变形杆菌属(Proteus)、弧菌属(Vibrio)、假单胞菌属(Pseudomonas)、拟杆菌属(Bacteroides)、醋杆菌属(Acetobacter)、气杆菌属(Aerobacter)、土壤杆菌属(Agrobacterium)、固氮菌属(Azotobacter)、螺旋状菌属(Spirilla)、沙雷氏菌属(Serratia)、弧菌属(Vibrio)、根瘤菌属(Rhizobium)、衣原体属(Chlamydia)、立克次体属(Rickettsia)、密螺旋体属(Treponema)、和梭杆菌属(Fusobacterium)。

[0161] “革兰氏阳性细菌”包括球菌、非孢子杆菌和孢子杆菌。革兰氏阳性细菌的属包括例如放线菌属(Actinomyces)、芽孢杆菌属(Bacillus)、梭菌属(Clostridium)、棒状杆菌属(Corynebacterium)、丹毒丝菌属(Erysipelothrix)、乳杆菌属(Lactobacillus)、李斯特菌属(Listeria)、分枝杆菌属(Mycobacterium)、粘球菌属(Myxococcus)、诺卡氏菌属(Nocardia)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)和链霉菌属(Streptomyces)。

[0162] 术语“重组微生物”和“重组宿主细胞”在本文中可互换使用,并且指已经被遗传修饰以在整合构建体中表达或过表达内源酶,表达异源酶(如包括在载体中的那些),或其内源基因的表达发生改变的微生物。通过“改变”意指基因的表达、或编码一种或多种多肽或多肽亚基的RNA分子或等同RNA分子的水平、或一种或多种多肽或多肽亚基的活性被上调或下调,使得表达、水平或活性大于或小于没有所述改变时观察到的。例如,术语“改变”可以意指“抑制”,但是单词“改变”的使用不限于这个定义。应理解的是,术语“重组微生物”和“重组宿主细胞”不仅指特定的重组微生物,而且指这样的微生物的后代或潜在后代。因为某些变化可在后代中由于突变或环境影响而发生,这种子代可能在事实上与亲代细胞不

同,但是仍然包括在如在此使用的术语范围内。

[0163] 就基因序列而言,术语“表达”指该基因的转录,并且视情况而定,指所得mRNA转录物翻译成蛋白质。因此,从上下文可以清楚地看出,蛋白质的表达是由开放阅读框序列的转录和翻译引起的。宿主细胞中所希望产物的表达水平可以基于存在于细胞中的相应mRNA的量或由所选序列编码的希望产物的量来确定。例如,可以通过qRT-PCR或Northern杂交量化从选定序列转录的mRNA(参见Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))。由选定序列编码的蛋白质可通过各种方法量化,例如通过ELISA,通过测定该蛋白质的生物学活性,或通过采用独立于此类活性的测定(如蛋白质印迹法或放射免疫测定),使用识别并结合该蛋白质的抗体。参见Sambrook et al.,1989,同上。

[0164] 术语“多核苷酸”与术语“核酸”在本文中可互换使用,并且是指由两种或更多种单体(包括核苷酸、核苷或其类似物)组成的有机聚合物,包括但不限于任何长度的单链或双链的有义或反义脱氧核糖核酸(DNA),以及适当时任何长度的单链或双链的有义或反义核糖核酸(RNA),包括siRNA。术语“核苷酸”是指由连接到嘌呤或嘧啶碱基和磷酸基团的核糖或脱氧核糖组成并且是核酸的基本结构单元的几种化合物中的任何一种。术语“核苷”是指由与脱氧核糖或核糖组合的嘌呤或嘧啶碱基组成并且尤其发现于核酸中的化合物(如鸟苷或腺苷)。术语“核苷酸类似物”或“核苷类似物”分别指核苷酸或核苷,其中一个或多个单独的原子已被不同的原子或不同的官能团替代。因此,术语多核苷酸包括任何长度的核酸、DNA、RNA、其类似物和片段。三个或更多个核苷酸的多核苷酸也称为核苷酸寡聚物或寡核苷酸。

[0165] 应理解,本文所述的多核苷酸包括“基因”并且本文所述的核酸分子包括“载体”或“质粒”。因此,术语“基因”,也称为“结构基因”,指编码特定氨基酸序列的多核苷酸,其包含一种或多种蛋白质或酶的全部或部分,并且可包括调节(非转录)DNA序列,如启动子序列,其确定例如该基因表达的条件。该基因的转录区可能包括非翻译区,包括内含子、5’非翻译区(UTR)和3’-UTR,以及编码序列。

[0166] 如本文所用,术语“酶”是指催化或促进一种或多种化学或生物化学反应的任何物质,其通常包括完全或部分由一种或多种多肽组成的酶,但可包括由不同的分子(包括多核苷酸)组成的酶。

[0167] 如本文所用,术语“非天然存在的”在提及本公开文本的微生物生物体或酶活性时旨在意指该微生物生物体或酶具有通常不存在于参考物种的天然存在的菌株(包括参考物种的野生型菌株)中的至少一个改变。遗传改变包括例如引入编码代谢多肽的可表达核酸的修饰、其他核酸添加、核酸缺失和/或微生物遗传物质的其他功能性破坏。这样的修饰包括例如所提及物种的异源、同源或者异源多肽和同源多肽的编码区及其功能片段。额外的修饰包括例如非编码调控区,其中修饰改变基因或操纵子的表达。示例性的非天然存在的微生物或酶活性包括上述的羟基化活性。

[0168] 如本文关于各种分子(例如多核苷酸、多肽、酶等)所用的术语“外源”是指通常不存在或天然不存在于给定的酵母、细菌、生物体、微生物或自然状态的细胞中和/或非由其产生的分子。

[0169] 在另一方面,如本文关于各种分子(例如多核苷酸、多肽、酶等)所用的术语“内源”

或“天然”是指通常或天然存在于给定的酵母、细菌、生物体、微生物或自然状态的细胞中和/或由其产生的分子。

[0170] 如本文所用,术语“内源或外源来源的饱和C6-C24脂肪酸”是指起源于微生物内(诸如当在该微生物内部产生或合成饱和C6-C24脂肪酸时)的饱和C6-C24脂肪酸的来源(内源的)或起源于微生物的外部(诸如当在摇瓶或其他容器的培养基中培养(culturing)或培养(cultivating)微生物的过程期间,向该微生物提供饱和C6-C24脂肪酸时)的饱和C6-C24脂肪酸的来源(外源的)。

[0171] 如本文所用,在经修饰的宿主细胞的背景下,术语“异源”是指如下的各种分子(例如多核苷酸、多肽、酶等),其中以下至少一项是真的:(a)该一种或多种分子对于宿主细胞来说是外来的(“外源”)(即,不是天然存在的);(b)该一种或多种分子对于给定的宿主微生物或宿主细胞来说是天然存在的(例如,“内源”),但在细胞中在非天然位置或以非天然量产生;和/或(c)该一种或多种分子在核苷酸或氨基酸序列上不同于内源核苷酸或氨基酸序列,使得在核苷酸或氨基酸序列上不同于以内源方式发现的内源核苷酸或氨基酸的分子在细胞中以非天然(例如,大于天然发现的)量产生。

[0172] 如本文所用,术语“同源序列”“同源物(homolog或homologs)”或“直系同源物”是指功能上与参考序列有关的相关序列(核酸或氨基酸)。可以以许多种方式之一来指示功能关系,所述方式包括但不限于:(a)序列同一性程度,和/或(b)相同或相似的生物学功能。在本公开中术语“同源物”的使用是指其中指示了(a)和(b)两者的情况。序列同一性程度可变化,但在一个实施方案中,当使用本领域中已知的标准序列比对程序(例如,使用默认参数的Clustal Omega比对)时,该序列同一性程度为至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、50%或50%序列同一性。可以使用本领域中容易获得的软件程序来确定同源性,诸如Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等,eds.,1987)附件30,第7.718节,表7.71中所讨论的。一些比对程序是MacVector(Oxford Molecular Ltd,Oxford,U.K.)和ALIGN Plus(Scientific and Educational Software,Pennsylvania)。其他非限制性比对程序包括Sequencher(Gene Codes,Ann Arbor,Michigan)、AlignX和Vector NTI(Invitrogen,Carlsbad,CA)。因此,在本公开中对同源物的提及将会被理解为提及如上述的具有相同或相似生物学功能和高程度序列同一性的相关序列。

[0173] 如本文所用,术语“脂肪酸”是指具有结构R-COOH的化合物,其中R是C6-C24饱和、不饱和、直链、支链或环状烃并且羧基在1位。在一个具体的实施方案中,R是C6-C24饱和或不饱和直链烃并且羧基在1位。

[0174] 如本文所用,术语“脂肪醇”是指具有式R-OH的脂族醇,其中R是C_6-C_{24}饱和、不饱和、直链、支链或环状烃。在一个具体的实施方案中,R是C_6-C_{24}饱和或不饱和直链烃。

[0175] 术语“脂肪酰基-CoA”指具有结构R-(CO)-S-R_1的化合物,其中R_1是辅酶A,并且术语“脂肪酰基-ACP”指具有结构R-(CO)-S-R_1的化合物,其中R_1是酰基载体蛋白ACP。

[0176] 术语“短链(short chain或short-chain)”是指碳链长度短于或等于C18的脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯,其包括信息素、香料、调味剂和聚合物中间体。

[0177] 介绍

[0178] 本公开文本涉及对用于从低成本原料有效生产有价值产品的新技术的需求。确切地说,本发明人已通过开发能够从低成本原料产生宽范围的不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯(包括合成昆虫信息素、香料、调味剂和聚合物中间体)的重组微生物解决了这个需要。因此,本公开文本的方面是基于发明人的发现,即可以将重组微生物工程化以便从低成本原料生产有价值的产品,其规避了用以生产有价值产品的常规合成方法。

[0179] 如上所述,重组微生物可以被工程化以合成单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。如本文所述合成的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇可以进一步转化为相应的醛或乙酸酯。因此,本公开文本的各个实施方案可用于合成选自脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯的多种昆虫信息素。此外,本文所述的实施方案也可以用于香料、调味剂和聚合物中间体的合成。

[0180] 微生物宿主的工程化需要表达非天然信息素生物合成途径,该生物合成途径由以下组成,但不限于以下:一种或多种脂肪酰基去饱和酶,以及形成脂肪醇或形成脂肪醛的还原酶。通过去饱和反应产生的脂肪酸可以以三酰基甘油酯的形式储存在细胞内,或通过还原酶酶促还原形成脂肪醇或脂肪醛。含有不饱和脂肪酸的三酰基甘油酯可以被萃取、酯化和化学还原以产生不饱和脂肪醇。经由所述途径产生的脂肪醇可以分别经由随后的化学氧化和酯化方法被进一步转化为脂肪醛信息素和脂肪乙酸酯信息素。化学氧化和酯化的方法是本领域已知的。经由所述信息素生物合成途径产生的脂肪醇也可以分别使用酶促转化诸如醇脱氢酶和乙酰基转移酶被进一步转化为脂肪醛信息素和脂肪乙酸酯信息素。类似地,在信息素生物合成途径中作为中间体形成的脂肪酰基-CoA或脂肪酰基-ACP可以通过天然或异源衍生的硫酯酶以游离脂肪酸的形式被释放,从而成为用于使用复分解合成信息素的底物。

[0181] 信息素

[0182] 如上所述,本公开文本的实施方案提供了使用重组微生物合成一种或多种昆虫信息素。信息素是挥发性化学化合物,由特定昆虫分泌,功能是在该物种内进行化学通讯。也就是说,信息素是分泌或排泄的化学因子,其触发相同物种的成员中的社会反应。尤其存在包括影响行为或生理学的报警信息素、食物踪迹信息素、性信息素、聚集信息素、疏散信息素、释放信息素、引物信息素和领土信息素。

[0183] 可以使用本文公开的重组微生物和方法合成的昆虫信息素的非限制性例子包括表1中列出的直链醇、醛和乙酸酯。

[0184] 表1.C_6-C_{20}直链信息素

[0185]

名称	名称
(E)-2-癸烯-1-醇	(E,E)-10,12-十四碳二烯-1-醇
(E)-2-癸烯基乙酸酯	(E,E)-10,12-十四碳二烯基乙酸酯
(E)-2-癸烯醛	(E,E)-10,12-十四碳二烯醛
(Z)-2-癸烯-1-醇	(E,Z)-10,12-十四碳二烯基乙酸酯
(Z)-2-癸烯基乙酸酯	(Z,E)-10,12-十四碳二烯基乙酸酯
(Z)-2-癸烯醛	(Z,Z)-10,12-十四碳二烯-1-醇
(E)-3-癸烯-1-醇	(Z,Z)-10,12-十四碳二烯基乙酸酯
(Z)-3-癸烯基乙酸酯	(E,Z,Z)-3,8,11-十四碳三烯基乙酸酯
(Z)-3-癸烯-1-醇	(E)-8-十五碳烯-1-醇
(Z)-4-癸烯-1-醇	(E)-8-十五碳烯基乙酸酯
(E)-4-癸烯基乙酸酯	(Z)-8-十五碳烯-1-醇
(Z)-4-癸烯基乙酸酯	(Z)-8-十五碳烯基乙酸酯
(Z)-4-癸烯醛	(Z)-9-十五碳烯基乙酸酯
(E)-5-癸烯-1-醇	(E)-9-十五碳烯基乙酸酯
(E)-5-癸烯基乙酸酯	(Z)-10-十五碳烯基乙酸酯
(Z)-5-癸烯-1-醇	(Z)-10-十五碳烯醛
(Z)-5-癸烯基乙酸酯	(E)-12-十五碳烯基乙酸酯
(Z)-5-癸烯醛	(Z)-12-十五碳烯基乙酸酯
(E)-7-癸烯基乙酸酯	(Z,Z)-6,9-十五碳二烯-1-醇
(Z)-7-癸烯基乙酸酯	(Z,Z)-6,9-十五碳二烯基乙酸酯
(E)-8-癸烯-1-醇	(Z,Z)-6,9-十五碳二烯醛
(E,E)-2,4-癸二烯醛	(E,E)-8,10-十五碳二烯基乙酸酯
(E,Z)-2,4-癸二烯醛	(E,Z)-8,10-十五碳二烯-1-醇
(Z,Z)-2,4-癸二烯醛	(E,Z)-8,10-十五碳二烯基乙酸酯
(E,E)-3,5-癸二烯基乙酸酯	(Z,E)-8,10-十五碳二烯基乙酸酯
(Z,E)-3,5-癸二烯基乙酸酯	(Z,Z)-8,10-十五碳二烯基乙酸酯

[0186]

名称	名称
(Z,Z)-4,7-癸二烯-1-醇	(E,Z)-9,11-十五碳二烯醛
(Z,Z)-4,7-癸二烯基乙酸酯	(Z,Z)-9,11-十五碳二烯醛
(E)-2-十一碳烯基乙酸酯	(Z)-3-十六碳烯基乙酸酯
(E)-2-十一碳烯醛	(E)-5-十六碳烯-1-醇
(Z)-5-十一碳烯基乙酸酯	(E)-5-十六碳烯基乙酸酯
(Z)-7-十一碳烯基乙酸酯	(Z)-5-十六碳烯-1-醇
(Z)-8-十一碳烯基乙酸酯	(Z)-5-十六碳烯基乙酸酯
(Z)-9-十一碳烯基乙酸酯	(E)-6-十六碳烯基乙酸酯
(E)-2-十二碳烯醛	(E)-7-十六碳烯-1-醇
(Z)-3-十二碳烯-1-醇	(E)-7-十六碳烯基乙酸酯
(E)-3-十二碳烯基乙酸酯	(E)-7-十六碳烯醛
(Z)-3-十二碳烯基乙酸酯	(Z)-7-十六碳烯-1-醇
(E)-4-十二碳烯基乙酸酯	(Z)-7-十六碳烯基乙酸酯
(E)-5-十二碳烯-1-醇	(Z)-7-十六碳烯醛
(E)-5-十二碳烯基乙酸酯	(E)-8-十六碳烯基乙酸酯
(Z)-5-十二碳烯-1-醇	(E)-9-十六碳烯-1-醇
(Z)-5-十二碳烯基乙酸酯	(E)-9-十六碳烯基乙酸酯
(Z)-5-十二碳烯醛	(E)-9-十六碳烯醛
(E)-6-十二碳烯-1-醇	(Z)-9-十六碳烯-1-醇
(Z)-6-十二碳烯基乙酸酯	(Z)-9-十六碳烯基乙酸酯
(E)-6-十二碳烯醛	(Z)-9-十六碳烯醛
(E)-7-十二碳烯-1-醇	(E)-10-十六碳烯-1-醇
(E)-7-十二碳烯基乙酸酯	(E)-10-十六碳烯醛
(E)-7-十二碳烯醛	(Z)-10-十六碳烯基乙酸酯
(Z)-7-十二碳烯-1-醇	(Z)-10-十六碳烯醛
(Z)-7-十二碳烯基乙酸酯	(E)-11-十六碳烯-1-醇
(Z)-7-十二碳烯醛	(E)-11-十六碳烯基乙酸酯
(E)-8-十二碳烯-1-醇	(E)-11-十六碳烯醛
(E)-8-十二碳烯基乙酸酯	(Z)-11-十六碳烯-1-醇
(E)-8-十二碳烯醛	(Z)-11-十六碳烯基乙酸酯
(Z)-8-十二碳烯-1-醇	(Z)-11-十六碳烯醛
(Z)-8-十二碳烯基乙酸酯	(Z)-12-十六碳烯基乙酸酯

[0187]

名称	名称
(E)-9-十二碳烯-1-醇	(Z)-12-十六碳烯醛
(E)-9-十二碳烯基乙酸酯	(E)-14-十六碳烯醛
(E)-9-十二碳烯醛	(Z)-14-十六碳烯基乙酸酯
(Z)-9-十二碳烯-1-醇	(E,E)-1,3-十六碳二烯-1-醇
(Z)-9-十二碳烯基乙酸酯	(E,Z)-4,6-十六碳二烯-1-醇
(Z)-9-十二碳烯醛	(E,Z)-4,6-十六碳二烯基乙酸酯
(E)-10-十二碳烯-1-醇	(E,Z)-4,6-十六碳二烯醛
(E)-10-十二碳烯基乙酸酯	(E,Z)-6,11-十六碳二烯基乙酸酯
(E)-10-十二碳烯醛	(E,Z)-6,11-十六碳二烯醛
(Z)-10-十二碳烯-1-醇	(Z,Z)-7,10-十六碳二烯-1-醇
(Z)-10-十二碳烯基乙酸酯	(Z,Z)-7,10-十六碳二烯基乙酸酯
(E,Z)-3,5-十二碳二烯基乙酸酯	(Z,E)-7,11-十六碳二烯-1-醇
(Z,E)-3,5-十二碳二烯基乙酸酯	(Z,E)-7,11-十六碳二烯基乙酸酯
(Z,Z)-3,6-十二碳二烯-1-醇	(Z,E)-7,11-十六碳二烯醛
(E,E)-4,10-十二碳二烯基乙酸酯	(Z,Z)-7,11-十六碳二烯-1-醇
(E,E)-5,7-十二碳二烯-1-醇	(Z,Z)-7,11-十六碳二烯基乙酸酯
(E,E)-5,7-十二碳二烯基乙酸酯	(Z,Z)-7,11-十六碳二烯醛
(E,Z)-5,7-十二碳二烯-1-醇	(Z,Z)-8,10-十六碳二烯基乙酸酯
(E,Z)-5,7-十二碳二烯基乙酸酯	(E,Z)-8,11-十六碳二烯醛
(E,Z)-5,7-十二碳二烯醛	(E,E)-9,11-十六碳二烯醛
(Z,E)-5,7-十二碳二烯-1-醇	(E,Z)-9,11-十六碳二烯基乙酸酯
(Z,E)-5,7-十二碳二烯基乙酸酯	(E,Z)-9,11-十六碳二烯醛
(Z,E)-5,7-十二碳二烯醛	(Z,E)-9,11-十六碳二烯醛
(Z,Z)-5,7-十二碳二烯基乙酸酯	(Z,Z)-9,11-十六碳二烯醛
(Z,Z)-5,7-十二碳二烯醛	(E,E)-10,12-十六碳二烯-1-醇
(E,E)-7,9-十二碳二烯基乙酸酯	(E,E)-10,12-十六碳二烯基乙酸酯
(E,Z)-7,9-十二碳二烯-1-醇	(E,E)-10,12-十六碳二烯醛
(E,Z)-7,9-十二碳二烯基乙酸酯	(E,Z)-10,12-十六碳二烯-1-醇
(E,Z)-7,9-十二碳二烯醛	(E,Z)-10,12-十六碳二烯基乙酸酯
(Z,E)-7,9-十二碳二烯-1-醇	(E,Z)-10,12-十六碳二烯醛
(Z,E)-7,9-十二碳二烯基乙酸酯	(Z,E)-10,12-十六碳二烯基乙酸酯
(Z,Z)-7,9-十二碳二烯-1-醇	(Z,E)-10,12-十六碳二烯醛

[0188]

名称	名称
(Z,Z)-7,9-十二碳二烯基乙酸酯	(Z,Z)-10,12-十六碳二烯醛
(E,E)-8,10-十二碳二烯-1-醇	(E,E)-11,13-十六碳二烯-1-醇
(E,E)-8,10-十二碳二烯基乙酸酯	(E,E)-11,13-十六碳二烯基乙酸酯
(E,E)-8,10-十二碳二烯醛	(E,E)-11,13-十六碳二烯醛
(E,Z)-8,10-十二碳二烯-1-醇	(E,Z)-11,13-十六碳二烯-1-醇
(E,Z)-8,10-十二碳二烯基乙酸酯	(E,Z)-11,13-十六碳二烯基乙酸酯
(E,Z)-8,10-十二碳二烯醛	(E,Z)-11,13-十六碳二烯醛
(Z,E)-8,10-十二碳二烯-1-醇	(Z,E)-11,13-十六碳二烯-1-醇
(Z,E)-8,10-十二碳二烯基乙酸酯	(Z,E)-11,13-十六碳二烯基乙酸酯
(Z,E)-8,10-十二碳二烯醛	(Z,E)-11,13-十六碳二烯醛
(Z,Z)-8,10-十二碳二烯-1-醇	(Z,Z)-11,13-十六碳二烯-1-醇
(Z,Z)-8,10-十二碳二烯基乙酸酯	(Z,Z)-11,13-十六碳二烯基乙酸酯
(Z,E,E)-3,6,8-十二碳三烯-1-醇	(Z,Z)-11,13-十六碳二烯醛
(Z,Z,E)-3,6,8-十二碳三烯-1-醇	(E,E)-10,14-十六碳二烯醛
(E)-2-十三碳烯基乙酸酯	(Z,E)-11,14-十六碳二烯基乙酸酯
(Z)-2-十三碳烯基乙酸酯	(E,E,Z)-4,6,10-十六碳三烯-1-醇
(E)-3-十三碳烯基乙酸酯	(E,E,Z)-4,6,10-十六碳三烯基乙酸酯
(E)-4-十三碳烯基乙酸酯	(E,Z,Z)-4,6,10-十六碳三烯-1-醇
(Z)-4-十三碳烯基乙酸酯	(E,Z,Z)-4,6,10-十六碳三烯基乙酸酯
(Z)-4-十三碳烯醛	(E,E,Z)-4,6,11-十六碳三烯基乙酸酯
(E)-6-十三碳烯基乙酸酯	(E,E,Z)-4,6,11-十六碳三烯醛
(Z)-7-十三碳烯基乙酸酯	(Z,Z,E)-7,11,13-十六碳三烯醛
(E)-8-十三碳烯基乙酸酯	(E,E,E)-10,12,14-十六碳三烯基乙酸酯
(Z)-8-十三碳烯基乙酸酯	(E,E,E)-10,12,14-十六碳三烯醛
(E)-9-十三碳烯基乙酸酯	(E,E,Z)-10,12,14-十六碳三烯基乙酸酯
(Z)-9-十三碳烯基乙酸酯	(E,E,Z)-10,12,14-十六碳三烯醛
(Z)-10-十三碳烯基乙酸酯	(E,E,Z,Z)-4,6,11,13-十六碳四烯醛
(E)-11-十三碳烯基乙酸酯	(E)-2-十七碳烯醛
(Z)-11-十三碳烯基乙酸酯	(Z)-2-十七碳烯醛
(E,Z)-4,7-十三碳二烯基乙酸酯	(E)-8-十七碳烯-1-醇
(Z,Z)-4,7-十三碳二烯-1-醇	(E)-8-十七碳烯基乙酸酯
(Z,Z)-4,7-十三碳二烯基乙酸酯	(Z)-8-十七碳烯-1-醇

[0189]

名称	名称
(E,Z)-5,9-十三碳二烯基乙酸酯	(Z)-9-十七碳烯醛
(Z,E)-5,9-十三碳二烯基乙酸酯	(E)-10-十七碳烯基乙酸酯
(Z,Z)-5,9-十三碳二烯基乙酸酯	(Z)-11-十七碳烯-1-醇
(Z,Z)-7,11-十三碳二烯基乙酸酯	(Z)-11-十七碳烯基乙酸酯
(E,Z,Z)-4,7,10-十三碳三烯基乙酸酯	(E,E)-4,8-十七碳二烯基乙酸酯
(E)-3-十四碳烯-1-醇	(Z,Z)-8,10-十七碳二烯-1-醇
(E)-3-十四碳烯基乙酸酯	(Z,Z)-8,11-十七碳二烯基乙酸酯
(Z)-3-十四碳烯-1-醇	(E)-2-十八碳烯基乙酸酯
(Z)-3-十四碳烯基乙酸酯	(E)-2-十八碳烯醛
(E)-5-十四碳烯-1-醇	(Z)-2-十八碳烯基乙酸酯
(E)-5-十四碳烯基乙酸酯	(Z)-2-十八碳烯醛
(E)-5-十四碳烯醛	(E)-9-十八碳烯-1-醇
(Z)-5-十四碳烯-1-醇	(E)-9-十八碳烯基乙酸酯
(Z)-5-十四碳烯基乙酸酯	(E)-9-十八碳烯醛
(Z)-5-十四碳烯醛	(Z)-9-十八碳烯-1-醇
(E)-6-十四碳烯基乙酸酯	(Z)-9-十八碳烯基乙酸酯
(Z)-6-十四碳烯基乙酸酯	(Z)-9-十八碳烯醛
(E)-7-十四碳烯-1-醇	(E)-11-十八碳烯-1-醇
(E)-7-十四碳烯基乙酸酯	(E)-11-十八碳烯醛
(Z)-7-十四碳烯-1-醇	(Z)-11-十八碳烯-1-醇
(Z)-7-十四碳烯基乙酸酯	(Z)-11-十八碳烯基乙酸酯
(Z)-7-十四碳烯醛	(Z)-11-十八碳烯醛
(E)-8-十四碳烯基乙酸酯	(E)-13-十八碳烯基乙酸酯
(Z)-8-十四碳烯-1-醇	(E)-13-十八碳烯醛
(Z)-8-十四碳烯基乙酸酯	(Z)-13-十八碳烯-1-醇
(Z)-8-十四碳烯醛	(Z)-13-十八碳烯基乙酸酯
(E)-9-十四碳烯-1-醇	(Z)-13-十八碳烯醛
(E)-9-十四碳烯基乙酸酯	(E)-14-十八碳烯醛
(Z)-9-十四碳烯-1-醇	(E,Z)-2,13-十八碳二烯-1-醇
(Z)-9-十四碳烯基乙酸酯	(E,Z)-2,13-十八碳二烯基乙酸酯
(Z)-9-十四碳烯醛	(E,Z)-2,13-十八碳二烯醛
(E)-10-十四碳烯基乙酸酯	(Z,E)-2,13-十八碳二烯基乙酸酯

[0190]

名称	名称
(Z)-10-十四碳烯基乙酸酯	(Z,Z)-2,13-十八碳二烯-1-醇
(E)-11-十四碳烯-1-醇	(Z,Z)-2,13-十八碳二烯基乙酸酯
(E)-11-十四碳烯基乙酸酯	(E,E)-3,13-十八碳二烯基乙酸酯
(E)-11-十四碳烯醛	(E,Z)-3,13-十八碳二烯基乙酸酯
(Z)-11-十四碳烯-1-醇	(E,Z)-3,13-十八碳二烯醛
(Z)-11-十四碳烯基乙酸酯	(Z,E)-3,13-十八碳二烯基乙酸酯
(Z)-11-十四碳烯醛	(Z,Z)-3,13-十八碳二烯基乙酸酯
(E)-12-十四碳烯基乙酸酯	(Z,Z)-3,13-十八碳二烯醛
(Z)-12-十四碳烯基乙酸酯	(E,E)-5,9-十八碳二烯-1-醇
(E,E)-2,4-十四碳二烯醛	(E,E)-5,9-十八碳二烯基乙酸酯
(E,E)-3,5-十四碳二烯基乙酸酯	(E,E)-9,12-十八碳二烯-1-醇
(E,Z)-3,5-十四碳二烯基乙酸酯	(Z,Z)-9,12-十八碳二烯基乙酸酯
(Z,E)-3,5-十四碳二烯基乙酸酯	(Z,Z)-9,12-十八碳二烯醛
(E,Z)-3,7-十四碳二烯基乙酸酯	(Z,Z)-11,13-十八碳二烯醛
(E,Z)-3,8-十四碳二烯基乙酸酯	(E,E)-11,14-十八碳二烯醛
(E,Z)-4,9-十四碳二烯基乙酸酯	(Z,Z)-13,15-十八碳二烯醛
(E,Z)-4,9-十四碳二烯醛	(Z,Z,Z)-3,6,9-十八碳三烯基乙酸酯
(E,Z)-4,10-十四碳二烯基乙酸酯	(E,E,E)-9,12,15-十八碳三烯-1-醇
(E,E)-5,8-十四碳二烯醛	(Z,Z,Z)-9,12,15-十八碳三烯基乙酸酯
(Z,Z)-5,8-十四碳二烯-1-醇	(Z,Z,Z)-9,12,15-十八碳三烯醛
(Z,Z)-5,8-十四碳二烯基乙酸酯	
(Z,Z)-5,8-十四碳二烯醛	
(E,E)-8,10-十四碳二烯-1-醇	
(E,E)-8,10-十四碳二烯基乙酸酯	
(E,E)-8,10-十四碳二烯醛	
(E,Z)-8,10-十四碳二烯基乙酸酯	
(E,Z)-8,10-十四碳二烯醛	
(Z,E)-8,10-十四碳二烯-1-醇	
(Z,E)-8,10-十四碳二烯基乙酸酯	
(Z,Z)-8,10-十四碳二烯醛	
(E,E)-9,11-十四碳二烯基乙酸酯	
(E,Z)-9,11-十四碳二烯基乙酸酯	

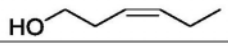
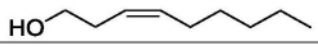
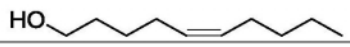
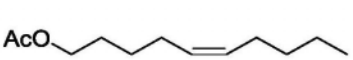
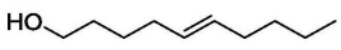
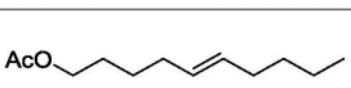
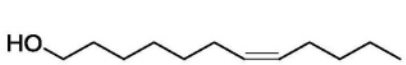
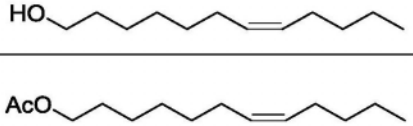
[0191]

名称	名称
(Z,E)-9,11-十四碳二烯-1-醇	
(Z,E)-9,11-十四碳二烯基乙酸酯	
(Z,E)-9,11-十四碳二烯醛	
(Z,Z)-9,11-十四碳二烯-1-醇	
(Z,Z)-9,11-十四碳二烯基乙酸酯	
(Z,Z)-9,11-十四碳二烯醛	
(E,E)-9,12-十四碳二烯基乙酸酯	
(Z,E)-9,12-十四碳二烯-1-醇	
(Z,E)-9,12-十四碳二烯基乙酸酯	
(Z,E)-9,12-十四碳二烯醛	
(Z,Z)-9,12-十四碳二烯-1-醇	
(Z,Z)-9,12-十四碳二烯基乙酸酯	

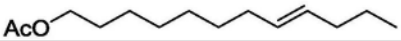
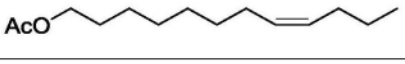
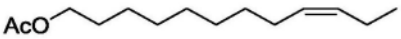
[0192] 在一些方面,如本公开文本所传授合成的信息素包括表2a中列出的至少一种信息素,来调节表2a中列出的昆虫的行为。在其他方面,可以使用本文公开的重组微生物和方法合成的昆虫信息素的非限制性例子包括表2a中列出的醇、醛和乙酸酯。然而,本文所述的微生物不限于表1和表2a中列出的C_6-C_{20}信息素的合成。相反,所公开的微生物还可用于合成各种C_6-C_{24}单或多不饱和脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯,包括香料、调味剂和聚合物中间体。

[0193] 表2a.可以根据本公开文本中描述的方法合成的示例性信息素。

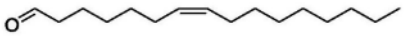
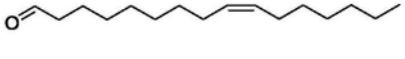
[0194]

名称	结构	具有生物学重要性的例子
(Z)-3-己烯-1-醇		参见，Sugimoto等人（2014）
(Z)-3-壬烯-1-醇		雄性西印度果蝇性信息素
(Z)-5-癸烯-1-醇		
(Z)-5-癸烯基乙酸酯		黄地老虎（*Agrotis segetum*）性信息素组分
(E)-5-癸烯-1-醇		桃条麦蛾（*Anarsia lineatella*）性信息素组分
(E)-5-癸烯基乙酸酯		桃条麦蛾（*Anarsia lineatella*）性信息素组分
(Z)-7-十二碳烯-1-醇		
(Z)-7-十二碳烯基乙酸酯		大豆尺夜蛾（*Pseudoplusia includens*）性信息素

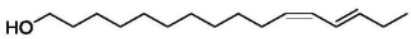
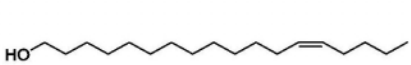
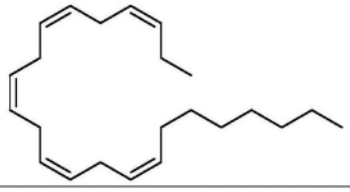
[0195]

名称	结构	具有生物学重要性的例子
		黄地老虎（*Agrotis segetum*）性信息素组分
(E)-8-十二碳烯-1-醇		柑橘果蛾（Citrus Fruit Moth）性信息素
(E)-8-十二碳烯基乙酸酯		梨小食心虫(*Grapholitha molesta*)、柑橘果实蛀虫(*Ecdytolopha aurantiana*)性信息素组分
(Z)-8-十二碳烯-1-醇		梨小食心虫（*Grapholitha molesta*）、柑橘果实蛀虫（*Ecdytolopha aurantiana*）性信息素组分
(Z)-8-十二碳烯基乙酸酯		梨小食心虫（*Grapholitha molesta*）性信息素组分
(Z)-9-十二碳烯-1-醇		
(Z)-9-十二碳烯基乙酸酯		女贞细卷蛾（*Eupoecilia ambiguella*）性信息素
(E,E)-8,10-十二碳二烯-1-醇		苹果小卷蛾（*Cydia pomonella*）
(7E,9Z)-十二碳二烯基乙酸酯		葡萄花翅小卷蛾（*Lobesia botrana*）
(Z)-9-十四碳烯-1-醇		
(Z)-9-十四碳烯基乙酸酯		褐卷叶蛾（*Pandemis pyrusana*）、稻螟蛉（*Naranga aenescens*）、黄地老虎（*Agrotis segetum*）性信息素组分
(Z)-11-十四碳烯-1-醇		
(Z)-11-十四碳烯基乙酸酯		褐卷叶蛾（*Pandemis pyrusana*）、蔷薇斜条卷叶蛾（*Choristoneura roseceana*）性信息素组分
(E)-11-十四碳烯-1-醇		
(E)-11-十四碳烯基乙酸酯		蔷薇斜条卷叶蛾（*Choristoneura roseceana*）、甘蓝薄翅螟（*Crocidolomia pavonana*）性信息素组分

[0196]

名称	结构	具有生物学重要性的例子
(Z)-7-十六碳烯-1-醇		
(Z)-7-十六碳烯醛		体贴杆草螟（*Diatraea considerata*）性信息素组分
(Z)-9-十六碳烯-1-醇		
(Z)-9-十六碳烯醛		玉米穗蛾（*Helicoverpa zea*）、棉铃虫（*Helicoverpa armigera*）、烟芽夜蛾（*Heliothis virescens*）性信息素组分
(Z)-9-十六碳烯基乙酸酯		稻螟蛉（*Naranga aenescens*）性信息素组分
(Z)-11-十六碳烯-1-醇		
(Z)-11-十六碳烯醛		洋葱羽蛾（*Platyptila carduidactyla*）、烟芽夜蛾（*Heliothis virescens*）性信息素、玉米穗蛾（*Helicoverpa zea*）、棉铃虫（*Helicoverpa armigera*）、小菜蛾（*Plutella xylostella*）、体贴杆草螟（*Diatraea considerata*）、西南玉米螟（*Diatraea grandiosella*）、小蔗螟（*Diatraea saccharalis*）、葱邻菜蛾（*Acrolepiopsis assectella*）性信息素组分
(Z)-11-十六碳烯基乙酸酯		旋幽夜蛾（*Discestra trifolii*）性信息素、烟芽夜蛾（*Heliothis virescens*）、小菜蛾（*Plutella xylostella*）、葱邻菜蛾（*Acrolepiopsis assectella*）、甘蓝薄翅螟（*Crocidolomiapavonana*）、稻螟蛉（*Naranga aenescens*）性信息素组分
(Z,Z)-11,13-十六碳二烯醛		脐橙螟蛾（*Amyelosis transitella*）
(Z,Z)-11,13-十六碳二烯-1-醇		脐橙螟蛾（*Amyelosis transitella*）

[0197]

名称	结构	具有生物学重要性的例子
(11Z,13E)-十六碳二烯-1-醇		脐橙螟蛾（*Amyelosis transitella*）
(9Z,11E)-十六碳二烯醛		
(Z)-13-十八碳烯-1-醇		
(Z)-13-十八碳烯醛		体贴杆草螟（*Diatraea considerata*）、西南玉米螟（*Diatraea grandiosella*）性信息素组分
(Z,Z,Z,Z,Z)-3,6,9,12,15-二十三碳五烯		脐橙螟蛾

[0198] 大多数信息素包含末端氢被官能团取代的烃骨架(Ryan MF(2002).Insect Chemoreception.Fundamental and Applied.Kluwer Academic Publishers)。表2b显示了一些常见官能团及其化学式、前缀和后缀。由来自相邻碳原子的氢的损失产生的一个或多个双键的存在决定了分子的不饱和度,并改变了从烷烃(无多重键)到烯烃的名称。两个和三个双键的存在分别以-二烯和-三烯命名结尾来指示。每个双键的位置由与其开始的碳的位置相对应的数字表示,每个碳原子都由与该官能团附接的碳来编号。该官能团所附接的碳被称为-1-。信息素可以具有但不限于编号10(癸)、12(十二)、14(十四)、16(十六)或18(十八)碳长度的烃链长度。双键的存在有另一个影响。通过将其固定为两种可能的构型中的一种来排除分子的旋转,每种代表作为不同的分子的几何异构体。当碳链分别连接在双键的相反(反式)或相同(顺式)侧时,它们被指定为E(来自德国单词Entgegen,相反)或Z(Zusammen,一起)。

[0199] 表2b.通用官能团的前缀和后缀

[0200]

官能团	化学式	前缀	后缀
醇	-OH	羟基-	-醇
醛	-CH=O	甲酰基-	-醛
胺	$-NH_2$	氨基-	-胺
羧酸	-COOH	羧基-	-酸
酯	-COOR	R-氧基羰基-	-R-酸酯
酮	>C=O	氧代-	-酮

[0201] 来自Howse,PE,Stevens,IDR and Jones,OT(1998).Insect pheromones and their use in pest management.London:Chapman and Hall。

[0202] 本文所述的信息素可以使用IUPAC命名法或本领域技术人员已知的各种缩写或变

化来提及。例如,(11Z)-十六碳烯-1-醛也可以写成Z-11-十六碳烯-1-醛、Z-11-十六碳烯醛或Z-x-y:Ald,其中x表示双键的位置,并且y表示烃骨架中的碳数目。本文所用和本领域技术人员已知的用于鉴定烃骨架上的官能团的缩写包括指示醛的“Ald”,指示醇的“OH”,以及指示乙酰基的“Ac”。此外,链中碳的数目可以使用数字指示,而不是使用书面名称。因此,如本文所用,由十六个碳组成的不饱和碳链可以写成十六碳烯或16。

[0203] 本文使用相似的缩写和派生词来描述信息素前体。例如,(11Z)-十六碳烯-1-醛的脂肪酰基-CoA前体可以被鉴定为(11Z)-十六碳烯基-CoA或Z-11-16:酰基-CoA。

[0204] 本公开文本涉及使用包含一种或多种异源酶的重组微生物合成单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和脂肪乙酸酯,该一种或多种异源酶催化合成过程的一个或多个步骤的底物到产物的转化。

[0205] 去饱和酶

[0206] 本公开文本描述了将脂肪酰基底物去饱和为相应的不饱和脂肪酰基底物的酶。

[0207] 在一些实施方案中,去饱和酶用于催化将脂肪酰基-CoA或酰基-ACP转化为相应的不饱和脂肪酰基-CoA或酰基-ACP。去饱和酶是如下的酶,其催化饱和脂肪酸或脂肪酸衍生物(例如,脂肪酰基-CoA或脂肪酰基-ACP(在本文统称为“脂肪酰基”))中形成碳-碳双键,该催化通过去除至少两个氢原子以产生相应的不饱和脂肪酸/酰基。根据酶选择性催化在相对于脂肪酸/酰基的甲基末端的近末端碳或相对于脂肪酸/酰基的羰基末端的近末端碳处形成双键的能力对去饱和酶进行分类。Omega(ω)去饱和酶催化在相对于脂肪酸/酰基的甲基末端在固定近末端碳处形成碳-碳双键。例如,ω^3去饱和酶催化在相对于脂肪酸/酰基的甲基末端的第三和第四个碳之间形成双键。Delta(Δ)去饱和酶催化在相对于脂肪酸的羧基或脂肪酰基CoA的羰基的特定位置处形成碳-碳双键。例如,Δ^9去饱和酶催化在相对于脂肪酸的羧基末端或脂肪酰CoA的羰基的C^9和C^{10}碳之间形成双键。

[0208] 如本文所用,去饱和酶可以参考去饱和酶催化双键形成的位置和不饱和烃的所得几何构型(即E/Z)来描述。因此,如本文所用,Z9去饱和酶是指如下的Δ去饱和酶,相对于脂肪酸/酰基的羰基末端,其催化C_9和C_{10}碳之间双键的形成,从而定向在顺式或Z构型的碳-碳双键相对侧上的两个烃。相似地,如本文所用,Z11去饱和酶是指如下的Δ去饱和酶,相对于脂肪酸/酰基的羰基末端,其催化C_{11}和C_{12}碳之间双键的形成。

[0209] 去饱和酶具有保守的结构基序。跨膜去饱和酶的此序列基序由[HX3-4HX7-41(3non-His)HX2-3(1nonHis)HHX61-189(40non-His)HX2-3(1non-His)HH]表征。可溶性去饱和酶的序列基序由[D/EEXXH]的两次发生表征。

[0210] 在一些实施方案中,该去饱和酶是催化脂肪酰基-CoA中双键形成的脂肪酰基-CoA去饱和酶。在一些这样的实施方案中,本文所述的脂肪酰基-CoA去饱和酶能够利用脂肪酰基-CoA作为底物,该脂肪酰基-CoA具有6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个碳原子的链长。因此,该重组微生物中使用的去饱和酶可以基于底物的链长来选择。

[0211] 在一些实施方案中,本文所述的脂肪酰基去饱和酶能够催化在相对于不饱和脂肪酰基-CoA上的末端CoA所希望的碳处形成双键。因此,在一些实施方案中,可以选择去饱和酶用于重组微生物,所述去饱和酶催化在相对于脂肪酰基-CoA上的羰基的3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13位处插入双键。

[0212] 在一些实施方案中,本文所述的脂肪酰基去饱和酶能够催化在饱和脂肪酰基-CoA中形成双键,使得所得不饱和脂肪酰基-CoA具有顺式或反式(即Z或E)几何构型。

[0213] 在一些实施方案中,该去饱和酶是催化脂肪酰基-ACP中双键形成的脂肪酰基-ACP去饱和酶。在一些实施方案中,本文所述的脂肪酰基-ACP去饱和酶能够利用脂肪酰基-CoA作为底物,该脂肪酰基-CoA具有6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个碳原子的链长。因此,该重组微生物中使用的去饱和酶可以基于底物的链长来选择。

[0214] 在一些实施方案中,本文所述的脂肪酰基-ACP去饱和酶能够催化在相对于不饱和脂肪酰基-ACP上的末端羰基所希望的碳处形成双键。因此,在一些实施方案中,可以选择去饱和酶用于重组微生物,所述去饱和酶催化在相对于脂肪酰基-ACP上的羰基的3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13位处插入双键。

[0215] 在一些实施方案中,本文所述的脂肪酰基去饱和酶能够催化在饱和脂肪酰基-CoA中形成双键,使得所得不饱和脂肪酰基-ACP具有顺式或反式(即Z或E)几何构型。

[0216] 在一个实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶是Z11去饱和酶。在一些实施方案中,对编码Z11去饱和酶的核酸序列进行密码子优化,该核酸序列来自物种黄地老虎(Agrotis segetum)、脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、红带卷蛾(Argyrotaenia velutiana)、蔷薇斜条卷叶蛾(Choristoneura rosaceana)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)、玉米穗蛾(Helicoverpa zea)、或假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)的生物体。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的核苷酸序列:来自粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)的SEQ ID NO:9、18、24和26。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)的SEQ ID NO:49中列出的氨基酸序列。在其他实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的核苷酸序列:来自黄地老虎(Agrotis segetum)的SEQ ID NO:10和16。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自黄地老虎的SEQ ID NO:53中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的核苷酸序列:来自假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)的SEQ ID NO:11和23。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)的SEQ ID NO:50和51中列出的氨基酸序列。在某些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的核苷酸序列:来自脐橙螟蛾(Amyelois transitella)的SEQ ID NO:12、17和30。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自脐橙螟蛾的SEQ ID NO:52中列出的氨基酸序列。在另外的实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的核苷酸序列:来自玉米穗蛾(Helicoverpa zea)的SEQ ID NO:13、19、25、27和31。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自玉米穗蛾的SEQ ID NO:54中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自水稻大螟的SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中该Z11去饱和酶包含GenBank登录号AF416738、AGH12217.1、AII21943.1、CAJ43430.2、AF441221、AAF81787.1、AF545481、AJ271414、AY362879、ABX71630.1和NP001299594.1、Q9N9Z8、ABX71630.1和AIM40221.1中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含嵌合多肽。在一些实施方案中,完全或部分Z11去饱和酶与另一种多肽融合。在某些实施方案中,Z11去饱和酶的N末端天然前导序列被来自另一物种的油质蛋白前导序列替代。在某些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项核苷酸的序列:SEQ ID NO:15、28和29。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含

选自SEQ ID NO:61、62、63、78、79和80的氨基酸序列。

[0217] 在一个实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶是Z9去饱和酶。在一些实施方案中,编码Z9去饱和酶的核酸序列经密码子优化。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自亚洲玉米螟(Ostrinia furnacalis)的SEQ ID NO:20中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自亚洲玉米螟(Ostrinia furnacalis)的SEQ ID NO:58中列出的氨基酸序列。在其他实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)的SEQ ID NO:21中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该该Z9去饱和酶包含来自红醋栗穿孔蛾的SEQ ID NO:59中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自玉米穗蛾(Helicoverpa zea)的SEQ ID NO:22中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自玉米穗蛾的SEQ ID NO:60中列出的氨基酸序列。

[0218] 因此,在一些实施方案中,本公开教导了一种重组微生物,其包含与选自39、49、50、51、52、53、54、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、78、79、80、95、97、99、101、103和105的SEQ ID No中的任一个表现出至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%或50%序列同一性的Z11或Z9去饱和酶。

[0219] 因此,在一些实施方案中,本公开教导了一种包含编码Z11或Z9去饱和酶的核酸分子的重组微生物,其中所述核酸分子与选自9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、68、69、70、71、94、96、98、100、102和104的SEQ ID No中的任一个表现出至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%或50%序列同一性。

[0220] 在一些实施方案中,本公开教导了一种重组微生物,其包含至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C6-C24脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C6-C24脂肪酰基-CoA,且与选自SEQ ID NO:39、54、60、62、78、79、80、95、97、99、101、103和105的脂肪酰基去饱和酶具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%或50%序列同一性。

[0221] 脂肪酰基还原酶

[0222] 本公开文本描述了将脂肪酰基底物还原为相应的脂肪醇或醛的酶。

[0223] 在一些实施方案中,使用形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶来催化脂肪酰基-CoA转化为相应的脂肪醇。在一些实施方案中,使用形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶来催化脂肪酰基-ACP转化为相应的脂肪醛。脂肪酰基还原酶是催化脂肪酰基-CoA还原为相应的脂肪醇或脂肪酰基-ACP还原为相应的脂肪醛的酶。脂肪酰基-CoA和脂肪酰基-ACP具有R-(CO)-S-R1的结构,其中R是C6-C24饱和、不饱和、直链、支链或环状烃,并且R_1表示CoA或ACP。在一个具体的实施方案中,R是C_6-C_{24}饱和或不饱和直链烃。“CoA”是脂肪酸合成和氧化涉及的非蛋白质

酰基载体基团。“ACP”是用于合成脂肪酸的脂肪酸合酶的酰基载体蛋白,即多肽或蛋白质亚基。

[0224] 因此,在一些实施方案中,本公开文本提供了形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶,其催化脂肪酰基-CoA还原为相应的脂肪醇。例如,当两个NAD(P)H分子被氧化为$NAD(P)^+$时,R-(CO)-S-CoA被转化为R-CH_2OH和CoA-SH。因此,在一些这样的实施方案中,本文所述的重组微生物可以包括形成异源脂肪醇的脂肪酰基还原酶,其催化脂肪酰基-CoA还原为相应的脂肪醇。在一个示例性实施方案中,本文公开的重组微生物包括至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该脂肪酰基还原酶催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。

[0225] 在其他实施方案中,本公开文本提供了形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶,其催化脂肪酰基-ACP还原为相应的脂肪醛。例如,当一个NAD(P)H分子被氧化为$NAD(P)^+$时,R-(CO)-S-ACP被转化为R-(CO)-H和ACP-SH。在一些这样的实施方案中,本文所述的重组微生物可以包括异源的形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶,其催化脂肪酰基-ACP还原为相应的脂肪醛。在一个示例性实施方案中,本文公开的重组微生物包括至少一种编码形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该脂肪酰基还原酶催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛。

[0226] 在一些昆虫物种中,经由位点特异性去磷酸化作用来激活各自的形成醇的脂肪酰基还原酶(FAR)(Jurenka,R.&Rafaeli,A.Regulatory Role of PBAN in Sex Pheromone Biosynthesis of Heliothine Moths.Front.Endocrinol.(Lausanne).2:46(2011);Gilbert,L.I.Insect Endocrinology.(学术出版社))。不受任一理论的束缚,酵母诸如解脂耶氏酵母中异源表达的FAR酶的磷酸化可导致失活,并导致低的脂肪醇滴度。在一些实施方案中,生物信息学方法可用于预测FAR中的磷酸化残基。已表明丙氨酸取代丝氨酸和苏氨酸残基可消除磷酸化(Shi,S.,Chen,Y.,Siewers,V.&Nielsen,J.Improving Production of Malonyl Coenzyme A-Derived Metabolites by Abolishing Snf1-Dependent Regulation of Acc1.mBio 5(2014))。因此,可以测试丙氨酸取代对防止丝氨酸残基磷酸化的影响及其对脂肪醇滴度的影响。除了丙氨酸取代之外,还可以通过其他氨基酸取代来实现FAR活性的改善。

[0227] 在一些实施方案中,提供了基于在宿主微生物中FAR表达后对磷酸化敏感残基的选择和改变来鉴定FAR的有益突变的方法。在优选的实施方案中,该宿主微生物是选自耶氏酵母属(Yarrowia)、假丝酵母属(Candida)、酵母属(Saccharomyces)、毕赤酵母属(Pichia)、汉森酵母属(Hansenula)和克鲁维酵母属(Kluyveromyces)的酵母。

[0228] 关于蛋白质磷酸化位点的其他参考资料包括:Blom,N.,Gammeltoft,S.&Brunak,S.Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites1.J.Mol.Biol.294,1351-1362(1999);Ingrell,C.R.,Miller,M.L.,Jensen,O.N.&Blom,N.NetPhosYeast:prediction of protein phosphorylation sites in yeast.Bioinforma.23:895-897(2007);Miller,W.T.Tyrosine kinase signaling and the emergence of multicellularity.Biochim.Biophys.Acta 1823,1053-1057(2012),其中每个通过提述以其整体并入本文。

[0229] 在一些实施方案中,密码子优化了编码脂肪酰基还原酶的核酸序列,其来自物种

黄地老虎(Agrotis segetum)、甜菜夜蛾(Spodoptera exigua)、海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、薄肌眼虫(Euglena gracilis)、稠李巢蛾(Yponomeuta evonymellus)和棉铃虫(Helicoverpa armigera)的生物体。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自黄地老虎(Agrotis segetum)的SEQ ID NO:1中列出的核苷酸序列。在其他实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)的SEQ ID NO:2中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含选自SEQ ID NO:3、32、40、72、74、76和81的核苷酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自黄地老虎的SEQ ID NO:55中列出的氨基酸序列。在其他实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自海灰翅夜蛾的SEQ ID NO:56中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含选自来自棉铃虫的SEQ ID NO:41和57的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含选自来自甜菜夜蛾的SEQ ID NO:73和82的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自薄肌眼虫的SEQ ID NO:75中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自稠李巢蛾的SEQ ID NO:77中列出的氨基酸序列。

[0230] 在一些实施方案中,重组微生物中不饱和脂肪醇的产生包括一种或多种突变FAR的表达。在某些实施方案中,提供了棉铃虫(Helicoverpa armigera)脂肪酰基-CoA还原酶(HaFAR)变体,其相对于由SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列编码的野生型棉铃虫(Helicoverpa armigera)脂肪酰基-CoA还原酶具有增强的酶活性。在一些实施方案中,增加的酶活性是相对于由SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列编码的野生型HaFAR的酶活性产生的脂肪醇的量,所产生的脂肪醇的量的净活性增加。在一些实施方案中,野生型HaFAR包含SEQ ID NO:90所示的核苷酸序列。在一些实施方案中,由SEQ ID NO:41所示氨基酸序列编码的野生型HaFAR的变体包含以下位置处的点突变:S60X、S195X、S298X、S378X、S394X、S418X和S453X,其中X包含选自F、L、M、I、V、P、T、A、Y、K、H、N、Q、K、D、E、C、W和R的氨基酸。在一些实施方案中,由SEQ ID NO:41所示氨基酸序列编码的野生型HaFAR的变体包含选自以下氨基酸位置处的突变的点突变的组合:S60X、S195X、S298X、S378X、S394X、S418X和S453X,其中X包含选自F、L、M、I、V、P、T、A、Y、K、H、N、Q、K、D、E、C、W和R的氨基酸。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶是突变的脂肪酰基还原酶,且包含选自SEQ ID NO:42-48的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶是突变的脂肪酰基还原酶,且包含选自SEQ ID NO:83-89的核苷酸序列。

[0231] 因此,在一些实施方案中,本公开教导了一种重组微生物,其包含与选自41、42、43、44、45、46、47、48、55、56、57、73、75、77和82的SEQ ID No.中的任一个表现出至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%或50%序列同一性的脂肪酰基还原酶。

[0232] 因此,在一些实施方案中,本公开教导了一种包含编码脂肪酰基还原酶的核酸分子的重组微生物,其中所述核酸分子与选自1、2、3、32、37、40、72、74、76、81、83、84、85、86、87、88、89和90的SEQ ID No.中的任一个表现出至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、

63％、62％、61％、60％、59％、58％、57％、56％、55％、54％、53％、52％、51％或50％序列同一性。

[0233] 在一些实施方案中,本公开教导了一种重组微生物,其包含至少一种编码脂肪酰基还原酶的核酸分子,该脂肪酰基还原酶催化单或多不饱和C6-C24脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C6-C24脂肪醇,该脂肪酰基还原酶与选自SEQ ID NO:41-48、57、73、75和77的脂肪酰基还原酶具有至少99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％、75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％、60％、59％、58％、57％、56％、55％、54％、53％、52％、51％或50％序列同一性。

[0234] 酰基-ACP合成酶

[0235] 本公开文本描述了将脂肪酸连接至相应的脂肪酰基-ACP的酶。

[0236] 在一些实施方案中,使用酰基-ACP合成酶来催化脂肪酸转化为相应的脂肪酰基-ACP。酰基-ACP合成酶是能够将脂肪酸与ACP连接以产生脂肪酸酰基-ACP的酶。在一些实施方案中,可使用酰基-ACP合成酶来催化脂肪酸转化为相应的脂肪酰基-ACP。在一些实施方案中,该酰基-ACP合成酶是能够利用如下脂肪酸作为底物的合成酶,该脂肪酸具有6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个碳原子的链长。在一个这样的实施方案中,本文所述的重组微生物可以包括异源酰基-ACP合成酶,其催化脂肪酸转化为相应的脂肪酰基-ACP。在一个示例性实施方案中,本文公开的重组微生物包括至少一种编码酰基-ACP合成酶的外源核酸分子,该酰基-ACP合成酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酸转化为相应的饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP。

[0237] 脂肪酸合酶复合物

[0238] 本公开文本描述了催化脂肪酸中碳链延长的酶。

[0239] 在一些实施方案中,使用脂肪酸合酶复合物来催化脂肪酸中碳链的起始和延长。“脂肪酸合酶复合物”是指一组催化脂肪酸上碳链的起始和延长的酶。脂肪酸合酶(FAS)途径中的ACP与酶一起控制产生的脂肪酸的长度、饱和度和支化。此途径中的步骤由脂肪酸生物合成(fab)和乙酰基-CoA羧化酶(acc)基因家族的酶催化。取决于所希望的产品,可以减弱、表达或过表达这些基因中的一种或多种。在示例性实施方案中,这些基因中的一种或多种被过表达。

[0240] 存在两种主要类别的脂肪酸合酶。I型(FAS I)系统利用单个大的多功能多肽,并且对哺乳动物和真菌都是常见的(尽管真菌和哺乳动物合酶的结构安排不同)。I型FAS系统在CMN细菌群(棒状杆菌、分枝杆菌和诺卡氏菌)中也有发现。II型FAS(FAS II)的特点是使用离散的单功能酶进行脂肪酸合成,并在古细菌和细菌中发现。

[0241] FAS I和FAS II延长和还原的机制基本相似,因为FAS I多酶多肽和FAS II酶的结构域在很大程度上是保守的。

[0242] 脂肪酸由一系列来自乙酰基-CoA和丙二酰基-CoA的脱羧克莱森(Claisen)缩合反应合成。此途径中的步骤由脂肪酸生物合成(fab)和乙酰基-CoA羧化酶(acc)基因家族的酶催化。对于此途径的描述,参见例如Heath et al.,Prog.Lipid Res.40:467,2001,其通过引用以全部内容并入本文。不受理论限制,在细菌中,乙酰基-CoA被乙酰基-CoA羧化酶(Acc,由四个独立基因accABCD编码的多亚基酶)羧化以形成丙二酰基-CoA。在酵母中,乙酰

基-CoA被由ACC1和ACC2编码的乙酰基-CoA羧化酶的酵母等效物羧化。在细菌中,通过丙二酰基-CoA:ACP转酰基酶(FabD)将丙二酸基团转移至ACP以形成丙二酰基-ACP。在酵母中,丙二酰基-棕榈酰转移酶结构域将来自丙二酰基-CoA的丙二酰基添加到FAS复合物的ACP结构域中。然后发生缩合反应,其中丙二酰基-ACP与酰基-CoA合并,得到β-酮脂酰基-ACP。以这种方式,碳氢化合物底物延长2个碳。

[0243] 延长后,通过酮还原酶(KR)、脱水酶(DH)和烯醇还原酶(ER)的连续作用,β-酮基被还原为完全饱和的碳链。延长的脂肪酸链处于这些活性位点之间,同时与ACP的磷酸泛酰巯基乙胺辅基共价附接。首先,β-酮脂酰基-ACP被NADPH还原以形成β-羟酰基-ACP。在细菌中,这一步由β-酮脂酰基-ACP还原酶(FabG)催化。等效的酵母反应由FAS的酮还原酶(KR)结构域催化。然后使β-羟酰基-ACP脱水以形成反式-2-烯酰基-ACP,其通过细菌中的β-羟酰基-ACP脱水酶/异构酶(FabA)或β-羟酰基-ACP脱水酶(FabZ)或酵母中FAS的脱水酶(DH)结构域催化。细菌中的NADPH依赖性反式-2-烯酰基-ACP还原酶I、II或III(分别为Fab1、FabK和FabL)和酵母中FAS的烯醇还原酶(ER)结构域还原反式-2-烯酰基-ACP以形成酰基-ACP。随后的循环由通过β-酮脂酰基-ACP合酶I或β-酮脂酰基-ACP合酶II(在细菌中分别为FabB和FabF,或在酵母中β-酮脂酰合酶(KS)结构域)进行的丙二酰基-ACP与酰基-ACP的缩合而开始。

[0244] 在一些实施方案中,可使用脂肪酸合酶复合物来催化脂肪酰基-ACP延长为相应的相对于底物具有两个碳延长的脂肪酰基-ACP。

[0245] 脱氢酶

[0246] 本公开文本描述了催化脂肪醛转化为脂肪醇的酶。在一些实施方案中,使用醇脱氢酶(ADH,表3和表3a)来催化脂肪醛转化为脂肪醇。已显示许多由链烷营养生物体即荧光假单胞菌NRRL B-1244(Hou et al.1983),丁酸假单胞菌ATCC 43655(Vangnai and Arp 2001)和不动杆菌属物种菌株M-1(Tani et al.2000)鉴定的ADH对短链至中链烷基醇(C_2至C_{14})有活性。此外,来自西格玛公司(Sigma)的可商购ADH、马肝ADH和面包酵母(Baker's yeast)ADH对具有长度C_{10}或更长的底物具有可检测到的活性。报道的对较长脂肪醇的活性可能受到增溶底物困难的影响。对于来自西格玛公司的酵母ADH,几乎没有观察到对C_{12}-C_{14}醛的活性(Tani et al.2000),然而观察到对C_{12}和C_{16}羟基-ω-脂肪酸的活性(Lu et al.2010)。最近,从使用LadA羟化酶降解C_{15}-C_{36}烷烃的生物,即嗜热脱氮土壤芽孢杆菌(Geobacillus thermodenitrificans)NG80-2,表征两种ADH。从甲醇到1-三十烷醇(C_{30})检测针对ADH的活性,其中1-辛醇是ADH2的优选底物,并且乙醇是ADH1(Liu et al.2009)的优选底物。

[0247] 在全细胞生物转化中ADH的使用主要集中在从酮类生产手性醇(Ernst et al.2005)(Schroer et al.2007)。使用来自短乳杆菌(Lactobacillus brevis)的ADH和与异丙醇的偶联辅因子再生,Schroer et al.报道了由乙酰乙酸甲酯产生797g(R)-甲基-3-羟基丁酸酯,时空产率为29g/L/h(Schroer et al.2007)。用商业上获得的酿酒酵母中报道了在全细胞转化中脂肪醇氧化的例子,用于将己醇转化为己醛(Presecki et al.2012)和将2-庚醇转化为2-庚酮(Cappaert and Larroche2004)。

[0248] 表3.示例性的醇脱氢酶。

[0249]

生物体	基因名称	登录号
橄榄果实蝇（Bactrocera oleae）（橄榄果蝇）（橄榄实蝇（Dacus oleae））	ADH	Q9NAR7

[0250]

生物体	基因名称	登录号
钩虫贪铜菌（Cupriavidus necator）（真养产碱杆菌（Alcaligenes eutrophus））（富养罗尔斯通氏菌（Ralstonia eutropha））	adh	P14940
Drosophila adiastola（果蝇）（Idiomyia adiastola）	Adh	Q00669
Drosophila affinidisjuncta（果蝇）（Idiomyia affinidisjuncta）	Adh	P21518
Drosophila ambigua（果蝇）	Adh	P25139
Drosophila borealis（果蝇）	Adh	P48584
Drosophila differens（果蝇）	Adh	P22245
Drosophila equinoxialis（果蝇）	Adh	Q9NG42
Drosophila flavomontana（果蝇）	Adh	P48585
Drosophila guanche（果蝇）	Adh	Q09009
黄胸果蝇（Drosophila hawaiiensis）（果蝇）	Adh	P51549
Drosophila heteroneura（果蝇）	Adh	P21898
Drosophila immigrans（果蝇）	Adh	Q07588
Drosophila insularis（果蝇）	Adh	Q9NG40
Drosophila lebanonensis（果蝇）（Scaptodrosophila lebanonensis）	Adh	P10807
毛里塔尼亚果蝇（Drosophila mauritiana）（果蝇）	Adh	P07162
Drosophila madeirensis（果蝇）	Adh	Q09010
Drosophila mimica（果蝇）（Idiomyia mimica）	Adh	Q00671
Drosophila nigra（果蝇）（Idiomyia nigra）	Adh	Q00672
Drosophila orena（果蝇）	Adh	P07159
伯格塔纳拟暗果蝇（Drosophila pseudoobscura bogotana）（果蝇）	Adh	P84328
Drosophila picticornis（果蝇）（Idiomyia picticornis）	Adh	P23361
Drosophila planitibia（果蝇）	Adh	P23277
Drosophila paulistorum（果蝇）	Adh	Q9U8S9
Drosophila silvestris（果蝇）	Adh	P23278
Drosophila subobscura（果蝇）	Adh	Q03384
Drosophila teissieri（果蝇）	Adh	P28484

[0251]

生物体	基因名称	登录号
Drosophila tsacasi（果蝇）	Adh	P51550
草莓（Fragaria ananassa/Strawberry）	ADH	P17648
苹果（Malus domestica/Apple）（Pyrus malus）	ADH	P48977
Scaptomyza albovittata（果蝇）	Adh	P25988
Scaptomyza crassifemur（果蝇）（Drosophila crassifemur)	Adh	Q00670
硫化叶菌属物种（菌株RC3）	adh	P50381
Zaprionus tuberculatus（醋蝇）	Adh	P51552
嗜热脂肪地芽孢杆菌（Geobacillus stearothermophilus）（嗜热脂肪芽孢杆菌（Bacillus stearothermophilus））	adh	P42327
Drosophila mayaguana（果蝇）	Adh，Adh2	P25721
黑腹果蝇（Drosophila melanogaster）（果蝇）	Adh，CG3481	P00334
拟暗果蝇（Drosophila pseudoobscura pseudoobscura）（果蝇）	Adh，GA17214	Q6LCE4
拟果蝇（Drosophila simulans）（果蝇）	Adh，GD23968	Q24641
Drosophila yakuba（果蝇）	Adh，GE19037	P26719
嗜凤梨果蝇（Drosophila ananassae）（果蝇）	Adh，GF14888	Q50L96
Drosophila erecta（果蝇）	Adh，GG25120	P28483
Drosophila grimshawi（果蝇）（Idiomyia grimshawi)	Adh，GH13025	P51551
Drosophila willistoni（果蝇）	Adh，GK18290	Q05114
Drosophila persimilis（果蝇）	Adh，GL25993	P37473
塞席尔果蝇（Drosophila sechellia）（果蝇）	Adh，GM15656	Q9GN94
钩虫贪铜菌（Cupriavidus necator）（菌株ATCC 17699/H16/DSM 428/Stanier 337）（富养罗尔斯通氏菌）	adh，H16_A0757	Q0KDL6
结核分枝杆菌（菌株CDC 1551/奥什科什（Oshkosh））	adh，MT1581	P9WQC2
金黄色葡萄球菌（菌株MW2）	adh，MW0568	Q8NXU1
结核分枝杆菌（菌株ATCC 25618/H37Rv）	adh，Rv1530	P9WQC3
金黄色葡萄球菌（菌株N315）	adh，SA0562	Q7A742
金黄色葡萄球菌（菌株牛RF122/ET3-1）	adh，SAB0557	Q2YSX0

[0252]

生物体	基因名称	登录号
嗜酸热硫化叶菌（Sulfolobus acidocaldarius）（菌株ATCC 33909/DSM 639/JCM 8929/NBRC 15157/NCIMB 11770）	adh，Saci_2057	Q4J781
金黄色葡萄球菌（菌株COL）	adh，SACOL0660	Q5HI63
金黄色葡萄球菌（菌株NCTC 8325）	adh,SAOUHSC_00608	Q2G0G1
金黄色葡萄球菌（菌株MRSA252）	adh，SAR0613	Q6GJ63
金黄色葡萄球菌（菌株MSSA476）	adh，SAS0573	Q6GBM4
金黄色葡萄球菌（菌株USA300）	adh，SAUSA300_0594	Q2FJ31
金黄色葡萄球菌（菌株Mu50/ATCC 700699）	adh，SAV0605	Q99W07
表皮葡萄球菌（菌株ATCC 12228）	adh，SE_0375	Q8CQ56
表皮葡萄球菌（菌株ATCC 35984/RP62A）	adh，SERP0257	Q5HRD6
嗜热硫矿硫化叶菌（Sulfolobus solfataricus）（菌株ATCC 35092/DSM 1617/JCM 11322/P2）	adh，SSO2536	P39462
超嗜热广古菌硫化叶菌（Sulfolobus tokodaii）（菌株DSM 16993/JCM 10545/NBRC 100140/7）	adh，STK_25770	Q96XE0
绿头鸭（Anas platyrhynchos）（家鸭）（Anas boschas）	ADH1	P30350
褐几维鸟（Apteryx australis）（褐几维（Brown kiwi））	ADH1	P49645
地中海实蝇（Ceratitis capitata）（地中海果蝇）（Tephritis capitata）	ADH1	P48814
芒果小条实蝇（Ceratitis cosyra）（芒果果蝇）（Trypeta cosyra）	ADH1	Q70UN9
原鸡属（Gallus）（鸡）	ADH1	P23991
原鸽（Columba livia）（家鸽）	ADH1	P86883
日本鹌鹑（Coturnix japonica/Japanese quail/Coturnix japonica）	ADH1	P19631
海德氏果蝇（Drosophila hydei）（果蝇）	Adh1	P23236
Drosophila montana（果蝇）	Adh1	P48586
Drosophila mettleri（果蝇）	Adh1	P22246
Drosophila mulleri（果蝇）	Adh1	P07161
Drosophila navojoa（果蝇）	Adh1	P12854

[0253]

生物体	基因名称	登录号
阿氏囊鼠（Geomys attwateri/Attwater's pocket gopher）（阿氏平原囊鼠（Geomys bursarius attwateri））	ADH1	Q9Z2M2
平原囊鼠（Geomys bursarius/Plains pocket gopher）	ADH1	Q64413
琼斯囊鼠（Geomys knoxjonesi）（诺克斯琼斯囊鼠（Knox Jones's pocket gopher））	ADH1	Q64415
大麦（Hordeum vulgare/Barley）	ADH1	P05336
马克斯克鲁维酵母（Kluyveromyces marxianus）（酵母）（乳酒假丝酵母（Candida kefyr））	ADH1	Q07288
玉蜀黍（Zea mays）（玉米）	ADH1	P00333
金黄地鼠（Mesocricetus auratus）（金仓鼠）	ADH1	P86885
美国狼尾草（Pennisetum americanum）（珍珠稗）（珍珠狼尾草（Pennisetum glaucum））	ADH1	P14219
矮牵牛（Petunia hybrida）（矮牵牛属（Petunia））	ADH1	P25141
家兔（Oryctolagus cuniculus）（兔）	ADH1	Q03505
马铃薯（Solanum tuberosum/Potato）	ADH1	P14673
鸵鸟（Struthio camelus/Ostrich）	ADH1	P80338
白三叶（Trifolium repens）（匍匐白三叶草）	ADH1	P13603
大刍草（Zea luxurians）（危地马拉大刍草（Guatemalan teosinte））(玉米草（Euchlaena luxurians））	ADH1	Q07264
酿酒酵母（菌株ATCC 204508/S288c）（面包酵母）	ADH1，ADC1，YOL086C，O0947	P00330
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	ADH1，ADH，At1g77120，F22K20.19	P06525
粟酒裂殖酵母（菌株972/ATCC 24843）（裂殖酵母）	adh1，adh，SPCC13B11.01	P00332
Drosophila lacicola（果蝇）	Adh1，Adh-1	Q27404
小家鼠（Mus musculus）（小鼠）	Adh1，Adh-1	P00329
鹿白足鼠（Peromyscus maniculatus）（北美鹿鼠）	ADH1，ADH-1	P41680
褐家鼠（Rattus norvegicus）（大鼠）	Adh1，Adh-1	P06757

[0254]

生物体	基因名称	登录号
大果蝇（Drosophila virilis）（果蝇）	Adh1，Adh-1，GJ18208	B4M8Y0
Scheffersomyces stipitis（菌株ATCC 58785/CBS 6054/NBRC 10063/NRRL Y-11545）（酵母）（树干毕赤酵母（Pichia stipitis））	ADH1，ADH2，PICST_68558	O00097
黄曲霉（Aspergillus flavus）（菌株ATCC 200026/FGSC A1120/NRRL 3357/JCM 12722/SRRC 167）	adh1，AFLA_048690	P41747
粗糙脉孢霉（Neurospora crassa）（菌株ATCC 24698/74-OR23-1A/CBS 708.71/DSM 1257/FGSC 987）	adh-1，B17C10.210，NCU01754	Q9P6C8
白假丝酵母（Candida albicans）（酵母）	ADH1，CAD	P43067
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	ADH1，DUPR11.3，Os11g0210300，LOC_Os11g10480，OsJ_032001	Q2R8Z5
Drosophila mojavensis（果蝇）	Adh1，GI17644	P09370
乳酸克鲁维酵母（Kluyveromyces lactis）（菌株ATCC 8585/CBS 2359/DSM 70799/NBRC 1267/NRRL Y-1140/WM37）（酵母）（圆球形假丝酵母（Candida sphaerica））	ADH1，KLLA0F21010g	P20369
籼稻（Oryza sativa subsp. indica）（水稻）	ADH1，OsI_034290	Q75ZX4
苏门答腊猩猩（Pongo abelii/Sumatran orangutan/Pongo pygmaeus abelii）	ADH1A	Q5RBP7
智人（人类）	ADH1A，ADH1	P07327
恒河猴（Macaca mulatta/Rhesus macaque）	ADH1A，ADH1	P28469
黑猩猩（Pan troglodytes/Chimpanzee）	ADH1B	Q5R1W2
狒狒（Papio hamadryas/Hamadryas baboon）	ADH1B	P14139
智人（人类）	ADH1B，ADH2	P00325
智人（人类）	ADH1C，ADH3	P00326
狒狒（Papio hamadryas/Hamadryas baboon）	ADH1C，ADH3	O97959
地中海实蝇（Ceratitis capitata）（地中海果蝇）（Tephritis capitata）	ADH2	P48815
芒果小条实蝇（Ceratitis cosyra）（芒果果蝇）（Trypeta cosyra）	ADH2	Q70UP5
纳塔尔实蝇（Ceratitis rosa）（纳塔尔果蝇）	ADH2	Q70UP6

[0255]

生物体	基因名称	登录号
（Pterandrus rosa）		
Drosophila arizonae（果蝇）	Adh2	P27581
Drosophila buzzatii（果蝇）	Adh2	P25720
海德氏果蝇（Drosophila hydei）（果蝇）	Adh2	P23237
Drosophila montana（果蝇）	Adh2	P48587
Drosophila mulleri（果蝇）	Adh2	P07160
Drosophila wheeleri（果蝇）	Adh2	P24267
痢疾内变形虫（Entamoeba histolytica）	ADH2	Q24803
大麦（Hordeum vulgare/Barley）	ADH2	P10847
马克斯克鲁维酵母（Kluyveromyces marxianus）（酵母）（乳酒假丝酵母（Candida kefyr））	ADH2	Q9P4C2
玉蜀黍（Zea mays）（玉米）	ADH2	P04707
籼稻（Oryza sativa subsp. indica）（水稻）	ADH2	Q4R1E8
番茄（Solanum lycopersicum/Tomato/Lycopersicon esculentum）	ADH2	P28032
马铃薯（Solanum tuberosum/Potato）	ADH2	P14674
Scheffersomyces stipitis（菌株ATCC 58785/CBS 6054/NBRC 10063/NRRL Y-11545）（酵母）（树干毕赤酵母（Pichia stipitis））	ADH2，ADH1，PICST_27980	O13309
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	ADH2，ADHIII，FDH1，At5g43940，MRH10.4	Q96533
酿酒酵母（菌株ATCC 204508/S288c）（面包酵母）	ADH2，ADR2，YMR303C，YM9952.05C	P00331
白假丝酵母（菌株SC5314/ATCC MYA-2876）（酵母）	ADH2，Ca41C10.04，CaO19.12579，CaO19.5113	O94038
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	ADH2，DUPR11.1，Os11g0210500，LOC_Os11g10510	Q0ITW7
Drosophila mojavensis（果蝇）	Adh2，GI17643	P09369
乳酸克鲁维酵母（Kluyveromyces lactis）（菌株ATCC 8585/CBS 2359/DSM 70799/NBRC	ADH2，KLLA0F18260g	P49383

[0256]

生物体	基因名称	登录号
1267/NRRL Y-1140/WM37）（酵母）（圆球形假丝酵母（Candida sphaerica））		
家兔（Oryctolagus cuniculus）（兔）	ADH2-1	O46649
家兔（Oryctolagus cuniculus）（兔）	ADH2-2	O46650
大麦（Hordeum vulgare/Barley）	ADH3	P10848
马铃薯（Solanum tuberosum/Potato）	ADH3	P14675
乳酸克鲁维酵母（Kluyveromyces lactis）（菌株ATCC 8585/CBS 2359/DSM 70799/NBRC 1267/NRRL Y-1140/WM37）（酵母）（圆球形假丝酵母（Candida sphaerica））	ADH3，KLLA0B09064g	P49384
酿酒酵母（菌株ATCC 204508/S288c）（面包酵母）	ADH3，YMR083W，YM9582.08	P07246
智人（人类）	ADH4	P08319
小家鼠（Mus musculus）（小鼠）	Adh4	Q9QYY9
褐家鼠（Rattus norvegicus）（大鼠）	Adh4	Q64563
鸵鸟（Struthio camelus/Ostrich）	ADH4	P80468
乳酸克鲁维酵母（Kluyveromyces lactis）（菌株ATCC 8585/CBS 2359/DSM 70799/NBRC 1267/NRRL Y-1140/WM37）（酵母）（圆球形假丝酵母（Candida sphaerica））	ADH4，KLLA0F13530g	P49385
粟酒裂殖酵母（菌株972/ATCC 24843）（裂殖酵母）	adh4，SPAC5H10.06c	Q09669
酿酒酵母（菌株YJM789）（面包酵母）	ADH4，ZRG5，SCY_1818	A6ZTT5
酿酒酵母（菌株ATCC 204508/S288c）（面包酵母）	ADH4，ZRG5，YGL256W，NRC465	P10127
巴氏酵母（Saccharomyces pastorianus）（窖藏酵母）（酿酒酵母 x 真贝酵母（Saccharomyces eubayanus））	ADH5	Q6XQ67
家牛（牛）	ADH5	Q3ZC42
家马（马）	ADH5	P19854
小家鼠（Mus musculus）（小鼠）	Adh5，Adh-2，Adh2	P28474
褐家鼠（Rattus norvegicus）（大鼠）	Adh5，Adh-2，Adh2	P12711
家兔（Oryctolagus cuniculus）（兔）	ADH5，ADH3	O19053
智人（人类）	ADH5，ADHX，FDH	P11766

[0257]

生物体	基因名称	登录号
盘基网柄菌（Dictyostelium discoideum）（粘液菌）	adh5，DDB_G0281865	Q54TC2
酿酒酵母（菌株ATCC 204508/S288c）（面包酵母）	ADH5，YBR145W，YBR1122	P38113
智人（人类）	ADH6	P28332
鹿白足鼠（Peromyscus maniculatus）（北美鹿鼠）	ADH6	P41681
苏门答腊猩猩（Pongo abelii/Sumatran orangutan/Pongo pygmaeus abelii）	ADH6	Q5R7Z8
褐家鼠（Rattus norvegicus）（大鼠）	Adh6	Q5XI95
智人（人类）	ADH7	P40394
褐家鼠（Rattus norvegicus）（大鼠）	Adh7	P41682
小家鼠（Mus musculus）（小鼠）	Adh7，Adh-3，Adh3	Q64437
结核分枝杆菌（菌株CDC 1551/奥什科什（Oshkosh））	adhA，MT1911	P9WQC0
苜蓿根瘤菌（Rhizobium meliloti）（菌株1021）（苜蓿剑菌（Ensifer meliloti））（苜蓿中华根瘤菌（Sinorhizobium meliloti））	adhA，RA0704，SMa1296	O31186
结核分枝杆菌（菌株ATCC 25618/H37Rv）	adhA，Rv1862	P9WQC1
运动发酵单胞菌原亚种（Zymomonas mobilis subsp. mobilis）（菌株ATCC 31821/ZM4/CP4）	adhA，ZMO1236	P20368
牛分枝杆菌（Mycobacterium bovis）（菌株ATCC BAA-935/AF2122/97）	adhB，Mb0784c	Q7U1B9
结核分枝杆菌（菌株CDC 1551/奥什科什（Oshkosh））	adhB，MT0786	P9WQC6
结核分枝杆菌（菌株ATCC 25618/H37Rv）	adhB，Rv0761c，MTCY369.06c	P9WQC7
运动发酵单胞菌原亚种（Zymomonas mobilis subsp. mobilis）（菌株ATCC 31821/ZM4/CP4）	adhB，ZMO1596	P0DJA2
运动发酵单胞菌原亚种（菌株ATCC 10988/DSM 424/LMG 404/NCIMB 8938/NRRL B-806/ZM1）	adhB，Zmob_1541	F8DVL8
结核分枝杆菌（菌株CDC 1551/奥什科什（Oshkosh））	adhD，MT3171	P9WQB8
结核分枝杆菌（菌株ATCC 25618/H37Rv）	adhD，Rv3086	P9WQB9

[0258]

生物体	基因名称	登录号
丙酮丁醇梭菌（Clostridium acetobutylicum）（菌株ATCC 824/DSM 792/JCM 1419/LMG 5710/VKM B-1787）	adhE，aad，CA_P0162	P33744
大肠杆菌（菌株K12）	adhE，ana，b1241，JW1228	P0A9Q7
大肠杆菌O157:H7	adhE，Z2016，ECs1741	P0A9Q8
球形红细菌（Rhodobacter sphaeroides）（菌株ATCC 17023/2.4.1/NCIB 8253/DSM 158）	adhI，RHOS4_11650，RSP_2576	P72324
籼稻（Oryza sativa subsp. indica）（水稻）	ADHIII，OsI_009236	A2XAZ3
大肠杆菌（菌株K12）	adhP，yddN，b1478，JW1474	P39451
嗜热脂肪地芽孢杆菌（Geobacillus stearothermophilus）（嗜热脂肪芽孢杆菌（Bacillus stearothermophilus））	adhT	P12311
构巢裸胞壳（Emericella nidulans）（菌株FGSC A4/ATCC 38163/CBS 112.46/NRRL 194/M139）（构巢曲霉（Aspergillus nidulans））	alcA，AN8979	P08843
构巢裸胞壳（Emericella nidulans）（菌株FGSC A4/ATCC 38163/CBS 112.46/NRRL 194/M139）（构巢曲霉（Aspergillus nidulans））	alc，AN3741	P54202
构巢裸胞壳（Emericella nidulans）（菌株FGSC A4/ATCC 38163/CBS 112.46/NRRL 194/M139）（构巢曲霉（Aspergillus nidulans））	alcC，adh3，AN2286	P07754
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	At1g22430，F12K8.22	Q9SK86
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	At1g22440，F12K8.21	Q9SK87
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	At1g32780，F6N18.16	A1L4Y2
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	At1g64710，F13O11.3	Q8VZ49
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	At4g22110，F1N20.210	Q0V7W6
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	At5g24760，T4C12_30	Q8LEB2
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	At5g42250，K5J14.5	Q9FH04
玉蜀黍（Zea mays）（玉米）	FDH	P93629
黑腹果蝇（Drosophila melanogaster）（果蝇）	Fdh，gfd，ODH，CG6598	P46415
枯草芽孢杆菌（菌株DSM 168）	gbsB，BSU31050	P71017
秀丽隐杆线虫（Caenorhabditis elegans）	H24K24.3	Q17335
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	Os02g0815500，	Q0DWH1

[0259]

生物体	基因名称	登录号
	LOC_Os02g57040，OsJ_008550，P0643F09.4	
结核分枝杆菌（菌株ATCC 25618/H37Rv）	Rv1895	O07737
秀丽隐杆线虫（Caenorhabditis elegans）	sodh-1，K12G11.3	Q17334
秀丽隐杆线虫（Caenorhabditis elegans）	sodh-2，K12G11.4	O45687
假单胞菌属物种（Pseudomonas sp.）	terPD	P33010
大肠杆菌（菌株K12）	yiaY，b3589，JW5648	P37686
莫拉氏菌属物种（Moraxella sp.）（菌株TAE123）		P81786
美国短吻鳄（Alligator mississippiensis/American alligator）		P80222
日日春（Catharanthus roseus）（马达加斯加长春花（Madagascar periwinkle））（玫瑰红长春花（Vinca rosea））		P85440
大西洋鳕卡拉瑞斯亚种（Gadus morhua subsp.callarias）（波罗的海鳕鱼）（卡拉瑞斯鳕（Gadus callarias））		P26325
眼镜蛇（Naja naja）（印度眼镜蛇）		P80512
豌豆（Pisum sativum\Garden pea）		P12886
佩氏侧褶蛙（Pelophylax perezi）（佩氏青蛙（Perez's frog））（佩氏蛙（Rana perezi））		P22797
哈氏萨拉蜥（Saara hardwickii）（印度刺尾飞蜥（Indian spiny-tailed lizard））（印度王者蜥（Uromastyx hardwickii））		P25405
哈氏萨拉蜥（Saara hardwickii）（印度刺尾飞蜥（Indian spiny-tailed lizard））（印度王者蜥（Uromastyx hardwickii））		P25406
家马（马）		P00327
家马（马）		P00328
嗜热脂肪地芽孢杆菌（Geobacillus stearothermophilus）（嗜热脂肪芽孢杆菌（Bacillus stearothermophilus））		P42328
大西洋鳕（Gadus morhua/Atlantic cod）		P81600
大西洋鳕（Gadus morhua/Atlantic cod）		P81601
大西洋盲鳗（Myxine glutinosa/Atlantic		P80360

生物体	基因名称	登录号
hagfish）		
普通章鱼(Octopus vulgaris/Common octopus）		P81431
豌豆（Pisum sativum\Garden pea）		P80572
哈氏萨拉蜥（Saara hardwickii）（印度刺尾飞蜥（Indian spiny-tailed lizard））（印度王者蜥（Uromastyx hardwickii））		P80467
小斑猫鲨(Scyliorhinus canicula/Small-spotted catshark）（小斑角鲨（Squalus canicula））		P86884
金头鲷（Sparus aurata/Gilthead sea bream）		P79896

[0260]

[0261] 表3a.另外示例性醇脱氢酶

[0262]

生物体	登录号
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q2K7
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q2W6
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	AKD01723.1
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q4H2
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q1E8
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q2K3
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q4H7
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q2J9
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q0W0
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q0V0
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q1F1
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q2X2
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q4I2
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q2X0
棉铃虫（Helicoverpa armigera）	A0A0F6Q2L9
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q4K1
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q4J7
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q2Y5

[0263]

生物体	登录号
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q2Y1
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q1G6
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q2Y9
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q0X5
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q2M3
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q2L1
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q1F9
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q0W6
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q1G9
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q2L4
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q2X6
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q1H3
烟夜蛾（Helicoverpa assulta）	A0A0F6Q0X1
家蚕（Bombyx mori）	NP_001188510.1
埃及伊蚊（Aedes aegypti）	XP_001655103.1
达氏按蚊（Anopheles darlingi）	ETN64198.1
解脂耶氏酵母（Yarrowia lipolytica）	YALI0F09603g (FADH)、YALI0D25630g (ADH1)、YALI0E17787g (ADH2)、YALI0A16379g (ADH3)、YALI0E15818g (ADH4)、YALI0D02167g (ADH5)、YALI0A15147g (ADH6)、YALI0E07766g (ADH7)

[0264] 在一些实施方案中,本公开教导了一种重组微生物,其包含选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7)的一种或多种内源(脂肪)醇脱氢酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低。

[0265] 因此,在一些实施方案中,本公开的重组微生物将会包含内源基因的缺失或其他

破坏,该内源基因编码与由YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)和YALI0E07766g(ADH7)编码的蛋白质表现出至少100％、99％、98％、97％、95％、94％、93％、92％、91％或90％序列同一性的蛋白质。

[0266] 因此,在一些实施方案中,本公开的重组微生物将会包含内源基因的缺失,该内源基因编码与uniprot数据库ID Q6C297(FADH)、Q6C7T0(ADH1)、F2Z678(ADH2)、Q6CGT5(ADH3)、Q6C5R5(ADH4)、Q6CAT5(ADH5)、Q6CGX5(ADH6)和Q6C7K3(ADH7)表现出至少100％、99％、98％、97％、95％、94％、93％、92％、91％或90％序列同一性的蛋白质。

[0267] 醇氧化酶

[0268] 本公开文本描述了将脂肪醇氧化为脂肪醛的酶。

[0269] 在一些实施方案中,使用醇氧化酶(AOX)来催化脂肪醇转化为脂肪醛。醇氧化酶通过使用分子氧进行的电子转移来催化醇转化为相应的醛(或酮),以形成作为副产物的过氧化氢。AOX酶利用黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)作为必需的辅因子,并在反应介质中的氧气帮助下再生。过氧化氢酶可与AOX偶联以避免过氧化氢通过催化转化为水和氧而累积。

[0270] 基于底物特异性,AOX可被分为四组:(a)短链醇氧化酶,(b)长链醇氧化酶,(c)芳香醇氧化酶以及(d)仲醇氧化酶(Goswami et al.2013)。取决于所希望的底物的链长,这四组中的一些成员比其他的更适合作为评价候选项。

[0271] 短链醇氧化酶(包括但不限于目前分类为EC 1.1.3.13的那些,表4)催化C1-C8碳范围内的低链长醇底物氧化(van der Klei et al.1991)(Ozimek et al.2005)。来自甲基营养酵母如博伊丁假丝酵母和毕赤酵母(Komagataella pastoris)(以前称为巴斯德毕赤酵母)的脂肪醇氧化酶催化伯烷醇氧化为相应的醛,无支链的短链脂肪醇优先。发现对于来自巴斯德毕赤酵母的醇氧化酶(包括炔丙醇、2-氯乙醇、2-氰基乙醇)具有最广泛的底物特异性(Dienys et al.2003)。醇氧化中遇到的主要挑战是醛产物的高反应性。利用双液相体系(水/溶剂)可以将醛产物在进一步转化为酸之前从反应相中原位除去。例如,在双相系统中利用水相中稳定的醇氧化酶的存在实现了使用与牛肝过氧化氢酶偶合的巴斯德毕赤酵母醇氧化酶由己醇产生己醛(Karra-Chaabouni et al.2003)。例如,当使用双相有机反应体系(Murray and Duff 1990)时,来自巴斯德毕赤酵母的醇氧化酶能够氧化C6至C11的脂族醇。通过引用以全部内容并入在根据(Karra-Chaabouni et al.2003)和(Murray and Duff 1990)的双相系统中使用醇氧化酶的方法。

[0272] 长链醇氧化酶(包括但不限于目前分类为EC 1.1.3.20的那些;表5)包括脂肪醇氧化酶、长链脂肪酸氧化酶和长链脂肪醇氧化酶,该氧化酶氧化碳链长度大于六的醇底物(Goswami et al.2013)。Banthorpee等人报道了从菊蒿(Tanacetum vulgare)的叶子纯化的长链醇氧化酶,其能够氧化饱和和不饱和的长链醇底物,包括己-反式-2-烯-1-醇和辛-1-醇(Banthorpe 1976)(Cardemil1978)。其他植物物种,包括加州希蒙得木(Moreau,R.A.,Huang 1979)、拟南芥(Cheng et al.2004)和莲花(Zhao et al.2008),也被报道为长链醇氧化酶的来源。脂肪醇氧化酶主要报道来自酵母菌物种(Hommel and Ratledge1990)(Vanhanen et al.2000)(Hommel et al.1994)(Kemp et al.1990),并且这些酶在长链脂肪酸代谢中起着重要作用(Cheng et al.2005)。来自酵母物种的脂肪醇氧化酶(其在长链烷烃和脂肪酸上降解和生长)催化脂肪醇的氧化。来自热带假丝酵母的脂肪醇氧化酶已经

作为微粒体细胞级分进行分离,并针对一系列底物(Eirich et al.2004)(Kemp et al.1988)(Kemp et al.1991)(Mauersberger et al.1992)进行表征。对于长度为C_8至C_{16}的伯醇观察到显著的活性,报道的K_M在10-50μM范围内(Eirich et al.2004)。所述的醇氧化酶可用于将中链脂肪醇转化为醛,例如,针对全细胞博伊丁假丝酵母(Gabelman and Luzio 1997)和巴斯德毕赤酵母(Duff and Murray 1988)(Murray and Duff 1990)所描述的。在烃底物上生长期间从丝状真菌产生长链醇氧化酶(Kumar and Goswami 2006)(Savitha and Ratledge 1991)。来自日本荷花的长链脂肪醇氧化酶(LjFAO1)已经在大肠杆菌中异源表达,并且对醇氧化包括1-十二烷醇和1-十六烷醇展现出广泛的底物特异性(Zhao et al.2008)。

[0273] 表4.能够氧化短链醇的醇氧化酶(EC 1.1.3.13)

[0274]

生物体	基因名称	登录号
毕赤酵母(Komagataella pastoris)(菌株ATCC 76273/CBS 7435/CECT 11047/NRRL	AOX1 PP7435_Chr4-0130	F2QY27

[0275]

生物体	基因名称	登录号
Y-11430/Wegner 21-1）（酵母）（巴斯德毕赤酵母（Pichia pastoris））		
毕赤酵母（Komagataella pastoris）（菌株GS115/ATCC 20864）（酵母）（巴斯德毕赤酵母（Pichia pastoris））	AOX1 PAS_chr4_0821	P04842
毕赤酵母（Komagataella pastoris）（菌株ATCC 76273/CBS 7435/CECT 11047/NRRL Y-11430/Wegner 21-1）（酵母）（巴斯德毕赤酵母（Pichia pastoris））	AOX2 PP7435_Chr4-0863	F2R038
毕赤酵母（Komagataella pastoris）（菌株GS115/ATCC 20864）（酵母）（巴斯德毕赤酵母（Pichia pastoris））	AOX2 PAS_chr4_0152	C4R702
博伊丁假丝酵母（*Candida boidinii*）（酵母）	AOD1	Q00922
安格斯毕赤酵母（Pichia angusta）（酵母）（多形汉逊酵母）	MOX	P04841
瓜亡革菌（Thanatephorus cucumeris）（菌株AG1-IB/分离株7/3/14）（莴苣底腐病菌）（立枯丝核菌（Rhizoctonia solani））	AOD1 BN14_10802	M5CC52
瓜亡革菌（Thanatephorus cucumeris）（菌株AG1-IB/分离株7/3/14）（莴苣底腐病菌）（立枯丝核菌（Rhizoctonia solani））	MOX BN14_12214	M5CF32
瓜亡革菌（Thanatephorus cucumeris）（菌株AG1-IB/分离株7/3/14）（莴苣底腐病菌）（立枯丝核菌（Rhizoctonia solani））	AOD1 BN14_10691	M5CAV1
瓜亡革菌（Thanatephorus cucumeris）（菌株AG1-IB/分离株7/3/14）（莴苣底腐病菌）（立枯丝核菌（Rhizoctonia solani））	AOD1 BN14_09479	M5C7F4
瓜亡革菌（Thanatephorus cucumeris）（菌株AG1-IB/分离株7/3/14）（莴苣底腐病菌）（立枯丝核菌（Rhizoctonia solani））	AOD1 BN14_10803	M5CB66
瓜亡革菌（Thanatephorus cucumeris）（菌株AG1-IB/分离株7/3/14）（莴苣底腐病菌）（立枯丝核菌（Rhizoctonia solani））	AOD1 BN14_09900	M5C9N9
瓜亡革菌（Thanatephorus cucumeris）（菌株AG1-IB/分离株7/3/14）（莴苣底腐病菌）（立枯丝核菌（Rhizoctonia solani））	AOD1 BN14_08302	M5C2L8
瓜亡革菌（Thanatephorus cucumeris）（菌株AG1-IB/分离株7/3/14）（莴苣底腐病菌）（立枯	MOX BN14_09408	M5C784

[0276]

生物体	基因名称	登录号
丝核菌（Rhizoctonia solani））		
瓜亡革菌（Thanatephorus cucumeris）（菌株AG1-IB/分离株7/3/14）（莴苣底腐病菌）（立枯丝核菌（Rhizoctonia solani））	MOX BN14_09478	M5C8F8
瓜亡革菌（Thanatephorus cucumeris）（菌株AG1-IB/分离株7/3/14）（莴苣底腐病菌）（立枯丝核菌（Rhizoctonia solani））	AOD1 BN14_11356	M5CH40
Ogataea henricii	AOD1	A5LGF0
甲醇山梨糖假丝酵母（Candida methanosorbosa）	AOD1	A5LGE5
Candida methanolovescens	AOD1	A5LGE4
Candida succiphila	AOD1	A5LGE6
黑曲霉（菌株CBS 513.88/FGSC A1513）	An15g02200	A2R501
黑曲霉（菌株CBS 513.88/FGSC A1513）	An18g05480	A2RB46
Moniliophthora perniciosa（丛枝病真菌（Witches'-broom disease fungus））（Marasmius perniciosus）		I7CMK2
Candida cariosilignicola	AOD1	A5LGE3
Candida pignaliae	AOD1	A5LGE1
Candida pignaliae	AOD2	A5LGE2
索诺拉沙漠假丝酵母（Candida sonorensis）	AOD1	A5LGD9
索诺拉沙漠假丝酵母（Candida sonorensis）	AOD2	A5LGE0
Pichia naganishii	AOD1	A5LGF2
Ogataea minuta	AOD1	A5LGF1
Ogataea philodendra	AOD1	A5LGF3
Ogataea wickerhamii	AOD1	A5LGE8
Kuraishia capsulate	AOD1	A5LGE7
柄篮状菌（Talaromyces stipitatus）（菌株ATCC 10500/CBS 375.48/QM 6759/NRRL 1006）（斯蒂派姆青霉（Penicillium stipitatum））	TSTA_021940	B8MHF8
柄篮状菌（Talaromyces stipitatus）（菌株ATCC 10500/CBS 375.48/QM 6759/NRRL 1006）（斯蒂派姆青霉（Penicillium stipitatum））	TSTA_065150	B8LTH7
柄篮状菌（Talaromyces stipitatus）（菌株ATCC 10500/CBS 375.48/QM 6759/NRRL 1006）（斯蒂	TSTA_065150	B8LTH8

[0277]

生物体	基因名称	登录号
派姆青霉（Penicillium stipitatum））		
柄篮状菌（Talaromyces stipitatus）（菌株ATCC 10500/CBS 375.48/QM 6759/NRRL 1006）（斯蒂派姆青霉（Penicillium stipitatum））	TSTA_000410	B8MSB1
Ogataea glucozyma	AOD1	A5LGE9
Ogataea parapolymorpha（菌株DL-1/ATCC 26012/NRRL Y-7560）（酵母）（多形汉逊酵母）	HPODL_03886	W1QCJ3
密粘褶菌（Gloeophyllumllum trabeum）（褐腐菌）	AOX	A8DPS4
安格斯毕赤酵母（Pichia angusta）（酵母）（多形汉逊酵母）	mox1	A6PZG8
喜海藻糖毕赤酵母（Pichia trehalophila）	AOD1	A5LGF4
安格斯毕赤酵母（Pichia angusta）（酵母）（多形汉逊酵母）	mox1	A6PZG9
安格斯毕赤酵母（Pichia angusta）（酵母）（多形汉逊酵母）	mox1	A6PZG7
肩板硬蜱（Ixodes scapularis）（黑腿壁虱）（鹿蜱）	IscW_ISCW017898	B7PIZ7

[0278] 表5.能够氧化包括脂肪醇在内的长链醇的醇氧化酶(EC 1.1.3.20)

[0279]

生物体	基因名称	登录号
日本百脉根（Lotus japonicus/Lotus corniculatus var.japonicus）	FAO1	B5WWZ8
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	FAO1 At1g03990 F21M11.7	Q9ZWB9
日本百脉根（Lotus japonicus/Lotus corniculatus var.japonicus）	FAO2	B5WWZ9
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	FAO3 At3g23410 MLM24.14 MLM24.23	Q9LW56
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	FAO4A At4g19380 T5K18.160	O65709
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）	FAO4B At4g28570 T5F17.20	Q94BP3
花药黑粉菌（Microbotryum violaceum）（菌株p1A1 Lamole）（花药黑粉病菌（Anther smut fungus））（花药黑粉菌	MVLG_06864	U5HIL4

[0280]

生物体	基因名称	登录号
（Astillgo violacea））		
皮炎芽生菌（Ajellomyces dermatitidis）ATCC 26199	BDFG_03507	T5BNQ0
玉米赤霉菌（Gibberella zeae）（菌株PH-1/ATCC MYA-4620/FGSC 9075/NRRL 31084）（小麦赤霉病菌）（禾谷镰刀菌（Fusarium graminearum））	FG06918.1 FGSG_06918	I1RS14
嗜山梨醇毕赤酵母(Pichia sorbitophila)（菌株ATCC MYA-4447/BCRC 22081/CBS 7064/NBRC 10061/NRRL Y-12695）（杂种酵母）	Piso0_004410 GNLVRS01_PISO0K16268g GNLVRS01_PISO0L16269g	G8Y5E1
构巢裸胞壳（Emericella nidulans）（菌株FGSC A4/ATCC 38163/CBS 112.46/NRRL 194/M139）（构巢曲霉（Aspergillus nidulans））	AN0623.2 ANIA_00623	Q5BFQ7
偃麦草核腔菌（Pyrenophora tritici-repentis）（菌株Pt-1C-BFP）（小麦褐斑病菌）（偃麦草内脐蠕孢（Drechslera tritici-repentis））	PTRG_10154	B2WJW5
鲁特兹副球孢子菌（Paracoccidioides lutzii）（菌株ATCC MYA-826/Pb01）（巴西副球孢子菌（Paracoccidioides brasiliensis））	PAAG_09117	C1HEC6
近平滑假丝酵母（Paracoccidioides lutzii）（菌株CDC 317/ATCC MYA-4646）（酵母）（近平滑念珠菌（Monilia parapsilosis））	CPAR2_204420	G8BG15
Pseudozyma brasiliensis（菌株GHG001）（酵母）	PSEUBRA_SCAF2g03010	V5GPS6
近平滑假丝酵母（Paracoccidioides lutzii）（菌株CDC 317/ATCC MYA-4646）（酵母）（近平滑念珠菌（Monilia parapsilosis））	CPAR2_204430	G8BG16
北方贝核盘霉（Sclerotinia borealis）F-4157	SBOR_5750	W9CDE2
Sordaria macrospora（菌株ATCC MYA-333/DSM 997/K(L3346)/K-hell）	SMAC_06361	F7W6K4
Sordaria macrospora（菌株ATCC	SMAC_01933	F7VSA1

[0281]

生物体	基因名称	登录号
MYA-333/DSM 997/K(L3346)/K-hell）		
季也蒙假丝酵母（Meyerozyma guilliermondii）（菌株ATCC 6260/CBS 566/DSM 6381/JCM 1539/NBRC 10279/NRRL Y-324）（酵母）（季也蒙假丝酵母（Candida guilliermondii））	PGUG_03467	A5DJL6
红色毛癣菌（Trichophyton rubrum）CBS 202.88	H107_00669	A0A023ATC5
寡孢节丛孢（Arthrobotrys oligospora）（菌株ATCC 24927/CBS 115.81/DSM 1491）（线虫捕获真菌）（Didymozoophaga oligospora）	AOL_s00097g516	G1XJI9
Scheffersomyces stipitis（菌株ATCC 58785/CBS 6054/NBRC 10063/NRRL Y-11545）(酵母)(树干毕赤酵母(Pichia stipitis））	FAO1 PICST_90828	A3LYX9
Scheffersomyces stipitis（菌株ATCC 58785/CBS 6054/NBRC 10063/NRRL Y-11545）(酵母)(树干毕赤酵母(Pichia stipitis））	FAO2 PICST_32359	A3LW61
米曲霉（菌株3.042）（黄曲霉（Yellow koji mold））	Ao3042_09114	I8TL25
尖孢镰刀菌（Fusarium oxysporum）（菌株Fo5176）（脉管镰刀菌（Fusarium vascular）枯萎病菌）	FOXB_17532	F9GFU8
德氏根霉（Rhizopus delemar）（菌株RA 99-880/ATCC MYA-4621/FGSC 9543/NRRL 43880）（毛霉菌病药）（少根根霉德氏变种（Rhizopus arrhizus var.delemar））	RO3G_08271	I1C536
德氏根霉（Rhizopus delemar）（菌株RA 99-880/ATCC MYA-4621/FGSC 9543/NRRL 43880）（毛霉菌病药）（少根根霉德氏变种（Rhizopus arrhizus var.delemar））	RO3G_00154	I1BGX0
尖孢镰刀菌（Fusarium oxysporum）（菌株Fo5176）（脉管镰刀菌（Fusarium vascular）枯萎病菌）	FOXB_07532	F9FMA2
罗克福尔青霉（Penicillium roqueforti）	PROQFM164_S02g001772	W6QPY1

[0282]

生物体	基因名称	登录号
棒曲霉（Aspergillus clavatus）（菌株ATCC 1007/CBS 513.65/DSM 816/NCTC 3887/NRRL 1）	ACLA_018400	A1CNB5
太田节皮菌（Arthroderma otae）（菌株ATCC MYA-4605/CBS 113480）（犬小孢子菌（Microsporum canis））	MCYG_08732	C5G1B0
断头毛癣菌（Trichophyton tonsurans）（菌株CBS 112818）（头皮癣菌（Scalp ringworm fungus））	TESG_07214	F2S8I2
希金斯炭疽菌（Colletotrichum higginsianum）（菌株IMI 349063）（十字花科炭疽病菌）	CH063_13441	H1VUE7
荚膜组织胞浆菌（Ajellomyces capsulatus）（菌株H143）（达林氏病真菌）（荚膜组织胞浆菌（Histoplasma capsulatum））	HCDG_07658	C6HN77
红色毛癣菌（Trichophyton rubrum）（菌株ATCC MYA-4607/CBS 118892）（运动员足部真菌）	TERG_08235	F2T096
异旋孢腔菌（Cochliobolus heterostrophus）（菌株C5/ATCC 48332/种族O）（南方玉米叶枯病菌）（玉蜀黍平脐蠕孢（Bipolaris maydis））	COCHEDRAFT_1201414	M2UMT9
拟平滑假丝酵母（Candida orthopsilosis）（菌株90-125）（酵母）	CORT_0D04510	H8X643
拟平滑假丝酵母（Candida orthopsilosis）（菌株90-125）（酵母）	CORT_0D04520	H8X644
拟平滑假丝酵母（Candida orthopsilosis）（菌株90-125）（酵母）	CORT_0D04530	H8X645
Pseudozyma aphidis DSM 70725	PaG_03027	W3VP49
波萨达斯球孢子菌（Coccidioides posadasii）（菌株C735）（谷热病菌）	CPC735_000380	C5P005
稻瘟病菌（Magnaporthe oryzae/Rice blast fungus/Pyricularia oryzae）（菌株P131）	OOW_P131scaffold01214g15	L7IZ92
四孢脉孢菌（Neurospora tetrasperma）（菌株FGSC 2508/ATCC MYA-4615/P0657）	NEUTE1DRAFT_82541	F8MKD1

[0283]

生物体	基因名称	登录号
绿色木霉菌（Hypocrea virens）（菌株Gv29-8/FGSC 10586）（绿粘帚霉（Gliocladium virens））（绿木霉菌（Trichoderma virens））	TRIVIDRAFT_54537	G9MMY7
绿色木霉菌（Hypocrea virens）（菌株Gv29-8/FGSC 10586）（绿粘帚霉（Gliocladium virens））（绿木霉菌（Trichoderma virens））	TRIVIDRAFT_53801	G9MT89
黑曲霉（菌株CBS 513.88/FGSC A1513）	An01g09620	A2Q9Z3
大丽轮枝菌（Verticillium dahliae）（菌株 VdLs.17/ATCC MYA-4575/FGSC 10137）（轮枝菌枯萎病）	VDAG_05780	G2X6J8
玉米黑粉菌（Ustilago maydis）（菌株521/FGSC 9021）（玉米黑穗病菌）	UM02023.1	Q4PCZ0
尖孢镰刀菌番茄专化型（Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici）MN25	FOWG_13006	W9LNI9
尖孢镰刀菌番茄专化型（Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici）MN25	FOWG_02542	W9N9Z1
热带假丝酵母（酵母）	FAO1	Q6QIR6
稻瘟病菌（Magnaporthe oryzae/Rice blast fungus/Pyricularia oryzae）（菌株70-15/ATCC MYA-4617/FGSC 8958）	MGG_11317	G4MVK1
热带假丝酵母（酵母）	faot	Q9P8D9
热带假丝酵母（酵母）	FAO2a	Q6QIR5
颖枯暗球腔菌（Phaeosphaeria nodorum）（菌株SN15/ATCC MYA-4574/FGSC 10173）（颖斑纹病菌）（颖枯壳针孢（Septoria nodorum））	SNOG_02371	Q0V0U3
热带假丝酵母（酵母）	FAO2b	Q6QIR4
无花果拟盘多毛孢（Pestalotiopsis fici）W106-1	PFICI_11209	W3WU04
稻瘟病菌（Magnaporthe oryzae/Rice blast fungus/Pyricularia oryzae）（菌株Y34）	OOU_Y34scaffold00240g57	L7IFT5
毁灭假裸囊菌（Pseudogymnoascus destructans）（菌株ATCC MYA-4855/20631-21）（蝙蝠白鼻综合	GMDG_01756	L8G0G6

[0284]

生物体	基因名称	登录号
征真菌）（毁灭地丝霉（Geomyces destructans））		
毁灭假裸囊菌（Pseudogymnoascus destructans）（菌株ATCC MYA-4855/20631-21）（蝙蝠白鼻综合征真菌）（毁灭地丝霉（Geomyces destructans））	GMDG_04950	L8GCY2
斐济球腔菌（Mycosphaerella fijiensis）（菌株CIRAD86）（黑叶条斑病真菌）（斐济假尾孢菌（Pseudocercospora fijiensis））	MYCFIDRAFT_52380	M2Z831
稻平脐蠕孢（Bipolaris oryzae）ATCC 44560	COCMIDRAFT_84580	W7A0I8
Cladophialophora psammophila CBS 110553	A1O5_08147	W9WTM9
尖镰刀菌甜瓜专化型（Fusarium oxysporum f. sp. melonis）26406	FOMG_05173	X0AEE6
尖镰刀菌甜瓜专化型（Fusarium oxysporum f. sp. melonis）26406	FOMG_17829	W9ZBB7
Cyphellophora europaea CBS 101466	HMPREF1541_02174	W2S2S5
白曲霉（Aspergillus kawachii）（菌株NBRC 4308）（白曲霉）（泡盛曲霉河内变种（Aspergillus awamori var. kawachi））	AKAW_00147	G7X626
土曲霉（菌株NIH 2624/FGSC A1156）	ATEG_05086	Q0CMJ8
粗球孢子菌（菌株RS）（谷热病菌）	CIMG_02987	J3KAI8
皮炎组织胞浆菌（菌株ER-3/ATCC MYA-2586）（皮炎芽生菌（Blastomyces dermatitidis））	BDCG_04701	C5GLS5
尖孢镰刀菌古巴专化型（Fusarium oxysporum f. sp. cubense）（菌株种族1）（巴拿马病真菌）	FOC1_g10013865	N4U732
粘红酵母（菌株ATCC 204091/IIP 30/MTCC 1151）（酵母）	RTG_00643	G0SVU8
黑曲霉（菌株ATCC 1015/CBS 113.46/FGSC A1144/LSHB Ac4/NCTC 3858a/NRRL 328/USDA 3528.7）	ASPNIDRAFT_35778	G3XTM6
阴沟假丝酵母	fao1	Q9P8D8

[0285]

生物体	基因名称	登录号
阴沟假丝酵母	fao2	Q9P8D7
尖孢镰刀菌古巴专化型（Fusarium oxysporum f. sp. cubense）（菌株种族1）（巴拿马病真菌）	FOC1_g10006358	N4TUH3
白假丝酵母（菌株SC5314/ATCC MYA-2876）（酵母）	FAO1 CaO19.13562 orf19.13562	Q59RS8
白假丝酵母（菌株SC5314/ATCC MYA-2876）（酵母）	FAO1 CaO19.6143 orf19.6143	Q59RP0
嗜热毛壳菌（Chaetomium thermophilum）（菌株DSM 1495/CBS 144.50/IMI 039719）	CTHT_0018560	G0S2U9
卷枝毛霉原变型（Mucor circinelloides f. circinelloides）（菌株1006PhL）（毛霉菌病药）（Calyptromyces circinelloides）	HMPREF1544_05296	S2JDN0
卷枝毛霉原变型（Mucor circinelloides f. circinelloides）（菌株1006PhL）（毛霉菌病药）（Calyptromyces circinelloides）	HMPREF1544_05295	S2JYP5
卷枝毛霉原变型（Mucor circinelloides f. circinelloides）（菌株1006PhL）（毛霉菌病药）（Calyptromyces circinelloides）	HMPREF1544_06348	S2JVK9
富氏葡萄孢盘菌（Botryotinia fuckeliana）（菌株BcDW1）（贵腐病菌）（灰葡萄孢菌（Botrytis cinerea））	BcDW1_6807	M7UD26
鹅柄孢壳菌（Podospora anserina）（菌株S/ATCC MYA-4624/DSM 980/FGSC 10383）（Pleurage anserina）	PODANS_5_13040	B2AFD8
烟色新萨托菌（Neosartorya fumigata）（菌株ATCC MYA-4609/Af293/CBS 101355/FGSC A1100）（烟曲霉）	AFUA_1G17110	Q4WR91
尖孢镰刀菌萎蔫专化型（Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum）25433	FOTG_00686	X0MEE6
尖孢镰刀菌萎蔫专化型（Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum）25433	FOTG_12485	X0LE98
趾间毛癣菌（Trichophyton interdigitale）H6	H101_06625	A0A022U717

[0286]

生物体	基因名称	登录号
球孢白僵菌（Beauveria bassiana）（菌株ARSEF 2860）（白僵病真菌）（Tritirachium shiotae）	BBA_04100	J4UNY3
尖孢镰刀菌番茄根腐萎凋专化型（Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici）26381	FOCG_00843	X0GQ62
尖孢镰刀菌番茄根腐萎凋专化型（Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici）26381	FOCG_15170	X0F4T1
四孢脉孢菌（Neurospora tetrasperma）（菌株FGSC 2509/P0656）	NEUTE2DRAFT_88670	G4UNN6
湖北假酶菌（Pseudozyma hubeiensis）（菌株SY62）（酵母）	PHSY_000086	R9NVU1
长孢洛德酵母（Lodderomyces elongisporus）（菌株ATCC 11503/CBS 2605/JCM 1781/NBRC 1676/NRRL YB-4239）（酵母）（长孢酵母（Saccharomyces elongisporus））	LELG_03289	A5E102
球形马拉色菌（Malassezia globosa）（菌株ATCC MYA-4612/CBS 7966）（头皮屑相关真菌）	MGL_3855	A8QAY8
壮观丝衣霉（Byssochlamys spectabilis）（菌株编号5/NBRC 109023）（多变拟青霉（Paecilomyces variotii））	PVAR5_7014	V5GBL6
荚膜组织胞浆菌（Ajellomyces capsulatus）（菌株H88）（达林氏病真菌）（荚膜组织胞浆菌（Histoplasma capsulatum））	HCEG_03274	F0UF47
阿萨希毛孢子菌原变种（Trichosporon asahii var. asahii）（菌株ATCC 90039/CBS 2479/JCM 2466/KCTC 7840/NCYC 2677/UAMH 7654）（酵母）	A1Q1_03669	J6FBP4
草酸青霉（Penicillium oxalicum）（菌株114-2/CGMCC 5302）（斜卧青霉（Penicillium decumbens））	PDE_00027	S7Z8U8
尖孢镰刀菌粘团专化型（Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans）种族2 54008	FOPG_02304	X0IBE3
尖孢镰刀菌粘团专化型（Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans）种族2	FOPG_13066	X0H540

[0287]

生物体	基因名称	登录号
54008		
尖孢镰刀菌萝卜属专化型（Fusarium oxysporum f. sp. raphani）54005	FOQG_00704	X0D1G8
尖孢镰刀菌萝卜属专化型（Fusarium oxysporum f. sp. raphani）54005	FOQG_10402	X0C482
蝗绿僵菌（Metarhizium acridum）（菌株CQMa 102）	MAC_03115	E9DZR7
贝纳米节丝皮菌（Arthroderma benhamiae）（菌株ATCC MYA-4681/CBS 112371）（须毛癣菌（Trichophyton mentagrophytes））	ARB_02250	D4B1C1
尖孢镰刀菌古巴专化型（Fusarium oxysporum f. sp. Cubense）热带种族4 54006	FOIG_12161	X0JFI6
尖孢镰刀菌古巴专化型（Fusarium oxysporum f. sp. Cubense）热带种族4 54006	FOIG_12751	X0JDU5
异旋孢腔菌（Cochliobolus heterostrophus）（菌株C4/ATCC 48331/种族T）（南方玉米叶枯病菌）（玉蜀黍平脐蠕孢（Bipolaris maydis））	COCC4DRAFT_52836	N4WZZ0
阿萨希毛孢子菌原变种（Trichosporon asahii var. asahii）（菌株CBS 8904）（酵母）	A1Q2_00631	K1VZW1
禾生球腔菌（Mycosphaerella graminicola）（菌株CBS 115943/IPO323）（斑点叶枯病菌）（小麦壳针孢（Septoria tritici））	MYCGRDRAFT_37086	F9X375
富氏葡萄孢盘菌（Botryotinia fuckeliana）（菌株T4）（贵腐病菌）（灰葡萄孢菌（Botrytis cinerea））	BofuT4_P072020.1	G2XQ18
金龟子绿僵菌（Metarhizium anisopliae）（菌株ARSEF 23/ATCC MYA-3075）	MAA_05783	E9F0I4
卡氏枝孢瓶霉（Cladophialophora carrionii）CBS 160.54	G647_05801	V9DAR1
波萨达斯球孢子菌（Coccidioides posadasii）（菌株RMSCC 757/Silveira）（谷热病菌）	CPSG_09174	E9DH75

[0288]

生物体	基因名称	登录号
圆红冬孢酵母（Rhodosporidium toruloides）（菌株NP11）（酵母）（瘦弱红酵母（Rhodotorula gracilis））	RHTO_06879	M7X159
禾柄锈菌小麦专化型（菌株CRL 75-36-700-3/种族SCCL）（秆锈病菌）	PGTG_10521	E3KIL8
红色毛癣菌(Trichophyton rubrum)CBS 288.86	H103_00624	A0A022WG28
Colletotrichum fioriniae PJ7	CFIO01_08202	A0A010RKZ4
红色毛癣菌(Trichophyton rubrum)CBS 289.86	H104_00611	A0A022XB46
Cladophialophora yegresii CBS 114405	A1O7_02579	W9WC55
黄瓜炭疽菌(Colletotrichum orbiculare)（菌株104-T/ATCC 96160/CBS 514.97/LARS 414/MAFF 240422）（黄瓜炭疽病菌）（葫芦科刺盘孢菌（Colletotrichum lagenarium））	Cob_10151	N4VFP3
Drechslerella stenobrocha 248	DRE_03459	W7IDL6
烟色新萨托菌（Neosartorya fumigata）（菌株CEA10/CBS 144.89/FGSC A1163）（烟曲霉）	AFUB_016500	B0XP90
太瑞斯梭孢壳霉（Thielavia terrestris）（菌株ATCC 38088/NRRL 8126）（亚拉巴马枝顶孢（Acadmonium alabamense））	THITE_2117674	G2R8H9
藤仓赤霉（Gibberella fujikuroi）（菌株CBS 195.34/IMI 58289/NRRL A-6831）（恶苗病和脚腐病真菌）（藤仓镰刀菌（Fusarium fujikuroi））	FFUJ_02948	S0DZP7
藤仓赤霉（Gibberella fujikuroi）（菌株CBS 195.34/IMI 58289/NRRL A-6831）（恶苗病和脚腐病真菌）（藤仓镰刀菌（Fusarium fujikuroi））	FFUJ_12030	S0EMC6
黄曲霉(Aspergillus flavus)(菌株ATCC 200026/FGSC A1120/NRRL 3357/JCM 12722/SRRC 167)	AFLA_109870	B8N941
Togninia minima（菌株UCR-PA7）(埃斯卡病（Esca disease）真菌）（Phaeoacremonium aleophilum）	UCRPA7_1719	R8BTZ6
皮炎组织胞浆菌（菌株ATCC	BDDG_09783	F2TUC0

[0289]

生物体	基因名称	登录号
18188/CBS 674.68）（皮炎芽生菌（Blastomyces dermatitidis））		
菜豆壳球孢菌（Macmatomina phaseolina）（菌株MS6）（木炭腐菌真菌）	MPH_10582	K2RHA5
粗糙脉孢霉（Neurospora crassa）（菌株 ATCC 24698/74-OR23-1A/CBS 708.71/DSM 1257/FGSC 987）	NCU08977	Q7S2Z2
费希新萨托菌（Neosartorya fischeri）（菌株ATCC 1020/DSM 3700/FGSC A1164/NRRL 181）（费氏曲霉（Aspergillus fischerianus））	NFIA_008260	A1D156
假小麦赤霉镰刀菌（Fusarium pseudograminearum）（菌株CS3096）（小麦和大麦冠腐病真菌）	FPSE_11742	K3U9J5
Spathaspora passalidarum（菌株NRRL Y-27907/11-Y1）	SPAPADRAFT_54193	G3AJP0
Spathaspora passalidarum（菌株NRRL Y-27907/11-Y1）	SPAPADRAFT_67198	G3ANX7
疣状毛癣菌（Trichophyton verrucosum）（菌株HKI 0517）	TRV_07960	D4DL86
石膏样节皮菌（Arthroderma gypseum）（菌株ATCC MYA-4604/CBS 118893）（石膏样小孢子菌（Microsporum gypseum））	MGYG_07264	E4V2J0
红褐肉座菌（Hypocrea jecorina）（菌株QM6a）（里氏木霉))	TRIREDRAFT_43893	G0R7P8
红色毛癣菌（Trichophyton rubrum）MR1448	H110_00629	A0A022Z1G4
红色红曲霉（Aspergillus ruber）CBS 135680	EURHEDRAFT_512125	A0A017SPR0
Glarea lozoyensis（菌株ATCC 20868/MF5171）	GLAREA_04397	S3D6C1
大斑病毛球腔菌（Setosphaeria turcica）（菌株28A）（北部叶枯病真菌）(大斑凸脐蠕孢（Exserohilum turcicum））	SETTUDRAFT_20639	R0K6H8
巴西副球孢子菌（Paracoccidioides brasiliensis）（菌株Pb18）	PADG_06552	C1GH16
尖孢镰刀菌Fo47	FOZG_13577	W9JPG9

[0290]

生物体	基因名称	登录号
尖孢镰刀菌Fo47	FOZG_05344	W9KPH3
红色毛癣菌（Trichophyton rubrum）MR1459	H113_00628	A0A022ZY09
马尔尼菲青霉（Penicillium marneffei）（菌株ATCC 18224/CBS 334.59/QM 7333）	PMAA_075740	B6QBY3
花叶亚球腔菌(Sphaerulina musiva)(菌株SO2202)（杨树茎溃疡真菌）（花叶壳针孢（Septoria musiva））	SEPMUDRAFT_154026	M3DAK6
串珠状赤霉（Gibberella moniliformis）（菌株M3125/FGSC 7600）（玉米穗和茎腐病真菌)(轮枝样镰刀菌(Fusarium verticillioides））	FVEG_10526	W7N4P8
串珠状赤霉（Gibberella moniliformis）（菌株M3125/FGSC 7600）（玉米穗和茎腐病真菌)(轮枝样镰刀菌(Fusarium verticillioides））	FVEG_08281	W7MVR9
南极假酶菌（Pseudozyma antarctica）（菌株T-34）（酵母）（南极假丝酵母）	PANT_22d00298	M9MGF2
巴西副球孢子菌（Paracoccidioides brasiliensis）（菌株Pb03）	PABG_07795	C0SJD4
异形根孢囊霉(Rhizophagus irregularis)（菌株DAOM 181602/DAOM 197198/MUCL 43194)(丛枝菌根真菌)（根内球囊霉（Glomus intraradices））	GLOINDRAFT_82554	U9TF61
产黄青霉（Penicillium chrysogenum）（菌株ATCC 28089/DSM 1075/Wisconsin 54-1255）（特异青霉（Penicillium notatum））	Pc21g23700 PCH_Pc21g23700	B6HJ58
Baudoinia compniacensis（菌株UAMH 10762）（天使分享真菌((Angels' share fungus））	BAUCODRAFT_274597	M2M6Z5
深绿肉座菌(Hypocrea atroviridis)（菌株ATCC 20476/IMI 206040）（深绿木霉（Trichoderma atroviride））	TRIATDRAFT_280929	G9NJ32
胶孢炭疽菌（Colletotrichum gloeosporioides）（菌株Cg-14）（炭疽病菌）（围小丛壳菌（Glomerella cingulata））	CGLO_06642	T0LPH0

[0291]

生物体	基因名称	登录号
蛹虫草（Cordyceps militaris）（菌株CM01）（冬虫夏草（Caterpillar fungus））	CCM_02665	G3JB34
烧土火丝菌（Pyronema omphalodes）（菌株CBS 100304）（融合火丝菌（Pyronema confluens））	PCON_13062	U4LKE9
禾生炭疽菌（Colletotrichum graminicola）（菌株M1.001/M2/FGSC 10212）（玉米炭疽病菌）（禾生小丛壳菌（Glomerella graminicola））	GLRG_08499	E3QR67
Glarea lozoyensis（菌株ATCC 74030/MF5533）	M7I_2117	H0EHX4
尖孢镰刀菌古巴专化型（Fusarium oxysporum f. sp. cubense）（菌株种族4）（巴拿马病真菌）	FOC4_g10002493	N1S969
尖孢镰刀菌古巴专化型（Fusarium oxysporum f. sp. cubense）（菌株种族4）（巴拿马病真菌）	FOC4_g10011461	N1RT80
禾旋孢腔菌（Cochliobolus sativus）（菌株ND90Pr/ATCC 201652）（普通根腐病和斑枯病真菌）（索氏平脐蠕孢（Bipolaris sorokiniana））	COCSADRAFT_295770	M2TBE4
Mixia osmundae（菌株CBS 9802/IAM 14324/JCM 22182/KY 12970）	Mo05571 E5Q_05571	G7E7S3
松针红斑病菌（Mycosphaerella pini）（菌株NZE10/CBS 128990）（红带针枯病真菌）（Dothistroma septosporum）	DOTSEDRAFT_69651	N1PXR0
Grosmannia clavigera（菌株kw1407/UAMH 11150）（蓝变真菌）（Graphiocladiella clavigera）	CMQ_1113	F0XC64
尖孢镰刀菌FOSC 3-a	FOYG_03004	W9IUE5
尖孢镰刀菌FOSC 3-a	FOYG_16040	W9HNP0
尖孢镰刀菌FOSC 3-a	FOYG_17058	W9HB31
血红丛赤壳（Nectria haematococca）（菌株 77-13-4/ATCC MYA-4622/FGSC 9596/MPVI）（茄病镰刀菌豌豆亚种（Fusarium solani subsp.pisi））	NECHADRAFT_37686	C7YQL1
血红丛赤壳（Nectria haematococca）（菌株 77-13-4/ATCC MYA-4622/FGSC 9596/MPVI）（茄病镰刀菌豌豆亚种	NECHADRAFT_77262	C7ZJI0

[0292]

生物体	基因名称	登录号
（Fusarium solani subsp.pisi））		
黑孢块菌（Tuber melanosporum）（菌株Mel28)(佩里戈尔黑松露菌(Perigord black truffle））	GSTUM_00010376001	D5GLS0
皮炎组织胞浆菌（菌株SLH14081）（皮炎芽生菌（Blastomyces dermatitidis））	BDBG_07633	C5JYI9
球毛壳菌（Chaetomium globosum）（ATCC 6205/CBS 148.51/DSM 1962/NBRC 6347/NRRL 1970）（土壤真菌）	CHGG_09885	Q2GQ69
纤细假丝酵母（Candida tenuis）（菌株ATCC 10573/BCRC 21748/CBS 615/JCM 9827/NBRC 10315/NRRL Y-1498/VKM Y-70）（酵母）	CANTEDRAFT_108652	G3B9Z1
红色毛癣菌(Trichophyton rubrum)CBS 100081	H102_00622	A0A022VKY4
圆核腔菌原变型（Pyrenophora teres f. teres）（菌株0-1）（大麦网斑病真菌）（圆内脐蠕孢原变型（Drechslera teres f. teres））	PTT_09421	E3RLZ3
胶孢炭疽菌（Colletotrichum gloeosporioides）（菌株Nara gc5）（炭疽病菌）（围小丛壳菌（Glomerella cingulata））	CGGC5_4608	L2GB29
玉米赤霉（Gibberella zeae）（小麦头枯病真菌）（禾谷镰刀菌（Fusarium graminearum））	FG05_06918	A0A016PCS4
苏丹毛癣菌（Trichophyton soudanense）CBS 452.61	H105_00612	A0A022Y6A6
核盘菌（Sclerotinia sclerotiorum）（菌株ATCC 18683/1980/Ss-1）（白霉菌）（维氏核盘菌（Whetzelinia sclerotiorum））	SS1G_07437	A7EQ37
尖孢镰刀菌豌豆专化型（Fusarium oxysporum f. sp. pisi）HDV247	FOVG_14401	W9NWU8
尖孢镰刀菌豌豆专化型（Fusarium oxysporum f. sp. pisi）HDV247	FOVG_02874	W9Q5V3
大麦坚黑粉菌（Ustilago hordei）（菌	UHOR_03009	I2G1Z4

[0293]

生物体	基因名称	登录号
株Uh4875-4）（大麦坚黑穗病真菌）		
丝黑粉菌（Sporisorium reilianum）（菌株SRZ2）（玉米丝黑穗病真菌）	sr12985	E6ZYF7
玉米生平脐蠕孢（Bipolaris zeicola）26-R-13	COCCADRAFT_81154	W6YIP8
松杨栅锈菌（Melampsora larici-populina）（菌株98AG31/致病型3-4-7）（杨树叶锈菌真菌）	MELLADRAFT_78490	F4RUZ8
尖孢镰刀菌番茄专化型（Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici）（菌株4287/CBS 123668/FGSC 9935/NRRL 34936）（番茄的脉管镰刀菌枯萎病菌）	FOXG_01901	J9MG95
尖孢镰刀菌番茄专化型（Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici）（菌株4287/CBS 123668/FGSC 9935/NRRL 34936）（番茄的脉管镰刀菌枯萎病菌）	FOXG_11941	J9N9S4
燕麦叶枯病菌（Bipolaris victoriae）FI3	COCVIDRAFT_39053	W7EMJ8
汉逊德巴利酵母（Debaryomyces hansenii）（菌株ATCC 36239/CBS 767/JCM 1990/NBRC 0083/IGC 2968）（酵母）(汉逊有孢圆酵母(Torulaspora hansenii））	DEHA2E04268g	Q6BQL4
葡萄牙棒孢酵母(Clavispora lusitaniae)（菌株ATCC 42720）（酵母）（葡萄牙假丝酵母（Candida lusitaniae））	CLUG_01505	C4XZX3
白假丝酵母（菌株WO-1）（酵母）	CAWG_02023	C4YME4
红色毛癣菌MR850	H100_00625	A0A022U0Q2
杜氏假丝酵母（Candida dubliniensis）（菌株CD36/ATCC MYA-646/CBS 7987/NCPF 3949/NRRL Y-17841）（酵母）	CD36_32890	B9WMC7
球拟假丝酵母（Starmerella bombicola）	AOX1	A0A024FB95
Thielavia heterothallica（菌株ATCC 42464/BCRC 31852/DSM 1799）（嗜热毁丝霉（Myceliophthora thermophila））	MYCTH_103590	G2QJL7
紫麦角菌（Claviceps purpurea）（菌株20.1）（麦角病真菌）（麦角蜜孢霉菌（Sphacelia segetum））	CPUR_07614	M1WFI4

[0294]

生物体	基因名称	登录号
米曲霉（菌株ATCC 42149/RIB 40）（黄曲霉（Yellow koji mold））	AO090023000571	Q2UH61
盘基网柄菌（Dictyostelium discoideum）（粘液菌）	DDB_0184181 DDB_G0292042	Q54DT6
乌拉尔图小麦（Triticum urartu）（红色野生单粒小麦）（乌拉尔图一粒小麦（Crithodium urartu））	TRIUR3_22733	M7YME5
马铃薯（Solanum tuberosum/Potato）	PGSC0003DMG400017211	M1BG07
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	OSJNBb0044B19.5 LOC_Os10g33540	Q8W5P8
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	OJ1234_B11.20 Os02g0621800	Q6K9N5
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	OSJNBa0001K12.5 LOC_Os10g33520	Q8W5P3
玉蜀黍（Zea mays）（玉米）	ZEAMMB73_809149	C0P3J6
克莱门柚（Citrus clementina）	CICLE_v10011111mg	V4S9P4
克莱门柚（Citrus clementina）	CICLE_v10018992mg	V4U4C9
克莱门柚（Citrus clementina）	CICLE_v10004405mg	V4S9D3
克莱门柚（Citrus clementina）	CICLE_v10004403mg	V4RZZ6
川桑（Morus notabilis）	L484_011703	W9RIK0
川桑（Morus notabilis）	L484_005930	W9RET7
蒺藜苜蓿（Medicago truncatula）（蒺藜状苜蓿）（Medicago tribuloides）	MTR_1g075650	G7I4U3
拟南芥（Arabidopsis thaliana）（鼠耳水芹）		Q8LDP0
蒺藜苜蓿（Medicago truncatula）（蒺藜状苜蓿）（Medicago tribuloides）	MTR_4g081080	G7JF07
加州希蒙得木（Simmondsia chinensis/Jojoba/Buxus chinensis）		L7VFV2
桃（Prunus persica/Peach/Amygdalus persica）	PRUPE_ppa018458mg	M5VXL1
螯虾丝囊霉（Aphanomyces astaci）	H257_07411	W4GI89
螯虾丝囊霉（Aphanomyces astaci）	H257_07412	W4GI44
螯虾丝囊霉（Aphanomyces astaci）	H257_07411	W4GKE3
螯虾丝囊霉（Aphanomyces astaci）	H257_07411	W4GK29

[0295]

生物体	基因名称	登录号
螯虾丝囊霉（Aphanomyces astaci）	H257_07411	W4GJ79
螯虾丝囊霉（Aphanomyces astaci）	H257_07411	W4GI38
三角褐指藻（Phaeodactylum tricornutum）（菌株CCAP 1055/1）	PHATRDRAFT_48204	B7G6C1
大麦原变种（Hordeum vulgare var. distichum）（双棱大麦）		F2E4R4
大麦原变种（Hordeum vulgare var. distichum）（双棱大麦）		F2DZG1
大麦原变种（Hordeum vulgare var. distichum）（双棱大麦）		M0YPG7
大麦原变种（Hordeum vulgare var. distichum）（双棱大麦）		M0YPG6
大麦原变种（Hordeum vulgare var. distichum）（双棱大麦）		F2CUY4
蓖麻（Ricinus communis/Castor bean）	RCOM_0867830	B9S1S3
大白菜（Brassica rapa subsp. pekinensis/Chinese cabbage/Brassica pekinensis）	BRA014947	M4DEM5
蓖麻（Ricinus communis/Castor bean）	RCOM_0258730	B9SV13
大白菜（Brassica rapa subsp. pekinensis/Chinese cabbage/Brassica pekinensis）	BRA001912	M4CCI2
大白菜（Brassica rapa subsp. pekinensis/Chinese cabbage/Brassica pekinensis）	BRA012548	M4D7T8
大白菜（Brassica rapa subsp. pekinensis/Chinese cabbage/Brassica pekinensis）	BRA024190	M4E5Y6
大白菜（Brassica rapa subsp. pekinensis/Chinese cabbage/Brassica pekinensis）	BRA015283	M4DFL0
蓖麻（Ricinus communis/Castor bean）	RCOM_1168730	B9SS54
玉蜀黍（Zea mays）（玉米）		C4J691
光稃稻（Oryza glaberrima）（非洲稻）		I1P2B7
玉蜀黍（Zea mays）（玉米）		B6SXM3
玉蜀黍（Zea mays）（玉米）		C0HFU4

[0296]

生物体	基因名称	登录号
节节麦（Aegilops tauschii）（陶施山羊草（Tausch's goatgrass））（节节麦（Aegilops squarrosa））	F775_19577	R7W4J3
多毛番茄（Solanum habrochaites）（野生番茄）（多毛番茄（Lycopersicon hirsutum））		R9R6T0
小立碗藓原亚种（Physcomitrella patens subsp. patens）（Moss）	PHYPADRAFT_124285	A9S535
小立碗藓原亚种（Physcomitrella patens subsp. patens）（Moss）	PHYPADRAFT_113581	A9RG13
小立碗藓原亚种（Physcomitrella patens subsp. patens）（Moss）	PHYPADRAFT_182504	A9S9A5
潘那利番茄（Solanum pennellii）（番茄）（潘那利番茄（Lycopersicon pennellii））		R9R6Q1
葡萄（Vitis vinifera/Grape）	VIT_02s0087g00630	F6HJ27
葡萄（Vitis vinifera/Grape）	VIT_07s0005g03780	F6HZM3
葡萄（Vitis vinifera/Grape）	VIT_05s0049g01400	F6H8T4
葡萄（Vitis vinifera/Grape）	VITISV_019349	A5AH38
荠菜（Capsella rubella）	CARUB_v10013046mg	R0HIT3
荠菜（Capsella rubella）	CARUB_v10004212mg	R0GUX4
荠菜（Capsella rubella）	CARUB_v10004208mg	R0F3X6
荠菜（Capsella rubella）	CARUB_v10012453mg	R0ILD0
荠菜（Capsella rubella）	CARUB_v10004208mg	R0GUX1
盐水水芹（Eutrema salsugineum/Saltwater cress/Sisymbrium salsugineum）	EUTSA_v10024496mg	V4MD54
盐水水芹（Eutrema salsugineum/Saltwater cress/Sisymbrium salsugineum）	EUTSA_v10020141mg	V4NM59
盐水水芹（Eutrema salsugineum/Saltwater cress/Sisymbrium salsugineum）	EUTSA_v10024496mg	V4LUR9
盐水水芹（Eutrema salsugineum/Saltwater cress/Sisymbrium salsugineum）	EUTSA_v10024528mg	V4P767
盐水水芹（Eutrema	EUTSA_v10006882mg	V4L2P6

[0297]

生物体	基因名称	登录号
salsugineum/Saltwater cress/Sisymbrium salsugineum）		
江南卷柏（Selaginella moellendorffii）（卷柏（Spikemoss））	SELMODRAFT_87684	D8R6Z6
江南卷柏（Selaginella moellendorffii）（卷柏（Spikemoss））	SELMODRAFT_87621	D8R6Z5
江南卷柏（Selaginella moellendorffii）（卷柏（Spikemoss））	SELMODRAFT_74601	D8QN81
江南卷柏（Selaginella moellendorffii）（卷柏（Spikemoss））	SELMODRAFT_73531	D8QN82
高粱（Sorghum bicolor/Sorghum/Sorghum vulgare）	Sb04g026390 SORBIDRAFT_04g026390	C5XXS4
高粱（Sorghum bicolor/Sorghum/Sorghum vulgare）	Sb04g026370 SORBIDRAFT_04g026370	C5XXS1
高粱（Sorghum bicolor/Sorghum/Sorghum vulgare）	Sb01g019470 SORBIDRAFT_01g019470	C5WYH6
高粱（Sorghum bicolor/Sorghum/Sorghum vulgare）	Sb01g019480 SORBIDRAFT_01g019480	C5WYH7
高粱（Sorghum bicolor/Sorghum/Sorghum vulgare）	Sb01g019460 SORBIDRAFT_01g019460	C5WYH5
醋栗番茄（Solanum pimpinellifolium/Currant tomato/Lycopersicon pimpinellifolium）		R9R6J2
菜豆（Phaseolus vulgaris）（肾形豆）（法国豆）	PHAVU_007G124200g	V7BGM7
菜豆（Phaseolus vulgaris）（肾形豆）（法国豆）	PHAVU_011G136600g	V7AI35
菜豆（Phaseolus vulgaris）（肾形豆）（法国豆）	PHAVU_001G162800g	V7D063
马铃薯（Solanum tuberosum/Potato）	PGSC0003DMG400024294	M1C923
马铃薯（Solanum tuberosum/Potato）	PGSC0003DMG400018458	M1BKV4
马铃薯（Solanum tuberosum/Potato）	PGSC0003DMG400018458	M1BKV3
大豆（Glycine max/Soybean/Glycine hispida）		K7LK61
大豆（Glycine max/Soybean/Glycine hispida）		K7KXQ9
毛果杨（Populus trichocarpa/Western	POPTR_0008s16920g	B9HKS3

[0298]

生物体	基因名称	登录号
balsam poplar/Populus balsamifera subsp. trichocarpa）		
西加云杉（Picea sitchensis/Sitka spruce/Pinus sitchensis）		B8LQ84
毛果杨（Populus trichocarpa/Western balsam poplar/Populus balsamifera subsp. trichocarpa）	POPTR_0004s24310g	U5GKQ5
毛果杨（Populus trichocarpa/Western balsam poplar/Populus balsamifera subsp. trichocarpa）	POPTR_0010s07980g	B9HSG9
大豆（Glycine max/Soybean/Glycine hispida）		I1N9S7
大豆（Glycine max/Soybean/Glycine hispida）		I1LSK5
小米（Setaria italica/Foxtail millet/Panicum italicum）	Si034362m.g	K4A658
番茄（Solanum lycopersicum/Tomato/Lycopersicon esculentum）	Solyc09g072610.2	K4CUT7
小米（Setaria italica/Foxtail millet/Panicum italicum）	Si016380m.g	K3YQ38
番茄（Solanum lycopersicum/Tomato/Lycopersicon esculentum）		R9R6I9
番茄（Solanum lycopersicum/Tomato/Lycopersicon esculentum）	Solyc09g090350.2	K4CW61
番茄（Solanum lycopersicum/Tomato/Lycopersicon esculentum）	Solyc08g005630.2	K4CI54
番茄（Solanum lycopersicum/Tomato/Lycopersicon esculentum）	Solyc08g075240.2	K4CMP1
小米（Setaria italica/Foxtail millet/Panicum italicum）	Si034359m.g	K4A655
小米（Setaria italica/Foxtail millet/Panicum italicum）	Si034354m.g	K4A650
斑花沟酸浆（Mimulus guttatus）（有斑猴面花）（黄色猴面花）	MIMGU_mgv1a001896mg	A0A022PU07

[0299]

生物体	基因名称	登录号
斑花沟酸浆（Mimulus guttatus）（有斑猴面花）（黄色猴面花）	MIMGU_mgv1a022390mg	A0A022RAV4
斑花沟酸浆（Mimulus guttatus）（有斑猴面花）（黄色猴面花）	MIMGU_mgv1a001868mg	A0A022S2E6
斑花沟酸浆（Mimulus guttatus）（有斑猴面花）（黄色猴面花）	MIMGU_mgv1a001883mg	A0A022S275
斑花沟酸浆（Mimulus guttatus）（有斑猴面花）（黄色猴面花）	MIMGU_mgv1a001761mg	A0A022QNF0
尖叶蕉马来客亚种（Musa acuminata subsp. malaccensis）（野生香蕉）（马来客尖叶蕉（Musa malaccensis））		M0SNA8
尖叶蕉马来客亚种（Musa acuminata subsp. malaccensis）（野生香蕉）（马来客尖叶蕉（Musa malaccensis））		M0RUT7
尖叶蕉马来客亚种（Musa acuminata subsp. malaccensis）（野生香蕉）（马来客尖叶蕉（Musa malaccensis））		M0RUK3
异枝水霉（Saprolegnia diclina）VS20	SDRG_10901	T0RG89
二穗短柄草（Brachypodium distachyon）（短柄草）（Trachynia distachya）	BRADI3G49085	I1IBP7
二穗短柄草（Brachypodium distachyon）（短柄草）（Trachynia distachya）	BRADI3G28677	I1I4N2
二穗短柄草（Brachypodium distachyon）（短柄草）（Trachynia distachya）	BRADI3G28657	I1I4N0
籼稻（Oryza sativa subsp. indica）（水稻）	OsI_34012	B8BHG0
籼稻（Oryza sativa subsp. indica）（水稻）	OsI_08118	B8AFT8
籼稻（Oryza sativa subsp. indica）（水稻）	OsI_34008	A2Z8H1
籼稻（Oryza sativa subsp. indica）（水稻）	OsI_34014	B8BHG1
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	LOC_Os10g33460	Q7XDG3
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	Os10g0474800	Q0IX12
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水	Os10g0474966	C7J7R1

[0300]

生物体	基因名称	登录号
稻）		
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	OSJNBa0001K12.13	Q8W5N7
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	OsJ_31873	B9G683
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	OsJ_31875	B9G684
粳稻（Oryza sativa subsp. japonica）（水稻）	OSJNBa0001K12.3	Q8W5P5
琴叶拟南芥原亚种（Arabidopsis lyrata subsp. lyrata）（琴叶筷子芥（Lyre-leaved rock-cress））	ARALYDRAFT_470376	D7KDA3
琴叶拟南芥原亚种（Arabidopsis lyrata subsp. lyrata）（琴叶筷子芥（Lyre-leaved rock-cress））	ARALYDRAFT_479855	D7L3B6
琴叶拟南芥原亚种（Arabidopsis lyrata subsp. lyrata）（琴叶筷子芥（Lyre-leaved rock-cress））	ARALYDRAFT_491906	D7MDA9
琴叶拟南芥原亚种（Arabidopsis lyrata subsp. lyrata）（琴叶筷子芥（Lyre-leaved rock-cress））	ARALYDRAFT_914728	D7MGS9

[0301] 在一些实施方案中，本公开教导了一种重组微生物，其包含一种或多种内源(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1)的缺失、破坏、突变和/或活性的降低。

[0302] 因此，在一些实施方案中，本公开的重组微生物将会包含内源基因的缺失或其他破坏，该内源基因编码与由(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1)编码的蛋白质表现出至少100％、99％、98％、97％、95％、94％、93％、92％、91％或90％序列同一性的蛋白质。

[0303] 因此，在一些实施方案中，本公开的重组微生物将会包含内源基因的缺失，该内源基因编码与uniprot数据库ID Q6CEP8(FAO1)表现出至少100％、99％、98％、97％、95％、94％、93％、92％、91％或90％序列同一性的蛋白质。

[0304] 乙酰基转移酶

[0305] 本公开文本描述了将醇转化为脂肪乙酸酯的酶。

[0306] 在一些实施方案中，使用乙酰基转移酶来催化脂肪醇转化为脂肪乙酸酯。乙酰基转移酶是具有通过将乙酰基从乙酰基-CoA转移到醇上来生产乙酸酯的能力的酶。在一些实施方案中，乙酰基转移酶可具有2.3.1.84的EC数。

[0307] 该乙酰基转移酶或编码它的核酸序列可以分离自各种生物体，包括但不限于物种光滑假丝酵母、酿酒酵母、黑脉金斑蝶(Danaus plexippus)、烟芽夜蛾、家蚕、小地老虎(Agrotis ipsilon)、黄地老虎、卫矛(Euonymus alatus)、智人、耐热克鲁维酵母和解脂耶氏酵母的生物体。在示例性实施方案中，该乙酰基转移酶包含选自GenBank登录号AY242066、AY242065、AY242064、AY242063、AY242062、EHJ65205、ACX53812、NP_001182381、

EHJ65977、EHJ68573、KJ579226、GU594061、KTA99184.1,AIN34693.1,AY605053,XP_002552712.1,XP_503024.1,和XP_505595.1,和XP_505513.1的序列。示例性乙酰基转移酶列于表5d中。另外的示例性乙酰基转移酶肽可见于US2010/0199548中,其通过引用并入本文。

[0308] 表5d.示例性乙酰基转移酶

[0309]

生物体	*酶ID*
光滑假丝酵母（Candida glabrata）	KTA99184.1
黄地老虎（Agrotis segetum）	AIN34693.1
智人（Homo sapiens）	AY605053
耐热克鲁维酵母（Lachancea thermotolerans）	XP_002552712.1
解脂耶氏酵母（Yarrowia lipolytica）	XP_503024.1
解脂耶氏酵母（Yarrowia lipolytica）	XP_505595.1
解脂耶氏酵母（Yarrowia lipolytica）	XP_505513.1

[0310] 脂肪酰基-ACP硫酯酶

[0311] 酰基-ACP硫酯酶从酰基-ACP(由从头脂肪酸生物合成而合成的)释放游离脂肪酸。反应终止脂肪酸生物合成。在植物中,脂肪酸生物合成发生在质体中,并且因此需要质体定位的酰基-ACP硫酯酶。在所有植物的营养组织中,酰基-ACP硫酯酶的主要产物是油酸酯(C18:0),并且在较小程度上为棕榈酸酯(C16:0)。释放的游离脂肪酸被重新酯化成质体包膜中的辅酶A,并从质体中输出。

[0312] 存在两种酰基-ACP硫酯酶同种型FatA和FatB。这些同种型的底物特异性决定了植物中饱和脂肪酸的链长和水平。FatA对C18:1-ACP的活性最高。与C18:1-ACP相比,FatA对其他酰基-ACP的活性非常低。FatB对C16:0-ACP的活性最高。它也对C18:1-ACP具有显著的高活性,随后是C18:0-ACP和C16:1-ACP。FatA和FatB的动力学研究指示,它们对不同酰基-ACP的底物特异性来自Kcat值,而不是来自Km。两种同种型对不同底物的Km值在微摩尔级上相似。FatA和FatB的域交换指示同种型的N-末端决定了它们的底物特异性(Salas JJ and Ohlrogge JB(2002)Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases.Arch BioChem Biophys 403(1):25-34)。对于在种子中主要累积中链长饱和脂肪酸的那些植物来说,它们演化出FatB和/或FatA硫酯酶(Voelker T and Kinney AJ(2001)Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids.Annu

Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52:335-361)。例如,月桂酸酯(12:0)是椰子中主要的种子油。相应地,在椰子种子中检测到中链特异性酰基-ACP硫酯酶活性。

[0313] 在一些实施方案中,本公开教导了一种重组微生物,其包含YALI0E16016g(FAT1)的缺失、破坏、突变和/或活性的降低。

[0314] 因此,在一些实施方案中,本公开的重组微生物将包含内源基因的缺失或其他破坏,该内源基因编码与由YALI0E16016g(FAT1)编码的蛋白质表现出至少100%、99%、98%、97%、95%、94%、93%、92%、91%或90%序列同一性的蛋白质。

[0315] 因此,在一些实施方案中,本公开的重组微生物将包含内源基因的缺失,该内源基因编码与uniprot数据库ID Q6C5Q8(FAO1)表现出至少100%、99%、98%、97%、95%、94%、93%、92%、91%或90%序列同一性的蛋白质。

[0316] 酰基-CoA氧化酶

[0317] 酰基-CoA氧化酶(ACO)作用于链长度为8至18的脂肪酸的CoA衍生物。它们是黄素酶,该黄素酶每个亚基含有一个非共价结合的FAD,与线粒体酰基-CoA脱氢酶属于同一超家族。与线粒体脂肪酰基-CoA脱氢酶一样,过氧化物酶体酰基-CoA氧化酶催化过氧化物酶体脂肪酸β-氧化途径(即酰基-CoA的α,β-脱氢作用)的起始和限速步骤,这在还原性半反应中产生反式-2-烯酰基-CoA。在过氧化物酶体酰基-CoA氧化酶的氧化半反应中,还原的FAD被分子氧再氧化,产生过氧化氢。

[0318] 酰基-CoA氧化酶是同型二聚体,并且亚基的多肽链折叠成N端α域、β域和C端α域。过氧化物酶体酰基-CoA氧化酶与线粒体酰基-CoA脱氢酶之间的功能差异归因于FAD环境中的结构差异。

[0319] 在一些实施方案中,提供了用于产生短链脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的重组微生物和方法。在某些实施方案中,该短链脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的碳链长度短于或等于C16。在一些实施方案中,该短链脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯是从长链脂肪酸产生的。在产生短链信息素的方法的一些优选的实施方案中,能够在信息素生物合成途径中缩短脂肪酰基-CoA的选择酶与信息素生物合成途径酶共表达。合适的缩短链的酶的实例包括FAD依赖性酰基-CoA氧化酶。在具有偶数碳的脂肪酸分子的情况下,缩短链的酶产生乙酰-CoA分子,和被缩短了两个碳的脂肪酰基-CoA。在每一轮氧化过程中,具有奇数碳的脂肪酸分子以产生乙酰-CoA分子的相似的方式被氧化,直至链长度减少至5个碳为止。在最后一轮氧化中,该5-碳酰基-CoA被氧化以产生乙酰基-CoA和丙酰基-CoA。

[0320] 已知酰基-CoA氧化酶对具有不同链长度的底物表现出不同的特异性(图40)。因此,控制脂肪酰基-CoA截短的程度取决于工程化或选择适合的酶变体。适于此目的的酰基-CoA氧化酶的实例列于表5a。

[0321] 在另外的实施方案中,本公开提供了一种能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的重组微生物,其中该重组微生物包含:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;(b)至少一种编码酰基-CoA氧化酶的外源核酸分子,该酰基-CoA氧化酶在一个或多个连续的酰基-CoA氧化酶活性循环之后催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和≤C_{18}脂肪酰基-CoA,其中指定循环产生相对于此循环中的起始单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA底物具有两个碳截短的

单或多不饱和C_4-C_{22}脂肪酰基-CoA中间体;和(c)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(b)的单或多不饱和≤C18脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和≤C18脂肪醇。在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶选自红带卷蛾(Argyrotaenia velutinana)、斜纹夜蛾(Spodoptera litura)、水稻大螟(Sesamia inferens)、烟草天蛾(Manduca sexta)、欧洲玉米螟(Ostrinia nubilalis)、玉米穗蛾(Helicoverpa zea)、蔷薇斜条卷叶蛾(Choristoneura rosaceana)、黑腹果蝇(Drosophila melanogaster)、海灰翅夜蛾、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)、黄地老虎(Agrotis segetum)、亚洲玉米螟(Ostrinia furnicalis)和假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)衍生的脂肪酰基去饱和酶。在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶与选自SEQ ID NO:39、49-54、58-63、78-80和GenBank登录号AF416738、AGH12217.1、AII21943.1、CAJ43430.2、AF441221、AAF81787.1、AF545481、AJ271414、AY362879、ABX71630.1、NP001299594.1、Q9N9Z8、ABX71630.1和AIM40221.1的脂肪酰基去饱和酶具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、50%或50%序列同一性。在一些实施方案中,该酰基-CoA氧化酶选自表5a。在其他实施方案中,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶选自黄地老虎(Agrotis segetum)、甜菜夜蛾(Spodoptera exigua)、海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、薄肌眼虫(Euglena gracilis)、稠李巢蛾(Yponomeuta evonymellus)和棉铃虫(Helicoverpa armigera)衍生的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶。在另外的实施方案中,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶与选自SEQ ID NO:1-3、32、41-48、55-57、73、75、77和82的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、50%或50%序列同一性。在一些实施方案中,该重组微生物是选自解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)、酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、白假丝酵母(Candida albicans)、热带假丝酵母(Candida tropicalis)和维斯假丝酵母(Candidaviswanathii)的酵母。

[0322] 在产生脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的方法的一些优选的实施方案中,微生物宿主的一种或多种编码酰基-CoA氧化酶的基因被缺失或下调以消除或减少所希望的脂肪酰基-CoA的截短超过所希望的链长度。此类缺失或下调目标包括但不限于解脂耶氏酵母POX1(YALI0E32835g)、解脂耶氏酵母POX2(YALI0F10857g)、解脂耶氏酵母POX3(YALI0D24750g)、解脂耶氏酵母POX4(YALI0E27654g)、解脂耶氏酵母POX5(YALI0C23859g)、解脂耶氏酵母POX6(YALI0E06567g);酿酒酵母POX1(YGL205W);假丝酵母属POX2(Ca019.1655、Ca019.9224、CTRG_02374、M18259)、假丝酵母属POX4(Ca019.1652、Ca019.9221、CTRG_02377、M12160)和假丝酵母属POX5(Ca019.5723、Ca019.13146、CTRG_02721、M12161)。

[0323] 在一些实施方案中,本公开教导了一种重组微生物,其包含一种或多种酰基-CoA

氧化酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低，该酰基-CoA氧化酶选自POX1(YALI0E32835g)、解脂耶氏酵母POX2(YALI0F10857g)、解脂耶氏酵母POX3(YALI0D24750g)、解脂耶氏酵母POX4(YALI0E27654g)、解脂耶氏酵母POX5(YALI0C23859g)、解脂耶氏酵母POX6(YALI0E06567g)。

[0324] 因此，在一些实施方案中，本公开的重组微生物将包含内源基因的缺失或其他破坏，该内源基因编码与由POX1(YALI0E32835g)、解脂耶氏酵母POX2(YALI0F10857g)、解脂耶氏酵母POX3(YALI0D24750g)、解脂耶氏酵母POX4(YALI0E27654g)、解脂耶氏酵母POX5(YALI0C23859g)、解脂耶氏酵母POX6(YALI0E06567g)编码的蛋白质表现出至少100％、99％、98％、97％、95％、94％、93％、92％、91％或90％序列同一性的蛋白质。

[0325] 因此，在一些实施方案中，本公开的重组微生物将包含内源基因的缺失，该内源基因编码与uniprot数据库ID POX1(O74934)、解脂耶氏酵母POX2(O74935)、解脂耶氏酵母POX3(O74936)、解脂耶氏酵母POX4(F2Z627)、解脂耶氏酵母POX5(F2Z630)、解脂耶氏酵母POX6(Q6C6T0)表现出至少100％、99％、98％、97％、95％、94％、93％、92％、91％或90％序列同一性的蛋白质。

[0326] 在一些实施方案中，提供了能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的重组微生物，其中该重组微生物表达一种或多种酰基-CoA氧化酶，且其中该重组微生物被操作以缺失、破坏、突变一种或多种内源酰基-CoA氧化酶和/或降低一种或多种内源酰基-CoA氧化酶的活性。在一些实施方案中，被表达的一种或多种酰基-CoA氧化酶不同于被缺失或下调的一种或多种内源酰基-CoA氧化酶。在一些实施方案中，该重组微生物进一步表达信息素生物合成途径酶。在另外的实施方案中，该信息素生物合成途径酶包含一种或多种脂肪酰基去饱和酶和/或脂肪酰基接合酶。在又一实施方案中，该信息素生物合成途径酶包含一种或多种形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶。在一些实施方案中，被表达的一种或多种酰基-CoA氧化酶选自表5a。在其他实施方案中，被表达的一种或多种酰基-CoA氧化酶调节单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的链长度。在一些实施方案中，被缺失、破坏、突变或下调的一种或多种内源酰基-CoA氧化酶选自解脂耶氏酵母POX1(YALI0E32835g)、解脂耶氏酵母POX2(YALI0F10857g)、解脂耶氏酵母POX3(YALI0D24750g)、解脂耶氏酵母POX4(YALI0E27654g)、解脂耶氏酵母POX5(YALI0C23859g)、解脂耶氏酵母POX6(YALI0E06567g)；酿酒酵母POX1(YGL205W)；假丝酵母属POX2(Ca019.1655、Ca019.9224、CTRG_02374、M18259)、假丝酵母属POX4(Ca019.1652、Ca019.9221、CTRG_02377、M12160)和假丝酵母属POX5(Ca019.5723、Ca019.13146、CTRG_02721、M12161)。在其他实施方案中，被缺失、破坏、突变或下调的一种或多种内源酰基-CoA氧化酶控制单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的链长度。

[0327] 在一些实施方案中，提供了从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的方法，其中该方法包括将至少一种编码酰基-CoA氧化酶的内源或外源核酸分子引入至重组微生物中或在重组微生物中表达至少一种编码酰基-CoA氧化酶的内源或外源核酸分子，以及在一种或多种编码酰基-CoA氧化酶的基因中引入缺失、插入或功能缺失突变，其中被引入或表达的至少一种编码酰基-CoA氧化酶的内源或外源核酸分子不同于被缺失或下调的一种或多种编码酰基-CoA氧化酶的基因。在一些实施方案中，该方法进一步包括将至少一种编码脂肪酰基去饱和酶和/或脂肪酰基接合

酶的内源或外源核酸分子引入至重组微生物中或在重组微生物中表达至少一种编码脂肪酰基去饱和酶和/或脂肪酰基接合酶的内源或外源核酸分子。在另外的实施方案中,该方法进一步包括将至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的内源或外源核酸分子引入至重组微生物中或在重组微生物中表达至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的内源或外源核酸分子。在一些实施方案中,至少一种内源或外源核酸分子编码选自表5a的酰基-CoA氧化酶。在其他实施方案中,至少一种内源或外源核酸分子编码酰基-CoA氧化酶,其调节单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的链长度。在一些实施方案中,被缺失或下调的一种或多种基因编码酰基-CoA氧化酶,其选自解脂耶氏酵母POX1(YALI0E32835g)、解脂耶氏酵母POX2(YALI0F10857g)、解脂耶氏酵母POX3(YALI0D24750g)、解脂耶氏酵母POX4(YALI0E27654g)、解脂耶氏酵母POX5(YALI0C23859g)、解脂耶氏酵母POX6(YALI0E06567g);酿酒酵母POX1(YGL205W);假丝酵母属POX2(Ca019.1655、Ca019.9224、CTRG_02374、M18259)、假丝酵母属POX4(Ca019.1652、Ca019.9221、CTRG_02377、M12160)和假丝酵母属POX5(Ca019.5723、Ca019.13146、CTRG_02721、M12161)。在其他实施方案中,被缺失或下调的一种或多种基因编码酰基-CoA氧化酶,其调节单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的链长度。

[0328] 表5a.示例性酰基-CoA氧化酶

[0329]

登录号	来源生物体
P07872	褐家鼠（*Rattus norvegicus*）
A0A178WDE4	拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）
P0CZ23	拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）
D7KG20	琴叶拟南芥（*Arabidopsis lyrata*）
R0I9Z2	荠菜（*Capsella rubella*）
V4KEW0	盐水水芹（*Eutrema salsugineum*）
M4DG68	大白菜（*Brassica rapa*）
A0A078IZG1	欧洲油菜（*Brassica napus*）
A0A087HLF0	黄花亭芥（*Arabis alpina*）
A0A0D3C825	甘蓝（*Brassica oleracea*）
A0A078FAW4	欧洲油菜（*Brassica napus*）
A0A178W833	拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）
Q9LMI7	拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）
D7KG21	琴叶拟南芥（*Arabidopsis lyrata*）

[0330]

登录号	来源生物体
A0A0D3C827	甘蓝（*Brassica oleracea*）
M4DG69	大白菜（*Brassica rapa*）
A0A078J4V6	欧洲油菜（*Brassica napus*）
A0A078FAY6	欧洲油菜（*Brassica napus*）
V4KY71	盐水水芹（*Eutrema salsugineum*）
A0A061E5C2	可可（*Theobroma cacao*）
A0A061E4K0	可可（*Theobroma cacao*）
M1APJ5	马铃薯（*Solanum tuberosum*）
J7KBI6	桃（ *Prunus persica*）
K4CXY8	番茄（*Solanum lycopersicum*）
V4W234	克莱门柚（*Citrus clementina*）
G8XNW7	苹果（*Malus domestica*）
F6H4X3	葡萄（*Vitis vinifera*）
A0A068V5Q3	中果咖啡 （*Coffea canephora*）
M1APJ6	马铃薯（*Solanum tuberosum*）
A0A067KHP0	麻风树（*Jatropha curcas*）
A0A0D2PZG8	雷蒙德氏棉（*Gossypium raimondii*）
B9IQS0	毛果杨（*Populus trichocarpa*）
W9RG01	川桑（*Morus notabilis*）
A0A0S3SB10	红小豆变种（*Vigna angularis var. angularis*）
A0A0L9V573	赤豆（*Phaseolus angularis*）
A0A0B0PPT6	木本棉（*Gossypium arboreum*）
A0A0D2T164	雷蒙德氏棉（*Gossypium raimondii*）
I1KEV4	大豆（*Glycine max*）
I1LS94	大豆（*Glycine max*）
G7JUZ2	蒺藜苜蓿（*Medicago truncatula*）
U5FVP5	毛果杨（*Populus trichocarpa*）
V7AGL5	菜豆（*Phaseolus vulgaris*）
A0A059A0G8	巨桉（*Eucalyptus grandis*）
A0A059A0N3	巨桉（*Eucalyptus grandis*）

[0331]

登录号	来源生物体
A0A166AUM6	胡萝卜亚种栽培（*Daucus carota subsp. sativus*）
A0A061EB81	可可（*Theobroma cacao*）
A0A0A0LQY1	黄瓜（*Cucumis sativus*）
A0A022QRB0	*Erythranthe guttata*
A0A0S3SB01	红小豆变种（*Vigna angularis var. angularis*）
A0A0D2Q6S9	雷蒙德氏棉（*Gossypium raimondii*）
B9SGN6	蓖麻（*Ricinus communis*）
A0A0B2PER8	野生大豆（*Glycine soja*）
A0A0B0NGI2	木本棉（*Gossypium arboreum*）
A0A0D2SKF2	雷蒙德氏棉（*Gossypium raimondii*）
A0A0B0NRR7	木本棉（*Gossypium arboreum*）
A0A0J8EFZ4	甜菜变种（*Beta vulgaris subsp. vulgaris*）
A0A0J8BLD2	甜菜变种（*Beta vulgaris subsp. vulgaris*）
M4DG71	大白菜（*Brassica rapa*）
W1Q111	无油樟（*Amborella trichopoda*）
M0S864	小果野芭蕉（*Musa acuminata*）
A0A166ABS1	胡萝卜亚种栽培（*Daucus carota subsp. sativus*）
A0A1D6CA75	小麦（*Triticum aestivum*）
A0A0A9CN11	芦竹（*Arundo donax*）
A0A1D6CKJ3	小麦（*Triticum aestivum*）
A0A164W703	胡萝卜亚种栽培（*Daucus carota subsp. sativus*）
A0A1D1YDC5	紫苞花烛（*Anthurium amnicola*）
I1Q2B7	光稃稻（*Oryza glaberrima*）
A0A0D9WQH3	假稻（*Leersia perrieri*）
Q69XR7	粳稻（*Oryza sativa subsp. japonica*）
A0A1D6CA73	小麦（*Triticum aestivum*）
A0A0E0A9E1	（*Oryza glumipatula*）
A0A199W504	菠萝（*Ananas comosus*）
A0A0E0HQR9	尼瓦拉野生稻（*Oryza nivara*）
M0T4I4	（*Musa acuminata subsp. malacc.*）

[0332]

登录号	来源生物体
C0PTG5	西加云杉（*Picea sitchensis*）
I1I3F1	二穗短柄草（*Brachypodium distachyon*）
K3XV57	小米（*Setaria italica*）
A0A0D3GGF4	短舌野生稻（*Oryza barthii*）
A2YCR4	籼稻（*Oryza sativa subsp. indica*）
A0A0K9RYF5	菠菜（*Spinacia oleracea*）
A0A0D3GGF3	短舌野生稻（*Oryza barthii*）
A0A0D3GGF2	短舌野生稻（*Oryza barthii*）
A0A0E0HQR8	尼瓦拉野生稻（*Oryza nivara*）
A0A1D6CA72	小麦（*Triticum aestivum*）
A3BBK8	粳稻（ *Oryza sativa subsp. japonica*）
A0A199V6E4	菠萝（*Ananas comosus*）
C5XPR4	高粱（*Sorghum bicolor*）
A0A0E0PXN1	普通野生稻（*Oryza rufipogon*）
B6U7U8	玉蜀黍（*Zea mays*）
A0A1D6N7A4	玉蜀黍（*Zea mays*）
A0A0E0E1N7	南方野生稻（*Oryza meridionalis*）
A0A0K9NPK9	大叶藻（ *Zostera marina*）
A0A059Q1I9	甘蔗属杂交栽培变种R570（*Saccharum hybrid cultivar R570*）
J3MDZ2	短花药野生稻（*Oryza brachyantha*）
A0A0K9RYH2	菠菜（*Spinacia oleracea*）
A0A103YIT3	刺菜蓟（*Cynara cardunculus*）
A0A0E0PXN2	普通野生稻（*Oryza rufipogon*）
A9RZ70	小立碗藓（*Physcomitrella patens*）
D8TES8	江南卷柏（*Selaginella moellendorffii*）
D8SQF1	江南卷柏（*Selaginella moellendorffii*）
M5X7E6	桃（*Prunus persica*）
A9T150	小立碗藓（*Physcomitrella patens*）
A0A176WTU5	地钱 （*Marchantia polymorpha*）
A0A0D2QZ34	雷蒙德氏棉（*Gossypium raimondii*）

[0333]

登录号	来源生物体
A0A1D6N7A2	玉蜀黍（*Zea mays*）
A0A1D1Z3C0	紫苞花烛（*Anthurium amnicola*）
A0A067DSI1	*Citrus sinensis*
A0A1D6CA74	小麦（*Triticum aestivum*）
M8CMI0	节节麦（*Aegilops tauschii*）
A0A0S3SB72	红小豆变种（*Vigna angularis var. angularis*）
M0UX36	大麦亚种（*Hordeum vulgare subsp. vulgare*）
A0A1D6CA76	小麦（*Triticum aestivum*）
A0A151SDZ7	木豆（*Cajanus cajan*）
Q9LNB8	拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）
A0A1D6CKJ4	小麦（*Triticum aestivum*）
F2EGJ0	大麦亚种（*Hordeum vulgare subsp. vulgare*）
A0A0D2U3V1	雷蒙德氏棉（*Gossypium raimondii*）
M0UX35	大麦亚种（*Hordeum vulgare subsp. vulgare*）
M2Y3U7	红藻（ *Galdieria sulphuraria*）
S8CGJ3	金钱草（*Genlisea aurea*）
A0A0E0HQS2	尼瓦拉野生稻（*Oryza nivara*）
A0A199VU62	菠萝（*Ananas comosus*）
M2WTY9	红藻（*Galdieria sulphuraria*）
A0A1D6N7A3	玉蜀黍（*Zea mays*）
A0A0E0HQS0	尼瓦拉野生稻（*Oryza nivara*）
A0A1E5VL23	*Dichanthelium oligosanthes*
R7Q711	角叉藻（*Chondrus crispus*）
S0F2R6	角叉藻（*Chondrus crispus*）
S0F2T2	角叉藻（*Chondrus crispus*）
A0A0E0HQS1	尼瓦拉野生稻（*Oryza nivara*）
D3BSZ9	*Polysphondylium pallidum*
A0A0D2WJ11	*Capsaspora owczarzaki*品系
R7QDC3	角叉藻（*Chondrus crispus*）
M1VCW4	红藻品系（*Cyanidioschyzon merolae str.*）

[0334]

登录号	来源生物体
F1A2F0	紫色网柄菌（*Dictyostelium purpureum*）
F4PI57	束状网柄菌（*Dictyostelium fasciculatum* .）
Q54II1	盘基网柄菌（*Dictyostelium discoideum*）
A0A0E0LBG6	斑点野生稻（*Oryza punctata*）
A0A151ZKZ0	乳网柄菌（*Dictyostelium lacteum*）
M1BZ65	马铃薯（*Solanum tuberosum*）
H8MFT9	珊瑚状珊瑚球菌（*Corallococcus coralloides s.*）
F8CEB4	橙色粘球菌（*Myxococcus fulvus*）
A0A0H4WJP1	*Myxococcus hansupus*
Q1CYG7	黄色粘球菌（*Myxococcus xanthus*）
F1A3A8	紫色网柄菌（*Dictyostelium purpureum*）
L7UK64	叶柄粘球菌（*Myxococcus stipitatus*）
A0A0F7BPX0	橙色粘球菌124B02（*Myxococcus fulvus 124B02*）
A0A0G4J3N5	芸苔根肿菌（*Plasmodiophora brassicae*）
D5H9X3	*Salinibacter ruber*菌株M8（*Salinibacter ruber strain M8*）
Q2S1W1	*Salinibacter ruber*菌株*D.*（*Salinibacter ruber strain D.*）
A0A085WN59	*Hyalangium minutum*
A0A0G2ZRH9	过渡原囊菌（*Archangium gephyra*）
A0A0S8HAC5	芽单胞菌属*SM23_52*（*Gemmatimonas sp. SM23_52*）
A0A177Q5I1	疣状结肠杆菌SC（ Verrucomicrobia bacterium SC）
D8TVM2	*Volvox carteri f. nagariensis*
A0A084SWJ9	紫囊杆菌*Cb vi76*（*Cystobacter violaceus Cb vi76*）
Q096A6	橙色标桩菌菌株（*Stigmatella aurantiaca stra.*）
R7QMZ0	角叉藻（*Chondrus crispus*）
A0A0G4J5Q9	芸苔根肿菌（*Plasmodiophora brassicae*）
A0A0Q9RNC6	类诺卡氏属*Soil797*（*Nocardioides sp. Soil797*）
A0A010YG34	*Cryptosporangium arvum DSM 4*
A0A098BJC6	推定的红色红球菌（*Putative Rhodococcus ruber*）
A0A059ML28	食醚红球菌（*Rhodococcus aetherivorans*）
N1M744	红球菌属*EsD8*（*Rhodococcus sp. EsD8*）

[0335]

登录号	来源生物体
W3ZXB8	紫红红球菌ATCC（*Rhodococcus rhodochrous ATCC*）
A0A0A9CKJ6	*2*芦竹（*2 Arundo donax*）
F4PQH3	束状网柄菌（*Dictyostelium fasciculatum*）
I0Z1P9	胶球藻菌株（*Coccomyxa subellipsoidea st.*）
A0A076ESS0	混浊红球菌（*Rhodococcus opacus*）
D3BKV2	*Polysphondylium pallidum*
X0Q4M3	推定的的红球菌*Rhodococcus wratislaviensis*
A0A1D6BHN7	小麦（*Triticum aestivum*）
C1AZ37	推定的混浊红球菌菌株B4
M7ZG40	乌拉尔图小麦（*Triticum urartu*）
W8HEJ3	混浊红球菌*Rhodococcus opacus PD630*
A0A135GJ74	红球菌属*SC4*（*Rhodococcus sp. SC4*）
A0A149ZW75	红球菌属LB1（*Rhodococcus sp. LB1*）
Q0SF32	*Rhodococcus jostii strain R.*
J2JJ09	红球菌属JVH1（*Rhodococcus sp. JVH1*）
K8XW36	混浊红球菌M213 （*Rhodococcus opacus M213*）
A0A152A546	乳网柄菌（*Dictyostelium lacteum*）
A0A0Q8ZY28	黄杆菌属Root901（*Flavobacterium sp. Root901*）
L2TJT8	*Rhodococcus wratislaviensis*
I0WB64	*Rhodococcus imtechensis*
A0A1B1KC92	混浊红球菌（*Rhodococcus opacus*）
I3C521	*Joostella marina DSM 19592*
A0A0F6W8X8	*Sandaracinus amylolyticus*
I3Z8X9	Belliella baltica菌株DS（*Belliella baltica strain DS*）
A0A0J6W3K0	奥布分支杆菌（*Mycobacterium obuense*）
A0A0Q7GA13	黄杆菌属种Root420（*Flavobacterium sp. Root420*）
D3BUR8	*Polysphondylium pallidum*
A0A098SD35	*Phaeodactylibacter xiamenensis*
A0A0D1LF86	*Mycobacterium llatzerense*
A0A0Q5QHB8	*Williamsia sp. Leaf354*

[0336]

登录号	来源生物体
A0A139VJG5	草分支杆菌DSM 4323（*Mycobacterium phlei DSM 4323*）
F4PMW9	束状网柄菌（*Dictyostelium fasciculatum*）
A0A180ERQ3	*Lewinella sp. 4G2*
Q8MMS1	盘基网柄菌（*Dictyostelium discoideum*）
A0A101CR99	黄杆菌（*Flavobacteriaceae bacterium*）
A0A0Q9TDE2	类诺卡氏属种*Soil805*（*Nocardioides sp. Soil805*）
A0A0Q9DX23	黄杆菌属种Root935（*Flavobacterium sp. Root935*）
A0A0C1XE41	*Hassallia byssoidea VB512170*
A0A0J6W7K0	楚布分支杆菌（*Mycobacterium chubuense*）
A0A0H4PGA5	阿穆尔斯克湾圆杆菌（*Cyclobacterium amurskyense*）
A0A1B1WLB8	分支杆菌属种djl-10（*Mycobacterium sp. djl-10*）
A0A0Q8NET9	黄杆菌属种Root186（*Flavobacterium sp. Root186*）
A0A0J6ZGS8	氯酚分支杆菌（*Mycobacterium chlorophenolicum*）
A0A085ZIW1	雷氏黄杆菌（*Flavobacterium reichenbachii*）
J3BZ97	黄杆菌属种菌株*C.*（*Flavobacterium sp. strain C.*）
A0A066WRY7	*Flavobacterium seoulense*
K2PYQ1	*Galbibacter marinus*
A0A0G4IN41	芸苔根肿菌（*Plasmodiophora brassicae*）
A0A1B5ZW29	栖砂杆菌属C-21（*Arenibacter sp. C-21*）
A0A1B9DW83	*Flavobacterium piscis*
A0A099CMP1	红分支杆菌（*Mycobacterium rufum*）
A0A1B2U6C7	约氏黄杆菌（*Flavobacterium johnsoniae*）
A0A0M8YPK7	糖丝菌属种NRRL B-16348（*Saccharothrix sp. NRRL B-16348*）
A0A0T1WAX5	分支杆菌种*Root135*（*Mycobacterium sp. Root135*）
K0VAQ4	母牛分支杆菌（*Mycobacterium vaccae*）
A0A0Q9JG60	分支杆菌种Soil538（*Mycobacterium sp. Soil538*）
A0A0M0TLE5	黄杆菌属种VMW（*Flavobacterium sp. VMW*）
A0A151ZK81	乳网柄菌（*Dictyostelium lacteum*）
K6WMK4	推定的*Gordonia rhizosphera NBRC 16*
L8GZJ4	*Acanthamoeba castellanii*

[0337]

登录号	来源生物体
I4BLB8	楚布分支杆菌（*Mycobacterium chubuense*）
H0RLL0	推定的*Gordonia polyisoprenivorans*
A0A0C1LEQ5	布劳氏菌属种Am3（*Prauserella sp. Am3*）
A0A1E4NXS4	假诺卡氏菌属种*SCN 73-27*（*Pseudonocardia sp. SCN 73-27*）
A0A1A1YGK6	分支杆菌属种ACS4331（*Mycobacterium sp. ACS4331*）
A0A0G3ILT8	分支杆菌属种EPa45（*Mycobacterium sp. EPa45*）
G7GR35	推定的*Gordonia amarae NBRC 15530*（*Putative Gordonia amarae NBRC 15530*）
A0A1A2LUF7	分支杆菌属种*E136*（*Mycobacterium sp. E136*）
A0A1A3GTN2	产粘液分支杆菌（*Mycobacterium mucogenicum*）
A0A1A0RZ49	分支杆菌属种*852002-519..*（*Mycobacterium sp. 852002-519..*）
A0A101AHK0	分支杆菌属种*IS-1496*（*Mycobacterium sp. IS-1496*）
A0A126YBZ9	白色链霉菌（*Streptomyces albus*）
A0A0X3WJ69	灰色链霉菌亚种（*Streptomyces griseus subsp.*）
A0A1C4KUQ6	链霉菌属种*BvitLS-983*（*Streptomyces sp. BvitLS-983*）
A0A1C4T5K2	链霉菌属种*OspMP-M43*（*Streptomyces sp. OspMP-M43*）
A0A1A3C0V1	分支杆菌属种*E740*（*Mycobacterium sp. E740*）
A0A0G4IKE4	芸苔根肿菌（*Plasmodiophora brassicae*）
K1VUE5	链霉菌属种*SM8*（*Streptomyces sp. SM8*）
D6B5U8	白色链霉菌J1074（*Streptomyces albus J1074*）
A0A1C4NBH5	链霉菌属种*ScaeMP-6W*（*Streptomyces sp. ScaeMP-6W*）
A0A1C4Q3W7	链霉菌属种*IgraMP-1*（*Streptomyces sp. IgraMP-1*）
R7WSQ4	红色红球菌*LMG 5362*（*Rhodococcus rhodnii LMG 5362*）
A0A0K2YP95	红球菌属种*RD6.2*（*Rhodococcus sp. RD6.2*）
XP_011566937	小菜蛾（*Plutella xylostella*）过氧化物酶体酰基-辅酶A氧化酶1样
XP_011568279	小菜蛾（*Plutella xylostella*） 可能的过氧化物酶体酰基-辅酶A氧化酶1
XP_011568389.1	小菜蛾（*Plutella xylostella*） 可能的过氧化物酶体酰基-辅酶A氧化酶1
XP_011554180.1	小菜蛾（*Plutella xylostella*） 可能的过氧化物酶体酰基-辅酶A氧化酶1

[0338]

登录号	来源生物体
XP_011549583.1	小菜蛾（*Plutella xylostella*） 可能的过氧化物酶体酰基-辅酶A氧化酶3
XP_011548846.1	小菜蛾（*Plutella xylostella*） 可能的过氧化物酶体酰基-辅酶A氧化酶3
AAP37772	拟南芥（*A. thaliana*）*酰基-CoA氧化酶-3 (ACX3)*
XP_011548846.1	小菜蛾（*Plutella xylostella*）*dbmfjv1x1核心32_85_1_蛋白_XP_011548846.1* 预测的过氧化物酶体酰基-辅酶A氧化酶3

[0339] 酰基转移酶

[0340] 在一些实施方案中,提供了用于产生短链脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的重组微生物和方法。在某些实施方案中,该短链脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的碳链长度短于或等于C18。在产生短链信息素的方法的一些优选的实施方案中,优选储存短链脂肪酰基-CoA的选择酶与一种或多种脂肪酰基去饱和酶共表达。此类合适的酰基转移酶是通过异源或经工程化的甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)、甘油磷脂酰基转移酶(GPLAT)和/或二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)例示的。适于此目的的酰基转移酶的实例列于表5b中。

[0341] 在产生脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的方法的一些优选的实施方案中,微生物宿主的一种或多种编码甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)、甘油磷脂酰基转移酶(GPLAT)和/或二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)的基因被缺失或下调,并被一种或多种优选储存短链脂肪酰基-CoA的GPAT、LPAAT、GPLAT或DGAT取代。此类缺失或下调目标包括但不限于解脂耶氏酵母YALI0C00209g、解脂耶氏酵母YALI0E18964g、解脂耶氏酵母YALI0F19514g、解脂耶氏酵母解脂耶氏酵母YALI0C14014g、解脂耶氏酵母YALI0E16797g、解脂耶氏酵母YALI0E32769g、解脂耶氏酵母YALI0D07986g、酿酒酵母YBL011w、酿酒酵母YDL052c、酿酒酵母YOR175C、酿酒酵母YPR139C、酿酒酵母YNR008w、酿酒酵母YOR245c、假丝酵母属I503_02577、假丝酵母属CTRG_02630、假丝酵母属Ca019.250、假丝酵母属Ca019.7881、假丝酵母属CTRG_02437、假丝酵母属Ca019.1881、假丝酵母属Ca019.9437、假丝酵母属CTRG_01687、假丝酵母属Ca019.1043、假丝酵母属Ca019.8645、假丝酵母属CTRG_04750、假丝酵母属Ca019.13439、假丝酵母属CTRG_04390、假丝酵母属Ca019.6941、假丝酵母属Ca019.14203和假丝酵母属CTRG_06209。在其他实施方案中,在AXP酸细胞外蛋白酶位点(YALI0B05654g)插入该酰基转移酶。

[0342] 因此,在一些实施方案中,本公开教导了一种包含酰基转移酶的重组微生物,该酰基转移酶与选自92的SEQ ID No中的任一个表现出至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%或50%序列同一性。

[0343] 因此,在一些实施方案中,本公开教导了一种包含编码酰基转移酶的核酸分子的重组微生物,其中所述核酸分子与选自91的SEQ ID No中的任一个表现出至少99%、98%、

97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％、75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％、60％、59％、58％、57％、56％、55％、54％、53％、52％、51％或50％序列同一性。

[0344] 在一些实施方案中,本公开教导了一种包含至少一种编码酰基转移酶的核酸分子的重组微生物,该酰基转移酶与选自SEQ ID NO:92的酰基转移酶具有至少99％、98％、97％、96％、95％、94％、93％、92％、91％、90％、89％、88％、87％、86％、85％、84％、83％、82％、81％、80％、79％、78％、77％、76％、75％、74％、73％、72％、71％、70％、69％、68％、67％、66％、65％、64％、63％、62％、61％、60％、59％、58％、57％、56％、55％、54％、53％、52％、51％或50％序列同一性。

[0345] 在一些实施方案中,本公开教导了一种包含一种或多种酰基转移酶的缺失、破坏、突变和/或活性降低的重组微生物,该酰基转移酶选自YALI0E32791g(DGA1)和/或YALI0D07986g(DGA2)。

[0346] 因此,在一些实施方案中,本公开的重组微生物将包含内源基因的缺失或其他破坏,该内源基因编码与由YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)编码的蛋白质表现出至少100％、99％、98％、97％、95％、94％、93％、92％、91％或90％序列同一性的蛋白质。

[0347] 因此,在一些实施方案中,本公开的重组微生物将包含内源基因的缺失,该内源基因编码与uniprot数据库ID Q6C3R1(DGA1)和/或Q6C9V5(DGA2)表现出至少100％、99％、98％、97％、95％、94％、93％、92％、91％或90％序列同一性的蛋白质。

[0348] 甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)

[0349] 本公开描述了催化甘油3-磷酸酯的sn-1位置处的酰化反应的酶,该反应如下所示:

[0350] 长链酰基-CoA+sn-甘油3-磷酸→1-酰基-sn-甘油3-磷酸+辅酶A。

[0351] 甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)催化甘油3-磷酸酯的sn-1位置处的酰化反应。植物细胞含有3种类型的GPAT,其位于叶绿体、线粒体和细胞质中。叶绿体中的该酶是可溶的,且使用酰基-(酰基-载体蛋白)作为酰基供体,而线粒体或细胞质中的该酶与膜结合,并使用酰基-CoA作为酰基供体(Nishida I等(1993)The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase of Arabidopsis thaliana.Plant Mol Biol.21(2):267-77;Murata N和Tasaka Y(1997)Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants.Biochim Biophys Acta.1348(1-2):10-16)。

[0352] 已经在拟南芥(Arabidopsis)中鉴定出8个GPAT基因(Zheng Z等(2003)Arabidopsis AtGPAT1,a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family,is essential for tapetum differentiation and male fertility.Plant Cell 15(8):1872-87)。已经表明了GPAT1编码线粒体酶(Zheng等2003)。已经表明了GPAT4、GPAT5和GPAT8是角质素生物合成必不可少的(Beisson F等(2007)The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis.Plant Cell 19(1):351-368;Li,Y等(2007)Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin

with suberin-like monomers.Proc Natl Acad Sci USA 104(46):18339-18344)。尚未表征GPAT2、GPAT3、GPAT6和GPAT7。

[0353] 细胞质GPAT负责三酰基甘油和非叶绿体膜磷脂的合成。由于这两种脂肪酸是在植物三酰基甘油的sn-1位置处发现的最常见的脂肪酸,因此预期对棕榈酸酯(C16:0)和油酸酯(C18:1)具有底物偏爱。从鳄梨中部分纯化了细胞质GPAT(Eccleston VS和Harwood JL(1995)Solubilisation,partial purification and properties of acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase from avocado(Persea americana)fruit mesocarp.Biochim Biophys Acta 1257(1):1-10)。

[0354] 来自大肠杆菌(E.coli)的膜结合的甘油-3-磷酸酰基转移酶(PlsB)催化磷脂生物合成中的第一关键步骤,且被认为在与后续的酶1-酰基甘油-3-磷酸O-酰基转移酶(PlsC)非常接近处发挥作用(Kessels JM等(1983)Facilitated utilization of endogenously synthesized lysophosphatidic acid by 1-acylglycerophosphate acyltransferase from Escherichia coli.Biochim Biophys Acta 753(2):227-235)。这对于sn-甘油3-磷酸酯的1位处的酰化作用是特定的,且可以利用脂肪酰基-酰基载体蛋白(酰基-ACP)或脂肪酰基-辅酶A(酰基-CoA)硫酯作为酰基供体,以形成1-酰基-sn-甘油3-磷酸酯。内源合成的脂肪酸被附接至ACP,且外源添加的脂肪酸被附接至CoA。在大肠杆菌(E.coli)磷脂中,sn 1位置主要被棕榈酸或顺式-异油酸占据,而sn 2位置则主要是棕榈油酸或顺式-异油酸。这被认为是由于PlsB和PlsC酶的底物偏爱引起的。

[0355] 已经表明了plsB基因受应激反应调节剂的调控,诸如RNA聚合酶、σ24(σE)因子和ppGpp(Wahl A等(2011)Antagonistic regulation of dgkA and plsB genes of phospholipid synthesis by multiple stress responses in Escherichia coli.Mol Microbiol 80(5):1260-75)。PlsB是用于磷脂合成的蛋白质网络的一部分,并与全-[酰基-载体蛋白](ACP)、酯酶/硫酯酶(YbgC)和磷脂酰丝氨酸合酶(PssA)相互作用,以在内膜的细胞质侧处形成复合物。

[0356] plsB对于生长是必需的(Baba T等(2006)Construction of Escherichia coli K-12in-frame,single-gene knockout mutants:the Keio collection.Mol Syst Biol.2:2006-2008;Yoshimura M等(2007)Involvement of the YneS/YgiH and PlsX proteins in phospholipid biosynthesis in both Bacillus subtilis and Escherichia coli.BMC Microbiol 7:69)。

[0357] 定点诱变和化学修饰研究已证明PlsB中具有催化重要性的氨基酸残基,包括对于催化必需的不变组氨酸残基(Lewin TM等(1999)Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction.Biochemistry 38(18):5764-5771)。遗传研究已确定plsB基因座涉及多药耐受的存留细胞的形成。

[0358] 在早期工作中研究了大肠杆菌(E.coli)B酶的性质(Kito M等(1972)Inhibition of L-glycerol 3-phosphate acyltransferase from Escherichia coli by cis-9,10-methylenehexadecanoic acid.J Biochem 71(1):99-105;Okuyama H和Wakil SJ(1973)Positional specificities of acyl coenzyme A:glycerophosphate and acyl coenzyme A:monoacylglycerophosphate acyltransferases in Escherichia coli.J

Biol Chem 248(14):5197-5205;Kito M等(1978)Function of phospholipids on the regulatory properties of solubilized and membrane-bound sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase of Escherichia coli.Biochim Biophys Acta 529(2):237-2499)。

[0359] 甘油-3-磷酸酯/二羟基丙酮磷酸酯双底物特异性sn-1酰基转移酶位于脂质颗粒和ER中,并涉及脂质生物合成中甘油3-磷酸酯和二羟基丙酮的逐步酰化。最保守的基序和功能相关的残基朝向ER内腔。

[0360] 从酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)中鉴定、克隆并在生物化学上表征了编码双甘油-3-磷酸酯O-酰基转移酶(GAT)/二羟基丙酮磷酸酯酰基转移酶(DHAT)的基因(SCT1)。在表现出很低GAT/DHAT活性的酵母Δgpt1突变体中,SCT1通过质粒载体的过表达显示出增加的GAT/DHAT活性,突显了提议的分子作为甘油-3-磷酸酯O-酰基转移酶/二羟基丙酮磷酸酯酰基转移酶的功能。在棕榈油酰基-CoA的情况下,GAT/DHAT对酰基供体的活性最高,随后是棕榈酰基-CoA,油酰基-CoA和硬脂酰基-CoA。SCT1p定位至胞液中的膜,最可能定位于内质网。Δsct1突变体的体内研究确实揭示了对所有四个磷脂的影响,但观察到的磷脂酰乙醇胺类中16:0脂肪酸的减少被其他脂肪酸(尤其是18:0分子种类)的增加所抵消。SCT1和GPT2的无效突变体在酵母中合成致死(Zheng Z和Zou J(2001)The initial step of the glycerolipid pathway:identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in Saccharomyces cerevisiae.J Biol Chem 276(45):417104-41716)。

[0361] 鉴定、克隆并在生物化学上表征了来自酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)的编码双甘油-3-磷酸酯O-酰基转移酶(GAT)/二羟基丙酮磷酸酯酰基转移酶(DHAT)的基因(GPT2)。GPT2在缺少GAT/DHAT活性的ΔplsB背景下在大肠杆菌中重组表达,并显示出增加的GAT活性,但由于GPT2在膜中的错误嵌入而无法挽救该突变体。在表现出很低的GAT/DHAT活性的酵母Δgpt1突变体中,来自质粒载体的GPT2的过表达显示出增加的GAT/DHAT活性,突显了提议的分子作为甘油-3-磷酸酯O-酰基转移酶/二羟基丙酮磷酸酯酰基转移酶的功能。在油酰基-CoA的情况下,GAT/DHAT对酰基供体的活性是最高的,随后是棕榈油酰基-CoA,棕榈酰基-CoA和硬脂酰基-CoA。

[0362] GPT2p位于胞液中的膜。Δgpt2突变体的体内研究未揭示对总脂肪酸谱有任何显著影响,但观察到磷脂酰乙醇胺类的16:1脂肪酸的减少,这可以通过16:0和18:1分子种类的增加来补偿。已知的GAT活性缺陷的酵母突变体TTA1的分析表明,TTA1 GPT2基因具有错义突变,在酰基转移酶的保守基序III中具有一个核苷酸改变。SCT1和GPT2的无效突变体在酵母中合成致死(Zheng和Zou 2001)。

[0363] 在一些实施方案中,甘油-3-磷酸酯酰基转移酶是来自拟南芥(Arabidopsis thaliana)的GPAT(At1g02390)。在一些实施方案中,甘油-3-磷酸酯酰基转移酶是来自大肠杆菌(E.coli)的PlsB(基因ID EG10740)。在一些实施方案中,甘油-3-磷酸酯酰基转移酶是来自酿酒酵母的双甘油-3-磷酸酯O-酰基转移酶(GAT)/二氢基丙酮磷酸酯酰基转移酶(DHAT)SCT1(YBL011w)。在一些实施方案中,甘油-3-磷酸酯酰基转移酶是来自解脂耶氏酵母的YALI0C00209g。在一些实施方案中,甘油-3-磷酸酯酰基转移酶是来自白假丝酵母的I503_02577。在一些实施方案中,甘油-3-磷酸酯酰基转移酶是来自热带假丝酵母的CTRG_

02630。在一些实施方案中,甘油-3-磷酸酯酰基转移酶是来自酿酒酵母的双甘油-3-磷酸酯O-酰基转移酶(GAT)/二氢基丙酮磷酸酯酰基转移酶(DHAT)GPT2(YKR067w)。在一些实施方案中,甘油-3-磷酸酯酰基转移酶是来自白假丝酵母的CaO19.5815。在一些实施方案中,甘油-3-磷酸酯酰基转移酶是来自白假丝酵母的CaO19.13237。在一些实施方案中,甘油-3-磷酸酯酰基转移酶是来自热带假丝酵母的CTRG_02630。

[0364] 溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)

[0365] 本公开描述了催化三酰基甘油的sn-2位置的酰化作用的酶。

[0366] 由基因plsC编码的膜结合的1-酰基甘油3-磷酸酯O-酰基转移酶催化磷脂生物合成的第二步,并被认为在非常接近由基因plsB编码的先前酶甘油-3-磷酸酯酰基转移酶时发挥功能(Kessels JM等1983)。这对于1-酰基-sn-甘油3-磷酸酯的sn-2位置处的酰化反应是特定的,且可以利用酰基-酰基载体蛋白(酰基-ACP)或酰基-辅酶A(酰基-CoA)作为脂肪酰基供体,以形成1,2-二酰基-sn-甘油3-磷酸酯(磷脂酸(phosphatidate,phosphatidic acid))。内源合成的脂肪酸被附接至ACP,且外源添加的脂肪酸被附接至CoA(Greenway DL和Silbert DF(1983)Altered acyltransferase activity in Escherichia coli associated with mutations in acyl coenzyme A synthetase.J Biol Chem 258(21):13034-13042)。在大肠杆菌(E.coli)中,sn 1位置处的磷脂主要被棕榈酸或顺式-异油酸占据,而sn 2位置则主要是棕榈油酸或顺式-异油酸。这被认为是由于PlsB和PlsC酶的底物偏爱引起的(Rock CO等(1981)Phospholipid synthesis in Escherichia coli.Characteristics of fatty acid transfer from acyl-acyl carrier protein to sn-glycerol 3-phosphate.J Biol Chem 256(2):736-742;Goelz SE和Cronan JE(1980)The positional distribution of fatty acids in Escherichia coliphospholipids is not regulated by sn-glycerol 3-phosphate levels.J Bacteriol 144(1):462-464)。

[0367] 定点诱变研究表明,将苏氨酸-122变化为丙氨酸或亮氨酸导致酰基-CoA底物特异性的变化(Morand LZ等(1998)Alteration of the fatty acid substrate specificity of lysophosphatidate acyltransferase by site-directed mutagenesis.Biochem Biophys Res Commun 244(1):79-84)。

[0368] 在经工程化的大肠杆菌(E.coli)菌株中,PlsC和GalU的过表达导致甘油糖脂的产量增加(Mora-Buye N等(2012).An engineered E.coli strain for the production of glycoglycerolipids.Metab Eng 14(5):551-559)。

[0369] 肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)的plsC基因编码与大肠杆菌(E.coli)酶同源的1-酰基甘油-3-磷酸酯酰基转移酶。该基因被克隆并在大肠杆菌(E.coli)中表达,并且显示了表达该基因的膜催化预期的功能(Lu YJ等(2006)Acyl-phosphates initiate membrane phospholipid synthesis in Gram-positive pathogens.Mol Cell 23(5):765-772)。

[0370] 植物溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)催化三酰基甘油的sn-2位置的酰化。在指定植物物种中,LPAAT的底物特异性通常决定在sn-2位置处并入哪些脂肪酸种类。LPAAT已从玉米和meadow foam中克隆。meadow foam中有两个LPAAT基因,而玉米中只有一个。通过体外测定证实了meadow foam中LAT1和LAT2二者的酶活性。此外,显示LAT2可以功能性补充大

肠杆菌(E.coli)LPAAT缺陷菌株(Brown AP等(2002)Limnanthes douglasii lysophosphatidic acid acyltransferases:immunological quantification,acyl selectivity and functional replacement of the Escherichia coli plsC gene.Biochem J 364(Pt 3):795-805)。

[0371] LAT1是一种高度选择性的酰基转移酶,其仅使用18:1-CoA作为底物。LAT2的选择性较低。显示了对22:1-CoA的最高活性,随后是16:0-和18:1-CoA。LAT1和LAT2的底物特异性与其提议的作用一致,即LAT1在膜脂质生物合成中和LAT2在存储脂质生物合成中的作用。植物细胞膜主要含有C16和C18不饱和脂肪酸,而存储脂质则含有宽范围的脂肪酸,包括饱和脂肪酸和很长链的不饱和脂肪酸。通过抗体来检测不同植物组织中的LAT1和LAT2的蛋白质水平。LAT1存在于叶片和发育中的种子中,而LAT2仅在发育中的种子中检测到。这再次与其提议的作用一致。通过油菜籽中的LAT2转化进一步显示了LAT2在三酰基甘油生物合成中的作用,该油菜籽通常在sn-2位置处不含有22:1-CoA。meadow foam LAT2的转化在sn-2位置处插入了22:1-CoA(Lassner MW等(1995)Lysophosphatidic acid acyltransferase from meadowfoam mediates insertion of erucic acid at the sn-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil.Plant Physiol 109(4):1389-1394)。

[0372] 利用缺乏鞘脂类生物合成的存活突变酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)菌株,分离了基因SLC1,并证明其编码酰基-CoA:溶血磷脂酸酰基转移酶。与被分类为1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酯酰基转移酶的大肠杆菌(E.coli)的PLSC蛋白同源的序列指示相似的功能。通过挽救大肠杆菌(E.coli)的ΔplsC突变体的能力,证实了SLC1p的这种推测的分子功能。可以显示,在131位置处将L-谷氨酰胺改变为L-亮氨酸的单个核苷酸改变将底物偏好从C16和C18脂肪酸转变为C26脂肪酸,这在体内反映在野生型(SLC1)对比突变体(SLC1-1)的相应脂肪酸组成中(Nagiec MM等(1993)A suppressor gene that enables Saccharomyces cerevisiae to grow without making sphingolipids encodes a protein that resembles an Escherichia coli fatty acyltransferase.J Biol Chem 268(29):22156-22163)。

[0373] 用在大肠杆菌中重组表达并纯化的SLC1p进行的体外测定揭示了对溶血磷脂酸和油酰-CoA的底物偏好,但也接受1-棕榈酰甘油3-磷酸酯和1-硬脂酰-sn-甘油3-磷酸酯。突变体(诸如Δslc1、Δslc4(另一潜在酰基-CoA:磷脂酰酰基转移酶)和Δslc1Δslc4的双突变体(其携有具有被称为2.ΔSLC1(或2.ΔSLC4)的SLC1或SLC4基因的质粒)的体内研究显示SLC1促进了磷脂酸酯以及磷脂酰肌醇和二酰基甘油的生物合成。表明了SLC1通过在体内交换甘油磷脂上的脂肪酸而参与磷脂重构(Benghezal M等(2007)SLC1 and SLC4 encode partially redundant acyl-coenzyme A 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferases of budding yeast.J Biol Chem 282(42):30845-30855)。

[0374] 使用已知酰基转移酶的候选开放阅读框(ORF)筛选酵母基因组,并测试相关的缺失菌株,鉴定出编码酰基-CoA依赖性溶血磷脂酰基转移酶(ALE1)的基因。在Δale1菌株中,观察到溶血磷脂酰乙醇胺酰基转移酶(LPEAT)活性急剧下降,但也可以证明当酿酒酵母中的主要LPAAT(即SLC1p)不存在或失活时,ALE1p可以提供多余的溶血磷脂酰酰基转移酶(LPAAT)活性。ALE1p优选将不同长度的不饱和酰基链附接至溶血磷脂的sn-2位置。利用高纯度细胞分级分离,将酶定位至微粒体膜和线粒体膜。已经提议ALE1可能是酵母中外源溶

血脂质(lysolipid)代谢(ELM)途径中的主要LPEAT,但它也是内源性Kennedy途径(Riekhof WR等(2007)Identification and characterization of the major lysophosphatidylethanolamine acyltransferase in Saccharomyces cerevisiae.J Biol Chem 282(39):28344-28352)的有效功能必需的。

[0375] 在一项同步研究中,通过应用合成遗传阵列分析鉴定了LPT1(与ALE1同义),并显示具有溶血磷脂酰基转移酶活性。在此研究中,LPT1(=ALE1)的最佳底物是溶血磷脂酰胆碱,因此充当溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶(LPCAT),还利用单Δlpt1突变体和双Δscl1Δlpt1突变体(后者不可存活)证明了先前报道的LPAAT的残余活性。确定了将油酸并入磷脂酰胆碱的比例为70%朝向从头合成和30%朝向重构(Jain S等(2007)Identification of a novel lysophospholipid acyltransferase in Saccharomyces cerevisiae.J Biol Chem 282(42):30562-30569)。

[0376] 在另一项同时监测放射性标记的溶血磷脂酰胆碱和/或棕榈酰-CoA并入磷脂酰胆碱(PC)中的研究中,证实了ALE1(也称为LCA1或SLC4)作为溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶(LPCAT)的分子功能。该研究证实ALE1p(本研究中=LCA1p)接受多种酰基供体,但无论溶血磷脂酰胆碱种类的酰基链如何(16:0或18:1),ALE1显示最高的LPCAT活性。此外,观察到对Zn2+的高敏感性,在高于0.1mM的浓度时是抑制性的,而在较低的浓度(10至25μM)下是活化的。测量的ALE1p(=LCA1p)的高PC周转率强调该酶是参与PC再酰化的关键催化剂(Chen Q等(2007)The yeast acylglycerol acyltransferase LCA1 is a key component of Lands cycle for phosphatidylcholine turnover."FEBS Lett 581(28):5511-5516)。

[0377] 在导致酿酒酵母中脂滴(LD)形成异常的基因的搜索,鉴定了编码酰基-CoA依赖性溶血磷脂酸酰基转移酶的基因LOA1(以前称为VPS66)。使用野生型和Δloa1酵母菌株的脂质组的比较来确定LOA1p的体内分子功能。分析显示,在LOA1缺陷突变体(Δloa1)中,含有油酸的磷脂酸酯分子种类的百分比显著降低,且三酰基甘油(TGA)的含量降低了20%。该蛋白质在大肠杆菌中重组表达,并通过获得高度富集的脂滴级分和通过具有仍与基质珠附接的LOA1p的亲和层析进行部分纯化。在体外测定中表征了纯化的LOA1p,该体外测定证明了LOA1p对溶血磷脂酸和油酰基-CoA具有特异性,因此在酵母中充当油酰基-CoA:溶血磷脂酸酰基转移酶。基于该结果,认为LOA1p显著参与引导过多的含油酸的磷脂酸酯种类进入TAG生物合成以及脂滴的(LD的)适当发展。利用基因组标记的构建体、亚细胞分级分离、免疫组化和荧光显微镜检查,LOA1可以被定位于内质网(ER)和脂滴(LD的)(Ayciriex S等(2012)YPR139c/LOA1 encodes a novel lysophosphatidic acid acyltransferase associated with lipid droplets and involved in TAG homeostasis.Mol Biol Cell 23(2):233-246)。

[0378] 在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自大肠杆菌的plsC(MetaCyc登录ID EG11377)。在其他实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自肺炎链球菌(S.pneumoniae)的plsC(MetaCyc登录ID G-10763)。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自荷包蛋花(Limnanthes douglasii)的LAT1。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自荷包蛋花(Limnanthes douglasii)的LAT2(MetaCyc登录ID G-9398)。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自酿酒酵母的SLC1(YDL052c)。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自解脂耶氏酵母的YALI0E18964g。在一些实施方案中,溶血

磷脂酸酰基转移酶是来自白假丝酵母的CaO19.250。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自白假丝酵母的CaO19.7881。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自热带假丝酵母的CTRG_02437。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自酿酒酵母的ALE1(YOR175C)。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自解脂耶氏酵母的YALI0F19514g。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自白假丝酵母的CaO19.1881。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自白假丝酵母的CaO19.9437。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自热带假丝酵母的CTRG_01687。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自酿酒酵母的LOA1(YPR139C)。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自解脂耶氏酵母的YALI0C14014g。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自白假丝酵母的CaO19.1043。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自白假丝酵母的CaO19.8645。在一些实施方案中,溶血磷脂酸酰基转移酶是来自热带假丝酵母的CTRG_04750。

[0379] 甘油磷脂酰基转移酶(GPLAT)

[0380] 本公开描述了催化下列反应的酶:

1-烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺+ 2-酰基-1-烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱⇌

O-1-烷基-2-酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺+ 1-烷基-2-溶血-sn-甘油-3-磷酸胆碱。

[0381] GPLAT酶催化脂肪酸从完整的含胆碱或乙醇胺的甘油磷脂转移至溶血-甘油磷脂的sn-2位置。供体或受体分子的sn-1上的有机基团可以是烷基、酰基或烷-1-烯基。有时使用术语“radyl”来指代此类取代基。该酶需要辅酶A,且不利于多不饱和酰基的转移。

[0382] 二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)

[0383] 本公开描述了将酰基基团添加至二酰基甘油(DAG)的sn-3位置以形成三酰基甘油(TAG)的酶。

[0384] 二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)催化三酰基甘油生物合成中唯一的独特反应。它将酰基添加至二酰基甘油(DAG)的sn-3位置,并形成三酰基甘油(TAG),如下所示:

[0385] 酰基-CoA +1,2-二酰基-sn-甘油→三酰基-sn-甘油+辅酶A。

[0386] DGAT接受广泛的酰基-CoA作为酰基供体,其包括针对拟南芥DGAT所证明的C18:1、C18:2和C20:1酰基-CoA(Jako C等(2001)Seed-specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight.Plant Physiol 126(2):861-874)。在昆虫细胞培养物中和酵母中表达DGAT的拟南芥(Arabidopsis)cDNA,以及在野生型拟南芥(Arabidopsis)中过表达该cDNA,证明了DGAT活性是将酰基转移到DAG的sn-3位置(Hobbs DH等(1999)Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis thaliana and its functional expression.FEBS Lett 452(3):145-149;Zou J等(1999)The Arabidopsis thaliana TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene.Plant J 19(6):645-653)。在野生型拟南芥中过表达该拟南芥(Arabidopsis)cDNA增加了种子中的油沉积,并且此增加与增加的DGAT的mRNA表达水平相关。这表明DGAT是三酰基甘油生物合成途径的调控点。

[0387] 在酿酒酵母中已鉴定出编码双功能酰基-CoA:酰基甘油酰基转移酶(DGAT)的基因,其是三酰基甘油生物合成的主要贡献者(Sandager L等(2002)Storage lipid

synthesis is non-essential in yeast.J Biol Chem 277(8):6478-6482)。该基因(DGA1)属于DGAT2家族,其成员的特征是酰基-CoA依赖性酰基转移酶(Lardizabal KD等(2001)DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family:purification, cloning,and expression in insect cells of two polypeptides from Mortierella ramanniana with diacylglycerol acyltransferase activity."J Biol Chem 276(42):38862-38869)。已经证明了DGA1p是酵母基因组中唯一的催化二酰基甘油(DAG)酯化为三酰基甘油(TAG)的酰基-CoA依赖性酰基转移酶。这已在DGA1的缺失突变体(Δdga1),并与酵母中其他重要的二酰基甘油酰基转移酶(即利用磷脂酰供体(Δlro1)酯化DAG的LRO1)的缺失相结合中显示。在Δdga1Δlro1双突变体中,几乎所有的二酰基甘油酰基转移酶已经被丢失,且TAG合成被废除了。携带DGA1基因的质粒可以挽救突变体中TAG的合成缺陷,这表明体内DGA1显著参与了TAG生物合成途径(Sorger D,Daum G(2002).Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast Saccharomyces cerevisiae.J Bacteriol 184(2):519-524;Oelkers P等(2002)The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast.J Biol Chem 277(11):8877-8881)。在体外,观察到DGA1p对油酰基-CoA和棕榈酰基-CoA的偏爱,这与磷脂依赖性酰基转移酶LRO1p是相反的(Oelkers等2002)。

[0388] 此外,在体内利用已经丧失了超过60%的MGAT活性的Δdga1突变体证明了DGA1p作为酰基-CoA依赖性单酰基甘油酰基转移酶(MGAT)的功能。通过2-油酰基甘油的油酰基-CoA依赖性酯化反应(在该过程中生成1,2-二油酰甘油)显示了DGA1的体外MGAT活性(Heier C等(2010)Identification of Yju3p as functional orthologue of mammalian monoglyceride lipase in the yeast Saccharomyces cerevisiae.Biochim Biophys Acta 1801(9):1063-1071)。

[0389] 通过电脑模拟分析、标签基序的定点诱变以及C和N末端的缺失突变,已获得对DGA1p的一级序列中序列基序的功能重要性和拓扑方向的更多见解。可以证明,除了在其他DGAT2家族成员中发现的标签基序以外,酵母属还具有独特的亲水性延伸,其显示出可显著调节酶活性。而且,四个确定的跨膜域的第二个中的组氨酸残基195被证明对酶活性是必不可少的。DGA1的拓扑结构揭示了,C末端和N末端二者面对细胞质,以及C末端对于DGA1活性比N末端更重要(Liu Q等(2011)Functional and topological analysis of yeast acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2,an endoplasmic reticulum enzyme essential for triacylglycerol biosynthesis.J Biol Chem 286(15):13115-13126)。

[0390] 使用高度纯化的细胞片段和免疫印迹法,Sorger等(2002)和Liu等(2011)证明了DGA1定位于脂滴和微粒体膜,最可能是内质网。

[0391] 不动杆菌属种(Acinetobacter sp.)ADP1表达一种双功能酶,其表现出蜡酯合酶(WS)和酰基-coA:二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)两种活性(Kalscheuer R和Steinbuchel A(2003)A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in Acinetobacter calcoaceticus ADP1.J Biol Chem 278(10):8075-8082)。此同型二聚体催化TAG和WE生物合成中的最终步骤(Stoveken T等(2005)The wax ester synthase/acyl

coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase from Acinetobacter sp.strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase.J Bacteriol 187(4):1369-1376)。它介导氧代酯和硫代酯键的形成,并且具有宽的底物范围,接受中链脂肪醇和酰基-CoA酯以及单酰基甘油(MAG)(Uthoff S等(2005)Thio wax ester biosynthesis utilizing the unspecific bifunctional wax ester synthase/acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase of Acinetobacter sp.strain ADP1.Appl Environ Microbiol 71(2):790-796)。

[0392] 在一些实施方案中,二酰基甘油酰基转移酶是来自拟南芥的TAG1(基因ID AT2G19450)。在一些实施方案中,二酰基甘油酰基转移酶是来自酿酒酵母的DGA1(YOR245c)。在一些实施方案中,二酰基甘油酰基转移酶是来自的不动杆菌属种ADP1的atfA(MetaCyc登录ID ACIAD0832)。在一些实施方案中,二酰基甘油酰基转移酶是来自解脂耶氏酵母的YALI0E32769g。在一些实施方案中,二酰基甘油酰基转移酶是来自白假丝酵母的Ca019.6941。在一些实施方案中,二酰基甘油酰基转移酶是来自白假丝酵母的Ca019.14203。在一些实施方案中,二酰基甘油酰基转移酶是来自热带假丝酵母的CTRG_06209。

[0393] 磷脂:二酰基甘油酰基转移酶(PDAT)催化下列反应:磷脂酰胆碱+1,2-二酰基-sn-甘油→三酰基-sn-甘油+1-酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。

[0394] 拟南芥PDAT可以使用不同的磷脂作为酰基供体,使用在任一sn-位置处具有碳链长度为10-22的酰基(Stahl U等(2004)Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis.Plant Physiol 135(3):1324-1335)。然而,磷脂酰胆碱的sn-2位置处的酰基用量比sn-1位置处的酰基大三倍。活性最高的是使用具有多个双键、环氧基或羟基的酰基。在测试中,使用蓖麻油酰基的酶活性最高。18:0-和22:1-酰基给予最低的酶活性。在不同的磷脂种类中,使用磷脂酰乙醇胺的活性高于使用磷脂酸酯或磷脂酰胆碱的活性。

[0395] 在蓖麻子种子微粒体级分中检测到PDAT活性。放射性标记的蓖麻油基(ricinoleoyl)和vernoloyl基被有效地从磷脂酰胆碱转移至DAG,形成三酰基甘油(Dahlqvist A等(2000)Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase:an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants.Proc Natl Acad Sci USA 97(12):6487-6492)。

[0396] 在其他实施方案中,二酰基甘油酰基转移酶是磷脂:二酰基甘油酰基转移酶(PDAT)。在一些实施方案中,PDAT来自拟南芥(基因ID AT5G13640)。在一些实施方案中,PDAT来自蓖麻(Ricinus communis)。在一些实施方案中,PDAT是来自酿酒酵母的LRO1(YNR008w)。在一些实施方案中,PDAT是来自解脂耶氏酵母的YALI0E16797g。在一些实施方案中,PDAT是来自白假丝酵母的Ca019.13439。在一些实施方案中,PDAT是来自热带假丝酵母的CTRG_04390。

[0397] 在一些实施方案中,提供了一种重组微生物,其能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯,其中该重组微生物表达一种或多种酰基转移酶,且其中该重组微生物经操作以缺失、破坏、突变一种或多种内源酰基转移酶和/或降低一种或多种内源酰基转移酶的活性。在一些实施方案中,被表达的一

种或多种酰基转移酶不同于被缺失或下调的一种或多种内源酰基转移酶。在一些实施方案中,该一种或多种内源或外源酰基转移酶包含甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)、甘油磷脂酰基转移酶(GPLAT)和/或二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)。在一些实施方案中,被表达的一种或多种酰基转移酶优选储存短链脂肪酰基-CoA。在其他实施方案中,被表达的一种或多种酰基转移酶选自表5b。在一些实施方案中,被缺失或下调的一种或多种内源酰基转移酶选自解脂耶氏酵母YALI0C00209g、解脂耶氏酵母YALI0E18964g、解脂耶氏酵母YALI0F19514g、解脂耶氏酵母YALI0C14014g、解脂耶氏酵母YALI0E16797g、解脂耶氏酵母YALI0E32769g、解脂耶氏酵母YALI0D07986g、酿酒酵母YBL011w、酿酒酵母YDL052c、酿酒酵母YOR175C、酿酒酵母YPR139C、酿酒酵母YNR008w、酿酒酵母YOR245c、假丝酵母属I503_02577、假丝酵母属CTRG_02630、假丝酵母属Ca019.250、假丝酵母属Ca019.7881、假丝酵母属CTRG_02437、假丝酵母属Ca019.1881、假丝酵母属Ca019.9437、假丝酵母属CTRG_01687、假丝酵母属Ca019.1043、假丝酵母属Ca019.8645、假丝酵母属CTRG_04750、假丝酵母属Ca019.13439、假丝酵母属CTRG_04390、假丝酵母属Ca019.6941、假丝酵母属Ca019.14203和假丝酵母属CTRG_06209。在一些实施方案中,该重组微生物进一步表达信息素生物合成途径酶。在另外的实施方案中,该信息素生物合成途径酶包含一种或多种脂肪酰基去饱和酶和/或脂肪酰基接合酶。在又一实施方案中,该信息素生物合成途径酶包含一种或多种形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶。

[0398] 在一些实施方案中,提供了从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的方法,其中该方法包括将至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子引入至重组微生物中或在重组微生物中表达至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子,或在一种或多种编码酰基转移酶的基因中引入缺失、插入或功能丧失突变,其中被引入或表达的至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子不同于被缺失或下调的一种或多种编码酰基转移酶的基因。在一些实施方案中,被引入或表达的至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子,或者被缺失或下调的一种或多种编码酰基转移酶的基因包含甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)、甘油磷脂酰基转移酶(GPLAT)和/或二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)。在一些实施方案中,该至少一种内源或外源核酸分子编码优选储存短链脂肪酰基-CoA的酰基转移酶。在一些实施方案中,该至少一种内源或外源核酸分子编码选自表5b的酰基转移酶。在一些实施方案中,被缺失或下调的一种或多种内源酰基转移酶选自解脂耶氏酵母YALI0C00209g、解脂耶氏酵母YALI0E18964g、解脂耶氏酵母YALI0F19514g、解脂耶氏酵母YALI0C14014g、解脂耶氏酵母YALI0E16797g、解脂耶氏酵母YALI0E32769g、解脂耶氏酵母YALI0D07986g、酿酒酵母YBL011w、酿酒酵母YDL052c、酿酒酵母YOR175C、酿酒酵母YPR139C、酿酒酵母YNR008w、酿酒酵母YOR245c、假丝酵母属503_02577、假丝酵母属CTRG_02630、假丝酵母属Ca019.250、假丝酵母属Ca019.7881、假丝酵母属CTRG_02437、假丝酵母属Ca019.1881、假丝酵母属Ca019.9437、假丝酵母属CTRG_01687、假丝酵母属Ca019.1043、假丝酵母属Ca019.8645、假丝酵母属CTRG_04750、假丝酵母属Ca019.13439、假丝酵母属CTRG_04390、假丝酵母属Ca019.6941、假丝酵母属Ca019.14203和假丝酵母属CTRG_06209。在一些实施方案中,该方法进一步包括将至少一种编码脂肪酰基去饱和酶和/或脂肪酰基接合酶的内源或外源核酸分子引入至重组微生物中或在重组微生物中表达至少一种编码脂肪酰基去饱和酶和/或脂

肪酰基接合酶的内源或外源核酸分子。在另外的实施方案中,该方法进一步包括将至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的内源或外源核酸分子引入重组微生物中或在重组微生物中表达至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的内源或外源核酸分子。

[0399] 表5b.示例性酰基转移酶

[0400]

登录号	来源生物体
AAL49962.1	牛（*Bos taurus*）
BAC43739.1	褐鼠（*Rattus norvegicus*）
AAH89846.1	褐鼠（*Rattus norvegicus*）
F6TMU0	家马（*Equus caballus*）
F6PXX7	家马（*Equus caballus*）
F7B020	家马（*Equus caballus*）
ALT83519.1	四叶澳洲坚果（*Macadamia tetraphylla*）

[0401]

登录号	来源生物体
ANN46862.1	萼距花（*Cuphea avigera*）
ANN46863.1	萼距花（*Cuphea avigera*）
ANN46864.1	萼距花（*Cuphea avigera*）
ANN46865.1	萼距花（*Cuphea avigera*）
AAC49119.1	椰子（*Cocos nucifera*）
JAT48335.1	紫苞花烛（*Anthurium amnicola*）
XP_008793203.1	海枣（*Phoenix dactylifera*）
XP_008806896.1	海枣（*Phoenix dactylifera*）
XP_008806740.1	海枣（*Phoenix dactylifera*）
XP_010908895.1	油棕（*Elaeis guineensis*）
XP_010908896.1	油棕（*Elaeis guineensis*）
Q96UY2	*Umbelopsis ramanniana*
A0A077WEU5	横梗霉（*Lichtheimia ramosa*）
A0A068SDP4	伞状毛霉菌*JMRC*（*Lichtheimia corymbifera JMRC*）
A0A068RXA2	伞状毛霉菌*JMRC*（*Lichtheimia corymbifera JMRC*）
A0A197JCE2	长穗被孢霉AG-77（*Mortierella elongata AG-77*）
A0A1C7N060	瓜笄霉（*Choanephora cucurbitarum*）
I1BLC3	德氏根霉（*Rhizopus delemar*）
A0A1C7NC56	瓜笄霉（*Choanephora cucurbitarum*）
A0A077X3B5	横梗霉（*Lichtheimia ramosa*）
Q96UY1	*Umbelopsis ramanniana*
A0A077WVD4	横梗霉（*Lichtheimia ramosa*）
A0A163K8G3	灰绿犁头霉（*Absidia glauca*）
S2J8P3	卷枝毛霉（*Mucor circinelloides*）
A0A168J818	卷枝毛霉（*Mucor circinelloides*）
A0A0C9MR10	不明毛霉（*Mucor ambiguus*）
A0A162PN39	布拉克须霉（*Phycomyces blakesleeanus*）
A0A167QXD0	布拉克须霉（*Phycomyces blakesleeanus*）
A0A0C9M4C3	不明毛霉（*Mucor ambiguus*）
A0A0B7NDT1	*Parasitella parasitica*

[0402]

登录号	来源生物体
A0A015LM78	异形根孢囊霉（*Rhizophagus irregularis*）
A0A0B7NHQ3	*Parasitella parasitica*
A0A0A1NVK5	小孢根霉（*Rhizopus microsporus*）
A0A0A1P436	小孢根霉（*Rhizopus microsporus*）
A0A0D7BI48	陶兰柱担菌（*Cylindrobasidium torrendii*）
A0A1B9HZT8	*Kwoniella pini*
A0A1D1XN50	紫苞花烛（*Anthurium amnicola*）
A0A1B9ILF0	*Kwoniella mangroviensis*
S2JU94	卷枝毛霉（*Mucor circinelloides*）
A0A1B9GCB0	*Kwoniella bestiolae CBS 10118*
A0A068RKT0	伞状毛霉菌（*Lichtheimia corymbifera*）
Q5KFU4	新型隐球菌（*Cryptococcus neoformans*）
Q55QC2	新型隐球菌（*Cryptococcus neoformans*）
U5GY58	*Microbotryum lychnidis*
A0A197KA94	长穗被孢霉AG-77（*Mortierella elongata AG-77*）
A0A088FR92	双倒卵形红酵母（*Rhodotorula diobovata*）
A0A194SBY3	禾本红酵母（*Rhodotorula graminis*）
E6R8N8	加特隐球酵母（*Cryptococcus gattii*）
M7WKS9	圆红冬孢酵母（*Rhodosporidium toruloides*）
A0A191UMW0	圆红冬孢酵母（*Rhodosporidium toruloides*）
C6KZS6	圆红冬孢酵母（*Rhodosporidium toruloides*）
J9VS50	新型隐球菌（*Cryptococcus neoformans*）
A0A109FM23	红酵母JG-1b（*Rhodotorula sp. JG-1b*）
I4YE91	蜜生节担菌（*Wallemia mellicola*）
A0A066WAJ3	*Tilletiaria anomala UBC 951*
A0A151VHJ4	真姬菇（*Hypsizygus marmoreus*）
A0A168LDJ3	灰绿犁头霉（*Absidia glauca*）
A0A0A1ULK8	立枯丝核菌AG-3 Rhs1AP（*Rhizoctonia solani AG-3 Rhs1AP*）
A0A074RWU7	立枯丝核菌123E（*Rhizoctonia solani 123E*）
A0A0K6FWT6	立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani*）

[0403]

登录号	来源生物体
R9AL76	*Wallemia ichthyophaga*
E6ZMU5	丝黑粉菌（*Sporisorium reilianum*）
A0A0K3CJX4	圆红冬孢酵母（*Rhodosporidium toruloides*）
A0A162Y103	布拉克须霉（*Phycomyces blakesleeanus*）
A0A0B7FYU9	瓜亡革菌（*Thanatephorus cucumeris*）
A0A1A5ZUI2	*Kwoniella dejecticola*
A0A1B9GXE9	*Kwoniella heveanensis BCC8398*
V5EIP7	*Kalmanozyma brasiliensis*
A0A127ZHG0	黑穗病菌（*Sporisorium scitamineum*）
M5FTN9	*Dacryopinax primogenitus*
A0A166HX72	*Sistotremastrum suecicum*
A0A067QH80	*Jaapia argillacea MUCL 33604*
A0A165PFB6	洁丽香菇（*Neolentinus lepideus*）
G7DXE4	蕨类锈菌（*Mixia osmundae*）
A0A165KJK5	黑耳HHB12029（*Exidia glandulosa HHB12029*）
A0A0F7TLQ7	巴西青霉（*Penicillium brasilianum*）
S8FI87	拟层孔菌属（*Fomitopsis pinicola*）
S7ZL04	草酸青霉菌（*Penicillium oxalicum*）
I2FMX3	大麦坚黑粉菌（*Ustilago hordei*）
F8P370	干朽菌（*Serpula lacrymans*）
V2WTH2	*Moniliophthora roreri*
S7Q9H4	密粘褶菌（*Gloeophyllum trabeum*）
W3VTZ4	*Pseudozyma aphidis*
B8M0V7	柄篮状菌（*Talaromyces stipitatus*）
A0A0D7B6H5	陶兰柱担菌（*Cylindrobasidium torrendii*）
R7SCW4	黄金银耳（*Tremella mesenterica*）
A0A093UWD0	马尔尼菲蓝状菌PM1（*Talaromyces marneffei PM1*）
B6Q8Q9	马尔尼菲蓝状菌（*Talaromyces marneffei*）
A0A093VC12	马尔尼菲蓝状菌PM1（*Talaromyces marneffei PM1*）
A0A167SF58	胶角耳TUFC12733（*Calocera viscosa TUFC12733*）

[0404]

登录号	来源生物体
A0A180GQ68	小麦叶绣菌（*Puccinia triticina*）
E3KWZ5	*Puccinia graminis f. sp.*
F4S978	松杨栅锈菌（*Melampsora larici-populina*）
A0A0U5GN87	*Aspergillus calidoustus*
W9WBT1	*Cladophialophora yegresii*
A0A0D2A9G0	*Verruconis gallopava*
S3DKQ1	*Glarea lozoyensis*
A0A167S691	产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）
A0A0C3G1P8	*Piloderma croceum F 1598*
A0A117NM34	*Penicillium freii*
A0A0M8NPT1	*Penicillium nordicum*
M2R3J5	木质素降解菌（*Ceriporiopsis subvermispora*）
A0A1E3JS60	*Cryptococcus depauperatus*
V9DJY4	卡氏枝孢瓶霉（*Cladophialophora carrionii*）
A0A1C1D128	*Cladophialophora carrionii*
A0A194XRZ1	*Phialocephala scopiformis*
A0A135LQY4	展青霉（*Penicillium patulum*）
F2S034	断头毛癣菌（*Trichophyton tonsurans*）
A0A059J710	趾间毛癣菌（*Trichophyton interdigitale*）
R7YTC1	*Coniosporium apollinis*
A0A0G4PR11	沙门柏干酪青霉菌FM103（*Penicillium camemberti FM 013*）
F2SHG6	红色毛癣菌（*Trichophyton rubrum*）
A0A022VWY8	红色毛癣菌（*Trichophyton rubrumCBS 288.86*）
A0A178F1Q9	红色毛癣菌（*Trichophyton rubrum*）
A0A022XM67	苏丹毛癣菌（*Trichophyton soudanense*）
F2PHM1	马发癣菌（*Trichophyton equinum*）
A0A178FDV0	堇色发癣菌（*Trichophyton violaceum*）
A0A0F8UUV5	*Aspergillus ochraceoroseus*
A0A0F8XD12	*Aspergillus rambellii*
D8Q1Z6	裂褶菌（*Schizophyllum commune*）

[0405]

登录号	来源生物体
A0A0L0VQ99	条形柄锈菌（*Puccinia striiformis*）
W6QE33	罗克福尔青霉（*Penicillium roqueforti*）
A0A0J0XU39	*Cutaneotrichosporon*
K2RIY7	菜豆壳球孢菌（*Macrophomina phaseolina*）
A0A1B9HIE8	*Kwoniella heveanensis CBS 569*
A0A0A2KLE4	意大利青霉菌（*Penicillium italicum*）
A0A177FP94	*Fonsecaea monophora*
Q0CU51	土曲霉（*Aspergillus terreus*）
A0A0D2C195	棘状外瓶霉（*Exophiala spinifera*）
K9GS70	指状青霉菌（*Penicillium digitatum*）
K9H4T7	指状青霉菌（*Penicillium digitatum*）
A0A0A2IRX2	扩展青霉（*Penicillium expansum*）
A0A165XA55	*Fibulorhizoctonia sp.*
A0A1E3HS30	*Cryptococcus depauperatus*
R0JHT6	大斑病毛球腔菌（*Setosphaeria turcica*）
W6XT38	玉米生平脐蠕孢26-R-13（*Bipolaris zeicola 26-R-13*）
K1WNS8	*Marssonina brunnea f. sp.*
A0A077R6Q5	地瘤黑粉菌（*Melanopsichium pennsylvanicum*）
A0A0G2F2K4	*Phaeomoniella chlamydospora*
M2UB23	异旋孢腔菌（*Cochliobolus heterostrophus*）
N4WZB4	异旋孢腔菌（*Cochliobolus heterostrophus*）
A0A0D2ECJ4	*Capronia semi-immersa*
K5ULK6	卡诺沙原毛平革菌（*Phanerochaete carnosa*）
A0A081CNS6	南极假酶菌（*Pseudozyma antarctica*）
W7E3D1	燕麦叶枯病菌（*Bipolaris victoriae FI3*）
A0A0D1YAT0	*Exophiala sideris*
V5FVB4	壮观丝衣霉（*Byssochlamys spectabilis*）
A0A150V2J4	*Acidomyces richmondensis BFW*
A0A0D2P224	亚砖红垂幕菇（*Hypholoma sublateritium*）
C5FY83	太田节皮菌（*Arthroderma otae*）

[0406]

登录号	来源生物体
A0A0E9NND3	*Saitoella complicata*
A0A163JYI7	灰绿犁头霉（*Absidia glauca*）
M2SYN8	禾旋孢腔菌（*Cochliobolus sativus*）
A0A0D2A9Y8	*Exophiala oligosperma*
B2WFQ5	偃麦草核腔菌（*Pyrenophora tritici*）
A0A178Z686	*Fonsecaea erecta*
R1GYF1	葡萄座腔菌（*Botryosphaeria parva*）
A0A0D2AM77	*Cladophialophora immunda*
A0A067TPJ7	纹缘盔孢伞CBS 339.88（*Galerina marginata CBS 339.88*）
A0A0G2DT71	色二孢属真菌（*Diplodia seriata*）
A0A0S6XG57	真菌种编号11243（fungal *sp. No.11243*）
A1CD57	棒曲霉菌株（*Aspergillus clavatus strain*）
W6ZE59	稻平脐蠕孢ATCC44560（*Bipolaris oryzae ATCC 44560*）
W9X299	*Cladophialophora psammophila*
A0A0L1HS74	番茄匍柄霉（*Stemphylium lycopersici*）
E3RYE6	圆核腔菌（*Pyrenophora teres*）
A0A178C491	*Fonsecaea multimorphosa*
A0A0D2JW30	*Fonsecaea multimorphosa*
A0A100ISZ7	黑曲霉（*Aspergillus niger*）
G7XRR4	白曲霉（*Aspergillus kawachii*）
E4ZGH1	斑点小球腔菌（*Leptosphaeria maculans*）
A0A0C3AU69	*Serendipita vermifera*
A0A0U1M481	*Talaromyces islandicus*
A0A179UDB8	皮炎组织胞浆菌（*Ajellomyces dermatitidis*）
A0A177DML0	链格孢（*Alternaria alternata*）
A0A074XTA2	*Aureobasidium namibiae*
R8BK00	*Togninia minima*
A0A178E1M9	棘壳孢属种*DS3sAY3a*（*Pyrenochaeta sp. DS3sAY3a*）
A0A074XCF2	出芽短梗霉菌（*Aureobasidium pullulans*）
A0A178CVL7	*Fonsecaea nubica*

[0407]

登录号	来源生物体
J4H349	*Fibroporia radiculosa*
F2T2H3	皮炎组织胞浆菌（*Ajellomyces dermatitidis*）
T5C9R0	皮炎芽生菌（*Blastomyces dermatitidis*）
C5GGF5	皮炎组织胞浆菌（*Ajellomyces dermatitidis*）
F8Q4F5	干朽菌（*Serpula lacrymans*）
A0A074YHW3	*Aureobasidium subglaciale*
A0A0D2E953	*Exophiala xenobiotica*
A0A0D2ETM7	*Exophiala xenobiotica*
A0A163ADJ9	狂犬亚隔孢壳菌（*Didymella rabiei*）
U7PLY5	申克孢子丝菌（*Sporothrix schenckii*）
A0A0F2MF45	申克孢子丝菌1099-18（*Sporothrix schenckii 1099-18*）
A0A0C2J820	巴西孢子丝菌（*Sporothrix brasiliensis5110*）
A0A1E3B843	冠突曲霉（*Aspergillus cristatus*）
A0A0L6WTD3	*Termitomyces sp. J132*
G2YTS7	富氏葡萄孢盘菌（*Botryotinia fuckeliana*）
W9XGA9	*Capronia epimyces CBS 606.96*
A0A0F4YS69	*Rasamsonia emersonii*
M9LWR9	南极假酶菌（*Pseudozyma antarctica*）
A0A074WDM7	产黑色素短梗霉（*Aureobasidium melanogenum*）
M3CBZ0	*Sphaerulina musiva*
A0A0C7C2J7	小孢根霉（*Rhizopus microsporus*）
W9YU83	*Capronia coronata CBS 617.96*
I8IUH8	米曲霉（*Aspergillus oryzae*）
A0A139HZI0	*Pseudocercospora musae*
E9DGY4	波萨达斯球孢子菌（*Coccidioides posadasii*）
A0A0J6F9P8	波萨达斯球孢子菌（*Coccidioides posadasii*）
H6BM52	皮炎外瓶霉（*Exophiala dermatitidis*）
Q2UDX3	米曲霉（*Aspergillus oryzae*）
M3ASJ4	斐济假尾孢菌（*Pseudocercospora fijiensis*）
A0A177BZU0	*Paraphaeosphaeria sporulosa*

[0408]

登录号	来源生物体
A0A017S910	赤曲霉CBS 135680（*Aspergillus ruber CBS 135680*）
A0A175VVF2	足马杜拉分枝菌（*Madurella mycetomatis*）
A0A0J8UWI6	粗球孢子菌（*Coccidioides immitis*）
A0A0J6YFS7	粗球孢子菌*RMSCC*（*Coccidioides immitis RMSCC*）
J3K3F7	粗球孢子菌（*Coccidioides immitis*）
A0A0D2FX82	*Rhinocladiella mackenziei*
A0A072PSS5	*Exophiala aquamarina*
A0A0A1MWE2	小孢根霉（*Rhizopus microsporus*）
W2RSU8	*Cyphellophora europaea*
C0S1D5	*Paracoccidioides brasiliensiensis*
C1G9R2	*Paracoccidioides brasiliensiensis*
A0A1D2JGH6	巴西副球孢子菌（*Paracoccidioides brasiliensis*）
A0A166PXN0	*Cordyceps brongniartii*
Q54GC1	盘基网柄菌（*Dictyostelium discoideum*）
A0A0H1B9A9	小金孢子菌UAMH 139（*Emmonsia parva UAMH 139*）
R4XEF3	畸形外囊菌（*Taphrina deformans*）
D3B2U8	*Polysphondylium pallidum*
U1HHT8	石果衣真菌（*Endocarpon pusillum*）
A0A1E3JYY5	*Tsuchiyaea wingfieldii*
A0A0C3JN41	*Pisolithus tinctorius Marx 270*
B6HF05	红色青霉（*Penicillium rubens*）
A0A060S368	朱红秘孔菌（*Pycnoporus cinnabarinus*）
K5W449	双孢子蘑菇（*Agaricus bisporus*）
B0CTA0	双色蜡蘑（*Laccaria bicolor*）
F0XD96	*Grosmannia clavigera*
A0A165EP91	胶角耳HHB12733（*Calocera cornea HHB12733*）

[0409] 酰基甘油脂肪酶和甾醇酯酶

[0410] 在一些实施方案中，提供了重组微生物用于产生短链脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯。在某些实施方案中，该短链脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯具有短于或等于C18的碳链长度。在产生短链信息素的方法的一些优选的实施方案中，优选水解长链酰基甘油的酯键的选择酶与一种或多种脂肪酰基去饱和酶共表达。此类合适的酶是通过异源或经工程化的酰基甘油脂肪酶来示例的。适于此目的的酰基甘油脂肪酶的实例列于表5c中。

[0411] 在产生脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的方法的一些优选的实施方案中，微生物

宿主的编码酰基甘油脂肪酶(单酰基-、二酰基或三酰基甘油脂肪酶)和甾醇酯酯酶的一种或多种基因被缺失或下调,且被一种或多种优选长链酰基甘油底物的酰基甘油脂肪酶取代。此类缺失或下调目标包括但不限于解脂耶氏酵母YALIOE32035g、解脂耶氏酵母YALIOD17534g、解脂耶氏酵母YALIOF10010g、解脂耶氏酵母YALIOC14520g、解脂耶氏酵母YALIOE00528g、酿酒酵母YKL140w、酿酒酵母YMR313c、酿酒酵母YKR089c、酿酒酵母YOR081c、酿酒酵母YKL094W、酿酒酵母YLL012W、酿酒酵母YLR020C、假丝酵母属Ca019.2050、假丝酵母属Ca019.9598、假丝酵母属CTRG_01138、假丝酵母属W5Q_03398、假丝酵母属CTRG_00057、假丝酵母属Ca019.5426、假丝酵母属Ca019.12881、假丝酵母属CTRG_06185、假丝酵母属Ca019.4864、假丝酵母属Ca019.12328、假丝酵母属CTRG_03360、假丝酵母属Ca019.6501,假丝酵母属Ca019.13854、假丝酵母属CTRG_05049、假丝酵母属Ca019.1887、假丝酵母属Ca019.9443、假丝酵母属CTRG_01683和假丝酵母属CTRG_04630。

[0412] 羧酸酯水解酶(EC 3.1.1)是一大类催化酯键水解或合成的酶。它们已经在所有生命领域(原核和真核)中得到描述。它们大多数属于α/β-水解酶超家族,且具有由His、酸性氨基酸和位于高度保守的GXSXG序列中的Ser残基形成的保守的“催化三联体”。在水解期间中,起催化作用的Ser将在三联体中其他两个残基的帮助(在空间上很近)下开始对底物进行亲核攻击。据推测,它们通过类似于胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白酶的机理促进酯的水解。另一个特征性特点是存在一个氨基酸性区域(该区域的序列不如催化三联体的保守),氧阴离子穴,其用于稳定催化期间生成的过渡状态。此外,这些酶通常不需要辅因子。酰基甘油脂肪酶和固醇酯酶属于羧酸酯水解酶家族。

[0413] 酰基甘油脂肪酶催化一种化学反应,该化学反应使用水分子破坏长链脂肪酸的甘油单酯。此酶类别的系统名称是甘油酯酰基水解酶。常用的其他名称包括单酰基甘油脂肪酶(monoacylglycerol lipase)、单酰基甘油脂肪酶(monoacylglycerolipase)、单甘油酯脂肪酶、单甘油酯水解酶、脂肪酰基单酯脂肪酶、单酰基甘油水解酶、单甘油酯脂肪酶和monoglyceridase。此酶参与甘油脂代谢。

[0414] 甾醇酯酶催化化学反应:

[0415] 甾醇酯+ H2O ⇌甾醇+脂肪酸

[0416] 因此,此酶的两种底物是甾醇酯和H2O,而其两种产物是甾醇和脂肪酸。

[0417] 此酶类别的系统名称是甾醇酯酰基水解酶。常用的其他名称包括胆固醇酯酶、胆固醇酯合酶、三萜醇酯酶、胆甾醇基酯酶、胆甾醇基酯水解酶、甾醇酯水解酶、胆固醇酯水解酶、胆固醇酯酶和酰基胆固醇脂肪酶。此酶参与胆汁酸的生物合成。甾醇酯酶在自然界广泛分布,并且已从哺乳动物的组织(诸如胰腺、肠粘膜、肝脏、胎盘、主动脉和大脑)、丝状真菌、酵母和细菌中鉴定出来。

[0418] 在底物特异性方面,许多甾醇酯酶能够催化相当宽范围的含有酯键的其他底物(诸如酰基甘油、芳基酯)的水解或合成,以及在某些情况下的醇酯、肉桂基酯、黄原酸酯(xhantophyl ester)或合成的聚合物。

[0419] 在一些实施方案中,提供了一种能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的重组微生物,其中该重组微生物表达一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶,且其中该重组微生物经操作以缺失、破坏、突变一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶和/或降低一种或多种内源酰基甘

油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶的活性。在一些实施方案中,被表达的一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶不同于被缺失或下调的一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶。在一些实施方案中,被表达的一种或多种内源或外源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶优选水解长链酰基甘油的酯键。在其他实施方案中,被表达的一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶选自表5c。在一些实施方案中,被缺失或下调的一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶选自解脂耶氏酵母YALI0E32035g、解脂耶氏酵母YALI0D17534g、解脂耶氏酵母YALI0F10010g、解脂耶氏酵母YALI0C14520g、解脂耶氏酵母YALI0E00528g、酿酒酵母YKL140w、酿酒酵母YMR313c、酿酒酵母YKR089c、酿酒酵母YOR081c、酿酒酵母YKL094W、酿酒酵母YLL012W、酿酒酵母YLR020C、假丝酵母属Ca019.2050、假丝酵母属Ca019.9598、假丝酵母属CTRG_01138、假丝酵母属W5Q_03398、假丝酵母属CTRG_00057、假丝酵母属Ca019.5426、假丝酵母属Ca019.12881、假丝酵母属CTRG_06185、假丝酵母属Ca019.4864、假丝酵母属Ca019.12328、假丝酵母属CTRG_03360、假丝酵母属Ca019.6501、假丝酵母属Ca019.13854、假丝酵母属CTRG_05049、假丝酵母属Ca019.1887、假丝酵母属Ca019.9443、假丝酵母属CTRG_01683和假丝酵母属CTRG_04630。在一些实施方案中,该重组微生物进一步表达信息素生物合成途径酶。在另外的实施方案中,该信息素生物合成酶包含一种或多种脂肪酰基去饱和酶和/或脂肪酰基接合酶。在又一实施方案中,信息素生物合成途径酶包含一种或多种形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶。

[0420] 在一些实施方案中,提供了一种从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的方法,其中该方法包括将至少一种编码酰基甘油脂肪酶或甾醇酯酯酶的内源或外源核酸分子导入重组微生物中或在重组微生物中表达至少一种编码酰基甘油脂肪酶或甾醇酯酯酶的内源或外源核酸分子,或引入编码酰基甘油脂肪酶或甾醇酯脂酶的一种或多种基因的缺失、插入或功能丧失突变,其中被引入或表达的至少一种编码酰基甘油脂肪酶或甾醇酯酯酶的内源或外源核酸分子不同于被缺失或下调的编码酰基甘油脂肪酶或甾醇酯酯酶的一种或多种基因。在一些实施方案中,被引入或表达的至少一种编码酰基甘油脂肪酶或甾醇酯酯酶的内源或外源核酸分子优选水解长链酰基甘油的酯键。在一些实施方案中,被引入或表达的至少一种编码酰基甘油脂肪酶或甾醇酯酯酶的内源或外源核酸分子选自表5c。在一些实施方案中,被缺失或下调的一种或多种基因编码选自下列的酰基甘油脂肪酶或甾醇酯酯酶:解脂耶氏酵母YALI0E32035g、解脂耶氏酵母YALI0D17534g、解脂耶氏酵母YALI0F10010g、解脂耶氏酵母YALI0C14520g、解脂耶氏酵母YALI0E00528g、酿酒酵母YKL140w、酿酒酵母YMR313c、酿酒酵母YKR089c、酿酒酵母YOR081c、酿酒酵母YKL094W,酿酒酵母YLL012W、酿酒酵母YLR020C、假丝酵母属Ca019.2050、假丝酵母属Ca019.9598、假丝酵母属CTRG_01138、假丝酵母属W5Q_03398、假丝酵母属CTRG_00057、假丝酵母属Ca019.5426、假丝酵母属Ca019.12881、假丝酵母属CTRG_06185、假丝酵母属Ca019.4864、假丝酵母属Ca019.12328、假丝酵母属CTRG_03360、假丝酵母属Ca019.6501、假丝酵母属Ca019.13854、假丝酵母属CTRG_05049、假丝酵母属Ca019.1887、假丝酵母属Ca019.9443、假丝酵母属CTRG_01683和假丝酵母属CTRG_04630。在一些实施方案中,该方法进一步包括将至少一种编码脂肪酰基去饱和酶和/或脂肪酰基接合酶的内源或外源核酸分子引入重组微生物中,或在重组微生物中表达至少一种编码脂肪酰基去饱和酶和/或脂肪酰基接合酶的内源或外源核酸分子。在另外的实施方案

中,该方法进一步包括将至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的内源或外源核酸分子引入重组微生物中,或在重组微生物中表达至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的内源或外源核酸分子。

[0421] 表5c.示例性酰基甘油脂肪酶

[0422]

登录号	来源生物体
EAY76846.1	稻（*Oryza sativa*）
OEL29276.1	*Dichanthelium oligosanthes*
ONM35522.1	玉蜀黍（*Zea mays*）
AFW56472.1	玉蜀黍（*Zea mays*）
AFW60230.1	玉蜀黍（*Zea mays*）
ACG33769.1	玉蜀黍（*Zea mays*）
ACG30143.1	玉蜀黍（*Zea mays*）
ACG39100.1	玉蜀黍（*Zea mays*）
ACG48810.1	玉蜀黍（*Zea mays*）
KQK11040.1	二穗短柄草（*Brachypodium distachyon*）
CAA64004.1	酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）
CAA81640.1	酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）
CAG78037.1	解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）
EEF47288.1	蓖麻（*Ricinus communis*）
EEF45491.1	蓖麻（*Ricinus communis*）
EEF52390.1	蓖麻（*Ricinus communis*）
EEF38788.1	蓖麻（*Ricinus communis*）
EEF38789.1	蓖麻（*Ricinus communis*）
EEF28563.1	蓖麻（*Ricinus communis*）
EEF46013.1	蓖麻（*Ricinus communis*）
AFQ93681.1	蓖麻（*Ricinus communis*）

[0423]

登录号	来源生物体
EEF45592.1	蓖麻（*Ricinus communis*）
EEF43592.1	蓖麻（*Ricinus communis*）
EEF50924.1	蓖麻（*Ricinus communis*）
EEF33440.1	蓖麻（*Ricinus communis*）

[0424] 毒性蛋白或多肽的表达

[0425] 本公开文本描述了可由重组微生物编码的毒性蛋白、肽或小分子。在一些实施方案中,该毒性蛋白、肽或小分子与昆虫信息素一起以生物合成方式产生。

[0426] 在一些实施方案中,该重组微生物表达一种或多种编码对昆虫有毒的蛋白质或多肽的核酸分子。在一些实施方案中,该毒性蛋白或多肽是来自昆虫病原生物。在一些实施方案中,该昆虫病原生物选自苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)和粘质沙雷氏菌(Serratia marcescens)。在一个具体的实施方案中,该核酸分子编码苏云金芽孢杆菌毒素。

[0427] 在一些实施方案中,重组微生物被工程化以表达代谢途径,其在表达时产生对昆虫有毒的小分子。

[0428] 在示例性实施方案中,可使用由本文所述的重组微生物产生的昆虫信息素来吸引有害生物,并且随后用已由本文所述的重组微生物共同产生的有毒物质如毒性蛋白、肽或小分子来根除该有害生物昆虫。

[0429] 使用重组微生物进行的信息素生物合成

[0430] 如上所讨论的,在第一方面,本公开文本涉及一种重组微生物,其能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。第一方面的说明性实施方案在图1中示出。蓝线表示用于产生饱和酰基-CoA的生物化学途径,其充当不饱和脂肪酰基-CoA转化的底物。底物向不饱和脂肪酰基-CoA的转化可以通过宿主中的内源或外源酶进行。绿线指示由编码酶的外源核酸分子催化的转化。因此,在一些实施方案中,饱和脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和脂肪酰基-CoA是通过至少一种由外源核酸分子编码的去饱和酶来催化。在另外的实施方案中,单或多不饱和脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和脂肪醇是通过至少一种由外源核酸分子编码的还原酶来催化。灰色虚线指示合成信息素、香料、调味剂和聚合物中间体的下游步骤,如使用醇氧化酶或氧化剂来产生单或多不饱和脂肪醛,并且使用乙酰基转移酶或化学物质(如乙酰氯)来产生单或多不饱和脂肪乙酸酯。红色叉指示缺失或下调的宿主天然途径,这增加了朝向工程化途径的通量。

[0431] 因此,在一个实施方案中,该重组微生物表达:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;以及(b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该脂肪酰基还原酶催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。在一些实施方案中,可以使用宿主微生物中的内源酶产生饱和的C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA。在其他实施方案中,可以使用宿主微生物中的一种或多种外源酶产生饱和的C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA。

[0432] 如上所述,脂肪酰基去饱和酶催化例如饱和脂肪酰基-CoA分子上的烃链去饱和,以生成相应的不饱和脂肪酰基CoA分子。在一些实施方案中,可以选择外源脂肪酰基去饱和酶并使其在重组微生物中表达,来催化在烃链中具有6至24个碳原子的脂肪酰基-CoA分子中形成至少一个双键。因此,在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶是能够利用脂肪酰基-CoA作为底物的去饱和酶,该脂肪酰基-CoA具有6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个碳原子的链长。

[0433] 可以选择本文所述的外源脂肪酰基去饱和酶来催化烃链上所希望位置的去饱和。因此,在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶能够在脂肪酸或其衍生物的C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12或C13位置生成双键,如例如,脂肪酸CoA酯。

[0434] 可以在宿主中表达一种或多种脂肪酰基-CoA去饱和酶以催化烃链上多个位置的

去饱和。在一些实施方案中,脂肪酰基-CoA去饱和酶对于宿主微生物是异源的。因此,各个实施方案提供了包含至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子的重组微生物,所述脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA。

[0435] 在一个示例性实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶是Z11去饱和酶。Z11脂肪酰基去饱和酶催化底物中相对于羰基第11个和第12个碳之间的双键形成。在本文所述的各个实施方案中,Z11去饱和酶或编码它的核酸序列可以分离自物种黄地老虎(Agrotis segetum)、脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、红带卷蛾(Argyrotaenia velutiana)、蔷薇斜条卷叶蛾(Choristoneura rosaceana)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)、玉米穗蛾(Helicoverpa zea)、或假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)的生物体。另外的Z11去饱和酶或编码它们的核酸序列可以分离自家蚕(Bombyx mori)、烟草天蛾(Manduca sexta)、西南玉米螟(Diatraea grandiosella)、埃及金刚钻(Earias insulana)、翠纹金刚钻(Earias vittella)、小菜蛾(Plutella xylostella)、家蚕(Bombyx mori)或黄瓜绢野螟(Diaphania nitidalis)。在示例性实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自GenBank登录号JX679209、JX964774、AF416738、AF545481、EU152335、AAD03775、AAF81787和AY493438的序列。在一些实施方案中,密码子优化了编码Z11去饱和酶的核酸序列,其来自物种黄地老虎(Agrotis segetum)、脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、红带卷蛾(Argyrotaenia velutiana)、蔷薇斜条卷叶蛾(Choristoneura rosaceana)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)、玉米穗蛾(Helicoverpa zea)、或假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)的生物体。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的序列:来自粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)的SEQ ID NO:9、18、24和26。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自粉纹夜蛾的SEQ ID NO:49中列出的氨基酸序列。在其他实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的序列:来自黄地老虎(Agrotis segetum)的SEQ ID NO:10和16。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自黄地老虎的SEQ ID NO:53中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的序列:来自假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)的SEQ ID NO:11和23。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自来自假微型海链藻的SEQ ID NO:50和51的氨基酸序列。在某些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的序列:来自脐橙螟蛾的SEQ ID NO:12、17和30。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自脐橙螟蛾的SEQ ID NO:52中列出的氨基酸序列。在另外的实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的序列:来自玉米穗蛾(Helicoverpa zea)的SEQ ID NO:13、19、25、27和31。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自玉米穗蛾(Helicoverpa zea)的SEQ ID NO:54中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含来自水稻大螟的SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含GenBank登录号AF416738、AGH12217.1、AII21943.1、CAJ43430.2、AF441221、AAF81787.1、AF545481、AJ271414、AY362879、ABX71630.1、NP001299594.1、Q9N9Z8、ABX71630.1和AIM40221.1中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含嵌合多肽。在一些实施方案中,完全或部分Z11去饱和酶与另一种多肽融合。在某些实施方案中,Z11去饱和酶的N末端天然前导序列被来自另一物种的油质蛋白前导序列替代。在某些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自如下项的序列:

SEQ ID NO:15、28和29。在一些实施方案中,该Z11去饱和酶包含选自SEQ ID NO:61、62、63、78、79和80的氨基酸序列。

[0436] 在某些实施方案中,该Z11去饱和酶催化脂肪酰基-CoA转化为选自以下项的单或双不饱和产物:Z11-13:酰基-CoA、E11-13:酰基-CoA、(Z,Z)-7,11-13:酰基-CoA、Z11-14:酰基-CoA、E11-14:酰基-CoA、(E,E)-9,11-14:酰基-CoA、(E,Z)-9,11-14:酰基-CoA、(Z,E)-9,11-14:酰基-CoA、(Z,Z)-9,11-14:酰基-CoA、(E,Z)-9,11-15:酰基-CoA、(Z,Z)-9,11-15:酰基-CoA、Z11-16:酰基-CoA、E11-16:酰基-CoA、(E,Z)-6,11-16:酰基-CoA、(E,Z)-7,11-16:酰基-CoA、(E,Z)-8,11-16:酰基-CoA、(E,E)-9,11-16:酰基-CoA、(E,Z)-9,11-16:酰基-CoA、(Z,E)-9,11-16:酰基-CoA、(Z,Z)-9,11-16:酰基-CoA、(E,E)-11,13-16:酰基-CoA、(E,Z)-11,13-16:酰基-CoA、(Z,E)-11,13-16:酰基-CoA、(Z,Z)-11,13-16:酰基-CoA、(Z,E)-11,14-16:酰基-CoA、(E,E,Z)-4,6,11-16:酰基-CoA、(Z,Z,E)-7,11,13-16:酰基-CoA、(E,E,Z,Z)-4,6,11,13-16:酰基-CoA、Z11-17:酰基-CoA、(Z,Z)-8,11-17:酰基-CoA、Z11-18:酰基-CoA、E11-18:酰基-CoA、(Z,Z)-11,13-18:酰基-CoA、(E,E)-11,14-18:酰基-CoA或其组合。

[0437] 在另一个示例性实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶是Z9去饱和酶。Z9脂肪酰基去饱和酶催化底物中相对于羰基第9个和第10个碳之间的双键形成。在本文所述的各个实施方案中,该Z9去饱和酶或编码它的核酸序列可以分离自物种亚洲玉米螟(Ostrinia furnacalis)、欧洲玉米螟(Ostrinia nobilalis)、蔷薇斜条卷叶蛾(Choristoneura rosaceana)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、烟夜蛾(Helicoverpa assulta)或玉米穗蛾(Helicoverpa zea)的生物体。在示例性实施方案中,该Z9去饱和酶包含选自GenBank登录号AY057862、AF243047、AF518017、EU152332,AF482906和AAF81788的序列。在一些实施方案中,编码Z9去饱和酶的核酸序列经密码子优化。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自亚洲玉米螟(Ostrinia furnacalis)的SEQ ID NO:20中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自亚洲玉米螟(Ostrinia furnacalis)的SEQ ID NO:58中列出的氨基酸序列。在其他实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)的SEQ ID NO:21中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)的SEQ ID NO:59中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自玉米穗蛾(Helicoverpa zea)的SEQ ID NO:22中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,该Z9去饱和酶包含来自玉米穗蛾(Helicoverpa zea)的SEQ ID NO:60中列出的氨基酸序列。

[0438] 在某些实施方案中,该Z9去饱和酶催化脂肪酰基-CoA转化为选自以下项的单不饱和或多不饱和产物:Z9-11:酰基-CoA、Z9-12:酰基-CoA、E9-12:酰基-CoA、(E,E)-7,9-12:酰基-CoA、(E,Z)-7,9-12:酰基-CoA、(Z,E)-7,9-12:酰基-CoA、(Z,Z)-7,9-12:酰基-CoA、Z9-13:酰基-CoA、E9-13:酰基-CoA、(E,Z)-5,9-13:酰基-CoA、(Z,E)-5,9-13:酰基-CoA、(Z,Z)-5,9-13:酰基-CoA、Z9-14:酰基-CoA、E9-14:酰基-CoA、(E,Z)-4,9-14:酰基-CoA、(E,E)-9,11-14:酰基-CoA、(E,Z)-9,11-14:酰基-CoA、(Z,E)-9,11-14:酰基-CoA、(Z,Z)-9,11-14:酰基-CoA、(E,E)-9,12-14:酰基-CoA、(Z,E)-9,12-14:酰基-CoA、(Z,Z)-9,12-14:酰基-CoA、Z9-15:酰基-CoA、E9-15:酰基-CoA、(Z,Z)-6,9-15:酰基-CoA、Z9-16:酰基-CoA、E9-16:酰基-CoA、(E,E)-9,11-16:酰基-CoA、(E,Z)-9,11-16:酰基-CoA、(Z,E)-9,11-16:酰基-CoA、

(Z,Z)-9,11-16:酰基-CoA、Z9-17:酰基-CoA、E9-18:酰基-CoA、Z9-18:酰基-CoA、(E,E)-5,9-18:酰基-CoA、(E,E)-9,12-18:酰基-CoA、(Z,Z)-9,12-18:酰基-CoA、(Z,Z,Z)-3,6,9-18:酰基-CoA、(E,E,E)-9,12,15-18:酰基-CoA、(Z,Z,Z)-9,12,15-18:酰基-CoA或其组合。

[0439] 饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA的去饱和可以通过多个反应进行以产生多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA。在一些实施方案中,该重组微生物可以表达能够催化形成至少两个双键的双功能去饱和酶。在一些实施方案中,该重组微生物可表达多于一种编码多于一种脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA。例如,该重组微生物可以表达编码Z11去饱和酶的外源核酸分子和编码Z9去饱和酶的另一种外源核酸分子。因此,所得多不饱和脂肪酰基-CoA在第9个和第10个碳之间具有双键并且在第11个和第12个碳之间具有另一个双键。

[0440] 在一些实施方案中,该重组微生物可表达脂肪酰基缀合酶,该脂肪酰基缀合酶独立或与脂肪酰基去饱和酶一同起作用来催化饱和或单不饱和脂肪酰基-CoA转化为缀合多不饱和脂肪酰基-CoA。

[0441] 在一个实施方案中,本公开文本提供了一种重组微生物,其能够从内源或外源来源的饱和或单不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA产生多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,其中该重组微生物表达:(a)至少一种编码脂肪酰基缀合酶的外源核酸分子,该脂肪酰基缀合酶催化饱和或单不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;以及(b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。

[0442] 在另一个实施方案中,该重组微生物表达编码脂肪酰基缀合酶的至少两种外源核酸分子,该脂肪酰基缀合酶催化饱和或单不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA。

[0443] 在另一个实施方案中,本公开文本提供了一种重组微生物,其能够从内源或外源来源的饱和或单不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA产生多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,其中该重组微生物表达:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子和至少一种编码脂肪酰基缀合酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶和该脂肪酰基缀合酶催化饱和或单不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;以及(b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。

[0444] 在另一个实施方案中,该重组微生物表达编码脂肪酰基去饱和酶的至少两种外源核酸分子和编码脂肪酰基缀合酶的至少两种外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶和该脂肪酰基缀合酶催化饱和或单不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA。

[0445] 在又另一个实施方案中,该脂肪酰基缀合酶是能够利用脂肪酰基-CoA作为底物的缀合酶,该脂肪酰基-CoA具有6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个碳原子的链长。

[0446] 在某些实施方案中,该缀合酶或编码它的核酸序列可以分离自物种苹果小卷蛾(Cydia pomonella)、豆荚小卷蛾(Cydia nigricana)、葡萄花翅小卷蛾(Lobesia botrana)、牛蒡筛螟(Myelois cribrella)、印度谷螟(Plodia interpunctella)、马尾松毛

虫(Dendrolimus punctatus)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、斜纹夜蛾(Spodoptera litura)、脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、烟草天蛾(Manduca sexta)、家蚕(Bombyx mori)、金盏菊(Calendula officinalis)、栝楼(Trichosanthes kirilowii)、石榴(Punica granatum)、苦瓜(Momordica charantia)、凤仙花(Impatiens balsamina)以及苹浅褐卷蛾(Epiphyas postvittana)的生物体。在示例性实施方案中,该缀合酶包含以下序列,其选自GenBank登录号或Uniprot数据库:A0A059TBF5、A0A0M3L9E8、A0A0M3L9S4、A0A0M3LAH8、A0A0M3LAS8、A0A0M3LAH8、B6CBS4、XP_013183656.1、XP_004923568.2、ALA65425.1、NP_001296494.1、NP_001274330.1、Q4A181、Q75PL7、Q9FPP8、AY178444、AY178446、AF182521、AF182520、Q95UJ3。

[0447] 如上所述,脂肪酰基还原酶催化还原例如不饱和脂肪酰基-CoA分子上的羰基,以生成相应的不饱和脂肪酸分子。在一些实施方案中,形成脂肪醇的脂肪酰CoA还原酶对于该微生物是异源的。因此,各个实施方案提供了包含至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子的重组微生物,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化还原不饱和脂肪酰基-CoA分子上的羰基,以生成相应的不饱和脂肪酸酸分子。

[0448] 在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶来自物种黄地老虎(Agrotis segetum)、甜菜夜蛾(Spodoptera exigua)、海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、薄肌眼虫(Euglena gracilis)、稠李巢蛾(Yponomeuta evonymellus)或棉铃虫(Helicoverpa amigera)的生物体。在一些实施方案中,编码脂肪酰基还原酶的核酸序列经密码子优化。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自黄地老虎(Agrotis segetum)的SEQ ID NO:1中列出的序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自黄地老虎的SEQ ID NO:55中列出的氨基酸序列。在其他实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)的SEQ ID NO:2中列出的序列。在其他实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)的SEQ ID NO:56中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含选自SEQ ID NO:3、32、40、72、74、76和81的序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自黄地老虎的SEQ ID NO:55中所列出的氨基酸序列。在其他实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自海灰翅夜蛾的SEQ ID NO:56中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含选自如下项的氨基酸序列:来自棉铃虫的SEQ ID NO:41和57。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含选自如下项的氨基酸序列:来自甜菜夜蛾的SEQ ID NO:73和82。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自薄肌眼虫的SEQ ID NO:75中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶包含来自稠李巢蛾的SEQ ID NO:77中列出的氨基酸序列。

[0449] 在一些实施方案中,在重组微生物中产生不包含饱和脂肪醇包括表达一种或多种突变体FAR。在某些实施方案中,提供了棉铃虫(Helicoverpa amigera)脂肪酰基-CoA还原酶(HaFAR)变体,其相较于由SEQ ID NO:41中列出的氨基酸序列编码的野生型棉铃虫(Helicoverpa amigera)脂肪酰基-CoA还原酶,显示出产生的脂肪醇的净增加。在一些实施方案中,增加的酶促活性是相对于由SEQ ID NO:41中列出的氨基酸序列编码的HaFAR的野生型酶促活性产生的脂肪醇的量,所产生的脂肪醇的量的净活性的增加。在一些实施方案中,野生型HaFAR包含SEQ ID NO:90中列出的核苷酸序列。在一些实施方案中,由SEQ ID NO:41中列出的氨基酸序列编码的野生型HaFAR的变体包含下列位置处的点突变:S60X、

S195X、S298X、S378X、S394X、S418X和S453X,其中X包含氨基酸F、L、M、I、V、P、T、A、Y、K、H、N、Q、K、D、E、C、W、R。在一些实施方案中,由SEQ ID NO:41中列出的氨基酸序列编码的野生型HaFAR的变体包含选自下列氨基酸位置处的突变的点突变的组合:S60X、S195X、S298X、S378X、S394X、S418X和S453X,其中X包含氨基酸F、L、M、I、V、P、T、A、Y、K、H、N、Q、K、D、E、C、W、R。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶是突变的脂肪酰基还原酶,且包含选自SEQ ID NO:42-48的氨基酸序列。在一些实施方案中,该脂肪酰基还原酶是突变的脂肪酰基还原酶,且包含选自SEQ ID NO:83-89的核苷酸序列。

[0450] 在示例性实施方案中,该脂肪酰基还原酶催化单或多不饱和脂肪酰基-CoA转化为选自以下项的脂肪醇产物:(Z)-3-己烯醇、(Z)-3-壬烯醇、(Z)-5-癸烯醇、(E)-5-癸烯醇、(Z)-7-十二碳烯醇、(E)-8-十二碳烯醇、(Z)-8-十二碳烯醇、(Z)-9-十二碳烯醇、(Z)-9-十四碳烯醇、(Z)-9-十六碳烯醇、(Z)-11-十四碳烯醇、(Z)-7-十六碳烯醇、(Z)-11-十六碳烯醇、(E)-11-十四碳烯醇、或(Z,Z)-11,13-十六碳二烯醇、(11Z,13E)-十六碳二烯醇、(E,E)-8,10-十二碳二烯醇、(E,Z)-7,9-十二碳二烯醇、(Z)-13-十八碳烯醇、或其组合。

[0451] 在一些实施方案中,本文所述的重组微生物可以包括多种脂肪酰基还原酶。因此,在这样的实施方案中,该重组微生物表达至少两种编码脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该脂肪酰基还原酶催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。

[0452] 在另外的实施方案中,本公开提供了一种能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的重组微生物,其中该重组微生物包含:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;(b)至少一种编码酰基-CoA氧化酶的外源核酸分子,该酰基-CoA氧化酶在一个或多个连续的酰基-CoA氧化酶活性循环之后催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和≤C_{18}脂肪酰基-CoA,其中指定循环产生相对于此循环中的起始单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA底物具有两个碳截短的单或多不饱和C_4-C_{22}脂肪酰基-CoA中间体;和(c)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(b)的单或多不饱和≤C18脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和≤C18脂肪醇。在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶选自红带卷蛾(Argyrotaenia velutinana)、斜纹夜蛾(Spodoptera litura)、水稻大螟(Sesamia inferens)、烟草天蛾(Manduca sexta)、欧洲玉米螟(Ostrinia nubilalis)、玉米穗蛾(Helicoverpa zea)、蔷薇斜条卷叶蛾(Choristoneura rosaceana)、黑腹果蝇(Drosophila melanogaster)、海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)、黄地老虎(Agrotis segetum)、亚洲玉米螟(Ostrinia furnicalis)和假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)衍生的脂肪酰基去饱和酶。在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶与选自下组的脂肪酰基去饱和酶具有95%序列同一性:SEQ ID NO:39、49-54、58-63、78-80和GenBank登录号AF416738、AGH12217.1、AII21943.1、CAJ43430.2、AF441221、AAF81787.1、AF545481、AJ271414、AY362879、ABX71630.1、NP001299594.1、Q9N9Z8、ABX71630.1和AIM40221.1。在一些实施方案中,该酰基-CoA氧化酶选自表5a。在其他实施方案中,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶选自黄地老虎(Agrotis segetum)、甜菜夜蛾

(Spodoptera exigua)、海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、薄肌眼虫(Euglena gracilis)、稠李巢蛾(Yponomeuta evonymellus)和棉铃虫(Helicoverpa armigera)衍生的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶。在另外的实施方案中,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶与选自下组的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有95%序列同一性:SEQ ID NO:1-3、32、41-48、55-57、73、75、77和82。在一些实施方案中,该重组微生物是选自解脂耶氏酵母、酿酒酵母、白假丝酵母、热带假丝酵母和维斯假丝酵母的酵母。

[0453] 在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该酰基转移酶优选储存≤C_{18}脂肪酰基-CoA。在一些实施方案中,该酰基转移酶选自甘油-3-磷酸酯酰基转移酶(GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)、甘油磷脂酰基转移酶(GPLAT)和二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)。在一些优选的实施方案中,该酰基转移酶选自表5b。

[0454] 在一些实施方案中,蜡酯酶的共表达将允许脂肪醇和脂肪酸以1:1的比例储存。与TAG储存结合,能够导致感兴趣的TAG与脂肪醇的比例,随后可将其用于不同的产品流。蜡酯合酶的实例:智人AWAT2(XM_011530876.2)、小鼠(AAT68766.1)、薄肌眼虫WS(ADI60058.1)、薄肌眼虫WSD2(BAV82975.1)、薄肌眼虫WSD5(BAV82978.1)。

[0455] 在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含至少一种编码酰基甘油脂肪酶的内源或外源核酸分子,该酰基甘油脂肪酶优选水解>C16、>C14、>C12或>C10酰基甘油底物的酯键。在一些实施方案中,该酰基甘油脂肪酶选自表5c。

[0456] 在一些实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酶催化与用于产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的生物合成途径竞争的途径中的反应。在另外的实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酶选自:(i)一种或多种酰基-CoA氧化酶;(ii)一种或多种酰基转移酶;(iii)一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶;(iv)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶;(v)一种或多种(脂肪)醇氧化酶;和(vi)一种或多种细胞色素P450单加氧酶。

[0457] 在一些优选的实施方案中,微生物宿主的编码一种或多种编码酰基-CoA氧化酶的基因被缺失或下调以消除或减少所希望的脂肪酰基-CoA的截短超过所希望的链长度。在一些实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源酰基-CoA氧化酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酰基-CoA氧化酶选自解脂耶氏酵母POX1(YALI0E32835g)、解脂耶氏酵母POX2(YALI0F10857g)、解脂耶氏酵母POX3(YALI0D24750g)、解脂耶氏酵母POX4(YALI0E27654g)、解脂耶氏酵母POX5(YALI0C23859g)、解脂耶氏酵母POX6(YALI0E06567g);酿酒酵母POX1(YGL205W);假丝酵母属POX2(CaO19.1655、CaO19.9224、CTRG_02374、M18259)、假丝酵母属POX4(CaO19.1652、CaO19.9221、CTRG_02377、M12160)和假丝酵母属POX5(CaO19.5723、CaO19.13146、CTRG_02721、M12161)。

[0458] 在一些实施方案中,提供了一种能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的重组微生物,其中该重组微生物表达一种或多种酰基-CoA氧化酶,且其中该重组微生物经操作以缺失、破坏、突变一种或多种内源酰基-CoA氧化酶和/或降低一种或多种内源酰基-CoA氧化酶的活性。在一些实施方案中,被表达的一种或多种酰基-CoA氧化酶不同于被缺失或下调的一种或多种内源酰基-CoA

氧化酶。在其他实施方案中,被表达的一种或多种酰基-CoA氧化酶调节单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的链长度。在其他实施方案中,被表达的一种或多种酰基-CoA氧化酶选自表5a。

[0459] 在一些实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源酰基转移酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酰基转移酶选自解脂耶氏酵母YALI0C00209g、解脂耶氏酵母YALI0E18964g、解脂耶氏酵母YALI0F19514g、解脂耶氏酵母YALI0C14014g、解脂耶氏酵母YALI0E16797g、解脂耶氏酵母YALI0E32769g和解脂耶氏酵母YALI0D07986g,酿酒酵母YBL011w、酿酒酵母YDL052c、酿酒酵母YOR175C、酿酒酵母YPR139C、酿酒酵母YNR008w和酿酒酵母YOR245c,和假丝酵母属I503_02577、假丝酵母属CTRG_02630、假丝酵母属Ca019.250、假丝酵母属Ca019.7881、假丝酵母属CTRG_02437、假丝酵母属Ca019.1881、假丝酵母属Ca019.9437、假丝酵母属CTRG_01687、假丝酵母属Ca019.1043、假丝酵母属Ca019.8645、假丝酵母属CTRG_04750、假丝酵母属Ca019.13439、假丝酵母属CTRG_04390、假丝酵母属Ca019.6941、假丝酵母属Ca019.14203和假丝酵母属CTRG_06209。

[0460] 在一些实施方案中,提供了一种能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的重组微生物,其中该重组微生物表达一种或多种酰基转移酶,且其中该重组微生物经操作以缺失、破坏、突变一种或多种内源酰基转移酶和/或降低一种或多种内源酰基转移酶的活性。在一些优选的实施方案中,微生物宿主的一种或多种编码GPAT、LPAAT、GPLAT和/或DGAT的基因被缺失或下调,并被优选储存短链脂肪酰基-CoA的一种或多种GPAT、LPAAT、GPLAT或DGAT取代。在一些实施方案中,被表达的一种或多种酰基转移酶不同于被缺失或下调的一种或多种内源酰基转移酶。在其他实施方案中,被表达的一种或多种酰基转移酶选自表5b。

[0461] 在一些优选的实施方案中,微生物宿主的一种或多种编码酰基甘油脂肪酶(单酰基-、双酰基-或三酰基甘油脂肪酶)和甾醇酯酯酶的基因被缺失或下调,并被一种或多种优选长链酰基甘油底物的酰基甘油脂肪酶取代。在一些实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶选自解脂耶氏酵母YALI0E32035g、解脂耶氏酵母YALI0D17534g、解脂耶氏酵母YALI0F10010g、解脂耶氏酵母YALI0C14520g和解脂耶氏酵母YALI0E00528g,酿酒酵母YKL140w、酿酒酵母YMR313c、酿酒酵母YKR089c、酿酒酵母YOR081c、酿酒酵母YKL094W、酿酒酵母YLL012W和酿酒酵母YLR020C,和假丝酵母属Ca019.2050、假丝酵母属Ca019.9598、假丝酵母属CTRG_01138、假丝酵母属W5Q_03398、假丝酵母属CTRG_00057、假丝酵母属Ca019.5426、假丝酵母属Ca019.12881、假丝酵母属CTRG_06185、假丝酵母属Ca019.4864、假丝酵母属Ca019.12328、假丝酵母属CTRG_03360、假丝酵母属Ca019.6501、假丝酵母属Ca019.13854、假丝酵母属CTRG_05049、假丝酵母属Ca019.1887、假丝酵母属Ca019.9443、假丝酵母属CTRG_01683和假丝酵母属CTRG_04630。

[0462] 在一些实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源细胞色素P450单加氧酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源细胞色素P450单加氧酶选自解脂耶氏酵母YALI0E25982g(ALK1)、解脂耶氏酵母YALI0F01320g(ALK2)、解脂耶氏酵母YALI0E23474g(ALK3)、解脂耶氏酵母YALI0B13816g(ALK4)、解脂耶氏酵母YALI0B13838g(ALK5)、解脂耶氏酵母YALI0B01848g(ALK6)、解脂耶氏酵母YALI0A15488g(ALK7)、解脂耶氏

酵母YALI0C12122g(ALK8)、解脂耶氏酵母YALI0B06248g(ALK9)、解脂耶氏酵母YALI0B20702g(ALK10)、解脂耶氏酵母YALI0C10054g(ALK11)和解脂耶氏酵母YALI0A20130g(ALK12)。

[0463] 在一些实施方案中,提供了一种能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的重组微生物,其中该重组微生物表达一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶,且其中该重组微生物经操作以缺失、破坏、突变一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶和/或降低一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶的活性。在一些实施方案中,被表达的一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶不同于被缺失或下调的一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶。在一些实施方案中,被表达的一种或多种内源或外源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶优选水解长链酰基甘油的酯键。在其他实施方案中,被表达的一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶选自表5c。

[0464] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶催化脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和中间体,该单或多不饱和中间体选自E5-10:酰基-CoA、E7-12:酰基-CoA、E9-14:酰基-CoA、E11-16:酰基-CoA、E13-18:酰基-CoA、Z7-12:酰基-CoA、Z9-14:酰基-CoA、Z11-16:酰基-CoA、Z13-18:酰基-CoA、Z8-12:酰基-CoA,Z10-14:酰基-CoA、Z12-16:酰基-CoA、Z14-18:酰基-CoA、Z7-10:酰基-coA、Z9-12:酰基-CoA、Z11-14:酰基-CoA、Z13-16:酰基-CoA、Z15-18:酰基-CoA、E7-10:酰基-CoA、E9-12:酰基-CoA、E11-14:酰基-CoA、E13-16:酰基-CoA、E15-18:酰基-CoA、E5Z7-12:酰基-CoA、E7Z9-12:酰基-CoA、E9Z11-14:酰基-CoA、E11Z13-16:酰基-CoA、E13Z15-18:酰基-CoA、E6E8-10:酰基-CoA、E8E10-12:酰基-CoA、E10E12-14:酰基-CoA、E12E14-16:酰基-CoA、Z5E8-10:酰基-CoA、Z7E10-12:酰基-CoA、Z9E12-14:酰基-CoA、Z11E14-16:酰基-CoA、Z13E16-18:酰基-CoA、Z3-10:酰基-CoA、Z5-12:酰基-CoA、Z7-14:酰基-CoA、Z9-16:酰基-CoA、Z11-18:酰基-CoA、Z3Z5-10:酰基-CoA、Z5Z7-12:酰基-CoA、Z7Z9-14:酰基-CoA、Z9Z11-16:酰基-CoA、Z11Z13-16:酰基-CoA和Z13Z15-18:酰基-CoA。在另外的实施方案中,该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇选自E5-10:OH、Z8-12:OH、Z9-12:OH、Z11-14:OH、Z11-16:OH、E11-14:OH、E8E10-12:OH、E7Z9-12:OH、Z11Z13-16OH、Z9-14:OH、Z9-16:OH和Z13-18:OH。

[0465] 在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含至少一种编码形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶的内源或外源核酸分子,该形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶能够催化单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。在一些优选的实施方案中,该形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶选自醋酸钙不动杆菌(Acinetobacter calcoaceticus)A0A1C4HN78、醋酸钙不动杆菌N9DA85、醋酸钙不动杆菌R8XW24、醋酸钙不动杆菌A0A1A0GGM5、醋酸钙不动杆菌A0A117N158和点状念珠藻(Nostoc punctiforme)YP_001865324。在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。在一些优选的实施方案中,该≤C_{18}脂肪醛选自Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0466] 在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。在一些实施方案中,该乙酰基转移酶选自表5d。在一些优选的实施方案中,该

≤C18脂肪乙酸酯选自E5-10:Ac、Z7-12:Ac、Z8-12:Ac、Z9-12:Ac、E7Z9-12:Ac、Z9-14:Ac、Z9E12-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac和Z11-16:Ac。

[0467] 在一些实施方案中,该重组微生物进一步包含:至少一种编码选自醇氧化酶、醇脱氢酶和形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶的酶的内源或外源核酸分子,醇氧化酶、醇脱氢酶和形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶能够催化单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛;和至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。在一些优选的实施方案中,该单或多不饱和≤C18脂肪醛和≤C_{18}脂肪乙酸酯选自E5-10:Ac、Z7-12:Ac、Z8-12:Ac、Z9-12:Ac、E7Z9-12:Ac、Z9-14:Ac、Z9E12-14:Ac、E11-14:Ac、Z11-14:Ac、Z11-16:Ac、Z9-16:Ac、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0468] 在另外的实施方案中,本公开提供一种重组解脂耶氏酵母微生物,其能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,其中该重组解脂耶氏酵母微生物包含:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA,且与选自SEQ ID NO:54、60、62、78、79、80、95、97、99、101、103和105的脂肪酰基去饱和酶具有95%序列同一性;和(b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶与选自SEQ ID NO:41-48、57、73、75和77的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有95%序列同一性,并且催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。

[0469] 在一些实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酶催化与用于产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的生物合成途径竞争的途径中的反应。在一些优选的实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酶选自下列:(i)一种或多种酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g(POX1)、YALI0F10857g(POX2)、YALI0D24750g(POX3)、YALI0E27654g(POX4)、YALI0C23859g(POX5)、YALI0E06567g(POX6);(ii)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶,其选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7);(iii)(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1);(iv)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g(ALK1)、YALI0F01320g(ALK2)、YALI0E23474g(ALK3)、YALI0B13816g(ALK4)、YALI0B13838g(ALK5)、YALI0B01848g(ALK6)、YALI0A15488g(ALK7)、(YALI0C12122g(ALK8),YALI0B06248g(ALK9)、YALI0B20702g(ALK10)、YALI0C10054g(ALK11)和YALI0A20130g(Alk12);和(v)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)。在其他优选的实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物包含一种或多种内源酶的缺失,该一种或多种内源酶选自下列:(i)一种或多种酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g(POX1)、YALI0F10857g(POX2)、YALI0D24750g(POX3)、YALI0E27654g(POX4)、YALI0C23859g(POX5)、YALI0E06567g(POX6);(ii)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶,其选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7);(iii)(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1);

(iv)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g(ALK1)、YALI0F01320g(ALK2)、YALI0E23474g(ALK3)、YALI0B13816g(ALK4)、YALI0B13838g(ALK5)、YALI0B01848g(ALK6)、YALI0A15488g(ALK7)、(YALI0C12122g(ALK8)、YALI0B06248g(ALK9)、YALI0B20702g(ALK10)、YALI0C10054g(ALK11)和YALI0A20130g(Alk12);和(v)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)。

[0470] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和中间体,该单或多不饱和中间体选自Z9-14:酰基-CoA、Z11-14:酰基-CoA、E11-14:酰基-CoA、Z9-16:酰基-CoA和Z11-16:酰基-CoA。在其他实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇选自Z9-14:OH、Z11-14:OH、E11-14:OH、Z9-16:OH、Z11-16:OH、Z11Z13-16:OH和Z13-18:OH。

[0471] 在一些实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物进一步包含至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛。在一些实施方案中,该醇脱氢酶选自表3a。在一些实施方案中,该C_6-C_{24}脂肪醛选自Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0472] 在一些实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物进一步包含至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。在一些实施方案中,该乙酰基转移酶选自表5d。在一些实施方案中,该C_6-C_{24}脂肪乙酸酯选自Z9-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac、Z11-16:Ac、Z11Z13-16:Ac和Z13-18:Ac。

[0473] 在一些实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物进一步包含:至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛;和至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。在一些实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯选自Z9-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac、Z11-16:Ac、Z11Z13-16:Ac、Z13-18:Ac、Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0474] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶不包含包含选自SEQ ID NO:64、65、66和67的氨基酸序列的脂肪酰基去饱和酶。在其他实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶不包含选自脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、黄地老虎(Agrotis segetum)或粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)衍生的去饱和酶的脂肪酰基去饱和酶。

[0475] 在一些实施方案中,本公开提供了一种工程化能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的解脂耶氏酵母微生物的方法,其中该方法包括将下列引入至解脂耶氏酵母微生物:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA,并且与选自SEQ ID NO:39、54、60、62、78、79、80、95、97、99、101、103和105的脂肪酰基去饱和酶具有95%序列同一性;和(b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,并且与选自SEQ ID NO:41-48、57、73、75和77的形

成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有95％序列同一性。在一些实施方案中,该微生物是MATA ura3-302::SUC2Δpox1Δpox2Δpox3Δpox4Δpox5Δpox6Δfadh Δadh1Δadh2Δadh3Δadh4Δadh5Δadh6Δadh7Δfao1::URA3。

[0476] 在一些实施方案中,本公开提供一种从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的方法,其包括:在含有原料的培养基中培养本文所述的重组微生物,该原料提供足以产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的碳源。在一些实施方案中,该方法进一步包含回收该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的步骤。在另外的实施方案中,该回收步骤包括蒸馏。在又一实施方案中,该回收步骤包含基于膜的分离。

[0477] 在一些实施方案中,使用化学方法将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛。在另外的实施方案中,该化学方法选自TEMPO-漂白、TEMPO-铜-空气、TEMPO-PhI(OAc)$_2$、斯文氧化和贵金属-空气。在一些实施方案中,使用化学方法将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。在另外的实施方案中,在4-N,N-二甲氨基吡啶(DMAP)或乙酸钠的存在下,该化学方法利用化学试剂将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇酯化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯,该化学试剂选自乙酰氯、乙酸酐、丁酰氯、丁酸酐、丙酰氯和丙酸酐。

[0478] 如上所讨论的,在第二方面,本申请涉及一种重组微生物,其能够从内源或外源来源的C_6-C_{24}脂肪酸产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。第二方面的说明性实施方案在图2中示出。蓝线表示宿主内源的生物化学途径,例如将正烷烃、脂肪醇或脂肪醛转化为脂肪酸的途径,或将脂肪酸转化为脂肪酰基-CoA、乙酰基-CoA或二羧酸的途径。底物向不饱和脂肪酸的转化可以通过宿主中的内源或外源酶进行。黄线指示由编码酶的外源核酸分子催化的转化。因此,在一些实施方案中,饱和脂肪酸向饱和脂肪酰基-ACP的转化可以由至少一种饱和脂肪酰基-ACP合成酶催化,其中该脂肪酰基-ACP合成酶由外源核酸分子编码。在另外的实施方案中,饱和脂肪酰基-ACP向单或多不饱和脂肪酰基-ACP的转化可以由至少一种脂肪酰基-ACP去饱和酶催化,其中该脂肪酰基-ACP去饱和酶由外源核酸分子编码。在仍另外的实施方案中,使用脂肪酸合酶复合物和碳源(例如丙二酰基-ACP),单或多不饱和脂肪酰基-ACP可以相对地延长至少2个碳。在一个这样的实施方案中,单或多不饱和脂肪酰基-ACP转化为相应的延长两个碳的单或多不饱和脂肪酰基-ACP可以由至少一种脂肪酸合酶复合物催化,其中该脂肪酸合酶复合物由一种或多种外源核酸分子编码。在又另外的实施方案中,延长的单或多不饱和脂肪酰基-ACP转化为单或多不饱和脂肪醛可以由形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶催化,其中形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶由外源核酸分子编码。在一些实施方案中,可将单或多不饱和脂肪醛转化为相应的单或多不饱和脂肪醇,其中底物向产物的转化由脱氢酶催化,其中该脱氢酶由内源或外源核酸分子编码。虚线指示本公开文本的下游步骤,如利用乙酰基转移酶或易位,或随后的化学转化以产生官能化信息素。红色叉指示缺失或下调的宿主天然途径,这增加了朝向工程化途径的通量。

[0479] 在一个实施方案中,该重组微生物表达(a):至少一种编码酰基-ACP合成酶的外源核酸分子,该酰基-ACP合成酶催化C_6-C_{24}脂肪酸转化为相应的饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP;(b)至少一种编码脂肪酰基-ACP去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基-ACP去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP;(c)编码脂肪酸合酶

复合物的一种或多种内源或外源核酸分子,该脂肪酸合酶复合物催化来自(b)的该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的相对于(b)的产物具有两个碳延长的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP;(d):至少一种编码形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶催化来自(c)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛;以及(e)至少一种编码脱氢酶的内源或外源核酸分子,该脱氢酶催化来自(d)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛C_6-C_{24}转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。在一些实施方案中,可以使用宿主微生物中的内源酶产生C_6-C_{24}脂肪酸。在其他实施方案中,可以由宿主微生物中的一种或多种外源酶产生饱和的C_6-C_{24}脂肪酸。

[0480] 在一些实施方案中,本文公开的重组微生物包括酰基-ACP合成酶以催化C_6-C_{24}脂肪酸转化为相应的饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP。在一些实施方案中,该酰基-ACP合成酶是能够利用如下脂肪酸作为底物的合成酶,该脂肪酸具有6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个碳原子的链长。在示例性实施方案中,该重组微生物可以包括来自物种哈维氏弧菌(Vibrio harveyi)、粘红酵母(Rhodotorula glutinis)或解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)的生物体的异源酰基-ACP合成酶。

[0481] 在一些实施方案中,该重组微生物包括脂肪酰基-ACP去饱和酶。在一些实施方案中,该脂肪酰基-ACP去饱和酶是可溶性去饱和酶。在其他实施方案中,该脂肪酰基-ACP去饱和酶来自物种天竺葵(Pelargonium hortorum)、叙利亚马利筋(Asclepias syriaca)或绒毛钩藤(Uncaria tomentosa)的生物体。

[0482] 在一些实施方案中,该重组微生物包括脂肪酸合酶复合物。在一些实施方案中,该一种或多种编码脂肪酸合酶复合物的核酸分子是内源核酸分子。在其他实施方案中,该一种或多种编码脂肪酸合酶复合物的核酸分子是外源核酸分子。

[0483] 在一些实施方案中,本文公开的重组微生物包括形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶,其催化C_6-C_{24}脂肪酰基-ACP转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛。在示例性实施方案中,该形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶来自物种天竺葵(Pelargonium hortorum)、叙利亚马利筋(Asclepias syriaca)以及绒毛钩藤(Uncaria tomentosa)的生物体。在一些实施方案中,该重组微生物包括脱氢酶,以将不饱和脂肪醛转化为相应的不饱和脂肪醇。在一些实施方案中,编码该脱氢酶的核酸分子对于该重组微生物是内源的。在其他实施方案中,编码该脱氢酶的核酸分子对于该重组微生物是外源的。在示例性实施方案中,该编码脱氢酶的内源或外源核酸分子分离自物种酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、大肠杆菌(Escherichia coli)、解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)或热带假丝酵母(Candida tropicalis)的生物体。

[0484] 如上所讨论的,在第三方面,本申请涉及一种重组微生物,其能够从内源或外源来源的C_6-C_{24}脂肪酸产生不饱和C_6-C_{24}脂肪醇。第二方面的说明性实施方案在图3中示出。蓝线表示宿主内源的生物化学途径,例如将正烷烃、脂肪醇或脂肪醛转化为脂肪酸的途径,或将脂肪酸转化为脂肪酰基-CoA、乙酰基-CoA或二羧酸的途径。底物向不饱和脂肪酸的转化可以通过宿主中的内源或外源酶进行。黄线指示由编码酶的外源核酸分子催化的转化。因此,在一些实施方案中,饱和脂肪酸向饱和脂肪酰基-ACP的转化可以由至少一种饱和脂肪酰基-ACP合成酶催化,其中该脂肪酰基-ACP合成酶由外源核酸分子编码。非天然饱和脂肪酰基-ACP硫酯建立适合去饱和的底物,并且不同于用于β-氧化或脂肪酸延长的CoA-硫酯。在

另外的实施方案中,饱和脂肪酰基-ACP向单或多不饱和脂肪酰基-ACP的转化可以由至少一种脂肪酰基-ACP去饱和酶催化,其中该脂肪酰基-ACP去饱和酶由外源核酸分子编码。在又一些实施方案中,该单或多不饱和脂肪酰基-ACP可通过脂肪酰基-ACP硫酯酶转化为相应的单或多不饱和脂肪酸。在一个具体的实施方案中,可溶性脂肪酰基-ACP硫酯酶可用于释放游离脂肪酸以再活化为CoA硫酯。可以使用脂肪酰基-ACP硫酯酶,包括Q41635、Q39473、P05521.2、AEM72519、AEM72520、AEM72521、AEM72523、AAC49784、CAB60830、EER87824、EER96252、ABN54268、AAO77182、CAH09236、ACL08376及其同系物。在另一个实施方案中,使用延长酶和碳源(例如丙二酰基-ACP),单或多不饱和脂肪酰基-CoA可以相对地延长至少2个碳。在又另外的实施方案中,延长的单或多不饱和脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和脂肪醇可以由形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化,其中该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶由外源核酸分子编码。虚线指示本公开文本的下游步骤,如利用乙酰基转移酶或易位,或随后的化学转化以产生官能化信息素。红色叉指示缺失或下调的宿主天然途径,这增加了朝向工程化途径的通量。

[0485] 如本文传授产生的脂肪醇可以进一步转化以产生下游产物,如昆虫信息素、香料、调味剂和聚合物中间体,其利用醛或乙酸官能团。因此,在一些实施方案中,该重组微生物还包含至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,其中该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛。在其他实施方案中,该重组微生物还可以包含至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。在某些实施方案中,该乙酰基转移酶或编码它的核酸序列可以分离自物种光滑假丝酵母、酿酒酵母、黑脉金斑蝶、烟芽夜蛾、家蚕、小地老虎、黄地老虎、卫矛、智人、耐热克鲁维酵母和解脂耶氏酵母的生物体。在示例性实施方案中,该乙酰基转移酶包含选自GenBank登录号AY242066、AY242065、AY242064、AY242063、AY242062、EHJ65205、ACX53812、NP_001182381、EHJ65977、EHJ68573、KJ579226、GU594061、KTA99184.1、AIN34693.1、AY605053、XP_002552712.1、XP_503024.1和XP_505595.1的序列。

[0486] 重组微生物

[0487] 本公开文本提供了可以被工程化以表达各种外源酶的微生物。

[0488] 在本文所述的各个实施方案中,该重组微生物是真核微生物。在一些实施方案中,该真核微生物是酵母。在示例性实施方案中,该酵母是选自下组的属的成员,该组由以下各项组成:耶氏酵母属(Yarrowia)、假丝酵母属(Candida)、酵母属(Saccharomyces)、毕赤酵母属(Pichia)、汉逊酵母属(Hansenula)、克鲁维酵母属(Kluyveromyces)、伊萨酵母属(Issatchenkia)、接合酵母属(Zygosaccharomyces)、德巴利酵母属(Debaryomyces)、裂殖酵母属(Schizosaccharomyces)、管囊酵母属(Pachysolen)、隐球酵母属(Cryptococcus)、丝孢酵母属(Trichosporon)、红酵母属(Rhodotorula)、以及Myxozyma。

[0489] 本发明人已经发现,产油酵母如假丝酵母属和耶氏酵母属对C_6-C_{24}脂肪醇底物和产物具有出人意料的高耐受性。因此,在一个这样的示例性实施方案中,本发明的重组微生物是产油酵母。在另外的实施方案中,该产油酵母是选自下组的属的成员,该组由以下各项组成:耶氏酵母属(Yarrowia)、假丝酵母属(Candida)、红酵母属(Rhodotorula)、红冬孢酵母属(Rhodosporidium)、隐球酵母属(Cryptococcus)、丝孢酵母属(Trichosporon)、以及油脂酵母属(Lipomyces)。在甚至另外的实施方案中,该产油酵母是选自以下项的物种的成

员:解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)、热带假丝酵母(Candida tropicalis)、圆红冬孢酵母(Rhodosporidium toruloides)、斯达油脂酵母(Lipomyces starkey)、产脂油脂酵母(L.lipoferus)、拉可夫氏假丝酵母(C.revkaufi)、铁红假丝酵母(C.pulcherrima)、产朊假丝酵母(C.utilis)、小红酵母(Rhodotorula minuta)、黑色丝孢酵母(Trichosporon pullans)、皮状丝孢酵母(T.cutaneum)、弯曲隐球酵母(Cryptococcus curvatus)、粘红酵母(R.glutinis)、以及禾本红酵母(R.graminis)。

[0490] 在一些实施方案中,该重组微生物是原核微生物。在示例性实施方案中,该原核微生物是选自下组的属的成员,该组由以下各项组成:埃希氏菌属(Escherichia)、梭菌属(Clostridium)、发酵单胞菌属(Zymomonas)、沙门氏菌属(Salmonella)、红球菌属(Rhodococcus)、假单胞菌属(Pseudomonas)、芽孢杆菌属(Bacillus)、乳杆菌属(Lactobacillus)、肠球菌属(Enterococcus)、产碱杆菌属(Alcaligenes)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、类芽孢杆菌属(Paenibacillus)、节杆菌属(Arthrobacter)、棒状杆菌属(Corynebacterium)、以及短杆菌属(Brevibacterium)。

[0491] 在一些实施方案中,该重组微生物用于产生本文公开的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯。

[0492] 因此,在另一方面,本发明提供了使用本文所述的重组微生物产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的方法。在一个实施方案中,该方法包括在含有提供碳源的原料的培养基中培养重组微生物直至产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯。在一些实施方案中,该方法包括在含有原料的培养基中培养本文所述的重组微生物,该原料提供足以产生单或多不饱和≤$_{C18}$脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的碳源。在另一个实施方案中,回收该单或多不饱和C_{18}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯。回收可以通过本领域已知的方法进行,如蒸馏、基于膜的分离气提、溶剂萃取和膨胀床吸附。

[0493] 在一些实施方案中,该原料包含碳源。在本文所述的各个实施方案中,该碳源可以选自糖、甘油、醇、有机酸、烷烃、脂肪酸、木质纤维素、蛋白质、二氧化碳和一氧化碳。在另一个实施方案中,该糖选自下组,该组由以下各项组成:葡萄糖、果糖和蔗糖。

[0494] 工程化能够产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的微生物的方法

[0495] 在一方面中,本公开提供了一种能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的微生物的方法,其中该方法包括将下列引入至微生物中:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;(b)至少一种编码酰基-CoA氧化酶的外源核酸分子,该酰基-CoA氧化酶在一个或多个连续的酰基-CoA氧化酶活性循环之后催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和≤C_{18}脂肪酰基-CoA,其中指定循环产生相对于此循环中的起始单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA底物具有两个碳截短的单或多不饱和C_4-C_{22}脂肪酰基-CoA中间体;和(c)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(b)的单或多不饱和≤C_{18}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇。在一些实施方案中,该微生物是MATA ura3-302::SUC2Δpox1Δpox2Δpox3Δpox4Δpox5Δpox6Δfadh Δadh1Δadh2Δadh3Δadh4Δadh5Δadh6Δadh7Δfao1::URA3。

[0496] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶选自红带卷蛾(Argyrotaenia velutinana)、斜纹夜蛾(Spodoptera litura)、水稻大螟(Sesamia inferens)、烟草天蛾(Manduca sexta)、欧洲玉米螟(Ostrinia nubilalis)、玉米穗蛾(Helicoverpa zea)、蔷薇斜条卷叶蛾(Choristoneura rosaceana)、黑腹果蝇(Drosophila melanogaster)、海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)、黄地老虎(Agrotis segetum)、亚洲玉米螟(Ostrinia furnicalis)和假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)衍生的脂肪酰基去饱和酶。在一些优选的实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶与选自SEQ ID NO:39、49-54、58-63、78-80和GenBank登录号AF416738、AGH12217.1、AII21943.1、CAJ43430.2、AF441221、AAF81787.1、AF545481、AJ271414、AY362879、ABX71630.1和NP001299594.1、Q9N9Z8、ABX71630.1和AIM40221.1的脂肪酰基去饱和酶具有95%序列同一性。在另外的实施方案中,该酰基-CoA氧化酶选自表5a。在又一实施方案中,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶选自黄地老虎(Agrotis segetum)、甜菜夜蛾(Spodoptera exigua)、斜纹夜蛾(Spodoptera littoralis)、薄肌眼虫(Euglena gracilis)、稠李巢蛾(Yponomeuta evonymellus)和棉铃虫(Helicoverpa armigera)衍生的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶。在另外的实施方案中,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶与选自SEQ ID NO:1-3、32、41-48、55-57、73、75、77和82的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有90%序列同一性。在一些实施方案中,该重组微生物是选自解脂耶氏酵母、酿酒酵母、白假丝酵母和维斯假丝酵母的酵母。

[0497] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶催化脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和中间体,该单或多不饱和中间体选自E5-10:酰基-CoA、E7-12:酰基-CoA、E9-14:酰基-CoA、E11-16:酰基-CoA、E13-18:酰基-CoA、Z7-12:酰基-CoA、Z9-14:酰基-CoA、Z11-16:酰基-CoA、Z13-18:酰基-CoA、Z8-12:酰基-CoA、Z10-14:酰基-CoA、Z12-16:酰基-CoA、Z14-18:酰基-CoA、Z7-10:酰基-coA、Z9-12:酰基-CoA、Z11-14:酰基-CoA、Z13-16:酰基-CoA、Z15-18:酰基-CoA、E7-10:酰基-CoA、E9-12:酰基-CoA、E11-14:酰基-CoA、E13-16:酰基-CoA、E15-18:酰基-CoA、E5Z7-12:酰基-CoA、E7Z9-12:酰基-CoA、E9Z11-14:酰基-CoA、E11Z13-16:酰基-CoA、E13Z15-18:酰基-CoA、E6E8-10:酰基-CoA、E8E10-12:酰基-CoA、E10E12-14:酰基-CoA、E12E14-16:酰基-CoA、Z5E8-10:酰基-CoA、Z7E10-12:酰基-CoA、Z9E12-14:酰基-CoA、Z11E14-16:酰基-CoA、Z13E16-18:酰基-CoA、Z3-10:酰基-CoA、Z5-12:酰基-CoA、Z7-14:酰基-CoA、Z9-16:酰基-CoA、Z11-18:酰基-CoA、Z3Z5-10:酰基-CoA、Z5Z7-12:酰基-CoA、Z7Z9-14:酰基-CoA、Z9Z11-16:酰基-CoA、Z11Z13-16:酰基-CoA和Z13Z15-18:酰基-CoA。在另外的实施方案中,该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇选自E5-10:OH、Z8-12:OH、Z9-12:OH、Z11-14:OH、Z11-16:OH、E11-14:OH、E8E10-12:OH、E7Z9-12:OH、Z11Z13-16OH、Z9-14:OH、Z9-16:OH和Z13-18:OH。

[0498] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子引入至微生物,该酰基转移酶优选储存≤C_{18}脂肪酰基-CoA。在一些实施方案中,该酰基转移酶选自甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)、甘油磷脂酰基转移酶(GPLAT)和二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)。在一些优选的实施方案中,该酰基转移酶选自表5b。

[0499] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将至少一种编码酰基甘油脂肪酶的内源或

外源核酸分子引入至微生物中,该酰基甘油脂肪酶优选水解>C16、>C14、>C12或>C10酰基甘油底物的酯键。在一些实施方案中,该酰基甘油脂肪酶选自表5c。

[0500] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将一种或多种修饰引入至微生物中,该一种或多种修饰包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酶催化与用于产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的生物合成途径竞争的途径中的反应。在另外的实施方案中,该重组微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酶选自:(i)一种或多种酰基-CoA氧化酶;(ii)一种或多种酰基转移酶;(iii)一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶;(iv)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶;(v)一种或多种(脂肪)醇氧化酶;和(vi)一种或多种细胞色素P450单加氧酶。

[0501] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将一种或多种修饰引入至微生物中,该一种或多种修饰包含一种或多种内源酰基-CoA氧化酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酰基-CoA氧化酶选自解脂耶氏酵母POX1(YALI0E32835g)、解脂耶氏酵母POX2(YALI0F10857g)、解脂耶氏酵母POX3(YALI0D24750g)、解脂耶氏酵母POX4(YALI0E27654g)、解脂耶氏酵母POX5(YALI0C23859g)、解脂耶氏酵母POX6(YALI0E06567g);酿酒酵母POX1(YGL205W);假丝酵母属POX2(Ca019.1655、Ca019.9224、CTRG_02374、M18259)、假丝酵母属POX4(Ca019.1652,Ca019.9221,CTRG_02377,M12160)和假丝酵母属POX5(Ca019.5723、Ca019.13146、CTRG_02721、M12161)。

[0502] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将一种或多种修饰引入至微生物中,该一种或多种修饰包括一种或多种内源酰基转移酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酰基转移酶选自解脂耶氏酵母YALI0C00209g、解脂耶氏酵母YALI0E18964g、解脂耶氏酵母YALI0F19514g、解脂耶氏酵母YALI0C14014g、解脂耶氏酵母YALI0E16797g、解脂耶氏酵母YALI0E32769g和解脂耶氏酵母YALI0D07986g,酿酒酵母YBL011w、酿酒酵母YDL052c、酿酒酵母YOR175C、酿酒酵母YPR139C、酿酒酵母YNR008w和酿酒酵母YOR245c,和假丝酵母属I503_02577、假丝酵母属CTRG_02630、假丝酵母属Ca019.250、假丝酵母属Ca019.7881、假丝酵母属CTRG_02437、假丝酵母属Ca019.1881、假丝酵母属Ca019.9437、假丝酵母属CTRG_01687、假丝酵母属Ca019.1043、假丝酵母属Ca019.8645、假丝酵母属CTRG_04750、假丝酵母属Ca019.13439、假丝酵母属CTRG_04390、假丝酵母属Ca019.6941、假丝酵母属Ca019.14203和假丝酵母属CTRG_06209。

[0503] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将一种或多种修饰引入至微生物中,该一种或多种修饰包括一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶选自解脂耶氏酵母YALI0E32035g、解脂耶氏酵母YALI0D17534g、解脂耶氏酵母YALI0F10010g、解脂耶氏酵母YALI0C14520g和解脂耶氏酵母YALI0E00528g,酿酒酵母YKL140w、酿酒酵母YMR313c、酿酒酵母YKR089c、酿酒酵母YOR081c、酿酒酵母YKL094W、酿酒酵母YLL012W和酿酒酵母YLR020C,和假丝酵母属Ca019.2050、假丝酵母属Ca019.9598、假丝酵母属CTRG_01138、假丝酵母属W5Q_03398、假丝酵母属CTRG_00057、假丝酵母属Ca019.5426、假丝酵母属Ca019.12881、假丝酵母属CTRG_06185、假丝酵母属Ca019.4864、假丝酵母属Ca019.12328、假丝酵母属CTRG_03360、假丝酵母属Ca019.6501、假丝酵母属Ca019.13854、假丝酵母属CTRG_05049、假丝酵母属Ca019.1887、假丝酵母属Ca019.9443、假丝酵母属CTRG_01683和假丝酵母属CTRG_

04630。

[0504] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将一种或多种修饰引入至微生物中,该一种或多种修饰包括一种或多种内源细胞色素P450单加氧酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源细胞色素P450单加氧酶选自解脂耶氏酵母YALI0E25982g(ALK1)、解脂耶氏酵母YALI0F01320g(ALK2)、解脂耶氏酵母YALI0E23474g(ALK3)、解脂耶氏酵母YALI0B13816g(ALK4)、解脂耶氏酵母YALI0B13838g(ALK5)、解脂耶氏酵母YALI0B01848g(ALK6)、解脂耶氏酵母YALI0A15488g(ALK7)、解脂耶氏酵母YALI0C12122g(ALK8)、解脂耶氏酵母YALI0B06248g(ALK9)、解脂耶氏酵母YALI0B20702g(ALK10)、解脂耶氏酵母YALI0C10054g(ALK11)和解脂耶氏酵母YALI0A20130g(ALK12)。

[0505] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将至少一种编码形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶的内源或外源核酸分子引入至微生物中,该形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶能够催化单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。在一些优选的实施方案中,该形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶选自醋酸钙不动杆菌A0A1C4HN78、醋酸钙不动杆菌N9DA85、醋酸钙不动杆菌R8XW24、醋酸钙不动杆菌A0A1A0GGM5、醋酸钙不动杆菌A0A117N158和点状念珠藻YP_001865324。在一些实施方案中,该方法进一步包括将至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子引入至微生物中,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。在一些优选的实施方案中,该≤C_{18}脂肪醛选自Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0506] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子引入至微生物中,该乙酰基转移酶能够催化单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。在一些实施方案中,该乙酰基转移酶选自表5d。在一些优选的实施方案中,该≤C_{18}脂肪乙酸酯选自E5-10:Ac、Z7-12:Ac、Z8-12:Ac、Z9-12:Ac、E7Z9-12:Ac、Z9-14:Ac、Z9E12-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac和Z11-16:Ac。

[0507] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将以下引入至微生物中:至少一种编码选自能够催化单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛的醇氧化酶、醇脱氢酶和形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶的酶的内源或外源核酸分子;和至少一种编码能够催化单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯的乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子。在一些优选的实施方案中,该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醛和≤C_{18}脂肪乙酸酯选自E5-10:Ac、Z7-12:Ac、Z8-12:Ac、Z9-12:Ac、E7Z9-12:Ac、Z9-14:Ac、Z9E12-14:Ac、E11-14:Ac、Z11-14:Ac、Z11-16:Ac、Z9-16:Ac、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0508] 在一些实施方案中,本公开提供了一种从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛or脂肪乙酸酯的方法,其包括:在含有原料的培养基中培养本文所述的重组微生物,该原料提供足以产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的碳源。在一些实施方案中,该方法进一步包括回收该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的步骤。在另外的实施方案中,该回收步骤包含蒸馏。在又另外的实施方案中,该回收步骤包含基于膜的分离。

[0509] 在一些实施方案中,使用化学方法将该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。在另外的实施方案中,该化学方法选自TEMPO-漂白、TEMPO-铜-空气、TEMPO-PhI(OAc)$_2$、斯文(Swern)氧化和贵金属-空气。在一些实施方案中,使用化学方法将该单或多不

饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。在另外的实施方案中,在4-N,N-二甲氨基吡啶(DMAP)或乙酸钠的存在下,该化学方法利用选自乙酰氯、乙酸酐、丁酰氯、丁酸酐、丙酰氯和丙酸酐的化学剂将该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇酯化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。

[0510] 在另一方面中,本公开提供一种工程化能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的解脂耶氏酵母微生物的方法,其中该重组解脂耶氏酵母微生物包含:(a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA,该脂肪酰基去饱和酶与选自SEQ ID NO:54、60、62、78、79、80、95、97、99、101、103和105的脂肪酰基去饱和酶具有95%序列同一性;和(b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶与选自SEQ ID NO:41-48、57、73、75和77的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有95%序列同一性。

[0511] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将一种或多种修饰引入至解脂耶氏酵母微生物中,该一种或多种修饰包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酶催化与用于产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的生物合成途径竞争的途径中的反应。在一些优选的实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该一种或多种内源酶选自下列:(i)一种或多种酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g(POX1)、YALI0F10857g(POX2)、YALI0D24750g(POX3)、YALI0E27654g(POX4)、YALI0C23859g(POX5)、YALI0E06567g(POX6);(ii)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶,其选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7);(iii)(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1);(iv)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g(ALK1)、YALI0F01320g(ALK2)、YALI0E23474g(ALK3)、YALI0B13816g(ALK4)、YALI0B13838g(ALK5)、YALI0B01848g(ALK6)、YALI0A15488g(ALK7)、(YALI0C12122g(ALK8)、YALI0B06248g(ALK9)、YALI0B20702g(ALK10)、YALI0C10054g(ALK11)和YALI0A20130g(Alk12);和(v)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)。在其他优选的实施方案中,该重组解脂耶氏酵母微生物包含一种或多种内源酶的缺失,该一种或多种内源酶选自下列:(i)一种或多种酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g(POX1)、YALI0F10857g(POX2)、YALI0D24750g(POX3)、YALI0E27654g(POX4)、YALI0C23859g(POX5)、YALI0E06567g(POX6);(ii)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶,其选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7);(iii)(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1);(iv)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g(ALK1),YALI0F01320g(ALK2)、YALI0E23474g(ALK3)、YALI0B13816g(ALK4)、YALI0B13838g(ALK5)、YALI0B01848g(ALK6)、YALI0A15488g(ALK7)、(YALI0C12122g(ALK8)、YALI0B06248g(ALK9)、YALI0B20702g(ALK10)、YALI0C10054g(ALK11)和YALI0A20130g(Alk12);和(v)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)。

[0512] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和脂肪酰基-CoA转化为单或多不

饱和中间体,该单或多不饱和中间体选自Z9-14:酰基-CoA、Z11-14:酰基-CoA、E11-14:酰基-CoA、Z9-16:酰基-CoA和Z11-16:酰基-CoA。在其他实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇选自Z9-14:OH、Z11-14:OH、E11-14:OH、Z9-16:OH、Z11-16:OH、Z11Z13-16:OH和Z13-18:OH。

[0513] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子引入至解脂耶氏酵母微生物中,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛。在一些实施方案中,该醇脱氢酶选自表3a。在一些实施方案中,该C_6-C_{24}脂肪醛选自Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0514] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子引入至解脂耶氏酵母微生物中,该乙酰基转移酶能够催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。在一些实施方案中,该乙酰基转移酶选自表5d。在一些实施方案中,该C_6-C_{24}脂肪乙酸酯选自Z9-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac、Z11-16:Ac、Z11Z13-16:Ac和Z13-18:Ac。

[0515] 在一些实施方案中,该方法进一步包括将以下引入至解脂耶氏酵母微生物:至少一种编码氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛;和至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。在一些实施方案中,该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯选自Z9-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac、Z11-16:Ac、Z11Z13-16:Ac、Z13-18:Ac、Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[0516] 在一些实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶不包含包含选自SEQ ID NO:64、65、66和67的氨基酸序列的脂肪酰基去饱和酶。在其他实施方案中,该脂肪酰基去饱和酶不包含选自脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、黄地老虎(Agrotis segetum)或粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)衍生的去饱和酶的脂肪酰基去饱和酶。

[0517] 在一些实施方案中,本公开提供了一种从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的方法,其包括:在含有原料的培养基中培养本文所述的重组微生物,该原料提供足以产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的碳源。在一些实施方案中,该方法进一步包括回收该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的步骤。在另外的实施方案中,该回收步骤包含蒸馏。在又另一实施方案中,该回收步骤包含基于膜的分离。

[0518] 在一些实施方案中,使用化学方法将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛。在另外的实施方案中,该化学方法选自TEMPO-漂白、TEMPO-铜-空气、TEMPO-$PhI(OAc)_2$、斯文氧化(Swern)和贵金属-空气。在一些实施方案中,使用化学方法将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。在另外的实施方案中,该化学方法在4-N,N-二甲氨基吡啶(DMAP)或乙酸钠的存在下利用选自乙酰氯、乙酸酐、丁酰氯、丁酸酐、丙酰氯和丙酸酐的化学剂将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇酯化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。

[0519] 酶工程

[0520] 可以工程化重组微生物中的酶以改进底物向产物转化的一个或多个方面。可进一步工程化以用于本公开文本的方法中的酶的非限制性例子包括去饱和酶(例如,脂肪酰基-CoA去饱和酶或脂肪酰基-ACP去饱和酶)、形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶、酰基-ACP合酶、脂肪酸合酶、脂肪酸合酶复合物、乙酰基转移酶、脱氢酶、和醇氧化酶、以及其组合。这些酶可针对改进的催化活性、改进的选择性、改进的稳定性、改进的对各种发酵条件(温度、pH等)的耐受性、或改进的对各种代谢底物、产品、副产物、中间体等的耐受性而工程化。

[0521] 去饱和酶可针对改进的不饱和底物去饱和中的催化活性、改进的烃选择性、改进的Z产物相对于E产物的选择性或E产物相对于Z产物的选择性而工程化。例如,可以工程化Z9脂肪酰基去饱和酶以改进将饱和脂肪酰基-CoA转化为相应的不饱和脂肪酰基-CoA的底物至产物转化的产率,并且另外或可替代地,改进9位去饱和的选择性以产生相应的Z-9脂肪酰基-CoA。在另外的非限制性例子中,可以针对改进的ACP连接活性来工程化脂肪酰基-ACP合成酶;可以针对脂肪酸底物延长的改进的催化活性来工程化脂肪酸合酶复合酶;可以针对在将脂肪酰基-CoA还原为相应的脂肪醇中改进的催化活性来工程化形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶;可以针对在将脂肪酰基-ACP还原为相应的脂肪醛中改进的催化活性来工程化形成脂肪醛的脂肪酰基还原酶;可以针对将脂肪酰基-ACP转化为相应的脂肪醇中改进的催化活性来工程化脱氢酶;可以针对将脂肪醇转化为相应的脂肪醛中改进的催化活性来工程化醇氧化酶;并且可以针对将脂肪醇转化为相应的脂肪乙酸酯中改进的催化活性来工程化乙酰基转移酶。

[0522] 如本文关于具体的酶活性所用的术语“改进的催化活性”是指相对于可比较的非工程化酶(如非工程化去饱和酶(例如脂肪酰基-CoA去饱和酶或脂肪酰基-ACP去饱和酶)、形成脂肪醇或脂肪醛的脂肪酰基还原酶、酰基-ACP合成酶、脂肪酸合成酶、脂肪酸合酶复合物、酰基转移酶、脱氢酶或醇氧化酶)测量的更高的酶活性水平。例如,特定酶的过表达可以导致细胞中该酶活性水平的增加。可将突变引入去饱和酶(例如脂肪酰基-CoA去饱和酶或脂肪酰基-ACP去饱和酶)、形成脂肪醇或脂肪醛的脂肪酰基还原酶、酰基-ACP合成酶、脂肪酸合成酶、脂肪酸合酶复合物、酰基转移酶、脱氢酶或醇氧化酶,从而得到具有改进的催化活性的工程化酶。用以增加酶活性的方法是本领域技术人员已知的。此类技术可以包括:通过增加质粒拷贝数和/或使用更强的启动子和/或使用激活型核糖开关来增加该酶的表达,引入突变以减轻该酶的负调节,引入特定突变以增加比活性和/或降低底物的K_M,或通过定向进化。参见例如Methods in Molecular Biology(vol.231),ed.Arnold and Georgiou,Humana Press(2003)。

[0523] 代谢工程-酶过表达和基因缺失/下调以增加途径通量

[0524] 在本文所述的各个实施方案中,参与本文所述生物合成途径的重组微生物中的外源和内源酶可被过表达。

[0525] 术语“过表达的”或“过表达”是指与相似的相应的未经修饰的表达基础水平的mRNA或具有基础水平的蛋白质的细胞相比,细胞中编码一种或多种蛋白质的mRNA的水平升高(例如,异常水平)和/或一种或多种蛋白质水平升高。在具体的实施方案中,在工程化以展现增加的基因mRNA、蛋白质和/或活性的微生物中,一种或多种mRNA或一种或多种蛋白质可以过表达至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、12倍、15倍或更多倍。

[0526] 在一些实施方案中,本公开文本的重组微生物由含有合成底物脂肪酸的酶能力的

宿主生成。在此特定实施方案中,它可用于增加脂肪酸的合成或累积以例如增加可用于工程化的脂肪醇生产途径的脂肪酸的量。

[0527] 在一些实施方案中,它可用于增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯生产途径中涉及的内源或外源酶的表达,以增加从脂肪酸到脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的通量,由此导致脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的合成或累积增加。

[0528] 在一些实施方案中,它可用于增加内源或外源酶的表达,以增加辅酶的细胞内水平。在一个实施方案中,该辅酶是NADH。在另一个实施方案中,该辅酶是NADPH。在一个实施方案中,增加磷酸戊糖途径中蛋白质的表达以增加NADPH的细胞内水平。磷酸戊糖途径是提供还原等效物的重要分解代谢途径并且是生物合成反应的重要合成代谢途径。在一个实施方案中,将葡萄糖-6-磷酸酯转化为6-磷酸D-葡糖酸-1,5-内酯的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶过表达。在一些实施方案中,该葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是来自酵母的ZWF1。在另一个实施方案中,该葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是来自酿酒酵母的ZWF1(YNL241C)。在一个实施方案中,将D-吡喃葡萄糖-6-磷酸酯转化为6-磷酸D-葡糖酸-1,5-内酯的葡萄糖-6-磷酸酯-1-脱氢酶过表达。在另一个实施方案中,该葡萄糖-6-磷酸酯-1-脱氢酶是来自细菌的zwf。在某些实施方案中,该葡萄糖-6-磷酸酯-1-脱氢酶是来自大肠杆菌的zwf(NP_416366)。在一个实施方案中,将6-磷酸D-葡糖酸-1,5-内酯转化为D-葡糖酸6-磷酸酯的6-磷酸葡糖酸内酯酶过表达。在一些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸内酯酶是酵母的SOL3。在某些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸内酯酶是酿酒酵母的SOL3(NP_012033)。在一些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸内酯酶是酵母的SOL4。在某些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸内酯酶是酿酒酵母的SOL4(NP_011764)。在一些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸内酯酶是细菌的pgl。在某些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸内酯酶是大肠杆菌的pgl(NP_415288)。在一个实施方案中,将D-葡糖酸6-磷酸转化为D-核酮糖5-磷酸酯的6-磷酸葡糖酸脱氢酶过表达。在一些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸脱氢酶是来自酵母的GND1。在某些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸脱氢酶是来自酿酒酵母的GND1(YHR183W)。在一些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸脱氢酶是来自酵母的GND2。在某些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸脱氢酶是来自酿酒酵母的GND2(YGR256W)。在一些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸脱氢酶是来自细菌的gnd。在某些实施方案中,该6-磷酸葡糖酸脱氢酶是来自大肠杆菌的gnd(NP_416533)。在一个实施方案中,将D-甘油醛3-磷酸酯和D-景天庚酮糖7-磷酸酯与β-D-呋喃果糖6-磷酸酯和D-赤藓糖4-磷酸酯相互转化的转醛醇酶过表达。在一些实施方案中,该转醛醇酶是酵母的TAL1。在某些实施方案中,该转醛醇酶是酿酒酵母的TAL1(NP_013458)。在一些实施方案中,该转醛醇酶是酵母的NQM1。在某些实施方案中,该转醛醇酶是酿酒酵母的NQM1(NP_011557)。在一些实施方案中,该转醛醇酶是细菌的tal。在某些实施方案中,该转醛醇酶是大肠杆菌的talB(NP_414549)。在某些实施方案中,该转醛醇酶是大肠杆菌的talA(NP_416959)。在一个实施方案中,将D-赤藓糖4-磷酸酯和D-木酮糖5-磷酸酯与β-D-呋喃果糖6-磷酸酯和D-甘油醛3-磷酸酯相互转化和/或将D-景天庚酮糖7-磷酸酯和D-甘油醛3-磷酸酯与D-核糖5-磷酸酯和D-木酮糖5-磷酸酯相互转化的转酮醇酶过表达。在一些实施方案中,该转酮醇酶是酵母的TKL1。在某些实施方案中,该转酮醇酶是酿酒酵母的TKL1(NP_015399)。在一些实施方案中,该转酮醇酶是酵母的TKL2。在一些实施方案中,该转酮醇酶是酿酒酵母的TKL2(NP_009675)。在一些实施方案中,该转酮醇酶是细菌的tkt。在某些实施方案中,该转酮醇酶是大肠杆菌的tktA(YP_026188)。在某些实施方案

中,该转酮醇酶是大肠杆菌的tktB(NP_416960)。在一个实施方案中,将D-核糖5-磷酸酯与D-核酮糖5-磷酸酯相互转化的核糖-5-磷酸酯酮醇-异构酶过表达。在一些实施方案中,该核糖-5-磷酸酯酮醇-异构酶是酵母的RKI1。在某些实施方案中,该核糖-5-磷酸酯酮醇-异构酶是酿酒酵母的RKI1(NP_014738)。在一些实施方案中,该核糖-5-磷酸酯异构酶是细菌的rpi。在某些实施方案中,该核糖-5-磷酸酯异构酶是大肠杆菌的rpiA(NP_417389)。在某些实施方案中,该核糖-5-磷酸酯异构酶是大肠杆菌的rpiB(NP_418514)。在一个实施方案中,将D-核酮糖5-磷酸酯和D-木酮糖5-磷酸酯相互转化的D-核酮糖-5-磷酸3-差向异构酶过表达。在一些实施方案中,该D-核酮糖-5-磷酸酯3-差向异构酶是酵母的RPE1。在某些实施方案中,该D-核酮糖-5-磷酸酯3-差向异构酶是酿酒酵母的RPE1(NP_012414)。在一些实施方案中,该D-核酮糖-5-磷酸酯3-差向异构酶是细菌的rpe。在某些实施方案中,该D-核酮糖-5-磷酸酯3-差向异构酶是大肠杆菌的rpe(NP_417845)。

[0529] 在一个实施方案中,增加NADP+依赖性异柠檬酸脱氢酶的表达以增加辅酶的细胞内水平。在一个实施方案中,NADP+依赖性异柠檬酸脱氢酶将D-苏式-异柠檬酸酯氧化为2-氧代戊二酸,伴随NADPH的生成。在另一个实施方案中,NADP+依赖性异柠檬酸脱氢酶将D-苏式-异柠檬酸酯氧化为2-草酰琥珀酸盐酯,伴随NADPH的生成。在一些实施方案中,该NADP+依赖性异柠檬酸脱氢酶是来自酵母的IDP。在某些实施方案中,该NADP+依赖性异柠檬酸脱氢酶是来自酿酒酵母的IDP2(YLR174W)。在一些实施方案中,该NADP+依赖性异柠檬酸脱氢酶是来自细菌的icd。在某些实施方案中,该NADP+依赖性异柠檬酸脱氢酶是来自大肠杆菌的icd(NP_415654)。

[0530] 在一些实施方案中,增加将苹果酸酯脱羧为丙酮酸酯伴随生成NADH或NADPH的苹果酸酶的表达,以增加辅酶的细胞内水平。在一个实施方案中,该苹果酸酶是NAD+依赖性的。在另一个实施方案中,该苹果酸酶是NADP+依赖性的。在一个实施方案中,该苹果酸酶是来自细菌的NAD+依赖性苹果酸脱氢酶。在一些实施方案中,该NAD+依赖性苹果酸脱氢酶是来自大肠杆菌的maeA(NP_415996)。在一些实施方案中,NAD+依赖性苹果酸脱氢酶为来自干酪乳杆菌(Lactobacillus casei)的maeE(CAQ68119)。在另一个实施方案中,该苹果酸酶是来自酵母的线粒体NAD+依赖性苹果酸脱氢酶。在一些实施方案中,该NAD+依赖性苹果酸脱氢酶是来自酿酒酵母的MAE1(YKL029C)。在另一个实施方案中,该苹果酸酶是来自寄生线虫的线粒体NAD+依赖性苹果酸脱氢酶。在一些实施方案中,该NAD+依赖性苹果酸脱氢酶是来自猪蛔虫(Ascaris suum)的M81055。在一个实施方案中,该苹果酸酶是来自细菌的NADP+依赖性苹果酸脱氢酶。在一些实施方案中,该NADP+依赖性苹果酸脱氢酶是来自大肠杆菌的maeB(NP_416958)。在一个实施方案中,该苹果酸酶是来自玉米的NADP+依赖性苹果酸脱氢酶。在一些实施方案中,该NADP+依赖性苹果酸脱氢酶是来自玉米的me1。

[0531] 在一些实施方案中,增加将醛氧化为羧酸伴随生成NADH或NADPH的醛脱氢酶的表达,以增加辅酶的细胞内水平。在一个实施方案中,该醛脱氢酶是NAD+依赖性的。在另一个实施方案中,该醛脱氢酶是NADP+依赖性的。在一个实施方案中,该醛脱氢酶是来自细菌的NAD+依赖性醛脱氢酶。在一些实施方案中,该NAD+依赖性醛脱氢酶是来自大肠杆菌的aldA(NP_415933)。在另一个实施方案中,该醛脱氢酶是来自酵母的胞质NADP+依赖性醛脱氢酶。在一些实施方案中,该NADP+依赖性醛脱氢酶是来自酿酒酵母的ALD6(YPL061W)。在另一个实施方案中,该醛脱氢酶是来自细菌的胞质NADP+依赖性醛脱氢酶。在一些实施方案中,该

NADP+依赖性醛脱氢酶是来自大肠杆菌的aldB(NP_418045)。

[0532] 在一个实施方案中,过表达酶以增加辅酶的细胞内水平包括将共底物的补充和该酶的过表达偶联。在一个实施方案中,与酶共底物补充偶联的酶过表达增加了通过生物化学途径的通量。在一个实施方案中,NAD+或NADP+依赖性醇脱氢酶与共底物一起表达。在某些实施方案中,醇脱氢酶与异丙醇共底物一起表达。在一个实施方案中,NAD+或NADP+依赖性葡萄糖脱氢酶与共底物一起表达。在某些实施方案中,葡萄糖脱氢酶与葡萄糖共底物一起表达。

[0533] 在一个实施方案中,增加转氢酶的表达以将NADH和NADPH相互转化。在一些实施方案中,该转氢酶是吡啶核苷酸转氢酶。在一些实施方案中,该吡啶核苷酸转氢酶来自细菌。在某些实施方案中,该吡啶核苷酸转氢酶是来自大肠杆菌的pntAB(β亚基:NP_416119;α亚基:NP_416120)。在一些实施方案中,该吡啶核苷酸转氢酶来自人。在某些实施方案中,该吡啶核苷酸转氢酶是来自智人的NNT(NP_036475)。在某些实施方案中,该吡啶核苷酸转氢酶来自马铃薯(Solanum tuberosum)。在某些实施方案中,该吡啶核苷酸转氢酶来自菠菜(Spinacea oleracea)。

[0534] 在一些实施方案中,它可用于增加内源或外源蛋白质的表达以诱导内质网(ER)膜增殖。在一些实施方案中,内质网膜增殖的诱导可以改进脂肪醇、醛或乙酸酯的产生。在一个实施方案中,含有一个或多个ER表面环的失活HMG-CoA还原酶(羟甲基戊二酰基-CoA还原酶)的表达增加。在某些实施方案中,该一个或多个环位于失活HMG-CoA还原酶的跨膜结构域6与7之间。在一些实施方案中,该失活HMG-CoA还原酶包含编码解脂耶氏酵母YALI0E04807p的前500个氨基酸或前500个氨基酸的子序列的失活蛋白或嵌合体。在其他实施方案中,该失活HMG-CoA还原酶包含编码来自酿酒酵母(HM_013636.1)的HMG1的前522个氨基酸或前522个氨基酸的子序列的失活蛋白或嵌合体。在其他实施方案中,该失活HMG-CoA还原酶包含编码来自酿酒酵母(HM_013555.1)的HMG2的前522个氨基酸或前522个氨基酸的子序列的失活蛋白或嵌合体。在一些实施方案中,增加一种或多种调节蛋白的表达以改进脂肪醇、醛或乙酸酯的产生。在某些实施方案中,该调节蛋白包含来自酿酒酵母(NP_116622.1)的HAC1转录因子。在某些实施方案中,该调节蛋白包含来自解脂耶氏酵母(YALI0B12716p)的HAC1转录因子。

[0535] 增加的合成或累积可以通过例如编码一种或多种上述脂肪醇途径酶的核酸的过表达来实现。一种或多种脂肪醇途径酶的过表达可以例如通过增加的一个或多个内源基因的表达,或通过一个或多个外源基因的表达或增加的一个或多个外源基因的表达而发生。因此,通过过表达编码脂肪醇生物合成途径酶的一种或多种核酸分子,可以容易地修饰天然存在的生物体,以生成非天然的产生的脂肪醇微生物。此外,非天然存在的生物体可通过诱导内源基因生成,这导致脂肪醇生物合成途径中酶的活性增加。

[0536] 配备本公开文本的技术人员将能够容易地构建本文所述的重组微生物,因为本公开文本的重组微生物可以使用如上文例示的本领域公知的方法构建,以外源表达足够产生脂肪醇的量的至少一种编码脂肪醇途径酶的核酸。

[0537] 用于构建和测试非天然存在的产生脂肪醇的宿主的表达水平的方法可以例如通过本领域公知的重组和检测方法进行。此类方法可发现描述于例如Sambrook et al., Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Third Ed.,Cold Spring Harbor

Laboratory,New York(2001);Ausubo et al.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,Baltimore,Md.(1999)。

[0538] 可使用本领域已知的多种机制来表达或过表达外源或内源基因。例如,可以构建一种或多种表达载体以含有如本文所例示的一种或多种编码脂肪醇生物合成途径酶的可操作地连接至在宿主生物体中起作用的表达控制序列的核酸。适用于本发明的微生物宿主生物中的表达载体包括例如质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人工染色体,包括载体和可操作地稳定整合到宿主染色体中的选择序列或标记。

[0539] 也可以包括选择性标记基因,例如提供对抗生素或毒素的抗性,补足营养缺陷型缺陷或提供培养基中没有的关键营养素。在一些实施方案中,本公开教导了bla(细菌ampR抗性标记物)的使用。在一些实施方案中,本公开教导了URA3标记物的使用。在一些实施方案中,本公开教导了包含SUC2基因的微生物以允许在蔗糖培养基中发酵。

[0540] 表达控制序列可以包括本领域公知的组成型和诱导型启动子、转录增强子、转录终止子等。当两种或更多种外源编码核酸将被共表达时,两种核酸都可以被插入例如单个表达载体或分开的表达载体中。对于单个载体表达,编码核酸可以与一个常见的表达控制序列可操作地连接或与不同的表达控制序列连接,如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。可以使用本领域公知的方法来确认代谢或合成途径涉及的外源核酸序列的转化。

[0541] 表达控制序列在本领域中是已知的,并且包括例如提供多核苷酸序列在宿主细胞中的表达的启动子、增强子、聚腺苷酸化信号、转录终止子、内部核糖体进入位点(IRES)等。表达控制序列与转录涉及的细胞蛋白特异性地相互作用(Maniatis et al.,Science,236:1237-1245(1987))。示例性的表达控制序列描述于例如Goeddel,Gene Expression Technology:Methods in Enzymology,Vol.185,Academic Press,San Diego,Calif.(1990)。

[0542] 在各个实施方案中,表达控制序列可以可操作地连接至多核苷酸序列。“可操作地连接”意指多核苷酸序列和一个或多个表达控制序列以如下的方式连接,即在适当的分子(例如转录激活蛋白)结合到该一个或多个表达控制序列上时允许基因表达。根据转录和翻译的方向,可操作地连接的启动子位于所选多核苷酸序列的上游。可操作地连接的增强子可位于所选多核苷酸的上游、内部或下游。

[0543] 在一些实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该一种或多种内源酶催化与产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯的生物合成途径竞争的途径中的反应。

[0544] 在一些实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该一种或多种内源酶催化脂肪酸转化为ω-羟基脂肪酸。在一些这样的实施方案中,催化脂肪酸转化为ω-羟基脂肪酸的酶选自下组,该组由以下各项组成:XP_504406、XP_504857、XP_504311、XP_500855、XP_500856、XP_500402、XP_500097、XP_501748、XP_500560、XP_501148、XP_501667、XP_500273、BAA02041、CAA39366、CAA39367、BAA02210、BAA02211、BAA02212、BAA02213、BAA02214、AAO73952、AAO73953、AAO73954、AAO73955、AAO73956、AAO73958、AAO73959、AAO73960、AAO73961、AAO73957、XP_002546278、BAM49649、AAB80867、AAB17462、ADL27534、AAU24352、AAA87602、CAA34612、ABM17701、AAA25760、CAB51047、AAC82967、WP_011027348或其同系物。

[0545] 在一些实施方案中,该重组微生物经操作以缺失、破坏、突变一种或多种内源细胞色素P450单加氧酶和/或降低一种或多种内源细胞色素P450单加氧酶的活性,该种内源细胞色素P450单加氧酶选自解脂耶氏酵母YALI0E25982g(ALK1)、解脂耶氏酵母YALI0F01320g(ALK2)、解脂耶氏酵母YALI0E23474g(ALK3)、解脂耶氏酵母YALI0B13816g(ALK4)、解脂耶氏酵母YALI0B13838g(ALK5)、解脂耶氏酵母YALI0B01848g(ALK6)、解脂耶氏酵母YALI0A15488g(ALK7)、解脂耶氏酵母(Y.lipolytica)YALI0C12122g(ALK8)、解脂耶氏酵母YALI0B06248g(ALK9)、解脂耶氏酵母YALI0B20702g(ALK10)、解脂耶氏酵母YALI0C10054g(ALK11)和解脂耶氏酵母YALI0A20130g(ALK12)。

[0546] 在其他实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该一种或多种内源酶催化脂肪酰基-CoA转化为α,β-烯酰基-CoA。在一些这样的实施方案中,催化脂肪酰基-CoA转化为α,β-烯酰基-CoA的酶选自下组,该组由以下各项组成:CAA04659、CAA04660、CAA04661、CAA04662、CAA04663、CAG79214、AAA34322、AAA34361、AAA34363、CAA29901、BAA04761、AAA34891、AAB08643、CAB15271、BAN55749、CAC44516、ADK16968、AEI37634、WP_000973047、WP_025433422、WP_035184107、WP_026484842、CEL80920、WP_026818657、WP_005293707、WP_005883960或其同系物。

[0547] 在一些实施方案中,宿主微生物的一种或多种编码酰基-CoA氧化酶的基因被缺失或下调以消除或降低所希望的脂肪酰基-CoA的截短超过所希望的链长度。此类缺失或下调目标包括但不限于解脂耶氏酵母POX1(YALI0E32835g)、解脂耶氏酵母POX2(YALI0F10857g)、解脂耶氏酵母POX3(YALI0D24750g)、解脂耶氏酵母POX4(YALI0E27654g)、解脂耶氏酵母(Y.lipolytica)POX5(YALI0C23859g)、解脂耶氏酵母POX6(YALI0E06567g);酿酒酵母POX1(YGL205W);假丝酵母属POX2(Ca0l9.1655、Ca0l9.9224、CTRG_02374、M18259)、假丝酵母属POX4(Ca0l9.1652、Ca0l9.9221、CTRG_02377、M12160),假丝酵母属POX5(Ca0l9.5723、Ca0l9.13146、CTRG_02721、M12161)。

[0548] 在一些实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变涉及过氧化物酶体生物发生的一种或多种蛋白质和/或降低涉及过氧化物酶体生物发生的一种或多种蛋白质的活性。在这样的实施方案中,过氧化物酶体生物发生涉及的一种或多种蛋白质选自下组,该组由以下各项组成:XP_505754、XP_501986、XP_501311、XP_504845、XP_503326、XP_504029、XP_002549868、XP_002547156、XP_002545227、XP_002547350、XP_002546990、EIW11539、EIW08094、EIW11472、EIW09743、EIW0828或其同系物。

[0549] 在一些实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该一种或多种内源酶催化与一种或多种不饱和脂肪酰基-CoA中间体的生物合成途径竞争的途径中的反应。在一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种二酰基甘油酰基转移酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种二酰基甘油酰基转移酶和/或降低一种或多种二酰基甘油酰基转移酶的活性,该一种或多种二酰基甘油酰基转移酶选自:YALI0E32769g、YALI0D07986g和CTRG_06209或其同系物。在另一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种甘油磷脂酰基转移酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种甘油磷脂酰基转移酶和/或降低一种或多种

甘油磷脂酰基转移酶的活性,该一种或多种甘油磷脂酰基转移酶选自:YALIOE16797g和CTG_04390或其同系物。在另一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种酰基-CoA/甾醇酰基转移酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种酰基-CoA/甾醇酰基转移酶和/或降低一种或多种酰基-CoA/甾醇酰基转移酶的活性,该一种或多种酰基-CoA/甾醇酰基转移酶选自:YALIOF06578g、CTRG_01764和CTRG_01765或其同系物。

[0550] 在一些实施方案中,微生物宿主的一种或多种编码甘油-3-磷酸酯酰基转移酶(GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)、甘油磷脂酰基转移酶(GPLAT)和/或二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)的基因被缺失或下调,并被一种或多种优选储存短链脂肪酰基-CoA的GPAT、LPAAT、GPLAT或DGAT取代。此类缺失或下调目标包括但不限于解脂耶氏酵母YALIOC00209g、解脂耶氏酵母YALIOE18964g、解脂耶氏酵母YALIOF19514g、解脂耶氏酵母YALIOC14014g、解脂耶氏酵母YALIOE16797g、解脂耶氏酵母YALIOE32769g、解脂耶氏酵母YALIOD07986g、酿酒酵母YBL011w、酿酒酵母YDL052c、酿酒酵母YOR175C、酿酒酵母YPR139C、酿酒酵母YNR008w、酿酒酵母YOR245c、假丝酵母属I503_02577、假丝酵母属CTRG_02630、假丝酵母属Ca019.250、假丝酵母属Ca019.7881、假丝酵母属CTRG_02437、假丝酵母属Ca019.1881、假丝酵母属Ca019.9437、假丝酵母属CTRG_01687、假丝酵母属Ca019.1043、假丝酵母属Ca019.8645、假丝酵母属CTRG_04750、假丝酵母属Ca019.13439、假丝酵母属CTRG_04390、假丝酵母属Ca019.6941、假丝酵母属Ca019.14203和假丝酵母属CTRG_06209。

[0551] 在一些优选的实施方案中,微生物宿主的一种或多种编码酰基甘油脂肪酶(单酰基、二酰基-或三酰基甘油脂肪酶)和甾醇酯酯酶的基因被缺失或下调,并被一种或多种优选长链酰基甘油底物的酰基甘油脂肪酶取代。在一些实施方案中,被缺失或下调的一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶选自解脂耶氏酵母YALIOE32035g、解脂耶氏酵母YALIOD17534g、解脂耶氏酵母YALIOF10010g、解脂耶氏酵母YALIOC14520g、解脂耶氏酵母YALIOE00528g、酿酒酵母YKL140w、酿酒酵母YMR313c、酿酒酵母YKR089c、酿酒酵母YOR081c、酿酒酵母YKL094W、酿酒酵母YLL012W、酿酒酵母YLR020C、假丝酵母属Ca019.2050、假丝酵母属Ca019.9598、假丝酵母属CTRG_01138、假丝酵母属W5Q_03398、假丝酵母属CTRG_00057、假丝酵母属Ca019.5426、假丝酵母属Ca019.12881、假丝酵母属CTRG_06185、假丝酵母属Ca019.4864、假丝酵母属Ca019.12328、假丝酵母属CTRG_03360、假丝酵母属Ca019.6501、假丝酵母属Ca019.13854、假丝酵母属CTRG_05049、假丝酵母属Ca019.1887、假丝酵母属Ca019.9443、假丝酵母属CTRG_01683和假丝酵母属CTRG_04630。

[0552] 在另一个实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该一种或多种内源酶催化氧化脂肪醛中间体的途径中的反应。在一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种脂肪醛脱氢酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种脂肪醛脱氢酶和/或降低一种或多种脂肪醛脱氢酶的活性,该一种或多种脂肪醛脱氢酶选自:YALIOA17875g、YALIOE15400g、YALIOB01298g、YALIOF23793g、CTRG_05010和CTRG_04471或其同系物。

[0553] 在另一个实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该一种或多种内源酶催化消耗脂肪乙酸酯产物的途

径中的反应。在一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种甾醇酯酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种甾醇酯酶和/或降低一种或多种甾醇酯酶的活性,该一种或多种甾醇酯酶选自:YALI0E32035g、YALI0E00528g、CTRG_01138、CTRG_01683和CTRG_04630或其同系物。在另一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种三酰基甘油脂肪酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种三酰基甘油脂肪酶和/或降低一种或多种三酰基甘油脂肪酶的活性,该一种或多种三酰基甘油脂肪酶选自:YALI0D17534g、YALI0F10010g、CTRG_00057和CTRG_06185或其同系物。在另一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种单酰基甘油脂肪酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种单酰基甘油脂肪酶和/或降低一种或多种单酰基甘油脂肪酶的活性,该一种或多种单酰基甘油脂肪酶选自:YALI0C14520g、CTRG_03360和CTRG_05049或其同系物。在另一个实施方案中,该一种或多种内源酶包含一种或多种胞外脂肪酶。在重组酵母微生物的背景下,该重组酵母微生物被工程化以缺失、破坏、突变一种或多种胞外脂肪酶和/或降低一种或多种胞外脂肪酶的活性,该一种或多种胞外脂肪酶选自:YALI0A20350g、YALI0D19184g、YALI0B09361g、CTRG_05930、CTRG_04188、CTRG_02799、CTRG_03052和CTRG_03885或其同系物。

[0554] 在一些实施方案中,该重组微生物经操作以缺失、破坏、突变一种或多种内源酶和/或降低一种或多种内源酶的活性,该内源酶(1)在β-氧化的过程中分解脂肪酸和/或(2)在ω-氧化的过程中将ω-羟基脂肪酸氧化为脂肪酸醛或氧化为二羧酸。在一些实施方案中,该重组微生物包含以下项的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:(i)一种或多种内源酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g(POX1)、YALI0F10857g(POX2)、YALI0D24750g(POX3)、YALI0E27654g(POX4)、YALI0C23859g(POX5)、YALI0E06567g(POX6);(ii)一种或多种内源(脂肪)醇脱氢酶,选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7);和(iii)内源(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1)。

[0555] 在一些实施方案中,其中引入了用于产生C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的生物合成途径的解脂耶氏酵母微生物是H222ΔPΔA ΔFΔURA3。ΔP表示解脂耶氏酵母中酰基-CoA氧化酶基因(POX 1-6)的缺失。ΔA表示解脂耶氏酵母中(脂肪)醇脱氢酶基因(FADH,ADH 1-7)的缺失。ΔF表示解脂耶氏酵母中(脂肪)醇氧化酶基因(FAO1)的缺失。ΔURA3表示解脂耶氏酵母中URA3基因的缺失,这使得该酵母为尿嘧啶营养缺陷型。在一些实施方案中,其中引入了用于产生C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的生物合成途径的解脂耶氏酵母微生物是H222ΔPΔA ΔF。在一些实施方案中,其中引入了用于产生C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛和/或脂肪乙酸酯的生物合成途径的解脂耶氏酵母微生物是MATAura3-302::SUC2Δpox1Δpox2Δpox3Δpox4Δpox5Δpox6Δfadh ΔadhlΔadh2Δadh3Δadh4Δadh5Δadh6Δadh7Δfaol::URA3。

[0556] 酵母解脂耶氏酵母的野生型分离物,优选为菌株H222的野生型分离物,可以用作用于构建根据本公开的菌株的起始菌株。根据《国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约》,菌株H222于2013年4月29日保藏在DSMZ(Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH,D-38142Braunschweig),编号为DSM 27185。使

用菌株用于进一步的遗传加工需要选择标记物。此选择标记物可以以本身已知的方式,例如以尿嘧啶营养缺陷型的形式,引入菌株中。可替换地,可以使用已知的尿嘧啶营养缺陷型菌株,优选是菌株H222-S4(Mauersberger S,Wang HJ,Gaillard in C,Barth G&Nicaud JM (2001)J Bacterial 183:5102-5109)。根据Barth和Gaillardin(Barth G&Gaillardin C (1996)Yarrowia lipolytica.Springer-Verlag,Berlin,Heidelberg,New York),通过PCR或限制性获得相应的缺失盒(例如POX 1-6、FADH、ADH 1-7、FAO1),并转化进解脂耶氏酵母H222-S4,其可从解脂耶氏酵母H222产生(Mauers-berger等(2001))。在WO 2015/086684(其通过提述以其整体并入本文)中描述了H222ΔPΔAΔFΔURA3的创建。解脂耶氏酵母菌株H222ΔPΔAΔFΔURA3用作用于引入本公开中的去饱和酶和还原酶的起始微生物(参见,例如,实施例7、9和10)。

[0557] 在另一个实施方案中,该重组微生物被操纵以缺失、破坏、突变一种或多种内源还原酶或去饱和酶和/或降低一种或多种内源还原酶或去饱和酶的活性,该一种或多种内源还原酶或去饱和酶干扰不饱和C_6-C_{24}脂肪醇、脂肪醛或脂肪乙酸酯,即,催化一种途径底物或产物转化为不想要的副产物。

[0558] 微生物合成产物的化学转化

[0559] 本公开文本描述了可用于将由重组微生物合成的产物转化为下游产物的化学转化。

[0560] 在一些实施方案中,由微生物产生的不饱和脂肪醇、脂肪醛、脂肪乙酸酯或脂肪羧酸可经历随后的化学转化以产生信息素、香料、调味剂、聚合物或聚合物中间体。化学转化的非限制性例子包括酯化、易位和聚合。

[0561] 不饱和脂肪羧酸可以通过本领域已知的方法酯化。例如,可使用费舍尔(Fischer)酯化来将脂肪羧酸转化为相应的脂肪酸酯。参见例如Komura,K.et al.,Synthesis 2008.3407-3410。

[0562] 碳链的延长可以通过已知方法进行,以将不饱和脂肪醇转化为其延长的衍生物。可以使用烯烃易位催化剂以增加脂肪碳链上的碳原子数目并赋予相应的不饱和产物的Z或E立体化学。

[0563] 在一些实施方案中,复分解催化剂是钨复分解催化剂、钼复分解催化剂或钌复分解催化剂。在某些实施方案中,复分解催化剂是钨催化剂或钼催化剂。在本发明采用的催化剂通常采用可介导特定期望的化学反应的金属。通常,任何过渡金属(例如,具有d个电子)可以用于形成催化剂,例如,选自元素周期表的第3-12族之一或来自镧系元素的金属。在一些实施方案中,该金属选自第3-8族,或在一些情况下,选自第4-7族。在一些实施方案中,该金属选自第6族。术语“第6族”是指包含铬、钼和钨的过渡金属族。此外,本发明还可包括形成含有这些元素形式的非均相催化剂(例如,通过将金属络合物固定在不溶性底物,例如二氧化硅上)。

[0564] 通常,在本公开文本中可以使用在反应条件下稳定且不与脂肪底物(例如醇、酯、羧酸、醛或乙酸酯)上的官能团反应的任何易位催化剂。此类催化剂是例如通过引用以全部内容并入本文的Grubbs(Grubbs,R.H.,“Synthesis of large and small molecules using olefin metathesis catalysts.”PMSE Prepr.,2012)所述的那些。依赖于所希望的烯烃异构体,可以使用顺式选择性易位催化剂,例如通过引用以全部内容并入本文的

Shahane等人(Shahane,S.,et al.ChemCatChem,2013.5(12):p.3436-3459)中描述的那些中的一种。展现出顺式选择性的催化剂先前已经描述过(Khan,R.K.,et al.J.Am.Chem.Soc.,2013.135(28):p.10258-61;Hartung,J.et al.J.Am.Chem.Soc.,2013.135(28):p.10183-5.;Rosebrugh,L.E.,et al.J.Am.Chem.Soc.,2013.135(4):p.1276-9.;Marx,V.M.,et al.J.Am.Chem.Soc.,2013.135(1):p.94-7.;Herbert,M.B.,et al.Angew.Chem.Int.Ed.Engl.,2013.52(1):p.310-4;Keitz,B.K.,et al.J.Am.Chem.Soc.,2012.134(4):p.2040-3.;Keitz,B.K.,et al.J.Am.Chem.SOC.,2012.134(1):p.693-9.;Endo,K.et al.J.Am.Chem.Soc.,2011.133(22):p.8525-7)。

[0565] 另外的Z选择性催化剂描述于(Cannon and Grubbs 2013;Bronner et al.2014;Hartung et al.2014;Pribisko et al.2014;Quigley and Grubbs 2014),并且通过引用以全部内容并入本文。由于其优异的稳定性和官能团耐受性,在一些实施方案中,易位催化剂包括但不限于具有形式上处于+2氧化态的金属中心、电子数为16、为五配位并且具有通式LL′AA′M=CRbRc或LL′AA′M=(C-)nCRbRc的中性钌或锇金属碳烯络合物(Pederson和Grubbs 2002);其中

[0566] M是钌或锇;

[0567] L和L'各自独立地为任何中性电子供体配体并且选自膦、磺化膦、亚磷酸酯、次膦酸酯、亚膦酸酯(phosphonite)、胂、辉锑矿、醚、胺、酰胺、亚胺、亚砜、羧基、亚硝酰基、吡啶、硫醚或杂环碳烯;并且

[0568] A和A'是独立地选自以下项的阴离子配体:卤素、氢、C_1-C_{20}烷基、芳基、C_1-C_{20}醇盐、芳基酚盐、C_2-C_{20}烷氧基羰基、芳基羧酸酯、C_1-C_{20}羧酸酯、芳基磺酰基、C_1-C_{20}烷基磺酰基、C_1-C_{20}烷基亚硫酰基;每个配体任选地被以下项取代:C_1-C_5烷基、卤素、C_1-C_5烷氧基;或被苯基取代,该苯基任选被卤素、C_1-C_5烷基或C_1-C_5烷氧基取代;并且A和A'一起可以任选地包含双齿配体;并且

[0569] R_b和R_c独立地选自氢、C_1-C_{20}烷基、芳基、C_1-C_{20}羧酸酯、C_1-C_{20}烷氧基、芳氧基、C_1-C_{20}烷氧基羰基、C_1-C_{20}烷硫基、C_1-C_{20}烷基磺酰基以及C_1-C_{20}烷基亚硫酰基,R_b和R_c中每个任选地被C_1-C_5烷基、卤素、C_1-C_5烷氧基或被苯基取代,该苯基任选被卤素、C_1-C_5烷基、或C_1-C_5烷氧基取代。

[0570] 也可使用其他易位催化剂,如"明确定义的催化剂"。此类催化剂包括但不限于由Grubbs et al.(Tetrahedron 1998,54:4413-4450)描述的施罗克(Schrock)钼易位催化剂2,6-二异丙基苯基亚氨基新植二烯双(六氟叔丁醇)钼(VI)和由Couturier,J.L.et al.(Angew.Chem.Int.Ed.Engl.1992,31:628)描述的巴塞特(Basset)钨易位催化剂。

[0571] 在本公开文本的方法中有用的催化剂还包括由以下描述的那些:美国专利号9,776,179、Peryshkov,et al.J.Am.Chem.Soc.2011,133:20754-20757;Wang,et al.Angewandte Chemie,2013,52:1939-1943;Yu,et al.J.Am.Chem.Soc.,2012,134:2788-2799;Halford.Chem.Eng.News,2011,89(45):11;Yu,et al.Nature,2011,479:88-93;Lee.Nature,2011,471:452-453;Meek,et al.Nature,2011:471,461-466;Flook,et al.J.Am.Chem.Soc.2011,133:1784-1786;Zhao,et al.Org Lett.,2011,13(4):784-787;Ondi,et al."High activity,stabilized formulations,efficient synthesis and industrial use of Mo-and W-based metathesis catalysts"XiMo Technology

Updates,2015:http://www.ximo-inc.com/files/ximo/uploads/download/Summary_3.11.15.pdf;Schrock,et al.Macromolecules,2010:43,7515-7522;Peryshkov,et al.Organometallics 2013:32,5256-5259;Gerber,et al.Organometallics 2013:32,5573-5580;Marinescu,et al.Organometallics 2012:31,6336-6343;Wang,et al.Angew.Chem.Int.Ed.2013:52,1939-1943;Wang,et al.Chem.Eur.J.2013:19,2726-2740;以及Townsend et al.J.Am.Chem.Soc.2012:134,11334-11337。

[0572] 在本公开文本的方法中有用的催化剂还包括以下项中描述的那些:国际公开号WO 2014/155185;国际公开号WO 2014/172534;美国专利申请公开号2014/0330018;国际公开号WO 2015/003815;以及国际公开号WO 2015/003814。

[0573] 在本公开文本的方法中有用的催化剂还包括以下项中描述的那些:美国专利号4,231,947;美国专利号4,245,131;美国专利号4,427,595;美国专利号4,681,956;美国专利号4,727,215;国际公开号WO 1991/009825;美国专利号5,0877,10;美国专利号5,142,073;美国专利号5,146,033;国际公开号WO 1992/019631;美国专利号6,121,473;美国专利号6,346,652;美国专利号8,987,531;美国专利申请公开号2008/0119678;国际公开号WO 2008/066754;国际公开号WO 2009/094201;美国专利申请公开号2011/0015430;美国专利申请公开号2011/0065915;美国专利申请公开号2011/0077421;国际公开号WO 2011/040963;国际公开号WO 2011/097642;美国专利申请公开号2011/0237815;美国专利申请公开号2012/0302710;国际公开号WO 2012/167171;美国专利申请公开号2012/0323000;美国专利申请公开号2013/0116434;国际公开号WO 2013/070725;美国专利申请公开号2013/0274482;美国专利申请公开号2013/0281706;国际公开号WO 2014/139679;国际公开号WO 2014/169014;美国专利申请公开号2014/0330018;以及美国专利申请公开号2014/0378637。

[0574] 在本公开文本的方法中有用的催化剂还包括以下项中描述的那些:国际公开号WO 2007/075427;美国专利申请公开号2007/0282148;国际公开号WO 2009/126831;国际公开号WO 2011/069134;美国专利申请公开号2012/0123133;美国专利申请公开号2013/0261312;美国专利申请公开号2013/0296511;国际公开号WO 2014/134333;以及美国专利申请公开号2015/0018557。

[0575] 在本公开文本的方法中有用的催化剂还包括以下项中描述的那些:美国专利申请公开号2008/0009598;美国专利申请公开号2008/0207911;美国专利申请公开号2008/0275247;美国专利申请公开号2011/0040099;美国专利申请公开号2011/0282068;以及美国专利申请公开号2015/0038723。

[0576] 在本公开文本的方法中有用的催化剂包括以下项中描述的那些:国际公开号WO 2007/140954;美国专利申请公开号2008/0221345;国际公开号WO 2010/037550;美国专利申请公开号2010/0087644;美国专利申请公开号2010/0113795;美国专利申请公开号2010/0174068;国际公开号WO 2011/091980;国际公开号WO 2012/168183;美国专利申请公开号2013/0079515;美国专利申请公开号2013/0144060;美国专利申请公开号2013/0211096;国际公开号WO 2013/135776;国际公开号WO 2014/001291;国际公开号WO 2014/067767;美国专利申请公开号2014/0171607;以及美国专利申请公开号2015/0045558。

[0577] 典型地,在反应混合物中以亚化学计量的量(例如,催化量)提供催化剂。在某些实施方案中,关于化学反应的限制试剂,该量在约0.001mol％至约50mol％的范围内,其取决

于哪种试剂处于化学计量过量。在一些实施方案中,该催化剂以相对于限制试剂的小于或等于约40mol％存在。在一些实施方案中,该催化剂以相对于限制试剂的小于或等于约30mol％存在。在一些实施方案中,该催化剂以相对于限制试剂的小于约20mol％、小于约10mol％、小于约5mol％、小于约2.5mol％、小于约1mol％、小于约0.5mol％、小于约0.1mol％、小于约0.015mol％、小于约0.01mol％、小于约0.0015mol％或更小存在。在一些实施方案中,该催化剂以相对于限制试剂的约2.5mol％至约5mol％的范围存在。在一些实施方案中,该反应混合物含有约0.5mol％催化剂。在催化剂络合物的分子式包括多于一种金属的情况下,可以相应地调整反应中使用的催化剂络合物的量。

[0578] 在一些情况下,本文所述的方法可以在不存在溶剂(例如,不掺水)的情况下进行。在一些情况下,这些方法可包括使用一种或多种溶剂。可适用于本公开文本的溶剂的例子包括但不限于苯、对甲酚、甲苯、二甲苯、二乙醚、乙二醇、二乙醚、石油醚、己烷、环己烷、戊烷、二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、二噁烷、四氢呋喃(THF)、二甲亚砜、二甲基甲酰胺、六甲基磷酸三酰胺、乙酸乙酯、吡啶、三乙胺、皮考啉等,以及其混合物。在一些实施方案中,该溶剂选自苯、甲苯、戊烷、二氯甲烷和THF。在某些实施方案中,该溶剂是苯。

[0579] 在一些实施方案中,该方法在减压下进行。在易位反应过程中可能产生挥发性副产物如乙烯的情况下,这可能是有利的。例如,从反应容器中除去乙烯副产物可有利地使易位反应的平衡转向形成所希望的产物。在一些实施方案中,该方法在约小于760托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于700托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于650托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于600托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于550托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于500托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于450托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于400托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于350托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于300托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于250托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于200托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于150托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于100托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于90托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于80托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于70托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于60托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于50托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于40托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于30托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约小于20托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约20托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约10托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约10托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在约1托的压力下进行。在一些实施方案中,该方法在小于约1托的压力下进行。

[0580] 在一些实施方案中,两种易位反应物以等摩尔量存在。在一些实施方案中,两种易位反应物不以等摩尔量存在。在某些实施方案中,两种反应物按以下摩尔比率存在:约20:1、19:1、18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、或1:20。在某些实施方案中,两种反应物以约10:1的摩尔比存在。在某

些实施方案中,两种反应物以约7:1的摩尔比存在。在某些实施方案中,两种反应物以约5:1的摩尔比存在。在某些实施方案中,两种反应物以约2:1的摩尔比存在。在某些实施方案中,两种反应物以约1:10的摩尔比存在。在某些实施方案中,两种反应物以约1:7的摩尔比存在。在某些实施方案中,两种反应物以约1:5的摩尔比存在。在某些实施方案中,两种反应物以约1:2的摩尔比存在。

[0581] 通常,用本文公开的许多易位催化剂进行的反应提供的产率优于15%、优于50%、优于75%或优于90%。另外,选取反应物和产物以提供沸点上至少5℃的差异、大于20℃的差异或大于40℃的差异。此外,使用易位催化剂使得产物形成比副产物更快,尽可能快地运行这些反应是理想的。具体而言,以少于约24小时、少于12小时、少于8小时、或少于4小时进行反应。

[0582] 本领域技术人员将会理解,时间、温度和溶剂可以相互依赖,并且在本公开文本的方法中改变一者可能需要改变其他的,以制备拟除虫菊酯产物和中间体。易位步骤可以在多个温度和时间下进行。通常,本公开文本的方法中的反应使用几分钟到几天的反应时间进行。例如,可以使用约12小时至约7天的反应时间。在一些实施方案中,可以使用1-5天的反应时间。在一些实施方案中,可以使用约10分钟至约10小时的反应时间。通常,本公开文本的方法中的反应在约0℃至约200℃的温度进行。例如,反应可以在15℃-100℃下进行。在一些实施方案中,反应可以在20℃-80℃下进行。在一些实施方案中,反应可以在100℃-150℃下进行。

[0583] 可以使用合适的还原剂还原不饱和脂肪酸酯,该还原剂可将该酯选择性还原为相应的醛或醇,但不会还原双键。使用二异丁基卤化铝(DIBAL)或Vitride®可将不饱和脂肪酸酯还原为相应的不饱和脂肪醛。可用例如DIBAL或Vitride®将不饱和脂肪醛还原为相应的脂肪醇。在一些实施方案中,可使用AlH_3或9-硼杂双环(3.3.1)壬烷(9-BBN)将不饱和脂肪酸酯还原为相应的脂肪醇。(参见Galatis,P.Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis.2001.New York:John Wiley&Sons;以及Carey&Sunderburg.Organic Chemistry,Part B:Reactions and Synthesis,5th edition.2007.New York.Springer Sciences)。

[0584] 信息素组合物及其用途

[0585] 如上所述,通过本文描述的方法制备的产品是信息素。可以配制根据本发明的方法制备的信息素用作昆虫控制组合物。该信息素组合物可以包括载体,和/或含在分配器中。该载体可以是但不限于惰性液体或固体。

[0586] 固体载体的例子包括但不限于填充剂如高岭土、膨润土、白云石、碳酸钙、滑石、氧化镁粉、富勒土、蜡、石膏、硅藻土、橡胶、塑料、瓷土,矿物土如二氧化硅、硅胶、硅酸盐、粘土、石灰石、白垩、黄土、粘土、白云石、硫酸钙、硫酸镁、氧化镁、磨碎的合成材料,肥料如硫酸铵、磷酸铵、硝酸铵、硫脲和尿素,植物来源的产物如谷物粉、树皮粉、木粉和坚果壳粉,纤维素粉,绿坡缕石,蒙脱土,云母,蛭石,合成二氧化硅和合成硅酸钙,或这些的组合物。

[0587] 液体载体的实例包括但不限于水;醇,如乙醇、丁醇或二醇,以及它们的醚或酯,如甲基乙二醇乙酸酯;酮,如丙酮、环己酮、甲基乙基酮、甲基异丁基酮或异佛尔酮;烷烃,如己烷、戊烷或庚烷;芳族烃,如二甲苯或烷基萘;矿物油或植物油;脂族氯化烃,如三氯乙烷或二氯甲烷;芳香族氯化烃,如氯苯;水溶性或强极性溶剂,如二甲基甲酰胺、二甲亚砜或N-甲

基吡咯烷酮;液化气体;蜡,如蜂蜡、羊毛脂、紫胶蜡、巴西棕榈蜡、果蜡(如杨梅或甘蔗蜡)、小烛树蜡,其他蜡如微晶、地蜡、矿蜡或褐煤蜡;盐,如单乙醇胺盐、硫酸钠、硫酸钾、氯化钠、氯化钾、乙酸钠、硫酸氢铵、氯化铵、乙酸铵、甲酸铵、草酸铵、碳酸铵、碳酸氢铵、硫代硫酸铵、二磷酸氢铵、单磷酸二氢铵、磷酸氢铵钠、硫氰酸铵、氨基磺酸铵或氨基甲酸铵、及其混合物。也可以将诱饵或摄食刺激剂添加到载体中。

[0588] 增效剂

[0589] 在一些实施方案中,该信息素组合物与活性化学试剂组合,从而产生协同效应。可以根据Colby公式(即(E)=X+Y-(X*Y/100))来量化由所传授的方法获得的协同效应。参见Colby,R.S.,"Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations",1967Weeds,vol.15,pp.20-22,通过引用将其全部内容并入本文。因此,"协同"是指由于其存在而将所希望的效果增加超过加和量的组分。本发明方法的信息素组合物和佐剂可以协同增加农业活性化合物以及农业辅助化合物的有效性。

[0590] 因此,在一些实施方案中,可以用增效剂配制信息素组合物。如本文所用,术语"增效剂"是指可与信息素一起使用的物质,来减少用于吸引至少一个昆虫物种的信息素剂量的量或增强信息素有效性。在没有信息素的情况下,增效剂可能是也可能不是昆虫的独立引诱剂。

[0591] 在一些实施方案中,该增效剂是吸引至少一个鳞翅目物种的挥发性植物化学物质。如本文所用,术语"植物化学物质"意指在植物物种中天然存在的化合物。在具体的实施方案中,该增效剂选自β-石竹烯、异石竹烯、α-律草烯、里哪醇、Z3-己烯醇基乙酸酯、β-法呢烯、苯甲醛、苯乙醛及其组合。

[0592] 该信息素组合物可以含有混合或其他组合形式的信息素和增效剂,或者它可以独立地含有处于非混合形式的信息素和增效剂。

[0593] 杀昆虫剂

[0594] 该信息素组合物可以包括一种或多种杀昆虫剂。在一个实施方案中,这些杀昆虫剂是本领域技术人员已知的化学杀昆虫剂。化学杀昆虫剂的例子包括以下项中的一种或多种:拟除虫菊酯或有机磷杀昆虫剂,包括但不限于氟氯氰菊酯、氯菊酯、氯氰菊酯、联苯菊酯(bifinthrin)、氰戊菊酯、氟氰菊酯、谷硫磷、甲基对硫磷、噻嗪酮、吡丙醚、氟啶虫酰胺、啶虫脒、呋虫胺、可尼丁、高灭磷、马拉硫磷、喹诺磷、氯吡磷、丙硫磷、苯二烃、双氰菊酯、毒死蜱、氟氯氰菊酯、噻嗪农、除虫菊酯、甲氰菊酯、烯虫炔酯、杀虫皂或油、新烟碱类、二酰胺类、阿维菌素及其衍生物、多杀菌素及其衍生物、印楝素、啶虫丙醚(pyridalyl)、及其混合物。

[0595] 在另一个实施方案中,这些杀昆虫剂是本领域技术人员已知的一种或多种生物杀昆虫剂。生物杀昆虫剂的例子包括但不限于印楝素(印楝油(neem oil))、来自天然除虫菊酯的毒素,苏云金芽孢杆菌和球孢白僵菌、病毒(例如,CYD-X™、CYD-X HP™、Germstar™、Madex HP™和Spod-X™)、肽(Spear-T™、Spear-P™和Spear-C™)

[0596] 在另一个实施方案中,这些杀昆虫剂是靶向神经和肌肉的杀昆虫剂。例子包括:乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制剂(如氨基甲酸酯(例如,灭多威和硫双灭多威)和有机磷酸酯(例如,毒死蜱)GABA-门控氯通道拮抗剂,如环二烯有机氯(例如,硫丹)和苯基吡唑(例如,氟虫腈)),钠通道调节剂(如除虫菊酯和拟除虫菊酯(例如,氯氰菊酯和λ-三氯氟氰菊酯)),烟碱乙酰胆碱受体(nAChR)激动剂(如新烟碱类(例如,啶虫脒、噻虫啉、噻虫嗪)),烟碱乙酰胆碱

受体(nAChR)变构调节剂(如多杀菌素(例如,spinose和乙基多杀菌素(spinetoram)),氯化物通道活化剂(如阿维菌素和米尔倍霉素(例如,阿维菌素、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐)),烟碱乙酰胆碱受体(nAChR)阻断剂(如杀虫磺和杀螟丹),电压依赖性钠通道阻断剂(如茚虫威和氰氟虫胺),兰尼碱受体调节剂(如二酰胺(例如,氯虫苯甲酰胺和氟虫双酰胺))。在另一个实施方案中,这些杀昆虫剂是靶向呼吸的杀昆虫剂。例子包括通过破坏质子梯度使氧化磷酸化解偶联的化学物质,如溴虫腈和线粒体复合物I电子传递抑制剂。

[0597] 在另一个实施方案中,这些杀昆虫剂是靶向中肠的杀昆虫剂。例子包括昆虫的中肠膜的微生物干扰者,如苏云金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌(Bacillus sphaericus)。

[0598] 在另一个实施方案中,这些杀昆虫剂是靶向生长和发育的杀昆虫剂。例子包括保幼激素模拟物(如保幼激素类似物(例如,苯氧威)),几丁质生物合成抑制剂(0型,如苯甲酰脲(例如,氟虫脲、氟苯脲和诺瓦龙)),以及蜕皮激素受体激动剂(如二酰肼(例如,甲氧虫酰肼和虫酰肼))。

[0599] 稳定剂

[0600] 根据本公开文本的另一个实施方案,该信息素组合物可包括一种或多种增强该组合物的稳定性的添加剂。添加剂的例子包括但不限于脂肪酸和植物油,如例如橄榄油、大豆油、玉米油、红花油、芥花油及其组合。

[0601] 填充剂

[0602] 根据本公开文本的另一个实施方案,该信息素组合物可以包括一种或多种填充剂。填充剂的例子包括但不限于一种或多种矿物粘土(例如,绿坡缕石)。在一些实施方案中,该引诱剂-组合物可以包括一种或多种有机增稠剂。这种增稠剂的例子包括但不限于甲基纤维素、乙基纤维素及其任何组合。

[0603] 溶剂

[0604] 根据另一个实施方案,本公开文本的信息素组合物可以包括一种或多种溶剂。当使用者采用液体组合物时,理想的是含有溶剂的组合物,可以通过刷涂、浸涂、滚涂、喷涂或以其他方式将液体组合物施加到用户希望提供信息素涂层(例如,诱饵)的底物上。在一些实施方案中,选择要使用的一种或多种溶剂以增溶或基本增溶该信息素组合物的一种或多种成分。溶剂的例子包括但不限于水、水性溶剂(例如,水和乙醇的混合物)、乙醇、甲醇、氯化烃、石油溶剂、松节油、二甲苯及其任何组合。

[0605] 在一些实施方案中,本公开文本的信息素组合物包含有机溶剂。有机溶剂主要用于配制可乳化浓缩物、ULV配制品,并且在较小程度上用于配制粒状配制品。有时使用溶剂的混合物。在一些实施方案中,本公开文本传授使用包括脂族石蜡油如煤油或精制石蜡的溶剂。在其他实施方案中,本公开文本传授使用芳族溶剂,如二甲苯以及C9和C10芳族溶剂的更高分子量级分。在一些实施方案中,当该配制品被乳化成水时,氯化烃可用作共溶剂以防止结晶。醇有时被用作共溶剂来增加溶剂的能力。

[0606] 增溶剂

[0607] 在一些实施方案中,本公开文本的信息素组合物包含增溶剂。增溶剂是一种表面活性剂,它将在浓度高于临界胶束浓度时在水中形成胶束。然后胶束能够在该胶束的疏水部分内部溶解或增溶不溶于水的物质。通常用于增溶的表面活性剂的类型为非离子表面活性剂:脱水山梨醇单油酸酯;脱水山梨醇单油酸酯乙氧基化物;和油酸甲酯。

[0608] 粘合剂

[0609] 根据本公开文本的另一个实施方案,该信息素组合物可以包括一种或多种粘合剂。可使用粘合剂来促进该信息素组合物与涂覆了所述组合物的材料表面的缔合。在一些实施方案中,可使用粘合剂来促进另一种添加剂(例如杀昆虫剂、昆虫生长调节剂等)与该信息素组合物和/或材料表面的缔合。例如,粘合剂可以包括典型地用于油漆和涂层的合成或天然树脂。这些可以被修饰以使涂覆的表面足够脆弱以允许昆虫咬掉并摄入该组合物的组分(例如,杀昆虫剂、昆虫生长调节剂等),同时仍保持涂层的结构完整性。

[0610] 粘合剂的非限制性例子包括聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、部分水解的聚乙酸乙烯酯、羧甲基纤维素、淀粉、乙烯基吡咯烷酮/乙酸乙烯酯共聚物和聚乙酸乙烯酯、或这些的组合物;润滑剂,如硬脂酸镁、硬脂酸钠、滑石或聚乙二醇、或这些的组合物;消泡剂(如硅酮乳液、长链醇、磷酸酯、乙炔二醇、脂肪酸或有机氟化合物)以及络合剂(如:乙二胺四乙酸(EDTA)盐、三硝基三乙酸盐或多磷酸盐、或者这些的组合物)。

[0611] 在一些实施方案中,该粘合剂还起到填充剂和/或增稠剂的作用。此类粘合剂的例子包括但不限于以下项中的一种或多种:虫胶、丙烯酸树脂、环氧树脂、醇酸树脂、聚氨酯、亚麻籽油、桐油及其任何组合。

[0612] 表面活性剂

[0613] 在一些实施方案中,该信息素组合物包含表面活性剂。在一些实施方案中,向液态农业组合物中添加该表面活性剂。在其他实施方案中,将该表面活性剂添加到固体配制品中,尤其是设计成在施用前用载体稀释的那些。因此,在一些实施方案中,该信息素组合物包含表面活性剂。有时使用表面活性剂,无论是单独使用还是与其他添加剂(如矿物油或植物油,作为喷雾罐混合物的佐剂)一起使用,以改进该信息素对靶标的生物学性能。表面活性剂可以是阴离子型、阳离子型或非离子型,并且可用作乳化剂、润湿剂、悬浮剂或其他目的。在一些实施方案中,该表面活性剂是非离子型的,如:烷基乙氧基化物、直链脂肪醇乙氧基化物和脂族胺乙氧基化物。常规用于配制品领域并且也可用于本发明配制品的表面活性剂描述于McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual,MC Publishing Corp.,Ridgewood,N.J.,1998,and in Encyclopedia of Surfactants,Vol.I-III,Chemical Publishing Co.,New York,1980-81。在一些实施方案中,本公开文本传授使用表面活性剂,该表面活性剂包括芳族磺酸(例如木质素磺酸、苯酚磺酸、萘磺酸和二丁基萘磺酸)的碱金属盐、碱土金属盐或铵盐,以及芳基磺酸酯的脂肪酸、烷基醚、月桂基醚、脂肪醇硫酸酯和脂肪醇乙二醇醚硫酸酯的碱金属盐、碱土金属盐或铵盐,磺化萘及其衍生物与甲醛的缩合物,萘或萘磺酸与苯酚和甲醛的缩合物,苯酚或苯酚磺酸与甲醛的缩合物,苯酚与甲醛和亚硫酸钠的缩合物,聚氧乙烯辛基苯基醚,乙氧基化的异辛基苯酚、辛基苯酚或壬基苯酚,三丁基苯基聚乙二醇醚,烷基芳基聚醚醇,异十三烷基醇,乙氧基化蓖麻油,乙氧基化三芳基苯酚,磷酸化三芳基苯酚乙氧基化物盐,月桂醇聚乙二醇醚乙酸酯,山梨醇酯,木质素-亚硫酸盐废液或甲基纤维素,或这些的组合物。

[0614] 在一些实施方案中,本公开文本传授了其他合适的表面活性剂,包括烷基硫酸盐,如月桂基硫酸二乙醇铵;烷基芳基磺酸盐,如十二烷基苯磺酸钙;烷基苯酚-氧化烯加成产物,如乙氧基化壬基苯酚-C18;醇-氧化烯加成产物,如乙氧基化十三烷醇-C16;皂,如硬脂酸钠;烷基萘磺酸盐,如二丁基-萘磺酸钠;磺基琥珀酸盐的二烷基酯,如二(2-乙基己基)磺

基琥珀酸钠;山梨醇酯,如山梨醇油酸酯;季胺,如月桂基三甲基氯化铵;脂肪酸的聚乙二醇酯,如聚乙二醇硬脂酸酯;环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物;单和二烷基磷酸酯的盐;植物油,如大豆油、菜籽油/芥花油、橄榄油、蓖麻油、葵花籽油、椰子油、玉米油、棉籽油、亚麻籽油、棕榈油、花生油、红花油、芝麻油、桐油等;以及上述植物油的酯,特别是甲酯。

[0615] 润湿剂

[0616] 在一些实施方案中,该信息素组合物包含润湿剂。润湿剂是当添加到液体中时,通过降低液体与其铺展的表面之间的界面张力来增加该液体的铺展力或渗透力的一种物质。润湿剂用于农业化学配制品中的两个主要功能:在加工和生产过程中,用于增加粉末在水中的润湿速率,以便为可溶性液体或悬浮浓缩物制备浓缩物;并且在产物与水在喷雾罐或其他容器中混合期间,用以减少可湿性粉剂的润湿时间并改进水向水分散性颗粒的渗透。在一些实施方案中,用于本公开文本的信息素组合物(包括可湿性粉剂、悬浮浓缩物和水分散性颗粒配制品)中的润湿剂的例子是:月桂基硫酸钠;二辛基磺基琥珀酸钠;烷基苯酚乙氧基化物;和脂肪醇乙氧基化物。

[0617] 分散剂

[0618] 在一些实施方案中,本公开文本的信息素组合物包含分散剂。分散剂是吸附在颗粒表面并有助于保持颗粒分散状态并防止它们重新聚集的物质。在一些实施方案中,将分散剂添加到本公开文本的信息素组合物中以促进制造过程中的分散和悬浮,并确保颗粒再分散到喷雾罐中的水中。在一些实施方案中,分散剂用于可湿性粉剂、悬浮浓缩物和水分散性颗粒剂中。用作分散剂的表面活性剂具有强力吸附到颗粒表面的能力,并为颗粒的重新聚集提供带电屏障或空间屏障。在一些实施方案中,最常用的表面活性剂是阴离子型、非离子型或两种类型的混合物。

[0619] 在一些实施方案中,对于可湿性粉剂配制品,最常见的分散剂是木质素磺酸钠。在一些实施方案中,悬浮浓缩物使用聚电解质如萘磺酸钠甲醛缩合物提供非常好的吸附和稳定性。在一些实施方案中,还使用三苯乙烯基苯酚乙氧基化磷酸酯。在一些实施方案中,如烷基芳基环氧乙烷缩合物和EO-PO嵌段共聚物有时与阴离子表面活性剂组合作为悬浮浓缩物的分散剂。

[0620] 聚合物表面活性剂

[0621] 在一些实施方案中,本公开文本的信息素组合物包含聚合物表面活性剂。在一些实施方案中,该聚合物表面活性剂具有非常长的疏水“主链”和大量形成“梳子”表面活性剂的“齿”的环氧乙烷链。在一些实施方案中,这些高分子量聚合物可以为悬浮浓缩物给出非常好的长期稳定性,因为疏水性主链在颗粒表面上具有许多锚定点。在一些实施方案中,本公开文本的信息素组合物中使用的分散剂的例子是:木质素磺酸钠;萘磺酸钠甲醛缩合物;三苯乙烯基苯酚乙氧基化物磷酸酯;脂肪醇乙氧基化物;烷基乙氧基化物;EO-PO嵌段共聚物;和接枝共聚物。

[0622] 乳化剂

[0623] 在一些实施方案中,本公开文本的信息素组合物包含乳化剂。乳化剂是一种物质,它可以稳定一种液相的液滴在另一种液相中的悬浮液。如果没有乳化剂,两种液体会分离成两个不混溶的液体相。在一些实施方案中,最常用的乳化剂共混物包括具有12个或更多个环氧乙烷单元的烷基苯酚或脂肪醇和十二烷基苯磺酸的油溶性钙盐。亲水-亲油平衡

("HLB")值范围为8至18,一般会提供良好的稳定乳液。在一些实施方案中,乳液稳定性有时可通过添加少量EO-PO嵌段共聚物表面活性剂来改进。

[0624] 胶凝剂

[0625] 在一些实施方案中,该信息素组合物包含胶凝剂。增稠剂或胶凝剂主要用于配制悬浮浓缩物、乳液和悬乳液,以修饰液体的流变性或流动性并防止分散的颗粒或液滴沉降。增稠剂、胶凝剂和抗沉降剂通常分为两类,即水不溶性微粒和水溶性聚合物。可以使用粘土和二氧化硅生产悬浮浓缩物配制品。在一些实施方案中,该信息素组合物包含一种或多种增稠剂,包括但不限于:蒙脱土,例如膨润土;硅酸铝镁;和绿坡缕石。在一些实施方案中,本公开文本传授使用多糖作为增稠剂。最常用的多糖类型是种子和海藻的天然萃取物或纤维素的合成衍生物。一些实施方案利用黄原胶,并且一些实施方案利用纤维素。在一些实施方案中,本公开文本传授使用增稠剂,包括但不限于:瓜尔胶;刺槐豆胶;角叉菜胶;藻酸酯;甲基纤维素;羧甲基纤维素钠(SCMC);羟乙基纤维素(HEC)。在一些实施方案中,本公开文本传授使用其他类型的抗沉降剂,如改性淀粉、聚丙烯酸酯、聚乙烯醇和聚环氧乙烷。另一种好的抗沉降剂是黄原胶。

[0626] 消泡剂

[0627] 在一些实施方案中,降低界面张力的表面活性剂的存在会导致水基配配制品在生产中的混合操作过程中起泡和通过喷雾罐施用时起泡。因此,在一些实施方案中,为了减少起泡趋势,通常在生产阶段中或在灌装到瓶/喷雾罐中之前添加消泡剂。一般来说,有两种类型的消泡剂,即硅酮和非硅酮。硅酮通常是二甲基聚硅氧烷的水性乳液,而非硅酮消泡剂是水不溶性油,如辛醇和壬醇,或二氧化硅。在这两种情况下,消泡剂的功能都是从气-水界面置换表面活性剂。

[0628] 防腐剂

[0629] 在一些实施方案中,该信息素组合物包含防腐剂。

[0630] 额外的活性剂

[0631] 根据本公开文本的另一个实施方案,该信息素组合物可以包括一种或多种昆虫摄食刺激剂。昆虫进食刺激剂的例子包括但不限于粗棉籽油、植醇的脂肪酸酯、香叶基香叶醇的脂肪酸酯、其他植物醇的脂肪酸酯、植物萃取物及其组合。

[0632] 根据本公开文本的另一个实施方案,该信息素组合物可以包括一种或多种生长调节剂("IGR")。可使用IGR来改变昆虫的生长并产生变形的昆虫。昆虫生长调节剂的例子包括例如敌灭灵(dimilin)。

[0633] 根据本公开文本的另一个实施方案,该引诱剂-组合物可以包括一种或多种昆虫杀菌剂,其使所捕获的昆虫绝育或以其他方式阻断其繁殖能力,从而减少下一代的种群。在一些情况下,允许绝育的昆虫存活并与未捕获的昆虫竞争配偶比直接杀灭它们更有效。

[0634] 可喷雾组合物

[0635] 在一些实施方案中,本文公开的信息素组合物可以配制成可喷雾组合物(即,可喷雾信息素组合物)。可以在可喷雾组合物中使用水性溶剂,例如,水或水与一种醇、乙二醇、酮或其他水混溶性溶剂的混合物。在一些实施方案中,这种混合物的水含量为至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。在一些实施方案中,该可喷雾组合物是浓缩物,即信息素和其他添加剂(例如,蜡质

物质、稳定剂等)在水性溶剂中的浓缩悬浮液,并且可以通过添加溶剂(例如水)稀释至最终使用浓度。

[0636] 在一些实施方案中,蜡状物质可用作可喷雾组合物中信息素及其位置异构体的载体。蜡状物质可以是例如生物可降解蜡如蜂蜡、巴西棕榈蜡等、小烛树蜡(烃蜡)、褐煤蜡、虫胶和相似的蜡,饱和或不饱和脂肪酸如月桂酸、棕榈酸、油酸或硬脂酸,脂肪酸酰胺和酯,羟基脂肪酸酯如羟乙基或羟丙基脂肪酸酯,脂肪醇,以及低分子量聚酯如聚亚烷基琥珀酸酯。

[0637] 在一些实施方案中,稳定剂可以与可喷雾信息素组合物一起使用。可使用稳定剂来调节浓缩物的粒径和/或制备稳定的信息素组合物悬浮液。在一些实施方案中,该稳定剂选自羟基和/或乙氧基化聚合物。例子包括环氧乙烷和环氧丙烷共聚物、多元醇(包括淀粉、麦芽糖糊精和其他可溶性碳水化合物或其醚或酯)、纤维素醚、明胶、聚丙烯酸及其盐和偏酯等。在其他实施方案中,该稳定剂可以包括聚乙烯醇及其共聚物,如部分水解的聚乙酸乙烯酯。可以以足以调节粒度和/或制备稳定悬浮液的量使用稳定剂,例如在水溶液的0.1%至15%之间。

[0638] 在一些实施方案中,粘合剂可以与可喷雾信息素组合物一起使用。在一些实施方案中,该粘合剂可用来进一步稳定分散体和/或改进喷雾分散体与目标场所(例如,诱捕器、诱饵、植物等)的粘附。该粘合剂可以是多糖(如藻酸盐)、纤维素衍生物(乙酸纤维素、烷基纤维素、羧甲基纤维素、羟烷基纤维素)、淀粉或淀粉衍生物、糊精、树胶(阿拉伯树胶、瓜尔胶、刺槐豆胶、黄蓍胶、角叉菜胶等)、蔗糖等等。粘合剂还可以是非碳水化合物,水溶性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮,或酸和/或盐形式的酸性聚合物如聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸,或此类聚合物的混合物。

[0639] 微囊化信息素

[0640] 在一些实施方案中,本文公开的信息素组合物可以配制为微囊化的信息素,如描述于Ill'lchev,AL et al.,J.Econ.Entomol.2006;99(6):2048-54;以及Stelinki,LLet al.,J.Econ.Entomol.2007;100(4):1360-9.。微囊化信息素(MEC)是封闭在聚合物胶囊内的小滴信息素。该胶囊控制信息素释放到周围环境中的速率,并且对于应用在喷雾所用的相同方法中施用来说足够小杀昆虫剂。尤其取决于气候条件、胶囊大小和化学性质,微囊化信息素配制品的有效田间寿命范围可以为几天到略多于一周。

[0641] 缓释配制品

[0642] 信息素组合物可以配制为缓慢释放到大气中,和/或在释放后保护其免于降解。例如,信息素组合物可以包括在载体如微胶囊、生物可降解薄片和基于石蜡的基质中。可替代地,该信息素组合物可以配制成缓释可喷雾剂。

[0643] 在某些实施方案中,该信息素组合物可以包括本领域技术人员已知的一种或多种聚合物试剂。该聚合物试剂可以控制该组合物释放到环境中的速率。在一些实施方案中,该聚合物引诱剂-组合物不受环境条件影响。该聚合物试剂也可以是持续释放剂,其使得该组合物能够以持续的方式释放到环境中。

[0644] 聚合物试剂的例子包括但不限于纤维素、蛋白质如酪蛋白、基于氟碳的聚合物、氢化松香、木质素、三聚氰胺、聚氨酯、乙烯基聚合物如聚乙酸乙烯酯(PVAC)、聚碳酸酯、聚偏二乙烯二腈(polyvinylidene dinitrile)、聚酰胺、聚乙烯醇(PVA)、聚酰胺-醛、聚乙烯醛、聚酯、聚氯乙烯(PVC)、聚乙烯、聚苯乙烯、聚偏二乙烯、硅酮及其组合。纤维素的例子包括但

不限于甲基纤维素、乙基纤维素、乙酸纤维素、乙酸-丁酸纤维素、乙酸-丙酸纤维素、丙酸纤维素及其组合。

[0645] 可用于缓释或持续释放配制品的其他试剂包括脂肪酸酯(如癸二酸酯、月桂酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯或花生酸酯)或脂肪醇(如十一醇、十二醇、十三醇、十三醇、十四醇、十四碳烯醇、十四碳二烯醇、十五醇、十五碳烯醇、十六醇、十六碳烯醇、十六碳二烯醇、十八碳烯醇和十八碳二烯醇)。

[0646] 可使用根据本发明的方法制备的信息素以及含有该信息素的组合物来控制昆虫在各种环境中的行为和/或生长。例如,该信息素可用于吸引或排斥雄性或雌性昆虫进出特定目标区域。可使用信息素来吸引易感作物区域的昆虫。信息素也可以用来吸引昆虫,作为昆虫监测、大规模捕获、引诱/吸引并杀灭或交配干扰策略的一部分。

[0647] 诱饵

[0648] 本公开文本的信息素组合物可以涂覆或喷涂在诱饵上,或者诱饵可以用信息素组合物浸渍。

[0649] 诱捕器

[0650] 本公开文本的信息素组合物可用于诱捕器,如通常用于吸引任何昆虫物种(例如,鳞翅目昆虫)的那些。这样的诱捕器对于本领域技术人员是公知的,并且通常用于许多州和国家的昆虫根除计划中。在一个实施方案中,诱捕器包括用于容纳该信息素组合物的一个或多个中隔、容器或贮器。因此,在一些实施方案中,本公开文本提供装载有至少一种信息素组合物的诱捕器。因此,本公开文本的信息素组合物可用于诱捕器中,例如用于诱捕昆虫,作为昆虫监测、大规模捕获、交配干扰或引诱/吸引并杀灭策略的一部分,例如通过将毒性物质掺入诱捕器来杀灭捕获的昆虫。

[0651] 大规模捕获包括将高密度的诱捕器放在要保护的作物中,以便在作物受到损害之前将大部分昆虫清除。诱饵/吸引并杀灭技术是相似的,除了一旦昆虫被诱饵吸引,它就会经受杀灭剂。如果该杀灭剂是杀昆虫剂,分配器也可以含有诱饵或摄食刺激剂,其将诱使昆虫摄取有效量的杀昆虫剂。该杀昆虫剂可以是本领域技术人员已知的杀昆虫剂。可将杀昆虫剂与引诱剂-组合物混合或可分开存在于诱捕器中。混合物可以发挥吸引和杀灭昆虫的双重功能。

[0652] 这种诱捕器可以采取任何适当的形式,并且杀灭诱捕不一定需要掺入有毒物质,这些昆虫可以通过其他手段如溺水或电击来杀灭。可替代地,诱捕器可以用会在后期杀灭昆虫的真菌或病毒来污染昆虫。即使在昆虫没有被杀灭时,诱捕器也可以用来从雌性昆虫的场所除去雄性昆虫以防止繁殖。

[0653] 本领域的技术人员将会理解,多种不同的诱捕器都是可能的。这种诱捕器的适当例子包括水诱捕器、粘性诱捕器和单向诱捕器。粘性诱捕器有许多种类。粘性诱捕器的一个例子是纸板结构,横截面为三角形或楔形,其内表面涂有非干燥粘性物质。昆虫接触粘性表面并被捕获。水诱捕器包括用于捕获昆虫的水和洗涤剂的盘状器皿。该洗涤剂破坏水的表面张力,导致被吸引到盘状器皿的昆虫在水中淹死。单向诱捕器允许昆虫进入诱捕器但阻止其退出。本公开文本的诱捕器可以明亮地着色,以为昆虫提供额外的吸引力。

[0654] 在一些实施方案中,含有该组合物的信息素诱捕器可以与其他种类的捕获机制组合。例如,除该信息素组合物之外,诱捕器可以包括一个或多个荧光灯、一种或多种粘性物

质和/或用于吸引飞蛾的一个或多个着色表面。在其他实施方案中,含有该组合物的信息素诱捕器可以不具有其他种类的捕获机制。

[0655] 诱捕器可能在一年中的任何时间在田中设置。本领域技术人员可以容易地确定适用于特定诱捕器的组合物的量,并且还可以确定要保护的作物田的适当密度(诱捕器数/英亩)。

[0656] 诱捕器可以放置在被昆虫侵染(或可能侵染)的区域。通常,诱捕器放置在树木或植物上或附近。信息素的香气将昆虫吸引到诱捕器。然后可以将该昆虫在诱捕器内捕获、固定和/或杀灭,例如,通过存在于诱捕器中的杀灭剂。

[0657] 诱捕器也可能被放置在果园内以覆盖雌性发射的信息素,因此雄性根本无法定位雌性。在这方面,诱捕器需要的不过是一个简单的装置,例如,受保护的可分配信息素的灯芯(wickable)。

[0658] 本公开文本的组合物可以制成形式提供,其中已经施加了本公开文本的化合物。在这种情况下,取决于化合物的半衰期,可将该化合物暴露,或可以常规方式密封,如与其他芳香剂分配器一起使用,一旦诱捕器就位,则密封件只能被移除。

[0659] 可替代地,诱捕器可以单独出售,并且本公开文本的化合物以非必需形式提供,使得一旦诱捕器就位,就可以将一个量应用于诱捕器。因此,在本公开文本中可以在小袋或其他分配器中提供该化合物。

[0660] 分配器

[0661] 信息素组合物可以与分配器结合使用,以在特定环境中释放该组合物。可以使用本领域已知的任何适合的分配器。此类分配器的例子包括但不限于气溶胶发射器,手工分配器,包含具有缓慢释放信息素的可渗透屏障的贮存器的泡罩,由橡胶构成的垫、珠、管棒、螺旋状物或球,用信息素组合物浸渍的塑料、皮革、棉花、棉绒、木材或木制品。例如,聚氯乙烯层压材料、丸粒、颗粒、蒸发出信息素组合物的绳索或螺旋状物、或橡胶隔片。本领域技术人员将能够选择合适的载体和/或分配器以用于希望的施用模式、存储、运输或处理。

[0662] 在另一个实施方案中,可以使用如下装置,该装置用含有信息素物质本身的粉末污染雄性昆虫。然后受污染的雄性会飞出,并通过向大气中渗透该信息素物质或通过吸引其他雄性到达受污染的雄性而不是真正的雌性来提供交配干扰的来源。

[0663] 行为修饰

[0664] 根据本文公开的方法制备的信息素组合物可用于控制或调节昆虫的行为。在一些实施方案中,目标昆虫的行为尤其可以通过改变组合物中信息素与位置异构体的比率以可调方式进行调节,使得该昆虫被吸引到特定场所但不接触所述场所,或使得该昆虫实际上接触所述场所。因此,在一些实施方案中,可使用信息素来吸引易感作物区域的昆虫。因此,本公开还提供了将昆虫吸引到场所的方法。该方法包括向某个场所给予有效量的信息素组合物。

[0665] 干扰交配的方法可包括定期监测所捕获昆虫的总数或数量。该监测可以通过对预定的时间段捕获的昆虫数目进行计数来进行,如例如每天、每周、每两周、每月、每隔三个月或由监测器选择的任何其他时间段。对所捕获的昆虫的这种监测可有助于估计该特定时间段的昆虫种群,并且从而有助于确定综合有害生物管理系统中有害生物控制的特定类型和/或剂量。例如,高昆虫种群的发现可能需要使用去除昆虫的方法。在新栖息地侵染的早

期预警允许在种群变得难以管理之前采取行动。相反,低昆虫种群的发现可导致足以继续监测种群的决定。昆虫种群可以定期监测,这样昆虫只有在达到某一阈值时才被控制。这提供了具有成本效益的昆虫控制,并减少了使用杀昆虫剂对环境的影响。

[0666] 交配干扰

[0667] 根据本公开文本的方法制备的信息素也可用于干扰交配。交配干扰是一种有害生物管理技术,其设计用于通过引入混淆昆虫并干扰交配定位和/或求偶的人工刺激(例如,本文公开的信息素组合物)来控制有害生物,从而阻止交配和阻断生殖周期。

[0668] 在许多农业上感兴趣的昆虫物种中,如鳞翅目的那些,雌性会发射构成该物种的性信息素的特定化学共混物的空中踪迹。这条航线被称为信息素羽流(plume)。该物种的雄性使用信息素羽流中含有的信息来定位发射信号的雌性(称为"召唤"雌性)。交配干扰通过将合成信息素引入昆虫栖息地利用雄性昆虫跟随羽流的自然反应,其被设计为模拟雌性昆虫产生的性信息素。因此,在一些实施方案中,用于交配干扰的合成信息素是合成衍生的信息素组合物,其包含具有性信息素的化学结构的信息素及其不由目标昆虫产生的位置异构体。

[0669] 交配干扰的总体效应是通过掩盖天然信息素羽流来混淆雄性昆虫,导致雄性以找到配偶为代价跟随"虚假信息素踪迹",并且影响雄性对"召唤"雌性响应的能力。因此,雄性群体成功定位雌性和与雌性交配的可能性降低,导致最终停止繁殖和昆虫侵染坍塌。

[0670] 交配干扰的策略包括混淆、掩蔽踪迹和错误跟踪。昆虫不断暴露于高浓度的信息素可以防止雄性昆虫对雌性昆虫释放的正常水平的信息素做出反应。掩蔽踪迹使用信息素来消除雌性释放的信息素的踪迹。通过在高浓度下铺设许多信息素斑点来进行虚假跟踪,为雄性呈现许多虚假踪迹进行追随。如果释放量足够高,雄性昆虫就无法找到性信息素(雌性昆虫)的天然来源,从而不会发生交配。

[0671] 在一些实施方案中,灯芯或诱捕器可被适配为发射信息素持续至少等于蠓的一个或多个繁殖季节的时间段,从而引起交配干扰。如果蠓繁殖季节延长或繁殖季节重复,则本公开文本提供了灯芯或诱捕器,其能够发射信息素一段时间,尤其约两周,并且通常约1周和4周之间和最多6周,该灯芯或诱捕器可循环使用或被随后的相似诱捕器所替代。可将含有该信息素组合物的多个诱捕器放置在所在地,例如邻近作物田。可以根据本领域技术人员已知的方法来选择诱捕器的位置以及诱捕器离地的高度。

[0672] 可替代地,该信息素组合物可以从配制品如微胶囊或扭结(twist-tie)分配,如通常用于干扰昆虫有害生物的分配。

[0673] 吸引并杀灭

[0674] 吸引并杀灭方法利用引诱剂(如性信息素)将目标物种的昆虫引诱到杀昆虫化学物质、表面、装置等,用于大规模杀灭和终极群体抑制,并且可以具有与大规模捕获相同的效果。例如,当使用合成的雌性性信息素来吸引雄性有害生物(例如飞蛾)时,吸引并杀灭策略中,大量雄性飞蛾必须在延长时间内杀灭,以减少交配和繁殖,并最终抑制有害生物种群。由于不需要任何诱捕服务或其他频繁的维护,吸引并杀灭方法可以是大规模捕获的有利替代方案。在本文所述的各个实施方案中,重组微生物可共表达(i)产生昆虫信息素的途径和(ii)对该昆虫有毒的蛋白质、肽、寡核苷酸或小分子。以这种方式,该重组微生物可以共同产生适用于吸引并杀灭方法的物质。

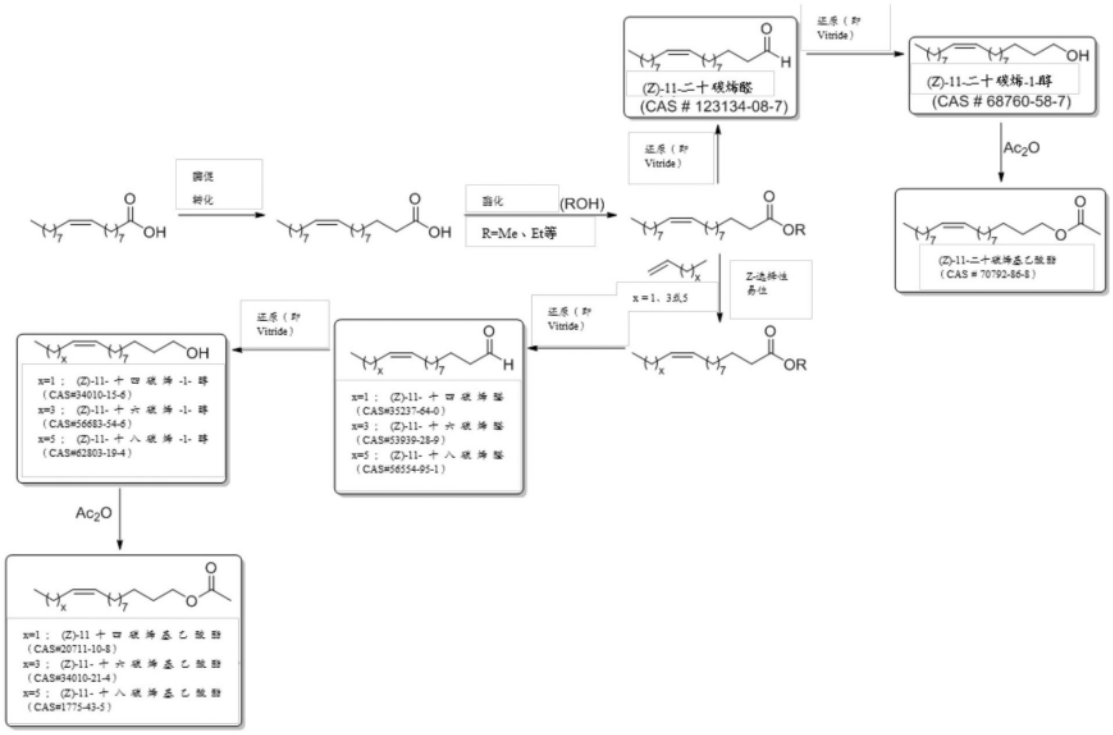
[0675] 对于本领域技术人员来说显而易见的是,用于特定应用的信息素或信息素组合物的量可以取决于若干因素而变化,如侵染的类型和水平;使用的组合物的类型;活性组分的浓度;如何提供组合物,例如,使用的分配器类型;要处理的位置的类型;使用该方法的时间长度;以及环境因素,如温度、风速和风向、降雨量和湿度。本领域技术人员将能够确定用于给定应用的信息素或信息素组合物的有效量。

[0676] 如本文所用,“有效量”意指所公开的信息素组合物的足以影响所希望结果的量。有效量能够以一次或多次给予来给予。例如,该组合物的有效量可以指足以将给定昆虫吸引到给定场所的信息素组合物的量。另外,该组合物的有效量可以指足以干扰给定位置中特定感兴趣的昆虫种群的交配的信息素组合物的量。

实施例

[0677] 实施例1通过易位和化学转化从酶促衍生的巨头鲸鱼酸(Gondoic acid)生产信息素产物

[0678] 此实施例示出了不同的脂肪酸可以用作生物合成生产信息素或信息素前体的起始材料。从本文公开的生物合成工艺获得的产物可以进行进一步的化学转化以生成不同的产物。

[0679] 

[0680] 油酸的酶促的两个碳延长产生巨头鲸鱼酸。酯化后,可以通过Z-选择性烯烃易位将巨头鲸鱼酸脂肪酸甲酯(FAME)转化为含有C11不饱和性的C16和C18 FAME产物。在还原该酯时,可以产生醛和脂肪醇信息素材料。脂肪醇产物的乙酰化可生成相应的脂肪乙酸酯信息素。此外,通过应用相同的酶促改性的油酸的化学转化,可以将巨头鲸鱼酸直接转化为C20脂肪醛、脂肪醇和脂肪乙酸酯信息素。

[0681] 预示性实施例2定制的合成共混物

[0682] 该预示性实施例示出了本文公开的重组微生物可用于建立昆虫信息素的合成共

混物。

[0683] 如图54中所描述的方案所示,使用十四烷基-ACP(14:ACP),可以用重组微生物产生E-和Z-十四碳烯基乙酸酯(E11-14:OAc和Z11-14:OAC)信息素的共混物。这种共混物由多种昆虫产生,例如,蔷薇斜条卷叶蛾(卷叶蛾科的蛾)。

[0684] 相似地,使用十六烷基-ACP(16:ACP),可以用重组微生物产生Z-和E-十六碳烯基乙酸酯信息素(E11-16:OAc和Z11-16:OAc)的共混物。

[0685] 该微生物可以用不同的去饱和酶或其他酶如还原酶等工程化,以产生所希望的信息素共混物。能够使用本发明的重组微生物和方法产生的具有特别相关性的一种共混物是(Z)-11-十六碳烯醛(Z11-16:Ald)和(Z)-9-十六碳烯醛(Z9-16:ALD)的97:3比率。

[0686] 实施例3:形成醇的跨膜还原酶在酿酒酵母中的表达

[0687] 背景和基本原理

[0688] 对从脂肪酸用微生物生产昆虫脂肪醇进行工程化需要合成途径的功能性表达。一种此类途径包含跨膜去饱和酶和形成醇的还原酶以介导脂肪酰基-CoA转化为区域和立体特异性不饱和脂肪酰基-CoA,并随后转化为脂肪醇。许多编码这些酶的基因发现于一些昆虫中(以及在脂肪醇还原酶的情况下的一些微藻中),并且可用于构建作为优选的生产宿主的酵母中的合成途径。将筛选许多跨膜去饱和酶和形成醇的还原酶变体,以鉴定允许高水平合成单一昆虫脂肪醇或脂肪醇共混物的集合体。此外,将在多个宿主(酿酒酵母、热带假丝酵母和解脂耶氏酵母)中对这些酶进行筛选,以优化搜索来寻找适合这些跨膜蛋白最佳表达的宿主。

[0689] 方法概述

[0690] 选择了三种昆虫来源的形成醇的还原酶。

[0691] 合成编码该还原酶的核酸(合成子),具有密码子优化以在酿酒酵母中表达。

[0692] 将编码给定还原酶的每种核酸在Gal1启动子下亚克隆到附加型表达盒中。

[0693] 用表达构建体转化酿酒酵母野生型和β-氧化缺失突变体。

[0694] 通过半乳糖诱导异源蛋白质,并且通过将Z11-十六碳烯酸生物转化为Z11-十六碳烯醇,在体内评估还原酶的功能性表达。

[0695] 使用GC-MS分析来鉴定和量化代谢物。

[0696] 结果

[0697] 在酿酒酵母W303(野生型)和BY4742ΔPOX1(β-氧化缺失突变体)中针对活性筛选形成醇的还原酶变体。在评估酶活性中选择Z11-十六碳烯酸作为底物。体内生物转化测定显示,来源于海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、棉铃虫(Helicoverpa armigera)和黄地老虎(Agrotis segetum)的酶变体在W303A中的表达(Ding,B-J.,Löfstedt,C.Analysis of the Agrotis segetumpheromone gland transcriptome in the light of sex pheromone biosynthesis.BMC Genomics 16:711(2015))赋予Z11-十六碳烯醇的生产,并且在蛋白质诱导48小时内分别达到约37μM(8mg/L)、约70μM(约16mg/L)和11μM(约3mg/L)(图5和图6)。如通过GC-MS测定的,生物学产生的Z11-十六碳烯醇匹配可信的Z11-十六碳烯醇标准品(Bedoukian)(图7)。也将BY4742ΔPOX1作为表达宿主进行探索,因为关键的β-氧化途径酶中的缺失可限制Z11-十六碳烯酸的降解。然而,与野生型宿主中的表达相比时,在β-氧化缺失突变体中表达还原酶变体降低了产物滴度(图5)。当与W303相比时,使用BY4742

ΔPOX1作为宿主时滴度降低的一个促成因素是生物量的减少(图8)。

[0698] 因此,酿酒酵母中至少两种形成醇的还原酶的功能性表达赋予Z11-十六碳烯酸到Z11-十六碳烯醇的生物转化。

[0699] 结论

[0700] 证明了酿酒酵母中昆虫形成醇的跨膜还原酶的功能性表达。在所测试的还原酶中,衍生自棉铃虫的变体对Z11-十六碳烯酸最具活性。

[0701] 可以探索其他脂肪酸底物的生物转化来评估酶可塑性。

[0702] 材料与方法

[0703] 菌株构建和功能性表达测定

[0704] 酿酒酵母W303(MATA ura3-1 trp1-1 leu2-3_112 his3-11_15 ade2-1 can1-100)和BY4742(MATa POX1::kanMX his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0)用作表达宿主。重新设计编码脂肪醇还原酶变体的DNA序列以优化酿酒酵母中的表达(SEQ ID NO:1-3)。将生成的合成子(金斯瑞公司(Genscript))使用BamHI-XhoI位点克隆到pESC-URA载体中以利用Gal1启动子促进蛋白质表达。所得质粒构建体用于转化W303,并且在CM琼脂培养基(具有2%葡萄糖并且缺少尿嘧啶)(天惠华公司(Teknova))上选择阳性转化体。为了评估功能性表达,使用24深孔板格式,将已在CM琼脂培养基(具有2%葡萄糖并且缺少尿嘧啶)上进行斑块生长的两个阳性转化克隆用于接种CM液体培养基。为了诱导蛋白质表达,然后将在28℃生长的过夜培养物补充半乳糖、棉子糖和YNB分别至最终浓度2%、1%和6.7g/L。蛋白质诱导24小时后,添加生物转化底物Z11-十六碳烯酸(在乙醇中)或十七烷酸(在乙醇中)至终浓度300mg/L。在GC-MS分析之前,生物转化测定在28℃下进行48小时。

[0705] 代谢物萃取和GC-MS检测

[0706] 根据Hagström等人(2012)(Hagström, Å.K.,Liénard,M.A.,Groot,A.T.,Hedenström,E.&Löfstedt,C.Semi-Selective Fatty Acyl Reductases from Four Heliothine Moths Influence the Specific Pheromone Composition.PLoS One 7:e37230(2012))的修改程序萃取脂质。将1.5mL细胞培养物转移到15mLfalcon管中。将细胞悬液用1mL 5N HCl酸化。添加5μL十四烷二酸(乙醇中10mM)作为内标。通过添加1.5mL己烷来萃取该混合物,然后在37℃、250rpm振荡1小时。为了促进相分离,将样品在2000g下离心10分钟。然后将1mL有机已烷相转移到1.5mL塑料管中。通过在90℃下加热样品30分钟来除去溶剂。将样品蒸发至干燥后,添加50μL BSTFA(含有1%三甲基氯硅烷的N,O-双(三甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺)。将1.5mL塑料管剧烈振荡两次,持续10秒。在转移到含有玻璃插入物的螺旋盖GC玻璃小瓶中之前,将样品离心1分钟(13000rpm)。将小瓶加盖并在90℃下加热30分钟。随后通过GC-MS分析来分析通过此方法生成的三甲基甲硅烷基酯。表6中指定了GC-MS参数。SIM模式(特征产物和IS离子)的使用通过降低背景噪音增加了检测灵敏度,允许检测低至2.4μM(0.6mg/L)的产物。分流比的进一步降低为进一步增加未来应用的灵敏度提供了可能性。使用图9中显示的Z11-十六碳烯醇校准曲线来量化由酵母产生的Z11-十六碳烯醇。还测试了十七烷酸的生物转化,因为易于区分的十七烷醇产物可用于用基准问题测试成功的GC-MS运行。然而,所测试的还原酶都没有显示出对十七烷酸的任何活性。

[0707] 表6.GC-MS参数

[0708]

系统	安捷伦6890 N GC，ChemStation G1701EA E.02.01.1177
柱	Rtx-5 30m x 320 µm x 25 µm 压力= 11.74 psi；流速= 7.1 mL/min
入口	加热器 = 250°C；压力= 11.74 psi; 总流量 {He} = 19.5 mL/min
载气	He @ 147 cm/sec, 11.74 psi
信号	数据速率 = 2 Hz/0.1 min
烘箱	150°C持续1 min 升温12°C/min至220°C，保持3 min 升温35°C/min至300°C，保持4 min
进样	分流，250°C 分流比 - 20:1
检测器	HP 5973 MSD，SIM模式（m/z：297.3和387.3）， 100毫秒停留时间，EMV模式：增益因子1， 3 min溶剂延迟，8.33个循环/秒
样品	进样体积 = 1 uL

[0709] 实施例4:在酿酒酵母中跨膜去饱和酶的表达

[0710] 背景和基本原理

[0711] 对从脂肪酸用微生物生产昆虫脂肪醇进行工程化需要合成途径的功能性表达。一种此类途径包含跨膜去饱和酶和形成醇的还原酶以介导脂肪酰基-CoA转化为区域和立体特异性不饱和脂肪酰基-CoA,并随后转化为脂肪醇。在一些昆虫以及一些微藻中发现了许多编码这些酶的基因。将筛选许多跨膜去饱和酶和形成醇的还原酶变体,以鉴定允许高水平合成单一昆虫脂肪醇或脂肪醇共混物的集合体。此外,将在多个宿主(酿酒酵母、热带假丝酵母和解脂耶氏酵母)中对这些酶进行筛选,以优化搜索来寻找适合这些跨膜蛋白最佳表达的宿主。

[0712] 方法概述

[0713] 选择一小组去饱和酶(昆虫来源:黄地老虎、粉纹夜蛾、脐橙螟蛾、玉米穗蛾和海洋硅藻(假微型海链藻))作为测试案例,以探索并建立功能性表达测定、代谢物萃取方法和分析化学。

[0714] 构建了用于在酿酒酵母中表达去饱和酶的合成盒。该盒由OLE1启动子区域、OLE1 N末端前导序列和VSP13终止子组成。

[0715] 通过GFP变体的表达针对功能性测试该表达盒。可以利用该盒的验证来探索昆虫去饱和酶的表达。

[0716] 用含有异源去饱和酶的表达构建体转化酿酒酵母ΔOLE1。通过在没有外源补充不饱和脂肪酸(UFA)的情况下挽救ΔOLE1生长的能力来评估该去饱和酶的功能性。将酿酒酵母去饱和酶(OLE1)用作成功补足的阳性对照。

[0717] 通过将十六烷酸(棕榈酸)在体内生物转化为(Z)-11-十六碳烯酸(棕榈异油酸(palmitvaccenic acid))来验证该去饱和酶的功能性。

[0718] 使用GC-MS分析来鉴定和量化代谢物。

[0719] 结果

[0720] 在酿酒酵母中筛选跨膜去饱和酶变体。初始测试了三种变体以探索并建立功能性

表达测定、代谢物萃取方法和分析化学。为了允许这些去饱和酶在酿酒酵母中的功能性表达,构建了称为pOLE1盒的附加型合成表达盒(图10),其由OLE1启动子区域、编码酿酒酵母OLE1的前27个氨基酸的N末端前导序列和VPS13(原生孢子膜形成涉及的蛋白质,其终止子先前已经被表征为可能通过延长mRNA半衰期来增加异源蛋白质表达)的终止子区域组成。通过表达GFP的能力验证pOLE1盒的功能性(图11A-图11E)。随后,将昆虫去饱和酶合成子和酵母OLE1合成子克隆到pOLE1盒中,并在酿酒酵母ΔOLE1菌株中表达。由于可利用OLE1等位基因(编码棕榈酰基:CoA/硬脂酰基:CoA(z)-9-去饱和酶)的缺失作为筛选功能性昆虫去饱和酶的工具,所以选取此菌株。确切地说,活性去饱和酶可以补足生长而不需要外源补充UFA。使用pOLE1盒的OLE1表达补足了无UFA的ΔOLE1生长(图11A-图11E);因此,将它在补足测定中用作阳性对照。当表达昆虫去饱和酶时,我们观察到它们在不同程度上挽救了没有UFA的ΔOLE1生长。在丰富培养基(YPD)琼脂板上,酿酒酵母OLE1的表达赋予最高水平的生长,其次为粉纹夜蛾去饱和酶(图12A)。后者指示,通过粉纹夜蛾去饱和酶产生不饱和脂肪酰基:CoA可以作为ΔOLE1中缺少的(Z)-9-十六碳烯酰:CoA生物合成的替代物。假微型海链藻和黄地老虎去饱和酶的表达显现不能很好地挽救YPD上的生长(图12A)。当在基本培养基(CM-Ura葡萄糖)琼脂板上进行斑块生长时,只有酿酒酵母OLE1和粉纹夜蛾去饱和酶的表达在没有外源UFA的情况下挽救了ΔOLE1生长(图12B)。假微型海链藻和黄地老虎去饱和酶的表达没有赋予在基本培养基琼脂上的ΔOLE1生长,表明它们在产生UFA方面的有限活性(结果未显示)。在热带假丝酵母中筛选去饱和酶文库鉴定了脐橙螟蛾和玉米穗蛾去饱和酶的功能性表达。当这些去饱和酶在ΔOLE1中表达时,它们赋予在YPD和CM-Ura葡萄糖培养基上在无UFA情况下的生长,这类似于粉纹夜蛾去饱和酶的表达(图12B)。

[0721] 通过棕榈酸到昆虫特异性UFA的体内生物转化进一步表征异源去饱和酶的功能性表达。在含有棕榈酸的基本培养基中约96小时培养后,表达粉纹夜蛾去饱和酶的酿酒酵母ΔOLE1的总脂肪酸分析揭示产生新的脂肪酸物质(Z)-11-十六碳烯酸,其在表达天然酵母OLE1去饱和酶的对照菌株中不存在(图13A-图13B)。在表达黄地老虎或假微型海链藻去饱和酶的菌株中未检测到(Z)-11-十六碳烯酸(结果未显示)。除(Z)-11-十六碳烯酸外,在表达粉纹夜蛾去饱和酶的ΔOLE1菌株中还检测到(Z)-9-十六碳烯酸(图13A-图13B)。在该培养条件下,表达粉纹夜蛾去饱和酶的ΔOLE1中的C16-脂肪酸由大约84.7%十六烷酸、5.6%(Z)-9-十六碳烯酸和9.8%(Z)-11-十六碳烯酸构成。相比之下,表达OLE1去饱和酶的ΔOLE1的C16脂肪酸部分由大约68.6%十六烷酸和31.4%(Z)-9-十六碳烯酸构成。在表达粉纹夜蛾去饱和酶的ΔOLE1中的(Z)-11-十六碳烯酸生物合成占约1.5mg/L。可以量化此混合物内的总脂肪酸和每种脂肪酸的量。如由GC-MS测定的(图14A-图14B),生物学产生的(Z)-11-十六碳烯酸也与可信标准品(Z)-11-十六碳烯酸(Larodan)的保留时间和碎片化图相匹配。因此,确认了生物学产生的(Z)-11-十六碳烯酸的区域和立体异构体。也可以进行脐橙螟蛾和玉米穗蛾去饱和酶的体内表征。

[0722] 总之,鉴定了在没有外源补充UFA(即(Z)-9-十六碳烯酸(棕榈油酸))的情况下能够挽救酿酒酵母ΔOLE1生长的至少三种昆虫去饱和酶。

[0723] 携带该表达构建体的酿酒酵母ΔOLE1的丰富培养基(YPD)上的生长程度处于以下去饱和酶含量顺序:OLE1、粉纹夜蛾、假微型海链藻和黄地老虎。

[0724] 携带该表达构建体的酿酒酵母ΔOLE1在基本培养基(CM葡萄糖,不具有尿嘧啶)上

的生长程度处于以下去饱和酶含量顺序:OLE1、粉纹夜蛾。

[0725] 使用脐橙螟蛾和玉米穗蛾去饱和酶进行补足测定,证明了通过体内生物转化测定显示的热带假丝酵母中的功能性表达。这些去饱和酶还补足了在丰富和基本培养基上的酿酒酵母ΔOLE1生长,至少像粉纹夜蛾去饱和酶一样。

[0726] 即使在长达14天的延长的孵育期后,假微型海链藻和黄地老虎去饱和酶的表达没有赋予在没有UFA的基本培养基上酿酒酵母ΔOLE1生长。在含有假微型海链藻或黄地老虎去饱和酶的菌株中没有观察到(Z)-11-十六碳烯酸。

[0727] 结论

[0728] 已经实现了酿酒酵母中昆虫来源的跨膜去饱和酶的功能性表达。

[0729] 给定的异源去饱和酶的活性可以通过其在没有外源棕榈油酸补充的情况下补足酿酒酵母ΔOLE1生长的能力以及将棕榈酸转化为昆虫信息素前体(Z)-11-十六碳烯酸的能力来评估。

[0730] 酿酒酵母中昆虫去饱和酶的功能性表达和/或活性依赖于序列来源而大不相同。如通过上述标准测量的,源自于粉纹夜蛾的变体展现出与黄地老虎和假微型海链藻相比最好的活性。

[0731] 源自于脐橙螟蛾和玉米穗蛾的去饱和酶补足了ΔOLE1,像粉纹夜蛾去饱和酶一样。可以使用这些去饱和酶进行生物转化测定。

[0732] 可以探索其他脂肪酸底物的生物转化来评估酶可塑性。

[0733] 材料与方法

[0734] 菌株构建和功能性表达测定

[0735] 酿酒酵母ΔOLE1(MATA OLE1::LEU2 ura3-52 his4)用作表达宿主。建立称为pOLE1的合成表达盒(图10,SEQ ID NO:4),其包含OLE1启动子区域(SEQ ID NO:5和6)、编码OLE1前导序列的27个N末端氨基酸的核苷酸(SEQ ID NO:7)以及VPS13终止子序列(SEQ ID NO:8),并将其克隆到SacI和EcoRI位点之间的pESC-URA载体中。为了测试该pOLE1盒的功能性,将Dasher GFP合成子插入SpeI和NotI位点之间以建立pOLE1-GFP质粒。将感受态ΔOLE1用pOLE1-GFP转化,并铺板在含有UFA的CM-Ura葡萄糖琼脂板(天惠华公司(Teknova))(20mm CM-URA葡萄糖琼脂板用100μL含有1%tergitol和3μL棕榈油酸的CM-Ura葡萄糖培养基涂覆)上。在30℃孵育5天后,如通过ΔOLE1转化体的绿色着色显示的,Dasher GFP表达明显。此结果显示pOLE1盒能够驱动异源蛋白质表达。通过恢复OLE1活性进行ΔOLE1补足验证。确切地说,将天然酿酒酵母OLE1合成子插入缺乏前导序列的pOLE1盒以产生pOLE1-OLE1质粒。在转化ΔOLE1和在含有UFA的CM-Ura葡萄糖琼脂上进行选择后,使单菌落在没有UFA的YPD和CM-Ura葡萄糖上进行斑块生长。在30℃孵育5天后,观察到生长(图11A-图11E)。如所预期的,Dasher GFP表达不能补足没有UFA的ΔOLE1生长(图11A-图11E)。合成编码去饱和酶变体的DNA序列(以包括去除用于克隆目的的限制性位点的核苷酸变化),并使用SpeI-NotI位点将其克隆到pOLE1中(金斯瑞公司,SEQ ID NO:9-13)。以与OLE1去饱和酶相同的方式用昆虫去饱和酶对ΔOLE1进行补足测定。

[0736] 为了评估功能性表达,将已在含有UFA的CM-Ura葡萄糖琼脂培养基上进行斑块生长的两个阳性转化克隆接种到含有终浓度为300mg/L的棕榈酸(在乙醇中)和6.7g/L的YNB的1.5mL CM-Ura葡萄糖液体培养基中。对于(z)-11-十六碳烯酸异构体确认,生成20mL培养

物。在GC-MS分析之前,生物转化测定在28℃下进行96小时。

[0737] 代谢物萃取和GC-MS检测

[0738] 总脂质组成以及(Z)-11-十六碳烯酸量化是基于Moss等人(1982)(Moss,C.W.,Shinoda,T.&Samuels,J.W.Determination of cellular fatty acid compositions of various yeasts by gas-liquid chromatography.J.Clin.Microbiol.16:1073-1079(1982))以及Yousuf等人(2010)(Yousuf,A.,Sannino,F.,Addorisio,V.&Pirozzi,D.Microbial Conversion of Olive Oil Mill Wastewaters into Lipids Suitable for Biodiesel Production.J.Agric.Food Chem.58:8630-8635(2010))的修改程序。将通常约10mg至80mg的沉淀细胞(在1.5mL塑料管中)重浮于含有5%(w/w)氢氧化钠的甲醇中。将碱性细胞悬浮液转移至1.8mL螺旋帽GC小瓶中。将混合物在90℃的加热块中加热1小时。在用400 2.5N HCl酸化之前,使小瓶冷却至室温。添加含1mM十七烷酸的500μL氯仿并剧烈振荡混合物,然后将水相和有机相转移至1.5mL塑料管中。将混合物以13,000rpm离心,之后将450μL有机相转移至新的1.5mL塑料管中。用500μL氯仿第二次萃取水相,这次不用十七烷酸。将合并的有机相在90℃蒸发。冷却至室温后,将残余脂肪酸甲酯和游离脂肪酸溶解并在含有0.2M TMSH(三甲基氢氧化锍)的甲醇中衍生化。

[0739] 通过比较二甲基二硫化物(DMDS)衍生物与可信标准品的DMDS衍生物的碎片化图来确定生物学产生的(Z)-11-十六碳烯酸的区域选择性。将酵母培养物分成12个等分试样(以不改变所开发程序中的任何参数)。将细胞沉淀,其平均产生63mg细胞(ccw)(来自18mL培养物的755mg)。如上所述将沉淀进行碱甲醇分解。然而,在酸化之后,将样品在50mLfalcon管中合并。将合并的样品用10mL氯仿萃取两次。将混合物以3000rpm离心10分钟以实现更好的相分离。将合并的有机相在新的50mL Falcon中合并,并用10mL盐水和10mL水连续洗涤。将有机相经无水硫酸钠干燥,并且在真空中浓缩。将浓缩的油溶于1.5mL氯仿中并转移至1.5mL塑料管中。将氯仿在90℃蒸发。将剩余的样品溶于50μL甲基叔丁基醚(MTBE)中。将50μL分成1、5、10和20μL,并转移到没有插入物的GC小瓶中。向每个小瓶中添加200μL DMDS(二甲基二硫化物)和50μL MTBE(含有60mg/mL碘)。在50℃下加热混合物48小时后,通过添加100μL饱和硫代硫酸钠溶液来除去过量的碘。将样品转移到塑料小瓶中并用500μL二氯甲烷萃取数次。将合并的有机相转移到新的1.5mL塑料小瓶中并在90℃下蒸发。将样品吸收在50μL DCM中并转移到GC小瓶中。使用Hagström等人(2013)(Hagström, Å.K.et al.A moth pheromone brewery:production of(Z)-11-hexadecenol by heterologous co-expression of two biosynthetic genes from a noctuid moth in a yeast cell factory.Microb.Cell Fact.12:125(2013))的方法,通过GC-MS分析样品(表7)。

[0740] 表7.用于DMDS-衍生物的GC-MS分析的分析参数

[0741]

系统	安捷伦6890 N GC，ChemStation G1701EA E.02,01.1177
柱	Rtx-5 30m x 320 µm x 25 µm 压力 = 11.74 psi；流速 = 7.1 mL/min
入口	加热器 = 250°C；压力= 11.74 psi; 总流量 {He} = 19.5 mL/min
载气	He @ 147 cm/sec, 11.74 psi
信号	数据速率 = 2 Hz/0.1 min
烘箱	80°C持续2 min 升温10°C/min至180°C 升温3°C/min至260°C 升温20°C/min至280°C，保持10 min
进样	分流；250°C 分流比 -1:1
检测器	HP 5973 MSD，SCAN模式（质量范围：41至500 amu） 100毫秒停留时间，EMV模式：增益因子1， 3 min溶剂延迟，8.33个循环/秒
样品	进样体积 = 1 uL

[0742] 实施例5:酿酒酵母作为昆虫脂肪醇合成的生产平台

[0743] 背景和基本原理

[0744] 对从脂肪酸用微生物生产昆虫脂肪醇进行工程化需要合成途径的功能性表达。一种此类途径包含跨膜去饱和酶和形成醇的还原酶以介导脂肪酰基-CoA转化为区域和立体特异性不饱和脂肪酰基-CoA,并随后转化为脂肪醇。在一些昆虫以及一些微藻中发现了许多编码这些酶的基因。筛选许多基因变体以鉴定如下酶活性,其允许建立能够高水平合成单一昆虫脂肪醇或其共混物的途径。此外,在多个宿主(酿酒酵母、热带假丝酵母和解脂耶氏酵母)中对这些酶进行筛选,以寻找用于这些跨膜蛋白最佳表达的适合宿主。

[0745] 方法概述

[0746] 先前对酿酒酵母进行了工程化以表达所选择的功能性跨膜去饱和酶变体以允许从棕榈酸合成(Z)-11-十六碳烯酸。这允许基于生物转化性能对变体进行鉴定和排序(参见实施例4)。

[0747] 先前对酿酒酵母进行了工程化以表达所选择的功能性跨膜还原酶变体,以允许从(Z)-11-十六碳烯酸合成(Z)-11-十六碳烯醇(Z11-16OH)。这允许基于生物转化性能对变体进行鉴定和排序(参见实施例3)。

[0748] 组装了几种脂肪醇途径,其由先前筛选中鉴定的最具活性的变体去饱和酶和还原酶构成。

[0749] 用途径构建体转化酿酒酵母W303A和ΔOLE1。通过重组酵母从棕榈酸合成Z11-16OH的能力评估该途径的功能性。

[0750] 使用GC-MS分析来鉴定和量化代谢物。

[0751] 结果

[0752] 目标是工程化酿酒酵母中的一种或多种昆虫脂肪醇生物合成途径。先前已证明了在酿酒酵母中昆虫来源的几种跨膜去饱和酶的功能性表达(参见实施例4)。简而言之,通过

设计由OLE1启动子区、编码酿酒酵母OLE1的前27个氨基酸的N末端前导序列和VPS13的终止子区组成的表达盒能够实现异源去饱和酶表达。筛选活性去饱和酶是通过使用两种方法进行的。首先,筛选活性去饱和酶在不外源添加不饱和脂肪酸(UFA)的情况下挽救ΔOLE1生长的能力,并且其次,通过体内筛选棕榈酸到(Z)-11-十六碳烯酸的生物转化来筛选活性去饱和酶。这些筛选策略允许鉴定几种活性变体,以及它们相对活性的排序。基于这些筛选结果,针对脂肪醇途径中的组合表达,选择来自粉纹夜蛾(TN_desat)和酿酒酵母(SC_desat)的去饱和酶。已知酿酒酵母去饱和酶形成棕榈油酸和油酸。

[0753] 先前也已证明了在酿酒酵母中昆虫来源的几种形成醇的跨膜还原酶的功能性表达(参见实施例3)。使用包含GAL1启动子和CYC终止子的表达盒来实现酿酒酵母中还原酶的功能性表达。通过将(Z)-11-十六碳烯酸到Z11-16OH的体内生物转化筛选几种还原酶允许鉴定活性变体和其相对活性的排序。基于此筛选,选择来自棉铃虫(HA_reduc)和海灰翅夜蛾(SL_reduc)的还原酶来组装脂肪醇途径。

[0754] 组合组装产生四个脂肪醇途径,即TN_desat-HA_reduc、TN_desat-SL_reduc、SC_desat-HA_reduc、以及SC_desat-SL_reduc。具有SC_desat的途径充当昆虫Z11-16OH合成的阴性对照。用含有这些途径的构建体转化酿酒酵母ΔOLE1和W303A,并分离在具有2%葡萄糖并涂覆有棕榈油酸的CM-Ura上生长的转化体。为了测试脂肪醇产生,将单独的克隆接种到含有2%葡萄糖、1%棉子糖、2%半乳糖的CM-Ura培养基中。添加300mg/L棕榈酸和360mg/L棕榈油酸作为生物转化底物。还测试了使用不含棕榈油酸的棕榈酸的生物转化。在棕榈酸和棕榈油酸的存在下培养约96小时后,培养肉汤分析揭示在培养含有SC_desat-HA_reduc和TN_desat-HA_reduc的ΔOLE1菌株时分别合成约0.2mg/L和约0.3mg/L的Z11-9OH,作为主要C16醇产物(图15、图16)。在采用粉纹夜蛾或酿酒酵母去饱和酶和棉铃虫还原酶的途径中也检测到微量的Z11-16OH。通常,预期在棕榈酸和棕榈油酸的存在下,Z9-16OH合成比Z11-16OH合成更有利,因为(Z)-11-十六碳烯酸必须从粉纹夜蛾去饱和酶生物合成,而外源添加棕榈油酸导致用于合成Z9-16OH的更容易获得的底物。还进行了脂肪酸分析。结果显示在含有昆虫去饱和酶的途径中(Z)-11-十六碳烯酸(图17)的累积高于表达酿酒酵母去饱和酶的途径中的累积。尽管数量很少,但从含有酿酒酵母去饱和酶的途径检测到Z11-16OH和(Z)-11-十六碳烯酸(这是未预期到的)开启了酿酒酵母去饱和酶较小的Δ11去饱和活性的可能性。Z11-16COOH脂肪酸部分的低水平合成也可以由Z9-14COOH脂肪酰基中间体的延长得到。图15所示的数据还显示,与采用棉铃虫还原酶的途径相比,包含海灰翅夜蛾还原酶导致Z9-16OH滴度降低(高达约30倍)。在采用海灰翅夜蛾还原酶的途径中不能检测到Z11-16OH。这些结果与还原酶筛选测定一致,该测定显示出与海灰翅夜蛾还原酶相比,使用棉铃虫还原酶的(Z)-11-十六碳烯酸的生物转化更优越。

[0755] 还通过表达TN_desat-HA_reduc和TN_desat-SL_reduc的ΔOLE1菌株单独(没有外源添加棕榈油酸)测试了棕榈酸的生物转化(图18)。培养液分析确定作为主要的不饱和C16脂肪酸产物的Z11-16OH的合成(图16)。在此测定中,分别通过含有棉铃虫还原酶和海灰翅夜蛾还原酶的途径合成高达0.22mg/L和0.05mg/L的Z11-16OH。生物学产生的Z11-16OH也与保留时间相匹配,并且像可信标准品Z11-16OH一样展现出特征297.3m/z峰,如通过GC-MS(SIM)测定的。因此,确认了生物学产生的Z11-16OH的区域和立体异构体(图19)。此外,在共表达粉纹夜蛾去饱和酶和棉铃虫还原酶的菌株的培养中也观察到Z9-16OH(0.01mg/L)。这

表明粉纹夜蛾去饱和酶也可能具有Δ9去饱和活性。

[0756] OLE1缺失损害生长。因此,还在W303A中研究了途径表达,该宿主具有完整的OLE1等位基因。然而,尽管生长得到改进,该宿主中的途径表达导致Z11-16OH滴度降低超过两倍。这个结果可能是由于OLE1的产物内源不饱和脂肪酰基CoA对OLE1启动子(其驱动异源去饱和酶表达)的抑制。酿酒酵母OLE1启动子先前已被表征,发现结构区域分别被饱和和不饱和脂肪酸正向和负向调控(Choi,J-Y.et al.Regulatory Elements That Control Transcription Activation and Unsaturated Fatty Acid-mediated Repression of the Saccharomyces cerevisiae OLE1 Gene.J.Biol.Chem.271:3581-3589(1996))。除了顺式转录调控之外,不饱和脂肪酸还与OLE1启动子元件相互作用以调节mRNA稳定性(Gonzales,C.I.et al.Fatty acid-responsive control of mRNA stability.Unsaturated fatty acid-induced degradation of the Saccharomyces OLE1 transcript.J.Biol.Chem.271:25801-25809(1996))。由于OLE1启动子的这种固有复杂性,可探索利用对用以驱动昆虫去饱和酶表达的未调控正交启动子,如来自克鲁维酵母(S.kluyveri)的OLE1启动子(Kajiwara,S.Molecular cloning and characterization of the v9 fatty acid desaturase gene and its promoter region from Saccharomyces kluyveri.FEMS Yeast.Res.2:333-339(2002))来增强脂肪醇产生。

[0757] 总之,酿酒酵母ΔOLE1中合成信息素途径变体的功能性表达导致由棕榈油脂肪酸(棕榈酸和棕榈油酸)合成Z11-16OH和Z9-16OH,分别达到大约0.2mg/L和0.3mg/L。

[0758] 得到最高脂肪醇的工程化途径是由粉纹夜蛾去饱和酶和棉铃虫还原酶构成。

[0759] 在产生Z11-16OH的菌株中还观察到(Z)-11-十六碳烯酸(该途径的中间体)的累积。

[0760] 没有产生Z11-16OH,并且在阴性对照菌株(仅含有载体)中仅检测到痕量Z9-16OH。

[0761] 通过GC-MS,与可信标准品化合物比较保留时间和碎片化图来确认生物学产生的Z11-16OH的区域和立体化学。

[0762] 结论

[0763] 证明了用于合成Z11-16OH和Z9-16OH(昆虫信息素的脂肪醇前体)的面包酵母的工程化。

[0764] 脂肪醇产量取决于去饱和酶和还原酶变体的选择。

[0765] (Z)-11-十六碳烯酸的累积表明通过增加形成醇的还原酶的性能可以进一步改进脂肪醇。然而,可能的是,检测到(Z)-11-十六碳烯酸也可能是归因于其作为磷脂掺入除内质网膜以外的任何膜(如线粒体膜、过氧化物酶体、核膜等),因此不可接近形成醇的还原酶(推测转移到内质网中),其必须利用其CoA硫酯部分中的(Z)-11-十六碳烯酸作为其底物。

[0766] 可以探索培养条件来增加脂肪醇滴度。在该途径中,粉纹夜蛾去饱和酶可以被脐橙螟蛾去饱和酶(也显示出高活性并且比粉纹夜蛾去饱和酶更快地挽救ΔOLE1生长的另一种变体)替代。该合成途径可以输入热带假丝酵母和解脂耶氏酵母中,它们是对疏水基质如棕榈酸和棕榈油酸具有高粘附特性的酵母。通过增加微生物生产平台对底物的可及性,可预见产物滴度和产量可以得到改进。

[0767] 材料与方法

[0768] 菌株构建和功能性表达测定

[0769] 酿酒酵母ΔOLE1(MATA OLE1::LEU2 ura3-52 his4)和W303A(MATA ura3-1 trp1-1 leu2-3_112his3-11_15ade2-1 can1-100)用作表达宿主。模块化设计允许组合途径组件利用BamHI和XhoI来切除还原酶合成子(参见实施例3)并亚克隆到含有pOLE1-去饱和酶构建体的质粒中(参见实施例4)。将感受态酵母用途径构建体转化并铺板于CM-Ura葡萄糖琼脂板(天惠华公司)上。在ΔOLE1转化的情况下,菌落铺板利用20mM CM-Ura葡萄糖琼脂板,该琼脂板涂覆有含有1%tergitol和3μL棕榈油酸的100μL CM-Ura葡萄糖培养基。

[0770] 为了评估功能性表达,将转化体接种到含有6.7g/L YNB、2%葡萄糖、1%棉子糖和2%半乳糖的约20mL CM-Ura液体培养基中。添加脂肪酸底物,即棕榈酸(在乙醇中),终浓度为300mg/L。添加棕榈油酸,终浓度为360mg/L。在GC-MS分析之前,生物转化测定在28℃下进行96小时。

[0771] 代谢物萃取和GC-MS检测

[0772] 脂肪酸分析如实施例4中所述,不同之处在于不是萃取样品两次,而是仅用含有1mM十七烷酸甲酯(C17:0Me)的氯仿萃取样品一次。脂肪醇分析如实施例3所述,不同之处在于不是使用己烷(含有十四烷二酸),而是使用氯仿(含有1mM十七烷酸甲酯)。萃取时间从1小时减少到20秒。之后,将样品收集在1.8mL GC小瓶中,而不是1.5mL塑料管中。以SIM模式使用质谱仪(m/z 208、297.3和387.3)。

[0773] 实施例6:在热带假丝酵母中跨膜去饱和酶的表达

[0774] 背景和基本原理

[0775] 对从脂肪酸用微生物生产昆虫脂肪醇进行工程化需要合成途径的功能性表达。一种此类途径包含跨膜去饱和酶和形成醇的还原酶以介导脂肪酰基-CoA转化为区域和立体特异性不饱和脂肪酰基-CoA,并随后转化为脂肪醇。在一些昆虫以及一些微藻中发现了许多编码这些酶的基因。筛选许多基因变体以鉴定如下酶活性,其允许建立能够高水平合成单一昆虫脂肪醇或其共混物的途径。此外,可在多个宿主(酿酒酵母、热带假丝酵母和解脂耶氏酵母)中对这些酶进行筛选,以优化搜索来寻找适合这些跨膜蛋白最佳表达的宿主。

[0776] 方法概述

[0777] 选择一小组去饱和酶(昆虫来源:黄地老虎、脐橙螟蛾、玉米穗蛾、粉纹夜蛾、亚洲玉米螟和红醋栗穿孔蛾和海洋硅藻(假微型海链藻))作为测试案例,以探索并建立功能性表达测定、代谢物萃取方法和分析化学。

[0778] 确认了来自pXICL表达盒的mCherry对照在SPV053中的成功整合和功能性表达。

[0779] 整合了在SPV053背景中使用相同pXICL载体的重组去饱和酶文库(图20)。还克隆了一种变体,即黄地老虎的Z11去饱和酶,以产生白假丝酵母Ole1p的前27个氨基酸融合至昆虫去饱和酶的N末端的蛋白质产物(SEQ ID NO:15)。

[0780] 通过将十六烷酸(棕榈酸)在体内生物转化为(Z)-11-十六碳烯酸(棕榈异油酸(palmitvaccenic acid))来验证该去饱和酶的功能性。

[0781] 使用GC-FID和GC-MS分析来鉴定和量化代谢物。

[0782] 结果

[0783] 文库构建

[0784] 本研究集中于筛选热带假丝酵母(SPV053)中的跨膜去饱和酶变体。筛选中包括对棕榈酰基-CoA(C16:0)具有报道的Z11去饱和酶活性的五种昆虫去饱和酶(SEQ ID NO:16-

19、23)和具有报道的Z9去饱和酶活性的三种昆虫去饱和酶(SEQ ID NO:20-22)。还克隆了一种变体,即来自黄地老虎的Z11去饱和酶(SEQ ID NO:16),其中白假丝酵母OLE1 N末端的27个氨基酸融合至昆虫序列上游(图20,SEQ ID NO:15)。在构建时,黄地老虎Z11去饱和酶被认为是阳性对照,并且构建白假丝酵母OLE1融合体以测试包含假丝酵母前导序列是否会改进功能性表达。该构建体被设计为模拟在酿酒酵母去饱和酶筛选中使用的那些(参见实施例4)。最后,包括表达mCherry红色荧光蛋白(SEQ ID NO:14)的对照构建体以充当整合和表达的阳性对照以及重组去饱和酶活性的阴性对照(图21A-图21D)。

[0785] 线性化质粒转化到SPV053中的效率在构建体间差异很大。尽管效率低下,但每种变体鉴定了至少3个克隆分离株(表8和9)。已假设,转化板上较大的菌落更有可能是阳性整合体,因为在Zeocin选择下Zeocin抗性标记的存在应增加生长速率。筛选结果分析表明,大型菌落的数目与转化效率无关。相反,总菌落(小和大)计数与观察到的效率最相关(图22)。另外,在一些情况下,在小菌落中发现阳性克隆。有可能在较低的铺板密度下,生长速率可能与整合事件相关(即阳性整合体生长较快)。在YPD+Zeocin上使菌落进行再次斑块生长的二次筛选证明在富集阳性整合体方面是有效的。快速生长的斑块比转化板上的一般种群更可能是阳性整合体。

[0786] 表8:SPV053中的去饱和酶转化。在Zeocin选择下,在具有相对较高程度背景的构建体间的转化效率有所不同。

[0787]

特异性	来源物种	pXICL质粒	DNA ug	大菌落(对照板)	总菌落(对照板)
对照	mCherry_Ct	pPV0137	1.1	60 (30)	2,000 (600)
Z11	黄地老虎-OLE1_Ca	pPV0138	1.2	120 (78)	>10,000 (320)
	黄地老虎	pPV0139	1.3	115 (78)	8,000 (320)
	脐橙螟蛾	pPV0140	1.1	220 (78)	5,000 (320)
	粉纹夜蛾	pPV0141	1.1	100 (78)	>10,000 (320)
	玉米穗蛾	pPV0142	1.0	350 (78)	5,000 (320)
	假微型海链藻	pPV0146	1.1	140 (78)	1,500 (320)
Z9	亚洲玉米螟	pPV0143	0.9	220 (78)	6,000 (320)
	红腊果穿孔蛾	pPV0144	1.2	230 (78)	5,000 (320)
	玉米穗蛾	pPV0145	1.2	72 (78)	2,000 (320)

[0788] 表9:去饱和酶SPV053文库构建。使用pXICL载体将五种具有推定的Z11去饱和活性的昆虫去饱和酶和3种具有推定的Z9去饱和活性的昆虫去饱和酶整合到SPV053背景中。另外,用相同的载体构建表达mCherry的对照菌株。

[0789]

特异性	来源物种	pXICL质粒	总阳性	总筛选	级分阳性
对照	mCherry_Ct	pPV0137	16	16	1.00
Z11	黄地老虎-OLE1_Ca	pPV0138	7	12	0.58
	黄地老虎	pPV0139	12	12	1.00
	脐橙螟蛾	pPV0140	5	60	0.08
	粉纹夜蛾	pPV0141	6	12	0.50
	玉米穗蛾	pPV0142	5	120	0.04
	假微型海链藻	pPV0146	3	96	0.03
Z9	亚洲玉米螟	pPV0143	3	57	0.05
	红醋栗穿孔蛾	pPV0144	3	58	0.05
	玉米穗蛾	pPV0145	3	94	0.03

[0790] 功能性表达测定

[0791] 通过一系列体内生物转化实验表征异源去饱和酶的功能性表达。在补充有乙醇(用于诱导)和饱和酸底物(棕榈酸、棕榈酸甲酯、肉豆蔻酸甲酯)的丰富(YPD)或限定(CM葡萄糖)培养基中培养表达昆虫去饱和酶的热带假丝酵母SPV053衍生的菌株。将小规模(2ml)培养物在24深孔板中培养总共72小时,在初始的24小时后添加底物。

[0792] 第一次筛选检查了补充棕榈酸底物的多种生物转化培养基。通过细胞脂质含量的脂肪酸甲酯(FAME)分析鉴定了两种功能性棕榈酰基-CoA(Z)-11去饱和酶。表达脐橙螟蛾或玉米穗蛾Z11去饱和酶的菌株(SPV0305-SPV0310)产生在mCherry对照菌株(SPV0302-SPV0304)中未观察到的脂肪酸物质,将其用(Z)-11-十六碳烯酸标准品洗脱(图23)。没有其他测试菌株产生非天然脂肪酸物质(数据未显示)。近似的C16-级分脂肪酸组成列于表10中。天然棕榈酰基-CoA(Z)-9去饱和酶仍存在于SPV053背景中,意指该去饱和酶的(Z)-9/(Z)-11特异性不能严格确定。在培养基中补充棕榈酸使得表达玉米穗蛾去饱和酶的菌株的(Z)-11/(Z)-9十六碳烯酸比率从0.6增加到1.4。对于表达脐橙螟蛾去饱和酶的菌株观察到(Z)-11-十六碳烯酸滴度为大约5.62mg/L,并且对于表达玉米穗蛾去饱和酶的菌株观察到为5.96mg/L。补充棕榈酸甲酯观察到了相似的性能(数据未显示)。

[0793] 表10:在表达不同去饱和酶的不同热带假丝酵母SPV053中C16-脂肪酸级分的组成。*NS=未添加底物(十六烷酸)。

[0794]

	C16:0 [%]	Z9-C16:1 [%]	Z11-C16:1 [%]	Z11/Z9 比率
mCherry	72.9	27.1	0.0	0.0
Hzea-YPD_NS	50.0	30.9	19.1	0.6
Hzea-YPD	58.1	17.5	24.4	1.4
AT-YPD	55.5	14.5	30.0	2.1

[0795] 在摇瓶中将生物转化测定放大至20ml,以便生成足够的生物质用于额外表征推定的(Z)-11-十六碳烯酸物质。尽管将观察到的物质用(Z)-11-十六碳烯酸标准品洗脱且独立于(Z)-9-十六碳烯酸标准品,可能的是,不同的脂肪酸异构体(例如(E)-9-十六碳烯酸)可以具有与(Z)-11-十六碳烯酸相似的保留时间。由于不同的立体异构体在DB-23上洗脱的方式不同,因此可排除(E)-11-十六碳烯酸的出现。通过使用DMDS衍生的脂肪酸的质谱检测完成(Z)-11-十六碳烯酸产生的最终确认来确认11-区域选择性。使用这种衍生技术,原则上也可以解析(Z)-11和(E)-11异构体。实验样品的碎片化图可以与(Z)-11-十六碳烯酸标准品匹配(图24A-24E)。使用此技术,对于表达脐橙螟蛾和玉米穗蛾去饱和酶的菌株确认了特异性(Z)-11-十六碳烯酸区域异构体和立体异构体的产生。

[0796] 最后,作为整个去饱和酶文库的底物测试了肉豆蔻酸甲酯(C14:0)。在表达脐橙螟蛾或玉米穗蛾Z11去饱和酶的菌株中观察到在肉豆蔻酸酯(C14:0)和(Z)-9-十四碳烯酸(Z9-C14:1)之间洗脱的非天然脂肪酸物质(图25A)。假设这种非天然物质是(Z)-11-十四碳烯酸,并且这可以用可信标准品来确认。此外,黄地老虎Z11去饱和酶、亚洲玉米螟Z9去饱和酶和玉米穗蛾Z9去饱和酶都产生肩峰,其恰在肉豆蔻酸酯(C14:0)峰后出现(图25B)。在所有菌株中观察到其他C14衍生物质(例如十四烷二酸)。这些结果表明,脐橙螟蛾和玉米穗蛾去饱和酶对肉豆蔻酰基-CoA具有一些活性。需要确认未知物种和量化以进一步得出有关体内去饱和酶底物特异性的结论。

[0797] 总之,来自玉米穗蛾(AAF81787)和来自脐橙螟蛾(JX964774)的两种去饱和酶在SPV053中表达,并赋予从内源产生的或补充的棕榈酸合成(Z)-11-十六碳烯酸。

[0798] 在丰富(YPD)和限定(CM葡萄糖)培养基中使用体内生物转化测定来确认玉米穗蛾和脐橙螟蛾去饱和酶在热带假丝酵母SPV053中的功能性表达。该活性去饱和酶生成细胞内(Z)-11-十六碳烯酸,其在mCherry表达对照菌株中未观察到。表达玉米穗蛾去饱和酶的SPV053的C16-脂肪酸组合物是大约50.0%十六烷酸、30.91%(Z)-9-十六碳烯酸和19.1%(Z)-11-十六碳烯酸。在补充棕榈酸的情况下,该组合物是58.1%十六烷酸、17.5%(Z)-9-十六碳烯酸和24.4%(Z)-11-十六碳烯酸。表达SPV053的脐橙螟蛾去饱和酶的C16-脂肪酸组合物是55.5%十六烷酸、14.5%(Z)-9-十六碳烯酸和30.0%(Z)-11-十六碳烯酸。相比之下,表达mCherry的SPV053产生具有大约72.9%十六烷酸、27.1%(Z)-9-十六碳烯酸且无(Z)-11-十六碳烯酸的C16-脂肪酸组合物。在表达功能性Z11去饱和酶的两个菌株中产生了约5.5mg/L的(Z)-11-十六碳烯酸。

[0799] 在含有粉纹夜蛾、假微型海链藻或黄地老虎去饱和酶的菌株中没有观察到(Z)-11-十六碳烯酸。

[0800] 在表达来自玉米穗蛾、亚洲玉米螟或红醋栗穿孔蛾的Z9昆虫去饱和酶的菌株中没

有观察到脂肪酸组成的差异。

[0801] 通过在DMDS衍生化后由GC-MS比较可信标准品化合物的保留时间和碎片化图来确认生物学产生的(Z)-11-十六碳烯酸的区域和立体异构体。

[0802] 在补充肉豆蔻酸甲酯的情况下,表达脐橙螟蛾和玉米穗蛾去饱和酶的SPV053的生物转化产生一种未鉴定的代谢物,这种代谢物在表达mCherry的阴性对照菌株中未观察到。发现此代谢物的GC保留时间在肉豆蔻酸酯(C14:0)和(Z)-9-十四碳烯酸之间。

[0803] 结论

[0804] 已经实现了热带假丝酵母SPV053中昆虫来源的跨膜去饱和酶的功能性表达。

[0805] 当在酿酒酵母ΔOLE1中表达时,通过在热带假丝酵母中筛选鉴定的活性去饱和酶也补足了OLE1功能(参见实施例4)。

[0806] 可使用体内测定来测定热带假丝酵母中针对非天然脂肪酸异构体(例如(Z)-11-十六碳烯酸)的去饱和酶活性。增加非天然脂肪酸的比例可以通过补充饱和酸底物如棕榈酸或肉豆蔻酸甲酯来产生。

[0807] 取决于序列来源,热带假丝酵母SPV053中昆虫去饱和酶的功能性表达和/或活性差异很大。相似于在酿酒酵母筛选中观察到的结果(参见实施例4),黄地老虎和假微型海链藻变体不会产生可检测到的(Z)-11-十六碳烯酸。有趣的是,在测定条件下,粉纹夜蛾去饱和酶也未能产生可检测到的(Z)-11-十六碳烯酸。不同于酿酒酵母测定,粉纹夜蛾表达构建体不包括嵌合OLE1前导序列。

[0808] 可以在功能性玉米穗蛾变体和非功能性粉纹夜蛾变体中针对包含白假丝酵母OLE1前导序列进行测试。

[0809] 可以探索另外的去饱和酶变体的功能性表达来鉴定C14特异性去饱和酶。

[0810] 可以进行功能性去饱和酶与还原酶变体的表达,并可以进行不饱和脂肪醇生产的后续筛选。

[0811] 材料与方法

[0812] 菌株构建

[0813] 使用保守方法重新编码基因。除了用TTA替代CTG亮氨酸密码子外,天然序列未改变。通过金斯瑞公司使用NcoI和NotI限制性位点将所有基因克隆到pPV0053中。转化到大肠杆菌NEB10β后,使用Zyppy质粒小量制备试剂盒(Zyppy Plasmid Miniprep Kit,酶研究公司(Zymo Research),欧文(Irvine),加利福尼亚州)小量制备质粒。在转化到SPV053中之前,通过用BsiWI(新英格兰生物实验室(New England Biolabs),伊普斯威奇(Ipswich),马萨诸塞州)消化将质粒线性化。消化后,使用清洁和浓缩器试剂盒(Clean and Concentrator Kit)(酶研究公司(Zymo Research),欧文,加利福尼亚州)分离DNA。通过电穿孔转化大约1μg的DNA。代替用TE+100mM乙酸锂+DTT进行孵育,将细胞在仅TE+100mM乙酸锂中孵育2小时。发现阳性整合体是位点特异性的,并且通过检查PCR进行基因分型。采用两阶段方法进一步筛选低效转化。使大约60个菌落在YPD+300μg/ml Zeocin上进行再次斑块生长并使其生长过夜。通过菌落PCR筛选快速生长(24小时内致密生长)的斑块的子集。绝大多数快速生长的斑块被鉴定为阳性整合体。

[0814] 功能性表达测定

[0815] 在YPD和CM葡萄糖中补充棕榈酸

[0816] 将阳性分离株在YPD+300μg/ml Zeocin上进行再次斑块生长并使其生长过夜,并且然后在4℃下储存。将菌株从斑块板接种到24深孔板(方孔,锥体底部)中的2ml YPD中。针对每种去饱和酶变体和表达mCherry的对照菌株接种三个阳性克隆。在Infors HT Multitron Pro板振荡器中,在30℃、1000rpm和80％湿度下,将深孔板孵育24小时。孵育24小时后,将培养物分成相等的1ml体积以制备两组相同的板。通过以500xg离心,使两组板沉淀。将一组板重悬于2ml YPD+0.3％(v/v)乙醇中,并将第二组重悬于2ml CM葡萄糖+0.3％乙醇中。在此阶段添加乙醇以从ICL启动子诱导重组酶表达。将培养物在相同条件下再孵育24小时,之后将300mg/L棕榈酸添加到来自乙醇中90g/L储备溶液的培养物中。结果是添加新的0.3％乙醇连同棕榈酸。还在不添加棕榈酸的情况下培养菌株的一个子组。这些培养物替代地添加0.3％乙醇。在最终添加0.3％乙醇之前,将所有培养物再孵育24小时。孵育另外24小时时间后,将1.5ml的每种培养物收获在1.7ml微量离心管中并使其沉淀。将上清液保存在新鲜试管中,并如下所述处理沉淀。还萃取了上清液样品的子集以在胞外培养基中寻找游离酸。

[0817] 用替代底物进行重复筛选

[0818] 使用棕榈酸和棕榈酸甲酯作为底物重新筛选mCherry对照和确认的阳性变体。如上所述用等摩尔(1.17mM)量的从乙醇储备溶液(棕榈酸甲酯94g/L储备液,313mg/L终浓度)添加的底物进行培养。还使用84g/L肉豆蔻酸甲酯(C14:0)储备液,用完整的一系列菌株重复相同的方案。底物的最终浓度再次为1.17mM。

[0819] (Z)-11-十六碳烯酸异构体的确认

[0820] 将体内生物转化测定放大以确认(Z)-11-十六碳烯酸合成。在Infors HT Multitron板振荡器中,在30℃、1000rpm、80％湿度下,使菌株SPV0302、SPV0303、和SPV0304(mCherry),SPV0304、SPV0305和SPV0306(脐橙螟蛾Z11去饱和酶)以及SPV0307、SPV0308和SPV0309(玉米穗蛾Z11去饱和酶)的2ml YPD种子培养物生长过夜。将来自三个克隆分离株中的每个的200μl过夜培养物合并并接种到含有20ml YPD的单个125ml带挡板的烧瓶中。将所得三个烧瓶在30℃和250rpm(Infors烧瓶振动器)下培养24小时。通过500xg离心使培养物沉淀并重悬于20ml YPD+0.3％(v/v)乙醇中,并返回至125ml带挡板的摇瓶。将培养物再孵育24小时,之后添加乙醇中90g/L储备液中的300mg/L棕榈酸(每个烧瓶221μl)。孵育24小时后,再将0.3％(v/v)乙醇(221μl)添加到每个烧瓶中用于持续诱导。将烧瓶再孵育24小时,之后收获细胞进行FAME分析和DMDS衍生化。

[0821] 代谢物萃取和GC-MS检测

[0822] 总脂质组成以及(Z)-11-十六碳烯酸量化是基于Moss等人(1982)和Yousuf等人(2010)的修改程序。将通常约10mg至80mg的沉淀细胞(在1.5mL塑料管中)重浮于含有5％(w/w)氢氧化钠的甲醇中。将碱性细胞悬浮液转移至1.8mL螺旋帽GC小瓶中。将混合物在90℃的加热块中加热1小时。在用400 2.5N HCl酸化之前,使小瓶冷却至室温。添加含1mM十七烷酸的500μL氯仿并剧烈振荡混合物,然后将水相和有机相转移至1.5mL塑料管中。将混合物以13,000rpm离心,之后将450μL有机相转移至新的1.5mL塑料管中。用500μL氯仿第二次萃取水相,这次不用十七烷酸。将合并的有机相在90℃蒸发。冷却至室温后,将残余脂肪酸甲酯和游离脂肪酸溶解并在含有0.2M TMSH(三甲基氢氧化锍)的甲醇中衍生化。

[0823] 通过比较二甲基二硫化物(DMDS)衍生物与可信标准品的DMDS衍生物的碎片化图

来确定生物学产生的(Z)-11-十六碳烯酸的区域选择性。将酵母培养物分成12个等分试样(以不改变所开发程序中的任何参数)。将细胞沉淀,其平均产生63mg细胞(ccw)(来自18mL培养物的755mg)。如上所述将沉淀进行碱甲醇分解。然而,在酸化之后,将样品在50mLfalcon管中合并。将合并的样品用10mL氯仿萃取两次。将混合物以3000rpm离心10分钟以实现更好的相分离。将合并的有机相在新的50mL falcon中合并,并用10mL盐水和10mL水连续洗涤。将有机相经无水硫酸钠干燥,并且在真空中浓缩。将浓缩的油溶于1.5mL氯仿中并转移至1.5mL塑料管中。将氯仿在90℃蒸发。将剩余样品溶于50μL甲基叔丁基醚(MTBE)中。将50μL分成1、5、10和20μL,并转移到没有插入物的GC小瓶中。向每个小瓶中添加200μL DMDS(二甲基二硫化物)和50μL MTBE(含有60mg/mL碘)。在50℃下加热混合物48小时后,通过添加100μL饱和硫代硫酸钠溶液来除去过量的碘;然而,由于来自假丝酵母菌株的洗涤剂过量形成,该层没有适当地混合。因此将样品在15mL falcon管中稀释至200μL,3.55mL MTBE(含有碘和分析物),500μL二氯甲烷,1.5mL水和1mL乙醇的最终样品组合物。将有机相在85℃下在1.8mL玻璃瓶中逐步蒸发。将样品吸收在500μL二氯甲烷中,并使用如实施例4中的Hagström等人(2013)的方法通过GC-MS分析样品。

[0824] 实施例7:跨膜去饱和酶在解脂耶氏酵母中的表达

[0825] 背景和基本原理

[0826] 对从脂肪酸用微生物生产昆虫脂肪醇进行工程化需要合成途径的功能性表达。一种此类途径包含跨膜去饱和酶和形成醇的还原酶以介导脂肪酰基-CoA转化为区域和立体特异性不饱和脂肪酰基-CoA,并随后转化为脂肪醇。在一些昆虫以及一些微藻中发现了许多编码这些酶的基因。可替代地,区域和立体特异性去饱和酶可用于生产富含脂肪酸前体的微生物油。然后可以将微生物油衍生化并还原为活性成分。筛选许多基因变体以鉴定允许建立如下途径的酶活性,该途径能够高水平合成单一昆虫脂肪酸和醇或其共混物。此外,在多个宿主(酿酒酵母、维斯假丝酵母(热带假丝酵母)和解脂耶氏酵母)中对这些酶进行筛选,以优化搜索来寻找用于这些跨膜蛋白最佳表达的适合宿主。

[0827] 在酿酒酵母和维斯假丝酵母(热带假丝酵母)中对去饱和酶的初始筛选鉴定了来自脐橙螟蛾、玉米穗蛾和粉纹夜蛾的三种活性Z11-C16:1去饱和酶变体。酿酒酵母筛选使用编码序列,其中酿酒酵母Ole1p Z9去饱和酶的N-末端前导序列与全长昆虫Z11去饱和酶序列融合。此策略以前在科学文献中用于在酿酒酵母中表达真核生物去饱和酶。当在OLE1缺失背景中表达时,所有三种上述去饱和酶在与Ole1p前导序列融合的情况下都展示Z11去饱和酶活性。具有白假丝酵母Ole1p前导序列的类似设计与来自玉米穗蛾的Z11去饱和酶一起使用。虽然有活性,这种Ole1p-玉米穗蛾脱氢酶融合不会显著增加Z11-十六碳烯酸滴度。此外,保守优化的脐橙螟蛾Z11去饱和酶在酿酒酵母和维斯假丝酵母中均有活性。以下研究集中于测试两个不同的解脂耶氏酵母菌株SPV140和SPV300中玉米穗蛾、粉纹夜蛾和脐橙螟蛾Z11去饱和酶的功能性表达。将天然和智人密码子优化的序列用于玉米穗蛾和粉纹夜蛾去饱和酶,而仅将天然序列用于脐橙螟蛾。最后,与来自酿酒酵母或白假丝酵母的Ole1p的N末端相比,解脂耶氏酵母Ole1p Z9硬脂酰基-CoA去饱和酶的N末端和昆虫去饱和酶的比对更接近。基于此比对,建立了两个额外的去饱和酶形式。将推定的前导序列从解脂耶氏酵母Ole1p交换到粉纹夜蛾和玉米穗蛾去饱和酶上。

[0828] 方法概述

[0829] 将在酿酒酵母或维斯假丝酵母中具有观察到的活性的Z11去饱和酶的聚焦文库(昆虫来源:脐橙螟蛾、玉米穗蛾、粉纹夜蛾)克隆到靶向XPR2基因座的具有URA3选择标记的双交换盒中。蛋白编码序列使用天然昆虫序列(SEQ ID NO:24、25)、智人优化的编码序列(SEQ ID NO:26、27)、或其中用N末端84个碱基(玉米穗蛾,SEQ ID NO:29)或81个碱基(粉纹夜蛾,SEQ ID NO:28)交换解脂耶氏酵母OLE1(YALI0C05951)基因N末端96个碱基的智人优化的序列。不同于在酿酒酵母和维斯假丝酵母筛选中,前导序列嵌合体测试前导序列的直接交换,而不是将宿主前导序列连接到全长去饱和酶编码序列的N末端。仅将天然编码序列用于脐橙螟蛾去饱和酶(SEQ ID NO:30)。

[0830] 将7种去饱和酶构建体中的每种转化到SPV140(P01f)和SPV300(H222ΔPΔA ΔFΔURA3)中,并确认位点特异性整合体。

[0831] 在YPD培养基中,通过将十六烷酸(棕榈酸)体内生物转化为(Z)-11-十六碳烯酸(棕榈异油酸(palmitvaccenic acid))来测试去饱和酶活性。

[0832] 使用GC-FID分析来鉴定和量化代谢物。

[0833] 结果

[0834] 菌株构建

[0835] 将去饱和酶变体克隆到pPV101载体中,其含有靶向整合到XPR2基因座中的解脂耶氏酵母表达盒。

[0836] 分别使用被来自解脂耶氏酵母OLE1去饱和酶的前导序列(SEQ ID NO:28、29)替代的天然昆虫序列(SEQ ID NO:24、25)、智人密码子优化的全长昆虫序列(SEQ ID NO:26、27)或推定的前导序列来合成粉纹夜蛾和玉米穗蛾去饱和酶。还使用天然昆虫编码序列(SEQ ID NO:30)合成脐橙螟蛾去饱和酶。将所有七种去饱和酶变体转化到SPV140中。基于先前的活性结果,仅玉米穗蛾和脐橙螟蛾去饱和酶变体被转化到SPV300中。

[0837] 功能性表达测定

[0838] 通过修饰用于维斯假丝酵母SPV053中跨膜去饱和酶表达的方案来评估功能活性(参见实施例6)。简而言之,将表达昆虫去饱和酶的解脂耶氏酵母SPV140和SPV300衍生的菌株在丰富(YPD)中培养以生成生物质。使用YPD生成的生物量,在24个深孔板中,将小规模(2ml)培养物与棕榈酸一起共培养48小时(详情参见材料与方法)。

[0839] 在粉纹夜蛾、玉米穗蛾和脐橙螟蛾变体的初始筛选中,仅经智人密码子优化的玉米穗蛾去饱和酶变体产生可检测到的Z11-十六碳烯酸(图26)。天然玉米穗蛾去饱和酶的表达使得可产生100±5mg/L Z11-十六碳烯酸,并且具有解脂耶氏酵母OLE1前导序列的形式产生83±11mg/L。如图26所示,其他主要脂肪酸物质的分布相对不受功能性去饱和酶表达的影响。在活性菌株中,Z11-十六碳烯酸占脂肪酸物质(包括可能吸附到细胞外表面的棕榈酸底物)的约10%(g/g)。

[0840] 进行了后续实验,将SPV140背景中的活性变体与SPV300衍生的去饱和酶菌株进行比较。将表达hrGFP的亲本SPV300和SPV140用作阴性对照。使用相同的生物转化测定方案。与SPV140中一样,仅智人优化的变体产生可检测到的活性(图27)。SPV300菌株生长至更高的最终细胞密度(SPV3000D600=26-28,SPV140 0D600=19-22)(图28)。对表达具有智人密码子优化的天然玉米穗蛾Z11-去饱和酶(pPV199)的菌株观察到最高滴度。重复测试的SPV140菌株产生113±1mg/L(5.5±0.2mg/L/OD)Z11-十六碳烯酸,比第一次实验中观察到

的滴度高13％(图29)。表达相同去饱和酶的SPV300菌株产生更广泛的生产力。它们平均产生89±18mg/L(3.3±1.2mg/L/OD)Z11-十六碳烯酸,但一个克隆产生124mg/L(4.6mg/L/OD)Z11-十六碳烯酸。

[0841] 总之,仅具有智人密码子优化的玉米穗蛾Z11去饱和酶变体产生可检测到的Z11-十六碳烯酸。在目前的测定条件下,与SPV300相比,在SPV140背景中观察到略高的滴度。表11总结了Z11-十六碳烯酸滴度。

[0842] 表11:从解脂耶氏酵母中的示例性去饱和酶表达获得的Z11-十六碳烯酸滴度

[0843]

去饱和酶	密码子优化	亲本菌株	Z11-十六碳烯酸滴度(mg/L)
Z11 粉纹夜蛾	天然	SPV140	ND(未检测)
Z11 粉纹夜蛾	智人	SPV140	ND
YlOLE1-Z11 粉纹夜蛾	智人	SPV140	ND
Z11 玉米穗蛾	天然	SPV140	ND
		SPV300	ND
Z11 玉米穗蛾	智人	SPV140	100±5
		SPV300	87±18
YlOLE1-Z11 玉米穗蛾	智人	SPV140	83±11
		SPV300	55±1
Z11 脐橙螟蛾	天然	SPV140	ND
		SPV300	ND

[0844] 在SPV300中,测试了pPV200(解脂耶氏酵母OLE1-具有智人密码子优化的玉米穗蛾Z11去饱和酶)的一种非位点特异性整合体。此整合体没有产生可检测到的Z11-十六碳烯酸,而两种位点特异性整合体产生55±1mg/L。

[0845] 从SPV140或SPV300衍生菌株的沉淀中未观察到主要的羟基或二酸峰,并且在当前的测定条件下(相对低的底物浓度,丰富培养基),SPV300中的β-氧化/ω-氧化基因的缺失没有增加Z11-十六碳烯酸累积。

[0846] 结论

[0847] 玉米穗蛾Z11去饱和酶具有活性,并且可从约500mg/L棕榈酸底物产生约100mg/L Z11-十六碳烯酸。在24孔板测定中,三种阳性整合体和重复实验证明了功能性表达。

[0848] 针对解脂耶氏酵母中的活性,需要对玉米穗蛾去饱和酶进行密码子优化(智人或潜在的解脂耶氏酵母)。

[0849] 粉纹夜蛾Z11去饱和酶虽然在酿酒酵母中有活性,但在解脂耶氏酵母中不产生可检测到的Z11-十六碳烯酸。

[0850] 可以从甘油原料开始确认针对解脂耶氏酵母菌株的测定的重现性。

[0851] 脐橙螟蛾去饱和酶可以进行密码子优化以在解脂耶氏酵母中表达。

[0852] 由于解脂耶氏酵母是候选生产宿主,因此可以在解脂耶氏酵母中整合额外的活性去饱和酶拷贝,可以鉴定改进生物转化的培养条件,并且可以量化底物转化。

[0853] 材料与方法

[0854] 菌株构建

[0855] 合成所有的去饱和酶基因(金斯瑞公司)。使用天然序列或智人密码子优化。将合成的基因亚克隆到pPV101中。转化质粒并使用Zyppy质粒小量制备试剂盒(酶研究公司(Zymo Research),欧文,加利福尼亚州)从大肠杆菌EPI400进行制备。使用Frozen-EZ酵母转化II试剂盒(酶研究公司(Zymo Research),欧文,加利福尼亚州)转化约1-2μg线性化

DNA。将整个转化混合物铺板在CM葡萄糖-ura琼脂板上。发现阳性整合体是位点特异性的，并且通过检查PCR进行基因分型。

[0856] 功能性表达测定

[0857] 在YPD中补充棕榈酸

[0858] 将阳性分离株在YPD上进行再次斑块生长，使其生长过夜，并且然后在4℃下储存。将菌株从斑块板接种到24深孔板(方孔，锥体底部)中的2ml YPD中。针对每种去饱和酶变体接种三个阳性克隆。将SPV140中的三个pPV101分离株和亲本SPV300用作阴性对照。在Infors Multitron冷藏烧瓶振荡器中，在28℃和250rpm下，将深孔板孵育24小时。孵育24小时后，通过以500xg离心使1ml体积的每种培养物沉淀。将每种沉淀重悬于2ml的YPD中。将500mg/L棕榈酸添加到来自乙醇中90g/L储备溶液的培养物中。结果是添加0.5％乙醇与棕榈酸底物。将所有培养物在终点采样前孵育48小时。使用Tecan Infinite 200pro读板仪测量最终细胞密度。将0.75或0.8ml的每种培养物收获在1.7ml微量离心管中并使其沉淀。去除上清液并且如下所述处理沉淀。

[0859] 代谢物萃取和GC-FID分析

[0860] 总脂质组成以及(Z)-11-十六碳烯酸量化是基于Moss等人(1982)和Yousuf等人(2010)的修改程序。将通常约10mg至80mg的沉淀细胞(在1.5mL塑料管中)重浮于含有5％(w/w)氢氧化钠的甲醇中。将碱性细胞悬浮液转移至1.8mL钳口小瓶(crimp vial)中。将混合物在90℃的加热块中加热1小时。在用400 2.5N HCl酸化之前，使小瓶冷却至室温。添加含1mM十七烷酸甲酯的500μL氯仿并剧烈振荡混合物，然后将水相和有机相转移至1.5mL塑料管中。将混合物以13,000rpm离心，之后将450μL有机相转移至GC小瓶中。为了分析脂质和量化脂肪酸，添加50μL的0.2M TMSH(甲醇中的三甲基氢氧化锍)，并通过GC-FID分析样品。

[0861] 实施例8:维斯假丝酵母(热带假丝酵母)作为昆虫脂肪醇合成的生产平台

[0862] 背景和基本原理

[0863] 预先筛选昆虫跨膜去饱和酶和还原酶的变体并基于在维斯假丝酵母或酿酒酵母中的功能性表达进行排序(参见实施例3、4和6)。选择玉米穗蛾去饱和酶和棉铃虫还原酶组装维斯假丝酵母中的合成昆虫脂肪醇途径。通过全脂肪醇途径的基因组整合实现密码子优化的玉米穗蛾去饱和酶(在假丝酵母异柠檬酸裂解酶(ICL)启动子下)以及密码子优化的棉铃虫还原酶(在假丝酵母转录延伸因子(TEF)启动子下)的同时表达。使用简单的碳源和棕榈酸在重组菌株(SPV0490)的培养物中实现Z11-16OH的累积。

[0864] 方法概述

[0865] 整合质粒被设计为含有功能性玉米穗蛾去饱和酶(参见实施例6)，与由推定的组成型热带假丝酵母启动子(pTEF)驱动的棉铃虫还原酶配对。

[0866] 通过将十六烷酸(棕榈酸)在体内生物转化为Z11-16OH来评估完整途径的功能性。

[0867] 使用GC-FID和GC-MS分析来鉴定和量化代谢物。

[0868] 结果

[0869] 在假丝酵母培养物中检测到Z11-16OH的累积，该假丝酵母被工程化为在ICL启动子下表达玉米穗蛾去饱和酶并且在TEF启动子下表达棉铃虫还原酶(表12和图30)。

[0870] 表12.列出的来自维斯假丝酵母生物转化测定的Z11-16OH滴度。SPV088是维斯假丝酵母，其被工程化以表达mCherry(阴性对照)。SPV0490是维斯假丝酵母，其被工程化以表

达昆虫脂肪醇途径。

[0871]

Z11-16OH滴度（mg/L）		
	SPV0488（阴性对照）	SPV0490
样品1	0.08	1.03
样品2	0.07	0.93
样品3	0.06	0.88
平均值	**0.07**	**0.95**
标准差	0.01	0.06

[0872]

[0873] 材料与方法

[0874] 菌株构建

[0875] 整合质粒(ppV0228)被设计为含有两个表达盒。第一盒含有由维斯假丝酵母ICL启动子(SEQ ID NO:33)驱动的玉米穗蛾密码子优化的去饱和酶(SEQ ID NO:31)。第二盒含有由热带假丝酵母TEF启动子(SEQ ID NO:34)驱动的密码子优化的棉铃虫RNA还原酶(SEQ ID NO:32)。ICL启动子盒中的基因表达由ICL终止子序列(SEQ ID NO:35)终止。TEF启动子盒中的基因表达由TEF终止子序列(SEQ ID NO:36)终止。使用保守方法重新编码基因。除了用TTA替代CTG亮氨酸密码子外,天然基因序列未改变。转化到大肠杆菌NEB10β中后,使用Zyppy质粒小量制备试剂盒(酶研究公司(Zymo Research),欧文,加利福尼亚州)小量制备质粒。在转化到SPV053中之前,通过用BsiWI(新英格兰生物实验室(New England Biolabs),伊普斯威奇(Ipswich),马萨诸塞州)消化将质粒线性化。消化后,使用清洁和浓缩器试剂盒(Clean and Concentrator Kit)(酶研究公司(Zymo Research),欧文,加利福尼亚州)分离DNA。通过电穿孔转化大约3-5μg的DNA。发现阳性整合体是位点特异性的,并且通过检查PCR进行基因分型。采用两阶段方法进一步筛选低效转化。使大约100个菌落在YPD+250μg/ml Zeocin上进行再次斑块生长并使其生长过夜。通过菌落PCR筛选快速生长(24小时内致密生长)的斑块的子集。

[0876] 功能性表达测定

[0877] 在YPD中补充棕榈酸

[0878] 将阳性分离株在YPD+300μg/ml Zeocin上进行再次斑块生长,使其生长过夜,并且然后在4℃下储存。将菌株从斑块板接种到24深孔板(方孔,锥体底部)中的2ml YPD中。针对每种去饱和酶和还原酶变体接种四个阳性克隆,并且针对每种去饱和酶和表达mCherry的对照菌株接种三个阳性克隆。在Infors HT Multitron Pro板振荡器中,在30℃、1000rpm和80％湿度下,将深孔板孵育24小时。孵育24小时后,通过以500xg离心使1ml体积的每种培养物沉淀。将每种沉淀重悬于2ml的YPD+0.3％(v/v)乙醇中。在此阶段添加乙醇以从ICL启动子诱导重组酶表达。将培养物在相同条件下再孵育24小时,之后将300mg/L棕榈酸添加到来自乙醇中90g/L储备溶液的培养物中。结果是添加新的0.3％乙醇连同棕榈酸。在最终添加0.3％乙醇之前,将所有培养物再孵育24小时。孵育另外24小时时间后,将1.5ml的每种培养

物收获在1.7ml微量离心管中并使其沉淀。去除上清液并且如下所述处理沉淀。

[0879] 代谢物萃取和GC-MS检测

[0880] 将通常约10mg至80mg的沉淀细胞(在1.5mL塑料管中)重浮于含有5％(w/w)氢氧化钠的甲醇中。将碱性细胞悬浮液转移至1.8mL钳口小瓶(crimp vial)中。将混合物在90℃的加热块中加热1小时。在用400μL 2.5N HCl酸化之前,使小瓶冷却至室温。添加含1mM十七烷酸甲酯的500μL氯仿并剧烈振荡混合物,然后将水相和有机相转移至1.5mL塑料管中。将混合物以13,000rpm离心,之后将450μL有机相转移至GC小瓶中。将有机相在90℃的加热块中蒸发30分钟。将残余物溶于含有1％三甲基氯硅烷的50μL N,O-双(三甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺中。在转移到玻璃插入物之前,将该混合物在90℃加热5分钟。通过GC-MS分析样品(表13)。

[0881] 表13.用于代谢物的GC-MS分析的分析参数

[0882]

系统	安捷伦6890 N GC，ChemStation G1701EA E.02.01.1177
柱	DB23 30 m x 25 μm x 25 μm 压力 = 11.60 psi；流速 = 0.6 mL/min
入口	加热器 = 250ºC；压力 = 11.74 psi； 总流量 {He} = 111 mL/min
载气	He @ 29 cm/sec，11.60 psi
信号	数据速率 = 2 Hz/0.1 min
烘箱	150ºC持续1 min

[0883]

	升温12ºC/min至220ºC，保持3 min 升温35ºC/min至300ºC，保持4 min
进样	不分流，250ºC
检测器	SIM模式HP 5973 MSD（m/z：208.0、297.3和387.3）， 100毫秒停留时间，EMV模式：增益因子1， 2.4 min溶剂延迟，3.09个循环/秒
样品	进样体积 = 1 μL

[0884] 实施例9:从解脂耶氏酵母产生昆虫脂肪醇

[0885] 背景和基本原理

[0886] 解脂耶氏酵母被工程化为用于从棕榈酸合成昆虫脂肪醇(Z11-16OH和Z9-16OH)的生产平台。

[0887] 在单独确认Z11去饱和酶(实施例7)和脂肪酰基-CoA还原酶(FAR)的功能性表达后,在解脂耶氏酵母中工程化完整的Z11-16OH和Z9-16OH途径(Bdr)。出于改进脂肪醇滴度的目的,还探索了为促进生长与引发脂质储存而设计的培养。生长条件有利于高生物量生产,但限制了工程化途径使用的脂肪酰基-CoA库大小并且将脂肪酰基-CoA中间体引向膜合

成。相反,脂质储存条件为产生脂肪酰基-CoA建立了强汇集处,这是理想的。然而,脂质酰基-CoA转运至脂质体对FAR活性产生强竞争。在第二种情况下,即使Z11-16酸或Z9-16酸在细胞中累积,但大部分都无法接近FAR。在另一方面,在脂质储存条件下可能存在持续的脂质再移动通量,其导致可用于FAR的持续的Z11-16CoA或Z9-16CoA库。

[0888] 方法概述

[0889] 在H222ΔPΔAΔF(SPV300)背景下测试了两种生物去饱和-还原(Bdr)途径变体。与棉铃虫脂肪酰基-CoA还原酶(FAR)配对的玉米穗蛾Z11去饱和酶的第一组合重组表达建立Z11-16OH合成途径。第二组合的天然解脂耶氏酵母Z9去饱和酶活性与棉铃虫脂肪酰基-CoA还原酶(FAR)表达建立Z9-16OH途径。

[0890] 构建了两种整合质粒以表达玉米穗蛾去饱和酶和棉铃虫FAR。TEF启动子用于去饱和酶表达,并且EXP1(输出蛋白)或TAL1(转醛醇酶)启动子用于还原酶表达。

[0891] 通过菌落PCR确认Z11-16OH途径盒成功整合到H222ΔPΔAΔF(SPV300)背景中。

[0892] 通过将16酸(棕榈酸)在体内生物转化为Z11-16OH(Z-11-十六碳烯醇)来评估完整Z11-16OH途径的功能性。

[0893] 使用先前构建的由TEF启动子驱动表达棉铃虫FAR的SPV471(H222ΔPΔAΔF衍生的),通过在体内生物转化16酸(棕榈酸)来评估完整Z9-16OH途径的功能。

[0894] 使用GC-MS分析来鉴定和量化Z9-16OH和Z11-16OH。使用GC-FID分析来鉴定和量化脂肪酸。

[0895] 概要

[0896] 筛选了表达玉米穗蛾去饱和酶(pTEF)和棉铃虫还原酶(pEXP1)的十个分离株。体内生物转化测定确认了所有分离株的Z11-16OH生产。

[0897] 在补充有10g/L棕榈酸甲酯的YPD培养基中观察到相对较低的可检测到的Z11-16OH滴度(0.26±0.09mg/L)。测量到Z11-16酸前体为220±11mg/L(在克隆2、4、9、17、23中)。

[0898] 在C:N比率为约80的半限定培养基中观察到更高的Z11-16OH滴度。在所有10个分离株中,Z11-16OH以2.65±0.36mg/L产生。Z11-16酸前体滴度为900±30mg/L。一个分离株(SPV578)产生3.68±0.31mg/L Z11-16OH(Z11-16酸840±14mg/L)。

[0899] 筛选了表达玉米穗蛾去饱和酶(pTEF)和棉铃虫还原酶(pTAL1)的九个分离株。体内生物转化测定确认了所有分离株的Z11-16OH生产。

[0900] 一个分离株(SPV603)在半限定培养基(Z11-16酸1.36g/L)中产生6.82±1.11mg/L Z11-16OH。

[0901] 使用半限定培养基(C:N比率为约80),先前测试的还原酶菌株SPV471(表达棉铃虫FAR的H222ΔPΔAΔF)产生4.30±2.33mg/L Z9-16OH和450±80mg/L Z9-16酸。

[0902] 表14:在体内生物转化测定中来自B_{dr}途径菌株的Z11/Z9-16OH滴度的汇总表。

[0903]

菌株	培养基	Z11-16OH (mg/L)	Z9-16OH (mg/L)
pTEF-玉米穗蛾Z11去饱和酶 pEXP-棉铃虫FAR亮 腺17 (SPV578)	半限定 C:N=80	3.99±0.37 (n=4)	0.22±0.03 (n=4)
pTEF-玉米穗蛾Z11去饱和酶 pTAL-棉铃虫FAR 亮腺9 (SPV603)	半限定 C:N=80	6.82±1.11 (n=2)	0.22±0.01 (n=2)
pOLE1-解脂耶氏酵母OLE1 (天然) pTEF-棉铃虫FAR (SPV471)	半限定 C:N=80	0.22±0.03 (n=2)	4.30±2.23 (n=2)

[0904] 结果

[0905] 菌株构建

[0906] 文献中的证据表明,昆虫去饱和酶和FAR都位于内质网的膜中,活性位点取向为朝向细胞质。在功能变体中,选择来自玉米穗蛾的Z11去饱和酶和来自棉铃虫的FAR(SEQ ID NO:41中列出的FAR氨基酸序列),一种假设是使用来自同一属(铃夜蛾属(Helicoverpa))的酶可更好地保留可能在ER膜中发生的蛋白质-蛋白质相互作用。

[0907] 从金斯瑞公司订购了两种新的构建体,并将其克隆到先前组装的玉米穗蛾去饱和酶质粒pPV0199中。用EXP1或TAL1启动子将来自解脂耶氏酵母的两个FAR合成子克隆到此表达盒中。

[0908] 将一个双重表达质粒(具有EXP1启动子)转化到亲本菌株SPV300(H222Δpox1Δpox2Δpox3Δpox4Δpox5Δpox6Δadh1Δadh2Δadh3Δadh4Δadh5Δadh6Δadh7Δfao1Δura3)中。将相同亲本菌株的两种不同的感受态细胞制备物进行转化以研究由感受态细胞制备物产生的菌株性能的可变性。大约25%的URA+克隆被确认为XPR2基因座处的靶向整合体(制备物1为20%,制备物2为33%)。选择来自感受态细胞制备物1的两个克隆和来自感受态细胞制备物2的所有八个靶向克隆用于功能性表达测定中的筛选。

[0909] 将第二双重表达质粒(具有TAL1启动子)整合到同一亲本菌株(SPV300)中。通过检查PCR筛选了二十三个菌落,并且发现11个是靶向整合体(48%)。在功能性表达测定中选择了九个整合体进行筛选。

[0910] 先前描述了SPV471(表达棉铃虫FAR的H222ΔPΔAΔF)的构建体。

[0911] Z11-16OH功能性表达测定

[0912] 使用体内24孔板测定来评价Z11-16OH的产生。该测定是基于用于筛选去饱和酶和还原酶变体的设计以及用以增加脂肪酸累积的条件。使用丰富培养基(YPD)和半限定培养基,补充10g/L棕榈酸甲酯作为生物转化底物。半限定培养基具有约80的C:N比率,并且包括5g/L甘油和60g/L葡萄糖(进一步的详情参见材料与方法)。

[0913] 含有由TEF启动子驱动的玉米穗蛾去饱和酶和由EXP1启动子驱动的棉铃虫FAR(SEQ ID NO:41中列出的FAR氨基酸序列)的菌株的初始筛选确认需要FAR的存在来产生Z11-16OH。在任何条件下,从亲本和仅去饱和酶的对照菌株均未观察到十六碳烯醇。在两种培养基条件下,从表达完整去饱和酶-还原酶途径的克隆中检测到Z11-16OH和较少程度的Z9-16OH。当在丰富培养基中完成转化时,产生0.26±0.09mg/L Z11-16OH和0.06±0.01mg/L Z9-16OH(图32A)。当使用半限定培养基时,观察到Z11-16OH滴度增加10倍,而Z9-16OH滴度增加3倍(图32B)。在所有途径克隆中,产生2.65±0.29mg/L Z11-16OH和0.18±0.02mg/L Z9-16OH。Z11-16OH超过Z9-16OH的富集支持设计区域特异性Bdr途径的潜力。在半限定培养

基条件下,技术重复之间的一致性在克隆间有所不同。克隆2、4、6、9和17的滴度与CV<20一致。克隆1、7和23具有CV>40%。观察到克隆17的最高的一致Z11-16OH滴度为3.68±31mg/L(表15)。

[0914] 表15.pEXP1克隆的Z11/Z9-16OH滴度的汇总表。在两种不同培养基条件下测定了表达由pTEF驱动的玉米穗蛾去饱和酶和由pEXP1驱动的棉铃虫还原酶(来自两种独立的感受态细胞制备物)的十个分离株的群体的Z11-16OH和Z9-16OH产量。呈现了分离株间和来自选择克隆的醇产生。

[0915]

pTEF-Hz_desat pEXP-Ha_FAR 克隆	培养基	Z11-16OH (mg/L)	Z9-16OH (mg/L)	Z11-16OH 倍数增加(相对于YPD)	Z9-16OH 倍数增加(相对于YPD)
所有克隆	YPD	0.26±0.09	0.06±0.01	-	-
所有克隆	半限定	2.65±0.29	0.18±0.02	10	3
克隆 2(SPV574)	YPD	0.18±0.09	0.05±0.03	-	-
克隆 2(SPV574)	半限定	2.08±0.26	0.14±0.04	12	3
克隆 4(SPV575)	YPD	0.28±0.01	0.11±0.01	-	-
克隆 4(SPV575)	半限定	3.24±0.28	0.21±0.03	12	2
克隆 9(SPV576)	YPD	1.03±0.84	0.05±0.01	-	-
克隆 9(SPV576)	半限定	1.56±0.28	0.11±0.02	1.5	2
克隆 23(SPV577)	YPD	0.16±0.14	0.05±0.05	-	-
克隆 23(SPV577)	半限定	3.35±1.85	0.26±0.15	21	5
克隆 17(SPV578)	YPD	0.19±0.01	0.06±0.01	-	-
克隆 17(SPV578)	半限定	3.68±0.31	0.26±0.02	14	4

[0916] 还量化了完整途径克隆的脂质谱。为了简单起见,在图33A-33B中针对选择克隆对16碳脂肪酸物质作图。通常,完整Bdr途径克隆比仅去饱和酶的对照累积更少的Z11-16酸(YPD中0.25<0.5g/L,半限定中0.8-1.0<1.5g/L)。在完整Bdr途径克隆中较低的Z11-16酸滴度可能是由于双表达盒中的去饱和酶表达降低或可能是由FAR和随后的副产物途径消耗的Z11-16酸所致。在YPD中没有观察到16酸滴度的趋势,而在半限定培养基中仅去饱和酶和完整途径菌株的16酸滴度相似。

[0917] 在用于评价pEXP克隆的相同半限定培养基条件下,测定使用第二双重表达盒(pTAL-Ha_FAR)的菌株。针对SPV300(亲本)、SPV575(pEXP-Ha_FAR克隆4)和SPV578(pEXP-Ha_FAR克隆17)对照测定了九个pTAL克隆。如所预期的,从阴性对照没有观察到醇产物。来自pEXP阳性对照菌株的醇滴度复制了在pEXP克隆的初始测定中观察到的结果(图34,表16)。排除一个异常克隆,即克隆9,pTAL克隆(4.19±0.16mg/L)和pEXP克隆(4.10±0.22mg/L)的Z11-16OH滴度相当。克隆9产生6.82±1.11mg/L的Z11-16OH。与用pEXP克隆进行的第一次测定一样,观察到低但可检测到的Z9-16OH滴度(图34,表16)。

[0918] 表16.pTAL1克隆的Z11/Z9-16OH滴度的汇总表。在半限定培养基条件下,测定了在TEF启动子下表达玉米穗蛾去饱和酶和在TAL启动子下表达棉铃虫还原酶的九个分离株群的Z11-16OH和Z9-16OH产量。将克隆与在TEF启动子下表达玉米穗蛾去饱和酶和在EXP启动子下表达棉铃虫还原酶的阳性对照进行比较。呈现了分离株间和来自选择克隆的醇产生。

[0919]

pTEF-Hz-desat pEXP-Ha_FAR 克隆	培养基	Z11-16OH (mg/L)	Z9-16OH (mg/L)
EXP 克隆 4 (SPV575)	半限定	3.91 ± 0.44	0.15 ± 0.01
EXP 克隆 17 (SPV578)	半限定	4.30 ± 0.16	0.17 ± 0.02
排除克隆9的pTAL克隆	半限定	4.19 ± 0.16	0.18 ± 0.01
pTAL 克隆 9 (SPV603)	半限定	6.82 ± 1.11	0.22 ± 0.01

[0920] 还在第二次(pTAL)完整途径筛选中量化了所有菌株的脂质谱。为了简单起见,在图35中对16碳脂肪酸物质作图。如所预期的,仅对于表达去饱和酶的菌株,Z11-16酸存在。完整的脂质谱与先前观察到的相似(图36)。Z9-18酸(油酸)是Z11-16酸后第二最丰富的脂肪酸物质。

[0921] Z9-16OH功能性表达测定

[0922] 使用体内烧瓶规模测定来测试Z9-16OH产生。将亲本对照菌株H222ΔPΔAΔF(SPV300)与表达依赖天然Z9去饱和酶活性以合成Z9-16CoA前体(SPV471)的棉铃虫FAR的菌株进行比较。通过YPD种子培养物生成生物质,模拟板测定。将生物转化烧瓶以初始OD600＝1或OD600＝4接种到用于Z11-16OH板测定中的相同半限定C:N＝80培养基中(详情参见材料与方法)。如所预期的,孵育24小时后,对照烧瓶没有产生可检测到的Z9-16OH,而SPV471烧瓶产生高达4.30±2.23mg/L(图37A-图37B)。尽管重复之间存在较大可变性,所有SPV471(棉铃虫FAR)重复次数均超过1mg/L滴度。增加接种密度不会增加Z9-16酸或Z9-16OH滴度。针对用于产生Z11-16OH的双重表达盒菌株观察到,24小时处前体Z9-16酸滴度比Z11-16酸前体显著更少(<0.5g/L)。其他脂肪酸物质的相对丰度与先前观察到的曲线相似,其中Z9-18酸作为下一种最丰富的物质(图38)。在48小时的过程中采集脂质和醇样品以产生Z9-16OH和脂质滴度的时间过程。Z9-16OH滴度在24小时处达到峰值,之后在第二天中降低(图39A)。Z9-16酸在前24小时内迅速增加,之后在第二个24小时内稳定或缓慢增加(图39B)。由于所采用的分析方法仅利用细胞沉淀,Z9-16OH滴度的下降支持醇产物下游消耗或分泌的假设。它们可能被氧化(ω-氧化),以游离醇形式分泌,或以酯的形式衍生化和分泌。使用FID和MS SCAN检测分析上清液样品揭示没有可检测到的Z9-16OH或Z9-16OH衍生物,支持通过氧化途径消耗的假设。

[0923] 结论

[0924] 铃夜蛾属Z11去饱和酶和脂肪酰基-CoA还原酶的组合表达导致在解脂耶氏酵母H222ΔPΔAΔF(SPV300)中产生Z11-16OH,滴度>1mg/L。

[0925] 相对于丰富培养基条件,高C:N比条件改进了Z11-16OH滴度。

[0926] 在脂质累积条件下,天然Z9去饱和酶和棉铃虫FAR活性的组合足以合成>1mg/L Z9-16OH。

[0927] 滴度增加,例如,通过缺失消耗脂肪醇产物和/或脂肪酸前体的途径;鉴定展现出比棉铃虫FAR更高的周转率的FAR变体;和/或增加途径拷贝数。

[0928] 鉴定了关键的不希望的副产物。

[0929] 探索了一些脂肪醇产物通过一种或多种内源乙酰基转移酶的活性转化为脂肪乙酸酯的可能性。

[0930] 改进的宿主菌株被工程化以消除ω-氧化途径和脂质储存途径的组分。

[0931] 材料与方法

[0932] 菌株构建

[0933] 所有去饱和酶和还原酶基因均从金斯瑞公司订购。使用智人密码子优化(金斯瑞公司算法)。使用SapI限制性位点,通过金斯瑞公司将新合成的表达盒亚克隆到pPV199中。转化质粒并使用Zyppy质粒小量制备试剂盒(Zyppy Plamsid Miniprep Kit,酶研究公司(Zymo Research),欧文,加利福尼亚州)从大肠杆菌EPI400进行制备。用PmeI(新英格兰生物实验室(New England Biolabs),伊普斯威奇(Ipswich),马萨诸塞州)消化质粒并使用Zymoclean Gel DNA回收试剂盒(酶研究公司(Zymo Research),欧文,加利福尼亚州)通过凝胶提取进行纯化。使用清洁和浓缩器试剂盒(Clean and Concentrator Kit)(酶研究公司(Zymo Research),欧文,加利福尼亚州)进一步浓缩DNA。使用Frozen-EZ酵母转化II试剂盒(酶研究公司(Zymo Research),欧文,加利福尼亚州)转化约1-2μg DNA。制造商的方案修改如下:在感受态细胞制备前一天的早上9点接种2ml YPD种子培养物。在接种250ml带挡板的摇瓶中的40ml YPD(或在125ml带挡板的烧瓶中的20ml)至初始OD600为0.0005之前,使种子生长8小时(直到下午5点)。将培养物在28℃和250rpm下孵育约24小时。在OD600＝0.5-1时收获细胞。代替按照制造商的说明将10ml培养物重悬于1ml溶液2中(OD600约10),将10ml SPV140培养物重悬于0.5ml中(OD600约20-30)。通过将管置于密闭的聚苯乙烯泡沫盒中,之后放入-80℃冰箱中,来将所有溶液2个等分试样缓慢冷冻至-80℃。将在1.7ml Eppendorf管中感受态细胞的50μl等分试样在冰上解冻,将在水中洗脱的DNA直接添加到细胞中,并且使用500μl溶液3以轻轻移液使细胞悬浮。将管在28℃下孵育3小时,每30分钟轻轻涡旋。将整个转化混合物铺板在CM葡萄糖-ura琼脂板上。发现阳性整合体是位点特异性的,并且通过检查PCR进行基因分型。

[0934] Z11-16OH功能性表达测定

[0935] 将阳性分离株在YPD上进行再次斑块生长,使其生长过夜,并且然后在4℃下储存。将菌株从斑块板接种到24深孔板(方孔,锥体底部)中的2ml YPD中。从每个斑块制备重复接种物。将阴性对照菌株从甘油储备液中振出到YPD上并且使用单个菌落进行接种。在Infors Multitron冷藏烧瓶振荡器中,在28℃和250rpm下,将深孔板孵育24小时。孵育24小时后,通过以800xg离心使0.85ml体积的每种培养物沉淀。将每种沉淀重悬于2ml YPD或半限定培养基中(如下表17所述)。将10g/L棕榈酸甲酯(预热至约50℃)添加到培养物中。将所有培养物在终点采样前孵育48小时。使用Tecan Infinite 200pro读板仪测量最终细胞密度。将1.5ml(醇分析)或500μl(脂质分析)转移至1.7ml微量离心管中并沉淀。将上清液转移至清洁的管中,并如下所述处理样品。

[0936] 表17.半限定(C:N＝80)培养基组成。描述了用于诱导脂质储存的半限定基础培养基的组分。

[0937]

培养基组分	浓度	单位
酵母提取物	2	g/L
蛋白胨	1	g/L
磷酸钾缓冲液pH 7	0.1	M
YNB、无aa、NH4	1.7	g/L
葡萄糖	60	g/L
甘油	5	g/l

[0938] Z9-16OH功能性表达测定

[0939] 将SPV300(阴性对照)和SPV471振出到YPD琼脂板上,使其生长过夜,并且然后在4℃下储存。将菌株从菌落接种到2ml YPD中,并在28℃和250rpm下在14ml圆底培养管中培养约8小时。孵育后,在125ml带挡板的摇瓶中,使用2ml培养物接种20ml YPD。将摇瓶在28℃和250rpm下培养24小时。孵育后,使用Tecan Infinite 200pro读板仪测量摇瓶中的细胞密度。将适当体积的培养物沉淀以便将细胞按初始OD600=1(约1gDCW/L)或4(约4gDCW/L)重悬于25ml半限定C:N=80培养基中(参见上表17)。将重悬的培养物添加到250ml带挡板的摇瓶中。预加热至50℃后,添加纯棕榈酸甲酯,终浓度为10g/L。在添加底物后,将烧瓶在28℃和250rpm下孵育两天。在12、18、24、36、42和48小时,在1.7ml微量离心管中取500μl(脂质分析)和1.5ml(醇分析)样品。将样品沉淀并将上清液转移到清洁的微量离心管中。

[0940] 代谢物萃取和GC-MS检测

[0941] 醇分析

[0942] 将通常约10mg至80mg的沉淀细胞(在1.5mL塑料管中)重浮于含有5%(w/w)氢氧化钠的甲醇中。将碱性细胞悬浮液转移至1.8mL钳口小瓶(crimp vial)中。将混合物在90℃的加热块中加热1小时。在用400μL 2.5N HCl酸化之前,使小瓶冷却至室温。添加含1mM十七烷酸甲酯的500μL氯仿并剧烈振荡混合物,然后将水相和有机相转移至1.5mL塑料管中。将混合物以13,000rpm离心,之后将450μL有机相转移至GC小瓶中。将有机相在90℃的加热块中蒸发30分钟。将残余物溶于含有1%三甲基氯硅烷的50μL N,O-双(三甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺中。在转移到玻璃插入物之前,将该混合物在90℃加热5分钟。通过GC-MS分析样品(表18)。

[0943] 表18GC-MS参数

[0944]

系统	安捷伦6890 N GC，ChemStation G1701EA E.02.01.1177
柱	DB23 30 m x 25 μm x 25 μm 压力 = 11.60 psi；流速 = 0.6 mL/min
入口	加热器 = 250°C；压力 = 11.74 psi； 总流量 {He} = 111 mL/min
载气	He @ 29 cm/sec, 11.60 psi
信号	数据速率 = 2 Hz/0.1 min
烘箱	150°C持续1 min 升温12°C/min至220°C，保持3 min 升温35°C/min至300°C，保持4 min
进样	不分流，250°C
检测器	初始菌株筛选和首个一式三份技术重复:HP 5973 SIM模式MSD（m/z：208.0、297.3和387.3）， SPV488/SPV490醇量化：HP 5973 MSD， SIM模式（m/z：284.0和297.3）， 100毫秒停留时间，EMV模式：增益因子1， 2.4 min溶剂延迟，3.09个循环/秒
样品	进样体积 = 1 uL

[0945] 脂质分析

[0946] 总脂质组成是基于Moss等人(1982)和Yousuf等人(2010)的修改程序。将通常约10mg至80mg的沉淀细胞(在1.5mL塑料管中)重浮于含有5%(w/w)氢氧化钠的甲醇中。将碱

性细胞悬浮液转移至1.8mL玻璃钳口GC-小瓶中。将混合物在90℃的加热块中加热1小时。在用400μL 2.5N HCl酸化之前,使小瓶冷却至室温。添加含1mM十七烷酸甲酯的500μL氯仿并剧烈振荡混合物,然后将水相和有机相转移至1.5mL塑料管中。将混合物以13,000rpm离心,之后将450μL有机相转移至新的1.8mL玻璃螺帽GC-小瓶中。冷却至室温后,将残余脂肪酸甲酯和游离脂肪酸溶解并在含有0.2M TMSH(三甲基氢氧化锍)的甲醇中衍生化(表19)。

[0947] 表19.GC-MS参数

[0948]

系统	安捷伦公司6890 GC，ChemStation Rev. B.03.02 (341)
柱	J&W DB-23 30 m x 25 mm x 25 μm 压力 = 16 psi；流速 = 0.9 mL/min；运行时间 = 14.4 min
入口	加热器 = 240°C；压力 = 16 psi；总流量 {He} = 31.4 mL/min
载气	H_2 @ 1 mL/min, 9 psi, 35 cm/sec
信号	数据速率 = 2 Hz/0.1 min
烘箱	150°C持续1 min 升温12°C/min至220°C，保持3 min 升温35°C/min至240°C，保持6 min 平衡时间： 2 min
进样	分流： 240°C 分流比 – 30:1; 29.1 mL/min
检测器	FID, 240°C H_2@ 35.0 mL/min，空气@ 350 mL/min；静电计{点火补偿} @2.0 pA
样品	进样体积 = 1 uL

[0949] 实施例10:解脂耶氏酵母中Z11-14酸的产生

[0950] 背景和基本原理

[0951] 解脂耶氏酵母经工程化以产生Z11-14酸,其是靶向鳞翅目(Lepidoptera)信息素Z11-14Ac的前体。

[0952] 选择了73种去饱和酶的文库以靶向潜在的信息素,包括Z11-14Ac、Z7-12Ac、Z9E12-14Ac、E8E10-C12OH和Z9E11-14Ac。在H222ΔPΔAΔF(SPV300)背景下测试了所有去饱和酶。

[0953] 从文献中鉴定出了11种具有Δ11活性的去饱和酶(DST001-DST009、DST030和DST039,表20)。通过进料棕榈酸甲酯(C16)、肉豆蔻酸甲酯(C14)或月桂酸甲酯(C12)作为底物来筛选所有去饱和酶,并通过GC分析确定完整的产物谱图。

[0954] 讨论了据称的Δ11去饱和酶文库以及显示出可产生Δ11化合物特别是Z11-14酸的其他去饱和酶的所得活性。

[0955] 表20.实施例10中讨论的去饱和酶

[0956]

酶代码	生物体来源	GenBank 登录号
DST001	红带卷蛾	AF416738
DST002	斜纹夜蛾	AGH12217.1
DST003	水稻大螟	AII21943.1
DST004	烟草天蛾	CAJ43430.2
DST005	欧洲玉米螟	AF441221
DST006	玉米穗蛾	AAF81787.1
DST007	蔷薇斜条卷叶蛾	AF545481
DST008	黑腹果蝇	AJ271414
DST009	海灰翅夜蛾	AY362879
DST030	红醋栗穿孔蛾	ABX71630.1
DST039	脐橙螟蛾	NP001299594.1

[0957] 结果

[0958] 当向去饱和酶文库进料2g/L肉豆蔻酸甲酯时,观察到高达69mg/L的Z11-14酸产生(图41)。除去饱和酶DST001至DST007、DST030和DST039之外,目前最佳的去饱和酶玉米穗蛾(Hz)DST(SPV459,由SEQ ID NO:54编码),产生一定量的Z11-14酸,范围为16mg/L至69mg/L。DST001(红带卷蛾)、DST004(烟草天蛾)和DST039(脐橙螟蛾)对Z11-14酸的产生比对Z11-16酸的产生更具特异性,尽管这些去饱和酶产生~20mg/L Z11-14酸。产生较高Z11-14酸滴度的菌株还从肉豆蔻酸甲酯底物以20-30mg/L产生Z9-14酸,这与阴性对照SPV298相比降低了。相较于SPV298,Hz DST(SPV459)的C14-C18产品谱在图42中显示。

[0959] 显示了Z11-14酸合成的概念验证。试图鉴定比玉米穗蛾DST(1.05g/L Z11-16酸;69mg/L Z11-14酸)具有改善的Z11-16酸滴度或产物特异性的酶。尽管不存在具有比Hz DST(SPV459)高的产量的去饱和酶,但是DST003(SEQ ID NO:39)具有与HzDesat菌株相似的产生表型,并且DST002和DST005具有相似的Z11-16酸产生,同时具有降低的Z11-14酸。DST006中的去饱和酶在基因上与SPV459中表达的玉米穗蛾去饱和酶等效,且作为文库对照。当进料棕榈酸甲酯时,DST006产生了等同水平的Z11-16酸;但是,此菌株在肉豆蔻酸甲酯上产生了较低的Z11-14酸滴度。菌株背景的遗传变异可能对观察到的差异作出解释。

[0960] 以前曾在不同条件下筛选DST039(脐橙螟蛾)。在丰富培养基中,未观察到在天然脐橙螟蛾编码序列情况下的Z11-16酸生产。测试了智人优化的序列,并且在丰富培养基条件下仍未观察到活性。在此筛选中,在氮限制条件下,在Hs优化的序列情况下测试了DST039,并且导致在相关底物上产生235mg/L的Z11-16酸和21mg/L的Z11-14酸。

[0961] 在SPV300背景中未观察到来自DST008(黑腹果蝇)或DST009(斜纹夜蛾)的Δ11产物。

[0962] 概要

[0963] 在10种去饱和酶中观察到Z11-14酸的产生,滴度范围为16mg/L至69mg/L(进料2g/L肉豆蔻酸甲酯)。

[0964] 玉米穗蛾DST(SEQ ID NO:54)仍然是最佳的Z11-16酸产生者(当进料棕榈酸甲酯时>1g/L)。

[0965] DST003(水稻大螟,SEQ ID NO:39)具有与玉米穗蛾DST最相似的表型。

[0966] 对于Z11-16酸产生,DST002(斜纹夜蛾)和DST005(欧洲玉米螟)比玉米穗蛾DST更具特异性(减少的Z11-14酸产生)。

[0967] 对于Z11-14酸产生,DST001(红带卷蛾)、DST004(烟草天蛾)和DST039(脐橙螟蛾)比玉米穗蛾DST更具有特异性。

[0968] 结论

[0969] 当进料豆蔻酸甲酯时,在特定的去饱和酶在解脂耶氏酵母中异源表达的情况下,可以产生Z11-14酸。

[0970] 多个拷贝的去饱和酶(相同序列或序列组合)被整合到改良的菌株背景中,用于增加Z11-14酸滴度、产物特异性和遗传稳定性。

[0971] 材料和方法

[0972] 文库产生

[0973] 将去饱和酶序列提供给金斯瑞(Genscript),用于密码子优化(智人表达生物体),使用PacI/SapI限制性消化将其克隆到pPV266(具有TEF启动子和终止子的XPR2基因座整合载体)中。提供冻干的DNA以及EPI400琼脂穿刺。去饱和酶构建体列于表21中。

[0974] 使用PmeI限制酶将构建体线性化,并直接转化到宿主菌株SPV300中。通过使用XPR2整合连接的外部和pTEF启动子的内部的引物的检查PCR验证转化子。

[0975] 表21.去饱和酶构建体

[0976]

酶代码	物种	GenBank登录号	大肠杆菌SPV	质粒pPV
DST001	红带卷蛾	AF416738	SPV0609	pPV0300
DST002	斜纹夜蛾	AGH12217.1	SPV0610	pPV0301
DST003	水稻大螟	AII21943.1	SPV0611	pPV0302
DST004	烟草天蛾	CAJ43430.2	SPV0612	pPV0303
DST005	欧洲玉米螟	AF441221	SPV0613	pPV0304
DST006	玉米穗蛾	AAF81787.1	SPV0614	pPV0305
DST007	蔷薇斜条卷叶蛾	AF545481	SPV0615	pPV0306
DST008	黑腹果蝇	AJ271414	SPV0616	pPV0307
DST009	海灰翅夜蛾	AY362879	SPV0617	pPV0308
DST030	红醋栗穿孔蛾	ABX71630.1	SPV0638	pPV0329

[0977]

DST039	脐橙螟蛾	NP_001299594.1	SPV0647	pPV0338

[0978] 质粒消化

[0979] 从Genscript订购了～10μg的冻干的DNA。将DNA重悬于50μL水中,最终浓度为～200ng/μL。将10μL的DNA与1.25μL 10x CutSmart缓冲液和1.25μL PmeI限制酶混合(12.5μL反应体积)。将反应物在PCR仪中在37℃下孵育1.5小时,并在65℃下热灭活30分钟。

[0980] 转化

[0981] 通过在有挡板的烧瓶中以0.0010D接种YPD培养物来使SPV300感受态细胞生长,并

生长到0.5-1.00D。以800xg收获细胞,并用来自Zymo Frozen-EZ转化II酵母试剂盒的0.25x体积的溶液1洗涤。将细胞以原始培养物体积的1000x浓度重悬于溶液2中,并在-80℃中缓慢冷冻,同时在泡沫聚苯乙烯容器中隔热(冷冻细胞可比新鲜细胞具有更高的转化效率)。首先将50μL细胞与12.5μL消化反应物混合(无需清除),然后与500μL溶液3混合。转化液在28℃下不摇动下孵育3小时,然后将完整的转化混合物铺板到合适的选择性琼脂培养基。在出现菌落之前,将有盖培养皿孵育3-4天。

[0982] 检查PCR

[0983] 将转化菌落挑入到PCR平板中的7μL水中。通过多通道,5μL细胞斑块生长至选择性全能托盘中,生长过夜。将剩余的2μL细胞微波处理2分钟,然后加入15μL PCR主混合物。

[0984]

PCR主混合物	1X反应物
2x Phusion主混合物(HF缓冲液)	7.5 μL
100μM oPV204(XPR2基因座F)	0.1 μL
100μM oPV195 (pTEF R)	0.1 μL
水	7.3 μL

[0985] PCR循环

[0986]

温度	时间	循环
98oC	2 min	1x
98oC	15 sec	30x
64oC	30 sec	
72oC	60 sec	
72oC	5 min	1x
4oC	∞	1x

[0987] 菌落斑块生长

[0988] 阳性克隆以包括测定对照的24孔形式重新斑块生长至YPD全能托盘中。全能托盘在28℃下生长过夜,并用于接种生物测定培养物。

[0989] 生物测定

[0990] 将阳性转化子(N=每个构建体4个克隆)接种到24孔培养板中的1mL YPD中,并在28℃下在Infors HT Mulitron Pro中以1000rpm摇动孵育24小时。以800xg沉淀细胞,然后重悬于具有5μL底物(~2 g/L浓度)的S2培养基中。生物转化48小时后,将250μL培养物取样到玻璃钳口小瓶中。

[0991] S2培养基

[0992] 2g/L酵母提取物,1g/L蛋白胨,0.1M磷酸盐缓冲液,1.7g/L YNB(不含氨基酸),NH4,60g/L葡萄糖,5g/L甘油

[0993] GC样品处理

[0994] 前入口/检测器

[0995] 系统 6890GC,化学工作站Rev.B.03.02(341)

[0996] 柱J&W DB-23 30m x 25mm x 25um

[0997] 运行时间＝14.4min

[0998] 入口 加热器＝240℃;压力＝9.0psi;总流量{H2}＝36.2

[0999] mL/min

[1000] 载体 H2@1.0mL/min,9.0psi,35cm/sec

[1001] 信号 数据速率＝2Hz/0.1min

[1002] 烘箱 150℃,持续1min

[1003] 升温12℃/min至220℃,维持3min

[1004] 升温35℃/min至240℃,维持4min

[1005] 平衡时间:2min

[1006] 注射 分流,240℃

[1007] 分流比-30:1;29.1mL/min

[1008] 检测器 FID,240℃

[1009] H2@35.0mL/min,空气@350mL/min

[1010] 静电计{点火补偿}@2.0pA

[1011] 样品 注射体积＝1μL

[1012] 后入口/检测器:

[1013] 系统 6890GC,化学工作站Rev.B.03.02(341)

[1014] 柱J&W DB-23 30m x 25mm x 25um

[1015] 运行时间＝14.4min

[1016] 入口 加热器＝240℃;压力＝9.8psi;总流量{H2}＝40.1mL/min

[1017] 载体 H2@1.1mL/min,9.8psi,38cm/sec

[1018] 信号 数据速率＝2Hz/0.1min

[1019] 烘箱 150℃,持续1min

[1020] 升温12℃/min至220℃,维持3min

[1021] 升温35℃/min至240℃,维持4min

[1022] 平衡时间:2min

[1023] 注射 分流,240℃

[1024] 分流比-30:1;32.3mL/min

[1025] 检测器FID,240℃

[1026] H2@35.0mL/min,空气@350mL/min

[1027] 静电计{点火补偿}@2.0pA

[1028] 样品 注射体积＝1μL

[1029] TMSH:三甲基氢氧化锍(在甲醇中0.2mol/L)-VWR TCT1576-025ML

[1030] 实施例11:使用增加的拷贝数的经工程化的变体形成脂肪醇的脂肪酰基Co-A还原酶(FAR)在解脂耶氏酵母中产生Z11-16OH

[1031] 背景和基本原理

[1032] 工程化不饱和昆虫脂肪醇的微生物产生需要合成途径的功能表达。一种此类途径包含跨膜去饱和酶,以介导脂肪酰基-CoA转化为区域专一性和立体特异性的不饱和脂肪酰基-CoA。形成醇的还原酶(FAR)补充了该合成途径,以产生相应的脂肪醇。

[1033] 在某些昆虫物种中,相应的FAR酶经由位点特异性去磷酸化被激活(Jurenka,R.&Rafaeli,A.Regulatory Role of PBAN in Sex Pheromone Biosynthesis of Heliothine Moths.Front.Endocrinol.(Lausanne).2,46(2011);Gilbert,L.I.Insect Endocrinology.(学术出版社))。解脂耶氏酵母中异源表达的FAR酶的磷酸化可导致失活,并导致低的脂肪醇滴度。生物信息学方法用于预测HaFAR中的磷酸化的残基。

[1034] 已显示丝氨酸和苏氨酸残基的丙氨酸替代可消除磷酸化(Shi,S.,Chen,Y.,Siewers,V.&Nielsen,J.Improving Production of Malonyl Coenzyme A-Derived Metabolites by Abolishing Snf1-Dependent Regulation of Acc1.mBio 5,(2014))。因此,除了增加FAR基因拷贝数之外,还测试了HaFAR酶(SEQ ID NO:41中列出的HaFAR氨基酸序列和SEQ ID NO:90中列出的HaFAR核苷酸序列)的几个丝氨酸残基的丙氨酸替代对Z11-16OH滴度的影响。

[1035] 方法

[1036] 将人密码子优化的棉铃虫FAR基因(HaFAR)的第二拷贝引入Z11-16OH产生者亲本菌株的染色体中。平行地,还探索了引入朝向Z11-16OH产量提高的突变的棉铃虫FAR基因变体的拷贝的效果。设计了七个突变变体,旨在通过潜在地缓解对去磷酸化的需求(如在某些昆虫物种中观察到的)来增加FAR活性。为此,鉴定了棉铃虫FAR的氨基酸序列内的几个潜在的磷酸化位点,并用丙氨酸取代。

[1037] 结果

[1038] 确定HaFAR中的磷酸化的位点

[1039] 万维网地址上的服务器:cbs.dtu.dk/services/NetPhos/()基于实验验证的磷蛋白质的数据库(万维网地址:phospho.elm.eu.org/about.htmL)基于17种激酶:ATM、CKI、CKII、CaMII、DNAPK、EGFR、GSK3、INSR、PKA、PKB、PKC、RSK、SRC、cdc2、cdk5和p38MAPK来预测潜在的磷酸化位点。

[1040] 该软件程序预测了棉铃虫FAR中22个丝氨酸、11个苏氨酸和10个酪氨酸作为潜在的磷酸化位点(图43)。

[1041] 接下来,应用定制的预测程序来确定棉铃虫FAR在酵母中表达后的磷酸化位点(万维网地址:cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast/;Blom,N.,Gammeltoft,S.&Brunak,S.Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites1.J.Mol.Biol.294,1351-1362(1999))。由于在酵母中尚未鉴定出酪氨酸激酶(Ingrell,C.R.,Miller,M.L.,Jensen,O.N.&Blom,N.NetPhosYeast:prediction of protein phosphorylation sites in yeast.Bioinforma.23,895-897(2007)),因此酵母特异性软件仅将丝氨酸和苏氨酸视为潜在的磷酸化位点。令人惊讶的是,这两个程序均预测相同的11个丝氨酸残基会被磷酸化。相反,酵母特异性分析工具未预测出任何磷酸化的苏氨酸残基(图44)。

[1042] 在第一个实验中,测试了由7个Ser至Ala点突变体组成的小型文库(表22)。不考虑

三个预测的磷酸化位点用于诱变(位置Ser301、Ser386、Ser416得分仅高于阈值)。对于其余的7个丝氨酸残基,引入了丙氨酸取代。

[1043] 表22.丝氨酸至丙氨酸突变文库

亲本菌株	额外的酶	菌株 #
解脂耶氏酵母H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR	SPV916
解脂耶氏酵母H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S60A	SPV909
解脂耶氏酵母H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL	HaFAR S195A	SPV910

[1044]

亲本菌株	额外的酶	菌株 #
1-HA_FAR-tXPR2_loxP		
解脂耶氏酵母H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S298A	SPV911
解脂耶氏酵母H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S378A	SPV912
解脂耶氏酵母H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S394A	SPV913
解脂耶氏酵母H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S418A	SPV914
解脂耶氏酵母H222ΔPΔAΔF xpr2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tLIP2-pTAL1-HA_FAR-tXPR2_loxP	HaFAR S453A	SPV915

[1045]

[1046] HaFAR文库是定制合成的,并亚克隆到质粒pPV234中,用于在TEF启动子和AXP基因座的XPR2终止子下表达。线性化的构建体被转化到解脂耶氏酵母H222ΔPΔAΔF SPV603中,该菌株表达与玉米棉铃虫FAR(SEQ ID NO:41)组合的玉米Z11去饱和酶(SEQ ID NO:54)。此方法确定了除单个点突变的影响外的第二拷贝的影响,例如蛋白表达。

[1047] 测试了阳性整合子的四个单独的克隆。在24孔板中进行培养。简而言之,从单个克

隆的斑块接种2mL YPD,并在28℃,1000rpm下孵育24h。24小时后,测量OD600,并在1000rpm下离心细胞(表23)。将细胞沉淀重悬于1mL S2培养基中,并添加10g/L棕榈酸甲酯。在28℃,1000rpm下,孵育细胞18小时。将培养物储存在-20℃直至分析。提取和分析是根据先前建立的标准流程使用GC-FID进行的。

[1048] 表23. 24孔板培养物的OD600测量(平行培养两个板)。在YPD中培养24小时后,以1:10稀释后,将每个孔以一式两份进行测量。给出了计算的OD600值。

[1049]

	HaFA R-GFP	HaFA R-GFP	HaFA R-GFP	HaFA R S60A	HaFA R S195A 克隆2	HaFA R S195A 克隆2	HaFA R S195A 克隆3	HaFA R S195A 克隆3	HaFA R S298A	HaFA R S298A	SPV60 3	SPV603	
OD60 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	15.392	16.16	17.376	17.976	17.56	18.272	14.188	14.774	14.774	15.708	17.14	17.24	板2
B	16.62	17.172	18.632	18.596	18.894	18.088	16.082	15.38	16.04	16.03	16.572	16.584	板2
C	16.978	16.952	18.154	18.224	18.678	19.384	16.062	14.858	15.498	15.58	18.14	17.528	板2
D	16.596	17.23	17.668	18.842	18.39	18.792	20.678	16.566	16.094	15.904	1.262	1.152	板2
E	17.53	17.156	16.78	15.776	17.398	16.736	16.154	15.514	16.748	16.792	18.26	17.322	板1
F	18.336	17.928	16.392	15.33	20.018	19.37	15.06	14.266	17.522	17.076	16.724	16.522	板1
G	17.16	17.224	15.984	16.194	17.878	17.626	15.372	15.15	16.688	17.022	17.742	16.942	板1
H	16.258	16.12	16.134	16.236	16.808	16.176	15.382	14.51	15.456	15.394	7.664	7.956	板1

[1050]

	HaFA R S378A	HaFA R S378A	HaFA R S394A	HaFA R S394A	HaFA R S418A	HaFA R S418A	HaFA R S453A	HaFA R S453A	HaFA R	HaFA R	SPV60 3	SPV60 3	
OD600	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	15.842	15.97	15.31	16.278	16.088	16.302	16.074	15.502	15.34	15.742	16.89	16.062	板2
B	16.3	17.306	16.064	16.5	16.64	16.344	15.69	15.598	15.434	15.248	16.674	16.476	板2
C	17.088	17.146	15.966	15.472	16.508	16.548	15.82	15.216	15.796	16.098	16.81	17.246	板2
D	17.512	17.198	15.15	14.168	16.094	13.93	15.642	15.078	16.77	16.242	0.9	0.864	板2
E	16.446	17.014	15.762	16.536	17.188	17.372	16.164	15.892	15.8	16.422	17.998	17.814	板1
F	16.982	11.196	16.098	13.148	16.1	12.348	16.688	10.232	15.596	13.068	18.456	16.098	板1
G	15.4	15.568	15.236	16.348	15.504	15.824	14.922	15.622	15.11	15.576	17.142	17.672	板1
H	17.088	16.63	0.968	1.006	13.82	12.49	15.826	15.27	17.132	16.166	1.082	0.932	板1

[1051] 如图45所示的,菌株表达编码点突变的第二HaFAR拷贝,HaFAR-GFP或HaFAR*(其

中*指示除现有拷贝的亲本菌株外的第二拷贝的亲本HaFAR酶)。当与亲本菌株(SPV603)相比时,该拷贝增加了脂肪醇滴度。当与HaFAR双拷贝菌株相比时,HaFAR(S60A)、HaFAR(S298A)、HaFAR(394A)、HaFAR(S453A)的引入是中立的或显示出略微增加。与之不同,HaFAR(S418A)和HaFAR(S195A)的表达导致Z11-16OH滴度的明显增加。

[1052] 总的来说,这些结果表明残基195和418对于增加解脂耶氏酵母中的HaFAR活性是重要的。它们被丙氨酸取代可抑制磷酸化;因此,不需要磷酸化机制来增强其活性。除其他解释外,丝氨酸突变为丙氨酸的激活作用可来自蛋白质折叠的改善,稳定性的提高或蛋白质表达的提高。

[1053] 此外,定量几种脂肪酸种类,以确定增加的Z11-16OH产量是否导致Z11-16酸消耗。一些样品的标准差非常高(图46)。在所有样品中,检测到饱和的和Z11-16酸。各个产物中间体Z11-16酸的定量显示表达HaFAR S195A和HaFAR S418A的突变菌株SPV910和SPV914的消耗增加。

[1054] 在摇瓶实验中,将额外的HaFAR染色体性整合到亲本菌株中使Z11-16OH滴度从∽20 mg/L增加到40mg/L。

[1055] 当引入HaFAR(Ser195Ala)或HaFAR(Ser418Ala)时,在摇瓶实验中,Z11-16OH滴度分别从∽40mg/L增加到∽120mg/L或∽80mg/L。

[1056] 携带HaFAR(Ser195Ala)的突变株SPV910和携带HaFAR(Ser418Ala)的突变SPV914的途径中间体Z11-16酸以∽100mg/L积累,这比亲代菌株SPV603少。

[1057] 结论

[1058] 向Z11-16OH产生者菌株中添加另一棉铃虫FAR基因略微增加滴度。但是,引入突变的FAR显著提高Z11-16OH多达约7倍。这表明解脂耶氏酵母使FAR酶磷酸化,并且FAR去磷酸化是其全部活性的瓶颈。HaFAR中设计的突变可减轻对于去磷酸作用以使Z11-16酸转化为Z11-16OH的需求。设计的突变也有可能通过去磷酸化依赖性的机制提高FAR活性。摇瓶实验表明生物量、时间和脂肪醇滴度之间的直接关联。

[1059] 通过例如消除脂质存储途径(例如二酰基甘油乙酰基转移酶(DGAT)基因缺失)和/或消除副产物(羟基酸,二酸)途径来创建第二代菌株用于进一步改善Z11-16OH。

[1060] 材料&方法

[1061] SPV603的标记获救

[1062] 在250mL带挡板的摇瓶中用SPV603接种30mL缺少尿嘧啶的CM。将培养物在台式摇床中以250-300rpm和28℃下孵育。第二天早晨,测量培养物的OD 600。在OD600:0.6时,收获细胞。在离心管中沉淀细胞(800xg,5min)。去除上清液,并以1/2体积(15mL)的来自Zymo试剂盒的溶液1进行洗涤。再次沉淀细胞(800xg,5min),并重悬于200μl溶液2中。将50μl等分试样直接用于1.7mL Eppendorf管中。将剩余的等分试样储存在-80℃。加入10μl DNA(1-2μg),并与细胞轻轻混合。加入500μl溶液3并轻轻混合。将转化混合物在28℃平板培养箱中孵育≥3小时,随后用2mL去离子水(高压灭菌的)洗涤。在28℃下以2mL YPD o/n进行回收。将转化混合物直接铺在选择平板上。挑取克隆,并在缺少FOA 0.1%的URA和YPD平板上再次斑块生长。使用标准PCR方案确认了URA去除。

[1063] 构建HaFAR整合盒

[1064] HaFAR文库是使用人密码子定制合成的(金斯瑞),并使用限制性位点SpeI和NotI亚克隆到质粒pPV234中,以便在TEF启动子和AXP基因座的XPR2终止子下表达。线性化的构建体被转化到解脂耶氏酵母H222ΔPΔAΔF SPV603中,该菌株表达与棉铃虫FAR(SEQ ID NO:41)结合的玉米穗蛾Z11去饱和酶(SEQ ID NO:54)。变体FAR的氨基酸序列在SEQ ID NO:42-48中列出。变体FAR的核苷酸序列在SEQ ID NO:83-89中列出。

[1065] 在24孔板中培养HaFAR突变体文库

[1066] 在第一轮中,测试了来自每个转化的四个单独的分离物。在24孔板中进行培养。对2mL YPD接种单个克隆的斑块,并在28°C,1000rpm下孵育24h。24小时后,测量OD 600,并将细胞以1000rpm离心。将细胞沉淀重悬于1mL S2培养基中,并添加10g/L棕榈酸甲酯。将细胞在28℃,1000rpm下孵育24小时。培养物储存在-20℃直至分析。接下来,测试了表现最佳的阳性整合子的四个克隆。在24孔板中进行培养。对2mL YPD接种单个克隆的斑块,并在28℃,1000rpm下孵育～28h。28小时后,测量OD 600,并以1000rpm离心细胞。将细胞沉淀重悬于1mL S2培养基中,并添加10g/L棕榈酸甲酯。在28℃,1000rpm下孵育细胞18小时。培养物储存在-20℃直至分析。

[1067] 在摇瓶中培养HaFAR突变体文库

[1068] 摇瓶实验1:摇瓶培养过程中脂肪醇和脂肪酸滴度的时程分析

[1069] 在第一步,对各个菌株进行摇瓶实验,以分析随时间变化的脂肪醇和脂肪酸形成。测试了表达HaFAR、HaFAR S195A和HaFAR S418A的菌株的表现最佳的克隆。对10mL YPD接种单个克隆的斑块,并在125mL摇瓶中于28℃,250rpm孵育24小时。接下来,在500mL摇瓶中对25mL YPD接种5mL起始发酵物,并在28℃,250rpm下孵育24h。收获细胞,并将沉淀重悬于15mL S2培养基中,并添加10g/L棕榈酸甲酯。测量OD 600,随后添加棕榈酸甲酯。在28℃,1000rpm下孵育细胞72小时。每24小时采集4x0.5mL样品,并保存在-20℃下,直到根据先前建立的标准方案进行分析(图47和图48)。为了改善取样并减少标准偏差,将样品直接转移到GC钳口小瓶中并保存直至分析。

[1070] 菌株的OD600为:SPV910-10.2,SPV914-11.5和SPV916-12.3。

[1071] 摇瓶实验2:增加的生物量对生物转化的影响

[1072] 时程实验表明脂肪醇随时间减少。因此,取样减少到20h。在之前的24个孔板生物转化实验中,测量的生物量比摇瓶实验高约2倍。接下来,对各个菌株进行摇瓶实验,以分析生物量对脂肪醇滴度的影响。在生物转化过程中,总的孵育时间减少,生物量增加。测试了表达HaFAR S195A和HaFAR S418A的菌株的最佳表现的克隆。对20mL YPD接种单个克隆的斑块,并在500mL摇瓶中于28℃,250rpm孵育28h。收获细胞,并将沉淀以10g/L重悬于10mL S2培养基中,测量OD 600,随后添加棕榈酸甲酯。在28℃,1000rpm下孵育细胞20小时。取4x0.5mL样品,并根据先前建立的标准方案进行分析(图49)。

[1073] 菌株的OD600为:SPV910-24.9和SPV914-24.7。

[1074] 代谢物提取

[1075] 用500μL 5%NaOH(在甲醇中)重悬细胞沉淀,然后在85℃加热1小时。冷却样品,然后通过添加400μL 5N HCl酸化样品。接下来,向样品中添加500μL氯仿(含有1mM C17:0十七烷酸酯内标物)。剧烈混合样品,然后使用台式离心机以13,000RPM自旋向下(spin down)2分钟。将450μL氯仿转移到新的小瓶中,然后在85℃蒸发～15分钟。然后将样品重悬于50μL

BSTFA中(现准备用于GC分析)。分析脂肪醇后,将样品约1:10稀释,在GC上重新运行以改善脂肪酸峰的峰分离。

[1076] 定量

[1077] 所有定量均基于内标物的浓度。内标物C17ME的浓度为1mM。脂肪醇以及脂肪酸的最终浓度是基于与内标物比较的有效碳数计算的。

[1078] 实施例12:使用经工程化以消除脂质储存途径的第二代菌株,或使用形成脂肪醇的脂肪酰基CoA还原酶(FAR)的额外变体的在解脂耶氏酵母中的脂肪醇和脂肪酸的产生

[1079] 测试了选自YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)的内源二酰基甘油酰基转移酶缺失的影响。每个dga基因在菌株SPV735(ΔURA,ΔLeu,leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP)中被单独缺失。随后,根据标准程序对每个缺失菌株SPV957(Δdga1,ΔLeu,leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP)和SPV959(Δdga2ΔURA,leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP)进行了单独的标记物筛选。所得的菌株SPV1053(Δdga1ΔURA,ΔLeu,leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP)和SPV1054(Δdga2ΔURA,ΔLeu,leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP)用于转化HaFAR和HaFARS195A。在摇瓶中测试了相较于菌株SPV603的脂肪醇的形成(图50和图51)。摇瓶中随时间的结果表明,每个单独dga基因的缺失均改善脂肪醇形成并减少脂肪酸储存。

[1080] 摇瓶培养过程中脂肪醇和脂肪酸滴度的时程分析。

[1081] 将一个拷贝的HAFAR酶(SEQ ID NO:41)或HaS195A(SEQ ID NO:43)引入菌株SPV1053(Δdga1ΔURA,ΔLeu,leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP)和SPV1054(Δdga2ΔURA,ΔLeu,leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP),这两个菌株中的每个表达玉米穗蛾Z11去饱和酶(SEQ ID NO:54),且被缺失了DGA1或DGA2二酰基甘油酰基转移酶。

[1082] 在摇瓶中以生物学一式三份进行培养。每个菌株的起始培养物在250mL摇瓶中的50mL YPD中在28℃以250rpm生长28小时。通过在室温下以800g离心5分钟收获细胞,并将其重悬于30mL S2培养基中。将细胞悬浮液标准化为OD600:∽8。将每种起始培养物分在三个单独的125mL摇瓶中。添加10g/L棕榈酸甲酯。孵育培养物72h。每24h进行一次取样,并测量每个摇瓶的OD600。图50和图51分别显示了时程实验中的脂肪醇滴度和脂肪酸滴度。

[1083] 培养样品的提取。将每个样品0.5mL直接收获到钳口小瓶中。以800g离心钳口小瓶5分钟。去除上清液,将样品密封并保存在-20℃直至分析。将样品重悬于500μL含5%KOH的甲醇中,并在65℃至85℃下孵育60分钟。冷却步骤后,向每个钳口小瓶中添加200μL 5N HCl。添加600μL含有1mM C17Me的氯仿,再次密封。混合样品并离心。将500uL的氯仿转移到新的GC小瓶中,并在85℃下干燥30分钟至完全。将样品重悬于100uL BSTFA中,并在室温下孵育1h。使用气相色谱法根据标准方案分析样品。

[1084] 在24孔板中新菌株的形成脂肪醇的脂肪酰基-CoA还原酶文库筛选

[1085] 将单个拷贝的来自表24中的每种各FAR酶的引入SPV1054菌株(Δdga2ΔURA、ΔLeu、leu2::pTEF-HZ_Z11_desat_Hs-tXPR2_loxP),该菌株表达玉米穗蛾Z11去饱和酶(SEQ ID NO:54)并缺失了DGA2二酰基甘油酰基转移酶。

[1086] 在24孔板中以生物学一式四份进行培养。对2mL YPD接种每个单独的转化子的斑块。在28℃,250rpm下孵育24孔板28h。通过在室温下以800g离心5min收获细胞。将细胞重悬于1mL S2+60g/L甘油中,并添加10g/L棕榈酸甲酯。在1000rpm,28℃下孵育细胞96h。图52和

图53分别显示了24孔板筛选实验的脂肪醇滴度和脂肪酸滴度。

[1087] 培养样品的提取。将每个样品0.5mL直接收获到钳口小瓶中。以800g离心钳口小瓶5分钟。去除上清液,将样品密封并保存在-20℃直至分析。将样品重悬于500μL含有5%KOH的甲醇中,并在65℃至85℃下孵育60分钟。冷却步骤后,向每个钳口小瓶中添加200μL 5N HCl。添加600μL含有1mM C17Me的氯仿,再次密封。混合样品并离心。将500uL的氯仿转移到新的GC小瓶中,并在85℃下干燥30min至完全。将样品重悬于100uL BSTFA中,并在室温下孵育1h。使用气相色谱法根据标准方案分析样品。

[1088] 表24.新FAR酶文库

[1089]

[1090]

生物体	酶ID	基因ID
黄地老虎	FAR027	AID66655.1
薄肌眼虫	FAR028	GU733919
Ostrinia palustralis	FAR029	M1QSS3
Ostrinia latipennis	FAR030	M1RG73
欧洲玉米螟	FAR031	FJ807735
欧洲玉米螟	FAR032	FJ807736
Ostrinia zealis	FAR033	M1QSS9
稠李巢蛾	FAR034	GQ907232
Yponomeuta padellus	FAR035	GQ907235
Yponomeuta rorrellus	FAR036	GQ907234
Tyto alba	FAR037	JN638549
Ostrinia scapulalis	FAR038	EU817405
甜菜夜蛾	FAR039	KR781121.1
海灰翅夜蛾	FAR040	KR781120
烟芽夜蛾	FAR041	EZ407233
H. subflexa	FAR042	AFD04726.1
棉铃虫	FAR043	AKD01773.1
H. assaulta	FAR044	AFD04727.1

[1091] 表25和表26分别列出了额外的FAR变体和额外的细菌FAR酶。如上所述测试了这些FAR酶的脂肪醇和脂肪酸产生。

[1092] 表25.具有磷酸化点突变体的新FAR酶文库

[1093]

氨基酸突变	酶ID
HaFAR S12A	pFAR055
SlFAR S10A	pFAR056
SlFAR S13A	pFAR057
SlFAR S61A	pFAR058
SlFAR S104A	pFAR059
SlFAR S310A	pFAR060
SlFAR S314A	pFAR061
SlFAR S419A	pFAR062

[1094] 表26.额外的细菌FAR酶文库

[1095]

生物体	基因ID
Spongiibacter tropicus	WP_022959477.1
Oleiphilus sp. HI0086	KZY30886.1
Marinobacter lipolyticus	WP_012138772.1
Marinobacter antarcticus	WP_072799080.1

[1096] 序列表

[1097]

SEQ ID NO: 1	黄地老虎FAR_酿酒酵母密码子优化 ATGCCAGTTTTGACTTCTAGAGAAGATGAAAAGTTGTCAGTTC CAGAATTTTACGCTGGTAAATCTATCTTCGTTACAGGTGGTAC TGGTTTCTTGGGTAAAGTTTTTATTGAAAAGTTGTTGTACTGTT GTCCAGATATTGATAAAATCTATATGTTAATTAGAGAAAAGAA AAATTTGTCTATTGATGAAAGAATGTCAAAGTTCTTGGATGAT CCATTATTTTCTAGATTGAAGGAAGAAAGACCTGGTGACTTGG AAAAGATTGTTTTGATTCCAGGTGACATTACAGCTCCAAATTT GGGTTTATCAGCAGAAAACGAAAGAATTTTGTTAGAAAAAGT TTCTGTTATTATTAATTCAGCTGCAACTGTTAAGTTTAATGAAC CATTGCCAATCGCTTGGAAGATTAATGTTGAAGGTACAAGAAT GTTGTTGGCATTGTCTAGAAGAATGAAGAGAATCGAAGTTTTT ATTCATATTTCTACTGCTTACTCAAATGCATCTTCAGATAGAAT CGTTGTTGATGAAATCTTGTATCCAGCTCCAGCAGATATGGAT CAAGTTTACCAATTGGTTAAAGATGGTGTTACAGAAGAAGAA ACTGAAAGATTGTTGAACGGTTTGCCAAACACTTACACTTTTA CTAAGGCTTTGACAGAACATTTGGTTGCAGAACATCAAACATA CGTTCCAACTATCATCATCAGACCATCTGTTGTTGCTTCAATTA AAGATGAACCAATCAGAGGTTGGTTATGTAATTGGTTTGGTGC TACAGGTATCTCTGTTTTTACTGCAAAGGGTTTGAACAGAGTT TTGTTGGGTAAAGCTTCAAACATCGTTGATGTTATCCCAGTTG ATTACGTTGCAAATTTGGTTATTGTTGCTGGTGCAAAATCTGG TGGTCAAAAATCAGATGAATTAAAGATCTATAACTGTTGTTCT TCAGATTGTAACCCAGTTACTTTGAAGAAAATTATTAAAGAGT TTACTGAAGATACTATTAAAAATAAGTCTCATATTATGCCATT GCCAGGTTGGTTCGTTTTTACTAAGTACAAGTGGTTGTTGACA TTGTTAACTATTATTTTTCAAATGTTACCAATGTATTTGGCTGA TGTTTACAGAGTTTTGACAGGTAAAATCCCAAGATACATGAAG TTGCATCATTTGGTTATTCAAACAAGATTGGGTATCGATTTCTT TACTTCTCATTCATGGGTTATGAAGACAGATAGAGTTAGAGAA TTATTCGGTTCTTTGTCATTGGCAGAAAAGCATATGTTTCCATG TGATCCATCTTCAATCGATTGGACAGATTATTTGCAATCATAC TGTTACGGTGTTAGAAGATTTTTGGAAAAGAAGAAATAA
SEQ ID NO: 2	海灰翅夜蛾FAR1_酿酒酵母密码子优化 ATGGTTGTTTTGACTTCAAAGGAAAAATCAAACATGTCTGTTG CTGATTTCTACGCTGGTAAATCTGTTTTTATTACAGGTGGTACT

[1098]

	GGTTTCTTGGGTAAAGTTTTTATTGAAAAGTTGTTGTACTCATG TCCAGATATTGATAAAATCTATATGTTGATCAGAGAAAAGAA AGGTCAATCTATCAGAGAAAGATTAACTAAAATTGTTGATGAT CCATTGTTTAATAGATTGAAGGATAAGAGACCAGATGATTTGG GTAAAATCGTTTTGATCCCAGGTGACATCACAGTTCCAGGTTT GGGTATTTCTGAAGAAAACGAAACAATCTTGACTGAAAAAGT TTCAGTTGTTATTCATTCTGCTGCAACTGTTAAGTTTAATGAAC CATTGGCTACTGCATGGAACGTTAACGTTGAAGGTACAAGAAT GATCATGGCATTATCAAGAAGAATGAAGAGAATCGAAGTTTT TATTCATATTTCTACTGCTTACACTAACACAAACAGAGCAGTT ATTGATGAAGTTTTGTATCCACCACCAGCTGATATCAACGATG TTCATCAACATGTTAAAAATGGTGTTACAGAAGAAGAAACTG AAAAGATTTTGAACGGTAGACCAAACACTTACACTTTTACTAA GGCTTTGACTGAACATTTGGTTGCAGAAAACCAATCATACATG CCAACAATCATTGTTAGACCATCTATTGTTGGTGCTATTAAAG ATGATCCAATTAGAGGTTGGTTGGCTAATTGGTATGGTGCAAC AGGTTTGTCAGTTTTTACTGCAAAGGGTTTGAACAGAGTTATA TATGGTCATTCTAACCATGTTGTTGATTTGATTCCAGTTGATTA CGTTGCTAATTTGGTTATTGTTGCTGGTGCAAAGACATACCAT TCAAACGAAGTTACTATCTATAACTCTTGTTCTTCATCTTGTAA CCCAATCACTATGAAGAGATTGGTTGGTTTGTTTATTGATTAC ACAGTTAAGCATAAGTCATACGTTATGCCATTGCCAGGTTGGT ATGTTTACTCTAACTACAAGTGGTTGGTTTTCTTGGTTACTGTT ATTTTCCAAGTTATTCCAGCTTACTTAGGTGACATTGGTAGAA GATTGTTAGGTAAAAATCCAAGATACTACAAGTTGCAAAATTT GGTTGCTCAAACACAAGAAGCAGTTCATTTCTTTACATCACAT ACTTGGGAAATTAAATCAAAGAGAACTTCTGAATTGTTTTCAT CTTTGTCTTTGACAGATCAAAGAATGTTTCCATGTGATGCTAA CAGAATCGATTGGACAGATTACATCACTGATTACTGTTCTGGT GTTAGACAATTTTTGGAAAAGATTAAATAA
SEQ ID NO: 3	棉铃虫FAR3_酿酒酵母密码子优化 ATGGTTGTTTTGACTTCAAAGGAAACAAAGCCATCTGTTGCTG AATTTTACGCTGGTAAATCAGTTTTTATTACAGGTGTACTGGTT TCTTGGGTAAAGTTTTTATTGAAAAGTTGTTGTACTCTTGTCCA GATATTGAAAATATCTATATGTTGATCAGAGAAAAGAAAGGT TTGTCAGTTTCTGAAAGAATTAAACAATTTTTAGATGATCCAT TGTTTACAAGATTGAAGGATAAGAGACCAGCTGATTTGGAAA AGATTGTTTTGATCCCAGGTGACATCACTGCACCAGATTTGGG TATTAATTCTGAAAACGAAAAGATGTTGATTGAAAAAGTTTCA GTTATTATTCATTCTGCTGCAACTGTTAAGTTTAATGAACCATT ACCAACAGCTTGGAAGATTAATGTTGAAGGTACTAGAATGAT GTTGGCATTGTCAAGAAGAATGAAGAGAATCGAAGTTTTTATT CATATTTCTACAGCTTACACTAACACAAACAGAGAAGTTGTTG ATGAAATCTTGTATCCAGCTCCAGCAGATATCGATCAAGTTCA TCAATACGTTAAGGATGGTATCTCAGAAGAAGATACTGAAAA GATTTTGAACGGTAGACCAAACACTTACACTTTTACTAAGGCT TTGACAGAACATTTGGTTGCTGAAAATCAAGCATACGTTCCAA CTATTATTGTTAGACCATCTGTTGTTGCTGCAATTAAAGATGA ACCATTGAAAGGTTGGTTGGGTAATTGGTTTGGTGCTACAGGT TTGACTGTTTTTACAGCAAAGGGTTTGAACAGAGTTATATATG GTCATTCTTCATACATCGTTGATTTGATCCCAGTTGATTACGTT GCTAATTTGGTTATTGCTGCAGGTGCAAAATCTTCAAAGTCAA

[1099]

	CAGAATTGAAGGTTTACAACTGTTGTTCTTCATCTTGTAACCC AGTTACTATCGGTACATTGATGTCAATGTTCGCTGATGATGCA ATTAAACAAAAATCTTACGCTATGCCATTGCCAGGTTGGTACA TTTTTACAAAGTACAAGTGGTTGGTTTTGTTGTTGACATTTTTG TTCCAAGTTATTCCAGCATACGTTACTGATTTGTCAAGACATTT GATCGGTAAATCTCCAAGATACATCAAGTTGCAATCATTGGTT AACCAAACTAGATCATCTATCGATTTCTTTACAAACCATTCTT GGGTTATGAAAGCTGATAGAGTTAGAGAATTGTACGCTTCATT GTCTCCAGCTGATAAGTACTTATTCCCATGTGATCCAACTGAT ATCAACTGGACACATTACATCCAAGATTACTGTTGGGGTGTTA GACATTTCTTGGAAAAGAAATCTTACGAATAA
SEQ ID NO: 4	pOLE1盒 CTTGCTGAAAAGATGATGTTCTGAGGTATTCGTATCGCTAGCT TGATACGCTTTTAACAAAAGTAAGCTTTTCGTTTGCAGGTTTG GTTACTTTTCTGTACGAGATGATATCGCTAAGTTTATAGTCATC TGTGAAATTTCTCAAAAACCTCATGGTTTCTCCATCACCCATTT TTCATTTCATTTGCCGGGCGGAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAA AAAAAAAAAAATAAATGACACATGGAAATAAGTCAAGGATTA GCGGATATGTAGTTCCAGTCCGGGTTATACCATCACGTGATAA TAAATCCAAATGAGAATGAGGGTGTCATATCTAATCATTATGC ACGTCAAGATTCTCCGTGACTATGGCTCTTTTCTGAAGCATTTT TCGGGCGCCCGGTGGCCAAAAACTAACTCCGAGCCCGGGCAT GTCCCGGGGTTAGCGGGCCCAACAAAGGCGCTTATCTGGTGG GCTTCCGTAGAAGAAAAAAAGCTGTTGAGCGAGCTATTTCGG GTATCCCAGCCTTCTCTGCAGACCGCCCCAGTTGGCTTGGCTC TGGTGCTGTTCGTTAGCATCACATCGCCTGTGACAGGCAGAGG TAATAACGGCTTAAGGTTCTCTTCGCATAGTCGGCAGCTTTCTT TCGGACGTTGAACACTCAACAAACCTTATCTAGTGCCCAACCA GGTGTGCTTCTACGAGTCTTGCTCACTCAGACACACCTATCCC TATTGTTACGGCTATGGGGATGGCACACAAAGGTGGAAATAA TAGTAGTTAACAATATATGCAGCAAATCATCGGCTCCTGGCTC ATCGAGTCTTGCAAATCAGCATATACATATATATATGGGGGCA GATCTTGATTCATTTATTGTTCTATTTCCATCTTTCCTACTTCTG TTTCCGTTTATATTTTGTATTACGTAGAATAGAACATCATAGTA ATAGATAGTTGTGGTGATCATATTATAAACAGCACTAAAACAT TACAACAAAGAATGCCAACTTCTGGAACTACTATTGAATTGAT TGACGACCAATTTCCAAAGGATGACTCTGCCAGCAGTGGCATT GTCGACACTAGTGCGGCCGCTCACATATGAAAGTATATACCCG CTTTTGTACACTATGTAGCTATAATTCAATCGTATTATTGTAGC TCCGCACGACCATGCCTTAGAAATATCCGCAGCGCG
SEQ ID NO: 5	延伸的OLE1启动子区域 CTTGCTGAAAAGATGATGTTCTGAGGTATTCGTATCGCTAGCT TGATACGCTTTTAACAAAAGTAAGCTTTTCGTTTGCAGGTTTG GTTACTTTTCTGTACGAGATGATATCGCTAAGTTTATAGTCATC TGTGAAATTTCTCAAAAACCTCATGGTTTCTCCATCACCCATTT TTCATTTCATTTGCCGGGCGGAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAA AAAAAAAAAAATAAATGACACATGGAAATAAGTCAAGGATTA GCGGATATGTAGTTCCAGTCCGGGTTATACCATCACGTGATAA TAAATCCAAATGAGAATGAGGGTGTCATATCTAATCATTATGC ACGTCAAGATTCTCCGTGACTATGGCTCTTTTCTGAAGCATTTT TCGGGCGCCCGGTGGCCAAAAACTAACTCCGAGCCCGGGCAT

[1100]

	GTCCCGGGGTTAGCGGGCCCAACAAAGGCGCTTATCTGGTGG GCTTCCGTAGAAGAAAAAAAGCTGTTGAGCGAGCTATTTCGG GTATCCCAGCCTTCTCTGCAGACCGCCCCAGTTGGCTTGGCTC TGGTGCTGTTCGTTAGCATCACATCGCCTGTGACAGGCAGAGG TAATAACGGCTTAAGGTTCTCTTCGCATAGTCGGCAGCTTTCTT TCGGACGTTGA
SEQ ID NO: 6	OLE1启动子区域 ACACTCAACAAACCTTATCTAGTGCCCAACCAGGTGTGCTTCT ACGAGTCTTGCTCACTCAGACACACCTATCCCTATTGTTACGG CTATGGGGATGGCACACAAAGGTGGAAATAATAGTAGTTAAC AATATATGCAGCAAATCATCGGCTCCTGGCTCATCGAGTCTTG CAAATCAGCATATACATATATATATGGGGGCAGATCTTGATTC ATTTATTGTTCTATTTCCATCTTTCCTACTTCTGTTTCCGTTTAT ATTTTGTATTACGTAGAATAGAACATCATAGTAATAGATAGTT GTGGTGATCATATTATAAACAGCACTAAAACATTACAACAAA GA
SEQ ID NO: 7	OLE1 27aa前导序列 ATGCCAACTTCTGGAACTACTATTGAATTGATTGACGACCAAT TTCCAAAGGATGACTCTGCCAGCAGTGGCATTGTCGAC
SEQ ID NO: 8	Vsp13终止子区域 TCACATATGAAAGTATATACCCGCTTTTGTACACTATGTAGCT ATAATTCAATCGTATTATTGTAGCTCCGCACGACCATGCCTTA GAAATATCCGCAGCGCG
SEQ ID NO: 9	粉纹夜蛾去饱和酶 ATGGCTGTGATGGCTCAAACAGTACAAGAAACGGCTACAGTG TTGGAAGAGGAAGCTCGCACAGTGACTCTTGTGGCTCCAAAG ACAACGCCAAGGAAATATAAATATATATACACCAACTTTCTTA CATTTTCATATGCGCATTTAGCTGCATTATACGGACTTTATTTG TGCTTCACCTCTGCGAAATGGGAAACATTGCTATTCTCTTTCGT ACTCTTCCACATGTCAAATATAGGCATCACCGCAGGGGCTCAC CGACTCTGGACTCACAAGACTTTCAAAGCCAAATTGCCTTTGG AAATTGTCCTCATGATATTCAACTCTTTAGCCTTTCAAAACAC GGCTATTACATGGGCTAGAGAACATCGGCTACATCACAAATA CAGCGATACTGATGCTGATCCCCACAATGCGTCAAGAGGGTTC TTCTACTCGCATGTTGGCTGGCTATTAGTAAAAAAACATCCCG ATGTCCTGAAATATGGAAAAACTATAGACATGTCGGATGTATA CAATAATCCTGTGTTAAAATTTCAGAAAAAGTACGCAGTACCC TTAATTGGAACAGTTTGTTTTGCTCTGCCAACTTTGATTCCAGT CTACTGTTGGGGCGAATCGTGGAACAACGCTTGGCACATAGCC TTATTTCGATACATATTCAATCTTAACGTGACTTTCCTAGTCAA CAGTGCTGCGCATATCTGGGGGAATAAGCCTTATGATAAAAG CATCTTGCCCGCTCAAAACCTGCTGGTTTCCTTCCTAGCAAGT GGAGAAGGCTTCCATAATTACCATCACGTCTTTCCATGGGATT ACCGCACAGCAGAATTAGGGAATAACTTCCTGAATTTGACGA CGCTGTTCATTGATTTTTGTGCCTGGTTTGGATGGGCTTATGAC TTGAAGTCTGTATCAGAGGATATTATAAAACAGAGAGCTAAA CGAACAGGTGACGGTTCTTCAGGGGTCATTTGGGGATGGGAC GACAAAGACATGGACCGCGATATAAAATCTAAAGCTAACATT

[1101]

	TTTTATGCTAAAAAGGAATGA
SEQ ID NO: 10	黄地老虎去饱和酶 ATGGCTCAAGGTGTCCAAACAACTACGATATTGAGGGAGGAG GAGCCGTCATTGACTTTCGTGGTACCTCAAGAACCGAGAAAGT ATCAAATCGTGTACCCAAACCTTATCACATTTGGGTACTGGCA TATAGCTGGTTTATACGGGCTATATTTGTGCTTTACTTCGGCAA AATGGCAAACAATTTTATTCAGTTTCATGCTCGTTGTGTTAGC AGAGTTGGGAATAACAGCCGGCGCTCACAGGTTATGGGCCCA CAAAACATATAAAGCGAAGCTTCCCTTACAAATTATCCTGATG ATACTGAACTCCATTGCCTTCCAAAATTCCGCCATTGATTGGG TGAGGGACCACCGTCTCCATCATAAGTACAGTGACACTGATGC AGACCCTCACAATGCTACTCGTGGTTTCTTCTATTCTCATGTTG GATGGTTGCTCGTAAGAAAACATCCAGAAGTCAAGAGACGTG GAAAGGAACTTGACATGTCTGATATTTACAACAATCCAGTGCT GAGATTTCAAAAGAAGTATGCTATACCCTTCATCGGGGCAATG TGCTTCGGATTACCAACTTTTATCCCTGTTTACTTCTGGGGAGA AACCTGGAGTAATGCTTGGCATATCACCATGCTTCGGTACATC CTCAACCTAAACATTACTTTCCTGGTCAACAGTGCTGCTCATA TCTGGGGATACAAACCTTATGACATCAAAATATTGCCTGCCCA AAATATAGCAGTTTCCATAGTAACCGGCGGCGAAGTTTCCATA ACTACCACCACGTTTTTTCCTTGGGATTATCGTGCAGCAGAAT TGGGGAACAATTATCTTAATTTGACGACTAAGTTCATAGATTT CTTCGCTTGGATCGGATGGGCTTACGATCTTAAGACGGTGTCC AGTGATGTTATAAAAAGTAAGGCGGAAAGAACTGGTGATGGG ACGAATCTTTGGGGTTTAGAAGACAAAGGTGAAG AAGATTTTTTGAAAATCTGGAAAGACAATTAA
SEQ ID NO: 11	假微型海链藻去饱和酶 ACTAGTATGGACTTTCTCTCCGGCGATCCTTTCCGGACACTCGT CCTTGCAGCACTTGTTGTCATCGGATTTGCTGCGGCGTGGCAA TGCTTCTACCCGCCGAGCATCGTCGGCAAGCCTCGTACATTAA GCAATGGTAAACTCAATACCAGAATCCATGGCAAATTGTACG ACCTCTCATCGTTTCAGCATCCAGGAGGCCCCGTGGCTCTTTCT CTTGTTCAAGGTCGCGACGGAACAGCTCTATTTGAGTCACACC ATCCCTTCATACCTCGAAAGAATCTACTTCAGATCCTCTCCAA GTACGAGGTTCCGTCGACTGAAGACTCTGTTTCCTTCATCGCC ACCCTAGACGAACTCAATGGTGAATCTCCGTACGATTGGAAG GACATTGAAAATGATGATTTCGTATCTGACCTACGAGCTCTCG TAATTGAGCACTTTTCTCCTCTCGCCAAGGAAAGGGGAGTTTC ACTCGTTGAGTCGTCGAAGGCAACACCTCAGCGGTGGATGGT GGTTCTACTGCTCCTTGCGTCGTTCTTCCTCAGCATCCCATTAT ATTTGAGTGGTTCGTGGACTTTCGTTGTCGTCACTCCCATCCTC GCTTGGCTGGCGGTTGTCAATTACTGGCACGATGCTACTCACT TTGCATTGAGCAGCAACTGGATTTTGAATGCTGCGCTCCCATA TCTCCTCCCTCTCCTATCGAGTCCGTCAATGTGGTATCATCATC ACGTCATTGGACATCACGCATACACCAACATTTCCAAAAGAG ATCCAGATCTTGCTCACGCTCCACAACTCATGAGAGAACACAA GAGTATCAAATGGAGACCATCTCACTTAAATCAAACACAGCTT CCGCGGATTCTCTTCATCTGGTCGATTGCAGTCGGTATTGGGTT GAACTTACTGAACGACGTGAGAGCACTAACCAAGCTTTCATAC AACAACGTTGTTCGGGTGGAGAAGATGTCATCGTCGCGAACA TTACTCCATTTCCTTGGACGTATGTTGCACATCTTTGTGACTAC

[1102]

	ACTTTGGCCCTTTTTGGCGTTTCCGGTGTGGAAGGCCATCGTTT GGGCGACTGTACCGAATGCCATACTGAGTTTGTGCTTCATGCT GAATACGCAAATCAATCACCTCATCAACACGTGTGCACATGCT TCCGATAACAACTTTTACAAGCATCAAGTTGTAACTGCTCAGA ACTTTGGCCGATCAAGTGCCTTTTGCTTCATCTTCTCGGGAGGT CTCAACTACCAAATTGAACATCATTTGTTGCCGACGGTGAACC ATTGCCATTTGCCAGCTTTGGCCCCGGGTGTAGAGCGTTTGTG TAAGAAACACGGGGTGACATACAACTCTGTTGAAGGATACAG AGAGGCCATCATTGCACACTTTGCACATACCAAAGATATGTCG ACGAAGCCTACTGATTGA
SEQ ID NO: 12	脐橙螟蛾去饱和酶 ATGGTCCCTAACAAGGGTTCCAGTGACGTTTTGTCTGAACATT CTGAGCCCCAGTTCACTAAACTCATAGCTCCACAAGCAGGGCC GAGGAAATACAAGATAGTGTATCGAAATTTGCTCACATTCGGC TATTGGCACTTATCAGCTGTTTATGGGCTCTACTTGTGCTTTAC TTGTGCGAAATGGGCTACCATCTTATTTGCATTTTTCTTATACG TGATCGCGGAAATCGGTATAACAGGTGGCGCTCATAGGCTAT GGGCACATCGGACTTATAAAGCCAAGTTGCCTTTAGAGATTTT GTTACTCATAATGAACTCTATTGCCTTCCAAGACACTGCTTTCA CCTGGGCTCGTGATCACCGCCTTCATCACAAATATTCGGATAC TGACGCTGATCCCCACAATGCTACCAGAGGGTTTTTCTATTCA CATGTAGGCTGGCTTTTGGTGAAGAAACACCCTGAAGTCAAA GCAAGAGGAAAATACTTGTCGTTAGATGATCTTAAGAATAATC CATTGCTTAAATTCCAAAAGAAATACGCTATTCTAGTTATAGG CACGTTATGCTTCCTTATGCCAACATTTGTGCCCGTATACTTCT GGGGCGAGGGCATCAGCACGGCCTGGAACATCAATCTATTGC GATACGTCATGAATCTTAACATGACTTTCTTAGTTAACAGTGC AGCGCATATCTTTGGCAACAAACCATACGATAAGAGCATAGC CTCAGTCCAAAATATTTCAGTTAGCTTAGCTACTTTTGGCGAA GGATTCCATAATTACCATCACACTTACCCCTGGGATTATCGTG CGGCAGAATTAGGAAATAATAGGCTAAATATGACTACTGCTTT CATAGATTTCTTCGCTTGGATCGGCTGGGCTTATGACTTGAAG TCTGTGCCACAAGAGGCCATTGCAAAAAGGTGTGCGAAAACT GGCGATGGAACGGATATGTGGGGTCGAAAAAGATAA
SEQ ID NO: 13	玉米穗蛾去饱和酶 ATGGCCCAAAGCTATCAATCAACTACGGTTTTGAGTGAGGAG AAAGAACTAACACTGCAACATTTGGTGCCCCAAGCATCGCCC AGGAAGTATCAAATAGTGTATCCGAACCTCATTACGTTTGGTT ACTGGCACATAGCCGGACTTTATGGCCTTTACTTGTGCTTCACT TCTGCTAAATGGGCTACGATTTTATTCAGCTACATCCTCTTCGT GTTAGCAGAAATAGGAATCACGGCTGGCGCTCACAGACTCTG GGCCCACAAAACTTACAAAGCGAAACTACCATTAGAAATACT CTTAATGGTATTCAACTCCATCGCTTTTCAAAACTCAGCCATTG ACTGGGTGAGGGACCACCGACTCCACCATAAGTATAGCGATA CAGATGCTGATCCCCACAATGCCAGCCGAGGGTTCTTTTATTC CCATGTAGGATGGCTACTTGTGAGAAAACATCCTGAAGTCAA AAAGCGAGGGAAAGAACTCAATATGTCCGATATTTACAACAA TCCTGTCCTGCGGTTTCAGAAAAAATACGCCATACCCTTCATT GGGGCTGTTTGTTTCGCCTTACCTACAATGATACCTGTTTACTT CTGGGGAGAAACCTGGTCCAATGCTTGGCATATCACCATGCTT CGCTACATCATGAACCTCAATGTCACCTTTTTGGTAAACAGCG

[1103]

	CTGCTCATATATGGGGAAACAAGCCTTATGACGCAAAAATATT ACCTGCACAAAATGTAGCTGTGTCGGTCGCCACTGGTGGAGA AGGTTTCCATAATTACCACCATGTCTTCCCCTGGGATTATCGA GCAGCGGAACTCGGTAACAATAGCCTCAATCTGACGACTAAA TTCATAGATTTATTCGCAGCAATCGGATGGGCATATGATCTGA AGACGGTTTCGGAGGATATGATAAAACAAAGGATTAAACGCA CTGGAGATGGAACGGATCTTTGGGGACACGAACAAAACTGTG ATGAAGTGTGGGATGTAAAAGATAAATCAAGTTAA
SEQ ID NO: 14	mCherry热带假丝酵母优化的 ATGGTTTCTAAGGGTGAAGAAGACAACATGGCAATCATCAAG GAATTTATGCGTTTTAAGGTCCATATGGAAGGCTCCGTTAACG GCCACGAGTTCGAGATCGAGGGAGAAGGTGAGGGTAGACCAT ACGAAGGTACTCAAACCGCCAAGTTGAAAGTTACAAAGGGTG GTCCATTGCCATTTGCTTGGGATATCTTGTCCCCACAATTTATG TACGGATCAAAGGCATATGTCAAGCATCCTGCCGACATCCCAG ATTACTTGAAGTTATCCTTTCCAGAAGGTTTTAAGTGGGAGAG AGTTATGAACTTTGAAGATGGCGGAGTTGTTACTGTTACTCAG GACTCTTCCTTGCAAGATGGTGAATTTATCTATAAAGTGAAAT TGAGAGGTACTAACTTTCCATCCGACGGTCCAGTCATGCAAAA GAAGACAATGGGTTGGGAGGCTTCTTCCGAAAGAATGTACCC AGAAGACGGTGCATTGAAAGGTGAAATCAAGCAACGTTTAAA GTTGAAGGACGGTGGTCACTACGATGCCGAGGTCAAGACCAC TTATAAGGCTAAGAAGCCAGTCCAATTGCCAGGTGCTTATAAC GTTAACATCAAGTTAGATATTACTTCACACAACGAAGACTACA CAATCGTTGAACAATATGAAAGAGCCGAAGGTAGACATTCTA CCGGCGGCATGGACGAGTTATATAAGTAG
SEQ ID NO: 15	CaOLE1-黄地老虎Z11去饱和酶 ATGACTACAGTTGAACAACTTGAAACTGTTGATATCACTAAAT TGAATGCCATTGCTGCTGGTACTAATAAGAAGGTGCCAATGGC TCAAGGTGTCCAAACAACTACGATATTGAGGGAGGAAGAGCC GTCATTGACTTTCGTGGTACCTCAAGAACCGAGAAAGTATCAA ATCGTGTACCCAAACCTTATCACATTTGGGTACTGGCATATAG CTGGTTTATACGGGCTATATTTGTGCTTTACTTCGGCAAAATG GCAAACAATTTTATTCAGTTTCATGCTCGTTGTGTTAGCAGAG TTGGGAATAACAGCCGGCGCTCACAGGTTATGGGCCCACAAA ACATATAAAGCGAAGCTTCCCTTACAAATTATCTTAATGATAT TAAACTCCATTGCCTTCCAAAATTCCGCCATTGATTGGGTGAG GGACCACCGTCTCCATCATAAGTACAGTGACACTGATGCAGAC CCTCACAATGCTACTCGTGGTTTCTTCTATTCTCATGTTGGATG GTTGCTCGTAAGAAAACATCCAGAAGTCAAGAGACGTGGAAA GGAACTTGACATGTCTGATATTTACAACAATCCAGTGTTAAGA TTTCAAAAGAAGTATGCTATACCCTTCATCGGGGCAATGTGCT TCGGATTACCAACTTTTATCCCTGTTTACTTCTGGGGAGAAAC CTGGAGTAATGCTTGGCATATCACCATGCTTCGGTACATCCTC AACCTAAACATTACTTTCTTAGTCAACAGTGCTGCTCATATCT GGGGATACAAACCTTATGACATCAAAATATTGCCTGCCCAAA ATATAGCAGTTTCCATAGTAACCGGCGGCGAAGTTTCCATAAC TACCACCACGTTTTTTCCTTGGGATTATCGTGCAGCAGAATTG GGGAACAATTATCTTAATTTGACGACTAAGTTCATAGATTTCT TCGCTTGGATCGGATGGGCTTACGATCTTAAGACGGTGTCCAG TGATGTTATAAAAAGTAAGGCGGAAAGAACTGGTGATGGGAC

[1104]

	GAATCTTTGGGGTTTAGAAGACAAAGGTGAAGAAGATTTTTTG AAAATCTGGAAAGACAATTAA
SEQ ID NO: 16	黄地老虎Z11去饱和酶 ATGGCTCAAGGTGTCCAAACAACTACGATATTGAGGGAGGAA GAGCCGTCATTGACTTTCGTGGTACCTCAAGAACCGAGAAAGT ATCAAATCGTGTACCCAAACCTTATCACATTTGGGTACTGGCA TATAGCTGGTTTATACGGGCTATATTTGTGCTTTACTTCGGCAA AATGGCAAACAATTTTATTCAGTTTCATGCTCGTTGTGTTAGC AGAGTTGGGAATAACAGCCGGCGCTCACAGGTTATGGGCCCA CAAAACATATAAAGCGAAGCTTCCCTTACAAATTATCTTAATG ATATTAAACTCCATTGCCTTCCAAAATTCCGCCATTGATTGGG TGAGGGACCACCGTCTCCATCATAAGTACAGTGACACT GATGCAGACCCTCACAATGCTACTCGTGGTTTCTTCTATTCTCA TGTTGGATGGTTGCTCGTAAGAAAACATCCAGAAGTCAAGAG ACGTGGAAAGGAACTTGACATGTCTGATATTTACAACAATCCA GTGTTAAGATTTCAAAAGAAGTATGCTATACCCTTCATCGGGG CAATGTGCTTCGGATTACCAACTTTTATCCCTGTTTACTTCTGG GGAGAAACCTGGAGTAATGCTTGGCATATCACCATGCTTCGGT ACATCCTCAACCTAAACATTACTTTCTTAGTCAACAGTGCTGC TCATATCTGGGGATACAAACCTTATGACATCAAAATATTGCCT GCCCAAAATATAGCAGTTTCCATAGTAACCGGCGGCGAAGTTT CCATAACTACCACCACGTTTTTTCCTTGGGATTATCGTGCAGC AGAATTGGGGAACAATTATCTTAATTTGACGACTAAGTTCATA GATTTCTTCGCTTGGATCGGATGGGCTTACGATCTTAAGACGG TGTCCAGTGATGTTATAAAAAGTAAGGCGGAAAGAACTGGTG ATGGGACGAATCTTTGGGGTTTAGAAGACAAAGGTGAAGAAG ATTTTTTGAAAATCTGGAAAGACAATTAA
SEQ ID NO: 17	脐橙螟蛾Z11去饱和酶 ATGGTCCCTAACAAGGGTTCCAGTGACGTTTTGTCTGAACATT CTGAGCCCCAGTTCACTAAACTCATAGCTCCACAAGCAGGGCC GAGGAAATACAAGATAGTGTATCGAAATTTGCTCACATTCGGC TATTGGCACTTATCAGCTGTTTATGGGCTCTACTTGTGCTTTAC TTGTGCGAAATGGGCTACCATCTTATTTGCATTTTTCTTATACG TGATCGCGGAAATCGGTATAACAGGTGGCGCTCATAGGCTAT GGGCACATCGGACTTATAAAGCCAAGTTGCCTTTAGAGATTTT GTTACTCATAATGAATTCTATTGCCTTCCAAGACACTGCTTTCA CCTGGGCTCGAGATCACCGCCTTCATCACAAATATTCGGATAC TGACGCTGATCCCCACAATGCTACCAGAGGGTTTTTCTATTCA CATGTAGGCTGGCTTTTGGTGAAGAAACACCCTGAAGTCAAA GCAAGAGGAAAATACTTGTCGTTAGATGATCTTAAGAATAATC CATTGCTTAAATTCCAAAAGAAATACGCTATTCTAGTTATAGG CACGTTATGCTTCCTTATGCCAACATTTGTGCCCGTATACTTCT GGGGCGAGGGCATCAGCACGGCCTGGAACATCAATCTATTGC GATACGTCATGAATCTTAACATGACTTTCTTAGTTAACAGTGC AGCGCATATCTTTGGCAACAAACCATACGATAAGAGCATAGC CTCAGTCCAAAATATTTCAGTTAGCTTAGCTACTTTTGGCGAA GGATTCCATAATTACCATCACACTTACCCCTGGGATTATCGTG CGGCAGAATTAGGAAATAATAGGCTAAATATGACTACTGCTTT CATAGATTTCTTCGCTTGGATCGGCTGGGCTTATGACTTGAAG TCTGTGCCACAAGAGGCCATTGCAAAAAGGTGTGCGAAAACT

[1105]

	GGCGATGGAACGGATATGTGGGGTCGAAAAAGATAA
SEQ ID NO: 18	粉纹夜蛾Z11去饱和酶 ATGGCTGTGATGGCTCAAACAGTACAAGAAACGGCTACAGTG TTGGAAGAGGAAGCTCGCACAGTGACTCTTGTGGCTCCAAAG ACAACGCCAAGGAAATATAAATATATATACACCAACTTTCTTA CATTTTCATATGCGCATTTAGCTGCATTATACGGACTTTATTTG TGCTTCACCTCTGCGAAATGGGAAACATTGCTATTCTCTTTCGT ACTCTTCCACATGTCAAATATAGGCATCACCGCAGGGGCTCAC CGACTCTGGACTCACAAGACTTTCAAAGCCAAATTGCCTTTGG AAATTGTCCTCATGATATTCAACTCTTTAGCCTTTCAAAACAC GGCTATTACATGGGCTAGAGAACATCGGCTACATCACAAATA CAGCGATACTGATGCTGATCCCCACAATGCGTCAAGAGGGTTC TTCTACTCGCATGTTGGCTGGCTATTAGTAAAAAAACATCCCG ATGTCTTAAAATATGGAAAAACTATAGACATGTCGGATGTATA CAATAATCCTGTGTTAAAATTTCAGAAAAAGTACGCAGTACCC TTAATTGGAACAGTTTGTTTTGCTCTTCCAACTTTGATTCCAGT CTACTGTTGGGGCGAATCGTGGAACAACGCTTGGCACATAGCC TTATTTCGATACATATTCAATCTTAACGTGACTTTCCTAGTCAA CAGTGCTGCGCATATCTGGGGGAATAAGCCTTATGATAAAAG CATCTTGCCCGCTCAAAACTTATTAGTTTCCTTCCTAGCAAGTG GAGAAGGCTTCCATAATTACCATCACGTCTTTCCATGGGATTA CCGCACAGCAGAATTAGGGAATAACTTCTTAAATTTGACGACG TTATTCATTGATTTTTGTGCCTGGTTTGGATGGGCTTATGACTT GAAGTCTGTATCAGAGGATATTATAAAACAGAGAGCTAAACG AACAGGTGACGGTTCTTCAGGGGTCATTTGGGGATGGGACGA CAAAGACATGGACCGCGATATAAAATCTAAAGCTAACATTTTT TATGCTAAAAAGGAATGA
SEQ ID NO: 19	玉米穗蛾Z11去饱和酶 ATGGCCCAAAGCTATCAATCAACTACGGTTTTGAGTGAGGAG AAAGAACTAACATTACAACATTTGGTGCCCCAAGCATCGCCCA GGAAGTATCAAATAGTGTATCCGAACCTCATTACGTTTGGTTA CTGGCACATAGCCGGACTTTATGGCCTTTACTTGTGCTTCACTT CTGCTAAATGGGCTACGATTTTATTCAGCTACATCCTCTTCGTG TTAGCAGAAATAGGAATCACGGCTGGCGCTCACAGACTCTGG GCCCACAAAACTTACAAAGCGAAACTACCATTAGAAATACTC TTAATGGTATTCAACTCCATCGCTTTTCAAAACTCAGCCATTG ACTGGGTGAGGGACCACCGACTCCACCATAAGTATAGCGATA CAGATGCTGATCCCCACAATGCCAGCCGAGGGTTCTTTTATTC CCATGTAGGATGGCTACTTGTGAGAAAACATCCTGAAGTCAA AAAGCGAGGGAAAGAACTCAATATGTCCGATATTTACAACAA TCCTGTCTTACGGTTTCAGAAAAAATACGCCATACCCTTCATT GGGGCTGTTTGTTTCGCCTTACCTACAATGATACCTGTTTACTT CTGGGGAGAAACCTGGTCCAATGCTTGGCATATCACCATGCTT CGCTACATCATGAACCTCAATGTCACCTTTTTGGTAAACAGCG CTGCTCATATATGGGGAAACAAGCCTTATGACGCAAAAATATT ACCTGCACAAAATGTAGCTGTGTCGGTCGCCACTGGTGGAGA AGGTTTCCATAATTACCACCATGTCTTCCCCTGGGATTATCGA GCAGCGGAACTCGGTAACAATAGCCTCAATTTAACGACTAAA TTCATAGATTTATTCGCAGCAATCGGATGGGCATATGATTTAA AGACGGTTTCGGAGGATATGATAAAACAAAGGATTAAACGCA CTGGAGATGGAACGGATCTTTGGGGACACGAACAAAACTGTG

[1106]

	ATGAAGTGTGGGATGTAAAAGATAAATCAAGTTAA
SEQ ID NO: 20	亚洲玉米螟Z9去饱和酶 ATGGCTCCTAATATTAAGGACGGAGCTGATTTGAACGGAGTTT TATTTGAAGATGACGCTAGCACCCCCGATTATGCCCTTGCCAC GGCCCCAGTCCAGAAAGCAGACAACTATCCCAGAAAACTAGT GTGGAGAAACATCATACTCTTTGCATACCTTCACCTTGCCGCT GTGTATGGAGCATACCTATTCTTATTTTCAGCGAAATGGCAGA CAGATATTTTTGCCTACATTCTTTACGTGATCTCAGGACTCGGC ATCACAGCGGGAGCCCACCGCCTTTGGGCGCACAAGTCATAC AAGGCTAAGTGGCCACTTAGACTCATTCTTATTATCTTCAACA CTGTATCATTCCAGGACTCTGCTCTCGACTGGTCACGTGACCA CCGCATGCACCACAAATACTCGGAGACCGACGCCGACCCGCA CAACGCGACTCGAGGGTTCTTCTTCTCTCATATCGGCTGGTTAT TAGTCCGCAAGCACCCGGAATTAAAGAGAAAGGGCAAGGGAT TAGACTTAAGCGACTTGTATGCTGATCCCATCCTCCGTTTCCA GAAGAAGTACTATTTACTATTAATGCCTCTTGGCTGCTTCATC ATGCCGACGGTGGTCCCGGTGTACTTCTGGGGTGAGACTTGGA CTAACGCTTTCTTCGTCGCCGCGCTCTTCCGATACACCTTCATC CTCAATGTCACCTGGTTGGTCAACTCCGCCGCGCACAAGTGGG GCCACAAGCCCTATGACAGCAGCATCAAGCCTTCCGAGAACC TCTCAGTCTCCTTATTCGCGTTGGGCGAAGGATTCCACAACTA CCACCACACATTCCCCTGGGACTACAAAACTGCCGAGCTCGGC AACAACAGACTCAATTTCACAACAAACTTCATCAACTTCTTCG CTAAAATCGGATGGGCTTACGACTTGAAAACGGTCTCCGACG AGATTATTCAGAATAGAGTCAAGCGCACAGGAGATGGCTCCC ACCACTTATGGGGTTGGGGCGACAAGGATCAACCTAAAGAGG AGGTAAACGCAGCCATTAGAATTAATCCTAAAGACGAGTAA
SEQ ID NO: 21	红醋栗穿孔蛾Z9去饱和酶 ATGCCGCCGAACGTGACAGAGGCGAACGGAGTGTTATTTGAG AATGACGTGCAGACTCCTGACATGGGGCTAGAAGTGGCCCCT GTGCAGAAGGCTGACGAGCGTAAGATCCAGCTCGTTTGGAGG AACATCATCGCTTTTGCATGTCTTCATTTAGCAGCTGTGTATGG AGCTTATTTATTCTTCACCTCGGCTATATGGCAGACAGACATA TTTGCATACATCCTTTACGTTATGTCTGGATTAGGAATCACGG CGGGAGCGCACAGATTATGGGCTCATAAGTCATACAAGGCGA AGTGGCCGTTAAGATTAATCCTCGTCGCATTCAACACTTTGGC ATTCCAGGATTCGGCAATCGACTGGGCGCGCGACCACCGCAT GCACCACAAGTACTCGGAGACGGATGCGGACCCACATAACGC CACTCGCGGCTTCTTCTTTTCGCACATTGGTTGGTTACTCTGCC GAAAACACCCGGAGCTAAAGCGCAAGGGCCAGGGCCTCGACT TAAGTGACCTCTACGCAGATCCTATTATTCGCTTCCAAAAGAA GTACTACTTATTGTTAATGCCGTTAGCCTGCTTTGTTCTTCCCA CCATAATTCCGGTCTACCTCTGGGGCGAGTCCTGGAAAAACGC GTTCTTCGTAGCTGCAATGTTCCGTTACACGTTCATCCTCAACG TAACATGGCTCGTCAACTCCGCCGCCCACAAATGGGGAGGCA AGCCCTATGATAAGAACATCCAGCCCGCTCAGAACATCTCTGT AGCTATCTTCGCATTAGGCGAGGGCTTCCACAACTACCACCAC ACGTTCCCCTGGGACTACAAGACCGCTGAATTAGGAAACAAC AGGTTAAATTTCACAACTTCGTTTATCAATTTCTTCGCAAGCTT CGGATGGGCCTACGACTTAAAGACCGTGTCGGACGAGATTAT ACAACAGCGCGTTAAGAGGACGGGAGATGGGAGCCATCACTT

[1107]

	ACGGGGCTGGGGCGACCAGGACATACCGGCCGAAGAAGCTCA AGCTGCTTTACGCATTAACCGTAAAGATGATTAG
SEQ ID NO: 22	玉米穗蛾Z9去饱和酶 ATGGCTCCAAATATATCGGAGGATGTGAACGGGGTGCTCTTCG AGAGTGATGCAGCGACGCCGGACTTAGCGTTATCCACGCCGC CTGTGCAGAAGGCTGACAACAGGCCCAAGCAATTAGTGTGGA GGAACATACTATTATTCGCGTATCTTCACTTAGCGGCTCTTTAC GGAGGTTATTTATTCCTCTTCTCAGCTAAATGGCAGACAGACA TATTTGCCTACATCTTATATGTGATCTCCGGGCTTGGTATCACG GCTGGAGCACATCGCTTATGGGCCCACAAGTCCTACAAAGCTA AATGGCCTCTCCGAGTTATCTTAGTCATCTTTAACACAGTGGC ATTCCAGGATGCCGCTATGGACTGGGCGCGCGACCACCGCAT GCATCACAAGTACTCGGAAACCGATGCTGATCCTCATAATGCG ACCCGAGGATTCTTCTTCTCTCACATTGGCTGGTTACTTGTCAG GAAACATCCCGACCTTAAGGAGAAGGGCAAGGGACTCGACAT GAGCGACTTACTTGCTGACCCCATTCTCAGGTTCCAGAAAAAA TACTACTTAATCTTAATGCCCTTGGCTTGCTTCGTGATGCCTAC CGTGATTCCTGTGTACTTCTGGGGTGAAACCTGGACCAACGCA TTCTTTGTGGCGGCCATGTTCCGCTACGCGTTCATCCTAAATGT GACGTGGCTCGTCAACTCTGCCGCTCACAAGTGGGGAGACAA GCCCTACGACAAAAGCATTAAGCCTTCCGAAAACTTGTCGGTC GCCATGTTCGCTCTCGGAGAAGGATTCCACAACTACCACCACA CTTTCCCTTGGGACTACAAAACTGCTGAGTTAGGCAACAACAA ACTCAACTTCACTACCACCTTTATTAACTTCTTCGCTAAAATTG GCTGGGCTTACGACTTAAAGACAGTGTCTGATGATATCGTCAA GAACAGGGTGAAGCGCACTGGTGACGGCTCCCACCACTTATG GGGCTGGGGAGACGAAAATCAATCCAAAGAAGAAATTGATGC CGCTATCAGAATCAATCCTAAGGACGATTAA
SEQ ID NO: 23	假微型海链藻Z11去饱和酶 ATGGACTTTCTCTCCGGCGATCCTTTCCGGACACTCGTCCTTGC AGCACTTGTTGTCATCGGATTTGCTGCGGCGTGGCAATGCTTC TACCCGCCGAGCATCGTCGGCAAGCCTCGTACATTAAGCAATG GTAAACTCAATACCAGAATCCATGGCAAATTGTACGACCTCTC ATCGTTTCAGCATCCAGGAGGCCCCGTGGCTCTTTCTCTTGTTC AAGGTCGCGACGGAACAGCTCTATTTGAGTCACACCATCCCTT CATACCTCGAAAGAATCTACTTCAGATCCTCTCCAAGTACGAG GTTCCGTCGACTGAAGACTCTGTTTCCTTCATCGCCACCCTAG ACGAACTCAATGGTGAATCTCCGTACGATTGGAAGGACATTG AAAATGATGATTTCGTATCTGACCTACGAGCTCTCGTAATTGA GCACTTTTCTCCTCTCGCCAAGGAAAGGGGAGTTTCACTCGTT GAGTCGTCGAAGGCAACACCTCAGCGGTGGATGGTGGTTCTAT TACTCCTTGCGTCGTTCTTCCTCAGCATCCCATTATATTTGAGT GGTTCGTGGACTTTCGTTGTCGTCACTCCCATCCTCGCTTGGTT AGCGGTTGTCAATTACTGGCACGATGCTACTCACTTTGCATTG AGCAGCAACTGGATTTTGAATGCTGCGCTCCCATATCTCCTCC CTCTCCTATCGAGTCCGTCAATGTGGTATCATCATCACGTCATT GGACATCACGCATACACCAACATTTCCAAAAGAGATCCAGAT CTTGCTCACGCTCCACAACTCATGAGAGAACACAAGAGTATCA AATGGAGACCATCTCACTTAAATCAAACACAGCTTCCGCGGAT TCTCTTCATCTGGTCGATTGCAGTCGGTATTGGGTTGAACTTAT TAAACGACGTGAGAGCACTAACCAAGCTTTCATACAACAACG

[1108]

	TTGTTCGGGTGGAGAAGATGTCATCGTCGCGAACATTACTCCA TTTCCTTGGACGTATGTTGCACATCTTTGTGACTACACTTTGGC CCTTTTTGGCGTTTCCGGTGTGGAAGGCCATCGTTTGGGCGAC TGTACCGAATGCCATATTAAGTTTGTGCTTCATGTTAAATACG CAAATCAATCACCTCATCAACACGTGTGCACATGCTTCCGATA ACAACTTTTACAAGCATCAAGTTGTAACTGCTCAGAACTTTGG CCGATCAAGTGCCTTTTGCTTCATCTTCTCGGGAGGTCTCAACT ACCAAATTGAACATCATTTGTTGCCGACGGTGAACCATTGCCA TTTGCCAGCTTTGGCCCCGGGTGTAGAGCGTTTGTGTAAGAAA CACGGGGTGACATACAACTCTGTTGAAGGATACAGAGAGGCC ATCATTGCACACTTTGCACATACCAAAGATATGTCGACGAAGC CTACTGATTGA
SEQ ID NO: 24	天然粉纹夜蛾Z11去饱和酶 ATGGCTGTGATGGCTCAAACAGTACAAGAAACGGCTACAGTG TTGGAAGAGGAAGCTCGCACAGTGACTCTTGTGGCTCCAAAG ACAACGCCAAGGAAATATAAATATATATACACCAACTTTCTTA CATTTTCATATGCGCATTTAGCTGCATTATACGGACTTTATTTG TGCTTCACCTCTGCGAAATGGGAAACATTGCTATTCTCTTTCGT ACTCTTCCACATGTCAAATATAGGCATCACCGCAGGGGCTCAC CGACTCTGGACTCACAAGACTTTCAAAGCCAAATTGCCTTTGG AAATTGTCCTCATGATATTCAACTCTTTAGCCTTTCAAAACAC GGCTATTACATGGGCTAGAGAACATCGGCTACATCACAAATA CAGCGATACTGATGCTGATCCCCACAATGCGTCAAGAGGGTTC TTCTACTCGCATGTTGGCTGGCTATTAGTAAAAAAACATCCCG ATGTCCTGAAATATGGAAAAACTATAGACATGTCGGATGTATA CAATAATCCTGTGTTAAAATTTCAGAAAAAGTACGCAGTACCC TTAATTGGAACAGTTTGTTTTGCTCTGCCAACTTTGATTCCAGT CTACTGTTGGGGCGAATCGTGGAACAACGCTTGGCACATAGCC TTATTTCGATACATATTCAATCTTAACGTGACTTTCCTAGTCAA CAGTGCTGCGCATATCTGGGGGAATAAGCCTTATGATAAAAG CATCTTGCCCGCTCAAAACCTGCTGGTTTCCTTCCTAGCAAGT GGAGAAGGCTTCCATAATTACCATCACGTCTTTCCATGGGATT ACCGCACAGCAGAATTAGGGAATAACTTCCTGAATTTGACGA CGCTGTTCATTGATTTTTGTGCCTGGTTTGGATGGGCTTATGAC TTGAAGTCTGTATCAGAGGATATTATAAAACAGAGAGCTAAA CGAACAGGTGACGGTTCTTCAGGGGTCATTTGGGGATGGGAC GACAAAGACATGGACCGCGATATAAAATCTAAAGCTAACATT TTTTATGCTAAAAAGGAATGA
SEQ ID NO: 25	玉米穗蛾Z11去饱和酶 ATGGCCCAAAGCTATCAATCAACTACGGTTTTGAGTGAGGAG AAAGAACTAACACTGCAACATTTGGTGCCCCAAGCATCGCCC AGGAAGTATCAAATAGTGTATCCGAACCTCATTACGTTTGGTT ACTGGCACATAGCCGGACTTTATGGCCTTTACTTGTGCTTCACT TCTGCTAAATGGGCTACGATTTTATTCAGCTACATCCTCTTCGT GTTAGCAGAAATAGGAATCACGGCTGGCGCTCACAGACTCTG GGCCCACAAAACTTACAAAGCGAAACTACCATTAGAAATACT CTTAATGGTATTCAACTCCATCGCTTTTCAAAACTCAGCCATTG ACTGGGTGAGGGACCACCGACTCCACCATAAGTATAGCGATA CAGATGCTGATCCCCACAATGCCAGCCGAGGGTTCTTTTATTC CCATGTAGGATGGCTACTTGTGAGAAAACATCCTGAAGTCAA AAAGCGAGGGAAAGAACTCAATATGTCCGATATTTACAACAA

[1109]

	TCCTGTCCTGCGGTTTCAGAAAAAATACGCCATACCCTTCATT GGGGCTGTTTGTTTCGCCTTACCTACAATGATACCTGTTTACTT CTGGGGAGAAACCTGGTCCAATGCTTGGCATATCACCATGCTT CGCTACATCATGAACCTCAATGTCACCTTTTTGGTAAACAGCG CTGCTCATATATGGGGAAACAAGCCTTATGACGCAAAAATATT ACCTGCACAAAATGTAGCTGTGTCGGTCGCCACTGGTGGAGA AGGTTTCCATAATTACCACCATGTCTTCCCCTGGGATTATCGA GCAGCGGAACTCGGTAACAATAGCCTCAATCTGACGACTAAA TTCATAGATTTATTCGCAGCAATCGGATGGGCATATGATCTGA AGACGGTTTCGGAGGATATGATAAAACAAAGGATTAAACGCA CTGGAGATGGAACGGATCTTTGGGGACACGAACAAAACTGTG ATGAAGTGTGGGATGTAAAAGATAAATCAAGTTAA
SEQ ID NO: 26	粉纹夜蛾Z11去饱和酶，智人优化的 ATGGCCGTGATGGCCCAGACCGTGCAGGAGACCGCAACAGTG CTGGAGGAGGAGGCAAGGACCGTGACACTGGTGGCACCCAAG ACCACACCTAGAAAGTACAAGTATATCTACACCAACTTCCTGA CCTTCAGCTACGCACACCTGGCCGCCCTGTATGGACTGTACCT GTGCTTTACCTCCGCCAAGTGGGAGACACTGCTGTTCTCTTTTG TGCTGTTCCACATGAGCAATATCGGAATCACCGCAGGAGCAC ACAGGCTGTGGACCCACAAGACATTCAAGGCCAAGCTGCCTC TGGAGATCGTGCTGATGATCTTCAACTCTCTGGCCTTTCAGAA TACCGCCATCACATGGGCCCGGGAGCACAGACTGCACCACAA GTATAGCGACACCGATGCAGACCCACACAACGCAAGCAGGGG CTTCTTTTACTCCCACGTGGGCTGGCTGCTGGTGAAGAAGCAC CCCGACGTGCTGAAGTATGGCAAGACAATCGACATGTCCGAC GTGTACAACAATCCCGTGCTGAAGTTTCAGAAGAAGTATGCCG TGCCTCTGATCGGCACCGTGTGCTTCGCCCTGCCAACACTGAT CCCCGTGTATTGTTGGGGCGAGTCTTGGAACAATGCCTGGCAC ATCGCCCTGTTCCGGTACATCTTTAACCTGAATGTGACCTTTCT GGTGAACTCCGCCGCCCACATCTGGGGCAATAAGCCTTACGAC AAGTCTATCCTGCCAGCCCAGAACCTGCTGGTGTCCTTCCTGG CCTCTGGCGAGGGCTTTCACAATTATCACCACGTGTTCCCATG GGACTACAGGACCGCAGAGCTGGGCAACAATTTTCTGAACCT GACCACACTGTTCATCGATTTTTGTGCCTGGTTCGGCTGGGCCT ATGACCTGAAGTCTGTGAGCGAGGATATCATCAAGCAGAGGG CAAAGAGGACAGGCGATGGCAGCTCCGGCGTGATCTGGGGAT GGGACGATAAGGATATGGACAGAGATATCAAGAGCAAGGCCA ATATCTTCTACGCCAAGAAGGAGTGA
SEQ ID NO: 27	玉米穗蛾Z11去饱和酶，智人优化的 ATGGCACAGTCATATCAGAGCACTACCGTCCTGAGCGAAGAG AAGGAACTGACACTGCAGCACCTGGTCCCACAGGCATCACCT AGAAAGTACCAGATCGTGTATCCAAACCTGATCACCTTCGGCT ACTGGCACATCGCCGGCCTGTACGGCCTGTATCTGTGCTTTAC CTCCGCCAAGTGGGCCACAATCCTGTTCTCTTACATCCTGTTTG TGCTGGCAGAGATCGGAATCACCGCAGGAGCACACAGACTGT GGGCACACAAGACATATAAGGCCAAGCTGCCCCTGGAGATCC TGCTGATGGTGTTCAACAGCATCGCCTTTCAGAATTCCGCCAT CGATTGGGTGCGGGACCACAGACTGCACCACAAGTACTCCGA CACCGATGCCGACCCCCACAACGCCTCTAGGGGCTTCTTTTAT AGCCACGTGGGATGGCTGCTGGTGCGGAAGCACCCTGAGGTG AAGAAGAGAGGCAAGGAGCTGAATATGTCTGATATCTACAAC

[1110]

	AATCCTGTGCTGCGCTTCCAGAAGAAGTATGCCATCCCATTCA TCGGCGCCGTGTGCTTTGCCCTGCCCACCATGATCCCCGTGTA CTTTTGGGGCGAGACATGGAGCAACGCCTGGCACATCACAAT GCTGCGGTATATCATGAACCTGAATGTGACATTCCTGGTGAAC TCCGCCGCCCACATCTGGGGCAATAAGCCATACGACGCCAAG ATCCTGCCCGCCCAGAACGTGGCCGTGAGCGTGGCAACCGGA GGAGAGGGCTTCCACAATTACCACCACGTGTTTCCTTGGGATT ATCGGGCCGCCGAGCTGGGCAACAATTCTCTGAATCTGACCAC AAAGTTCATCGACCTGTTTGCCGCCATCGGCTGGGCCTATGAT CTGAAGACAGTGAGCGAGGACATGATCAAGCAGAGGATCAAG CGCACCGGCGATGGCACAGACCTGTGGGGGCACGAGCAGAAC TGTGATGAAGTGTGGGATGTGAAAGACAAGTCCTCCTAA
SEQ ID NO: 28	解脂耶氏酵母OLE1前导序列-粉纹夜蛾Z11去饱和酶（智人优化的） ATGGTGAAGAACGTGGACCAGGTGGATCTGTCTCAGGTGGAC ACCATCGCAAGCGGAAGGGATGTGAATTATAAGGTGAAGTAC ACATCTGGCGTGAAGACCACACCAAGAAAGTACAAGTATATC TACACCAACTTCCTGACATTTTCTTACGCCCACCTGGCCGCCCT GTATGGCCTGTACCTGTGCTTTACCAGCGCCAAGTGGGAGACA CTGCTGTTCTCCTTTGTGCTGTTCCACATGTCTAATATCGGAAT CACCGCAGGAGCACACAGGCTGTGGACCCACAAGACATTCAA GGCCAAGCTGCCCCTGGAGATCGTGCTGATGATCTTCAACTCC CTGGCCTTTCAGAATACCGCCATCACATGGGCCCGGGAGCACA GACTGCACCACAAGTATTCTGACACCGATGCAGACCCACACA ACGCAAGCAGGGGCTTCTTTTACTCCCACGTGGGCTGGCTGCT GGTGAAGAAGCACCCTGACGTGCTGAAGTATGGCAAGACAAT CGACATGAGCGACGTGTACAACAATCCTGTGCTGAAGTTTCAG AAGAAGTATGCCGTGCCACTGATCGGCACCGTGTGCTTCGCCC TGCCCACACTGATCCCCGTGTACTGTTGGGGCGAGTCCTGGAA CAATGCCTGGCACATCGCCCTGTTCCGGTACATCTTTAACCTG AATGTGACCTTTCTGGTGAACAGCGCCGCCCACATCTGGGGCA ATAAGCCATACGACAAGTCCATCCTGCCCGCCCAGAACCTGCT GGTGTCCTTCCTGGCCTCTGGCGAGGGCTTTCACAATTATCAC CACGTGTTCCCTTGGGACTACAGGACCGCAGAGCTGGGCAAC AATTTTCTGAACCTGACCACACTGTTCATCGATTTTTGTGCCTG GTTCGGCTGGGCCTATGACCTGAAGTCTGTGAGCGAGGATATC ATCAAGCAGAGGGCAAAGAGGACAGGCGATGGCAGCTCCGGC GTGATCTGGGGATGGGACGATAAGGATATGGACAGAGATATC AAGTCCAAGGCCAATATCTTCTACGCCAAGAAGGAGTGA
SEQ ID NO: 29	解脂耶氏酵母OLE1前导序列-玉米穗蛾Z11去饱和酶（智人优化的） ATGGTGAAAAACGTGGACCAAGTGGATCTCTCGCAGGTCGAC ACCATTGCCTCCGGCCGAGATGTCAACTACAAGGTCAAGTACA CCTCCGGCGTTCGCAAGTATCAGATCGTGTATCCTAACCTGAT CACCTTCGGCTACTGGCATATCGCTGGACTGTACGGACTGTAT CTGTGCTTCACTTCCGCCAAGTGGGCCACCATCCTGTTCTCTTA CATCCTGTTTGTGCTGGCAGAGATCGGAATCACCGCAGGAGCA CACAGACTGTGGGCACACAAGACATATAAGGCCAAGCTGCCA CTGGAGATCCTGCTGATGGTGTTCAACAGCATCGCCTTTCAGA ATTCCGCCATCGATTGGGTGCGGGACCACAGACTGCACCACA AGTACTCCGACACAGATGCCGACCCCCACAACGCCTCTAGGG GCTTCTTTTATAGCCACGTGGGATGGCTGCTGGTGCGGAAGCA CCCTGAGGTGAAGAAGAGAGGCAAGGAGCTGAATATGTCTGA

[1111]

	TATCTACAACAATCCTGTGCTGCGCTTCCAGAAGAAGTATGCC ATCCCATTCATCGGCGCCGTGTGCTTTGCCCTGCCCACCATGA TCCCCGTGTACTTTTGGGGCGAGACATGGAGCAACGCCTGGCA CATCACAATGCTGCGGTATATCATGAACCTGAATGTGACATTC CTGGTGAACTCCGCCGCCCACATCTGGGGCAATAAGCCATACG ACGCCAAGATCCTGCCCGCCCAGAACGTGGCCGTGAGCGTGG CAACCGGAGGAGAGGGCTTCCACAATTACCACCACGTGTTTCC ATGGGATTATAGGGCAGCAGAGCTGGGAAACAATTCTCTGAA TCTGACCACAAAGTTCATCGACCTGTTTGCCGCCATCGGCTGG GCCTATGATCTGAAGACAGTGAGCGAGGACATGATCAAGCAG AGGATCAAGCGCACCGGCGATGGCACAGACCTGTGGGGGCAC GAGCAGAATTGTGATGAAGTGTGGGATGTGAAGGATAAAAGC AGTTGA
SEQ ID NO: 30	天然脐橙螟蛾Z11去饱和酶 ATGGTCCCTAACAAGGGTTCCAGTGACGTTTTGTCTGAACATT CTGAGCCCCAGTTCACTAAACTCATAGCTCCACAAGCAGGGCC GAGGAAATACAAGATAGTGTATCGAAATTTGCTCACATTCGGC TATTGGCACTTATCAGCTGTTTATGGGCTCTACTTGTGCTTTAC TTGTGCGAAATGGGCTACCATCTTATTTGCATTTTTCTTATACG TGATCGCGGAAATCGGTATAACAGGTGGCGCTCATAGGCTAT GGGCACATCGGACTTATAAAGCCAAGTTGCCTTTAGAGATTTT GTTACTCATAATGAATTCTATTGCCTTCCAAGACACTGCTTTCA CCTGGGCTCGAGATCACCGCCTTCATCACAAATATTCGGATAC TGACGCTGATCCCCACAATGCTACCAGAGGGTTTTTCTATTCA CATGTAGGCTGGCTTTTGGTGAAGAAACACCCTGAAGTCAAA GCAAGAGGAAAATACTTGTCGTTAGATGATCTTAAGAATAATC CATTGCTTAAATTCCAAAAGAAATACGCTATTCTAGTTATAGG CACGTTATGCTTCCTTATGCCAACATTTGTGCCCGTATACTTCT GGGGCGAGGGCATCAGCACGGCCTGGAACATCAATCTATTGC GATACGTCATGAATCTTAACATGACTTTCTTAGTTAACAGTGC AGCGCATATCTTTGGCAACAAACCATACGATAAGAGCATAGC CTCAGTCCAAAATATTTCAGTTAGCTTAGCTACTTTTGGCGAA GGATTCCATAATTACCATCACACTTACCCCTGGGATTATCGTG CGGCAGAATTAGGAAATAATAGGCTAAATATGACTACTGCTTT CATAGATTTCTTCGCTTGGATCGGCTGGGCTTATGACTTGAAG TCTGTGCCACAAGAGGCCATTGCAAAAAGGTGTGCGAAAACT GGCGATGGAACGGATATGTGGGGTCGAAAAAGATAA
SEQ ID NO: 31	pPV0228_-_Z11_玉米穗蛾_去饱和酶 ATGGCCCAAAGCTATCAATCAACTACGGTTTTGAGTGAGGAG AAAGAACTAACATTACAACATTTGGTGCCCCAAGCATCGCCCA GGAAGTATCAAATAGTGTATCCGAACCTCATTACGTTTGGTTA CTGGCACATAGCCGGACTTTATGGCCTTTACTTGTGCTTCACTT CTGCTAAATGGGCTACGATTTTATTCAGCTACATCCTCTTCGTG TTAGCAGAAATAGGAATCACGGCTGGCGCTCACAGACTCTGG GCCCACAAAACTTACAAAGCGAAACTACCATTAGAAATACTC TTAATGGTATTCAACTCCATCGCTTTTCAAAACTCAGCCATTG ACTGGGTGAGGGACCACCGACTCCACCATAAGTATAGCGATA CAGATGCTGATCCCCACAATGCCAGCCGAGGGTTCTTTTATTC CCATGTAGGATGGCTACTTGTGAGAAAACATCCTGAAGTCAA AAAGCGAGGGAAAGAACTCAATATGTCCGATATTTACAACAA TCCTGTCTTACGGTTTCAGAAAAAATACGCCATACCCTTCATT

[1112]

	GGGGCTGTTTGTTTCGCCTTACCTACAATGATACCTGTTTACTT CTGGGGAGAAACCTGGTCCAATGCTTGGCATATCACCATGCTT CGCTACATCATGAACCTCAATGTCACCTTTTTGGTAAACAGCG CTGCTCATATATGGGGAAACAAGCCTTATGACGCAAAAATATT ACCTGCACAAAATGTAGCTGTGTCGGTCGCCACTGGTGGAGA AGGTTTCCATAATTACCACCATGTCTTCCCCTGGGATTATCGA GCAGCGGAACTCGGTAACAATAGCCTCAATTTAACGACTAAA TTCATAGATTTATTCGCAGCAATCGGATGGGCATATGATTTAA AGACGGTTTCGGAGGATATGATAAAACAAAGGATTAAACGCA CTGGAGATGGAACGGATCTTTGGGGACACGAACAAAACTGTG ATGAAGTGTGGGATGTAAAAGATAAATCAAGTTAA
SEQ ID NO: 32	pPV0228_-_棉铃虫还原酶（密码子优化的） ATGGTCGTTTTAACTTCTAAAGAGACAAAACCTTCAGTAGCTG AGTTTTATGCGGGAAAATCTGTTTTTATTACGGGTGGCACTGG ATTCCTTGGAAAGGTATTCATAGAGAAACTTTTATATAGCTGT CCAGATATCGAGAATATCTACATGCTCATACGAGAGAAGAAA GGTCTTTCTGTTAGCGAAAGAATAAAACAGTTCCTTGATGACC CGCTCTTTACCAGACTAAAAGACAAAAGACCAGCTGACTTAG AGAAGATTGTATTAATACCAGGAGATATTACTGCTCCTGACTT AGGCATTAATTCTGAAAACGAGAAGATGCTTATAGAGAAGGT ATCGGTGATTATTCATTCGGCTGCTACGGTGAAGTTTAATGAG CCTCTCCCTACGGCTTGGAAGATCAACGTGGAAGGAACCAGA ATGATGTTAGCTTTGAGTCGAAGAATGAAGCGGATTGAGGTTT TCATTCACATATCGACAGCATACACGAACACAAACAGGGAAG TGGTTGACGAGATCTTATACCCAGCTCCTGCTGATATCGACCA AGTTCATCAGTATGTCAAAGATGGAATCTCTGAGGAAGACACT GAGAAAATATTAAATGGTCGTCCAAATACGTACACGTTTACGA AAGCGTTAACTGAGCATTTAGTTGCTGAGAACCAAGCCTACGT ACCCACTATTATCGTCAGGCCGTCAGTCGTGGCAGCAATAAAA GATGAGCCATTAAAAGGTTGGTTAGGCAACTGGTTTGGAGCG ACTGGTCTCACCGTGTTCACCGCTAAGGGTCTCAACCGAGTCA TCTACGGTCATTCTAGCTACATCGTAGACTTAATTCCTGTGGAT TATGTCGCTAATTTAGTGATTGCTGCTGGGGCTAAGAGTAGCA AGTCAACTGAGTTGAAGGTATACAACTGCTGCAGCAGCTCCTG CAATCCCGTCACTATTGGCACGTTAATGAGCATGTTTGCTGAC GATGCCATCAAACAGAAGTCGTATGCTATGCCGCTACCGGGGT GGTACATATTCACGAAATATAAGTGGTTAGTTCTTCTTTTAAC ATTTCTCTTCCAAGTTATACCGGCGTATGTCACAGATCTCTCCA GGCACTTGATTGGGAAGAGTCCACGGTACATAAAACTCCAAT CACTAGTAAATCAAACGCGCTCTTCAATCGACTTCTTCACGAA TCACTCCTGGGTGATGAAGGCAGACAGAGTGAGAGAGTTATA TGCGTCTCTTTCCCCCGCAGACAAGTACTTATTTCCCTGTGATC CTACGGACATTAACTGGACACATTACATACAAGACTACTGTTG GGGAGTCCGACATTTTTTGGAGAAAAAAAGCTACGAATAA
SEQ ID NO: 33	pPV0228_-_ICL_启动子 TATTAGGCGAAGAGGCATCTAGTAGTAGTGGCAGTGGTGAGA ACGTGGGCGCTGCTATAGTGAACAATCTCCAGTCGATGGTTAA GAAGAAGAGTGACAAACCAGCAGTGAATGACTTGTCTGGGTC CGTGAGGAAAAGAAAGAAGCCCGACACAAAGGACAGTAACG TCAAGAAACCCAAGAAATAGGGGGGACCTGTTTAGATGTATA GGAATAAAAACTCCGAGATGATCTCAATGTGTAATGGAGTTGT

[1113]

	AATATTGCAAAGGGGGAAAATCAAGACTCAAACGTGTGTATG AGTGAGCGTACGTATATCTCCGAGAGTAGTATGACATAATGAT GACTGTGAATCATCGTAATCTCACACAAAAACCCCATTGTCGG CCATATACCACACCAAGCAACACCACATATCCCCCGGAAAAA AAAACGTGAAAAAAAGAAACAATCAAAACTACAACCTACTCC TTGATCACACAGTCATTGATCAAGTTACAGTTCCTGCTAGGGA ATGACCAAGGTACAAATCAGCACCTTAATGGTTAGCACGCTCT CTTACTCTCTCTCACAGTCTTCCGGCCCCTATTCAAAATTCTGC ACTTCCATTTGACCCCAGGGTTGGGAAACAGGGCCACAAAAG AAAAACCCGACGTGAATGAAAAAACTAAGAAAAGAAAAAAA ATTATCACACCAGAAATTTACCTAATTGGGTAATTCCCATCGG TGTTTTTCCTGGATTGTCGCACGCACGCATGCTGAAAAAAGTG TTCGAGTTTTGCTTTTGCCTCGGAGTTTCACGCAAGTTTTTCGA TCTCGGAACCGGAGGGCGGTCGCCTTGTTGTTTGTGATGTCGT GCTTTGGGTGTTCTAATGTGCTGTTATTGTGCTCTTTTTTTTTCT TCTTTTTTTGGTGATCATATGATATTGCTCGGTAGATTACTTTC GTGTGTAGGTATTCTTTTAGACGTTTGGTTATTGGGTAGATATG AGAGAGAGAGAGTGGGTGGGGGAGGAGTTGGTTGTAGGAGG GACCCCTGGGAGGAAGTGTAGTTGAGTTTTCCCTGACGAATGA AAATACGTTTTTGAGAAGATAATACAGGAAAGGTGTGTCGGT GAATTTCCATCTATCCGAGGATATGAGTGGAGGAGAGTCGTGT GCGTGTGGTTAATTTAGGATCAGTGGAACACACAAAGTAACT AAGACAGAGAGACAGAGAGAAAAATCTGGGGAAGAGACAAA GAGTCAGAGTGTGTGAGTTATTCTGTATTGTGAAATTTTTTTGC CCAACTACATAATATTGCTGAAACTAATTTTACTTAAAAAGAA AAGCCAACAACGTCCCCAGTAAAACTTTTCTATAAATATCAGC AGTTTTCCCTTTCCTCCATTCCTCTTCTTGTCTTTTTTCTTACTTT CCCTTTTTTATACCTTTTCATTATCATCCTTTATAATTGTCTAAC CAACAACTATATATCTATCAA
SEQ ID NO: 34	pPV0228_-_TEF_热带假丝酵母_启动子_区域 AGGAAGACAACCAAAAGAAAGATCAAATTGACTAAATGTTGA ACAGACCAAAAAAAAAGAACAACAAATAGATAAATTACAAC ATATTAATCTTTTGATATGTTGTTGAATATTCTAGTAAATCTAA TGATCTCAATAGTGGTTATCATTCACTCTCTTCGTCCTCCTCTC TCCCCTCCTCCTCTTGCAGTATATTAAAAGCAATAAAAAAAAA AAAAAAAAGAAAATCTGCCAACACACACAAAAAAAACTTACA TAGTCGTGTACCAGTGTCAATATTTCACCAGCGCAGAGAAAAG AAGATGAACAGAAAAATTTTCTCTTTGGTTTTGTCTTTGGTTTT GTATTAATCTCATTGAAAAATTTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTCACTCACACACTCACTCGCATTTCGTTTGGGTTACAGCAG AAGTCAGACAGAAAAAAAAAATCGTATATAACTCTCATCAAA TGCCCTAGAGAAAAATTTTTCTTCTATCCTTTTTTTTTTCTTCTT CTTCTTCTTTTCCTTTTTTCTTTTAGAAGATCTTTTTGAATTCAT CAAAGATATATATTTAATCAATC
SEQ ID NO: 35	pPV0228_-_ICL_终止子 AAGAAAAAAGAAAAGGTAAAGAACTTCATTTGAGATGAACTT TTGTATATGACTTTTAGTTTCTACTTTTTTTTTTATTTATTGCTT AATTTTCTTTATTTCAATCCCCCATAGTTTGTGTAGAATATATT TATTCATTCTGGTAACTCAAACACGTAGCAAGCTCGTTGCATC TCGCCTCGTCACGGGTACAGCTCTGGAACCAAAGACAAAAAA AAAAGTTGATCCGAACCCTCTCGCTATTCCTTGCTATGCTATCC

[1114]

	ACGAGATGGGGTTTATCAGCCCAGGCAAGTCACTAAA
SEQ ID NO: 36	pPV0228_-_TEF_终止子 GCTGATTAATGAATAATTAATAAGTATTGTTTTTTTTGTTTTTA ATATATATATATCTTGAAATTAGTATAAAAAAAATCTTTTTTTT TTCTTTTTTATTTATTTTATCAATAGTTTATATATATATATATAT AAACTTGTAAGAGATTAGGTATATCTAACAGTGATACTACTAA TAGTGCTTAATATCTTTGTTAAACAAGAAAATAAAATAAAC
SEQ ID NO: 37	SapI-tLIP2-pEXP1-HA_FAR-SapI（插入pPV199产生pPV247） GCCTGAAGAGCGCTATTTATCACTCTTTACAACTTCTACCTCA ACTATCTACTTTAATAAATGAATATCGTTTATTCTCTATGATTA CTGTATATGCGTTCCTCCATGGGAGTTTGGCGCCCGTTTTTTCG AGCCCCACACGTTTCGGTGAGTATGAGCGGCGGCAGATTCGA GCGTTTCCGGTTTCCGCGGCTGGACGAGAGCCCATGATGGGGG CTCCCACCACCAGCAATCAGGGCCCTGATTACACACCCACCTG TAATGTCATGCTGTTCATCGTGGTTAATGCTGCTGTGTGCTGTG TGTGTGTGTTGTTTGGCGCTCATTGTTGCGTTATGCAGCGTACA CCACAATATTGGAAGCTTATTAGCCTTTCTATTTTTTCGTTTGC AAGGCTTAACAACATTGCTGTGGAGAGGGATGGGGATATGGA GGCCGCTGGAGGGAGTCGGAGAGGCGTTTTGGAGCGGCTTGG CCTGGCGCCCAGCTCGCGAAACGCACCTAGGACCCTTTGGCAC GCCGAAATGTGCCACTTTTCAGTCTAGTAACGCCTTACCTACG TCATTCCATGCATGCATGTTTGCGCCTTTTTTCCCTTGCCCTTG ATCGCCACACAGTACAGTGCACTGTACAGTGGAGGTTTTGGGG GGGTCTTAGATGGGAGCTAAAAGCGGCCTAGCGGTACACTAG TGGGATTGTATGGAGTGGCATGGAGCCTAGGTGGAGCCTGAC AGGACGCACGACCGGCTAGCCCGTGACAGACGATGGGTGGCT CCTGTTGTCCACCGCGTACAAATGTTTGGGCCAAAGTCTTGTC AGCCTTGCTTGCGAACCTAATTCCCAATTTTGTCACTTCGCACC CCCATTGATCGAGCCCTAACCCCTGCCCATCAGGCAATCCAAT TAAGCTCGCATTGTCTGCCTTGTTTAGTTTGGCTCCTGCCCGTT TCGGCGTCCACTTGCACAAACACAAACAAGCATTATATATAAG GCTCGTCTCTCCCTCCCAACCACACTCACTTTTTTGCCCGTCTT CCCTTGCTAACACAAAAGTCAAGAACACAAACAACCACCCCA ACCCCCTTACACACAAGACATATCTACAGCAATGGTGGTGCTG ACCAGCAAGGAGACAAAGCCTTCCGTGGCCGAGTTCTACGCC GGCAAGTCCGTGTTTATCACAGGCGGCACCGGCTTCCTGGGCA AGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTACTCTTGCCCAGACATCGA GAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAAGGGCCTGAGCGT GTCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGATCCCCTGTTTACA CGGCTGAAGGACAAGAGACCTGCCGATCTGGAGAAGATCGTG CTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGATCTGGGCATCAACT CCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAGGTGTCCGTGATCA TCCACTCTGCCGCCACCGTGAAGTTCAACGAGCCCCTGCCTAC AGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACCAGGATGATGCTGGC CCTGAGCCGGAGAATGAAGCGCATCGAGGTGTTTATCCACATC TCCACAGCCTACACCAACACAAATCGGGAGGTGGTGGACGAG ATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATCGATCAGGTGCACCAGT ATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGGATACCGAGAAGATCC TGAACGGCCGGCCAAATACCTACACATTCACCAAGGCCCTGA CAGAGCACCTGGTGGCCGAGAACCAGGCCTATGTGCCTACCA TCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCATCAAGGATGAGCC

[1115]

	CCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCGGAGCAACAGGACT GACCGTGTTTACAGCCAAGGGCCTGAATAGAGTGATCTACGG CCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATCCCCGTGGATTACGTG GCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAAGTCTAGCAAGTCT ACCGAGCTGAAGGTGTATAACTGCTGTTCCTCTAGCTGTAATC CTGTGACCATCGGCACACTGATGTCCATGTTCGCCGACGATGC CATCAAGCAGAAGTCTTACGCCATGCCTCTGCCAGGCTGGTAC ATCTTTACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTGCTGCTGACCTTCC TGTTTCAGGTCATCCCAGCCTACGTGACCGATCTGTCTAGGCA CCTGATCGGCAAGAGCCCCCGCTATATCAAGCTGCAGTCTCTG GTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTTCTTTACAAATCACA GCTGGGTCATGAAGGCCGATAGGGTGCGCGAGCTGTACGCCT CTCTGAGCCCTGCCGACAAGTATCTGTTCCCCTGCGACCCTAC CGATATCAATTGGACACACTACATCCAGGATTATTGTTGGGGC GTGCGCCACTTCCTGGAGAAGAAGTCCTATGAGTGAGCCTGA AGAGC
SEQ ID NO: 38	NcoI-pTAL-AleI（插入pPV247产生pPV248） CCATGGGTAAGCAGGTGGCTCCGTTTGTGTCTTTGTGTTTTTCC CCTCCTTTTTGGACCATTTGTCAGCATGTTGCGTAGGTCTGGGT GTTTGACTGTTCAGGTGGTGGATGACGGATGCATCATCTGACG GCAGAGTGGGTACCTGGCAGTGGCAGGCTCGCAGACGAGGTA GAGAGATTCTGAAAGGAGCCATTGACAGATGGAGAATTGGAT ACTCCTGGTATGTCCTCCGTTTCCACTTTTGACGTTGGTGACGT GCTCTGGAACGACTTTTTTCTTTTTCTTTAAAACAAAAAAAAG AAAGAAAAAAAAAACATTTACTACTACCAGTAGTACACCTCA ACATTGGGTCCAGAACGTCCCAACTGCATGAGTCACTGGAGTC ATGCCGAGGTCGCTAAGGTGCTGTAAAATACAACGTCAATTG AGAGAGACACAGGCGCAGCGCGCCGAGGGAGAAACGAGGCA TTTATCTTCTGACCCTCCTTTTTACTCGTAATCTGTATCCCGGA ACCGCGTCGCATCCATGTTAATTAAATCAACACTTACACTTGC TTGCTTCGTATGATGAAGATTTCTGACTGGCAACCCAGTCAGC AGCAGATTGGGGCAGATGTAGTAATGAAAAACACTGCAAGGT GTGACGTTTGAGACACTCCAATTGGTTAGAAAGCGACAAAGA AGACGTCGGAAAAATACCGGAAAAATCGAGTCTTTTTCTTTCT GCGTATTGGGCCCTTCTGCCTCCTTTGCCGCCCTTTCCACGCTC TTTCCACACCCTCACACTCCCTGAGCACTATGATCTCATTGCGC AATAAGATATACATGCACGTGCATTTGGTGAGCACGCAGAAC CTTGTTGGGGGAAGATGCCCTAACCCTAAGGGCGTTCCATACG GTTCGACAGAGTAACCTTGCTGTCGATTATAACGCATATATAG CCCCCCCCTTCGGACCCTCCTTCTGATTTCTGTTTCTGTATCAA CATTACACACAAACACACAATGGTG
SEQ ID NO: 39	pDST003水稻大螟去饱和酶 MLSQEEPTDTSLVPRAAPRKYQIVYPNLITFGYWHLAGLYGLYLC FTSAKWTTILFSFILCVIAEIGVTAGAHRLWAHKTYKANLPLQILL MVMNSIAFQNSAIDWVRDHRLHHKYSDTDADPHNASRGFFYSH VGWLLVKKHPEVKKRGKELDMSDIYSNPVLRFQKQYAIPFIGAV CFILPTVIPVYCWGETWTNAWHITMLRYITNLNVTFLVNSAAHIW GYKPYDENILPAQNIAVSIATCGEGFHNYHHVFPWDYRAAELGN NNLNLTTKFIDFFAWLGWAYDLKTVSSDMIKLRAKRTGDGTNL WGEHNDELKEGKED

[1116]

SEQ ID NO: 40	来自SEQ ID NO: 37棉铃虫FAR ATGGTGGTGCTGACCAGCAAGGAGACAAAGCCTTCCGTGGCC GAGTTCTACGCCGGCAAGTCCGTGTTTATCACAGGCGGCACCG GCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTACTCTTG CCCAGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGAA GGGCCTGAGCGTGTCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACGA TCCCCTGTTTACACGGCTGAAGGACAAGAGACCTGCCGATCTG GAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGAT CTGGGCATCAACTCCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAAG GTGTCCGTGATCATCCACTCTGCCGCCACCGTGAAGTTCAACG AGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACCA GGATGATGCTGGCCCTGAGCCGGAGAATGAAGCGCATCGAGG TGTTTATCCACATCTCCACAGCCTACACCAACACAAATCGGGA GGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATCGAT CAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGGAT ACCGAGAAGATCCTGAACGGCCGGCCAAATACCTACACATTC ACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAACCAGGCC TATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGCCA TCAAGGATGAGCCCCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTTCG GAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCAAGGGCCTGAATA GAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATCCC CGTGGATTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCCAA GTCTAGCAAGTCTACCGAGCTGAAGGTGTATAACTGCTGTTCC TCTAGCTGTAATCCTGTGACCATCGGCACACTGATGTCCATGT TCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCTTACGCCATGCCTCT GCCAGGCTGGTACATCTTTACAAAGTATAAGTGGCTGGTGCTG CTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCAGCCTACGTGACCG ATCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCCCGCTATATCAA GCTGCAGTCTCTGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTTC TTTACAAATCACAGCTGGGTCATGAAGGCCGATAGGGTGCGC GAGCTGTACGCCTCTCTGAGCCCTGCCGACAAGTATCTGTTCC CCTGCGACCCTACCGATATCAATTGGACACACTACATCCAGGA TTATTGTTGGGGCGTGCGCCACTTCCTGGAGAAGAAGTCCTAT GAGTGA
SEQ ID NO: 41	棉铃虫形成醇的还原酶（HaFAR） MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDI ENIYMLIREKKGLS VSERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPGDITAPDLGINSENE KMLIEKVSVIIHS AATVKFNEPLPTAWKINVEGTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYT NTNREVVDEILYPAP ADIDQVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQ AYVPTIIVRPSVVAA IKDEPLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYGHSSYIVDLIPVD YVANLVIAAGAKSSK STELKVYNCCSSSCNPVTIGTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYI FTKYKWLVLLLTFLF QVIPAYVTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMK ADRVRELYASLSPA DKYLFPCDPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKKSYE

[1117]

SEQ ID NO: 42	HaFAR S60A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDI ENIYMLIREKKGLAVSERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIP GDITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAATVKFNEPLPTAWKINV EGTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADID QVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYV PTIIVRPSVVAAIKDEPLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYG HSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELKVYNCCSSSCNPVTI GTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVI PAYVTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKAD RVRELYASLSPADKYLFPCDPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKK SYE
SEQ ID NO: 43	HaFAR S195A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDI ENIYMLIREKKGLSVSERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPG DITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAATVKFNEPLPTAWKINVE GTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADID QVHQYVKDGIAEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYV PTIIVRPSVVAAIKDEPLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYG HSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELKVYNCCSSSCNPVTI GTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVI PAYVTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKAD RVRELYASLSPADKYLFPCDPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKK SYE
SEQ ID NO: 44	HaFAR S298A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDI ENIYMLIREKKGLSVSERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPG DITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAATVKFNEPLPTAWKINVE GTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADID QVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYV PTIIVRPSVVAAIKDEPLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYG HSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKASKSTELKVYNCCSSSCNPVTI GTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVI PAYVTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKAD RVRELYASLSPADKYLFPCDPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKK SYE
SEQ ID NO: 45	HaFAR S378A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDI ENIYMLIREKKGLSVSERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPG DITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAATVKFNEPLPTAWKINVE GTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADID QVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYV PTIIVRPSVVAAIKDEPLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYG HSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELKVYNCCSSSCNPVTI GTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVI PAYVTDLSRHLIGKAPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKAD RVRELYASLSPADKYLFPCDPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKK SYE

[1118]

SEQ ID NO: 46	HaFAR S394A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDI ENIYMLIREKKGLSVSERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPG DITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAATVKFNEPLPTAWKINVE GTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADID QVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYV PTIIVRPSVVAAIKDEPLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYG HSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELKVYNCCSSSCNPVTI GTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVI PAYVTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSAIDFFTNHSWVMKAD RVRELYASLSPADKYLFPCDPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKK SYE
SEQ ID NO: 47	HaFAR S418A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDI ENIYMLIREKKGLSVSERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPG DITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAATVKFNEPLPTAWKINVE GTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADID QVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYV PTIIVRPSVVAAIKDEPLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYG HSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELKVYNCCSSSCNPVTI GTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVI PAYVTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKAD RVRELYASLAPADKYLFPCDPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKK SYE
SEQ ID NO: 48	HaFAR S453A MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDI ENIYMLIREKKGLSVSERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPG DITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAATVKFNEPLPTAWKINVE GTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADID QVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYV PTIIVRPSVVAAIKDEPLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYG HSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELKVYNCCSSSCNPVTI GTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVI PAYVTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKAD RVRELYASLSPADKYLFPCDPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKK AYE
SEQ ID NO: 49	粉纹夜蛾去饱和酶 MAVMAQTVQETATVLEEEARTVTLVAPKTTPRKYKYIYTNFLTF SYAHLAALYGLYLCFTSAKWETLLFSFVLFHMSNIGITAGAHRL WTHKTFKAKLPLEIVLMIFNSLAFQNTAITWAREHRLHHKYSDT DADPHNASRGFFYSHVGWLLVKKHPDVLKYGKTIDMSDVYNNP VLKFQKKYAVPLIGTVCFALPTLIPVYCWGESWNNAWHIALFRYI FNLNVTFLVNSAAHIWGNKPYDKSILPAQNLLVSFLASGEGFHNY HHVFPWDYRTAELGNNFLNLTTLFIDFCAWFGWAYDLKSVSEDII KQRAKRTGDGSSGVIWGWDDKDMDRDIKSKANIFYAKKE
SEQ ID NO: 50	由SEQ ID NO: 11编码的假微型海链藻去饱和酶 TSMDFLSGDPFRTLVLAALVVIGFAAAWQCFYPPSIVGKPRTLSN GKLNTRIHGKLYDLSSFQHPGGPVALSLVQGRDGTALFESHHPFI

[1119]

	PRKNLLQILSKYEVPSTEDSVSFIATLDELNGESPYDWKDIENDDF VSDLRALVIEHFSPLAKERGVSLVESSKATPQRWMVVLLLLASFF LSIPLYLSGSWTFVVVTPILAWLAVVNYWHDATHFALSSNWILN AALPYLLPLLSSPSMWYHHHVIGHHAYTNISKRDPDLAHAPQLM REHKSIKWRPSHLNQTQLPRILFIWSIAVGIGLNLLNDVRALTKLS YNNVVRVEKMSSSRTLLHFLGRMLHIFVTTLWPFLAFPVWKAIV WATVPNAILSLCFMLNTQINHLINTCAHASDNNFYKHQVVTAQN FGRSSAFCFIFSGGLNYQIEHHLLPTVNHCHLPALAPGVERLCKK HGVTYNSVEGYREAIIAHFAHTKDMSTKPTD
SEQ ID NO: 51	由SEQ ID NO: 23编码的假微型海链藻Z11去饱和酶 MDFLSGDPFRTLVLAALVVIGFAAAWQCFYPPSIVGKPRTLSNGK LNTRIHGKLYDLSSFQHPGGPVALSLVQGRDGTALFESHHPFIPRK NLLQILSKYEVPSTEDSVSFIATLDELNGESPYDWKDIENDDFVSD LRALVIEHFSPLAKERGVSLVESSKATPQRWMVVLLLLASFFLSIP LYLSGSWTFVVVTPILAWLAVVNYWHDATHFALSSNWILNAALP YLLPLLSSPSMWYHHHVIGHHAYTNISKRDPDLAHAPQLMREHK SIKWRPSHLNQTQLPRILFIWSIAVGIGLNLLNDVRALTKLSYNNV VRVEKMSSSRTLLHFLGRMLHIFVTTLWPFLAFPVWKAIVWATV PNAILSLCFMLNTQINHLINTCAHASDNNFYKHQVVTAQNFGRSS AFCFIFSGGLNYQIEHHLLPTVNHCHLPALAPGVERLCKKHGVTY NSVEGYREAIIAHFAHTKDMSTKPTD
SEQ ID NO: 52	脐橙螟蛾去饱和酶 MVPNKGSSDVLSEHSEPQFTKLIAPQAGPRKYKIVYRNLLTFGYW HLSAVYGLYLCFTCAKWATILFAFFLYVIAEIGITGGAHRLWAHR TYKAKLPLEILLLIMNSIAFQDTAFTWARDHRLHHKYSDTDADPH NATRGFFYSHVGWLLVKKHPEVKARGKYLSLDDLKNNPLLKFQ KKYAILVIGTLCFLMPTFVPVYFWGEGISTAWNINLLRYVMNLN MTFLVNSAAHIFGNKPYDKSIASVQNISVSLATFGEGFHNYHHTY PWDYRAAELGNNRLNMTTAFIDFFAWIGWAYDLKSVPQEAIAK RCAKTGDGTDMWGRKR
SEQ ID NO: 53	黄地老虎去饱和酶 MAQGVQTTTILREEEPSLTFVVPQEPRKYQIVYPNLITFGYWHIAG LYGLYLCFTSAKWQTILFSFMLVVLAELGITAGAHRLWAHKTYK AKLPLQIILMILNSIAFQNSAIDWVRDHRLHHKYSDTDADPHNAT RGFFYSHVGWLLVRKHPEVKRRGKELDMSDIYNNPVLRFQKKY AIPFIGAMCFGLPTFIPVYFWGETWSNAWHITMLRYILNLNITFLV NSAAHIWGYKPYDIKILPAQNIAVSIVTGGEVSITTTTFFPWDYRA AELGNNYLNLTTKFIDFFAWIGWAYDLKTVSSDVIKSKAERTGD GTNLWGLEDKGEEDFLKIWKDN
SEQ ID NO: 54	玉米穗蛾去饱和酶 MAQSYQSTTVLSEEKELTLQHLVPQASPRKYQIVYPNLITFGYWH IAGLYGLYLCFTSAKWATILFSYILFVLAEIGITAGAHRLWAHKTY KAKLPLEILLMVFNSIAFQNSAIDWVRDHRLHHKYSDTDADPHN ASRGFFYSHVGWLLVRKHPEVKKRGKELNMSDIYNNPVLRFQK KYAIPFIGAVCFALPTMIPVYFWGETWSNAWHITMLRYIMNLNV TFLVNSAAHIWGNKPYDAKILPAQNVAVSVATGGEGFHNYHHV FPWDYRAAELGNNSLNLTTKFIDLFAAIGWAYDLKTVSEDMIKQ RIKRTGDGTDLWGHEQNCDEVWDVKDKSS

[1120]

SEQ ID NO: 55	由SEQ ID NO: 1编码的黄地老虎FAR MPVLTSREDEKLSVPEFYAGKSIFVTGGTGFLGKVFIEKLLYCCPD IDKIYMLIREKKNLSIDERMSKFLDDPLFSRLKEERPGDLEKIVLIP GDITAPNLGLSAENERILLEKVSVIINSAATVKFNEPLPIAWKINVE GTRMLLALSRRMKRIEVFIHISTAYSNASSDRIVVDEILYPAPADM DQVYQLVKDGVTEEETERLLNGLPNTYTFTKALTEHLVAEHQTY VPTIIIRPSVVASIKDEPIRGWLCNWFGATGISVFTAKGLNRVLLG KASNIVDVIPVDYVANLVIVAGAKSGGQKSDELKIYNCCSSDCNP VTLKKIIKEFTEDTIKNKSHIMPLPGWFVFTKYKWLLTLLTIIFQM LPMYLADVYRVLTGKIPRYMKLHHLVIQTRLGIDFFTSHSWVMK TDRVRELFGSLSLAEKHMFPCDPSSIDWTDYLQSYCYGVRRFLEK KK
SEQ ID NO: 56	由SEQ ID NO: 2编码的海灰翅夜蛾FAR MVVLTSKEKSNMSVADFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCP DIDKIYMLIREKKGQSIRERLTKIVDDPLFNRLKDKRPDDLGKIVLI PGDITVPGLGISEENETILTEKVSVVIHSAATVKFNEPLATAWNVN VEGTRMIMALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNRAVIDEVLYPPPADI NDVHQHVKNGVTEEETEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQSY MPTIIVRPSIVGAIKDDPIRGWLANWYGATGLSVFTAKGLNRVIY GHSNHVVDLIPVDYVANLVIVAGAKTYHSNEVTIYNSCSSSCNPI TMKRLVGLFIDYTVKHKSYVMPLPGWYVYSNYKWLVFLVTVIF QVIPAYLGDIGRRLLGKNPRYYKLQNLVAQTQEAVHFFTSHTWEI KSKRTSELFSSLSLTDQRMFPCDANRIDWTDYITDYCSGVRQFLE KIK
SEQ ID NO: 57	由SEQ ID NO: 3或32编码的棉铃虫FAR MVVLTSKETKPSVAEFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCPDI ENIYMLIREKKGLSVSERIKQFLDDPLFTRLKDKRPADLEKIVLIPG DITAPDLGINSENEKMLIEKVSVIIHSAATVKFNEPLPTAWKINVE GTRMMLALSRRMKRIEVFIHISTAYTNTNREVVDEILYPAPADID QVHQYVKDGISEEDTEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQAYV PTIIVRPSVVAAIKDEPLKGWLGNWFGATGLTVFTAKGLNRVIYG HSSYIVDLIPVDYVANLVIAAGAKSSKSTELKVYNCCSSSCNPVTI GTLMSMFADDAIKQKSYAMPLPGWYIFTKYKWLVLLLTFLFQVI PAYVTDLSRHLIGKSPRYIKLQSLVNQTRSSIDFFTNHSWVMKAD RVRELYASLSPADKYLFPCDPTDINWTHYIQDYCWGVRHFLEKK SYE
SEQ ID NO: 58	由SEQ ID NO: 20编码的亚洲玉米螟Z9去饱和酶 MAPNIKDGADLNGVLFEDDASTPDYALATAPVQKADNYPRKLV WRNIILFAYLHLAAVYGAYLFLFSAKWQTDIFAYILYVISGLGITA GAHRLWAHKSYKAKWPLRLILIIFNTVSFQDSALDWSRDHRMHH KYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPELKRKGKGLDLSDL YADPILRFQKKYYLLLMPLGCFIMPTVVPVYFWGETWTNAFFVA ALFRYTFILNVTWLVNSAAHKWGHKPYDSSIKPSENLSVSLFALG EGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNRLNFTTNFINFFAKIGWAYDLK TVSDEIIQNRVKRTGDGSHHLWGWGDKDQPKEEVNAAIRINPKD E
SEQ ID NO: 59	由SEQ ID NO: 21编码的红醋栗穿孔蛾Z9去饱和酶

[1121]

	MPPNVTEANGVLFENDVQTPDMGLEVAPVQKADERKIQLVWRN IIAFACLHLAAVYGAYLFFTSAIWQTDIFAYILYVMSGLGITAGAH RLWAHKSYKAKWPLRLILVAFNTLAFQDSAIDWARDHRMHHKY SETDADPHNATRGFFFSHIGWLLCRKHPELKRKGQGLDLSDLYA DPIIRFQKKYYLLLMPLACFVLPTIIPVYLWGESWKNAFFVAAMF RYTFILNVTWLVNSAAHKWGGKPYDKNIQPAQNISVAIFALGEG FHNYHHTFPWDYKTAELGNNRLNFTTSFINFFASFGWAYDLKTV SDEIIQQRVKRTGDGSHHLRGWGDQDIPAEEAQAALRINRKDD
SEQ ID NO: 60	由SEQ ID NO: 22编码的玉米穗蛾Z9去饱和酶 MAPNISEDVNGVLFESDAATPDLALSTPPVQKADNRPKQLVWRN ILLFAYLHLAALYGGYLFLFSAKWQTDIFAYILYVISGLGITAGAH RLWAHKSYKAKWPLRVILVIFNTVAFQDAAMDWARDHRMHHK YSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPDLKEKGKGLDMSDLL ADPILRFQKKYYLILMPLACFVMPTVIPVYFWGETWTNAFFVAA MFRYAFILNVTWLVNSAAHKWGDKPYDKSIKPSENLSVAMFAL GEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNKLNFTTTFINFFAKIGWAYDL KTVSDDIVKNRVKRTGDGSHHLWGWGDENQSKEEIDAAIRINPK DD
SEQ ID NO: 61	由SEQ ID NO: 28编码的具有解脂耶氏酵母OLE1前导序列的粉纹夜蛾去饱和酶 MVKNVDQVDLSQVDTIASGRDVNYKVKYTSGVKTTPRKYKYIY TNFLTFSYAHLAALYGLYLCFTSAKWETLLFSFVLFHMSNIGITA GAHRLWTHKTFKAKLPLEIVLMIFNSLAFQNTAITWAREHRLHH KYSDTDADPHNASRGFFYSHVGWLLVKKHPDVLKYGKTIDMSD VYNNPVLKFQKKYAVPLIGTVCFALPTLIPVYCWGESWNNAWHI ALFRYIFNLNVTFLVNSAAHIWGNKPYDKSILPAQNLLVSFLASG EGFHNYHHVFPWDYRTAELGNNFLNLTTLFIDFCAWFGWAYDL KSVSEDIIKQRAKRTGDGSSGVIWGWDDKDMDRDIKSKANIFYA KKE
SEQ ID NO: 62	由SEQ ID NO: 29编码的具有解脂耶氏酵母OLE1前导序列的玉米穗蛾去饱和酶 MVKNVDQVDLSQVDTIASGRDVNYKVKYTSGVRKYQIVYPNLIT FGYWHIAGLYGLYLCFTSAKWATILFSYILFVLAEIGITAGAHRL WAHKTYKAKLPLEILLMVFNSIAFQNSAIDWVRDHRLHHKYSDT DADPHNASRGFFYSHVGWLLVRKHPEVKKRGKELNMSDIYNNP VLRFQKKYAIPFIGAVCFALPTMIPVYFWGETWSNAWHITMLRYI MNLNVTFLVNSAAHIWGNKPYDAKILPAQNVAVSVATGGEGFH NYHHVFPWDYRAAELGNNSLNLTTKFIDLFAAIGWAYDLKTVSE DMIKQRIKRTGDGTDLWGHEQNCDEVWDVKDKSS
SEQ ID NO: 63	由SEQ ID NO: 15编码的具有解脂耶氏酵母OLE1前导序列的黄地老虎去饱和酶 MTTVEQLETVDITKLNAIAAGTNKKVPMAQGVQTTTILREEEPSL TFVVPQEPRKYQIVYPNLITFGYWHIAGLYGLYLCFTSAKWQTIL FSFMLVVLAELGITAGAHRLWAHKTYKAKLPLQIILMILNSIAFQ NSAIDWVRDHRLHHKYSDTDADPHNATRGFFYSHVGWLLVRKH PEVKRRGKELDMSDIYNNPVLRFQKKYAIPFIGAMCFGLPTFIPVY FWGETWSNAWHITMLRYILNLNITFLVNSAAHIWGYKPYDIKILP AQNIAVSIVTGGEVSITTTTFFPWDYRAAELGNNYLNLTTKFIDFF

[1122]

	AWIGWAYDLKTVSSDVIKSKAERTGDGTNLWGLEDKGEEDFLKIWKDN
SEQ ID NO: 64	来自DTU WO 2016/207339_SEQ ID NO: 2的脐橙螟蛾去饱和酶 MVPNKGSSDVLSEHSEPQFTKLIAPQAGPRKYKIVYRNLLTFGYWHLSAVYGLYLCFTCAKWATILFAFFLYVIAEIGITGGAHRLWAHRTYKAKLPLEILLLIMNSIAFQDTAFTWARDHRLHHKYSDTDADPHNATRGFFYSHVGWLLVKKHPEVKARGKYLSLDDLKNNPLLKFQKKYAILVIGTLCFLMPTFVPVYFWGEGISTAWNINLLRYVMNLNMTFLVNSAAHIFGNKPYDKSIASVQNISVSLATFGEGFHNYHHTYPWDYRAAELGNNRLNMTTAFIDFFAWIGWAYDLKSVPQEAIAKRCAKTGDGTDMWGRKR
SEQ ID NO: 65	DTU WO 2016/207339_SEQ ID NO: 41的海灰翅夜蛾去饱和酶 MAQCVQTTTILEQKEEKTVTLLVPQAGKRKFEIVYFNIITFAYWHIAGLYGLYLCFTSTKWATVLFSFFLFVVAEVGVTAGSHRLWSHKTYKAKLPLQILLMVMNSLAFQNTVIDWVRDHRLHHKYSDTDADPHNASRGFFYSHVGWLLVRKHPDVKKRGKEIDISDIYNNPVLRFQKKYAIPFIGAVCFVLPTLIPVYGWGETWTNAWHVAMLRYIMNLNVTFLVNSAAHIYGKRPYDKKILPSQNIAVSIATFGEGFHNYHHVFPWDYRAAELGNNSLNFPTKFIDFFAWIGWAYDLKTVSKEMIKQRSKRTGDGTNLWGLEDVDTPEDLKNTKGE
SEQ ID NO: 66	来自DTU WO 2016/207339_SEQ ID NO: 43的黄地老虎去饱和酶 MAQGVQTTTILREEEPSLTFVVPQEPRKYQIVYPNLITFGYWHIAGLYGLYLCFTSAKWQTILFSFMLVVLAELGITAGAHRLWAHKTYKAKLPLQIILMILNSIAFQNSAIDWVRDHRLHHKYSDTDADPHNATRGFFYSHVGWLLVRKHPEVKRRGKELDMSDIYNNPVLRFQKKYAIPFIGAMCFGLPTFIPVYFWGETWSNAWHITMLRYILNLNITFLVNSAAHIWGYKPYDIKILPAQNIAVSIVTGGEVSITTTTFFPWDYRAAELGNNYLNLTTKFIDFFAWIGWAYDLKTVSSDVIKSKAERTGDGTNLWGLEDKGEEDFLKIWKDN
SEQ ID NO: 67	来自DTU WO 2016/207339_SEQ ID NO: 45的粉纹夜蛾去饱和酶 MAVMAQTVQETATVLEEEARTVTLVAPKTTPRKYKYIYTNFLTFSYAHLAALYGLYLCFTSAKWETLLFSFVLFHMSNIGITAGAHRLWTHKTFKAKLPLEIVLMIFNSLAFQNTAITWAREHRLHHKYSDTDADPHNASRGFFYSHVGWLLVKKHPDVLKYGKTIDMSDVYNNPVLKFQKKYAVPLIGTVCFALPTLIPVYCWGESWNNAWHIALFRYIFNLNVTFLVNSAAHIWGNKPYDKSILPAQNLLVSFLASGEGFHNYHHVFPWDYRTAELGNNFLNLTTLFIDFCAWFGWAYDLKSVSEDIIKQRAKRTGDGSSGVIWGWDDKDMDRDIKSKANIFYAKKE
SEQ ID NO: 68	来自DTU WO 2016/207339_SEQ ID NO: 1的脐橙螟蛾去饱和酶 atggttccaaacaagggttcctctgatgttttgtctgaacattctgaaccacaattcaccaagttgattgctccacaagctggtccaagaaagtacaaaatcgtttacagaaacttgttgaccttcggttactggcatttgtctgctgtttatggtttgtacttgtgtttcacttgtgctaagtgggctactattttgttcgctttcttcttgtacgttatcgccgaaattggtattactggtggtgctcatagattatgggctcatagaacttacaaagccaagttgccattggaaatcttgttgttgatcatgaactccattgccttccaagatactgcttttacttgggctagagatcatagattgcatcacaagtactctgatactgatgctgatccacataatgctactagaggtttcttctactctcatgttggttggttgttggttaagaaacacccagaagttaaggctagaggtaagtacttgtctttggatgacttgaagaacaaccctttgttgaagttccaaaagaagtacgccattttggtcattggtactttgtgctttttgatgccaactttc

[1123]

	gttccagtttacttttggggtgaaggtatttctactgcctggaacattaacttgttaagatacgtcatgaactt gaacatgacctttttggttaactccgctgctcatatttttggtaacaagccatacgataagtctatcgcctctg ttcaaaacatctctgtttctttggctactttcggtgaaggtttccataactaccatcatacttatccatgggatt acagagctgctgaattgggtaacaatagattgaatatgaccaccgccttcattgatttctttgcttggattgg ttgggcctacgatttgaaatctgttccacaagaagctattgctaagagatgtgctaaaactggtgatggta ctgatatgtggggtagaaagagatga
SEQ ID NO: 69	来自DTU WO 2016/207339_SEQ ID NO: 40的海灰翅夜蛾去饱和酶 ggacactgacatggactgaaggagtagagaatcggcccgtggagttggccttcattttcagtcttatctct cggtgttatggtagtcacttatatcggtattaaaataagtgaataaggcttgtaaaaatggcgcaatgtgta caaacaacaacgattttggaacaaaaagaagagaaaacagtaactttgctggtacctcaagcgggaaa gaggaagtttgaaattgtgtattttaatatcatcaccttcgcttactggcatatagctggactatatggccttt atttgtgcttcacttcaacaaaatgggcgacagttttattctcattctttctattcgtcgtagcagaagtaggg gtcacggctggctcccacagactttggtcgcataaaacttacaaagcaaaactacctttacaaattctgct aatggtgatgaattcccttgcatttcaaaacacagtcattgattgggtgagagaccatcgactccatcataa gtatagcgacactgatgccgatccccataatgcctcccgaggatttttctattcgcacgtcggttggctgct tgtgagaaaacaccctgatgtcaagaaacgaggaaaggaaattgatatatctgatatttacaacaatccg gtactgaggttccagaagaagtacgcaattcctttcatcggggcagtttgtttcgtcttaccaacattgata ccggtttacggttggggagaaacctggactaatgcctggcacgtcgccatgctgcggtacattatgaac cttaacgtcaccttcctggtcaacagcgctgctcatatatatggaaagagaccttatgacaagaagatcct accatctcaaaacatagctgtgtccattgcaacctttggggaaggtttccataattatcatcatgtatttccat gggattatcgcgcagctgaacttggaaataacagtttgaatttccctacgaaatttattgatttctttgcgtg gatcggatgggcgtatgacctaaagactgtttcgaaagaaatgataaaacaaaggtcaaaaagaactg gtgatggaactaatctatgggggttagaagatgtggataccccggaggatttaaaaaatacaaaaggcg aataggcaaacccttaaactcaaacagtgaggtttaatgtgatatttagaattagaattaatttatttgaaatt aaatgaaggttttggataactgtttttaataataaaaatagtttttcgattaaattccttagattatttttaaagga aatgtataaggtactcgcgtggttagcaacccagcagtccctgtttatctgtttttatgaatttattctatgaat gtagatgtcgcatgaaattttaaaatgttgcatttgtataattttacttatgaataaataaatttatttttaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
SEQ ID NO: 70	来自DTU WO 2016/207339_SEQ ID NO: 42的黄地老虎去饱和酶 atggctcaaggtgtccaaacaactacgatattgagggaggaagagccgtcattgactttcgtggtacctc aagaaccgagaaagtatcaaatcgtgtacccaaaccttatcacatttgggtactggcatatagctggtttat acgggctatatttgtgctttacttcggcaaaatggcaaacaattttattcagtttcatgctcgttgtgttagca gagttgggaataacagccggcgctcacaggttatgggcccacaaaacatataaagcgaagcttcccctta caaattatcctgatgatactgaactccattgccttccaaaattccgccattgattgggtgagggaccaccgt ctccatcataagtacagtgacactgatgcagaccctcacaatgctactcgtggtttcttctattctcatgttg gatggttgctcgtaagaaaacatccagaagtcaagagacgtggaaaggaacttgacatgtctgatattta caacaatccagtgctgagatttcaaaagaagtatgctataccttcatcggggcaatgtgcttcggattac caacttttatccctgtttacttctggggagaaacctggagtaatgcttggcatatcaccatgcttcggtacat cctcaacctaaacattacttttcctggtcaacagtgctgctcatatctggggatacaaaccttatgacatcaa aatattgcctgcccaaaatatagcagtttccatagtaaccggcggcgaagtttccataactaccaccacgt tttttccttgggattatcgtgcagcagaattggggaacaattatcttaatttgacgactaagttcatagatttct tcgcttggatcggatgggcttacgatcttaagacggtgtccagtgatgttataaaaagtaaggcggaaag aactggtgatgggacgaatctttggggtttagaagacaaaggtgaagaagatttttgaaaatctggaaa gacaattaa
SEQ ID NO: 71	来自DTU WO 2016/207339_SEQ ID NO: 44的粉纹夜蛾去饱和酶 atggctgtgatggctcaaacagtacaagaaacggctacagtgttggaagaggaagctcgcacagtgac tcttgtggctccaaagacaacgccaaggaaatataaatatatatacaccaactttcttacattttcatatgcg catttagctgcattatacggactttatttgtgcttcacctctgcgaaatgggaaacattgctattctctttcgta ctcttccacatgtcaaatataggcatcaccgcaggggctcaccgactctggactcacaagactttcaaag

[1124]

	ccaaattgcctttggaaattgtcctcatgatattcaactctttagcctttcaaaacacggctattacatgggct agagaacatcggctacatcacaaatacagcgatactgatgctgatccccacaatgcgtcaagagggttc ttctactcgcatgttggctggctattagtaaaaaaacatcccgatgtcctgaaatatggaaaaactatagac atgtcggatgtatacaataatcctgtgttaaaatttcagaaaaagtacgcagtacccttaattggaacagttt gttttgctcttccaactttgattccagtctactgttggggcgaatcgtggaacaacgcttggcacatagcctt atttcgatacatattcaatcttaacgtgactttcctagtcaacagtgctgcgcatatctgggggaataagcct tatgataaaagcatcttgcccgctcaaaacctgctggtttccttcctagcaagtggagaaggcttccataat taccatcacgtctttccatgggattaccgcacagcagaattagggaataacttcctgaatttgacgacgct gttcattgatttttgtgcctggtttggatgggcttatgacttgaagtctgtatcagaggatattataaaacaga gagctaaacgaacaggtgacggttcttcaggggtcatttggggatgggacgacaaagacatggaccg cgatataaaatctaaagctaacatttttttatgctaaaaaggaatga
SEQ ID NO: 72	甜菜夜蛾FAR样蛋白VIII核苷酸序列（Genbank ID KR781121.1，密码子优化的） ATGGTGGTGCTGACCAGCAAGGAGAAGTCCAACATGTCTGTG GCCGACTTCTACGCCGGCAAGTCCGTGTTTATCACAGGCGGCA CCGGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTACTC TTGCCCAGACATCGATAAGATCTATATGCTGATCCGGGAGAAG AAGGGCCAGAGCATCAGGGAGCGCCTGACCAAGATCGTGGAC GATCCCCTGTTCAATAGGCTGAAGGAGAAGCGCCCTGGCGAC CTGGATAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGATGTGACAGTGCCCG GCCTGGGCATCTCCGACGAGAACGAGGCCATCCTGATCGATA AGGTGTCTGTGGTCATCCACAGCGCCGCCACAGTGAAGTTCAA TGAGCCCCTGGAGACCGCCTGGAACGTGAATGTGGAGGGCAC AAGGATGATCATGGCCCTGTCTCGGAAGATGAAGAGAATCGA GATCTTTATCCACATCAGCACCGCCTACACCAACACAAATAGG GCAGTGGTGGACGAGGTGCTGTACCCACCTCCAGCCGACATC AACGAGGTGCACCAGTATGTGAAGAATGGCATCACAGAGGAG GAGACCGAGAAGATCCTGAACGGCAGGCCCAATACCTACACA TTCACCAAGGCCCTGACCGAGCACCTGGTGGCAGAGAACCAG GCCTATATGCCTACAATCATCGTGCGGCCATCCATCGTGGGCG CCATCAAGGACGATCCTATCAGAGGCTGGCTGGCAAACTGGT ACGGAGCAACAGGACTGAGCGTGTTCACCGCCAAGGGCCTGA ATCGCGTGATCTACGGCCAGAGCAGCCACGTGGTGGACCTGA TCCCTGTGGATTATGTGGCAAACCTGGTCATCGTGGCAGGAGC AAAGACATACCGGTCCAACGAGGTGACCATCTATAATTCTTGC TCTAGCTCCTGTAATCCAATCACAATGGAGCGGCTGGTGGGCC TGTTCATCGACGATACAGTGAAGCACAACAGCTACGTGATGCC CCTGCCTGGCTGGTACGTGTATTCCAATTACCGGTGGCTGGTG TATCTGGTGACCATCATCTTTCAGATGATCCCAGCCTATCTGG CAGACATCGGCCGGAGACTGCTGGGCAAGAATCCCAGATACT ATAAGCTGCAGTCCCTGGTGGCACAGACCCAGGAGGCAGTGC ACTTCTTTACATCTCACACCTGGGAGATCAAGAGCAAGAGGAC CTCCGAGCTGTTCGCCTCTCTGAGCCACACAGACCAGCGCATC TTTCCTTGCGATGCCAAGAAGATCGACTGGACAGATTACATCA CCGATTATTGTAGCGGCGTGCGGCAGTTCCTGGAGAAGAAGA AGTGA
SEQ ID NO: 73	甜菜夜蛾FAR样蛋白VIII氨基酸序列（Genbank ID ALJ94061.1） MVVLTSKEKSNMSVADFYAGKSVFITGGTGFLGKVFIEKLLYSCP DIDKIYMLIREKKGQSIRERLTKIVDDPLFNRLKEKRPGDLDKIVLI PGDVTVPGLGISDENEAILIDKVSVVIHSAATVKFNEPLETAWNV

[1125]

	NVEGTRMIMALSRKMKRIEIFIHISTAYTNTNRAVVDEVLYPPPA DINEVHQYVKNGITEEETEKILNGRPNTYTFTKALTEHLVAENQA YMPTIIVRPSIVGAIKDDPIRGWLANWYGATGLSVFTAKGLNRVI YGQSSHVVDLIPVDYVANLVIVAGAKTYRSNEVTIYNSCSSSCNPI TMERLVGLFIDDTVKHNSYVMPLPGWYVYSNYRWLVYLVTIIFQ MIPAYLADIGRRLLGKNPRYYKLQSLVAQTQEAVHFFTSHTWEIK SKRTSELFASLSHTDQRIFPCDAKKIDWTDYITDYCSGVRQFLEK KK
SEQ ID NO: 74	薄肌眼虫脂肪酰基-辅酶A还原酶核苷酸序列，密码子优化的 ATGAACGACTTCTACGCCGGCAAGGGCGTGTTTCTGACAGGCG TGACCGGCTTCGTGGGCAAGATGGTGGTGGAGAAGATCCTGC GGTCTCTGCCAACCGTGGGCAGGCTGTATGTGCTGGTGCGCCC AAAGGCAGGCACAGATCCTCACCAGAGACTGCACAGCGAAGT GTGGAGCAGCGCCGGATTTGACGTGGTGAGGGAGAAAGTGGG AGGACCTGCAGCCTTCGATGCACTGATCCGCGAGAAGGTGGT GCCTGTGCCAGGCGACATGGTGAAGGATAGGTTTGGCCTGGA CGATGCAGCATACCGCTCCCTGGCAGCCAACGTGAATGTGATC ATCCACATGGCCGCCACAATCGACTTCACCGAGAGGCTGGAT GTGGCCGTGTCTCTGAACGTGCTGGGCACAGTGCGGGTGCTGA CCCTGGCAAGGAGAGCCAGAGAGCTGGGCGCCCTGCACAGCG TGGTGCACGTGTCCACCTGCTACGTGAACTCCAATCAGCCCCC TGGCGCCCGGCTGAGAGAGCAGCTGTATCCCCTGCCTTTTGAC CCACGGGAGATGTGCACAAGAATCCTGGACATGAGCCCTCGG GAGATCGATCTGTTCGGCCCACAGCTGCTGAAGCAGTACGGCT TCCCCAATACCTATACCTTCACCAAGTGCATGGCAGAGCAGCT GGGCGCCCAGATCGCACACGACCTGCCATTCGCCATCTTTAGA CCAGCAATCATCGGAGCCGCCCTGTCCGAGCCATTTCCCGGCT GGTGCGATTCTGCCAGCGCCTGTGGAGCCGTGTTCCTGGCAGT GGGACTGGGCGTGCTGCAGGAGCTGCAGGGAAACGCCTCTAG CGTGTGCGACCTGATCCCTGTGGATCACGTGGTGAATATGCTG CTGGTGACAGCAGCATATACCGCATCTGCCCCACCAGCCGACC CTAGCCCATCCTCTCTGGCCCTGTCCCCTCCACAGCTGCCACTG GCCACACTGCCCCCTGGCACCGTGGCAGATGTGCCAATCTACC ACTGTGGCACCTCTGCCGGCCCTAACGCCGTGAATTGGGGCAG GATCAAGGTGAGCCTGGTGGAGTATTGGAACGCACACCCAAT CGCAAAGACCAAGGCAGCAATCGCCCTGCTGCCCGTGTGGAG GTTCGAGCTGAGCTTTCTGCTGAAGAGGCGCCTGCCTGCAACA GCCCTGTCCCTGGTGGCCTCTCTGCCAGGCGCATCCGCCGCCG TGCGGAGACAGGCAGAGCAGACAGAGCGGCTGGTGGGCAAG ATGAGAAAGCTGGTGGACACCTTTCAGTCCTTCGTGTTTTGGG CCTGGTACTTCCAGACAGAGAGCAGCGCCAGGCTGCTGGCCTC TCTGTGCCCAGAGGACCGCGAGACCTTTAACTGGGACCCCAG GAGGATCGGATGGAGGGCCTGGGTGGAGAATTACTGTTATGG CCTGGTGCGGTATGTGCTGAAGCAGCCAATCGGCGATAGACC ACCAGTGGCAGCAGAGGAGCTGGCAAGCAATAGGTTCCTGCG CGCCATGCTGTGA
SEQ ID NO: 75	薄肌眼虫脂肪酰基-辅酶A还原酶氨基酸序列（ADI60057.1） MNDFYAGKGVFLTGVTGFVGKMVVEKILRSLPTVGRLYVLVRP KAGTDPHQRLHSEVWSSAGFDVVREKVGGPAAFDALIREKVVPV PGDMVKDRFGLDDAAYRSLAANVNVIIHMAATIDFTERLDVAVS LNVLGTVRVLTLARRARELGALHSVVHVSTCYVNSNQPPGARLR

[1126]

	EQLYPLPFDPREMCTRILDMSPREIDLFGPQLLKQYGFPNTYTFTK CMAEQLGAQIAHDLPFAIFRPAIIGAALSEPFPGWCDSASACGAVF LAVGLGVLQELQGNASSVCDLIPVDHVVNMLLVTAAYTASAPPA DPSPSSLALSPPQLPLATLPPGTVADVPIYHCGTSAGPNAVNWGRI KVSLVEYWNAHPIAKTKAAIALLPVWRFELSFLLKRRLPATALSL VASLPGASAAVRRQAEQTERLVGKMRKLVDTFQSFVFWAWYFQ TESSARLLASLCPEDRETFNWDPRRIGWRAWVENYCYGLVRYVL KQPIGDRPPVAAEELASNRFLRAML
SEQ ID NO: 76	稠李巢蛾脂肪-酰基CoA还原酶II核苷酸序列，密码子优化的 ATGGTGCAGCTGAAGGAGGACTCCGTGGCCGCCTTTTACGCCG AGAAGTCTATCTTCATCACAGGCGGCACCGGCTTTCTGGGCAA GGTGCTGATCGAGAAGCTGCTGTACTCCTGCAAGGCCGTGGAC CAGATCTATGTGCTGATCCGGAAGAAGAAGGATCAGACACCT TCTGAGCGCATCGCCCAGCTGCTGGAGTCTGAGCTGTTCAGCC GGCTGAGAAAGGACGATCCAAGCGCCCTGAAGAAGGTGGTGC CCGTGGTGGGCGACCTGACCATGCCTAACCTGGGACTGAGCG CCGCAGTGCAGGATCTGATCGTGACAAAGGTGTCCATCATCTT CCACGTGGCCGCCACCGTGAAGTTTAACGAGAGGATGAAGAA TGCCCTGGCCAACAATGTGGAGGCCACCAGAGAAGTGATCAA CCTGTGCCACCGCCTGGAGAAGGTGGACGCCTTCATCCACGTG TCCACAGCCTATTCTAATACCGATCAGAAGGTGGTGGAGGAG CGCGTGTACCCACCTCCAGCACCTCTGAGCGAGGTGTATGCCT TTGTGACCAACAATGGCGACGATATGGACATCATCCAGAACCT GCTGAATGGCCGGCCAAATACCTACACATATACCAAGGCCCT GGCCGAGGACATCGTGCTGAAGGAGCACGGCGGCATCCCTAC AGCCATCATCAGACCAAGCATCGTGCTGTCCGTGCTGAAGGA GCCCATCCCTGGCTGGCTGGACAACTGGAATGGACCAACCGG ACTGCTGCACGCCAGCTCCCAGGGAGTGCACTGCTCCATGCTG GGCTCTGGCAGCAACGTGGCCGACCTGATCCCTGTGGACATCG TGACAAATCTGATGATCGTGGTGGCCTCTCGGTGCAAGAAGA GCAACGGCCTGAAGGTGTACAATTCCTGTTCTGGCACCACAAA CCCAATCGCCTATCAGGCCTTCACCAAGATGTTTCTGGATAGC TGTATCTCCAGGGGCTGGAACAAGGTGCCATTCCCCATGCTGC TGTTTGTGAAGTGGGCCTTCCTGAATCGCGTGCTGAAGTTCTT CCTGGTCATCGTGCCATTCTTTCTGATCGACGTGTACCTGCGGT TCTTTGGCAAGCCCAATTACATGAGAATGATCACATATACCAA GAAGGCCGAGGATCTGATGACATTCTTTACCTCTCACGAGTGG CAGTTCAAGGACGGCAACGTGCGGGATCTGATCAATATGATG AGCCCCGAGGATAGAAAGATCTTTTACTGCGACCCCGATGAG ATCCACTGGAAGCCTTACTTCGACGATTATTGCGTGGGCGTGT TTAAGTATCTGCTGAAGAGGAAGGTGTGA
SEQ ID NO: 77	稠李巢蛾脂肪-酰基CoA还原酶II氨基酸序列（ADD62439.1） MVQLKEDSVAAFYAEKSIFITGGTGFLGKVLIEKLLYSCKAVDQI YVLIRKKKDQTPSERIAQLLESELFSRLRKDDPSALKKVVPVVGD LTMPNLGLSAAVQDLIVTKVSIIFHVAATVKFNERMKNALANNV EATREVINLCHRLEKVDAFIHVSTAYSNTDQKVVEERVYPPPAPL SEVYAFVTNNGDDMDIIQNLLNGRPNTYTYTKALAEDIVLKEHG GIPTAIIRPSIVLSVLKEPIPGWLDNWNGPTGLLHASSQGVHCSML GSGSNVADLIPVDIVTNLMIVVASRCKKSNGLKVYNSCSGTTNPI AYQAFTKMFLDSCISRGWNKVPFPMLLFVKWAFLNRVLKFFLVI VPFFLIDVYLRFFGKPNYMRMITYTKKAEDLMTFFTSHEWQFKD

[1127]

	GNVRDLINMMSPEDRKIFYCDPDEIHWKPYFDDYCVGVFKYLLK RKV
SEQ ID NO: 78	黑腹果蝇脂肪酸去饱和酶（Q9N9Z8） mapysriyhqdkssretgvlfeddaqtvdsdlttdrfqlkraekrrlplvwrniilfalvhlaalyglhsi ftraklattlfaaglyiigmlgvtagahrlwahrtykakwplrlllvifntiafqdavyhwardhrvhhk ysetdadphnatrgfffshvgwllckkhpdikekgrgldlsdlradpilmfqrkhyyilmplacfvlp tvipmvywnetlasswfvatmfrwcfqlnmtwlvnsaahkfgnrpydktmnptqnafvsaftfg egwhnyhhafpwdyktaewgcyslnittafidlfakigwaydlktvapdviqrrvlrtgdgshelw gwgdkdltaedarnvllvdksr
SEQ ID NO: 79	红醋栗穿孔蛾酰基-CoA-Δ11-去饱和酶（ABX71630.1） mppypeevdtnhifeedisheeskpalkplvapqadnrkpeivplnlitfgyghlaaiygiylcftsa kwativfafvlyicaelgitagahrlwshrsykaklplrlilllfntlafqntaidwvrdhrmhhkysdt dadphnatrgfffshvgwlltrkhpevkrrgkdidmmdiyndsllkfqkkyaipfvglvcfviptl mpmyfwnetlnnswhiatmlryivnlnmtflvnsaahiwgykpydksikpvqnitvsililgegf hnyhhvfpwdyrtselgndflnfttlfinlfakigwaydlktasdkvvaarrkrtgdgtnlwgwedk slneeerqaatvlypnkylnlkd
SEQ ID NO: 80	苹果小卷蛾去饱和酶（AIM40221.1） mapnvtdvngvlfesdaatpdlalanapvqqaddspriyvwrniilfaylhiaalyggylflvsakw qtdifayflyvasglgitagahrlwahksykakwplrlilvifntiafqdsaidwardhrmhhkyset dadphnatrgfffshigwllvrkhpelkrkgkgldlsdlyadpilrfqkkyylilmplacfvlptvipv ylwnetwtnaffvaalfryafilnvtwlvnsaahkwgdkpydksikpsenisvslfafgegfhnyh htfpwdyktaelssnrlnfttkfinffakigwaydmktvsdeiiqkrvnrtgdgshhlwgwgdkdh skeevnaavrinpkdd
SEQ ID NO: 81	甜菜夜蛾FAR样蛋白VII核苷酸序列（KF805977.1），密码子优化的 ATGACGTATAGACAAATAAATGAATTTGATGCTGAAAAGTTTA CGGCAGCTACAGTACCGACAAGCTACGTATCAGTACCAGATTT TTATGCGGGCAAGACAATTTTTATCACTGGTGGAACTGGATTT CTTGGAAAGGTGTTTCTAGAGAAACTTCTTTACAGTTGTAAAG ATGTTGAAACCGTATACATTTTGATCAGAGAGAAAAAAGGCA AAACACCTCAGCAAAGAGTTGAAGATCTTTTTAACAAACCGAT TTTCTCAAGATTGAAACAGAAGGACTCTCAGTGTATGAAGAA AGTCACTGCAATAATTGGTGACCTTAGTGAACCTGGTCTTGGC ATATCAAAAGATGATGAAGAACTACTTTTGCAAAAGGTATCTG TAGTATTCCATGTCGCAGCCAATGTTCAGTTTTACAAGGAATT CAAAGAGATTATAAATACGAATGTTGGTGGGACAAAATACGT ACTCCAATTGTGTCAGCGAATAAAAGATATTAAGGCATTTGTC CATATTTCCACAGCCTACTGTCACACAGACCAAAAGGTATTAG AAGAGAGAATATACCCCCCTCCAGCAGAACTCAGTGAAGTCC TGAAGTTCCTTCAGCAGCCACAGCATGACAAGAAACAGATTA AGGAATTATTTAAGAAACAACCAAACAGTTACACCTTTGCCAA GGCTTTAGCAGAAACCTACATTGCTGAGAACTGCGGACGCGTC CCCACAATTATCATCAGACCTTCTATTATATCAGCATCACTGA AAGAGCCGCTACCAGGATGGGTGGATTCATGGAACGGAGCCA CAGGCCTCATCACAGCTAGCTACAACGGCGCCAACAGAGTGC TTCTCGGCGAAGGCAGCAACTTCCTCGACCTGATCCCAGTTGA CTTTGTTGCTAACCTGGCAATTGTAGCTGCTGCTAAATGTACT AGCTCTTTGAAAGTTTACAATTGCTGCTCAAGCGGATGTAACC CTTTAACATTGAAACAATTGGTCAGCCACATGAATAATGTCGG

	ATTTGATAAAAACGTCTCCATAATATTCACCAATAACAAAGCC TCGCTTTCCACATTGACATTTTTCCTTCAAACAACGCCATCTTT CACCGCTGATATGTTTCTGAGAGTCACGGGAAAGTCACCAAG GTACATGAAAATCCAGTCAAAACTGACCATCGCTCGGAATGC CTTAAATTTTTTCACCTGTCATTCCTGGGTCATGAAGGCTGATA ATTCTAGAAGACTGTATGCTTCCTTGTCATTACACGACCGACA TACGTTCCCTTGTGATCCTACAGACATAGACTGGAAGAAGTAC ATAAATATATACATAGAAGGAATTAATCAGTTCTTAATGAAGA AACGTAGTTAA
SEQ ID NO: 82	甜菜夜蛾FAR样蛋白VII氨基酸序列（AIS85928.1） MTYRQINEFDAEKFTAATVPTSYVSVPDFYAGKTIFITGGTGFLG KVFLEKLLYSCKDVETVYILIREKKGKTPQQRVEDLFNKPIFSRLK QKDSQCMKKVTAIIGDLSEPGLGISKDDEELLLQKVSVVFHVAAN VQFYKEFKEIINTNVGGTKYVLQLCQRIKDIKAFVHISTAYCHTD QKVLEERIYPPPAELSEVLKFLQQPQHDKKQIKELFKKQPNSYTF AKALAETYIAENCGRVPTIIIRPSIISASLKEPLPGWVDSWNGATGL ITASYNGANRVLLGEGSNFLDLIPVDFVANLAIVAAAKCTSSLKV YNCCSSGCNPLTLKQLVSHMNNVGFDKNVSIIFTNNKASLSTLTF FLQTTPSFTADMFLRVTGKSPRYMKIQSKLTIARNALNFFTCHSW VMKADNSRRLYASLSLHDRHTFPCDPTDIDWKKYINIYIEGINQF LMKKRS
SEQ ID NO: 83	HaFAR S60A FAR2 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCC GAGTTCTACGCCGGCAAGAGCGTGTTCATCACAGGCGGCACC GGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTACAGCT GCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGA AGGGCCTGGCCGTGTCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACG ATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCCCTGCCGATCT GGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGA TCTGGGCATCAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAA GGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCCACCGTGAAGTTCAAC GAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACC AGGATGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAG GTGTTTATCCACATCAGCACAGCCTACACCAACACAAATAGGG AGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATCG ATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGG ATACCGAGAAGATCCTGAACGGCAGACCCAATACCTACACAT TCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAACCAGG CCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGC CATCAAGGATGAGCCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTT CGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCAAGGGCCTGAA TAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATC CCAGTGGATTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCC AAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAGGTGTATAACTGCTGTT CCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCAT GTTCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCT CTGCCAGGCTGGTACATCTTTACAAAGTATAAGTGGCTGGTGC TGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTACGTGACC GACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCA AGCTGCAGAGCCTGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTT CTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGCCGATAGGGTGCGC

[1128]

[1129]

	GAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCC CTTGCGACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGA TTATTGTTGGGGCGTGCGCCACTTTCTGGAGAAGAAGTCCTAT GAGTGA
SEQ ID NO: 84	HaFAR S195A FAR3 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCC GAGTTCTACGCCGGCAAGAGCGTGTTCATCACAGGCGGCACC GGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTACAGCT GCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGA AGGGCCTGAGCGTGTCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACG ATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCCCTGCCGATCT GGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGA TCTGGGCATCAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAA GGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCCACCGTGAAGTTCAAC GAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACC AGGATGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAG GTGTTTATCCACATCAGCACAGCCTACACCAACACAAATAGGG AGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATCG ATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCGCCGAGGAGG ATACCGAGAAGATCCTGAACGGCAGACCCAATACCTACACAT TCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAACCAGG CCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGC CATCAAGGATGAGCCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTT CGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCAAGGGCCTGAA TAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATC CCAGTGGATTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCC AAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAGGTGTATAACTGCTGTT CCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCAT GTTCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCT CTGCCAGGCTGGTACATCTTTACAAAGTATAAGTGGCTGGTGC TGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTACGTGACC GACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCA AGCTGCAGAGCCTGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTT CTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGCCGATAGGGTGCGC GAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCC CTTGCGACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGA TTATTGTTGGGGCGTGCGCCACTTTCTGGAGAAGAAGTCCTAT GAGTGA
SEQ ID NO: 85	HaFAR S298A FAR4 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCC GAGTTCTACGCCGGCAAGAGCGTGTTCATCACAGGCGGCACC GGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTACAGCT GCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGA AGGGCCTGAGCGTGTCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACG ATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCCCTGCCGATCT GGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGA TCTGGGCATCAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAA GGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCCACCGTGAAGTTCAAC GAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACC AGGATGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAG

[1130]

	GTGTTTATCCACATCAGCACAGCCTACACCAACACAAATAGGG AGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATCG ATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGG ATACCGAGAAGATCCTGAACGGCAGACCCAATACCTACACAT TCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAACCAGG CCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGC CATCAAGGATGAGCCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTT CGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCAAGGGCCTGAA TAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATC CCAGTGGATTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCC AAGGCCAGCAAGTCCACCGAGCTGAAGGTGTATAACTGCTGT TCCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCA TGTTCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCC TCTGCCAGGCTGGTACATCTTTACAAAGTATAAGTGGCTGGTG CTGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTACGTGAC CGACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATC AAGCTGCAGAGCCTGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACT TCTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGCCGATAGGGTGCG CGAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTC CCTTGCGACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGG ATTATTGTTGGGGCGTGCGCCACTTTCTGGAGAAGAAGTCCTA TGAGTGA
SEQ ID NO: 86	HaFAR S378A FAR5 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCC GAGTTCTACGCCGGCAAGAGCGTGTTCATCACAGGCGGCACC GGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTACAGCT GCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGA AGGGCCTGAGCGTGTCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACG ATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCCCTGCCGATCT GGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGA TCTGGGCATCAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAA GGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCCACCGTGAAGTTCAAC GAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACC AGGATGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAG GTGTTTATCCACATCAGCACAGCCTACACCAACACAAATAGGG AGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATCG ATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGG ATACCGAGAAGATCCTGAACGGCAGACCCAATACCTACACAT TCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAACCAGG CCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGC CATCAAGGATGAGCCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTT CGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCAAGGGCCTGAA TAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATC CCAGTGGATTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCC AAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAGGTGTATAACTGCTGTT CCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCAT GTTCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCT CTGCCAGGCTGGTACATCTTTACAAAGTATAAGTGGCTGGTGC TGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTACGTGACC GACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGGCCCCACGCTATATCA AGCTGCAGAGCCTGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTT CTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGCCGATAGGGTGCGC

[1131]

	GAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCC CTTGCGACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGA TTATTGTTGGGGCGTGCGCCACTTTCTGGAGAAGAAGTCCTAT GAGTGA
SEQ ID NO: 87	HaFAR S394A FAR6 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCC GAGTTCTACGCCGGCAAGAGCGTGTTCATCACAGGCGGCACC GGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTACAGCT GCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGA AGGGCCTGAGCGTGTCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACG ATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCCCTGCCGATCT GGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGA TCTGGGCATCAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAA GGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCCACCGTGAAGTTCAAC GAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACC AGGATGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAG GTGTTTATCCACATCAGCACAGCCTACACCAACACAAATAGGG AGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATCG ATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGG ATACCGAGAAGATCCTGAACGGCAGACCCAATACCTACACAT TCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAACCAGG CCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGC CATCAAGGATGAGCCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTT CGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCAAGGGCCTGAA TAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATC CCAGTGGATTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCC AAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAGGTGTATAACTGCTGTT CCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCAT GTTCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCT CTGCCAGGCTGGTACATCTTTACAAAGTATAAGTGGCTGGTGC TGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTACGTGACC GACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCA AGCTGCAGAGCCTGGTGAACCAGACCAGGTCCGCCATCGACT TCTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGCCGATAGGGTGCG CGAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTC CCTTGCGACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGG ATTATTGTTGGGGCGTGCGCCACTTTCTGGAGAAGAAGTCCTA TGAGTGA
SEQ ID NO: 88	HaFAR S418A FAR7 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCC GAGTTCTACGCCGGCAAGAGCGTGTTCATCACAGGCGGCACC GGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTACAGCT GCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGA AGGGCCTGAGCGTGTCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACG ATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCCCTGCCGATCT GGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGA TCTGGGCATCAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAA GGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCCACCGTGAAGTTCAAC GAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACC AGGATGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAG GTGTTTATCCACATCAGCACAGCCTACACCAACACAAATAGGG

[1132]

	AGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATCG ATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGG ATACCGAGAAGATCCTGAACGGCAGACCCAATACCTACACAT TCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAACCAGG CCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGC CATCAAGGATGAGCCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTT CGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCAAGGGCCTGAA TAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATC CCAGTGGATTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCC AAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAGGTGTATAACTGCTGTT CCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCAT GTTCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCT CTGCCAGGCTGGTACATCTTTACAAAGTATAAGTGGCTGGTGC TGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTACGTGACC GACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCA AGCTGCAGAGCCTGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTT CTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGCCGATAGGGTGCGC GAGCTGTACGCATCTCTGGCCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCC CTTGCGACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGA TTATTGTTGGGGCGTGCGCCACTTTCTGGAGAAGAAGTCCTAT GAGTGA
SEQ ID NO: 89	HaFAR S453A FAR8 ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCC GAGTTCTACGCCGGCAAGAGCGTGTTCATCACAGGCGGCACC GGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTACAGCT GCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGA AGGGCCTGAGCGTGTCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACG ATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCCCTGCCGATCT GGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGA TCTGGGCATCAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAA GGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCCACCGTGAAGTTCAAC GAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACC AGGATGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAG GTGTTTATCCACATCAGCACAGCCTACACCAACACAAATAGGG AGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATCG ATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGG ATACCGAGAAGATCCTGAACGGCAGACCCAATACCTACACAT TCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAACCAGG CCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGC CATCAAGGATGAGCCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTT CGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCAAGGGCCTGAA TAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATC CCAGTGGATTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCC AAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAGGTGTATAACTGCTGTT CCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCAT GTTCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCT CTGCCAGGCTGGTACATCTTTACAAAGTATAAGTGGCTGGTGC TGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTACGTGACC GACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCA AGCTGCAGAGCCTGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTT CTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGCCGATAGGGTGCGC GAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCC

[1133]

	CTTGCGACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGA TTATTGTTGGGGCGTGCGCCACTTTCTGGAGAAGAAGGCCTAT GAGTGA
SEQ ID NO: 90	密码子优化的野生型HaFAR（FAR9；菌株SPV916） ATGGTGGTGCTGACCTCCAAGGAGACAAAGCCCTCTGTGGCC GAGTTCTACGCCGGCAAGAGCGTGTTCATCACAGGCGGCACC GGCTTCCTGGGCAAGGTGTTTATCGAGAAGCTGCTGTACAGCT GCCCTGACATCGAGAACATCTATATGCTGATCCGGGAGAAGA AGGGCCTGAGCGTGTCCGAGAGAATCAAGCAGTTCCTGGACG ATCCCCTGTTTACAAGGCTGAAGGACAAGCGCCCTGCCGATCT GGAGAAGATCGTGCTGATCCCAGGCGACATCACCGCACCAGA TCTGGGCATCAACAGCGAGAATGAGAAGATGCTGATCGAGAA GGTGAGCGTGATCATCCACTCCGCCGCCACCGTGAAGTTCAAC GAGCCCCTGCCTACAGCCTGGAAGATCAATGTGGAGGGCACC AGGATGATGCTGGCCCTGTCTCGGAGAATGAAGCGCATCGAG GTGTTTATCCACATCAGCACAGCCTACACCAACACAAATAGGG AGGTGGTGGACGAGATCCTGTACCCAGCCCCCGCCGACATCG ATCAGGTGCACCAGTATGTGAAGGACGGCATCAGCGAGGAGG ATACCGAGAAGATCCTGAACGGCAGACCCAATACCTACACAT TCACCAAGGCCCTGACAGAGCACCTGGTGGCCGAGAACCAGG CCTATGTGCCTACCATCATCGTGAGACCATCCGTGGTGGCCGC CATCAAGGATGAGCCTCTGAAGGGATGGCTGGGAAACTGGTT CGGAGCAACAGGACTGACCGTGTTTACAGCCAAGGGCCTGAA TAGAGTGATCTACGGCCACAGCTCCTATATCGTGGACCTGATC CCAGTGGATTACGTGGCAAACCTGGTCATCGCAGCAGGAGCC AAGTCTAGCAAGTCCACCGAGCTGAAGGTGTATAACTGCTGTT CCTCTAGCTGTAATCCCGTGACCATCGGCACACTGATGAGCAT GTTCGCCGACGATGCCATCAAGCAGAAGTCCTACGCCATGCCT CTGCCAGGCTGGTACATCTTTACAAAGTATAAGTGGCTGGTGC TGCTGCTGACCTTCCTGTTTCAGGTCATCCCTGCCTACGTGACC GACCTGTCTAGGCACCTGATCGGCAAGAGCCCACGCTATATCA AGCTGCAGAGCCTGGTGAACCAGACCAGGTCCTCTATCGACTT CTTTACAAATCACTCCTGGGTCATGAAGGCCGATAGGGTGCGC GAGCTGTACGCATCTCTGAGCCCAGCCGACAAGTATCTGTTCC CTTGCGACCCAACCGATATCAACTGGACACACTACATCCAGGA TTATTGTTGGGGCGTGCGCCACTTTCTGGAGAAGAAGTCCTAT GAGTGA
SEQ ID NO: 91	PdDGAT1A（海枣DGAT1A） ATGGCCATCCCATCCGATAGAGAGACCCTGGAGAGGGCACCA GAGCCTTCTCCAGCAAGCGACCTGCAGAGCTCCCTGCGGAGA AGGCTGCACTCTACCGTGGCAGCAGTGGTGGTGCCAGATTCTA GCTCCAAGACATCTAGCCCCAGCGCCGAGAACCTGACCACAG ACAGCGGAGAGGATTCCAGGGGCGACACCTCCTCTGACGCCG ATACAAGGGATAGGGTGGTGGACGGAGTGGATAGGGAGGAG GAGAACAAGACCGTGAGCGTGCTGAATGGCAGACAGTACGAG GACGGAGGCGGCAGGGGACAGGGACAGGGCACAGGCGGCGG CGTGCCCGCCAAGTTTCTGTATAGGGCATCTGCCCCTGCACAC AGGAAGGTGAAGGAGAGCCCACTGAGCTCCGATGCCATCTTC AAGCAGAGCCACGCCGGCCTGCTGAACCTGTGCATCGTGGTG CTGATCGCCGTGAACTCCAGGCTGATCATCGAGAATCTGATGA AGTACGGCCTGCTGATCCGCGCCGGCTATTGGTTTTCTAGCAA

[1134]

	GTCCCTGCGGGACTGGCCTCTGCTGATGTGCTGTCTGACCCTG CCAGCATTTCCTCTGGGAGCCTTCATGGTGGAGAAGCTGGCCC AGCACAATTTCATCTCCGAGTCTGTGGTCATCAGCCTGCACGT GATCATCACCACAGCCGAGCTGCTGTACCCAGTGATCGTGATC CTGAGATGCGATTCTGCCGTGCTGAGCGGCATCACACTGATGC TGTTTGCCAGCGTGGTGTGGCTGAAGCTGGTGTCCTACGCCCA CACCAACTATGACATGAGGACACTGAGCAAGTCCATCGACAA GGAGGATATGTACTCCAAGTGTCCAGAGATCGATAATCTGAA GGGCGACTCCTTTAAGTCTCTGGTGTATTTCATGGTGGCCCCC ACCCTGTGCTACCAGCCAAGCTATCCAAGGACCACCTGCATCA GGAAGGGATGGGTCATCCGCCAGGTGGTGAAGCTGGTCATCT TCACCGGCCTGATGGGCTTCATCATCGAGCAGTACATCAACCC CATCGTGCAGAATTCCCAGCACCCTCTGAAGGGCAACTTTCTG AATGCCATCGAGCGGGTGCTGAAGCTGTCTGTGCCCACCCTGT ACGTGTGGCTGTGCATGTTCTATTGTTTCTTTCACCTGTGGCTG AACATCCTGGCCGAGCTGCTGTGCTTTGGCGATAGAGAGTTCT ACAAGGACTGGTGGAACGCCAAGACAATCGAGGAGTATTGGA GGATGTGGAATATGCCTGTGCACCGCTGGATGATCCGGCACAT CTACTTCCCTTGTCTGAGAAATGGCCTGCCAAGGGCCGTGGCC ATCCTGATCTCCTTTCTGGTGTCTGCCATCTTCCACGAGATCTG CATCGCCGTGCCCTGTCACATCTTTAAGTTCTGGGCCTTTATCG GCATCATGTTCCAGATCCCCCTGGTCATCCTGACCAAGTATCT GCAGCACAAGTTTACAAACTCCATGGTGGGCAATATGATCTTC TGGTTCTTTTTCTCTATCCTGGGCCAGCCTATGTGCGTGCTGCT GTACTATCACGACGTGATGAATAGAAAGGTGAGGACCGAGTG A
SEQ ID NO: 92	由SEQ ID NO 91编码的PdDGAT1A（海枣DGAT1A）蛋白质 MAIPSDRETLERAPEPSPASDLQSSLRRRLHSTVAAVVVPDSSSKT SSPSAENLTTDSGEDSRGDTSSDADTRDRVVDGVDREEENKTVS VLNGRQYEDGGGRGQGQGTGGGVPAKFLYRASAPAHRKVKESP LSSDAIFKQSHAGLLNLCIVVLIAVNSRLIIENLMKYGLLIRAGYW FSSKSLRDWPLLMCCLTLPAFPLGAFMVEKLAQHNFISESVVISLH VIITTAELLYPVIVILRCDSAVLSGITLMLFASVVWLKLVSYAHTN YDMRTLSKSIDKEDMYSKCPEIDNLKGDSFKSLVYFMVAPTLCY QPSYPRTTCIRKGWVIRQVVKLVIFTGLMGFIIEQYINPIVQNSQHP LKGNFLNAIERVLKLSVPTLYVWLCMFYCFFHLWLNILAELLCFG DREFYKDWWNAKTIEEYWRMWNMPVHRWMIRHIYFPCLRNGL PRAVAILISFLVSAIFHEICIAVPCHIFKFWAFIGIMFQIPLVILTKYL QHKFTNSMVGNMIFWFFFSILGQPMCVLLYYHDVMNRKVRTE
SEQ ID NO: 93	用 于 酶 表 达 的 TEF 启 动 子 GAGACCGGGTTGGCGGCGCATTTGTGTCCCAAAAAACAGCCC CAATTGCCCCAATTGACCCCAAATTGACCCAGTAGCGGGCCCA ACCCCGGCGAGAGCCCCCTTCTCCCCACATATCAAACCTCCCC CGGTTCCCACACTTGCCGTTAAGGGCGTAGGGTACTGCAGTCT GGAATCTACGCTTGTTCAGACTTTGTACTAGTTTCTTTGTCTGG CCATCCGGGTAACCCATGCCGGACGCAAAATAGACTACTGAA

[1135]

	AATTTTTTTGCTTTGTGGTTGGGACTTTAGCCAAGGGTATAAA AGACCACCGTCCCCGAATTACCTTTCCTCTTCTTTTCTCTCTCT CCTTGTCAACTCACACCCGAAATCGTTAAGCATTTCCTTCTGA GTATAAGAATCATTCAAA
SEQ ID NO: 94	DST076编码序列Z9去饱和酶 ATGCACATCGAGTCTGAGAACTGCCCCGGCAGGTTTAAGGAG GTGAACATGGCCCCTAATGCCACCGATGCCAATGGCGTGCTGT TCGAGACCGATGCCGCCACACCTGACCTGGCCCTGCCACACGC ACCTGTGCAGCAGGCCGACAACTACCCAAAGAAGTACGTGTG GCGCAATATCATCCTGTTTGCCTACCTGCACATCGCCGCCCTG TACGGCGGCTATCTGTTTCTGTTCCACGCCAAGTGGCAGACCG ATATCTTCGCCTACATCCTGTATGTGATGTCTGGACTGGGAAT CACAGCAGGAGCACACAGGCTGTGGGCCCACAAGAGCTACAA GGCCAAGTGGCCTCTGAGACTGATCCTGGTCATCTTCAACACA CTGGCCTTTCAGGACTCTGCCATCGATTGGAGCAGGGACCACC GCATGCACCACAAGTATTCCGAGACCGACGCCGATCCCCACA ATGCCACACGGGGCTTCTTTTTCTCTCACATCGGCTGGCTGCTG GTGCGGAAGCACCCTGAGCTGAAGAGAAAGGGCAAGGGCCTG GACCTGTCCGATCTGTATGCCGACCCAATCCTGAGATTTCAGA AGAAGTACTATCTGATCCTGATGCCCCTGACCTGTTTCGTGCT GCCAACAGTGATCCCCGTGTACTATTGGGGCGAGACCTGGAC AAACGCCTTTTTCGTGGCCGCCCTGTTTAGGTACGCCTTCATCC TGAACGTGACCTGGCTGGTGAATAGCGCCGCCCACAAGTGGG GCGATAAGCCTTATGACCGCAACATCAAGCCATCCGAGAATA TCAGCGTGTCCATGTTTGCCCTGGGCGAGGGCTTCCACAACTA CCACCACACCTTCCCATGGGATTATAAGACAGCCGAGCTGGGC AACAATATGCTGAACTTCACCACAAACTTCATCAACTTCTTCG CCAAGATCGGCTGGGCCTACGATCTGAAGACCGTGTCCGACG AGATCGTGCGGTCTAGAGCAAAGAGGACAGGCGACGGAAGCC ACCACCTGTGGGGATGGGGCGACAAGGATCACTCCAGGGAGG AGATGGCTGCCGCCATCCGCATCCACCCCAAGGACGATTGA
SEQ ID NO: 95	由SEQ ID NO 94编码的DST076_氨基酸Z9去饱和酶 MHIESENCPGRFKEVNMAPNATDANGVLFETDAATPDLALPHAP VQQADNYPKKYVWRNIILFAYLHIAALYGGYLFLFHAKWQTDIF AYILYVMSGLGITAGAHRLWAHKSYKAKWPLRLILVIFNTLAFQ DSAIDWSRDHRMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHP ELKRKGKGLDLSDLYADPILRFQKKYYLILMPLTCFVLPTVIPVY YWGETWTNAFFVAALFRYAFILNVTWLVNSAAHKWGDKPYDR NIKPSENISVSMFALGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNMLNFTT NFINFFAKIGWAYDLKTVSDEIVRSRAKRTGDGSHHLWGWGDK

[1136]

	DHSREEMAAAIRIHPKDD
SEQ ID NO: 96	DST180_编码序列Z9去饱和酶 ATGGCCCCAAACATCTCTGACGATGTGAATGGCGTGCTGTTTG AGAGCGATGCAGCAACACCAGACCTGGCCCTGGCAAGCCCCC CTGTGCAGAAGGCCGATAACCGGCCCAAGCAGTACGTGTGGA GAAATATCCTGCTGTTCGCATATCTGCACGCCGCCGCCCTGTA CGGCGGCTATCTGTTTCTGACAAGCGCCAAGTGGCAGACCGAC GTGTTCGCCTACATCCTGTATGTGATGTCCGGACTGGGAATCA CAGCAGGAGCACACAGGCTGTGGGCACACAAGTCTTACAAGG CCAAGTGGCCCCTGAAAGTGATCCTGATCATCTTTAACACCAT CGCCTTTCAGGACGCAGCAATGGATTGGGCAAGGGACCACAG AATGCACCACAAGTATAGCGAGACAGACGCCGATCCTCACAA TGCCACCAGGGGCTTCTTTTTCTCCCACATCGGCTGGCTGCTG GTGCGCAAGCACCCAGATCTGAAGGAGAAGGGCAAGGGCCTG GACATGAGCGATCTGCAGGCCGACCCCATCCTGCGGTTTCAGA AGAAGTACTATCTGCTGCTGATGCCTCTGGCCTGCTTTGTGAT GCCAACAGTGATCCCCGTGTACTTCTGGGGCGAGACCTGGAAC AATGCCTTTTTCGTGGCCGCCATGTTTAGATATGCCTTCATCCT GAACGTGACCTGGCTGGTGAATTCCGCCGCCCACAAGTGGGG CGATAAGCCTTACGACAAGAGCATCAAGCCATCCGAGAACAT GAGCGTGGCCATGTTTGCCCTGGGCGAGGGCTTCCACAATTAC CACCACACATTCCCCTGGGATTATAAGACCGCCGAGCTGGGCA ACAATAAGCTGAACTTTACCACAACCTTCATCAACTTCTTCGC CAAGCTGGGCTGGGCCTACGACATGAAGACAGTGTCCGACGA TATCGTGAAGAACAGGGTGAAGCGCACCGGCGATGGATCTCA CCACCTGTGGGGATGGGGCGACAAGAACCAGAGCAAGGAGG AGATCGCCTCCGCCATCCGGATCAATCCTAAGGACGATTGA
SEQ ID NO: 97	由SEQ ID NO: 96编码的DST180_氨基酸Z9去饱和酶 MAPNISDDVNGVLFESDAATPDLALASPPVQKADNRPKQYVWR NILLFAYLHAAALYGGYLFLTSAKWQTDVFAYILYVMSGLGITA GAHRLWAHKSYKAKWPLKVILIIFNTIAFQDAAMDWARDHRMH HKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPDLKEKGKGLDMSD LQADPILRFQKKYYLLLMPLACFVMPTVIPVYFWGETWNNAFFV AAMFRYAFILNVTWLVNSAAHKWGDKPYDKSIKPSENMSVAMF ALGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNKLNFTTTFINFFAKLGWAY DMKTVSDDIVKNRVKRTGDGSHHLWGWGDKNQSKEEIASAIRIN PKDD

[1137]

SEQ ID NO: 98	DST181_编码序列Z9去饱和酶 ATGGCCCCAAACATCTCTGAGGATGCCAATGGCGTGCTGTTTG AGAGCGATGCAGCAACACCAGACCTGGCCCTGGCAAGCCCAC CTGTGCAGAAGGCAGACAACAGGCCCAAGCAGTACGTGTGGA GAAATATCATCCTGTTTGCCTATCTGCACCTGGCCGCCCTGTA CGGCGGCTATCTGTTTCTGTTCAGCGCCAAGTGGCAGACAGAC GTGTTCGCCTACATCCTGTATGTGATGTCCGGACTGGGAATCA CCGCAGGAGCACACAGACTGTGGGCACACAAGTCTTACAAGG CCAAGTGGCCCCTGAAAGTGATCCTGATCATCTTTAACACCAT CGCCTTTCAGGACGCAGCAATGGATTGGGCAAGGGACCACAG AATGCACCACAAGTATAGCGAGACAGACGCCGATCCTCACAA TGCCACCAGGGGCTTCTTTTTCTCCCACATCGGCTGGCTGCTG GTGCGCAAGCACCCAGACCTGAAGAAGAAGGGCAAGGGCCTG GACATGAGCGATCTGCTGAACGACCCCATCCTGAAGTTTCAGA AGAAGTACTATCTGCTGCTGATGCCTCTGGCCTGCTTCGTGAT GCCAACAATGATCCCCGTGTACCTGTGGGGCGAGACATGGAC CAATGCCTTTTTCGTGGCCGCCATGTTTCGGTATGCCTTCATCC TGAACGTGACCTGGCTGGTGAATTCCGCCGCCCACAAGTGGG GCGATAAGCCTTACGACAAGAGCATCAAGCCATCCGAGAACC TGTCTGTGGCCATGTTTGCCCTGGGCGAGGGCTTCCACAATTA CCACCACACATTCCCCTGGGATTATAAGACCGCCGAGCTGGGC AACCAGAAGCTGAACTTCACCACAACCTTCATCAACTTTTTCG CCAAGCTGGGCTGGGCCTACGACATGAAGACAGTGTCCGACG ATATCGTGAAGAATAGGGTGAAGCGCACCGGCGATGGATCTC ACCACCTGTGGGGATGGGGCGACAAGAACCAGAGCAAGGAG GAGATCGCCTCCGCCATCCGGATCAATCCTAAGGACGATTGA
SEQ ID NO: 99	由SEQ ID NO: 98编码的DST181_氨基酸Z9去饱和酶 MAPNISEDANGVLFESDAATPDLALASPPVQKADNRPKQYVWR NIILFAYLHLAALYGGYLFLFSAKWQTDVFAYILYVMSGLGITAG AHRLWAHKSYKAKWPLKVILIIFNTIAFQDAAMDWARDHRMHH KYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPDLKKKGKGLDMSDL

[1138]

	LNDPILKFQKKYYLLLMPLACFVMPTMIPVYLWGETWTNAFFVA AMFRYAFILNVTWLVNSAAHKWGDKPYDKSIKPSENLSVAMFA LGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNQKLNFTTTFINFFAKLGWAYD MKTVSDDIVKNRVKRTGDGSHHLWGWGDKNQSKEEIASAIRINP KDD
SEQ ID NO: 100	DST183_编码序列Z9去饱和酶 ATGGCCCCAAACATCAGCGAGGATGTGAATGGCGTGCTGTTC GAGTCCGATGCCGCCACACCAGACCTGGCCCTGTCTACCCCAC CTGTGCAGAAGGCAGACAACAGGCCCAAGCAGCTGGTGTGGA GAAATATCCTGCTGTTTGCATACCTGCACCTGGCAGCACAGTA CGGAGGCTATCTGTTTCTGTTCTCTGCCAAGTGGCAGACAGAT ATCTTCGCCTACATCCTGTATGTGATCAGCGGACTGGGAATCA CCGCAGGAGCACACCGGCTGTGGGCCCACAAGTCCTACAAGG CCAAGTGGCCTCTGAGAGTGATCCTGGTCATCTTCAACACCGT GGCCTTTCAGGACGCAGCAATGGATTGGGCAAGGGACCACAG AATGCACCACAAGTATTCTGAGACAGACGCCGATCCTCACAAT GCCACCAGGGGCTTCTTTTTCAGCCACATCGGCTGGCTGCTGG TGCGCAAGCACCCAGATCTGAAGGAGAAGGGCAAGGGCCTGG ACATGAGCGATCTGCTGGCCGACCCCATCCTGAGGTTTCAGAA GAAGTACTATCTGATCCTGATGCCTCTGGCCTGCTTTGTGATG CCAACAGTGATCCCCGTGTACTTCTGGGGCGAGACATGGACCA ACGCCTTTTTCGTGGCCGCCATGTTTCGCTATGCCTTCATCCTG AACGTGACCTGGCTGGTGAATTCTGCCGCCCACAAGTGGGGC GATAAGCCTTACGACAAGAGCATCAAGCCATCCGAGAACCTG TCTGTGGCCATGTTTGCCCTGGGCGAGGGCTTCCACAATTACC ACCACACATTCCCCTGGGACTATAAGACCGCCGAGCTGGGCA ACAATAAGCTGAACTTTACCACAACCTTCATCAACTTCTTCGC CAAGATCGGCTGGGCCTATGATCTGAAGACAGTGTCCGACGA TATCGTGAAGAATAGGGTGAAGAGGACCGGCGACGGAAGCCA CCACCTGTGGGGCTGGGGCGATGAGAACCAGTCCAAGGAGGA

	GATCGACGCCGCCATCCGGATCAATCCTAAGGACGATTGA
SEQ ID NO: 101	由SEQ ID NO: 100编码的DST183氨基酸Z9去饱和酶 MAPNISEDVNGVLFESDAATPDLALSTPPVQKADNRPKQLVWRN ILLFAYLHLAAQYGGYLFLFSAKWQTDIFAYILYVISGLGITAGAH RLWAHKSYKAKWPLRVILVIFNTVAFQDAAMDWARDHRMHHK YSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPDLKEKGKGLDMSDLL ADPILRFQKKYYLILMPLACFVMPTVIPVYFWGETWTNAFFVAA MFRYAFILNVTWLVNSAAHKWGDKPYDKSIKPSENLSVAMFAL GEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNKLNFTTTFINFFAKIGWAYDL KTVSDDIVKNRVKRTGDGSHHLWGWGDENQSKEEIDAAIRINPK DD
SEQ ID NO: 102	DST189_编码序列Z9去饱和酶 ATGGCCCCTAACGTGACCGAGGAGAATGGCGTGCTGTTCGAG TCTGATGCAGCAACACCTGACCTGGCCCTGGCAAGAGAGCCA GTGCAGCAGGCAGATAGCTCCCCACGGGTGTACGTGTGGAGA AACATCATCCTGTTTGCCTATCTGCACATCGCCGCCGTGTACG GCGGCTATCTGTTTCTGTTCTCCGCCAAGTGGCAGACCGACAT CTTCGCCTACCTGCTGTATGTGGCCTCTGGACTGGGAATCACA GCAGGAGCACACAGGCTGTGGGCCCACAAGAGCTACAAGGCC AAGTGGCCCCTGAGACTGATCCTGACCATCTTTAACACCACAG CCTTTCAGGACAGCGCCATCGATTGGGCCCGGGACCACAGAA TGCACCACAAGTATTCCGAGACCGACGCCGATCCCCACAATGC CACAAGGGGCTTCTTTTTCTCCCACATCGGCTGGCTGCTGGTG AGGAAGCACCCTGAGCTGAAGCGCAAGGGCAAGGGCCTGGAC CTGTCTGATCTGTACGCCGATCCTATCCTGCGCTTTCAGAAGA AGTACTATCTGATCCTGATGCCACTGGCCTGCTTCATCCTGCCC ACCGTGATCCCCGTGTACCTGTGGAACGAGACATGGAGCAAT GCCTTTTTCGTGGCCGCCCTGTTTCGGTATACCTTCATCCTGAA CGTGACATGGCTGGTGAATTCCGCCGCCCACAAGTGGGGCGA TAAGCCATACGACAAGTCCATCAAGCCCTCTGAGAACCTGTCT

[1139]

[1140]

	GTGAGCCTGTTTGCCTTCGGCGAGGGCTTTCACAATTACCACC ACACCTTCCCATGGGATTATAAGACAGCCGAGCTGGGCAACC ACCGGCTGAACTTCACCACAAAGTTCATCAACTTTTTCGCCAA GATCGGCTGGGCCTATGATATGAAGACCGTGTCTCACGAGATC GTGCAGCAGAGGGTGAAGAGGACAGGCGACGGAAGCCACCA CCTGTGGGGATGGGGCGACAAGGATCACGCACAGGAGGAGAT CGACGCCGCCATCAGAATCAATCCCAAGGACGATTGA
SEQ ID NO: 103	由SEQ ID NO: 102编码的DST189_氨基酸Z9去饱和酶 MAPNVTEENGVLFESDAATPDLALAREPVQQADSSPRVYVWRNI ILFAYLHIAAVYGGYLFLFSAKWQTDIFAYLLYVASGLGITAGAH RLWAHKSYKAKWPLRLILTIFNTTAFQDSAIDWARDHRMHHKYS ETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPELKRKGKGLDLSDLYAD PILRFQKKYYLILMPLACFILPTVIPVYLWNETWSNAFFVAALFRY TFILNVTWLVNSAAHKWGDKPYDKSIKPSENLSVSLFAFGEGFHN YHHTFPWDYKTAELGNHRLNFTTKFINFFAKIGWAYDMKTVSHE IVQQRVKRTGDGSHHLWGWGDKDHAQEEIDAAIRINPKDD
SEQ ID NO: 104	DST192_编码序列Z9去饱和酶 ATGGATTTTCTGAACGAGATCGACAATTGCCCCGAGCGGCTGA GAAAGCCAGAGAAGATGGCCCCCAACGTGACCGAGGAGAATG GCGTGCTGTTCGAGTCCGATGCAGCAACCCCAGACCTGGCCCT GGCAAGGACACCTGTGGAGCAGGCCGACGATTCTCCAAGGAT CTACGTGTGGCGCAACATCATCCTGTTTGCCTATCTGCACCTG GCCGCCATCTACGGCGGCTATCTGTTTCTGTTCTCCGCCAAGT GGCAGACCGATATCTTCGCCTACCTGCTGTATGTGGCATCTGG ACTGGGAATCACAGCAGGAGCACACAGGCTGTGGGCACACAA GAGCTACAAGGCCAAGTGGCCTCTGCGCCTGATCCTGACCATC TTTAACACAATCGCCTTTCAGGACAGCGCCATCGATTGGGCCA GGGACCACCGCATGCACCACAAGTATTCCGAGACCGACGCCG ATCCACACAATGCCACACGGGGCTTCTTTTTCTCTCACATCGG ATGGCTGCTGGTGCGGAAGCACCCAGAGCTGAAGAGAAAGGG CAAGGGCCTGGACCTGTCTGATCTGTACAGCGATCCCATCCTG

[1141]

	AGATTTCAGAAGAAGTACTATATGATCCTGATGCCTCTGGCCT GTTTCATCCTGCCCACCGTGATCCCCGTGTATATGTGGAACGA GACATGGAGCAATGCCTTTTTCGTGGCCGCCCTGTTTAGGTAT ACCTTCATCCTGAACGTGACATGGCTGGTGAATTCCGCCGCCC ACAAGTGGGGCGATAAGCCTTACGACAAGTCCATCAAGCCAT CTGAGAACATGAGCGTGTCCCTGTTTGCCTTCGGCGAGGGCTT TCACAATTACCACCACACCTTCCCTTGGGACTATAAGACAGCC GAGCTGGGCAACCACCGGCTGAACTTCACCACAAAGTTCATC AACTTCTTCGCCAAGATCGGCTGGGCCTATGATATGAAGACCG TGTCTCAGGAGATCGTGCAGCAGCGGGTGAAGAGAACAGGCG ACGGAAGCCACCACCTGTGGGGATGGGGCGACAAGGATCACG CACAGGAGGAGATCAACGCCGCCATCCGCATCAATCCAAAGG ACGATTGA
SEQ ID NO: 105	由SEQ ID NO: 104编码的DST192_氨基酸Z9去饱和酶 MDFLNEIDNCPERLRKPEKMAPNVTEENGVLFESDAATPDLALA RTPVEQADDSPRIYVWRNIILFAYLHLAAIYGGYLFLFSAKWQTD IFAYLLYVASGLGITAGAHRLWAHKSYKAKWPLRLILTIFNTIAF QDSAIDWARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRK HPELKRKGKGLDLSDLYSDPILRFQKKYYMILMPLACFILPTVIPV YMWNETWSNAFFVAALFRYTFILNVTWLVNSAAHKWGDKPYD KSIKPSENMSVSLFAFGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNHRLNFT TKFINFFAKIGWAYDMKTVSQEIVQQRVKRTGDGSHHLWGWGD KDHAQEEINAAIRINPKDD

[1142] 前面的详细描述仅仅是为了清楚理解而给出的,而不应该从中理解为不必要的限制,因为对于本领域技术人员来说修改是显而易见的。

[1143] 虽然结合本公开文本的特定实施例对本公开文本进行了描述,但将会理解能够进行进一步的修改,并且本申请意在涵盖任何一般而言遵循本公开文本的原理的变化、用途或改编,并且包括这样的偏离本公开文本的内容:其在本公开文本所属领域的已知或惯常操作内,并且可以适用于此前所示的关键特征,并且遵循所附权利要求的范围。

[1144] 通过提述并入

[1145] 本文引用的所有参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请出于所有目的通过提述以其整体并入本文。本申请特此通过提述整体并入以下内容:2015年11月18日提交的美国临时申请序列号62/257,054,2016年6月17日提交的美国临时申请序列号62/351,605和2016年11月18日提交的PCT申请号PCT/US2016/062852。

[1146] 然而,本文中引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请均未(也不应视为)承认或以任何形式暗示它们构成了有效的现有技术或构成世界上任何国家的常识的一部分。

[1147] 本发明的另外的实施方案

[1148] 在以下编号的实施方案中阐述了本公开内容预期的其他主题:

[1149] 1.一种重组解脂耶氏酵母微生物,其能够从酸的内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,其中该重组解脂耶氏酵母微生物包含:

[1150] (a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA,该脂肪酰基去饱和酶与选自SEQ ID NO: 39、54、60、62、78、79、80、95、97、99、101、103和105的脂肪酰基去饱和酶具有至少95%序列同一性;和

[1151] (b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶与选自SEQ ID NO: 41-48、57、73、75和77的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有至少95%序列同一性。

[1152] 2.根据实施方案1所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该重组解脂耶氏酵母微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酶催化与用于产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的生物合成途径竞争的途径中的反应。

[1153] 3.根据实施方案1或2所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该重组解脂耶氏酵母微生物包含选自下列的一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:

[1154] (i)一种或多种酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g(POX1)、YALI0F10857g(POX2)、YALI0D24750g(POX3)、YALI0E27654g(POX4)、YALI0C23859g(POX5)、YALI0E06567g(POX6);

[1155] (ii)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶,其选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7);

[1156] (iii)(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1);

[1157] (iv)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g(ALK1)、YALI0F01320g(ALK2)、YALI0E23474g(ALK3)、YALI0B13816g(ALK4)、YALI0B13838g(ALK5)、YALI0B01848g(ALK6)、YALI0A15488g(ALK7)、(YALI0C12122g(ALK8)、YALI0B06248g(ALK9)、YALI0B20702g(ALK10)、YALI0C10054g(ALK11)和YALI0A20130g(Alk12);和

[1158] (v)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)。

[1159] 4.根据实施方案1或2所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该重组解脂耶氏酵母微生物包含选自下列的一种或多种内源酶的缺失:

[1160] (i)一种或多种酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g(POX1)、YALI0F10857g(POX2)、YALI0D24750g(POX3)、YALI0E27654g(POX4)、YALI0C23859g(POX5)、YALI0E06567g

(POX6)；

[1161] (ii)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶,其选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7)；

[1162] (iii)(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1)；

[1163] (iv)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g(ALK1)、YALI0F01320g(ALK2)、YALI0E23474g(ALK3)、YALI0B13816g(ALK4)、YALI0B13838g(ALK5)、YALI0B01848g(ALK6)、YALI0A15488g(ALK7)、(YALI0C12122g(ALK8),YALI0B06248g(ALK9)、YALI0B20702g(ALK10)、YALI0C10054g(ALK11)和YALI0A20130g(Alk12)；和

[1164] (v)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)。

[1165] 5.根据实施方案1-4中任一项所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该脂肪酰基去饱和酶催化饱和脂肪酰基-CoA转化为选自Z9-14:酰基-CoA、Z11-14:酰基-CoA、E11-14:酰基-CoA、Z9-16:酰基-CoA和Z11-16:酰基-CoA的单和或多不饱和中间体。

[1166] 6.根据实施方案1-5中任一项所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇选自Z9-14:OH、Z11-14:OH、E11-14:OH、Z9-16:OH、Z11-16:OH、Z11Z13-16:OH和Z13-18:OH。

[1167] 7.根据实施方案1-6中任一项所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该重组解脂耶氏酵母微生物进一步包含至少一种内源或外源核酸分子,该内源或外源核酸分子编码能够催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛的醇氧化酶或醇脱氢酶。

[1168] 8.根据实施方案7所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该醇脱氢酶选自表3a。

[1169] 9.根据实施方案7或8所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该C_6-C_{24}脂肪醛选自Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[1170] 10.根据实施方案1-9中任一项所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该重组解脂耶氏酵母微生物进一步包含至少一种或多种内源或外源核酸分子,该内源或外源核酸分子编码能够催化单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯的乙酰基转移酶。

[1171] 11.根据实施方案10所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该乙酰基转移酶选自表5d。

[1172] 12.根据实施方案10或11所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该C_6-C_{24}脂肪乙酸酯选自Z9-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac、Z11-16:Ac、Z11Z13-16:Ac和Z13-18:Ac。

[1173] 13.根据实施方案1-12任一项所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该重组解脂耶氏酵母微生物进一步包含：

[1174] 至少一种内源或外源核酸分子,其编码能够催化所述单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛的醇氧化酶或醇脱氢酶；和

[1175] 至少一种内源或外源核酸分子,其编码能够催化所述单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯的乙酰基转移酶。

[1176] 14.根据实施方案13的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪

醛和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯选自Z9-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac、Z11-16:Ac、Z11Z13-16:Ac、Z13-18:Ac、Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[1177] 15.根据实施方案1-14中任一项所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该脂肪酰基去饱和酶不包含包含选自SEQ ID NO:64、65、66和67的氨基酸序列的脂肪酰基去饱和酶。

[1178] 16.根据实施方案1-15中任一项所述的重组解脂耶氏酵母微生物,其中该脂肪酰基去饱和酶不包含选自脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、黄地老虎(Agrotis segetum)或粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)衍生的去饱和酶的脂肪酰基去饱和酶。

[1179] 17.一种从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的方法,该方法包括:在含有原料的培养基中培养实施方案1-6中任一项所述的重组解脂耶氏酵母微生物,所述原料提供足以产生该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的碳源。

[1180] 18.根据实施方案17所述的方法,其中该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇选自Z9-14:OH、Z11-14:OH、E11-14:OH、Z9-16:OH、Z11-16:OH、Z11Z13-16:OH和Z13-18:OH。

[1181] 19.根据实施方案17或18所述的方法,其中该重组解脂耶氏酵母微生物包含选自下列的一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:

[1182] (i)一种或多种酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g(POX1)、YALI0F10857g(POX2)、YALI0D24750g(POX3)、YALI0E27654g(POX4)、YALI0C23859g(POX5)、YALI0E06567g(POX6);

[1183] (ii)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶,其选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7);

[1184] (iii)(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1);

[1185] (iv)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g(ALK1)、YALI0F01320g(ALK2)、YALI0E23474g(ALK3)、YALI0B13816g(ALK4)、YALI0B13838g(ALK5)、YALI0B01848g(ALK6)、YALI0A15488g(ALK7)、(YALI0C12122g(ALK8),YALI0B06248g(ALK9)、YALI0B20702g(ALK10)、YALI0C10054g(ALK11)和YALI0A20130g(Alk12);和

[1186] (v)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)。

[1187] 20.根据实施方案17或18所述的方法,其进一步包括回收该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的步骤。

[1188] 21.根据实施方案20所述的方法,其中所述回收步骤包括蒸馏。

[1189] 22.根据实施方案20所述的方法,其中所述回收步骤包括基于膜的分离。

[1190] 23.一种从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛的方法,该方法包括:在含有原料的培养基中培养实施方案1-16中任一项所述的重组解脂耶氏酵母微生物,所述原料提供足以产生该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛的碳源。

[1191] 24.根据实施方案23所述的方法,其中该C_6-C_{24}脂肪醛选自Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[1192] 25.根据实施方案23或24所述的方法,其进一步包括回收该单或多不饱和C_6-C_{24}脂

肪醛的步骤。

[1193] 26.根据实施方案25所述的方法,其中所述回收步骤包括蒸馏。

[1194] 27.根据实施方案25所述的方法,其中所述回收步骤包括基于膜的分离。

[1195] 28.一种从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯的方法,该方法包括:在含有原料的培养基中培养实施方案1-16中任一项所述的重组解脂耶氏酵母微生物,所述原料提供足以产生该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯的碳源。

[1196] 29.根据实施方案28所述的方法,其中该C_6-C_{24}脂肪乙酸酯选自Z9-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac、Z11-16:Ac、Z11Z13-16:Ac和Z13-18:Ac。

[1197] 30.根据实施方案28所述的方法,其进一步包括回收该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯的步骤。

[1198] 31.根据实施方案28所述的方法,其中所述回收步骤包括蒸馏。

[1199] 32.根据实施方案28所述的方法,其中所述回收步骤包括基于膜的分离。

[1200] 33.一种从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯的方法,该方法包括:在含有原料的培养基中培养实施方案1-16中任一项所述的重组解脂耶氏酵母微生物,所述原料提供足以产生该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯的碳源。

[1201] 34.根据实施方案33所述的方法,其中该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯选自Z9-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac、Z11-16:Ac、Z11Z13-16:Ac、Z13-18:Ac、Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[1202] 35.一种工程化能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的解脂耶氏酵母微生物的方法,其中该方法包括将下列引入至解脂耶氏酵母微生物:

[1203] (a)编码至少一种脂肪酰基去饱和酶的核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA,该脂肪酰基去饱和酶与选自SEQ ID NO: 39、54、60、62、78、79、80、95、97、99、101、103和105的脂肪酰基去饱和酶具有至少95%序列同一性;和

[1204] (b)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶与选自SEQ ID NO: 41-48、57、73、75和77的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有至少95%序列同一性。

[1205] 36.根据实施方案35所述的方法,其中该方法进一步包括将一种或多种修饰引入至该解脂耶氏酵母微生物中,该修饰包括一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酶催化与用于产生单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇的生物合成途径竞争的途径中的反应。

[1206] 37.根据实施方案35或36所述的方法,其中该解脂耶氏酵母微生物为MATA ura3-

302::SUC2ΔpoxlΔpox2Δpox3Δpox4Δpox5Δpox6ΔfadhΔadh1Δadh2Δadh3Δadh4Δadh5Δadh6Δadh7Δfao1::URA3。

[1207] 38.根据权利要求35所述的方法,其中该方法进一步包括将一种或多种修饰引入至该解脂耶氏酵母微生物中,该修饰包含选自下列的一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:

[1208] (i)一种或多种酰基-CoA氧化酶,其选自YALI0E32835g(POX1)、YALI0F10857g(POX2)、YALI0D24750g(POX3)、YALI0E27654g(POX4)、YALI0C23859g(POX5)、YALI0E06567g(POX6);

[1209] (ii)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶,其选自YALI0F09603g(FADH)、YALI0D25630g(ADH1)、YALI0E17787g(ADH2)、YALI0A16379g(ADH3)、YALI0E15818g(ADH4)、YALI0D02167g(ADH5)、YALI0A15147g(ADH6)、YALI0E07766g(ADH7);

[1210] (iii)(脂肪)醇氧化酶YALI0B14014g(FAO1);

[1211] (iv)一种或多种细胞色素P450酶,其选自YALI0E25982g(ALK1),YALI0F01320g(ALK2)、YALI0E23474g(ALK3)、YALI0B13816g(ALK4),YALI0B13838g(ALK5)、YALI0B01848g(ALK6)、YALI0A15488g(ALK7),(YALI0C12122g(ALK8)、YALI0B06248g(ALK9)、YALI0B20702g(ALK10)、YALI0C10054g(ALK11)和YALI0A20130g(Alk12);和

[1212] (v)一种或多种二酰基甘油酰基转移酶,其选自YALI0E32791g(DGA1)和YALI0D07986g(DGA2)。

[1213] 39.根据实施方案35-38中任一项所述的方法,其中该脂肪酰基去饱和酶催化脂肪酰基-CoA转化为选自Z9-14:Acyl-CoA、Z11-14:Acyl-CoA、E11-14:Acyl-CoA、Z9-16:Acyl-CoA和Z11-16:Acyl-CoA的单或多不饱和中间体。

[1214] 40.根据实施方案35-39中任一项所述的方法,其中该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇选自Z9-14:OH、Z11-14:OH、E11-14:OH、Z9-16:OH、Z11-16:OH、Z11Z13-16:OH和Z13-18:OH。

[1215] 41.根据实施方案35-40中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子引入至该重组解脂耶氏酵母微生物中,或在该重组解脂耶氏酵母微生物中表达至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛。

[1216] 42.根据实施方案41所述的方法,其中该醇脱氢酶选自表3a。

[1217] 43.根据实施方案41所述的方法,其中该C_6-C_{24}脂肪醛选自Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[1218] 44.根据实施方案35-43中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子引入至该重组解脂耶氏酵母微生物中,或在该重组解脂耶氏酵母微生物中表达至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。

[1219] 45.根据实施方案44所述的方法,其中该乙酰基转移酶选自表5d。

[1220] 46.根据实施方案44所述的方法,其中该C_6-C_{24}脂肪乙酸酯选自Z9-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac、Z11-16:Ac、Z11Z13-16:Ac和Z13-18:Ac。

[1221] 47.根据实施方案35-46中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将下列引入

至该重组解脂耶氏酵母微生物中,或在该重组解脂耶氏酵母微生物中表达下列:

[1222] 至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛;和

[1223] 至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。

[1224] 48.根据实施方案35-47中任一项所述的方法,其中该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醛和C_6-C_{24}脂肪乙酸酯选自Z9-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac、Z11-16:Ac、Z11Z13-16:Ac、Z13-18:Ac、Z9-14:Ald、Z11-14:Ald、E11-14:Ald、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[1225] 49.根据实施方案35-48中任一项所述的方法,其中该脂肪酰基去饱和酶不包含包含选自SEQ ID NO:64、65、66和67的氨基酸序列的脂肪酰基去饱和酶。

[1226] 50.根据实施方案35-49中任一项所述的方法,其中该脂肪酰基去饱和酶不包含选自脐橙螟蛾(Amyelois transitella)、海灰翅夜蛾(Spodoptera littoralis)、黄地老虎(Agrotis segetum)或粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)衍生的去饱和酶的脂肪酰基去饱和酶。

[1227] 51.根据实施方案17-22中任一项所述的方法,其中使用化学方法将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪醛。

[1228] 53.根据实施方案17-22中任一项所述的方法,其中使用化学方法将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇转化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。

[1229] 54.根据实施方案53所述的方法,其中该化学方法在4-N,N-二甲氨基吡啶(DMAP)或乙酸钠的存在下利用选自乙酰氯、乙酸酐、丁酰氯、丁酸酐、丙酰氯和丙酸酐的化学剂将该单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪醇酯化为相应的C_6-C_{24}脂肪乙酸酯。

[1230] 55.一种能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的重组微生物,其中该重组微生物包含:

[1231] (a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;

[1232] (b)至少一种编码酰基-CoA氧化酶的外源核酸分子,该酰基-CoA氧化酶在一个或多个连续的酰基-CoA氧化酶活性循环之后催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和≤C_{18}脂肪酰基-CoA,其中指定循环产生相对于此循环中的起始单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA底物具有两个碳截短的单或多不饱和C_4-C_{22}脂肪酰基-CoA中间体;和

[1233] (c)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(b)的单或多不饱和≤C_{18}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇。

[1234] 56.根据实施方案55所述的重组微生物,其中该重组微生物进一步包含至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该酰基转移酶优选储存≤C_{18}脂肪酰基-CoA。

[1235] 57.根据实施方案55-56中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物进一步包含至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该酰基转移酶优选储存≤C_{18}脂肪酰基-CoA,且其中该酰基转移酶选自甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)、甘油磷脂酰基转移酶(GPLAT)和二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)。

[1236] 58.根据实施方案55-57中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物进一步包含至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该酰基转移酶优选储存≤C_{18}脂肪酰基-CoA,且其中该酰基转移酶选自表5b。

[1237] 59.根据实施方案55-58中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物进一步包含至少一种编码酰基甘油脂肪酶的内源或外源核酸分子,该酰基甘油脂肪酶优选水解>C16、>C14、>C12或>C10酰基甘油底物的酯键。

[1238] 60.根据实施方案55-59中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物进一步包含至少一种编码酰基甘油脂肪酶的内源或外源核酸分子,该酰基甘油脂肪酶优选水解>C16、>C14、>C12或>C10酰基甘油底物的酯键,且其中该酰基甘油脂肪酶选自表5c。

[1239] 61.根据实施方案55-60中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酶催化与用于产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的生物合成途径竞争的途径中的反应。

[1240] 62.根据实施方案55-61中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物包含选自下列的一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:

[1241] (i)一种或多种酰基-CoA氧化酶;

[1242] (ii)一种或多种酰基转移酶;

[1243] (iii)一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶;

[1244] (iv)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶;

[1245] (v)一种或多种(脂肪)醇氧化酶;和

[1246] (vi)一种或多种细胞色素P450单加氧酶。

[1247] 63.根据实施方案55-62中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物包含一种或多种内源酰基-CoA氧化酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酰基-CoA氧化酶选自解脂耶氏酵母(Y.lipolytica)POX1(YALI0E32835g)、解脂耶氏酵母POX2(YALI0F10857g)、解脂耶氏酵母POX3(YALI0D24750g)、解脂耶氏酵母POX4(YALI0E27654g)、解脂耶氏酵母POX5(YALI0C23859g)、解脂耶氏酵母POX6(YALI0E06567g);酿酒酵母(S.cerevisiae)POX1(YGL205W);假丝酵母属(Candida)POX2(CaO19.1655、CaO19.9224、CTRG_02374、M18259)、假丝酵母属POX4(CaO19.1652、CaO19.9221、CTRG_02377、M12160)和假丝酵母属POX5(CaO19.5723、CaO19.13146、CTRG_02721、M12161)。

[1248] 64.根据实施方案55-63中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物包含一种或多种内源酰基转移酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酰基转移酶选自解脂耶氏酵母YALI0C00209g、解脂耶氏酵母YALI0E18964g、解脂耶氏酵母YALI0F19514g、解脂耶氏酵母YALI0C14014g、解脂耶氏酵母YALI0E16797g、解脂耶氏酵母YALI0E32769g和解脂耶氏酵母YALI0D07986g,酿酒酵母YBL011w、酿酒酵母YDL052c、酿酒酵母YOR175C、酿酒酵母YPR139C、酿酒酵母YNR008w和酿酒酵母YOR245c,和假丝酵母属I503_02577、假丝酵母属CTRG_02630、假丝酵母属CaO19.250、假丝酵母属CaO19.7881、假丝酵母属CTRG_02437、假丝酵母属CaO19.1881、假丝酵母属CaO19.9437、假丝酵母属CTRG_01687、假丝酵母属CaO19.1043、假丝酵母属CaO19.8645、假丝酵母属CTRG_04750、假丝酵母属CaO19.13439、假丝酵母属CTRG_04390、假丝酵母属CaO19.6941、假丝酵母属CaO19.14203和假丝酵母属CTRG_06209。

[1249] 65.根据实施方案55-64中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物包含一种或多种内源酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酰基甘油脂酶和/或甾醇酯酯酶选自解脂耶氏酵母YALI0E32035g、解脂耶氏酵母YALI0D17534g、解脂耶氏酵母YALI0F10010g、解脂耶氏酵母YALI0C14520g和解脂耶氏酵母YALI0E00528g,酿酒酵母YKL140w、酿酒酵母YMR313c、酿酒酵母YKR089c、酿酒酵母YOR081c、酿酒酵母YKL094W、酿酒酵母YLL012W和酿酒酵母YLR020C,和假丝酵母属CaO19.2050、假丝酵母属CaO19.9598、假丝酵母属CTRG_01138、假丝酵母属W5Q_03398、假丝酵母属CTRG_00057、假丝酵母属CaO19.5426、假丝酵母属CaO19.12881、假丝酵母属CTRG_06185、假丝酵母属CaO19.4864、假丝酵母属CaO19.12328、假丝酵母属CTRG_03360、假丝酵母属CaO19.6501、假丝酵母属CaO19.13854、假丝酵母属CTRG_05049、假丝酵母属CaO19.1887、假丝酵母属CaO19.9443、假丝酵母属CTRG_01683和假丝酵母属CTRG_04630。

[1250] 66.根据实施方案55-65中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物包含一种或多种内源细胞色素P450单加氧酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源细胞色素P450单加氧酶选自解脂耶氏酵母YALI0E25982g(ALK1)、解脂耶氏酵母YALI0F01320g(ALK2)、解脂耶氏酵母YALI0E23474g(ALK3)、解脂耶氏酵母YALI0B13816g(ALK4)、解脂耶氏酵母YALI0B13838g(ALK5)、解脂耶氏酵母YALI0B01848g(ALK6)、解脂耶氏酵母YALI0A15488g(ALK7)、解脂耶氏酵母YALI0C12122g(ALK8)、解脂耶氏酵母YALI0B06248g(ALK9)、解脂耶氏酵母YALI0B20702g(ALK10)、解脂耶氏酵母YALI0C10054g(ALK11)和解脂耶氏酵母YALI0A20130g(ALK12)。

[1251] 67.根据实施方案55-66中任一项所述的重组微生物,其中该脂肪酰基去饱和酶选自红带卷蛾(Argyrotaenia velutinana)、斜纹夜蛾(Spodoptera litura)、水稻大螟(Sesamia inferens)、烟草天蛾(Manduca sexta)、欧洲玉米螟(Ostrinia nubilalis)、玉米穗蛾(Helicoverpa zea)、蔷薇斜条卷叶蛾(Choristoneura rosaceana)、黑腹果蝇(Drosophila melanogaster)、海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)、红醋栗穿孔蛾(Lampronia capitella)、脐橙螟蛾(*Amyelois transitella*)、粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)、黄地老虎(*Agrotis segetum*)、亚洲玉米螟(Ostrinia furnicalis)和假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana)衍生的脂肪酰基去饱和酶。

[1252] 68.根据实施方案55-67中任一项所述的重组微生物,其中该脂肪酰基去饱和酶与选自SEQ ID NO:39、49-54、58-63、78-80和GenBank登录号AF416738、AGH12217.1、AII21943.1、CAJ43430.2、AF441221,AAF81787.1、AF545481、AJ271414、AY362879、ABX71630.1、NP001299594.1、Q9N9Z8、ABX71630.1和AIM40221.1的脂肪酰基去饱和酶具有至少95%序列同一性。

[1253] 69.根据实施方案55-68中任一项所述的重组微生物,其中该酰基-CoA氧化酶选自表5a。

[1254] 70.根据实施方案55-69中任一项所述的重组微生物,其中该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶选自黄地老虎(Agrotis segetum)、甜菜夜蛾(Spodoptera exigua)、斜纹夜蛾(*Spodoptera*littoralis)、薄肌眼虫(Euglena gracilis)、稠李巢蛾(Yponomeuta evonymellus)和棉铃虫(Helicoverpa armigera)衍生的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶。

[1255] 71.根据实施方案55-70中任一项所述的重组微生物,其中该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶与选自SEQ ID NO:1-3、32、41-48、55-57、73、75、77和82的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有至少95%序列同一性。

[1256] 72.根据实施方案55-71中任一项所述的重组微生物,其中该脂肪酰基去饱和酶催化脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和中间体,该单或多不饱和中间体选自E5-10:酰基-CoA、E7-12:酰基-CoA、E9-14:酰基-CoA、E11-16:酰基-CoA、E13-18:酰基-CoA、Z7-12:酰基-CoA、Z9-14:酰基-CoA、Z11-16:酰基-CoA、Z13-18:酰基-CoA、Z8-12:酰基-CoA、Z10-14:酰基-CoA、Z12-16:酰基-CoA、Z14-18:酰基-CoA、Z7-10:酰基-coA、Z9-12:酰基-CoA、Z11-14:酰基-CoA、Z13-16:酰基-CoA、Z15-18:酰基-CoA、E7-10:酰基-CoA、E9-12:酰基-CoA、E11-14:酰基-CoA、E13-16:酰基-CoA、E15-18:酰基-CoA、E5Z7-12:酰基-CoA、E7Z9-12:酰基-CoA、E9Z11-14:酰基-CoA、E11Z13-16:酰基-CoA、E13Z15-18:酰基-CoA、E6E8-10:酰基-CoA、E8E10-12:酰基-CoA、E10E12-14:酰基-CoA、E12E14-16:酰基-CoA、Z5E8-10:酰基-CoA、Z7E10-12:酰基-CoA、Z9E12-14:酰基-CoA、Z11E14-16:酰基-CoA、Z13E16-18:酰基-CoA、Z3-10:酰基-CoA、Z5-12:酰基-CoA、Z7-14:酰基-CoA、Z9-16:酰基-CoA、Z11-18:酰基-CoA、Z3Z5-10:酰基-CoA、Z5Z7-12:酰基-CoA、Z7Z9-14:酰基-CoA、Z9Z11-16:酰基-CoA、Z11Z13-16:酰基-CoA和Z13Z15-18:酰基-CoA。

[1257] 73.根据实施方案55-72中任一项所述的重组微生物,其中该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇选自E5-10:OH、Z8-12:OH、Z9-12:OH、Z11-14:OH、Z11-16:OH、E11-14:OH、E8E10-12:OH、E7Z9-12:OH、Z11Z13-16OH、Z9-14:OH、Z9-16:OH和Z13-18:OH。

[1258] 74.根据实施方案55-73中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物进一步包含至少一种编码形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶的内源或外源核酸分子,该形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。

[1259] 75.根据实施方案74所述的重组微生物,其中该形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶选自醋酸钙不动杆菌(Acinetobacter calcoaceticus)A0A1C4HN78、醋酸钙不动杆菌N9DA85、醋酸钙不动杆菌R8XW24、醋酸钙不动杆菌A0A1A0GGM5、醋酸钙不动杆菌A0A117N158和点状念珠藻(Nostoc punctiforme)YP_001865324。

[1260] 76.根据实施方案55-75中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物进一步包含至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。

[1261] 77.根据实施方案55-76中任一项所述的重组微生物,其中该≤C_{18}脂肪醛选自Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[1262] 78.根据实施方案55-77中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物进一步包含至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。

[1263] 79.根据实施方案78所述的重组微生物,其中该乙酰基转移酶选自表5d。

[1264] 80.根据实施方案78所述的重组微生物,其中该≤C_{18}脂肪乙酸酯选自E5-10:Ac、Z7-12:Ac、Z8-12:Ac、Z9-12:Ac、E7Z9-12:Ac、Z9-14:Ac、Z9E12-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac和Z11-16:Ac。

[1265] 81.根据实施方案55-80中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物进一步包

含:

[1266] 至少一种编码选自醇氧化酶、醇脱氢酶和形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶的酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶、醇脱氢酶和形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛;和

[1267] 至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。

[1268] 82.根据实施方案81所述的重组微生物,其中该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醛和≤C_{18}脂肪乙酸酯选自E5-10:Ac、Z7-12:Ac、Z8-12:Ac、Z9-12:Ac、E7Z9-12:Ac、Z9-14:Ac、Z9E12-14:Ac、E11-14:Ac、Z11-14:Ac、Z11-16:Ac、Z9-16:Ac、Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[1269] 83.根据实施方案55-82中任一项所述的重组微生物,其中该重组微生物是选自解脂耶氏酵母、酿酒酵母、白假丝酵母(Candida albicans)和维斯假丝酵母(Candida viswanathii)的酵母。

[1270] 84.一种从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的方法,该方法包括:在含有原料的培养基中培养实施方案55-83中任一项所述的重组微生物,该原料提供足以产生该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的碳源。

[1271] 85.根据实施方案84所述的方法,其中该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇选自E5-10:OH、Z8-12:OH、Z9-12:OH、Z11-14:OH、Z11-16:OH、E11-14:OH、E8E10-12:OH、E7Z9-12:OH、Z11Z13-16OH、Z9-14:OH、Z9-16:OH和Z13-18:OH。

[1272] 86.根据实施方案84-85中任一项所述的方法,其进一步包括回收该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的步骤。

[1273] 87.根据实施方案86所述的方法,其中所述回收步骤包括蒸馏。

[1274] 88.根据实施方案86所述的方法,其中所述回收步骤包括基于膜的分离。

[1275] 89.一种工程化能够从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的微生物的方法,其中该方法包括将下列引入至微生物中:

[1276] (a)至少一种编码脂肪酰基去饱和酶的外源核酸分子,该脂肪酰基去饱和酶催化饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为相应的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA;

[1277] (b)至少一种编码酰基-CoA氧化酶的外源核酸分子,该酰基-CoA氧化酶在一个或多个连续的酰基-CoA氧化酶活性循环后,催化来自(a)的单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和≤C_{18}脂肪酰基-CoA,其中指定循环产生相对于此循环中的起始单或多不饱和C_6-C_{24}脂肪酰基-CoA底物具有两个碳截短的单或多不饱和C_4-C_{22}脂肪酰基-CoA中间体;和

[1278] (c)至少一种编码形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶的外源核酸分子,该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶催化来自(b)的单或多不饱和≤C_{18}脂肪酰基-CoA转化为该相应的单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇。

[1279] 90.根据实施方案89所述的方法,其中该微生物为MATA ura3-302::SUC2Δpox1Δpox2Δpox3Δpox4Δpox5Δpox6Δfadh1Δadh2Δadh3Δadh4Δadh5Δadh6Δadh7Δfao1::URA3。

[1280] 91.根据实施方案89-90中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将至少一种

编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子引入至该微生物中,该酰基转移酶优选储存≤C_{18}脂肪酰基-CoA。

[1281] 92.根据实施方案89-91中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子引入至该微生物中,该酰基转移酶优选储存≤C_{18}脂肪酰基-CoA,且其中该酰基转移酶选自甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)、甘油磷脂酰基转移酶(GPLAT)和二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)。

[1282] 93.根据实施方案89-92中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将至少一种编码酰基转移酶的内源或外源核酸分子引入至该微生物中,该酰基转移酶优选储存≤C_{18}脂肪酰基-CoA,且其中该酰基转移酶选自表5b。

[1283] 94.根据实施方案89-93中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将至少一种编码酰基甘油脂肪酶的内源或外源核酸分子引入至该微生物中,该酰基甘油脂肪酶优选水解>C16、>C14、>C12或>C10酰基甘油底物的酯键。

[1284] 95.根据实施方案89-94中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将至少一种编码酰基甘油脂酶的内源或外源核酸分子引入至该微生物中,该酰基甘油脂酶优选水解>C16、>C14、>C12或>C10酰基甘油底物的酯键,且其中该酰基甘油脂肪酶选自表5c。

[1285] 96.根据实施方案89-95中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将一种或多种修饰引入至该微生物中,该修饰包含一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酶催化与用于产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇的生物合成途径竞争的途径中的反应。

[1286] 97.根据实施方案89-96中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将一种或多种修饰引入至该微生物中,该修饰包含选自下列的一种或多种内源酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低:

[1287] (i)一种或多种酰基-CoA氧化酶;

[1288] (ii)一种或多种酰基转移酶;

[1289] (iii)一种或多种酰基甘油脂肪酶和/或甾醇酯酯酶;

[1290] (iv)一种或多种(脂肪)醇脱氢酶;

[1291] (v)一种或多种(脂肪)醇氧化酶;和

[1292] (vi)一种或多种细胞色素P450单加氧酶。

[1293] 98.根据实施方案89-97中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括一种或多种修饰引入至该微生物中,该修饰包含一种或多种内源酰基-CoA氧化酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酰基-CoA氧化酶选自解脂耶氏酵母POX1(YALI0E32835g)、解脂耶氏酵母POX2(YALI0F10857g)、解脂耶氏酵母POX3(YALI0D24750g)、解脂耶氏酵母POX4(YALI0E27654g)、解脂耶氏酵母POX5(YALI0C23859g)、解脂耶氏酵母POX6(YALI0E06567g);酿酒酵母POX1(YGL205W);假丝酵母属POX2(Ca019.1655、Ca019.9224、CTRG_02374、M18259)、假丝酵母属POX4(Ca019.1652、Ca019.9221、CTRG_02377、M12160)和假丝酵母属POX5(Ca019.5723、Ca019.13146、CTRG_02721、M12161)。

[1294] 99.根据实施方案89-98中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括一种或多种修饰引入至该微生物中,该修饰包含一种或多种内源酰基转移酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低,该内源酰基转移酶选自解脂耶氏酵母YALI0C00209g、解脂耶氏酵母

YALI0E18964g、解脂耶氏酵母YALI0F19514g、解脂耶氏酵母YALI0C14014g、解脂耶氏酵母YALI0E16797g、解脂耶氏酵母YALI0E32769g和解脂耶氏酵母YALI0D07986g，酿酒酵母YBL011w、酿酒酵母YDL052c、酿酒酵母YOR175C、酿酒酵母YPR139C、酿酒酵母YNR008w和酿酒酵母YOR245c，和假丝酵母属I503_02577、假丝酵母属CTRG_02630、假丝酵母属Ca019.250、假丝酵母属Ca019.7881、假丝酵母属CTRG_02437、假丝酵母属Ca019.1881、假丝酵母属Ca019.9437、假丝酵母属CTRG_01687、假丝酵母属Ca019.1043、假丝酵母属Ca019.8645、假丝酵母属CTRG_04750、假丝酵母属Ca019.13439、假丝酵母属CTRG_04390、假丝酵母属Ca019.6941、假丝酵母属Ca019.14203和假丝酵母属CTRG_06209。

[1295] 100.根据实施方案89-99中任一项所述的方法，其中该方法进一步包括将一种或多种修饰引入至该微生物中，该修饰包含一种或多种内源酰基甘油脂酶和/或甾醇酯酯酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低，该内源酰基甘油脂酶和/或甾醇酯酯酶选自解脂耶氏酵母YALI0E32035g、解脂耶氏酵母YALI0D17534g、解脂耶氏酵母YALI0F10010g、解脂耶氏酵母YALI0C14520g和解脂耶氏酵母YALI0E00528g，酿酒酵母YKL140w、酿酒酵母YMR313c、酿酒酵母YKR089c、酿酒酵母YOR081c、酿酒酵母YKL094W、酿酒酵母YLL012W和酿酒酵母YLR020C，和假丝酵母属Ca019.2050、假丝酵母属Ca019.9598、假丝酵母属CTRG_01138、假丝酵母属W5Q_03398、假丝酵母属CTRG_00057、假丝酵母属Ca019.5426、假丝酵母属Ca019.12881、假丝酵母属CTRG_06185、假丝酵母属Ca019.4864、假丝酵母属Ca019.12328、假丝酵母属CTRG_03360、假丝酵母属Ca019.6501、假丝酵母属Ca019.13854、假丝酵母属CTRG_05049、假丝酵母属Ca019.1887、假丝酵母属Ca019.9443、假丝酵母属CTRG_01683和假丝酵母属CTRG_04630。

[1296] 101.根据实施方案89-100中任一项所述的方法，其中该方法进一步包括一种或多种修饰，该修饰包含一种或多种内源细胞色素P450单加氧酶的缺失、破坏、突变和/或活性的降低，该细胞色素P450单加氧酶选自解脂耶氏酵母YALI0E25982g(ALK1)、解脂耶氏酵母YALI0F01320g(ALK2)、解脂耶氏酵母YALI0E23474g(ALK3)、解脂耶氏酵母YALI0B13816g(ALK4)、解脂耶氏酵母YALI0B13838g(ALK5)、解脂耶氏酵母YALI0B01848g(ALK6)、解脂耶氏酵母YALI0A15488g(ALK7)、解脂耶氏酵母YALI0C12122g(ALK8)、解脂耶氏酵母YALI0B06248g(ALK9)、解脂耶氏酵母YALI0B20702g(ALK10)、解脂耶氏酵母YALI0C10054g(ALK11)和解脂耶氏酵母YALI0A20130g(ALK12)。

[1297] 102.根据实施方案89-101中任一项所述的方法，其中该脂肪酰基去饱和酶选自红带卷蛾、斜纹夜蛾、水稻大螟、烟草天蛾、欧洲玉米螟、玉米穗蛾、蔷薇斜条卷叶蛾、黑腹果蝇、海灰翅夜蛾、红醋栗穿孔蛾、脐橙螟蛾、粉纹夜蛾、黄地老虎、亚洲玉米螟和假微型海链藻衍生的脂肪酰基去饱和酶。

[1298] 103.根据实施方案89-102中任一项所述的方法，其中该脂肪酰基去饱和酶与选自SEQ ID NO:39、49-54、58-63，和GenBank登录号AF416738、AGH12217.1、AII21943.1、CAJ43430.2、AF441221、AAF81787.1、AF545481、AJ271414、AY362879、ABX71630.1、NP001299594.1、Q9N9Z8，ABX71630.1和AIM40221.1的脂肪酰基去饱和酶具有至少95％序列同一性。

[1299] 104.根据实施方案89-103中任一项所述的方法，其中该酰基-CoA氧化酶选自表5a。

[1300] 105.根据实施方案89-104中任一项所述的方法,其中该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶选自黄地老虎、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、薄肌眼虫、稠李巢蛾和棉铃虫衍生的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶。

[1301] 106.根据实施方案89-105中任一项所述的方法,其中该形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶与选自SEQ ID NO:1-3、32、41-48、55-57、73、75、77和82的形成脂肪醇的脂肪酰基还原酶具有至少90%序列同一性。

[1302] 107.根据实施方案89-106中任一项所述的方法,其中该脂肪酰基去饱和酶催化脂肪酰基-CoA转化为单或多不饱和中间体,该单或多不饱和中间体选自E5-10:酰基-CoA、E7-12:酰基-CoA、E9-14:酰基-CoA、E11-16:酰基-CoA、E13-18:酰基-CoA、Z7-12:酰基-CoA、Z9-14:酰基-CoA、Z11-16:酰基-CoA、Z13-18:酰基-CoA、Z8-12:酰基-CoA、Z10-14:酰基-CoA、Z12-16:酰基-CoA、Z14-18:酰基-CoA、Z7-10:酰基-coA、Z9-12:酰基-CoA、Z11-14:酰基-CoA、Z13-16:酰基-CoA、Z15-18:酰基-CoA、E7-10:酰基-CoA、E9-12:酰基-CoA、E11-14:酰基-CoA、E13-16:酰基-CoA、E15-18:酰基-CoA、E5Z7-12:酰基-CoA、E7Z9-12:酰基-CoA、E9Z11-14:酰基-CoA、E11Z13-16:酰基-CoA、E13Z15-18:酰基-CoA、E6E8-10:酰基-CoA、E8E10-12:酰基-CoA、E10E12-14:酰基-CoA、E12E14-16:酰基-CoA、Z5E8-10:酰基-CoA、Z7E10-12:酰基-CoA、Z9E12-14:酰基-CoA、Z11E14-16:酰基-CoA、Z13E16-18:酰基-CoA、Z3-10:酰基-CoA、Z5-12:酰基-CoA、Z7-14:酰基-CoA、Z9-16:酰基-CoA、Z11-18:酰基-CoA、Z3Z5-10:酰基-CoA、Z5Z7-12:酰基-CoA、Z7Z9-14:酰基-CoA、Z9Z11-16:酰基-CoA、Z11Z13-16:酰基-CoA和Z13Z15-18:酰基-CoA。

[1303] 108.根据实施方案89-107中任一项所述的方法,其中该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇选自E5-10:OH、Z8-12:OH、Z9-12:OH、Z11-14:OH、Z11-16:OH、E11-14:OH、E8E10-12:OH、E7Z9-12:OH、Z11Z13-16OH、Z9-14:OH、Z9-16:OH和Z13-18:OH。

[1304] 109.根据实施方案89-108中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将至少一种编码形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶的内源或外源核酸分子引入至该微生物中,该形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。

[1305] 110.根据实施方案109所述的方法,其中该形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶选自醋酸钙不动杆菌A0A1C4HN78、醋酸钙不动杆菌N9DA85、醋酸钙不动杆菌R8XW24、醋酸钙不动杆菌A0A1A0GGM5、醋酸钙不动杆菌A0A117N158和点状念珠藻YP_001865324。

[1306] 111.根据实施方案89-110中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将至少一种编码醇氧化酶或醇脱氢酶的内源或外源核酸分子引入至该微生物中,该醇氧化酶或醇脱氢酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。

[1307] 112.根据实施方案109-111中任一项所述的方法,其中该≤C_{18}脂肪醛选自Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[1308] 113.根据实施方案89-112中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子引入至该微生物中,该乙酰基转移酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。

[1309] 114.根据实施方案113所述的方法,其中该乙酰基转移酶选自表5d。

[1310] 115.根据实施方案113-114中任一项所述的方法,其中该≤C_{18}脂肪乙酸酯选自E5-10:Ac、Z7-12:Ac、Z8-12:Ac、Z9-12:Ac、E7Z9-12:Ac、Z9-14:Ac、Z9E12-14:Ac、E11-14:Ac、

Z9-16:Ac、Z11-14:Ac和Z11-16:Ac。

[1311] 116.根据实施方案89-115中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括将下列引入至该微生物中:

[1312] 至少一种编码选自醇氧化酶、醇脱氢酶和形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶的酶的内源或外源核酸分子,该醇氧化酶、醇脱氢酶和形成醛的脂肪酰基-CoA还原酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛;和

[1313] 至少一种编码乙酰基转移酶的内源或外源核酸分子,该乙酰基转移酶能够催化该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。

[1314] 117.根据实施方案116所述的方法,其中该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醛和≤C_{18}脂肪乙酸酯选自E5-10:Ac、Z7-12:Ac、Z8-12:Ac、Z9-12:Ac、E7Z9-12:Ac、Z9-14:Ac、Z9E12-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z11-16:Ac、Z9-16:Ald、Z9-16:Ac、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[1315] 118.一种从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪醛的方法,其包括:在含有原料的培养基中培养实施方案74-76中任一项所述的重组微生物,该原料提供足以产生该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醛的碳源。

[1316] 119.根据实施方案118所述的方法,其中该≤C_{18}脂肪醛选自Z9-16:Ald、Z11-16:Ald、Z11Z13-16:Ald和Z13-18:Ald。

[1317] 120.根据实施方案118-119中任一项所述的方法,其进一步包括回收该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醛的步骤。

[1318] 121.根据实施方案120所述的方法,其中所述回收步骤包括蒸馏。

[1319] 122.根据实施方案120所述的方法,所述回收步骤包括基于膜的分离。

[1320] 123.一种从内源或外源来源的饱和C_6-C_{24}脂肪酸产生单或多不饱和≤C_{18}脂肪乙酸酯的方法,其包括:在含有原料的培养基中培养实施方案78-80中任一项所述的重组微生物,该原料提供足以产生该单或多不饱和≤C_{18}脂肪乙酸酯的碳源。

[1321] 124.根据实施方案123所述的方法,其中该单或多不饱和≤C_{18}脂肪乙酸酯选自E5-10:Ac、Z7-12:Ac、Z8-12:Ac、Z9-12:Ac、E7Z9-12:Ac、Z9-14:Ac、Z9E12-14:Ac、Z11-14:Ac、E11-14:Ac、Z9-16:Ac和Z11-16:Ac。

[1322] 125.根据实施方案123-124中任一项所述的方法,其进一步包括回收该单或多不饱和≤C_{18}脂肪乙酸酯的步骤。

[1323] 126.根据实施方案125所述的方法,其中所述回收步骤包括蒸馏。

[1324] 127.根据实施方案125所述的方法,其中所述回收步骤包括基于膜的分离。

[1325] 128.根据实施方案89-115中任一项所述的方法,其中该重组微生物是选自解脂耶氏酵母、酿酒酵母、白假丝酵母和维斯假丝酵母的酵母。

[1326] 129.根据实施方案89-115中任一项所述的方法,其中使用化学方法将该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪醛。

[1327] 130.根据实施方案129所述的方法,其中该化学方法选自TEMPO-漂白、TEMPO-铜-空气、TEMPO-PhI(OAc)$_2$、斯文(Swern)氧化和贵金属-空气。

[1328] 131.根据实施方案89-115中任一项所述的方法,其中使用化学方法该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇转化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。

[1329] 132.根据实施方案131所述的方法,其中该化学方法在4-N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP)或乙酸钠的存在下利用选自乙酰氯、乙酸酐、丁酰氯、丁酸酐、丙酰氯和丙酸酐的化学剂将该单或多不饱和≤C_{18}脂肪醇酯化为相应的≤C_{18}脂肪乙酸酯。

[0001] 序列表

[0002] <110> Provivi, Inc.

[0003] Sheppard, Micah

[0004] Heel, Thomas

[0005] Meinhold, Peter

[0006] Wampler, Keith

[0007] Coelho, Pedro

[0008] Leonard, Effendi

[0009] <120> 用于产生昆虫信息素和相关化合物的微生物

[0010] <130> PRVI-020/01WO 321611-2044

[0011] <150> US 62/507,654

[0012] <151> 2017-05-17

[0013] <160> 105

[0014] <170> PatentIn版本3.5

[0015] <210> 1

[0016] <211> 1377

[0017] <212> DNA

[0018] <213> 人工序列

[0019] <220>

[0020] <223> 黄地老虎FAR 酿酒酵母密码子优化的

[0021] <400> 1

[0022] atgccagttt tgacttctag agaagatgaa aagttgtcag ttccagaatt ttacgctggt 60

[0023] aaatctatct tcgttacagg tggtactggt ttcttgggta aagtttttat tgaaaagttg 120

[0024] ttgtactgtt gtccagatat tgataaaatc tatatgttaa ttagagaaaa gaaaaatttg 180

[0025] tctattgatg aaagaatgtc aaagttcttg gatgatccat tattttctag attgaaggaa 240

[0026] gaaagacctg gtgacttgga aaagattgtt ttgattccag gtgacattac agctccaaat 300

[0027] ttgggtttat cagcagaaaa cgaaagaatt ttgttagaaa aagtttctgt tattattaat 360

[0028] tcagctgcaa ctgttaagtt taatgaacca ttgccaatcg cttggaagat taatgttgaa 420

[0029] ggtacaagaa tgttgttggc attgtctaga agaatgaaga gaatcgaagt ttttattcat 480

[0030] atttctactg cttactcaaa tgcatcttca gatagaatcg ttgttgatga aatcttgtat 540

[0031] ccagctccag cagatatgga tcaagtttac caattggtta aagatggtgt tacagaagaa 600

[0032] gaaactgaaa gattgttgaa cggtttgcca aacacttaca cttttactaa ggctttgaca 660

[0033] gaacatttgg ttgcagaaca tcaaacatac gttccaacta tcatcatcag accatctgtt 720

[0034] gttgcttcaa ttaaagatga accaatcaga ggttggttat gtaattggtt tggtgctaca 780

[0035] ggtatctctg tttttactgc aaagggtttg aacagagttt tgttgggtaa agcttcaaac 840

[0036] atcgttgatg ttatcccagt tgattacgtt gcaaatttgg ttattgttgc tggtgcaaaa 900

[0037] tctggtggtc aaaaatcaga tgaattaaag atctataact gttgttcttc agattgtaac 960

[0038] ccagttactt tgaagaaaat tattaaagag tttactgaag atactattaa aaataagtct 1020

[0039] catattatgc cattgccagg ttggttcgtt tttactaagt acaagtggtt gttgacattg 1080

[0040] ttaactatta tttttcaaat gttaccaatg tatttggctg atgtttacag agttttgaca 1140

[0041] ggtaaaatcc caagatacat gaagttgcat catttggtta ttcaaacaag attgggtatc 1200

[0042] gatttcttta cttctcattc atgggttatg aagacagata gagttagaga attattcggt 1260

[0043] tctttgtcat tggcagaaaa gcatatgttt ccatgtgatc catcttcaat cgattggaca 1320

[0044] gattatttgc aatcatactg ttacggtgtt agaagatttt tggaaaagaa gaaataa 1377

[0045] <210> 2

[0046] <211> 1365

[0047] <212> DNA

[0048] <213> 人工序列

[0049] <220>

[0050] <223> 海灰翅夜蛾FAR1 酿酒酵母密码子优化的

[0051] <400> 2

[0052] atggttgttt tgacttcaaa ggaaaaatca aacatgtctg ttgctgattt ctacgctggt 60

[0053] aaatctgttt ttattacagg tggtactggt ttcttgggta aagtttttat tgaaaagttg 120

[0054] ttgtactcat gtccagatat tgataaaatc tatatgttga tcagagaaaa gaaaggtcaa 180

[0055] tctatcagag aaagattaac taaaattgtt gatgatccat tgtttaatag attgaaggat 240

[0056] aagagaccag atgatttggg taaaatcgtt ttgatcccag gtgacatcac agttccaggt 300

[0057] ttgggtattt ctgaagaaaa cgaaacaatc ttgactgaaa aagtttcagt tgttattcat 360

[0058] tctgctgcaa ctgttaagtt taatgaacca ttggctactg catggaacgt taacgttgaa 420

[0059] ggtacaagaa tgatcatggc attatcaaga agaatgaaga gaatcgaagt ttttattcat 480

[0060] atttctactg cttacactaa cacaaacaga gcagttattg atgaagtttt gtatccacca 540

[0061] ccagctgata tcaacgatgt tcatcaacat gttaaaaatg gtgttacaga agaagaaact 600

[0062] gaaaagattt tgaacggtag accaaacact tacactttta ctaaggcttt gactgaacat 660

[0063] ttggttgcag aaaaccaatc atacatgcca acaatcattg ttagaccatc tattgttggt 720

[0064] gctattaaag atgatccaat tagaggttgg ttggctaatt ggtatggtgc aacaggtttg 780

[0065] tcagttttta ctgcaaaggg tttgaacaga gttatatatg gtcattctaa ccatgttgtt 840

[0066] gatttgattc cagttgatta cgttgctaat ttggttattg ttgctggtgc aaagacatac 900

[0067] cattcaaacg aagttactat ctataactct tgttcttcat cttgtaaccc aatcactatg 960

[0068] aagagattgg ttggtttgtt tattgattac acagttaagc ataagtcata cgttatgcca 1020

[0069] ttgccaggtt ggtatgttta ctctaactac aagtggttgg ttttcttggt tactgttatt 1080

[0070] ttccaagtta ttccagctta cttaggtgac attggtagaa gattgttagg taaaaatcca 1140

[0071] agatactaca agttgcaaaa tttggttgct caaacacaag aagcagttca tttctttaca 1200

[0072] tcacatactt gggaaattaa atcaaagaga acttctgaat tgttttcatc tttgtctttg 1260

[0073] acagatcaaa gaatgtttcc atgtgatgct aacagaatcg attggacaga ttacatcact 1320

[0074] gattactgtt ctggtgttag acaatttttg gaaaagatta aataa 1365

[0075] <210> 3

[0076] <211> 1368

[0077] <212> DNA

[0078] <213> 人工序列

[0079] <220>

[0080] <223> 棉铃虫FAR3 酿酒酵母密码子优化的

[0081] <400> 3

[0082] atggttgttt tgacttcaaa ggaaacaaag ccatctgttg ctgaatttta cgctggtaaa 60

[0083] tcagttttta ttacaggtgg tactggtttc ttgggtaaag tttttattga aaagttgttg 120

[0084] tactcttgtc cagatattga aaatatctat atgttgatca gagaaaagaa aggtttgtca 180
[0085] gtttctgaaa gaattaaaca atttttagat gatccattgt ttacaagatt gaaggataag 240
[0086] agaccagctg atttggaaaa gattgttttg atcccaggtg acatcactgc accagatttg 300
[0087] ggtattaatt ctgaaaacga aaagatgttg attgaaaaag tttcagttat tattcattct 360
[0088] gctgcaactg ttaagtttaa tgaaccatta ccaacagctt ggaagattaa tgttgaaggt 420
[0089] actagaatga tgttggcatt gtcaagaaga atgaagagaa tcgaagtttt tattcatatt 480
[0090] tctacagctt acactaacac aaacagagaa gttgttgatg aaatcttgta tccagctcca 540
[0091] gcagatatcg atcaagttca tcaatacgtt aaggatggta tctcagaaga agatactgaa 600
[0092] aagattttga acggtagacc aaacacttac acttttacta aggctttgac agaacatttg 660
[0093] gttgctgaaa atcaagcata cgttccaact attattgtta gaccatctgt tgttgctgca 720
[0094] attaaagatg aaccattgaa aggttggttg ggtaattggt ttggtgctac aggtttgact 780
[0095] gtttttacag caaagggttt gaacagagtt atatatggtc attcttcata catcgttgat 840
[0096] ttgatcccag ttgattacgt tgctaatttg gttattgctg caggtgcaaa atcttcaaag 900
[0097] tcaacagaat tgaaggttta caactgttgt tcttcatctt gtaacccagt tactatcggt 960
[0098] acattgatgt caatgttcgc tgatgatgca attaaacaaa aatcttacgc tatgccattg 1020
[0099] ccaggttggt acatttttac aaagtacaag tggttggttt tgttgttgac atttttgttc 1080
[0100] caagttattc cagcatacgt tactgatttg tcaagacatt tgatcggtaa atctccaaga 1140
[0101] tacatcaagt tgcaatcatt ggttaaccaa actagatcat ctatcgattt ctttacaaac 1200
[0102] cattcttggg ttatgaaagc tgatagagtt agagaattgt acgcttcatt gtctccagct 1260
[0103] gataagtact tattcccatg tgatccaact gatatcaact ggacacatta catccaagat 1320
[0104] tactgttggg gtgttagaca tttcttggaa aagaaatctt acgaataa 1368
[0105] <210> 4
[0106] <211> 1199
[0107] <212> DNA
[0108] <213> 人工序列
[0109] <220>
[0110] <223> pOLE1盒
[0111] <400> 4
[0112] cttgctgaaa agatgatgtt ctgaggtatt cgtatcgcta gcttgatacg cttttaacaa 60
[0113] aagtaagctt ttcgtttgca ggtttggtta cttttctgta cgagatgata tcgctaagtt 120
[0114] tatagtcatc tgtgaaattt ctcaaaaacc tcatggtttc tccatcaccc atttttcatt 180
[0115] tcatttgccg ggcggaaaaa aaaaaggaaa aaaaaaaaaa aaaaaaataa atgacacatg 240
[0116] gaaataagtc aaggattagc ggatatgtag ttccagtccg ggttatacca tcacgtgata 300
[0117] ataaatccaa atgagaatga gggtgtcata tctaatcatt atgcacgtca agattctccg 360
[0118] tgactatggc tcttttctga agcatttttc gggcgcccgg tggccaaaaa ctaactccga 420
[0119] gcccgggcat gtcccggggt tagcgggccc aacaaaggcg cttatctggt gggcttccgt 480
[0120] agaagaaaaa aagctgttga gcgagctatt tcgggtatcc cagccttctc tgcagaccgc 540
[0121] cccagttggc ttggctctgg tgctgttcgt tagcatcaca tcgcctgtga caggcagagg 600
[0122] taataacggc ttaaggttct cttcgcatag tcggcagctt tctttcggac gttgaacact 660
[0123] caacaaacct tatctagtgc ccaaccaggt gtgcttctac gagtcttgct cactcagaca 720
[0124] cacctatccc tattgttacg gctatgggga tggcacacaa aggtggaaat aatagtagtt 780
[0125] aacaatatat gcagcaaatc atcggctcct ggctcatcga gtcttgcaaa tcagcatata 840

[0126] catatatata tgggggcaga tcttgattca tttattgttc tatttccatc tttcctactt 900

[0127] ctgtttccgt ttatattttg tattacgtag aatagaacat catagtaata gatagttgtg 960

[0128] gtgatcatat tataaacagc actaaaacat tacaacaaag aatgccaact tctggaacta 1020

[0129] ctattgaatt gattgacgac caatttccaa aggatgactc tgccagcagt ggcattgtcg 1080

[0130] acactagtgc ggccgctcac atatgaaagt atatacccgc ttttgtacac tatgtagcta 1140

[0131] taattcaatc gtattattgt agctccgcac gaccatgcct tagaaatatc cgcagcgcg 1199

[0132] <210> 5

[0133] <211> 655

[0134] <212> DNA

[0135] <213> 酿酒酵母

[0136] <400> 5

[0137] cttgctgaaa agatgatgtt ctgaggtatt cgtatcgcta gcttgatacg cttttaacaa 60

[0138] aagtaagctt ttcgtttgca ggtttggtta cttttctgta cgagatgata tcgctaagtt 120

[0139] tatagtcatc tgtgaaattt ctcaaaaacc tcatggtttc tccatcaccc atttttcatt 180

[0140] tcatttgccg ggcggaaaaa aaaaaggaaa aaaaaaaaaa aaaaaaataa atgacacatg 240

[0141] gaaataagtc aaggattagc ggatatgtag ttccagtccg ggttatacca tcacgtgata 300

[0142] ataaatccaa atgagaatga gggtgtcata tctaatcatt atgcacgtca agattctccg 360

[0143] tgactatggc tcttttctga agcatttttc gggcgcccgg tggccaaaaa ctaactccga 420

[0144] gcccgggcat gtcccggggt tagcgggccc aacaaaggcg cttatctggt gggcttccgt 480

[0145] agaagaaaaa aagctgttga gcgagctatt tcgggtatcc cagccttctc tgcagaccgc 540

[0146] cccagttggc ttggctctgg tgctgttcgt tagcatcaca tcgcctgtga caggcagagg 600

[0147] taataacggc ttaaggttct cttcgcatag tcggcagctt tctttcggac gttga 655

[0148] <210> 6

[0149] <211> 346

[0150] <212> DNA

[0151] <213> 酿酒酵母

[0152] <400> 6

[0153] acactcaaca aaccttatct agtgcccaac caggtgtgct tctacgagtc ttgctcactc 60

[0154] agacacacct atccctattg ttacggctat ggggatggca cacaaaggtg gaaataatag 120

[0155] tagttaacaa tatatgcagc aaatcatcgg ctcctggctc atcgagtctt gcaaatcagc 180

[0156] atatacatat atatatgggg gcagatcttg attcatttat tgttctattt ccatctttcc 240

[0157] tacttctgtt tccgtttata ttttgtatta cgtagaatag aacatcatag taatagatag 300

[0158] ttgtggtgat catattataa acagcactaa aacattacaa caaaga 346

[0159] <210> 7

[0160] <211> 81

[0161] <212> DNA

[0162] <213> 酿酒酵母

[0163] <400> 7

[0164] atgccaactt ctggaactac tattgaattg attgacgacc aatttccaaa ggatgactct 60

[0165] gccagcagtg gcattgtcga c 81

[0166] <210> 8

[0167] <211> 103

[0168] <212> DNA

[0169] <213> 酿酒酵母

[0170] <400> 8

[0171] tcacatatga aagtatatac ccgcttttgt acactatgta gctataattc aatcgtatta 60

[0172] ttgtagctcc gcacgaccat gccttagaaa tatccgcagc gcg 103

[0173] <210> 9

[0174] <211> 1050

[0175] <212> DNA

[0176] <213> 粉纹夜蛾

[0177] <400> 9

[0178] atggctgtga tggctcaaac agtacaagaa acggctacag tgttggaaga ggaagctcgc 60

[0179] acagtgactc ttgtggctcc aaagacaacg ccaaggaaat ataaatatat atacaccaac 120

[0180] tttcttacat tttcatatgc gcatttagct gcattatacg gactttattt gtgcttcacc 180

[0181] tctgcgaaat gggaaacatt gctattctct ttcgtactct tccacatgtc aaatataggc 240

[0182] atcaccgcag gggctcaccg actctggact cacaagactt tcaaagccaa attgcctttg 300

[0183] gaaattgtcc tcatgatatt caactcttta gcctttcaaa acacggctat tacatgggct 360

[0184] agagaacatc ggctacatca caaatacagc gatactgatg ctgatcccca caatgcgtca 420

[0185] agagggttct tctactcgca tgttggctgg ctattagtaa aaaaacatcc cgatgtcctg 480

[0186] aaatatggaa aaactataga catgtcggat gtatacaata atcctgtgtt aaaatttcag 540

[0187] aaaaagtacg cagtaccctt aattggaaca gtttgttttg ctctgccaac tttgattcca 600

[0188] gtctactgtt ggggcgaatc gtggaacaac gcttggcaca tagccttatt tcgatacata 660

[0189] ttcaatctta acgtgacttt cctagtcaac agtgctgcgc atatctgggg gaataagcct 720

[0190] tatgataaaa gcatcttgcc cgctcaaaac ctgctggttt ccttcctagc aagtggagaa 780

[0191] ggcttccata attaccatca cgtctttcca tgggattacc gcacagcaga attagggaat 840

[0192] aacttcctga atttgacgac gctgttcatt gatttttgtg cctggtttgg atgggcttat 900

[0193] gacttgaagt ctgtatcaga ggatattata aaacagagag ctaaacgaac aggtgacggt 960

[0194] tcttcagggg tcatttgggg atgggacgac aaagacatgg accgcgatat aaaatctaaa 1020

[0195] gctaacattt tttatgctaa aaaggaatga 1050

[0196] <210> 10

[0197] <211> 1011

[0198] <212> DNA

[0199] <213> 黄地老虎

[0200] <400> 10

[0201] atggctcaag gtgtccaaac aactacgata ttgagggagg aggagccgtc attgactttc 60

[0202] gtggtacctc aagaaccgag aaagtatcaa atcgtgtacc caaaccttat cacatttggg 120

[0203] tactggcata tagctggttt atacgggcta tatttgtgct ttacttcggc aaaatggcaa 180

[0204] acaattttat tcagtttcat gctcgttgtg ttagcagagt tgggaataac agccggcgct 240

[0205] cacaggttat gggcccacaa aacatataaa gcgaagcttc ccttacaaat tatcctgatg 300

[0206] atactgaact ccattgcctt ccaaaattcc gccattgatt gggtgaggga ccaccgtctc 360

[0207] catcataagt acagtgacac tgatgcagac cctcacaatg ctactcgtgg tttcttctat 420

[0208] tctcatgttg gatggttgct cgtaagaaaa catccagaag tcaagagacg tggaaaggaa 480

[0209] cttgacatgt ctgatattta caacaatcca gtgctgagat ttcaaaagaa gtatgctata 540

[0210] cccttcatcg gggcaatgtg cttcggatta ccaactttta tccctgttta cttctgggga 600

[0211] gaaacctgga gtaatgcttg gcatatcacc atgcttcggt acatcctcaa cctaaacatt 660

[0212] actttcctgg tcaacagtgc tgctcatatc tggggataca aaccttatga catcaaaata 720

[0213] ttgcctgccc aaaatatagc agtttccata gtaaccggcg gcgaagtttc cataactacc 780

[0214] accacgtttt ttccttggga ttatcgtgca gcagaattgg ggaacaatta tcttaatttg 840

[0215] acgactaagt tcatagattt cttcgcttgg atcggatggg cttacgatct taagacggtg 900

[0216] tccagtgatg ttataaaaag taaggcggaa agaactggtg atgggacgaa tctttggggt 960

[0217] ttagaagaca aaggtgaaga agatttttg aaaatctgga aagacaatta a 1011

[0218] <210> 11

[0219] <211> 1440

[0220] <212> DNA

[0221] <213> 假微型海链藻

[0222] <400> 11

[0223] actagtatgg actttctctc cggcgatcct ttccggacac tcgtccttgc agcacttgtt 60

[0224] gtcatcggat ttgctgcggc gtggcaatgc ttctacccgc cgagcatcgt cggcaagcct 120

[0225] cgtacattaa gcaatggtaa actcaatacc agaatccatg gcaaattgta cgacctctca 180

[0226] tcgtttcagc atccaggagg ccccgtggct ctttctcttg ttcaaggtcg cgacggaaca 240

[0227] gctctatttg agtcacacca tcccttcata cctcgaaaga atctacttca gatcctctcc 300

[0228] aagtacgagg ttccgtcgac tgaagactct gtttccttca tcgccaccct agacgaactc 360

[0229] aatggtgaat ctccgtacga ttggaaggac attgaaaatg atgatttcgt atctgaccta 420

[0230] cgagctctcg taattgagca cttttctcct ctcgccaagg aaaggggagt ttcactcgtt 480

[0231] gagtcgtcga aggcaacacc tcagcggtgg atggtggttc tactgctcct tgcgtcgttc 540

[0232] ttcctcagca tcccattata tttgagtggt tcgtggactt tcgttgtcgt cactcccatc 600

[0233] ctcgcttggc tggcggttgt caattactgg cacgatgcta ctcactttgc attgagcagc 660

[0234] aactggattt tgaatgctgc gctcccatat ctcctccctc tcctatcgag tccgtcaatg 720

[0235] tggtatcatc atcacgtcat tggacatcac gcatacacca acatttccaa aagagatcca 780

[0236] gatcttgctc acgctccaca actcatgaga gaacacaaga gtatcaaatg gagaccatct 840

[0237] cacttaaatc aaacacagct tccgcggatt ctcttcatct ggtcgattgc agtcggtatt 900

[0238] gggttgaact tactgaacga cgtgagagca ctaaccaagc tttcatacaa caacgttgtt 960

[0239] cgggtggaga agatgtcatc gtcgcgaaca ttactccatt tccttggacg tatgttgcac 1020

[0240] atctttgtga ctacactttg gccctttttg gcgtttccgg tgtggaaggc catcgtttgg 1080

[0241] gcgactgtac cgaatgccat actgagtttg tgcttcatgc tgaatacgca aatcaatcac 1140

[0242] ctcatcaaca cgtgtgcaca tgcttccgat aacaactttt acaagcatca agttgtaact 1200

[0243] gctcagaact ttggccgatc aagtgccttt tgcttcatct tctcgggagg tctcaactac 1260

[0244] caaattgaac atcatttgtt gccgacggtg aaccattgcc atttgccagc tttggccccg 1320

[0245] ggtgtagagc gtttgtgtaa gaaacacggg gtgacataca actctgttga aggatacaga 1380

[0246] gaggccatca ttgcacactt tgcacatacc aaagatatgt cgacgaagcc tactgattga 1440

[0247] <210> 12

[0248] <211> 981

[0249] <212> DNA

[0250] <213> 脐橙螟蛾

[0251] <400> 12

[0252] atggtcccta acaagggttc cagtgacgtt ttgtctgaac attctgagcc ccagttcact 60

[0253] aaactcatag ctccacaagc agggccgagg aaatacaaga tagtgtatcg aaatttgctc 120

[0254] acattcggct attggcactt atcagctgtt tatgggctct acttgtgctt tacttgtgcg 180

[0255] aaatgggcta ccatcttatt tgcatttttc ttatacgtga tcgcggaaat cggtataaca 240

[0256] ggtggcgctc ataggctatg ggcacatcgg acttataaag ccaagttgcc tttagagatt 300

[0257] ttgttactca taatgaactc tattgccttc caagacactg ctttcacctg ggctcgtgat 360

[0258] caccgccttc atcacaaata ttcggatact gacgctgatc cccacaatgc taccagaggg 420

[0259] tttttctatt cacatgtagg ctggcttttg gtgaagaaac accctgaagt caaagcaaga 480

[0260] ggaaaatact tgtcgttaga tgatcttaag aataatccat tgcttaaatt ccaaaagaaa 540

[0261] tacgctattc tagttatagg cacgttatgc ttccttatgc caacatttgt gcccgtatac 600

[0262] ttctggggcg agggcatcag cacggcctgg aacatcaatc tattgcgata cgtcatgaat 660

[0263] cttaacatga ctttcttagt taacagtgca gcgcatatct ttggcaacaa accatacgat 720

[0264] aagagcatag cctcagtcca aaatatttca gttagcttag ctacttttgg cgaaggattc 780

[0265] cataattacc atcacactta cccctgggat tatcgtgcgg cagaattagg aaataatagg 840

[0266] ctaaatatga ctactgcttt catagatttc ttcgcttgga tcggctgggc ttatgacttg 900

[0267] aagtctgtgc cacaagaggc cattgcaaaa aggtgtgcga aaactggcga tggaacggat 960

[0268] atgtggggtc gaaaaagata a 981

[0269] <210> 13

[0270] <211> 1017

[0271] <212> DNA

[0272] <213> 玉米穗蛾

[0273] <400> 13

[0274] atggcccaaa gctatcaatc aactacggtt ttgagtgagg agaaagaact aacactgcaa 60

[0275] catttggtgc cccaagcatc gcccaggaag tatcaaatag tgtatccgaa cctcattacg 120

[0276] tttggttact ggcacatagc cggactttat ggcctttact tgtgcttcac ttctgctaaa 180

[0277] tgggctacga ttttattcag ctacatcctc ttcgtgttag cagaaatagg aatcacggct 240

[0278] ggcgctcaca gactctgggc ccacaaaact tacaaagcga aactaccatt agaaatactc 300

[0279] ttaatggtat tcaactccat cgcttttcaa aactcagcca ttgactgggt gagggaccac 360

[0280] cgactccacc ataagtatag cgatacagat gctgatcccc acaatgccag ccgagggttc 420

[0281] ttttattccc atgtaggatg gctacttgtg agaaaacatc ctgaagtcaa aaagcgaggg 480

[0282] aaagaactca atatgtccga tatttacaac aatcctgtcc tgcggtttca gaaaaaatac 540

[0283] gccataccct tcattggggc tgtttgtttc gccttaccta caatgatacc tgtttacttc 600

[0284] tggggagaaa cctggtccaa tgcttggcat atcaccatgc ttcgctacat catgaacctc 660

[0285] aatgtcacct ttttggtaaa cagcgctgct catatatggg gaaacaagcc ttatgacgca 720

[0286] aaaatattac ctgcacaaaa tgtagctgtg tcggtcgcca ctggtggaga aggtttccat 780

[0287] aattaccacc atgtcttccc ctgggattat cgagcagcgg aactcggtaa caatagcctc 840

[0288] aatctgacga ctaaattcat agatttattc gcagcaatcg gatgggcata tgatctgaag 900

[0289] acggtttcgg aggatatgat aaaacaaagg attaaacgca ctggagatgg aacggatctt 960

[0290] tggggacacg aacaaaactg tgatgaagtg tgggatgtaa aagataaatc aagttaa 1017

[0291] <210> 14

[0292] <211> 711

[0293] <212> DNA

[0294] <213> 人工序列

[0295] <220>

[0296] <223> mCherry热带假丝酵母优化的

[0297] <400> 14

[0298] atggtttcta agggtgaaga agacaacatg gcaatcatca aggaatttat gcgttttaag 60

[0299] gtccatatgg aaggctccgt taacggccac gagttcgaga tcgagggaga aggtgagggt 120

[0300] agaccatacg aaggtactca aaccgccaag ttgaaagtta caaagggtgg tccattgcca 180

[0301] tttgcttggg atatcttgtc cccacaattt atgtacggat caaaggcata tgtcaagcat 240

[0302] cctgccgaca tcccagatta cttgaagtta tcctttccag aaggttttaa gtgggagaga 300

[0303] gttatgaact ttgaagatgg cggagttgtt actgttactc aggactcttc cttgcaagat 360

[0304] ggtgaattta tctataaagt gaaattgaga ggtactaact ttccatccga cggtccagtc 420

[0305] atgcaaaaga agacaatggg ttgggaggct tcttccgaaa gaatgtaccc agaagacggt 480

[0306] gcattgaaag gtgaaatcaa gcaacgttta aagttgaagg acggtggtca ctacgatgcc 540

[0307] gaggtcaaga ccacttataa ggctaagaag ccagtccaat tgccaggtgc ttataacgtt 600

[0308] aacatcaagt tagatattac ttcacacaac gaagactaca caatcgttga acaatatgaa 660

[0309] agagccgaag gtagacattc taccggcggc atggacgagt tatataagta g 711

[0310] <210> 15

[0311] <211> 1092

[0312] <212> DNA

[0313] <213> 人工序列

[0314] <220>

[0315] <223> CaOLE1-黄地老虎Z11去饱和酶

[0316] <400> 15

[0317] atgactacag ttgaacaact tgaaactgtt gatatcacta aattgaatgc cattgctgct 60

[0318] ggtactaata agaaggtgcc aatggctcaa ggtgtccaaa caactacgat attgagggag 120

[0319] gaagagccgt cattgacttt cgtggtacct caagaaccga gaaagtatca aatcgtgtac 180

[0320] ccaaacctta tcacatttgg gtactggcat atagctggtt tatacgggct atatttgtgc 240

[0321] tttacttcgg caaaatggca aacaatttta ttcagtttca tgctcgttgt gttagcagag 300

[0322] ttgggaataa cagccggcgc tcacaggtta tgggcccaca aaacatataa agcgaagctt 360

[0323] cccttacaaa ttatcttaat gatattaaac tccattgcct tccaaaattc cgccattgat 420

[0324] tgggtgaggg accaccgtct ccatcataag tacagtgaca ctgatgcaga ccctcacaat 480

[0325] gctactcgtg gtttcttcta ttctcatgtt ggatggttgc tcgtaagaaa acatccagaa 540

[0326] gtcaagagac gtggaaagga acttgacatg tctgatattt acaacaatcc agtgttaaga 600

[0327] tttcaaaaga agtatgctat acccttcatc ggggcaatgt gcttcggatt accaactttt 660

[0328] atccctgttt acttctgggg agaaacctgg agtaatgctt ggcatatcac catgcttcgg 720

[0329] tacatcctca acctaaacat tactttctta gtcaacagtg ctgctcatat ctggggatac 780

[0330] aaaccttatg acatcaaaat attgcctgcc caaaatatag cagtttccat agtaaccggc 840

[0331] ggcgaagttt ccataactac caccacgttt tttccttggg attatcgtgc agcagaattg 900

[0332] gggaacaatt atcttaattt gacgactaag ttcatagatt tcttcgcttg gatcggatgg 960

[0333] gcttacgatc ttaagacggt gtccagtgat gttataaaaa gtaaggcgga aagaactggt 1020

[0334] gatgggacga atctttgggg tttagaagac aaaggtgaag aagatttttt gaaaatctgg 1080

[0335] aaagacaatt aa 1092

[0336] <210> 16

[0337] <211> 1011

[0338] <212> DNA

[0339] <213> 黄地老虎

[0340] <400> 16

[0341] atggctcaag gtgtccaaac aactacgata ttgagggagg aagagccgtc attgactttc 60

[0342] gtggtacctc aagaaccgag aaagtatcaa atcgtgtacc caaaccttat cacatttggg 120

[0343] tactggcata tagctggttt atacgggcta tatttgtgct ttacttcggc aaaatggcaa 180

[0344] acaattttat tcagtttcat gctcgttgtg ttagcagagt tgggaataac agccggcgct 240

[0345] cacaggttat gggcccacaa aacatataaa gcgaagcttc ccttacaaat tatcttaatg 300

[0346] atattaaact ccattgcctt ccaaaattcc gccattgatt gggtgaggga ccaccgtctc 360

[0347] catcataagt acagtgacac tgatgcagac cctcacaatg ctactcgtgg tttcttctat 420

[0348] tctcatgttg gatggttgct cgtaagaaaa catccagaag tcaagagacg tggaaaggaa 480

[0349] cttgacatgt ctgatattta caacaatcca gtgttaagat ttcaaaagaa gtatgctata 540

[0350] cccttcatcg gggcaatgtg cttcggatta ccaactttta tccctgttta cttctgggga 600

[0351] gaaacctgga gtaatgcttg gcatatcacc atgcttcggt acatcctcaa cctaaacatt 660

[0352] actttcttag tcaacagtgc tgctcatatc tggggataca aaccttatga catcaaaata 720

[0353] ttgcctgccc aaaatatagc agtttccata gtaaccggcg gcgaagtttc cataactacc 780

[0354] accacgtttt ttccttggga ttatcgtgca gcagaattgg ggaacaatta tcttaatttg 840

[0355] acgactaagt tcatagattt cttcgcttgg atcggatggg cttacgatct taagacggtg 900

[0356] tccagtgatg ttataaaaag taaggcggaa agaactggtg atgggacgaa tctttggggt 960

[0357] ttagaagaca aaggtgaaga agatttttg aaaatctgga aagacaatta a 1011

[0358] <210> 17

[0359] <211> 981

[0360] <212> DNA

[0361] <213> 脐橙螟蛾

[0362] <400> 17

[0363] atggtcccta acaagggttc cagtgacgtt ttgtctgaac attctgagcc ccagttcact 60

[0364] aaactcatag ctccacaagc agggccgagg aaatacaaga tagtgtatcg aaatttgctc 120

[0365] acattcggct attggcactt atcagctgtt tatgggctct acttgtgctt tacttgtgcg 180

[0366] aaatgggcta ccatcttatt tgcatttttc ttatacgtga tcgcggaaat cggtataaca 240

[0367] ggtggcgctc ataggctatg ggcacatcgg acttataaag ccaagttgcc tttagagatt 300

[0368] ttgttactca taatgaattc tattgccttc caagacactg ctttcacctg ggctcgagat 360

[0369] caccgccttc atcacaaata ttcggatact gacgctgatc cccacaatgc taccagaggg 420

[0370] tttttctatt cacatgtagg ctggcttttg gtgaagaaac accctgaagt caaagcaaga 480

[0371] ggaaaatact tgtcgttaga tgatcttaag aataatccat tgcttaaatt ccaaaagaaa 540

[0372] tacgctattc tagttatagg cacgttatgc ttccttatgc caacatttgt gcccgtatac 600

[0373] ttctggggcg agggcatcag cacggcctgg aacatcaatc tattgcgata cgtcatgaat 660

[0374] cttaacatga ctttcttagt taacagtgca gcgcatatct ttggcaacaa accatacgat 720

[0375] aagagcatag cctcagtcca aaatatttca gttagcttag ctacttttgg cgaaggattc 780

[0376] cataattacc atcacactta cccctgggat tatcgtgcgg cagaattagg aaataatagg 840

[0377] ctaaatatga ctactgcttt catagatttc ttcgcttgga tcggctgggc ttatgacttg 900

[0378] aagtctgtgc cacaagaggc cattgcaaaa aggtgtgcga aaactggcga tggaacggat 960

[0379] atgtggggtc gaaaaagata a 981

[0380] <210> 18

[0381] <211> 1050

[0382] <212> DNA

[0383] <213> 粉纹夜蛾

[0384] <400> 18

[0385] atggctgtga tggctcaaac agtacaagaa acggctacag tgttggaaga ggaagctcgc 60

[0386] acagtgactc ttgtggctcc aaagacaacg ccaaggaaat ataaatatat atacaccaac 120

[0387] tttcttacat tttcatatgc gcatttagct gcattatacg gactttattt gtgcttcacc 180

[0388] tctgcgaaat gggaaacatt gctattctct ttcgtactct tccacatgtc aaatataggc 240

[0389] atcaccgcag gggctcaccg actctggact cacaagactt tcaaagccaa attgcctttg 300

[0390] gaaattgtcc tcatgatatt caactcttta gcctttcaaa acacggctat tacatgggct 360

[0391] agagaacatc ggctacatca caaatacagc gatactgatg ctgatcccca caatgcgtca 420

[0392] agagggttct tctactcgca tgttggctgg ctattagtaa aaaaacatcc cgatgtctta 480

[0393] aaatatggaa aaactataga catgtcggat gtatacaata atcctgtgtt aaaatttcag 540

[0394] aaaaagtacg cagtaccctt aattggaaca gtttgttttg ctcttccaac tttgattcca 600

[0395] gtctactgtt ggggcgaatc gtggaacaac gcttggcaca tagccttatt tcgatacata 660

[0396] ttcaatctta acgtgacttt cctagtcaac agtgctgcgc atatctgggg gaataagcct 720

[0397] tatgataaaa gcatcttgcc cgctcaaaac ttattagttt ccttcctagc aagtggagaa 780

[0398] ggcttccata attaccatca cgtctttcca tgggattacc gcacagcaga attagggaat 840

[0399] aacttcttaa atttgacgac gttattcatt gatttttgtg cctggtttgg atgggcttat 900

[0400] gacttgaagt ctgtatcaga ggatattata aaacagagag ctaaacgaac aggtgacggt 960

[0401] tcttcagggg tcatttgggg atgggacgac aaagacatgg accgcgatat aaaatctaaa 1020

[0402] gctaacattt tttatgctaa aaaggaatga 1050

[0403] <210> 19

[0404] <211> 1017

[0405] <212> DNA

[0406] <213> 玉米穗蛾

[0407] <400> 19

[0408] atggcccaaa gctatcaatc aactacggtt ttgagtgagg agaaagaact aacattacaa 60

[0409] catttggtgc cccaagcatc gcccaggaag tatcaaatag tgtatccgaa cctcattacg 120

[0410] tttggttact ggcacatagc cggactttat ggcctttact tgtgcttcac ttctgctaaa 180

[0411] tgggctacga ttttattcag ctacatcctc ttcgtgttag cagaaatagg aatcacggct 240

[0412] ggcgctcaca gactctgggc ccacaaaact tacaaagcga aactaccatt agaaatactc 300

[0413] ttaatggtat tcaactccat cgcttttcaa aactcagcca ttgactgggt gagggaccac 360

[0414] cgactccacc ataagtatag cgatacagat gctgatcccc acaatgccag ccgagggttc 420

[0415] ttttattccc atgtaggatg gctacttgtg agaaaacatc ctgaagtcaa aaagcgaggg 480

[0416] aaagaactca atatgtccga tatttacaac aatcctgtct tacggtttca gaaaaaatac 540

[0417] gccataccct tcattggggc tgtttgtttc gccttaccta caatgatacc tgtttacttc 600

[0418] tggggagaaa cctggtccaa tgcttggcat atcaccatgc ttcgctacat catgaacctc 660

[0419] aatgtcacct ttttggtaaa cagcgctgct catatatggg gaaacaagcc ttatgacgca 720

[0420] aaaatattac ctgcacaaaa tgtagctgtg tcggtcgcca ctggtggaga aggtttccat 780

[0421] aattaccacc atgtcttccc ctgggattat cgagcagcgg aactcggtaa caatagcctc 840

[0422] aatttaacga ctaaattcat agatttattc gcagcaatcg gatgggcata tgatttaaag 900

[0423] acggtttcgg aggatatgat aaaacaaagg attaaacgca ctggagatgg aacggatctt 960

[0424] tggggacacg aacaaaactg tgatgaagtg tgggatgtaa aagataaatc aagttaa 1017

[0425] <210> 20

[0426] <211> 1068

[0427] <212> DNA

[0428] <213> 亚洲玉米螟

[0429] <400> 20

[0430] atggctccta atattaagga cggagctgat ttgaacggag ttttatttga agatgacgct 60

[0431] agcacccccg attatgccct tgccacggcc ccagtccaga aagcagacaa ctatcccaga 120

[0432] aaactagtgt ggagaaacat catactcttt gcataccttc accttgccgc tgtgtatgga 180

[0433] gcatacctat tcttattttc agcgaaatgg cagacagata tttttgccta cattctttac 240

[0434] gtgatctcag gactcggcat cacagcggga gcccaccgcc tttgggcgca caagtcatac 300

[0435] aaggctaagt ggccacttag actcattctt attatcttca acactgtatc attccaggac 360

[0436] tctgctctcg actggtcacg tgaccaccgc atgcaccaca aatactcgga gaccgacgcc 420

[0437] gacccgcaca acgcgactcg agggttcttc ttctctcata tcggctggtt attagtccgc 480

[0438] aagcacccgg aattaaagag aaagggcaag ggattagact taagcgactt gtatgctgat 540

[0439] cccatcctcc gtttccagaa gaagtactat ttactattaa tgcctcttgg ctgcttcatc 600

[0440] atgccgacgg tggtcccggt gtacttctgg ggtgagactt ggactaacgc tttcttcgtc 660

[0441] gccgcgctct tccgatacac cttcatcctc aatgtcacct ggttggtcaa ctccgccgcg 720

[0442] cacaagtggg gccacaagcc ctatgacagc agcatcaagc cttccgagaa cctctcagtc 780

[0443] tccttattcg cgttgggcga aggattccac aactaccacc acacattccc ctgggactac 840

[0444] aaaactgccg agctcggcaa caacagactc aatttcacaa caaacttcat caacttcttc 900

[0445] gctaaaatcg gatgggctta cgacttgaaa acggtctccg acgagattat tcagaataga 960

[0446] gtcaagcgca caggagatgg ctcccaccac ttatggggtt ggggcgacaa ggatcaacct 1020

[0447] aaagaggagg taaacgcagc cattagaatt aatcctaaag acgagtaa 1068

[0448] <210> 21

[0449] <211> 1059

[0450] <212> DNA

[0451] <213> 红醋栗穿孔蛾

[0452] <400> 21

[0453] atgccgccga acgtgacaga ggcgaacgga gtgttatttg agaatgacgt gcagactcct 60

[0454] gacatggggc tagaagtggc ccctgtgcag aaggctgacg agcgtaagat ccagctcgtt 120

[0455] tggaggaaca tcatcgcttt tgcatgtctt catttagcag ctgtgtatgg agcttattta 180

[0456] ttcttcacct cggctatatg gcagacagac atatttgcat acatccttta cgttatgtct 240

[0457] ggattaggaa tcacggcggg agcgcacaga ttatgggctc ataagtcata caaggcgaag 300

[0458] tggccgttaa gattaatcct cgtcgcattc aacactttgg cattccagga ttcggcaatc 360

[0459] gactgggcgc gcgaccaccg catgcaccac aagtactcgg agacggatgc ggacccacat 420

[0460] aacgccactc gcggcttctt cttttcgcac attggttggt tactctgccg aaaacacccg 480

[0461] gagctaaagc gcaagggcca gggcctcgac ttaagtgacc tctacgcaga tcctattatt 540

[0462] cgcttccaaa agaagtacta cttattgtta atgccgttag cctgctttgt tcttcccacc 600

[0463] ataattccgg tctacctctg gggcgagtcc tggaaaaacg cgttcttcgt agctgcaatg 660

[0464] ttccgttaca cgttcatcct caacgtaaca tggctcgtca actccgccgc ccacaaatgg 720

[0465] ggaggcaagc cctatgataa gaacatccag cccgctcaga acatctctgt agctatcttc 780

[0466] gcattaggcg agggcttcca caactaccac cacacgttcc cctgggacta caagaccgct 840

[0467] gaattaggaa acaacaggtt aaatttcaca acttcgttta tcaatttctt cgcaagcttc 900

[0468] ggatgggcct acgacttaaa gaccgtgtcg gacgagatta tacaacagcg cgttaagagg 960

[0469] acgggagatg ggagccatca cttacggggc tggggcgacc aggacatacc ggccgaagaa 1020

[0470] gctcaagctg ctttacgcat taaccgtaaa gatgattag 1059

[0471] <210> 22

[0472] <211> 1062

[0473] <212> DNA

[0474] <213> 玉米穗蛾

[0475] <400> 22

[0476] atggctccaa atatatcgga ggatgtgaac ggggtgctct tcgagagtga tgcagcgacg 60

[0477] ccggacttag cgttatccac gccgcctgtg cagaaggctg acaacaggcc caagcaatta 120

[0478] gtgtggagga acatactatt attcgcgtat cttcacttag cggctcttta cggaggttat 180

[0479] ttattcctct tctcagctaa atggcagaca gacatatttg cctacatctt atatgtgatc 240

[0480] tccgggcttg gtatcacggc tggagcacat cgcttatggg cccacaagtc ctacaaagct 300

[0481] aaatggcctc tccgagttat cttagtcatc tttaacacag tggcattcca ggatgccgct 360

[0482] atggactggg cgcgcgacca ccgcatgcat cacaagtact cggaaaccga tgctgatcct 420

[0483] cataatgcga cccgaggatt cttcttctct cacattggct ggttacttgt caggaaacat 480

[0484] cccgacctta aggagaaggg caagggactc gacatgagcg acttacttgc tgaccccatt 540

[0485] ctcaggttcc agaaaaaata ctacttaatc ttaatgccct tggcttgctt cgtgatgcct 600

[0486] accgtgattc ctgtgtactt ctggggtgaa acctggacca acgcattctt tgtggcggcc 660

[0487] atgttccgct acgcgttcat cctaaatgtg acgtggctcg tcaactctgc cgctcacaag 720

[0488] tggggagaca agccctacga caaaagcatt aagccttccg aaaacttgtc ggtcgccatg 780

[0489] ttcgctctcg gagaaggatt ccacaactac caccacactt tcccttggga ctacaaaact 840

[0490] gctgagttag gcaacaacaa actcaacttc actaccacct ttattaactt cttcgctaaa 900

[0491] attggctggg cttacgactt aaagacagtg tctgatgata tcgtcaagaa cagggtgaag 960

[0492] cgcactggtg acggctccca ccacttatgg ggctggggag acgaaaatca atccaaagaa 1020

[0493] gaaattgatg ccgctatcag aatcaatcct aaggacgatt aa 1062

[0494] <210> 23

[0495] <211> 1434

[0496] <212> DNA

[0497] <213> 假微型海链藻

[0498] <400> 23

[0499] atggactttc tctccggcga tcctttccgg acactcgtcc ttgcagcact tgttgtcatc 60

[0500] ggatttgctg cggcgtggca atgcttctac ccgccgagca tcgtcggcaa gcctcgtaca 120

[0501] ttaagcaatg gtaaactcaa taccagaatc catggcaaat tgtacgacct ctcatcgttt 180

[0502] cagcatccag gaggccccgt ggctctttct cttgttcaag gtcgcgacgg aacagctcta 240

[0503] tttgagtcac accatccctt catacctcga aagaatctac ttcagatcct ctccaagtac 300

[0504] gaggttccgt cgactgaaga ctctgtttcc ttcatcgcca ccctagacga actcaatggt 360

[0505] gaatctccgt acgattggaa ggacattgaa aatgatgatt tcgtatctga cctacgagct 420

[0506] ctcgtaattg agcacttttc tcctctcgcc aaggaaaggg gagtttcact cgttgagtcg 480

[0507] tcgaaggcaa cacctcagcg gtggatggtg gttctattac tccttgcgtc gttcttcctc 540

[0508] agcatcccat tatatttgag tggttcgtgg actttcgttg tcgtcactcc catcctcgct 600

[0509] tggttagcgg ttgtcaatta ctggcacgat gctactcact ttgcattgag cagcaactgg 660

[0510] attttgaatg ctgcgctccc atatctcctc cctctcctat cgagtccgtc aatgtggtat 720

[0511] catcatcacg tcattggaca tcacgcatac accaacattt ccaaaagaga tccagatctt 780

[0512] gctcacgctc cacaactcat gagagaacac aagagtatca aatggagacc atctcactta 840

[0513] aatcaaacac agcttccgcg gattctcttc atctggtcga ttgcagtcgg tattgggttg 900

[0514] aacttattaa acgacgtgag agcactaacc aagctttcat acaacaacgt tgttcgggtg 960

[0515] gagaagatgt catcgtcgcg aacattactc catttccttg gacgtatgtt gcacatcttt 1020

[0516] gtgactacac tttggccctt tttggcgttt ccggtgtgga aggccatcgt ttgggcgact 1080

[0517] gtaccgaatg ccatattaag tttgtgcttc atgttaaata cgcaaatcaa tcacctcatc 1140

[0518] aacacgtgtg cacatgcttc cgataacaac ttttacaagc atcaagttgt aactgctcag 1200

[0519] aactttggcc gatcaagtgc cttttgcttc atcttctcgg gaggtctcaa ctaccaaatt 1260

[0520] gaacatcatt tgttgccgac ggtgaaccat tgccatttgc cagctttggc cccgggtgta 1320

[0521] gagcgtttgt gtaagaaaca cggggtgaca tacaactctg ttgaaggata cagagaggcc 1380

[0522] atcattgcac actttgcaca taccaaagat atgtcgacga agcctactga ttga 1434

[0523] <210> 24

[0524] <211> 1050

[0525] <212> DNA

[0526] <213> 粉纹夜蛾

[0527] <400> 24

[0528] atggctgtga tggctcaaac agtacaagaa acggctacag tgttggaaga ggaagctcgc 60

[0529] acagtgactc ttgtggctcc aaagacaacg ccaaggaaat ataaatatat atacaccaac 120

[0530] tttcttacat tttcatatgc gcatttagct gcattatacg gactttattt gtgcttcacc 180

[0531] tctgcgaaat gggaaacatt gctattctct ttcgtactct tccacatgtc aaatataggc 240

[0532] atcaccgcag gggctcaccg actctggact cacaagactt tcaaagccaa attgcctttg 300

[0533] gaaattgtcc tcatgatatt caactcttta gcctttcaaa acacggctat tacatgggct 360

[0534] agagaacatc ggctacatca caaatacagc gatactgatg ctgatcccca caatgcgtca 420

[0535] agagggttct tctactcgca tgttggctgg ctattagtaa aaaaacatcc cgatgtcctg 480

[0536] aaatatggaa aaactataga catgtcggat gtatacaata atcctgtgtt aaaatttcag 540

[0537] aaaaagtacg cagtaccctt aattggaaca gtttgttttg ctctgccaac tttgattcca 600

[0538] gtctactgtt ggggcgaatc gtggaacaac gcttggcaca tagccttatt tcgatacata 660

[0539] ttcaatctta acgtgacttt cctagtcaac agtgctgcgc atatctgggg gaataagcct 720

[0540] tatgataaaa gcatcttgcc cgctcaaaac ctgctggttt ccttcctagc aagtggagaa 780

[0541] ggcttccata attaccatca cgtctttcca tgggattacc gcacagcaga attagggaat 840

[0542] aacttcctga atttgacgac gctgttcatt gatttttgtg cctggtttgg atgggcttat 900

[0543] gacttgaagt ctgtatcaga ggatattata aaacagagag ctaaacgaac aggtgacggt 960

[0544] tcttcagggg tcatttgggg atgggacgac aaagacatgg accgcgatat aaaatctaaa 1020

[0545] gctaacattt tttatgctaa aaaggaatga 1050

[0546] <210> 25

[0547] <211> 1017

[0548] <212> DNA

[0549] <213> 玉米穗蛾

[0550] <400> 25

[0551] atggcccaaa gctatcaatc aactacggtt ttgagtgagg agaaagaact aacactgcaa 60

[0552] catttggtgc cccaagcatc gcccaggaag tatcaaatag tgtatccgaa cctcattacg 120

[0553] tttggttact ggcacatagc cggactttat ggcctttact tgtgcttcac ttctgctaaa 180

[0554] tgggctacga ttttattcag ctacatcctc ttcgtgttag cagaaatagg aatcacggct 240

[0555] ggcgctcaca gactctgggc ccacaaaact tacaaagcga aactaccatt agaaatactc 300

[0556] ttaatggtat tcaactccat cgcttttcaa aactcagcca ttgactgggt gagggaccac 360

[0557] cgactccacc ataagtatag cgatacagat gctgatcccc acaatgccag ccgagggttc 420

[0558] ttttattccc atgtaggatg gctacttgtg agaaaacatc ctgaagtcaa aaagcgaggg 480

[0559] aaagaactca atatgtccga tatttacaac aatcctgtcc tgcggtttca gaaaaaatac 540

[0560] gccataccct tcattggggc tgtttgtttc gccttaccta caatgatacc tgtttacttc 600

[0561] tggggagaaa cctggtccaa tgcttggcat atcaccatgc ttcgctacat catgaacctc 660

[0562] aatgtcacct ttttggtaaa cagcgctgct catatatggg gaaacaagcc ttatgacgca 720

[0563] aaaatattac ctgcacaaaa tgtagctgtg tcggtcgcca ctggtggaga aggtttccat 780

[0564] aattaccacc atgtcttccc ctgggattat cgagcagcgg aactcggtaa caatagcctc 840

[0565] aatctgacga ctaaattcat agatttattc gcagcaatcg gatgggcata tgatctgaag 900

[0566] acggtttcgg aggatatgat aaaacaaagg attaaacgca ctggagatgg aacggatctt 960

[0567] tggggacacg aacaaaactg tgatgaagtg tgggatgtaa aagataaatc aagttaa 1017

[0568] <210> 26

[0569] <211> 1050

[0570] <212> DNA

[0571] <213> 人工序列

[0572] <220>

[0573] <223> 粉纹夜蛾Z11去饱和酶 智人优化的

[0574] <400> 26

[0575] atggccgtga tggcccagac cgtgcaggag accgcaacag tgctggagga ggaggcaagg 60

[0576] accgtgacac tggtggcacc caagaccaca cctagaaagt acaagtatat ctacaccaac 120

[0577] ttcctgacct tcagctacgc acacctggcc gccctgtatg gactgtacct gtgctttacc 180

[0578] tccgccaagt gggagacact gctgttctct tttgtgctgt tccacatgag caatatcgga 240

[0579] atcaccgcag gagcacacag gctgtggacc cacaagacat tcaaggccaa gctgcctctg 300

[0580] gagatcgtgc tgatgatctt caactctctg gcctttcaga ataccgccat cacatgggcc 360

[0581] cgggagcaca gactgcacca caagtatagc gacaccgatg cagacccaca caacgcaagc 420

[0582] aggggcttct tttactccca cgtgggctgg ctgctggtga agaagcaccc cgacgtgctg 480

[0583] aagtatggca agacaatcga catgtccgac gtgtacaaca atcccgtgct gaagtttcag 540

[0584] aagaagtatg ccgtgcctct gatcggcacc gtgtgcttcg ccctgccaac actgatcccc 600

[0585] gtgtattgtt ggggcgagtc ttggaacaat gcctggcaca tcgccctgtt ccggtacatc 660

[0586] tttaacctga atgtgacctt tctggtgaac tccgccgccc acatctgggg caataagcct 720

[0587] tacgacaagt ctatcctgcc agcccagaac ctgctggtgt ccttcctggc ctctggcgag 780

[0588] ggctttcaca attatcacca cgtgttccca tgggactaca ggaccgcaga gctgggcaac 840

[0589] aattttctga acctgaccac actgttcatc gatttttgtg cctggttcgg ctgggcctat 900

[0590] gacctgaagt ctgtgagcga ggatatcatc aagcagaggg caaagaggac aggcgatggc 960

[0591] agctccggcg tgatctgggg atgggacgat aaggatatgg acagagatat caagagcaag 1020

[0592] gccaatatct tctacgccaa gaaggagtga 1050

[0593] <210> 27

[0594] <211> 1017

[0595] <212> DNA

[0596] <213> 人工序列

[0597] <220>

[0598] <223> 玉米穗蛾Z11去饱和酶 智人优化的

[0599] <400> 27

[0600] atggcacagt catatcagag cactaccgtc ctgagcgaag agaaggaact gacactgcag 60

[0601] cacctggtcc cacaggcatc acctagaaag taccagatcg tgtatccaaa cctgatcacc 120

[0602] ttcggctact ggcacatcgc cggcctgtac ggcctgtatc tgtgctttac ctccgccaag 180

[0603] tgggccacaa tcctgttctc ttacatcctg tttgtgctgg cagagatcgg aatcaccgca 240

[0604] ggagcacaca gactgtgggc acacaagaca tataaggcca agctgcccct ggagatcctg 300

[0605] ctgatggtgt tcaacagcat cgcctttcag aattccgcca tcgattgggt gcgggaccac 360

[0606] agactgcacc acaagtactc cgacaccgat gccgaccccc acaacgcctc taggggcttc 420

[0607] ttttatagcc acgtgggatg gctgctggtg cggaagcacc ctgaggtgaa gaagagaggc 480

[0608] aaggagctga atatgtctga tatctacaac aatcctgtgc tgcgcttcca gaagaagtat 540

[0609] gccatcccat tcatcggcgc cgtgtgcttt gccctgccca ccatgatccc cgtgtacttt 600

[0610] tggggcgaga catggagcaa cgcctggcac atcacaatgc tgcggtatat catgaacctg 660

[0611] aatgtgacat tcctggtgaa ctccgccgcc cacatctggg gcaataagcc atacgacgcc 720

[0612] aagatcctgc ccgcccagaa cgtggccgtg agcgtggcaa ccggaggaga gggcttccac 780

[0613] aattaccacc acgtgtttcc ttgggattat cgggccgccg agctgggcaa caattctctg 840

[0614] aatctgacca caaagttcat cgacctgttt gccgccatcg gctgggccta tgatctgaag 900

[0615] acagtgagcg aggacatgat caagcagagg atcaagcgca ccggcgatgg cacagacctg 960

[0616] tgggggcacg agcagaactg tgatgaagtg tgggatgtga aagacaagtc ctcctaa 1017

[0617] <210> 28

[0618] <211> 1065

[0619] <212> DNA

[0620] <213> 人工序列

[0621] <220>

[0622] <223> 解脂耶氏酵母OLE1前导子 - 粉纹夜蛾Z11去饱和酶 智人优化的

[0623] <400> 28

[0624] atggtgaaga acgtggacca ggtggatctg tctcaggtgg acaccatcgc aagcggaagg 60

[0625] gatgtgaatt ataaggtgaa gtacacatct ggcgtgaaga ccacaccaag aaagtacaag 120

[0626] tatatctaca ccaacttcct gacattttct tacgcccacc tggccgccct gtatggcctg 180

[0627] tacctgtgct ttaccagcgc caagtgggag acactgctgt tctcctttgt gctgttccac 240

[0628] atgtctaata tcggaatcac cgcaggagca cacaggctgt ggacccacaa gacattcaag 300

[0629] gccaagctgc ccctggagat cgtgctgatg atcttcaact ccctggcctt tcagaatacc 360

[0630] gccatcacat gggcccggga gcacagactg caccacaagt attctgacac cgatgcagac 420
[0631] ccacacaacg caagcagggg cttcttttac tcccacgtgg gctggctgct ggtgaagaag 480
[0632] caccctgacg tgctgaagta tggcaagaca atcgacatga gcgacgtgta caacaatcct 540
[0633] gtgctgaagt ttcagaagaa gtatgccgtg ccactgatcg gcaccgtgtg cttcgccctg 600
[0634] cccacactga tccccgtgta ctgttggggc gagtcctgga acaatgcctg gcacatcgcc 660
[0635] ctgttccggt acatctttaa cctgaatgtg acctttctgg tgaacagcgc cgcccacatc 720
[0636] tggggcaata agccatacga caagtccatc ctgcccgccc agaacctgct ggtgtccttc 780
[0637] ctggcctctg gcgagggctt tcacaattat caccacgtgt tcccttggga ctacaggacc 840
[0638] gcagagctgg gcaacaattt tctgaacctg accacactgt tcatcgattt ttgtgcctgg 900
[0639] ttcggctggg cctatgacct gaagtctgtg agcgaggata tcatcaagca gagggcaaag 960
[0640] aggacaggcg atggcagctc cggcgtgatc tggggatggg acgataagga tatggacaga 1020
[0641] gatatcaagt ccaaggccaa tatcttctac gccaagaagg agtga 1065
[0642] <210> 29
[0643] <211> 1029
[0644] <212> DNA
[0645] <213> 人工序列
[0646] <220>
[0647] <223> 解脂耶氏酵母OLE1前导子 - 玉米穗蛾Z11去饱和酶 智人优化的
[0648] <400> 29
[0649] atggtgaaaa acgtggacca agtggatctc tcgcaggtcg acaccattgc ctccggccga 60
[0650] gatgtcaact acaaggtcaa gtacacctcc ggcgttcgca agtatcagat cgtgtatcct 120
[0651] aacctgatca ccttcggcta ctggcatatc gctggactgt acggactgta tctgtgcttc 180
[0652] acttccgcca agtgggccac catcctgttc tcttacatcc tgtttgtgct ggcagagatc 240
[0653] ggaatcaccg caggagcaca cagactgtgg gcacacaaga catataaggc caagctgcca 300
[0654] ctggagatcc tgctgatggt gttcaacagc atcgcctttc agaattccgc catcgattgg 360
[0655] gtgcgggacc acagactgca ccacaagtac tccgacacag atgccgaccc ccacaacgcc 420
[0656] tctaggggct tcttttatag ccacgtggga tggctgctgg tgcggaagca ccctgaggtg 480
[0657] aagaagagag gcaaggagct gaatatgtct gatatctaca acaatcctgt gctgcgcttc 540
[0658] cagaagaagt atgccatccc attcatcggc gccgtgtgct ttgccctgcc caccatgatc 600
[0659] cccgtgtact tttggggcga gacatggagc aacgcctggc acatcacaat gctgcggtat 660
[0660] atcatgaacc tgaatgtgac attcctggtg aactccgccg cccacatctg gggcaataag 720
[0661] ccatacgacg ccaagatcct gcccgcccag aacgtggccg tgagcgtggc aaccggagga 780
[0662] gagggcttcc acaattacca ccacgtgttt ccatgggatt atagggcagc agagctggga 840
[0663] aacaattctc tgaatctgac cacaaagttc atcgacctgt ttgccgccat cggctgggcc 900
[0664] tatgatctga agacagtgag cgaggacatg atcaagcaga ggatcaagcg caccggcgat 960
[0665] ggcacagacc tgtgggggca cgagcagaat tgtgatgaag tgtgggatgt gaaggataaa 1020
[0666] agcagttga 1029
[0667] <210> 30
[0668] <211> 981
[0669] <212> DNA
[0670] <213> 脐橙螟蛾
[0671] <400> 30

[0672] atggtcccta acaagggttc cagtgacgtt ttgtctgaac attctgagcc ccagttcact 60
[0673] aaactcatag ctccacaagc agggccgagg aaatacaaga tagtgtatcg aaatttgctc 120
[0674] acattcggct attggcactt atcagctgtt tatgggctct acttgtgctt tacttgtgcg 180
[0675] aaatgggcta ccatcttatt tgcatttttc ttatacgtga tcgcggaaat cggtataaca 240
[0676] ggtggcgctc ataggctatg ggcacatcgg acttataaag ccaagttgcc tttagagatt 300
[0677] ttgttactca taatgaattc tattgccttc caagacactg ctttcacctg ggctcgagat 360
[0678] caccgccttc atcacaaata ttcggatact gacgctgatc cccacaatgc taccagaggg 420
[0679] tttttctatt cacatgtagg ctggcttttg gtgaagaaac accctgaagt caaagcaaga 480
[0680] ggaaaatact tgtcgttaga tgatcttaag aataatccat tgcttaaatt ccaaaagaaa 540
[0681] tacgctattc tagttatagg cacgttatgc ttccttatgc caacatttgt gcccgtatac 600
[0682] ttctggggcg agggcatcag cacggcctgg aacatcaatc tattgcgata cgtcatgaat 660
[0683] cttaacatga ctttcttagt taacagtgca gcgcatatct ttggcaacaa accatacgat 720
[0684] aagagcatag cctcagtcca aaatatttca gttagcttag ctacttttgg cgaaggattc 780
[0685] cataattacc atcacactta cccctgggat tatcgtgcgg cagaattagg aaataatagg 840
[0686] ctaaatatga ctactgcttt catagatttc ttcgcttgga tcggctgggc ttatgacttg 900
[0687] aagtctgtgc cacaagaggc cattgcaaaa aggtgtgcga aaactggcga tggaacggat 960
[0688] atgtggggtc gaaaaagata a 981
[0689] <210> 31
[0690] <211> 1017
[0691] <212> DNA
[0692] <213> 玉米穗蛾
[0693] <400> 31
[0694] atggcccaaa gctatcaatc aactacggtt ttgagtgagg agaaagaact aacattacaa 60
[0695] catttggtgc cccaagcatc gcccaggaag tatcaaatag tgtatccgaa cctcattacg 120
[0696] tttggttact ggcacatagc cggactttat ggcctttact tgtgcttcac ttctgctaaa 180
[0697] tgggctacga ttttattcag ctacatcctc ttcgtgttag cagaaatagg aatcacggct 240
[0698] ggcgctcaca gactctgggc ccacaaaact tacaaagcga aactaccatt agaaatactc 300
[0699] ttaatggtat tcaactccat cgcttttcaa aactcagcca ttgactgggt gagggaccac 360
[0700] cgactccacc ataagtatag cgatacagat gctgatcccc acaatgccag ccgagggttc 420
[0701] ttttattccc atgtaggatg gctacttgtg agaaaacatc ctgaagtcaa aaagcgaggg 480
[0702] aaagaactca atatgtccga tatttacaac aatcctgtct tacggtttca gaaaaaatac 540
[0703] gccataccct tcattggggc tgtttgtttc gccttaccta caatgatacc tgtttacttc 600
[0704] tggggagaaa cctggtccaa tgcttggcat atcaccatgc ttcgctacat catgaacctc 660
[0705] aatgtcacct ttttggtaaa cagcgctgct catatatggg gaaacaagcc ttatgacgca 720
[0706] aaaatattac ctgcacaaaa tgtagctgtg tcggtcgcca ctggtggaga aggtttccat 780
[0707] aattaccacc atgtcttccc ctgggattat cgagcagcgg aactcggtaa caatagcctc 840
[0708] aatttaacga ctaaattcat agatttattc gcagcaatcg gatgggcata tgatttaaag 900
[0709] acggtttcgg aggatatgat aaaacaaagg attaaacgca ctggagatgg aacggatctt 960
[0710] tggggacacg aacaaaactg tgatgaagtg tgggatgtaa aagataaatc aagttaa 1017
[0711] <210> 32
[0712] <211> 1368
[0713] <212> DNA

[0714] <213> 人工序列

[0715] <220>

[0716] <223> pPV0228 - 密码子优化的棉铃虫还原酶

[0717] <400> 32

[0718] atggtcgttt taacttctaa agagacaaaa ccttcagtag ctgagtttta tgcgggaaaa 60

[0719] tctgttttta ttacgggtgg cactggattc cttggaaagg tattcataga gaaactttta 120

[0720] tatagctgtc cagatatcga gaatatctac atgctcatac gagagaagaa aggtctttct 180

[0721] gttagcgaaa gaataaaaca gttccttgat gacccgctct ttaccagact aaaagacaaa 240

[0722] agaccagctg acttagagaa gattgtatta ataccaggag atattactgc tcctgactta 300

[0723] ggcattaatt ctgaaaacga gaagatgctt atagagaagg tatcggtgat tattcattcg 360

[0724] gctgctacgg tgaagtttaa tgagcctctc cctacggctt ggaagatcaa cgtggaagga 420

[0725] accagaatga tgttagcttt gagtcgaaga atgaagcgga ttgaggtttt cattcacata 480

[0726] tcgacagcat acacgaacac aaacagggaa gtggttgacg agatcttata cccagctcct 540

[0727] gctgatatcg accaagttca tcagtatgtc aaagatggaa tctctgagga agacactgag 600

[0728] aaaatattaa atggtcgtcc aaatacgtac acgtttacga aagcgttaac tgagcattta 660

[0729] gttgctgaga accaagccta cgtacccact attatcgtca ggccgtcagt cgtggcagca 720

[0730] ataaaagatg agccattaaa aggttggtta ggcaactggt ttggagcgac tggtctcacc 780

[0731] gtgttcaccg ctaagggtct caaccgagtc atctacggtc attctagcta catcgtagac 840

[0732] ttaattcctg tggattatgt cgctaattta gtgattgctg ctggggctaa gagtagcaag 900

[0733] tcaactgagt tgaaggtata caactgctgc agcagctcct gcaatcccgt cactattggc 960

[0734] acgttaatga gcatgtttgc tgacgatgcc atcaaacaga agtcgtatgc tatgccgcta 1020

[0735] ccggggtggt acatattcac gaaatataag tggttagttc ttcttttaac atttctcttc 1080

[0736] caagttatac cggcgtatgt cacagatctc tccaggcact tgattgggaa gagtccacgg 1140

[0737] tacataaaac tccaatcact agtaaatcaa acgcgctctt caatcgactt cttcacgaat 1200

[0738] cactcctggg tgatgaaggc agacagagtg agagagttat atgcgtctct ttcccccgca 1260

[0739] gacaagtact tatttccctg tgatcctacg gacattaact ggacacatta catacaagac 1320

[0740] tactgttggg gagtccgaca ttttttggag aaaaaaagct acgaataa 1368

[0741] <210> 33

[0742] <211> 1478

[0743] <212> DNA

[0744] <213> 热带假丝酵母

[0745] <400> 33

[0746] tattaggcga agaggcatct agtagtagtg gcagtggtga gaacgtgggc gctgctatag 60

[0747] tgaacaatct ccagtcgatg gttaagaaga agagtgacaa accagcagtg aatgacttgt 120

[0748] ctgggtccgt gaggaaaaga aagaagcccg acacaaagga cagtaacgtc aagaaaccca 180

[0749] agaaataggg gggacctgtt tagatgtata ggaataaaaa ctccgagatg atctcaatgt 240

[0750] gtaatggagt tgtaatattg caaaggggga aaatcaagac tcaaacgtgt gtatgagtga 300

[0751] gcgtacgtat atctccgaga gtagtatgac ataatgatga ctgtgaatca tcgtaatctc 360

[0752] acacaaaaac cccattgtcg gccatatacc acaccaagca acaccacata tcccccggaa 420

[0753] aaaaaaacgt gaaaaaaaga aacaatcaaa actacaacct actccttgat cacacagtca 480

[0754] ttgatcaagt tacagttcct gctagggaat gaccaaggta caaatcagca ccttaatggt 540

[0755] tagcacgctc tcttactctc tctcacagtc ttccggcccc tattcaaaat tctgcacttc 600

[0756] catttgaccc cagggttggg aaacagggcc acaaaagaaa aacccgacgt gaatgaaaaa 660

[0757] actaagaaaa gaaaaaaaat tatcacacca gaaatttacc taattgggta attcccatcg 720

[0758] gtgtttttcc tggattgtcg cacgcacgca tgctgaaaaa agtgttcgag ttttgctttt 780

[0759] gcctcggagt ttcacgcaag tttttcgatc tcggaaccgg agggcggtcg ccttgttgtt 840

[0760] tgtgatgtcg tgctttgggt gttctaatgt gctgttattg tgctcttttt ttttcttctt 900

[0761] tttttggtga tcatatgata ttgctcggta gattactttc gtgtgtaggt attcttttag 960

[0762] acgtttggtt attgggtaga tatgagagag agagagtggg tgggggagga gttggttgta 1020

[0763] ggagggaccc ctgggaggaa gtgtagttga gttttccctg acgaatgaaa atacgttttt 1080

[0764] gagaagataa tacaggaaag gtgtgtcggt gaatttccat ctatccgagg atatgagtgg 1140

[0765] aggagagtcg tgtgcgtgtg gttaatttag gatcagtgga acacacaaag taactaagac 1200

[0766] agagagacag agagaaaaat ctggggaaga gacaaagagt cagagtgtgt gagttattct 1260

[0767] gtattgtgaa atttttttgc ccaactacat aatattgctg aaactaattt tacttaaaaa 1320

[0768] gaaaagccaa caacgtcccc agtaaaactt ttctataaat atcagcagtt ttccctttcc 1380

[0769] tccattcctc ttcttgtctt ttttcttact ttccctttt tatacctttt cattatcatc 1440

[0770] ctttataatt gtctaaccaa caactatata tctatcaa 1478

[0771] <210> 34

[0772] <211> 586

[0773] <212> DNA

[0774] <213> 热带假丝酵母

[0775] <400> 34

[0776] aggaagacaa ccaaaagaaa gatcaaattg actaaatgtt gaacagacca aaaaaaaaga 60

[0777] acaacaaata gataaattac aacatattaa tcttttgata tgttgttgaa tattctagta 120

[0778] aatctaatga tctcaatagt ggttatcatt cactctcttc gtcctcctct ctcccctcct 180

[0779] cctcttgcag tatattaaaa gcaataaaaa aaaaaaaaaa aagaaaatct gccaacacac 240

[0780] acaaaaaaaa cttacatagt cgtgtaccag tgtcaatatt tcaccagcgc agagaaaaga 300

[0781] agatgaacag aaaaattttc tctttggttt tgtctttggt tttgtattaa tctcattgaa 360

[0782] aaatttttttc tctctctctc tctctctctc tcactcacac actcactcgc atttcgtttg 420

[0783] ggttacagca gaagtcagac agaaaaaaaa aatcgtatat aactctcatc aaatgcccta 480

[0784] gagaaaaatt tttcttctat ccttttttttt ttcttcttct tcttcttttc ctttttttctt 540

[0785] ttagaagatc tttttgaatt catcaaagat atatatttaa tcaatc 586

[0786] <210> 35

[0787] <211> 297

[0788] <212> DNA

[0789] <213> 热带假丝酵母

[0790] <400> 35

[0791] aagaaaaaag aaaaggtaaa gaacttcatt tgagatgaac ttttgtatat gacttttagt 60

[0792] ttctactttt ttttttattt attgcttaat tttctttatt tcaatccccc atagtttgtg 120

[0793] tagaatatat ttattcattc tggtaactca aacacgtagc aagctcgttg catctcgcct 180

[0794] cgtcacgggt acagctctgg aaccaaagac aaaaaaaaaa gttgatccga accctctcgc 240

[0795] tattccttgc tatgctatcc acgagatggg gtttatcagc ccaggcaagt cactaaa 297

[0796] <210> 36

[0797] <211> 217

[0798] <212> DNA

[0799] <213> 热带假丝酵母

[0800] <400> 36

[0801] gctgattaat gaataattaa taagtattgt ttttttttgtt tttaatatat atatatcttg 60

[0802] aaattagtat aaaaaaaatc ttttttttttt ctttttttatt tattttatca atagtttata 120

[0803] tatatatata tataaacttg taagagatta ggtatatcta acagtgatac tactaatagt 180

[0804] gcttaatatc tttgttaaac aagaaaataa aataaac 217

[0805] <210> 37

[0806] <211> 2487

[0807] <212> DNA

[0808] <213> 人工序列

[0809] <220>

[0810] <223> SapI-tLIP2-pEXP1-HA_FAR-SapI (插入至pPV199 创建pPV247)

[0811] <400> 37

[0812] gcctgaagag cgctatttat cactctttac aacttctacc tcaactatct actttaataa 60

[0813] atgaatatcg tttattctct atgattactg tatatgcgtt cctccatggg agtttggcgc 120

[0814] ccgtttttttc gagccccaca cgtttcggtg agtatgagcg gcggcagatt cgagcgtttc 180

[0815] cggtttccgc ggctggacga gagcccatga tgggggctcc caccaccagc aatcagggcc 240

[0816] ctgattacac acccacctgt aatgtcatgc tgttcatcgt ggttaatgct gctgtgtgct 300

[0817] gtgtgtgtgt gttgtttggc gctcattgtt gcgttatgca gcgtacacca caatattgga 360

[0818] agcttattag cctttctatt ttttcgtttg caaggcttaa caacattgct gtggagaggg 420

[0819] atggggatat ggaggccgct ggagggagtc ggagaggcgt tttggagcgg cttggcctgg 480

[0820] cgcccagctc gcgaaacgca cctaggaccc tttggcacgc cgaaatgtgc cacttttcag 540

[0821] tctagtaacg ccttacctac gtcattccat gcatgcatgt ttgcgccttt tttcccttgc 600

[0822] ccttgatcgc cacacagtac agtgcactgt acagtggagg ttttgggggg gtcttagatg 660

[0823] ggagctaaaa gcggcctagc ggtacactag tgggattgta tggagtggca tggagcctag 720

[0824] gtggagcctg acaggacgca cgaccggcta gcccgtgaca gacgatgggt ggctcctgtt 780

[0825] gtccaccgcg tacaaatgtt tgggccaaag tcttgtcagc cttgcttgcg aacctaattc 840

[0826] ccaattttgt cacttcgcac ccccattgat cgagccctaa cccctgccca tcaggcaatc 900

[0827] caattaagct cgcattgtct gccttgttta gtttggctcc tgcccgtttc ggcgtccact 960

[0828] tgcacaaaca caaacaagca ttatatataa ggctcgtctc tccctcccaa ccacactcac 1020

[0829] ttttttgccc gtcttccctt gctaacacaa aagtcaagaa cacaaacaac caccccaacc 1080

[0830] cccttacaca caagacatat ctacagcaat ggtggtgctg accagcaagg agacaaagcc 1140

[0831] ttccgtggcc gagttctacg ccggcaagtc cgtgtttatc acaggcggca ccggcttcct 1200

[0832] gggcaaggtg tttatcgaga agctgctgta ctcttgccca gacatcgaga acatctatat 1260

[0833] gctgatccgg gagaagaagg gcctgagcgt gtccgagaga atcaagcagt tcctggacga 1320

[0834] tcccctgttt acacggctga aggacaagag acctgccgat ctggagaaga tcgtgctgat 1380

[0835] cccaggcgac atcaccgcac cagatctggg catcaactcc gagaatgaga agatgctgat 1440

[0836] cgagaaggtg tccgtgatca tccactctgc cgccaccgtg aagttcaacg agcccctgcc 1500

[0837] tacagcctgg aagatcaatg tggagggcac caggatgatg ctggccctga gccggagaat 1560

[0838] gaagcgcatc gaggtgttta tccacatctc cacagcctac accaacacaa atcgggaggt 1620

[0839] ggtggacgag atcctgtacc cagcccccgc cgacatcgat caggtgcacc agtatgtgaa 1680

[0840] ggacggcatc agcgaggagg ataccgagaa gatcctgaac ggccggccaa atacctacac 1740
[0841] attcaccaag gccctgacag agcacctggt ggccgagaac caggcctatg tgcctaccat 1800
[0842] catcgtgaga ccatccgtgg tggccgccat caaggatgag cccctgaagg gatggctggg 1860
[0843] aaactggttc ggagcaacag gactgaccgt gtttacagcc aagggcctga atagagtgat 1920
[0844] ctacggccac agctcctata tcgtggacct gatccccgtg gattacgtgg caaacctggt 1980
[0845] catcgcagca ggagccaagt ctagcaagtc taccgagctg aaggtgtata actgctgttc 2040
[0846] ctctagctgt aatcctgtga ccatcggcac actgatgtcc atgttcgccg acgatgccat 2100
[0847] caagcagaag tcttacgcca tgcctctgcc aggctggtac atctttacaa agtataagtg 2160
[0848] gctggtgctg ctgctgacct tcctgtttca ggtcatccca gcctacgtga ccgatctgtc 2220
[0849] taggcacctg atcggcaaga gcccccgcta tatcaagctg cagtctctgg tgaaccagac 2280
[0850] caggtcctct atcgacttct ttacaaatca cagctgggtc atgaaggccg atagggtgcg 2340
[0851] cgagctgtac gcctctctga gccctgccga caagtatctg ttcccctgcg accctaccga 2400
[0852] tatcaattgg acacactaca tccaggatta ttgttggggc gtgcgccact tcctggagaa 2460
[0853] gaagtcctat gagtgagcct gaagagc 2487
[0854] <210> 38
[0855] <211> 1012
[0856] <212> DNA
[0857] <213> 人工序列
[0858] <220>
[0859] <223> NcoI-pTAL-AleI (插入至pPV247 创建pPV248)
[0860] <400> 38
[0861] ccatgggtaa gcaggtggct ccgtttgtgt ctttgtgttt ttcccctcct ttttggacca 60
[0862] tttgtcagca tgttgcgtag gtctgggtgt ttgactgttc aggtggtgga tgacggatgc 120
[0863] atcatctgac ggcagagtgg gtacctggca gtggcaggct cgcagacgag gtagagagat 180
[0864] tctgaaagga gccattgaca gatggagaat tggatactcc tggtatgtcc tccgtttcca 240
[0865] cttttgacgt tggtgacgtg ctctggaacg actttttct ttttctttaa aacaaaaaaa 300
[0866] agaaagaaaa aaaaaacatt tactactacc agtagtacac ctcaacattg ggtccagaac 360
[0867] gtcccaactg catgagtcac tggagtcatg ccgaggtcgc taaggtgctg taaaatacaa 420
[0868] cgtcaattga gagagacaca ggcgcagcgc gccgagggag aaacgaggca tttatcttct 480
[0869] gaccctcctt tttactcgta atctgtatcc cggaaccgcg tcgcatccat gttaattaaa 540
[0870] tcaacactta cacttgcttg cttcgtatga tgaagatttc tgactggcaa cccagtcagc 600
[0871] agcagattgg ggcagatgta gtaatgaaaa acactgcaag gtgtgacgtt tgagacactc 660
[0872] caattggtta gaaagcgaca aagaagacgt cggaaaaata ccggaaaaat cgagtctttt 720
[0873] tctttctgcg tattgggccc ttctgcctcc tttgccgccc tttccacgct ctttccacac 780
[0874] cctcacactc cctgagcact atgatctcat tgcgcaataa gatatacatg cacgtgcatt 840
[0875] tggtgagcac gcagaacctt gttgggggaa gatgccctaa ccctaagggc gttccatacg 900
[0876] gttcgacaga gtaaccttgc tgtcgattat aacgcatata tagccccccc cttcggaccc 960
[0877] tccttctgat ttctgtttct gtatcaacat tacacacaaa cacacaatgg tg 1012
[0878] <210> 39
[0879] <211> 324
[0880] <212> PRT
[0881] <213> 水稻大螟

[0882] <400> 39

[0883] Met Leu Ser Gln Glu Glu Pro Thr Asp Thr Ser Leu Val Pro Arg Ala
[0884] 1 5 10 15
[0885] Ala Pro Arg Lys Tyr Gln Ile Val Tyr Pro Asn Leu Ile Thr Phe Gly
[0886] 20 25 30
[0887] Tyr Trp His Leu Ala Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Leu Cys Phe Thr Ser
[0888] 35 40 45
[0889] Ala Lys Trp Thr Thr Ile Leu Phe Ser Phe Ile Leu Cys Val Ile Ala
[0890] 50 55 60
[0891] Glu Ile Gly Val Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys Thr
[0892] 65 70 75 80
[0893] Tyr Lys Ala Asn Leu Pro Leu Gln Ile Leu Leu Met Val Met Asn Ser
[0894] 85 90 95
[0895] Ile Ala Phe Gln Asn Ser Ala Ile Asp Trp Val Arg Asp His Arg Leu
[0896] 100 105 110
[0897] His His Lys Tyr Ser Asp Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Ser Arg
[0898] 115 120 125
[0899] Gly Phe Phe Tyr Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Lys Lys His Pro
[0900] 130 135 140
[0901] Glu Val Lys Lys Arg Gly Lys Glu Leu Asp Met Ser Asp Ile Tyr Ser
[0902] 145 150 155 160
[0903] Asn Pro Val Leu Arg Phe Gln Lys Gln Tyr Ala Ile Pro Phe Ile Gly
[0904] 165 170 175
[0905] Ala Val Cys Phe Ile Leu Pro Thr Val Ile Pro Val Tyr Cys Trp Gly
[0906] 180 185 190
[0907] Glu Thr Trp Thr Asn Ala Trp His Ile Thr Met Leu Arg Tyr Ile Thr
[0908] 195 200 205
[0909] Asn Leu Asn Val Thr Phe Leu Val Asn Ser Ala Ala His Ile Trp Gly
[0910] 210 215 220
[0911] Tyr Lys Pro Tyr Asp Glu Asn Ile Leu Pro Ala Gln Asn Ile Ala Val
[0912] 225 230 235 240
[0913] Ser Ile Ala Thr Cys Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Val Phe
[0914] 245 250 255
[0915] Pro Trp Asp Tyr Arg Ala Ala Glu Leu Gly Asn Asn Asn Leu Asn Leu
[0916] 260 265 270
[0917] Thr Thr Lys Phe Ile Asp Phe Phe Ala Trp Leu Gly Trp Ala Tyr Asp
[0918] 275 280 285
[0919] Leu Lys Thr Val Ser Ser Asp Met Ile Lys Leu Arg Ala Lys Arg Thr
[0920] 290 295 300
[0921] Gly Asp Gly Thr Asn Leu Trp Gly Glu His Asn Asp Glu Leu Lys Glu
[0922] 305 310 315 320
[0923] Gly Lys Glu Asp

[0924] <210> 40

[0925] <211> 1368

[0926] <212> DNA

[0927] <213> 人工序列

[0928] <220>

[0929] <223> 来自SEQ ID NO: 37的棉铃虫FAR

[0930] <400> 40

[0931] atggtggtgc tgaccagcaa ggagacaaag ccttccgtgg ccgagttcta cgccggcaag 60

[0932] tccgtgttta tcacaggcgg caccggcttc ctgggcaagg tgtttatcga gaagctgctg 120

[0933] tactcttgcc cagacatcga gaacatctat atgctgatcc gggagaagaa gggcctgagc 180

[0934] gtgtccgaga gaatcaagca gttcctggac gatcccctgt ttacacggct gaaggacaag 240

[0935] agacctgccg atctggagaa gatcgtgctg atcccaggcg acatcaccgc accagatctg 300

[0936] ggcatcaact ccgagaatga gaagatgctg atcgagaagg tgtccgtgat catccactct 360

[0937] gccgccaccg tgaagttcaa cgagcccctg cctacagcct ggaagatcaa tgtggagggc 420

[0938] accaggatga tgctggccct gagccggaga atgaagcgca tcgaggtgtt tatccacatc 480

[0939] tccacagcct acaccaacac aaatcgggag gtggtggacg agatcctgta cccagccccc 540

[0940] gccgacatcg atcaggtgca ccagtatgtg aaggacggca tcagcgagga ggataccgag 600

[0941] aagatcctga acggccggcc aaatacctac acattcacca aggccctgac agagcacctg 660

[0942] gtggccgaga accaggccta tgtgcctacc atcatcgtga gaccatccgt ggtggccgcc 720

[0943] atcaaggatg agcccctgaa gggatggctg ggaaactggt tcggagcaac aggactgacc 780

[0944] gtgtttacag ccaagggcct gaatagagtg atctacggcc acagctccta tatcgtggac 840

[0945] ctgatccccg tggattacgt ggcaaacctg gtcatcgcag caggagccaa gtctagcaag 900

[0946] tctaccgagc tgaaggtgta taactgctgt tcctctagct gtaatcctgt gaccatcggc 960

[0947] acactgatgt ccatgttcgc cgacgatgcc atcaagcaga agtcttacgc catgcctctg 1020

[0948] ccaggctggt acatctttac aaagtataag tggctggtgc tgctgctgac cttcctgttt 1080

[0949] caggtcatcc cagcctacgt gaccgatctg tctaggcacc tgatcggcaa gagcccccgc 1140

[0950] tatatcaagc tgcagtctct ggtgaaccag accaggtcct ctatcgactt ctttacaaat 1200

[0951] cacagctggg tcatgaaggc cgatagggtg cgcgagctgt acgcctctct gagccctgcc 1260

[0952] gacaagtatc tgttcccctg cgaccctacc gatatcaatt ggacacacta catccaggat 1320

[0953] tattgttggg gcgtgcgcca cttcctggag aagaagtcct atgagtga 1368

[0954] <210> 41

[0955] <211> 455

[0956] <212> PRT

[0957] <213> 人工序列

[0958] <220>

[0959] <223> 棉铃虫形成醇的还原酶(HaFAR)

[0960] <400> 41

[0961] Met Val Val Leu Thr Ser Lys Glu Thr Lys Pro Ser Val Ala Glu Phe

[0962] 1 5 10 15

[0963] Tyr Ala Gly Lys Ser Val Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu Gly

[0964] 20 25 30

[0965] Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Asp Ile Glu Asn

[0966] 35 40 45

[0967] Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Leu Ser Val Ser Glu Arg

[0968] 50 55 60

[0969] Ile Lys Gln Phe Leu Asp Asp Pro Leu Phe Thr Arg Leu Lys Asp Lys

[0970] 65 70 75 80

[0971] Arg Pro Ala Asp Leu Glu Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Ile Thr

[0972] 85 90 95

[0973] Ala Pro Asp Leu Gly Ile Asn Ser Glu Asn Glu Lys Met Leu Ile Glu

[0974] 100 105 110

[0975] Lys Val Ser Val Ile Ile His Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn Glu

[0976] 115 120 125

[0977] Pro Leu Pro Thr Ala Trp Lys Ile Asn Val Glu Gly Thr Arg Met Met

[0978] 130 135 140

[0979] Leu Ala Leu Ser Arg Arg Met Lys Arg Ile Glu Val Phe Ile His Ile

[0980] 145 150 155 160

[0981] Ser Thr Ala Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Glu Val Val Asp Glu Ile Leu

[0982] 165 170 175

[0983] Tyr Pro Ala Pro Ala Asp Ile Asp Gln Val His Gln Tyr Val Lys Asp

[0984] 180 185 190

[0985] Gly Ile Ser Glu Glu Asp Thr Glu Lys Ile Leu Asn Gly Arg Pro Asn

[0986] 195 200 205

[0987] Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val Ala Glu Asn

[0988] 210 215 220

[0989] Gln Ala Tyr Val Pro Thr Ile Ile Val Arg Pro Ser Val Val Ala Ala

[0990] 225 230 235 240

[0991] Ile Lys Asp Glu Pro Leu Lys Gly Trp Leu Gly Asn Trp Phe Gly Ala

[0992] 245 250 255

[0993] Thr Gly Leu Thr Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg Val Ile Tyr

[0994] 260 265 270

[0995] Gly His Ser Ser Tyr Ile Val Asp Leu Ile Pro Val Asp Tyr Val Ala

[0996] 275 280 285

[0997] Asn Leu Val Ile Ala Ala Gly Ala Lys Ser Ser Lys Ser Thr Glu Leu

[0998] 290 295 300

[0999] Lys Val Tyr Asn Cys Cys Ser Ser Ser Cys Asn Pro Val Thr Ile Gly

[1000] 305 310 315 320

[1001] Thr Leu Met Ser Met Phe Ala Asp Asp Ala Ile Lys Gln Lys Ser Tyr

[1002] 325 330 335

[1003] Ala Met Pro Leu Pro Gly Trp Tyr Ile Phe Thr Lys Tyr Lys Trp Leu

[1004] 340 345 350

[1005] Val Leu Leu Leu Thr Phe Leu Phe Gln Val Ile Pro Ala Tyr Val Thr

[1006] 355 360 365

[1007] Asp Leu Ser Arg His Leu Ile Gly Lys Ser Pro Arg Tyr Ile Lys Leu

[1008] 370 375 380
[1009] Gln Ser Leu Val Asn Gln Thr Arg Ser Ser Ile Asp Phe Phe Thr Asn
[1010] 385 390 395 400
[1011] His Ser Trp Val Met Lys Ala Asp Arg Val Arg Glu Leu Tyr Ala Ser
[1012] 405 410 415
[1013] Leu Ser Pro Ala Asp Lys Tyr Leu Phe Pro Cys Asp Pro Thr Asp Ile
[1014] 420 425 430
[1015] Asn Trp Thr His Tyr Ile Gln Asp Tyr Cys Trp Gly Val Arg His Phe
[1016] 435 440 445
[1017] Leu Glu Lys Lys Ser Tyr Glu
[1018] 450 455
[1019] <210> 42
[1020] <211> 455
[1021] <212> PRT
[1022] <213> 人工序列
[1023] <220>
[1024] <223> HaFAR S60A
[1025] <400> 42
[1026] Met Val Val Leu Thr Ser Lys Glu Thr Lys Pro Ser Val Ala Glu Phe
[1027] 1 5 10 15
[1028] Tyr Ala Gly Lys Ser Val Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu Gly
[1029] 20 25 30
[1030] Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Asp Ile Glu Asn
[1031] 35 40 45
[1032] Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Leu Ala Val Ser Glu Arg
[1033] 50 55 60
[1034] Ile Lys Gln Phe Leu Asp Asp Pro Leu Phe Thr Arg Leu Lys Asp Lys
[1035] 65 70 75 80
[1036] Arg Pro Ala Asp Leu Glu Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Ile Thr
[1037] 85 90 95
[1038] Ala Pro Asp Leu Gly Ile Asn Ser Glu Asn Glu Lys Met Leu Ile Glu
[1039] 100 105 110
[1040] Lys Val Ser Val Ile Ile His Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn Glu
[1041] 115 120 125
[1042] Pro Leu Pro Thr Ala Trp Lys Ile Asn Val Glu Gly Thr Arg Met Met
[1043] 130 135 140
[1044] Leu Ala Leu Ser Arg Arg Met Lys Arg Ile Glu Val Phe Ile His Ile
[1045] 145 150 155 160
[1046] Ser Thr Ala Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Glu Val Val Asp Glu Ile Leu
[1047] 165 170 175
[1048] Tyr Pro Ala Pro Ala Asp Ile Asp Gln Val His Gln Tyr Val Lys Asp
[1049] 180 185 190

[1050] Gly Ile Ser Glu Glu Asp Thr Glu Lys Ile Leu Asn Gly Arg Pro Asn
[1051] 195 200 205
[1052] Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val Ala Glu Asn
[1053] 210 215 220
[1054] Gln Ala Tyr Val Pro Thr Ile Ile Val Arg Pro Ser Val Val Ala Ala
[1055] 225 230 235 240
[1056] Ile Lys Asp Glu Pro Leu Lys Gly Trp Leu Gly Asn Trp Phe Gly Ala
[1057] 245 250 255
[1058] Thr Gly Leu Thr Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg Val Ile Tyr
[1059] 260 265 270
[1060] Gly His Ser Ser Tyr Ile Val Asp Leu Ile Pro Val Asp Tyr Val Ala
[1061] 275 280 285
[1062] Asn Leu Val Ile Ala Ala Gly Ala Lys Ser Ser Lys Ser Thr Glu Leu
[1063] 290 295 300
[1064] Lys Val Tyr Asn Cys Cys Ser Ser Ser Cys Asn Pro Val Thr Ile Gly
[1065] 305 310 315 320
[1066] Thr Leu Met Ser Met Phe Ala Asp Asp Ala Ile Lys Gln Lys Ser Tyr
[1067] 325 330 335
[1068] Ala Met Pro Leu Pro Gly Trp Tyr Ile Phe Thr Lys Tyr Lys Trp Leu
[1069] 340 345 350
[1070] Val Leu Leu Leu Thr Phe Leu Phe Gln Val Ile Pro Ala Tyr Val Thr
[1071] 355 360 365
[1072] Asp Leu Ser Arg His Leu Ile Gly Lys Ser Pro Arg Tyr Ile Lys Leu
[1073] 370 375 380
[1074] Gln Ser Leu Val Asn Gln Thr Arg Ser Ser Ile Asp Phe Phe Thr Asn
[1075] 385 390 395 400
[1076] His Ser Trp Val Met Lys Ala Asp Arg Val Arg Glu Leu Tyr Ala Ser
[1077] 405 410 415
[1078] Leu Ser Pro Ala Asp Lys Tyr Leu Phe Pro Cys Asp Pro Thr Asp Ile
[1079] 420 425 430
[1080] Asn Trp Thr His Tyr Ile Gln Asp Tyr Cys Trp Gly Val Arg His Phe
[1081] 435 440 445
[1082] Leu Glu Lys Lys Ser Tyr Glu
[1083] 450 455
[1084] <210> 43
[1085] <211> 455
[1086] <212> PRT
[1087] <213> 人工序列
[1088] <220>
[1089] <223> HaFAR S195A
[1090] <400> 43
[1091] Met Val Val Leu Thr Ser Lys Glu Thr Lys Pro Ser Val Ala Glu Phe

[1092] 1 5 10 15
[1093] Tyr Ala Gly Lys Ser Val Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu Gly
[1094] 20 25 30
[1095] Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Asp Ile Glu Asn
[1096] 35 40 45
[1097] Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Leu Ser Val Ser Glu Arg
[1098] 50 55 60
[1099] Ile Lys Gln Phe Leu Asp Asp Pro Leu Phe Thr Arg Leu Lys Asp Lys
[1100] 65 70 75 80
[1101] Arg Pro Ala Asp Leu Glu Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Ile Thr
[1102] 85 90 95
[1103] Ala Pro Asp Leu Gly Ile Asn Ser Glu Asn Glu Lys Met Leu Ile Glu
[1104] 100 105 110
[1105] Lys Val Ser Val Ile Ile His Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn Glu
[1106] 115 120 125
[1107] Pro Leu Pro Thr Ala Trp Lys Ile Asn Val Glu Gly Thr Arg Met Met
[1108] 130 135 140
[1109] Leu Ala Leu Ser Arg Arg Met Lys Arg Ile Glu Val Phe Ile His Ile
[1110] 145 150 155 160
[1111] Ser Thr Ala Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Glu Val Val Asp Glu Ile Leu
[1112] 165 170 175
[1113] Tyr Pro Ala Pro Ala Asp Ile Asp Gln Val His Gln Tyr Val Lys Asp
[1114] 180 185 190
[1115] Gly Ile Ala Glu Glu Asp Thr Glu Lys Ile Leu Asn Gly Arg Pro Asn
[1116] 195 200 205
[1117] Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val Ala Glu Asn
[1118] 210 215 220
[1119] Gln Ala Tyr Val Pro Thr Ile Ile Val Arg Pro Ser Val Val Ala Ala
[1120] 225 230 235 240
[1121] Ile Lys Asp Glu Pro Leu Lys Gly Trp Leu Gly Asn Trp Phe Gly Ala
[1122] 245 250 255
[1123] Thr Gly Leu Thr Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg Val Ile Tyr
[1124] 260 265 270
[1125] Gly His Ser Ser Tyr Ile Val Asp Leu Ile Pro Val Asp Tyr Val Ala
[1126] 275 280 285
[1127] Asn Leu Val Ile Ala Ala Gly Ala Lys Ser Ser Lys Ser Thr Glu Leu
[1128] 290 295 300
[1129] Lys Val Tyr Asn Cys Cys Ser Ser Ser Cys Asn Pro Val Thr Ile Gly
[1130] 305 310 315 320
[1131] Thr Leu Met Ser Met Phe Ala Asp Asp Ala Ile Lys Gln Lys Ser Tyr
[1132] 325 330 335
[1133] Ala Met Pro Leu Pro Gly Trp Tyr Ile Phe Thr Lys Tyr Lys Trp Leu

[1134] 340 345 350
[1135] Val Leu Leu Leu Thr Phe Leu Phe Gln Val Ile Pro Ala Tyr Val Thr
[1136] 355 360 365
[1137] Asp Leu Ser Arg His Leu Ile Gly Lys Ser Pro Arg Tyr Ile Lys Leu
[1138] 370 375 380
[1139] Gln Ser Leu Val Asn Gln Thr Arg Ser Ser Ile Asp Phe Phe Thr Asn
[1140] 385 390 395 400
[1141] His Ser Trp Val Met Lys Ala Asp Arg Val Arg Glu Leu Tyr Ala Ser
[1142] 405 410 415
[1143] Leu Ser Pro Ala Asp Lys Tyr Leu Phe Pro Cys Asp Pro Thr Asp Ile
[1144] 420 425 430
[1145] Asn Trp Thr His Tyr Ile Gln Asp Tyr Cys Trp Gly Val Arg His Phe
[1146] 435 440 445
[1147] Leu Glu Lys Lys Ser Tyr Glu
[1148] 450 455
[1149] <210> 44
[1150] <211> 455
[1151] <212> PRT
[1152] <213> 人工序列
[1153] <220>
[1154] <223> HaFAR S298A
[1155] <400> 44
[1156] Met Val Val Leu Thr Ser Lys Glu Thr Lys Pro Ser Val Ala Glu Phe
[1157] 1 5 10 15
[1158] Tyr Ala Gly Lys Ser Val Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu Gly
[1159] 20 25 30
[1160] Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Asp Ile Glu Asn
[1161] 35 40 45
[1162] Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Leu Ser Val Ser Glu Arg
[1163] 50 55 60
[1164] Ile Lys Gln Phe Leu Asp Asp Pro Leu Phe Thr Arg Leu Lys Asp Lys
[1165] 65 70 75 80
[1166] Arg Pro Ala Asp Leu Glu Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Ile Thr
[1167] 85 90 95
[1168] Ala Pro Asp Leu Gly Ile Asn Ser Glu Asn Glu Lys Met Leu Ile Glu
[1169] 100 105 110
[1170] Lys Val Ser Val Ile Ile His Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn Glu
[1171] 115 120 125
[1172] Pro Leu Pro Thr Ala Trp Lys Ile Asn Val Glu Gly Thr Arg Met Met
[1173] 130 135 140
[1174] Leu Ala Leu Ser Arg Arg Met Lys Arg Ile Glu Val Phe Ile His Ile
[1175] 145 150 155 160

[1176] Ser Thr Ala Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Glu Val Val Asp Glu Ile Leu
[1177] 165 170 175
[1178] Tyr Pro Ala Pro Ala Asp Ile Asp Gln Val His Gln Tyr Val Lys Asp
[1179] 180 185 190
[1180] Gly Ile Ser Glu Glu Asp Thr Glu Lys Ile Leu Asn Gly Arg Pro Asn
[1181] 195 200 205
[1182] Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val Ala Glu Asn
[1183] 210 215 220
[1184] Gln Ala Tyr Val Pro Thr Ile Ile Val Arg Pro Ser Val Val Ala Ala
[1185] 225 230 235 240
[1186] Ile Lys Asp Glu Pro Leu Lys Gly Trp Leu Gly Asn Trp Phe Gly Ala
[1187] 245 250 255
[1188] Thr Gly Leu Thr Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg Val Ile Tyr
[1189] 260 265 270
[1190] Gly His Ser Ser Tyr Ile Val Asp Leu Ile Pro Val Asp Tyr Val Ala
[1191] 275 280 285
[1192] Asn Leu Val Ile Ala Ala Gly Ala Lys Ala Ser Lys Ser Thr Glu Leu
[1193] 290 295 300
[1194] Lys Val Tyr Asn Cys Cys Ser Ser Ser Cys Asn Pro Val Thr Ile Gly
[1195] 305 310 315 320
[1196] Thr Leu Met Ser Met Phe Ala Asp Asp Ala Ile Lys Gln Lys Ser Tyr
[1197] 325 330 335
[1198] Ala Met Pro Leu Pro Gly Trp Tyr Ile Phe Thr Lys Tyr Lys Trp Leu
[1199] 340 345 350
[1200] Val Leu Leu Leu Thr Phe Leu Phe Gln Val Ile Pro Ala Tyr Val Thr
[1201] 355 360 365
[1202] Asp Leu Ser Arg His Leu Ile Gly Lys Ser Pro Arg Tyr Ile Lys Leu
[1203] 370 375 380
[1204] Gln Ser Leu Val Asn Gln Thr Arg Ser Ser Ile Asp Phe Phe Thr Asn
[1205] 385 390 395 400
[1206] His Ser Trp Val Met Lys Ala Asp Arg Val Arg Glu Leu Tyr Ala Ser
[1207] 405 410 415
[1208] Leu Ser Pro Ala Asp Lys Tyr Leu Phe Pro Cys Asp Pro Thr Asp Ile
[1209] 420 425 430
[1210] Asn Trp Thr His Tyr Ile Gln Asp Tyr Cys Trp Gly Val Arg His Phe
[1211] 435 440 445
[1212] Leu Glu Lys Lys Ser Tyr Glu
[1213] 450 455
[1214] <210> 45
[1215] <211> 455
[1216] <212> PRT
[1217] <213> 人工序列

[1218] <220>

[1219] <223> HaFAR S378A

[1220] <400> 45

[1221] Met Val Val Leu Thr Ser Lys Glu Thr Lys Pro Ser Val Ala Glu Phe

[1222] 1 5 10 15

[1223] Tyr Ala Gly Lys Ser Val Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu Gly

[1224] 20 25 30

[1225] Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Asp Ile Glu Asn

[1226] 35 40 45

[1227] Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Leu Ser Val Ser Glu Arg

[1228] 50 55 60

[1229] Ile Lys Gln Phe Leu Asp Asp Pro Leu Phe Thr Arg Leu Lys Asp Lys

[1230] 65 70 75 80

[1231] Arg Pro Ala Asp Leu Glu Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Ile Thr

[1232] 85 90 95

[1233] Ala Pro Asp Leu Gly Ile Asn Ser Glu Asn Glu Lys Met Leu Ile Glu

[1234] 100 105 110

[1235] Lys Val Ser Val Ile Ile His Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn Glu

[1236] 115 120 125

[1237] Pro Leu Pro Thr Ala Trp Lys Ile Asn Val Glu Gly Thr Arg Met Met

[1238] 130 135 140

[1239] Leu Ala Leu Ser Arg Arg Met Lys Arg Ile Glu Val Phe Ile His Ile

[1240] 145 150 155 160

[1241] Ser Thr Ala Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Glu Val Val Asp Glu Ile Leu

[1242] 165 170 175

[1243] Tyr Pro Ala Pro Ala Asp Ile Asp Gln Val His Gln Tyr Val Lys Asp

[1244] 180 185 190

[1245] Gly Ile Ser Glu Glu Asp Thr Glu Lys Ile Leu Asn Gly Arg Pro Asn

[1246] 195 200 205

[1247] Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val Ala Glu Asn

[1248] 210 215 220

[1249] Gln Ala Tyr Val Pro Thr Ile Ile Val Arg Pro Ser Val Val Ala Ala

[1250] 225 230 235 240

[1251] Ile Lys Asp Glu Pro Leu Lys Gly Trp Leu Gly Asn Trp Phe Gly Ala

[1252] 245 250 255

[1253] Thr Gly Leu Thr Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg Val Ile Tyr

[1254] 260 265 270

[1255] Gly His Ser Ser Tyr Ile Val Asp Leu Ile Pro Val Asp Tyr Val Ala

[1256] 275 280 285

[1257] Asn Leu Val Ile Ala Ala Gly Ala Lys Ser Ser Lys Ser Thr Glu Leu

[1258] 290 295 300

[1259] Lys Val Tyr Asn Cys Cys Ser Ser Ser Cys Asn Pro Val Thr Ile Gly

[1260] 305 310 315 320
[1261] Thr Leu Met Ser Met Phe Ala Asp Asp Ala Ile Lys Gln Lys Ser Tyr
[1262] 325 330 335
[1263] Ala Met Pro Leu Pro Gly Trp Tyr Ile Phe Thr Lys Tyr Lys Trp Leu
[1264] 340 345 350
[1265] Val Leu Leu Leu Thr Phe Leu Phe Gln Val Ile Pro Ala Tyr Val Thr
[1266] 355 360 365
[1267] Asp Leu Ser Arg His Leu Ile Gly Lys Ala Pro Arg Tyr Ile Lys Leu
[1268] 370 375 380
[1269] Gln Ser Leu Val Asn Gln Thr Arg Ser Ser Ile Asp Phe Phe Thr Asn
[1270] 385 390 395 400
[1271] His Ser Trp Val Met Lys Ala Asp Arg Val Arg Glu Leu Tyr Ala Ser
[1272] 405 410 415
[1273] Leu Ser Pro Ala Asp Lys Tyr Leu Phe Pro Cys Asp Pro Thr Asp Ile
[1274] 420 425 430
[1275] Asn Trp Thr His Tyr Ile Gln Asp Tyr Cys Trp Gly Val Arg His Phe
[1276] 435 440 445
[1277] Leu Glu Lys Lys Ser Tyr Glu
[1278] 450 455
[1279] <210> 46
[1280] <211> 455
[1281] <212> PRT
[1282] <213> 人工序列
[1283] <220>
[1284] <223> HaFAR S394A
[1285] <400> 46
[1286] Met Val Val Leu Thr Ser Lys Glu Thr Lys Pro Ser Val Ala Glu Phe
[1287] 1 5 10 15
[1288] Tyr Ala Gly Lys Ser Val Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu Gly
[1289] 20 25 30
[1290] Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Asp Ile Glu Asn
[1291] 35 40 45
[1292] Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Leu Ser Val Ser Glu Arg
[1293] 50 55 60
[1294] Ile Lys Gln Phe Leu Asp Asp Pro Leu Phe Thr Arg Leu Lys Asp Lys
[1295] 65 70 75 80
[1296] Arg Pro Ala Asp Leu Glu Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Ile Thr
[1297] 85 90 95
[1298] Ala Pro Asp Leu Gly Ile Asn Ser Glu Asn Glu Lys Met Leu Ile Glu
[1299] 100 105 110
[1300] Lys Val Ser Val Ile Ile His Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn Glu
[1301] 115 120 125

[1302] Pro Leu Pro Thr Ala Trp Lys Ile Asn Val Glu Gly Thr Arg Met Met
[1303] 130 135 140
[1304] Leu Ala Leu Ser Arg Arg Met Lys Arg Ile Glu Val Phe Ile His Ile
[1305] 145 150 155 160
[1306] Ser Thr Ala Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Glu Val Val Asp Glu Ile Leu
[1307] 165 170 175
[1308] Tyr Pro Ala Pro Ala Asp Ile Asp Gln Val His Gln Tyr Val Lys Asp
[1309] 180 185 190
[1310] Gly Ile Ser Glu Glu Asp Thr Glu Lys Ile Leu Asn Gly Arg Pro Asn
[1311] 195 200 205
[1312] Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val Ala Glu Asn
[1313] 210 215 220
[1314] Gln Ala Tyr Val Pro Thr Ile Ile Val Arg Pro Ser Val Val Ala Ala
[1315] 225 230 235 240
[1316] Ile Lys Asp Glu Pro Leu Lys Gly Trp Leu Gly Asn Trp Phe Gly Ala
[1317] 245 250 255
[1318] Thr Gly Leu Thr Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg Val Ile Tyr
[1319] 260 265 270
[1320] Gly His Ser Ser Tyr Ile Val Asp Leu Ile Pro Val Asp Tyr Val Ala
[1321] 275 280 285
[1322] Asn Leu Val Ile Ala Ala Gly Ala Lys Ser Ser Lys Ser Thr Glu Leu
[1323] 290 295 300
[1324] Lys Val Tyr Asn Cys Cys Ser Ser Ser Cys Asn Pro Val Thr Ile Gly
[1325] 305 310 315 320
[1326] Thr Leu Met Ser Met Phe Ala Asp Asp Ala Ile Lys Gln Lys Ser Tyr
[1327] 325 330 335
[1328] Ala Met Pro Leu Pro Gly Trp Tyr Ile Phe Thr Lys Tyr Lys Trp Leu
[1329] 340 345 350
[1330] Val Leu Leu Leu Thr Phe Leu Phe Gln Val Ile Pro Ala Tyr Val Thr
[1331] 355 360 365
[1332] Asp Leu Ser Arg His Leu Ile Gly Lys Ser Pro Arg Tyr Ile Lys Leu
[1333] 370 375 380
[1334] Gln Ser Leu Val Asn Gln Thr Arg Ser Ala Ile Asp Phe Phe Thr Asn
[1335] 385 390 395 400
[1336] His Ser Trp Val Met Lys Ala Asp Arg Val Arg Glu Leu Tyr Ala Ser
[1337] 405 410 415
[1338] Leu Ser Pro Ala Asp Lys Tyr Leu Phe Pro Cys Asp Pro Thr Asp Ile
[1339] 420 425 430
[1340] Asn Trp Thr His Tyr Ile Gln Asp Tyr Cys Trp Gly Val Arg His Phe
[1341] 435 440 445
[1342] Leu Glu Lys Lys Ser Tyr Glu
[1343] 450 455

[1344] <210> 47

[1345] <211> 455

[1346] <212> PRT

[1347] <213> 人工序列

[1348] <220>

[1349] <223> HaFAR S418A

[1350] <400> 47

[1351] Met Val Val Leu Thr Ser Lys Glu Thr Lys Pro Ser Val Ala Glu Phe

[1352] 1 5 10 15

[1353] Tyr Ala Gly Lys Ser Val Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu Gly

[1354] 20 25 30

[1355] Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Asp Ile Glu Asn

[1356] 35 40 45

[1357] Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Leu Ser Val Ser Glu Arg

[1358] 50 55 60

[1359] Ile Lys Gln Phe Leu Asp Asp Pro Leu Phe Thr Arg Leu Lys Asp Lys

[1360] 65 70 75 80

[1361] Arg Pro Ala Asp Leu Glu Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Ile Thr

[1362] 85 90 95

[1363] Ala Pro Asp Leu Gly Ile Asn Ser Glu Asn Glu Lys Met Leu Ile Glu

[1364] 100 105 110

[1365] Lys Val Ser Val Ile Ile His Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn Glu

[1366] 115 120 125

[1367] Pro Leu Pro Thr Ala Trp Lys Ile Asn Val Glu Gly Thr Arg Met Met

[1368] 130 135 140

[1369] Leu Ala Leu Ser Arg Arg Met Lys Arg Ile Glu Val Phe Ile His Ile

[1370] 145 150 155 160

[1371] Ser Thr Ala Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Glu Val Val Asp Glu Ile Leu

[1372] 165 170 175

[1373] Tyr Pro Ala Pro Ala Asp Ile Asp Gln Val His Gln Tyr Val Lys Asp

[1374] 180 185 190

[1375] Gly Ile Ser Glu Glu Asp Thr Glu Lys Ile Leu Asn Gly Arg Pro Asn

[1376] 195 200 205

[1377] Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val Ala Glu Asn

[1378] 210 215 220

[1379] Gln Ala Tyr Val Pro Thr Ile Ile Val Arg Pro Ser Val Val Ala Ala

[1380] 225 230 235 240

[1381] Ile Lys Asp Glu Pro Leu Lys Gly Trp Leu Gly Asn Trp Phe Gly Ala

[1382] 245 250 255

[1383] Thr Gly Leu Thr Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg Val Ile Tyr

[1384] 260 265 270

[1385] Gly His Ser Ser Tyr Ile Val Asp Leu Ile Pro Val Asp Tyr Val Ala

[1386] 275 280 285
[1387] Asn Leu Val Ile Ala Ala Gly Ala Lys Ser Ser Lys Ser Thr Glu Leu
[1388] 290 295 300
[1389] Lys Val Tyr Asn Cys Cys Ser Ser Ser Cys Asn Pro Val Thr Ile Gly
[1390] 305 310 315 320
[1391] Thr Leu Met Ser Met Phe Ala Asp Asp Ala Ile Lys Gln Lys Ser Tyr
[1392] 325 330 335
[1393] Ala Met Pro Leu Pro Gly Trp Tyr Ile Phe Thr Lys Tyr Lys Trp Leu
[1394] 340 345 350
[1395] Val Leu Leu Leu Thr Phe Leu Phe Gln Val Ile Pro Ala Tyr Val Thr
[1396] 355 360 365
[1397] Asp Leu Ser Arg His Leu Ile Gly Lys Ser Pro Arg Tyr Ile Lys Leu
[1398] 370 375 380
[1399] Gln Ser Leu Val Asn Gln Thr Arg Ser Ser Ile Asp Phe Phe Thr Asn
[1400] 385 390 395 400
[1401] His Ser Trp Val Met Lys Ala Asp Arg Val Arg Glu Leu Tyr Ala Ser
[1402] 405 410 415
[1403] Leu Ala Pro Ala Asp Lys Tyr Leu Phe Pro Cys Asp Pro Thr Asp Ile
[1404] 420 425 430
[1405] Asn Trp Thr His Tyr Ile Gln Asp Tyr Cys Trp Gly Val Arg His Phe
[1406] 435 440 445
[1407] Leu Glu Lys Lys Ser Tyr Glu
[1408] 450 455
[1409] <210> 48
[1410] <211> 455
[1411] <212> PRT
[1412] <213> 人工序列
[1413] <220>
[1414] <223> HaFAR S453A
[1415] <400> 48
[1416] Met Val Val Leu Thr Ser Lys Glu Thr Lys Pro Ser Val Ala Glu Phe
[1417] 1 5 10 15
[1418] Tyr Ala Gly Lys Ser Val Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu Gly
[1419] 20 25 30
[1420] Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Asp Ile Glu Asn
[1421] 35 40 45
[1422] Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Leu Ser Val Ser Glu Arg
[1423] 50 55 60
[1424] Ile Lys Gln Phe Leu Asp Asp Pro Leu Phe Thr Arg Leu Lys Asp Lys
[1425] 65 70 75 80
[1426] Arg Pro Ala Asp Leu Glu Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Ile Thr
[1427] 85 90 95

[1428] Ala Pro Asp Leu Gly Ile Asn Ser Glu Asn Glu Lys Met Leu Ile Glu
[1429] 100 105 110
[1430] Lys Val Ser Val Ile Ile His Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn Glu
[1431] 115 120 125
[1432] Pro Leu Pro Thr Ala Trp Lys Ile Asn Val Glu Gly Thr Arg Met Met
[1433] 130 135 140
[1434] Leu Ala Leu Ser Arg Arg Met Lys Arg Ile Glu Val Phe Ile His Ile
[1435] 145 150 155 160
[1436] Ser Thr Ala Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Glu Val Val Asp Glu Ile Leu
[1437] 165 170 175
[1438] Tyr Pro Ala Pro Ala Asp Ile Asp Gln Val His Gln Tyr Val Lys Asp
[1439] 180 185 190
[1440] Gly Ile Ser Glu Glu Asp Thr Glu Lys Ile Leu Asn Gly Arg Pro Asn
[1441] 195 200 205
[1442] Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val Ala Glu Asn
[1443] 210 215 220
[1444] Gln Ala Tyr Val Pro Thr Ile Ile Val Arg Pro Ser Val Val Ala Ala
[1445] 225 230 235 240
[1446] Ile Lys Asp Glu Pro Leu Lys Gly Trp Leu Gly Asn Trp Phe Gly Ala
[1447] 245 250 255
[1448] Thr Gly Leu Thr Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg Val Ile Tyr
[1449] 260 265 270
[1450] Gly His Ser Ser Tyr Ile Val Asp Leu Ile Pro Val Asp Tyr Val Ala
[1451] 275 280 285
[1452] Asn Leu Val Ile Ala Ala Gly Ala Lys Ser Ser Lys Ser Thr Glu Leu
[1453] 290 295 300
[1454] Lys Val Tyr Asn Cys Cys Ser Ser Ser Cys Asn Pro Val Thr Ile Gly
[1455] 305 310 315 320
[1456] Thr Leu Met Ser Met Phe Ala Asp Asp Ala Ile Lys Gln Lys Ser Tyr
[1457] 325 330 335
[1458] Ala Met Pro Leu Pro Gly Trp Tyr Ile Phe Thr Lys Tyr Lys Trp Leu
[1459] 340 345 350
[1460] Val Leu Leu Leu Thr Phe Leu Phe Gln Val Ile Pro Ala Tyr Val Thr
[1461] 355 360 365
[1462] Asp Leu Ser Arg His Leu Ile Gly Lys Ser Pro Arg Tyr Ile Lys Leu
[1463] 370 375 380
[1464] Gln Ser Leu Val Asn Gln Thr Arg Ser Ser Ile Asp Phe Phe Thr Asn
[1465] 385 390 395 400
[1466] His Ser Trp Val Met Lys Ala Asp Arg Val Arg Glu Leu Tyr Ala Ser
[1467] 405 410 415
[1468] Leu Ser Pro Ala Asp Lys Tyr Leu Phe Pro Cys Asp Pro Thr Asp Ile
[1469] 420 425 430

[1470] Asn Trp Thr His Tyr Ile Gln Asp Tyr Cys Trp Gly Val Arg His Phe
[1471] 435 440 445
[1472] Leu Glu Lys Lys Ala Tyr Glu
[1473] 450 455
[1474] <210> 49
[1475] <211> 349
[1476] <212> PRT
[1477] <213> 粉纹夜蛾
[1478] <400> 49
[1479] Met Ala Val Met Ala Gln Thr Val Gln Glu Thr Ala Thr Val Leu Glu
[1480] 1 5 10 15
[1481] Glu Glu Ala Arg Thr Val Thr Leu Val Ala Pro Lys Thr Thr Pro Arg
[1482] 20 25 30
[1483] Lys Tyr Lys Tyr Ile Tyr Thr Asn Phe Leu Thr Phe Ser Tyr Ala His
[1484] 35 40 45
[1485] Leu Ala Ala Leu Tyr Gly Leu Tyr Leu Cys Phe Thr Ser Ala Lys Trp
[1486] 50 55 60
[1487] Glu Thr Leu Leu Phe Ser Phe Val Leu Phe His Met Ser Asn Ile Gly
[1488] 65 70 75 80
[1489] Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Thr His Lys Thr Phe Lys Ala
[1490] 85 90 95
[1491] Lys Leu Pro Leu Glu Ile Val Leu Met Ile Phe Asn Ser Leu Ala Phe
[1492] 100 105 110
[1493] Gln Asn Thr Ala Ile Thr Trp Ala Arg Glu His Arg Leu His His Lys
[1494] 115 120 125
[1495] Tyr Ser Asp Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Ser Arg Gly Phe Phe
[1496] 130 135 140
[1497] Tyr Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Lys Lys His Pro Asp Val Leu
[1498] 145 150 155 160
[1499] Lys Tyr Gly Lys Thr Ile Asp Met Ser Asp Val Tyr Asn Asn Pro Val
[1500] 165 170 175
[1501] Leu Lys Phe Gln Lys Lys Tyr Ala Val Pro Leu Ile Gly Thr Val Cys
[1502] 180 185 190
[1503] Phe Ala Leu Pro Thr Leu Ile Pro Val Tyr Cys Trp Gly Glu Ser Trp
[1504] 195 200 205
[1505] Asn Asn Ala Trp His Ile Ala Leu Phe Arg Tyr Ile Phe Asn Leu Asn
[1506] 210 215 220
[1507] Val Thr Phe Leu Val Asn Ser Ala Ala His Ile Trp Gly Asn Lys Pro
[1508] 225 230 235 240
[1509] Tyr Asp Lys Ser Ile Leu Pro Ala Gln Asn Leu Leu Val Ser Phe Leu
[1510] 245 250 255
[1511] Ala Ser Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Val Phe Pro Trp Asp

[1512] 260 265 270
[1513] Tyr Arg Thr Ala Glu Leu Gly Asn Asn Phe Leu Asn Leu Thr Thr Leu
[1514] 275 280 285
[1515] Phe Ile Asp Phe Cys Ala Trp Phe Gly Trp Ala Tyr Asp Leu Lys Ser
[1516] 290 295 300
[1517] Val Ser Glu Asp Ile Ile Lys Gln Arg Ala Lys Arg Thr Gly Asp Gly
[1518] 305 310 315 320
[1519] Ser Ser Gly Val Ile Trp Gly Trp Asp Asp Lys Asp Met Asp Arg Asp
[1520] 325 330 335
[1521] Ile Lys Ser Lys Ala Asn Ile Phe Tyr Ala Lys Lys Glu
[1522] 340 345
[1523] <210> 50
[1524] <211> 479
[1525] <212> PRT
[1526] <213> 假微型海链藻
[1527] <400> 50
[1528] Thr Ser Met Asp Phe Leu Ser Gly Asp Pro Phe Arg Thr Leu Val Leu
[1529] 1 5 10 15
[1530] Ala Ala Leu Val Val Ile Gly Phe Ala Ala Ala Trp Gln Cys Phe Tyr
[1531] 20 25 30
[1532] Pro Pro Ser Ile Val Gly Lys Pro Arg Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu
[1533] 35 40 45
[1534] Asn Thr Arg Ile His Gly Lys Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Phe Gln His
[1535] 50 55 60
[1536] Pro Gly Gly Pro Val Ala Leu Ser Leu Val Gln Gly Arg Asp Gly Thr
[1537] 65 70 75 80
[1538] Ala Leu Phe Glu Ser His His Pro Phe Ile Pro Arg Lys Asn Leu Leu
[1539] 85 90 95
[1540] Gln Ile Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro Ser Thr Glu Asp Ser Val Ser
[1541] 100 105 110
[1542] Phe Ile Ala Thr Leu Asp Glu Leu Asn Gly Glu Ser Pro Tyr Asp Trp
[1543] 115 120 125
[1544] Lys Asp Ile Glu Asn Asp Asp Phe Val Ser Asp Leu Arg Ala Leu Val
[1545] 130 135 140
[1546] Ile Glu His Phe Ser Pro Leu Ala Lys Glu Arg Gly Val Ser Leu Val
[1547] 145 150 155 160
[1548] Glu Ser Ser Lys Ala Thr Pro Gln Arg Trp Met Val Val Leu Leu Leu
[1549] 165 170 175
[1550] Leu Ala Ser Phe Phe Leu Ser Ile Pro Leu Tyr Leu Ser Gly Ser Trp
[1551] 180 185 190
[1552] Thr Phe Val Val Val Thr Pro Ile Leu Ala Trp Leu Ala Val Val Asn
[1553] 195 200 205

[1554] Tyr Trp His Asp Ala Thr His Phe Ala Leu Ser Ser Asn Trp Ile Leu
[1555] 210 215 220
[1556] Asn Ala Ala Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ser Pro Ser Met
[1557] 225 230 235 240
[1558] Trp Tyr His His His Val Ile Gly His His Ala Tyr Thr Asn Ile Ser
[1559] 245 250 255
[1560] Lys Arg Asp Pro Asp Leu Ala His Ala Pro Gln Leu Met Arg Glu His
[1561] 260 265 270
[1562] Lys Ser Ile Lys Trp Arg Pro Ser His Leu Asn Gln Thr Gln Leu Pro
[1563] 275 280 285
[1564] Arg Ile Leu Phe Ile Trp Ser Ile Ala Val Gly Ile Gly Leu Asn Leu
[1565] 290 295 300
[1566] Leu Asn Asp Val Arg Ala Leu Thr Lys Leu Ser Tyr Asn Asn Val Val
[1567] 305 310 315 320
[1568] Arg Val Glu Lys Met Ser Ser Ser Arg Thr Leu Leu His Phe Leu Gly
[1569] 325 330 335
[1570] Arg Met Leu His Ile Phe Val Thr Thr Leu Trp Pro Phe Leu Ala Phe
[1571] 340 345 350
[1572] Pro Val Trp Lys Ala Ile Val Trp Ala Thr Val Pro Asn Ala Ile Leu
[1573] 355 360 365
[1574] Ser Leu Cys Phe Met Leu Asn Thr Gln Ile Asn His Leu Ile Asn Thr
[1575] 370 375 380
[1576] Cys Ala His Ala Ser Asp Asn Asn Phe Tyr Lys His Gln Val Val Thr
[1577] 385 390 395 400
[1578] Ala Gln Asn Phe Gly Arg Ser Ser Ala Phe Cys Phe Ile Phe Ser Gly
[1579] 405 410 415
[1580] Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Leu Pro Thr Val Asn His
[1581] 420 425 430
[1582] Cys His Leu Pro Ala Leu Ala Pro Gly Val Glu Arg Leu Cys Lys Lys
[1583] 435 440 445
[1584] His Gly Val Thr Tyr Asn Ser Val Glu Gly Tyr Arg Glu Ala Ile Ile
[1585] 450 455 460
[1586] Ala His Phe Ala His Thr Lys Asp Met Ser Thr Lys Pro Thr Asp
[1587] 465 470 475
[1588] <210> 51
[1589] <211> 477
[1590] <212> PRT
[1591] <213> 假微型海链藻
[1592] <400> 51
[1593] Met Asp Phe Leu Ser Gly Asp Pro Phe Arg Thr Leu Val Leu Ala Ala
[1594] 1 5 10 15
[1595] Leu Val Val Ile Gly Phe Ala Ala Ala Trp Gln Cys Phe Tyr Pro Pro

[1596] 20 25 30
[1597] Ser Ile Val Gly Lys Pro Arg Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Asn Thr
[1598] 35 40 45
[1599] Arg Ile His Gly Lys Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Phe Gln His Pro Gly
[1600] 50 55 60
[1601] Gly Pro Val Ala Leu Ser Leu Val Gln Gly Arg Asp Gly Thr Ala Leu
[1602] 65 70 75 80
[1603] Phe Glu Ser His His Pro Phe Ile Pro Arg Lys Asn Leu Leu Gln Ile
[1604] 85 90 95
[1605] Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro Ser Thr Glu Asp Ser Val Ser Phe Ile
[1606] 100 105 110
[1607] Ala Thr Leu Asp Glu Leu Asn Gly Glu Ser Pro Tyr Asp Trp Lys Asp
[1608] 115 120 125
[1609] Ile Glu Asn Asp Asp Phe Val Ser Asp Leu Arg Ala Leu Val Ile Glu
[1610] 130 135 140
[1611] His Phe Ser Pro Leu Ala Lys Glu Arg Gly Val Ser Leu Val Glu Ser
[1612] 145 150 155 160
[1613] Ser Lys Ala Thr Pro Gln Arg Trp Met Val Val Leu Leu Leu Leu Ala
[1614] 165 170 175
[1615] Ser Phe Phe Leu Ser Ile Pro Leu Tyr Leu Ser Gly Ser Trp Thr Phe
[1616] 180 185 190
[1617] Val Val Val Thr Pro Ile Leu Ala Trp Leu Ala Val Val Asn Tyr Trp
[1618] 195 200 205
[1619] His Asp Ala Thr His Phe Ala Leu Ser Ser Asn Trp Ile Leu Asn Ala
[1620] 210 215 220
[1621] Ala Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ser Pro Ser Met Trp Tyr
[1622] 225 230 235 240
[1623] His His His Val Ile Gly His His Ala Tyr Thr Asn Ile Ser Lys Arg
[1624] 245 250 255
[1625] Asp Pro Asp Leu Ala His Ala Pro Gln Leu Met Arg Glu His Lys Ser
[1626] 260 265 270
[1627] Ile Lys Trp Arg Pro Ser His Leu Asn Gln Thr Gln Leu Pro Arg Ile
[1628] 275 280 285
[1629] Leu Phe Ile Trp Ser Ile Ala Val Gly Ile Gly Leu Asn Leu Leu Asn
[1630] 290 295 300
[1631] Asp Val Arg Ala Leu Thr Lys Leu Ser Tyr Asn Asn Val Val Arg Val
[1632] 305 310 315 320
[1633] Glu Lys Met Ser Ser Ser Arg Thr Leu Leu His Phe Leu Gly Arg Met
[1634] 325 330 335
[1635] Leu His Ile Phe Val Thr Thr Leu Trp Pro Phe Leu Ala Phe Pro Val
[1636] 340 345 350
[1637] Trp Lys Ala Ile Val Trp Ala Thr Val Pro Asn Ala Ile Leu Ser Leu

[1638] 355 360 365
[1639] Cys Phe Met Leu Asn Thr Gln Ile Asn His Leu Ile Asn Thr Cys Ala
[1640] 370 375 380
[1641] His Ala Ser Asp Asn Asn Phe Tyr Lys His Gln Val Val Thr Ala Gln
[1642] 385 390 395 400
[1643] Asn Phe Gly Arg Ser Ser Ala Phe Cys Phe Ile Phe Ser Gly Gly Leu
[1644] 405 410 415
[1645] Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Leu Pro Thr Val Asn His Cys His
[1646] 420 425 430
[1647] Leu Pro Ala Leu Ala Pro Gly Val Glu Arg Leu Cys Lys Lys His Gly
[1648] 435 440 445
[1649] Val Thr Tyr Asn Ser Val Glu Gly Tyr Arg Glu Ala Ile Ile Ala His
[1650] 450 455 460
[1651] Phe Ala His Thr Lys Asp Met Ser Thr Lys Pro Thr Asp
[1652] 465 470 475
[1653] <210> 52
[1654] <211> 326
[1655] <212> PRT
[1656] <213> 脐橙螟蛾
[1657] <400> 52
[1658] Met Val Pro Asn Lys Gly Ser Ser Asp Val Leu Ser Glu His Ser Glu
[1659] 1 5 10 15
[1660] Pro Gln Phe Thr Lys Leu Ile Ala Pro Gln Ala Gly Pro Arg Lys Tyr
[1661] 20 25 30
[1662] Lys Ile Val Tyr Arg Asn Leu Leu Thr Phe Gly Tyr Trp His Leu Ser
[1663] 35 40 45
[1664] Ala Val Tyr Gly Leu Tyr Leu Cys Phe Thr Cys Ala Lys Trp Ala Thr
[1665] 50 55 60
[1666] Ile Leu Phe Ala Phe Phe Leu Tyr Val Ile Ala Glu Ile Gly Ile Thr
[1667] 65 70 75 80
[1668] Gly Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Arg Thr Tyr Lys Ala Lys Leu
[1669] 85 90 95
[1670] Pro Leu Glu Ile Leu Leu Leu Ile Met Asn Ser Ile Ala Phe Gln Asp
[1671] 100 105 110
[1672] Thr Ala Phe Thr Trp Ala Arg Asp His Arg Leu His His Lys Tyr Ser
[1673] 115 120 125
[1674] Asp Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr Arg Gly Phe Phe Tyr Ser
[1675] 130 135 140
[1676] His Val Gly Trp Leu Leu Val Lys Lys His Pro Glu Val Lys Ala Arg
[1677] 145 150 155 160
[1678] Gly Lys Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Leu Lys Asn Asn Pro Leu Leu Lys
[1679] 165 170 175

[1680] Phe Gln Lys Lys Tyr Ala Ile Leu Val Ile Gly Thr Leu Cys Phe Leu
[1681] 180 185 190
[1682] Met Pro Thr Phe Val Pro Val Tyr Phe Trp Gly Glu Gly Ile Ser Thr
[1683] 195 200 205
[1684] Ala Trp Asn Ile Asn Leu Leu Arg Tyr Val Met Asn Leu Asn Met Thr
[1685] 210 215 220
[1686] Phe Leu Val Asn Ser Ala Ala His Ile Phe Gly Asn Lys Pro Tyr Asp
[1687] 225 230 235 240
[1688] Lys Ser Ile Ala Ser Val Gln Asn Ile Ser Val Ser Leu Ala Thr Phe
[1689] 245 250 255
[1690] Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Thr Tyr Pro Trp Asp Tyr Arg
[1691] 260 265 270
[1692] Ala Ala Glu Leu Gly Asn Asn Arg Leu Asn Met Thr Thr Ala Phe Ile
[1693] 275 280 285
[1694] Asp Phe Phe Ala Trp Ile Gly Trp Ala Tyr Asp Leu Lys Ser Val Pro
[1695] 290 295 300
[1696] Gln Glu Ala Ile Ala Lys Arg Cys Ala Lys Thr Gly Asp Gly Thr Asp
[1697] 305 310 315 320
[1698] Met Trp Gly Arg Lys Arg
[1699] 325
[1700] <210> 53
[1701] <211> 336
[1702] <212> PRT
[1703] <213> 黄地老虎
[1704] <400> 53
[1705] Met Ala Gln Gly Val Gln Thr Thr Thr Ile Leu Arg Glu Glu Glu Pro
[1706] 1 5 10 15
[1707] Ser Leu Thr Phe Val Val Pro Gln Glu Pro Arg Lys Tyr Gln Ile Val
[1708] 20 25 30
[1709] Tyr Pro Asn Leu Ile Thr Phe Gly Tyr Trp His Ile Ala Gly Leu Tyr
[1710] 35 40 45
[1711] Gly Leu Tyr Leu Cys Phe Thr Ser Ala Lys Trp Gln Thr Ile Leu Phe
[1712] 50 55 60
[1713] Ser Phe Met Leu Val Val Leu Ala Glu Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala
[1714] 65 70 75 80
[1715] His Arg Leu Trp Ala His Lys Thr Tyr Lys Ala Lys Leu Pro Leu Gln
[1716] 85 90 95
[1717] Ile Ile Leu Met Ile Leu Asn Ser Ile Ala Phe Gln Asn Ser Ala Ile
[1718] 100 105 110
[1719] Asp Trp Val Arg Asp His Arg Leu His His Lys Tyr Ser Asp Thr Asp
[1720] 115 120 125
[1721] Ala Asp Pro His Asn Ala Thr Arg Gly Phe Phe Tyr Ser His Val Gly

[1722] 130 135 140
[1723] Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Glu Val Lys Arg Arg Gly Lys Glu
[1724] 145 150 155 160
[1725] Leu Asp Met Ser Asp Ile Tyr Asn Asn Pro Val Leu Arg Phe Gln Lys
[1726] 165 170 175
[1727] Lys Tyr Ala Ile Pro Phe Ile Gly Ala Met Cys Phe Gly Leu Pro Thr
[1728] 180 185 190
[1729] Phe Ile Pro Val Tyr Phe Trp Gly Glu Thr Trp Ser Asn Ala Trp His
[1730] 195 200 205
[1731] Ile Thr Met Leu Arg Tyr Ile Leu Asn Leu Asn Ile Thr Phe Leu Val
[1732] 210 215 220
[1733] Asn Ser Ala Ala His Ile Trp Gly Tyr Lys Pro Tyr Asp Ile Lys Ile
[1734] 225 230 235 240
[1735] Leu Pro Ala Gln Asn Ile Ala Val Ser Ile Val Thr Gly Gly Glu Val
[1736] 245 250 255
[1737] Ser Ile Thr Thr Thr Thr Phe Phe Pro Trp Asp Tyr Arg Ala Ala Glu
[1738] 260 265 270
[1739] Leu Gly Asn Asn Tyr Leu Asn Leu Thr Thr Lys Phe Ile Asp Phe Phe
[1740] 275 280 285
[1741] Ala Trp Ile Gly Trp Ala Tyr Asp Leu Lys Thr Val Ser Ser Asp Val
[1742] 290 295 300
[1743] Ile Lys Ser Lys Ala Glu Arg Thr Gly Asp Gly Thr Asn Leu Trp Gly
[1744] 305 310 315 320
[1745] Leu Glu Asp Lys Gly Glu Glu Asp Phe Leu Lys Ile Trp Lys Asp Asn
[1746] 325 330 335
[1747] <210> 54
[1748] <211> 338
[1749] <212> PRT
[1750] <213> 玉米穗蛾
[1751] <400> 54
[1752] Met Ala Gln Ser Tyr Gln Ser Thr Thr Val Leu Ser Glu Glu Lys Glu
[1753] 1 5 10 15
[1754] Leu Thr Leu Gln His Leu Val Pro Gln Ala Ser Pro Arg Lys Tyr Gln
[1755] 20 25 30
[1756] Ile Val Tyr Pro Asn Leu Ile Thr Phe Gly Tyr Trp His Ile Ala Gly
[1757] 35 40 45
[1758] Leu Tyr Gly Leu Tyr Leu Cys Phe Thr Ser Ala Lys Trp Ala Thr Ile
[1759] 50 55 60
[1760] Leu Phe Ser Tyr Ile Leu Phe Val Leu Ala Glu Ile Gly Ile Thr Ala
[1761] 65 70 75 80
[1762] Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys Thr Tyr Lys Ala Lys Leu Pro
[1763] 85 90 95

[1764] Leu Glu Ile Leu Leu Met Val Phe Asn Ser Ile Ala Phe Gln Asn Ser
[1765] 100 105 110
[1766] Ala Ile Asp Trp Val Arg Asp His Arg Leu His His Lys Tyr Ser Asp
[1767] 115 120 125
[1768] Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Ser Arg Gly Phe Phe Tyr Ser His
[1769] 130 135 140
[1770] Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Glu Val Lys Lys Arg Gly
[1771] 145 150 155 160
[1772] Lys Glu Leu Asn Met Ser Asp Ile Tyr Asn Asn Pro Val Leu Arg Phe
[1773] 165 170 175
[1774] Gln Lys Lys Tyr Ala Ile Pro Phe Ile Gly Ala Val Cys Phe Ala Leu
[1775] 180 185 190
[1776] Pro Thr Met Ile Pro Val Tyr Phe Trp Gly Glu Thr Trp Ser Asn Ala
[1777] 195 200 205
[1778] Trp His Ile Thr Met Leu Arg Tyr Ile Met Asn Leu Asn Val Thr Phe
[1779] 210 215 220
[1780] Leu Val Asn Ser Ala Ala His Ile Trp Gly Asn Lys Pro Tyr Asp Ala
[1781] 225 230 235 240
[1782] Lys Ile Leu Pro Ala Gln Asn Val Ala Val Ser Val Ala Thr Gly Gly
[1783] 245 250 255
[1784] Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Val Phe Pro Trp Asp Tyr Arg Ala
[1785] 260 265 270
[1786] Ala Glu Leu Gly Asn Asn Ser Leu Asn Leu Thr Thr Lys Phe Ile Asp
[1787] 275 280 285
[1788] Leu Phe Ala Ala Ile Gly Trp Ala Tyr Asp Leu Lys Thr Val Ser Glu
[1789] 290 295 300
[1790] Asp Met Ile Lys Gln Arg Ile Lys Arg Thr Gly Asp Gly Thr Asp Leu
[1791] 305 310 315 320
[1792] Trp Gly His Glu Gln Asn Cys Asp Glu Val Trp Asp Val Lys Asp Lys
[1793] 325 330 335
[1794] Ser Ser
[1795] <210> 55
[1796] <211> 458
[1797] <212> PRT
[1798] <213> 黄地老虎
[1799] <400> 55
[1800] Met Pro Val Leu Thr Ser Arg Glu Asp Glu Lys Leu Ser Val Pro Glu
[1801] 1 5 10 15
[1802] Phe Tyr Ala Gly Lys Ser Ile Phe Val Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu
[1803] 20 25 30
[1804] Gly Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Cys Cys Pro Asp Ile Asp
[1805] 35 40 45

[1806] Lys Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Asn Leu Ser Ile Asp Glu
[1807] 50 55 60
[1808] Arg Met Ser Lys Phe Leu Asp Asp Pro Leu Phe Ser Arg Leu Lys Glu
[1809] 65 70 75 80
[1810] Glu Arg Pro Gly Asp Leu Glu Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Ile
[1811] 85 90 95
[1812] Thr Ala Pro Asn Leu Gly Leu Ser Ala Glu Asn Glu Arg Ile Leu Leu
[1813] 100 105 110
[1814] Glu Lys Val Ser Val Ile Ile Asn Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn
[1815] 115 120 125
[1816] Glu Pro Leu Pro Ile Ala Trp Lys Ile Asn Val Glu Gly Thr Arg Met
[1817] 130 135 140
[1818] Leu Leu Ala Leu Ser Arg Arg Met Lys Arg Ile Glu Val Phe Ile His
[1819] 145 150 155 160
[1820] Ile Ser Thr Ala Tyr Ser Asn Ala Ser Ser Asp Arg Ile Val Val Asp
[1821] 165 170 175
[1822] Glu Ile Leu Tyr Pro Ala Pro Ala Asp Met Asp Gln Val Tyr Gln Leu
[1823] 180 185 190
[1824] Val Lys Asp Gly Val Thr Glu Glu Glu Thr Glu Arg Leu Leu Asn Gly
[1825] 195 200 205
[1826] Leu Pro Asn Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val
[1827] 210 215 220
[1828] Ala Glu His Gln Thr Tyr Val Pro Thr Ile Ile Ile Arg Pro Ser Val
[1829] 225 230 235 240
[1830] Val Ala Ser Ile Lys Asp Glu Pro Ile Arg Gly Trp Leu Cys Asn Trp
[1831] 245 250 255
[1832] Phe Gly Ala Thr Gly Ile Ser Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg
[1833] 260 265 270
[1834] Val Leu Leu Gly Lys Ala Ser Asn Ile Val Asp Val Ile Pro Val Asp
[1835] 275 280 285
[1836] Tyr Val Ala Asn Leu Val Ile Val Ala Gly Ala Lys Ser Gly Gly Gln
[1837] 290 295 300
[1838] Lys Ser Asp Glu Leu Lys Ile Tyr Asn Cys Cys Ser Ser Asp Cys Asn
[1839] 305 310 315 320
[1840] Pro Val Thr Leu Lys Lys Ile Ile Lys Glu Phe Thr Glu Asp Thr Ile
[1841] 325 330 335
[1842] Lys Asn Lys Ser His Ile Met Pro Leu Pro Gly Trp Phe Val Phe Thr
[1843] 340 345 350
[1844] Lys Tyr Lys Trp Leu Leu Thr Leu Leu Thr Ile Ile Phe Gln Met Leu
[1845] 355 360 365
[1846] Pro Met Tyr Leu Ala Asp Val Tyr Arg Val Leu Thr Gly Lys Ile Pro
[1847] 370 375 380

[1848] Arg Tyr Met Lys Leu His His Leu Val Ile Gln Thr Arg Leu Gly Ile
[1849] 385 390 395 400
[1850] Asp Phe Phe Thr Ser His Ser Trp Val Met Lys Thr Asp Arg Val Arg
[1851] 405 410 415
[1852] Glu Leu Phe Gly Ser Leu Ser Leu Ala Glu Lys His Met Phe Pro Cys
[1853] 420 425 430
[1854] Asp Pro Ser Ser Ile Asp Trp Thr Asp Tyr Leu Gln Ser Tyr Cys Tyr
[1855] 435 440 445
[1856] Gly Val Arg Arg Phe Leu Glu Lys Lys Lys
[1857] 450 455
[1858] <210> 56
[1859] <211> 454
[1860] <212> PRT
[1861] <213> 灰翅夜蛾
[1862] <400> 56
[1863] Met Val Val Leu Thr Ser Lys Glu Lys Ser Asn Met Ser Val Ala Asp
[1864] 1 5 10 15
[1865] Phe Tyr Ala Gly Lys Ser Val Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu
[1866] 20 25 30
[1867] Gly Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Asp Ile Asp
[1868] 35 40 45
[1869] Lys Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Gln Ser Ile Arg Glu
[1870] 50 55 60
[1871] Arg Leu Thr Lys Ile Val Asp Asp Pro Leu Phe Asn Arg Leu Lys Asp
[1872] 65 70 75 80
[1873] Lys Arg Pro Asp Asp Leu Gly Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Ile
[1874] 85 90 95
[1875] Thr Val Pro Gly Leu Gly Ile Ser Glu Glu Asn Glu Thr Ile Leu Thr
[1876] 100 105 110
[1877] Glu Lys Val Ser Val Val Ile His Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn
[1878] 115 120 125
[1879] Glu Pro Leu Ala Thr Ala Trp Asn Val Asn Val Glu Gly Thr Arg Met
[1880] 130 135 140
[1881] Ile Met Ala Leu Ser Arg Arg Met Lys Arg Ile Glu Val Phe Ile His
[1882] 145 150 155 160
[1883] Ile Ser Thr Ala Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Ala Val Ile Asp Glu Val
[1884] 165 170 175
[1885] Leu Tyr Pro Pro Pro Ala Asp Ile Asn Asp Val His Gln His Val Lys
[1886] 180 185 190
[1887] Asn Gly Val Thr Glu Glu Glu Thr Glu Lys Ile Leu Asn Gly Arg Pro
[1888] 195 200 205
[1889] Asn Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val Ala Glu

[1890] 210 215 220
[1891] Asn Gln Ser Tyr Met Pro Thr Ile Ile Val Arg Pro Ser Ile Val Gly
[1892] 225 230 235 240
[1893] Ala Ile Lys Asp Asp Pro Ile Arg Gly Trp Leu Ala Asn Trp Tyr Gly
[1894] 245 250 255
[1895] Ala Thr Gly Leu Ser Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg Val Ile
[1896] 260 265 270
[1897] Tyr Gly His Ser Asn His Val Val Asp Leu Ile Pro Val Asp Tyr Val
[1898] 275 280 285
[1899] Ala Asn Leu Val Ile Val Ala Gly Ala Lys Thr Tyr His Ser Asn Glu
[1900] 290 295 300
[1901] Val Thr Ile Tyr Asn Ser Cys Ser Ser Ser Cys Asn Pro Ile Thr Met
[1902] 305 310 315 320
[1903] Lys Arg Leu Val Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Thr Val Lys His Lys Ser
[1904] 325 330 335
[1905] Tyr Val Met Pro Leu Pro Gly Trp Tyr Val Tyr Ser Asn Tyr Lys Trp
[1906] 340 345 350
[1907] Leu Val Phe Leu Val Thr Val Ile Phe Gln Val Ile Pro Ala Tyr Leu
[1908] 355 360 365
[1909] Gly Asp Ile Gly Arg Arg Leu Leu Gly Lys Asn Pro Arg Tyr Tyr Lys
[1910] 370 375 380
[1911] Leu Gln Asn Leu Val Ala Gln Thr Gln Glu Ala Val His Phe Phe Thr
[1912] 385 390 395 400
[1913] Ser His Thr Trp Glu Ile Lys Ser Lys Arg Thr Ser Glu Leu Phe Ser
[1914] 405 410 415
[1915] Ser Leu Ser Leu Thr Asp Gln Arg Met Phe Pro Cys Asp Ala Asn Arg
[1916] 420 425 430
[1917] Ile Asp Trp Thr Asp Tyr Ile Thr Asp Tyr Cys Ser Gly Val Arg Gln
[1918] 435 440 445
[1919] Phe Leu Glu Lys Ile Lys
[1920] 450
[1921] <210> 57
[1922] <211> 455
[1923] <212> PRT
[1924] <213> 棉铃虫
[1925] <400> 57
[1926] Met Val Val Leu Thr Ser Lys Glu Thr Lys Pro Ser Val Ala Glu Phe
[1927] 1 5 10 15
[1928] Tyr Ala Gly Lys Ser Val Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu Gly
[1929] 20 25 30
[1930] Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Asp Ile Glu Asn
[1931] 35 40 45

[1932] Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Leu Ser Val Ser Glu Arg
[1933] 50 55 60
[1934] Ile Lys Gln Phe Leu Asp Asp Pro Leu Phe Thr Arg Leu Lys Asp Lys
[1935] 65 70 75 80
[1936] Arg Pro Ala Asp Leu Glu Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Ile Thr
[1937] 85 90 95
[1938] Ala Pro Asp Leu Gly Ile Asn Ser Glu Asn Glu Lys Met Leu Ile Glu
[1939] 100 105 110
[1940] Lys Val Ser Val Ile Ile His Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn Glu
[1941] 115 120 125
[1942] Pro Leu Pro Thr Ala Trp Lys Ile Asn Val Glu Gly Thr Arg Met Met
[1943] 130 135 140
[1944] Leu Ala Leu Ser Arg Arg Met Lys Arg Ile Glu Val Phe Ile His Ile
[1945] 145 150 155 160
[1946] Ser Thr Ala Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Glu Val Val Asp Glu Ile Leu
[1947] 165 170 175
[1948] Tyr Pro Ala Pro Ala Asp Ile Asp Gln Val His Gln Tyr Val Lys Asp
[1949] 180 185 190
[1950] Gly Ile Ser Glu Glu Asp Thr Glu Lys Ile Leu Asn Gly Arg Pro Asn
[1951] 195 200 205
[1952] Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val Ala Glu Asn
[1953] 210 215 220
[1954] Gln Ala Tyr Val Pro Thr Ile Ile Val Arg Pro Ser Val Val Ala Ala
[1955] 225 230 235 240
[1956] Ile Lys Asp Glu Pro Leu Lys Gly Trp Leu Gly Asn Trp Phe Gly Ala
[1957] 245 250 255
[1958] Thr Gly Leu Thr Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg Val Ile Tyr
[1959] 260 265 270
[1960] Gly His Ser Ser Tyr Ile Val Asp Leu Ile Pro Val Asp Tyr Val Ala
[1961] 275 280 285
[1962] Asn Leu Val Ile Ala Ala Gly Ala Lys Ser Ser Lys Ser Thr Glu Leu
[1963] 290 295 300
[1964] Lys Val Tyr Asn Cys Cys Ser Ser Ser Cys Asn Pro Val Thr Ile Gly
[1965] 305 310 315 320
[1966] Thr Leu Met Ser Met Phe Ala Asp Asp Ala Ile Lys Gln Lys Ser Tyr
[1967] 325 330 335
[1968] Ala Met Pro Leu Pro Gly Trp Tyr Ile Phe Thr Lys Tyr Lys Trp Leu
[1969] 340 345 350
[1970] Val Leu Leu Leu Thr Phe Leu Phe Gln Val Ile Pro Ala Tyr Val Thr
[1971] 355 360 365
[1972] Asp Leu Ser Arg His Leu Ile Gly Lys Ser Pro Arg Tyr Ile Lys Leu
[1973] 370 375 380

[1974] Gln Ser Leu Val Asn Gln Thr Arg Ser Ser Ile Asp Phe Phe Thr Asn
[1975] 385 390 395 400
[1976] His Ser Trp Val Met Lys Ala Asp Arg Val Arg Glu Leu Tyr Ala Ser
[1977] 405 410 415
[1978] Leu Ser Pro Ala Asp Lys Tyr Leu Phe Pro Cys Asp Pro Thr Asp Ile
[1979] 420 425 430
[1980] Asn Trp Thr His Tyr Ile Gln Asp Tyr Cys Trp Gly Val Arg His Phe
[1981] 435 440 445
[1982] Leu Glu Lys Lys Ser Tyr Glu
[1983] 450 455
[1984] <210> 58
[1985] <211> 355
[1986] <212> PRT
[1987] <213> 亚洲玉米螟
[1988] <400> 58
[1989] Met Ala Pro Asn Ile Lys Asp Gly Ala Asp Leu Asn Gly Val Leu Phe
[1990] 1 5 10 15
[1991] Glu Asp Asp Ala Ser Thr Pro Asp Tyr Ala Leu Ala Thr Ala Pro Val
[1992] 20 25 30
[1993] Gln Lys Ala Asp Asn Tyr Pro Arg Lys Leu Val Trp Arg Asn Ile Ile
[1994] 35 40 45
[1995] Leu Phe Ala Tyr Leu His Leu Ala Ala Val Tyr Gly Ala Tyr Leu Phe
[1996] 50 55 60
[1997] Leu Phe Ser Ala Lys Trp Gln Thr Asp Ile Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr
[1998] 65 70 75 80
[1999] Val Ile Ser Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala
[2000] 85 90 95
[2001] His Lys Ser Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Arg Leu Ile Leu Ile Ile
[2002] 100 105 110
[2003] Phe Asn Thr Val Ser Phe Gln Asp Ser Ala Leu Asp Trp Ser Arg Asp
[2004] 115 120 125
[2005] His Arg Met His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn
[2006] 130 135 140
[2007] Ala Thr Arg Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu Val Arg
[2008] 145 150 155 160
[2009] Lys His Pro Glu Leu Lys Arg Lys Gly Lys Gly Leu Asp Leu Ser Asp
[2010] 165 170 175
[2011] Leu Tyr Ala Asp Pro Ile Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr Leu Leu
[2012] 180 185 190
[2013] Leu Met Pro Leu Gly Cys Phe Ile Met Pro Thr Val Val Pro Val Tyr
[2014] 195 200 205
[2015] Phe Trp Gly Glu Thr Trp Thr Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala Leu Phe

[2016] 210 215 220
[2017] Arg Tyr Thr Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala
[2018] 225 230 235 240
[2019] His Lys Trp Gly His Lys Pro Tyr Asp Ser Ser Ile Lys Pro Ser Glu
[2020] 245 250 255
[2021] Asn Leu Ser Val Ser Leu Phe Ala Leu Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr
[2022] 260 265 270
[2023] His His Thr Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Gly Asn Asn
[2024] 275 280 285
[2025] Arg Leu Asn Phe Thr Thr Asn Phe Ile Asn Phe Phe Ala Lys Ile Gly
[2026] 290 295 300
[2027] Trp Ala Tyr Asp Leu Lys Thr Val Ser Asp Glu Ile Ile Gln Asn Arg
[2028] 305 310 315 320
[2029] Val Lys Arg Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Trp Gly Trp Gly Asp
[2030] 325 330 335
[2031] Lys Asp Gln Pro Lys Glu Glu Val Asn Ala Ala Ile Arg Ile Asn Pro
[2032] 340 345 350
[2033] Lys Asp Glu
[2034] 355
[2035] <210> 59
[2036] <211> 352
[2037] <212> PRT
[2038] <213> 红醋栗穿孔蛾
[2039] <400> 59
[2040] Met Pro Pro Asn Val Thr Glu Ala Asn Gly Val Leu Phe Glu Asn Asp
[2041] 1 5 10 15
[2042] Val Gln Thr Pro Asp Met Gly Leu Glu Val Ala Pro Val Gln Lys Ala
[2043] 20 25 30
[2044] Asp Glu Arg Lys Ile Gln Leu Val Trp Arg Asn Ile Ile Ala Phe Ala
[2045] 35 40 45
[2046] Cys Leu His Leu Ala Ala Val Tyr Gly Ala Tyr Leu Phe Phe Thr Ser
[2047] 50 55 60
[2048] Ala Ile Trp Gln Thr Asp Ile Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr Val Met Ser
[2049] 65 70 75 80
[2050] Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys Ser
[2051] 85 90 95
[2052] Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Arg Leu Ile Leu Val Ala Phe Asn Thr
[2053] 100 105 110
[2054] Leu Ala Phe Gln Asp Ser Ala Ile Asp Trp Ala Arg Asp His Arg Met
[2055] 115 120 125
[2056] His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr Arg
[2057] 130 135 140

[2058] Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu Cys Arg Lys His Pro
[2059] 145 150 155 160
[2060] Glu Leu Lys Arg Lys Gly Gln Gly Leu Asp Leu Ser Asp Leu Tyr Ala
[2061] 165 170 175
[2062] Asp Pro Ile Ile Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr Leu Leu Leu Met Pro
[2063] 180 185 190
[2064] Leu Ala Cys Phe Val Leu Pro Thr Ile Ile Pro Val Tyr Leu Trp Gly
[2065] 195 200 205
[2066] Glu Ser Trp Lys Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala Met Phe Arg Tyr Thr
[2067] 210 215 220
[2068] Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Lys Trp
[2069] 225 230 235 240
[2070] Gly Gly Lys Pro Tyr Asp Lys Asn Ile Gln Pro Ala Gln Asn Ile Ser
[2071] 245 250 255
[2072] Val Ala Ile Phe Ala Leu Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Thr
[2073] 260 265 270
[2074] Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Gly Asn Asn Arg Leu Asn
[2075] 275 280 285
[2076] Phe Thr Thr Ser Phe Ile Asn Phe Phe Ala Ser Phe Gly Trp Ala Tyr
[2077] 290 295 300
[2078] Asp Leu Lys Thr Val Ser Asp Glu Ile Ile Gln Gln Arg Val Lys Arg
[2079] 305 310 315 320
[2080] Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Arg Gly Trp Gly Asp Gln Asp Ile
[2081] 325 330 335
[2082] Pro Ala Glu Glu Ala Gln Ala Ala Leu Arg Ile Asn Arg Lys Asp Asp
[2083] 340 345 350
[2084] <210> 60
[2085] <211> 353
[2086] <212> PRT
[2087] <213> 玉米穗蛾
[2088] <400> 60
[2089] Met Ala Pro Asn Ile Ser Glu Asp Val Asn Gly Val Leu Phe Glu Ser
[2090] 1 5 10 15
[2091] Asp Ala Ala Thr Pro Asp Leu Ala Leu Ser Thr Pro Pro Val Gln Lys
[2092] 20 25 30
[2093] Ala Asp Asn Arg Pro Lys Gln Leu Val Trp Arg Asn Ile Leu Leu Phe
[2094] 35 40 45
[2095] Ala Tyr Leu His Leu Ala Ala Leu Tyr Gly Gly Tyr Leu Phe Leu Phe
[2096] 50 55 60
[2097] Ser Ala Lys Trp Gln Thr Asp Ile Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr Val Ile
[2098] 65 70 75 80
[2099] Ser Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys

[2100] 85 90 95
[2101] Ser Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Arg Val Ile Leu Val Ile Phe Asn
[2102] 100 105 110
[2103] Thr Val Ala Phe Gln Asp Ala Ala Met Asp Trp Ala Arg Asp His Arg
[2104] 115 120 125
[2105] Met His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr
[2106] 130 135 140
[2107] Arg Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His
[2108] 145 150 155 160
[2109] Pro Asp Leu Lys Glu Lys Gly Lys Gly Leu Asp Met Ser Asp Leu Leu
[2110] 165 170 175
[2111] Ala Asp Pro Ile Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr Leu Ile Leu Met
[2112] 180 185 190
[2113] Pro Leu Ala Cys Phe Val Met Pro Thr Val Ile Pro Val Tyr Phe Trp
[2114] 195 200 205
[2115] Gly Glu Thr Trp Thr Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala Met Phe Arg Tyr
[2116] 210 215 220
[2117] Ala Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Lys
[2118] 225 230 235 240
[2119] Trp Gly Asp Lys Pro Tyr Asp Lys Ser Ile Lys Pro Ser Glu Asn Leu
[2120] 245 250 255
[2121] Ser Val Ala Met Phe Ala Leu Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His
[2122] 260 265 270
[2123] Thr Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Gly Asn Asn Lys Leu
[2124] 275 280 285
[2125] Asn Phe Thr Thr Thr Phe Ile Asn Phe Phe Ala Lys Ile Gly Trp Ala
[2126] 290 295 300
[2127] Tyr Asp Leu Lys Thr Val Ser Asp Asp Ile Val Lys Asn Arg Val Lys
[2128] 305 310 315 320
[2129] Arg Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Trp Gly Trp Gly Asp Glu Asn
[2130] 325 330 335
[2131] Gln Ser Lys Glu Glu Ile Asp Ala Ala Ile Arg Ile Asn Pro Lys Asp
[2132] 340 345 350
[2133] Asp
[2134] <210> 61
[2135] <211> 354
[2136] <212> PRT
[2137] <213> 人工序列
[2138] <220>
[2139] <223> 由SEQ ID NO: 28编码的具有解脂耶氏酵母OLE1前导序列的粉纹夜蛾去饱和酶
[2140] <400> 61
[2141] Met Val Lys Asn Val Asp Gln Val Asp Leu Ser Gln Val Asp Thr Ile

[2142] 1 5 10 15
[2143] Ala Ser Gly Arg Asp Val Asn Tyr Lys Val Lys Tyr Thr Ser Gly Val
[2144] 20 25 30
[2145] Lys Thr Thr Pro Arg Lys Tyr Lys Tyr Ile Tyr Thr Asn Phe Leu Thr
[2146] 35 40 45
[2147] Phe Ser Tyr Ala His Leu Ala Ala Leu Tyr Gly Leu Tyr Leu Cys Phe
[2148] 50 55 60
[2149] Thr Ser Ala Lys Trp Glu Thr Leu Leu Phe Ser Phe Val Leu Phe His
[2150] 65 70 75 80
[2151] Met Ser Asn Ile Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Thr His
[2152] 85 90 95
[2153] Lys Thr Phe Lys Ala Lys Leu Pro Leu Glu Ile Val Leu Met Ile Phe
[2154] 100 105 110
[2155] Asn Ser Leu Ala Phe Gln Asn Thr Ala Ile Thr Trp Ala Arg Glu His
[2156] 115 120 125
[2157] Arg Leu His His Lys Tyr Ser Asp Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala
[2158] 130 135 140
[2159] Ser Arg Gly Phe Phe Tyr Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Lys Lys
[2160] 145 150 155 160
[2161] His Pro Asp Val Leu Lys Tyr Gly Lys Thr Ile Asp Met Ser Asp Val
[2162] 165 170 175
[2163] Tyr Asn Asn Pro Val Leu Lys Phe Gln Lys Lys Tyr Ala Val Pro Leu
[2164] 180 185 190
[2165] Ile Gly Thr Val Cys Phe Ala Leu Pro Thr Leu Ile Pro Val Tyr Cys
[2166] 195 200 205
[2167] Trp Gly Glu Ser Trp Asn Asn Ala Trp His Ile Ala Leu Phe Arg Tyr
[2168] 210 215 220
[2169] Ile Phe Asn Leu Asn Val Thr Phe Leu Val Asn Ser Ala Ala His Ile
[2170] 225 230 235 240
[2171] Trp Gly Asn Lys Pro Tyr Asp Lys Ser Ile Leu Pro Ala Gln Asn Leu
[2172] 245 250 255
[2173] Leu Val Ser Phe Leu Ala Ser Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His
[2174] 260 265 270
[2175] Val Phe Pro Trp Asp Tyr Arg Thr Ala Glu Leu Gly Asn Asn Phe Leu
[2176] 275 280 285
[2177] Asn Leu Thr Thr Leu Phe Ile Asp Phe Cys Ala Trp Phe Gly Trp Ala
[2178] 290 295 300
[2179] Tyr Asp Leu Lys Ser Val Ser Glu Asp Ile Ile Lys Gln Arg Ala Lys
[2180] 305 310 315 320
[2181] Arg Thr Gly Asp Gly Ser Ser Gly Val Ile Trp Gly Trp Asp Asp Lys
[2182] 325 330 335
[2183] Asp Met Asp Arg Asp Ile Lys Ser Lys Ala Asn Ile Phe Tyr Ala Lys

[2184] 340 345 350

[2185] Lys Glu

[2186] <210> 62

[2187] <211> 342

[2188] <212> PRT

[2189] <213> 人工序列

[2190] <220>

[2191] <223> 由SEQ ID NO: 29编码的具有解脂耶氏酵母OLE1前导序列的玉米穗蛾去饱和酶

[2192] <400> 62

[2193] Met Val Lys Asn Val Asp Gln Val Asp Leu Ser Gln Val Asp Thr Ile

[2194] 1 5 10 15

[2195] Ala Ser Gly Arg Asp Val Asn Tyr Lys Val Lys Tyr Thr Ser Gly Val

[2196] 20 25 30

[2197] Arg Lys Tyr Gln Ile Val Tyr Pro Asn Leu Ile Thr Phe Gly Tyr Trp

[2198] 35 40 45

[2199] His Ile Ala Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Leu Cys Phe Thr Ser Ala Lys

[2200] 50 55 60

[2201] Trp Ala Thr Ile Leu Phe Ser Tyr Ile Leu Phe Val Leu Ala Glu Ile

[2202] 65 70 75 80

[2203] Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys Thr Tyr Lys

[2204] 85 90 95

[2205] Ala Lys Leu Pro Leu Glu Ile Leu Leu Met Val Phe Asn Ser Ile Ala

[2206] 100 105 110

[2207] Phe Gln Asn Ser Ala Ile Asp Trp Val Arg Asp His Arg Leu His His

[2208] 115 120 125

[2209] Lys Tyr Ser Asp Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Ser Arg Gly Phe

[2210] 130 135 140

[2211] Phe Tyr Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Glu Val

[2212] 145 150 155 160

[2213] Lys Lys Arg Gly Lys Glu Leu Asn Met Ser Asp Ile Tyr Asn Asn Pro

[2214] 165 170 175

[2215] Val Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Ala Ile Pro Phe Ile Gly Ala Val

[2216] 180 185 190

[2217] Cys Phe Ala Leu Pro Thr Met Ile Pro Val Tyr Phe Trp Gly Glu Thr

[2218] 195 200 205

[2219] Trp Ser Asn Ala Trp His Ile Thr Met Leu Arg Tyr Ile Met Asn Leu

[2220] 210 215 220

[2221] Asn Val Thr Phe Leu Val Asn Ser Ala Ala His Ile Trp Gly Asn Lys

[2222] 225 230 235 240

[2223] Pro Tyr Asp Ala Lys Ile Leu Pro Ala Gln Asn Val Ala Val Ser Val

[2224] 245 250 255

[2225] Ala Thr Gly Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Val Phe Pro Trp

[2226] 260 265 270
[2227] Asp Tyr Arg Ala Ala Glu Leu Gly Asn Asn Ser Leu Asn Leu Thr Thr
[2228] 275 280 285
[2229] Lys Phe Ile Asp Leu Phe Ala Ala Ile Gly Trp Ala Tyr Asp Leu Lys
[2230] 290 295 300
[2231] Thr Val Ser Glu Asp Met Ile Lys Gln Arg Ile Lys Arg Thr Gly Asp
[2232] 305 310 315 320
[2233] Gly Thr Asp Leu Trp Gly His Glu Gln Asn Cys Asp Glu Val Trp Asp
[2234] 325 330 335
[2235] Val Lys Asp Lys Ser Ser
[2236] 340
[2237] <210> 63
[2238] <211> 363
[2239] <212> PRT
[2240] <213> 人工序列
[2241] <220>
[2242] <223> 由SEQ ID NO: 15编码的具有白假丝酵母OLE1前导序列的黄地老虎去饱和酶
[2243] <400> 63
[2244] Met Thr Thr Val Glu Gln Leu Glu Thr Val Asp Ile Thr Lys Leu Asn
[2245] 1 5 10 15
[2246] Ala Ile Ala Ala Gly Thr Asn Lys Lys Val Pro Met Ala Gln Gly Val
[2247] 20 25 30
[2248] Gln Thr Thr Thr Ile Leu Arg Glu Glu Glu Pro Ser Leu Thr Phe Val
[2249] 35 40 45
[2250] Val Pro Gln Glu Pro Arg Lys Tyr Gln Ile Val Tyr Pro Asn Leu Ile
[2251] 50 55 60
[2252] Thr Phe Gly Tyr Trp His Ile Ala Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Leu Cys
[2253] 65 70 75 80
[2254] Phe Thr Ser Ala Lys Trp Gln Thr Ile Leu Phe Ser Phe Met Leu Val
[2255] 85 90 95
[2256] Val Leu Ala Glu Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala
[2257] 100 105 110
[2258] His Lys Thr Tyr Lys Ala Lys Leu Pro Leu Gln Ile Ile Leu Met Ile
[2259] 115 120 125
[2260] Leu Asn Ser Ile Ala Phe Gln Asn Ser Ala Ile Asp Trp Val Arg Asp
[2261] 130 135 140
[2262] His Arg Leu His His Lys Tyr Ser Asp Thr Asp Ala Asp Pro His Asn
[2263] 145 150 155 160
[2264] Ala Thr Arg Gly Phe Phe Tyr Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Arg
[2265] 165 170 175
[2266] Lys His Pro Glu Val Lys Arg Arg Gly Lys Glu Leu Asp Met Ser Asp
[2267] 180 185 190

[2268] Ile Tyr Asn Asn Pro Val Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Ala Ile Pro
[2269] 195 200 205
[2270] Phe Ile Gly Ala Met Cys Phe Gly Leu Pro Thr Phe Ile Pro Val Tyr
[2271] 210 215 220
[2272] Phe Trp Gly Glu Thr Trp Ser Asn Ala Trp His Ile Thr Met Leu Arg
[2273] 225 230 235 240
[2274] Tyr Ile Leu Asn Leu Asn Ile Thr Phe Leu Val Asn Ser Ala Ala His
[2275] 245 250 255
[2276] Ile Trp Gly Tyr Lys Pro Tyr Asp Ile Lys Ile Leu Pro Ala Gln Asn
[2277] 260 265 270
[2278] Ile Ala Val Ser Ile Val Thr Gly Gly Glu Val Ser Ile Thr Thr Thr
[2279] 275 280 285
[2280] Thr Phe Phe Pro Trp Asp Tyr Arg Ala Ala Glu Leu Gly Asn Asn Tyr
[2281] 290 295 300
[2282] Leu Asn Leu Thr Thr Lys Phe Ile Asp Phe Phe Ala Trp Ile Gly Trp
[2283] 305 310 315 320
[2284] Ala Tyr Asp Leu Lys Thr Val Ser Ser Asp Val Ile Lys Ser Lys Ala
[2285] 325 330 335
[2286] Glu Arg Thr Gly Asp Gly Thr Asn Leu Trp Gly Leu Glu Asp Lys Gly
[2287] 340 345 350
[2288] Glu Glu Asp Phe Leu Lys Ile Trp Lys Asp Asn
[2289] 355 360
[2290] <210> 64
[2291] <211> 326
[2292] <212> PRT
[2293] <213> 脐橙螟蛾
[2294] <400> 64
[2295] Met Val Pro Asn Lys Gly Ser Ser Asp Val Leu Ser Glu His Ser Glu
[2296] 1 5 10 15
[2297] Pro Gln Phe Thr Lys Leu Ile Ala Pro Gln Ala Gly Pro Arg Lys Tyr
[2298] 20 25 30
[2299] Lys Ile Val Tyr Arg Asn Leu Leu Thr Phe Gly Tyr Trp His Leu Ser
[2300] 35 40 45
[2301] Ala Val Tyr Gly Leu Tyr Leu Cys Phe Thr Cys Ala Lys Trp Ala Thr
[2302] 50 55 60
[2303] Ile Leu Phe Ala Phe Phe Leu Tyr Val Ile Ala Glu Ile Gly Ile Thr
[2304] 65 70 75 80
[2305] Gly Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Arg Thr Tyr Lys Ala Lys Leu
[2306] 85 90 95
[2307] Pro Leu Glu Ile Leu Leu Leu Ile Met Asn Ser Ile Ala Phe Gln Asp
[2308] 100 105 110
[2309] Thr Ala Phe Thr Trp Ala Arg Asp His Arg Leu His His Lys Tyr Ser

[2310] 115 120 125
[2311] Asp Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr Arg Gly Phe Phe Tyr Ser
[2312] 130 135 140
[2313] His Val Gly Trp Leu Leu Val Lys Lys His Pro Glu Val Lys Ala Arg
[2314] 145 150 155 160
[2315] Gly Lys Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Leu Lys Asn Asn Pro Leu Leu Lys
[2316] 165 170 175
[2317] Phe Gln Lys Lys Tyr Ala Ile Leu Val Ile Gly Thr Leu Cys Phe Leu
[2318] 180 185 190
[2319] Met Pro Thr Phe Val Pro Val Tyr Phe Trp Gly Glu Gly Ile Ser Thr
[2320] 195 200 205
[2321] Ala Trp Asn Ile Asn Leu Leu Arg Tyr Val Met Asn Leu Asn Met Thr
[2322] 210 215 220
[2323] Phe Leu Val Asn Ser Ala Ala His Ile Phe Gly Asn Lys Pro Tyr Asp
[2324] 225 230 235 240
[2325] Lys Ser Ile Ala Ser Val Gln Asn Ile Ser Val Ser Leu Ala Thr Phe
[2326] 245 250 255
[2327] Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Thr Tyr Pro Trp Asp Tyr Arg
[2328] 260 265 270
[2329] Ala Ala Glu Leu Gly Asn Asn Arg Leu Asn Met Thr Thr Ala Phe Ile
[2330] 275 280 285
[2331] Asp Phe Phe Ala Trp Ile Gly Trp Ala Tyr Asp Leu Lys Ser Val Pro
[2332] 290 295 300
[2333] Gln Glu Ala Ile Ala Lys Arg Cys Ala Lys Thr Gly Asp Gly Thr Asp
[2334] 305 310 315 320
[2335] Met Trp Gly Arg Lys Arg
[2336] 325
[2337] <210> 65
[2338] <211> 338
[2339] <212> PRT
[2340] <213> 灰翅夜蛾
[2341] <400> 65
[2342] Met Ala Gln Cys Val Gln Thr Thr Thr Ile Leu Glu Gln Lys Glu Glu
[2343] 1 5 10 15
[2344] Lys Thr Val Thr Leu Leu Val Pro Gln Ala Gly Lys Arg Lys Phe Glu
[2345] 20 25 30
[2346] Ile Val Tyr Phe Asn Ile Ile Thr Phe Ala Tyr Trp His Ile Ala Gly
[2347] 35 40 45
[2348] Leu Tyr Gly Leu Tyr Leu Cys Phe Thr Ser Thr Lys Trp Ala Thr Val
[2349] 50 55 60
[2350] Leu Phe Ser Phe Phe Leu Phe Val Val Ala Glu Val Gly Val Thr Ala
[2351] 65 70 75 80

[2352] Gly Ser His Arg Leu Trp Ser His Lys Thr Tyr Lys Ala Lys Leu Pro
[2353] 85 90 95
[2354] Leu Gln Ile Leu Leu Met Val Met Asn Ser Leu Ala Phe Gln Asn Thr
[2355] 100 105 110
[2356] Val Ile Asp Trp Val Arg Asp His Arg Leu His His Lys Tyr Ser Asp
[2357] 115 120 125
[2358] Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Ser Arg Gly Phe Phe Tyr Ser His
[2359] 130 135 140
[2360] Val Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Asp Val Lys Lys Arg Gly
[2361] 145 150 155 160
[2362] Lys Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ile Tyr Asn Asn Pro Val Leu Arg Phe
[2363] 165 170 175
[2364] Gln Lys Lys Tyr Ala Ile Pro Phe Ile Gly Ala Val Cys Phe Val Leu
[2365] 180 185 190
[2366] Pro Thr Leu Ile Pro Val Tyr Gly Trp Gly Glu Thr Trp Thr Asn Ala
[2367] 195 200 205
[2368] Trp His Val Ala Met Leu Arg Tyr Ile Met Asn Leu Asn Val Thr Phe
[2369] 210 215 220
[2370] Leu Val Asn Ser Ala Ala His Ile Tyr Gly Lys Arg Pro Tyr Asp Lys
[2371] 225 230 235 240
[2372] Lys Ile Leu Pro Ser Gln Asn Ile Ala Val Ser Ile Ala Thr Phe Gly
[2373] 245 250 255
[2374] Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Val Phe Pro Trp Asp Tyr Arg Ala
[2375] 260 265 270
[2376] Ala Glu Leu Gly Asn Asn Ser Leu Asn Phe Pro Thr Lys Phe Ile Asp
[2377] 275 280 285
[2378] Phe Phe Ala Trp Ile Gly Trp Ala Tyr Asp Leu Lys Thr Val Ser Lys
[2379] 290 295 300
[2380] Glu Met Ile Lys Gln Arg Ser Lys Arg Thr Gly Asp Gly Thr Asn Leu
[2381] 305 310 315 320
[2382] Trp Gly Leu Glu Asp Val Asp Thr Pro Glu Asp Leu Lys Asn Thr Lys
[2383] 325 330 335
[2384] Gly Glu
[2385] <210> 66
[2386] <211> 336
[2387] <212> PRT
[2388] <213> 黄地老虎
[2389] <400> 66
[2390] Met Ala Gln Gly Val Gln Thr Thr Thr Ile Leu Arg Glu Glu Glu Pro
[2391] 1 5 10 15
[2392] Ser Leu Thr Phe Val Val Pro Gln Glu Pro Arg Lys Tyr Gln Ile Val
[2393] 20 25 30

[2394] Tyr Pro Asn Leu Ile Thr Phe Gly Tyr Trp His Ile Ala Gly Leu Tyr
[2395] 35 40 45
[2396] Gly Leu Tyr Leu Cys Phe Thr Ser Ala Lys Trp Gln Thr Ile Leu Phe
[2397] 50 55 60
[2398] Ser Phe Met Leu Val Val Leu Ala Glu Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala
[2399] 65 70 75 80
[2400] His Arg Leu Trp Ala His Lys Thr Tyr Lys Ala Lys Leu Pro Leu Gln
[2401] 85 90 95
[2402] Ile Ile Leu Met Ile Leu Asn Ser Ile Ala Phe Gln Asn Ser Ala Ile
[2403] 100 105 110
[2404] Asp Trp Val Arg Asp His Arg Leu His His Lys Tyr Ser Asp Thr Asp
[2405] 115 120 125
[2406] Ala Asp Pro His Asn Ala Thr Arg Gly Phe Phe Tyr Ser His Val Gly
[2407] 130 135 140
[2408] Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro Glu Val Lys Arg Arg Gly Lys Glu
[2409] 145 150 155 160
[2410] Leu Asp Met Ser Asp Ile Tyr Asn Asn Pro Val Leu Arg Phe Gln Lys
[2411] 165 170 175
[2412] Lys Tyr Ala Ile Pro Phe Ile Gly Ala Met Cys Phe Gly Leu Pro Thr
[2413] 180 185 190
[2414] Phe Ile Pro Val Tyr Phe Trp Gly Glu Thr Trp Ser Asn Ala Trp His
[2415] 195 200 205
[2416] Ile Thr Met Leu Arg Tyr Ile Leu Asn Leu Asn Ile Thr Phe Leu Val
[2417] 210 215 220
[2418] Asn Ser Ala Ala His Ile Trp Gly Tyr Lys Pro Tyr Asp Ile Lys Ile
[2419] 225 230 235 240
[2420] Leu Pro Ala Gln Asn Ile Ala Val Ser Ile Val Thr Gly Gly Glu Val
[2421] 245 250 255
[2422] Ser Ile Thr Thr Thr Thr Phe Phe Pro Trp Asp Tyr Arg Ala Ala Glu
[2423] 260 265 270
[2424] Leu Gly Asn Asn Tyr Leu Asn Leu Thr Thr Lys Phe Ile Asp Phe Phe
[2425] 275 280 285
[2426] Ala Trp Ile Gly Trp Ala Tyr Asp Leu Lys Thr Val Ser Ser Asp Val
[2427] 290 295 300
[2428] Ile Lys Ser Lys Ala Glu Arg Thr Gly Asp Gly Thr Asn Leu Trp Gly
[2429] 305 310 315 320
[2430] Leu Glu Asp Lys Gly Glu Glu Asp Phe Leu Lys Ile Trp Lys Asp Asn
[2431] 325 330 335
[2432] <210> 67
[2433] <211> 349
[2434] <212> PRT
[2435] <213> 粉纹夜蛾

[2436] <400> 67

[2437] Met Ala Val Met Ala Gln Thr Val Gln Glu Thr Ala Thr Val Leu Glu

[2438] 1 5 10 15

[2439] Glu Glu Ala Arg Thr Val Thr Leu Val Ala Pro Lys Thr Thr Pro Arg

[2440] 20 25 30

[2441] Lys Tyr Lys Tyr Ile Tyr Thr Asn Phe Leu Thr Phe Ser Tyr Ala His

[2442] 35 40 45

[2443] Leu Ala Ala Leu Tyr Gly Leu Tyr Leu Cys Phe Thr Ser Ala Lys Trp

[2444] 50 55 60

[2445] Glu Thr Leu Leu Phe Ser Phe Val Leu Phe His Met Ser Asn Ile Gly

[2446] 65 70 75 80

[2447] Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Thr His Lys Thr Phe Lys Ala

[2448] 85 90 95

[2449] Lys Leu Pro Leu Glu Ile Val Leu Met Ile Phe Asn Ser Leu Ala Phe

[2450] 100 105 110

[2451] Gln Asn Thr Ala Ile Thr Trp Ala Arg Glu His Arg Leu His His Lys

[2452] 115 120 125

[2453] Tyr Ser Asp Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Ser Arg Gly Phe Phe

[2454] 130 135 140

[2455] Tyr Ser His Val Gly Trp Leu Leu Val Lys Lys His Pro Asp Val Leu

[2456] 145 150 155 160

[2457] Lys Tyr Gly Lys Thr Ile Asp Met Ser Asp Val Tyr Asn Asn Pro Val

[2458] 165 170 175

[2459] Leu Lys Phe Gln Lys Lys Tyr Ala Val Pro Leu Ile Gly Thr Val Cys

[2460] 180 185 190

[2461] Phe Ala Leu Pro Thr Leu Ile Pro Val Tyr Cys Trp Gly Glu Ser Trp

[2462] 195 200 205

[2463] Asn Asn Ala Trp His Ile Ala Leu Phe Arg Tyr Ile Phe Asn Leu Asn

[2464] 210 215 220

[2465] Val Thr Phe Leu Val Asn Ser Ala Ala His Ile Trp Gly Asn Lys Pro

[2466] 225 230 235 240

[2467] Tyr Asp Lys Ser Ile Leu Pro Ala Gln Asn Leu Leu Val Ser Phe Leu

[2468] 245 250 255

[2469] Ala Ser Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Val Phe Pro Trp Asp

[2470] 260 265 270

[2471] Tyr Arg Thr Ala Glu Leu Gly Asn Asn Phe Leu Asn Leu Thr Thr Leu

[2472] 275 280 285

[2473] Phe Ile Asp Phe Cys Ala Trp Phe Gly Trp Ala Tyr Asp Leu Lys Ser

[2474] 290 295 300

[2475] Val Ser Glu Asp Ile Ile Lys Gln Arg Ala Lys Arg Thr Gly Asp Gly

[2476] 305 310 315 320

[2477] Ser Ser Gly Val Ile Trp Gly Trp Asp Asp Lys Asp Met Asp Arg Asp

[2478] 325 330 335

[2479] Ile Lys Ser Lys Ala Asn Ile Phe Tyr Ala Lys Lys Glu

[2480] 340 345

[2481] <210> 68

[2482] <211> 981

[2483] <212> DNA

[2484] <213> 人工序列

[2485] <220>

[2486] <223> 来自DTU WO 2016/207339 SEQ ID NO: 1的脐橙螟蛾去饱和酶

[2487] <400> 68

[2488] atggttccaa acaagggttc ctctgatgtt ttgtctgaac attctgaacc acaattcacc 60

[2489] aagttgattg ctccacaagc tggtccaaga aagtacaaaa tcgtttacag aaacttgttg 120

[2490] accttcggtt actggcattt gtctgctgtt tatggtttgt acttgtgttt cacttgtgct 180

[2491] aagtgggcta ctattttgtt cgctttcttc ttgtacgtta tcgccgaaat tggtattact 240

[2492] ggtggtgctc atagattatg ggctcataga acttacaaag ccaagttgcc attggaaatc 300

[2493] ttgttgttga tcatgaactc cattgccttc caagatactg cttttacttg ggctagagat 360

[2494] catagattgc atcacaagta ctctgatact gatgctgatc cacataatgc tactagaggt 420

[2495] ttcttctact ctcatgttgg ttggttgttg gttaagaaac acccagaagt taaggctaga 480

[2496] ggtaagtact tgtctttgga tgacttgaag aacaaccctt tgttgaagtt ccaaaagaag 540

[2497] tacgccattt tggtcattgg tactttgtgc tttttgatgc caactttcgt tccagtttac 600

[2498] ttttggggtg aaggtatttc tactgcctgg aacattaact tgttaagata cgtcatgaac 660

[2499] ttgaacatga ccttttttggt taactccgct gctcatattt ttggtaacaa gccatacgat 720

[2500] aagtctatcg cctctgttca aaacatctct gtttctttgg ctactttcgg tgaaggtttc 780

[2501] cataactacc atcatactta tccatgggat tacagagctg ctgaattggg taacaataga 840

[2502] ttgaatatga ccaccgcctt cattgatttc tttgcttgga ttggttgggc ctacgatttg 900

[2503] aaatctgttc cacaagaagc tattgctaag agatgtgcta aaactggtga tggtactgat 960

[2504] atgtggggta gaaagagatg a 981

[2505] <210> 69

[2506] <211> 1470

[2507] <212> DNA

[2508] <213> 人工序列

[2509] <220>

[2510] <223> 来自DTU WO 2016/207339 SEQ ID NO: 40的灰翅夜蛾去饱和酶

[2511] <400> 69

[2512] ggacactgac atggactgaa ggagtagaga atcggcccgt ggagttggcc ttcattttca 60

[2513] gtcttatctc tcggtgttat ggtagtcact tatatcggta ttaaaataag tgaataaggc 120

[2514] ttgtaaaaat ggcgcaatgt gtacaaacaa caacgatttt ggaacaaaaa gaagagaaaa 180

[2515] cagtaacttt gctggtacct caagcgggaa agaggaagtt tgaaattgtg tattttaata 240

[2516] tcatcacctt cgcttactgg catatagctg gactatatgg cctttatttg tgcttcactt 300

[2517] caacaaaatg ggcgacagtt ttattctcat tctttctatt cgtcgtagca gaagtagggg 360

[2518] tcacggctgg ctcccacaga ctttggtcgc ataaaactta caaagcaaaa ctacctttac 420

[2519] aaattctgct aatggtgatg aattcccttg catttcaaaa cacagtcatt gattgggtga 480

[2520] gagaccatcg actccatcat aagtatagcg acactgatgc cgatccccat aatgcctccc 540
[2521] gaggattttt ctattcgcac gtcggttggc tgcttgtgag aaaacaccct gatgtcaaga 600
[2522] aacgaggaaa ggaaattgat atatctgata tttacaacaa tccggtactg aggttccaga 660
[2523] agaagtacgc aattcctttc atcggggcag tttgtttcgt cttaccaaca ttgataccgg 720
[2524] tttacggttg gggagaaacc tggactaatg cctggcacgt cgccatgctg cggtacatta 780
[2525] tgaaccttaa cgtcaccttc ctggtcaaca gcgctgctca tatatatgga aagagacctt 840
[2526] atgacaagaa gatcctacca tctcaaaaca tagctgtgtc cattgcaacc tttggggaag 900
[2527] gtttccataa ttatcatcat gtatttccat gggattatcg cgcagctgaa cttggaaata 960
[2528] acagtttgaa tttccctacg aaatttattg atttctttgc gtggatcgga tgggcgtatg 1020
[2529] acctaaagac tgtttcgaaa gaaatgataa aacaaaggtc aaaaagaact ggtgatggaa 1080
[2530] ctaatctatg ggggttagaa gatgtggata ccccggagga tttaaaaaat acaaaaggcg 1140
[2531] aataggcaaa cccttaaact caaacagtga ggtttaatgt gatatttaga attagaatta 1200
[2532] atttatttga aattaaatga aggttttgga taactgtttt taataataaa aatagttttt 1260
[2533] cgattaaatt ccttagatta ttttaaagga aatgtataag gtactcgcgt ggttagcaac 1320
[2534] ccagcagtcc ctgtttatct gtttttatga atttattcta tgaatgtaga tgtcgcatga 1380
[2535] aattttaaaa tgttgcattt gtataatttt acttatgaat aaataaattt atttttaaaa 1440
[2536] aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1470
[2537] <210> 70
[2538] <211> 1011
[2539] <212> DNA
[2540] <213> 人工序列
[2541] <220>
[2542] <223> 来自DTU WO 2016/207339 SEQ ID NO: 42的黄地老虎去饱和酶
[2543] <400> 70
[2544] atggctcaag gtgtccaaac aactacgata ttgagggagg aagagccgtc attgactttc 60
[2545] gtggtacctc aagaaccgag aaagtatcaa atcgtgtacc caaaccttat cacatttggg 120
[2546] tactggcata tagctggttt atacgggcta tatttgtgct ttacttcggc aaaatggcaa 180
[2547] acaattttat tcagtttcat gctcgttgtg ttagcagagt tgggaataac agccggcgct 240
[2548] cacaggttat gggcccacaa aacatataaa gcgaagcttc ccttacaaat tatcctgatg 300
[2549] atactgaact ccattgcctt ccaaaattcc gccattgatt gggtgaggga ccaccgtctc 360
[2550] catcataagt acagtgacac tgatgcagac cctcacaatg ctactcgtgg tttcttctat 420
[2551] tctcatgttg gatggttgct cgtaagaaaa catccagaag tcaagagacg tggaaaggaa 480
[2552] cttgacatgt ctgatattta caacaatcca gtgctgagat ttcaaaagaa gtatgctata 540
[2553] cccttcatcg gggcaatgtg cttcggatta ccaactttta tccctgttta cttctgggga 600
[2554] gaaacctgga gtaatgcttg gcatatcacc atgcttcggt acatcctcaa cctaaacatt 660
[2555] actttcctgg tcaacagtgc tgctcatatc tggggataca aaccttatga catcaaaata 720
[2556] ttgcctgccc aaaatatagc agtttccata gtaaccggcg gcgaagtttc cataactacc 780
[2557] accacgtttt ttccttggga ttatcgtgca gcagaattgg ggaacaatta tcttaatttg 840
[2558] acgactaagt tcatagattt cttcgcttgg atcggatggg cttacgatct taagacggtg 900
[2559] tccagtgatg ttataaaaag taaggcggaa agaactggtg atgggacgaa tctttggggt 960
[2560] ttagaagaca aaggtgaaga agatttttg aaaatctgga aagacaatta a 1011
[2561] <210> 71

[2562] <211> 1050
[2563] <212> DNA
[2564] <213> 人工序列
[2565] <220>
[2566] <223> 来自DTU WO 2016/207339_SEQ ID NO: 44的粉纹夜蛾去饱和酶
[2567] <400> 71
[2568] atggctgtga tggctcaaac agtacaagaa acggctacag tgttggaaga ggaagctcgc 60
[2569] acagtgactc ttgtggctcc aaagacaacg ccaaggaaat ataaatatat atacaccaac 120
[2570] tttcttacat tttcatatgc gcatttagct gcattatacg gactttattt gtgcttcacc 180
[2571] tctgcgaaat gggaaacatt gctattctct ttcgtactct tccacatgtc aaatataggc 240
[2572] atcaccgcag gggctcaccg actctggact cacaagactt tcaaagccaa attgcctttg 300
[2573] gaaattgtcc tcatgatatt caactcttta gcctttcaaa acacggctat tacatgggct 360
[2574] agagaacatc ggctacatca caaatacagc gatactgatg ctgatcccca caatgcgtca 420
[2575] agagggttct tctactcgca tgttggctgg ctattagtaa aaaaacatcc cgatgtcctg 480
[2576] aaatatggaa aaactataga catgtcggat gtatacaata atcctgtgtt aaaatttcag 540
[2577] aaaaagtacg cagtaccctt aattggaaca gtttgttttg ctcttccaac tttgattcca 600
[2578] gtctactgtt ggggcgaatc gtggaacaac gcttggcaca tagccttatt tcgatacata 660
[2579] ttcaatctta acgtgacttt cctagtcaac agtgctgcgc atatctgggg gaataagcct 720
[2580] tatgataaaa gcatcttgcc cgctcaaaac ctgctggttt ccttcctagc aagtggagaa 780
[2581] ggcttccata attaccatca cgtctttcca tgggattacc gcacagcaga attagggaat 840
[2582] aacttcctga atttgacgac gctgttcatt gatttttgtg cctggtttgg atgggcttat 900
[2583] gacttgaagt ctgtatcaga ggatattata aaacagagag ctaaacgaac aggtgacggt 960
[2584] tcttcagggg tcatttgggg atgggacgac aaagacatgg accgcgatat aaaatctaaa 1020
[2585] gctaacattt tttatgctaa aaaggaatga 1050
[2586] <210> 72
[2587] <211> 1365
[2588] <212> DNA
[2589] <213> 人工序列
[2590] <220>
[2591] <223> 密码子优化的甜菜夜蛾FAR样蛋白VIII核苷酸序列(Genbank ID KR781121.1)
[2592] <400> 72
[2593] atggtggtgc tgaccagcaa ggagaagtcc aacatgtctg tggccgactt ctacgccggc 60
[2594] aagtccgtgt ttatcacagg cggcaccggc ttcctgggca aggtgtttat cgagaagctg 120
[2595] ctgtactctt gcccagacat cgataagatc tatatgctga tccgggagaa gaagggccag 180
[2596] agcatcaggg agcgcctgac caagatcgtg gacgatcccc tgttcaatag gctgaaggag 240
[2597] aagcgccctg gcgacctgga taagatcgtg ctgatcccag gcgatgtgac agtgcccggc 300
[2598] ctgggcatct ccgacgagaa cgaggccatc ctgatcgata aggtgtctgt ggtcatccac 360
[2599] agcgccgcca cagtgaagtt caatgagccc ctggagaccg cctggaacgt gaatgtggag 420
[2600] ggcacaagga tgatcatggc cctgtctcgg aagatgaaga gaatcgagat ctttatccac 480
[2601] atcagcaccg cctacaccaa cacaaatagg gcagtggtgg acgaggtgct gtacccacct 540
[2602] ccagccgaca tcaacgaggt gcaccagtat gtgaagaatg gcatcacaga ggaggagacc 600
[2603] gagaagatcc tgaacggcag gcccaatacc tacacattca ccaaggccct gaccgagcac 660

[2604] ctggtggcag agaaccaggc ctatatgcct acaatcatcg tgcggccatc catcgtgggc 720
[2605] gccatcaagg acgatcctat cagaggctgg ctggcaaact ggtacggagc aacaggactg 780
[2606] agcgtgttca ccgccaaggg cctgaatcgc gtgatctacg gccagagcag ccacgtggtg 840
[2607] gacctgatcc ctgtggatta tgtggcaaac ctggtcatcg tggcaggagc aaagacatac 900
[2608] cggtccaacg aggtgaccat ctataattct tgctctagct cctgtaatcc aatcacaatg 960
[2609] gagcggctgg tgggcctgtt catcgacgat acagtgaagc acaacagcta cgtgatgccc 1020
[2610] ctgcctggct ggtacgtgta ttccaattac cggtggctgg tgtatctggt gaccatcatc 1080
[2611] tttcagatga tcccagccta tctggcagac atcggccgga gactgctggg caagaatccc 1140
[2612] agatactata agctgcagtc cctggtggca cagacccagg aggcagtgca cttctttaca 1200
[2613] tctcacacct gggagatcaa gagcaagagg acctccgagc tgttcgcctc tctgagccac 1260
[2614] acagaccagc gcatctttcc ttgcgatgcc aagaagatcg actggacaga ttacatcacc 1320
[2615] gattattgta gcggcgtgcg gcagttcctg gagaagaaga agtga 1365
[2616] <210> 73
[2617] <211> 454
[2618] <212> PRT
[2619] <213> 甜菜夜蛾
[2620] <400> 73
[2621] Met Val Val Leu Thr Ser Lys Glu Lys Ser Asn Met Ser Val Ala Asp
[2622] 1 5 10 15
[2623] Phe Tyr Ala Gly Lys Ser Val Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu
[2624] 20 25 30
[2625] Gly Lys Val Phe Ile Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Pro Asp Ile Asp
[2626] 35 40 45
[2627] Lys Ile Tyr Met Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Gln Ser Ile Arg Glu
[2628] 50 55 60
[2629] Arg Leu Thr Lys Ile Val Asp Asp Pro Leu Phe Asn Arg Leu Lys Glu
[2630] 65 70 75 80
[2631] Lys Arg Pro Gly Asp Leu Asp Lys Ile Val Leu Ile Pro Gly Asp Val
[2632] 85 90 95
[2633] Thr Val Pro Gly Leu Gly Ile Ser Asp Glu Asn Glu Ala Ile Leu Ile
[2634] 100 105 110
[2635] Asp Lys Val Ser Val Val Ile His Ser Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn
[2636] 115 120 125
[2637] Glu Pro Leu Glu Thr Ala Trp Asn Val Asn Val Glu Gly Thr Arg Met
[2638] 130 135 140
[2639] Ile Met Ala Leu Ser Arg Lys Met Lys Arg Ile Glu Ile Phe Ile His
[2640] 145 150 155 160
[2641] Ile Ser Thr Ala Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Ala Val Val Asp Glu Val
[2642] 165 170 175
[2643] Leu Tyr Pro Pro Pro Ala Asp Ile Asn Glu Val His Gln Tyr Val Lys
[2644] 180 185 190
[2645] Asn Gly Ile Thr Glu Glu Glu Thr Glu Lys Ile Leu Asn Gly Arg Pro

[2646] 195 200 205
[2647] Asn Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Ala Leu Thr Glu His Leu Val Ala Glu
[2648] 210 215 220
[2649] Asn Gln Ala Tyr Met Pro Thr Ile Ile Val Arg Pro Ser Ile Val Gly
[2650] 225 230 235 240
[2651] Ala Ile Lys Asp Asp Pro Ile Arg Gly Trp Leu Ala Asn Trp Tyr Gly
[2652] 245 250 255
[2653] Ala Thr Gly Leu Ser Val Phe Thr Ala Lys Gly Leu Asn Arg Val Ile
[2654] 260 265 270
[2655] Tyr Gly Gln Ser Ser His Val Val Asp Leu Ile Pro Val Asp Tyr Val
[2656] 275 280 285
[2657] Ala Asn Leu Val Ile Val Ala Gly Ala Lys Thr Tyr Arg Ser Asn Glu
[2658] 290 295 300
[2659] Val Thr Ile Tyr Asn Ser Cys Ser Ser Ser Cys Asn Pro Ile Thr Met
[2660] 305 310 315 320
[2661] Glu Arg Leu Val Gly Leu Phe Ile Asp Asp Thr Val Lys His Asn Ser
[2662] 325 330 335
[2663] Tyr Val Met Pro Leu Pro Gly Trp Tyr Val Tyr Ser Asn Tyr Arg Trp
[2664] 340 345 350
[2665] Leu Val Tyr Leu Val Thr Ile Ile Phe Gln Met Ile Pro Ala Tyr Leu
[2666] 355 360 365
[2667] Ala Asp Ile Gly Arg Arg Leu Leu Gly Lys Asn Pro Arg Tyr Tyr Lys
[2668] 370 375 380
[2669] Leu Gln Ser Leu Val Ala Gln Thr Gln Glu Ala Val His Phe Phe Thr
[2670] 385 390 395 400
[2671] Ser His Thr Trp Glu Ile Lys Ser Lys Arg Thr Ser Glu Leu Phe Ala
[2672] 405 410 415
[2673] Ser Leu Ser His Thr Asp Gln Arg Ile Phe Pro Cys Asp Ala Lys Lys
[2674] 420 425 430
[2675] Ile Asp Trp Thr Asp Tyr Ile Thr Asp Tyr Cys Ser Gly Val Arg Gln
[2676] 435 440 445
[2677] Phe Leu Glu Lys Lys Lys
[2678] 450
[2679] <210> 74
[2680] <211> 1545
[2681] <212> DNA
[2682] <213> 人工序列
[2683] <220>
[2684] <223> 密码子优化的薄肌眼虫脂肪酰基-辅酶A还原酶核苷酸序列
[2685] <400> 74
[2686] atgaacgact tctacgccgg caagggcgtg tttctgacag gcgtgaccgg cttcgtgggc 60
[2687] aagatggtgg tggagaagat cctgcggtct ctgccaaccg tgggcaggct gtatgtgctg 120

[2688] gtgcgcccaa aggcaggcac agatcctcac cagagactgc acagcgaagt gtggagcagc 180
[2689] gccggatttg acgtggtgag ggagaaagtg ggaggacctg cagccttcga tgcactgatc 240
[2690] cgcgagaagg tggtgcctgt gccaggcgac atggtgaagg ataggtttgg cctggacgat 300
[2691] gcagcatacc gctccctggc agccaacgtg aatgtgatca tccacatggc cgccacaatc 360
[2692] gacttcaccg agaggctgga tgtggccgtg tctctgaacg tgctgggcac agtgcgggtg 420
[2693] ctgaccctgg caaggagagc cagagagctg ggcgccctgc acagcgtggt gcacgtgtcc 480
[2694] acctgctacg tgaactccaa tcagcccccc ggcgcccggc tgagagagca gctgtatccc 540
[2695] ctgccttttg acccacggga gatgtgcaca agaatcctgg acatgagccc tcgggagatc 600
[2696] gatctgttcg gcccacagct gctgaagcag tacggcttcc ccaataccta taccttcacc 660
[2697] aagtgcatgg cagagcagct gggcgcccag atcgcacacg acctgccatt cgccatcttt 720
[2698] agaccagcaa tcatcggagc cgccctgtcc gagccatttc ccggctggtg cgattctgcc 780
[2699] agcgcctgtg gagccgtgtt cctggcagtg ggactgggcg tgctgcagga gctgcaggga 840
[2700] aacgcctcta gcgtgtgcga cctgatccct gtggatcacg tggtgaatat gctgctggtg 900
[2701] acagcagcat ataccgcatc tgccccacca gccgacccta gcccatcctc tctggccctg 960
[2702] tcccctccac agctgccact ggccacactg ccccctggca ccgtggcaga tgtgccaatc 1020
[2703] taccactgtg gcacctctgc cggccctaac gccgtgaatt ggggcaggat caaggtgagc 1080
[2704] ctggtggagt attggaacgc acacccaatc gcaaagacca aggcagcaat cgccctgctg 1140
[2705] cccgtgtgga ggttcgagct gagctttctg ctgaagaggc gcctgcctgc aacagccctg 1200
[2706] tccctggtgg cctctctgcc aggcgcatcc gccgccgtgc ggagacaggc agagcagaca 1260
[2707] gagcggctgg tgggcaagat gagaaagctg gtggacacct ttcagtcctt cgtgttttgg 1320
[2708] gcctggtact tccagacaga gagcagcgcc aggctgctgg cctctctgtg cccagaggac 1380
[2709] cgcgagacct ttaactggga ccccaggagg atcggatgga gggcctgggt ggagaattac 1440
[2710] tgttatggcc tggtgcggta tgtgctgaag cagccaatcg gcgatagacc accagtggca 1500
[2711] gcagaggagc tggcaagcaa taggttcctg cgcgccatgc tgtga 1545
[2712] <210> 75
[2713] <211> 514
[2714] <212> PRT
[2715] <213> 薄肌眼虫
[2716] <400> 75
[2717] Met Asn Asp Phe Tyr Ala Gly Lys Gly Val Phe Leu Thr Gly Val Thr
[2718] 1 5 10 15
[2719] Gly Phe Val Gly Lys Met Val Val Glu Lys Ile Leu Arg Ser Leu Pro
[2720] 20 25 30
[2721] Thr Val Gly Arg Leu Tyr Val Leu Val Arg Pro Lys Ala Gly Thr Asp
[2722] 35 40 45
[2723] Pro His Gln Arg Leu His Ser Glu Val Trp Ser Ser Ala Gly Phe Asp
[2724] 50 55 60
[2725] Val Val Arg Glu Lys Val Gly Gly Pro Ala Ala Phe Asp Ala Leu Ile
[2726] 65 70 75 80
[2727] Arg Glu Lys Val Val Pro Val Pro Gly Asp Met Val Lys Asp Arg Phe
[2728] 85 90 95
[2729] Gly Leu Asp Asp Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Ala Ala Asn Val Asn Val

[2730] 100 105 110
[2731] Ile Ile His Met Ala Ala Thr Ile Asp Phe Thr Glu Arg Leu Asp Val
[2732] 115 120 125
[2733] Ala Val Ser Leu Asn Val Leu Gly Thr Val Arg Val Leu Thr Leu Ala
[2734] 130 135 140
[2735] Arg Arg Ala Arg Glu Leu Gly Ala Leu His Ser Val Val His Val Ser
[2736] 145 150 155 160
[2737] Thr Cys Tyr Val Asn Ser Asn Gln Pro Pro Gly Ala Arg Leu Arg Glu
[2738] 165 170 175
[2739] Gln Leu Tyr Pro Leu Pro Phe Asp Pro Arg Glu Met Cys Thr Arg Ile
[2740] 180 185 190
[2741] Leu Asp Met Ser Pro Arg Glu Ile Asp Leu Phe Gly Pro Gln Leu Leu
[2742] 195 200 205
[2743] Lys Gln Tyr Gly Phe Pro Asn Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Cys Met Ala
[2744] 210 215 220
[2745] Glu Gln Leu Gly Ala Gln Ile Ala His Asp Leu Pro Phe Ala Ile Phe
[2746] 225 230 235 240
[2747] Arg Pro Ala Ile Ile Gly Ala Ala Leu Ser Glu Pro Phe Pro Gly Trp
[2748] 245 250 255
[2749] Cys Asp Ser Ala Ser Ala Cys Gly Ala Val Phe Leu Ala Val Gly Leu
[2750] 260 265 270
[2751] Gly Val Leu Gln Glu Leu Gln Gly Asn Ala Ser Ser Val Cys Asp Leu
[2752] 275 280 285
[2753] Ile Pro Val Asp His Val Val Asn Met Leu Leu Val Thr Ala Ala Tyr
[2754] 290 295 300
[2755] Thr Ala Ser Ala Pro Pro Ala Asp Pro Ser Pro Ser Ser Leu Ala Leu
[2756] 305 310 315 320
[2757] Ser Pro Pro Gln Leu Pro Leu Ala Thr Leu Pro Pro Gly Thr Val Ala
[2758] 325 330 335
[2759] Asp Val Pro Ile Tyr His Cys Gly Thr Ser Ala Gly Pro Asn Ala Val
[2760] 340 345 350
[2761] Asn Trp Gly Arg Ile Lys Val Ser Leu Val Glu Tyr Trp Asn Ala His
[2762] 355 360 365
[2763] Pro Ile Ala Lys Thr Lys Ala Ala Ile Ala Leu Leu Pro Val Trp Arg
[2764] 370 375 380
[2765] Phe Glu Leu Ser Phe Leu Leu Lys Arg Arg Leu Pro Ala Thr Ala Leu
[2766] 385 390 395 400
[2767] Ser Leu Val Ala Ser Leu Pro Gly Ala Ser Ala Ala Val Arg Arg Gln
[2768] 405 410 415
[2769] Ala Glu Gln Thr Glu Arg Leu Val Gly Lys Met Arg Lys Leu Val Asp
[2770] 420 425 430
[2771] Thr Phe Gln Ser Phe Val Phe Trp Ala Trp Tyr Phe Gln Thr Glu Ser

[2772] 435 440 445

[2773] Ser Ala Arg Leu Leu Ala Ser Leu Cys Pro Glu Asp Arg Glu Thr Phe

[2774] 450 455 460

[2775] Asn Trp Asp Pro Arg Arg Ile Gly Trp Arg Ala Trp Val Glu Asn Tyr

[2776] 465 470 475 480

[2777] Cys Tyr Gly Leu Val Arg Tyr Val Leu Lys Gln Pro Ile Gly Asp Arg

[2778] 485 490 495

[2779] Pro Pro Val Ala Ala Glu Glu Leu Ala Ser Asn Arg Phe Leu Arg Ala

[2780] 500 505 510

[2781] Met Leu

[2782] <210> 76

[2783] <211> 1350

[2784] <212> DNA

[2785] <213> 人工序列

[2786] <220>

[2787] <223> 密码子优化的稠李巢蛾脂肪酰基CoA还原酶II核苷酸序列

[2788] <400> 76

[2789] atggtgcagc tgaaggagga ctccgtggcc gcttttacg ccgagaagtc tatcttcatc 60

[2790] acaggcggca ccggctttct gggcaaggtg ctgatcgaga agctgctgta ctcctgcaag 120

[2791] gccgtggacc agatctatgt gctgatccgg aagaagaagg atcagacacc ttctgagcgc 180

[2792] atcgcccagc tgctggagtc tgagctgttc agccggctga gaaaggacga tccaagcgcc 240

[2793] ctgaagaagg tggtgcccgt ggtgggcgac ctgaccatgc ctaacctggg actgagcgcc 300

[2794] gcagtgcagg atctgatcgt gacaaaggtg tccatcatct tccacgtggc cgccaccgtg 360

[2795] aagtttaacg agaggatgaa gaatgccctg gccaacaatg tggaggccac cagagaagtg 420

[2796] atcaacctgt gccaccgcct ggagaaggtg gacgccttca tccacgtgtc cacagcctat 480

[2797] tctaataccg atcagaaggt ggtggaggag cgcgtgtacc cacctccagc acctctgagc 540

[2798] gaggtgtatg cctttgtgac caacaatggc gacgatatgg acatcatcca gaacctgctg 600

[2799] aatggccggc caaataccta cacatatacc aaggccctgg ccgaggacat cgtgctgaag 660

[2800] gagcacggcg gcatccctac agccatcatc agaccaagca tcgtgctgtc cgtgctgaag 720

[2801] gagcccatcc ctggctggct ggacaactgg aatggaccaa ccggactgct gcacgccagc 780

[2802] tcccagggag tgcactgctc catgctgggc tctggcagca acgtggccga cctgatccct 840

[2803] gtggacatcg tgacaaatct gatgatcgtg gtggcctctc ggtgcaagaa gagcaacggc 900

[2804] ctgaaggtgt acaattcctg ttctggcacc acaaacccaa tcgcctatca ggccttcacc 960

[2805] aagatgtttc tggatagctg tatctccagg ggctggaaca aggtgccatt ccccatgctg 1020

[2806] ctgtttgtga agtgggcctt cctgaatcgc gtgctgaagt tcttcctggt catcgtgcca 1080

[2807] ttctttctga tcgacgtgta cctgcggttc tttggcaagc ccaattacat gagaatgatc 1140

[2808] acatatacca agaaggccga ggatctgatg acattcttta cctctcacga gtggcagttc 1200

[2809] aaggacggca acgtgcggga tctgatcaat atgatgagcc ccgaggatag aaagatcttt 1260

[2810] tactgcgacc ccgatgagat ccactggaag ccttacttcg acgattattg cgtgggcgtg 1320

[2811] tttaagtatc tgctgaagag gaaggtgtga 1350

[2812] <210> 77

[2813] <211> 449

[2814] <212> PRT

[2815] <213> 稠李巢蛾

[2816] <400> 77

[2817] Met Val Gln Leu Lys Glu Asp Ser Val Ala Ala Phe Tyr Ala Glu Lys

[2818] 1 5 10 15

[2819] Ser Ile Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu Gly Lys Val Leu Ile

[2820] 20 25 30

[2821] Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Lys Ala Val Asp Gln Ile Tyr Val Leu

[2822] 35 40 45

[2823] Ile Arg Lys Lys Lys Asp Gln Thr Pro Ser Glu Arg Ile Ala Gln Leu

[2824] 50 55 60

[2825] Leu Glu Ser Glu Leu Phe Ser Arg Leu Arg Lys Asp Asp Pro Ser Ala

[2826] 65 70 75 80

[2827] Leu Lys Lys Val Val Pro Val Val Gly Asp Leu Thr Met Pro Asn Leu

[2828] 85 90 95

[2829] Gly Leu Ser Ala Ala Val Gln Asp Leu Ile Val Thr Lys Val Ser Ile

[2830] 100 105 110

[2831] Ile Phe His Val Ala Ala Thr Val Lys Phe Asn Glu Arg Met Lys Asn

[2832] 115 120 125

[2833] Ala Leu Ala Asn Asn Val Glu Ala Thr Arg Glu Val Ile Asn Leu Cys

[2834] 130 135 140

[2835] His Arg Leu Glu Lys Val Asp Ala Phe Ile His Val Ser Thr Ala Tyr

[2836] 145 150 155 160

[2837] Ser Asn Thr Asp Gln Lys Val Val Glu Glu Arg Val Tyr Pro Pro Pro

[2838] 165 170 175

[2839] Ala Pro Leu Ser Glu Val Tyr Ala Phe Val Thr Asn Asn Gly Asp Asp

[2840] 180 185 190

[2841] Met Asp Ile Ile Gln Asn Leu Leu Asn Gly Arg Pro Asn Thr Tyr Thr

[2842] 195 200 205

[2843] Tyr Thr Lys Ala Leu Ala Glu Asp Ile Val Leu Lys Glu His Gly Gly

[2844] 210 215 220

[2845] Ile Pro Thr Ala Ile Ile Arg Pro Ser Ile Val Leu Ser Val Leu Lys

[2846] 225 230 235 240

[2847] Glu Pro Ile Pro Gly Trp Leu Asp Asn Trp Asn Gly Pro Thr Gly Leu

[2848] 245 250 255

[2849] Leu His Ala Ser Ser Gln Gly Val His Cys Ser Met Leu Gly Ser Gly

[2850] 260 265 270

[2851] Ser Asn Val Ala Asp Leu Ile Pro Val Asp Ile Val Thr Asn Leu Met

[2852] 275 280 285

[2853] Ile Val Val Ala Ser Arg Cys Lys Lys Ser Asn Gly Leu Lys Val Tyr

[2854] 290 295 300

[2855] Asn Ser Cys Ser Gly Thr Thr Asn Pro Ile Ala Tyr Gln Ala Phe Thr

[2856] 305 310 315 320
[2857] Lys Met Phe Leu Asp Ser Cys Ile Ser Arg Gly Trp Asn Lys Val Pro
[2858] 325 330 335
[2859] Phe Pro Met Leu Leu Phe Val Lys Trp Ala Phe Leu Asn Arg Val Leu
[2860] 340 345 350
[2861] Lys Phe Phe Leu Val Ile Val Pro Phe Phe Leu Ile Asp Val Tyr Leu
[2862] 355 360 365
[2863] Arg Phe Phe Gly Lys Pro Asn Tyr Met Arg Met Ile Thr Tyr Thr Lys
[2864] 370 375 380
[2865] Lys Ala Glu Asp Leu Met Thr Phe Phe Thr Ser His Glu Trp Gln Phe
[2866] 385 390 395 400
[2867] Lys Asp Gly Asn Val Arg Asp Leu Ile Asn Met Met Ser Pro Glu Asp
[2868] 405 410 415
[2869] Arg Lys Ile Phe Tyr Cys Asp Pro Asp Glu Ile His Trp Lys Pro Tyr
[2870] 420 425 430
[2871] Phe Asp Asp Tyr Cys Val Gly Val Phe Lys Tyr Leu Leu Lys Arg Lys
[2872] 435 440 445
[2873] Val
[2874] <210> 78
[2875] <211> 361
[2876] <212> PRT
[2877] <213> 黑腹果蝇
[2878] <400> 78
[2879] Met Ala Pro Tyr Ser Arg Ile Tyr His Gln Asp Lys Ser Ser Arg Glu
[2880] 1 5 10 15
[2881] Thr Gly Val Leu Phe Glu Asp Asp Ala Gln Thr Val Asp Ser Asp Leu
[2882] 20 25 30
[2883] Thr Thr Asp Arg Phe Gln Leu Lys Arg Ala Glu Lys Arg Arg Leu Pro
[2884] 35 40 45
[2885] Leu Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Phe Ala Leu Val His Leu Ala Ala
[2886] 50 55 60
[2887] Leu Tyr Gly Leu His Ser Ile Phe Thr Arg Ala Lys Leu Ala Thr Thr
[2888] 65 70 75 80
[2889] Leu Phe Ala Ala Gly Leu Tyr Ile Ile Gly Met Leu Gly Val Thr Ala
[2890] 85 90 95
[2891] Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Arg Thr Tyr Lys Ala Lys Trp Pro
[2892] 100 105 110
[2893] Leu Arg Leu Leu Leu Val Ile Phe Asn Thr Ile Ala Phe Gln Asp Ala
[2894] 115 120 125
[2895] Val Tyr His Trp Ala Arg Asp His Arg Val His His Lys Tyr Ser Glu
[2896] 130 135 140
[2897] Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr Arg Gly Phe Phe Phe Ser His

[2898] 145 150 155 160
[2899] Val Gly Trp Leu Leu Cys Lys Lys His Pro Asp Ile Lys Glu Lys Gly
[2900] 165 170 175
[2901] Arg Gly Leu Asp Leu Ser Asp Leu Arg Ala Asp Pro Ile Leu Met Phe
[2902] 180 185 190
[2903] Gln Arg Lys His Tyr Tyr Ile Leu Met Pro Leu Ala Cys Phe Val Leu
[2904] 195 200 205
[2905] Pro Thr Val Ile Pro Met Val Tyr Trp Asn Glu Thr Leu Ala Ser Ser
[2906] 210 215 220
[2907] Trp Phe Val Ala Thr Met Phe Arg Trp Cys Phe Gln Leu Asn Met Thr
[2908] 225 230 235 240
[2909] Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Lys Phe Gly Asn Arg Pro Tyr Asp
[2910] 245 250 255
[2911] Lys Thr Met Asn Pro Thr Gln Asn Ala Phe Val Ser Ala Phe Thr Phe
[2912] 260 265 270
[2913] Gly Glu Gly Trp His Asn Tyr His His Ala Phe Pro Trp Asp Tyr Lys
[2914] 275 280 285
[2915] Thr Ala Glu Trp Gly Cys Tyr Ser Leu Asn Ile Thr Thr Ala Phe Ile
[2916] 290 295 300
[2917] Asp Leu Phe Ala Lys Ile Gly Trp Ala Tyr Asp Leu Lys Thr Val Ala
[2918] 305 310 315 320
[2919] Pro Asp Val Ile Gln Arg Arg Val Leu Arg Thr Gly Asp Gly Ser His
[2920] 325 330 335
[2921] Glu Leu Trp Gly Trp Gly Asp Lys Asp Leu Thr Ala Glu Asp Ala Arg
[2922] 340 345 350
[2923] Asn Val Leu Leu Val Asp Lys Ser Arg
[2924] 355 360
[2925] <210> 79
[2926] <211> 359
[2927] <212> PRT
[2928] <213> 红醋栗穿孔蛾
[2929] <400> 79
[2930] Met Pro Pro Tyr Pro Glu Glu Val Asp Thr Asn His Ile Phe Glu Glu
[2931] 1 5 10 15
[2932] Asp Ile Ser His Glu Glu Ser Lys Pro Ala Leu Lys Pro Leu Val Ala
[2933] 20 25 30
[2934] Pro Gln Ala Asp Asn Arg Lys Pro Glu Ile Val Pro Leu Asn Leu Ile
[2935] 35 40 45
[2936] Thr Phe Gly Tyr Gly His Leu Ala Ala Ile Tyr Gly Ile Tyr Leu Cys
[2937] 50 55 60
[2938] Phe Thr Ser Ala Lys Trp Ala Thr Ile Val Phe Ala Phe Val Leu Tyr
[2939] 65 70 75 80

[2940] Ile Cys Ala Glu Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ser
[2941] 85 90 95
[2942] His Arg Ser Tyr Lys Ala Lys Leu Pro Leu Arg Leu Ile Leu Leu Leu
[2943] 100 105 110
[2944] Phe Asn Thr Leu Ala Phe Gln Asn Thr Ala Ile Asp Trp Val Arg Asp
[2945] 115 120 125
[2946] His Arg Met His His Lys Tyr Ser Asp Thr Asp Ala Asp Pro His Asn
[2947] 130 135 140
[2948] Ala Thr Arg Gly Phe Phe Phe Ser His Val Gly Trp Leu Leu Thr Arg
[2949] 145 150 155 160
[2950] Lys His Pro Glu Val Lys Arg Arg Gly Lys Asp Ile Asp Met Met Asp
[2951] 165 170 175
[2952] Ile Tyr Asn Asp Ser Leu Leu Lys Phe Gln Lys Lys Tyr Ala Ile Pro
[2953] 180 185 190
[2954] Phe Val Gly Leu Val Cys Phe Val Ile Pro Thr Leu Met Pro Met Tyr
[2955] 195 200 205
[2956] Phe Trp Asn Glu Thr Leu Asn Asn Ser Trp His Ile Ala Thr Met Leu
[2957] 210 215 220
[2958] Arg Tyr Ile Val Asn Leu Asn Met Thr Phe Leu Val Asn Ser Ala Ala
[2959] 225 230 235 240
[2960] His Ile Trp Gly Tyr Lys Pro Tyr Asp Lys Ser Ile Lys Pro Val Gln
[2961] 245 250 255
[2962] Asn Ile Thr Val Ser Ile Leu Ile Leu Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr
[2963] 260 265 270
[2964] His His Val Phe Pro Trp Asp Tyr Arg Thr Ser Glu Leu Gly Asn Asp
[2965] 275 280 285
[2966] Phe Leu Asn Phe Thr Thr Leu Phe Ile Asn Leu Phe Ala Lys Ile Gly
[2967] 290 295 300
[2968] Trp Ala Tyr Asp Leu Lys Thr Ala Ser Asp Lys Val Val Ala Ala Arg
[2969] 305 310 315 320
[2970] Arg Lys Arg Thr Gly Asp Gly Thr Asn Leu Trp Gly Trp Glu Asp Lys
[2971] 325 330 335
[2972] Ser Leu Asn Glu Glu Glu Arg Gln Ala Ala Thr Val Leu Tyr Pro Asn
[2973] 340 345 350
[2974] Lys Tyr Leu Asn Leu Lys Asp
[2975] 355
[2976] <210> 80
[2977] <211> 352
[2978] <212> PRT
[2979] <213> 苹果小卷蛾
[2980] <400> 80
[2981] Met Ala Pro Asn Val Thr Asp Val Asn Gly Val Leu Phe Glu Ser Asp

[2982] 1 5 10 15
[2983] Ala Ala Thr Pro Asp Leu Ala Leu Ala Asn Ala Pro Val Gln Gln Ala
[2984] 20 25 30
[2985] Asp Asp Ser Pro Arg Ile Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Phe Ala
[2986] 35 40 45
[2987] Tyr Leu His Ile Ala Ala Leu Tyr Gly Gly Tyr Leu Phe Leu Val Ser
[2988] 50 55 60
[2989] Ala Lys Trp Gln Thr Asp Ile Phe Ala Tyr Phe Leu Tyr Val Ala Ser
[2990] 65 70 75 80
[2991] Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys Ser
[2992] 85 90 95
[2993] Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Arg Leu Ile Leu Val Ile Phe Asn Thr
[2994] 100 105 110
[2995] Ile Ala Phe Gln Asp Ser Ala Ile Asp Trp Ala Arg Asp His Arg Met
[2996] 115 120 125
[2997] His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr Arg
[2998] 130 135 140
[2999] Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro
[3000] 145 150 155 160
[3001] Glu Leu Lys Arg Lys Gly Lys Gly Leu Asp Leu Ser Asp Leu Tyr Ala
[3002] 165 170 175
[3003] Asp Pro Ile Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr Leu Ile Leu Met Pro
[3004] 180 185 190
[3005] Leu Ala Cys Phe Val Leu Pro Thr Val Ile Pro Val Tyr Leu Trp Asn
[3006] 195 200 205
[3007] Glu Thr Trp Thr Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala Leu Phe Arg Tyr Ala
[3008] 210 215 220
[3009] Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Lys Trp
[3010] 225 230 235 240
[3011] Gly Asp Lys Pro Tyr Asp Lys Ser Ile Lys Pro Ser Glu Asn Ile Ser
[3012] 245 250 255
[3013] Val Ser Leu Phe Ala Phe Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Thr
[3014] 260 265 270
[3015] Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Ser Ser Asn Arg Leu Asn
[3016] 275 280 285
[3017] Phe Thr Thr Lys Phe Ile Asn Phe Phe Ala Lys Ile Gly Trp Ala Tyr
[3018] 290 295 300
[3019] Asp Met Lys Thr Val Ser Asp Glu Ile Ile Gln Lys Arg Val Asn Arg
[3020] 305 310 315 320
[3021] Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Trp Gly Trp Gly Asp Lys Asp His
[3022] 325 330 335
[3023] Ser Lys Glu Glu Val Asn Ala Ala Val Arg Ile Asn Pro Lys Asp Asp

[3024] 340 345 350

[3025] <210> 81

[3026] <211> 1380

[3027] <212> DNA

[3028] <213> 人工序列

[3029] <220>

[3030] <223> 密码子优化的甜菜夜蛾FAR样蛋白VII核苷酸序列(KF805977.1)

[3031] <400> 81

[3032] atgacgtata gacaaataaa tgaatttgat gctgaaaagt ttacggcagc tacagtaccg 60

[3033] acaagctacg tatcagtacc agatttttat gcgggcaaga caatttttat cactggtgga 120

[3034] actggatttc ttggaaaggt gtttctagag aaacttcttt acagttgtaa agatgttgaa 180

[3035] accgtataca ttttgatcag agagaaaaaa ggcaaaacac ctcagcaaag agttgaagat 240

[3036] ctttttaaca aaccgatttt ctcaagattg aaacagaagg actctcagtg tatgaagaaa 300

[3037] gtcactgcaa taattggtga ccttagtgaa cctggtcttg gcatatcaaa agatgatgaa 360

[3038] gaactacttt tgcaaaaggt atctgtagta ttccatgtcg cagccaatgt tcagttttac 420

[3039] aaggaattca aagagattat aaatacgaat gttggtggga caaaatacgt actccaattg 480

[3040] tgtcagcgaa taaaagatat taaggcattt gtccatattt ccacagccta ctgtcacaca 540

[3041] gaccaaaagg tattagaaga gagaatatac ccccctccag cagaactcag tgaagtcctg 600

[3042] aagttccttc agcagccaca gcatgacaag aaacagatta aggaattatt taagaaacaa 660

[3043] ccaaacagtt acacctttgc caaggcttta gcagaaacct acattgctga gaactgcgga 720

[3044] cgcgtcccca caattatcat cagaccttct attatatcag catcactgaa agagccgcta 780

[3045] ccaggatggg tggattcatg gaacggagcc acaggcctca tcacagctag ctacaacggc 840

[3046] gccaacagag tgcttctcgg cgaaggcagc aacttcctcg acctgatccc agttgacttt 900

[3047] gttgctaacc tggcaattgt agctgctgct aaatgtacta gctctttgaa agtttacaat 960

[3048] tgctgctcaa gcggatgtaa ccctttaaca ttgaaacaat tggtcagcca catgaataat 1020

[3049] gtcggatttg ataaaaacgt ctccataata ttcaccaata acaaagcctc gctttccaca 1080

[3050] ttgacatttt tccttcaaac aacgccatct ttcaccgctg atatgtttct gagagtcacg 1140

[3051] ggaaagtcac caaggtacat gaaaatccag tcaaaactga ccatcgctcg gaatgcctta 1200

[3052] aatttttca cctgtcattc ctgggtcatg aaggctgata attctagaag actgtatgct 1260

[3053] tccttgtcat tacacgaccg acatacgttc ccttgtgatc ctacagacat agactggaag 1320

[3054] aagtacataa atatatacat agaaggaatt aatcagttct taatgaagaa acgtagttaa 1380

[3055] <210> 82

[3056] <211> 459

[3057] <212> PRT

[3058] <213> 甜菜夜蛾

[3059] <400> 82

[3060] Met Thr Tyr Arg Gln Ile Asn Glu Phe Asp Ala Glu Lys Phe Thr Ala

[3061] 1 5 10 15

[3062] Ala Thr Val Pro Thr Ser Tyr Val Ser Val Pro Asp Phe Tyr Ala Gly

[3063] 20 25 30

[3064] Lys Thr Ile Phe Ile Thr Gly Gly Thr Gly Phe Leu Gly Lys Val Phe

[3065] 35 40 45

[3066] Leu Glu Lys Leu Leu Tyr Ser Cys Lys Asp Val Glu Thr Val Tyr Ile
[3067] 50 55 60
[3068] Leu Ile Arg Glu Lys Lys Gly Lys Thr Pro Gln Gln Arg Val Glu Asp
[3069] 65 70 75 80
[3070] Leu Phe Asn Lys Pro Ile Phe Ser Arg Leu Lys Gln Lys Asp Ser Gln
[3071] 85 90 95
[3072] Cys Met Lys Lys Val Thr Ala Ile Ile Gly Asp Leu Ser Glu Pro Gly
[3073] 100 105 110
[3074] Leu Gly Ile Ser Lys Asp Asp Glu Glu Leu Leu Leu Gln Lys Val Ser
[3075] 115 120 125
[3076] Val Val Phe His Val Ala Ala Asn Val Gln Phe Tyr Lys Glu Phe Lys
[3077] 130 135 140
[3078] Glu Ile Ile Asn Thr Asn Val Gly Gly Thr Lys Tyr Val Leu Gln Leu
[3079] 145 150 155 160
[3080] Cys Gln Arg Ile Lys Asp Ile Lys Ala Phe Val His Ile Ser Thr Ala
[3081] 165 170 175
[3082] Tyr Cys His Thr Asp Gln Lys Val Leu Glu Glu Arg Ile Tyr Pro Pro
[3083] 180 185 190
[3084] Pro Ala Glu Leu Ser Glu Val Leu Lys Phe Leu Gln Gln Pro Gln His
[3085] 195 200 205
[3086] Asp Lys Lys Gln Ile Lys Glu Leu Phe Lys Lys Gln Pro Asn Ser Tyr
[3087] 210 215 220
[3088] Thr Phe Ala Lys Ala Leu Ala Glu Thr Tyr Ile Ala Glu Asn Cys Gly
[3089] 225 230 235 240
[3090] Arg Val Pro Thr Ile Ile Ile Arg Pro Ser Ile Ile Ser Ala Ser Leu
[3091] 245 250 255
[3092] Lys Glu Pro Leu Pro Gly Trp Val Asp Ser Trp Asn Gly Ala Thr Gly
[3093] 260 265 270
[3094] Leu Ile Thr Ala Ser Tyr Asn Gly Ala Asn Arg Val Leu Leu Gly Glu
[3095] 275 280 285
[3096] Gly Ser Asn Phe Leu Asp Leu Ile Pro Val Asp Phe Val Ala Asn Leu
[3097] 290 295 300
[3098] Ala Ile Val Ala Ala Ala Lys Cys Thr Ser Ser Leu Lys Val Tyr Asn
[3099] 305 310 315 320
[3100] Cys Cys Ser Ser Gly Cys Asn Pro Leu Thr Leu Lys Gln Leu Val Ser
[3101] 325 330 335
[3102] His Met Asn Asn Val Gly Phe Asp Lys Asn Val Ser Ile Ile Phe Thr
[3103] 340 345 350
[3104] Asn Asn Lys Ala Ser Leu Ser Thr Leu Thr Phe Phe Leu Gln Thr Thr
[3105] 355 360 365
[3106] Pro Ser Phe Thr Ala Asp Met Phe Leu Arg Val Thr Gly Lys Ser Pro
[3107] 370 375 380

[3108] Arg Tyr Met Lys Ile Gln Ser Lys Leu Thr Ile Ala Arg Asn Ala Leu
[3109] 385 390 395 400
[3110] Asn Phe Phe Thr Cys His Ser Trp Val Met Lys Ala Asp Asn Ser Arg
[3111] 405 410 415
[3112] Arg Leu Tyr Ala Ser Leu Ser Leu His Asp Arg His Thr Phe Pro Cys
[3113] 420 425 430
[3114] Asp Pro Thr Asp Ile Asp Trp Lys Lys Tyr Ile Asn Ile Tyr Ile Glu
[3115] 435 440 445
[3116] Gly Ile Asn Gln Phe Leu Met Lys Lys Arg Ser
[3117] 450 455
[3118] <210> 83
[3119] <211> 1368
[3120] <212> DNA
[3121] <213> 人工序列
[3122] <220>
[3123] <223> HaFAR S60A FAR2
[3124] <400> 83
[3125] atggtggtgc tgacctccaa ggagacaaag ccctctgtgg ccgagttcta cgccggcaag 60
[3126] agcgtgttca tcacaggcgg caccggcttc ctgggcaagg tgtttatcga gaagctgctg 120
[3127] tacagctgcc ctgacatcga gaacatctat atgctgatcc gggagaagaa gggcctggcc 180
[3128] gtgtccgaga gaatcaagca gttcctggac gatcccctgt ttacaaggct gaaggacaag 240
[3129] cgccctgccg atctggagaa gatcgtgctg atcccaggcg acatcaccgc accagatctg 300
[3130] ggcatcaaca gcgagaatga gaagatgctg atcgagaagg tgagcgtgat catccactcc 360
[3131] gccgccaccg tgaagttcaa cgagcccctg cctacagcct ggaagatcaa tgtggagggc 420
[3132] accaggatga tgctggccct gtctcggaga atgaagcgca tcgaggtgtt tatccacatc 480
[3133] agcacagcct acaccaacac aaatagggag gtggtggacg agatcctgta cccagccccc 540
[3134] gccgacatcg atcaggtgca ccagtatgtg aaggacggca tcagcgagga ggataccgag 600
[3135] aagatcctga acggcagacc caatacctac acattcacca aggccctgac agagcacctg 660
[3136] gtggccgaga accaggccta tgtgcctacc atcatcgtga gaccatccgt ggtggccgcc 720
[3137] atcaaggatg agcctctgaa gggatggctg ggaaactggt tcggagcaac aggactgacc 780
[3138] gtgtttacag ccaagggcct gaatagagtg atctacggcc acagctccta tatcgtggac 840
[3139] ctgatcccag tggattacgt ggcaaacctg gtcatcgcag caggagccaa gtctagcaag 900
[3140] tccaccgagc tgaaggtgta taactgctgt tcctctagct gtaatcccgt gaccatcggc 960
[3141] acactgatga gcatgttcgc cgacgatgcc atcaagcaga agtcctacgc catgcctctg 1020
[3142] ccaggctggt acatctttac aaagtataag tggctggtgc tgctgctgac cttcctgttt 1080
[3143] caggtcatcc ctgcctacgt gaccgacctg tctaggcacc tgatcggcaa gagcccacgc 1140
[3144] tatatcaagc tgcagagcct ggtgaaccag accaggtcct ctatcgactt ctttacaaat 1200
[3145] cactcctggg tcatgaaggc cgatagggtg cgcgagctgt acgcatctct gagcccagcc 1260
[3146] gacaagtatc tgttcccttg cgacccaacc gatatcaact ggacacacta catccaggat 1320
[3147] tattgttggg gcgtgcgcca ctttctggag aagaagtcct atgagtga 1368
[3148] <210> 84
[3149] <211> 1368

[3150] <212> DNA
[3151] <213> 人工序列
[3152] <220>
[3153] <223> HaFAR S195A FAR3
[3154] <400> 84
[3155] atggtggtgc tgacctccaa ggagacaaag ccctctgtgg ccgagttcta cgccggcaag 60
[3156] agcgtgttca tcacaggcgg caccggcttc ctgggcaagg tgtttatcga gaagctgctg 120
[3157] tacagctgcc ctgacatcga gaacatctat atgctgatcc gggagaagaa gggcctgagc 180
[3158] gtgtccgaga gaatcaagca gttcctggac gatcccctgt ttacaaggct gaaggacaag 240
[3159] cgccctgccg atctggagaa gatcgtgctg atcccaggcg acatcaccgc accagatctg 300
[3160] ggcatcaaca gcgagaatga gaagatgctg atcgagaagg tgagcgtgat catccactcc 360
[3161] gccgccaccg tgaagttcaa cgagcccctg cctacagcct ggaagatcaa tgtggagggc 420
[3162] accaggatga tgctggccct gtctcggaga atgaagcgca tcgaggtgtt tatccacatc 480
[3163] agcacagcct acaccaacac aaatagggag gtggtggacg agatcctgta cccagccccc 540
[3164] gccgacatcg atcaggtgca ccagtatgtg aaggacggca tcgccgagga ggataccgag 600
[3165] aagatcctga acggcagacc caatacctac acattcacca aggccctgac agagcacctg 660
[3166] gtggccgaga accaggccta tgtgcctacc atcatcgtga gaccatccgt ggtggccgcc 720
[3167] atcaaggatg agcctctgaa gggatggctg ggaaactggt tcggagcaac aggactgacc 780
[3168] gtgtttacag ccaagggcct gaatagagtg atctacggcc acagctccta tatcgtggac 840
[3169] ctgatcccag tggattacgt ggcaaacctg gtcatcgcag caggagccaa gtctagcaag 900
[3170] tccaccgagc tgaaggtgta taactgctgt tcctctagct gtaatcccgt gaccatcggc 960
[3171] acactgatga gcatgttcgc cgacgatgcc atcaagcaga agtcctacgc catgcctctg 1020
[3172] ccaggctggt acatctttac aaagtataag tggctggtgc tgctgctgac cttcctgttt 1080
[3173] caggtcatcc ctgcctacgt gaccgacctg tctaggcacc tgatcggcaa gagcccacgc 1140
[3174] tatatcaagc tgcagagcct ggtgaaccag accaggtcct ctatcgactt ctttacaaat 1200
[3175] cactcctggg tcatgaaggc cgatagggtg cgcgagctgt acgcatctct gagcccagcc 1260
[3176] gacaagtatc tgttcccttg cgacccaacc gatatcaact ggacacacta catccaggat 1320
[3177] tattgttggg gcgtgcgcca ctttctggag aagaagtcct atgagtga 1368
[3178] <210> 85
[3179] <211> 1368
[3180] <212> DNA
[3181] <213> 人工序列
[3182] <220>
[3183] <223> HaFAR S298A FAR4
[3184] <400> 85
[3185] atggtggtgc tgacctccaa ggagacaaag ccctctgtgg ccgagttcta cgccggcaag 60
[3186] agcgtgttca tcacaggcgg caccggcttc ctgggcaagg tgtttatcga gaagctgctg 120
[3187] tacagctgcc ctgacatcga gaacatctat atgctgatcc gggagaagaa gggcctgagc 180
[3188] gtgtccgaga gaatcaagca gttcctggac gatcccctgt ttacaaggct gaaggacaag 240
[3189] cgccctgccg atctggagaa gatcgtgctg atcccaggcg acatcaccgc accagatctg 300
[3190] ggcatcaaca gcgagaatga gaagatgctg atcgagaagg tgagcgtgat catccactcc 360
[3191] gccgccaccg tgaagttcaa cgagcccctg cctacagcct ggaagatcaa tgtggagggc 420

[3192] accaggatga tgctggccct gtctcggaga atgaagcgca tcgaggtgtt tatccacatc 480
[3193] agcacagcct acaccaacac aaatagggag gtggtggacg agatcctgta cccagccccc 540
[3194] gccgacatcg atcaggtgca ccagtatgtg aaggacggca tcagcgagga ggataccgag 600
[3195] aagatcctga acggcagacc caatacctac acattcacca aggccctgac agagcacctg 660
[3196] gtggccgaga accaggccta tgtgcctacc atcatcgtga gaccatccgt ggtggccgcc 720
[3197] atcaaggatg agcctctgaa gggatggctg ggaaactggt tcggagcaac aggactgacc 780
[3198] gtgtttacag ccaagggcct gaatagagtg atctacggcc acagctccta tatcgtggac 840
[3199] ctgatcccag tggattacgt ggcaaacctg gtcatcgcag caggagccaa ggccagcaag 900
[3200] tccaccgagc tgaaggtgta taactgctgt tcctctagct gtaatcccgt gaccatcggc 960
[3201] acactgatga gcatgttcgc cgacgatgcc atcaagcaga agtcctacgc catgcctctg 1020
[3202] ccaggctggt acatctttac aaagtataag tggctggtgc tgctgctgac cttcctgttt 1080
[3203] caggtcatcc ctgcctacgt gaccgacctg tctaggcacc tgatcggcaa gagcccacgc 1140
[3204] tatatcaagc tgcagagcct ggtgaaccag accaggtcct ctatcgactt ctttacaaat 1200
[3205] cactcctggg tcatgaaggc cgatagggtg cgcgagctgt acgcatctct gagcccagcc 1260
[3206] gacaagtatc tgttcccttg cgacccaacc gatatcaact ggacacacta catccaggat 1320
[3207] tattgttggg gcgtgcgcca ctttctggag aagaagtcct atgagtga 1368
[3208] <210> 86
[3209] <211> 1368
[3210] <212> DNA
[3211] <213> 人工序列
[3212] <220>
[3213] <223> HaFAR S378A FAR5
[3214] <400> 86
[3215] atggtggtgc tgacctccaa ggagacaaag ccctctgtgg ccgagttcta cgccggcaag 60
[3216] agcgtgttca tcacaggcgg caccggcttc ctgggcaagg tgtttatcga gaagctgctg 120
[3217] tacagctgcc ctgacatcga gaacatctat atgctgatcc gggagaagaa gggcctgagc 180
[3218] gtgtccgaga gaatcaagca gttcctggac gatcccctgt ttacaaggct gaaggacaag 240
[3219] cgccctgccg atctggagaa gatcgtgctg atcccaggcg acatcaccgc accagatctg 300
[3220] ggcatcaaca gcgagaatga gaagatgctg atcgagaagg tgagcgtgat catccactcc 360
[3221] gccgccaccg tgaagttcaa cgagcccctg cctacagcct ggaagatcaa tgtggagggc 420
[3222] accaggatga tgctggccct gtctcggaga atgaagcgca tcgaggtgtt tatccacatc 480
[3223] agcacagcct acaccaacac aaatagggag gtggtggacg agatcctgta cccagccccc 540
[3224] gccgacatcg atcaggtgca ccagtatgtg aaggacggca tcagcgagga ggataccgag 600
[3225] aagatcctga acggcagacc caatacctac acattcacca aggccctgac agagcacctg 660
[3226] gtggccgaga accaggccta tgtgcctacc atcatcgtga gaccatccgt ggtggccgcc 720
[3227] atcaaggatg agcctctgaa gggatggctg ggaaactggt tcggagcaac aggactgacc 780
[3228] gtgtttacag ccaagggcct gaatagagtg atctacggcc acagctccta tatcgtggac 840
[3229] ctgatcccag tggattacgt ggcaaacctg gtcatcgcag caggagccaa gtctagcaag 900
[3230] tccaccgagc tgaaggtgta taactgctgt tcctctagct gtaatcccgt gaccatcggc 960
[3231] acactgatga gcatgttcgc cgacgatgcc atcaagcaga agtcctacgc catgcctctg 1020
[3232] ccaggctggt acatctttac aaagtataag tggctggtgc tgctgctgac cttcctgttt 1080
[3233] caggtcatcc ctgcctacgt gaccgacctg tctaggcacc tgatcggcaa ggccccacgc 1140

[3234] tatatcaagc tgcagagcct ggtgaaccag accaggtcct ctatcgactt ctttacaaat 1200
[3235] cactcctggg tcatgaaggc cgatagggtg cgcgagctgt acgcatctct gagcccagcc 1260
[3236] gacaagtatc tgttcccttg cgacccaacc gatatcaact ggacacacta catccaggat 1320
[3237] tattgttggg gcgtgcgcca ctttctggag aagaagtcct atgagtga 1368
[3238] <210> 87
[3239] <211> 1368
[3240] <212> DNA
[3241] <213> 人工序列
[3242] <220>
[3243] <223> HaFAR S394A FAR6
[3244] <400> 87
[3245] atggtggtgc tgacctccaa ggagacaaag ccctctgtgg ccgagttcta cgccggcaag 60
[3246] agcgtgttca tcacaggcgg caccggcttc ctgggcaagg tgtttatcga gaagctgctg 120
[3247] tacagctgcc ctgacatcga gaacatctat atgctgatcc gggagaagaa gggcctgagc 180
[3248] gtgtccgaga gaatcaagca gttcctggac gatcccctgt ttacaaggct gaaggacaag 240
[3249] cgccctgccg atctggagaa gatcgtgctg atcccaggcg acatcaccgc accagatctg 300
[3250] ggcatcaaca gcgagaatga gaagatgctg atcgagaagg tgagcgtgat catccactcc 360
[3251] gccgccaccg tgaagttcaa cgagcccctg cctacagcct ggaagatcaa tgtggagggc 420
[3252] accaggatga tgctggccct gtctcggaga atgaagcgca tcgaggtgtt tatccacatc 480
[3253] agcacagcct acaccaacac aaatagggag gtggtggacg agatcctgta cccagccccc 540
[3254] gccgacatcg atcaggtgca ccagtatgtg aaggacggca tcagcgagga ggataccgag 600
[3255] aagatcctga acggcagacc caatacctac acattcacca aggccctgac agagcacctg 660
[3256] gtggccgaga accaggccta tgtgcctacc atcatcgtga gaccatccgt ggtggccgcc 720
[3257] atcaaggatg agcctctgaa gggatggctg ggaaactggt tcggagcaac aggactgacc 780
[3258] gtgtttacag ccaagggcct gaatagagtg atctacggcc acagctccta tatcgtggac 840
[3259] ctgatcccag tggattacgt ggcaaacctg gtcatcgcag caggagccaa gtctagcaag 900
[3260] tccaccgagc tgaaggtgta taactgctgt tcctctagct gtaatcccgt gaccatcggc 960
[3261] acactgatga gcatgttcgc cgacgatgcc atcaagcaga agtcctacgc catgcctctg 1020
[3262] ccaggctggt acatctttac aaagtataag tggctggtgc tgctgctgac cttcctgttt 1080
[3263] caggtcatcc ctgcctacgt gaccgacctg tctaggcacc tgatcggcaa gagcccacgc 1140
[3264] tatatcaagc tgcagagcct ggtgaaccag accaggtccg ccatcgactt ctttacaaat 1200
[3265] cactcctggg tcatgaaggc cgatagggtg cgcgagctgt acgcatctct gagcccagcc 1260
[3266] gacaagtatc tgttcccttg cgacccaacc gatatcaact ggacacacta catccaggat 1320
[3267] tattgttggg gcgtgcgcca ctttctggag aagaagtcct atgagtga 1368
[3268] <210> 88
[3269] <211> 1368
[3270] <212> DNA
[3271] <213> 人工序列
[3272] <220>
[3273] <223> HaFAR S418A FAR7
[3274] <400> 88
[3275] atggtggtgc tgacctccaa ggagacaaag ccctctgtgg ccgagttcta cgccggcaag 60

[3276] agcgtgttca tcacaggcgg caccggcttc ctgggcaagg tgtttatcga gaagctgctg 120
[3277] tacagctgcc ctgacatcga gaacatctat atgctgatcc gggagaagaa gggcctgagc 180
[3278] gtgtccgaga gaatcaagca gttcctggac gatcccctgt ttacaaggct gaaggacaag 240
[3279] cgccctgccg atctggagaa gatcgtgctg atcccaggcg acatcaccgc accagatctg 300
[3280] ggcatcaaca gcgagaatga gaagatgctg atcgagaagg tgagcgtgat catccactcc 360
[3281] gccgccaccg tgaagttcaa cgagcccctg cctacagcct ggaagatcaa tgtggagggc 420
[3282] accaggatga tgctggccct gtctcggaga atgaagcgca tcgaggtgtt tatccacatc 480
[3283] agcacagcct acaccaacac aaatagggag gtggtggacg agatcctgta cccagccccc 540
[3284] gccgacatcg atcaggtgca ccagtatgtg aaggacggca tcagcgagga ggataccgag 600
[3285] aagatcctga acggcagacc caatacctac acattcacca aggccctgac agagcacctg 660
[3286] gtggccgaga accaggccta tgtgcctacc atcatcgtga gaccatccgt ggtggccgcc 720
[3287] atcaaggatg agcctctgaa gggatggctg ggaaactggt tcggagcaac aggactgacc 780
[3288] gtgtttacag ccaagggcct gaatagagtg atctacggcc acagctccta tatcgtggac 840
[3289] ctgatcccag tggattacgt ggcaaacctg gtcatcgcag caggagccaa gtctagcaag 900
[3290] tccaccgagc tgaaggtgta taactgctgt tcctctagct gtaatcccgt gaccatcggc 960
[3291] acactgatga gcatgttcgc cgacgatgcc atcaagcaga agtcctacgc catgcctctg 1020
[3292] ccaggctggt acatctttac aaagtataag tggctggtgc tgctgctgac cttcctgttt 1080
[3293] caggtcatcc ctgcctacgt gaccgacctg tctaggcacc tgatcggcaa gagcccacgc 1140
[3294] tatatcaagc tgcagagcct ggtgaaccag accaggtcct ctatcgactt ctttacaaat 1200
[3295] cactcctggg tcatgaaggc cgatagggtg cgcgagctgt acgcatctct ggccccagcc 1260
[3296] gacaagtatc tgttcccttg cgacccaacc gatatcaact ggacacacta catccaggat 1320
[3297] tattgttggg gcgtgcgcca ctttctggag aagaagtcct atgagtga 1368
[3298] <210> 89
[3299] <211> 1368
[3300] <212> DNA
[3301] <213> 人工序列
[3302] <220>
[3303] <223> HaFAR S453A FAR8
[3304] <400> 89
[3305] atggtggtgc tgacctccaa ggagacaaag ccctctgtgg ccgagttcta cgccggcaag 60
[3306] agcgtgttca tcacaggcgg caccggcttc ctgggcaagg tgtttatcga gaagctgctg 120
[3307] tacagctgcc ctgacatcga gaacatctat atgctgatcc gggagaagaa gggcctgagc 180
[3308] gtgtccgaga gaatcaagca gttcctggac gatcccctgt ttacaaggct gaaggacaag 240
[3309] cgccctgccg atctggagaa gatcgtgctg atcccaggcg acatcaccgc accagatctg 300
[3310] ggcatcaaca gcgagaatga gaagatgctg atcgagaagg tgagcgtgat catccactcc 360
[3311] gccgccaccg tgaagttcaa cgagcccctg cctacagcct ggaagatcaa tgtggagggc 420
[3312] accaggatga tgctggccct gtctcggaga atgaagcgca tcgaggtgtt tatccacatc 480
[3313] agcacagcct acaccaacac aaatagggag gtggtggacg agatcctgta cccagccccc 540
[3314] gccgacatcg atcaggtgca ccagtatgtg aaggacggca tcagcgagga ggataccgag 600
[3315] aagatcctga acggcagacc caatacctac acattcacca aggccctgac agagcacctg 660
[3316] gtggccgaga accaggccta tgtgcctacc atcatcgtga gaccatccgt ggtggccgcc 720
[3317] atcaaggatg agcctctgaa gggatggctg ggaaactggt tcggagcaac aggactgacc 780

[3318] gtgtttacag ccaagggcct gaatagagtg atctacggcc acagctccta tatcgtggac 840
[3319] ctgatcccag tggattacgt ggcaaacctg gtcatcgcag caggagccaa gtctagcaag 900
[3320] tccaccgagc tgaaggtgta taactgctgt tcctctagct gtaatcccgt gaccatcggc 960
[3321] acactgatga gcatgttcgc cgacgatgcc atcaagcaga agtcctacgc catgcctctg 1020
[3322] ccaggctggt acatctttac aaagtataag tggctggtgc tgctgctgac cttcctgttt 1080
[3323] caggtcatcc ctgcctacgt gaccgacctg tctaggcacc tgatcggcaa gagcccacgc 1140
[3324] tatatcaagc tgcagagcct ggtgaaccag accaggtcct ctatcgactt ctttacaaat 1200
[3325] cactcctggg tcatgaaggc cgatagggtg cgcgagctgt acgcatctct gagcccagcc 1260
[3326] gacaagtatc tgttcccttg cgacccaacc gatatcaact ggacacacta catccaggat 1320
[3327] tattgttggg gcgtgcgcca ctttctggag aagaaggcct atgagtga 1368
[3328] <210> 90
[3329] <211> 1368
[3330] <212> DNA
[3331] <213> 人工序列
[3332] <220>
[3333] <223> 密码子优化的野生型HaFAR(FAR9;菌株SPV916)
[3334] <400> 90
[3335] atggtggtgc tgacctccaa ggagacaaag ccctctgtgg ccgagttcta cgccggcaag 60
[3336] agcgtgttca tcacaggcgg caccggcttc ctgggcaagg tgtttatcga gaagctgctg 120
[3337] tacagctgcc ctgacatcga gaacatctat atgctgatcc gggagaagaa gggcctgagc 180
[3338] gtgtccgaga gaatcaagca gttcctggac gatcccctgt ttacaaggct gaaggacaag 240
[3339] cgccctgccg atctggagaa gatcgtgctg atcccaggcg acatcaccgc accagatctg 300
[3340] ggcatcaaca gcgagaatga gaagatgctg atcgagaagg tgagcgtgat catccactcc 360
[3341] gccgccaccg tgaagttcaa cgagcccctg cctacagcct ggaagatcaa tgtggagggc 420
[3342] accaggatga tgctggccct gtctcggaga atgaagcgca tcgaggtgtt tatccacatc 480
[3343] agcacagcct acaccaacac aaatagggag gtggtggacg agatcctgta cccagccccc 540
[3344] gccgacatcg atcaggtgca ccagtatgtg aaggacggca tcagcgagga ggataccgag 600
[3345] aagatcctga acggcagacc caatacctac acattcacca aggccctgac agagcacctg 660
[3346] gtggccgaga accaggccta tgtgcctacc atcatcgtga gaccatccgt ggtggccgcc 720
[3347] atcaaggatg agcctctgaa gggatggctg ggaaactggt tcggagcaac aggactgacc 780
[3348] gtgtttacag ccaagggcct gaatagagtg atctacggcc acagctccta tatcgtggac 840
[3349] ctgatcccag tggattacgt ggcaaacctg gtcatcgcag caggagccaa gtctagcaag 900
[3350] tccaccgagc tgaaggtgta taactgctgt tcctctagct gtaatcccgt gaccatcggc 960
[3351] acactgatga gcatgttcgc cgacgatgcc atcaagcaga agtcctacgc catgcctctg 1020
[3352] ccaggctggt acatctttac aaagtataag tggctggtgc tgctgctgac cttcctgttt 1080
[3353] caggtcatcc ctgcctacgt gaccgacctg tctaggcacc tgatcggcaa gagcccacgc 1140
[3354] tatatcaagc tgcagagcct ggtgaaccag accaggtcct ctatcgactt ctttacaaat 1200
[3355] cactcctggg tcatgaaggc cgatagggtg cgcgagctgt acgcatctct gagcccagcc 1260
[3356] gacaagtatc tgttcccttg cgacccaacc gatatcaact ggacacacta catccaggat 1320
[3357] tattgttggg gcgtgcgcca ctttctggag aagaagtcct atgagtga 1368
[3358] <210> 91
[3359] <211> 1623

[3360] <212> DNA
[3361] <213> 海枣
[3362] <400> 91
[3363] atggccatcc catccgatag agagaccctg gagagggcac cagagccttc tccagcaagc 60
[3364] gacctgcaga gctccctgcg gagaaggctg cactctaccg tggcagcagt ggtggtgcca 120
[3365] gattctagct ccaagacatc tagccccagc gccgagaacc tgaccacaga cagcggagag 180
[3366] gattccaggg gcgacacctc ctctgacgcc gatacaaggg atagggtggt ggacggagtg 240
[3367] gatagggagg aggagaacaa gaccgtgagc gtgctgaatg gcagacagta cgaggacgga 300
[3368] ggcggcaggg gacagggaca gggcacaggc ggcggcgtgc ccgccaagtt tctgtatagg 360
[3369] gcatctgccc ctgcacacag gaaggtgaag gagagcccac tgagctccga tgccatcttc 420
[3370] aagcagagcc acgccggcct gctgaacctg tgcatcgtgg tgctgatcgc cgtgaactcc 480
[3371] aggctgatca tcgagaatct gatgaagtac ggcctgctga tccgcgccgg ctattggttt 540
[3372] tctagcaagt ccctgcggga ctggcctctg ctgatgtgct gtctgaccct gccagcattt 600
[3373] cctctgggag ccttcatggt ggagaagctg gcccagcaca atttcatctc cgagtctgtg 660
[3374] gtcatcagcc tgcacgtgat catcaccaca gccgagctgc tgtacccagt gatcgtgatc 720
[3375] ctgagatgcg attctgccgt gctgagcggc atcacactga tgctgtttgc cagcgtggtg 780
[3376] tggctgaagc tggtgtccta cgcccacacc aactatgaca tgaggacact gagcaagtcc 840
[3377] atcgacaagg aggatatgta ctccaagtgt ccagagatcg ataatctgaa gggcgactcc 900
[3378] tttaagtctc tggtgtattt catggtggcc cccaccctgt gctaccagcc aagctatcca 960
[3379] aggaccacct gcatcaggaa gggatgggtc atccgccagg tggtgaagct ggtcatcttc 1020
[3380] accggcctga tgggcttcat catcgagcag tacatcaacc ccatcgtgca gaattcccag 1080
[3381] caccctctga agggcaactt tctgaatgcc atcgagcggg tgctgaagct gtctgtgccc 1140
[3382] accctgtacg tgtggctgtg catgttctat tgtttctttc acctgtggct gaacatcctg 1200
[3383] gccgagctgc tgtgctttgg cgatagagag ttctacaagg actggtggaa cgccaagaca 1260
[3384] atcgaggagt attggaggat gtggaatatg cctgtgcacc gctggatgat ccggcacatc 1320
[3385] tacttccctt gtctgagaaa tggcctgcca agggccgtgg ccatcctgat ctcctttctg 1380
[3386] gtgtctgcca tcttccacga gatctgcatc gccgtgccct gtcacatctt taagttctgg 1440
[3387] gcctttatcg gcatcatgtt ccagatcccc ctggtcatcc tgaccaagta tctgcagcac 1500
[3388] aagtttacaa actccatggt gggcaatatg atcttctggt tctttttctc tatcctgggc 1560
[3389] cagcctatgt gcgtgctgct gtactatcac gacgtgatga atagaaaggt gaggaccgag 1620
[3390] tga 1623
[3391] <210> 92
[3392] <211> 540
[3393] <212> PRT
[3394] <213> 海枣
[3395] <400> 92
[3396] Met Ala Ile Pro Ser Asp Arg Glu Thr Leu Glu Arg Ala Pro Glu Pro
[3397] 1 5 10 15
[3398] Ser Pro Ala Ser Asp Leu Gln Ser Ser Leu Arg Arg Arg Leu His Ser
[3399] 20 25 30
[3400] Thr Val Ala Ala Val Val Val Pro Asp Ser Ser Ser Lys Thr Ser Ser
[3401] 35 40 45

[3402] Pro Ser Ala Glu Asn Leu Thr Thr Asp Ser Gly Glu Asp Ser Arg Gly
[3403] 50 55 60
[3404] Asp Thr Ser Ser Asp Ala Asp Thr Arg Asp Arg Val Val Asp Gly Val
[3405] 65 70 75 80
[3406] Asp Arg Glu Glu Glu Asn Lys Thr Val Ser Val Leu Asn Gly Arg Gln
[3407] 85 90 95
[3408] Tyr Glu Asp Gly Gly Gly Arg Gly Gln Gly Gln Gly Thr Gly Gly Gly
[3409] 100 105 110
[3410] Val Pro Ala Lys Phe Leu Tyr Arg Ala Ser Ala Pro Ala His Arg Lys
[3411] 115 120 125
[3412] Val Lys Glu Ser Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ile Phe Lys Gln Ser His
[3413] 130 135 140
[3414] Ala Gly Leu Leu Asn Leu Cys Ile Val Val Leu Ile Ala Val Asn Ser
[3415] 145 150 155 160
[3416] Arg Leu Ile Ile Glu Asn Leu Met Lys Tyr Gly Leu Leu Ile Arg Ala
[3417] 165 170 175
[3418] Gly Tyr Trp Phe Ser Ser Lys Ser Leu Arg Asp Trp Pro Leu Leu Met
[3419] 180 185 190
[3420] Cys Cys Leu Thr Leu Pro Ala Phe Pro Leu Gly Ala Phe Met Val Glu
[3421] 195 200 205
[3422] Lys Leu Ala Gln His Asn Phe Ile Ser Glu Ser Val Val Ile Ser Leu
[3423] 210 215 220
[3424] His Val Ile Ile Thr Thr Ala Glu Leu Leu Tyr Pro Val Ile Val Ile
[3425] 225 230 235 240
[3426] Leu Arg Cys Asp Ser Ala Val Leu Ser Gly Ile Thr Leu Met Leu Phe
[3427] 245 250 255
[3428] Ala Ser Val Val Trp Leu Lys Leu Val Ser Tyr Ala His Thr Asn Tyr
[3429] 260 265 270
[3430] Asp Met Arg Thr Leu Ser Lys Ser Ile Asp Lys Glu Asp Met Tyr Ser
[3431] 275 280 285
[3432] Lys Cys Pro Glu Ile Asp Asn Leu Lys Gly Asp Ser Phe Lys Ser Leu
[3433] 290 295 300
[3434] Val Tyr Phe Met Val Ala Pro Thr Leu Cys Tyr Gln Pro Ser Tyr Pro
[3435] 305 310 315 320
[3436] Arg Thr Thr Cys Ile Arg Lys Gly Trp Val Ile Arg Gln Val Val Lys
[3437] 325 330 335
[3438] Leu Val Ile Phe Thr Gly Leu Met Gly Phe Ile Ile Glu Gln Tyr Ile
[3439] 340 345 350
[3440] Asn Pro Ile Val Gln Asn Ser Gln His Pro Leu Lys Gly Asn Phe Leu
[3441] 355 360 365
[3442] Asn Ala Ile Glu Arg Val Leu Lys Leu Ser Val Pro Thr Leu Tyr Val
[3443] 370 375 380

[3444] Trp Leu Cys Met Phe Tyr Cys Phe Phe His Leu Trp Leu Asn Ile Leu
[3445] 385 390 395 400
[3446] Ala Glu Leu Leu Cys Phe Gly Asp Arg Glu Phe Tyr Lys Asp Trp Trp
[3447] 405 410 415
[3448] Asn Ala Lys Thr Ile Glu Glu Tyr Trp Arg Met Trp Asn Met Pro Val
[3449] 420 425 430
[3450] His Arg Trp Met Ile Arg His Ile Tyr Phe Pro Cys Leu Arg Asn Gly
[3451] 435 440 445
[3452] Leu Pro Arg Ala Val Ala Ile Leu Ile Ser Phe Leu Val Ser Ala Ile
[3453] 450 455 460
[3454] Phe His Glu Ile Cys Ile Ala Val Pro Cys His Ile Phe Lys Phe Trp
[3455] 465 470 475 480
[3456] Ala Phe Ile Gly Ile Met Phe Gln Ile Pro Leu Val Ile Leu Thr Lys
[3457] 485 490 495
[3458] Tyr Leu Gln His Lys Phe Thr Asn Ser Met Val Gly Asn Met Ile Phe
[3459] 500 505 510
[3460] Trp Phe Phe Phe Ser Ile Leu Gly Gln Pro Met Cys Val Leu Leu Tyr
[3461] 515 520 525
[3462] Tyr His Asp Val Met Asn Arg Lys Val Arg Thr Glu
[3463] 530 535 540
[3464] <210> 93
[3465] <211> 405
[3466] <212> DNA
[3467] <213> 人工的
[3468] <220>
[3469] <223> 用于酶表达的TEF启动子
[3470] <400> 93
[3471] gagaccgggt tggcggcgca tttgtgtccc aaaaaacagc cccaattgcc ccaattgacc 60
[3472] ccaaattgac ccagtagcgg gcccaacccc ggcgagagcc cccttctccc cacatatcaa 120
[3473] acctcccccg gttcccacac ttgccgttaa gggcgtaggg tactgcagtc tggaatctac 180
[3474] gcttgttcag actttgtact agtttctttg tctggccatc cgggtaaccc atgccggacg 240
[3475] caaaatagac tactgaaaat ttttttgctt tgtggttggg actttagcca agggtataaa 300
[3476] agaccaccgt ccccgaatta cctttcctct tcttttctct ctctccttgt caactcacac 360
[3477] ccgaaatcgt taagcatttc cttctgagta taagaatcat tcaaa 405
[3478] <210> 94
[3479] <211> 1107
[3480] <212> DNA
[3481] <213> 人工的
[3482] <220>
[3483] <223> DST076_编码序列Z9去饱和酶
[3484] <400> 94
[3485] atgcacatcg agtctgagaa ctgccccggc aggtttaagg aggtgaacat ggcccctaat 60

[3486] gccaccgatg ccaatggcgt gctgttcgag accgatgccg ccacacctga cctggccctg 120
[3487] ccacacgcac ctgtgcagca ggccgacaac tacccaaaga agtacgtgtg gcgcaatatc 180
[3488] atcctgtttg cctacctgca catcgccgcc ctgtacggcg gctatctgtt tctgttccac 240
[3489] gccaagtggc agaccgatat cttcgcctac atcctgtatg tgatgtctgg actgggaatc 300
[3490] acagcaggag cacacaggct gtgggcccac aagagctaca aggccaagtg gcctctgaga 360
[3491] ctgatcctgg tcatcttcaa cacactggcc tttcaggact ctgccatcga ttggagcagg 420
[3492] gaccaccgca tgcaccacaa gtattccgag accgacgccg atccccacaa tgccacacgg 480
[3493] ggcttctttt tctctcacat cggctggctg ctggtgcgga agcaccctga gctgaagaga 540
[3494] aagggcaagg gcctggacct gtccgatctg tatgccgacc caatcctgag atttcagaag 600
[3495] aagtactatc tgatcctgat gcccctgacc tgtttcgtgc tgccaacagt gatccccgtg 660
[3496] tactattggg gcgagacctg gacaaacgcc tttttcgtgg ccgccctgtt taggtacgcc 720
[3497] ttcatcctga acgtgacctg gctggtgaat agcgccgccc acaagtgggg cgataagcct 780
[3498] tatgaccgca acatcaagcc atccgagaat atcagcgtgt ccatgtttgc cctgggcgag 840
[3499] ggcttccaca actaccacca caccttccca tgggattata agacagccga gctgggcaac 900
[3500] aatatgctga acttcaccac aaacttcatc aacttcttcg ccaagatcgg ctgggcctac 960
[3501] gatctgaaga ccgtgtccga cgagatcgtg cggtctagag caaagaggac aggcgacgga 1020
[3502] agccaccacc tgtggggatg gggcgacaag gatcactcca gggaggagat ggctgccgcc 1080
[3503] atccgcatcc accccaagga cgattga 1107
[3504] <210> 95
[3505] <211> 368
[3506] <212> PRT
[3507] <213> 人工的
[3508] <220>
[3509] <223> 由SEQ ID NO 94编码的DST076_氨基酸Z9去饱和酶
[3510] <400> 95
[3511] Met His Ile Glu Ser Glu Asn Cys Pro Gly Arg Phe Lys Glu Val Asn
[3512] 1 5 10 15
[3513] Met Ala Pro Asn Ala Thr Asp Ala Asn Gly Val Leu Phe Glu Thr Asp
[3514] 20 25 30
[3515] Ala Ala Thr Pro Asp Leu Ala Leu Pro His Ala Pro Val Gln Gln Ala
[3516] 35 40 45
[3517] Asp Asn Tyr Pro Lys Lys Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Phe Ala
[3518] 50 55 60
[3519] Tyr Leu His Ile Ala Ala Leu Tyr Gly Gly Tyr Leu Phe Leu Phe His
[3520] 65 70 75 80
[3521] Ala Lys Trp Gln Thr Asp Ile Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr Val Met Ser
[3522] 85 90 95
[3523] Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys Ser
[3524] 100 105 110
[3525] Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Arg Leu Ile Leu Val Ile Phe Asn Thr
[3526] 115 120 125
[3527] Leu Ala Phe Gln Asp Ser Ala Ile Asp Trp Ser Arg Asp His Arg Met

[3528] 130 135 140
[3529] His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr Arg
[3530] 145 150 155 160
[3531] Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro
[3532] 165 170 175
[3533] Glu Leu Lys Arg Lys Gly Lys Gly Leu Asp Leu Ser Asp Leu Tyr Ala
[3534] 180 185 190
[3535] Asp Pro Ile Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr Leu Ile Leu Met Pro
[3536] 195 200 205
[3537] Leu Thr Cys Phe Val Leu Pro Thr Val Ile Pro Val Tyr Tyr Trp Gly
[3538] 210 215 220
[3539] Glu Thr Trp Thr Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala Leu Phe Arg Tyr Ala
[3540] 225 230 235 240
[3541] Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Lys Trp
[3542] 245 250 255
[3543] Gly Asp Lys Pro Tyr Asp Arg Asn Ile Lys Pro Ser Glu Asn Ile Ser
[3544] 260 265 270
[3545] Val Ser Met Phe Ala Leu Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Thr
[3546] 275 280 285
[3547] Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Gly Asn Asn Met Leu Asn
[3548] 290 295 300
[3549] Phe Thr Thr Asn Phe Ile Asn Phe Phe Ala Lys Ile Gly Trp Ala Tyr
[3550] 305 310 315 320
[3551] Asp Leu Lys Thr Val Ser Asp Glu Ile Val Arg Ser Arg Ala Lys Arg
[3552] 325 330 335
[3553] Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Trp Gly Trp Gly Asp Lys Asp His
[3554] 340 345 350
[3555] Ser Arg Glu Glu Met Ala Ala Ala Ile Arg Ile His Pro Lys Asp Asp
[3556] 355 360 365
[3557] <210> 96
[3558] <211> 1062
[3559] <212> DNA
[3560] <213> 人工的
[3561] <220>
[3562] <223> DST180_编码序列Z9去饱和酶
[3563] <400> 96
[3564] atggccccaa acatctctga cgatgtgaat ggcgtgctgt ttgagagcga tgcagcaaca 60
[3565] ccagacctgg ccctggcaag ccccccctgtg cagaaggccg ataaccggcc caagcagtac 120
[3566] gtgtggagaa atatcctgct gttcgcatat ctgcacgccg ccgccctgta cggcggctat 180
[3567] ctgtttctga caagcgccaa gtggcagacc gacgtgttcg cctacatcct gtatgtgatg 240
[3568] tccggactgg gaatcacagc aggagcacac aggctgtggg cacacaagtc ttacaaggcc 300
[3569] aagtggcccc tgaaagtgat cctgatcatc tttaacacca tcgcctttca ggacgcagca 360

[3570] atggattggg caagggacca cagaatgcac cacaagtata gcgagacaga cgccgatcct 420
[3571] cacaatgcca ccaggggctt ctttttctcc cacatcggct ggctgctggt gcgcaagcac 480
[3572] ccagatctga aggagaaggg caagggcctg gacatgagcg atctgcaggc cgaccccatc 540
[3573] ctgcggtttc agaagaagta ctatctgctg ctgatgcctc tggcctgctt tgtgatgcca 600
[3574] acagtgatcc ccgtgtactt ctggggcgag acctggaaca atgccttttt cgtggccgcc 660
[3575] atgtttagat atgccttcat cctgaacgtg acctggctgg tgaattccgc cgcccacaag 720
[3576] tggggcgata agccttacga caagagcatc aagccatccg agaacatgag cgtggccatg 780
[3577] tttgccctgg gcgagggctt ccacaattac caccacacat tcccctggga ttataagacc 840
[3578] gccgagctgg gcaacaataa gctgaacttt accacaacct tcatcaactt cttcgccaag 900
[3579] ctgggctggg cctacgacat gaagacagtg tccgacgata tcgtgaagaa cagggtgaag 960
[3580] cgcaccggcg atggatctca ccacctgtgg ggatggggcg acaagaacca gagcaaggag 1020
[3581] gagatcgcct ccgccatccg gatcaatcct aaggacgatt ga 1062
[3582] <210> 97
[3583] <211> 353
[3584] <212> PRT
[3585] <213> 人工的
[3586] <220>
[3587] <223> 由SEQ ID NO: 96编码的DST180_氨基酸Z9去饱和酶
[3588] <400> 97
[3589] Met Ala Pro Asn Ile Ser Asp Asp Val Asn Gly Val Leu Phe Glu Ser
[3590] 1 5 10 15
[3591] Asp Ala Ala Thr Pro Asp Leu Ala Leu Ala Ser Pro Pro Val Gln Lys
[3592] 20 25 30
[3593] Ala Asp Asn Arg Pro Lys Gln Tyr Val Trp Arg Asn Ile Leu Leu Phe
[3594] 35 40 45
[3595] Ala Tyr Leu His Ala Ala Ala Leu Tyr Gly Gly Tyr Leu Phe Leu Thr
[3596] 50 55 60
[3597] Ser Ala Lys Trp Gln Thr Asp Val Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr Val Met
[3598] 65 70 75 80
[3599] Ser Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys
[3600] 85 90 95
[3601] Ser Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Lys Val Ile Leu Ile Ile Phe Asn
[3602] 100 105 110
[3603] Thr Ile Ala Phe Gln Asp Ala Ala Met Asp Trp Ala Arg Asp His Arg
[3604] 115 120 125
[3605] Met His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr
[3606] 130 135 140
[3607] Arg Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His
[3608] 145 150 155 160
[3609] Pro Asp Leu Lys Glu Lys Gly Lys Gly Leu Asp Met Ser Asp Leu Gln
[3610] 165 170 175
[3611] Ala Asp Pro Ile Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr Leu Leu Leu Met

[3612] 180 185 190
[3613] Pro Leu Ala Cys Phe Val Met Pro Thr Val Ile Pro Val Tyr Phe Trp
[3614] 195 200 205
[3615] Gly Glu Thr Trp Asn Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala Met Phe Arg Tyr
[3616] 210 215 220
[3617] Ala Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Lys
[3618] 225 230 235 240
[3619] Trp Gly Asp Lys Pro Tyr Asp Lys Ser Ile Lys Pro Ser Glu Asn Met
[3620] 245 250 255
[3621] Ser Val Ala Met Phe Ala Leu Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His
[3622] 260 265 270
[3623] Thr Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Gly Asn Asn Lys Leu
[3624] 275 280 285
[3625] Asn Phe Thr Thr Thr Phe Ile Asn Phe Phe Ala Lys Leu Gly Trp Ala
[3626] 290 295 300
[3627] Tyr Asp Met Lys Thr Val Ser Asp Asp Ile Val Lys Asn Arg Val Lys
[3628] 305 310 315 320
[3629] Arg Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Trp Gly Trp Gly Asp Lys Asn
[3630] 325 330 335
[3631] Gln Ser Lys Glu Glu Ile Ala Ser Ala Ile Arg Ile Asn Pro Lys Asp
[3632] 340 345 350
[3633] Asp
[3634] <210> 98
[3635] <211> 1062
[3636] <212> DNA
[3637] <213> 人工的
[3638] <220>
[3639] <223> DST181_编码序列Z9去饱和酶
[3640] <400> 98
[3641] atggccccaa acatctctga ggatgccaat ggcgtgctgt ttgagagcga tgcagcaaca 60
[3642] ccagacctgg ccctggcaag cccacctgtg cagaaggcag acaacaggcc caagcagtac 120
[3643] gtgtggagaa atatcatcct gtttgcctat ctgcacctgg ccgccctgta cggcggctat 180
[3644] ctgtttctgt tcagcgccaa gtggcagaca gacgtgttcg cctacatcct gtatgtgatg 240
[3645] tccggactgg gaatcaccgc aggagcacac agactgtggg cacacaagtc ttacaaggcc 300
[3646] aagtggcccc tgaaagtgat cctgatcatc tttaacacca tcgcctttca ggacgcagca 360
[3647] atggattggg caagggacca cagaatgcac cacaagtata gcgagacaga cgccgatcct 420
[3648] cacaatgcca ccaggggctt ctttttctcc cacatcggct ggctgctggt gcgcaagcac 480
[3649] ccagacctga agaagaaggg caagggcctg gacatgagcg atctgctgaa cgaccccatc 540
[3650] ctgaagtttc agaagaagta ctatctgctg ctgatgcctc tggcctgctt cgtgatgcca 600
[3651] acaatgatcc ccgtgtacct gtggggcgag acatggacca atgccttttt cgtggccgcc 660
[3652] atgtttcggt atgccttcat cctgaacgtg acctggctgg tgaattccgc cgcccacaag 720
[3653] tggggcgata agccttacga caagagcatc aagccatccg agaacctgtc tgtggccatg 780

[3654] tttgccctgg gcgagggctt ccacaattac caccacacat tcccctggga ttataagacc 840
[3655] gccgagctgg gcaaccagaa gctgaacttc accacaacct tcatcaactt tttcgccaag 900
[3656] ctgggctggg cctacgacat gaagacagtg tccgacgata tcgtgaagaa tagggtgaag 960
[3657] cgcaccggcg atggatctca ccacctgtgg ggatggggcg acaagaacca gagcaaggag 1020
[3658] gagatcgcct ccgccatccg gatcaatcct aaggacgatt ga 1062
[3659] <210> 99
[3660] <211> 353
[3661] <212> PRT
[3662] <213> 人工的
[3663] <220>
[3664] <223> 由SEQ ID NO: 98编码的DST181_氨基酸Z9去饱和酶
[3665] <400> 99
[3666] Met Ala Pro Asn Ile Ser Glu Asp Ala Asn Gly Val Leu Phe Glu Ser
[3667] 1 5 10 15
[3668] Asp Ala Ala Thr Pro Asp Leu Ala Leu Ala Ser Pro Pro Val Gln Lys
[3669] 20 25 30
[3670] Ala Asp Asn Arg Pro Lys Gln Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Phe
[3671] 35 40 45
[3672] Ala Tyr Leu His Leu Ala Ala Leu Tyr Gly Gly Tyr Leu Phe Leu Phe
[3673] 50 55 60
[3674] Ser Ala Lys Trp Gln Thr Asp Val Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr Val Met
[3675] 65 70 75 80
[3676] Ser Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys
[3677] 85 90 95
[3678] Ser Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Lys Val Ile Leu Ile Ile Phe Asn
[3679] 100 105 110
[3680] Thr Ile Ala Phe Gln Asp Ala Ala Met Asp Trp Ala Arg Asp His Arg
[3681] 115 120 125
[3682] Met His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr
[3683] 130 135 140
[3684] Arg Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His
[3685] 145 150 155 160
[3686] Pro Asp Leu Lys Lys Lys Gly Lys Gly Leu Asp Met Ser Asp Leu Leu
[3687] 165 170 175
[3688] Asn Asp Pro Ile Leu Lys Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr Leu Leu Leu Met
[3689] 180 185 190
[3690] Pro Leu Ala Cys Phe Val Met Pro Thr Met Ile Pro Val Tyr Leu Trp
[3691] 195 200 205
[3692] Gly Glu Thr Trp Thr Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala Met Phe Arg Tyr
[3693] 210 215 220
[3694] Ala Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Lys
[3695] 225 230 235 240

[3696] Trp Gly Asp Lys Pro Tyr Asp Lys Ser Ile Lys Pro Ser Glu Asn Leu
[3697] 245 250 255
[3698] Ser Val Ala Met Phe Ala Leu Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His
[3699] 260 265 270
[3700] Thr Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Gly Asn Gln Lys Leu
[3701] 275 280 285
[3702] Asn Phe Thr Thr Thr Phe Ile Asn Phe Phe Ala Lys Leu Gly Trp Ala
[3703] 290 295 300
[3704] Tyr Asp Met Lys Thr Val Ser Asp Asp Ile Val Lys Asn Arg Val Lys
[3705] 305 310 315 320
[3706] Arg Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Trp Gly Trp Gly Asp Lys Asn
[3707] 325 330 335
[3708] Gln Ser Lys Glu Glu Ile Ala Ser Ala Ile Arg Ile Asn Pro Lys Asp
[3709] 340 345 350
[3710] Asp
[3711] <210> 100
[3712] <211> 1062
[3713] <212> DNA
[3714] <213> 人工的
[3715] <220>
[3716] <223> DST183_编码序列Z9去饱和酶
[3717] <400> 100
[3718] atggccccaa acatcagcga ggatgtgaat ggcgtgctgt tcgagtccga tgccgccaca 60
[3719] ccagacctgg ccctgtctac cccacctgtg cagaaggcag acaacaggcc caagcagctg 120
[3720] gtgtggagaa atatcctgct gtttgcatac ctgcacctgg cagcacagta cggaggctat 180
[3721] ctgtttctgt tctctgccaa gtggcagaca gatatcttcg cctacatcct gtatgtgatc 240
[3722] agcggactgg gaatcaccgc aggagcacac cggctgtggg cccacaagtc ctacaaggcc 300
[3723] aagtggcctc tgagagtgat cctggtcatc ttcaacaccg tggcctttca ggacgcagca 360
[3724] atggattggg caagggacca cagaatgcac cacaagtatt ctgagacaga cgccgatcct 420
[3725] cacaatgcca ccaggggctt ctttttcagc cacatcggct ggctgctggt gcgcaagcac 480
[3726] ccagatctga aggagaaggg caagggcctg gacatgagcg atctgctggc cgaccccatc 540
[3727] ctgaggtttc agaagaagta ctatctgatc ctgatgcctc tggcctgctt tgtgatgcca 600
[3728] acagtgatcc ccgtgtactt ctggggcgag acatggacca acgccttttt cgtggccgcc 660
[3729] atgtttcgct atgccttcat cctgaacgtg acctggctgg tgaattctgc cgcccacaag 720
[3730] tggggcgata agccttacga caagagcatc aagccatccg agaacctgtc tgtggccatg 780
[3731] tttgccctgg gcgagggctt ccacaattac caccacacat tcccctggga ctataagacc 840
[3732] gccgagctgg gcaacaataa gctgaacttt accacaacct tcatcaactt cttcgccaag 900
[3733] atcggctggg cctatgatct gaagacagtg tccgacgata tcgtgaagaa tagggtgaag 960
[3734] aggaccggcg acggaagcca ccacctgtgg ggctggggcg atgagaacca gtccaaggag 1020
[3735] gagatcgacg ccgccatccg gatcaatcct aaggacgatt ga 1062
[3736] <210> 101
[3737] <211> 353

[3738] <212> PRT
[3739] <213> 人工的
[3740] <220>
[3741] <223> 由SEQ ID NO: 100SEQ ID NO: 100编码的DST183_氨基酸Z9去饱和酶
[3742] <400> 101
[3743] Met Ala Pro Asn Ile Ser Glu Asp Val Asn Gly Val Leu Phe Glu Ser
[3744] 1 5 10 15
[3745] Asp Ala Ala Thr Pro Asp Leu Ala Leu Ser Thr Pro Pro Val Gln Lys
[3746] 20 25 30
[3747] Ala Asp Asn Arg Pro Lys Gln Leu Val Trp Arg Asn Ile Leu Leu Phe
[3748] 35 40 45
[3749] Ala Tyr Leu His Leu Ala Ala Gln Tyr Gly Gly Tyr Leu Phe Leu Phe
[3750] 50 55 60
[3751] Ser Ala Lys Trp Gln Thr Asp Ile Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr Val Ile
[3752] 65 70 75 80
[3753] Ser Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys
[3754] 85 90 95
[3755] Ser Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Arg Val Ile Leu Val Ile Phe Asn
[3756] 100 105 110
[3757] Thr Val Ala Phe Gln Asp Ala Ala Met Asp Trp Ala Arg Asp His Arg
[3758] 115 120 125
[3759] Met His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr
[3760] 130 135 140
[3761] Arg Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His
[3762] 145 150 155 160
[3763] Pro Asp Leu Lys Glu Lys Gly Lys Gly Leu Asp Met Ser Asp Leu Leu
[3764] 165 170 175
[3765] Ala Asp Pro Ile Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr Leu Ile Leu Met
[3766] 180 185 190
[3767] Pro Leu Ala Cys Phe Val Met Pro Thr Val Ile Pro Val Tyr Phe Trp
[3768] 195 200 205
[3769] Gly Glu Thr Trp Thr Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala Met Phe Arg Tyr
[3770] 210 215 220
[3771] Ala Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Lys
[3772] 225 230 235 240
[3773] Trp Gly Asp Lys Pro Tyr Asp Lys Ser Ile Lys Pro Ser Glu Asn Leu
[3774] 245 250 255
[3775] Ser Val Ala Met Phe Ala Leu Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His
[3776] 260 265 270
[3777] Thr Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Gly Asn Asn Lys Leu
[3778] 275 280 285
[3779] Asn Phe Thr Thr Thr Phe Ile Asn Phe Phe Ala Lys Ile Gly Trp Ala

[3780] 290 295 300
[3781] Tyr Asp Leu Lys Thr Val Ser Asp Asp Ile Val Lys Asn Arg Val Lys
[3782] 305 310 315 320
[3783] Arg Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Trp Gly Trp Gly Asp Glu Asn
[3784] 325 330 335
[3785] Gln Ser Lys Glu Glu Ile Asp Ala Ala Ile Arg Ile Asn Pro Lys Asp
[3786] 340 345 350
[3787] Asp
[3788] <210> 102
[3789] <211> 1059
[3790] <212> DNA
[3791] <213> 人工的
[3792] <220>
[3793] <223> DST189_编码序列Z9去饱和酶
[3794] <400> 102
[3795] atggccccta acgtgaccga ggagaatggc gtgctgttcg agtctgatgc agcaacacct 60
[3796] gacctggccc tggcaagaga gccagtgcag caggcagata gctccccacg ggtgtacgtg 120
[3797] tggagaaaca tcatcctgtt tgcctatctg cacatcgccg ccgtgtacgg cggctatctg 180
[3798] tttctgttct ccgccaagtg gcagaccgac atcttcgcct acctgctgta tgtggcctct 240
[3799] ggactgggaa tcacagcagg agcacacagg ctgtgggccc acaagagcta caaggccaag 300
[3800] tggcccctga gactgatcct gaccatcttt aacaccacag cctttcagga cagcgccatc 360
[3801] gattgggccc gggaccacag aatgcaccac aagtattccg agaccgacgc cgatccccac 420
[3802] aatgccacaa ggggcttctt tttctcccac atcggctggc tgctggtgag gaagcaccct 480
[3803] gagctgaagc gcaagggcaa gggcctggac ctgtctgatc tgtacgccga tcctatcctg 540
[3804] cgctttcaga agaagtacta tctgatcctg atgccactgg cctgcttcat cctgcccacc 600
[3805] gtgatccccg tgtacctgtg gaacgagaca tggagcaatg ccttttcgt ggccgccctg 660
[3806] tttcggtata ccttcatcct gaacgtgaca tggctggtga attccgccgc ccacaagtgg 720
[3807] ggcgataagc catacgacaa gtccatcaag ccctctgaga acctgtctgt gagcctgttt 780
[3808] gccttcggcg agggctttca caattaccac cacaccttcc catgggatta taagacagcc 840
[3809] gagctgggca accaccggct gaacttcacc acaaagttca tcaacttttt cgccaagatc 900
[3810] ggctgggcct atgatatgaa gaccgtgtct cacgagatcg tgcagcagag ggtgaagagg 960
[3811] acaggcgacg gaagccacca cctgtgggga tggggcgaca aggatcacgc acaggaggag 1020
[3812] atcgacgccg ccatcagaat caatcccaag gacgattga 1059
[3813] <210> 103
[3814] <211> 352
[3815] <212> PRT
[3816] <213> 未知的
[3817] <220>
[3818] <223> 由SEQ ID NO: 102编码的DST189_氨基酸Z9去饱和酶
[3819] <400> 103
[3820] Met Ala Pro Asn Val Thr Glu Glu Asn Gly Val Leu Phe Glu Ser Asp
[3821] 1 5 10 15

[3822] Ala Ala Thr Pro Asp Leu Ala Leu Ala Arg Glu Pro Val Gln Gln Ala
[3823] 20 25 30
[3824] Asp Ser Ser Pro Arg Val Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile Leu Phe Ala
[3825] 35 40 45
[3826] Tyr Leu His Ile Ala Ala Val Tyr Gly Gly Tyr Leu Phe Leu Phe Ser
[3827] 50 55 60
[3828] Ala Lys Trp Gln Thr Asp Ile Phe Ala Tyr Leu Leu Tyr Val Ala Ser
[3829] 65 70 75 80
[3830] Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys Ser
[3831] 85 90 95
[3832] Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Arg Leu Ile Leu Thr Ile Phe Asn Thr
[3833] 100 105 110
[3834] Thr Ala Phe Gln Asp Ser Ala Ile Asp Trp Ala Arg Asp His Arg Met
[3835] 115 120 125
[3836] His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr Arg
[3837] 130 135 140
[3838] Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His Pro
[3839] 145 150 155 160
[3840] Glu Leu Lys Arg Lys Gly Lys Gly Leu Asp Leu Ser Asp Leu Tyr Ala
[3841] 165 170 175
[3842] Asp Pro Ile Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr Leu Ile Leu Met Pro
[3843] 180 185 190
[3844] Leu Ala Cys Phe Ile Leu Pro Thr Val Ile Pro Val Tyr Leu Trp Asn
[3845] 195 200 205
[3846] Glu Thr Trp Ser Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala Leu Phe Arg Tyr Thr
[3847] 210 215 220
[3848] Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Lys Trp
[3849] 225 230 235 240
[3850] Gly Asp Lys Pro Tyr Asp Lys Ser Ile Lys Pro Ser Glu Asn Leu Ser
[3851] 245 250 255
[3852] Val Ser Leu Phe Ala Phe Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His Thr
[3853] 260 265 270
[3854] Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Gly Asn His Arg Leu Asn
[3855] 275 280 285
[3856] Phe Thr Thr Lys Phe Ile Asn Phe Phe Ala Lys Ile Gly Trp Ala Tyr
[3857] 290 295 300
[3858] Asp Met Lys Thr Val Ser His Glu Ile Val Gln Gln Arg Val Lys Arg
[3859] 305 310 315 320
[3860] Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Trp Gly Trp Gly Asp Lys Asp His
[3861] 325 330 335
[3862] Ala Gln Glu Glu Ile Asp Ala Ala Ile Arg Ile Asn Pro Lys Asp Asp
[3863] 340 345 350

[3864] <210> 104
[3865] <211> 1116
[3866] <212> DNA
[3867] <213> 未知的
[3868] <220>
[3869] <223> DST192_编码序列Z9去饱和酶
[3870] <400> 104
[3871] atggattttc tgaacgagat cgacaattgc cccgagcggc tgagaaagcc agagaagatg 60
[3872] gcccccaacg tgaccgagga gaatggcgtg ctgttcgagt ccgatgcagc aaccccagac 120
[3873] ctggccctgg caaggacacc tgtggagcag gccgacgatt ctccaaggat ctacgtgtgg 180
[3874] cgcaacatca tcctgtttgc ctatctgcac ctggccgcca tctacggcgg ctatctgttt 240
[3875] ctgttctccg ccaagtggca gaccgatatc ttcgcctacc tgctgtatgt ggcatctgga 300
[3876] ctgggaatca cagcaggagc acacaggctg tgggcacaca agagctacaa ggccaagtgg 360
[3877] cctctgcgcc tgatcctgac catctttaac acaatcgcct ttcaggacag cgccatcgat 420
[3878] tgggccaggg accaccgcat gcaccacaag tattccgaga ccgacgccga tccacacaat 480
[3879] gccacacggg gcttcttttt ctctcacatc ggatggctgc tggtgcggaa gcacccagag 540
[3880] ctgaagagaa agggcaaggg cctggacctg tctgatctgt acagcgatcc catcctgaga 600
[3881] tttcagaaga agtactatat gatcctgatg cctctggcct gtttcatcct gcccaccgtg 660
[3882] atccccgtgt atatgtggaa cgagacatgg agcaatgcct ttttcgtggc cgccctgttt 720
[3883] aggtatacct tcatcctgaa cgtgacatgg ctggtgaatt ccgccgccca caagtggggc 780
[3884] gataagcctt acgacaagtc catcaagcca tctgagaaca tgagcgtgtc cctgtttgcc 840
[3885] ttcggcgagg gctttcacaa ttaccaccac accttccctt gggactataa gacagccgag 900
[3886] ctgggcaacc accggctgaa cttcaccaca aagttcatca acttcttcgc caagatcggc 960
[3887] tgggcctatg atatgaagac cgtgtctcag gagatcgtgc agcagcgggt gaagagaaca 1020
[3888] ggcgacggaa gccaccacct gtggggatgg ggcgacaagg atcacgcaca ggaggagatc 1080
[3889] aacgccgcca tccgcatcaa tccaaaggac gattga 1116
[3890] <210> 105
[3891] <211> 371
[3892] <212> PRT
[3893] <213> 未知的
[3894] <220>
[3895] <223> 由SEQ ID NO: 104编码的DST192_氨基酸Z9去饱和酶
[3896] <400> 105
[3897] Met Asp Phe Leu Asn Glu Ile Asp Asn Cys Pro Glu Arg Leu Arg Lys
[3898] 1 5 10 15
[3899] Pro Glu Lys Met Ala Pro Asn Val Thr Glu Glu Asn Gly Val Leu Phe
[3900] 20 25 30
[3901] Glu Ser Asp Ala Ala Thr Pro Asp Leu Ala Leu Ala Arg Thr Pro Val
[3902] 35 40 45
[3903] Glu Gln Ala Asp Asp Ser Pro Arg Ile Tyr Val Trp Arg Asn Ile Ile
[3904] 50 55 60
[3905] Leu Phe Ala Tyr Leu His Leu Ala Ala Ile Tyr Gly Gly Tyr Leu Phe

[3906] 65 70 75 80
[3907] Leu Phe Ser Ala Lys Trp Gln Thr Asp Ile Phe Ala Tyr Leu Leu Tyr
[3908] 85 90 95
[3909] Val Ala Ser Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala
[3910] 100 105 110
[3911] His Lys Ser Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Arg Leu Ile Leu Thr Ile
[3912] 115 120 125
[3913] Phe Asn Thr Ile Ala Phe Gln Asp Ser Ala Ile Asp Trp Ala Arg Asp
[3914] 130 135 140
[3915] His Arg Met His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn
[3916] 145 150 155 160
[3917] Ala Thr Arg Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu Val Arg
[3918] 165 170 175
[3919] Lys His Pro Glu Leu Lys Arg Lys Gly Lys Gly Leu Asp Leu Ser Asp
[3920] 180 185 190
[3921] Leu Tyr Ser Asp Pro Ile Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr Met Ile
[3922] 195 200 205
[3923] Leu Met Pro Leu Ala Cys Phe Ile Leu Pro Thr Val Ile Pro Val Tyr
[3924] 210 215 220
[3925] Met Trp Asn Glu Thr Trp Ser Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala Leu Phe
[3926] 225 230 235 240
[3927] Arg Tyr Thr Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala
[3928] 245 250 255
[3929] His Lys Trp Gly Asp Lys Pro Tyr Asp Lys Ser Ile Lys Pro Ser Glu
[3930] 260 265 270
[3931] Asn Met Ser Val Ser Leu Phe Ala Phe Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr
[3932] 275 280 285
[3933] His His Thr Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Gly Asn His
[3934] 290 295 300
[3935] Arg Leu Asn Phe Thr Thr Lys Phe Ile Asn Phe Phe Ala Lys Ile Gly
[3936] 305 310 315 320
[3937] Trp Ala Tyr Asp Met Lys Thr Val Ser Gln Glu Ile Val Gln Gln Arg
[3938] 325 330 335
[3939] Val Lys Arg Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Trp Gly Trp Gly Asp
[3940] 340 345 350
[3941] Lys Asp His Ala Gln Glu Glu Ile Asn Ala Ala Ile Arg Ile Asn Pro
[3942] 355 360 365
[3943] Lys Asp Asp
[3944] 370

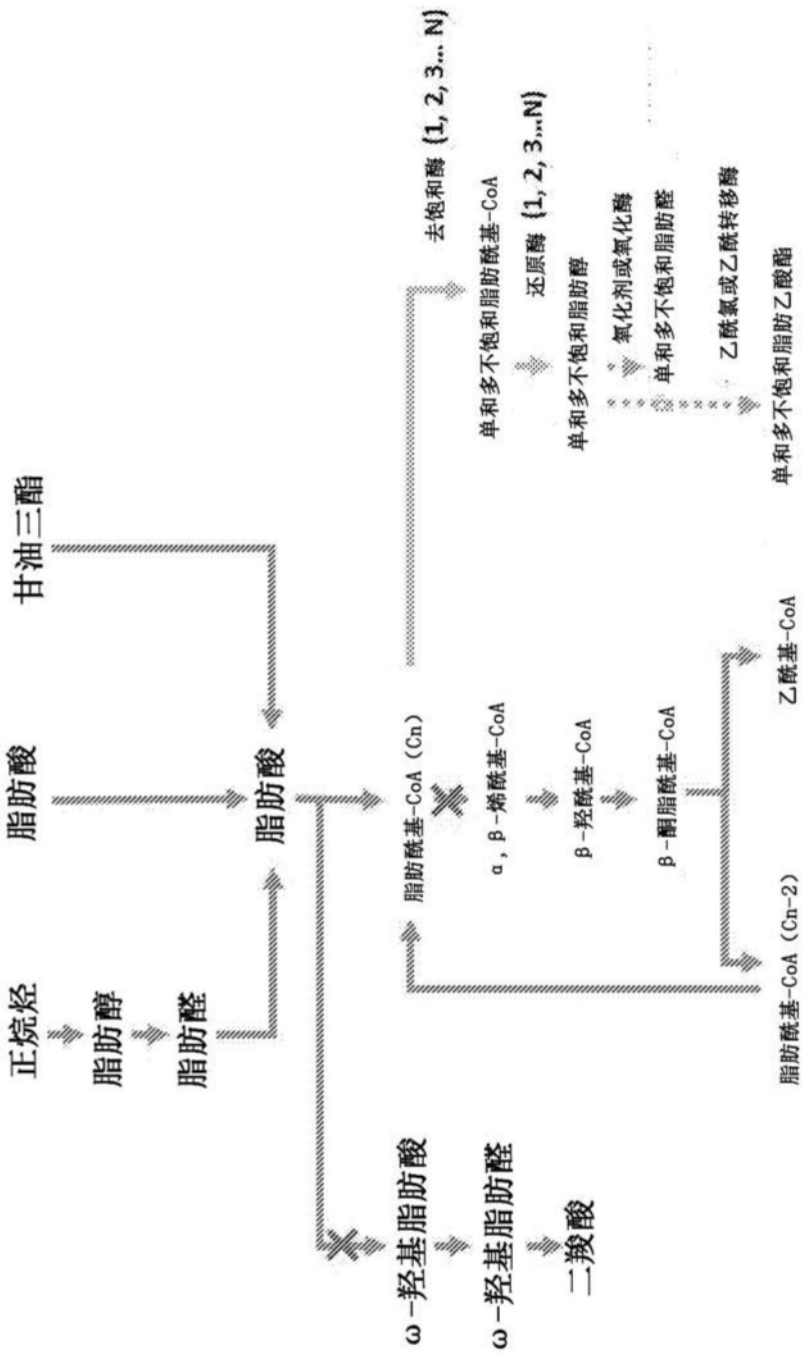

正烷烃
脂肪酸
甘油三酯
脂肪醇
脂肪醛
脂肪酸
脂肪酸
脂肪酰基-CoA（Cn）
去饱和酶 {1, 2, 3... N}
单和多不饱和脂肪酰基-CoA
还原酶 {1, 2, 3...N}
单和多不饱和脂肪醇
α，β-烯酰基-CoA
β-羟酰基-CoA
β-酮脂酰基-CoA
氧化剂或氧化酶
单和多不饱和脂肪醛
乙酰氯或乙酰转移酶
单和多不饱和脂肪乙酸酯
乙酰基-CoA
脂肪酰基-CoA（Cn-2）
ω-羟基脂肪酸
ω-羟基脂肪醛
二羧酸

图1

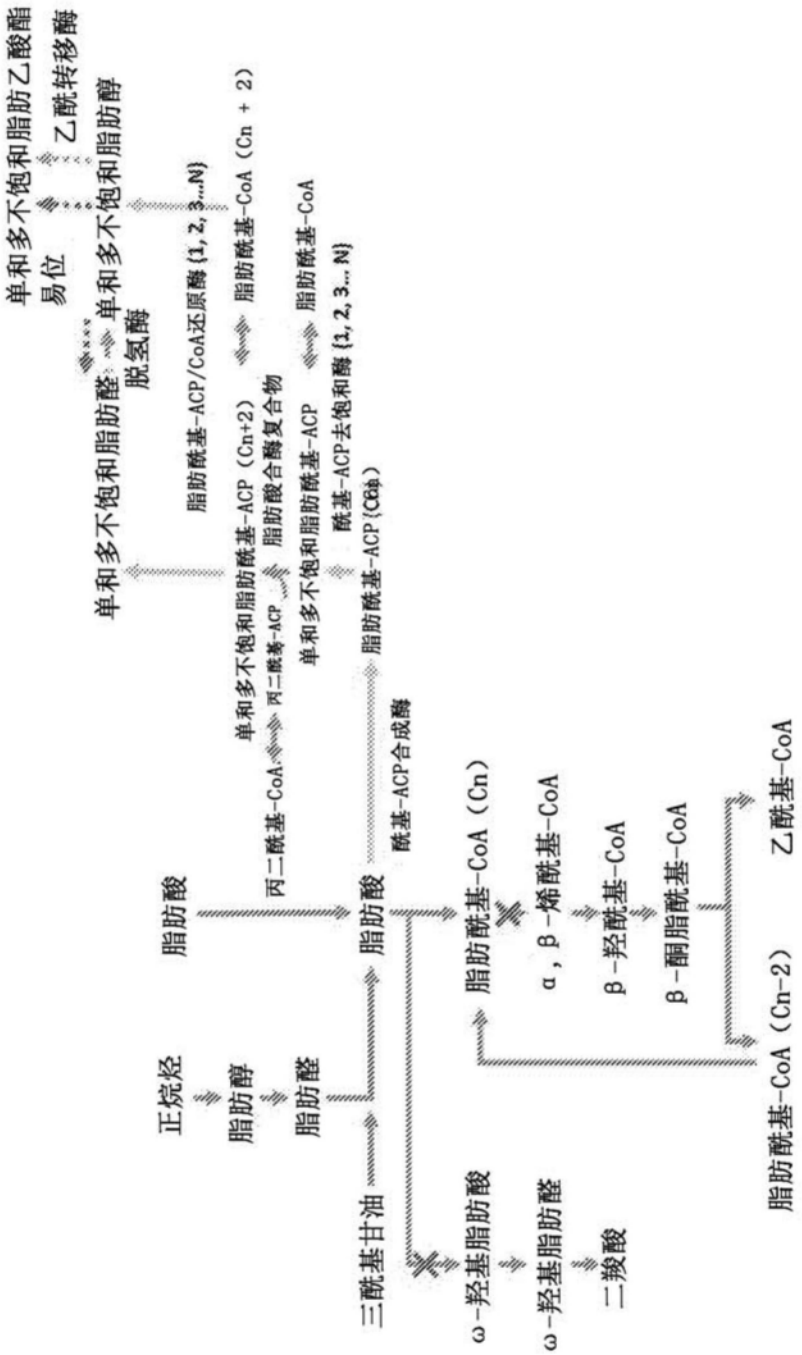

单和多不饱和脂肪乙酸酯
易位
乙酰转移酶
单和多不饱和脂肪醛
单和多不饱和脂肪醇
脱氢酶
脂肪酰基-ACP/CoA还原酶{1, 2, 3...N}
单和多不饱和脂肪酰基-ACP（Cn+2）
脂肪酰基-CoA（Cn + 2）
丙二酰基-CoA
丙二酰基-ACP
脂肪酸合酶复合物
单和多不饱和脂肪酰基-ACP
脂肪酰基-CoA
酰基-ACP去饱和酶{1, 2, 3... N}
脂肪酰基-ACP(Cn)
脂肪酸
脂肪酸
酰基-ACP合成酶
脂肪酰基-CoA（Cn）
α，β-烯酰基-CoA
β-羟酰基-CoA
β-酮脂酰基-CoA
乙酰基-CoA
脂肪酰基-CoA（Cn-2）
正烷烃
脂肪醇
脂肪醛
三酰基甘油
ω-羟基脂肪酸
ω-羟基脂肪醛
二羧酸

图2

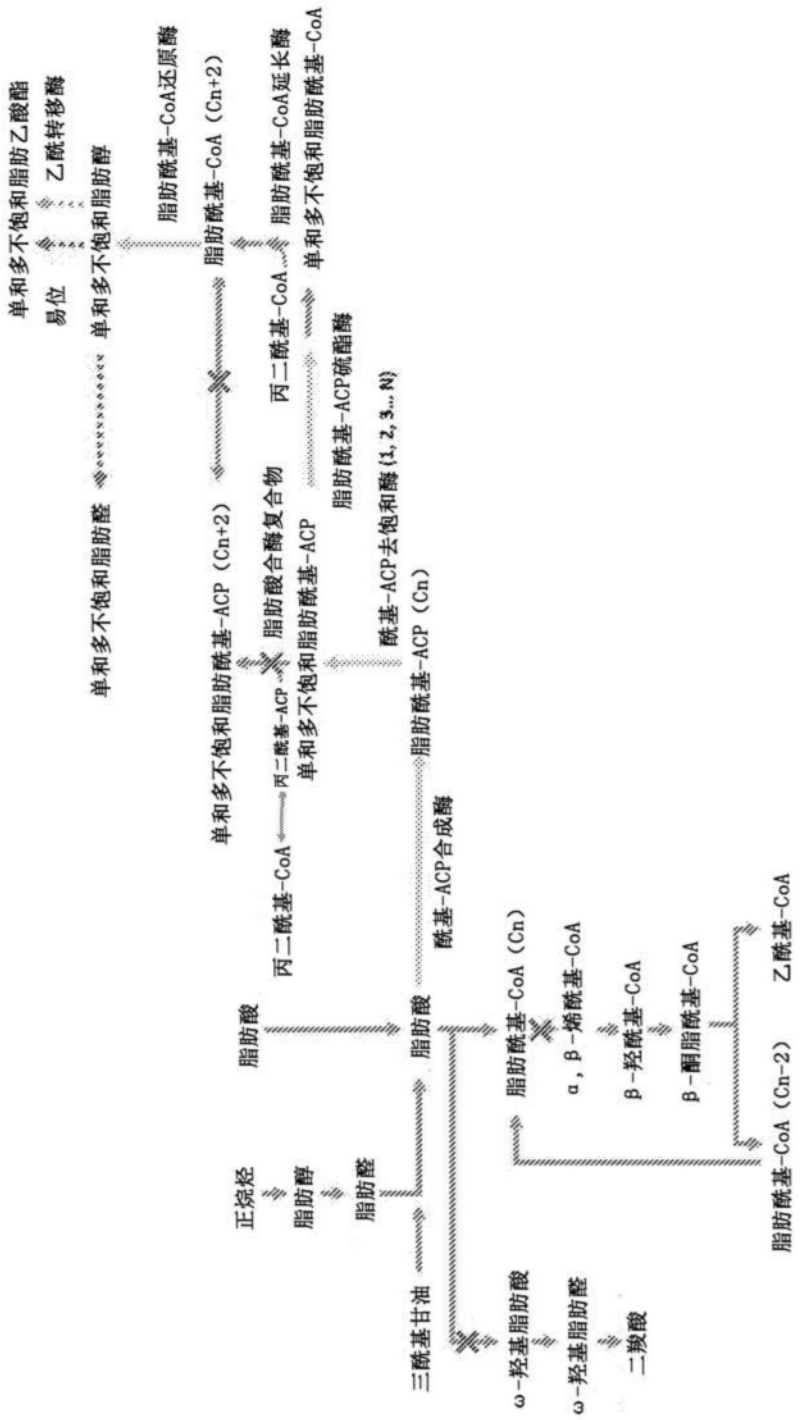

单和多不饱和脂肪乙酸酯
易位
乙酰转移酶
单和多不饱和脂肪醛
单和多不饱和脂肪醇
脂肪酰基-CoA还原酶
脂肪酰基-CoA（Cn+2）
单和多不饱和脂肪酰基-ACP（Cn+2）
脂肪酸合酶复合物
丙二酰基-CoA
丙二酰基-ACP
脂肪酰基-CoA延长酶
单和多不饱和脂肪酰基-CoA
单和多不饱和脂肪酰基-ACP
脂肪酰基-ACP硫酯酶
酰基-ACP去饱和酶（1，2，3...，N）
脂肪酰基-ACP（Cn）
酰基-ACP合成酶
正烷烃
脂肪酸
脂肪醇
脂肪醛
脂肪酸
脂肪酰基-CoA（Cn）
α，β-烯酰基-CoA
β-羟酰基-CoA
β-酮脂酰基-CoA
三酰基甘油
ω-羟基脂肪酸
ω-羟基脂肪醛
二羧酸
脂肪酰基-CoA（Cn-2）
乙酰基-CoA

图3

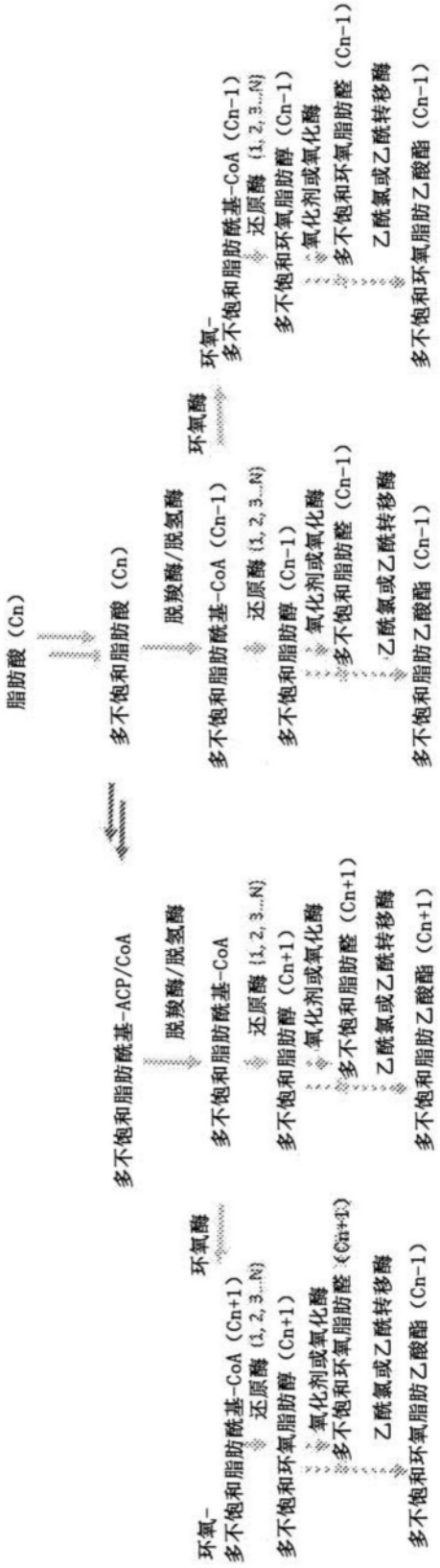

脂肪酸（Cn）
多不饱和脂肪酸（Cn）
脱羧酶/脱氢酶
多不饱和脂肪酰基-CoA（Cn-1）
还原酶 {1, 2, 3...N}
多不饱和脂肪醇（Cn-1）
氧化剂或氧化酶
多不饱和脂肪醛（Cn-1）
乙酰氯或乙酰转移酶
多不饱和脂肪乙酸酯（Cn-1）
环氧酶
环氧-
多不饱和脂肪酰基-CoA（Cn-1）
还原酶 {1, 2, 3...N}
多不饱和环氧脂肪醇（Cn-1）
氧化剂或氧化酶
多不饱和环氧脂肪醛（Cn-1）
乙酰氯或乙酰转移酶
多不饱和环氧脂肪乙酸酯（Cn-1）
多不饱和脂肪酰基-ACP/CoA
脱羧酶/脱氢酶
多不饱和脂肪酰基-CoA
还原酶 {1, 2, 3...N}
多不饱和脂肪醇（Cn+1）
氧化剂或氧化酶
多不饱和脂肪醛（Cn+1）
乙酰氯或乙酰转移酶
多不饱和脂肪乙酸酯（Cn+1）
环氧酶
环氧-
多不饱和脂肪酰基-CoA（Cn+1）
还原酶 {1, 2, 3...N}
多不饱和环氧脂肪醇（Cn+1）
氧化剂或氧化酶
多不饱和环氧脂肪醛（Cn+1）
乙酰氯或乙酰转移酶
多不饱和环氧脂肪乙酸酯（Cn-1）

图4

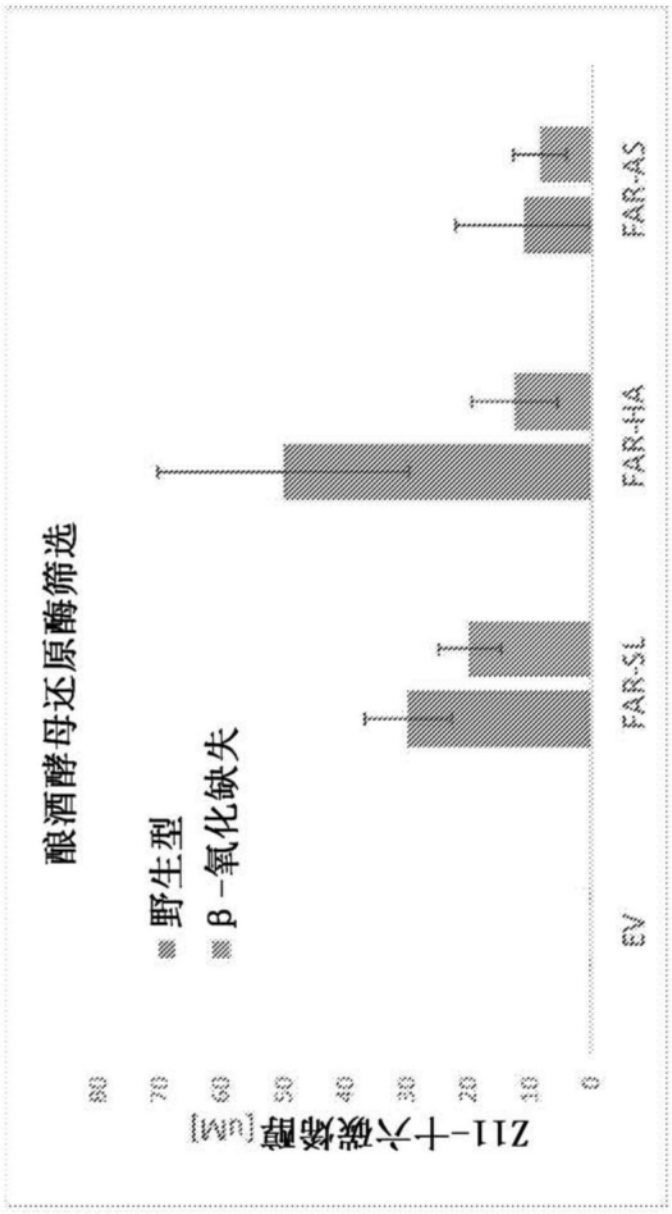

酿酒酵母还原酶筛选
野生型
β-氧化缺失
Z11-十六碳烯醇 (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
EV
FAR-SL
FAR-HA
FAR-AS

图5

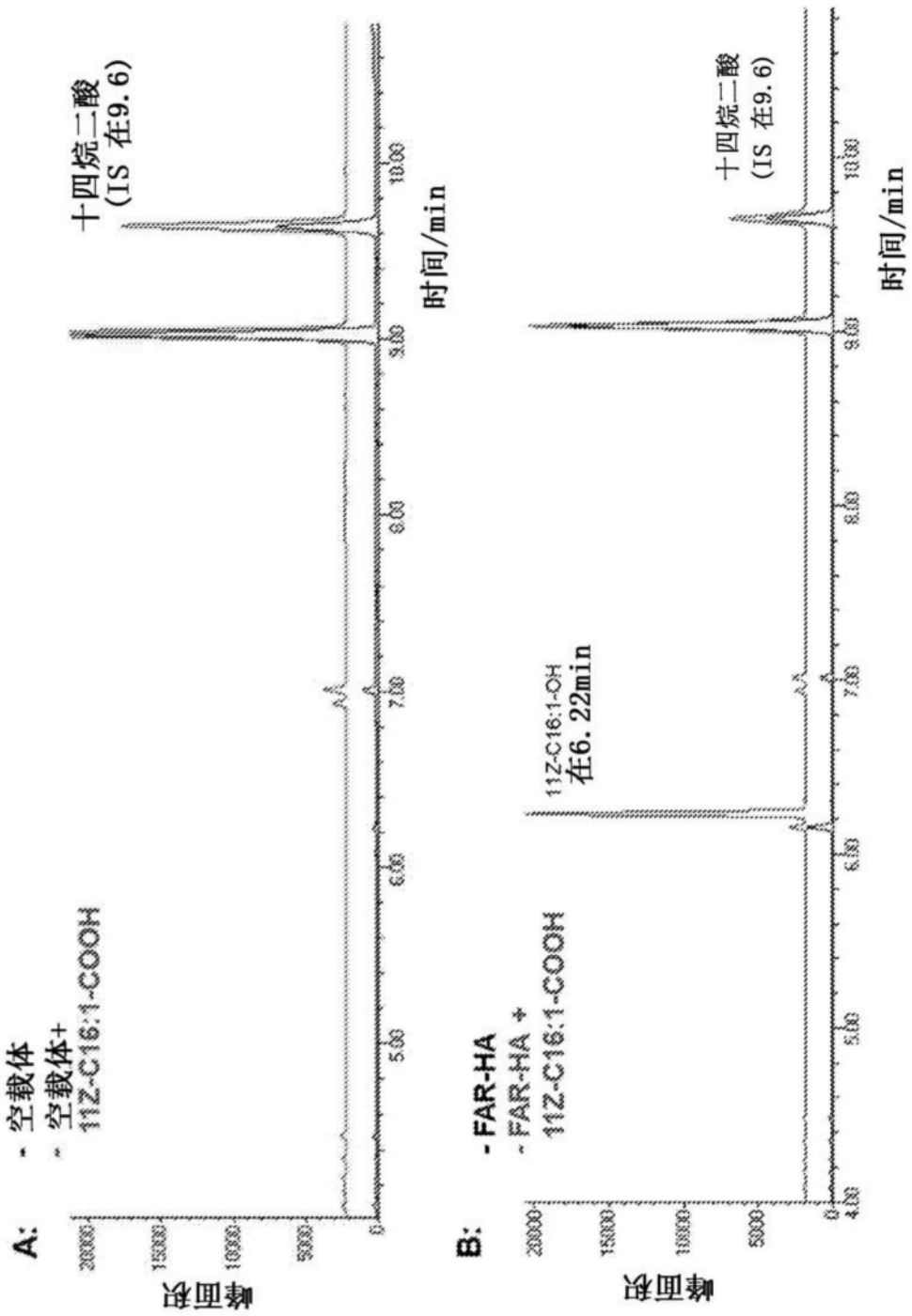

A:
- 空载体
~ 空载体+
11Z-C16:1-COOH
十四烷二酸
(IS 在9.6)
峰面积
时间/min
B:
- FAR-HA
~ FAR-HA +
11Z-C16:1-COOH
11Z-C16:1-OH
在6.22min
十四烷二酸
(IS 在9.6)
峰面积
时间/min

图6

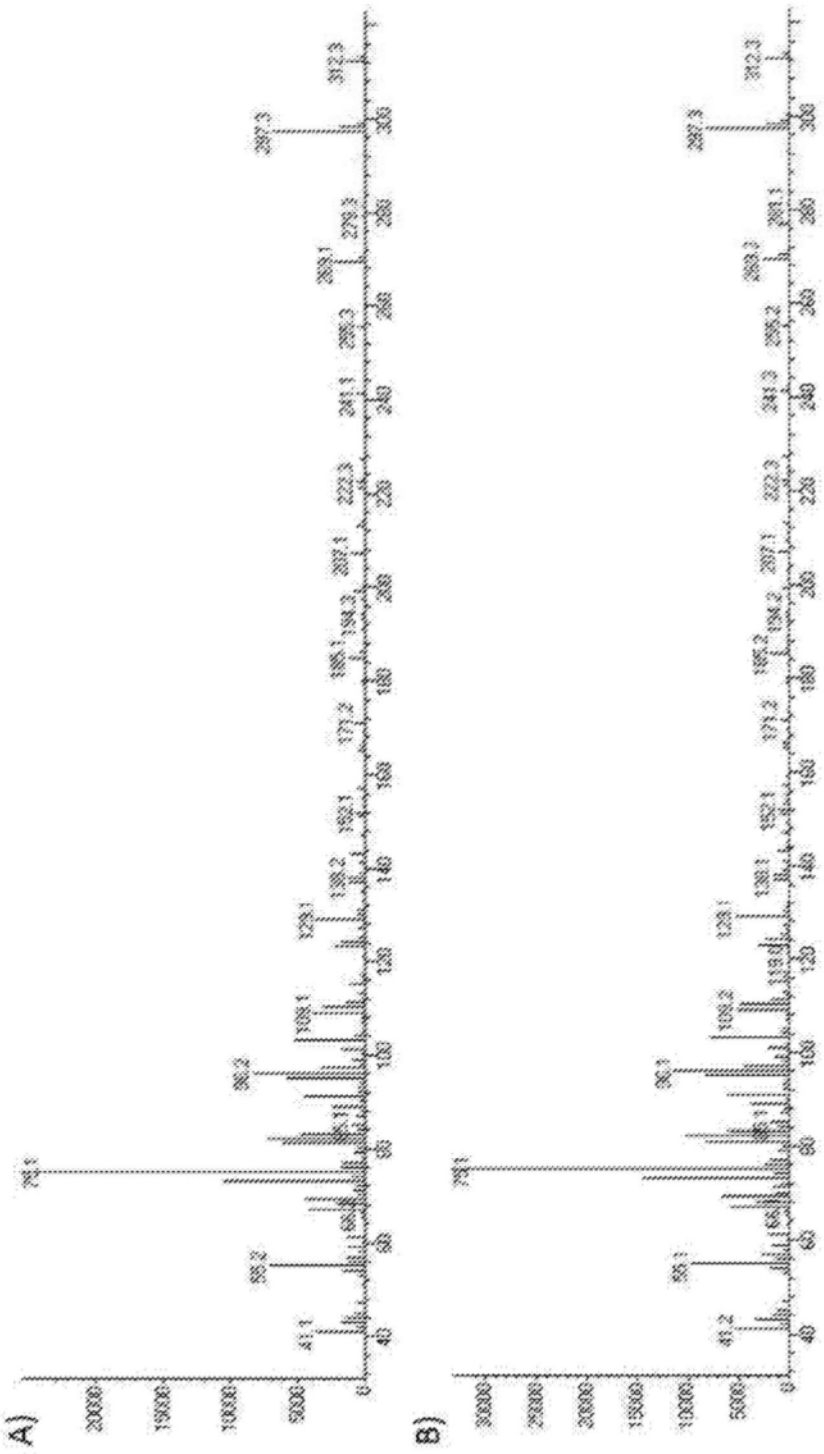


图7

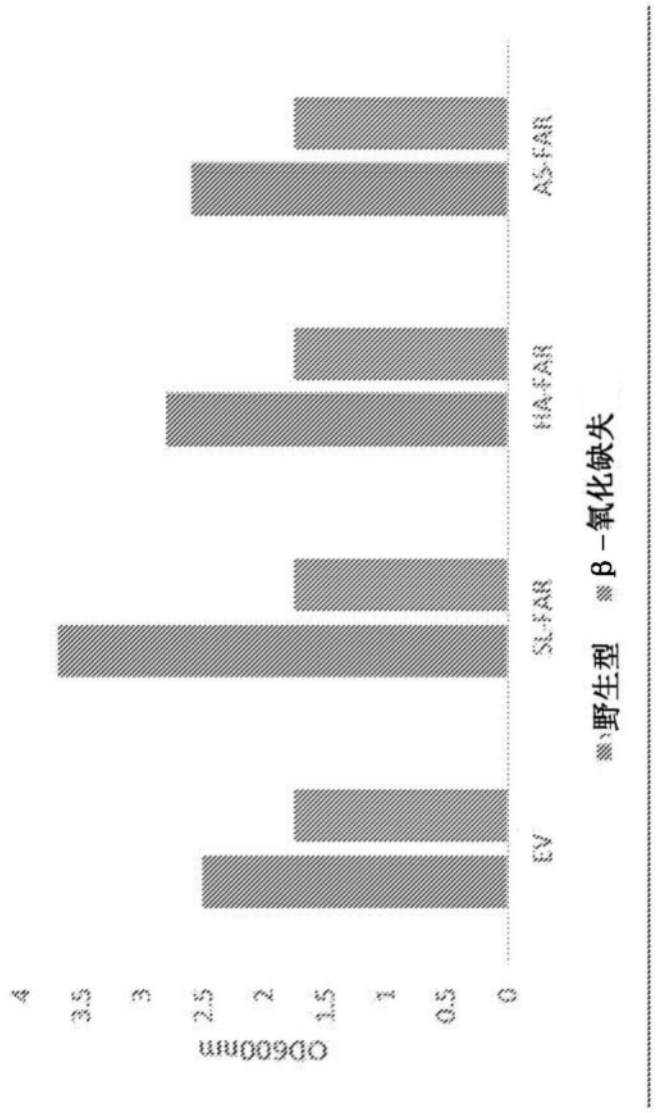


图8

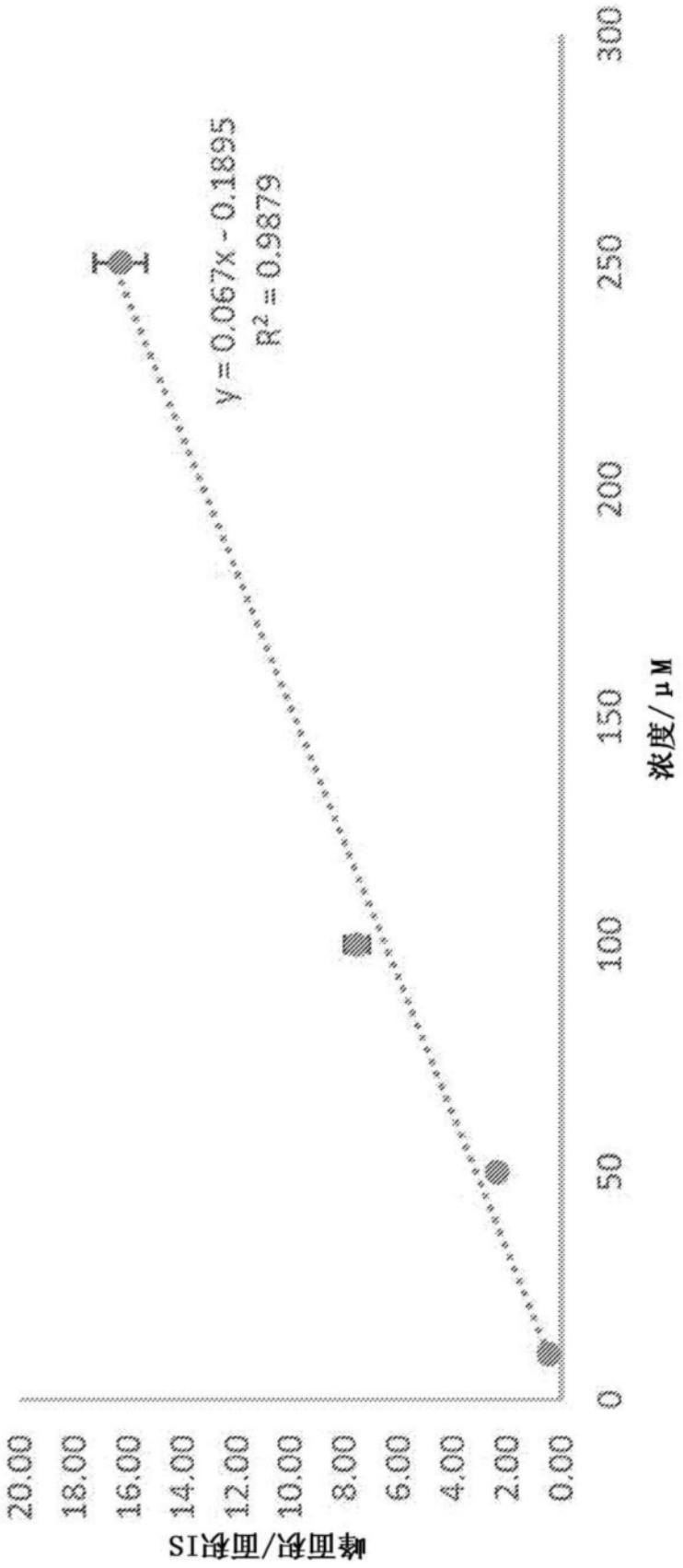

y = 0.067x - 0.1895
R² = 0.9879
峰面积/面积IS
浓度/μM
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
0
50
100
150
200
250
300

图9

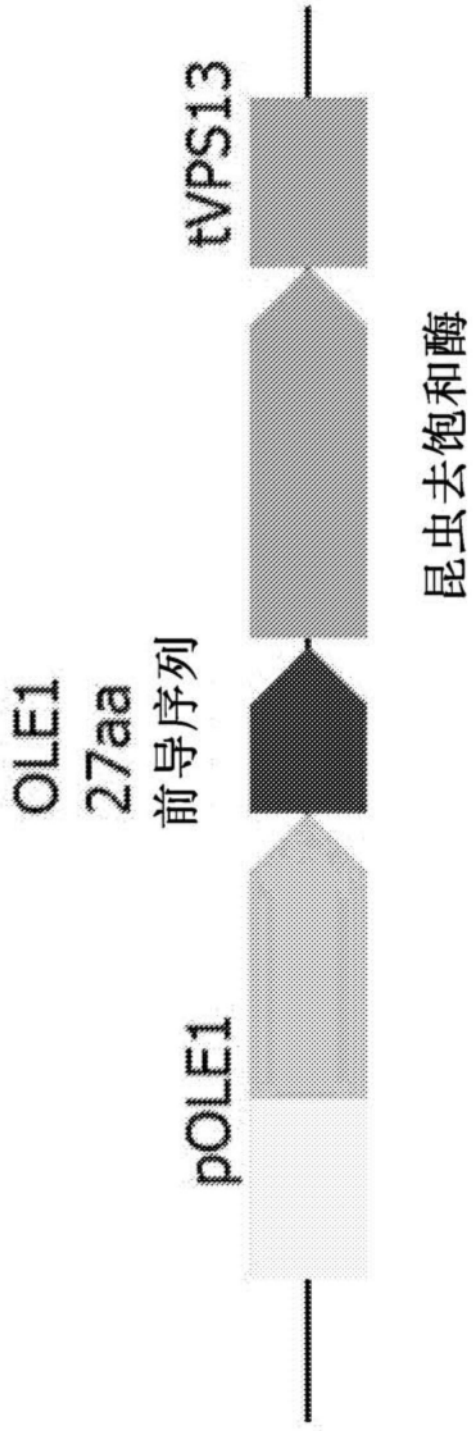


图10

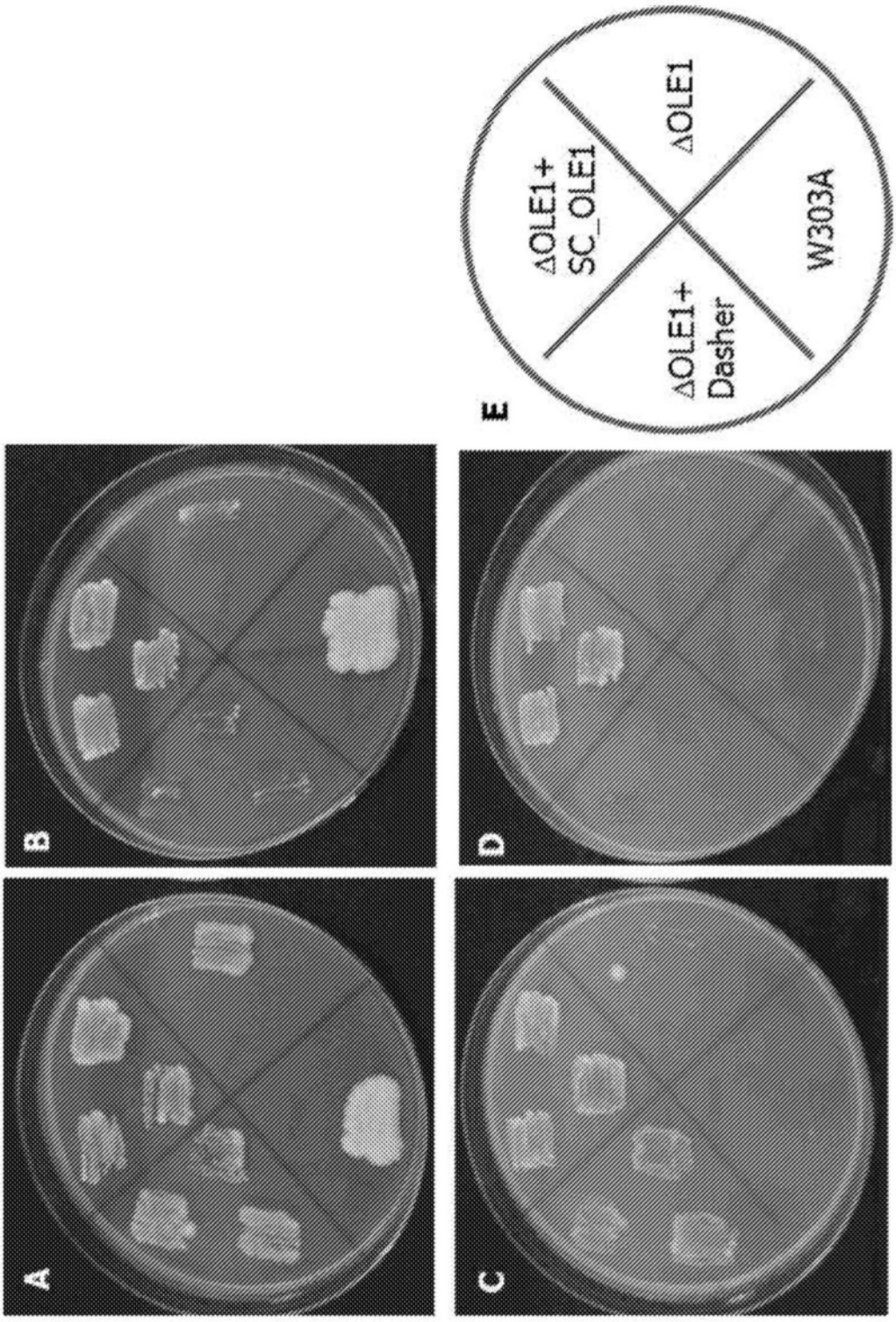


图11

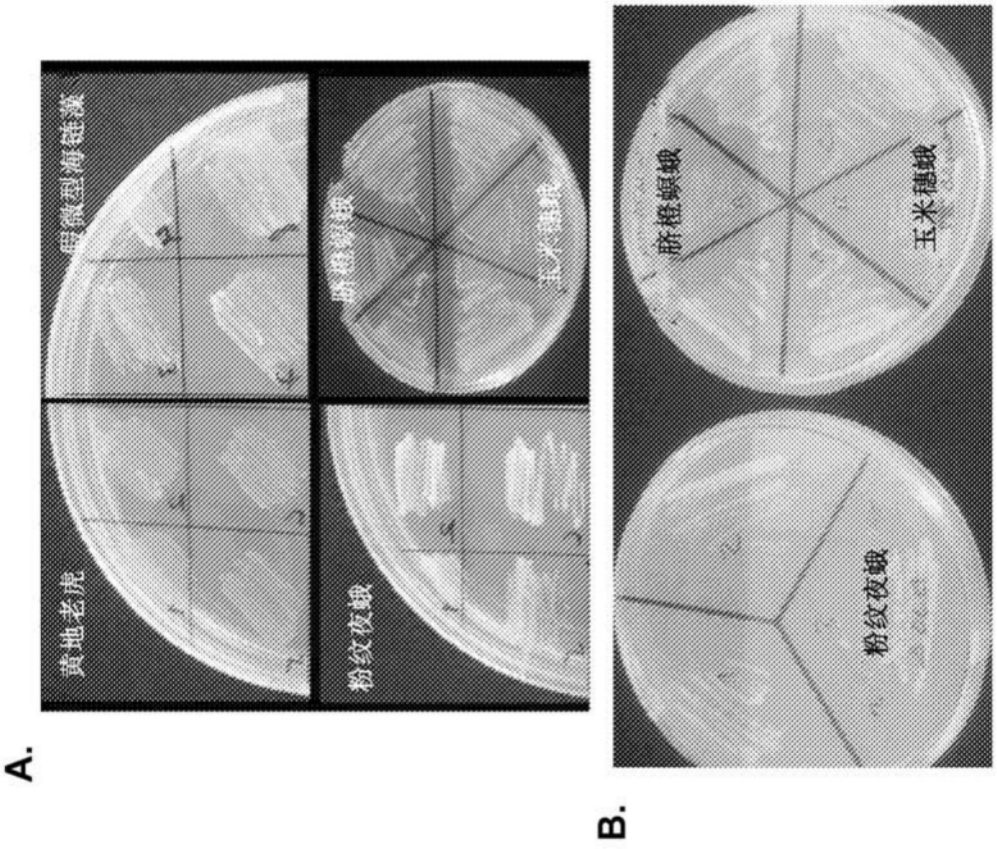


图12

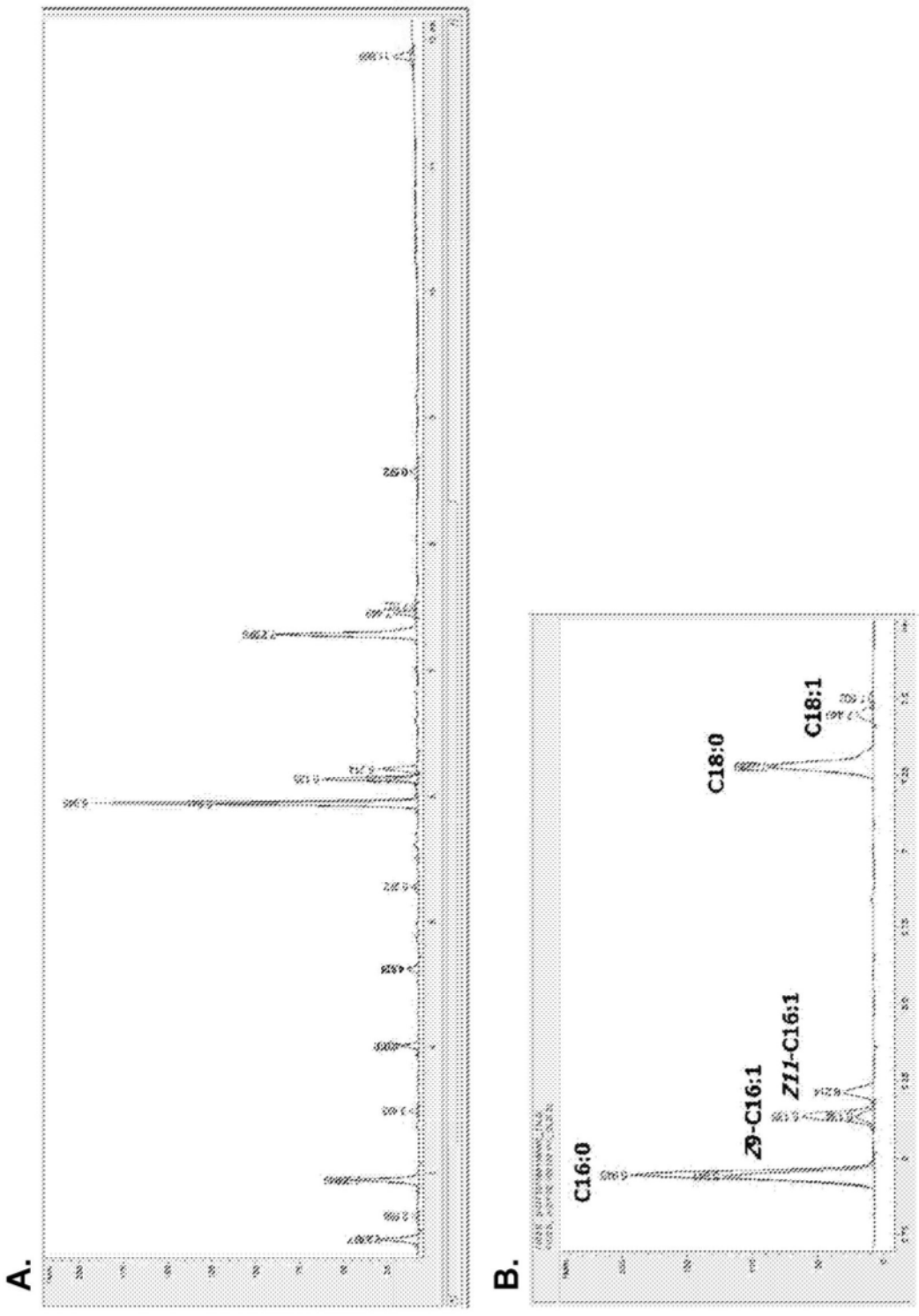


图13

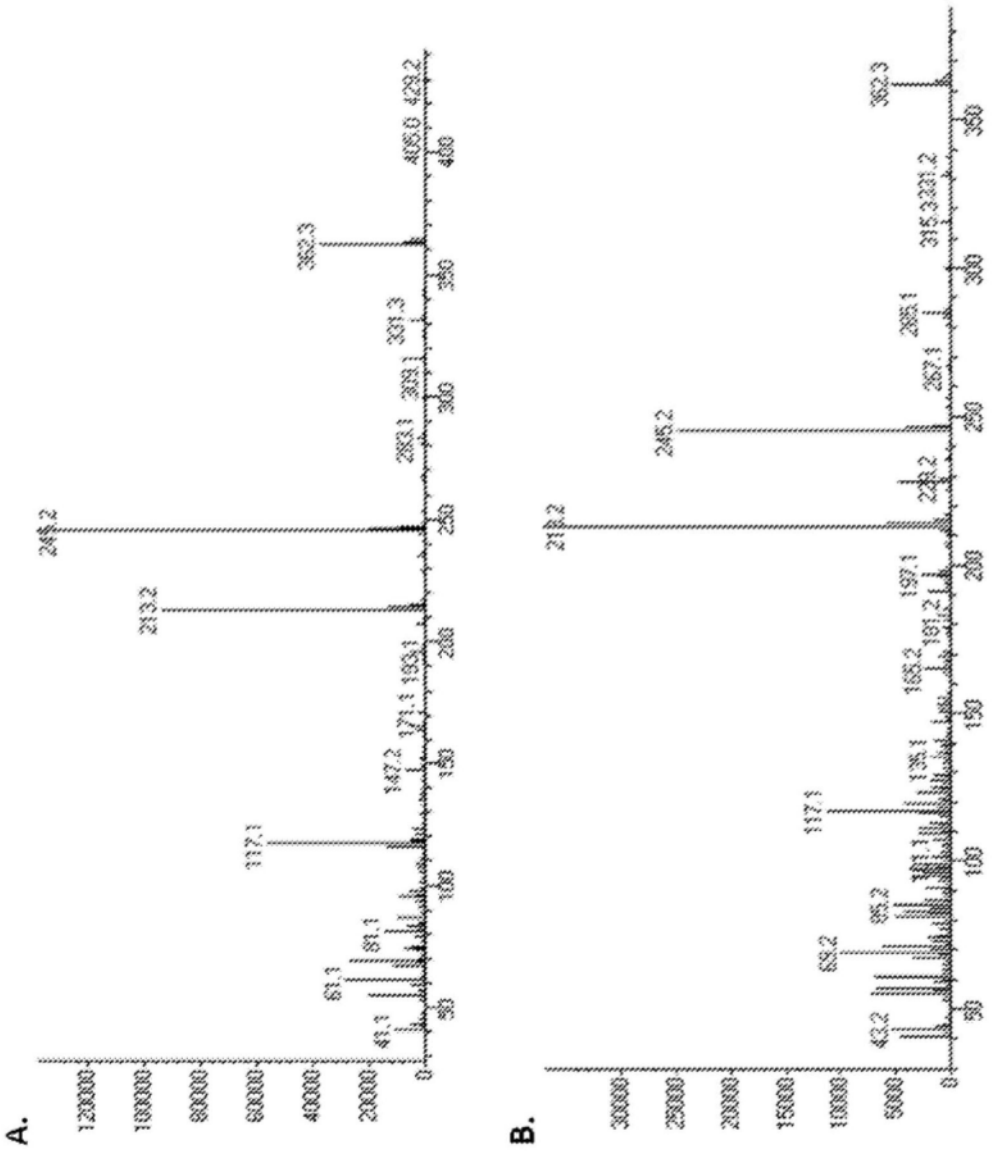


图14

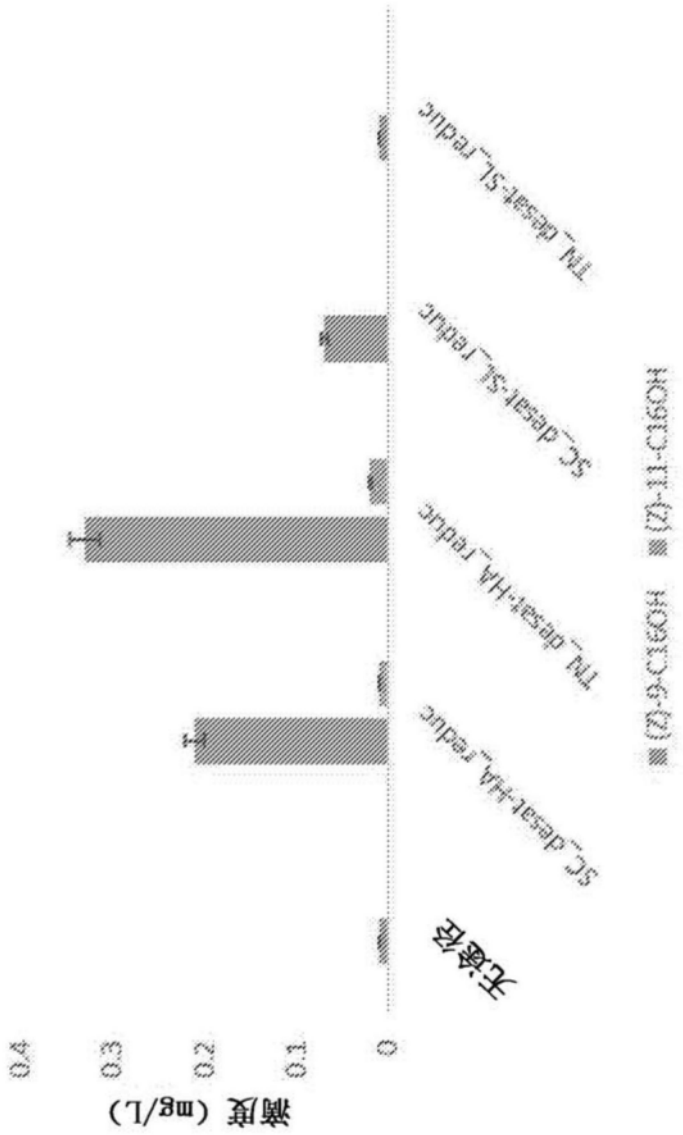

浓度 (mg/L)
0.4
0.3
0.2
0.1
0
无添加
SC_desat-HA_reduc
TM_desat-HA_reduc
SC_desat-SL_reduc
TM_desat-SL_reduc
(Z)-9-C16OH
(Z)-11-C16OH

图15

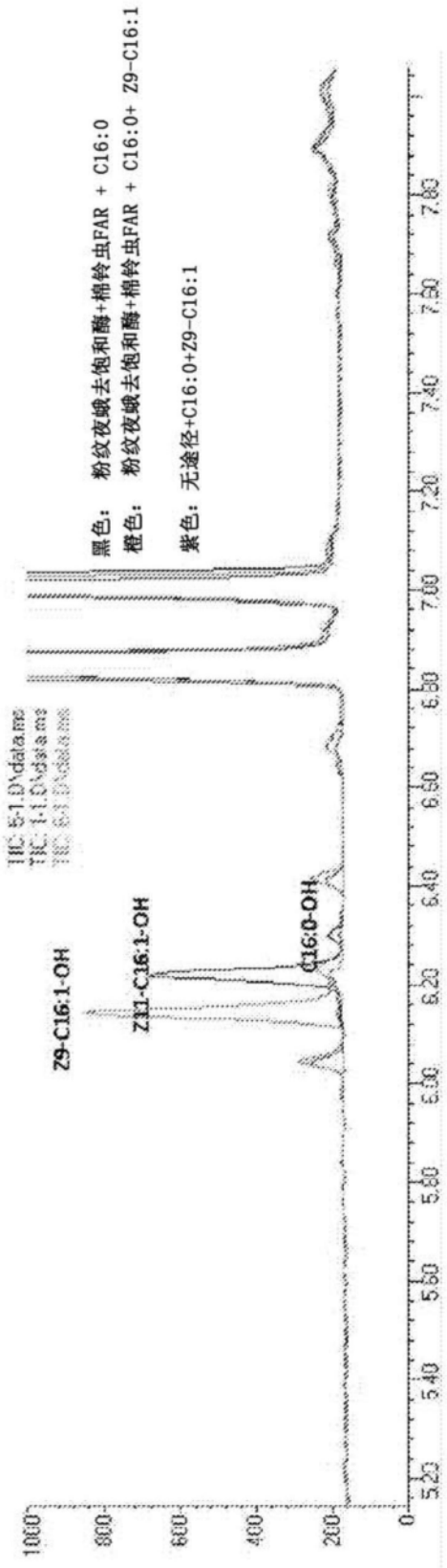

黑色： 粉纹夜蛾去饱和酶+棉铃虫FAR + C16:0
橙色： 粉纹夜蛾去饱和酶+棉铃虫FAR + C16:0+ Z9-C16:1
紫色：无途径+C16:0+Z9-C16:1
Z9-C16:1-OH
Z11-C16:1-OH
C16:0-OH

图16

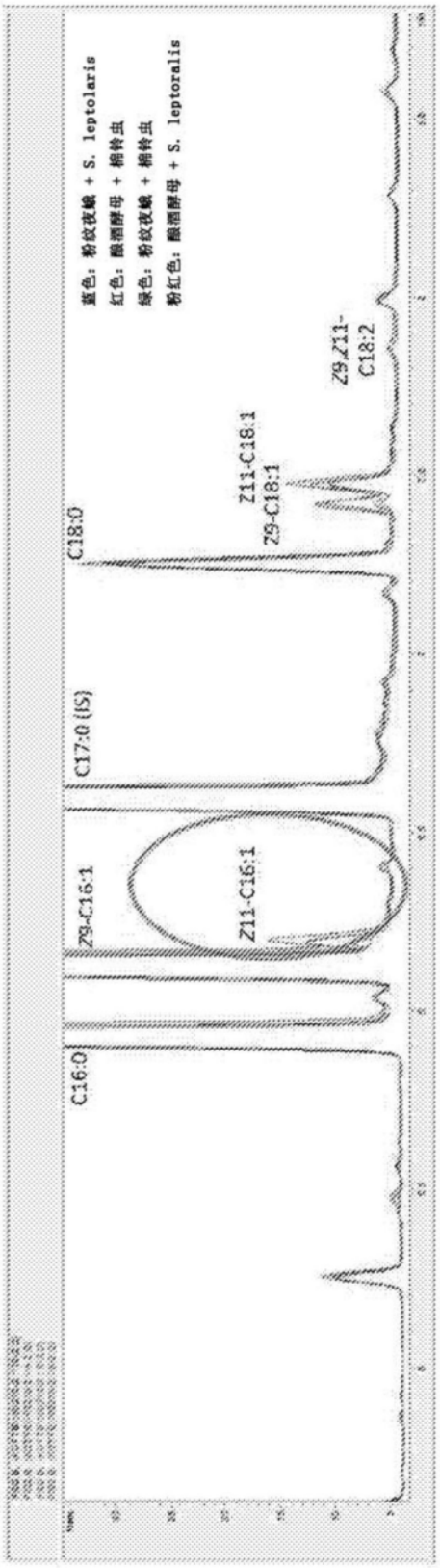

蓝色：粉纹夜蛾 + S. leptolaris
红色：酿酒酵母 + 棉铃虫
绿色：粉纹夜蛾 + 棉铃虫
粉红色：酿酒酵母 + S. leptoralis
C16:0
Z9-C16:1
Z11-C16:1
C17:0 (IS)
C18:0
Z11-C18:1
Z9-C18:1
Z9,Z11-
C18:2

图17

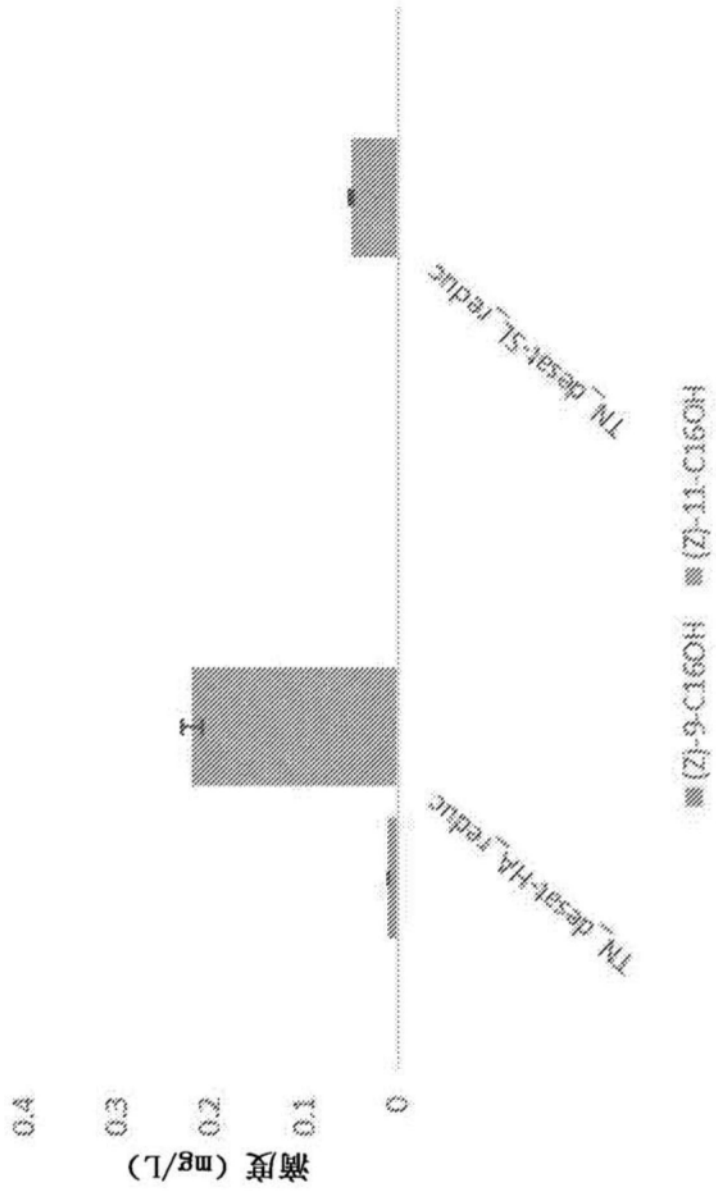

浓度（mg/L）
0.4
0.3
0.2
0.1
0
TN_desat-HA_reduc
TN_desat-SL_reduc
■(Z)-9-C16OH
■(Z)-11-C16OH

图18

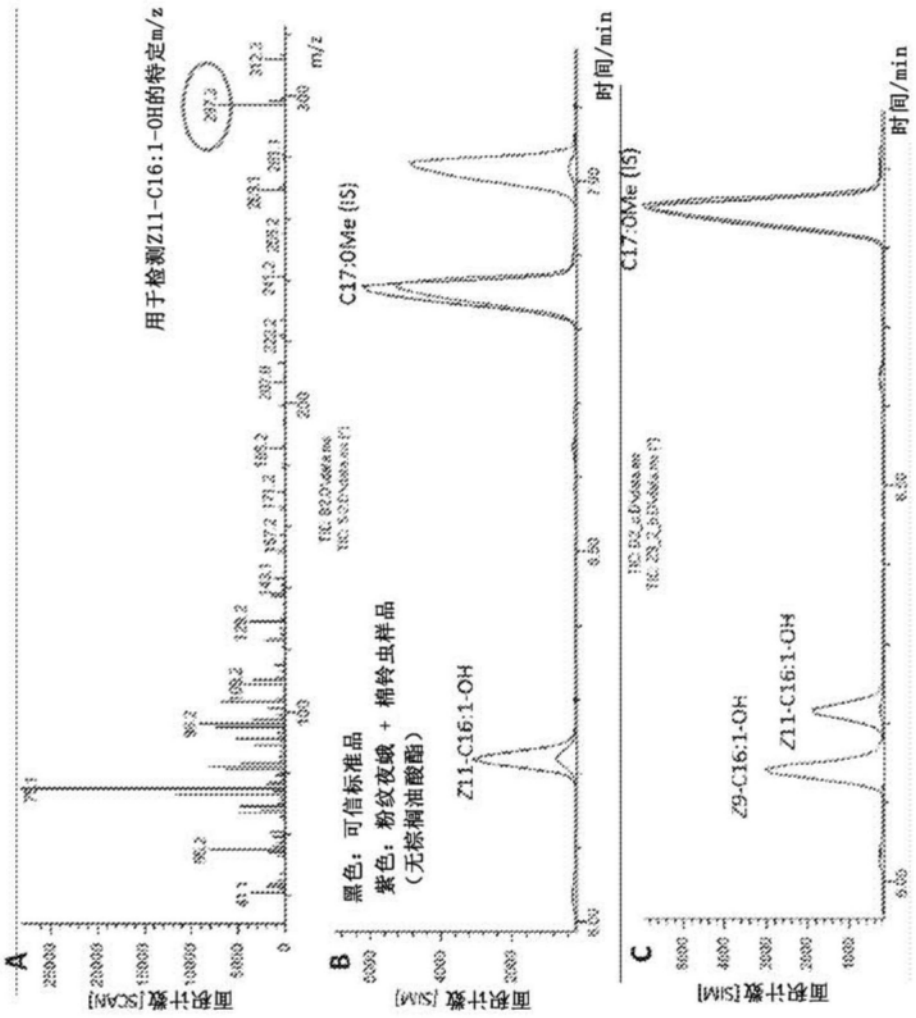

A
用于检测Z11-C16:1-OH的特定m/z
297.3
m/z
面积计数[SCAN]
B
黑色：可信标准品
紫色：粉纹夜蛾 + 棉铃虫样品
（无棕褐油酸酯）
Z11-C16:1-OH
C17:OMe (IS)
时间/min
面积计数[SIM]
C
C17:OMe (IS)
Z9-C16:1-OH
Z11-C16:1-OH
时间/min
面积计数[SIM]

图19

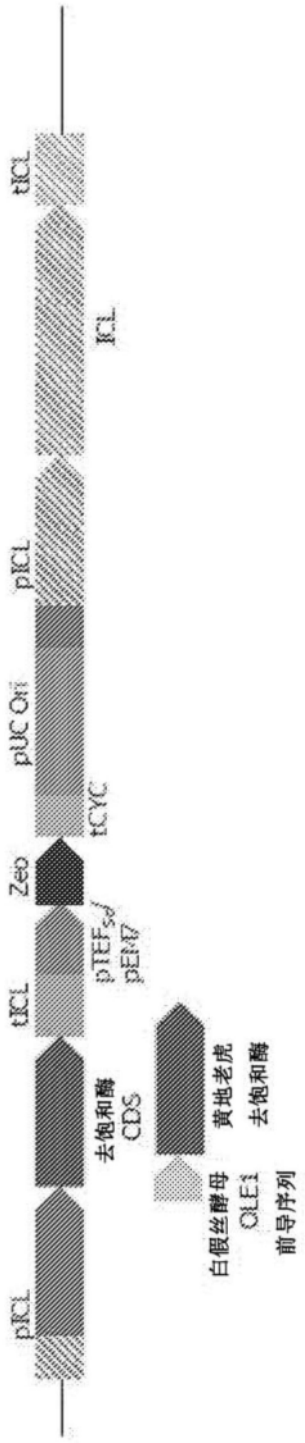

tICL
ICL
pICL
pUC Ori
tCYC
Zeo
pTEF$_{sd}$/
pENO
tICL
去饱和酶
CDS
pICL
白假丝酵母
OLE1
前导序列
黄地老虎
去饱和酶

图20

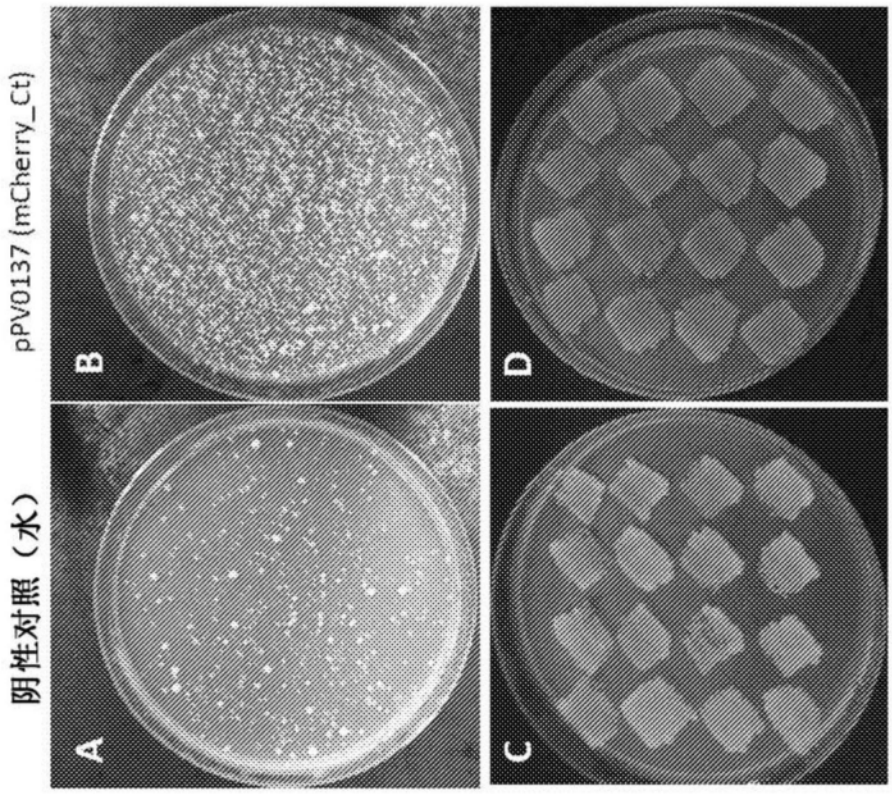


图21

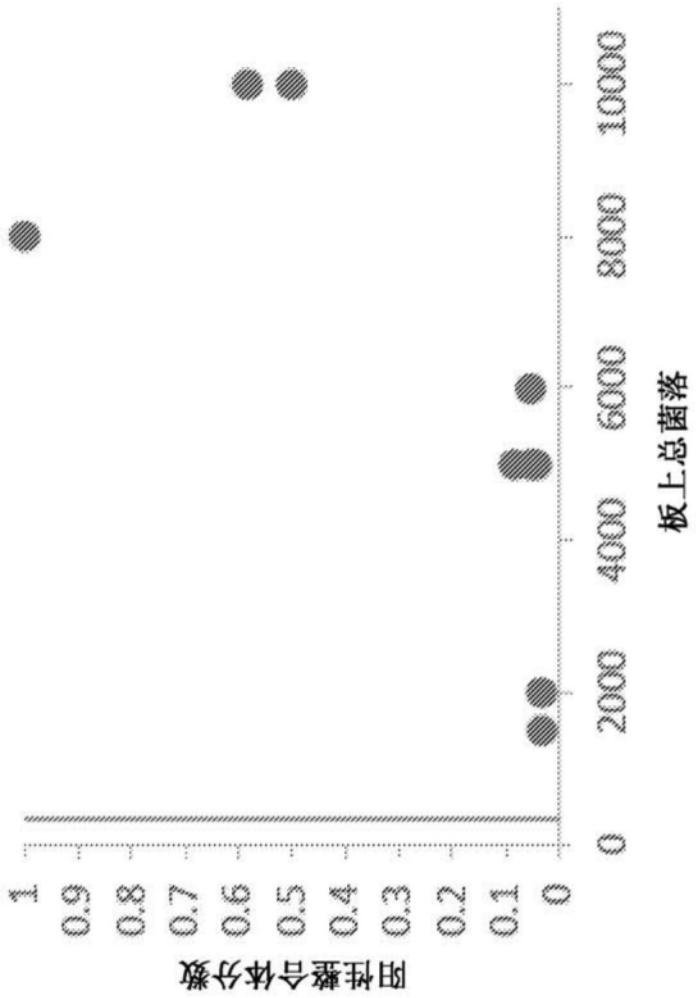

阳性整合体分数
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
板上总菌落
0
2000
4000
6000
8000
10000

图22

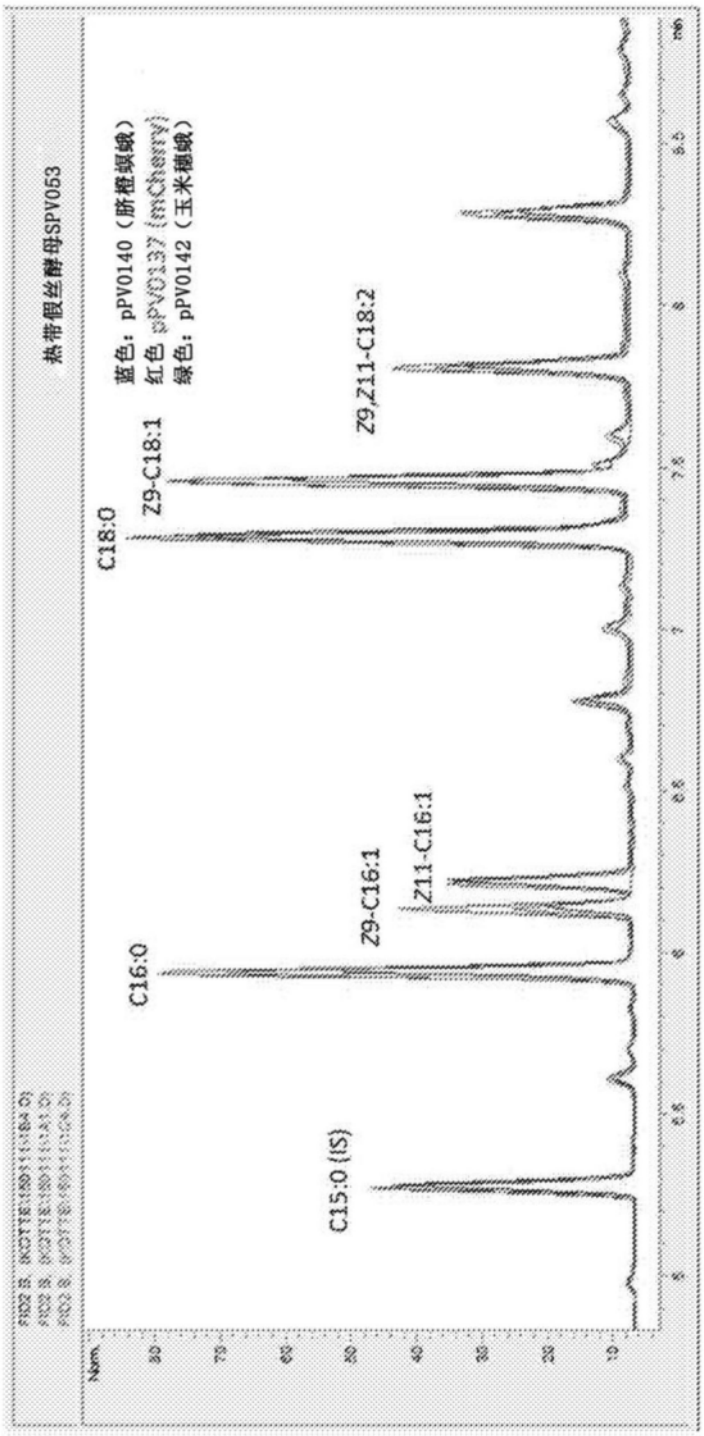

热带假丝酵母SPV053
蓝色：pPV0140（脐橙蚬蛾）
红色 pPV0137 (mCherry)
绿色：pPV0142（玉米穗蛾）
C15:0 (IS)
C16:0
Z9-C16:1
Z11-C16:1
C18:0
Z9-C18:1
Z9,Z11-C18:2
Norm.

图23

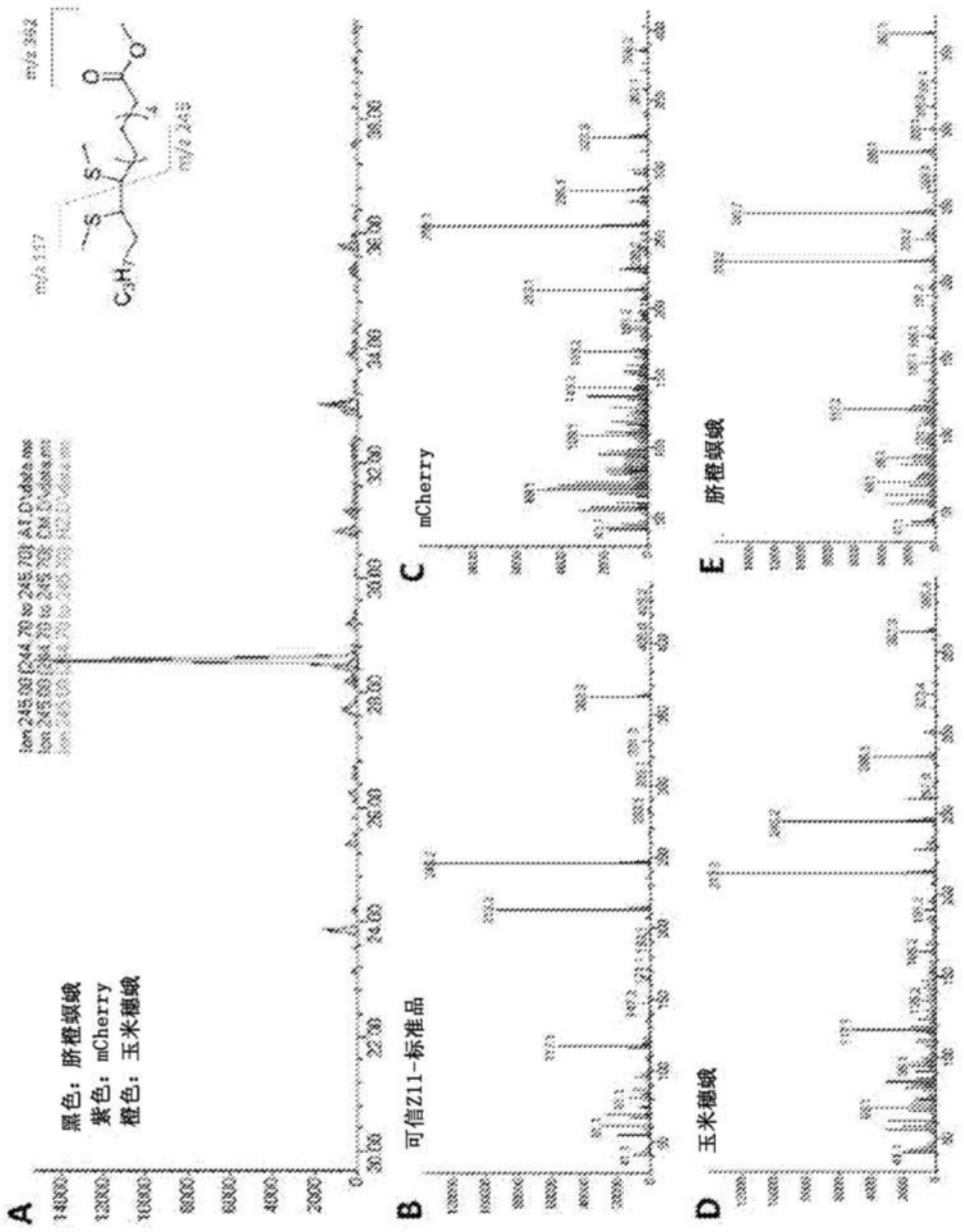


图24

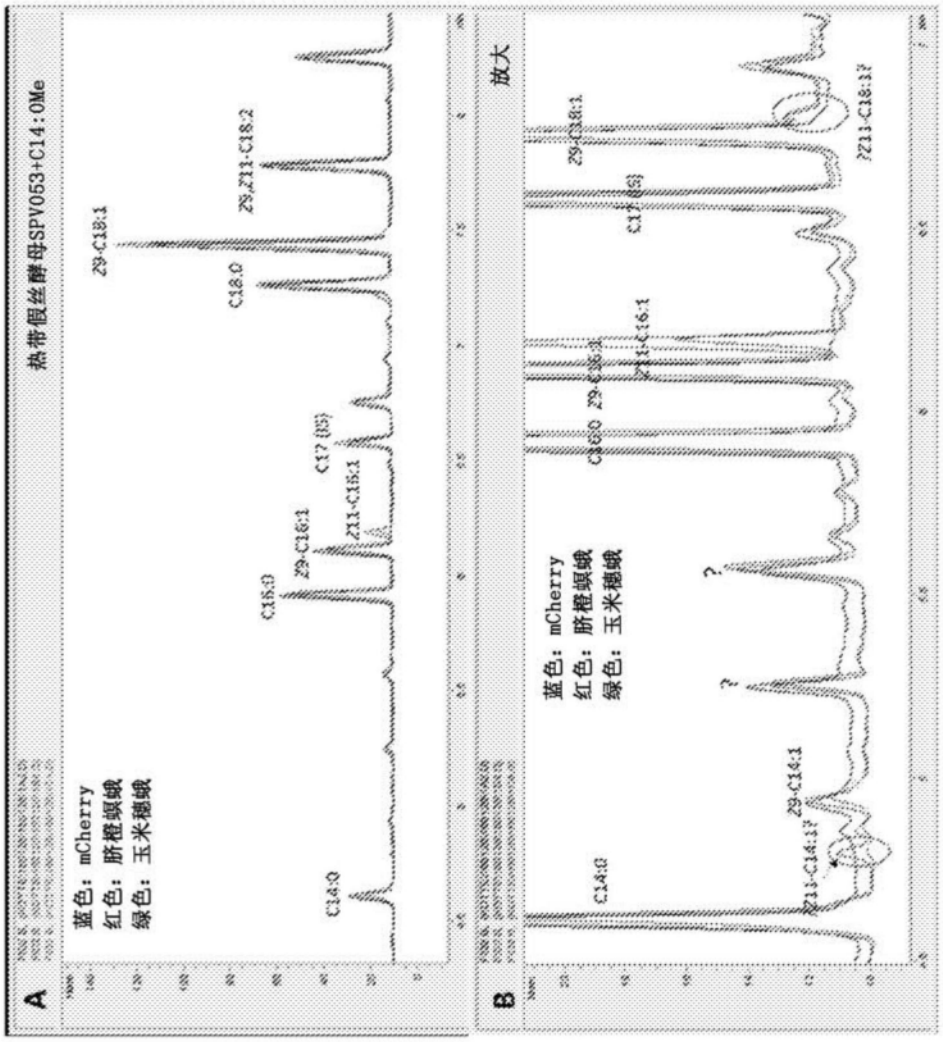

A
热带假丝酵母SPV053+C14:0Me
蓝色：mCherry
红色：脐橙螟蛾
绿色：玉米穗蛾
C14:0
C16:0
Z9-C16:1
Z11-C16:1
C17 (ISTD)
C18:0
Z9,Z11-C18:2
Z9-C18:1
B
放大
蓝色：mCherry
红色：脐橙螟蛾
绿色：玉米穗蛾
C14:0
Z11-C14:1?
Z9-C14:1
?
?
C16:0
Z9-C16:1
Z11-C16:1
C17 (ISTD)
Z9-C18:1
Z11-C18:1?

图25

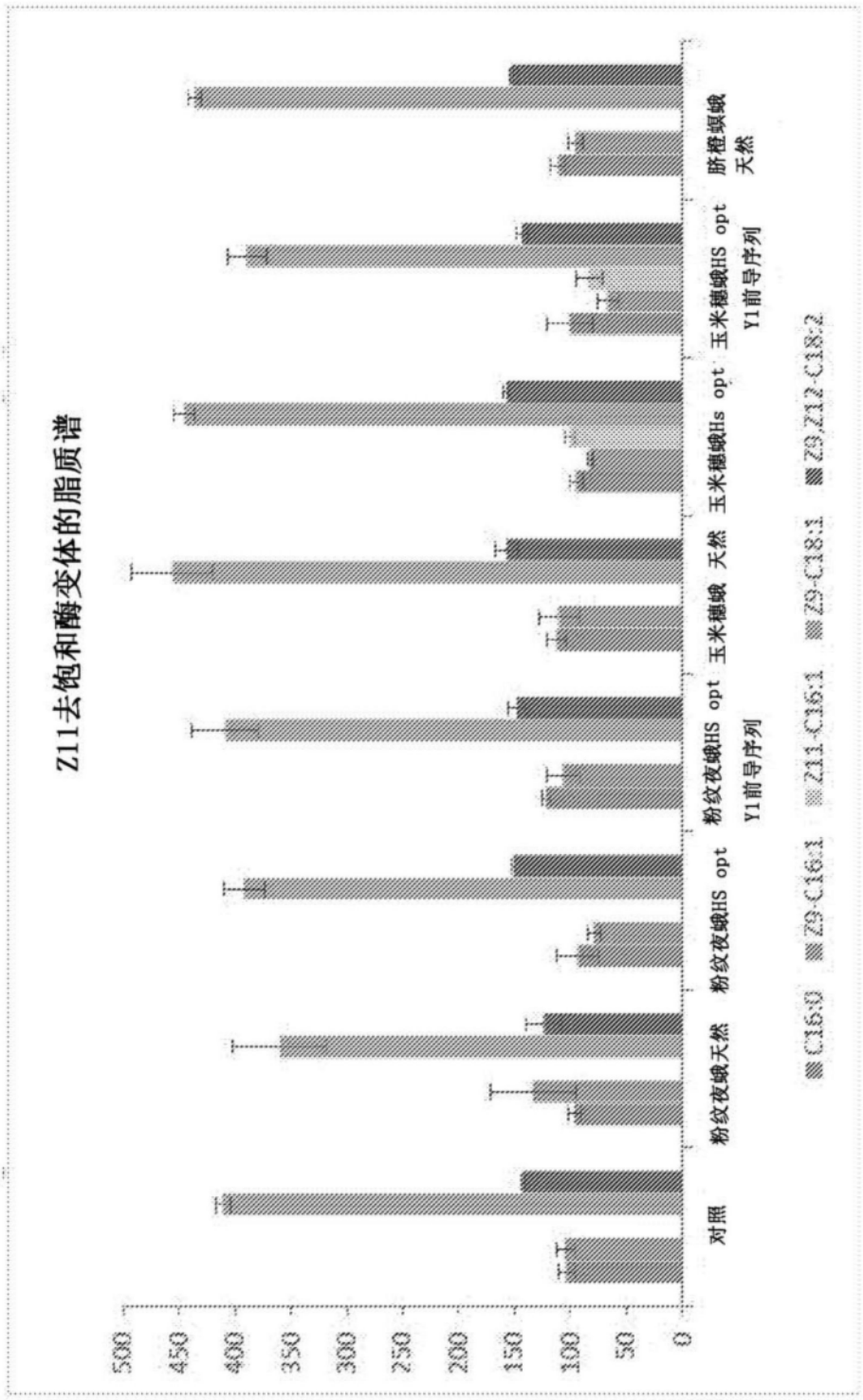

Z11去饱和酶变体的脂质谱
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
对照
粉纹夜蛾天然
粉纹夜蛾HS opt
粉纹夜蛾HS opt
玉米穗蛾
天然
玉米穗蛾Hs opt
玉米穗蛾HS opt
脐橙螟蛾
天然
Y1前导序列
Y1前导序列
C16:0
Z9-C16:1
Z11-C16:1
Z9-C18:1
Z9,Z12-C18:2

图26

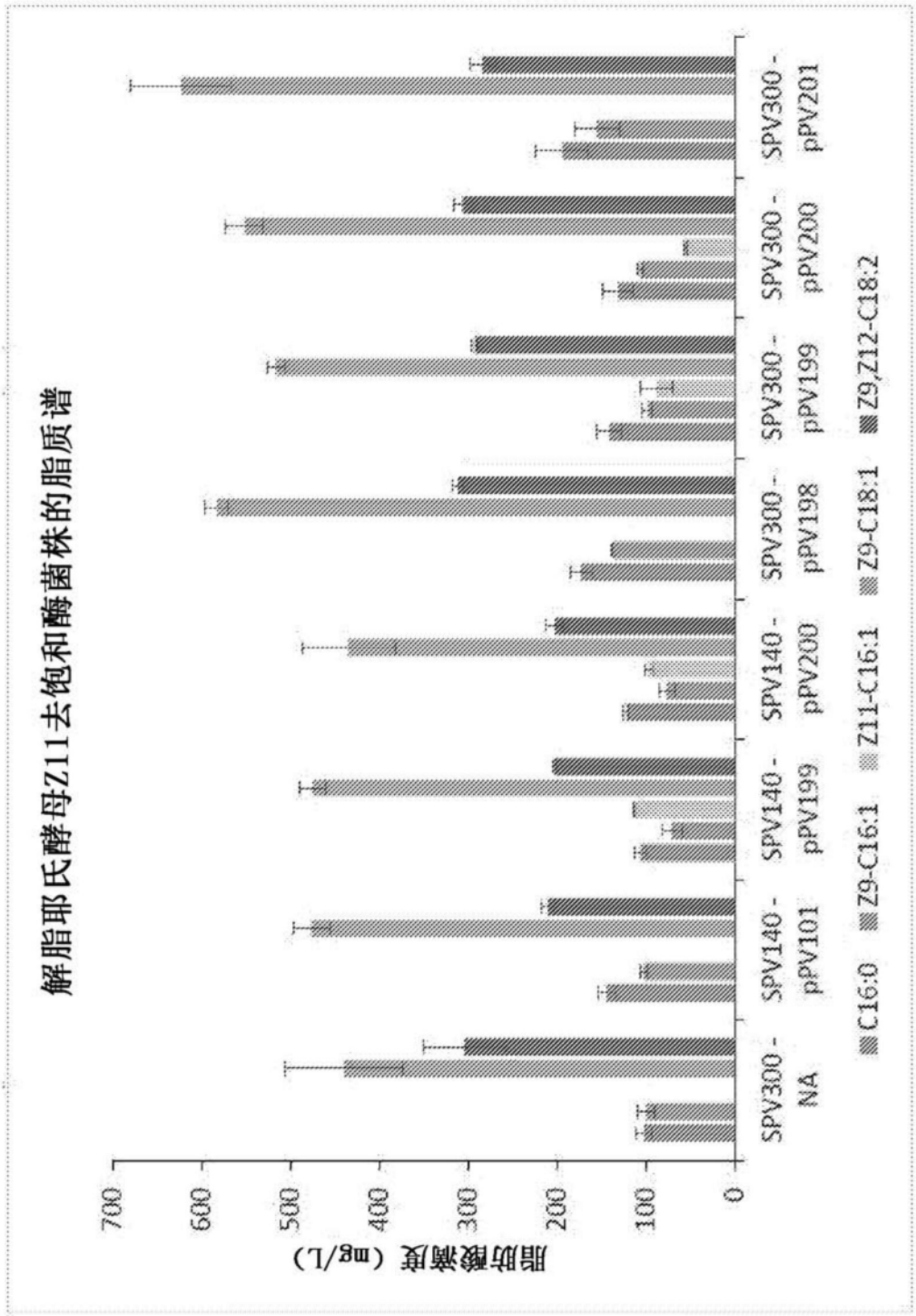

解脂耶氏酵母Z11去饱和酶菌株的脂质谱
脂肪酸滴度（mg/L）
0
100
200
300
400
500
600
700
SPV300-NA
SPV140-pPV101
SPV140-pPV199
SPV140-pPV200
SPV300-pPV198
SPV300-pPV199
SPV300-pPV200
SPV300-pPV201
C16:0
Z9-C16:1
Z11-C16:1
Z9-C18:1
Z9,Z12-C18:2

图27

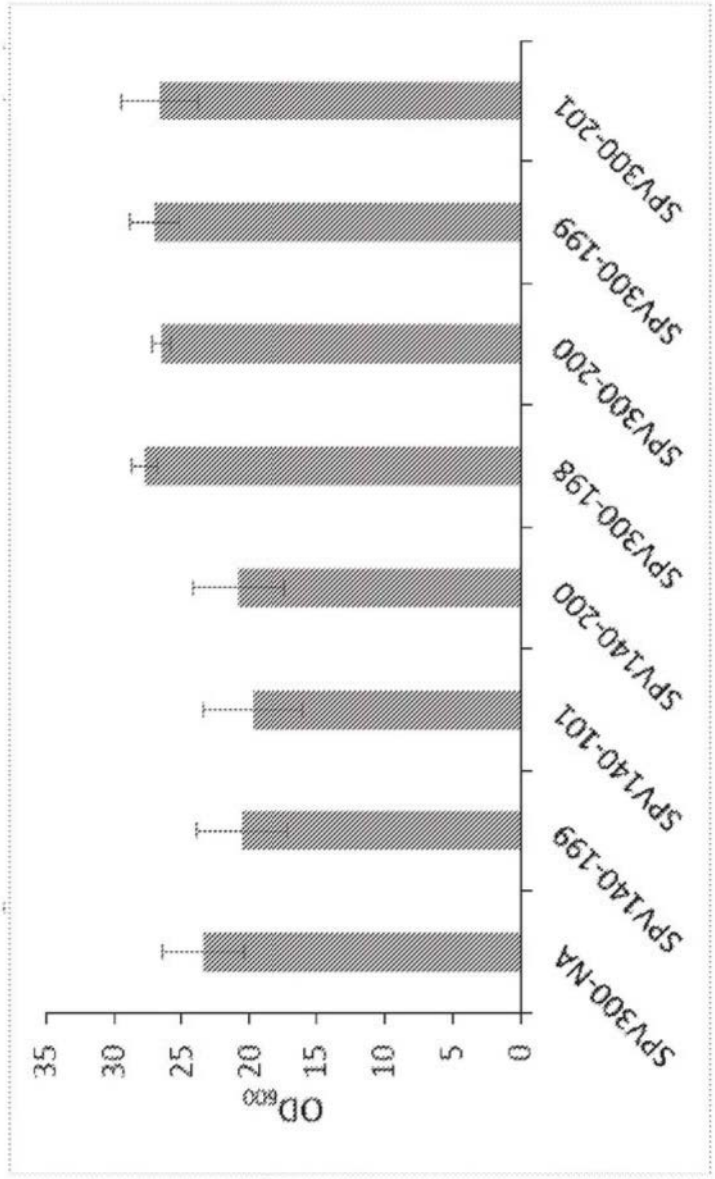

SPV300-NA
SPV140-199
SPV140-101
SPV140-200
SPV300-198
SPV300-200
SPV300-199
SPV300-201
0
5
10
15
20
25
30
35
OD600

图28

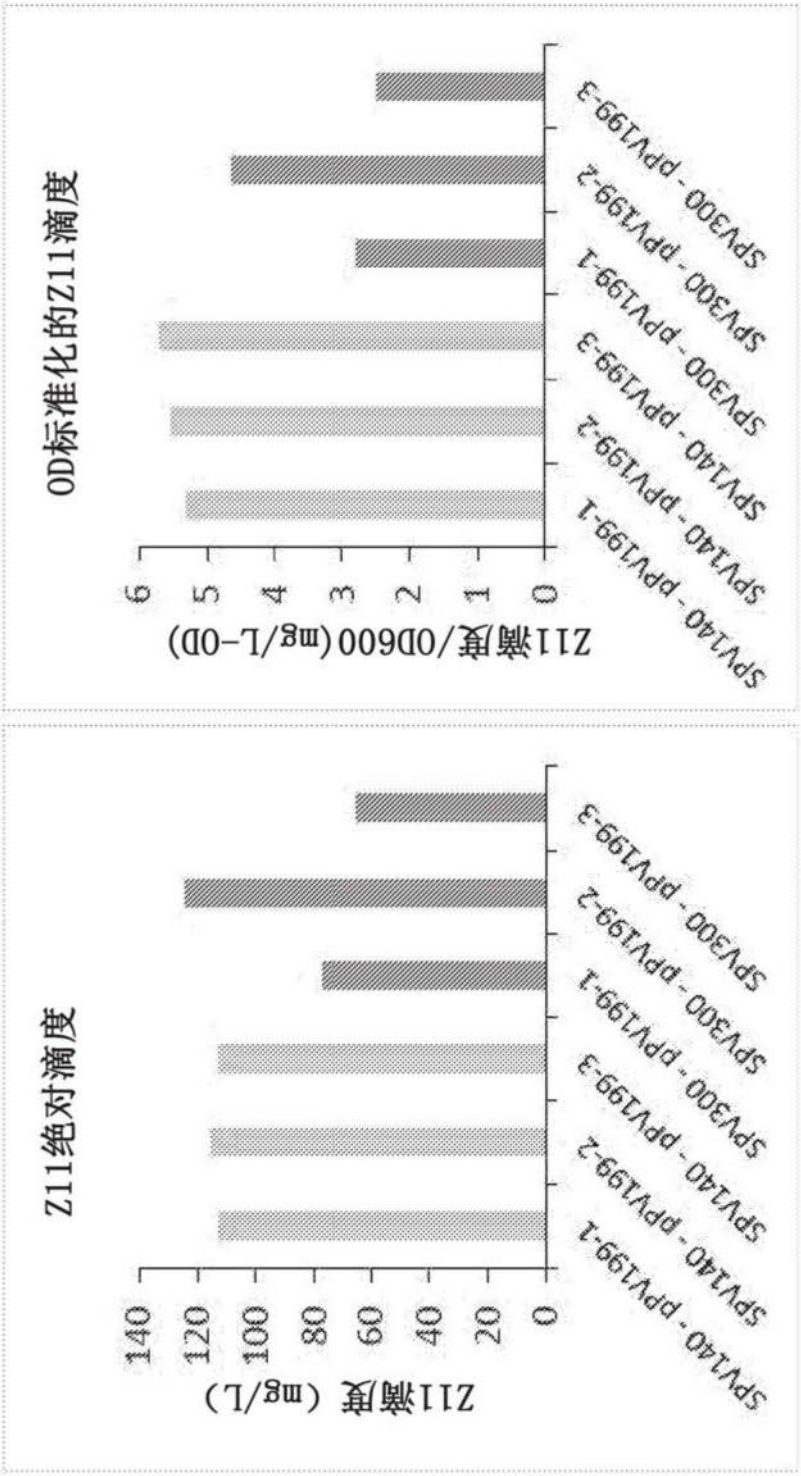

OD标准化的Z11滴度
Z11滴度/OD600 (mg/L-OD)
0
1
2
3
4
5
6
SPY140 - PPY199-1
SPY140 - PPY199-2
SPY140 - PPY199-3
SPY300 - PPY199-1
SPY300 - PPY199-2
SPY300 - PPY199-3
Z11绝对滴度
Z11滴度 (mg/L)
0
20
40
60
80
100
120
140
SPY140 - PPY199-1
SPY140 - PPY199-2
SPY140 - PPY199-3
SPY300 - PPY199-1
SPY300 - PPY199-2
SPY300 - PPY199-3

图29

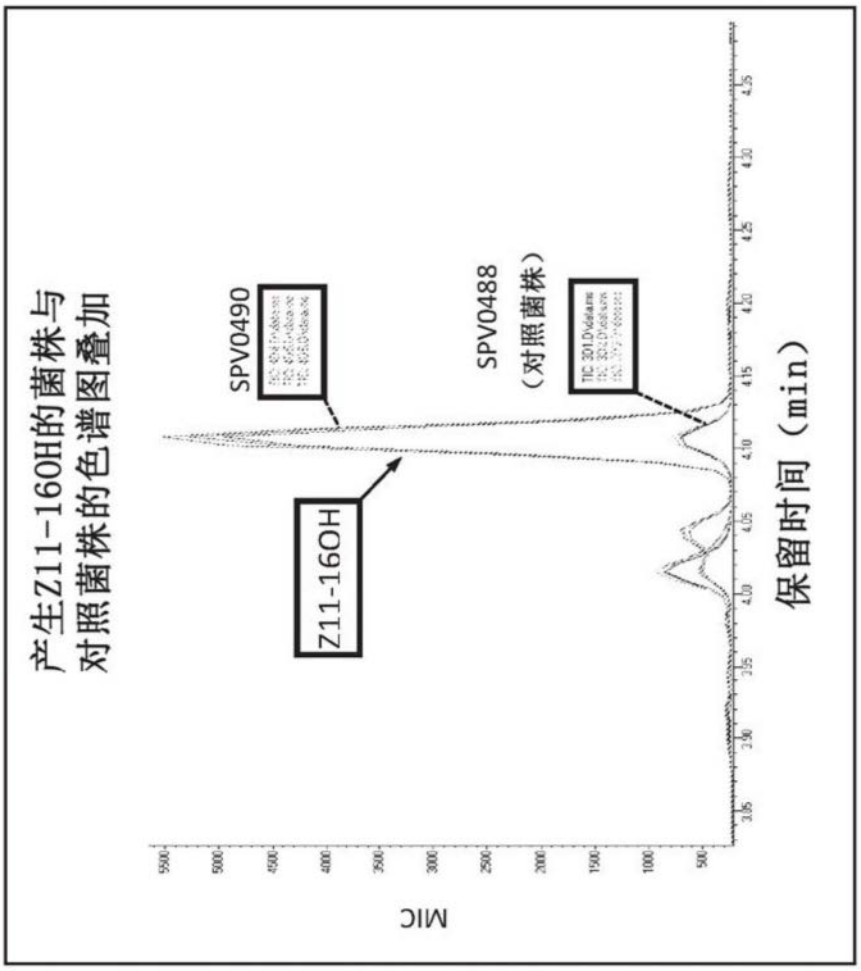

产生Z11-16OH的菌株与
对照菌株的色谱图叠加
SPV0490
SPV0488
（对照菌株）
Z11-16OH
TIC
保留时间（min）

图30

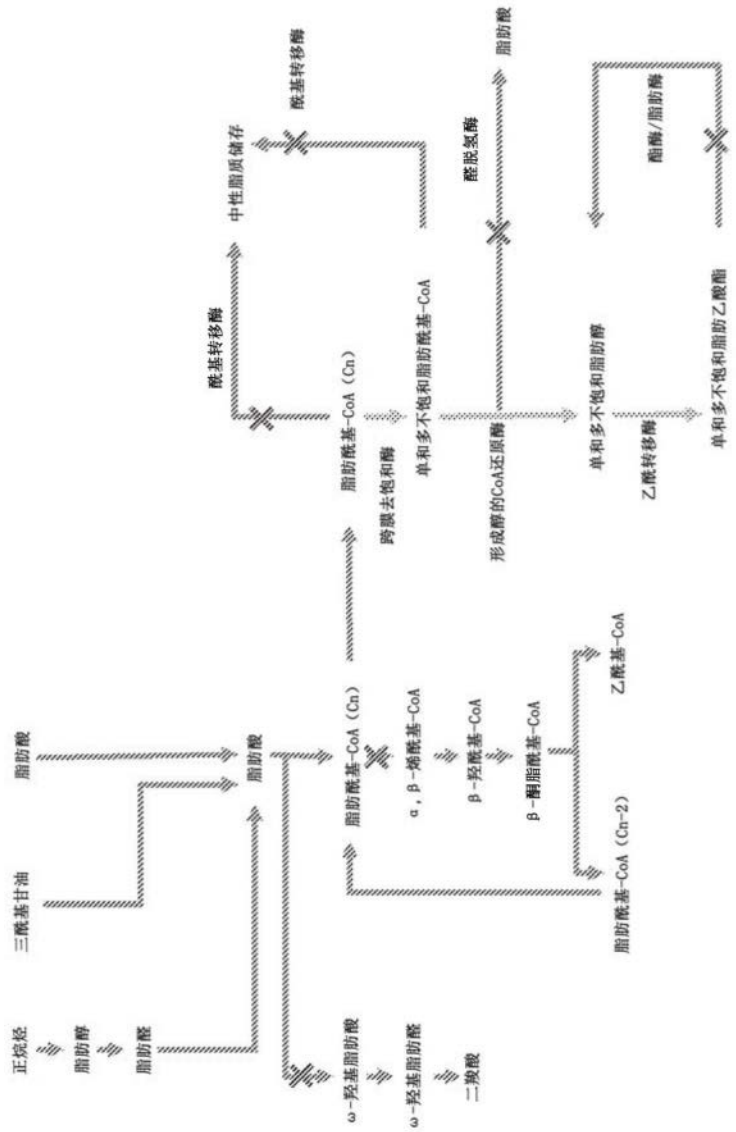

正烷烃
脂肪醇
脂肪醛
三酰基甘油
脂肪酸
脂肪酸
ω-羟基脂肪酸
ω-羟基脂肪醛
二羧酸
脂肪酰基-CoA（Cn）
α，β-烯酰基-CoA
β-羟酰基-CoA
β-酮脂酰基-CoA
乙酰基-CoA
脂肪酰基-CoA（Cn-2）
跨膜去饱和酶
单和多不饱和脂肪酰基-CoA
形成醇的CoA还原酶
单和多不饱和脂肪醇
乙酰转移酶
单和多不饱和脂肪乙酸酯
酯酶/脂肪酶
脂肪酸
醛脱氢酶
酰基转移酶
中性脂质储存
酰基转移酶

图31

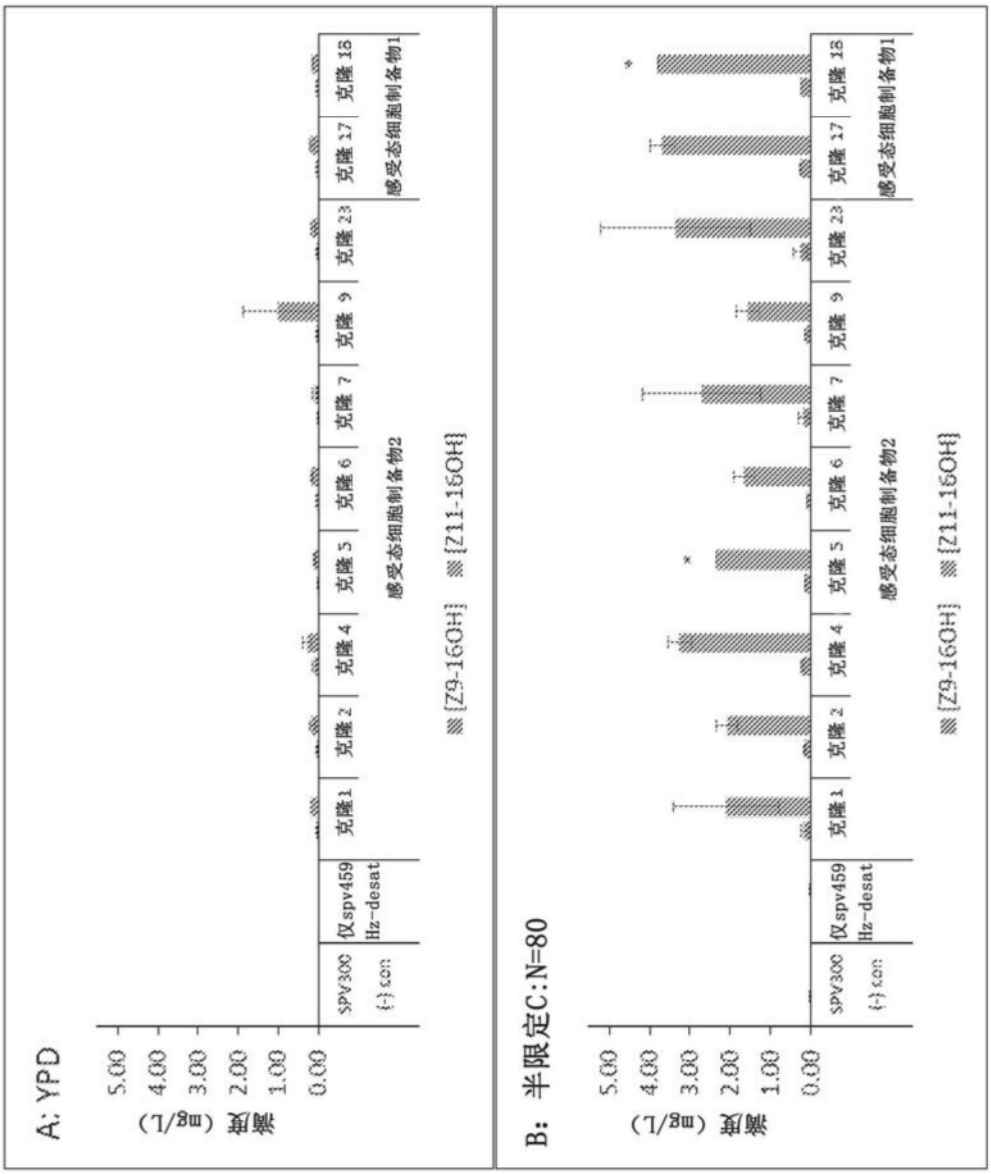

A: YPD
B：半限定C:N=80
滴度（mg/L）
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
SPV300
仅spv459 Hz-desat
克隆1
克隆2
克隆4
克隆5
克隆6
克隆7
克隆9
克隆23
克隆17
克隆18
感受态细胞制备物1
感受态细胞制备物2
{Z9-16OH}
{Z11-16OH}

图32

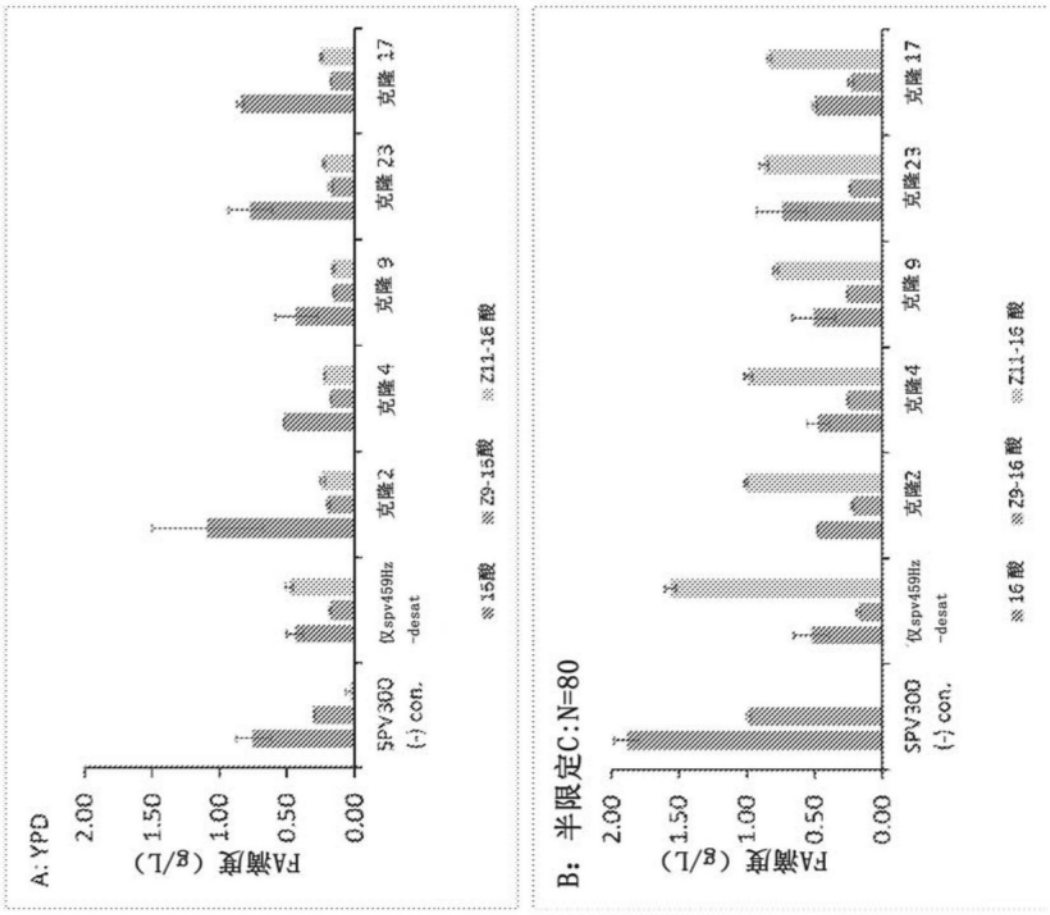

A: YPD
FA滴度 (g/L)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
SPV300
(-) con.
仅spv459Hz
-desat
克隆2
克隆4
克隆9
克隆23
克隆17
※15酸
※Z9-15酸
※Z11-16酸
B：半限定C:N=80
FA滴度 (g/L)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
SPV300
(-) con.
仅spv459Hz
-desat
克隆2
克隆4
克隆9
克隆23
克隆17
※16酸
※Z9-16酸
※Z11-16酸

图33

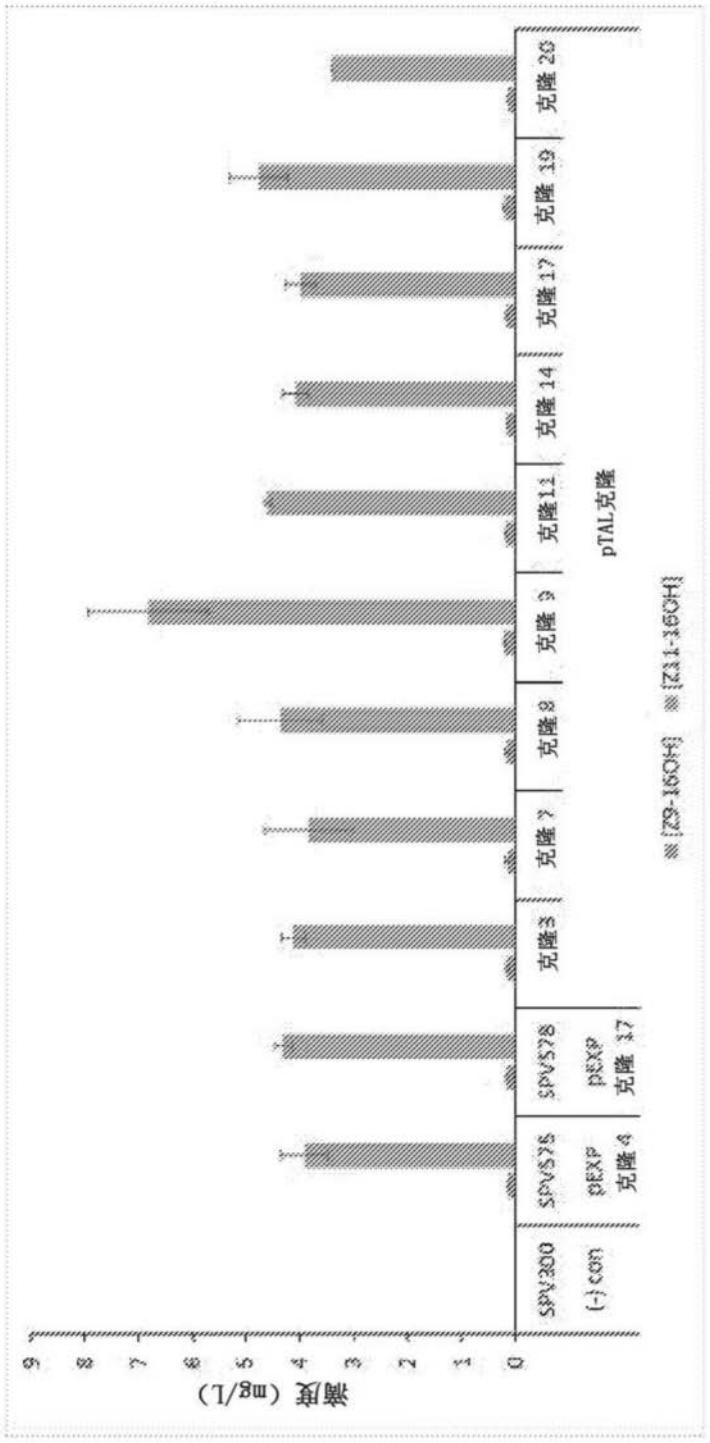

滴度（mg/L）
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
SPV3000
(-)-con
SPVS78
pEXP
克隆4
SPVS78
pEXP
克隆17
克隆3
克隆7
克隆8
克隆9
克隆11
克隆14
克隆17
克隆19
克隆20
pTAL克隆
≈{29-160H}
≈{231-360H}

图34

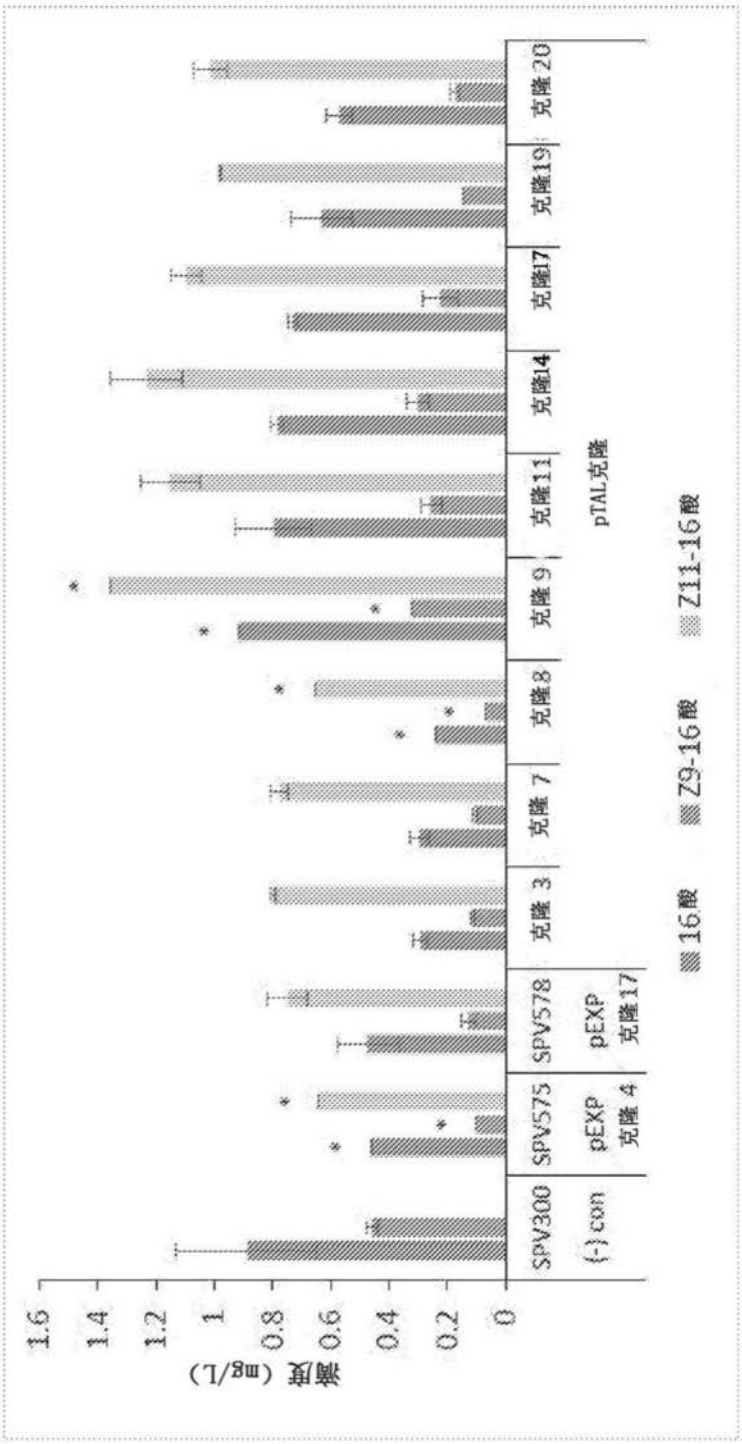

滴度（mg/L）
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
SPV300
(-)con
SPV575
pEXP
克隆 4
SPV578
pEXP
克隆17
克隆 3
克隆 7
克隆 8
克隆 9
克隆11
克隆14
克隆17
克隆19
克隆 20
pTAL克隆
16酸
Z9-16酸
Z11-16酸

图35

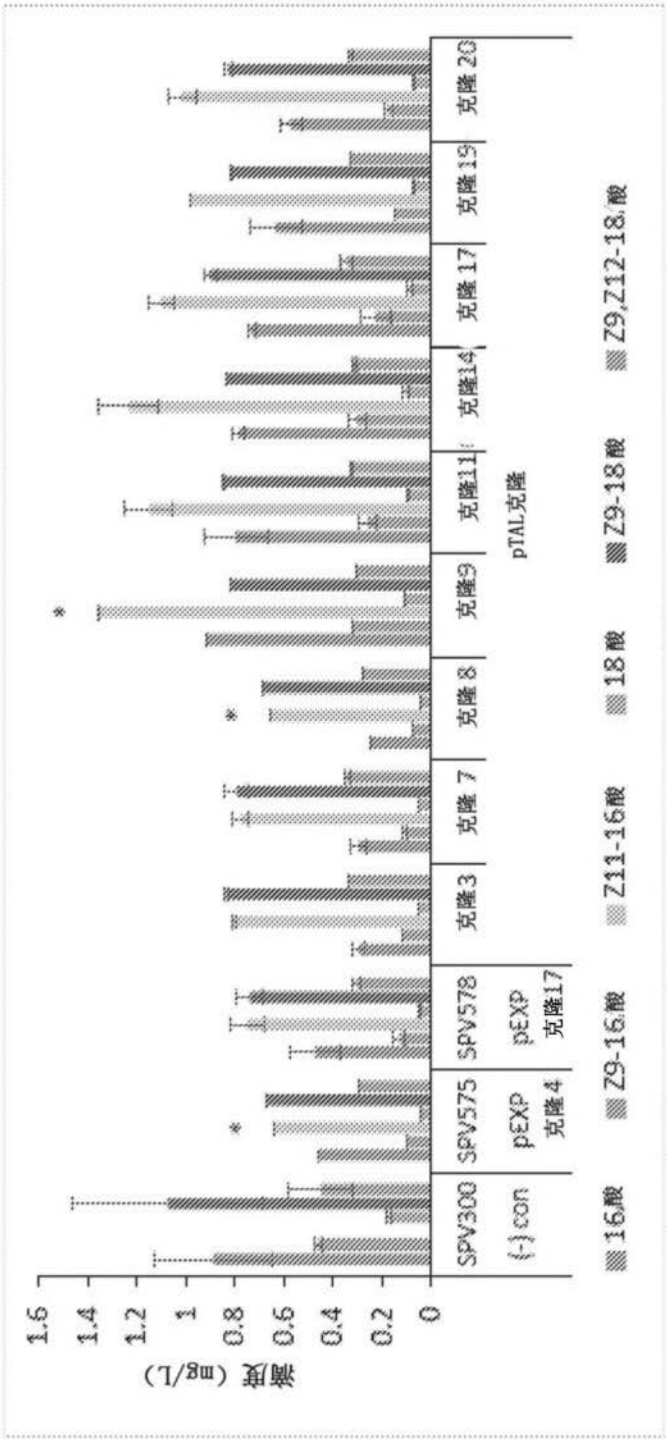

浓度（mg/L）
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
SPV300
(-)con
SPV575
pEXP
克隆4
SPV578
pEXP
克隆17
克隆3
克隆 7
克隆 8
克隆9
克隆11
克隆14
克隆 17
克隆19
克隆 20
pTAL克隆
16酸
Z9-16酸
Z11-16酸
18酸
Z9-18酸
Z9,Z12-18酸

图36

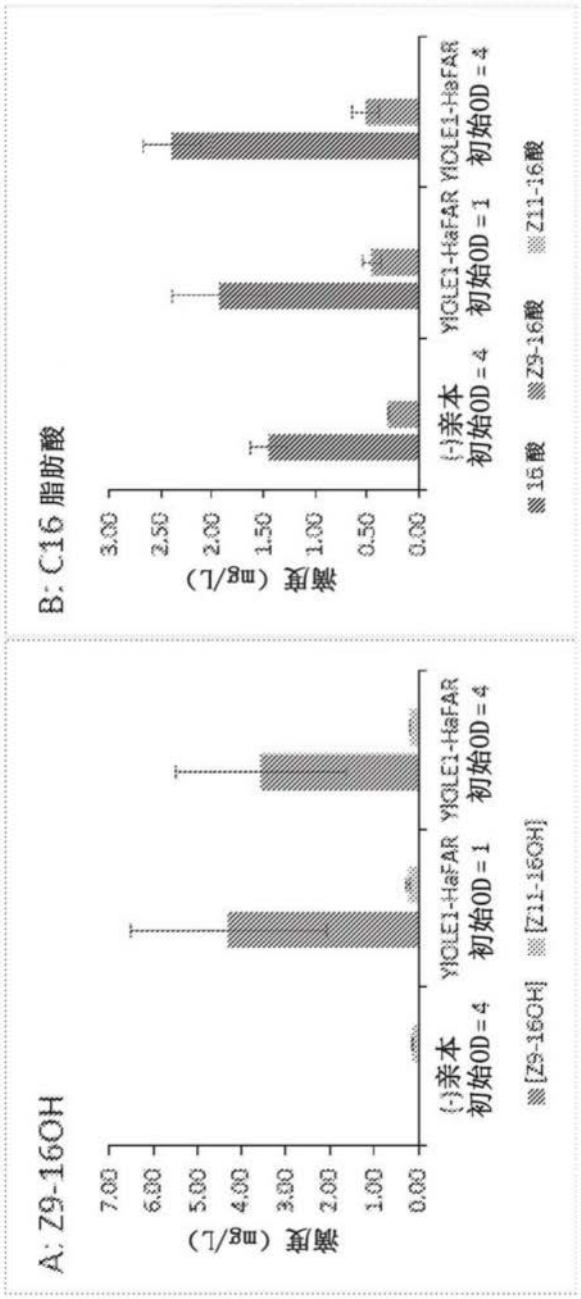

A: Z9-16OH
浓度 (mg/L)
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
(-)亲本
初始OD=4
YICLE1-HaFAR
初始OD=1
YICLE1-HaFAR
初始OD=4
[Z9-16OH]
[Z11-16OH]
B: C16 脂肪酸
浓度 (mg/L)
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
(-)亲本
初始OD=4
YICLE1-HaFAR
初始OD=1
YICLE1-HaFAR
初始OD=4
16酸
Z9-16酸
Z11-16酸

图37

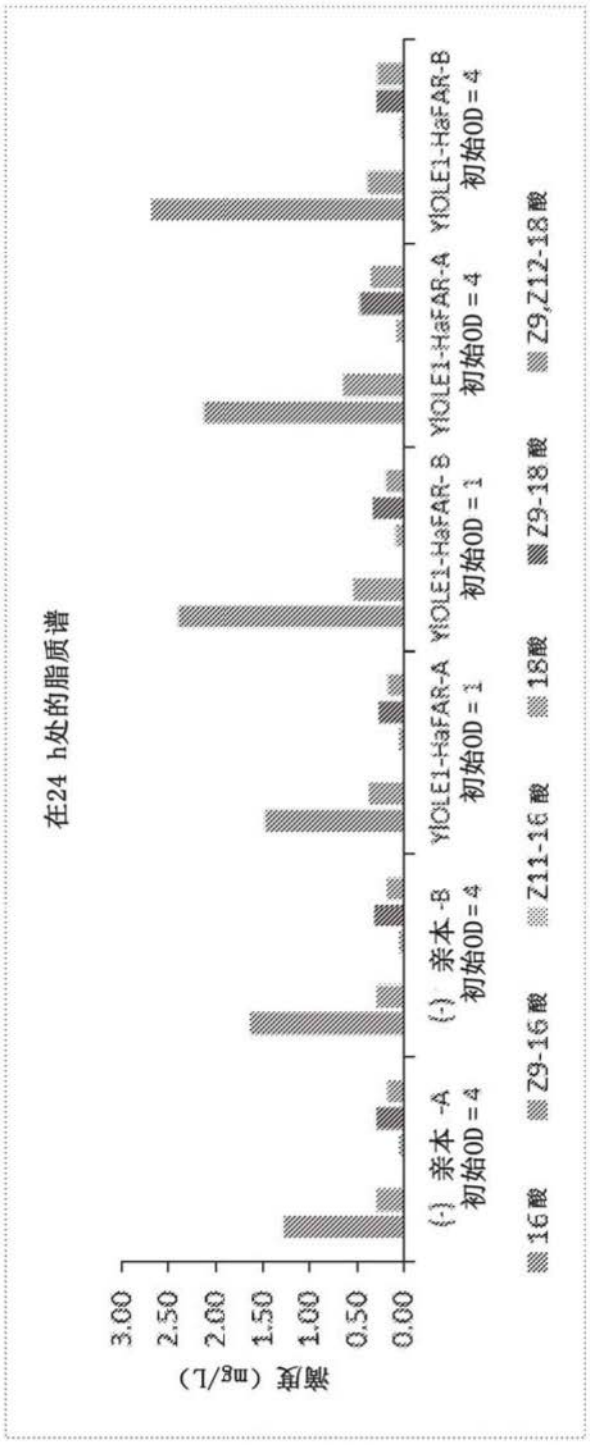

在24 h处的脂质谱
浓度（mg/L）
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
{-} 亲本 -A 初始OD = 4
{-} 亲本 -B 初始OD = 4
YlOLE1-HaFAR-A 初始OD = 1
YlOLE1-HaFAR-B 初始OD = 1
YlOLE1-HaFAR-A 初始OD = 4
YlOLE1-HaFAR-B 初始OD = 4
16酸
Z9-16酸
Z11-16酸
18酸
Z9-18酸
Z9,Z12-18酸

图38

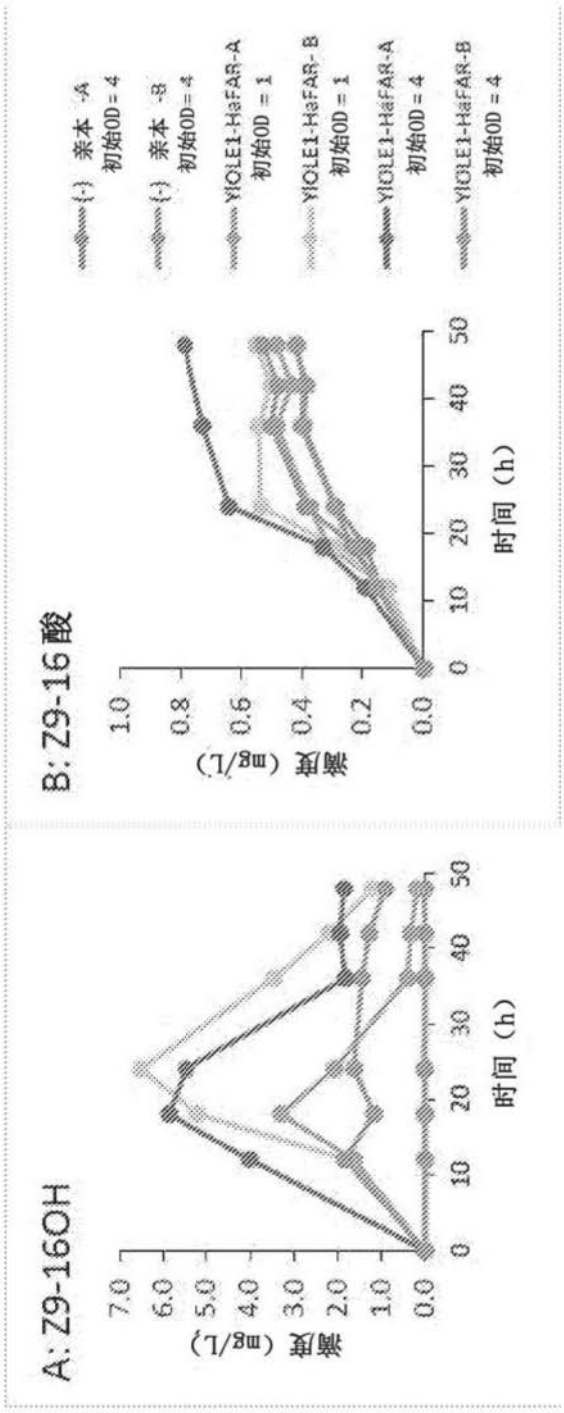

A: Z9-16OH
B: Z9-16酸
浓度 (mg/L)
时间 (h)
(-) 亲本 -A 初始OD=4
(-) 亲本 -B 初始OD=4
YlOLE1-HaFAR-A 初始OD = 1
YlOLE1-HaFAR-B 初始OD = 1
YlOLE1-HaFAR-A 初始OD = 4
YlOLE1-HaFAR-B 初始OD = 4

图39

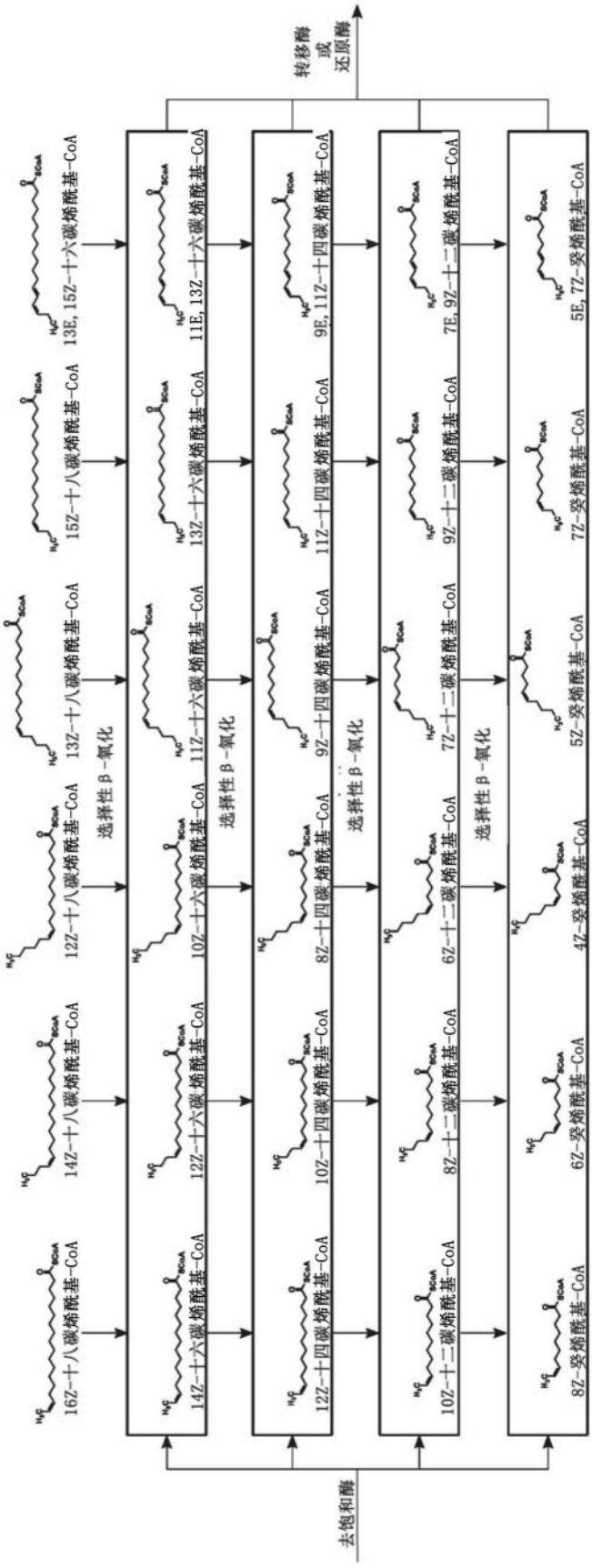

转移酶
或
还原酶
16Z-十八碳烯酰基-CoA
14Z-十六碳烯酰基-CoA
12Z-十四碳烯酰基-CoA
10Z-十二碳烯酰基-CoA
8Z-癸烯酰基-CoA
14Z-十八碳烯酰基-CoA
12Z-十六碳烯酰基-CoA
10Z-十四碳烯酰基-CoA
8Z-十二碳烯酰基-CoA
6Z-癸烯酰基-CoA
12Z-十八碳烯酰基-CoA
10Z-十六碳烯酰基-CoA
8Z-十四碳烯酰基-CoA
6Z-十二碳烯酰基-CoA
4Z-癸烯酰基-CoA
10Z-十八碳烯酰基-CoA
8Z-十六碳烯酰基-CoA
6Z-十四碳烯酰基-CoA
4Z-十二碳烯酰基-CoA
2Z-癸烯酰基-CoA
8Z-十八碳烯酰基-CoA
6Z-十六碳烯酰基-CoA
4Z-十四碳烯酰基-CoA
2Z-十二碳烯酰基-CoA
选择性β-氧化
选择性β-氧化
选择性β-氧化
选择性β-氧化
15Z-十八碳烯酰基-CoA
13Z-十六碳烯酰基-CoA
11Z-十四碳烯酰基-CoA
9Z-十二碳烯酰基-CoA
7Z-癸烯酰基-CoA
13Z-十八碳烯酰基-CoA
11Z-十六碳烯酰基-CoA
9Z-十四碳烯酰基-CoA
7Z-十二碳烯酰基-CoA
5Z-癸烯酰基-CoA
11Z-十八碳烯酰基-CoA
9Z-十六碳烯酰基-CoA
7Z-十四碳烯酰基-CoA
5Z-十二碳烯酰基-CoA
3Z-癸烯酰基-CoA
9Z-十八碳烯酰基-CoA
7Z-十六碳烯酰基-CoA
5Z-十四碳烯酰基-CoA
3Z-十二碳烯酰基-CoA
1Z-癸烯酰基-CoA
13E,15Z-十六碳烯酰基-CoA
11E,13Z-十六碳烯酰基-CoA
9E,11Z-十四碳烯酰基-CoA
7E,9Z-十二碳烯酰基-CoA
5E,7Z-癸烯酰基-CoA
去饱和酶

图40

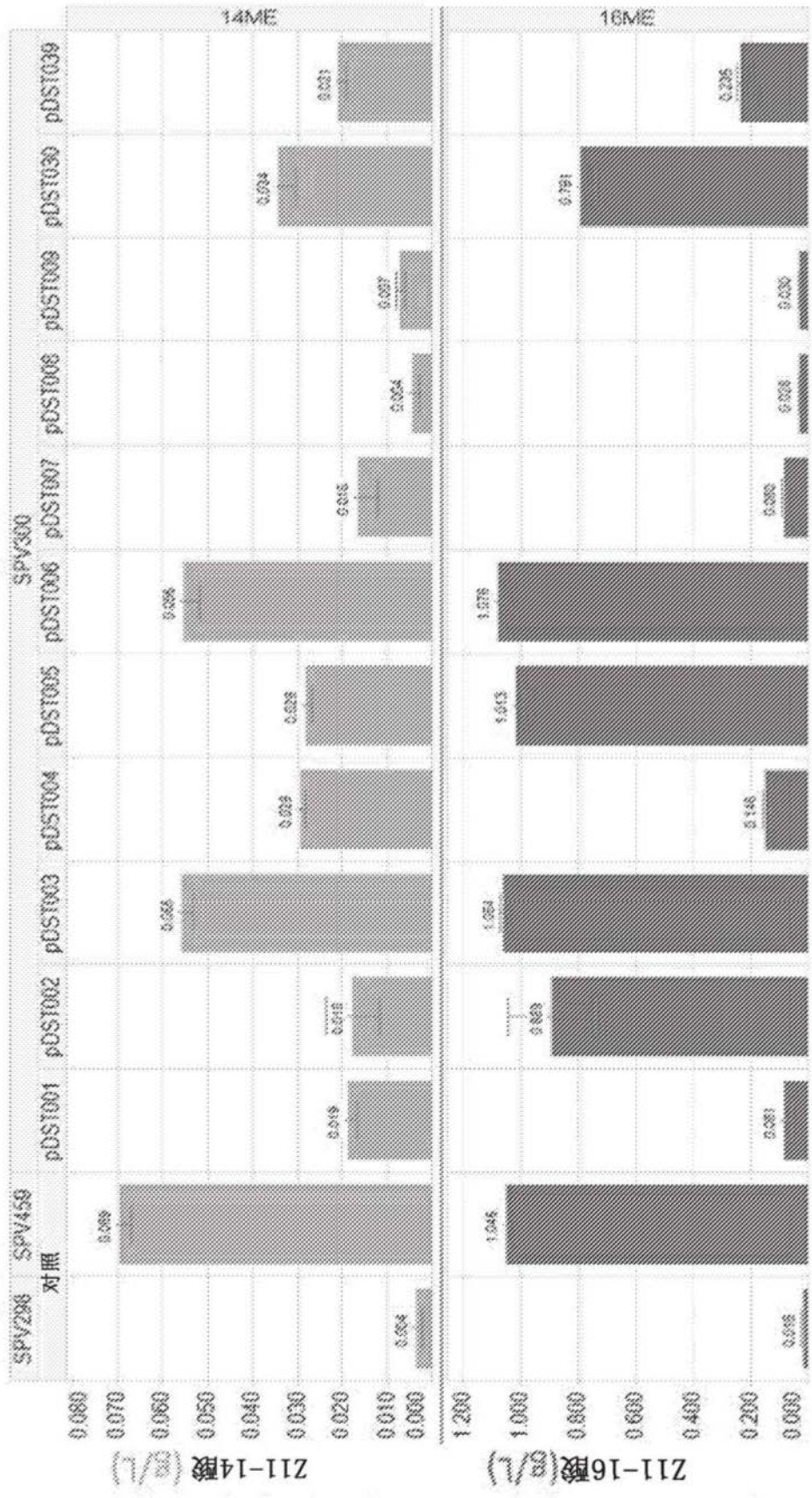

14ME
16ME
SPV300
SPV286
对照
SPV458
pDST001
pDST002
pDST003
pDST004
pDST005
pDST006
pDST007
pDST008
pDST009
pDST030
pDST039
0.080
0.070
0.060
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
Z11-14酸 (g/L)
Z11-16酸(g/L)

图41

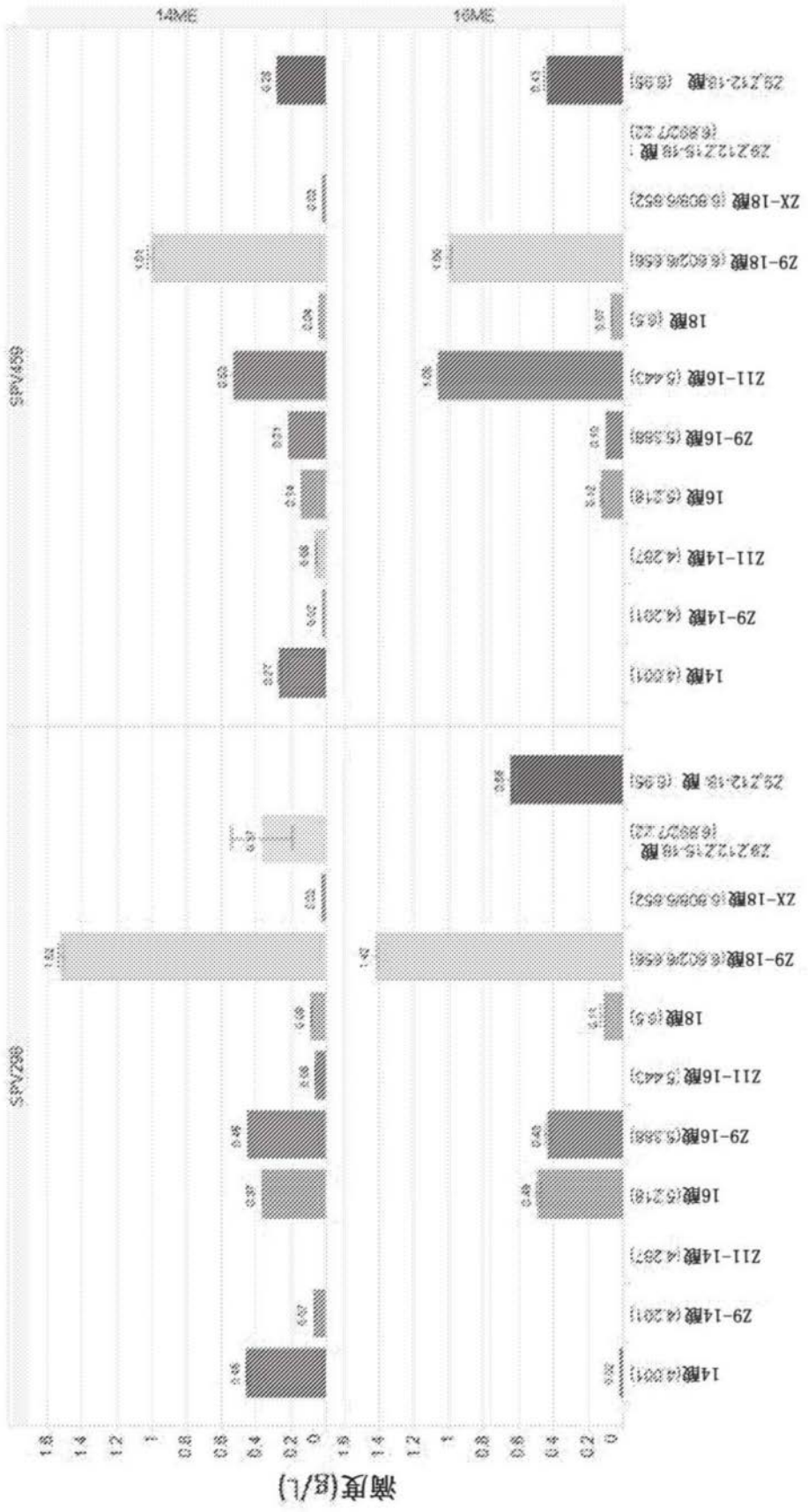

14ME
16ME
SPV468
SPV268
14酸
Z9-14酸
Z11-14酸
16酸
Z9-16酸
Z11-16酸
18酸
Z9-18酸
ZX-18酸
Z9Z12Z15-18酸
Z9Z12-18酸
滴度(g/L)

图42

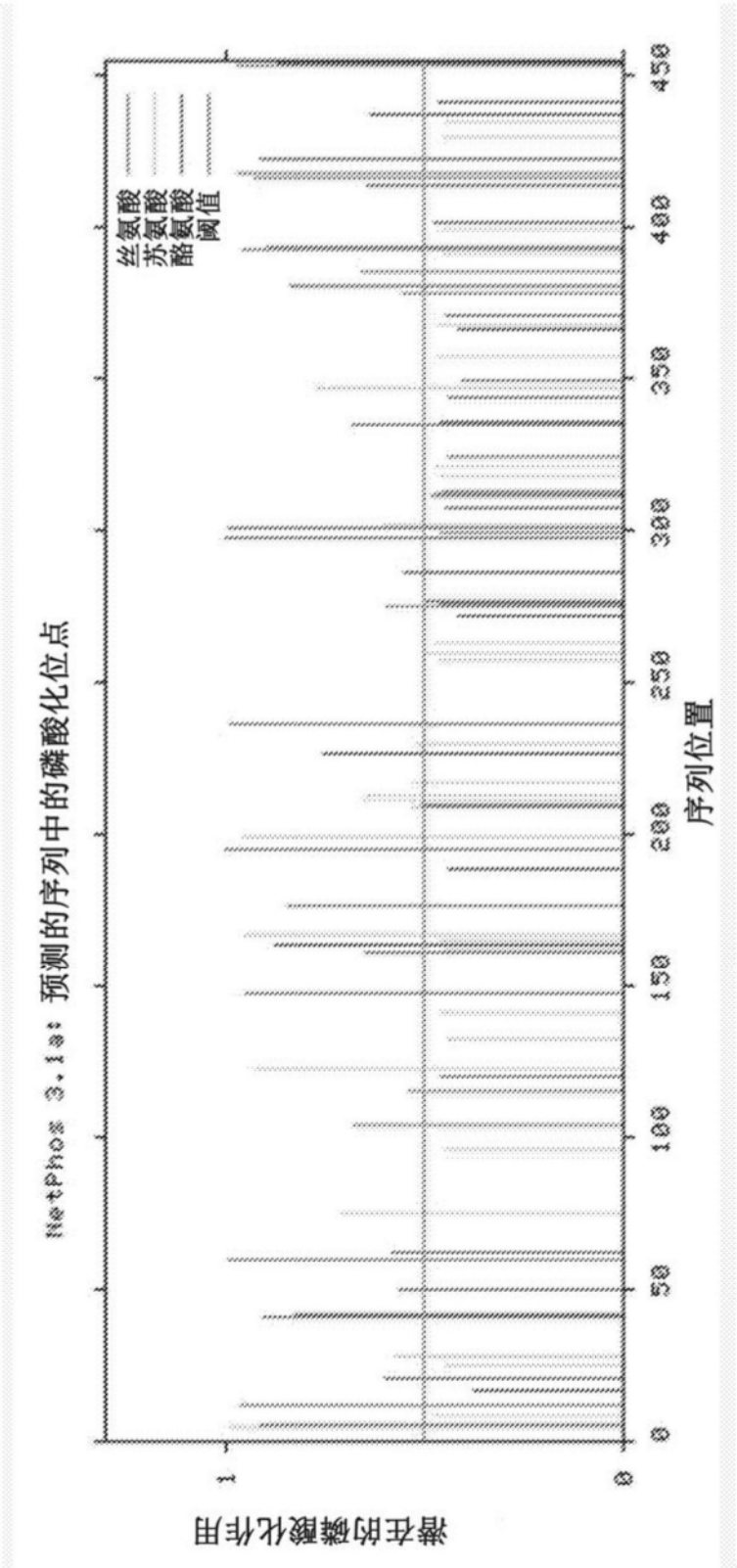

NetPhos 3.1a: 预测的序列中的磷酸化位点
丝氨酸
苏氨酸
酪氨酸
阈值
潜在的磷酸化作用
序列位置
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
1
0

图43

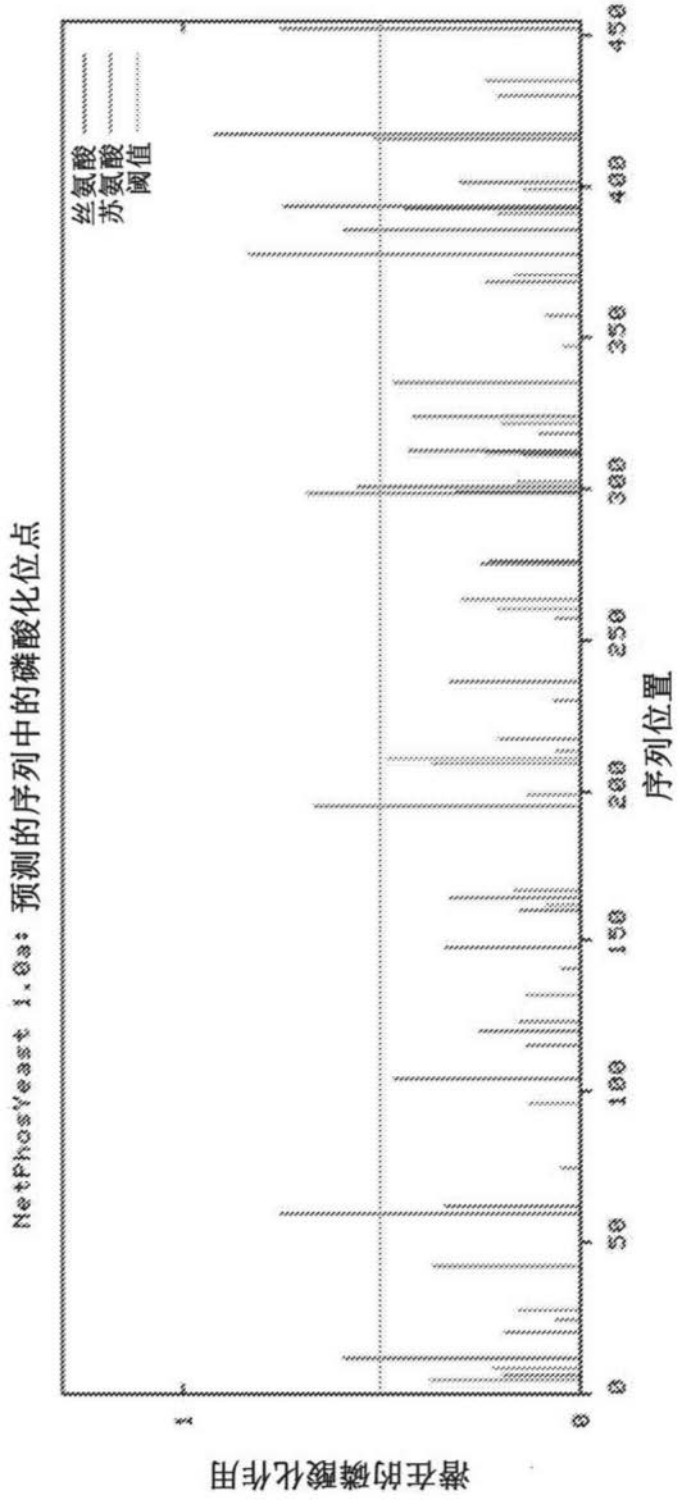

NetPhosYeast 1.0a: 预测的序列中的磷酸化位点
丝氨酸
苏氨酸
阈值
潜在的磷酸化作用
序列位置
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450

图44

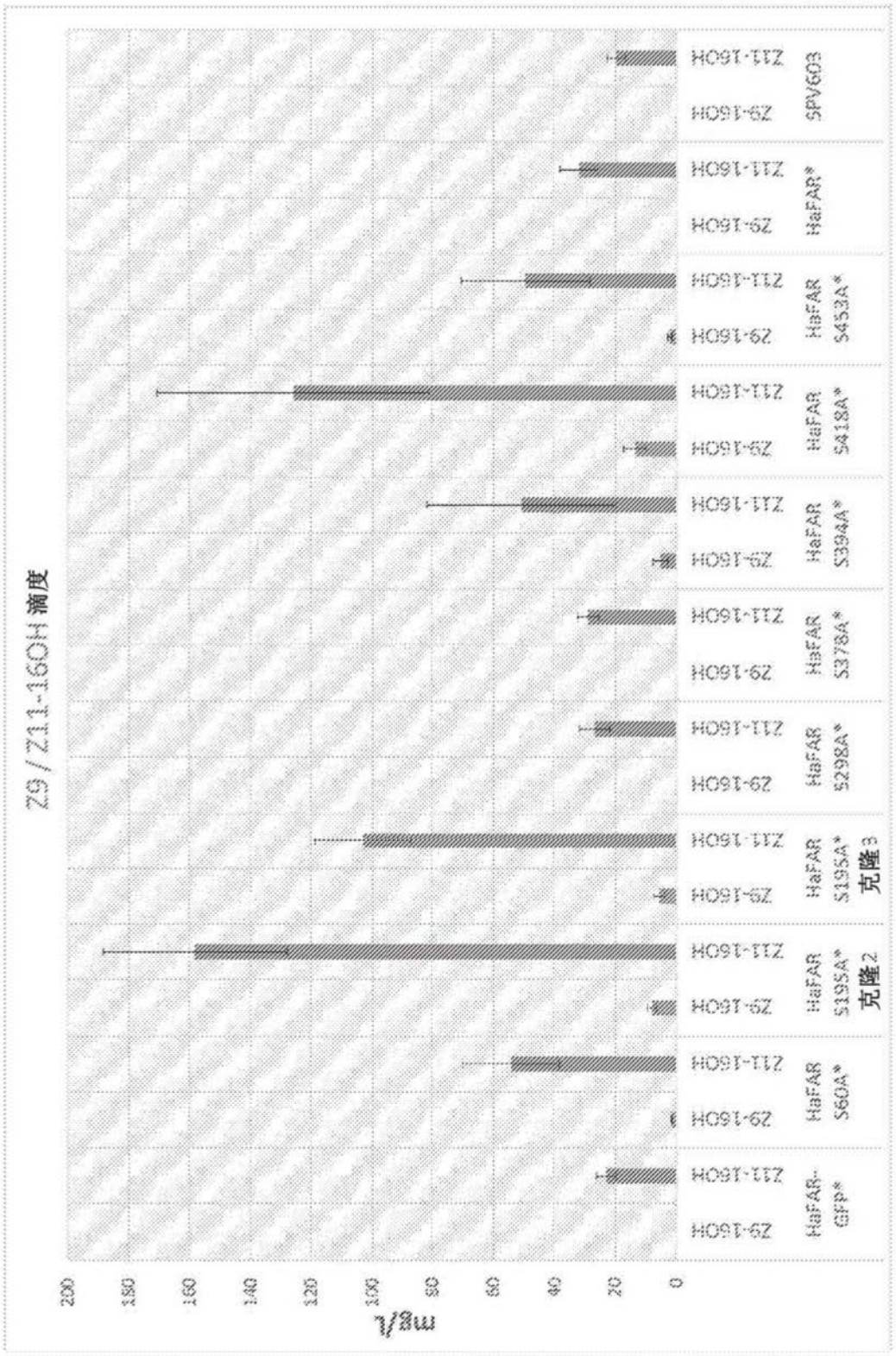

Z9 / Z11-16OH 滴度
mAU
200
150
100
50
0
Z11-16OH
Z9-16OH
SPV603
HaFAR*
HaFAR S453A*
HaFAR S418A*
HaFAR S394A*
HaFAR S378A*
HaFAR S298A*
HaFAR S195A* 克隆3
HaFAR S195A* 克隆2
HaFAR S60A*
HaFAR-GFP*

图45

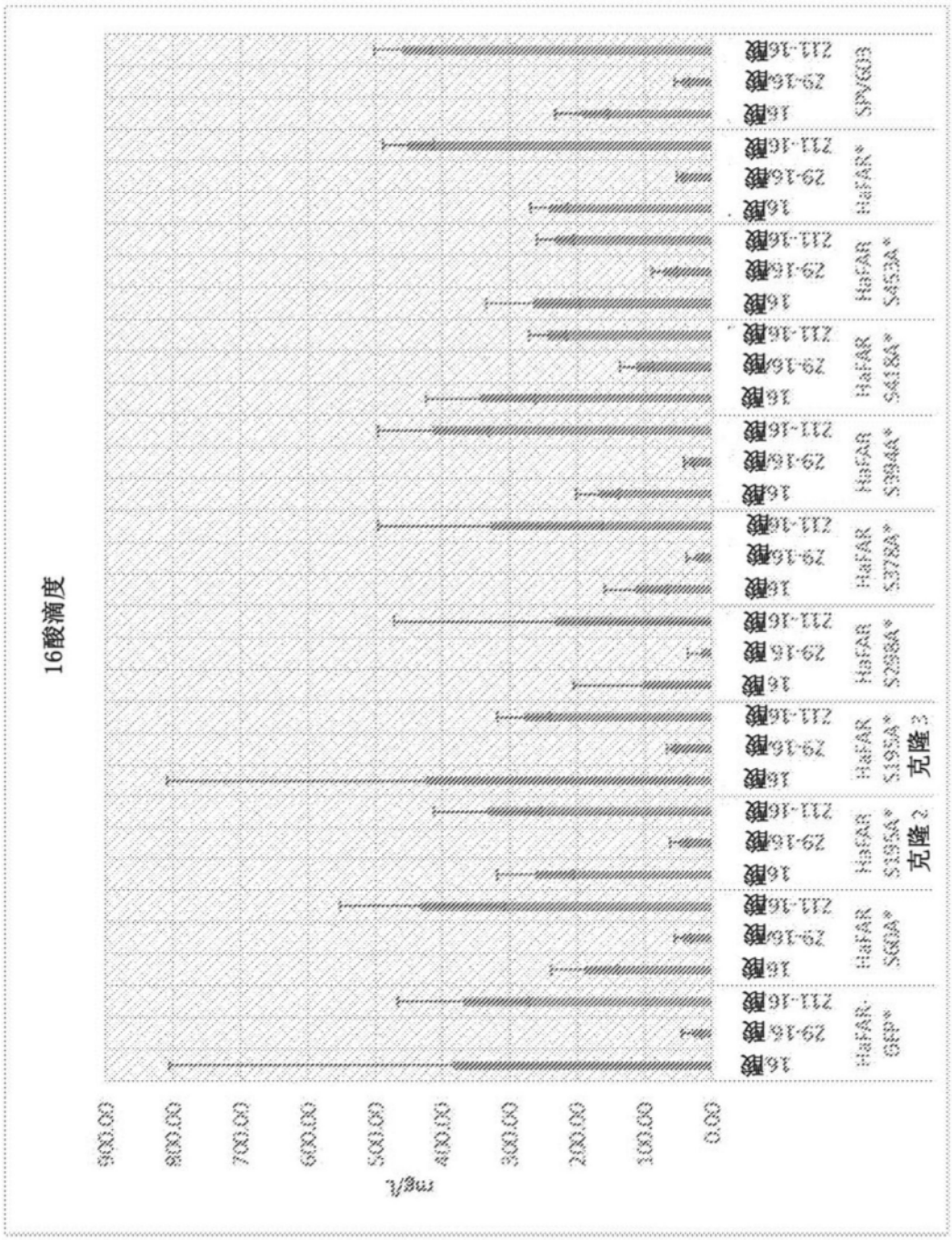

16酸滴度
克隆 2
克隆 2
16酸
29-16酸
211-16酸
SPY603
HaFAR*
HaFAR S453A*
HaFAR S418A*
HaFAR S394A*
HaFAR S378A*
HaFAR S298A*
HaFAR S195A*
HaFAR S95A*
HaFAR GFP*
900.00
800.00
700.00
600.00
500.00
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00

图46

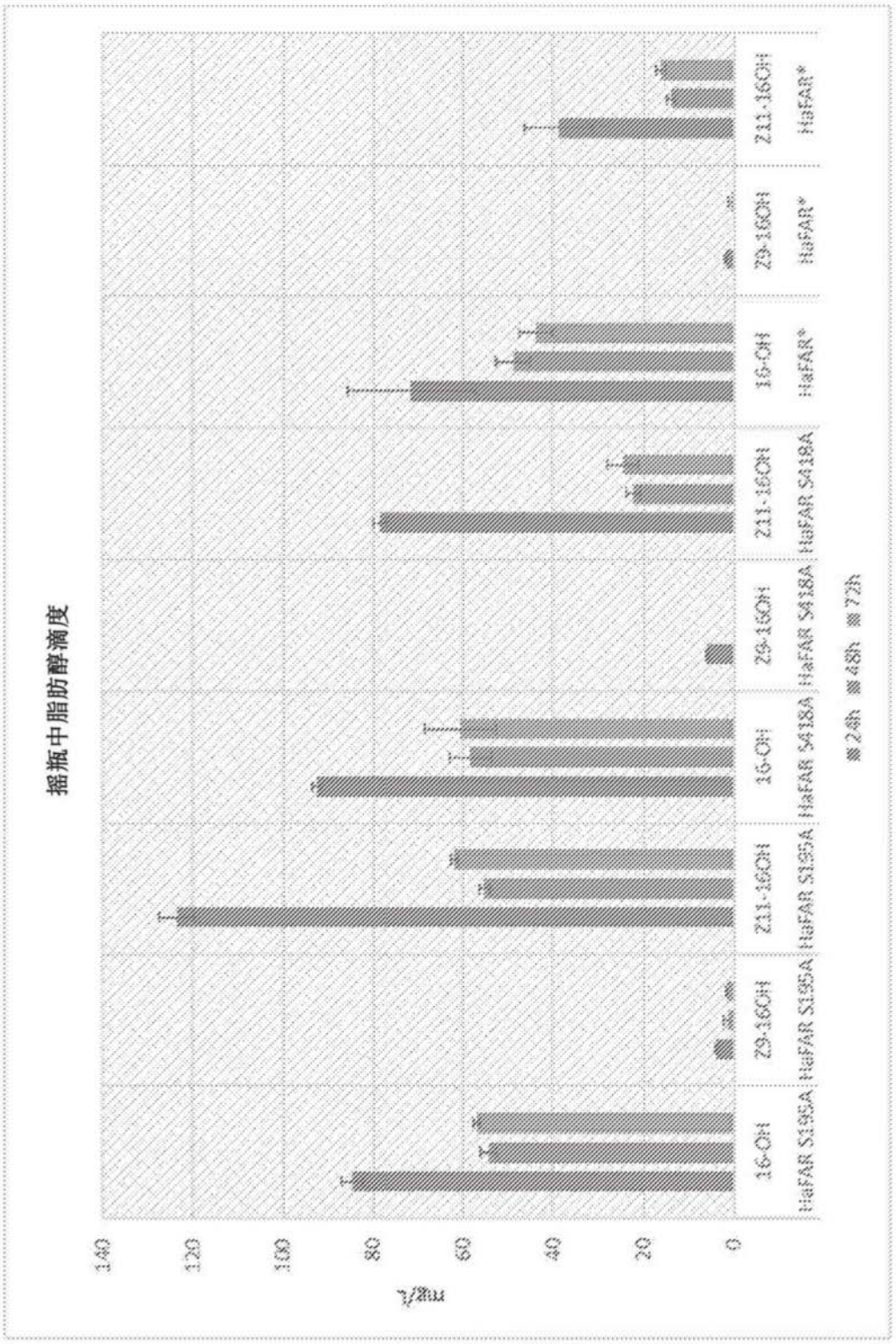

摇瓶中脂肪醇滴度
mg/L
140
120
100
80
60
40
20
0
16-OH
29-16OH
211-16OH
HaFAR S195A
HaFAR S418A
HaFAR*
24h
48h
72h

图47

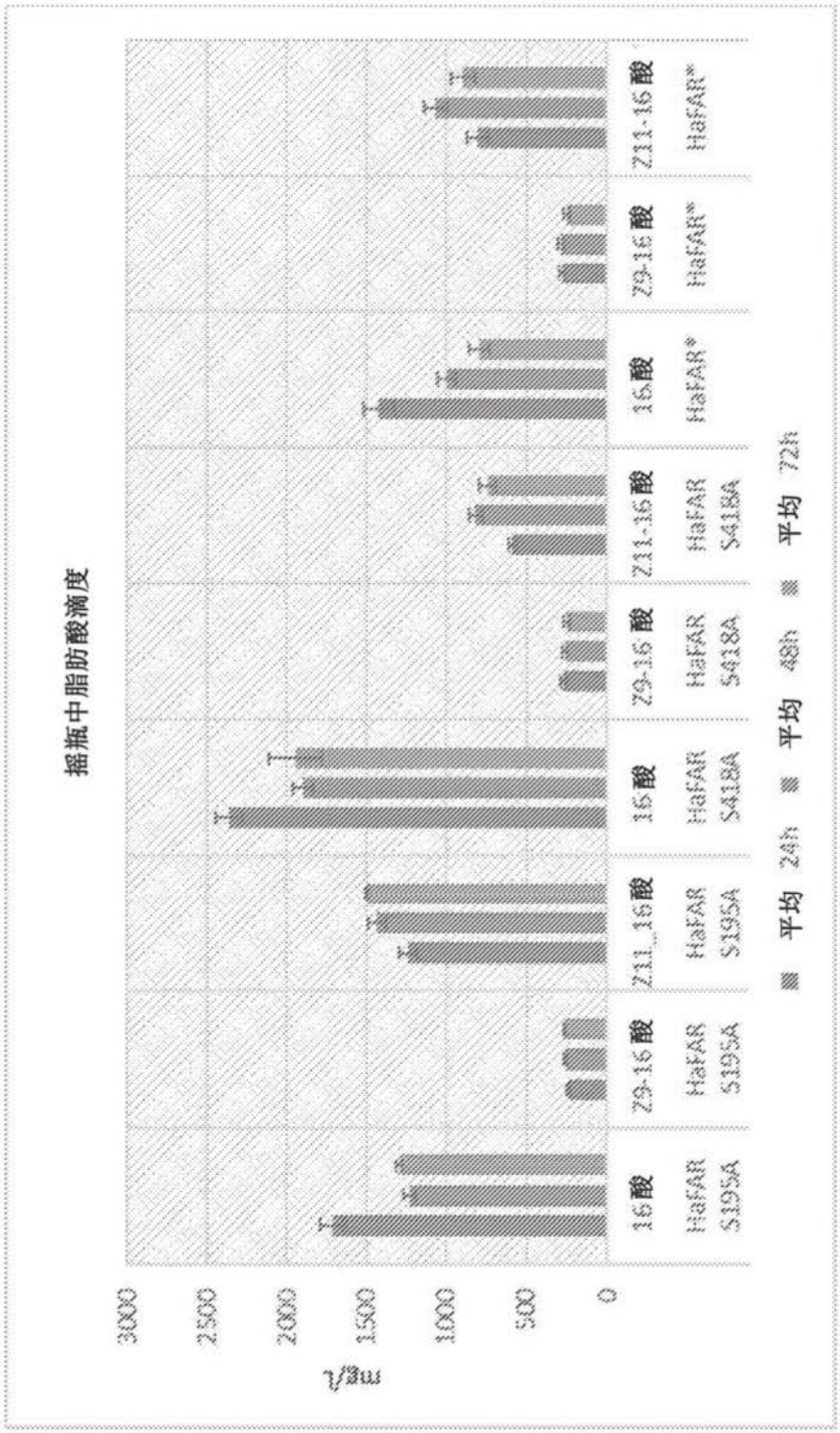

摇瓶中脂肪酸滴度
mg/L
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
16酸 HaFAR S195A
Z9-16酸 HaFAR S195A
Z11_16酸 HaFAR S195A
16酸 HaFAR S418A
Z9-16酸 HaFAR S418A
Z11-16酸 HaFAR S418A
16酸 HaFAR*
Z9-16酸 HaFAR*
Z11-16酸 HaFAR*
平均 24h 平均 48h 平均 72h

图48


摇瓶中脂肪醇滴度
mg/L
300
250
200
150
100
50
0
16-OH
HaFAR S195A
Z9-16OH
HaFAR S195A
Z11-16OH
HaFAR S195A
16-OH
HaFAR S418A
Z9-16OH
HaFAR S418A
Z11-16OH
HaFAR S418A

图49

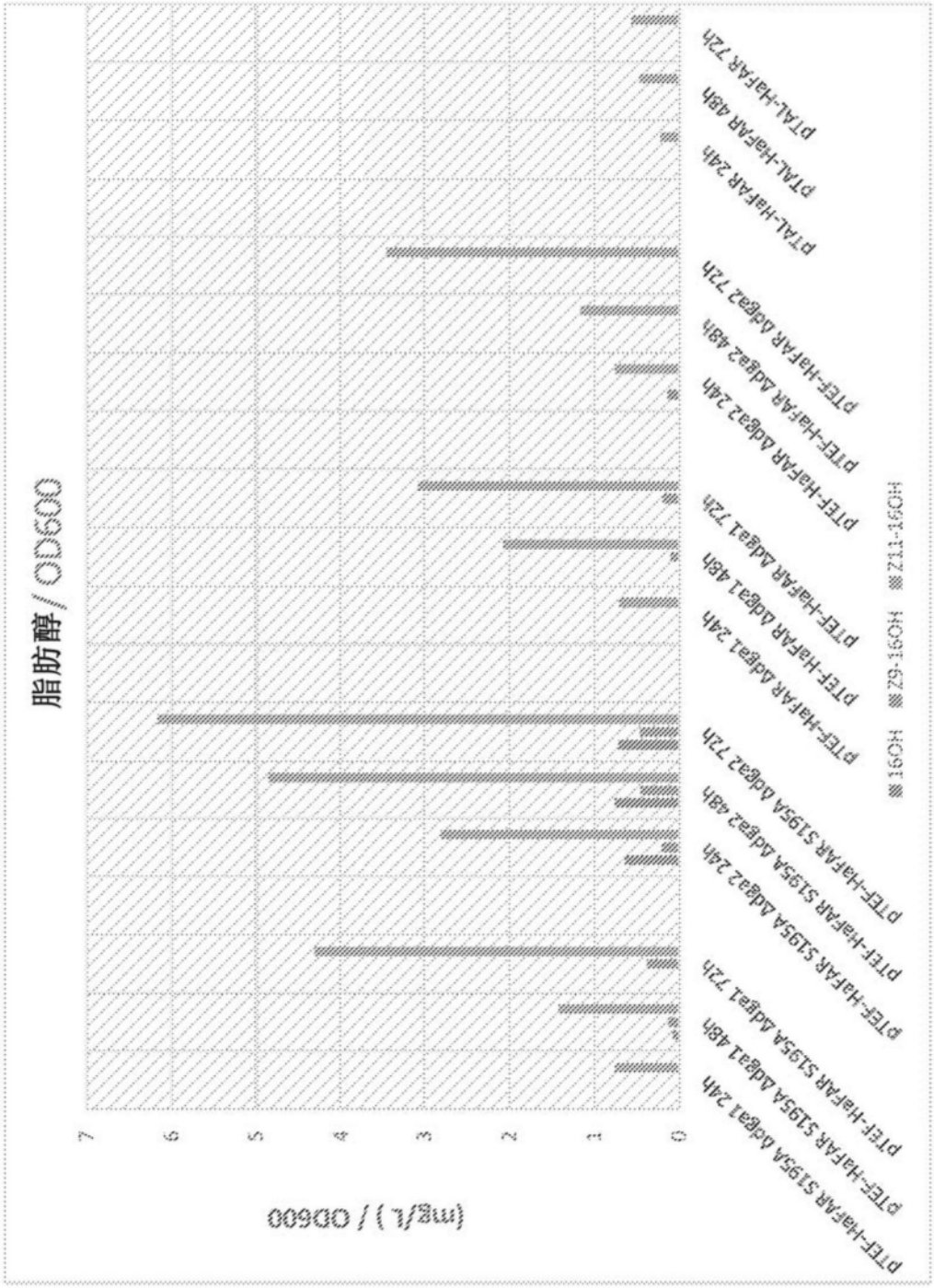

脂肪醇/OD600
(mg/L)/OD600
0
1
2
3
4
5
6
7
16OH
Z9-16OH
Z11-16OH
pTAL-HaFAR 24h
pTAL-HaFAR 48h
pTAL-HaFAR 72h
pTEF-HaFAR Ade2 24h
pTEF-HaFAR Ade2 48h
pTEF-HaFAR Ade2 72h
pTEF-HaFAR Ade1 24h
pTEF-HaFAR Ade1 48h
pTEF-HaFAR Ade1 72h
pTEF-HaFAR S195A Ade2 24h
pTEF-HaFAR S195A Ade2 48h
pTEF-HaFAR S195A Ade2 72h
pTEF-HaFAR S195A Ade1 24h
pTEF-HaFAR S195A Ade1 48h
pTEF-HaFAR S195A Ade1 72h

图50

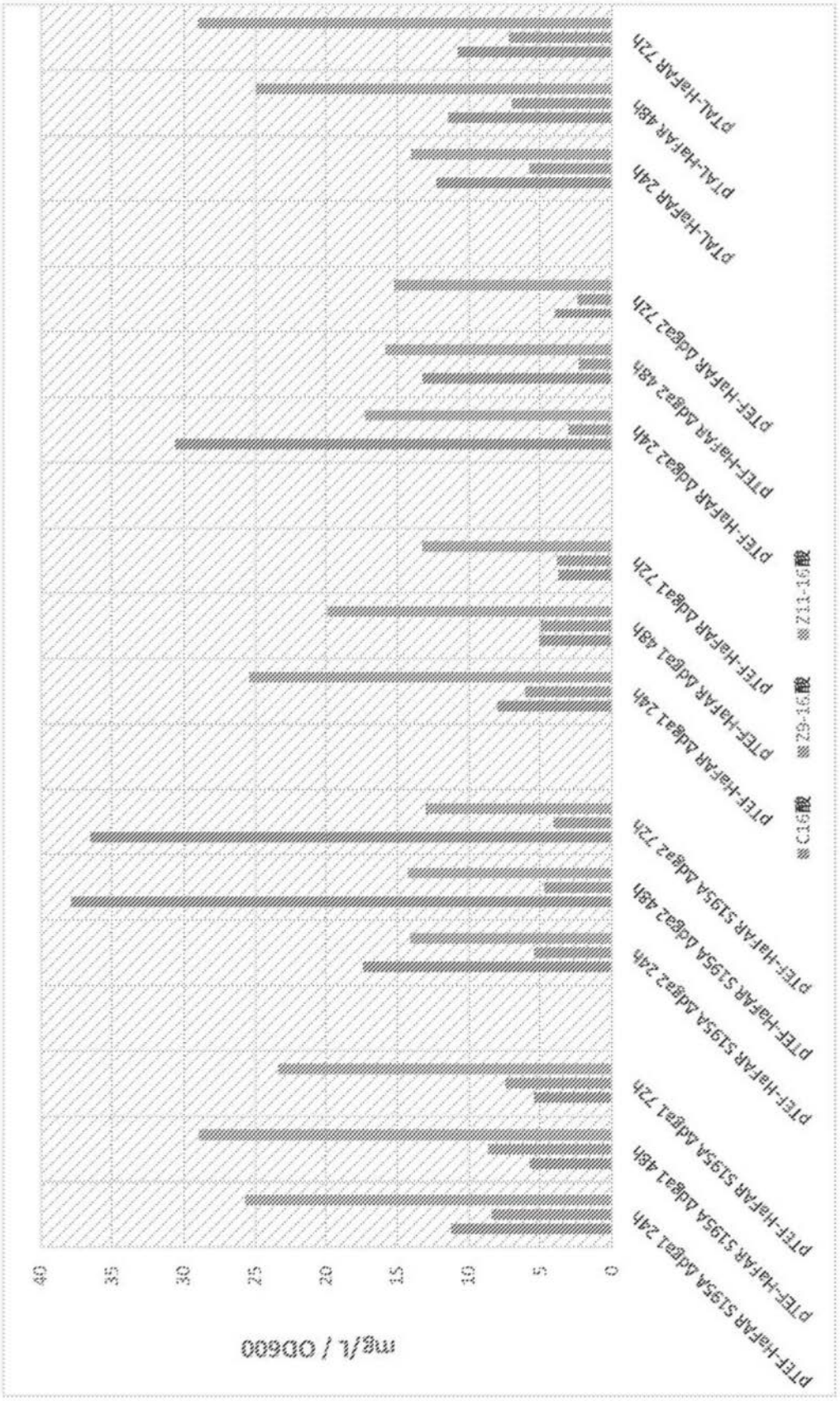

pTAL-HaFAR 72h
pTAL-HaFAR 48h
pTAL-HaFAR 24h
pTEF-HaFAR AdGa2 72h
pTEF-HaFAR AdGa2 48h
pTEF-HaFAR AdGa2 24h
pTEF-HaFAR AdGa1 72h
pTEF-HaFAR AdGa1 48h
pTEF-HaFAR AdGa1 24h
pTEF-HaFAR S195A AdGa2 72h
pTEF-HaFAR S195A AdGa2 48h
pTEF-HaFAR S195A AdGa2 24h
pTEF-HaFAR S195A AdGa1 72h
pTEF-HaFAR S195A AdGa1 48h
pTEF-HaFAR S195A AdGa1 24h
※C16酸
※29-16酸
※211-16酸
40
35
30
25
20
15
10
5
0
mg/L / OD600

图51

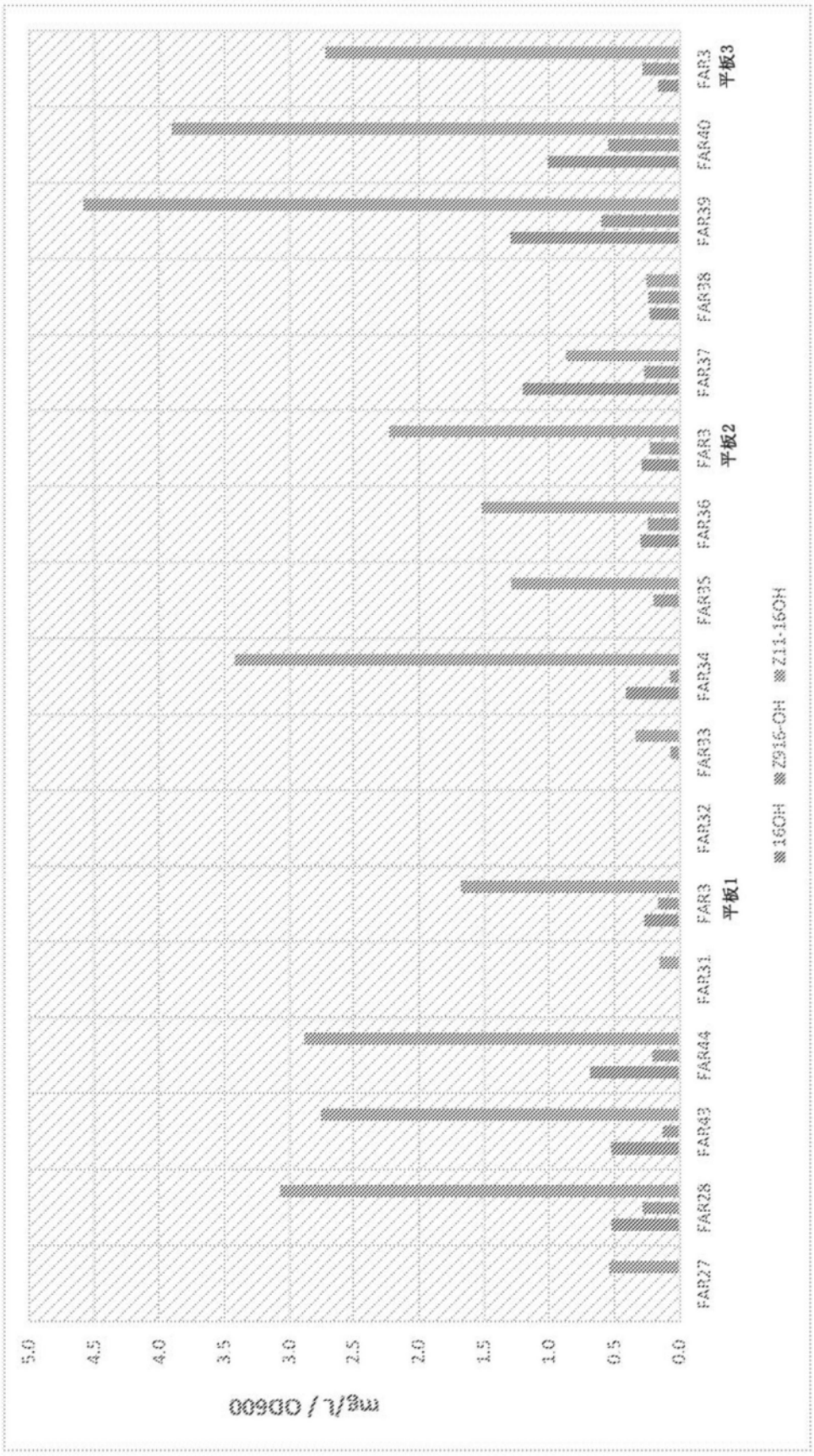

mg/L / OD600
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
FAR27
FAR28
FAR43
FAR44
FAR31
FAR3
FAR32
FAR33
FAR34
FAR35
FAR36
FAR3
FAR37
FAR38
FAR39
FAR40
FAR3
平板1
平板2
平板3
16OH
Z9,16-OH
Z11-16OH

图52

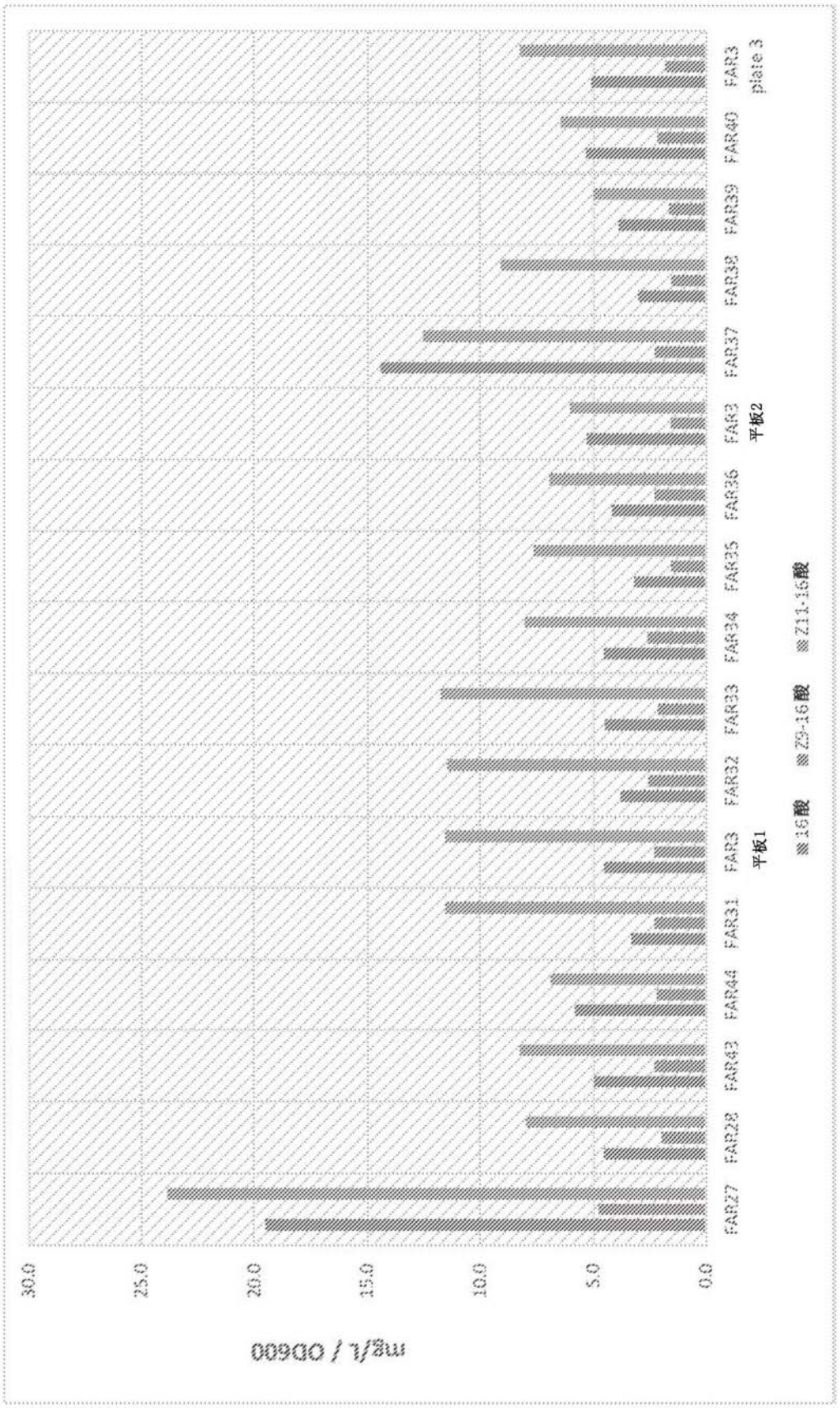

30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
OD600 / 1/8μl
FAR27 FAR28 FAR43 FAR44 FAR31 FAR3 FAR32 FAR33 FAR34 FAR35 FAR36 FAR3 FAR37 FAR38 FAR39 FAR40 FAR3
平板1
平板2
plate 3
※16酸 ※Z9-16酸 ※Z11-16酸

图53

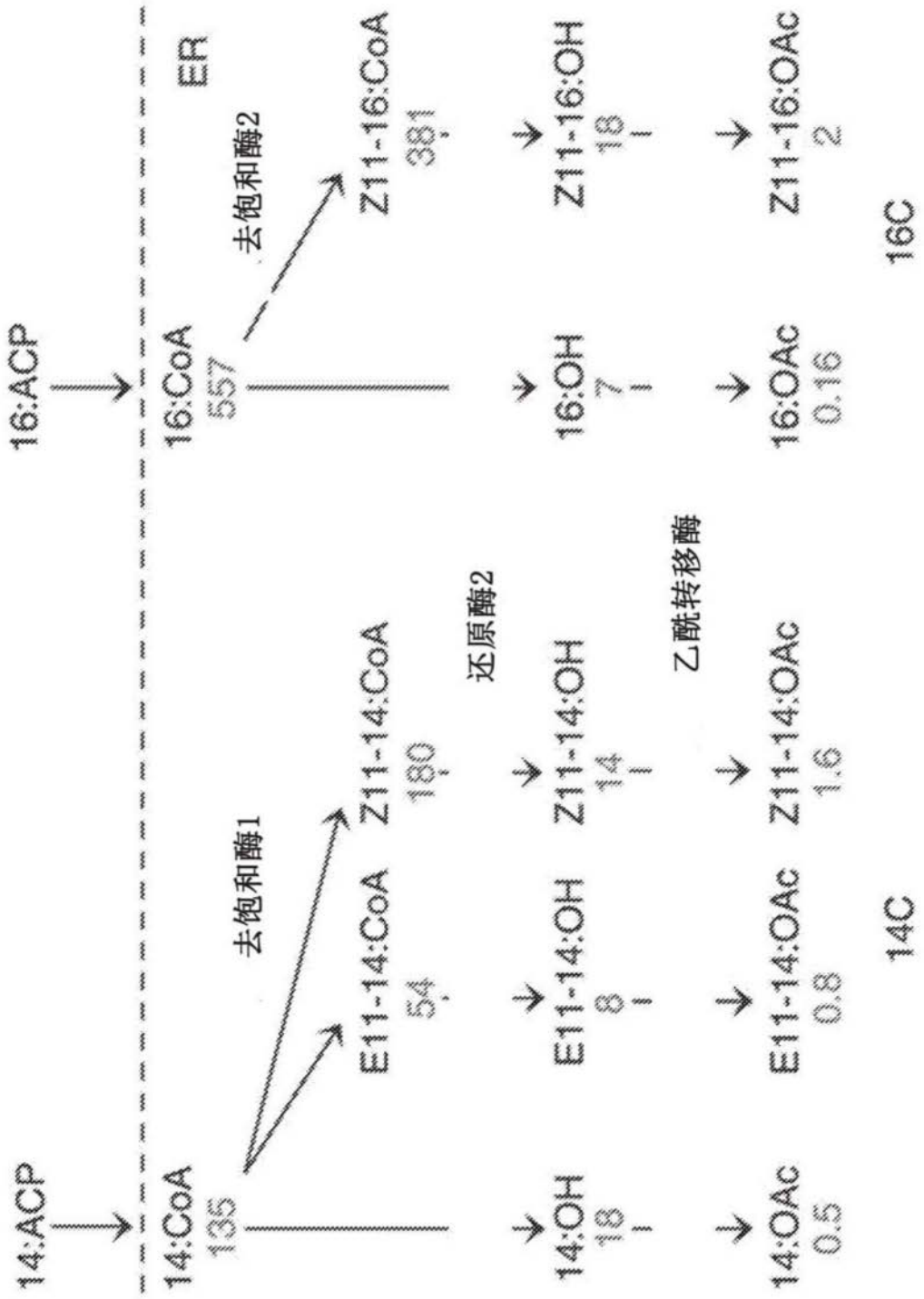

14:ACP
16:ACP
14:CoA
135
16:CoA
557
ER
去饱和酶2
Z11-16:CoA
381
16:OH
7
Z11-16:OH
18
16:OAc
0.16
Z11-16:OAc
2
16C
去饱和酶1
E11-14:CoA
54
Z11-14:CoA
180
还原酶2
14:OH
18
E11-14:OH
8
Z11-14:OH
14
乙酰转移酶
14:OAc
0.5
E11-14:OAc
0.8
Z11-14:OAc
1.6
14C

图54