



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104160020 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 19

(21) 申请号 201280060959. 3

(22) 申请日 2012. 10. 19

(30) 优先权数据

61/548, 901 2011. 10. 19 US

61/663, 263 2012. 06. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/061101 2012. 10. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/059649 EN 2013. 04. 25

(71) 申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 G · 斯蒂芬诺珀罗斯 M · 泰

S · 查克拉伯蒂

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 袁泉

(51) Int. Cl.

C12N 9/10 (2006. 01)

C12P 7/64 (2006. 01)

权利要求书5页 说明书59页

序列表31页 附图10页

(54) 发明名称

工程改造的微生物及用于微生物油生产的方法

(57) 摘要

本发明的一些方面提供了用于油生产的工程改造的微生物。本文还提供了用于对微生物进行工程改造的方法及工程改造的微生物的用途。在一些实施方式中, 提供了微生物, 其经过工程改造而调制了脂质合成的速率控制步骤的组合, 例如生成代谢物乙酰-CoA、ATP或NADPH用于脂质合成的步骤(推步骤)和隔离脂质合成途径中介导脂质合成的反馈抑制的产物或中间产物的步骤(拉步骤)的组合。这种推-和-拉工程改造的微生物显示了极大增强的转化产率、TAG合成以及储存特性。

1. 分离的产油细胞,其包含增加 DGA1 基因产物的表达的遗传修饰。
2. 权利要求 1 的分离的产油细胞,其进一步包含增加 ACC1 基因产物的表达的遗传修饰。
3. 权利要求 1 或权利要求 2 的分离的产油细胞,其进一步包含增加 SCD 基因产物的表达的遗传修饰。
4. 权利要求 1-3 的任何一项的分离的产油细胞,其进一步包含增加 ACL 基因产物的表达的遗传修饰。
5. 权利要求 1-4 的任何一项的分离的产油细胞,其中的遗传修饰包含增加基因产物表达的核酸构建体,所述核酸构建体包含
 - (a) 包含在合适的同源或异源启动子的控制下的、编码基因产物的核酸序列的表达盒,及 / 或
 - (b) 当插入细胞基因组时,调制基因产物的表达水平的核酸序列。
6. 权利要求 5 的分离的产油细胞,其中启动子为诱导型或组成型启动子。
7. 权利要求 5 或权利要求 6 的分离的产油细胞,其中启动子为 TEF 启动子。
8. 权利要求 5-7 的任何一项的分离的产油细胞,其中表达构建体进一步包含内含子。
9. 权利要求 8 的分离的产油细胞,其中内含子位于转录起始位点的下游。
10. 权利要求 8 或权利要求 9 的分离的产油细胞,其中内含子是在编码基因产物的核酸序列之内。
11. 权利要求 1-10 的任何一项的分离的产油细胞,其中核酸构建体抑制或破坏对编码基因产物的原生基因的天然调控,导致原生基因的过表达。
12. 权利要求 11 的分离的产油细胞,其中对原生基因的天然调控的抑制或破坏是通过对调控所述基因表达的调控区域或调控区域的部分进行删除、破坏、突变和 / 或置换而介导的。
13. 权利要求 1-12 的任何一项的分离的产油细胞,其中基因产物是转录物。
14. 权利要求 1-13 的任何一项的分离的产油细胞,其中基因产物为蛋白质。
15. 权利要求 5-14 的任何一项的分离的产油细胞,其中核酸构建体插入细胞的基因组内。
16. 权利要求 1-15 的任何一项的分离的产油细胞,其中基因产物的表达增加赋予细胞将碳源向脂肪酸、脂肪酸衍生物和 / 或甘油三酯 (TAG) 转化的有益表型。
17. 权利要求 16 的分离的产油细胞,其中有益表型包括修饰的脂肪酸谱、修饰的 TAG 谱、增加的脂肪酸和 / 或甘油三酯合成速率、增加的转化产率、增加的细胞中甘油三酯积累及 / 或增加的细胞脂质体中甘油三酯的积累。
18. 权利要求 16 或 17 的分离的产油细胞,其中细胞的脂肪酸或 TAG 的合成速率比相同细胞类型的未修饰细胞增加至少 2 倍。
19. 权利要求 18 的分离的产油细胞,其中细胞的脂肪酸或 TAG 的合成速率比相同类型细胞类型的未修饰细胞增加至少 5 倍。
20. 权利要求 18 的分离的产油细胞,其中细胞的脂肪酸或 TAG 的合成速率比相同类型细胞类型的未修饰细胞增加至少 10 倍。
21. 权利要求 16-20 的任何一项的分离的产油细胞,其中细胞将碳源转化为脂肪酸或

TAG 的转化率在大约 0.025g/g- 大约 0.32g/g(产生的 TAG g/ 消耗的葡萄糖 g) 的范围内。

22. 权利要求 21 的分离的产油细胞,其中细胞将碳源转化为脂肪酸或 TAG 的转化率为至少大约 0.11g/g。

23. 权利要求 22 的分离的产油细胞,其中细胞将碳源转化为脂肪酸或 TAG 的转化率为至少大约 0.195g/g。

24. 权利要求 23 的分离的产油细胞,其中细胞将碳源转化为脂肪酸或 TAG 的转化率为至少大约 0.24g/g。

25. 权利要求 24 的分离的产油细胞,其中细胞将碳源转化为脂肪酸或 TAG 的转化率为至少大约 0.27g/g。

26. 权利要求 1-25 的任何一项的分离的产油细胞,其中细胞包含脂质小体或液泡。

27. 权利要求 1-26 的任何一项的分离的产油细胞,其中细胞为细菌细胞、藻类细胞、真菌细胞或酵母细胞。

28. 权利要求 1-27 的任何一项的分离的产油细胞,其中细胞为产油酵母细胞。

29. 权利要求 1-28 的任何一项的分离的产油细胞,其中细胞为解脂耶氏酵母细胞。

30. 培养物,其包含权利要求 1-29 的任何一项的产油细胞。

31. 权利要求 30 的培养物,其进一步包含碳源。

32. 权利要求 31 的培养物,其中碳源包含可发酵糖。

33. 权利要求 32 的培养物,其中可发酵糖为 C6 糖。

34. 权利要求 33 的培养物,其中碳源包含葡萄糖。

35. 权利要求 31-34 的任何一项的培养物,其中碳源包含有机酸。

36. 权利要求 35 的培养物,其中有机酸为醋酸。

37. 权利要求 36 的培养物,其中醋酸的浓度为至少 5% vol/vol、至少 10% vol/vol、至少 15% vol/vol、至少 20% vol/vol、至少 25% vol/vol 或至少 30% vol/vol。

38. 权利要求 31-37 的任何一项的培养物,其中碳源包含醋酸。

39. 权利要求 38 的培养物,其中醋酸盐的浓度为至少 1% vol/vol。

40. 权利要求 38 的培养物,其中醋酸盐的浓度为至少 2% vol/vol。

41. 权利要求 38 的培养物,其中醋酸盐的浓度为至少 3% vol/vol。

42. 权利要求 38 的培养物,其中醋酸盐的浓度为至少 4% vol/vol。

43. 权利要求 38 的培养物,其中醋酸盐的浓度为至少 5% vol/vol。

44. 权利要求 30-43 的任何一项的培养物,其中培养物包含甘油。

45. 权利要求 44 的培养物,其中甘油浓度为大约 2% vol/vol。

46. 权利要求 30-45 的任何一项的培养物,其中培养物包含溶解氧水平为至少 5%、至少 10%、至少 15%或至少 20%。

47. 权利要求 30-46 的任何一项的培养物,其中培养物显示的 pH 在 pH7.0-pH7.5 的范围内。

48. 权利要求 30-47 的任何一项的培养物,其中培养物包含硫酸铵。

49. 权利要求 48 的培养物,其中培养物包含以 1:2 比率的硫酸铵和醋酸。

50. 权利要求 30-49 的任何一项的培养物,其中培养物显示 5g/l-60g/l 之间的脂质滴度。

51. 权利要求 30-50 的任何一项的培养物,其中培养物显示 0.04g/1/h-0.60g/1/h 之间的脂质生产。

52. 权利要求 30-51 的任何一项的培养物,其中培养物显示 0.1g/1/h-1g/1/h 之间的最大脂质生产效率。

53. 方法,其包含

将碳源与分离的产油细胞接触,所述细胞包含增加 DGA1 基因产物的表达的遗传修饰;
以及

将碳源与细胞接触在适合细胞将至少部分碳源转化为脂肪酸或甘油三酯的条件下进行孵育。

54. 权利要求 53 的方法,其中产油细胞进一步包含增加 ACC1 基因产物的表达的遗传修饰。

55. 权利要求 53 或权利要求 54 的方法,其中产油细胞进一步包含增加 SCD 基因产物的表达的遗传修饰。

56. 权利要求 53-55 的任何一项的方法,其中产油细胞进一步包含增加 ACL 基因产物的表达的遗传修饰。

57. 权利要求 53-56 的任何一项的方法,其中分离的产油细胞是权利要求 1-27 中任何一项的分离的产油细胞。

58. 权利要求 53-57 的任何一项的方法,其中碳源包含可发酵糖。

59. 权利要求 58 的方法,其中碳源包含葡萄糖。

60. 权利要求 53-59 的任何一项的方法,其中碳源包含醋酸盐。

61. 权利要求 60 的方法,其中醋酸盐的浓度为至少 1% vol/vol。

62. 权利要求 60 的方法,其中醋酸盐的浓度为至少 2% vol/vol。

63. 权利要求 60 的方法,其中醋酸盐的浓度为至少 3% vol/vol。

64. 权利要求 60 的方法,其中醋酸盐的浓度为至少 4% vol/vol。

65. 权利要求 60 的方法,其中醋酸盐的浓度为至少 5% vol/vol。

66. 权利要求 53-65 的任何一项的方法,其中碳源包含醋酸。

67. 权利要求 66 的方法,其中醋酸的浓度为至少 5% vol/vol、至少 10% vol/vol、至少 15% vol/vol、至少 20% vol/vol、至少 25% vol/vol 或至少 30% vol/vol。

68. 权利要求 53-67 的任何一项的方法,其中方法包括将细胞与溶解氧接触,其中溶解氧水平为至少 5%、至少 10%、至少 15%, 或至少 20%。

69. 权利要求 53-68 的任何一项的方法,其中的接触和 / 或孵育是在 pH7.0-pH7.5 的 pH 范围内进行的。

70. 权利要求 53-69 的任何一项的方法,其中的方法包括将细胞与硫酸铵接触。

71. 权利要求 70 的方法,其中方法包括将细胞与比率为 1:2 的硫酸铵和醋酸接触。

72. 权利要求 53-71 的任何一项的方法,其中方法进一步包含将细胞与甘油接触。

73. 权利要求 72 的方法,其中方法包括将细胞与浓度为大约 2% vol/vol 的甘油接触。

74. 权利要求 53-73 的任何一项的方法,其中与分离的产油细胞接触的碳源在反应器中进行孵育。

75. 权利要求 53-74 的任何一项的方法,其中将碳源与分离的产油细胞接触,并在分批

补料过程中进行孵育,使碳源转化为脂肪酸或甘油三酯。

76. 权利要求 53-75 的任何一项的方法,其中将碳源与分离的产油细胞接触,并在连续过程中进行孵育,使碳源转化为脂肪酸或甘油三酯。

77. 权利要求 53-76 的任何一项的方法,其进一步包括在孵育步骤中一次或多次地将额外量的碳源或一定量的额外碳源与接触分离的产油细胞的碳源进行接触。

78. 权利要求 53-77 的任何一项的方法,其中通过溶剂萃取法从接触分离的产油细胞的碳源中萃取脂肪酸或甘油三酯。

79. 权利要求 78 的方法,其中溶剂萃取包括氯仿甲醇萃取。

80. 权利要求 78 的方法,其中溶剂萃取包括正己烷萃取。

81. 权利要求 53-80 的任何一项的方法,其中将脂肪酸或甘油三酯与接触分离的产油细胞的碳源分离,并随后通过酯交换反应进行精炼。

82. 方法,其包括通过增加细胞中 DGA1 基因产物的表达以在产油细胞中修饰脂肪酸谱、甘油三酯谱、脂肪酸合成速率、甘油三酯合成速率、脂肪酸衍生物积累的程度、脂肪酸衍生物分泌速率、碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化率、和 / 或碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物转化的有效产率。

83. 权利要求 82 的方法,其进一步包括增加细胞中 ACC1 基因产物的表达。

84. 权利要求 82 或权利要求 83 的方法,其进一步包括增加细胞中 SCD 基因产物的表达

85. 权利要求 82-84 的任何一项的方法,其进一步包括增加细胞中 ACL 基因产物的表达。

86. 权利要求 82-85 的任何一项的方法,其中脂肪酸衍生物积累的程度是脂肪酸衍生物在脂质小体中积累的程度。

87. 权利要求 82-86 的任何一项的方法,其中脂肪酸衍生物为甘油三酯。

88. 权利要求 82-87 的任何一项的方法,其中对产油细胞中脂肪酸谱、甘油三酯谱、脂肪酸合成速率、甘油三酯合成速率、脂肪酸衍生物积累的程度、脂肪酸衍生物分泌速率、碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化率、和 / 或碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物转化的有效产率的修饰包含增加产油细胞中的脂肪酸合成速率、甘油三酯合成速率、脂肪酸衍生物积累的程度、脂肪酸衍生物分泌速率、碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化率、和 / 或碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物转化的有效产率。

89. 权利要求 88 的方法,其中对细胞中碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化效率的修饰包含使转化效率增加至少 2 倍。

90. 权利要求 88 的方法,其中对细胞中碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化效率的修饰包含使转化效率增加至少 3 倍。

91. 权利要求 88 的方法,其中对细胞中碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化效率的修饰包含使转化效率增加至少 4 倍。

92. 权利要求 88 的方法,其中对细胞中碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化效率的修饰包含使转化效率增加至少 5 倍。

93. 权利要求 82-92 的任何一项的方法,其中细胞为酵母细胞。

94. 权利要求 93 的方法,其中酵母细胞为耶氏酵母属细胞。

95. 权利要求 94 的方法,其中产油酵母为解脂耶氏酵母。

96. 分离的核酸分子,其包含:
- a) 编码 SEQ ID NO:2(解脂耶氏酵母 DGA1)的核苷酸序列,或
 - b) 与 a) 的核苷酸序列至少 85% 相同的核苷酸序列。
97. 权利要求 96 的分离的核酸分子,其中编码 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列包含 SEQ ID NO:1。
98. 表达盒,其包含权利要求 96 或 97 的分离的核酸分子以及异源启动子。
99. 权利要求 98 的表达盒,其中启动子为组成型启动子或诱导型启动子。
100. 权利要求 99 的表达盒,其中异源启动子为翻译延长因子 (TEF) 启动子。
101. 权利要求 98-100 的任何一项的表达盒,其中异源启动子包含内含子。
102. 权利要求 98-101 的任何一项的表达盒,其中异源启动子进一步包含起始密码子。
103. 权利要求 102 的表达盒,其中内含子位于编码 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的翻译起始位点的下游。
104. 载体,其包含权利要求 98-103 中任何一项的表达盒。
105. 细胞,其包含权利要求 98-104 中任何一项的表达盒或权利要求 104 的载体的至少一部分。

工程改造的微生物及用于微生物油生产的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请依 35U. S. C. § 119 要求对美国临时专利申请 U. S. S. N. 61/548, 901 (提交于 2011 年 10 月 19 日); 及美国临时专利申请 U. S. S. N. 61/663, 263 (提交于 2012 年 6 月 22 日) 的优先权, 两个申请的题目均为“工程改造的微生物及用于微生物油生产的方法”, 其全部内容都通过引用并入本文。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明是在政府支持下完成的, 所属基金为美国能源部所授予的 DE-AR0000059 号基金。政府在本发明中拥有特定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 能持续生产的生物燃料是化石燃料的一个替代选择, 可以帮助减少对容易开采的化石燃料储备的消耗, 同时能够避免化石燃料相关的污染以及温室气体排放, 由此能满足不断增长的对可持续获得的能源的需要。发展适合于将碳源有效转化为脂质的方法及产油生物体是微生物生物燃料生产得到广泛应用的前提条件。

[0007] 本发明特定方面的概述

[0008] 如果能达到高的转化产率, 那么异养生物的微生物油生产是从可再生资源经济有效生产生物燃料的一个最有前途的路径。由可再生原料的经济有效的微生物油生产的关键是高的碳水化合物向油转化的产率。随着使能技术应用于此, 代谢工程已经出现, 并且有大量的实例证明成功的途径工程改造能显著地提高微生物生物催化剂在化学、药学和燃料产品的合成中的效能。

[0009] 先前在对微生物进行工程改造用于油生产上的努力聚焦于扩增脂肪酸合成途径中推测的限速步骤。这样的规模扩增有一个显著的缺陷, 就是不断增加的碳流进入脂肪酸合成途径会增加细胞中饱和脂肪酸的水平, 由此激活了脂肪酸生物合成中强烈的负反馈循环。

[0010] 本发明的一些方面提供了微生物工程改造的策略, 其组合了上游的代谢物形成途径 (本文也称为“推”代谢途径) 的扩增以及类似的下游产物隔离 (sequestering) 途径 (本文也称为: “拉”代谢途径) 中代谢流的增加。本发明的一些方面提供了微生物中推-和-拉修饰的平衡组合, 使得大量碳流的扩增进入脂质合成途径, 而中间代谢物的浓度不会显著偏离其稳态生理水平, 因此避免了对脂质合成的反馈抑制。

[0011] 本公开的一些方面涉及这样的认识, 即单一分支修饰如仅推的修饰或仅拉的修饰的对转化效率的效应通常是有限的, 因为细胞中有合成产率的补偿性的调控, 并且微生物细胞中脂质生物合成的推和拉步骤的和谐调控对脂质生产产生惊人的协同效应。

[0012] 例如, 本公开的一些方面提供了遗传修饰的产油微生物, 其包含了脂质生物合成途径的不同修饰的组合, 本文也称为推拉修饰。在一些实施方式中, 本文提供的微生物包含了产生脂质合成中需要的代谢物或中间产物的产率增加的修饰, 以及使得细胞中脂质合成的产物的隔离的修饰, 如甘油三酯向储存形式的脂质, 由此减少了其一些产物如脂肪酸或甘油二酯对脂质合成的反馈抑制。在一些实施方式中, 代谢性推和代谢性拉的途径中修饰

的组合使得脂质生产有协同性的增加。在一些实施方式中,推修饰使得脂质合成的元件块或脂质合成的代谢物在细胞中的水平增加。在一些实施方式中,拉修饰减少了对脂质合成的反馈抑制。

[0013] 本发明的一些方面提供了包含遗传修饰的微生物,所述修饰同时影响脂质生物合成的推和拉途径。例如,推和拉修饰被引入到产油的模式微生物中——产油酵母解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 中。研究甘油三酯 (TAG) 合成途径中最后一步的甘油二脂乙酰转移酶 (DGA1) 的过表达,作为示例性的拉修饰。DGA1 过表达使得脂质生产比对照微生物中增加 4 倍,脂质含量达到细胞干重 (DCW) 的 33.8%。研究脂肪酸合成的第一个关键步骤中乙酰基-CoA 羧基水解酶 (ACC1) 作为示例性的推修饰。ACC1 过表达使得脂质含量是对照的 2 倍,达到 17.9% 的脂质含量。对串联基因表达构建体中同时共表达 ACC1 和 DGA1 进行研究作为示例性的推-拉修饰。ACC1 和 DGA1 同时过表达进一步使脂质含量增加到 41.4%,表明 ACC1+DGA1 共表达具有协同效应。

[0014] 在 2L 生物反应器发酵中,探索了 ACC1+DGA1 转化子的脂质生产特征,120hr 后,脂质含量达到 61.7%。发酵过程的脂质积累期中的总体的产率和生产效率分别为 0.195g/g 和 0.143g/L/hr,最大产率和生产效率为 0.270g/g 和 0.253g/L/hr。该研究表明了产油酵母解脂耶氏酵母具有极佳的脂质生产能力,也证明了对脂质合成途径中两个重要步骤进行代谢工程改造的效应,所述改造将流转移至脂质合成并产生 TAG 合成的驱动力。

[0015] 本发明的一些方面提供了用于产油微生物,例如产油酵母的新型过表达平台。本发明的一些方面提供了表达构建体,其包含启动子(驱动包括编码序列和内含子的转录物的转录),例如翻译延长因子-1 α (TEF) 启动子,其位于包含内含子和编码序列的核酸上游。本公开的一些方面提供了能够比无内含子 TEF 启动子增加表达至少 17 倍的含内含子的表达构建体。

[0016] 本公开的一些方面提供了分离的产油细胞,其包含了增加 DGA1 基因产物的表达的遗传修饰。在一个实施方式中,所述分离的产油细胞进一步包含增加 ACC1 基因产物的表达的遗传修饰。在一些实施方式中,所述分离的产油细胞进一步包含了增加 SCD 基因产物的表达的遗传修饰。在一些实施方式中,所述分离的产油细胞进一步包含了增加 ACL 基因产物的表达的遗传修饰。在一些实施方式中,所述遗传修饰包含了增加基因表达的核酸构建体,所述核酸构建体包含 (a) 包含在合适的同源或异源启动子控制下的、编码基因产物的核酸序列的表达盒,和/或 (b) 当插入细胞基因组时,调控基因产物的表达水平的核酸序列。在一些实施方式中,启动子是诱导型或组成型的启动子。在一些实施方式中,启动子为 TEF 启动子。在一些实施方式中,所述表达构建体进一步包含内含子。在一些实施方式中,所述内含子在转录起始位点的下游。在一些实施方式中,内含子在编码基因产物的核酸序列之内。在一些实施方式中,所述核酸构建体抑制或破坏对编码所述基因产物的原生基因的天然调控,导致原生基因的过表达。在一些实施方式中,对原生基因的天然调控的抑制或破坏是通过调控基因表达的调控区域或调控区域的部分进行删除、破坏、突变和/或置换而介导的。在一些实施方式中,所述基因产物是转录物。在一些实施方式中,所述基因产物是蛋白质。在一些实施方式中,所述核酸构建体插入细胞的基因组内。在一些实施方式中,基因产物的表达增加赋予细胞将碳源转化为脂质,例如脂肪酸,脂肪酸衍生物和/或甘油三酯 (TAG) 的有益表型。在一些实施方式中,所述有益表型包括修饰的脂肪酸谱、修饰的

TAG 谱、增加的脂肪酸和 / 或甘油三酯合成速率、增加的转化产率、增加的细胞中甘油三酯积累,和 / 或细胞的脂质小体中增加的甘油三酯积累。在一些实施方式中,所述细胞的脂肪酸或 TAG 的合成速率比相同细胞类型的未修饰细胞增加至少 2 倍。在一些实施方式中,所述细胞的脂肪酸或 TAG 的合成速率比相同细胞类型的未修饰细胞增加至少 5 倍。在一些实施方式中,所述细胞的脂肪酸或 TAG 的合成速率比相同细胞类型的未修饰细胞增加至少 10 倍。在一些实施方式中,细胞将碳源转化为脂肪酸或 TAG 的转化率在大约 0.025g/g- 大约 0.32g/g(例如,所产生的脂质 g/ 所消耗的碳源 g) 的范围内。在一些实施方式中,细胞将碳源转化为脂肪酸或 TAG 的转化率为至少大约 0.11g/g。在一些实施方式中,细胞将碳源转化为脂肪酸或 TAG 的转化率为至少大约 0.195g/g。在一些实施方式中,细胞将碳源转化为脂肪酸或 TAG 的转化率为至少大约 0.24g/g。在一些实施方式中,细胞将碳源转化为脂肪酸或 TAG 的转化率为至少大约 0.27g/g。在一些实施方式中,所述细胞包含脂质小体或液泡。在一些实施方式中,细胞为细菌细胞、藻类细胞、真菌细胞或酵母细胞。在一些实施方式中,所述细胞为产油酵母细胞。在一些实施方式中,细胞为解脂耶氏酵母细胞。

[0017] 本公开的一些方面提供了包含产油细胞,例如本文所描述的产油细胞的培养物。在一些实施方式中,所述培养物进一步包含碳源。在一些实施方式中,所述碳源包含可发酵糖。在一些实施方式中,所述可发酵糖为 C6 糖。在一些实施方式中,所述碳源包含葡萄糖。在一些实施方式中,所述碳源包含有机酸。在一些实施方式中,所述有机酸是醋酸。在一些实施方式中,醋酸浓度为至少 5% vol/vol、至少 10% vol/vol、至少 15% vol/vol、至少 20% vol/vol、至少 25% vol/vol 或至少 30% vol/vol。在一些实施方式中,所述碳源包含醋酸盐。在一些实施方式中,醋酸盐的浓度为至少 1% vol/vol。在一些实施方式中,醋酸盐的浓度为至少 2% vol/vol。在一些实施方式中,醋酸盐的浓度为至少 3% vol/vol。在一些实施方式中,醋酸盐的浓度为至少 4% vol/vol。在一些实施方式中,醋酸盐的浓度为至少 5% vol/vol。在一些实施方式中,所述培养物包含甘油。在一些实施方式中,甘油浓度为大约 2% vol/vol。在一些实施方式中,所述培养物包含溶解氧水平为至少 5%、至少 10%、至少 15% 或至少 20%。在一些实施方式中,所述培养物显示的 pH 在 pH7.0-pH7.5 范围内。在一些实施方式中,所述培养物包含硫酸铵。在一些实施方式中,所述培养物包含以 1:2 比率的硫酸铵和醋酸。在一些实施方式中,所述培养物显示 5g/l-60g/l 之间的脂质滴度。在一些实施方式中,所述培养物显示 0.04g/l/h-0.60g/l/h 之间的脂质生产。在一些实施方式中,所述培养物显示 0.1g/l/h-1g/l/h 之间的最大脂质生产效率。

[0018] 本公开的一些方面提供了方法,包含将碳源和分离的产油细胞接触,所述细胞包含增加 DGA1 基因产物的表达的遗传修饰;以及将碳源与细胞接触在适合细胞将至少部分碳源转化为脂肪酸或甘油三酯的条件下进行孵育。在一些实施方式中,所述产油细胞进一步包含增加 ACC1 基因产物的表达的遗传修饰。在一些实施方式中,所述产油细胞进一步包含增加 SCD 基因产物的表达的遗传修饰。在一些实施方式中,所述产油细胞进一步包含增加 ACL 基因产物的表达的遗传修饰。在一些实施方式中,所述分离的产油细胞是如本文所描述的工程改造的分离的产油细胞。在一些实施方式中,所述碳源包含可发酵糖。在一些实施方式中,所述碳源包含葡萄糖。在一些实施方式中,所述碳源包含醋酸盐。在一些实施方式中,醋酸盐的浓度为至少 1% vol/vol、至少 2% vol/vol、至少 3% vol/vol、至少 4% vol/vol 或至少 5% vol/vol。在一些实施方式中,所述碳源包含醋酸。在一些实施方式

中,醋酸的浓度为至少 5% vol/vol、至少 10% vol/vol、至少 15% vol/vol、至少 20% vol/vol、至少 25% vol/vol 或至少 30% vol/vol。在一些实施方式中,所述方法包括将细胞与溶解氧接触,所述溶解氧水平为至少 5%、至少 10%、至少 15%或至少 20%。在一些实施方式中,所述的接触和 / 或孵育是在 pH7.0-pH7.5 的 pH 范围内进行的。权利要求 53-69 中任一项的方法,其中所述方法包括将细胞与硫酸铵接触。在一些实施方式中,所述方法包括将细胞与比率为 1:2 的硫酸铵和醋酸接触。在一些实施方式中,所述方法进一步包含将细胞与甘油接触。在一些实施方式中,所述方法包括将细胞与浓度为大约 2% vol/vol 的甘油接触。在一些实施方式中,与分离的产油细胞接触的碳源是在反应器中进行孵育。在一些实施方式中,将碳源与分离的产油细胞接触,并在分批补料过程中进行孵育,使碳源转化为脂肪酸或甘油三酯。在一些实施方式中,将碳源与分离的产油细胞接触,并在连续过程中进行孵育,使碳源转化为脂肪酸或甘油三酯。在一些实施方式中,所述方法进一步包括在孵育步骤中一次或多次地将额外量的碳源或一定量的额外碳源与接触分离产油细胞的碳源接触。在一些实施方式中,通过溶剂萃取法从接触分离的产油细胞的碳源中萃取脂肪酸或甘油三酯。在一些实施方式中,溶剂萃取包括氯仿甲醇萃取。在一些实施方式中,溶剂萃取包括己烷萃取。在一些实施方式中,将脂肪酸或甘油三酯与接触分离的产油细胞的碳源分离,并随后通过酯交换反应进行精炼。

[0019] 本公开的一些方面提供了方法,其包括通过增加细胞中 DGA1 基因产物的表达以在产油细胞中修饰脂肪酸谱、甘油三酯谱、脂肪酸合成速率、甘油三酯合成速率、脂肪酸衍生物积累的程度、脂肪酸衍生物分泌速率、碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化率、和 / 或碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物转化的有效产率。在一些实施方式中,所述方法进一步包括增加细胞中 ACC1 基因产物、SCD 基因产物和 / 或 ACL 基因产物的表达。在一些实施方式中,脂肪酸衍生物积累的程度是脂肪酸衍生物在脂质小体中积累的程度。在一些实施方式中,所述脂肪酸衍生物是甘油三酯。在一些实施方式中,对产油细胞中脂肪酸谱、甘油三酯谱、脂肪酸合成速率、甘油三酯合成速率、脂肪酸衍生物积累的程度、脂肪酸衍生物分泌速率、碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化率、和 / 或碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物转化的有效产率的修饰包含增加产油细胞中的脂肪酸合成速率、甘油三酯合成速率、脂肪酸衍生物积累的程度、脂肪酸衍生物分泌速率、碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化率、和 / 或碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物转化的有效产率。在一些实施方式中,对细胞中碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化效率的修饰包含使转化效率增加至少 2 倍。在一些实施方式中,对细胞中碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化效率的修饰包含使转化效率增加至少 3 倍。在一些实施方式中,对细胞中碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化效率的修饰包含使转化效率增加至少 4 倍。在一些实施方式中,对细胞中碳水化合物向脂肪酸或脂肪酸衍生物的转化效率的修饰包含使转化效率增加至少 5 倍。在一些实施方式中,所述细胞为酵母细胞。在一些实施方式中,所述酵母细胞为耶氏酵母属细胞。在一些实施方式中,所述产油酵母是解脂耶氏酵母。

[0020] 本公开的一些方面提供了分离的核酸分子,其包括:a) 编码 SEQ ID NO:2(解脂耶氏酵母 DGA1) 的核苷酸序列,或 b) 与 a) 的核苷酸序列至少 85%相同的核苷酸序列。在一些实施方式中,编码 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列包含 SEQ ID NO:1。本公开的一些方面提供了表达盒,其包含如本文描述的分离的核酸分子以及异源启动子。在一些实施方式中,启动

子是组成型启动子或诱导型启动子。在一些实施方式中,所述异源启动子为翻译延长因子(TEF)启动子。在一些实施方式中,所述异源启动子包含内含子。在一些实施方式中,所述异源启动子进一步包含起始密码子。在一些实施方式中,内含子位于编码 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的翻译起始位点的下游。本公开的一些方面提供了载体,其包含如本文所描述的表达盒。本公开的一些方面提供了细胞,其包含如本文所描述的表达盒或本文描述的载体的至少一部分。

[0021] 本申请的主体要素在一些情况下涉及相关产品、对特定问题的备选解决方案,和/或单一系统或物品的大量不同用途。

[0022] 本发明的其他优势、特征以及用途在特定非限制性实施方式的具体描述、附图以及权利要求条款中更显而易见。

[0023] 附图简述

[0024] 图 1. 解脂耶氏酵母中脂质合成的主要代谢途径总览。

[0025] 图 2. 培养 50 小时后不同启动子控制下 β -半乳糖苷酶的酶活性。

[0026] 图 3. ACC1+DGA1 转化子的生物反应器发酵 (MTYL065)。

[0027] 图 4. 2-L 生物反应器发酵过程中 ACC1+DGA1 转化子的脂肪酸谱 (FAP)。

[0028] 图 5. 在 2-L 生物反应器中生长并以醋酸盐为碳源的 ACC+DGA 转化子的脂肪酸谱。

[0029] 图 6. 在醋酸盐上的 ACC+DGA1 解脂耶氏酵母的脂肪酸生产情况。

[0030] 图 7. 组合表达构建程序。为构建含有同脂质积累基因靶标的组合的质粒采用的克隆途径和策略。这些质粒随后转化入解脂耶氏酵母以研究脂质积累情况。

[0031] 图 8. 通过 pMT053 整合与 pMT092 比较 TEF_{in}-DGA 盒的转录表达。

[0032] 图 9. 表达组合构建体的解脂耶氏酵母菌株之间的相对脂质生产效率和产率,通过将总脂肪酸含量以对照菌株标准化测出。在图下方指示了是 (+) 或否 (-) 存在相应基因靶标的转化的过表达盒。以最初培养 100 小时内相对脂质积累来计算生产效率(浅灰色条形)。产率是通过将脂质积累除以所消耗的糖计算的。培养基的 C/N 比率为 20。结果为多个实验的平均值。

[0033] 图 10. 靶标基因在菌株 MTYL089 中的转录表达。表达根据肌动蛋白表达进行内部标准化,并且是与对照 (MTYL038) 菌株相比较,表达测定在生长 66 小时后进行。

[0034] 图 11. 过表达 ACC、D9、ACL12 和 DGA 的 MTYL089 菌株在批式生物反应器的发酵情况。C/N 摩尔比率为 100。所有取样都进行三次重复。

[0035] 图 12. 2-L 发酵结束时 MTYL089 的显微镜成像。普通光学显微镜成像(左图)显示了大部分细胞是酵母形式,包含大的液泡。荧光显微成像(右图)表明这些液泡是由中性脂质组成的。

[0036] 图 13. MTYL065 和 MTYL089 两种菌株之间的脂肪酸谱对比。取自各个发酵终点的脂肪酸谱,相对总的脂肪酸含量进行标准化。

[0037] 图 14. 氮 (mM)、非脂质和脂质滴度 (g/L) 的变化趋势。

[0038] 图 15. 脂质滴度 (g/L)、脂质含量 (%) 和 C/N 比率的趋势。主坐标轴显示了脂质滴度和脂质含量,以细胞干重 % 表示。次坐标轴显示了 C/N 比率。C/N 比率在终点时由于醋酸盐快速消耗有所下降。

[0039] 图 16. 上图——在没有荧光的油浸显微镜 (100X) 下观察到的“浮游细胞”。下

图——荧光下相同视野显示了明亮的红色脂质小体。

[0040] 本发明特定实施方式详述

[0041] 液体生物燃料作为化石燃料的替代品非常有前途,可以帮助减轻对于气候变化的顾虑,并且缓解了供应的不确定性(1)。生物柴油、航空油料和其他油衍生燃料对于航空和重型货车运输是尤其必需的。目前这些产品都是只在蔬菜油中生产,这是一条成本高又不可持续的途径(2)。一个有吸引力的可能性是将可再生的碳水化合物原料非光合作用地转化为油(3)。对于生物柴油,对于油原料从蔬菜油向微生物油生产的转变具有大量的其他优势:能适应多样的物料,在对土地的需求上非常灵活,有效的加工循环转换,并且很容易进行规模扩大(4)。用于微生物生产的生物平台也更容易在遗传上进行操纵,利于进一步的优化。

[0042] 由碳水化合物转化为油的经济有效微生物技术的关键是高碳水化合物向油的转化产率。随着使能技术应用于此,代谢工程已经出现,并且有大量的实例证明成功的途径工程改造能显著地提高微生物催化剂在化学、药学和燃料产品的合成中的效能(5)。先前在工程改造具有高脂质合成的微生物的努力集中于扩大脂肪酸合成途径中推测的限速步骤(6)。然而这些努力都产生了好坏参半的结果,可能是因为调控脂肪酸流导致饱和脂肪酸水平升高,饱和脂肪酸是脂肪酸生物合成酶的有力的变构抑制剂,也为脂肪酸生物合成创造了负反馈循环(7)。本文描述了结合上游代谢物形成途径的扩大和类似地增加下游代谢物消耗途径中代谢流的方法。如果得到平衡,则这种推-和-拉策略可产生大的代谢流的扩增,而中间产物代谢物的浓度不会明显偏离其的稳态生理水平。

[0043] 产油酵母解脂耶氏酵母是生物柴油生产的一个有吸引力候选者,其也在其他工业应用中有广泛用途:柠檬酸生产、蛋白质生产(例如,蛋白酶和酯酶)以及生物修复(8-10)。随着对其基因组的完全测序和遗传工程工具不断完善,要完成对解脂耶氏酵母的工程改造相对容易(11)。而且还发现解脂耶氏酵母在培养基中生长旺盛,能够在多种底物上生长,并且也可用于在农业工业废品、工业甘油及工业脂肪上生产脂质(12-14)。其具有极佳的脂质积累能力,通常能积累高达36%细胞干重(DCW)的脂质(15)。

[0044] 已经开始对解脂耶氏酵母中从头开始的脂质合成的代谢途径进行完整的作图,图1中阐明了目前的脂质合成模型:进入糖酵解过程的葡萄糖会进入线粒体,用作TCA循环中的丙酮酸;然而,多余的乙酰-CoA是通过柠檬酸穿梭途径从线粒体进入细胞溶胶的。然后细胞溶胶中的乙酰-CoA被乙酰-CoA羧化酶(ACC)转化为丙二酰-CoA,这是脂肪酸合成的第一个步骤。在脂肪酸合成后,甘油三酯(TAG)合成沿着肯尼迪途径进行,这是在网内质网(ER)和脂质小体中进行的。酰基-CoA是酰基化成甘油-3-磷酸骨架以形成溶血磷脂酸(LPA)的前体,后者进一步酰基化形成磷脂酸(PA)。随后PA去磷酸化形成二脂酰甘油(DAG),最后二脂酰甘油酰基转移酶(DGA)进行一步酰化反应产生TAG。

[0045] 乙酰-CoA从线粒体向细胞溶胶的运输是通过以下进行的:ATP-通过柠檬酸穿梭的柠檬酸裂解酶(ACL)介导的柠檬酸裂解产生乙酰-CoA和草酰乙酸(OAA)。然后乙酰-CoA羧化酶(ACC)催化进行脂质生物合成的第一个关键步骤,将细胞溶胶中乙酰-CoA转化为丙二酰-CoA,后者是脂肪酸链延伸的主要前体。然后完整的脂肪酰-CoA链被运输到网内质网(ER)或脂质小体膜,通过肯尼迪途径进行甘油三酯(TAG)的最后组装。解脂耶氏酵母中生产的超过80%的储存脂质都是TAG形式(16)。细胞溶胶OAA被苹果酸脱氢酶转化为苹果

酸并运输回线粒体,以完成柠檬酸穿梭循环。NADPH形式的还原性等价物可由磷酸戊糖途径或转氢酶途径中的苹果酸酶来提供。在解脂耶氏酵母中,有高的PPP代谢流且苹果酸酶过表达没有效果,这表明前者是NADPH的主要来源(4,17)。

[0046] 细胞内脂质积累可经由两种方法进行:从头开始的脂质合成或外源脂肪酸和脂质的外部并入。在营养供应耗尽时又有多余碳源存在下,最常发生脂质的积累。在培养中,这种状态通常与静止期的开始相吻合。在实践中,最常用的限制性营养是氮,因为在培养基组合中非常容易控制氮的含量(15)。除了这些可诱导的条件,脂质合成途径是受到高度调节的,这样生物体能够使细胞生长与能量储存达到平衡。例如,仅仅是ACC就在多个水平上受到多种因素的调节(7)。

[0047] 这种紧密的调节在特定情况下也可以进行规避。通过消除过氧化物酶体氧化途径及对甘油代谢进行工程改造,解脂耶氏酵母能够通过从头脂质积累达到40%-70%脂质(18,19)。 $\Delta 6-$ 和 $\Delta 12-$ 去饱和酶基因的共表达使得细胞产生显著量的 γ -亚麻酸(GLA)(20)。然而,在解脂耶氏酵母中工程改造脂质生物合成途径相对而言依然没有得到很好的探索,人们依然在发展用于有效工程改造脂质生产途径以使产率最大化的策略。

[0048] 本公开的一些方面提供了工程改造的微生物,用于生产生物燃料或生物燃料前体。术语“生物燃料”指的是衍生于生物学来源如活细胞、微生物、真菌或植物的燃料。该术语包括例如直接由生物学来源获得,例如,通过常规萃取、蒸馏或精炼方法得到的燃料,以及通过加工获自生物学来源的生物燃料前体而生产的燃料,如通过化学修饰如酯交换步骤进行加工。直接获得的生物燃料的实例为酒精类,如乙醇、丙醇和丁醇,脂肪和油。可通过加工生物燃料前体(例如脂质)而获得的生物燃料的实例为生物柴油(例如通过对脂质进行酯交换反应产生)以及绿色柴油/改性油染料(例如通过对油进行脱氢反应产生)。生物柴油,也称为脂肪酸甲酯(或乙酯)是现今在经济上最重要的生物燃料之一,可以通过对脂质进行酯交换反应在工业规模上进行生产,在所述酯交换反应中,氢氧化钠和甲醇(或乙醇)与脂质如甘油三酯发生反应,产生生物柴油和甘油。

[0049] 生物柴油的工业规模生产的原料包括动物脂肪、植物油、棕榈油、麻、大豆、油菜籽、亚麻、向日葵、油质和产油藻类。在其他方法中,由微生物将生物质转化为生物燃料前体如脂质,随后将所述前体进行萃取并进一步加工生成生物燃料。术语“生物质”指的是通过培养和/或繁殖活细胞或生物体(例如微生物)产生的物质。生物质可以包含细胞、微生物和/或细胞间内含物,例如细胞脂肪酸和TAGS,以及细胞外物质。细胞外物质包括但不限于细胞分泌的化合物,例如分泌到细胞外的脂肪酸或TAG。用于生物燃料生产的重要的生物质类型为藻类生物质和植物衍生的生物质,例如玉米秸秆和木纤维。在一些实施方式中,用于生物燃料或生物燃料前体生产的生物质可包含植物衍生的糖类,例如蔗糖或玉米衍生糖类。

[0050] 本公开的一些方面涉及脂质的微生物来源的工程改造和开发,其可用于例如经济上可行的工业规模生物柴油生产。术语“脂质”指的是脂肪酸及其衍生物。相应地,脂质的实例包括脂肪酸(FA,包括饱和及不饱和);甘油酯或甘油酯,也称为酰基甘油(如单甘油酯(单酰基甘油)、甘油二酯(二酰基甘油)、甘油三酯(三酰基甘油,TAG,或中性脂肪);磷酸甘油酯(甘油磷酸酯);非甘油酯(鞘脂,固醇脂,包括胆固醇和类固醇激素,异戊烯醇脂包括萜类,脂肪醇,蜡和聚酮化合物);以及复合脂质衍生物(糖连接的脂质或糖脂,和蛋白连

接的脂质)。脂质是活细胞和微生物细胞质膜中至关重要的部分。一些细胞和微生物还生产脂质用于储存能量,例如以三酰基甘油的形式,存在于脂质小体、脂肪滴或液泡中。

[0051] 本发明的一些方面涉及工程改造的微生物用于生物燃料或生物燃料前体的生产。在一些实施方式中,本文提供的微生物经过工程改造以优化其脂质代谢以生产脂质。术语“脂质代谢”指的是涉及脂质的制造或降解的分子过程。脂肪酸合成、脂肪酸氧化、脂肪酸去饱和、TAG 合成、TAG 储存以及 TAG 降解都是细胞中脂质代谢组成部分的实例。因此,术语“脂肪酸代谢”指的是涉及脂肪酸合成、产生、转化或降解的所有细胞或生物体的过程。脂肪酸合成、脂肪酸氧化、脂肪酸去饱和、TAG 合成以及 TAG 降解都是细胞中脂肪酸代谢组成部分的实例。

[0052] 术语“三酰基甘油”(TAG,有时也称为甘油三酯)指的是如下分子,其包含通过酯键共价连接于三个脂肪酸分子(为一元的脂肪族羧酸)的甘油的单个分子,在甘油分子的三个羟基(OH)基团上分别连接一个脂肪酸分子。三酰基甘油是代谢能量的高度浓缩的储备,因为其特征为体积小、不含水,并且是生物柴油生产的合适的原料。

[0053] 许多细胞和生物体都以脂肪酸和脂肪酸衍生物的形式储存代谢能量,如 TAG。脂肪酸及其衍生物,如 TAG,提供了储存代谢能量的理想形式。在 C-C 键中包含的能量可通过 β -氧化反应得到有效释放,这在形式上是等价于脂肪酸生物合成的逆反应的一个反应过程,但是是由不同的酶组成的不同分子途径介导和调节的。微生物可由外部供应、内部转换及从头合成而获取脂肪酸。本发明的一些方面涉及基于微生物有效地从外部供应的碳源合成及储存脂肪酸或脂肪酸衍生物如 TAG 的能力,鉴别用于生物燃料或生物燃料前体生产的微生物。

[0054] 天然脂肪酸分子通常具有 4-28 个碳原子的无分支的脂肪链或尾巴。如果脂肪链的所有碳原子都是经由 C-C 单键连接,则脂肪酸被称为“饱和的”,如果两个或更多个碳原子是经由 C-C 双键连接,则脂肪酸被称为“不饱和的”。不饱和脂肪酸在膜的流动性、细胞活性、代谢和控制基因转录的核内事件中起重要作用。

[0055] 酵母中的脂肪酸谱主要由 C16 和 C18 脂肪酸组合,例如棕榈酸(C16)、棕榈油酸(C16)、硬脂酸(C18)和油酸(C18)。棕榈酸是无支链的饱和脂肪酸,脂肪链具有 16 个碳原子(碳原子/不饱和键:16.0)。硬脂酸是无支链的饱和脂肪酸,脂肪链有 18 个碳原子(18.0)。棕榈油酸是单不饱和脂肪,脂肪链有 16 个碳原子(16.1)。油酸是单不饱和脂肪,脂肪链有 18 个碳原子(18.1)。酵母中有少数脂肪酸种类包括 C14 和 C26 脂肪酸,这些在蛋白质修饰中起至关重要的作用或分别作为鞘脂及 GPI 锚定物的组成部分。

[0056] 脂肪酸的从头合成利用了大量代谢物、乙酰-CoA、ATP 和 NADPH,因此与依赖于这些化合物的其他细胞过程相竞争。脂肪酸延伸循环中有两个还原步骤都需要 NADPH,这将脂肪酸合成与细胞的代谢状态关联起来,使脂肪酸合成被限制在细胞具有高的能量负荷(表现为 ATP/AMP 比率增加,还原性当量升高及乙酰-CoA 库升高)的条件下。几乎所有亚细胞细胞器都参与到脂肪酸代谢中,这表明脂肪酸平衡的维持需要在多种水平上进行调节。生成用于脂质生物合成的代谢物、乙酰-CoA、ATP 或 NADPH 的脂质合成步骤在本文中有时被称为脂质合成的“推步骤”。例如通过过表达介导如代谢物生产过程的基因产物对增加细胞中脂质生物合成的代谢物、乙酰-CoA、ATP 或 NADPH 的生产的这些过程进行扩增,在本文有时被称为“推修饰”。

[0057] 包括酵母在内的大多数生物体能够由多种碳源从头合成脂肪酸。在起始步骤中,乙酰-CoA 由乙酰-CoA 羧化酶 (ACC; 在酵母中由 ACC1 和 HFA1 编码) 通过将 CO₂ 添加到丙二酰-CoA 上进行羧化。生物素是该反应中一个至关重要的辅助因子,其通过生物素:载脂蛋白连接酶 (在酵母中由 BPL1/ACC2 编码) 这种酶的作用共价连接于 ACC 载脂蛋白上。ACC 是一种具有三重功能的酶,其具有生物素羧基运载蛋白 (BCCP) 结构域、生物素-羧化酶 (BC) 结构域和羧基转移酶 (CT) 结构域。在多数细菌中,这些结构域是作为单独的多肽表达,并组装成异聚体复合物。相反,包括线粒体 ACC 变体 (酵母中的 Hfa1) 在内的真核 ACC 是在单多肽上具有上述这些功能。由 ACC 产生的丙二酰-CoA 在由脂肪酸合成酶、FAS 和延伸酶催化的循环系列反应中作为两个碳原子的供体发挥作用。

[0058] 从头开始的脂肪酸合成的直接产物是饱和脂肪酸。已知在包括酵母在内的真核细胞中,饱和脂肪酸是不饱和脂肪酸的前体。通常不饱和脂肪酸是通过由特殊的酶类 (称为去饱和酶) 对饱和脂肪酸中的 C-C 单键进行去饱和作用而产生的。对掌控饱和脂肪酸向不饱和脂肪酸的转化的控制机制还没有得到深入了解。在真核细胞中,不饱和脂肪酸在膜的流动性、细胞活性、代谢和控制基因转录的细胞核事件的调控中起重要作用。通常,酵母脂肪酸的大约 80% 为单不饱和脂肪酸,这意味着它们在其脂肪链上含有一个不饱和键。

[0059] 脂肪酸是脂肪酸合成的有效抑制剂,脂肪酸对脂肪酸合成的反馈抑制是对微生物进行工程改造用于油生产的主要障碍。本公开的一些方面是基于这样的认识,即尽管脂质合成的推修饰通常不能盖过脂肪酸介导的脂质合成的反馈抑制,然而推修饰 (例如 ACC1 过表达) 与拉修饰 (例如 DGA1 过表达) 的组合能有效地绕过反馈抑制,由此全面实现脂质合成途径的碳流增加,例如在细胞的脂质小体或液泡中储存的 TGA。

[0060] 本公开的一些方面提供了工程改造微生物用于油生产的策略。在一些实施方式中,这些策略采用了对产油微生物如解脂酵母进行遗传工程改造,以同时扩增脂质合成的推和拉步骤。如本文所公开的,使用这些策略使得产油酵母宿主细胞中的脂质生产得到显著增加。

[0061] 本公开的一些方面基于这样的认识,即推-和-拉修饰如同时扩增生产脂质合成途径的代谢物生产的代谢步骤及隔离脂质合成的合成产物介导的反馈抑制的代谢步骤,导致进入脂质合成途径的碳流比只有推或只有拉修饰的工程改造情况得到显著增加。本发明的一些方面涉及一项惊人的发现,即 DGA1 基因产物在产油微生物如解脂耶氏酵母中的过表达导致向脂质合成途径中碳流的极大增加,同时过表达 ACC1 基因产物与 DGA1 过表达产生协同作用,导致推-和-拉修饰的微生物具有碳流特性极大地增强,这一点适合于由多种碳底物进行工业规模的油生产。

[0062] 对微生物中的代谢物生成步骤 (如丙二酰-CoA 的产生) 以及产物隔离代谢步骤 (如二酰基甘油酰基化成为三酰基甘油) 进行平衡的调控会使得进入脂质合成的净碳流有显著增加,这一发现对在工程改造的细胞的帮助下以可再生碳源转化为生物燃料或生物燃料前体为目标的过程具有重要意义。基于本发明的一些方面,现在对微生物如产油酵母 (如解脂耶氏酵母) 的脂质合成代谢进行修饰是可以的,以这样的方式进行:赋予高度希望的表型以进行工业规模的碳水化合物向生物燃料或生物燃料前体的转化,例如脂肪酸合成、TAG 合成,以及脂质小体或液泡中脂肪酸和 TAG 储存的极大增加。

[0063] 根据本发明的一些方面,在根据本文提供的方法微生物中修饰脂质代谢使得能够

生成优化的用于生物燃料或生物燃料前体生产过程的微生物,所述方法为例如同时过表达介导代谢物生成(推)步骤的基因产物以及介导产物隔离(拉)步骤的基因产物。本发明的一些方面提供了用于工程改造微生物中脂肪酸代谢的策略和方法,使得微生物中脂肪酸及脂肪酸衍生物的合成速率及累积得到增加,这是通过同时扩增脂质生物合成的推步骤和拉步骤而进行的。

[0064] 本发明的一些方面提供了方法,其包括遗传修饰,使得调控用于生物燃料或生物燃料前体生产的微生物的脂质代谢的基因产物表达和/或活性得到调制。根据本发明的一些方面,这些遗传修饰的目标是增加碳水化合物向脂肪酸和/或 TAG 的转化,以优化所修饰的微生物用于由碳源(例如碳水化合物)的大规模生产脂质。根据本发明的一些方面所提供的一些修饰,如对特定基因产物的过表达、敲除、敲低、激活和/或抑制可单独发挥作用或与本领域技术人员已知的其他修饰组合而发挥作用。术语“修饰”指的是遗传操纵,例如对特定基因产物的过表达、敲除、敲低、激活和/或抑制;以及非遗传操纵,例如对生长培养基、底物、底物预处理、pH、温度、转化过程等等的操纵。

[0065] 基因表达的修饰——在本文也称作对基因表达的调制——可以是对天然的表达调节的破坏或抑制,对给定基因的过表达、表达的抑制或完全消除。将异源启动子插入原生基因序列,如原生 DGA1 或 ACC1 基因序列的上游,或在启动子内部删除调控序列,如介导饱和脂肪酸对 DGA1 或 ACC1 基因的反馈抑制的调控序列,这些都是对表达的天然调控的破坏或抑制的实例。用于调制基因表达的策略可包括遗传改变,例如通过重组技术如基因靶向或病毒转导进行;或非遗传改变,例如对已知会导致基因表达上调或下调的环境进行改变;或调制子的瞬时递送,例如将药物或小 RNA 分子递送至靶标细胞。用于对微生物进行遗传和非遗传改变的方法对本领域技术人员已知,在例如以下著作中有所描述:J. Sambrook 和 D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd edition (January 15, 2001); David C. Amberg, Daniel J. Burke; 和 Jeffrey N. Strathern, *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (April 2005); John N. Abelson, Melvin I. Simon, Christine Guthrie, 和 Gerald R. Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Part A, Volume 194 (Methods in Enzymology Series, 194)*, Academic Press (March 11, 2004); Christine Guthrie 和 Gerald R. Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part B, Volume 350 (Methods in Enzymology, Vol 350)*, Academic Press; 1st edition (July 2, 2002); Christine Guthrie 和 Gerald R. Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part C, Volume 351*, Academic Press; 1st edition (July 9, 2002); Gregory N. Stephanopoulos, Aristos A. Aristidou 和 Jens Nielsen, *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*, Academic Press; 1st edition (October 16, 1998); 以及 Christina Smolke, *The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Fundamentals*, CRC Press; 1st edition (July 28, 2009), 其以全部并入本文作为参考。宿主细胞包括细菌、酵母、藻类、昆虫、哺乳动物和植物细胞。

[0066] 如本文所使用的,术语“过表达”指的是给定基因产物在给定细胞、细胞类型或细胞状态中表达水平相比于参考细胞得到增加,所述参考细胞为例如相同细胞类型的野生型

细胞或相同细胞类型但缺乏特定修饰（例如遗传修饰）的细胞。解脂耶氏酵母细胞中 DGA1 和 / 或 ACC1 基因的驱动的持续表达显示浓度饱和脂肪酸，这样的浓度会在野生型细胞中抑制 DGA1 或 ACC1 基因表达，这是基因过表达的一个实例。

[0067] 本发明一些方面提供了用于操纵微生物中二酰基甘油酰基转移酶 1 (DGA1) 基因产物的活性用于生物燃料或生物燃料前体生产的方法。DGA1 基因编码酰基转移酶，其催化三酰基甘油 (TAG) 形成的最后一步，使用酰基 -CoA 作为酰基供体对二酰基甘油进行酰基化作用。此酰基转移酶反应的结果是产生三酰基甘油，其不会显示像脂肪酸本身那样的对脂肪酸合成的抑制反馈效应。TAG 通常储存在产脂细胞的脂质小体或液泡中。在一些实施方式中，所述的操纵为过表达。在一些实施方式中，所述操纵是通过将用于生物燃料或生物燃料前体生产的微生物与包含编码 DGA1 基因产物（例如 DGAT2 蛋白质）并可操作地连接于异源启动子如组成型或诱导型启动子的核酸的表达构建体接触而产生效应的。在一些实施方式中，编码 DGA1 基因产物的核酸包含 SEQ ID NO:1 的编码序列。在一些实施方式中，所述 DGA1 为解脂耶氏酵母 DGA1，例如包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的解脂耶氏酵母 DGA1。在一些实施方式中，所述微生物为解脂耶氏酵母。在一些实施方式中，对微生物中 DGA1 基因产物活性的操纵能够赋予其有益的表型以将碳水化合物大规模地转化为脂质，所述表型为例如增加的脂肪合成速率、增加的碳水化合物至脂质的转化效率、增加的脂质储存和、增加的生长速率、对碳源或脂质产物浓度升高的耐受性增加。DGA1 基因及基因产物序列对于本领域技术人员是已知的。示例性地，代表基因和基因产物序列可在 NCBI 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中以索引号 XM_504700 找到。

[0068] DGA1 核酸及蛋白质序列的合适序列的非限制性实例在下文提供。其他的合适的 DGA1 序列，包括来自其他物种的序列对本领域技术人员是清楚的，本发明在此方面并不受到限制。

[0069] >gi|50554582|ref|XM_504700.1| 解脂耶氏酵母 YALI0E32769p (YALI0E32769g) mRNA, 完全 cds

[0070] ATGACTATCGACTCACAATACTACAAGTCGCGAGACAAAAACGACACGGCACCCAAAATCGCGGGAATC
CGATATGCCCCGCTATCGACACCATTAATCAACCGATGTGAGACCTTCTCTCTGGTCTGGCACATTTTCAGCATTCC
CACTTTCCTCACAATTTTCATGCTATGCTGCGCAATTCACCTGCTCTGGCCATTTGTGATTGCGTATGTAGTGTACG
CTGTTAAAGACGACTCCCCGTCCAACGGAGGAGTGGTCAAGCGATACTCGCCTATTTCAAGAACTTCTTCATCTGG
AAGCTCTTTGGCCGCTACTTCCCCATAACTCTGCACAAGACGGTGGATCTGGAGCCCACGCACACATACTACCCTCT
GGACGTCCAGGAGTATCACCTGATTGCTGAGAGATACTGGCCGCAGAACAAGTACCTCCGAGCAATCATCTCCACCA
TCGAGTACTTTCTGCCCCGCTTCATGAAACGGTCTCTTTCTATCAACGAGCAGGAGCAGCCTGCCGAGCGAGATCCT
CTCCTGTCTCCCGTTTCTCCCAGCTCTCCGGGTTCTCAACCTGACAAGTGGATTAAACCACGACAGCAGATATAGCCG
TGGAGAATCATCTGGCTCCAACGGCCACGCTCGGGCTCCGAACTTAACGGCAACGGCAACAATGGCACCCTAACC
GACGACCTTTGTGCTCCGCCTCTGCTGGCTCCACTGCATCTGATTCCACGCTTCTTAACGGGTCCCTCAACTCCTAC
GCCAACAGATCATTGGCGAAAACGACCCACAGCTGTGCCCCAAAACTCAAGCCCACTGGCAGAAAATACATCTT
CGGCTACCACCCCCACGGCATTATCGGCATGGGAGCCTTTGGTGGAAATTGCCACCGAGGGAGCTGGATGGTCCAAGC
TCTTTCGGGCATCCCTGTTTCTCTTATGACTCTACCAACAACCTCCGAGTGCCTCTCTACAGAGGTACCTCATG
AGTCTGGGAGTCGCTTCTGTCTCCAAGAAGTCCTGCAAGGCCCTCCTCAAGCGAAACCAGTCTATCTGCATTGTCGT
TGGTGGAGCACAGGAAAGTCTTCTGGCCAGACCCGGTGTATGGACCTGGTGCTACTCAAGCGAAAGGGTTTTGTTC

GACTTGGTATGGAGGTCGAAATGTCGCCCTTGTCCCATCATGGCCTTTGGTGAGAACGACCTCTATGACCAGGTT
AGCAACGACAAGTCGTCCAAGCTGTACCGATTCCAGCAGTTTGTCAAGAACTTCCTTGATTACCCCTTCCTTTGAT
GCATGCCCCGAGGCGTCTTCAACTACGATGTCGGTCTTGTCCCCTACAGGCGACCCGTCAACATTGTGGTTGGTTCCC
CCATTGACTTGCTTATCTCCACACCCCCACCGACGAAGAAGTGTCCGAATACCACGACCGATACATCGCCGAGCTG
CAGCGAATCTACAACGAGCACAAGGATGAATATTTTCATCGATTGGACCGAGGAGGGCAAAGGAGCCCCAGAGTTCCG
AATGATTGAGTAA (SEQ ID NO:1)

[0071] >gi|50554583|ref|XP_504700.1|YALI0E32769p[解脂耶氏酵母]

[0072] MTIDSQYYKSRDKNDTAPKIAIRYAPLSTPLLNRCEFTSLVWHIFSIPFTLTIFMLCCAIPLLWPFVI
AYVVYAVKDDSPSNGGVVKRYSPISRNFFIWKLFGRYFPITLHKTVDLEPTHTYYPLDVQEYHLIAERYWPQNKYL
AIISTIEYFLPAFMKRSLSINEQEQPAERDPLLSPVSPSSPGSQPKWINHDSRYSRGESSGSNGHASGSELNGNG
NGTTNRRPLSSASAGSTASDSTLLNGSLNSYANQIIGENDPQLSPTKLKPTGRKYIFGYHPHGIIGMGAFGGIATEG
AGWSKLFPGIPVSLMTLTNNFRVPLYREYLMISLGVASVSKKSKALLKRNQSIIVVGGAQESLLARPGVMDLVLLK
RKGFVRLGMEVGNVALVPIMAFGENDLYDQVSNDKSSKLYRFQQFVKNFLGFTLPLMHARGVFNYDVLVPPYRRPVN
IVVGSPIDLPLYPHPTDEEVSEYHdryIAELQRIYNEHKDEYFIDWTEEGKGAPEFRMIE (SEQ ID NO:2)

[0073] 本发明的一些方面提供了用于在用于生物燃料或生物燃料前体生产的微生物如解脂耶氏酵母中操纵乙酰-CoA 羧化酶 (ACC) 基因产物的方法。ACC 基因产物介导了乙酰-CoA 向丙二酰-CoA 的转化,其中前者为脂肪酸合成中主要的 C2- 前体,此步骤被认为是脂肪酸合成中第一个关键步骤,因此被认为也是脂肪酸合成中的限速步骤(见 Cao Y, Yang J, Xian M, Xu X, Liu W. Increasing unsaturated fatty acid contents in *Escherichia coli* by coexpression of three different genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010)。在一些实施方式中,ACC 活性操纵是将 ACC 进行过表达。在一些实施方式中,所述操纵是通过将用于生物燃料或生物燃料前体生产的微生物与包含编码 ACC 基因产物(例如 ACC1 蛋白)的核酸的表达构建体接触而实现,所述核酸可操作地连接于异源启动子如组成型或诱导型启动子。在一些实施方式中,编码 ACC 基因产物的核酸包含 SEQ ID NO:3 的编码序列。在一些实施方式中,ACC 基因产物是包含 SEQ ID NO:4 氨基酸序列的 ACC1 蛋白质。在一些实施方式中,微生物中 ACC 的过表达增加了脂肪酸合成速率及/或赋予微生物有益的表型,用于将碳水化合物大规模转化为生物燃料或生物燃料前体,例如增加的脂质合成速率、增加的碳水化合物向脂质转化效率、增加的脂质储存以及增加的生长速率、增加的对特定物质如碳源、生物燃料或生物燃料前体的浓度的耐受性。ACC 基因及基因产物序列对本领域技术人员是已知的。示例性地,代表基因和基因产物序列可在 NCBI 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中在登记号 GeneID:855750 和 2909424 的条目下,或以索引号 NC_006069 找到。

[0074] 合适的 ACC 核酸序列和蛋白质序列的非限制性实例在下文提供。其他的合适的 ACC 序列,包括来自其他物种的序列对本领域技术人员是清楚的,本发明在此方面并不受到限制。

[0075] ACC 编码核酸序列:

[0076] atgcgactgcaattgaggacactaacacgtcggtttttcaggtgagtaaacgacggtggccgtggc ca
cgacagccgagggcgtcacgatggccagacgagcacattctcgccgccacaacctcgccagca caagaaactaacc
cagtatggcttcaggatcttcaacgccagatgtggctcccttgggtggacccca acattcacaaaggtctcgcctct
catttcttttgactcaattctgtccacacagccaagccctcaaaa gtcaaggagtttgtggcttctcacggaggtc

atacagttatcaacaaggtgagtatttgacgtttaga ctgtataacaggcgccgcagtgcaacaacgacccaaaa
gggtcgaaaaagggtcgaaaacgg acacaaaagctggaaaacaagagtgtataacattcttacacgtccaattgtt
agacaaacacggct gttcgggtcccaaaaccaccagtatcacctatcttccacttgtgtctcggatctgatcataat
ctgatct caagatgaaattttacgccaccgacatgatattgtgatttttcggattctccagaccgagcagattcca g
caataccaccacttgeccacettcageggcctctcggcgcgattcgccactttccccaacgagtgtt actaacca
ggctctcatcgctaacaacggtattgcccgcagtaaaaggagatccgttcagtacgaaa atgggcctacgagacctt
ggcgacgagcgagcaatctcgttcaccgtcatggccacccccgaaga tctcgtgccaacgccgactacattagaa
tggccgatcagtacgtcgaggtgcccggaggaacca caacaacaactacgccaacgtcgagctgattgtcgacgt
ggctgagcgattcggcgctcatgcccgt gtgggcccggatggggccatgccagtgaaaatcccctgctccccgagtcg
ctagcggcctctccccg caagattgtcttcacgtggcctccccggagctgccatgagatctctgggagacaaaattt
cttctacca ttgtggcccagcacgcaaaggtcccgtgtatcccgtggctctggaaccggagtggacgaggttgtgg
ttgacaagagcaccaacctcgtgtccgtgtccgaggaggtgtacaccaagggtcgcaccaccggtc ccaagcaggg
tctggagaaggctaagcagattggattccccgtgatgatcaaggcttccgaggga ggaggaggaaagggtattcga
aaggttgagcgagaggaggacttcgaggtgcttaccaccagg tgcagggagagatccccggctcgcccatcttca
ttatgcagcttgccaggcaatgcccggcatttgg ggtgcagcttctggctgatcagtacggcaacaatatttact
gtttggctgagattgttcggttcage gacggcatcaaaagattattgaggaggctcctgtgactgtggctggccag
cagaccttcactgcca tggagaaggctgccgtgcgactcggttaagcttgtcggatatgtctctgcaggtaccgttg
aatatct gtattcccatgaggacgacaagttctacttcttggagctgaatcctcgtcttcaggctgaacatccta
ccaccgagatggtcaccggtgtcaacctgcccgtgcccagcttcagatcgccatgggtatccccct cgatcgaat
caaggacattcgtctcttttacgggtgttaacctcacaccaccactccaattgatttcga cttctcgggcgaggat
gctgataagacacagcgacgtcccgtcccccgaggtcacaccactgcttg ccgaatcacatccgaggaccttgag
agggtttcaagccctccggaggtactatgcacgagctcaa cttccgatcctcgtccaacgtgtggggttacttctc
cgtttgtaaccagggaggtatccattcgttctc ggattcgcagtttgggtcacatcttcgccttcgggtgagaaccga
agtgcgtctcgaaagcacatgggt gtgctttgaaggaactatctattcaggtgacttccgaaccaccgctcgagt
acctcatcaagctgct ggagacaccggacttcgaggacaacaccatcaccaccggctggctggatgagcttatctc
caaca agctgactgccgagcgacccgactcgttcctcgtgtgttgttgggtgctgctaccaaggcccatcga gc
ttccgaggactctattgccacctacatggcttcgctagagaagggccagggtccctgctcgagaca ttctcaagacc
cttttccccgttgacttcatctacgagggccagcgggtacaagttcaccgccaccgg tegtctgaggactcttaca
cgctgttcatcaacggttctcgatgcgacattggaggttagacctctttct gacgggtggtattctgtgtctttagg
tgggagatcccacaatgtctactggaaggaggaggttgag ccacgcgactgtctgttgactccaagacctgcctt
ctcgaggttggaacgaccccaactcagcttcg atctccctctccccgtaagctgggttaagttcctggctcgagaacg
gcgaccacgtgcgagccaacca gccctatgccgagattgaggtcatgaagatgtacatgactctcactgctcagga
ggacgggtattgtc cagctgatgaagcagcccgggtccaccatcgaggctggcgacatcctcggtatcttggccctt
gatg atccttccaaggtcaagcatgccaagcccttgagggccagcttcccagcttggacccccactct cagc
ggtaacaagcctcatcagcgatacagcactgccagaacgtgtccataacattctgcttgg ttctgataaccagg
tggtgatgaagtcactcttcaggagatgggttggtctgtcgcgaaacctgag cttccttatctccagttgggtca
tcaggtgtcttctctgcacacccgaatgagcgccaagctggatgc tactcttgctgggtctcattgacaaggccaag
cagcgaggtggcgagtttccctgccaagcagcttctg cgagcccttgagaaggaggcgagctctggcgaggtcgatg
cgctcttccagcaaacctcttgctctc tgtttgaccttgctcgagagtaccaggacggctcttgctatccacgagct

tcaggttgcctgcaggcctt ctgcaggcctactacgactctgaggccccggttctgcggacccaacgtacgtgacgag
gatgtcattc tcaagcttcgagaggagaaccgagattctcttcgaaaggttgatggcccagctgtctcattctc
g agtcggagccaagaacaaccttgctgctggcccttctcgatgaatacaaggtggccgaccaggctgg caccgact
ctcctgcctccaacgtgcacgttgcaaagtacttgcgacctgtgctgcgaaagattgtg gagctggaatctcgagc
ttctgccaaggtatctctgaaagcccgagagattctcatccagtgcgctc tgccctctctaaaggagcgaactgac
cagcttgagcacattctgcgatcttctgtctgctgagctctga tacggagaggttggtctggagcaccgaactcccc
gagccgatattctcaaggaggttgctgactcc aagtacattgtctttgatgtgcttgcccagttctttgcccacga
tgatccctggatcgctccttgctgccc tggagctgtacatccgacgagcttgcaaggcctactccatcctggacatc
aactaccaccaggact cggacctgcctcccgtcatctcgtggcgatttagactgcctaccatgtcgtctgctttgt
acaactcag tagtgtcttctggctccaaaacccccacttccccctcggtgtctcgagctgattccgtctccgactt
ttc gtacaccgttgagcgagactctgctcccgtcgaaccggagcgattgttgccgtgcctcatctggat gatct
ggaggatgctctgactcgtgttctggagaacctgcccacacggggcgctggtcttgccatct ctgttggtgctagc
aacaagagtgcgctgcttctgctcgtgacgctgctgctgctgcccgttcatcc gttgacactggcctgtccaaca
tttgcaacgttatgattggctgggttgatgagctctgatgacgacga cactctgattgcccgaatctcccaggtcat
tgaggactttaaggaggactttgaggcctgttctctgc gacgaatcaccttctccttcggcaactcccaggtact
tatcccaagtatttcacgttccgaggcccc gcatacgaggaggacccccactatccgacacattgagcctgctctgg
ccttccagctggagctcgcc cgtctgtccaacttcgacatcaagcctgtccacaccgacaaccgaaacatccacgt
gtacagggt actggcaagaacgctgcttccgacaagcgggttcttccaccgaggtatcgtagacctggctgctctt
c gagagaacatccccacctcggagtatctcatttccgaggctgaccggctcatgagcgatattttgga cgctcta
gaggtgattggaaccaccaactcggatctcaaccacattttcatcaacttctcagccgtct ttgctctgaagcccc
aggaggttgaagctgcctttggcggtttcctggagcgatttgcccgacgtctg tggcgacttcgagtcaccgggtgc
cgagatccgaatgatggtatccgacccccgaaactggctctgctt tccctctgcgagcaatgatcaacaacgtctct
ggttacgttgctgagctctgagctgtacgtgaggcc aagaacgacaagggccagtggttttcaagtctctgggca
agccccgctccatgcacatgcggtct atcaacactccctacccaccaaggagtggctgcagcccaagcggtacaa
ggcccatctgatgggt accacctactgctatgacttccccgagctgttccgacagtccattgagtcggactggaag
aagtatg acggcaaggctcccgacgatctcatgacttgcaacgagctgattctcgatgaggactctggcgagc tg
caggaggtgaaccgagagccccggcgccaacaacgtcggtatggttgctggaagtttgaggcc aagacccccgagt
accctcgaggccgatctttcatcgttggtggccaacgatataccttccagattg gttcgtttggccctgctgagga
ccagttcttcttcaaggtgacggagctggctcgaaagctcggtatt cctcgaatctatctgtctgccaactctggt
gctcgaatcggcattgctgacgagctcgttggcaagta caaggttgctggaacgacgagactgacccctccaagg
gcttcaagtacctttacttccacctgag tctcttgccacctcaagccccgacactgttgctcaccactgagattga
ggaggagggtcccaacggc gtggagaagcgtcatgtgatcgactacattgtcggagagaaggacggtctcggagtc
gagtgtctg cggggctctggtctcattgcaggcgccacttctcgagcctacaaggatatcttactctcactcttg
tc acctgctgatccgttggtatcggtgcttaccttgctcttgggtcaacgagccatccagattgagggc cagc
ccatcattctcactgggtgcccccgccatcaacaagctgcttggctcgagaggtctactcttccaa cttgcagcttgg
tggtactcagatcatgtacaacaacggtgtgtctcatctgactgcccagatgate tcaacggtgtccacaagatc
atgcagtggctgtcatacatccctgcttctcgaggtcttccagtgctt gttctccctcacaagaccgatgtgtggg
atcgagacgtgacgttccagcctgtccgaggcgagcag tacgatgttagatggcttatttctggccgaactctcga
ggatgggtgctttcgagctctggtctctttgac aaggactcttccaggagactctgtctggctgggccaagggtgtt

gttggttggtcgagctcgtcttgg cggcattcccttcggtgtcattggtgtcgagactgcgaccgtcgacaatacta
ccccctgccgateccg ccaacccggactctattgagatgagcacctctgaagccggccaggttttggtaccccaacte
ggcctt caagacctctcaggccatcaacgacttcaacatggtgagggcgttcctctcatgattcttgcctaact g
gcgaggtttttctggttggtcagcgagacatgtacaatgaggttctcaagtacggatctttcattgtt gatgctctg
gttgactacaagcageccatcatggtgtacatccctcccaccgggtgagctgcgaggtg gttcttgggttggttg
acccaccatcaactcggacatgatggagatgtacgctgacgtcgagtct cgaggtggtgtgctggagccccgaggg
aatggtcggtatcaagtaccgacgagacaagctactgga caccatggctcgtctggatcccagagtactcctctctc
aagaagcagcttgaggagtctcccgattctg aggagctcaaggtcaagctcagcgtgcgagagaagtctctcatgc
ccatctaccagcagatctcgg tgcagtttgccgacttgcatgaccgagctggccgaatggaggccaagggtgtcat
tcgtgaggctct tgtgtggaaggatgctcgtcgattcttcttctggcgaatccgacgacgattagtcgaggagtac
ctca ttaccaagatcaatagcattctgccctcttgcactcggcttgagtgtctggctcgaatcaagtcgtgg aag
cctgccactcttgatcagggtcttgaccgggggtgttgccgagtggtttgacgagaactctgatg ccgtctctgctc
gactcagcgagctcaagaaggacgcttctgccccagtcgtttgcttctcaactgaga aaggaccgacagggtactct
ccagggcataagcaggctctcgttctcttcttgaggctgagcgg gctgagctgctcaagggttggtga (SEQ ID
NO:3)

[0077] >gi|50548503|ref|XP_501721.1|YALIOC11407p[解脂耶氏酵母]

[0078] MRLQLRTLRRFFSMASGSSTPDVAPLVDPNHKGSLASHFFGLNSVHTAKPSKVKEFVASHGGHTVINK
VLIANNGIAAVKEIRSVRKWAYETFGDERAISFTVMATPEDLAANADYIRMADQYVEVPGGTNNNNYANVELIVDVA
ERFGVDVAVWAGWGHASENPLLPESLAASPRKIVFIGPPGAAMRSLGDKISSTIVAQHAKVPCIPWSGTGVDEVVVDK
STNLVSVSEEVYTKGCTTGPKQGLEKAKQIGFPVMIKASEGGGGKGIRKVEREEDFEAAHYHQVEGEIPGSPIFIMQL
AGNARHLEVQLLADQYGNNISLFRDCSVQRRHQKIEEAPVTVAGQQFTAMEKAAVRLGKLVGYVSAGTVEYLYS
HEDDKFYFLELNPRLQVEHPTTEMVTGVNLPAAQLQIAMGIPLDRIKD IRLFYGVNPHTTTPIDFDFSGEDADKTQR
RPVPRGHTTACRITSEDPGEGFKPSGGTMHELNFRSSSNVWGYFSVGNQGGIHSFSDSQFGHIFAFGENRSASRKHM
VVALKELSIRGDFRTTVEYLIKLETPDFEDNTITTGWLDELISNKLTAERPDSFLAVVCGAATKAHRASEDSIATY
MASLEKGQVPARDILKTLFPVDFIYEGQRYKFTATRSESSTYTLFINGSRCDIGVRPLSDGGILCLVGGRSHNVYWK
EEVGATRLSVDSTCLLEVENDPQLRSPSPGKLVKFLVENGDHVRANQPYAIEVMKMYMTLTAQEDGIVQLMKQP
GSTIEAGDILGILALDDPSKVKHAKPFEGQLPELGPPTLSGNKPHQRYEHCQNVLHNILLGFDNQVVMKSTLQEMVG
LLRNPELPYLQWAHQVSSLHTRMSAKLDATLAGLIDKAKQRGGEFPAKQLLRALKEKEASSGEVDALFQQTLAPLFDL
AREYQDGLA IHELQVAAGLLQAYYDSEARFCGPVNRDEDVILKREENRDSLKVMAQLSHSRVGAKNLVLALLD
EYKVADQAGTDSASNHVHAKYLRPVLRKIVELESRASAKVSLKAREILIQCALPSLKERTDQLEHILRSSVVESRY
GEVGLHRTPRADILKEVVDISKYIVFDVLAQFFAHDDPWIVLAALLEYIRACKAYSILDINYHQSDLPPIVSWRF
RLPTMSSALYNSVSSGSKTPTSPSVSRADSVSDFSYTVERDSAPARTGAIVAVPHLDDLEDALTRVLENLPKRGAG
LAISVGASNKSAASARDAASSVDTGLSNICNVMIGRVDESDDDDTLIARISQVIEDFKEDFEACSLRRITFS
FGNSRGTYPKYFTFRGPAYEEDPTIRHIEPALAFQLELARLSNFDIKPVHTDNRNIHVYEATGKNAASDKRFFTRGI
VRPGRLENIPTSEYLI SEADRLMSDILDALEVIGTTNSDLNHIFINFSAVFALKPEEVEAAFGGFLERFGRRLWRL
RVTGAEIRMMVSDPETGSAPPLRAMINNVSGYVVQSELYAEAKNDKGQWIFKSLGKPGSMHMRINTPYPTKEWLQP
KRYKAHLMGTTYCYDFPELFRQSIESDWKKYDGKAPDDLMTCNELILDEDSGELQEVNREPGANNVGMVAWKFEAKT
PEYPRGRSFIVVANDITFQIGSFPAEDQFFFKVTELARKLGIPRIYLSANSGARIGIADELVGKYKVAWNDETDP
KGFKYLYFTPESLATLKPDTVVTTETIEEEGPNGVEKRHVIDYIVGEKDGLGVECLRGSGLIAGATSRAYKDIFTLTL

VTCSRSGIGAYLVRLGQRAIQIEGQPIILTGAPAINKLLGREVYSSNLQLGGTQIMYNNGVSHLTARDDLNGVHKIM
QWLSYIPASRGLPVPVLPKHTDVWDRDVTTFQPVERGEQYDVRWLISGRTLEDGAFESGLFDKDSFQETLSGWAKGVVV
GRARLGGIPFGVIGVETATVDNTTPADPANPDSIEMSTSEAGQVWYPNSAFKTSQAINDFNHGEALPLMILANWRGF
SGGQRDMYNEVLKYGSFIVDALVDYKQPIIMVYIPPTGELRGGSWVVDPTINSDDMMEMYADVESRGGVLEPEGMVGI
KYRRDKLLDTMARLDPEYSSLKKQLEESPDSEELKVKLSVREKSLMPIYQQISVQFADLHDRAGRMEAKGVIREALV
WKDARRFFFWIRRRRLVEEYLITKINSILPSCTRLECLARIKSWKPATLDQGS DRGVAEWF DENSDAVSARLSELKK
DASAQSFASQLRKDRQGT LQGMKQALASLSEAERAELLKGL (SEQ ID NO:4).

[0079] 本发明的一些方面提供了用于在用于生物燃料或生物燃料前体生产的微生物中操纵硬脂酰-CoA-去饱和酶 (SCD) 活性的方法。SCD 是一种 $\Delta 9$ 去饱和酶,其能够在偶联于 CoA 的硬脂酸的 C9 和 C10 之间插入双键,这是生成去饱和脂肪酸及其衍生物的一个关键步骤,这在本文其他地方有更详尽的描述。在一些实施方式中,所述操纵是进行过表达。在一些实施方式中,所述操纵是通过将用于生物燃料或生物燃料前体生产的微生物与包含编码 SCD 基因产物 (例如 SCD 蛋白) 的核酸的表达构建体接触而实现,所述核酸可操作地连接于异源启动子如组成型或诱导型启动子。在一些实施方式中,编码 SCD 基因产物的核酸包含 SEQ ID NO:5 的编码序列。在一些实施方式中,SCD 基因产物是解脂耶氏酵母的 SCD,例如包含 SEQ ID NO:6 氨基酸序列的解脂耶氏酵母 SCD。在一些实施方式中,所述微生物为解脂耶氏酵母。在一些实施方式中,微生物中对 SCD 活性的操纵赋予微生物有益的表型,用于将碳水化合物大规模转化为生物燃料或生物燃料前体,例如增加的脂质合成速率、增加的碳水化合物向脂质转化效率、增加的脂质储存以及增加的生长速率、增加的对碳源或脂质产物浓度升高的耐受性。硬脂酰-CoA-去饱和酶基因及基因产物序列对本领域技术人员是已知的。示例性地,代表基因和基因产物序列可在 NCBI 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中在登记号 GeneID:852825 的条目下找到。

[0080] 合适的 SCD 核酸序列和蛋白质序列的非限制性实例在下文提供。其他的合适的 SCD 序列,包括来自其他物种的序列对本领域技术人员是清楚的,本发明在此方面并不受到限制。

[0081] >gi|50548052|ref|XM_501496.1| 解脂耶氏酵母 YALI0C05951p (YALI0C05951g) mRNA, 完整 cds

[0082] ATGGTGAAAAACGTGGACCAAGTGGATCTCTCGCAGGTCGACACCATTCGCTCCGGCCGAGATGTCAAC
TACAAGGTCAAGTACACCTCCGGCGTTAAGATGAGCCAGGGCGCCTACGACGACAAGGGCCGCCACATTTCCGAGCA
GCCCTTACCTGGGCCAACTGGCACCAGCACATCAACTGGCTCAACTTCATTCTGGTGATTGCGCTGCCTCTGTCTGT
CCTTTGCTGCCGCTCCCTTCGTCTCCTTCAACTGGAAGACCGCCGCGTTTGTCTGTCGGCTATTACATGTGCACCGGT
CTCGGTATCACCGCCGGCTACCACCGAATGTGGGCCCCATCGAGCCTACAAGGCCGCTCTGCCCCGTTCAATCATCCT
TGCTCTGTTTGGAGGAGGAGCTGTGAGGGCTCCATCCGATGGTGGGCCTCGTCTCACCGAGTCCACCACCGATGGA
CCGACTCCAACAAGGACCCCTTACGACGCCCCGAAAGGGATTCTGGTTCTCCCACTTTGGCTGGATGCTGCTTGTGCCC
AACCCCAAGAACAAGGGCCGAAGTACATTTCTGACCTCAACAACGACTGGGTGTCCGACTCCAGCACAAGTACTA
CGTTTACGTTCTCGTCTTCATGGCCATTGTTCTGCCCCACCTCGTCTGTGGCTTTGGCTGGGGCGACTGGAAGGGAG
GTCTTGTCTACGCCGTATCATGCGATACACCTTTGTGTCAGCAGGTGACTTTCTGTGTCAACTCCCTTGCCCACTGG
ATTGGAGAGCAGCCCTTCGACGACCGACGAACTCCCCGAGACCACGCTCTTACCGCCCTGGTCACCTTTGGAGAGGG
CTACCACAACCTTCCACCACGAGTTCCCTCGGACTACCGAAACGCCCTCATCTGGTACCAGTACGACCCCAACCAAGT

GGCTCATCTGGACCTCAAGCAGGTTGGTCTCGCCTGGGACCTCCAGACCTTCTCCCAGAACGCCATCGAGCAGGGTCTCGTGCAGCAGCGACAGAAGAAGCTGGACAAGTGGCGAAACAACCTCAACTGGGGTATCCCCATTGAGCAGCTGCCGTGTCATTGAGTTTGAGGAGTTCCAAGAGCAGGCCAAGACCCGAGATCTGGTTCTCATTTCTGGCATTGTCCACGACGTGTCTGCCTTTGTGAGCACCACCTGGTGGAAAGGCCCTCATTATGAGCGCCGTCGGCAAGGACGGTACCGCTGCTTCAACGGAGGTGTCTACCGACACTCCAACGCTGGCCACAACCTGCTTGCCACCATGCGAGTTTCGGTCATTTCGAGCGGCATGGAGGTTGAGGTGTGGAAGACTGCCCAGAACGAAAAGAAGGACCAGAACATTGTCTCCGATGAGAGTGGA AACCGAATCCACCGAGCTGGTCTCCAGGCCACCCGGGTCGAGAACCCCGGTATGTCTGGCATGGCTGCTTAG (SEQ ID NO:5)

[0083] >gi|50548053|ref|XP_501496.1|YALI0C05951p[解脂耶氏酵母]

[0084] MVKNVDQVDLSQVDTIASGRDVNYKVKYTSGVKMSQGAYDDKGRHISEQPFTWANWHQHINWLNFI LVI ALPLSSFAAAPFVSFNWKTAAFAVGYYMCTGLGITAGYHRMWAHRAKALPVRIILALFGGGAVEGSIRWWASSHR VHHRWTD SNKDPYDARKGFWSHFGWMLLPNPNKNGRTDISDLNDWVRLQHKYVYVLFVMAIVLPTLVCGFGW GDWKGGLVYAGIMRYTFVQQVTFVNSLAHWIGEQPFDDRRTPRDHALTALVTFGEGYHNFHHEFPSDYRNALI WYQ YDPTKWLIIWTLKQVGLAWDLQTF SQNAIEQGLVQQRQKKLDKWRNNLWGIPIEQLPVIEFEFQEQA KTRDLVLIS GIVHDVSAFVEHHPGGKALIMSAVGKDGTA VFNNGGVYRHSNAGHNLLATMRVSVIRGGMEVEVWKTAQNEKKDQNI V SDESGNRIHRAGLQATRVENPGMSGMAA (SEQ ID NO:6)

[0085] 本发明的一些方面提供了用于在用于生物燃料或生物燃料前体生产的微生物中操纵 ATP- 柠檬酸裂解酶 (ACL) 活性的方法。ACL 通过裂解作为 TCA 循环产物从线粒体中穿梭出来的柠檬酸而提供细胞溶胶乙酰 -CoA。ACL 基因产物将柠檬酸裂解为草酰乙酸和乙酰 -CoA, 由此为 ACC 提供了乙酰 -CoA 底物, 后者随后介导乙酰 -CoA (这是脂肪酸合成中的主要 C2- 前体) 向丙二酰 -CoA 的转化, 这一过程被视为脂肪酸合成中的第一关键步骤并在本文其他地方会有更详尽的描述。在一些实施方式中, ACL 基因产物是由分别的基因编码的两个亚基组成的蛋白质。在一些实施方式中, ACL 基因产物是由相同基因编码的两个亚基组成的。在一些实施方式中, 所述操纵是进行过表达。在一些实施方式中, 所述操纵是通过将用于生物燃料或生物燃料前体生产的微生物与包含编码 ACL 基因产物 (例如 ACL 蛋白) 的核酸的表达构建体接触而实现, 所述核酸可操作地连接于异源启动子如组成型或诱导型启动子。在一些实施方式中, 编码 ACL 基因产物的核酸包含 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:9 的编码序列。在一些实施方式中, 所述 ACL 是解脂耶氏酵母的 ACL, 例如包含 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:10 氨基酸序列的解脂耶氏酵母 ACL。在一些实施方式中, 所述微生物为解脂耶氏酵母。在一些实施方式中, 微生物中对 ACL 活性的操纵赋予微生物有益的表型, 用于将碳水化合物大规模转化为生物燃料或生物燃料前体, 例如增加的脂质合成速率、增加的碳水化合物向脂质转化效率、增加的脂质储存以及增加的生长速率、增加的对碳源或脂质产物浓度升高的耐受性。ATP- 柠檬酸裂解酶基因及基因产物序列对本领域技术人员是已知的。示例性地, 代表基因和基因产物序列可在 NCBI 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中在 GeneID:2912101 和 2910381 的条目下找到。

[0086] 合适的 ACL 核酸序列和蛋白质序列的非限制性实例在下文提供。其他的合适的 ACL 序列, 包括来自其他物种的序列对本领域技术人员是清楚的, 本发明在此方面并不受到限制。

[0087] ATP 柠檬酸裂解酶 (解脂耶氏酵母) 亚基 1, ACL1DNA

[0088] YALIOE34793g

[0089] XM_504787

[0090] atgtctgccaacgagaaacatctccccgattcgacgccccctgtgggcaaggagcaccgccctacgag ct
cttccataaccacacacgatcttttctgtctatggtctccagcctcgagcctgccagggtatgctgga cttcgacttc
atctgtaagcgagagaacccctccgtggccggtgtcatctatcccttcggcgccaggt tcgtcaccaagatgtact
ggggcaccaaggagactcttctccctgtctaccagcaggtcgagaagg ccgctgccaagcaccgccgaggtcgatgt
cgtgggtcaactttgcctctctctcgatccgtctactcctcta ccatggagctgctcgagtacccccagttccgaacc
atcgccattattgcccagggtgtccccgagcg acgagcccgagagatcctccacaaggccccagaagaagggtgtga
ccatcattgggtcccgctaccg tcggagggtatcaagcccggttgcttcaagggttgaaacaccggaggtatgatgga
caacattgtcg cctccaagctctaccgaccgggtccggttgcttacgtctccaagtccggaggaatgtccaacgag
ct gaacaacattatctctcacaccaccgacgggtgtctacgagggtattgctattgggtggtagccgatac cctgggt
actaccttcattgaccatatactgcatagcagggccgaccccaagtgtgaagatcatcgtcct ccttgggtgaggttg
gtgggtgttgaggagtaccgagtcacgaggtgttaagaacggccagatcaa gaagcccatcgctcgcttgggcat
tggtacttgtgcctccatgttcaagactgaggttcagttcgcc acgcccgtccatggccaactccgacctggag
actgccaaggctaagaacgcgcgcatgaagtct gctggcttctacgtccccgataccttcgaggacatgcccagg
tccttgccgagctctacgagaaga tggctgccaagggcgagctgtctcgaaatctctgagcctgaggtccccaagat
ccccattgactactc ttgggcccaggagcttgggtcttaccgaaagcccgtgctttcatctccactatttccgat
gaccgag gccaggagcttctgtacgtggcatgcccatttccgaggttttcaaggaggacattgggtatcggcgg t
gtcatgtctctgtgtgtgttccgacgacgactccccgactacgcctccaagtttcttgagatggttct catgctta
ctgctgaccacgggtccgcgctatccgggtgcatgaacaccattatcaccacccgagct ggtaaggatctcatttc
ttccctggttgcgtgtgtctctgaccattgggtaccgattcgaggtgtcttt gacgggtgctgccaccgagttcacc
actgcctacgacaagggtctgtccccccgacagttcggttgata ccatgcgaaagcagaacaagctgattccttggt
ttggccatcgagtcgaagtctcgaaacaaccccg atttccgagtcgagcttgtcaaggactttgttaagaagaactt
ccctccaccagctgctcgactac gcccttgcgtgctgaggaggtcaccacctccaagaaggacaacctgattctg
aacgttgacgggtgct attgctgtttcttttgcgatctcatgcatcttgcggtgcctttactgtggaggagactg
aggactac ctcaagaacgggtgttctcaacgggtctgttcgttctcggtcgatccattgggtctcattgccaccatct
c gatcagaagcgactcaagaccggtctgtaccgacatccttgggacgatatcacctacctggttggc caggaggc
tatccagaagaagcgagtcgagatcagcgccggcgacgtttccaaggccaagactc gatcatag (SEQ ID NO:7)

[0091] ATP 柠檬酸裂解酶（解脂耶氏酵母）亚基 1, ACL1 蛋白质

[0092] YALIOE34793p

[0093] XP_504787

[0094] MSANENISRFDAPVGKEHPAYELFHNHTRSFVYGLQPRACQGMDFDFICKRENPSVAGVIYPFGGQFV
TKMYWGKTETLLPVYQQVEKAAAKHPEVDVVNFASSRSVYSSTMELLEYPQFRTIAIIAEGVPERRAREILHKAQK
KGVTIIGPATVGGIKPGCFKVGNTGGMMDNIVASKLYRPGSVAYVSKSGGMSNELNNIISHTTDGVYEGIAIGGDRY
PGTTTFIDHILRYEADPKCKIIVLLGEVGGVEEYRVIEAVKNGQIKKPIVAWAIGTCASMFKTEVQFGHAGSMANSDL
ETAKAKNAAMKSAGFYVPDTFEDMPEVLAELYEKMVAKGELSRISEPEVPKIPIDYSAQELGLIRKPAAFISTISD
DRGQELLYAGMPISEVFKEDIGIGGVMSLLWFRRLPDYASKFLEMVLMLTADHGPVSGAMNTIITTRAGKDLISS
LVAGLLTIGTRFGGALDGAATEFTTAYDKGLSPRQFVD TMRKQNKLI PGIGHRVKSRNNPDFRVELVKDFVKKNFPS
TQLLDYALAVEEVTTSKKDNLILNVDGAIAVSFV DLMRSCGAF TVEETEDYLNKGVNLNGLFVLGRSIGLIAHHL DQK

RLKTGLYRHPWDDITYLVGQEIQKKRVEISAGDVSKAKTRS (SEQ ID NO:8)

[0095] ATP 柠檬酸裂解酶 (解脂耶氏酵母) 亚基 2, ACL2DNA

[0096] YALI0D24431g

[0097] XM_503231

[0098] atgtcagegaaatccattcacgaggccgacggcaaggccctgctcgcacactttctgtccaaggcg cc
cgtgtgggcccagacgagcagcccatcaacacgtttgaaatgggcacacccaagctggcgctctctg acgttcgaggac
ggcgtggccccgagcagatcttcgcccgcgtgaaaagacctaccctggctg ctggagtcggcgccaagtttg
tgccaagccccgaccagctcatcaagcgacgaggcaaggccgg cctgctggtactcaacaagtcgtgggaggagt
caagccctggatcgccgagcgggcccgaagc ccatcaacgtggagggcattgacggagtgtggaacgttcctg
gtcgagccctttgtgccccacg accagaagcacgagtactacatcaacatccactccgtgcgagagggcgactgga
tcctctttctacc acgaggggaggagtcgacgtcggcgacgtggacgccaaggccgccaagatcctcatccccgttga
c attgagaacgagtaccctccaacgccacgctcaccaaggagctgctggcacacgtgccccgagga ccagcacca
gacctgtctgacttcatcaaccggctctacgccgtctacgtcgatctgcagtttacgt atctggagatcaacccc
ctggctgtgatccccaccgcccaggcgctcgaggtccactacctggatct tgccggcaagctcgaccagaccgcag
agtttgagtgcggccccaagtgggctgctgcgcggtcccc cgccgctctgggccaggctcgtcaccattgacgcgg
ctccaccaaggtgtccatcgacgcggccc cgccatggtcttccccgctcctttcggtcgagagctgtccaaggag
gaggcgtacattgcggagctc gattccaagaccggagcttctctgaagctgactgttctcaatgccaagggccgaa
tctggacccttg tggctggtggaggagcctccgtcgtctacgccgacgccattgctgctgcccggctttgctgacga
gct cgccaactacggcgagtactctggcgctcccaacgagaccagacctacgagtacgcaaaaccg tactgga
tctcatgacccggggcgacgtcaccgccaggggcaaggctactgttcattggcggaggaa tcgccaacttcaccag
gttgatccaccttcaagggcacatccgggcttccgggactaccagtc ttctctgcacaaccacaagggtgaaga
tttacgtgcgacgagcggttcccaactggcaggagggtct gcggttgatcaagtcggctggcgacgagctgaatct
gcccattggagatttacggccccgacatgca cgtgtcgggtattgttccctttggctctgcttggaaagcggcccaag
aatgtcaagccttttggcaccg gaccttctactgaggttccactcctctcgaggtttaa (SEQ ID NO:9)

[0099] 柠檬酸裂解酶 (解脂耶氏酵母) 亚基 2, ACL2 蛋白质

[0100] YALI0D24431p

[0101] XP_503231

[0102] MSAKSIHEADGKALLAHFLSKAPVWAEQQPINTFEMGTPKLASLTFEDGVAPEQIFAAAEKTPWLLES
GAKFVAKPDQLIKRRGKAGLLVLNKSWECKPWIAERAAKPINVEGIDGVLRTFLVEPFVPHDQKHEYYINIHSVRE
GDWILFYHEGGVDVGDVDAKAAKILIPVDIENEYPSNATLTKELLAHVPEDQHQTLTDFINRLYAVYVDLQFTYLEI
NPLVVIPTAQGVEVHYLDLAGKLDQTAEFECGPKWAAARSPAALGQVVTIDAGSTKVSIDAGPAMVFPAPFGRELSK
EEAYIAELDSKTGASLKLTVLNAKGRIWTLVAGGGASVVYADAIASAGFADELANYGEYSGAPNETQTYEYAKTVLD
LMTRGDAHPEGKVLFIGGGIANFTQVGSTFKGIIRAFRDYQSSLHNHKVKIYVRRGGPNWQEGLRLIKSAGDELNLP
MEIYGPD MHVSGIVPLALLGKRPNKVPFGTGPSTEASTPLGV (SEQ ID NO:10)

[0103] 本发明的一些方面提供了用于油生产的产油微生物,其包含本文描述的任意修饰,例如本文描述的 DGA1 修饰、如本文所描述的 ACC1 修饰及 / 或如本文所描述的 SCD 修饰。在一些实施方式中,提供了修饰的产油微生物,其包含如本文描述的推修饰以及如本文描述的拉修饰。在一些实施方式中,推修饰包含 ACC1 基因产物的过表达。在一些实施方式中,拉修饰包含 DGA1 和 / 或 SCD 基因产物。

[0104] 本发明的一些方面提供了核酸，其编码的基因产物赋予微生物如解脂耶氏酵母生产生物燃料或生物燃料前体所需要的和 / 或希望的表型。在一些实施方式中，所述核酸是来源于解脂耶氏酵母的核酸。在一些实施方式中，所述核酸编码 DGA1 基因产物如 DGA1 蛋白质。在一些实施方式中，所述核酸编码 ACC1 基因产物如 ACC1 蛋白质。在一些实施方式中，所述核酸编码去饱和酶如 $\Delta 9$ 去饱和酶。在一些实施方式中，所述核酸编码解脂耶氏酵母 $\Delta 9$ 去饱和酶 (SCD)。在一些实施方式中，提供了编码基因产物的组合的核酸，例如在多顺反子中，其包含过表达代表脂质生物合成中的推修饰的基因产物（如 ACC1 基因产物）和过表达代表了脂质生物合成中的拉修饰的基因产物（例如 DGA1 和 / 或 SCD 基因产物）。

[0105] 术语“核酸”指的是包含多个相连的核苷酸的分子。“核酸”和“核酸分子”可交换使用，指代寡核糖核苷酸以及寡脱氧核糖核苷酸。该术语还包括多核苷（即多核苷酸减去磷酸）及任何其他含有核酸的有机碱。所述有机碱包括腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶及肌苷。所述核酸可以为单链或双链。所述核酸可以为天然或非天然存在的。核酸可获自天然来源，或可使用核酸合成仪进行合成（即合成的）。核酸的分离在本领域是常规进行的，合适的方法可见于标准分子生物学课本（例如见 Maniatis 的 Handbook of Molecular Biology）。如本文所描述的，所述核酸可以为 DNA 或 RNA 如基因组 DNA、线粒体 DNA、mRNA、cDNA、rRNA、miRNA、PNA 或 LNA 或其组合。非天然存在的核酸如细菌人工染色体 (BAC) 及酵母人工染色体 (YAC) 也可根据本发明的一些方面而使用。

[0106] 本发明的一些方面涉及核酸衍生物的用途。特定核酸衍生物的用途可通过防止其被消化而增加本发明核酸的稳定性，尤其是在其接触可以含有核酸酶的生物学样品的情况下。如本文所使用的，核酸衍生物是非天然存在的核酸或其单元。核酸衍生物可以含有非天然存在的元素如非天然存在的核苷酸和非天然存在的骨架连接。根据本发明的一些方面的核酸衍生物可含有骨架修饰，例如但不限于，硫代磷酸酯键、磷酸二酯修饰的核酸、磷酸二酯和硫代磷酸酯核酸的组合、甲基磷酸酯、烷基膦、磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酯、羧甲基酯、甲基硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯，p- 乙氧基，及其组合。核酸的骨架组合物可以为同源或异源的。

[0107] 根据本发明的一些方面，核酸衍生物可以在糖和 / 或碱基部分含有置换或修饰。例如，一些核酸衍生物可以包括这样的核酸，其的骨架糖在 3' 位置共价附着至低分子量有机基团而不是羟基基团，在 5' 位置也并非附着至磷酸基团（例如 2' -O- 烷基化核糖基团）。核酸衍生物可以包括非核糖的糖类如阿拉伯糖。核酸衍生物可含有置换的嘌呤或嘧啶，如 C-5 丙炔修饰的碱基、5- 甲基胞嘧啶、2- 氨基嘌呤、2- 氨基 -6- 氯嘌呤、2, 6- 二氨基嘌呤、次黄嘌呤、2- 硫尿嘧啶和假异胞嘧啶。

[0108] 在一些实施方式中，核酸可以包含肽核酸 (PNA)、锁核酸 (LNA)、DNA、RNA 或上述核酸的共 - 核酸如 DNA-LNA 共 - 核酸。

[0109] 如本文所使用的，术语“分离的核酸分子”指的是不在天然环境下的核酸分子，例如这样的核酸：(i) 通过本领域已知的方法从细胞或微生物如细菌或真菌中被提取和 / 或纯化的核酸，所述方法例如对宿主细胞进行碱裂解并随后例如使用硅吸附步骤对核酸进行纯化；(ii) 例如通过聚合酶链反应 (PCR) 在体外扩增的核酸；(iii) 通过克隆而重组生产的核酸，例如将核酸克隆至表达载体；(iv) 经过片断化并通过大小被分离的核酸，例如通过体外酶消化或通过剪切并随后进行凝胶分离；或 (v) 例如通过化学合成而合成的核

酸。在一些实施方式中,术语“分离的核酸分子”指的是(vi)在化学上与任何天然存在的核酸有极大不同的核酸。在一些实施方式中,可通过本领域已知的重组 DNA 技术容易地对分离的核酸进行操纵。因此,克隆入载体的核酸或递送到宿主细胞中并整合进入宿主基因组的核酸被认为是分离的,但以其天然状态在天然宿主中的核酸则不是。分离的核酸可以大体上得到纯化,但不一定需要如此。例如,在克隆或表达载体内分离的核酸不是纯化的,因为其可以含有少量百分比的其居留的细胞中的物质。然而如本文所使用的术语一样,这样的核酸也是分离的。

[0110] 本发明的一些方面涉及这样的核酸,其编码的基因产物赋予微生物需要的或期望的表型,用于生物燃料或生物燃料前体生产,所述核酸连接于启动子或其他转录激活元件。在一些实施方式中,编码基因产物并连接于启动子的核酸是包含在表达载体或表达构建体中的。如本文所使用的,术语“表达载体”或“表达构建体”指的是重组或合成生成的核酸构建体,具有一系列特异的核酸元件允许特定核酸在宿主微生物如产油酵母中的转录。在一些实施方式中,表达载体可为质粒、病毒或核酸片段的部分。在一些实施方式中,表达载体包括可操作地连接于启动子的待转录的编码核酸。启动子是一种核酸元件,其促进待转录核酸的转录。启动子通常位于其控制转录的核酸序列的相同链上,并位于其上游(或 5')。在一些实施方式中,表达载体包括可操作地连接于异源启动子的待转录的编码核酸。异源启动子是并非天然可操作连接于给定核酸序列的启动子。例如,解脂耶氏酵母中的 DGA1 基因天然可操作地连接于解脂耶氏酵母 DGA1 基因启动子。因此例如在表达构建物中野生型解脂耶氏酵母 DGA1 基因启动子之外的任何启动子(其可操作地连接于 DGA1 基因)或其部分因此在上下文中就是异源启动子。例如,连接于编码 DGA1 基因产物的核酸的 TEF1 启动子对于 DGA1 来说就是异源启动子。

[0111] 在一些实施方式中,表达载体包括编码核酸,例如编码 DGA1, ACC1 和 / 或 SCD 基因产物的核酸,其可操作地连接于组成型启动子。术语“组成型启动子”指的是允许相连的基因得到持续转录的启动子。在一些实施方式中,表达载体包括编码核酸,例如编码 DGA1, ACC1 和 / 或 SCD 基因产物的核酸,其可操作地连接于诱导型启动子。术语“诱导型启动子”在本文可与术语“条件型启动子”交换使用,指的是只在一些在生物或非生物因素下才允许与其相连的基因进行转录的启动子。药物诱导启动子如四环素 / 强力霉素诱导的启动子、他莫昔芬诱导启动子以及依赖于重组事件而被激活的启动子,例如 cre- 介导的 loxP 位点的重组,这些都是本领域熟知的诱导型启动子的实例。

[0112] 本公开的一些方面涉及惊人的发现,即产油微生物中给定基因产物在异源启动子下过表达可通过在相应表达构建物中包含内含子得到显著增强。本发明的一些方面提供了内含子增强的组成型启动子用于在产油微生物中的基因过表达,并且提供了这种内含子增强启动子的表达构建体和载体。在一些实施方式中,提供了内含子增强的 TEF 启动子,其包含 TEF 启动子序列、转录起始位点、转录起始位点下游的内含子序列以及编码合适序列,例如编码 DGA1, ACC1 和 / 或 SCD 基因产物的核酸序列。在一些实施方式中,所述内含子位于翻译起始位点的下游,但仍然位于基因序列的开放阅读框之内,例如,位于起始密码子之后,但在编码所述基因产物核酸序列的终止位点之前。在一些实施方式中,所述内含子紧接着位于翻译起始位点如 ATG 起始密码子下游,但仍然在编码序列的其余部分的上游。为了阐述清楚,提供如下所示的内含子增强表达构建体的非限制的示例性结构:

[0113] 5' —TEF 启动子—转录起始位点 - 内含子 --DGA1 编码序列 --3'。下文提供了另一个内含子增强表达构建体的非限制的示例性结构：

[0114] 5' —TEF 启动子—转录起始位点 - 起始密码子—内含子 --DGA1 编码序列 - 终止密码子 --3'。ACC1 和 SCD 基因产物的表达构建体分别具有 DGA1 编码序列置换 ACC 或 SCD 编码序列。

[0115] 合适的 TEF 启动子序列及合适的内含子序列对本领域技术人员是清楚的。一些无内含子 TEF 启动子序列在例如美国专利 #6, 265, 185 中已经公开。下文提供了一些示例代表性序列。然而,要理解的是本发明在此方面不限于此。

[0116] 示例性 TEF 启动子序列：

[0117] agagaccgggttggcggcgcatTTgtgtcccaaaaaacagccccaattgcccccaattgaccc caaattgacccagtagcgggcccacccccggcgagagcccccttctccccacatatcaaacctccc ccggttcccacacttgccgttaagggcgttagggtactgcagttctggaatctacgcttggtcagacttt gtactagtttctttgtctggccatccgggtaacccatgccggacgcaaaatagactactgaaaatttt tttgctttgtggttgggacttttagccaagggtataaaaagaccaccgtccccgaattacctttcctcttc tttctctctctccttgtcaactcacacccgaaatcgtaaagcatttccttctgagtataagaatcattc aaa (SEQ ID NO:11)

[0118] 示例性内含子序列：

[0119] gtgagtttcagaggcagcagcaattgccacgggctttgagcacacggccgggtgtggtccc attcccatcgacacaagacgccacgtcatccgaccagcactttttgcagtactaaccgcag (SEQ ID NO:12)

[0120] 在启动子和内含子序列之间含有起始密码子 (ATG) 的示例性 TEF 启动子 - 内含子序列：

[0121] agagaccgggttggcggcgcatTTgtgtcccaaaaaacagccccaattgcccccaattgaccc caaattgacccagtagcgggcccacccccggcgagagcccccttctccccacatatcaaacctccc ccggttcccacacttgccgttaagggcgttagggtactgcagttctggaatctacgcttggtcagacttt gtactagtttctttgtctggccatccgggtaacccatgccggacgcaaaatagactactgaaaatttt tttgctttgtggttgggacttttagccaagggtataaaaagaccaccgtccccgaattacctttcctcttc tttctctctctccttgtcaactcacacccgaaatcgtaaagcatttccttctgagtataagaatcattc aaaATGgtgagtttcagaggcagcagcaattgccacgggctttgagcacacggccgggtgtggt cccattcccatcgacacaagacgccacgtcatccgaccagcactttttgcagtactaaccgcag

[0122] (SEQ ID NO:13)

[0123] 将表达载体或表达构建物递送入微生物如酵母细胞的方法对本领域技术人员是熟知的。包括表达载体在内的核酸可通过生物相关领域技术人员熟知的多种方法递送入原核及真核微生物中。根据本发明的一些方面将核酸递送入微生物的方法包括但不限于不同的化学、电化学及生物学方法,例如热激转化、电穿孔、转染如脂质体介导的转染、DEAE- 葡聚糖 - 介导的转染或磷酸钙转染。在一些实施方式中,使用媒介物或载体将核酸构建体如包含 DGA1、ACC1 和 / 或 SCD 编码核酸序列的组的表达构建体引入宿主微生物用于转移遗传物质。用于将遗传物质转移至微生物的方法对本领域技术人员是已知的,包括例如质粒、人工染色体和病毒载体。用于构建核酸构建体包括含有组成型或诱导型异源启动子的表达构建体、敲除或敲低构建体的方法,以及将核酸或核酸构建体递送至微生物的方法及载体对本领域技术人员是熟知的,在例如

下列著作中有所描述:J. Sambrook 和 D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd edition (January 15, 2001); David C. Amberg, Daniel J. Burke; 和 Jeffrey N. Strathern, *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (April 2005); John N. Abelson, Melvin I. Simon, Christine Guthrie, 和 Gerald R. Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Part A, Volume 194 (Methods in Enzymology Series, 194)*, Academic Press (March 11, 2004); Christine Guthrie 和 Gerald R. Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part B, Volume 350 (Methods in Enzymology, Vol 350)*, Academic Press; 1st edition (July 2, 2002); Christine Guthrie 和 Gerald R. Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part C, Volume 351*, Academic Press; 1st edition (July 9, 2002); Gregory N. Stephanopoulos, Aristos A. Aristidou 和 Jens Nielsen, *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*, Academic Press; 1st edition (October 16, 1998); 以及 Christina Smolke, *The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Fundamentals*, CRC Press; 1st edition (July 28, 2009), 其以全部并入本文作为参考。

[0124] 在一些实施方式中, 编码基因产物的基因的原生启动子例如原生 DGA1、ACC1 或 SCD 启动子赋予了微生物需要的或希望的表型, 在微生物中, 这些启动子得到修饰以改变其转录活性的调节。在一些实施方式中, 经过修饰的启动子相比于未修饰的对等物转录活性增加。如本文所使用的, 术语“经修饰启动子”指的是其核苷酸序列受到人为改变的启动子。单独的核苷酸删除、插入或突变或其组合都是所述人为改变的实例。人为的启动子改变可以以靶向的方式实现, 例如通过同源重组手段如基因靶向、敲除、敲入、定点诱变或人工锌指核酸酶介导的策略实现。备选地, 这样的改变可通过随机或准随机事件实现, 如辐射或非靶向核苷酸整合并随后进行筛选。启动子修饰一般是不断改进的以调制相应启动子转录激活特性。例如, 在对细胞内脂肪酸水平升高作出应答时介导 DGA1、ACC1 或 SCD 启动子的抑制的调节元件的破坏或删除会导致相应的基因甚至在细胞内脂肪酸水平升高的条件下持续转录激活。类似地, 组成型激活的转录激活元件插入条件型启动子区域可以对相应的基因在正常的抑制性条件下的过表达产生影响。用于在微生物中靶向破坏原生启动子例如原生 DGA1、ACC1 或 SCD 启动子, 例如用于靶向破坏使得转录速率增加的方法对本领域技术人员是熟知的。

[0125] 本发明的一些方面涉及微生物如解脂耶氏酵母的工程改造, 以显示用于生物燃料或生物燃料前体的大规模生产所需要和 / 或希望的表型。本发明的一些方面涉及脂质合成途径的代谢工程改造以产生就生物燃料生产而优化的微生物。本发明的一些方面涉及代谢改造, 其包含调制那些调节进入脂质合成途径的碳流的基因的表达的遗传修饰的组合, 以产生就生物燃料生产而优化的微生物。在一些实施方式中, 所述遗传修饰的组合包括推修饰和拉修饰。在一些实施方式中, 推修饰包含增加细胞中用于脂质合成的代谢物乙酰-CoA、ATP 或 NADPH 水平的遗传修饰, 例如 ACC1 基因产物的过表达。在一些实施方式中, 拉修饰是降低脂质合成中那些显示有反馈抑制功能的产物或中间产物, 如脂肪酸水平的遗传修饰。在一些实施方式中, 拉修饰包含 DGA1 和 / 或 SCD 基因产物的过表达。

[0126] 本发明的一些方面提供了通过调制解脂耶氏酵母的原生脂质代谢极大地增加解脂耶氏酵母介导的碳源向脂质转化效率的方法。显著而意外地,相比于仅仅分别调制推或拉过程的单独的修饰,根据本发明提供的一些方法的脂质代谢的推-和-拉修饰的组合能使得进入脂质合成途径的碳流有显著的增加。

[0127] 本发明的一些方面涉及工程改造和/或优化用于大规模生物燃料或生物燃料前体生产的微生物。在一些实施方式中,提供了工程改造的微生物,其已经通过本发明的一些方面提供的方法或使用了本发明的一些方面提供的核酸或蛋白质进行操纵,所述核酸或蛋白质例如本文提供的表达构建体或表达构建体组合,其导致介导脂质合成推过程的基因产物(例如 ACC1 产物)与介导脂质合成拉过程的基因产物(例如 DGA1 和/或 SCD 基因产物)的组合的过表达。在一些实施方式中,提供了工程改造的微生物,其过表达的基因产物的推-和-拉的组合,根据本发明的一些实施方式赋予所述微生物用于生物燃料或生物燃料前体生产必需的及/或希望的表型。在一些实施方式中,提供了微生物,其包含的 DGA1、ACC1 和/或 SCD 基因产物活性得到增加。在一些实施方式中,所述微生物显示了增加的脂肪酸合成速率、增加的 TAG 储存及/或此外的必需或希望的特征。

[0128] 如本文在微生物脂质合成的上下文中所使用的,例如在本文描述的产油微生物的脂肪酸合成速率的上下文中所使用的,术语“增加的合成速率”或“合成速率增加”指的是在工程改造的微生物中合成速率相比于相同种属野生型微生物中相应的合成速率得到增加。例如,在本文描述的工程改造的解脂耶氏酵母微生物中, TAG 合成速率增加指的是脂质合成速率比野生型 TAG 合成速率得到增加。在一些实施方式中,增加的脂质合成速率,例如 TAG 或总脂质合成速率指的是细胞培养物例如工程改造的微生物培养物中脂肪酸合成速率。在一些实施方式中,增加的脂质合成速率是脂质合成如 TAG 合成或总脂质合成速率为至少 0.01g/L/h(脂质克每升培养基每小时)、至少 0.004g/L/h、至少 0.05g/L/h、至少 0.1g/L/h、至少 0.14g/L/h、至少 0.15g/L/h、至少 0.2g/L/h、至少 0.3g/L/h、至少 0.4g/L/h、至少 0.5g/L/h、至少 0.6g/L/h、至少 0.7g/L/h、至少 0.8g/L/h、至少 0.9g/L/h、至少 1g/L/h、至少 2g/L/h、至少 3g/L/h、至少 4g/L/h、至少 5g/L/h、至少 6g/L/h、至少 7g/L/h、至少 8g/L/h、至少 9g/L/h、至少 10g/L/h 或至少 25g/L/h。

[0129] 在一些实施方式中,本上下文中合成速率为生物反应器进行一个完整的运行周期中测量的合成速率,例如由生物反应器运行总时间内或脂质测量的总时间内合成的脂质例如 TAG 总量计算合成速率。这种合成速率的类型在本文有时候称作“总脂质生产效率”或“总体脂质生产效率”,通常以 g/L/h(每小时运行时间每升培养基生产的脂质克数)为单位提供。在一些实施方式中,提供了工程改造的微生物,例如工程改造的解脂耶氏酵母,其过表达 ACC1 基因产物、DGA1 基因产物及/或 SCD 基因产物,与野生型微生物如野生型解脂耶氏酵母相比,总脂质生产效率显示了至少 5 倍的增加、至少 6 倍的增加、至少 7 倍的增加、至少 8 倍的增加、至少 9 倍的增加、至少 10 倍的增加、至少 12 倍的增加、至少 10 倍的增加、至少 12.5 倍的增加、至少 15 倍的增加、至少 20 倍的增加、至少 30 倍的增加、至少 40 倍的增加、至少 50 倍的增加、至少 60 倍的增加、至少 70 倍的增加、至少 80 倍的增加、至少 90 倍的增加、至少 100 倍的增加、至少 500 倍的增加,或至少 1000 倍的增加。

[0130] 在一些实施方式中,增加的总脂质合成速率或增加的总脂质生产效率为至少 0.01g/L/h、至少 0.004g/L/h、至少 0.05g/L/h、至少 0.1g/L/h、至少 0.14g/L/h、至少 0.15g/L/h、至少 0.2g/L/h、至少 0.3g/L/h、至少 0.4g/L/h、至少 0.5g/L/h、至少 0.6g/L/h、至少 0.7g/L/h、至少 0.8g/L/h、至少 0.9g/L/h、至少 1g/L/h、至少 2g/L/h、至少 3g/L/h、至少 4g/L/h、至少 5g/L/h、至少 6g/L/h、至少 7g/L/h、至少 8g/L/h、至少 9g/L/h、至少 10g/L/h 或至少 25g/L/h。

L/h、至少 0.2g/L/h、至少 0.3g/L/h、至少 0.4g/L/h、至少 0.5g/L/h、至少 0.6g/L/h、至少 0.7g/L/h、至少 0.8g/L/h、至少 0.9g/L/h、至少 1g/L/h、至少 2g/L/h、至少 3g/L/h、至少 4g/L/h 或至少 5g/L/h。

[0131] 在一些实施方式中,合成速率是在例如优化的生长条件下有营养物的存在下测量的最大合成速率或峰合成速率。这种类型的合成速率在本文有时候称为“最大脂质生产效率”。在一些实施方式中,增加的最大脂质合成速率是脂质合成如 TAG 合成的速率为至少 0.2g/L/h、至少 0.3g/L/h、至少 0.4g/L/h、至少 0.5g/L/h、至少 0.6g/L/h、至少 0.7g/L/h、至少 0.8g/L/h、至少 0.9g/L/h、至少 1g/L/h、至少 2g/L/h、至少 3g/L/h、至少 4g/L/h、至少 5g/L/h、至少 6g/L/h、至少 7g/L/h、至少 8g/L/h、至少 9g/L/h、至少 10g/L/h, 或至少 25g/L/h。

[0132] 在一些实施方式中,工程改造的微生物是产油酵母如解脂耶氏酵母。在一些实施方式中,本发明提供的工程改造的酵母显示了一种或多种高度所需的且预期外的表型特征,例如:增加的碳-油转化率或效率,增加的脂质小体中的脂质积累。

[0133] 在一些实施方式中,本发明的某些方面提供的工程改造的微生物,例如工程改造的酵母,显示的碳-油转化率(本文也称为“脂质产率”)在大约 0.02g/g(生产的油、脂质或 TAG(g)/碳(g),例如消耗的葡萄糖、醋酸盐或醋酸)-大约 0.3g/g 的范围内。在一些实施方式中,本发明的某些方面提供的工程改造的微生物,例如工程改造的酵母,显示的碳-油转化率为大约 0.010g/g、大约 0.02g/g、大约 0.025g/g、大约 0.03g/g、大约 0.04g/g、大约 0.05g/g、大约 0.06g/g、大约 0.07g/g、大约 0.075g/g、大约 0.08g/g、大约 0.09g/g、大约 0.1g/g、大约 0.11g/g、大约 0.12g/g、大约 0.13g/g、大约 0.14g/g、大约 0.15g/g、大约 0.16g/g、大约 0.17g/g、大约 0.18g/g、大约 0.19g/g、大约 0.2g/g、大约 0.21g/g、大约 0.22g/g、大约 0.23g/g、大约 0.24g/g、大约 0.25g/g、大约 0.26g/g、大约 0.27g/g、大约 0.28g/g、大约 0.29g/g、大约 0.3g/g、大约 0.31g/g、大约 0.32g/g 或接近理论值。在一些实施方式中,本发明的某些方面提供的工程改造的微生物,例如工程改造的酵母,显示的碳-油转化率为至少大约 0.010g/g(生产的脂质(g)/碳(g),例如,消耗的葡萄糖、醋酸盐或醋酸)、至少大约 0.02g/g、至少大约 0.025g/g、至少大约 0.03g/g、至少大约 0.04g/g、至少大约 0.05g/g、至少大约 0.06g/g、至少大约 0.07g/g、至少大约 0.075g/g、至少大约 0.08g/g、至少大约 0.09g/g、至少大约 0.1g/g、至少大约 0.11g/g、至少大约 0.12g/g、至少大约 0.13g/g、至少大约 0.14g/g、至少大约 0.15g/g、至少大约 0.16g/g、至少大约 0.17g/g、至少大约 0.18g/g、至少大约 0.19g/g、至少大约 0.2g/g、至少大约 0.21g/g、至少大约 0.22g/g、至少大约 0.23g/g、至少大约 0.24g/g、至少大约 0.25g/g、至少大约 0.26g/g、至少大约 0.27g/g、至少大约 0.28g/g、至少大约 0.29g/g、至少大约 0.3g/g、至少大约 0.31g/g、至少大约 0.32g/g 或接近理论值。

[0134] 如本文使用的术语“脂质滴度”在微生物脂质合成的上下文中,例如在本文描述的产油微生物进行脂肪酸合成的上下文中,指的是每份体积的包含所述产油微生物的微生物培养物合成的脂质的量。在一些实施方式中,改造的微生物例如本文描述的改造的解脂耶氏酵母微生物可达到或确实达到的脂质滴度为至少 1g/L(脂质克数每升微生物培养物)、至少 2g/L、至少 3g/L、至少 4g/L、至少 5g/L、至少 6g/L、至少 7g/L、至少 8g/L、至少 9g/L、至少 10g/L、至少 15g/L、至少 20g/L、至少 25g/L、至少 30g/L、至少 40g/L、至少 50g/L、至少 60g/L、至少 70g/L、至少 80g/L、至少 90g/L、至少 100g/L、至少 200g/L 或至少 250g/L。

[0135] 在一些实施方式中,如本文所提供的工程改造的微生物在碳-油转化中显示了增加的脂质滴度。如本文在微生物脂质合成的上下文中例如在本文描述的产油微生物进行脂肪酸合成的上下文中所使用的术语“增加的脂质滴度”指的是每份体积的包含所述产油微生物的微生物培养物中合成的脂质的量相比于相同种属的野生型微生物在相同条件(例如,在相同生长基质中、具有相同的C/N比率、等量的氧气、相同的pH、相同的营养物,等等)下相应的脂质滴度得到增加。例如,本文描述的工程改造的微生物解脂耶氏酵母达到的增加的脂质滴度指的是脂质滴度相比于同一条件下野生解脂耶氏酵母达到的脂质滴度得到增加。在一些实施方式中,增加的脂质滴度指的是脂质滴度为至少1g/L(脂质克数每升微生物培养物)、至少2g/L、至少3g/L、至少4g/L、至少5g/L、至少6g/L、至少7g/L、至少8g/L、至少9g/L、至少10g/L、至少15g/L、至少20g/L、至少25g/L、至少30g/L、至少40g/L、至少50g/L、至少60g/L、至少70g/L、至少80g/L、至少90g/L、至少100g/L、至少200g/L或至少250g/L。

[0136] 本发明的一些方面提供了工程改造的微生物用于油生产,其可使用多种碳源,包括但不限于可发酵糖类,例如C6糖,如葡萄糖和有机酸,例如醋酸和/或其他盐,例如醋酸盐。

[0137] 本发明的一些方面涉及本文提供的遗传修饰的微生物的培养物。在一些实施方式中,所述培养物包括本文提供的遗传修饰的微生物以及基质,例如液体基质。在一些实施方式中,所述培养物包含本文提供的遗传修饰的微生物以及碳源,例如可发酵碳水化合物源或有机酸或其盐。在一些实施方式中,所述培养物包含了本文提供的遗传修饰的微生物以及构成盐度、渗透压以及pH条件的盐和/或缓冲液,适合于微生物的存活、生长和/或碳水化合物向生物燃料或生物燃料前体的转化。在一些实施方式中,所述培养物包含其他的组分例如添加剂。添加剂的非限制性实例为营养物、酶、氨基酸、白蛋白、生长因子、酶抑制剂(例如蛋白酶抑制剂)、脂肪酸、脂质、激素(例如地塞米松和赤霉素)、痕量元素、无机化合物(例如还原试剂如镁)、氧化还原调节剂(例如抗氧化剂)、稳定试剂(例如二甲基亚砷)、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、明胶、抗生素(例如,布雷菲德菌素A)、盐(如NaCl)、螯合剂(例如EDTA、EGTA)和酶(如纤维素酶、分散酶、透明质酸酶或脱氧核糖核酸酶)。在一些实施方式中,所述培养物可以包含诱导或抑制条件型或诱导型启动子调控的转录的药物,例如多西环素、四环素,他莫昔芬, IPTG, 激素, 或金属离子。

[0138] 虽然特定培养条件如碳源浓度会取决于要培养的工程改造的微生物自身,然而用于生成微生物培养物的通用方法和培养物条件对本领域技术人员是已知的,在例如以下著作中有所描述:J. Sambrook 和 D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd edition (January 15, 2001); David C. Amberg, Daniel J. Burke; 和 Jeffrey N. Strathern, *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (April 2005); John N. Abelson, Melvin I. Simon, Christine Guthrie, 和 Gerald R. Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Part A, Volume 194* (Methods in Enzymology Series, 194), Academic Press (March 11, 2004); Christine Guthrie 和 Gerald R. Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part B, Volume 350* (Methods in Enzymology, Vol 350), Academic Press;

1st edition(July2,2002);Christine Guthrie 和 Gerald R.Fink,Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology,Part C,Volume351,Academic Press;1st edition(July9,2002),其以全部并入本文作为参考。为生成油,本文描述的工程改造的微生物培养物在适合油积累的条件下进行培养。

[0139] 在一些实施方式中,所述遗传修饰的微生物显示了相对于相同种类野生型微生物和/或相对于其他微生物(例如通常发现会污染用于碳源向生物燃料或生物燃料前体转化的微生物培养物的那些微生物)的生长优势。在一些实施方式中,本发明的某些方面提供的工程改造的微生物的生长和/或增殖优势转化为使用非灭菌培养和发酵条件用于生物燃料或生物燃料前体的生产的可能性,因为培养物中污染性微生物过度生长的问题能得到缓解或完全消除。在一些实施方式中,本发明的某些方面提供的工程改造的微生物是在非灭菌条件下培养的,用于生物燃料或生物燃料前体生产。例如,在一些实施方式中,非灭菌原料、非灭菌的培养基、非灭菌的补充物或非灭菌的生物反应器(例如在非灭菌环境中的开放式反应器)被用于生物燃料或生物燃料前体生产。

[0140] 根据本发明的一些方面,多种不同的微生物都可进行遗传修饰并用于工业规模的生物燃料或生物燃料前体生产,例如来自多种酵母来源如产油酵母、细菌、藻类和真菌的微生物。合适的酵母细胞的非限制性实例为来自以下种属的细胞:解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、多形汉逊(*Hansenula polymorpha*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、贝酵母(*S. bayanus*)、乳酸克鲁维酵母(*S. K. lactis*)、*Waltomyces lipofer*、高山被孢霉(*Mortierella alpine*)、黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)、多形汉逊、鲁氏毛霉(*Mucor rouxii*)、皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneu*)、粘红酵母酿酒(*Rhodotorula glutinis*)、糖化酵母(*Saccharomyces diastasicus*)、西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)和裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)。合适的细菌的非限制性实例有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、假单胞菌属(*Pseudomonas sp.*)、红球菌属(*Rhodococcus sp.*)、链霉菌属(*Streptomyces sp.*)和产碱杆菌(*Alcaligenes sp.*)。合适的真菌细胞的非限制性实例可以培养自,例如,*Aspergillus shirousamii*、黑曲霉(*Aspergillus niger*)和里氏木霉(*Trichoderma reesei*)等种属。合适的藻细胞的非限制性实例为来自以下种属的细胞:富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans*)、斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)、微绿球藻属(*Nannochloropsis sp.*)、杜氏盐藻(*Dunaliella tertiolecta*)、小球藻(*Chlorella vulgaris*)、浮水小球藻(*Chlorella emersonii*)和极大螺旋藻(*Spirulina maxima*)。

[0141] 本发明的一些方面提供了用于生产生物燃料或生物燃料前体的方法,所述方法使用了本文提供的遗传修饰的微生物。在一些实施方式中,提供了以工业规模生产生物燃料或生物燃料前体的方法。

[0142] 使用本文提供的方法和/或遗传修饰的微生物可以将多种碳源转化为生物燃料或生物燃料前体。在一些实施方式中,碳源包含碳水化合物。糖类、淀粉以及纤维都是适合于本文提供的转化方法的碳水化合物来源的实例。根据本发明的一些方面,碳水化合物来

源可包含精炼的和 / 或粗制的糖、淀粉和 / 或纤维,或这些物质的任意组合。糖的非限制性的实例为可发酵糖如葡萄糖、果糖、蔗糖、木糖和乳糖。淀粉的非限制性实例为直链淀粉和支链淀粉。纤维的非限制性实例为植物纤维如纤维素、半纤维素和木纤维。本发明的一些方面涉及工业副产品、中间产物、或废品的用作碳源用途,例如植物粗提取物、糖蜜、秸秆或污水作为碳源。在一些实施方式中,碳源来自藻类。在一些实施方式中,藻类生物质特别生产为用作微生物介导的生物燃料或生物燃料前体生产中的碳源。

[0143] 在一些实施方式中,提供了用于生产生物燃料或生物燃料前体的方法,包括使用便宜、丰富且易得的碳源原料作为碳源。在一些实施方式中,纤维素或半纤维素被用作碳源。在一些实施方式中,纤维素或半纤维素来自工业副产品或废品。在一些实施方式中,纤维素或半纤维素直接来源于植物或藻类生物质。植物或藻类生物质是最丰富的原料之一,并且包含显著量的不可发酵糖和纤维,例如纤维素和本纤维素。在一些实施方式中,对生物质原料进行预处理以将不可发酵糖或纤维转化为可发酵糖类,这样使其能够用于微生物生长及微生物介导的生物燃料或生物燃料前体生产。在一些实施方式中,生物质原料的预处理包括使纤维素和 / 或半纤维素组分解聚为单体糖,所使用的预处理方法对本领域技术人员是熟知的,例如使用稀释酸或氨纤维膨胀 (AFEX) 法 (见例如, Yang B, Wyman CE. Dilute acid and autohydrolysis pretreatment. *Methods Mol Biol.* 2009 ;581:103-14 ;Balan V, Bals B, Chundawat SP, Marshall D, Dale BE, Lignocellulosic biomass pretreatment using AFEX *Methods Mol Biol.* 2009 ;581:61-77)。其他用于将生物质多聚体解聚为单体糖的方法对本领域技术人员是熟知的,并且预期会在本发明的一些实施方式中使用。

[0144] 在一些实施方式中,使用了稀释酸法对含有不可发酵糖的生物质原料进行预处理,将不可发酵糖解聚为单体的可发酵糖。在一些实施方式中,在适度温和的温度下用稀释的硫酸对生物质处理一段限定的时间。例如,在一些实施方式中,用大约 0.5%、大约 1%、大约 2%、大约 3%、大约 4%、大约 5% 或大约 6% 的硫酸对生物质进行处理。在一些实施方式中,在大约 30℃、大约 37℃、大约 40℃、大约 50℃、大约 60℃、大约 70℃、大约 80℃、大约 90℃、大约 100℃、大约 110℃、大约 120℃、大约 130℃、大约 140℃、大约 150℃、大约 175℃、大约 200℃ 或大约 200℃ 以上的温度下对生物质进行处理。

[0145] 在一些实施方式中,所得的水解物含有不溶的木质素及溶解的纤维素和半纤维素多聚物。后者产物可使用本领域技术人员熟知的方法进一步处理,如使用纤维素酶或其他水解酶处理生产六碳糖和五碳糖,如葡萄糖和木糖单体。在一些实施方式中,用稀释酸对不可发酵糖进行预处理导致一些副产品的生成,包括毒性化合物,其抑制没有根据本发明的方面进行工程改造的微生物的生长、降低其活力且 / 或抑制其的生物燃料或生物燃料生产。在一些实施方式中,用有助于微生物生长、生物燃料或生物燃料生产的基质对预处理过的原料进行洗涤和补充,且 / 或对原料过石灰 (over-limed) 以脱毒。

[0146] 在一些实施方式中,使用 AFEX 法对含有不可发酵糖的生物质原料预处理以将不可发酵糖解聚成单体可发酵糖。在一些实施方式中,在高温高压下用液态氨对生物质进行一段限定时间的处理。在一些实施方式中,对生物质的处理为大约 10 分钟、大约 20 分钟、大约 30 分钟、大约 40 分钟、大约 50 分钟、大约 60 分钟、大约 70 分钟、大约 80 分钟、大约 90 分钟或更长。在一些实施方式中,在大约 30℃、大约 37℃、大约 40℃、大约 50℃、大约 60℃、大约 70℃、大约 80℃、大约 90℃、大约 100℃、大约 110℃、大约 120℃、大约 130℃、大约 140℃、

大约 150℃、大约 175℃、大约 200℃或大约 200℃以上的温度下对生物质进行处理。在一些实施方式中, AFEX 预处理使原料中所含的结晶纤维素转化为无定形、可发酵的形式。在一些实施方式中, 经过 AFEX 预处理的生物原料不含有显著量的抑制微生物生长和 / 或生物燃料或生物燃料生产的毒性副产品, 并且不经过预先的脱毒步骤就可以用作微生物生物燃料或生物燃料生产。

[0147] 在一些实施方式中, 经过或不经过预处理的生物质原料, 都用水解或解聚糖多聚物的酶进行处理, 例如使用纤维素酶或半纤维素酶进行处理。在一些实施方式中, 将原料与所述酶在液相中接触, 并在允许酶催化解聚或水解反应的温度下孵育一段时间, 时间足以水解或解聚生物质原料中显著量的不可发酵糖或纤维。在一些实施方式中, 在孵育进行水解和解聚后, 通过例如离心的方法将原料与酶接触的液相 (含有可溶的、可发酵糖部分) 与包含不可发酵糖和纤维的固相相分离。在一些实施方式中, 随后将原料的液体部分与微生物, 例如本文的一些方面提供的微生物接触, 以转化为生物燃料或生物燃料前体。在一些实施方式中, 不可发酵糖或纤维的酶转化是在综合的生物过程中进行的, 例如, 所产生的可发酵糖向生物燃料或生物燃料前体的微生物转化过程也在同时且 / 或在同一个反应器中发生。在一些实施方式中, 首先进行酶转化, 随后将接触了酶的原料与用于生物燃料或生物燃料前体生产的微生物接触。在一些实施方式中, 酶和微生物转化在同时且在同一个反应器中进行。

[0148] 在一些实施方式中, 如本文提供的工程改造的微生物例如过表达 DGA1、ACC1 和 / 或 SCD 基因产物的解脂耶氏酵母, 以醋酸盐为主要碳源生长。在一些实施方式中, 微生物生长的溶液中醋酸浓度为大约 1%、大约 2%、大约 3%、大约 4%、大约 5%、大约 6%、大约 7%、大约 8%、大约 9%、大约 10% vol/vol、大约 20% vol/vol、大约 25% vol/vol, 或大约 30% vol/vol。在一些实施方式中, 醋酸盐的浓度为 3% -10% wt/vol 之间。在一些实施方式中, 将包含如本文提供的遗传修饰的微生物并以醋酸盐或醋酸为主要碳源的细胞培养物与甘油接触或“穿刺 (spike)”混入甘油。在一些实施方式中, 间歇地将遗传修饰的微生物与甘油接触。在一些实施方式中, 连续或半连续地将微生物与甘油接触。在一些实施方式中, 将微生物与浓度为大约 0.5%、大约 1%、大约 2%、大约 3%、大约 4%或大约 5% vol/vol 的甘油接触。将本文提供的工程改造的微生物与甘油接触为 TAG 的生产提供代谢物, 并由碳水化合物生产脂肪酸提供还原性部分。在一些实施方式中, 甘油穿刺是在使用了醋酸盐之外的碳源, 例如任何本文描述的碳源的物燃料或生物燃料生产方法中进行的。

[0149] 在一些实施方式中, 如本文提供的工程改造的微生物, 例如过表达 DGA1 基因产物, 且 / 可选地表达 ACC1 和 / 或 SCD 基因产物的解脂耶氏酵母是在碳源例如醋酸盐或醋酸上生长的, 在生长过程中或培养阶段可以得到更新 (replenished), 例如在培养一定时间段之后例如 8 小时后、24 小时后或 48 小时后通过将微生物与添加量的碳源或与一定量的此外的碳源接触而更新。在一些实施方式中, 如本文提供的工程改造的微生物在包含低碳氮 (C/N) 比的培养基中起始培养第一个 6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66 或 72 小时, 例如 C/N 比率为大约 10、大约 20、大约 25、大约 30、低于大约 30、低于 25 或低于 20。在一些实施方式中, 低 C/N 比率是通过向培养基中补充氮源实现的, 如补充氮以达到所需的 C/N 比率。在一些实施方式中, 例如在其中碳源 (例如醋酸盐或醋酸) 加料于如本文所述的产油微生物培养物的实施方式中, 在碳源中补充了氮源, 如氨。在一些实施方式中, 在起始培养一段时

间后停止用氮源进行补充,例如在培养的第一个 6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66 或 72 小时之后,由此使得培养物中工程改造的微生物能消耗氮源,这样进而增加了 C/N 比率。C/N 比率的这一变化可通过向没有补充氮源的培养物中加料额外的碳源,例如通过加料不补充氮或任何其他氮源的醋酸或醋酸盐而得到增强或加速。在一些实施方式中,本文描述的工程改造的微生物进行油生产的优化的 C/N 比率在 80-120 的范围内。

[0150] 在一些实施方式中,用于大规模微生物介导的碳水化合物向脂质转化的发酵过程可在反应器中施行。如本文所使用的,术语“生物反应器”和“发酵罐”在本文交换使用,指的是封闭或部分封闭的空间,其中发生生物学和 / 或化学反应,所述反应至少有一部分涉及活体生物或活体生物的一部分。“大规模生物反应器”或“工业规模反应器”是用于在商业或准商业规模上生成产品如生物燃料或生物燃料前体(如脂肪酸和 / 或 TAG)的反应器。大规模生物反应器通常具有的容积在升、数百升、数千升或者更大的范围内。

[0151] 根据本发明的某些方面的生物反应器可包含微生物或微生物培养物。在一些实施方式中,生物反应器可包含本发明的某些方面提供的任意微生物的孢子和 / 或任意种类的休眠细胞类型,例如干粉状态的细胞。在一些实施方式中,将合适的碳水化合物源加入这样的生物反应器可导致休眠细胞的活化,例如导致酵母孢子的出芽并随后至少部分地将碳水化合物源转化为生物燃料或生物燃料前体。

[0152] 根据本发明的某些方面的一些生物反应器可包括细胞培养系统,其中微生物与移动的液体和 / 或气泡接触。根据本发明的某些方面的微生物或微生物培养物可悬浮生长或贴附于固相载体而生长。载体细胞的非限制性实例包括微载体(例如聚合物球、微珠以及微盘,可以为多孔或无孔的)、负荷特异性化学基团(例如季铵基团)的交联珠子(例如葡聚糖)、2D 微载体(包括捕获在非多孔多聚物纤维中的细胞)、3D 微载体(例如载体纤维、中空纤维、多管反应器、和可包含多孔纤维的半透膜)、离子交换能力减弱的微载体、胶囊细胞、毛细管以及絮凝物。载体可由物质如葡聚糖、明胶、玻璃和纤维素制造。

[0153] 根据本发明方面的工业规模的碳水化合物向脂质转化的过程可以连续、半连续或非连续的模式操作。根据本发明的操作模式的非限制性实例为批式、补料批式、延长批式、重复批式、取出 / 注满、旋转壁、转瓶和 / 或灌注的操作模式。

[0154] 在一些实施方式中,可使用允许底物原料如碳水化合物的连续或半连续更新,和 / 或产物如分泌的脂质、包含脂质的有机相和 / 或显示了所需的脂质含量的细胞与反应器进行连续或半连续分离的生物反应器。

[0155] 根据本发明的生物反应器的非限制性实例为:搅拌槽发酵罐、由旋转混合设备搅拌的生物反应器、恒化器、由振荡设备搅拌的生物反应器、气升式发酵罐、堆积床反应器、固定床反应器、流化床反应器、采用波式诱导搅拌的生物反应器、离心式生物反应器、滚瓶以及中空纤维生物反应器、滚轮设备(例如台式设备、载车式设备和 / 或自动控制的这些种类)、垂直堆放的平板、转瓶、搅拌或摇瓶、振荡的多孔板、MD 瓶、T- 瓶、Roux 瓶、多表面组织培养繁殖器、修饰的发酵罐以及包被的珠子(例如,由血清蛋白质、硝酸纤维素或羧甲基纤维素包被珠子以防止细胞附着)。

[0156] 根据本发明的方面的生物反应器和发酵罐可选地包含感受器和 / 或控制系统以测量和 / 或调整反应参数。反应参数的非限制性实例为:生物学参数例如生长速率、细胞大小、细胞数量、细胞密度、细胞类型或细胞状态,化学参数如 pH、氧化还原势能、反应底物和

/ 或产物的浓度、溶解气体的浓度如氧气浓度和 CO_2 浓度、营养物浓度、代谢物浓度、葡萄糖浓度、谷氨酰胺浓度、丙酮酸浓度、磷石灰浓度、寡肽的浓度、氨基酸的浓度、维生素的浓度、激素的浓度、添加剂的浓度、血清浓度、离子强度、离子的浓度、相对湿度、摩尔浓度、渗透压、其他化学物例如缓冲试剂、佐剂或反应副产物的浓度, 物理 / 机械参数如密度、电导率、搅拌度、压力和流速、剪切力、剪切速率、粘度、颜色、浑浊度、光吸收、混合速率、转化率以及热动力学参数如温度、光强度 / 质量等等。

[0157] 机械和电子领域的相关技术人员对能够测量如本文所述的参数的传感器是熟知的。能够基于如本文所描述的传感器的输入信号调整反应器中参数的控制系统对生物反应器工程领域的技术人员是熟知的。

[0158] 根据本发明的某些方面的用于向生物燃料或生物燃料前体转化所采用的碳源类型取决于所采用的特定微生物。本发明的某些方面提供的一些微生物能够有效地转化特定的碳水化合物源, 但是相同的微生物可不能高效地加工不同的碳水化合物来源或根本无法加工。根据本发明的方面, 例如产油酵母解脂耶氏酵母能有效地将糖类如葡萄糖、果糖、蔗糖和 / 或乳糖, 及富含糖类的碳水化合物, 例如糖蜜和植物纤维转化为脂肪酸及其衍生物。

[0159] 在一些实施方式中, 由碳源原料生成的生物燃料或生物燃料前体如脂肪酸或三酰基甘油是由本发明的某些方面提供的微生物例如产油酵母如解脂耶氏酵母细胞分泌的, 或至少由其分泌的。在一些实施方式中, 根据本发明的某些方面的微生物与在生物反应器中的水溶液中的碳水化合物源接触, 并且分泌的生物燃料或生物燃料前体形成了可以与水相相分离的有机相。如本文使用的, 术语有机相指的是包含非极性、有机化合物例如脂肪酸、TAG 和 / 或其他非极性脂质的液相。根据本发明的有机相可以进一步含有微生物、碳水化合物或在相应生物反应器中其他相中发现的其他化合物。用于进行工业规模的相分离的方法对本领域一般技术人员是熟知的。在一些实施方式中, 有机相是持续或半持续虹吸出去。在一些实施方式中, 采用了包含分离器的生物反应器, 分离器能够连续或半连续地萃取有机相。

[0160] 在一些实施方式中, 根据本发明的某些方面, 生物燃料或生物燃料前体在细胞中积累。在一些实施方式中, 例如通过离心、沉淀或过滤的方式, 连续或半连续地将积累了所需量的生物燃料或生物燃料前体的细胞从生物反应器中分离。细胞分离可进一步例如基于细胞物理特征如细胞大小或密度, 通过本领域技术人员熟知的方法实现。随后可使用本领域技术人员熟知的标准萃取方法如溶剂正己烷萃取法, 从相应的细胞中萃取积累的生物燃料或生物燃料前体。在一些实施方式中, 以 3 倍于所收集的细胞体积的正己烷收集和萃取微生物细胞。在一些实施方式中, 对萃取的生物燃料或生物燃料前体进行进一步的精炼。在一些实施方式中, 使用本领域技术人员熟知的方法例如酯交换步骤将生物燃料前体如三酰基甘油转化为生物燃料如生物柴油。

[0161] 本发明的这些和其他实施方式的功能和优势将从下文实施例得到更全面的理解。以下实施例意欲阐述本发明的益处, 但并未示例说明本发明的全部范围。因此, 要理解的是实施例章节不意欲限制本发明的范围。

实施例

[0162] 实施例 1.

[0163] 材料和方法

[0164] 酵母菌株、生长及培养条件

[0165] 用于本研究的解脂耶氏酵母菌株来自野生型解脂耶氏酵母 W29 菌株 (ATCC20460)。用于所有转化的营养缺陷型 Polg(Leu-) 获自 Yeastern Biotech 公司 (Taipei, Taiwan)。本研究使用的所有菌株列于表 1。

[0166] 表 1. 解脂耶氏酵母菌株的总脂肪酸含量、产率和分布。50mL 培养物在 100 小时之后的总脂肪酸含量表示为平均值 $\pm$ S. D. ($n = 3$) (C/N 摩尔比率为 20)。脂肪酸谱表示为脂肪酸相对于总脂肪酸的百分比, 误差低于 2.5%。

[0167]

	生 物 质 (g DCW)	脂 质 含 量 (%)	油 产 率 (g/g 葡萄糖)	脂 肪 酸 (丰 度 分 数 %)				
				C16	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
对 照 (MTYL037)	10.49	8.77 $\pm$ 0.37	2.28	20.5	3.9	24.0	43.0	8.7
ACCI (MTYL040)	6.04	17.9 $\pm$ 1.13	6.25	20.3	3.5	23.4	41.7	11.0
DGAI (MTYL053)	7.53	33.8 $\pm$ 0.55	9.36	18.3	2.6	34.1	38.6	6.4
ACCI+DGAI (MTYL065)	8.60	41.4 $\pm$ 1.90	11.4	16.0	2.3	32.8	44.9	4.0

[0169] 大肠埃希氏菌的培养基和生长条件在之前由 Sambrook 等人描述 (21), 解脂耶氏酵母的培养基和生长条件由 Barth 和 Gaillardin 描述 (11)。Rich 培养基 (YPD) 的制备方法如下: 20g/L Bacto 蛋白质 (Difco Laboratories, Detroit, MI), 10g/L 酵母提取物 (Difco), 20g/L 葡萄糖 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。YNB 基质是由 1.7g/L 酵母酵母氮源 (不含氨基酸) (Difco), 0.69g/L CSM-Leu (MP Biomedicals, Solon, OH), 和 20g/L 葡萄糖制备的。选择性 YNB 平板含有 1.7g/L 酵母氮源 (不含氨基酸)、0.69g/L CSM-Leu、20g/L 葡萄糖和 15g/L Bacto 琼脂 (Difco)。

[0170] 摇瓶实验是使用以下基质进行的: 1.7g/L 酵母氮源 (无氨基酸), 1.5g/L 酵母提取物和 50g/L 葡萄糖。从冻存储备物中将预培养物接种于 YNB 培养基 (Falcon 管中 5mL, 200rpm, 28°C, 24hr)。将过夜培养物接种于 250mL Erlenmeyer 摇瓶中的 50mL 培养基中, 达到光学密度 (A_{600}) 为 0.05, 孵育 100 小时 (200rpm, 28°C), 之后取出并分析生物质、糖含量和脂质含量。

[0171] 在 2 升带档板的搅拌罐生物反应器中进行生物反应器规模的发酵。所使用的基质含有 1.5g/L 酵母含氮碱基 (无氨基酸及硫酸铵), 2g/L 硫酸铵, 1g/L 酵母提取物和 90g/L 葡萄糖。从选择性平板上挑取起始预培养物接种于 YPD 基质 (在 250mL Erlenmeyer 摇瓶中 40mL, 200rpm, 28°C, 24hr)。将来自过夜预培养物中的对数期生长的细胞转移入生物反应器, 直至 2L 反应器中的光学密度 (A_{600}) 为 0.1 (2.5vvm 通风, pH6.8, 28°C, 搅拌转速

250rpm)。将在不同时间点的样品储存于 -20℃ 用于随后的脂质分析。通过 HPLC 确定糖有机酸含量。将样品在 60℃ 下干燥两夜后通过重量分析测量确定生物质。

[0172] 质粒构建

[0173] 在本研究中一直使用的是标准分子遗传技术 (21)。在克隆中使用的限制性酶和 Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶获自 New England Biolabs (Ipswich, MA)。来自酵母转化子的基因组 DNA 是使用 Yeastar Genomic DNA 试剂盒 (Zymo Research, Irvine, CA) 制备的。所有构建的质粒都通过测序得到确认。PCR 产物和 DNA 片段是用 PCR Purification 试剂盒或 QIAEX II 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 进行纯化。所使用的质粒描述于表 3。所使用的引物描述于表 4。

[0174] 使用引物 MT078 和 MT079 从解脂耶氏酵母 *Po1g* 基因组 DNA 上扩增翻译延长因子 -1 α (TEF) 的启动子区域 (登记号 :AF054508) 而构建质粒 pMT010。将扩增子插入起始载体 pINA1269 (也称为 pYLEX1, 获自 Yeastern Biotech 公司 (Taipei, Taiwan)) 的 *SalI* 和 *KpnI* 位点之间。反向引物 MT079 中还包括 *MluI* 和 *NsiI* 位点, 这样为多克隆位点又添加了新的限制性位点。

[0175] 从解脂耶氏酵母 *Po1g* 基因组 DNA 上扩增 TEF 启动子及含有 ATG 起始密码子和 113bp 的内源内含子的 5' 编码区 (登记号 :CR382129) 而构建质粒 pMT015。引物 MT118 和 MT122 被用于此扩增, 并被插入起始载体 pMT010 的 *SalI* 和 *MluI* 位点之间。为了进行克隆, 删除了一些内含子使得能够并入 *SnaBI* 限制性位点。因此将基因克隆入此质粒需要删除基因的 ATG 起始密码子, 而向 5' 引物的起始端添加了 TAACCGCAG, 在 5' 末端添加平末端连接位点。

[0176] 使用引物 MT170 和 MT171 从大肠杆菌中扩增编码 β -半乳糖苷酶的 *LacZ* 基因并将其插入起始载体 pINA1269 的 *PmlI* 和 *BamHI* 位点中而构建 pMT025 质粒。使用引物 MT168 和 MT169 扩增 *LacZ* 基因并将其插入 pMT010 的 *MluI* 和 *NsiI* 位点中而构建质粒 pMT038。因为 *LacZ* 含有多个 *MluI* 位点, 所以使用了 *AscI* 作为 MT168 上的 5' 限制性位点, 因为 MT168 上有一个匹配的突出。扩增 *LacZ* 基因并将其插入 pMT015 的 *SnaBI* 和 *NsiI* 位点中而构建质粒 pMT037。使用了引物 MT172 和 MT169, 其中正向引物 MT127 删除了 *LacZ* 的 ATG 起始密码子, 相反, 是以序列 TAACCGCAG 开始的, 这段序列补全了 pMT015 的内含子序列。

[0177] 使用引物 MT080 和 MT081 从解脂耶氏酵母 *Po1g* 基因组 DNA (登记号 :XM_501721) 上扩增 *ACC1* 基因并将其插入 pMT010 的 *MluI* 和 *NsiI* 位点中而构建 pMT013。使用引物 MT222 和 MT137 从 pMT013 上扩增 *ACC1* 基因及其终止子并将此序列插入经过 *PmlI* 和 *ClaI* 消化的起始载体 pINA1269, 而构建质粒 pMT040。

[0178] 使用引物 MT271 和 MT272 从解脂耶氏酵母 *Po1g* 基因组 DNA (登记号 :XM_504700) 上扩增 *DGA1* 基因, 而构建质粒 pMT053。经过扩增的基因经过 *NsiI* 消化并被插入 pMT015, 插入方式与 pMT037 的构建相同。

[0179] 为产生能够同时表达 *ACC1* 和 *DGA1* 两者的单一质粒, 使用引物 MT220 和 MT265 从 pMT053 扩增启动子-基因-终止子的表达盒。然后将此片段用 *DpnI* 和 *AseI* 进行消化并插入经 *NruI* 和 *AseI* 消化的 pMT040 中, 产生串联基因构建体 pMT065。选择使用 *AseI* 限制性位点以利于筛选, 因为其位于氨苄青霉素抗性标记之内。由于 *NruI* 是平末端限制性位点, 所以扩增子的插入并不会增加总的 *NruI* 位点数, 这样有利于后续插入。

[0180] 用 NotI 或 SacII 对质粒进行线性化并将其在染色体上整合入 Polg, 这是根据 Chen 等人描述的一步醋酸锂转化法 (22) 进行的。将转化子铺于选择性培养基上并通过对制备的基因组 DNA 的 PCR 进行验证。然后将经验证的转化子以冷冻储备液储存于 -80°C , 或在选择性 YNB 平板上储存于 4°C 。

[0181] RNA 提取及转录物定量

[0182] 在酵母菌株在 YNB 上生长 24 小时后, 收集细胞, 并用液氮冷冻, 保存于 80°C 。在液氮中破碎样品, 根据制造商说明书, 使用 RNeasy Mini 试剂盒 (Qiagen) 从解脂耶氏酵母中提取总 RNA, 在提取步骤中用无 RNA 酶的 DNA 酶进行处理。用分光光度计在 260nm 处对提取的 RNA 进行定量。使用具有 SYBR Green 的 iScript One-step RT-PCR 试剂盒 (Bio-Rad, Hercules, CA) 进行 qRT-PCR 分析。相对定量基于 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 法, 其中使用编码肌动蛋白的 ACT1 作为内参。样品都以三次重复进行分析。

[0183] β -半乳糖苷酶测定

[0184] LacZ 酶活性是使用 β -gal 测定试剂盒进行测量的 (来自 Sigma-Aldrich)。将细胞重悬于 PBS 缓冲液并通过加入 $500\text{ }\mu\text{m}$ 玻璃珠 (Sigma-Aldrich) 涡旋振荡 2 分钟裂解细胞。将 $40\text{ }\mu\text{L}$ 的细胞裂解物转移至 $340\text{ }\mu\text{L}$ 反应混合物中, 其含有 47mg/mL ONPG, 0.6M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4M $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1M KCl, 0.01M $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。在 37°C 孵育反应物使得颜色发生变化, 最终使用 $500\text{ }\mu\text{L}$ 1M 碳酸钠淬灭反应。然后用分光光度计测量 420nm 处的吸收值。基于酶活除以孵育时间和细胞干重计算酶单位。

[0185] 脂质分析

[0186] 使用 Folch 等人的方法提取总的脂质 (23)。将测定量的细胞生物质 (大约 1mg) 重悬于 1mL 的氯仿: 甲醇 (2:1) 溶液中并涡旋振荡 1 小时。离心后, 将 $500\text{ }\mu\text{L}$ 转移至 $125\text{ }\mu\text{L}$ 生理盐水溶液中。移除上层水层并使下层液相挥发, 重悬于 $100\text{ }\mu\text{L}$ 正己烷中。然后将样品储存于 -20°C 直至进行酯交换反应。

[0187] 向每个样品中加入溶于甲醇中的 $1\text{mL} 2\%$ (wt/vol) 的硫酸, 进行总脂质提取物的酯交换反应。然后将样品在 60°C 下孵育 2 小时。此后, 对样品进行部分挥发, 并通过加入 1mL 正己烷, 涡旋振荡 10min, 对脂肪酸甲酯 (FAME) 进行萃取。然后将 $800\text{ }\mu\text{L}$ 的所述正己烷转移入玻璃管分装, 用于 GC 分析。

[0188] FAME 的 GC 分析是使用配有火焰离子化检测器和毛细管柱 HP-INNOWAX ($30\text{m} \times 0.25\text{mm}$) 的 Bruker450-GC 设备进行的。GC 烘箱条件如下: 150°C (1min), 在 10min 中逐渐增高至 230°C , 在 230°C 下保持 2min。分流比为 10:1。通过与商业化的 FAME 标准品进行比较而对脂肪酸进行鉴别和定量, 结果相对十三酸甲酯 (C13:0) 进行标准化。总的脂质含量以五种 FAME 的总脂肪酸含量之和计算: 棕榈酸甲酯 (C16:0), 甲基棕榈烯酸 (C16:1), 硬脂酸甲酯 (C18:0), 油酸甲酯 (C18:1), 亚油酸甲酯 (C18:2) (Sigma-Aldrich)。向氯仿-甲醇萃取的液体中加入十三烷酸作为内部标准物, 这在整个分析过程中都存在, 并进行酯交换成为其甲基酯形式。

[0189] 结果和讨论

[0190] 使用翻译延伸因子 -1α 的表达增强内含子建立高效的表达平台

[0191] 在解脂耶氏酵母中, 大量的启动子可用于基因表达, 包括诱导型和组成型启动子 (24)。TEF 启动子最初是作为强的组成型启动子得到鉴定的; 然而, 随后的克隆和鉴定的结

果表明其相对可诱导 XPR2 启动子表达较低 (25)。最近, 杂交 hp4d 启动子由于有强的准组成型表达, 逐渐受欢迎 (26), 已经用于大量要求蛋白质高表达的应用中 (20, 27, 28)。

[0192] 对 TEF 的基因组序列的分析表明在开放阅读框 5' 区域中紧接着起始密码子后有一段 122-bp 的剪接体内含子。经常发现启动子 - 临近的间接体内含子极大地影响在大量生物体内相应的基因表达 (29)。我们推测 TEF 的强表达依赖于此内含子, 并且通过将此内含子与启动子一起包含到表达载体中而达到更强的表达效果。事实上, 对 TEF 启动子进行最初筛选和分离可以依赖于在 cDNA 文库中富集的内含子增强作用, 一旦内含子被剪切, 这一特征便不会得到注意。

[0193] 构建表达 LacZ 的质粒 pMT025、pMT037 和 pMT038 以比较三个启动子的相对表达: 合成杂合启动子 (php4d)、无内含子的 TEF 启动子 (pTEF), 以及有内含子的 TEF 启动子 (pTEFin)。显著地, 在培养 50 小时之后 TEFin 启动子显示了比无内含子的 TEF 启动子的表达有 17 倍的增加, 比 hp4d 启动子的表达有 5 倍的增加。

[0194] 在其他系统中观察到的内含子增强有极大的不同: 从在人细胞和酵母中仅仅有 2 倍的增加, 到玉米中超过 1000 倍的增加 (30, 31)。人们认为内含子能以多种方式增强基因表达: 通过包含调节元件, 促进 mRNA 的输出以及增加转录起始速率等方式 (29)。具有内含子的基因作为一组基因, 通常相对无内含子基因显示了更高的表达水平。例如, 在酿酒酵母中, 具有内含子的基因仅仅占总基因数的不到 4%, 却表达了细胞中生成的总 RNA 的 27% (32)。解脂耶氏酵母基因组的 10.6% 的基因中都含有内含子, 而酿酒酵母中只有 4.5% 的基因具有内含子 (33)。利用所述内源过程以增强我们需要的基因, 这一手段为使表达最大化的一个简单的方式, 可应用于很宽泛的真核生物体范围。例如, 半子囊酵母之间的剪接序列有很高的序列同源性 (34)。虽然研究一直在更多地解释内含子的功能、进化及目的, 但是将内含子用于生物技术目的还是相对而言未打开的机会。

[0195] ACC1 和 DGA1 的过表达导致脂质积累有显著增加

[0196] 将 TEF 启动子与其表达增强内含子一同使用为解脂耶氏酵母的基因表达提供了优秀的平台。因此我们使用这一方法过表达 DGA1 (pMT053), 显示这一基因在解脂耶氏酵母和酿酒酵母二者中的脂质积累都十分重要 (19, 35)。ACC1 已经具有两个内源的启动子 - 邻近的内含子, 并未与 TEFin 启动子一同克隆。相反, 将其与 TEF 和 hp4d 启动子一同克隆 (分别为 pMT013 和 pMT040)。生长速率和脂质生产在这二者之间相对而言非常类似 (数据未显示), 因此将 php4d-ACC1 用于脂质实验并用于 ACC1+DGA1 的串联基因构建 (pMT065)。选择 hp4d 启动子也是为了使 ACC1+DGA1 构建体中这两个平行的基因表达盒同源重组的可能性达到最小。使用串联基因构建方式在解脂酵母中使两个基因同时共表达已经在他处成功进行 (20)。

[0197] ACC1 和 DGA1 的过表达对脂质生产的效应在摇瓶实验中首次得到评估。对照 LacZ 菌株只产生了 8.77% (g/g DCW) 的脂质, 这与摇瓶中以葡萄糖作为唯一底物的野生型菌株表现类似 (36)。ACC1 和 DGA1 转化子都比对照表现更好, 分别积累了 17.9% 和 33.8% 的脂质含量。尤其是 DGA1, 显示了几近两倍于 ACC1 的脂质积累, 大约是对照的 4 倍。由对照生成的生物质比其他菌株显著更高, 提示 ACC1 和 DGA1 的表达可以破坏了解脂耶氏酵母的生长潜力。与理论最大产率 (0.32g/g (37)) 相比, 总体的油产率相对低。脂肪酸谱也有轻微的变化, 其中 ACC1 产生了显著更多的亚油酸而 DGA1 维持了更高比例的硬脂酸。油酸比例

在所有转化子中都保持相对平缓。

[0198] ACC1+DGA1 比两种单一基因转化子都有改进,能够达到 41.4% 的脂质含量,比对照有 4.7 倍提高。生物质的生产相比于单一转化子得到提高,但比对照还是较少。油产率有成比例的提高,达到 0.114g/g, 或 35% 的理论产率。

[0199] 在真核生物体中,ACC 的过表达只对脂质生产产生有限的改进。在非产油酵母多形汉逊中异源表达来自产油真菌鲁氏毛霉的 ACC1 仅仅使脂肪酸含量有 40% 的增加,含量从 3.8% 增加至 5.3% (38)。在植物中,拟南芥 ACC1 的过表达导致酶活性有极大的增加,但最终的脂质含量增加不超过 30% (39, 40)。推测因为真核细胞中维持对该酶的强的代谢和调节控制,所以改进很有限。ACC 表达和活性被大量转录因子、蛋白质激酶和代谢物所影响 (41)。例如,在解脂念珠菌 (耶氏酵母) 中,乙酰 -CoA 合成酶突变体中酰基 -CoA 的积累导致 ACC 活性降低 8 倍 (42)。然而,解脂耶氏酵母可以代表真核生物中的一个调节例外,这大部分导致其产油特质,因为我们在这里通过过表达内源 ACC1 而达到了 2 倍的脂质增加。

[0200] DGA 的作用仅仅是最近才被发现对于脂质合成有重要作用。在解脂耶氏酵母中,DGA1p 主要定位于脂质小体的膜表面,并且与甘油三酯酯酶 (TGL3) 协调作用以平衡 TAG 在脂质小体中的流入和流出 (16)。因此,预期 TAG 的储存严重依赖于 DGA1p 的相对其 TGL3p 对应物的活性 (和丰度)。还有假设认为 DGA 使代谢流从磷脂合成中转移走,由此创造了驱动力进行脂质合成,因为更多的代谢流需要用来生产仍然必需的磷脂 (6)。因此,DGA1 的过表达在脂质积累上产生显著效应。在产油 Δ snf2 突变体中进行 DGA1 的过表达导致酿酒酵母中积累了高达 27% 的脂质含量,即增加 2.3 倍 (35)。在植物中,拟南芥 DGAT 过表达导致叶子中脂质含量增加 20 倍,总体脂质含量增加 2 倍 (43)。

[0201] 脂肪酸和 TAG 合成途径之间的平衡在于酰基 -CoA 中间产物,因为这些中间产物既是脂肪酸 (上游) 途径的产物和反馈抑制剂也是 TAG (下游) 途径的主要前体。上游途径的上调增加脂肪酸合成的通量,尤其是对于 ACC,其将代谢流从任何会竞争使用细胞溶胶乙酰 -CoA 的途径转移出。下游途径的上调通过消耗酰基 -CoA 中间产物创造驱动力,并且增加 TAG 在脂质小体中的储存速率。然而,当单独受到调制时,其会导致不平衡,这会对细胞新陈代谢和生长产生不利的效应。

[0202] 通过共表达 ACC1 和 DGA1,上游和下游途径都同时被上调,这导致脂质生产的增加,而不会干扰到中间产物介导的调控。这种方法还将 ACC 产生的脂质合成的高代谢流与由 DGA 介导的 TAG 向脂质小体内的隔离提供的驱动力相结合。结果是脂质积累的协同性增加,高出对照几乎 5 倍。事实上,将过生产和驱动力与代谢沉没相偶联已经是代谢工程的最近努力中的一种非常强有力的策略,尤其是用于生物燃料 (44-46)。

[0203] ACC1+DGA1 转化子的发酵表现

[0204] 为进一步对 ACC1+DGA1 转化子 (MTYL065) 进行定性并探索其脂质积累特征,使用 2L 搅拌罐生物反应器进行大规模发酵。增加葡萄糖浓度,将硫酸铵浓度减少,达到 C/N 摩尔比为 100。用于脂质积累的最佳 C/N 摩尔比率通常在 80-120 的范围内 (15),

[0205] 在 120 小时的发酵过程中,葡萄糖得到完全的消耗,最终的生物质达到 28.49g/L (图 3)。最终脂质含量为 61.7% DCW,相比于摇瓶实验,脂质积累有 50% 的增加。这与其他糖发酵相比时具有优势 (28, 47-49),也比离体脂质积累的方案中得到的值更具有优势 (19, 50)。总体的产率和生产效率分别为 0.195g/g 和 0.143g/L/hr;然而,在 70-100 小时

间观察到的最大脂质生产中,达到的产率为 0.270g/g,生产效率为 0.253g/L/hr(表 2)。在这个时期生产的几乎所有生物质都是由脂质含量的增加引起的。所达到的总体和最大产率分别为 TAG 合成理论产率的 60.9%和 84.3%。

[0206] 表 2. ACC1+DGA1 转化子在 2L 生物反应器发酵中计算的产率和生产效率。产率是由产生的脂质(克)除以消耗的葡萄糖(克)计算的。生产效率是通过每小时生产的脂质浓度计算的。最大值是从 70-100hrs 两个时间点之间计算。

[0207]	油(g/g 葡萄糖)	
	总体值	0.195
	最大值	0.270

[0208]	油生产效率(g/L/hr)	
	总体值	0.143
	最大值	0.253

[0209] 脂肪酸谱在规模扩大的过程中发生巨大的变化(图 4)。此过程中观察到硬脂酸的相对消耗和棕榈酸和油酸的富集,油酸最终构成了总脂肪酸的 49.3%。油酸和硬脂酸之间的比率在整个发酵过程中稳定增加(数据未显示),最终以 4.6 的比率结束。从摇瓶实验中 1.3 的比率来看,这是一个巨大的变化。用醋酸作为碳源也进行了类似的实验。在 134 小时分析脂肪酸谱,结果显示于图 5。

[0210] 在其他 2L 发酵中也观察到高的油酸相对浓度(高达 58.5%)(51),这一点与积累了超过 50%脂质含量的其他产油酵母的形式更加相似(15)。在脂质快速生产的条件下,油酸可以更快地得到储存并更容易积累,因为已知 DGA1p 具有对于不同酰基-CoA 的多种特异性;在酿酒酵母中,C18:1 是最优选的底物,对其的活性是对 C18:0 的两倍(52)。进一步地,高油酸浓度也可以是对生物反应器中达到的更高通风速率的应答,这一点在摇瓶发酵中不容易见到。

[0211] 在 ACC1+DGA1 菌株中见到的高脂质含量、产率和生产效率表明解脂耶氏酵母天生能为脂质合成途径提供高的代谢流。在得到进一步修饰和过程优化后。具有工程改造的脂质合成通路的解脂耶氏酵母可以在强烈有效的脂质从头合成中产生有前景的突破。

[0212] 表 3. 本研究应用的菌株和质粒菌株

[0213]

(宿主菌株)	基因型或质粒	来源
大肠杆菌		
DH5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Invitrogen</i> <i>Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1</i> <i>hsdR17</i>	
pINA1269	JMP62-LEU	Yeastern

[0214]

pMT010	<i>pINA1269 php4d::TEF</i>	本实施例
pMT015	<i>pINA1269 php4d::TEFin</i>	本实施例
pMT025	<i>hp4d-LacZ</i>	本实施例
pMT038	<i>YTEF-LacZ</i>	本实施例
pMT037	<i>YTEFin-LacZ</i>	本实施例
pMT013	<i>YTEF-ACC1</i>	本实施例
pMT040	<i>php4d-ACC1</i>	本实施例
pMT053	<i>YTEFin-DGA</i>	本实施例
pMT065	<i>php4d-ACC1 + YTEFin-DGA</i>	本实施例

解脂耶氏酵母

Po1g	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2	Yeastern
MTYL038	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2 TEF-LacZ-LEU2	本实施例
MTYL037	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2 TEFfin-LacZ-LEU2	本实施例
MTYL040	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2 hp4d-ACC1-LEU2	本实施例
MTYL053	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2 TEFfin-DGA1-LEU2	本实施例
MTYL065	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2 hp4d-ACC1 + TEFfin-DGA1-LEU2	本实施例

[0215] 表 4. 本研究使用的引物

[0216]

引物	描述	序列	SEQ ID
PCR			
MT078	TEF	<i>GACTGTCGACAGAGACCGGGTTGGCGGC</i> <i>TTGTG</i>	14
MT079	TEF	<i>GACTGGTACCTCAAGATGCATAGCACGCG</i> <i>TTTTGAATGATTCTTATACTC</i>	15
MT118	TEFin	<i>GGCAGTCGACAGAGACCGGGTTGGCGGC</i>	16
MT122	TEFin	<i>TTATTCACGCGTGTAGATACGTACTGCAAAAA</i> <i>GTGCTGGTCGGA</i>	17
MT170	LacZ	<i>AATGACCATGATTACGGATTCACTGG</i>	18
MT171	LacZ	<i>CTAGGTGGATCCTTATTTTTGACACCAGACCA</i> <i>ACTGGTAA</i>	19
MT172	LacZ	<i>TAACCGCAGACCATGATTACGGATTCACTGGC</i>	20
[0217]			
		<i>C</i>	
MT173	LacZ	<i>CTAGGTATGCATATGACCATGATTACGGATTCACTGG</i>	21
MT174	LacZ	<i>CTTACAGGTACCTTATTTTTGACACCAGACCA</i> <i>ACTGGTAA</i>	22
MT080	TEF-ACC	<i>GACTACGCGTCACAATGCGACTGCAATTGA</i>	23
MT081	TEF-ACC	<i>TAGCATGCATTACACAACCCCTTGAGCAGCT</i>	24
MT222	Hp4d-ACC	<i>AATGCGACTGCAATTGAGGACACTAA</i>	25
MT137	Hp4d-ACCI	<i>CGTTGAATCGATTTTCGGACACGGGCATCTCAC</i>	26
MT271	DGA	<i>TAACCGCAGACTATCGACTCACAATACTACAA</i> <i>GTCGCG</i>	27
MT272	DGA	<i>CTAGGTATGCATTTACTCAATCATTCGGAA</i> <i>CTCTGGG</i>	28
MT220	NruI AseI	<i>CCCGGCAACAATTAATAGACTGGAT</i>	29
MT265	NruI AseI	<i>TTCGGACACGGGCATCTCAC</i>	30

[0218] RT-

[0219] PCR

[0220] Actin

[0221] Actin

[0222] LacZ

[0223] LacZ

[0224] ACC1

[0225] ACC1

[0226] DGA

[0227] DGA

[0228] 使用工程改造的 ACC+DGA 菌株由醋酸生产脂质

[0229] 解脂耶氏酵母天然生长在机酸醋酸盐上。醋酸盐作为底物有很大的吸引力,因为其可由同型乙酸生物体通过非光合碳固定途径从二氧化碳或一氧化碳以高产率生产。醋酸以乙酰-CoA 的形式进入细胞代谢途径,乙酰-CoA 是经由乙酰-CoA 羧化酶 (ACC) 进行脂质合成的主要前体。由此, ACC+DGA 菌株看上去是以醋酸盐为底物进行脂质生产的一个有前景的候选物,因为利用乙酰-CoA 的酶过表达直接与脂质积累的强驱动力相偶联。

[0230] 使用 ACC+DGA 菌株在 2 升生物反应器中发酵,以醋酸盐作为碳底物 (图 6)。在氧气含量高的情况下,观察到醋酸盐迅速被消耗,同时生成的生物质的量很低,因此在氮和氧都受限的条件下进行发酵,以使脂质生产和产率达到最大化。

[0231] 130 小时后,油生产的最终滴度为 5.5g/L,这占总的生物质细胞干重 (8.9g/L) 的 62%。以醋酸盐为底物的总体脂质产率为 0.152g 油 /g 醋酸盐。在脂质生产期 (90-130 小时之间),产率为 0.27g 油 /g 醋酸盐时达到最大脂质生产,这是理论最大产率的 96%。

[0232] 与以葡萄糖为底物的发酵特征的对比显示,尽管生物质产率和生长速率较低,但是脂质积累和最大脂质产率达到最大。

[0233] 表 5. 以葡萄糖和醋酸盐为底物的发酵情况对比

[0234]

	葡萄糖	醋酸盐
指数生长速率	0.0982hr ⁻¹	0.0368hr ⁻¹
总体生物质产率	0.316g/g	0.246g/g
总体脂质产率	0.195g/g	0.152g/g
脂质生产期	70-120 小时	90-130 小时
最大脂质产率	0.249g/g	0.270g/g
最大生产效率	0.258g/L/ 小时	0.103g/L/ 小时
最终脂质滴度	17.6g/L	5.5g/L

[0235] 结论

[0236] 脂质生物合成是一个受到严密调控的代谢途径。要进行工业相关的脂质生产的应用,需要进行周全的代谢工程以使产率和生产效率最大化。产油酵母解脂耶氏酵母的用途受益于其具有高的脂质积累能力,并且将其用作脂质代谢途径工程改造的工具。本文中我们显示,脂质合成途径中两个重要基因 ACC1 和 DGA1 的内含子增强的过表达提供了朝向脂质生产的驱动力,甚至在中等 C/N 比率下。由于这两种酶进行了脂质合成的初始和最后的步骤,所以对向 TAG 的碳流入同时进行推和拉,使得生产增强,而可以导致抑制的中间产物的积累达到最小化。所得的 ACC1+DGA1 菌株能够通过从头合成积累高达其 DCW 的 62% 作为脂质,总体的体积生产效率为 0.143g/L/ 小时。

[0237] 以下概念 (a) 途径基因的强过表达, (b) 上游和下游途径的平衡, (c) 将代谢流转移至想要的途径, 以及 (d) 朝向最终产品的驱动力, 是代谢工程实践中最重要的策略, 使得代谢网络得到工程改造和优化, 以生成想要的产品。在脂质积累这一点上履行这些概念可容易地延伸至大量其他生物学平台, 包括微藻。这些策略是发展有力、有效、商品规模的生物学衍生化学品和燃料生产技术的基礎。其在脂质生物合成上的应用开启了微生物油过生产以及经济有效的生物燃料制造的道路。

[0238] 参考文献

- [0239] 1. G. Stephanopoulos, *Science* 315, 801 (2007).
- [0240] 2. J. Hill, E. Nelson, D. Tilman, S. Polasky, D. Tiffany, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 11206 (2006).
- [0241] 3. Q. Li, W. Du, D. Liu, *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, 749 (2008).
- [0242] 4. A. Beopoulos, J. -M. Nicaud, C. Gaillardin, *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 1193 (2011).
- [0243] 5. J. D. Keasling, *Science* 330, 1355 (December 3, 2010, 2010).
- [0244] 6. N. M. D. Courchesne, A. Parisien, B. Wang, C. Q. Lan, *Journal of Biotechnology* 141, 31 (2009).
- [0245] 7. J. B. Ohlrogge, J. G. Jaworski, *Annual Review of Plant Biology* 48, 109 (1997).
- [0246] 8. S. Papanikolaou, L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis, I. Marc, *Journal of Applied Microbiology* 92, 737 (2002).
- [0247] 9. J. M. Beckerich, A. Boisramé-Baudevin, C. Gaillardin, *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 1, 123 (1998).
- [0248] 10. C. Scioli, L. Vollaro, *Water Research* 31, 2520 (1997).
- [0249] 11. G. Barth, C. Gaillardin, *FEMS Microbiology Reviews* 19, 219 (1997).
- [0250] 12. S. Papanikolaou, L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis, I. Marc, *Current microbiology* 46, 124 (2003).
- [0251] 13. S. Papanikolaou, G. Aggelis, *Bioresource Technology* 82, 43 (2002).
- [0252] 14. S. Papanikolaou, G. Aggelis, *Current microbiology* 46, 398 (2003).
- [0253] 15. A. Beopoulos 等人, *Progress in Lipid Research* 48, 375 (2009).
- [0254] 16. K. Athenstaedt 等人, *Proteomics* 6, 1450 (2006).
- [0255] 17. L. M. Blank, F. Lehmbeck, U. Sauer, *FEMS Yeast Research* 5, 545 (2005).
- [0256] 18. A. Beopoulos 等人, *Applied and environmental microbiology* 74, 7779 (2008).
- [0257] 19. T. Dulermo, J. -M. Nicaud, *Metabolic Engineering In Press, Corrected Proof* (2011).
- [0258] 20. L. -T. Chuang 等人, *New Biotechnology* 27, 277 (2010).
- [0259] 21. J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular cloning: a laboratory manual* (CSHL press, 2001)

- [0260] 22. D. C. Chen, J. M. Beckerich, C. Gaillardin, Applied Microbiology and Biotechnology48, 232(1997).
- [0261] 23. J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane-Stanley, J. biol. Chem226, 497(1957).
- [0262] 24. C. Madzak, C. Gaillardin, J. M. Beckerich, Journal of Biotechnology109, 63(2004).
- [0263] 25. S. Müller, T. Sandal, P. Kamp Hansen, H. **Dalbøge**, Yeast14, 1267(1998).
- [0264] 26. C. Madzak, B. Treton, S. Blanchin-Roland, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology2, 207(2000).
- [0265] 27. N. Gasmi, A. Ayed, J. M. Nicaud, H. Kallel, Microbial Cell Factories10, 38(2011).
- [0266] 28. W. Cui 等人, Process Biochemistry46, 1442(2011).
- [0267] 29. H. Le Hir, A. Nott, M. J. Moore, Trends in biochemical sciences28, 215(2003).
- [0268] 30. J. Callis, M. Fromm, V. Walbot, Genes&Development1, 1183(1987).
- [0269] 31. A. Furger, J. M. O. S. A. Binnie, B. A. Lee, N. J. Proudfoot, Genes&Development16, 2792(November1, 2002, 2002).
- [0270] 32. M. Ares, L. Grate, M. H. Pauling, Rna5, 1138(1999).
- [0271] 33. A. T. Ivashchenko, M. I. Tauasova, S. A. Atambayeva, Molecular Biology43, 24(2009).
- [0272] 34. E. Bon 等人, Nucleic acids research31, 1121(2003).
- [0273] 35. Y. Kamisaka, N. Tomita, K. Kimura, K. Kainou, H. Uemura, Biochem J408, 61(2007).
- [0274] 36. S. Papanikolaou 等人, Current microbiology52, 134(2006).
- [0275] 37. C. Ratledge, in Single Cell Oil R. S. Moreton, Ed. (Longman Scientific&Technical, 1988)pp. 33-70.
- [0276] 38. R. Ruenwai, S. Cheevadhanarak, K. Laoteng, Molecular biotechnology42, 327(2009).
- [0277] 39. D. Klaus, J. B. Ohlrogge, H. E. Neuhaus, P. **Dörmann**, Planta219, 389(2004).
- [0278] 40. K. Roesler, D. Shintani, L. Savage, S. Boddupalli, J. Ohlrogge, Plant Physiology113, 75(January1, 1997, 1997).
- [0279] 41. R. W. Brownsey, A. N. Boone, J. E. Elliott, J. E. Kulpa, W. M. Lee, Biochemical Society Transactions34, 223(2006).
- [0280] 42. T. Kamiryo, Y. Nishikawa, M. Mishina, M. Terao, S. Numa, Proceedings of the National Academy of Sciences76, 4390(1979).
- [0281] 43. V. Andrianov 等人, Plant biotechnology journal8, 277(2009).
- [0282] 44. C. R. Shen 等人, Appl. Environ. Microbiol. 77, 2905(May1, 2011, 2011).
- [0283] 45. X. Liu, J. Sheng, R. Curtiss Iii, Proceedings of the National Academy of Sciences108, 6899(April26, 2011, 2011).

- [0284] 46. Y. X. Huo 等人, Nature biotechnology 29, 346 (2011).
- [0285] 47. G. Aggelis, M. Komaitis, Biotechnology Letters 21, 747 (1999).
- [0286] 48. S. E. Karatay, G. **Dönmez**, Bioresource Technology 101, 7988 (2010).
- [0287] 49. Y. A. Tsigie, C. -Y. Wang, C. -T. Truong, Y. -H. Ju, Bioresource Technology In Press, Corrected Proof (2011).
- [0288] 50. S. Papanikolaou, I. Chevalot, M. Komaitis, I. Marc, G. Aggelis, Applied Microbiology and Biotechnology 58, 308 (2002).
- [0289] 51. C. H. Zhao, W. Cui, X. Y. Liu, Z. M. Chi, C. Madzak, Metabolic Engineering (2010).
- [0290] 52. P. Oelkers, D. Cromley, M. Padamsee, J. T. Billheimer, S. L. Sturley, Journal of Biological Chemistry 277, 8877 (2002).
- [0291] 实施例 2.
- [0292] 解脂耶氏酵母中脂质合成基因的组合表达
- [0293] 细胞代谢的研究可以用代谢工程得到阐明。代谢工程是使用重组 DNA 技术对生物体中代谢途径的操纵 (Bailey 1991)。通过操纵和工程改造特定的代谢网络, 可鉴别和阐明其中的控制因子和限速步骤。在特定生物体或途径的现有知识和工具的基础上, 能够评估新型的干扰如何使用以重新定向和控制所需产品的生成。
- [0294] 脂质合成是用于代谢工程研究的极佳途径, 具有范围广泛的应用, 从健康、癌症和医药到生物化学品和生物燃料的生产 (Beopoulos 等人 2011; Courchesne 等人 2009; Kohlwein 和 Petschnigg 2007)。用于脂质生物合成的生理学、酶学和代谢在从细菌到人的广泛范围的生物体中都得到了深入的研究, 形成了比较和探索性分析的强有力的知识基础 (Kurat 等人 2006; Ohlrogge and Jaworski 1997)。脂质代谢在细胞生理学的许多方面都起到不可或缺的作用, 从细胞生长和增殖到能量储存和代谢 (Kohlwein 和 Petschnigg 2007; Tehlivets 等人 2007)。为利用这些途径用于医药和工业目的, 了解何种干扰对总体过程起到最大影响是非常重要的。
- [0295] 产油酵母解脂耶氏酵母是研究脂质代谢的极佳的模式生物。作为产油酵母, 解脂耶氏酵母能在富碳环境中天然积累高达 36% 的脂质 (Beopoulos 等人 2009)。这些脂质以脂质小体中甘油三酯的形式储存 (TAG)。其是研究最深入的“非常规”的酵母种属, 可以使用其测序的基因组和一系列遗传工具 (Barth 和 Gaillardin 1997)。已经将其用于大量工业应用, 并将其视为蛋白质分泌、疏水底物利用、脂质代谢和线粒体呼吸方面的模式生物 (Beckerich 等人 1998; Beopoulos 等人 2009; Coelho 等人 2010; Kerscher 等人 2002)。解脂耶氏酵母天然积累了大量脂质, 同时大量工程改造方面的努力已经成功地进一步增加或改进了其脂质积累特征 (Beopoulos 等人 2008; Chuang 等人 2010; Dulermo 和 Nicaud 2011; Zhang 等人 2011)。然而, 为此目的所检验的遗传操纵的数量和种类仍然相对有限, 解脂耶氏酵母作为脂质过生产平台的潜能相对而言开发的还很少。
- [0296] 通过多种手段和策略将大量目的基因靶标与脂质积累相关联 (Courchesne 等人 2009)。乙酰-CoA 羧化酶 (ACC) 通常被认为是脂肪酸生物合成中的限速步骤, 控制了进入该途径的代谢流。其负责生产丙二酰-CoA, 后者可用于脂肪酸延伸中。ACC 利用细胞溶胶乙酰-CoA 作为其主要的代谢前体。大多数真核细胞中供应细胞溶胶乙酰-CoA 的酶都是

ATP 柠檬酸裂解酶 (ACL)。ACL 裂解柠檬酸,后者作为 TCA 循环的产物穿梭出线粒体,形成乙酰-CoA 和草酰乙酸。在脂肪酸合成酶复合体完成脂肪酸生产后,酰基-CoA 分子可进一步通过在内质网上进行延伸和去饱和得到进一步操纵。这些过程帮助修饰酰基-CoA 链的化学特性,以利于进行储存或在其他代谢途径中利用。例如 $\Delta 9$ -去饱和酶 (D9) 之类的酶将硬脂酰-CoA 分子转化为油酰-CoA 分子,后者似乎在脂质调控和代谢中都非常重要 (Dobrzyn 和 Ntambi2005)。脂质装配和储存中的最后一步是二酰基甘油 (DAG) 通过二酰基甘油酰基转移酶 (DGA) 向 TAG 的转化。这一步骤在内质网和脂质小体表面都有发生,在后者上进行的这一步骤根据生物体对能量的需要建立了 TAG 装配和降解的动态平衡 (Athenstaedt 等人 2006)。在解脂耶氏酵母中,已经鉴定出大量执行此项功能的 DGA 基因 (Zhang 等人 2011)。

[0297] 这些酶步骤都显示了与脂质积累的有意义的关系。ACC 控制进入脂质合成的代谢流,在细菌大肠埃希氏菌中 ACC 的过表达使得脂肪酸合成增加 6 倍 (Davis 等人 2000)。受 ACL 控制的柠檬酸穿梭在产油真菌中观察到的与非产油真菌相比是有差异的,因此推测其为高代谢流进入脂质生物合成途径的必要途径 (Boulton 和 Ratledge1981;Vorapreeda 等人 2012)。还认为 ACL 的灭活导致柠檬酸积累和分泌,这也是脂质生产中不期望的现象 (Papanikolaou 和 Aggelis2002;Papanikolaou 等人 2002)。D9 参与了癌症代谢,其在哺乳动物肿瘤细胞中上调。其是脂质生成的一个潜在的强的正向调控子,促进了癌症细胞中所见的迅速生长所必须的脂质生产 (Dobrzyn 和 Ntambi2005;Hulver 等人 2005;Ntambi 和 Miyazaki2004)。DGA 是脂质储存的最后关键步骤,酿酒酵母 Δ snf2 突变体中 DGA 的过表达导致脂质积累有巨大的增加 (Kamisaka 等人 2007)。这些结果产生了一些有意义的结果和含义,同时对其在单个模式生物体中的分布的分析可使我们能系统地鉴别它们能如何贡献、合作,以达到增加的脂质生产。

[0298] 这里我们观察了脂质生物合成中涉及的几个重要基因的影响,并且探索了其对于产油酵母解脂耶氏酵母中脂质积累增加做出的贡献。通过单独或组合过表达基因靶标,我们能够探索基因如何能通过脂质生物合成途径正向影响代谢流。进一步地,我们研究了两种候选菌株的脂质生成表现,以阐明细胞中代谢流达到平衡对达到高生成效率的重要性。

[0299] 材料和方法

[0300] 酵母菌株、生长和培养条件

[0301] 本研究使用的解脂耶氏酵母菌株衍生于野生型的解脂耶氏酵母 W29 菌株 (ATCC20460)。在所有转化中使用的营养缺陷型 Polg (Leu-) 都来自 Yeastern Biotech 公司 (Taipei, Taiwan)。本研究中使用的所有菌株都列于表 6。将构建的质粒用 SacII 线性化,并根据 Chen 等人描述的一步醋酸锂转化法 (Chen 等人 1997) 在染色体上插入 Polg。除了 MTYL088 和 MTYL089 之外,MTYL 转化子是根据其对应整合的质粒而命名。为构建菌株 MTYL088 和 MTYL089,菌株 MTYL078 和 MTYL079 经历了两轮额外的转化:(1) 以 URA KO 表达盒转化并用选择性的 5-FOA 筛选,以敲除内源的 URA;(2) 用经过 SacII 线性化的 PMT092 转化。将转化子铺板于选择性基质上,并通过制备基因组 DNA 的 PCR 进行验证。然后将经验证的转化子以甘油储备物冷冻储存于 -80°C ,在选择性 YNB 平板上于 4°C 储存。为每个菌株设计的基因过表达情况的总结在表 7 中有所描述。

[0302] Sambrook 等人先前已经描述了大肠埃希氏菌的基质和生长条件 (Sambrook 和 Russell2001),用于解脂耶氏酵母的基质和生长条件由 Barth 和 Gaillardin 等

人描述 (Barth 和 Gaillardin1997)。富营养基质 (YPD) 是用 20g/L Bacto 蛋白胨 (Difco Laboratories, Detroit, MI)、10g/L 酵母提取物 (Difco)、20g/L 葡萄糖 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 制备的。YNB 基质是以 1.7g/L 酵母氮源 (无氨基酸) (Difco)、0.69g/L CSM-Leu (MP Biomedicals, Solon, OH) 和 20g/L 葡萄糖制成的。选择性 YNB 平板含有 1.7g/L 酵母氮源 (无氨基酸)、0.69g/L CSM-Leu, 20g/L 葡萄糖和 15g/L Bacto 琼脂 (Difco)。使用以下基质进行摇瓶实验: 1.7g/L 酵母氮源 (无氨基酸)、1.5g/L 酵母提取物和 50g/L 葡萄糖。从冻存储备物中将预培养物接种于 YNB 培养基 (Falcon 管中 5mL, 200rpm, 28°C, 24hr)。将过夜培养物接种于 250mL Erlenmeyer 摇瓶中的 50mL 培养基中, 达到光学密度 (A600) 为 0.05, 孵育 100 小时 (200rpm, 28°C), 之后取出并分析生物质、糖含量和脂质含量。

[0303] 在 2 升带板的搅拌罐生物反应器中进行生物反应器规模的发酵。所使用的基质含有 1.7g/L 酵母氮源 (无氨基酸及硫酸铵)、2g/L 硫酸铵、1g/L 酵母提取物和 90g/L 葡萄糖。从选择性平板上, 起始预培养物接种于 YPD 基质 (250mL Erlenmeyer 摇瓶中 40mL, 200rpm, 28°C, 24hr)。将来自过夜预培养物中的对数期生长的细胞转移入生物反应器, 直至在 2L 反应器中的光学密度 (A600) 为 0.1 (2.5vvm 通风, pH6.8, 28°C, 搅拌转速 250rpm)。将在不同时间点的样品储存于 -20°C 用于随后的脂质分析。通过 HPLC 确定糖有机酸含量。将样品洗涤并在 60°C 下干燥两夜后通过重量分析测量确定生物质。

[0304] 遗传技术

[0305] 在本研究中一直使用的是标准分子遗传技术 (Sambrook 和 Russell2011)。在克隆中使用的限制性酶和 Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶获自 New England Biolabs (Ipswich, MA)。来自酵母转化子的基因组 DNA 是使用 Yeastar Genomic DNA 试剂盒 (Zymo Research, Irvine, CA) 制备的。所有构建的质粒都通过测序得到验证。用 PCR Purification 试剂盒或 QIAEX II 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化 PCR 产物和 DNA 片段。所使用的质粒描述于表 6 中有描述。所使用的引物在描述于表 9。

[0306] URA3 删除

[0307] 为增加解脂耶氏酵母菌株中标记物的可用性, 扩增编码尿嘧啶原养型乳清苷 -5'-磷酸脱羧酶 (URA3, 登记号: AJ306421) 的基因并将其用作敲除盒的基础, 生成 URA 营养缺陷菌株。分别使用引物对 MT310-MT311 和 MT312-MT313 扩增 URA 开放阅读框的上游和下游序列。将引物设计成使两个扩增子携带 23bp 重叠区域。纯化两个扩增子后, 将产物进行混合, 并使用引物 MT310 和 MT313 进行 PCR 以产生上游和下游扩增子融合而成的 456bp 的扩增子。随后将所述 DNA 进行纯化并随后转化入 Po1g。然后将转化的细胞铺板于含有尿嘧啶和 5-氟乳清酸 (5-FOA) 的选择性基质平板上。将生长的克隆重新铺于 5-FOA 平板以对 URA 营养缺陷型进行再选择, 并通过制备的基因组 DNA 的 PCR 进行验证。所得的 Δ LEU2 Δ URA3 菌株命名为 MTYL100。

[0308] 质粒构建

[0309] 质粒 pMT010、pMT015、pMT038、pMT040、pMT013 和 pMT065 的构建在上文有描述, 与这里描述的方法类似。使用引物 MT252 和 MT253, 从解脂耶氏酵母 Po1g 基因组 DNA 扩增 ACL1 基因 (登记号: XM_504787) 并将其插入 pMT010 的 MluI 和 NsiI 位点中而构建表达 ATP: 柠檬酸裂解酶亚基 1 的质粒 pMT047。类似地, 使用引物 MT254 和 MT255, 从解脂耶氏酵母 Po1g

基因组 DNA 扩增 ACL2 基因 (登记号 :XM_503231) 并将其插入 pMT010 的 MluI 和 NsiI 位点中而构建表达 ATP: 柠檬酸裂解酶亚基 2 的质粒 pMT049。用引物 MT283 和 MT284, 从 Po1g 基因组 DNA 扩增表达 $\Delta 9$ 脂肪酸去饱和酶 (D9) (登记号 :XM_501496) 的质粒 pMT061 并使用限制性位点 PmlI 和 BamHI 插入 pINA1269, 使之受到 php4d 启动子的控制。

[0310] 为产生表达多个基因的质粒 (pMT050、pMT065、pMT066、pMT073、pMT074、pMT075、pMT078、pMT079), 使用引物 MT220 和 MT265 从一个质粒上扩增启动子 - 基因 - 终止子表达盒。然后将其用 DpnI 和 AseI 消化并插入经过 NruI 和 AseI 消化的第二个质粒, 产生串联基因构建体 pMT065。选择使用 AseI 限制性位点以利于筛选, 因为其位于氨苄青霉素抗性标记之内。因为 NruI 是一个平末端限制性位点, 所以扩增子的插入并不会增加总的 NruI 位点数, 这样有利于后续使用相同的步骤进行迭代插入。用于这些质粒的组合构建的总体序列和方案描述于图 7 中。为了构建互补的载体, 选择 pACYCDUET-1 作为互补的穿梭载体, 因为其利用了不同的骨架、选择性标记物及复制起点。使用引物对 MT316-MT317, 从解脂耶氏酵母 Po1g 基因组 DNA 扩增 LIP2 (登记号 :XM_500282) 的上游序列, 并使用限制性位点 BamHI 和 EcoRI 将其整合入 pDUET。使用引物对 MT318-MT319, 扩增 LIP2 的下游序列, 并使用限制性位点 KpnI 和 AvrII 将其整合入 pDUET。使用引物对 MT314-MT315, 从质粒 JMP62-URA 扩增用于酵母尿嘧啶原养型的选择性标记物, 并使用限制性位点 PvuI 和 KpnI 将其整合入 pDUET。所得的质粒 pMT091 含有多克隆位点, 上游和下游两侧为 LIP2 序列和 URA3 标记物。用限制性酶 SacII 消化对质粒进行线性化, 并将整合载体与质粒骨架分开, 使外部及不期望的 DNA 的整合达到最小化。互补质粒的用途要求在起始的 pINA1269 骨架上构建表达盒并随后使用限制性酶亚克隆将所述表达盒转移至 pMT091。所述大的多克隆位点和差异化抗生素标记物有利于克隆和选择过程。

[0311] RNA 提取和转录定量

[0312] 收集生长 42 小时的摇瓶培养物, 在 10,000g 下离心 5min。将每种沉淀在 1.0ml 的 Trizol 反应剂 (Invitrogen) 中重悬, 加入 100 μ L 的酸洗的玻璃珠 (Sigma-Aldrich)。在 4°C 下将试管漩涡振荡 15min 进行细胞裂解。然后将离心管在 4°C 下于 12,000g 离心 10min, 将上清液收集在一个新 2-mL 管中。然后加入 200 μ L 氯仿, 用手摇晃离心管 10 秒钟。再次将离心管在 4°C 下于 12,000g 离心 10min。将 400 μ L 的上层水相转移至新管, 然后加入等体积的苯酚 - 氯仿 - 异戊醇 (pH4.7) (Ambion, Austin, TX)。再次用手摇离心管 10 秒钟, 并在 4°C 下于 12,000g 离心 10min。将 250 μ L 的上层相转移至有等体积冰乙醇及 1/10 体积醋酸钠 (pH5.2) 的新管中。将离心管在 -20°C 下冷冻三十分钟以促进沉淀。然后将离心管以 12,000g 离心 5 分钟, 用 70% 乙醇洗涤两次, 并在 60°C 烘箱内干燥, 最终重悬于无 RNA 酶的水中。使用 NanoDrop ND-1000 分光光度计 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) 分析 RNA 的量, 并将样品储存于 -80°C 冰箱中。使用具有 SYBR Green 的 iScript One-step RT-PCR 试剂盒 (Bio-Rad, Hercules, CA)、Bio-Rad iCycler iQ Real-Time PCR Detection System 进行 qRT-PCR 分析。使用实时定量 PCR Miner 分析荧光结果, 用使用 REST2009 (Qiagen) 确定相对定量并进行统计分析, 其中使用肌动蛋白作为参考基因, 将 MTYL038 作为参考菌株 (Zhao 和 Fernald2005)。样品重复分析四次。

[0313] 脂质萃取和定量

[0314] 使用 Folch 等人的方法萃取总脂质 (Folch 等人 1957)。将测定量的细胞生物

质（大约 1mg）重悬于 1mL 的氯仿：甲醇（2:1）溶液中，涡旋振荡 1 小时。离心后，将其中 500 μ L 转移至 125 μ L 生理盐水溶液中。移除上层水层并使下层液相挥发，重悬于 100 μ L 正己烷中。然后将样品储存于 -20℃ 直至进行酯交换反应。

[0315] 向每个样品中加入 1mL 2% (wt/vol) 的硫酸（溶于甲醇中），进行总脂质提取物的酯交换反应。然后将样品在 60℃ 下孵育 2 小时。此后，对样品进行部分挥发，并加入 1mL 正己烷，涡旋振荡 10min，对脂肪酸甲酯（FAME）进行萃取。然后将 800 μ L 的所述正己烷转移入玻璃管分装，用于 GC 分析。

[0316] FAME 的 GC 分析是使用配有火焰离子化检测器和毛细管柱 HP-INNOWAX (30m x 0.25mm) 的 Bruker 450-GC 设备进行的。GC 烘箱条件如下：150℃ (1min)，在 10min 中逐渐增高至 230℃，在 230℃ 下保持 2min。分流比为 10:1。通过与商业化的 FAME 标准品进行比较对脂肪酸进行鉴别和定量，结果以对十三酸甲酯（C13:0）进行标准化。总的脂质含量以五种 FAME 的总脂肪酸含量之和计算：棕榈酸甲酯（C16:0）、甲基棕榈烯酸（C16:1）、硬脂酸甲酯（C18:0）、油酸甲酯（C18:1）、亚油酸甲酯（C18:2）（Sigma-Aldrich）。向氯仿-甲醇萃取液体中加入十三烷酸作为内部标准物，这在整个分析过程中都存在，并被转酯化成为其甲基酯形式。

[0317] 结果和讨论

[0318] 互补载体的构建使得 DGA 表达有备选方法。

[0319] 为提供备选和互补的方法在解脂耶氏酵母中表达基因，从亲本菌株 Po1g 中敲除 URA 标记物。作为互补整合载体设计的一部分，细胞外酯酶 LIP2 被选作对接位点，因为这一基因已经得到很好的定性，而且可以对脂质合成和积累具有可忽略的或中性的效应。因此，在整合互补载体的过程中，LIP2 将被敲除。在构建互补载体用于基因表达时，有必要检验基因的表达是否根据所用的载体而受影响。为测试这一点，将编码二酰基甘油酰基转移酶（DGA）的基因克隆到 pMT015 和 pMT091 这两个载体中。尽管在两个载体中表达盒都是相同的，但是对接位点是不同的：pBR322 是 pMT015（以及所有基于 pINA1269 的载体）的对接位点，LIP2 基因是 pMT091 的对接位点。在这些载体转化并验证基因组整合时，对两种菌株都提取 RNA 并进行 RT-PCR 实验，检验两种情况下 DGA 相对于对照菌株（MTYL038）的过表达情况。如图 8 所示，两种菌株在 DGA 表达上相对于 MTYL038 对照菌株显示了 32 倍的增加。这些结果证实 pMT091 用作互补载体、LIP2 用作备选的对接位点进行基因表达没有产生可检测的来自可能表观遗传现象的干扰。

[0320] 对组合构建体进行全面调查鉴别出具有选定基因的改进的菌株。

[0321] 为研究基因靶标的贡献和相互作用，在多种中间产物基因表达组合间进行了调查，测试转化菌株的脂质生产能力。表 7 描述了 13 个构建的菌株及其相应的基因上调情况。脂质测量都是在培养 100 小时后进行的，以对比脂质生产效率而不仅仅是脂质积累。用于工业目的，总体的生产效率是比总脂质含量更重要的测量，因为生长慢但有高产率的菌株仍然不如快速生长而具有中等高产率的菌株有用。对脂质生产效率和产率的完整调查结果在图 9 中说明。

[0322] 检验只含有单个基因过表达的菌株（MTYL040、MTYL053、MTYL050、MTYL061），发现 ACC 和 DGA 在生产效率和产率上都有明显的改进。ACL 和 D9 在生产效率或产率上都没有显著的增加。这些结果表明，对于解脂耶氏酵母，ACC 和 DGA 显示了对脂质生物合成的控制，

也是限速步骤,而 ACL 和 D9 并未显示类似的现象。

[0323] ACC 和 DGA 的效应在上文有深入讨论,但 DGA 通过隔离脂质并消耗酰基 -CoA 中间产物创造驱动力,而 ACC 通过将代谢流转移至脂质合成并更迅速地调动细胞溶胶的乙酰 -CoA 库而增加产率。当两个基因在菌株 MTYL065 中组合时,其通过在脂质合成途径中建立推 - 和 - 拉的动态关系产生协同应答,其中酰基 -CoA 为平衡的中间产物。

[0324] 当与其他基因组合时,基因 D9 能够为脂质生产效率赋予少量的益处。例如,过表达 D9 和 DGA 的 MTYL069 比 MTYL053 具有更高的脂质生产效率,后者仅仅含有 DGA 过表达。类似地,过表达 ACC 和 D9 的 MTYL066 比单独过表达 ACC 的 MTYL040 具有更高的脂质生产效率。然而过表达 ACC+D9+DGA 的 MTYL073 却显示了比 MTYL065 低的脂质生产效率。在 MTYL089 及其缺少 D9 的变体 MTYL088 之间没有显著差异。虽然在积累和生产效率上观察到有一些益处,但是对于产率的益处并不显著。观察到的 D9 只在与其他基因组合时才提高脂质生产的现象似乎提示 D9 对于脂质合成过程没有强的调控或限速控制,但是其的酶作用提供了有利的条件,放大了其他基因的效应。作为在脂质小体膜和内质网上与膜相连的酶, D9 在脂质积累期得到上调 (Morin 等人 2011)。已经发现有很多脂质合成酶对油酸都有最高的特异性,而油酸正是 D9 去饱和的产物 (Oelkers 等人 2002)。这一点在所观察到的解脂耶氏酵母以油酸为碳源会生长迅速的现象上也可以得到证明,并且在此底物上的生长得到了深入的研究 (Beopoulos 等人 2008 ;Fickers 等人 2005)。因此,增加的油酸浓度虽然不会特异地驱动脂质生产或产率,但是却使脂肪酸库更迅速地隔离。这最终导致脂质积累速率更快,而产率不增加,因为隔离的增加只会发生在脂质合成已经收到其他操纵的上调的情况下。

[0325] 相反,将 ACL 与其他基因组合过表达时,脂质生产效率倾向于降低。MTYL078 和 MTYL079 尽管过表达了 ACC 和 / 或 D9,在脂质生产中却没有显示出显著的增加。具有 ACC+ACL+DGA 的 MTYL088 比对照增加了脂质生产,但相比 MTYL065 却没有显示出任何脂质生产上的改进。这些结果提示虽然 ACL 可以影响整个代谢网络中的碳流分布,但是 ACL 的过表达不论是独立的还是与其他脂肪合成的改进组合都不会显著促进脂质生产,而且在大多数情况下还降低了脂质的生产效率。这一点类似于观察到的这一现象——尽管 ATP 柠檬酸裂解酶在产油酵母中与非含有酵母中的表达有差异,但是多种生物体中该基因的活性与测量的产油性并无联系 (Boulton 和 Ratledge 1981)。

[0326] 来自脂质调查的另一项观察表明 DGA 与多种其他靶标一同表达通常导致生产效率和产率上类似的应答。虽然有可能在这些构建体中发生表达或活性的一些饱和的情况,但是这一趋于平稳的应答也可以由于所用的实验条件的限制,因为本调查中测量的特征是起始的总体生产效率,而不是静止期脂质积累或生产效率。进一步地,虽然菌株 MTYL065 清楚地表现出最强的生产效率,但产率与很多趋于平稳的菌株还是相对类似的。这表明尽管所有这些菌株都成功地将代谢流转移至脂质,产率增加,但是 MTYL065 却是例外的,并未达到其上游和下游途径的平衡而达到高的生产效率和产率。这些结果强调了对代谢流网络中进行平衡的扰动以达到最佳生产效率和产率的重要性,这也是对生长偶联产物进行代谢工程的一个共同的主题 (Feist 等人 2010 ;Tyo 等人 2007)。

[0327] 对全长构建体的 RT-PCR 分析显示了其在 MTYL089 中的过表达。

[0328] 为探索该脂质调查中的平台区域,对过表达 ACC+D9+ACL12+DGA 的 MTYL089 进行进一步的研究。将两个质粒 pMT079 和 pMT092 转化入 Δ LEU 和 Δ URA 背景的解脂耶氏酵母菌

株 MTYL100, 构建菌株。使用这两种质粒主要是处于质粒大小的考虑, 因为 pMT079 已经包括在四个串联表达盒中, 长度有 23kb。基因组 DNA 的 PCR 结果确证了两个质粒都成功整合入所述菌株, 并且确认每个单独的表达盒都正确整合了。对完成并验证的菌株相对对照菌株进行 RT-PCR 分析, 确认所有五个基因都得到合适的转录过表达 (图 10)。DGA 作为 TEF_{in} 表达控制下的唯一基因有很强的过表达, 这表明剪接体内含子甚至在有来自多个利用相同启动子的表达盒的潜在竞争的情况下仍然具有增强的特征。在无内含子 TEF 启动子控制下的 ACC 显示了最低的表达。也在 TEF 启动子控制之下的 ACL 的两个亚基显示了高于 D9 的表达, 后者是受 hp4d 启动子控制的。由于取样刚好是在指数生长期后进行 (其中 hp4d 能显示准 - 生长依赖性表达 (Madzak 等人 2000)), 所以 hp4d 和 TEF 的组成型表达似乎彼此之间相对都很接近。这些结果显示了所靶向的基因都得到充分的过表达。

[0329] MTYL089 的 2L 发酵表明其具有强的脂质积累能力。

[0330] 在验证了菌株 MTYL089 中的基因表达后, 在 2L 生物反应器发酵中测试了菌株的油生产效能。将基质的 C/N 比调整至 100 以助于促进脂质积累。C/N 比决定了发酵中一旦氮耗竭, 有多少量的多余的碳可用, 常常需要精细的平衡以优化脂质生产, 使之超过柠檬酸生产 (Beopoulos 等人 2009)。图 11 显示了批次发酵过程的时间曲线。在发酵 185 小时后, 所有 90g/L 的葡萄糖都已经被消耗, 产生了 26g/L 的生物质 (细胞干重), 产生的脂质含量很可观, 为 76.8%, 生产效率为 0.109g 脂质 /L/ 小时。以葡萄糖为碳源的总体脂质产率为 0.227g 脂质 /g 葡萄糖, 即理论最大产率的 70%。在脂质积累期 (66-185 小时), 达到脂质生产效率及产率的最大值, 分别为 0.154g 脂质 /L/ 小时和 0.277g 脂质 /g 葡萄糖, 产率增加到最大理论产率的 85%。

[0331] 图 12 中显示的发酵末期的细胞培养物显微镜成像显示了所有细胞都含有大的液泡, 几乎占据了细胞的整个体积。尼罗河红染色和荧光表明这些液泡主要是由中性脂质组成的。至少量的菌丝细胞 (通常产率不高) (Coelho 等人 2010) 也显示了显著的脂质积累, 沿着细胞的长度方向产生出多个脂质小体。

[0332] 尽管在培养物中观察到脂质的巨大的积累, 但是也发现了大量不期望的特征, 尤其是在与前面使用 MTYL065 的工作相比。首先, 从 75 小时开始就有显著量的柠檬酸生产与脂质生产同时发生。柠檬酸是脂质生物合成途径的一个中间产物, 利用 ATP 柠檬酸裂解酶进行酶转化, 转化为草酰乙酸和脂质合成前体乙酰 -CoA。尽管两种 ACL 酶都在 MTYL089 菌株中有过表达, 但是还是观察到了柠檬酸的积累。有可能 C/N 比太高, 而这一点被显示会导致柠檬酸生产而不是脂质生产 (Beopoulos 等人 2009); 然而, 我们的结果显示柠檬酸和脂质都是同时被生产的。两种产物的偶联生产与在菌株 MTYL065 的实验中观察到的分离的脂质生产期及其后代柠檬酸生产期不同。进一步地, C/N 比与 MTYL065 的批次发酵相匹配, 没有显示这么大量的柠檬酸生产。这表明更可能是在发酵条件下 ATP 生成的量不足, 结合上游有大量代谢流进入此途径, 导致细胞内柠檬酸库的积累, 最终导致分泌。此外, 在 MTYL089 中观察到显著较低的生产效率。由于在整个发酵过程中通风保持恒定, 所以在发酵后期的阶段预期有氧受限的生长。然而, 线性生长的起始在此发酵中比用 MTYL065 进行发酵时发生的早得多, 仅仅在生物质浓度达到大约 6g/L 后一天就开始发生。线性生长起始较早导致发酵时间较长, 因此导致较低的生产效率, 尽管有着较高的脂质含量。因为通风情况也与 MTYL065 的发酵条件匹配, 所以很可能 MTYL089 的代谢变化是对生长造成了更大的限制。在

另一方面,MTYL089 显示了相比于 MTYL065 的 0.195g 脂质 /g 葡萄糖更好的总体脂质产率,为 0.227g/g。最终前者的发酵得到相比后者的 17.6g/L 更高的滴度,为 20.2g/L 脂质。

[0333] 表 8 总结了菌株 MTYL065 和 MTYL089 的 2L 发酵之间的关键表现特征对比。脂肪酸谱的对比(图 13)表明在菌株间的脂肪酸分布只有轻微变化,对单不饱和的脂肪酸棕榈油酸和油酸有更强的偏好。ACL 和 D9 过表达的其他效应似乎增加了代谢流进入脂质合成,但是是以生长速率为相当大的代价。此外,由于细胞代谢生成的 ATP 没有匹配的增加,所以柠檬酸被以副产物的形式分泌,而不是在脂质合成途径中利用。由于脂质合成和储存能与生长强有力地竞争资源,所以严密的调控通常对管理此活性是有必要的(Tehlivets 等人 2007)。这四种基因靶标的过表达为这一调控开启了很多,因此,我们观察的是细胞生长和脂质生产在争夺优先权上的强烈竞争。作为代谢工程中的共同主题,使具体产物的生产最大化常常要求在使代谢流进入期望的产物与生物的总体健康和生长之间进行平衡。MTYL065 和 MTYL089 之间的对比清楚地表明了这一需要,MTYL065 是一个示例,其中有更优化的代谢流经过脂质合成途径。

[0334] 结论

[0335] 尽管脂质生物合成的组分已经得到充分的理解,但对于基因扰动,尤其是组合之后如何影响此途径的能力和经过此途径的代谢流,还有很多是未知的。通过研究产油酵母解脂耶氏酵母,我们能够利用具有天然脂质生产能力的宿主生物体研究代谢工程改造能将脂质生产效率和产率改进到何种程度。我们检验了四种基因靶标——ACC、D9、ACL、DGA——并能够用携带所有四个靶标过表达的菌株在 2L 生物反应器中达到 76.8%的脂质含量,这是很可观的。通过进一步通过组合过表达来研究这些基因靶标,我们能够将这些基因对脂质生产的正面影响排序,其中 DGA 和 ACC 产生最强的正面贡献,D9 只是在与其他基因组合时产生微小的贡献,最后,ACL 并未作出任何显著的正面贡献。我们还能够探索个体效应之间可以的相互作用,鉴定出 ACC 和 DGA 之间有最强的协同相互作用。微生物脂质的生产具有广泛的应用范围,其因为能够用于生产生物柴油而迅速获得关注。脂质合成中央途径的代谢工程改造将在这些未来技术和方法能够取得成功上至关重要。

[0336] 参考文献

[0337] Athenstaedt K, Jolivet P, Boulard C, Zivy M, Negroni L, Nicaud JM, Chardot T. 2006. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. *Proteomics* 6(5):1450-1459.

[0338] Bailey JE. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252(5013):1668-1675.

[0339] Barth G, Gaillardin C. 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19(4):219-237.

[0340] Beckerich JM, Boissramé-Baudevin A, Gaillardin C. 1998. *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *International Microbiology* 1(2):123.

[0341] Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribe Larrea JL, Molina-Jouve C, Nicaud JM. 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research* 48(6):375-387.

- [0342] Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, Le Dall MT, Hapala I, Papanikolaou S, Chardot T, Nicaud JM. 2008. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(24):7779.
- [0343] Beopoulos A, Nicaud J-M, Gaillardin C. 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90(4):1193-1206.
- [0344] Boulton CA, Ratledge C. 1981. Correlation of Lipid Accumulation in Yeasts with Possession of ATP:Citrate Lyase. *Journal of General Microbiology* 127(1):169-176.
- [0345] Chen DC, Beckerich JM, Gaillardin C. 1997. One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48(2):232-235.
- [0346] Chuang L-T, Chen D-C, Nicaud J-M, Madzak C, Chen Y-H, Huang Y-S. 2010. Co-expression of heterologous desaturase genes in *Yarrowia lipolytica*. *New Biotechnology* 27(4):277-282.
- [0347] Coelho MAZ, Amaral PFF, Belo I. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology ;2010. Formatex Research Center. p930-944.
- [0348] Courchesne NMD, Parisien A, Wang B, Lan CQ. 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J. Biotechnol.* 141(1-2):31-41.
- [0349] Davis MS, Solbiati J, Cronan Jr. JE. 2000. Overproduction of 乙酰-CoA Carboxylase Activity Increases the Rate of Fatty Acid Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275(37):28593-28598.
- [0350] Dobrzyn A, Ntambi JM. 2005. The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73(1):35-41.
- [0351] Dulermo T, Nicaud J-M. 2011. Involvement of the G3P shuttle and β -oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.* 13(5):482-491.
- [0352] Feist AM, Zielinski DC, Orth JD, Schellenberger J, Herrgard MJ, Palsson BO. 2010. Model-driven evaluation of the production potential for growth-coupled products of *Escherichia coli*. *Metab Eng* 12(3):173-186.
- [0353] Fickers P, Benetti PH, Wache Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, Nicaud JM. 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* 5(6-7):527-543.
- [0354] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226(1):497-509.
- [0355] Hulver MW, Berggren JR, Carper MJ, Miyazaki M, Ntambi JM, Hoffman EP, Thyfault JP, Stevens R, Dohm GL, Houmard JA and others. 2005. Elevated

stearoyl-CoA desaturase-expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab* 2(4):251-261.

[0356] Kamisaka Y, Tomita N, Kimura K, Kainou K, Uemura H. 2007. DGA1(diacylglycerol acyltransferase gene) overexpression and leucine biosynthesis significantly increase lipid accumulation in the Δ snf2 disruptant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemal Journal* 408(1):61-68.

[0357] Kerscher S, Droese S, Zwicker K, Zickermann V, Brandt U. 2002. *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta* 1555(1-3):83-91.

[0358] Kohlwein S, Petschnigg J. 2007. Lipid-induced cell dysfunction and cell death: Lessons from yeast. *Current Hypertension Reports* 9(6):455-461.

[0359] Kurat CF, Natter K, Petschnigg J, Wolinski H, Scheuringer K, Scholz H, Zimmermann R, Leber R, Zechner R, Kohlwein SD. 2006. Obese Yeast: Triglyceride Lipolysis Is Functionally Conserved from Mammals to Yeast. *J. Biol. Chem.* 281(1):491-500.

[0360] Madzak C, Tréton B, Blanchin-Roland S. 2000. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2(2):207-216.

[0361] Morin N, Cescut J, Beopoulos A, Lelandais G, Le Berre V, Uribe Larrea J-L, Molina-Jouve C, Nicaud J-M. 2011. Transcriptomic Analyses during the Transition from Biomass Production to Lipid Accumulation in the Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica*. *PLoS ONE* 6(11):e27966.

[0362] Nicaud J-M, Madzak C, van den Broek P, Gysler C, Duboc P, Niederberger P, Gaillardin C. 2002. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 2(3):371-379.

[0363] Ntambi JM, Miyazaki M. 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 43(2):91-104.

[0364] Oelkers P, Cromley D, Padamsee M, Billheimer JT, Sturley SL. 2002. The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J. Biol. Chem.* 277(11):8877.

[0365] Ohlrogge JB, Jaworski JG. 1997. Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 48(1):109-136.

[0366] Papanikolaou S, Aggelis G. 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour. Technol.* 82(1):43-49.

[0367] Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I. 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology* 92(4):737-744.

- [0368] Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual: CSHL press.
- [0369] Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein SD. 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771(3):255-270.
- [0370] Tyo KE, Alper HS, Stephanopoulos GN. 2007. Expanding the metabolic engineering toolbox: more options to engineer cells. *Trends Biotechnol.* 25(3):132-137.
- [0371] Vorapreeda T, Thammarongtham C, Cheevadhanarak S, Laoteng K. 2012. Alternative routes of 乙酰-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology* 158(1):217-228.
- [0372] Zhang H, Damude HG, Yadav NS. 2011. Three diacylglycerol acyltransferases contribute to oil biosynthesis and normal growth in *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 1:25-38.
- [0373] Zhao S, Fernald RD. 2005. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Computational Biology* 12(8):1047-1064.
- [0374] 表 6. 本研究使用的菌株和质粒
- [0375]

菌株(宿主菌株)	基因型和质粒	来源
大肠杆菌		
NEB10 β	<i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>fhuA lacX74 galK</i> New England (ϕ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15) <i>mcrA galU recA1 endA1</i> Biolabs <i>nupG rpsL (StrR) Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)</i>	
pINA1269	JMP62-LEU	Yeastern

[0376]

pDUET1	<i>pACYCDUET-1</i>	Novagen
JMP-URA	<i>JMP62-URA</i>	(Nicaud 等人 2002)
pMT010	<i>pINA1269 php4d::TEF</i>	实施例 1
pMT015	<i>pINA1269 php4d::TEFin</i>	实施例 1
pMT038	<i>YTEF-LacZ</i>	实施例 1
pMT013	<i>YTEF-ACC1</i>	实施例 1
pMT040	<i>php4d-ACC1</i>	实施例 1
pMT047	<i>YTEF-ACL1 (LEU)</i>	本实施例
pMT049	<i>YTEF-ACL2 (LEU)</i>	本实施例
pMT050	<i>YTEF-ACL1 + YTEF-ACL2 (LEU)</i>	本实施例
pMT053	<i>YTEFin-DGA</i>	实施例 1
pMT061	<i>php4d-D9 (LEU)</i>	本实施例
pMT065	<i>php4d-ACC1 + YTEFin-DGA</i>	实施例 1
pMT066	<i>YTEF-ACC + YLEX-D9 (LEU)</i>	本实施例
pMT073	<i>YTEF-ACC + YLEX-D9 + YTEFin-DGA (LEU)</i>	本实施例
pMT074	<i>YTEF-ACC + YTEF-ACL1 (LEU)</i>	本实施例
pMT075	<i>YTEF-ACC + YLEX-D9 + YTEF-ACL1 (LEU)</i>	本实施例
pMT078	<i>YTEF-ACC + YTEF-ACL1 + YTEF-ACL2 (LEU)</i>	本实施例
pMT079	<i>YTEF-ACC + YLEX-D9 + YTEF-ACL1 + YTEF-ACL2 (LEU)</i>	本实施例
pMT091	<i>pACYC Lip2 KO 质粒(URA)</i>	本实施例
pMT092	<i>YTEFin-DGA (URA)</i>	本实施例

解脂耶氏酵母

Polg	<i>MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2</i>	Yeastern
MTYL038	<i>MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2 TEF-LacZ-LEU2</i>	实施例 1
MTYL040	<i>MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2 hp4d-ACC1-LEU2</i>	实施例 1
MTYL050	<i>MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2 TEF-ACL1 + TEF-ACL2</i>	本实施例
MTYL053	<i>MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2 TEFfin-DGA1-LEU2</i>	实施例 1
MTYL065	<i>MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2 hp4d-ACC1 + TEFfin-DGA1-LEU2</i>	实施例 1

[0377]

MTYL066	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, 本实施例 axp-2 TEF-ACC + hp4d-D9
MTYL073	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, 本实施例 axp-2 TEF-ACC + hp4d-D9 + TEFin-DGA1
MTYL078	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, 本实施例 axp-2 TEF-ACC + TEF-ACL1 + TEF-ACL2
MTYL079	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, 本实施例 axp-2 TEF-ACC + hp4d-D9 + TEF-ACL1 + TEF-ACL2
MTYL088	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, 本实施例 axp-2 TEF-ACC + TEF-ACL1 + TEF-ACL2 + TEFin-DGA
MTYL089	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, 本实施例 axp-2 TEF-ACC + hp4d-D9 + TEF-ACL1 + TEF-ACL2 + TEFin-DGA
MTYL092	MATa, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, 本实施例 axp-2 LIP2::TEFin-DGA

[0378] 表 7. 列出了用于检验脂质积累的所有菌株,标明了存在(+)或不存在(-)四种靶标的过表达盒:乙酰-CoA 羧化酶(ACC)、二酰基甘油酰基转移酶(DGA)、ATP:柠檬酸裂解酶(ACL12)以及 $\Delta 9$ -去饱和酶(D9)。

	质粒	ACC	DGA	ACL	D9	靶标数量
	MTYL038	-	-	-	-	0
	MTYL040	+	-	-	-	1
	MTYL053	-	+	-	-	1
	MTYL050	-	-	+	-	1
	MTYL061	-	-	-	+	1
[0379]	MTYL065	+	+	-	-	2
	MTYL078	+	-	+	-	2
	MTYL066	+	-	-	+	2
	MTYL069	-	+	-	+	2
	MTYL073	+	+	-	+	3
	MTYL079	+	-	+	+	3
	MTYL088	+	+	+	-	3
	MTYL089	+	+	+	+	4

[0380] 表 8. 菌株 MTYL065 和 MTYL089 之间发酵特征的比较。两个发酵过程中 C/N 比均为 100,在 2L 生物反应器中进行。葡萄糖生物反应器初始时装有 90g/L 的葡萄糖。

	MTYL065	MTYL089
总体生物质产率	0.316 g/g	0.295 g/g
总体脂质产率	0.195 g/g	0.227 g/g
总体生产效率	0.143 g/L/小时	0.109 g/L/小时
脂质生产期	70 - 120 小时	66 - 185 小时
最大脂质产率	0.249 g/g	0.277 g/g
最大生产效率	0.178 g/L/小时	0.154 g/L/小时
最终脂质滴度	17.6 g/L	20.2 g/L

[0382] 表 9. 用于本研究的引物。相关限制性位点以黑体表示。

[0383]

引物	描述	序列	SEQ ID
PCR			
MT252	ACL1	CTTACAACGCGTATGTCTGCCAACGAGAACATCTCC	31
MT253	ACL1	CTAGGTATGCATCTATGATCGAGTCTTGGCCTTGGA	32
MT254	ACL2	CTTACAACGCGTATGTCAGCGAAATCCATTACGA	33
MT255	ACL2	CTAGGTATGCATTTAAACTCCGAGAGGAGTGGAAGC	34
MT283	D9	AATGGTGAAAAACGTGGACCAAGTG	35
MT284	D9	CTCACAGGATCCCTAAGCAGCCATGCCAGACATACC	36
MT220	盒	CCCGGCAACAATTAATAGACTGGAT	37
MT265	盒	TTCGGACACGGGCATCTCAC	38
RT-PCR			
MTR001	肌动蛋白	TCCAGGCCGTCCTCTCCC	39
MTR002	肌动蛋白	GGCCAGCCATATCGAGTCGCA	40
MTR031	DGA	AACGGAGGAGTGGTCAAGCGA	41
MTR032	DGA	TTATGGGGGAAGTAGCGGCCAA	42
MTR033	D9	GACCGACTCCAACAAGGACCCTT	43
MTR034	D9	GGGTTGGGCACAAGCAGCAT	44
MTR041	ACC	GCTTCTCACGGAGGTCATACAGT	45
MTR042	ACC	CTGCGGCAATACCGTTGTTAG	46
MTR068	ACL1	CCTCCTTGGTGAGGTTGGTGGT	47
MTR069	ACL1	GCGACGATGGGCTTCTTGATC	48
MTR070	ACL2	CCTTCAAGGGCATCATCCGG	49
MTR071	ACL2	CGCCTCGTCGCACGTAAATCT	50

[0384] 实施例 3.

[0385] 材料和方法

[0386] 酵母菌株、生长和培养条件

[0387] 如实施例 1 中所讨论的, 本节描述的实验中使用解脂耶氏酵母的 ACC+DGA1 转化子

菌株 (MTLY065)。YPD 基质如实施例 1 中所描述的方法进行制备。用于生物反应器中的基质成分为酵母氮源 (无氨基酸、无硫酸铵) (Amresco)、酵母提取物 (Difco)、硫酸铵 (Macron Chemicals)、醋酸钠 (Macron Chemicals) 以及醋酸 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)。在 2L 带档板的搅拌罐反应器中进行生物反应器反应。用于生物反应器的接种物如实施例 1 中所描述的方法进行制备。

[0388] 生物反应器操作 : 醋酸盐、醋酸和硫酸铵加料

[0389] 反应器中起始机制组合物如下 : 30g/L 醋酸钠、2.5g/L 酵母提取物、4.25g/L 酵母氮源以及 2.4g/L 的硫酸铵。用于本节描述的实验的酵母提取物和酵母氮源浓度比实施例 1 中讨论的要高一些。选择碳氮比 (C/N) 为 20 以提供足够的氮, 用于生物质生产。通过级联控制在所有时间点都维持反应器中为 20% 的恒定溶解氧水平。使用的 pH 设定值为 7.3。

[0390] 为生成高的细胞密度 (这将在随后成为脂质积累的平台), 设计并实施了一项策略, 其中通过加料醋酸补充 30g/L 醋酸钠的碳源。使用醋酸具有几项优势, 其有双重用途 : 为生长和分裂的细胞提供碳来源 ; 同时提供对 pH 的控制。为了在生长起始阶段维持低的 C/N 比率, 与醋酸同时加料氮源。生长的起始阶段包括在加料 15g/L 硫酸铵每升 30% (vol/vol) 醋酸。后续的供料含有纯的 100% 醋酸 (无硫酸铵), 这样, 随着氮被细胞消耗且从基质中耗尽, C/N 比会增加, 产生改进的脂质积累。

[0391] 在反应进行起始的工作体积为 1.6L。在起初 60h 之内, 加入了 1L 的酸和硫酸铵溶液。在随后的 40h 中加入了大约 200ml 的纯醋酸。在除了每 24h 取样用于测量目的之外的任何时间点都不移除培养物体积。为了抵消进入反应器的额外的体积, 允许液体挥发。高的通风速率 (2.5vvm) 产生足够的挥发, 有助于维持反应器的体积。甚至是在有挥发的情况下, 培养液体积也在运行过程中有轻微上升, 到大约 1.8L。

[0392] 每 24 小时测量一次培养液的光学密度 (OD)。将样品储存于 -20°C 用于脂质分析。HPLC 分析得到反应器中醋酸水平。用 YSI7100 铵电极 (YSI Life Sciences) 测量铵含量。用实施例 1 中讨论的方法确定生物质。

[0393] 脂质分析

[0394] 脂质分析包括直接酯交换操作流程, 该流程根据美国专利 7,932,077 以及 Griffiths 等人 LIPIDS (2010) 45:1053 - 1060 进行调整, 二者的全部内容都并入本文作为参考。所述操作流程采用了 0.5N 甲醇钠和 18M 的硫酸 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)。甲醇钠是使用氢氧化钠 (Macron Chemicals) 和甲醇 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 自制生成的。首先将 500 μ l 的 0.5N 甲醇钠加入 1mg 细胞样品沉淀, 接着漩涡振荡 1 小时。此后, 加入 40 μ l 硫酸和 500 μ l 正己烷, 接着进行另一个 30min 的漩涡振荡步骤以将转酯化的甲酯溶解进入正己烷。在 8000rpm 下将反应混合物离心 1min, 并将 800 μ l 的上层正己烷相转移至 GC 试样管并在 GC-FID 中进行分析。GC 柱子、操作方法以及最后的分析都按照实施例 1 中讨论的方法进行, 除了其中使用了十七烷酸甘油三酯作为对照而不是十三烷酸。

[0395] 结果和讨论

[0396] 生物反应器反应结果总结于表 10。

[0397] 表 10. 用醋酸盐进行生物反应器反应的结果

[0398]

脂质滴度	55g/L
脂质含量	67%
总体脂质生产效率	0.56g/L/h

[0399]

最大脂质生产效率	1g/L/h
总体脂质产率 (g 脂质 /g 醋酸盐)	0.16g/g
最大脂质产率	0.24g/g

[0400] 图 14 和 15 显示了一个代表性的醋酸生物反应器反应中氮、非脂质和脂质滴度、脂质含量和 C/N 比率的趋势。在将氮加料入反应器时,非脂质生物质在生长的初始阶段不断升高。48h 后,由于脂质有积累,所以几乎所有生物质都有增长。在此阶段,细胞合成脂质的产率为 0.24g/g,合成速率为 1g/L/h,生产的最终脂质滴度为 55g/L,这比实施例 1 中描述的实验中达到的滴度高至少 10 倍。然而,最终脂质含量和总体脂质产率非常类似于实施例 1 中的脂质含量和总体脂质产率。这些数字大多取决于所采用的微生物菌株。几乎 70% 的脂质是油酸,其与实施例 1 中描述的发现相一致。

[0401] 本文讨论的反应目的是通过采用上文提到的操作策略和优化的过程条件使用 ACC+DGA1 突变体使脂质产率最大化。此反应的结果与实施例 1 中显示的结果的对比显示于下文表 11。在这些用醋酸进行的反应中观察到滴度提高了 10 倍,总体生产效率提高了 14 倍。

[0402] 表 11. 以醋酸进行的反应与实施例 1 中显示的反应之间的对比

[0403]

	葡萄糖 (实施例 1)	醋酸 (实施例 1)	醋酸 (本节)
脂质滴度	17.6g/L	5.5g/L	55g/L
总体脂质生产效率	0.14g/L/h	0.04g/L/h	0.56g/L/h
最大脂质生产效率	0.26g/L/h	0.10g/L/h	1g/L/h
总体脂质产率	0.19g/g	0.15g/g	0.16g/g
最大脂质产率	0.25g/g	0.27g/g	0.24g/g

[0404] 离心中具有高脂质含量 (超过 80%) 的细胞浮于上部,而不是沉积下来。在显微镜下,这些细胞似乎充满了油。图 16 显示了用尼罗河红染色后这种细胞在油浸显微镜 (100x) 下状态。亮点为脂质液泡。

[0405] 在本文说明书中提到的所有出版物、专利和序列数据库条目都以其全文并入本文作为参考,如特定地或单独地指出单独的出版物或专利以通过参考并入本文。在有冲突的

情况下,以本申请(包括本文的任何定义)为主。

[0406] 等同替换及范围

[0407] 本领域技术人员使用不超过常规实验会认识到或能够确定很多本文描述的发明的特定实施方式的等同替换。本发明的范围不意欲受到上文描述的限制,但在附随的权利要求提出了所述范围。

[0408] 除非在上下文中明显指出是相反或其他的,否则在权利要求条款中如“一”、“一个”和“这个”可以指一个或超过一个。除非从上下文中明显表明是相反或其他的,否则如果组成员中超过一个或多个都在给定产品或过程中存在、被其采用或与其相关,则在组的一个或多个成员之间有“或”这个字的权利要求或描述被认为是适当的。本发明包括实施方式,其中确切地组的一个成员在给定产品或过程中存在、被其采用或与其相关。本发明还包括实施方式,其中超过一个或所有组成员都在给定产品或过程中存在、被其采用或相与其关。

[0409] 进一步地,要理解的是,本发明包括所有变动、组合和排列,其中来自一个或多个权利要求或来自描述相关部分的一个或多个限制、元素、条款、描述性术语等等被引入另一权利要求中。例如,任何依赖于另一权利要求的权利要求都能得到修饰以包括在依赖于相同基础权利要求的任何其他权利要求中存在的一个或多个限制。进一步地,当权利要求提到某一组合物时,要理解的是包括使用所述组合物用于本文公开的任意目的的方法,以及根据本文公开的任何制造方法用于制造所述组合物的方法,或包括本领域已知的其他方法,除非有其他说明,或除非对本领域普通技术人员很明显地会有矛盾或不一致的产生。

[0410] 当元素以表的形式如以马库什组格式呈递时,要理解的是这些元素的每个亚组也是公开的,而且任何元素都可以从该组移除。还要注意的是术语“包含”意欲为开放状态,允许包括其他的元素或步骤。应当理解的是,通常如果发明或发明的方面被称为包含特定元素、特征、步骤等等,则该发明或发明的方面的特定实施方式包括或基本上包括这些元素、特征、步骤等等。为了简明起见,这些实施方式在本文的这些文字中没有特定提出。因此,对于本发明每个包含一个或多个元素、特征、步骤等等的实施方式,本发明还提供了包含或基本上包含这些元素、特征、步骤等等的实施方式。

[0411] 当给出范围时,包括区间端点。进一步地,要理解的是除非有其他说明或从上下文和/或本领域普通技术人员的理解中明显不是如此,否则以范围表示的数值可包含本发明不同实施方式中陈述的范围内的任何特定数值,直到范围下限的十分之一单位,除非上下文清楚地有其他说明。还要理解的是除非有其他说明或从上下文和/或本领域普通技术人员的理解中明显不是如此,否则以范围表示的数值可包含给定范围内的任意子集,其中子集的区间端点被表示为与范围下限的十分之一单位有相同的精确度。

[0412] 此外,要理解的是本发明的任何特定实施方式可以从一项或多项权利要求中明确排除。当给出范围时,范围内的任何数值都可从一项或多项权利要求中明确排除。本发明的任何实施方式、元素、特征、应用或组合物的方法和/或本发明的方法都可从任何一项或多项权利要求中排除。为了简洁起见,所有其中一个或多个元素、特征、目的或方面得到排除的实施方式在本文没有明确提出。

[0001]

序列表

<110>	Massachusetts Institute of Technology Stephanopoulos, Gregory Tai, Mitchell Chakraborty, Sagar	
<120>	工程改造的微生物及用于微生物油生产的方法	
<130>	M0656, 70253W000	
<140>	Not yet assigned	
<141>	2012-10-19	
<150>	US 61/548, 901	
<151>	2011-10-19	
<150>	US 61/663, 263	
<151>	2012-06-22	
<160>	50	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	1545	
<212>	DNA	
<213>	解脂耶氏酵母	
<400>	1	
	atgactatcg actcacaata ctacaagtcg cgagacaaaa acgacacggc acccaaaatc	60
	gcgggaatcc gatatgcccc gctategaca ccattactca accgatgtga gaccttctct	120
	ctggtctggc acattttcag cattcccact ttcttcacaa ttttcattgt atgtctgcga	180
	attccactgc tctggccatt tctgattgcg tatgtagtgt acgtgttaa agacgactcc	240
	ccgtccaacg gaggagtgt caagcgatac tgcctattt caagaaactt cttcacttgg	300
	aagctctttg gccgtactt cccataact ctgcacaaga cgggtgatct ggagccacg	360
	cacacatact accctcigga cgtccaggag tatcacttga ttgctgagag atactggcgc	420
	cagaacaagt acctccgagc aatcacttcc accatcgagt actttctgcc cgccttcagt	480
	aaacggtctc ttctatcaa cgagcaggag cagcctgccg agcgagatcc tctctgtct	540
	cccgtttctc ccagctctcc gggttctcaa cctgacaagt ggattaacca cgacagcaga	600
	tatagccgtg gagaatcacc tggtccaac gccacgcct cgggtccga acttaacggc	660
	aacggcaaca atggcaccac taaccgacga cttttgtcgt ccgcctctgc tggctccact	720
	gcatctgatt ccacgttct taacgggtcc ctcaactct acgccaacca gatcattggc	780
	gaaaacgacc cacagctgtc gccacaaaa ctcaagccca ctggcagaaa atacatcttc	840
	ggctaccacc cccacggcat tatcgcatg ggagccittg gtggaattgc caccgaggga	900
	gtggatgggt ccaagctctt tccgggcacc cctgtttctc ttatgactct caccaacaac	960
	ttccgagtgc ctctctacag agagtacctc atgagtctgg gagtctctc tctctccaag	1020
	aagtcttgcg aggcctctct caagcgaaac cagtctatct gcattgtcgt tggtaggagc	1080
	caggaaagtc ttctggccag acccgtgtc atggaccttg tctactcaa gcgaaagggt	1140
	ttgttctgac ttggtatgga ggtcggaat gtgcctcttg tcccatcat ggcctttggt	1200
	gagaacgacc tctatgacca ggttagcaac gacaagtcgt ccaagctgta ccgattccag	1260
	cagtttgtca agaacttctt tggattcacc ctctcttga tgcattgccg aggcgtcttc	1320
	aactacgatg tgggtcttgt cccctacagg cgaccgtca acattgtgtt tgggtccccc	1380

[0002]

```

atfgacttgc cttatctccc acaccccacc gacgaagaag tgtccgaata ccacgaccga      1440
tacatcgccg agctgcagcg aatctacaac gagcacaagg atgaatattt catcgattgg      1500
accgaggagg gcaaaggagc cccagagttc cgaatgattg agtaa                        1545

```

<210> 2
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> 解脂耶氏酵母

<400> 2

```

Met Thr Ile Asp Ser Gln Tyr Tyr Lys Ser Arg Asp Lys Asn Asp Thr
1          5          10          15

```

```

Ala Pro Lys Ile Ala Gly Ile Arg Tyr Ala Pro Leu Ser Thr Pro Leu
20          25          30

```

```

Leu Asn Arg Cys Glu Thr Phe Ser Leu Val Trp His Ile Phe Ser Ile
35          40          45

```

```

Pro Thr Phe Leu Thr Ile Phe Met Leu Cys Cys Ala Ile Pro Leu Leu
50          55          60

```

```

Trp Pro Phe Val Ile Ala Tyr Val Val Tyr Ala Val Lys Asp Asp Ser
65          70          75          80

```

```

Pro Ser Asn Gly Gly Val Val Lys Arg Tyr Ser Pro Ile Ser Arg Asn
85          90          95

```

```

Phe Phe Ile Trp Lys Leu Phe Gly Arg Tyr Phe Pro Ile Thr Leu His
100          105          110

```

```

Lys Thr Val Asp Leu Glu Pro Thr His Thr Tyr Tyr Pro Leu Asp Val
115          120          125

```

```

Gln Glu Tyr His Leu Ile Ala Glu Arg Tyr Trp Pro Gln Asn Lys Tyr
130          135          140

```

```

Leu Arg Ala Ile Ile Ser Thr Ile Glu Tyr Phe Leu Pro Ala Phe Met
145          150          155          160

```

```

Lys Arg Ser Leu Ser Ile Asn Glu Gln Glu Gln Pro Ala Glu Arg Asp
165          170          175

```

```

Pro Leu Leu Ser Pro Val Ser Pro Ser Ser Pro Gly Ser Gln Pro Asp
180          185          190

```

```

Lys Trp Ile Asn His Asp Ser Arg Tyr Ser Arg Gly Glu Ser Ser Gly
195          200          205

```

```

Ser Asn Gly His Ala Ser Gly Ser Glu Leu Asn Gly Asn Gly Asn Asn
210          215          220

```

```

Gly Thr Thr Asn Arg Arg Pro Leu Ser Ser Ala Ser Ala Gly Ser Thr
225          230          235          240

```

```

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

```

[0003]

Gln Ile Ile Gly Glu Asn Asp Pro Gln Leu Ser Pro Thr Lys Leu Lys
 260 265 270
 Pro Thr Gly Arg Lys Tyr Ile Phe Gly Tyr His Pro His Gly Ile Ile
 275 280 285
 Gly Met Gly Ala Phe Gly Gly Ile Ala Thr Glu Gly Ala Gly Trp Ser
 290 295 300
 Lys Leu Phe Pro Gly Ile Pro Val Ser Leu Met Thr Leu Thr Asn Asn
 305 310 315 320
 Phe Arg Val Pro Leu Tyr Arg Glu Tyr Leu Met Ser Leu Gly Val Ala
 325 330 335
 Ser Val Ser Lys Lys Ser Cys Lys Ala Leu Leu Lys Arg Asn Gln Ser
 340 345 350
 Ile Cys Ile Val Val Gly Gly Ala Gln Glu Ser Leu Leu Ala Arg Pro
 355 360 365
 Gly Val Met Asp Leu Val Leu Leu Lys Arg Lys Gly Phe Val Arg Leu
 370 375 380
 Gly Met Glu Val Gly Asn Val Ala Leu Val Pro Ile Met Ala Phe Gly
 385 390 395 400
 Glu Asn Asp Leu Tyr Asp Gln Val Ser Asn Asp Lys Ser Ser Lys Leu
 405 410 415
 Tyr Arg Phe Gln Gln Phe Val Lys Asn Phe Leu Gly Phe Thr Leu Pro
 420 425 430
 Leu Met His Ala Arg Gly Val Phe Asn Tyr Asp Val Gly Leu Val Pro
 435 440 445
 Tyr Arg Arg Pro Val Asn Ile Val Val Gly Ser Pro Ile Asp Leu Pro
 450 455 460
 Tyr Leu Pro His Pro Thr Asp Glu Glu Val Ser Glu Tyr His Asp Arg
 465 470 475 480
 Tyr Ile Ala Glu Leu Gln Arg Ile Tyr Asn Glu His Lys Asp Glu Tyr
 485 490 495
 Phe Ile Asp Trp Thr Glu Glu Gly Lys Gly Ala Pro Glu Phe Arg Met
 500 505 510
 Ile Glu

<210> 3
 <211> 7270
 <212> DNA
 <213> 解脂耶氏酵母
 <400> 3

[0004]

atgcgactgc aattgaggac actaacacgt cggtttttca ggtgagtaaa cgacgggtggc	60
cgtggccacg acagccgagg cgtcacgatg gccagacga gcacattctc gccgcacaaa	120
ccctgccagc acaagaaact aaccagtat ggcttcagga tcttcaacgc cagatgtggc	180
tcccttggtg gacccaaca ttacaaaagg tctcgctctt catttctttg gactcaatte	240
tgtccacaca gccaaagccct caaaagtcaa ggagtttgtg gcttctcagc gaggtcatac	300
agttatcaac aaggtagta ttgacgttt agactgtata acaggcgcc gcagtgaac	360
aacgaccaaa aagggtcgaa aaagggtcga aaacggacac aaaagctgga aaacaagagt	420
gtaatacatt ctacacgtc caattgttag acaaacacgg ctgttcggtc ccaaaaccac	480
cagtatcacc tattttccac ttgtgtctcg gatctgatca taatctgac tcaagatgaa	540
atttaccca ccgacatgat attgtgattt tcggattctc cagaccgagc agattccagc	600
aataccacca ctgcccacc ttacgggcc tctcggcgcg atcgccact ttcccacacg	660
agtggtacia acccaggctc tcatcgctaa caacggtatt gccgcagtaa aggagatccg	720
ttcagiacga aaatgggctt acgagacctt tggcgacgag cgagcaatct cgttcaccgt	780
catggccacc ccgaagatc tcgtgccaa cgcgactac attagaatgg ccgatcagta	840
cgtcgagggtg cccggaggaa ccaacaacaa caactacgcc aacgtcgagc tgattgtcga	900
cgtggctgag cgattcggcg tcgatccgt gtgggccgga tggggccatg ccagtgaana	960
tccccgtctc cccgagtcgc tagcgccctc tccccgaag attgtcttca tcggccctcc	1020
cggagctgcc atgagatctc tgggagacaa aatttcttct accattgttg cccagcacgc	1080
aaaggtcccg tgtatccgtt ggtctggaac cggagtggac gaggttgttg ttgacaagag	1140
caccaacctc gtgtccgtgt ccgaggaggt gtacaccaag gctgcacca ccggtcccaa	1200
gcagggtctg gagaaggcta agcagatttg attccccgtg atgatcaagg ctcccgaggg	1260
aggaggagga aagggtattc gaaaggttga gcgagaggag gacttcgagg ctgcttacca	1320
ccaggctcag ggagagatcc ccggtcgcgc catcttcatt atgcagcttg caggcaatgc	1380
ccggcatttg gaggtgcagc ttctggctga tcagtacggc aacaatattt cactgttttg	1440
tcgagattgt tcggttcagc gacggcatca aaagattatt gaggaggctc ctgtgactgt	1500
ggtcgccag cagaccttca ctgccatgga gaaggctgce gtgcgactcg gtaagcttgt	1560
cggatatgtc tctgcaggta ccgttgaaata tctgtattcc catgaggacg acaagttcta	1620
cttcttggag ctgaatcctc gtcttcaggf cgaacatcct accaccgaga tggtcaccgg	1680
tgtaacctg cccgtgcgc agcttcagat cgcctagggt atccccctcg atcgaatcaa	1740
ggacattcgt ctcttttacg gtgttaaccc tcacaccacc actccaattg atttcgaatt	1800
ctcgggcgag gatgtgata agacacagcg acgtcccgtc ccccagggtc acaccactgc	1860
ttgccgaatc acatccgagg accctggaga gggtttcaag ccttcggag gtactatgca	1920
cgagctcaac ttccgactct cgtccaacgt gtggggttac ttctccgttg gtaaccaggg	1980
aggtatccat tcgttctcgg attcgcagtt tggtcacatc ttgccttcg gtgagaaccg	2040
aagtgcgtct cgaagcaca tggttgttgc ttgaaggaa ctatctatc gaggtgaatt	2100
ccgaaccacc gtcgagtacc tcatcaagct gctggagaca ccgacttcg aggacaacac	2160
catcaccacc ggctggctgg atgagcttat ctccaacaag ctgactgccg agcgacccga	2220
ctcgttcttc gctgttgttt ggggtgctgc taccaaggcc catcgagctt ccgaggactc	2280

[0005]

tattgccacc tacatggctt cgctagagaa gggccaggtc cctgctcgag acattctcaa	2340
gacccttttc cccgttgact tcatctacga gggccagcgg tacaagtica ccgccaccgc	2400
gtcgtctgag gactcttaca cgctgttcac caacggttct ccatgacgaca ttggagttag	2460
acctctttct gacggtgga ttctgtgtct tctagggtgg agateccaca atgtctactg	2520
gaaggaggag gtggagacca cgcgactgtc ttgtgactcc aagacctgcc ttctcgaggt	2580
ggagaacgac cccactcagc ttcatctcc cttctcccggt aagctggita agttctgtgt	2640
cgagaacggc gaccacgtgc gagecaacca gcccctatgc gagattgagg tcatgaagat	2700
gtacatgact ctactgtc aggaggacgg tatgtccag ctgatgaage agcccggttc	2760
caccatcgag gtggcgaca tctctggtat ctggccctt gatgatctt ccaaggtaaa	2820
gcatgccaag ccttttgagg gccagcttc cgagcttga ccccccactc tcagcggtaa	2880
caagctcat cagcgatac agcacigcca gaacgtgtc cataacattc tgcttggttt	2940
cgataaccag gtggtgatga agtccactct tcaggagatg gtggctgtc tccgaaacct	3000
tgagcttctt tatctccagt gggtcatca ggtgtctct ctgcacacct gaatgagcgc	3060
caagctggat gctactcttg ctggtctcat tgacaaggcc aagcagcgag gtggcgagtt	3120
tcctgccaa gacgtctgtc gageccttga gaaggaggcg agctctggcg aggtcgatgc	3180
gtctctccag caaactcttg ctctctgtt tgaccttgc cgagagtacc aggacggtct	3240
tgctatccac gacttcagg ttgtgcagg cttctgcag gcctactacg actctgaggc	3300
ccggttctgc ggaccaacg tactgtacga ggatgtcatt ctcaagcttc gagaggagaa	3360
ccgagattct ctgcgaaagg ttgtgatgc ccagctgtct cattctcgag tcggagccaa	3420
gaacaacctt gtgtggccc ttctcgatga atacaagggt gccgaccagg ctggcaccga	3480
ctctctcgc tccaacgtgc acgttgcaaa gtacttgcga cctgtgtgtc gaaagattgt	3540
ggagctggaa tctcgagctt ctgccaaggt atctctgaaa gcccagaga ttctcatcca	3600
gtgcgtctg cctctctaa aggagcgaa tgaccagctt gacacattc tgcgatctc	3660
tgtctcgag tctcgatac gagaggttg tctggagcac cgaactcccc gagccgatat	3720
tctcaaggag gtgtctgact ccaagtacat tgtctttgat gtgttgccc agttctttgc	3780
ccacgatgat ccctggatc tcttctgtc cctggagctg tacatccgac gactttgcaa	3840
ggcctactcc atcttgaca tcaactacca ccaggactcg gacctgcctc ccgtcatctc	3900
gtggcgattt agactgccta ccatgtgtc tctttgtac aactcagtag tctctctgg	3960
ctccaaaacc cccacttccc cctcgggtgc tcgagctgat tccgtctccg acttttcgta	4020
caccgttgag cgagactctg ctcccgtcg aaccggagcg attgttgccg tgcctcatct	4080
ggatgatctg gaggatgtc tgactcgtgt tctggagaac ctgcccaaac ggggcgtgg	4140
tcttgccatc tctgttggtg ctgacaacaa gactgccgt gctctgtct gtgacgtgc	4200
tgctgtgcc gcttcactcg ttgacactgg cctgtccaac atttgcaac ttatgattgg	4260
tcgggttgat gactctgat acgacgacac tctgattgcc cgaatctccc aggtcattga	4320
ggactttaag gaggactttg aggcctgtt tctgcgacga atcaacttct ccttcggcaa	4380
ctcccagggt acttatecca agtatttca gttccgagc cccgatac agaggaccc	4440
cactatccga cacattgagc ctgctctggc ctccagctg gagctcgccc gtctgtccaa	4500
cttcgacatc aagctgtcc acaccgaaa ccgaaacatc cactgttacg aggtacttgg	4560

[0006]

caagaacgct gcttccgaca agcgggttctt caccagaggt atcgtacgac ctggtcgtct	4620
tcgagagaac atceccacct cggagtatct catttccgag gctgaccggc tcatgagcga	4680
tattttggac gccttagagg tgattggaac caccaactcg gatctcaacc acattttcat	4740
caacttctca gccgtctttg ctctgaagcc cgaggaggtt gaagctgcct ttggcggttt	4800
ccggagcga ttggccgac gctctggcg acttcgagtc accggcgccg agatccgaat	4860
gaiggtatcc gaccccgaaa ctggtctctg ttccctctg cgagcaatga tcaacaacgt	4920
ctctggttac gtgtgcagt ctgagctgta cgtgaggcc aagaacgaca agggccagtg	4980
gattttcaag tctctgggca agcccggctc catgcacatg cggctctatca acactcccta	5040
ccccaccaag gattggctgc agcccaagcg gtacaaggcc catctgatgg gtaccaacta	5100
ctgctatgac ttcccggagc tgttccgaca gtccattgag tcggactgga agaagtatga	5160
cggcaaggct cccgacgac tcatgacttg caacgagctg attctcgatg aggactctgg	5220
cgagctgcag gaggtaaac gagagcccgg cgccaacaac gtcggtatgg ttgcgtggaa	5280
gtttgaggcc aagaccccc agtacctcg aggccgatct ttcatcgtgg tggccaacga	5340
tateaccttc cagattgggt cgtttggccc tctgaggac cagttctct tcaaggtagc	5400
ggagctggtc cgaagctcg gtattcctcg aatctatctg tctgccaact ctggtgctcg	5460
aatcggcatt gctgacgagc tcgttggcaa gtacaaggtt gcgtggaac acgagactga	5520
ccccccaag gccttcaagt acctttactt caccctgag tctcttgcca cctcaagcc	5580
cgacactggt gtcaccactg agattgagga ggagggtccc aacggcgtgg agaagcgtca	5640
tgigatcgac tacattgtcg gagagaagga cggctcggga gtcgagtgtc tgcggggctc	5700
tggtctcatt gcaggcgcca ctctcagac ctacaaggat atcttctactc tcactcttgt	5760
cacctgtcga tccgttggta tcggtgetta ccttgttcgt ctgggcaac gagccatcca	5820
gattgagggc cagcccatca ttctactgg tgccecgcc atcaacaagc tgccttggtcg	5880
agaggtctac tcttccaact tgcagcttgg tggtaactcag atcatgtaca acaacggtgt	5940
gtctcatctg actgcccagc atgatctcaa cgggtgccac aagatcatgc agtggcgtc	6000
atacatccct gcttctcgag gtcttcaggt gcctgttctc cctcacaaga ccgaigtgtg	6060
ggatcgagac gtgacgttcc agcctgtccg aggcgagcag tacgatgtta gatggttat	6120
ttctggccga actctcgagg atggtgttt cagctctggt ctcttgaca aggaactttt	6180
ccaggagact ctgtctggtt ggccaagggt tgttgttgtt ggtcgagctc gtcttgccg	6240
cattcccttc ggtgtcattg gtgtcgagac tgcgaccgtc gacaatacta cccctgccga	6300
tcgcccaac ccgactctta ttgagatgag cactctgaa gccggccagg ttgggtacce	6360
caactcggcc ttcaagacct ctccagccat caacgacttc aacctgggtg aggcgcttcc	6420
tcctatgatt ctgtctaact ggcgaggctt ttctgggtgt cagcgagaca tgtacaatga	6480
ggttctcaag tacggatctt tcattgttga tgctctgggt gactacaagc agcccatcat	6540
gggttacatc cctcccaacc gtgagctgcg aggtgttctt tgggttgttg ttgaacccac	6600
catcaactcg gacatgatgg agatgtacgc tgacgtcgag tctcgagggt gtgtgtctga	6660
gccccaggga atggtcggtt tcaagtaccg acgagacaag ctactggaca ccatggctcg	6720
tcctgatccc gactactcct ctctcaagaa gcagcttgag gactctccc atcttgagga	6780
gtcaangtc aagctcagcg tgcgagagaa gtctctcatg cccatctacc agcagatctc	6840

[0007]

```

cgtgcagttt gccgacttgc atgaccgagc tggccgaatg gaggccaagg gtgtcattcg      6900
tgaggctctt gtgtggaagg atgctcgtcg attcttcttc tggcgaatcc gacgacgatt      6960
agtcgaggag taccicatta ccaagatcaa tagcattctg cctctttgca ctcggttga      7020
gtgtctggct cgaatcaagt cgtggaagcc tgccactctt gatcagggct ctgaccgggg      7080
tgttgccgag tsgtttgacg agaactctga tgccgictct gctcgactca gcgagctcaa      7140
gaaggacgct tctgcccagt cgtttgcttc tcaactgaga aaggaccgac agggctactct      7200
ccagggcatt aagcaggctc tcgtttctct ttctgagget gagcgggctg agctgctcaa      7260
ggggttgtga                                     7270

```

<210> 4
 <211> 2266
 <212> PRT
 <213> 解脂耶氏酵母

<400> 4

```

Met Arg Leu Gln Leu Arg Thr Leu Thr Arg Arg Phe Phe Ser Met Ala
1          5          10          15

```

```

Ser Gly Ser Ser Thr Pro Asp Val Ala Pro Leu Val Asp Pro Asn Ile
20          25          30

```

```

His Lys Gly Leu Ala Ser His Phe Phe Gly Leu Asn Ser Val His Thr
35          40          45

```

```

Ala Lys Pro Ser Lys Val Lys Glu Phe Val Ala Ser His Gly Gly His
50          55          60

```

```

Thr Val Ile Asn Lys Val Leu Ile Ala Asn Asn Gly Ile Ala Ala Val
65          70          75          80

```

```

Lys Glu Ile Arg Ser Val Arg Lys Trp Ala Tyr Glu Thr Phe Gly Asp
85          90          95

```

```

Glu Arg Ala Ile Ser Phe Thr Val Met Ala Thr Pro Glu Asp Leu Ala
100         105         110

```

```

Ala Asn Ala Asp Tyr Ile Arg Met Ala Asp Gln Tyr Val Glu Val Pro
115         120         125

```

```

Gly Gly Thr Asn Asn Asn Asn Tyr Ala Asn Val Glu Leu Ile Val Asp
130         135         140

```

```

Val Ala Glu Arg Phe Gly Val Asp Ala Val Trp Ala Gly Trp Gly His
145         150         155         160

```

```

Ala Ser Glu Asn Pro Leu Leu Pro Glu Ser Leu Ala Ala Ser Pro Arg
165         170         175

```

```

Lys Ile Val Phe Ile Gly Pro Pro Gly Ala Ala Met Arg Ser Leu Gly
180         185         190

```

```

Asp Lys Ile Ser Ser Thr Ile Val Ala Gln His Ala Lys Val Pro Cys
195         200         205

```

[0008]

```

Ile Pro Trp Ser Gly Thr Gly Val Asp Glu Val Val Val Asp Lys Ser
210                215                220

Thr Asn Leu Val Ser Val Ser Glu Glu Val Tyr Thr Lys Gly Cys Thr
225                230                235                240

Thr Gly Pro Lys Gln Gly Leu Glu Lys Ala Lys Gln Ile Gly Phe Pro
                245                250                255

Val Met Ile Lys Ala Ser Glu Gly Gly Gly Gly Lys Gly Ile Arg Lys
                260                265                270

Val Glu Arg Glu Glu Asp Phe Glu Ala Ala Tyr His Gln Val Glu Gly
                275                280                285

Glu Ile Pro Gly Ser Pro Ile Phe Ile Met Gln Leu Ala Gly Asn Ala
290                295                300

Arg His Leu Glu Val Gln Leu Leu Ala Asp Gln Tyr Gly Asn Asn Ile
305                310                315                320

Ser Leu Phe Gly Arg Asp Cys Ser Val Gln Arg Arg His Gln Lys Ile
                325                330                335

Ile Glu Glu Ala Pro Val Thr Val Ala Gly Gln Gln Thr Phe Thr Ala
                340                345                350

Met Glu Lys Ala Ala Val Arg Leu Gly Lys Leu Val Gly Tyr Val Ser
                355                360                365

Ala Gly Thr Val Glu Tyr Leu Tyr Ser His Glu Asp Asp Lys Phe Tyr
370                375                380

Phe Leu Glu Leu Asn Pro Arg Leu Gln Val Glu His Pro Thr Thr Glu
385                390                395                400

Met Val Thr Gly Val Asn Leu Pro Ala Ala Gln Leu Gln Ile Ala Met
                405                410                415

Gly Ile Pro Leu Asp Arg Ile Lys Asp Ile Arg Leu Phe Tyr Gly Val
                420                425                430

Asn Pro His Thr Thr Thr Pro Ile Asp Phe Asp Phe Ser Gly Glu Asp
                435                440                445

Ala Asp Lys Thr Gln Arg Arg Pro Val Pro Arg Gly His Thr Thr Ala
450                455                460

Cys Arg Ile Thr Ser Glu Asp Pro Gly Glu Gly Phe Lys Pro Ser Gly
465                470                475                480

Gly Thr Met His Glu Leu Asn Phe Arg Ser Ser Ser Asn Val Trp Gly
                485                490                495

Tyr Phe Ser Val Gly Asn Gln Gly Gly Ile His Ser Phe Ser Asp Ser
                500                505                510

```

[0009]

Gln Phe Gly His Ile Phe Ala Phe Gly Glu Asn Arg Ser Ala Ser Arg
 515 520 525
 Lys His Met Val Val Ala Leu Lys Glu Leu Ser Ile Arg Gly Asp Phe
 530 535 540
 Arg Thr Thr Val Glu Tyr Leu Ile Lys Leu Leu Glu Thr Pro Asp Phe
 545 550 555 560
 Glu Asp Asn Thr Ile Thr Thr Gly Trp Leu Asp Glu Leu Ile Ser Asn
 565 570 575
 Lys Leu Thr Ala Glu Arg Pro Asp Ser Phe Leu Ala Val Val Cys Gly
 580 585 590
 Ala Ala Thr Lys Ala His Arg Ala Ser Glu Asp Ser Ile Ala Thr Tyr
 595 600 605
 Met Ala Ser Leu Glu Lys Gly Gln Val Pro Ala Arg Asp Ile Leu Lys
 610 615 620
 Thr Leu Phe Pro Val Asp Phe Ile Tyr Glu Gly Gln Arg Tyr Lys Phe
 625 630 635 640
 Thr Ala Thr Arg Ser Ser Glu Asp Ser Tyr Thr Leu Phe Ile Asn Gly
 645 650 655
 Ser Arg Cys Asp Ile Gly Val Arg Pro Leu Ser Asp Gly Gly Ile Leu
 660 665 670
 Cys Leu Val Gly Gly Arg Ser His Asn Val Tyr Trp Lys Glu Glu Val
 675 680 685
 Gly Ala Thr Arg Leu Ser Val Asp Ser Lys Thr Cys Leu Leu Glu Val
 690 695 700
 Glu Asn Asp Pro Thr Gln Leu Arg Ser Pro Ser Pro Gly Lys Leu Val
 705 710 715 720
 Lys Phe Leu Val Glu Asn Gly Asp His Val Arg Ala Asn Gln Pro Tyr
 725 730 735
 Ala Glu Ile Glu Val Met Lys Met Tyr Met Thr Leu Thr Ala Gln Glu
 740 745 750
 Asp Gly Ile Val Gln Leu Met Lys Gln Pro Gly Ser Thr Ile Glu Ala
 755 760 765
 Gly Asp Ile Leu Gly Ile Leu Ala Leu Asp Asp Pro Ser Lys Val Lys
 770 775 780
 His Ala Lys Pro Phe Glu Gly Gln Leu Pro Glu Leu Gly Pro Pro Thr
 785 790 795 800
 Leu Ser Gly Asn Lys Pro His Gln Arg Tyr Glu His Cys Gln Asn Val
 805 810 815

[0010]

Leu His Asn Ile Leu Leu Gly Phe Asp Asn Gln Val Val Met Lys Ser
 820 825 830
 Thr Leu Gln Glu Met Val Gly Leu Leu Arg Asn Pro Glu Leu Pro Tyr
 835 840 845
 Leu Gln Trp Ala His Gln Val Ser Ser Leu His Thr Arg Met Ser Ala
 850 855 860
 Lys Leu Asp Ala Thr Leu Ala Gly Leu Ile Asp Lys Ala Lys Gln Arg
 865 870 875 880
 Gly Gly Glu Phe Pro Ala Lys Gln Leu Leu Arg Ala Leu Glu Lys Glu
 885 890 895
 Ala Ser Ser Gly Glu Val Asp Ala Leu Phe Gln Gln Thr Leu Ala Pro
 900 905 910
 Leu Phe Asp Leu Ala Arg Glu Tyr Gln Asp Gly Leu Ala Ile His Glu
 915 920 925
 Leu Gln Val Ala Ala Gly Leu Leu Gln Ala Tyr Tyr Asp Ser Glu Ala
 930 935 940
 Arg Phe Cys Gly Pro Asn Val Arg Asp Glu Asp Val Ile Leu Lys Leu
 945 950 955 960
 Arg Glu Glu Asn Arg Asp Ser Leu Arg Lys Val Val Met Ala Gln Leu
 965 970 975
 Ser His Ser Arg Val Gly Ala Lys Asn Asn Leu Val Leu Ala Leu Leu
 980 985 990
 Asp Glu Tyr Lys Val Ala Asp Gln Ala Gly Thr Asp Ser Pro Ala Ser
 995 1000 1005
 Asn Val His Val Ala Lys Tyr Leu Arg Pro Val Leu Arg Lys Ile
 1010 1015 1020
 Val Glu Leu Glu Ser Arg Ala Ser Ala Lys Val Ser Leu Lys Ala
 1025 1030 1035
 Arg Glu Ile Leu Ile Gln Cys Ala Leu Pro Ser Leu Lys Glu Arg
 1040 1045 1050
 Thr Asp Gln Leu Glu His Ile Leu Arg Ser Ser Val Val Glu Ser
 1055 1060 1065
 Arg Tyr Gly Glu Val Gly Leu Glu His Arg Thr Pro Arg Ala Asp
 1070 1075 1080
 Ile Leu Lys Glu Val Val Asp Ser Lys Tyr Ile Val Phe Asp Val
 1085 1090 1095
 Leu Ala Gln Phe Phe Ala His Asp Asp Pro Trp Ile Val Leu Ala
 1100 1105 1110

[0011]

Ala Leu Glu Leu Tyr Ile Arg 1115	Arg Ala Cys Lys Ala Tyr Ser Ile 1120	
Leu Asp Ile Asn Tyr His Gln 1130	Asp Ser Asp Leu Pro Pro Val Ile 1135	
Ser Trp Arg Phe Arg Leu Pro 1145	Thr Met Ser Ser Ala Leu Tyr Asn 1150	
Ser Val Val Ser Ser Gly Ser 1160	Lys Thr Pro Thr Ser Pro Ser Val 1165	
Ser Arg Ala Asp Ser Val Ser 1175	Asp Phe Ser Tyr Thr Val Glu Arg 1180	
Asp Ser Ala Pro Ala Arg Thr 1190	Gly Ala Ile Val Ala Val Pro His 1195	
Leu Asp Asp Leu Glu Asp Ala 1205	Leu Thr Arg Val Leu Glu Asn Leu 1210	
Pro Lys Arg Gly Ala Gly Leu 1220	Ala Ile Ser Val Gly Ala Ser Asn 1225	
Lys Ser Ala Ala Ala Ser Ala 1235	Arg Asp Ala Ala Ala Ala Ala Ala 1240	
Ser Ser Val Asp Thr Gly Leu 1250	Ser Asn Ile Cys Asn Val Met Ile 1255	
Gly Arg Val Asp Glu Ser Asp 1265	Asp Asp Asp Thr Leu Ile Ala Arg 1270	
Ile Ser Gln Val Ile Glu Asp 1280	Phe Lys Glu Asp Phe Glu Ala Cys 1285	
Ser Leu Arg Arg Ile Thr Phe 1295	Ser Phe Gly Asn Ser Arg Gly Thr 1300	
Tyr Pro Lys Tyr Phe Thr Phe 1310	Arg Gly Pro Ala Tyr Glu Glu Asp 1315	
Pro Thr Ile Arg His Ile Glu 1325	Pro Ala Leu Ala Phe Gln Leu Glu 1330	
Leu Ala Arg Leu Ser Asn Phe 1340	Asp Ile Lys Pro Val His Thr Asp 1345	
Asn Arg Asn Ile His Val Tyr 1355	Glu Ala Thr Gly Lys Asn Ala Ala 1360	
Ser Asp Lys Arg Phe Phe Thr 1370	Arg Gly Ile Val Arg Pro Gly Arg 1375	
Leu Arg Glu Asn Ile Pro Thr 1385	Ser Glu Tyr Leu Ile Ser Glu Ala 1390	

[0012]

Asp Arg Leu Met Ser Asp Ile Leu Asp Ala Leu Glu Val Ile Gly 1400 1405 1410
Thr Thr Asn Ser Asp Leu Asn His Ile Phe Ile Asn Phe Ser Ala 1415 1420 1425
Val Phe Ala Leu Lys Pro Glu Glu Val Glu Ala Ala Phe Gly Gly 1430 1435 1440
Phe Leu Glu Arg Phe Gly Arg Arg Leu Trp Arg Leu Arg Val Thr 1445 1450 1455
Gly Ala Glu Ile Arg Met Met Val Ser Asp Pro Glu Thr Gly Ser 1460 1465 1470
Ala Phe Pro Leu Arg Ala Met Ile Asn Asn Val Ser Gly Tyr Val 1475 1480 1485
Val Gln Ser Glu Leu Tyr Ala Glu Ala Lys Asn Asp Lys Gly Gln 1490 1495 1500
Trp Ile Phe Lys Ser Leu Gly Lys Pro Gly Ser Met His Met Arg 1505 1510 1515
Ser Ile Asn Thr Pro Tyr Pro Thr Lys Glu Trp Leu Gln Pro Lys 1520 1525 1530
Arg Tyr Lys Ala His Leu Met Gly Thr Thr Tyr Cys Tyr Asp Phe 1535 1540 1545
Pro Glu Leu Phe Arg Gln Ser Ile Glu Ser Asp Trp Lys Lys Tyr 1550 1555 1560
Asp Gly Lys Ala Pro Asp Asp Leu Met Thr Cys Asn Glu Leu Ile 1565 1570 1575
Leu Asp Glu Asp Ser Gly Glu Leu Gln Glu Val Asn Arg Glu Pro 1580 1585 1590
Gly Ala Asn Asn Val Gly Met Val Ala Trp Lys Phe Glu Ala Lys 1595 1600 1605
Thr Pro Glu Tyr Pro Arg Gly Arg Ser Phe Ile Val Val Ala Asn 1610 1615 1620
Asp Ile Thr Phe Gln Ile Gly Ser Phe Gly Pro Ala Glu Asp Gln 1625 1630 1635
Phe Phe Phe Lys Val Thr Glu Leu Ala Arg Lys Leu Gly Ile Pro 1640 1645 1650
Arg Ile Tyr Leu Ser Ala Asn Ser Gly Ala Arg Ile Gly Ile Ala 1655 1660 1665
Asp Glu Leu Val Gly Lys Tyr Lys Val Ala Trp Asn Asp Glu Thr 1670 1675 1680

[0013]

Asp Pro Ser Lys Gly Phe Lys Tyr Leu Tyr Phe Thr Pro Glu Ser 1685 1690 1695	
Leu Ala Thr Leu Lys Pro Asp Thr Val Val Thr Thr Glu Ile Glu 1700 1705 1710	
Glu Glu Gly Pro Asn Gly Val Glu Lys Arg His Val Ile Asp Tyr 1715 1720 1725	
Ile Val Gly Glu Lys Asp Gly Leu Gly Val Glu Cys Leu Arg Gly 1730 1735 1740	
Ser Gly Leu Ile Ala Gly Ala Thr Ser Arg Ala Tyr Lys Asp Ile 1745 1750 1755	
Phe Thr Leu Thr Leu Val Thr Cys Arg Ser Val Gly Ile Gly Ala 1760 1765 1770	
Tyr Leu Val Arg Leu Gly Gln Arg Ala Ile Gln Ile Glu Gly Gln 1775 1780 1785	
Pro Ile Ile Leu Thr Gly Ala Pro Ala Ile Asn Lys Leu Leu Gly 1790 1795 1800	
Arg Glu Val Tyr Ser Ser Asn Leu Gln Leu Gly Gly Thr Gln Ile 1805 1810 1815	
Met Tyr Asn Asn Gly Val Ser His Leu Thr Ala Arg Asp Asp Leu 1820 1825 1830	
Asn Gly Val His Lys Ile Met Gln Trp Leu Ser Tyr Ile Pro Ala 1835 1840 1845	
Ser Arg Gly Leu Pro Val Pro Val Leu Pro His Lys Thr Asp Val 1850 1855 1860	
Trp Asp Arg Asp Val Thr Phe Gln Pro Val Arg Gly Glu Gln Tyr 1865 1870 1875	
Asp Val Arg Trp Leu Ile Ser Gly Arg Thr Leu Glu Asp Gly Ala 1880 1885 1890	
Phe Glu Ser Gly Leu Phe Asp Lys Asp Ser Phe Gln Glu Thr Leu 1895 1900 1905	
Ser Gly Trp Ala Lys Gly Val Val Val Gly Arg Ala Arg Leu Gly 1910 1915 1920	
Gly Ile Pro Phe Gly Val Ile Gly Val Glu Thr Ala Thr Val Asp 1925 1930 1935	
Asn Thr Thr Pro Ala Asp Pro Ala Asn Pro Asp Ser Ile Glu Met 1940 1945 1950	
Ser Thr Ser Glu Ala Gly Gln Val Trp Tyr Pro Asn Ser Ala Phe 1955 1960 1965	

[0014]

Lys Thr Ser Gln Ala Ile Asn Asp Phe Asn His Gly Glu Ala Leu 1970 1975 1980
Pro Leu Met Ile Leu Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly Gly Gln 1985 1990 1995
Arg Asp Met Tyr Asn Glu Val Leu Lys Tyr Gly Ser Phe Ile Val 2000 2005 2010
Asp Ala Leu Val Asp Tyr Lys Gln Pro Ile Met Val Tyr Ile Pro 2015 2020 2025
Pro Thr Gly Glu Leu Arg Gly Gly Ser Trp Val Val Val Asp Pro 2030 2035 2040
Thr Ile Asn Ser Asp Met Met Glu Met Tyr Ala Asp Val Glu Ser 2045 2050 2055
Arg Gly Gly Val Leu Glu Pro Glu Gly Met Val Gly Ile Lys Tyr 2060 2065 2070
Arg Arg Asp Lys Leu Leu Asp Thr Met Ala Arg Leu Asp Pro Glu 2075 2080 2085
Tyr Ser Ser Leu Lys Lys Gln Leu Glu Glu Ser Pro Asp Ser Glu 2090 2095 2100
Glu Leu Lys Val Lys Leu Ser Val Arg Glu Lys Ser Leu Met Pro 2105 2110 2115
Ile Tyr Gln Gln Ile Ser Val Gln Phe Ala Asp Leu His Asp Arg 2120 2125 2130
Ala Gly Arg Met Glu Ala Lys Gly Val Ile Arg Glu Ala Leu Val 2135 2140 2145
Trp Lys Asp Ala Arg Arg Phe Phe Phe Trp Arg Ile Arg Arg Arg 2150 2155 2160
Leu Val Glu Glu Tyr Leu Ile Thr Lys Ile Asn Ser Ile Leu Pro 2165 2170 2175
Ser Cys Thr Arg Leu Glu Cys Leu Ala Arg Ile Lys Ser Trp Lys 2180 2185 2190
Pro Ala Thr Leu Asp Gln Gly Ser Asp Arg Gly Val Ala Glu Trp 2195 2200 2205
Phe Asp Glu Asn Ser Asp Ala Val Ser Ala Arg Leu Ser Glu Leu 2210 2215 2220
Lys Lys Asp Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ala Ser Gln Leu Arg Lys 2225 2230 2235
Asp Arg Gln Gly Thr Leu Gln Gly Met Lys Gln Ala Leu Ala Ser 2240 2245 2250

[0015]

Leu Ser Glu Ala Glu Arg Ala Glu Leu Leu Lys Gly Leu
2255 2260 2265

<210> 5
<211> 1449
<212> DNA
<213> 解脂耶氏酵母

<400> 5
atggtgaaaa acgtggacca agtggatctc tcgcaggctc acaccattgc ctccggccga 60
gatgtcaact acaagggtcaa gtacacctcc ggcgttaaga tgagccaggc cgcttacgac 120
gacaagggcc gccacatttc cgagcagccc ttacactggc ccaactggca ccagcacatc 180
aactggctca acttcattct ggtgattgct ctgcctctgt cgtcctttgc tgcgctccc 240
ttcgtctcct tcaactggaa gaccgccgct ttgtctgctg gctattacat gtgcaccggt 300
ctcgggtatca ccgcggcta ccaccgaatg tgggcccatc gagcctacaa ggccgctctg 360
cccgttcgaa tcatecttgc tctgtttgga ggaggagctg tcgagggtct catccgatgg 420
tgggcctcgt ctacccgagt ccaccaccga tggaccgact ccaacaagga cccttacgac 480
gcccgaagg gattctggtt ctcccacttt ggcctggaic tgccttgccc caacccaag 540
aacaagggcc gaactgacat ttctgacctc aacaacgact gggttgtccg actccagcac 600
aagtactacg ttacggttct cgtcttcatt gccattgttc tgcccacctt cgtctgtgce 660
tttggctggg gcgactggaa gggaggtctt gtctacgccg gtatcatgct atacaccttt 720
gtgcagcagg tgactttctg tgtcaactcc ctgtcccact ggattggaga gcagcccttc 780
gacgaccgac gaactccccg agaccacgct ctaccgccc tggtcacctt tggagagggc 840
taccacaact tccaccacga gtccctctcg gactaccgaa acgcccctat ctggtaccag 900
tacgacccca ccaagtggct catctggacc ctcaagcagg ttggtctcgc ctgggacctc 960
cagaccttct ccagaacgc catcgagcag ggtctcgtgc agcagcgaca gaagaagctg 1020
gacaagtggc gaaacaacct caactggggt atccccattg agcagctgcc tgcattgag 1080
tttgaggagt tccaagagca ggccaagacc cgagatctgg ttctcatttc tggcattgtc 1140
cacgacgtgt ctgcctttgt cgagcaccac cctgggtgaa aggccctcat taigagcgcc 1200
gtcggcaagg acggtaccgc tgtcttcaac ggagggtctt accgacactc caacgtggc 1260
cacaacctgc ttgccaccat gcgagtttgc gtcattcgag gcggcatgga ggttgaggtg 1320
tggaagactg ccagaacga aaagaaggac cagaacattg tctccgatga gagtggaaac 1380
cgaatccacc gagctggtct ccaggccacc cgggtcgaga accccggtat gtctggcatg 1440
gtctgcttag 1449

<210> 6
<211> 482
<212> PRT
<213> 解脂耶氏酵母

<400> 6

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

Ala Ser Gly Arg Asp Val Asn Tyr Lys Val Lys Tyr Thr Ser Gly Val
20 25 30

[0016]

Lys Met Ser Gln Gly Ala Tyr Asp Asp Lys Gly Arg His Ile Ser Glu
 35 40 45
 Gln Pro Phe Thr Trp Ala Asn Trp His Gln His Ile Asn Trp Leu Asn
 50 55 60
 Phe Ile Leu Val Ile Ala Leu Pro Leu Ser Ser Phe Ala Ala Ala Pro
 65 70 75 80
 Phe Val Ser Phe Asn Trp Lys Thr Ala Ala Phe Ala Val Gly Tyr Tyr
 85 90 95
 Met Cys Thr Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Tyr His Arg Met Trp Ala
 100 105 110
 His Arg Ala Tyr Lys Ala Ala Leu Pro Val Arg Ile Ile Leu Ala Leu
 115 120 125
 Phe Gly Gly Gly Ala Val Glu Gly Ser Ile Arg Trp Trp Ala Ser Ser
 130 135 140
 His Arg Val His His Arg Trp Thr Asp Ser Asn Lys Asp Pro Tyr Asp
 145 150 155 160
 Ala Arg Lys Gly Phe Trp Phe Ser His Phe Gly Trp Met Leu Leu Val
 165 170 175
 Pro Asn Pro Lys Asn Lys Gly Arg Thr Asp Ile Ser Asp Leu Asn Asn
 180 185 190
 Asp Trp Val Val Arg Leu Gln His Lys Tyr Tyr Val Tyr Val Leu Val
 195 200 205
 Phe Met Ala Ile Val Leu Pro Thr Leu Val Cys Gly Phe Gly Trp Gly
 210 215 220
 Asp Trp Lys Gly Gly Leu Val Tyr Ala Gly Ile Met Arg Tyr Thr Phe
 225 230 235 240
 Val Gln Gln Val Thr Phe Cys Val Asn Ser Leu Ala His Trp Ile Gly
 245 250 255
 Glu Gln Pro Phe Asp Asp Arg Arg Thr Pro Arg Asp His Ala Leu Thr
 260 265 270
 Ala Leu Val Thr Phe Gly Glu Gly Tyr His Asn Phe His His Glu Phe
 275 280 285
 Pro Ser Asp Tyr Arg Asn Ala Leu Ile Trp Tyr Gln Tyr Asp Pro Thr
 290 295 300
 Lys Trp Leu Ile Trp Thr Leu Lys Gln Val Gly Leu Ala Trp Asp Leu
 305 310 315 320
 Gln Thr Phe Ser Gln Asn Ala Ile Glu Gln Gly Leu Val Gln Gln Arg
 325 330 335

[0017]

Gln Lys Lys Leu Asp Lys Trp Arg Asn Asn Leu Asn Trp Gly Ile Pro
340 345 350

Ile Glu Gln Leu Pro Val Ile Glu Phe Glu Glu Phe Gln Glu Gln Ala
355 360 365

Lys Thr Arg Asp Leu Val Leu Ile Ser Gly Ile Val His Asp Val Ser
370 375 380

Ala Phe Val Glu His His Pro Gly Gly Lys Ala Leu Ile Met Ser Ala
385 390 395 400

Val Gly Lys Asp Gly Thr Ala Val Phe Asn Gly Gly Val Tyr Arg His
405 410 415

Ser Asn Ala Gly His Asn Leu Leu Ala Thr Met Arg Val Ser Val Ile
420 425 430

Arg Gly Gly Met Glu Val Glu Val Trp Lys Thr Ala Gln Asn Glu Lys
435 440 445

Lys Asp Gln Asn Ile Val Ser Asp Glu Ser Gly Asn Arg Ile His Arg
450 455 460

Ala Gly Leu Gln Ala Thr Arg Val Glu Asn Pro Gly Met Ser Gly Met
465 470 475 480

Ala Ala

<210> 7
<211> 1953
<212> DNA
<213> 解脂耶氏酵母

<400> 7
atgtctgcc aacagaacat ctcccattc gaagccctg tgggcaagga gcaccccgcc 60
taagagctct tcataacca cacacgatct ttctctatg gtctecagcc tcgagcctgc 120
cagggtatgc tggacttca cttcatctgt aagcagaga accctccgt ggccggtgc 180
atctatccct tcggcgcca gtctctacc aagatgtact ggggcaccaa ggagactctt 240
ctccctgtct accagcaggt cgagaagcc gctgccaage acccagaggt cgatgtcgtg 300
gtcaactttg cctctctcg atccgtctac tctctacca tggagctgct cgagtacccc 360
cagttccgaa ccacgccat tatgcccag ggtgtcccg agcagcagc ccgagagatc 420
ctccacaagg ccagaagaa ggggtgacc atcattggc ccgtaccgt cggaggtatc 480
aagcccggtt gcttcaaggt tggaaacacc ggaggtatga tggacaacat tgcgcctcc 540
aagctctacc gacccggtc cgttgctac gtctccaagt ccgaggaat gtccaacgag 600
ctgaacaaca ttatctctca caccaccgac ggtgtctac aggttatgc tatgtgtgt 660
gaccgatacc ctgttactac ctccattgac catatcctgc gatacagagc cagccccaag 720
tgtaatgca tctctctct tggtaggtt ggtggtgtt agaggtaccg agtcacgag 780
gctgttaaga acggccagat caagaagcc atcgtcgtt ggccattgg tacttgtgcc 840
tccatgttca agactgaggt tcagttcgcc cagcccggt ccatggccaa ctccgacctg 900

[0018]

```

gagactgcc aaggctaagaa cgccgccatg aagtctgctg gcttctacgt ccccgatacc 960
ttcgaggaca tgcggaggt ccttgccgag ctctacgaga agatggtcgc caagggcgag 1020
ctgtctcgaa tctctgagcc tgaggcccc aagatcccc ttgactactc ttgggcccag 1080
gagcttggtc ttatccgaaa gcccgtgct ttcattctca ctatttccga tgaccgaggc 1140
caggagcttc tgtacgtgg catgcccatt tccgaggitt tcaaggagga cattggatc 1200
ggcgggtgca tgtctctgct gtggttccga cgacgactcc ccgactaacc ctccaagttt 1260
cttgagatgg ttctcatgct tactgtcgac caccgtcccc ccgtatccgg tgccatgaac 1320
accattatca ccaccgagc tggtaaggat ctcatctctt ccttggttgc tggctctctg 1380
accattggta cccgattcgg aggtgctctt gacgggtgct ccaccgagtt caccactgcc 1440
tacgacaagg gtctgtcccc ccgacagttc gttgatacca tgcgaaagca gaacaagctg 1500
attcttggtt ttggccatcg agtcaagttt cgaaacaacc ccgatttccg agtcgagctt 1560
gtcaaggact ttgttaagaa gaacttcccc tccaccagc tgcctgacta cgcccttgc 1620
gtcgaggagg tcaccaactc caagaaggac aacctgattc tgaacgttga cgggtctatt 1680
gctgtttctt ttgtcgatct catgcgatct tgcggtgctt ttactgtgga ggagactgag 1740
gactacctca agaacggtgt tctcaacggt ctgttcgttc tgggtcgatc cattgtctc 1800
attgccacc atctcgatca gaagcgactc aagaccggtc tgtaccgaca tcttgggac 1860
gatataacct acctggttgg ccaggaggct atccagaaga agcgagtcca gatcagcgcc 1920
ggcgacgttt ccaaggccaa gactcgatca tag 1953

```

<210> 8
 <211> 650
 <212> PRT
 <213> 解脂耶氏酵母

<400> 8

Met Ser Ala Asn Glu Asn Ile Ser Arg Phe Asp Ala Pro Val Gly Lys
 1 5 10 15

Glu His Pro Ala Tyr Glu Leu Phe His Asn His Thr Arg Ser Phe Val
 20 25 30

Tyr Gly Leu Gln Pro Arg Ala Cys Gln Gly Met Leu Asp Phe Asp Phe
 35 40 45

Ile Cys Lys Arg Glu Asn Pro Ser Val Ala Gly Val Ile Tyr Pro Phe
 50 55 60

Gly Gly Gln Phe Val Thr Lys Met Tyr Trp Gly Thr Lys Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Leu Pro Val Tyr Gln Gln Val Glu Lys Ala Ala Ala Lys His Pro Glu
 85 90 95

Val Asp Val Val Val Asn Phe Ala Ser Ser Arg Ser Val Tyr Ser Ser
 100 105 110

Thr Met Glu Leu Leu Glu Tyr Pro Gln Phe Arg Thr Ile Ala Ile Ile
 115 120 125

[0019]

Ala Glu Gly Val Pro Glu Arg Arg Ala Arg Glu Ile Leu His Lys Ala
 130 135 140
 Gln Lys Lys Gly Val Thr Ile Ile Gly Pro Ala Thr Val Gly Gly Ile
 145 150 155 160
 Lys Pro Gly Cys Phe Lys Val Gly Asn Thr Gly Gly Met Met Asp Asn
 165 170 175
 Ile Val Ala Ser Lys Leu Tyr Arg Pro Gly Ser Val Ala Tyr Val Ser
 180 185 190
 Lys Ser Gly Gly Met Ser Asn Glu Leu Asn Asn Ile Ile Ser His Thr
 195 200 205
 Thr Asp Gly Val Tyr Glu Gly Ile Ala Ile Gly Gly Asp Arg Tyr Pro
 210 215 220
 Gly Thr Thr Phe Ile Asp His Ile Leu Arg Tyr Glu Ala Asp Pro Lys
 225 230 235 240
 Cys Lys Ile Ile Val Leu Leu Gly Glu Val Gly Gly Val Glu Glu Tyr
 245 250 255
 Arg Val Ile Glu Ala Val Lys Asn Gly Gln Ile Lys Lys Pro Ile Val
 260 265 270
 Ala Trp Ala Ile Gly Thr Cys Ala Ser Met Phe Lys Thr Glu Val Gln
 275 280 285
 Phe Gly His Ala Gly Ser Met Ala Asn Ser Asp Leu Glu Thr Ala Lys
 290 295 300
 Ala Lys Asn Ala Ala Met Lys Ser Ala Gly Phe Tyr Val Pro Asp Thr
 305 310 315 320
 Phe Glu Asp Met Pro Glu Val Leu Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Met Val
 325 330 335
 Ala Lys Gly Glu Leu Ser Arg Ile Ser Glu Pro Glu Val Pro Lys Ile
 340 345 350
 Pro Ile Asp Tyr Ser Trp Ala Gln Glu Leu Gly Leu Ile Arg Lys Pro
 355 360 365
 Ala Ala Phe Ile Ser Thr Ile Ser Asp Asp Arg Gly Gln Glu Leu Leu
 370 375 380
 Tyr Ala Gly Met Pro Ile Ser Glu Val Phe Lys Glu Asp Ile Gly Ile
 385 390 395 400
 Gly Gly Val Met Ser Leu Leu Trp Phe Arg Arg Arg Leu Pro Asp Tyr
 405 410 415
 Ala Ser Lys Phe Leu Glu Met Val Leu Met Leu Thr Ala Asp His Gly
 420 425 430

[0020]

Pro Ala Val Ser Gly Ala Met Asn Thr Ile Ile Thr Thr Arg Ala Gly
 435 440 445
 Lys Asp Leu Ile Ser Ser Leu Val Ala Gly Leu Leu Thr Ile Gly Thr
 450 455 460
 Arg Phe Gly Gly Ala Leu Asp Gly Ala Ala Thr Glu Phe Thr Thr Ala
 465 470 475 480
 Tyr Asp Lys Gly Leu Ser Pro Arg Gln Phe Val Asp Thr Met Arg Lys
 485 490 495
 Gln Asn Lys Leu Ile Pro Gly Ile Gly His Arg Val Lys Ser Arg Asn
 500 505 510
 Asn Pro Asp Phe Arg Val Glu Leu Val Lys Asp Phe Val Lys Lys Asn
 515 520 525
 Phe Pro Ser Thr Gln Leu Leu Asp Tyr Ala Leu Ala Val Glu Glu Val
 530 535 540
 Thr Thr Ser Lys Lys Asp Asn Leu Ile Leu Asn Val Asp Gly Ala Ile
 545 550 555 560
 Ala Val Ser Phe Val Asp Leu Met Arg Ser Cys Gly Ala Phe Thr Val
 565 570 575
 Glu Glu Thr Glu Asp Tyr Leu Lys Asn Gly Val Leu Asn Gly Leu Phe
 580 585 590
 Val Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ile Ala His His Leu Asp Gln Lys
 595 600 605
 Arg Leu Lys Thr Gly Leu Tyr Arg His Pro Trp Asp Asp Ile Thr Tyr
 610 615 620
 Leu Val Gly Gln Glu Ala Ile Gln Lys Lys Arg Val Glu Ile Ser Ala
 625 630 635 640
 Gly Asp Val Ser Lys Ala Lys Thr Arg Ser
 645 650

<210> 9

<211> 1494

<212> DNA

<213> 解脂耶氏酵母

<400> 9

atgtcagcga aatccattca cgaggccgac ggcaaggecc tgcctgcaca ctctctgtcc 60
 aaggcgcccg tgtgggccga gcagcagecc atcaacacgt ttgaaatggg cacacccaag 120
 ctggcgtctc tgacgttcga ggaaggcgtg gcccccgagc agatcttctc cgccgtgaa 180
 aagacctacc cctggtctgt ggagtccggc gccaaatttg tggccaagcc cgaccagetc 240
 atcaagcgac gaggcaaggc cgccctgtgt gtactcaaca agtcgtggga ggagtgaag 300
 ccctggatcg ccgagcgggc cgccaagccc atcaacgttg agggcatitga cggagtgtg 360
 cgaacgttcc tggctcagcc ctttgtgcc cagcaccaga agcagagta ctacatcaac 420

[0021]

```

atccactccg tgcgagaggg cgactggatc ctcttctacc acgagggagg agtcgacgtc 480
ggcgacgtgg acgccaaggc cgccaagatc ctcatcccg ttgacatiga gaacgagtac 540
ccctccaacg ccacgctcac caaggagctg ctggcacacg tgcccagga ccagcaccag 600
acctgtctcg acttcatcaa cgggtcttac gccgtctacg tcgactctga gtttacgtat 660
ctggagatca accccctggt cgtgatcccc accgcccagg gcgtcgaggt ccactacctg 720
gatcttgccg gcaagctcga ccagaccgca gagtttgagt gcggcccaa gtgggctgct 780
gcgcggctcc ccgcgcctct ggccaggctc gtcaccattg acgcggctc caccaagggtg 840
tccatcgacg ccggcccgcg catggtcttc ccgcctctt tcggtcgaga gcgtccaag 900
gaggaggcgt acattgcgga gctcgattcc aagaccggag cttctctgaa gctgactgtt 960
ctcaatgcca agggccgaat ctggaccctt gtggttggtg gaggagctc cgtcgtctac 1020
gccgacgcca ttgcgtctgc cggtttgctg gacgagctcg ccaactacgg cgagtactct 1080
ggcgctccca acgagacca gacctacgag tacgceaaaa ccgtactgga tctcatgacc 1140
cgggggcagc ctacccccga gggcaaggta ctgttcattg gcggaggaat cgccaacttc 1200
acceagggtg gatccacctt caagggcac atccgggect tccgggacta ccagtctctt 1260
ctgcacaacc acaaggtaga gatttacgtg cgacgaggcg gtcccaactg gcaggagggt 1320
ctgcggttga tcaagtcggc tggcgacgag ctgaatctgc ccatggagat ttacggcccc 1380
gacatgcacg tgtcggttat tgttctttg gctctgcttg gaaagcgcc caagaatgct 1440
aagccttttg gcaccggacc ttctactgag gcttcactc ctctcgagt ttaa 1494

```

<210> 10
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> 解脂耶氏酵母

<400> 10

Met Ser Ala Lys Ser Ile His Glu Ala Asp Gly Lys Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

His Phe Leu Ser Lys Ala Pro Val Trp Ala Glu Gln Gln Pro Ile Asn
20 25 30

Thr Phe Glu Met Gly Thr Pro Lys Leu Ala Ser Leu Thr Phe Glu Asp
35 40 45

Gly Val Ala Pro Glu Gln Ile Phe Ala Ala Ala Glu Lys Thr Tyr Pro
50 55 60

Trp Leu Leu Glu Ser Gly Ala Lys Phe Val Ala Lys Pro Asp Gln Leu
65 70 75 80

Ile Lys Arg Arg Gly Lys Ala Gly Leu Leu Val Leu Asn Lys Ser Trp
85 90 95

Glu Glu Cys Lys Pro Trp Ile Ala Glu Arg Ala Ala Lys Pro Ile Asn
100 105 110

Val Glu Gly Ile Asp Gly Val Leu Arg Thr Phe Leu Val Glu Pro Phe
115 120 125

[0022]

Val Pro His Asp Gln Lys His Glu Tyr Tyr Ile Asn Ile His Ser Val
 130 135 140
 Arg Glu Gly Asp Trp Ile Leu Phe Tyr His Glu Gly Gly Val Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Asp Val Asp Ala Lys Ala Ala Lys Ile Leu Ile Pro Val Asp Ile
 165 170 175
 Glu Asn Glu Tyr Pro Ser Asn Ala Thr Leu Thr Lys Glu Leu Leu Ala
 180 185 190
 His Val Pro Glu Asp Gln His Gln Thr Leu Leu Asp Phe Ile Asn Arg
 195 200 205
 Leu Tyr Ala Val Tyr Val Asp Leu Gln Phe Thr Tyr Leu Glu Ile Asn
 210 215 220
 Pro Leu Val Val Ile Pro Thr Ala Gln Gly Val Glu Val His Tyr Leu
 225 230 235 240
 Asp Leu Ala Gly Lys Leu Asp Gln Thr Ala Glu Phe Glu Cys Gly Pro
 245 250 255
 Lys Trp Ala Ala Ala Arg Ser Pro Ala Ala Leu Gly Gln Val Val Thr
 260 265 270
 Ile Asp Ala Gly Ser Thr Lys Val Ser Ile Asp Ala Gly Pro Ala Met
 275 280 285
 Val Phe Pro Ala Pro Phe Gly Arg Glu Leu Ser Lys Glu Glu Ala Tyr
 290 295 300
 Ile Ala Glu Leu Asp Ser Lys Thr Gly Ala Ser Leu Lys Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu Asn Ala Lys Gly Arg Ile Trp Thr Leu Val Ala Gly Gly Gly Ala
 325 330 335
 Ser Val Val Tyr Ala Asp Ala Ile Ala Ser Ala Gly Phe Ala Asp Glu
 340 345 350
 Leu Ala Asn Tyr Gly Glu Tyr Ser Gly Ala Pro Asn Glu Thr Gln Thr
 355 360 365
 Tyr Glu Tyr Ala Lys Thr Val Leu Asp Leu Met Thr Arg Gly Asp Ala
 370 375 380
 His Pro Glu Gly Lys Val Leu Phe Ile Gly Gly Gly Ile Ala Asn Phe
 385 390 395 400
 Thr Gln Val Gly Ser Thr Phe Lys Gly Ile Ile Arg Ala Phe Arg Asp
 405 410 415
 Tyr Gln Ser Ser Leu His Asn His Lys Val Lys Ile Tyr Val Arg Arg
 420 425 430

[0023]

Gly Gly Pro Asn Trp Gln Glu Gly Leu Arg Leu Ile Lys Ser Ala Gly
 435 440 445

Asp Glu Leu Asn Leu Pro Met Glu Ile Tyr Gly Pro Asp Met His Val
 450 455 460

Ser Gly Ile Val Pro Leu Ala Leu Leu Gly Lys Arg Pro Lys Asn Val
 465 470 475 480

Lys Pro Phe Gly Thr Gly Pro Ser Thr Glu Ala Ser Thr Pro Leu Gly
 485 490 495

Val

<210> 11
 <211> 406
 <212> DNA
 <213> 解脂耶氏酵母

<400> 11
 agagaccggg ttggcggcgc atttgtgtcc caaaaaacag cccaattgc cccaattgac 60
 cccaaattga ccagtagcgg ggcccaaccc cggcgagagc ccccttctcc ccacatatca 120
 aacctccccc ggttcccaca cttgccgtta agggcgtagg gtactgcagt ctggaatcta 180
 cgcttgttca gactttgtac tagtttcttt gtctggccat ccgggtaacc catgccggac 240
 gcaaaataga ctactgaaaa tttttttgct ttgtggttgg gactttagcc aagggtataa 300
 aagaccaccg tccccgaatt acctttcttc ttcttttctc tctctccttg tcaactcaca 360
 ccggaaatcg ttaagcattt ccttctgagt ataagaatca ttcaaa 406

<210> 12
 <211> 122
 <212> DNA
 <213> 解脂耶氏酵母

<400> 12
 gtgagtttca gaggcagcag caattgccac gggttttgag cacacggccg ggtgtgtgcc 60
 cattcccatc gacacaagac gccacgtcat ccgaccagca ctttttgcag tactaaccgc 120
 ag 122

<210> 13
 <211> 531
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> TEF启动子-内含子序列

<400> 13

Ala Gly Ala Gly Ala Cys Cys Gly Gly Gly Thr Thr Gly Gly Cys Gly
 1 5 10 15

Gly Cys Gly Cys Ala Thr Thr Thr Gly Thr Gly Thr Cys Cys Cys Ala
 20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Ala Ala Thr Thr
 35 40 45

[0024]

Gly Cys Cys Cys Cys Ala Ala Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Ala
 50 55 60
 Ala Ala Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Ala Gly Thr Ala Gly Cys Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Cys Cys Cys Ala Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Cys Gly Ala
 85 90 95
 Gly Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys Thr Thr Cys Thr Cys Cys Cys Cys
 100 105 110
 Ala Cys Ala Thr Ala Thr Cys Ala Ala Ala Cys Cys Thr Cys Cys Cys
 115 120 125
 Cys Cys Gly Gly Thr Thr Cys Cys Cys Ala Cys Ala Cys Thr Thr Gly
 130 135 140
 Cys Cys Gly Thr Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Gly Thr Ala Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala
 165 170 175
 Thr Cys Thr Ala Cys Gly Cys Thr Thr Gly Thr Thr Cys Ala Gly Ala
 180 185 190
 Cys Thr Thr Thr Gly Thr Ala Cys Thr Ala Gly Thr Thr Thr Cys Thr
 195 200 205
 Thr Thr Gly Thr Cys Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Cys Gly Gly
 210 215 220
 Gly Thr Ala Ala Cys Cys Cys Ala Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Cys
 225 230 235 240
 Gly Cys Ala Ala Ala Ala Thr Ala Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly
 245 250 255
 Ala Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Cys Thr Thr Thr
 260 265 270
 Gly Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Gly Ala Cys Thr Thr Thr Ala Gly
 275 280 285
 Cys Cys Ala Ala Gly Gly Gly Thr Ala Thr Ala Ala Ala Ala Gly Ala
 290 295 300
 Cys Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Cys Cys Cys Gly Ala Ala Thr Thr
 305 310 315 320
 Ala Cys Cys Thr Thr Thr Cys Cys Thr Cys Thr Thr Cys Thr Thr Thr
 325 330 335
 Thr Cys Thr Cys Thr Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr Thr Gly Thr Cys
 340 345 350

[0025]

Ala Ala Cys Thr Cys Ala Cys Ala Cys Cys Gly Ala Ala Ala Thr
355 360 365

Cys Gly Thr Thr Ala Ala Gly Cys Ala Thr Thr Thr Cys Cys Thr Thr
370 375 380

Cys Thr Gly Ala Gly Thr Ala Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr Cys Ala
385 390 395 400

Thr Thr Cys Ala Ala Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Gly Thr Thr
405 410 415

Thr Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala
420 425 430

Thr Thr Gly Cys Cys Ala Cys Gly Gly Gly Cys Thr Thr Thr Gly Ala
435 440 445

Gly Cys Ala Cys Ala Cys Gly Gly Cys Cys Gly Gly Gly Thr Gly Thr
450 455 460

Gly Gly Thr Cys Cys Cys Ala Thr Thr Cys Cys Cys Ala Thr Cys Gly
465 470 475 480

Ala Cys Ala Cys Ala Ala Gly Ala Cys Gly Cys Cys Ala Cys Gly Thr
485 490 495

Cys Ala Thr Cys Cys Gly Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Thr Thr
500 505 510

Thr Thr Thr Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys Thr Ala Ala Cys Cys Gly
515 520 525

Cys Ala Gly
530

<210> 14
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 14
gactgtcgac agagaccggg ttggcggcgc atttgtg

37

<210> 15
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 15
gactgtgacc tcaagatgca tagcacgcgt tttgaatgat tcttatactc

50

<210> 16
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

[0026]

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	16	
	ggcagtcgac agagaccggg ttggcggc	28
<210>	17	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	17	
	ttattcacgc gtgtagatac gtactgcaaa aagtgtgtgt cgga	44
<210>	18	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	18	
	aatgaccatg attacggatt cactgg	26
<210>	19	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	19	
	ctaggtggat ccttatTTTT gacaccagac caactggtaa	40
<210>	20	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	20	
	taaccgcaga ccatgattac ggattcactg gcc	33
<210>	21	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	21	
	ctaggtatgc atatgaccai gattacggat tcactgg	37
<210>	22	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	

[0027]

<400> 22	
cttacaggta cttatitit gacaccagac caactggtaa	40
<210> 23	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 23	
gactacgcgt cacaatgcga ctgcaattga	30
<210> 24	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 24	
tagcatgcat tcacaacccc ttgagcagct	30
<210> 25	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 25	
aatgcgactg caattgagga cactaa	26
<210> 26	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 26	
cgttgaatcg atttcggaca cgggcatttc ac	32
<210> 27	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 27	
taaccgcaga ctatcgactc acaatactac aagtcgcg	38
<210> 28	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸	
<400> 28	
ctaggatatgc atttactcaa tcattcggaa ctctggg	37

[0028]

<210>	29	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	29	
	cccggaaca attaatagac tggat	25
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	30	
	ttcgacacg ggcacacac	20
<210>	31	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	31	
	cttacaacgc gtatgtctgc caacgagac atctcc	36
<210>	32	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	32	
	ctaggtatgc atctatgac gagtcttggc cttgga	36
<210>	33	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	33	
	cttacaacgc gtatgtcagc gaaatccatt cacga	35
<210>	34	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	34	
	ctaggtatgc atttaaacac cgagaggagt ggaagc	36
<210>	35	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0029]

<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	35	
	aatggtgaaa aacgtggacc aagtg	25
<210>	36	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	36	
	ctcacaggat ccctaagcag ccatgccaga catacc	36
<210>	37	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	37	
	cccggcaaca attaatagac tggat	25
<210>	38	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	38	
	ttcggacacg ggcatctcac	20
<210>	39	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	39	
	tccaggecgt cctctccc	18
<210>	40	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	40	
	ggccagccat atcgagtcgc a	21
<210>	41	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	

[0030]

<400> 41 aacggaggag tggtaagcg a	21
<210> 42 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 42 ttaatggggaa gtagcggcca a	21
<210> 43 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 43 gaccgactcc aacaaggacc ctt	23
<210> 44 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 44 gggttgggca caagcagcat	20
<210> 45 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 45 gcttctcacg gaggtcatac agt	23
<210> 46 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 46 ctgcggcaat accgttggtta g	21
<210> 47 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 47 cctccttggt gaggttggtg gt	22

[0031]

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 48
gcgacgatgg gcttcttgat c

21

<210> 49
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 49
ccttcaaggg catcatcgg

20

<210> 50
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 50
cgccctcgteg cacgtaaatc t

21

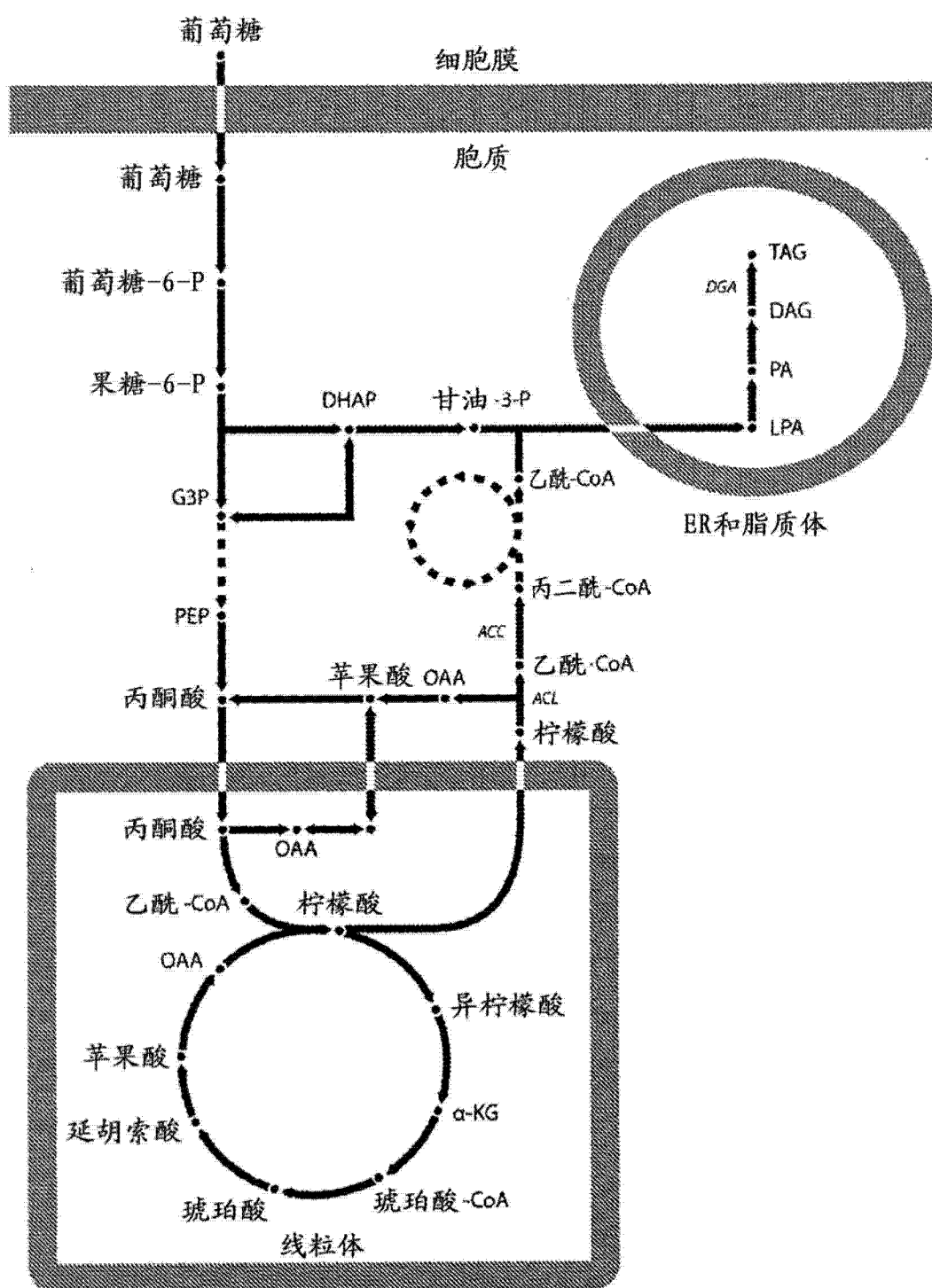


图 1

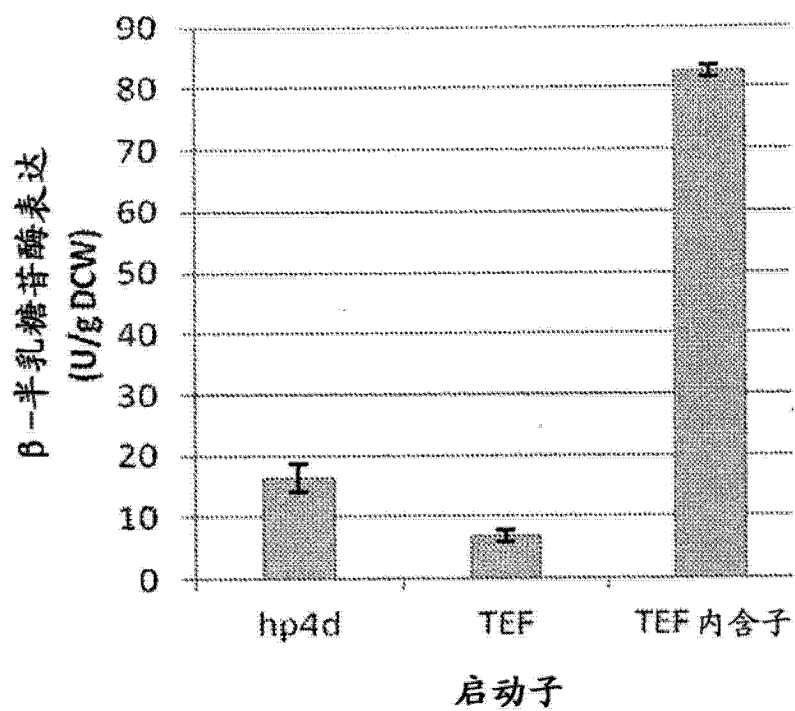


图 2

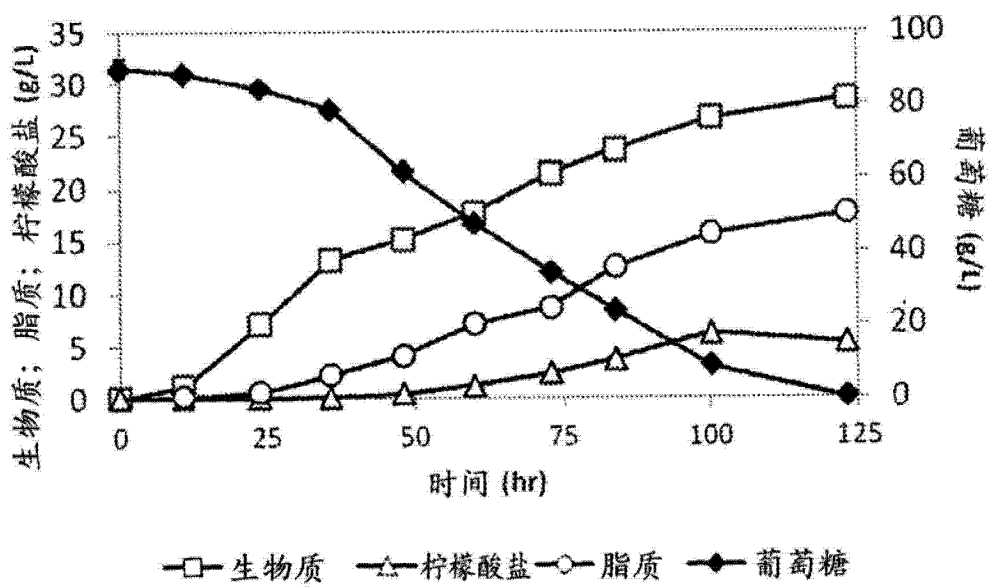


图 3

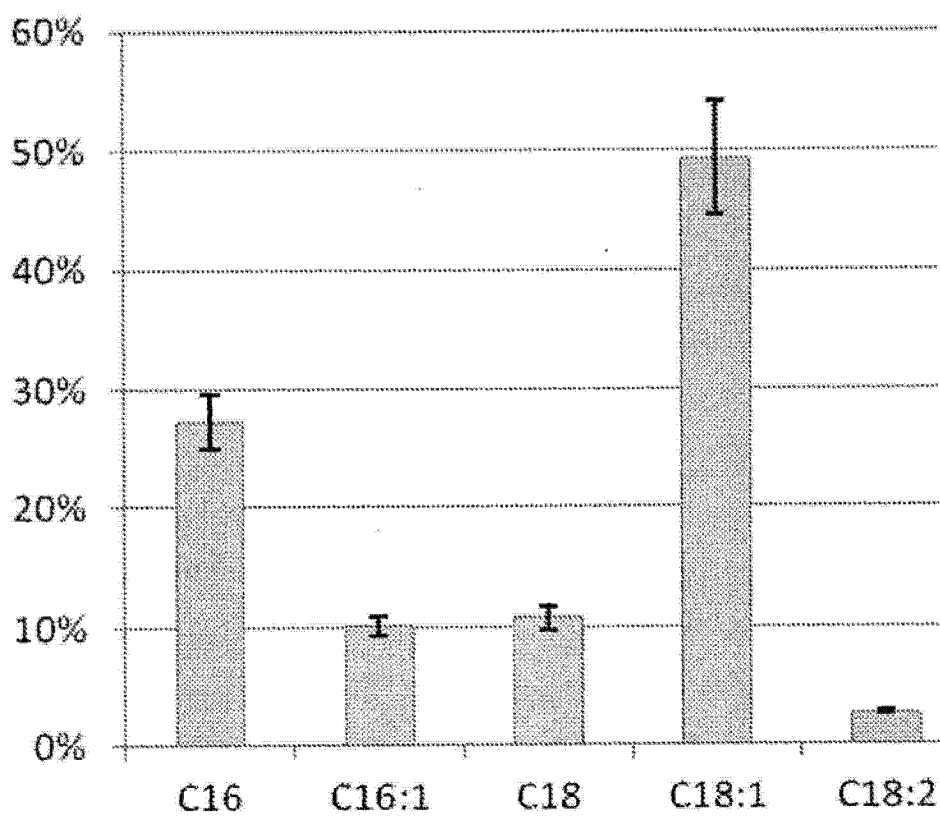


图 4

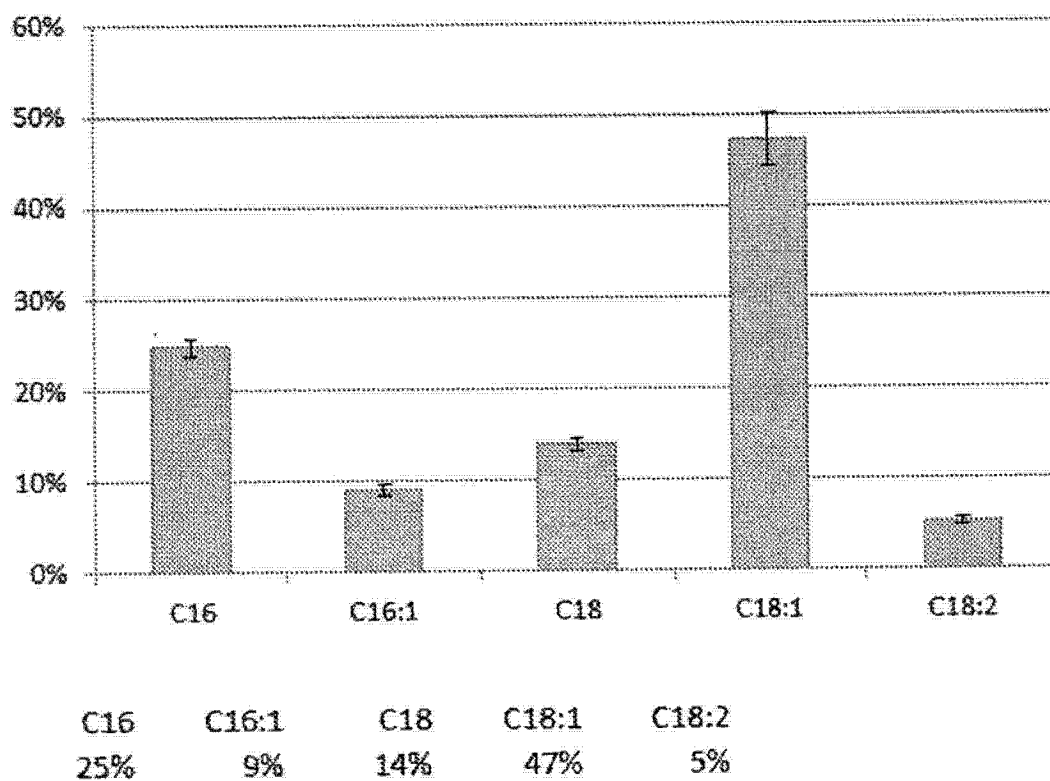


图 5

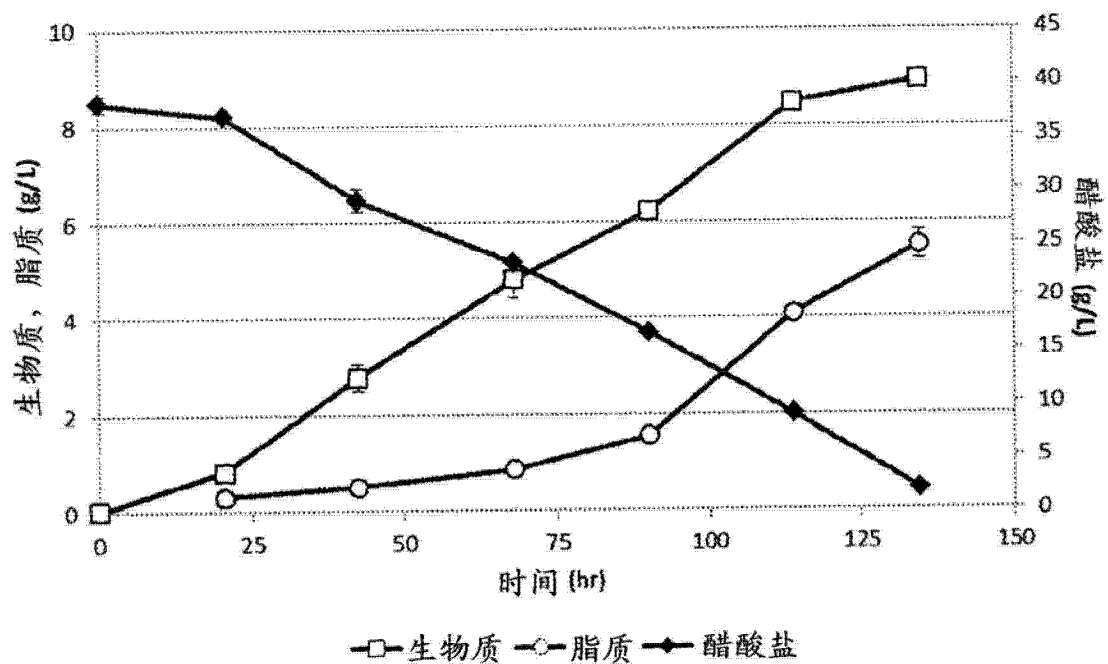


图 6

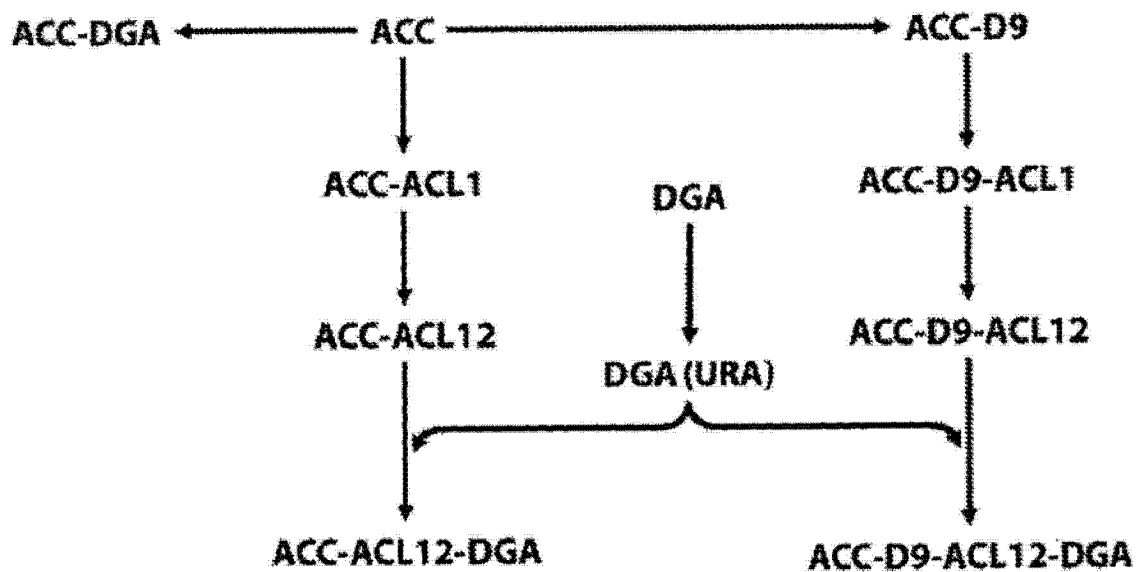


图 7

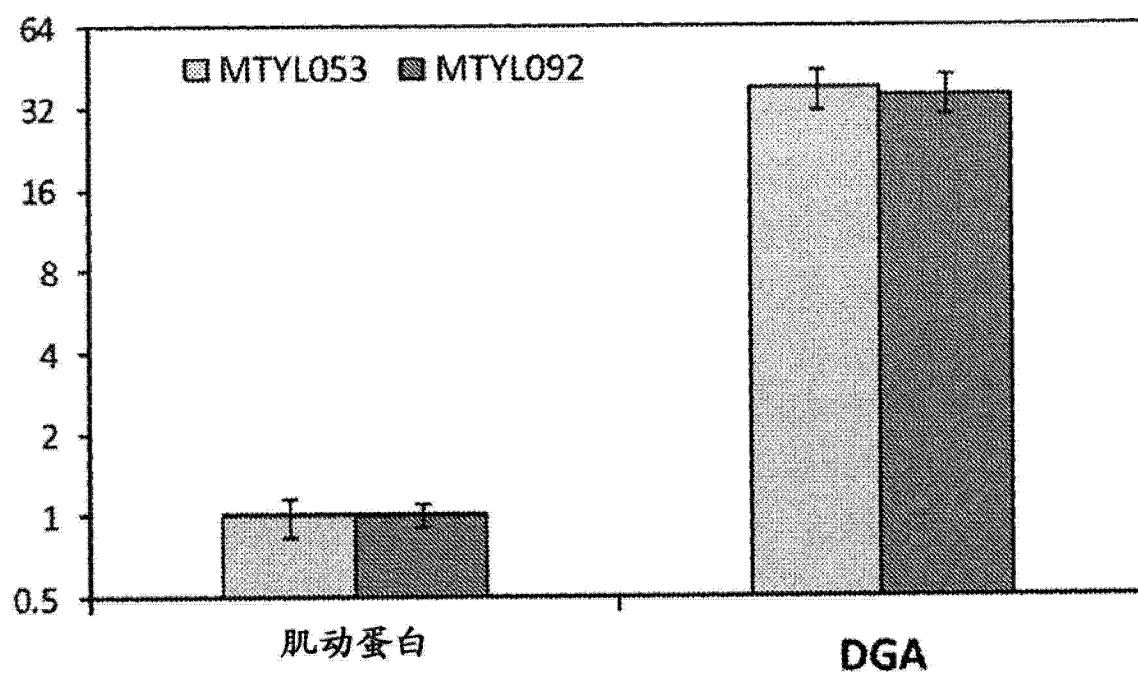


图 8

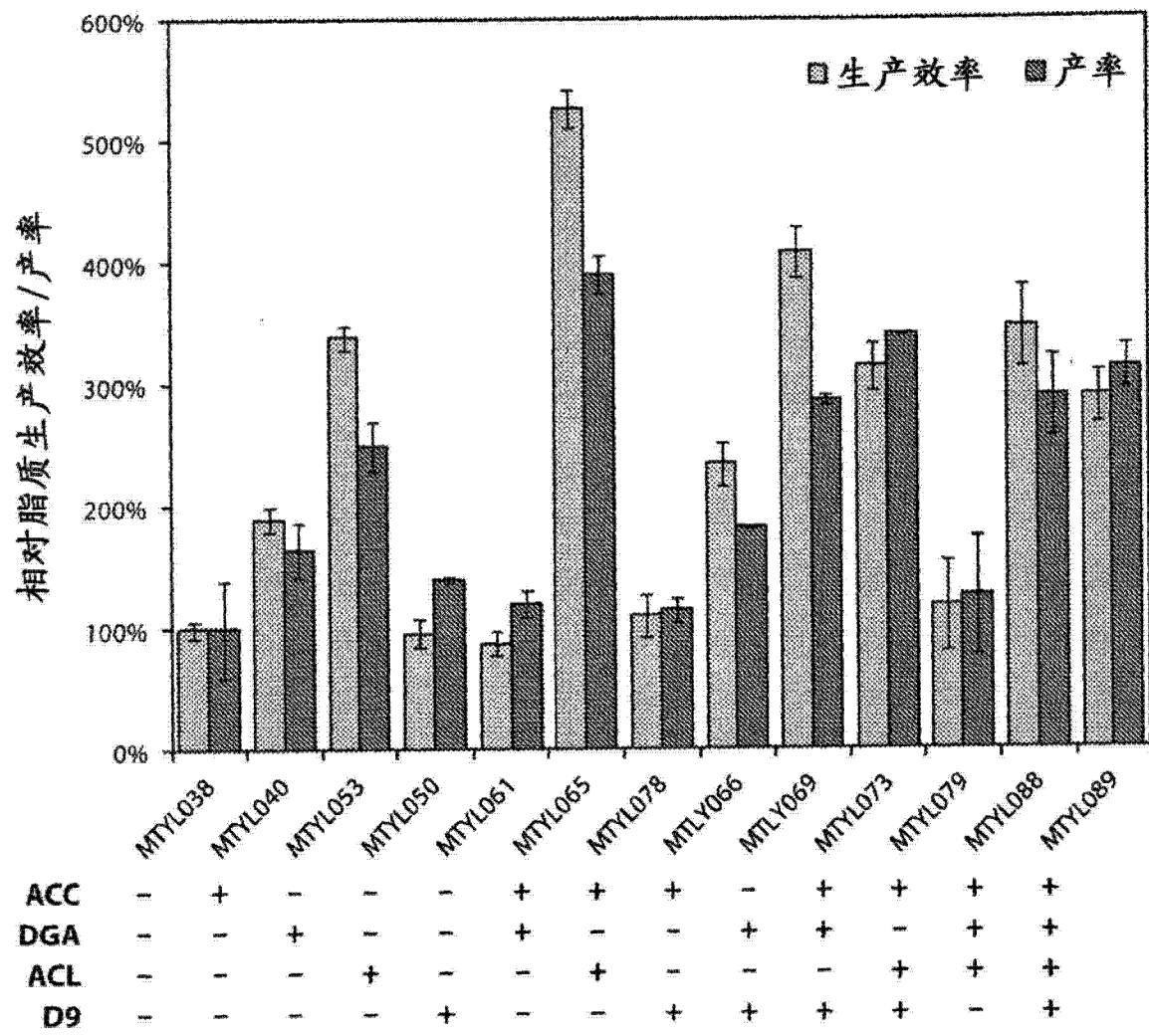


图 9

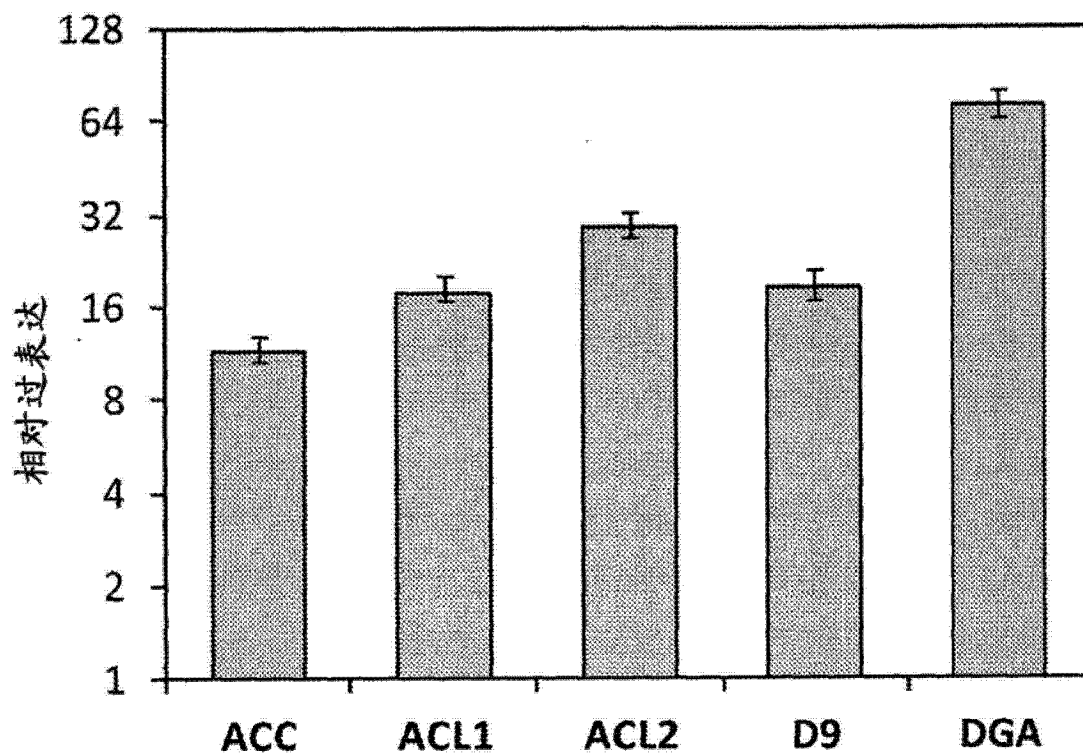


图 10

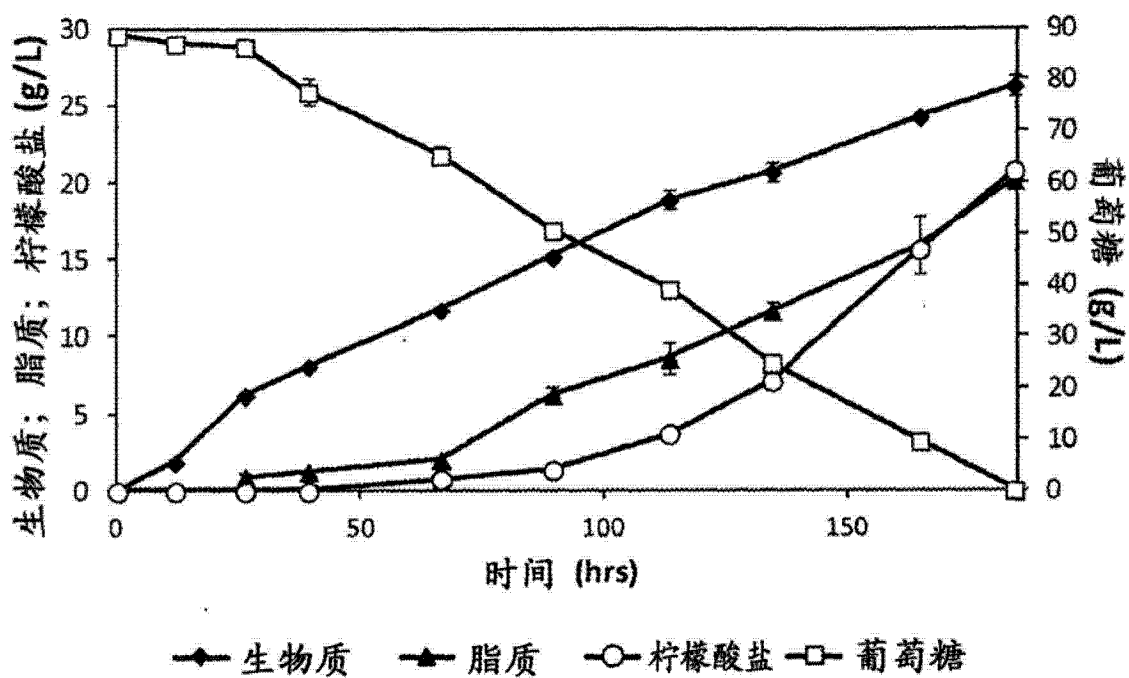


图 11

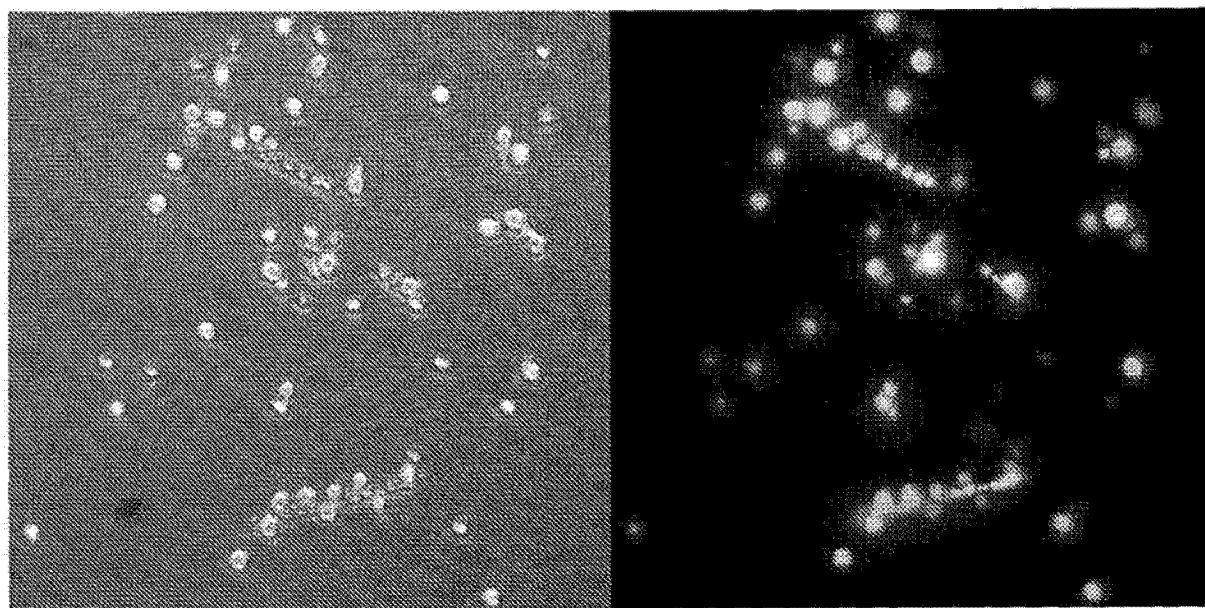


图 12

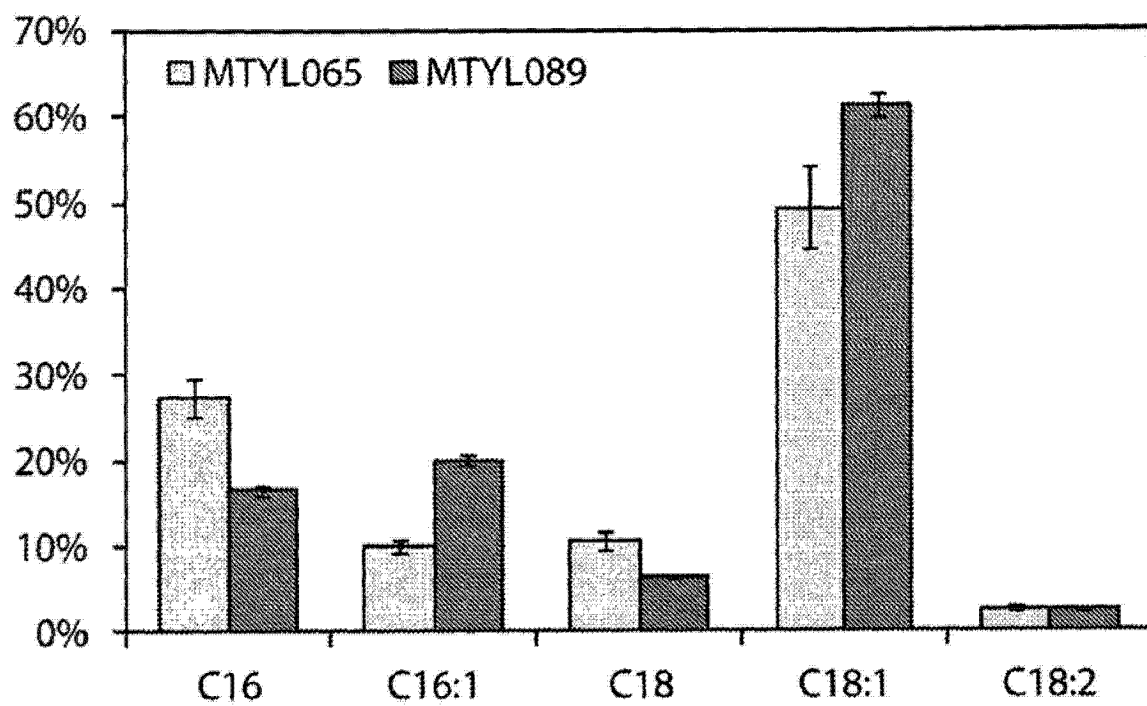


图 13

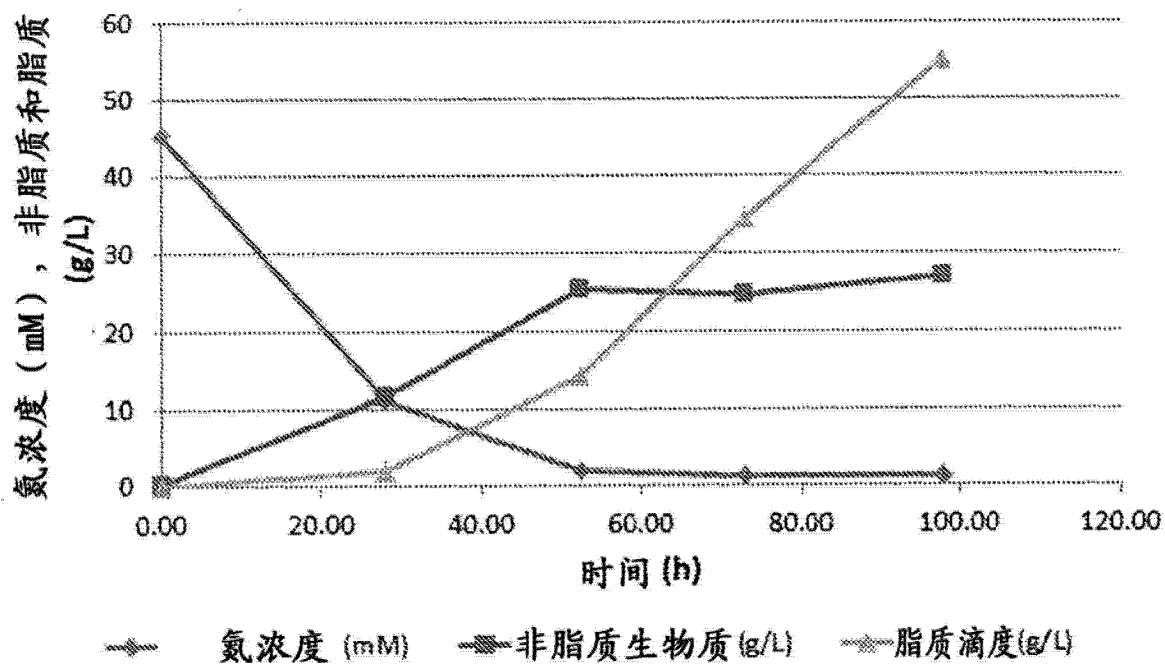


图 14

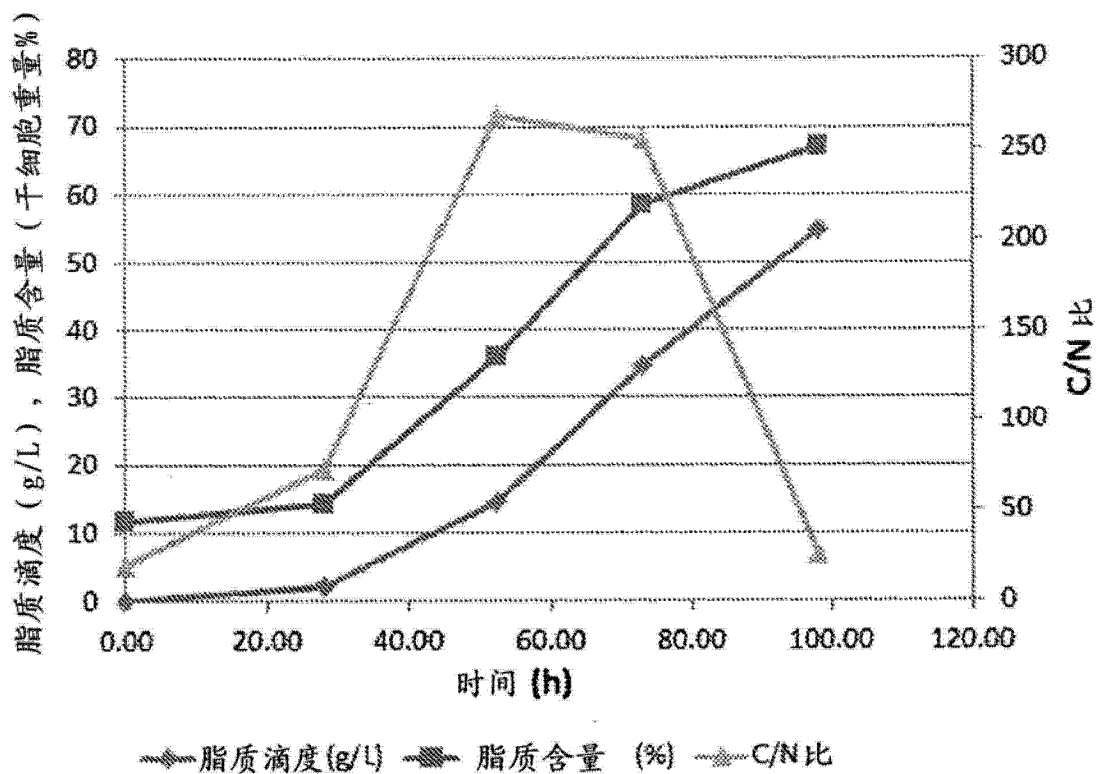


图 15

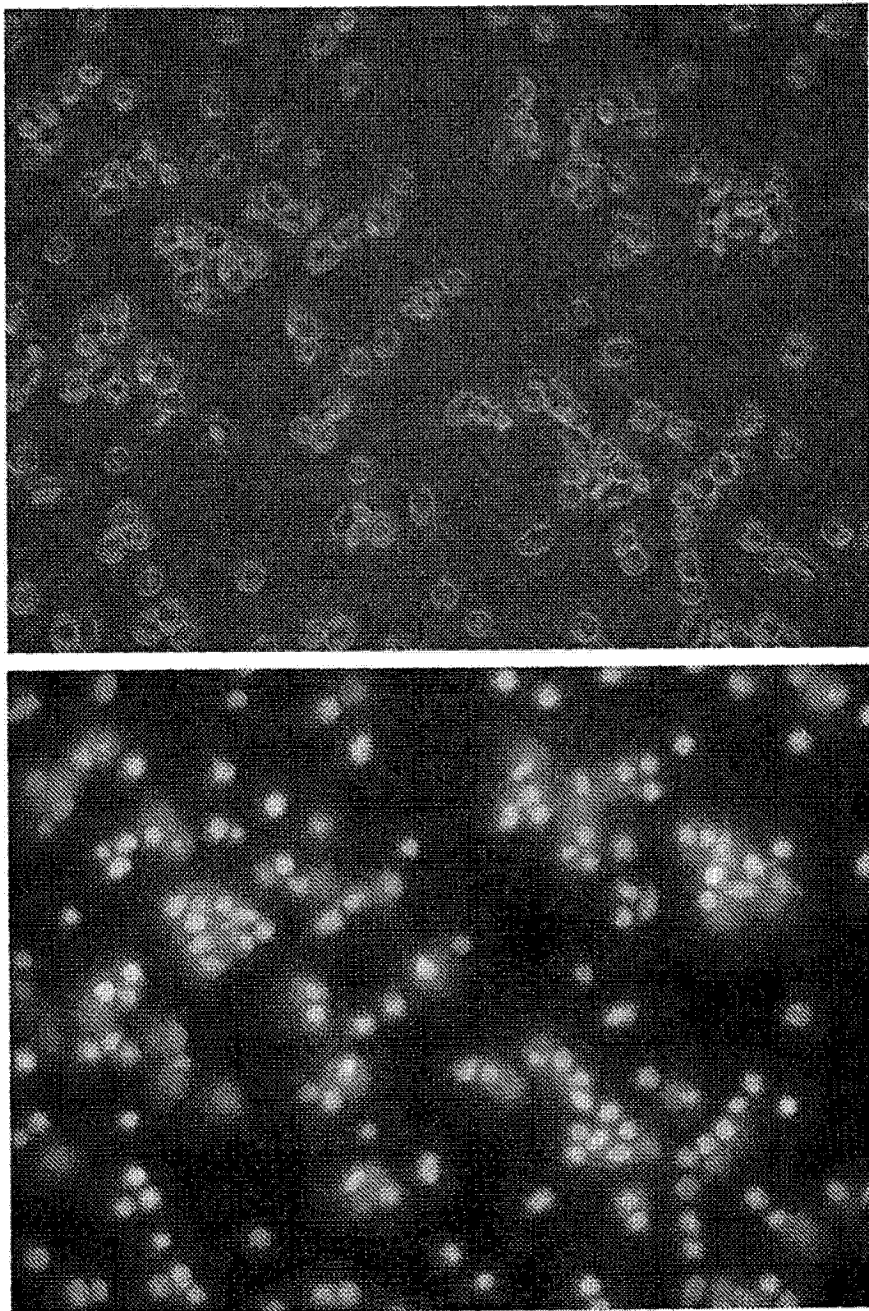


图 16