

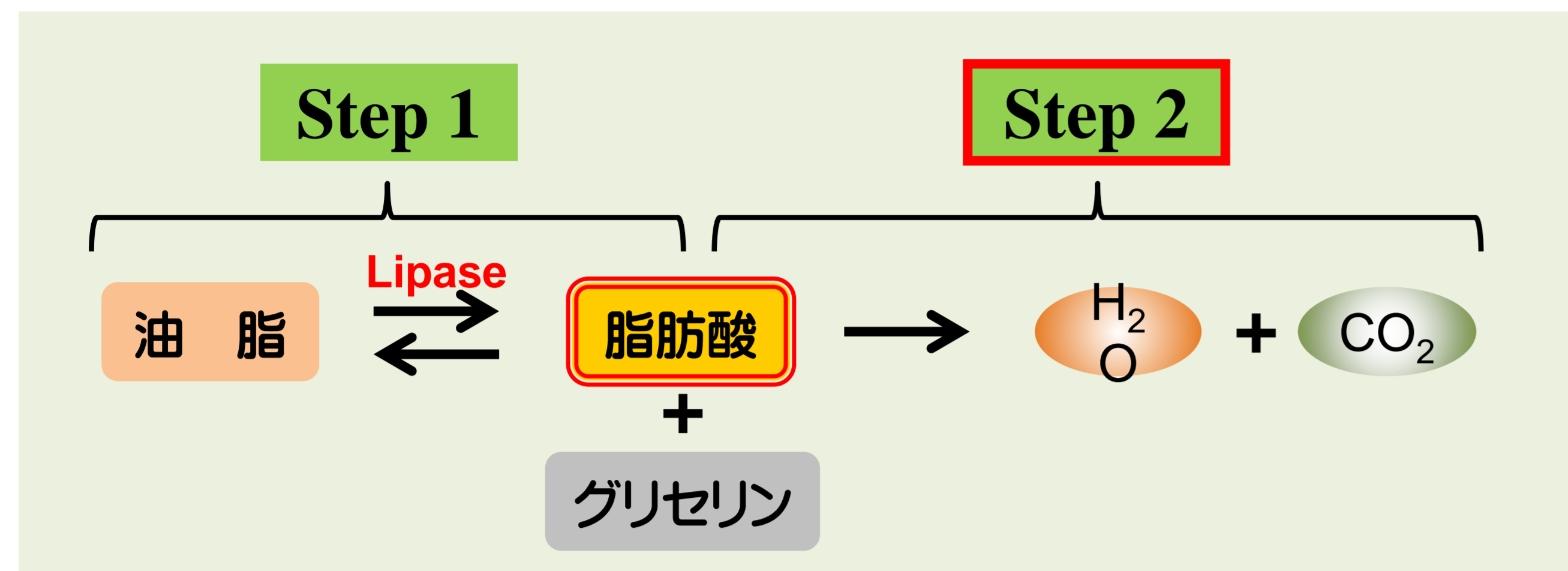
高濃度脂肪酸を効率的に分解する酵母の単離と挙動解析法の検討

Isolation of high concentration fatty acids -degrading yeast and construction of behavior analysis

株式会社MKバイオ 福岡県小郡市三沢2964-7 TEL 0942-75-0777

1) 背景

○食品加工工場や飲食店では大量の油脂が排出されるが、排水管を閉塞させたり、悪臭を発生させたりするため、その処理方法が問題となっている。
○油脂分解により副成する脂肪酸も同様の問題を引き起こすため、同時に積極的に分解する必要がある。

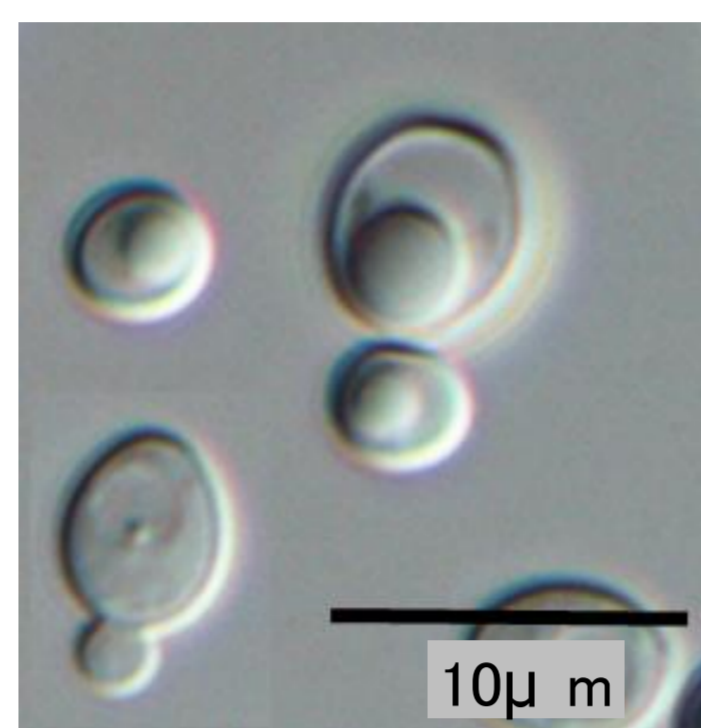
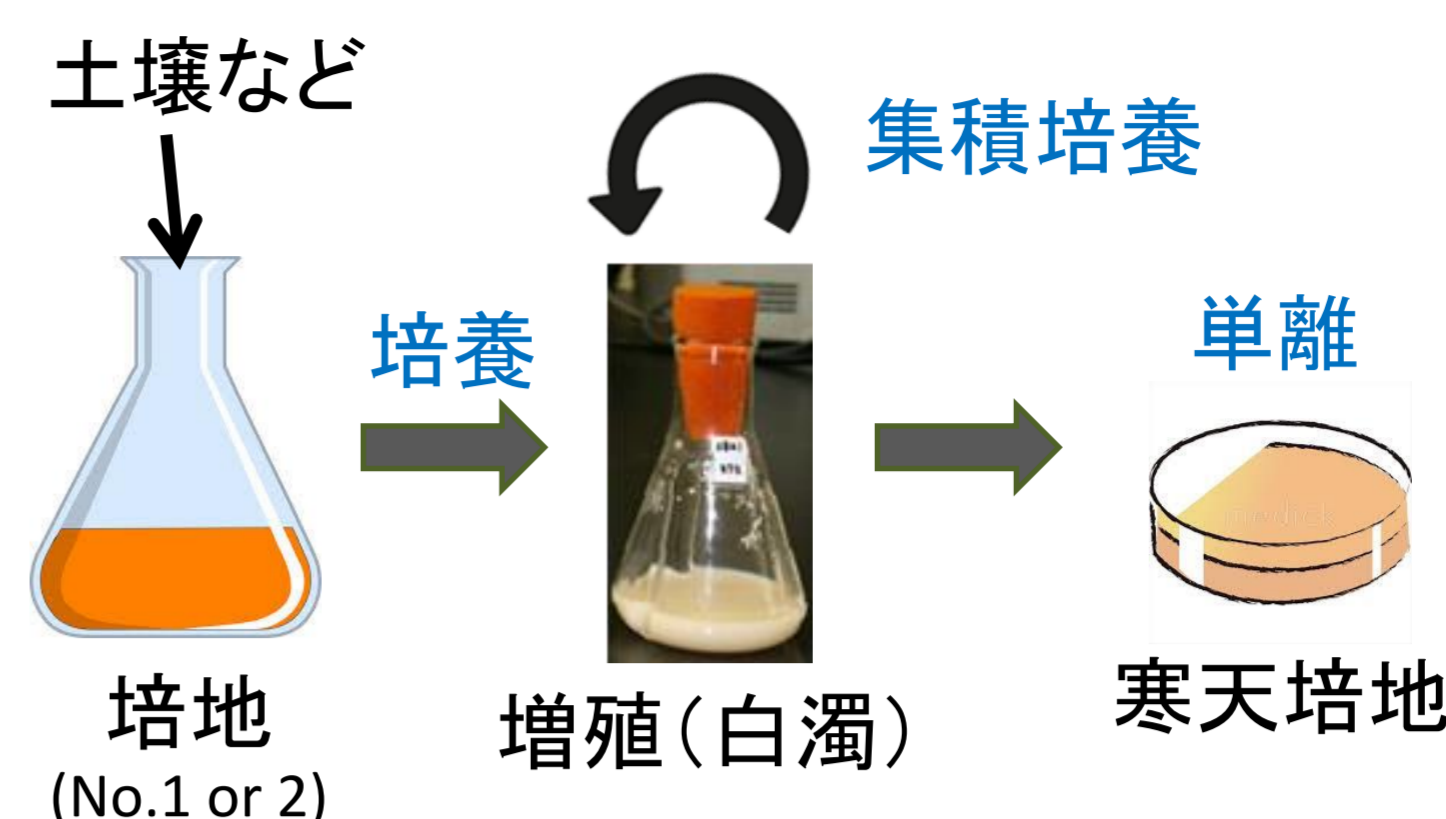


油脂の微生物分解において高濃度脂肪酸生成により発生する問題点

1. 油脂分解反応が逆に向かう
2. 溶液が酸性化する
3. 脂肪酸が殺菌作用を示す

2) 5%オレイン酸分解菌のスクリーニング

【方法】
培地
No.1 無機塩培地
No.2 栄養培地
pH5.0
オレイン酸5%



HFA40-c株の光学顕微鏡写真

オレイン酸分解試験後に薄層クロマトで油脂類を検出することにより候補株を選抜
福岡県内のツバキの木の下の土壌より酸性条件下、オレイン酸の殺菌作用を受けずに高い分解能を示す酵母(HFA40-c株)を取得

26S rDNA-D1/D2配列、MALDIにより同定

同定結果: *Candida orthopsilosis*

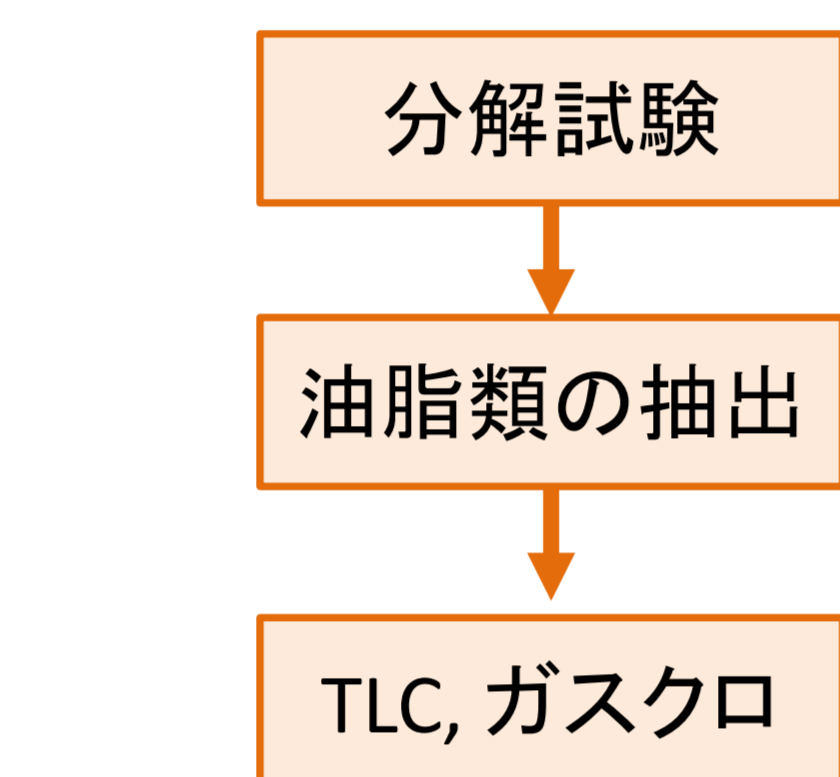
Physiological characteristics of strain HFA40-c

項目	結果
糖類発酵性試験	
グルコース	+
炭素源資化性試験	
グルコース	+
ガラクトース	+
スクロース	+
マルトース	+
トレハロース	+
溶性でんぷん	-
グリセリン	+
クエン酸塩	+
エタノール	+
ビタミン要求性試験	
ビタミン不含培地	+
耐性試験	
50%(w/v) D-グルコース	+
10% NaCl / 5% グルコース	+

3) 脂肪酸分解試験

【方法】
培地組成:
Difco Yeast nitrogen base w/o amino acid, ammonium sulfate
BD Difco Yeast extract 5.0g
日本製薬hipolypepton 2.5g
Tween20 5.0g
D.W. 1L
反応温度: 28°C
時間: 3d

添加基質:
オレイン酸 5% (Table 1);
ラウリン酸、ミリスチン酸、
パルミチン酸、ステアリン酸
各1%合計4% (Table 2)



GC条件:
システム: GC/FID
カラム: InertCap FFAP
0.25mmI.D. × 15m df=0.25μ m
カラム温度: 60°C(2 min hold)-
10°C/min-240°C(10 min hold)
キャリアガス: He 100kPa

Table 1 Comparison with other *Candida sp.*

Strain	Residual quantity [ppm]
Control	41,400
HFA40-c	81
<i>Candida parapsilosis</i> NBRC1396	15,912
<i>Candida lipolytica</i> NBRC1548	11,829

5%オレイン酸を高効率分解

Table 2 Degradation of saturated fatty acid

Substrate	Degradation rate
Lauric acid (C12:0)	100%
Myristic acid (C14:0)	77%
Palmitic acid (C16:0)	50%
Stearic acid (C18:0)	11%

飽和脂肪酸は、炭素鎖が長くなるにつれて(疎水性が高くなるにつれて)分解率低下

4) HFA40-c株の生育条件

【方法】
pH test:
YM培地をHCl, NaOHで各pHに調整後、前培養液を0.5%植菌してOD600を経時的に測定 (Fig. 1)
Temperature test:
YM培地に前培養液を0.5%植菌して各温度で培養しOD600を経時的に測定 (Fig. 2)

YM培地組成
グルコース 10g
日本製薬ハイポリペプトン 5g
BD Difco 酵母エキス 3g
麦芽エキス 3g
蒸留水 1L

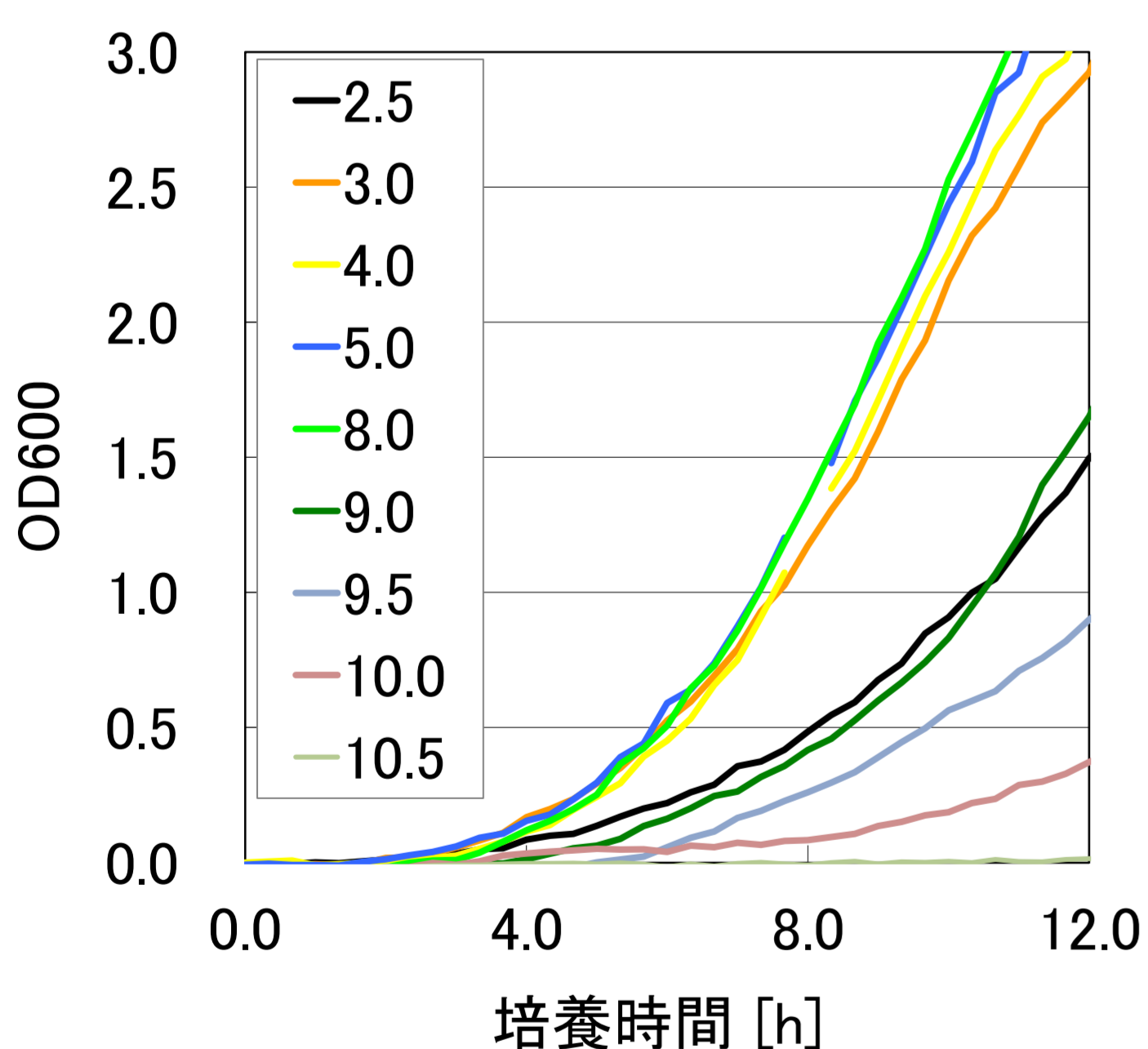


Fig.1 Growth Curve at each pH

増殖 pH2.5-10.0
至適 pH3.0-8.5

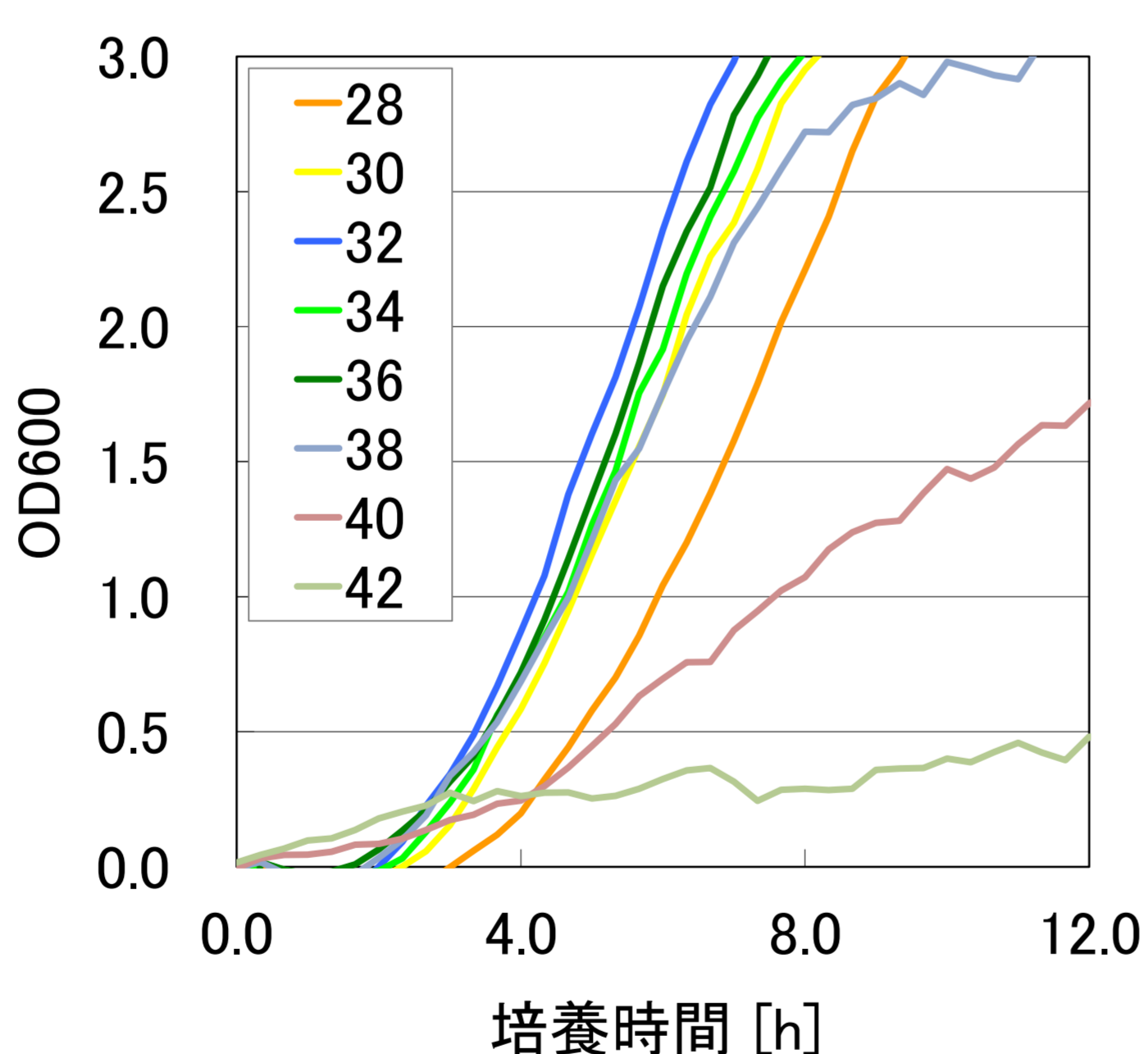


Fig.2 Growth Curve at each temperature

増殖温度 ≤40°C
至適温度 30-38°C

5) リアルタイムPCRによるHFA40-c株の特異的検出

【方法】
・26S rDNA-D1/D2配列を基にプライマー設計
・PCR条件の検討
YM培地で培養した培養液 (CFU 10⁸/ml) のDNAをTakara GenTLEキットで抽出

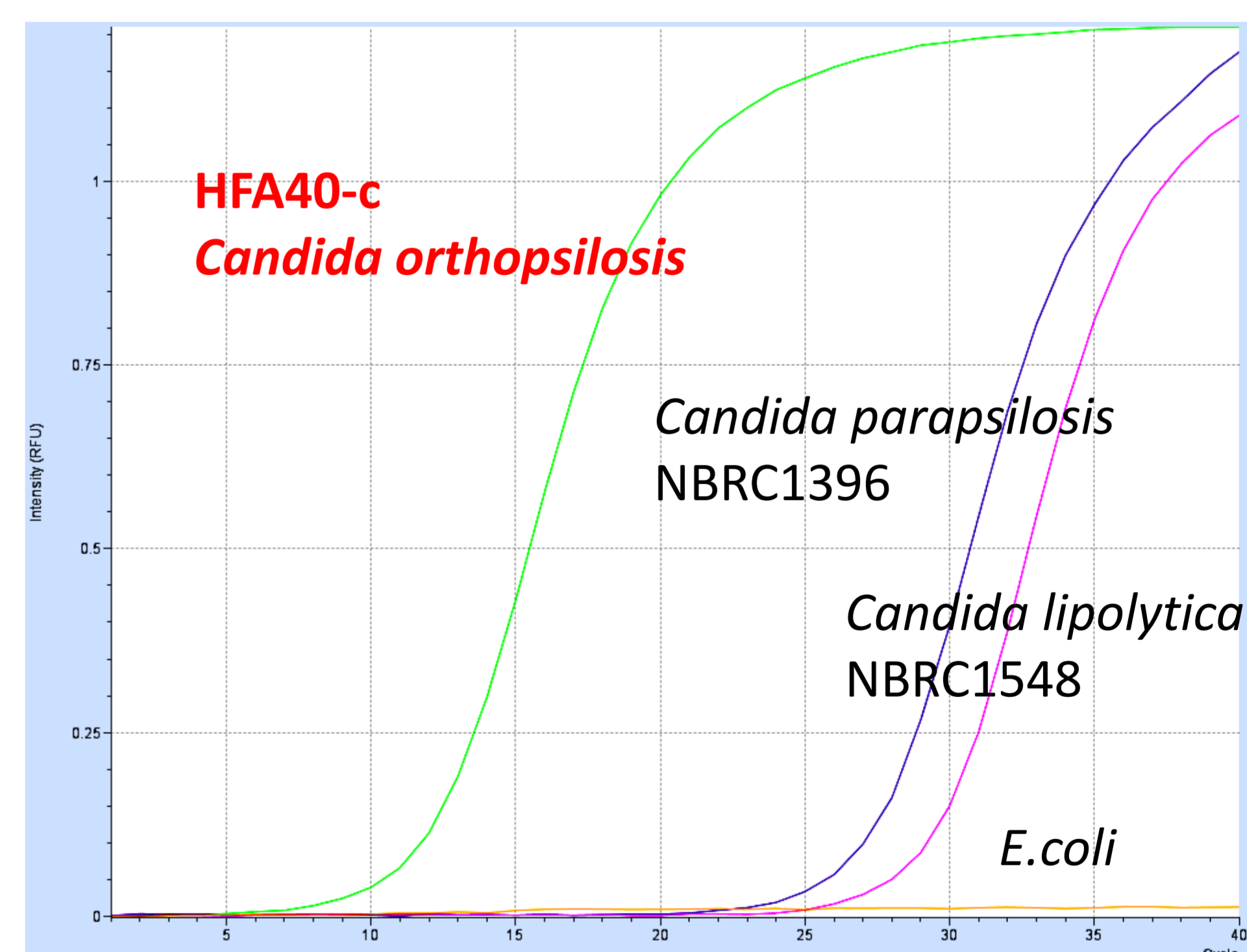
PCR mixture	[μl]
Roshe Green Master	5
primer F (5pmol/ul)	0.5
primer R (5pmol/ul)	0.5
DNA	1
H2O	3
Total	10

[PCR conditions]
10min at 95°C,
40cycles of
(10s at 95°C, 10s at 64 °C,
15s at 72 °C)
10s at 95°C,
60°C→97°C at 0.1°C/s

The PCR process was monitored by fluorescence quantification of the DNA-binding dye SYBR Green for detection of double-stranded amplified DNA.

Quantification cycle (Cq) values

Strain	Cq value
HFA40-c	11.3
<i>Candida parapsilosis</i> NBRC1396	26.5
<i>Candida lipolytica</i> NBRC1548	28.7
<i>E.coli</i>	-



Amplification curve of DNA

6) まとめ・課題

○高濃度油脂を分解するには、脂肪酸も積極的に分解する必要がある。酸性条件下、オレイン酸の殺菌作用を受けずに5%オレイン酸を効率よく分解する酵母を取得した。同定試験の結果、*Candida orthopsilosis*であった。

○ HFA40-c株の環境中での挙動を解析するために、リアルタイムPCRにより特異的に検出するプライマーとPCRの条件を見出した。

○飽和脂肪酸については、疎水性が上がるにつれて分解率が低下した。その理由として、菌体内への取込みが困難になったと推測した。飽和脂肪酸の分解率を上げるために、HFA40-c株に影響を与えず、かつ有効な可溶化剤を今後探索する。