



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월14일

(11) 등록번호 10-2065526

(24) 등록일자 2020년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C11B 1/02 (2006.01) A23D 9/007 (2006.01)

C10M 169/04 (2006.01) C11B 1/06 (2006.01)

C11B 1/10 (2006.01) C11B 3/00 (2006.01)

C11B 3/06 (2006.01) C11B 3/10 (2006.01)

C11B 3/14 (2006.01) C12N 15/79 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C11B 1/025 (2013.01)

C11B 1/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7008866(분할)

(22) 출원일자(국제) 2011년11월03일

심사청구일자 2019년04월19일

(85) 번역문제출일자 2019년03월27일

(65) 공개번호 10-2019-0036570

(43) 공개일자 2019년04월04일

(62) 원출원 특허 10-2013-7013979

원출원일자(국제) 2011년11월03일

심사청구일자 2016년11월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2011/059224

(87) 국제공개번호 WO 2012/061647

국제공개일자 2012년05월10일

(30) 우선권주장

61/409,902 2010년11월03일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

W02009126843 A2

W02010063032 A2

KR1020100022473 A

W02010111698 A2

(73) 특허권자

테라비아 홀딩스 인코포레이티드

미합중국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코, 게이트웨이 블러바드 225

(72) 발명자

프랭클린, 스캇

미국 94080-1906 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 게이트웨이 블러바드 225

루, 웬후아

미국 94080-1906 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 게이트웨이 블러바드 225

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 31 항

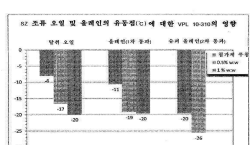
심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 유동점이 낮은 미생물 오일, 이 오일로 제조된 유전성 유체 및 관련 방법

(57) 요약

미생물, 예를 들어 오일 보유 미생물에 의해 생산된 지질로부터 유전성 유체를 생산하는 방법, 이를 위한 조성물 및 상기 미생물을 저렴하게 배양하는 방법이 제공된다. 예를 들어 수크로스 운반체, 수크로스 인버타제, 프럭토키나제, 다당류 분해 효소, 지질 경로 변경 효소, 지방 아실-ACP 티오에스테라제, 불포화 효소, 지방 아실-CoA/알데하이드 환원 효소 및/또는 아실기 운반 단백질질을 암호화하는 외인성 유전자를 함유하는 미세 조류 세포는 유전성 유체를 제조함에 있어서 유용하다.

대표도



(52) CPC특허분류

C11B 1/10 (2013.01)
C11B 3/001 (2013.01)
C11B 3/006 (2013.01)
C11B 3/008 (2013.01)
C11B 3/06 (2013.01)
C12N 15/79 (2013.01)
C12N 9/2442 (2013.01)
C12P 7/6409 (2013.01)
C12P 7/6463 (2013.01)

(72) 발명자

라키츠키, 왈터

미국 94080-1906 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
 게이트웨이 블러바드 225

로드리게즈, 펠리프 아라나

미국 94080-1906 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
 게이트웨이 블러바드 225

루텐코, 조지

미국 94080-1906 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
 게이트웨이 블러바드 225

위, 제니스

미국 94080-1906 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
 게이트웨이 블러바드 225

자오, 신후아

미국 94080-1906 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
 게이트웨이 블러바드 225

(30) 우선권주장

61/438,966	2011년02월02일	미국(US)
61/522,231	2011년08월10일	미국(US)
61/546,932	2011년10월13일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

-5℃ 미만의 유동점을 갖는 미생물 오일로서, 지방산 메틸 에스테르 불꽃 이온화 기체 크로마토그래피를 사용하여 상기 미생물 오일의 지방산 조성을 분석할 때, 상기 미생물 오일의 지방산 조성이 C18:1 50% 이상 및 C18:2 2% 미만을 포함하는 미생물 오일.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유동점은 -10℃ 내지 -40℃인 미생물 오일.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 미생물 오일의 지방산 조성은 C18:1 60% 이상인 미생물 오일.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 미생물 오일의 지방산 조성은 C18:1 70% 이상인 미생물 오일.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 미생물 오일의 지방산 조성은 C18:1 80% 이상인 미생물 오일.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 미생물 오일의 지방산 조성은 C18:2 1% 미만인 미생물 오일.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 미생물 오일의 발연점은 250℃ 내지 375℃인 미생물 오일.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 미생물 오일의 발화점은 300℃ 내지 450℃인 미생물 오일.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 미생물 오일의 요오드 수치는 25 내지 200인 미생물 오일.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 미생물 오일은 하나 이상의 외인성 유전자를 발현하도록 조작된 유전자 조작 미생물에 의해 생산되는 미생물 오일.

청구항 11

제10항에 있어서, 유전자 조작된 미생물은 프로토테카 또는 클로렐라인 미생물 오일.

청구항 12

제10항에 있어서, 유전자 조작된 미생물은 프로토테카 모리포르미스인 미생물 오일.

청구항 13

제10항에 있어서, 하나 이상의 외인성 유전자는 수크로스 인버타제, 하나 이상의 지방 아실-ACP 티오에스테라제, 또는 이들의 조합물을 암호화하는 미생물 오일.

청구항 14

제10항에 있어서, 하나 이상의 외인성 유전자는 수크로스 인버타제 및 하나 이상의 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 미생물 오일.

청구항 15

제10항에 있어서, 하나 이상의 외인성 유전자는 2개 이상의 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 미생물 오일.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 오일은 유동점 강하제를 추가로 포함하는 미생물 오일.

청구항 17

제1항 또는 제2항에 따른 미생물 오일을 포함하는 생산물로서, 윤활제, 유압유, 산업용 오일, 또는 유전성 유체인 생산물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 생산물은 항산화제, 금속 이온 불활성화제, 부식 억제제, 항 유화제, 마모 방지 첨가제, 유동점 강하제, 가수 분해 방지 화합물, 또는 이들의 조합물을 추가로 포함하는 생산물.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 생산물은 유동점 강하제를 추가로 포함하는 생산물.

청구항 20

제17항에 있어서, 생산물은 상기 유전성 유체인 생산물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 유전성 유체의 파괴 전압은 20kv 내지 75kv인 생산물.

청구항 22

제20항에 있어서, 유전성 유체의 절연 강도는 20MV/m(RMS) 내지 75MV/m(RMS)인 생산물.

청구항 23

유전자 조작된 미생물에 의해 생산된 미생물 오일을 포함하는 유전성 유체로서, 상기 유전성 유체는 -10°C 내지 -40°C 의 유동점을 가지며, 지방산 메틸 에스테르 불꽃 이온화 기체 크로마토그래피를 사용하여 상기 미생물 오일의 지방산 조성을 분석할 때, 상기 미생물 오일의 지방산 조성이 C18:1 50% 이상 및 C18:2 2% 미만을 포함하는 유전성 유체.

청구항 24

제23항에 있어서, 지방산 조성은 C18:2 1% 미만인 유전성 유체.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 지방산 조성은 C18:1 70% 이상인 유전성 유체.

청구항 26

제23항 또는 제24항에 있어서, 지방산 조성은 C18:1 80% 이상인 유전성 유체.

청구항 27

제23항 또는 제24항에 있어서, 유전자 조작된 미생물은 프로토테카 또는 클로렐라인 유전성 유체.

청구항 28

제23항 또는 제24항에 있어서, 유전자 조작된 미생물은 프로토테카 모리포르미스인 유전성 유체.

청구항 29

제23항 또는 제24항에 따른 유전성 유체를 포함하는 전기 부재.

청구항 30

제29항에 있어서, 전기 부재는 변압기인 전기 부재.

청구항 31

제1항 또는 제2항에 있어서, 미생물 오일은 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함하는 미생물 오일: $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만으로 존재하는 카로티노이드; $0.001\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만으로 존재하는 라이코펜; $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만으로 존재하는 베타 카로틴; 및/또는 오일 1kg당 0.02mg 미만으로 존재하는 엽록소.

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참고 문헌

[0002] 본 출원은 선행 기술인 미국 가출원 제61/546,932호(2011년 10월 13일 출원); 선행 기술인 미국 가출원 제61/522,231호(2011년 8월 10일 출원); 선행 기술인 미국 가출원 제61/438,966호(2011년 2월 2일 출원); 선행 기술인 미국 가출원 제61/409,902호(2010년 11월 3일 출원)(상기 참고 문헌들은 모두 본원에 전체가 참조로 포함됨)의 우선권의 이익을 주장한다.

[0004] 서열목록에 대한 참조

[0005] 본 출원은 이에 첨부된 제1면 내지 제44면에 나타난 서열 목록을 포함한다.

[0007] 본 발명의 분야

[0008] 본 발명은 미생물로부터 오일을 제조하는 것과 이 오일의 유동점을 개선하기 위해 오일을 가공하는 방법, 그리고 이 오일로부터 유래하는 생산물, 예를 들어 식품용 오일과 이러한 오일을 포함하는 식품, 그리고 산업용 생산물, 예를 들어 윤활제와 유전성 유체에 관한 것이다. 그러므로, 본 발명의 구체에는 화학, 특히 함유 화학 제품, 식품용 오일과 이의 생산 및 용도, 윤활제와 이의 생산, 유전성 유체, 공급 원료와 이의 생산, 미생물학 및 분자 생물학 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0009] 화석 연료는 썩은 식물 및 동물로부터 형성되어 수억년 이상 동안 지각에서 열 및 압력에 노출됨에 의해 원유, 석탄, 천연 가스 또는 중유로 전환된, 매장된 유기 물질의 연소성 지질학적 퇴적물에 대한 일반적인 용어이다. 화석 연료는 한정된 재생가능하지 않은 자원이다.

[0010] 다수의 산업 분야, 예를 들어 플라스틱 및 화학 생산물 제조 분야는 주로 생산물의 제조 공정에 있어서 탄화수소의 공급 원료로서의 이용 가능성에 바탕을 둔다.

[0011] PCT 공보 제2008/151149호는 오일의 생산을 위하여 미세 조류를 배양하고, 미생물 오일을 추출하며, 유지성 미생물에 의해 생산된 오일로부터 식품, 식품용 오일, 연료 그리고 기타 다른 함유 화학 제품을 생산하는 방법과 이에 사용되는 재료에 대해 기술하고 있다.

[0012] 한 가지 중요한 함유 화학 제품의 용도는, 변압기와 기타 다른 전기 장치에서 절연, 냉각 또는 방열에 사용되는 산업용 유전성 유체를 생산하는 것이다. 이와 같은 전기 장치는 전력 변압기와 배전 변압기, 회로 차단기, 축전기, 개폐 장치, X선 기계 및 절연 케이블을 포함한다.

[0013] 바이오 기반 오일, 특히 고 올레산 대두 오일은 1990년대로부터 밀폐 변압기에서 유전성 유체로 사용되어 왔다 (Srivastava (2009) *Int'l J Computer Electrical Eng*, v. 1(2) pp. 212-216 참조). 현재의 바이오 기반 유전성 유체는 첨가제가 혼합된 정제 고 올레산 트리아실글리세롤(TAG)이다(미국 특허 제6,274,067호 및 미국 특허 출원 제20100243969호 및 제20080283803호 참조). 예를 들어 미네랄 오일 기반 유전성 유체에 비해 고 올레산 대두 오일 유전성 유체의 주요 이점으로는, (i) 발화점을 상승시킨다는 점(2배), (ii) 변압기 수명을 늘린다는 점(4배 내지 8배), 그리고 (iii) 바이오 기반 오일의 생분해성이 높고(> 3배) 독성이 낮음으로 인해서 오일이 유출되었을 때 이를 수습하는데 드는 비용이 적다는 점이 있다(Schneider (2006) *J Sci Food Agric*, v. 86 pp:1769-1780).

[0014] 미네랄 기반 오일과 비교하였을 때 바이오 기반 오일의 주요 단점으로는, 바이오 기반 오일이 산화 불안정성을 가진다는 점, 바이오 기반 오일을 얻는데 비용이 많이 든다는 점, 그리고 미네랄 기반 오일로부터 바이오 기반 오일로 이행하는 장치를 사용함에 있어서도 비용이 많이 든다는 점이 있다(상기의 Schneider (2006) 참조). 바이오 기반 유전성 유체가 유전성 유체 시장에서 중요한 위치를 차지하고 있었지만, 현재는 미네랄 오일 기반 유전성 유체가 시장을 우점하고 있다. 또 다른 단점으로서 중요한 것으로는, 이와 같은 대두 기반 오일의 생산 비용 문제와, 중요한 식품 공급원으로 사용되고 있는 오일이 식품 이외의 분야에 전환 사용될 때의 비용 문제가

있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 유동점이 개선된 미생물 오일, 이러한 오일을 제조하는 방법, 그리고 이 오일로부터 유래하는 생산물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0016] 임의의 구체예에서, 본 발명은 유동점이 개선된 미생물 오일, 이러한 오일을 제조하는 방법, 그리고 이 오일로부터 유래하는 생산물을 제공한다. 유동점은 트리글리세라이드 오일의 포화 지방산 대 불포화 지방산의 상대적 농도와, 지방산의 사슬 길이 간 함수이다. 본 발명의 방법에 관한 구체예에서, 미생물 오일의 초기 유동점은, 포화된 분획, 예를 들어 스테아린 분획으로 알려진 스테아르산 트리글리세라이드 및 팔미트산 트리글리세라이드의 상대적 비율을 감소시킴으로써 강화된다. 이와 같은 방법에 따르면, 오일이 분별될 때, 이 오일의 포화 트리글리세라이드 농도는 감소하게 된다. 이는, 건조 분별, 즉 “윈터리제이션(winterization)”을 수행하는 예시적 방법에 의해 본 발명의 구체예에 따라서 이루어질 수 있다. 이와 같은 방법에 관한 하나의 구체예에서, 미생물 (예를 들어 조류) 오일은 임의로 처음에 정제, 표백, 탈취 또는 고무 성질 제거되어 “RBD 오일” (이는 초기 유동점에 의해 특징지어짐)로 제조된다. 이후, RBD 오일의 온도는 결정 핵이 생성될 때까지 제어된 방식으로 강화되고, 이후에는 처음의 결정화 온도가 (수 시간 동안) 유지됨에 따라서 결정이 생성된다. 그 다음, 결정은 여과에 의해 제거되며, 그 결과 다음과 같은 2개의 분획이 생성된다: 스테아린 분획 일부 또는 대부분을 함유하는 고체상, 그리고 대부분이 올레인 분획으로 이루어진 액체상. 상기 액체상은 초기 유동점보다 낮은 제2 유동점을 가지는 것을 특징으로 하는데, 여기서, 상기 제2 유동점은, 예를 들어 약 -10°C 내지 약 -40°C 일 수 있으며, 이 액체상의 지방산 조성은 C18:1 50% 이상 및 C18:2 10% 미만일 수 있다. 액체상은 또한 제2의 더 낮은 결정화 온도에 대해서 분별되고, 그 결과, 스테아린이 추가로 제거될 수 있다. 예시적 구체예에서, 제1 결정화 온도는 15°C 이상 내지 약 50°C 이고, 제2 결정화 온도는 약 -15°C 내지 약 15°C 이다.

[0017] 임의의 경우, 생성된 정제 액체 분획은, 식물성 오일 산업 분야에서 일반적으로 알려진 바와 같은 슈퍼 올레인 오일(super olein oil)과 동급이거나 실질적으로 유사하며, 천연 조류 오일의 열 특성보다 우수한 열 특성을 가진다. 몇몇 구체예에서, 이와 같은 특성은 (특정 분야에서 요망될 수 있는 바와 같이) 유동점을 훨씬 더 강화하는 화학적 유동점 강화제를 첨가하여 추가로 개선된다. 이와 같은 방법에 의해 제공된 미생물 오일은 식품용으로서뿐만 아니라, 산업용(예를 들어 윤활제, 유압유, 산업용 오일 및 유전성 유체 생산용)으로서도 사용될 수 있다. (예를 들어 유전성 유체와 같은) 산업상 용도로 사용될 때, (유동점 강화제 이외에, 또는 이것 대신에) 미생물 오일에 첨가될 수 있는 하나 이상의 첨가제로서는 다음과 같은 것들을 포함한다: 항산화제, 금속 이온 불활성화제, 부식 억제제, 향 유화제, 마모 방지 첨가제 또는 가수 분해 방지 화합물.

[0018] 다양한 구체예에서, 미생물 오일은 지질 프로파일이 뚜렷한(즉 지방산 프로파일 뚜렷한) 유지성 미생물, 예를 들어 미세 조류 세포, 예를 들어 단백질, 예를 들어 하나 이상의 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 외인성 유전자를 발현하는 재조합 세포로부터 유래한다. 예시적인 구체예에서, 미생물 오일은 하나 이상의 외인성 유전자를 발현하도록 조작된 유전자 조작 미생물로부터 유래하고, 이 오일을 제조하는 방법은, 미생물이 건조 중량을 기준으로 10% 이상의 오일을 가지게 될 때까지 이 미생물을 배양하는 단계, 그리고 미생물로부터 오일을 분리하여, 추후 전술한 바와 같이 정제, 표백, 탈취 및 임의로는 고무 성질 제거될 수 있는 미생물 오일을 제조하는 단계를 추가로 포함한다. 유사하거나 뚜렷이 구별되는 지질 프로파일을 가지는 기타 다른 유지성 미생물, 예를 들어 효모, 진균 및 박테리아도 사용될 수 있다. 임의의 구체예에서, 본 발명은 상기와 같은 미세 조류 및/또는 유지성 미생물, 예를 들어 효모, 진균 및 박테리아로부터 지질 및 오일 기반 생산물, 예를 들어 유전성 유체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0019] 임의의 구체예에서, 본 발명은 미생물 오일을 포함하는 생산물을 제공하는데, 여기서, 상기 미생물 오일의 유동점은 약 10°C 내지 약 -40°C 이며, 이 미생물 오일의 지방산 조성은 C18:1 약 50% 이상 및 C18:2 약 10% 미만이다. 이와 같은 구체예의 변형예에서, 생산물의 유동점은 -10°C 내지 약 -40°C 이다. 이와 같은 생성물 중 미생물 오일은, 예를 들어 C18:1을 약 60% 이상, 약 70% 이상, 또는 약 80% 이상 포함할 수 있다. 몇몇 경우에 있어서, 미생물 오일은 C18:2를 약 5% 미만 포함할 수 있다(예를 들어 C18:1 약 80% 이상, 그리고 C18:2 약 5% 미만을 포함한다). 특정 구체예에서, 생산물 중 미생물 오일은 요오드가 약 25 내지 약 200이다. 임의의 구체예에서,

미생물 오일은 하나 이상의 외인성 유전자를 발현하도록 조작된 유전자 조작 미생물에 의해 생성될 수 있다. 이와 같은 목적에 사용되는 예시적 미생물로서는 프로토테카(*Prototheca*) 또는 클로렐라(*Chlorella*) 속에 속하는 종(예를 들어 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*))을 포함한다. 이러한 미생물은, 예를 들어 수크로스 인버타제 및/또는 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 외인성 유전자 하나 이상을 발현하도록 조작될 수 있다. 예시적 구체예에서, 미생물은 2개 이상의 지방 아실-ACP 티오에스테라제 또는 수크로스 인버타제 및 하나 이상의 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 외인성 유전자를 발현하도록 조작된다.

[0020] 다양한 구체예에서, 생산물은 하나 이상의 첨가제(들), 예를 들어 항산화제, 금속 이온 불활성화제, 부식 억제제, 향 유화제, 마모 방지 첨가제, 유동점 강하제 또는 가수 분해 방지 화합물을 포함한다. 예시적 생산물로서는 윤활제, 유압유, 산업용 오일 및 유전성 유체를 포함한다. 특히 유전성 유체는 전술한 첨가제들 중 하나 이상을 가질 수 있다.

[0021] 몇몇 경우에 있어서, 미생물 오일 기반 생산물은 유전성 유체이다. 몇몇 구체예에서, 유전성 유체에 사용되는 미생물 오일은 다음과 같은 속성들 중 하나 이상을 가진다: (i) 총 카로티노이드 0.4 μ g/ml 미만; (ii) 라이코펜 0.001 μ g/ml 미만; (iii) 베타 카로틴 0.02 μ g/ml 미만; (iv) 오일 1kg당 엽록소 0.02mg 미만; (v) 오일 100g당 감마 토코페롤 0.40mg 내지 0.60mg; (vi) 오일 100g당 캄페스테롤 3mg 내지 9mg; 또는 (vii) 오일 1g당 총 토코트리엔놀 0.5mg 미만. 몇몇 경우에 있어서, 유전성 유체는 다음과 같은 특성들 중 하나 이상의 특성을 가진다: (a) 40 $^{\circ}$ C에서의 점도 = 약 110cSt 미만, 예를 들어 20cSt 내지 30cSt; (b) 100 $^{\circ}$ C에서의 점도 = 약 2cSt 내지 약 15cSt, 예를 들어 4cSt 내지 8cSt; (c) 40 $^{\circ}$ C에서의 점도 지수(VI, 무단위 수치) = 35 이상, 예를 들어 VI = 35 내지 80, VI = 80 내지 110, VI = 110 내지 125, VI = 125 내지 160(이에 한정되는 것은 아님), 그리고 몇몇 구체예에서는 VI = 160 이상; (d) 유동점(액체가 흐르게 될 때의 최저 온도) = -8 $^{\circ}$ C 내지 10 $^{\circ}$ C 이하, 예를 들어 유동점 = -20 $^{\circ}$ C 내지 -25 $^{\circ}$ C 이하(이에 한정되는 것은 아님), 그리고 몇몇 구체예에서는 유동점 = -30 $^{\circ}$ C 내지 -40 $^{\circ}$ C 이하; (e) 윤활성 = ASTM D2882; (f) 낮은 휘발성; (g) 높은 발연점, 예를 들어 발연점 = 150 $^{\circ}$ C 이상, 예를 들어 발연점 = 300 $^{\circ}$ C 이상; (h) 발화점 = 150 $^{\circ}$ C 이상(예를 들어 300 $^{\circ}$ C 이상), 예를 들어 발화점 = 300 $^{\circ}$ C 이상; (i) 낮은 반응성, 예를 들어 산과 염기의 존재 하에서의 분해에 대한 저항성, 우수한 열 안정성, 산소와의 반응에 대한 낮은 감수성, 그리고 낮은 중화수(0.06 이하, 예를 들어 0.03 이하); (j) 우수한 유화성, 예를 들어 높은 향 유화성; (k) 25 $^{\circ}$ C에서의 역률 = 1% 이하, 예를 들어 0.5% 이하, 0.15% 이하, 0.1% 이하(이에 한정되는 것은 아님), 그리고 몇몇 구체예에서 0.05% 이하; (l) 100 $^{\circ}$ C에서의 역률 = 1.5% 이하, 예를 들어 1% 이하, 0.3% 이하(이에 한정되는 것은 아님), 그리고 몇몇 구체예에서, 0.1% 이하; (m) 높은 절연 내구력; (n) 낮은 손실 계수; (o) 낮은 전기 전도성; (p) 높은 비열량, 예를 들어 비열량 = 적어도 0.39cal/g/ $^{\circ}$ C(이에 한정되는 것은 아님), 그리고 몇몇 구체예에서는 비열량 = 적어도 0.45cal/g/ $^{\circ}$ C 이상; 그리고 (q) 생분해성(즉 미생물의 존재 하에서 이산화탄소와 물로 분해되는 특성으로, 표준 테스트 조건 하에서 유전성 유체의 적어도 15% 이상이 28일 이내에 분해되고, 몇몇 구체예에서는 이와 같은 조건 하에서 유전성 유체 30% 이상, 70% 이상 또는 100%가 생분해됨).

[0022] 본 발명은 또한 전술한 유전성 유체를 포함하는 전기 부재를 제공한다. 임의의 구체예에서, 전기 부재는 변압기이다.

[0023] 본 발명은 또한 미생물 오일을 포함하는 생산물을 제조하는 방법을 추가로 제공한다. 임의의 구체예에서, 생산물의 유동점은 약 -10 $^{\circ}$ C 내지 약 -40 $^{\circ}$ C이고, 미생물 오일의 지방산 조성은 C18:1 50% 이상 및 C18:2 10% 미만이다. 이와 같은 구체예에서, 본 발명의 방법은, 미생물이 건조 중량을 기준으로 하여 10% 이상의 오일을 함유할 때까지 하나 이상의 외인성 유전자를 발현하도록 조작된 유전자 조작 미생물을 배양하는 단계, 및 이 미생물로부터 오일을 분리하는 단계를 포함한다. 이후, 미생물 오일은 정제, 표백, 탈취, 그리고 임의로는 고무 성질 제거되어 RBD 오일로 제조된다. 본 발명의 방법은, 임의로 항산화제, 금속 이온 불활성화제, 부식 억제제, 향 유화제, 마모 방지 첨가제, 유동점 강하제 또는 가수 분해 방지 화합물을 RBD 오일에 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예시적으로 조작된 미생물로서는 프로토테카 또는 클로렐라 속에 속하는 종들(예를 들어 프로토테카 모리포르미스)을 포함할 수 있다. 이러한 미생물은, 예를 들어 수크로스 인버타제 및/또는 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 외인성 유전자 하나 이상을 발현하도록 조작될 수 있다. 예시적인 구체예에서, 미생물은 2개 이상의 지방 아실-ACP 티오에스테라제 또는 수크로스 인버타제 및 하나 이상의 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 외인성 유전자를 발현하도록 조작된다.

[0024] 하나의 구체예에서, 본 발명은 유전성 유체를 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 다음과 같은 단계들을 포함한다: (a) 유지성 미생물을 배양하여, 건조 중량을 기준으로 10% 이상의 지질을 함유하는 유지성 미생물을 제공하는 단계; (b) 유지성 미생물로부터 지질을 분리하는 단계, 그리고 (c) 지질을 대상으로 하여, 정제, 표백,

탈취, 고무 성질 제거 및 분별(결정화 또는 건조 분별 또는 원터리제이션에 의함)로 이루어진 군으로부터 선택되는 가공 단계 하나 이상을 수행하는 단계.

[0025] 본 발명의 방법에 관한 몇몇 특정 구체예에서, 유지성 미생물은 미세 조류, 유지성 효모, 유지성 진균 및 유지성 박테리아로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 경우에 있어서, 유지성 미생물은 로도코커스 오파쿠스(*Rhodococcus opacus*)인 유지성 박테리아이다. 몇몇 경우에 있어서, 유지성 미생물은 유지성 진균이다. 몇몇 경우에 있어서, 유지성 진균은 표 3에 나열된 종들이다. 몇몇 경우에 있어서, 유지성 미생물은 유지성 효모이다. 몇몇 경우에 있어서, 유지성 효모는 표 2에 나열된 종들이다. 몇몇 경우에 있어서, 유지성 미생물은 미세 조류이다. 몇몇 경우에 있어서, 미세 조류는 표 1에 나열된 종이다. 몇몇 경우에 있어서, 미세 조류는 프로토타카속에 속하는 것이다.

[0026] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 유전성 유체는 다음과 같은 속성들 중 하나 이상을 가진다: (i) 총 카로티노이드 0.05mcg/g 내지 0.244mcg/g; (ii) 라이코펜 0.003mcg/g 미만; (iii) 베타 카로틴 0.003mcg/g 미만; (iv) 엽록소 A 0.045mcg/g 내지 0.268mcg/g; (v) 감마 토코페롤 38.3mcg/g 내지 164mcg/g; (vi) 브라시카스테롤, 캄페스테롤, 스티그나스테롤 또는 베타-시토스테롤 0.25% 미만; (vii) 총 토코트리엔놀 249.6mcg/g 내지 325.3mcg/g; (viii) 루테인 0.003mcg/g 내지 0.039mcg/g; 및 (ix) 토코페롤 60.8mcg/g 내지 261.7mcg/g. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 유전성 유체는 다음과 같은 특성들로 이루어진 군으로부터 선택된 특성을 가진다: (a) 40℃에서의 점도 = 약 110cSt 미만, 예를 들어 20cSt 내지 30cSt; (b) 100℃에서의 점도 = 약 2cSt 내지 약 15cSt, 예를 들어 4cSt 내지 8cSt; (c) 40℃에서의 점도 지수 = 35 이상; (d) 유동점 = -8℃ 내지 -10℃ 이하, 예를 들어 유동점 = -15℃ 내지 -25℃ 이하; (e) 윤활성 = ASTM D2882; (f) 발연점 = 150℃ 이상; (g) 중화수 = 0.06 이하; (h) 25℃에서의 역률 = 1% 이하; (i) 비열량 = 0.39cal/g/℃ 이상; 그리고 (j) 생분해성(표준적 테스트 조건 하에서 유전성 유체 15% 이상이 28일 이내에 분해됨).

[0027] 몇몇 경우에 있어서, 유전성 유체는 다음과 같은 첨가제들 중 하나 이상과 혼합된다: (a) 항산화제; (b) 금속 이온의 불활성화제; (c) 부식 억제제; (d) 항 유화제; (e) 마모 방지 첨가제; (f) 말란 스티렌 공중합체; (g) 유동점 강하제, 예를 들어 비스코플렉스(VISCOPLEX)[®] 10-310 또는 1-333(로맥스-에보닉 애더티브스 게엠베하(Rohmax-Evonik Additives GmbH)), 또는 기타 다른 폴리(알킬) 아크릴레이트 및 폴리(메틸)아크릴레이트, 예를 들어 인피니엄(INFINEUM)[®] V-351(인피니엄 UK 리미티드(Infineum UK limited)), PMA-D110 및 PMA D(이에 한정되는 것은 아님); 또는 (h) 카보디이미드; 또는 (i) 합성 에스테르; 또는 (j) 폴리 알파 올레핀(PAO); 또는 (k) 에스테르의 에스테르.

[0028] 다른 구체예에서, 본 발명은 유지성 미생물 오일을 포함하는 유전성 유체를 제공하는데, 여기서, 상기 유전성 유체는 C18:2를 약 10% 미만 포함한다. 몇몇 경우에 있어서, 유전성 유체는 C18:2를 약 5% 미만 포함한다. 몇몇 경우에 있어서, 유전성 유체는 C18:2를 약 2% 미만 포함한다. 몇몇 경우에 있어서, 유전성 유체는 C18:1을 65% 이상 추가로 포함한다. 몇몇 경우에 있어서, 유전성 유체는 C16:0을 30% 미만 추가로 포함한다.

[0029] 몇몇 구체예에서, 미생물 오일은 본 발명의 구체예에 따라서 다른 오일과 배합되어 유전성 유체로 제조된다. 몇몇 경우에 있어서, 기타 다른 오일은 미생물 오일이 아니다. 몇몇 경우에 있어서, 기타 다른 오일은 대두, 평지씨, 카놀라, 야자, 팜핵, 코코넛, 옥수수, 폐기 식물, 오구나무(Chinese tallow), 올리브, 해바라기, 면화씨, 닭 지방, 우지, 돈지(porcine tallow), 미세 조류, 거대 조류, 미생물, 쿠페아(Cuphea), 아마, 땅콩, 초이스 백색 그리스(choice white grease), 라드, 양구슬냉이(Camellina sativa), 겨자씨, 캐슈 너트, 귀리, 루핀, 양마, 금잔화, 대마, 커피, 아마씨(아마), 헤이즐넛, 등대풀속, 호박씨, 고수, 동백 나무, 참깨, 홍화, 벼, 유동, 코코아, 코프라, 양귀비, 아주까리씨, 피칸, 호호바, 마카다미아, 브라질 너트, 아보카도, 유지성 효모, 유지성 박테리아, 석유, 또는 상기 오일들 중 임의의 것의 증류 분획으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0030] 몇몇 구체예에서, 유전성 유체 중 기타 다른 오일의 함량은 30% 미만이다. 몇몇 경우에 있어서, 유전성 유체 중 기타 다른 오일의 함량은 20% 미만이다. 몇몇 경우에 있어서, 유전성 유체 중 기타 다른 오일의 함량은 10% 미만이다. 몇몇 구체예에서, 유전성 유체 중 미생물 오일의 함량은 50% 미만이다. 몇몇 경우에 있어서, 유전성 유체 중 미생물 오일의 함량은 25% 미만이다. 몇몇 경우에 있어서, 유전성 유체 중 미생물 오일의 함량은 10% 미만이다.

[0031] 다른 구체예에서, 본 발명은 다음과 같은 첨가제들 중 하나 이상을 포함하는 유전성 유체를 제공한다: (a) 항산화제, 예를 들어 BHT 및 기타 다른 페놀(이에 한정되는 것은 아님); (b) 금속 이온, 예를 들어 Cu, Zn 등의 불활성화제, 예를 들어 벤조트리아졸(이에 한정되는 것은 아님); (c) 부식 억제제, 예를 들어 에스테르 설포네이

트 및 숙신산 에스테르(이에 한정되는 것은 아님); (d) 항 유화제; (e) 마모 방지 첨가제, 예를 들어 아연 디티 오포스페이트(이에 한정되는 것은 아님); (f) 유동점을 낮추는 첨가제, 예를 들어 말란 스티렌 공중합체 및 폴리(알킬)아크릴레이트, 예를 들어 폴리메타크릴레이트(이에 한정되는 것은 아님); 그리고 (g) 가수 분해를 막아 주는 화합물, 예를 들어 카보디이미드(이에 한정되는 것은 아님).

[0032] 본 발명의 이와 같은 구체예와 기타 구체예는 이하에 상세히 기술되어 있으며, 이하 실시예에 구체화되어 있다. 전술되어 있으며 본 출원 명세서 전체에 기술된 특징들 중 임의의 것 또는 전부는 본 발명의 다수의 구체예들과 합하여질 수 있다.

발명의 효과

[0033] 유동점이 개선된 미생물 오일, 이러한 오일을 제조하는 방법, 그리고 이 오일로부터 유래하는 생산물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0034] 본 발명은, 본 발명의 임의의 특정 구체예를 예시하는 첨부 도면과 함께 이하 상세한 설명을 참고로 하였을 때 이해될 수 있다.

도 1은 RBD 오일 분별에 대한 통상의 냉각 프로필을 보여주는 것이다(Tf = 여과 온도).

도 2는 조류 올레인 분별에 대한 통상의 냉각 프로필을 보여주는 것이다(Tf = 여과 온도).

도 3은 조류 오일과 분별된 오일의 유동점에 대한 VPL 10-310 효과를 보여주는 것이다. “탈취된 오일”은 RBD 오일이고; “올레인”은 올레인 #1이며; “수퍼 올레인”은 수퍼 올레인 #1이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 발명은, 부분적으로 프로토타카 및 기타 다른 유지성 미생물이 (임의의 구체예에서) 기타 다른 용도들(예를 들어 생분해성 윤활제, 특히 엔진 오일 및 유압유) 중 유전성 유체(이전에는 주로 미네랄 오일을 주성분으로 하였던 유전성 유체)의 제조에 있어서 예상 외의 유리한 특성들을 가진다는 발견을 바탕으로 한다. 미생물 오일을 주성분으로 하는 윤활제는, 체인톱 바에 사용되는 석유 윤활제, 시추 이수 및 오일, 스트레이트 금속 가공 유체(straight metalworking fluid), 식품 산업용 윤활제, 개방형 기어 오일(open gear oil), 생분해성 그리즈, 유압유, 해양유 및 아웃보드 엔진 윤활제, 수펌프 및 지하 펌프용 오일, 레일 플랜지 윤활제, 속 업소버 윤활제, 트랙터 오일, 농업 장비용 윤활제, 엘리베이터 오일, 이형 오일, 2 스트로크 엔진 윤활제(two stroke engine lubricant) 및 기타 다른 윤활제를 대신하여 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명은 또한, 부분적으로 미생물 오일의 유동점을 낮추기 위해 미생물 오일을 개질하는 방법의 발견을 바탕으로 한다. 지질의 에스테르 결합 전이는 장쇄 지방산 에스테르를 생성한다. 기타 다른 효소적 방법 및 화학적 방법은 지방산, 알데하이드, 알코올, 알칸 및 알켄을 생성하도록 변형될 수 있다. 몇몇 응용에 있어서는, 유전성 유체에 유용한 탄화수소 화합물이 제조된다.

[0037] 본 상세한 설명은 독자의 편의를 위해서 몇 가지 섹션으로 나누어진다. 섹션 I은 본원에 사용된 용어의 정의를 제공한다. 섹션 II는 본 발명의 방법에 관한 구체예에 유용한 배양 조건에 대한 설명을 제공한다. 섹션 III은 유전자 조작 방법과 이에 사용되는 재료에 대한 설명을 제공한다. 섹션 IV는 수크로스를 이용할 수 있는 미생물, 구체적인 예로서 미세 조류, 예를 들어 프로토타카의 유전자 조작에 대한 설명을 제공한다. 섹션 V는 지질 생합성을 개질하는 유전자 조작에 대한 설명을 제공한다. 섹션 VI은 본 발명의 구체예에 의한 미생물 오일의 제조 방법과 이 오일로부터 유래하는 생산물, 예를 들어 유전성 유체를 기술하고 있다. 섹션 VII은 본 발명의 다양한 구체예를 예시하는 예들을 기술하고 있다.

[0038] I. 정의

[0039] 달리 정의되지 않는다면, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 의미를 갖는다. 하기의 참조문헌은 본 발명에 사용되는 많은 용어의 일반적인 정의를 당업자에게 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 본원에 사용된 바와 같이, 하기의 용어는 달리 특정되지 않는다면 이들 본래의 의미를 갖는다.

- [0040] “미세 조류에서 활성(active in microalgae)”은 미세 조류에서 기능성인 핵산을 말한다. 예를 들어, 유전자 이식 미세 조류에 항생제 내성을 부여하는 항생제 내성 유전자를 구동하기 위해 사용된 프로모터는 미세 조류에서 활성이다.
- [0041] “아실기 운반 단백질” 또는 “ACP”는 4'-포스포판테테인 잔기의 원위 티올에서 티올 에스테르로서 지방산 합성 동안에 성장하는 아실 쇄와 결합하는 단백질이고 지방산 합성 효소 복합체의 성분을 포함한다.
- [0042] “아실-CoA 분자” 또는 “아실-CoA”는 조효소 A의 4'-포스포판테테인 잔기의 원위 티올에서 티올 에스테르 연결을 통해 조효소 A에 공유적으로 부착된 아실 잔기를 포함하는 분자이다.
- [0043] “항산화제”는 기타 다른 분자들의 산화를 억제할 수 있는 분자이다. 항산화제는 종종 산업 생산물에 첨가된다. 일반적인 용도로서는, 안정화제(연료의 경우), 산화를 막는 윤활제, 그리고 엔진을 막히게 만드는 잔류물을 생성시키는 중합을 막는 용도(가솔린의 경우)가 있다. 상기 항산화제는 또한 중합체, 예를 들어 고무, 플라스틱 및 접착제의 산화적 분해(이 산화적 분해는 상기 재료들의 강도와 가요성을 손상시킴)를 막는 데에 널리 사용된다.
- [0044] “가수 분해 방지 화합물”은 물과의 반응에 의해 화학 화합물의 분해를 억제하는 분자이다. 예를 들어 카보디이미드는 가수 분해 방지 화합물로서 사용될 수 있다. 가수 분해 방지 화합물은 다수의 공급체들 중에서도, 예를 들어 스페셜캠(SpecialChem)으로부터 시판된다.
- [0045] “마모 방지 첨가제”는, 부재의 마모 내구성과 스코어링 내구성을 높여주어 기계의 수명을 연장시키는, 유체(예를 들어 윤활 오일)에 대한 첨가제이다. 마모 방지 첨가제는, 오일 필름이 분해될 때 기계 부품들 간 금속 대 금속이 직접 접촉하는 것을 막아준다. 통상적으로, 상기 첨가제는 부품 표면에서 금속과 반응하여 막을 형성하는데, 이로써 부품이 마찰 표면 위를 매끄럽게 지나갈 수 있게 만든다. 마모 방지 첨가제는 통상적으로 아연 및 인 화합물을 함유한다. 마모 방지 첨가제의 예로서는 아연 디티오포스페이트(ZDP), 아연 디알킬 디티오포스페이트(ZDDP, 부식 억제제 및 항산화제로서의 기능도 가짐), 트리크레실 포스페이트(TCP, 고온 작동에 사용됨), 할로젠화 탄화수소(염소화 파라핀, 극압 작동의 경우), 글리세롤 모노-올리에이트, 스테아르산(150℃ 이하의 온도에서 가역적 흡착 공정을 통해 표면에 접촉되며, 중간 정도의 접촉 조건 하에서 유용함)을 포함한다.
- [0046] “면적 백분율”은 FAME GC/FID 검출 방법을 사용하여 관찰된 피크의 면적을 말하며, 상기 방법에서 샘플 내 모든 지방산은 검출 전에 지방산 메틸 에스테르(FAME)로 전환된다. 예를 들어, 분리 피크는 C14:1과 같은 임의의 기타 다른 지방산과 비교하여 불포화성(C14:0)을 갖지 않는 14개 탄소 원자의 지방산에 대해서 관찰된다. 각각의 부류의 FAME에 대한 피크 면적은 혼합물 내 이의 백분율 조성과 정비례하고 샘플 내 존재하는 모든 피크의 합계를 기준으로 계산된다(즉, [특정 피크하의 면적/모든 측정된 피크의 총 면적] X 100). 본원에 기술된 오일 및 세포의 지질(지방산) 프로파일은 말하는 경우, “4% 이상의 C8 내지 C14”는 세포 내 또는 추출된 글리세로지질 조성물 내의 총 지방산의 4% 이상이 탄소 원자 8개, 10개, 12개 또는 14개를 포함하는 사슬 길이를 가짐을 의미한다.
- [0047] “무균성”은 기타 다른 생존 유기체에 의해 오염되지 않은 유기체의 배양물을 말한다.
- [0048] “바이오디젤”은 디젤 엔진에서 연료로서 사용하기에 적당한 생물학적으로 생산된 지방산 알킬 에스테르이다.
- [0049] “바이오매스”는 세포의 성장 및/또는 번식에 의해 생산된 물질이다. 바이오매스는 세포에 의해 분비되는 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 세포의 물질뿐만 아니라 세포 및/또는 세포 내 내용물을 함유할 수 있다.
- [0050] “생물 반응기”는 임의로 현탁된 세포가 배양된 인클로저(enclosure) 또는 부분적 인클로저이다.
- [0051] 유전성 유체의 “파괴 전압(breakdown voltage)”은 유전성 유체가 자체의 절연 특성을 잃게 될 때의 전압이다.
- [0052] “촉매”는 생성물의 일부가 되지 않고 반응물의 생성물로의 화학적 반응을 용이하게 하거나 촉진시킬 수 있는 분자 또는 거대분자 복합체와 같은 제제이다. 촉매는 반응 속도를 증가시키고 이후 촉매는 또 다른 반응물에 작용하여 생성물을 형성시킬 수 있다. 촉매는 일반적으로 반응을 위해 요구되는 총 활성화 에너지를 저하시켜 반응이 보다 신속하게 또는 보다 저온에서 진행되도록 한다. 따라서, 반응 평형은 보다 신속하게 도달할 수 있다. 촉매의 예는 생물학적 촉매인 효소; 비생물학적 촉매인 열; 및 화석 오일 정유 공정에 사용되는 금속을 포함한다.
- [0053] “셀룰로스 물질”은 글루코스 및 자일로스, 및 이당류, 올리고당, 리그닌, 푸르푸랄 및 기타 화합물과 같은 임의의 추가의 화합물을 포함하는, 셀룰로스의 분해 생성물이다. 셀룰로스 물질의 공급원의 비제한적인 예는 사탕

수수 바가스, 사탕무 펄프, 옥수수 대, 목재 칩, 톱밥 및 스위치그래스(switchgrass)를 포함한다.

- [0054] “동시배양”, 및 이의 변형어구, 예를 들어 “공동 배양하다” 및 “공동 발효시키다”는 동일한 생물 반응기에 2가지 이상의 세포 유형을 배양함을 말한다. 2가지 이상의 세포 유형은 둘 다 미세 조류와 같은 미생물일 수 있거나 상이한 세포 유형과 함께 배양되는 미세 조류 세포일 수 있다. 상기 배양 조건은 2개 이상의 세포 유형의 성장 및/또는 증식을 조성하는 것들 또는 다른 나머지 세포 성장을 유지하면서 2개 이상의 세포중 하나 또는 서브세트의 성장 및/또는 증식을 촉진시키는 것들일 수 있다.
- [0055] “조인자”는 이의 효소 활성을 수행하는 효소에 대해 요구되는 기질 이외의 임의의 분자이다.
- [0056] “상보적 DNA” 또는 “cDNA”는 전령 RNA(mRNA)의 역전사 또는 증폭(예를 들어, 중합 효소 연쇄 반응(“PCR”)을 통한)에 의해 보통 수득되는 mRNA의 DNA 카피이다.
- [0057] “부식 억제제”는 유체에 첨가될 때 유체와 접촉하는 금속 또는 합금의 부식률을 감소시키는 분자이다.
- [0058] “배양된(cultivated)”, 및 이의 변형어, 예를 들어 “배양되는(cultured)” 및 “발효된”은 선택되고/선택되거나 제어된 조건의 사용에 의한 하나 이상의 세포의 생장의 의도적인 조성(세포 크기, 세포 함량 및/또는 세포 활성의 증가) 및/또는 번식(propagation)(유사분열을 통한 세포 수의 증가)을 말한다. 성장 및 번식 둘 다의 조합은 “증식(proliferation)”이라고 일컬어진다. 선택되고/선택되거나 제어된 조건의 예는 생물 반응기에서 규정된 배지(pH, 이온 강도 및 탄소원과 같은 공지된 특성을 가짐), 특정 온도, 산소분압, 이산화탄소 수준 및 생장의 사용을 포함한다. “배양된”은 자연에서 또는 다르게는 사람 간섭이 없는 미생물의 성장 또는 번식을 말하지 않고, 예를 들어 궁극적으로 화석화되어 지질학적 미정제 오일을 생성하는 유기체의 자연적인 생장은 배양이 아니다.
- [0059] “세포용해”는 저장성 환경내에서의 세포의 용해이다. 세포 용해는 과도한 삼투압, 또는 세포 내부를 향한 물의 이동(과수화)에 의해 유발된다. 상기 세포는 내부 물의 삼투압을 견딜 수 없어서 터진다.
- [0060] “탈지질화된 음식물” 및 “탈지질화된 미생물 바이오매스”는 오일(지질을 포함)이 기계적 추출(즉, 익스펠러 프레스에 의해 수행됨) 또는 용매 추출 또는 이 둘 다를 통해 이로부터 추출되거나 분리된 후의 미생물 바이오매스다. 탈지질화된 음식물은 미생물 바이오매스로부터 오일/지질의 추출 또는 분리 전과 비교하여 감소된 양의 오일/지질을 갖지만 일부 잔류하는 오일/지질을 함유한다.
- [0061] “항 유화제”는 유액(일반적으로는 액체-액체 유액)을 파괴하거나 유액이 형성되는 것을 방지하는 분자이다. 항 유화제는 통상적으로 다음과 같은 화학 물질들을 주성분으로 한다: 산 촉매화된 페놀-포름알데하이드 수지, 염기 촉매화된 페놀-포름알데하이드 수지, 폴리아민, 디-에폭시드, 폴리올. 이와 같은 분자들은 일반적으로 에톡시화(및/또는 프로폭시화)되어 물/오일 용해도를 원하는 정도로 만든다. 산화에틸렌을 첨가하면 수 용해도가 증가하는 반면에, 산화프로필렌을 첨가하면 수 용해도가 감소한다. 시판되고 있는 항 유화제 제제로서는, 통상적으로 캐리어 용매(들), 예를 들어 자일론, 중 방향성 나프타(Heavy Aromatic Naptha; HAN), 이소프로판올, 메탄올, 2-에틸헥사놀 또는 디젤 중 2개 내지 4개의 상이한 화학 물질들의 혼합물이 있다.
- [0062] “유전성” 또는 “유전성 유체”는 보통의 조건 하에서(또는 의도된 용도 조건 하에서) 전류를 전도하지 않거나, 전류의 전도도 수준이 매우 낮은 유체이다. 유전성 유체는, 예를 들어 변압기 및 기타 다른 전기 장치 내에서 전기 절연, 냉각 및 윤활에 사용된다. 유전성 유체를 이용하는 전기 장치로서는 전력 변압기와 배전 변압기, 회로 자동 차단기, 축전기, 개폐 장치, X선 기계 및 절연 케이블을 포함한다.
- [0063] 재료(예를 들어 절연체)의 “절연 강도”는 절연 파괴(즉 절연 특성의 상실)를 유도하는데 필요한 최대 전압으로서, 단위 두께당 볼트로 표시된다. 재료의 절연 강도는 표준 방법, 예를 들어 ASTM 테스트 방법 D1816, D877, D3300, D117, D2413, D6180, D6181 또는 D1310에 따라서 측정될 수 있다.
- [0064] “발현 벡터” 또는 “발현 구조물” 또는 “플라스미드” 또는 “재조합 DNA 구조물”은 숙주 세포에서 특정 핵산의 전사 및/또는 번역을 허용하는 일련의 특정 핵산 요소를 사용한 재조합 수단 또는 직접적인 화학적 합성에 의한 것을 포함하는, 사람 간섭을 통해 생성된 핵산을 언급한다. 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스 또는 핵산 단편의 일부일 수 있다. 통상적으로, 상기 발현 벡터는 프로모터에 작동적으로 연결되어 전사된 핵산을 포함한다.
- [0065] “외인성 유전자”는 세포로 도입된(“형질 전환된”) RNA 및/또는 단백질의 발현을 위해 이들을 암호화하는 핵산이며, 또한 “이식 유전자”라고도 지칭된다. 형질 전환된 세포는 추가의 외인성 유전자(들)가 도입될 수 있는 재조합 세포로서 언급될 수 있다. 상기 외인성 유전자는 형질 전환된 세포에 대해 상이한 중(및 따라서 이중

성) 또는 동일한 종(따라서 동종성)으로부터 유래한 것일 수 있다. 따라서, 외인성 유전자는 유전자의 내인성 복사체에 비해 세포의 계놈 내에서 상이한 위치를 차지하거나 상이한 제어 하에 있는 동종성 유전자를 포함할 수 있다. 외인성 유전자는 세포 내에서 하나 초과와 복사체에 존재할 수 있다. 외인성 유전자는 계놈(핵 또는 플라스미드) 내로의 삽입물로서 또는 에피솜 분자로서 세포 내에 유지될 수 있다.

[0066] “외인성으로 제공된”은 세포 배양의 배양 배지에 공급된 분자를 말한다.

[0067] “익스펠러 프레스”은 대두 및 평지씨와 같은 원료로부터 오일을 추출하는 기계적 방법이다. 익스펠러 프레스는 스크류형의 기계이고 케이지 배럴형 공극을 통해 물질을 압축시킨다. 원료는 프레스의 한 측면으로 들어가고 적용된 케이크는 다른 측면에서 빠져 나오며 오일은 케이지내 막대 사이에서 스며나오고 수거된다. 상기 기계는 원료를 움직이고 압축시키는 스크류 구동체로부터의 마찰 및 연속적인 가압을 사용한다. 상기 오일은 고체가 통과하지 못하도록 하는 작은 구멍을 통해 스며나온다. 원료가 압축됨으로써, 마찰은 통상적으로 이를 가열시킨다.

[0068] “지방산”은 지방족의 미부(사슬)가 긴 카복실산이다. 지방산의 지방족 부는 전체가 포화될 수 있거나(이중 결합(들)을 함유하지 않거나) 또는 분자의 하나 이상의 다양한 부들이 불포화될 수 있다. 자연적으로 생성된 지방산 대부분은 짝수 개(4개 내지 28개)의 탄소 원자로 이루어진 사슬을 가진다. 지방산은 트리글리세라이드 또는 기타 다른 지질, 예를 들어 인지질, 스펅고지질의 성분일 수 있다. 지방산은 “지질 수”에 의해 특징지어질 수 있다. 지질 수는 C:D의 형태를 가지는데, 여기서, C는 지방산 중 탄소 원자의 수이고, D는 지방산 중 이중 결합의 수이다. 그러므로, “C18:1”이란, 18개의 탄소와 1개의 이중 결합을 가지는 지방산을 말하며, “C18:2”란, 18개의 탄소와 2개의 이중 결합을 가지는 지방산을 말한다.

[0069] “지방 아실-ACP 티오에스테라제”는 지질 합성동안에 아실기 운반 단백질(ACP)로부터 지방산의 절단을 촉매하는 효소이다.

[0070] “지방 아실-CoA/알데하이드 환원 효소”는 아실-CoA 분자의 1급 알코올로의 환원을 촉매하는 효소이다.

[0071] “지방 아실-CoA 환원 효소”는 아실-CoA 분자의 알데하이드로의 환원을 촉매하는 효소이다.

[0072] “지방 알데하이드 탈카보닐화 효소”는 지방 알데하이드의 알칸으로의 전환을 촉매하는 효소이다.

[0073] “지방 알데하이드 환원 효소”는 알데하이드의 1급 알코올로의 환원을 촉매하는 효소이다.

[0074] 재료의 “발화점”은 개방 불꽃(open flame)에 의해 점화되었을 때 5초 이상 동안 계속해서 재료가 연소될 때의 온도이다. 발화점은 표준적 방법, 예를 들어 ASTM 테스트 방법 D92 또는 D1310에 의해 측정될 수 있다.

[0075] “인화점”은 재료가 기화되어 공기 중에서 점화 가능한 혼합물을 형성할 때의 최저 온도이다. 인화점에서, 재료는 점화될 수 있으나, 점화시 생성되는 증기는 연소를 지속하는데 충분한 비율로 생성될 수 없다. 인화점은 표준적인 방법, 예를 들어 ASTM 테스트 방법 D3278, D3828, D56 또는 D93에 의해 측정될 수 있다.

[0076] “고정 탄소원”은 본원에서 배양된 미생물에 의해 사용될 수 있는 배양 배지 내 고체 또는 액체 형태로 주위 온도 및 압력에서 존재하는 탄소를 함유하는 분자(들), 통상적으로 유기 분자이다.

[0077] 배양 조건과 관련하여 “중속 영양”은, 고정 탄소 공급원을 이용하거나 대사하면서 실질적으로 빛이 없는 조건 하에 배양되는 경우를 말한다.

[0078] “파쇄액”은 물리적으로 파괴된 바이오매스다.

[0079] “유압유”는 유압 장치에서 송전 매질로서 작동하는 유체이다.

[0080] “탄화수소”는 수소 및 탄소 원자만을 함유하는 분자이고, 여기서, 탄소 원자는 공유 결합되어 선형, 분지형, 환형 또는 부분적인 환형 골격을 형성하고 상기 골격에는 수소 원자가 부착되어 있다. 탄화수소 화합물의 분자 구조는 천연 가스 성분인 메탄(CH_4) 형태의 가장 단순한 형태에서 매우 무겁고 복잡한, 예를 들어 원유, 석유 및 역청에서 발견되는 아스팔텐과 같은 몇몇 분자까지 다양하다. 탄화수소는 가스, 액체 또는 고체 형태, 또는 이들의 조합된 형태일 수 있고 골격내 인접한 탄소 원자간에 하나 이상의 이중 결합 또는 삼중 결합을 가질 수 있다. 따라서, 당해 용어는 선형, 분지형, 환형 또는 부분적인 환형 알칸, 알켄, 지질 및 파라핀을 포함한다. 이의 예는 프로판, 부탄, 펜탄, 헥산, 옥탄, 및 스쿠알렌을 포함한다.

[0081] “수소:탄소 비율”은 원자 대 원자를 기준으로 분자 내 수소 원자 대 탄소 원자의 비율이다. 상기 비율은 탄화수소 분자 내 탄소 원자 및 수소 원자의 수를 말하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 최고 비율의 탄화수소는 메

탄 $\text{CH}_4(4:1)$ 이다.

- [0082] “소수성 분획”은 수성상과 비교하여 소수성상에서 보다 가용성인 물질의 일부 또는 분획이다. 소수성 분획은 실질적으로 물에 불용성이고 통상적으로 비극성이다.
- [0083] “지질 수율을 증가시킨다”는 예를 들어, 배양 리터당 세포의 건조 중량을 증가시키거나 지질로 구성된 세포의 %를 증가시키거나 단위 시간당 배양 용적 리터당 지질의 전체 양을 증가시킴에 의한 미생물 배양의 지질 생산성의 증가를 언급한다.
- [0084] “유도성 프로모터”는 특정 자극에 응답하여 작동적으로 연결된 유전자의 전사를 매개하는 프로모터이다.
- [0085] “산업용 오일”은 산업에서 유용한 오일이다. 일반적인 산업용 오일은 체인톱 바에 사용되는 윤활제, 금속 가공 유체, 식품용 윤활제, 기어 오일, 해양유, 엔진 윤활제, 트랙터 오일, 농업 장비용 윤활제, 엘리베이터 오일 및 이형 오일등을 포함한다. “체인톱 바 윤활제”는 체인톱의 바와 체인의 외부 윤활에 사용된다. “금속 가공 유체”는 금속 조각을 유용한 물품으로 성형하는 공정을 윤활시키고/윤활시키거나 이 공정의 온도를 낮추는데 사용되는 유체이다. “식품용 윤활제”는 육류, 가공류 및 기타 다른 식품 가공 장치, 식품 가공 분야 및 공장 설비에 사용될 수 있는 윤활제이다. “기어 오일”은, 예를 들어 변속 장치, 이동 수단, 그리고 자동차, 트럭 및 기타 다른 기계의 차동 장치에 있어서 기어를 윤활하는데 유용한 오일이다. “해양유”는 해양 장비의 가동부를 윤활하는데 유용한 오일이다. “엔진 윤활제”는 다양한 내연기관을 윤활하는데 사용된다. 주요 기능은 가동부를 윤활하는 것이며, 엔진 윤활제는 또한 엔진을 세정하고, 이 엔진의 부식을 억제하며, 밀폐 상태를 개선하고, 가동부로부터 멀리 떨어진 곳으로 열을 운반함으로써 엔진을 냉각할 수도 있다. “트랙터 오일”은 트랙터에 존재하는 가동부를 윤활하는데 유용한 오일이다. “농업 장비용 윤활제”는 농업 장비의 가동부를 윤활하는데 유용한 윤활제이다. “엘리베이터 오일”은 유압 엘리베이터에서 유압유로서 사용되는 오일이다. “이형 오일”은 성형틀을 사용하여 성형된 물품을 제조함에 있어서 유용한 오일이다. 이형 오일은 성형된 물품이 성형틀로부터 이형되는 것을 촉진하는 것으로서, 요망되는 표면 피니쉬를 제공하는 표면 컨디셔닝 특징(surface conditioning characteristic)을 가질 수 있다.
- [0086] “작동 가능한 연결”은 2개의 핵산 서열, 예를 들어 제어 서열(통상적으로 프로모터)과 연결된 서열(통상적으로 단백질을 암호화하는 서열, 또는 암호화 서열이라고 불림) 간의 기능적 연결이다. 프로모터는 이것이 유전자의 전사를 매개할 수 있다면 외인성 유전자와 작동가능하게 연결되어 있다.
- [0087] “동일계”는 “원위치” 또는 “본래의 위치”를 의미한다.
- [0088] “요오드가” (또는 “요오드 수”)는 오일의 불포화 정도에 대한 척도이다. 즉 오일 중 불포화 결합에 의해 소모되는 요오드의 질량이다. 예를 들어 요오드가가 50인 오일은 오일 100g이 요오드 50g을 소모하게 될 오일이다. 요오드가는 당업계에서 통상적인 방법으로 측정된다. 요오드가를 측정하는 표준적 방법은 ASTM D5768-02(2006) 및 DIN 53241을 포함한다.
- [0089] “영양물의 제한 농도”는 배양된 유기체의 번식을 제한하는 배양물내 화합물의 농도이다. “영양물의 비제한 농도”는 소정의 배양 기간 동안에 최대 번식을 지지하는 농도이다. 따라서, 소정의 배양 기간 동안에 생성되는 세포의 수는 영양물이 비제한적인 경우 보다 영양물의 제한 농도의 존재 하에 보다 낮다. 영양물은 영양물이 최대 번식을 지지하는 것 보다 큰 농도로 존재하는 경우 배양물에 과량인 것으로 언급된다.
- [0090] “리파제”는 수불용성 지질 기질에서 에스테르 결합의 가수 분해를 촉매하는 수용성 효소이다. 리파제는 지질의 글리세롤 및 지방산으로의 가수 분해를 촉매한다.
- [0091] “지질 변경 효소”란, 지질의 공유 결합 구조를 변경하는 효소를 말한다. 지질 변경 효소의 예로서는 리파제, 지방 아실-ACP 티오에스테라제, 불포화 효소, 예를 들어 스테아로일 아실기 운반 단백질 불포화 효소(SAD) 및 지방 아실 불포화 효소(FAD), 그리고 지방 알데하이드 탈카보닐화 효소를 포함한다.
- [0092] “지질 경로 효소”는 지질 대사, 즉 지질 합성, 변형 또는 분해에 역할을 하는 임의의 효소 및 운반 단백질뿐만 아니라 지질을 화학적으로 변형시키는 임의의 단백질이다.
- [0093] “지질” 또는 “지질들”은 비극성 용매(예를 들어, 에테르 및 클로로포름)에 가용성이고 물에 상대적으로 또는 완전히 불용성인 부류의 분자이다. 지질 분자는 이들이 주로 자연적으로 소수성인 장쇄의 탄화수소 꼬리로 이루어지기 때문에 상기 성질을 갖는다. 지질의 예는 지방산(포화 및 불포화); 글리세라이드 또는 글리세로지질(예를 들어, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 트리글리세라이드 또는 중성 지방 및 포스포글리세라이드 또는

글리세로인지질); 비글리세라이드지질(nonglyceride)(스핑고지질, 스테롤 지질(콜레스테롤 및 스테로이드 호르몬 포함), 프레놀 지질(테페노이드 포함), 지방 알코올, 왁스 및 폴리케타이드); 및 복합 지질 유도체(당-연결된 지질 또는 당지질 및 단백질 연결된 지질)을 포함한다. “지방”은 소위 “트리아실글리세라이드”인 지질의 서브그룹이다.

- [0094] “유허제”는 고체 표면들 간에 막으로서 도포될 때 마찰, 열 및/또는 마모를 감소시킬 수 있는 물질이다.
- [0095] “용해물”은 용해된 세포의 내용물을 함유하는 용액이다.
- [0096] “용해(lysing 또는 lysis)”는 적어도 일부 세포 내 내용물을 방출시키기에 충분한 생물학적 유기체 또는 세포의 세포막 및 임의로 세포벽을 파괴시키는 것이다.
- [0097] “금속 불활성화제” 또는 “금속 불활성화 제제(MDA)”라고도 알려져있는 “금속 이온 불활성화제”는 금속 이온을 불활성화(일반적으로는 격리)함으로써 유체를 안정화하는데 사용되는 연료 및/또는 오일 첨가제이다. 금속 이온은, 연료 중 천연 생성 산과, 시스템 중 금속부와의 산화 과정을 통해서 유허제 중에 생성된 산의 작용에 의해 생성될 수 있다.
- [0098] “미세 조류”는 엽록체 또는 색소체를 함유하고 임의로 광합성을 수행할 수 있는 진핵 미생물 유기체, 또는 광합성을 수행할 수 있는 원핵 미생물 유기체이다. 미세 조류는 고정 탄소원으로부터 유일하게 생존할 수 있는 종속 영양 생물뿐만 아니라 에너지로서 고정 탄소원을 대사시킬 수 없는 절대 광합성 독립 영양 생물을 포함한다. 미세 조류는 2개의 독특한 세포 유형의 단순한 다중세포 광합성 미생물인, 예를 들어 볼복스(*Volvox*)와 같은 미생물뿐만 아니라 세포 분열 후 단시간에 자매 세포로부터 분리되는 단일 세포 유기체, 예를 들어 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)를 포함한다. 미세 조류는 클로렐라, 두날리엘라(*Dunaliella*), 및 프로토테카와 같은 세포를 포함한다. 미세 조류는 또한 아그메넬룸(*Agmenellum*), 아나바에나(*Anabaena*), 및 피로보트리스(*Pyrobotrys*)와 같은 세포-세포 접촉을 나타내는 기타 다른 미생물 광합성 유기체를 포함한다. “미세 조류”는 또한 특정 디노플라겔레이트 조류 종 및 프로토테카 속의 종과 같은 광합성을 수행하는 능력을 상실한 절대 종속 영양 미생물을 말한다.
- [0099] “미생물(microorganism)” 및 “미생물(microbe)”은 현미경적 단일 세포 유기체이다.
- [0100] 2개의 단백질 또는 유전자와 관련하여 “자연적으로 공동 발현된”은 단백질 또는 이들의 유전자가 이들이 유래된 조직 또는 유기체에서 자연적으로 공동 발현됨을 의미하며, 이는 예를 들어 2개의 단백질을 암호화하는 유전자가 공동된 조절 서열의 제어 하에 있기 때문이거나 이들이 동일한 자극에 응답하여 발현되기 때문이다.
- [0101] “오일”이란, 유기체, 예를 들어 유지성 효모, 식물 및/또는 동물에 의해 생산된 임의의 트리아실글리세라이드 오일을 말한다. “오일”이란, 달리 특정되지 않는 한, 일반적으로 통상의 실온과 압력에서 액체인(항상 그런 것은 아님) 지질을 말한다(“지방”과 구별). 예를 들어 “오일”은 식물성 오일 또는 식물로부터 유래하는 종자 오일, 예를 들어 아보카도, 브라질 너트, 금잔화, 카멜리나, 카멜리나 사티바, 카놀라, 캐슈넛, 아주까리씨, 코코아 버터(카카오라고도 알려져 있으며, 통상적으로 실온과 압력에서 고체인 카카오콩 유래 트리아실글리세라이드 오일임), 코코넛, 커피, 코프라, 고수, 옥수수, 목화씨, 쿠페아, 등대풀, 헤이즐넛, 대마, 자트로파, 호호바, 양마, 아마씨, 루핀, 마카다미아, 겨자씨, 귀리, 올리브, 양귀비, 팜, 팜핵, 땅콩, 피칸, 호박씨, 핑지씨, 벼, 홍화, 참깨, 대두, 해바라기 및 유동 나무, 그리고 이것들의 조합(이에 한정되는 것은 아님)으로부터 유래하는 오일을 포함한다. “미생물 오일”이란, 미생물로부터 유래하는 오일을 말한다.
- [0102] “유지성 효모”는, 자연적으로 이 효모의 건조 세포 중량의 20% 이상을 지질로서 축적할 수 있는 효모로서, 진균의 디카리아(*Dikarya*) 아계에 속하는 것이다. 유지성 효모로서는 유기체, 예를 들어 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*), 크립토코커스 커바투스(*Cryptococcus curvatus*) 및 리포마이세스 스타케이(*Lipomyces starkeyi*)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0103] “삼투압 쇼크”는 삼투압의 급작스런 감소 후 용액 내 세포의 파열이다. 삼투압 쇼크는 때때로 상기 세포의 세포 성분을 용액 내로 방출하도록 유도된다.
- [0104] “다당류 분해 효소”는 임의의 다당류의 가수 분해 또는 당화를 촉매할 수 있는 임의의 효소이다. 예를 들어, 셀룰라제는 셀룰로스의 가수 분해를 촉매한다.
- [0105] “다당류” 또는 “글리칸”은 글리코시드 결합에 의해 서로 함께 연결된 단당류로 구성된 탄수화물이다. 셀룰로스는 특정 식물 세포 벽을 구성하는 다당류다. 셀룰로스는 보다 큰 이당류 및 올리고당뿐만 아니라 자일로스

및 글루코스와 같은 당당류를 생성하도록 효소에 의해 해중합될 수 있다.

- [0106] “유동점”은, 액체가 특별히 설정된 조건 하에서 유동성을 가지거나 흐르게 될 때의 최저 온도이다. 예시적인 유동점 표준으로서는 ASTM D97-11, D5853-11 및 D5949-10을 포함하며, 기타 다른 당업자에게 알려져 있거나 당업자에 의해 개발된 표준도 본원에 기술된 방법을 이용하여 유동점을 측정하는데 적용될 수도 있다.
- [0107] “유동점 강하제” 또는 “PPD”는, 오일이나 윤활제 중에 왁스 결정이 생성되는 것을 억제하여, 유동점을 낮추고 저온 흐름 성능을 개선하는 중합체이다.
- [0108] “프로모터”는 핵산의 전사를 지시하는 핵산 제어 서열이다. 본원에 사용된 바와 같이, 프로모터는 전사 개시 부위 근처에 필수 핵산 서열, 예를 들어 중합 효소 II형 프로모터의 경우에, TATA 요소를 포함한다. 프로모터는 또한 임의로 전사 개시 부위로부터 수천 염기쌍 정도로 멀리 위치할 수 있는 원거리 인핸서 또는 리프레서 요소를 포함한다.
- [0109] “재조합체”는 외인성 핵산의 도입 또는 고유 핵산의 변경으로 인해 변형된 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터를 말한다. 따라서, 예를 들어 재조합 세포는 천연(비재조합체) 형태의 세포 내에서 발견되지 않는 유전자를 발현할 수 있거나 비재조합 세포에 의해 발현되는 유전자와는 상이하게 천연 유전자를 발현한다. “재조합 핵산”은 예를 들어, 중합 효소 및 엔도뉴클레아제를 사용하는 핵산의 조작에 의해 일반적으로 시험관내 형성된 본래의 핵산이거나, 다르게는 통상적으로 자연적으로 발견되지 않는 형태로 존재한다. 재조합 핵산은, 예를 들어 2개 이상의 핵산을 작동가능하게 연결시키도록 하여 생성될 수 있다. 따라서, 통상적으로 자연적으로 연결되어 있지 않은 DNA 분자를 연결함에 의해 시험관내 형성된 분리된 핵산 또는 발현 벡터는 둘 다 재조합체인 것으로 고려된다. 일단 재조합 핵산이 제조되고 숙주 세포 또는 유기체로 도입되면, 이것은 숙주 세포의 생체내 세포 기구를 사용하여 복제할 수 있지만, 일단 재조합적으로 생성되면 당해 핵산은 후속적으로 세포 내에서 복제된다 하더라도 여전히 재조합체인 것으로 고려된다. 유사하게, “재조합 단백질”은, 즉 재조합 핵산의 발현을 통해 재조합 기술을 사용하여 제조된 단백질이다.
- [0110] “RBD 오일”은 정제, 표백 또는 탈취된 오일이다.
- [0111] “재생 디젤”은 지질의 수소화 및 탈산소화를 통해 천연 오일로부터 생성된 알칸(예를 들어, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 및 C 18:0)의 혼합물이다.
- [0112] “당화”는 바이오매스, 통상적으로 셀룰로스 또는 리그노셀룰로스 바이오매스를 글루코스 및 자일로스와 같은 단량체성 당으로 전환시키는 공정이다. “당화된” 또는 “해중합된” 셀룰로스 물질 또는 바이오매스는 당화를 통해 단량체 당으로 전환되는 셀룰로스 물질 또는 바이오매스를 말한다.
- [0113] “초음파 처리”는 초음파 에너지를 사용하여 세포와 같은 생물학적 물질을 파괴시키는 공정이다.
- [0114] “푸르푸랄 중”은 동일한 염기성 구조 특징을 보유한 2-푸란카복스알데하이드 또는 유도체이다.
- [0115] “스토버”는 낱알이 수거된 후 잔류하는 작물의 무수 줄기 및 잎이다.
- [0116] “수크로스 이용 유전자”는 발현되는 경우 에너지원으로서 수크로스를 이용하는 세포의 능력을 도와주는 유전자이다. 수크로스 이용 유전자에 의해 암호화된 단백질은 본원에서 “수크로스 이용 효소”로 지칭되고 수크로스 수송체, 수크로스 인버타제, 및 글루코키나제 및 프럭토키나제와 같은 핵소키나제를 포함한다.
- [0117] “변압기”는 유도적으로 커플링된 도체, 통상적으로 변압기의 코일을 통해 하나의 회로에서 다른 회로로 전기 에너지를 운반하는 장치이다.
- [0118] “윈터리제이션” 오일 또는 “오일의 윈터리제이션”이란 용어는, 오일로부터 고 용융점 성분들을 제거하는 단계 및/또는 하나 이상의 유동점 강하제(들)를 첨가하는 단계를 포함하는 공정을 말한다.
- [0119] **II. 배양 및 배양 조건**
- [0120] 임의의 구체예에서, 본 발명은 일반적으로 미생물 오일(지질)을 생산하기 위해서 유지성 미생물, 예를 들어 야생형 및 재조합 미세 조류, 예를 들어 클로렐라 및 프로토테카 종과 균주, 그리고 효모, 진균 및 박테리아 종 및 균주를 배양하는 것에 관한 것이다. 독자의 편의를 위하여, 본 섹션은 서브섹션들로 구분된다. 서브섹션 1에는 프로토테카 종과 균주, 그리고 신규 프로토테카 종 및 균주, 그리고 관련 미세 조류, 그리고 본원에 기술된 방법에 유용한 기타 다른 미세 조류, 효모, 진균 및 박테리아를 계놈 DNA 비교에 의해 확인하는 방법이 기술되어 있다. 서브섹션 2에는 배양에 유용한 생물 반응기가 기술되어 있다. 서브섹션 3에는 배양용 배지가 기술되어

있다. 서브섹션 4에는 본원에 기술된 예시적 배양 방법에 따른 오일(지질) 생산이 기술되어 있다. 서브섹션 5에는 본원에 기술된 방법에 사용하기 적당한 유지성 효모의 종류, 효모 바이오매스를 제조하기 위한 배양 조건, 그리고 본원에 기술된 예시적인 방법에 따라서 제조된 바이오매스의 지질 프로필과 화학 조성이 기술되어 있다.

[0121] **1. 프로토테카 종 및 균주와 기타 다른 유지성 미생물**

[0122] 프로토테카는, 지질, 특히 유전성 유체와 기타 다른 윤활제 생산에 적당한 지질을 높은 수준으로 생산할 수 있으므로, 지질 생산에 사용되는 주목할 만한 미생물이다. 프로토테카에 의해 생성되는 지질의 포화도는, 기타 다른 미세 조류에 의해 생성되는 지질의 포화도보다 크다. 뿐만 아니라, 프로토테카 지질은 일반적으로 색소를 함유하지 않으며(즉 엽록소 및 임의의 카로티노이드를 낮은 수준 내지 검출 불가능한 수준으로 함유하며), 임의의 경우에는 기타 다른 미세 조류로부터 생산되는 지질에 함유된 색소보다 훨씬 적은 양의 색소를 함유한다. 뿐만 아니라, 본원에 기술된 방법에 사용하기 위해 제공된 재조합 프로토테카 세포는, 기타 다른 미생물로부터 지질을 생산하는 경우보다 더욱 많은 양과 높은 효율로, 그리고 낮은 비용으로 지질을 생산하는데 사용될 수 있다. 본원에 기술된 방법에 사용되는 예시적 프로토테카 종 및 균주로서는, 프로토테카 위커해미(*Prototheca wickerhamii*), 프로토테카 스태그노라(*Prototheca stagnora*)(UTEX 327 포함), 프로토테카 포르토리센시스(*Prototheca portoricensis*), 프로토테카 모리포르미스(UTEX 균주 1441, 1435 포함), 그리고 프로토테카 조프피(*Prototheca zopfii*)를 포함한다. 프로토테카 속에 속하는 종들은 절대 종속 영양 생물이다.

[0123] 본원에 기술된 방법에 사용하기 위한 프로토테카 종은 계놈의 특정 표적 영역의 증폭에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 특정 프로토테카 종 또는 균주의 확인은 프라이머 및 계놈의 임의의 영역을 사용하는 방법, 예를 들어 문헌[Wu et al., Bot. Bull. Acad. Sin. (2001) 42: 115-121 Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences]에 기재된 방법을 사용하여 핵 및/또는 엽록체 DNA의 증폭 및 서열분석을 통해 성취할 수 있다. 리보솜 내부 전사된 스페이서(ITS1 및 ITS2 rDNA), 23S rRNA, 18S rRNA, 및 기타 보존된 계놈 영역의 증폭 및 서열분석과 같은 계통발생적 분석에 대해 널리 확립된 방법은 당업자에 의해 사용되어 프로토테카의 종뿐만 아니라 유사한 지질 프로필 및 생산 능력을 갖는 다른 탄화수소 및 지질 생산 미생물 종을 확인할 수 있다. 조류의 확인 및 분류 방법에 대한 예는 또한 문헌[Genetics, 2005 Aug;170(4): 1601-10] 및 [RNA, 2005 Apr;11(4):361-4]을 참조한다.

[0124] 따라서, 계놈 DNA 비교를 사용하여 본원에 기술된 방법에서 사용되는 미세 조류의 적합한 종을 확인할 수 있다. 23S rRNA를 암호화하는 DNA(이에 제한되지 않음)와 같은 보존된 계놈 DNA의 영역은 미세 조류 종으로부터 증폭시키고 공통 서열과 비교하여 본원에 기술된 방법에서 사용되는 바람직한 미세 조류와 분류학적으로 관련된 미세 조류 종을 스크리닝할 수 있다. 프로토테카 속 내의 종에 대한 상기 DNA 서열 비교의 예는 하기에 나타낸다. 계놈 DNA 비교는 또한 균주 수거에서 잘못 확인된 미생물 종을 확인하는 데 유용할 수 있다. 흔히 균주 수거는 표현형 및 형태적 특성에 기반하여 미세 조류 종을 확인한다. 이들 특성의 사용은 미세 조류의 종 또는 속의 잘못된 분류를 유도할 수 있다. 계놈 DNA 비교를 사용하는 것이 이들의 계통발생 관계를 기준으로 미세 조류 종을 분류하는데 보다 우수한 방법일 수 있다.

[0125] 본원에 기술된 방법에서 사용하기 위한 예시적인 미세 조류는 통상적으로 서열번호 11 내지 서열번호 19에 열거된 서열중 하나 이상과 99%, 95%, 90%, 또는 85% 이상의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 23S rRNA를 암호화하는 계놈 DNA 서열을 갖는다.

[0126] 뉴클레오타이드 백분율 또는 아미노산 동일성을 결정하기 위한 서열 비교를 위해, 통상적으로 하나의 서열이 참조 서열로서 작용하고 이것과 시험 서열을 비교한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 시험 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고 필요하다면 세부서열의 좌표를 지정하고 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 이어서 서열 비교 알고리즘을 사용하여, 지정된 프로그램 파라미터를 기준으로 참조 서열에 대한 시험 서열(들)의 서열 동일성의 백분율을 계산한다.

[0127] 비교용 서열의 최적의 정렬은 예를 들어, 문헌[Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘, 문헌[Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘, 문헌[Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)]의 유사성 검색 방법, 당해 알고리즘의 컴퓨터에 의한 수행(Wisconsin Genetics Software Package(Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA), 또는 육안 검사(일반적으로 상기한 문헌[Ausubel et al.])에 의해 수행될 수 있다.

[0128] 서열 동일성 백분율 및 서열 유사성을 결정하기 위해 적합한 알고리즘의 또 다른 예로는 문헌[Altschul et al.,

J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]에 기재된 BLAST 알고리즘이 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information(웹 주소: www.ncbi.nlm.nih.gov)을 통해 공개적으로 이용 가능하다. 상기 알고리즘은 먼저 탐색 서열에서 길이 W의 단어를 확인하여 높은 점수의 서열쌍(HSP)를 확인함을 포함하고, 이는 데이터베이스 서열중에 동일한 길이의 단어와 정렬되는 경우 몇몇 양성값의 역치 점수 T와 일치하거나 이를 충족한다. T는 이웃 단어 점수 역치로서 언급된다(상기한 문헌 [Altschul *et al.*]). 이들 초기 이웃 단어 히트는 이들을 함유하는 보다 긴 HSP를 발견하기 위한 검색을 개시하기 위한 근원으로서 작용한다. 이어서, 누적 정렬 점수가 증가될 수 있는 한 각각의 서열을 따라 양방향으로 단어 히트를 확장시킨다. 누적 점수는 뉴클레오티드 서열에 대해 파라미터 M(일치하는 잔기쌍에 대한 보상 점수: 항상 > 0임) 및 N(불일치 잔기에 대한 페널티 점수: 항상 < 0)을 사용하여 계산한다. 아미노산 서열의 경우, 스코어링 매트릭스를 사용하여 누적 점수를 계산한다. 각각의 방향에서의 단어 히트의 확장은 다음의 경우에 중지한다: 누적 정렬 점수가 이의 최대 성취 값으로부터 X 양만큼 이탈하는 경우; 누적 점수가 하나 이상의 음성 스코어링 잔기 정렬의 누적으로 인해 0 이하로 되는 경우; 또는 서열의 말단에 도달하는 경우. 핵산 또는 폴리펩티드가 본 발명의 범위내에 있는지의 여부를 확인하기 위해, BLAST 프로그램의 디폴트(default) 파라미터가 적합하다. BLASTN 프로그램(뉴클레오티드 서열용)은 11의 단어 길이(W), 10의 예상치(E), M=5, N=-4, 및 양쪽 서열가닥의 비교를 디폴트로서 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 3의 단어 길이(W), 10의 예상치(E) 및 BLOSUM62 스코어링 매트릭스를 디폴트로서 사용한다. TBLASTN 프로그램(뉴클레오티드 서열용 단백질 서열을 사용함)은 3의 단어 길이(W), 10의 예상치(E) 및 BLOSUM 62 스코어링 매트릭스를 디폴트로서 사용한다(문헌 [Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)] 참조).

[0129] 서열 동일성 백분율을 계산하는 것뿐만 아니라, BLAST 알고리즘은 또한 2개의 서열간의 유사성에 대한 통계학적 분석을 수행한다(예를 들어, 문헌[Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877 (1993)] 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공된 한가지의 유사성 척도는 최소 합계 가능성(P(N))이고 이는 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열간의 일치가 우연히 발생할 가능성을 나타낸다. 예를 들어, 표준 핵산과 시험 핵산의 비교에 있어서 최소 합계 가능성이 약 0.1 미만, 보다 바람직하게는 약 0.01 미만 및 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우, 핵산은 참조 서열과 유사한 것으로 간주된다.

[0130] 본원에 기술된 방법에는 프로토타카 이외에도 다양한 유지성 미생물이 사용될 수 있다. 예를 들어 클로렐라, 예를 들어 클로렐라의 프로토타코이데스 종(이에 한정되는 것은 아님)은 본원에 기술된 방법에 사용되는 우수한 미세 조류이다. 오일, 연료 및 함유 화학 제품을 생산하는데 적당한 지질 또는 탄화수소를 생산하는 것 이외에도, 본원에 기술된 방법에 사용될 미생물을 선택함에 있어서 영향을 미치는 고려 사항들로서는 다음과 같은 것들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (1) 고 지질 함량(세포 중량 백분율로 표시); (2) 생장의 용이성; (3) 유전자 조작의 용이성; 및 (4) 바이오매스 처리의 용이성. 특정 구체예에서, 야생형 또는 유전자 조작된 미생물은 미생물 오일(즉 지질 및 지방산)의 함유율이 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상 또는 70% 이상인 세포를 생산한다. 바람직한 유기체는 (빛이 실질적으로 존재하지 않는 조건 하에서 당을 기반으로) 종속 영양 성장을 한다(종속 영양 성장을 하게 된다). 미세 조류는 일반적으로 본원에 기술된 방법에 사용하기에 아주 적당한 미생물이다. 본 발명의 방법을 수행하는데 사용될 수 있는 미세 조류의 예로서는 이하 표 1에 나열된 조류를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

표 1

[0131]

조류의 예

아크난테스 오리엔탈리스(*Achnanthes orientalis*), 아그메넬룸(*Agmenellum*), 암피프로라
히알린(*Amphiprora hyaline*), 암포라 코페이포르미스(*Amphora coffeiformis*), 암포라 코페이포르미스
리니아(*Amphora coffeiformis linea*), 암포라 코페이포르미스 평타타(*Amphora coffeiformis
punctata*), 암포라 코페이포르미스 타일로리(*Amphora coffeiformis taylori*), 암포라 코페이포르미스
테뉴이스(*Amphora coffeiformis tenuis*), 암포라 델리카티시마(*Amphora delicatissima*), 암포라 델리
카티시마 카피타타(*Amphora delicatissima capitata*), 암포라 종(*Amphora sp.*),
아나바에나(*Anabaena*), 안키스트로데스무스(*Ankistrodesmus*), 안키스트로데스무스
팔카투스(*Ankistrodesmus falcatus*), 보에켈로비아 후글란디(*Boekelovia hooglandii*), 보로디넬라
종(*Borodinella sp.*), 보트리오크커스 브라우니(*Botryococcus braunii*), 보트리오크커스
수데티쿠스(*Botryococcus sudeticus*), 카르테리아(*Carteria*), 카에토세로스 그라실리스(*Chaetoceros
gracilis*), 카에토세로스 무엘러리(*Chaetoceros muelleri*), 카에토세로스 무엘러리
서브살섬(*Chaetoceros muelleri subsalsum*), 카에토세로스 종(*Chaetoceros sp.*), 클로렐라 아니트라
타(*Chlorella anitrata*), 클로렐라 안타르크티카(*Chlorella Antarctica*), 클로렐라
아우레오비리디스(*Chlorella aureoviridis*), 클로렐라 칸디다(*Chlorella candida*), 클로렐라
캡슐라테(*Chlorella capsulate*), 클로렐라 데시카테(*Chlorella desiccate*), 클로렐라
엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 에머소니(*Chlorella emersonii*), 클로렐라
푸스카(*Chlorella fusca*), 클로렐라 푸스카 변종 바큐올라타(*Chlorella fusca var. vacuolata*), 클로
렐라 글루코트로파(*Chlorella glucotropha*), 클로렐라 인퓨시오눔(*Chlorella infusionum*), 클로렐라
인퓨시오눔 변종 악토펴라(*Chlorella infusionum var. actophila*), 클로렐라 인퓨시오눔 변종 옥세노
필라(*Chlorella infusionum var. auxenophila*), 클로렐라 케슬러리(*Chlorella kessleri*), 클로렐라
로보포라(*Chlorella lobophora*)(균주 SAG 37.88), 클로렐라 루테오비리디스(*Chlorella
luteoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 변종 아우레오비리디스(*Chlorella luteoviridis var.
aureoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 변종 루테센스(*Chlorella luteoviridis var. lutescens*),
클로렐라 미니아타(*Chlorella miniata*), 클로렐라 미뉴티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 뮤타
빌리스(*Chlorella mutabilis*), 클로렐라 녹터나(*Chlorella nocturna*), 클로렐라 파르바(*Chlorella
parva*), 클로렐라 포토필리아(*Chlorella photophila*), 클로렐라 프링스헤이미(*Chlorella
pringsheimii*), 클로렐라 프로토테코이데스(*Chlorella protothecoides*)(UTEX 균주 1806, 411, 264,
256, 255, 250, 249, 31, 29, 25, 및CCAP 균주 211/17 및 211/8d 중 임의의 것 포함), 클로렐라 프로
토테코이데스 변종 아시디콜라(*Chlorella protothecoides var. acidicola*), 클로렐라
레귤라리스(*Chlorella regularis*), 클로렐라 레귤라리스 변종 미니마(*Chlorella regularis var.
minima*), 클로렐라 레귤라리스 변종 움브리카타(*Chlorella regularis var. umbricata*), 클로렐라 레이
시글리(*Chlorella reisiigii*), 클로렐라 사카로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 사카로필라
변종 엘립소이데아(*Chlorella saccharophila var. ellipsoidea*), 클로렐라 살리나(*Chlorella
salina*), 클로렐라 심플렉스(*Chlorella simplex*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*),

클로렐라 종(*Chlorella* sp.), 클로렐라 스파에리카(*Chlorella sphaerica*), 클로렐라 스티그마토포라(*Chlorella stigmatophora*), 클로렐라 바니엘리(*Chlorella vanniellii*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 불가리스, 클로렐라 불가리스 에프. 테르티아(*Chlorella vulgaris f. tertia*), 클로렐라 불가리스 변종 오토트로피카(*Chlorella vulgaris var. autotrophica*), 클로렐라 불가리스 변종 비리디스(*Chlorella vulgaris var. viridis*), 클로렐라 불가리스 변종 불가리스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris*), 클로렐라 불가리스 에프. 테르티아(*Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia*), 클로렐라 불가리스 변종 불가리스 에프. 비리디스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis*), 클로렐라 잔텔라(*Chlorella xanthella*), 클로렐라 조핀지엔시스(*Chlorella zofingiensis*), 클로렐라 트레복시오이데스(*Chlorella trebouxioides*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로로코쿰 인퓨시오눔(*Chlorococcum infusionum*), 클로로코쿰 종(*Chlorococcum* sp.), 클로로고늄(*Chlorogonium*), 크로오모나스 종(*Chroomonas* sp.), 크리소스파에라 종(*Chrysosphaera* sp.), 크리코스파에라 종(*Cricosphaera* sp.), 크립토모나스 종(*Cryptomonas* sp.), 시클로텔라 크립티카(*Cyclotella cryptica*), 시클로텔라 메네기니아나(*Cyclotella meneghiniana*), 시클로텔라 종(*Cyclotella* sp.), 두날리엘라 종(*Dunaliella* sp.), 두날리엘라 바르다윌(*Dunaliella bardawil*), 두날리엘라 비오쿨라타(*Dunaliella bioculata*), 두날리엘라 그라눌라테(*Dunaliella granulate*), 두날리엘라 마리타임(*Dunaliella maritime*), 두날리엘라 미뉴타(*Dunaliella minuta*), 두날리엘라 파르바(*Dunaliella parva*), 두날리엘라 페이르세이(*Dunaliella peircei*), 두날리엘라 프리몰렉타(*Dunaliella primolecta*), 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*), 두날리엘라 테리콜라(*Dunaliella terricola*), 두날리엘라 터티올렉타(*Dunaliella tertiolecta*), 두날리엘라 비리디스(*Dunaliella viridis*), 두날리엘라 터티올렉타, 에레모스파에라 비리디스(*Eremosphaera viridis*), 에레모스파에라 종(*Eremosphaera* sp.), 엘립소이돈 종(*Ellipsoidon* sp.), 유글레나(*Euglena*), 프란세이아 종(*Franceia* sp.), 프라길라리아 크로토넨시스(*Fragilaria crotonensis*), 프라길라리아 종(*Fragilaria* sp.), 글레오캡사 종(*Gleocapsa* sp.), 글레오탐니온 종(*Gleothamnion* sp.), 하이메노모나스 종(*Hymenomonas* sp.), 이소크리시스 에이에프 에프. 갈바나(*Isochrysis aff. galbana*), 이소크리시스 갈바나(*Isochrysis galbana*), 레포신클리스(*Lepocinlis*), 마이크락티늄(*Micractinium*), 마이크락티늄(UTEX LB 2614), 모노라피둠 미뉴텀(*Monoraphidium minutum*), 모노라피둠 종(*Monoraphidium* sp.), 나노클로리스 종(*Nannochloris* sp.), 나노클로롭시스 살리나(*Nannochloropsis salina*), 나노클로롭시스 종(*Nannochloropsis* sp.), 나비쿨라 아셉타타(*Navicula acceptata*), 나비쿨라 비스칸테라에(*Navicula biskanterae*), 나비쿨라 슈도테넬로이데스(*Navicula pseudotenelloides*), 나비쿨라 펠리쿨로사(*Navicula pelliculosa*), 나비쿨라 사프로필라(*Navicula saprophila*), 나비쿨라 종(*Navicula* sp.), 네프로클로리스 종(*Nephrochloris* sp.), 네프로셀미스 종(*Nephroselmis* sp.), 니츠시아 커뮤니스(*Nitzschia communis*), 니츠시아 알렉산드리나(*Nitzschia alexandrina*), 니츠시아 커뮤니스(*Nitzschia communis*), 니츠시아 디스파타(*Nitzschia dissipata*), 니츠시아 프루스툴럼(*Nitzschia frustulum*), 니츠시아 한츠시아나(*Nitzschia hantzschiana*), 니츠시아 인컨스피큐아(*Nitzschia inconspicua*), 니츠시아 인터미디아(*Nitzschia intermedia*), 니츠시아 마이크로세팔라(*Nitzschia microcephala*), 니츠시아 푸실라(*Nitzschia pusilla*), 니츠시아 푸실라 엘립티카(*Nitzschia pusilla elliptica*), 니츠시아 푸실라 모노엔시스(*Nitzschia pusilla monoensis*), 니츠시아 쿼드랭글라(*Nitzschia quadrangular*), 니츠시아 종(*Nitzschia* sp.), 오크로모나스 종(*Ochromonas* sp.), 오오시스티스 파르바(*Oocystis parva*), 오오시스티스 푸실라(*Oocystis pusilla*), 오오시스티스 종(*Oocystis* sp.), 오실라토리아 림네티카(*Oscillatoria limnetica*), 오실라토리아 종(*Oscillatoria* sp.), 오실라토리아 수브레비스(*Oscillatoria subbrevis*), 파세리아 악시도필라(*Pascheria acidophila*), 파블로바 종(*Pavlova* sp.), 파구스(*Phagus*), 포르미디움(*Phormidium*), 플라티모나스 종(*Platymonas* sp.), 플루로크리시스 카르테라에(*Pleurochrysis carterae*), 플루로크리시스 덴타테(*Pleurochrysis dentate*), 플루로크리시스 종(*Pleurochrysis* sp.), 프로토테카 윌커해미(*Prototheca wickerhamii*), 프로토테카 스태그노라(*Prototheca stagnora*), 프로토테카 포르토리센시스(*Prototheca portoricensis*), 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*), 프로토테카 조프피(*Prototheca zopfii*), 피라미모나스 종(*Pyramimonas* sp.), 피로보트리스(*Pyrobotrys*), 사르시노이드 크리소피트(*Sarcinoid chrysophyte*), 세네데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*), 스피로자이라(*Spirogyra*), 스피롤리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*), 스티코코커스 종(*Stichococcus* sp.), 시네코코커스 종(*Synechococcus* sp.), 테트라에드론(*Tetraedron*), 테트라셀미스 종(*Tetraselmis* sp.), 테트라셀미스 수에시카(*Tetraselmis suecica*), 탈라시오시라 웨이스플로기(*Thalassiosira weissflogii*) 및 비리디엘라 프리데리시아나(*Viridiella friderician*)

[0133]

미세 조류 이외에, 유지성 효모는 자체의 건조 세포 중량의 20% 이상만큼의 지질을 축적할 수 있으며, 또한 이 효모는 본원에 기술된 방법에 유용하다. 본 발명의 하나의 구체예에서, 지질을 생산하는 미생물, 또는 오일이 추출, 회수 또는 생산될 수 있는 미생물은 유지성 효모이다. 본원에 기술된 방법에 사용될 수 있는 유지성 효모의 예로서는 표 2에 나열된 유지성 효모를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 오일 함량을 높이기 위한 유지성 효모(야로위아 리폴리티카 및 로도토룰라 그래미니스)의 예시적인 배양 방법은 이하 실시예에 제공되어 있다.

표 2

[0134]

유지성 효모의 예

칸디다 아피콜라(*Candida apicola*), 칸디다 종(*Candida* sp.), 크립토크커스 커바투스(*Cryptococcus curvatus*), 크립토크커스 테리콜러스(*Cryptococcus terricolus*), 디바로마이세스 한세니(*Debaromyces hansenii*), 엔도마이콕시스 버날리스(*Endomycopsis vernalis*), 게오텐리쿰 카라비다룸(*Geotrichum carabidarum*), 게오텐리쿰 쿠쿠조이다룸(*Geotrichum cucujoidarum*), 게오텐리쿰 히스테리다룸(*Geotrichum histeridarum*), 게오텐리쿰 실비콜라(*Geotrichum silvicola*), 게오텐리쿰 불가레(*Geotrichum vulgare*), 하이포피치아 버토니(*Hyphopichia burtonii*), 리포마이세스 리포퍼(*Lipomyces lipofer*), 리포마이세스 오렌탈리스(*Lipomyces orientalis*), 리포마이세스 스타케이(*Lipomyces starkeyi*), 리포마이세스 테트라스포러스(*Lipomyces tetrasporous*), 피치아 멕시카나(*Pichia Mexicana*), 로도스포리디움 스파에로카르푸(*Rodosporidium sphaerocarpum*), 로도스포리디움 토룰로이데스(*Rodosporidium toruloides*), 로도토룰라 오란티아카(*Rhodotorula aurantiaca*), 로도토룰라 다이레넨시스(*Rhodotorula dairenensis*), 로도토룰라 디플루엔스(*Rhodotorula diffluens*), 로도토룰라 글루티누스(*Rhodotorula glutinus*), 로도토룰라 글루티누스 변종 글루티누스(*Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*), 로도토룰라 그라실리스(*Rhodotorula gracilis*), 로도토룰라 그래미니스(*Rhodotorula graminis*), 로도토룰라 미뉴타(*Rhodotorula minuta*), 로도토룰라 뮤실라기노사(*Rhodotorula mucilaginosa*), 로도토룰라 뮤실라기노사 변종 뮤실라기노사(*Rhodotorula mucilaginosa* var. *mucilaginosa*), 로도토룰라 터페노이달리스(*Rhodotorula terpenoidalis*), 로도토룰라 토룰로이데스(*Rhodotorula toruloides*), 스포로볼로마이세스 알보루베센스(*Sporobolomyces alborubescens*), 스타메렐라 봄비콜라(*Starmerella bombicola*), 토룰라스포라 델브루에키(*Torulaspora delbruekii*), 토룰라스포라 프레토리엔시스(*Torulaspora pretoriensis*), 트리코스포론 비렌드(*Trichosporon behrend*), 트리코스포론 브라시카에(*Trichosporon brassicae*), 트리코스포론 도메스티쿰(*Trichosporon domesticum*), 트리코스포론 라이바치(*Trichosporon laibachii*), 트리코스포론 루비에리(*Trichosporon loubieri*), 트리코스포론 루비에리 변종 루비에리(*Trichosporon loubieri* var. *loubieri*), 트리코스포론 몬테비딘스(*Trichosporon montevidense*), 트리코스포론 풀루란스(*Trichosporon pullulans*), 트리코스포론 종(*Trichosporon* sp.), 위커하모마이세스 카나덴시스(*Wickerhamomyces Canadensis*), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 및 자이고아스쿠스 메이어라에(*Zygoascus meyeriae*)

[0135]

본 발명의 하나의 구체예에서, 지질 생산 미생물 또는 지질이 추출, 회수 또는 생성될 수 있는 미생물은 진균이다. 본원에 기술된 방법에 사용될 수 있는 진균의 예로서는 표 3에 나열된 진균을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

표 3

[0136]

유지성 진균의 예

모르티에렐라(*Mortierella*), 모르티에렐라 비나세아(*Mortierella vinacea*), 모르티에렐라 알파인(*Mortierella alpine*), 피티움 디바리아눔(*Pythium debaryanum*), 뮤코 서시넬로이데스(*Mucor circinelloides*), 아스퍼질러스 오크라세우스(*Aspergillus ochraceus*), 아스퍼질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*), 페니실리움 일라시넘(*Penicillium iilacinum*), 헨세놀로(*Hensenulo*), 카에토미움(*Chaetomium*), 클라도스포리움(*Cladosporium*), 말브랑키아(*Malbranchea*), 리조퍼스(*Rhizopus*) 및 피티움(*Pythium*)

[0137]

그러므로, 본 발명의 하나의 구체예에서, 본원에 기술된 방법에 사용할 미생물 바이오매스를 생산하는데 사용되는 미생물은 진균이다. 적당한 진균의 예(예를 들어 모르티에렐라 알파인, 뮤코 서시넬로이데스 및 아스퍼질러스 오크라세우스)로서는, 예를 들어 문헌[*Microbiology*, Jul; 153(Pt.7): 2013-25 (2007)]; [*Mol Genet Genomics*, Jun; 271(5): 595-602 (2004)]; [*Curr Genet*, Mar; 21(3): 215-23 (1992)]; [*Current Microbiology*, 30(2): 83-86 (1995)]; [Sakuradani, NISR Research Grant, "Studies of Metabolic Engineering of Useful Lipid-producing Microorganisms" (2004)]; 및 PCT/JP2004/012021에 기술된 바와 같이 유전자 조작에 순응할 수 있는 것으로 보이는 것들을 포함한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 지질 생산 미생물 또는 오일이 추출, 회수 또는 생성될 수 있는 미생물은 유지성 박테리아이다. 유지성 박테리아는 자체 건조 세포 중량의 20% 이상을 지질로서 축적할 수 있는 박테리아이다. 본원에 기술된 방법에 사용될 유지성 박테리아 종으로서, 로도코커스 속의 종, 예를 들어 로도코커스 오파쿠스 및 로도코커스 종을 포함한다. 유지성 박테리아, 예를 들어 로도코커스 오파쿠스를 배양하는 방법은 당업계에 공지되어 있다(Waltermann, et al., (2000) *Microbiology*, 146: 1143-1149). 오일의 함량을 높이기 위해 로도코커스 오파쿠스를 배양하는 예시적 방법은 이하 실시예에 제공되어 있다.

[0138]

2. 생물 반응기

[0139]

미생물 오일(예를 들어 탄화수소, 예를 들어 지질, 지방산, 알데하이드, 알코올 및 알칸)을 유전자 조작하고 이

오일을 생산하기 위하여 미생물이 배양된다. 미생물 오일을 유전자 조작하기 위한 유형의 배양은, 처음에는 최소한 출발 미생물이 성장할 수 있는 조건 하에서 작은 규모로 수행된다. 탄화수소를 생산하기 위한 배양은 일반적으로 생물 반응기 내에서 큰 규모로(예를 들어 10,000L, 40,000L, 100,000L 또는 이 이상의 용적으로) 수행된다. 본원에 기술된 미세 조류, 예를 들어 프로토타카 종, 그리고 기타 다른 유지성 미생물은 통상적으로 본원에 기술된 방법에서(생물 반응기 내 액체 배지 중에서) 배양된다. 통상적으로, 생물 반응기에는 빛이 거의 입사될 수 없거나 조금도 입사될 수 없다. 몇몇 구체예에서, 유지성 미생물, 예를 들어 미세 조류의 전체 배양 단계(들)는 빛이 실질적으로 존재하지 않는 조건 하에서 수행된다.

[0140] 생물 반응기 또는 발효기를 사용하여 다양한 단계의 세포의 생리학적 사이클을 통해 미세 조류 세포를 배양한다. 생물 반응기는 종속 영양 성장 및 번식 방법에 사용하기 위한 많은 이점을 제공한다. 본원에 기술된 미세 조류 및 기타 다른 유지성 미생물은 통상적으로 액체 중에서, 예를 들어 현탁 배양으로 대량으로 발효시킨다. 강철 발효기와 같은 생물 반응기는 매우 큰 배양 용적(40,000리터 이상의 용량을 갖는 생물 반응기가 본 발명의 다양한 구체예에서 사용됨)을 수용할 수 있다. 생물 반응기는 또한 통상적으로 온도, pH, 산소분압 및 이산화탄소 수준과 같은 배양 조건의 제어를 허용한다. 예를 들어, 생물 반응기는 통상적으로, 예를 들어 관에 부착된 포트를 사용하여 산소 또는 질소와 같은 가스 성분이 액체 배양물을 통해 기포 주입될 수 있도록 하는 형태를 취할 수 있다. 배양 배지의 pH, 미량 요소의 종류 및 농도 및 기타 다른 배지 성분과 같은 기타 다른 배양 파라미터가 또한 생물 반응기를 사용하여 보다 용이하게 조작될 수 있다.

[0141] 생물 반응기는 미세 조류가 증식하고 수적으로 증가하는 전반적인 시간에 걸쳐 생물 반응기를 통해 배양 배지가 유입되도록 하는 형태를 취할 수 있다. 몇몇 양태에서, 예를 들어 배지는 접종 후 세포가 원하는 밀도에 도달하기 전에 생물 반응기로 주입될 수 있다. 다른 경우에, 생물 반응기에는 배양 초기에 배양 배지가 충전되고 배양물이 접종된 후에는 더이상의 배양 배지가 주입되지 않는다. 다시 말해서, 미세 조류(또는 기타 다른 미생물) 바이오매스는 미세 조류가 증식하고 수적으로 증가하는 기간 동안 수성 배지에서 배양되지만, 수성 배양 배지의 양이 그 기간에 걸쳐 생물 반응기를 통해 유입되지 않는다. 따라서, 몇몇 양태에서, 수성 배양 배지는 접종 후 생물 반응기를 통해 유입되지 않는다.

[0142] 회전 블레이드 및 임펠러, 진동(rocking) 기구, 교반 막대, 가압 가스 주입용 수단과 같은 장치가 장착된 생물 반응기를 사용하여 미세 조류 배양물이 혼합되도록 할 수 있다. 혼합은 연속적이거나 간헐적일 수 있다. 예를 들어, 몇몇 구체예에서, 미세 조류의 수에 있어서 원하는 증가가 이루어질 때까지 가스 주입 및 배지 주입의 난류 체계는 상기 미세 조류의 번식 동안에 유지되지 않는다.

[0143] 생물 반응기 포트를 사용하여 가스, 고체, 반고체 및 액체를, 미세 조류를 함유하는 생물 반응기 챔버에 도입하거나 추출할 수 있다. 많은 생물 반응기는 하나 초과인 포트(예를 들어, 배지 주입을 위한 하나 및 샘플링을 위한 또 다른 하나)를 갖는 한편, 단지 하나의 물질이 포트를 출입할 필요는 없다. 예를 들어, 포트를 사용하여 배양 배지가 생물 반응기로 유입될 수 있도록 하고 이후에 샘플링, 가스 주입, 가스 배출 또는 기타 다른 목적을 위해 사용될 수 있다. 바람직하게, 샘플링 포트는 배양물의 무균 특성을 변경, 손상시키지 않고 반복적으로 사용될 수 있다. 샘플링 포트는 샘플의 흐름이 중지되고 개시되거나 연속 샘플링의 수단을 제공하도록 하는 밸브 또는 기타 다른 장치로 구성될 수 있다. 생물 반응기는 통상적으로 배양물의 집종을 가능하게 하는 하나 이상의 포트를 갖고 상기 포트는 또한 배지 또는 가스 주입과 같은 기타 다른 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0144] 생물 반응기 포트는 미세 조류의 배양물의 가스 함량이 조작되도록 할 수 있다. 설명하자면, 생물 반응기 용적의 일부는 액체보다는 가스일 수 있고, 생물 반응기의 가스 주입구는 가스가 생물 반응기로 펌핑될 수 있도록 한다. 생물 반응기 내로 이롭게 펌핑될 수 있는 가스는 공기, 공기/CO₂ 혼합물, 비활성 가스(예를 들어, 아르곤) 및 기타 다른 가스를 포함한다. 생물 반응기는 통상적으로 사용자가 생물 반응기로의 가스 주입 속도를 조절할 수 있도록 구성된다. 상기에 언급된 바와 같이, 생물 반응기로의 가스 주입 증가를 사용하여 배양물의 혼합을 증가시킬 수 있다.

[0145] 증가된 가스 유입은 또한 배양물의 혼탁도에 영향을 미친다. 난기류는 수성 배양 배지의 수위 하부에 가스 주입 포트를 위치시켜 생물 반응기로 주입되는 가스가 배양물 표면으로 기포 주입되도록 함으로써 성취할 수 있다. 하나 이상의 가스 배출 포트는 가스가 배출되도록 하여 생물 반응기 내 압력 증가를 차단한다. 바람직하게, 가스 배출 포트는 생물 반응기로 오염 미생물이 들어가는 것을 차단하는 “원-웨이” 밸브와 연결된다.

[0146] **3. 배지**

[0147] 미세 조류뿐만 아니라 기타 다른 미생물 배양 배지는 통상적으로 고정 질소원, 고정 탄소원, 미량 요소, 임의로

pH 유지를 위한 완충제 및 포스페이트(통상적으로 포스페이트 염으로서 제공됨)와 같은 성분들을 함유한다. 기타 다른 성분은 특히 해양 미세 조류를 위해 염화나트륨과 같은 염을 포함할 수 있다. 질소원은, 예를 들어 제한 없이 분자 질소, 질산염(nitrate), 질산 염(nitrate salt), 암모니아(순수 형태 또는 염 형태, 예를 들어 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 NH_4OH), 단백질, 대두 밀, 옥수수 침지액, 및 효모 추출물을 포함하는 유기 및 무기 질소원을 함유한다. 미량 요소의 예로서는 아연, 붕소, 코발트, 구리, 망간, 및 몰리브덴을 포함하고, 예를 들어 이의 각각의 형태는 ZnCl_2 , H_3BO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 및 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 이다.

[0148] 본 발명의 방법에 따라 유용한 미생물은 전세계적으로 다양한 장소 및 환경에서 발견된다. 기타 다른 종 및 이들의 궁극적인 진화적 분기점으로부터의 분리 결과로서, 최적의 성장 및 지질 및/또는 탄화수소 성분들의 최적의 생산을 위한 특정 성장 배지는 예측하기 어려울 수 있다. 몇몇 경우에, 특정 미생물 균주는 몇몇 억제 성분의 존재 또는 특정 미생물 균주에 의해 요구되는 일부 필수 영양 요구성 물질의 부재 때문에 특정 성장 배지에서 성장하지 않을 수 있다.

[0149] 고체 및 액체 성장 배지는 일반적으로 다양한 공급원으로부터 이용 가능하며, 광범위하게 다양한 미생물 균주에 적합한 특정 배지를 제조하기 위한 지침은, 예를 들어 조류의 배양 수집물을 위하여 텍사스 대학교 오스틴 캠퍼스(University of Texas at Austin; 1 University Station A6700, Austin, Texas, 78712-0183, (UTEX))에서 운영하는 온라인 사이트(www.utex.org/)에서 찾을 수 있다. 예를 들어, 다양한 담수 및 염수 배지는 본원에 참조로서 포함된 문헌[PCT Pub. No. 2008/151149]에 기재된 것들을 포함한다.

[0150] 특정 예에서, 프로테오스 배지(Proteose Medium)는 무균 배양에 적합하고, 1L 용적의 배지(pH 약 6.8)는 1리터의 Bristol 배지에 1g의 프로테오스 펩톤을 첨가하여 제조할 수 있다. Bristol 배지는 수용액 중에 2.94mM NaNO_3 , 0.17mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.43mM, 1.29mM KH_2PO_4 , 및 1.43mM NaCl 을 포함한다. 1.5% 한천 배지에 대해, 15g의 한천을 1L의 용액에 첨가할 수 있다. 상기 용액을 덮고 오토클레이브 처리하며, 이어서 사용 전에 냉장 온도에 저장한다. 또 다른 예는 프로토테카 분리 배지(PIM)이며, 이는 10g/L의 수소칼륨 프탈레이트(KHP), 0.9g/L의 수산화나트륨, 0.1g/L의 황산마그네슘, 0.2g/L의 인산수소칼륨, 0.3g/L의 염화암모늄, 10g/L의 글루코스, 0.001g/L의 티아민 염산염, 20g/L 한천, 0.25g/L의 5-플루오로사이토신을 pH 범위 5.0 내지 5.2로 포함한다(문헌[Pore, 1973, App. Microbiology, 26: 648-649] 참조). 본원에 기술된 방법에 사용하기에 적합한 기타 다른 배지는 상기의 URL에 문의하거나 미생물 배양물(예를 들어, SAG, CCAP, 또는 CCALA)을 유지하는 기타 다른 기관에 문의하여 용이하게 확인할 수 있다. SAG는 괴팅겐 대학교(University of Göttingen, Göttingen, Germany)에서의 조류의 배양 수집물을 말하고, CCAP는 스코틀랜드 해양과학협회(Scottish Association for Marine Science; Scotland, United Kingdom)에 의해 관리되는 조류 및 원생동물의 배양 수집물을 말하며, CCALA는 식물연구원(Institute of Botany; Třeboň, Czech Republic)의 조류 연구소의 배양 수집물을 말한다. 추가로, 미국 특허 제5,900,370호는 프로토테카 종의 종속 영양 발효에 적합한 배지 제형 및 조건을 기술한다.

[0151] 비용 효율적 생산을 위해, 고정 탄소원의 선택이 중요한데, 그 이유는 오일 생산을 경제적으로 하기 위해서는 고정 탄소원의 비용이 충분히 낮아야 하기 때문이다. 적당한 탄소 공급원으로서, 예를 들어 아세테이트, 폴리리도시드, 프럭토스, 갈락토스, 글루쿠론산, 글루코스, 글리세롤, 락토스, 만노스, N-아세틸글루코사민, 람노스, 라피노스, 스타키오스, 수크로스 및/또는 자일로스를 포함한다. 본원에 기술된 방법에 따라서 사용하기 적당한 공급 원료로서, 예를 들어 흑액, 옥수수 전분, 해중합된 셀룰로스 재료, 유청, 전화당(글루코스/프럭토스), 당밀, 감자, 수수, 수크로스, 사탕무, 사탕 수수, 진한 감자 당즙, 벼 및 밀을 포함한다. 탄소 공급원은 또한 혼합물, 예를 들어 수크로스 및 해중합된 사탕무 펄프의 혼합물로서 제공될 수도 있다.

[0152] 하나 이상의 탄소 공급원(들)은 농도 약 50 μM 이상, 약 100 μM 이상, 약 500 μM 이상, 약 5mM 이상, 약 50mM 이상, 그리고 약 500mM 이상의 외부 공급 고정 탄소 공급원(들) 하나 이상으로서 공급될 수 있다. 고도로 농축된 탄소 공급원이 발효 공급 원료로서 바람직하며, 다양한 구체예에서, 탄소 공급원은 자체의 최고 용해도에 근접한 농도로 공급 원료 중에 제공된다(즉 용해도 90%를 넘는 농도, 예를 들어 95% 이상의 농도, 즉 용해도 99%).

[0153] 예를 들어 몇몇 구체예에서, 회분식 배양의 공급 원료 중 글루코스 수준은 300g/L 이상, 400g/L 이상, 500g/L 이상 또는 600g/L 이상인데, 여기서, 고도로 농축된 고정 탄소 공급원은 세포가 성장하여 미생물 오일(지질)을 축적할 때 경시적으로 세포에 공급된다. 다른 구체예에서, 회분식 배양의 공급 원료에 사용된 수크로스 수준은

500g/L 이상, 600g/L 이상, 700g/L 이상 또는 800g/L 이상이다. 고도로 농축된 수크로스 탄소 공급원의 비제한적 예로서는 진한 감자 당즙, 사탕 수수 즙, 사탕무 즙 및 당밀을 포함한다. 본원에 기술된 방법에 사용될, 특정 목적을 가지는 탄소 공급원으로서의 셀룰로스(해중합된 형태), 글리세롤, 수크로스 및 수수를 포함하며, 이것들은 각각 이하에 더욱 상세히 기술되어 있다.

[0154] 본원에 기술된 방법에 따라, 미생물은 공급원료로서 해중합된 셀룰로스 바이오매스를 사용하여 배양할 수 있다. 셀룰로스 바이오매스(예를 들어, 여물, 예를 들어 옥수수 대)는 저렴하고 용이하게 입수할 수 있지만, 이러한 물질을 효모의 공급 원료로 사용하려는 시도는 실패했다. 특히, 상기 공급원료는 효모 성장에 억제 작용을 하는 것으로 밝혀졌고, 효모는 셀룰로스 물질로부터 생성된 5탄당(예를 들어, 헤미셀룰로스 유래의 자일로스)을 사용할 수 없다. 대조적으로, 미세 조류는 가공된 셀룰로스 물질 상에서 성장할 수 있다. 셀룰로스 물질은 일반적으로 약 40% 내지 60%의 셀룰로스, 약 20% 내지 40%의 헤미셀룰로스 및 10% 내지 30%의 리그닌을 포함한다.

[0155] 적합한 셀룰로스 물질은 농작물, 즉, 식물 일부, 1차 식품 또는 섬유 생성물과 함께 야생에서 제거되지 않는 주로 줄기 및 잎뿐만 아니라 초본성 및 목재 에너지 작물로부터의 잔사를 포함한다. 이의 예로서는 농업 폐기물, 예를 들어 사탕수수 바가스, 쌀겨, 옥수수 섬유(줄기, 잎, 껍질 및 속대를 포함함), 대두 밀(meal), 밀짚, 쌀짚, 사탕무 펄프, 감귤 펄프, 감귤 과피; 산림 폐기물, 예를 들어 경목재 및 연목재 간벌, 및 수목 작업으로부터의 경목재 및 연목재 잔사; 목재 폐기물, 예를 들어 톱 가루 폐기물(목재 칩, 톱밥) 및 펄프 가루 폐기물; 도시 폐기물, 예를 들어 시의 고형 폐기물의 종이 분획물, 도시 목재 폐기물 및 도시 녹색 폐기물, 예를 들어 시의 깎아낸 풀; 및 목재 건축 폐기물을 포함한다. 추가의 셀룰로스는 스위치그래스, 잡종 포플러 목재 및 억제, 섬유 케인(cane) 및 섬유 수수와 같은 전용 셀룰로스 작물을 포함한다. 상기 물질로부터 생성된 5탄당은 자일로스를 포함한다.

[0156] 셀룰로스 물질은 상기 물질내 함유된 당(들)을 미생물이 이용할 수 있는 효율이 증가되도록 처리될 수 있다. 본원에 기술된 방법들은 산 폭쇄(acid explosion) 후 셀룰로스 물질을 처리하여 물질이 미생물(예를 들어, 미세 조류 및 유지성 효모)의 종속 영양성 배양에 사용하기에 적합하도록 하는 방법을 제공한다. 상기 논의된 바와 같이, 리그노셀룰로스 바이오매스는 셀룰로스, 베타 1,4 연결된 글루코스(6탄당)의 결정성 중합체, 헤미셀룰로스, 자일로스(5탄당)로 주로 구성된 보다 느슨하게 회합된 중합체 및 보다 적은 정도의 만노스, 갈락토스, 아라비노스, 리그닌, 시나필 알코올 및 이의 유도체로 구성된 복합 방향족 중합체, 및 알파 1,4-연결된 폴리갈락투론산의 선형 사슬인 펙틴을 포함하는, 다양한 분획물로 구성된다. 셀룰로스 및 헤미셀룰로스의 중합체 구조 때문에 이들 내 당(예를 들어, 단량체 글루코스 및 자일로스)은 많은 미생물에 의해 효율적으로 사용(대사)될 수 있는 형태로 존재 하지 않는다. 상기 미생물을 위해 중합체를 구성하는 단량체 당을 생성하도록 셀룰로스 바이오매스를 추가로 가공하면 셀룰로스 물질이 공급원료(탄소원)로서 효율적으로 사용되도록 보장하는데 매우 도움이 될 수 있다.

[0157] 셀룰로스 또는 셀룰로스 바이오매스는, 바이오매스가 승온 및 승압에서 회석 황산(또는 기타 다른 산)으로 처리되는 “폭쇄(explosion)”로 호칭되는 공정을 거친다. 상기 공정은, 바이오매스가 셀룰로스 및 헤미셀룰로스 분획물의 글루코스 및 자일로스 단량체로의 효소 가수 분해를 효율적으로 거칠 수 있도록 바이오매스에 영향을 미친다. 생성된 단량체 당은 셀룰로스 당으로 호칭된다. 셀룰로스 당은 이어서 미생물에 의해 이용되어 다양한 대사물(예를 들어, 지질)을 생성할 수 있다. 산 폭쇄 단계는 헤미셀룰로스 분획물이 구성 단당류로 부분 가수 분해되도록 한다. 이들 당은 추가의 처리로 바이오매스로부터 완전히 유리될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 추가의 처리는 열수 처리이고, 이는 폭쇄된 물질을 고온수로 세척하여 염과 같은 오염물을 제거하는 것을 포함한다. 이러한 단계는 상기 공정에 사용되는 보다 회석된 당 농도로 인해 셀룰로스 에탄올 발효에 대해서는 필요하지 않다. 다른 구체예에서, 추가의 처리는 추가의 산 처리이다. 또 다른 구체예에서, 추가의 처리는 폭쇄된 물질의 효소 가수 분해이다. 이들 처리는 또한 임의의 조합으로 사용될 수 있다. 처리 유형은 유리되는 당의 유형(예를 들어, 5탄당 대 6탄당), 및 이들이 당해 공정에서 유리되는 단계에 영향을 미칠 수 있다. 결과로서, 이들이 주로 5탄당 또는 6탄당인 상관없이 상이한 당 스트림이 형성될 수 있다. 따라서 이들 농축된 5탄당 또는 6탄당 스트림은 상이한 탄소 이용 능력을 갖는 특이적 미생물에 지시될 수 있다.

[0158] 본원에 기술된 방법에서는 통상적으로 에탄올 발효에서 달성되는 것 보다 높은 세포 밀도로 발효가 이루어진다. 종속 영양성 지질 생산을 위한 배양물의 보다 높은 밀도 때문에, 고정 탄소원(예를 들어, 셀룰로스 유래 당 스트림(들))은 바람직하게 농축된 형태로 존재한다. 해중합된 셀룰로스 물질의 글루코스 수준은 바람직하게 배양 단계 전에 300g/리터 이상, 400g/리터 이상, 500g/리터 이상 또는 600g/리터 이상이며, 상기 배양 단계는 임의로 유가식 배양이고, 여기서 상기 물질은 세포가 성장하고 지질을 축적함에 따라서 시간 경과에 따라 세포에 공급된다. 셀룰로스 당 스트림은 셀룰로스 에탄올의 생산에서 이러한 농도 범위로 또는 그 근처로 사용되지 않는

다. 따라서, 리그노셀룰로스 오일의 생산 동안에 매우 높은 세포 밀도를 생성하고 유지하기 위해서, 탄소 공급 원료(들)가 고농축된 형태로 종속 영양 배양물로 전달되어야만 한다. 그러나, 유지성 미생물에 대한 기질이 아니고 유지성 미생물에 의해 대사되지 않는 공급 스트림에서 임의의 성분은 생물 반응기에 축적할 것이며, 이는 성분이 독성을 가지거나 원하는 최종 생성물의 생산을 억제하는 경우 문제점을 유발할 수 있다. (폭쇄 공정 및 후속적인 중화 공정 둘 다에서) 셀룰로스 물질의 생성으로부터 유래된 푸르푸랄 및 하이드록시메틸 푸르푸랄 및 염과 같은 리그닌 및 리그닌 유래 부산물, 탄수화물 유래 부산물, 및 심지어 비대사된 펜토스/헥소스 당은 에탄올 발효에서 문제점을 제시할 수 있고, 이들 효과는 초기 공급원료에서 이들의 농도가 높은 공정에서 상당히 증폭된다. 셀룰로스 재료로부터 유래하는 당의, 본 발명에 따라서 대규모 생산용으로 사용될 수 있는 6탄당에 대한 농도를 300g/L, 400g/L 또는 500g/L 이상으로 만들기 위해서는, 독성 재료의 농도가 통상적으로 셀룰로스 바이오매스의 에탄올 발효에서의 농도보다 20배 높을 수 있다.

[0159] 셀룰로스 물질의 폭쇄 공정 처리는 상당한 양의 황산, 열 및 압력을 사용함으로써 탄수화물의 부산물, 즉 푸르푸랄 및 하이드록시메틸 푸르푸랄을 유리시킨다. 푸르푸랄 및 하이드록시메틸 푸르푸랄은 자일로스의 푸르푸랄 및 물로의 탈수를 통한 헤미셀룰로스의 가수 분해 동안에 생성된다. 본 발명의 몇몇 구체예에서, 이들 부산물(예를 들어, 푸르푸랄 및 하이드록시메틸 푸르푸랄)은 생물 반응기로 도입하기 전에 당화된 리그노셀룰로스 물질로부터 제거된다. 본 발명의 특정 구체예에서, 탄수화물의 부산물의 제거 공정은 폭쇄된 셀룰로스 물질의 열수 처리이다. 추가로, 특정 구체예에서 본 발명은 푸르푸랄 또는 하이드록시메틸 푸르푸랄과 같은 화합물에 내성일 수 있는 균주가 생산에 사용되는 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 또한 발효 배지에서 푸르푸랄에 내성일 수 있는 것뿐만 아니라 실제로 발효 동안에 당해 부산물을 대사시킬 수 있는 미생물을 사용하는 방법을 제공한다.

[0160] 상기 폭쇄 공정은 또한 상당한 수준의 염을 생성한다. 예를 들어, 폭쇄를 위한 통상적인 조건은, 폭쇄된 셀룰로스 바이오매스가 10:1의 물:고체(건조 중량)의 비율로 재현탁되는 경우 5mS/cm 초과와 전도성을 초래할 수 있다. 본 발명의 임의의 구체예에서, 희석된 폭쇄된 바이오매스는 효소 당화를 거치고, 생성된 상청액은 생물 반응기에 사용하기 위해 25배까지 농축된다. 농축된 당 스트림(들)에서 염 수준(전도성에 의해 측정됨)은 허용 가능하지 않게 높을 수 있다(1.5M까지의 Na^+ 당량). 추가의 염은 또한 후속적인 효소 당화 공정을 위해 폭쇄된 물질의 중화시 생성된다. 본원에 기술된 방법에 따라서, 이들 염을 제거하여 생성된 농축된 셀룰로스 당 스트림(들)이 지질을 생산하기 위한 종속 영양 공정에 사용될 수 있도록 한다. 몇몇 구체예에서, 상기 염을 제거하는 방법은, 예를 들어 이에 제한되지 않지만 DOWEX Marathon MR3과 같은 수지를 사용한 탈이온화이다. 임의의 구체예에서 수지 단계를 사용하는 탈이온화는 당화 전에, 바이오매스의 당 농축 또는 pH 조정 및 열수 처리 전, 또는 이들의 임의의 조합 전에 일어나며, 다른 구체예에서 상기 단계는 이들 공정 중 하나 이상 후에 수행한다. 다른 구체예에서, 폭쇄 공정 자체는 허용가능하지 않게 높은 수준으로 염이 생성되는 것을 피하도록 변화시킨다. 예를 들어, 셀룰로스 바이오매스의 황산(또는 기타 다른 산) 폭쇄에 대한 적절한 대안법은 기계적 펄핑으로 셀룰로스 바이오매스가 효소 가수 분해(당화)에 민감해지도록 하는 것이다. 또 다른 구체예에서, 고수준의 염에 내성인 미생물의 본래의 균주 또는 고수준의 염에 내성을 갖는 유전자 조작된 균주가 사용된다.

[0161] 유지성 미생물을 사용하는 종속 영양 미생물 오일 생산에 사용하기 위한 폭쇄된 셀룰로스 바이오매스를 제조하는 방법에 대한 바람직한 구체예는 다음과 같이 수행된다. 제1 단계는 재현탁된 폭쇄된 셀룰로스 바이오매스의 pH를 5.0 내지 5.3의 범위로 조정하고 이어서 셀룰로스 바이오매스를 3회 세척하는 것을 포함한다. 이러한 세척 단계는 탈염 및 이온 교환 수지, 역삼투압, 열수 처리(전술한 바와 같음) 또는 단지 반복적인 탈이온수 중의 재현탁 및 원심분리의 사용을 포함하는 다양한 수단에 의해 성취될 수 있다. 이러한 세척 단계는 전도성이 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 내지 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 인 셀룰로스 스트림을 초래하고 상당한 양의 푸르푸랄 및 하이드록시메틸 푸르푸랄을 제거시킨다. 이러한 세척 단계로부터 경사분리(decant)는 헤미셀룰로스 분획물로부터 유리된 5탄당을 농축시키는 단계를 배제할 수 있다. 제2 단계는 세척된 셀룰로스 바이오매스의 효소 당화를 포함한다. 하나의 구체예에서, 아셀레라제(Genencor)를 사용한다. 제3 단계는 상기 당화된 바이오매스의 원심분리 또는 경사분리 및 세정을 통한 당의 회수를 포함한다. 생성한 바이오매스(고체)는 연료로서 사용될 수 있거나 폐기물로 보내질 수 있는 에너지가 밀집한 리그닌 풍부 성분이다. 원심분리/경사분리 및 세정 공정에서 회수된 당 스트림을 수집한다. 제4 단계는 투과물의 회수와 함께 오염 고체를 제거하기 위한 마이크로여과를 포함한다. 제5 단계는 진공 증발기를 사용하여 성취될 수 있는 농축 단계를 포함한다. 이러한 단계는 P'2000(Sigma/Fluka)과 같은 소포제의 첨가를 임의로 포함할 수 있으며, 이는 생성된 당 공급원료의 단백질 함량으로 인해 때때로 필요하다.

[0162] 본 발명의 방법의 다른 구체예에서, 탄소원은 글리세롤이며, 이는 바이오디젤 에스테르 결합 전이로부터 산성화 및 비산성화된 글리세롤 부산물을 포함한다. 하나의 구체예에서, 탄소원은 글리세롤 및 하나 이상의 기타 다른

탄소원을 포함한다. 몇몇 경우에, 글리세롤 및 하나 이상의 기타 다른 고정 탄소원 모두는 발효 초기에 미생물에 제공된다. 몇몇 경우에, 글리세롤 및 하나 이상의 기타 다른 고정 탄소원이 소정의 비율로 동시에 미생물에 제공된다. 몇몇 경우에, 글리세롤 및 하나 이상의 기타 다른 고정 탄소원은 발효 과정 동안에 소정의 속도로 미생물에 공급된다.

[0163] 몇몇 미세 조류는 글루코스의 존재 하에서보다 글리세롤의 존재 하에서 보다 신속하게 세포 분열을 진행한다 (PCT 공개 제2008/151149호 참조). 이와 같은 경우에 있어서, 2단계 성장 과정으로서, 처음에 세포가 글리세롤을 공급받아 세포 밀도가 신속하게 증가되고, 이후 글루코스를 공급받아 미생물 오일(지질)을 축적하게 되는 과정은, 오일이 생성되는 효율을 개선할 수 있다. 에스테르 결합 전이 방법의 글리세롤 부산물이 사용될 때, 이 부산물이 미생물 오일 생산 공정에 다시 투입되면 경제적으로 상당히 유리하다. 기타 다른 공급 방법, 예를 들어 고정 탄소 공급원으로서 글루코스와 글리세롤의 혼합물을 사용하는 방법이 제공되기도 한다. 이러한 혼합물을 공급하면 또한 유사한 경제적 이점이 얻어질 수도 있다. 뿐만 아니라, 임의의 구체예에서, 본 발명은 대체당, 예를 들어 수크로스를 글리세롤과 다양하게 조합하여 미세 조류에 공급하는 방법도 제공한다.

[0164] 본 발명의 방법에 관한 다른 구체예에서, 탄소 공급원은 전화당이다. 전화당은 수크로스를 자체의 단당류 성분들, 즉 프럭토스와 글루코스로 분해하여 생성된다. 전화당은 당업계에 공지된 몇몇 방법들을 통하여 생성될 수 있다. 이와 같은 방법의 일례로서는 수크로스의 수용액을 가열하는 것이 있다. 종종 수크로스가 전화당으로 전환되는 것을 촉진하는 촉매가 사용되기도 한다. 이와 같은 촉매는 생물학적 촉매일 수 있는데, 예를 들어 효소, 예를 들어 인버타제 및 수크라제는 전화당을 생성하는 가수 분해 반응을 촉진하기 위해 수크로스에 첨가될 수 있다. 산은 열과 함께 사용될 때 가수 분해 반응을 촉진할 수 있는 비 생물학적 촉매의 일례이다. 전화당이 생성되면, 이 전화당은 수크로스에 비하여 결정화되는 성향이 작으므로, 저장과 회분식 발효에 이점을 제공하는데, 다만 미세 조류를 포함하는 미생물의 종속 영양 배양의 경우에는 농축된 탄소 공급원이 필요하다. 하나의 구체예에서, 탄소 공급원은 전화당, 바람직하게는 농축된 형태의 전화당(전술한 바와 같이, 사용된 조건에서의 최대 용해도 90% 이상), 즉 800g/리터 이상, 900g/리터 이상, 1000g/리터 이상 또는 1100g/리터 이상으로 존재하는 전화당이다. 세포가 성장하여 지질을 축적할 때 전화당, 바람직하게는 농축된 형태의 전화당이 세포에 경시적으로 공급된다.

[0165] 본 발명의 방법의 다른 구체예에서, 탄소원은 수크로스이며, 이는 사탕수수 가공 유래의 진한 감자 당즙과 같이 수크로스를 함유하는 복합 공급원료를 포함한다. 전술한 바와 같이, 종속 영양 오일 생산용 배양액의 밀도는 높기 때문에, 고정 탄소 공급원(예를 들어 수크로스 및 글루코스 등)은 농축된 형태를 가지는데, 다시 말해서, 세포가 성장하여 지질을 축적할 때 세포에 재료가 경시적으로 공급되는, 회분식 배양일 수도 있는 배양 단계에 도입되기 전의 고정 탄소 공급원은 500g/리터 이상, 600g/리터 이상, 700g/리터 이상 또는 800g/리터 이상 존재한다. 몇몇 경우에 있어서 탄소 공급원은 진한 감자 당즙의 형태(통상적으로 농축된 형태)를 가지는 수크로스인데, 다시 말해서 회분식 배양일 수도 있는 배양 단계에 도입되기 전, 고체 60% 이상 또는 당 1리터당 약 770g, 고체 70% 이상 또는 당 1리터당 약 925g, 또는 고체 80% 이상 또는 당 1리터당 약 1125g으로 존재한다. 농축된 진한 감자 당즙은, 세포가 성장하여 지질을 축적할 때 경시적으로 세포에 공급된다.

[0166] 하나의 구체예에서, 배양 배지는 추가로 하나 이상의 수크로스 이용 효소를 포함한다. 몇몇 경우에, 배양 배지는 수크로스 인버타제를 포함한다. 하나의 구체예에서, 수크로스 인버타제 효소는 미생물 집단에 의해 발현되는 외인성 수크로스 인버타제 유전자에 의해 암호화된 분비가능한 수크로스 인버타제 효소이다. 따라서, 몇몇 경우에 하기 섹션 IV에 보다 상세하게 기술된 바와 같이, 본원에 기술된 방법에 사용되는 미생물은 수크로스 수송체, 수크로스 인버타제, 헥소키나제, 글루코키나제 또는 프럭토키나제와 같은 수크로스 이용 효소를 발현하도록 유전자 조작하였다.

[0167] 수크로스를 함유하는 복합 공급원료는 사탕수수 가공 유래의 폐기 당밀을 포함하며, 사탕수수 가공의 낮은 가치의 폐기물의 사용은 탄화수소 및 기타 다른 오일의 생성에 상당한 비용 절감을 제공할 수 있다. 본원에 기술된 방법에 유용한 수크로스를 함유하는 다른 복합 공급원료는 수수 시럽 및 순수한 수수를 포함하는 수수이다. 수수 시럽은 달콤한 수수 줄기의 즙으로부터 생산된다. 이의 당 프로파일은 주로 글루코스(텍스트로스), 프럭토스 및 수크로스 이루어진다.

[0168] 4. 오일 생산

[0169] 본원에 기술된 방법에 따라서 오일(지질)을 생성하기 위해서는, 예를 들어 빛이 배양을 방해하지 않는 매우 큰 용적(40,000리터 이상의 용적)의 발효조를 사용하는 경우에서와 같이, 세포를 어두운 환경에서 배양하는 것이 바람직하다. 예를 들어 프로토타가 및 기타 다른 미세 조류 종은, 빛이 존재하지 않는 조건 하에 고정 탄소 공

급원을 함유하는 배지 중에서 오일을 생산하도록 생장 및 번식될 수 있으며; 이와 같은 생장은 종속 영양 생장이라고 알려져 있다.

[0170] 하나의 예로서, 지질 생산 미세 조류 세포의 접종물을 배지에 도입하고, 세포가 번식을 시작하기 전에 지체(lag) 기간(지체 단계)이 있다. 지체 기간 후, 번식률은 일정하게 증가하고 대수기(log) 또는 지수기로 진입한다. 지수기에 이어서 차례로 질소와 같은 영양물의 감소, 및 독성 물질의 증가 및 퀴럼센싱(quorum sensing) 시작으로 번식이 느려진다. 상기와 같이 느려진 후, 번식은 멈추고 세포는 정지기 또는 일정한 생장 상태로 진입하며, 이는 세포에 제공된 특정 환경에 좌우된다. 지질 풍부 바이오매스를 수득하기 위해, 상기 배양물은 통상적으로, 질소 또는 다른 주요 영양물(탄소 이외의 다른 영양물)이 고갈되게 함으로써 조기에 종결되어 세포가 과량으로 존재하는 탄소원을 지질로 전환하도록 하는 지수기의 말기 후에 잘 수거한다. 배양 조건 매개 변수는 전체 오일 생산, 생산된 오일 중 지방산 혼합물 및/또는 특정 지방산 및 상응하는 지질(들)의 생산을 최적화하도록 조정될 수 있다.

[0171] 바람직하게, 본원에 기재된 조건 및 당업계에 공지된 기타 다른 조건을 사용하여 생장한 미생물은 약 20중량% 이상의 지질, 바람직하게는 약 40중량% 이상의 지질, 보다 바람직하게는 약 50중량% 이상의 지질 및 가장 바람직하게는 약 60중량% 이상의 지질을 포함한다. 가공 조건은 특정 용도를 위해 적합한 지질의 수율을 증가시키도록 및/또는 생산 비용을 절감시키도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 특정 구체예에서, 미세 조류 또는 기타 다른 유지성 미생물은 예를 들어, 질소, 인 또는 황과 같은 하나 이상의 영양물의 제한 농도의 존재 하에 배양하고 글루코스와 같은 과량의 고정 탄소 에너지를 제공한다. 질소 제한은 질소가 과량으로 공급된 배양물에서의 미생물 지질 수율 이상으로 미생물 지질 수율을 증가시키는 경향이 있다. 특정 구체예에서, 지질 수율의 증가는 약 10%, 50%, 100%, 200%, 또는 500% 이상이다. 상기 미생물은 전체 배양 기간 중 일부 동안 또는 전체 기간 동안 제한된 양의 영양물의 존재 하에 배양할 수 있다. 특정 구체예에서, 영양물 농도는 총 배양 기간 동안 2회 이상 제한 농도와 비제한 농도 사이에서 순환한다. 세포의 지질 함량은 과량의 탄소를 제공하지만 질소를 제한하거나 제공하지 않으면서 증가된 기간 동안 배양을 계속함으로써 증가시킬 수 있다.

[0172] 다른 구체예에서, 지질 수율은 지질 경로 효소(예를 들어, 지방산 합성 효소)를 위한 하나 이상의 조인자(들)의 존재 하에 지질 생산 미생물(예를 들어, 미세 조류)을 배양함으로써 증가된다. 일반적으로, 조인자(들)의 농도는 조인자(들)의 부재 하의 미생물 오일 수율 이상으로 미생물 오일(예를 들어, 지질 및 지방산) 수율을 증가시키기에 충분하다. 특정 구체예에서, 상기 조인자(들)는 배양물에 조인자(들)를 암호화하는 외인성 유전자를 함유하는 미생물(예를 들어, 미세 조류)을 포함시킴으로써 배양물에 제공된다. 대안적으로, 조인자(들)는 조인자의 합성에 관여하는 단백질을 암호화하는 외인성 유전자를 함유하는 미생물(예를 들어, 미세 조류)를 포함시킴으로써 배양물에 제공될 수 있다. 임의의 구체예에서, 적합한 조인자는, 예를 들어 비오틴 및 판토텐산과 같은 지질 경로 효소에 의해 요구되는 임의의 비타민을 포함한다. 본원에 기술된 방법에서 사용하기에 적합한 조인자를 암호화하거나 상기 조인자의 합성에 관여하는 유전자는 널리 공지되어 있고 전술한 것들과 같은 기술 및 구조물을 사용하여 미생물(예를 들어, 미세 조류 또는 본원에 기술된 기타 다른 유지성 미생물)에 도입될 수 있다.

[0173] 본원에 기술된 생물 반응기, 배양 조건 및 종속 영양 생장 및 번식 방법의 특정 예를 임의의 적합한 방식으로 조합하여 미생물 생장 및 지질 및/또는 단백질 생산의 효율을 개선시킬 수 있다.

[0174] 건조 중량으로 높은 백분율의 오일/지질이 축적된 미세 조류 바이오매스가 생성되었다(PCT 공개 제2008/151149호 참조). 본원에 기술되고 본원에 기술된 방법에 따라 유용한 배양 방법에 의해 생성된 미세 조류 바이오매스는 건조 중량으로 10% 이상의 미세 조류 오일을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 미생물 바이오매스는 건조 중량을 기준으로 25% 이상, 50% 이상, 55% 이상 또는 60% 이상의 미세 조류 오일을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 미세 조류 바이오매스는 건조 중량으로 10% 내지 90%의 미세 조류 오일, 25% 내지 75%의 미세 조류 오일, 40% 내지 75%의 미세 조류 오일, 또는 50% 내지 70%의 미세 조류 오일을 함유한다.

[0175] 본원에 기술된 바이오매스의 미세 조류 오일, 또는 본원에 기술된 방법 및 조성물에 사용하기 위한 바이오매스로부터 추출된 오일은 하나 이상의 별개의 지방산 에스테르 측쇄를 갖는 글리세로지질을 포함할 수 있다. 글리세로지질은 다양한 길이 및 다양한 포화도를 가질 수 있는 1개, 2개 또는 3개의 지방산 분자에 에스테르화된 글리세롤 분자로 구성된다. 지방산 분자(및 지방산 분자를 함유하는 미세 조류 오일)의 길이 및 포화 특성은 하기 섹션 V에서 보다 상세하게 기술된 바와 같은 배양 조건을 통해 또는 지질 경로 조작을 통해 본원에 기술된 미세 조류 오일 중 지방산 분자의 특성 또는 비율을 변형시키기 위해 조작될 수 있다. 따라서, 조류(또는 기타 다른 미생물) 오일의 특이적 배합물은 2가지 이상의 미세 조류 종으로부터 바이오매스 또는 조류 오일을 함께 혼합함

으로써, 또는 대두, 평지씨, 카놀라, 야자, 팜핵, 코코넛, 옥수수, 폐기 식물, 오구나무(Chinese tallow), 올리브, 해바라기, 면화씨, 닭 지방, 우지, 돈지, 미세 조류, 거대 조류, 미생물, 쿠페아, 아마, 땅콩, 초이스 백색 그리스, 라드, 양구슬냉이, 겨자씨, 캐슈 너트, 귀리, 루핀, 양마, 금잔화, 대마, 커피, 아마인(아마), 헤이즐넛, 등대풀속, 호박씨, 고수, 동백나무, 참깨, 홍화, 벼, 유동, 코코아, 코프라, 양귀비, 아주까리씨, 피칸, 호호마, 마카다미아, 브라질 너트, 아보카도, 석유 또는 상기 오일 중 임의의 종류 분획물과 같은 기타 다른 공급원 유래의 오일과 본원에 기술된 조류 오일을 배합함으로써 조류의 단일 종 내에서 제조할 수 있다.

[0176] 상기 언급한 바와 같이, 오일 조성물, 즉 글리세로지질의 지방산 성분의 특성 및 비율은 또한 미세 조류의 2가지 이상의 별개 종으로부터 유래한 바이오매스 또는 오일을 조합함으로써 조작할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 미세 조류의 2가지 이상의 별개 종은 상이한 글리세로지질 프로필을 갖는다. 미세 조류의 별개 종은 바람직하게 종속 영양 조건 하에 본원에 기술된 바와 같이 함께 배양하거나 별도로 배양하여 각각의 오일을 생성할 수 있다. 미세 조류의 상이한 종은 세포의 글리세로지질 내 상이한 백분율의 별개의 지방산 성분을 함유할 수 있다.

[0177] 일반적으로 프로토테카 군주의 지질 프로필은 C16 및 C18 지방산이 주요 종으로서 존재한다. 이와 같은 장쇄 지방산, 특히 단일 포화 C16 및 C18 지방산(즉 C16:1 및 C18:1)은 일반적으로 유전성 유체를 생산하는데 바람직하다(예를 들어 미국 특허 제6,274,067호 참조). 예를 들어 프로토테카 모리포르미스(UTEX 1435), 프로토테카 스타그노라(UTEX 327) 및 프로토테카 모리포르미스(UTEX 1441)는 C16 지방산을 12% 내지 30%, 그리고 C18:1 지방산을 50% 내지 58% 함유한다. 클로렐라 프로토테코이데스(UTEX 250)는 C18:1 지방산을 약 73% 함유하고, 기타 다른 클로렐라 프로토테코이데스 군주, 예를 들어 UTEX 25, UTEX 249, UTEX 256, UTEX 264, UTEX 411, CCAP 211/17, CCAP 221/8D 및 SAG 221 10d(이에 한정되는 것은 아님)는 C16 지방산을 7% 내지 18%, 그리고 C18:1 지방산을 55% 내지 75% 함유한다. 다양한 구체예에서, 본원에 기술된 생산물(예를 들어 유전성 유체)에 유용한 미생물 오일(지질)은 C18:1을 약 50% 이상, 예를 들어 C18:1을 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상 및 약 90% 이상 함유한다. 이와 같은 구체예 또는 다른 구체예에 있어서, 미생물 오일(지질)은 C18:2를 약 10% 미만, 예를 들어 C18:2를 약 7.5% 미만, 약 5% 미만, 약 2.5% 미만, 그리고 약 1% 미만 함유한다. 미생물 오일은 C18:1 및 C18:2를 임의의 백분율(전부 합하여 100% 이하)로 조합하여 함유할 수 있다. 예를 들어 미생물 오일은 C18:1을 50% 이상 그리고 C18:2를 10% 미만, 또는 C18:1을 80% 이상 그리고 C18:2를 5% 미만으로 함유할 수 있다.

[0178] 미세 조류(또는 기타 다른 미생물) 오일(지질)은 또한 미세 조류에 의해 생산되거나 또는 배양 배지로부터 유래하는 미세 조류 오일에 혼합되는 기타 다른 성분들을 포함할 수도 있다. 이와 같은 기타 다른 성분들은 배양 조건, 미생물 종, 바이오매스로부터 오일을 회수하는데 사용되는 추출 방법, 그리고 오일 조성에 영향을 미칠 수 있는 기타 다른 인자에 따라서, 다양한 양으로 존재할 수 있다. 이와 같은 성분들의 비제한적인 예로서는 카로티노이드($0.4\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만으로 존재); 라이코펜($0.001\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만으로 존재); 베타 카로틴($0.02\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만으로 존재); 엽록소(오일 1kg당 0.02mg 미만으로 존재); 감마 토코페롤(오일 100g당 0.40mg 내지 0.60mg으로 존재); 캄페스테롤(오일 100g당 3mg 내지 9mg으로 존재); 및 토코트리엔올(오일 1g당 0.5mg 미만으로 존재)을 포함한다.

[0179] 기타 다른 성분은 제한 없이, 인지질, 토코페롤, 토코트리엔올, 카로티노이드(예를 들어, 알파-카로틴, 베타-카로틴, 라이코펜 등), 크산토폰(예를 들어, 루테인, 제아잔틴, 알파-크립토산틴 및 베타-크립토산틴), 및 다양한 유기 또는 무기 화합물을 함유할 수 있다. 몇몇 경우에 있어서, 프로토테카 종으로부터 추출된 오일은, 오일 1g당 $0.003\mu\text{g}$ 내지 $0.039\mu\text{g}$ 의 루테인, 오일 1g당 $0.003\mu\text{g}$ 미만의 라이코펜, 그리고 오일 1g당 $0.003\mu\text{g}$ 미만의 베타 카로틴을 포함한다.

[0180] 5. 유지성 효모 군주 및 배양 조건

[0181] 본 발명은 유지성 효모 바이오매스로부터 오일/지질을 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명은, 부분적으로는 오일 함량이 높은 효모 바이오매스가 제조될 수 있으며, 추출된 오일은 다수의 유용한 생산물, 예를 들어 유전성 유체 및 기타 다른 윤활제로 전환될 수 있다는 발견을 바탕으로 한다. 포화 및 중간 길이 사슬로부터 장쇄 지방산(예를 들어 C16 및 C18 지방산)에 이르기까지의 혼합물을 포함할 수 있는 효모 오일은, 화학 생산물, 예를 들어 유전성 유체를 제조하는데 사용되는 우수한 출발 물질을 제공한다.

[0182] 천연의 조건에서, 적당한 오일 또는 지질을 높은 수준으로 생산하는 효모가 바람직하지만, 적당한 오일 및/또는 지질을 생산하는 다양한 효모 종이 본원에 기술된 방법에 따라서 사용될 수 있다.

[0183] 특정 구체예에서, 유지성 효모는 건조 중량을 기준으로 하였을 때 트리글리세라이드 오일을 20% 이상 함유하는

세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 유지성 효모는 건조 중량을 기준으로 하였을 때 트리글리세라이드 오일을 25% 내지 35% 이상 함유한다. 일반적으로, 이와 같은 구체예에서, 유지성 효모 중에는 많은 양의 오일이 함유되어 있을수록, 바이오매스로부터 많은 양의 오일이 추출될 수 있으므로, 유지성 효모는 건조 중량을 기준으로 40% 이상, 50% 이상 또는 60% 이상의 트리글리세라이드 오일을 함유하도록 배양될 수 있는 것이 통상적으로 바람직하다. 지질의 사슬 길이, 포화 수준은 원치 않는 정도일 수도 있거나, 원치 않는 오염 물질과 결합되어 있을 수도 있으므로, 모든 종류의 지질이 화학 생산물, 예를 들어 유전성 유체에 사용될 것이 요망되는 것은 아니다. 이와 같은 고려 사항은 또한 본원에 기술된 방법에 사용될 유지성 효모(또는 기타 다른 임의의 미생물)의 선별에 영향을 주기도 한다.

[0184] 본원에 기술된 방법에 사용될 유지성 효모의 적당한 종으로서는 칸디다 아피콜라, 칸디다 종, 크립토크스 커바투스, 크립토크스 테리콜러스, 디바로마이세스 한세니, 엔도마이콕시스 버날리스, 게오텐리쿰 카라비다룸, 게오텐리쿰 쿠쿠조이다룸, 게오텐리쿰 히스테리다룸, 게오텐리쿰 실비콜라, 게오텐리쿰 불가레, 하이포피치아 버토니, 리포마이세스 리포퍼, 리포마이세스 오렌탈리스, 리포마이세스 스타케이, 리포마이세스 테트라스포러스, 피치아 맥시카나, 로도스포리디움 스파에로카르푸, 로도스포리디움 토룰로이데스, 로도토룰라 오란티아카, 로도토룰라 다이레넨시스, 로도토룰라 디플루엔스, 로도토룰라 글루티누스, 로도토룰라 글루티니스 변종 글루티니스, 로도토룰라 그라실리스, 로도토룰라 그라미니스, 로도토룰라 미뉴타, 로도토룰라 뮤실라기노사, 로도토룰라 뮤실라기노사 변종 뮤실라기노사, 로도토룰라 터페노이달리스, 로도토룰라 토룰로이데스, 스포로볼로마이세스 알보루베센스, 스타메렐라 봄비콜라, 토룰라스포라 텔브루에키, 토룰라스포라 프레토리엔시스, 트리코스포론 비렌드, 트리코스포론 브라시카에, 트리코스포론 도메스티쿰, 트리코스포론 라이바치, 트리코스포론 루비에리, 트리코스포론 루비에리 변종 루비에리, 트리코스포론 몬테비딘스, 트리코스포론 폴루란스, 트리코스포론 종, 위커하모마이세스 카나덴시스, 야로위아 리폴리티카 및 자이코아스쿠스 메이에라에를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0185] 본원에 기술된 방법에 사용될 유지성 효모 종은, 효모 계능의 임의의 표적 영역과 본원에서 지정된 종의 동일 영역들을 비교함으로써 확인될 수 있으며; 바람직한 종은, 본원에서 지정된 종과 동일하거나 이러한 종과의 상동성을 매우 높은 수준으로 나타내며, 본원에 구체적으로 개시된 균주가 생산하는 지질과 유사한 유형 및 유사한 양의 지질을 생산하는 종이다. 예를 들어 특정 유지성 효모 종 또는 균주의 확인은, 프라이머를 사용하는 계능 DNA의 증폭 및 서열 결정, 그리고, 계능의 적절한 영역들을 이용하는 방법론을 통해, 예를 들어 문헌 [Kurtzman 및 Robnett, *Antonie van Leeuwenhoek* 73(4): 331-371 (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit(26S) ribosomal DNA partial sequences]에 개시된 방법을 이용하여 이루어질 수 있다. 잘 확립된 계통 발생 분석법, 예를 들어 리보솜 RNA 유전자의 핵내 18S 및 26S 영역, 그리고 내부 전사된 스페이서(ITS) 영역과 기타 다른 보존된 영역의 증폭과 서열 결정은 당업자에 의해 본원에 기술된 방법에 사용하기 적당한 유지성 효모의 종을 확인하는데 사용될 수 있다.

[0186] 그러므로, 계능 DNA 비교법은 본원에 기술된 방법에 사용될 유지성 효모의 적당한 종들을 확인하는데 사용될 수 있다. 보존된 계능 DNA 영역, 예를 들어 진균 18S rRNA 유전자의 3' 영역과 진균 26S rRNA 유전자의 5' 영역 사이에 존재하는 보존 계능 서열 영역(이에 한정되는 것은 아님)은, 예를 들어 본원에 기술된 방법에 사용된 바람직한 유지성 효모와 분류학적으로 관련될 수 있는 효모 종으로부터 증폭된 후, 이와 같은 바람직한 종의 상응하는 영역과 비교될 수 있다. 이후, 유사성 수준이 높은 종은 본원에 기술된 방법에 사용되도록 선별된다. 실시예 6에는 유지성 효모 균주의 48개 균주에 대한 진균 18S rRNA의 보존된 3' 영역과 진균 26S rRNA의 5' 영역의 계능 서열 결정에 대해 기술되어 있다. 뉴클레오타이드 또는 아미노산 동일성%를 측정하기 위한 서열 비교는 미세조류/미생물에 대해 전술된 방법들과 동일한 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0187] 유지성 효모는 본원에 기술된 방법에 따라서 바이오매스를 번식시키기 위해 액체 배지 중에서 배양된다. 본원에 기술된 방법에 있어서, 유지성 효모 종은 빛이 존재하지 않는 조건 하에서 고정 탄소 공급원 및/또는 고정 질소 공급원을 함유하는 배지 중에서 성장한다(중속 영양 성장). 유지성 효모의 중속 영양 성장은 일반적으로 호기 환경에서 진행된다. 예를 들어 제한된 질소 조건 하에서 장기간(예를 들어 10일 내지 15일 이상) 동안 이루어지는 중속 영양 성장을 통해서 세균 중 경 지질/경 오일 함유물이 축적될 수 있다.

[0188] 유지성 효모 배양 배지는 통상적으로 성분, 예를 들어 고정 탄소 공급원(이하에 언급됨), 고정 질소 공급원(예를 들어 단백질, 대두 밀, 효모 추출물, 옥수수 침지액, 암모니아(순수한 형태 또는 염 형태), 질산염(nitrate) 또는 질산 염(nitrate salt)), 미량 원소, 임의로는 pH 유지용 완충제 및 포스페이트(인 공급원; 기타 다른 포스페이트 염도 사용 가능)를 함유한다.

- [0189] 특정 구체예에서, 유지성 효모 균주를 배양하는데 적당한 배지는 YPD 배지이다. 이 배지는 무균 배양에 적당한 것으로서, 증류수에 박토-효모 10g, 박토-펩톤 20g 및 글루코스 40g을 첨가함으로써 1L 용적의 배지(pH 약 6.8)가 제조될 수 있다. 1.5% 한천 배지에 있어서는, 한천 15g이 용액 1L에 첨가될 수 있다. 상기 용액은 덮개로 덮어진 후, 오토클레이브 처리가 되고 나서, 냉장 온도에 보관되었다가 사용된다. 건조 중량을 기준으로 하는 백분율로 표시되는 지질 수준을 높게 만들기 위해서 유지성 효모 균주를 생장 및 번식시키는 기타 다른 방법에 대해서는, 예를 들어 (회분식 발효법을 이용하여 지질 함량이 67.5%w/w가 되도록 로도스포리디움 톨로이데스를 배양하는 것에 관하여 기술된) 문헌[Li et al., *Enzyme and Microbial Technology* (2007) 41:312-317]에 기술되어 있다. 유지성 효모 내 지질/오일 함량은 통상적으로 질소 제한 조건 하에서 탄소 공급원을 과량으로 제공하여 발효 시간을 늘림으로써 증가할 수 있다.
- [0190] 고체 및 액체 생장 배지는 일반적으로 다양한 공급처로부터 구입될 수 있으며, 다양한 유지성 효모 균주에 사용하기 적당한 특정 배지를 제조하는 것에 관한 지침은, 예를 들어 웹사이트(www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium186.pdf)에서 살펴볼 수 있다.
- [0191] 본원에 기술된 방법에 사용하기 적당한 기타 다른 배지는 상기 지정된 URL을 참고로 하거나, 유지성 효모 배양액을 보관하는 기타 다른 기구, 예를 들어 세계 오스트리아 생물 자원 및 응용 균학 센터의 진균 배양 수집소(Fungal Culture Collections of The World Austrian Center of Biological Resources and Applied Mycology(www.biotech.boku.ac.at/acbr.html)); 생물 의학 진균 및 효모 수집소(The Biomedical Fungi and Yeasts Collection(bccm.belspo.be/about/ihem.php)); 체코 미생물 수집소(Czech Collection of Microorganisms(sci.muni.cz/ccm/index.html)); 파스퇴르 연구소(Institut Pasteur(www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-000011-08h/)); 독일 미생물 및 세포 배양액 수집소(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures(www.dsmz.de/)); 미코테카 유니베르시타티스 타우리넨시스(Mycotheca Univesitatis Taurinensis(web086.unito.it/cgi-bin/bioveg/documenti.pl/Show?_id=b522)); 리켄 생물 자원 센터 일본 미생물 수집소(Riken Bioresource Center Japan Collection of Microorganisms(www.jcm.riken.jp/JCM/announce.shtml)); 국립 효모 배양액 수집소(The National Collection of Yeast Cultures(www.ncyc.co.uk/)); ATCC (www.atcc.org/); 파프 효모 배양액 수집소(Phaff Yeast Culture Collection (www.phaffcollection.org/))로부터 얻은 자료들을 참고함으로써 용이하게 확인될 수 있다.
- [0192] 본원에 기술된 방법에 따라서 유용한 유지성 효모는 전 세계적으로 다양한 지역과 환경에서 발견된다. 다른 종들로부터 상기와 같은 효모 종이 분리되고 이로부터 확인된 진화학적 다양성으로 인하여, 특정 미생물 종의 최적 생장과 이와 같은 미생물 종으로부터 오일 및/또는 지질 및/또는 단백질을 생산하는데 사용되는 특정 생장 배지는 예측하기 어렵거나 불가능하지만, 당업자들은 본원에 개시된 사항을 참고로 하여 통상의 테스트를 통해 적당한 배지를 용이하게 알아낼 수 있다. 몇몇 경우에 있어서, 임의의 미생물 균주는 특정 생장 배지에서는 생장할 수 없는데, 그 이유는 몇몇 억제 성분이 존재하거나 아니면 미생물의 특정 균주에 의해 요구되는 몇몇 필수 영양 조건이 갖추어지지 않기 때문이다. 이하 실시예는 지질을 높은 수준(건조 세포 중량의 백분율로서 표시)으로 축적하기 위해, 다양한 유지성 효모 종을 배양하는 예시적인 방법을 제공한다.
- [0193] 고정 탄소 공급원은 배지의 중요한 성분이다. 본원에 기술된 방법에 사용하기 적당한 고정 탄소 공급원으로서, 예를 들어 글루코스, 프럭토스, 수크로스, 락토스, 갈락토스, 자일로스, 만노스, 람노스, 아라비노스, N-아세틸글루코사민, 글리세롤, 글루쿠론산, 라피노스, 스타키오스 및/또는 아세테이트를 포함한다. 전술한 서브 섹션 3(배지)은, 적당한 탄소 공급원에 대한 더 상세한 설명을 포함한다.
- [0194] 공정 조건은 지질(오일)인 세포 중량 백분율을 증가시키도록 조정될 수 있다. 예를 들어 임의의 구체예에서, 유지성 효모는, 하나 이상의 영양소, 예를 들어 질소, 포스페이트 및 임의의 금속 이온이 한정된 농도만큼 존재하는 조건 하에 배양되며, 이때 고정 탄소 공급원(예를 들어 글루코스)은 과량으로 제공된다. 질소가 제한되면 미생물 지질 수율이, 질소가 과량으로 제공된 배양액 중 미생물 지질 수율에 비하여 증가되는 경향이 있다. 특정 구체예에서, 지질 수율의 증가율은 약 10%, 50%, 100%, 200% 또는 500% 이상이다. 미생물은 전체 배양 기간 중 일부 또는 전체 배양 기간 동안 제한된 양만큼의 영양소의 존재 하에 배양될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 영양소의 농도는 제한 농도와 비 제한 농도 사이에서 순환한다(전체 배양 기간 중 2회 이상).
- [0195] 정상 생장 상태에서, 세포는 오일(지질)을 축적하지만, 세포 분열을 진행시키지는 않는다. 본 발명의 하나의 구체예에서, 생장 상태는 세포에 원 생장 배지의 모든 성분들(고정 질소 공급원은 제외)을 계속 공급함으로써 유지된다. 예를 들어 장기간 동안 세포에 고정 질소 공급원을 제외한 모든 영양소를 공급함으로써 유지성 효모를 배양하면, 지질이 높은 수준(건조 세포 중량을 기준으로 하는 백분율로 표시)으로 얻어진다.

- [0196] 다른 구체예에서, 고 지질 바이오매스는, 장기간(예를 들어 1주 또는 2주 이상)에 걸쳐 모든 고정 질소 공급원이 소모된 후 고정 탄소 공급원을 세포에 공급함으로써 제조된다. 몇몇 구체예에서, 세포는, 고정 탄소 공급원의 존재하에서, 그리고 고정 질소 공급원의 부재 하에서 10일 이상, 15일 이상 또는 20일 이상의 기간에 걸쳐 오일을 축적하게 된다. 본원에 기술되어 있거나 당업계에 공지된 조건들을 이용하여 생산한 유지성 효모는 건조 중량을 기준으로 약 20% 이상의 지질을 포함할 수 있으며, 종종 건조 중량을 기준으로 35%, 45%, 55%, 65% 및 심지어 75% 이상의 지질을 포함할 수 있다. 그러므로, 미생물내 지질 생산에서 건조 세포 중량을 기준으로 하여 백분율로 표시되는 지질의 수준은, 세포를 성장 상태(세포가 탄소를 소모하여 오일을 축적하되 세포 분열은 진행시키지 않는 상태)로 유지시킴으로써 증가될 수 있다.
- [0197] 질소가 과량으로 존재하는 조건은, 질소가 과량으로 공급되지 않는 배양 조건에서의 미생물 오일 수율에 비해 미생물 단백질 수율을 증가시키는 경향이 있다. 유지성 효모용으로서 적당한 질소 공급원은 유기 질소 공급원 및/또는 무기 질소 공급원으로부터 유래할 수 있다.
- [0198] 유기 질소 공급원의 비제한적 예로서는 효모 추출물, 펩톤, 옥수수 침지액 및 옥수수 침지 분말이 있다. 바람직한 무기 질소 공급원의 비제한적 예로서는, 예를 들어 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 NH_4OH 를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 하나의 구체예에서, 본 발명을 수행하기 위한 배양 배지는 오로지 무기 질소 공급원만을 함유한다. 다른 구체예에서, 본 발명을 수행하기 위한 배양 배지는 오로지 유기 질소 공급원만을 함유한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명을 수행하기 위한 배양 배지는 유기 및 무기 질소 공급원들의 혼합물을 함유한다.
- [0199] 유지성 효모를 생산시키는데 사용되는 배지 제제의 일례는 다음과 같은 성분들을 포함한다: 7g/L KH_2PO_4 ; 2g/L Na_2HPO_4 ; 1.5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.5g/L 효모 추출물; 0.2g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.1g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.001g/L 바이오틴 및 0.001g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 수준은 HCl을 사용하여 5.5로 맞추어지고, 질소 공급원으로서는 12g/L 글루코스와 30g/L NH_4Cl 을 함유함). 유지성 효모를 생산시키는데 사용되는 다른 배지는 다음과 같은 성분들을 포함한다: 20g/L 글루코스; 0.5g/L 효모 추출물; 5g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 및 1g/L KH_2PO_4 ; 0.5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. 발효조 내 유지성 효모를 생산시키는데 사용되는 하나의 배지 제제는 다음과 같은 성분들을 포함한다: 30g/L 글루코스; 20g/L 자일로스; 2g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1g/L KH_2PO_4 ; 및 0.5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- [0200] 본원에 기술된 방법에 있어서, 생물 반응기 또는 발효조는 유지성 효모 세포의 생리학적 주기 중 다수의 단계들을 거쳐 상기 유지성 효모 세포를 배양하는데 사용된다. 예를 들어 지질 생산 유지성 효모 세포의 접종물이 배지에 혼입되는데; 이 경우, 세포는 번식을 개시하기 전에 지연기(지연 단계)를 거친다. 지연기가 지나고 나면, 번식률은 꾸준히 증가하여 대수기 또는 지수기로 들어가게 된다. 지수기 이후에는 영양소, 예를 들어 질소와 같은 영양물의 감소, 독성 물질 증가, 및 퀴럼 센싱 기작(quorum sensing mechanism)으로 인해 번식이 느려진다. 이와 같이 번식이 느려지다가 번식이 멈추어지며, 세포는 이 세포에 제공되는 구체적인 환경에 따라서 정지기 또는 일정한 성장 상태로 들어가게 된다. 지질이 풍부한 바이오매스를 얻기 위해서, 배양액은 통상적으로 지수기가 끝나갈 때 수집되는데, 여기서, 상기 지수기는, 처음에 질소 또는 기타 다른 중요 영양소(탄소 제외)를 고갈시켜 조기 종결시킨 다음, 세포가 과량으로 존재하는 탄소 공급원을 지질로 전환하도록 할 수 있다. 배양 조건 매개 변수는 총 오일 생산, 생산된 지방산 종들의 조합 및/또는 특정 오일의 생산을 최적화하도록 조작될 수 있다.
- [0201] 고 지질 유지성 효모를 생산하기 위하여, 세포는 액체, 예를 들어 현탁 배양액 중에서 다량으로 발효되는 것이 바람직하다. 생물 반응기, 예를 들어 강철 발효기(본 발명의 다양한 구체예에서, 5000리터, 10,000리터, 80,000리터, 그리고 이 이상의 용적이 사용됨)는 매우 큰 용적의 배양액을 담을 수 있다. 생물 반응기는 또한, 통상적으로 배양 조건, 예를 들어 온도, pH, 산소 분압 및 이산화탄소 수준을 제어할 수 있다. 예를 들어 생물 반응기는 통상적으로, 기체 성분들, 예를 들어 산소 또는 질소가 액체 배양액을 통해 기포 주입될 수 있도록, 예를 들어 관에 부착된 포트를 이용하여 구성될 수 있다.
- [0202] 생물 반응기는, 유지성 효모가 증식하여 그 수가 증가하게 되는 시기에 걸쳐서 배양 배지가 생물 반응기로 흐르도록 구성될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 예를 들어 배지는, 접종이 이루어진 후이되 세포가 원하는 밀도에 도달하기 전에 생물 반응기에 주입될 수 있다. 다른 경우에 있어서, 생물 반응기는 배양 초기의 배양 배지로 충전되며, 배양액이 접종된 후에는 더 이상의 배양 배지는 주입되지 않는다. 다시 말해서, 유지성 효모 바이오매스는, 효모가 증식하여 그 수가 증가하는 시기 동안 수성 배지 중에서 배양되지만; 다량의 수성 배양 배지는 전체 기간 동안 생물 반응기를 통과하지 않는다. 그러므로, 몇몇 구체예에서, 수성 배양 배지는 접종이 이루어진 후 생

물 반응기를 통과하여 흐르지 않는다.

- [0203] 장치, 예를 들어 회전 블레이드와 임펠러, 진동 메커니즘(rocking mechanism), 교반 막대, 가압 기체 주입 수단이 장착된 생물 반응기는 유지성 효모 배양액을 혼합하는데 사용될 수 있다. 혼합은 계속 진행될 수 있거나, 간헐적으로 진행될 수 있다. 상기 간략하게 기술된 바와 같이, 생물 반응기에는 종종, 예를 들어 배양액의 기체 함유물을 조작할 수 있는 다양한 포트가 장착된다. 예시를 위해서, 생물 반응기의 용적부는 액체보다는 기체일 수 있으며, 생물 반응기의 기체 유입구는 기체를 생물 반응기에 펌핑시킬 수 있다. 유리하게 생물 반응기내에 펌핑될 수 있는 기체는 공기, 공기/CO₂ 혼합물, 비활성 가스, 예를 들어 아르곤 및 기타 다른 기체를 포함한다. 생물 반응기는, 통상적으로 기체가 생물 반응기에 도입되는 속도를 사용자가 제어할 수 있도록 장착된다. 전술한 바와 같이, 생물 반응기로의 기류가 증가하면 배양액의 혼합량이 증가될 수 있다.
- [0204] 증가된 가스 유입은 또한 배양물의 혼탁도에 영향을 미친다. 난기류는 수성 배양 배지의 수위 하부에 가스 주입 포트를 위치시켜 생물 반응기로 도입되는 가스가 배양물 표면으로 기포 주입되도록 함으로써 성취할 수 있다. 하나 이상의 기체 배출 포트는 가스가 배출되도록 하여 생물 반응기 내 압력 증강을 차단한다. 바람직하게, 가스 배출 포트는 생물 반응기로 오염 미생물이 들어가는 것을 차단하는 “원-웨이” 밸브와 연결된다.
- [0205] 본원에 기술된 생물 반응기, 배양 조건 및 종속 영양 성장, 그리고 번식 방법에 대한 구체예들은, 미생물 성장 및 지질 및/또는 단백질 생산의 효율을 개선하기 적당한 임의의 방식으로 조합될 수 있다.
- [0206] 전술한 방법에 따라서 제조된 유지성 효모 배양액은 발효 배지 중에서 유지성 효모 바이오매스를 생산한다. 이와 같이 오일 추출용 바이오매스를 제조하기 위해서, 그리고 미세 조류 또는 기타 다른 미생물 바이오매스를 제조하기 위해서, 바이오매스는 통상적으로 발효 배지로부터 수집 또는 농축된다. 발효 배지로부터 유지성 효모 바이오매스를 수집하는 시점에서의 바이오매스는 수성 배양 배지 중에 현탁된, 주로 천연의 상태인 세포를 포함한다. 바이오매스를 농축하기 위하여, 탈수 단계가 수행될 수 있다. 탈수 또는 농축이란, 발효액 또는 기타 다른 액체 배지로부터 바이오매스를 분리하는 것(고체-액체 분리)을 말한다. 그러므로, 탈수가 진행될 때, 배양 배지는 (예를 들어 바이오매스를 보유하는 필터를 통하여 발효액을 배수하여) 바이오매스로부터 분리되거나, 아니면 바이오매스는 배양 배지로부터 분리된다. 일반적인 탈수 공정은 원심 분리, 여과 및 물리적 압력을 이용하는 것을 포함한다. 이와 같은 공정은 개별적으로 사용될 수 있거나 또는 임의의 형태로 병행될 수 있다.
- [0207] 원심 분리는 혼합물을 분리하는데 원심력을 이용하는 것을 포함한다. 원심 분리가 진행되는 동안, 혼합물의 성분들 중 밀도가 큰 성분들은 원심 분리 축으로부터 멀리 떨어진 곳으로 이동하고, 혼합물의 성분들 중 밀도가 작은 성분들은 원심 분리 축에 가까운 곳으로 이동한다. 유효 중력을 증가시킴으로써(즉 원심 분리 속도를 증가시킴으로써) 밀도가 큰 재료, 예를 들어 고체는 밀도가 작은 재료, 예를 들어 액체로부터 분리된다(밀도 차에 의한 분리). 바이오매스, 발효액 또는 기타 다른 수성 용액을 원심 분리하면, 유지성 효모 세포를 포함하는 농축 페이스트가 생성된다. 원심 분리는 세포 내 수분은 거의 제거하지 않는다. 실제로, 원심 분리후 바이오매스 중에는 유리 수분 또는 표면 수분이 여전히 상당량 존재할 수 있으므로(예를 들어 70% 이상), 원심 분리는 건조 단계로서 간주하지 않는다.
- [0208] 여과도 탈수에 사용될 수 있다. 본원에 기술된 방법에 적당한 여과의 일례로서는 접선 흐름 여과(TFF)(직교류 여과라고도 알려짐)가 있다. 접선 흐름 여과는, 막 시스템과 흐름력(flow force)을 이용하여 액체로부터 고체를 분리하는 분리 기술이다. 예를 들어 적당한 여과 방법에 관하여는, 맥스셀 A/G 테크놀로지스(MaxCell A/G Technologies) 0.45μm 공동 섬유 필터에 관하여 기술된 문헌[Geresh, Carb. Polym. 50; 183-189 (2002)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon)[®] 장치(100kD, 300kD, 1000kD 막(카탈로그 번호: P2C01MC01), 0.1μm 막(카탈로그 번호: P2VPPV01), 0.22μm 막(카탈로그 번호: P2GVPPV01) 및 0.45μm 막(카탈로그 번호: P2HVMPV01) 사용)를 참조한다. 정체물은 유의적 수준으로 필터를 통과하지 않는 것이 바람직하며, 정체물 중 생성물은 필터 재료에 부착되지 않는 것이 바람직하다. TFF는 또한 공동 섬유 여과 시스템을 사용하여 수행될 수도 있다. 공극 크기 약 0.1μm 이상, 예를 들어 약 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.2, 0.22, 0.45 μm 또는 약 0.65μm 이상인 필터가 적당하다. TFF의 공극 크기는 발효액 중 용질과 세포 조각은 통과시키되, 미생물 세포는 통과시키지 않는 정도인 것이 바람직하다.
- [0209] 탈수는, 또한 미생물 바이오매스로부터 액체 발효액을 분리할 때 바이오매스를 탈수시키기 충분하되 세포는 거의 용해되지 않는 물리적 압력을 바이오매스에 직접 적용시켜 이루어질 수도 있다. 미생물 바이오매스를 탈수하는 물리적 압력은, 예를 들어 벨트 필터 프레스(belt filter press)를 사용하여 가하여질 수 있다. 벨트 필터 프레스는 물리적 압력을 슬러리(예를 들어 발효조 또는 생물 반응기로부터 직접 수집된 미생물 바이오매스)에

적용하는 탈수 장치로서, 지름이 큰 롤로부터 작은 롤에 이르기까지 다수의 롤들이 지그재그로 배치되어 있으며, 인장된 벨트 2개 사이에 슬러리가 통과하는 장치이다. 상기 벨트 필터 프레스는 실제로 다음과 같이 3개의 대역으로 구분될 수 있다: 중력 대역(중력에 의해서 자유 배출 물/액체가 다공성 벨트를 통과하는 대역); 웨지 대역(wedge zone)(압력이 가하여지게 될 고체가 제조되는 대역); 그리고 압력 대역(조정 가능한 압력이 중력에 의해 배출된 고체에 가하여지는 대역).

[0210] 농축 후, 유지성 효모 바이오매스는 이하에 기술된 바와 같이 처리되어 오일 추출용으로서 제조된다.

[0211] 당업계에 공지된 방법들을 포함하는 상이한 배양 방법을 사용하여, 오일/지질 축적 백분율(건조 중량 기준)이 큰 유지성 효모 바이오매스가 제조되었다. 축적된 오일/지질 백분율이 큰 유지성 효모가 본원에 기술된 방법에 유용하다. 칸디다 107은 질소 제한 조건 하에서 지질을 최대 40%wt/wt 축적할 수 있는 것으로 관찰되었다(Gill et al., *Appl and Environ Microbiology* (1977) pp.231-239). Li et al.는, 지질 함량이 48%w/w인 로도스피리디움 톨로로이즈 44를 회분식 배양액 중에서 생산하는 것에 대해 개시하였다(Li et al., *Enzyme and Microbial Technology* (2007) 41:312-317). 야로위아 리폴리티카는, 탄소 공급원으로서 동물성 지방(스테아린)을 이용할 때 바이오매스 1g당 지질 0.44g 내지 0.54g을 생산할 수 있는 것으로 관찰되었다(Panpanikolaou et al., *Appl Microbiol Biotechnol* (2002) 58:308-312).

[0212] 본원에 기술된 배양법에 의해 제조되었으며, 본원에 기술된 방법에 따라서 유용한 바이오매스는 건조 중량을 기준으로 10% 이상의 오일을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 바이오매스는 건조 중량을 기준으로 25% 이상, 50% 이상, 55% 이상 또는 60% 이상의 오일을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 바이오매스는 건조 중량을 기준으로 10% 내지 90%, 25% 내지 75%, 40% 내지 75% 또는 50% 내지 70%의 오일을 함유한다.

[0213] 본원에 기술된 바이오매스의 오일, 또는 본원에 기술된 방법과 조성물에 사용되는 바이오매스로부터 추출된 오일은, 뚜렷한 지방산 에스테르 측쇄를 하나 이상 가지는 글리세로지질을 포함할 수 있다. 글리세로지질은, 길이와 포화도가 다양할 수 있는 지방산 분자 1개, 2개 또는 3개에 대해서 에스테르화된 글리세롤 분자로 이루어져 있다. 오일 조성, 즉 글리세로지질의 지방산 성분의 특성과 비율은, 2개 이상의 개별 유지성 효모 종(또는 유지성 효모 및 기타 다른 오일 생산 미생물 군주)으로부터 유래하는 바이오매스 또는 오일을 합하여 조정될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 개별 미생물 종 2개 이상은 상이한 글리세로지질 프로필을 나타낸다. 미생물의 개별 종들은, 바람직하게 종속 영양 조건 하에서 본원에 기술된 바와 같이 함께 또는 별도로 배양되어, 각각의 오일을 생산할 수 있다. 상이한 미생물 종은 세포의 글리세로지질 중 개별 지방산 성분들을 상이한 백분율로 함유할 수 있다.

[0214] 야로위아 리폴리티카는 유전자 조작되었다. 본 발명의 하나의 구체예는, 윤활제 및 유전성 유체로서 사용하기 적당한 오일을 생산하도록, 지질 변경 효소를 함유하도록 조작된 야로위아 리폴리티카 균주를 사용한다. 야로위아를 조작하는 것에 대한 예는 미국 특허 제7,465,565호 및 제7,273,746호, 그리고 미국 특허 출원 제10/840579호, 제11/613420호, 제11/714377호 및 제11/264737호에 기술되어 있다.

[0215] III. 유전자 조작 방법과 재료

[0216] 본원에 기술된 방법은 재조합 미세 조류 또는 기타 다른 재조합 유지성 미생물을 이용하여 수행될 수 있다. 본 섹션에는, 유지성 미생물, 예를 들어 미세 조류(구체적으로 예를 들면 프로토테카 세포)를 유전적으로 변형하여 본원에 기술된 방법에 유용한 재조합 숙주 세포, 예를 들어 재조합 프로토테카 모리포르미스, 프로토테카 조프피, 프로토테카 크루가니 및 프로토테카 스태그노라 숙주 세포(이에 한정되는 것은 아님)를 생산하는 방법과 이에 사용되는 재료에 대해 기술되어 있다. 이러한 방법과 재료에 대한 설명은 독자의 편의를 위해서 서브섹션들로 나누어 기술되어 있다. 서브섹션 1에는 형질 전환 방법이 기술되어 있다. 서브섹션 2에는 상동성 재조합법을 이용하는 유전자 조작 방법이 기술되어 있다. 서브섹션 3에는 발현 벡터와 구성 요소가 기술되어 있다.

[0217] 1. 조작 방법 - 형질 전환

[0218] 세포는, 예를 들어 유전자 총(biolistics), 전기천공(문헌[Maruyama et al. (2004), *Biotechnology Techniques* 8:821-826] 참조), 유리 비드 형질 전환 및 탄화규소 휘스커 형질 전환을 포함하는 임의의 적합한 기술에 의해 형질 전환될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 방법은 원형질체를 형성하고 CaCl_2 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 사용하여 재조합 DNA를 미세 조류 세포 또는 기타 다른 미생물 세포에 도입하는 것을 수반한다(문헌[Kim et al. (2002), *Mar. Biotechnol.* 4:63-73] 참조, 상기 문헌은 클로렐라 엘립소이데아의 형질 전환을 위한 상기 방법의 사용을 보고함). 미세 조류의 동시 형질 전환을 사용하여 2가지의 별개 벡터 분자를 세포에 동시에 도입할 수

있다(예를 들어, 문헌[Protist 2004 Dec;155(4):381-93] 참조).

[0219] 또한 유전자 총 방법(예를 들어, 문헌[Sanford, Trends In Biotech. (1988) 6:299 302], 미국 특허 제 4,945,050호 참조); 전기천공[문헌[Fromm et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) (1985) 82:5824 5828]; 레이저 빔, 미세주입 또는 DNA를 미세 조류로 도입할 수 있는 임의의 기타 다른 방법을 프로토타카 세포와 같은 유지성 미생물의 형질 전환에 사용할 수 있다.

[0220] 2. 조작 방법 - 상동성 재조합법

[0221] 상동성 재조합법은 상보성 DNA 서열이 정렬되어 상동성 영역들을 교체하는 능력에 관한 것이다. 상동성 재조합법에 있어서, 표적화되는 게놈 서열(“주형”)에 상동성인 서열을 함유하는 유전자 이식 DNA(“공여체”)를 유기체 내에 도입한 다음, 상응하는 상동성 게놈 서열의 특정 위치에 있는 게놈으로의 재조합을 수행한다. 이 방법에 있어서 기계 작용에 의한 단계는, 대부분의 경우, 다음과 같은 단계들을 포함한다: (1) 상동성 DNA 분절의 쌍 형성; (2) 이중 사슬 파괴부의 공여 DNA 분자로의 도입; (3) 유리 공여 DNA 말단의 주형 DNA 분자로의 침투 및 DNA 합성; 그리고 (4) 이중 사슬 파괴부가 수복되어 최종 재조합 생성물이 생성되는 현상의 분석.

[0222] 숙주 유기체에서 상동성 재조합을 수행하기 위한 능력은 분자 유전학적 수준에서 수행될 수 있는 것에 대한 많은 실제 연관성을 갖고 맞춤 오일(지질)을 생성할 수 있는 유지성 미생물의 생성에 유용하다. 이의 매우 자연적인 상동성 재조합이란 정확한 유전자 표적화 사건이고, 따라서 동일한 표적화 서열로 생성된 대부분의 이식 유전자 계열은 표현형의 관점에서 근본적으로 동일하고 극소수의 형질 전환 사건의 스크리닝을 필요로 한다. 상동성 재조합은 또한 숙주 염색체로의 유전자 삽입 사건을 표적화하여, 심지어 유전자 선별 부재 하에서도 우수한 유전학적 안정성을 가져온다. 상이한 염색체 유전자좌는 심지어 이중성 프로모터/UTR로부터 유전자 발현에 영향을 줄 수 있기 때문에, 상동성 재조합은 잘 모르는 게놈 환경 내에서 유전자좌를 탐색하고 유전자 발현에 대한 특정 게놈 환경의 영향을 평가하는 방법일 수 있다.

[0223] 상동성 재조합을 사용하는 특히 유용한 유전자 조작 접근법은 고도로 특이적인 방식으로 이중성 유전자 발현을 구동시키는 프로모터/UTR과 같은 특이적 숙주 조절 요소를 선택하는 것이다. 예를 들어 선택 마커를 암호화하는 이중 유전자에 의한 불포화 효소 유전자/유전자 군의 소모 또는 녹아웃은 숙주 세포 중에서 생산된 포화 지방산의 전체 백분율을 증가시키는데 사용될 수 있다. 실시예 4에는, 구조물을 상동성 재조합 표적화하는 것과, 프로토타카 모리포르미스 내에서 일어나는 불포화 효소 유전자 소모(녹아웃)의 작업 실시예가 기술되어 있다. 내인성 유전자의 발현을 감소시키는 또 다른 접근법으로서는, 유전자 발현을 하향 조절 또는 침묵시키는 RNA 유도성 방법, 예를 들어 RNAi 또는 안티센스 접근법과 dsRNA 접근법(이에 한정되는 것은 아님)을 이용하는 것이 있다. 안티센스, RNAi, dsRNA 및 헤어핀 RNA 접근법은 당업계에 널리 알려져 있으며, 이 접근법은, mRNA로서 발현될 때 헤어핀 RNA를 형성시키는 발현 구조물, 또는 안티센스 배향으로 전사되는 표적 유전자의 일부를 함유하는 발현 구조물을 도입하는 것을 포함한다. 이와 같은 접근법들은 모두 표적 유전자의 발현을 감소시킨다. 실시예 4에는 또한 헤어핀 RNA 접근법에 의해 내인성 프로토타카 모리포르미스 델타 12 불포화 효소 유전자(FADc)를 하향 조절하는 것에 관한 작업 실시예와 발현 구조물에 대해 기술되어 있다.

[0224] 상동성 재조합은 정확한 유전자 표적화 현상이므로, 이는 충분한 측접 영역들이 확인되는 한, 목적으로 하는 유전자 또는 영역 내 임의의 뉴클레오티드(들)를 정확히 변형하는데 사용될 수 있다. 그러므로, 상동성 재조합은 RNA 및/또는 단백질의 유전자 발현에 영향을 주는 조절 서열들을 변형하는 수단으로서 이용될 수 있다. 상동성 재조합은 효소 활성, 예를 들어 기질 특이성, 친화성 및 Km을 변경하도록 단백질 암호화 영역을 변형하여, 숙주 세포 내 대사를 원하는 바대로 변경하는데 사용될 수도 있다. 상동성 재조합은 숙주 게놈을 조작하여, 유전자 표적화, 유전자 전환, 유전자 결실, 유전자 중복 및 유전자 역위를 유발시킬 뿐만 아니라, 유전자 발현 조절 요소, 예를 들어 프로모터, 인핸서 및 3'UTR을 교환하는 강력한 수단을 제공한다.

[0225] 상동성 재조합은 내인성 숙주 세포 게놈 내에 관심의 유전자 또는 영역을 “표적화” 하기 위한 내인성 서열 조각을 함유하는 표적화 구조물을 사용하여 성취될 수 있다. 상기 표적화 서열은 관심의 유전자 또는 영역의 5'에 위치하거나 관심의 유전자/영역의 3'에 위치하거나 심지어 관심의 유전자/영역을 측접할 수 있다. 상기 표적화 구조물은 추가의 벡터 골격과 함께 고차코일화된 플라스미드 DNA로서, 벡터 골격을 갖지 않는 PCR 생성물로서 또는 선형화된 분자로서 숙주 세포로 형질 전환될 수 있다. 몇몇 경우에, 이것은 먼저 제한 효소에 이식 유전자 DNA(공여체 DNA)내의 상동성 서열을 노출시키는 것이 유리할 수 있다. 상기 단계는 재조합 효율을 증가시킬 수 있고 원하지 않는 사건의 발생을 감소시킬 수 있다. 재조합 효율을 증가시키는 기타 다른 방법은 PCR을 사용하여 표적화된 게놈 서열에 상동성인 선형 말단을 함유하는 형질 전환 이식 유전자 DNA를 생성시키는 것을 포함한다.

[0226] 비제한적으로 예시하기 위해서, 상동성 재조합에 유용한 공여 DNA 서열의 영역들로서는, 프로토타카 모리포르미스 내 DNA의 KE858 영역을 포함한다. 상기 KE858은, 단백질의 운반 RNA(tRNA) 군과 상동성을 공유하는, 단백질 암호화 영역의 일부를 포함하는, 1.3kb의 게놈 단편이다. 서던 블롯은, KE858 서열이 프로토타카 모리포르미스 (UTEX 1435) 게놈 내에 단일 복사체로서 존재하는 것을 보였다. 이 영역과 이 영역을 상동성 재조합 표적화에 사용하는 구체예는 PCT 특허 출원 PCT/US2009/66142에 기술되어 있다. 공여 DNA의 유용한 영역으로서 또 다른 것으로는 6S 게놈 서열이 있다.

[0227] 3. 벡터 및 벡터 구성 성분

[0228] 미생물의 형질 전환에 사용되는 벡터는 본원에 개시된 바를 참고로 하여 당업자들에게 공지된 기술에 의해 제조될 수 있다. 벡터는 통상적으로 하나 이상의 유전자를 포함하는데, 여기서, 상기 유전자는, 각각 원하는 생성물(유전자 생성물)을 발현하도록 암호화되며, 또한 유전자 발현을 조절하거나 유전자 생성물을 재조합 세포 내 특정 위치에 표적화하는 제어 서열 하나 이상에 작동 가능하도록 결합된다. 독자의 이해를 돕기 위해서, 본 섹션은 서브섹션들로 구분되어 있다. 서브섹션 A에는, 벡터에 함유될 수 있는 제어 서열에 대해 기술되어 있다. 서브섹션 B에는, 통상적으로 벡터 내에 함유된 유전자와, 코돈 최적화 방법 및 이 방법을 사용하여 제조된 유전자에 대해 기술되어 있다.

[0229] A. 제어 서열

[0230] 제어 서열은 암호화 서열의 발현을 조절하거나 유전자 생성물을 세포 내부 또는 외부의 특정 위치로 지시하는 핵산이다. 발현을 조절하는 제어 서열은, 예를 들어 암호화 서열의 전사를 조절하는 프로모터 및 암호화 서열의 전사를 종결시키는 종결자를 포함한다. 다른 제어 서열은 폴리아데닐화 신호를 암호화하는 암호화 서열의 말단에 위치한 3' 비번역 서열이다. 유전자 생성물을 특정 위치로 지시하는 제어 서열은 단백질이 세포 내부 또는 외부의 특정 위치에 부착되는 위치로 지시하는 신호 펩티드를 암호화하는 것들을 포함한다.

[0231] 따라서, 미세 조류 또는 기타 다른 유지성 미생물 내 외인성 유전자의 발현을 위한 예시적인 벡터 설계는, 미세 조류 또는 기타 다른 유지성 미생물 내에서 활성인 프로모터에 작동 가능하도록 결합된 원하는 유전자 생성물(예를 들어, 선택가능한 마커, 지질 경로 변형 효소 또는 수크로스 이용 효소)에 대한 암호화 서열을 함유한다. 대안적으로, 벡터가 관심의 암호화 서열과 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유하지 않는 경우, 상기 암호화 서열은 이것이 벡터 통합 지점에서 내인성 프로모터와 작동가능하게 연결되도록 세포 내로 형질 전환될 수 있다. 형질 전환의 프로모터 부재 방법은 미세 조류(예를 들어, 문헌[Plant Journal 14:4, (1998), pp.441-447] 참조), 및 기타 다른 미생물에서 작동하는 것으로 입증되었다.

[0232] 많은 프로모터, 예를 들어 형질 전환된 조류에 내인성이 아닌 프로모터(즉, 다른 조류 유래의 프로모터, 고등 식물 유래의 프로모터 및 식물 바이러스 또는 조류 바이러스 유래의 프로모터)뿐만 아니라 형질 전환된 조류에 내인성인 프로모터는 미세 조류 내에서 활성이다. 미세 조류 내에서 활성인 예시적인 외인성 및/또는 내인성 프로모터(또한 미세 조류에서 기능하는 항생제 내성 유전자는 PCT 공개 제2008/151149호 및 본원에 인용된 참조 문헌에 기술되어 있다).

[0233] 외인성 유전자를 발현시키는데 사용되는 프로모터는 상기 유전자에 자연적으로 연결되는 프로모터일 수 있거나 이종성 유전자 프로모터일 수 있다. 몇몇 프로모터는 하나 초과 미세 조류 종에서 활성이다. 기타 다른 프로모터는 종 특이적이다. 예시적인 프로모터로서는 하기 실시예에 사용된 클라미도모나스 레인하르트티(*Chlamydomonas reinhardtii*) 유래의 β -튜불린과 같은 프로모터, 및 다수의 미세 조류 종에서 활성인 것으로 밝혀진 콜리플라워 모자이크 바이러스(CMV) 및 클로렐라 바이러스로부터 유래한 프로모터와 같은 바이러스 프로모터를 포함한다(예를 들어, 문헌[Plant Cell Rep. 2005 Mar;23(10-11):727-35]; [J Microbiol. 2005 Aug;43(4):361-5]; [Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan;4(1):63-73] 참조). 프로토타카에서 외인성 유전자의 발현에 사용하기에 적합한 다른 프로모터는 클로렐라 소로키니아나 글루타메이트 탈수소화 효소 프로모터/5' UTR이다. 통상적으로, 프로모터를 함유하는 상기 서열중 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 또는 60개 이상의 뉴클레오타이드가 사용된다. 프로토타카에서 외인성 유전자의 발현에 유용한 예시적인 프로모터는 본 출원의 서열 목록에 열거되어 있으며, 예를 들어 클로렐라 HUP1 유전자의 프로모터(서열번호 1) 및 클로렐라 엘립소이데아 질산염 환원 효소 프로모터(서열번호 2)가 있다. 클로렐라 바이러스 프로모터는 또한 프로토타카에서 미국 특허 제 6,395,965호의 서열번호 1 내지 서열번호 7과 같은 유전자를 발현시키는데 사용될 수 있다. 프로토타카에서 활성인 추가의 프로모터는 예를 들어 문헌[Biochem Biophys Res Commun. 1994 Oct 14;204(1): 187-94]; [Plant Mol Biol. 1994 Oct;26(1):85-93]; [Virology. 2004 Aug 15;326(1): 150-9]; 및 [Virology. 2004 Jan

5:318(1):214-23]에서 찾을 수 있다.

- [0234] 프로모터는 일반적으로 지속성(constitutive)이거나 유도성인 것으로서 특징지어질 수 있다. 지속성 프로모터는 일반적으로 동일한 수준에서 항상(또는 세포 수명 사이클의 특정 시점에서) 발현을 구동하는데 활성이거나 발현을 구동하도록 작용한다. 역으로, 유도성 프로모터는 활성이거나(또는 불활성화되거나) 단지 자극에 응답하여 상당히 상향 조절되거나 하향 조절된다. 상기 프로모터 유형 둘 다 본원에 기술된 방법에 적용된다. 본원에 기술된 방법에서 유용한 유도성 프로모터는 외인성으로 제공된 소분자(예를 들어, 서열번호 1에서와 같이 글루코스), 온도(열 또는 냉), 배양 배지 내 질소 부재 등과 같은 자극에 응답하여 작동 가능하도록 결합된 유전자의 전사를 매개하는 것들을 포함한다. 적합한 프로모터는 근본적으로 사일런트 유전자의 전사를 활성화시킬 수 있거나 바람직하게 낮은 수준으로 전사된 작동 가능하도록 결합된 유전자의 전사를 상당히 상향 조절할 수 있다.
- [0235] 종결 영역 제어 서열의 내포는 임의적이며, 상기 종결 영역은 비교적 상호교환가능하므로 사용되는 경우 상기 선택은 주로 편의를 위한 것이다. 상기 종결 영역은 전사 개시 영역(프로모터)에 고유한 것일 수 있거나, 관심의 DNA 서열에 고유한 것일 수 있거나, 다른 공급원으로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Chen 및 Orozco, Nucleic Acids Res. (1988) 16:8411]를 참조한다.
- [0236] 본원에 기술된 방법은 또한 관심의 유전자의 구분된 발현을 제공하는 제어 서열 및 재조합 유전자들을 함유하는 벡터를 이용할 수 있다. 표적화를 위한 기관은 엽록체, 색소체, 미토콘드리아, 및 소포체이다. 또한, 본원에 기술된 방법은 제어 서열 및 재조합 유전자, 및 세포 외부로의 단백질의 분비를 제공하는, 본원에 기술된 것들을 함유하는 벡터를 이용할 수 있다.
- [0237] 프로토테카 핵 계놈에서 발현되는 단백질은 색소체 표적화 신호를 사용하여 색소체로 표적화될 수 있다. 클로렐라에 내인성인 색소체 표적화 서열은, 예를 들어 색소체로 표적화되는 단백질을 암호화하는 클로렐라 핵 계놈 내 유전자들은 공지되어 있고, 이는 예를 들어 GenBank 수탁 번호 제AY646197호 및 제AF499684호를 참조하며, 하나의 구체예에서 이러한 제어 서열을 함유하는 벡터는 단백질의 발현을 프로토테카 색소체로 표적화하는 본원에 기술된 방법에서 사용된다.
- [0238] 하기 실시예는 숙주 세포 내 올바른 구획으로 이중성 단백질을 표적화하는 조류 색소체 표적화 서열의 용도를 기술한다. cDNA 라이브러리는 프로토테카 모리포르미스 및 클로렐라 프로토테코디에스(*Chlorella protothecoides*) 세포를 사용하여 제조되었으며 PCT 출원 PCT/US2009/066142호에 기술되어 있다.
- [0239] 본 발명의 다른 구체예에서, 프로토테카 또는 다른 유지성 미생물 내에서 폴리펩티드의 발현은 소포체로 표적화된다. 발현 벡터 내 적절한 보유 또는 분류 신호의 내포는 단백질이 소포체(ER)에 보유되고 골지체로 하류로 가지 않도록 하는 것을 보장한다. 예를 들어, IMPACTVECTOR 1.3 벡터(Wageningen UR- Plant Research International 제조)는 널리 공지된 KDEL 보유 또는 분류 신호를 포함한다. 상기 벡터와 함께, ER 보유는 이것이 발현 수준을 5배 이상으로 개선시킬 수 있다고 보고되었다는 점에서 실제 이점을 갖는다. 이에 대한 주요 이유는 ER이 세포질 내 존재하는 것보다 발현된 단백질의 번역 후 분해에 관여하는 보다 낮은 농도이고/농도이거나 상이한 프로테아제를 함유하는 것으로 나타난다. 녹색 미세 조류에서 기능하는 ER 보유 신호는 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 26;102(17):6225-30]을 참조한다.
- [0240] 본 발명의 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 배양 배지 내로 세포 외부로의 분비를 위해 표적화된다. 또한 프로토테카와 같은 기타 다른 미세 조류에서 사용될 수 있는 클로렐라 중에서 활성인 분비 신호에 대한 예는 문헌[Hawkins et al., Current Microbiology Vol. 38 (1999), pp. 335-341]을 참조한다.
- [0241] **B. 유전자 및 코돈 최적화**
- [0242] 통상적으로, 유전자는 프로모터, 암호화 서열 및 종결 제어 서열을 포함한다. 재조합 DNA 기술에 의해 어셈블리되는 경우, 유전자는 발현 카세트로 호칭될 수 있고, 재조합 유전자를 숙주 세포로 도입하는데 사용되는 벡터로의 편리한 삽입을 위한 제한 부위에 축적할 수 있다. 상기 발현 카세트는 상동성 재조합에 의해 발현 카세트의 계놈으로의 안정적인 통합을 촉진시키는, 계놈 또는 기타 다른 핵산 표적 유래의 DNA 서열에 축적할 수 있다. 대안적으로, 상기 벡터 및 이의 발현 카세트는 통합되지 않은 상태로 유지될 수 있고, 이 경우에 상기 벡터는 통상적으로, 이중성 벡터 DNA의 복제를 제공할 수 있는 복제 기점을 포함한다.
- [0243] 벡터상에 존재하는 통상의 유전자는 단백질을 암호화하는 유전자이고, 이의 발현은 상기 단백질을 함유하는 재조합 세포가 상기 단백질을 발현하지 않는 세포로부터 구분될 수 있도록 한다. 상기 유전자 또는 이의 상응하는 유전자 생성물은 선택가능한 마커로서 호칭된다. 다양한 선택가능한 마커들 중 임의의 것은 본원에 개시된 방법들에 유용한 기타 다른 임의의 유지성 미생물 또는 프로토테카를 형질 전환하는데 유용한 유전자 이식 구조물에

사용될 수 있다. 적합한 선택가능한 마커의 예로서는 G418 내성 유전자, 질산염 환원 효소 유전자(문헌[Dawson et al. (1997), Current Microbiology 35:356-362] 참조), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자(HPT; 문헌[Kim et al. (2002), Mar. Biotechnol. 4:63-73] 참조), 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자, 및 플레오마이신에 대해 내성을 부여하는 ble 유전자(문헌[Huang et al. (2007), Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:197-205] 참조)를 포함한다. 항생제에 대한 미세 조류 및 기타 다른 유지성 미생물의 민감성을 측정하는 방법은 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Mol Gen Genet. 1996 Oct 16;252(5):572-9]를 참조한다.

[0244] 항생제를 기반으로 하지 않는 기타 다른 선택가능한 마커들은 또한 일반적으로 미세 조류, 예를 들어 프로토타카 종을 형질 전환하는데 유용한 유전자 이식 구조물에서 사용될 수도 있다. 이전에는 미세 조류에 의해 이용될 수 없었던 임의의 탄소 공급원을 이용하는 능력을 부여하는 유전자도 또한 선택가능한 마커로서 사용될 수 있다. 예를 들어 프로토타카 모리포르미스 균주는 통상적으로 수크로스가 전혀 존재하지 않으면 잘 성장하지 못한다. 수크로스 인버타제 유전자를 함유하는 구조물을 사용하면, 양성 형질 전환체가 탄소 공급원으로서 수크로스를 바탕으로 성장할 수 있는 능력이 부여될 수 있다.

[0245] 본원에 기술된 방법에 관한 임의의 구체예에 있어서, 유전자들 중 하나가 선택가능한 마커라면, 재조합 숙주 세포를 생산하는데 사용되는 발현 벡터는 2개 이상, 종종 3개의 유전자를 포함할 것이다. 예를 들어 유전자 조작된 프로토타카는 선택가능한 마커 이외에 하나 이상의 외인성 유전자, 예를 들어 수크로스 인버타제 유전자 또는 아실 ACP-티오에스테라제 유전자를 포함하는 벡터로 형질 전환되어 생산될 수 있다. 하나 또는 2개의 유전자는 지질 수율 및 지방산 에스테르로의 전환을 증진시키기 위해 상기 유전자들의 발현의 상대 타이밍이 제어될 수 있게 하는 유도성 프로모터를 사용하여 발현될 수 있다. 2개 이상의 외인성 유전자의 발현은 동일한 유도성 프로모터의 제어 하에 또는 상이한 유도성(또는 지속성) 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 후자 상황에서, 제1 외인성 유전자의 발현은 제1 기간 동안 유도될 수 있고(제1 기간 동안에 제2 외인성 유전자의 발현은 유도되거나 유도되지 않을 수 있음) 제2 외인성 유전자의 발현은 제2 기간 동안 유도될 수 있다(제2 기간 동안에 제1 외인성 유전자의 발현은 유도되거나 유도되지 않을 수 있음).

[0246] 다른 구체예에서, (임의의 선택가능한 마커에 추가로) 2개 이상의 외인성 유전자는 지방 아실-ACP 티오에스테라제 및 지방 아실-CoA/알데하이드 환원 효소이고, 상기 조합 작용은 알코올 생성물을 생성시킨다. 추가로 제한 없이 알데하이드를 생성하기 위한 지방 아실-ACP 티오에스테라제 및 지방 아실-CoA 환원 효소를 포함하는 외인성 유전자의 기타 다른 조합이 제공된다. 하나의 구체예에서, 벡터는 알칸을 생성하기 위한 지방 아실-ACP 티오에스테라제, 지방 아실-CoA 환원 효소 및 지방 알데하이드 탈카보닐화 효소의 조합을 제공한다. 이들 각각의 구체예에서, 외인성 유전자 중 하나 이상은 유도성 프로모터를 사용하여 발현될 수 있다.

[0247] 2개 이상의 외인성 유전자를 발현하는 기타 다른 예시적인 벡터는 수크로스 수송체 및 수크로스 인버타제 효소들 다를 암호화하는 것들 및 선택가능한 마커 및 분비된 수크로스 인버타제 둘 다를 암호화하는 것들을 포함한다. 어느 하나의 유형의 벡터로 형질 전환된 재조합 프로토타카 또는 기타 다른 미세 조류 또는 미생물 세포는, 탄소 공급원으로서 사탕 수수(그리고 사탕 수수 유래 당)를 사용하는 능력을 가지도록 조작됨으로써, 저렴한 제조 비용으로 지질을 생산한다. 전술한 2개의 외인성 유전자의 삽입은, 유도적 돌연변이 유발 및/또는 무작위 돌연변이 유발을 통해 다당류 생합성의 파괴와 조합될 수 있으며, 이는 지질 생산으로 훨씬 더 많은 탄소가 유입되게 한다. 개별적으로 및 조합적으로, 영양성 전환, 지질 생산을 변화시키기 위한 조작 및 외인성 효소를 사용한 처리는 미생물에 의해 생산되는 지질의 조성을 변형시킨다. 상기 변형은 미생물 내에서 생산되는 지질의 양, 기타 다른 지질 종과 비교하여 생산되는 하나 이상의 지질(지방산) 종의 양, 및/또는 생산되는 지질 종의 유형의 변화일 수 있다. 예를 들어, 미세 조류는 보다 높은 양 및/또는 %의 TAG(트리아실글리세라이드)를 생산하도록 조작될 수 있다.

[0248] 재조합 단백질의 최적의 발현을 위해, 형질 전환될 숙주 세포에 의해 우선적으로 사용되는 코돈을 가지는 mRNA를 생산하는 암호화 서열을 사용하는 것이 이롭다. 따라서, 이식 유전자의 적절한 발현은, 이식 유전자의 코돈 사용 빈도가 이식 유전자가 발현되는 유기체의 특이적 코돈 편향에 부합하는 것을 필요로 할 수 있다. 상기 효과의 기저를 이루는 정확한 기작은 많지만, 상기 필요성이 충족되는 경우 이식 유전자 전령 RNA(mRNA)의 보다 효율적인 번역과 커플링되는, 세포 내에서 합성되는 단백질과 이용가능하게 아미노아실화된 tRNA 풀의 적당한 균형을 포함한다. 이식 유전자 내 코돈 사용 빈도가 최적화되지 않은 경우, 이용가능한 tRNA 풀은 이식 유전자 mRNA의 가능한 불안정성 및 리보솜 멈춤(stalling)과 종결을 초래하는 이중성 mRNA의 효율적인 번역을 가능하게 하기에 충분하지 않다.

[0249] 프로토타카 내에서 재조합 단백질을 성공적으로 발현하는데 유용한 코돈 최적화 핵산은 본원에 기술되어 있다.

프로토테카 중 내 코돈 사용 빈도는, 프로토테카 모리포르미스로부터 분리된 cDNA 서열을 연구함으로써 분석되었다. 이와 같은 분석은, 24,000개 코돈에 대한 질문과 이하 표 4에 나타난 결과들을 설명해준다.

표 4

프로토테카 균주에서 바람직한 코돈 사용 빈도

Ala	GCG	345 (0.36)	Asn	AAT	8 (0.04)
	GCA	66 (0.07)		AAC	201 (0.96)
	GCT	101 (0.11)	Pro	CCG	161 (0.29)
	GCC	442 (0.46)		CCA	49 (0.09)
Cys	TGT	12 (0.10)		CCT	71 (0.13)
	TGC	105 (0.90)		CCC	267 (0.49)
Asp	GAT	43 (0.12)	Gln	CAG	226 (0.82)
	GAC	316 (0.88)		CAA	48 (0.18)
Glu	GAG	377 (0.96)	Arg	AGG	33 (0.06)
	GAA	14 (0.04)		AGA	14 (0.02)
Phe	TTT	89 (0.29)		CGG	102 (0.18)
	TTC	216 (0.71)		CGA	49 (0.08)
Gly	GGG	92 (0.12)		CGT	51 (0.09)
	GGA	56 (0.07)		CGC	331 (0.57)
	GGT	76 (0.10)	Ser	AGT	16 (0.03)
	GGC	559 (0.71)		AGC	123 (0.22)
His	CAT	42 (0.21)		TCG	152 (0.28)
	CAC	154 (0.79)		TCA	31 (0.06)
Ile	ATA	4 (0.01)		TCT	55 (0.10)
	ATT	30 (0.08)		TCC	173 (0.31)
	ATC	338 (0.91)	Thr	ACG	184 (0.38)
Lys	AAG	284 (0.98)		ACA	24 (0.05)
	AAA	7 (0.02)		ACT	21 (0.05)
Leu	TTG	26 (0.04)		ACC	249 (0.52)
	TTA	3 (0.00)	Val	GTG	308 (0.50)
	CTG	447 (0.61)		GTA	9 (0.01)
	CTA	20 (0.03)		GTT	35 (0.06)
	CTT	45 (0.06)		GTC	262 (0.43)
	CTC	190 (0.26)	Trp	TGG	107 (1.00)
Met	ATG	191 (1.00)	Tyr	TAT	10 (0.05)
				TAC	180 (0.95)
			Stop	TGA/TAG/TAA	

다른 구체예에서, 재조합 벡터 내 유전자는 프로토테카 균주 또는 기타 다른 미생물 균주 이외의 미세 조류 균주를 바탕으로 하여 코돈 최적화되었다. 예를 들어 미세 조류 내 발현을 위한 유전자를 재 암호화하는 방법은 미국 특허 제7,135,290호에 기술되어 있다. 코돈 최적화에 대한 추가 정보는 GenBank의 코돈 사용 빈도 데이터베이스에서 얻을 수 있다.

본원에 기술된 방법과 재료들은 임의의 외인성 유전자를 프로토테카 또는 기타 다른 미세 조류 또는 기타 다른 유지성 미생물에 도입할 수 있으며, 수크로스 이용 및 지질 경로 변경과 관련된 유전자는, 이하 섹션들에 기술된 바와 같이, 천연의 상태에서 수크로스를 이용할 수 없는 미생물 또는 수크로스를 비효율적으로 이용하는 미생물에 특히 요망된다.

IV. 수크로스 이용

하나의 구체예에서, 재조합 프로토테카 또는 기타 다른 미세 조류 또는 기타 다른 미생물 세포는 하나 이상의

외인성 수크로스 이용 유전자를 함유한다. 다양한 구체예에서, 하나 이상의 유전자는 프럭토키나제, 글루코키나제, 헥소키나제, 수크로스 인버타제 및 수크로스 운반체로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 하나 이상을 암호화한다. 예를 들어 수크로스 운반체 및 수크로스 인버타제가 발현되면, 프로토타카 또는 임의의 기타 다른 미세 조류 또는 기타 다른 미생물 세포는 수크로스를 배양 배지 유래 세포에 운반할 수 있으며, 또한 수크로스를 가수 분해하여 글루코스 및 프럭토스를 생성할 수 있다. 임의로, 프럭토키나제는 또한 내인성 헥소키나제 활성이 프럭토스를 최대로 인산화하는데 불충분한 경우에도 발현될 수 있다. 적당한 수크로스 운반체의 예로서는 GenBank 수탁 번호 제CAD91334호, 제CAB92307호 및 제CAA53390호인 것이 있다. 적당한 프럭토키나제의 예로서는 GenBank 수탁 번호 제P26984호, 제P26420호 및 제CAA43322호인 것이 있다.

[0255] 하나의 구체예에서, 본원에 기술된 방법은 수크로스 인버타제를 분비하는 프로토타카 숙주 세포를 사용하여 수행된다. 수크로스 인버타제가 분비되면 세포에 수크로스를 운반할 수 있는 운반체는 발현될 필요가 없다. 이는, 수크로스 분자가 글루코스 분자와 프럭토스 분자(이들 분자는 둘 다 본원에 기술된 방법에 유용한 미생물에 의해 운반 및 이용될 수 있음)로 전환되는 것을, 분비된 인버타제가 촉진하기 때문이다. 예를 들어, 분비 신호(예를 들어, 서열번호 4(효모 유래), 서열번호 5(고등 식물 유래), 서열번호 6(진핵 공통 분비 신호) 및 서열번호 7(고등 식물 및 진핵 공통 서열 유래의 신호 서열의 조합체))와 함께 수크로스 인버타제(예를 들어, 서열번호 3)의 발현은 세포 외부에서 인버타제 활성을 생성시킨다. 본원에 개시된 유전자 조작 방법에 의해 가능해진 이러한 단백질의 발현은 이미 에너지원으로서 세포의 글루코스를 이용할 수 있는 세포가 세포외 에너지원으로 수크로스를 이용할 수 있게 한다.

[0256] 수크로스를 함유하는 배지에 분비되는 인버타제를 발현하는 프로토타카 종은, 유전성 유체 또는 기타 다른 운환체로서 사용되는 미생물 오일을 생산하는 바람직한 미세 조류 종이다(식품용 오일 생산하기 위해서, 일부 소비자는 비 재조합 미생물을 이용하여 생산된 오일을 선호할 수 있다). 이와 같이 완전히 활성인 단백질의 발현과 세포외 표적화는 생성된 숙주 세포가 수크로스를 바탕으로 성장할 수 있게 해주는 반면에, 형질 전환되지 않은 대응 숙주 세포는 그렇지 않다. 그러므로, 본원에 기술된 방법을 수행함에 있어서는 코돈 최적화 인버타제 유전자, 예를 들어 효모 인버타제 유전자(이에 한정되는 것은 아님)가 세포 계놈에 통합되어, 인버타제 유전자를 발현하는(이 유전자의 발현은 인버타제 활성 및 수크로스 가수 분해 여부에 의해 평가됨) 프로토타카 재조합 세포를 이용할 수 있다. 인버타제 유전자는 프로토타카 및 기타 다른 미세 조류 재조합 세포 내에서 선택가능한 마커로서 유용하므로, 세포는 수크로스를 바탕으로 성장할 수 있는 반면에, 형질 전환되지 않은 대응 세포는 수크로스를 바탕으로 성장할 수 없으며; 인버타제를 사용하여 재조합 숙주 세포를 선별하는 방법은 조류 분자 유전학에 있어서 강력한 선택가능한 마커이다.

[0257] 프로토타카 내 수크로스 인버타제의 성공적 발현은 또한, 이중(재조합) 단백질이 조류 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이 단백질이 완전한 활성을 가지며 기능을 가지는 형태로서 세포 외부로부터 배양 배지 중에 성공적으로 운반될 수 있음을 입증하는 것이다. 그러므로 미세 조류 내에서 이중 단백질의 다양하고도 광범위한 어레이를 발현할 수 있고, 상기 이중 단백질을 숙주 세포의 외부로 분비하는 방법 및 이에 사용되는 시약이 사용될 수 있다. 이와 같은 단백질로서는, 예를 들어 산업용 효소, 예를 들어 리파제, 프로테아제, 셀룰라제, 펙티나제, 아밀라제, 에스테라제, 산화 환원 효소, 트랜스퍼라제, 락타제, 이소머라제 및 인버타제를 포함한다.

[0258] 적합한 수크로스 인버타제의 예로서는 Genbank 수탁 번호 제CAB95010호, 제NP_012104호 및 제CAA06839호에 의해 확인된 것들을 포함한다. 적합한 인버타제의 비제한적인 예는 하기 표 5에 열거되어 있다. 각각의 열거된 인버타제에 대한 아미노산 서열은 하기의 서열 목록에 포함된다. 몇몇 경우에, 본원에 개시된 방법 및 벡터에 사용하기에 적합한 외인성 수크로스 이용 유전자는 표 5로부터 선택되는 수크로스 인버타제와 적어도 40%, 50%, 60%, 75%, 또는 90% 이상의 아미노산 동일성을 갖는 수크로스 인버타제를 암호화한다.

표 5

수크로스 인버타제

기재	유기체	GenBank 수탁 번호	서열번호
인버타제	키코리움 인티부스	Y11124	서열번호 20
인버타제	쉬조사카로마이세스 폼베	AB011433	서열번호 21
베타-프럭토폴라노시다제 (인버타제)	피키아 야노말라	X80640	서열번호 22
인버타제	데바리오마이세스 옥시덴탈리스	X17604	서열번호 23
인버타제	오리재 사티바	AF019113	서열번호 24
인버타제	알리움 세파	AJ006067	서열번호 25
인버타제	베타 불가리스 아종 불가리스	AJ278531	서열번호 26
베타-프럭토폴라노시다제 (인버타제)	비피도박테리움 브레베 UCC2003	AAT28190	서열번호 27
인버타제	사카로마이세스 세레비지아애	NP_012104	서열번호 8 (뉴클레오티드) 서열번호 28 (아미노산)
인버타제 A	지모모나스 모빌리스	AAO38865	서열번호 29

[0259]

[0260]

프로토테카에 의해 인버타제가 배양 배지에 분비되면, 세포는 순수한 시약 등급의 글루코스를 이용하게 되므로 이 세포는 또한 사탕 수수 가공시 유래하는 폐 당밀을 기반으로 성장할 수도 있으며; 이와 같이 사탕 수수 가공시 유래하는, 이용 가치가 낮은 폐 생성물이 사용되면, 지질 및 기타 다른 오일을 생산함에 있어서 비용이 상당히 절감될 수 있다. 그러므로, 본원에 기술된 방법은, 프로토테카 또는 기타 다른 미세 조류 미생물 군집을 함유하는 미생물 배양액을 사용하는 것을 포함할 수 있으며, 이때 사용되는 배양 배지는 (i) 수크로스 및 (ii) 수크로스 인버타제 효소를 포함한다. 다양한 구체예에서, 배양액 중 수크로스는 수수, 사탕무, 사탕 수수, 당밀 또는 해중합 셀룰로스 재료(임의로는 리그닌을 함유할 수 있음)로부터 유래한다. 본원에 예시된 미생물들은 변형되어 수크로스를 이용할 수 있게 되고, 본원에 기술된 방법과 시약이 사용되면, 조작된 숙주 미생물(셀룰라제, 펙티나제, 이소머라제 등을 분비할 수 있는 능력을 가지는 미생물)은 공급 원료, 예를 들어 셀룰로스를 이용할 수 있게 되므로, 효소 반응의 분해 생성물은 더 이상 단순히 관용되지 않게 되기 보다는 탄소 공급원으로서 숙주에 의해 이용되지 않는다.

[0261]

V. 지질 경로 조작

[0262]

프로토테카(또는 기타 다른 미세 조류 세포 또는 기타 다른 미생물 세포)가 공급 원료, 예를 들어 수크로스 함유 공급 원료를 이용하는 능력을 변경시키는 것 이외에, 생산되는 지질의 특성 및/또는 비율이 변경되도록 조작된 재조합 프로토테카(또는 기타 다른 미세 조류 또는 기타 다른 미생물 세포)가 본원에 기술된 방법에 유용하다. 경로는 추가로 또는 대안적으로, 지방산 경로의 중간 물질 및 지질을 효소에 의해 가공함으로써, 생산된 다수의 지질 분자의 특성 및/또는 비율이 변경되도록 조작될 수 있다. 다양한 구체예에서, 재조합 세포는, 이 세포의 비 형질 전환 대응 세포의 경우와 비교하였을 때 단위 용적 및/또는 단위 시간 당 지질 수율, (예를 들어 산업용 화학 물질, 예를 들어 유전성 유체 및 기타 다른 지질 공급 원료를 필요로 하는 분야에 사용되는

지질의) 탄소 사슬 길이가 증가 또는 최적화되고, 이중 또는 삼중 결합의 수가 감소하며(임의로는 존재하지 않게 되며), 또한 지질(지방산)의 특정 중 또는 뚜렷한 지질 군집의 수소:탄소 비율이 증가된다.

[0263] 특정 구체예에서, 지방산 합성으로의 대사에서 분기점을 제어하는 하나 이상의 주요 효소는 지질 생산을 개선시키기 위해 상향 조절되거나 하향 조절되었다. 상향조절은, 예를 들어 전사를 증가시키는 강한 프로모터 및/또는 인핸서 요소를 사용하여, 관심의 효소를 암호화하는 유전자가 발현되는 발현 구조물로 세포를 형질 전환시킴으로써 성취될 수 있다. 상기 구조물은 선택가능한 마커를 포함하여 상기 형질 전환체는 선택될 수 있고 이에 의해 유전자 유지, 및 가능하게는 구조물의 증폭과 암호화된 효소의 발현 수준의 부수적인 증가에 또한 사용될 수 있다. 본원에 기술된 방법에 따른 상향 조절을 위해 적합한 효소의 예는 피루베이트를 아세틸-CoA로 전환시키는 역할을 하는 피루베이트 탈수소화 효소 (예를 들어, 미세 조류 유래의 일부는 Genbank 수탁 번호 제NP_415392호; 제AAA53047호; 제Q1XDM1호; 및 제CAF05587호를 포함함)를 포함한다. 피루베이트 탈수소화 효소의 상향조절은 아세틸-CoA의 생산을 증가시킬 수 있고, 이에 의해 지방산 합성을 증가시킬 수 있다. 아세틸-CoA 카복실라제는 지방산 합성에서 초기 단계를 촉매한다. 따라서, 상기 효소는 지방산의 생산을 증가시키기 위해 상향조절될 수 있다(예를 들어, 미세 조류 유래의 일부는 Genbank 수탁 번호 제BAA94752호; 제AAA75528호; 제AAA81471호; 제YP_537052호; 제YP_536879호; 제NP_045833호; 및 제BAA57908호를 포함함). 지방산 생산은 또한 지방산 합성 동안에 성장하는 아실 사슬을 운반하는 아실기 운반 단백질(ACP)의 상향 조절에 의해 증가될 수 있다(예를 들어, 미세 조류 유래의 일부는 Genbank 수탁 번호 제AOT0F8호; 제P51280호; 제NP_849041호; 제YP_874433호를 포함함). 글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제는 지방산 합성의 속도 제한 단계를 촉매한다. 상기 효소의 상향 조절은 지방산 생산을 증가시킬 수 있다(예를 들어, 미세 조류 유래의 일부는 Genbank 수탁 번호 제AAA74319호; 제AAA33122호; 제AAA37647호; 제P44857호; 및 제ABO94442호를 포함함).

[0264] 유전자의 상향 조절 및/또는 하향 조절은 지방산 생합성 경로의 유전자의 발현을 제어하는 범용 조절제에 적용될 수 있다. 따라서, 지방산 합성의 하나 이상의 범용 조절제는 적절히 각각 다수의 지방산 합성 유전자의 발현을 억제하거나 증진시키고 궁극적으로 지질 생산을 증가시키도록 상향 또는 하향 조절될 수 있다. 이의 예로서는 스테롤 조절 요소 결합 단백질(SREBP), 예를 들어 SREBP-1a 및 SREBP-1c(예를 들어, Genbank 수탁 번호 제NP_035610호 및 제Q9WTN3호를 참조)를 포함한다.

[0265] 본원에 기술된 방법은 또한 지질 변경 효소, 예를 들어 지방 아실-ACP 티오에스테라제(표 6 참조), 지방 아실-CoA/알데하이드 환원 효소(표 8 참조), 지방 아실-CoA 환원 효소, 지방 알데하이드 탈카보닐화 효소, 지방 알데하이드 환원 효소, 불포화 효소(예를 들어 스테아로일-ACP 불포화 효소 및 지방 아실 불포화 효소), 그리고 스쿠알렌 합성 효소(GenBank 수탁 번호 제AF205791호 참조)를 암호화하는 외인성 유전자 하나 이상을 함유하도록 변형된 재조합 프로토타카(또는 기타 다른 미세 조류 또는 기타 다른 미생물) 세포를 사용하여 수행될 수도 있다. 몇몇 구체예에서, 지방 아실-ACP 티오에스테라제와 천연 공동 발현 아실기 운반 단백질을 암호화하는 유전자는, 임의로는 기타 다른 지질 변경 효소를 암호화하는 유전자 하나 이상과 함께, 프로토타카(또는 기타 미세 조류 또는 기타 다른 미생물) 세포에 도입되어 이 세포를 형질 전환한다. 다른 구체예에서, ACP 및 지방 아실-ACP 티오에스테라제는 서로에 대해 친화성을 가질 수 있는데, 이와 같은 특성은, 상기 2개의 효소들이 특정 조직 또는 유기체 내에서 자연적으로 공동 발현되는지 여부와는 상관 없이, 상기 효소들이 본원에 기술된 미생물 및 방법에 함께 사용될 때 이점을 부여한다. 그러므로, 임의의 구체예에서, 본 발명은 상기 효소들의 천연 공동 발현 쌍뿐만 아니라, 서로 상호 작용할 때의 친화성을 공유하여 ACP로부터 탄소 사슬이 길이 특이적으로 절단되는 것을 촉진하는 효소의 쌍 둘 다를 고려한 것이다.

[0266] 또 다른 구체예에서, 불포화 효소를 암호화하는 외인성 유전자는, 지질 포화 양상을 변경하는, 기타 다른 지질 변경 효소 암호화 유전자 하나 이상과 함께 프로토타카(또는 기타 다른 미세 조류 또는 기타 다른 미생물) 세포에 도입되어 이 세포를 형질 전환한다. 다른 구체예에서, 내인성 불포화 효소 유전자는 프로토타카(또는 기타 다른 미세 조류 또는 기타 다른 미생물) 세포 내에서 (예를 들어 유전자의 부가 복사체들이 도입됨으로 인해) 과발현된다. 예를 들어 스테아로일-ACP 불포화 효소(예를 들어 GenBank 수탁 번호 제AAF15308호; 제ABM45911호; 및 제AAAY86086호 참조)는 스테아로일-ACP로부터 올레오일-ACP로의 전환을 촉진한다. 이 유전자를 상향 조절하면 세포에 의해 생산되는 단일 불포화 지방산의 비율이 증가될 수 있는 반면에; 이 유전자를 하향 조절하면 단일 불포화 지방산의 비율이 감소될 수 있다. 예를 들어, 스테아로일-ACP 불포화 효소(SAD)는 C18:0 전구체로부터 C18:1 지방산을 합성하는데 관여한다. 불포화 효소의 다른 군으로서는 지방 아실 불포화 효소(FAD), 예를 들어 델타 12 지방산 불포화 효소가 있다. 이와 같은 불포화 효소는 또한 지질의 포화를 변경하기도 한다. 예를 들어, 델타 12 지방산 불포화 효소는 C18:1 전구체로부터 C18:2 지방산을 합성하는데 관여한다. 이와 유사하게, 하나 이상의 글리세로지질 불포화 효소, 예를 들어 ω -6 지방산 불포화 효소, ω -3 지방산 불포화 효소 또는 ω

-6 올리에이트 불포화 효소의 발현은, 불포화 지방산 대 포화 지방산의 비율이 바뀌도록 제어될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 불포화 효소는 원하는 탄소 사슬 길이를 기준으로 선택될 수 있으므로, 이 불포화 효소는 탄소 길이가 특정된 기질 또는 탄소 길이가 특정 범위에 속하는 기질 내에서 위치 특이적 변형을 수행할 수 있다. 다른 구체예에서, 만일 원하던 지방산 프로파일에 있어서 단일 불포화물(예를 들어 C16:1 및/또는 C18:1)이 증가하면, SAD의 과발현 또는 이중 SAD 발현은, 지방 아실 불포화 효소(FAD)를 (예를 들어 돌연 변이, RNAi, 헤어핀 RNA, 내인성 불포화 효소 유전자의 녹아웃 등에 의해) 침묵 또는 불활성화하면서 진행될 수 있다. 이하 실시예 4에는, 스테아로일-ACP 불포화 효소와 델타 12 지방산 불포화 효소의 표적화된 소모 또는 녹아웃이 기술되어 있을 뿐만 아니라, 내인성 불포화 효소 유전자의 발현을 감소시키는데 있어서 헤어핀 RNA 안티센스 구조물의 용도도 기술되어 있다.

[0267] 그러므로, 특정 구체예에서, 본 발명의 미생물은 아실-ACP 티오에스테라제, 아실-CoA/알데하이드 환원 효소, 지방 아실-CoA 환원 효소, 지방 알데하이드 환원 효소, 불포화 효소, 지방 알데하이드 탈카보닐화 효소 또는 자연적으로 공동 발현되는 아실기 운반 단백질의 유전자들로부터 선택되는 외인성 유전자 하나 이상을 발현하도록 유전자 조작된다. 리파제 유전자를 발현하기 위한 적당한 발현 방법, 예를 들어 다른 방법들 중에서도 유도성 발현 및 구획화 발현(compartmentalized expression)에 대해서는 전술되어 있다. 지방 아실-ACP 티오에스테라제는 지질 합성중 아실기 운반 단백질(ACP)로부터 지방산을 절단한다. 추가의 효소 가공을 통하여, 상기와 같이 절단된 지방산은 이후 조효소와 결합되어 아실-CoA 분자로 생성된다. 상기 아실-CoA는 지방 아실-CoA 환원 효소의 효소 활성화에 대한 기질(알데하이드가 생성됨)일 뿐만 아니라, 지방 아실-CoA/알데하이드 환원 효소에 대한 기질(알코올이 생성됨)이기도 하다. 상기 지정된 지방 아실-CoA 환원 효소의 작용에 의해 생성된 알데하이드는 추가 효소(지방 알데하이드 환원 효소(알코올 생성) 또는 지방 알데하이드 탈카보닐화 효소(알칸 또는 알켄 생성))의 활성화에 대한 기질이다.

[0268] 몇몇 구체예에서, 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 지방산, 글리세로지질 또는 상응하는 1차 알코올, 알데하이드, 알칸 또는 알켄은 16개 또는 18개의 탄소 원자를 함유한다. 유전성 유체 생산용으로서 바람직한 지방산 또는 이에 상응하는 알코올, 알데하이드, 알칸 및 알켄은 16개 내지 18개의 탄소 원자를 함유한다. 임의의 구체예에서, 상기 지방산은 포화(탄소-탄소 이중 결합 또는 삼중 결합을 포함하지 않음); 단일 불포화(하나의 이중 결합 포함); 다중 불포화(2개 이상의 이중 결합 포함)되며, 또한 선형(시클릭이 아닌 형태) 또는 분지형 또는 이 두 가지 형태를 다 가질 수 있다. 유전성 유체에 있어서, 단일 불포화된 지방산, 특히 올레산(C18:1)이 바람직하다. 원하는 사슬 길이 및/또는 포화도를 가지는 지질의 생산을 증가시키기 위해서 미세 조류 세포는, 원하는 사슬 길이 특이성을 가지는 티오에스테라제를 과발현하거나, 단쇄 길이 특이성을 가지는 티오에스테라제의 생산을 녹아웃시키거나 또는 이러한 유전자의 발현을 감소시키고/감소시키거나, 원하는 지질의 포화도를 좌우하는 불포화 효소 유전자를 녹아웃시키도록 조작될 수 있다.

[0269] 전술한 다양한 효소들 통상적으로 탄소 원자를 특정 수만큼 함유하는 기질의 가수 분해에 대해 선호적 특이성을 가진다. 예를 들어 지방 아실-ACP 티오에스테라제는 ACP로부터 12개의 탄소 원자를 가지는 지방산을 선호적으로 절단할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 상기 ACP 및 길이 특이적 티오에스테라제는 서로에 대해 친화성을 가질 수 있으며, 이러한 특성은 상기 ACP 및 길이 특이적 티오에스테라제가 함께 사용되는 것이 특히 유용하도록 만든다 (예를 들어 외인성 ACP 및 티오에스테라제 유전자는 자연적으로 특정 조직이나 이 조직이 유래한 유기체 내에서 공동 발현될 수 있다). 그러므로, 다양한 구체예에서, 본 발명의 재조합 프로토타입(또는 기타 다른 미세 조류 또는 기타 다른 미생물) 세포는 기질 중에 함유된 탄소 원자의 수와 관련한 효소 활성화(예를 들어 ACP로부터의 지방산의 절단, 아실-CoA의 알데하이드 또는 알코올로의 환원, 또는 알데하이드의 알칸으로의 전환)을 촉진함에 있어 특이성을 가지는 단백질을 암호화하는 외인성 유전자를 함유할 수 있다. 다양한 구체예에서, 효소 특이성은 8개 내지 34개의 탄소 원자, 바람직하게는 16개 내지 18개의 탄소 원자를 가지는 기질에 대한 것일 수 있다.

[0270] 본원에 기술된 미생물 및 방법과 함께 사용하기에 적합한 기타 다른 지방 아실-ACP 티오에스테라제는 표 6에 열거된 것들을 제한없이 포함한다.

표 6

[0271]

지방 아실-ACP 티오에스테라제 및 GenBank 수탁 번호

움벨루라리아 캘리포니카 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAC49001)
 시나모뎀 캄포라 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #Q39473)
 움벨루라리아 캘리포니카 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #Q41635)
 미리스티카 프래그란스 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAB71729)
 미리스티카 프래그란스 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAB71730)
 엘라에이스 기닌시스 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #ABD83939)
 엘라에이스 기닌시스 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAD42220)
 파플러스 토멘토사 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #ABC47311)
 아라비돕시스 탈리야나 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #NP_172327)
 아라비돕시스 탈리야나 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #CAA85387)
 아라비돕시스 탈리야나 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #CAA85388)
 고시피움 히르서툼 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #Q9SQI3)
 쿠페아 란세올라타 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #CAA54060)
 쿠페아 후커리아나 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAC72882)
 쿠페아 칼로필라 아종 메소스테몬 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #ABB71581)
 쿠페아 란세올라타 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #CAC19933)
 엘라에이스 기닌시스 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAL15645)
 쿠페아 후커리아나 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #Q39513)
 고시피움 히르서툼 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAD01982)
 비티스 비니페라 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #CAN81819)
 가르시니아 망고스타나 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAB51525)
 브라시카 준세아 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #ABI18986)
 마듀카 론지폴리아 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAX51637)
 브라시카 나푸스 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #ABH11710)
 오리자 사티바(인디카 켈티바군) 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #EAY86877)
 오리자 사티바(자포니카 켈티바군) 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #NP_001068400)
 오리자 사티바(인디카 켈티바군) 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #EAY99617)
 쿠페아 후커리아나 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAC49269)
 얼머스 아메리카나 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAB71731)
 쿠페아 란세올라타 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #CAB60830)
 쿠페아 팔루스트리스 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAC49180)
 아이리스 게르마니카 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAG43858)
 아이리스 게르마니카 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAG43858.1)
 쿠페아 팔루스트리스 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #AAC49179)
 미리스티카 프래그란스 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank# AAB71729)
 미리스티카 프래그란스 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank# AAB717291.1)
 쿠페아 후커리아나 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #U39834)
 움벨루라리아 캘리포니카 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank # M94159)
 시나모뎀 캄포라 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank #U31813)
 리시누스 커뮤니스 지방 아실-ACP 티오에스테라제 (GenBank#ABS30422.1)

[0272]

바이오 오일 기반 화학 생산물, 예를 들어 유전성 유체는 천연 에스테르(즉 종자 오일), 예를 들어 해바라기 오일 및 카놀라 오일로부터 기원하는, 올레산(C18:1) 함량이 높은 지방산 조성을 가진다. 이하 표 7은 시판중인 통상의 종자 오일의 지방산 프로필을 보여주는 것이다. 이하 시판중인 종자 오일에 관한 데이터는 모두 문헌[US Pharmacopeias Food and Chemicals Codes, 7th Ed. 2010-2011]에서 수집되었다.

표 7

[0273]

시판중인 종자 오일의 지질 프로필

	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:0-d iOH	C18:1-0 H	C18:2	C18: 3 a
알. 커뮤니티 (피마자 오일)	0	0	0	0	0.9-1.6	1.0-1.8	3.7-6.7	0.4-1.3	83.6-89.0	0	0.2-0.6
씨. 뉴시페라 (코코넛 오일)	5.0-9.0	4.0-8.0	44-52	15-21	8.0-11.0	1.0-4.0	5.0-8.0	0	0	0-2.5	0
체트. 메이스 (옥수수 오일)	0	0	0	< 1.0	8.0-19.0	0.5-4.0	19-50	0	0	38-65	< 2.0
지. 바르바덴스 (목화씨 오일)	0	0	< 0.1	0.5-2.0	17-29	1.0-4.0	13-44	0	0	40-63	0.1-2.1
비. 라파, 비. 나푸스, 비. 준세아 (카놀라)	0	0	< 0.1	< 0.2	< 6.0	< 2.5	> 50	0	0	< 40	< 14
오. 유폴피아 (올리브)	0	0	0	< 0.1	6.5-20.0	0.5-5.0	56-85	0	0	3.5-20.0	< 1.2
에이. 하이 포가에아 (땅콩)	0	0	< 0.1	< 0.2	7.0-16.0	1.3-6.5	35-72	0	0	13.0-43	< 0.6
이. 기넨시스 (팜핵)	3.0-5.0	2.5-6.0	40-52	14.0-18.0	7.0-10.0	1.0-3.0	11.0-19.0	0	0	0.5-4.0	0
이. 기넨시스 (팜)	0	0	0	0.5-5.9	32.0-47.0	2.0-8.0	34-44	0	0	7.2-12.0	0
씨. 톱크토 러스 (홍화)	0	0	< 0.1	< 0.1	2.0-10.0	1.0-10.0	7.0-16.0	0	0	72-81	< 1.5
에이치. 아 너스 (해바라기)	0	0	< 0.1	< 0.5	3.0-10.0	1.0-10.0	14-65	0	0	20-75	< 0.5
지. 맥스 (대두)	0	0	< 0.1	< 0.5	7.0-12.0	2.0-5.5	19-30	0	0	48-65	5.0-10.0
엘. 우시타티시 덤 (솔린-플렉스)	0	0	< 0.1	< 0.5	2.0-9.0	2.0-5.0	8.0-60	0	0	40-80	< 5.0
비. 파키 (시어넛)	0	0	0	0	3.8-4.1	41.2-56.8	34.0-46.9	0	0	3.7-6.5	0

[0274]

본원에 기술된 미생물 및 방법과 함께 사용하기에 적합한 지방 아실-CoA/알데하이드 환원 효소는 제한없이 표 8에 열거된 것들을 포함한다.

표 8

[0275]

GenBank 수탁 번호로 열거된 지방 아실-CoA/알데하이드 환원 효소

AAC45217, YP_047869, BAB85476, YP_001086217, YP_580344, YP_001280274, YP_264583, YP_436109, YP_959769, ZP_01736962, ZP_01900335, ZP_01892096, ZP_01103974, ZP_01915077, YP_924106, YP_130411, ZP_01222731, YP_550815, YP_983712, YP_001019688, YP_524762, YP_856798, ZP_01115500, YP_001141848, NP_336047, NP_216059, YP_882409, YP_706156, YP_001136150, YP_952365, ZP_01221833, YP_130076, NP_567936, AAR88762, ABK28586, NP_197634, CAD30694, NP_001063962, BAD46254, NP_001030809, EAZ10132, EAZ43639, EAZ07989, NP_001062488, CAB88537, NP_001052541, CAH66597, CAE02214, CAH66590, CAB88538, EAZ39844, AAZ06658, CAA68190, CAA52019, 및 BAC84377

[0276]

아실-ACP 티오에스테라제는 고등 식물(및 일부 미세 조류 중) 지방산 생합성에 있어서 종결 인자이며, 대부분의 식물 종에 있어서 지방산의 생합성은 FatA 유전자 군의 일원에 의해 수행되는데, 상기 아실-ACP 티오에스테라제는 C16:0 단계에서 C18:0 단계로 진행되는 연장 과정을 종결하는 역할을 한다. 단쇄 지방산을 합성하는 종(예를 들어 쿠페아, 엘라에이스, 미리스티카 또는 움벨루라리아)에 있어서, FatB 유전자에 의해 암호화되는 아실-ACP 티오에스테라제의 상이한 군은 이와 같은 종결 단계를 수행한다.본원에 기술된 방법에 사용하기 적당한 기타 다른 효소로서는 표 6 및 표 8에 나열된 단백질들 중 하나와의 아미노산 동일성이 70% 이상이며, 원하는 해당 효소 활성(예를 들어 아실기 운반 단백질로부터의 지방산의 절단, 아실-CoA의 알데하이드 또는 알코올로의 환원, 또는 알데하이드의 알칸으로의 전환)을 나타내는 효소를 포함한다. 부가의 구체예에서, 효소 활성은, 본원에 모두 참조로 포함된 상기 서열들 중 하나와의 동일성이 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 99% 이상인 서열에서 나타난다.

[0277]

발현될 외인성 유전자(또는 불활성화된 내인성 유전자, 아니면 이 유전자 둘 다)를 원하는 바대로 조합하여 선별함으로써, 미생물에 의해 생산된 후 수성 바이오매스로부터 추출될 수 있는 오일이 특제될 수 있다. 예를 들어 미생물은 다음과 같은 요소들을 포함할 수 있다: (i) 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 외인성 유전자; (ii) 임의로는 천연의 상태에서 공동 발현되는 아실기 운반 단백질 또는 지방산 아실-ACP 티오에스테라제에 대한 친화성을 가지는 아실기 운반 단백질; (iii) 돌연 변이된 내인성 불포화 효소 유전자(이 경우, 돌연 변이는 불포화 효소 유전자 또는 불포화 효소 단백질을 비활성으로 만듦(예를 들어 불포화 효소의 녹아웃)); (iv) 내인성 스테아로일 아실기 운반 단백질 불포화 효소의 과발현 또는 이중 SAD의 발현; 및 (v) 상기 (i) 내지 (iv)의 임의의 조합.

[0278]

이러한 효소, 예를 들어 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 유전자는, 지질을 유의적으로 생산하는 것으로 이미 알려진 세포, 예를 들어 클로렐라 프로토타코이데스로부터 얻을 수 있다. 지질을 생산하는 기능을 가지는 것으로 이미 알려진 유전자, 예를 들어 이중 결함을 포화시키는 효소를 암호화하는 유전자는 수용 세포에 개별적으로 도입되어 이 세포를 형질 전환할 수 있다. 미세 조류 내 지질 생산을 변경(개선)할 수 있는 유전자를 확인하는 방법에 관하여는, 본원에 참조로 포함되어 있는 PCT 공보 제2008/151149호에 기술되어 있다.

[0279]

그러므로, 임의의 구체예에서, 본 발명을 수행함에 있어서는 동일 미생물 종의 야생형 세포의 지질 경로 효소의 수준과 비교하였을 때, 이 효소의 수준과 상이한 수준으로 지질 경로 효소를 발현하도록 유전자 조작된 기타 다른 미생물 세포 또는 기타 다른 미세 조류 또는 프로토타카가 이용될 수 있다. 몇몇 경우에, 상기 세포는 2개 세포가 동일한 조건 하에서 성장하는 경우 야생형 세포에 비해 더 많은 지질을 생산한다. 몇몇 경우에, 상기 세포는 야생형 세포보다 더 높은 수준으로 지질 경로 효소를 발현하도록 유전자 조작되고/조작되거나 선택되었다. 몇몇 경우에, 지질 경로 효소는 피루베이트 탈수소화 효소, 아세틸-CoA 카복실라제, 아실기 운반 단백질 및 글리세롤-3 포스페이트 아실트랜스퍼라제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 경우에, 상기 세포는 야생형 세포보다 더 낮은 수준으로 지질 경로 효소를 발현하도록 유전자 조작되고/조작되거나 선택되었다. 세포가 더 낮은 수준으로 지질 경로 효소를 발현하는 하나의 구체예에서, 지질 경로 효소는 시트레이트 합성 효소를 포함한다.

[0280]

몇몇 구체예에서, 상기 세포는 야생형 세포와 비교하여 변화된 수준으로 지방산 합성의 범용 조절제를 발현하도록 유전자 조작되고/조작되거나 선택됨으로써 다수의 지방산 합성 유전자의 발현 수준은 야생형 세포와 비교하여 변화된다. 몇몇 경우에, 지질 경로 효소는 지방산을 변형시키는 효소를 포함한다. 몇몇 경우에, 지질 경로 효소는 스테아로일-ACP 불포화 효소 및 글리세롤지질 불포화 효소로부터 선택된다. 몇몇 경우에 있어서, 세포는 지질 경로 효소를 낮은 수준으로 발현하거나 특정 지질 경로 효소를 전혀 발현하지 않도록 유전자 조작되어/유전자 조작되거나 선별되었다(이 경우, 지질 경로 효소는 녹아웃되거나 외인성 유전자와 치환됨).

[0281]

다른 구체예에서, 본 발명을 수행함에 있어서는 하나 이상의 외인성 유전자 및/또는 하나 이상의 불활성화된 내

인성 유전자를 함유하는 오일 생산 미생물을 이용하는데, 여기서, 상기 외인성 또는 내인성 유전자는 지방 아실-ACP 티오에스테라제, 지방 아실-CoA 환원 효소, 지방 알데하이드 환원 효소, 지방 아실-CoA/알데하이드 환원 효소, 지방 알데하이드 탈카보닐화 효소, 불포화 효소 및 아실기 운반 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질(들)을 암호화한다. 다른 구체예에서, 내인성 불포화 효소 유전자는 상기 외인성 유전자들 중 하나 이상을 함유하는 미생물 내에서 과발현된다. 하나의 구체예에서, 외인성 유전자는 자극에 반응하여 유도 또는 억제되는 프로모터와 작동 가능하도록 결합된다. 몇몇 경우에 있어서, 상기 자극은 외부에서 제공되는 소분자, 열, 냉각 환경 및 배양 배지 중 질소 제한 또는 질소 부재로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 경우에 있어서, 외인성 유전자는 세포내 구획에서 발현되거나 이 구획으로 표적화된다. 몇몇 구체예에서, 세포내 구획은 엽록체, 색소체 및 미토콘드리아로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 구체예에서, 미생물은 프로토타카 모리포르미스, 프로토타카 크루가니, 프로토타카 스태그노라 또는 프로토타카 조프피이다.

[0282] 하나의 구체예에서, 외인성 유전자 또는 불활성화된 내인성 유전자는 지방산 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화한다. 몇몇 경우에 있어서, 외인성 유전자 또는 불활성화된 내인성 유전자에 의해 암호화된 티오에스테라제는 아실기 운반 단백질(ACP)로부터 8 내지 18 탄소 지방산이 절단되는 것을 촉진한다. 몇몇 경우에 있어서, 외인성 유전자 또는 불활성화된 내인성 유전자에 의해 암호화되는 티오에스테라제는 ACP로부터 10 내지 14 탄소 지방산이 절단되는 것을 촉진한다. 하나의 구체예에서, 외인성 유전자 또는 불활성화된 내인성 유전자에 의해 암호화되는 티오에스테라제는 ACP로부터 12 탄소 지방산이 절단되는 것을 촉진한다. 몇몇 구체예에서, 외인성 유전자에 의해 암호화되는 티오에스테라제는 ACP로부터 16 내지 18 탄소 지방산이 절단되는 것을 촉진한다.

[0283] 하나의 구체예에서, 외인성 유전자는 지방 아실-CoA/알데하이드 환원 효소를 암호화한다. 몇몇 경우에 있어서, 외인성 유전자에 의해 암호화되는 환원 효소는 8 내지 18 탄소 지방 아실-CoA가 상응하는 1차 알코올로 환원되는 것을 촉진한다. 몇몇 경우에 있어서, 외인성 유전자 또는 불활성화된 내인성 유전자에 의해 암호화되는 환원 효소는 10 내지 14 탄소 지방 아실-CoA가 상응하는 1차 알코올로 환원되는 것을 촉진한다. 하나의 구체예에서, 외인성 유전자 또는 불활성화된 내인성 유전자에 의해 암호화되는 환원 효소는 12 탄소 지방 아실-CoA가 도데칸올로 환원되는 것을 촉진한다.

[0284] 본원에 기술된 방법을 수행함에 있어서, 2개의 외인성 유전자들(또는 2개의 불활성화된 내인성 유전자들)을 함유하는 재조합 프로토타카(또는 기타 다른 미세 조류 또는 미생물) 세포가 이용될 수 있는데, 이 경우, 제1 외인성 유전자 또는 불활성화된 내인성 유전자는 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하고, 제2 외인성 유전자 또는 불활성화된 내인성 유전자는 지방 아실-CoA 환원 효소, 지방 아실-CoA/알데하이드 환원 효소 및 아실기 운반 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질을 암호화한다. 몇몇 경우에 있어서, 2개의 외인성 유전자는 각각, 자극에 반응하여 유도될 수 있는 프로모터와 작동 가능하도록 결합된다. 몇몇 경우에 있어서, 각각의 프로모터는 동일한 자극, 예를 들어 배양 배지 중 질소 제한 또는 질소 부재에 반응하여 유도될 수 있다. 배양 배지 중 질소가 제한되거나 아예 존재하지 않으면, 일부 미생물, 예를 들어 프로토타카 및 기타 다른 미세 조류, 그리고 기타 다른 미생물 중 내 오일 생산을 촉진하며, 또한 오일(지질)이 높은 수준으로 생산되도록 유도하는 촉진 인자로서 사용될 수 있다. 지질이 본원에 기술된 유전자 조작 방법에 사용될 때, 이 지질(건조 세포 중량을 기준으로 백분율로 표시)은 높은 수준, 예를 들어 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상 및 75% 이상으로 증가될 수 있다.

[0285] 본원에 기술된 신규 오일(지질) 및 이로부터 유래하는 유전성 유체는, C16 및 C18 지방산이 다량으로 존재하는 기타 다른 천연 생성 오일, 예를 들어 해바라기 오일 및 카놀라 오일과 구별된다.

[0286] 하나의 구체예에서, 제1 외인성 유전자에 의해 암호화되는 티오에스테라제는 ACP로부터 8 내지 18 탄소 지방산이 절단되는 것을 촉진한다. 부가적으로, 장쇄 오일이 요망되는 구체예에서, 하나 이상의 단쇄(즉 C14 이하, 예를 들어 C12, C10 및/또는 C8) TE 및/또는 상응하는 ACP 유전자의 발현은 (자체의 발현을 변경함으로써) 감소되거나, 또는 (예를 들어 녹아웃됨으로써) 일어나지 않는다.

[0287] 전술한 다양한 구체예에 있어서, 프로토타카(또는 기타 다른 미세 조류 또는 기타 다른 미생물) 세포는 지질 경로 효소를 암호화하는, 하나 이상의 불활성화된(또는 발현이 감소되도록 조작된) 내인성 유전자 또는 하나 이상의 외인성 유전자를 함유할 수 있다. 몇몇 경우에 있어서, 지질 경로 효소는 스테아로일-ACP 불포화 효소, 지방산 불포화 효소, 글리세로지질 불포화 효소, 피루베이트 탈수소화 효소, 아세틸-CoA 카복실라제, 아실기 운반 단백질 및 글리세롤-3 포스페이트 아실트랜스퍼라제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 경우에 있어서, 프로토타카 또는 기타 다른 세포는 지방 아실-ACP 티오에스테라제, 지방 아실-CoA/알데하이드 환원 효소, 지방 아실-CoA 환원 효소, 지방 알데하이드 환원 효소, 지방 알데하이드 탈카보닐화 효소 및/또는 아실기 운반 단백질

로 이루어진 군으로부터 선택되는 지질 변경 효소를 함유한다.

[0288] **VI. 미생물 오일의 생산 및 이로부터 유래하는 생성물**

[0289] **1. 미생물 오일의 생산**

[0290] 본원에 기술된 방법에 따라 미생물 오일을 생산하기 위해서, 미생물 세포에 의해 생산된 원료 그대로의 가공되지 않은 오일(지질)은 임의의 통상적인 방법에 의해 회수 또는 수집된다. 오일은, 예를 들어 전 세포 추출에 의해 분리될 수 있다. 이와 같은 방법에 있어서, 세포는 우선 파열되고, 이후 세포 내 및 세포막/세포벽 결합 지질 및 지방산과, 세포의 탄화수소는, 예를 들어 전술한 바와 같은 원심 분리법을 사용하여 세포 덩어리로부터 분리될 수 있다. 다수의 구체예에서, 미생물 내에서 생산된 세포 내 지질은 미생물 세포를 용해하는 공정 이후 또는 이와 같은 공정이 진행되는 동안에 추출된다.

[0291] 더욱 구체적으로, 배양을 마친 후 미생물은 통상적으로 발효액으로부터 분리된다. 분리 공정은 종종 원심 분리에 의해 수행되며, 그 결과, 미생물 바이오매스의 농축 페이스트가 제조된다. 이후, 바이오매스는 발효액과 세포 파편을 제거하기 위해 세정 용액(예를 들어 탈이온수)으로 세정될 수도 있다. 임의로, 세정된 미생물 바이오매스는 또한 세포 파열을 수행하기 전에 건조(오븐 건조, 동결 건조 등)될 수도 있다. 대안적으로, 세포는 발효가 마쳐졌을 때 발효액 중 일부 또는 발효액 전부로부터 분리 공정을 거치지 않고 용해될 수 있다. 예를 들어 세포가 용해될 때, 이 세포는 세포 대 세포의 액체의 비율 1:1 v:v 미만으로 존재할 수 있다.

[0292] 액체를 함유하는 미생물은 용해시켜 용해물을 생성할 수 있다. 본원에 상세히 기술된 바와 같이, 미생물 용해시키는 단계(또한 세포 용해로서 언급됨)는 열 유도된 용해, 염기의 첨가, 산의 첨가, 프로테아제와 같은 효소 및 아밀라제와 같은 다당류 분해 효소의 사용, 초음파의 사용, 기계적 용해, 삼투압 충격의 사용, 용균성 바이러스에 의한 감염 및/또는 하나 이상의 용균성 유전자의 발현을 포함하는 임의의 간편한 수단에 의해 성취될 수 있다. 용해를 수행하여 미생물에 의해 생성된 세포 내 분자를 방출시킨다. 미생물을 용해시키기 위한 이들 방법 각각은 단일 방법으로 또는 동시에 또는 연속적으로 조합하여 사용할 수 있다. 세포 파쇄 정도는 현미경 분석에 의해 관찰할 수 있다. 본원에 기술된 방법중 하나 이상을 사용하여, 통상적으로 70% 초과와 세포 파괴가 관찰된다. 바람직하게, 세포 파괴는 80% 초과, 보다 바람직하게는 90% 초과 및 가장 바람직하게는 약 100%이다.

[0293] 특정 구체예에서, 미생물은 생장 후 용해되므로, 예를 들어 추출 또는 추가 가공에 있어서 미생물 오일 노출량은 증가하게 된다. 만일 외인성 리파제 유전자가 사용되면, (예를 들어 유도성 프로모터를 통한) 리파제 발현 또는 세포 용해의 타이밍은 지질 및/또는 탄화수소 수율을 최적화하도록 조정될 수 있다. 다수의 용해 기술에 대해서는 이하에 기술되어 있다. 이와 같은 기술은 개별적으로 또는 병행하여 사용될 수 있다.

[0294] 본 발명의 하나의 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 미생물을 함유하는 세포 현탁액의 가열을 포함한다. 이러한 구체예에서, 미생물을 함유하는 발효액(또는 발효액으로부터 분리된 미생물 현탁액)는 미생물, 즉 미생물의 세포벽 및 막이 분해하거나 파괴될 때까지 가열한다. 통상적으로, 적용되는 온도는 50℃ 이상이다. 보다 효율적인 세포 용해를 위해, 보다 고온, 예를 들어 30℃ 이상, 60℃ 이상, 70℃ 이상, 80℃ 이상, 90℃ 이상, 100℃ 이상, 110℃ 이상, 120℃ 이상, 또는 130℃ 이상 또는 그 이상의 온도가 사용된다. 가열 처리에 의한 세포 용해는 미생물을 비등시킴으로써 수행할 수 있다. 대안적으로, 열 처리(비등 없이)는 오토클레이브에서 수행할 수 있다. 열 처리된 용해물은 추가의 처리를 위해 냉각시킬 수 있다. 세포 파쇄는 또한 증기 처리, 즉 가압된 증기의 부가를 통해 수행할 수 있다. 세포 파쇄를 위한 미세 조류의 증기 처리는, 예를 들어 미국 특허 제 6,750,048호에 기술되어 있다. 몇몇 구체예에서, 증기 처리는 발효기로 증기를 살포하고 브로스를 약 90분 미만, 바람직하게는 약 60분 미만, 보다 바람직하게는 약 30분 미만 동안 원하는 온도에서 유지시킴으로써 성취할 수 있다.

[0295] 본 발명의 다른 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 염기를, 미생물을 함유하는 세포 현탁액에 첨가하는 것을 포함한다. 상기 염기는 사용되는 미생물의 단백질성 화합물의 적어도 일부를 가수 분해하기에 충분히 강해야만 한다. 단백질을 가수화시키는데 유용한 염기는 화학 기술 분야에 공지되어 있다. 본 발명의 방법의 구체예에 유용한 예시적인 염기로서는 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘의 수산화물, 탄산염 및 중탄산염, 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직한 염기는 KOH이다. 세포 파쇄를 위한 미세 조류의 염기 처리는, 예를 들어 미국 특허 제 6,750,048호에 기술되어 있다.

[0296] 본 발명의 다른 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 산을, 미생물을 함유하는 세포 현탁액에 첨가하는 것을 포함한다. 산 용해는 10mN 내지 500mN 또는 바람직하게 40nM 내지 160nM의 농도로 산을 사용하여 수행할 수 있다. 산 용해는 바람직하게 실온 초과(예를 들어, 40℃ 내지 160℃, 즉, 50℃ 내지 130℃의 온도)에서 수행한

다. 적당한 온도(예를 들어, 실온 내지 100℃ 및 특히 실온 내지 65℃)에 대해서, 산 처리는 초음파 처리 또는 기타 다른 세포 파쇄 방법과 유용하게 조합할 수 있다.

[0297] 본 발명의 다른 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 효소를 사용함으로써 미생물을 용해시키는 것을 포함한다. 미생물을 용해시키기 위해 바람직한 효소로서는 프로테아제 및 다당류 분해 효소, 예를 들어 헤미셀룰라제(예를 들어, 아스퍼질러스 나이저; Sigma Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재; #H2125), 펙티나제(예를 들어, 리조푸스 종 유래의 펙티나제; Sigma Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재; #P2401), 만나웨이(Mannaway) 4.0 L(Novozymes), 셀룰라제(예를 들어, 트리코더마 비리데 유래의 셀룰라제; Sigma Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재; #C9422), 및 트리셀라제(예를 들어, 바시디오마이세테스 종 유래의 트리셀라제; Sigma Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스 소재; #D9515)가 있다.

[0298] 본 발명의 다른 구체예에서, 용해는, 예를 들어 임의로 클로렐라 또는 클로렐라 바이러스 유래의 다당류 분해 효소와 같은 셀룰라제, 및/또는 스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*) 프로테아제, 키모트립신, 프로테이나제 K, 문헌[Degradation of Polylactide by Commercial Proteases, Oda Yet al., Journal of Polymers and the Environment, Volume 8, Number 1, January 2000, pp. 29-32(4)]에 열거된 프로테아제, 알칼라제 2.4 FG(Novozymes), 및 플라보우르짐 100 L(Novozymes)과 같은 프로테아제와 같은 효소를 사용하여 성취한다. 또한 이전의 프로테아제 및 다당류 분해 효소의 임의의 조합을 비롯한, 프로테아제 및 다당류 분해 효소의 임의의 조합을 사용할 수 있다.

[0299] 다른 구체예에서, 용해는 익스펠러 프레스를 사용하여 수행할 수 있다. 이러한 공정에서, 바이오매스는 고압에서 스크류형 장치를 통해 강제 주입하고 세포를 용해시키며, 세포 내 지질이 방출되게 하고 세포 내에서 단백질 및 섬유(및 기타 다른 성분)로부터 분리되도록 한다.

[0300] 본 발명의 다른 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 초음파, 즉 초음파 처리를 사용하여 수행한다. 따라서, 세포는 또한 고주파음으로 용해시킬 수 있다. 상기 음은 전자적으로 생성될 수 있고 금속 팁을 통해 적절히 농축된 세포 현탁액으로 운반된다. 상기 초음파 처리(또는 초음파 처리(ultrasonication))는 세포 현탁액 중 공극의 형성을 기준으로 세포 완전성을 붕괴시킨다.

[0301] 본 발명의 다른 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 기계적 용해에 의해 수행한다. 세포는 기계적으로 용해시키고, 임의로 균질화하여 탄화수소(예를 들어, 지질) 수집을 촉진시킬 수 있다. 예를 들어, 압력 분쇄기를 사용하여 세포 함유 슬러리를 제한된 오리피스 밸브를 통과하도록 펌핑시킬 수 있다. 고압(1500바 이하)을 적용함에 이어서 출구 노즐을 통해 즉시 확장시킨다. 세포 파쇄는 밸브상에 충돌, 오리피스 내 액체 고전단, 및 방출시 급작스런 압력 강하로 세포 파열의 유도 3가지 상이한 기작에 의해 성취한다. 상기 방법은 세포 내 분자를 방출시킨다. 대안적으로, 볼 밀을 사용할 수 있다. 볼 밀에서, 세포는 비드와 같은 작은 연마 입자와 함께 현탁 상태로 교반시킨다. 전단력 때문에 세포는 분해되고, 비드 사이에서 분쇄되며 비드와 충돌한다. 상기 비드는 세포를 파쇄하여 세포 내용물을 방출시킨다. 세포는, 예를 들어 블렌딩(예를 들어, 고속 또는 와링 블렌더(Waring blender)), 프렌치 프레스 또는 심지어 약한 세포 벽의 경우에 세포 파쇄를 위한 원심분리의 사용에 의한 것과 같은 전단력에 의해 파쇄될 수 있다.

[0302] 본 발명의 다른 구체예에서, 미생물을 용해하는 단계는 삼투압 쇼크를 적용함으로써(즉 저장 용액 중에 미생물 세포를 현탁함으로써) 수행된다.

[0303] 본 발명의 다른 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 용균성 바이러스로 미생물을 감염시키는 것을 포함한다. 본원에 개시된 방법에 사용하기 위해 적합한 미생물을 용해시키기 위한 광범위하게 다양한 바이러스는 공지되어 있고, 특정 미생물에 대한 특정 용균성 바이러스의 선택 및 용도는 당업계의 기술 수준 내에 있다. 예를 들어, 파라메시움 부르사리아 클로렐라 바이러스(*paramecium bursaria chlorella virus*; PBCV-1)는 특정 단일 세포 진핵 클로렐라형 녹색 조류 내에서 복제하고 이를 용해시키는 대형의 20면체 플라크 형성 이중가닥의 DNA 바이러스군의 프로토타입이다(피코드나비리데(Phycodnaviridae) 계열, 클로로바이러스(Chlorovirus) 속). 따라서, 임의의 민감성 미세 조류는 적합한 클로렐라 바이러스로 배양물을 감염시킴으로써 용해시킬 수 있다. 클로렐라 바이러스로 클로렐라 종을 감염시키는 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[*Adv. Virus Res.* 2006;66:293-336]; [*Virology*, 1999 Apr 25;257(1): 15-23]; [*Virology*, 2004 Jan 5;318(1):214-23]; [*Nucleic Acids Symp. Ser.* 2000;(44): 161-2]; [*J. Virol.* 2006 Mar;80(5):2437-44]; 및 [*Annu. Rev. Microbiol.* 1999;53:447-94]을 참조한다.

[0304] 본 발명의 다른 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 자가용해를 포함한다. 이러한 구체예에서, 미생물은

미생물을 용해시킬 용균성 단백질을 생성하도록 유전자 조작된다. 이러한 용균성 유전자는 유도성 프로모터를 사용하여 발현시켜 세포가 처음에 발효기 내에서 바람직한 밀도로 성장한 후 프로모터를 유도하여 용균성 유전자를 발현시킴으로써 세포를 용해시킬 수 있게 할 수 있다. 하나의 구체예에서, 상기 용균성 유전자는 다당류 분해 효소를 암호화한다. 다른 특정 구체예에서, 상기 용균성 유전자는 용균성 바이러스 유래의 유전자이다. 따라서, 예를 들어 클로렐라 바이러스 유래의 용균성 유전자는 조류 세포에서 발현될 수 있고, 문헌[Virology 260, 308-315 (1999)]; [FEMS Microbiology Letters 180 (1999) 45-53]; [Virology 263, 376-387 (1999)]; 및 [Virology 230, 361-368 (1997)]을 참조한다. 용균성 유전자의 발현은 바람직하게 유도성 프로모터, 예를 들어 소분자, 광, 열의 존재와 같은 자극 및 기타 다른 자극에 의해 유도되는 미세 조류에서 활성인 프로모터를 사용하여 수행한다.

[0305] 상기 방법에 의해 생성된 세포 용해물로부터 지질을 분리하기 위한 다양한 방법이 이용가능하다. 예를 들어, 지방 알데하이드, 지방 알코올 및 탄화수소(예를 들어, 알칸)와 같은 지질 및 지질 유도체는 헥산과 같은 소수성 용매로 추출할 수 있다(문헌[Frenz et al. 1989, Enzyme Microb. Technol., 11:717] 참조). 지질 및 지질 유도체는 또한 액화(예를 들어, 문헌[Sawayama et al. 1999, Biomass and Bioenergy 17:33-39] 및 [Inoue et al. 1993, Biomass Bioenergy 6(4):269-274] 참조); 오일 액화(예를 들어, 문헌[Minowa et al. 1995, Fuel 74(12):1735-1738] 참조); 및 초임계 CO₂ 추출(예를 들어, 문헌[Mendes et al. 2003, Inorganica Chimica Acta 356:328-334] 참조)을 사용하여 추출할 수 있다. Miao 및 Wu는 클로렐라 프로토테오코이데스의 배양으로부터 미세 조류 지질 회수의 프로토콜을 기술하며, 여기서 상기 세포는 원심분리에 의해 수거되고 증류수로 세척되며 동결 건조에 의해 건조된다. 생성된 세포 분말을 모르타르에서 분쇄하고 이어서 n-헥산으로 추출하였다(문헌[Miao 및 Wu, Biosource Technology (2006) 97:841-846]).

[0306] 따라서, 본원에 기술된 미생물에 의해 생성된 지질, 지질 유도체 및 탄화수소는 유기 용매로 추출하여 회수할 수 있다. 몇몇 경우에, 바람직한 유기 용매는 헥산이다. 통상적으로, 유기 용매는 용해 성분의 사전 분리 없이 용해물에 직접 첨가한다. 하나의 구체예에서, 전술한 방법 중 하나 이상의 방법에 의해 생성된 용해물은 지질 및/또는 탄화수소 성분이 유기 용매와 용액을 형성하도록 하기에 충분한 시간 동안 유기 용매와 접촉시킨다. 몇몇 경우에, 상기 용액을 이어서 추가로 정제하여 특정의 원하는 지질 또는 탄화수소 성분을 회수할 수 있다. 헥산 추출 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0307] 미생물로부터 지질을 추출하는 기타 다른 방법에 관하여는 본원에 참조로 포함되어 있는 PCT 특허 출원 US10/031108에 개시되어 있다.

[0308] 본원에 기술된 세포에 의해 생성된 지방 알데하이드, 지방 알코올 및 탄화수소(예를 들어, 알칸)와 같은 지질 및 지질 유도체는 리파제를 포함하여 하나 이상의 효소를 사용함으로써 변형시킬 수 있다. 탄화수소가 세포의 세포외 환경에 존재하는 경우, 효소가 탄화수소를 변형시키거나 탄화수소 전구체로부터 이의 합성을 완성하도록 하는 조건 하에서 하나 이상의 효소를 상기 환경에 첨가할 수 있다. 대안적으로, 상기 탄화수소는 효소와 같은 하나 이상의 촉매의 첨가 전에 세포 물질로부터 부분적으로 또는 완전하게 분리될 수 있다. 상기 촉매는 외인성으로 첨가되고, 이들의 활성은 세포 외부에서 또는 시험관내에서 발생한다.

[0309] 2. 미생물 오일의 추가 가공

[0310] 따라서, 본원에 기술된 바와 같이 생체 내에서 세포에 의해 생성되거나 시험관 내에서 효소로 변형된 지질 및 탄화수소는 임의로 통상적인 수단에 의해 추가로 가공될 수 있다. 상기 가공은 탄화수소 분자의 크기를 감소시키고 따라서 이의 수소:탄소 비율을 증가시키기 위한 “크래킹(cracking)”을 포함할 수 있다. 촉매 및 열 크래킹 방법은 통상적으로 탄화수소 및 트리글리세라이드 오일 가공에 사용한다. 촉매 방법은 고체 산 촉매와 같은 촉매의 사용을 포함한다. 촉매는 실리카-알루미나 또는 제올라이트일 수 있고, 이로써 탄소-탄소 결합을 이중 용해 또는 비대칭 분해시켜 카보양이온(carbocation) 및 수소화물 음이온을 생성할 수 있다. 이들 반응성 중간체를 이어서 다른 탄화수소와 함께 재배열하거나 수소화 전달을 진행시킨다. 따라서 상기 반응은 중간체를 재생성시켜 자가 증폭 사슬 기작을 유도할 수 있다. 또한 탄화수소는 여기서의 탄소-탄소 이중 결합 또는 삼중 결합의 수를 임의로 0까지 감소하도록 가공할 수 있다. 또한 탄화수소를 가공하여 여기서의 고리 또는 환형 구조를 제거할 수 있다. 탄화수소를 또한 가공하여 수소:탄소 비율을 증가시킬 수 있다. 이것은 수소의 첨가(“수소화”) 및/또는 탄화수소의 보다 작은 탄화수소로의 “크래킹”을 포함할 수 있다.

[0311] 일단 지질이 추출되면, 지질은 본원에 기술된 방법에 따라서 하나 이상의 가공 단계를 거칠 수 있다. 이와 같은 가공 단계는 연료 생산시 미정제 오일(예를 들어 석유 및 기타 다른 공급원)을 대상으로 수행되는 정제 단계와 구별된다. 몇몇 양태에 있어서, 이와 같은 가공 단계는 사람이 소비하기 위해 생산되는 종자 오일을 대상으로

수행되는 단계들과 유사하다. 몇몇 구체예에서, 추출된 지질은 레시틴 및 기타 다른 인지질을 추출하도록 고무 성질 제거된다. 다른 구체예에서, 추출된 지질은 염기 또는 알칼리성 금속을 사용하여 정제된다. 또 다른 구체예에서, 추출된 지질은 표백토, 일반적으로는 산성 점토를 통과한다. 다른 구체예에서, 추출된 지질은 탈취되며 그 결과, 휘발성 불순물, 예를 들어 알데하이드 및 케톤이 제거 또는 감소된다. 또 다른 구체예에서, 추출된 지질은 윈터리제이션되며 그 결과, 왁스 또는 포화 지방이 제거 또는 감소된다. 전술한 가공 단계들은, 원하는 생성물의 특징에 따라서, 추출된 지질에 대해 임의의 양상으로 병행되며 모든 양상으로 병행된다. 정제(예를 들어 염기 또는 알칼리성 금속 사용), 표백(예를 들어 표백토 사용) 및/또는 탈취된 추출 지질은 일반적으로 RBD 오일이라 칭하여 진다. 본원에 기술된 미세 조류 및/또는 유지성 효모로부터 추출된 지질로 생산된 RBD 오일은 다양한 산업적 용도(예를 들어 유전성 유체 생산용)로서 유용하다.

[0312] 몇몇 구체예에서, 고무 성질 제거는 오일로부터 오염 물질, 예를 들어 인지질을 분리하기 위해 수행된다. 본 발명의 몇몇 구체예에서, 추출된 오일의 고무 성질 제거는 정제, 표백 및 탈취(또는 RBD)의 일환이다. RBD 공정은 추출된 오일의 악취, 색 및/또는 풍미를 제거 또는 감소시킨다. 몇몇 구체예에서, 정제 공정은 일반적으로 2개의 단계들, 즉 수산화 나트륨을 사용하는 가성 스트립핑(caustic stripping)을 통해 오일 중 유리 지방산(FFA)을 제거하는 중화 단계 및 고무 성질 제거 단계로 이루어져 있다. 표백 단계는 오일과 다양한 표백토를 혼합하여, 색, 미량 금속 및 황 화합물을 흡수하는 단계를 포함할 수 있다. 탈취 단계는 낮은 압력과 높은 온도에서 진행되는 증류 공정일 수 있다. 예시적인 증류 공정에 있어서 오일은 진공 하에 방치된 상태에서 증기로 가열되며, 그 결과, 잔여 풍미 또는 악취 및 FFA가 제거된다. 탈취는 또한 활성탄을 사용하는 처리에 의해 이루어질 수도 있다.

[0313] 상기 언급된 단계들은 유동점을 낮추기 위해 사용될 수 있다. 다양한 구체예에서, 미생물 오일(지질)의 유동점은 약 -10°C , 약 -15°C , 약 -20°C , 약 -25°C , 약 30°C , 약 -35°C 또는 약 -40°C 로 감소될 수 있다. 뿐만 아니라, 미생물 오일의 유동점은 상기와 같은 수치들 중 임의의 수치에 의해 한정되는 범위 내, 예를 들어 약 -10°C 내지 -40°C 또는 약 -15°C 내지 약 -35°C 등에 속할 수 있다. 이와 같은 단계들은 주로 팔미트산과 스테아르산 트리글리세라이드로 이루어진 포화 분획(스테아린 분획이라고 알려짐)의 상대적 비율을 감소시키므로, 유동점이 감소될 수 있다. 오일을 분별하면 오일 중 포화 트리글리세라이드 농도가 감소된다. 분별은, 식물성 오일 산업 분야에서 알려진 윈터리제이션 공정에서와 같이, 건조 분별법에 의해 이루어질 수 있다. 이와 같은 공정에서, 미생물(예를 들어 조류) 오일은, 우선 식물성 오일 산업 분야에서 사용되는 방법과 유사한 방법에 의해 정제, 표백 및 탈취된다. 이로써, 유동점이 -5°C 내지 -10°C , 예를 들어 -8°C 인 오일이 생성된다.

[0314] 이후, RBD 오일의 온도는, 결정 핵이 형성될 때까지 제어된 방식으로 낮아질 수 있다. 그 다음, 오일은 수시간 동안 상기 결정화 온도로 방치되며, 그 결과, 결정의 생장이 촉진된다. 이후, 결정은 여과에 의해 분리되며, 그 결과, 다음과 같은 2개의 분획이 생성된다: 스테아린 분획의 일부 또는 대부분을 함유하는 고체 상 및 대부분이 올레인 분획으로 이루어진 액체 상. 그 결과, 유동점이 -8°C 내지 -15°C , 예를 들어 -11°C 인 오일이 생성된다. 액체 상은 다시 더 낮은 결정화 온도에 대해 분별되며, 그 결과 스테아린이 추가로 분리된다. 식물성 오일 산업 분야에 일반적으로 알려져 있는 바와 같이, 생성된 정제 액체 분획(수퍼 올레인에 해당)의 열 특성은 천연 미생물 오일의 열 특성보다 우수하다. 예를 들어 제2 분별이 행하여지면, 유동점이 -15°C 내지 -25°C , 예를 들어 -20°C 인 오일이 생성될 수 있다. 의외로 생성된 오일은, 미생물 오일이 동물성 오일 및 식물성 오일 중에서 더욱 저렴하고 건강에 유리하기도 한 대체물로서 전체적으로 또는 부분적으로 사용될 수 있는 다수의 분야, 예를 들어 중요 식품 산업 분야에서 유용하다.

[0315] 3. 미생물 오일 유래 생산물

[0316] 본원에 기술된 미생물 오일은 또한 생산물, 예를 들어 윤활제, 유압유, 산업용 오일 또는 유전성 유체를 생산하는데 사용될 수 있다. 일반적인 산업용 오일로서는 체인톱 바 윤활제, 금속 가공 유체, 식품용 윤활제, 기어 오일, 해양유, 엔진 윤활제, 트랙터 오일, 농업 장비용 윤활제, 엘리베이터 오일 및 이형 오일등을 포함한다. 유전성 유체는 통상적으로 전기 부재들(특히 고 전압 배전 장치), 예를 들어 자동 재폐로 차단기, 축전기, 회로 차단기, 고 전압 유체 충전 전송 케이블, 배전 부재, 개폐 장치(예를 들어 고 전압 부하 개폐기, 예를 들어 USPN 6,797,909에 개시된 것), 변압기, 전송 부재 및 전압 조정기를 냉각 및/또는 절연하는데 사용된다.

[0317] 통상의 유전성 유체는 미네랄 오일 기반 윤활제를 포함한다. 그 예로서는 통상적으로 정제되었거나 중간 정도로 수소 처리되었으며, 점도 지수(VI)가 120 미만인 석유 기반 오일인 I, II 및 II+ 족 염기 오일을 포함한다. 그 예로서는 고도로 정제된 통상의 오일 생산물인 III족 염기 오일(미국에서는 “합성 모터 오일” 포함)을 포함하기도 한다. III족 염기 오일은 I 또는 II/II+족 염기 오일을 수소화 처리(수소화 분해 및/또는 수소 첨가 이성

질화)함으로써 제조될 수 있으며, I, II 또는 II+ 족 염기 오일보다 적은 양의 포화물, 황 그리고 질소를 함유할 수 있고, 또한 VI는 120 초과일 수 있다. 미국 재료 시험 학회(ASTM)는, 다수의 인자들, 예를 들어 비등점, 세탄가, 혼탁점, 인화점, 점도, 아닐린점, 황 함량, 수분 함량, 회분 함량, 구리 스트립 부식 및 탄소 잔류물 중 임의의 것에 따라서, 유전성 유체 및 기타 다른 탄화수소 조성물에 대한 명세 사항(예를 들어 디젤 연료(ASTM D975), 제트 연료(ASTM D1655) 및 바이오디젤(ASTM D6751))을 확립한다.

[0318] 바이오 기반 유전성 유체는 다양한 공정에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어 미정제 식물성 오일로 개시되는 하나의 공정은, 고무 성질 제거, 알칼리 정제, 표백, 탈취, 수소화, 윈터리제이션(RBD 식물성 오일 생성), 미량의 극성 화합물과 산성 물질을 제거하기 위해 점토를 사용하는 처리(미국 특허 제6,274,067호 참조), 그리고 바이오 기반 유전성 유체를 생산하기 위해 첨가제와 혼합하는 단계들을 포함한다.

[0319] 유전성 유체의 중요 특성으로서는 점도, 발연성, 반응성, 유화성, 절연 능력, 생분해성 및 제조 비용을 포함한다. 이와 같은 특성들과 기타 다른 특성들은 이하에서 재고되었으며, 독자들은 미네랄 오일 기반 유전성 유체와 비교하였을 때 전형적인 바이오 기반 유전성 유체의 이점들과 단점들 중 일부를 이해함으로써, 본 발명의 임의의 구체예의 이점들 중 일부를 더욱 잘 이해할 수 있을 것이다. 점도에 있어서, 바이오 기반 유전성 유체의 점도 및 유동점은 일반적으로 더욱 높으므로, 저온 특성은, 미네랄 오일 기반 유전성 유체의 저온 특성과 비교하였을 때 더욱 떨어진다. 그러나, 미네랄 오일 기반 유전성 유체의 점도는, 다양한 미네랄 오일 공급원의 화합물 상호간 불일치 및 화합물간 복잡성으로 인해 분획 대 분획 간에 매우 다양할 수 있다. 바이오 기반 유전성 유체의 발연점과 발화점은 일반적으로 미네랄 오일 기반 유전성 유체의 발연점과 발화점보다 (2배 이상) 높다. 바이오 기반 유전성 유체는 일반적으로, 미네랄 오일 기반 유전성 유체의 경우에 비하여, 가수 분해 안정성, 열 안정성 및 산화 안정성이 떨어지고, 산가는 (약 2배) 크다. 바이오 기반 유전성 유체는 일반적으로, 미네랄 오일 기반 유전성 유체의 경우에 비하여, 생분해성이 더욱 우수하며, 독성은 더욱 낮고, 또한 상기 유체는 비 재생성 공급원이 아닌 재생성 공급원으로 제조된다. 바이오 기반 유전성 유체는 일반적으로, 미네랄 오일 기반 유전성 유체의 경우에 비하여, 생산 비용이 많이 들며, 더욱 많은 첨가제를 필요로 한다.

[0320] 본 발명의 방법은, 임의의 구체예에서, 통상의 바이오 기반 유전성 유체의 이점들을 모두 가지고 단점은 거의 가지지 않거나, 몇몇 구체예에서는 단점을 전혀 가지지 않는, 신규의 유전성 유체를 제공한다. 본 발명의 방법의 상기와 같은 이점과 기타 다른 이점은, 유전성 유체의 일반적인 특성에 대해 이하에 기술된 바를 고려하면 더욱 잘 이해될 수 있다.

[0321] 이상적으로, 유전성 유체의 점도는 온도에 따라서 가능한한 거의 변하지 않아야 할 것이다. 점도(“진하기”)는 유체의 유동 또는 전단에 대한 내구성의 척도로서, 운동학적 수치(kv) 및 절대 수치(동력학적 수치)로 측정된다(40℃ 및 100℃에서 mm^2/s 또는 cSt)(ASTM D2270-04; ASTM D445; ASTM D88). 일반적으로, 2개의 가동 표면들을 충분히 떨어뜨리는, 점성이 최소인 윤활제가 요망된다. 때때로, 점도는 유압유의 가장 중요한 특징인 것으로 간주된다. 만일 점도가 너무 크면, 마찰이 일어나고, 압력이 강해지며, 동력이 소모되고, 열 발생량이 증가한다. 만일 점도가 너무 작으면, 작동 온도가 높을 때 내부 누수량이 증가될 수 있다. 오일 막은 가동부가 과도하게 마모되거나 이상 정지할 가능성을 막기에 불충분할 수 있다. 다양한 공급원으로부터 유래하는 유전성 유체의 예시적 점도(단위 = cSt)는 다음과 같다: 미네랄 오일 유래 유전성 유체 = 40℃에서는 20이고 100℃에서는 4; 대두 오일 유래 유전성 유체 = 40℃에서는 30이고 100℃에서는 7.6; 해바라기 오일 유래 유전성 유체 = 40℃에서는 40이고 100℃에서는 8.7; 및 평지씨(카놀라) 오일 유래 유전성 유체 = 40℃에서 33(Siniawski et al.; *J. Synthetic Lubrication*; 24, 101-110 (2007); Schneider; *J. Sci. Food Agric.*, 86, 1769-1780 (2006)). 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은, 전술한 공급원으로부터 유래하는 유전성 유체의 점도와 유사한 점도를 가진 유전성 유체를 제공할 수 있다. 예시적인 구체예에서, 유전성 유체의 40℃에서의 점도는 약 110cSt 미만, 예를 들어 20cSt 내지 30cSt이고/이거나 100℃에서의 점도는 약 2cSt 내지 약 15cSt, 예를 들어 4cSt 내지 8cSt이다.

[0322] 점도 지수(VI, 단위 없음)는 온도가 변함에 따라 일어나는 점도 변화의 척도이다. VI는, 40℃에서 오일의 kv와 2개의 참고 오일(VI가 각각 0 및 100인 참고 오일)의 kv를 비교함으로써 분석되며, 이 경우, 모든 오일의 kv는 100℃에서 동일하다(ASTM D2270). VI 수치는 일반적으로 가능한한 커야 한다. VI 수치가 크다는 것은 곧, 오일의 점도가 온도에 따라서 조금 변한다는 의미이다. 일반적으로, 저 VI는 35 이하이고; 중 VI는 35 내지 80이며; 고 VI는 80 내지 110이고; 극고(very high) VI는 110 내지 125이며; 초 VI는 125 내지 160이고; 초고(super high) VI는 160 이상이다. 다양한 출발 물질로부터 유래하는 유전성 유체들의 VI는 각각 다음과 같다: 미네랄 오일 유래 유전성 유체 = 103; 대두 오일 유래 유전성 유체 = 246; 및 해바라기 오일 유래 유전성 유체 = 206(Siniawski et al.; *J. Synthetic Lubrication*; 24, 101-110 (2007)). 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은,

상기 공급원으로부터 유래하는 유전성 유체의 VI와 유사한 VI를 가진 유전성 유체를 제공할 수 있다.

- [0323] 유동점은 액체가 흐르거나 유동하게 될때의 최저 온도(℃)이다(ASTM D97). 유동점은, 유전성 유체가 사용될 예상 최저 상온보다 10℃ 이상 낮을 것이다. 다양한 출발 물질로부터 유래하는 유전성 유체의 유동점은 각각 다음과 같다: 미네랄 오일 유래 유전성 유체 = -50℃; 대두 오일 유래 유전성 유체 = -9℃; 해바라기 오일 유래 유전성 유체 = -12℃; 및 팽지씨(카놀라) 오일 유래 유전성 유체 = -21℃(Siniawski et al.; *J. Synthetic Lubrication*; 24, 101-110 (2007)). 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 상기 공급원으로부터 유래하는 유전성 유체의 유동점과 유사한 유동점을 가지는 유전성 유체를 제공할 수 있다. 다양한 구체예에서, 미생물 오일 기반 유전성 유체의 유동점은 약 -10℃, 약 -15℃, 약 -20℃, 약 -25℃, 약 -30℃, 약 -35℃ 또는 약 -40℃일 수 있다. 뿐만 아니라, 미생물 오일 기반 유전성 유체의 유동점은 이와 같은 수치들 중 임의의 수치에 의해 한정되는 임의의 범위, 예를 들어 약 -10℃ 내지 -40℃, 또는 약 -15℃ 내지 약 -35℃ 등에 포함될 수 있다.
- [0324] 예를 들어, 그리고 전술한 바와 같이, 본원에 기술된 방법에 따라서 생산된, 유동점이 약 -8℃ 이하인 RBD 오일은 용이하게 생산될 수 있다. 이와 같은 유동점은, RBD 오일과 유동점 강하제를 혼합함으로써 추가로 하강될 수 있으며, 그 결과 오일에 첨가된 유동점 강하제의 양을 기준으로 유동점이 -15℃ 내지 -20℃ 이하인 오일이 생성된다. 1회의 분별을 통해 얻어진 올레인 분획으로부터는 유동점이 약 -11℃인 오일이 용이하게 생성되며, 이때, 상기 유동점은 올레인 분획이 유동점 강하제와 혼합될 때 하강될 수 있고, 그 결과 오일에 첨가된 유동점 강하제의 양을 기준으로 유동점이 -16℃ 내지 -20℃ 이하인 오일이 생성될 수 있다. 제2 분별을 통해 얻어진 올레인 분획(“수퍼 올레인”)으로부터는 유동점이 약 -20℃인 오일이 용이하게 생성되며, 이때, 상기 유동점은 수퍼 올레인 분획이 유동점 강하제와 혼합될 때 하강될 수 있고, 그 결과 오일에 첨가된 유동점 강하제의 양을 기준으로 유동점이 -20℃ 이하, 즉 -26℃ 이하인 오일이 생성될 수 있다. 다양한 유동점 강하제가 셰브론(Chevron), 오로나이트(Oronite), 인피니엄(Infineum), 제너럴 일렉트릭(General Electric) 및 로맥스 에보닉(RohmMax Evonik) 등으로부터 시판되고 있다. 본원에 기술된 미생물 오일(지질)과 함께 사용될 예시적 유동점 강하제로서는 비스코플렉스(VISCOPLEX)[®] 10-310 또는 1-133(로맥스-에보닉 애더티브스 게엠베하(Rohmax-Evonik Additives GmbH)), 또는 기타 다른 폴리(알킬) 아크릴레이트 및 폴리(메틸) 아크릴레이트, 예를 들어 인피니엄(INFINEUM)[®] V-351(인피니엄 UK 리미티드(Infineum UK limited)), PMA-D110 및 PMA D를 포함한다.
- [0325] 유체의 점도가 불충분하고 유체 막이 표면 접촉을 막지 못할 때 조기 마모(premature wear)가 일어나므로, 유전성 유체의 윤활성(항 마모 특성)은 중요한 의미를 갖는다(ASTM D2882). 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 윤활도가 우수한(ASTM D2882과 동등하거나 우수한) 유전성 유체를 제공한다.
- [0326] 휘발성 즉, 오일이 증발하는 성향(증기압 대 ℃)도 또한 유전성 유체에 있어서 중요하다. 일반적으로 휘발성이 낮은 것이 바람직하다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은, 미네랄 오일 기반 유전성 유체 및 통상의 바이오 기반 유전성 유체의 휘발성만큼 작거나 이보다 훨씬 작은 휘발성을 가진 유전성 유체를 제공할 수 있다.
- [0327] 유전성 유체의 발연성은 중요하다. 일반적으로, 발연성이 낮은 것이 바람직하다(“Bio-Based Lubricants: A Market Opportunity Study Update” United Soybean Board, Nov. 2008, Omni Tech International, Ltd., www.soynewuses.org/downloads/reports/BioBasedLubricantsMarketStudy.pdf). 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은, 미네랄 오일 기반 유전성 유체 및 통상의 바이오 기반 유전성 유체의 발연성만큼 작거나 이보다 훨씬 작은 발연성을 가진 유전성 유체를 제공할 수 있다.
- [0328] 인화점은, 오일이 증발하여 공기 중 점화 가능한 혼합물을 형성할 때의 최저 온도(℃)이다. ASTM D3278, D3828, D56 및 D93에는, 유전성 유체에 적당한 인화점 명세 사항이 기술되어 있다. 오일의 점화를 막기 위하여, 인화점은 일반적으로 가능한 한 높아야 한다. 다양한 공급원으로부터 유래하는 유전성 유체의 인화점은 각각 다음과 같다: 미네랄 오일 유래 유전성 유체 = 147℃; 및 TAG-유래 유전성 유체(통상의 것) = 324℃(New Safety Dielectric Coolants for Distribution and Power Transformers, www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf). 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은, 상기 공급원으로부터 유래하는 유전성 유체의 발연점과 유사하고, ASTM D1310 및 ASTM D92 명세 사항보다 우수하거나 동급인 인화점을 가진 유전성 유체를 제공할 수 있다.
- [0329] 발화점은, 오일이 개방 불꽃에 의해 점화된 후 5초 이상 계속해서 연소될 때의 최저 온도(℃)이다. ASTM D1310 및 ASTM D92에는, 유전성 유체에 적당한 발화점 명세 사항이 기술되어 있다. 오일의 발화를 막기 위해, 발화점은 가능한 한 높아야 한다. 다양한 공급원으로부터 유래하는 유전성 유체의 발화점은 각각 다음과 같다: 미네랄 오일 유래 유전성 유체 = 165℃; 및 TAG 유래 유전성 유체(통상의 것) = 360℃(New Safety Dielectric

Coolants for Distribution and Power Transformers, www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf). 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은, 상기 공급원으로부터 유래하는 유전성 유체의 발화점과 유사하고, ASTM D1310 및 ASTM D92 명세 사항보다 우수하거나 동급인 발화점을 가진 유전성 유체를 제공할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 이와 같은 발화점은 300℃ 이상, 예를 들어 300℃ 내지 450℃이다.

- [0330] 유전성 유체의 반응성은 중요한데; 이 유전성 유체는 산/염기, 열 및 공기와 반응하지 않아야(또는 반응성이 낮아야) 한다.
- [0331] 가수 분해 반응성이란, 산 또는 염기의 존재 하에서의 유체의 분해에 대한 감수성을 말한다. ASTM D2619 및 ASTM D943에는, 유전성 유체에 적당한 가수 분해 반응성에 대해 기술되어 있다. TAG에 있어서, 감수성 작용기는 에스테르 및 산/염기 감수성 작용기이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 가수 분해 반응성이 작은(ASTM D2619 및/또는 ASTM D943의 명세 사항과 동일하거나 양호한) 유전성 유체를 제공할 수 있다.
- [0332] 열 안정성이란, 열 분해에 대한 유전성 유체의 감수성을 말한다. 바이오 오일 유래 유전성 유체에 있어서, 열 불안정성은 통상적으로 글리세롤상 β -수소에 기인하며, 결과적으로는 생성물이 제거되게 한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 열 안정성이 큰(통상의 바이오 오일 유래 유전성 유체의 열 안정성과 동일하거나 이보다 큰) 유전성 유체를 제공할 수 있다.
- [0333] 산화 감수성이란, 유전성 유체가 산소와 반응하여 산화 생성물을 생성할 때의 감수성을 말한다. ASTM D943 및 ASTM D2272에는, 유전성 유체에 적당한 산화 안정성에 대해 기술되어 있다. 산화에 대한 감수성이 작은 것이 요망되는데; 윤활제의 감수성 수치가 크다는 것은 곧, 이 윤활제가 산화성이 더 크다는 것을 나타낸다. 임의의 구체예에서, 본 발명의 방법은 산화 감수성이 작은 유전성 유체(예를 들어 ASTM D943 또는 ASTM D2272)를 제공할 수 있다.
- [0334] 중화가(산 수치/산가)는, 오일 또는 유전성 유체 중 산의 양을 나타내는 척도이다. 산은, 오일(또는 유전성 유체)이 노화 및 사용됨에 따라서 산화될 때 생성된다. 산은, 바이오 기반 윤활제가 산화, 에스테르 열 분해 또는 산/염기 가수 분해될 때 생성된다. ASTM D947, ASTM D3487 및 ASTM D6871에는, 유전성 유체에 적당한 중화가에 대해 기술되어 있다. 일반적으로, 산 수치는 가능한한 낮아야 한다. 표준적 미네랄 오일에 대한 산가는 0.03이고 바이오 기반 오일에 대한 산가는 0.06이다(Ester Transformer Fluids, IEEE/PES Transformer Committee Meeting, October 7, 2003, www.transformerscommittee.org/info/F03/F03-EsterFluids.pdf). 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 산가가 낮은 유전성 유체를 제공할 수 있다(예를 들어 ASTM D947, ASTM D3487 또는 ASTM D6871).
- [0335] 유화성이란, 하나의 유체가 다른 유체들과 혼합되는 능력을 말한다. 이상적으로, 유전성 유체는 다른 윤활제, 유체 및 첨가제와 잘 혼합되어야 하지만, 물과는 혼합되지 않아야 한다. 항 유화성이란, 유압유가 물과 혼합되지 않으려는 성질을 말한다. 항 유화성은 유전성 유체에서 최적이다. 원하는 윤활제 및 첨가제와의 유화성은 유전성 유체에서 최적이다. 임의의 구체예에서, 본 발명의 방법은 특히 유화성과 항 유화성이 우수한 유전성 유체를 제공할 수 있다.
- [0336] 유전성 유체는 절연성이 우수해야 하는데, 다시 말해서, 상기 유체는 전류가 손실되는 것을 막아야 한다. 절연 전력 계수 테스트(Insulation power factor test)는 변압기를 대상으로 수행되는, 유전 손실 측정 테스트이다(%로 측정됨). 이때 구하여지는 수치는, 변압기 상태(침수, 건조 상태 및 절연 불량 여부)와, 권선, 장벽, 탭 전환기, 부싱 및 오일의 상태를 보여준다. 유전성 유체와 연관된 역률 수치는 가능한한 낮아야 한다(통상적으로 0.5% 이하). 예를 들어 정제 장치로부터 운반된 신규 오일의 역률은 25℃에서는 0.05% 이하이고, 100℃에서는 0.3% 이하이어야 한다(IEEE Guideline C57, 106-1991 as cited in www.nttworldwide.com/tech2209.htm). 69kV 이하에서 작동하는 신규 장치 내 신규 오일의 경우, 역률은 25℃에서는 0.15% 이하이고, 100℃에서는 1.5% 이하이어야 하고; 69kV 내지 288kV 이하에서 작동하는 신규 장치 내 신규 오일의 경우, 역률은 25℃에서는 0.10% 이하이고, 100℃에서는 1.0% 이하이어야 하며; 345kV 이상에서 작동하는 신규 장치 내 신규 오일의 경우, 역률은 25℃에서는 0.05% 이하이고, 100℃에서는 0.3% 이하이어야 한다. 회로 차단기용 신규 오일의 역률은, 25℃에서는 0.05% 이하이고, 100℃에서는 0.3% 이하이어야 한다. 회로 차단기에 사용되는 오일의 역률은 25℃에서 1.0%를 초과해서는 안된다. 본 발명의 방법에 관한 임의의 구체예는 역률 조건이 적당한 유전성 유체를 제공한다.
- [0337] 절연 강도란, 유전성 유체(전기 절연기)가 회로가 차단되기 전에 저항할 수 있는 최대 전기장 강도를 말한다. 절연 강도는 단위 MV/m로 측정되며(유전율 기준), ASTM D877은 유전성 유체에 적당한 명세 사항을 제공한다. 윤활제가 절연체로서 사용될 때, 이 윤활제의 절연 강도는 가능한한 커야한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법

은 절연 강도가 ASTM D877에 의해 특정되는 절연 강도와 동일하거나 더 큰 유전성 유체를 제공할 수 있다.

- [0338] 손실 계수는, 유전성 유체가 절연체로서 사용될 때 유전성 유체로 인하여 전기가 손실되는 것에 대한 척도이며, 25℃에서의 백분율 단위로서 표시된다. ASTM D924는 유전성 유체에 적당한 명세 사항을 제공한다. 절연체의 손실 계수 수치는 가능한 한 낮아야 한다. 임의의 구체예에서, 본 발명의 방법은 ASTM D924에 의해 지정되는 손실 계수와 동일하거나 더 우수한 손실 계수를 가지는 유전성 유체를 제공한다.
- [0339] 유전성 유체가 절연체로서 사용될 때, 전기 전도도는, 유전성 유체가 전류를 전도하는 능력에 대한 척도로서, 단위 $S\text{cm}^{-1}$ 로 측정된다. ASTM D2624는 유전성 유체에 적당한 명세 사항을 제공한다. 유전성 유체가 절연체로서 사용될 때, 이 유전성 유체의 전기 전도도 수치는 가능한 한 낮아야 한다. 본 발명의 방법에 관한 구체예는 ASTM D2624에 의해 지정되는 전기 전도도와 비교하였을 때 우수한 전기 전도도를 가지는 유전성 유체를 제공한다.
- [0340] 전기 변압기 및 기타 다른 용도에 사용될 경우, 유전성 유체의 열 특성은, 열을 효율적으로 전달할 수 있어야 한다. 비열(specific heat)이란, 물질의 열용량을 말하는 것으로서, 단위 $\text{cal/gm/}^{\circ}\text{C}$ 으로 표시된다. ASTM D-2766은 유전성 유체에 적당한 명세 사항을 제공한다. 비열 수치가 크다는 것은 열을 보다 효율적으로 전달하고 냉각시킬 수 있다는 의미이다. 미네랄 오일 유래 유전성 유체의 비열 수치는 일반적으로 약 0.39이고, TAG 유래 유전성 유체의 비열 수치는 약 0.45이다(Safety Dielectric Coolants for Distribution and Power Transformers, www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf). 본 발명의 구체예에 따른 방법은 비열 수치가 0.39 이상이고/이상이거나 ASTM D2624 명세 사항을 충족하는 유전성 유체를 제공할 수 있다.
- [0341] 유전성 유체의 환경 특성(environmental property)은 중요하다. 일반적으로, 유출 또는 기타 다른 사고에 의해 환경에 미치는 영향을 경감시키는 것으로 선택된 유전성 유체를 사용하여야 한다. 생분해성이란, 특정 환경에서 유전성 유체가 이산화탄소와 물로 분해되는 특성을 말하며, 일반적으로는 28일 동안의 백분율 단위로 측정된다. OECD 301B 및 ASTM D-6046은 유전성 유체에 적당한 생분해성 관련 명세 사항을 제공한다. 용이하게 생분해 가능한 생분해성 수치는 일반적으로 약 100%이며; 본래 생분해 가능한 생분해성 수치는 일반적으로 20% 내지 70%이고; 생분해 불가능한 생분해성 수치는 일반적으로 무시할 수 있는 정도 내지 0%이다. 미네랄 오일 유래 유전성 유체는 일반적으로 생분해성 수치가 15% 내지 35%이고, 바이오 오일 유래 유전성 유체는 일반적으로 생분해성 수치가 70% 내지 100%이다. 본 발명의 방법에 관한 임의의 구체예는 생분해성 수치가 70% 내지 100%인 유전성 유체를 제공할 수 있다(Renewable Lubricants Manual: Biobased Oils, Fluids, & Greases www.renewablelubricants.com/RenewableLubricantsManual_Biodegradable.html#Introduction).
- [0342] 요오드 수치(또는 요오드가)는 오일의 불포화 정도에 대한 척도이다. 더욱 구체적으로, 요오드 수치는 오일 중 불포화 결합에 의해 소모되는 요오드의 질량이다. 건성유는 요오드 수치가 비교적 크다(약 175 이상). 대두 오일의 요오드 수치는 약 130이고, 올리브 오일의 요오드 수치는 약 80이다. 요오드 수치는 당업계에 통상적으로 알려진 방법에 따라서 측정된다. 요오드 수치를 측정하는 표준적 방법으로는 ASTM D5768-02(2006) 및 DIN 53241을 포함한다. 다양한 구체예에서, 미생물 오일 기반 생산물, 예를 들어 유전성 유체 중 미생물 오일의 요오드 수치는 약 25 내지 약 200, 예를 들어 약 50, 약 75, 약 100, 약 125, 약 150 또는 약 175일 수 있다. 뿐만 아니라, 요오드 수치는 상기 수치들 중 임의의 수치에 의해 한정되는 임의의 범위에 속할 수 있다(예를 들어 약 25 내지 약 175, 약 50 내지 약 200, 약 50 내지 약 175 등).
- [0343] 지방산 불포화도도 변경될 수 있다. 불포화도가 증가하면 동결점/유동점은 감소한다. 현재 단일 불포화물, 예를 들어 고 올레산 바이오 윤활제에서 살펴볼 수 있는 것은 최적의 불포화도를 가지는 것으로서, 유동점과 산화 반응성 간 밸런스가 이루어져 있음을 나타낸다. 단일 불포화 오일은 공기와 반응하지만, 그 반응 속도는 다중 불포화 FA 또는 PUFA의 경우보다 느리다. PUFA의 예로서는 아라키돈산(ARA), 에이코사펜타에논산(EPA), 그리고 도코사헥사에논산(DHA)을 포함한다. 이중 불포화 및 다중 불포화 FA는 산화에 매우 취약하므로, 전기적 응용에 적당하지 않다. 식물성 오일로부터 유래하는 유전성 유체와 관련된 하나의 문제점은, 다중 불포화 FA(예를 들어 리놀레산 및 리놀렌산)가 존재한다는 점이다. 본 발명의 몇몇 구체예에 관한 유전성 유체의 하나의 이점은, 몇몇 구체예의 경우, 미생물 오일을 포함하는(또는 이 미생물 오일로부터 유래하는) 유전성 유체가, 기타 다른 바이오 오일로부터 유래하는 유전성 유체보다 적은 양의 이중 및 다중 불포화 FA를 함유하거나 아니면 이것들을 함유하지 않는다는 점이다.
- [0344] 유전성 유체의 지질 프로필은 일반적으로 공급 원료인 오일의 지질 프로필과 매우 유사하다. 유전성 유체로서 사용될 장쇄(C16 내지 C18) 단일 불포화 지방산은 다량으로 존재하는 것이 바람직하다. 다중 불포화 지방산(예를 들어 C18:2, C18:3, ARA, EPA 및 DHA)은 산화되어 산화 생성물을 생성하므로 바람직하지 않다. 포화된 지방산은 어는점이 높은 액체 또는 고체로 존재하는 성향이 있는데, 이와 같은 성향은 유전성 유체 중에 포화 지방

산이 다량으로 존재하는 것이 불리하게끔 만든다. 다양한 구체예에서, 유전성 유체 제조에 유용한 미생물 오일(지질)은 약 50% 이상의 C18:1, 예를 들어 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상 그리고 약 90% 이상의 C18:1을 함유한다. 이와 같은 구체예 또는 다른 구체예에 있어서, 미생물 오일(지질)은 약 10% 미만의 C18:2, 예를 들어 약 7.5% 미만, 약 5% 미만, 약 2.5% 미만 및 약 1% 미만의 C18:2를 함유한다. 미생물 오일은 C18:1과 C18:2를 임의의 백분율로 조합하여 함유할 수 있으며, 이 경우, 이와 같은 백분율의 조합은 총합 100% 이하일 수 있다. 예를 들어 미생물 오일은 50% 이상의 C18:1과 10% 미만의 C18:2 또는 80% 이상의 C18:1과 5% 미만의 C18:2를 함유할 수 있다.

[0345] 예를 들어, 본원에 제공된 유지성 미생물 유래 TAG 오일은 C18:2를 2% 미만 함유하는데(실시예 4 참조), 이는 C18:2를 20% 내지 75% 함유하는 해바라기 오일과, C18:2를 48% 내지 65% 함유하는 대두 오일과는 비교된다. 뿐만 아니라, C18:3을 0.5% 미만 함유하는 TAG 오일도 제공되는데, 이 TAG 오일은 C18:3을 5% 내지 10% 함유하는 대두 오일과 비교된다.

[0346] 유전성 유체의 상기와 같은 특성과 기타 다른 특성은, 본원에 기술된 방법에 따라서 임의의 용도로서 유용한 생산물, 예를 들어 윤활제, 유압유, 산업용 오일 또는 유전성 유체를 제공하도록 얻어지고, 조작되며/조작되거나 변경될 수 있다. 예를 들어 유지성 미생물의 유전자 조작은 전술한 바와 같이 지질 중 다양한 지방산의 사슬 길이, 포화도 및/또는 조성을 변경하도록 이루어질 수 있다. 임의의 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같이 유용한 미생물 오일은, 하나 이상의 외인성 유전자를 발현하도록 조작된 유전자 조작 미생물에 의해 생산된다. 예를 들어 유전자 조작된 미생물은 프로토테카(예를 들어 프로토테카 모리포르미스) 또는 클로렐라일 수 있다. 예시적 외인성 유전자로서는 수크로스 인버타제 및/또는 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 유전자를 포함한다.

[0347] 뿐만 아니라, 미세 조류 또는 유지성 효모로부터 추출된 지질은 다양한 화학적 변형을 통하여 유전성 유체에 원하는 특성을 부여할 수 있다. 통상의 변경으로서는 지방산(FA) 사슬 길이의 변경을 포함한다. 단쇄 FA는 유동점이 감소하였다. 본 발명의 방법에 관한 구체예에 따라서, 불포화도를 감소시키기 위한 화학적 변형도 사용될 수 있으며, 이와 같은 화학적 변형으로서는 알킬화, 라디칼 부가, 아실화, 엔-반응, 하이드로포르밀화, 선택적 수소화, 올리고머화, 하이드로아미노메틸화, 아실옥시화 및 에폭시화를 포함한다. 부가적으로, 또는 대안적으로, 첨가제, 예를 들어 유동점 강하제는 가공된 미생물 오일과 혼합되어 원하는 특성, 예를 들어 유동점을 상기 미생물 오일에 부여할 수 있다. 예시적인 첨가제는 이하에 더욱 상세히 기술되어 있다.

[0348] 전술한 바와 같이, 특정 구체예에서, 유지성 미생물로부터 추출된 미가공 미생물 오일은 통상적으로 본 발명의 생산물에 혼합되기 전에 “증량” 된다. 예를 들어 미생물 지질 중에는 결정화 및/또는 침전되어 용액 중에 퇴적물의 형태로 가라앉은 오염 물질이 존재할 수 있다. 퇴적물의 생성은 유전성 유체가 저온에서 사용될 때 특히 문제가 된다. 퇴적물 또는 침전물은 유속을 감소시키거나 엉김 현상 등의 문제를 일으킬 수 있다. 이와 같은 오염 물질과 퇴적물을 특수 처리하여 제거함으로써 고급 생산물을 생산하는 방법들은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이와 같은 방법의 예로서는 오일을 전처리하여 오염 물질, 예를 들어 인지질 및 유리 지방산을 제거하는 방법(예를 들어, 고무 성질 제거, 가성 정제 및 실리카 흡착 여과)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0349] 윈터리제이션은, 본 발명의 방법에 관한 구체예에 따라서 미생물 오일을 증량하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 구체예에 따라서 유전성 유체를 윈터리제이션하는 접근법이 몇 가지 존재한다. 한 가지 접근법은, 기타 다른 유전성 유체와 특정 유전성 유체를 배합하는 것이다. 또 다른 접근법은, 어느 점을 낮출 수 있는 첨가제를 사용하는 것이다. 건조 분별법은 또한 포화 분획(스테아린 분획)의 상대적 비율을 감소시키는데 사용될 수도 있다. 오일을 냉각하면 포화물이 결정화되고, 그 결과, 이 결정들은 여과될 수 있다. 분별은 유체를 개별 성분들 또는 분획들로 선택적으로 분리하여, 특정 분획들을 제거 또는 포함시킬 수 있다. 기타 다른 분별법으로서는 우레아 분별법, 용매 분별법 및 열 증류법을 포함한다.

[0350] 규조토 또는 기타 다른 여과재, 예를 들어 표백토는 이후 냉각된 액체에 첨가되어 슬러리를 생성할 수 있는데, 이 슬러리는 추후 압력 리프 필터(pressure leaf filter) 또는 다른 유형의 필터를 통과하여 여과되고, 그 결과, 미립자가 제거될 수 있다. 이후, 여과된 액체는 연마 필터(polish filter)를 통과하게 되며, 그 결과, 잔류하는 임의의 퇴적물과 규조토가 제거됨으로써 최종 생산물이 제조될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 전술한 공정 단계들 중 임의의 단계의 말미에 제조된 생산물 또는 미생물 오일은 유동점 강하제와 혼합되어, 본 발명의 생산물, 예를 들어 유전성 유체로 제조될 수 있다.

[0351] 본 발명의 하나의 구체예에서는, (a) 본원에 기술된 방법을 사용하여 지질 함유 미생물을 배양하는 단계, (b) 지질 함유 미생물을 용해하여 용해물을 제조하는 단계, (c) 용해된 미생물로부터 지질 조성물을 분리하는 단계,

및 (d) 분리된 지질 조성물을 증량하여, 윤활 오일 또는 유전성 유체를 제조하는 단계를 포함하는, 윤활 오일 또는 유전성 유체를 제조하는 방법이 제공된다. 통상적으로, 단계 (d)는 1회 이상의 정제, 표백 및/또는 탈취 단계와 1회 이상의 분별 단계를 포함하므로, 팔미트산 및/또는 스테아르산 트리글리세라이드를 제거함으로써 포화 분획의 상대적 비율을 감소시킬 수 있다. 추가의 구체예에서, 단계 (d)로부터 얻어진 윤활 오일 또는 유전성 유체는 유동점 강하제와 혼합된다.

[0352] 임의로, 분리된 지질의 산화 안정성을 높이기 위한 기타 다른 첨가제는 이와 같은 방법에 의해 생산된 미생물 오일, 윤활제 또는 유전성 유체와 혼합될 수 있다. 이와 같은 첨가제의 예로서는 항산화제, 예를 들어 토코페롤 (비타민 E, 예를 들어 알파-, 베타- 및/또는 델타-토코페롤) 및 아스코르브산(비타민 C)을 포함한다. 적당한 항산화제는 시판되고 있다. 바스프(BASF)사는 상표명 엘가녹스(IGRANOX)[®]로서, 적당한 페놀 기반 및 아민 기반 항산화제 계열을 시판하고 있다. 엘가녹스 L109, 엘가녹스 L64, 엘가녹스 L57, 기타 다른 엘가녹스 항산화제, 그리고 기타 다른 페놀 기반 및 아민 기반 화합물이 오일 및 생산물, 예를 들어 유전성 유체에 대한 항산화 첨가제로서 적당하다. 항산화제에 대한 기타 다른 비제한적 예로서는 부틸화 하이드록시 아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시 톨루엔(BHT), 모노-3차 부틸 하이드로 퀴논(TBHQ), 부틸화 하이드로아니솔, 테트라하이드로부트로페논, 아스코르빌 팔미테이트 및 프로필 갈레이트를 포함한다. 임의의 구체예에서, 미생물 오일 기반 생산물, 예를 들어 유전성 유체는 부가적으로 0.1중량% 내지 5중량%, 바람직하게는 0.5중량% 내지 2중량%의 항산화제를 포함한다.

[0353] 생산물, 예를 들어 유전성 유체로서 사용될 분리 지질에 임의로 첨가될 수 있는 기타 다른 첨가제로서는, 금속 이온에 대한 불활성화제, 부식 억제제, 마모 방지 첨가제 및/또는 가수 분해 방지 화합물이 있다. 유전성 유체에 널리 사용되고 있는 몇몇 첨가제에 관하여는 문헌[Schneider, 2006, *J Science Food and Agriculture*; 86: 1769-1780]에 기술되어 있다. 금속 이온 불활성화제는 2개의 주요 기능을 가진다. 상기 금속 이온 불활성화제는 금속 표면에 대한 화학 공격을 억제할 뿐만 아니라, 금속 표면을 부동태화하여 라디칼(작은 형성하지 않은 전자)을 생성하기 위한 촉매로서 작용할 수 있는 임의의 잔류물을 억제한다. 금속 불활성화제는 시판되고 있다. 예를 들어 바스프사는 금속 불활성화제 계열, 예를 들어 금속 불활성화제의 엘가멧(IRGAMET)[®] 계열을 제공한다. 알티반데르빌트(RTVANDERBILT)사는 금속 불활성화제의 쿠반(CUVAN)[®] 계열을 시판하고 있다. 금속 불활성화제의 기타 다른 예로서는 유도체화된 트리아졸, 예를 들어 1-(디-이소옥틸아미노메틸)-1,2,4-트리아졸, 1-(2-메톡시프로프-2-일)톨릴트리아졸, 1-(1-시클로헥실옥시프로필)톨릴트리아졸, 1-(1-시클로헥실옥시헵틸)톨릴트리아졸, 1-(1-시클로헥실옥시부틸)톨릴트리아졸, 1-[비스(2-에틸헥실)아미노메틸-4-메틸벤조트리아졸, 유도체화된 보론, 예를 들어 트리에틸 보레이트, 트리프로필 보레이트, 트리아이소프로필 보레이트, 트리부틸 보레이트, 트리펜틸 보레이트, 트리헥실 보레이트, 트리스클로헥실 보레이트, 트리옥틸 보레이트, 트리아이소옥틸 보레이트, 및 기타 다른 유도체화된 히드라진 금속 불활성화제, 예를 들어 2',3-비스[[3-[3,5-디-tert-부틸-4-하이드록시페닐]프로피오닐]]프로포니오히드라진 등을 포함한다. 임의의 구체예에서, 미생물 오일 기반 생산물, 예를 들어 유전성 유체는 부가적으로 하나 이상의 금속 불활성화제를 0.1중량% 내지 5중량%, 바람직하게는 0.5중량% 내지 2중량%를 포함한다.

[0354] 그러므로, 본원에 기술된 방법에 따라서 제조된 유전성 유체는 다수의 첨가제, 예를 들어 다음과 같은 첨가제들 중 하나 이상(이에 한정되는 것은 아님)을 함유할 수 있다: (a) 항산화제, 예를 들어 BHT 및 기타 다른 페놀(이에 한정되는 것은 아님); (b) 금속 이온, 예를 들어 Cu 및 Zn 등(이에 한정되는 것은 아님)의 불활성화제, 예를 들어 벤조트리아졸(이에 한정되는 것은 아님); (c) 부식 억제제, 예를 들어 에스테르 실포네이트 및 숙신산 에스테르(이에 한정되는 것은 아님); (d) 항 유화제; (e) 마모 방지 첨가제, 예를 들어 아연 디티오포스페이트(이에 한정되는 것은 아님); (f) 유동점을 강하하는 첨가제, 예를 들어 말란 스티렌 공중합체, 폴리(알킬)아크릴레이트, 예를 들어 폴리메타크릴레이트(이에 한정되는 것은 아님); 및 (g) 가수 분해되는 것을 막아주는 화합물, 예를 들어 카보디이미드(이에 한정되는 것은 아님).

[0355] 임의의 구체예에서, 본 발명의 방법은 유동점이 약 -10℃ 내지 약 -40℃인 미생물 오일을 포함하는 생산물을 제조하는데, 여기서, 미생물 오일의 지방산 조성은 C18:1 50% 이상, 그리고 C18:2 10% 미만이다. 본 발명의 방법은, 미생물이 건조 중량을 기준으로 10% 이상의 오일을 함유하게 될 때까지 하나 이상의 외인성 유전자를 발현하도록 조작된, 유전자 조작 미생물을 배양하는 단계를 포함한다. 예시적 유전자 조작 미생물로서는, 프로토테카(예를 들어 프로토테카 모리포르미스) 또는 클로렐라를 포함한다. 예시적 외인성 유전자로서는 수크로스 인버타제를 암호화하는 유전자 및/또는 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 유전자를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 유전자 조작된 미생물은 2개 이상의 외인성 유전자, 예를 들어 수크로스 인버타제 및 지방 아실-ACP 티

오에스테라제를 암호화하는 외인성 유전자, 2개의 상이한 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 외인성 유전자, 또는 수크로스 인버타제와 2개의 상이한 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 암호화하는 외인성 유전자를 발현한다. 일단 미생물이 건조 중량을 기준으로 10% 이상의 오일을 함유하면, 이 오일은 미생물로부터 분리되며, 또한 정제, 표백, 탈취 또는 고무 성질 제거되어 RBD 오일로 생성된다. 임의로, 항산화제, 금속 이온 불활성화제, 부식 억제제, 향 유화제, 마모 방지 첨가제, 유동점 강하제 및/또는 가수 분해 방지 화합물이 RBD 오일에 첨가될 수 있으며, 그 결과, 원하는 생산물이 생산된다.

[0356] 특정 구체예에서, 본 발명의 분별 방법은 유동점이 약 -10°C 내지 약 -40°C 인 생산물(예를 들어 유전성 유체)에 혼입되기 적당한 미생물 오일을 제조하는데, 여기서, 미생물 오일의 지방산 조성은 C18:1 50% 이상 및 C18:2 10% 미만이다. 본 발명의 방법은, 출발(즉 “제1”) 미생물 오일을 정제, 표백, 탈취 또는 고무 성질 제거하여 RBD 오일을 생산하는 단계로서, 상기 RBD 오일은 초기 유동점과 제1 온도에 의해 특징지어지는 것인 단계, RBD 오일의 온도를 제2 온도로 낮추는 단계, 그리고 제2 온도에서 RBD 오일을 여과하여, 제2 유동점(초기 유동점보다 낮음)에 의해 특징지어지는 제2 미생물 오일을 제공하는 단계로서, 상기 제2 유동점은 약 -10°C 내지 약 -40°C 이고, 상기 제2 미생물 오일의 지방산 조성은 C18:1 50% 이상 및 C18:2 10% 미만인 것인 단계를 포함한다. 예시적 제1 온도는 15°C 이상 내지 약 50°C 이며, 예시적 제2 온도는 약 -15°C 내지 약 15°C 이다. 임의로 항산화제, 금속 이온 불활성화제, 부식 억제제, 향 유화제, 마모 방지 첨가제, 유동점 강하제 및/또는 가수 분해 방지 화합물이 제2 미생물 오일에 첨가될 수 있으며, 그 결과 원하는 생산물이 생산된다. 이와 같은 구체예의 변형예에 있어서, 제1 미생물 오일은, 미생물이 건조 중량을 기준으로 10% 이상의 오일을 함유하게 될 때까지 하나 이상의 외인성 유전자를 발현하도록 조작된 유전자 조작 미생물을 배양한 후, 이 미생물로부터 오일을 분리하여 제1 미생물 오일을 생산함으로써 제조된다. 이러한 방법은, 예를 들어 윤활제, 유압유, 산업용 오일 또는 유전성 유체를 생산하는데 사용될 수 있다. 생산물이 유전성 유체인 임의의 구체예에서, 이 유체는 항산화제, 금속 이온 불활성화제, 부식 억제제, 향 유화제, 마모 방지 첨가제, 유동점 강하제 또는 가수 분해 방지 화합물 중 하나 이상을 포함한다.

[0357] 본 발명의 하나의 구체예에서, 유전성 유체는, 유지성 미생물로부터 유래하는 유전성 유체 및/또는 오일을 기존의 오일 또는 유전성 유체와 배합하여 생산된다. 기존의 오일과 유전성 유체는 식물 또는 동물 기원(또는 식물과 동물 둘 다 기원, 즉 석유)의 것일 수 있다.

[0358] 그러므로, 본 발명은, 유지성 미생물로부터 유래하는 지질이 산업용 및 기타 다른 용도로서 다양하게 사용되는 유전성 유체 및 기타 다른 생산물로 생산되는 다양한 방법들을 포함한다. 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 오일을 변경하는 방법의 예로서는 오일의 가수 분해, 오일의 수소화 공정 및 오일의 에스테르화를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 기타 다른 미세 조류 지질의 화학적 변형법으로는 에폭시화, 산화, 가수 분해, 황산화, 설폰화, 에폭시화, 프로폭시화, 아미드화 및 비누화를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 미세 조류 오일의 변경은 원하는 기능을 가지는, 선택된 유도성 함유 화학 제품으로 추가로 변경될 수 있는 염기성 함유 화학 제품을 생산한다. 연료 생산 가공과 관련하여 전술한 방법과 유사한 방법으로, 이들 화학 변형법은 또한 본원에 기술된 미생물 배양액으로부터 생산된 오일을 대상으로 수행될 수도 있다.

[0359] 임의의 구체예에서, 본원에 기술된 유전성 유체는 전기 시스템, 예를 들어 변압기, 예를 들어 변압기 코어/코일 조립체를 수용하는 탱크에 사용되는데, 이 경우, 상기 유전성 유체는 상기 코어/코일 조립체를 둘러싼다. 이와 같은 구체예의 변형예에 있어서, 탱크는 또한 탱크 내 기체들과 접촉하되, 유전성 절연 유체와는 격리된 산소 흡수재를 포함한다. 적당한 산소 흡수재로서는 탱크 내부 유전성 유체를 둘러싸고 있는 대기 중 유리 산소의 농도를 감소시킴과 아울러 유체 자체 중에 용해된 산소의 존재량도 감소시키는 것이 있다. 이와 같은 화합물은 산소 스캐빈저 화합물이라 칭하여질 수 있다. 유용한 산소 스캐빈저 화합물로서는 식품 포장 업계에서 일반적으로 사용되고 있는 것들을 포함한다. 본 발명을 수행하는데 유용한 산소 스캐빈저 화합물의 대표 예로서는 다음과 같은 것들을 포함한다: 아황산 나트륨; 황산구리 5수화물; 탄소 및 활성화된 철 분말의 배합물; 히드로아황산염, 수산화칼슘, 중탄산나트륨 및 활성탄의 혼합물; 금속 분말의 표면에 코팅된 금속 할로겐화물 분말; 그리고 알칼리 화합물, 예를 들어 수산화칼슘과 탄산나트륨 또는 중탄산나트륨의 배합물. 상기 조성물들 중 하나 이상의 혼합물 및 조합도 또한 유용한 것으로 간주된다. 또한, 산소 스캐빈저 화합물로서 유용한 것으로서는 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제2,825,651호에 따라서 제공되는 조성물들, 예를 들어 아황산 염(sulfite salt)과 가속화제, 예를 들어 수화 황산구리, 염화주석 또는 산화코발트의 혼합물을 포함하는 산소 제거 조성물이 있다. 산소 스캐빈저 화합물의 또 다른 유용한 군은, 망간, 철, 코발트 또는 니켈의 염, 알칼리 화합물, 그리고 아황산염 또는 조해성 화합물을 포함하는 조성물, 예를 들어 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제 4,384,972호에 개시된 것을 포함한다. 바람직한 산소 스캐빈저 화합물은 하나 이상의 염기성 산화철, 예를 들어

산화 제1철을 포함하거나(또는 자체의 염기 성분을 포함하거나), 또는 산화철 재료의 혼합물로 제조된다. 유용한 산화철 함유 조성물이, 예를 들어 상표명 “에이질리스(Ageless)”로서 미즈비시 가스 케미컬 컴퍼니(사우스 캐롤라이나 던칸 소재)로부터 시판되고 있으며, 또한 상표명 “후레쉬맥스(Freshmax)”로서 멀티솔브 테크놀로지스 인코포레이션(뉴욕 버팔로 소재)으로부터 시판되고 있다. 철 염과 산화 개질제 및/또는 금속 아황산염 또는 황산염 화합물의 혼합물을 포함하는 산소 흡수제도 유용하다.

[0360] 상기에서 상세하게 기술된 본 발명은 하기의 실시예에 예시되지만, 이는 청구된 발명을 설명하기 위해 제공될 뿐 이에 제한되지 않는다.

[0361] VII. 실시예

[0362] 실시예 1: 프로토테카를 배양하는 방법

[0363] 프로토테카 균주는 건조 세포 중량을 기준으로 높은 백분율의 오일을 성취하기 위해 배양하였다. 동결보존된 세포를 실온에서 해동시키고 500 μ l의 세포를 4.5ml의 배지(4.2g/L K₂HPO₄, 3.1g/L NaH₂PO₄, 0.24g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.25g/L 시트르산 1수화물, 0.025g/L CaCl₂ 2H₂O, 2g/L 효모 추출물) + 2% 글루코스에 첨가하고 6웰 평판에서 교반(200rpm)하면서 7일 동안 28℃에서 성장시켰다. 건조 세포 중량은 1ml의 배양물을 예비 칭량된 에펜도르프 튜브에서 5분 동안 14,000rpm에서 원심분리하여 측정하였다. 배양 상청액을 버리고 수득한 세포 펠렛을 1ml의 탈이온수로 세척하였다. 배양물을 다시 원심분리하고, 상청액을 버리며, 세포 펠렛을 동결될 때까지 -80℃에 두었다. 이어서 샘플을 24시간 동안 동결건조시키고 건조 세포 중량을 계산하였다. 배양물 중 총 지질을 측정하기 위해, 3ml의 배양물을 제거하고 제조업자의 프로토콜에 따라 Ankom 시스템(Ankom Inc., Macedon, NY)을 사용하여 분석하였다. 샘플은 제조업자의 프로토콜에 따라 Ankom XT10 추출기로 용매 추출을 하였다. 총 지질은 산 가수 분해된 건조 샘플 및 용매 추출된 건조 샘플간의 질량 차이로서 측정하였다. 오일 건조 세포 중량의 백분율 측정은 표 9에 나타내어져 있다.

표 9

[0364] 건조 세포 중량을 기준으로 한 오일 백분율

종	균주	% 오일
프로토테카 스테그노라	UTEX 327	13.14
프로토테카 모리포르미스	UTEX 1441	18.02
프로토테카 모리포르미스	UTEX 1435	27.17

[0365] 프로토테카 속에 속하는 다수의 균주들로부터 얻은 미세 조류 샘플의 유전자형을 분석하였다. 게놈 DNA는 조류 바이오매스로부터 다음과 같이 분리하였다. 세포(약 200mg)를 액체 배양액으로부터 원심 분리하였다(5분, 14,000×g). 그 다음, 세포를 멸균 증류수 중에 재현탁하여, 원심 분리하고 나서(5분, 14,000×g), 상청액을 따라버렸다. 직경이 약 2mm인 단일 유리 비드를 바이오매스에 첨가하고 튜브를 15분 이상 동안 -80℃에 두었다. 샘플을 제거하고 150 μ l의 분쇄 완충액(1% 사르코실(Sarkosyl), 0.25M 수크로스, 50mM NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH 8.0, RNase A 0.5ug/ μ l)을 첨가하였다. 펠렛을 간단히 와류시켜 재현탁시키고, 이어서 40 μ l의 5M NaCl을 첨가하였다. 샘플을 간단히 와류시키고, 이어서 66 μ l의 5% CTAB(세틸 트리메틸암모늄 브로마이드)를 첨가하며, 최종적으로 간단히 와류시켰다. 다음에 샘플을 10분 동안 65℃에서 항온처리하고, 이후 이들을 10분 동안 14,000 x g에서 원심분리하였다. 상기 상청액을 새로운 튜브로 옮기고, 300 μ l의 페놀:클로로포름:이소아밀알코올 12:12:1로 1회 추출함에 이어서 14,000 x g에서 5분 동안 원심분리하였다. 생성된 수성 상을 0.7용적의 이소프로판올(약 190 μ l)을 함유하는 새로운 튜브로 옮기고, 뒤집어서 혼합하며, 30분 동안 실온에서 또는 밤새 4℃에서 항온처리하였다. DNA를 10분 동안 14,000 x g에서 원심분리를 통해 회수하였다. 이어서 생성된 펠렛을 70% 에탄올로 2회 세척함에 이어서 100% 에탄올로 최종 세척하였다. 펠렛을 실온에서 20분 내지 30분 동안 공기 건조시킴에 이어서 50 μ l의 10mM TrisCl, 1mM EDTA(pH 8.0) 중에 재현탁시켰다. 상기된 바와 같이 제조된 5 μ l의 총 조류 DNA를 10mM Tris(pH 8.0) 중에서 1:50으로 희석시켰다. 최종 용적 20 μ l의 PCR 반응을 다음과 같이 준비하였다. 10 μ l의 2 x iProof HF 마스터 믹스(BIO-RAD)를 0.4 μ l의 프라이머 SZ02613 (10mM 스톡 농도에서 5'-TGTTGAAGAATGAGCCGCGAC-3'(서열번호 9))에 첨가하였다. 상기 프라이머 서열은 GenBank 수탁 번호 제L43357호에서 567번 내지 588번이고, 고등 식물 및 조류 색소체 게놈에서 고도로 보존되어 있다. 이어서 0.4 μ l의 프라이머 SZ02615(10mM 스톡 농도에서 5'-CAGTGAGCTATTACGACTC-3'(서열번호 10))를 첨가하였다. 상기 프라이머 서열은 GenBank 수탁 번호 제L43357호에서 1112번 내지 1093번 위치에 상보적이고, 고등 식물 및 조류 색소체 게

놈에서 고도로 보존되어 있다. 다음에, 5 μ l의 희석된 총 DNA 및 3.2 μ l의 dH₂O를 첨가하였다. PCR 반응을, 35 사이클 동안 98℃, 45초; 98℃, 8초; 53℃, 12초; 72℃, 20초에 이어서 1분 동안 72℃에서 수행하며, 25℃에 유지시켜 수행한다. PCR 생성물의 정제를 위해, 20 μ l의 10mM Tris(pH 8.0)를 각각의 반응에 첨가하고, 이어서 40 μ l의 페놀:클로로포름:이소아밀 알코올 12:12:1로 추출하며, 와류시키고 5분 동안 14,000 x g에서 원심분리하였다. PCR 반응을 S-400 칼럼(GE Healthcare)에 적용하고 3,000 x g에서 2분 동안 원심분리하였다. 정제된 PCR 생성물을 이어서 PCR8/GW/TOPO로 TOPO 클로닝하고, 양성 클론을 LB/Spec 평판을 위해 선택하였다. 정제된 플라스미드 DNA를 M13 정배향 및 역배향 프라이머를 사용하여 양 방향으로 서열분석하였다. 전체적으로, 12개의 프로토타카 균주는 서열분석된 이들의 23S rRNA DNA를 갖도록 선택하고, 상기 서열을 서열 목록 중에 열거하였다. 균주 및 서열 번호에 대한 요약은 하기에 포함된다. 상기 서열은 UTEX 1435(서열번호 15) 서열로부터 총 분기점에 대해 분석하였다. 2개의 쌍(UTEX 329/UTEX 1533 및 UTEX 329/UTEX 1440)이 가장 분기된 것으로서 나타났다. 양 경우에, 쌍형성 정렬은 75.0% 쌍형성 서열 동일성을 나타내었다. UTEX 1435에 대한 서열 동일성 백분율은 또한 하기에 포함된다.

종	균주	% nt 동일성	서열번호
프로토타카 크루에가니	UTEX 329	75.2	서열번호 11
프로토타카 워커해미	UTEX 1440	99	서열번호 12
프로토타카 스태그노라	UTEX 1442	75.7	서열번호 13
프로토타카 모리포르미스	UTEX288	75.4	서열번호 14
프로토타카 모리포르미스	UTEX 1439; 1441; 1435; 1437	100	서열번호 15
프로토타카 워커해미	UTEX 1533	99.8	서열번호 16
프로토타카 모리포르미스	UTEX 1434	75.9	서열번호 17
프로토타카 조프피	UTEX 1438	75.7	서열번호 18
프로토타카 모리포르미스	UTEX 1436	88.9	서열번호 19

상기 열거된 균주의 서브세트 유래의 지질 샘플은 HPLC를 사용하여 지질 프로필에 대해 분석하였다. 결과는 하기 표 10에 나타내어져 있다.

표 10

프로토타카 종에서 지질 사슬의 다양성

균주	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
UTEX 327	0	12.01	0	0	50.33	17.14	0	0	0
UTEX 1441	1.41	29.44	0.70	3.05	57.72	12.37	0.97	0.33	0
UTEX 1435	1.09	25.77	0	2.75	54.01	11.90	2.44	0	0

용매 추출을 통해 또는 익스펠러 프레스를 사용하여 프로토타카 모리포르미스 UTEX 1435로부터 추출된 오일은 카로티노이드, 엽록소, 토코페롤, 다른 스테롤 및 토코트리에놀에 대해 분석하였다. 그 결과는 하기 표 11에 요약한다.

표 11

프로토타카 모리포르미스(UTEX 1435)로부터 추출된 오일 중 카로티노이드, 엽록소, 토코페롤/스테롤 및 토코트리에놀 분석 결과

	압착된 오일 (mcg/ml)	용매 추출된 오일(mcg/ml)
cis-루테인	0.041	0.042
trans-루테인	0.140	0.112
trans-제아잔틴	0.045	0.039
cis-제아잔틴	0.007	0.013

t-알파-크립토잔틴	0.007	0.010
t-베타-크립토잔틴	0.009	0.010
t-알파-카로틴	0.003	0.001
c-알파-카로틴	검출되지 않음	검출되지 않음
t-베타-카로틴	0.010	0.009
9-cis-베타-카로틴	0.004	0.002
라이코펜	검출되지 않음	검출되지 않음
총 카로티노이드	0.267	0.238
엽록소	<0.01mg/kg	<0.01mg/kg
토코페롤 및 스테롤		
	압착된 오일 (mg/100g)	용매추출된 오일(mg/100g)
감마 토코페롤	0.49	0.49
카페스테롤	6.09	6.05
스티그마스테롤	47.6	47.8
베타-시토스테롤	11.6	11.5
기타 다른 스테롤	445	446
토코트리에놀		
	프레스된 오일 (mg/g)	용매추출된 오일(mg/g)
알파 토코트리에놀	0.26	0.26
베타 토코트리에놀	<0.01	<0.01
감마 토코트리에놀	0.10	0.10
델타 토코트리에놀	<0.01	<0.01
총 토코트리에놀	0.36	0.36

[0371] 표준 식물성 오일 가공 방법을 이용하여, 프로토테카 모리포르미스(4개의 개별 분획)로부터 추출된 오일을 정제 한 후 표백하였다. 간단히 말해서, 프로토테카 모리포르미스로부터 추출된 미정제 오일을 수평 디켄터 내에서 투명하게 만들었는데, 이때, 오일로부터 고체가 분리되었다. 그 다음, 투명한 오일을 시트르산과 물이 담긴 탱 크로 옮긴 후, 이를 약 24시간 동안 방치하여 침강시켰다. 24시간 경과 후, 탱크 내 혼합물은 2개의 별도 층들 을 형성하였다. 아래 층은 물과 고무질로 이루어졌는데, 이후, 이것들을 경사분리(decantation)에 의해 제거한 후, 고무 성질이 제거된 오일을 표백 탱크로 옮겨 담았다. 그 다음, 오일을 일정량의 추가 시트르산과 함께 가 열하였다. 이후, 표백토를 상기 표백 탱크 내에 첨가하였으며, 이 혼합물을 진공 하에서 추가로 가열하여 잔류 하던 물을 전부 증발시켰다. 그 다음, 혼합물을 펌핑하여 일상 필터를 통과시킴으로써 표백토를 제거하였다. 이 후, 여과된 오일을 최종 5μm 연마 필터에 통과시킨 다음, 이를 수집하여 사용시까지 보관하여 두었다. 그 다음, 정제 및 표백(RB) 오일을 대상으로 카로티노이드, 엽록소, 스테롤, 토코트리에놀 및 토코페롤에 대해 분석하였 다. 이와 같은 분석 결과를 이하 표 12에 요약하였다. “nd” 는 검출되지 않았음을 의미하고, 검출 감도는 다음 에 나열된 바와 같았다.

[0372] **검출 감도**

[0373] 카로티노이드(mcg/g) nd = <0.003 mcg/g

[0374] 엽록소(mcg/g) nd = <0.03 mcg/g

[0375] 스테롤(%) nd = 0.25%

[0376] 토코페롤(mcg/g); nd = 3 mcg/g

표 12

정제 및 표백된 프로토테카 모리포르미스 오일 중 카로티노이드, 엽록소, 스테롤, 토코트리에놀 및 토코페롤 분석 결과

	분획 A	분획 B	분획 C	분획 D
카로티노이드 (mcg/g)				
루테인	0.025	0.003	nd	0.039
제아잔틴	nd	nd	nd	nd
cis-루테인/제아잔틴	nd	nd	nd	nd
trans-알파-크립토잔틴	nd	nd	nd	nd
trans-베타-크립토잔틴	nd	nd	nd	nd
trans-알파-카로틴	nd	nd	nd	nd
cis-알파-카로틴	nd	nd	nd	nd
trans-베타-카로틴	nd	nd	nd	nd
cis-베타-카로틴	nd	nd	nd	nd
라이코펜	nd	nd	nd	nd
미확인	0.219	0.066	0.050	0.026
총 카로티노이드	0.244	0.069	0.050	0.065
엽록소 (mcg/g)				
엽록소 A	0.268	0.136	0.045	0.166
엽록소 B	nd	nd	nd	nd
총 엽록소	0.268	0.136	0.045	0.166
스테롤 (%)				
브라시카스테롤	nd	nd	nd	nd
캄페스테롤	nd	nd	nd	nd
스티그마스테롤	nd	nd	nd	nd
베타-시토스테롤	nd	nd	nd	nd
총 스테롤	nd	nd	nd	nd
토코페롤 (mcg/g)				
알파-토코페롤	23.9	22.8	12.5	8.2
베타-토코페롤	3.72	nd	nd	nd
감마-토코페롤	164	85.3	43.1	38.3
델타-토코페롤	70.1	31.1	18.1	14.3
총 토코페롤	262	139.2	73.7	60.8
토코트리에놀 (mcg/g)				
알파-토코트리에놀	190	225	253	239
베타-토코트리에놀	nd	nd	nd	nd
감마-토코트리에놀	47.3	60.4	54.8	60.9
델타-토코트리에놀	12.3	16.1	17.5	15.2
총 토코트리에놀	250	302	325	315

[0377]

[0378] 프로토테카 모리포르미스 오일의 동일한 4개 분획을 대상으로 또한 미량 원소 분석을 실시하였으며, 그 결과를 표 13에 요약하였다.

표 13

[0379] 정제 및 표백된 프로토테카 모리포르미스 오일의 원소 분석

	분획 A	분획 B	분획 C	분획 D
원소 분석(ppm)				
칼슘	0.08	0.07	< 0.04	0.07
인	< 0.2	0.38	< 0.2	0.33
나트륨	< 0.5	0.55	< 0.5	< 0.5
칼륨	1.02	1.68	< 0.5	0.94
마그네슘	< 0.04	< 0.04	< 0.04	0.07
망간	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
철	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
아연	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
구리	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
황	2.55	4.45	2.36	4.55
납	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
실리콘	0.37	0.41	0.26	0.26
니켈	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2

유기 염화물	< 1.0	< 1.0	< 1.0	2.2
무기 염화물	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0
질소	4.4	7.8	4.2	6.9
리튬	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
붕소	0.07	0.36	0.09	0.38
알루미늄	--	< 0.2	< 0.2	< 0.2
바나듐	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
로비본드 색(° L)				
레드	5.0	4.3	3.2	5.0
옐로우	70.0	70.0	50.0	70.0
모노 & 디글리세라이드(HPLC에 의해 분석)(%)				
디글리세라이드	1.68	2.23	1.25	1.61
모노글리세라이드	0.03	0.04	0.02	0.03
유리 지방산(FFA)	1.02	1.72	0.86	0.83
비누	0	0	0	
산화 및 중합된 트리글리세라이드				
산화 트리글리세라이드 (%)	3.41	2.41	4.11	1.00
중합 트리글리세라이드 (%)	1.19	0.45	0.66	0.31
과산화물가(meg/kg)	0.75	0.80	0.60	1.20
p-아니시딘가 (단위 무)	5.03	9.03	5.44	20.1
물 및 기타 다른 불순물(%)				
칼 피셔 수분	0.8	0.12	0.07	0.18
총 극성 화합물	5.02	6.28	4.54	5.23
비누화될 수 없는 물질	0.92	1.07	0.72	1.04
불용성 불순물	<0.01	<0.01	0.01	< 0.01
총 오일(%)				
중성 오일	98.8	98.2	99.0	98.9

[0380] 실시예 2: 프로토타카의 일반적 유전자 총 형질 전환법

[0381] 씨셀 골드 마이크로캐리어 550(Seashell Gold Microcarriers 550) 나노미터를 제조자 프로토콜에 따라서 제조하였다. 플라즈미드(20 μ g)를 결합 완충액 50 μ l 및 S550d 골드 캐리어 60 μ l(30mg)와 혼합하고 나서, 이 혼합물을 1분 동안 얼음 속에서 항온 처리하였다. 여기에 침전 완충액(100 μ l)을 첨가하고, 이 혼합물을 얼음 속에서 1분 더 항온 처리하였다. 이를 와류시킨 다음, 에펜도르프 5415C 마이크로 원심 분리로 회전시켜(10,000rpm, 10초) DNA-코팅된 입자를 펠릿화하였다. 골드 펠릿을 냉각 100% 에탄올 500 μ l로 1회 세정한 후, 마이크로 원심 분리로 간단히 회전시켜 펠릿화한 다음, 얼음 냉각된 에탄올 50 μ l로 재현탁하였다. 간단히 초음파 처리한 후(1초 내지 2초), DNA-코팅된 입자들 10 μ l를 즉시 캐리어 막으로 이동시켰다.

[0382] 프로토타카 균주를 2% 글루코스 함유 프로테오스 배지(2g/L 효모 추출물, 2.94mM NaNO₃, 0.17mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.3mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.4mM K₂HPO₄, 1.28mM KH₂PO₄, 0.43mM NaCl) 중에서, 세포 밀도가 2 × 10⁶ 세포/ml가 될 때까지 선회 진탕기에서 생장시켰다. 세포를 회수한 후, 멸균 증류수로 1회 세정하고 나서, 배지 50 μ l 중에 재현탁하였다. 1 × 10⁷ 세포를 비선별성 프로테오스 배지 평판 중앙 3분의 1에 해당하는 부위에 도말하였다. 세포를 PDS-1000/He 유전자 총 입자 전달 시스템(Bio-Rad)으로 발사하였다. 파열 판(rupture disk)(1350psi)을 사용하였으며, 평판을 스크리닝/매크로캐리어 조립체 6cm 아래에 놓았다. 25℃에서 12시간 내지 24시간 동안 세포를 회수하였다. 회수시, 고무 주걱으로 세포를 평판으로부터 긁어내고 나서, 이를 배지 100 μ l와 혼합한 다음, 적절히 선택된 항생제를 함유하는 평판상에 도말하였다. 25℃에서 7일 내지 10일 동안 항온 처리한 다음, 형질 전환된 세포를 나타내는 콜로니들을 평판 상에서 가시적으로 확인하였다. 콜로니들을 골라낸 다음 (항생제 또는

탄소 공급원 함유) 선별 한천 평판 상에 점 찍었다(제2 선별 라운드용).

[0383] 실시예 3: 미세 조류 세포 내 이중 지방 아실 ACP 티오에스테라제 유전자의 발현

[0384] 미세 조류 세포, 예를 들어 프로토타카 종에서 이중 티오에스테라제 유전자를 발현하는 방법과 그 결과는, 본문에 참조로 포함되어 있는 PCT 출원 PCT/US2009/66412에 이미 기술되어 있다. 본 실시예에는 고등 식물 종으로부터 유래하는 기타 다른 티오에스테라제 유전자/유전자 생성물을 이용하였을 때의 결과가 기술되어 있다.

[0385] 리시누스 커뮤니스로부터 유래하는 지방 아실-ACP 티오에스테라제를 프로토타카 모리포르미스 UTEX 1435 유전적 배경에 도입하였으며, 코돈 최적화된 cDNA 서열(서열 번호 87) 및 아미노산 서열(GenBank 수탁 번호 제 ABS30422.1호)(서열 번호 88)을 서열 목록에 나열하였다. 발현 구조물은 6S 게놈 영역에 대한 5'(서열 번호 100) 및 3'(서열 번호 101) 상동성 재조합 표적화 서열(구조물에 축적)을 함유하였는데, 이 상동성 재조합 표적화 서열은 씨.레인하르티 β -튜블린 프로모터/5'UTR 및 클로렐라 불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR의 제어 하에 있는 에스.세레비지아에 *suc2* 수크로스 인버타제 암호화 영역과 핵내 게놈으로의 통합에 사용되었다. 에스.세레비지아에 *suc2* 발현 카세트는 서열 번호 78로서 나열하였으며, 이는 선택 마커로 사용되었다. 알.커뮤니스 암호화 영역은 프로토타카 모리포르미스 Amt03 프로모터/5'UTR(서열 번호 84) 및 씨.불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR(서열 번호 85)의 제어 하에 두었다. 리시누스 커뮤니스 천연 운반 펩티드를 또한 씨.프로토타코이데스 스테아로일 불포화 효소로부터 유래하는 운반 펩티드(서열 번호 86)와 치환하였으며, 운반 펩티드가 치환된 티오에스테라제의 cDNA 서열을 서열 번호 87로서 나열하였다. 전체 리시누스 커뮤니스 발현 카세트를 pSZ1375로 명명하였으며, 이를 프로토타카 모리포르미스 유전적 배경에 도입하여 균주를 형질 전환하였다. 양성 클론을, 유일한 탄소 공급원으로서 수크로스를 함유하는 평판 상에서 스크리닝하였다. 양성 클론의 하위 세트들을 선별하고 나서, 이를 지질 생산 조건 하에 성장시킨 다음, 전술한 바와 같은 직접 에스테르 결합 전이법을 이용하여 지질(지방산) 프로필을 분석하였다. 선별된 클론의 지방산 프로필을 이하 표 14에 요약하였다.

표 14

[0386]

리시누스 커뮤니스 ACP 티오에스테라제 유전자 이식 프로토타카 세포의 지방산 프로필							
균주	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
야생형	0.01	0.03	0.98	24.65	3.68	62.48	6.26
pSZ1375	0.01	0.03	0.91	18.34	2.55	67.93	8.35
클론 A							
pSZ1375 클론 B	0.01	0.03	0.97	18.51	2.47	67.83	8.25
pSZ1375 클론 C	0.01	0.03	0.93	18.65	2.84	67.58	7.90
pSZ1375 클론 D	0.01	0.03	0.92	18.90	2.30	67.48	8.37

[0387] 상기 결과는, 리시누스 커뮤니스 티오에스테라제 이식 유전자를 포함하는 형질 전환체는 C16:0 지방산의 수준이 야생형 균주의 경우와 비교하였을 때 변경되었으며, 이보다는 그 정도가 작지만 C18:0 지방산의 수준도 마찬가지로 지었다는 것을 보여주는 것이다. 뿐만 아니라, 야생형의 수준과 비교하였을 때 C18:1 지방산 수준도 이와 함께 증가하였다.

[0388] 실시예 4: 미세 조류 프로토타카 모리포르미스 내 포화 지방산 수준의 변경

[0389] A. 유전자 녹아웃 접근법에 의한 스테아로일 ACP 불포화 효소 및 델타 12 지방산 불포화 효소 발현의 감소

[0390] 생물 정보학을 바탕으로 하는 접근법(cDNA 대상)을 사용하는 유전체학적 스크리닝의 일환으로서, 프로토타카 모리포르미스(UTEX 1435) 유래 게놈 DNA의 로쉬 454 서열 결정 및 일루미나 전사체, 지방산 불포화에 관여하는 유전자의 특정 군 2개를 확인하였다: 스테아로일 ACP 불포화 효소(SAD) 및 델타 12 지방산 불포화 효소(Δ 12 FAD). 스테아로일 ACP 불포화 효소는 지질을 합성하는 경로, 예를 들어 C18:0 지방산으로부터 C18:1 지방산을 합성하는 경로에 관여하는 일원으로서, 이중 결합을 지방 아실 사슬에 도입하는 기능을 갖는다. 델타 12 지방산 불포화 효소는 또한 지질을 합성하는 경로, 예를 들어 C18:1 지방산으로부터 C18:2 지방산을 합성하는 경로에 관여하는 일원으로서, 이미 불포화된 지방산에 이중 결합을 도입하는 기능을 갖는다. 생물 정보학적 시도가 행해질 때 확인된 지방산 불포화 효소 유전자 군 2개를 바탕으로 하는 프로브를 사용하는 서던 블롯 분석은, 불포화 효소 유전자 각 군이 다수의 군 일원들로 이루어져 있을 것임을 말해주었다. 뿐만 아니라, 스테아로일 ACP

불포화 효소를 암호화하는 유전자들은 2개의 별도 군들에 속하였다. 이와 같은 결과를 토대로 하여, 3개의 유전자 중단 구조물을, 불포화 효소 각 군에 더욱 고도로 보존된 암호화 영역을 표적화함으로써, 다수의 유전자 군 일원들을 중단하도록 디자인하였다.

[0391] 다음과 같은 것들을 사용하여 3개의 상동성 재조합 표적화 구조물을 디자인하였다: (1) 델타 12 지방산 불포화 효소(d12FAD) 군 일원의 암호화 서열의 고도로 보존된 부분들과 (2) SAD의 개별 군 2개 각각을 표적화하는 2개의 구조물(상기 구조물은 각각 상기 각 군으로부터 유래하는 암호화 서열의 보존된 영역을 함유함). 이와 같은 기법은, 통상적인 유전자 치환 기법보다 선택가능한 마커 유전자(에스.세레비지아에로부터 유래하는 *suc2* 수크로스 인버타제 카세트로서, 수크로스를 가수 분해하는 능력을 부여함)를 고도로 보존된 암호화 영역(다수의 군에 속하는 일원들을 표적화함)에 더욱 효율적으로 삽입하도록 디자인하였으며, 이 경우, 상동성 재조합은 표적화된 유전자에 축적하는 영역들이 표적화될 것이다.

[0392] 전술한 방법들을 사용하여 유전자 총 형질 전환법에 의해 모든 구조물들을 세포에 도입하였는데 즉, 구조물을 선형화한 다음 세포에 발사하였다. 수크로스 함유 평판/배지에서 형질 전환체를 선별하였으며, 지방산 프로파일 변화는 전술한 방법을 사용하여 분석하였다. 3개의 표적화 구조물 각각으로부터 유래하는 관련 서열들을 이하에 나열하였다:

[0393] 설 명 서열 번호

[0394] d12FAD 표적화 구조물의 5' 서열 서열 번호 30

[0395] d12FAD 표적화 구조물의 3' 서열 서열 번호 31

[0396] d12FAD 표적화 구조물 cDNA 서열 서열 번호 32

[0397] SAD2A 표적화 구조물의 5' 서열 서열 번호 33

[0398] SAD2A 표적화 구조물의 3' 서열 서열 번호 34

[0399] SAD2A 표적화 구조물 cDNA 서열 서열 번호 35

[0400] SAD2B 표적화 구조물의 5' 서열 서열 번호 36

[0401] SAD2B 표적화 구조물의 3' 서열 서열 번호 37

[0402] SAD2B 표적화 구조물 cDNA 서열 서열 번호 38

[0403] 구조물 각각으로 형질 전환하여 얻은, 대표적인 양성 클론들을 골라낸 다음, 이 클론들에 대한 지방산 프로필을 측정하여(면적%로 표시) 이하 표 15에 요약하였다.

표 15

[0404]

불포화 효소 녹아웃시 지방산 프로파일				
지방산	d12FAD KO	SAD2A KO	SAD2B KO	wt UTEX 1435
C8:0	0	0	0	0
C10:0	0.01	0.01	0.01	0.01
C12:0	0.03	0.03	0.03	0.03
C14:0	1.08	0.985	0.795	1.46
C16:0	24.42	25.335	23.66	29.87
C18:0	6.85	12.89	19.555	3.345
C18:1	58.35	47.865	43.115	54.09
C18:2	7.33	10.27	9.83	9.1
C18:3 알파	0.83	0.86	1	0.89
C20:0	0.48	0.86	1.175	0.325

[0405] 구조물 각각은 지방산의 원하는 군에 측정 가능한 정도의 영향을 미쳤으며, 3가지 경우 모두에 있어서, 특히 2개의 SAD가 녹아웃되었을 때 C18:0 수준은 눈에 띄게 증가하였다. SAD 녹아웃으로 인해 생산된 클론들 다수 개를 추가로 비교한 결과, SAD2B 녹아웃 계열들은 C18:1 지방산 수준이, SAD2A 녹아웃 계열들에서 관찰되는 C18:1 지방산 수준보다 유의적으로 많이 감소되었음이 확인되었다. 부가의 Δ12 지방산 불포화 효소(FAD) 녹아웃은, 전

술한 방법을 사용하였을 때 프로토타카 모리포르미스(UTEX 1435) 배경에서 나타났다. $\Delta 12FAD$ 의 잠재적인 상동성을 확인하기 위해서 다음과 같은 프라이머들을 사용하여 추정 FAD를 암호화하는 게놈 영역을 증폭하였다:

[0406] 프라이머 1 5'-TCACTTCATGCCGCGGTCC-3' 서열 번호 74

[0407] 프라이머 2 5'- GCGCTCTGCTTGGCTCGAA-3' 서열 번호 75

[0408] 프로토타카 모리포르미스 게놈 DNA를, 상기 프라이머들을 사용하여 게놈 증폭 생성된 서열들은 매우 유사하였는데, 이는 프로토타카 모리포르미스 내에 $\Delta 12FAD$ 의 유전자 또는 대립 유전자 다수 개가 존재함을 암시하는 것이었다.

[0409] 이와 같은 결과를 바탕으로 하여, 1개 이상의 $\Delta 12FAD$ 유전자를 소모시키고자 하는 2개의 유전자 중단 구조물을 디자인하였다. 이때 사용된 기법은, 통상의 유전자 치환 기법이 아니고, 수크로스 인버타제(에스.세레비지아에 유래 *suc2*) 카세트(선택가능한 마커로서 수크로스를 가수 분해하는 능력 부여)를 고도로 보존된 암호화 영역에 삽입하는 기법이었다. 제1 구조물(pSZ1124라 명명)은 에스.세레비지아에 *suc2* 유전자와 클로렐라 불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR(에스.세레비지아에 *suc2* 카세트)을 발현시키는, 씨.레이하르트티 β -튜불린 프로모터 측접 5' 및 3' 게놈 표적화 서열을 함유하였다. 제2 구조물(pSZ1125라 명명)은 에스.세레비지아에 *suc2* 유전자와 클로렐라 불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR을 발현시키는, 씨.레이하르트티 β -튜불린 프로모터 측접 5' 및 3' 게놈 표적화 서열들을 함유하였다. 이 구조물의 관련 서열을 서열 목록에 나열하였다:

[0410] pSZ1124 (FAD2B) 5' 게놈 표적화 서열 서열 번호 76

[0411] pSZ1124 (FAD2B) 3' 게놈 표적화 서열 서열 번호 77

[0412] 에스.세레비지아에 *suc2* 카세트 서열 번호 78

[0413] pSZ1125 (FAD2C) 5' 게놈 표적화 서열 서열 번호 79

[0414] pSZ1125 (FAD2C) 3' 게놈 표적화 서열 서열 번호 80

[0415] pSZ1124 및 pSZ1125를 각각 프로토타카 모리포르미스 배경에 도입하고, 수크로스를 가수 분해하는 능력을 바탕으로 양성 클론을 선별하였다. 표 16은 pSZ1124 및 pSZ1125 표적화 벡터를 이용한 유전자 이식 계열 2개의 지방산 프로파일(면적%, 전술한 방법을 사용하여 구함)을 요약한 것이다.

표 16

[0416]

$\Delta 12 FAD$ 녹아웃의 지방산 프로파일									
	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 α
부모	0.01	0.03	1.15	26.13	1.32	4.39	57.20	8.13	0.61
FAD2B	0.02	0.03	0.80	12.84	1.92	0.86	74.74	7.08	0.33
FAD2C	0.02	0.04	1.42	25.85	1.65	2.44	66.11	1.39	0.22

[0417] FAD2B 구조물(pSZ1124)을 함유하는 유전자 이식체는 지질 프로파일(C18:2 수준)에 있어서 매우 이색적이면서 예상 외의 양상을 보였는데, 즉, 상기 C18:2 수준은 감소하되, 단지 약 1 면적%까지만 감소하는 것으로 예상되었다. 그러나, C18:1 지방산 수준은 유의적으로 증가하였으며, 이때, C16:0 수준은 거의 배타적으로 (유의적으로) 감소하였다. FAD2C 구조물(pSZ1125)을 함유하는 유전자 이식체는 또한 지방산 프로파일도 변경하였는데; C18:2의 수준은, C18:1 수준이 증가하였던 것과는 달리, 유의적으로 감소하였다.

[0418] B. 델타 12 불포화 효소(FADc)를 하향 조절하기 위한 프로토타카 세포 내 RNA 헤어핀 접근법

[0419] 헤어핀 RNA에 의해 FADc 유전자(델타 12 불포화 효소 유전자) 발현을 하향 조절하는 벡터를 프로토타카 모리포르미스 UTEX 1435 유전적 배경에 도입하였다. 사카로마이세스 세레비지아에 *suc2* 수크로스 인버타제 유전자를 선택가능한 마커(유일한 탄소 공급원으로서 수크로스를 사용하여 성장할 수 있는 능력을 양성 클론에 부여)로서 사용하였으며, 이때 2가지 유형의 구조물을 사용하였다. 제1 유형의 구조물은, 자체의 제1 인트론에 대해 cis 배열로 결합된 FADc 암호화 영역의 제1 엑손의 일부와, 이것의 다음에 존재하는 제1 엑손의 역 반복 단위를 이용하였다. 이와 같은 유형의 구조물은 mRNA로서 발현될 때 헤어핀을 형성하도록 디자인하였다. 상기 제1 유형의 구조물 2개를 제조하였는데, 이것들 중 하나(pSZ1468로 명명)는 프로토타카 모리포르미스 Amt03 프로모터(서열 번호 84)에 의해 작동되었으며, 제2 구조물(pSZ1469로 명명)은 클라미도모마스 레이하르트티 β -튜불린 프로모터(서열 번호 89)에 의해 작동되었다. 제2 유형의 구조물은, 프로토타카 모리포르미스 Amt03 프로모터(서열 번

호 84)에 의해 작동되거나(pSZ1470), 또는 클라미도모마스 레인하르티 β -튜불린 프로모터(서열 번호 89)에 의해 작동되는(pSZ1471), 크기가 큰 FADc 엑손 2(안티센스 배향)를 이용하였다. 4개의 구조물은 모두 에스.세레비지아에 *suc2* 수크로스 인버타제 카세트(서열 번호 78) 및 6S 게놈 영역에 대해 상동성인 5'(서열 번호 100) 및 3'(서열 번호 101) 재조합 표적화 서열(구조물에 축적)(핵내 게놈으로의 통합에 사용)을 가졌다. 각 구조물의 관련 부분들과 함께 각 헤어핀 RNA 구조물의 FADc 부분들의 서열을 다음과 같이 서열 목록으로 나열하였다:

[0420]	<u>설 명</u>	<u>서열 번호</u>
[0421]	pSZ1468 FADc 헤어핀 RNA 카세트	서열 번호 90
[0422]	pSZ1468 구조물의 관련 부분	서열 번호 91
[0423]	pSZ1469 FADc 헤어핀 RNA 카세트	서열 번호 92
[0424]	pSZ1469 구조물의 관련 부분	서열 번호 93
[0425]	헤어핀 RNA 카세트의 pSZ1470 FADc 엑손 2	서열 번호 94
[0426]	pSZ1470 구조물의 관련 부분	서열 번호 95
[0427]	헤어핀 RNA 카세트의 pSZ1471 FADc 엑손 2	서열 번호 96
[0428]	pSZ1471 구조물의 관련 부분	서열 번호 97

[0429] 4개의 구조물 각각을 프로토타카 모리포르미스 배경에 도입하여 이를 형질 전환하고, 유일한 탄소 공급원으로서 수크로스를 함유하는 평판을 사용하여 양성 클론들을 스크리닝하였다. 각각의 형질 전환으로부터 양성 클론들을 골라낸 다음, 이것들의 하위 세트를 선별하여, pSZ1468, pSZ1469, pSZ1470 및 pSZ1471에 함유된 안티센스 카세트와 헤어핀 구조의 지방산 프로필에 대한 영향력을 분석하였다. 각각의 형질 전환으로부터 선별된 클론들을 지질 생산 조건 하에서 생장시켰으며, 이때, 전술한 바와 같은 직접 에스테르 결합 전이 방법을 사용하여 지방산 프로필을 분석하였다. 각각의 형질 전환으로부터의 대표적인 지방산 프로필을 이하 표 17에 요약하였다. 야생형 1 및 2 세포들은, 음성 대조군으로서 형질 전환체들 각각과 별도로 생장하는 비형질 전환 프로토타카 모리포르미스 세포였다.

표 17

[0430] 델타 12 불포화 효소 유전자(FADc)의 발현을 하향 조절하기 위한 헤어핀 RNA 구조물을 함유하는 프로토타카 모리포르미스 세포의 지방산 프로필							
균주	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
야생형 1	0.01	0.03	1.20	27.08	4.01	57.58	7.81
pSZ1468 클론 A	0.01	0.04	1.33	25.95	3.68	65.60	1.25
pSZ1468 클론 B	0.01	0.03	1.18	23.43	2.84	65.32	4.91
pSZ1468 클론 C	0.01	0.04	1.34	23.18	4.27	63.65	5.17
pSZ1468 클론 D	0.01	0.03	1.24	23.00	3.85	61.92	7.62
pSZ1470 클론 A	0.01	0.03	1.23	24.79	4.33	58.43	8.92
pSZ1470 클론 B	0.01	0.03	1.26	24.91	4.14	57.59	9.64
pSZ1470 클론 C	0.01	0.03	1.21	23.35	4.75	58.52	9.70
야생형2	0.01	0.03	0.98	24.65	3.68	62.48	6.26
pSZ1469 클론 A	0.01	0.03	1.05	21.74	2.71	71.33	1.22
pSZ1469 클론 B	0.01	0.03	1.01	22.60	2.98	70.19	1.27
pSZ1469 클론 C	0.01	0.03	1.03	19.82	2.38	72.95	1.82
pSZ1469 클론 D	0.01	0.03	1.03	20.54	2.66	70.96	2.71

pSZ1471 클론 A	0.01	0.03	1.03	18.42	2.63	66.94	8.55
pSZ1471 클론 B	0.01	0.03	0.94	18.61	2.58	67.13	8.66
pSZ1471 클론 C	0.01	0.03	1.00	18.31	2.46	67.41	8.71
pSZ1471 클론 D	0.01	0.03	0.93	18.82	2.54	66.84	8.77

[0431] 상기 요약된 결과들을 통하여, 헤어핀 구조물인 pSZ1468 및 pSZ1469는 예상 표현형(즉, 야생형 1 및 야생형 2 각각과 비교하였을 때, C18:2 지방산 수준은 감소하였으며, C18:1 지방산 수준은 증가함)을 보였음을 알 수 있었다. 안티센스 구조물인 pSZ1470 및 pSZ1471은 C18:2 지방산 수준을 감소시키지 않았으나, 그 대신, 야생형 1 및 야생형 2와 비교하였을 때 C18:2 지방산 수준을 약간 증가시켰고, C16:0 지방산 수준을 약간 감소시켰다.

[0432] C. 외인성 스테아로일-ACP 불포화 효소의 발현

[0433] 올레아 유로파에아 스테아로일-ACP 불포화 효소(GenBank 수탁 번호 제AAB67840.1호)를 프로토타카 모리포르미스 UTEX1435 유전적 배경에 도입하였다. 발현 구조물은 6S 게놈 영역에 대한 5'(서열 번호 100) 및 3'(서열 번호 101) 상동성 제조합 표적화 서열(구조물에 축적)을 함유하였는데, 이 제조합 표적화 서열은 씨.레인하르트티 β-튜불린 프로모터/5'UTR 및 클로렐라 불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR의 제어 하에 있는 에스.세레비지아에 *suc2* 수크로스 인버타제 암호화 영역과 핵내 게놈으로의 통합에 사용되었다. 이와 같은 에스.세레비지아에 *suc2* 발현 카세트는 서열 번호 78로서 나열하였으며, 이를 선택 마커로 사용하였다. 올레아 유로파에아 스테아로일-ACP 불포화 효소 암호화 영역은 프로토타카 모리포르미스 Amt03 프로모터/5'UTR(서열 번호 84) 및 씨.불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR의 제어 하에 두었으며, 천연 운반 펩티드는 클로렐라 프로토타코이테스 스테아로일-ACP 불포화 효소 운반 펩티드(서열 번호 86)로 치환되었다. 코돈 최적화된 cDNA 서열과 아미노산 서열(운반 펩티드가 치환됨)을 서열 목록 중 서열 번호 98 및 서열 번호 99로 각각 나열하였다. 전체 오.유로파에아 SAD 발현 카세트를 pSZ1377이라 명명하고, 이를 프로토타카 모리포르미스 유전적 배경에 도입하여 이 균주를 형질 전환하였다. 양성 클론을, 유일한 탄소 공급원으로서 수크로스를 함유하는 평판 상에서 스크리닝하였다. 양성 클론들의 하위 세트를 선별하여, 지질 생산 조건 하에서 성장시켰으며, 이때, 지방산 프로파일은 전술한 바와 같은 직접 에스테르 결합 전이 방법을 통하여 분석하였다. 선별된 클론들의 지방산 프로파일을 이하 표 18에 요약하였다.

표 18

[0434]

올레아 유로파에아 스테아로일-ACP 불포화 효소 유전자 이식 프로토타카 모리포르미스 세포의 지방산 프로파일					
균주	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
야생형	0.88	22.82	3.78	64.43	6.54
pSZ1377 클론 A	0.94	18.60	1.50	69.45	7.67
pSZ1377 클론 B	0.93	18.98	1.35	69.12	7.67
pSZ1377 클론 C	0.93	19.01	2.31	68.56	7.43

[0435] 상기 요약된 결과들은, 이중 불포화 효소(이 경우에는 올레아 유로파에아 유래 스테아로일-ACP 불포화 효소)를 도입하면 C18:1 지방산 수준은 증가할 수 있으며, 아울러 C18:0 및 C16:0 지방산 수준은 감소할 수 있음을 입증하는 것이다.

[0436] 실시예 5: 유지성 효모의 배양

[0437] 본 실시예 및 이하 실시예에서 사용되는 유지성 효모 균주는, 도이쯔 삼룽 본 마이크로오르가니즈멘 운 젤쿨투렌 게엠베하(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ))(독일 38124 브라운스비그 인호펜슈트라ße 7B 소재) 또는 센트라알부레우 부르 쉴멜스쿨터에즈(CBS) 훈갈 비오디베시티 센트레(Centraalbureau voor Schimmelscultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre)(네덜란드 3508 우트레히트 P.O. Box 85167 소재)로부터 입수하였다. 185개의 유지성 효모 균주들을 성장물과 지질 생산에 대해 스크리닝하였다.

[0438] YPD 한천(이하 기술된 바와 같은 YPD 배지로서 2% 한천이 첨가된 것) 평판 상의 독립된 콜로니를 긁어서(streaking), 모든 균주들을 순수 배양된 상태로 만들었다. 각각의 균주의 YPD 평판으로부터 얻은 독립된 콜로니를 골라낸 후 이를 회전 진탕기(200rpm, 30℃)에 있는 YPD 배지(박토-효모 추출물 10g, 박토-펩톤 20g 및 20g 글루코스/1L 최종 부피, 증류수 중)에서 대수기까지 성장시켰다.

[0439] 지질 생산성을 평가하기 위해, YPD 배지 2mL를, 50mL들이 타르 처리 생물 반응기 튜브(MidSci, Inc.)에 첨가하고 나서, 여기에 각 균주의 동결 스톱을 접종하였다. 그 다음, 상기 튜브를 30℃의 항온 처리기에 넣은 후 24시간 동안 균주를 성장시켰는데, 이때, 이 튜브를 200rpm에서 진탕하여 종자 배양액을 만들었다. 24시간 경과후, 0.1M 프탈레이트 완충제(pH 5.0) 함유 Y1 배지(아미노산을 함유하지 않는 효모 질소 베이스, Difco) 8mL를 첨가하고 나서, 서서히 피펫팅하여 이 혼합물을 잘 혼합하였다. 생성된 배양액을 제2의 타르 처리 생물 반응기 튜브에 균일하게 분배하였다. 이후, 생성된 2개의 배양액들(각각 5mL씩)을 30℃의 항온 처리기에 넣었으며, 이때, 이 배양액들을 200rpm에서 5일 동안 교반하였다. 그 다음, 세포들을 지질 생산성과 지질 프로파일 분석을 위해 수집하였다. 배양액 3mL를 사용하여, 건조 세포 중량과 총 지질 함량(지질 생산성)을 측정하였으며, 이 배양액 중 1mL는 지방산 프로파일 분석에 사용하였다. 두 가지 경우들 중 어느 하나의 경우에서, 배양액을 튜브에 넣고, 3500rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 세포를 펠릿화하였다. 상청액을 경사분리한 다음, 각각의 튜브에 탈이온수 2mL를 첨가하였는데, 이 탈이온수는 생성된 세포 펠릿을 세정하는데 사용하였다. 튜브를 다시 3500rpm에서 10분 동안 회전시켜, 세정된 세포들을 펠릿화하였는데, 이후, 상청액을 경사분리한 다음, 세포 펠릿을 -70℃의 동결기에 30분 동안 넣어두었다. 그 다음, 튜브를 동결 건조기에 밤새도록 넣어두어 내용물을 건조하였다. 그 다음 날, 원뿔형 튜브와 건조된 바이오매스(배양액 3mL로 제조)의 중량을 합한 값을 기록하였으며, 안컴 산 가수 분해 시스템(Ankom Acid Hydrolysis system)(제조자의 지침에 따름)을 사용하여 생성된 세포 펠릿을 대상으로 총 지질 추출을 수행함으로써, 총 지질 함량을 분석하였다.

[0440] 스크리닝된 185개의 균주들 중 30개의 균주들을, 성장률과 지질 생산성을 바탕으로 선택하였다. 상기 30개 균주의 지질 생산성(건조 세포 중량당 지질%로 표시)을 이하 표 19에 요약하였다.

표 19

[0441]

유지성 효모 균주의 지질 생산성		
종	수집소 수탁번호	지질 % (DCW)
로도토룰라 테르페노이달리스	CBS 8445	27
로도토룰라 글루티누스	DSMZ 70398	53.18
리포마이세스 테트라스포리스	CBS 1810	51
리포마이세스 테트라스포리스	CBS 7656	17.63
리포마이세스 테트라스포리스	CBS 8724	18
크립토코커스 커바투스	CBS 5324	53
크립토코커스 커바투스	CBS 2755	48
로도스포리디움 스파에로카르푸	CBS 2371	43
로도토룰라 글루티누스	CBS 4476	30.97
리포마이세스 테트라스포리스	CBS 1808	29
트리코스포론 도메스티쿰	CBS 8111	35.16
트리코스포론 종	CBS 7617	40.09
리포마이세스 테트라스포리스	CBS 5911	27.63

리포마이세스 테트라스포러스	CBS 5607	12.81
크립토코커스 커바투스	CBS 570	38.64
크립토코커스 커바투스	CBS 2176	40.57
크립토코커스 커바투스	CBS 5163	35.26
토룰라스포라 텔브루에키	CBS 2924	40.00
로도토룰라 토룰로이데스	CBS 8761	36.52
게오텐리쿰 히스테리다툼	CBS 9892	33.77
야로위아 리폴리티카	CBS 6012	29.21
게오텐리쿰 불가레	CBS 10073	28.04
트리코스포론 몬테비딘스	CBS 8261	25.60
리포마이세스 스타케이	CBS 7786	25.43
트리코스포론 비렌드	CBS 5581	23.93
트리코스포론 루비에리 변종 루비에리	CBS 8265	22.39
로도스포리디움 토룰로이데스	CBS 14	21.03
트리코스포론 브라시카에	CBS 6382	20.34
로도토룰라 오란티아카	CBS 317	17.51
스포로볼로마이세스 알보루베센스	CBS 482	10.09

[0442] 1ml 배양액으로부터 생성된 세포 펠릿을 대상으로 직접 에스테르 결합 전이법을 실시하였으며, GC에 의해 지방산 프로필에 대해 분석하였다. 상기 효모 균주들 중 17개에 대한 지방산 프로필을 요약한 것을 이하 표 20에 제시하였다.

표 20

[0443]

유지성 효모 균주의 지방산 프로필												
종	수집소 수탁번호	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	>C20
로도토룰라 테르페노 이달리스	CBS 8445	0.06	0.8	0.02	27.44	0.67	0.03	0.03	5.6	59.44	3.37	2.13
로도토룰라 글루티누스	DSMZ 70398	0.05	1.55	0.09	27.34	0.34	0.23	0.08	10.47	44.68	11.65	2.23
리포마이세스 테트라스포러스	CBS 1810	nd	0.26	0.08	24.22	2.13	0.28	0.30	9.93	55.04	4.48	3.01
리포마이세스 테트라스포러스	CBS 76556	nd	0.293	0.212	28.14	4.24	0.37	0.66	6.61	48.48	8.33	1.178

리포마이 세스 테트라소 포르스	CBS 8724	nd	0.27	0.08	30.69	2.12	0.27	0.24	11.8	46.71	4.36	2.89
크립토크 코스 커바투스	CBS 5324	nd	0.27	0.22	23.31	0.49	0.12	0.09	11.55	50.78	10.80	1.61
크립토크 코스 커바투스	CBS 27556	nd	0.62	0.03	25.07	0.31	0.05	0.03	17.07	45.74	14.60	2.01
로도스포 리디움 스파에로 카르폴	CBS 2371	0.03	0.68	0.03	17.86	0.13	0.54	0.17	10.4	51.01	14.60	1.82
로도톨 라 글루티 누스	CBS 4476	0.021	0.47	0.02	24.64	0.16	0.064	0.27	13.73	42.46	16.29	1.642
리포마이 세스 테트라소 포르스	CBS 1808	0.01	0.40	0.12	26.64	3.11	0.25	0.39	7.39	54.15	3.96	2.34
트리코스 포론 도메스티 쿰	CBS 8111	0.066	0.486	0.10	23.19	0.11	0.37	0.033	30.65	29.75	11.66	3.414
트리코스 포론 중	CBS 7617	0.046	0.527	0.063	24.26	0.187	0.171	0.026	19.61	41.95	9.97	2.61
리포마이 세스 테트라소 포르스	CBS 5911	0.017	0.45	0.16	30.79	3.56	0.29	0.48	7.77	49.99	4.40	1.433
리포마이 세스 테트라소 포르스	CBS 5607	nd	0.35	0.17	37.56	3.0	0.328	0.40	9.31	42.36	4.28	1.376
크립토크 코스 커바투스	CBS 570	0.017	0.21	0.09	12.78	0.13	0.147	0.09	19.6	53.17	8.42	4.01
크립토크 코스 커바투스	CBS 2176	0.02	0.31	0.09	19.0	0.87	0.08	0.10	7.24	60.51	9.26	2.154
크립토크 코스 커바투스	CBS 5163	0.019	0.34	0.06	22.7	0.70	0.13	0.10	10.65	51.36	10.34	2.24
nd는 측정되지 않았음을 나타냄												

[0444] 유지성 효모의 추가 균주들을 대상으로 지방산 프로파일 분석을 수행하였으며, 이 균주들 중 몇개(토룰라스포라 텔브루에키 CBS 2924 포함)는 C16:1 지방산 백분율이 높다는 것이 파악되었다. 상기 유지성 효모 균주의 지질 생산성에 있어서, 지질은 약 40%(DCW 백분율)였으며, 지방산 프로파일은 다음과 같았다: C12:0(0.36%); C14:0(1.36%); C15:0(0.16%); C16:0(10.82%); C 16:1(42.9%); C17:0(0.11%); C18:0(2.1%); C18:1(35.81%); C18:2(4.62%). 이 균주는, 자체의 지방산 프로파일의 일부인 C16:1(팔미톨레산)의 백분율이 특히 높았던 것으로 파악되었다. 다음과 같은 추가 균주 4개는 C16:1을 높은 백분율로 생산하였음이 확인되었다: 야로위아 리폴리티카 CBS 6012(10.10%); 야로위아 리폴리티카 CBS 6331(14.80%), 야로위아 리폴리티카 CBS 10144(12.90%) 및 야로위아 리폴리티카 CBS 5589(14.20%).

[0445] **실시예 6: 유지성 효모 균주의 유전자 분석**

- [0446] 상이한 유지성 효모 균주 48개의 유전자 분석을 수행하였다. 상이한 유지성 효모 바이오매스 균주 48개 각각으로부터 게놈 DNA를 다음과 같이 분리하였다. 세포(약 200mg)를 액체 배양액으로부터 원심 분리하였다(5분, 14,000×g). 그 다음, 세포를 멸균 증류수에 재현탁하고 나서, 이를 원심 분리한 후(5분, 14,000×g), 상청액을 따라냈다. 지름 약 2mm인 단일 유리 비드를 바이오매스에 첨가한 후, 튜브를 -80℃에 15분 이상 동안 놓아 두었다. 샘플을 분리하고, 여기에 분쇄 완충액(1% 살코실, 0.25M 수크로스, 50mM NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH 8.0, RNase A 0.5ug/ul) 150μl를 첨가하였다. 펠릿을 간단히 와류하여 재현탁하고 나서, 여기에 5M NaCl 40ul를 첨가하였다. 샘플을 간단히 와류하고 나서, 여기에 5% CTAB(세틸 트리메틸암모늄 브로마이드) 66μl를 첨가하고 나서, 마지막으로 간단히 와류하였다. 그 다음, 샘플을 65℃에서 10분 동안 항온 처리하였으며, 이후, 샘플을 원심 분리하였다(10분, 14,000×g). 상청액을 새로 마련한 튜브로 옮겨 담은 후 페놀:클로로포름:이소아밀 알코올 12:12:1 300μl를 사용하여 1회 추출하고 나서, 원심 분리하였다(5분, 14,000×g). 생성된 수성 상을 새로 마련한, 이소프로판올 0.7vol(약 190μl)이 담긴 튜브에 옮겨 담은 후, 튜브를 뒤집어서 내용물을 혼합하고 나서, 실온에서 30분 동안 항온 처리하거나 또는 밤새도록 4℃에서 항온 처리하였다. 원심 분리 (10분, 14,000×g)를 통해 DNA를 회수하였다. 그 다음, 생성된 펠릿을 70% 에탄올로 2회 세정한 다음, 마지막으로 100% 에탄올로 세정하였다. 펠릿을 실온에서 20분 내지 30분 동안 공기 건조한 다음, 10mM Tris-Cl 50μl 및 1mM EDTA(pH 8.0) 중에 재현탁하였다.
- [0447] 전술한 바와 같이 제조된 조류의 총DNA 5μl를 10mM Tris(pH 8.0) 중에 1:50으로 희석하였다. PCR 반응(최종 용적 = 20μl)을 다음과 같이 마련하였다. 2× iProof HF 마스터 믹스(Bio-Rad) 10μl를, 프라이머 즉, SZ5434 정방향 프라이머(5'GTCCCTGCCCTTTGTACACAC -3')(서열 번호 39) 0.4μl(스톡 농도 = 10mM) 및 프라이머 즉, SZ5435 역 프라이머(5'TTGATATGCTTAAGTTCAGCGG-3')(서열 번호 40) 0.4μl(스톡 농도 = 10mM)에 첨가하였다. 상기 프라이머들은, 18S rRNA 유전자의 프라이밍 영역 3개와 진균 26S rRNA 유전자의 프라이밍 영역 5개 사이에 존재하는 서열 보존부를 바탕으로 선택되었다. 정방향 프라이머는, GenBank 수탁 번호 제AY550243호의 1632번 내지 1652번 뉴클레오티드와 동일하였으며, 역 프라이머는, GenBank 수탁 번호 제NC_001144호의 464271번 내지 464293번 뉴클레오티드와 동일하였다. 그 다음, 희석된 총DNA 5μl와 dH₂O 3.2μl를 첨가하였다. PCR 반응을, 35사이클 동안 98℃, 45초; 98℃, 8초; 53℃, 12초; 72℃, 20초에 이어서 1분 동안 72℃에서 수행하며, 25℃에 유지시켜 수행한다. PCR 생성물을 정제하기 위해, 10mM Tris(pH 8.0) 20μl를 각각의 반응에 첨가하고 나서, 페놀:클로로포름:이소아밀 알코올 12:12:1 40μl로 추출한 다음, 와류시킨 후, 원심 분리하였다(5분, 14,000×g). PCR 반응을 S-400 컬럼(GE 헬스케어)에서 진행시키고 나서 내용물을 원심 분리하였다(2분, 3,000×g). 생성된 정제 PCR 생성물을 클로닝한 다음, 이를 제조자의 지침에 따라서 이.콜라이(*E. coli*)에 도입하여 형질 전환하였다(제로블런트 PCR4블런트-TOPO(ZeroBlunt PCR4Blunt-TOPO) 벡터 키트(인비트로젠) 사용). 암피실린 내성 콜로니를 대상으로 서열 결정 반응을 직접 수행하였다. 정제된 플라스미드 DNA의 서열 결정은 M13 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 양방향으로 수행하였다. 추후 정제된 PCR 생성물을 PCR8/GW/TOPO에 TOPO 클로닝하였으며, 양성 클론은 LB/Spec 평판에서 선별하였다. 정제된 플라스미드 DNA의 서열 결정은 M13 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 양방향으로 수행하였다.
- [0448] 유전자 분석된 유지성 효모 균주 48개의 리스트를, 상응하는 서열 번호와 함께 이하 표 21에 제시하였다.

표 21

유전자 분석된 유지성 효모 균주 균주명	균주 번호	서열 번호
로도토콜라 글루티니스	DSMZ-DSM 7098	서열 번호 41
리포마이세스 테트라스포러스	CBS 5911	서열 번호 41
로도토콜라 글루티니스		
변종 글루티니스	CBS 3044	서열 번호 42
리포마이세스 테트라스포러스	CBS 8664	서열 번호 42
리포마이세스 테트라스포러스	CBS 1808	서열 번호 43
리포마이세스 테트라스포러스	CBS 1810	서열 번호 43
리포마이세스 스타케이	CBS 1809	서열 번호 44
트리코스포론 몬테비딘스	CBS 8261	서열 번호 44
야로위아 리폴리티카	CBS 6331	서열 번호 45
크립토크커스 커바투스	CBS 5324	서열 번호 46
로도토콜라 유실라기노사		
변종 유실라기노사	CBS 316	서열 번호 46
크립토크커스 커바투스	CBS 570	서열 번호 46
크립토크커스 커바투스	CBS 2176	서열 번호 46
크립토크커스 커바투스	CBS 2744	서열 번호 46
크립토크커스 커바투스	CBS 2754	서열 번호 46
크립토크커스 커바투스	CBS 2829	서열 번호 46
크립토크커스 커바투스	CBS 5163	서열 번호 46
크립토크커스 커바투스	CBS 5358	서열 번호 46
트리코스포론 종	CBS 7617	서열 번호 47

[0449]

스포로로볼로마이세스 알보루베센스	CBS 482	서열 번호 48
로도토콜라 글루티니스		
변종 글루티니스	CBS 324	서열 번호 49
로도토콜라 글루티니스		
변종 글루티니스	CBS 4476	서열 번호 50
트리코스포론 비렌드	CBS 5581	서열 번호 51
게오텐리쿰 히스테리다툼	CBS 9892	서열 번호 52
로도토콜라 오란티아카	CBS 8411	서열 번호 53
크립토크커스 커바투스	CBS 8126	서열 번호 53
트리코스포론 도메스티쿰	CBS 8111	서열 번호 54
로도토콜라 토크로이데스	CBS 8761	서열 번호 55
로도토콜라 터렌도이달리스	CBS 8445	서열 번호 56
야로위아 리폴리티카	CBS 10144	서열 번호 57
로도토콜라 글루티니스		
변종 글루티니스	CBS 5805	서열 번호 58
야로위아 리폴리티카	CBS 10143	서열 번호 59
리포마이세스 테트라스포러스	CBS 5607	서열 번호 60
야로위아 리폴리티카	CBS 5589	서열 번호 61
리포마이세스 테트라스포러스	CBS 8724	서열 번호 62
로도스포리디움 스파레로카르푸	CBS 2371	서열 번호 63
트리코스포론 브라시카에	CBS 6382	서열 번호 64
크립토크커스 커바투스	CBS 2755	서열 번호 65
리포마이세스 테트라스포러스	CBS 7656	서열 번호 65
리포마이세스 스타케이	CBS 7786	서열 번호 66
야로위아 리폴리티카	CBS 6012	서열 번호 67
트리코스포론 루비에리		
변종 루비에리	CBS 8265	서열 번호 68

[0450]

게오텐리쿰 불가레	CBS 10073	서열 번호 69
로도스포리디움 토크로이데스	CBS 14	서열 번호 70
로도토콜라 글루티니스		
변종 글루티니스	CBS 6020	서열 번호 71
리포마이세스 오리엔탈리스	CBS 10300	서열 번호 71
로도토콜라 오란티아카	CBS 317	서열 번호 72
토콜라스포라 델부루엑키	CBS 2924	서열 번호 73

[0451]

[0452] 실시예 7: 오일 함량을 높이기 위한 로도코커스 오파쿠스 배양

[0453]

4% 수크로스를 함유하는 MSM 배지 50mℓ(Schlegel, et al., (1961) *Arch Mikrobiol* 38, 209-22)에 접종된 동결 보존 스톱 2mℓ를 사용하여, 로도코커스 오파쿠스 PD630 (DSM 44193; 도이췌 삼롱 본 미크로오르가니즈멘 운 젤 쿨투렌 게엠베하)의 종자 배양액을 250mℓ들이 배플 플라스크 내에 제조하였다. 상기 종자 배양액의 광학 밀도가 600nm에서 1.16이 될 때까지 이 종자 배양액을 30℃에서 교반하면서 성장시켰다(200rpm). 다음과 같은 2가지의 상이한 질소 조건 하에서 종자 플라스크 배양액 10mℓ를 지질 생산용 배양액에 접종하였다: 10mM NH₄Cl 및 18.7mM NH₄Cl(각각 2개씩 준비). 성장 배양액을 30℃에서 교반하면서 6일 동안 성장시켰다(200rpm). 10mM NH₄Cl 조건에서 배양액을 6일 동안 성장시킨 후 세포의 최대 지질 수준은 (평균) 57.2%(DCW 기준)에 도달하였다.

18.7mM NH₄Cl 조건 하에 5일 동안 배양액 중에서 성장시킨 후 세포의 최대 지질 수준은 (평균) 51.8%(DCW 기준)에 도달하였다.

[0454] 로도코쿠스 오파쿠스 바이오매스 샘플을 대상으로 하여 직접 에스테르 결합 전이법을 수행하였으며, GC/FID를 통하여 지방산 프로필에 대해 분석하였다. 분석 결과는 다음과 같았다: C14:0(2.33); C15:0(9.08); C16:0(24.56); C16:1(11.07); C17:0(10.50); 2 이중 결합 당량(2DBE) C17 종(19.90); C18:0(2.49); C18:1(17.41); C18:2(0.05); C19:0(0.75) 및 2DBE C19 종(1.87).

[0455] **실시예 8: 미생물로부터의 오일 추출**

[0456] **A. 익스펠러 프레스 및 프레스 보조 장치를 사용하는, 미세 조류로부터의 오일 추출**

[0457] 드럼 건조기를 사용하여 DCW를 기준으로 오일 38%를 함유하는 미세 조류 바이오매스를 건조한 결과, 수분 함량이 5% 내지 5.5%가 되었다. 이 바이오매스를 프렌치 L250 프레스에 공급하였다. 바이오매스 30.4kg(67lbs.)을 프레스에 공급하였을 때에는 오일이 회수되지 않았다. 다양한 백분율의 스위치그래스(switchgrass)와 혼합된 동일 건조 미생물 바이오매스를 프레스 보조체로서 상기 프레스에 함께 공급하였다. 건조 미생물 바이오매스와 20% w/w 스위치그래스를 혼합한 결과, 전반적인 오일 회수 백분율이 상당히 증가하였다. 그 다음, 프레스된 케이크를 대상으로 핵산 추출을 수행하였는데, 이때, 20% 스위치그래스 조건에 대한 최종 수율은, 총 이용 가능 오일 61.6%(중량 기준 산정)였다. 오일을 추출함에 있어서, 건조 세포 중량을 기준으로 50% 이상의 오일을 함유하는 바이오매스는 오일 추출을 위해 프레스 보조제, 예를 들어 스위치그래스와 함께 사용할 필요는 없었다. 익스펠러 프레스를 사용하여 미세 조류로부터 오일을 추출하는 또 다른 방법에 대해서는 본원에 참조로 포함된 PCT 특허 출원 PCT/US2010/31108에 기술되어 있다.

[0458] **B. 익스펠러 프레스를 이용하는, 유지성 효모로부터의 오일 추출**

[0459] 효모 균주인 로도토룰라 글루티니스(DSMZ-DSM 70398)를, 도이쯔 샴룽 본 마이크로오르가니즈멘 운 젤쿨투렌 게엠베하(미생물 및 세포 배양물의 독일 수집물, 독일 38124 브라운스비그 인호펜슈트라베 7B 소재)로부터 구입하였다. 냉동 보존된 세포를 해동한 다음, 이를 1× DAS 비타민 용액(1000×: 9g/L 트리신; 0.67g/L 티아민-HCl; 0.01 g/L d-바이오틴; 0.008 시아노코발라민; 0.02 칼슘 판토테네이트; 그리고 0.04 g/L p-아미노벤조산)을 함유하는 YPD 배지(전술한 바와 같음) 50ml에 첨가한 후, OD 판독 결과가 5 OD(A600)가 될 때까지 상기 혼합물을 30℃에서 18시간 내지 24시간 동안 교반하면서(200rpm) 성장시켰다. 그 다음, 배양액을 7L들이 발효조에 옮긴 후, 1× DAS 비타민 용액을 함유하는 YP1 배지(8.5 g/L 디프코 효모 질소 베이스(Difco Yeast Nitrogen Base) (아미노산 및 황산암모늄 불포함), 3g/L 황산암모늄, 4g/L 효모 추출물)에 대해 스위칭(switching)하였다. 배양액의 샘플을 매일 2회씩 채취하였으며, 이를 대상으로 OD(A600), 건조 세포 중량(DCW) 및 지질 농도에 대해 분석하였다. 배양액 농도가 50g/L DCW 이상이 되었을 때, 배양액을 수집하였다. 건조 세포 중량을 기준으로 하여 효모 바이오매스는 약 50% 오일을 함유하였다. 효모 바이오매스 샘플 2개를 대상으로 직접 에스테르 결합 전이법을 수행하고, GC/FID로 지방산 프로필에 대해 분석하였다. 그 결과를 이하 표 22에 면적%로서 제시하였다.

표 22

[0460]

에스테르 전이 효모 바이오매스 샘플의 지방산 프로필												
	C10:0	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 a	≥C:20
샘플 1	0.03	0.21	3.36	0.25	33.26	0.76	0.20	6.88	42.68	9.28	1.33	1.1
샘플 2	0.02	0.10	2.18	0.12	29.94	0.49	0.16	8.17	48.12	7.88	0.84	1.45

[0461] 수집된 효모 배양액을 건조하여 3가지 상이한 방법으로 비교 분석하였다: (1) 강제 통풍 오븐(75℃)에서 밤새도록 트레이 건조하는 방법; (2) 농축 공정을 거치지 않고 드럼 건조기 상에서 건조하는 방법; 및 (3) 효모 배양액을 고체 함량이 22%가 될 때까지 농축한 후, 슬러리를 드럼 건조기로 건조하는 방법. 3개의 상이한 각각의 건조 조건으로부터 얻은 재료를 열로 컨디셔닝한 다음, 스크류 프레스에 공급하여 오일을 추출하였다. 프레스의 온도는 150°F였으며, 컨디셔닝된 건조 효모 바이오매스가 프레스에 공급될 수 있게 될 때까지 이 건조 효모 바이오매스를 약 190°F에 놓아두었다. 트레이 건조 효모의 수분 함량은 1.45%였으며, 건조된 효모를 오븐(90℃)에서 10분 동안 컨디셔닝하였다. 컨디셔닝후 수분 함량은 0.9%였다. 이후, 컨디셔닝된 트레이 건조 재료를 벤치탑 태비(Taby) 스크류 프레스(2.2Hp 모터와 지름 70mm의 스크류가 장착된 태비 프레스 타입 70(Taby Pressen Type 70) 오일 프레스)에 공급하여 오일을 추출하였다. 이 재료로부터는 오일이 거의 생산되지 않았으며, 프레스에서

는 헤비 풋팅(heavy footing)이 관찰되었다.

[0462] 드럼 건조된 효모 배양액(농축하지 않은 것)의 수분 함량은 5.4%였으며, 이후, 드럼 건조된 효모를 오븐(90℃)에서 20분 동안 컨디셔닝하였다. 컨디셔닝 후 수분 함량은 1.4%였다. 이후, 컨디셔닝된 드럼 건조 효모를 벤치탑 태비 스크류 프레스에 공급하여 오일을 추출하였다. 이 재료로부터는 오일이 많이 생산되었으며, 풋팅(footing)도 최소화였다.

[0463] 드럼 건조된 농축 효모 배양액의 수분 함량은 2.1%였으며, 이후, 드럼 건조된 농축 효모를 오븐(90℃)에서 20분 동안 컨디셔닝하였다. 컨디셔닝 후 수분 함량은 1.0%였다. 이후, 컨디셔닝된 드럼 건조 농축 효모를 벤치탑 태비 스크류 프레스에 공급하여 오일을 추출하였다. 이 재료로부터는 오일이 많이 생산되었으며, 풋팅도 최소화였다.

[0464] **C. 유지성 박테리아의 건조 및 이로부터의 오일 추출**

[0465] 유지성 박테리아 균주인 로도코커스 오파쿠스 PD630(DSMZ-DSM 44193)을 본원에 제공된 방법에 따라서 배양하여, 지질 함량이 DCW를 기준으로 약 32%인 유지성 박테리아 바이오매스를 생산하였다.

[0466] 수집된 로도코커스 오파쿠스 배양액을 원심 분리로 농축하고 나서, 탈이온수로 세정한 다음, 이 탈이온수 1.8L 중에 재현탁하였다. 정제된 셀룰로스(PB20-Pre-co-Floc, 네바다 소재 EP 미네랄스(EP Minerals)) 50g을 재현탁된 바이오매스에 첨가한 후, 탈이온수를 사용하여 고체의 총 함량을 20%로 조정하였다. 그 다음, 로도코커스 바이오매스를 드럼 건조기로 건조하였는데, 이 드럼 건조후 로도코커스의 수분 함량은 약 3%였다.

[0467] 이후, 드럼 건조된 재료를 오븐(130℃)에서 30분 동안 열 컨디셔닝한 결과, 수분 함량이 약 1.2%가 되었다. 그 다음, 열 컨디셔닝된 바이오매스를 벤치탑 태비 프레스(스크류 프레스)에 공급하여 오일을 추출하였다. 프레스 온도는 209°F였으며, 컨디셔닝된 건조 효모 바이오매스를 프레스에 공급할 준비가 될 때까지 약 240°F에 방치하여 두었다. 오일 회수시 헤비 풋팅이 동반되었다.

[0468] **실시예 9: 추출된 오일의 가공: 유동점 강화**

[0469] **요약**

[0470] 전술한 실시예에 따라서 제조된 미생물 오일을, 본원에 기술된 방법에 의해 가공하여, 식품에, 그리고 윤활제로서 사용할 오일의 특성을 개선할 수 있었다. 상기 실시예에 기술된 미생물들 이외에, 미세 조류 클로렐라 프로토테코이데스는 미생물 오일의 우수한 생산 균주이다. 오일을 다량으로 생산하고 상기 균주로부터 오일을 추출하도록 클로렐라 종과 균주를 배양하는 방법에 대해서는, 본원에 참조로 포함된 PCT 특허 출원 공보 제 2008/151149호, 제2010/120939호, 그리고 제2010/138,620호에 기술되어 있다.

[0471] 주로 팔미트산 및 스테아르산 트리글리세라이드로 이루어진 포화 분획(스테아린 분획으로서 업계에 공지됨)의 상대적 비율을 감소시킨 결과, 클로렐라 프로토테코이데스로부터 얻은 오일의 유동점은 감소하였다. 이는, 오일을 분별하여 이 오일의 포화 트리글리세라이드 농도를 감소시킴으로써 이루어졌다. 이는, 식물성 오일 업계에 공지되어 있는 윈터리제이션 공정과 유사한, 결정화 또는 건조 분별에 의해 수행되었다. 전술된 방법(식물성 오일 생산 업계에서 사용되는 방법과 유사한 방법도 사용될 수 있음)에 의해 먼저 조류 오일을 정제, 표백 및 탈취하여 “RBD 오일”을 제조하였다.

[0472] 결정 핵이 생성될 때까지 RBD 오일의 온도를 제어된 방식으로 감소시켰다. 그 다음, 상기 오일을 결정화 온도에 서 수 시간 동안 방치하였더니, 결정의 생장이 촉진되었다. 이후, 결정을 여과로 제거한 결과, 다음과 같이 2개의 분획이 제조되었다: 스테아린 분획 일부 또는 대부분을 함유하는 고체 상, 그리고 올레인 분획 대부분을 함유하는 액체 상. 액체 상을 대상으로 다시 낮은 결정화 온도에 대해 분별법을 수행한 결과, 스테아린이 추가로 제거되었다. 생성된 정제 액체 분획(식물성 오일 제조 업계에서 일반적으로 알려진 수퍼 올레인과 동급)의 열 특성은, 천연 조류 오일의 열 특성보다 우수하였다.

[0473] **재료 및 방법**

[0474] **재료**

[0475] 솔라자임 인코포레이션(Solazyme, Inc.)(캘리포니아 사우스 샌프란시스코 소재)에 의해 (정제, 표백 및 탈취된) 조류 오일을 제조하였다. 표 23은 본 연구에 사용된 오일의 특성들을 요약한 것이다.

표 23

[0476]

본 연구에 사용된 조류 오일의 특성	
분석	수치
수분[%]	0.01
유리 지방산 [올레산%]	0.03
요오드가	83.5
지방산 프로파일	
8:0	0.00
10:0	0.00
12:0	0.03
14:0	1.12
16:0	14.02
18:0	3.24
18:1	67.73
18:2	11.18
18:3	0.62
20:0	0.32
20:1	0.20

[0477]

약 50%(w/w)의 평지씨 오일 캐리어를 함유하는 폴리 알킬 메타크릴레이트 공중합체 기반 유동점 강하제(PPD) 비스코플렉스[®] 10-310과, 정제된 미네랄 오일 캐리어를 함유하는 비스코플렉스[®] 1-133은 롬맥스 에보닉(팬실베이니아 호삼 소재)에 의해 공급되었다.

[0478]

방법

[0479]

A. 건조 분별: 결정화

[0480]

조류 오일 약 2.5kg을, 3L들이의, 재킷이 장착된 용기(온도 제어 순환 수조에 연결되어 있으며, 생성물을 가열 및 냉각하는데 사용됨)(벨기에 찰레로이 소재, 크리스탈라이제이션 앤 디거밍(Crystallization & Degumming))에 넣었다. 반응기에는 회전 속도를 조절할 수 있는 교반 장치가 장착되어 있다. 냉각은 오일과 반응기의 이중 벽 사이를 순환하는 물의 온도를 모니터링함으로써 제어하였다. 스틱이 장착된 반응기로부터 결정 현탁액 액적 샘플을 취하고, 이 샘플을 커버슬립 위에 놓은 후, 냉각의 마지막 단계에 결정이 생성되는지 여부를 모니터링하였다. 결정이 녹게 되기 직전에 이 샘플을 현미경으로 분석하였다.

[0481]

전체적인 냉각 패턴을 도 1에 보였다. 제1 단계에서 교반기 속도는 30rpm으로 설정하였으며, 냉각 프로그램의 마지막 단계에서 교반기 속도는 15rpm으로 설정하였다.

[0482]

B. 건조 분별: 여과

[0483]

결정화의 말미에 1L 막 프레스 필터(프랑스 쇼니 소재, 쇼케네 에스아(Choquenot SA))를 사용하여 결정 현탁액을 여과하였다. 최종 냉각 온도로 유지시킨 챔버 내에서 여과를 수행하였다. 여과 시간은 20분이었으며, 필터 공급 압력은 4bar였다.

[0484]

분리 단계의 말미에 스테아린 및 올레인 분획의 중량을 측정하고, 분획 수율을 산정한 다음, 각각의 분획의 샘플을 추가 분석을 위해 따로 분리하여 두었다. 제1 분별로부터 얻어진 올레인을 가공하고, 전술한 바와 같이 결정화 및 여과 공정을 반복 수행한 다음, 도 2에 보인 바와 같은 냉각 프로그램을 수행함으로써, 조류 슈퍼 올레인 #1을 제조하였다. 조류 슈퍼 올레인 #2 및 #3은, 우선 탈취 오일을 분별한 후, 도 2에 보인 냉각 프로그램과 유사한 냉각 프로그램을 이용하여 결정화 및 여과 공정을 반복 수행하여 제조하였다.

[0485]

C. 유동점(PP)

[0486]

유동점 강하제(0.5 및 1.0g)의 중량을 측정하여 플라스크에 담았다. 조류 오일, 올레인 및 슈퍼올레인 분획들(100g)을 각각의 플라스크에 넣었다. 이 혼합물을 철저히 혼합하였다. 각각의 샘플을 D 97 ASTM(미국 재료 시험학회) 표준 방법에 따라서 테스트하였다. 이 샘플을 테스트 튜브에 넣은 후, 수조 내에서 교반하지 않고 가열하였다(이때, 수조의 온도는 48.0℃로 설정함). 샘플의 온도가 46.0℃에 이르게 될 때까지 샘플을 가열하였다. 가

열 후, 샘플을 (수조에서) 25.0℃로 냉각하였다. 그 다음, 샘플을 메탄올조 내 금속 실린더에 넣었다. 메탄올조의 온도는, 샘플의 온도가 10.0℃에 이르게될 때까지 -1.0℃ 내지 -2.0℃로 설정하였다. 그 다음, 메탄올조의 온도는, 샘플의 온도가 -7.0℃에 이르게될 때까지 -17.0℃로 감소시켰다. 샘플 온도가 예상 유동점보다 약 11.0℃ 상승하였을 때, 3.0℃씩 온도가 감소될 때마다 메탄올조로부터 샘플을 취하여 유동능을 검사하였다. 테스트 튜브 내 샘플이 유동성을 잃게되었을 때(메탄올조로부터 샘플을 취하였을 때) 샘플의 유동점을 측정하였다(온도로 측정함). 기록된 온도에 3.0℃를 더하여 샘플의 실제 유동점을 구하였다.

[0487] 본원에 기술된 방법에 따라서 유동점을 더욱 강하시키는 화학적 유동점 강하제를 첨가한 결과, 각각의 단계에서 생산된 오일의 특성은 더욱 개선되었다. 이 샘플에 사용된 유동점 강하제는 비스코플렉스® 10-310 및 1-133(이 유동점 강하제는 둘 다 에보닉에 의해 제조되는 것임)이었으나, 그 결과는, 임의의 표준 유동점 강하제를 사용하여 얻어지는 결과와 유사할 수 있었다. 결과를 이하 표 24와 도 3에 보였다.

표 24

[0488]

조류 오일에 대한 유동점 ⁽¹⁾ (℃) 강하제 및 분별의 효과					
샘플	첨가제 불포함	비스코플렉스 [®] 10-310 ⁽²⁾ (% w:w)		비스코플렉스 [®] 1-133 ⁽³⁾ (% w:w)	
		0	0.5	1	0.5
정제, 표백 및 탈취 오일	-8	-17	-20	-14	-16
올레인 #1 (제1 분별로부터 생성된 액체)	-11	-19	-20	-16	-17
슈퍼 올레인 #1 (올레인 분별 (제2 분별)로부터 생성된 액체)	-20	-26	NT	NT	NT
슈퍼 올레인 #2 (올레인 분별 (제2 분별)로부터 생성된 액체)	-14	-20	-23	NT	NT
슈퍼 올레인 #3 (올레인 분별 (제2 분별)로부터 생성된 액체)	-20	-23	-29	NT	NT
(1) 유동점 ASTM D97					
(2) 폴리(알킬) 아크릴레이트 및 평지씨 오일의 50:50 혼합물. 생체 분해 등급					
(3) 폴리(알킬)아크릴레이트 및 정제된 미네랄 오일의 혼합물.					
NT = 테스트 안함.					

[0489] 실시예 10: 조작된 미세 조류로부터 생산된 오일의 유동점 실시예 2의 방법에 따라서, 이하 표 25에 나열된 플라스미드 구조물들 중 하나를 사용하여 프로토테카 모리포르미스(UTEX 1435)를 형질 전환하였다.

표 25

[0490]

프로토테카 모리포르미스(UTEX 1435)를 형질 전환하는데 사용된 플라스미드 구조물	
플라스미드 구조물	서열 요소
1	6SA-CrbTub_yInv_nr::CrbTub_hpFADc_nr-6SB
2	6SA-bTub-yInv-nr-6SB
3	FADc5'_btub-yInv-nr::amt03-S106SAD-CtOTE-nr-FADc3'
4	SAD2B5'-CrbTub_yInv_ef1::amt03_CWTE2_nr-SAD2B3

[0491] 각각의 구조물들은, 씨.레이하르트티 β-튜불린 프로모터/5'트R 및 클로렐라 불가리스 질산염 환원 효소 3'트R

의 제어 하에 있는, 에스.세레비지아에 *suc2* 수크로스 인버타제 암호화 영역과 핵내 게놈으로의 통합에 사용되는 영역을 함유하였다. 이와 같은 에스.세레비지아에 *suc2* 발현 카세트를 서열 번호 78로서 나열하였으며, 이는 선택 마커로서 사용되었다. 핵내 게놈 통합에 사용되는 표적화 영역의 관련 서열을 이하에 보여주었다.

[0492]	<u>설 명</u>	<u>서열 번호</u>
[0493]	6S 게놈 표적화 서열의 5' 서열	서열 번호 100
[0494]	6S 게놈 표적화 서열의 3' 서열	서열 번호 101
[0495]	FADc 위치에 존재하는 게놈 통합용 5' 서열	서열 번호 102
[0496]	FADc 위치에 존재하는 게놈 통합용 3' 서열	서열 번호 103
[0497]	SAD2B 위치에 존재하는 게놈 통합용 5' 서열	서열 번호 36
[0498]	SAD2B 위치에 존재하는 게놈 통합용 3' 서열	서열 번호 37
[0499]	수크로스 선택가능한 마커 이외에, 4개의 구조물들 중 3개는 또한, 상이한 추가의 서열(단백질 또는 RNA 발현용 서열)을 함유하기도 하였다. 표 26은 제시된 구조물 내 DNA 서열에 의해 암호화되는 헤어핀 RNA 카세트 또는 중요 효소들을 제시하는 것이다. 단백질 암호화 영역은 모두 프로토타카 모리포르미스 UTEX 1435(표 2 참조) 핵내 유전자에 고유한 코돈 편향 사용을 반영하도록 최적화된 코돈이었다. 사용된 구조물에 대한 cDNA 서열과 아미노산 서열 둘 다를 서열 목록에 나열하였다.	

표 26

[0500]	프로토타카 모리포르미스(UTEX 1435)를 형질 전환하는데 사용된 헤어핀 RNA 발현 또는 티오에스테라제의 플라스미드 구조물		
	플라스미드 구조물	단백질 또는 헤어핀 RNA	서열 번호
	1	FADc 헤어핀	서열 번호 92
	3	칼타머스 텅크토리우스 ACP 티오에스테라제 (GenBank 수탁 번호 제AAA33019.1호)	서열 번호 104
	4	쿠페아 라이티 FatB2 티오에스테라제 (GenBank 수탁 번호 제U56104호)	서열 번호 105

[0501] 칼타머스 텅크토리우스 ACP 티오에스테라제(구조물 3 내 CtOTE) 및 쿠페아 라이티 FatB2 티오에스테라제(구조물 4 내 CwTE2) 암호화 영역은, 프로토타카 모리포르미스 Amt03 프로모터/5'UTR(서열 번호 84) 및 씨.불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR(서열 번호 85)의 제어 하에 두었다. 씨.텅크토리우스 ACP 티오에스테라제의 천연 운반 펩티드를, 클로렐라 프로토타코이데스 스테아로일-ACP 불포화 효소 운반 펩티드(서열 번호 86)와 치환하였다. 씨.텅크토리우스 ACP 티오에스테라제의 코돈 최적화된 cDNA 서열 및 아미노산 서열(운반 펩티드가 치환됨)을 서열 목록 중 각각 서열 번호 106 및 서열 번호 104로서 나열하였다. 쿠페아 라이티 FatB2 티오에스테라제의 코돈 최적화된 cDNA 서열 및 아미노산 서열을 서열 목록 중 각각 서열 번호 107 및 서열 번호 105로서 나열하였다. FADc 헤어핀 RNA를 함유하는 구조물 1은 실시예 4에 기술하였다. 각각의 구조물을 프로토타카 모리포르미스 유전적 배경에 도입하여 이 균주를 형질 전환하였다. 유일한 탄소 공급원으로서 수크로스를 함유하는 평판 상에서 양성 클론을 스크리닝하였다. 이 양성 클론의 하위 세트들을 선별한 다음, 이 클론을 지질 생산 조건 하에서 생장시켰다. 글루코스를 사용하여 야생형 UTEX 1435를 생장시켰는데, 이때, 다른 유전자 이식 계열도 모두 수크로스 중에서 배양하였다. 각각의 구조물에 대해서, 형질 전환체를 생장시켜 오일을 분리하였다. 분리된 오일을 지방산 프로필에 대해 분석하였으며, 유동점은 본원에 기술된 바와 같이 측정하였다. 유동점은 ASTM D97 표준 테스트 방법을 이용하여 측정하였다(유동점 평가). 유전자 이식 균주 오일의 지방산 프로필과 유동점은 이하 표 27에 보였다. 표 27은, 유전자 조작된 미세 조류에 의해 생산된 오일의 유동점을 성공적으로 변경하였을 때의 데이터를 제시하는 것이다. 구조물 3으로 형질 전환된 균주로부터 생산된 오일의 유동점은 -10.5°C에서 -19.5°C로 강하였다.

표 27

[0502]

상이한 구조물들을 함유하는 프로토타카 모리포르미스 세포의 유동점 온도와 지방산 프로필					
	야생형	구조물 1	구조물 2	구조물 3	구조물 4
C6:0	0	0	0	0	0
C8:0	0	0	0	0	0
C10:0	0	0	0.01	0.03	0.01
C12:0	0.03	0.02	0.03	0.11	0.03
C14:0	1.12	0.68	0.75	0.90	1.08
C16:0	14.02	15.55	13.26	7.75	26.09
C18:0	3.24	3.79	5.26	1.78	12.37
C18:1	67.76	76.84	71.75	86.40	53.42
C18:2	11.49	0.91	6.44	0.12	4.38
C18:3 a	0.62	0.09	0.07	0.02	0.2
유동점	-10.5℃	-7.6℃	-7.6℃	-19.5℃	10.4℃

[0503]

실시예 11: 지방산 프로필이 변경된 조작 미세 조류 전술한 바와 같이, 프로토타카 종 내 특이적 내인성 지질 경로 효소를 녹아웃 또는 녹다운하도록 이중 유전자를 통합시키면, 조작된 미생물의 지방산 프로필이 바뀔수 있었다. 내인성 지방 아실-ACP 티오에스테라제는 지질 합성시 아실기 운반 단백질로부터 지방산이 절단되는 것을 촉진하였으므로, 상기 티오에스테라제는 숙주 유기체의 지질 프로필을 확립함에 있어서 중요한 지질 경로 효소이다. 본 실시예에서는 숙주 세포의 지질 프로필이, 내인성 지방 아실-ACP 티오에스테라제 유전자인 FATA1을 녹아웃 또는 녹다운함으로써 영향을 받을 수 있는지 여부에 대해 평가하기 위해 플라스미드 구조물을 제조하였다.

[0504]

A. 내인성 프로토타카 모리포르미스 티오에스테라제 유전자를 녹아웃함으로써 지방산 프로필 변경

[0505]

전통적 방식으로 돌연 변이된 프로토타카 모리포르미스 UTEX 1435 파생 균주 S1920에, 실시예 2의 방법을 사용하여 표 28에 나열된 플라스미드 구조물들중 하나를 도입하여 이 균주를 형질 전환하였다. 각각의 구조물은, 씨.레인하르트티 β-튜불린 프로모터/5'UTR 및 클로렐라 불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR의 제어 하에 있는 에스.세레비지아에 *suc2* 수크로스 인버타제 암호화 영역과 내인성 FATA1 유전자를 중단하는, 핵내 게놈으로의 통합에 사용되는 영역을 함유하였다. 이와 같은 에스.세레비지아에 *suc2* 발현 카세트를 서열 번호 78로서 나열하였으며, 이는 선택 마커로서 사용되었다. 모든 단백질 암호화 영역은 프로토타카 모리포르미스 UTEX 1435(표 2 참조) 핵내 유전자에 고유한 코돈 편향 사용을 반영하도록 최적화된 코돈이었다. 핵내 게놈 통합에 사용되는 FATA1 유전자에 대한 영역을 표적화하는 것과 관련된 서열들을 이하에 보였다.

[0506]

설 명

서열 번호

[0507]

FATA1 위치로의 통합에 사용되는 5' 서열 서열 번호 108

[0508]

FATA1 위치로의 통합에 사용되는 3' 서열 서열 번호 109

표 28

[0509]

프로토타카 모리포르미스(UTEX 1435) S1920을 형질 전환하는데 사용된 플라스미드 구조물	
플라스미드 구조물	서열 요소
pSZ1883	FATA1-CrbTub_yInv_nr-FATA1
pSZ1925	FATA1-CrbTub_yInv_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1

[0510]

구조물 FATA1-CrbTub_yInv_nr-FATA1 내 관련 제한 위치들은 아래의 서열에서 굵은 글씨체의 소문자에 밑줄을 쳐서 표시하였는데, 이 제한 위치들로서는 5'→3' 방향으로 *BspQ* 1, *Kpn* I, *Asc* I, *Mfe* I, *Sac* I, *BspQ* I이 있다. *BspQ*I 위치는 형질 전환 DNA의 5' 및 3' 말단을 한정한다. 굵은 글씨체의 소문자로 표시한 서열은, 상동성 재조합을 통하여 FATA1 위치에서 표적화 통합이 일어나는 것을 허용하는 S1920 유래 게놈 DNA를 나타낸다. 5'→3' 방향으로 진행하였을 때, (S1920에 수크로스를 대사하는 능력을 부여하는) 효모 수크로스 인버타제 유전자를 발현시키는 씨.레인하르트티 β-튜불린 프로모터는 글자에 박스를 쳐서 표시하였다. 인버타제에 대한 개시 인자 ATG와 종결 인자 TGA는 굵은 이탤릭체의 대문자로 표시하였으며, 암호화 영역은 이탤릭체 소문자로 표시하였다. 클로렐라 불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR은 소문자에 밑줄을 쳐서 표시하였고, 그 다음에 존재하는 굵

은 글씨체의 소문자는 S190의 FATA1 게놈 영역을 표시하는 것이었다: gctcttcggagtcactgtgccactgagttcgactggtagctgaatggagtcgctgctccactaaacgaattgtcagcaccgccagccggccgaggacc
gagtcacatagcgagggtagtagcgcccatggcaccgaccagcctgcttgccagtagtgccgtctcttccgcttctctgtggtcctctgcgcgctccagcgcg
tgcgcttttccggtggatcatgcggtccgtggcgccaccgagcgccgctgcccacagcagcgccgctgcttccgaacagtgccggtcagggccgcacccgcg
gtagccgtccgtccggaacccgcccgaagagtttgggagcagcttgagccctgcaagatggcggaggacaagcgcatcttctggaggagcaccggtgcgtg
gaggtccggggctgaccggccgtcgattcaacgtaataatcgcatgatgatcagaggacacgaagtcttggtggcggtggccagaacactgtccattgc
aaggcatagggatgcgttccctcacctctcatttctcatttctgaatccctccctgctcactcttctcctcctccttcccgttcacgcagcattcgggggt
accctttcttgcgtatgacacttccagcaaaagtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacacgatgatgcttcgacccccgaag
ctccttcggggctgcatggcgctccgatgccgtccagggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaaagacattatagcgagctaccaaagc
catattcaaacacctagatcactaccactttacacaggccactcgagcttggatcgacactccgctaagggggcgctcttctccttctcggttcagtcacaa
cccgcaaacggcgcgccATGgacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagcaacgccggccccggagccggttcgccaccaacacc
acgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccaccagacgatctcc
aagtcggtgttcgaggaccttccctctggttcaaggccctggaggaccccgaggagtagctccgcatgggcttcgaggtgtccgctcctccttcttctg
gaccgcggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgagcgtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcc
tactacaaggtgtacggctgctggaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgagctcgtgtccaccaacacacttcatgaccaccgggaac
gccctgggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaagTGAcaattggcagcagcagctcgg
atagatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgcgccacacttgccttgacctggaatatccctgccgcttttatcaaacagctt
cagtggtgttctgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgcgtatttgcgaataccacccccagcatcccttccctcggttcatatcgc
ttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgccctcgacagccttgggttgggctccgctt
gtattctcctggtactgcaacctgtaaacacgacactgcaatgctgatgcacgggaagtgtgggatgggaacacaaatggaggatcgtagagctcactagta
tgcatttcgaagacaggggtggttgggtggatggggaacgctggtcgcggtatcgatcctgctgcttatatcctccctggaagcacaccacgactctgaa
gaagaaaacgtgcacacacacaacccaaccggccgaatatttgcttcccttatcccgggtccaagagagactgcgatgccccctcaatcagcatcctcctcc
ctgccgttcaatcttccctgcttgctgcgcccggtgcgccgttgcgccccagtcagtcactcctgcacaggcccttgtgcgcagtgtcctgtac
cctttaccgctccttccattctgcgagggccctatgaaatgtatcgttgctgttgcccaagcggtgctggcgcgcccgctcgggcagtgctcgg
cgactttggcggaagccgattgttcttctgaagccacgcgcttgcgttgggaagagaagggggggggtactgaatggatgaggaggagaaggagggt
attggtattatctgagttgggtgaagagc (서열 번호 111)

[0511] 쿠페아 라이티 ACP-티오에스테라제 2(CwFatB2) 유전자(수탁 번호 제U56104호)를, S1920의 FATA1 위치에 도입하
 기 위하여, 프로토테카 모리포르미스 Amt03 프로모터/5'UTR(서열 번호 84) 및 씨.불가리스 질산염 환원 효소 3
 'UTR(서열 번호 85)의 제어 하에 있는 CwFatB2 유전자의 단백질 암호화 영역을 발현하는 구조물을 제조하였다.
 S1920 내에서 발현된 구조물은 FATA1-CrbTub_yInv_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1이라 표시하였다.

[0512] 구조물 FATA1-CrbTub_yInv_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1 내 관련 제한 위치들은 하기 서열에 있어서 굵은 글씨체
 의 소문자에 밑줄을 쳐서 표시하였으며, 이 제한 위치들로서는 각각 5'→3' 방향으로 BspQ 1, Kpn I, Asc I,
 Mfe I, BamH I, EcoR I, Spe I, Asc I, Pac I, Sac I, BspQ I이 있다. BspQI 위치들은 형질 전환 DNA의 5' 및
 3' 말단을 한정하였다. 굵은 글씨체의 소문자로 표시한 서열은 상동성 재조합을 통하여 FATA1 위치에서의 표적화
 통합을 허용하는 S1920 유래 게놈 DNA를 나타낸다. 5'→3' 방향으로 진행하였을 때, (S1920에 수크로스를 대
 사하는 능력을 부여하는) 효모 수크로스 인버타제 유전자를 발현시키는 씨.레인하르트티 β-튜불린 프로모터는 문
 자에 박스를 쳐서 표시하였다. 인버타제에 대한 개시 인자 ATG와 종결 인자 TGA는 굵은 이탤릭체의 대문자로 표
 시하였으며, 암호화 영역은 이탤릭체 소문자로 표시하였다. 클로렐라 불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR은 소문
 자에 밑줄을 쳐서 표시하였고, 그 다음에 존재하는 프로토테카 모리포르미스의 내인성 amt03 프로모터는 이탤릭
 체 문자에 박스를 쳐서 표시하였다. 씨.라이티 ACP-티오에스테라제의 개시 인자 ATG 및 종결 인자 TGA 코돈은
 굵은 이탤릭체의 대문자로 표시하였으며, ACP-티오에스테라제 암호화 영역의 나머지 부분은 굵은 이탤릭체로 표
 시하였다. 씨.불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR은 또한 소문자에 밑줄을 쳐서 표시하였으며, 그 다음에 존재하
 는 S1920 FATA1 게놈 영역은 굵은 글씨체의 소문자로 표시하였다. 쿠페아 라이티 FatB2 티오에스테라제의 코돈
 회적화된 cDNA 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열 목록에서 서열 번호 107 및 서열 번호 105로 표시하였다.

[0513] gctcttcggagtcactgtgccactgagttcgactggtagctgaatggagtcgctgctccactaaacgaattgtcagcaccgccagccggccgaggacc
tcacatagcgagggtagtagcgcccatggcaccgaccagcctgcttgccagtagtgccgtctcttccgcttctctgtggtcctctgcgcgctccagcgctgc
gcttttccggtggatcatgcggtccgtggcgccaccgagcgccgctgcccacagcagcgccgctgcttccgaacagtgccggtcagggccgcacccgcggtg
gccgtccgtccggaacccgcccgaagagtttgggagcagcttgagccctgcaagatggcggaggacaagcgcatcttctggaggagcaccggtgcgtggag
gtccggggctgaccggccgtcgattcaacgtaataatcgcatgatgatcagaggacacgaagtcttggtggcggtggccagaacactgtccattgcaag
ggcatagggatgcgttccctcacctctcatttctcatttctgaatccctccctgctcactcttctcctcctccttcccgttcacgcagcattcgggggtacc

ctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggttagggcgggctgcgagacggcttccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctc
cttcggggctgcatggcgctccgatgccgtccagggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccat
attcaaacacctagatcactaccacttctacacagggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgctcttctctctgcttcagtcacaaccc
gcaaa**ggcgcgccATG**gacggagctgatcaacctgaagggcgagccgatcctgaacatcagcaacggccgccccctggagccggttcgccaccaacaccag
ttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccaccagacgatctcaa
tcctgttcgcggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgctcctccttcttctggac
cgcggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgatgagcgtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctac
tacaaggtgtacggcttgcctggaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacactacttcatgaccaccgggaacgcc
ctgggctcctgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagtccaggtgcgcgaggtcaag**TGA**caattggcagcagcagctcggata
gtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgcgccacacttgcctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcag
tgtgtttgatcttgtgtgtacgccttttgcgagttgctagctgcttgtgtctatttgcgaataccacccccagcatcccttccctcgtttcatatcgcttg
catccaacccgaacttatctacgtgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgccccctgcacagccttgggttgggctccgctgtat
ttctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggt**cc**cgctctcgaacagagcg
cgagaggaacgctgaaggtctgcctctgtcgacactcagcgcgccatataccacacaataaacacctgacgaatgcgcttgggttcttctgctccattagcgaag
cgtccggttcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatat**gaattc**gtt
ctgtcgacagagcgggccacagccggtcgagcc**actagtatggtggtggccgcccggccagcgccttcttccccgtgccgccccccgccccacc**
cccaagcccggcaagttcggcaactggcccagcagcctgagccagcccttcaagcccaagagcaaccccaacggccgcttcagggtgaaggccaacgtgagc
ccccacggcgccgccaacggccacacccgcgcatcagcaccTGAtttaattaa**ctcgaggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgc**
tggctgtgtgatggactgttgcgccacacttgcctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgtgtttgatcttgtgtgtac
gcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgtctatttgcgaataccacccccagcatcccttccctcgtttcatatcgcttgcatccaacccgaacttatct
acgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgccccctgcacagccttgggttgggctccgctgtatctcctggtactgcaacctg
taaacagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaagcttgagctcttggtttccagaaggagtgtgctccttgagcctt
tcattctcagcctcgataacctccaaagccgcttaattgtggagggggttcgaag**acaggggtggttggctggatggggaaacgctggtcgcgggat**tcgat
cctgtgcttatatcctccct**ggaagcacacccacgactctgaagaagaaaacgtgcacacacacaacccaacggccgaatat**tgtctccttatccggg
tccaagagagactgcgatccccctcaatcagcatcctcctcctgccgttcaatcttccctgcttgctgcgcccggtgcgctgtgccgcccag
tcagtactcctgcacagggcccttgtgcgcagtgtcctgtaccctttaccgctccttccattctgcgaggccccctattgaatgtattcgttgccgtgtgt
ggccaagcggggtgctggcgcgcccgctcgggcagtgctcggcgactttggcggaagccgattgttcttctgtaagccacgctgtgctgctttgggaag
agaagggggggggtactgaatggatgaggaggagaaggagggtattggtattatctgagttgggt**gaagagc** (서열 번호 112)

[0514]

FATA1-CrbTub_yInv_nr-FATA1을 S1920에 도입하여 이 균주를 형질 전환하고 나서, 1차 형질 전환체를 클론으로서 정제한 후 표준 지질 생산 조건(pH 5.0, 실시예 1에 기술된 조건과 유사한 조건) 하에서 생장시켰다. 표준 지방산 메틸 에스테르 기체 크로마토그래피 불꽃 이온화 검출법(FAME GC/FID)을 사용하여 지방산 프로필을 분석하였다. 이하 표 29는 몇몇 형질 전환체의 지방산 프로필을 제시하는 것이다.

표 29

[0515]

내인성 FATA1 대립유전자를 중단하는 선택가능한 마커를 함유하는, 프로토타가 모리포르미스 세포의 지방산 프로필					
형질 전환	% C14:0	% C16:0	% C18:0	% C18:1	% C18:2
야생형	1.23	25.68	2.83	60.54	7.52
pSZ1883	0.86	16.95	1.75	68.44	9.78
형질 전환체 1					
pSZ1883	0.85	17.33	1.71	68.57	9.31
형질 전환체 2					
pSZ1883	0.82	17.40	1.78	68.55	9.22
형질 전환체 3					
pSZ1883	0.84	17.43	1.78	68.25	9.53
형질 전환체 4					
pSZ1883	0.75	17.64	2.02	69.02	8.61
형질 전환체 5					

[0516]

상기 결과들은, 숙주의 내인성 FATA1 대립 유전자가 소모되면, 조작된 미세 조류의 지질 프로필이 변경된다는 것을 보여주는 것이다. 선택가능한 마커를 표적화하였을 때의 내인성 FATA1 대립 유전자에 대한 영향으로,

C16:0 지방산의 생산은 감소하였으며, C18:1 지방산의 생산은 증가하였음이 명확히 확인되었다. FATA1-CrbTub_yInv_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1를 S1920에 도입하여 이 균주를 형질 전환하고 나서, 1차 형질 전환체를 클론으로서 정제한 후 표준 지질 생산 조건(pH 7.0, 상이한 탄소 공급원이 총 농도 40g/L 가 되도록 제공됨) 하에서 생장시켰다. 수크로스 농도는 40g/L이었다. 오로지 글루코스만이 탄소 공급원으로 사용되었을 경우, 글루코스는 40g/L로 제공되었다. 글루코스와 프럭토스가 탄소 공급원으로 사용되었을 경우, 글루코스는 20g/L로 제공되었으며, 프럭토스도 20g/L로 제공되었다. GC-FID에 의해 지방산 프로필을 평가하였다. 얻어진 지방산 프로필을 이하 표 30에 제시하였다.

표 30

[0517]

내인성 FATA1 대립유전자를 중단하는 외인성 티오에스테라제와 선택가능한 마커를 함유하는 프로토타카 모리프르미스 세포의 지방산 프로필									
형질 전환체	복사체 수	탄소 공급원	% C10:0	% C12:0	% C14:0	% C16:0	% C18:0	% C18:1	% C18:2
야생형	0	글루코스	0.01	0.04	1.38	28.83	3.00	56.05	8.21
야생형	0	글루코스	0.01	0.04	1.50	29.38	3.00	55.29	8.23
야생형	0	글루코스/ 프럭토스	0.01	0.05	1.48	28.58	3.20	57.14	7.27
야생형	0	글루코스/ 프럭토스	0.01	0.04	1.54	29.05	3.23	56.47	7.32
pSZ1925 형질전환체 1	> 2	글루코스/ 프럭토스	4.29	19.98	9.17	20.68	3.47	34.38	6.37
pSZ1925 형질전환체 2	> 2	글루코스/ 프럭토스	3.11	16.17	9.91	15.97	1.57	45.72	5.81
pSZ1925 형질전환체 3	> 2	수크로스	4.84	24.22	11.56	19.48	2.67	29.56	6.02
pSZ1925 형질전환체 4	> 2	수크로스	3.24	16.67	10.39	16.34	1.43	44.41	6.00
pSZ1925 형질전환체 5	1-2	글루코스/ 프럭토스	0.18	1.64	1.85	14.43	2.12	70.30	7.63
pSZ1925 형질전환체 6	1-2	글루코스/ 프럭토스	0.18	1.56	1.74	13.56	2.25	71.04	7.72
pSZ1925 형질전환체 7	1-2	수크로스	0.19	1.69	1.89	13.79	3.15	69.97	7.68
pSZ1925 형질전환체 8	1-2	수크로스	0.15	1.26	1.49	13.44	2.73	71.46	7.77

[0518]

숙주 FATA1 대립 유전자에 선택가능한 마커만을 표적화하는 것과 아울러, 외인성 티오에스테라제와 함께 선택가능한 마커를 통합하였더니, 조작된 미세 조류의 지질 프로필이 바뀌었다. 전술한 바와 같이, FATA1 대립 유전자에 외인성 유전자를 표적화한 결과, C16:0 지방산 생산이 명확히 감소하였다. FATA1 위치에서 CwTE2 티오에스테라제를 추가로 발현하면 또한, 분석된 형질 전환체 내에서 나타나는 외인성 티오에스테라제 활성의 수준에 의존적으로 중간쇄 지방산과 C18:1 지방산 생산에 영향을 미쳤다. 구조물 내 반복 단위, 예를 들어 씨.불가리스 질산염 환원 효소

[0519]

3'UTR에 의해 경계가 한정되는 유전자, 예를 들어 FATA1-CrbTub_yInv_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1는 숙주 게놈에 통합될 때 증폭될 수 있다. 표적 통합 위치에서 증폭된 이식 유전자의 복사체 수와 티오에스테르 수준은 서로 조화가 매우 잘 되었다(이는 지방산 프로필에 대한 영향력이나 재조합 단백질 축적 여부(웨스턴 블롯팅에 의해

평가됨)에 의해 규명됨).

[0520] *CwTE2* 유전자를 증폭시킨 유전자 이식 계열에서는 중간쇄(C10:0 내지 C14:0) 지방산이 눈에 띄게 증가하였고, 이와 아울러 C18:1 지방산은 감소하였다. 이와는 대조적으로, *CwTE2*가 약간 증폭되었거나 아예 증폭되지 않은 (예를 들어 복사체가 1개 내지 2개인 경우의) 형질 전환체들은 외인성 티오에스테라제를 더욱 낮은 수준으로 발현하였으며, 그 결과, 중간쇄 지방산은 약간 증가하였고, C18:1 지방산의 증가에는 더욱 큰 영향을 미쳤다.

[0521] 종합하여 보면, 상기 데이터는 숙주의 내인성 FATA1 대립 유전자가 소모되면 조작된 미세 조류의 지질 프로필이 바뀐다는 것을 보여준다.

[0522] B. 내인성 프로토테카 모리포르미스 티오에스테라제 유전자의 녹다운에 의한 지질 프로필의 변경

[0523] 헤어핀 RNA에 의해 프로토테카 모리포르미스 FATA1 유전자 발현을 하향 조절하는 구조물(pSZ1773)을, 프로토테카 모리포르미스 UTEX 1435 S1920 유전적 배경에 도입하였다. 사카로마이세스 세레비지아에 *suc2* 수크로스 인버타제 유전자를, 유일한 탄소 공급원으로서 수크로스를 바탕으로 성장할 수 있는 능력을 부여하는 선택가능한 마커로서 이용하였다. 헤어핀 RNA를 암호화하는 구조물의 일부는 FatA1 암호화 영역의 제1 엑손 → 내인성 인트론 → 제1 엑손의 역 반복 단위를 이용하였다. 6S 게놈 영역에 대한 5' 및 3' 상동성 재조합 표적화 서열(구조물에 축적)(각각 서열 번호 100 및 101로 나열됨)을 헤어핀 구조물의 핵 내 게놈으로의 통합을 위해 포함시켰다. 이 구조물을 6S::β-Tub:suc2:nr::β-tub:hairpinFatA:nr::6S로 명명하였다.

[0524] 6S::β-Tub:suc2:nr::β-tub:hairpin FatA:nr::6S 내 관련 제한 위치들은 이하 서열에 굵은 글씨체의 소문자에 밑줄을 쳐서 표시하였으며, 이 제한 위치로서는 5' → 3' 방향으로 *BspQ* I, *Kpn* I, *Mfe* I, *BamH* I, *EcoR* I, *Spe* I, *Xho* I, *Sac* I, *BspQ* I이 있다. *BspQ* I 위치는 형질 전환 DNA의 5' 및 3' 말단을 한정한다. 굵은 글씨체의 소문자로 표시한 서열은 상동성 재조합을 통하여 6S 위치에서의 표적화 통합을 허용하는 S1920 유래 게놈 DNA를 나타낸다. 5' → 3' 방향으로 진행되는, 효모 수크로스 인버타제 유전자(S1920이 수크로스를 대사할 수 있는 능력 부여)를 발현시키는 씨.레인하르트티 β-튜불린 프로모터는 글자에 박스를 쳐서 표시하였다. 인버타제에 대한 개시 인자 ATG 및 종결 인자 TGA는 굵은 이탤릭체의 대문자로 표시하였으며, 암호화 영역은 이탤릭체의 소문자로 표시하였다. 클로렐라 불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR은 소문자에 밑줄을 쳐서 표시하였으며, 그 다음에 존재하는 제2 씨.레인하르트티 β-튜불린 프로모터(헤어핀 FatA1을 발현시킴)는 이탤릭체에 박스를 쳐서 표시하였다. FatA1의 개시 인자 ATG 코돈은 굵은 이탤릭체의 대문자로 표시하였으며, FatA1 암호화 영역의 제1 엑손의 나머지 부분은 대문자로 표시하였다. FatA 유전자의 인트론은 대문자에 밑줄을 쳐서 표시하였으며, 굵은 이탤릭체 대문자에 밑줄을 쳐서 표시한 링커 영역을 FatA1 인트론/역행 제1 엑손 접합부에 삽입하여, 이 벡터 내에서의 RNA 스플라이싱을 보조하도록 만들었다. FatA1의 역행 제1 엑손은 대문자로 표시하였다. 씨.불가리스 질산염 환원 효소 3'UTR도 역시 소문자에 밑줄을 쳐서 표시하였으며, 그 다음에 존재하는 S1920의 6S 게놈 영역은 굵은 글씨체의 소문자로 표시하였다. 이 RNAi 구조물의 FATA 부분들의 서열을 서열 번호 110으로서 나열하였다.

[0525] gctcttcgcccgcgccactcctgctcgagcgcgcccgcgctgcgccgcagcgcccttggccttttcgcccgcgctcgtgcgcgtcgctgatgtccatcacca
ggatccatgaggtctgccttgcgccggctgagccactgcttcgtccggcgccgaagaggagcatgagggaggactcctggatccagggtcctgacgtggcg
ggctctgggagcgggcccagcatcatctggctctgccgcaccgagggcgccctccaactggctcctccagcagccgcagtcgccgcccagccctggcagaggaaga
caggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagtcaggttttacctggatgacggcctcgcaacagctg
tccagcgaccctcgctgccgcccgttctcccgcacgcttctttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccgatctga
ggacagtcgggggaactctgatcagcttaaaccccttgcgcgttagtgttgcacatcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgtgcgccacccccaca
ccacctcctcccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcgccctcgccctgcagagaggacagcagtcgccagccgctgggggttggcggtgca
cgctcaggtaccctttcttgcgctatgacacttcagcaaaaaggtaggcgccggtgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaaacccgatgatgtctgcac
ccccgaagctccttcggggctgcatggcgctccgatgccgtccaggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagc
taccaaaagccatattcaaacactagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgactccgctaaggggcgcccttctcctcttctgttt
cagtcacaaccgcgaactcttagaataatcaATGgacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagcaacgccggccctggagccggtt
cgccaccaacaccagcttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacagcaccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccac
ccagacgatctccaagtcggttgcgggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgatgggcttcgaggtgtccgctc
ctccttcttctggaccgcgggaacagcaaggtgaagtctgtgaaggagaaccctacttcaccaaccgcatgagcgtgaacaaccagcccttcaagagcga
gaacgacctgtcctactacaaggtgtacggctgtgtggaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgagcgtcgtgtccaccaacacctacttcat
gaccaccgggaacgcccctgggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaagTGAcaattggc
agcagcagctcggtatgtagacacactctggacgctggctgtgatggactgttgcgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttt

tatcaaacagcctcagtggtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccttccct
cgtttcataatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgccctcgacagccttggg
ttgggctccgctgtatttctcctggtactgcaacctgtaaacagcactgcaatgctgatgcacgggaagtgtgggatgggaacacaaatggaggatcccg
cgtctcgaacagagcgcgagaggaacgctgaaggtctcgctctgtcgacacctcagcgcgcatacaccacaataaacacctgacgaatcgcttgtgttct
tcgtccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagg
gatatcgaattcctttcttgcgctatgacacttcagcaaaaggtaggcgggctgcgagacggcttccggcgctgcatgcaaacaccgatgatgttcgac
ccccgaagctccttcggggctgcatggcgctccgatgccgtccaggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagc
taccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgcccttctccttctggtt
cagtcacaacccgcaaacactagtATGGACCGACCAGCCTGCTTGCCAGTACTGGCGTCTCTTCCGCTTCTCTGTGGTCCTCTGCGCGCTCCAGCGGTGC
GCTTTTCCGTTGGATCATGCGGTCCGTGGCGCACCGCAGCGGCCGTGCCATGACAGCGCGCTGCTTCCGAACAGTGGCGGTGAGGCGCCACCCGCGGTA
GCCGTCCGTCCGGAACCCGCCAAGAGTTTTGGGAGCAGCTTAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGACAAGCGCATCTTCTGGAGGAGCACCAGGTGCGTGGAG
GTCCGGGGCTGACCGGCCGTGCGATTCAACGTAATCAATCGCATGATGATCAGAGGACACGAAGTCTTGGTGGCGGTGGCCAGAAACACTGTCCATTGCAAG
GGCATAGGGATGCGTTCCTTCACCTCTCATTCTCATTTCTGAATCCCTCCCTGCTCACTCTTTCTCCTCCTCTCCCGTTCACGCGCATTTCGGGGCAAC
GAGGTGGGCGCTGCTCTCCAGGAAGATGCGCTTGTCTCCGCCATCTTGACGGGCTCAAGCTGCTCCCAAACTCTTGGGCGGGTTCGGACGAGCGCT
ACCGCGGTGCGGCCCTGACCGCCACTGTTCCGAAGCAGCGCGCTGCATGGGCAGCGCGCTGCGGTGCGCCACGACCGCATGATCCACGGAAAAAGCG
CACGCGTGGAGCGCGCAGAGGACCACAGAGAAGCGGAAGAGACGCCAGTACTGGCAAGCAGGCTGGTGGTGCATatcgatagatctcttaaggcagcag
cagctcggatagatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgcgcccacttgcctgccttgacctggaatatccctgccgcttttatca
aacagcctcagtggtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccttccctcgttt
catatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgccctcgacagccttgggttggg
ctccgctgtatttctcctggtactgcaacctgtaaacagcactgcaatgctgatgcacgggaagtgtgggatgggaacacaaatggaaagcttaattaaag
agctcttgttttccagaaggagtgtccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggagggggttcgaattttaaagc
ttggaatgttgggtcgtgctgtggaacaagcccagacttgttgcctcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaacttgccgctcaaaccgctacctct
gctttcgcgcaatctgccctgttgaaatcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagctgtgaattgcctcagaatgtggaatcatctgccctgtg
cgagcccatgccaggcatgtcgggcgaggacaccgcccactcgtacagcagaccattatgctacctacaatagttcataacagtaccatatttctcga
agctcccaacgagcacctccatgctctgagtggccacccccggccctggtgcttgcggaggcgaggtcaaccggcatggggctaccgaatccccgaccg
gatccaccaccccccgatgggaagaatctctccccgggatgtggccaccaccagcacaacctgctggcccaggcgagcgtcaaacattaccacacaaa
tatccttggcatcgccctgaattccttctgccgctctgctaccgggtgcttctgtcgaagcagggttgcctagggatcgctccgagtcgcaaaccttgc
tcgctggcggggcttgttcgagcttgaagagc (서열 번호 113)

[0526] 6S::β-Tub:suc2:nr::β-tub:hairpin FataA:nr::6S를 발현하였을 경우, 헤어핀 RNA가 형성되어 표적 FatA 유전자가 침묵되었다. S1920에 형질 전환하여 1차 형질 전환체를 클론으로서 정제한 다음, 표준적 지질 생산 조건 (pH 5.0) 하에서 상기 클론을 생장시켰다. 각각의 형질 전환체 클론으로부터 얻어진 프로필을 표 31에 제시하였다.

표 31

[0527]

FATA의 발현을 하향 조절하는 헤어핀 RNA 구조물을 함유하는 프로토포테카 모리포르미스 세포의 지방산 프로필								
형질 전환체	% C10:0	% C12:0	% C14:0	% C16:0	% C16:1	% C18:0	% C18:1	% C18:2
야생형	0.01	0.03	1.23	25.68	0.96	2.83	60.54	7.52
pSZ1773 형질 전환체 1	0.01	0.03	0.71	15.10	1.05	1.67	72.08	8.27
pSZ1773 형질 전환체 2	0.01	0.03	0.81	15.66	1.16	1.56	70.03	9.61
pSZ1773 형질 전환체 3	0.01	0.03	1.09	22.67	1.05	2.12	63.18	8.66
pSZ1773 형질 전환체 4	0.01	0.04	1.14	23.31	1.01	2.23	62.83	8.26

[0528] 상기 결과들은, FATA 헤어핀 구조물이 예상 표현형을 나타낸다는 것을 보여주는 것인데: 이 경우, C16 지방산

수준은 야생형(비 형질 전환 대조군)의 C16 지방산 수준보다 감소하였고, C18:1 지방산 수준은 야생형(비 형질 전환 대조군)의 C18:1 지방산 수준보다 증가하였다. 본 발명은 이의 특정 구체예와 관련하여 기술되었지만, 추가의 변형이 가능함이 이해될 것이다. 본원은 일반적으로 본 발명의 원리에 따르고 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지되거나 통상적인 실시 범위 내에 있고 이전에 제시된 필수적 특징에 적용될 수 있는 바와 같이, 본 개시 내용을 벗어나는 것을 포함하는 본 발명의 임의의 변형, 용도 또는 적용을 포함하는 것으로 의도된다.

[0529] 본원에 인용된 모든 참고 문헌, 예를 들어 특허, 특허 출원 및 공보, 예를 들어 GenBank 수탁 번호는, 사전에 구체적으로 인용되었거나 인용되지 않았거나, 본원에 전체가 참조로 포함되어 있는 것이다. 본원에 인용된 공보는, 본 발명과 연관되어 사용될 수 있는 시약, 방법 및 개념을 기술 및 개시하고자 하는 목적으로 인용되었다. 본원에 개시된 것들 중 그 어떤 것도, 본원에 인용된 참고 문헌들이 본원에 기술된 본 발명과 관련하여 선행 기술에 해당함을 인정하는 것으로서 해석되지 않는다. 특히 다음과 같은 특허 출원은 모든 목적을 위하여 전체가 본원에 참조로 포함되어 있다: PCT 특허 출원 PCT/US2009/066142(2009년 11월 30일 출원; 발명의 명칭: “Production of Tailored Oils in Heterotrophic Microorganisms”); PCT 특허 출원 PCT/US2009/066141(2009년 11월 30일 출원; 발명의 명칭: “Production of Tailored Oils in Heterotrophic Microorganisms”); 및 PCT 특허 출원 PCT/US2010/31108(2010년 4월 14일 출원; 발명의 명칭 “Methods of Microbial Oil Extraction and Separation.”)

[0531] 서열 목록

[0532] 서열 번호 1: 클로렐라 유래 HUP 프로모터(GenBank 수탁 번호 제X55349호의 부분 서열)

```
gatcagacgggctgacctgcgagataatcaagtctctgtaggcaaccaactcagcagctgctgtgttgggtctgcaggatagt
gttgaggggcccaaggacagcagggggaacttacactgtccccgacccagttttatggagtgcattgcccagagcctagccg
gagcgttaggctacatacttgcgcacccggtatgaggggatatagtactgcactgcgctgtctagtgcagatgggcagtgctccc
ataaacaactgctgctcagccattgttggcggaacattctggggggggccagcaatgcctgacttctgggtagggtgaaactgaa
caagactacaaaacagaattctctctcttggagggtgaagcgcaggccggccgcctgcgcccacatggcgctccgaacacctc
catagctgtaaggcgcaaacatggccggactgtgtgcagcacttctatggccatacaaggatgctgcagattagtgtctgagtaa
gacacatcacccatgttcgattgaagccgtgacttcatgccaaactgcctctgggcgttagcagacgfatgccatcatgaccactag
ccgacatgcgctgtcttttggccacaaaacaactgtgtacacgctcgaagtcgtgcgcacacctccgggagtgagtcggcgact
ctccccggcgggcgccggccctacctgggtgaggtgcctacgcccacgacaaacgacgcagggagggtgattggggtagg
gaatcccaaccagcctaacaagaaggcacctataataatggggggggactaacagccctataatgcagactttgggtgctatc
ttgagaagcagcaggtggagtggtgtgtacggtcgaacctaaagtggtgtgcccgcagcctgaaacaaagcgtcagcagctgct
tctataatgtgtcagccgtgtgtttcagttatattgtatgctattgtttgtctgtctagggtggcgaggccacactactgtggcgggcc
attgtgtgtgctgaattgcccacatctaaggctgaacgctcactcaaacgccttgtacaactgcagaacttctgtgctgtgca
actacagtggtgcaaacagcacaatagcactcccttaccatccaccagcagtaaca
```

[0534] 서열 번호 2: AY307383 유래 클로렐라 엘립소이테아 질산염 환원 효소 프로모터

```
cgctgcgaccaggggccgacgctcgtgatgtcgtccaaatgcgggtcccccgaattttgttctcatcttccacctgtgggcct
tcttggccagggecttcagctgcacgacagaccgttgagctcctgaicagcatcctcaggaggccctttgacaagcaagccctt
gtgcaagcccatcaggggtaccagtggtgctgaggttagatgggttgaagaggattgctcggtcgattgctgctcatggaattggc
atgtgcatgcatgttcacataatgccaccaggcttggagcaagagagcatgaatgcttcaggcaggtgaaagtctctgggggtg
aagaggcagggccgaggattggaggaggaagcatcaagtcgtcgtcatgtttcagtcagagtttgcgaagctcacag
gagcagagacaagactggctgctcaggtgttgcacgtgtgtgtgtgggggggggggggttaatacgggtacgaatgcacttgg
aattccacctcatgccagggaccacatgctgaattcaggccgtgtgggtgagaaatgctcactcgtccctcgttctgaggtgta
ctcagggccgtgagctcaaatgcatgcccgtgctgtctatcaggccctgcaccttgggtgagccgtcagcctccttgcgggg
catggagtagggccggcagcgttcatgtccggggccaggcagcgggtgtgccataaatgctggtgatggtggggaggggggg
ccgtcggcacaccattgcccgtgtgtgctgacgcatgcatgtggcctgggtggcaccggcagcactgtgtctcagccagccag
caagtggctgttcaggaaagcgccatgttgtgtgcccgtgcgcatgtaattcccagatcaaggagggaacagcttggattgatg
tagtcccaccggactgaatgtgcgagtgccaggtccctttagtctccgaattactagcagggcactgtgacctaacgcagcatg
ccaaccgcaaaaaafgattgacagaaaatgaagcgggtgtgtcaatattgtgtatttattcgtttaacagcaaccaggttcgaaac
gcaactatcgtggtgatcaagtgaacctatcagacttacctgtcggcaaggaaacggaggcaccacaaattccattgatattatcg
ctgccaagctagagctgatcttgggaaacacactgcccagacagtgagctgtgatggagtgcgccgagtggtgagcccttctgat
tcggttagtcattactaactgaacccctcagtgaaaggaccatcagaccagaaagaccagatctctctctgacaccgagagagtg
tgcggcagtaggacgacaag
```

[0535]

[0536] 서열 번호 3: 효모 수크로스 인버타제

MTNETSDRPLVHFTPNKJWMNDPNGLWYDEKDAKWHL YFQYNPNDTVWGTPLF
WGHATSDDL TNWEDQPIAIAPKRND SGAFSGSMVVDYNNTSGFFNDTIDPRQRCV
AIWTYNTPESEEQYISYSLDGGYTFT EYQKNPVLAANSTQFRDPKVFVWYEPSQKWI
MTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGLGYQYECPLIEVPTEQDPSKSY

[0537]

WVMFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQSRVVDFGKDYYALQTFNTD
PTYGSALGIAWASNWEYSASFVPTNPWRSSMSLV RKFSLNTEYQANPETELINLKAE
PILNISNAGPWSRFATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFA
DLSLWFKGLEDP EYL RMGF EVSASSFFLDRGNSKV KFKVKNPYFTNRM SVNNQPF
KSENDLSYYKVYGLLDQNI LELYFNDGDV VSTNTYFMTTGNALGSVNM TTVGVDNL
FYIDKFQVREVK

[0538]

[0539] 서열 번호 4: 효모 분비 시그널

MLLQAFLFLLAGFAAKISAS

[0540]

[0541] 서열 번호 5: 고등 식물 분비 시그널

MANKSLLLLLLGLSLASG

[0542]

[0543] 서열 번호 6: 공통 진핵 생물 분비 시그널

MARLPLAALG

[0544]

[0545] 서열 번호 7: 고등 식물/진핵 생물 분비 시그널의 조합

MANKLLLLLLLLLPLAASG

[0546]

[0547] 서열 번호 8: 에스.세레비지아에 수크로스 인버타제 NP_012104

GAATTC C C C C A A C A T G G T G G A G C A C G A C A C T C T C G T C T A C T C C A A G A A T A T C A A A
G A T A C A G T C T C A G A A G A C C A A A G G G C T A T T G A G A C T T T T C A A C A A A G G G T A A T
A T C G G G A A A C C T C C T C G G A T T C C A T T G C C C A G C T A T C T G T C A C T T C A T C A A A A G
G A C A G T A G A A A A G G A A G G T G G C A C C T A C A A A T G C C A T C A T T G C G A T A A A G G A A
A G G C T A T C G T T C A A G A T G C C T C T G C C G A C A G T G G T C C C A A A G A T G G A C C C C C A C
C C A C G A G G A G C A T C G T G G A A A A A G A A G A C G T T C C A A C C A C G T C T T C A A A G C A A
G T G G A T T G A T G T G A A C A T G G T G G A G C A C G A C A C T C T C G T C T A C T C C A A G A A T A T
C A A A G A T A C A G T C T C A G A A G A C C A A A G G G C T A T T G A G A C T T T T C A A C A A A G G G
T A A T A T C G G G A A A C C T C C T C G G A T T C C A T T G C C C A G C T A T C T G T C A C T T C A T C A A
A A G G A C A G T A G A A A A G G A A G G T G G C A C C T A C A A A T G C C A T C A T T G C G A T A A A G
G A A A G G C T A T C G T T C A A G A T G C C T C T G C C G A C A G T G G T C C C A A A G A T G G A C C C C
C A C C C A C G A G G A G C A T C G T G G A A A A A G A A G A C G T T C C A A C C A C G T C T T C A A A G
C A A G T G G A T T G A T G T G A T A T C T C C A C T G A C G T A A G G G A T G A C G C A C A A T C C C A C
T A T C C T T C G C A A G A C C C T T C C T C T A T A T A A G G A A G T T C A T T T C A T T T G G A G A G G
A C A C G C T G A A A T C A C C A G T C T C T C T A C A A A T C T A T C T C T G G C G C G C C A T A T C
A A T G C T T C T T C A G G C T T T C T T T T C T T C T T G C T G G T T T T G C T G C C A A G A T C A G C G
C C T C T A T G A C G A A C G A A A C C T C G G A T A G A C C A C T T G T G C A C T T T A C A C C A A A C A
A G G G C T G G A T G A A T G A C C C C A A T G G A C T G T G G T A C G A C G A A A A A G A T G C C A A G
T G G C A T C T G T A C T T T C A A T A C A A C C C G A A C G A T A C T G T C T G G G G G A C G C C A T T G
T T T T G G G G C C A C G C C A C G T C C G A C G A C C T G A C C A A T T G G G A G G A C C A A C C A A T

[0548]

AGCTATCGCTCCGAAGAGGAACGACTCCGGAGCATTCTCGGGTTCCATGGTGGT
TGACTACAACAATACTTCCGGCTTTTCAACGATACCATGACCCGAGACAACG
CTGCGTGGCCATATGGACTTACAACACACCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTC
GTATAGCCTGGACGGTGGATACACTTTTACAGAGTATCAGAAGAACCCTGTGCT
TGCTGCAAATTCGACTCAGTTCGAGATCCGAAGGTCTTTTGGTACGAGCCCTC
GCAGAAAGTGGATCATGACAGCGGCAAAGTCACAGGACTACAAGATCGAAATTT
ACTCGTCTGACGACCTTAAATCCTGGAAGCTCGAATCCGCGTTCGCAAACGAGG
GCTTTCTCGGCTACCAATACGAATGCCAGGCCTGATAGAGGTCCCAACAGAGC
AAGATCCCAGCAAGTCTACTGGGTGATGTTTATTTCCA'TTAATCCAGGAGCAC
CGGCAGGAGGTTCTTTTAATCAGTACTTCGTGCGGAAGCTTTAACGGAACTCATT
TCGAGGCATTTGATAACCAATCAAGAGTAGTTGATTTTGAAAAGGACTACTATG
CCCTGCAGACTTTCTTCAATACTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGCATTG
CGTGGGCTTCTAACTGGGAGTATTCGCGATTTCGTTCTTACAAACCCTTGGAGGT
CCTCCATGTCGCTCGTGAGGAAATTCTCTCTCAACACTGAGTACCAGGCCAACCC
CGGAAACCGAACTCATAAACCTGAAAGCCGAACCGATCCTGAACATTAGCAAC
GCTGGCCCTGGAGCCGGTTTGCAACCAACACCACGTTGACGAAAGCCAAACAG
CTACAACGTCGATCTTTCGAATAGCACCGGTACACTTGAATTTGAACTGGTGTA
TGCCGTCAATACCACCCAAACGATCTCGAAGTCGGTGTTGCGGACCTCTCCCT
CTGGTTTAAAGGCCCTGGAAGACCCCGAGGAGTACCTCAGAATGGGTTTCGAGG
TTTCTGCGTCTCTCTTCTTCTGATCGCGGGAACAGCAAAGTAAAATTTGTTAA
GGAGAACCCATATTTTACCAACAGGATGAGCGTTAACAACCAACCATTCAAGA
GCGAAAACGACCTGTCGTACTACAAAGTGTATGGTTTGCTTGATCAAAATATCC
TGGAACCTACTTCAACGATGGTGATGTCGTGTCCACCAACACATACTTCATGA
CAACCGGGAACGCACTGGGCTCCGTGAACATGACGACGGGTGTGGATAACCTG
TTCTACATCGACAAATTCAGGTGAGGGAAGTCAAGTGAGATCTGTGATCGAC
AAGCTCGAGTTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAGGGAATTAG
GGTTCCTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCCTAGTATGT
ATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAAA
TCCAGTACTAAAATCCAGATCCCCCGAATTAA

[0549]

[0550]

서열 번호 9:

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAC

[0551]

[0552]

서열 번호 10:

CAGTGAGCTATTACGCACTC

[0553]

[0554]

서열 번호 11: UTEX329 프로토텐카 크루가니

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAAGAGTGGCATGGTTAAAGAAAATAC
TCTGGAGCCATAGCGAAAGCAAGTTTAGTAAGCTTAGGTCATTCTTTTAGACC
CGAAACCGAGTGATCTACCCATGATCAGGGTGAAGTGTTAGTAAAATAACATG
GAGGCCCCGAACCGACTAATGTTGAAAAATTAGCGGATGAATTGTGGGTAGGGG
CGAAAAACCAATCGAACTCGGAGTTAGCTGGTTCTCCCGAAATGCGTTTAGGC
GCAGCAGTAGCAGTACAAATAGAGGGGTAAAGCACTGTTCTTTTGTGGGCTTC
GAAAGTTGTACCTCAAAGTGGCAAACCTCTGAATACTCTATTTAGATATCTACTA

[0555]

GTGAGACCTTGGGGGATAAGCTCCTTGGTCAAAAAGGGAAACAGCCCAGATCAC
CAGTTAAGGCCCCAAAATGAAAATGATAGTGAAGGATGTGGGTATGTCAA
AACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAGCAGCAATCCTTTCAAGAGTGCCTAATAGC
TCACTG

[0556]

[0557] 서열 번호 12: UTEX 1440 프로토테카 워커해미

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAAAAATAAATGGCAGGCTAAGAGATTTAAT
AACTCGAAACCTAAGCGAAAGCAAGTCTTAATAGGGCGTCAATTTAACAAAAC
TTTAAATAAAATATAAAGTCATTTATTTTAGACCCGAACCTGAGTGATCTAACC
ATGGTCAGGATGAAACTTGGGTGACACCAAGTGGAAGTCCGAACCGACCGATG
TTGAAAAATCGGCGGATGAACTGTGGTTAGTGGTGAAATACCAGTCGAACTCA
GAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAATATATCTCGTCTA
TCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTATGAAAATGGTACCAAATCGTG
GCAAACCTCTGAATACTAGAAATGACGATATATTAGTGAGACTATGGGGGATAA
GCTCCATAGTCGAGAGGGGAAACAGCCCAGACCACCAGTTAAGGCCCCAAAATG
ATAATGAAGTGGTAAAGGAGGTGAAAATGCAAATACAACCAGGAGGTTGGCTT
AGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

[0558]

[0559] 서열 번호 13: UTEX 1442 프로토테카 스태그노라

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAAAATGGCATGGTTAAAGATATTTCT
TCTGAAGCCATAGCGAAAGCAAGTTTACAAAGCTATAGTCATTTTTTTTAGACC
CGAAACCGAGTGATCTACCCATGATCAGGGTGAAAGTGTGGTCAAATAACATG
GAGGCCCGAACCGACTAATGGTGAAAAATTAGCGGATGAATTGTGGGTAGGGG
CGAAAAACCAATCGAACTCGGAGTTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGC
GCAGCAGTAGCAACACAAATAGAGGGGTAAAGCACTGTTCTTTTGTGGGCTTC
GAAAGTTGTACCTCAAAGTGGCAAACCTCTGAATACTCTATTTAGATATCTACTA
GTGAGACCTTGGGGGATAAGCTCCTTGGTCAAAAAGGGAAACAGCCCAGATCAC
CAGTTAAGGCCCCAAAATGAAAATGATAGTGACTAAGGACGTGAGTATGTCAA
AACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAGCAGCAATCCTTTCAAGAGTGCGTAATAGC
TCACTG

[0560]

[0561] 서열 번호 14: UTEX 288 프로토테카 모리포르미스

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAAGAGTGGCATGGTTAAAGATAATTC
TCTGGAGCCATAGCGAAAGCAAGTTTAAACAAGCTAAAGTCACCCTTTTTAGACC
CGAAACCGAGTGATCTACCCATGATCAGGGTGAAAGTGTGGTAAAATAACATG
GAGGCCCGAACCGACTAATGGTGAAAAATTAGCGGATGAATTGTGGGTAGGGG
CGAAAAACCAATCGAACTCGGAGTTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGC
GCAGCAGTAGCAACACAAATAGAGGGGTAAAGCACTGTTCTTTTGTGGGCTTC
GAAAGTTGTACCTCAAAGTGGCAAACCTCTGAATACTCTATTTAGATATCTACTA
GTGAGACCTTGGGGGATAAGCTCCTTGGTCAAAAAGGGAAACAGCCCAGATCAC
CAGTTAAGGCCCCAAAATGAAAATGATAGTGACTAAGGATGTGGGTATGTAA

[0562]

AACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAGCAGCAATCCTTTCAAGAGTGCGTAATAGC
TCACTG

[0563]

[0564] 서열 번호 15: UTEX 1439, UTEX 1441, UTEX 1435, UTEX 1437 프로토테카 모리포르미스

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAAAAATAAATGGCAGGCTAAGAGAATTAAT
AACTCGAAACCTAAGCGAAAGCAAGTCTTAATAGGGCGCTAATTTAACAAAAC
ATTAAATAAAATCTAAAGTCATTTATTTTAGACCCGAACCTGAGTGATCTAACC
ATGGTCAGGATGAAACTTGGGTGACACCAAGTGGAAGTCCGAACCGACCGATG
TTGAAAAATCGGCGGATGAACTGTGGTTAGTGGTGAAATACCAGTCGAACTCA
GAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAATATATCTCGTCTA
TCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTATGAAAATGGTACCAAATCGTG
GCAAACCTCTGAATACTAGAAATGACGATATATTAGTGAGACTATGGGGGATAA
GCTCCATAGTCGAGAGGGGAAACAGCCCAGACCACCAGTTAAGGCCCCAAAATG
ATAATGAAGTGGTAAAGGAGGTGAAAATGCAAATACAACCAGGAGGTTGGCTT
AGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

[0565]

[0566] 서열 번호 16: UTEX 1533 프로토테카 워커해미

TGTTGAAGAATGAGCCGTCGACTTAAAAATAAATGGCAGGCTAAGAGAATTAAT
AACTCGAAACCTAAGCGAAAGCAAGTCTTAATAGGGCGCTAATTTAACAAAAC
ATTAAATAAAATCTAAAGTCATTTATTTTAGACCCGAACCTGAGTGATCTAACC
ATGGTCAGGATGAAACTTGGGTGACACCAAGTGGAAGTCCGAACCGACCGATG
TTGAAAAATCGGCGGATGAACTGTGGTTAGTGGTGAAATACCAGTCGAACTCA
GAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAATATATCTCGTCTA
TCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTATGAAAATGGTACCAAATCGTG
GCAAACTCTGAATACTAGAAAATGACGATATATTAGTGAGACTATGGGGGATAA
GCTCCATAGTCGAGAGGGGAAACAGCCAGACCACAGTTAAGGCCCAAAATG
ATAATGAAGTGGTAAAGGAGGTGAAAATGCAAATACAACCAGGAGGTTGGCTT
AGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

[0567]

[0568] 서열 번호 17: UTEX 1434 프로토테카 모리포르미스

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAAGAGTGCGTGTTAAAGAAAATTC
TCTGGAACCATAGCGAAAGCAAGTTTAAACAAGCTTAAGTCACTTTTTTTAGACC
CGAAACCGAGTGATCTACCCATGATCAGGGTGAAAGTGTGGTAAAATAACATG
GAGGCCCGAAACCGACTAATGGTGAAAAATTAGCGGATGAATTGTGGGTAGGGG
CGAAAAACCAATCGAACTCGGAGTTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGC
GCAGCAGTAGCAACACAAATAGAGGGGTAAAGCACTGTTTCTTTGTGGGCTCC
GAAAGTTGTACCTCAAAGTGGCAAACCTCTGAATACTCTATTTAGATATCTACTA
GTGAGACCTTGGGGGATAAGCTCCTTGGTCGAAAGGGAAACAGCCCAGATCAC
CAGTTAAGGCCCAAAATGAAAATGATAGTGAAGGATGTGAGTATGTCAA
AACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAGCAGCAATCCTTTCAAGAGTGCGTAATAGC
TCACTG

[0569]

[0570] 서열 번호 18: UTEX 1438 프로토테카 조프피

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAAGAGTGGCATGGTTAAAGAAAATTC
TCTGGAGCCATAGCGAAAGCAAGTTTAAACAAGCTTAAGTCACTTTTTTTAGACC
CGAAACCGAGTGATCTACCCATGATCAGGGTGAAAGTGTGGTAAAATAACATG
GAGGCCCGAAACCGACTAATGGTGAAAAATTAGCGGATGAATTGTGGGTAGGGG
CGAAAAACCAATCGAACTCGGAGTTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGC
GCAGCAGTAGCAACACAAATAGAGGGGTAAAGCACTGTTTCTTTCTGTGGGCTTC
GAAAGTTGTACCTCAAAGTGGCAAACCTCTGAATACTCTATTTAGATATCTACTA
GTGAGACCTTGGGGGATAAGCTCCTTGGTCAAAAGGGAAACAGCCCAGATCAC
CAGTTAAGGCCCAAAATGAAAATGATAGTGAAGGATGTGAGTATGTCAA
AACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAGCAGCAATCCTTTCAAGAGTGCGTAATAGC
TCACTG

[0571]

[0572] 서열 번호 19: UTEX 1436 프로토테카 모리포르미스

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAAGGTGGCATGGTTAAGGAAATATT
CCGAAGCCGTAGCAAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATAAAATATATTAATATT
TAGAATCTAGTCATTTTTCTAGACCCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAG
GATGAAGCTTGGGTGATACCAAGTGAAGGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAA
TCGGCGGATGAGTTGTGGTTAGCGGTGAAATACCAGTCGAACCCGGAGCTAGC
TGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAGTACATCTAGTCTATCTAGGGG
TAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGTGAGAACGGTACCAAATCGTGGCAAACCTC
TGAATACTAGAAATGACGATGTAGTAGTGAGACTGTGGGGGATAAGCTCCATT
GTCAAGAGGGAAACAGCCCAGACCACAGCTAAGGCCCAAAATGGTAATGTA
GTGACAAAGGAGGTGAAAATGCAAATACAACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAG
CCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

[0573]

[0574] 서열 번호 20: 키코리움 인티버스 인버타제: GenBank 수탁 번호 제Y11124호

MSNSSNASESLFPATSEQPYRTAFHFQPPQNWMNDPNGPMCYNGVYHLFYQYNPF
GPLWNLRMVWAHVSVDHDLINWIHLDAFAPTEPFDDINGCLSGSATVLPGNKPMIMLY
TGIDTENRQVQNLAVPKDLSDPYLREWVKHTGNPIISLPEEIQPDDEFDPTTTWLEE
DGTWRLLVGSQKDKTGIAFLYHSGDFVNWTKSDSPLHKVSGTGMWECVDFFPVW
VDSTNGVDTSIINPSNRVKHVLKLGIDHKGDCYLIGKYSADKENYVPEDELTLSTL
RLDYGMYYASKSFFDPVKNRRIMTAWVNESDSEADVIARGWSGVQSFPRLWLDK
NQKQLLQWPIEEIEMLHQNEVSFHNKKLDGGSSLEVLGITASQADVKSFKLANLEE
AEELDPSWVDPQLICSENDASKKGKFGPFGLLALASSDLREQTAIFFRVFRKNGRYV
VLMCSDQSRSSMKNGIEKRTYGAFVDIDPQQDEISLRTLIDHSIVESFGGRGKTCITT
RVYPTLAJGEQARLFAFNHGTESVEISELSAWSMKKAQMKVEEP

[0575]

[0576] 서열 번호 21: 쉬조사카로마이세스 품베 인버타제: GenBank 수탁 번호 제AB011433호

MFLKYILASGICLVSLSSSTNAAPRHLVYVKRYPVTYNASNITEVSNSTTVPPPPFVNT
TAPNGTCLGNYNEYLPSGYNATDRPKIHFTPSGFMNDPNGLVYTGGVYHMFQ
YSPKILTAGEVHWGHTVSKDLHWENYPIAIYPDEHENGVLSPFSGSAVVDVHNS
SGLFSNDTIPEERIVLIYTDHWTGVAERQAIAYTTDGGYTFFKKYSGNPVLDINSLQF
RDPKVIWDFDANRWVMIVAMSQNYGIAFYSSYDLIHWTELSVFSTSGYLGQYECF
GMARVPVEGTDEYKWVLFISINPGAPLGGSVVQYFVGWDWNGTNFVDDGQTRFVD
LGKDFYASALYHSSANADVIGVGWASNWQYTNQAPTQVFRSAMTVARKFTLRD
VPQNPMTNLTSLIQTPLNVSLLRDETFTAPVINSSSSLSGSPITLPSNTAFEFNVLSI
NYTEGCTTGCLGRIHDSDDPYRLQSSISVDVDFAASTLVINRAKAQMGWFNSLFTP
SFANDIYTYGNVTLYGIVDNGLLELYVNNGEKTNTNDEFFLQGATPGQISFAAFQGV
SFNNVTVTPLKTIWNC

[0577]

[0578] 서열 번호 22: 피카 아노말라 베타-프럭토푸라노시다제(인버타제): GenBank 수탁 번호 제X80640호

MIQLSPLLLLPLFSVFNSIADASTEYLRPQIHLTPDQGWMDPNGMFYDRKDKLWH
VYFQHNPKKSIWATPVTWGHSTSKDLLTWDYHGNALEPENDEGIFSGSVVDR
NNTSGFFNDSTDEPQIRVAIYTNNALQQTQEIAYS�DKGYSEFIKYDQNPVINVNSSQ
QRDPKVLWHDESNDQWIMVVAKTQEFKVQIYGSPDLKKWDLKSNFTSNGYLGQY
ECPGLFKLPIENPLNDTVTSTKVVLLAINPGSPLGGSINEYFIGDFDGTTFHPDDGAT
RFMDIGKDFYAFQSFNDTEPEDGALGLAWASNWQYANTVPTENWRSSMSLVRNY
TLKYVDVNPENYGLTLIQKPVYDTKETRLNETLKTLETINEYEVNDLKLKDKSSFVA
TDFENTERNATGVFEFDLKFQTDLKMGYSNMTTQFGLYIHSQTVKGSQETLQLVFD
TLSTTWYIDRTTQHSFQRNSPVFTERISTYVEKIDTTDQGNVYTYLGVVDRNILELY
FNDGSIAMTNTFFFRECKJPTSFEVVCDESEKSFITIDELSVRELARK

[0579]

[0580] 서열 번호 23: 데바리오마이세스 옥시덴탈리스 인버타제: GenBank 수탁 번호 제X17604호

MVQVLSVLVPLLTLLFFGYVASSIDLSVDTSEYNRPLIHFTPEKGWMNDPNGLFYD
KTAKLWHLYFYQYNPNATAWGQPLYWGHATSNDLVHWEHEIAIGPEHDNEGIFS
GSIVVDHNNTSGFFNSIDPNQRIVAIYTNIPDLQTQDIAFSLDGGYTFTKYENNPVI
DVSSNQFRDPKVFVHERFKSMDHGCSEIARVKIQIFGSANLKNWVLNSNFSSGYG
NQYGMRLIEVPIENSDDKSKWVMFLAINPGSPLGGSINQYFVGDFDGFQFVDDST
RFVDIGKDFYAFQTFSEVEHGVGLAWASNWQYADQVPTNPWRSSSTSLARNYTLR
YVIQMLKLTANIDKSVLPDSINVDKLKKKNVKLTNKKPIKTNFKGSTGLFDENITF
KVLNLNVSPGKTHFDILINSQELNSSVDSIKIGFDSSQSLFYIDRHIPNVEFPRKQFFT
DKLAAYLEPLDYDQDLRVFSLYGIVDKNIELYFNDGTVAMTNTFFMGEKGYPHDI
QIVTDTEEPLFELESVIIRELNK

[0581]

[0582] 서열 번호 24: 오라이자오리자 사티바 인버타제: GenBank 수탁 번호 제AF019113호

MATSRLTAPAYDLKNAAAAAYTTPLEQPHSAEVEIRDKPFKIISAILSSLLLLALILV
AVNYQAPPSHSSGDNQPAAVMPPSRGVSQGVSEKAFRGASGAGNGVSFAWSNL
MLSWQRTSYHFQPVKNWMNDPNGPLYKGYHLFYQYNPDSAVWGNITWGHA
VSTDILINWLHLPFAMVPDQWYDVNGVWGTGSATILPDGRIVMLYTGDTDDYVQDQ
NLAFAPANLSDPLLVDWVKYPNNPVIYPPPVGKDFRDPTTAGTAGMQNGQRLVTI

[0583]

GSKVGKTGISLVYETTNFTTFKLLYGVHLHAVPGTGMWECVDLYPVSTTGENGLDT
SVNGLGVKHLVLTSLDDDKHDYYALGTYDPVKNKWTDPNDLVDVGIGLRLDYGK
YYAARTFYDQNKQRRILWGWIGETDLEAVDLMKGWASLQAIPRTIVFDKKTGTNV
LQRPEEEVESWSSGDPITQRRIFEPGSVVIHVSGATQLDITASFEVDETLLETTSSEH
DAGYDCSNSGGAGTRGSLGPFGLLVVADEKLSELTVPVYLYVAKGGDGKAKAHL
AYQTRSSMASGVEKEVYGSAPVPLDGENYSARILIDHSIVESFAQAGRTCVRSDY
PTKDIYGAARCFEENATEASVRASLKAWQMKSFIRPYPFIPDQKS

[0584]

[0585] 서열 번호 25: 알리움 세파 인버타제: GenBank 수탁 번호 제AJ006067호

MSSDDLESPPSSYLPIPPSDEFHDQPPPLRSWLRLLSIPLALMFLFLATFLSNLESPPS
DSGLVSDPVTDFVNPAVVRGKDAGVSDKTSQVDSGFVLDPAVDANSVVVHRG
KDAGVSDKTSQVDSGLLKDSPLGPYPWTNQMLSWQRTGFHFQPVKNWMNDPNGP
LYYKGWYHFFYQYNPEGAVWGNIAWGHAVSRDLVHWTHLPLAMVPDQWYDIN
GVWTGSATILPDGQIVMLYTGATNESVQVQNLAVPADQSDTLLLRWKKSEANPL
VPPPFIGDKDFRDPPTAWYEPSSDTRWIVIGSKDSSHSGIAIVYSTKDFINYKLIPGIL
HAVERVGMWECVDFYPVATADSSHANHGLDPSARPSPAVKHVLKASMDDDRHD
YYAIGTYDPAQNTWVPDDASVDVGIGLRYDWGKIFYASKTFYDHAKRRILWSWI
GETDSETADIAKGWASLQGVPRTVLLDVKTGSNLITWPVVEIESLRTRPRDFSGITV
DAGSTFKLDVGGAAQLDIEAEFKISSELEAVKEADVSYNCSGGAAERGVLGPF
GLLVLANQDLTE
QTATYFYVSRGMDGGLNTHFCQDEKRSSKASDIVKRIVGHSVPVLDGESFALRLV
DHSIVESFAQGGRASATSRVYPTAEIYNARVVFVFNATGAKVTAQSLKVWHMST
AINETYDPATSV

[0586]

[0587] 서열 번호 26: 베타 불가리스 아종 불가리스 인버타제: GenBank 수탁 번호 제AJ278531호

LFYQYNPNNGVIWGPVWGHSTSKDLVNWVPQPLTMEPEMAANINGSWSGSATILP
GNKPAILFTGLDPKYEQVQVLAYPKDTSDPNLKEWFLAPQNPVMEPTPQNQINATS
FRDPTTAWRLPDGVWRLLIGSKRGQRGLSLLFRSRDFVHWVQAKHPLYSDKLSGM
WECPDFFPVYANGDQMGVDTSIIGSHVVKHVLKNSLDITKHDIYTIGDYNKKDAYT
PDIGYMNDSRLRYDYGKYASKTFDDAKKERILLGWANESSSVEDDIKKGWSGIH
TIPRKIWLDKLGKQLIQWPIANIEKLQKPVNIYRKVLKGGSQIEVSGITAAQADVEI
SFKIKDLKNVEKFDASWTSPQLLCSKKGASVKGGLGPFGLLTLASXGLEEYTAFF
RIFKAYDNKFVVLMSDQSRSSLNPTNDKTTYGTTFVDVNPIREGLSLRVLIDHSVVE
SFGAKGKNVITARVYPTLAINEKAHLVVFNRGTSNVEITGLTAWSMKKANIA

[0588]

[0589] 서열 번호 27: 비피도박테리움 브레베 UCC2003 베타-프락토포라노시다제(인버타제): GenBank 수탁 번호 제AAT28190호

MTDFTPETPVLTPIRDHAAELAKAEAGVAEMAAKRNNRWYPKYHIASNGGWINDP
NGLCFYKGRWHVYFYLHPYGTQWGPMHWHGVSSDMLNWKREPIMFAPSLEQE
KDGVFSGSAVIDDNGDLRFYYTGHRWANGHDNTGGDWQVQMTALPDNDEL TSA
TKQGMIIDCPTDKVDHHRDPKVWKTGDTWYMTFGVSSSEDKRGQMWFSSKDM
VRWEYERVLQHPDPDFVFMLECPDFPIKDKDGNEKWWIGFSAMGSKPSGFMNRN

[0590]

VNNAGYMITWEPGGEFKPETEFRLWDCGHNYAPQSFNVDGRQIVYGWMSPFV
QPIPMEDDGWCGQLTLPREITLDDGDVVTAPVAEMEGLREDTLDHGSITLDMDG
EQVIADDAEAVEIEMTIDLAASADRAGLKIHATEDGAYTYVAYDDQIGRVVDR
QAMANGDHGYRAAPLTDAELASGKDLRVFVDRGSVEVYVNGGHQVLSSYSYAS
EGPRAIKLVAEFGNLKVESLKLHMKSIGLE

[0591]

[0592] 서열 번호 28: 사카로마이세스 세레비지아에 인버타제: GenBank 수탁 번호 제NP_012104호

MLLQAFLLAGFAAKISASMTNETSDRPLVHFIPNKGWMNDPNGLWYDEKDAK
WHLYFQYNPNDTVWGTPLFWGHATSDDL TNWEDQPIAIAPKRND SGAFSGSMVV
DYNNTSGFFNDTIDPRQRCVAIWYNTPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAA
NSTQFRDPKVFWEPSQKWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLES AFANEGFLGY
QYECPLIEVPTEQDPSKSYWVMFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQS
RVVDFGKDYYALQTFNTDPTYGSALGIAWASNWEYS AFVPTNPWRSSMSLVRKF
SLNTEYQANPETELINLKAEPI LNISNAGPWSRFATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLE
FELVYAVNTTQTISKSVFADLSLWFKGLEDP E EYLRMGFEVSASSFFLDRGNSKVKF
VKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSYYKVYGLLDQNILELYFNDGDVVSTNTYFM
TTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKFQVREV K

[0593]

[0594] 서열 번호 29: 자이모모나스 모빌리스 인버타제 A: GenBank 수탁 번호 제AY171597호

MESPSYKNLIKAEDAQKKAGKRLLSSEWYPGFHV TPLTGWMNDPNGLIFFKGEYH
LFYQYYPFAPVWGP MHWGHAKSRDLVHWETLPVALAPGDLFDRDGCFSGCAVDN
NGVLTLIYTGHI VLSNDSPDAIREVQCMATSIDGIHFQKEGIVLEKAPMPQVAHFRD
PRVWKENDHWF MVVGYRTDDEKHQGI GHVALYRSEN LKDWIFVKTLLGDNSQLP
LGKRAF MWECDFSLGNRSVLMFSPQGLKASGYKNRNLFQNGYILGKWQAPQFT
PETSFQELDYGHDFYAAQRFEAKDGRQILIAWFD MWENQKPSQRD GWAGCMTLP
RKLDLIDNKIVMTPVREMEILRQSEKIESVVTLSDAEHPFTMDSP LQEIELIFDLEKSS
AYQAGLALRCNGKGQETLLYIDRSQNRJILDNRNSGQNVKGRSCPLPNTSKVRLHI
FLDRSSI E IFVGGDDQTQGLYSISRI FPKDSLKGRLFAIEGYAVFDSFKRWTLQDAN
LAAFFSSDAC

[0595]

[0596] 서열 번호 30: 프로토테카 모리포르미스 텔타 12FAD 녹아웃 상동성 재조합 표적화 구조물의 5' 공여 DNA 서열

GCTCTTCGGGTTTGCTCACCCGCGAGGTCGACGCCAGCATGGCTATCAAGACG
AACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTACGATCGGGACGCTGCGCAAGGC
CATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGCATGTACCTGGC
CTTTGACATCGCGGTCATGTCCCTGCTCTACGTCGCGTCGACGTACATCGACCT
GCGCCGGTGCCTACGTGGGTCAAGTATGGCGTCATGTGGCCGCTCTACTGGTTC
TTCCAGGTGTGTGTGAGGGTGTGGTTGCCCGTATCGAGGTCTTGGTGGCGCGC
ATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCTCCCGGCACCT
TCCAGGGCGCCTTCGGCACGGGTGTCTGGGTGTGCGCGCACGAGTGCGGCCACC
AGGCCTTTTCTCCAGCCAGGCCATCAACGACGGCGTGGGCCTGGTGTTCACA
GCCTGCTGCTGGTGCCCTACTACTCCTGGAAGCACTCGCACCGCCGCCACCACT

[0597]

CCAACACGGGGTGCTGGACAAGGACGAGGTGTTTGTGCCGCCGCACCGCGCA
GTGGCGCACGAGGGCCTGGAGTGGGAGGAGTGGCTGCCCATCCGCATGGGCAA
GGTGCTGGTCACCCTGACCCTGGGCTGGCCGCTGTACCTCATGTTCAACGTGCG
CTCGCGCCGTACCCGCGCTTCGCCAACCACITTTGACCCGTGGTCGCCCATCTTC
AGCAAGCGCGAGGTACCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGG
CGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACC
CCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGC
GCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAA
GCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTG
TGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGC
AAACGGCGCGCC

[0598]

[0599]

서열 번호 31: 프로토테카 모리포르미스 델타 12FAD 녹아웃 상동성 재조합 표적화 구조물의 3' 공여 DNA 서열

CAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGT
GATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTT
TTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGATTGC
TAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCA
TATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGC
TGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGT
ATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAA
GTAGTGGGATGGGAACACAAAATGGAGCATCGAGGTGGTCATCTCCGACCTCGC
GTTGGTGGCGGTGCTCAGCGGGCTCAGCGTGCTGGGGCCGCACCATGGGCTGGG
CCTGGCTGGTCAAGACCTACGTGGTGCCCTACATGATCGTGAACATGTGGCTGG
TGCTCATCACGCTGCTCCAGCACACGCACCCGGCCCTGCCGCACTACTTCGAGA
AGGACTGGGACTGGCTACGCGGCGCCATGGCCACCGTCGACCGCTCCATGGGC
CCGCCCTTCATGGACAGCATCCTGCACCACATCTCCGACACCCACGTGCTGCAC
CACCTCTTCAGCACCATCCCGCACTACCACGCCGAGGAGGCCTCCGCCGCCATC
CGGCCCATCCTGGGCAAGTACTACCAATCCGACAGCCGCTGGGTCCGCCGCCGCC
CTGTGGGAGGACTGGCGCGACTGCCGCTACGTCTGTCCTCCCGACGCGCCCGAGGA
CGACTCCGCGCTCTGGTTCCACAAGTGAGCGCGCCTGCGCGAGGACGCAGAAC
AACGCTGCCGCCGTGTCTTTTGACGCGCGACTCCGGCGCTTCGCTGGTGGCAC
CCCCATAAAGAAACCTCAATTCTGTTTGTGGAAGACACGGTGTACCCCAACC
ACCCACCTGCACCTCTATTATTGTTATTATTGACGCGGGAGTGGGCGTTGTACC
CTACAACGTAGCTTCTCTAGTTTTAGCTGGCTCCCAACATTGTAAAGAGCCTCT
AGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC
TGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCAT
AAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT
GCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATG
AATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCC

[0600]

[0601] 서열 번호 32: 프로토테카 모리포르미스 델타 12FAD 녹아웃 상동성 재조합 표적화 구조물

GCTCTTCGGGTTTGCTCACCCGCGAGGTCGACGCCCCAGCATGGCTATCAAGACG
AACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTACGATCGGGACGCTGCGCAAGGC
CATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGCATGTACCTGGC
CTTTGACATCGCGGTCAATGTCCCTGCTCTACGTCCGCTCGACGTACATCGACCCT
GCGCCGGTGCCCTACGTGGGTCAAGTATGGCGTCATGTGGCCGCTCTACTGGTTC
TTCCAGGTGTGTGTGAGGGTTGTGGTTGCCCGTATCGAGGTCTTGGTGGCGCGC
ATGGGGGAGAAAGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCCCTCCCGGCACCT
TCCAGGGCGCCTTCGGCACGGGTGTCTGGGTGTGCGCGCACGAGTGGGCCACC
AGGCCTTTTCTCCAGCCAGGCCATCAACGACGGCGTGGGCTGGTGTTCACA
GCCTGCTGCTGGTGCCCTACTACTCCTGGAAGCACTCGCACCGCCGCCACCACT
CCAACACGGGGTGCCCTGGACAAGGACGAGGTGTTTGTGCCGCGCACCGCGCA
GTGGCGCACGAGGGCCTGGAGTGGGAGGAGTGGCTGCCCATCCGCATGGGCAA
GGTGCTGGTACCCCTGACCCTGGGCTGGCGCTGTACCTCATGTTCAACGTGCG
CTCGCGGCCGTACCCGCGCTTCGCCAACCCTTTGACCCGTGGTGGCCATCTTC
AGCAAGCGCGAGGTACCCCTTTCTTGCCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGG
CGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACC
CCCCGAACTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGC
GCTGTTTAAATAGCCAGGCCCGGATTGCAAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAA
GCCATATTCAAAACCTAGATCACTACCCTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTG
TGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGC
AAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCTTCTCTTCTGCTGGCCGGCTTCGCC
GCCAAGATCAGCGCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGCCCCCTGGTGCA
CTTACCCCCAACAAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTGTGGTACGACG
AGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAACGACACCGTC
TGGGGGACGCCCCTTGTTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAACTGG
GAGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCGGCGCCTTCTCC
GGCTCCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCAACGACACCATC
GACCCGCGCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCGGAGTCCGA
GGAGCAGTACATCTCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTCAACGAGTACCA
GAAGAACCCCGTGTGGCCGCCAATCCACCCAGTTCCGCGACCCGAAGGTCTT
CTGGTACGAGCCCTCCAGAAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGTCCAGGACT
ACAAGATCGAGATCTACTCCTCCGACGACCTGAAGTCTTGGAAAGCTGGAGTCCG
CGTTCGCCAACGAGGGCTTCTCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCGGCCTGATCG
AGGTCCCCACCGAGCAGGACCCAGCAAGTCTTACTGGGTGATGTTTATCTCCA
TCAACCCCGCGCGCCCCGGCCGGCGGCTCCTTCAACCAGTACTTCGTGCGCAGCT
TCAACGGCACCCACTTTCGAGGGCTTCGACAACCAGTCCCGCGTGGTGGACTTCG
GCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTCAACACCCGACCCGACCTACGGGA
GCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCTTCCAACCTGGGAGTACTCCGCTTTCGTGCCA
CCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGCGCAAGTTCTCCCTCAACACCG
AGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGAAGGCCGAGCCGATC
CTGAACATCAGCAACGCCGGCCCCCTGGAGCCGGTTCCGCCACCAACACCACGTTG
ACGAAGGCCAACAGCTACAACGTGACCTGTCCAACAGCACCGGCACCCCTGGA
GTTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATCTCCAAGTCCGTGTT
CGCGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCCGAGGAGTACCTCCG
CATGGGCTTCGAGGTGTCCGCTCCTCCTTCTTCTGGACCGCGGGAACAGCAA
GGTGAAGTTCTGTAAGGAGAAACCCCTACTTCAACCAACCGCATGAGCGTGAACA
ACCAGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCTTACTACAAGGTGTACGGCTTGC
TGGACCAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTGCTGTCCACCA

[0602]

ACACCTACTTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAACATGACGACG
GGGGTGGACAACCTGTTCTACATCGACAAGTTCAGGTGCGCGAGGTCAAGTG
ACAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTG
TGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCT
TTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTG
CTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCAAGCATCCCTTCCCTCGTTTC
ATATCGCTTGCAATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCG
CTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCTG
TATTCCTCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGA
AGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGCATCGAGGTGGTCATCTCCGACCTCG
CGTTGGTGGCGGTGCTCAGCGGGCTCAGCGTGCTGGGCCGACCATGGGCTGG
GCCTGGCTGGTCAAGACCTACGTGGTGCCCTACATGATCGTGAACATGTGGCTG
GTGCTCATCACGCTGCTCCAGCACACGCACCCGGCCCTGCCGCACTACTTCGAG
AAGGACTGGGACTGGCTACGCGGCGCCATGGCCACCGTCGACCGCTCCATGGG
CCCGCCCTTCATGGACAGCATCCTGCACCACATCTCCGACACCCACGTGCTGCA
CCACCTCTTCAGCACCATCCCGCACTACCACGCCGAGGAGGCCTCCGCCGCCAT
CCGGCCCATCCTGGGCAAGTACTACCAATCCGACAGCCGCTGGGTGGGCCGCG
CCTGTGGGAGGACTGGCGCGACTGCCGCTACGTCTCCCGACGCGCCCGAGG
ACGACTCCGCGCTCTGGTTCCACAAGTGAGCGCGCCTGCGCGAGGACGCAGAA
CAACGCTGCCGCCGTGTCTTTGCACGCGGACTCCGGCGCTTCGCTGGTGGCA
CCCCATAAAGAAACCCCTCAATTCTGTTTGTGGAAGACACGGTGTACCCCAAC
CACCCACCTGCACCTCTATTATTGGTATTATTGACGCGGGAGTGGCGCTTGTAC
CCTACAACGTAGCTTCTCTAGTTTTAGCTGGCTCCCAACATTGTAAAGAGCCTC
TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC
CTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCA
TAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGT
TGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAAT
GAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCC

[0603]

[0604]

서열 번호 33: 프로토테카 모리포르미스 SAD2A 녹아웃 상동성 제조합 표적화 구조물의 5' 공여 DNA 서열

GCTCTCCGCCTGGAGCTGGTGCAGAGCATGGGTCAAGTTTGGCGAGGAGAGGG
TGCTCCCGCTGCTGCACCCCGTGGACAAGCTGTGGCAGCCGCAAGGACTTCCTGC
CCGACCCCGAGTCCGCCGACTTCGAGGACCAGGTGGCGGAGCTGCGCGCGCGC
GCCAAGGACCTGCCCGACGAGTACTTTGTGGTGTGCTGGTGGCGGACATGATCACG
GAGGAGGCGCTGCCGACCTACATGGCCATGCTCAACACCTTGGACGGTGTGCG
CGACGACACGGGCGCGGCTGACCACCCGTGGGCGCGCTGGACCGCGGCAAGTGGG
TGGCCGAGGAGAACCAGGACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGTTGGCTGACG
GGGCGCGTCAACATGCGGGCCGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGAG
CGGCATGAACCCGACAGCGGACAACAACCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTC
CTCCAGGAGCGCGCCACCAAGTAGGTACC

[0605]

[0606] 서열 번호 34: 프로토테카 모리포르미스 SAD2A 녹아웃 상동성 재조합 표적화 구조물의 3' 공여 DNA 서열

CAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGT
GATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTT
TTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTTCGAGTTGC
TAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCAACCCCAAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCA
TATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGC
TGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCCTCGCACAGCCTTGTTTGGGCTCCGCCTGT
ATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAA
GTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAAGGATCGTAGAGCTCCAGCCACGGCAAC
ACCGCGCGCCTGGCGGCCGAGCACGGCGACAAGGGCCTGAGCAAGATCTGCGG
GCTGATCGCCAGCGACGAGGGCCGGCACGAGATCGCCTACACGCGCATCGTGG
ACGAGTTCTTCCGCCTCGACCCCGAGGGCGCCGTCGCCGCTACGCCAACATGA
TGCGCAAGCAGATCAACATGCCCCGCGCACCTCATGGACGACATGGGCCACGGC
GAGGCCAACCCGGGCCGCAACCTCTTCGCCGACTTCTCCGCCGTCGCCGAGAAG
ATCGACGCTACGACGCCGAGGACTACTGCCGCATCCTGGAGCACTCAACGCG
CGCTGGAAGGTGGACGAGCGCCAGGTCAGCGGCCAGGCCGCCGCGGACCAGGA
GTACGTTCTGGGCTGCCCCAGCGCTTCCGGAACCTCGCCGAGAAGACCGCCGC
CAAGCGCAAGCGCGTCGCGCGCAGGCCCGTCGCCTTCTCCTGGAGAGAAGAGC
CTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT
TTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAA
GCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTG
CGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATT
AATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCC

[0607]

[0608] 서열 번호 35: 프로토테카 모리포르미스 SAD2A 녹아웃 상동성 재조합 표적화 구조물

GCTCTTCCGCCTGGAGCTGGTGCAGAGCATGGGTCAGTTTTCGGAGGAGAGGG
TGCTCCCCGTGCTGCACCCCGTGGACAAGCTGTGGCAGCCGACGAGACTTCTGC
CCGACCCCGAGTCGCCCGACTTCGAGGACCAGGTGGCGGAGCTGCGCGCGCGC
GCCAAGGACCTGCCCGACGAGTACTTTGTGGTGTGTTGGGCGACATGATCAG
GAGGAGGCGCTGCCGACCTACATGGCCATGCTCAACACCTTGGACGGTGTGCG
CGACGACACGGGCGCGGCTGACCACCCGTGGGCGCGCTGGACGCGGCAGTGGG
TGGCCGAGGAGAACC GGACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGTTGGCTGACG
GGGCGCGTCAACATGCGGGCCGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGAG
CGGCATGAACCCGACGACGAGACAACAACCCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTC
CTTCCAGGAGCGCGCCACCAAGTAGGTACCCTTTCTTTCGCGCTATGACACTTCCA
GCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCG
ATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCC
GCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTAT
AGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAG
GCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGTTT
CAGTCACAACCCGCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCCTTCTGTTCTGCTG
TGGCCGGCTTCGCCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGAC
CGCCCCCTGGTGCACCTTCAACCCCAACAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGG
CCTGTGGTACGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACC
CGAACGACACCGTCTGGGGGACGCCCTTGTTCGGGGCCACGCCACGTCCGACG
ACCTGACCAACTGGGAGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGAC
TCCGGCGCCTTCTCCGGCTCCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTC

[0609]

TTCAACGACACCATCGACCCGCGCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAAC
 ACCCCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCTACAGCCTGGACGGCGGCTACAC
 CTTACCCGAGTACCAGAAGAACCCCGTGCTGGCCGCCAACTCCACCCAGTTCGG
 CGACCCGAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTCCCAGAAGTGGATCATGACCGCGGC
 CAAGTCCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACTCCTCCGACGACCTGAAGTCCTG
 GAAGCTGGAGTCCGCGTTCGCCAACGAGGGCTTCTCGGCTACCAGTACGAGTG
 CCCCCGCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCCAGCAAGTCTACTGGGT
 GATGTTTCATCTCCATCAACCCCGGCGCCCCGGCCGGCGGCTCCTTCAACCAGTA
 CTTGCTCGGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCCTTCGACAACCAGTCCCG
 CGTGGTGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTCAACACCGA
 CCCGACCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCCTCCAAGTGGGAGTACTC
 CGCCTTCGTGCCAACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGGCAAGTTC
 TCCCTCAACACCCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGAA
 GGCCGAGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCTGGAGCCGGTTCGCCA
 CCAACACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTCGACCTGTCCAACAGC
 ACCGGCACCCCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATC
 TCCAAGTCCGTGTTCCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCC
 GAGGAGTACCTCCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCTCCTTCTTCTGGAC
 CGCGGGAACAGCAAGGTGAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCACCAACCG
 CATGAGCGTGAACAACAGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCTACTACA
 AGGTGATCGGCTTGGCTGGACCAAGACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCG
 ACGTCGTGTCCACCAACACCTACTTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCG
 TGAACATGACGACGGGGGTGGACAACCTGTTCTACATCGACAAGTTCAGGTG
 CGCGAGGTCAAGTGACAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTC
 TGGACGCTGGTGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGT
 GAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTAC
 GCGCTTTTGGCAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATAACACCCCCAGCAT
 CCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTG
 CTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCCTCGCACAGCCTTG
 GTTTGGGCTCCGCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCA
 ATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAAGGATCGTAGA
 GTCCAGCCACGGCAACACCCGCGCCTGGCGGCCGAGCACGGCGACAAGGGC
 CTGAGCAAGATCTGCGGGCTGATCGCCAGCGACGAGGGCCGGCACGAGATCGC
 CTACACGCGCATCGTGGACGAGTTCCTCCGCTCGACCCCGAGGGCGCCGTCGC
 CGCCTACGCCAACATGATGCGCAAGCAGATCACCATGCCCGCGCACCTCATGG
 ACGACATGGGCCACGGCGAGGCCAACCCGGGCCGCAACCTCTTCGCCGACTTCT
 CCGCCGTGCGCGAGAAGATCGACGTCTACGACGCGGAGGACTACTGCCGCATC
 CTGGAGCACCTCAACGCGCGCTGGAAGGTGGACGAGCGCCAGGTCAGCGGCCA
 GGCCGCCGCGGACCAGGAGTACGTTCTGGGCCCTGCCCCAGCGCTTCGGAAACT
 CGCCGAGAAGACCGCCGCCAAGCGCAAGCGCGTCGCGCGCAGGCCCGTCGCCT
 TCTCCTGGAGAGAAGAGCCTCTAGAGTGCACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGT
 AATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGTCACAATTCCACA
 CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA
 GCTAACTCACATTAAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACC
 TGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTG
 CGTATTGGGCGCTCTTC

[0610]

[0611]

서열 번호 36: 프로토테카 모리포르미스 SAD2B 녹아웃 상동성 재조합 표적화 구조물의 5' 공여 DNA 서열

GCTCTTCCCGCTGGAGCTGGTGCAGAGCATGGGGCAGTTTGCGGAGGAGAGG
 GTGCTCCCCGTGCTGCACCCCGTGGACAAGCTGTGGCAGCCGACGACTTCTG
 CCCGACCCCGAGTCGCCCCGACTTCGAGGACCAGGTGGCGGAGCTGCGCGCGCG
 CGCCAAGGACCTGCCCCGACGAGTACTTTGTGGTGTGTTGGGCGACATGATCAC
 GGAGGAGGGCGCTGCCGACCTACATGGCCATGCTCAACACCTTGGACGGTGTGC
 GCGACGACACGGGCGCGGCTGACCACCCGTGGGCGCGCTGGACGCGGCAGTGG
 GTGGCCGAGGAGAACCGGCACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGTTGGCTGAC
 GGGGCGCGTCAACATGCGGGCGGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGA
 GCGGCATGAACCCGACGACGGACAACAACCCCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCT
 CCTTCCAGGAGCGCGCCACCAAGTAGGTACC

[0612]

[0613] 서열 번호 37: 프로토테카 모리포르미스 SAD2B 녹아웃 상동성 재조합 표적화 구조물의 3' 공여 DNA 서열

CAGCCACGGCAACACCGCGCGCCTTGCGGCCGAGCACGGCGACAAGAACCTGA
GCAAGATCTGCGGGCTGATCGCCAGCGACGAGGGCCGGCACGAGATCGCCTAC
ACGCGCATCGTGGACGAGTTCTTCCGCCTCGACCCCGAGGGCGCCGTCGCCGCC
TACGCCAACATGATGCGCAAGCAGATCACCATGCCC GCGCACCTCATGGACGA
CATGGGCCACGGCGAGGCCAACCCGGGCCGCAACCTCTTCGCCGACTTCTCCGC
GGTCGCCGAGAAGATCGACGTCTACGACGCCGAGGACTACTGCCGCATCCTGG
AGCACCTCAACGCGCGCTGGAAGGTGGACGAGCGCCAGGTGAGCGGCCAGGCC
GCCGCGGACCAAGAGTACGTCTTGGGCCCTGCCCGAGCGCTTCCGGAAACTCGCC
GAGAAGACCGCCGCCAAGCGCAAGCGCGTCGCGCGCAGGCCCGTCGCCCTTCTC
CTGGAGAAGAGCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCA
TGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTGCT
GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATT
GGGCGCTCTTCC

[0614]

[0615] 서열 번호 38: 프로토테카 모리포르미스 SAD2B 녹아웃 상동성 재조합 표적화 구조물

GCTCTTCCCGCCTGGAGCTGGTGCAGAGCATGGGGCAGTTTGCGGAGGAGAGG
GTGCTCCCCGTGCTGCACCCCGTGGACAAGCTGTGGCAGCCGCAGGACTTCCTG
CCCGACCCCGAGTCGCCCGACTTCGAGGACCAGGTGGCGGAGCTGCGCGCGCG
CGCCAAGGACCTGCCCGACGAGTACTTTGTGGTGCTGGTGGGCGACATGATCAC
GGAGGAGGCGCTGCCGACCTACATGGCCATGCTCAACACCTTGGACGGTGTGC
GCGACGACACGGGCGCGGCTGACCACCCGTGGGCGCGCTGGACGCGGCAGTGG
GTGGCCGAGGAGAACCGGCACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGTTGGCTGAC
GGGGCGCGTCAACATGCGGGCCGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGA
GCGGCATGAACCCGCAGACGGACAACAACCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCT
CCTTCCAGGAGCGCGCCACCAAGTAGGTACCTTTCTTGGCGCTATGACACTTCC
AGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGCGCTGCATGCAACACC

[0616]

[0621] 서열 번호 40: 역 프라이머 SZ5435

[0622] TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGG

[0623] 서열 번호 41: 로도토룰라 글루티니스 DSMZ-DSM70398 및 리포마이세스 테트라스포러스 CBS5911

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATT
GGGAGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGAATATTAGGGTGTCCAACCTTAACCTGGAGCCCGACCCTCACTTTCTAA
CCCTGTGCATTTGTCTTGGGTAGTAGCTTGCGTCAGCGAGCGAATCCCATTTTCA
TTACAAACACAAAGTCTATGAATGTAAACAAATTTATAACAAAACAAAACCTTTCA
ACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGGATAC
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCG
CTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGAATTTCTTCAACCCA
CCTCTTTCTTAGTGAATCAGGCGGTGTTTGGATTCTGAGCGCTGCTGGCTTCGCG
GCCTAGCTCGCTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTCG
GCGTAATAGACTATTGTTGAGGATTCTGGTCTCTGACTGGAGCCGGGTAAGGT
TAAAGGGAGCTACTAATCCTCATGTCTATCTTGAGATTAGACCTCAAATCAGGT
AGGACTA

[0624]

[0625] 서열 번호 42: 로도토룰라 글루티니스 변종 글루티니스 CBS 3044 및 리포마이세스 테트라스포러스 CBS8664

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATT
GGGAGCTCGCGAGAGCACCCGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTT
AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC
ATTAGTGAATATTAGGGCGTCCAACCTTAACCTGGAGCCCGAACTCTCACTTTCT
AACCCTGTGCATCTGTTTCTGGTCAGTAGCTCTCTCGGGAGTGAACGCCATTCA
CTTAAACACAAAGTCTATGAATGTATAAAATTTATAACAAAACAAAACCTTTCA
ACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA

[0626]

GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCG
CTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGAAATCTTCAACCCT
CTCTTTTCTTAATGAATCGAGAGGTGCTTGGATCCTGAGCGCTGCTGGCTTCGGC
CTAGCTCGTTCTGAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTTGGC
GTAATAGACTATTGCTGAGGATTCTGGTCTCGTACCAGAGCCGGGTGGGTTA
AAGGAAGCTTCTAATCCTAAAAGTCTAACTTTTGATTAGATCTCAAATCAGGTA
GGACTA

[0627]

[0628] 서열 번호 43: 리포마이세스 테트라스포러스 CBS1808 및 리포마이세스 테트라스포러스 CBS1810

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGACTGGCTCCA
GAAAATGGGAAACCATTATCAGGAGCTGGAAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTT
AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC
ATTACTGAGTATTTGTCTTTTAAAGACATCTCTCTATCCATAAACTCTTTTTTCTA
AAAAGACATGATTTACACAATTAGTCTGAATGATTATATAAAAATCTTCAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCG
ATAAGTATTGTGAATTGCAGGATTTTGTGAATCATCGAATTTTGAACGCACAT
TGCACCTTCTGGTATTCCGGAGGGTATACCTGTTTGAGCGTCATTTATATACTCA
AACTTTGTTTTGGTGATGGGCACATATCTGGTGAGAGCTAGATTTGCCTGAAA
TATAGTGGTAGAGATTGCTACGAGTTATGCAAGTTAGCCAATGCTATTAAGTTA
ATTCGTTGGTGAAGCATGCGGAGCTTTAGCGGTTCGCTTCCTTAACTATTGGAA
TTTTTCTAATTTTGACCTCAAATCAGGCAGGAGTA

[0629]

[0630] 서열 번호 44: 리포마이세스 스타케이 CBS1809 및 트리코스포론 몬테비딘스 CBS8261

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCCTCGGATTGGCGTTA
GGAAGCCGGCAACGGCATCCTTTGGCCGAGAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGATTGCCTTTATAGGCTTATAACTATATCCACTTACACCTGTGAACTGTT
CTATTACTTGACGCAAGTCGAGTATTTTACAAACAATGTGTAATGAACGTCGT
TTTATTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCAGCTTGCCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTG
TTTCAGTGTGATGAAATCTCAACCACTAGGGTTTCCTAATGGATTGGATTGGG
CGTCTGCGATCTCTGATCGCTCGCCTTAAAAGAGTTAGCAAGTTTGACATTAAT
GTCTGGTGTAATAAGTTTCACTGGGTCCATTGTGTTGAAGCGTGCTTCTAATCGT
CCGCAAGGACAATTACTTTGACTCTGGCCTGAAATCAGGTAGGACTA

[0631]

[0632] 서열 번호 45: 야로위아 리폴리티카 CBS6331

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGACCCTTGGGAGGGCGAGAT
GAGGGGGGCAACCCCTTTTGAACATCCAAACTTGGTCAAACCTTGATTATTTAGA
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT
ATTGATTTTATCTATTTCTGTGGATTCTGGTATATTACAGCGTCATTTTATCTCA
ATTATAACTATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGC

[0633]

GAACCGCGATATTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCGGTATGGCATTCCGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGTCCCTCTG
GGATCGCATTGCTTTCTTGAAATGGATTTTTTAAACTCTCAATTATTACGTCATT
TCACCTCCTTCATCCGAGATTA

[0634]

[0635] 서열 번호 46:

[0636] 크립토크커스 커바투스 CBS5324, 로도토롤라 뮤실라기노사 변종 뮤실라기노사 CBS316, 크립토크커스 커바투스 CBS570, 크립토크커스 커바투스 CBS2176, 크립토크커스 커바투스 CBS2744, 크립토크커스 커바투스 CBS2754, 크립토크커스 커바투스 CBS2829, 크립토크커스 커바투스 CBS5163 및 크립토크커스 커바투스 CBS5358

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGATTTCTGGATTGGCGTTA
GGAAGCCGGCAACGGCATCCTTTGGCTGAGAAGTTACTCAAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGATTTGCCTTCGGCTAAACTATATCCATAACACCTGTGAACTGTTGATT
GACTTCGGTCAATATTTTTACAAACATTGTGTAATGAACGTCATGTTATAATAA
CAAATATAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCAACTTGGCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAT
GAAATCTCAACCATTAGGGTTTCTTAATGGCTTGGATTGGACGTTTGCCAGTC
AAATGGCTCGTCTTAAAAGAGTTAGTGAATTTAACATTTGCTTCTTGGCGTAAT
AAGTTTCGCTGGGCTGATAGTGTGAAGTTTGCTTCTAATCGTCCGCAAGGACAA
TTCTTGAACCTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTA

[0637]

[0638] 서열 번호 47: 트리코스포론 종 CBS7617

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCCTCGGATTGGCGTTA
AGAAGCCGGCAACGGCATCTTTTGGCCGAGAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGAATTGCTCTTTGAGCGTTAAACTATATCCATCTACACCTGTGAACTGTT
GATTGACTTCGGTCAATTACTTTTACAAACATTGTGTAATGAACGTCATGTTATT
ATAACAAAAATAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCAACTTGGCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTA
TCATGAAATCTCAACCATTAGGGTTTCTTAATGGCTTGGATTGGGCGCTGCCA
CTTGCCTGGCTCGCCTTAAAAGAGTTAGCGTATTAACCTTGTCGATCTGGCGTAA
TAAGTTTCGCTGGTGTAGACTTGAGAAGTGCGCTTCTAATCGTCTCGGACAAAT
TCTTGAACCTCTGGTCTCAAATCAGGTAGGACTA

[0639]

[0640] 서열 번호 48: 스포로볼로마이세스 알보루베센스 CBS482

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATT
GGGAGCTCGCGAGAGCACCCGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTT
AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC
ATTAGTGAATATAGGAACGTCCAACCTTAACCTGGAGTCCGAACCTCTCACTTTCTA
ACCCTGTGCACCTGTTTGGGATAGTAACTCTCGCAAGAGAGCGAACTCCTATTC

[0641]

ACTTATAAACACAAAGTCTATGAATGTATTAAATTTTATAACAAAATAAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG
CGCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTATGAATACTTCAAC
CCTCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCCTT
TACGGTCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAATTTCCGATTGA
CTTGGCGTAATAGACTATTGCTGAGGAATTCTAGTCTTCCGATTAGAGCCGGG
TTGGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTTAAGATTAGATCTCA
AATCAGGTAGGACTA

[0642]

[0643] 서열 번호 49: 로도토룰라 글루티니스 변종 글루티니스 CBS324

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATT
GGGAGCTCGCGAGAGCACCCGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTT
AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC
ATTAGTGAATCTAGGACGTCCAACCTTAACCTGGAGTCCGAACCTCTCACTTTCTA
ACCCTGTGCATCTGTTTAAATTTGGCTAGTAGCTCTTCGGAGCGAACCACCAT
TFTTCACCTTATACAAACACAAAGTCTATGAATGTAAACAAATTTATAACAAAC
AAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTATGAAAT
CTTCAACCCACCTCTTTCTTAGTGAATCTGGTGGTGCTTGGTTTCTGAGCGCTGC
TCTGCTTCGGCTTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAACCGAAACTTCG
GATTGACTTGGCGTAATAGACTATTGCTGAGGATTCAGACTTGTCTGGAGC
CGAGTTGGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCCTAAAGTCTATTTTGTGATTAGATCTC
AAATCAGGTAGGACTA

[0644]

[0645] 서열 번호 50: 로도토룰라 글루티니스 변종 글루티니스 CBS4476

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGGCTCCGGATTGGCTTCT
GGGAGCCGGCAACGGCACCTAGTCGCTGAGAAGTTGGACGAACTTGGTCATTT
AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC
ATTAATGAAATGCAAGGACGCTCTTTTATAGAGGTCCGACCCAATTCATTTTCTC
ACACTGTGCACACACTACTTTTTACACCATTTTAAACACTTGAAGTCTAAGAATG
TAAACAGTCTCTTAATTGAGCATAAAAATTAAACAAAACCTTTCAGCAACGGATC
TCTTGGCTCTCCCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTCTTTGGTATT
CCGAAGAGTATGTCTGTTTGAAGTGTATGAACTCTCAACCCCCCTGTTTGTAA
TGAACCAGGCGTGGGCTTGGATTATGGCTGCTGCCGGCGTAATTGTGACTCGG
CTGAAATACACGAGCTACCCATTTTATAAGAAATAGACGGTTTGACTCGGCGTA
ATAACATATTTGCTGAGGACGTACATTCTTTACCTAGTGGTGCTTCTAATGCG
ACATCTAAACTTTAAGCTTTAGACCTCAAATCAGTCAGGACTA

[0646]

[0647] 서열 번호 51: 트리코스포론 비렌드 CBS5581

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCCTCGGATTGGCGTTA
GGAAGCCGGCAACGGCATCCTTTGGCCGAGAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TAGTGATTGCCATCATAGGCTTAACTATATCCACATACACCTGTGAACTGTTC
CACCATTGACGCAAGTCGAGTGTTTTTACAAACAATGTGTAATGAACGTCGTT
TTATTATAACAAAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCAGCTTGGCTCTCTGGTATTCGGGAGAGCATGCCTGT
TTCAGTGTCTGAAATCTCAACCACTAGGGTTTCTAATGGATTGGATTGGGGC
GTCTGCGATCTCTGATCGCTCGCTTAAAAGAGTTAGCAAGTTTGACATTAATG
TCTGGTGTAAATAAGTTTCACTGGGTCCATTGTGTGGAAGCGTGCTTCTAATCGTC
CGCAAGGACAATTACTTTGACTCTGGCCTGAAATCAGGTAGGACTA

[0648]

[0649] 서열 번호 52: 게오텐리쿰 히스테리다럼 CBS9892

CAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGT
GATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTT
TTATCAAACAGCCTCAGTGTTTGTATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGATTGC
TAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCGAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCA
TATCGCTTGCAATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGC
TGCTCCTGTCTGTCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGT
ATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAA
GTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGCATCGAGGTGGTCATCTCCGACCTCGC
GTTGGTGGCGGTGCTCAGCGGGCTCAGCGTGCTGGGCCGACCATGGGCTGGG
CCTGGCTGGTCAAGACCTACGTGGTGCCCTACATGATCGTGAACATGTGGCTGG
TGCTCATCACGCTGCTCCAGCACACGCAACCCGGCCCTGCCGCACTACTTCGAGA
AGGACTGGGACTGGCTACGCGGGCGCCATGGCCACCGTCGACCGCTCCATGGGC
CCGCCCTTCATGGACAGCATCTTGCAACCATCTCCGACACCCACGTGCTGCAC
CACCTCTTCAGCACCATCCCGCACTACCACGCGGAGGAGGCTCCGCGCGCCATC
CGGCCCATCTGGGCAAGTACTACCAATCCGACAGCCGCTGGGTGGGCCGCGCC
CTGTGGGAGGACTGGCGCGACTGCCGCTACGTCGTCCCCGACGCGCCCGAGGA
CGACTCCGCGCTCTGGTTCCACAAGTGAGCGCGCCTGCGCGAGGACGAGAAC
AACGCTGCCGCGCTGTCTTTTGACGCGCGACTCCGCGCTTCGCTGGTGGCAC
CCCCATAAAGAAACCTCAATTCTGTTTGTGGAAGACACGGTGTACCCCCACCC
ACCCACCTGCACCTCTATTATTGGTATTATTGACGCGGGAGTGGGCGTTGTACC
CTACAACGTAGCTTCTCTAGTTTTAGCTGGCTCCACCATTTGTAAGAGCCTCT
AGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC
TGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCAT
AAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT
GCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATG
AATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCC

[0650]

CGCCCGTCGCTACTACCGATCGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATTGATTGG
GAGAGAGGGCGACTTTTTCTGGAACGAGAAGCTAGTCAAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGAAAAATGCGATATTAGTGGTTTATTTTGTCTCGCCGAAAGGCAAACCTTTA
ACATACCTACCTTTTTTAACTATAAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTTTTGTGAATTGCAGAAGT
GAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTGGTGGTATTCCGCCAGGCATAC
CTGTTTGAGCGTTGTTCTCTCTGGGATTGTCTACTTTCCTCAAAGAAATTAACA
AACAAGTTTGACACAACACCTCAACCTCAGATCAGGTAGGACTA

[0651]

[0652] 서열 번호 53: 로도코를라 아우오란티아카 CBS8411 및 크립토크스 커바투스 CBS8126

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCCTTCGGATTGGCTTCT
GGGAGCCGGCAACGGCACCTAGTCGCTGAGAAAGTTTGACGAACTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAATGAATTTTAGGACGTTCTTTTTAGAAAGTCCGACCCCTTCATTTTCTTACAC
TGTGCACACACTTCTTTTTTACACACACTTTTAACACCTTAGTATAAGAATGTAA
TAGTCTCTTAATTGAGCATAAATAAAAAACAAAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTG
GCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCA
GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTCTTGGTATTCCGA
AGAGTATGTCTGTTTGTGAGTGTATGAACTCTCAACCCCTATTTTGTAAATGAG
ATGGGTGTGGGCTTGGATTATGGTTGTCTGTGCGCGTAATTGCCGGCTCAACTG
AAATACACGAGCAACCCATTGAAATAAACGGTTTGACTTGGCGTAATAATTAT
TTCGCTAAGGACGCTTCTTCAAATATAAGAGGTGCTTCTAATTGCTTCTAATA
GCATTTAAGCTTTAGACCTCAAATCAGTCAGGACTA

[0653]

[0654] 서열 번호 54: 트리코스포론 도메스티쿰 CBS8111

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCTCCGGATTGGCGTTG
AGAAGCCGGCAACGGCATCTCTTGGCTGAGAAAGTTGGTCAAACCTGGTCATTTA

[0655]

GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGATTGCCTTAATTGGCTTAACTATATCCATCTACACCTGTGAACGTGTTT
GATTGAATCTTCGGATTTCGATTTTATACAAACATTGTGTAATGAACGTCATTATA
TTATAACAAAAAATACTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCAACTTGCCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTT
GAGTGTATGAAATCTCAACCATAGGGTTTCTTAATGGCTTGGATTGGAGGT
TTGCCAGTCTGACTGGCTCCTCTTAAAGAGTTAGCAAGTTGAACTATTGCTAT
CTGGCGTAATAAGTTTCGCTGGAATGGTATTGTGAAGCGTGCTTCTAATCGTCTT
CGGACAATTTTTGACTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTA

[0656]

[0657] 서열 번호 55: 로도토크를라 톨로로이데스 CBS8761

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATTGGCTATC
GGGAGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGAATATTAGGGTGTCCAACCTTAACTTGGAGCCCGACCCCTCACTTTCTAA
CCCTGTGCATTTGTCTTGGGTAGTAGCTCGTGTGAGCGAGCGAATCCCATTTTCA
TTACAAACACAAAGTCTATGAATGTAACAAATTTATAACAAACAAAACCTTTCAA
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCGCT
CCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGTATGAATTCTTCAACCCACC
TCTTTCTTAGTGAATCAGGCGGTGTTTGGATTCTGAGCGTTGCTGGCTTCGCGGC
CTAGCTCGCTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTCGGC
GTAATAGACTATTTCGCTGAGGATTCTGGTCTCTGACTGGAGCCGGGTAAAGATTA
AAGGAAGCTACTAATCCTCATGTCTATCTTTGAGATTAGACCTCAAATCAGGT
AGGACTA

[0658]

[0659] 서열 번호 56: 로도토룰라 터펜도이달리스 CBS8445

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGACTGGCTATT
GGGATCTCGCGAGAGAACCTGACTGCTGGGAAGTTGTACGAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAATGAATATTAGGGTGCTCTTTTCATCAAAGAGGCCTGACCTTCATTCTTCTA
CCCTGTGCACTATTCAAACATTCGGCAGTTGGTAATTTGGCTTGTAAGAGAGCC
AGACGACTCTGCTGAATTCACCTCTAAACTCTAAAGTATAAGAATGTTACAAAT
AAAACAAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACCTTTCGCTCGCTGGTATTCGGCGAGCATGCCTGTTTGAGTG
TCATGAAAACCTCAACCTTCAATTCCTTGTGAATTGTAAGGTGTTTGGATTCT
GAATGTTTGTGCTGGCTTGAAGGGCCCTTGGCTACTTCAAAAGCGAAGCTCATTCTG
TAATACATTAGCATCTCAATTTCAATATTCGATTGACTCGGCGTAATAGACT
TTATTCGCTGAGGACACCTTCAAGGTGGCCGAATTTTCGAGGTAGAAGCTTCC
AATTCGATCAAAAGTCACTCTTAGTTTAGACCTCAGATCAGGCAGGACTA

[0660]

[0661] 서열 번호 57: 야로위아 리폴리티카 CBS10144

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGACCTTGGGAGGGCGAGAT
GAGGGGGGCAACCCCTTTTGAACATCCAAACTTGGTCAAACCTTGATTATTTAGA
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT
ATTGATTTTATCTATTTCTGTGGATTCTGGTATATTACAGCGTCATTTTATCTCA
ATTATACTATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGC
GAACCGGATATTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCGGTATGGTATTCGGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGTTCCCTCTG
GGATCGCATTGCTTTCTTGAAATGGATTTTTTAACTCTCAATTATTACGTCATT
TCACCTCCTTCATCCGAGATTA

[0662]

[0663] 서열 번호 58: 로도토룰라 글루티니스 변종 글루티니스 CBS5805

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATT
GGGAGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGAATATTAGGGTGTCCTCAACTTAACTTGAACCCGACCTCACTTTCTAA
CCCTGTGCATTTGTCTTGGGTAGTAGCTTGGCTCGGCGAGCGAATCCCATTTCA
TTACAAACACAAAGTCTATGAATGTAAACAAATTTATAACAAACAAACTTTCAA
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCT
CCATGGTATTCGGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGAATTCTTCAACCCACC
TATTTCTTAGTGAATCAGGCGGTGTTTGGATTCTGAGCGCTGCTGGCCTCACGG
CCTAGCTCGCTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAATTCGGATTGACTCGG
CGTAATAGACTATTTCGCTGAGGATTCTGGTCTCTGACTGGAGCCGGGTGAGATT
AAAGGAAGCTACTAATCCTCATGTCTATCTTGAGATTAGACCTCAAATCAGGTA
GGACTA

[0664]

[0665] 서열 번호 59: 야로위아 리폴리티카 CBS10143

GTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTTAGTG
AGACCTTGGGAGGGCGAGATGAGGGGGGCAACCCCTTCTGAACATCCAAACTT
GGTCAAACCTGATTATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT
GAACCTGCGGAAGGATCATTTATTGATTTTATCTATTTCTGTGGATTCTATTTCTA
TTACAGCGTCATTTTATCTCAATTATACTATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTC
ACATCGATGAAGAACGCAGCGAACCGCGATATTTTTTGTGACTTGCAGATGTGA
ATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCGCGGTATGGCATTCCGTACCGCACGGAT
GGAGGAGCGTGTTCCCTCTGGGATCGCATTGCTTTCTTGAAATGGATTTTTTAA
CTCTCAATTATTACGTCATTTACCTCCTTCATCCGAGATTACCCGCTGAACTTA
AGCATATCAA

[0666]

[0667] 서열 번호 60: 리포마이세스 테트라스포러스 CBS5607

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATT
GGGAGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCTGAGAAGTTGTACGAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGAATCTAGGACGTCCAACCTAACTTGGAGTCCGAAATCTCACTTTCTAA
CCCTGTGCATCTGTTAATTGGAATAGTAGCTCTTCGGAGTGAACCACCATTAC
TTATAAAACACAAAGTCTATGAATGTATACAAATTTATAACAAAACAAAACCTT
CAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
ACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG
CGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTTCAAC
CCACCTCTTTCTTAGTGAATCTGGTGGTGCTTGGTTTCTGAGCGCTGCTCTGCTT
CGGCTTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAACCGAACTTCGGATTGACT
TGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGATTCTAGTTTACTAGAGCCGAGTTGGGTT
AAAGGAAGCTCCTAATCCTAAAGTCTATTTTTTGATTAGATCTCAAATCAGGTA
GGACTA

[0668]

[0669] 서열 번호 61: 야로위아 리폴리티카 CBS5589

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGACCTTGGGAGGGCGAGAT
GAGGGGGGCAACCCCTTCTGAACATCCAACCTTGGTCAAACCTTGATTATTTAGA
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT
ATTGATTTTATCTATTTCTGTGGATTCTATTCTATTACAGCGTCATTTTATCTCA
ATTATAACTATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGC
GAACCGGATATTTTTTGTGACTTGAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGCA
CATTCGCGGTATGGCATTCCGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGTTCCCTCTG
GGATCGCATTGCTTTCTTGAATGGATTTTTTAAACTCTCAATTATTACGTCA
TTCACCTCCTTCATCCGAGATTA

[0670]

[0671] 서열 번호 62: 리포마이세스 테트라스포러스 CBS8724

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGAAGTGGCTCCA
GAAAATGGGAAACCATTATCAGGAGCTGGAAAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATT
AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGAGACTTACTGAAGCTT
AGCAGCCCCGAAAAGGCGAATGCTAGCGACTATAAATAAATATGGCGTTCTTAA
ATGCTAGTCTCTGATTAGAGGCGACATTGCCAAATTGCGGGGACATCCTAAAGA
TCTTGATACCAAGCTGGTAGTCGAAAGACGCCAGTGGCCGAGCTAACAGCCCT
GGGTATGGTAATAATTCAAGATATGGAACAATGGGTAAATCCGCAGCCAAGTCC
TAAACTACGCAAGTAGCATGGATGCAGTTCACAGGCCAAATGGTGATGGGTAG
ATTACTAAATGTGCTTAAGATATGGTCCGTCCCGCTGTGAGAGCAGATGGGAAG
CTACAAAGCAGACTCGTGAGTTTGCGCAACGTAACATAAAACGTTCCGTAGGT
GAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTATTTGTCTTTTAAAGACATCTCTATC
CATAAACTCTTTTTCTAAAAAGACATGATTTACACAATTAGTCTGAATGATTAT
ATAAAAATCTTCAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCAAAATGCGATAAGTATTGTGAATTGCAGGATTTTGTGAATCATCG
AATTTTTGAACGCACATTGCACCTTCTGGTATTCGGAGGGTATACCTGTTTGA
CGTCATTTATATACTCAAAACTTCGTTTTTGGTGATGGGCACATATCTGGTGAGA
GCTAGATTTGCCTGAAATATAGTGGTAGAGATTGCTACGAGTTATGCAAGTTAG

[0672]

CCAATGCTATTAAGTTAATTCGTTGGTGAAGCATGCGGAGCTTTAGTGATCGCC
TTCCTTAACTATIGGAATTTTTCTAATTTTGACCTCAAATCAGGCAGGAGTA

[0673]

[0674] 서열 번호 63: 로도스포리디움 스파에로카르푸 CBS2371

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGACCGGCTATT
GGGAGCTCGCGAGAGCACCCGACTGCTGGGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGAATATAGGACGTCCAACCTTAACCTTGGAGTCCGAACTCTCACTTTCTAA
CCCTGTGCATTTGTTTGGGATAGTAGCCTCTCGGGGTGAACCTCTATTCACTCAT
AAACACAAAAGTCTATGAATGTATTTAATTTATAACAAAATAAAACTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCA
TGGTATTTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGAATACTTCAACCCTCCTCT
TTTCTAGTGAAAGAGAAGGTGCTTGGTTTCTGAGCGTTTGTGCGCCTCACGGT
CGAGCTCGCTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTTGGC
GTAATAGACTATTGCTGAGGAATTCTAATCTTCGGATTAGAGCCGGGTGGGT
TAAAGGAAGCTTCTAATCCTAATGTCTATATTTTAGATTAGATCTCAAATCAG
GTAGGACTA

[0675]

[0676] 서열 번호 64: 트리코스포론 브라시카에 CBS6382

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCTCCGGATTGGCGTTG
AGAAGCCGGCAACGGCATCTCTTGGCCGAGAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGATTGCCTTAATTGGCTTAAACTATATCCAACCTACACCTGTGAACCTGTC
GATTGAATCTTCGATTCAATTTTACAAACATTGTGTAAAGAACGTCATTAGATC
ATAACAAAAAATACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGA
ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCAACTTGGCGCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGT
GTCATGAAATCTCACACATCAAGGTTTCTTGATGAAGTGGATTTGGAGGTTGCC
AGTCTAACTGGCTCCTCTTAAAGGAGTTAGCATATTTGATTATTGCTGTCTGGCG
TAATAAGTTTCGCTAGTTTGGCATTTTGAAGTGTGCTTCTAATCGTCTTCGGACA
ATTTTTGACTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTA

[0677]

[0678] 서열 번호 65: 트립토크스 커바투스 CBS 2755 및 리포마이세스 테트라스포리스 CBS7656

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGATTTCCGGATTGGCGTTA
GGAAGCCGGCAACGGCATCTCTTGGCTGAGAAGCTACTCAAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGATTGCTTTCGGGCTAACTATATCCATAACACCTGTGAACCTGTTGATTG
ACTTCGGTCAATATTTTACAAACATTGTGTAATGAACGTCATGTTATAATAAC
AAATATAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCAACTTGCGCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATG

[0679]

AAATCTCAACCATTAGGGTTTCTTAATGGCTTGGATTGGACGTTTGCCAGTCA
AATGGCTCGTCTTAAAAGAGTTAGTGAATTTAACATTTGTCTTCTGGCGTAATA
AGTTTCGCTGGGCTGATAGTGTGAAGTTTGCTTCTAATCGTCCGCAAGGACAAT
TCTTGAACCTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTA

[0680]

[0681] 서열 번호 66: 리포마이세스 스타케이 CBS7786

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGACTGGCTCCA
GAAAATGGGAAACCATTATCAGGAGCTGGAAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTT
AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC
ATTACTGAGTATTTGTCTTTTCAAGACATCTCTATCCATAAACTCTTTTTTTA
AAAAGACATGATTTATAACAATTAGTCTGAATGATTATTTTAAATCTTCAAAA
CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATTGC
GATAAGTAATGTGAATTGCAGGATTTTGTGAATCATCGAATTTTGAACGCACA
TTGCACCTTCTGGTATTCCGGAGGGTATACCTGTTTGAGCGTCATTTATATACTC
AAAACCTTACGTTTTGGTGATGGGCACGTATCTGGCTTCTAAGTTAGATTTGCCTG
AAATATAGCGGTAGAGGTGCTAGAAAGCGATGCAAGTTAGCCAATGCTATTAA
AGTTAATTCGTTGGTGACGCATGTTGAGCTTTTGGTGAAGTCTTCCTTAATTATT
GGAATTTTTTTCTAATTTTGACCTCAAATCAGGCAGGAGTA

[0682]

[0683] 서열 번호 67: 야로위아 리폴리티카 리폴리티카 CBS6012

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGACCTTGGGAGGGCGAGAT
GAGGGGGGCAACCCCTTTTGAACATCCAACTTGGTCAAACCTTGATTATTTAGA
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT
ATTGATTTTATCTATTTCTGTGGATTTCTATTCTATTACAGCGTCATTTTATCTCA
ATTATAACTATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGC
GAACCGCGATATTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCGGTATGGCATTCCGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGTCCCTCTG
GGATCGCATTGCTTTCTTGAAATGGATTTTTTAAACTCTCAATTATTACGTCAT
TTCACCTCCTTCATCCGAGATTA

[0684]

[0685] 서열 번호 68: 트리코스폰 루비에리 변종 루비에리 CBS8265

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCTCCGGATTGGCGTTG
AGAAGCCGGCAACGGCATCTCTTGGCCGAGAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGATTGCCATCTTGGCTTAAACTATATCCATCTACACCTGTGAACCGTTTG
ATTGAATCTTCTGATTCAATTTTACAAACATTGTGTAATGAACGTCATTAGATCA
TAATAAGAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCAACTTGCCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTG
TCATGAAATCTCAACCATTAGGGTTTCTTAATGGCTTGGATTTGGAGGTTGCCAT
TCTAAATGGCTCCTCTTAAAAGAGTTAGCGAGTTAACTATTGCTATCTGGCGT

[0686]

AATAAGTTTCGCTGGAATGGTATTGTGAAGCGCGCTTCTAATCGTCTTCGGACA
ATTTTTTGACTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTA

[0687]

[0688] 서열 번호 69: 게오텐리쿰 불가레 CBS 10073

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATTGATTAGT
TGAGAGGGGAGACTTTTCTGACTGAACGAGAAGCTAGTCAAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TAAAGATTTAATATTAATGTGAAATTAACGATATTAACAAAAAATCATAC
AATCAATTATAAAAAAATCAAACTTTTAAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGTA
TCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATTTCTTGTGAATTGCAGAAAGTGAAT
CATCAGTTTTTTGAACGCACATTGCATTTGGGGTATCCCCAAAGTATACTTGTT
TGAGCGTTGTTTCTCTTCTTGAATTGCATTGCTTTTCTAAAAAATCGAATCAAAT
TCGTTTGAAACATCCATTCTTCAACCTCAGATCAAGTAGGATTA

[0689]

[0690] 서열 번호 70: 로도스포리디움 토룰로이데스 CBS14

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATTGGCTATT
GGGAGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACCTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGAAATATTAGGGTGCCAACTTAACTTGGAGCCCGACCCCTCACTTTCTAA
CCCTGTGCATTTGTCTTGGGTAGTAGCTTGCCTCAGCGAGCGAATCCCATTTTAC
TTACAAACACAAAGTCTATGAATGTAACAAATTTATAACAAAACAAAACCTTTCA
ACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAC
GTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCG
CTCCATGGTATTCGCTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTTCATGAATTCTTCAACCCA
CCTCTTTCTTAGTGAATCAGGCGGTGTTTGGATTCTGAGCGCTGCTGGCTTCGCG
GCCTAGCTCGCTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTCG
GCGTAATAGACTATTGCTGAGGATTCTGGTCTCTGACTGGAGCCGGGTAAGGT
TAAAGGGAGCTACTAATCCTCATGTCTATCTTGAGATTAGACCTCAAATCAGGT
AGGACTA

[0691]

[0692] 서열 번호 71: 로도토코를라 글루티니스 변종 글루티니스 CBS6020 및 리포마이세스 오리엔탈리스 CBS10300

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATT
GGGAGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCTGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGAATCTAGGACGTCCAACCTTAACCTTGGAGTCCGAACTCTCACTTICTAA
CCCTGTGCATCTGTTAATTGGAATAGTAGCTCTTCGGAGTGAACCACCATTAC
TTATAAAACACAAAGTCTATGAATGTATACAAATTTATAACAAAACAAAACCTT
CAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
ACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG
CGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTTCAAC
CCACCTCTTTCTTAGTGAATCTGGTGGTGCCTTGGTTTCTGAGCGCTGCTCTGCTT
CGGCTTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAACCGAACTTCGGATTGACT

[0693]

TGGCGTAATAGACTATTTCGCTGAGGATTCTAGTTTACTAGAGCCGAGTTGGGTT
AAAGGAAGCTCCTAATCCTAAAGTCTATTTTTTGATTAGATCTCAAATCAGGTA
GGACTA

[0694]

[0695] 서열 번호 72: 로도토코를라 오란티아카 CBS317

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGATTTCCGGATTGGCGTTA
GGAAGCCGGCAACGGCATCCTTTGGCTGAGAAGCTACTCAAACCTTGGTCATTTA
AAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTAGTGAATTTGCCTTCGGGCTAACTATATCCATAACACCTGTGAACCTGTTGATTG
ACTTCGGTCAATATTTTACAAACATTGTGTAATGAACGTCATGTTATAATAAC
AAATATAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCAACTTGCCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATG
AAATCTCAACCATTAAGGTTTTCTTAATGGCTTGGATTGGACGTTTGCCACATCA
AATGGCTCGTCTTAAAAGAGTTAGTGAATTTAACATTTGTCTTCTGGCGTAATA
AGTTTTCGCTGGGCTGATAGTGTGAAGTTTGCTTCTAATCGTCCGCAAGGACAAT
TCTTGAACCTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTA

[0696]

[0697] 서열 번호 73: 토룰라스포라 텔브루에키 CBS2924

CGCCCGTCGCTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATCTGCTTAG
AGAAGGGGGCAACTCCATCTCAGAGCGGAGAATCTGGTCAAACCTTGGTCATTT
AGAGGAACTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC
ATTAGAGAAATCTATATGAATGAAGTTAGAGGACGTCTAAAGATACTGTAAGA
GAGGATCAGGTTCAAGACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTGCGGCTTGGTTTCGCT
TTTGCGGAACATGTCTTTCTCGTTGTTAACTCTACTTCAACTTCTACAACACTG
TGGAGTTTCTACACAACCTTTCTTCTTTGGGAAGATACGTCTTGTGCGTGCTTC
CCAGAGGTGACAAACACAAACAACCTTTTATTATTATAAACCAAGTCAAACCAA
TTTCGTTATGAAATTAATAATTTTAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATT
CCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGG
CATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACAATCATGTTTGGTAGTGAGTGA
TACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATGCTAGCCTGTTATTGGTTGTGATTTTG
CTGGCTTGGATGACTTTGTCCAGTCTAGCTAATACCGAATTGTCGTATTAGGTTT
TACCAACTTCGGCAGACTGTGTGTTGGCTCGGGCGCTTTAAAGACTTTGTGCTA
AACGATTTATCGTTTGTGTTGAGCTTTTCGCATACGCAATCCGGGGCAACAATAC
TCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATA

[0698]

[0699] 서열 번호 74: 프로토테카 모리포르미스(UTEX1435) 유래 5' 프라이머 Δ12 FAD 게놈 증폭

[0700] 5'-TCACTTCATGCCGGCGGTCC-3'

[0701] 서열 번호 75: 프로토테카 모리포르미스(UTEX1435) 유래 3' 프라이머 Δ12 FAD 게놈 증폭

[0702] 5'-GCGCTCCTGCTTGGCTCGAA-3'

[0710] 서열 번호 79: pSZ1125 5' 유전자 표적화 서열(FAD2C)

gctcttcgaggggctggtcgaatccttcaggcggtgttaccgagaaagaaagggtgccgattcaagcagacccatgtgccg
ggccctgtggcctgtgttggcgctatgtatgacccccctcacccaattgtcgcagtttgcgactccataaactcaaacagca
gcttctgagctgcgtgttcaagaacacctctgggtttgtcaccgcgcgaggtcgacgccagcatggctatcaagacgaacagg
cagccgtgtgagaagcctcgttccagatcgggacgctgcgcaaggccatccccgcgcactgttccgagcgctcggcgcttcgta
gcagcatgtacctggcctttgacatcgcggtcatgtccctgtctacgtcgctcgacgtacatcgacctgcaccgggtgctacgtg
ggcaagtacggcatcatgtggcgctctactgtgtcttcagggtgtgttggagggttttgggtgcccgtattgaggtcctggtggcgcg
catggaggagaaggcgctgtcccgctgaccccccggtacccctccggcaccttccaggcgccctcggcacgggtgtctgg
gtgtgcgcgcacgagtgcgggccaccaggccttttctccaggccatcaacgcagcggtgggctggtgttccacagcctgc
tgctgggtgcccctactactcctggaagcactcgacccgggtacc

[0711]

[0712] 서열 번호 80: pSZ1125 3' 유전자 표적화 서열(FAD2C)

ccgccaccactccaacacgggggtgcttggaagaaggacgaggtgttgtgcccgcaccgcgcagtgggcgacgagggcctgg
agtgggaggagtggtgctgcccatccgcatgggcaagggtgctggtcacccctgacctgggctggcgctgtacctatgttcaogtc
gctcgcggcgctacccgcgttcccaaccactttgacctggtgctccatcttcagcaagcgcgagcgcatcgaggtggtcat
ctccgacctggcgctgtgtgcggtgctcagcggtcagcggtgctggccgcaccatgggctggcgctggtgtaagaccta
cgtgtgtgcccactcatgacgtgtaacatgtggctcgtgctcatcagctgctccagcacagcaccggcgctgcccactacttga
gaaggactgggactggtgctgcgggcgccatggccaccgtggaccgtccatgggcccgccttcatggacaacatcctgcacca
catctccgacacccagtgctgcaccactcttcagcaccatcccgactaccacgagggagggcctccgcccacatcaggccc
atcctgggcaagtactaccagtcgcagcggctgggtcgccgcgcctgtgggaggaactggcgcgactggcgctacgtcgtc
ccggacgcgcccggagacgactccgcgctgtgttccacaagtgtgagtgagtgagaagagc

[0713]

[0714] 서열 번호 81: 5'6S 게놈 공여 서열

GCTCTTCGCCGCCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCG
CCTTGGCCTTTTCGCCCGCTCGTGCCTGCTGATGTCCATCACCAGGTCCAT
GAGGTCTGCCTTGCGCCGGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGGCGGCCAAGAGGA
GCATGAGGGAGGACTCCTGGTCCAGGGTCTGACGTGGTTCGCGGCTCTGGGAG
CGGGCCAGCATCATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCGCTCCAACCTGGTCCTCC
AGCAGCCGCAGTCGCCGCCGACCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTAT

[0715]

GAATTGTACAGAACAACCACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATG
GCTTTACCTGGATGACGGCCTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCCTCGCTGCCGCC
GCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCCAGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCAC
GCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTGAGGACAGTCGGGGAACTCTGATCAGTCTA
AACCCCTTTCGCGTTAGTGTGCCATCCTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTT
GTTGTGCGCCACCCCCACACCACCTCCTCCCAGACCAATTCTGTACCTTTTTC
GCCAAGGCATCGGCCTCGGCCTGCAGAGGACAGCAGTGGCCAGCCGCTGGG
GGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACC

[0716]

[0717] 서열 번호 82: 시나모름 캠포라 티오에스테라제에 대한 관련 발현 구조물(β tub.:neo::nitred:: β tub.:C.camphora TE::nitred)

CTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCT
TCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGG
GGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTAAATAGCCAG
GCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCT
AGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAA
GGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACCTCTAGAATATCA
ATGATCGAGCAGGACGGCCTCCACGCCGGCTCCCCGCGCCTGGGTGGAGCG
CCTGTTTCGGCTACGACTGGGCCCAGCAGACCATCGGCTGCTCCGACGCCGCCGT
GTTCCGCCTGTCCGCCCAGGGCCGCCCGTGTGTTTCGTGAAGACCGACCTGTC
CGGCGCCCTGAACGAGCTGCAGGACGAGGCCGCCCGCCTGTCCTGGCTGGCCA
CCACCGGCGTGCCCTGCGCCGCCGTGCTGGACGTGGTGACCGAGGCCGGCCGC
GACTGGCTGCTGCTGGGCGAGGTGCCCGGCCAGGACCTGCTGTCCTCCACCTG
GCCCCCGCCGAGAAGGTGTCCATCATGGCCGACGCCATGCGCCGCCTGCACACC
CTGGACCCCCGCCACCTGCCCTTCGACCACCAGGCCAAGCACCGCATCGAGCGC
GCCCCGACCCGCATGGAGGCCGGCCTGGTGGACCAAGGACGACCTGGACGAGGA
GCACCAGGGCCTGGCCCCCGCCGAGCTGTTGCGCCGCCCTGAAGGCCCGCATGCC
CGACGGCGAGGACCTGGTGGTGACCCACGGCGACGCCTGCCTGCCCAACATCA
TGGTGGAGAACGGCCGCTTCTCCGGCTTCATCGACTGCGGCCGCCCTGGGCGTGG
CCGACCGCTACCAGGACATCGCCCTGGCCACCCGCGACATCGCCGAGGAGCTG
GGCGGCGAGTGGGCCGACCGCTTCTGCTGTGTACGGCATCGCCGCCCCCGAC
TCCCAGCGCATCGCCTTCTACCGCCTGCTGGACGAGTTCTTCTGACAATTGGCA
GCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTTCGTGTGATGGACTG
TTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAAC
AGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCTAGCTGCTT
GTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCCTCCCTCGTTTCATATCGCTTG
CATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGC
TCCTGCTCACTGCCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTG
GTA CTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGG
ATGGGAACACAAATGGAGGATCCCGCGTCTCGAACAGAGCGCGCAGAGGAACG
CTGAAGGTCTCGCCTCTGTGCGACCTCAGCGCGGCATACACCACAATAACCACC
TGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTAGCGAAGCGTCCGGTTCACACACGT
GCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGATCGGTGGAGCTGATGGTCGAAA
CGTTCACAGCCTAGGGATATCGAATTCCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCA
AAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGCGCTGCATGCAACACCGATG

[0718]

ATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCT
CCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAG
CGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGC
CACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCA
GTCAACAACCCGAAACACTAGTATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAA
TGCCCCGCTGCGGGGACCTGCGTCGCTCGGCGGGCTCCGGGCCCCGGCGCCCAGC
GAGGCGCCTCCCCGTGCGCGGGGCGCGCCCCGACTGGTCCATGCTGTTCCGCCGT
GATCACCACCATCTTCTCCGCCGCCGAGAAGCAGTGGACCAACCTGGAGTGA
AGCCCAAGCCCAACCCCCCAGCTGCTGGACGACCACTTCGGCCCCCAGCGCC
TGGTGTTCGCGCACCTTCGCCATCCGCAGCTACGAGGTGGGCCCCGACCGCT
CCACCAGCATCTGTGCGGTGATGAACCACCTGCAGGAGGCCGCCCTGAACCAC
GCCAAGTCCGTGGGCATCTGGGCGACGGCTTCGGCACCACTTGGAGATGTCC
AAGCGCGACCTGATCTGGGTGGTGAAGCGCACCCACGTGGCCGTGGAGCGCTA
CCCCGCTGGGGCGACACCGTGGAGGTGGAGTGTGGGTGGGCGCTCCGGCA
ACAACGGCCCGCCGACGACTTCCTGGTGCAGGACTGCAAGACCGGCGAGATC
CTGACCCGCTGCACCTCCCTGAGCGTGATGATGAACACCCGCACCCGCCGCTG
AGCAAGATCCCCGAGGAGGTGCGCGGGGAGATCGGCCCCGCTTCATCGACAA
CGTGGCCGTGAAGGACGAGGAGATCAAGAAGCCCCAGAAGCTGAACGACTCCA
CCGCCGACTACATCCAGGGCGGCCTGACCCCCCGCTGGAACGACCTGGACATC
AACCAGCACGTGAACAACATCAAGTACGTGGACTGGATCCTGGAGACCGTGCC
CGACAGCATCTTCGAGAGGCCACCATCTCCTCCTTCACCATCGAGTACCGCCG
CGAGTGACCATGGACAGCGTGCTGCAGTCCCTGACCACCGTGAGCGGCGCT
CCTCCGAGGCCGCTGGTGTGCGAGCACCTGCTGCAGCTGGAGGGCGGCAAGC
GAGGTGCTGCGCGCCAAGACCGAGTGGCGCCCCAAGCTGACCGACTCCTTCGG
CGGCATCAGCGTGATCCCCGCCGAGTCCAGCGTGAATGGACTACAAGGACCACG
ACGGCGACTACAAGGACACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGA
CTCGAGGCGAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCTGCT
GATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCT
TTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGGAGTTGC
TAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCCTCCCTCGTTTCA
TATCGCTTGATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGC
TGCTCCTGCTCCTGCTCACITGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGT
ATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAA
GTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAAAGCTT

[0719]

[0720]

서열 번호 83: 프로토텀카 모리포르미스 SugT 당 운반체 프로모터/5" 린TR

CCAGGCAGGCGGTAGGGTTGCCGATTGCTTGAGCGAATTGGAAGATATAATTTT
TTGTGGTGTGCTGGACGCTGTTTGTGGCGCTCCTTTTTGGAGAAGATTGCGTGG
GGGAGCTTTCCATGTACCACGCTTCCTTCTGAAAGGATTCTGGCCGAGTCCTGA
TGAGCCCAAAGAAAACACCTGCCTTTCACTGCTGGCACTCTGAAAACGTCAACA
GATGATTATACATGTCAAAAAGGCAGCCGATTAGGAACGGGAGCTCTGGCCG
TTGTTTGGCTGCCTGGGCTGATTGAAGTGAATCCACCTGTTTGAATGAAGGCG
GTCGAGTGAATTATCGACCGGAGCTGTCCGGAAAGGCGTCCGGGGCAGAGTGA
GGTGTGCTGCGGCTGGTTGTCTGTTCAAAAAGACCCCGGTAGCCCAACAATCACGA
ACGAAAGGAATATAATTGCTTGCATACTATACATTCACTTTCTATGTGGCGGGT
AGACAAGTCTCATGGGCTTCTAAAGGCTGTCCCTTGAAGGCTACTTATAAAAAC

[0721]

TTGCTGCGCCATGGCACGGATCGCGCTTGCGCAGGCTGCAACCCTGCGCGCAAG
GTCAAATACACAGCAAAAGATACTAACAGAATTTCTAAAAACATTTAAATATTT
GTTTCGACAGCAATTGTGGTTCGTAGGCACGCAAAAGACTTTGTTTGGGCCC
ACCGAGCATCCACGCTGGCAGTCAAGCCAGTCCGATGTGCATTGCGTGGCAGC
ATCGAGGAGCATCAAAAACCTCGTGCACGCTTTCTGTCAATCATCATCAACCA
CTCCACCATGTATACCCGATGCATCGCGGTGCGCAGCGCGCCACGCGTCCCAGA
CCCCCCCCAAAACCCAGCAGCGGCGAAAGCAAATCTTCACTTGGCCGAAACCC
CGAGCAGCGGCATTACACGTTGGGCGAAAACCCCACTTGCCCTAACAGGCGTA
TGCTGTGCTGCACGATGCCTGACAACGGTATTATAGATATACTGATTAATGT
TTGAGTGTGTGCGAGTCGCGAATCAGGAATGAATTGCTAGTAGGCACTCCGACC
GGGCGGGGGCCGAGGGACCA

[0722]

[0723] 서열 번호 84: amt03 프로모터/UTR 서열

GGCCGACAGGACGCGCGTCAAAGGTGCTGGTCTGTATGCCCTGGCCGGCAGG
TCGTTGCTGCTGCTGGTTAGTGATTCCGCAACCCTGATTTTGGCGTCTTATTTTG
GCGTGGCAAACGCTGGCGCCCGCGAGCCGGGCGGCGGCGATGCGGTGCCCA
CGGCTGCCGGAATCCAAGGGAGGCAAGAGCGCCCGGGTCAGTTGAAGGGCTTT
ACGCGCAAGGTACAGCCGCTCCTGCAAGGCTGCGTGGTGGAATTGGACGTGCA
GGTCCTGCTGAAGTTCCTCCACCGCCTCACCAGCGGACAAAGCACCGGTGTATC
AGGTCCGTGTCACTCTAAAGAGCTCGACTACGACCTACTGATGGCCCTAG
ATTCTTCATCAAAAACGCCTGAGACACTTGCCAGGATTGAAACTCCCTGAAGG
GACCACAGGGGCCCTGAGTTGTTCTTCCCCCGTGGCGAGCTGCCAGCCAGG
CTGTACCTGTGATCGAGGCTGGCGGGAAAATAGGCTTCGTGTGCTCAGGTCATG
GGAGGTGCAGGACAGCTCATGAAACGCCAACAATCGCACAAATTCATGTCAAGC
TAATCAGCTATTTCTCTTCACGAGCTGTAATTGTCCCAAAATCTGGTCTACCG
GGGGTGATCCTTCGTGTACGGGCCCTTCCCTCAACCCTAGGTATGCGCGCATGC
GGTCGCCGCGCAACTCGCGCGAGGGCCGAGGGTTTGGGACGGGCCGTCCCGAA
ATGCAGTTGCACCCGGATGCGTGGCACCTTTTTTGCGATAATTTATGCAATGGA
CTGCTCTGCAAAATTCGGTCTGTGCGCAACCCTAGGATCAGCGGCGTAGGAT
TTCGTAATCATTCTGCTGATGGGGAGCTACCGACTACCTAATATCAGCCCGA
CTGCCTGACGCCAGCGTCCACTTTTGTGCACACATTCCATTCTGCCCCAAGACA
TTTCATTGTGGTGCAGAGCGTCCCGAGTTACGCTCACCTGTTTCCCGACCTCCTT
ACTGTTCTGTGACAGAGCGGGCCACAGGCCGGTTCGCAGCC

[0724]

[0725] 서열 번호 85: 클로렐라 불가리스 니트레이트질산염 환원 효소 3'UTR

GCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCTGTGATGG
ACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATC
AAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGATTGCTAGCT
GCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCGAGCATCCCTTCCCTCGTTTCATATCG
CTTGCAATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTC
CTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCT
CCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGT
GGGATGGGAACACAAATGGAGGATCC

[0726]

[0727] 서열 번호 86: 코돈 최적화된 클로렐라 프로토테코이데스(UTEX250) 스테아로일 ACP 불포화 효소 운반 펩티드 cDNA 서열

ACTAGTATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATGCCCGCTGCGGCGAC
CTGCGTCGCTCGGCGGGCTCCGGGCCCCGGCGCCAGCGAGGCCCTCCCCGTG
CGCGGGCGCGCC

[0728]

[0729] 서열 번호 87: pSZ1135 유래 클로렐라 프로토테코이데스 UTEX250 스테아로일-ACP 불포화 효소 운반 펩티드 포함 리시누스 커뮤니스 ACP-티오에스테라제의 코돈 최적화된 암호화 서열

ACTAGTATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATGCCCGCTGCGGCGAC
CTGCGTCGCTCGGCGGGCTCCGGGCCCCGGCGCCAGCGAGGCCCTCCCCGTG
CGCGGGCGCGCCCGCTCCTACGAGGTGGGCATCAACAAGACCGCCACCGTGGA
GACCATCGCCAACCTGCTGCAGGAGGTGGGCTGCAACCACGCCAGTCCGTGG
GCTTCTCCACCGACGGCTTCGCCACCACCACTCCATGCGCAAGATGCACCTGA
TCTGGGTGACCGCCCGCATGCACATCGAGATCTACAAGTACCCCGCTGGTCCG
ACGTGGTGGAGGTGGAGACCTGGTGCCAGTCCGAGGGCCGCATCGGCACCCGC
CGCGACTGGATCCTGACCGACTACGCCACCGGCCAGATCATCGGCCGCGCCACC
TCCAAGTGGGTGATGATGAACCAGGACACCCGCCCGCTGCAGAAGGTGACCGA
CGACGTGCGCGAGGAGTACCTGGTGTCTTGCCCCGCGAGCTGCGCCTGGCCTT
CCCCGAGGAGAACAACCGCTCCTCCAAGAAGATCTCCAAGCTGGAGGACCCCG
CCCAGTACTCCAAGCTGGGCCTGGTGCCCGCCGCGCCGACCTGGACATGAACC
AGCACGTGAACAACGTGACCTACATCGGCTGGGTGCTGGAGTCCATCCCCAG
GAGATCATCGACACCCACGAGCTGCAGACCATCACCTGGACTACCGCCGCGA
GTGCCAGCACGACGACATCGTGGACTCCCTGACCTCCGTGGAGCCCTCCGAGAA
CCTGGAGGCCGTGTCCGAGCTGCGCGGCACCAACGGCTCCGCCACCACCAACCG
CCGGCGACGAGGACTGCCGCAACTTCCTGCACCTGCTGCGCCTGTCCGGCGACG
GCCTGGAGATCAACCGCGGCCGACCGAGTGGCGCAAGAAGTCCGCCCCCATG
GACTACAAGGACACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGA
CGACGACGACAAGTGAATCGAT

[0730]

[0731] 서열 번호 88: 리시누스 커뮤니스 ACP-티오에스테라제의 아미노산 서열(수탁 번호 제ABS30422.1호)

MLKVPCCNATDPIQSLSSQCRFLTHFNRPYFTRRPSIPTFFSSKNSSASLQAVVSDIS
SVESAACDSLNRRLRLGKLTEDGFSYKEKFIVRSYEVGINKTATVETIANLLQEVGC
NHAQSVGFSTDGFATTTSMRKMHLIWWVTARMHIEIYKYPAWSDVVEVETWCQSEG
RIGTRRDWILTDYATGQIIGRATSKWVMNNDTRRLQKVTDDVREEYLVFCPREL
RLAFPEENNRRSSKKISKLEDPAQYSKLGVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIP
QEIIDTHELQTITLDYRRECQHDIDVDSLTSVEPSENLEAVSELRGTNNGSATTTAGDE
DCRNFLHLRLSGDGLNRRGRTEWRKKSAR

[0732]

[0733] 서열 번호 89: 클라미도모나스 레인하르트티 TUB2 프로모터/5'UTR

CTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCT
TCCCGGCCTGTCATGCAACACCGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGG
GGCTGTCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAG
CCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCT
AGATCACTACCACCTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAA
GGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAAC

[0734]

[0735] 서열 번호 90: pSZ1468 유래 헤어핀 RNA 발현 카세트의 FADc 부

ACTAGTATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTTAC
GATCGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCT
TCGTAGCAGCATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTCATGTCCCTGCTCTACGTC
GCGTCGACGTACATCGACCCTGCACCGGTGCCTACGTGGGTCAAAGTACGGCATC
ATGTGGCCGCTCTACTGGTCTTCCAGGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCGTA
TTGAGGTCTTGGTGGCGCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCC
CGGTACTCCCTCCCGCACCTTCCAGGGCGGTACGGGAAGAACCAGTAGAGCG
GCCACATGATGCCGTACTTGACCCACGTAGGCACCGGTGCAGGGTCGATGTACG
TCGACGCGACGTAGAGCAGGGACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATG
CTGCTACGAAGCGCCGAGCGCTCGAAACAGTGCGCGGGGATGGCCTTGCGCAG
CGTCCCGATCGTGAACGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTGCTCTTGATAGC
CAT

[0736]

[0737] 서열 번호 91: pSZ1468 유래 FADc 헤어핀 RNA 발현 카세트의 관련 부

GCTCTTCGCCGCCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGGCGCCAGCG
CCTTGGCCTTTTCGCCGCGCTCGTGCGCGTCGCTGATGTCCATCACCAGGTCCAT
GAGGTCTGCCTTGCGCCGGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGGCGGCCAAGAGGA
GCATGAGGGAGGACTCCTGGTCCAGGGTCTGACGTGGTTCGCGGCTCTGGAG
CGGGCCAGCATCATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCGCTCCAAGTGGTCTCTCC
AGCAGCCGCAGTTCGCCGCCGACCCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTAT
GAATTGTACAGAACAACACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATG
GCTTTACCTGGATGACGGCCTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCCTCGCTGCCGCC
GCTTCTCCCGCACGCTTCTTCCAGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCAC
GCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTGAGGACAGTCGGGGAACTCTGATCAGTCTA
AACCCCTTGGCGGTTAGTGTTGCCATCCTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTT
GTTGTGCGCCACCCCCACACCACCTCCTCCCAGACCAATTCTGTACCTTTTTG
GCGAAGGCATGEGGCCTCGGCCTGCAGAGAGGACAGCAGTGCCAGCCGCTGGG
GGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACCCCTTCTTGGCGCTATGACACTTCCAGCAA
AAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGA
TGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTC
CAGGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCGCGATTGCAAAGACATTATAGC
GAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCC
ACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTTTCCTCTTCGTTTCAG
TCACAACCCGCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCTTCTGTTCTGCTGG
CCGGCTTCGCCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGC

[0738]

CCCCTGGTGCACCTTACCCCCAACAAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTG
 TGGTACGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAA
 CGACACCGTCTGGGGGACGCCCTTGTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCT
 GACCAACTGGGAGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCG
 GCGCCTTCTCCGGCTCCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCA
 ACGACACCATCGACCCGCGCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCC
 CGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCTACAGCCTGGAOGGCGGCTACACCTTCA
 CCGAGTACCAGAAGAACCCCGTGTCTGGCCGCCAACTCCACCCAGTTCGCGGACC
 CGAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTCCAGAAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGT
 CCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACTCCTCCGACGACCTGAAGTCTTGAAGC
 TGGAGTCCGCGTTTCGCCAACGAGGGCTTCTCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCG
 GCCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCAGCAAGTCTACTGGGTGATGT
 TCATCTCCATCAACCCCGCGCGCCCCGGCGGCTCCTTCAACCAGTACTTCG
 TCGGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCCTTCGACAACCAGTCCCGCGTGG
 TGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTCAACACCGACCCGA
 CCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCCTCCAAGTGGGAGTACTCCGCCT
 TCGTGCCCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGCGCAAGTTCCTCCT
 CAACAACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGAAGGCCG
 AGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCTGGAGCCGGTTCGCCACCAAC
 ACCAGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTGACCTGTCCAACAGCACCAG
 CACCCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATCTCCAA
 GTCCGTGTTCCGCGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCCGAGGA
 GTACCTCCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCTCCTCCTTCTTCTGGACCGCGG
 GAACAGCAAGGTGAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCACCAACCGCATGA
 GCGTGAACAACAGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCTACTACAAGGTG
 TACGGCTTGCTGGACCAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTC
 GTGTCCACCAACACCTACTTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAAC
 ATGACGACGGGGGTGGACAACCTGTTCTACATCGACAAGTTCAGGTGCGCGA
 GGTCAAGTGACAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGAC
 GCTGGTCTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGTCTGCTTGAACCTGTGAATA
 TCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCT
 TTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCAAGCATCCCT
 TCCCTCGTTTCATATCGCTTGCTATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCT
 ATCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTG
 GGCTCCGCTGTATTCTCTGCTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCT
 GATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGGATCCCGCGTCTCGA
 ACAGAGCGCGCAGAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTGCGACCTCAGCGCG
 GCATACACCACAATAACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCITCGTCCATTAGCG
 AAGCGTCCGGTTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGAT
 CGGTGGAGCTGATGGTCCAAACGTTACAGCCTAGGGATATCGAATTCGGCCG
 ACAGGACGCGCGTCAAAGGTGCTGCTCGTGTATGCCCTGGCCGGCAGGTGCTTG
 CTGCTGCTGGTTAGTGATTCCGCAACCCCTGATTTTGGCGTCTIATTTTGGCGTGG
 CAAACGCTGGCGCCCGCGAGCCGGCCGGCGCGATGCGGTGCCCCACGGCTG
 CCGGAATCCAAGGGAGGCAAGAGCGCCCGGTCAGTTGAAGGGCTTTACGCGC
 AAGGTACAGCCGCTCCTGCAAGGCTGCGTGGTGAATTGGACGTGCAGGTCTT
 GCTGAAGTTCCTCCACCGCCTCACCAGCGGACAAAGCACCGGTGTATCAGGTCC
 GTGTATCCACTCTAAAGAGCTCGACTACGACCTACTGATGGCCCTAGATTCTT
 CATCAAAAACGCTGAGACACTTGCCAGGATTGAAACTCCCTGAAGGGACCA

[0739]

CCAGGGGCCCTGAATTGTTCCCTTCCCCCGTGGCGAGCTGCCAGCCAGGCTGTA
CCTGTGATCGAGGCTGGCGGGAAAAATAGGCTTCGTGTGCTCAGGTCATGGGAG
GTGCAGGACAGCTCATGAAACGCCAACAAATCGCACAAATTCATGTCAAGCTAAT
CAGCTATTTCTCTTCACGAGCTGTAATTGTCCCAAAATTCTGGTCTACCGGGGG
TGATCCTTCGTGTACGGGCCCTTCCCTCAACCCTAGGTATGCGCGCATGCGGTC
GCCGCGCAACTCGCGCGAGGGCCGAGGGTTTGGGACGGGCCGTCCCGAAATGC
AGTTGCACCCGGATGCGTGGCACCTTTTTTGCATAATTTATGCAATGGACTGC
TCTGCAAAATTTCTGGCTCTGTGCGCAACCCTAGGATCAGCGGCGTAGGATTTCTG
TAATCATTTCGTCTGTATGGGGAGCTACCGACTACCCTAATATCAGCCCGACTGC
CTGACGCCAGCGTCCACTTTTGTGCACACATTCATTCGTGCCCAAGACATTTCA
TTGTGGTGCAGAGCGTCCCCAGTTACGCTCACCTGTTTCCCGACCTCCTTACTGT
TCTGTGCACAGAGCGGGCCACAGGCCGGTGCAGCCACTAGTATGGCTATCA
AGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTACGATCGGGACGCTGCGC
AAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGCATGTAC
CTGGCCTTTGACATCGCGGTCATGTCCCTGCTCTACGTCGCGTCGACGTACATCG
ACCCTGCACCCGGTGCCTACGTGGGTCAAGTACGGCATCATGTGGCCGCTCTACT
GGTTCCTCCAGGTGTGTTTGAGGGTTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCTGTGGG
GCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGC
ACCTTCCAGGGCGCGTACGGGAAGAACAGTAGAGCGGCCACATGATGCCGTA
CTTGACCCACGTAGGCACCGGTGCAGGGTCGATGTACGTCGACGCGACGTAGA
GCAGGGACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGAAGCGCC
GAGCGCTCGAAACAGTGCGCGGGGATGGCCTTGCGCAGCGTCCCGATCGTGAA
CGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTCTGTCTTGATAGCCATCTCGAGGCAGCA
GCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTG
CCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGC
CTCAGTGTGTGTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGTTGCTAGCTGCTTGTG
CTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCAT
CCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCC
TGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCTGTATTCTCCTGGTA
CTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATG
GGAACACAAATGGAAAGCTGTAGAGCTCTTGTTTTCCAGAAGGAGTTGCTCCT
GAGCCTTTCATTCTCAGCCTCGATAACCTCCAAAGCCGCTCTAATTGTGGAGGG
GGTTCGAATTTAAAAGCTTGGAATGTTGGTTCTGTGCGTCTGGAACAAGCCCAGA
CTTGTGTGCTCACTGGGAAAAGGACCATCAGCTCCAAAAAAGTTGCCGCTCAAAC
CGCGTACCTCTGCTTTTCGCGCAATCTGCCCTGTTGAAATCGCCACCACATTCTA
TTGTGACGCTTGAGCAGTCTGTAATTGCCTCAGAATGTGGAATCATCTGCCCCC
TGTGCGAGCCCATGCCAGGCATGTGCGGGGCGAGGACACCCGCCACTCGTACA
GCAGACCATTATGCTACCTCACAAATAGTTTATAACAGTGACCATATTTCTCGAA
GCTCCCCAACGAGCACCTCCATGCTCTGAGTGGCCACCCCCCGGCCCTGGTGCT
TGCGGAGGGCAGGTCAACCGGCATGGGGCTACCGAAATCCCCGACCGGATCCC
ACCAACCCCGCGATGGGAAGAATCTCCCCGGGATGTGGGCCCAACACCAGC
ACAACCTGCTGGCCCAGGCGAGCGTCAAACCATAACCACACAAATATCCTTGGC
ATCGGCCCTGAATTCTTCTGCCGCTCTGCTACCCGGTGCCTTCTGTCCGAAGCAG
GGGTTGCTAGGGATCGCTCCGAGTCCGCAAACCCTTGTGCGGTGGCGGGGCTTG
TTCGAGCTTGAAGAGC

[0740]

[0741] 서열 번호 92: pSZ1469 유래 헤어핀 RNA 발현 카세트의 FADc 부

ACTAGTATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTAC
GATCGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCT
TCGTAGCAGCATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTCATGTCCCTGCTCTACGTC
GCGTCGACGTACATCGACCCTGCACCGGTGCCTACGTGGGTCAAGTACGGCATC
ATGTGGCCGCTCTACTGGTTCTTCCAGGTGTGTTTGAGGGTTTGGTTGCCCGTA
TTGAGGTCTGGTGGCGCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCC
CGGCTACCTCCCCGACCTTCCAGGGCGCGTACGGGAAGAACCAGTAGAGCG
GCCACATGATGCCGCTATGACCCACGTAGGCACCGGTGCAGGGTCGATGTACG
TCGACGCGACGTAGAGCAGGGACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATG
CTGCTACGAAGCGCCGAGCGCTCGAAACAGTGCGCGGGGATGGCCTTGCGCAG
CGTCCCGATCGTGAACGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTCTGTCTTGATAGC
CAT

[0742]

[0743] 서열 번호 93: pSZ1469 유래 FADc 헤어핀 RNA 발현 카세트의 관련 부

GCTCTTCGCCGCCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCG
CCTTGGCCTTTTCGCCCGCTCGTGCGCGTGCCTGATGTCCATCACCAGGTCCAT
GAGGTCTGCCTTGCGCCGGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGGCGGCCAAGAGGA
GCATGAGGGAGGACTCCTGGTCCAGGGTCTGACGTGGTGC CGGCTCTGGGAG
CGGGCCAGCATCATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCGCCCTCCAAC TGGTCCTCC
AGCAGCCGCAGTCGCCGCCGACCCCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTAT
GAATTGTACAGAACAACCACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATG
GCTTTACCTGGATGACGGCCTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCCTCGCTGCCGCC
GCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCCAGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCAC
GCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTGAGGACAGTCGGGGAAC TCTGATCAGTCTA
AACCCCTTGCGCGTTAGTGTTGCCATCCTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTT
GTTGTGCGCCACCCCCACACCACCTCCTCCAGACCAATTCTGTCACTTTTGTG
GCGAAGGCATCGGCCTCGGCCCTGCAGAGAGGACAGCAGTGGCCAGCCGCTGGG
GGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACCCCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAA
AAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGA
TGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTC
CAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGC
GAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCC
ACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAG
TCACAACCCGCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCCTTCTGTTCCTGCTGG
CCGGCTTCGCCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGC
CCCCTGGTGCACCTTACCCCCAACAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTG
TGGTACGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAA
CGACACCGTCTGGGGGACGCCCTTGTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCT
GACCAACTGGGAGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCG
GCGCCTTCTCCGGCTCCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCA
ACGACACCATCGACCCGCGCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCC
CGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTCA
CCGAGTACCAGAAGAACCCCGTGCTGGCCGCCAACTCCACCCAGTTCCGCGACC
CGAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTCCAGAAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGT
CCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACTCCTCCGACGACCTGAAGTCCTGGAAGC

[0744]

TGGAGTCCGCGTTTCGCCAACGAGGGCTTCTCGGCTACCAAGTACGAGTGCCCCG
GCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCAGCAAGTCTACTGGGTGATGT
TCATCTCCATCAACCCCGGCGCCCCGGCCGGGCTCCTTCAACCAGTACTTCG
TCGGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCTTCGACAACCAGTCCCGCGTGG
TGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTCAACACCGACCCGA
CCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCCTCCAAGTGGGAGTACTCCGCCT
TCGTGCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGCGCAAGTTCTCCCT
CAACACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGAAGGCCG
AGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCCCTGGAGCCGGTTCGCCACCAAC
ACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTCGACCTGTCCAACAGCACCAGG
CACCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATCTCAA
GTCCGTGTTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCCGAGGA
GTACCTCCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCTCCTTCTTCTTCTGGACCGCG
GAACAGCAAGGTGAAGTTCTGTGAAGGAGAACCCTACTTCACCAACCGCATGA
GCGTGAACAACCAGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCTACTACAAGGTG
TACGGCTTGCTGGACAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTC
GTGTCCACCAACACCTACTTTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAAC
ATGACGACGGGGGTGGACAACCTGTTCTACATCGACAAGTTCAGGTGCGCGA
GGTCAAGTGACAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGAC
GCTGGTCTGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCCTTGACCTGTGAATA
TCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCT
TTTGGAGTTGTAGCTGCTTGTGCTATTTCGAATACCACCCCGAGCATCCCT
TCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCT
ATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGCACAGCCITGGTTTG
GGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCT
GATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGGATCCCGCGTCTCGA
ACAGAGCGCGCAGAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTGCGACCTCAGCGCG
GCATACACCACAATAACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCCTCGTCCATTAGCG
AAGCGTCCGGTTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGAT
CGGTGGAGCTGATGGTTCGAAACGTTACAGCCTAGGGATATCGAATTCCTTTCT
TGCGCTATGACACTTCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCG
GCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTG
CATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCG
CGATTGCAAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAGCCATATTCAAACACCTAGATC
ACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGG
CGCCTCTTCTCTTCGTTTCAGTCAACACCCGCAAACTAGTATGGCTATCAAG
ACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTACGATCGGGACGCTGCGCAA
GGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGCATGTACCT
GGCCTTTGACATCGCGGTCATGTCCCTGCTCTACGTGCGGTGACGTACATCGA
CCCTGCACCGGTGCCTACGTGGGTCAAGTACGGCATCATGTGGCCGCTCTACTG
GTTCTTCCAGGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCTGTGGCG
CGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGCA
CCTTCCAGGGCGCGTACGGGAAGAACCAGTAGAGCGGCCACATGATCCCGTAC
TTGACCCACGTAGGCACCGGTGCAGGGTCGATGTACGTGACGCGACGTAGAG
CAGGGACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGAAGCGCCG
AGCGCTCGAAACAGTGCAGGGGGATGGCCTTGCAGCGCTCCCGATCGTGAAC
GGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTCTGTCTTGATAGCCATCTCGAGGCAGCAG
CAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCTGTGTGATGGACTGTTGC

[0745]

CGCCACACTTGCTGCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCC
TCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGC
TATTTGCGAATAACACCCCCAGCATCCCCCTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATC
CCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCT
GCTCACTGCCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCTGTATTCTCCTGGTAC
TGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGG
GAACACAAATGGAAAGCTGTAGAGCTCTTGTTTTCCAGAAGGAGTTGCTCCTTG
AGCCTTTCATTCTCAGCCTCGATAACCTCCAAAGCCGCTCTAATTGTGGAGGGG
GTTCGAATTTAAAAGCTTGGGAATGTTGGTTTCGTGCGTCTGGAACAAGCCCAGAC
TTGTTGCTCACTGGGAAAAGGACCATCAGCTCCAAAAAACTTGCCGCTCAAACC
GCGTACCTCTGCTTTTCGCGCAATCTGCCCTGTTGAAATCGCCACCACATTCATAT
TGTGACGCTTGAGCAGTCTGTAATTGCCTCAGAATGTGGAATCATCTGCCCCCT
GTGCGAGCCCATGCCAGGCATGTCGCGGGCGAGGACACCCGCCACTCGTACAG
CAGACCATTATGCTACCTCACAATAGTTTCATAACAGTGACCATATTTCTCGAAG
CTCCCCAACGAGCACCTCCATGCTCTGAGTGGCCACCCCCCGGCCCTGGTGCTT
GCGGAGGGCAGGTCAACCGGCATGGGGCTACCGAAATCCCCGACCGGATCCCA
CCACCCCGCGATGGGAAGAATCTCTCCCGGGATGTGGGCCCACCACCAGCA
CAACCTGCTGGCCCAGGCGAGCGTCAAACCATACCACACAAATATCCTTGGCAT
CGGCCCTGAATTCTTCTGCCGCTCTGCTACCCGGTGCTTCTGTCCGAAGCAGG
GGTTGCTAGGGATCGCTCCGAGTCCGCAAACCCCTGTCGCGTGCGGGGGCTTGT
TCGAGCTTGAAGAGC

[0746]

[0747] 서열 번호 94: pSZ1470 유래 헤어핀 RNA 발현 카세트의 FADc 부

ACTAGTTCACCTTGTGGAACCAGAGCGCGGAGTCGTCCTCGGGCGCGTCCGGGAC
GACGTAGCGGCAGTCGCGCCAGTCTCCACAGGGCGCGGCCGACCCAGCGGC
TGTCGGACTGGTAGTACTTGCCAGGATGGGCCTGATGGCGGCGGAGGCCTCCT
CGGCGTGGTAGTGCGGGATGGTGCTGAAGAGGTGGTGCAGCACGTGGGTGTCG
GAGATGTGGTGCAGGATGTTGTCCATGAAGGGCGGGCCCATGGAGCGGTCCAC
GGTGGCCATGGCGCCGCGCAGCCAGTCCAGTCTTCTCGAAGTAGTGCGGCAG
CGCCGGGTGCGTGTGCTGGAGCAGCGTGATGAGCACGAGCCACATGTTACGA
TCAGGTAGGGCACCACGTAGGTCTTGACCAGCCAGGCCAGCCCATGGTGCGG
CCCAGCACGCTGAGCCCGCTGAGCACCGCCACCAGCGCCAGGTTCGGAGATGAC
CACCTCGATGCGCTCGCGCTTGCTGAAGATGGGCGACCACGGGTCAAAGTGTT
GGCGAAGCGCGGGTACGGCCGCGAGGCGACGTTGAACATGAGGTACAGCGGCC
AGCCAGGGTCAGGGTGACCAGCACCTTGCCCATGCGGATGGGCAGCCACTCC
TCCCACTCCAGGCCCTCGTGCGCCACTGCGCGGTGCGGCGGCACAAACACCTCG
TCCTTGTCAGGCACCCCGTGTGGAGTGGTGGCGGCGGTGCGAGTGCTTCCAG
GAGTAGTAGGGCACCAGCAGCAGGCTGTGGAACACCAGGCCACGCCGTCGTT
GATGGCCTGGCTGGAGGAAAAGGCCTGGTGGCCGCACTCGTGCGCGCACACCC
AGACACCCGTGCCGAAGGCGCCCTGGAAGGTGCCGGGAGGGTAGCCGGGGGG
GTCAGCGGGACAGGCGCCTTCTCCTCCATGCGCGCCACCAGGACCTCAATACGG
GCAACCAAAACCCTCAAACACACCTGGAAGAACCAGTAGAGCGGCCACATGAT
GCCGTACTTGACCCACGTAGGCACCGGTGACGGGTGATGTACGTCGACCGCA
CGTAGAGCAGGGACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGA
AGCGCCGAGCGCTCGAAACAGTGCGCGGGGATGGCCTTGCGCAGCGTCCCGAT
CGTGAACGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTGCTCTTGATAGCCAT

[0748]

[0749] 서열 번호 95: pSZ1470 유래 FADc 헤어핀 RNA 발현 카세트의 관련 부

GCTCTTCGCCGCCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCG
CCTTGCCCTTTTCGCCCGCGCTCGTGC CGCTCGCTGATGTCCATCACCAGGTCCAT
GAGGTCTGCCTTGCGCCGGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGCGGCCAAGAGGA
GCATGAGGGAGGACTCCTGGTCCAGGGTCTGACGTGGTGC CGGCTCTGGGAG
CGGGCCAGCATCATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCGCCTCCAACTGGTCTCTC
AGCAGCGCAGTCGCCCGCCAGCCCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTAT
GAATTGTACAGAACAACCACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATG
GCTTTACCTGGATGACGGCCTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCTCGCTGCCGCC
GCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCCAGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCAC
GCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTGAGGACAGTCGGGGAACTCTGATCAGTCTA
AACCCCTTGCGCGTTAGTGTTCATCCTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTT
GTTGTGCGCCACCCCCACACCCTCCTCCCAGACCAATTCTGTACCTTTTTG
GCCAAGGCATCGGCCCTCGGCCCTGCAGAGAGGACAGCAGTGGCCAGCCGCTGGG
GGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAA
AAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGCGCTGCATGCAACACCGATGA
TGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTC
CAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCGCGATTGCAAAGACATTATAGC
GAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCC
ACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGTTTCAG
TCACAACCCGCAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCCTTCTGTTCTCTGCTGG
CCGGCTTCGCCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGC
CCCCTGGTGCACCTTCACCCCCAACAAGGGCTGGATGAACGACCCCCAACGGCCTG
TGGTACGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAA
CGACACCGTCTGGGGGACGCCCTTGTCTGGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCT
GACCAACTGGGAGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCG
GCGCCTTCTCCGGCTCCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCA
ACGACACCATCGACCCGCGCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCC
CGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTCA
CCGAGTACCAGAAGAACCCCGTGCTGGCCGCCAACTCCACCCAGTTCCGCGACC
CGAAGGTCTTCTGTGACGAGCCCTCCCAGAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGT
CCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACTCCTCCGACGACCTGAAGTCCTGGAAGC
TGGAGTCCGCGTTCGCCAACGAGGGCTTCTCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCG
GCCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCCAGCAAGTCCTACTGGGTGATGT
TCATCTCCATCAACCCCGCGCGCCCCGGCCGGCGGCTCCTTCAACCAGTACTTCG
TCGGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCCTTCGACAACCAGTCCCGCGTGG
TGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTCAACACCGACCCGA
CCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCCTCCAACCTGGGAGTACTCCGCCT
TCGTGCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGC GCAAGTTCTCCCT
CAACACCGAGTACCAGGCCAACC CGAGACGGAGCTGATCAACCTGAAGGCCG
AGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCTGGAGCCGGTTCGCCACCAAC
ACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTCGACCTGTCCAACAGCACCGG
CACCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATCTCCAA
GTCCGTGTTCCGGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCTGGAGGACCCCGAGGA
GTACCTCCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCTCCTCCTTCTCTCTGGACCGCG

[0750]

GAACAGCAAGGTGAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCACCAACCGCATGA
GCGTGAACAACCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCTACTACAAGGTG
TACGGCTTGCTGGACCAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTC
GTGTCCACCAACACCTACTTTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAAC
ATGACGACGGGGGTGGACAACCTGTTCTACATCGACAAGTTCAGGTGCGCGA
GGTCAAGTGACAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGAC
GCTGGTTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGTGCTTGACCTGTGAATA
TCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTGATCTTGTGTGTACGCGCT
TTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCAACCCAGCATCCCT
TCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCT
ATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTG
GGCTCCGCTGTATTCTCTGGTACTGCAACCTGTAAACAGCACTGCAATGCT
GATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGGATCCCGCGTCTCGA
ACAGAGCGCGCAGAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTGCGACCTCAGCGCG
GCATACACCACAATAACCACTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCTGTCATTAGCG
AAGCGTCCGGTTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGAT
CGGTGGAGCTGATGGTCAAAACGTTACAGCCTAGGGATATCGAATTCGGCCG
ACAGGACGCGCGTCAAAGGTGCTGGTTCGTGTATGCCCTGGCCGGCAGGTGCTTG
CTGCTGCTGGTTAGTGATTCCGCAACCCGTGATTTTGGCGCTCTTATTTTGGCGTGG
CAAACGCTGGCGCCCGGAGCCGGGCGCGCGGCGATGCGGTGCCCCACGGCTG
CCGGAATCAAAGGGAGGCAAGAGCGCCCGGGTCAAGTTGAAGGGCTTACGCGC
AAGGTACCCGCTCCTGCAAGGCTGCGTGGTGAATTGGACGTGCAGGTCTCT
GCTGAAGTTCTCCACCGCCTCACCAGCGGACAAAGCACCGGTGTATCAGGTCC
GTGTCATCCACTCTAAAGAGCTCGACTACGACCTACTGATGGCCCTAGATTCTT
CATCAAAAACGCCTGAGACACTTGCCAGGATTGAAACTCCCTGAAGGGACCA
CCAGGGGCCCTGAGTTGTTCTTCCCCCGTGGCGAGCTGCCAGCCAGGCTGTA
CCTGTGATCGAGGCTGGCGGGAAAATAGGCTTCGTGTGCTCAGGTGATGGGAG
GTGCAGGACAGCTCATGAAACGCCAACAAATCGCACAAATTCATGTCAAGCTAAT
CAGCTATTTCTCTTTCACGAGCTGTAATTGTCCAAAATTCGTGGTCTACCGGGG
TGATCTTTCGTGTACGGGGCCCTTCCCTCAACCTAGGTATGCGCGCATGCGGT
GCCGCGCAACTCGCGCGAGGGCCGAGGGTTTGGGACGGGGCGTCCCGAAATG
AGTTGCACCCGGATGCGTGGCACCTTTTTTGGGATAATTTATGCAATGGACTGC
TCTGCAAAATTCGTGCTGTCGCCAACCCTAGGATCAGCGGCGTAGGATTTG
TAATCATTCGTCTGTATGGGGAGCTACCGACTACCTAATATCAGCCCGACTGC
CTGACGCCAGCGTCCACTTTTGTGCACACATTCCATTCTGTGCCCAAGACATTCA
TTGTGGTGCAGAGCGTCCCCAGTTACGCTCACCTGTTTCCCGACCTCCTTACTGT
TCTGTGACAGAGCGGGCCACAGGCCGCTCGCAGCCACTAGTTCACCTGTGGA
ACCAGAGCGCGGAGTCTGCTCCTCGGGCGCGTCCGGGACGACGTAGCGGCAGTCG
CGCCAGTCTCTCCACAGGGCGCGGCCGACCCAGCGGCTGTCCGACTGGTAGTA
CTTGCCCAAGGATGGGCTGATGGCGGCGGAGGCCCTCTCGGCGTGGTAGTCCG
GGATGGTGTCTGAAGAGGTGGTGCAGCACGTGGGTGTCCGAGATGTGGTGCAGG
ATGTTGTCCATGAAGGGCGGGCCCATGGAGCGGTCCACGGTGGCCATGGCGCC
GCGCAGCCAGTCCAGTCTTCTCGAAGTAGTGGCGCAGCGCCGGGTGCGTGTG
CTGGAGCAGCGTGATGAGCACGAGCCACATGTTACGATCAGGTAGGGCACCA
CGTAGGTCTTGACCAGCCAGGCCAGCCCATGGTGGGCCCAGCACGCTGAGC
CCGCTGAGCACCGCCACCAGCGCCAGGTCCGAGATGACCACCTCGATGCGCTC
GCGCTTGCTGAAGATGGGCGACCACGGGTCAAAGTGGTTGGCGAAGCGCGGGT
ACGGCCGCGAGGCGACGTTGAACATGAGGTACAGCGGCCAGCCAGGGTCAGG

[0751]

GTGACCAGCACCTTGCCCATGCGGATGGGCAGCCACTCCTCCCACTCCAGGCC
TCGTGCGCCACTGCGCGGTGCGGCGGCACAAACACCTCGTCCTTGTCAGGCAC
CCCGTGTGGAGTGGTGGCGGCGGTGCGAGTGCTTCCAGGAGTAGTAGGGCAC
CAGCAGCAGGCTGTGGAACACCAGGCCACGCCGTCGTTGATGGCCTGGCTGG
AGGAAAAGGCCTGGTGGCCGCACTCGTGCGCGCACACCCAGACACCCGTGCCG
AAGGCGCCCTGGAAGGTGCCGGGAGGGTAGCCGGGGGGGTGAGCGGGACAGG
CGCCTTCTCCTCCATGCGCGCCACCAGGACCTCAATACGGGCAACCAAAACCT
CAAACACACCTGGAAGAACCAGTAGAGCGGCCACATGATGCCGTACTTGACCC
ACGTAGGCACCGGTGCAGGGTCGATGTACGTGACGCGACGTAGAGCAGGGAC
ATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGAAGCGCCGAGCGCTC
GAAACAGTGCGCGGGGATGGCTTGCAGCGGTCCCGATCGTGAACGGAGGCT
TCTCCACAGGCTGCCTGTTGCTTGTATAGCCATCTCGAGGCAGCAGCAGCTCG
GATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACA
CTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGT
GTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGC
GAATACCACCCCCAGCATCCCCTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCG
CAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACT
GCCCCTCGCACAGCCTTGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACC
TGTAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACA
AATGGAAAGCTGTAGAGCTCTTGTTTCCAGAAGGAGTTGCTCCTTGAGCCTTT
CATCTCAGCTCGAATAACCTCCAAAGCCGCTCTAATTGTGGAGGGGGTTCGAA
TTTAAAGCTTGAATGTTGGTTCTGTCGTCTGGAACAAGCCAGACTTGTTCG
TCACTGGGAAAAGGACCATCAGCTCCAAAAAATTTGCCGCTCAAACCGCGTAC
CTCTGCTTTCGCGCAATCTGCCCTGTTGAAATCGCCACCACATTCATATTGTGAC
GCTTGAGCAGTCTGTAATTGCCTCAGAATGTGGAATCATCTGCCCCCTGTGCGA
GCCCATGCCAGGCATGTGCGGGGCGAGGACACCCGCCACTCGTACAGCAGACC
ATTATGCTACCTCACAATAGTTCATAACAGTGACCATATTTCTCGAAGCTCCCC
AACGAGCACCTCCATGCTCTGAGTGGCCACCCCCGGGCCCTGGTGCTTGCGGAG
GGCAGGTCAACCGGCATGGGGCTACCGAAATCCCCGACCGGATCCCACCAACC
CCGCGATGGGAAGAATCTCTCCCCGGGATGTGGGCCCACCACCAGCACAACT
GCTGGCCAGGCGAGCGTCAAACCATACCACACAAATATCCTTGCAATCGGCC
TGAATTCTTCTGCGCTCTGCTACCCGGTGCTTCTGTCCGAAGCAGGGGTTGCT
AGGGATCGCTCCGAGTCCGCAAAACCTTGTGCGGTGGCGGGGCTTGTTCGAGCT
TGAAGAGC

[0752]

[0753] 서열 번호 96: pSZ1471 유래 헤어핀 RNA 발현 카세트의 FADc 부

ACTAGTTCACCTTGTGGAACCAGAGCGCGGAGTCGTCTCGGGCGCGTCCGGGAC
GACGTAGCGGCAGTCGCGCCAGTCCTCCACAGGGCGCGGCCGACCCAGCGGC
TGTCGGACTGGTAGTACTTGCCAGGATGGGCCTGATGGCGGCGGAGGCCTCCT
CGGCGTGGTAGTGCGGGATGGTGCTGAAGAGGTGGTGCAGCACGTGGGTGTG
GAGATGTGGTGCAGGATGTTGTCCATGAAGGGCGGGCCCATGGAGCGGTCCAC
GGTGGCCATGGCGCCGCGCAGCCAGTCCAGTCTTCTCGAAGTAGTGCGGCAG
CGCCGGGTGCGTGTGCTGGAGCAGCGTGATGAGCACGAGCCACATGTTACGA
TCAGGTAGGGCACCACGTAGGTCTTGACCAGCCAGGCCAGCCATGGTGCGG
CCCAGCACGCTGAGCCCGCTGAGCACCGCCACCAGCGCCAGGTTCGAGATGAC
CACCTCGATGCGCTCGCGCTTGCTGAAGATGGGCGACCACGGGTCAAAGTGTT

[0754]

GGCGAAGCGCGGGTACGGCCGCGAGGCGACGTTGAACATGAGGTACAGCGGCC
AGCCAGGGTCAGGGTGACCAGCACCTTGCCCATGCGGATGGGCAGCCACTCC
TCCCCTCCAGGCCCTCGTGCGCCACTGCGCGGTGCGGCGGCACAAACACCTCG
TCCTTGTCAGGCACCCCGTGTGGAGTGGTGGCGGCGGTGCGAGTGCTTCCAG
GAGTAGTAGGGCACCAGCAGCAGGCTGTGGAACACCAGGCCACGCCGTCGTT
GATGGCCTGGCTGGAGGA~~AA~~AAGGCCTGGTGGCCGCACTCGTGCGCGCACACCC
AGACACCCGTGCCGAAGGCGCCCTGGAAGGTGCCGGGAGGGTAGCCGGGGGG
GTCAGCGGGACAGGCGCCTTCTCCTCCATGCGCGCCACCAGGACCTCAATACGG
GCAACCAAAACCTCAAACACACCTGGAAGAACCAGTAGAGCGGCCACATGAT
GCCGTACTTGACCCACGTAGGCACCGGTGCAGGGTCGATGTACGTGACGCGA
CGTAGAGCAGGACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGA
AGCGCCGAGCGCTCGAAACAGTGCGCGGGATGGCCTTGCGCAGCGTCCCGAT
CGTGAACGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTGCTCTTGATAGCCAT

[0755]

[0756] 서열 번호 97: pSZ1471 유래 FADc 헤어핀 RNA 발현 카세트의 관련 부

GCTCTTCGCGCCGCCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCG
CCTTGCCCTTTTCGCGCGCTCGTGCGCGTCTGCTGATGTCCATCACCAGGTCCAT
GAGGTCTGCCTTGCGCCGGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGGCGGCCAAGAGGA
GCATGAGGGAGGACTCCTGGTCCAGGGTCTGACGTGGTTCGCGGCTCTGGGAG
CGGGCCAGCATCATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGGCCGCCTCCAACCTGGTCCTCC
AGCAGCCGCAGTCGCCGCCGACCCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTAT
GAATTGTACAGAACAACCACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATG
GCTTTACCTGGATGACGGCCTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCCTCGCTGCCGCC
GCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCCAGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCAC
GCTGGCGCTGCGCTTCGCGCGATCTGAGGACAGTCGGGGAACTCTGATCAGTCTA
AACCCCTTGCGCGTTAGTGTGTCATCCTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTT
GTTGTGCGCCACCCCCACACCACTCCTCCCAGACCAATTCTGTACCTTTTGTG
GCGAAGGCATCGGCCTCGGCCTGCAGAGAGGACAGCAGTGCCAGCCGCTGGG
GGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACCTTTCTTGCCTATGACACTTCCAGCAA
AAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGCGCTGCATGCAACACCGATGA
TGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTC
CAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCGATTGCAAAGACATTATAGC
GAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCC
ACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGTTTCAG
TCACAACCCGCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCTTCTGTTCCTGCTGG
CCGGCTTCGCCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGC
CCCCTGGTGCCTTCACCCCCAACAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTG
TGGTACGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAA
CGACACCGTCTGGGGGACGCCCTTGTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCT
GACCAACTGGGAGGACCAGCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCG
GCGCCTTCTCCGGCTCCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCA
ACGACACCATCGACCCGCGCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCC
CGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTCA
CCGAGTACCAGAAGAAACCCGTGCTGGCCGCCAACTCCACCCAGTTCCGCGACC
CGAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTCCAGAAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGT
CCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACTCCTCCGACGACCTGAAGTCCTGGAAGC

[0757]

TGGAGTCCGCGTTCCGCCAACGAGGGCTTCCTCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCG
GCCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCAGCAAGTCTACTGGGTGATGT
TCATCTCCATCAACCCCGGCGCCCCGGCCGGCGCTCCTTCAACCAGTACTTCG
TCGGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGGCTTCGACAACCAGTCCCGCGTGG
TGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTCAACACCGACCCGA
CCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCCCTCCAAGTGGGAGTACTCCGCCT
TCGTGCCCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGCGCAAGTTCTCCCT
CAACACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGAAGGCCG
AGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCTGGAGCCGGTTCGCCACCAAC
ACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTCGACCTGTCCAACAGCACCGG
CACCCTGGAGTTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATCTCCA
GTCCGTGTTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCGAGGA
GTACCTCCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCTCTCTTCTTCTGGACCGCG
GAACAGCAAGGTGAAGTTCTGTGAAGGAGAACCCCTACTTCACCAACCGCATGA
GCGTGAACAACAGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCTACTACAAGGTG
TACGGCTTGCTGGACCAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTC
GTGTCCACCAACACCTACTTTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAAC
ATGACGACGGGGGTGGACAACCTGTTCTACATCGACAAGTTCAGGTGCGCGA
GGTCAAGTGACAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGAC
GCTGGTCTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATA
TCCCTGCGGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGT
TTGCGAGTTGCTAGCTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCT
TCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCT
ATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTG
GGCTCCGCCTGTATTCCTTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCT
GATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGGATCCCGCGTCTCGA
ACAGAGCGCGCAGAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTGCGACCTCAGCGCG
GCATACACCACAATAACCACTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTAGCG
AAGCGTCCGTTTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGAT
CGGTGGAGCTGATGGTGCAAAACGTTTCACAGCCTAGGGATATCGAATTCCTTCT
TGCCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCG
GCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTG
CATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCC
CGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATC
ACTACCCTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGG
CGCCTCTTCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACACTAGTTCACTTGTGGAA
CCAGAGCGCGGAGTCGTCTCGGGCGCGTCCGGGACGACGTAGCGGCAGTCCG
GCCAGTCTCCACAGGGCGCGGCCGACCCAGCGGCTGTCCGACTGGTAGTACT
TGCCCAAGGATGGGCTGATGGCGGCGGAGGCCCTCTCGCGGTGGTAGTGCGGG
ATGGTGCTGAAGAGGTGGTGCAGCACGTGGGTGTCCGAGATGTGGTGCAGGAT
GTTGTCCATGAAGGGCGGGCCCATGGAGCGGTCCACGGTGGCCATGGCGCCGC
GCAGCCAGTCCAGTCTTCTCGAAGTAGTGCGGCAGCGCCGGGTGCGTGTGCT
GGAGCAGCGTGATGAGCACGAGCCACATGTTACGATCAGGTAGGGCACCACG
TAGGTCTTGACCAGCCAGGCCAGCCCATGGTGCGGGCCAGCACGCTGAGCCC
GCTGAGCACCGCCACCAGCGCCAGGTCCGAGATGACCACCTCGATGCGCTCGC
GCTTGCTGAAGATGGGCGACCACGGGTCAAAGTGGTTGGCGAAGCGCGGGTAC
GGCCGCGAGGGCAGCGTTGAACATGAGGTACAGCGGCCAGCCAGGGTCAGGGT
GACCAGCACCTTGCCCATGCGGATGGGCAGCCACTCCTCCCACTCCAGGCCCTC

[0758]

GTGCGCCACTGCGCGGTGCGGGCGGCACAAACACCTCGTCCTTGTCCAGGCACCC
CGTGTTGGAGTGGTGGCGGGCGGTGCGAGTGCTTCCAGGAGTAGTAGGGCACCA
GCAGCAGGCTGTGGAACACCAGGCCACGCCGTCGTTGATGGCCTGGCTGGAG
GAAAAGGCCTGGTGGCCGCACTCGTGCGCGCACACCCAGACACCCGTGCCGAA
GGCGCCCTGGAAGGTGCCGGGAGGGTAGCCGGGGGGGTGAGCGGGACAGGCG
CCTTCTCCTCCATGCGCGCCACCAGGACCTCAATACGGGCAACCAAAACCTCA
AACACACCTGGAAGAACCAGTAGAGCGGCCACATGATGCCGTACTTGACCCAC
GTAGGCACCGGTGCAGGGTCGATGTACGTCGACGCGACGTAGAGCAGGGACAT
GACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGAAGCGCCGAGCGCTCGA
AACAGTGCGCGGGGATGGCCTTGCGCAGCGTCCCGATCGTGAACGGAGGCTTC
TCCACAGGCTGCCTGTTGCTCTTGATAGCCATCTCGAGGCAGCAGCAGCTCGGA
TAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACT
TGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGT
TTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGA
ATACCACCCCGAGCATCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGATCCCAACCGCA
ACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGC
CCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTG
TAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAA
TGGAAAGCTGTAGAGCTCTTGTTTTCCAGAAGGAGTTGCTCCTTGAGCCTTTCAT
TCTCAGCCTCGATAACCTCCAAAGCCGCTCTAATTGTGGAGGGGGTTCGAATTT
AAAAGCTTGGAATGTTGGTTTCGTGCGTCTGGAACAAGCCCAGACTTGTGTCTCA
CTGGGAAAAGGACCATCAGCTCCAAAAAAGTTGCCGCTCAAACCGCGTACCTCT
GCTTTCGCGCAATCTGCCCTGTTGAAATCGCCACCACATTATATTGTGACGCTT
GAGCAGTCTGTAATTGCCCTCAGAATGTGGAATCATCTGCCCCCTGTGCGAGCCC
ATGCCAGGCATGTGCGGGGCGAGGACACCCGCCACTCGTACAGCAGACCATTA
TGCTACCTCACAATAGTTCATAACAGTGACCATATTTCTCGAAGCTCCCCAACG
AGCACCTCCATGCTCTGAGTGGCCACCCCCCGGCCCTGGTGTCTGCGGAGGGCA
GGTCAACCGGCATGGGGCTACCGAAATCCCCGACCGGATCCACCAACCCCCGC
GATGGGAAGAATCTCTCCCCGGGATGTGGGGCCACCACCAGCACAACCTGCTG
GCCAGGCGAGCGTCAAACCATAACCACACAAATATCCTTGGCATCGGCCCTGA
ATTCTTCTGCCGCTCTGCTACCCGGTGCTTCTGTCCGAAGCAGGGGTTGCTAGG
GATCGCTCCGAGTCCGCAAACCTTGTGCGGTGGCGGGGCTTGTTCGAGCTTGA
AGAGC

[0759]

[0760]

서열 번호 98: pSZ1377 유래 클로렐라 프로토테코이데스 UTEX250 스테아로일-ACP 운반 펩티드 포함 올레아 유로 파에아 스테아로일-ACP 불포화 효소의 코돈 최적화 암호화 서열

ACTAGTATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATGCCCGCTGCGGGCAG
CTGCGTCGCTEGGCGGGCTCCGGGCCCGGCGCCAGCGAGGCCCTCCCCGTG
CGCGGGCGCGCCGAGGTGCACGTGCAGGTGACCCACTCCCTGGCCCCGAGAA
GCGCGAGATCTTCAACTCCCTGAACAAGTGGGGCCAGGAGAACATCCTGGTGCT
GCTGAAGGACGTGGACAAAGTCTGGCAGCCCTCCGACTTCTGCCCCACTCCGC
CTCCGAGGGCTTCGACGAGCAGGTGATGGAGCTGCGCAAGCGCTGCAAGGAGA
TCCCCGACGACTACTTCATCGTGCTGGTGGGCGACATGATCACCAGGAGGGCC
TGCCACCTACCAGACCATGCTGAACACCTGGACGGCGTGCGCGACGAGACC
GGCGCTCCCTGACCCCTGGGCCATCTGGACCCGCGCCTGGACCGCCGAGGAG
AACCGCCACGGCGACCTGCTGAACAAGTACCTGTACCTGTCCGGCCGCGTGAC

[0761]

ATGAAGCAGATCGAGAAGACCATCCAGTACCTGATCGGCTCCGGCATGGACCC
CCGCACCGAGAAACAACCCCTACCTGGGCTTCATCTACACCTCCTTCCAGGAGCG
CGCCACCTTCATCTCCACGGCAACACCGCCCGCTGGCCAAGGAGCACGGCG
ACCTGAAGCTGGCCAGATCTGCGGCATCATCGCCGCCGACGAGAAGCGCCAC
GAGACCGCCTACACCAAGATCGTGGAGAAGCTGTTGAGATCGACCCCGACGG
CACCGTGCTGGCCCTGGCCGACATGATGCGCAAGAAGGTGTCCATGCCCGCCCA
CCTGATGTACGACGGCCAGGACGACAACCTGTTCGAGAACTTCTCCTCCGTGGC
CCAGCGCCTGGGCGTGTACACCGCCAAGGACTACGCCGACATCCTGGAGTTCCT
GGTGGGCGCGTGGGACATCGAGAAGCTGACCGGCCTGTCCGGCGAGGGCCGCA
AGGCCACGACTACGTGTGACCCCTGCCCCCGCATCCGCCGCTGGAGGAGC
GCGCCAGTCCCGGTGAAGAAGGCTCCGCCACCCCTTCTCCTGGATCTTCG
GCCGCGAGATCAACCTGATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGAC
CACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGAATCGAT

[0762]

[0763] 서열 번호 99: 올레아 유로파에아 스테아로일-ACP 불포화 효소의 아미노산 서열(수탁 번호 제AAB67840.1호)

MALKLCFPPHKMPSFPDARIRSHRVFMASITIHSPSMEVGKVKKPFTPPREHVHVQVT
HSLAPEKREIFNSLNNWAQENILVLLKDVDKWCWQPSDFLPDSASEGFDEQVMELRK
RCKEIPDDYFIVLVGDMITEALPTYQTMLNTLDGVRDETGASLTPWAIWTRAWTA
EENRHGDLNLYLYLSGRVDMKQIEKTIQYLIGSGMDPRTENNPYLGFIYTSFQERA
TFISHGNTARLAKEHGDLLKLAQICGIIAADEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGTVLALA
DMMRKKVSMPLAHLMYDGGDDNLFENFSSVAQRLGVYTAKDYADILEFLVGRWDI
EKLTLGLSGEGRKAQDYVCTLPPIRRLEERAQSRVKKASATPFSWIFGREINL

[0764]

[0765] 서열 번호 100: 프로토테카 모리포르미스의 5'6S 계놈 공여 서열

GCTCTTCGCCGCCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCG
CCTTGCGCCTTTTCGCCCGCTCGTGCCTGCTGCTGATGTCCATCACCAGGTCCAT
GAGGTCTGCTTGCGCCGGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGCGGCCAAGAGGA
GCATGAGGGAGGACTCCTGGTCCAGGGTCTGACGTGGTTCGCCGGCTCTGGGAG
CGGGCCAGCATCATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCCGCTCCAACGGTCTCTCC
AGCAGCCGCAGTCGCCGCCGACCCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTAT
GAATTGTACAGAACAACACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATG
GCTTACCTGGATGACGGCTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCTCGCTGCCGCC
GCTTCTCCCGCACGCTTCTTCCAGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCAC
GCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTGAGGACAGTCGGGGAACTCTGATCAGTCTA
AACCCCTTGGCGCTTAGTGTGGCATCCTTTCGAGACCGGTGAGAGCCGACTT
GTTGTGCGCCACCCCCACACACCTCCTCCAGACCAATTCTGTACCTTTTGG
GCGAAGGCATCGGCCCTCGGCTGCGAGAGGACAGCAGTGCAGGCCGCTGGG
GGTGGCGGATGCACGCTCAGGTACC

[0766]

[0767] 서열 번호 101: 프로토테카 모리포르미스의 3'6S 계놈 공여 서열

GAGCTCCTTGTTTTCCAGAAGGAGTTGCTCCTTGAGCCTTTCATTCTCAGCCTCG
ATAACCTCCAAAGCCGCTCTAATTGTGGAGGGGGTTTGAATTTAAAAGCTTGA
ATGTTGGTTTCGTGCGTCTGGAACAAGCCAGACTTGTGCTCACTGGGAAAAGG
ACCATCAGCTCCAAAAAATTGCCGCTCAAACCGCGTACCTCTGCTTTCGCGCA
ATCTGCCCTGTTGAAATCGCCACCACATTCATATTGTGACGCTTGAGCAGTCTGT
AATTGCCTCAGAATGTGGAATCATCTGCCCCCTGTGCGAGCCCATGCCAGGCAT
GTCGCGGGCGAGGACACCCGCCACTCGTACAGCAGACCATTTATGCTACCTCACA
ATAGTTGATAACAGTGACCATATTTCTCGAAGCTCCCCAACGAGCACCTCCATG
CTCTGATTGGCCACCCCCCGCCCTGGTGCTTGGCGAGGGCAGGTCAACCGGCA
TGGGGCTACCGAAATCCCCGACCGGATCCCAACACCCCCCGGATGGGAAGAAT
CTCTCCCCGGGATGTGGGCCACCAACAGCACAACCTGCTGGCCCAGGCGAGC
GTCAAACCATACACACAAATATCCTTGGCATCGGCCCTGAATTCCTTCTGCCG
CTCTGCTACCCGGTGTCTGTGTCGAAGCAGGGGTGCTAGGGATCGCTCCGAG
TCCGCAAACCTTGTGCGGTGGCGGGGCTTGTTCGAGCTTGAAGAGC

[0768]

[0769] 서열 번호 102: 프로토테카 모리포르미스 FADc 녹아웃 상동성 제조합 표적화 구조물의 5' 공여 DNA 서열

GGGCTGGTCTGAATCCTTCAGGCGGGTGTACCCGAGAAAGAAAGGGTGCCGA
TTTCAAAGCAGACCCATGTGCCGGGCCCTGTGGCCTGTGTTGGCGCCTATGTAG
TACCCCCCTCACCAATTGTCGCCAGTTTGGCGACTCCATAAACTCAAAACA
GCAGCTTCTGAGCTGCGCTGTTCAAGAACACCTCTGGGGTTTGCTCACCCGCGA
GGTCGACGCCCAGCATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCT
CCGTTACGATCGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGC
TCGGCGCTTCGTAGCAGCATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTATGTCCCTG
CTCTACGTGCGCTCGACGTACATCGACCCTGCACCGGTGCCTACGTGGGTCAAG
TACGGCATCATGTGGCCGCTCTACTGGTCTTCCAGGTGTGTTTGAGGGTTTTGG
TTGCCCGTATTGAGGTCTGGTGGCGCGCATGGAGGAGAAGCGCCTGTCCCGC
TGACCCCCCGGCTACCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCCTTCGGCACGGGTGT
CTGGGTGTGCGCGCACGAGTGCGGCCACAGGCCCTTTTCCTCCAGCCAGGCCAT
CAACGACGGCGTGGGCCCTGGTGTTCACAGCCTGCTGCTGGTGGCCCTACTACTC
CTGGAAGCACTCGCACCG

[0770]

[0771] 서열 번호 103: 프로토테카 모리포르미스 FADc 녹아웃 상동성 재조합 표적화 구조물의 3' 공여 DNA 서열

CCGCCACCACTCCAACACGGGGTGCCTGGACAAGGACGAGGTGTTTGTGCCGC
CGCACCCGCGCAGTGGCGCACGAGGGCCTGGAGTGGGAGGAGTGGCTGCCCATC
CGCATGGGCAAGGTGCTGGTCACCCCTGACCCTGGGCTGGCCGCTGTACCTCATG
TTCAACGTCGCCTCGCGGCCGTACCCGCGCTTCGCCAACCACTTTGACCCGTGG
TCGCCCATCTTCAGCAAGCGCGAGCGCATCGAGGTGGTCATCTCCGACCTGGCG
CTGGTGGCGGTGCTCAGCGGGCTCAGCGTGCTGGGCCGCACCATGGGCTGGGC
CTGGCTGGTCAAGACCTACGTGGTGCCCTACCTGATCGTGAACATGTGGCTCGT
GCTCATCAGCTGCTCCAGCACACGCACCCGGCGCTGCCGCACTACTTCGAGAA
GGACTGGGACTGGCTGCGCGGGCCATGGCCACCGTGGACCGCTCCATGGGCC
CGCCCTTCATGGACAACATCCTGCACCACATCTCCGACACCCACGTGCTGCACC

[0772]

ACCTCTTCAGCACCATCCCGCACTACCACGCCGAGGAGGCCTCCGCCGCCATCA
GGCCCATCCTGGGCAAGTACTACCACTCCGACAGCCGCTGGGTCGGCCGCGCCC
TGTGGGAGGACTGGCGCGACTGCCGCTACGTGCTCCCGGACGCGCCCGAGGAC
GACTCCGCGCTCTGGTTCCACAAGTGAGTGAGTGA

[0773]

[0774] 서열 번호 104: 클로렐라 프로토테코이데스(UTEX250) 스테아로일 ACP 불포화 효소 운반 펩티드(39개 잔기, 밑줄 쳐서 표시) 및 3×FLAG(굵은 글씨) 포함 칼타머스 텅크토리우스 올레오일-아실기 운반 단백질(CtOTE) 티오에스테라제

MATASTESAFNARCGDLRRSAGSGPRRPAPRLPVRGRAATGEQPSGVASLREADKE
KSLGNRLRLGSLTEDGLSYKEKPVIRCYEVGINKTATITETIANLLQEVGGNHAQGVG
FSTDGFATTTTMRKLHLIWWTARMHIEIYRYPAWSDVIEIETWVQGEKVGTRRD
WILKDYANGEVIGRATSKWVMNEDTRRLQKVSDDVREEYL VFCPRTLRLAFPEE
NNNSMKKIPKLEDPAEYSRLGLVPRRSDLDNMNHVNNVTYIGWALESPPEIDTHE
LQAITLDYRRECQRDDIVDSLTSREPLGNAAGVKFKEINGSVSPKKDEQDLSRFMHL
LRSAGSGLEINRCRTEWRKKPAKRMDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

[0775]

[0776] 서열 번호 105: 쿠페아 라이티 FatB2(CwTE2) 티오에스테라제에 대한 단백질 서열; GenBank 수탁 번호 제U56104 호

MVAAAAASSAFFPVPAPRPTPKPGKFGNWPSSLSQPFKPKSNPNGRFQVKANVSPH
PKANGSAVSLKSGSLNTLEDPPSSPPRPTFLNQLPDWSRLRTAITTVFVAAEKQFTRL
DRKSKRPDMLVDWFGSETTVQDGLVFRERFSIRS YEIGADRTASIEITLMNHLQDTS
NHCKSVGLLNDGFGRTPEMCTRDLIWVLTKMQIVNRYPTWGD TVEINSWFSQSG
KIGMGREWLISDCNTGEILVRATSAWAMMNQKTRRFSKLPCEVRQEIAPHFVDAPP
VIEDNDRKLHKFDVKTGDSICKGLTPGWNDFDVNQHVSNVKYIGWILESMPTVLE
TQELCSLTLEYRRECGRSVSVTSMNPSKVGDRSQYQHLLRLEDGADIMKGRTE
WRPKNAGTNRAIST

[0777]

[0778] 서열 번호 106: 클로렐라 프로토테코이데스(UTEX250) 스테아로일 ACP 불포화 효소 운반 펩티드 및 3×FLAG 태그 포함 칼타머스 텅크토리우스 올레오일-아실기 운반 단백질(CtOTE) 티오에스테라제에 대한 코돈 최적화 서열

ATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATGCCCGCTGCGGCGACCTGCGT
CGCTCGGCGGGCTCCGGGCCCCGGCGCCAGCGAGGCCCTCCCGTGC GCGG
GCGCGCCGCCACCGGCGAGCAGCCCTCGGCGTGGCCTCCCTGCGCGAGGCCG
ACAAGGAGAAAGTCCCTGGGCAACCGCCTGCGCCTGGGCTCCCTGACCGAGGAC
GGCCTGTCTTACAAGGAGAAGTTCGTGATCCGCTGCTACGAGGTGGGCATCAAC
AAGACCGCCACCATCGAGACCATGCCAACCTGCTGCAGGAGGTGGGCGGCAA
CCACGCCCAGGGCGTGGGCTTCTCCACCGACGGCTTCGCCACCACCACCACCAT
GCGCAAGCTGCACCTGATCTGGGTGACCGCCCGCATGCACATCGAGATCTACCG
CTACCCCGCCTGGTCCGACGTGATCGAGATCGAGACCTGGGTGCAGGGCGAGG
GCAAGGTGGGCACCCGCGCGACTGGATCCTGAAGGACTACGCCAACGGCGAG
GTGATCGGCCCGCGCCACCTCCAAGTGGGTGATGATGAACGAGGACACCCGCCG
CCTGCAGAAGGTGTCCGACGACGTGCGCGAGGAGTACCTGGTGTCTGCCCCCG

[0779]

CACCCCTGCGCCTGGCCCTTCCCCGAGGAGAACAACAACCTCCATGAAGAAGATCC
 CCAAGCTGGAGGACCCCGCCGAGTACTCCCGCCTGGGCCTGGTGCCCCGCCGCT
 CCGACCTGGACATGAACAAGCACGTGAACAACGTGACCTACATCGGCTGGGCC
 CTGGAGTCCATCCCCCGAGATCATCGACACCCACGAGCTGCAGGCCATCACC
 CTGGACTACCGCCGCGAGTGCCAGCGCGACGACATCGTGGACTCCCTGACCTCC
 CGCGAGCCCTGGGCAACGCCGCCGCGGTGAAGTTCAAGGAGATCAACGGCTC
 CGTGTCCCCCAAGAAGGACGAGCAGGACCTGTCCCGCTTCATGCACCTGCTGCG
 CTCCGCCGGCTCCGGCCTGGAGATCAACCGCTGCCGCACCGAGTGCGCAAGA
 AGCCCGCCAAGCGCATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCAC
 GACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGA

[0780]

[0781]

서열 번호 107: 쿠페아 라이티 FatB2(CwTE2) 티오에스테라제에 대한 코돈 최적화 서열

ATGGTGGTGGCCGCCGCCGCGCCAGCAGCGCCTTCTTCCCCGTGCCCCCCCC
 CCGCCCCACCCCCAAGCCCGGCAAGTTTCGGCAACTGGCCAGCAGCCTGA
 GCCAGCCCTTCAAGCCCAAGAGCAACCCCAACGGCCGCTTCCAGGTGAAG
 GCCAACGTGAGCCCCACGGGCGCGCCCCCAAGGCCAACGGCAGCGCCGT
 GAGCCTGAAGTCCGGCAGCCTGAACACCCTGGAGGACCCCCCAGCAGCC
 CCCCCCCCCGACCTTCTCTGAACCAGCTGCCCGACTGGAGCCGCTGCGC
 ACCGCCATCACCAACCGTGTTCGTGGCCGCCGAGAAGCAGTTCACCCGCCT
 GGACCGCAAGAGCAAGCGCCCCGACATGCTGGTGGACTGGTTCGGCAGCG
 AGACCATCGTGACAGGACGGCCTGGTGTTCGCGGAGCGCTTCAGCATCCGC
 AGCTACGAGATCGGCGCCGACCGCACCGCCAGCATCGAGACCCTGATGAA
 CCACCTGCAGGACACCAGCCTGAACCACTGCAAGAGCGTGGGCCTGCTGA
 ACGACGGCTTCGGCCCGCACCCCCGAGATGTGCACCCGCGACCTGATCTGG
 GTGCTGACCAAGATGCAGATCGTGGTGAACCGCTACCCACCTGGGGCGA
 CACCGTGGAGATCAACAGCTGGTTCAGCCAGAGCGGCAAGATCGGCATGG
 GCCGCGAGTGGCTGATCAGCGACTGCAACACCGGCGAGATCCTGGTGCGC
 GCCACCAGCGCCTGGGCCATGATGAACCAGAAGACCCGCCGCTTCAGCAA
 GCTGCCCTGCGAGGTGCGCCAGGAGATCGCCCCCACTTCGTGGACGCCC
 CCCCCGTGATCGAGGACAACGACCGCAAGCTGCACAAGTTCGACGTGAAG
 ACCGGCGACAGCATCTGCAAGGGCCTGACCCCCGGCTGGAACGACTTCGA
 CGTGAACCAGCACGTGAGCAACGTGAAGTACATCGGCTGGATTCTGGAGA
 GCATGCCACCCAGGCTGCTGGAGACCCAGGAGCTGTGCAGCCTGACCCTG
 GAGTACCGCCGCGAGTGCGGCCGCGAGAGCGTGGTGGAGAGCGTGACCA
 CATGAACCCAGCAAGGTGGGCGACCGCAGCCAGTACCAGCACCTGCTGC
 GCCTGGAGGACGGCGCCGACATCATGAAGGGCCGACCGAGTGCGCCCC
 AAGAACGCCGGCACCAACCGCGCCATCAGCACCTGA

[0782]

[0783]

서열 번호 108: 프로토텐카 모리포르미스 FATA1 녹아웃 상동성 재조합 표적화 구조물의 5' 공여 DNA 서열

GCTCTTCGGAGTCACTGTGCCACTGAGTTCGACTGGTAGCTGAATGGAGTCGCT
 GCTCCACTAAACGAATTGTCAGCACCGCCAGCCGGCCGAGGACCCGAGTCATA
 GCGAGGGTAGTAGCGCGCCATGGCACCGACCAGCCTGCTTGCCAGTACTGGCG
 TCTCTTCCGCTTCTCTGTGGTCTCTGCGCGCTCCAGCGCGTGCGCTTTTCCGGT
 GGATCATGCGGTCCGTGGCGCACCGCAGCGGCCGCTGCCATGCAGCGCCGCT
 GCTTCCGAACAGTGGCGGTACGGGCCGACCCGCGGTAGCCGTCCGTCCGGAA
 CCCGCCCAAGAGTTTTGGGAGCAGCTTGAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGACAA
 GCGCATCTTCTTGAGGAGCACCGGTGCGTGGAGGTCCGGGGCTGACCGGCCG
 TCGCATTCAACGTAATCAATCGCATGATGATCAGAGGACACGAAGTCTTGGTGG
 CGGTGGCCAGAAACACTGTCCATTGCAAGGGCATAGGGATGCGTTCCTTCACCT
 CTCATTTCTCATTTCTGAATCCCTCCCTGCTCACTCTTTCTCCTCCTTCCCCT
 TCACGCAGCATTCGGGGTACC

[0784]

[0785] 서열 번호 109: 프로토타카 모리포르미스 FATA1 녹아웃 상동성 재조합 표적화 구조물의 3' 공여 DNA 서열

GACAGGGTGGTTGGCTGGATGGGGAACGCTGGTCGCGGGATTTCGATCCTGCT
GCTTATATCCTCCCTGGAAGCACACCCACGACTCTGAAGAAGAAAACGTGCAC
ACACACAACCCAACCGGCCGAATATTTGCTTCCTTATCCCGGGTCCAAGAGAGA
CTGCGATGCCCCCTCAATCAGCATCCTCCTCCCTGCCGCTTCAATCTTCCCTGC
TTGCCTGCGCCCGCGGTGCGCCGTCTGCCCGCCAGTCAGTCACTCCTGCACAG
GCCCCCTGTGCGCAGTGCTCCTGTACCCCTTACCGCTCCTTCCATTCTGCGAGGC
CCCCTATTGAATGTATTCGTTGCCTGTGTGGCCAAGCGGGCTGCTGGGCGCGCC
GCCGTGCGGCAGTGCTCGGCGACTTTGGCGGAAGCCGATTGTTCTTCTGTAAGC
CACGCGCTTGCTGCTTTGGGAAGAGAAGGGGGGGGTACTGAATGGATGAGGA
GGAGAAGGAGGGGTATTGGTATTATCTGAGTTGGGTGAAGAGC

[0786]

[0787] 서열 번호 110: 헤어핀 RNA 발현 카세트의 FATA 부

ATGGCACCGACCAGCCTGCTTGCCAGTACTGGCGTCTCTTCCGCTTCTCTGTGGT
CCTCTGCGCGCTCCAGCGCGTGCGCTTTTCCGGTGGATCATGCGGTCCGTGGCG
CACCGCAGCGGCCGCTGCCCATGCAGCGCCGCTGCTTCCGAACAGTGGCGGTCA

[0788]

GGGCGGCACCCGCGGTAGCCGTCCTGCCGAACCCGCCCAAGAGTTTTGGGAG
CAGCTTGAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGACAAGCGCATCTTCTGGAGGAGCA
CCGGTGCGTGGAGGTCCGGGGCTGACCGGCCGTCGCATTCAACGTAATCAATCG
CATGATGATCAGAGGACACGAAGTCTTGGTGGCGGTGGCCAGAAACACTGTCC
ATTGCAAGGGCATAGGGATGCGTTCCTTCACCTCTCATTTCTCATTTCTGAATCC
CTCCCTGCTCACTCTTTCTCCTCCTCCTTCCCGTTCACGCAGCATTCGGGGCAAC
GAGGTGGGCCCCTGCTCCTCCAGGAAGATGCGCTTGTCTCCGCCATCTTGCAG
GGCTCAAGCTGCTCCCAAACTCTTGGGCGGGTCCCGACGGACGGCTACCGCG
GGTGCGGCCCTGACCGCCACTGTTCCGAAGCAGCGGCGCTGCATGGGCAGCGG
CCGCTGCGGTGCGCCACGGACCGCATGATCCACCGGAAAAGCGCACGCGCTGG
AGCGCGCAGAGGACCACAGAGAAGCGGAAGAGACGCCAGTACTGGCAAGCAG
GCTGGTCGGTGCCAT

[0789]

[0790] 서열 번호 111: 씨.레인하르트티 β-튜불린 프로모터/5'트R 및 클로렐라 불가리스 니트레이트질산염 환원 효소 3'트R의 제어하에 있는 에스.세레비지아에 suc2 수크로스 인버타제 암호화 영역 및 내인성 FATA1 유전자를 중단 하는 핵내 계놈으로의 통합에 사용되는 영역을 함유하는, 구조물 FATA1-CrbTub_yInv_nr-FATA1의 일부

gctcttcggagtgactgtgccactgagttcgactggtagctgaatggagtcgctgctccactaaacgaattgtcagcaccgcc
agccggcgaggaccgagtcagtcgagggtagtagcgccatggcaccgaccagcctgttggccagtactggcgctctc
ttccgcttctctgttgctctctgcccgtccagcgctgctgttctccgggtgatcatcggttccgtggcgaccgagcgcc
gctgccatgcagcgccgtgcttccgaaagtgccggtagggccgcaccggggtagccgtccgtccggaacccgccc
agagttttgggagcagcttgagccctgcaagatggcggaggacaagcgcatcttctggaggagcaccgggtgctggagg
tcgggggtgaccggccgtgcattcaacgtaataatcgcatgatgatcagaggacagaaagtcttgggtgggtggcca
gaaacactgtccattgcaaggccatagggatgcttcttcaacctctcaattctgaatccctccctgctcactcttct
cctctcttcccggttcacgcagcattcggggtacgcttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcggtgctgagac
ggcttccggcgctgcatgcaacacgagatgcttgcacccccgaagctcttccggcgctgcatggcgctccgatccgctcc
agggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatca
ctaccacttctacacagccactcgagctgtgtagcactccgctaaagggcgccctcttctcttctggttcagtcacaacccgcaa
acggcgccATGctgtgtagggccttctgttctgtgctggcggttccgcccgaagatcagcgccctcatgacgaacgag
acgtccgaccgccccctgtgtagcacttcccccaaacagggtggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaag
gacgcaagtgccacgtgacttccagtacaacccgaacgacacccgttggggagcgccctgttctggggccacgccacgtc
cgacgactgaccaactgggaggaccagccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactcggcgcccttctccggtccatg
gtgtgggactacaacaacaccccgcttcttcaacgacacccatcgaccccgccagcgctgctgggctcatctggaactaca
caccgggagtgccgaggagcagatctctctacagcctggacggcggttacccttaccgagtagcagaagaaccccggtg
ctggccgcaactccacccagttccgagcccggaaggtcttctggtacgagccctccagaagtgatcagaccgcccga
gtccagagactacaagatcgagatctactctccgacgacctgaagtcctggaagctggagtcggcgttcgcaacgagggtt
cctcggttaccagtagagtgcccccggcctgatcgaggtccccaccgagcagggacccagcaagtcctacgggtgatgttcat
ctcatcaacccccggcgccccggcgcggtcttcaaccagtaattctggtggcagcttcaacggcaccacttccgaggtt
cgacaacaggctcccgctgtgtgagcttccgcaaggactactacgcccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacggga
gcgccccggcgatcggtgggcttccacactggggtactccgcttctgtgcccacccacccctggcgctcctccatgtccctgt
gcgaaggttctccctcaacaccgagtagcagggcccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaa
caccagcaacgcccggccccgtggagccggttccgccaacaccacggttgacggaaggcccaacagctacacgctgacctgtc
aacagcaccggcaacctggagctgagctgggtgacgcccgaacacccagacgacttccaagcttctggttccggacct
ctccctctgttcaagggtctggaggaccccgaggagtaacctccgcatgggttccgaggtgtccgcttctcttcttctggacc
gggggaacagcaaggtgaaggtctggaaggagaacccctacttcaacccgcatgagcgtgaacaaccagcccttcaaga
gcgagaacgacctgtctactacaaggtgtacggctgtctggaccagaacatctggagctgtacttcaacgacggcgacgtc

gtgtccaccaacaccttactcatgaccaccgggaacgccctgggtccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttcta
catcgacaaggttccaggtgcgagaggtaagTGAcnaattggcagcagcagctcggatagtagacacactcggacgtgg
tctgtgtatggactgttccgcccacacttgccttgacctgtgaatatccctggcgctttatcaaacagccctcagtgtttgactt
tgtgtacggcttctgaggttgcagctgcttctgtctatttgcgaataccacccccagatcccttccctcgttctatcgttgcac
ccaaccgcaactatctacgctgtctgtatccctagcgctgctctgctcactgcccccgacagcccttgggttgggtc
cgctgtatttctctgtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcaggggaagtgtggatgggaacaaatgga
ggatcgtagagctcactagtagctgatttgaagacaggggtgttggctggatggggaacgctgtgtcggggttgcacgtc
tcttatactccttgggaagcaccacgactctgaagaagaaaagtgacacacacacccaaacggccgaatatt
gttcttataccgggtccaagagagactcgatgccccctcaatcagcactctctccctgccccttcaatcttctctgt
cctgcccgggggtgcccgtctgcccggcagtcacttctctgacagggcccttgtgagtgctctgtaccccttac
cgctcttccatttctcgaggccccctattgaatgtattctgttgcctgtgtggccaagcgggtgtggtggcgccgcccgtgg
gcagtgctcgggacttggcggaagcgtatttcttctgtaagcaccgcttgcctgttgggaagagaaggggggggg
tactgaatggatgaggaggagaaggagggtattgtattctgagttgggtgaagagc

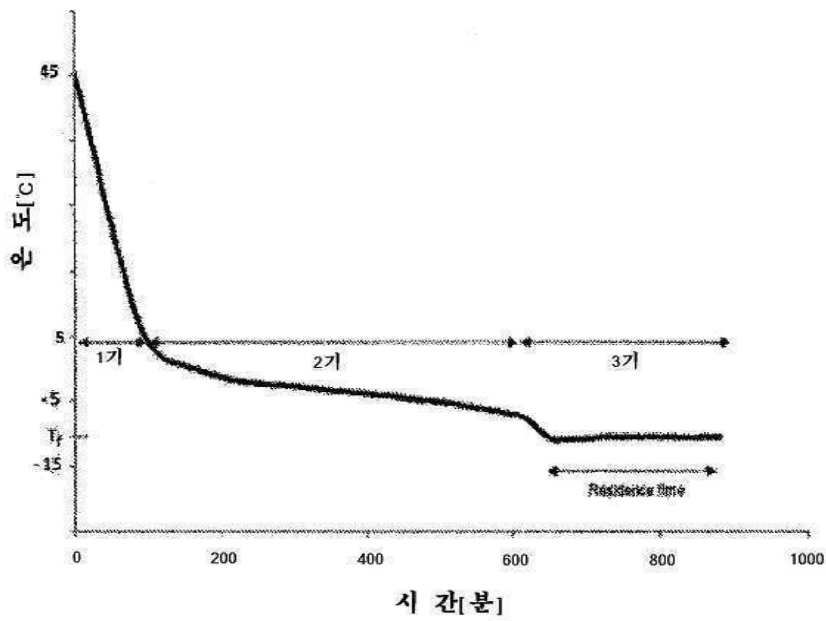
[0791] 서열 번호 112: 씨.레인하르티 β-튜불린 프로모터/5'UTR 및 클로렐라 불가리스 니트레이트질산염 환원 효소 3'UTR의 제어하에 있는 에스.세레비지아에 suc2 수크로스 인버타제 암호화 영역 및 내인성 FATA1 유전자를 중단 하는 핵내 게놈으로의 통합에 사용되는 영역을 함유하는, 구조물 FATA1-CrbTub_yInv_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1 의 일부

gctcttcggagtcactgtgccactgagttcgaactggtagctgaatggagtcgtctcactaaacgaattgtcagaccgce
agccggcgaggaccgagtcatagcgagggtagtagcgccatggcaccgaccagctgttgcagtaactggcgctc
ttccgtctctctgttgctctctgctgcgtccagcgctgctgttccgggtgatcatcggttcgtggcgaccgagcggtc
gtgcccattgcagcgccgtcttccgaacagtggtgggtcagggcgccacccgggtagccgtccgtccggaacccgccc
agagttttgggagcagcttgagccctgaagatggcgaggagacaagcgatcttctggaggagcaccgggtgctggagg
tccggggtgacggcgctgcattcaacgtaatcaatcgcatgatgatcagaggacacgaagtcttgggtgggtggcca
gaaacactgtccattgcaagggcatagggatgcgttcttcaactctcatttctcatttgaatccctccctgctcactttct
ctctctcttcccgtaacgcagcattcgggtacccttcttgcgtatgacacttccagcaaaaggtagggcggtgctcgagac
ggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttgcaccccccgaagctcttggggctgcatggcgctccgatgccgtcc
agggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgaattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctgatca
ctaccacttctacacagccactcgagctgtgatcgcaactcggctaaagggcgcccttctcttctgttcaptcacaacccgcaa
acggcgccATGctgctgcagggcttctctgtctgtggttcggcgttcggcccaagatcagcgctccaigacgaacgag
acgtccgaccgccccctggtgcacttacccccacaagggtggatgaacgaccccaacggcctgtgtacgacgagaag
gacgccaaagtggcacctgtacttccagtacaacccgaacgacacccgtctggggagcgccttgttctggggccacgccacgtc
cgacgacctgaccaactgggaggaccagccatcgccatcgcccgaaagcgcaacgaetccggcgcttctcggctccatg
gtgtggactacaacaacacctcggttcttcaacgacacctcgaccccgccagcgctgctgggtccatctggacctaca
caccgggagtgaggagcagtgatctctctacagcctggacggcggtacaccttaccgagtgaccagaagaaccccggtg
ctggcgccaacacccacccagttccgtgacccgaaggtcttctgtgtacgagccctccagaagtggatcatgaccggtccaa
gtccaggactacaagatcgagatctactcctcgacgacctgaagtctggaagctggagtcgcgttcgccaacgagggtt
ctctggctaccagtacgagtgccccggcctgacgagggtcccccagcagcagccacagcaagtcctactgggtgatgttcat
ctccatcaaccccgcgccccggcggtccttcaaccagtacttctgctggcagcttcaacggcaccacttcgaggcctt
cgacaaccagtcctcggtgtgtgacttcggcaaggactactacgcccctgcagaccttctcaacaccgacccgacctacggga
gcgcccctgggcatcgctggggtcccaactgggagtaactcggttctgtgcccaacacccctggcgcttctccatgtcctcgt
gcgaagttctccctcaacaccgagtaaccggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatctgaa
catcagcaacgcggccctggagcggttcgccaccaacacacgttgacgaaggccaaacagctacaacgtcgacctgtcc
aacagcaccggcaccctggagttcagctgtgtgtacgggtcaacacacccagacgactccaagtcgtgttcgggacct
ctccctctgttcaaggccctggaggaacccgaggagtaactccgcatgggttcgaggtgtccggtctctcttcttgggacc
gcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttaccacccgatgagcgtgaacaaccagcccttcaaga

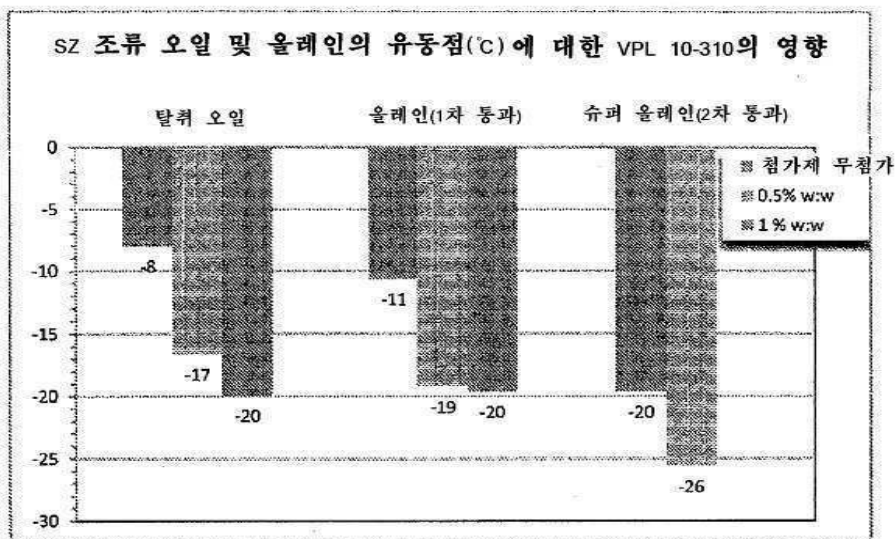
[0794]

- 133 -

도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Solazyme, Inc.

<120> MICROBIAL OILS WITH LOWERED POUR POINTS, DIELECTRIC FLUIDS
PRODUCED THEREFROM, AND RELATED METHODS

<130> SOLAP009WO

<140> PCT/US2011/059224

<141> 2011-11-03
 <150> 61/409,902
 <151> 2010-11-03
 <150> 61/438,966
 <151> 2011-02-02
 <150> 61/522,231
 <151> 2011-08-10
 <150> 61/546,932
 <151> 2011-10-13
 <160> 113
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1187
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220><223> HUP promoter from Chlorella

<400> 1

gatcagacgg gcctgacctg cgagataatc aagtgctcgt aggcaaccaa ctcagcagct	60
gcttggtgtt gggctctgcag gatagtgttg cagggcccca aggacagcag gggaacttac	120
accttgctcc cgaccagatt ttatggagtg cattgcctca agagcctagc cggagcgcta	180
ggctacatac ttccgcacc ggtatgaggg gatatagtac tcgcactgcg ctgtctagtg	240
agatggcgag tgcctgccat aaacaactgg ctgctcagcc attgtttggc ggaccattct	300
ggggggggcca gcaatgcctg actttcgggt aggggtgaaa ctgaacaaag actacaaaa	360
cagaatttct tcctccttgg aggtaagcgc aggccggccc gcctgcgccc acatggcgct	420
ccgaacacct ccatagctgt aaggcgcaa acatggccgg actgttgtca gcactctttc	480
atggccatac aaggtcatgt cgagattagt gctgagtaag acaactacac cccatgttcg	540
attgaagcgg tgacttcatg ccaacctgcc cctgggcgta gcagacgtat gccatcatga	600
ccactagcgg acatgcgctg tcttttgcca ccaaaacaac tggtagaccg ctggaagtcg	660
tgccgcacac ctccgggagt gaggccggcg actcctcccc ggccggccgc ggccctacct	720
gggtagggtc gccatacgcc cagacacaaa cgacgcagga ggggattggg gtagggaatc	780
ccaaccagcc taaccaagac ggcacctata ataatagggt gggggactaa cagccctata	840
tcgcaagctt tgggtgccta tcttgagaag cagagttgg agtggctgtg tacggtcgac	900

cctaagggtgg gtgtgccgca gcctgaaaca aagcgtctag cagctgcttc tataatgtgt 960
cagccgttgt gtgtcagtta tattgtatgc tattgtttgt tcgtgctagg gtggcgagg 1020
cccacctact gtggcgggcc attggttggg gcttgaattg cctcaccatc taaggctcga 1080
acgtcactc aaacgccttt gtacaactgc agaactttcc ttggcgctgc aactacagtg 1140
tgcaaacag cacaatagcac tcccttacct caccagcag tacaaca 1187

<210> 2

<211> 1414

<212> DNA

<213> Chlorella ellipsoidea

<400> 2

cgctgcgcac caggggccgc agctcgtga tgcgctcca aatgcggtcc cccgattttt 60
tgtttctcat ctctccacc ttgggtggcct tcttggccag ggccttcagc tgcattgcga 120
cagaccgttg agctcctgat cagcatctc aggaggccct ttgacaagca agccctgtg 180
caagccatt caggggtac cagtgggtgct gaggtatagtg ggtttgaaaa ggattgctcg 240
gtcattgct gctcatgaa ttggcatgtg catcatgtt cacaatatgc caccaggctt 300
tggagcaaga gagcatgaat gccttcaggc aggttgaaag ttcctggggg tgaagaggca 360

gggccgagga ttggaggagg aaagcatcaa gtcgtcgtc atgctcatgt tttcagtcag 420
agtttgccaa gctcacagga gcagagacaa gactggctgc tcaggtgttg catcgtgtgt 480
gtggtggggg ggggggggtt aatacgttac gaaatgcact tggaaattccc acctcatgcc 540
agcggaccca catgcttgaa ttgaggcct gtgggtgag aaatgctcac tctgcctcgc 600
ttgctgaggt acttcaggcc gctgagctca aagtcgatgc cctgctcgtc tatcagggcc 660
tgcacctctg ggtgaccgg ctcagcctcc ttcgaggga tggagtaggc gccggcagcg 720
ttcatgtccg ggcccagggc agcgtgtgtg ccataaatgt cggatggtt ggggaggggg 780

gacctgcga caccattgcc gttgtgtgct gacgcatgca catgtggcct ggctggcacc 840
ggcagcactg gtctccagcc agccagcaag ttgctgttca ggaaagcggc catgttgttg 900
gtccctgcgc atgtaattcc ccagatcaaa ggagggaaca gcttggattt gatgtagtgc 960
ccaaccggac tgaatgtcgc atggcaggtc cctttgagtc tcccgaatta ctacagggc 1020
actgtgacct aacgcagcat gccaacgca aaaaaatgat tgacagaaaa tgaagcgggtg 1080
tgtcaatatt tgctgtattt attcgtttta atcagcaacc aagttcgaaa cgcaactatc 1140
gtggtgatca agtgaacctc atcagactta cctcgttcgg caaggaaacg gaggcaccaa 1200

attccaattt gatattatcg cttgccaagc tagagctgat ctttgggaaa ccaactgcca 1260

gacagtgga c tggatggag tgccccgagt ggtggagcct cttcgattcg gttatgcatt 1320
actaacgtga accctcagtg aaggacat cagaccagaa agaccagatc tcctcctcga 1380
caccgagaga gtgttcggc agtaggacga caag 1414

<210> 3

<211> 512

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Yeast sucrose invertase

<400> 3

Met Thr Asn Glu Thr Ser Asp Arg Pro Leu Val His Phe Thr Pro Asn

1 5 10 15

Lys Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu Trp Tyr Asp Glu Lys Asp

20 25 30

Ala Lys Trp His Leu Tyr Phe Gln Tyr Asn Pro Asn Asp Thr Val Trp

35 40 45

Gly Thr Pro Leu Phe Trp Gly His Ala Thr Ser Asp Asp Leu Thr Asn

50 55 60

Trp Glu Asp Gln Pro Ile Ala Ile Ala Pro Lys Arg Asn Asp Ser Gly

65 70 75 80

Ala Phe Ser Gly Ser Met Val Val Asp Tyr Asn Asn Thr Ser Gly Phe

85 90 95

Phe Asn Asp Thr Ile Asp Pro Arg Gln Arg Cys Val Ala Ile Trp Thr

100 105 110

Tyr Asn Thr Pro Glu Ser Glu Glu Gln Tyr Ile Ser Tyr Ser Leu Asp

115 120 125

Gly Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Gln Lys Asn Pro Val Leu Ala Ala

130 135 140

Asn Ser Thr Gln Phe Arg Asp Pro Lys Val Phe Trp Tyr Glu Pro Ser

145 150 155 160

Gln Lys Trp Ile Met Thr Ala Ala Lys Ser Gln Asp Tyr Lys Ile Glu

165 170 175

Ile Tyr Ser Ser Asp Asp Leu Lys Ser Trp Lys Leu Glu Ser Ala Phe

180	185	190
Ala Asn Glu Gly Phe Leu Gly Tyr Gln Tyr Glu Cys Pro Gly Leu Ile		
195	200	205
Glu Val Pro Thr Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Tyr Trp Val Met Phe		
210	215	220
Ile Ser Ile Asn Pro Gly Ala Pro Ala Gly Gly Ser Phe Asn Gln Tyr		
225	230	235
Phe Val Gly Ser Phe Asn Gly Thr His Phe Glu Ala Phe Asp Asn Gln		
245	250	255
Ser Arg Val Val Asp Phe Gly Lys Asp Tyr Tyr Ala Leu Gln Thr Phe		
260	265	270
Phe Asn Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Ser Ala Leu Gly Ile Ala Trp Ala		
275	280	285
Ser Asn Trp Glu Tyr Ser Ala Phe Val Pro Thr Asn Pro Trp Arg Ser		
290	295	300
Ser Met Ser Leu Val Arg Lys Phe Ser Leu Asn Thr Glu Tyr Gln Ala		
305	310	315
Asn Pro Glu Thr Glu Leu Ile Asn Leu Lys Ala Glu Pro Ile Leu Asn		
325	330	335
Ile Ser Asn Ala Gly Pro Trp Ser Arg Phe Ala Thr Asn Thr Thr Leu		
340	345	350
Thr Lys Ala Asn Ser Tyr Asn Val Asp Leu Ser Asn Ser Thr Gly Thr		
355	360	365
Leu Glu Phe Glu Leu Val Tyr Ala Val Asn Thr Thr Gln Thr Ile Ser		
370	375	380
Lys Ser Val Phe Ala Asp Leu Ser Leu Trp Phe Lys Gly Leu Glu Asp		
385	390	395
Pro Glu Glu Tyr Leu Arg Met Gly Phe Glu Val Ser Ala Ser Ser Phe		
405	410	415
Phe Leu Asp Arg Gly Asn Ser Lys Val Lys Phe Val Lys Glu Asn Pro		
420	425	430

Tyr Phe Thr Asn Arg Met Ser Val Asn Asn Gln Pro Phe Lys Ser Glu
 435 440 445
 Asn Asp Leu Ser Tyr Tyr Lys Val Tyr Gly Leu Leu Asp Gln Asn Ile
 450 455 460

Leu Glu Leu Tyr Phe Asn Asp Gly Asp Val Val Ser Thr Asn Thr Tyr
 465 470 475 480
 Phe Met Thr Thr Gly Asn Ala Leu Gly Ser Val Asn Met Thr Thr Gly
 485 490 495
 Val Asp Asn Leu Phe Tyr Ile Asp Lys Phe Gln Val Arg Glu Val Lys
 500 505 510

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Yeast secretion signal

<400> 4

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys

1 5 10 15

Ile Ser Ala Ser

20

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> higher plants secretion signal

<400> 5

Met Ala Asn Lys Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ser Leu Ala

1 5 10 15

Ser Gly

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> consensus eukaryotic secretion signal

<400> 6

Met Ala Arg Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly

1 5 10

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> combination higher plants / eukaryotic secretion signal

<400> 7

Met Ala Asn Lys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu

1 5 10 15

Ala Ala Ser Gly

20

<210> 8

<211> 2615

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 8

gaattcccca acatggtgga gcacgacact ctctgtctact ccaagaatat caaagataca 60

gtctcagaag accaaagggc tattgagact tttcaacaaa gggtaatatc gggaaacctc 120

ctcggattcc attgcccagc tatctgtcac ttcatacaaa ggacagtaga aaaggaaggt 180

ggcacctaca aatgccatca ttgcgataaa ggaaaggcta tcgttcaaga tgcctctgcc 240

gacagtggtc ccaaagatgg acccccaccc acgaggagca tcgtggaaaa agaagacgtt 300

ccaaccacgt cticaaagca agtggattga tgtgaacatg gtggagcacg acactctcgt 360

ctactccaag aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggctattg agacttttca 420

acaaagggtg atatcgggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcacttcat 480

caaaaggaca gtagaaaagg aagggtggcac ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa 540

ggctatcggt caagatgcct ctgccgacag tgggcccaaa gatggacccc caccacagag 600

gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cagctcttca aagcaagtgg attgatgtga 660

tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc 720

tatataagga agttcatttc atttgagag gacacgtga aatcaccagt ctctctctac	780
aaatctatct ctggcgccgc atatcaatgc ttcttcaggc ctttcttttt cttcttgctg	840
gttttgctgc caagatcagc gcctctatga cgaacgaaac ctcggataga ccacttgctc	900
actttacacc aaacaagggc tggatgaatg accccaatgg actgtggtac gacgaaaaag	960
atgccaagtg gcatctgtac tttcaataca acccgaacga tactgtctgg gggacgcat	1020
tgttttgggg ccacgccagc tccgacgacc tgaccaattg ggaggaccaa ccaatagcta	1080
tcgctccgaa gaggaacgac tccggagcat tctcgggttc catggtggtt gactacaaca	1140
atacttccgg ctttttcaac gataaccattg acccgagaca acgctgcgtg gccatatgga	1200
cttacaacac accggagtcc gaggagcagt acatctcgta tagcctggac ggtggataca	1260
cttttacaga gtatcagaag aacctgtgct ttgctgcaa ttcgactcag ttccgagatc	1320
cgaaggtctt ttggtacgag ccctcgcaga agtggatcat gacagcggca aagtcacagg	1380
actacaagat cgaaatttac tcgtctgacg accttaaate ctggaagctc gaatccgct	1440
tcgcaaacga gggctttctc ggctaccaat acgaatgcc aggctgata gaggtcccaa	1500
cagagcaaga tccagcaag tctactggg tgatgtttat ttccattaat ccaggagcac	1560
cggcaggagg ttcttttaac cagtacttcg tcggaagctt taacggaact ctttcgagg	1620
catttgataa ccaatcaaga gtagttgatt ttggaaagga ctactatgcc ctgcagactt	1680
tcttcaatac tgaccegcac tatgggagcg ctcttgcat tgcgtgggct tctaactggg	1740
agtattccgc attcgttctt acaaacctt ggaggtcctc catgtcgtc gtgaggaaat	1800
tctctctcaa cactgagtac caggccaacc cggaaaccga actcataaac ctgaaagccg	1860
aaccgatcct gaacattagc aacgttgcc cctggagccg gtttgcaacc aacaccacgt	1920
tgacgaaagc caacagctac aacgtcgatc ttctgaatag caccgttaca cttgaatttg	1980
aactggtgta tgccgtcaat accacccaaa cgatctcgaa gtcggtgttc gcggacctct	2040
ccctctggtt taaaggcctg gaagaccccg aggagtacct cagaatgggt ttcgaggttt	2100
ctgcgtcctc cttcttctt gatcgccgga acagcaaagt aaaatttgtt aaggagaacc	2160
catattttac caacaggatg agcgtaaca accaaccatt caagagcgaa aacgacctgt	2220
cgtactacaa agtgtatggt ttgcttgatc aaaatatcct ggaactctac ttcaacgatg	2280
gtgatgtcgt gtccaccaac acatacttca tgacaaccgg gaacgcactg ggctccgtga	2340
acatgacgac ggggtgtgat aacctgttct acatcgacaa attccaggtg agggaagtca	2400
agtgagatct gtcgatcgac aagctcgagt ttctccataa taatgtgtga gtagttccca	2460
gataagggaa ttagggttcc tatagggttt cgtcatgtg ttgagcatat aagaaacct	2520
tagtatgtat ttgtatttgt aaaatacttc tatcaataaa atttctaatt cctaaaacca	2580

aaatccagta ctaaaatcca gatcccccga attaa 2615

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> primer

<400> 9

tgttgaagaa tgagccggcg ac 22

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> primer

<400> 10

cagtgaagcta ttacgcactc 20

<210> 11

<211> 541

<212> DNA

<213> Prototheca kruegani

<400> 11

tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaag agtggcatgg ttaaagaaaa tactctggag 60

ccatagcgaa agcaagttta gtaagcttag gtcattcttt ttagaccga aaccgagtga 120

tctacccatg atcaggggtga agtggttagta aaataacatg gaggcccgaa cgcactaatg 180

ttgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaa tcggagttag 240

ctggttctcc ccgaaatgcg tttagggcga gcagtagcag tacaataga ggggtaaagc 300

actgtttctt ttgtgggctt cgaaagtgtt acctcaaagt ggcaaactct gaatactcta 360

tttagatata tactagttag accttggggg ataagctcct tggtaaaaag ggaaacagcc 420

cagatcacca gtttaagccc caaaatgaaa atgatatga ctaaggatgt gggtatgtca 480

aaacctccag caggtttagct tagaagcagc aatcctttca agagtgcgta atagtcact 540

g 541

<210> 12

<211> 573

<212> DNA

<213> *Prototheca wickerhamii*

<400> 12

tggtgaagaa tgagccggcg acttaaaata aatggcaggc taagagattt aataactcga	60
aacctaagcg aaagcaagtc ttaatagggc gtcaatttaa caaaacttta aataaattat	120
aaagtcattt attttagacc cgaacctgag tgatctaacc atggtcagga tgaaacttgg	180
gtgacaccaa gtggaagtc gaaccgaccg atgttgaaaa atcggcggat gaactgtggt	240
tagtggtgaa ataccagtcg aactcagagc tagctggttc tccccgaaat gcgttgaggc	300

gcagcaatat atctcgtcta tctaggggta aagcactgtt tcggtgcggg ctatgaaaat	360
ggtaccaaat cgtggcaaac tctgaatact agaaatgacg atatattagt gagactatgg	420
gggataagct ccatagtcca gagggaaaca gcccgacca ccagttaagg ccccaaatg	480
ataatgaagt ggtaaaggag gtgaaaatgc aaatacaacc aggaggttgg cttagaagca	540
gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg	573

<210> 13

<211> 541

<212> DNA

<213> *Prototheca stagnora*

<400> 13

tggtgaagaa tgagccggcg agttaaaaa aatggcatgg ttaaagatat ttctctgaag	60
ccatagcgaa agcaagtttt acaagctata gtcatttttt ttagaccgga aaccgagtga	120
tctaccatg atcagggtga agtgttggtc aaataacatg gagggccgaa cgcactaatg	180
gtgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaa tcggagttag	240
ctggttctcc ccgaaatgcg tttaggcgca gcagtagcaa cacaataga ggggtaaagc	300
actgtttctt ttgtgggctt cgaaagttgt acctcaaagt ggcaaactct gaatactcta	360
tttagatata tactagttag accttggggg ataagctcct tgggtcaaag ggaaacagcc	420
cagatcacca gttaaggccc caaatgaaa atgatatga ctaaggacgt gagtatgtca	480

aaacctccag caggttagct tagaagcagc aatcctttca agagtgcgta atagctcact	540
g	541

<210> 14

<211> 541

<212> DNA

<213> *Prototheca moriformis*

<400> 14

tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaag agtggcatgg ttaaagataa ttctctggag	60
ccatagcgaa agcaagttta acaagctaaa gtcacccttt ttagaccga aaccgagtga	120
tctacccatg atcagggtga agtgttggta aaataacatg gagggccgaa ccgactaatg	180
gtgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaac tcggagttag	240
ctggttctcc ccgaaatgcg tttaggcgca gcagtagcaa cacaataga ggggtaaagc	300
actgtttctt ttgtgggctt cgaaagtgt acctcaaagt ggcaaactct gaatactcta	360
tttagatata tactagttag accttggggg ataagctcct tgggtcaaaag ggaacagcc	420
cagatcacca gtttaagggc caaaatgaaa atgatatga ctaaggatgt gggtatgtta	480
aaacctccag caggttagct tagaagcagc aatcctttca agagtgcgta atagctcact	540
g	541

<210> 15

<211> 573

<212> DNA

<213> *Prototheca moriformis*

<400> 15

tgttgaagaa tgagccggcg acttaaaata aatggcaggc taagagaatt aataactga	60
aacctaaagc aaagcaagtc ttaatagggc gctaatttaa caaacatta aataaaatct	120
aaagtcattt attttagacc cgaacctgag tgatctaacc atggtcagga tgaaacttgg	180
gtgacaccaa gtggaagtcc gaaccgaccg atgttgaaaa atcggcggat gaactgtggt	240
tagtggtgaa ataccagtcg aactcagagc tagctgggtc tccccgaaat gcgttgaggc	300
gcagcaatat atctcgtcta tctaggggta aagcactgtt tcggtgcggg ctatgaaaat	360
ggtaccaaat cgtggcaaac tctgaatact agaaatgacg atatattagt gagactatgg	420
gggataagct ccatagtcga gagggaaaca gcccagacca ccagttaagg ccccaaatg	480
ataatgaagt ggtaaaggag gtgaaaatgc aaatacaacc aggaggttgg cttagaagca	540
gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg	573

<210> 16

<211> 573

<212> DNA

<213> *Prototheca wickerhamii*

<400> 16

tgttgaagaa tgagccgtcg acttaaaata aatggcaggc taagagaatt aataactga	60
--	----

aacctaagcg aaagcaagtc ttaatagggc gctaatttaa caaacatta aataaaatct 120
aaagtcattt attttagacc cgaacctgag tgatctaacc atggtcagga tgaaacttgg 180

gtgacaccaa gtggaagtcc gaaccgaccg atgttgaaaa atcggcggat gaactgtggt 240
tagtggtgaa ataccagtcg aactcagagc tagctggttc tccccgaaat gcgttgaggc 300
gcagcaatat atctcgtcta tctaggggta aagcactgtt tcggtgcggg ctatgaaaat 360
ggtaccaaat cgtggcaaac tctgaatact agaaatgacg atatattagt gagactatgg 420
gggataagct ccatagtcga gagggaaaca gcccagacca ccagttaagg ccccaaatg 480
ataatgaagt ggtaaaggag gtgaaaatgc aaatacaacc aggaggttgg cttagaagca 540
gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg 573

<210> 17

<211> 541

<212> DNA

<213> Prototheca moriformis

<400> 17

tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaag agtggcgtgg ttaaagaaaa ttctctggaa 60
ccatagcgaa agcaagttta acaagcttaa gtcacttttt ttagaccgga aaccgagtga 120
tctacccatg atcagggtga agtgttggtta aaataacatg gagggccgaa ccgactaatg 180
gtgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaac tcggagttag 240
ctggttctcc ccgaaatgcg tttaggcgca gcagtagcaa cacaataga ggggtaaagc 300
actgtttctt ttgtgggctc cgaaagtgtt acctcaaagt ggcaaactct gaatactcta 360

tttagatata tactagttag accttggggg ataagctcct tggtcgaaag ggaaacagcc 420
cagatcacca gttaaggccc caaatgaaa atgatatgta ctaaggatgt gagtatgtca 480
aaacctccag caggttagct tagaagcagc aatcctttca agagtgcgta atagctcact 540
g 541

<210> 18

<211> 541

<212> DNA

<213> Prototheca zopfii

<400> 18

tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaag agtggcatgg ttaaagaaaa ttctctggag 60
ccatagcgaa agcaagttta acaagcttaa gtcacttttt ttagaccgga aaccgagtga 120

tctacccatg atcaggggtga agtgttggta aaataacatg gaggcccgaa cgcactaatg 180
 gtgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaac tcggagttag 240
 ctggttctcc ccgaaatgcg tttaggcgca gcagtagcaa cacaaataga ggggtaaagc 300
 actgtttctt tcgtgggctt cgaaagtgtt acctcaaagt ggcaaactct gaatactcta 360
 tttagatata tactagttag accttggggg ataagctcct tggtaaaaag ggaaacagcc 420
 cagatcacca gtttaagggc caaaatgaaa atgatatga ctaaggatgt gagtatgtca 480
 aaacctccag caggtttagct tagaagcagc aatcctttca agagtgcgta atagtcact 540

g 541

<210> 19

<211> 565

<212> DNA

<213> Prototheca moriformis

<400> 19

tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaaa gttggcatgg ttaaggaaat attccgaagc 60
 cgtagcaaaa gcgagtctga ataggcgcat aaaatatatt aatatttaga atctagtcac 120
 tttttctaga cccgaaccgc ggtgatctaa ccatgaccag gatgaagctt gggatgatacc 180
 aagtgaaggt ccgaaccgac cgatgttgaa aaatcggcgg atgagtgttg gttagcggtg 240
 aaataccagt cgaaccggga gctagctggt tctccccgaa atgcgttgag gcgcagcagt 300

acatctagtc tatctagggg taaagcactg tttcgggtgc ggctgtgaga acggtaccaa 360
 atcgtggcaa actctgaata ctagaatga cgatgtagta gtgagactgt gggggataag 420
 ctccattgtc aagagggaaa cagcccagac caccagctaa ggccccaaaa tggtaatgta 480
 gtgacaaagg aggtgaaaat gcaatacaaa ccaggagggt ggcttagaag cagccatcct 540
 ttaaagagtg cgtaatatagct cactg 565

<210> 20

<211> 550

<212> PRT

<213> Chicorium intybus

<400> 20

Met Ser Asn Ser Ser Asn Ala Ser Glu Ser Leu Phe Pro Ala Thr Ser

1 5 10 15
 Glu Gln Pro Tyr Arg Thr Ala Phe His Phe Gln Pro Pro Gln Asn Trp
 20 25 30

Met Asn Asp Pro Asn Gly Pro Met Cys Tyr Asn Gly Val Tyr His Leu
35 40 45

Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Phe Gly Pro Leu Trp Asn Leu Arg Met Tyr
50 55 60

Trp Ala His Ser Val Ser His Asp Leu Ile Asn Trp Ile His Leu Asp

65 70 75 80

Leu Ala Phe Ala Pro Thr Glu Pro Phe Asp Ile Asn Gly Cys Leu Ser
85 90 95

Gly Ser Ala Thr Val Leu Pro Gly Asn Lys Pro Ile Met Leu Tyr Thr
100 105 110

Gly Ile Asp Thr Glu Asn Arg Gln Val Gln Asn Leu Ala Val Pro Lys
115 120 125

Asp Leu Ser Asp Pro Tyr Leu Arg Glu Trp Val Lys His Thr Gly Asn

130 135 140

Pro Ile Ile Ser Leu Pro Glu Glu Ile Gln Pro Asp Asp Phe Arg Asp

145 150 155 160

Pro Thr Thr Thr Trp Leu Glu Glu Asp Gly Thr Trp Arg Leu Leu Val
165 170 175

Gly Ser Gln Lys Asp Lys Thr Gly Ile Ala Phe Leu Tyr His Ser Gly
180 185 190

Asp Phe Val Asn Trp Thr Lys Ser Asp Ser Pro Leu His Lys Val Ser

195 200 205

Gly Thr Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Phe Phe Pro Val Trp Val Asp
210 215 220

Ser Thr Asn Gly Val Asp Thr Ser Ile Ile Asn Pro Ser Asn Arg Val
225 230 235 240

Lys His Val Leu Lys Leu Gly Ile Gln Asp His Gly Lys Asp Cys Tyr
245 250 255

Leu Ile Gly Lys Tyr Ser Ala Asp Lys Glu Asn Tyr Val Pro Glu Asp

260 265 270

Glu Leu Thr Leu Ser Thr Leu Arg Leu Asp Tyr Gly Met Tyr Tyr Ala

275 280 285
 Ser Lys Ser Phe Phe Asp Pro Val Lys Asn Arg Arg Ile Met Thr Ala
 290 295 300
 Trp Val Asn Glu Ser Asp Ser Glu Ala Asp Val Ile Ala Arg Gly Trp
 305 310 315 320
 Ser Gly Val Gln Ser Phe Pro Arg Ser Leu Trp Leu Asp Lys Asn Gln

 325 330 335
 Lys Gln Leu Leu Gln Trp Pro Ile Glu Glu Ile Glu Met Leu His Gln
 340 345 350
 Asn Glu Val Ser Phe His Asn Lys Lys Leu Asp Gly Gly Ser Ser Leu
 355 360 365
 Glu Val Leu Gly Ile Thr Ala Ser Gln Ala Asp Val Lys Ile Ser Phe
 370 375 380
 Lys Leu Ala Asn Leu Glu Glu Ala Glu Glu Leu Asp Pro Ser Trp Val

 385 390 395 400
 Asp Pro Gln Leu Ile Cys Ser Glu Asn Asp Ala Ser Lys Lys Gly Lys
 405 410 415
 Phe Gly Pro Phe Gly Leu Leu Ala Leu Ala Ser Ser Asp Leu Arg Glu
 420 425 430
 Gln Thr Ala Ile Phe Phe Arg Val Phe Arg Lys Asn Gly Arg Tyr Val
 435 440 445
 Val Leu Met Cys Ser Asp Gln Ser Arg Ser Ser Met Lys Asn Gly Ile

 450 455 460
 Glu Lys Arg Thr Tyr Gly Ala Phe Val Asp Ile Asp Pro Gln Gln Asp
 465 470 475 480
 Glu Ile Ser Leu Arg Thr Leu Ile Asp His Ser Ile Val Glu Ser Phe
 485 490 495
 Gly Gly Arg Gly Lys Thr Cys Ile Thr Thr Arg Val Tyr Pro Thr Leu
 500 505 510
 Ala Ile Gly Glu Gln Ala Arg Leu Phe Ala Phe Asn His Gly Thr Glu

 515 520 525

Ser Val Glu Ile Ser Glu Leu Ser Ala Trp Ser Met Lys Lys Ala Gln
530 535 540
Met Lys Val Glu Glu Pro
545 550
<210> 21
<211> 581
<212> PRT
<213> Schizosaccharomyces pombe
<400> 21
Met Phe Leu Lys Tyr Ile Leu Ala Ser Gly Ile Cys Leu Val Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Thr Asn Ala Ala Pro Arg His Leu Tyr Val Lys Arg Tyr
20 25 30
Pro Val Ile Tyr Asn Ala Ser Asn Ile Thr Glu Val Ser Asn Ser Thr
35 40 45
Thr Val Pro Pro Pro Pro Phe Val Asn Thr Thr Ala Pro Asn Gly Thr
50 55 60
Cys Leu Gly Asn Tyr Asn Glu Tyr Leu Pro Ser Gly Tyr Tyr Asn Ala
65 70 75 80
Thr Asp Arg Pro Lys Ile His Phe Thr Pro Ser Ser Gly Phe Met Asn
85 90 95
Asp Pro Asn Gly Leu Val Tyr Thr Gly Gly Val Tyr His Met Phe Phe
100 105 110
Gln Tyr Ser Pro Lys Thr Leu Thr Ala Gly Glu Val His Trp Gly His
115 120 125
Thr Val Ser Lys Asp Leu Ile His Trp Glu Asn Tyr Pro Ile Ala Ile
130 135 140
Tyr Pro Asp Glu His Glu Asn Gly Val Leu Ser Leu Pro Phe Ser Gly
145 150 155 160
Ser Ala Val Val Asp Val His Asn Ser Ser Gly Leu Phe Ser Asn Asp
165 170 175
Thr Ile Pro Glu Glu Arg Ile Val Leu Ile Tyr Thr Asp His Trp Thr

180 185 190
 Gly Val Ala Glu Arg Gln Ala Ile Ala Tyr Thr Thr Asp Gly Gly Tyr
 195 200 205
 Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Gly Asn Pro Val Leu Asp Ile Asn Ser Leu

 210 215 220
 Gln Phe Arg Asp Pro Lys Val Ile Trp Asp Phe Asp Ala Asn Arg Trp
 225 230 235 240
 Val Met Ile Val Ala Met Ser Gln Asn Tyr Gly Ile Ala Phe Tyr Ser
 245 250 255
 Ser Tyr Asp Leu Ile His Trp Thr Glu Leu Ser Val Phe Ser Thr Ser
 260 265 270
 Gly Tyr Leu Gly Leu Gln Tyr Glu Cys Pro Gly Met Ala Arg Val Pro

 275 280 285
 Val Glu Gly Thr Asp Glu Tyr Lys Trp Val Leu Phe Ile Ser Ile Asn
 290 295 300
 Pro Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ser Val Val Gln Tyr Phe Val Gly Asp
 305 310 315 320
 Trp Asn Gly Thr Asn Phe Val Pro Asp Asp Gly Gln Thr Arg Phe Val
 325 330 335
 Asp Leu Gly Lys Asp Phe Tyr Ala Ser Ala Leu Tyr His Ser Ser Ser

 340 345 350
 Ala Asn Ala Asp Val Ile Gly Val Gly Trp Ala Ser Asn Trp Gln Tyr
 355 360 365
 Thr Asn Gln Ala Pro Thr Gln Val Phe Arg Ser Ala Met Thr Val Ala
 370 375 380
 Arg Lys Phe Thr Leu Arg Asp Val Pro Gln Asn Pro Met Thr Asn Leu
 385 390 395 400
 Thr Ser Leu Ile Gln Thr Pro Leu Asn Val Ser Leu Leu Arg Asp Glu

 405 410 415
 Thr Leu Phe Thr Ala Pro Val Ile Asn Ser Ser Ser Ser Leu Ser Gly
 420 425 430

Ser Pro Ile Thr Leu Pro Ser Asn Thr Ala Phe Glu Phe Asn Val Thr
435 440 445
Leu Ser Ile Asn Tyr Thr Glu Gly Cys Thr Thr Gly Tyr Cys Leu Gly
450 455 460
Arg Ile Ile Ile Asp Ser Asp Asp Pro Tyr Arg Leu Gln Ser Ile Ser
465 470 475 480
Val Asp Val Asp Phe Ala Ala Ser Thr Leu Val Ile Asn Arg Ala Lys
485 490 495
Ala Gln Met Gly Trp Phe Asn Ser Leu Phe Thr Pro Ser Phe Ala Asn
500 505 510
Asp Ile Tyr Ile Tyr Gly Asn Val Thr Leu Tyr Gly Ile Val Asp Asn
515 520 525
Gly Leu Leu Glu Leu Tyr Val Asn Asn Gly Glu Lys Thr Tyr Thr Asn
530 535 540
Asp Phe Phe Phe Leu Gln Gly Ala Thr Pro Gly Gln Ile Ser Phe Ala
545 550 555 560
Ala Phe Gln Gly Val Ser Phe Asn Asn Val Thr Val Thr Pro Leu Lys
565 570 575
Thr Ile Trp Asn Cys
580
<210> 22
<211> 550
<212> PRT
<213> Picha anomala
<400> 22
Met Ile Gln Leu Ser Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ser Val Phe
1 5 10 15
Asn Ser Ile Ala Asp Ala Ser Thr Glu Tyr Leu Arg Pro Gln Ile His
20 25 30
Leu Thr Pro Asp Gln Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Met Phe Tyr
35 40 45
Asp Arg Lys Asp Lys Leu Trp His Val Tyr Phe Gln His Asn Pro Asp

50 55 60
 Lys Lys Ser Ile Trp Ala Thr Pro Val Thr Trp Gly His Ser Thr Ser

 65 70 75 80
 Lys Asp Leu Leu Thr Trp Asp Tyr His Gly Asn Ala Leu Glu Pro Glu
 85 90 95
 Asn Asp Asp Glu Gly Ile Phe Ser Gly Ser Val Val Val Asp Arg Asn
 100 105 110
 Asn Thr Ser Gly Phe Phe Asn Asp Ser Thr Asp Pro Glu Gln Arg Ile
 115 120 125
 Val Ala Ile Tyr Thr Asn Asn Ala Gln Leu Gln Thr Gln Glu Ile Ala

 130 135 140
 Tyr Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Ser Phe Ile Lys Tyr Asp Gln Asn Pro
 145 150 155 160
 Val Ile Asn Val Asn Ser Ser Gln Gln Arg Asp Pro Lys Val Leu Trp
 165 170 175
 His Asp Glu Ser Asn Gln Trp Ile Met Val Val Ala Lys Thr Gln Glu
 180 185 190
 Phe Lys Val Gln Ile Tyr Gly Ser Pro Asp Leu Lys Lys Trp Asp Leu

 195 200 205
 Lys Ser Asn Phe Thr Ser Asn Gly Tyr Leu Gly Phe Gln Tyr Glu Cys
 210 215 220
 Pro Gly Leu Phe Lys Leu Pro Ile Glu Asn Pro Leu Asn Asp Thr Val
 225 230 235 240
 Thr Ser Lys Trp Val Leu Leu Leu Ala Ile Asn Pro Gly Ser Pro Leu
 245 250 255
 Gly Gly Ser Ile Asn Glu Tyr Phe Ile Gly Asp Phe Asp Gly Thr Thr

 260 265 270
 Phe His Pro Asp Asp Gly Ala Thr Arg Phe Met Asp Ile Gly Lys Asp
 275 280 285
 Phe Tyr Ala Phe Gln Ser Phe Asp Asn Thr Glu Pro Glu Asp Gly Ala
 290 295 300

Leu Gly Leu Ala Trp Ala Ser Asn Trp Gln Tyr Ala Asn Thr Val Pro
 305 310 315 320
 Thr Glu Asn Trp Arg Ser Ser Met Ser Leu Val Arg Asn Tyr Thr Leu

 325 330 335
 Lys Tyr Val Asp Val Asn Pro Glu Asn Tyr Gly Leu Thr Leu Ile Gln
 340 345 350
 Lys Pro Val Tyr Asp Thr Lys Glu Thr Arg Leu Asn Glu Thr Leu Lys
 355 360 365
 Thr Leu Glu Thr Ile Asn Glu Tyr Glu Val Asn Asp Leu Lys Leu Asp
 370 375 380
 Lys Ser Ser Phe Val Ala Thr Asp Phe Asn Thr Glu Arg Asn Ala Thr

 385 390 395 400
 Gly Val Phe Glu Phe Asp Leu Lys Phe Thr Gln Thr Asp Leu Lys Met
 405 410 415
 Gly Tyr Ser Asn Met Thr Thr Gln Phe Gly Leu Tyr Ile His Ser Gln
 420 425 430
 Thr Val Lys Gly Ser Gln Glu Thr Leu Gln Leu Val Phe Asp Thr Leu
 435 440 445
 Ser Thr Thr Trp Tyr Ile Asp Arg Thr Thr Gln His Ser Phe Gln Arg

 450 455 460
 Asn Ser Pro Val Phe Thr Glu Arg Ile Ser Thr Tyr Val Glu Lys Ile
 465 470 475 480
 Asp Thr Thr Asp Gln Gly Asn Val Tyr Thr Leu Tyr Gly Val Val Asp
 485 490 495
 Arg Asn Ile Leu Glu Leu Tyr Phe Asn Asp Gly Ser Ile Ala Met Thr
 500 505 510
 Asn Thr Phe Phe Phe Arg Glu Gly Lys Ile Pro Thr Ser Phe Glu Val

 515 520 525
 Val Cys Asp Ser Glu Lys Ser Phe Ile Thr Ile Asp Glu Leu Ser Val
 530 535 540
 Arg Glu Leu Ala Arg Lys

545	550																		
<210>	23																		
<211>	533																		
<212>	PRT																		
<213>	Debaryomyces occidentalis																		
<400>	23																		
Met	Val	Gln	Val	Leu	Ser	Val	Leu	Val	Ile	Pro	Leu	Leu	Thr	Leu	Phe				
1				5					10					15					
Phe	Gly	Tyr	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Ile	Asp	Leu	Ser	Val	Asp	Thr	Ser				
				20				25					30						
Glu	Tyr	Asn	Arg	Pro	Leu	Ile	His	Phe	Thr	Pro	Glu	Lys	Gly	Trp	Met				
		35					40					45							
Asn	Asp	Pro	Asn	Gly	Leu	Phe	Tyr	Asp	Lys	Thr	Ala	Lys	Leu	Trp	His				
	50					55					60								
Leu	Tyr	Phe	Gln	Tyr	Asn	Pro	Asn	Ala	Thr	Ala	Trp	Gly	Gln	Pro	Leu				
65					70				75						80				
Tyr	Trp	Gly	His	Ala	Thr	Ser	Asn	Asp	Leu	Val	His	Trp	Asp	Glu	His				
				85				90					95						
Glu	Ile	Ala	Ile	Gly	Pro	Glu	His	Asp	Asn	Glu	Gly	Ile	Phe	Ser	Gly				
		100						105					110						
Ser	Ile	Val	Val	Asp	His	Asn	Asn	Thr	Ser	Gly	Phe	Phe	Asn	Ser	Ser				
		115						120					125						
Ile	Asp	Pro	Asn	Gln	Arg	Ile	Val	Ala	Ile	Tyr	Thr	Asn	Asn	Ile	Pro				
	130						135					140							
Asp	Leu	Gln	Thr	Gln	Asp	Ile	Ala	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Gly	Tyr	Thr				
145					150				155						160				
Phe	Thr	Lys	Tyr	Glu	Asn	Asn	Pro	Val	Ile	Asp	Val	Ser	Ser	Asn	Gln				
				165					170				175						
Phe	Arg	Asp	Pro	Lys	Val	Phe	Trp	His	Glu	Arg	Phe	Lys	Ser	Met	Asp				
		180						185					190						
His	Gly	Cys	Ser	Glu	Ile	Ala	Arg	Val	Lys	Ile	Gln	Ile	Phe	Gly	Ser				
	195						200						205						

Ala Asn Leu Lys Asn Trp Val Leu Asn Ser Asn Phe Ser Ser Gly Tyr

210

215

220

Tyr Gly Asn Gln Tyr Gly Met Ser Arg Leu Ile Glu Val Pro Ile Glu

225

230

235

240

Asn Ser Asp Lys Ser Lys Trp Val Met Phe Leu Ala Ile Asn Pro Gly

245

250

255

Ser Pro Leu Gly Gly Ser Ile Asn Gln Tyr Phe Val Gly Asp Phe Asp

260

265

270

Gly Phe Gln Phe Val Pro Asp Asp Ser Gln Thr Arg Phe Val Asp Ile

275

280

285

Gly Lys Asp Phe Tyr Ala Phe Gln Thr Phe Ser Glu Val Glu His Gly

290

295

300

Val Leu Gly Leu Ala Trp Ala Ser Asn Trp Gln Tyr Ala Asp Gln Val

305

310

315

320

Pro Thr Asn Pro Trp Arg Ser Ser Thr Ser Leu Ala Arg Asn Tyr Thr

325

330

335

Leu Arg Tyr Val Ile Gln Met Leu Lys Leu Thr Ala Asn Ile Asp Lys

340

345

350

Ser Val Leu Pro Asp Ser Ile Asn Val Val Asp Lys Leu Lys Lys Lys

355

360

365

Asn Val Lys Leu Thr Asn Lys Lys Pro Ile Lys Thr Asn Phe Lys Gly

370

375

380

Ser Thr Gly Leu Phe Asp Phe Asn Ile Thr Phe Lys Val Leu Asn Leu

385

390

395

400

Asn Val Ser Pro Gly Lys Thr His Phe Asp Ile Leu Ile Asn Ser Gln

405

410

415

Glu Leu Asn Ser Ser Val Asp Ser Ile Lys Ile Gly Phe Asp Ser Ser

420

425

430

Gln Ser Leu Phe Tyr Ile Asp Arg His Ile Pro Asn Val Glu Phe Pro

435

440

445

Arg Lys Gln Phe Phe Thr Asp Lys Leu Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Leu

450 455 460
Asp Tyr Asp Gln Asp Leu Arg Val Phe Ser Leu Tyr Gly Ile Val Asp

465 470 475 480
Lys Asn Ile Ile Glu Leu Tyr Phe Asn Asp Gly Thr Val Ala Met Thr

485 490 495
Asn Thr Phe Phe Met Gly Glu Gly Lys Tyr Pro His Asp Ile Gln Ile

500 505 510
Val Thr Asp Thr Glu Glu Pro Leu Phe Glu Leu Glu Ser Val Ile Ile

515 520 525
Arg Glu Leu Asn Lys

530

<210

> 24

<211> 654

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 24

Met Ala Thr Ser Arg Leu Thr Pro Ala Tyr Asp Leu Lys Asn Ala Ala

1 5 10 15

Ala Ala Val Tyr Thr Pro Leu Pro Glu Gln Pro His Ser Ala Glu Val

20 25 30

Glu Ile Arg Asp Arg Lys Pro Phe Lys Ile Ile Ser Ala Ile Ile Leu

35 40 45

Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ile Leu Val Ala Val Asn Tyr Gln

50 55 60

Ala Pro Pro Ser His Ser Ser Gly Asp Asn Ser Gln Pro Ala Ala Val

65 70 75 80

Met Pro Pro Ser Arg Gly Val Ser Gln Gly Val Ser Glu Lys Ala Phe

85 90 95

Arg Gly Ala Ser Gly Ala Gly Asn Gly Val Ser Phe Ala Trp Ser Asn

100 105 110

Leu Met Leu Ser Trp Gln Arg Thr Ser Tyr His Phe Gln Pro Val Lys

115	120	125	
Asn Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Pro Leu Tyr Tyr Lys Gly Trp Tyr			
130	135	140	
His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Asp Ser Ala Val Trp Gly Asn Ile			
145	150	155	160
Thr Trp Gly His Ala Val Ser Thr Asp Leu Ile Asn Trp Leu His Leu			
165	170	175	
Pro Phe Ala Met Val Pro Asp Gln Trp Tyr Asp Val Asn Gly Val Trp			
180	185	190	
Thr Gly Ser Ala Thr Ile Leu Pro Asp Gly Arg Ile Val Met Leu Tyr			
195	200	205	
Thr Gly Asp Thr Asp Asp Tyr Val Gln Asp Gln Asn Leu Ala Phe Pro			
210	215	220	
Ala Asn Leu Ser Asp Pro Leu Leu Val Asp Trp Val Lys Tyr Pro Asn			
225	230	235	240
Asn Pro Val Ile Tyr Pro Pro Pro Gly Ile Gly Val Lys Asp Phe Arg			
245	250	255	
Asp Pro Thr Thr Ala Gly Thr Ala Gly Met Gln Asn Gly Gln Arg Leu			
260	265	270	
Val Thr Ile Gly Ser Lys Val Gly Lys Thr Gly Ile Ser Leu Val Tyr			
275	280	285	
Glu Thr Thr Asn Phe Thr Thr Phe Lys Leu Leu Tyr Gly Val Leu His			
290	295	300	
Ala Val Pro Gly Thr Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Leu Tyr Pro Val			
305	310	315	320
Ser Thr Thr Gly Glu Asn Gly Leu Asp Thr Ser Val Asn Gly Leu Gly			
325	330	335	
Val Lys His Val Leu Lys Thr Ser Leu Asp Asp Asp Lys His Asp Tyr			
340	345	350	
Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Asp Pro Val Lys Asn Lys Trp Thr Pro Asp			
355	360	365	

Asn Pro Asp Leu Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Leu Asp Tyr Gly Lys

370

375

380

Tyr Tyr Ala Ala Arg Thr Phe Tyr Asp Gln Asn Lys Gln Arg Arg Ile

385

390

395

400

Leu Trp Gly Trp Ile Gly Glu Thr Asp Leu Glu Ala Val Asp Leu Met

405

410

415

Lys Gly Trp Ala Ser Leu Gln Ala Ile Pro Arg Thr Ile Val Phe Asp

420

425

430

Lys Lys Thr Gly Thr Asn Val Leu Gln Arg Pro Glu Glu Glu Val Glu

435

440

445

Ser Trp Ser Ser Gly Asp Pro Ile Thr Gln Arg Arg Ile Phe Glu Pro

450

455

460

Gly Ser Val Val Pro Ile His Val Ser Gly Ala Thr Gln Leu Asp Ile

465

470

475

480

Thr Ala Ser Phe Glu Val Asp Glu Thr Leu Leu Glu Thr Thr Ser Glu

485

490

495

Ser His Asp Ala Gly Tyr Asp Cys Ser Asn Ser Gly Gly Ala Gly Thr

500

505

510

Arg Gly Ser Leu Gly Pro Phe Gly Leu Leu Val Val Ala Asp Glu Lys

515

520

525

Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Leu Tyr Val Ala Lys Gly Gly Asp

530

535

540

Gly Lys Ala Lys Ala His Leu Cys Ala Tyr Gln Thr Arg Ser Ser Met

545

550

555

560

Ala Ser Gly Val Glu Lys Glu Val Tyr Gly Ser Ala Val Pro Val Leu

565

570

575

Asp Gly Glu Asn Tyr Ser Ala Arg Ile Leu Ile Asp His Ser Ile Val

580

585

590

Glu Ser Phe Ala Gln Ala Gly Arg Thr Cys Val Arg Ser Arg Asp Tyr

595

600

605

Pro Thr Lys Asp Ile Tyr Gly Ala Ala Arg Cys Phe Phe Phe Asn Asn

610 615 620
Ala Thr Glu Ala Ser Val Arg Ala Ser Leu Lys Ala Trp Gln Met Lys

625 630 635 640
Ser Phe Ile Arg Pro Tyr Pro Phe Ile Pro Asp Gln Lys Ser

645 650

<210> 25

<211> 690

<212> PRT

<213> Allium cepa

<400> 25

Met Ser Ser Asp Asp Leu Glu Ser Pro Pro Ser Ser Tyr Leu Pro Ile

1 5 10 15

Pro Pro Ser Asp Glu Phe His Asp Gln Pro Pro Pro Leu Arg Ser Trp

20 25 30

Leu Arg Leu Leu Ser Ile Pro Leu Ala Leu Met Phe Leu Leu Phe Leu

35 40 45

Ala Thr Phe Leu Ser Asn Leu Glu Ser Pro Pro Ser Asp Ser Gly Leu

50 55 60

Val Ser Asp Pro Val Thr Phe Asp Val Asn Pro Ala Val Val Arg Arg

65 70 75 80

Gly Lys Asp Ala Gly Val Ser Asp Lys Thr Ser Gly Val Asp Ser Gly

85 90 95

Phe Val Leu Asp Pro Val Ala Val Asp Ala Asn Ser Val Val Val His

100 105 110

Arg Gly Lys Asp Ala Gly Val Ser Asp Lys Thr Ser Gly Val Asp Ser

115 120 125

Gly Leu Leu Lys Asp Ser Pro Leu Gly Pro Tyr Pro Trp Thr Asn Gln

130 135 140

Met Leu Ser Trp Gln Arg Thr Gly Phe His Phe Gln Pro Val Lys Asn

145 150 155 160

Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Pro Leu Tyr Tyr Lys Gly Trp Tyr His

165	170	175
Phe Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Glu Gly Ala Val Trp Gly Asn Ile Ala		
180	185	190
Trp Gly His Ala Val Ser Arg Asp Leu Val His Trp Thr His Leu Pro		
195	200	205
Leu Ala Met Val Pro Asp Gln Trp Tyr Asp Ile Asn Gly Val Trp Thr		
210	215	220
Gly Ser Ala Thr Ile Leu Pro Asp Gly Gln Ile Val Met Leu Tyr Thr		
225	230	235
240		
Gly Ala Thr Asn Glu Ser Val Gln Val Gln Asn Leu Ala Val Pro Ala		
245	250	255
Asp Gln Ser Asp Thr Leu Leu Leu Arg Trp Lys Lys Ser Glu Ala Asn		
260	265	270
Pro Ile Leu Val Pro Pro Pro Gly Ile Gly Asp Lys Asp Phe Arg Asp		
275	280	285
Pro Thr Thr Ala Trp Tyr Glu Pro Ser Asp Asp Thr Trp Arg Ile Val		
290	295	300
Ile Gly Ser Lys Asp Ser Ser His Ser Gly Ile Ala Ile Val Tyr Ser		
305	310	315
320		
Thr Lys Asp Phe Ile Asn Tyr Lys Leu Ile Pro Gly Ile Leu His Ala		
325	330	335
Val Glu Arg Val Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Phe Tyr Pro Val Ala		
340	345	350
Thr Ala Asp Ser Ser His Ala Asn His Gly Leu Asp Pro Ser Ala Arg		
355	360	365
Pro Ser Pro Ala Val Lys His Val Leu Lys Ala Ser Met Asp Asp Asp		
370	375	380
Arg His Asp Tyr Tyr Ala Ile Gly Thr Tyr Asp Pro Ala Gln Asn Thr		
385	390	395
400		
Trp Val Pro Asp Asp Ala Ser Val Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Tyr		
405	410	415

Asp Trp Gly Lys Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Tyr Asp His Ala Lys
 420 425 430
 Lys Arg Arg Ile Leu Trp Ser Trp Ile Gly Glu Thr Asp Ser Glu Thr
 435 440 445
 Ala Asp Ile Ala Lys Gly Trp Ala Ser Leu Gln Gly Val Pro Arg Thr
 450 455 460
 Val Leu Leu Asp Val Lys Thr Gly Ser Asn Leu Ile Thr Trp Pro Val
 465 470 475 480

 Val Glu Ile Glu Ser Leu Arg Thr Arg Pro Arg Asp Phe Ser Gly Ile
 485 490 495
 Thr Val Asp Ala Gly Ser Thr Phe Lys Leu Asp Val Gly Gly Ala Ala
 500 505 510
 Gln Leu Asp Ile Glu Ala Glu Phe Lys Ile Ser Ser Glu Glu Leu Glu
 515 520 525
 Ala Val Lys Glu Ala Asp Val Ser Tyr Asn Cys Ser Ser Ser Gly Gly
 530 535 540

 Ala Ala Glu Arg Gly Val Leu Gly Pro Phe Gly Leu Leu Val Leu Ala
 545 550 555 560
 Asn Gln Asp Leu Thr Glu Gln Thr Ala Thr Tyr Phe Tyr Val Ser Arg
 565 570 575
 Gly Met Asp Gly Gly Leu Asn Thr His Phe Cys Gln Asp Glu Lys Arg
 580 585 590
 Ser Ser Lys Ala Ser Asp Ile Val Lys Arg Ile Val Gly His Ser Val
 595 600 605

 Pro Val Leu Asp Gly Glu Ser Phe Ala Leu Arg Ile Leu Val Asp His
 610 615 620
 Ser Ile Val Glu Ser Phe Ala Gln Gly Gly Arg Ala Ser Ala Thr Ser
 625 630 635 640
 Arg Val Tyr Pro Thr Glu Ala Ile Tyr Asn Asn Ala Arg Val Phe Val
 645 650 655
 Phe Asn Asn Ala Thr Gly Ala Lys Val Thr Ala Gln Ser Leu Lys Val

660 665 670

Trp His Met Ser Thr Ala Ile Asn Glu Ile Tyr Asp Pro Ala Thr Ser

675 680 685

Val Met

690

<210> 26

<211> 501

<212> PRT

<213> Beta vulgaris

<220><221> misc_feature

<222> (382)..(382)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Asn Gly Val Ile Trp Gly Pro Pro Val

1 5 10 15

Trp Gly His Ser Thr Ser Lys Asp Leu Val Asn Trp Val Pro Gln Pro

20 25 30

Leu Thr Met Glu Pro Glu Met Ala Ala Asn Ile Asn Gly Ser Trp Ser

35 40 45

Gly Ser Ala Thr Ile Leu Pro Gly Asn Lys Pro Ala Ile Leu Phe Thr

50 55 60

Gly Leu Asp Pro Lys Tyr Glu Gln Val Gln Val Leu Ala Tyr Pro Lys

65 70 75 80

Asp Thr Ser Asp Pro Asn Leu Lys Glu Trp Phe Leu Ala Pro Gln Asn

85 90 95

Pro Val Met Phe Pro Thr Pro Gln Asn Gln Ile Asn Ala Thr Ser Phe

100 105 110

Arg Asp Pro Thr Thr Ala Trp Arg Leu Pro Asp Gly Val Trp Arg Leu

115 120 125

Leu Ile Gly Ser Lys Arg Gly Gln Arg Gly Leu Ser Leu Leu Phe Arg

130 135 140

Ser Arg Asp Phe Val His Trp Val Gln Ala Lys His Pro Leu Tyr Ser

145 150 155 160

Asp Lys Leu Ser Gly Met Trp Glu Cys Pro Asp Phe Phe Pro Val Tyr

165 170 175

Ala Asn Gly Asp Gln Met Gly Val Asp Thr Ser Ile Ile Gly Ser His

180 185 190

Val Lys His Val Leu Lys Asn Ser Leu Asp Ile Thr Lys His Asp Ile

195 200 205

Tyr Thr Ile Gly Asp Tyr Asn Ile Lys Lys Asp Ala Tyr Thr Pro Asp

210 215 220

Ile Gly Tyr Met Asn Asp Ser Ser Leu Arg Tyr Asp Tyr Gly Lys Tyr

225 230 235 240

Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Phe Asp Asp Ala Lys Lys Glu Arg Ile Leu

245 250 255

Leu Gly Trp Ala Asn Glu Ser Ser Ser Val Glu Asp Asp Ile Lys Lys

260 265 270

Gly Trp Ser Gly Ile His Thr Ile Pro Arg Lys Ile Trp Leu Asp Lys

275 280 285

Leu Gly Lys Gln Leu Ile Gln Trp Pro Ile Ala Asn Ile Glu Lys Leu

290 295 300

Arg Gln Lys Pro Val Asn Ile Tyr Arg Lys Val Leu Lys Gly Gly Ser

305 310 315 320

Gln Ile Glu Val Ser Gly Ile Thr Ala Ala Gln Ala Asp Val Glu Ile

325 330 335

Ser Phe Lys Ile Lys Asp Leu Lys Asn Val Glu Lys Phe Asp Ala Ser

340 345 350

Trp Thr Ser Pro Gln Leu Leu Cys Ser Lys Lys Gly Ala Ser Val Lys

355 360 365

Gly Gly Leu Gly Pro Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ala Ser Xaa Gly Leu

370 375 380

Glu Glu Tyr Thr Ala Val Phe Phe Arg Ile Phe Lys Ala Tyr Asp Asn

385 390 395 400
 Lys Phe Val Val Leu Met Cys Ser Asp Gln Ser Arg Ser Ser Leu Asn

 405 410 415
 Pro Thr Asn Asp Lys Thr Thr Tyr Gly Thr Phe Val Asp Val Asn Pro
 420 425 430
 Ile Arg Glu Gly Leu Ser Leu Arg Val Leu Ile Asp His Ser Val Val
 435 440 445
 Glu Ser Phe Gly Ala Lys Gly Lys Asn Val Ile Thr Ala Arg Val Tyr
 450 455 460
 Pro Thr Leu Ala Ile Asn Glu Lys Ala His Leu Tyr Val Phe Asn Arg

 465 470 475 480
 Gly Thr Ser Asn Val Glu Ile Thr Gly Leu Thr Ala Trp Ser Met Lys
 485 490 495
 Lys Ala Asn Ile Ala
 500
 <210> 27
 <211> 518
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium breve
 <400> 27
 Met Thr Asp Phe Thr Pro Glu Thr Pro Val Leu Thr Pro Ile Arg Asp
 1 5 10 15
 His Ala Ala Glu Leu Ala Lys Ala Glu Ala Gly Val Ala Glu Met Ala

 20 25 30
 Ala Lys Arg Asn Asn Arg Trp Tyr Pro Lys Tyr His Ile Ala Ser Asn
 35 40 45
 Gly Gly Trp Ile Asn Asp Pro Asn Gly Leu Cys Phe Tyr Lys Gly Arg
 50 55 60
 Trp His Val Phe Tyr Gln Leu His Pro Tyr Gly Thr Gln Trp Gly Pro
 65 70 75 80
 Met His Trp Gly His Val Ser Ser Thr Asp Met Leu Asn Trp Lys Arg

85	90	95	
Glu Pro Ile Met Phe Ala Pro Ser Leu Glu Gln Glu Lys Asp Gly Val			
100	105	110	
Phe Ser Gly Ser Ala Val Ile Asp Asp Asn Gly Asp Leu Arg Phe Tyr			
115	120	125	
Tyr Thr Gly His Arg Trp Ala Asn Gly His Asp Asn Thr Gly Gly Asp			
130	135	140	
Trp Gln Val Gln Met Thr Ala Leu Pro Asp Asn Asp Glu Leu Thr Ser			
145	150	155	160
Ala Thr Lys Gln Gly Met Ile Ile Asp Cys Pro Thr Asp Lys Val Asp			
165	170	175	
His His Tyr Arg Asp Pro Lys Val Trp Lys Thr Gly Asp Thr Trp Tyr			
180	185	190	
Met Thr Phe Gly Val Ser Ser Glu Asp Lys Arg Gly Gln Met Trp Leu			
195	200	205	
Phe Ser Ser Lys Asp Met Val Arg Trp Glu Tyr Glu Arg Val Leu Phe			
210	215	220	
Gln His Pro Asp Pro Asp Val Phe Met Leu Glu Cys Pro Asp Phe Phe			
225	230	235	240
Pro Ile Lys Asp Lys Asp Gly Asn Glu Lys Trp Val Ile Gly Phe Ser			
245	250	255	
Ala Met Gly Ser Lys Pro Ser Gly Phe Met Asn Arg Asn Val Asn Asn			
260	265	270	
Ala Gly Tyr Met Ile Gly Thr Trp Glu Pro Gly Gly Glu Phe Lys Pro			
275	280	285	
Glu Thr Glu Phe Arg Leu Trp Asp Cys Gly His Asn Tyr Tyr Ala Pro			
290	295	300	
Gln Ser Phe Asn Val Asp Gly Arg Gln Ile Val Tyr Gly Trp Met Ser			
305	310	315	320
Pro Phe Val Gln Pro Ile Pro Met Glu Asp Asp Gly Trp Cys Gly Gln			
325	330	335	

Leu Thr Leu Pro Arg Glu Ile Thr Leu Asp Asp Asp Gly Asp Val Val

340 345 350

Thr Ala Pro Val Ala Glu Met Glu Gly Leu Arg Glu Asp Thr Leu Asp

355 360 365

His Gly Ser Ile Thr Leu Asp Met Asp Gly Glu Gln Val Ile Ala Asp

370 375 380

Asp Ala Glu Ala Val Glu Ile Glu Met Thr Ile Asp Leu Ala Ala Ser

385 390 395 400

Thr Ala Asp Arg Ala Gly Leu Lys Ile His Ala Thr Glu Asp Gly Ala

405 410 415

Tyr Thr Tyr Val Ala Tyr Asp Asp Gln Ile Gly Arg Val Val Val Asp

420 425 430

Arg Gln Ala Met Ala Asn Gly Asp His Gly Tyr Arg Ala Ala Pro Leu

435 440 445

Thr Asp Ala Glu Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Leu Arg Val Phe Val

450 455 460

Asp Arg Gly Ser Val Glu Val Tyr Val Asn Gly Gly His Gln Val Leu

465 470 475 480

Ser Ser Tyr Ser Tyr Ala Ser Glu Gly Pro Arg Ala Ile Lys Leu Val

485 490 495

Ala Glu Phe Gly Asn Leu Lys Val Glu Ser Leu Lys Leu His His Met

500 505 510

Lys Ser Ile Gly Leu Glu

515

<210> 28

<211> 532

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 28

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys

1 5 10 15

Ile Ser Ala Ser Met Thr Asn Glu Thr Ser Asp Arg Pro Leu Val His
 20 25 30
 Phe Thr Pro Asn Lys Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu Trp Tyr
 35 40 45
 Asp Glu Lys Asp Ala Lys Trp His Leu Tyr Phe Gln Tyr Asn Pro Asn
 50 55 60
 Asp Thr Val Trp Gly Thr Pro Leu Phe Trp Gly His Ala Thr Ser Asp

 65 70 75 80
 Asp Leu Thr Asn Trp Glu Asp Gln Pro Ile Ala Ile Ala Pro Lys Arg
 85 90 95
 Asn Asp Ser Gly Ala Phe Ser Gly Ser Met Val Val Asp Tyr Asn Asn
 100 105 110
 Thr Ser Gly Phe Phe Asn Asp Thr Ile Asp Pro Arg Gln Arg Cys Val
 115 120 125
 Ala Ile Trp Thr Tyr Asn Thr Pro Glu Ser Glu Glu Gln Tyr Ile Ser

 130 135 140
 Tyr Ser Leu Asp Gly Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Gln Lys Asn Pro
 145 150 155 160
 Val Leu Ala Ala Asn Ser Thr Gln Phe Arg Asp Pro Lys Val Phe Trp
 165 170 175
 Tyr Glu Pro Ser Gln Lys Trp Ile Met Thr Ala Ala Lys Ser Gln Asp
 180 185 190
 Tyr Lys Ile Glu Ile Tyr Ser Ser Asp Asp Leu Lys Ser Trp Lys Leu

 195 200 205
 Glu Ser Ala Phe Ala Asn Glu Gly Phe Leu Gly Tyr Gln Tyr Glu Cys
 210 215 220
 Pro Gly Leu Ile Glu Val Pro Thr Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Tyr
 225 230 235 240
 Trp Val Met Phe Ile Ser Ile Asn Pro Gly Ala Pro Ala Gly Gly Ser
 245 250 255
 Phe Asn Gln Tyr Phe Val Gly Ser Phe Asn Gly Thr His Phe Glu Ala

260	265	270
Phe Asp Asn Gln Ser Arg Val Val Asp Phe Gly Lys Asp Tyr Tyr Ala		
275	280	285
Leu Gln Thr Phe Phe Asn Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Ser Ala Leu Gly		
290	295	300
Ile Ala Trp Ala Ser Asn Trp Glu Tyr Ser Ala Phe Val Pro Thr Asn		
305	310	315
Pro Trp Arg Ser Ser Met Ser Leu Val Arg Lys Phe Ser Leu Asn Thr		
325	330	335
Glu Tyr Gln Ala Asn Pro Glu Thr Glu Leu Ile Asn Leu Lys Ala Glu		
340	345	350
Pro Ile Leu Asn Ile Ser Asn Ala Gly Pro Trp Ser Arg Phe Ala Thr		
355	360	365
Asn Thr Thr Leu Thr Lys Ala Asn Ser Tyr Asn Val Asp Leu Ser Asn		
370	375	380
Ser Thr Gly Thr Leu Glu Phe Glu Leu Val Tyr Ala Val Asn Thr Thr		
385	390	395
Gln Thr Ile Ser Lys Ser Val Phe Ala Asp Leu Ser Leu Trp Phe Lys		
405	410	415
Gly Leu Glu Asp Pro Glu Glu Tyr Leu Arg Met Gly Phe Glu Val Ser		
420	425	430
Ala Ser Ser Phe Phe Leu Asp Arg Gly Asn Ser Lys Val Lys Phe Val		
435	440	445
Lys Glu Asn Pro Tyr Phe Thr Asn Arg Met Ser Val Asn Asn Gln Pro		
450	455	460
Phe Lys Ser Glu Asn Asp Leu Ser Tyr Tyr Lys Val Tyr Gly Leu Leu		
465	470	475
Asp Gln Asn Ile Leu Glu Leu Tyr Phe Asn Asp Gly Asp Val Val Ser		
485	490	495
Thr Asn Thr Tyr Phe Met Thr Thr Gly Asn Ala Leu Gly Ser Val Asn		
500	505	510

Met Thr Thr Gly Val Asp Asn Leu Phe Tyr Ile Asp Lys Phe Gln Val

515 520 525

Arg Glu Val Lys

530

<210> 29

<211> 512

<212> PRT

<213> *Zymomonas mobilis*

<400> 29

Met Glu Ser Pro Ser Tyr Lys Asn Leu Ile Lys Ala Glu Asp Ala Gln

1 5 10 15

Lys Lys Ala Gly Lys Arg Leu Leu Ser Ser Glu Trp Tyr Pro Gly Phe

20 25 30

His Val Thr Pro Leu Thr Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu Ile

35 40 45

Phe Phe Lys Gly Glu Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Tyr Pro Phe Ala

50 55 60

Pro Val Trp Gly Pro Met His Trp Gly His Ala Lys Ser Arg Asp Leu

65 70 75 80

Val His Trp Glu Thr Leu Pro Val Ala Leu Ala Pro Gly Asp Leu Phe

85 90 95

Asp Arg Asp Gly Cys Phe Ser Gly Cys Ala Val Asp Asn Asn Gly Val

100 105 110

Leu Thr Leu Ile Tyr Thr Gly His Ile Val Leu Ser Asn Asp Ser Pro

115 120 125

Asp Ala Ile Arg Glu Val Gln Cys Met Ala Thr Ser Ile Asp Gly Ile

130 135 140

His Phe Gln Lys Glu Gly Ile Val Leu Glu Lys Ala Pro Met Pro Gln

145 150 155 160

Val Ala His Phe Arg Asp Pro Arg Val Trp Lys Glu Asn Asp His Trp

165 170 175

Phe Met Val Val Gly Tyr Arg Thr Asp Asp Glu Lys His Gln Gly Ile
 180 185 190
 Gly His Val Ala Leu Tyr Arg Ser Glu Asn Leu Lys Asp Trp Ile Phe
 195 200 205
 Val Lys Thr Leu Leu Gly Asp Asn Ser Gln Leu Pro Leu Gly Lys Arg
 210 215 220
 Ala Phe Met Trp Glu Cys Pro Asp Phe Phe Ser Leu Gly Asn Arg Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Met Phe Ser Pro Gln Gly Leu Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Asn
 245 250 255
 Arg Asn Leu Phe Gln Asn Gly Tyr Ile Leu Gly Lys Trp Gln Ala Pro
 260 265 270
 Gln Phe Thr Pro Glu Thr Ser Phe Gln Glu Leu Asp Tyr Gly His Asp
 275 280 285
 Phe Tyr Ala Ala Gln Arg Phe Glu Ala Lys Asp Gly Arg Gln Ile Leu
 290 295 300
 Ile Ala Trp Phe Asp Met Trp Glu Asn Gln Lys Pro Ser Gln Arg Asp
 305 310 315 320
 Gly Trp Ala Gly Cys Met Thr Leu Pro Arg Lys Leu Asp Leu Ile Asp
 325 330 335
 Asn Lys Ile Val Met Thr Pro Val Arg Glu Met Glu Ile Leu Arg Gln
 340 345 350
 Ser Glu Lys Ile Glu Ser Val Val Thr Leu Ser Asp Ala Glu His Pro
 355 360 365
 Phe Thr Met Asp Ser Pro Leu Gln Glu Ile Glu Leu Ile Phe Asp Leu
 370 375 380
 Glu Lys Ser Ser Ala Tyr Gln Ala Gly Leu Ala Leu Arg Cys Asn Gly
 385 390 395 400
 Lys Gly Gln Glu Thr Leu Leu Tyr Ile Asp Arg Ser Gln Asn Arg Ile
 405 410 415
 Ile Leu Asp Arg Asn Arg Ser Gly Gln Asn Val Lys Gly Ile Arg Ser

420 425 430
Cys Pro Leu Pro Asn Thr Ser Lys Val Arg Leu His Ile Phe Leu Asp
435 440 445
Arg Ser Ser Ile Glu Ile Phe Val Gly Asp Asp Gln Thr Gln Gly Leu
450 455 460
Tyr Ser Ile Ser Ser Arg Ile Phe Pro Asp Lys Asp Ser Leu Lys Gly
465 470 475 480
Arg Leu Phe Ala Ile Glu Gly Tyr Ala Val Phe Asp Ser Phe Lys Arg

485 490 495
Trp Thr Leu Gln Asp Ala Asn Leu Ala Ala Phe Ser Ser Asp Ala Cys
500 505 510

<210> 30

<211> 1092

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 30

gctcttcggg ttigtctacc cgcgaggtcg acgcccagca tggctatcaa gacgaacagg 60
cagcctgtgg agaagcctcc gttcacgatac gggacgtgc gcaaggccat ccccgcgac 120
tgtttcgagc gctcggcgct tcgtagcagc atgtacctgg cctttgacat cgcgggtcatg 180

tcctgctct acgtcgcgtc gacgtacatc gaccctgcgc cggctcctac gtgggtcaag 240
tatggcgtea tgtggccgct ctactggttc ttccaggtgt gtgtgagggt tgtggttgcc 300
cgtatcgagg tcctggtggc gcgcattgggg gagaaggcgc ctgtcccgt gaccccccg 360
gtacacctc cggcaccttc cagggcgcct tcggcacggg tgtctgggtg tgcgcgcacg 420
agtgcggcca ccaggccttt tcctccagcc aggccatcaa cgacggcgtg ggcttggtgt 480
tccacagcct gctgctggtg ccctactact cctggaagca ctgcaccgc cgccaccact 540
ccaacacggg gtgcctggac aaggacgagg tgtttgtgcc gccgcaccgc gcagtggcgc 600

acgagggcct ggagtgggag gagtggctgc ccatccgat gggcaagggtg ctggtcaccc 660
tgacctggg ctggccgctg tacctcatgt tcaacgtgc ctgcggccg tacccgcgt 720
tcgcaacca ctttgaccgc tggtcgcca tcttcagcaa gcgcgaggta cctttcttg 780
cgctatgaca ctccagcaa aaggtagggc gggctgcgag acggcttccc ggcgtgcat 840
gcaacaccga tgatgcttcg accccccgaa gtccttcgg ggctgcatgg gcgtccgat 900

gccgtccag ggcgagcgct gtttaaatag ccaggccccc gattgcaaag acattatagc 960
gagctaccaa agccatatcc aaacacctag atcactacca cttctacaca ggccactcga 1020

gcttgtgac gcactccgct aagggggcgc ctcttctct tegtctcagt cacaaccgc 1080
aaacggcgcg cc 1092

<210> 31
<211> 1400
<212> DNA
<213> Prototheca moriformis
<400> 31

caattggcag cagcagctcg gatagtatcg acacactctg gacgctggtc gtgtgatgga 60
ctgttgccgc cacacttgct gccctgacct gtgaatatcc ctgccgttt tatcaaacag 120
cctcagtgtg ttgatcttg tgtgtacgcg cttttgcgag ttgctagctg cttgtgctat 180
ttgcgaatac cacccccagc atccccttc ctcgtttcat atcgcttgca tcccaaccgc 240

aacttatcta cgtgtcctg ctatccctca gcgtgctcc tgcctctgt cactgcccct 300
cgcacagcct tggtttgggc tccgctgta ttctcctggt actgcaacct gtaaaccagc 360
actgcaatgc tgatgcacgg gaagtagtgg gatgggaaca caaatggagc atcgaggtgg 420
tcattccga cctcgcttg gtggcggtgc tcagcgggct cagcgtgctg ggccgcacca 480
tgggctgggc ctggctggtc aagacctacg tggtgcccta catgatcgtg aacatgtggc 540
tgggtgctcat cacgtgctc cagcacagc acccgccct gccgcactac ttcgagaagg 600
actgggactg gctacgcggc gccatggcca ccgtcgaccg ctccatgggc cgccttca 660

tggacagcat cctgcaccac atctccgaca cccacgtgct gcaccacctc ttcagcacca 720
tcccgcacta ccacgccgag gaggcctccg ccgcatccg gccatcctg ggcaagtact 780
accaatccga cagccgctgg gtcggccgcg cctgtggga ggactggcg gactgccgt 840
acgtcgtccc cgacgcgcc gaggcgact ccgcgtctg gttccacaag tgagcgcgc 900
tgcgcgagga cgcagaacaa cgctgccgc gtgtcttttg cacgcgcgac tccggcgctt 960
cgctgggtggc accccataa agaaaccctc aattctgttt gtggaagaca cgggtgtacc 1020
ccaccaccc acctgcacct ctattattgg tattattgac gcgggagtgg gcgttgtacc 1080

ctacaacgta gcttctctag ttttcagctg gctcccacca ttgtaaagag cctctagagt 1140
cgacctgcag gcatgcaagc ttggcgtaat catggtcata gctgttctt gtgtgaaatt 1200
gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg 1260
gtgcctaag agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt 1320

cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt 1380
 tgcgtattgg gcgctcttcc 1400
 <210> 32
 <211> 4091
 <212> DNA
 <213> *Prototheca moriformis*

<400> 32

gctcttcggg tttgctcacc cgcgaggtcg acgcccagca tggctatcaa gacgaacagg 60
 cagcctgtgg agaagcctcc gttcacgac gggacgctgc gcaaggccat ccccgcgcac 120
 tgtttcgagc gctcggcgct tcgtagcagc atgtacctgg cctttgacat cgcggtcacg 180
 tcctgctct acgtcgcgc gacgtacatc gacctgcgc cggcgcctac gtgggtcaag 240
 tatggcgta tgggcccgt ctactggttc ttccaggtgt gtgtgagggt tgtggttgc 300
 cgtatcgagg tcctggtggc gcgcacgggg gagaaggcgc ctgtcccgt gaccccccg 360
 gctacctec cggcaccttc cagggcgct tcggcacggg tgtctgggtg tgcgcgcacg 420

agtgcggcca ccaggccttt tctccagcc aggccatcaa cgacggcgtg ggcctggtgt 480
 tccacagcct gctgctggtg cctactact cctggaagca ctgcaccgc cgcaccact 540
 ccaacacggg gtgcctggac aaggacgagg tgtttgtgc gccgcaccgc gcagtggcgc 600
 acgagggcct ggagtggag gagtggctgc ccatccgat gggcaagggt ctggtcaccc 660
 tgacctggg ctggccgtg tacctcatgt tcaacgtgc ctgcggccg taccgcgt 720
 tcgccaacca ctttgacccg tggtcgcca tcttcagca gcgcgaggta ccctttctt 780
 cgctatgaca ctccagcaa aaggtagggc gggctgcgag acggcttccc ggcgtgcat 840

gcaacaccga tgatgcttcg accccccgaa gctccttcgg ggctgcatgg gcgtccgat 900
 gccgctccag ggcgagcgt gtttaaatag ccaggcccc gattgcaaag acattatagc 960
 gagctaccaa agccatatc aaacacctag atcactacca cttctacaca ggccactcga 1020
 gcttgtgac gactccgt aagggggcgc ctcttctct tcgtttcagt cacaaccgc 1080
 aaacggcgcg ccatgtgct gcaggccttc ctgttctgc tggccggctt cgccccaag 1140
 atcagcgct ccatgacgaa cgagacgtcc gaccgcccc tgggtgactt caccaccaac 1200
 aagggtgga tgaacgacc caacggcctg tggtagcagc agaaggacgc caagtggcac 1260

ctgtacttcc agtacaaccc gaacgacacc gtctggggga cgcccttgtt ctggggccac 1320
 gccacgtccg acgacctgac caactgggag gaccagccca tcgccatgc cccgaagcgc 1380
 aacgactccg gcgccttctc cggctccatg gtggtggact acaacaacac ctccggcttc 1440

ttcaacgaca ccatcgaccc gcgccagcgc tgcgtggcca tctggacctt caacaccccg	1500
gagtcaggagg agcagtagat ctctacagc ctggacggcg gctacacctt caccgagtag	1560
cagaagaacc ccgtgctggc cgccaactcc acccagttcc gcgacccgaa ggtcttctgg	1620
tacgagccct cccagaagtg gatcatgacc gcggccaagt cccaggacta caagatcgag	1680
atctactcct ccgacgacct gaagtcctgg aagctggagt ccgcttctgc caacgagggc	1740
ttctctggct accagtaga gtgccccggc ctgatcgagg tccccaccga gcaggacccc	1800
agcaagtctt actgggtgat gttcatctcc atcaaccccg gcgccccggc cggcggctcc	1860
ttcaaccagt acttctcgg cagcttcaac ggcacccact tcgaggcctt cgacaaccag	1920
tcccgcgtgg tggacttcgg caaggactac tacgccctgc agaccttctt caacaccgac	1980
ccgacctacg ggagcgccct gggcatcgcg tggcctcca actgggagta ctccgccttc	2040
gtgccacca acccctggcg ctctccatg tcctctgtgc gcaagtcttc cctcaacacc	2100
gagtagcagg ccaacccgga gacggagctg atcaacctga aggccgagcc gatcctgaac	2160
atcagcaacg ccggcccctg gagccggttc gccaccaaca ccacgttgac gaaggccaac	2220
agctacaacg tcgacctgtc caacagcacc ggcacctgg agttcgagct ggtgtacgcc	2280
gtcaacacca ccagacgat ctccaagtcc gtgttcgcgg acctctccct ctggttcaag	2340
ggcctggagg accccgagga gtacctccgc atgggcttcg aggtgtccgc gtcctccttc	2400
ttcttgacc gcgggaacag caagtgaaag ttctgaagg agaacccta cttaccaaac	2460
cgcatgagcg tgaacaacca gcccttcaag agcgagaacg acctgtccta ctacaaggtg	2520
tacggttgc tggaccagaa catctggag ctgtacttca acgacggcga cgtcgtgtcc	2580
accaacacct acttcatgac caccgggaac gcctgggct ccgtgaacat gacgacgggg	2640
gtggacaacc tgttctatc cgacaagttc caggtgcgcg aggtcaagt acaattggca	2700
gcagcagctc ggatagtatc gacacactct ggacgctggt cgtgtgatgg actgttgccg	2760
ccacacttgc tgcttgacc tgtgaatatc cctgccgctt ttatcaaaca gcctcagtgt	2820
gtttgatctt gtgtgtacgc gcttttgca gttgctagct gcttgtgcta ttgcaata	2880
ccacccccag catcccttc cctcgtttca tatcgttgc atccaaccg caacttatct	2940
acgtgtcct gctatccctc agcgtgtctc ctgctcctgc tcactgcccc tcgcacagcc	3000
ttggtttggg ctccgctgt attctcctgg tactgcaacc tgtaaaccag cactgcaatg	3060
ctgatgcacg ggaagtagtg ggatgggaac acaaatggag catcagggtg gtcactccg	3120
acctcgcgtt ggtggcggcg ctacgcccgc tcagcgtgct gggccgcacc atgggctggg	3180
cctggctggt caagacctac gtggtgccct acatgatcgt gaacatgtgg ctggtgctca	3240
tcacgtgct ccagcacacg caccggcccc tgccgcacta cttcgagaag gactgggact	3300

ggctacgagg cgccatggcc accgtcgacc gctccatggg cccgcccttc atggacagca 3360

tcctgcacca catctccgac acccacgtgc tgcaccacct cttcagcacc atcccgcact 3420

accacgccga ggaggcctcc gccgccatcc ggcccatcct gggcaagtac taccaatccg 3480

acagccgctg ggtcggccgc gccctgtggg aggactggcg cgactgccgc tacgtcgtcc 3540

ccgacgcgcc cgaggacgac tccgcgctct ggttcacaaa gtgagcgcgc ctgcgcgagg 3600

acgcagaaca acgtcgccgc cgtgtctttt gcacgcgcga ctccggcgct tcgctggtgg 3660

cacccccata aagaaccct caattctgtt tgtggaagac acggtgtacc cccaccacc 3720

cacctgcacc tctattattg gtattattga cgcgggagtg ggcgttgtac cctacaacgt 3780

agcttctcta gttttcagct ggctcccacc attgtaaaga gcctctagag tcgacctgca 3840

ggcatgcaag cttagcgtaa tcatggatcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc 3900

tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata 3960

gagtgcgcta atcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc 4020

tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcgcc aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg 4080

ggcgtcttcc c 4091

<210> 33

<211> 510

<212> DNA

<213> Prototheca moriformis

<400> 33

gctcttccgc ctggagctgg tgcagagcat gggtcagttt gcggaggaga ggggtgctccc 60

cgtgtgcac cccgtggaca agctgtggca gccgcaggac ttcttgccg accccgagtc 120

gcccgaacttc gaggaccagg tggcggagct gcgcgcgcgc gccaaaggacc tgcccgaaga 180

gtactttgtg gtgctggtgg gcgacatgat cacggaggag gcgctgccga cctacatggc 240

catgtcaac accttggacg gtgtgcgcga cgacacgggc gcggtgacc acccgtgggc 300

gcgctggacg cggcagtggtg tggccgagga gaaccggcac ggcgacctgc tgaacaagta 360

ctgttggctg acggggcgcg tcaacatgcg ggccgtggag gtgacctca acaacctgat 420

caagagcggc atgaaccgc agacggacaa caacccttac ttgggcttcg tctacacctc 480

cttcaggag cgcgccacca agtaggtacc 510

<210> 34

<211> 1186

<212> DNA

<213> Prototheca moriformis

<400> 34

caattggcag cagcagctcg gatagtatcg acacactctg gacgctggtc gtgtgatgga	60
ctgttgccgc cacacttgct gccttgacct gtgaatatcc ctgccgcttt tatcaaacag	120
cctcagtgtg ttgatcttg tgtgtacgcg cttttgcgag ttgctagctg cttgtgctat	180
ttgcgaatac cccccccagc atccccctcc ctgcttccat atcgcttgca tcccaaccgc	240
aacttatcta cgctgtcctg ctatccctca gcgctgctcc tgctcctgct cactgcccct	300
cgcacagcct tggtttgggc tccgctgta ttctctgggt actgcaacct gtaaaccagc	360
actgcaatgc tgatgcacgg gaagtagtgg gatgggaaca caaatggaag gatcgtagag	420
ctccagccac ggcaacaccg cgcgcctggc ggccgagcac ggcgacaagg gcctgagcaa	480
gatctgcggg ctgatcgcca gcgacgagg ccggcacgag atcgcttaca cgcgcatcgt	540
ggacgagttc ttccgctcg accccgaggg cgccgtcgcc gcctacgcca acatgatgcg	600
caagcagatc accatgcccc cgcacctcat ggacgacatg ggccacggcg aggccaaccc	660
gggccgcaac ctcttcgccg acttctccgc cgtcgccgag aagatcgacg tctacgacgc	720
cgaggactac tgccgcatcc tggagcacct caacgcgcgc tggaaggtgg acgagcgcca	780
ggtcagcggc caggccgccg cggaccagga gtacgttctg ggcttgcccc agcgcttcgc	840
gaaactgccg gagaagaccg ccgccaagcg caagcgcgtc gcgcgcaggc ccgtcgctt	900
ctcctggaga gaagagcctc tagagtcgac ctgcagcat gcaagcttgg cgtaatcatg	960
gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgtcaca attccacaca acatacgagc	1020
cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc	1080
gttgcgtca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat	1140
cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttcc	1186

<210> 35

<211> 3615

<212> DNA

<213> Prototheca moriformis

<400> 35

gtctttccgc ctggagctgg tgcagagcat gggtcagttt gcggaggaga ggggtgtccc	60
cgtgctgcac cccgtggaca agctgtggca gccgcaggac ttcttgccc accccgagtc	120
gccccacttc gaggaccagg tggcggagct gcgcgcgcgc gccaaggacc tgcccagca	180
gtactttgtg gtgctgggtg gcgacatgat cacggaggag gcgctgccga cctacatggc	240

catgctcaac accttggacg gtgtgctgca cgacacgggc gcggctgacc acccgtgggc 300

gcgctggacg cggcagtggt tggccgagga gaaccggcac ggcgacctgc tgaacaagta 360

ctgttggctg acggggcgcg tcaacatgcg ggccgtggag gtgaccatca acaacctgat 420

caagagcggc atgaaccgcg agacggacaa caacccttac ttgggcttcg tctacacctc 480

cttcaggag cgcgccacca agtaggtacc ctttcttgcg ctatgacact tccagcaaaa 540

ggtagggcgg gctgcgagac ggcttcccgg cgtgcatgc aacaccgatg atgcttcgac 600

ccccgaagc tccttcgggg ctgcatgggc gctccgatgc cgctccaggg cgagcgctgt 660

ttaaatagcc aggccccga ttgcaaagac attatagcga gctaccaaag ccatattcaa 720

acacntagat cactaccact tctacacagg ccactcgagc ttgtgatcgc actccgctaa 780

ggggcgccct ctctctctc gtttcagtca caaccgcaa acggcgcgcc atgctgctgc 840

aggcttctct gttcctgctg gccggttcg ccgccaagat cagcgctcc atgacgaacg 900

agacgtccga ccgccccctg gtgcacttca ccccaacaa gggctggatg aacgacccca 960

acggcctgtg gtacgacgag aaggacgcca agtggcacct gtacttcag tacaaccga 1020

acgacacgt ctgggggacg cccttgcttct ggggccacgc cacgtccgac gacctgacca 1080

actgggagga ccagcccatc gccatcgccc cgaagcgcaa cgactccggc gccttctccg 1140

gctccatggt ggtggactac aacaacacct ccggttctt caacgacacc atcgaccgc 1200

gccagcgctg cgtggccatc tggacctaca acacccgga gtccgaggag cagtacatct 1260

cctacagcct ggacggcggc tacacattca ccgagtacca gaagaacccc gtgctggccg 1320

ccaactccac ccagtccgc gaccgaagg tcttctggta cgagccctcc cagaagtgga 1380

tcatgaccgc ggccaagtc caggactaca agatcgagat ctactctcc gacgacctga 1440

agtcctgaa gctggagtc gcgttcgcca acgaggcctt cctcggtac cagtacgagt 1500

gccccggcct gatcgaggtc cccaccgagc aggacccag caagtctac tgggtgatgt 1560

tcatctccat caaccccggc gccccggcgg gcggctcctt caaccagtac ttcgtcgga 1620

gcttcaacgg caccacttc gaggccttcg acaaccagtc ccgctggtg gacttcgga 1680

aggactacta cgccctgcag accttcttca acaccgacce gacctacggg agcgcctgg 1740

gcatcgctg ggctccaac tgggagtact ccgcttcgt gccaccaac ccctggcgct 1800

cctccatgtc cctcgtgcg aagttctccc tcaacaccga gtaccaggcc aaccggaga 1860

cggagctgat caacctgaag gccgagccga tctgaacat cagcaacgcc ggccctgga 1920

gccggttcgc caccaacacc acgttgacga aggccaacag ctacaacgtc gacctgtcca 1980

acagcaccgg caccctggag ttcgagctgg tgtacgccgt caacaccacc cagacgatct 2040

ccaagtccgt gttcgcgac ctctccctct ggttcaaggg cctggaggac cccgaggagt 2100

acctccgcat gggcttcgag gtgtccgct cctccttctt cctggaccgc gggaacagca 2160

aggtgaagtt cgtgaaggag aacctctact tcaccaaccg catgagcgtg aacaaccagc 2220

ccttcaagag cgagaacgac ctgtcctact acaaggtgta cggcttgctg gaccagaaca 2280

tcctggagct gtacttcaac gacggcgacg tcgtgtccac caacacctac ttcatgacca 2340

ccgggaacgc cctgggctcc gtgaacatga cgacgggggt ggacaacctg ttctacatcg 2400

acaagtcca ggtgcgcgag gtcaagtac aattggcagc agcagctcgg atagtatcga 2460

cacactctgg acgctggctg tgtgatggac tgttgccgcc acacttgctg ccttgacctg 2520

tgaatatccc tgccgctttt atcaaacagc ctgagtgtgt ttgatcttgt gtgtacgcgc 2580

ttttgcgagt tgctagctgc ttgtgctatt tgcgaatacc acccccagca tccccctccc 2640

tcgtttcata tcgcttgcat cccaaccgca acttatctac gctgtcctgc tatccctcag 2700

cgtgtctcct gctcctgctc actgcccctc gcacagcctt ggtttgggct ccgctgtat 2760

tctcctggta ctgcaacctg taaaccagca ctgcaatgct gatgcacggg aagtagtggg 2820

atgggaacac aaatggaagg atcgtagagc tccagccacg gcaacaccgc gcgcctggcg 2880

gccgagcacg gcgacaaggg cctgagcaag atctgcgggc tgatcgccag cgacgagggc 2940

cggcacgaga tcgcctacac gcgcatcgtg gacgagtctt tccgcctcga ccccgagggc 3000

gccgtcgccg cctacgcaa catgatgcgc aagcagatca ccatgcccgc gcacctcatg 3060

gacgacatgg gccacggcga ggccaaccg ggccgcaacc tcttcgccga cttctccgcc 3120

gtcgccgaga agatcgacgt ctacgacgc gaggactact gccgcatcct ggagcacctc 3180

aacgcgcgct ggaagggtga cgagcgccag gtcagcggcc aggcgcgcgc ggaccaggag 3240

tacgttctgg gcctgcccc ggccttccgg aaactcgccg agaagaccgc cgccaagcgc 3300

aagcgcgtcg cgcgcaggcc cgctgccttc tcctggagag aagagcctct agagtcgacc 3360

tgcaggcatg caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat 3420

ccgtcaciaa ttccacacia catacagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc 3480

taatgagtga gtaactcac attaatgcg ttgcgtcac tgcccgttt ccagtcggga 3540

aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt 3600

attgggcgct cttcc 3615

<210> 36

<211> 511

<212> DNA

<213> Prototheca moriformis

<400> 36

gctcttcccg cctggagctg gtgcagagca tggggcagtt tgcggaggag aggggtgctcc 60

ccgtgtgtga ccccgaggac aagctgtggc agccgcagga cttcctgccc gaccccgagt 120

cgcccgactt cgaggaccag gtggcggagc tgcgcgcgcg cgccaaggac ctgcccgcg 180

agtactttgt ggigtctgtg ggcgacatga tcacggagga ggcgctgccg acctacatgg 240

ccatgtctaa caccttggac ggtgtgcgcg acgacacggg cgcggctgac caccctggg 300

cgcgctggac gggcagtggt gtggccgagg agaaccggca cggcgacctg ctgaacaagt 360

actgttggct gacggggcgc gtcaaatgc gggccgtgga ggtgaccatc aacaacctga 420

tcaagagcgg catgaaccg cagacggaca acaaccctta cttgggcttc gtctacacct 480

ccttccagga gcgcgccacc aagtaggtac c 511

<210> 37

<211> 761

<212> DNA

<213> Prototheca moriformis

<400> 37

cagccacggc aacaccgcgc gccttgcggc cgagcacggc gacaagaacc tgagcaagat 60

ctgcgggctg atgccagcg acgagggcgc gcacgagatc gcctacacgc gcatcgtgga 120

cgagttcttc cgctcgacc ccgagggcgc cgtgcgcgc tacgccaaca tgatgcgcaa 180

gcagatcacc atgcccgcgc acctcatgga cgacatgggc cacggcgagg ccaaccggg 240

ccgcaacctc ttgcgcgact tctccgcggt cgcgcgagaag atcgacgtct acgacgccga 300

ggactactgc cgcatcctgg agcacctcaa cgcgcgctgg aaggtggacg agcgccaggt 360

cagcggccag gccgcgcgcg accaggagta cgtcctgggc ctgccccagc gcttccggaa 420

actcgccgag aagaccgcgc ccaagcgcaa gcgcgtcgcg cgcaggcccg tcgccttctc 480

ctggagaaga gcctctagag tcgacctgca ggcatgcaag cttggcgtaa tcatggtcat 540

agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa 600

gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gattgagcta actcacatta attgcgttgc 660

gtcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc 720

aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc c 761

<210> 38

<211> 3599

<212> DNA

<213> Prototheca moriformis

<400> 38

gctcttcccg cctggagctg gtgcagagca tggggcagtt tgcggaggag aggggtgctcc	60
ccgtgctgca ccccgaggac aagctgtggc agccgcagga cttcctgccc gaccccgagt	120
cgccccgactt cgaggaccag gtggcggagc tgcgcgcgcg cgccaaggac ctgccccgacg	180
agtactttgt ggtgctgggtg ggcgacatga tcacggagga ggcgctgccg acctacatgg	240
ccatgctcaa caccttggac ggtgtgcgcg acgacacggg cgcggctgac caccctggg	300
cgcgctggac gggcagtggt gtggccgagg agaaccggca cggcgacctg ctgaacaagt	360
actgttggct gacggggcgc gtcaacatgc gggccgtgga ggtgaccatc aacaacctga	420
tcaagagcgg catgaaccg cagacggaca acaaccctta cttgggcttc gtctacacct	480
ccttccagga gcgcgccacc aagtaggtac ctttcttgc gctatgacac ttccagcaaa	540
aggtagggcg ggtcgcgaga cggcttcccg gcgctgcatg caacaccgat gatgcttcga	600
ccccccaag ctcttcggg gctgcatggg cgtccgatg ccgtccagg gcgagcgtg	660
tttaaatagc caggcccccg attgcaaaga cattatagcg agctacaaa gccatattca	720
aacacctaga tcactaccac ttctacacag gccactcgag cttgtgatcg cactccgcta	780
agggggcgcc tcttctctt cgtttcagtc acaaccgca aacggcgcgc catgctgctg	840
caggccttcc tgttctgct ggccggcttc gccccaaga tcagcgctc catgacgaac	900
gagacgtccg accgccccct ggtgcacttc accccaaca agggctggat gaacgacccc	960
aacggcctgt ggtacgacga gaaggacgcc aagtggcacc tgtacttcca gtacaacccg	1020
aacgacaccg tctgggggac gcccttgctt tggggccacg ccacgtccga cgacctgacc	1080
aactgggagg accagcccat cgccatgcc ccgaagcgca acgactccgg cgccttctcc	1140
ggctccatgg tggtaggacta caacaacacc tccggcttct tcaacgacac catcgacccg	1200
cgccagcgtc gcgtggccat ctggacctac aacaccccg agtccgagga gcagtacatc	1260
tcctacagcc tggacggcgg ctacaccttc accgagtacc agaagaacct cgtgctggcc	1320
gccaaactca ccagttccg cgaccgaag gtcttctggt acgagccctc ccagaagtgg	1380
atcatgaccg cggccaagtc ccaggactac aagatcgaga tctactctc cgacgacctg	1440
aagtcttgga agctggagtc cgcgttcgcc aacgagggtc tcctcggcta ccagtacgag	1500
tgccccggcc tgatcgaggt cccaccgag caggaccca gcaagtcta ctgggtgatg	1560
ttcatctcca tcaaccccg gcgccggcc ggcggtcct tcaaccagta ctctgtcggc	1620
agcttcaacg gcacccactt cgaggccttc gacaaccagt cccgctggt ggacttcggc	1680
aaggactact acgccctgca gacctcttc aacaccgacc cgacctacgg gagcgccctg	1740

ggcatcgctg gggcctccaa ctgggagtag tccgccttcg tgcccaccaa cccctggcgc 1800

tcctccatgt cctcgtgag caagtctctc ctcaacaccg agtaccaggc caaccggag 1860

acggagctga tcaacctgaa ggccgagccg atcctgaaca tcagcaacgc cggcccctgg 1920

agccggttcg ccaccaacac caggttgacg aaggccaaca gctacaacgt cgacctgtcc 1980

aacagcaccg gcacctgga gttagagctg gtgtacgccc tcaacaccac ccagacgac 2040

tccaagtccg tgttcgagg cctctccctc tggttcaagg gcctggaggc ccccaggag 2100

tacctccga tgggcttcga ggtgtccgcg tctccttct tcctggaccg cgggaacagc 2160

aaggtgaagt tcgtgaagga gaaccctac ttcaccaacc gcatgagcgt gaacaaccag 2220

cccttcaaga gcgagaacga cctgtcctac tacaaggtgt acggcttgct ggaccagaac 2280

atcctggagc tgtacttcaa cgacggcgac gtctgttcca ccaacaccta cttcatgacc 2340

accgggaacg cctgggctc cgtgaacatg acgacggggg tggacaacct gttctacatc 2400

gacaagttcc aggtgcgga ggtcaagtga caattggcag cagcagctcg gatagatcg 2460

acacactctg gacgtggtc gtgtgatgga ctgttgccg cacacttgct gccttgacct 2520

gtgaatatcc ctgcccttt tatcaaacag cctcagtggtg tttgatcttg tgtgtacgag 2580

cttttgcgag ttgctagctg cttgtgctat ttgcgaatac cacccccagc atccccttc 2640

ctcgtttcat atcgcttgca tcccaaccgc aacttatcta cgctgtcctg ctatccctca 2700

gcgtgtctcc tgctcctgct cactgcccct cgacagcct tggtttgggc tccgcctgta 2760

ttctcctggt actgcaacct gtaaacagc actgcaatgc tgatgcacgg gaagtagtgg 2820

gatgggaaca caaatggaca gccacggcaa caccgcgcgc cttgcggcgg agcacggcga 2880

caagaacctg agcaagatct gcgggctgat cgccagcgac gagggccggc acgagatcg 2940

ctacacgcgc atcgtggagc agttcttccg cctcgacccc gagggcgccg tcgccgcta 3000

cgccaacatg atgcgaagc agatcacat gcccgcgac ctcagtgagc acatgggcca 3060

cggcgaggcc aaccggggc gcaacctctt cgccgacttc tccggttcg ccgagaagat 3120

cgacgtctac gacgccgagg actactgccg catcctggag cacctcaacg cgcgtggaa 3180

ggtggacgag cgccaggta gcggccaggc cgccgaggac caggagtacg tcctgggcct 3240

gccccagcgc ttccggaac tcgccgagaa gaccgccgc aagcgcaagc gcgtcgcgcg 3300

caggcccgtc gccttctct ggagaagagc ctctagagtc gacctgcagg catgcaagct 3360

tggcgtaac atggtcatag ctgtttctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac 3420

acaacatacg agccggaagc ataaagtga aagcctgggg tgcctaata gtgagctaac 3480

tcacattaat tgcgttgccg tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc 3540

tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttcc 3599

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> primer

<400> 39

gtccctgccc ttgtacaca c 21

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> primer

<400> 40

ttgatatgct taagttcagc ggg 23

<210> 41

<211> 710

<212> DNA

<213> Rhodotorula glutini

<400> 41

cgcctgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccgattggc tattgggagc 60

tcgcgagagc acctgactgc cgagaagtig tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaaaca gggttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat attagggtgt 180

ccaacttaac ttggagcccg accctcaatt tctaaccctg tgcatttgtc ttgggtagta 240

gcttgcgtca gcgagcgaat cccatttcac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaaaaa 300

atttataaca aaacaaaact ttcaacaacg gatctcttgg ctctcgcac gatgaagaac 360

gcagcgaaat gcgatacgta atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa 420

cgcaccttgc gctccatggt attccgtgga gcatgcctgt ttgagtgtca tgaattcttc 480

aaccacctc tttcttagtg aatcaggcgg tgtttggatt ctgagcgtg ctggcttcgc 540

ggcctagctc gctcgtaatg cattagcatc cgcaatcgaa cttcggattg actcggcgta 600

atagactatt cggttaggat tctggtctct gactggagcc gggtaaggtt aaaggagct 660

actaatctc atgtctatct tgagattaga cctcaaatca ggtaggacta 710

<210> 42

<211> 707

<212> DNA

<213> *Rhodotorula glutini*

<400> 42

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccgattggc tattgggagc 60

tgcgagagc acccgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat attagggcgt 180

ccaacttaac ttggagcccg aactctcact ttctaaccct gtgcatctgt ttctggtcag 240

tagctctctc gggagtgaac gccattcact taaaacacaa agtctatgaa tgtataaaat 300

ttataacaaa acaaaacttt caacaacgga tctcttggct ctgcatcga tgaagaacgc 360

agcgaatgc gataagtaat gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgaa tctttgaacg 420

caccttgcgc tctctgggat tccggagagc atgcctgttt gagtgcattg aaatcttcaa 480

ccctctcttt tcttaatgaa tcgagagggtg cttggatcct gagcgtgct ggcttcggcc 540

tagctcggtc gtaatgcatt agcatccgca atcgaaacttc ggattgactt ggcgtaatag 600

actattcgct gaggattctg gtctcgtacc agagccgggt tgggttaaag gaagcttcta 660

atcctaaaag tctaactttt gattagatct caaatcagggt aggacta 707

<210> 43

<211> 630

<212> DNA

<213> *Lipomyces tetrasporu*

<400> 43

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct tcggactggc tccagaaaat 60

gggaaacat tatcaggagc tggaaagtgt gtcaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attactgagt atttgtcttt 180

taaagacatc tctctatcca taaactcttt ttctaaaaa gacatgattt acacaattag 240

tctgaatgat tatataaaaa tcttcaaaac ttcaacaac ggatctcttg gttctcgcat 300

cgatgaagaa cgcagcaaaa tgcgataagt attgtgaatt gcaggatttt gtgaatcatc 360

gaatttttga acgcacattg cacttctggt tattccggag ggtataacctg tttagcgtc 420

atttatatac tcaaaacttt gttttggtga tgggcacata tctggtgaga gctagatttg 480

cctgaaatat agtggtagag attgtacga gttatgcaag ttagccaatg ctattaagtt 540

aattcgttgg tgaagcatgc ggagcttttag cggtcgcctt ccttaactat tggaaatttt 600
ctaattttga cctcaaatca ggcaggagta 630
<210> 44
<211> 641
<212> DNA
<213> *Lipomyces starkeyi*
<400> 44
cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgagaccc tcggattggc gttaggaagc 60
cggcaacggc atccttttggc cgagaagttg gtcaaacttg gtcattttaga ggaagtaaaa 120
gtcgtaaaca ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtatt gcctttatag 180
gcttataact atatccactt acacctgtga actgttctat tacttgacgc aagtcgagta 240

tttttcaaaa caatgtgtaa tgaacgtcgt ttattataa caaaataaaa ctttcaacaa 300
cggatctctt ggctctcgca tcgatgaaga acgcagcgaa ttgcgataag taatgtgaat 360
tgcagaattc agtgaatcat cgaatctttg aacgcagctt gcgctctctg gtattccgga 420
gagcatgcct gtttcagtgt catgaaatct caaccactag gggttcctaa tggattggat 480
ttgggcgtct gcgatctctg atcgtctgcc ttaaaagagt tagcaagttt gacattaatg 540
tctgggtgtaa taagtttcaac tgggtccatt gtgttgaagc gtgcttctaa tcgtccgcaa 600
ggacaattac ttigactctg gcctgaaatc aggtaggact a 641

<210> 45
<211> 456
<212> DNA
<213> *Yarrowia lipolytica*
<400> 45
cgcccgctgc tactaccgat tgaatggttt agtgagacct tgggagggcg agatgagggg 60
ggcaaccctt tttgaacatc caaacttggc caaacttgat tatttagagg aagtaaaagt 120
cgtaacaagg tticcgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgatttt atctatttct 180
gtggatttct ggtatattac agcgtcattt tatctcaatt ataactatca acaacggatc 240
tcttggctct cacatcgatg aagaacgcag cgaaccgca tattttttgt gacttgcaga 300
tgtgaatcat caatctttga acgcacattg cgcggtatgg cattccgtac cgcacggatg 360

gaggagcgtg ttcctcttgg gatcgatttg ctttcttgaa atggattttt taaactctca 420
attattacgt catttcacct ccttcatccg agatta 456
<210> 46

<211> 628

<212> DNA

<213> *Cryptococcus curvatus*

<400> 46

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagattt ctggattggc gttaggaagc	60
cggcaacggc atccttttggc tgagaagtta ctcaaacttg gtcattttaga ggaagtaaaa	120
gtcgttaaaa gggttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtattg tgccttcggg	180
ctaaactata tccataacac ctgtgaactg ttgattgact tcggtcaata tttttacaaa	240
catttgttaa tgaacgtcat gttataataa caaatataac tttcaacaac ggatctcttg	300
gctctcgcat cgatgaagaa cgcagcgaaa tgcgataagt aatgtgaatt gcagaattca	360
gtgaatcacc gaatctttga acgcaacttg cgtctctctg tattccggag agcatgcctg	420
tttgagtgtc atgaaatctc aaccattagg gtttcttaat ggcttggatt tggacgtttg	480
ccagtcaaat ggctcgtctt aaaagagtta gtgaatttaa catttgtctt ctggcgtaat	540
aagtttcgct gggtgatag tgtgaagttt gtttctaatc gtccgcaagg acaattcttg	600
aactctggcc tcaaatcagg taggacta	628

<210> 47

<211> 628

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> *Trichosporon* sp. CBS 7617

<400> 47

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacc tcggattggc gttagaagc	60
cggcaacggc atcttttggc cgagaagtig gtcaaacttg gtcattttaga ggaagtaaaa	120
gtcgttaaaa gggttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat tgctctttga	180
gcgttaaaact atatccatct acacctgtga actgttgatt gacttcggtc aattactttt	240
acaaacattg tgtaaatgaac gtcatgttat tataacaaaa ataactttca acaacggatc	300
tcttggtctc cgcacgatg aagaacgcag cgaatgcga taagtaattg gaattgcaga	360
attcagttaa tcatcgaatc ttgtaacgca acttgcgtc tctggtattc cggagagcat	420
gcctgtttga gtatcatgaa atctcaacca ttagggtttc ttaatggctt ggatttgggc	480
gctgccactt gcctggctcg ccttaaaaga gttagcgtat taacttgtcg atctggcgta	540
ataagtttcg ctggtgtaga cttgagaagt gcgcttctaa tcgtcctcgg acaattcttg	600
aactctggtc tcaaatcagg taggacta	628

<210> 48

<211> 716

<212> DNA

<213> *Sporobolomyces alborubescens*

<400> 48

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct ccggaattggc tattgggagc 60

tgcgagagc acccgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat ataggacgtc 180

caacttaact tggagtccga actctcactt tctaaccctg tgcacttggt tgggatagta 240

actctcgcaa gagagcgaac tcctattcac ttataaacac aaagtctatg aatgtattaa 300

atthttataac aaaataaaaac tttcaacaac ggatctcttg gctctcgcat cgatgaagaa 360

cgcagcgaaa tgcgataagt aatgtgaatt gcagaattca gtgaatcatc gaatctttga 420

acgcaccttg cgtccatgg tattccgtgg agcatgcctg tttgagtgtc atgaatactt 480

caacctcct ctttcttaat gattgaagag gtgtttgggt tctgagcgt gctggccttt 540

acggtctagc tcgttcgtaa tgcattagca tccgcaatcg aatttcggat tgacttggcg 600

taatagacta ttcgctgagg aattctagtc ttcggattag agccgggttg ggttaaagga 660

agcttctaata cagaatgtct acattttaag attagatctc aaatcaggta ggacta 716

<210> 49

<211> 718

<212> DNA

<213> *Rhodotorula glutinis*

<400> 49

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct ccggaattggc tattgggagc 60

tgcgagagc acccgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat ctaggacgtc 180

caacttaact tggagtccga actctcactt tctaaccctg tgcacttggt ttaaaattgg 240

ctagtagctc ttcggagcga accaccattt ttcacttata caaacacaaa gtctatgaat 300

gtaaacaaat ttataacaaa acaaaacttt caacaacgga tctcttggct ctgcgcatga 360

tgaagaacgc agcgaaatgc gatacgtaat gtgaattgca gaattcagt aatcatcgaa 420

tctttgaacg caccttgcgc tccttgggtat tccgaggagc atgcctgttt gagtgtcatg 480

aaatcttcaa cccacctctt tcttagtgaa tctggtgggt cttggtttct gagcgtgct 540

ctgcttcggc ttagctcggt cgtaatgcat tagcatccgc aaccgaaact tcggattgac 600
 ttggcgtaat agactattcg ctgaggattc cagacttggt ctggagccga gttgggttaa 660
 aggaagcttc taatcctaaa gtctatTTTT tgattagatc tcaaatcagg taggacta 718
 <210> 50
 <211> 693
 <212> DNA
 <213> Rhodotorula glutinis
 <400> 50
 cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgagggct ccggattggc ttctgggagc 60
 cggcaacggc acctagtcgc tgagaagttg gacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaatgaaa tgcaaggacg 180
 ctcttttttag aggtccgacc caattcattt tctcacactg tgcacacact actttttaca 240
 ccatttttaa cacttgaagt ctaagaatgt aaacagcttc ttaattgagc ataaaattta 300
 aacaaaactt tcagcaacgg atctcttggc tctcccatcg atgaagaacg cagcgaaatg 360
 cgatacgtaa tgggaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac gcaccttgca 420
 ctctttggta ttccgaagag tatgtctgtt tgagtgtcat gaaactctca accccctgt 480
 tttgtaatga accaggcgtg ggcttggatt atggctgctg ccggcgtaat tgcgactcg 540
 gctgaaatac acgagctacc cattcataa gaaatagacg gtttgactcg gcgtaataac 600
 atatttcgct gaggacgtca cattctttac ctagtgtgct ttctaatacg acatctaaac 660
 tttaagcttt agacctcaaa tcagtcagga cta 693
 <210> 51
 <211> 640
 <212> DNA
 <213> Trichosporon behrend
 <400> 51
 cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgagaccc tcggattggc gttaggaagc 60
 cggcaacggc atcctttggc cgagaagttg gtcaaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtatt gccttcatag 180
 gcttaacta tatccacata cacctgtgaa ctgttcacc acttgacgca agtcgagtgt 240
 ttttacaac aatgtgtaat gaacgtcgtt ttattataac aaaataaac tttcaacaac 300
 ggatctcttg gctctcgcat cgatgaagaa cgcagcgaat tgcgataagt aatgtgaatt 360
 gcagaattca gtgaatcatc gaatctttga acgcagcttg cgctctctgg tattccggag 420

agcatgcctg tttcagtgtc atgaaatctc aaccactagg gtttcctaata ggattggatt 480
 tggcgctctg cgatctctga tcgctcgctt taaaagagtt agcaagtttg acattaatgt 540
 ctggtgtaat aagtttccact ggggtccattg tgttgaagcg tgcttctaata cgtccgcaag 600
 gacaattact ttgactctgg cctgaaatca ggtaggacta 640

<210> 52

<211> 476

<212> DNA

<213> Geotrichum histeridarum

<400> 52

cgcgcgtcgc tactaccgat cgaatggctt agtgaggctt ccgattgat ttgggagaga 60
 gggcgacttt tttcctggaa cgagaagcta gtcaaacttg gtcattttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagaaaaa tgcgatatta 180
 gtggtttatt ttgctcgccg aaaggcaaac ttttaacata cctacctttt ttttaactata 240
 aaaaactttta acaacggatc tcttggttct cgcattcgatg aagaacgcag cgaattgcga 300
 tacgttttgt gaattgcaga agtgaatcat caatctttga acgcacattg cgcctggtgg 360

tattccgcca ggcatacctg tttgagcgtt gttctctctg ggattgtcta ctttctctaa 420
 agaaattaaa caaacaagtt tgacacaaca cctcaacctc agatcaggta ggacta 476

<210> 53

<211> 687

<212> DNA

<213> Rhodotorula aurantiaca

<400> 53

cgcgcgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct tcgattggc tttctgggagc 60
 cggcaacggc acctagtcgc tgagaagttt gacgaacttg gtcattttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaatgaat tttaggacgt 180
 tctttttaga agtccgaccc tttcatcttc ttacactgtg cacacacttc ttttttacac 240

acacttttaa caccttagta taagaatgta atagtctctt aattgagcat aaataaaaac 300
 aaaactttca gcaacggatc tcttggtctc cgcattcgatg aagaacgcag cgaattgcga 360
 taagtaatgt gaattgcaga attcagtga tcatcgaatc tttgaacgca ccttgactc 420
 tttggtattc cgaagagtat gtctgtttga gtgtcatgaa actctcaacc cccctatctt 480
 gtaatgagat ggggtgtgggc ttggattatg gttgtctgtc ggcgtaattg ccggctcaac 540
 tgaaatacac gagcaacctt attgaaataa acggtttgac ttggcgtaat aattatttcg 600

ctaaggacgc ttctttcaaa tataagaggt gcttctaatt cgcttctaag agcatttaag 660

cttttagacct caaatcagtc aggacta 687

<210> 54

<211> 636

<212> DNA

<213> Trichosporon domesticum

<400> 54

cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct ccgattggc gttgagaagc 60

cggcaacggc atctcttggc tgagaagttg gtcaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtatt gccttaattg 180

gcttaaaacta tatccatcta cacctgtgaa ctgtttgatt gaatcttcgg attcgatttt 240

atacaaacat tigttaatga acgtcattat attataacaa aaaaaaaact ttcaacaacg 300

gatctcttgg ctctcgcatc gatgaagaac gcagcgaaat gcgataagta atgtgaattg 360

cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa cgcaacttgc gctctctggt attccggaga 420

gcatgcctgt ttgagtgtca tgaaatctca accattaggg tttcttaatg gcttggattt 480

ggaggtttgc cagtctgact ggctcctctt aaaagagtta gcaagttgaa ctattgctat 540

ctggcgtaat aagtttcgct ggaatggat tgtgaagcgt gcttctaact gcttccggac 600

aattttttga ctctggcctc aaatcaggta ggacta 636

<210> 55

<211> 711

<212> DNA

<213> Rhodotorula toruloides

<400> 55

cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccgattggc tatcgggagc 60

tcgcgagagc acctgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat attagggtgt 180

ccaacttaac ttggagcccg accctcactt tctaaccctg tgcatttgc ttgggtagta 240

gtctgtgtca gcgagcgaat cccatttcac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaacaa 300

attataaca aacaaaactt tcaacaacgg atctcttggc tctcgcatcg atgaagaacg 360

cagcgaaatg cgatacgtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac 420

gcaccttgcg ctccatggta ttccgtggag catgcctgtt tgagtgtcat gaattcttca 480

acccacctct ttcttagtga atcaggcggt gtttggattc tgagcgttgc tggcttcgcg 540
 gcctagctcg ctcgtaatgc attagcatcc gcaatcgaac ttcggattga ctcggcgtaa 600
 tagactattc gctgaggatt ctggctcttg actggagccg ggtaagatta aaggaagcta 660
 ctaatcctca tgctatctt ttgagattag acctcaaatc aggtaggact a 711
 <210> 56
 <211> 753
 <212> DNA
 <213> Rhodotourula terpendoidalis
 <400> 56
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccggactggc tattgggac 60

 tcgcgagaga acctgactgc tgggaagttg tacgaacttg gtcatttga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaatgaat attagggtgc 180
 tcttttcac aaagaggcct gaccttcatt ctctaccct gtgcactatt caaacattcg 240
 gcagtggta atttggcttg taaaagagcc agacgactct gctgaattca ctcttaaact 300
 ctaaagtata agaattgtac aaataaaaca aataaaactt tcaacaacgg atctcttggc 360
 tctcgcatcg atgaagaacg cagcgaaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt 420
 gaatcatcga atctttgaac gcaccttgcg ctcgctggta ttccggcgag catgcctgtt 480

 tgagtgtcat gaaaacctca accttcaat tccttgttga attglaaggt gtttggattc 540
 tgaatgtttg ctggcttgaa gggcccttgg ctacttcaa agcgaagctc attcgtaata 600
 cattagcatc tcaatttcga atattcggat tgactcggcg taatagactt tattcgctga 660
 ggacaccttc acaaggtggc cgaatttcga ggtagaagct tccaattcga tcaaaagtca 720
 ctcttagttt agacctcaga tcaggcagga cta 753
 <210> 57
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 57
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggttt agtgagacct tgggagggcg agatgagggg 60

 ggcaaccctt ttgaacatc caaacttggc caaacttgat tatttagagg aagtaaaagt 120
 cgtaacaagg ttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgatttt atctatttct 180
 gtggatttct ggtatattac agcgtcattt tatctcaatt ataactatca acaacggatc 240
 tcttggctct cacatcatg aagaacgcag cgaaccgcga tattttttgt gacttgcaga 300

tgatgaatcat caatctttga acgcacattg cgcggtatgg tattccgtac cgcacggatg 360
gaggagcgtg ttccctctgg gatcgattg ctttcttgaa atggattttt taaactctca 420
attattacgt catttcacct ctttcacccg agatta 456

<210> 58

<211> 709

<212> DNA

<213> Rhodotorula glutinis

<400> 58

cgccccgcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccggattggc tattgggagc 60
tcgcgagagc acctgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat attagggtgt 180
ccaacttaac ttggaaccgc accctcacct tctaaccctg tgcatctgtc ttgggtagta 240
gcttgcgctg gcgagcgaat cccatttcac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaacaa 300
atttataaca aacaaaactt tcaacaacgg atctcttggc tctcgcatcg atgaagaacg 360

cagcgaatg cgatacgtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac 420
gcaccttgcg ctccatggta ttccgtggag catgcctgtt tgagtgtcat gaattcttca 480
accacctat ttcttagtga atcaggcggg gtttggattc tgagcgctgc tggcctcacg 540
gcctagctcg ctcgtaatgc attagcatcc gcaatcgaac ttcggattga ctcggcgtaa 600
tagactattc gctgaggatt ctggctcttg actggagccg ggtgagatta aaggaagcta 660
ctaactctca tgctatctt gagattagac ctcaaactcag gtaggacta 709

<210> 59

<211> 500

<212> DNA

<213> Yarrowia lipolytica

<400> 59

gtccctgccc ttgtacaca ccgcccgtcg ctactaccga ttgaatgggt tagtgagacc 60
ttgggagggc gagatgaggg gggcaacccc ttctgaacat ccaaacttgg tcaaacttga 120
ttatttagag gaagtaaaag tcgtaacaag gtttccgtag gtgaacctgc ggaaggatca 180
ttattgattt tatctatttc tgttgatttc tattctatta cagcgtcatt ttatctcaat 240
tataactatc aacaacggat ctcttggctc tcacatcgat gaagaacgca gcgaaccgcg 300
atattttttg tgacttgcag atgtgaatca tcaatctttg aacgcacatt gcgcggtatg 360

gcattccgta ccgcacggat ggaggagcgt gttccctctg ggatcgatt gctttcttga 420

aatggatttt ttaaactctc aattattacg tcatttcacc tccttcatcc gagattacc 480

gctgaactta agcatatcaa 500

<210> 60

<211> 707

<212> DNA

<213> *Lipomyces tetrasporus*

<400> 60

cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccggattggc tattgggagc 60

tcgcgagagc acctgactgc tgagaagtig tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat ctaggacgtc 180

caacttaact tggagtcgca aatctcactt tctaaccctg tgcatctgtt aattggaata 240

gtagctcttc ggagtgaacc accattcact tataaaacac aaagtctatg aatgtataca 300

aatttataac aaaaacaaaac tttaacaac ggatctcttg gctctcgcat cgatgaagaa 360

cgcagcgaaa tgcgatacgt aatgtgaatt gcagaattca gtgaatcatc gaatctttga 420

acgcaccttg cgctccttgg tattccgagg agcatgcctg tttgagtgtc atgaaatctt 480

caaccacctt ctttcttagt gaatctggig gtgcttgggt tctgagcgt gctctgcttc 540

ggcttagctc gttcgtaatg cattagcatc cgcaaccgaa cttcggattg acttggcgta 600

atagactatt cgctgaggat tctagtttac tagagccgag ttgggttaaa ggaagctcct 660

aatcctaaag tctatTTTTT gattagatct caaatcaggt aggacta 707

<210> 61

<211> 457

<212> DNA

<213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 61

cgcccgctgc tactaccgat tgaatggttt agtgagacct tgggaggcg agatgagggg 60

ggcaaccctt tctgaacatc caaacttggc caaacttgat tatttagagg aagtaaaagt 120

cgtaacaagg ttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgatttt atctatttct 180

gtggatttct attctattac agcgtcattt tatctcaatt ataactatca acaacggatc 240

tcttggctct cacatcgatg aagaacgcag cgaaccgcga tttttttgt gacttgcaga 300

tgtgaatcat caatctttga acgcacattg cgcggtatgg cattccgtac cgcacggatg 360

gaggagcgtg ttccctctgg gatcgattg ctttcttgaa atggattttt ttaaactctc 420
aattattacg tcatttcacc tccttcaccc gagatta 457
<210> 62
<211> 1022
<212> DNA
<213> *Lipomyces tetraspo*
<400> 62
cgcccgctgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct tcggactggc tccagaaaat 60
gggaaacat tatcaggagc tggaaagtgt gtcaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
gtcgtaaaca ggtttccttc cgtagcactt actgaagcct tagcagcccg aaaaggcgaa 180

tgctagcgac tataaataaa tatggcgctt ttaaatgcta gtctctgatt agaggcgaca 240
ttgccaaatt gcggggacat cctaaagatc ttgataccaa gctggtagtc gaaagacgcc 300
agtggccgag ctaacagccc tgggtatggt aataattcaa gatatggaac aatgggtaat 360
ccgcagccaa gtctaaact acgcaagtag catggatgca gttcacaggc caaatggtaga 420
tgggtagatt actaaatctg cttaagatat ggtcgggtccc gctgtgagag cagatgggaa 480
gtacaaaagc agactcgtga gtttgcgcaa acgtaactaa aaacgttccg taggtgaacc 540
tgcggaagga tcattactga gtatttgtct tttaaagaca tctctctatc cataaactct 600

tttttctaaa aagacatgat ttacacaatt agtctgaatg attatataaa aatcttcaaa 660
actttcaaca acggatctct tggttctcgc atcgatgaag aacgcagcaa aatgcgataa 720
gtatttgtaa ttgcaggatt ttgtgaatca tcgaattttt gaacgcacat tgcaccttct 780
ggtattccgg agggatatacc tgtttgagcg tcatttatat actcaaaact tcgttttgggt 840
gatgggcaca tatctggtga gagctagatt tgcctgaaat atagtggtag agattgctac 900
gagttatgca agttagccaa tgctattaag ttaattcgtt ggtgaagcat gcggagcttt 960
agtgatcgcc ttccttaact attggaattt ttctaatttt gacctcaaat caggcaggag 1020

ta 1022
<210> 63
<211> 712
<212> DNA
<213> *Rhodosporidium sphaerocarpum*
<400> 63
cgcccgctgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct ccggaccggc tattgggagc 60
tcgcgagagc acccgactgc tgggaagtgt tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat ataggacgtc 180
caacttaact tggagtcgca actctcactt tctaaccctg tgcatttggt tgggatagta 240
gcctctcggg gtgaactcct attcactcat aaacacaaag tctatgaatg tatttaattt 300

ataacaaaat aaaactttca acaacggatc tcttggctct cgcatcgatg aagaacgcag 360
cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagtga tcatcgaatc tttgaacgca 420
ccttgcgctc catggtatc cgtaggagcat gcctgtttga gtgtcatgaa tacttcaacc 480
ctcctctttt ctagtgaaag agaagggtct tggtttctga gcgttttgct ggcctcacgg 540
tcgagctcgc tcgtaatgca ttagcatccg caatcgaact tcggattgac ttggcgtaat 600
agactattcg ctgaggaatt ctaatcttcg gattagagcc gggttgggtt aaaggaagct 660
tctaactcta atgtctatat ttttagatta gatctcaat caggtaggac ta 712

<210> 64

<211> 631

<212> DNA

<213> Trichosporon brassicae

<400> 64

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct ccgattggc gttgagaagc 60
cggcaacggc atctcttggc cgagaagttg gtcaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat gccttaattg 180
gcttaaaacta tatccaacta cacctgtgaa ctgttcgatt gaatcttcga ttcaatttta 240
caaacattgt gtaaagaacg tcattagatc ataacaaaaa aaaactttta acaacggatc 300
tcttggctct cgcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga 360

attcagtga tcatcgaatc tttgaacgca acttgcgctc tctggtatc cggagagcat 420
gcctgtttga gtgtcatgaa atctcacaca tcaaggtttc ttgatgaagt ggatttggag 480
gttgccagtc taactggctc ctcttaaagg agttagcata tttgattatt gctgtctggc 540
gtaataagtt tcgctagttt ggcattttga agtgtgttc taatcgtctt cggacaattt 600
tttgactctg gcctcaaac aggtaggact a 631

<210> 65

<211> 627

<212> DNA

<213> Cryptococcus curvatus

<400> 65

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgagattt ccggattggc gttaggaagc 60

cggaacggc atcctttggc tgagaagcta ctcaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtattg tgccttcggg 180

ctaactatat ccataacacc tgtgaactgt tgattgactt cggtaaatat tttacaaac 240

attgtgtaat gaacgtcatg ttataataac aaatataact ttcaacaacg gatctcttgg 300

ctctcgcatc gatgaagaac gcagcgaaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag 360

tgaatcatcg aatctttgaa cgcaacttgc gctctctggg attccggaga gcatgcctgt 420

ttgagtgtca tgaatctca accattaggg tttcttaatg gcttggattt ggacgtttgc 480

cagtcaaatg gctcgtctta aaagagttag tgaatttaac atttgtcttc tggcgtaata 540

agtttcgctg ggctgatagt gtgaagtttg cttctaactg tccgcaagga caattcttga 600

actctggcct caaatcaggt aggacta 627

<210> 66

<211> 637

<212> DNA

<213> *Lipomyces starkeyi*

<400> 66

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct tcggactggc tccagaaaat 60

gggaacccat tatcaggagc tggaaagtgt gtcaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attactgagt atttgtcttt 180

tcaagacatc tcctatcca taaactcttt tttttaaaaa gacatgattt ataacaatta 240

gtctgaatga ttatttttaa atcttcaaaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctcgca 300

tcgatgaaga acgcagcaaa ttgcgataag taatgtgaat tgcaggattt tgtgaatcat 360

cgaatttttg aacgcacatt gcaccttctg gtattccgga gggtatacct gtttgagcgt 420

catttatata ctcaaaactt acgttttggg gatgggcacg tatctggcct ctaagttaga 480

tttgcctgaa atatagcggg agaggtcgct agaagcgatg caagttagcc aatgctatta 540

aagttaattc gttggtgacg catgttgagc ttttggtgaa gtcttcctta attattggaa 600

tttttttcta attttgacct caaatcaggc aggagta 637

<210> 67

<211> 457

<212> DNA

<213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 67

cgcccgctgc tactaccgat tgaatggttt agtgagacct tgggagggcg agatgagggg	60
ggcaaccctt tttgaacatc caaacttggc caaacttgat tatttagagg aagtaaaagt	120
cgtaacaagg tticcgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgatttt atctatttct	180
gtggatttct attctattac agcgtcattt tatctcaatt ataactatca acaacggatc	240
tcttggctct cacatcgatg aagaacgcag cgaaccgcga tttttttgt gacttgcaga	300
tgtgaatcat caatcttga acgcacattg cgcggtatgg cattccgtac cgcacggatg	360
gaggagcgtg ttccctctgg gatcgattg ctttcttgaa atggattttt ttaaactctc	420
aattattacg tcatttcacc tccttcaccc gagatta	457

<210> 68

<211> 631

<212> DNA

<213> Trichosporon loubieri

<400> 68

cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct ccggattggc gttgagaagc	60
cggcaacggc atctcttggc cgagaagttg gtcaaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120
gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtatt gccatcttgg	180
cttaactat atccatctac acctgtgaac cgtttgattg aatcttctga ttcaatttta	240
caaacattgt gtaatgaacg tcattagatc ataataagaa aaaactttca acaacggatc	300
tcttggctct cgcatcgatg aagaacgcag cgaatgcga taagtattgt gaattgcaga	360
attcagttaa tcatcgaac tttgaacgca acttgcgctc tctggtattc cggagagcat	420
gcctgtttga gtgtcatgaa atctcaacca ttagggtttc ttaatggctt ggatttggag	480
gttgccattc taaatggctc ctcttaaaag agttagcgag tttaactatt gctatctggc	540
gtaataagtt tcgttggaat ggtattgtga agcgcgcttc taatcgtctt cggacaattt	600
tttgactctg gcctcaaac aggtaggact a	631

<210> 69

<211> 476

<212> DNA

<213> Geotrichum vulgare

<400> 69

cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggctt ccggattgat tagttggaga	60
gggagacttt tctgactgaa cgagaagcta gtcaaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaaagatt taatattaat 180

tgtgaaatta aaacgatatt aacaaaaaat catacaatca attataaaaa aaatcaaaac 240

ttttaacaat ggatctcttg gttctctgtat cgatgaagaa cgcagcgaaa cgcgatattt 300

cttgtgaatt gcagaagtga atcatcagtt ttgaacgca cattgcactt tggggtatcc 360

cccaaagtat acttggttga gcgttggttc tctcttggaa ttgcattgct tttctaaaaa 420

atcgaatcaa attcgtttga aacatccatt cttcaacctc agatcaagta ggatta 476

<210> 70

<211> 710

<212> DNA

<213> Rhodosporidium toruloides

<400> 70

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct ccgattggc tattgggagc 60

tcgcgagagc acctgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat attaggtgt 180

ccaacttaac ttggagcccg accctcactt tctaaccctg tgcatTTgtc ttgggtagta 240

gcttgcgtca gcgagcgaat cccatttcac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaacaa 300

atttataaca aaacaaaact ttcaacaacg gatctcttgg ctctcgcatc gatgaagaac 360

gcagcgaaat gcgatacgta atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa 420

cgcaccttgc gctccatggt attccgtgga gcatgcctgt ttgagtgtca tgaattcttc 480

aaccacctc tttcttagtg aatcaggcgg tgtttggatt ctgagcgctg ctggcttcgc 540

ggcctagctc gctcgtaatg cattagcatc cgcaatcgaa cttcggattg actcggcgta 600

atagactatt cgtgaggat tctggtctct gactggagcc gggtaaggtt aaaggagct 660

actaatcctc atgtctatct tgagattaga cctcaaatca ggtaggacta 710

<210> 71

<211> 707

<212> DNA

<213> Rhodotorula glutinis

<400> 71

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct ccgattggc tattgggagc 60

tcgcgagagc acctgactgc tgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat ctaggacgtc 180

caacttaact tggagtccga actctcactt tctaaccctg tgcactctgtt aattggaata 240

gtagctcttc ggagtgaacc accattcact tataaaacac aaagtctatg aatgtataca 300

aatttataac aaaacaaaac ttccaacaac ggatctcttg gctctcgcat cgatgaagaa 360

cgcagcgaaa tgcgatacgt aatgtgaatt gcagaattca gtgaatcatc gaatctttga 420

acgcaccttg cgctccttgg tattccgagg agcatgcctg tttgagtgtc atgaaatctt 480

caaccacctt ctttcttagt gaatctgggtg gtgcttgggt tctgagcgct gctctgcttc 540

ggcttagctc gticgtaatg cattagcatc cgcaaccgaa cttcggattg acttggcgta 600

atagactatt cgctgaggat tctagtttac tagagccgag ttgggttaaa ggaagctcct 660

aatcctaaag tctatTTTTT gattagatct caaatcaggt aggacta 707

<210> 72

<211> 627

<212> DNA

<213> *Rhodotorula aurantiaca*

<400> 72

cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgagattt ccggattggc gttaggaagc 60

cggcaacggc atcctttggc tgagaagcta ctcaaacttg gtcatttaaa ggaagtaaaa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgtt tgccttcggg 180

ctaactatat ccataacacc tgtgaactgt tgattgactt cggatcaatat tttacaaac 240

attgtgtaat gaacgtcatg ttataataac aaatataact ttcaacaacg gatctcttgg 300

ctctcgcatc gatgaagaac gcagcgaaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag 360

tgaatcatcg aatctttgaa cgcaacttgc gctctctggg attccggaga gcatgcctgt 420

ttgagtgtca tgaaatctca accattaggg tttcttaatg gcttggattt ggacgtttgc 480

cagtcaaag gctcgtctta aaagagttag tgaatttaac atttgtcttc tggcgtaata 540

agtttcgctg ggctgatagt gtgaagtttg cttctaactg tccgcaagga caattcttga 600

actctggcct caaatcaggt aggacta 627

<210> 73

<211> 899

<212> DNA

<213> *Torulaspora delbrueckii*

<400> 73

cgcccgctgc tagtaccgat tgaatggctt agtgaggcct caggatctgc ttagagaagg 60

gggcaactcc atctcagagc ggagaatctg gtcaaacttg gtcatttaga ggaactaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagagaaa tctatatgaa 180
 tgaagttaga ggacgtctaa agatactgta agagaggatc aggttcaaga ccagcgctta 240
 attgcgcggt tgcggcttgg ttgcctttt gcggaacatg tcttttctcg ttgttaactc 300
 tacttcaact tctacaacac tgtggagttt tctacacaac ttttcttctt tgggaagata 360
 cgtcttgtgc gtgcttccca gaggtgacaa acacaaacaa ctttttatta ttataaacca 420

gtcaaaacca atttcgttat gaaattaaaa atatttaaaa ctttcaacaa cggatctctt 480
 ggttctcgca tcgatgaaga acgcagcgaa atcgatagc taatgtgaat tgcagaattc 540
 cgtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgccccttg gtattccagg gggcatgcct 600
 gtttgagcgt catttccttc tcaacaatc atgtttggta gtgagtata cttgttcaag 660
 ggtaacttg aaattgctag cctgttattt ggttgtgatt ttgctggctt ggatgacttt 720
 gtccagtcta gctaataccg aattgtcgta ttaggtttta ccaacttcgg cagactgtgt 780
 gttggctcgg gcgctttaa gactttgtcg taaacgattt atcgtttgtt tgagcttttc 840

gcatacgcaa tccggcgcaa caatactctc aaagtttgac ctcaaatcag gtaggaata 899

<210> 74
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Prototheca moriformis
 <400> 74

tcacttcattg ccggcgggtcc 20

<210> 75
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Prototheca moriformis
 <400> 75

gcgctcctgc ttggctcgaa 20

<210> 76
 <211> 733
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gene targeting sequence
 <400> 76

gctcttcgag acgtggctctg aatcctccag gcgggtttcc ccgagaaaga aagggtgccg 60

atttcaaagc agagccatgt gccgggccct gtggcctgtg ttggcgccta ttagtcacc 120

ccccctcacc caattgtcgc cagtttgcgc aatccataaa ctcaaaactg cagcttctga 180

gctgcgtctg tcaagaacac ctctgggggtt tgctcaccgc cgaggtcgac gccagcatg 240

gctatcaaga cgaacaggca gcctgtggag aagcctccgt tcacgatcgg gacgtgcgc 300

aaggccatcc ccgcgcactg ttctgagcgc tcggcgcttc gtagcagcat gtacctggcc 360

tttgacatcg cggatcatgt cctgctctac gtgcgcgcga cgtacatcga ccctgcgccg 420

gtgcctacgt gggtaagta tggcgtcatg tggccgctct actggttctt ccaggtgtgt 480

gtgaggggtg tggttgcgcc tatcgaggtc ctggtggcgc gcatggggga gaaggcgctt 540

gtcccgtga ccccccgcc taccctcccg gcacctcca gggcgcttc ggcacgggtg 600

tctgggtgtg cgcgcacgag tgggccacc aggccttttc ctccagccag gccatcaacg 660

acggcgtggg cctggtgttc cacagcctgc tgctgtgcc ctactactcc tggaagcact 720

cgcaccgggt acc 733

<210> 77

<211> 739

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene targeting sequence

<400> 77

ccgccaccac tccaacacgg ggtgcctgga caaggacgag gtgtttgtgc cgccgcaccg 60

cgcagtggcg cagcagggcc tggagtggga ggagtggctg cccatccga tgggcaaggt 120

gctggtcacc ctgacctgg gctggccgt gtacctcatg ttcaacgtcg cctcgcggcc 180

gtaccgcgc ttgcccaacc actttgacc gtggtcgccc atcttcagca agcgcgagcg 240

catcgaggtg gtcatctccg acctggcgt ggtggcggtg ctacgcgggc tcagctgct 300

gggccgcacc atgggctggg cctggctggt caagacctac gtggtgccct acctgatcgt 360

gaacatgtgg ctctgtctca tcacgtgct ccagcacacg caccggcgcc tgccgcacta 420

cttcgagaag gactgggact ggctgcgcgg cgccatggcc accgtggacc gtcctatggg 480

ccgcaccttc atggacaaca tcctgcacca catctccgac acccactgc tgcaccacct 540

cttcagcacc atcccgcact accacgccga ggaggcctcc gccgcatca ggcccatcct 600

gggcaagtac taccagtccg acagccgtg ggtcggccgc gcctgtggg aggactggcg 660

cgactgccgc tacgtcgtcc cggacgcgcc cgaggacgac tccgcgtct ggttcacaa 720

gtgagtgagt gagaagagc 739

<210> 78

<211> 2327

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 78

ctttcttgcg ctatgacact tccagcaaaa ggtagggcgg gctgcgagac ggcttcccgg 60

cgctgcatgc aacaccgatg atgcttcgac cccccgaagc tccttcgggg ctgcatgggc 120

gtcccgatgc cgtccaggcg cgagcgctgt ttaaatagcc agggccccga ttgcaaagac 180

attatagcga gctaccaaag ccatattcaa acacctagat cactaccact tctacacagg 240

ccactcgagc ttgtgatcgc actccgctaa gggggcgccct cttcctcttc gtttcagtca 300

caaccgcaa acggcgcgcc atgctgctgc aggccttcct gttcctgctg gccggcttcg 360

ccgccaagat cagcgccctc atgacgaacg agacgtccga ccgccccctg gtgcacttca 420

cccccaacaa gggctggatg aacgaccca acggcctgtg gtacgacgag aaggacgcca 480

agtggcacct gtacttccag tacaaccga acgacaccgt ctgggggacg cccttgttct 540

ggggccacgc cagctccgac gacctgacca actgggagga ccagcccatc gccatcgccc 600

cgaagcgcaa cgactccggc gccttctccg gctccatggt ggtggactac aacaacacct 660

ccggcttctt caacgacacc atcgaccgc gccagcgctg cgtggccatc tggacctaca 720

acaccccgga gtccgaggag cagtacatct cctacagcct ggacggcggc tacaccttca 780

ccgagtacca gaagaacccc gtgctggccg ccaactccac ccagttccgc gacccgaagg 840

tcttctggta cgagccctcc cagaagtgga tcatgaccgc ggccaagtcc caggactaca 900

agatcgagat ctactctcc gacgacctga agtcttgga gctggagtcc gcgttcgcca 960

acgagggctt cctcggttac cagtacgagt gccccggcct gatcgaggtc cccaccgagc 1020

aggacccag caagtcttac tgggtgatgt tcatctccat caaccccggc gccccggccg 1080

gcggctcctt caaccagtac ttcttcggca gtttcaacgg caccacttc gaggccttcg 1140

acaaccagtc ccgctgggtg gacttcggca aggactacta cgccctgcag accttcttca 1200

acaccgacc gacctacggg agcgccctgg gcatcgctg ggcctccaac tgggagtact 1260

ccgccttcgt gccaccaaac ccctggcgt cctccatgtc cctcgtgcgc aagttctccc 1320

tcaacaccga gtaccaggcc aaccggaga cgagctgat caacctgaag gccgagccga 1380

tcctgaacat cagcaacgcc ggccccctga gccggttcgc caccaacacc acgttgacga 1440

aggccaacag ctacaacgtc gacctgtcca acagcaccgg caccctggag ttcgagctgg 1500

tgtacccgt caacaccacc cagacgatct ccaagtccgt gttcgcggac ctctccctct 1560
 ggttcaaggg cctggaggac cccgaggagt acctccgcat gggcttcgag gtgtccgct 1620
 cctccttctt cctggaccgc gggaacagca aggtgaagtt cgtgaaggag aaccctact 1680
 tcaccaaccg catgagcgtg aacaaccagc cttcaagag cgagaacgac ctgtcctact 1740

 acaaggtgta cggcttgctg gaccagaaca tcctggagct gtacttcaac gacggcgacg 1800
 tcgtgtccac caacacctac ttcatgacca cgggaacgc cctgggctcc gtgaacatga 1860
 cgacgggggt ggacaacctg ttctacatcg acaagttcca ggtgcgcgag gtcaagtgac 1920
 aattggcagc agcagctcgg atagtatcga cacactctgg acgtgggtcg tgtgatggac 1980
 tgttgccgcc acacttgctg ctttgacctg tgaatatccc tgccgctttt atcaaacagc 2040
 ctgagtgtgt ttgatcttgt gtgtacgcgc ttttgcgagt tgctagctgc ttgtgctatt 2100
 tgcaatacc acccccagca tcccttccc tcgtttcata tcgcttgcat cccaaccgca 2160

 acttatctac gcgtctctgc taccctcag cgctgctcct gctcctgctc actgcccctc 2220
 gcacagcctt ggtttgggct ccgctgtat tctcctggta ctgcaacctg taaaccagca 2280
 ctgcaatgct gatgcacggg aagtagtggg atgggaacac aaatgga 2327

 <210> 79
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gene targeting sequence
 <400> 79

 gctcttcgag gggctggctt gaatccttca ggcgggtgtt acccgagaaa gaaagggtgc 60
 cgatttcaaa gcagacccat gtgccgggcc ctgtggcctg tgttggcgcc tatgtagtca 120
 cccccctca cccaattgtc gccagtttgc gactccata aactcaaac agcagcttct 180

 gagctgcgct gttcaagaac acctctgggg tttgctcacc cgcgaggtcg acgccagca 240
 tggctatcaa gacgaacagg cagcctgtgg agaagcctcc gttcacgac gggacgctgc 300
 gcaaggccat ccccgcgcac tgtttcgagc gctcggcgct tcgtagcagc atgtacctgg 360
 cctttgacat cgcggtcatg tcctgtctct acgtcgcgtc gacgtacatc gacctgcac 420
 cgggtgctac gtgggtcaag tacggcatca tgtggcgtct ctactggttc ttccagggtg 480
 gtttgagggt tttggttgcc cgtattgagg tcctgggtggc gcgcatggag gagaaggcgc 540
 ctgtcccgtg gaccccccg gctaccctcc cggcaccttc cagggcgctt tcggcacggg 600

 tgtctgggtg tgcgcgcacg agtgcggcca ccaggccttt tcctccagcc aggccatcaa 660

cgacggcgtg ggcttgggtg tccacagcct gctgctggtg ccctactact cctggaagca	720
ctcgaccgg gtacc	735
<210> 80	
<211> 739	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> gene targeting sequence	
<400> 80	
ccgccaccac tccaacacgg ggtgcctgga caaggacgag gtgtttgtgc cgccgcaccg	60
cgcagtggcg cagagggcc tggagtggga ggagtggctg cccatccgca tgggcaaggt	120
gctggtcacc ctgaccctgg gctggccgct gtacctcatg ttcaacgtcg cctcgcggcc	180
gtaccgcgc ttccccaacc actttgacct gtggtcgccc atcttcagca agcgcgagcg	240
catcgagggt gtcattccg acctggcgct ggtggcggtg ctgagcgggc tcagcgtgct	300
gggccgcacc atgggctggg cctggctggt caagacctac gtggtgccct acctgatcgt	360
gaacatgtgg ctctgtctca tcacgtgct ccagcacacg caccggcggc tgccgcacta	420
cttcgagaag gactgggact ggctgcgcgg cgccatggcc accgtggacc gtcctatggg	480
ccgccccttc atggacaaca tctgcacca catctcgac acccacgtgc tgcaccacct	540
cttcagcacc atcccgcact accacgccga ggaggcctcc gccgcatca ggcccatcct	600
gggcaagtac taccagtccg acagccgctg ggtcgccgc gccctgtggg aggactggcg	660
cgactgccgc tacgtcgtcc cgagcgcgc cgaggacgac tccgcgtct ggttcacaa	720
gtgagtgagt gagaagagc	739
<210> 81	
<211> 726	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> genomic donor sequence	
<400> 81	
gtctttcgcc gccgcaactc ctgctcgagc gcgcccgcgc gtgcgcgcc agcgcttgg	60
ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgctga tgtccatcac caggatcatg aggtctgcct	120
tgcgccggt gagccactgc ttctgcggg cgccaagag gagcatgagg gaggactcct	180
ggtccagggt cctgacgtgg tcgcggtctt ggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc	240
gcaccgaggc cgctccaac tggctctcca gcagccgag tcgccgccga ccctggcaga	300

ggaagacagg tgaggggggt atgaattgia cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga 360
atccctacca gtcatggctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgaccct 420
cgctgccgcc gcttctcccg cacgttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcgcc 480
gcacgtggc gctgcgttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa 540
cccccttgcg cgttagtggt gccatccttt gcagaccggt gagagccgac ttgttgcg 600

ccacccccca caccacctcc tcccagacca attctgtcac ctttttggcg aaggcatcgg 660
cctcggcctg cagagaggac agcagtgtcc agccgctggg ggttggcgga tgcacgtca 720
ggtacc 726

<210> 82
<211> 3635
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> relevant expression construct
<400> 82

ctttcttgcg ctatgacact tccagcaaaa ggtaggcgcg gctgcgagac ggcttcccgg 60
cgctgcatgc aacaccgatg atgcttcgac cccccgaagc tccttcgggg ctgcatgggc 120
gctccgatgc cgtccaggcg cgagcgctgt ttaaatagcc aggccccga ttgcaaagac 180

attatagcga gtiaccaaag ccatattcaa acacctagat cactaccact tctacacagg 240
ccactcgagc ttgtgatgc actccgctaa gggggcgctt cttcctcttc gtttcagtca 300
caaccgcaa actctagaat atcaatgatc gagcaggacg gcctccacgc cggctcccc 360
gccgcctggg tggagcgctt gttcggctac gactgggccc agcagaccat cggctgctcc 420
gagccgcgct gtctccgctt gtccgccag ggccgccccg tgctgttcgt gaagaccgac 480
ctgtccggcg cctgaacga gctgcaggac gagggcgccc gcctgtcctg gctggccacc 540
accggcgtgc cctgcgccgc cgtgctggac gtggtgaccg aggccggccg cgactggctg 600

ctgctggcg aggtgcccg ccaggacctg ctgtctctcc acctggcccc cgccgagaag 660
gtgtccatca tggccgacgc catgcgccgc ctgcacacc tggacccgc cacctgcccc 720
ttcgaccacc aggccaaaga ccgcatcgag cgcgcccgca cccgcatgga ggccggcctg 780
gtggaccagg acgacctgga cgaggagcac cagggcctgg cccccgccga gctgttcgcc 840
cgctgaagg cccgcatgcc cgacggcgag gacctggtgg tgaccacagg cgacgcctgc 900
ctgcccaaca tcatggtgga gaacggcgcg ttctccggtt tcatcgactg cgcccgctg 960
ggcgtggcgg accgctacca ggacatgcc ctggccaccc gcgacatgc cgaggagctg 1020

ggcggcgagt gggccgaccg ctctctgggtg ctgtacggca tcgccgcccc cgactcccag 1080
 cgcacgcct tctaccgct gctggacgag ttcttctgac aattggcagc agcagctcgg 1140
 atagtatcga cacactctgg acgctggctg tgtgatggac tgttcccgcc acacttgctg 1200
 ccttgacctg tgaatatccc tgccgctttt atcaaacagc ctacagtgtgt ttgatcttgt 1260
 gtgtacgcgc ttttgcgagt tgctagctgc ttgtgctatt tgcgaatacc acccccagca 1320
 tccccctccc tcgtttcata tcgcttgcat cccaaccgca acttatctac gctgtcctgc 1380
 tatccctcag cgctgctcct gctcctgctc actgccccctc gcacagcctt ggtttgggct 1440

ccgcctgtat tctcctggta ctgcaacctg taaaccagca ctgcaatgct gatgcacggg 1500
 aagtagtggg atgggaacac aaatggagga tcccgcgtct cgaacagagc gcgcagagga 1560
 acgctgaagg tctgcctct gtcgcacctc agcgcggcat acaccacaat aaccacctga 1620
 cgaatgcgct tggttcttcg tccattagcg aagcgtccgg ttacacacg tgccacgttg 1680
 gcgaggtggc aggtgacaat gatcggtgga gctgatggc gaaacgttca cagcctaggg 1740
 atatcgaatt ctttcttgc gctatgacac ttccagcaaa aggtaggcg ggctgcgaga 1800
 cggttcccc gcgtgcatg caacaccgat gatgcttca cccccgaag ctcttcggg 1860

gctgcatggg cgctccgatg ccgctccagg gcgagcgtg tttaaatagc caggcccccg 1920
 attgcaaaga cattatagcg agctacaaa gccatatca aacacctaga tcactaccac 1980
 ttctacacag gccactcgag ctgtgatcg cactccgcta agggggcgcc tcttctctt 2040
 cgtttcagtc acaaccgca aacactagta tggccaccgc atccacttc tcggcggtca 2100
 atgcccgctg cggcgacctg cgctcctcg cgggctccgg gccccggcg ccagcgaggc 2160
 cctccccgt gcgcgggcgc gccccgact ggtccatgct gttcgccgtg atcaccacca 2220
 tcttctcgc cgccgagaag cagtggacca acctggagtg gaagcccaag cccaaccccc 2280

cccagctgct ggacgaccac ttccgcccc acggcctgggt gttccgccgc accttcgcca 2340
 tccgcagcta cgaggtgggc cccgaccgt ccaccagcat cgtggccgtg atgaaccacc 2400
 tgcaggaggc cgccctgaac cagccaagt ccgtgggcat cctgggcgac ggcttcggca 2460
 ccacctgga gatgtcaag cgcgacctga tctgggtggt gaagcgcacc cacgtggcgg 2520
 tggagcgcta cccgcctgg ggcgacaccg tggaggtgga gtgctgggtg ggcgcctccg 2580
 gcaacaacgg ccgccccac gacttctgg tgcgcgactg caagaccggc gagatcctga 2640
 cccgtgcac ctccctgagc gtgatgatga acaccgcac ccgcgcctg agcaagatcc 2700

ccgaggaggt gcgcggcgag atcgccccg ctttcatcga caactggcc gtgaaggacg 2760
 aggagatcaa gaagccccag aagctgaacg actccaccgc cgaactacac cagggcggcc 2820
 tgacccccg ctggaacgac ctggacatca accagcacgt gaacaacac aagtacgtgg 2880

actggatcct ggagaccgtg cccgacagca tcttcgagag ccaccacatc tcctccttca 2940
ccatcgagta ccgccgcgag tgcacatgg acagcgtgct gcagtccttg accaccgtga 3000
gcggcggtc ctccgaggcc ggccctggtgt gcgagcacct gctgcagctg gagggcgga 3060
gcgaggtgct gcgcgccaag accgagtggc gcccgaagct gaccgactcc ticcgcgga 3120

tcagcgtgat ccccgccgag tccagcgtga tggactacaa ggaccacgac ggcgactaca 3180
aggaccagca catcgactac aaggacgacg acgacaagtg actcgaggca gcagcagctc 3240
ggatagtatc gacacactct ggacgctggt cgtgtgatgg actgttgccg ccacacttgc 3300
tgccctgacc tgtgaatate cctgccgtt ttatcaaaca gcctcagtgt gtttgatctt 3360
gtgtgtacgc gcttttgcga gttgctagct gcttgtgcta tttgcgaata ccaccccag 3420
catcccttc cctcgtttca tatcgcttgc atcccaaccg caacttatct acgtgtcct 3480
gctatccctc agcgtgtctc ctgctcctgc tactgcccc tcgcacagcc ttggtttggg 3540

ctccgcctgt attctcctgg tactgcaacc tgtaaaccag cactgcaatg ctgatgcacg 3600
ggaagtagtg ggatgggaac acaaatggaa agctt 3635

<210> 83
<211> 1096
<212> DNA
<213> *Prototheca moriformis*
<400> 83

ccaggcaggc ggtagggttg ccgattgctt gagcgaattg gaagatataa tttttgtgg 60
tgtccctgga cgctgtttgt ggcgtctctt ttggagaag attgcgtggg ggagctttcc 120
atgtaccacg ctctcttctg aaaggattct ggccgagtcc tgatgagccc aaagaaaaca 180
cctgcctttc agtgcctggca ctctgaaaac gtcaacagat gattatacat gtcacaaaag 240

gcagccgatt aggaacggga gctctggccg ttcgtttggc tgcctgggct gattgaagtg 300
atccacctg ttcgaatgaa ggcggtcgag tcgaattatc gaccggagct gtcggaagg 360
cgtccggggc agagttaggt gctgcggcct ggttgtcgtt caaaaagacc ccggtagccc 420
aacaatcacg aacgaaagga atataattgc ttgcatacta tacattcagt ttctatgtgg 480
cgggtagaca agtctcatgg gcttctaaag gctgtccctt gaaggctact tataaaaact 540
tgctgcgcca tggcacggat cgcgtttgcg caggctgcaa cctgcgcgc aaggtcaaat 600
acacagcaaa agatactaac agaatttcta aaaacattta aatatttgtt tcgaccagcc 660

aattgtggc gtaggcacgc aaaagacttt gttttgcgcc caccgagcat ccacgtggc 720
agtcaagcca gtccgatgtg cattgcgtgg cagcatcgag gagcatcaaa aacctcgtgc 780

acgcttttct gtcaatcatc atcaaccact ccacatgta taccgatgc atcgcggtgc 840
gcagcgcgcc acgcgtccca gaccgcacca aaaaccagc agcggcgaaa gcaaatttc 900
acttgcccga aaccccagc agcggcattc acacgtgggc gaaaaccca ctgcccata 960
caggcgtatg tctgctgtca cgatgcctga caacgttatt atagatatac actgattaat 1020
gtttgagtgt gtgcgagtcg cgaatcagga atgaattgct agtaggcact ccgaccgggc 1080

gggggcccag ggacca 1096

<210> 84

<211> 1065

<212> DNA

<213> Prototheca moriformis

<400> 84

ggccgacagg acgcgcgtca aagggtctgg tctgtatgc cctggccggc aggtcgttgc 60
tgctgctggt tagtgattcc gcaaccctga ttttggcgtc ttattttggc gtggcaaacg 120
ctggcgcccc cgagccgggc cggcggcgat gcggtgcccc acggtgccc gaatccaagg 180
gaggcaagag cgcccggtc agttgaaggg ctttacgcgc aaggtacagc cgctcctgca 240
aggctgcgtg gtggaattgg acgtgcaggt cctgctgaag ttctccacc gcctcaccag 300

cggacaaagc accggtgtat caggtcctg tcatccactc taaagagtc gactacgacc 360
tactgatggc ctagattct tcatcaaaaa cgctgagac acttgcccag gattgaaact 420
ccctgaaggg accaccaggg gccctgagtt gtctctccc cccgtggcga gctgccagcc 480
aggctgtacc tigtatcgag gctggcggga aaataggctt cgtgtgtca ggtcatggga 540
ggtgcaggac agtcatgaa acgccaacaa tcgcacaatt catgtcaagc taatcagcta 600
ttctctctc acgagctgta attgtcccaa aattctggc taccgggggt gatcctcgt 660
gtacggggcc ttccctcaac ctaggtatg cgcgatgcg gtcgccgcgc aactcgcgcg 720

agggccgagg gtttgggacg ggccgtccc aaatgcagtt gcaccggat gcgtggcacc 780
ttttttgcga taatttatgc aatggactgc tctgcaaat tctggctctg tcgccaaccc 840
taggatcagc ggcgtaggat ttcgtaatca ttcgtcctga tggggagcta ccgactaccc 900
taatatcagc ccgactgcct gacgccagcg tccactttg tgcacacatt ccattcgtgc 960
ccaagacatt tcatttgtgt gcgaagcgtc cccagttacg ctacactgtt tcccgaacct 1020
cttactgttc tgtcgacaga gcgggcccac aggccggtcg cagcc 1065

<210> 85

<211> 408

<212> DNA

<213> Chlorella vulgaris

<400> 85

```
gcagcagcag ctcggatagt atcgacacac tctggacgct ggtcgtgtga tggactgttg      60
ccgccacact tgctgccttg acctgtgaat atccctgccg cttttatcaa acagcctcag      120
tgtgtttgat cttgtgtgta cgcgcttttg cgagttgcta gctgcttgtg ctatttgca      180
ataccacccc cagcatcccc ttccctcggt tcatatcgct tgcacccaa ccgcaactta      240
tctacgctgt cctgctatcc ctacgcgtg ctctgctcc tgctcactgc ccctcgca      300
gccttggttt gggctccgcc tgtattctcc tggactgca acctgtaaac cagcactgca      360
atgctgatgc acgggaagta gtgggatggg aacacaaatg gaggatcc      408
```

<210> 86

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 86

```
actagtatgg ccaccgcac cactttctcg gcgttcaatg cccgctgcgg cgacctgcgt      60
cgctcggcgg gctccgggcc ccggcgccca gcgaggcccc tcccctgcg cgggcgcgcc      120
```

<210> 87

<211> 1038

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 87

```
actagtatgg ccaccgcac cactttctcg gcgttcaatg cccgctgcgg cgacctgcgt      60
cgctcggcgg gctccgggcc ccggcgccca gcgaggcccc tcccctgcg cgggcgcgcc      120
```

```
cgctcctacg aggtgggcat caacaagacc gccaccgtgg agaccatcgc caacctgctg      180
```

```
caggaggtgg gctgcaacca cgcccagtcc gtgggttctt ccaccgacgg cttegccacc      240
```

```
accacctcca tgcgcaagat gcacctgac tgggtgaccg cccgcatgca catcgagatc      300
```

```
tacaagtacc ccgctggtc cgacgtggtg gaggtggaga cctggtgcca gtccgagggc      360
```

```
cgcatcgga cccgccgca ctggatctg accgactacg ccaccggcca gatcatcggc      420
```

```
cgcgccacct ccaagtgggt gatgatgaac caggacaccc gccgcctgca gaaggtgacc      480
```

gacgacgtgc gcgaggagta cctggtgttc tgcccccgcg agctgcgcct ggccttcccc 540

gaggagaaca accgtctctc caagaagatc tccaagctgg aggaccccgcc ccagtactcc 600

aagctggggc tgggtgccccg ccgcgccgac ctggacatga accagcacgt gaacaacgtg 660

acctacatcg gctgggtgct ggagtcctat ccccaggaga tcacgcacac ccacgagctg 720

cagaccatca ccttggacta ccgcgccgag tgccagcacg acgacatcgt ggactccctg 780

acctccgtgg agccctccga gaacctggag gccgtgtccg agctgcgcgg caccaacggc 840

tccgccacca ccaccgccgg cgacgaggac tgccgcaact tcctgcacct gctgcgcctg 900

tccggcgacg gcctggagat caaccgccgc cgcaccgagt ggcgcaagaa gtccgccccg 960

atggactaca aggaccacga cggcgactac aaggaccacg acatcgacta caaggacgac 1020

gacgacaagt gaatcgat 1038

<210> 88

<211> 371

<212> PRT

<213> Ricinus communis

<400> 88

Met Leu Lys Val Pro Cys Cys Asn Ala Thr Asp Pro Ile Gln Ser Leu

1 5 10 15

Ser Ser Gln Cys Arg Phe Leu Thr His Phe Asn Asn Arg Pro Tyr Phe

20 25 30

Thr Arg Arg Pro Ser Ile Pro Thr Phe Phe Ser Ser Lys Asn Ser Ser

35 40 45

Ala Ser Leu Gln Ala Val Val Ser Asp Ile Ser Ser Val Glu Ser Ala

50 55 60

Ala Cys Asp Ser Leu Ala Asn Arg Leu Arg Leu Gly Lys Leu Thr Glu

65 70 75 80

Asp Gly Phe Ser Tyr Lys Glu Lys Phe Ile Val Arg Ser Tyr Glu Val

85 90 95

Gly Ile Asn Lys Thr Ala Thr Val Glu Thr Ile Ala Asn Leu Leu Gln

100 105 110

Glu Val Gly Cys Asn His Ala Gln Ser Val Gly Phe Ser Thr Asp Gly

115 120 125

Phe Ala Thr Thr Thr Ser Met Arg Lys Met His Leu Ile Trp Val Thr
 130 135 140
 Ala Arg Met His Ile Glu Ile Tyr Lys Tyr Pro Ala Trp Ser Asp Val
 145 150 155 160
 Val Glu Val Glu Thr Trp Cys Gln Ser Glu Gly Arg Ile Gly Thr Arg
 165 170 175
 Arg Asp Trp Ile Leu Thr Asp Tyr Ala Thr Gly Gln Ile Ile Gly Arg
 180 185 190
 Ala Thr Ser Lys Trp Val Met Met Asn Gln Asp Thr Arg Arg Leu Gln
 195 200 205
 Lys Val Thr Asp Asp Val Arg Glu Glu Tyr Leu Val Phe Cys Pro Arg
 210 215 220
 Glu Leu Arg Leu Ala Phe Pro Glu Glu Asn Asn Arg Ser Ser Lys Lys
 225 230 235 240
 Ile Ser Lys Leu Glu Asp Pro Ala Gln Tyr Ser Lys Leu Gly Leu Val
 245 250 255
 Pro Arg Arg Ala Asp Leu Asp Met Asn Gln His Val Asn Asn Val Thr
 260 265 270
 Tyr Ile Gly Trp Val Leu Glu Ser Ile Pro Gln Glu Ile Ile Asp Thr
 275 280 285
 His Glu Leu Gln Thr Ile Thr Leu Asp Tyr Arg Arg Glu Cys Gln His
 290 295 300
 Asp Asp Ile Val Asp Ser Leu Thr Ser Val Glu Pro Ser Glu Asn Leu
 305 310 315 320
 Glu Ala Val Ser Glu Leu Arg Gly Thr Asn Gly Ser Ala Thr Thr Thr
 325 330 335
 Ala Gly Asp Glu Asp Cys Arg Asn Phe Leu His Leu Leu Arg Leu Ser
 340 345 350
 Gly Asp Gly Leu Glu Ile Asn Arg Gly Arg Thr Glu Trp Arg Lys Lys
 355 360 365
 Ser Ala Arg

370

<210> 89

<211> 312

<212> DNA

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 89

```
ctttcttgcg ctatgacact tccagcaaaa ggtagggcgg gctgcgagac ggcttcccgg      60
cgctgcagtc aacaccgatg atgcttcgac cccccgaagc tccttcgggg ctgcatgggc      120
gctccgatgc cgctccaggc cgagcgctgt ttaaatagcc agggccccga ttgcaaagac      180
attatagcga gtiaccaaag ccatattcaa acacctagat cactaccact tctacacagg      240
ccactcgagc ttgtgatcgc actccgctaa gggggcgccct cttctcttc gtttcagtca      300
```

caaccgcaa ac 312

<210> 90

<211> 595

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> construct FADc portion of the hairpin RNA expression cassette

<400> 90

```
actagtatgg ctatcaagac gaacaggcag cctgtggaga agcctccgtt cacgatcggg      60
acgtgcgca aggccatccc cgcgactgt ttcgagcgct cgcgcttcg tagcagcatg      120
tacctggcct ttgacatcgc ggtcatgtcc ctgctctacg tcgctcgac gtacatcgac      180
cctgcaccgg tgcctacgtg ggtaagtac ggcatcatgt ggccgtctta ctggttcttc      240
```

```
caggtgtgtt tgagggtttt gggtgcccgt attgaggtcc tggtagcgcg catggaggag      300
aaggcgctg tcccgtgac cccccggct accctccgg cacttccag ggcgcgtacg      360
ggaagaacca gtagagcggc cacatgatgc cgtacttgac ccacgtagc accggtgcag      420
ggtcgatgta cgtcgacgcg acgtagagca gggacatgac cgcgatgtca aaggccaggt      480
acatgctgct acgaagcgcc gagcgctcga aacagtgcgc ggggatggcc ttgcgcagcg      540
tcccgatcgt gaacggagge ttctccacag gctgcctgtt cgtcttgata gccat      595
```

<210> 91

<211> 6101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> construct FADc hairpin RNA expression cassette

<400> 91

gctcttcgcc gccgccactc ctgctcgagc gcgcccgcgc gtgcgccgcc agcgccttgg	60
ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgctga tgtccatcac caggatccatg aggtctgcct	120
tgcgccggct gagccactgc ttcgtccggg cgccaagag gagcatgagg gaggactcct	180
ggtccagggt cctgacgtgg tcgcggtctt gggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc	240
gcaccgaggc cgctccaac tggctcctca gcagccgcag tcgccgccga ccctggcaga	300
ggaagacagg tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga	360
atccctacca gtcatggctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgaccct	420
cgctgccgcc gcttctcccg cacgtttctt tccagaccg tgatggcgcg agccagcgcc	480
gcacgtggc gctgcgttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa	540
cccccttgcg cgttagtgtt gccatccttt gcagaccggt gagagccgac ttgttgtgcg	600
ccacccccca caccacctcc tcccagacca attctgtcac ctttttggcg aaggcatcgg	660
cctcgccctg cagagaggac agcagtgcgc agccgctggg ggttggcgga tgcacgtca	720
ggtacccttt ctgcgctat gacattcca gcaaaaggta gggcgggctg cgagacggct	780
tcccggcgct gcatgcaaca ccgatgatgc ttcgaccccc cgaagtcct tcggggctgc	840
atgggcgctc cgatgccgt ccagggcgag cgtgtttta atagccaggc ccccgattgc	900
aaagacatta tagcgagcta ccaagccat attcaaacac ctatgact accacttcta	960
cacaggccac tcgagcttgt gatcgactc cgctaagggg gcgcctcttc ctcttcgttt	1020
cagtcaaac ccgcaaacgg cgcccatgc tctgcaggc cttctgttc ctgctggccg	1080
gcttcgccgc caagatcagc gcctccatga cgaacgagac gtccgaccgc cccctggtgc	1140
acttcacccc caacaagggc tggatgaacg accccaacgg cctgtggtac gacgagaagg	1200
acgccaagtg gcacctgtac ttccagtaca acccgaacga caccgtctgg gggacgccct	1260
tgttctgggg ccacgccag tccgacgacc tgaccaactg ggaggaccag cccatcgcca	1320
tcgccccgaa gcgcaacgac tccggcgct tctccggctc catggtggtg gactacaaca	1380
acacctccgg ctcttcaac gacaccatcg acccgcgcca gcgtgcgtg gccatctgga	1440
cctacaacac cccggagtcc gaggagcagt acatctccta cagcctggac ggcggctaca	1500
ccttcaccga gtaccagaag aaccccgctc tggccgcaa ctccaccag ttccgcgacc	1560
cgaaggtctt ctggtacgag ccctcccaga agtggatcat gaccgcgcc aagtcccagg	1620
actacaagat cgagatctac tcctccgacg acctgaagtc ctggaagctg gagtccgct	1680
tcgccaacga gggcttcttc ggctaccagt acgagtgcgc cggcctgatc gaggtcccca	1740

ccgagcagga ccccagcaag tcctactggg tgatgttcat ctccatcaac cccggcgccc	1800
cggccggcgg ctctttcaac cagtacttcg tcggcagctt caacggcacc cacttcgagg	1860
ccttcgacaa ccagtcgccg gtggtggact tcggcaagga ctactacgcc ctgcagacct	1920
tcttcaaac cgacccgacc tacgggagcg ccttgggcat cgcgtgggcc tccaactggg	1980
agtactccgc cttcgtgccc accaaccctt ggcgctcttc catgtccctc gtgcgcaagt	2040
tctccctcaa caccgagtac caggccaacc cggagacgga gctgatcaac ctgaaggcgc	2100
agccgatcct gaacatcagc aacgccggcc cctggagccg gttcgccacc aacaccacgt	2160
tgacgaaggc caacagctac aacgtcgacc tgtccaacag caccggcacc ctggagttcg	2220
agctggtgta cgcgtcaac accacccaga cgaatcctaa gtccgtgttc gcggacctct	2280
ccctctggtt caagggcctg gaggaccccg aggagtacct ccgcatgggc ttcgaggtgt	2340
ccgctctctc cttcttctg gaccgcggga acagcaaggt gaagtctgtg aaggagaacc	2400
cctacttcac caaccgatg agcgtgaaca accagccctt caagagcgag aacgacctgt	2460
cctactacaa ggtgtacggc ttgctggacc agaacatcct ggagctgtac ttcaacgacg	2520
gcgacgtcgt gtccaacaac acctacttca tgaccaccgg gaacgccctg ggctccgtga	2580
acatgacgac gggggtggac aacctgttct acatcgacaa gttccagggtg cgcgaggta	2640
agtgacaatt ggcagcagca gctcgatag tatcgacaca ctctggacgc tggctcgtgtg	2700
atggactgtt gccgccacac ttgctgcctt gacctgtgaa tatccctgcc gcttttatca	2760
aacagcctca gtgtgtttga tcttgttgtt acgcgctttt gcgagttgct agctgcttgt	2820
gctatttgcg aataccaccc ccagatccc cttccctcgt ttcatatcgc ttgcatccca	2880
accgcaactt atctacgtg tcctgctatc cctcagcgt gctcctgctc ctgctcactg	2940
cccctgcac agccttggtt tgggtccgc ctgtattctc ctggtactgc aacctgtaaa	3000
ccagcactgc aatgctgatg cacgggaagt agtgggatgg gaacacaaat ggaggatccc	3060
gcgtctcgaa cagagcgcc agaggaaacgc tgaaggtctc gcctctgtcg cacctcagcg	3120
cggcatacac cacaataacc acctgacgaa tgcgcttggt tcttcgtcca ttagcgaagc	3180
gtccggttca cacacgtgcc acgttggcga ggtggcaggt gacaatgatc ggtggagctg	3240
atggtcgaaa cgttcacagc ctagggatat cgaattcggc cgacaggacg cgcgtcaaag	3300
gtgctggtcg tgatgacct ggccggcagg tcgttgctgc tgctggttag tgattccgca	3360
acctgatatt tggcgtctta ttttggcgtg gcaaacgtg gcgcccgcga gccgggccgg	3420
cggcgatcgc gtgccccacg gctgccggaa tccaaggag gcaagagcgc ccgggtcagt	3480
tgaagggctt tacgcgcaag gtacagccgc tctgcaagg ctgctggtg gaattggacg	3540
tgcaggctct gctgaagttc tcaccaccgc tcaccagcg acaaagcacc ggtgtatcag	3600

gtccgtgtca tccactctaa agagctcgac tacgacctac tgatggccct agattcttca	3660
tcaaaaacgc ctgagacact tgcccaggat tgaaactccc tgaagggacc accagggggcc	3720
ctgagttgtt ctttcccccc gtggcgagct gccagccagg ctgtacctgt gatcgagget	3780
ggcgggaaaa taggcttcgt gtgctcaggt catgggaggt gcaggacagc tcatgaaacg	3840
ccaacaatcg cacaattcat gtcaagctaa tcagctatitt cctcttcacg agctgtaatt	3900
gtcccaaaat tctggtctac cgggggtgat ccttcgtgta cgggcccttc cctcaaccct	3960
aggatatgcgc gcatgcggtc gccgcgcaac tcgcgcgagg gccgagggtt tgggacgggc	4020
cgtcccgaat tgcagttgca cccggatgcg tggcaccttt ttgcgataa ttatgcaat	4080
ggactgctct gcaaaattct ggctctgtcg ccaaccctag gatcagcggc gtaggatttc	4140
gtaatcattc gtctgatgg ggagctaccg actaccctaa tatcagcccg actgcctgac	4200
gccagcgtec acttttgtgc acacattcca ttctgtgcca agacatttca ttgtggtgcg	4260
aagcgteccc agttacgctc acctgtttcc cgacctcctt actgttctgt cgacagagcg	4320
ggcccacagg ccggtcgag ccactagtat ggctatcaag acgaacagcg agcctgtgga	4380
gaagcctccg ttacagatcg ggacgtgag caaggccatc cccgcgact gtttcgagcg	4440
ctcgcgctt cgtagcagca tgtacctggc ctttgacatc gcggtcatgt cctgctcta	4500
cgtcgctcg acgtacatcg acctgcacc ggtgcctacg tgggtcaagt acggcatcat	4560
gtggccgctc tactggttct tccaggtgtg tttagagggt ttggttgccc gtattgaggt	4620
cctgttggtg cgcatggagg agaaggcgcc tgtcccgtg accccccgg ctacctccc	4680
ggcaccttc agggcgcgta cgggaagaac cagtagagcg gccacatgat gccgtacttg	4740
accacgtag gcaccggtgc agggtcgatg tacgtcgacg cgacgtagag caggacatg	4800
accgcatgt caaaggccag gtacatgtg ctacgaagcg ccgagcgctc gaaacagtgc	4860
gcggggatgg cttgcgag cgctccgatc gtgaacggag gcttctccac aggtgcctg	4920
ttctcttga tagcatctc gaggcagcag cagctcgat agtatcgaca cactctggac	4980
gctggtcgtg tgatggactg ttgccgccac acttgctgcc ttgacctgtg aatatccctg	5040
ccgtttttat caaacagcct cagtgtgttt gatcttgtgt gtacgcgctt ttgcgagttg	5100
ctagctgctt gtgctatttg cgaataccac cccagcatc ccttccctc gtttcatac	5160
gcttgatcc caaccgcaac ttatctacg tgcctgcta tccctcagcg ctgctcctgc	5220
tcctgctcac tgccctcgc acagccttg tttgggtcc gccgtattc tcctggtact	5280
gcaacctgta aaccagcact gcaatgctga tgcacgggaa gtagtgggat gggaacacaa	5340

atggaaagct gtagagctct tgttttccag aaggagtgc tccttgagcc tticattctc 5400

agcctcgata acctccaaag ccgctctaata tggaggagg gttcgaattt aaaagcttgg 5460

aatgttggtt cgtgcgtctg gaacaagccc agacttggtg ctactggga aaaggacat 5520

cagctccaaa aaacttgccg ctcaaaccgc gtacctctgc tttcgcgcaa tctgccctgt 5580

tgaaatgcc accacattca tattgtgacg ctgagcagt ctgtaattgc ctgagaatgt 5640

ggaatcatct gccccctgtg cgagcccatg ccaggcatgt cgcgggcgag gacaccgcc 5700

actcgtacag cagaccatta tgctacctca caatagtca taacagtac catattctc 5760

gaagctcccc aacgagcacc tccatgctct gaggggccac cccccggccc tgggtgcttg 5820

ggagggcagg tcaaccggca tggggctacc gaaatcccc accgcatccc accacccccg 5880

cgatgggaag aatctctccc cgggatgtgg gccaccacc agcacaacct gctggcccag 5940

gcgagcgta aaccatacca cacaatatc ctggcatcg gccctgaatt ccttctgccg 6000

ctctgtacc cgggtcttct gtccgaagca ggggttgcta gggatcgctc cgagtcgca 6060

aaccctgtc gcgtggcggg gcttgctga gcttgaagag c 6101

<210> 92

<211> 595

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> construct FADc portion of the hairpin RNA expression cassette

<400> 92

actagtatgg ctatcaagac gaacaggcag cctgtggaga agcctccgtt cacgatcggg 60

acgctgcga aggccatccc cgcgcactgt ttgagcgct cggcgcttcg tagcagcatg 120

tacctggcct ttgacatcgc ggtcatgtcc ctgctctacg tcgcgtcgac gtacatcgac 180

cctgcaccgg tgcctacgtg ggtcaagtac ggcatcatgt ggccgctcta ctggttcttc 240

caggtgtgtt tgagggtttt ggttggccgt attgaggtcc tgggtggcgc catggaggag 300

aaggcgctg tcccgtgac cccccggct accctcccgg caccttcag ggcgcgtacg 360

ggaagaacca gtagagcggc cacatgatgc cgtacttgac ccacgtaggc accggtgcag 420

ggtcgatgta cgtcgacgcg acgtagagca gggacatgac cgcgatgtca aaggccaggt 480

acatgctgct acgaagcgc gagcgctcga aacagtgcgc ggggatggcc ttgcgcagcg 540

tcccgatcgt gaacggagcg ttctccacag gctgcctgtt cgtcttgata gccat 595

<210> 93

<211> 5348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> construct FADc hairpin RNA expression cassette

<400> 93

gctcttcgcc gccgccactc ctgctcgagc gcgcccgcgc gtgcgccgcc agcgccttgg	60
ccttttcgcc gcgctcgtc gcgtcgctga tgtccatcac caggatcatg aggtctgcct	120
tgccgggct gagccactgc ttcgtccggg cgccaagag gagcatgagg gaggactcct	180
ggtccagggt cctgacgtgg tcgcggtctt gggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc	240
gcaccgaggc cgctccaac tggctcctca gcagccgag tcgcccgcga ccctggcaga	300
ggaagacagg tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga	360
atccctacca gtatggctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgaccct	420
cgctgccgcc gcttctcccg cacgttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcgcc	480
gcacgtggc gctgcgttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa	540
cccccttgcg cgttagtgtt gccatccttt gcagaccggt gagagccgac ttgttgtgcg	600
ccacccccca caccacctcc tccagacca attctgtcac ctttttggcg aaggcatcgg	660
cctcgccctg cagagaggac agcagtgcc agccgctggg ggttggcgga tgcacgtca	720
ggtacccttt cttagctat gacattcca gcaaaaggta gggcgggctg cgagacggct	780
tccggcgct gcatgcaaca ccgatgatgc ttgaccccc cgaagctcct tcggggctgc	840
atggcgctc cgatgccgt ccaggcgag cgtgtttta atagccagc cccgattgc	900
aaagacatta tagcgagcta ccaaagccat attcaaacac ctagatcact accattcta	960
cacaggccac tcgagcttgt gatcgactc cgctaagggg gcgcctcttc ctcttcgttt	1020
cagtcaaac ccgcaaagg cgcccatgc tgtgcaggc cttcctgttc ctgctggcgg	1080
gcttcgccgc caagatcagc gcctccatga cgaacgagac gtccgaccgc cccctggcgc	1140
acttcacccc caacaagggc tggatgaacg accccaacgg cctgtgttac gacgagaagg	1200
acgccaagtg gcacctgtac ttccagtaca acccgaacga caccgtctgg gggacgccct	1260
tgttctgggg ccacgccag tccgacgacc tgaccaactg ggaggaccag cccatcgcca	1320
tcgccccgaa gcgcaacgac tccggcgct tctccgctc catggtggtg gactacaaca	1380
acacctccgg ctctttcaac gacaccatcg acccgcgcca gcgtgcgtg gccatctgga	1440
cctacaacac cccggagtcc gaggagcagt acatctccta cagcctggac ggcggctaca	1500
ccttcaccga gtaccagaag aaccccgctc tggccgcaa ctccaccag ttccgcgacc	1560
cgaaggtctt ctggtacgag ccctcccaga agtggatcat gaccgcgcc aagtcccagg	1620

actacaagat cgagatctac tcctccgacg acctgaagtc ctggaagctg gagtccgct	1680
tcgccaacga gggcttcttc ggctaccagt acgagtcccc cggcctgac gaggtcccca	1740
ccgagcagga cccagcaag tcctactggg tgatgttcat ctccatcaac cccggcgccc	1800
cggccggcgg ctctttcaac cagtacttcg tcggcagctt caacggcacc cacttcgagg	1860
ccttcgacaa ccagtccgc gtggtggact tcggcaagga ctactacgc ctgcagacct	1920
tcttcaacac cgaccegaac tacgggagcg cctgggcat cgcgtgggcc tccaactggg	1980
agtactccgc ctctgtgccc accaaccctt ggcgctcttc catgtccctc gtgcgcaagt	2040
tctccctcaa caccgagtac caggccaacc cggagacgga gctgatcaac ctgaaggccg	2100
agccgatcct gaacatcagc aacgccggcc cctggagccg gttcgccacc aacaccacgt	2160
tgacgaaggc caacagctac aacgtcgacc tgtccaacag caccggcacc ctggagttcg	2220
agctggtgta cgccgtcaac accaccaga cgatctccaa gtcgtgttc gcggacctct	2280
ccctctggtt caagggcctg gaggaccccg aggagtacct ccgcatgggc ttcgaggtgt	2340
ccgctctctc ctcttctctg gaccgcggga acagcaaggt gaagtctgt aaggagaacc	2400
cctacttcaac caaccgcatg agcgtgaaca accagccctt caagagcgag aacgacctgt	2460
cctactacaa ggtgtacggc ttgctggacc agaatacct ggagctgtac ttcaacgacg	2520
gcgacgtcgt gtccaccaac acctacttca tgaccaccgg gaacgccctg ggctccgtga	2580
acatgacgac gggggtggac aacctgttct acatcgacaa gttccagggt gcgaggtca	2640
agtgacaatt ggcagcagca gctcggatag tatcgacaca ctctggacgc tggctcgtgtg	2700
atggactgtt gccgccacac ttgctgcctt gacctgtgaa tatccctgcc gcttttatca	2760
aacagcctca gtgtgtttga tcttgttgt acgcgctttt gcgagttgct agctgcttgt	2820
gctatttgcg aataaccacc ccagatccc ctccctcgt ttcatacgc ttgcatccca	2880
accgcaactt atctacgtg tcctgctatc cctcagcgt gctcctgctc ctgctcactg	2940
cccctgcac agccttggtt tgggctccgc ctgtattctc ctggtactgc aacctgtaaa	3000
ccagcactgc aatgctgatg cagggaagt agtgggatgg gaacacaaat ggagatccc	3060
gcgtctcgaa cagagcgcg agaggaacgc tgaaggctc gcctctgtcg cacctcagcg	3120
cggcatacac cacaataacc acctgacgaa tgcgcttggg tcttcgtcca ttagcgaagc	3180
gtccggttca cacacgtgcc acgttggcga ggtggcaggt gacaatgac ggtggagctg	3240
atggtcgaaa cgttcacagc ctagggatat cgaattcctt tcttgcgcta tgacacttcc	3300
agcaaaagggt agggcgggct gcgagacggc ttcccgcgc tgcatgcaac accgatgatg	3360
cttcgacccc ccgaagctc ttccgggctg catggcgct ccgatgccgc tccagggcga	3420

gcgctgttta aatagccagg ccccgattg caaagacatt atagcgagct accaaagcca 3480

tattcaaac cctagatcac taccatttct acacaggcca ctcgagcttg tgatcgact 3540

ccgctaaggg ggcgcctctt cctcttcgtt tcagtcacaa cccgcaaaca ctagtatggc 3600

tatcaagacg aacaggcagc ctgtggagaa gcctccgttc acgatcgga cgctgcgcaa 3660

ggccatcccc gcgcaactgt tcgagcgctc ggcgcttcgt agcagcatgt acctggcctt 3720

tgacatcgcg gtcatgtccc tgctctacgt cgcgtcgacg tacatcgacc ctgcaccggt 3780

gcctacgtgg gtcaagtacg gcatcatgtg gccgctctac tggttcttcc aggtgtgttt 3840

gagggttttg gttgcccgta ttgaggctct ggtggcgcgc atggaggaga aggcgctgt 3900

cccgtgacc ccccggtta cctcccggc acctccagg gcgctacgg gaagaaccag 3960

tagagcgcc acatgatgcc gtacttgacc cacgtaggca ccggtgcagg gtcgatgtac 4020

gtcgacgga cgtagagcag ggacatgacc gcgatgtcaa aggccaggta catgctgcta 4080

cgaagcgccg agcgctcga acagtgcgcg gggatggcct tgcgcagcgt cccgatcgtg 4140

aacggaggct tctccacagg ctgcctgttc gtcttgatag ccatctcgag gcagcagcag 4200

ctcgatagt atcgacacac tctggacgt ggtcgtgtga tggactgttg ccgccacact 4260

tgctgccttg acctgtgaat atccctgccg cttttatcaa acagcctcag tgtgtttgat 4320

cttgtgtga cgcgcttttg cgagtgtga gctgcttggt ctatttgca ataccacccc 4380

cagcatcccc ttccctcgtt tcatatcgt tgcacccaa ccgcaactta tctacgtgt 4440

cctgctatcc ctcagcgctg ctctgctcc tgctcactgc cctcgaca gccttggttt 4500

gggctccgcc tgtattctcc tggtagtga acctgtaaac cagcactgca atgctgatgc 4560

acgggaagta gtgggatggg aacacaaatg gaaagctgta gagctcttgt tttccagaag 4620

gagttgctcc ttgagccttt cattctcagc ctcgataacc tccaaagccg ctctaattgt 4680

ggagggggtt cgaattttaa agcttggaat gttggttcgt gcgtctggaa caagcccaga 4740

cttgttgctc actgggaaaa ggaccatcag ctccaaaaaa cttgccgctc aaaccgcgta 4800

cctctgcttt cgcgcaatct gccctgttga aatgccacc acattcatat tgtgacgctt 4860

gagcagtctg taattgcctc agaattgtga atcatctgcc cctgtgcga gccatgcca 4920

ggcatgtcg ggcgaggac acccgccact cgtacagcag accattatgc tacctcacia 4980

tagttcataa cagtgacat atttctcgaa gctcccaac gagcacctcc atgctctgag 5040

tggccacccc ccggccctgg tgcttcgga gggcaggtca accggcatgg ggctaccgaa 5100

atccccgacc ggatccacc accccgcga tgggaagaat ctctccccgg gatgtgggcc 5160

caccaccagc acaacctgct ggcccaggcg agcgtcaaac cataccacac aaatatcctt 5220
ggcatcggcc ctgaattcct tctgccgctc tgcctaccgg tgcttctgtc cgaagcaggg 5280
gttgctaggg atcgctccga gtccgcaaac ccttgtcgcg tggcggggct tgttcgagct 5340
tgaagagc 5348
<210> 94
<211> 1220
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> construct FADc portion of the hairpin RNA expression cassette
<400> 94
actagttcac ttgtggaacc agagcgcgga gtcgtcctcg ggcgcgctcg ggacgacgta 60

gcggcagtcg cgccagtcct cccacagggc gcggccgacc cagcggtgt cggacttgta 120
gtacttgccc aggatgggccc tgatggcggc ggaggcctcc tcggcgtggt agtgcgggat 180
ggtgtcgaag aggtggtgca gcacgtgggt gtcggagatg tggtcagga tgttgtccat 240
gaaggcgagg cccatggagc ggtccacggt ggccatggcg ccgcgcagcc agtcccagtc 300
cttctcgaag tagtgcggca gcgccgggtg cgtgtgctgg agcagcgtga tgagcacgag 360
ccacatgttc acgatcaggt agggcaccac gtaggtcttg accagccagg cccagcccat 420
ggtgcggccc agcacgtga gcccgtgag caccgccacc agcgccaggt cggagatgac 480

cacctcgatg cgctcgcgct tgctgaagat gggcgaccac gggtaaagt ggttggcgaa 540
gcgcgggtac ggccgcgagg cgacgttgaa catgaggtac agcggccagc ccagggtcag 600
ggtgaccagc accttgccca tgcggatggg cagccactcc tccactcca ggccctcgtg 660
cgccactgcg cggatgcggcg gcacaaacac ctgctccttg tccaggcacc ccgtgttgga 720
gtggtggcgg cggatgcgagt gcttccagga gtagtagggc accagcagca ggctgtggaa 780
caccaggccc acgccgtcgt tgatggcctg gctggaggaa aaggcctggt ggccgcactc 840
gtgcgcgcac acccagacac ccgtgccgaa ggcgccctgg aaggtgccgg gagggtagcc 900

gggggggtca gcgggacagg cgccttctcc tccatgcgcg ccaccaggac ctcaatcgg 960
gcaacaaaaa cctcaaaaa cactggaag aaccagtaga gcggccacat gatgccgtac 1020
ttgaccacag taggcaccgg tgcagggtcg atgtacgtcg acgcgacgta gagcagggac 1080
atgaccgcga tgtcaaaggc caggtacatg ctgctacgaa gcgccgagcg ctcgaaacag 1140
tgccggggga tggccttgcg cagcgtcccg atcgtgaacg gaggtttctc cacaggtgc 1200
ctgttcgtct tgatagccat 1220
<210> 95

<211> 6726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> construct FADc hairpin RNA expression cassette

<400> 95

gtctttcgcc gccgccaactc ctgctcgagc gcgcccgcgc gtgcgccgcc agcgccttgg	60
ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgctga tgtccatcac caggltccatg aggtctgcct	120
tgcgccggct gagccactgc ttctgccggg cgccaagag gagcatgagg gaggactcct	180
ggtccagggt cctgacgtgg tcgcggtctt gggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc	240
gcaccgaggc cgctccaac tggctcctca gcagccgcag tcgccgccga ccctggcaga	300
ggaagacagg tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga	360
atccctacca gtcatggctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgaccct	420
cgctgccgcc gcttctcccg cacgtttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcgcc	480
gcacgtgggc gctgcgttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa	540
cccccttgcg cgtagtggt gccatcctt gcagaccggt gagagccgac ttgttgcg	600
ccacccccca caccacctcc tcccagacca attctgtcac cttttggcg aaggcatcgg	660
cctcggcctg cagagaggac agcagtgcc agccgctggg ggttggcgga tgcacgtca	720
ggtacccttt ctgcgctat gacacttcca gcaaaaggta gggcgggctg cgagacggct	780
tcccggcgt gcattgcaaca ccgatgatgc ttcgaccccc cgaagctcct tcggggctgc	840
atgggcgctc cgatgccgt ccaggcgag cgctgtttaa atagccaggc cccgattgc	900
aaagacatta tagcgagcta ccaagccat attcaaacac ctagatcact accacttcta	960
cacaggccac tcgagcttgt gatcgcactc cgttaagggg gcgcctcttc ctcttcgttt	1020
cagtcaaac ccgcaaacgg cgcccatgc tgctgcaggc cttctgttc ctgctggccg	1080
gcttcgcgc caagatcagc gcctccatga cgaacgagac gtccgaccgc cccctggtgc	1140
acttcacccc caacaagggc tggatgaacg accccaacgg cctgtggtac gacgagaagg	1200
acgccaagtg gcacctgtac ttccagtaca acccgaacga caccgtctgg gggacgcct	1260
tgttctgggg ccacgccag tccgacgacc tgaccaactg ggaggaccag cccatcgcca	1320
tcgccccgaa gcgcaacgac tccggcgct tctccgctc catggtgggtg gactacaaca	1380
acacctccgg cttcttcaac gacaccatcg acccgcgcca gcctgcgtg gccatctgga	1440
cctacaacac cccggagtcc gaggagcagt acatctccta cagcctggac ggcggctaca	1500
ccttcaccga gtaccagaag aaccccgctg tggccgcaa ctccaccag ttccgcgacc	1560

cgaaggtctt ctggtacgag ccctcccaga agtggatcat gaccgcggcc aagtcccagg 1620

actacaagat cgagatctac tcttccgacg acctgaagtc ctggaagctg gagtccgct 1680

tcgccaacga gggcttcctc ggctaccagt acgagtcccc cggcctgacg gaggtcccca 1740

ccgagcagga cccagcaag tctactggg tgatgttcat ctccatcaac cccggcgccc 1800

cggccggcgg ctcttcaac cagtacttcg tcggcagctt caacggcacc cacttcgagg 1860

ccttcgacaa ccagtcccgc gtggtggact tcggcaagga ctactacgcc ctgcagacct 1920

tcttcaacac cgaccgacc tacgggagcg ccttgggcat cgcgtgggcc tccaactggg 1980

agtactccgc cttcgtgccc accaaccctt ggcgtcctc catgtcctc gtgcgcaagt 2040

tctccctcaa caccgagtac caggccaacc cggagacgga gctgatcaac ctgaaggccg 2100

agccgatcct gaacatcagc aacgcgggcc cctggagccg gttcgccacc aacaccacgt 2160

tgacgaaggc caacagctac aacgtcgacc tgtccaacag caccggcacc ctggagttcg 2220

agctggtgta cgcgtcaac accaccaga cgatctcaa gtccgtgttc gcggacctct 2280

ccctctggtt caagggcctg gaggaccccg aggagtacct ccgcatgggc ttcgaggtgt 2340

ccgctcctc cttcttcctg gaccgcggga acagcaaggt gaagttcgtg aaggagaacc 2400

cctacttcac caaccgatg agcgtgaaca accagccctt caagagcgag aacgacctgt 2460

cctactacaa ggtgtacggc ttgctggacc agaacatcct ggagctgtac ttcaacgacg 2520

gcgacgtcgt gtccaccaac acctacttca tgaccaccgg gaacgccctg ggctccgtga 2580

acatgacgac gggggtggac aacctgttct acatcgacaa gttccagtg cgcgaggtca 2640

agtgacaatt ggcagcagca gctcggatag tatcgacaca ctctggacgc tggctcgtgtg 2700

atggactgtt gccgccacac ttgctgcctt gacctgtgaa tatccctgcc gcttttatca 2760

aacagcctca gtgtgttga tcttgtgtgt acgcgtttt gcgagttgct agctgcttgt 2820

gtatattgcg aataccacc ccagcatecc ctccctcgt ttcatatcgc ttgcatccca 2880

accgcaactt atctacgtg tctgctatc cctcagcgt gctcctgctc ctgctcactg 2940

cccctcgac agccttggtt tgggtccgc ctgtattctc ctggtactgc aacctgtaaa 3000

ccagcactgc aatgctgatg cacgggaagt agtgggatgg gaacacaaat ggaggatccc 3060

gcgtctcgaa cagagcgcg agaggaacgc tgaaggtctc gcctctgtcg cacctcagcg 3120

cggcatacac cacaataacc acctgacgaa tgcgttggg tcttcgtcca ttagcgaagc 3180

gtccggttca cacacgtgcc acgttggcga ggtggcaggt gacaatgatc ggtggagctg 3240

atggtcgaaa cgttcacagc ctagggatat cgaattcggc cgacaggacg cgcgtcaaag 3300

gtgctggctg tgiatgccct ggccggcagg tcgttgctgc tgctggtag tgattccgca 3360
accctgattt tggcgtctta ttttggcgtg gcaaacgtg gcgcccgcga gccgggccgg 3420
cggcgatgcg gtgccccacg gctgccggaa tccaaggag gcaagagcgc ccgggtcagt 3480
tgaagggtt tacgcgaag gtacagccgc tctgcaagg ctgctgggtg gaattggacg 3540
tgcaggtcct gctgaagttc ctccaccgcc tcaccagcgg acaaagcacc ggtgtatcag 3600
gtccgtgtca tcactctaa agagctcgac tacgacctac tgatggccct agattcttca 3660
tcaaaaacgc ctgagacct tgcccaggat tgaaactccc tgaagggacc accaggggcc 3720

ctgagttgtt cttcccccc gtggcgagct gccagccagg ctgtacctgt gatcgaggct 3780
ggcgggaaaa taggcttcgt gtgctcaggt catgggaggt gcaggacagc tcatgaaacg 3840
ccaacaatcg cacaattcat gtcaagctaa tcagctatit cctcttcacg agctgtaatt 3900
gtcccaaat tctggtctac cgggggtgat cttcgtgta cgggcccttc cctcaaccct 3960
aggtatgctg gcatgcggtc gccgcgcaac tcgcgcgagg gccgagggtt tgggacgggc 4020
cgtccgaaa tgcagttgca cccgatgctg tggcaccttt tttgcgataa tttatgcaat 4080
ggactgctct gcaaaattct ggctctgctg ccaaccctag gatcagcggc gtaggatttc 4140

glaatcattc gtctgatgg ggagctaccg actaccctaa taccagcccg actgcctgac 4200
gccagcgtcc acttttctgc acacattcca ttcgtgcca agacatttca ttgtgtgctg 4260
aagctcccc agttacgtc acctgtttcc cgacctctt actgttctgt cgacagagcg 4320
ggccacagc cggctcgag ccactagttc acttgtgga ccagagcgcg gattcgtcct 4380
cgggcgcgtc cgggacgac tagcggcagt cgcgccagtc ctccacagc gcgcggccga 4440
cccagcggct gtcggactgg tagtacttgc ccagatggg cctgatggcg gcggaggcct 4500
cctcggcgtg gtagtcggg atggtgctga agaggtggtg cagcacgtgg gtgtcggaga 4560

tgtggtgcag gatgttctcc atgaaggcg ggcccatgga gcggtccacg gtggccatgg 4620
cgccgcgag ccagtcacg tcttctcga agtagtcgg cagcgccggg tgcgtgtgct 4680
ggagcagcgt gatgagcag agccacatgt tcacgatcag gtagggcacc acgtaggtct 4740
tgaccagcca ggccagccc atggtgcggc ccagcacgtg gagcccgtg agcaccgcca 4800
ccagcgcag gtcggagatg accacctcga tgcgtcgcg cttgctgaag atggcgacc 4860
acgggtcaaa gtggttggcg aagcggggt acggccgca ggcgagttg aacatgaggt 4920
acagcggcca gccagggtc agggtagcca gcaccttgc catgcggatg ggcagccact 4980

cctccactc caggccctcg tgcgccactg cgcggtgcgg cggcacaac acctcgtcct 5040
tgtccaggca cccgtgttg gattggtggc ggcggtgcga gtgcttcag gattagtagg 5100
gcaccagcag caggctgtgg aacaccaggc ccacgcgtc gttgatggcc tggctggagg 5160

aaaaggcctg gtggccgcac tcgtgcgcgc acaccagac acccgtgccg aaggcgccct 5220
 ggaaggtgcc gggagggtag ccgggggggt cagcgggaca ggcgccttct cctccatgcg 5280
 cgccaccagg acctcaatac gggcaaccaa aacctcaaa cacacctgga agaaccagta 5340
 gagcgccac atgatgccgt acttgaccca cgtaggcacc ggtgcagggt cgatgtacgt 5400

 cgacgcgacg tagagcaggg acatgaccgc gatgtcaaag gccaggtaca tgctgctacg 5460
 aagcgccgag cgctcgaac agtgcgcggg gatggccttg cgcagcgtcc cgatcgtgaa 5520
 cggaggcttc tcacaggtt gcctgttcgt cttgatagcc atctcgaggc agcagcagct 5580
 cggatagtat cgacacactc tggacgttg tcgtgtgatg gactgttgcc gccacacttg 5640
 ctgccttgac ctgtgaatat ccctgccgt tttatcaaac agcctcagtg tgtttgatct 5700
 tgtgtgtacg cgcttttgcg agttgctagc tgcttgtgct atttgcaat accaccccca 5760
 gcatccctt ccctcgttc atatcgcttg catccaacc gcaacttacc tacgctgtcc 5820

 tgctatccct cagcgtgct cctgctcctg ctactgccc ctgcacagc cttggtttgg 5880
 gctccgctg tattctcctg gtactgcaac ctgtaacca gcactgcaat gctgatgcac 5940
 gggaagttagt gggatgggaa cacaattgga aagctgtaga gctctgttt tccagaagga 6000
 gttgctcctt gagcctttca ttctcagcct cgataacctc caaagccgct ctaattgtgg 6060
 agggggttcg aatttaaaag cttggaatgt tggttcgtgc gtctggaaca agcccagact 6120
 tgttgctcac tgggaaaagg accatcagct ccaaaaaact tgccgctcaa accgcgtacc 6180
 tctgctttcg cgcaatctgc cctgttgaat tcgccaccac attcatattg tgacgcttga 6240

 gcagtctgta attgcctcag aatgtggaat catctgccc ctgtgcgagc ccatgccagg 6300
 catgtcgcgg gcgaggacac ccgccactcg tacagcagac cattatgcta cctcacaata 6360
 gttcataaca gtgacatat ttctcgaagc tcccaacga gcacctccat gctctgagtg 6420
 gccaccccc ggccctggtg cttgcggagg gcaggtcaac cggcatgggg ctaccgaaat 6480
 ccccgaccgg atcccaccac ccccgcatg ggaagaatct ctccccggga tgtgggcccc 6540
 ccaccagcac aacctgctgg ccagggcgag cgtcaaacca taccacaaa atatccttgg 6600
 categgccct gaattccttc tgccgctctg ctaccgggtg cttctgtccg aagcagggtt 6660

 tgctagggat cgctccgagt ccgcaaacc ttgtcgcgtg gcggggcttg ttcgagcttg 6720
 aagagc 6726

 <210> 96
 <211> 1220
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> construct FADc portion of the hairpin RNA expression cassette

<400> 96

actagttcac ttgtggaacc agagcgcgga gtcgtcctcg ggcgcgctccg ggacgacgta 60
gcggcagtcg cgccagtcct cccacagggc gcggccgacc cagcggtgt cggactggta 120
gtacttgccc aggatgggcc tgatggcggc ggaggcctcc tcggcggtgt agtgcgggat 180

gggtgctgaag aggtggtgca gcacgtgggt gtcggagatg tggcgagga tgttgtccat 240
gaaggcgagg cccatggagc ggtccacggt ggccatggcg ccgcgagcc agtcccagtc 300
cttctcgaag tagtgcggca gcgccgggtg cgtgtgctgg agcagcgtga tgagcacgag 360
ccacatgttc acgatcaggt agggcaccac gtaggtcttg accagccagg cccagcccat 420
gggtgcggccc agcacgctga gcccgctgag caccgccacc agcgccaggt cggagatgac 480
cacctcgatg cgctcgcgct tgctgaagat gggcgaccac gggtcaaagt ggttggcgaa 540
gcgcgggtac ggccgcgagg cgacgttgaa catgaggtac agcggccagc ccagggtcag 600

ggtgaccagc accttgccca tgcggatggg cagccactcc tccactcca ggcctcgtg 660
cgccactcgc cgggtgcggc gcacaaacac ctgctccttg tccaggcacc ccgtgttgga 720
gtggtggcgg cgggtgcgagt gcttccagga gtagtagggc accagcagca ggctgtggaa 780
caccaggccc acgccgtcgt tgatggcctg gctggaggaa aaggcctggt ggccgcactc 840
gtgcgcgcac acccagacac ccgtgccgaa ggccgctgg aaggtgccgg gagggtagcc 900
gggggggtca ggggacagg cgcttctcc tccatgcgcg ccaccaggac ctcaatcgg 960
gcaacaaaaa cctcaaaaca cacctggaag aaccagtaga gcggccacat gatgccgtac 1020

ttgaccacag taggcaccgg tgcagggtcg atgtacgtcg acgcgacgta gagcaggagc 1080
atgaccgcga tgtcaaaggc caggtacatg ctgctacgaa gcgccgagcg ctgaaacag 1140
tgcgcgggga tggccttgcg cagcgtcccg atcgtgaacg gaggtttctc cacaggtgc 1200
ctgttcgtct tgatagccat 1220

<210> 97

<211> 5973

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> construct FADc hairpin RNA expression cassette

<400> 97

gctcttcgcc gccgccactc ctgctcgagc gcgcccgcgc gtgcgccgcc agcgcccttg 60

ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgctga tgtccatcac caggtccatg aggtctgcct 120

tgccgcccgt gagccactgc ttctgtccggg cggccaagag gagcatgagg gaggactcct	180
ggtccagggt cctgacgtgg tcgcggtctt gggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc	240
gcaccgaggc cgcctccaac tggctcctca gcagccgcag tcgccgccga ccctggcaga	300
ggaagacagg tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga	360
atccctacca gtcatggctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgaccct	420
cgctgccgcc gcttctcccg cacgttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcgcc	480
gcacgctggc gctgcgcttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa	540
cccccttgcg cgttagtggt gccatccttt gcagaccggt gagagccgac ttgtttgcg	600
ccacccccca caccacctcc tcccagacca attctgtcac ctttttggcg aaggcatcgg	660
cctcgccctg cagagaggac agcagtgccc agccgctggg ggttggcgga tgcacgtca	720
ggtacccttt ctgtcgctat gacacttcca gcaaaaaggta gggcgggctg cgagacggct	780
tcccggcgct gcatgcaaca ccgatgatgc ttcgaccccc cgaagctcct tcggggctgc	840
atgggcgctc cgatgccgct ccagggcgag cgctgtttaa atagccaggc ccccgattgc	900
aaagacatta tagcgagcta ccaaagccat attcaaacac ctagatcact accacttcta	960
cacaggccac tcgagcttgt gatcgactc cgctaagggg gcgcctcttc ctcttcgttt	1020
cagtcaaac ccgcaaacgg cgcgccatgc tgtgcaggc cttcctgttc ctgctggccg	1080
gcttcgcgc caagatcagc gcctccatga cgaacgagac gtccgaccgc cccctggcgc	1140
acttcacccc caacaagggc tggatgaacg accccaacgg cctgtggtac gacgagaagg	1200
acgccaagtg gcacctgtac ttccagtaca acccgaacga caccgtctgg gggacgccct	1260
tgttctgggg ccacgccag tccgacgacc tgaccaactg ggaggaccag cccatcgcca	1320
tcgccccgaa gcgcaacgac tccggcgctt tctccgctc catggtgggt gactacaaca	1380
acacctccgg ctctttcaac gacaccatcg acccgccca gcgtgcgtg gccatctgga	1440
cctacaacac cccggagtcg gaggagcagt acatctccta cagcctggac ggcggctaca	1500
ccttcaccga gtaccagaag aaccccgctc tggccgcaa ctccaccag ttccgcgacc	1560
cgaaggtctt ctggtacgag ccctcccaga agtggatcat gaccgcgcc aagtcaccag	1620
actacaagat cgagatctac tctccgacg acctgaagtc ctggaagctg gagtccgct	1680
tcgccaacga gggcttcttc ggctaccagt acgagtcccc cggcctgatc gaggtcccca	1740
ccgagcagga cccagcaag tctactggg tgatgttcat ctccatcaac cccggcgccc	1800
cggccggcgg ctctttcaac cagtacttcg tcggcagctt caacggcacc cacttcgagg	1860
ccttcgacaa ccagtcgcg gtgggtggact tcggcaagga ctactacgcc ctgcagacct	1920
tcttcaacac cgacccgacc tacgggagcg ccttgggcat cgcgtgggcc tccaactggg	1980

agtactccgc cticgtgccc accaaccctt ggcgctcttc catgtccctc gtgcgcaagt	2040
tctccctcaa caccgagtac caggccaacc cggagacgga gctgatcaac ctgaaggccg	2100
agccgatact gaacatcagc aacgccggcc cctggagccg gttcgccacc aacaccacgt	2160
tgacgaaggc caacagctac aacgtcgacc tgtccaacag caccggcacc ctggagttcg	2220
agctggtgta cgccgtcaac accaccaga cgaatcctaa gtccgtgttc gcggacctct	2280
ccctctggtt caagggcctg gaggaccccg aggagtacct ccgcatgggc ttcgagggtg	2340
ccgctctctc ctcttctctg gaccgcggga acagcaaggt gaagtctgtg aaggagaacc	2400
cctacttcac caaccgcatg agcgtgaaca accagccctt caagagcgag aacgacctgt	2460
cctactacaa gggttacggc ttgctggacc agaatacctt ggagctgtac ttcaacgacg	2520
gcgacgtcgt gtccaccaac acctacttca tgaccaccgg gaacgccctg ggctccgtga	2580
acatgacgac gggggtggac aacctgttct acatcgacaa gttccagggtg cgcgaggtea	2640
agtgacaatt ggcagcagca gctcggatag tatcgacaca ctctggacgc tggctcgtgtg	2700
atggactgtt gccgccacac ttgctgcctt gacctgtgaa tatccctgcc gcttttatca	2760
aacagccctc gtgtgtttga tcttgtgtgt acgcgctttt gcgagtgtct agctgcttgt	2820
gctattttcg aataccaccc ccagcatccc ctccctcgt ttcatacgc ttgcatccca	2880
accgcaactt atctacgtg tcttctatc cctcagcgt gctcctgctc ctgctcactg	2940
cccctcgac agccttggtt tgggctccgc ctgtattctc ctggtactgc aacctgtaaa	3000
ccagcactgc aatgctgatg caccggaagt agtgggatgg gaacacaaat ggaggatccc	3060
gcgtctcgaa cagagcgcg cagaggaacgc tgaaggcttc gcctctgtcg caccctcagcg	3120
cggcatacac cacaataacc acctgacgaa tgcgcttggg tcttcgtcca ttagcgaagc	3180
gtccggttca cacacgtgcc acgttggcga ggtggcaggt gacaatgatc ggtggagctg	3240
atggtcgaaa cgttcacagc ctagggatat cgaattcctt tcttgcgcta tgacacttec	3300
agcaaaaggt agggcgggct gcgagacggc ttcccggcg tgcatgcaac accgatgatg	3360
cttcgacccc ccgaagctcc ttcggggctg catgggcgct ccgatgccgc tccagggcga	3420
gcgtgtttta aatagccagg cccccgattg caaagacatt atagcgagct accaaagcca	3480
tattcaaaca cctagatcac taccattctt acacaggcca ctcgagcttg tgatcgact	3540
ccgctaaggg ggcgcctctt cctcttctgt tcagtcacaa cccgcaaaca ctagtctact	3600
tgtggaacca gagcgcgag tgcctctcgg gcgcgtccgg gacgacgtag cggcagtcgc	3660
gccagtctc ccacaggcg cgcccgacc agcggctgtc ggactggtag tacttgccca	3720
ggatgggct gatggcgcg gaggcctctt cggcgtggta gtgcgggatg gtgctgaaga	3780

ggtgggtgcag cacgtgggtg tcggagatgt ggtgcaggat gttgtccatg aaggcgggc 3840

 ccatggagcg gtccacggtg gccatggcgc cgcgcagcca gtccagtc tctcgaagt 3900
 agtgcggcag cgcgggtgc gtgtgctgga gcagcgtgat gagcacgagc cacatgttca 3960
 cgatcaggta gggcaccacg taggtcttga ccagccaggc ccagcccatg gtgcggccca 4020
 gcacgttag cccgctgagc accgccacca gcgccaggtc ggagatgacc acctcgatgc 4080
 gctcgcgctt gctgaagatg ggcgaccacg ggtcaaagt gttggcgaag cgcgggtacg 4140
 gccgcgaggc gacgttgaac atgaggtaca gcggccagcc cagggtcagg gtgaccagca 4200
 ccttgcccat gcggatgggc agccactcct cccactccag gccctcgtgc gccactgcgc 4260

 ggtgcggcgg cacaacacc tcgtccttgt ccaggcacc cgtgttggag tggcggcggc 4320
 ggtgcgagt ctccaggag tagtagggca ccagcagcag gctgttgaac accaggccca 4380
 cgccgtcgtt gatggcctgg ctggaggaaa aggcctggtg gccgcactcg tgcgcgcaca 4440
 ccagacacc cgtgccgaag gcgccttga aggtgcggg aggttagccg ggggggtcag 4500
 cgggacaggc gccttctcct ccatgcgcgc caccaggacc tcaatacggg caacaaaac 4560
 cctcaaacac acctggaaga accagtagag cggccacatg atgccgtact tgaccacgt 4620
 aggcaccggt gcagggtcga tgtacgtcga cgcgacgtag agcagggaca tgaccgcgat 4680

 gtcaaaggcc aggtacatgc tgctacgaag cgcgagcgc tcgaaacagt gcgcggggat 4740
 ggcttgcgc agcgtcccga tcgtgaacgg aggccttctc acaggctgcc tgttcgtctt 4800
 gatagccatc tcgaggcagc agcagctcgg atagtatga cacactctgg acgtggtcg 4860
 tgtgatggac tgttgccgc acacttctg ccttgacctg tgaatatccc tgccgtttt 4920
 atcaaacagc ctcatgtgt ttgatcttgt gtgtacgcgc ttttgcgagt tgctagctgc 4980
 ttgtgctatt tgcaatacc acccccagca tccccctccc tcgtttcata tcgcttgcatt 5040
 cccaaccgca acttatctac gctgtcctgc tatccctcag cgtgctcct getcctgctc 5100

 actgcccctc gcacagcctt ggtttgggct ccgctgtat tctcctgta ctgcaacctg 5160
 taaaccagca ctgcaatgct gatgcacggg aagtagtggg atgggaacac aaatggaaag 5220
 ctgtagagct ctgttttcc agaaggagt gtccttgag cctttcattc tcagcctcga 5280
 taacctcaa agccgtctta attgtggagg gggttcgaat ttaaaagctt ggaatgttgg 5340
 ttcgtgcgtc tggaacaagc ccagacttgt tgcctactgg gaaaaggacc atcagctcca 5400
 aaaaacttgc cgctcaaac gcgtacctct gctttcgcgc aatctgccct gttgaaatcg 5460
 ccaccacatt catatttga cgcttgagca gtctgtaatt gcctcagaat gtggaatcat 5520

ctgccccctg tgcgagccca tgccaggcat gtcgcgggcg aggacacccg ccactcgtac 5580
 agcagaccat tatgctacct cacaatagtt cataacagt accatatttc tcgaagctcc 5640
 ccaacgagca cctccatgct ctgagtggcc accccccggc cctgggtgctt gcggaggggca 5700
 ggtcaaccgg catggggcta ccgaaatccc cgaccggatc ccaccacccc cgcgatggga 5760
 agaatctctc cccgggaigt gggcccacca ccagcacaac ctgctggccc aggcgagcgt 5820
 caaacatac cacacaaata tccttggcat cggccctgaa ttcttctgc cgctctgcta 5880
 cccgggtgctt ctgtccgaag caggggttgc tagggatcgc tccgagtcgc caaaccttg 5940

tcgcgtggcg gggcttgctc gagcttgaag agc 5973

<210> 98
 <211> 1221
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> codon-optimized construct
 <400> 98

actagtatgg ccaccgcac cactttctcg gcgttcaatg cccgctgcgg cgacctgcgt 60
 cgctcggcgg gctccgggcc ccggcgccca gcgaggcccc tccccgtgcg cgggcgcgcc 120
 gaggtgcacg tgcaggtgac ccactccctg gccccgaga agcgcgagat ctccaactcc 180
 ctgaacaact gggcccagga gaacatcctg gtgctgctga aggacgtgga caagtgtctg 240
 cagccctccg acttctgcc cgactccgcc tccgagggtc tcgacgagca ggtgatggag 300

ctgcgcaagc gctgcaagga gatccccgac gactacttca tcgtgctggt gggcgacatg 360
 atcaccgagg aggccctgcc cacctaccag accatgctga acaccctgga cggcgtgcgc 420
 gacgagaccg gcgcctccct gacccccctg gccatctgga cccgcgcctg gaccgccgag 480
 gagaaccgcc acggcgacct gctgaacaag tacctgtacc tgtccggccg cgtggacatg 540
 aagcagatcg agaagaccat ccagtacctg atcggtccg gcattggacc ccgcaccgag 600
 aacaaccctt acctgggctt catctacacc tccttcagg agcgcgccac ctccatctcc 660
 cacggcaaca ccgcccgcct ggccaaggag cacggcgacc tgaagctggc ccagatctgc 720

ggcatcatcg ccgccgacga gaagcgccac gagaccgctt acaccaagat cgtggagaag 780
 ctgttcgaga tcgacccga cggcaccgtg ctggccctgg ccgacatgat gcgcaagaag 840
 gtgtccatgc ccgccacct gatgtacgac ggccaggacg acaacctgtt cgagaacttc 900
 tcctccgtgg cccagcgctt gggcgtgtac accgccaagg actacgccga catctggag 960
 ttcttggtgg gccgctggga catcgagaag ctgaccggcc tgtccggcga gggccgcaag 1020
 gccaggact acgtgtgcac cctgcccccc cgcacccgcc gcctggagga gcgcgccag 1080

tcccgcgtga agaaggcctc cgccaccccc ttctcctgga tcttcggcgcg cgagatcaac 1140

ctgatggact acaaggacca cgacggcgac tacaaggacc acgacatcga ctacaaggac 1200

gacgacgaca agtgaatcga t 1221

<210> 99

<211> 390

<212> PRT

<213> Olea europae

<400> 99

Met Ala Leu Lys Leu Cys Phe Pro Pro His Lys Met Pro Ser Phe Pro

1 5 10 15

Asp Ala Arg Ile Arg Ser His Arg Val Phe Met Ala Ser Thr Ile His

20 25 30

Ser Pro Ser Met Glu Val Gly Lys Val Lys Lys Pro Phe Thr Pro Pro

35 40 45

Arg Glu Val His Val Gln Val Thr His Ser Leu Ala Pro Glu Lys Arg

50 55 60

Glu Ile Phe Asn Ser Leu Asn Asn Trp Ala Gln Glu Asn Ile Leu Val

65 70 75 80

Leu Leu Lys Asp Val Asp Lys Cys Trp Gln Pro Ser Asp Phe Leu Pro

85 90 95

Asp Ser Ala Ser Glu Gly Phe Asp Glu Gln Val Met Glu Leu Arg Lys

100 105 110

Arg Cys Lys Glu Ile Pro Asp Asp Tyr Phe Ile Val Leu Val Gly Asp

115 120 125

Met Ile Thr Glu Glu Ala Leu Pro Thr Tyr Gln Thr Met Leu Asn Thr

130 135 140

Leu Asp Gly Val Arg Asp Glu Thr Gly Ala Ser Leu Thr Pro Trp Ala

145 150 155 160

Ile Trp Thr Arg Ala Trp Thr Ala Glu Glu Asn Arg His Gly Asp Leu

165 170 175

Leu Asn Lys Tyr Leu Tyr Leu Ser Gly Arg Val Asp Met Lys Gln Ile

180 185 190
 Glu Lys Thr Ile Gln Tyr Leu Ile Gly Ser Gly Met Asp Pro Arg Thr
 195 200 205
 Glu Asn Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Ile Tyr Thr Ser Phe Gln Glu Arg
 210 215 220
 Ala Thr Phe Ile Ser His Gly Asn Thr Ala Arg Leu Ala Lys Glu His

225 230 235 240
 Gly Asp Leu Lys Leu Ala Gln Ile Cys Gly Ile Ile Ala Ala Asp Glu
 245 250 255
 Lys Arg His Glu Thr Ala Tyr Thr Lys Ile Val Glu Lys Leu Phe Glu
 260 265 270
 Ile Asp Pro Asp Gly Thr Val Leu Ala Leu Ala Asp Met Met Arg Lys
 275 280 285
 Lys Val Ser Met Pro Ala His Leu Met Tyr Asp Gly Gln Asp Asp Asn

290 295 300
 Leu Phe Glu Asn Phe Ser Ser Val Ala Gln Arg Leu Gly Val Tyr Thr
 305 310 315 320
 Ala Lys Asp Tyr Ala Asp Ile Leu Glu Phe Leu Val Gly Arg Trp Asp
 325 330 335
 Ile Glu Lys Leu Thr Gly Leu Ser Gly Glu Gly Arg Lys Ala Gln Asp
 340 345 350
 Tyr Val Cys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Arg Arg Leu Glu Glu Arg Ala

355 360 365
 Gln Ser Arg Val Lys Lys Ala Ser Ala Thr Pro Phe Ser Trp Ile Phe
 370 375 380
 Gly Arg Glu Ile Asn Leu
 385 390

<210> 100

<211> 726

<212> DNA

<213> Prototheca moriformis

<400> 100

gctcttcgcc gccgccactc ctgctcgagc gcgcccgcgc gtgcgccgcc agcgcttgg 60
 ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgctga tgtccatcac caggtcctatg aggtctgcct 120
 tgcgccggt gagccactgc ttctgccggg cgccaagag gagcatgagg gaggactcct 180

 ggtccagggt ccigacgtgg tcgcggtctt gggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc 240
 gcaccgaggc cgcctccaac tggctctcca gcagccgcag tcgccgccga ccctggcaga 300
 ggaagacagg tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga 360
 atccctacca gtcatggctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgaccct 420
 cgctgccgcc gcttctcccg cacgttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcgcc 480
 gcacgtggc gctgcgttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa 540
 ccccttgcg cgtagtggt gccatcctt gcagaccgt gagagccgac ttgttgtgcg 600

 ccacccccca caccacctcc tcccagacca attctgtcac ctttttggcg aaggcatcgg 660
 cctcgccctg cagagaggac agcagtgcc agccgctggg ggttggcgga tgcacgtca 720
 ggtacc 726

 <210> 101
 <211> 749
 <212> DNA
 <213> Prototheca moriformis
 <400> 101

 gagtccttg tttccagaa ggagtgtct cttgagcctt tcattctcag cctcgataac 60
 ctccaaagcc gctctaattg tggaggggt tcgaatttaa aagcttgaa tgttggttcg 120
 tgcgtctgga acaagcccag acttgttgc cactgggaaa aggaccatca gtccaaaaa 180

 acttgccgt caaacccgt acctctgct tcgcgcaatc tgcctgttg aaatgccac 240
 cacattcata ttgtacgtc tgagcagtct gtaattgcct cagaatgtgg aatcatctgc 300
 cccctgtgcg agcccatgcc aggcattgtc cgggcgagga caccgccac tcgtacagca 360
 gaccattatg ctacctaca atagttcata acagtgacca ttttctcga agctcccaa 420
 cgagcacctc catgctctga gtggccacc cccggccctg gtgcttgcgg agggcaggtc 480
 aaccggcatg gggctaccga aatccccgac cggatccac cccccgcg atgggaagaa 540
 tctctccccg ggatgtgggc ccaccaccag cacaacctgc tggcccaggc gagcgtcaaa 600

 ccataccaca caaatacct tggcatcggc cctgaattcc ttctgccgt ctgtaccgc 660
 gtgttctgt ccgaagcagg ggttgctagg gatcgtccg agtccgaaa ccttgtcgc 720
 gtggcggggc ttgttcgagc ttgaagagc 749

<210> 102

<211> 719

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 102

```

gggctggtct gaatccttca ggcgggtgtt acccgagaaa gaaagggtgc cgatttcaaa      60
gcagacccat gtgccgggcc ctgtggcctg tgttggcgcc tatgtagtca cccccctca      120
cccaattgtc gccagtttgc gcactccata aactcaaaac agcagcttct gagctgcgct      180

gttcaagaac acctctgggg ttgtctcacc cgcgaggtcg acgcccagca tggctatcaa      240
gacgaacagg cagcctgtgg agaagcctcc gttcacgac gggacgctgc gcaaggccat      300
ccccgcgcac tgtttcgagc gctcggcgct tcgtagcagc atgtacctgg cctttgacat      360
cgcggtcatg tccctgctct acgtcgcgtc gacgtacatc gaccctgcac cgggtgcctac      420
gtgggtcaag tacggcatca tgtggccgct ctactggttc ttccaggtgt gtttgagggt      480
tttggttgcc cgtattgagg tcctggtggc gcgcatggag gagaaggcgc ctgtcccgt      540
gacccccccg gctaccctcc cggcaccttc cagggcgctt tcggcacggg tgtctgggtg      600

tgcgcgcacg agtgcggcca ccaggccttt tctccagcc aggccatcaa cgacggcgtg      660
ggcctggtgt tcacagcct gctgtgtgtg ccctactact cctggaagca ctgcaccg      719

```

<210> 103

<211> 732

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 103

```

ccgccaccac tccaacacgg ggtgcctgga caaggacgag gtgtttgtgc cgccgcaccg      60
cgcagtggcg cagcagggcc tggagtggga ggagtggctg cccatccgca tgggcaaggt      120
gctgttcacc ctgacctgg gctggccgct gtacctcatg ttcaacgtcg cctcgcggcc      180
gtaccgcgc ttcgccaacc actttgacct gtggtcgccc atcttcagca agcgcgagcg      240

catcgagggt gtcattccg acctggcgct ggtggcggtg ctacgcgggc tcagcgtgct      300
gggccgcacc atgggctggg cctggctggt caagacctac gtggtgccct acctgatcgt      360
gaacatgtgg ctctgtctca tcacgtgct ccagcacacg caccggcgcc tgccgcacta      420
cttcgagaag gactgggact ggctgcgcgg cgccatggcc accgtggacc gtcctatggg      480

```

cccgcccttc atggacaaca tcctgcacca catctccgac acccacgtgc tgcaccacct 540
cttcagcacc atcccgcact accacgccga ggaggcctcc gccgcatca ggcccatcct 600
gggcaagtac taccagtccg acagccgctg ggtcggccgc gccctgtggg aggactggcg 660

cgactgccgc tacgtcgtcc cggacgcgcc cgaggacgac tccgcgtctt ggttcacaa 720
gtgagtgagt ga 732

<210> 104

<211> 384

<212> PRT

<213> *Carthamus tinctorius*

<400> 104

Met Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ser Ala Phe Asn Ala Arg Cys Gly Asp

1 5 10 15

Leu Arg Arg Ser Ala Gly Ser Gly Pro Arg Arg Pro Ala Arg Pro Leu

20 25 30

Pro Val Arg Gly Arg Ala Ala Thr Gly Glu Gln Pro Ser Gly Val Ala

35 40 45

Ser Leu Arg Glu Ala Asp Lys Glu Lys Ser Leu Gly Asn Arg Leu Arg

50 55 60

Leu Gly Ser Leu Thr Glu Asp Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Lys Phe Val

65 70 75 80

Ile Arg Cys Tyr Glu Val Gly Ile Asn Lys Thr Ala Thr Ile Glu Thr

85 90 95

Ile Ala Asn Leu Leu Gln Glu Val Gly Gly Asn His Ala Gln Gly Val

100 105 110

Gly Phe Ser Thr Asp Gly Phe Ala Thr Thr Thr Thr Met Arg Lys Leu

115 120 125

His Leu Ile Trp Val Thr Ala Arg Met His Ile Glu Ile Tyr Arg Tyr

130 135 140

Pro Ala Trp Ser Asp Val Ile Glu Ile Glu Thr Trp Val Gln Gly Glu

145 150 155 160

Gly Lys Val Gly Thr Arg Arg Asp Trp Ile Leu Lys Asp Tyr Ala Asn

165	170	175	
Gly Glu Val Ile Gly Arg Ala Thr Ser Lys Trp Val Met Met Asn Glu			
180	185	190	
Asp Thr Arg Arg Leu Gln Lys Val Ser Asp Asp Val Arg Glu Glu Tyr			
195	200	205	
Leu Val Phe Cys Pro Arg Thr Leu Arg Leu Ala Phe Pro Glu Glu Asn			
210	215	220	
Asn Asn Ser Met Lys Lys Ile Pro Lys Leu Glu Asp Pro Ala Glu Tyr			
225	230	235	240
Ser Arg Leu Gly Leu Val Pro Arg Arg Ser Asp Leu Asp Met Asn Lys			
245	250	255	
His Val Asn Asn Val Thr Tyr Ile Gly Trp Ala Leu Glu Ser Ile Pro			
260	265	270	
Pro Glu Ile Ile Asp Thr His Glu Leu Gln Ala Ile Thr Leu Asp Tyr			
275	280	285	
Arg Arg Glu Cys Gln Arg Asp Asp Ile Val Asp Ser Leu Thr Ser Arg			
290	295	300	
Glu Pro Leu Gly Asn Ala Ala Gly Val Lys Phe Lys Glu Ile Asn Gly			
305	310	315	320
Ser Val Ser Pro Lys Lys Asp Glu Gln Asp Leu Ser Arg Phe Met His			
325	330	335	
Leu Leu Arg Ser Ala Gly Ser Gly Leu Glu Ile Asn Arg Cys Arg Thr			
340	345	350	
Glu Trp Arg Lys Lys Pro Ala Lys Arg Met Asp Tyr Lys Asp His Asp			
355	360	365	
Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys			
370	375	380	
<210> 105			
<211> 408			
<212> PRT			
<213> Cuphea wrightii			
<400> 105			

Met Val Val Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Phe Phe Pro Val Pro Ala
1 5 10 15
Pro Arg Pro Thr Pro Lys Pro Gly Lys Phe Gly Asn Trp Pro Ser Ser
20 25 30
Leu Ser Gln Pro Phe Lys Pro Lys Ser Asn Pro Asn Gly Arg Phe Gln
35 40 45
Val Lys Ala Asn Val Ser Pro His Pro Lys Ala Asn Gly Ser Ala Val
50 55 60
Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu Asn Thr Leu Glu Asp Pro Pro Ser Ser
65 70 75 80
Pro Pro Pro Arg Thr Phe Leu Asn Gln Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu
85 90 95
Arg Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe Val Ala Ala Glu Lys Gln Phe Thr
100 105 110
Arg Leu Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met Leu Val Asp Trp Phe
115 120 125
Gly Ser Glu Thr Ile Val Gln Asp Gly Leu Val Phe Arg Glu Arg Phe
130 135 140
Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Ala Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu
145 150 155 160
Thr Leu Met Asn His Leu Gln Asp Thr Ser Leu Asn His Cys Lys Ser
165 170 175
Val Gly Leu Leu Asn Asp Gly Phe Gly Arg Thr Pro Glu Met Cys Thr
180 185 190
Arg Asp Leu Ile Trp Val Leu Thr Lys Met Gln Ile Val Val Asn Arg
195 200 205
Tyr Pro Thr Trp Gly Asp Thr Val Glu Ile Asn Ser Trp Phe Ser Gln
210 215 220
Ser Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Glu Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn
225 230 235 240
Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr Ser Ala Trp Ala Met Met Asn

245 250 255
 Gln Lys Thr Arg Arg Phe Ser Lys Leu Pro Cys Glu Val Arg Gln Glu
 260 265 270
 Ile Ala Pro His Phe Val Asp Ala Pro Pro Val Ile Glu Asp Asn Asp
 275 280 285

 Arg Lys Leu His Lys Phe Asp Val Lys Thr Gly Asp Ser Ile Cys Lys
 290 295 300
 Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Phe Asp Val Asn Gln His Val Ser
 305 310 315 320
 Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu Ser Met Pro Thr Glu Val
 325 330 335
 Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Thr Leu Glu Tyr Arg Arg Glu
 340 345 350

 Cys Gly Arg Glu Ser Val Val Glu Ser Val Thr Ser Met Asn Pro Ser
 355 360 365
 Lys Val Gly Asp Arg Ser Gln Tyr Gln His Leu Leu Arg Leu Glu Asp
 370 375 380
 Gly Ala Asp Ile Met Lys Gly Arg Thr Glu Trp Arg Pro Lys Asn Ala
 385 390 395 400
 Gly Thr Asn Arg Ala Ile Ser Thr
 405

<210> 106

<211> 1155

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon optimized sequence

<400> 106

atggccaccg catccacttt ctcggcggtt aatgcccgct gcggcgacct gcgtcgctcg 60
 gcgggctcgg ggccccggcg cccagcgagg ccctccccg tgcgcgggcg cgccgccacc 120
 ggcgagcagc cctccggcgt ggcctccctg cgcgaggccg acaaggagaa gtccttgggc 180
 aaccgcctgc gcctgggctc cctgaccgag gacggcctgt cctacaagga gaagtctgtg 240
 atccgtgtgt acgaggtggg catcaacaag accgccacca tcgagaccat cgccaacctg 300

ctgcaggagg tgggcgga caacgcccag ggcgtgggct tctccaccga cggttcgcc 360

accaccacca ccatgcgcaa gctgcacctg atctgggtga ccgccgcat gcacatcgag 420

atctaccgct accccgctg gtccgacgtg atcgagatcg agacctgggt gcaggcgag 480

ggcaaggtgg gcacccgccc cgactggatc ctgaaggact acgccaacgg cgaggatgc 540

ggccgcgcca cctccaagt ggtgatgatg aacgaggaca ccgcccct gcagaaggtg 600

tccgacgacg tgcgagga gtacctggtg ttctgcccc gcacctgcg cctggccttc 660

cccaggaga acaacaactc catgaagaag atccccaagc tggaggacc cgccgagtac 720

tccgcctgg gcctggtgcc ccgcccctcc gacctggaca tgaacaagca cgtgaacaac 780

gtgacctaca tcggtgggc cctggagtcc atccccccg agatcatcga caccacgag 840

ctgcaggcca tcacctgga ctaccgccgc gactgccagc gcgacgacat cgtggactcc 900

ctgacctccc gcgagccctt gggcaacgcc gccggcgtga agttcaagga gatcaacggc 960

tccgtgtccc ccaagaagga cgagcaggac ctgtcccgt tcatgcacct gctgcgtcc 1020

gccggtccg gcctggagat caaccgtgc cgcaccgagt ggcgcaagaa gcccgcaag 1080

cgcatggact acaaggacca cgacggcgac tacaaggacc acgacatcga ctacaaggac 1140

gacgacgaca agtga 1155

<210> 107

<211> 1236

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> codon optimized sequence

<400> 107

atggtggtgg ccgccgcgc cagcagcgc ttcttcccc tgcgcgcgc ccgccccacc 60

cccaagcccc gcaagtccg caactggccc agcagcctga gccagccctt caagcccaag 120

agcaacccca acggccgctt ccaggtgaag gccaacgtga gccccacgg gcgcgcccc 180

aaggccaacg gcagcgcgt gagcctgaag tccggcagcc tgaacacct ggaggacccc 240

cccagcagcc ccccccccg cacttcttg aaccagctgc ccgactggag ccgctgcgc 300

accgccatca ccaccgtgtt cgtggccgcc gagaagcagt tcaccgcct ggaccgaag 360

agcaagcgc ccgacatgct ggtggactgg ttcggcagcg agaccatcgt gcaggacggc 420

ctggtgttcc gcgagcgtt cagcatccgc agctacgaga tcggcgccga ccgaccgcc 480

agcatcgaga cctgatgaa ccacctgcag gacaccagcc tgaaccactg caagagcgtg 540

ggcctgctga acgacggctt cggccgcacc cccgagatgt gcaccgcga cctgatctgg 600

gtgctgacca agatgcagat cgtggtgaac cgctacccca cctggggcga caccgtggag 660
atcaacagct ggttcagcca gagcggaag atcggcattg gccgcgagtg gctgatcagc 720
gactgcaaca ccggcgagat cctggtgcgc gccaccagcg cctgggcat gatgaaccag 780

aagacccgcc gcttcagcaa gctgccctgc gaggtgcgc aggagatcgc cccccacttc 840
gtggacgccc ccccgatgat cgaggacaac gaccgcaagc tgcacaagtt cgacgtgaag 900
accggcgaca gcatctgcaa gggcctgacc cccggctgga acgacttcga cgtgaaccag 960
cacgtgagca acgtgaagta catcggtggt attctggaga gcatccccc cgagggtgctg 1020
gagacccagg agctgtgcag cctgaccctg gactaccgcc gcgagtgcgg ccgcgagagc 1080
gtggtggaga gcgtgaccag catgaacccc agcaaggtgg gcgaccgcag ccagtaccag 1140
cacctgctgc gcctggagga cggcgccgac atcatgaagg gccgcaccga gtggcgcccc 1200

aagaacgccc gcaccaaccg cgccatcagc acctga 1236

<210> 108
<211> 612
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> construct 5' donor DNA sequence of *Prototheca moriformis* FATA1
knockout homologous recombination targeting construct

<400> 108

gctcttcgga gtcactgtgc cactgagttc gactggtagc tgaatggagt cgctgtccca 60
ctaaacgaat tgcagcacc gccagccggc cgaggaccgc agtcatagcg agggtagtag 120
cgcgccatgg caccgaccag cctgcttgcc agtactggcg tctcttcgc ttctctgtgg 180

tcctctgcgc gctccagcgc gtgcgctttt ccggtggatc atgcgggtccg tggcgccaccg 240
cagcgccgcg tgcccatgca gcgccgctgc ttccgaacag tggcggtcag ggccgcaccc 300
gcggtagccg tccgtccgga acccgcccaa gagttttggg agcagcttga gccctgcaag 360
atggcgagg acaagcgcat ctctctggag gagcaccggt gcgtggaggt ccggggctga 420
ccggccgtcg cattcaacgt aatcaatcgc atgatgatca gaggacacga agtcttggtg 480
gcggtggcca gaaacactgt ccattgcaag ggcataggga tgcgttcctt cacctctcat 540
ttctcatctc tgaatccctc cctgtcact cttctctctc ctcttcccg ttcacgcagc 600

attcggggta cc 612

<210> 109
<211> 528

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> construct 3' donor DNA sequence of *Prototheca moriformis* FATA1
knockout homologous recombination targeting construct

<400> 109

```

gacagggatg ttggctggat ggggaaacgc tggtcgcggg attcgatcct gctgcttata      60
tcctccctgg aagcacaccc acgactctga agaagaaaac gtgcacacac acaaccaaac      120
cgccgaata ttgcttctct tatcccggtt ccaagagaga ctgcgatgcc cccctcaatc      180

agcatcctcc tcctgcgcgc ttcaattctt cctgcttgcc tgcgcccgcg gtgcgcgctc      240
tgcccgccca gtcagtact cctgcacagg ccccttgtgc gcagtgtcc tgtacccttt      300
accgtcctct ccattctgcg agggccccta ttgaatgtat tcgttgctg tgtggccaag      360
cgggctgctg ggcgcgcgcg cgtcgggcag tgcctggcga ctttggcgga agccgattgt      420
tcttctgtaa gccacgcgct tgctgctttg ggaagagaag ggggggggta ctgaatggat      480
gaggaggaga aggaggggta ttggtattat ctgagttggg tgaagagc      528

```

<210> 110

<211> 767

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> construct FATA portion of the hairpin RNA expression cassette

<400> 110

```

atggcaccga ccagcctgct tgccagtact ggcgtctctt ccgcttctct gtggtcctct      60
gcgcgtccca gcgcgtgcgc ttttccggtg gatcatgcgg tccgtggcgc accgcagcgg      120
ccgctgcccc tgcagcgccg ctgcttccga acagtggcgg tcagggccgc acccgcggtg      180
gccgtccgtc cggaaccgcg ccaagagttt tgggagcagc ttgagccctg caagatggcg      240
gaggacaagc gcatttctct ggaggagcac cgtgctgtgg aggtccgggg ctgaccggcc      300
gtcgatttca acgtaatcaa tcgcatgatg atcagaggac acgaagtctt ggtggcgggtg      360

gccagaaaca ctgtccattg caagggcata gggatgcgtt ccttcacctc tcattttctca      420
tttctgaatc cctccctgct cactctttct cctctcctt cccgttcacg cagcattcgg      480
ggcaacgagg tgggcccgtg ctctccagg aagatgcgct tgtcctccgc catcttgacg      540
ggctcaagct gctcccaaaa ctcttgggcg ggttccggac ggacggctac cgcgggtgcg      600
gccctgaccg ccaactgttcg gaagcagcgg cgtgcatgg gcagcggccg ctgcggtgcg      660
ccacggaccg catgatccac cggaagagcg cacgcgtgg agcgcgcaga ggaccacaga      720

```


gaagcggaag agacgccagt actggcaagc aggctggtcg gtgccat 767

<210> 111

<211> 3499

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 111

gctcttcgga gtcactgtgc cactgagttc gactggtagc tgaatggagt cgctgtctcca 60
ctaaacgaat tgcagcacc gccagccggc cgaggaccgc agtcatagcg agggtagtag 120
cgcgccatgg caccgaccag cctgcttgcc agtactggcg tctcttccgc ttctctgtgg 180
tcctctgcgc gtcaccagcg gtgcgctttt ccggtggatc atgcggtccg tggcgccaccg 240
cagcgccgcg tgcccatgca gcgcgctgc ttccgaacag tggcggtcag ggccgcaccc 300
gcggtagccg tccgtccgga acccgcccaa gagttttggg agcagcttga gccctgcaag 360

atggcggagg acaagcgcgt cttcttgag gagcacccgt gcgtggaggt ccggggctga 420
ccggccgtcg cattcaacgt aatcaatcgc atgatgatca gaggacacga agtcttggtg 480
gcggtggcca gaaacactgt ccattgcaag ggcataggga tgcgttcctt cacctctcat 540
ttctcatitc tgaatccctc cctgtcact ctttctctc ctccttccg ttacgcagc 600
attcggggtg ccttttcttg cgctatgaca cttccagcaa aaggtagggc gggtgcgag 660
acggcttccc ggctgtgat gcaacaccga tgatgcttcg acccccga gctccttcgg 720
ggctgcatgg gcgtccgat gccgtccag ggcgagcgct gtttaaatag ccaggccccc 780

gattgcaaag acattatagc gagctaccaa agccatattc aaacacctag atcactacca 840
ctttacaca ggccactcga gcttgtgat gcactccgt aagggggcgc ctcttctct 900
tcgtttcagt cacaaccgc aaacggcgcg ccatgtgct gcaggcctt ctgttctgc 960
tggccggctt cgcgcgaag atcagcgtt ccatgacgaa cgagagctcc gaccgcccc 1020
tggtgcactt ccccccaac aagggtgga tgaacgaccc caacggcctg tggtagcagc 1080
agaaggacgc caagtggcac ctgtacttcc agtacaacc gaacgacacc gtctggggga 1140
cgcccttggt ctggggccac gccacgtccg acgacctgac caactgggag gaccagccca 1200

tcgccatgc cccgaagcgc aacgactccg gcgccttctc cggtccatg gtggtggact 1260
acaacaacac ctccggttc ttcaacgaca ccatgaccc gcgccagcgc tgcgtggcca 1320
tctggaccta caacaccccg gagtccgagg agcagtacat ctctacagc ctggacggcg 1380
gctacacctt caccgaglac cagaagaacc ccgtgctggc cgccaactcc acccagttcc 1440

gcgacccgaa ggictttctgg tacgagccct cccagaagtg gatcatgacc gcggccaagt 1500
cccaggacta caagatcgag atctactcct ccgacgacct gaagtcctgg aagctggagt 1560
ccgcgttcgc caacgagggc ttctctggct accagtacga gtgccccggc ctgatcgagg 1620

tccccaccga gcaggacccc agcaagtcct actgggtgat gttcatctcc atcaaccccg 1680
gcgccccggc cggcggctcc ttcaaccagt acttcgtcgg cagcttcaac ggcacccact 1740
tcgaggcctt cgacaaccag tcccgcgtgg tggacttcgg caaggactac tacgcctgc 1800
agaccttctt caacaccgac ccgacctacg ggagcgcctt gggcatcgcg tgggcctcca 1860
actgggagta ctccgccttc gtgcccacca acccctggcg ctctccatg tccctcgtgc 1920
gcaagttctc cctcaacacc gagtaccagg ccaaccggga gacggagctg atcaacctga 1980
aggccgagcc gatcctgaac atcagcaacg ccggccccctg gagccggttc gccaccaaca 2040

ccacgttgac gaaggecaac agctacaacg tcgacctgtc caacagcacc ggcaccctgg 2100
agttcagact gggttacgcc gtcaacacca cccagacgat ctccaagtcc gtgttcgcgg 2160
acctctccct ctggttcaag ggcctggagg accccgagga gtacctccgc atgggcttcg 2220
aggtgtccgc gtctctcttc ttcttgacc gcgggaacag caaggtgaag ttcgtgaagg 2280
agaaccctta cttaccaac cgcatgagcg tgaacaacca gcccttcaag agcgagaacg 2340
acctgtccta ctacaaggtg tacggcttgc tggaccagaa catcctggag ctgtacttca 2400
acgacggcga cgtcgtgtcc accaacacct acttcatgac caccgggaac gccctgggct 2460

ccgtgaacat gacgacgggg gtggacaacc tgttctacat cgacaagttc caggtgcgcg 2520
aggtcaagtg acaattggca gcagcagctc ggatagtatc gacacactct ggacgtgggt 2580
cgtgtgatgg actgttgccg ccacacttgc tgccttgacc tgtgaatatc cctgccgctt 2640
ttatcaaaca gcctcagttg gtttgatctt gtgtgtacgc gcttttgcga gttgctagct 2700
gcttgtgcta ttgcgaaata ccacccccag catcccttc cctcgtttca tatcgttgc 2760
atcccaaccg caacttatct acgtgtcct gctatccctc agcgtgtctc ctgctcctgc 2820
tactgcccc tcgcacagcc ttggtttggg ctccgcctgt attctcctgg tactgcaacc 2880

tgtaaaccag cactgcaatg ctgatgcacg ggaagtagtg ggatgggaac acaaatggag 2940
gatcgtagag ctactagta tcgatttcga agacagggtg gttggctgga tggggaacg 3000
ctggtcgcgg gattcgatcc tgcgtcttat atcctccctg gaagcacacc cagactctg 3060
aagaagaaaa cgtgcacaca cacaacccaa ccggccgaat atttgcttcc ttatccggg 3120
tccaagagag actgcgatgc cccctcaat cagcatcctc ctccctgccg cttcaatctt 3180
ccctgcttgc ctgcgccgcg ggtgcgccgt ctgccccccc agtcagtcac tcctgcacag 3240

gcccccttggtg cgcagtgtct ctgtaccctt taccgtctct tccattctgc gagggccccct 3300

attgaatgta ttcgttgctt gtgtggccaa gcgggctgct gggcgcgccg ccgtcgggca 3360

gtgctcggcg actttggcgg aagccgattg ttcttctgta agccacgcgc ttgctgcttt 3420

gggaagagaa ggggggggggt actgaatgga tgaggaggag aaggaggggt attggtatta 3480

tctgagttgg gtgaagagc 3499

<210> 112

<211> 6514

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 112

gtctttcgga gtcactgtgc cactgagttc gactggtagc tgaatggagt cgctgtcca 60

ctaaacgaat tgtcagcacc gccagccggc cgaggaccgc agtcatagcg agggtagtag 120

cgcgccatgg caccgaccag cctgtttgcc agtactggcg tctcttccgc ttctctgttg 180

tcctctgcgc gctccagcgc gtgcgctttt ccggtggatc atgcgggtccg tggcgccaccg 240

cagcgccgcg tgcccatgca gcgccgtgc ttccgaacag tggcggtcag ggccgcaccc 300

gcggtagccg tccgtccgga acccgcccaa gaggtttggg agcagcttga gccctgcaag 360

atggcggagg acaagcgcat cttcttgag gagcaccggt gcgtggaggt ccggggctga 420

ccggccgtcg cattcaacgt aatcaatgc atgatgatca gaggacacga agtcttggtg 480

gcgggtggcca gaaacactgt ccattgcaag ggcataggga tgcgttcctt cacctctcat 540

ttctcatttc tgaatccctc cctgtcact ctttctctc ctccttcccg ttcacgcagc 600

attcggggta ccttttcttg cgctatgaca cttccagcaa aaggtagggc gggctgcgag 660

acggcttccc ggcgtgcat gcaacaccga tgatgcttcg accccccgaa gtccttcgg 720

ggctgcatgg gcgtccgat gccgtccag ggcgagcgct gtttaaatag ccaggcccc 780

gattgcaaag acattatagc gagctaccaa agccatatc aaacacctag atcactacca 840

cttctacaca ggccactcga gcttgtgat gcactccgt aagggggcgc ctcttctct 900

tcgtttcagt cacaaccgc aaacggcgcg ccattgtgct gcaggccttc ctgttctgc 960

tggccggctt cgccgccaag atcagcgct ccatgacgaa cgagacgtcc gaccgcccc 1020

tgggtgactt ccccccaac aagggtgga tgaacgacc caacggcctg tggtagcagc 1080

agaaggacgc caagtggcac ctgtacttcc agtacaacce gaacgacac gtctggggga 1140

cgcccttggt ctggggccac gccacgtccg acgacctgac caactgggag gaccagccca 1200

tcgccatcgc cccgaagcgc aacgactccg gcgccttctc cggtccatg gtggtggact	1260
acaacaacac ctccggcttc ttcaacgaca ccatcgaccc gcgccagcgc tgcgtggcca	1320
tctggaccta caacaccccg gagtccgagg agcagtacat ctctacagc ctggacggcg	1380
gctacacctt caccgagtac cagaagaacc ccgtgctggc cgccaactcc acccagttcc	1440
gcgacccgaa ggtcttctgg tacgagccct ccagaagtg gatcatgacc gcggccaagt	1500
cccaggacta caagatcgag atctactect ccgacgacct gaagtcctgg aagctggagt	1560
ccgcgttcgc caacgagggc ttctcggct accagtacga gtccccggc ctgatcgagg	1620
tccccaccga gcaggacccc agcaagtcct actgggtgat gttcatctcc atcaaccccg	1680
gcgccccggc cggcggctcc ttcaaccagt acttcgtcgg cagcttcaac ggcacccact	1740
tcgaggcctt cgacaaccag tcccgcgtgg tggacttcgg caaggactac tacgccctgc	1800
agaccttctt caacaccgac ccgacctacg ggagcgcctt gggcatcgcg tgggcctcca	1860
actgggagta ctccgccttc gtgccacca acccctggcg ctctccatg tccctcgtgc	1920
gcaagtctc cctcaacacc gagtaccagg ccaaccgga gacggagctg atcaacctga	1980
aggccgagcc gatcctgaac atcagcaacg ccggccctg gagccggttc gccaccaaca	2040
ccacgttgac gaaggccaac agctacaacg tcgacctgtc caacagcacc ggcacccctgg	2100
agttcgagct ggtgtacgc gtcaacacca ccagacgat ctccaagtcc gtgttcgagg	2160
acctctcct ctggttcaag ggctggagg acccgagga gtacctccgc atgggcttcg	2220
agggtgccg gtctctcttc ttctggacc gcgggaacag caagtgaa gttcgtgaagg	2280
agaacccta cttaccaac cgcatgagcg tgaacaacca gcccttcaag agcgagaacg	2340
acctgtccta ctacaagggtg tacggcttgc tggaccagaa catcctggag ctgtacttca	2400
acgacggcga cgtcgtgtcc accaacacct acttcatgac caccgggaac gccctgggct	2460
ccgtgaacat gacgacgggg gtggacaacc tgtttacat cgacaagttc caggtgcgcg	2520
agggtcaagtg acaattggca gcagcagctc ggatagtatc gacacactct ggacgtggt	2580
cgtgtgatgg actgttgccg ccacacttgc tgccttgacc tgtgaatatc cctgccgctt	2640
ttatcaaaac gcctcagtg gtttgatctt gtgtgtacgc gcttttgca gttgctagct	2700
gcttgtgcta ttgcaata ccaccccag catcccttc cctcgtttca tatcgttgc	2760
atcccaaccg caacttatct acgtgtctt gctatccctc agcgtgtctc ctgctcctgc	2820
tcactgcccc tcgcacagcc ttggtttggg ctccgcctgt attctcctgg tactgcaacc	2880
tgtaaaccag cactgcaatg ctgatgcacg ggaagtagtg ggatgggaac acaaatggag	2940
gatcccgct ctgaacaga gcgcgcagag gaacgtgaa ggtctgcct ctgtgcacc	3000

tcagcgcggc atacaccaca ataaccacct gacgaatgcg cttggttctt cgtccattag	3060
cgaagcgtcc ggttcacaca cgtgccacgt tggcgagggt gcaggtgaca atgatcgggtg	3120
gagctgatgg tcgaaacgtt cacagcctag ggatatcgaa ttcggccgac aggacgcgcg	3180
tcaaaggtgc tggtcgtgta tgccctggcc ggcaggtcgt tgctgctgct ggttagtgat	3240
tccgcaacc tgattttggc gtcttatttt ggcgtggcaa acgctggcgc ccgcgagccg	3300
ggccggcggc gatgcgggtc cccacggctg ccggaatcca agggaggcaa gagcgcccgg	3360
gtcagttgaa gggctttacg cgcaaggtag agccgctcct gcaaggctgc gtggtggaat	3420
tggacgtgca ggtcctgctg aagttcctcc accgcctcac cagcggacaa agcaccggtg	3480
tatcaggtcc gtgtcatcca ctctaaagag ctgcactacg acctactgat ggccctagat	3540
tcttcatcaa aaacgcctga gacacttgc caggattgaa actccctgaa gggaccacca	3600
ggggccctga gttgttctt ccccccgtgg cgagctgcca gccaggtgt acctgtgatc	3660
gaggctggcg ggaatatagg ctctgtgtgc tcaggtcatg ggaggtgcag gacagctcat	3720
gaaacccaa caatgcaca attcatgtca agctaactag ctatttctc ttcacagct	3780
gtaattgtcc caaattctg gtctaccggg ggtgatcctt cgtgtacggg ccttccctc	3840
aaccctaggt atgcgcgat gcggtcgccg cgcaactcgc gcgagggccg agggtttggg	3900
acgggcccgc ccgaaatgca gttgcacccg gatgcgtggc acctttttg cgataattta	3960
tgcaatggac tgctctgcaa aattctggct ctgtcgccaa ccctaggatc agcggcgtag	4020
gatttcgtaa tcattctgac tgatggggag ctaccgacta ccctaataac agcccactg	4080
cctgacgcca gcgtccactt ttgtcacac attccattcg tgcccaagac atttcattgt	4140
ggtgcgaagc gtccccagtt acgtcacct gtttccgac ctcttactg ttctgtcgac	4200
agagcgggcc cacaggccgg tcgcagccac tagtatggtg gtggccgcgc ccgccagcag	4260
cgctttcttc cccgtgcccc cccccgcc ccccccaag cccggcaagt tcggcaactg	4320
gcccagcagc ctgagccagc cttcaagcc caagagcaac cccaacggcc gtttcaggt	4380
gaaggccaac gtgagccccc acgggcgcgc ccccaaggcc aacggcagcg ccgtgagcct	4440
gaagtccggc agcctgaaca ccctggagga cccccccagc agccccccc cccgcacctt	4500
cctgaaccag ctgcccagct ggagccgcct gcgcaccgcc atcaccaccg tgttcgtggc	4560
cgccgagaag cagttcaccc gcctggaccg caagagcaag cgccccgaca tgctggtgga	4620
ctggttcggc agcgagacca tcgtgcagga cggcctggtg ttccgcgagc gtttcagcat	4680
ccgcagctac gagatcggcg ccgaccgcac cgccagcatc gagaccctga tgaaccacct	4740

gcaggacacc agcctgaacc actgcaagag cgtgggcctg ctgaacgacg gcttcggccg 4800
cacccccgag atgtgcaccc gcgacctgat ctgggtgctg accaagatgc agatcgtggt 4860
gaaccgctac cccacctggg gcgacaccgt ggagatcaac agctggttca gccagagcgg 4920
caagatcggc atgggccgag agtggctgat cagcgactgc aacaccggcg agatcctggt 4980
gcgcgccacc agcgccctgg ccatgatgaa ccagaagacc cgccgcttca gcaagctgcc 5040
ctgcgagggtg cgccaggaga tcgccccca cttcgtggac gcccccccg tgatcgagga 5100
caacgaccgc aagctgcaca agttcgacgt gaagaccggc gacagcatct gcaaggccct 5160

gacccccggc tggaacgact tcgacgtgaa ccagcacgtg agcaacgtga agtacatcgg 5220
ctggattctg gagagcatgc ccaccgaggt gctggagacc caggagctgt gcagcctgac 5280
cctggagtac cgccgcgagt gcggccgcga gagcgtggtg gagagcgtga ccagcatgaa 5340
ccccgaag gtgggcgacc gcagccagta ccagcacctg ctgcgcctgg aggacggcgc 5400
cgacatcatg aagggccgca ccgagtggcg cccaagaac gccggcacca accgcgccat 5460
cagcacctga ttaattaact cgaggcagca gcagctcgga tagtatcgac acactctgga 5520
cgctggtcgt gtgatggact gttgccgcca cacttgctgc cttgacctgt gaatatccct 5580

gccgctttta tcaaacagcc tcagtgtgtt tgatcttgtg tgtacgcgct tttgcgagtt 5640
gctagctgct tgtgtatatt gcgaatacca cccccagcat ccccttcct cgtttcatat 5700
cgcttgcatc ccaaccgcaa cttatctacg ctgtcctgct atccctcagc gctgctcctg 5760
ctcctgctca ctgccccctg cacagccttg gtttgggctc cgctgtgatt ctcttggtac 5820
tgcaacctgt aaaccagcac tgcaatgctg atgcacggga agtagtggga tgggaacaca 5880
aatggaaaagc ttgagctctt gttttccaga aggagtgtct ccttgagcct ttcattctca 5940
gcctcgataa cctccaaagc cgctctaatt gtggaggggg ttcgaagaca gggtggttgg 6000

ctggatgggg aaacgtggt cgcgggattc gatcctgctg cttatatcct ccctggaagc 6060
acaccacga ctctgaagaa gaaaacgtgc acacacaca cccaaccggc cgaatatttg 6120
cttccttate cgggtccaa gagagactgc gatgcccccc tcaatcagca tcctcctccc 6180
tgccgcttca atcttcctg cttgcctgcg ccgcgggtgc gccgtctgcc cgcccagtea 6240
gtcactcctg cacaggcccc ttgtgcgcag tgctcctgta ccccttaccg ctcttccat 6300
tctgcgaggc cccctattga atgtattcgt tgctgtgtg gccaaagcggg ctgctgggcg 6360
cgccgccgtc gggcagtgct cggcgacttt ggcggaagcc gattgttctt ctgtaagcca 6420

cgcgcttgct gctttgggaa gagaaggggg ggggtactga atggatgagg aggagaagga 6480
ggggtatttg tattatctga gttgggtgaa gaggc 6514

<210> 113

<211> 5546

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 113

```

gtctctcgcc gccgccactc ctgctcgagc gcgcccgcgc gtgcgccgcc agcgcttgg      60
ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgctga tgtccatcac caggatcatg aggtctgcct      120
tgcgccggct gagccactgc ttctgccggg cggccaagag gagcatgagg gaggactcct      180
gggtccagggt cctgacgtgg tcgcggtctt gggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc      240

gcaccgaggc cgctccaac tggctctcca gcagccgcag tcgccgccga ccctggcaga      300
ggaagacagg tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga      360
atccctacca gtcatggctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgaccct      420
cgctgccgcc gcttctcccg cacgtttctt tccagaccg tgatggcgcg agccagcgcc      480
gcacgtgggc gctgcgttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa      540
cccccttgcg cgtagtgtt gccatccttt gcagaccggt gagagccgac ttgttgtgcg      600
ccacccccca caccacctcc tcccagacca attctgtcac ctttttgcg aaggcatcgg      660

cctcggcctg cagagaggac agcagtgcc agccgctggg ggttggcgga tgcacgtca      720
ggtacccttt ctgcgctat gacacttcca gcaaaaggta gggcgggctg cgagacggct      780
tcccggcgt gcatgcaaca ccgatgatgc ttcgaccccc cgaagctcct tcggggctgc      840
atggcgctc cgatgccgt ccaggcgag cgtgtttta atagccaggc ccccgattgc      900
aaagacatta tagcgagcta ccaagccat attcaaacac ctatgact accacttcta      960
cacaggccac tcgagcttgt gatcgactc cgtaagggg gcgcctcttc ctcttcgttt      1020
cagtcacaac ccgcaaactc tagaatatca atgctgctgc aggccttctt gttcctgctg      1080

gccggcttcg ccgccaagat cagcgcttcc atgacgaacg agacgtccga ccgccccctg      1140
gtgcacttca cccccaacaa gggctggatg aacgaccca acggcctgtg gtacgacgag      1200
aaggacgcca agtggcacct gtacttccag tacaaccga acgacaccgt ctgggggacg      1260
cccttgttct ggggccacgc cagtcggac gacctgacca actgggagga ccagcccatc      1320
gccatgcgcc cgaagcgcaa cgactccggc gccttctccg gctccatggt ggtggactac      1380
aacaacacct ccggcttctt caacgacacc atcgaccgc gccagcgctg cgtggccatc      1440
tggacctaca acaccccgga gtccgaggag cagtacatct cctacagcct ggacggcggc      1500

tacaccttca ccgagtacca gaagaacccc gtgctggccg ccaactccac ccagtccgc      1560

```

gacccgaagg tcttctggta cgagccctcc cagaagtgga tcatgaccgc ggccaagtcc 1620
caggactaca agatcgagat ctactcctcc gacgacctga agtcttgaa gctggagtcc 1680
gcgttcgcca acgagggtt cctcggttac cagtacgagt gccccggcct gatcgaggtc 1740
ccaccgagc aggacccag caagtcctac tgggtgatgt tcatctccat caaccccggc 1800
gccccggcgc ggggtcctt caaccagtac ttcgtcggca gcttcaacgg caccacttc 1860
gaggccttcg acaaccagtc ccgctgggtg gacttcggca aggactacta cgccctgcag 1920

accttcttca acaccgacc gacctacggg agcgccctgg gcatcgctg ggcctccaac 1980
tgaggagtact ccgcttctg gccaccaac ccctggcgt cctccatgtc cctcgtgcgc 2040
aagttctccc tcaacaccga gtaccaggcc aaccggaga cggagctgat caacctgaag 2100
gccgagccga tctgaacat cagcaacgcc gggccctgga gccggttcgc caccaacacc 2160
acgttgacga agccaacag ctacaacgtc gacctgtcca acagcaccgg caccctggag 2220
ttcgagctgg tgiacccgt caacaccacc cagacgatct ccaagtccgt gttcgcggac 2280
ctctccctct ggttcaaggg cctggaggac cccgaggagt acctccgat gggcttcgag 2340

gtgtccggt cctccttctt cctggaccgc gggaacagca aggtgaagtt cgtgaaggag 2400
aaccctact tcaccaaccg catgagcgtg aacaaccagc ccttcaagag cgagaacgac 2460
ctgtcctact acaagggtga cggcttgctg gaccagaaca tctggagct gtacttcaac 2520
gacggcgacg tegtgtccac caacacctac ttcattacca ccgggaacgc cctgggtcc 2580
gtgaacatga cgacgggggt ggacaacctg ttctacatcg acaagttcca ggtgcgcgag 2640
gtcaagtac aattggcagc agcagctcgg atagtatga cacactctgg acgtgggtcg 2700
tgtatggac tgttgccgc acacttgctg ccttgacctg tgaatatccc tgccgtttt 2760

atcaaacagc ctcatgtgt ttgatctgt gtgtacgcgc ttttgcgagt tgctagctgc 2820
ttgtgtatt tgcgaatacc acccccagca tccccctccc tcgtttcata tcgttgcatt 2880
cccaaccgca acttatctac gctgtcctgc tatccctcag cgtgctcct gctcctgctc 2940
actgcccctc gcacagcctt ggtttgggt cgcctgtat tctcctgta ctgcaacctg 3000
taaaccagca ctgcaatgt gatgcacggg aagtagtggg atgggaacac aaatggagga 3060
tcccgcgtct cgaacagagc gcgcagagga acgtgaagg tctgcctct gtcgcacctc 3120
agcgcggcat acaccacaat aaccacctga cgaatgcgt tggttcttcg tccattagcg 3180

aagcgtccgg ttcacacag tgccacgttg gcgaggggc aggtgacaat gatcggtgga 3240
gctgatggtc gaaacgttca cagcctaggg atatcgaatt ctttcttgc gctatgacac 3300
ttccagcaaa aggtaggcg ggctgcgaga cggcttccc gcgtgcatg caacaccgat 3360
gatgcttca ccccccgaag ctcttcggg gctgcatggg cgctccgat cgctccagg 3420

gcgagcgctg tttaaatagc caggcccccg attgcaaaga cattatagcg agctacaaaa 3480

gccatattca aacacctaga tcactaccac ttctacacag gccactcgag cttgtgatcg 3540

cactccgcta agggggcgcc tcttcctctt cgtttcagtc acaaccgca aacactagta 3600

tggcaccgac cagcctgctt gccagtactg gcgtctcttc cgcttctctg tggctctctg 3660

cgcgctccag cgctgctgct ttcccggtgg atcatgcggt ccgtggcgca ccgcagcggc 3720

cgctgcccac gcagcgccgc tgcttccgaa cagtggcggt caggcgccga cccgcggtag 3780

ccgtccgtcc ggaacccgcc caagagtttt gggagcagct tgagccctgc aagatggcgg 3840

aggacaagcg catcttctct gaggagcacc ggtgcgtgga ggtccggggc tgaccggccg 3900

tcgcattcaa cgtaatcaat cgcatgatga tcagaggaca cgaagtcttg gtggcggtgg 3960

ccagaaacac tgtccattgc aaggcatag ggatgcgttc cttcacctct catttctcat 4020

ttctgaatcc ctccctgctc actctttctc ctctctcttc ccgttcacgc agcattcggg 4080

gcaacgaggt gggcccgctc tctccagga agatgcgctt gtcctccgcc atcttgagg 4140

gctcaagctg ctcccaaac tcttgggcgg gttccggacg gacggctacc gcgggtgcgg 4200

ccctgaccgc cactgttcgg aagcagcggc gctgcatggg cagcgccgcg tcgggtgcgc 4260

cacggaccgc atgatccacc ggaaaagcgc acgcgctgga gcgcgcagag gaccacagag 4320

aagcggaaga gacgccagta ctggcaagca ggctggtcgg tgccatatcg atagatctct 4380

taaggcagca gcagctcgga tagtatcgac acactctgga cgctggctgt gtgatggact 4440

gttgcgcga cacttgctgc cttgacctgt gaatatccct gccgtttta tcaaacagcc 4500

tcagtgtgtt tgatcttggt tgtacgcgtt ttgcgagtt gctagctgct tgtgctatct 4560

gcgaatacca ccccgagcat ccccttcctt cgtttcatac cgcttgcatc ccaaccgcaa 4620

cttatctacg ctgtctgct atccctcagc gctgctcttg ctctgctca ctgccctcg 4680

cacagccttg gtttggctc cgctgtatt ctctggtac tgcaacctgt aaaccagcac 4740

tgcaatgctg atgcacggga agtagtggga tgggaacaca aatggaaagc ttaattaaga 4800

gctcttggtt tccagaagga gttgctctt gagcctttca ttctcagcct cgataacctc 4860

caaagccgct ctaattgtgg agggggttcg aatttaaaag cttggaatgt tggttcgtgc 4920

gtctggaaca agcccagact tgttgctcac tgggaaaagg accatcagct ccaaaaaact 4980

tgccgctcaa acccgctacc tctgctttcg cgcaatctgc cctgttgaaa tcgccaccac 5040

attcatattg tgacgcttga gcagtctgta attgcctcag aatgtggaat catctgcccc 5100

ctgtgcgagc ccatgccagg catgtcgagg gcgaggacac ccgcactcg tacagcagac 5160

cattatgcta cctcacaata gttcataaca gtgaccatat ttctcgaagc tcccaacga 5220

gcacctccat gccttgagtg gccaccccc ggccctgggtg cttgcggagg gcaggtaac	5280
cggcatgggg ctaccgaaat ccccgaccgg atcccaccac ccccgcatg ggaagaatct	5340
ctccccggga tgtgggcca ccaccagcac aacctgctgg cccaggcgag cgtcaaacca	5400
taccacaaa atacccttg catcgccct gaattcctt tgccgtctg ctaccgggtg	5460
cttctgtcg aagcaggggt tgctaggat cgtccgagt ccgcaaacc ttgtcgtg	5520
gcggggcttg ttcgagctg aagagc	5546