



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106367198 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(21)申请号 201610803975.7

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22)申请日 2010.04.14

代理人 凌立 黄革生

(30)优先权数据

61/169,271 2009.04.14 US
PCT/US2009/060692 2009.10.14 US
PCT/US2009/066141 2009.11.30 US
PCT/US2009/066142 2009.11.30 US
61/299,250 2010.01.28 US

(51)Int.Cl.

C11B 1/06(2006.01)
C11B 1/02(2006.01)
C11B 1/10(2006.01)
C12N 1/06(2006.01)
C12N 13/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

201080026280.3 2010.04.14

(71)申请人 泰拉瑞亚控股公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·维特恩伯格 F·阿拉纳

权利要求书2页 说明书67页
序列表22页 附图1页

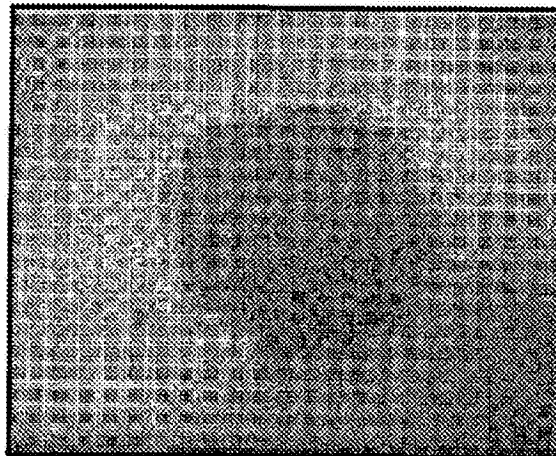
(54)发明名称

微生物油提取和分离方法

(57)摘要

脂质可以从含至少20重量%脂质且水分含量小于4重量%的微生物物质中提取,该提取是通过对该物质施加压力,使其释放脂质,由此留下脂质含量降低的生物物质;并收集所述脂质实现。

a



1. 一种从微生物生物质中提取脂质的方法,包括:
 - a. 干燥微生物生物质以产生干燥的微生物生物质,所述干燥的微生物生物质水分含量为小于6重量%,且含至少20重量%油;
 - b. 通过加热干燥的微生物生物质至70°C到150°C范围内的温度,调节干燥的微生物生物质以产生经过调节的原料;和
 - c. 使经过调节的原料经受足以将生物质中至少5%的油与其它组分分离的压力,留下相对于调节的原料,油含量降低的用过的生物质。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中在调节干燥的微生物生物质之前向干燥的微生物生物质施加膨胀剂。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述微生物生物质水分含量为0.1重量%-5重量%。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述微生物生物质水分含量为0.1重量%-3重量%。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述微生物生物质水分含量为0.7重量%-1.2重量%。
6. 一种从微生物生物质中提取脂质的方法,包括:对含至少20重量%脂质且水分含量低于5重量%的微生物生物质施加压力,由此裂解所述生物质的细胞,释放出超过5%的所述脂质,并留下脂质含量降低的用过的微生物生物质,其中所述提取的脂质和用过的生物质彼此分离。
7. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中脂质通过压榨机提取。
8. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述用过的生物质含有小于50重量%-小于1重量%的油,且所述用过的生物质中的油含量低于微生物生物质中的油含量。
9. 根据权利要求7所述的方法,其中对所述微生物生物质施加一个或多个循环的波动压力,其中每个循环由较低压力持续第一时间段,随后施加较高压力持续第二时间段组成,其中如果进行大于一个循环,则其中在最后一个循环过程期间施加于所述生物质的平均压力比在第一个或任何之前循环过程期间施加于所述生物质的平均压力高达至少2倍。
10. 根据权利要求7或权利要求9所述的方法,其中所述压榨机是在笼内连续旋转的蜗杆轴,所述笼的一端具有进料器且在其相对端具有油嘴,且在所述笼内具有开口,其中所述笼的内部长度是其内径的至少10倍到至少20倍,且包括多个细长的杆,其中所述细长的杆中至少一些由一个或多个隔板分开,所述杆搁置在框架上,其中在所述杆之间的所述一个或多个隔板形成所述开口,且油通过所述开口释放到与所述笼流体连接的收集容器中,其中所述细长杆之间的所述隔板具有不同厚度,由此使各细长杆之间的空隙不同,其中所述隔板或所述杆之间的间隙的厚度为0.005英寸到0.030英寸,其中所述生物质通过所述进料器进入所述笼,且所述蜗杆轴旋转将沿所述笼推进所述生物质,并对设置在所述笼与所述油嘴之间的所述生物质施加压力,所述压力裂解所述生物质的细胞,并通过笼的所述开口释放油,且含油量降低的用过的生物质从所述笼的所述油嘴端挤出。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述压力从所述笼的所述进料器端到所述油嘴

端增加了在10与20之间的倍数,且在所述笼的所述进料器端与油嘴端之间每一线英尺笼上的增加不超过在所述笼的所述进料器端处的压力的100%。

12. 前述权利要求中任一项的方法,进一步包括用有机溶剂从所述油含量降低的用过的生物质中提取脂质。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述有机溶剂是己烷。

14. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括

当对所述微生物生物质施加压力时,将膨胀剂加入到所述微生物生物质中以促进所述脂质的释放。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述生物质调节10分钟与60分钟之间的时间。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述膨胀剂选自柳枝稷、大豆皮、干燥的迷迭香、玉米秸秆、纤维素、甘蔗渣,或用过的微生物生物质包含介于40%与90%之间的多糖和低于10%的油,且在所述微生物生物质脱水达到低于6%的水分含量的步骤之前加入到所述微生物生物质中。

17. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物生物质选自微藻属生物质、细菌生物质、产油酵母生物质,和非酵母产油真菌生物质,且所述微生物生物质来源于通过选自异养法、光自养法和兼养法的方法培养的培养物。

18. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物生物质是来自如下所述的微藻的生物质,所述微藻的脂肪酸组成为:

低于2%的C14:0;约13—16%的C16:0;约1—4%的C18:0;约64—71%的C18:1;约10—15%的C18:2;约0.5—2%的C18:3;和低于1%的长度为20或更长的碳链;

约1—2%的C14:0;约16—26%的C16:0;约2—6%的C18:0;约58—68%的C18:1;和约7—11%的C18:2;

至少4%的C8—C14,其中微藻含有编码偏好一种或多种链长度为8、10、12和14个碳原子的脂肪酸的硫酯酶的外源基因;

在10%与40%之间的C8—C14;或

至少15%的C:16脂肪酸、至少50%的C18:1脂肪酸、至少7%的C18:2脂肪酸和低于3%的C10:0—C14:0脂肪酸。

19. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述提取的脂质具有选自如下的一个或多个特性:

每千克脂质低于0.01毫克的叶绿素;或

一种或多种物质:不超过8ppm的氯化物、不超过2ppm的磷、不超过26ppm的钾、不超过12ppm的钠和不超过5ppm的硫。

微生物油提取和分离方法

[0001] 本申请是申请人于2010年4月14日提交的题为“微生物油提取和分离方法”的中国专利申请201080026280.3的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请依照美国法典第35篇第119条(e)款要求2009年4月14日提交的第61/169,271号美国临时申请和2010年1月28日提交的第61/299,250号美国临时申请的权益。本申请也是2009年10月14日提交的第PCT/US2009/060692号国际申请的部分连续案。本申请还是2009年11月30日提交的第PCT/US2009/066142号和第PCT/US2009/066141号国际申请的部分连续案。这些申请各自的全部内容都以引用的方式并入本文中用于所有目的。

[0004] 序列表的参考

[0005] 本申请附有序列表,如第1—21页附录中所示。

发明领域

[0006] 本发明通常涉及由微生物生产和提取油。具体说来,本发明提供从微生物中提取、回收、分离和获得油的方法以及包含该油的组合物。因此,本发明涉及生物学、微生物学、发酵技术以及油和燃料生产技术领域。

[0007] 发明背景

[0008] 化石燃料是由腐烂的植物和动物所形成的可燃的有机物质的地质沉积物的一般术语,这些腐烂的植物和动物经过上亿年暴露于地壳中的热和压力而被转化成了原油、煤、天然气或重质油。

[0009] 化石燃料是一种有限的不可再生资源。随着20世纪和21世纪全球现代化的进程,对于由化石燃料得到的能源,尤其是来源于油的汽油的需求日益增长,并且已经成为引起主要区域和全球冲突的导火索。能源需求的增加也引起了烃燃料成本的增加。除作为能源外,包括塑料和化学制造工业在内的许多工业还将烃用作制造原料。当前供应源的代用品将有助于减轻这些原料成本的上涨压力。

[0010] 生物燃料中使用的脂质可以在例如藻类、真菌和细菌等微生物中产生。通常,在微生物中生产脂质涉及:使例如藻类、真菌或细菌等微生物生长,这些微生物能够在发酵罐或生物反应器中产生所需脂质;分离微生物生物质;干燥;并提取细胞内脂质,这些脂质是油的一种形式。然而,这些方法一般被认为是低效而且昂贵的,特别是当进行这些方法的规模必须产生有益的燃料供应时更是如此。这些方法的一个明显问题是如何从微生物中提取脂质或油。

[0011] 需要一种从微生物中提取油的方法,该方法可缓解当前从微生物中提取脂质的方法的低效率和高成本的问题。本发明将提供此类方法。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供从微生物生物质中提取脂质/油的方法。在一个实施方案中,本发明提供从微生物生物质中提取油的方法,所述方法包括以下步骤:对干燥的微生物生物质施加足以从生物质中提取出超过5重量%油的压力,由此产生提取出来的油和油含量降低的用

过的生物质,所述干燥的微生物生物质的水分含量低于6重量%且含至少20重量%的油,并且被热调节达到在70℃到150℃(160°F到300°F)范围内的温度。在各种实施方案中,在压榨步骤中,从生物质中提取出干燥的微生物生物质中超过75重量%的油。

[0014] 因此,本方法包括干燥且随后调节微生物生物质以产生经过调节的原料,接着使该经过调节的原料经受压力。调节将改变生物质的物理和/或生理化学性质,但不会引起生物质中超过5%的油的释放。调节步骤包括将干燥的微生物生物质加热到在70℃到150℃(160°F到300°F)范围内的温度,借此改变其水分含量。在各种实施方案中,在压榨步骤期间施加压力之前将“膨胀剂(bulking agent)”或“压榨助剂(press-aid)”加入到微生物生物质或经过调节的原料中。在压榨步骤期间,使经过调节的原料经受足以将生物质或经过调节的原料中至少5%的油与其它组分分离的压力。“用过的生物质”中所含这些其它组分可包括残留的油,但在任何情况下含油量都低于经过调节的原料。在一个实施方案中,由压榨机施加压力。

[0015] 在本发明此方面和其它方面的各种实施方案中,生物质是由选自微藻、产油细菌、产油酵母和真菌的微生物发酵来制备的。在各种实施方案中,微藻是选自小球藻属(*Chlorella*)、拟小球藻属(*ParaChlorella*)或无绿藻属(*Protocheca*)的种类,或为下表1中其它种类的藻。在各种实施方案中,产油细菌是红球菌属(*Rhodococcus*)的菌种。在各种实施方案中,产油酵母是粘红酵母或下表2中所列的别的种类。在各种实施方案中,真菌是下表3中所列的种类。

[0016] 在本发明此方面和其它方面的各种实施方案中,生物质是由含有18:1脂肪酸的微生物发酵来制备的。在各种实施方案中,微生物中脂肪酸组成为低于2%的C14:0;约13—16%的C16:0;约1—4%的C18:0;约64—71%的C18:1;约10—15%的C18:2;约0.5—2%(重量比)的C18:3;和低于1%的长度为20或更长的碳链。在各种实施方案中,微生物中脂肪酸组成为约1—2%的C14:0;约20%的C16:0;约4%的C18:0;约64%的C18:1;和约7—8%的C18:2。在一些实施方案中,微生物中脂肪酸组成为约C14:0(1.65);C16:0(28.0);C18:0(2.90);C18:1(53.80);C18:2(10.95);和C18:3 α (0.80)。在其它实施方案中,微生物中脂肪酸组成为C14:0(2.33);C15:0(9.08);C16:0(24.56);C16:1(11.07);C17:0(10.50);C18:0(2.49);C18:1(17.41);C18:2(0.05)。还在其它实施方案中,微生物中脂肪酸组成为C12(低于1%);C14:0(2.18—3.36);C15:0(0.12—0.25);C16:0(29.94—33.26);C16:1(0.49—0.76);C17:0;C18:0(6.88—8.17);C18:1(42.68—48.12);C18:2(7.88—9.28)C18:3 α (0.84—1.33);以及高于C:20(1.1—1.45)。在各种实施方案中,微生物具有低于0.5%的DHA。在这些和其它实施方案中,微生物在一些情形中是微藻。

[0017] 在本发明此方面和其它方面的各种实施方案中,微生物生物质(呈干燥或水合形式)或经过调节的原料含有至少25重量%油(脂质)。在各种实施方案中,干燥微生物生物质或经过调节的原料以细胞干重计含有至少25%的油。在各种实施方案中,干燥的微生物生物质或经过调节的原料以细胞干重计含有至少40%、至少50%或至少75%的油。在各种实施方案中,干燥的微生物生物质或经过调节的原料以细胞干重计含有至少15%的碳水化合物。

[0018] 在本发明此方面和其它方面的各种实施方案中,调节步骤涉及对生物质施加热和/或压力。在各种实施方案中,调节步骤包括在70℃到150℃(160°F to 300°F)范围内的

温度下加热生物质。在各种实施方案中,加热是使用垂直堆积式振荡器进行的。在各种实施方案中,调节步骤包括用膨胀机或挤压机处理干生物质以使生物质成形和/或均质化。在各种实施方案中,干生物质或经过调节的原料的水分含量低于5重量%。在各种实施方案中,干生物质或经过调节的原料的水分含量在0.1重量%和5重量%的范围内。在各种实施方案中,干生物质或经过调节的原料的水分含量低于4重量%。在各种实施方案中,干生物质或经过调节的原料的水分含量在0.5重量%和3.5重量%的范围内。在各种实施方案中,干生物质或经过调节的原料的水分含量在0.1重量%和3重量%的范围内。

[0019] 在本发明此方面和其它方面的各种实施方案中,在压榨步骤前,将膨胀剂加入到微生物生物质中,该微生物生物质可以是干燥或水合的(即,生物质尚未干燥或含有大量,即超过6重量%的水分,包括在还未进行任何处理来除去或分离水的发酵液中的生物质)微生物生物质或经过调节的原料。在各种实施方案中,膨胀剂的平均粒度小于1.5mm。在各种实施方案中,膨胀剂选自以下各物:纤维素、玉米秸秆、干燥的迷迭香、大豆皮、用过的生物质(脂质含量相对于制备它的生物质而言降低的生物质)、甘蔗渣和柳枝稷。在各种实施方案中,膨胀剂是含有在50重量%与80重量%之间的多糖和/或低于10重量%油的用过的生物质。在各种实施方案中,在用过的生物质中用作膨胀剂的多糖含有20—30摩尔%半乳糖、55—65摩尔%葡萄糖和/或5—15摩尔%甘露糖。

[0020] 本发明提供有关采用上述膨胀剂从微生物生物质中提取油的各种方法。在一种方法中,通过将膨胀剂加入到生物质中,并干燥由此获得的混合物至水分含量低于6重量%,借此形成干燥的膨胀剂/生物质混合物,来制备适于提取油的水合微生物生物质。在另一种方法中,通过共干燥含有至少20重量%油的水合微生物生物质与膨胀剂以形成干燥的膨胀剂/生物质混合物;将混合物中的水分含量减少到低于4重量%;并压榨水分含量降低的混合物以从其中提取油,来提取微生物生物质中的油,由此形成脂质含量降低的用过的生物质。在另一种方法中,通过共干燥微生物生物质与膨胀剂来使从含有至少20重量%脂质的微生物生物质中获得油的产率增加,因为共干燥的混合物在压榨时所释放的油比在不存在膨胀剂情况下在相同条件下从生物质中获得的油多。在本发明这些和其它方法的各种实施方案中,在将膨胀剂加入到生物质中之前,水合微生物生物质包含在还未进行处理以分离或除去生物质中的水的发酵液中。通常,在临压榨步骤前,通过将膨胀剂与生物质的混杂物加热到在70°C到150°C (160°F到300°F)范围内的温度来加以调节。

[0021] 在本发明不同方面的各种实施方案中,在压榨步骤中对干燥的微生物生物质、混杂有膨胀剂的水合微生物生物质或任选包含膨胀剂的经过调节的原料施加压力来提取油,从而产生与用过的生物质分离的油。压榨步骤涉及施加足以从经过调节的原料提取出油的压力。如果生物质或原料在压榨步骤前未经历裂解部分或全部细胞的条件,那么在此步骤期间会发生细胞裂解。在本发明不同方面的各种实施方案中,压榨步骤涉及对经过调节的原料施加至少10,000psi压力。在各种实施方案中,压榨步骤涉及在第一时间段施加压力,在第二时间段降低压力,随后在第三时间段施加比第一时间段期间高的压力。此过程可重复一次或多次(“波动压力”)。在各种实施方案中,施加超过5个循环的波动压力。在各种实施方案中,后续的一个或多个循环施加的平均压力可高于早期一个或多个循环中所施加的平均压力。例如(但不限于),最后一个循环中的平均压力可以比第一个或早期任一循环中的平均压力高达至少2倍。在各种实施方案中,在压榨步骤期间控制经过调节的原料的水分

含量。在各种实施方案中,水分被控制在0.1重量%至3重量%范围内。

[0022] 在各种实施方案中,压榨步骤是用压榨机进行的。在各种实施方案中,压榨步骤是以连续流动模式进行。在各种实施方案中,出油速率为至少500g/min到不超过1000g/min。在各种连续流动式实施方案中,压榨机是在笼内包含连续旋转的蜗杆轴的装置,该笼的一端具有进料器且在相对端具有油嘴,在笼内具有可利用的开口。经过调节的原料通过进料器进入笼内,且蜗杆轴旋转将沿笼推进原料,并对设置在笼与油嘴之间的原料施加压力,该压力释放油通过笼的开口并从笼的油嘴端挤出用过的生物质。在各种实施方案中,笼的内部长度是其内径的至少10倍到至少20倍。在各种实施方案中,笼包括多个细长杆,其中至少一些细长杆由一个或多个隔板分开,这些杆搁置在框架上,其中各杆之间的一个或多个隔板形成开口,且油通过这些开口释放到与笼流体连接的收集容器中。在各种实施方案中,细长杆之间的隔板具有不同厚度,由此使各细长杆之间的空隙不同。在各种实施方案中,各杆之间的隔板或间隙的厚度为0.005英寸到0.030英寸。

[0023] 在各种实施方案中,笼的进料器端到油嘴端的压力增加的倍数在10倍与20倍之间。在各种实施方案中,沿笼的压力在笼的进料器端与油嘴端之间每一线英尺笼上的增加不超过在笼的进料器端处的压力的100%。在各种实施方案中,相对于空转,当满载经过调节的原料时所述装置消耗的功率不会增加超过10%。在各种实施方案中,原料在装置桶中的停留时间不超过5—10分钟。在各种实施方案中,压榨机装置的温度或压榨机装置所施加的压力或二者受到监测和/或控制。

[0024] 在各种实施方案中,通过调节蜗杆轴的旋转速度来控制压力。在包括其中压力不受控制在内的各种实施方案中,可以使用包括蜗杆轴和桶的压榨(螺杆式)机,。在各种实施方案中,桶具有一定长度并具有直径尺寸可容纳蜗杆轴的槽,且其中桶长度比槽直径大到至少10倍到15倍。在各种实施方案中,压榨机的桶具有进口和出口,且从进口到出口,蜗杆轴的直径增加,并且压榨包括从桶的进口到出口增加压力;在各种实施方案中,出口处的压力比入口处压力高达12倍到16倍,或者甚至到高达20倍。在各种实施方案中,压榨机包括蜗杆轴和具有第一槽和第二槽的桶,两个槽同轴且尺寸能容纳蜗杆轴,其中第一槽具有第一直径,而第二槽具有不同于第一直径的第二直径。在各种实施方案中,经过调节的原料在压榨机的桶中保留5分钟到10分钟。

[0025] 在各种实施方案中,压榨机包括设置在桶中的蜗杆轴,所述桶衬以经由其间一个或多个隔板分开的多个细长杆,这些隔板产生各细长杆之间的间隙。在此类压榨机中,可通过改变细长杆之间的隔板的尺寸或数量来调节间隙,从而控制压力,和/或如果在压榨机蜗杆轴外表面与细长杆的内表面之间存在空隙,那么可通过用不同尺寸的杆更换至少一些细长杆改变该空隙,从而控制压力。在各种实施方案中,压榨机包括输出孔和与该输出孔连接的可调节的油嘴,并通过调节油嘴增加或降低压力来控制压力。在各种实施方案中,压榨机包括设置在桶中的蜗杆轴,并通过调节蜗杆轴外表面与桶内表面之间的间隙来控制压力。

[0026] 压榨步骤后,所述方法将进行油的提取和产生用过的生物质。在各种实施方案中,释放的油含有生物质或经过调节的原料的固体颗粒,且该方法进一步包括将释放的油与固体颗粒分离。可任选对分离出来的固体颗粒施加压力以从其中提取出任何残留的油。在各种实施方案中,提取的油含有不超过8ppm的氯化物、不超过2ppm磷、不超过26ppm钾、不超过12ppm钠和/或不超过5ppm硫。由本方法产生的油适用于多种应用,包括但不限于,生产燃料

(例如生物柴油和可再生柴油)和生产食品。

[0027] 在各种实施方案中,油含量降低的用过的生物质中的含油量比压榨步骤前微生物生物质的含油量低至少45%。在各种实施方案中,使压榨步骤后剩下的油含量降低的用过的生物质粒化或挤压成饼状。用过的生物质可另外进行处理,包括另外进行调节和压榨或者基于溶剂或其它提取方法以提取出残留的油,这类似地适用于多种应用中,包括但不限于,用作食品,尤其是动物饲料,以及用作膨胀剂。在各种实施方案中,从油含量降低的用过的生物质中提取出剩下的油;在各种实施方案中,提取是通过对用过的生物质施加压力或通过用有机溶剂提取油来进行。

[0028] 根据前述,本发明一方面涉及从微生物生物质中提取脂质的方法。在一个实施方案中,该方法包括对含至少20重量%脂质且水分含量低于6重量%的微生物生物质施加压力,由此裂解生物质的细胞,释放出超过5%的脂质并留下脂质含量降低的用过的生物质,其中提取出来的脂质与用过的生物质彼此分离。

[0029] 在一些情况下,在第一时间段对微生物生物质施加较低压力,随后在第二时间段施加较高压力。在一些情况下,对微生物生物质施加超过5个循环的波动压力,且在最后一个循环过程中施加于生物质的平均压力比第一个循环过程中施加于生物质的平均压力高达至少2倍。在一些情况下,对微生物生物质施加压力的方法包括连续流过施加压力的装置。在一个实施方案中,该装置是压榨机。在一些情况下,对微生物生物质施加至少10,000PSI的压力。

[0030] 在一些实施方案中,对微生物生物质施加压力的方法包括连续流过施加压力的装置,其中该装置是在笼内连续旋转的蜗杆轴,该笼的一端具有进料器且在其相对端具有油嘴,并且在笼内具有开口,其中生物质通过进料器进入笼内,且蜗杆轴旋转将沿笼推进生物质,并对设置在笼与油嘴之间的生物质施加压力,该压力使生物质细胞裂解,并通过笼的开口释放油,由此从笼的油嘴端挤压出油含量降低的用过的生物质。在一些情况下,笼包括多个细长杆,其中至少一些细长杆由一个或多个隔板分开,且这些杆搁置在框架上,其中各杆之间的一个或多个隔板形成开口,且脂质通过这些开口释放到与笼流体连接的收集容器中。在一些情况下,细长杆之间的隔板具有不同厚度,由此使各细长杆之间的空隙不同。在一些实施方案中,各杆之间的隔板或间隙的厚度为0.005英寸到0.030英寸。在一些情况下,笼的进料器端到油嘴端的压力增加10倍到20倍。在一些情况下,生物质在装置桶中的停留时间在5—10分钟之间。在一些实施方案中,笼的内部长度是其内径的至少10倍到至少20倍。在一些情况下,相对于空转,当满载微生物生物质时装置消耗的功率不会增加超过10%。在一些情况下,沿笼的压力在笼的进料器端与油嘴端之间每一线英尺笼上的增加不超过在笼的进料器端处的压力的100%。

[0031] 在一些实施方案中,所述方法还包括使油含量降低的用过的生物质粒化或将油含量降低的用过的生物质挤压成饼状。在一些实施方案中,该方法进一步包括从油含量降低的用过的生物质中提取脂质。在一些情况下,油含量降低的用过的生物质中的脂质含量比施加压力前微生物生物质的脂质含量低至少45%。在一些实施方案中,该方法进一步包括用有机溶剂从油含量降低的用过的生物质中提取脂质。在一些实施方案中,该方法进一步包括在对微生物生物质施加压力前,将微生物生物质的水分含量调到0.1%与5%之间。

[0032] 在一些情况下,所述方法包括在对微生物生物质施加压力前,将微生物生物质的

水分含量调到0.5重量%与3.5重量%之间。在一些情况下,该方法包括在对微生物生物质施加压力前,将微生物生物质的水分含量调到1.0重量%与2.0重量%之间。在一些实施方案中,所述调节是通过用热调节生物质实现。在一些情况下,用热进行调节是使用垂直堆积式调节器进行的。

[0033] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括调节生物质以改变其物理或生理化学性质,同时不会释放出超过5%的脂质,以便在后续对生物质施加压力的步骤中促进脂质释放。在一些情况下,调节步骤包括在150—300°F下加热生物质。在一些情况下,调节步骤包括在200—270°F下加热生物质。在一些情况下,调节步骤包括在210—260°F下加热生物质。在一些实施方案中,调节步骤包括加热生物质达20分钟与60分钟之间的时间。在一些实施方案中,调节步骤包括对生物质施加第一压力,该压力不会释放生物质中超过5%的脂质。

[0034] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括在对生物质施加足以释放超过5%脂质的压力的步骤前,用膨胀机或挤压机处理生物质,同时不会释放出生物质中超过5%的脂质。

[0035] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括在对微生物生物质施加压力时,将膨胀剂加入到微生物生物质中,以促进脂质释放。在一些情况下,膨胀剂选自柳枝稷、大豆皮、干燥的迷迭香、玉米秸秆、纤维素、脂质含量降低的用过的生物质和甘蔗渣。在一些情况下,膨胀剂是脂质含量降低的用过的微生物生物质,其包含在40%与90%之间的多糖和低于10%的油。在一些情况下,膨胀剂是脂质含量降低的用过的微生物生物质,其包含在60%与80%之间的多糖和低于10%的油。在一些情况下,膨胀剂是种类与微生物生物质相同的用过的微生物生物质。在一些实施方案中,多糖含20—30摩尔%半乳糖;55—65%摩尔%葡萄糖;和5—15摩尔%甘露糖。在一些情况下,脂质含量降低的用过的生物质是来自小球藻属、拟小球藻属或无绿藻属的微藻。在一些实施方案中,膨胀剂的平均粒度小于1.5mm。在一些情况下,膨胀剂的平均粒度在150—350微米之间。在一些情况下,膨胀剂是在使微生物生物质脱水达到水分含量低于6%的步骤前加入到微生物生物质中的。

[0036] 在本发明一些实施方案中,微生物生物质是微藻。在一些情况下,微藻选自表1中所列的种类。在一些情况下,微藻属于小球藻属、拟小球藻属或无绿藻属。在一些实施方案中,微藻的23S rRNA基因组序列与SEQ ID NOs:1-23或26-34中的一个或多个具有至少75%、85%或95%的核苷酸同一性。

[0037] 在本发明一些实施方案中,微生物生物质是细菌。在一些情况下,细菌是来自红球菌属。

[0038] 在本发明一些实施方案中,微生物生物质是产油酵母。在一些情况下,产油酵母选自表2中所列的种类。在一些情况下,产油酵母是粘红酵母。在一些实施方案中,产油酵母的真菌18S和26S rRNA基因组序列与SEQ ID NOs:37-69中的一个或多个具有至少75%、85%或95%的核苷酸同一性。在一些实施方案中,微生物生物质是有孢圆酵母属(*Torulasporea*)或耶罗威亚酵母属(*Yarrowia*)的产油酵母。

[0039] 在本发明一些实施方案中,微生物生物质是非酵母产油真菌。在一些情况下,非酵母产油真菌选自表3中所列的种类。

[0040] 在一些实施方案中,微生物生物质以细胞干重计含有至少45%的脂质。在一些情况下,微生物生物质以干重计具有至少15%的碳水化合物。在一些情况下,微生物生物质来

源于具有以下脂肪酸组成的微藻：低于2%的C14:0；约13—16%的C16:0；约1—4%的C18:0；约64—71%的C18:1；约10—15%的C18:2；约0.5—2%的C18:3；和低于1%的长度为20或更长的碳链。在一些情况下，微藻的脂肪酸脂质组成包含至少15%的C:16脂肪酸、至少50%的C18:1脂肪酸、至少7%的C18:2脂肪酸和低于3%的C10:0—C14:0脂肪酸。在一些情况下，微藻的脂肪酸组成为：约1—2%的C14:0；约16—26%的C16:0；约2—6%的C18:0；约58—68%的C18:1；和约7—11%的C18:2。在一些实施方案中，微藻具有包含至少4%的C8—C14的脂质组成且含有编码偏好一种或多种链长度为8、10、12和14个碳原子的脂肪酸的硫酯酶的外源基因。在一些情况下，微藻的脂质组成包含在10%与40%之间的C8—C14。在一些情况下，微生物生物质的脂质组成包含至少10%的16:1。在一些实施方案中，微生物生物质含有至少30重量%的脂质。在一些情况下，微生物生物质含有至少40重量%的脂质。在一些情况下，微生物生物质含有至少50重量%的脂质。在一些情况下，微生物生物质含有在60—70重量%之间的脂质。

[0041] 在一些实施方案中，提取的脂质具有每千克脂质不到0.01毫克的叶绿素。在一些情况下，提取的脂质具有每毫升脂质在0.2微克与0.3微克之间的类胡萝卜素。

[0042] 在一些实施方案中，微生物生物质含有编码蔗糖转化酶的外源基因。

[0043] 在一些实施方案中，在施加压力前，微生物生物质已经进行了气流干燥步骤。

[0044] 在一些实施方案中，提取的脂质包含以下一种或多种物质：不超过8ppm的氯化物、不超过2ppm的磷、不超过26ppm的钾、不超过12ppm的钠和不超过5ppm的硫。

[0045] 另一方面，本发明涉及制备供提取油的水合微生物生物质的方法。在一个实施方案中，该方法包括将膨胀剂加入到生物质中，以及将膨胀剂和生物质一起干燥到水分含量低于6%，由此形成干燥的膨胀剂-生物质混合物。在一些实施方案中，水合微生物生物质包含在还未进行分离或除水过程的发酵液中。在一些情况下，膨胀剂选自柳枝稷、大豆皮、干燥的迷迭香、玉米秸秆、纤维素、脂质含量降低的用过的生物质和甘蔗渣。在一些情况下，膨胀剂是脂质含量降低的用过的生物质，其包含在40%与90%之间的多糖和低于10%的油。

[0046] 另一方面，本发明涉及从微生物生物质中提取脂质的方法。在一个实施方案中，该方法包括：(a) 共干燥包含至少20重量%脂质的水合微生物生物质与膨胀剂，由此形成干燥的膨胀剂-生物质混合物；(b) 调节干燥的膨胀剂-生物质混合物，以使水分含量低于4重量%；以及(c) 对经过调节的干燥膨胀剂-生物质混合物施加压力，借此裂解生物质的细胞，释放出超过5%的脂质并留下脂质含量降低的用过的生物质。在一些实施方案中，水合微生物生物质包含在还未进行分离或除水过程的发酵液中。在一些情况下，膨胀剂选自柳枝稷、大豆皮、干燥的迷迭香、玉米秸秆、纤维素、脂质含量降低的用过的生物质和甘蔗渣。在一些情况下，膨胀剂是脂质含量降低的用过的生物质，其包含在40%与90%之间的多糖和低于10%油。

[0047] 又一方面，本发明涉及增加从包含至少20重量%脂质的微生物生物质中提取脂质的产率的方法。在一个实施方案中，该方法包括共干燥微生物生物质与膨胀剂，由此使在施加压力时由共干燥的微生物生物质和膨胀剂提取出来的油量大于不加入膨胀剂时的情形。在一些情况下，微生物生物质是来源于通过选自异养法、光自养法和兼养法的方法培养的培养物。

[0048] 本发明的这些和其它方面及实施方案将在下文的附图、紧接着的附图简要说明以

及本发明详述中予以描述,且在以下实施例中进行例示。上文和本申请通篇论述中的任一或所有特征可在本发明各种实施方案中组合。

[0049] 附图简述

[0050] 图1a示出在通过转鼓干燥除去表面水分后的微藻生物质。

[0051] 图1b示出在使用低压“预压榨”调节形成套筒(collet)后的微藻生物质。

[0052] 图2a示出由微生物生物质得到的质量不适于后续溶剂提取的用过的压榨饼。

[0053] 图2b示出由微生物生物质得到的质量适于后续溶剂提取的用过的压榨饼。

[0054] 发明详述

[0055] 本发明提供从微生物中提取脂质的方法。为方便读者,发明详述将分为几个部分,开头的第I部分将提供用于描述本发明的各种术语的定义。第II部分描述本发明从微生物中提取油、制备供提取油的微生物生物质以及进一步处理用过的生物质的方法。第III部分描述适用于产生含油微生物生物质的微生物以及培养这些微生物以产生油的方法。第V部分提供如何实行本发明方法的说明性实施例。

[0056] I. 定义

[0057] 除非另作定义,否则本文中所有科技术语都具有本发明所属领域技术人员通常所了解的含义。以下参考文献将向本发明所属领域技术人员提供本公开中所用许多术语的一般定义:Singleton等,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(第2版,1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker编辑,1988);Glossary of Genetics,第5版,R.Rieger等(编辑),Springer Verlag(1991);以及Hale和Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。除非另作具体说明,否则本文所用的以下术语具有属于其的含义。

[0058] “面积%”是指使用FAME GC/FID检测法观察到的峰的面积,在FAME GC/FID检测法中,样本中的每一脂肪酸在检测前都被转化成脂肪酸甲酯(FAME)。例如,观察到具有14个碳原子且不存在不饱和的脂肪酸(C14:0)与例如C14:1等任何其它脂肪酸相比独立的峰。每一类FAME的峰面积与其在混合物中的组成%成正比,并根据样本中存在的所有峰的总和计算(即,[特定峰下的面积/所有测量的峰的总面积]×100)。当提到本发明的油和细胞的脂质组成时,“至少4%的C8-C14”意思指,细胞中或提取的甘油酯组合中总脂肪酸的至少4%的链长度包括8、10、12或14个碳原子。

[0059] “无菌”是指未受其它活生物体污染的生物体培养物。

[0060] “生物质”是指由细胞生长和/或繁殖产生的物质。生物质可含有细胞和/或细胞内内含物以及细胞外物质。细胞外物质包括但不限于细胞分泌的化合物。

[0061] “生物反应器”是指任选其中在悬浮液中培养细胞(例如微生物)的封闭体或局部封闭体。

[0062] “膨胀剂”和“压榨助剂”在本文中可互换使用,意思指适于加入到原料(例如干燥和/或经过调节的生物质)中用以增加原料的纤维含量的物质。膨胀剂包括但不限于柳枝稷、大豆皮、用过的生物质和甘蔗渣。膨胀剂可能是通过提高能够施加于生物质的组分细胞的压力的均匀性来促进从生物质中释放脂质(油)。在一些情况下,压榨助剂也可充当助滤剂,用以澄清或减少与油一起提取出的渣滓量。也可充当助滤剂的压榨助剂的实例是纤维素。

[0063] “纤维素物质”是指消化纤维素得到的产物,包括葡萄糖、木糖、二糖、寡糖、木质素和其它分子。

[0064] “经过调节的原料”是在干燥后通过某种方式改变物理性质的干燥的含油微生物物质,其通常未释放超过5%的生物总油量,并且被加热到在70°C到150°C (160°F到300°F)范围内的温度。如本文中所示,“释放”和“所释放”的物质是油。调节的实例包括使干燥的含油微生物物质通过垂直堆积式调节器、膨胀机、挤压机或压榨机;和/或使干燥的含油微生物物质经历成片、破裂、研磨、碾碎、加热、汽蒸、热调节、低压、高压和用于改变干燥的含油微生物物质的物理性质的其它方法,以便将使用非化学或无溶剂提取方法提取的油最多。在干燥的含油微生物物质进行调节时发生的改变包括在微观水平上的改变,例如细胞壁裂开,以及在宏观水平上的改变,例如干燥的薄片通过低压压榨转变成球状,同时不释放油。

[0065] “脱脂粕”和“脱脂微生物物质”是指使用压榨机或溶剂提取法或二者提取出油(包括脂质)的微生物物质。

[0066] “干式回填(Dry back)”是指将压榨饼(本文中又称用过的生物物质)加回到压榨机的进料端的过程,压榨机的进料端压榨饼在压榨机的进料端与未压榨的生物物质混合。基本上来说,压榨饼充当未压榨物质的膨胀剂或压榨助剂。使用这一方法,可进一步回收压榨饼中残留的油以及来自未压榨生物物质中的油。

[0067] “细胞干重”是指已经除去所有或基本上所有水(水分)的微生物生物物质的重量。

[0068] “干燥的微生物物质”是指游离水分或表面水分已经被除去的微生物物质,因此微生物物质通常含有低于10重量%且常低于6重量%水分。在一个实施方案中,干燥的微生物物质来源于微藻。在一个实施方案中,干燥的微生物物质来源于在干燥后以细胞干重计含有至少20%脂质的微藻。

[0069] “膨胀机”是一种低剪切力挤压机,其将含油种子和其它含油物质加热、均质化和/或成形成具有高堆积密度的多孔套筒或团粒。在由膨胀机促成的过程的一个实施方案中,在压力下,将蒸汽注入到含油种子薄片/饼或含油物质中,并挤压此混合物通过板释放到大气中。套筒当释放到大气中时膨胀,因此命名为膨胀机。过去,膨胀机曾被用于制备植物种子/含油种子来源的套筒以进行溶剂提取,因为在用膨胀机处理后,套筒具有较高的堆积密度,这使得表面积更大且溶剂提取的效率增加。

[0070] “压榨机”是指螺杆式压榨机或连续式压榨机,其可用于以机械方式提取含油种子,例如但不限于,大豆和油菜籽/卡诺拉。将含油原材料(例如含油种子)从一端送入到机器中,并使材料经历由螺杆驱动所产生的摩擦力和高压,使材料沿轴移动。油被释放出来,并通过沿轴的小开口渗出,且固体(含油量降低的)在轴的末端以压榨饼的形式排出。压榨机/螺杆式压榨机的实例包括Anderson International Corp. (Cleveland,OH)、Alloco (Santa Fe,Argentina)、De Smet Rosedowns (Humberston,UK)、The Dupps Co. (Germantown,Ohio)、Grupo Tecnal (Sao Paulo,Brazil)、Insta Pro (Des Moines,Iowa)、Harburg Freudenberg (先前的Krupp Extraktionstechnik) (Hamburg,Germany)、French Oil Mill Machinery Company (Piqua,OH)、Maschinenfabrik Reinartz (Neuss,Germany)、Shann Consulting (New South Wales,Australia)和SKET (Magdeburg,Germany)销售的产品。

[0071] “纤维”是指来自植物和其它含纤维来源(例如无法被人消化的微生物)的复杂碳水化合物。纤维中所发现的复杂碳水化合物可包括纤维素、半纤维素和木质素、糊精、果胶、 β -葡聚糖和寡糖。

[0072] “固定碳源”是指发酵期间在环境温度和压力下呈固体或液体形式的含碳分子,通常是有机分子。

[0073] “水合微生物生物质”是指含有至少10%水分含量的液体微生物生物质。在一些实施方案中,水合微生物生物质包含在还未进行分离或除水过程的发酵液中。

[0074] “烃”是指:(a)只含有氢原子和碳原子的分子,其中碳原子共价连接形成直链、支链、环状或部分环状主链,氢原子连接到主链上;或(b)主要含有氢原子和碳原子的分子,其可通过1到4个化学反应转化成仅含有氢和碳原子。后者的非限制性实例包括在一个碳与一个氢原子之间含有氧原子从而形成醇分子的烃,以及含有氧原子的醛。用于将醇还原成只含有碳原子和氢原子的烃的方法是众所周知的。烃的另一个实例是酯,其中有机基团置换了含氧酸中的一个氢原子(或超过一个氢原子)。烃化合物的分子结构可有所不同,从作为天然气成分的最简单的甲烷形式(CH_4)到极大且极复杂的结构,例如原油、石油和沥青中所见的沥青烯。烃可呈气体、液体或固体形式,或这些形式的任何组合,并且在主链中相邻碳原子之间可具有一个或多个双键或三键。因此,本术语包括直链、支链、环状或部分环状烷烃、烯烃、脂质和石蜡。实例包括丙烷、丁烷、戊烷、己烷、辛烷、角鲨烯和类胡萝卜素。

[0075] “氢:碳比”是指以原子比计分子中氢原子与碳原子的比例。该比例也可用于指烃分子中碳原子和氢原子的数量。例如,比例最大的烃是甲烷,即 CH_4 (4:1)。

[0076] “疏水性部分”是指物质的相比于水相来说更易溶于疏水相中的部分。疏水性部分基本上不溶于水且通常是非极性的。

[0077] 短语“增加的脂质产率”是指通过例如增加每升培养物的细胞干重、增加细胞中的脂质百分比和/或包含脂质的细胞百分比和/或增加每单位时间每体积培养物的脂质总量来增加微生物培养物的生产率。

[0078] 短语“营养物质的限制性浓度”是指限制培养的生物体繁殖的培养物中营养物质的浓度。“营养物质的非限制性浓度”是在指定培养期中支持最大繁殖的浓度。因此,在营养物质的限制性浓度下在指定培养期中产生的细胞数量低于当营养物质为非限制性时的数量。当存在的营养物质浓度高于支持最大繁殖的浓度时,认为该营养物质在培养物中是“过量的”。

[0079] “脂质”是指来自生物有机体的亲脂性分子。脂质的生物功能包括但不限于,储存能量、用作细胞膜的结构组分和充当信号传导分子。脂质分子可溶于非极性溶剂(例如乙醚和氯仿)并且相对或完全不溶于水。脂质分子具有这些特性是因为其主要由相对较长的疏水性烃链组成。脂质的实例包括脂肪酸(饱和和不饱和的);甘油酯或甘油脂(例如单酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯和中性脂肪,以及磷酸甘油酯或甘油磷脂);非甘油酯类(鞘脂;固醇脂,包括胆固醇和类固醇激素;异戊烯醇脂,包括类萜;蜡;和聚酮);和复杂的脂质衍生物(糖联脂质或糖脂,和蛋白质联脂质)。脂质的其它实例包括游离脂肪酸;脂肪酸酯;固醇;颜料(例如类胡萝卜素和氧基类胡萝卜素)、植物固醇、麦角硫因(ergothionine)、硫辛酸、抗氧化剂(包括 β -胡萝卜素和生育酚)。脂质类别中还包括多不饱和脂肪酸,例如花生四烯酸、十八碳四烯酸、胆固醇、去氢胆固醇、虾青素、角黄素,以及n-6和n-3高度不饱和脂肪酸,例

如二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid,EPA)、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid,DHA)。本文中使用的微生物油是指脂质。

[0080] 短语“脂质:有机溶剂组合物”是指脂质与有机溶剂的混合物。

[0081] “裂解的”是指已经破裂或破坏细胞或质膜以及任选的生物有机体或细胞的细胞壁,并将至少一些细胞内内含物释放到细胞外环境中。“裂解作用”是指通常通过损害细胞或质膜以及任选的生物有机体细胞壁的完整性的机械、病毒、渗透或温度变化机制将细胞或质膜以及任选的生物有机体的细胞壁破裂到足以将至少一些细胞内内含物释放到细胞外环境中。“裂解”是指将细胞或质膜和任选的生物有机体或细胞的细胞壁破坏到足以将至少一些细胞内内含物释放到细胞外环境中。

[0082] “微藻”是指含有叶绿体且任选能够进行光合作用的微生物有机体。微藻包括无法代谢作为能量的固定碳源的专性光自养型生物,以及只能依赖固定碳源存活的异养生物。微藻可以指在细胞分裂后即与姊妹细胞分离的单细胞生物体,例如衣藻(*Chlamydomonas*),以及微生物,例如团藻(*Volvox*),其为具有两种不同的细胞类型的简单多细胞光合微生物。“微藻”还可以指细胞,例如小球藻和杜氏藻(*Dunaliella*)。“微藻”还包括展现细胞-细胞粘附作用的其它微生物光合生物体,例如阿格门氏藻(*Agmenellum*)、鱼腥藻(*Anabaena*)和桑椹藻(*Pyrobotrys*)。“微藻”还包括已丧失进行光合作用能力的专性异养微生物,例如某些甲藻(dinoflagellate)种类和无绿藻属种类。

[0083] “微生物物质”是指来源于微生物的生物物质。

[0084] “微生物(Microorganism)”与“微生物(microbe)”在本文中可互换使用,意思指用显微镜可见的单细胞生物体。

[0085] “油”是指疏水亲脂非极性含碳物质,包括但不限于,地质来源的原油、地质来源的原油的馏分、烃、植物油、藻类油和微生物脂质。

[0086] “产油酵母”是指可积累超过其细胞干重的20%的脂质的酵母。产油酵母包括以下生物体:例如解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*),和真菌双核亚界(Dikarya subkingdom)的其它种类,例如圆红冬孢酵母菌(*Rhodospiridium toruloides*) (真核生物域(Eukaryota);真菌/复细胞动物组(Fungi/Metazoa group);真菌;双核亚界;担子菌门(Basidiomycota);柄锈菌亚门(Pucciniomycotina);微球黑粉菌纲(Microbotryomycetes);锁掷酵母目(Sporidiobolales);红冬孢酵母属(*Rhodospiridium*);粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*) (真核生物域;真菌/复细胞动物组;真菌;双核亚界;担子菌门;柄锈菌亚门;微球黑粉菌纲;锁掷酵母目;有丝分裂孢子锁掷酵母目(mitosporic Sporidiobolales);红酵母属(*Rhodotorula*));子囊菌油脂酵母(*Lipomyces tetrasporus*) (真核生物域;真菌/复细胞动物组;真菌;双核亚界;子囊菌门(Ascomycota);酵母科(Saccharomyceta);酵母菌亚门(Saccharomycotina);酵母目(Saccharomycetes);酵母菌目(Saccharomycetales);油脂酵母科(Lipomycetaceae);油脂酵母属(*Lipomyces*));弯曲隐球酵母(*Cryptococcus curvatu*) (真核生物域;真菌/复细胞动物组;真菌;双核亚界;担子菌门;伞菌亚门(Agaricomycotina);银耳纲(Tremellomycetes);银耳目(Tremellales);有丝分裂孢子银耳目(mitosporic Tremellales);隐球酵母(*Cryptococcus*));家毛孢子菌属(*Trichosporon domesticum*) (真核生物域;真菌/复细胞动物组;真菌;双核亚界;担子菌门;伞菌亚门;银耳纲;银耳目;有丝

分裂孢子银耳目;毛孢子菌属(*Trichosporon*);解脂耶氏酵母(真核生物域;真菌/复细胞动物组;真菌;双核亚界;子囊菌门;酵母科;酵母菌亚门;酵母目;酵母菌目;双足囊菌科(*Dipodascaceae*);耶罗威亚酵母属);浅红掷孢酵母(*Sporobolomyces alborubescens*) (真核生物域;真菌/复细胞动物组;真菌;双核亚界;担子菌门;柄锈菌亚门;微球黑粉菌纲(*Microbotryomycetes*);锁掷酵母目;有丝分裂孢子锁掷酵母目;掷孢酵母属(*Sporobolomyces*));普通地霉属(*Geotrichum vulgare*) (真核生物域;真菌/复细胞动物组;真菌;双核亚界;子囊菌门;酵母科;酵母菌亚门;酵母目;酵母菌目;双足囊菌科;有丝分裂孢子双足囊菌科;地霉属(*Geotrichum*));和戴尔有孢圆酵母属(*Torulasporea delbrueckii*) (真核生物域;真菌/复细胞动物组;真菌;双核亚界;子囊菌门;酵母科;酵母菌亚门;酵母目;酵母菌目;酵母科;有孢圆酵母属)。在双核亚界内,本发明包括使用来自双核亚界的所有子域(子囊菌门和担子菌门)以及在子囊菌门和担子菌门内分类学子类的生物体。

[0087] “有机溶剂”是指溶解固体、液体或气体溶质产生溶液的含碳物质。

[0088] “光生物反应器”是指一种容器,该容器至少一部分是至少部分透明或部分敞开的,由此允许光透过,其中可培养例如一种或多种微藻细胞。如在聚乙烯袋或Erlenmeyer烧瓶的情况下,光生物反应器可以是密闭的,或如在露天池塘的情况下可为向环境敞开的。

[0089] “多糖”(又称“聚糖”)是指由单糖通过糖苷键连接在一起构成的碳水化合物。纤维素是构成某些植物细胞壁的多糖的实例。纤维素可在酶作用下解聚,得到单糖,例如木糖和葡萄糖,以及较大的二糖和寡糖。多糖的其它实例包括纤维、可溶性和不可溶膳食纤维、半纤维素,以及来自微生物细胞壁的碳水化合物,例如用过的生物质中所含者。

[0090] “多糖降解酶”是指能够催化任何多糖水解或解聚的任何酶。例如,纤维素可催化纤维素水解。

[0091] 在生物反应器的上下文中,“端口”是指生物反应器中允许例如气体、液体和细胞等物质流入或流出的开口。端口通常连接到从光生物反应器引出的管道。

[0092] “压榨”是指施加足够压力来迫使微生物生物质释放细胞内的油,其在本文中又称“压榨步骤”。压榨应足以裂解微生物生物质中所有或基本上所有的细胞。

[0093] “用过的生物质”、“用过的微生物生物质”和“压榨饼”都是指已经成为经过调节的原料且随后经受高压以使所得物质的脂质含量以重量比计低于由其得到脂质的经过调节的原料的微生物生物质。高压可通过使用例如由压榨机、螺杆式榨油机和机械压榨机等机器提供的压缩压力以及通过直接液压和其它过程实现,由此从经过调节的原料中挤出油。在一个实施方案中,通过使含油微生物生物质通过含油种子压榨机来制备用过的微生物生物质。在一个实施方案中,用过的微生物生物质是以细胞干重计具有低于30%油的微藻生物质。

[0094] “适用于动物饲料”是指某一物质或材料可被动物消耗,而无有害作用,所述动物通常为相关非人类农用哺乳动物或相关家畜,包括但不限于,马、牛、猪、鸡、狗和猫;在优选实施方案中,适用于动物饲料的物质将为动物提供营养。

[0095] II. 从微生物中提取油的方法

[0096] 一方面,本发明提供从微生物中提取、回收、分离或以其它方式获得油(脂质)的方法。本发明方法适用于从多种微生物中提取多种脂质。在本发明方法中,首先在允许脂质产

生的条件下培养产脂质微生物(例如微藻),以产生含油微生物生物质。随后根据所用方法,任选将含油生物质与膨胀剂混杂,并进行干燥和调节,以制备经过调节的干燥原料,随后压榨该原料以提取油。为方便读者,本论述将分为几个子部分。

[0097] 子部分A描述适于根据本发明方法提取油的微生物生物质。子部分B描述除去生物质中的水的方法,包括脱水和干燥。子部分C描述调节生物质的方法。子部分D描述膨胀剂(压榨助剂)和其与干燥的微生物生物质、水合微生物生物质和经过调节的原料的使用。子部分E描述对经过调节的原料施加压力以提取油(压榨步骤)的各种方法。子部分F描述由压榨步骤产生的油及其使用和进一步纯化的方法。子部分G描述由压榨步骤产生的油含量降低的用过的生物质及其使用方法。

[0098] A. 合适的生物质

[0099] 尽管本发明方法中可以采用来自包括微藻、产油细菌、产油酵母和真菌(参看下文第III部分)在内的多种微生物的生物质,但适用于本文所述方法中的微生物生物质通常以细胞干重计包含至少20%油。在一些实施方案中,生物质以细胞干重计包含在至少25%到至少60%范围内或更多的油。在一些实施方案中,生物质以细胞干重计含有15—90%油、25—85%油、40—80%油或50—75%油。在本发明各种实施方案中,微生物生物质(干燥或水合)或经过调节的原料含有至少25重量%油。在各种实施方案中,干燥的微生物生物质或经过调节的原料以重量计或以细胞干重计含有至少25%脂质。在各种实施方案中,干燥的微生物生物质或经过调节的原料以重量计或以细胞干重计含有至少40%、至少50%或至少75%脂质。在各种实施方案中,干燥的微生物生物质或经过调节的原料以重量计或以细胞干重计含有至少15%碳水化合物。

[0100] 本文所述生物质的油或从适用于本发明方法和组合物的生物质中提取的油可包含具有一个或多个不同脂肪酸酯侧链的甘油酯。甘油酯由酯化一个、两个或三个脂肪酸分子的甘油分子组成,所述脂肪酸分子可为不同长度且具有不同饱和度。可如本文所述通过培养条件或经由脂质路径改造来控制脂肪酸分子(且因此油)的长度和饱和特征,以改变本发明油中脂肪酸分子的性质或比例(也参看第US09/066141号和第US09/066142号PCT专利申请,以引用的方式并入本文中)。因此,可在单一种类的微藻(或其它微生物)内或通过将来自两种或两种以上种类微藻(或其它微生物)的生物质或藻类油混合在一起,来制备藻类油的特定共混物。

[0101] 也可通过组合来自至少两种不同属或种类的微生物(即微藻)的生物质或油来控制油组成,即甘油酯的脂肪酸成分的性质和比例。在一些实施方案中,至少两种不同属或种类的微生物(即微藻)具有不同的甘油酯组成。如本文所述,可一起或单独培养不同种类(或属)的微生物(对于微藻,通常在异养条件下培养),以产生相应的油。在细胞的甘油酯中,不同种类的微生物可含有不同百分比的不同脂肪酸成分。

[0102] 在各种实施方案中,微生物油主要由单不饱和油组成。在一些情况下,该油以重量或体积计含有至少50%的单不饱和油。在各种实施方案中,该油以重量或体积计含有至少50%、至少60%、至少70%或至少80%或更多的单不饱和油。在一些实施方案中,油以重量或体积计包含至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%或更多的酯化油酸或酯化 α -亚麻酸。在各种实施方案中,油以重量或体积计包含低于10%、低于5%或低于1%的酯化二十二碳六烯酸(DHA)或基本上不含该物质。

[0103] 在本发明此方面和其它方面的各种实施方案中,生物物质是通过使含有18:1脂肪酸的微生物发酵来制备的。在各种实施方案中,微生物的脂肪酸组成为低于1%的C14:0;约10—11%的C16:0;约3—4%的C18:0;约70—71%的C18:1;约14—15%的C18:2;约1—2%的C18:3;和低于1%的C20:0。在各种实施方案中,微生物的脂肪酸组成为约1—2%的C14:0;约20%的C16:0;约4%的C18:0;约64%的C18:1;和约7—8%的C18:2。在各种实施方案中,微生物具有最多0.5%的DHA。在这些和其它实施方案中,微生物在一些情形中是微藻。

[0104] 因此,多种微生物生物物质适用于本发明方法中。根据这些方法,含油生物物质通常经过脱水、干燥、调节且随后压榨,来提取油。

[0105] B. 将微生物生物物质脱水并干燥

[0106] 本发明方法的各种实施方案涉及一个或多个除去微生物生物物质中的水(或其它液体)的步骤。这些除水的步骤可包括本文中称为脱水和干燥的不同步骤。

[0107] 本文中使用的脱水是指将含油微生物与在其中培养该含油微生物的发酵液(液体)分离。如果进行脱水,则应利用不会导致或仅导致极少生物物质含油量损失的方法来进行。因此,一般需小心避免在任何脱水步骤期间发生细胞裂解。脱水是固体-液体分离,并且涉及从固体物质中除去液体。常用的脱水方法包括离心、过滤和/或使用机械压力。

[0108] 离心是包括使用离心力来分离混合物的过程。混合物中密度大的组分迁移远离离心轴,而混合物中密度较小的组分向离心轴迁移。通过增加有效引力(即,通过增加离心速度),密度较大的物质(通常是固体)根据密度与密度较小的物质(通常是液体)分离开。

[0109] 可通过使用离心将适用于本发明方法中的微生物生物物质从发酵液中脱水,由此形成浓缩的糊状物。离心后,在微生物生物物质中仍存在大量的表面或游离水分(例如超过70%),且因此为本发明的目的,不将离心视为干燥步骤。任选在离心后,可用洗涤液(例如去离子水)洗涤生物物质,以除去剩余的发酵液和碎片。

[0110] 在一些实施方案中,脱水涉及使用过滤。适于本发明的过滤的一个实例是切向流过滤(tangential flow filtration, TFF), 又称错流过滤。切向流过滤是使用膜系统和流动力从液体中纯化固体的分离技术。有关优选的过滤方法,参看Geresh, Carb. Polym. 50; 183-189 (2002), 其论述了使用MaxCell A/G technologies的0.45 μ m中空纤维过滤器。也参看例如使用100kD膜、300kD膜、1000kD膜(目录号P2C01MC01)、0.1 μ m膜(目录号P2VVPPV01)、0.22 μ m膜(目录号P2GVPPV01)和0.45 μ m膜(目录号P2HVMPV01)的Millipore Pellicon[®]装置。滞留物不应以显著的水平通过过滤器。滞留物也不应明显粘附至过滤材料。使用中空纤维过滤系统也可进行TFF。

[0111] 切向流过滤的非限制性实例包括涉及使用孔径为至少约0.1微米、至少约0.12微米、至少约0.14微米、至少约0.16微米、至少约0.18微米、至少约0.2微米、至少约0.22微米、至少约0.45微米或至少约0.65微米的过滤器的技术。优选的TFF孔径可使发酵液中的溶质和碎片流过,但微生物细胞不能流过。

[0112] 在其它实施方案中,脱水涉及使用直接施加于生物物质的机械压力来分离液体发酵液与微生物生物物质。所施加的机械压力量不应使显著百分比的微生物细胞破裂,如果破裂将导致油的损失的话,但只不过应足以将生物物质脱水到后续处理所需的程度。

[0113] 使用机械压力对微生物生物物质进行脱水的一个非限制性实例采用带式压滤机。带式压滤机是一种对穿过直径递减的蛇形压辊在两个张力带之间通过的浆料(例如直接来自

发酵罐或生物反应器的微生物物质)施加机械压力的脱水装置。带式压滤机实际上可分为三个区:重力区,在该区中,游离的排出水/液体在重力作用下穿过多孔带排出;楔形区,在该区中,使固体为压力施加作准备;和压力区,在该区中,对借助重力排出的固体施加可调压力。

[0114] 上述一种或多种脱水技术可单独或组合使用以对用于本发明中的微生物物质脱水。本发明部分基于以下发现:微生物物质(经过调节的原料)的水分含量显著影响压榨步骤中获得的油的产率,而且低于6%且优选低于2%的最佳水分含量完全不同于由许多含油种子压榨油的最佳水分含量。尽管最佳水分含量可视含油种子的类型而变化,且也可视微生物物质的类型变化,但压榨微生物物质的最佳水分含量低于对含油种子的最佳水分含量。例如,压榨芝麻和亚麻籽的最佳水分含量为约4%(Willems等, *J. Food Engineering* 89:1, 第8—16页, 2008)。压榨海甘蓝籽的最佳水分含量在9.2%与3.6%之间(Singh等, *JAOCs* 79:2, 第165—170页, 2006)。压榨卡诺拉籽的最佳水分含量为约5%(Vadke等, *JAOCs* 65:7, 第1169—1176页, 1988)。压榨椰子的最佳水分含量为约11%(Mpagalile等, *Int. J. Food Sciences and Nutrition*, 56:2, 第125—132页, 2005)。其它最佳水分含量是,对于油菜籽为7%,对于亚麻荠为6%,对于向日葵为8.5%,对于红花为11%,且对于大豆为12%(Alam, M.S. 2007年11月。Basics of Fats and Oils Chemistry: Factors Affecting Crude Oil Quality. Presented to the Vegetable Oils Extraction Short Course, Texas A&M Food Protein R&D Center, College Station, Texas)。

[0115] 相比之下,压榨微生物物质的最佳水分含量低于6重量%,且优选低于3%。例如,最佳水分含量可为0.5—2重量%。在各种实施方案中,尤其有关从微藻物质中提取油的实施方案中,最佳水分含量在微生物物质总重量的0.5%到2%范围内。在一个实施方案中,水分含量在微生物物质总重量的0.7%到1.2%范围内。在一个实施方案中,水分含量在微生物物质总重量的1.0%到2.0%范围内。最佳水分含量可取决于若干因素,包括但不限于,以细胞干重计(DCW)测量的脂质(油)%或物质中的纤维和半纤维素量。在本发明方法的一些实施方案中,例如在采用膨胀剂(参看子部分D)的实施方案中,仅仅脱水就能提供合适的微生物物质的水分含量,随后进行调节,之后进行压榨步骤。在本发明的其它方法和实施方案中,脱水的物质将经历干燥步骤,随后进行调节,之后进入压榨步骤(在该步骤中,从物质中提取出油)。

[0116] 本文中提到的干燥是指除去微生物物质中部分或全部的游离水分或表面水分。与脱水相同,干燥过程不应导致微生物物质损失大量的油。因此,干燥步骤通常不应使大量的微生物细胞裂解,因为在大多数情况下,脂质位于微生物物质的细胞内隔室中。本领域中已知用于其它目的的数种干燥微生物物质的方法都适用于本发明方法。除去了游离水分或表面水分后的微生物物质称为干燥的微生物物质。在压榨步骤前,如果在调节时不能进一步除去水分,或通过加入干燥的膨胀剂发生水分减少,那么干燥的微生物物质应含有低于6重量%的水分。

[0117] 在各种实施方案中,干燥的微生物物质的水分含量在0.1重量%到5重量%范围内。在各种实施方案中,干燥的微生物物质的水分含量低于4重量%。在各种实施方案中,干燥的微生物物质的水分含量在0.5重量%到3.5重量%范围内。在各种实施方案中,干

干燥的微生物生物质的水分含量在0.1重量%到3重量%范围内。适用于根据本发明方法制备干燥微生物生物质的干燥方法的非限制性实例包括冻干法,以及使用干燥器,例如转鼓式干燥器、喷雾干燥器和盘式干燥器,下文将分别予以描述。

[0118] 冻干,又称冷冻干燥或低温干燥,是通常用来保存易腐烂物质的脱水方法。冻干法涉及冷冻该物质,随后降低周围压力并添加足量的热以使物质中冷冻的水由固相升华成为气体。在冻干微生物生物质(例如微藻来源的生物质)的情况下,微藻的细胞壁充当低温保护剂,防止在冷冻干燥过程中细胞内脂质发生降解。

[0119] 转鼓式干燥器是适于干燥大量微生物生物质的最经济的方法之一。转鼓式干燥器或滚筒式干燥器由两个大的钢制圆筒组成,这两个钢制圆筒彼此相向转动并借助蒸汽由内部加热。在一些实施方案中,以薄片形式将微生物生物质施加到大圆筒外部。通过来自蒸汽的热,微生物生物质随后通常在不到大圆筒的一转时间被干燥,且用钢片将所得干燥的微生物生物质从圆筒上刮掉。所得干燥的微生物生物质具有易剥落的稠度。在各种实施方案中,首先使微生物生物质脱水,随后使用转鼓式干燥器干燥。有关转鼓式干燥器的更详细描述参见第5,729,910号美国专利,该专利公开一种旋转干燥筒。

[0120] 喷雾干燥是使用热气体干燥液体进料的常用方法。喷雾干燥器携带液体流(例如含有微生物生物质),并将溶质分离为固体,将液体变为蒸气。液体输入流通过喷嘴喷到热蒸汽流中并汽化。随着水分迅速离开液滴,固体形成。喷雾干燥器的喷嘴是可调的,且通常被调成产生尽可能小的液滴,以使热传递和水汽化速率最大化。所得干燥固体可视所用喷嘴的尺寸而具有精细、粉末状稠度。在其它实施方案中,喷雾干燥器可使用冻干法而非蒸汽加热法来干燥物质。

[0121] 盘式干燥器通常被用于实验室研究和小试规模干燥操作。盘式干燥器基于对流加热和蒸发来工作。使用热和出气孔除去蒸发的水,可由多种细胞浓度有效地干燥含有微生物生物质的发酵液。

[0122] 闪蒸干燥器通常被用于干燥经过脱水或本身具有低水分含量的固体。这些干燥器又称为“气流式干燥器”,通常将潮湿物质分散到通过干燥管道输送潮湿物质的热空气流(或气流)中。当通过干燥管道输送物质时,来自空气流(或气流)的热将使其干燥。随后使用旋风分离器和/或袋式过滤器分离干燥的产物。对许多产物可用较高的干燥温度,因为闪蒸掉表面水分将立即冷却干燥气体/空气,同时不会明显增加产物的温度。有关闪蒸干燥器和气流式干燥器的更详细描述参见第4,214,375号美国专利,其描述了一种闪蒸干燥器,以及第3,789,513号和第4,101,264号美国专利,其描述了气流式干燥器。

[0123] 不管所选用于干燥步骤的方法如何,干燥步骤的目的是减少微生物生物质中的水分含量。如果水分没能在调节步骤期间从干燥的微生物生物质中除去或通过加入干燥的膨胀剂减少,那么水分含量应低于6重量%。通常,适于压榨的干燥的微生物生物质(经过调节的原料)的水分含量为约0.1重量%到6重量%,包括在各种实施方案中,水分含量为0.5—2.5%。必要时,在干燥后可将水分加回到生物质中,以将水分含量调到最佳水平。如果干燥的微生物生物质与干燥的膨胀剂混杂(参看子部分D),或按进一步降低水分含量的方式调节(参看子部分C),那么较高(超过6重量%)的水分含量是可接受的,因为在一些实施方案中,膨胀剂和/或调节可将水分含量降到所需的最佳水平。

[0124] 如以下子部分中所述,在压榨步骤前调节脱水和/或干燥的微生物生物质。

[0125] C. 调节微生物生物质

[0126] 调节微生物生物质有助于达到所需的油提取水平。调节是指将生物质加热到在70℃到150℃(160°F到300°F)范围内的温度,并改变微生物生物质的物理或生理化学性质,以提高后续油提取(压榨)步骤的油产率。调节微生物生物质将产生“经过调节的原料”。除加热或“蒸煮”生物质外,调节生物质的非限制性实例还包括调节干燥的微生物生物质内的水分含量、对干燥的微生物生物质进行低压“预压榨”、使干燥的微生物生物质经历加热和冷却循环、使干燥的微生物生物质经历膨胀机处理和/或调节干燥的微生物生物质的粒度。

[0127] 调节步骤包括的技术(例如加热或施加压力)可能与干燥或压榨步骤中所用的技术部分重叠。但这些步骤的主要目标是不同的:干燥步骤的主要目标是除去微生物生物质中部分或全部的游离水分或表面水分。调节步骤的主要目标是加热生物质,此举可任选除去微生物生物质细胞内的水,即调节微生物生物质的细胞内水分含量,和/或改变微生物生物质的物理或生理化学性质,同时基本上不会释放脂质,从而在压榨步骤期间促进油的释放。压榨步骤的主要目标是释放出微生物生物质或经过调节的原料中的油,即提取油。

[0128] 在各种实施方案中,调节包括通过施加热来改变或调节微生物生物质的水分含量,即热调节。本文中使用的热调节是指微生物生物质的热处理(直接或间接)。可通过使用热调节(直接或间接)来调节微生物生物质的水分含量,这一操作(如果有的话)通常是在干燥步骤后进行。即使可以通过上述任一方法来干燥生物质,但干燥后微生物生物质的水分含量可为在例如3重量%到15重量%水分或5—10重量%水分的范围内。这一水分范围对于在压榨步骤中实现最大油回收可能并非最佳的。因此,宜在热调节脱水和/或干燥的微生物生物质中将水分含量调到实现最大油回收最适宜的水平(低于6%)。

[0129] 含油种子处理中所使用的热调节器适用于根据本发明方法调节微生物生物质,例如垂直堆积式调节器。这些调节器由一系列三个到七个或更多个封闭的叠放圆柱形钢盘组成。每一盘独立地在两侧和底部装有用于蒸汽加热的夹套,并装备有靠近底部安装的扫动式搅拌器,且通过延伸穿过整个盘系列的公共轴操作。热调节器的温度也可通过调控蒸汽加热来调节。除最后一个盘外,在每一盘的底部都有自动操作的闸门,用于将内含物排放到下面的盘。顶部盘设有喷淋器,用以在必要时加入水分。尽管在许多农用油提取过程中,水分是在调节期间喷到种子上的,但这一常用方法不适合调节微生物生物质。蒸煮器通常也具有排气管和风扇,用以除去水分。因此,有可能控制微生物生物质的水分,不仅是最终的水分含量,而且还控制每一操作阶段的水分含量。就这一点来说,通过加热微生物生物质较长时间段(例如10—60分钟)进行的调节步骤不仅将实现减少生物质水分和增加其温度的作用,而且还能改变微生物生物质的生物物理性质,超出在后续压榨步骤中可能发生的任何加热作用,即,当迫使物质通过例如压榨机时仅依靠物质的摩擦力。

[0130] 另外,带蒸汽夹套的卧式蒸煮器是适于在本文中根据本发明方法使用的另一类热调节器。在这一设计中,将生物质混合,加热并在比常规垂直堆积式蒸煮器深的床中的水平平面上输送。在卧式蒸煮器中,特别设计的螺旋混合器起到输送生物质的作用,同时通过来自蒸汽夹套的间接蒸汽加热生物质。水和蒸气以及空气通过上部管道从蒸煮器中放出,根据蒸煮器的容量,这里可存在或可不存在排气扇。对于在高流速下蒸煮生物质,可以将几个卧式蒸煮器堆叠在一起。在这一配置中,将生物质送入顶层蒸煮器并加热,且通过螺旋输送机输送,随后在重力作用下落入下一层蒸煮器中,在这里重复上述过程。根据所需流速和所

需调节时间/温度,可将几层卧式蒸煮器堆叠在一起。每一层卧式蒸煮器的水分和温度可独立监测和调节。

[0131] 对于微生物生物物质的热调节,尤其微藻生物物质,生物物质在垂直堆积式调节器中经历的最佳时间和温度可视干燥后生物物质的水分含量而不同。热调节(有时称为“蒸煮”)不应在蒸煮期间燃烧或烧焦大量的微生物生物物质。根据热调节前微生物生物物质的水分含量,即,对于极低水分含量,适宜或甚至必需在热调节前润湿生物物质以避免燃烧或烧焦。根据打算进料通过压榨机的微生物生物物质的类型,热调节的最佳温度将不同。对于某些类型的微藻,热调节的最佳温度在200—270°F之间。在一些实施方案中,在210—230°F下热调节微藻生物物质。在其它实施方案中,在220—270°F下热调节微藻生物物质。还在其它实施方案中,在240—260°F下热调节微藻生物物质。与水分含量一样,这些温度范围与通常用于含油种子调节过程中的温度范围不同,因为含油种子的处理通常使用较低的调节温度。

[0132] 在压榨前加热含油微生物生物物质可有助于油从细胞的载油隔室中释放和/或接近细胞的载油隔室。含油微生物生物物质在由例如蛋白质和磷脂等细胞组分构成的隔室中含有油。重复的加热和冷却循环可使蛋白质变性,并改变这些含油隔室的细胞组分的化学结构,由此便利在后续萃取过程期间更好地取得油。因此,在本发明各种实施方案中,对微生物生物物质进行调节以制备用于压榨步骤中的经过调节的原料,且调节步骤涉及加热以及任选一个或多个加热和冷却循环。

[0133] 如果不打算进行进一步热调节或其它改变水分含量的调节,且如果不打算加入膨胀剂来改变水分含量,那么由热调节得到的经过调节的原料应含有低于6重量%水分。在各种实施方案中,经过调节的原料的水分含量在0.1重量%到5重量%范围内。在各种实施方案中,经过调节的原料的水分含量低于4重量%。在各种实施方案中,经过调节的原料的水分含量在0.5重量%到3.5重量%范围内。在各种实施方案中,经过调节的原料的水分含量在0.1重量%到3重量%范围内。

[0134] 除加热生物物质外,在一些实施方案中,调节还可涉及对微生物生物物质施加压力。为了区分此类调节与在油提取(压榨步骤)期间施加的压力,此类调节称为“预压榨”。预压榨是在低压下进行,该压力低于压榨步骤中用于提取油的压力。通常的高压压榨机(螺杆式)可在适于此预压榨调节步骤的低压下操作。在低压下预压榨生物物质可有助于打开细胞以使油在后续高压压榨期间更好地流动;然而,预压榨不会使大量(例如超过5%)的油与微生物生物物质分离。另外,在预压榨期间产生的摩擦和热也可帮助打开细胞中的油隔室。在低压下预压榨生物物质还能改变生物物质的构造和粒度,因为生物物质将在压榨机中以团粒状形式被挤压出来。在一些实施方案中,挤压机(参看下文的论述)可用来达到与低压预压榨调节步骤相同或相似的结果。在一些实施方案中,经过调节的生物物质的团粒被进一步处理,以获得适于后续全压力压榨的最佳粒度。

[0135] 因此,与实现微生物生物物质中油的最佳提取有关的另一参数是粒度。通常,适于榨油机(螺杆式压榨机)的最佳粒度为约1/16英寸厚。可能影响粒度范围的因素包括但不限于,用于干燥微生物生物物质的方法和/或将膨胀剂或压榨助剂加入到生物物质中。如果通过托盘干燥生物物质,例如涂湿托盘,随后在烘箱中干燥,那么所得干燥微生物生物物质可能需要被破碎成具有最佳粒度的均匀片,以便最佳适于在压榨机中进行压榨。如果在干燥过程前将膨胀剂加入到微生物生物物质中,也是相同情形。因此,调节可涉及改变微生物生物物质的粒度

或平均粒度的步骤。例如锤式粉碎机或刨片机等机器可用于本发明方法中以调节含油微生物生物质的厚度和粒度。

[0136] 按类似方式,可通过改变干燥微生物生物质的其它物理性质来改进油提取。具体说来,微生物生物质的孔隙度和/或密度可影响油提取的产率。在本发明方法的各种实施方案中,调节生物质以改变其孔隙度和/或密度。在用己烷或其它溶剂提取含油种子中的油之前,常用膨胀机和挤压机增加原料的孔隙度和堆积密度。根据本发明方法,在提取油之前,可使用膨胀机和挤压机调节微生物生物质,并且可使或不使大量的油与微生物生物质分离。膨胀机和挤压机都是将含油物质加热、均质化并形成套筒或团粒的低剪切力机器。膨胀机和挤压机以类似方式工作;二者都在轴内具有蜗杆/轴环结构,以致当其在轴内移动物质时,机械压力和剪切力将打开细胞。膨胀机与挤压机的最大差别在于,膨胀机在轴端使用水和/或蒸汽来使物质膨大。突然的高压(和压力改变)使物质中的水分汽化,由此使用内部水分使物质“膨大”或膨胀。挤压机会改变物质的形状,形成套筒或团粒。挤压机还裂解细胞并使生物质中的水汽化(减少水分),同时通过挤压机施加于生物质的机械摩擦力升高生物质的温度(加热生物质)。因此,挤压机和膨胀机都可用于本发明方法中,以调节干燥的微生物生物质。挤压机/膨胀机可打开细胞,释放细胞内脂质,同时还可改变物质的孔隙度和堆积密度。原料这些物理性质的改变有利于后续的油提取。

[0137] 上述调节方法可单独或组合用于本发明方法中,以获得适于后续油提取的经过最佳调节的微生物生物质原料。因此,调节步骤包括对生物质施加热且任选施加压力。在各种实施方案中,调节步骤包括在在70°C到150°C(160°F到300°F)范围内的温度下加热生物质。在各种实施方案中,加热是使用垂直堆积式振荡器进行的。在各种实施方案中,调节步骤还包括用膨胀机或挤压机处理干燥的生物质以使生物质成形和/或均质化。

[0138] D. 膨胀剂(压榨助剂)

[0139] 在本发明各种实施方案中,在压榨步骤前,将膨胀剂或压榨助剂加入到微生物生物质中,该微生物生物质可为干燥的或水合的(即,生物质尚未干燥或含有大量,即超过6重量%水分,包括还未进行任何处理来除去或分离水的发酵液中的生物质)微生物生物质或经过调节的原料。在各种实施方案中,膨胀剂的平均粒度小于1.5mm。在一些实施方案中,膨胀剂或压榨助剂的粒度在50微米与1.5毫米之间。在其它实施方案中,压榨助剂的粒度在150微米与350微米之间。在一些实施方案中,膨胀剂是助滤剂。在各种实施方案中,膨胀剂选自纤维素、玉米秸秆、干燥的迷迭香、大豆皮、用过的生物质(脂质含量比制备脂质的生物质低的生物质,包括用过的微生物生物质)、甘蔗渣和柳枝稷。在各种实施方案中,膨胀剂是用过的微生物生物质(参看下文的子部分G),其含有在40重量%与90重量%之间的多糖,例如纤维素、半纤维素、可溶和不可溶纤维以及这些不同多糖的组合,和/或低于10重量%的油。在各种实施方案中,在用过的微生物生物质中用作膨胀剂的多糖含有20—30摩尔%半乳糖、55—65摩尔%葡萄糖和/或5—15摩尔%甘露糖。

[0140] 因此,在本发明一些实施方案中,加入压榨助剂或膨胀剂将有益。当生物质中存在高含油量和低纤维时,将生物质进料通过压榨机可产生乳液。这将导致低油产率,因为油被截留在固体内。根据本发明方法,在这种情况下,提高产率的一种方式是将膨胀剂形式的多糖加入到生物质中,其又称“压榨助剂”。膨胀剂通常是高纤维添加剂,其通过将微生物生物质的总纤维含量调到最佳范围来起效。微生物生物质,例如微藻等,通常具有极低的粗纤维

含量。通常,包括微藻生物质在内的微生物生物质中粗纤维含量都低于2%。加入高纤维添加剂(压榨助剂形式)可有助于将微生物生物质的总纤维含量调到适于使用压榨机提取油的最佳范围。适于典型含油种子的最佳纤维含量可在10—20%范围内。根据本发明方法,调节微生物生物质的纤维含量可有助于实现最佳的油提取。生物质中纤维含量的范围可与适于典型含油种子的最佳纤维含量范围相同或相似,但每一微生物生物质的最佳纤维含量可低于或高于适于典型含油种子的最佳纤维含量。合适的压榨助剂包括但不限于,柳枝稷、稻秆、甜菜浆、甘蔗渣、大豆皮、干燥的迷迭香、纤维素、玉米秸秆、由大豆得到的脱脂(经过压榨或溶剂提取)饼、卡诺拉、棉籽、向日葵、麻风树籽、纸浆、废纸等。在一些实施方案中,将由先前压榨得到的脂质含量降低的用过的微生物生物质用作膨胀剂。在一些应用中,尤其当打算将油用于食品应用中或打算消费掉时,将选择与微生物生物质(干燥或水合的)或经过调节的原料混合使用的压榨助剂以满足法规要求(适用作食料)。因此,膨胀剂当并入生物质中时,会改变生物质的生理化学性质,以促进对生物质中的细胞更均匀地施加压力。

[0141] 在一些情况下,膨胀剂可在微生物生物质干燥后但未调节时加入。在这种情况下,宜将干燥的微生物生物质与所需量的压榨助剂混合,随后一起调节微生物生物质和压榨助剂,再送入到螺杆式压榨机中。在其它情况下,压榨助剂可在微生物生物质经历任何分离或脱水过程、干燥或调节之前加入到水合微生物生物质中。在这种情况下,压榨助剂可在进行任何脱水或其它步骤前直接加入到含有微生物生物质的发酵液中。

[0142] 本发明提供各种与采用上述膨胀剂从微生物生物质中提取油有关的方法。在一种方法中,通过将膨胀剂加入到生物质中,并干燥由此获得的混合物达到水分含量低于6重量%,由此形成干燥的膨胀剂/生物质混合物,来制备适于油提取的水合微生物生物质。在另一种方法中,通过共干燥含有至少20重量%的油(包括至少40重量%的油)的水合微生物生物质与膨胀剂,形成干燥的膨胀剂/生物质混合物;将混合物中的水分含量减少到低于4重量%,即借助干燥和/或调节;并压榨水分含量减少的混合物以从其中提取出油,由此从微生物生物质中提取油,从而形成脂质含量降低的用过的生物质。在另一种方法中,通过共干燥微生物生物质与膨胀剂,由含有至少20重量%脂质的微生物生物质获得较高产率的油,因为共干燥的混合物在压榨时释放的油比在不存在膨胀剂情况下在相同条件下由生物质获得的油多。在本发明这些和其它方法的各种实施方案中,水合微生物生物质包含在还未进行处理以分离或除去生物质中的水的发酵液中。

[0143] 在一个实施方案中,膨胀剂是合并有未被提取的微生物生物质的用过的微生物生物质,其任选经过处理或磨碎(便于均质及共混)。在这种情况下,在送入压榨机前,共混(作为压榨助剂的用过的生物质以及未提取过的微生物生物质)的微生物生物质中的总多糖含量占共混的生物质的总重量的10%到40%。

[0144] E. 压榨微生物生物质

[0145] 因此,根据本发明方法,在压榨步骤中,对任选包含膨胀剂的经过调节的原料施加压力以提取油,由此产生与用过的生物质分开的油。压榨步骤包括施加足以从经过调节的原料中提取出油的压力。因此,在一些实施方案中,在压榨步骤中压榨的经过调节的原料包含的油主要或完全包封在生物质的细胞中。在其它实施方案中,生物质主要包含裂解的细胞,且因此油主要不被包封在细胞中。

[0146] 在本发明不同方面的各种实施方案中,压榨步骤涉及对经过调节的原料施加至少

10,000psi压力。在各种实施方案中,压榨步骤涉及在第一时间段施加压力,随后在第二时间段施加较高压力。这一过程可重复一次或多次(“波动压力”)。在各种实施方案中,施加超过5个循环的波动压力。在各种实施方案中,后续的一个或多个循环施加的平均压力可高于早期一个或多个循环中所施加的平均压力。例如(但不限于),最后一个循环中的平均压力可以比第一个或早期任一循环中的平均压力高达至少2倍。在各种实施方案中,在压榨步骤期间控制经过调节的原料的水分含量。在各种实施方案中,水分被控制在0.1重量%到3重量%范围内。

[0147] 在各种实施方案中,压榨步骤是用压榨机进行的。在各种实施方案中,压榨步骤是以连续流动模式进行的。在各种实施方案中,出油速率为至少500g/min到不超过1000g/min。在各种连续流动实施方案中,压榨机是在笼内包括连续旋转的蜗杆轴的装置,该笼的一端具有进料器且在相对端具有油嘴,在笼内具有可利用的开口。经过调节的原料通过进料器进入笼内,且蜗杆轴旋转将沿笼推进原料,并对设置在笼与油嘴之间的原料施加压力,该压力释放油通过笼的开口并从笼的油嘴端挤出用过的生物质。在各种实施方案中,笼的内部长度是其内径的至少10倍到至少20倍。在各种实施方案中,笼包括多个细长杆,其中至少一些细长杆由一个或多个隔板分开,这些杆搁置在框架上,其中各杆之间的一个或多个隔板形成开口,且油通过这些开口释放到与笼流体连接的收集容器中。在各种实施方案中,细长杆之间的隔板具有不同厚度,由此使各细长杆之间的空隙不同。在各种实施方案中,各杆之间的隔板或间隙的厚度为0.005英寸到0.030英寸。

[0148] 根据获得最大产率所需的最佳温度,可使用蒸汽加热或使用水冷却一些压榨机上的笼。最佳温度应足够热以帮助压榨,但不能过热以致在生物质进料通过压榨机时燃烧生物质。压榨机的笼的最佳温度可视欲压榨的微生物生物质而变化。在一些实施方案中,对于压榨微生物或微藻生物质,可将笼预热并保持在200—270°F之间的温度。在其它实施方案中,适于微生物或某些种类的微藻生物质的最佳笼温度在210—230°F之间。还在其它实施方案中,适于微生物或某些种类的微藻生物质的最佳笼温度在240—260°F之间。这些温度与许多含油种子压榨过程明显不同,且事实上,一些含油种子压榨过程因在过程中没有加热种子或压榨机而被称为“冷压榨”。

[0149] 在各种实施方案中,笼的进料器端到油嘴端的压力增加达10倍到20倍。在各种实施方案中,沿笼的压力在笼的进料器端与油嘴端之间每一线英尺笼上的增加不超过在笼的进料器端处的压力的100%。在各种实施方案中,相对于空转,当满载生物质或经过调节的原料时所述装置消耗的功率不会增加超过10%。在各种实施方案中,原料在装置桶中的停留时间不超过5—10分钟。在各种实施方案中,装置的温度或装置所施加的压力或二者受到监测和/或控制。

[0150] 在各种实施方案中,通过调节蜗杆轴的旋转速度来控制压力。在包括其中不控制压力的实施方案在内的各种实施方案中,可以使用包括蜗杆轴和桶的压榨机(螺杆式)。在各种实施方案中,桶具有一定长度并具有直径尺寸可容纳蜗杆轴的槽,且其中桶长度比槽直径大到至少10倍到15倍。在各种实施方案中,压榨机的桶具有进口和出口,且从进口到出口,蜗杆轴的直径增加,并且压榨包括从桶的进口到出口增加压力;在各种实施方案中,出口处的压力比入口处压力高达12倍到16倍,或者甚至到高达20倍。在各种实施方案中,压榨机(螺杆式)包括蜗杆轴和具有第一槽和第二槽的桶,两个槽同轴且尺寸能容纳蜗杆轴,

其中第一槽具有第一直径,而第二槽具有不同于第一直径的第二直径。在各种实施方案中,经过调节的原料在螺杆式压榨机的桶中保留5分钟到10分钟。

[0151] 在各种实施方案中,压榨机(螺杆式)包括设置在桶中的蜗杆轴,所述桶衬以经由其间一个或多个隔板分开的多个细长杆,这些隔板产生各细长杆之间的间隙。在此类压榨机中,可通过改变细长杆之间的隔板的尺寸或数量来调节间隙,从而控制压力,和/或如果在压榨机蜗杆轴外表面与细长杆的内表面之间存在空隙,那么可通过用不同尺寸的杆更换至少一些细长杆改变该空隙,从而控制压力。在各种实施方案中,压榨机包括输出孔和与该输出孔连接的可调节的油嘴,并通过调节油嘴增加或降低压力来控制压力。在各种实施方案中,压榨机(螺杆式)包括设置在桶中的蜗杆轴,并通过调节蜗杆轴外表面与桶内表面之间的间隙来控制压力。

[0152] 压榨机(螺杆式压榨机)惯常被用于从大豆和含油种子中以机械方式提取油。一般说来,压榨机的主要部分包括进出口、旋转进料器螺杆、笼或桶、蜗杆轴和油盘。压榨机是连续笼式压榨机,其中压力是由连续旋转的蜗杆轴产生的。通过蜗杆倚可调节的油嘴作用,在笼或桶内建立起每平方英寸约10,000-20,000磅的极高压力,所述油嘴限制压榨饼(用过的生物质)从桶端部排放。在各种实施方案中,由以下制造商生产的螺杆式压榨机将适用: Anderson International Corp. (Cleveland, OH)、Alloco (Santa Fe, Argentina)、De Smet Rosedowns (Humberston, UK)、The Dupps Co. (Germantown, Ohio)、Grupo Tecnal (Sao Paulo, Brazil)、Insta Pro (Des Moines, Iowa)、French Oil Mill (Piqua, OH)、Harburg Freudenberg (以前的Krupp Extraktionstechnik) (Hamburg, Germany)、Maschinenfabrik Reinartz (Neuss, Germany)、Shann Consulting (New South Wales, Australia) 和SKET (Magdeburg, Germany)。

[0153] 通过进出口将微生物生物质或经过调节的原料供应到压榨机中。旋转的进料器螺杆将由进出口供应的物质推进到桶中,在桶中,该物质接着通过蜗杆轴旋转进行压缩。随后,从物质中提取的油被收集到油盘中,然后泵送到储罐。接着剩余用过的生物质以饼状从压榨机中挤压出来,并且可收集起来供另外的处理(参看下文子部分G)。该饼可粒化。

[0154] 蜗杆轴与轴环装置相关联,且分成几个部分。每一部分内的蜗杆和轴环装置是可定制的。蜗杆轴负责输送生物质(原料)通过压榨机。其特征可在于,具有一定直径和螺距。改变轴直径和间距可增加或降低原料通过压榨机时施加于原料的压力和剪切应力。使用轴环的目的是增加压榨机内原料受的压力,也对生物质施加剪切应力。

[0155] 从载有微生物生物质(经过调节的原料)的压榨机运转所需的电流方面来说,压榨机负荷通常不超过压榨机空转所需电流的约10%,且这表明,压榨微生物生物质(本文公开的经过调节的原料)所需的功率低于含油种子工业的其它典型功率要求,其中压榨机满负荷高于含油种子原料的压榨机空转所需电流的10%。

[0156] 蜗杆轴优选呈锥形,因此其外径沿远离桶入口的纵向长度增加。这使得蜗杆轴与桶内部之间的间隙减小,由此当生物质通过桶移动时,产生更大的压力和剪切应力。另外,桶内部是由经隔板(又称垫片)分开的平钢杆制成,所述隔板沿边设置在桶周边的周围,并通过重摇架型笼固定在合适的位置。调节各杆之间的垫片可控制各杆之间的间隙,从而有助于提取的油排出,以及还帮助调节桶压力。垫片的厚度通常为0.003"到0.030",且优选为0.005"到0.020",但也可采用其它厚度。另外,也可以调节杆,由此在桶内产生各部分。

[0157] 当进料物质在桶内压榨或向下移动时,摩擦产生大量的热。在一些情况下,使用围绕桶的水夹套冷却系统来控制热量。由于压力极端,由螺杆式压榨机或压榨机压榨出来的油含有一定比例的与油一起在各杆之间流出的生物质中的“渣滓”或固体物质。渣滓可经由过筛,排出并连同未压榨的原料一起送回到压榨机中。温度传感器可设置在桶周围的各位置处,以监测并帮助控制温度。另外,压力传感器也可附接于桶的各位置处,以帮助监测和控制压力。

[0158] 压榨机(螺杆式)的各种操作特性都可以压缩比来表达或分析。压缩比是在桶开端部分蜗杆轴每转一周时物质移位的体积除以在桶末端部分处蜗杆轴每转一周时物质移位的体积的比例。例如,由于压缩比增加,在桶末端部分处的压力可比在桶开端部分处的压力高达10倍到18倍。桶内部长度可为桶内部直径的至少10倍或甚至13倍。根据进料物质的情况,螺杆式压榨机或压榨机的典型压缩比范围为1到18。

[0159] 进料物质在压榨机(螺杆式)中的停留时间可影响油的回收量。增加在压榨机中的停留时间将使原料更多地暴露于压榨机产生的剪切应力和压力,此举可得到较高油回收率。原料的停留时间取决于压榨机运转时的速度以及螺杆式压榨机的长度与直径比(或L/D)。轴长度与轴直径的比例越大,则原料的停留时间越长(当旋转速度保持恒定时)。在一些实施方案中,用压榨机压榨的藻类生物质的停留时间不超过5到10分钟。藻类生物质的这一停留时间是例如大豆、卡诺拉或棉籽等其它含油种子的平均停留时间的约两倍。

[0160] 所得经过压榨的固体或饼(含油量比供应到螺杆式压榨机中的原料低的用过的生物质)通过桶/轴末端部分的排放锥从压榨机中放出。油嘴利用液压系统控制压榨机上的出口孔。充分优化的榨油机操作可提取出含油物质中的大部分可用油。例如,使用压榨机从大豆中提取油的最佳条件产生约4—6%的残留油;根据本发明方法,可由微生物生物质(经过调节的原料)获得类似产率。多种因素可影响压榨饼中的残留含油量。这些因素包括但不限于,压榨机破裂含油细胞和细胞隔壁的能力以及含油物质本身的组成,所述含油物质可对排出的油具有亲和力。在一些情况下,含油物质可对排出的油具有高亲和力,并且可将排出的油重新吸收到该物质中,由此截留油。在这种情况下,用过的生物质中留下的油可如本文所述进行再压榨或溶剂提取,以回收油。

[0161] 使用压榨机提取油时不必使用生物制剂,即,独立于微生物生物质产生的酶等试剂。施加于经过调节的生物质上的压力是使由微生物生物质中的油泡释放油的主要机制。

[0162] F. 产生的微生物油

[0163] 压榨步骤后,本发明方法将进行油的提取,且最终产生提取的油和含油量低于供应到压榨步骤中的经过调节的原料的用过的生物质。在各种实施方案中,释放的油含有生物质(经过调节的原料)固体颗粒,且所述方法进一步包括使释放的油与这些固体颗粒分离。

[0164] 压榨(或溶剂提取,参看下文子部分G;或二者)后的油中可存在污染物。在一些实施方案中,在后续使用油(用于食品应用或用于后续化学反应中,如燃料生产中)之前,宜除去这些污染物。提取的油中可能存在来自生物质的细粉或小颗粒。通常,经使油通过过滤器或者以物理方式分离颗粒与油的一些其它方式来除去细粉。分离出来的固体颗粒可任选经受压力或溶剂提取,以从其中提取出任何剩余的油。

[0165] 脱胶是适用于本发明方法中以除去油中例如磷脂等污染物的另一方法。在本发明

一些实施方案中,将提取的油的脱胶与精制、漂白和除臭(或RBD)相结合。RBD方法将消除或减少提取的油的臭味、颜色和/或味道。精制过程通常由两个步骤组成:脱胶和中和步骤,该中和步骤通过用氢氧化钠进行碱溶出,来除去油中的游离脂肪酸(FFA)。漂白步骤涉及将油与各种漂白土混合来吸收颜色、微量的金属和硫化物。除臭步骤是在低压和高温下进行的蒸馏过程。将油放入高真空下,并用蒸汽加热,以除去任何残留味道或臭味和FFA。除臭也可通过用活性炭处理来实现。

[0166] 除去例如重金属等污染物的其它方法涉及碱精制、酸预处理和使用活性粘土或沸石,这些方法也可用于本发明各种实施方案中。在适度温度下,将油与少量某些碱或氢氧化铵和碱或铵盐在相转移催化剂下混合。由Phillips Petroleum Company公司开发的PROP技术将化学脱金属法与氢化法相结合来除去油中的污染物。该过程涉及:将油与磷酸二铵水溶液在高温下混合以降低油中的金属含量。这一过程导致生成金属磷酸盐的化学反应,这些金属磷酸盐随后可通过过滤从油中除去。接下来,在氢化反应器中,将油与氢混合,并由粘土床渗滤且越过Ni/Mo催化剂。这一吸附步骤将除去剩下的微量污染化合物,例如硫、氧、氯和氮。

[0167] 在各种实施方案中,由本发明方法产生的提取的油含有不超过8ppm的氯、不超过2ppm的磷、不超过26ppm的钾、不超过12ppm的钠和/或不超过5ppm的硫。由该方法产生的油适用于多种应用,包括但不限于,例如生物柴油和可再生柴油等燃料的生产(参看例如第2008/151149号PCT公开以及第US09/066141号和第US09/066142号PCT申请,各案均以引用的方式并如本文中)和食品生产(参看例如第US09/060692号PCT申请,以引用的方式并如本文中)。

[0168] G.产生的用过的生物质

[0169] 本发明的油提取方法将产生含油量低于在压榨步骤中经受压力的经过调节的原料的微生物生物质(用过的生物质又称压榨饼或经过压榨的生物质)。在本发明各种实施方案中,油含量降低的用过的生物质中的含油量比压榨步骤前微生物生物质的含油量低至少45%。在各种实施方案中,压榨步骤后剩余的油含量降低的用过的生物质粒化或被挤压成饼状。用过的饼可根据本发明进行另外的处理,包括另外进行调节和压榨或基于溶剂的提取方法以提取残留的油,这类似地适用于多种应用中,包括但不限于,用作食品,尤其是动物饲料,以及用作压榨助剂。在本发明各种实施方案中,从油含量降低的用过的生物质中提取出剩余的油;在各种实施方案中,通过对用过的生物质施加压力或通过用有机溶剂提取油来进行提取。

[0170] 在一些情形中,压榨饼所含油量在低于50重量%到低于1重量%范围内,包括例如低于40重量%、低于20重量%、低于10重量%、低于5重量%和低于2重量%。在所有情况下,压榨饼中的含油量低于未压榨物质中的含油量。

[0171] 在一些实施方案中,收集用过的生物质或压榨饼,并作为膨胀剂压榨助剂连同新鲜的经过调节的原料或干燥的生物质一起再循环到压榨机中。在此情况下,可能需要在用过的生物质与未压榨原料或生物质混杂之前或之后对其进行调节,以使其适用作压榨助剂。在其它实施方案中,用过的生物质或压榨饼可含有残留的油和其它组分(即,膳食纤维),其适用作人类或动物食品或食品添加剂。在此类应用中,由本发明方法产生的用过的生物质可称为“粕”或“脱脂粕”。

[0172] 因此,由本发明方法产生的用过的生物质适用作动物饲料用于耕畜,例如反刍动物、家禽、猪和水产动物。上文所述的这种脱脂粕是脂质/油含量较低的微生物生物质,并且可通过机械方法(例如压榨)或通过溶剂提取方法(参看下文)或二者制造。通常,脱脂粕具有低于15重量%的油。在优选实施方案中,由压榨机(螺杆式)压榨微生物生物质随后溶剂提取产生的脱脂粕的含油量低于10重量%。如上文所述,脱脂粕适用作膨胀剂(压榨助剂)。另外,脱脂粕尽管含油量较低,但仍含有高品质的蛋白质、碳水化合物、纤维、矿物质和其它适用于动物饲料的营养物质。由于细胞大部分裂解,故脱脂粕易于消化。在动物饲料中,脱脂粕可任选组合其它成分,例如谷物。由于脱脂粕具有粉末稠度,故可以使用挤压机或膨胀机将其压榨成团粒在市面上销售。

[0173] 如上文所述,根据压榨步骤的效率,用过的生物质可含油大量油。尽管在各种实施方案中,该油可通过根据本发明方法压榨(例如与将用过的生物质用作膨胀剂的情形一样)来提取,但也可对用过的生物质进行溶剂提取以从微生物生物质中回收更多的油。

[0174] 适用于本发明这些实施方案中的溶剂提取的一个实例是己烷溶剂提取。在本实施方案中,在使用压榨法提取出油后,将剩余用过的生物质与己烷混合,以提取剩余的油含量。用过的微生物生物质中游离的油与溶剂(例如己烷)形成混合油,并与固体(脱脂生物质粕)分离。过滤油-溶剂的混合油,并蒸发溶剂且再循环用于将来的溶剂提取中。根据本发明方法,脱脂生物质粕可脱除溶剂,并由此适用于动物饲料或饲料添加剂中。

[0175] 溶剂提取可回收截留或再吸收到用过的微生物生物质中的游离的油;然而,溶剂提取无法回收仍截留在未破裂/未裂解的微生物细胞中的油。在挤压机或膨胀机中经过调节(且裂解)但未经受螺杆式压榨机的高压的微生物生物质也可进行溶剂提取,以回收在调节期间从生物质中释出的油。由于溶剂提取的效率取决于溶剂与游离油的可接近性,故增加溶剂提取的物质的孔隙度和/或表面积是重要的。理想的情况是,对于溶剂提取,用过的微生物生物质或压榨饼应含有较高百分比的裂解或破裂的微生物细胞,其具有多孔构造和较大表面积供溶剂提取,不应高度压缩或燃烧,且不应为粉末和干燥的。在优选实施方案中,用过的微生物生物质含有至少85%的裂解或破裂的微生物细胞。

[0176] 几类溶剂提取器可用于本领域中,且适用于如上文所述的用过的生物质。在一个实施方案中,使用连续渗滤溶剂提取器来提取用过的微生物生物质中残留的游离油。适用于本发明方法中的另一油提取方法是超临界流体/二氧化碳提取法,其中二氧化碳在压力下液化,并加热到使其具有液体和气体二者的性质的温度。随后此液化流体可充当溶剂,提取用过的微生物生物质中的油。

[0177] 本领域中已知用于脂质的无溶剂提取法也可用于根据本发明回收用过的生物质中的油。例如,可以使用第6,750,048号美国专利中的方法从本发明方法产生的用过的生物质中回收油。另一合适的无溶剂提取法涉及用酸处理用过的生物质以产生液体浆料。可任选声波处理该浆料,以确保用过的生物质中的微藻细胞完全裂解。优选在高于室温的温度下产生由酸处理产生的裂解物。此裂解物在离心或在重力作用下沉降后,可分成几层,其中一层是含水层:脂质层。其它层可包括固体团粒、含水层和脂质层。可通过冷冻解冻或以其它方式冷却乳液,从乳液层中提取出脂质。在这些方法中,不需要加入任何有机溶剂,但在一些实施方案中宜加入有机溶剂。

[0178] 以下部分将描述适用于产生适用于本发明方中的含油微生物生物质的微生物。

[0179] III. 适用于产生油的微生物和其培养方法

[0180] 本发明部分源自以下发现：某些微生物可用于经济地产生大量的油以及由此衍生的烃组合物，用于运输燃料和石油化学工业以及许多其它应用中。合适的微生物包括微藻、产油细菌、产油酵母和真菌。脂质的酸性酯交换生成适用作生物柴油的长链脂肪酸酯。其它酶促过程可应用于源自于本文所述这些生物体的脂质，得到脂肪酸、醛、醇和烷烃。本发明还提供用于培养微生物（例如微藻）以实现脂质生产力提高和脂质产率增加的方法。

[0181] 适用于本发明中的微生物将产生适于生物柴油生产或用作工业应用原料的油（脂质或烃）。适用于生物柴油生产的烃包括含有长链脂肪酸分子的三酰基甘油酯（TAG）。适用于工业应用（例如制造）的烃包括脂肪酸、醛、醇和烷烃。在一些实施方案中，由本文所述方法产生的合适的脂肪酸或相应的伯醇、醛或烷烃含有至少8个到至少35个碳原子。用于生物柴油的长链脂肪酸一般含有至少14个或更多个原子。

[0182] 优选用于工业应用的脂肪酸或相应伯醇、醛和烷烃含有至少8个或更多个碳原子，在本发明的某些实施方案中，上述脂肪酸以及其它相应烃分子是饱和（不具有碳碳双键或三键）；单不饱和（单一碳碳双键）；或多不饱和（两个或更多个碳碳双键）的；且为直链（非环状）；和/或结构中具有极少或不具有分支。

[0183] 碳链长度在C8到C22范围内的三酰基甘油可以使用本发明方法制造，且优选用于多种应用。对于表面活性剂，优选的TAG通常为C10-C14。对于生物柴油或可再生柴油，优选的TAG通常为C16-C18。对于喷气燃料，优选的TAG通常为C8-C10。对于营养物质，优选的TAG为C22多不饱和脂肪酸（例如DHA）和类胡萝卜素（例如虾青素）。

[0184] 可产生合适的脂质或烃的任何种类的生物体都可用于本发明方法中，但优选天然产生高水平合适的脂质或烃的微生物。由微生物制造烃评述于以下文献中：Metzger等，Appl Microbiol Biotechnol (2005) 66:486-496和A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann和Paul Roessler (1998)，以引用的方式并如本文中。

[0185] 影响本发明中所用微生物选择的考虑因素除制造适于生物柴油或工业应用的烃外，还包括：(1) 以细胞重量百分比计的高脂质含量；(2) 易于生长；和(3) 易于处理。在特定实施方案中，油提取收获时，微生物得到的细胞含至少：约40%到60%或更多（包括超过70%）的脂质。对于某些应用，异养生长（在不存在光的情况下依赖于糖生长）或被工程改造成异养生长的生物体可用于本发明方法中。参看第60/837,839号、第61/118,994号、第11/893,364号和第12/194,389号美国专利申请，以及第20090004715号、第20090047721号、第20090011480号、第20090035842号、第20090061493号和第20090148918号美国专利申请公开；第2009/066141号和第2009/066142号PCT申请；以及第2008/151149号PCT公开，各案以引用方式整体并入本文中。对于其中生物体经过基因修饰的应用，在微生物中起作用的可选择标记物和组成型和/或诱导型启动子的转化便利性和可用性将影响欲修饰的生物体的选择。

[0186] 天然微藻是优选可用于本发明方法中的微生物。因此，在本发明各种优选实施方案中，产生脂质的微生物，即用于提取、回收或获得油的微生物是微藻。可用于本发明方法中的微藻的属和种类的实例包括但不限于，以下各属和种类微藻。

[0187] 表1.微藻类

[0188]

曲壳藻属(*Achnanthes orientalis*)、阿格门氏藻(*Agmenellum*)、透明茧形藻(*Amphiprora hyaline*)、硅藻(*Amphora coffeiformis*)、线咖啡形双眉藻(*Amphora coffeiformis linea*)、点咖啡形双眉藻(*Amphora coffeiformis punctata*)、泰咖啡形双眉藻(*Amphora coffeiformis taylori*)、*Amphora coffeiformis tenuis*、*Amphora delicatissima*、*Amphora delicatissima capitata*、*Amphora sp.*、鱼腥藻(*Anabaena*)、纤维藻属(*Ankistrodesmus*)、廉形纤维藻(*Ankistrodesmus falcatus*)、*Boekelovia hooglandii*、*Borodinella sp.*、布朗葡萄藻(*Botryococcus braunii*)、*Botryococcus sudeticus*、*Bracteococcus aerius*、*Bracteococcus sp.*、*Bracteococcus grandis*、*Bracteococcus cinnabarinus*、*Bracteococcus minor*、*Bracteococcus medionucleatus*、*Carteria*、纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)、牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)、*Chaetoceros muelleri subsalsum*、角毛藻属(*Chaetoceros sp.*)、*Chlorella anitrata*、*Chlorella Antarctica*、*Chlorella aureoviridis*、*Chlorella candida*、*Chlorella capsulate*、*Chlorella desiccata*、圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)、浮水小球藻(*Chlorella emersonii*)、*Chlorella fusca*、*Chlorella fusca var. vacuolata*、*Chlorella glucotropha*、*Chlorella infusionum*、*Chlorella infusionum var. actophila*、*Chlorella infusionum var. auxenophila*、凯氏小球藻(*Chlorella kessleri*)、*Chlorella lobophora* (SAG 37.88 株)、*Chlorella luteoviridis*、*Chlorella luteoviridis var. aureoviridis*、*Chlorella luteoviridis var. lutescens*、

[0189]

Chlorella miniata, 微小小球藻(*Chlorella cf. minutissima*)、极微小球藻(*Chlorella minutissima*)、*Chlorella mutabilis*、*Chlorella nocturna*、*Chlorella ovalis*、*Chlorella parva*、*Chlorella photophila*、*Chlorella pringsheimii*、原始小球藻(*Chlorella protothecoides*) (包括 UTEX 株 1806、411、264、256、255、250、249、31、29、25 中任一者)、*Chlorella protothecoides* var. *acidicola*、*Chlorella regularis*、*Chlorella regularis* var. *minima*、*Chlorella regularis* var. *umbricata*、*Chlorella reisiigii*、嗜糖小球藻(*Chlorella saccharophila*)、*Chlorella saccharophila* var. *ellipsoidea*、海水小球藻(*Chlorella salina*)、*Chlorella simplex*、耐热性小球藻(*Chlorella sorokiniana*)、小球藻属(*Chlorella* sp.)、*Chlorella sphaerica*、*Chlorella stigmatophora*、*Chlorella vanniellii*、普通小球藻、*Chlorella vulgaris* f. *tertia*、*Chlorella vulgaris* var. *autotrophica*、*Chlorella vulgaris* var. *viridis*、*Chlorella vulgaris* var. *vulgaris*、*Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* f. *tertia*、*Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* f. *viridis*、*Chlorella xanthella*、*Chlorella zofingiensis*、*Chlorella trebouxioides*、*Chlorella vulgaris*、*Chlorococcum infusionum*、绿球藻属(*Chlorococcum* sp.)、绿梭藻属(*Chlorogonium*)、蓝隐藻属(*Chroomonas* sp.)、*Chrysosphaera* sp.、集胞藻属(*Cricosphaera* sp.)、寇氏隐甲藻(*Crypthecodinium cohnii*)、隐藻属(*Cryptomonas* sp.)、隐秘小环藻(*Cyclotella cryptica*)、梅尼小环藻(*Cyclotella meneghiniana*)、小环藻属(*Cyclotella* sp.)、杜氏藻属(*Dunaliella* sp.)、拜尔代维勒杜氏藻(*Dunaliella bardawil*)、*Dunaliella bioculata*、*Dunaliella granulate*、*Dunaliella maritime*、*Dunaliella minuta*、巴夫杜氏

[0190]

藻(*Dunaliella parva*)、*Dunaliella peircei*、*Dunaliella primolecta*、盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)、*Dunaliella terricola*、*Dunaliella tertiolecta*、*Dunaliella viridis*、*Dunaliella tertiolecta*、*Eremosphaera viridis*、*Eremosphaera sp.*、后棘藻属(*Ellipsoidon sp.*)、裸藻属(*Euglena*)、*Franceia sp.*、克罗脆杆藻(*Fragilaria crotonensis*)、脆杆藻属(*Fragilaria sp.*)、粘球藻属(*Gleocapsa sp.*)、丽丝藻属(*Gloeothamnion sp.*)、鞭毛藻属(*Hymenomonas sp.*)、大溪地等鞭金藻(*Isochrysis aff. galbana*)、球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)、鳞孔藻属(*Lepocinclis*)、微芒藻属(*Micractinium*)、微芒藻属(UTEX LB 2614)、单壳缝藻(*Monoraphidium minutum*)、单针藻属(*Monoraphidium sp.*)、微小绿藻属(*Nannochloris sp.*)、*Nannochloropsis salina*、微拟球藻属(*Nannochloropsis sp.*)、*Navicula acceptata*、*Navicula biskanterae*、*Navicula pseudotenelloides*、*Navicula pelliculosa*、*Navicula saprophila*、舟形藻属(*Navicula sp.*)、富油新绿藻(*Neochloris oleabundans*)、*Nephrochloris sp.*、*Nephroselmis sp.*、*Nitzschia communis*、亚历山大菱形藻(*Nitzschia alexandrina*)、*Nitzschia communis*、细端菱形藻(*Nitzschia dissipata*)、碎片菱形藻(*Nitzschia frustulum*)、*Nitzschia hantzschiana*、*Nitzschia inconspicua*、*Nitzschia intermedia*、*Nitzschia microcephala*、*Nitzschia pusilla*、*Nitzschia pusilla elliptica*、*Nitzschia pusilla monoensis*、*Nitzschia quadrangular*、菱形藻属(*Nitzschia sp.*)、棕鞭藻属(*Ochromonas sp.*)、小卵囊藻(*Oocystis parva*)、*Oocystis pusilla*、卵囊藻属(*Oocystis sp.*)、*Oscillatoria limnetica*、颤藻属(*Oscillatoria sp.*)、拟短形颤藻(*Oscillatoria subbrevis*)、*Parachlorella beijerinckii*、凯氏拟小球藻

[0191]

(*Parachlorella kessleri*)、*Pascheria acidophila*、巴夫藻属(*Pavlova sp.*)、*Phagus*、席藻属(*Phormidium*)、扁藻属(*Platymonas sp.*)、*Pleurochrysis carterae*、*Pleurochrysis dentate*、颗石藻属(*Pleurochrysis sp.*)、淤滞型无绿藻(*Prototheca stagnora*)、*Prototheca portoricensis*、桑椹型无绿藻(*Prototheca moriformis*)、威克海姆无绿藻(*Prototheca wickerhamii*)、佐普夫无绿藻(*Prototheca zopfii*)、*Pseudochlorella aquatica*、塔孢藻属(*Pyramimonas sp.*)、桑椹藻属(*Pyrobotrys*)、八叠球菌金藻(*Sarcinoid chrysophyte*)、被甲栅藻(*Scenedesmus armatus*)、栅藻冬凌草(*Scenedesmus rubescens*)、裂殖壶菌属(*Schizochytrium*)、水绵(*Spirogyra*)、钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)、裂丝藻属(*Stichococcus sp.*)、聚球藻属(*Synechococcus sp.*)、四角藻(*Tetraedron*)、扁藻属(*Tetraselmis sp.*)、司西扁藻(*Tetraselmis suecica*)、威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)和 *Viridiella fridericiana*。

[0192] 在本发明各优选实施方案中,产生脂质的微生物或用于提取、回收或获得油的微生物是小球藻属种类的生物体。在各种优选实施方案中,微藻是原始小球藻(*Chlorella protochecoides*)、椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)、极微小球藻(*Chlorella minutissima*)、*Chlorella zofinienesi*、*Chlorella luteoviridis*、普通小球藻、耐热性小球藻、*Chlorella fusca* var. *vacuolata*、小球藻属、微小小球藻或浮水小球藻。小球藻是单细胞绿藻属,属于绿藻门(phylum Chlorophyta)。其呈球形,直径为约2 μ m到10 μ m且无鞭毛。小球藻中一些种类为天然异养的。小球藻,尤其原始小球藻,因具有高脂质组成且能够异养生长而成为适用于本发明中的优选微生物。

[0193] 小球藻,优选原始小球藻、极微小球藻或浮水小球藻,可经过基因改造以表达一个或多个异源基因(“转基因”)。在小球藻中表达转基因的实例可见于文献中(参看例如, *Current Microbiology* 第35卷(1997),第356-362页; *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2000年7月; 16(4):443-6; *Current Microbiology* 第38卷(1999),第335-341页; *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) 72:197-205; *Marine Biotechnology* 4,63-73,2002; *Current Genetics* 39:5,365-370(2001); *Plant Cell Reports* 18:9,778-780,(1999); *Biologia Plantarum* 42(2):209-216,(1999); *Plant Pathol. J* 21(1):13-20,(2005)),且这些参考文献以及上文提到的专利申请都以引用的方式整体并入本文中,其教导了用于在所述生物体中引入和

表达所关注基因的各种方法和物质。其它产脂质的微藻也可经过改造,包括原核微藻类(参看Kalscheuer等,Applied Microbiology and Biotechnology,第52卷,第4期/1999年10月),该微藻适用于本发明方法中。

[0194] 适用于本发明中的小球藻种类也可通过以下方法鉴别,该方法涉及扩增基因组的某些靶区域。例如,可使用引物以及使用基因组任何区域的方法(例如Wu等,Bot.Bull.Acad.Sin.42:115-121(2001)中所述的方法),通过对核和/或叶绿体DNA进行扩增和测序来鉴别特定小球藻种类或小球藻株。使用核糖体DNA序列鉴别小球藻分离株。本领域技术人员可使用确立的系统发生分析法,例如核糖体内转录间隔子(ITS1和ITS2rDNA)、18S rRNA和其它保守基因组区域的扩增和测序方法,来鉴别小球藻种类,以及其它能够使用本文公开的方法产生油和脂质的生物体。有关藻类鉴别和分类的方法的实例,参见Genetics,170(4):1601-10(2005)以及RNA,11(4):361-4(2005)。

[0195] 也可以使用基因组DNA比较来鉴别适用于本发明中的微藻种类。保守DNA区,包括但不限于编码23S rRNA的DNA,可由微藻种类扩增,并与一致序列相比较,以筛选在分类学上与适用于本发明方法中的优选微藻相关的微藻种类。类似的基因组DNA比较也可用来鉴别适用于本发明方法中的产油酵母种类。保守基因组DNA区域,例如但不限于真菌18S三个主要区域与真菌26S rRNA基因五个主要区域之间的保守基因组序列,可由例如分类上与用于本发明中的优选产油酵母种类有关的产油酵母种类扩增,并与这些优选种类的相应区域相比较。实施例13将描述48种产油酵母株的真菌18S的保守3'区和真菌26S rRNA的5'区的基因组测序,且基因组序列列为SEQ ID NOs:37-69。

[0196] 在一些实施方案中,优选用于本发明方法中的产油酵母中编码真菌18S和26S rRNA基因组序列的基因组DNA序列与SEQ ID NOs:37-69中一个或多个序列具有至少75%、85%或95%的核苷酸同一性。

[0197] 在一些实施方案中,优选用于本发明方法中的微藻中编码23S rRNA的基因组DNA序列与小球藻种类的23S rRNA序列具有至少99%或至少95%或至少90%或至少85%的同一性。

[0198] 无绿藻属是一种单细胞微藻属,被认为是小球藻属的非光合作用突变体。尽管小球藻可通过光合作用获得其能量,但无绿藻种属类是专性异养型的。无绿藻呈球形,直径为约2到15微米,且无鞭毛。在各种优选实施方案中,本发明方法中所用的微藻选自以下无绿藻种类:淤滞型无绿藻(*Prototheca stagnora*)、波多黎各无绿藻(*Prototheca portoricensis*)、桑椹型无绿藻、威克海姆无绿藻和佐普夫无绿藻。

[0199] 在一些实施方案中,优选用于本发明方法中的微藻具有编码23S rRNA的基因组DNA序列,所述基因组DNA序列与无绿藻种类的23S rRNA序列具有至少99%或至少95%或至少90%或至少85%的同一性。

[0200] 除无绿藻和小球藻外,其它微藻也可用于本发明方法中。在各种优选实施方案中,微藻选自以下任一属和种类:普通拟小球藻、*Parachlorella beijerinckii*、富油新绿藻、*Bracteococcus grandis*、*Bracteococcus cinnabarinus*、*Bracteococcus aerius*、*Bracteococcus sp.*或*Scenedesmus rebescens*。微藻(包括小球藻)的其它非限制性实例列于上表1中。

[0201] 除微藻外,产油酵母也可累积占其细胞干重超过20%的脂质且因此适用于本发明

方法中。在本发明一个优选实施方案中，产生脂质的微生物或用于提取、回收或获得油的微生物是产油酵母。可用于本发明方法中的产油酵母的实例包括但不限于表2中所列的产油酵母。用于培养产油酵母(解脂耶氏酵母和禾本红酵母(*Rhodotorula graminis*))以获得高含油量的说明性方法提供于以下实施例中。

[0202] 表2.产油酵母.

[0203]

蜂生假丝酵母(*Candida apicola*)、假丝酵母菌(*Candida sp.*)、弯曲隐球酵母、隐球酵母(*Cryptococcus terricolus*)、汉森德巴利酵母(*Debaromyces hansenii*)、产脂拟内孢霉(*Endomycopsis vernalis*)、*Geotrichum carabidarum*、*Geotrichum cucujoidarum*、*Geotrichum histeridarum*、昔维考拉地霉(*Geotrichum silvicola*)、*Geotrichum vulgare*、*Hyphopichia burtonii*、产油油脂酵母(*Lipomyces lipofer*)、红冬孢酵母(*Lypomyces orientalis*)、斯达油脂酵母菌(*Lipomyces starkeyi*)、*Lipomyces tetrasporous*、墨西哥毕赤酵母(*Pichia mexicana*)、*Rodosporidium sphaerocarpum*、圆红冬孢酵母菌(*Rodosporidium toruloides*)、橙黄红酵母(*Rhodotorula aurantiaca*)、*Rhodotorula dairenensis*、*Rhodotorula diffluens*、粘红酵母(*Rhodotorula glutinus*)、粘红酵母粘红变种(*Rhodotorula glutinis var. glutinis*)、瘦弱红酵母(*Rhodotorula gracilis*)、禾本红酵母(*Rhodotorula graminis*)、小红酵母

[0204]

(*Rhodotorula minuta*), 粘质红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、粘质红酵母胶粘变种(*Rhodotorula mucilaginosa var. mucilaginosa*)、*Rhodotorula terpenoidalis*、红冬孢酵母(*Rhodotorula toruloides*)、*Sporobolomyces alborubescens*、*Starmerella bombicola*、*Torulaspora delbruekii*、有孢圆酵母属(*Torulaspora pretoriensis*)、丝孢酵母菌(*Trichosporon behrend*)、芸苔丝孢酵母(*Trichosporon brassicae*)、家毛孢子菌、赖巴克丝孢酵母(*Trichosporon laibachii*)、*Trichosporon loubieri*、*Trichosporon loubieri var. loubieri*、丝孢酵母(*Trichosporon montevideense*)、茁芽丝孢酵母(*Trichosporon pullulans*)、丝孢酵母属(*Trichosporon sp.*)、*Wickerhamomyces Canadensis*、解脂耶氏酵母和 *Zygoascus meyeriae*。

[0205] 在本发明一个优选实施方案中,产生脂质的微生物或可用于提取、回收或获得脂质的微生物是真菌。可用于本发明方法中的真菌的实例包括但不限于表3中所列的真菌。

[0206] 表3. 含油真菌.

[0207]

被孢霉(*Mortierella*)、葡萄酒色被孢霉(*Mortierella vinacea*)、高山被孢霉(*Mortierella alpine*)、德巴利腐霉(*Pythium debaryanum*)、卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)、赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)、土曲霉(*Aspergillus terreus*)、淡紫青霉(*Penicillium iilacinum*)、*Hensenulo*、球毛壳属(*Chaetomium*)、枝孢霉(*Cladosporium*)、*Malbranchea*、根霉属(*Rhizopus*)和腐霉属(*Pythium*)

[0208] 因此,在本发明一个优选实施方案中,用于产生适用于本发明方法中的微生物物质的微生物是真菌。合适的真菌实例(例如高山被孢霉、卷枝毛霉和赭曲霉)包括所显示的适用于基因操作的真菌,如文献中所述(参看例如, *Microbiology*, Jul;153 (Pt.7) :2013-25 (2007); *Mol Genet Genomics*, Jun;271 (5) :595-602 (2004); *Curr Genet*, Mar;21 (3) :215-23 (1992); *Current Microbiology*, 30 (2) :83-86 (1995); Sakuradani, NISR Research

Grant, "Studies of Metabolic Engineering of Useful Lipid-producing Microorganisms" (2004); 和PCT/JP2004/012021)。

[0209] 在本发明其它实施方案中,产生脂质的微生物或可用于提取、回收或获得脂质的微生物是产油细菌。产油细菌是可积累占其细胞干重超过20%的脂质的细菌。适用于本发明方法中的产油细菌种类包括红球菌属种类,例如混浊红球菌和红球菌属。本领域中已知产油细菌(例如混浊红球菌)的培养方法(参看Waltermann,等,(2000) Microbiology, 146: 1143-1149)。用于培养混浊红球菌以获得高含油量的说明性方法提供于以下实施例中。

[0210] 为制造适用于本发明方法中的含油微生物物质,培养微生物以产生油(例如烃、脂质、脂肪酸、醛、醇和烷烃)。此类培养通常首先最初至少在起始微生物可生长的条件下小规模进行。例如,如果起始微生物是光合自养生物,那么初始培养是在光存在下进行。如果微生物进化或改造成不需要光来生长,那么可改变培养条件。为达产生烃的目的进行的培养优先大规模进行。优选固定碳源是过量存在。必要时或有益时,培养物也可暴光一段或全部时间。

[0211] 微藻可在液体培养基中培养。培养物可包含在生物反应器内。任选生物反应器不允许光进入。或者,可在光生物反应器中培养微藻,该光生物反应器含有固定碳源并允许光照向细胞。对于可利用光作为能源的微藻细胞,使这些细胞暴光,即使在细胞可运输和利用(即,兼养生长)的固定碳源存在下,也能使细胞生长比在暗处培养的细胞快。可控制培养条件参数以优化总油产量、所产生的烃物质的组合和/或产生特定烃物质。在一些情形中,优选在暗处培养细胞,例如当使用不允许光照向较大比例(或任何)培养物的极大(40,000升及更大)发酵罐时。

[0212] 微藻培养基通常含有例如以下组分:固定碳源、微量元素、任选使用的维持pH值的缓冲液和磷酸盐。组分除例如乙酸盐或葡萄糖等固定碳源外,还可包括例如氯化钠等盐,尤其对于海水微藻。微量元素的实例包括锌、硼、钴、铜、锰和钼,例如分别呈以下形式: $ZnCl_2$ 、 H_3BO_3 、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 和 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 。也可控制其它培养参数,例如培养基的pH值、微量元素的种类和浓度以及其它培养基成分。

[0213] 对于能够依赖固定碳源生长的生物体,固定碳源可为例如葡萄糖、果糖、蔗糖、半乳糖、木糖、甘露糖、鼠李糖、N-乙酰葡萄糖胺、甘油、红藻糖苷、葡糖醛酸和/或乙酸盐。提供固定碳源的一种或多种外源供应到培养基中的浓度可为至少约50mM到至少500mM及在该范围内的各种量(即,100 μ M、500 μ M、5mM、50mM)。

[0214] 某些微藻可在光存在下生长。可控制照向所述微藻细胞培养物的光子量,以及其它参数,例如波长谱和每天暗:亮小时比。也可在自然光以及同时和/或交替自然光与人工光的组合下培养微藻。例如,可在白天数小时期间在自然光下且在夜晚数小时期间在人工光下培养小球藻属的微藻。

[0215] 可控制光生物反应器中使如微藻等微生物生长的气体含量。光生物反应器中一部分体积可含有气体而非液体。可以使用气体进口将气体泵入光生物反应器中。任何气体都可被泵入光生物反应器中,包括空气、空气/ CO_2 混合物、稀有气体(例如氩气)等。也可控制气体进入光生物反应器中的速率。增加进入光生物反应器中的气流将增加微藻培养物的浊度。将气体输送到光生物反应器中的端口的设置也可影响在指定气体流速下培养物的浊度。空气/ CO_2 混合物可经过调节以产生最佳的 CO_2 量供特定生物体最大生长。微藻在光中在

例如3%CO₂/97%空气下生长明显快于在100%空气中生长。3%CO₂/97%空气中所含CO₂比空气中所见的高达大约100倍。例如,可将在约99.75%空气:0.25%CO₂到95.00%空气:5.0%CO₂范围内的空气:CO₂混合物输注到生物反应器或光生物反应器中。

[0216] 微藻培养物也可以使用例如旋转叶片和叶轮、摇动培养物、搅拌棒、输注加压气体和其它仪器等装置进行混合;这种方法可用于确保光生物反应器中的所有细胞都暴光,但当然不使用光作为能源的细胞培养物也适用。

[0217] 一些微藻种类可在不存在光的情况下,利用例如葡萄糖或乙酸盐等固定碳源生长。这种生长称为异养生长。例如对于原始小球藻,异养生长将大量产生生物质并积累高脂质含量。因此,上述光合生长和繁殖的微生物的替代选择是使用在以固定碳源提供生长和脂质积累的能量的条件下异养生长和繁殖的微生物。在一些实施方案中,固定碳能源包含纤维素物质,包括解聚的纤维素物质、5碳糖或6碳糖。

[0218] 本领域已经报导用于使原始小球藻生长和繁殖达到以干重计高油含量百分比的方法(参看例如,Miao和Wu,J. Biotechnology, 2004, 11:85-93,以及Miao和Wu, Biosource Technology (2006) 97:841-846,报导了用于获得以细胞干重计55%油的方法)。

[0219] PCT公开W02008/151149(以引用的方式并如本文)中描述了小球藻的优选生长条件。多个小球藻种类和在该种类内的多个小球藻株都可在甘油存在下生长。上文提到的专利申请描述的培养参数并入了使用甘油进行多个微藻属的发酵。多个小球藻种类和小球藻株依赖于纯化的试剂级甘油以及由生物柴油酯交换得到的酸化和非酸化甘油副产物增殖良好。在一些情形中,微藻(例如小球藻株)进行的细胞分裂在甘油存在下比在葡萄糖存在下快。在这种情况下,首先送给细胞甘油以增加细胞密度,随后送给葡萄糖以积累脂质的两阶段生长过程可提高脂质产生效率。

[0220] 为本发明的目的,用于在异养生长条件下培养微藻的其它原料包括甘油与葡萄糖的混合物、葡萄糖与木糖的混合物、果糖与葡萄糖的混合物、蔗糖、葡萄糖、果糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、乙酸盐和糖蜜。其它合适的原料包括玉米秸秆、甜菜浆和柳枝稷与解聚酶的组合。

[0221] 为产生脂质和油,通常大量发酵细胞,包括重组细胞。培养可以较大液体体积进行,例如悬浮培养。其它实例包括以可扩增成较大生物质的少量细胞培养物为起始物,结合细胞生长和繁殖以及脂质(油)产生。可使用生物反应器或钢制发酵罐容纳较大培养物体积。对于这些发酵,使用光合生长条件是不可能或至少不可行且无效的,因此优选异养生长条件。

[0222] 在具有异养生长条件的发酵罐中培养的合适营养源包括例如以下一种或多种原材料:固定碳源,例如葡萄糖、玉米淀粉、解聚纤维素物质、蔗糖、甘蔗、甜菜、乳糖、乳清、糖蜜等;氮源,例如蛋白质、大豆粕、玉米浆、氨(纯或盐形式)、硝酸酯或硝酸盐;和磷源,例如磷酸盐。另外,具有异养生长条件的发酵罐允许控制培养条件,例如温度、pH、氧压和二氧化碳含量。任选将如氧气或氮气等气态组分鼓泡通过液体培养基。其它淀粉(葡萄糖)源包括小麦、马铃薯、大米和高粱。其它碳源包括处理液流,例如技术级甘油、黑液和有机酸(例如乙酸)和糖蜜。提供的碳源也可混合物,例如蔗糖与解聚甜菜浆的混合物。

[0223] 具有异养生长条件的发酵罐可用来使细胞经历其生理周期的各个阶段。例如,可将产脂质细胞的接种体引入培养基中,随后经历停滞期,之后细胞开始繁殖。停滞期后,繁

殖速率平稳增加且进入对数或指数期。指数期之后,繁殖又因例如氮等营养物质减少、有毒物质增加以及群体感测机制而减慢。在这一减速期后,根据提供给细胞的特定环境,繁殖停止,且细胞进入静止期或平稳生长状态。

[0224] 在适用于本发明目的的一种异养培养方法中,使用解聚纤维素物质作为原料来培养微生物。与例如玉米淀粉或来自甘蔗或甜菜的蔗糖等其它可用来培养微生物的原料相反,纤维素物质(解聚或其它形式)不适于人类食用。纤维素物质(例如秸秆,例如玉米秸秆)较为便宜且易于获得;然而,尝试使用这一物质作为用于酵母的原料已经失败。具体说来,已经发现此类原料抑制酵母生长,且酵母无法使用由纤维素物质产生的5碳糖(例如来自半纤维素的木糖)。相比之下,微藻可依赖解聚纤维素物质增殖。因此,本发明涵盖在异养生长条件下,在纤维素物质和/或5碳糖存在下培养微藻的方法。纤维素物质一般包括:40—60%的纤维素;20—40%的半纤维素;和10—30%的木质素。

[0225] 合适的纤维素物质包括草本和木本能源作物以及粮食作物的残余物,即,植株部分,主要是通常不能从田间除去的茎和叶,和初级食品或纤维产物。实例包括农业废弃物,例如甘蔗渣、稻壳、玉米纤维(包括茎、叶、外皮和玉米棒子)、麦秆、稻秆、甜菜浆、柑桔渣、柑桔皮;林业废弃物,例如硬木材和软木材间伐物,以及由木材建造操作产生的硬木材和软木材残余物;木材废弃物,例如锯木厂废弃物(木片、锯末)和纸浆厂废弃物;城市废弃物,例如市政固体废弃物的纸质部分、城市木材废弃物,和城市绿色废弃物,例如市政草坪修剪物;和木制构造废弃物。其它纤维素物质包括专用纤维作物,例如柳枝稷、杂交杨木和芒属植物、纤维甘蔗和纤维高粱。由这些物质制造的五碳糖包括木糖。

[0226] 一些微生物能够处理纤维素物质并直接利用纤维素物质作为碳源。然而,纤维素物质须经过处理以增加可及表面积或用于首先破坏纤维素以制备供微生物利用作为碳源。本领域中众所周知制备或预处理供酶消化的纤维素物质的方式。这些方法主要分为两类:(1)将纤维素物质分解成较小颗粒以增加可及表面积;和(2)以化学方式处理纤维素物质以产生供酶消化的可用底物。

[0227] 用于增加可及表面积的方法包括蒸汽爆破,其涉及使用高温蒸汽来分解纤维素物质。因为这一过程需要高温,所以纤维素物质中的一些糖会损失,由此减少供酶消化的可用碳源(参看例如,Chahal,D.S.等,Proceedings of the 2nd World Congress of Chemical Engineering;(1981)和Kaar等,Biomass and Bioenergy(1998)14(3):277-87)。氨气爆破能够在较低温度下爆破纤维素物质,但进行的成本较高,且氨气可能会干扰后续的酶消化过程(参看例如,Dale,B.E.等,Biotechnology and Bioengineering(1982);12:31-43)。另一爆破技术包括使用超临界二氧化碳爆破将纤维素物质分解成较小片段(参看例如,Zheng等,Biotechnology Letters(1995);17(8):845-850)。

[0228] 以化学方式处理纤维素物质以产生供酶消化的可用底物的方法也是本领域中已知的。第7,413,882号美国专利(以引用的方式并入本文中)描述使用基因改造的微生物,这些微生物将 β -葡糖苷酶分泌到发酵液中,并用该发酵液处理纤维素物质以增进纤维素物质水解成葡萄糖。也可用强酸和碱处理纤维素物质以帮助后续酶消化。第3,617,431号美国专利(以引用的方式并入本文中)描述使用碱消化来分解纤维素物质。

[0229] 微生物可具有利用例如纤维素物质或甘油等原本不适合食用的原料作为碳源(或经过预处理的纤维素物质作为碳源)的能力,以及产生可食用油的天然能力。利用这两种性

质,可将通常不作为人类食物链的一部分的纤维素物质或甘油(与适于人类消费的食品组合物的玉米葡萄糖以及来自甘蔗和甜菜的蔗糖相反)转化成高营养、可食用的油,从而作为人类(或动物)日常饮食的一部分提供营养和热量。按此方式,先前不适合食用的原料可变为高营养可食用油以及含有这些高营养可食用油的其它食品和食品组合物,以及适用于其它目的的油。

[0230] 生物反应器可用于异养生长和繁殖方法。如所了解的,当在本文所述的异养生长和繁殖方法中使用固定碳源时,光合生长方法中提出的使光为细胞所用的条件就不必要了。

[0231] 本文所述的处理条件以及异养生长和繁殖方法的具体实例可以任何合适的方式组合以提高微生物生长和脂质产生的效率。例如,利用任一上述原料增加增殖和/或脂质产量能力较强的微生物可用于本发明方法中。

[0232] 兼养生长涉及使用光和固定碳源作为能源来培养细胞。兼养生长可在光生物反应器中进行。微藻可在由不同类型透明或半透明材料制成的封闭光生物反应器中生长和维持。所述材料可包括Plexiglass[®]外壳、玻璃外壳、由例如聚乙烯等物质制成的袋子、透明或半透明管和其它材料。微藻可在例如开放池塘、沉降池和其它非密闭容器等敞开式光生物反应器中生长和维持。以下适用于兼养生长条件的光生物反应器的论述也适用于光合生长条件。

[0233] 光生物反应器可具有允许气体、固体、半固体和液体进入含有微藻的腔室内的端口。端口通常附接至管道或用于输送物质的其它装置。气体端口例如将气体输送到培养物中。将气体泵入光生物反应器中可用于向细胞送CO₂和其它气体并对培养物充气,由此产生浑浊。培养物的浊度值随气体端口数量和位置的改变而变化。例如,气体端口可沿圆柱形聚乙烯袋的底部放置。当将CO₂加入到空气中并鼓泡到光生物反应器中时,微藻生长较快。例如,可将5%CO₂:95%空气的混合物输注到含有葡萄藻细胞的光生物反应器中用于所述目的(参看例如,J Agric Food Chem.54(13):4593-9(2006);J Biosci Bioeng.87(6):811-5(1999);和J Nat Prod.66(6):772-8(2003))。

[0234] 可通过导向光生物反应器表面的光,使光生物反应器暴露于一种或多种光源,以向微藻提供光作为能源。优选光源强度足以使细胞生长,但强度不致引起氧化损伤或引起光抑制反应。在一些情况下,光源的波长范围模拟或基本模拟太阳的波长范围。在其它情况下,使用不同的波长范围。光生物反应器可放置在室外或在温室中,或放置在使阳光能够照向表面的其它设施中。对于葡萄藻属种类,优选光子强度在25 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 与500 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之间(参看例如,Photosynth Res.84(1-3):21-7(2005))。

[0235] 如上文所述,光生物反应器优选具有一个或多个允许培养基进入的端口。未必只一种物质进入或离开口。例如,可以使用端口来使培养基流入到光生物反应器中,且接着可用于取样、气体进入、气体排出或其它目的。在一些情形中,光生物反应器在培养开始时填充以培养基,并在接种培养物后,不再输注生长培养基。换句话说,在第一时间中,在含水培养基中培养微藻生物物质,在此期间,微藻繁殖且数量增加;然而,在整个时间段内,含水培养基的量都未流过光生物反应器。因此,在一些实施方案中,在接种后,含水培养基不流过光生物反应器。

[0236] 在其它情况下,在整个时间段内,培养基可流过光生物反应器,在此期间,微藻繁

殖且数量增加。在一些实施方案中,在接种后但在细胞达到所需密度前,将培养基输注到光生物反应器中。换句话说,在微藻的数量增加达到所需水平之前,所述微藻的繁殖不需要维持气体进入和培养基进入的湍流方案。

[0237] 光生物反应器通常具有一个或多个允许气体进入的端口。气体可用于提供营养物质,例如CO₂,以及在培养基中提供湍流。可通过将气体进入端口放置在含水培养基水平面以下,由此使进入光生物反应器的气体鼓泡至培养物表面来实现湍流。一个或多个气体排出端口使气体逸出,由此防止光生物反应器中压力累积。优选气体排出端口通向“单向”阀门,由此防止污染微生物进入光生物反应器中。在一些情形中,在光生物反应器中培养细胞一段时间,在此期间,微藻繁殖且数量增加,但不能在全部时间段内在整个培养基中维持利用主要由气体进入引起的湍流涡旋的湍流方案。在其它情况下,可在全部时间段内在整个培养基中维持利用主要由气体进入引起的湍流涡旋的湍流方案,在此期间,微藻繁殖且数量增加。在一些情况下,在微藻繁殖且数量增加的时间段内不保持光生物反应器规模与涡旋规模之间的预定比例范围。在其它情况下,可维持该范围。

[0238] 光生物反应器通常具有至少一个端口,用来对培养物取样。优选取样端口可重复使用,而不会改变(损害)培养物的无菌性质。取样端口可配置阀门或其它使样本流停止和开始的装置。或者,取样端口可允许连续取样。光生物反应器通常还具有至少一个端口,用以接种培养物。此端口也可用于其它目的,例如培养基或气体进入。

[0239] 适用于本发明方法中的微生物在全世界各种位置和环境都可发现。由于这些微生物与其它物质隔离以及其由此产生的进化趋异性,可能需要凭经验确定适于任一特定微生物种类最佳生长和产油和/或脂质的特定生长培养基。在一些情况下,归因于某种抑制组分的存在或特定微生物株所需的某种必需营养要求的不存在,某些微生物株不能在特定生长培养基上生长。本领域中已知多种用于培养多种微藻以积累以细胞干重百分比计高水平脂质的方法,且本领域也已知用于确定任一相关种类的最佳生长条件的方法。

[0240] 固体和液体生长培养基一般可从多种来源获得,且有关制备适于多种微生物株的特定培养基的说明可见于例如得克萨斯大学奥斯汀分校(University of Texas at Austin)所维护的有关其藻类物种库(UTEX)的在线网址<http://www.utex.org/>。例如,各种淡水和盐水培养基包括表4中所示者。

[0241] 表4. 藻类培养基.

	淡水培养基	盐水培养基
[0242]	1/2 CHEV Diatom 培养基	1% F/2
	1/3 CHEV Diatom 培养基	1/2 富集海水培养基

[0243]

1/5 CHEV Diatom 培养基	1/2 Erdschreiber 培养基
1:1 DYIII/PEA + Gr+	1/2 土壤+海水培养基
2/3 CHEV Diatom 培养基	1/3 土壤+海水培养基
2X CHEV Diatom 培养基	1/4 ERD
Ag Diatom 培养基	1/4 土壤+海水培养基
Allen 培养基	1/5 土壤+海水培养基
BG11-1 培养基	2/3 富集海水培养基
Bold 1NV 培养基	20% Allen + 80 % ERD
Bold 3N 培养基	2X Erdschreiber 培养基
Botryococcus 培养基	2X 土壤+海水培养基
Bristol 培养基	5% F/2 培养基
CHEV Diatom 培养基	5/3 土壤+海水琼脂培养基
Chu 培养基	人工海水培养基
CR1 Diatom 培养基	BG11-1 + .36% NaCl 培养基
CR1+ Diatom 培养基	BG11-1 + 1% NaCl Medium
CR1-S Diatom 培养基	Bold 1NV:Erdschreiber (1:1)
氰化物培养基	Bold 1NV:Erdschreiber (4:1)
蓝藻培养基	Bristol-NaCl 培养基
Desmid 培养基	Dasycladales 海水培养基
DYIII 培养基	富集海水培养基
Euglena 培养基	Erdschreiber 培养基
HEPES 培养基	ES/10 富集海水培养基
J 培养基	ES/2 富集海水培养基
Malt 培养基	ES/4 富集海水培养基
MES 培养基	F/2 培养基

	改良型 Bold 3N 培养基	F/2+NH ₄
	改良型 COMBO 培养基	LDM 培养基
	N/20 培养基	改良型 2 X CHEV
	棕鞭藻培养基	改良型 2 X CHEV + 土壤
	P49 培养基	改良型人工海水培养基
	Polytomella 培养基	改良型 CHEV
	蛋白胨培养基	紫球藻培养基
	雪生藻培养基	土壤+海水培养基
	土壤提取物培养基	SS Diatom 培养基
	土壤水: BAR 培养基	
	土壤水: GR-培养基	
	土壤水: GR-/NH ₄ 培养基	
[0244]	土壤水: GR+培养基	
	土壤水: GR+/NH ₄ 培养基	
	土壤水: PEA 培养基	
	土壤水: Peat 培养基	
	土壤水 VT 培养基	
	螺旋藻培养基	
	Tap 培养基	
	共球藻培养基	
	团藻科培养基	
	团藻科-3N 培养基	
	Volvox 培养基	
	Volvox-右旋糖培养基	
	Waris 培养基	
	Waris+土壤提取培养基	

[0245] 适于培养原始小球藻的培养基包含蛋白胨培养基。此培养基适于无菌培养,且1L体积的培养基(约pH 6.8)可通过将1g蛋白胨加入1升Bristol培养基中来制备。Bristol培养基在水溶液中包含2.94mM的NaNO₃、0.17mM的CaCl₂·2H₂O、0.3mM的MgSO₄·7H₂O、0.43mM、1.29mM的KH₂PO₄和1.43mM的NaCl。对于1.5%琼脂培养基,可将15g琼脂加入到1L溶液中。覆盖溶液并用高压釜灭菌,随后在冷冻温度下储存待用。

[0246] 其它适用于本发明方法中的培养基易于通过查询上文标识的URL,或通过咨询保

存微生物培养物的其它组织来鉴别,所述组织为SAG the Culture Collection of Algae at the University of **Göttingen** (**Göttingen**,Germany)、Scottish Association for Marine Science (Scotland,United Kingdom)管理的CCAP(藻类和原生生物菌种保藏中心)以及位于Institute of Botany (**Třeboň**,Czech Republic)的CCALA(藻类实验室菌种保藏中心)。

[0247] 本发明方法特别适于具有高脂质含量(例如以干重计至少20%脂质)的微藻。可调节处理条件以增加细胞中脂质百分比。例如,在某些实施方案中,在有限浓度的一种或多种营养物质(例如氮和/或磷和/或硫)存在下培养微生物(例如微藻),同时提供过量的例如葡萄糖等固定碳能。氮限制有可能使微生物脂质产率增加超过提供过量氮的培养物中的微生物脂质产率。在特定实施方案中,脂质产率增加为至少约10%到100%,到多达500%或更高。微生物可在有限量营养物质的存在下培养总培养时间的一部分或整个时间段。在特定实施方案中,在整个培养期中,营养物质浓度在限制浓度与非限制浓度之间循环至少两次。

[0248] 为增加以细胞干重计脂质的百分比,可在原料中采用乙酸盐用于产脂质的微生物(例如微藻)。乙酸盐直接送入启动脂肪酸合成的代谢点(即,乙酰基-CoA);因此,在培养物中提供乙酸盐可增加脂肪酸产量。一般说来,在足量乙酸盐存在下培养微生物以增加微生物脂质产率和/或微生物脂肪酸产率,具体说来,增加超过在不存在乙酸盐情况下微生物脂质(例如脂肪酸)产率。送入乙酸盐是本文中提供的用于产生以干细胞重量计具有高脂质百分比的微藻生物质的方法有用组成部分。

[0249] 在稳态生长状态下,细胞积累油(脂质),但不经历细胞分裂。在本发明一个实施方案中,通过向细胞提供原始生长培养基中除固定氮源外的所有组分来维持生长状态。通过送入除固定氮源外最初提供给细胞的所有营养物质,例如通过对细胞送料一段较长时间来培养微藻细胞,可产生以细胞干重计较高百分比的脂质。在一些实施方案中,提供的除固定碳源外的营养物质(例如微量金属、磷酸盐和其它组分)的浓度远低于在开始发酵时最初提供的浓度,以避免细胞“过量送入”不被细胞使用的营养物质,由此降低成本。

[0250] 在其它实施方案中,在消耗掉所有固定氮一段较长时间(例如至少8到16天或更多天)后,可通过送给细胞固定碳源来产生高脂质(油)生物质。在一些实施方案中,使细胞在固定碳源存在下且在不存在固定氮源的情况下积累油超过30天。优选使用本文所述且本领域中已知的条件生长的微生物包含的脂质在以细胞干重计至少约20%脂质到以细胞干重计约75%脂质的范围内。

[0251] 用于使细胞积累以细胞干重计高百分比脂质的另一工具涉及原料的选择。多个小球藻种类和所述小球藻种类内的多个小球藻株当在生物柴油甘油副产物存在下培养时以细胞干重计积累的脂质百分比高于当在等浓度纯试剂级甘油存在下培养时的脂质百分比。类似地,小球藻当在甘油与葡萄糖的等浓度(重量%)混合物存在下培养时以细胞干重计积累的脂质百分比高于当仅存在葡萄糖下培养时的脂质百分比。

[0252] 用于使细胞积累以细胞干重计高百分比脂质的另一工具涉及原料选择以及加入某些原料的时间选择。例如,当在第一时间段将甘油加入到培养物中,随后在第二时间段加入葡萄糖且继续培养,以细胞干重计小球藻积累的脂质百分比高于在发酵开始时同时加入相同量甘油和葡萄糖的情形。参看第2008/151149号PCT公开,以引用的方式并入本文中。

[0253] 因此,通过使用某些原料和临时分离碳源,以及通过将细胞保持在异养生长状态

(在该状态中,细胞积累油但不经历细胞分裂),在微生物脂质产生中以细胞干重计的脂质(油)%至少相对于某些细胞有所提高。下文的实施例将显示使各种微生物(包括数种)生长以积累较高脂质水平(以DCW计)。

[0254] 在另一实施方案中,通过在一种或多种脂质路径酶(例如脂肪酸合成酶)辅因子存在下培养产脂质微生物(例如微藻),来增加脂质产率。一般说来,辅因子的浓度应足以增加微生物脂质(例如脂肪酸)产率超过在不存在辅因子情况下的微生物脂质产率。在特定实施方案中,通过在培养物中包括含有编码辅因子的外源基因的微生物(例如微藻),将辅因子提供到培养物中。或者,可通过包括含有编码参与辅因子合成的蛋白质的外源基因的微生物(例如微藻),将辅因子提供到培养物中。在某些实施方案中,合适的辅因子包括脂质路径酶所需的任何维生素,例如:生物素或泛酸盐。众所周知编码适用于本发明中的辅因子或参与所述辅因子合成的基因,并且可以使用构建体和技术(例如本文所述的构建体和技术)引入到微生物(例如微藻)中。

[0255] 可调节处理条件以增加适于多种应用(包括但不限于,生物柴油)的脂质的产率。也可调节处理条件以降低生产成本。例如,在某些实施方案中,在有限浓度一种或多种营养物质(例如氮、磷和/或硫)存在下培养微生物(例如微藻)。这一条件可增加微生物脂质产率,超过在过量提供营养物质的培养物中微生物的脂质产率。在特定实施方案中,脂质产率增加至少约10%、20—500%。

[0256] 限制营养物质往往也可能降低所产生的生物质的量。因此,有限浓度通常用于增加指定生物质的脂质产率百分比,但不会过度降低总生物质。在示例性实施方案中,生物质降低不超过约5—25%。微生物可在有限量营养物质存在下培养总培养时间的一部分或整个时间段。在特定实施方案中,在整个培养期中,营养物质浓度在限制浓度与非限制浓度之间循环至少两次。

[0257] 由本文所述培养方法产生的微藻生物质包含微藻油(脂质)以及由微生物产生或在发酵期间微生物自培养基并入的其它成分。

[0258] 已经使用本领域中已知的不同培养方法产生以干重计积累高百分比油/脂质的微藻生物质。积累较高百分比油/脂质的微藻生物质微藻生物质适用于本发明方法中。Li等描述在静置培养中使用高铁(Fe)浓度在自养条件下生长的以细胞干重计(DCW)具有多达56.6%脂质的普通小球藻培养物(Li等,Bioresource Technology 99(11):4717-22(2008)。Rodolfi等描述在光生物反应器中于氮饥饿条件下生长的以DCW计分别具有60%脂质和39.8%脂质的微拟球藻属(*Nanochloropsis* sp.)和钙质角毛藻(*Chaetoceros calcitrans*)培养物(Rodolfi等,Biotechnology&Bioengineering(2008)[6月18,电子版在印刷版前])。Solovchenko等描述当在低氮条件下向光生长时积累约30%脂质(DCW)的雪地绿藻(*Parietochloris incise*)培养物(Solovchenko等,Journal of Applied Phycology 20:245-251(2008)。原始小球藻在某些异养条件及氮饥饿下生长时可产生多达55%的脂质(DCW)(Miao和Wu,Bioresource Technology 97:841-846(2006)。已经描述过其它小球藻种类,包括浮水小球藻、耐热性小球藻和极微小球藻,当在搅拌罐生物反应其中于低氮培养基条件下生长时积累多达63%的油(DCW)(Illman等,Enzyme and Microbial Technology 27:631-635(2000)。甚至曾报导过以细胞干重计更高百分比的脂质积累,包括在较高NaCl条件下生长时积累70%脂质(DCW)的杜氏藻(*Dumaliella tertiolecta*)培养物(Takagi等,

Journal of Bioscience and Bioengineering 101 (3) :223-226 (2006)), 和积累75%脂质的布朗葡萄藻 (*Botryococcus braunii*) 培养物 (Banerjee等, Critical Reviews in Biotechnology 22 (3) :245-279 (2002))。

[0259] 本发明的这些和其它方面和实施方案将通过 (但不限于) 以下实施例予以说明; 这些实施例也将突出本发明方法的优点。

[0260] IV. 实施例

[0261] 实施例1

[0262] 培养微藻以获得高含油量

[0263] 培养微藻株以获得以细胞干重计高百分比油。在室温下解冻低温保存的细胞, 并将500 μ l细胞加入到加有2%葡萄糖的4.5ml培养基 (4.2g/L的K₂HPO₄、3.1g/L的NaH₂PO₄、0.24g/L的MgSO₄·7H₂O、0.25g/L单水合柠檬酸、0.025g/L的CaCl₂·2H₂O、2g/L酵母提取物) 中, 并在搅动 (200rpm) 下, 在28℃下于6孔板中生长7天。通过在预先称重的Eppendorf管中, 以14,000rpm离心1ml培养物5分钟来测定细胞干重。丢弃培养物上清液, 并用1ml去离子水洗涤所得细胞团粒。再离心培养物, 丢弃上清液, 并将细胞团粒放于-80℃下, 直到冷冻。随后将样本冻干24小时, 并计算细胞干重。为测定培养物中的总脂质, 取出3ml培养物, 并根据制造商的方案, 使用Ankom系统 (Ankom Inc., Macedon, NY) 进行分析。根据制造商的方案, 使用Ankom XT10提取器对样本进行溶剂提取。总脂质测定为酸水解的干燥样本与溶剂提取的干燥样本之间的质量差异。以细胞干重计油%测量值显示于下表5中。

[0264] 表5. 培养微藻以获得高含油量。

种类	株	油%	SEQ ID NO:
普通小球藻	UTEX 397	39.42	4
普通小球藻	UTEX 2229	54.07	5
普通小球藻	UTEX 398	41.67	6
凯氏拟小球藻	SAG 11.80	37.78	7

凯氏拟小球藻	SAG 14.82	50.70	8
凯氏拟小球藻	SAG 21.11 H9	37.92	9
淤滞型无绿藻	UTEX 327	13.14	10
桑椹型无绿藻	UTEX 1441	18.02	11
桑椹型无绿藻	UTEX 1435	27.17	12
极微小球藻	UTEX 2341	31.39	13
原始小球藻	UTEX 250	34.24	1
原始小球藻	UTEX 25	40.00	2
原始小球藻	CCAP 211/8D	47.56	3
小球藻属	UTEX 2068	45.32	14
[0266] 小球藻属	CCAP 211/92	46.51	15
耐热性小球藻	SAG 211.40B	46.67	16
拜氏拟小球藻 (<i>Parachlorella beijerinckii</i>)	SAG 2046	30.98	17
<i>Chlorella luteoviridis</i>	SAG 2203	37.88	18
<i>Chlorella reisiiglii</i>	CCAP 211/11K	35.85	19
<i>Chlorella reisiiglii</i>	CCAP 11/8	31.17	20
椭圆小球藻	CCAP 211/42	32.93	21
嗜糖小球藻	CCAP 211/31	34.84	22
嗜糖小球藻	CCAP 211/32	30.51	23

[0267] 培养原始小球藻以获得高含油量

[0268] 利用三种不同的培养基配方进行三次发酵过程,以达到产生具有高含油量藻类生物质的目的。第一个配方(培养基1)是基于Wu等(1994Science in China,第37卷,第3期,第326-335页)中所述的培养基,并由每升培养基含以下各物组成:KH₂PO₄,0.7g;K₂HPO₄,0.3g;MgSO₄-7H₂O,0.3g;FeSO₄-7H₂O,3mg;盐酸硫胺,10μg;葡萄糖,20g;甘氨酸,0.1g;H₃BO₃,2.9mg;MnCl₂-4H₂O,1.8mg;ZnSO₄-7H₂O,220μg;CuSO₄-5H₂O,80μg;和NaMoO₄-2H₂O,22.9mg。第

二种培养基(培养基2)源自于实施例1中所述的烧瓶培养基并由每升培养基含以下各物组成:K₂HPO₄,4.2g;NaH₂PO₄,3.1g;MgSO₄·7H₂O,0.24g;单水合柠檬酸,0.25g;脱水氯化钙,25mg;葡萄糖,20g;酵母提取物,2g。第三种培养基(培养基3)是杂合物,并由每升培养基含以下各物组成:K₂HPO₄,4.2g;NaH₂PO₄,3.1g;MgSO₄·7H₂O,0.24g;单水合柠檬酸,0.25g;脱水氯化钙,25mg;葡萄糖,20g;酵母提取物,2g;H₃BO₃,2.9mg;MnCl₂·4H₂O,1.8mg;ZnSO₄·7H₂O,220μg;CuSO₄·5H₂O,80μg;和NaMoO₄·2H₂O,22.9mg。制备全部三种培养基配方并在实验室规模发酵罐中,在121℃下高压蒸汽灭菌30分钟。高压蒸汽灭菌后冷却,向各容器中加入无菌葡萄糖。

[0269] 向各发酵罐中接种原始小球藻(UTEX 250),该原始小球藻使用接种的发酵罐的培养基和温度条件分两个烧瓶阶段制备。每一发酵罐接种10%(v/v)对数生长中期培养物。在实验持续时间内,三个实验室规模发酵罐都保持在28℃。也在23℃温度下评估微藻细胞在培养基1中的生长。对于所有发酵罐评估,pH值都保持在6.6-6.8,以500rpm搅动且气流为1vvm。培养发酵培养物11天。通过在750nm下的光密度和细胞干重来测量生物质积累。

[0270] 使用直接酯交换和标准气相色谱法测定脂质/油浓度。简单点说,将含有生物质的发酵液样本印迹到吸油纸(blotting paper)上,并转移到离心管中,且在真空烘箱中于65℃到70℃下干燥1小时。当样本干燥时,将2mL 5% H₂SO₄的甲醇溶液加入管中。随后在加热块上于65-70℃下加热3.5小时,同时涡旋,并间歇地用声波处理。随后加入2mL庚烷,并剧烈振荡各管。加入2mL 6%的K₂CO₃并剧烈振荡各管以进行混合,随后在800rpm下离心2分钟。接着将上清液转移到含有Na₂SO₄干燥剂的GC小瓶中并使用标准气相色谱法运行。油/脂质%是以细胞干重计。使用以下培养基生长的细胞的干燥细胞的重量如下:培养基1在23℃下为9.4g/L;培养基1在28℃下为1.0g/L,培养基2在28℃下为21.2g/L;且培养基3在28℃下为21.5g/L。使用以下培养基生长的细胞的脂质/油浓度如下:培养基1在23℃下为3g/L;培养基1在28℃下为0.4g/L;培养基2在28℃下为18g/L;且培养基3在28℃下为19g/L。使用以下培养基生长的细胞以细胞干重计的油百分含量如下:培养基1在23℃下为32%;培养基1在28℃下为40%;培养基2在28℃下为85%;且培养基3在28℃下为88%。使用三种不同的培养基配方在28℃下产生的藻类生物质的脂质组成(针对内部标准品归一化后得到的面积%)概述于下表6中。

[0271] 表6.在不同培养基条件下生长的原始小球藻的脂质组成。

[0272]

	培养基 1 28℃ (面积%)	培养基 2 28℃ (面积%)	培养基 3 28℃ (面积%)
C14:0	1.40	0.85	0.72
C16:0	8.71	7.75	7.43
C16:1	--	0.18	0.17
C17:0	--	0.16	0.15
C17:1	--	0.15	0.15
C18:0	3.77	3.66	4.25
C18:1	73.39	72.72	73.83
C18:2	11.23	12.82	11.41
C18:3α	1.50	0.90	1.02
C20:0	--	0.33	0.37
C20:1	--	0.10	0.39

[0273]

C20:1	--	0.25	--
C22:0	--	0.13	0.11

[0274] 培养产油酵母以获得高含油量

[0275] 酵母菌株粘红酵母 (DSMZ-DSM 70398) 是从Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(German Collection of Microorganism and Cell Culture, Inhoffenstraße 7B, 38124Braunschweig, Germany) 获得。解冻低温保存的细胞, 并将其加入含有1×DAS维生素溶液 (1000x:9g/L三(羟甲基)甘氨酸(tricine); 0.67g/L盐酸硫胺;0.01g/L d-生物素;0.008氰基钴胺素;0.02泛酸钙;和0.04g/L对氨基苯甲酸)的50mL YPD培养基(如上文所述), 且在200rpm搅动下, 于30℃下生长18到24小时, 直到OD读数超过5OD (A600)。随后将培养物转移到7L发酵罐中, 并转变成含有1×DAS维生素溶液的YP1培养基 (8.5g/L不含氨基酸和硫酸铵的Difco酵母氮源、3g/L硫酸铵、4g/L酵母提取物)。每天对培养物取样两次, 并测定OD (A600)、干细胞重量 (DCW) 和脂质浓度。当培养物超过50g/LDCW时, 采集培养物。以细胞干重计, 酵母生物质含有约50%油。使两个酵母生物质样本进行直接酯交换化反应, 并通过GC/FID分析脂质组成。结果以面积%表示, 并显示于下表7中。

[0276] 表7. 酯交换化酵母生物质样本的脂质组成.

[0277]

	C1 0:0	C1 2:0	C1 4:0	C1 5:0	C1 6:0	C1 6:1	C1 7:0	C1 8:0	C1 8:1	C1 8:2	C18 :3 α	\geq C: 20
样 本 1	0.0 3	0.2 1	3.3 6	0.2 5	33. 26	0.7 6	0.2 0	6.8 8	42. 68	9.2 8	1.33	1.1
样 本 2	0.0 2	0.1 0	2.1 8	0.1 2	29. 94	0.4 9	0.1 6	8.1 7	48. 12	7.8 8	0.84	1.4 5

[0278] 培养混浊红球菌以获得高含油量

[0279] 在250ml三角烧瓶(baffle flask)中,将2ml低温保存的储备液接种到含4%蔗糖的50ml MSM培养基中产生混浊红球菌PD630(DSM 44193,Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkuttwen GmbH)的种子培养物(参看Schlegel,等,(1961)Arch Mikrobiol 38,209-22)。在200rpm搅动下,使种子培养物在30℃下生长,直到其在600nm下达到1.16的光学密度。在以下两种不同氮条件下,使用10ml种子烧瓶来接种培养物以产生脂质:10mM NH₄Cl和18.7mM NH₄Cl(各一式两份)。在200rpm搅动下,使生长培养物在30℃下生长6天。在10mM NH₄Cl条件下生长的细胞在培养6天后以DCW计得到最大57.2%(平均)的脂质。Cells grown在18.7mM NH₄Cl条件下生长的细胞在培养5天后以DCW计得到最大51.8%(平均)的脂质。

[0280] 使混浊红球菌生物质样本发生直接酯交换化反应,并通过GC/FID分析脂质组成。结果是:C14:0(2.33);C15:0(9.08);C16:0(24.56);C16:1(11.07);C17:0(10.50);2个等效双键数(2double bond equivalent,2DBE)的C17物质(19.90);C18:0(2.49);C18:1(17.41);C18:2(0.05);C19:0(0.75);和2DBE C19物质(1.87)。

[0281] 实施例2

[0282] 微藻种类中脂质链的多样性

[0283] 使用HPLC分析来自一亚组表5中所列在实施例1中生长的微藻株的脂质样本中的脂质组成。结果显示于下表8中。

[0284] 表8.微藻种类中脂质链的多样性.

[0285]

微藻株	C:14:	C:16:	C:16:	C:18:	C:18:	C:18:	C:18:	C:20:	C:20:
	0	0	1	0	1	2	3	0	1

[0286]

原始小 球藻 (UTEX 250)	0.57	10.30	0	3.77	70.52	14.24	1.45	0.27	0
原始小 球藻 (UTEX 25)	0.61	8.70	0.30	2.42	71.98	14.21	1.15	0.20	0.24
凯氏小 球藻 (UTEX 397)	0.68	9.82	0	2.83	65.78	12.94	1.46	0	0
凯氏小 球 藻)(UTE X 2229)	1.47	21.96	0	4.35	22.64	9.58	5.2	3.88	3.3
淤滞型 无绿藻 (UTEX 327)	0	12.01	0	0	50.33	17.14	0	0	0
桑椹型 无绿藻 (UTEX 1441)	1.41	29.44	0.70	3.05	57.72	12.37	0.97	0.33	0
桑椹型 无绿藻 (UTEX 1435)	1.09	25.77	0	2.75	54.01	11.90	2.44	0	0

[0287] 实施例3

[0288] 转鼓干燥微藻生物质

[0289] 使用原始小球藻 (UTEX 250) 的F罐批料 (约1,200加仑) 产生用于提取处理的生物质。将该批料培养约100小时,同时将葡萄糖含量控制在16g/L,之后终止玉米糖蜜进料。2小时后,残余葡萄糖含量降到约0g/L。培养液最终体积为1,120加仑。处理间污染物检查和针对最终培养液样本的完整分析都未能显示任何污染迹象。微藻生物质以细胞干重 (DCW) 计含有38%油。

[0290] 随后,在常压双转鼓式干燥器上干燥微藻生物质。通过喷嘴将培养液送到朝向彼此反向旋转的两个蒸汽加热的转鼓上。在反向旋转的转鼓作用下,以机械方式将培养液散布到两个热圆柱上的分离薄片上。转鼓内凝结蒸汽的高热通量迅速传导干燥附着于薄片的培养液。蒸汽压力在45psig到105psig范围内,且转鼓旋转速度被调节到2rpm到20rpm之间。转鼓干燥后生物质的水分含量在3—10% (以重量计) 之间。

[0291] 热调节微生物生物质

[0292] 使用实施例6中所述的方法产生原始小球藻并转鼓干燥。使用4层垂直堆积式调节器 (424型, French Oil Mill Machinery, Piqua, Ohio) 热调节经过转鼓干燥的微藻生物质。每一层保持多达2.8立方英尺的物质。在热调节生物质之前,使用45psig到100psig蒸汽预加热垂直堆积式调节器约1小时。预加热后,将微藻生物质装载到垂直堆积式调节器顶层,并通过每一层上的旋刮板臂 (sweeper arm) 引导到斜槽中,导向下一层,该旋刮板臂安装于共用垂直轴并通过电动机供电。用150磅载量经过转鼓干燥的微藻生物质填充垂直调节器,且为了确保均匀热调节,通过打开垂直堆积式调节器底部的排料闸阀并使生物质返回垂直调节器的顶部来循环生物质。监测每一层中生物质的温度,并控制在180°F与250°F之间,以防止烧焦。热调节保持时间在10分钟到60分钟间变动,以获得具有不同水分含量的生物质。将经过热调节的生物质卸载到经过覆盖的聚乙烯推车中,并立即在含油种子压榨机中进行压榨。分析热调节之前和之后生物质样本的水分和油含量。

[0293] 使用台面式Taby Pressen从微藻中提取油

[0294] 将根据上述方法制造的经过转鼓干燥的原始小球藻 (UTEX 250) 生物质干燥,以使所得水分含量为约5—5.5%。以细胞干重 (DCW) 计,微藻生物质含有48.5%油。通过带有2.2Hp电动机和70mm螺杆直径的70型Taby Pressen压榨机送入生物质。压榨机预加热到桶温度为100°C。在这些条件下未提取出油。使用相同批次经过转鼓干燥的生物质再进行一轮压榨,该经过转鼓干燥的生物质在送入压榨机中之前,使用强制送风烘箱在70°C下干燥30分钟将水分下调到0.5重量%水分,以此作为调节步骤。将压榨机桶加热到82°C,并将经过转鼓干燥且经过调节的微藻生物质送料通过台面式压榨机。回收到约68%可用油 (以重量计),随后用溶剂提取压榨饼或用过的生物质,以回收残留的油。在用具有不同含油量 (在40—55%油DCW之间) 的微藻生物质进行多次实验后,每次通过分析方法测量出压榨饼具有约30%油。

[0295] 用于测定样本中脂质/油百分比的分析方法是建立在改良的Soxhlet方法的基础上的。简单点说,称取1g样本,并酸水解,随后用石油醚进行溶剂提取。使用MARS (微波加速反应系统; Microwave accelerated reaction system) 通过加热来加速酸水解和石油醚提取。随后蒸发石油醚溶剂并通过重力测量法测定所提取的脂质的量。

[0296] 小规模溶剂提取

[0297] 用溶剂提取由台面式压榨机产生的压榨饼,以回收残余油。将过量石油醚加入压榨饼(5:1,重量/体积比),并在室温下混合最少1小时。随后使石油醚混合物通过含有含有5 μ m过滤器的布氏漏斗(Buchner funnel)。从过滤器中收集固体,接着再用石油醚洗涤3次,每次2 \times 体积。将过滤的石油醚混合物与洗涤液汇集在一起,并放入RotoVap(2L)中以蒸馏石油醚。收集残余的油,并称重。显微镜检查用石油醚提取的饼时,发现在石油醚提取后的饼中未检测到游离的油。然而,在完整(未破裂)的藻类细胞中仍看到脂质小泡。此方法将回收压榨饼中100%的游离油,但不能回收完整藻类细胞中的油。这一小规模溶剂提取处理可用来确定在破裂或破坏藻类细胞时压榨机的有效性。

[0298] 实施例4

[0299] 使用实验室规模Komet压榨机从微藻中提取油

[0300] 在预压榨调节步骤中,在排放喷嘴完全打开状态下,使30千克以DCW计含有约48%油且水分含量为约5%的经过转鼓干燥的原始小球藻(UTEX 250)微藻生物质穿过65mm直径的Komet含油种子压榨机。在此低压预压榨条件下,没有释放出油;但干燥的微藻生物质由松散的片状转变成经过预压榨的团粒。图2a示出送入压榨机中的经过转鼓干燥的生物质材料。图2b示出预压榨的团粒。收集预压榨的团粒,并穿过处于完全压榨条件下的同一压榨机,此时排放喷嘴完全啮合以获得最大压力。结果是从团粒中回收得到69%油。

[0301] 随后在渗滤型提取其中使用异己烷对来自压榨机的用过的饼进行溶剂提取。异己烷提取又得到1kg油。经过调节的压榨随后己烷提取的组合从干燥的微藻生物质中回收到可用油总量中总计76%的油。这些结果概述于下表9中。

[0302] 表9.由运行Komet压榨机获得的结果概述.

[0303]	总生物质	30 千克
	油% (DCW)	48%
[0304]	以重量计可用油总量	14.4 千克
	回收的初榨油(调节式压榨)	10 千克
	由压榨回收的油%	69%
	以重量计压榨后获得的油	4.4 千克
	由己烷提取回收的油%	从压榨饼获得 23%油(约 1 千克油)
	回收的总油%	76%

[0305] 实施例5

[0306] 使用压榨助剂以中试规模压榨微藻

[0307] 使用转鼓式干燥器干燥以DCW计含有38%油的微藻生物质(原始小球藻UTEX 250),且所得水分含量为约3.5%(通过水分分析仪测量)。在以下实验中使用L-250(3.5"直径)French中试规模含油种子螺杆式压榨机(French Oil Mill Machinery Company, Piqua, Ohio)。核心的主要桶(或笼)的直径为3.5英寸。螺杆由压缩比设置为7到18的交互式

蜗杆和套管组成。主传动装置由20马力电动机供电且主轴旋转速度为20rpm。笼和轴通过间接蒸汽预加热到在180°F与260°F之间的温度。所用喷嘴间隙0.5英寸,该间隙是在喷嘴托座与喷嘴安装板之间测量。使用3位方向阀和液压喷嘴缸的手压泵来调节喷嘴间隙。

[0308] 干燥的柳枝稷用作微藻的压榨助剂。经过转鼓干燥的含38%油(DCW)的藻类生物质与柳枝稷混合,以形成20%柳枝稷/生物质、5%柳枝稷/生物质或单独生物质样本。在垂直堆积式调节器(如上文所述)中,在121°C下单独热调节全部三种藻类生物质样本30分钟。在加入生物质之前,将压榨机加热到桶温度为93°C。通过压榨20%柳枝稷/生物质回收得到可用油总量中约39.5%的油(以重量计),同时也得到质量较佳的压榨饼供己烷提取。通过压榨5%柳枝稷/生物质回收得到可用油总量中约25%的油(以重量计),同时也得到质量较佳的压榨饼供己烷提取。单独生物质条件得到较低油回收率,占总油量约5%(以重量计),并且压榨饼质量较差,不适于己烷提取。

[0309] 也使用大豆皮作为微藻的压榨助剂。将经过转鼓干燥的含38%油(DCW)的藻类生物质与大豆皮混合,以形成20%大豆皮/生物质、10%大豆皮/生物质或单独生物质样本。在垂直堆积式调节器中,在121°C下单独热调节全部三种藻类生物质30分钟。在加入生物质之前,将压榨机加热到桶温度为93°C。20%大豆皮/生物质混合物未送入通过压榨机;因此,没有回收到油。通过压榨10%大豆皮/生物质回收得到可用油总量中约22.5%的油(以重量计),同时也得到质量较佳的压榨饼供己烷提取。单独生物质条件没有得到油,并堵塞压榨机的螺杆组合件。在5%柳枝稷、20%柳枝稷和10%大豆皮条件下,所回收的油中存在约25重量%固体。结果概述于下表10中,该表显示在减去固体重量后所回收到的总油重量百分比。

[0310] 表10. 使用压榨助剂压榨微藻.

压榨助剂	加入百分比	回收的油%	溶剂提取得到的压榨饼的质量
柳枝稷	0	约 5%	差
[0311] 柳枝稷	5%	24.9%	好
柳枝稷	20%	39.5%	好
大豆皮	0	无	N/A
大豆皮	10%	22.5%	好
大豆皮	20%	无	N/A

[0312] 实施例6

[0313] 水分含量对油回收的影响

[0314] 根据实施例3中所述的方法,转鼓干燥含38%油(DCW)的原始小球藻(UTEX 250)藻类生物质。测量出水分含量为约3%到5%,且在送入螺杆式压榨机中前,未进行调节。将72磅生物质送入预加热到200°F的3.5"含油种子螺杆式压榨机(French Oil Mill Company, Piqua, OH)中。观察到大量渣滓或固体被推到笼中各杆之间,遍及压榨机所有部分。回收到

约5%油(在除去固体后)。用溶剂提取压榨饼又回收到可用油总量中58%的油(约7kg)。针对溶剂提取的饼的分析显示,存在约18.6%残余油。油的总回收率(压榨和溶剂提取)为62%,这表明压榨机仅破裂或裂解62%的微藻细胞。观察到的低油回收率(5%)和大量渣滓表明,这些条件(例如微生物生物质的水分含量)不是最合适的。

[0315] 进行一系列试验以确立可在压榨机中得到最高油回收率的最佳干燥微生物生物质水分含量范围。使用转鼓式干燥器干燥以DCW计含有51.3%油的微藻生物质。使用French 3.5"含油种子压榨机(与L250French压榨机相当),且设置与实施例5中所述相同。在垂直堆积式调节器中,在250°F下热调节干燥的藻类生物质。改变热调节的时间以获得不同的水分含量。除非另作注释,否则在所有实验期间,压榨机桶都预热到且保持在200°F。将经过热调节的微藻生物质缓慢引入含油种子压榨机中,同时监测压榨机的电负荷。通过变速螺杆式输送机控制送料率。通过经2到3分钟加入所收集的原油和压榨饼重量来测定送料率。使用上述分析方法分析由不同条件得到的每一压榨饼样本以测量脂质/油含量。

[0316] 利用与上述相同批次的经过转鼓干燥的微藻生物质进行第二组实验。在垂直堆积式调节器中,在200°F下调节一批微藻生物质,并得到1.2%的最终水分含量。在垂直堆积式调节器中,在290°F下调节另一批微藻生物质,并得到0.7%的最终水分含量。在桶温度为200°F的L250(3.5"直径)含油种子压榨机中压榨两种批料。1.2%水分含量的批料回收得到54.3%油(以重量计),与由上述1.2%水分含量生物质的批料得到结果(回收得到48.2%油)相当。0.7%水分含量条件得到最佳结果,产生质量较佳的饼供随后溶剂提取,并回收得到73%油。然而,油颜色略深于由在200°F下调节的生物质产生的油。下表11概述了由这两组实验得到的测试水分含量和回收的油百分比%油(减去固体之后计算)。

[0317] 表11.水分含量对油回收的影响。

[0318]

水分含量	回收的油%	压榨饼中的油%	出油率(g/min)	溶剂提取得到的压榨饼的质量
0.2%	49.1%	8%	355	差—烧毁;粉末状
1%	66.9%	29%	596	好
1.2%	48.2	33%	518	好
2.4%	34.9%	39%	277	好
1.2%; 调节温度 200°F	54.3%	32%	520	好
0.7%; 调节温度 290°F	73%	16%	697	好; 油颜色略深于在 200°F 下运行的情形

[0319] 由这两组实验得到的结果表明,在本实施例中,实现最高油回收百分比并获得质量较佳的压榨饼供随后溶剂提取的最佳水分含量在0.7%与1.2%之间。微藻生物质的这一水分含量范围还使油中产生的固体较少(低于25重量%)。其他类似实验显示,水分含量低于0.5%导致在油中存在大量渣滓(固体)(超过40重量%),从而影响总产率,并产生不适于随后溶剂提取的呈粉末状且质量较差的烧毁的饼(参看图3a)。如果水分含量高于1.2%,则油的总产率较低,但产生的压榨饼质量极佳,适于随后的溶剂提取(参看图3b)。这一结果表明,水分含量在由微生物生物质得到的压榨饼的质量和构造方面起到重要作用,且如果水分含量过高,就会抑制油产率百分比。

[0320] 实施例7

[0321] 在实验室中压榨无绿藻以及经过压榨、提取和合并的物质中的脂质组成

[0322] 使用台面式70型Taby压榨机压榨约2kg经过转鼓干燥的以DCW计含有60%脂质的桑椹型无绿藻藻类生物质(有关压榨机条件,参看上述实施例8)。在强制送风烘箱中,在212°F下热调节干燥的生物质30分钟。压榨机预加热到200°F,并在除去固体后回收到235.5g油(19%)。收集油,并使用标准方法分析脂质组成(以面积%表示)、

[0323] 叶绿素和类胡萝卜素含量。通过用石油醚分批提取来回收压榨饼中的残余油(如实施例3中所述)。从961g压榨饼中提取到总计311g油。也分析提取的油的脂质组成(以面积%表示)、叶绿素和类胡萝卜素含量,概述于下。总的说来,压榨的油与溶剂提取的油的脂质组成、叶绿素和类胡萝卜素含量极其类似。

[0324] 表12. 从桑椹型无绿藻提取的油的脂质组成.

[0325]

	压榨的油(面积%)	溶剂提取的油(面积%)
C12:0	0.05	0.05
C14:0	1.36	1.37
C14:1	0.02	0.02
C15:0	0.04	0.04
C16:0	19.90	20.11
C16:1	0.85	0.85
C18:0	4.11	4.15
C18:1	64.81	64.56
C18:2	7.83	7.83

[0326]

C20:0	0.03	0.03
-------	------	------

[0327] 表13. 从桑椹型无绿藻提取的油中的类胡萝卜素和叶绿素含量.

[0328]

	压榨油(mcg/ml)	溶剂提取的油 (mcg/ml)
顺式叶黄素	0.041	0.042
反式叶黄素	0.140	0.112
反式玉米黄质	0.045	0.039
顺式玉米黄质	0.007	0.013
t- α -隐黄质	0.007	0.010
t- β -隐黄质	0.009	0.010
t- α -胡萝卜素	0.003	0.001
c- α -胡萝卜素	未检测到	未检测到
t- β -胡萝卜素	0.010	0.009
9-顺- β -胡萝卜素	0.004	0.002
番茄红素	未检测到	未检测到
总类胡萝卜素	0.267	0.238
叶绿素	<0.01 mg/kg	<0.01 mg/kg

[0329] 此外,还使用ICP质谱法对来自桑椹型无绿藻的压榨油和溶剂提取的油进行元素分析。结果概述于下表14中。

[0330] 表14. 从桑椹型无绿藻提取的油的元素分析。

[0331]

	压榨的油 (ppm)	溶剂提取的 油(ppm)
锂	<2	<2
铍	<2	<2
硼	<2	<2
钠	12	12

[0334]	铅	<2	<2
	铋	<2	<2
	钍	<2	<2
	铀	<2	<2
	碘	28	<4
	硫(ICP)	<5	<5
	汞	<2	<2
	氯化物	<8	<6

[0335] 实施例8

[0336] 中试规模压榨桑椹型无绿藻

[0337] 使用实施例3中所述的方法,通过转鼓干燥含有约66%油(以细胞干重计)的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)。在转鼓干燥后,生物质的水分含量为约2.7%。随后使用实施例3中所述的方法,热调节干燥的生物质。热调节后生物质的水分含量为约0.6%到1.4%。接着将藻类生物质送入笼预加热到195-220°F的3.5"含油种子螺杆式压榨机(French Oil Mill Company, Piqua OH)中。观察到大量渣滓被推到笼中各杆之间,表明这些条件不是最合适的。利用细粉(固体)回收到约47.9%油(以重量计且为生物质中可用油的理论计算值)。通过离心回收固体,在澄清后总油产率为31.9%。针对压榨饼的分析显示,存在约22%(以压榨饼重量计)残余油。同样通过压榨机运转以类似方式制备的另一批生物质,且回收到类似产率的油(57.3%,包括油中的固体)。

[0338] 实施例9

[0339] 使用压榨助剂从桑椹型无绿藻提取油

[0340] 在实验室规模的台面式Taby压榨机上,利用不同的压榨助剂进行一系列试验,以便了解加入压榨助剂是否能增加油产率。在收获生物质后,将不同压榨助剂加入发酵液中。随后在转鼓式干燥器上同时干燥压榨助剂/生物质,接着进行热调节。然后在上文实施例3中所述的条件下,将此压榨助剂/生物质混合物送入实验室规模的Taby压榨机中。使用未加入压榨助剂的条件作为负对照。

[0341] 对阴性对照,在转鼓式干燥器上干燥3L含有63.4%油发酵液含有生物质。将干燥的生物质送料通过台面式压榨机,并得到极少量的油。下一条件是3L加有150g(以发酵液的湿重计,5%)纤维素助滤剂(PB20, EP Minerals, Nevada)的发酵液。随后在转鼓式干燥器上干燥混合物,在转鼓干燥后,水分含量为2.25%。随后在110°C烘箱中热调节纤维素/生物质20到30分钟,达到最终水分含量为1.2%。接着将这一经过调节的纤维素/生物质送入实验室规模压榨机中。根据可用油的理论计算值,生物质中存在约145g可用油。使用实验室规模压榨机回收到约148g油,故总油回收率为约100%。

[0342] 下一测试的条件是加入5%粗研磨的大豆皮(以湿重计)。将150g大豆皮与3L含有桑椹型无绿藻生物质的发酵液混合。在混合处理期间,观察到这些粗研磨的大豆皮倾向于从溶液中沉淀析出,因此需要持续混合。随后在转鼓式干燥器上干燥混合物,在转鼓干燥后

水分含量为6.5%。接着在110℃烘箱中热调节干燥的大豆皮/生物质20到30分钟,达到最终水分含量为2.5%。然后将经过热调节的大豆皮/生物质送料通过实验室规模的螺杆式压榨机。从实验室规模螺杆式压榨机回收到所计算的162g可用油中46g的油,故总油回收率为28%。用另一批次桑椹型无绿藻发酵液重复这些实验,并加入2%粗研磨的大豆皮、加入1%大豆皮、加入2%纤维素和加入1%纤维素。还对作为负对照的仅经过转鼓干燥的发酵液进行测试。从负对照回收到极少量的油。由2%大豆皮条件,回收到42%可用油;从1%大豆皮条件回收到30%可用油。由2%纤维素条件,回收到40%可用油;从1%纤维素条件,回收到10%可用油。

[0343] 使用精细研磨的大豆皮以及干式回填加入的发酵液作为压榨助剂来进行其他实验。由于粗研磨的大豆皮有沉淀析出的倾向,故使用咖啡研磨机以最精细设置精细研磨粗研磨的大豆皮。研磨后,精细研磨的大豆皮呈粉末构造。在本实验中,也将干式回填物质(2×含油量为5%的桑椹型无绿藻生物质的压榨饼)磨成粉。对照条件是不加入压榨助剂的含有约60%油的桑椹型无绿藻生物质。将150g精细研磨的大豆皮(5%)或经过研磨的干式回填物质(5%)加入3L含有桑椹型无绿藻生物质的发酵液中。随后在转鼓式干燥器上干燥藻类生物质与压榨助剂的混合物。转鼓干燥后,对照(仅含桑椹型无绿藻生物质)条件的水分含量为4%,转鼓干燥后5%精细研磨的大豆皮条件的水分含量为2.3%,并且转鼓干燥后5%干式回填物质条件的水分含量为2.5%。接着在110℃烘箱中干燥各生物质20到30分钟,以便对生物质进行热调节。对照生物质的最终水分含量为2%,加入5%精细研磨的大豆皮得到的最终水分含量为1.3%,并且加入5%干式回填物质得到的最终水分含量为1.01%。热调节后,接着在上文实施例3中所述的条件下,将各生物质送料通过实验室规模的Taby螺杆式压榨机。收集提取的油和压榨饼,并分析预计产率。对于对照条件,收集到6.7g油(在除去油中的固体后),产率为约2.8%。观察到大量渣滓通过压榨机排出,并且压榨饼堵塞了压榨机的排放端。在加入5%精细研磨的大豆皮的条件下,收集到148.2g油(在除去油中的固体后),回收产率为约79.2%。在压榨期间,出现极少量的渣滓,而且在澄清之前,压榨的油中存在极少量的固体。在加入5%干式回填物质的条件下,收集到195.9g油(在除去油中的固体后),产率为约54.6%。在压榨期间,出现极少量的渣滓,而且在澄清之前,压榨的油中存在极少量的固体。这些结果与上述结果一致,其中将压榨助剂加入发酵液(含有微藻生物质)中随后在转鼓干燥器上共干燥所产生的生物质当在螺杆式压榨机上压榨时的油产率相比不加入压榨助剂的微藻生物质有所增加。

[0344] 使用压榨助剂在中试规模上压榨桑椹型无绿藻

[0345] 进行中试工厂规模的试验,以评价研磨大豆皮作为压榨助剂与转鼓干燥的桑椹型无绿藻微藻生物质干式混合时的情形。将按以最终混合物重量计10%和20%(重量比)的研磨大豆皮与转鼓干燥的生物质混合。随后在French 424垂直堆积式调节器中热调节微藻生物质/大豆皮混合物,之后在3.5"螺杆式压榨机(French Oil Mill Company, Piqua, OH)中压榨。回收油和压榨饼,并称重以估算产率。

[0346] 按类似方式制备桑椹型无绿藻生物质的对照批料,但其中不包括大豆皮。转鼓干燥后,该对照批料的含油量为52%(DCW)且水分含量为2.57%。在垂直堆积式调节器中,在195°F到223°F下热调节70磅对照批料30分钟,并且水分含量降到0.81—0.95%。在195°F到223.5°F下,调节72磅加入10%大豆皮且初始水分含量为3.30%的生物质30分钟,并且水分

含量降到1.06%。在208°F到227°F下,热调节70磅加入20%大豆皮且初始水分含量为3.07%的生物质30分钟,并且水分含量降到1.47%。随后,将经过热调节的生物质送入螺杆式压榨机中。在对照批料中,有30磅(总计70磅经过热调节的批料)在压榨机堵塞前送料通过压榨机。从送料通过的30磅生物质中回收到约4.0磅油(包括固体),产率为约20.5%。在10%大豆皮条件中,有61磅(总计72磅经过热调节的批料)送料通过压榨机,并且回收到约7.0磅油(包括固体),产率为约20%。在20%大豆皮试验中,全部70磅经过热调节的物质送料通过压榨机,但回收到极少(未测量)量的油。

[0347] 由于在上述实验室规模螺杆式压榨机实验中取得了成功,故在收获藻类生物质后将压榨助剂加入发酵液的处理按比例放大以用于中试规模的螺杆式压榨机(3.5"含油种子螺杆式压榨机(French Oil Mill Company,Piqua,OH))。在不同实验条件下制备桑椹型无绿藻生物质:未加入纤维素(PB20)的负对照、收获后向发酵液中加入25g/L纤维素的生物质,以及收获后向发酵液中加入50g/L纤维素的生物质。在转鼓式干燥器上干燥来自全部三种条件的生物质。负对照生物质具有约58%含油量(DCW)和6.68%水分含量。随后在垂直堆积式调节器中,在225°F下调节140磅负对照生物质45分钟,并且热调节后水分含量为2.5—3.5%。转鼓干燥后加入25g/L纤维素的生物质的水分含量为5.30%。接着在垂直堆积式调节器中,在200°F下调节200磅加入25g/L纤维素的生物质45分钟,并且热调节后水分含量为2.5—3.5%。转鼓干燥后加入50g/L纤维素的生物质的水分含量为4.35%。随后在垂直堆积式调节器中,在200°F下调节115磅加入50g/L纤维素的生物质45分钟,并且热调节后水分含量为2.5—3.5%。然后,将来自各实验条件的生物质送料通过3.5"含油种子压榨机。在负对照条件中,回收到32.3磅油(包括油中的固体或细粉)。分析来自负对照条件的压榨饼中的残余含油量,并且发现该饼含有42—52%(以重量计)残余油。在25g/L纤维素条件下,回收到87.6磅油(包括油中的固体)。分析压榨饼中的残余含油量,并且发现该饼含有10—11%(以重量计)残余油。从加入50g/L纤维素的条件未回收到油。生物质未能送料通过压榨机,并且在5分钟后堵塞压榨机。

[0348] 由本实验得到的结果与从实验室规模台面式压榨机得到的结果一致。尽管从负对照条件回收到适量的油,但在压榨饼中仍有相当大量的残余油残留。25g/L纤维素条件进行得最好,得到压榨饼中几乎大部分的油,且残余油量最少。50g/L纤维素条件无法得到任何油,而且在运转5分钟后堵塞压榨机。这些结果显示,向收获的微藻生物质的发酵液中加入压榨助剂并且共干燥可增加在含油种子螺杆式压榨机中压榨时的油产率。

[0349] 中试规模两步全压榨桑椹型无绿藻

[0350] 进行桑椹型无绿藻生物质的两步全压榨,由此在压榨机中压榨经过干燥和调节的桑椹型无绿藻生物质,随后调节用过的生物质持续第二时间段,并在压榨机中压榨第二时间段。

[0351] 使用上文实施例3中所述的方法,转鼓干燥含有约62%油(以细胞干重计)的桑椹型无绿藻(UTEX 1435)。转鼓干燥后,生物质的水分含量为约2.7%。随后使用实施例3中所述的方法热调节干燥的生物质。热调节后生物质的水分含量为约1.7—2.1%。

[0352] 使用笼预加热到194°F到220°F的3.5"含油种子螺杆式压榨机(French Oil Mill Company,Piqua,OH)对经过热调节的生物质进行第一遍压榨。在第一遍压榨期间,从微藻生物质回收到约77.1%油(以重量计)。针对压榨饼的分析显示,存在约21重量%残余油。

[0353] 热调节压榨饼,持续第二时间段,以使压榨饼为约166°F到197°F。经过热调节的压榨饼的水分含量为约1.8%。随后将经过热调节的饼送入笼预加热到180°F到235°F的压榨机中。以在来自第二次压榨的所述第二压榨饼中回收的油和第一次通过螺杆式压榨机后计算的可用油的重量计,在此第二遍压榨中回收到约72.5%油。将在两次通过压榨机的压榨饼中回收的油相加,得到通过两遍压榨的总油回收率为约92.9%。

[0354] 脱脂桑椹型无绿藻生物质的单糖组合物

[0355] 随后收获高油桑椹型无绿藻生物质,并使用转鼓式干燥器干燥。如本文所述,使用压榨机裂解干燥的藻类生物质并提取油。接着使用石油醚,通过溶剂提取压榨的生物质中的残余油。使用Rotovapor旋转蒸发器(Buchi Labortechnik AG, Switzerland)蒸发脱脂粕中残余的石油醚。然后,使用针对组合气相色谱法/质谱法(GC/MS)对含有由样本酸性甲醇解产生的单糖甲基糖苷的过氧-三甲基硅烷基(TMS)衍生物的脱脂粕进行糖基(单糖)组成分析。使脱脂粕的样本在80°C下于1M HCl的甲醇溶液中发生甲醇解,持续约20小时,随后用吡啶和乙酸酐在甲醇中进行再N-乙酰基化(用于检测氨基糖)。接着通过在80°C下用Tri-Sil (Pierce)处理,使样本过氧-三甲基硅烷化,持续30分钟(参看Merkle和Poppe (1994) *Methods Enzymol.* 230:1-15,以及York等, (1985) *Methods Enzymol.* 118:3-40中的方法)。在与5975b MSD介接的HP 6890GC上,使用All Tech EC-1熔融二氧化硅毛细管柱(30m×0.25mm ID)进行TMS甲基糖苷的GC/MS分析。根据滞留时间,并与标准品相比较来鉴别单糖,并通过其质谱证实这些单糖的碳水化合物性质。在衍生化之前将每一样本20微克肌醇加入样本中作为内标物。脱脂桑椹型无绿藻(UTEX 1435)生物质的单糖组合物概述于下表15中。

[0356] 表15. 桑椹型无绿藻(UTEX 1435)脱脂生物质的单糖(糖基)组合物分析。

	质量(μg)	摩尔% (占总碳水化合物化合物的比例)
阿拉伯糖	0.6	1.2
木糖	n.d.	n.d.
半乳糖醛酸(GalUA)	n.d.	n.d.
甘露糖	6.9	11.9
半乳糖	14.5	25.2
[0357] 葡萄糖	35.5	61.7
N 乙酰半乳糖胺 (GalNAc)	n.d.	n.d.
N 乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)	n.d.	n.d.
庚糖	n.d.	n.d.
3 脱氧-2-甘露糖基-2 辛 酮糖酸(KDO)	n.d.	n.d.
总计	57	100

[0358] n.d. = 未检测到

[0359] 还使用AOAC方法991.43分析两个脱脂桑椹型无绿藻 (UTEX 1435) 生物质样本中的膳食纤维含量。两个样本的膳食纤维含量为22.89%和33.06%。

[0360] 实施例10

[0361] 用溶剂提取来自微藻生物质的压榨饼

[0362] 为了使从微藻生物质获得的总油产率最大,使用转鼓分批型提取器,并使用商用己烷作为溶剂,对压榨饼(如前述实施例中所述)进行溶剂提取。将经过压榨的生物质与商用己烷混合于提取器中。在转鼓式提取器中,通过用商用己烷洗涤压榨饼3次来提取油,所用溶剂与固体比例在0.7:1到2:1之间。提取器的温度保持在122°F到131°F之间,每次洗涤的停留时间是1小时且利用1到2英寸水柱的低真空。在每次洗涤期间,连续旋转转鼓式提取器,以改进混合物的提取效率。

[0363] 使留在提取器中的油-己烷微胞滤过1微米过滤器,随后在分批式蒸发容器中蒸发达到最小溶剂含量。通过在170°F到200°F和20到24英寸Hg柱的真空下蒸发来除去溶剂。喷射0.5—2%氮气以使原油中残留较少溶剂。接着将脱溶剂的原油包装到5加仑的容器中。在抽空油-己烷微胞后,在同一转鼓式提取器中脱除潮湿的用过的粕(“marc”)的溶剂。在转鼓式提取器中,只是用间接蒸汽将生物质加热到220°F到240°F,来对marc进行脱溶剂化和干燥。将脱溶剂的粕包装于44加仑纤维制圆筒中。

[0364] 在用于除去水和固体的溶剂水分槽中浓缩并回收来自转鼓式提取器和油蒸发器的溶剂蒸气。储存收回的溶剂,并且可再用于未来的溶剂提取中。

[0365] 实施例11

[0366] 干燥并提取产油酵母中的油

[0367] 根据实施例1中的方法培养产油酵母株粘红酵母(DSMZ-DSM 70398),以产生以DCW计含有约50%脂质的产油酵母生物质。使用三种不同的方法干燥收获的酵母培养液以供比较:(1)在强制送风烘箱中在75℃下托盘干燥过夜;(2)在转鼓式干燥器上干燥,同时不进行浓缩;和(3)将酵母培养液浓缩到22%固体,随后在转鼓式干燥器上干燥浆料。对来自三种不同干燥条件每一者的材料进行热调节,并送料通过螺杆式压榨机以提取油。压榨机温度为150°F,并且经过调节的干燥酵母生物质保持在约190°F,直到准备好将其送入压榨机中。

[0368] 在不浓缩情况下经过转鼓干燥的酵母培养液的水分含量为5.4%,随后在烘箱中于90℃下调节转鼓干燥的酵母20分钟。调节后水分含量为1.4%。接着将经过调节的转鼓干燥的酵母送入台面式Taby螺杆式压榨机中进行油提取。该物质提取出大量油,而且渣滓很少。

[0369] 转鼓干燥的浓缩酵母培养液的水分含量为2.1%,随后在烘箱中于90℃下调节转鼓干燥的浓缩酵母20分钟。调节后水分含量为1.0%。随后将经过调节的转鼓干燥的浓缩酵母送入台面式Taby螺杆式压榨机中进行油提取。该物质提取出大量油,而且渣滓很少。

[0370] 实施例12

[0371] 干燥和提取产油细菌中的油

[0372] 根据实施例1中的方法培养产油细菌株混浊红球菌PD630(DSMZ-DSM 44193),以产生以DCW计含有约32%脂质的产油细菌生物质。

[0373] 使用离心法浓缩收获的混浊红球菌培养液,随后用去离子水洗涤,并且再悬浮于1.8L去离子水中。将50g纯化的纤维素(PB20-Pre-co-Floc,EP Minerals,Nevada)加入再悬浮的生物质中,并用去离子水将总固体调节到20%。随后在转鼓式干燥器上干燥红球菌生物质,且转鼓干燥后红球菌的水分含量为约3%。

[0374] 接着在烘箱中于130℃下热调节经过转鼓干燥的物质30分钟,且所得水分含量为约1.2%。然后,将经过热调节的生物质送料通过台面式Taby压榨机(螺杆式压榨机)进行油提取。压榨机温度为209°F,且经过调节的干燥酵母生物质保持在约240°F,直到准备好将其送入压榨机中。回收的油伴随大量渣滓。

[0375] 实施例13

[0376] 微藻株的基因分型

[0377] 对来自上表5中所列23种微藻株的微藻样本进行基因分型。如下所述从藻类生物质中分离出基因组DNA。在14,000×g下,将来自液体培养物的细胞(约200mg)离心5分钟。随后将细胞再悬浮于无菌蒸馏水中,在14,000×g下离心5分钟,并丢弃上清液。将直径为约2mm的单一玻璃珠加入生物质中,并将试管-80℃下放置至少15分钟。取出样本,并加入150μl研磨缓冲液(grinding buffer)(1% Sarkosyl、0.25M蔗糖、50mM NaCl、20mM EDTA、100mM Tris-HCl(pH 8.0)、RNase A 0.5μg/μl)。通过短时间涡旋使团粒再悬浮,随后加入40μl 5M NaCl。短时间涡旋样本,随后加入66μl 5%CTAB(鲸蜡基三甲基溴化铵),并且最后进行短时间涡旋。接下来在65℃下孵育样本10分钟,之后在14,000×g下离心10分钟。将上清液转移到新试管中,并用300μl苯酚:氯仿:异戊醇(12:12:1)萃取一次,随后在14,000×g下离心5分钟。将所得水相转移到含有0.7体积异戊醇(约190μl)的新试管中,通过倒转进行混合,并

在室温下孵育30分钟或在4℃下孵育过夜。通过在14,000×g下离心10分钟来回收DNA。随后用70%乙醇洗涤所得团粒两次,接着用100%乙醇进行最后一次洗涤。在室温下空气干燥团粒20到30分钟,随后再悬浮于50μl 10mM TrisCl、1mM EDTA (pH 8.0) 中。

[0378] 将5μl如上述制备的总藻类DNA按1:50稀释于10mM Tris (pH 8.0) 中。PCR反应(最终体积20μl)进行如下。将10μl 2×iProof HF混合液(BIO-RAD)加入0.4μl引物SZ02613 (5'-TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAC-3' (SEQ ID NO:24), 10mM储备液浓度)中。这一引物序列在Gen Bank寄存编号L43357中处于567-588位,并且在高等植物和藻类质粒基因组中高度保守。此后加入0.4μl引物SZ02615 (5'-CAGTGAGCTATTACGCACTC-3' (SEQ ID NO:25), 10mM储备液浓度)。这一引物序列与Gen Bank寄存编号L43357中的1112-1093位互补,并且在高等植物和藻类质粒基因组中高度保守。接下来,加入5μl稀释的总DNA和3.2μl dH₂O。如下所述执行PCR反应:98℃, 45秒;98℃, 8秒;53℃, 12秒;72℃, 20秒,持续35个循环,之后在72℃下保持1分钟并保持在25℃。对于PCR产物的纯化,将20μl 10mM Tris (pH 8.0) 加入各反应物中,随后用40μl苯酚:氯仿:异戊醇(12:12:1)萃取,涡旋并在14,000×g下离心5分钟。将PCR反应物施加到S-400柱(GE Healthcare)中,并在3,000×g下离心2分钟。随后将纯化的PCR产物TOPO克隆到PCR8/GW/TOPO中,并在LB/Spec板上选择阳性克隆。使用M13正向和反向引物在两个方向上测定纯化的质粒DNA的序列。来自23种微藻株的序列在所附序列列表中列为SEQ ID NOs:1-23(相关性参看表5)。此外,还使用上述方法和引物对数种无绿藻属微藻株进行基因分型(参看下表16)。23S rRNA基因组序列在所附序列列表中列为SEQ ID NOs:26-34并描述于下文中。

[0379] 表16. 无绿藻属微藻株.

	<u>种类</u>	<u>微藻株</u>	<u>SEQ ID NO.</u>
	<i>Prototheca kruegani</i>	UTEX 329	SEQ ID NO:26
	威克海姆无绿藻	UTEX 1440	SEQ ID NO:27
	淤滞型无绿藻	UTEX 1442	SEQ ID NO:28
[0380]	桑椹型无绿藻	UTEX 288	SEQ ID NO:29
	桑椹型无绿藻	UTEX 1439; 1441; 1435; 1437	SEQ ID NO:30
	威克海姆无绿藻	UTEX 1533	SEQ ID NO:31
	桑椹型无绿藻	UTEX 1434	SEQ ID NO:32
[0381]	佐普夫无绿藻	UTEX 1438	SEQ ID NO:33
	桑椹型无绿藻	UTEX 1436	SEQ ID NO:34

[0382] 产油酵母株的基因分型

[0383] 对48种不同产油酵母株进行基因分型。如下所述从产油酵母生物质中分离出基因组DNA。在14,000×g下,将来自液体培养物的细胞(约200mg)离心5分钟。随后将细胞再悬浮于无菌蒸馏水中,在14,000×g下离心5分钟,并丢弃上清液。将直径为约2mm的单一玻璃珠加入生物质中,并将试管-80℃下放置至少15分钟。取出样本,并加入150μl研磨缓冲液(1%

Sarkosyl、0.25M蔗糖、50mM NaCl、20mM EDTA、100mM Tris-HCl (pH 8.0)、RNase A (0.5 μ g/ μ l)。通过短时间涡旋使团粒再悬浮,随后加入40 μ l 5M NaCl。短时间涡旋样本,随后加入66 μ l 5%CTAB(鲸蜡基三甲基溴化铵),并且最后进行短时间涡旋。接下来在65 $^{\circ}$ C下孵育样本10分钟,之后在14,000 \times g下离心10分钟。将上清液转移到新试管中,并用300 μ l苯酚:氯仿:异戊醇(12:12:1)萃取一次,随后在14,000 \times g下离心5分钟。将所得水相转移到含有0.7体积异戊醇(约190 μ l)的新试管中,通过倒转进行混合,并在室温下孵育30分钟或在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。通过在14,000 \times g下离心10分钟来回收DNA。随后用70%乙醇洗涤所得团粒两次,接着用100%乙醇进行最后一次洗涤。在室温下空气干燥团粒20到30分钟,随后再悬浮于50 μ l 10mM TrisCl、1mM EDTA (pH 8.0)中。

[0384] 将5 μ l如上述制备的总藻类DNA按1:50稀释于10mM Tris (pH 8.0)中。PCR反应(最终体积20 μ l)进行如下。将10 μ l 2 \times iProof HF混合液(BIO-RAD)加入0.4 μ l引物SZ5434正向引物(5' GTCCCTGCCCTTTGTACACAC-3' (SEQ ID NO:35), 10mM储备液浓度)和0.4 μ l引物SZ5435反向引物(5' -TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3' (SEQ ID NO:36), 10mM储备液浓度)中。根据18S的三个引物区与真菌26S rRNA基因5个引物区之间的序列保守性选择引物。根据文献,所述正向引物与Genbank Ascension#AY550243的核苷酸1632-1652相同,且反向引物与Genbank Ascension#NC_001144的核苷酸464271-464293相同。接下来,加入5 μ l稀释的总DNA和3.2 μ l dH₂O。如下所述执行PCR反应:98 $^{\circ}$ C, 45秒;98 $^{\circ}$ C, 8秒;58 $^{\circ}$ C, 12秒;72 $^{\circ}$ C, 36秒,持续35个循环,之后在72 $^{\circ}$ C下保持1分钟并保持在4 $^{\circ}$ C。对于PCR产物的纯化,将20 μ l 10mM Tris (pH 8.0)加入各反应物中,随后用40 μ l苯酚:氯仿:异戊醇(12:12:1)萃取,涡旋并在14,000 \times g下离心5分钟。将PCR反应物施加到S-400柱(GE Healthcare)中,并在3,000 \times g下离心2分钟。根据制造商的说明书,使用ZeroBlunt PCR4Blunt-TOPO载体试剂盒(Invitrogen)将所得纯化的PCR产物克隆并转化到大肠杆菌(E. coli)中。直接对氨比西林(ampicillin)抗性集落进行测序反应。使用M13正向和反向引物在两个方向上测定纯化的质粒DNA的序列。

[0385] 经过基因分型的48种产油酵母株的清单以及相应SEQ ID NO概述于下表17中。

[0386] 表17.产油酵母株.

	<u>产油酵母株名称</u>	<u>产油酵母株编号</u>	<u>SEQ ID NO</u>
	粘红酵母	DSMZ-DSM 70398	SEQ ID NO:37
	子囊菌油脂酵母	CBS 5911	SEQ ID NO:37
	粘红酵母粘红变种	CBS 3044	SEQ ID NO:38
	子囊菌油脂酵母	CBS 8664	SEQ ID NO:38
[0387]	子囊菌油脂酵母	CBS 1808	SEQ ID NO:39
	子囊菌油脂酵母	CBS 1810	SEQ ID NO:39
	斯达油脂酵母	CBS 1809	SEQ ID NO:40
	丝孢酵母	CBS 8261	SEQ ID NO:40
	解脂耶氏酵母	CBS 6331	SEQ ID NO:41
	弯曲隐球酵母 _s	CBS 5324	SEQ ID NO:42
	粘质红酵母胶粘变种	CBS 316	SEQ ID NO:42

弯曲隐球酵母	CBS 570	SEQ ID NO:42
弯曲隐球酵母	CBS 2176	SEQ ID NO:42
弯曲隐球酵母	CBS 2744	SEQ ID NO:42
弯曲隐球酵母	CBS 2754	SEQ ID NO:42
弯曲隐球酵母	CBS 2829	SEQ ID NO:42
弯曲隐球酵母	CBS 5163	SEQ ID NO:42
弯曲隐球酵母	CBS 5358	SEQ ID NO:42
丝孢酵母属	CBS 7617	SEQ ID NO:43
<i>Sporobolomyces</i>	CBS 482	SEQ ID NO:44
<i>alborubescens</i>		
粘红酵母粘红变种	CBS 324	SEQ ID NO:45
粘红酵母粘红变种	CBS 4476	SEQ ID NO:46
丝孢酵母菌	CBS 5581	SEQ ID NO:47
<i>Geotrichum</i>	CBS 9892	SEQ ID NO:48
<i>histeridarum</i>		
[0388] 橙黄红酵母	CBS 8411	SEQ ID NO:49
弯曲隐球酵母	CBS 8126	SEQ ID NO:49
家毛孢子菌	CBS 8111	SEQ ID NO:50
红冬孢酵母	CBS 8761	SEQ ID NO:51
<i>Rhodotorula</i>	CBS 8445	SEQ ID NO:52
<i>terpendoidalis</i>		
解脂耶氏酵母	CBS 10144	SEQ ID NO:53
粘红酵母粘红变种	CBS 5805	SEQ ID NO:54
解脂耶氏酵母	CBS 10143	SEQ ID NO:55
子囊菌油脂酵母	CBS 5607	SEQ ID NO:56
解脂耶氏酵母	CBS 5589	SEQ ID NO:57
子囊菌油脂酵母	CBS 8724	SEQ ID NO:58
球红冬孢酵母	CBS 2371	SEQ ID NO:59
(<i>Rhodospordium</i>		
<i>sphaerocarpum</i>)		

	苔丝孢酵母	CBS 6382	SEQ ID NO:60
	弯曲隐球酵母 <i>s</i>	CBS 2755	SEQ ID NO:61
	子囊菌油脂酵母	CBS 7656	SEQ ID NO:61
	斯达油脂酵母	CBS 7786	SEQ ID NO:62
	解脂耶氏酵母	CBS 6012	SEQ ID NO:63
	<i>Trichosporon loubieri</i>	CBS 8265	SEQ ID NO:64
[0389]	<i>var. loubieri</i>		
	<i>Geotrichum vulgare</i>	CBS 10073	SEQ ID NO:65
	圆红冬孢酵母菌	CBS 14	SEQ ID NO:66
	粘红酵母粘红变种	CBS 6020	SEQ ID NO:67
	<i>Lipomyces orientalis</i>	CBS 10300	SEQ ID NO:67
	橙黄红酵母	CBS 317	SEQ ID NO:68
	戴尔有孢圆酵母属	CBS 2924	SEQ ID NO:69

[0390] 本文中引用的所有参考文献,包括专利、专利申请和科技杂志出版物,无论前文具体说明并入还是没有,都以引用的方式整体并入本文中。具体说来,2010年4月14日提交的标题为“Novel Microalgal Food Compositions”的PCT申请No._____ (代理人案号026172-004150PC)以引用的方式并如本文中。所引用的本文中提到的出版物是出于描述和公开可结合本发明使用的试剂、方法和概念的目的。本文中任何内容都应解释为承认这些参考文献是与本文所述发明有关的现有技术。

[0391] 尽管已经联系本发明的具体实施方案描述了本发明,但应了解,其能够进一步修改。所附权利要求书意图涵盖大体上遵循本发明的原理的本发明的任何变更、应用或改编,并且包括在本发明所属领域的已知或常规实践范围内且可适用于前文所述基本特征的本公开的改变。

序列表

<110> SOLAZYME, INC.

<120> 微生物油提取和分离方法

<130> 026172-004910PC

<140> PCT/US2010/031108

<141> 2010-04-14

<150> 61/299,250

<151> 2010-01-28

<150> PCT/US2009/066141

<151> 2009-11-30

<150> PCT/US2009/066142

<151> 2009-11-30

<150> PCT/US2009/060692

<151> 2009-10-14

<150> 61/169,271

<151> 2009-04-14

<160> 76

<170> 专利版本 3.5

<210> 1

<211> 565

<212> DNA

<213> 原始小球藻

<400> 1

[0001]

```

tgtgaagaa tgagccggcg acttagaaaa agtggcgtgg ttaaggaaaa attccgaage      60
cttagcgaaa gcgagctctga atagggcgat caaatatttt aafattfaca atttagteat    120
ttttctaga cccgaaccgg ggtgatctaa ccatgaccag gatgaaactt gggtgatacc      180
aagtgaagg cogaaccgac cgatgtttaa aaatcggcgg atgagttgtg gtagcgggtg     240
aaataccagt cgaaccggga gctagctggt tctcccggaa atgcgftgag cgcgacagct     300
acatctagtc tatctagggg taaagcactg tttcgggtcg ggcctgtgaaa acgggtaccaa    360
atcgtggcaa actctgaata ctagaaatga cgggtgtagta gtgagactgt gggggataag     420
ctccattctc aagagggaaa cagcccagac caccagctaa ggcccacaaa tggtaatgta     480
gtgacaaaag aggtgaaat gcaaacacaa ccaggaggtt ggcttagaag cagccatcct     540
taaagagtg cgtaaatgct cactg                                             565
    
```

<210> 2

<211> 546

<212> DNA

<213> 原始小球藻

<400> 2

```

tgtgaagaa tgagccggcg acttagaaaa cgtggcaagg ttaaggaaac gfatccggag      60
ccgaagcga agcaagtctg aacagggcga ttaagtcatt tttctagac ccgaaccggg     120
gtgatctaac catgaccagg atgaagcttg ggtgacaeca agtgaaggte cgaaccgacc     180
gatgttgaaa aatcggcggg tgagttgttg ttacgggtga aataccagtc gaactcggag     240
ctagctggtt ctcccggaaa tgcgttgagg cgcagcgggt cataaggctg tctaggggta     300
aagcactgtt tcgggtcggg ctgcgaaagc ggtaccacaa cgtggcacaac tctgaatact     360
agataigeta tttatgggcc agtgagacgg tgggggataa gcttcctcgt cgagagggaa     420
acagcccaga teactagcta aggcccacaa atgatcgta agtgacaaag gaggtgagaa     480
tgcagaaaca accaggaggt ttgcttagaa gcagccacce ttaaagagt gcgtaatagc     540
tactg                                             546
    
```

<210> 3

<211> 565

<212> DNA

<213> 原始小球藻

<400> 3

tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaaa agtggcgtgg ttaaggaaaa attccgaagc 60
 cttagcgaaa gcgagtctga atagggcgat caaatatit aatattaca atttagcat 120
 ttttictaga cccgaaccgg ggtgatctaa ccatgaccag gatgaaactt ggtgatacc 180
 aagtgaaggt cogaaccgac cgatgtttaa aaatcggcgg atgagttgtg gttagcggtg 240
 aaataccagt cgaacccgga gctagctggt tetccccgaa atgcgtttag gcgcagcagt 300
 acatctagtc tatctagggg taaagcactg ttccggtcgc ggctgtgaaa acggtaccaa 360
 atcgtggcaa actctgaata ctagaaatga cgggttagta gtgagactgt gggggataag 420
 ctecafftc aagagggaaa cagcccagac caccagctaa ggccccaaaa tggtaatgta 480
 gtgacaaagg aggtgaaaat gcaaacacaa ccaggagggt ggcttagaag cagccatcct 540
 taaagagtg cgtaatagct cactg 565

<210> 4

<211> 565

<212> DNA

<213> 凯氏小球藻

<400> 4

tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaaa agtggcgtgg ttaaggaaaa attccgaagc 60
 cttagcgaaa gcgagtctga atagggcgat caaatatit aatattaca atttagcat 120
 ttttictaga cccgaaccgg ggtgatctaa ccatgaccag gatgaaactt ggtgatacc 180
 aagtgaaggt cogaaccgac cgatgtttaa aaatcggcgg atgagttgtg gttagcggtg 240
 aaataccagt cgaacccgga gctagctggt tetccccgaa atgcgtttag gcgcagcagt 300
 acatctagtc tatctagggg taaagcactg ttccggtcgc ggctgtgaaa acggtaccaa 360
 atcgtggcaa actctgaata ctagaaatga cgggttagta gtgagactgt gggggataag 420
 ctecafftc aagagggaaa cagcccagac caccagctaa ggccccaaaa tggtaatgta 480
 gtgacaaagg aggtgaaaat gcaaacacaa ccaggagggt ggcttagaag cagccatcct 540
 taaagagtg cgtaatagct cactg 565

<210> 5

<211> 548

<212> DNA

<213> 凯氏小球藻

<400> 5

tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaga agtggcgtgg ttaaggataa ctatccggag 60
 ccagagcgaa agcaagctc aatagggcgc ttaaaggcca cttttctag acccgaacc 120
 ggtgateta accatgacca ggaagaagct tgggtaacac cacgtgaagg tccgaaccga 180
 ccgatgtga aaaatcggcg gatgagttgt gttagcgggt gaaataccaa tcgaactcgg 240
 agctagctgg ttctccccga aatgcgttga ggcgcagcgg ttatgaggc tcttagggg 300
 taaagcactg ttccggtcgc ggctgcgaaa gcggtaccaa atcgtggcaa actctgaata 360
 ctagatagtc tatcatgag ccagtgagac ggtgggggat aagcttcatc gtcaagaggg 420
 aaacagccca gatcaccagc taaggcccca aaatgctcgt taagtggcaa aggaggtgag 480
 aatgctgaaa caaccaggag gttgcttag aagcagccac ccttaaaga gtgcgtaata 540
 gctcactg 548

<210> 6

<211> 548

<212> DNA

<213> 凯氏小球藻

<400> 6

tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaga agtggcgtgg ttaaggataa ctatccggag 60
 ccagagcgaa agcaagctc aatagggcgc ttaaaggcca cttttctag acccgaacc 120
 ggtgateta accatgacca ggaagaagct tgggtaacac cacgtgaagg tccgaaccga 180
 ccgatgtga aaaatcggcg gatgagttgt gttagcgggt gaaataccaa tcgaactcgg 240
 agctagctgg ttctccccga aatgcgttga ggcgcagcgg ttatgaggc tcttagggg 300
 taaagcactg ttccggtcgc ggctgcgaaa gcggtaccaa atcgtggcaa actctgaata 360
 ctagatagtc tatcatgag ccagtgagac ggtgggggat aagcttcatc gtcaagaggg 420
 aaacagccca gatcaccagc taaggcccca aaatgctcgt taagtggcaa aggaggtgag 480
 aatgctgaaa caaccaggag gttgcttag aagcagccac ccttaaaga gtgcgtaata 540
 gctcactg 548

[0002]

<210> 7		
<211> 548		
<212> DNA		
<213> 凯氏拟小球藻		
<400> 7		
tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaga agtggcttgg ttaaggataa ctatccggag	60	
ccagagcgaa agcaagtctg aatagggcgc ttaaaggtea cttttctag accegaacc	120	
gggtgatcta accatgacca ggatgaagct tgggtaacac cacgtgaagg tccgaaccga	180	
ccgatgttga aaaatcggcg gatgagtgt ggttagcggg gaaataccaa tcgaactcgg	240	
agctagctgg ttctccccga aatgcgttga ggcgcagcgg ttatgaggc tctctagggg	300	
taaagcactg ttccgggtcg ggctgcgaaa gcgglaccaa atcgtggcaa actctgaata	360	
ctagatagtc taticatgag ccagtgagac ggtgggggat aagcttcatc gtcaagaggg	420	
aaacagccca gatcaccagc taaggcccca aaatggtcgt taagtggcaa aggaggtgag	480	
aatgtgaaa caaccaggag gtttgcttag aagcagccac cctftaaaga gtgcgtaata	540	
gtcactg		548
<210> 8		
<211> 548		
<212> DNA		
<213> 凯氏拟小球藻		
<400> 8		
tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaga agtggcttgg ttaaggataa ctatccggag	60	
ccagagcgaa agcaagtctg aatagggcgc ttaaaggtea cttttctag accegaacc	120	
gggtgatcta accatgacca ggatgaagct tgggtaacac cacgtgaagg tccgaaccga	180	
ccgatgttga aaaatcggcg gatgagtgt ggttagcggg gaaataccaa tcgaactcgg	240	
agctagctgg ttctccccga aatgcgttga ggcgcagcgg ttatgaggc tctctagggg	300	
taaagcactg ttccgggtcg ggctgcgaaa gcgglaccaa atcgtggcaa actctgaata	360	
ctagatagtc taticatgag ccagtgagac ggtgggggat aagcttcatc gtcaagaggg	420	
aaacagccca gatcaccagc taaggcccca aaatggtcgt taagtggcaa aggaggtgag	480	
aatgtgaaa caaccaggag gtttgcttag aagcagccac cctftaaaga gtgcgtaata	540	
gtcactg		548
[0003]		
<210> 9		
<211> 565		
<212> DNA		
<213> 凯氏拟小球藻		
<400> 9		
tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaaa agtggcgttg ttaaggaaaa attccgaagc	60	
cttagcgaaa gcgagtctga atagggcgat caaatattt aatatttaca atttagcat	120	
ttttctaga cccgaaccgg ggtgatctaa ccatgaccag gatgaaactt ggttgatacc	180	
aagtgaaggt ccgaaccgac cgatgtgaa aaatcggcgg atgagtgtg gttagcggtg	240	
aaataaccag cgaaccggga gctagctgtt tctccccgaa atgcgtttag gcgcagcagl	300	
acatctagtc tatctagggg taaagcactg ttccgggtcg ggctgtgaaa acggtaccaa	360	
atcgtggcaa actctgaata ctagaaatga cgggttagta gtgagactgt gggggataag	420	
ctccattgtc aagagggaaa cagcccagac caccagctaa ggccccaaaa tggtaatgta	480	
gtgacaaagg aggtgaaat gcaaacacaa ccaggaggtt ggcttagaag cagccatcct	540	
ttaaagagtg cgtaatagct cactg		565
<210> 10		
<211> 541		
<212> DNA		
<213> 淤滞型无绿藻		
<400> 10		
tgttgaagaa tgagccggcg agtataaaaa aatggcatgg ttaaagatat ttcttgaag	60	
ccatagcgaa agcaagttt acaagctata gtcattttt itagaccgga aaccgagtga	120	
tetaccatg atcaggggtga agtgttggtc aaataacatg gagccccgaa ccgactaatg	180	
gtgaaaaat agcggatgaa ttgtggtag gggcgaaaa ccaatcgaac tggaggttag	240	

	ctggttctcc cegaaatcg ttaggcgca gcagtagcaa cacaaataga ggggtaaagc	300	
	actgtttctt ttgtgggett cgaagttgt acctcaaagt ggcaactct gaatactcta	360	
	ttagatate tactagttag accttggggg ataagctect tggtaaaaag ggaaacagcc	420	
	cgatcacca gftaaggccc caaaatgaaa atgatagta ctaaggacgt gagtatgtca	480	
	aaacctccag caggttagct tagaagcage aatecittca agagtgcgta atagctcact	540	
	g		541
	<210> 11		
	<211> 573		
	<212> DNA		
	<213> 桑椹型无绿藻		
	<400> 11		
	tggtgaagaa tgagccggcg acttaaaaata aatggcaggc taagagaatt aataactega	60	
	aacctaagcg aaagcaagtc ttaatagggc gctaatttaa caaacatta aataaaatct	120	
	aaagtcattt attttagacc cgaacctgag tgatctaacc atggtcagga tgaacttgg	180	
	gtgacaccaa gtggaagtcc gaaccgaccg atgttgaaaa atcggcggat gaactgtggt	240	
	tagtggtgaa ataccagtcg aactcagagc tagctggffc tccccgaaat gcgttgagcc	300	
	gcagcaatat atctcgtcta tctaggggta aagcactggt tccgtcggg ctatgaaaat	360	
	ggtaccaaaat cgtggcaaac tctgaatact agaaatgacg atatattagt gagactatgg	420	
	gggataagct ccatagtcga gagggaaaca gccccagacca ccagttaagg ccccaaatg	480	
	ataatgaagt gftaaaggag gtgaaaatgc aaatacaacc aggaggttgg cftagaagca	540	
	gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg		573
	<210> 12		
	<211> 573		
	<212> DNA		
	<213> 桑椹型无绿藻		
	<400> 12		
[0004]	tggtgaagaa tgagccggcg acttaaaaata aatggcaggc taagagaatt aataactega	60	
	aacctaagcg aaagcaagtc ttaatagggc gctaatttaa caaacatta aataaaatct	120	
	aaagtcattt attttagacc cgaacctgag tgatctaacc atggtcagga tgaacttgg	180	
	gtgacaccaa gtggaagtcc gaaccgaccg atgttgaaaa atcggcggat gaactgtggt	240	
	tagtggtgaa ataccagtcg aactcagagc tagctggffc tccccgaaat gcgttgagcc	300	
	gcagcaatat atctcgtcta tctaggggta aagcactggt tccgtcggg ctatgaaaat	360	
	ggtaccaaaat cgtggcaaac tctgaatact agaaatgacg atatattagt gagactatgg	420	
	gggataagct ccatagtcga gagggaaaca gccccagacca ccagttaagg ccccaaatg	480	
	ataatgaagt gftaaaggag gtgaaaatgc aaatacaacc aggaggttgg cftagaagca	540	
	gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg		573
	<210> 13		
	<211> 565		
	<212> DNA		
	<213> 极微小球藻		
	<400> 13		
	tggtgaagaa tgagccggcg acttagaaaa agtggcgtgg ttaaggaaaa attccgaagc	60	
	cttagcgaaa gcgagtctga atagggcgat caaatatitt aatattaca atttagtcat	120	
	ttttctaga ccgaacccc ggtgatctaa ccatgaccag gatgaaactt gggtgatacc	180	
	aagtgaaggt ccgaaccgac cgatgtttaa aaatcggcgg atgagttgtg gttagcggtg	240	
	aanataccagt cgaaccccga gctagctggt tctcccgaat atgcgtttag gcgcagcagt	300	
	acatctagtc tatctagggg taaagcactg ttccggtgcg ggctgtgaaa acggtaccaa	360	
	atcgtggcaa actctgaata ctagaatga cgggttagta gtgagactgt gggggataag	420	
	ctccattgtc aagagggaaa cagcccagac caccagctaa ggccccaaaa tggtaatgta	480	
	gtgacaaagg aggtgaaaat gcaaacacaa ccaggaggtt ggcttagaag cagccatcct	540	
	ttaaagatg cgtaatagct cactg		565
	<210> 14		
	<211> 565		
	<212> DNA		

<213> 小球藻属	
<400> 14	
tggtgaagaa tgaaccggcg acttagaaaa agtggcgtgg ttaaggaaaa attccgaage	60
cttagcgaaa gcgagctga ataggcgat caaatatit aalattaca atttagcat	120
ttttctaga cccgaaccg ggtgatctaa ccatgaccag gatgaaact gggtgatacc	180
aagtgaagg cgaaccgac cgatgtgaa aaatcggcg atgagttg gttagcggtg	240
aaataccagt cgaaccgga gtagctgtg tctcccga atgcgtgag gcgcagcagt	300
acatctagtc tatctaggg taaagcactg ttccggtgc ggctgtgaaa acggtacca	360
atcgtggcaa actctgaata ctagaaatga cgggtgtaga gtgagactgt gggggataag	420
ctccattgtc aagaggaaa cagcccagac caccagctaa ggecccaaaa tggtaatga	480
gtgacaaagg aggtgaaat gcaaacacaa ccaggaggt ggcttagaag cagccatcct	540
ttaaagatg cgtaatagct cactg	565
<210> 15	
<211> 546	
<212> DNA	
<213> 小球藻属	
<400> 15	
tggtgaagaa tgaaccggcg acttagaaaa cgtggcaagg ttaaggacat gtatccggag	60
ccgaagegaa agcaagtctg aataggcgcg ctaagtcatt tttctagac cgaaccgg	120
gtgatctaac catgaccagg atgaagctg ggtgacacca agtgaaggtc cgaaccgacc	180
gatgtgaaa aatcggcgga tgagttgtg ttacgggtga aataccagtc gaactcggag	240
ctagctggtt ctcccgaaa tgcgttgagg cgcagcgggt cataaggctg tctaggggta	300
aagcactgtt tccgtcggg ctgcgaaagc ggtaccaa atcgtgcaaac tctgaatact	360
agatatgcta ttatagcc agtgagacgg tgggggataa gcttcatct cgagagggaa	420
acagcccaga tcaactagcta aggccctaa atgatctta agtgacaaag gaggtgagaa	480
tgcagaaaca accaggaggt ttcttagaa gcagccacce ttaaagagt gcgtaatage	540
tcactg	546
[0005] <210> 16	
<211> 550	
<212> DNA	
<213> 耐热性小球藻	
<400> 16	
tggtgaagaa tgaaccggcg acttatagga agtggcagg ttaaggaaaga atctccggag	60
cccaagegaa agcagctctg aaaaggcgga tttgtcact tctatggac ccgaacctg	120
atgatctaat catggccaag tgaagcatg ggtaacacta tctcaggagc tgaaccacc	180
gatgtgaaa aatcggggga tgagctgtg ttacgggtga aatccaatc gaattcagag	240
ctagctggtt ctcccgaaa tgcgttgagg cgcagcggcg acgatctct gtctaagggt	300
agagcactg ttccggtgc ggctgcgaaa gcggtaccaa gtcgtggcaa actccgaata	360
ttaggcaaag gattcctga gccagtgaga ctgtggggga taagctcat agtcaagagg	420
gaaacagccc agaccatcag ctaaggcccc taaatggctg ctaagtggaa aaggatgtga	480
gaatgctgaa acaaccagga ggttcctta gaagcagcta ttcttgaaa gattgcgtaa	540
tagctcactg	550
<210> 17	
<211> 548	
<212> DNA	
<213> 拜氏拟小球藻	
<400> 17	
tggtgaagaa tgaaccggcg acttagaaga agtggcttgg ttaaggataa ctatccggag	60
ccagagcgaa agcaagtctg aataggcgcg ttaaaggta cttttctag acccgaacc	120
gggtgateta accatgacca ggatgaagct tgggtaaac cacgtgaagg tccgaaccga	180
ccgatgtga aaaatcggcg gatgagttg gtttagcggg gaaatacaa tcaactcgg	240
agctagctgg ttctcccga aatgcgtga gcgcagcgg tttataggc tctctaggg	300
taaagcactg ttccggtgc ggctgcgaaa gcggtaccaa atcgtggcaa actctgaata	360
ctagatatgc tattcatgag ccagtgagac ggtggggat aagcttcat gtaagagg	420
aaacagccca gatcaccagc taagcccga aaatggctg taagtggcaa aggaggtgag	480

	aatgctgaaa caaccaggag gttgcttag aagcagccac ccttaaaga gtgcgtaata getcactg	540	548
	<210> 18 <211> 556 <212> DNA <213> Chlorella luteoviridis <400> 18		
	tgttgaagaa tgagccggcg acttataggg ggtggcgtgg ttaaggaaat aatccgaagc caaagcgaaa gcaagtttc aatagagcga tttgtcacc ccttatggac cogaaccggg gtgatctaac ctgaccagg atgaagcttg ggtaacacca agtgaaggtc cgaactcacc gatcttgaaa aatcgtggga tgagtgggg ttagtgggt aatgctaaf cgaactcggg gctagctggt tctcccga aatgtgtgag gcgcagcgt taacgaata tttgtacgg ttaggggta aagcactgtt cgggtcggg ctgcgaaagc ggtaccaat cgtggcaaac tctgaatac aagcctgtat accgttagtc agttagagta taggggataa gctctatac caagagggaa acagcccaga tcaccagca aggcccaaaa atgacagcia agtggcaaac gaggtgaaag tgcagaaaca accaggaggt tcgcttagaa gcagcaacc tftaaagat gcgtaatagc tcaactg	60 120 180 240 300 360 420 480 540	556
	<210> 19 <211> 548 <212> DNA <213> 普通小球藻 <400> 19		
[0006]	tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaga agtggcttgg ttaaggataa ctatccggag ccagagcgaa agcaagtctg aataggcgcg ttaaaggta ctttcttag acccgaacc gggtgatct accatgacca ggatgaagct tgggtaacac cacgtgaagg tccgaaccga ccgatgtga aaaatcggcg gatgagtgt ggttagcggg gaaataccaa tgaactcgg agetactggt tctcccga aatgcgttga ggcgcagcgg tttatgaggc tcttagggg taaagcaact ttcgggtgag ggctgcgaaa gcggtacca atcgtggcaa actctgaata ctagatagtc tattcatgag ccagtgcagc ggtgggggat aagctcacc gtcaagaggg aaacagccca gatcaccagc taaggccca aatggctgt taagtggcaa aggaggtgag aatgctgaaa caaccaggag gttgcttag aagcagccac ccttaaaga gtgcgtaata getcactg	60 120 180 240 300 360 420 480 540	548
	<210> 20 <211> 565 <212> DNA <213> Chlorella reisiigii <400> 20		
	tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaaa agtggcgtgg ttaaggaaaa attccgaagc cttagcgaaa gcgagtctga ataggcggat caaatattt aatattaca afttagtcat ttttctaga cccgaaccgg ggtgatctaa ccatgaccag gatgaaacti gggtgatacc aagtgaaggt cogaaccgac cgaagtga aatcggcgg atgagtgtg gttagcggtg aaataaccagt cgaaccggga gctagctggt tctcccga atgcgtttag gcgcagcagt acatctagtc tatctagggg taaagcaact ttcgggtgag ggtctgtaaa acggtacca atcgtggcaa actctgaata ctagaatga cgggttagta gtgagactgt gggggataag ctecatgtc aagagggaaa cagcccagac caccagctaa ggccecaaaa tggtaatga gtgacaaagg aggtgaaaat gcaaacaaa ccaggaggt ggcttagaag cagccatct ttaaagatg cgtaatagct cactg	60 120 180 240 300 360 420 480 540	565
	<210> 21 <211> 573 <212> DNA <213> 圆小球藻 <400> 21		
	tgttgaagaa tgagccggcg acttataggg ggtggcgtgg ttaaggacta caatccgaag cccgaagcga agcaagttg aagtgtacac acattgtgtg tctagagcga tttgtcact	60 120	

ccftatggac cgaaccogg gtgatctatt catggccagg atgaagcttg ggtaacacca	180
agtgaaggte cgaactcadc gatgttgaaa aatcgtggga tgagtttga ataggggtga	240
aatgccaate gaacteggag ctagctggft cccccgaaa tgtgttgagg cgcagegatt	300
cacgatctaa agtacggftt aggggtaaag cactgtttcg gtgcgggctg ttaacgcggt	360
accaaatcgt ggcaactaa gaatactaaa ctgtatgcc gtgaatcagt gagactaaga	420
gggataagct tcttagtcaa gagggaaaca gcccagatca ccagctaagg ccccaaatg	480
acagctaagt ggcaaaggag gtgagagtgc agaacaacc aggaggttg ctfagaagca	540
gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg	573
<210> 22	
<211> 573	
<212> DNA	
<213> 嗜糖小球藻	
<400> 22	
tgtgaagaa tgagccggcg acttataggg ggtggcttgg itaaggacta caatccgaag	60
ccaagcgaa agcaagttg aagtgtacac acgttgtgtg tctagagcga tttgtcact	120
ccftatggac cgaaccogg gtgatctatt catggccagg atgaagcttg ggtaacacca	180
agtgaaggte cgaactcadc gatgttgaaa aatcgtggga tgagtttga ataggggtga	240
aatgccaate gaacteggag ctagctggft cccccgaaa tgtgttgagg cgcagegatt	300
cacgatctaa agtacggftt aggggtaaag cactgtttcg gtgcgggctg ttaacgcggt	360
accaaatcgt ggcaactaa gaatactaaa ctgtatgcc gtgaatcagt gagactaaga	420
gggataagct tcttagtcaa gagggaaaca gcccagatca ccagctaagg ccccaaatg	480
acagctaagt ggcaaaggag gtgagagtgc agaacaacc aggaggttg ctfagaagca	540
gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg	573
<210> 23	
<211> 573	
<212> DNA	
<213> 嗜糖小球藻	
<400> 23	
tgtgaagaa tgagccggcg acttataggg ggtggcttgg itaaggacta caatccgaag	60
ccaagcgaa agcaagttg aagtgtacac acattgtgtg tctagagcga tttgtcact	120
ccftatggac cgaaccogg gtgatctatt catggccagg atgaagcttg ggtaacacca	180
agtgaaggte cgaactcadc gatgttgaaa aatcgtggga tgagtttga ataggggtga	240
aatgccaate gaacteggag ctagctggft cccccgaaa tgtgttgagg cgcagegatt	300
cacgatctaa agtacggftt aggggtaaag cactgtttcg gtgcgggctg ttaacgcggt	360
accaaatcgt ggcaactaa gaatactaaa ctgtatgcc gtgaatcagt gagactaaga	420
gggataagct tcttagtcaa gagggaaaca gcccagatca ccagctaagg ccccaaatg	480
acagctaagt ggcaaaggag gtgagagtgc agaacaacc aggaggttg ctfagaagca	540
gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg	573
<210> 24	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 24	
tgtgaagaa tgagccggcg ac	22
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成引物	

<400> 25		
cagtgaageta ttacgcactc		20
<210> 26		
<211> 541		
<212> DNA		
<213> Prototheca kruegani		
<400> 26		
tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaag agtggcatgg ttaaagaaaa tactctggag	60	
ccatagcgaag agcaagttta gtaagcttag gtcattcttt ttagaccgca aaccgagtga	120	
tctaccatg atcagggtga agtgttagta aaataacatg gaggcccgaa ccgactaatg	180	
ttgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaac tcggagttag	240	
ctggtctcc ccgaaatgcg tttaggcgca gcagtagcag tacaataga ggggtaaagc	300	
actgtttct ttgtggcct cgaagttgt acctcaaat ggcaactct gaatacteta	360	
ttagatate tactagttag acctggggg ataagctct tggfcaaaag ggaacagcc	420	
cagatcacca gtaaggccc caaatgaaa atgatagtga ctaaggatgt gggtatgca	480	
aaacctccag caggttagct tagaagcagc aatccttca agagtgcgta atagctcact	540	
g		541
<210> 27		
<211> 573		
<212> DNA		
<213> 威克海姆无绿藻		
<400> 27		
tgttgaagaa tgagccggcg acttaaaata aatggcagcg taagagattt aataactcga	60	
aacctaagcg aaagcaagtc ttaataggcg gtcattttaa caaaactta aataaattat	120	
aaagtcattt attttagacc cgaacctgag tgatctaacc atggtcagga tgaacttgg	180	
gtgacaccaa gtggaagtcc gaaccgaccg atgtgaaaa atcggcggat gaactgtggt	240	
tagtggtag ataccagtcg aactcagagc tagctggtc tcccgaat gcgttaggc	300	
gcagcaatat atctcgtcta tctaggggta aagcactgt tcggtcggg ctatgaaaat	360	
ggtaccaaat cgtggcaaac tctgaatact agaatgacg atatattagt gagactatgg	420	
gggataagct ccatagtcga gagggaaca gccagacca ccagttaagg ccccaaatg	480	
ataatgaagt ggtaaaggag gtgaaaatgc aaatacaacc aggaggttgg cttagaagca	540	
gccatcttt aaagagtgcg taatagctca ctg		573
<210> 28		
<211> 541		
<212> DNA		
<213> 淤滞型无绿藻		
<400> 28		
tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaa aatggcatgg ttaaagatat ttctctgaag	60	
ccatagcgaag agcaagtttt acaagctata gtcattttt ttagaccgca aaccgagtga	120	
tctaccatg atcagggtga agtgttggtc aaataacatg gaggcccgaa ccgactaatg	180	
gtgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaac tcggagttag	240	
ctggtctcc ccgaaatgcg tttaggcgca gcagtagcaa cacaataga ggggtaaagc	300	
actgtttct ttgtggcct cgaagttgt acctcaaat ggcaactct gaatacteta	360	
ttagatate tactagttag acctggggg ataagctct tggfcaaaag ggaacagcc	420	
cagatcacca gtaaggccc caaatgaaa atgatagtga ctaaggactg gattatgca	480	
aaacctccag caggttagct tagaagcagc aatccttca agagtgcgta atagctcact	540	
g		541
<210> 29		
<211> 541		
<212> DNA		
<213> 桑椹型无绿藻		
<400> 29		
tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaag agtggcatgg ttaaagataa ttctctggag	60	

[0008]

```

ccatagcgaa agcaagtta acaagctaaa gtcaccctt ftagaccga aaccgagtga      120
tctacccatg atcagggtga agtgttgta aaataacatg gaggccgaa cgcactaatg      180
gtgaaaaatt agcggatgaa ttgtggtag gggcgaaaa ccaatcgaac tcggagttag      240
ctggttctcc ccgaaatgct tttaggcgca gcagtagcaa cacaaataga ggggtaaagc      300
actgtttctt ttgtggctc cgaagttgt acctcaaagt ggcaactct gaactacta      360
tttagatate tactagttag acctggggg ataagctct tggcctaaag ggaacagcc      420
cagatcacca gtaaggccc caaatgaaa atgatagta ctaaggatgt gggtatgta      480
aaacctccag caggttagct tagaagcagc aatccttca agagtgcgta atagtcact      540
g

```

541

<210> 30

<211> 573

<212> DNA

<213> 桑椹型无绿藻

<400> 30

```

tgtgaagaa tgagccggcg acttaaaata aatggcagcg taagagaatt aataactga      60
aaactaacgc aaagcaagtc ttaatagggc gctaatttaa caaacatta aataaatct      120
aaagtcaftt atttagacc cgaacctgag tgatctaacc atggtcagga tgaacttgg      180
gtgacaccaa gtggaagtc gaaccgacc atgtgaaaa atcggcggat gaactgtggt      240
tagtggtaga ataccagtc aactcagagc tagctggctc tcccgaat gcggtgagcg      300
gcagcaatct atctctcta tctaggggta aagcactgtt tcggtcggg ctatgaaat      360
ggtaccaaat cgtggcaaac tetgaatact agaaatgacg atataatagt gagactatgg      420
gggataagct ccatagtcga gagggaaaca gccagacca ccagttaagg ccccaaatg      480
ataatgaagt ggtaaaggag gtgaaaatgc aatacaacc aggaggttgg cttagaagca      540
gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg                                573

```

<210> 31

<211> 573

<212> DNA

<213> 威克海姆无绿藻

<400> 31

```

tgtgaagaa tgagccgctc acttaaaata aatggcagcg taagagaatt aataactga      60
aaactaacgc aaagcaagtc ttaatagggc gctaatttaa caaacatta aataaatct      120
aaagtcaftt atttagacc cgaacctgag tgatctaacc atggtcagga tgaacttgg      180
gtgacaccaa gtggaagtc gaaccgacc atgtgaaaa atcggcggat gaactgtggt      240
tagtggtaga ataccagtc aactcagagc tagctggctc tcccgaat gcggtgagcg      300
gcagcaatct atctctcta tctaggggta aagcactgtt tcggtcggg ctatgaaat      360
ggtaccaaat cgtggcaaac tetgaatact agaaatgacg atataatagt gagactatgg      420
gggataagct ccatagtcga gagggaaaca gccagacca ccagttaagg ccccaaatg      480
ataatgaagt ggtaaaggag gtgaaaatgc aatacaacc aggaggttgg cttagaagca      540
gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg                                573

```

[0009]

<210> 32

<211> 541

<212> DNA

<213> 桑椹型无绿藻

<400> 32

```

tgtgaagaa tgagccggcg agttaaaaag agtggcgtgg taaagaaaa ttctctgaa      60
ccatagcgaa agcaagtta acaagctaaa gtcactttt ftagaccga aaccgagtga      120
tctacccatg atcagggtga agtgttgta aaataacatg gaggccgaa cgcactaatg      180
gtgaaaaatt agcggatgaa ttgtggtag gggcgaaaa ccaatcgaac tcggagttag      240
ctggttctcc ccgaaatgct tttaggcgca gcagtagcaa cacaaataga ggggtaaagc      300
actgtttctt ttgtggctc cgaagttgt acctcaaagt ggcaactct gaactacta      360
tttagatate tactagttag acctggggg ataagctct tggcctaaag ggaacagcc      420
cagatcacca gtaaggccc caaatgaaa atgatagta ctaaggatgt gagtatgta      480
aaacctccag caggttagct tagaagcagc aatccttca agagtgcgta atagtcact      540
g

```

541

<210> 33		
<211> 541		
<212> DNA		
<213> 饶氏无绿藻		
<400> 33		
tgttgaagaa tgagccggcg agtataaaa agtggeatgg ttaaagaaaa ttctctggag	60	
ccatagegaa agcaagtta acaagcttaa gtcactttt tttagaccga aaccgagtga	120	
tctaccatg atcagggtga agtgitgga aaataacatg gaggccgaa cegactaatg	180	
gtgaaaaat agcggatgaa ttgtggtag gggcgaaaa ccaatcgaac tcggagttag	240	
ctggttctcc ccgaaatgcg tttaggcgca gcagttagca cacaaataga ggggtaaaagc	300	
actgtttct tegtgggctt cgaaagtgt acctcaagt ggcaaaactt gaatactcta	360	
tttagatc tactagttag acctggggg ataagctct tggcaaaaag gaaacagcc	420	
cagatacca gtaaggccc caaaatgaaa atgatatga ctaaggatgt gagtatgca	480	
aaacctccag caggttagct tagaagcagc aatccttca agagtgcgta atagctca	540	
g		541
<210> 34		
<211> 565		
<212> DNA		
<213> 桑椹型无绿藻		
<400> 34		
tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaaa ggtgcatgg ttaaggaaat attccgaagc	60	
cgtagcaaaa gcgagctga ataggcgat aaaatatai aatattaga atctagtcat	120	
ttttctaga cccgaaccg ggtgatctaa ccatgaccag gatgaagctt gggtgatacc	180	
aagtgaaggt ccgaaccgac cgatgtttaa aaatggcgg atgagtgtg gtagcggtg	240	
aaataaccgt cgaaccggga gctagctggt tctccccgaa atgcgttag gcgcagcagt	300	
acatctagtc tatctagggg taaageactg ttcgggtcgc ggctgtgaga acggfaccaa	360	
atcgtggcaa actctgaata ctagaaatga cgatgtagta gtgagactgt gggggataag	420	
ctccattgtc aagagggaaa cageccagac caccagctaa ggccccaaaa ttgtaatgta	480	
gtgacaaagg aggtgaaat gcaatacaa ccaggaggt ggcttagaag cagccatcct	540	
ttaagagtg cgtaatagct cactg		565
<210> 35		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 合成引物		
<400> 35		
gtccctgccc ttgtacaca c		21
<210> 36		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 合成引物		
<400> 36		
ttgatagct taagtcagc ggg		23
<210> 37		
<211> 710		
<212> DNA		
<213> 粘红酵母		
<400> 37		

[0010]

cgcccgcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct cggattggc tattgggagc 60
 tcgcgagagc acctgactgc cgagaagttg tacgaaactg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaggatc attagtgaat attaggggtg 180
 ccaacttaac ttggagccc accctcactt tctaaccctg tgcattgtc ttgggtagta 240
 gcttgcgta cgcagcgaat cccattcac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaacaa 300
 attataaca aaacaaaact tcaacaacg gatctcttgg ctctcgcac gatgaagaac 360
 gcagcgaat gcgafacgta atgtgaattg cagaattcag tgaatcatc aatclitgaa 420
 cgcaccttgc gctccatggt attccgtgga gcatgcctgt ttgagtgca tgaattctc 480
 aaccacctc ttcttagtg aatcagcgg tgttggatt ctgagcgtg ctggcttgc 540
 ggcttagctc gctcgtaatg cattagcacc cgcaatcga ctcggattg actcggcgta 600
 atagactatt cgttgaggat tctggctct gactggagcc gggtaaagtt aaagggagct 660
 actaatctc atgtctatct tgagattaga cctcaaatca ggtaggacta 710

<210> 38
 <211> 707
 <212> DNA
 <213> 粘红酵母
 <400> 38

cgcccgcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct cggattggc tattgggagc 60
 tcgcgagagc acctgactgc cgagaagttg tacgaaactg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaggatc attagtgaat attagggcgt 180
 ccaacttaac ttggagccc aactctcaet tctaaccct gtgcactctt ttctggcag 240
 tagctctctc gggagtgaa gccattcaat taaacacaa agtctatgaa tgtataaaat 300
 ttatacaaaa acaaaacttt caacaacgga tctcttggct ctgcacgca tgaagaacgc 360
 agcgaatgc gataagtaat gtgaattgca gaattcagtg aatcatcga tctttgaacg 420
 caccitgcgc tctctggtat tccggagagc atgcctgttt gagtgcacg aaatcttcaa 480
 cctctcttt tctaatgaa tegagaggtg cttggatcct gagecgtct ggcttcggcc 540
 tagctcgttc gtaatgcatt agcatccca atcgaactc ggattgactt ggcgtaatg 600
 actattcgtc gaggattctg gtctcgtacc agagccgggt tgggttaaag gaagcttcta 660
 atcctaaaag tctaactttt gattagatct caatcaggt aggacta 707

[0011]

<210> 39
 <211> 630
 <212> DNA
 <213> 子囊菌油脂酵母
 <400> 39

cgcccgcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct tcggactggc tccagaaaaat 60
 gggaaacctt taccaggagc tggaaagttg gtcaactctg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaggatc attactgagt atttctctt 180
 taaagacatc tctctatcca taaactcttt ttctaaaaa gacatgatt acacaattag 240
 tctgaatgat tatataaaaa tctcaaaac ttcaacaac ggatctcttg gttctegcat 300
 cgatgaagaa cgcagcaaaa tgcgataagt attgtgaatt gcaggatttt gtgaatcatc 360
 gaattttga aegcaactg caccctctgg tattccggag ggtataactg ttgagcgtc 420
 attatatac tcaaaacttt gttttgtga tgggcacata tctggtgaga gctagatttg 480
 cctgaaatat agtggtagag attgctacga gttatgcaag ttgccaatg ctattaagtt 540
 aattcgttgg tgaagcatgc ggagctttag cggctgcctt ccttaactat tgaattttt 600
 ctaattttga cctcaaatca ggcaggagta 630

<210> 40
 <211> 641
 <212> DNA
 <213> 斯达油脂酵母菌
 <400> 40

cgcccgcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacc tcggattggc gtaggaagc 60
 cggcaaccgc atccttggc cgagaagttg gtcaactctg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaggatc attagtatt gcctttatag 180
 gcttataact atatccactt acacctgtga actgtctat tacttgacgc aagtcgagta 240
 ttittacaaa caatgtgtaa tgaacgtcgt ttattataa caaaataaaa ctffcaacaa 300

	cggatctctt ggctctcgca tcgatgaaga acgcagcgaa ttgcgataag taatgtgaat	360	
	tcgagaatfc agtgaateat cgaatctttg aacgcagctt gcgctctctg gtattccgga	420	
	gagcatgcct gtttcagtgt catgaaatct caaccactag ggtttctctaa tggattggat	480	
	ttgggcgtct gcgactctct atcgcctgcc ttaaaagagl tagcaagttt gacatlaatg	540	
	tctgtgtaa faagtttcaac tgggtccatt gtgtgaagc gtgcttctaa tcgtccgcaa	600	
	ggacaattac ttgactctg ccctgaaatc aggtaggact a		641
	<210> 41		
	<211> 456		
	<212> DNA		
	<213> 解脂耶氏酵母		
	<400> 41		
	cgcccgctgc tactaccgat tgaatggttt agtgagacct tgggagggcg agatgagggg	60	
	ggcaacccct ttgaaacatc caaacttggc caaactgat tatttagagg aagtaaaagt	120	
	cgtacaacag ttccctgagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgattt atctatttct	180	
	gtggatttct ggtatattac agcgtcattt tatetcaatf ataactatac acaacggatc	240	
	tcttggctct cacatcgatg aagaacgcag cgaaccgcca tatttttgt gacttgcaga	300	
	tgtgaatcat caatcttga acgcacattg cgcggtatgg cattccgtac cgcacggatg	360	
	gaggagcgtg ttccctctgg gatcgcattg ctttctgaa atggatttt taaactctca	420	
	attattaegt catttcaect ccttcaiccg agatta		456
	<210> 42		
	<211> 628		
	<212> DNA		
	<213> 弯曲隐球酵母		
	<400> 42		
	cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgagattt ctggattggc gttaggaagc	60	
	cggaacggcg atcctttggc tgagaagtta ctcaaacctg gtcatttaga ggaagtaaaa	120	
[0012]	gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cgggaaggatc attagtgaat tgccttcggg	180	
	ctaaactata tccataacac ctgtgaactg ttgattgact tcggtaata tttttacaaa	240	
	cattgtgtaa tgaacgtcat gttataataa caaatataac ttcaacaac ggatctcttg	300	
	gctctcgcat cgatgaagaa cgcagcgaaa tgcgataagt aatgtgaatt gcagaatfca	360	
	gtgaatcatc gaatcttga acgcaacttg cgtctctggt tattccggag agcatgcctg	420	
	ttgagtgat atgaaatctc aaccattagg gttcttaat ggcttggatt tggacgtttg	480	
	ccagtcfaat ggctcgtctt aaaagagta gtgaatttaa catttctctt ctggcgtaat	540	
	aagtttctg ggcctgatag tgtgaagttt gcttctaate gtccgcaagg acaattcttg	600	
	aactctggcc tcaaatcagg taggacta		628
	<210> 43		
	<211> 628		
	<212> DNA		
	<213> 丝孢酵母属		
	<400> 43		
	cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacce tcggattggc gftaagaagc	60	
	cggaacggcg atcctttggc cgagaagttg gtcnaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120	
	gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cgggaaggatc attagtgaat tgcctcttga	180	
	gggtfaaact atatccatct acaactgtga actgttgatt gacttcggtc aattaetttt	240	
	acaaacattg tftaatgaac gtcattgtat tataacaaaa ataactttca acaacggatc	300	
	tcttggctct cgcategatg aagaacgcag cgaatgcga taagtaatgt gaattgcaga	360	
	attcagttaa tcatcgaatc ttgaaacgca acttgcgctc tctgttatte cggagagcat	420	
	gcctgttga gtatcatgaa atctcaacca ttagggttct ttaatggctt ggatttgggc	480	
	gctgccactt gcctggctcg ccttaaaaga gttagcgtat taacttgcg atctggcgtg	540	
	ataagttctg ctgggtttaga cttagaaggt gcgcttctaa tcgtctctgg acaattcttg	600	
	aactctggtc tcaaatcagg taggacta		628
	<210> 44		
	<211> 716		
	<212> DNA		

<213> Sporobolomyces alborubescens	
<400> 44	
cgcccgtcgc tactacogat tgaatggctt agtgaggcct cgggattggc tattgggagc	60
tcgcgagagc acccgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcattfaga ggaagtaaaa	120
gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cgggaaggatc attagtgaat ataggacgctc	180
caacttaact tggagtcgca actctcaact tctaaccctg tgcacttgtt tgggatagta	240
actctcgcaa gagagcgaac tcctatcac ttataaacac aaagtctatg aatgtattaa	300
atftataac aaaataaac tticaacaac ggatctcttg gctctcgc atgaagaaga	360
cgcagcgaaa tgcgataagt aatgtgaatt gcagaattca gtgaatcacc gaacttttga	420
acgcaccttg cgtcccatgg tattecgtgg agcatgcctg ttgagtgct atgaataact	480
caaccctect ctittctaat gattgaagag gtgtttggtt tctgagcctg gctggcctt	540
acggtctagc tcgttcgtaa tgcattagca tccgcaatcg aatttcggat tgaactggcg	600
taatagacta ttcgctgagg aattctagtc ttcggattag agccgggttg ggttaaagga	660
agcttctaat cagaatgtct acattttag attagatctc aaatcaggta ggacta	716
<210> 45	
<211> 718	
<212> DNA	
<213> 粘红酵母	
<400> 45	
cgcccgtcgc tactacogat tgaatggctt agtgaggcct cgggattggc tattgggagc	60
tcgcgagagc acccgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcattfaga ggaagtaaaa	120
gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cgggaaggatc attagtgaat ctaggacgctc	180
caacttaact tggagtcgca actctcaact tctaaccctg tgcacttgtt taaaattgg	240
ctagtagctc ttcggagcga accaccattt tcaactata caaacacaaa gtctatgaat	300
glaaacaaat ttataacaaa acaaaacttt caacaacgga tctcttggct ctcgcatcga	360
tgaagaacgc agcgaatgc gatacgtaat gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgaa	420
tctttgaacg caccctggcg tctttggtat tccgaggagc atgcttgttt gactgtcatg	480
aaatctcaa cccaccttft tcttagtgaa tctggtggtg ctgggttct gagcctgct	540
ctgcttcggc ttagctgctt cgtaatgc atagatccgc aaccgaaact tccgattgac	600
tggcgtaat agactattcg ctgaggattc cagacttgtt ctggagccga gttgggttaa	660
aggaagcttc taactctaaa gtctattttt tgattagatc tcaaatcagg taggacta	718
<210> 46	
<211> 693	
<212> DNA	
<213> 粘红酵母	
<400> 46	
cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct cgggattggc ttctgggagc	60
cggcaacggc acctagtgc tgagaagttg gacgaacttg gtcattfaga ggaagtaaaa	120
gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cgggaaggatc attaatgaaa tgcgaaggacg	180
ctcttttag aggtccgacc caattcattt tctcactctg tgcacacact actttttaca	240
ccatttttaa cacttgaagt ctaagaatgt aaacagctct ttaattgagc ataaaattta	300
aaacaaactt tcagcaacgg atctcttggc tctcccatcg atgaagaacg cagcgaatg	360
cgatacgtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac gcaccttga	420
ctctttggta ttcggaagag tatgtctgtt tgagtgtcat gaaactctca acccccctgt	480
tttgtaatga accagcgtg ggccttggatt atggctgctg cggcgtaat tctcagctcg	540
gctgaaatcc acgagctacc catftcataa gaaatagacg gttgactcg gcgtaataac	600
atatttgcct gaggacgctc cattctttac ctagtgtgct ttctaagtcg acatclaaac	660
tttaagcttt agacctcaaa tcagtcagga cta	693
<210> 47	
<211> 640	
<212> DNA	
<213> 丝孢酵母菌	
<400> 47	
cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacce tcggattggc gttagggaagc	60
cggcaacggc atccfttggc cgagaagttg gtcaaacctg gtcattfaga ggaagtaaaa	120

gicgtaacaa ggfttccgta ggtgaacctg cggaggatc affagtatt gcctcatag 180
 gettaaaacta tatccacata cacctgtgaa ctgttccacc acttgacgca agtctagtgt 240
 tttacaaac aatgtgtaat gaactgtgtt ttattataac aaaataaaac ttcaacaac 300
 ggatctcttg gctctgcgat ccatgaagaa cgcagcgaat tgcgataagt aatgtgaatt 360
 gcagaattca gfgaatcacc gaacttttga acgcagcttg cgtctcttg tattccggag 420
 agcatgcttg ttccagtctc atgaaatctc aaccactagg gtttctaat ggattggatt 480
 tgggcgtctg ccatctctga tgcctcgcct taaaagagtt agcaagttg acattaatgt 540
 ctggtgtaat aagtttcaact gggtcattg tgttgaagcg tgettctaat cgtccgcaag 600
 gacaatact ttgactctgg cctgaaatca ggtaggacta 640

<210> 48
 <211> 476
 <212> DNA
 <213> Geotrichum histeridarum
 <400> 48

cgcccgtcgc tactaccgat cgaatggctt agtgaggcct cggattgat ttgggagaga 60
 gggcgaactt ttctctggaa cgagaagcta gtcaaacctg gtcatttaga ggaagtataa 120
 gicgtaacaa ggfttccgta ggtgaacctg cggaggatc affagaaaa tgcgatatta 180
 gtgtttatt ttctctgcag aaaggcaaac ttttaacata cctacctttt ttaactata 240
 aaaaacttta acaacggatc tcttggctct cgcacgatg aagaacgcag cgaattgcga 300
 tacgtttgt gaattgcaga agtgaatcat caacttttga acgcacattg cgcctgggtg 360
 tattccgcca ggcataactg ttgagcgtt gttctctctg ggattgtcta ctttctcaa 420
 agaaataaa caaacaagtt tgacacaaca cctcaacctc agatcaggta ggacta 476

<210> 49
 <211> 687
 <212> DNA
 <213> 橙黄红酵母
 <400> 49

[0014]

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct tccgattggc ttctgggagc 60
 cggcaacggc acctagtctc tgagaagttt gacgaacttg gtcatttaga ggaagtataa 120
 gicgtaacaa ggfttccgta ggtgaacctg cggaggatc ataatgaat tttaggactg 180
 tcttttaga agtcgaccc ttcaatttc ttacactgtg cacacacttc ttitttacac 240
 acactttta cacttagta taagaatgta atagtctctt aattgagcat aaataaaaaac 300
 aaaaacttca gcaacggatc tcttggctct cgcacgatg aagaacgcag cgaattgcga 360
 taagtaatgt gaattgcaga atcagttaa tcatcgaatc ttgaaacgca ccttgcactc 420
 ttggatc cgaagagatg gttgttttga gttgatgaa actctcaacc cccctatfff 480
 gtaatgagat ggggtgtggc ttgattatg gttgtctgtc ggcgtaattg cggctcaac 540
 tgaatacac gagcaacctc attgaaataa acggtttgac ttggcgtaat aatatttgc 600
 ctaaggacgc ttcttcaaaa tataagaggt gcttctaatt cgttctaant agcatftaag 660
 ctttagacct caaatcagtc aggacta 687

<210> 50
 <211> 636
 <212> DNA
 <213> 家毛孢子菌
 <400> 50

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct cggattggc gttgagaagc 60
 cggcaacggc atctcttggc tgagaagttg gtcaaacctg gtcatttaga ggaagtataa 120
 gicgtaacaa ggfttccgta ggtgaacctg cggaggatc affagtatt gccttaattg 180
 gettaaaacta tatccatcta cacctgtgaa ctgtttgatt gaactctcgg attcgatfff 240
 atacaacat tgtgtaatga acgtcattat attataacaa aaaaaaaact tcaacaacg 300
 gatctcttgg ctctcgcate gatgaagaac gcagcgaat gcgataagta atgtgaattg 360
 cagaattcag tgaatcctg aatctttgaa cgcacttgc gctctctgtt attccggaga 420
 gcatgctctg ttgagtgtca tgaatctca accattaggg ttcttaattg gcttggatff 480
 ggaggtttgc cagtctgact ggtcctctt aaaaagagta gcaagttgaa ctattgctat 540
 ctggcgtaat aagtttctg ggaatggtat tgtgaagcgt gcttctaant gtctcggac 600
 aatttttga ctctggcctc aatcaggta ggacta 636

<210> 51
 <211> 711
 <212> DNA
 <213> 红冬孢酵母
 <400> 51
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccggattggc tategggagc 60
 tcgagagcgc acctgactgc cgagaagtgc tacgaacttg gtcattfaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat attagggtgt 180
 ccaacttaac ttggagcccg accctcaact tctaaccctg tgcattfge ttgggtagta 240
 gctcgtgta gcgagcgaat cccatttac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaacaa 300
 attataaca aacaaaactt tcaacaacgg atctcttggc tctcgcacgc atgaagaacg 360
 cagcgaatg cgatacgtaa tfgaattgc agaattcagt gaatcctega atctttgaac 420
 gcaccttgcg ctccatggta ttccgtggag catgcctgtt tgagtgtcat gaattctca 480
 acccactctt tcttagtga atcagcgggt gtttggatc tgagcgttgc tggcttcgcg 540
 gcctagctcg ctcgtaatgc attagcacc gcaatcgaac ttccgattga ctccgctaa 600
 tagactatc getgaggatt ctggtctcg actggagccg ggtaagatta aaggaageta 660
 ctaactctca tctctatctt ttgagattag acctcaaatc aggtaggact a 711

<210> 52
 <211> 753
 <212> DNA
 <213> Rhodotorula terpendoidalis
 <400> 52
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccggactggc tattgggatc 60
 tcgagagaga acctgactgc tgggaagtgc tacgaacttg gtcattfaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaatgaat attagggtgc 180
 tcttttcatc aaagagcct gacctcatt ctctaccct gtgcactatt caaacattcg 240
 gcagttggta atttggcttg taaaagagcc agacgactct gctgaattca ctctaaact 300
 ctaaagtata agaattgtac aaataaaaca aataaaactt tcaacaacgg atctcttggc 360
 tctcgcacgc atgaagaacg cagcgaatg cgataagtaa tfgaattgc agaattcagt 420
 gaatcctega atctttgaac gcaccttgcg ctccgtggta ttccggcgag catgcctgtt 480
 tgagtgtcat gaaaacctca accttcaat tcttgttga atgtaagggt gtttggatc 540
 tgaatgttg ctggctttaa gggcccttgg ctacttcaaa agcgaagctc attcgtata 600
 cattagcacc tcaatttga atattcggat tgactcggcg taatagactt tattcctga 660
 ggacacctc acaagggtgc cgaatttga ggtagaagct tcaatttga tcaaaagta 720
 ctcttagttt agacctcaga tcaggeagga cta 753

[0015]

<210> 53
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 解脂耶氏酵母
 <400> 53
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct tgggagggcg agatgagggg 60
 ggcaacctt ttgaacatc caaacttggc caaacttgat tatttagagg aagtaaaagt 120
 cgtaacaagg ttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgattt atctattct 180
 gtggatttct ggtatattac agcgtcatt tatctcaatt ataactatca acaacggatc 240
 tcttggctct cacatcgtatg aagaacgcag cgaaccgcga tttttttgt gacttgcaga 300
 tftgaaatc caatcttga acgcacattg cgcggtatgg tattccgtac cgcacggatg 360
 gaggagcgtg ttccctctgg gatcgcattg ctctctttaa atggatttt taaacttca 420
 attattactg cattcaact cttcctcgc agatta 456

<210> 54
 <211> 709
 <212> DNA
 <213> 粘红酵母
 <400> 54
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccggattggc tattgggagc 60

```

tcgcgagagc acctgactgc cgagaagtg tacgaactg gtcatttaga ggaagtaaaa      120
gtcgttaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaggatc attagtgaat attagggtgt      180
ccaacttaac ttggaacctg acctcactt tetaacctg tgcattgtc ttgggtagta      240
gcttgctgctg gcgagcgaat cccatttcac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaacaa      300
attataaca aacaaaactt tcaacaacgg atctcttggc tctcgcacg atgaagaacg      360
cagcgaaatg cgatacgtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac      420
gcaccttgcg ctccatgglg ttccgtggag catgcctgtt lgagtgtcat gaattctca      480
accacactat ttctagtga atcaggcggg gttggatc tgagcgtgc tggccctcag      540
gcctagctcg ctcgtaatgc attagcatcc gcaatcgaac ttggattga ctcgccgtaa      600
tagactattc gctgaggatt ctggtctctg actggagccg ggtgagatta aaggaagcta      660
ctaactctca tgtctatctt gagattagac ctcaaatcag gtaggacta      709

```

<210> 55

<211> 500

<212> DNA

<213> 解脂耶氏酵母

<400> 55

```

gtcccctccc ttgtacaca ccgccctgct ctactaccga ttgaatggtt tagtgagacc      60
ttgggagggc gagatgaggg gggcaacccc ttctgaacat ccaaacitgg tcaaacitga      120
ttatttagag gaagtaaaag tcgtaacaag gtttccgtag gtgaacctgc ggaaggatca      180
ttattgattt tatctatttc tgtggattc tattctatta cagcgtcatt ttatctcaat      240
fataactatc aacaacggat ctcttggctc tcacatcgat gaagaacgca gcgaaccgct      300
atattttttg tgacttgcag atgtgaatca tcaatctttg aacgcacatt gcgcgggatg      360
gcattccgta ccgcacggat ggaggagcgt gttccctctg ggatcgcatt gctttctga      420
aatggatttt taaactctc aattattacg tcatttcaac tecttcatcc gagattacce      480
getgaactta agcatalcaa

```

500

<210> 56

<211> 707

<212> DNA

<213> 子囊菌油脂酵母

<400> 56

```

cgcccctgcg tactaccgat tgaatgggtt agtgaggcct cggattggc tattgggagc      60
tcgcgagagc acctgactgc tgagaagtg tacgaactg gtcatttaga ggaagtaaaa      120
gtcgttaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaggatc attagtgaat ctaggacgctc      180
caacttaact tggagtcgca aatctcactt tetaacctg tgcattctgt aattggaala      240
gtagctcttc ggagtgaacc accattcact tataaaacac aaagtctatg aatgtataca      300
aatttataac aaaacaaaac ttcaacaac ggatctcttg gctctcgcac cgatgaagaa      360
cgcagcgaaa tgcgatacgt aatgtgaatt gcagaatca gtgaatcacc gaatctttga      420
acgcaccttg cgtctcttgg tattccgagg agcatgcctg ttgagtgtc atgaaatctt      480
caaccacctc ctftctagt gaatctggtg gtgcttgggt tctgagcgtc gctctgcttc      540
ggcttagctc gttcgtaatg cattagcate cgcaaccgaa ctccggattg acttggcgtg      600
atagactatt cgctgaggat tctagtttac tagagccgag ttgggtaaa ggaagctctc      660
aatcctaaag tctatttttt gattagatct caaatcaggt aggacta      707

```

<210> 57

<211> 457

<212> DNA

<213> 解脂耶氏酵母

<400> 57

```

cgcccctgcg tactaccgat tgaatgggtt agtgagacct tgggagggcg agatgagggg      60
ggcaaccccc tctgaacate caaacitggt caaacitgat tatttagagg aagtataaagt      120
cgtaacaagg ttccgttagg tgaacctgct gaaggatcat tattgatttt atctatttct      180
gtggatttct attctattac agcgtcattt tatctcaatt ataactatca acaaccggatc      240
tcttggctct cacatcgatg aagaacgcag cgaaccgcga tattttttgt gacttgcaga      300
tgtgaatcat caatctttga acgcacattg ccgggtatgg cattccgtac cgcacggatg      360
gaggagcgtg ttccctctgg gatcgcattg ctftctttaa atggatttt taaactctc      420
aattaffacg tcatttcaac tecttcatcc gagatta

```

457

[0016]

<210> 58
 <211> 1022
 <212> DNA
 <213> 子囊菌油脂酵母
 <400> 58
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct tgggactggc tccagaaaat 60
 gggaaacat taccaggagc tggaaagttg gtcaacttg gtcattfaga ggaagtataa 120
 gtctgaacaa ggtttccttc cgtagcactt actgaagctt tagcagcccg aaaaggcgaa 180
 tgetagcga cataaataaa tatggcgttc ttaaagtcta gtctctgatt agaggcgaca 240
 ttgccaattt gcggggacat cctaagatc ttgatccaa gctggtagtc gaaagacgcc 300
 agtggccgag ctaacagccc tgggtatgtt aataatcaa gatatggaac aatgggtaat 360
 ccgcagccaa gtctaaact acgcaagtag catggatgca gttcacaggc caaatggtga 420
 tgggtagatt actaaatctg ctaagatat ggtcggctcc gctgtgagag cagatgggaa 480
 gtacaaaagc agactcgtga gtttgcgcaa acgtaactaa aaacgttccg taggtgaacc 540
 tgcggaagga tcattactga gtaattgtct ttaaagaca tctctctatc cataaactct 600
 ttttctaaa aagacatgat ttacacaatt agtctgaatg attatataaa aatcttcaaa 660
 actttcaaca accgatctct tggfctcgc atcgatgaag aacgcagcaa aatgogataa 720
 gtattgtgaa ttgcaggatt ttgtaatca tegaatttt gaacgcacat tgcacctct 780
 ggtattccgg agggfatacc tgtttgagcg tcatttatat actcaaaact tcttttggf 840
 gatgggcaca tatctgtgta gagctagatt tgcctgaaat atagtggtag agattgctac 900
 gagtatgca agitagcaa tgcattaaag ttaattcgtt ggtgaagcat gcggagcttt 960
 agtgcgcgc ttcttaact attggaattt ttctaatttt gacctcaaat caggcaggag 1020
 ta 1022

[0017]

<210> 59
 <211> 712
 <212> DNA
 <213> 球红冬孢酵母
 <400> 59
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct cgggaccggc tattgggagc 60
 tcgcgagagc acccgactgc tgggaagttg taegaaactg gtcattfaga ggaagtataa 120
 gtctgaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cgggaagatc attagtgaat ataggacgctc 180
 caacttaact tggagtcgga actctcactt tctaaccctg tgcatttgtt tgggatagta 240
 gcctctcggg gtgaactctc attcactcat aaacacaaag tctatgaatg tatttaattt 300
 ataacaaaat aaaacttca acaacggatc tcttggctct cgcctcgaag aagaacgcag 360
 cgaatgcga taagtatgtt gaattgcaga attcagttaa tcatcgaate ttgaaacgca 420
 ccttgccttc catggtatc cgtggagcat gccgttttga gtgcatgaa tacttcaace 480
 ctctctttt ctagtgaag agaaggtgct tggtttctga gctgttctc ggctcaccgg 540
 tcgagctcgc tctaatgca ttacatccg caatcgaact tggattgac ttggcgaat 600
 agactatcgc ctgaggaatt ctaactctcg gattagagcc gggttgggtt aaaggaagct 660
 tctaactcct atgtctatat ttttagatta gatctcaaat caggtaggac ta 712

<210> 60
 <211> 631
 <212> DNA
 <213> 芸苔丝孢酵母
 <400> 60
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct cgggattggt gttgagaagc 60
 cggcaacggc atctcttggc cgagaagttg gtcaacttg gtcattfaga ggaagtataa 120
 gtctgaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cgggaagatc attagtgaat gccittaattg 180
 gettaaacta tatecaacta cacctgtgaa ctgtctgatt gaatctcga ttaatttta 240
 caaacattgt gtaaagaacg tcattagatc ataacaaaa aaaactttta acaacggatc 300
 tcttggctct cgcctcgaag aagaacgcag cgaatgcga taaglaattg gaattgcaga 360
 attcagttaa tcatcgaate ttgaaacgca acttgcctc tctggtatc cggagagcat 420
 gccctgttga gtgcatgaa atctcacaca tcaaggtttc ttgatgaagt ggatttggag 480
 gttgceagtc taactggctc ctctaaagg agttagcata ttgattatt gctgtctggc 540
 gtaataagtt tctctagttt ggcattttga agtgtgcttc taatcgtctt cggacaattt 600

	ttgactctg gccccaatc aggtaggact a	631
	<210> 61	
	<211> 627	
	<212> DNA	
	<213> 弯曲隐球酵母	
	<400> 61	
	cgcccgcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagattf cggattggc gttaggaagc	60
	cggaacggc atccttggc tgagaagcta ctcaacttg gtcattaga ggaagtaaaa	120
	gtcgtacaa ggttccgta ggtgaacctg cggaggatc attagtatt tgcctcggg	180
	ctaactatat ccataacacc tgtgaactgt tgattgactt cggfcaatat ttttacaac	240
	attgtgtaat gaacgtcatg ttataatac aaatataact tcaacaacg gatctettgg	300
	ctctcgatc gatgaagaac gcagcgaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag	360
	tgaatcatcg aatctttaa cgaacttgc gctctctgtt attccggaga gcattcctgt	420
	ttgagtgtca tgaatctca accattaggg ttctaatg gcttggattt ggaacttgc	480
	cagtcaaatg gctctctta aaagattag tgaattaac atttctctc tggcgtata	540
	agtctcgtc ggtctgtagt gtgaagtgg ctctaatcg tccgcaagga caattctga	600
	actctggcct caaatcaggt aggacta	627
	<210> 62	
	<211> 637	
	<212> DNA	
	<213> 斯达油脂酵母菌	
	<400> 62	
	cgcccgcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct tcgactggc tccagaaaat	60
	gggaacccat taccaggagc tgaagaattg gtcaacttg gtcattaga ggaagtaaaa	120
	gtcgtacaa ggttccgta ggtgaacctg cggaggatc attactgatt atttctctt	180
	tcagacatc tctctatcca taaactctt ttttaaaaa gacatgattt ataacaatta	240
[0018]	gtctgaatga ttattttta atctcaaaa ctccaacaa cggatctctt ggtctcgcg	300
	tcgatgaaga acgcagcaaa ttccgataag taatgtgaa tgcaggattt tgtaatcat	360
	cgaattttg aacgcacatt gcactcttg gtattccgga gggtataact gtttgagcgt	420
	catttatata ctcaaaactt acgttttgg gatgggcacg tatctggctt ctaagttaga	480
	ttgcctgaa atatagcggg agaggtcgtc agaagcgatg caagttagc aatgctatta	540
	aagttaate gtgggtgacg catgtgagc ttgtggtaa gcttctcta attattgaa	600
	ttttttcta attttgacct caaatcaggc aggagta	637
	<210> 63	
	<211> 457	
	<212> DNA	
	<213> 解脂耶氏酵母	
	<400> 63	
	cgcccgcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct tggaggggc agatgagggg	60
	ggcaacccct ttgaacatc caaacttggc caaacttgat tatttagagg aagtaaaagt	120
	cgtacaagg ttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgattt atctattct	180
	gtggattct attctattac agcgtcattt tatctcaatt ataactatca acaacggatc	240
	tcttggctct cacatcgatg aagaacgcag cgaaccgcga taattttgt gacttcaga	300
	tgtgaatcat caatcttga acgcacattg cgcggtatgg cattccgtac cgcacggatg	360
	gaggagcgtg ttcctctgg gatcgcattg cttctttaa atggatttt taaactctc	420
	aattattacg tcatttcaac tcttcatcc gagatta	457
	<210> 64	
	<211> 631	
	<212> DNA	
	<213> Trichosporon loubieri	
	<400> 64	
	cgcccgcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct cggattggc gttgagaagc	60
	cggaacggc atctctggc cgagaattg gtcaacttg gtcattaga ggaagtaaaa	120
	gtcgtacaa ggttccgta ggtgaacctg cggaggatc attagtatt gccatcttgg	180

cttaaactat atccatctac acctgtgaac cgtttgattg aatctctga tcaatttta 240
 caaacattgt gtaatgaacg tcattagatc ataataagaa aaaacttca acaacggatc 300
 tcttgctct cgcategatg aagaacgcag cgaatgcga taagtaatgt gaattgcaga 360
 atfcagttaa tcatcgaatc ttgaacgca acttgcgctc tctggtaic cggagagcat 420
 gectgttga gttcctgaa atctcaacca itagggttc ttaatggctt ggattggag 480
 gttgccatc taaatggctc ctctaaaag agttagcgag ttaactatt gctatctggc 540
 gtaataagtt tctgtggaat ggtatttga agcgcgctc taatcgtctt cggacaattt 600
 ttgactctg gcctcaaatc aggtaggact a 631

<210> 65
 <211> 476
 <212> DNA
 <213> Geotrichum vulgare
 <400> 65

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggctt cggattgat tagttggaga 60
 gggagacttt tctgactgaa cgagaagcta gicaaacttg gtcatttga ggaagtataaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaaggatc attaaagatt taatattaat 180
 tgtgaaatta aaacgatatt aacaaaaat catacaatca attataaaaa aaatcaaaac 240
 ttitaacaat ggatctcttg gttctcgtat cgatgaagaa cgcagcgaac cgcgatattt 300
 ctttgaatt gcagaagtga atcatcagtt ttgaacgca cattgcactt tggggatctc 360
 cccaaagtat actgtttga gcgtgttctc tctcttggaa ttgcattgct ttctataaaa 420
 atcgaatcaa atcgtttga aacatccatt ctcaacctc agatcaagta ggatta 476

<210> 66
 <211> 710
 <212> DNA
 <213> 圆红冬孢酵母菌
 <400> 66

[0019] cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggctt cggattgge tattgggagc 60
 tccgagagc acctgactgc cgagaagtg tacgaacttg gtcatttga ggaagtataaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaaggatc attagtgaat attagggtgt 180
 ccaacttaac ttggagcccg accctcactt tctaacctg tgcatttgc ttgggtagta 240
 gttcgcgca gcgagcgaat cccatttcac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaacaa 300
 attataaca aaacaaaaact ttcaacaacg gatctcttgg ctctcgcac gatgaagaac 360
 gcagcgaat gcgatacgt atgtgaattg cagaattcag tgaatcatg aatctttgaa 420
 cgcaccttgc gctccatggt atcccttggg gcacccctgt ttgagtgtca tgaattctc 480
 aaccacctc ttcttagtg aatcaggcgg tgtttgatt ctgagcgcct ctggcttgc 540
 ggcttagctc gctcgtaatg cattagcacc cgcaatcga cttcggattg actcggcgta 600
 atagactatt cctcaggat tctggtctct gactggagcc gggtaagggt aaagggagct 660
 actaatctc atgtctatct tgagattaga cctcaaatca ggtaggacta 710

<210> 67
 <211> 707
 <212> DNA
 <213> 粘红酵母
 <400> 67

cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggctt cggattgge tattgggagc 60
 tccgagagc acctgactgc tgagaagtg tacgaacttg gtcatttga ggaagtataaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaaggatc attagtgaat ctaggacgct 180
 caacttaact ttggagccga actctcactt tctaacctg tgcatttgtt aattggaata 240
 gtactcttc ggagtgaacc accattcact tataaaacac aaagtctatg aatgtataca 300
 aattataac aaaacaaaac ttcaacaac ggatctcttg gctctcgcac cgatgaagaa 360
 cgcagcgaac tgcgatacgt aatgtgaatt gcagaattca gtaatcacc gaatctttga 420
 acgcacctg cgtccttgg tattccgagg agcatgcctg ttgagtgtc atgaatctt 480
 caaccacct ctcttagt gaatctggtg gtgcttgggt tctgagcctt gctctcttc 540
 ggcttagctc gttcgtaatg cattagcacc cgcaaccgaa cttcggattg acttggcgta 600
 atagactatt cctcaggat tctagtttac tagagccgag ttgggtataa ggaagctct 660
 aatcctaaag tctattttt gattagatct caaatcaggt aggacta 707

<210> 68	
<211> 627	
<212> DNA	
<213> 橙黄红酵母	
<400> 68	
cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagattf ccggaftggc gftaggaagc	60
cggaacacgc atcctttggc fgagaagcta ctcaaacftg gtcatttaaa ggaagtaaaa	120
gtcgtaaaca ggfttccgta ggtgaacctg cggaaagatc attagtattf tgccttcggg	180
ctaaactat ccataacacc tgtgaactgt tgattgactf cggtaataf ttttacaac	240
attgtgtaat gaacgtcatg ttataataac aaatataact tcaacaacg gatctcttgg	300
ctctcgcacg gatgaagaac gcagcgaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag	360
tgaatcatcg aatctttgaa cgcaacttcg gctctctgtt atccggaga gcatgcctgt	420
ttgagtgtca tgaatctca accattaggg tttctaatg gcttggattf ggacgtttgc	480
cagtcaaatg gctcgtetta aaagagttag tgaattaac attgtcttc tggcgttaa	540
agttcgtcgt ggctgatagt tgaagtttg ctctaatcg tccgaagga caattcttga	600
actctgacct caaatcaggt aggacta	627
<210> 69	
<211> 899	
<212> DNA	
<213> 戴尔球孢酵母	
<400> 69	
cgcccgtcgc tagtaccgat tgaatggctt agtgaggcct caggatctgc ttagagaagg	60
gggcaactcc atctcagagc ggagaactctg gcaaacftg gtcatttaga ggaactaaaa	120
gtcgtaaaca ggfttccgta ggtgaacctg cggaaagatc attagagaaa tctatatgaa	180
tgaagttaga ggacgtctaa agatactgta agagaggatc aggttcaaga ccagcgtta	240
attcgcgggt tgcggcttgg ttcgccitft gcggaacatg tctttctcg ttgttaactc	300
tactcaact tctacaacac tgtggagttf tctacacaac tttctctt tgggaagata	360
[0020] cgtcttctgc gtcttccca gaggtagaca acacaaaca ctttttatta ttataaacca	420
gtcaaaacca atttctgtat gaaatataaa atattataaa ctttcaaca cggatctctt	480
ggttctcgea tcatgaaga acgcagcga atgcgatacg taatgtgaat tgcagaatte	540
cgtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgccccttg gtattccagg gggcatgcct	600
gfttgagcgt catttcttc tcaacaate atgtttgta gtgagtata ctctgtcaag	660
ggttaacttg aaattgctag cctgttattf ggtgtgattf ttctctgctt gcatgacttt	720
gtccagctca gtaaataccg aattgtctga ttaggttta ccaacttcgg cagactgtgt	780
gttggctcgg gcgctttaa gactttgtc taaacgattf atcgtttgtf tgagctttc	840
gcatacgeaa tccggcgcaa caatactctc aaagttgac ctcaaatcag gtaggaata	899
<210> 70	
<211> 710	
<212> DNA	
<213> 子囊菌油脂酵母	
<400> 70	
cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccggaftggc fattgggagc	60
tccgagagc acctgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120
gtcgtaaaca ggfttccgta ggtgaacctg cggaaagatc attagtgaat attagggtgt	180
ccaactaac tggagcccc accctcactf tctaacctg tgcatttgc ttggtagta	240
gcttgcgtca gcgagcgaat cccattcac ttacaacac aaagtctatg aatgtaaca	300
attataaca aaacaaaact tcaacaacg gatctcttgg ctctcgcacg gatgaagaac	360
gcagcgaat gcgataccta atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa	420
cgcaccttgc gctccatggt atccgttga gcatgcctgt ttgagtgtca tgaattctc	480
aaccacctc tttcttagtg aatcaggcgg tttttgattf ctgagcgtc ctggettcgc	540
ggcctagctc gctcgtaatg cattagcacc cgcaatcga ctctggattg actcggcgt	600
atagactatt cgttggagat tctgtctctf gactggagcc ggttaaggtf aaaggagct	660
actaactctc atgtctatct tgagattaga ctcaaatca ggtaggacta	710
<210> 71	

<211> 707
 <212> DNA
 <213> 子囊菌油脂酵母
 <400> 71
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccggattggc tattgggagc 60
 tcgcgagagc acccgactgc cgagaagtgc tacgaacttg gtcatttaga ggaagtataa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggate attagtgaat attagggcgt 180
 ccaactaac ttggagcccc aactctcact ttctaacctt gtgcactcgt tcttggtcag 240
 tagctctctc gggagtgaac gccattcact taaaacacaa agtctatgaa tgtataaat 300
 ttataacaaa acaaaaactt caacaacgga tctcttgget ctcgcatega tgaagaacgc 360
 agcgaatgc gataagtaat gtgaattgca gaaticagtg aatcatgaa tctttgaacg 420
 caacttgcgc tctctggtat tccggagagc atgcctgttt gagtgcctg aaatcttcaa 480
 ccctctcttt tctaatgaa tcgagagggt cttgcatcct gagecgtcct ggttcggcc 540
 tagctcgttc gtaatgcatt agcatccgca atcgaacttc ggattgactt ggcgtaatag 600
 actatcgcct gaggattctg gtctcgtacc agagccgggt tgggttaaag gaagcttcta 660
 atcctaaaag tctaactttt gattagatct caaatcaggt aggacta 707

<210> 72
 <211> 641
 <212> DNA
 <213> 丝孢酵母
 <400> 72
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagaccc tcggattggc gttaggaagc 60
 cggcaacggc atcccttggc cgagaagtgc gtaaaccttg gtcatttaga ggaagtataa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggate attagtattt gcctttatag 180
 gcttataact atatccactt acacctgtga actgtctat tacttgacgc aagtcgagta 240
 ttttacaaa caatgtgtaa tgaacgtcgt tttattataa caaaataaaa ctttcaaca 300
 cggatctctt ggtctctgca tcgatgaaga acgcagcgaa ttgcgataag taatgtgaat 360
 tgcagaatc agtgaatcat cgaatctttg aacgcagctt gcctctctg gtattccgga 420
 gagcatgcct gtttcagtgf catgaaatct caaccactag ggtttctaa tggattggat 480
 ttggcgctct gcgatctctg atcgtctgccc taaaagagt tagcaagttt gacattaatg 540
 tctgggttaa taagtttcaac tgggtccatt gtgttgaagc gtgcttctaa tcgtccgcaa 600
 ggacaattac ttgactctg gcctgaaatc aggtaggact a 641

[0021]

<210> 73
 <211> 628
 <212> DNA
 <213> 粘质红酵母
 <400> 73
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagattt ctggattggc gttaggaagc 60
 cggcaacggc atcccttggc tgagaagtta ctcaaacctg gtcatttaga ggaagtataa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggate attagtattt tgccttcggg 180
 ctaaactata tccataaac ctgtgaactg ttgattgact tcggtaata ttttacaaa 240
 cattgtgtaa tgaacgtcat gttataataa caaatataac ttcaacaac ggatctcttg 300
 gctctcgcct cgatgaagaa cgcagcgaaa tgcgataagt aatgtgaat gcagaatca 360
 gtgaatcctc gaatctttga acgcaacttg cgtctctctg tattecggag agcatgcctg 420
 ttgagtgctc atgaaatctc aaccattagg gtttctaat gccttggatt tggcgtttg 480
 ccagtcataa ggtctgctct aaaagagtta gtgaatttaa catttgcct ctggcgtaat 540
 aagtttgcct ggctgtatag tgtgaagttt gcttctaate gtccgcaagg acaattcttg 600
 aactctggcc tcaaatcagg taggacta 628

<210> 74
 <211> 687
 <212> DNA
 <213> 弯曲隐球酵母
 <400> 74
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct tcggattggc ttctgggagc 60
 cggcaacggc acctagtctc tgagaagttt gacgaacttg gtcatttaga ggaagtataa 120

gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc atfaatgaat tttaggacgt	180	
tcttttaga agtccgaccc ttcaatttc ttacactgtg cacacactc tttttacac	240	
acactttfaa caccttagta taagaatgta atagtctctt aattgagcat aaataaaaa	300	
aaaactttca gcaacggatc tcttgctct cgcacgatg aagaacgcag cgaattgcga	360	
taagtaatgt gaattgcaga atcagtgaa tcatcgaate ttgaacgca ccttgcaact	420	
tttggtatc cgaagagtat gtctgttga gtgtcatgaa actctcaacc cccctatftt	480	
gtaatgagat ggggtgtggc ttggattatg gttgtctgtc ggcgtaattg ccggctcaac	540	
tgaatafac gagcaacct attgaaataa acggttgac ttggcgtaat aattattcg	600	
ctaaggacgc ttcttcaaa tataagaggt gcttetaat cgttetaat agcatttaag	660	
ctttagacct caaatcagtc aggacta		687
<210> 75		
<211> 627		
<212> DNA		
<213> 子囊菌油脂酵母		
<400> 75		
cgcccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgagattt ccggattggc gttaggaagc	60	
cggaacggc atcctttggc tgagaagcta ctcaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120	
gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgatt tgcctcggg	180	
ctaactatat ccafaacacc tfgaactgt tgaatgactt cggtaatat tttaacaac	240	
atgtgtaat gaacgcatg ttataatac aaatataact ttcaacaacg gatctcttgg	300	
ctctcgcac gatgaagaac gcagcgaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag	360	
[0022] tgaatcatc aatctttgaa cgaacttgc gctctctggg attccggaga gcatgacctg	420	
ttgagtgca tgaatctca accattaggg ttcttaatg gcttggattt ggacgttgc	480	
cagcaaatg gctcgtctta aaagagttg tgaattaac attgtcttc tggcgtata	540	
agttcgcct ggctgatgt gtgaagttg ctctaatcg tccgcaagga caattctga	600	
actctggcct caaatcaggt aggacta		627
<210> 76		
<211> 707		
<212> DNA		
<213> Lipomyces orientalis		
<400> 76		
cgcccgctgc taetaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccggattggc tattgggagc	60	
tcgcgagagc acctgactgc tgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120	
gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat ctaggacgtc	180	
caacttaact tggagtccga actctcaact tctaaccctg tgcactgttt aattggaata	240	
gtagctctc ggagtgaacc accattcaact tataaaacac aaagtctatg aatgtataca	300	
aattfataac aaaacaaaac ttcaacaac ggatctcttg gctctcgcac ccatgaagaa	360	
cgcagcgaaa tgcgatacgt aatgtgaatt gcagaattca gtgaatcac gaatcttga	420	
acgcacctg cctctcttgg tattccgagg agcatgctg ttgagtgct atgaaatctt	480	
caaccacct cttcttagt gaatctggtg gtgcttggtt tctgagcct gctctgctc	540	
ggcttagctc gttcgtaatg cattagcac cgcaaccgaa ctccggattg acttggcgta	600	
atagactatt cctgaggat tetagttac tagagccgag ttgggttaaa ggaagctcct	660	
aatcctaaag tctattttt gattagatct caaatcaggt aggacta	707	

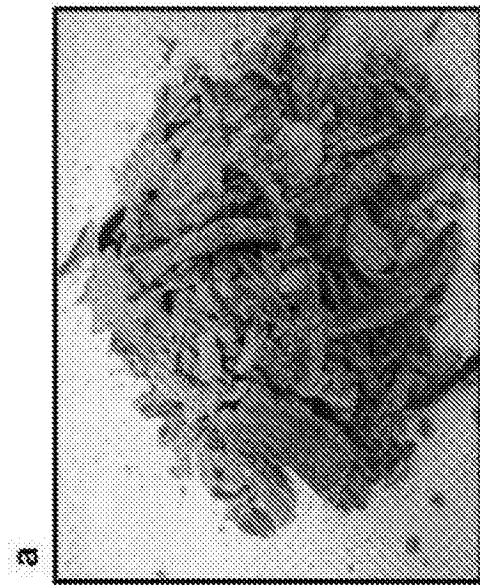
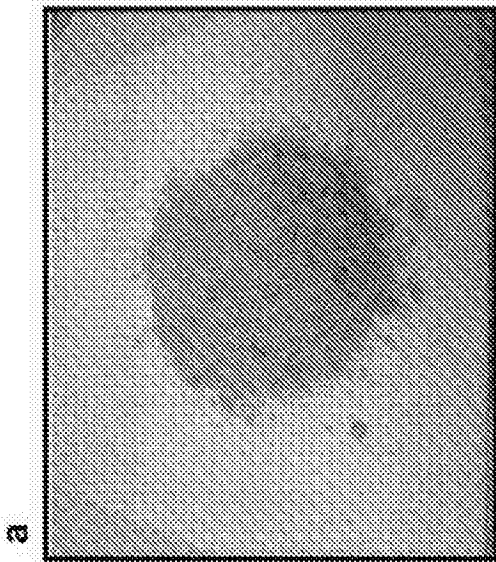
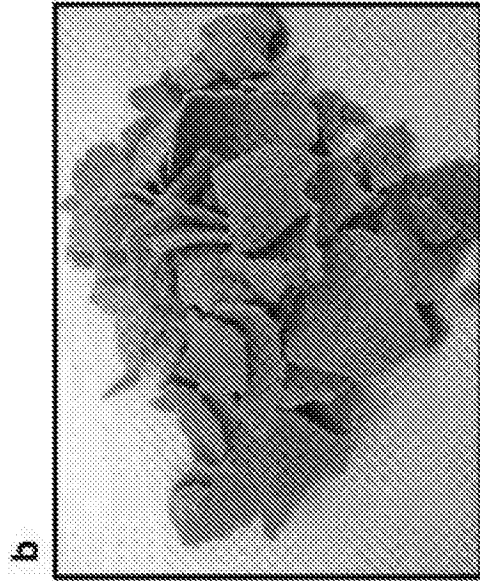
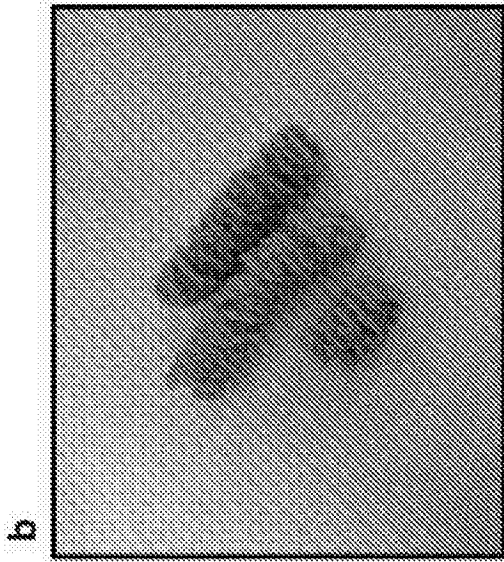


图1

图2