



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103025862 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 03

(21) 申请号 201180033272. 6

迪纳·莱拉克华达 洪瑗京

(22) 申请日 2011. 04. 25

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

72003

(30) 优先权数据

代理人 吴小瑛 菅兴成

10-2010-0041942 2010. 05. 04 KR

10-2010-0041944 2010. 05. 04 KR

10-2010-0117373 2010. 11. 24 KR

(51) Int. Cl.

C12N 1/12 (2006. 01)

C12P 7/64 (2006. 01)

C12R 1/89 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 01. 04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2011/002999 2011. 04. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02011/139040 KO 2011. 11. 10

(83) 生物保藏信息

KCTC 11686BP 2010. 04. 22

(71) 申请人 韩国生命工学研究院

地址 韩国大田市

(72) 发明人 徐正又 金哲镐

权利要求书 1 页 说明书 14 页

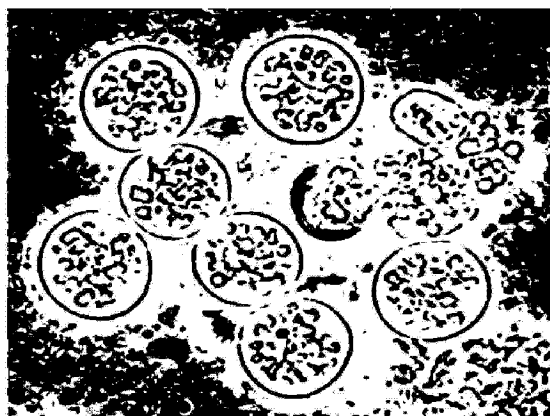
序列表 2 页 附图 7 页

(54) 发明名称

新型破囊壶菌类微藻及用其生产生物油的方法

(57) 摘要

本发明涉及具有生产生物油能力的新型破囊壶菌类微藻及用其生产生物油的方法。当在含葡萄糖的培养基中培养时,本发明的微藻在菌株中以高比例积累生物油,并因此可生产高产量的生物油。所述微藻还可使用豆粉作为氮源生产生物油,通过用可食用豆粉作为培养基培养所获的产品可用作生产食品和饲料的原料。此外,本发明所述微藻还可使用非食物性纤维素类生物质作为碳源生产生物油,使用非食物性纤维素类生物质作为培养基可以克服诸如食物资源供需失衡、原料成本增加等限制生物油开发的因素,确保微生物发酵油的产业竞争力。



1. 具有生产生物油能力的破囊壶菌 (thraustochytrid) 类微藻 KRS101 (KCTC11686BP)。
2. 根据权利要求 1 所述的破囊壶菌类微藻 KRS101(KCTC11686BP), 其具有 SEQ ID NO:1 的 18S DNA 核苷酸序列。
3. 根据权利要求 1 所述的破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP), 其中所述生物油包含不饱和脂肪酸。
4. 根据权利要求 3 所述的破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP), 其中所述不饱和脂肪酸为二十二碳六烯酸(DHA)。
5. 根据权利要求 4 所述的破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP), 其中所述微藻 KRS101 中含有的二十二碳六烯酸(DHA) 的含量占其中脂肪酸总含量的比例为 40% 或更多。
6. 一种生产生物油的方法, 所述方法包括如下步骤:
  - (a) 培养权利要求 1 所述的破囊壶菌类微藻 KRS 101 (KCTC11686BP) 以产生生物油; 及
  - (b) 回收所产生的生物油。
7. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中所述生物油包含不饱和脂肪酸。
8. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中所述不饱和脂肪酸为二十二碳六烯酸(DHA)。
9. 一种生产生物油的方法, 所述方法包括如下步骤:
  - (a) 在含豆粉的培养基中培养破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP) 以产生生物油; 及
  - (b) 回收所产生的生物油。
10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中所述培养基包含的豆粉作为单一氮源。
11. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中所述生物油包含不饱和脂肪酸。
12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中所述不饱和脂肪酸为二十二碳六烯酸(DHA)。
13. 一种生产生物油的方法, 所述方法包括如下步骤:
  - (a) 在含纤维素类生物质的培养基中培养破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP) 以产生生物油; 及
  - (b) 回收所产生的生物油。
14. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述培养基包含的纤维素类生物质作为单一碳源或营养源。
15. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述纤维素类生物质选自羧甲基纤维素、纤维二糖和棕榈油副产品。
16. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述生物油包含不饱和脂肪酸。
17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中所述不饱和脂肪酸为二十二碳六烯酸(DHA)。
18. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述破囊壶菌类微藻为 KRS101(KCTC11686BP)。

## 新型破囊壶菌类微藻及其生产生物油的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及具有生产生物油能力的新型破囊壶菌(thraustochytrid)类微藻及其生产生物油的方法。

### 背景技术

[0002] 从油类植物如油菜籽、大豆和棕榈的油中生产的生物柴油是已商品化的典型生物柴油,并且其生产在全世界迅速增长。然而,由于用于生产生物柴油的原料作物价格昂贵,所以与原油来源的柴油相比,生物柴油在生产成本方面不具优势并且竞争力较低。因此,尽管它在环境和农业经济方面有多种优势,但如果不减税,生物柴油似乎不具有商业竞争力。尽管预期能源枯竭引起的原油价格上升会为生物柴油带来商业竞争力,但生物柴油生产近来增加引起的原料作物价格的突然上升成为降低生物柴油竞争力的新因素。

[0003] 此外,由于利用日光并循环二氧化碳,来自油类植物和光合微藻的光合油(其是用于生产生物柴油的生物油的主要来源)具有重要的优势,但它受包括时间、空间、季节和气候在内的多种因素的不利影响。而且,产自光合油的生物柴油使用的增加会引起食物短缺和由于大量种植原料作物而产生的新的环境问题,因而存在对来自光合油的生物柴油效能的质疑。

[0004] 由于这些原因,有机营养微生物的发酵作为用于大量生产生物油的方法已经受到了关注。产油的典型微生物包括原壳小球藻(*Chlorella protothecoides*)、解脂耶罗威亚酵母(*Yarrowia lipolytica*)、圆红冬孢酵母菌(*Rhodospiridium toruloides*)、粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)等,人们已经积极进行了对其发酵方法的研究。

[0005] 在这些油类微生物中,属于破囊壶菌家族的微藻是能够产生生物油的油类微生物,其含有含量高达细胞干重 70% 的多不饱和脂肪酸,如 DHA (二十二碳六烯酸)。公知 DHA (脑、眼组织和神经组织的必需脂肪酸)在婴儿视力和运动神经的发育中起重要作用。此外,据报道,在痴呆患者的脑中 DHA 的量显著降低,也有报道 DHA 具有多种新功能,如抑制与年龄相关的黄斑退行性改变。尽管有此类有益的生理功能,但人体无法自身合成足量的 DHA。因此,公认 DHA 是从外界补充的必需营养成分,许多国际组织包括世界卫生组织建议每日摄入 1g 或更多的 DHA。因此,DHA 被商品化为包括健康功能性食品在内的多种产品,并且其作为医药原料的实用性高,这说明 DHA 具有非常高的商业价值。因此,不同于一般的微生物油或光合油,产自属于破囊壶菌家族的微藻发酵的油能够在利用 DHA 的高附加值产业和生物柴油产业间提供联系,从而为生物柴油提供了商业竞争力。

[0006] 然而,保证微生物发酵油作为生物柴油原料的商业竞争力的最重要因素是使用工业废料、废料资源和剩余生物质作为营养源,并最终使用丰富的不可食用的纤维素类生物质。非食物性纤维素类生物质资源的实例包括木质生物质、农业副产品、城市废品等。

[0007] 已报道了许多种使用破囊壶菌家族的微生物生产 DHA (二十二碳六烯酸)的方法。此类方法主要是通过含葡萄糖作为碳源的培养基中培养破囊壶菌家族的微生物来生产 DHA 的方法(韩国专利公开号 2008-0087820、韩国专利公开号 2009-0064603、美国专利公开

号 20080009045 和美国专利公开号 20050019880)。然而,还没有关于使用下一代生物质资源的非食物性纤维素类生物质生产生物油的方法的报道。

[0008] 为此,本发明人付出大量的努力来开发使用微藻生产高产量 DHA 的方法,由此发现从马来西亚红树林区域的土壤中分离出的新型破囊壶菌类微藻含有高浓度的 DHA,并且当使用豆粉或纤维素类生物质作为营养源培养所述新型微藻时会产生含 DHA 的生物油,从而完成了本发明。

## 发明内容

[0009] 本发明的一个目的是提供生产高产量生物油的新型微藻菌株。

[0010] 本发明的另一目的是提供使用所述新型微藻菌株生产生物油的方法。

[0011] 为了实现上述目的,本发明提供具有生产生物油能力的破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP)。

[0012] 本发明还提供一种生产生物油的方法,所述方法包括如下步骤:(a) 培养破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP) 以产生生物油;及(b) 回收所产生的生物油。

[0013] 本发明还提供一种生产生物油的方法,所述方法包括如下步骤:(a) 在含豆粉的培养基中培养破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP) 以产生生物油;及(b) 回收所产生的生物油。

[0014] 本发明还提供一种生产生物油的方法,所述方法包括如下步骤:(a) 在含纤维素类生物质的培养基中培养破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP) 以产生生物油;及(b) 回收所产生的生物油。

[0015] 本发明的其它特征和实施方式从以下详细说明和所附权利要求书中将会更为显而易见。

## 附图说明

[0016] 图 1 为新型破囊壶菌类微藻 KRS101 的显微照片。

[0017] 图 2 显示了新型破囊壶菌类微藻 KRS101 的系统发育图。

[0018] 图 3 显示了新型破囊壶菌类微藻 KRS101 在 5L 发酵罐中分批培养的结果。

[0019] 图 4 显示了新型破囊壶菌类微藻 KRS101 在 5L 发酵罐中补料分批培养的结果。

[0020] 图 5 为显示通过新型破囊壶菌类微藻 KRS101 用纤维素类生物质作为营养源生产生物油及其用途的示意图。

[0021] 图 6 为显示新型破囊壶菌类微藻 KRS101 用纤维素类生物质作为营养源时增殖的图。

[0022] 图 7 为显示通过使用纤维素类生物质作为营养源培养新型破囊壶菌类微藻 KRS101 所生产的油和 DHA 的量的图。

[0023] 图 8 为显示使用纤维素类生物质作为营养源培养的新型破囊壶菌类微藻 KRS 101 培养物的羧甲基纤维素酶活性的图。

[0024] 图 9 为显示使用纤维素类生物质作为营养源培养的新型破囊壶菌类微藻 KRS 101 培养物的纤维二糖糖苷酶活性的图。

## 具体实施方式

[0025] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语均具有本发明所属领域普通技术人员通常理解相同含义。通常,本文所用的命名法是公知的并在本领域普遍使用。

[0026] 一方面,本发明涉及具有生产生物油能力的破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP)。

[0027] 本发明的破囊壶菌类微藻 KRS101 分离自马来西亚红树林区域的树叶/土壤样品,通过在 B1 培养基(在 1L 含 300mg/L 青霉素 G 和 500mg/L 硫酸链霉素的天然海水中的 1g/L 酵母提取物、1g/L 蛋白胨和 10g/L 琼脂的溶液)中培养所述样品来分离破囊壶菌微藻、分离所述培养物并分离形成破囊壶菌微藻典型特征性游动孢子的菌株而获得。

[0028] 对破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP) 进行生物学鉴定的 18SrRNA 测序结果显示所述微藻具有 SEQ ID NO:1 的 18S rRNA 核苷酸序列。

[0029] 在本发明中,由微藻 KRS101 生产的生物油可包含不饱和脂肪酸,所述不饱和脂肪酸可以是二十二碳六烯酸(DHA)。

[0030] 微藻 KRS101 中含有的二十二碳六烯酸(DHA)的含量占其中脂肪酸总含量的比例可以为 40% 或更高,优选为 45% 或更高,更优选为 49% 或更高。

[0031] 在本发明的一个实施例中,显示本发明的微藻菌株 KRS101 含有高浓度的高度不饱和脂肪酸,尤其是 DHA 含量达到总脂肪酸含量的 49.5%。

[0032] 在本发明的另一实施例中,在含多种浓度的葡萄糖作为单一碳源的基础培养基中培养本发明的微藻菌株 KRS101。结果,显示微藻细胞的生长在 60g/L 的葡萄糖浓度中为最高(细胞干重:9.09g/L),并且油含量为细胞干重的 45%,DHA 含量为总脂肪酸含量的 41.22%。

[0033] 在本发明的又一实施例中,在含多种浓度的酵母提取物作为单一氮源的基础培养基中培养本发明的微藻菌株 KRS101。结果,显示微藻细胞的生长随酵母提取物浓度的升高而变得更高,但油含量随酵母提取物浓度的降低而升高。此外,DHA 含量随酵母提取物浓度的降低而略微降低。检测了海水盐浓度的作用,结果显示微藻细胞的生长和油及 DHA 的含量随海水盐浓度的降低而升高。

[0034] 在本发明的又一实施例中,在含 60g/L 的果糖、阿拉伯糖、木糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘油或粗甘油代替葡萄糖作为碳源的培养基中培养本发明的微藻菌株 KRS101。结果,显示微藻细胞的生长略微降低但仍然可以生长,尤其是使用生物柴油废料粗甘油作为碳源与使用纯甘油相比显示出微藻细胞生长的增加。

[0035] 在本发明的又一实施例中,在含 10g/L 的玉米浆、牛肉膏、麦芽提取物、蛋白胨或胰蛋白胨代替酵母提取物作为有机氮源的培养基中培养本发明的微藻菌株 KRS 101。结果,显示微藻细胞的生长是可以进行的,尤其是使用玉米浆显示出与使用酵母提取物相似的微藻细胞生长。此外,使用含乙酸铵(2.34g/L)、硝酸铵(1.22g/L)、硫酸铵(2.0g/L)、硝酸钠(2.58g/L)或尿素(0.9g/L)的培养基检测了多种无机氮盐的作用,结果,显示微藻细胞的生长在含乙酸铵或尿素的培养基中为最高。同时,使用含乙酸钠(15.48g/L)、碳酸氢钠(15.86g/L)、碳酸钠(10.0g/L)、柠檬酸钠(27.8g/L)、硝酸钠(16.0g/L)和硫酸钠(13.4g/L)的培养基检测了非氮盐的作用,结果,显示 KRS101 菌株在所有培养基中均表现出良好的细胞生长。

[0036] 另一方面,本发明涉及一种生产生物油的方法,所述方法包括如下步骤:(a)培养破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP) 以产生生物油;及(b)回收所产生的生物油。

[0037] 在本发明中,培养可以是分批培养或补料分批培养。

[0038] 在本发明的一个实施例中,在含 60g/L 葡萄糖、10g/L 玉米浆、5g/L 乙酸铵、3g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 15g/L 海水盐的培养基中分批培养微藻菌株 KRS101。结果,显示所述菌株在培养 72 小时时完全消耗了葡萄糖,此时,细胞干重、油含量和 DHA 含量分别为 24.8g/L、31.2% 和 36.7%,并且油和 DHA 的产量分别为 7.8g/L 和 2.9g/L。同时,在如上相同条件下补料分批培养微藻菌株 KRS101,结果,显示最高细胞生长出现在培养 60 小时时,此时,细胞干重、油含量和 DHA 含量分别为 50.2g/L、43.5% 和 40.3%,并且油和 DHA 的产量分别为 21.9g/L 和 8.8g/L。

[0039] 又一方面,本发明涉及一种生产生物油的方法,所述方法包括如下步骤:(a)在含豆粉的培养基中培养破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP) 以产生生物油;及(b)回收所产生的生物油。

[0040] 在本发明中,可使用豆粉作为单一氮源。

[0041] 在本发明中,由 KRS101 菌株生产的生物油可以是不饱和脂肪酸,所述不饱和脂肪酸可以是二十二碳六烯酸(DHA)。

[0042] 此外,培养可以是补料分批培养或分批培养。

[0043] 在本发明的一个实施例中,微藻菌株 KRS101 在含豆粉作为氮源的培养基中显示出高细胞生长率,并且含 DHA 的生物油的生产率在所述培养基中也很高。

[0044] 又一方面,本发明涉及一种生产生物油的方法,所述方法包括如下步骤:(a)在含纤维素类生物质的培养基中培养破囊壶菌类微藻 KRS101 (KCTC11686BP)以产生生物油;及(b)回收所产生的生物油。

[0045] 在本发明中,培养基可包含纤维素类生物质作为单一碳源,所述纤维素类生物质可选自羧甲基纤维素、纤维二糖和棕榈油副产品。

[0046] 所述破囊壶菌类微藻可以是 KRS101 (KCTC11686BP)。

[0047] 此外,由破囊壶菌类微藻生产的生物油可含有不饱和脂肪酸,所述不饱和脂肪酸可以是二十二碳六烯酸(DHA)。

[0048] 在本发明中,培养可以是分批培养或补料分批培养。

[0049] 在本发明的一个实施例中,使用纤维素类生物质羧甲基纤维素、纤维二糖或棕榈油副产品作为碳源培养微藻菌株 KRS101,结果,显示 KRS101 菌株可以增殖。此外,使用改良的 Bligh-Dyer 方法测定油和 DHA 的含量,结果,显示在培养 72 小时时,当使用羧甲基纤维素时,油和 DHA 的产量分别为 0.3g/L 和 0.18g/L (60.7%TFA);当使用纤维二糖时,油和 DHA 的产量分别为 0.4g/L 和 0.24g/L (59.8%TFA)。当使用棕榈油副产品时,油和 DHA 的产量为 0.3g/L 和 0.16g/L (54.3%TFA)。

[0050] 在本发明的另一实施例中,检测了微藻 KRS101 培养液中被认为与利用纤维素类生物质相关的羧甲基纤维素酶和纤维二糖糖苷酶活性。结果,显示在微藻 KRS101 培养液中检测到了羧甲基纤维素酶和纤维二糖糖苷酶活性,尽管这些活性随纤维素类营养源的种类而变化。

[0051] 实施例

[0052] 在下文中,将通过实施例进一步详细描述本发明。这些实施例仅为说明目的而不应解释为限制本发明的范围,这对于本领域普通技术人员而言是显而易见的。

[0053] 实施例 1:分离和鉴定含 DHA 的新型油类微藻

[0054] 用 50ml 的 falcon 管在马来西亚的红树林区域收集树叶/土壤样品并悬浮于 10ml 盐水中,随后将悬浮液适当稀释并接种于 B1 培养基(在 1L 含 300mg/L 青霉素 G 和 500mg/L 硫酸链霉素的天然海水中的 1g/L 酵母提取物、1g/L 蛋白胍和 10g/L 琼脂的溶液)(Burja 等,2006)中用于分离破囊壶菌微藻。将培养基在 28°C 以 200rpm 温育 2-4 天,并将所获的菌落再次接种于 B1 培养基中。随后,用显微镜观察菌落,并分离 30 个菌落,这些菌落均形成了破囊壶菌微藻典型特征性游动孢子(见图 1)。

[0055] 将 30 个分离出的菌落在 50mL 海生菌肉汤(marine broth, Sigma-Aldrich)(250mL 三角瓶)中在 28°C 以 200rpm 培养 3 天,并随后收集细胞并在真空离心机中在 60°C 干燥 12 小时。在 3ml 的 5% 甲醇硫酸中悬浮干燥后的细胞并在 90°C 温育 1 小时,随后用 0.6mL 的己烷萃取所产生的脂肪酸酯并经气相色谱分析。

[0056] 分析结果显示在下文的表 1 中。如其中所示,微藻细胞含高浓度的高度不饱和脂肪酸,尤其是细胞中 DHA 含量达到总脂肪酸含量的 49.5%。此外,所分析的 30 个菌落均显示出相似的脂肪酸组成。

[0057] [表 1] 新型破囊壶菌类微藻 KRS101 的脂肪酸组成

[0058]

脂肪酸组成 (% TFA)	14:0	15:0	16:1	16:0	17:0	18:3	18:2	18:1	20:5	22:5(n6)	22:6	22:5(n3)
海生菌肉汤	-	17.39	-	8.89	3.1	-	0.93	-	2.18	8.12	49.59	0.86
基础培养基	2.73	14.09	0.43	24.60	2.72	0.26	-	0.91	0.48	10.00	39.49	0.35

[0059] 对于分离到的菌落的分子生物学鉴定,进行了 18S rRNA 测序。

[0060] 使用常规酚-氯仿方法从一个菌落中分离染色体 DNA,并使用用于扩增破囊壶菌微藻的 18S rRNA 基因的引物 5'-ATGAACATCAAAAA-3' (P1, SEQ ID NO:2) 和 5'-ATGAACATCAAAAA-3' (P2, SEQ ID NO:3) 通过 PCR 扩增其中的 18S rRNA 基因。具体而言,对于 PCR 扩增,制备含 EFTaq 聚合酶(Takara)(2.5U)、聚合酶缓冲液、dNTP(每种 1mM)、1 $\mu$ l 的各引物(100pmol)和 500ng 模板 DNA 的 PCR 反应溶液(50 $\mu$ l)并使用 PCR 系统(Takara, 日本)进行 PCR 反应 30 个循环,每一循环由 96°C 30 秒、43°C 1 分钟和 72°C 3 分钟组成。在 1% 的琼脂糖凝胶上对 PCR 产物进行电泳以确定具有期望大小的 DNA 片段得到了扩增,并使用 pGEM-TEasy 载体(Promega, USA)将其转化入大肠杆菌(E. coli)DH5 $\alpha$  中。从转化后重组的大肠杆菌细胞(Qiagen, 美国)中提取质粒 DNA 并用限制性内切酶 EcoRI 消化以确定具有所需大小的 DNA 片段得到了克隆,并对其测序(SEQ ID NO:1, GenBank 登录号 HM126528)。序列同源性分析结果显示该菌株为分别与 *Aurantiochytrium mangrovei* 和 *Aurantiochytrium* sp. BL1 具有 99.3% 和 98.9% 同源性的新型破囊壶菌类微藻菌株。由此,将该微藻菌株命名为“KRS101”并在 2010 年 4 月 22 日以登录号 KCTC11686BP 保藏于韩国生命工学研究院韩国典型培养物保藏中心(KCTC)。

[0061] 图 2 显示了新型破囊壶菌类微藻 KRS 101 的系统发育图。

**[0062] 实施例 2:新型破囊壶菌类微藻 KRS101 的细胞生长和所述微藻产含 DHA 油的能力的分析**

[0063] 在多种营养源条件下检测实施例 1 中分离的新型破囊壶菌类微藻 KRS 101 的细胞生长和所述微藻产含 DHA 油的能力。

[0064] 使用含 60g/L 的碳源葡萄糖、1g/L 的氮源酵母提取物和 6g/L 的人工海水盐的培养基作为基础培养基。将单一菌落在 15ml 的基础培养基中在 28℃ 以 120rpm 预培养 3 天, 随后将 1ml 的培养液接种至含多种浓度的碳源、氮源和海水盐的培养基中并在 28℃ 以 120rpm 培养 3 天。用 PBS 缓冲液(磷酸盐缓冲盐溶液, pH 7.2) 将经离心收集的细胞洗涤三次, 在 60℃ 干燥 12 小时, 并测定细胞干重(DCW)。

[0065] 使用改良的 Bligh-Dyer 方法(Burja 等, 2007) 分析含 DHA 油的含量。具体而言, 向 125mg 的干细胞中加入 6.25mL 氯仿、12.5mL 甲醇和 5mL 50mM  $K_2HPO_4$  缓冲液(pH 7.4), 之后在 28℃ 以 200rpm 温育 1 小时, 随后加入 6.25mL 氯仿和 6.25mL  $K_2HPO_4$  缓冲液, 将细胞溶液振荡约 30 次并将其静置 30 分钟, 使其分为水层和含油的有机溶剂层。小心地将氯仿层转移至已预先称重的铝皿中, 之后在 80℃ 干燥 30 分钟, 随后测定油重。总油含量用以下公式计算:

[0066] 总油含量 (%) = 油 (g) / 细胞干重 (100g) =  $(W_L - W_D) \times V_C \times 100 / V_P \times W_S$

[0067]  $W_L$ : 铝皿重量;

[0068]  $W_D$ : 铝皿 + 油脂的重量;

[0069]  $V_C$ : 氯仿总体积;

[0070]  $V_P$ : 转移至铝皿的氯仿体积;

[0071]  $W_S$ : 所用的细胞重量(细胞干重)。

[0072] 同时, 通过气相色谱测定油中的 DHA 含量。具体而言, 在 3ml 5% 的甲醇硫酸溶液中悬浮合适量的干细胞并在 90℃ 温育 1 小时以产生脂肪酸酯, 随后用 0.6ml 的己烷萃取并通过气相色谱分析。

[0073] 分析结果显示于上文表 1 中。如其中所示, 相比于在海生菌肉汤中培养菌株, 当在基础培养基中培养新型微藻菌株 KRS101 时, 脂肪酸组成略微变化, 但包括 DHA 的高度不饱和脂肪酸均以高浓度产生。

[0074] 在含多种浓度的葡萄糖作为单一碳源的基础培养基中培养新型微藻菌株 KRS101。结果, 如下文表 2 中可见, 该菌株在葡萄糖浓度为 60g/L 时显示出最高的细胞生长(细胞干重: 9.09g/L), 在该浓度下, 油含量为细胞干重的 45%, DHA 含量为总脂肪酸含量的 41.22%。

[0075] [表 2] 葡萄糖浓度对新型破囊壶菌类微藻 KRS101 的细胞生长和油及 DHA 含量的作用

[0076]

浓度 (g L <sup>-1</sup> )	细胞干重 (g L <sup>-1</sup> )	油含量 (%DCW)	DHA (%TFA)
5	4.49	8.50	44.08
20	8.22	35.85	40.13



40	7.38	36.75	41.19
60	9.09	45.00	41.22
100	5.57	28.10	38.76
160	6.19	27.45	40.57

[0077] 同时,在含多种浓度的酵母提取物作为单一氮源的基础培养基中培养新型微藻菌株 KRS101。结果,如下文表 3 中可见,细胞生长随酵母提取物浓度的升高而升高,而油含量随酵母提取物浓度的降低而升高,升高至最高细胞干重的 70%。另一方面,总脂肪酸中 DHA 的含量随酵母提取物浓度的降低而略微降低。

[0078] [表 3] 酵母提取物浓度对破囊壶菌类微藻 KRS101 的细胞生长和油及 DHA 含量的作用

[0079]

浓度 (g L <sup>-1</sup> )	细胞干重 (g L <sup>-1</sup> )	油含量 (%DCW)	DHA (%TFA)
2	6.28	70.00	32.66
4	6.50	53.25	35.15
6	6.12	51.90	39.55
8	7.68	48.00	38.74

[0080] 随后,检测了海水盐浓度的作用。结果,如下文表 4 中可见,细胞生长和油及 DHA 含量随海水盐浓度的降低而降低。

[0081] [表 4] 海水盐浓度对破囊壶菌类微藻 KRS101 的细胞生长和油及 DHA 含量的作用

[0082]

浓度 (g L <sup>-1</sup> )	细胞干重 (g L <sup>-1</sup> )	油含量 (%DCW)	DHA (%TFA)
2	7.62	50.80	41.87
6	7.75	45.00	37.77
15	7.87	40.35	35.06
30	6.19	14.65	34.94
40	6.37	14.20	36.17
50	7.27	13.20	35.25

[0083] 实施例 3:破囊壶菌类微藻 KRS101 利用各种营养源的能力

[0084] 检测了破囊壶菌类微藻 KRS101 利用各种营养源的能力。具体而言,在含多种碳

源、氮源或非氯盐的基础培养基中以与上述相同的方式培养微藻菌株 KRS101, 并检测细胞生长和油及 DHA 的含量。

[0085] 在含 60g/L 的果糖、阿拉伯糖、木糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘油或粗甘油代替葡萄糖作为碳源的培养基中培养微藻菌株 KRS101。结果, 如表 5 中可见, 尽管与在含葡萄糖的培养基中相比, 微藻菌株 KRS101 的细胞生长有所降低, 但其在所述培养基中仍旧可以生长。尤其是, 使用生物柴油废料粗甘油作为碳源比使用纯甘油显示出更高的细胞生长。

[0086] [表 5] 破囊壶菌类微藻 KRS101 使用多种碳源的细胞生长和含 DHA 油的产生

[0087]

碳源	细胞干重 (g/L <sup>-1</sup> )	油含量 (%DCW)	DHA (%TFA)
果糖	10.15	15.30	37.25
阿拉伯糖	3.00	8.90	43.88
木糖	3.38	8.50	43.90
乳糖	4.41	9.00	46.55
麦芽糖	4.15	6.50	52.36
蔗糖	4.27	21.80	48.25
纯甘油	5.60	9.40	37.56
粗甘油	7.32	8.50	43.38

[0088] 另外, 在含 10g/L 的玉米浆、牛肉膏、麦芽提取物、蛋白胨或胰蛋白胨代替酵母提取物作为有机氮源的培养基中培养微藻菌株 KRS101。结果, 如下文表 6 中可见, 新型微藻菌株 KRS101 的细胞生长是在所述培养基中进行的, 尤其是在玉米浆中的细胞生长与在酵母提取物中的细胞生长是类似的。此外, 使用含乙酸铵 (2.34g/L)、硝酸铵 (1.22g/L)、硫酸铵 (2.0g/L)、硝酸钠 (2.58g/L) 或尿素 (0.9g/L) 的培养基检测了多种无机氮盐的作用。结果, 如下文表 7 中可见, 在乙酸铵和尿素中细胞生长为最高。

[0089] [表 6] 破囊壶菌类微藻 KRS 101 使用多种有机氮源的细胞生长和含 DHA 油的产生

[0090]

有机氮源	细胞干重 (g/L <sup>-1</sup> )	油含量 (%DCW)	DHA (%TFA)
玉米浆	9.44	15.30	37.25
牛肉膏	3.00	8.90	43.88
麦芽提取物	3.38	8.50	43.90
蛋白胨	4.41	9.00	46.55

胰蛋白胨	7.32	8.50	43.38
------	------	------	-------

[0091] [表7] 破囊壶菌类微藻 KRS 101 使用多种无机氮源的细胞生长和含 DHA 油的产生

[0092]

无机氮源	细胞干重 (g/L <sup>-1</sup> )	油含量 (%DCW)	DHA (%TFA)
乙酸铵	9.52	55.40	43.00
硝酸铵	5.99	32.10	47.06
硫酸铵	6.04	19.80	49.34
硝酸钠	6.00	63.50	28.25
尿素	10.28	57.70	29.78

[0093] 同时,使用含乙酸钠(15.48g/L)、碳酸氢钠(15.86g/L)、碳酸钠(10.0g/L)、柠檬酸钠(27.8g/L)、硝酸钠(16.0g/L)或硫酸钠(13.4g/L)的培养基检测了非氯盐的作用。结果,如下文表8中可见,新型微藻菌株 KRS101 在所有培养基中均显示出良好的细胞生长。

[0094] [表8] 新型破囊壶菌类微藻 KRS 101 使用多种非氯盐的细胞生长和含 DHA 油的产生

[0095]

非氯盐	细胞干重 (g/L <sup>-1</sup> )	油含量 (%DCW)	DHA (%TFA)
乙酸钠	6.70	20.30	45.65
碳酸氢钠	6.29	4.30	4.23
碳酸钠	5.15	5.74	7.21
柠檬酸钠	3.20	15.80	39.19
硝酸钠	7.43	29.00	28.25
硫酸钠	7.53	21.30	40.30

[0096] 实施例4:通过在发酵罐中培养新型破囊壶菌类微藻 KRS101 来生产含 DHA 的生物油

[0097] 根据上述的营养需求的分析结果,选择了最适的培养基组成,并用所选培养基在 5L 发酵罐中培养该新型微藻菌株 KRS101。

[0098] 具体而言,在含所选培养基组成(60g/L 葡萄糖、10g/L 玉米浆、5g/L 乙酸铵、3g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 15g/L 海水盐)的培养基中预培养菌株 KRS101,将预培养后的细胞转移至 3L 的相同培养基中(5L 发酵罐),并在 28℃、300rpm、3vvm 和 pH 7 的条件下进行分批培养,同时以 12 小时间隔收集细胞并检测其生长状况和油及 DHA 的含量。

[0099] 结果,如图 3 中可见,培养基中的葡萄糖在培养 72 小时完全消耗,此时,细胞干重和油及 DHA 的含量分别为 24.8g/L、31.2% 和 36.7%,油和 DHA 的产量分别为 7.8g/L 和 2.9g/L。

[0100] 同时,在如上相同的条件下进行新型微藻菌株 KRS101 的补料分批培养。结果,如图 4 中可见,最高细胞生长出现在培养 60 小时,此时,细胞干重和油及 DHA 的含量分别为 50.2g/L、43.5% 和 40.3%,油和 DHA 的产量分别为 21.9g/L 和 8.8g/L。

[0101] 实施例 5:在含豆粉的培养基中培养新型破囊壶菌类微藻 KRS101

[0102] 豆作为植物蛋白和脂肪来源,已被用作诸如豆瓣酱、豆腐、酱油等食品的原料。近来,发现豆富含具有包括抗癌效果在内的多种生理效应的异黄酮,因此它已作为健康功能性食物而受到大量关注。此外,尽管豆具有高营养含量,但可通过大规模栽培来大量生产,因此其生产成本低。

[0103] 为了检测具有低生产成本的豆粉是否可用作培养新型微藻菌株 KRS101 的营养源,使用含多种浓度豆粉的培养基(60g/L 葡萄糖、5g/L 玉米浆固体、5g/L 乙酸铵、3g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 15g/L 人工海水盐)培养新型微藻菌株 KRS101。

[0104] 具体而言,将所述菌株的单一菌落在 15ml 的培养基(60g/L 葡萄糖、5g/L 玉米浆固体、5g/L 乙酸铵、3g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 15g/L 人工海水盐)中在 28°C 以 120rpm 预培养 3 天,并将 1ml 的培养液接种至含多种浓度豆粉(5g/L、10g/L 和 20g/L)的培养基中并在 28°C 以 120rpm 培养 3 天。随后,收集细胞并分析其生长和油及 DHA 的含量。分析结果显示于下文表 9 中。另外,未接种微藻的对照组的分析结果显示于下文表 10 中。

[0105] [表 9] 在含豆粉的培养基中培养的新型破囊壶菌类微藻 KRS101 的培养产物分析结果

[0106]

豆粉(g/L)	细胞干重 ( $\text{g L}^{-1}$ )	油含量 (%CW)	脂肪酸组成(% TFA)									
			14:0	15:0	16:0	18:0	18:1	18:2	20:5	22:6 (n6)	22:6 (n3)	22:5 (n3)
0	29.49	22.66	3.75	0.90	44.12	0.76	nd	0.33	1.10	6.17	32.38	1.54
5	31.21	24.94	3.74	0.90	42.12	1.36	4.97	6.25	1.01	5.76	29.83	1.48
10	35.28	25.32	3.58	0.83	41.37	2.04	7.77	9.43	1.18	4.73	26.61	nd
20	41.24	27.22	2.89	0.63	37.72	2.86	11.33	13.47	1.06	3.83	19.44	nd

[0107] 20:5, EPA ;22:6 (n6), DPA ;22:6 (n3), DHA ;22:5 (n3), DPA。nd, 未检测到。

[0108] [表 10] 未接种微藻的豆粉基础培养基的组成分析结果

[0109]

豆粉 (g/L)	细胞干 重 (g L <sup>-1</sup> )	油含量(% CW)	脂肪酸组成 (% TFA)									
			14:0	15:0	16:0	18:0	18:1	18:2	20:5	22:6 (n6)	22:6 (n3)	22:5 (n3)
5	2.82	25.10	nd	nd	11.20	4.04	29.85	54.25	nd	nd	nd	nd
10	5.35	24.76	nd	nd	11.50	3.76	28.66	55.28	nd	nd	nd	nd
20	12.70	24.16	nd	nd	12:08	3.60	25.21	27.60	nd	nd	nd	nd

[0110] 20:5, EPA ;22:6 (n6), DPA ;22:6 (n3), DHA ;22:5 (n3), DPA。nd, 未检测到。

[0111] 基于上述结果, 将新型微藻菌株 KRS101 在用豆粉代替碳源或氮源的含豆粉培养基中培养。

[0112] 具体而言, 为了检测豆粉是否可用作碳源, 在含多种浓度豆粉(5g/L、10g/L 和 20g/L)的无葡萄糖(碳源)培养基中以与上述相同的方式培养新型微藻菌株 KRS101。随后, 收集细胞并分析其生长状况和油及 DHA 的含量。

[0113] 结果, 如下文表 11 中可见, 新型微藻菌株 KRS101 的细胞生长明显降低, 说明豆粉不适合作为碳源。

[0114] 同时, 为了检测豆粉是否可用作有机氮源, 在含多种浓度(5g/L、10g/L 和 20g/L)的无玉米浆固体(有机氮源)培养基中以与上述相同的方式培养新型微藻菌株 KRS101。随后, 收集细胞并分析其生长和油及 DHA 的含量。

[0115] 由此, 如下文表 12 中可见, 新型微藻菌株 KRS101 显示出非常高的细胞生长, 说明豆粉可用作有效氮源。表 12 中的 DHA 含量以总脂肪酸的 DHA 含量(%) 表示。由于豆粉含量升高, 豆粉中非 DHA 的脂肪酸浓度也升高, 因此总脂肪酸的 DHA 含量(%) 逐渐降低。

[0116] [表 11] 在含豆粉代替葡萄糖作为碳源的培养基中培养的新型破囊壶菌类微藻 KRS101 的培养产物分析结果

[0117]

豆粉 (g/L)	细胞干 重 (g L <sup>-1</sup> )	油含量 (%DCW)	脂肪酸组成 (% TFA)									
			14:0	15:0	16:0	18:0	18:1	18:2	20:5	22:6 (n6)	22:6 (n3)	22:5 (n3)
0	6.20	3.96	0.94	1.21	18.32	8.36	4.64	1.47	2.54	11.44	47.34	2.41
5	8.24	3.94	3.74	0.56	16.72	23.75	20.59	4.53	1.13	5.80	21.46	1.16
10	10.34	12.59	nd	0.36	15.56	22.66	21.19	7.91	1.36	5.27	18.58	1.24
20	16.54	6.81	nd	nd	16.36	23.61	22.04	6.17	1.74	4.84	18.70	4.28

[0118] 20:5, EPA ;22:6 (n6), DPA ;22:6 (n3), DHA ;22:5 (n3), DPA。nd, 未检测到。

[0119] [表 12] 在含豆粉作为氮源的培养基中培养的新型破囊壶菌类微藻 KRS101 的培养产物分析结果

[0120]

豆粉 (g/L)	细胞干 重 (g L <sup>-1</sup> )	油含量 (% CW)	脂肪酸组成 (% TFA)									
			14:0	15:0	16:0	18:0	18:1	18:2	20:5	22:6 (n6)	22:6 (n3)	22:5 (n3)
0	2.57	6.71	1.30	4.04	31.51	nd	nd	1.40	3.24	10.92	44.86	1.39
5	29.80	27.21	2.01	0.46	35.35	7.76	6.83	1.76	1.42	6.35	30.68	1.16
10	32.02	32.26	3.09	0.64	42.07	9.95	8.16	2.66	0.94	4.92	24.03	nd
20	42.99	35.20	2.48	nd	34.02	9.55	7.80	2.88	0.72	2.94	15.79	nd

[0121] 20:5, EPA ;22:6 (n6), DPA ;22:6 (n3), DHA ;22:5 (n3), DPA。nd, 未检测到。

[0122] 实施例 6 :使用纤维素类物质作为营养源培养新型破囊壶菌类微藻 KRS101

[0123] 保证微生物发酵油作为生物柴油原料的商业竞争力的最重要因素是使用工业废料、废料资源和剩余生物质作为营养源,并最终使用丰富的不可食用的纤维素类物质(见图 5)。

[0124] 因此,为了检测纤维素类物质是否可用作培养新型微藻菌株 KRS101 的营养源,将所述菌株的单一菌落接种到含 60g/L 碳源葡萄糖、1g/L 氮源酵母提取物和 6g/L 人工海水盐的基础培养基中并在 28°C 以 120rpm 预培养 3 天。随后,将 1ml 的预培养液分别接种到含 0.5% (w/v) 的羧甲基纤维素(CMC)代替葡萄糖作为碳源的基础培养基、含 0.5% (w/v) 的纤维二糖作为碳源的基础培养基和含 0.5% (w/v) 的棕榈油副产品(空壳棕榈果实束(empty fruit bunch, EFB))的基础培养基中,并 28°C 以 120rpm 培养,同时通过测定 600nm 处吸光度(光密度(OD))分析细胞生长。

[0125] 在将棕榈油副产品用作工业可用的纤维素类物质资源的情况下,将棕榈油副产品粉碎至约 1-2mm 大小,在 0.5M NaOH 溶液中浸泡 4 小时,在 121°C 和 15psi 高压灭菌 15 分钟,用水洗涤以去除 NaOH 并干燥。将由此预处理后的棕榈油副产品用于制备培养基。

[0126] 结果,如图 6 中可见,使用羧甲基纤维素、纤维二糖和棕榈油副产品作为营养源能够使新型微藻菌株 KRS101 增殖。此外,如图 7 中可见,在培养 72 小时时,当使用羧甲基纤维素时油和 DHA 的产量分别为 0.3g/L 和 0.18g/L(60.7%TFA),当用纤维二糖时油和 DHA 的产量分别为 0.4g/L 和 0.24g/L(59.8%TFA)。当用棕榈油副产品时,油和 DHA 的产量分别为 0.3g/L 和 0.16g/L (54.3%TFA)。

[0127] 已知破囊壶菌家族的微藻不具有纤维素酶活性(Taoka 等, Biosci Biotechnol Biochem., 73:180, 2009),但近来发现非 Aurantiochytrium sp. 的破囊壶菌微藻(Aplanochytrium、Botryochytrium、Oblongichytrium、Parietichytrium、裂殖壶菌属(Schizochytrium)、Sicyoidochytrium、破囊壶菌属(Thraustochytrium)和 Ulkenia (吾肯氏壶菌属))具有羧甲基纤维素酶活性(Nagano 等, Mar Biotechnol, 2010)。

[0128] 因此,分析了新型微藻菌株 KRS101 中被认为与纤维素类物质利用相关的纤维素酶(羧甲基纤维素酶和纤维二糖糖苷酶)的活性。

[0129] 为了检测羧甲基纤维素酶活性,将 0.2ml 的样品(细胞裂解物或培养上清液)与 0.8ml 含 1%(w/v)羧甲基纤维素的 10mM Tris-HCl 缓冲液(pH6.5)混合,并将混合物在 60°C 温育 2 小时。使用 DNS (3,5-二硝基水杨酸)方法测定释放出的还原糖的浓度,将一个酶活

性单位定义为每 mg 蛋白质的活性。

[0130] 结果,如图 8 中可见,在新型微藻菌株 KRS101 的培养液中检测到了羧甲基纤维素酶活性,尽管羧甲基纤维素酶活性随纤维素类营养源的种类而变化。此外,使用羧甲基纤维素作为底物显示出最高的酶活性。

[0131] 为了检测纤维二糖糖苷酶的活性,将 0.2ml 的样品(细胞裂解物或培养上清液)与含纤维二糖(15mM)的 50mM 柠檬酸盐缓冲液(pH 4.8)混合,并将混合物在 60°C 温育 2 小时。随后,使用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)方法测定释放出的还原糖的浓度,将一个酶活性单位定义为每 mg 蛋白质的活性。

[0132] 结果,如图 9 中可见,在微藻菌株 KRS101 的培养液中检测到了纤维二糖糖苷酶活性,尽管纤维二糖糖苷酶活性随纤维素类营养源的种类而变化。此外,使用棕榈油副产品作为底物显示出最高的酶活性。

[0133] 微生物保藏

[0134] 保藏机构:韩国生命工学研究院;

[0135] 登录号:KCTC11686BP;

[0136] 保藏日期:2010 年 4 月 22 日。

[0137] 尽管已通过具体特征详细描述了本发明,但对于本领域技术人员显而易见的是,本说明书仅为优选的实施方式而不限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围将由所附权利要求及其等同项限定。

[0138] 工业实用性

[0139] 如上文描述,当在含葡萄糖培养基中培养本发明的微藻时,其在细胞中以高比例积累生物油,并因此可生产高产量的生物油。此外,所述微藻可使用豆粉作为氮源生产生物油,并且通过用可食用豆粉作为培养基培养所获的产品可用作生产食品和饲料的原料。本发明的微藻还可使用非食物性纤维素类生物质作为碳源生产生物油。此外,使用非食物性纤维素类生物质用于生产生物油可以克服包括食物资源供应不稳定及原料成本增加在内限制生物油开发的因素,并可以提高微生物发酵油的商业竞争力。序列表的自由内容

[0140] 已附电子文档。

[0141] 申请人韩国生命工学研究院 国际申请号

[0142] 文档参照号 PP-B0961

[0143] 所保藏的微生物或其它生物学物质的著录项目

[0144] (专利协作条约规则第 33 条第 2 款)

[0145]

A 下述事项涉及说明书 19 页 165 段所记载的保藏微生物或其它生物学物质	
B 保藏物质的确认 <span style="float: right;">其它追加保藏物质另行记载 <input type="checkbox"/></span>	
保藏机构名称 KCTC 韩国典型培养物保藏中心	
保藏机构地址（包括邮政编码和国家名称） 韩国 大田广域市 305-333 儒城区鱼隐洞 52	
保藏日期 2010 年 4 月 22 日	保藏号 KCTC 11686BP
C 追加著录项目（无记载内容则以空白栏提出） <span style="float: right;">其它追加页 续 <input type="checkbox"/></span>	
D 著录项目所指定的国家（著录项目并非针对所有指定国的情况）	
E 著录项目的另行提出（无记载内容则以空白栏提出）	
下述著录项目是后续向国际局提出的项目（应当限定著录项目的一般性质）	

[0146]

受理局使用栏	国际局使用栏
<input type="checkbox"/> 本页已与国际申请同时被受理	<input type="checkbox"/> 本页已与国际申请同时被受理
负责人	负责人

[0147] PCT/RO/134 表（1998 年 7 月；2004 年 1 月重印）。



[0001]

## 序列表

- <110> 韩国生命工学研究院
- <120> 新型脂肪油微藻KRS101及用其生产生物油的方法
- <130> PP-B0961
- <150> KR10-2010-0041942  
<151> 2010-05-04
- <150> KR10-2010-0041944  
<151> 2010-05-04
- <150> KR10-2010-0117373  
<151> 2010-11-24
- <160> 3
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1  
<211> 1779  
<212> DNA  
<213> 破囊壶菌KRS101
- <400> 1  
tacciggttg atccigccag tagtcataig ctcgctcaaa agattaagcc atgcatgigt 60  
aagtataagc gattgtactg tgagactgag aacggctcat tatatcagta ataatttctt 120  
cggtagtttc ttttatatgg atacctgcag taattctgga aataatacat gctgtaagag 180  
ccctglatgg ggcctgcactt attagattga agccgatttt attggtgaat catgalaatt 240  
gagcagattg acatTTTTgt cgatgaatcg tttgagtttc tgcccatca gttgctgacg 300  
gtagtgattt ggactacggt gactataacg ggtgacggag agttaggget cgactccgga 360  
gagggagcct gagagacggc taccatatec aaggatagca gcagggcgt aaattacca 420  
ctgtggactc cagcaggtag tgacgagaaa tatcgatgag aagcgtgtat gcgttttget 480  
atcggaatga gagcaatgta aaacctcat cgaggatcaa ctggagggca agtctggtgc 540  
cagcagccgc ggtaattcca gctccagaag catatgctaa agttgttgca gttaaaaagc 600  
tcgtagttag atttctgca tggcgaccg gtgctttccc tgaatggga ttgattgtct 660  
ggttgctt ggccatcttt ctcattgtgt tattggtatg agatcttca ctgtaatcaa 720  
agcagagtgt tccaagcagg tcgtatgacc ggtatgltta ttatgggatg ataagatagg 780  
acttggtgct tattttgttg gtttgacgc ctgagtaatg gttaatagga acagttgggg 840  
gtattctgat ttaggagcta gaggtgaaat tcttgattt ccgaaagacg aactagagcg 900

[0002]

aaggcattta ccaageatgt tticattaat caagaacgaa agtcigggga tgaagatga 960  
ttagatacca tegtagteta gaccgtaaac gatgccgact tgcgattggt gggtagctta 1020  
ttaatgggcc tcagcagcag cacatgagaa atcaaagtct ttgggttccg gggggagtat 1080  
ggtcgcaagg ctgaaactta aaggaattga cggaagggea ccaccaggag tggagcctgc 1140  
ggcttaatftt gactcaacac gggaaaactt accaggtcca gacataggtta ggattgacag 1200  
atlgagagct ctitcatgat tetatgggtg gtggtagcatg gccgttetta gttggiggag 1260  
tgatttgtct ggtaatttc gttaacgaac gagacctcgg cctactaaat agtgcgtggt 1320  
atggcaacat agtaagtttt taacttetta gagggacatg tccggtttac gggcaggaag 1380  
ttcgaggcaa taacaggctct gtgatgcct tagatgttct ggccgcacg cgcgtacac 1440  
tgatgggttc atcgggtttt aattctgatt ttgggaattg agtgcttggt cggaaggcct 1500  
ggctaalctt tggaacgctc atcgtgcigg ggctagattt ttgcaattat taatctccaa 1560  
cgaggaattc ctagtaaacg caagcatca gcttgcaattg aatacgtccc tgccctttgt 1620  
acacaccgcc cgtcgcacct accgattgaa cggtcctgatg aaacctggg atgtttctgt 1680  
ttggattaat tttggacag aggcagaact cgggtgaatc ttattgttta gaggaagggtg 1740  
aagtcgtaac aaggtttccg taggtgaacc tgcggaagg 1779

<210> 2  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 引物

<400> 2  
atgaacatca aaaa 14

<210> 3  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 引物

<400> 3  
atgaacatca aaaa 14

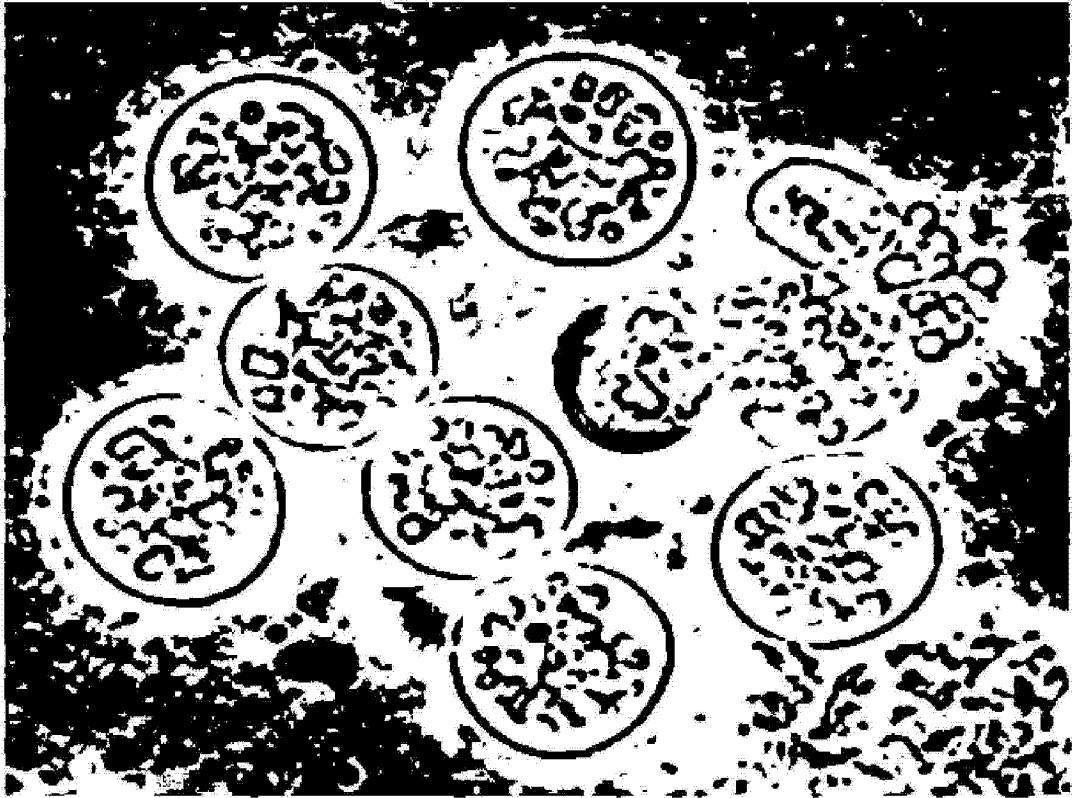


图 1

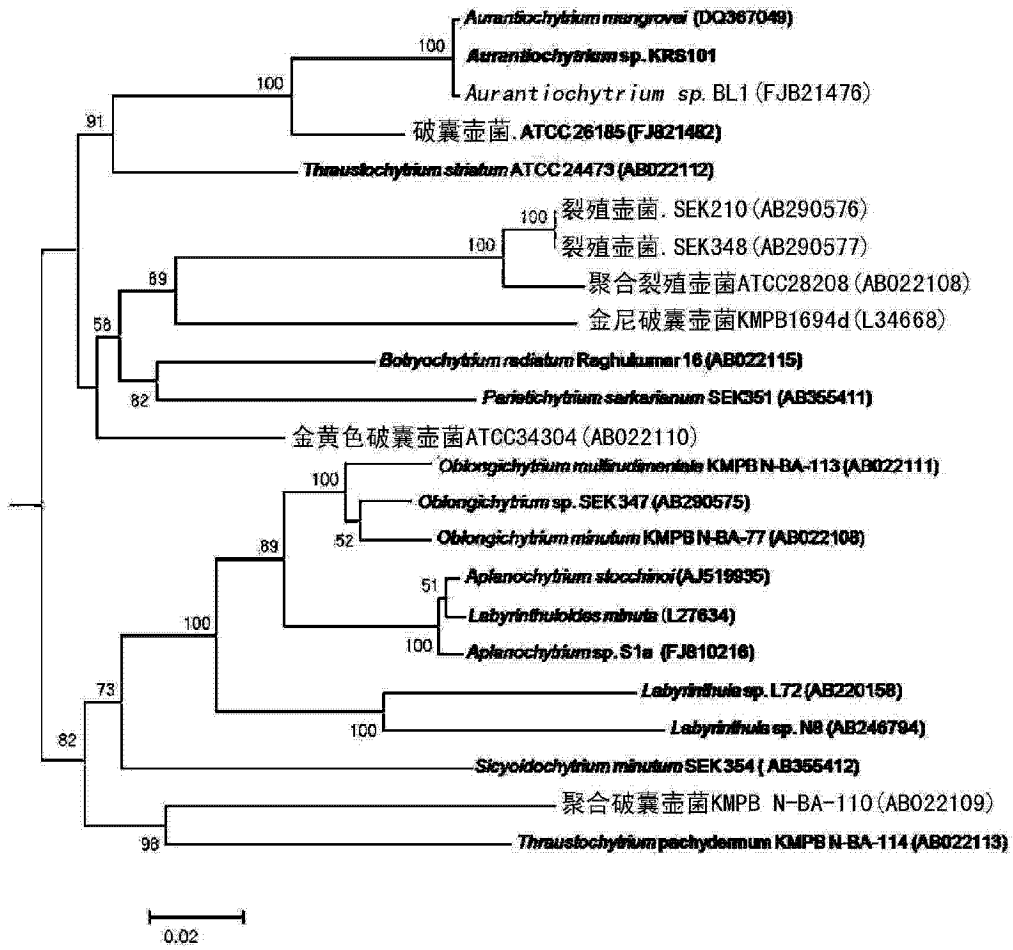


图 2

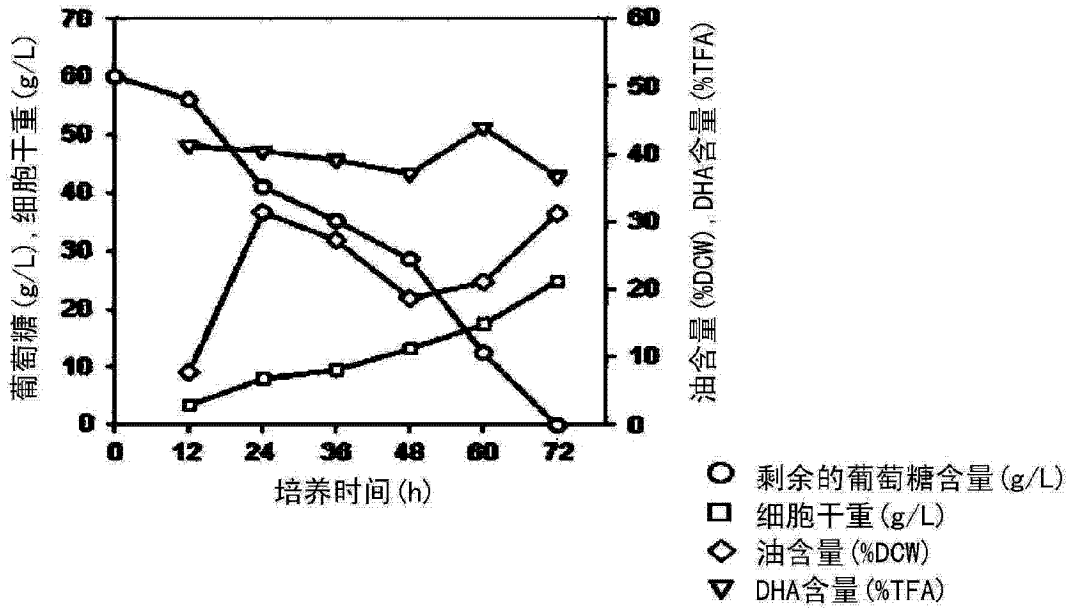


图 3

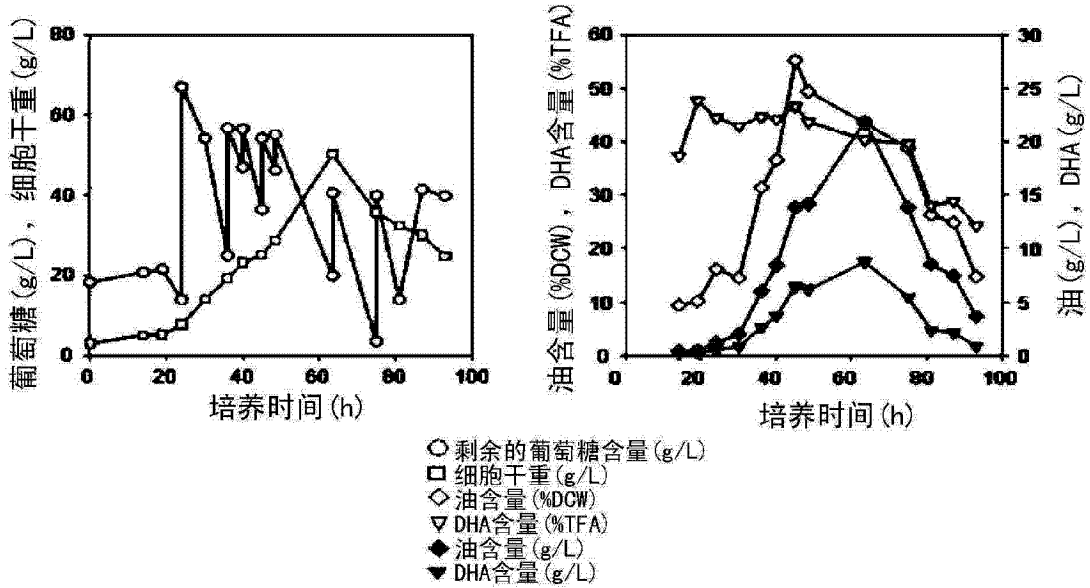


图 4

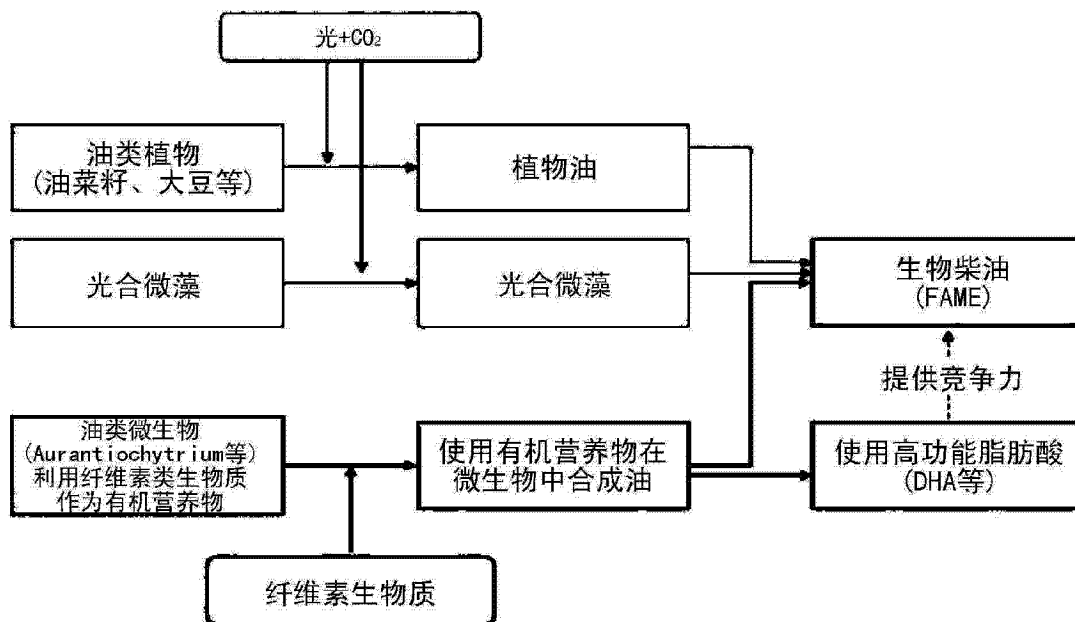


图 5

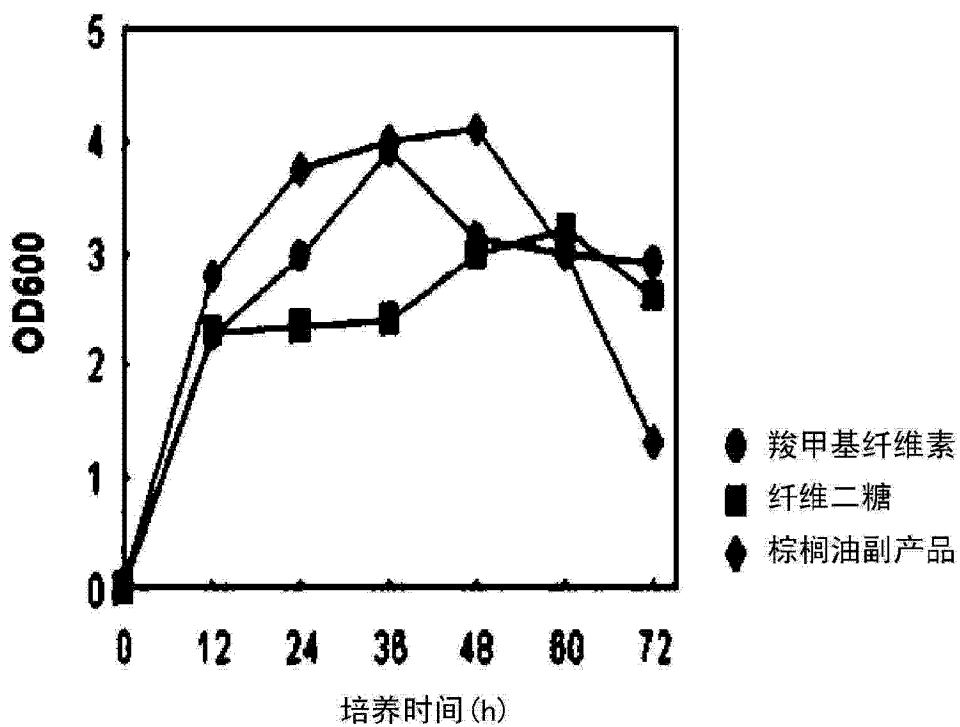


图 6

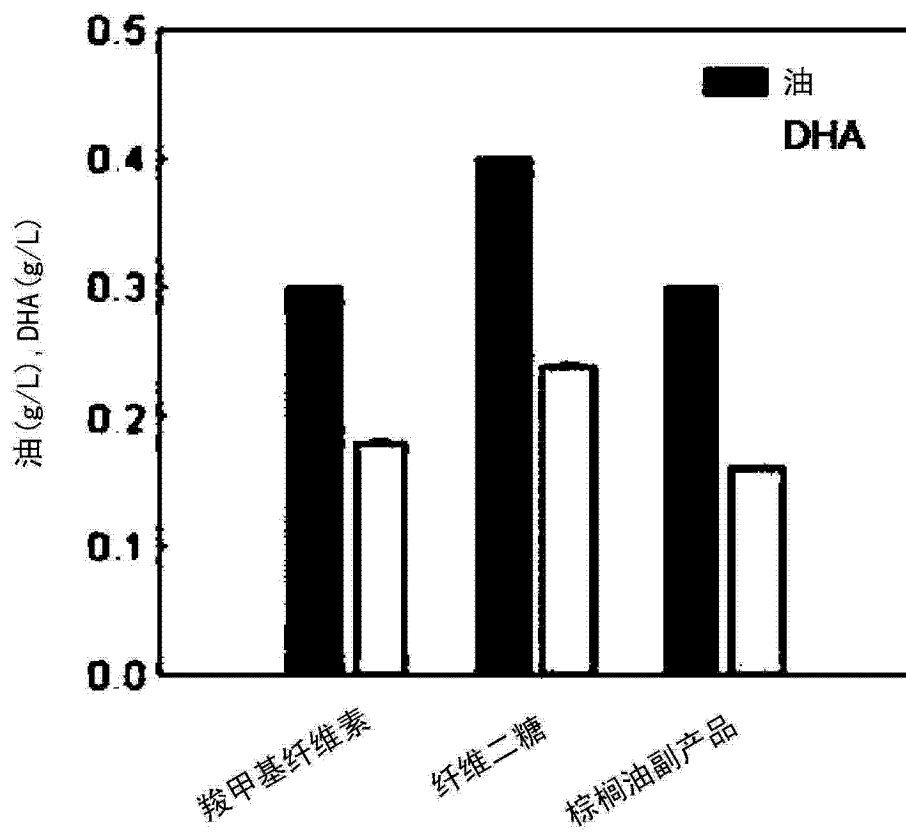


图 7

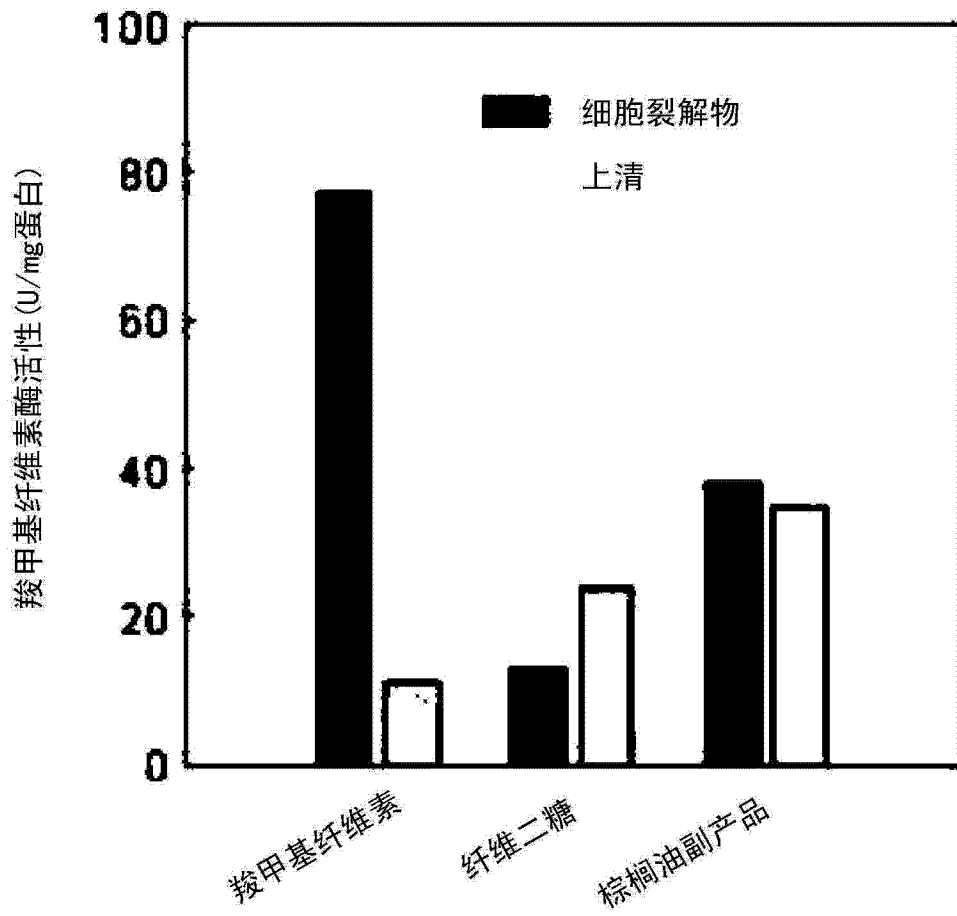


图 8



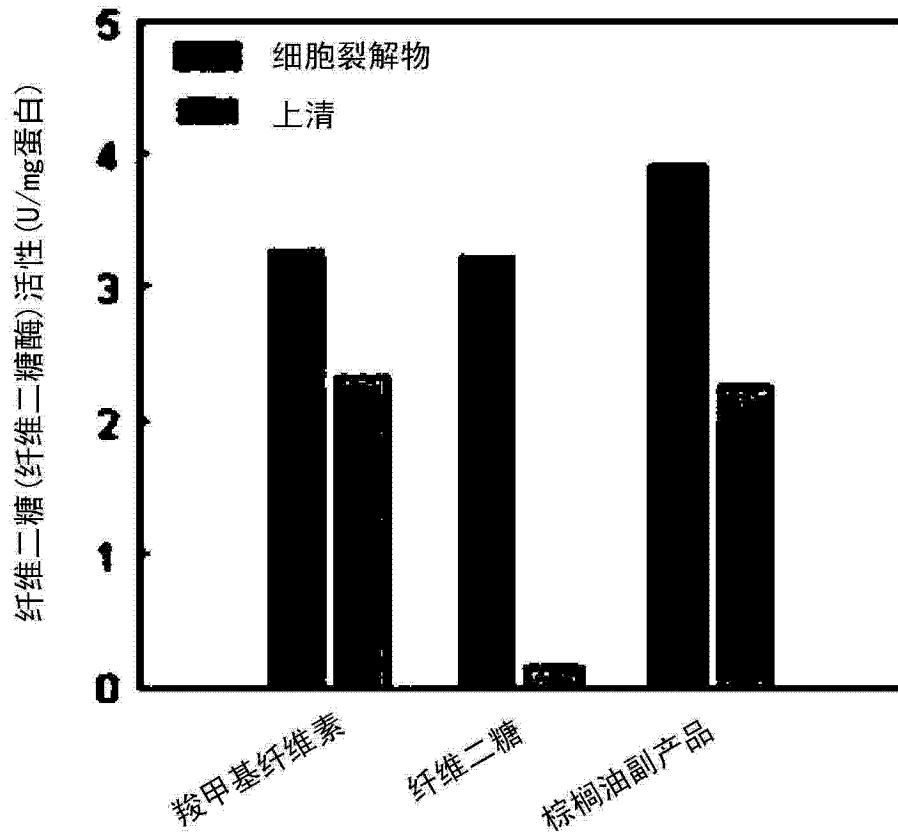


图 9