

# 博士論文

フザリウム属糸状菌を活用した水酸化脂肪酸生産に関する研究

2022年3月

徳島大学先端技術科学教育部 物質生命システム工学

生命テクノサイエンスコース 博士後期課程3年

村川 直美

## 目次

第 1 章 要旨	……………1
第 2 章 序論	……………3
第 3 章 実験方法	……………7
第 4 章 結果と考察	……………16
第 5 章 総括	……………34
謝辞	……………38
参考文献	……………39

## 第1章 要旨

徳島県内からサンプリングした土壌や汚水の試料から、廃グリセロール資化性に優れた糸状菌 D2 株を単離した。ITS-5.8S rDNA 配列による簡易同定の結果、D2 株は *Fusarium solani* と最も高い類似度を示した。

D2 株は廃グリセロールを炭素源とした培地 (CG 培地) で培養した場合、10-ヒドロキシ-*cis*-12-オクタデセン酸 (HYA)、10-ヒドロキシオクタデカン酸 (HYB)、10-オキソオクタデカン酸 (KetoB) を蓄積した。D2 株の HYB 生産量は培地中の廃グリセロール濃度に依存し、8%の廃グリセロールを含む CG 培地で培養すると 2.20 g/L (総脂肪酸の 40%) に達した。また、D2 株を 6%の廃グリセロールを含む CG 培地で 4 日間振とうし、その後 3 日間の静置条件に置くことで、微好気条件における水酸化脂肪酸生産への影響を評価した。その結果、HYB の収量は 7 日間振とう条件の 2.2 倍である 1.19 g/L に達し、総脂肪酸の 53%を占めた。

D2 株の水酸化脂肪酸が廃グリセロールに含まれる脂質の代謝産物であると推察し、トリアシルグリセロール、脂肪酸メチルエステル、遊離脂肪酸をそれぞれ外部添加した。その結果、いずれの構造脂質を用いた場合も同程度の水酸化脂肪酸生産性を示したが、CG 培地による生産性に及ばなかった。

次に、HYB や HYA 生産性バクテリアの知見を基に、水酸化脂肪酸生産に関与するオレイン酸水和酵素を推定し、大腸菌による異種発現を行った。さらに、精製した推定オレイン酸水和酵素 D2Ohy2 について至適 pH と至適温度を検討した結果、pH 5.0 および 45°C で最も高い活性を示した。これらの至適条件は既報のバクテリア由来水和酵素に比べて低い pH および高い温度であり、D2Ohy2 がバクテリア由来の酵素とは異なる性質を持つことが明らかとなった。

本研究は糸状菌による HYB、HYA、KetoB といった水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸生産性、およびこれらの生産に関与する水和酵素における初めての

報告である。さらに、廃グリセロールに含まれる不純物が水酸化脂肪酸合成を促進することが示唆された。

## 第2章 序論

石炭や石油などの化石燃料は、我々の生活に欠かせないエネルギーや化学製品を提供する重要な資源として、今日まで世界各国の経済成長に大きく貢献してきた (Bateni et al., 2017)。一方、化石燃料の消費は地球温暖化の原因となる CO<sub>2</sub>、NO<sub>x</sub>、SO<sub>x</sub> などの温室効果ガスや PM<sub>2.5</sub> などの微小粒子状物質の発生、オゾン層の破壊の原因として長年にわたり深刻な問題となっている (Apte et al., 2015; Chattopadhyay, 2020; Cooper et al., 2010; Lin et al., 2017; Lundquist, 2021; Vohra et al., 2021)。また、化石燃料の埋蔵量には限界があるため、様々なモデルの使用限界量の換算が行われている (Allen et al., 2019; Pellegrini et al., 2021)。これらの懸念を受け、2015年12月にフランス・パリで開催された COP21 (国連気候変動枠組条約第21回締約国会議) において、世界約200カ国の合意のもとで脱炭素化社会を目指す「パリ協定」が成立した。現在、パリ協定を実現すべく、化石燃料に代わる持続可能なエネルギー資源の開発が急務とされている。

バイオディーゼルは、動植物由来の脂質をアルカリ触媒の存在下でメタノールやエタノールなどのアルコール類とエステル化することで製造されるバイオ燃料であり、すでに実用化されている持続可能なエネルギー資源の一つである (Atabani et al., 2012; Bateni and Karimi, 2016; Felizardo et al., 2006; Tremblay and Montpetit, 2017)。欧州連合では2018年の再生可能エネルギー指令改定案 (Renewable Energy Directive II) 制定によってパーム油を原料とするバイオディーゼルの土地利用変化リスクが見直されたため、バイオディーゼル燃料の消費量はやや減少している。一方、米国では再生可能燃料基準 (Renewable Fuel Standard) に従ってバイオ燃料の需要は維持されている。これらの要因により、2019~2030年のバイオディーゼルの世界供給量は年間約500億リットルで安定すると予想されている (OECD/FAO, 2021)。

しかし、10 kg のバイオディーゼル製造につき、約 1 kg の廃グリセロールが副産物として生産される (Chol et al., 2018; Hájek and Skopal, 2010; Tan et al., 2013)。廃グリセロールにはメタノール、石鹼、触媒、塩類、グリセロール以外の有機物、原料由来の不純物などが含まれるため、利用価値は低い。さらに、これらの化学組成は、ケン化に使用される触媒の種類、エステル交換の効率、および原料によって異なるため品質が一定ではなく、グリセロールの含有量は 14~87% の範囲で大きく異なる (Kumar et al., 2019)。また、石鹼やアルコール飲料産業からは常に同様の廃グリセロールが供給されており (Tan et al., 2013)、これらの廃グリセロールの有効的な再利用法が求められている。

廃グリセロールはそのまま家畜飼料としての用途開発が進められ、ブロイラー、産卵鶏、豚などの非反芻動物にとって優れたカロリー源となることが報告されている (Kerr et al., 2007; Lammers et al., 2008a,b)。さらに反芻動物については、廃グリセロールを飼料に用いた給餌方法に関する特許が開示されている (Cecava et al., 2008)。しかし、廃グリセロールに含まれるカリウムやメタノールは毒性が高いため、利用には注意が必要であり、飼料としての利用法はほとんど普及していない。また、廃グリセロールから純度の高いグリセロールを精製する方法も研究されているが、膜ろ過、真空蒸留、ナノ粒子法、酵素触媒法、超臨界法などの精製プロセスには多くの労力と費用を必要とするため採算に見合わない点が課題となっている (Chol et al., 2018; Ma and Hanna, 1999; Ilham and Saka, 2016; Talebian-Kiakalaieh et al., 2018; Wan Isahak et al., 2015)。その他にも、Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> や Ni を触媒として用いて廃グリセロールから水素を精製するシステムの開発なども進められているが、生産効率は純グリセロールを用いた場合よりも悪い (Dou et al., 2010; Slinn et al., 2008)。一方、廃グリセロールを炭素源とした微生物変換は最も有望な廃グリセロールの再利用法とされる。例えば、*Yarrowia lipolytica* (Dobrowolski et

al., 2016)、*Lipomyces starkeyi*、*Rhodotorula* sp. (Tchakouteu et al., 2015)、*Schizochytrium* sp. (Chang et al., 2015; Chi et al., 2007)、*Chlorella protothecoides* (Chen and Walker, 2011)、*Mortierella alpina* (Dedyukhina et al., 2014) といった油糧微生物による油脂生産が試みられている。しかし、これらの微生物における廃グリセロール資化性は低く、実用的な育種には至っていない。

油脂の主成分は長鎖の炭素骨格を持つ脂肪酸であり、様々な化成品の基幹物質として用いることが可能である。特に炭素骨格に 1 つ以上の水酸基を有する水酸化脂肪酸は、水酸基を基軸とした修飾・加工が容易であることから、化粧品、医薬品、ポリマー原料など、幅広い分野において注目されている (Cao and Zhang, 2013; Hou and Forman, 2000; Lu et al., 2010)。10-ヒドロキシステアリン酸 [10(OH)-18:0, HYB] は自然界に存在する典型的な水酸化脂肪酸の一種であり、 $\gamma$ -ドデカラクトンやジカルボン酸であるアゼライン酸への変換プロセスについての研究が進んでいる (An and Oh, 2013; Song et al., 2014)。HYB の生合成についてはオレイン酸 (C18:1 $\omega$ 9) の水和反応による経路が知られており、*Nocardia cholesterolicum* (Koritala et al., 1989)、*Streptococcus pyogenes* (Volkov et al., 2010)、*Lysinibacillus fusiformis* (Kim et al., 2012)、*Lactobacillus plantarum* (Takeuchi et al., 2015)、*Elizabethkingia meningoseptica* (Engleder et al., 2015; Todea et al., 2015)、*Stenotrophomonas maltophilia* (Kang et al., 2017) といった様々なルーメン細菌や乳酸菌においてオレイン酸水和酵素が報告されている。しかし、これらの細菌は増殖速度が遅く、脂質生産性も非常に低いため、バイオリピッド生産の育種株に適さない。また、これらのオレイン酸水和酵素遺伝子を真菌に応用した発酵生産系の開発も行われているが、未だに育種株の実用化には至っていない。

本論文では、廃グリセロール資化性糸状菌 D2 株による水酸化脂肪酸生産性および関連酵素の諸性質について報告する。本菌株は、廃グリセロール培地上での生育が良好であるだけでなく、比較的高い脂質生産性と HYB を始

めとした数種の水酸化脂肪酸の生産を示した。また、D2株における水酸化脂肪酸生産は微好気条件によって誘導されることを見出し、さらに水酸化脂肪酸合成に関与する水和酵素が高温、酸性条件下で活性することを明らかにした。本酵素は長鎖脂肪酸である C18:1 $\omega$ 9 に対する基質特異性が非常に高いだけでなく、パルミトレイン酸 (C16:1 $\omega$ 7) にも比較的高い水和活性を示した。



### 第3章 実験方法

#### 試薬および菌株

本研究で使用した廃グリセロールは京都市廃食用油燃料化施設から供与され、約 45% (w/w) グリセロール、約 13% (w/w) メタノール、約 13% (w/w) 脂質、約 16% (w/w) カリウム、約 0.02% (w/w) 窒素、約 0.01% (w/w) 硫黄、およびその他の成分を含んでいた。このうち、脂質中の脂肪酸組成は 6.6% パルミチン酸 (C16:0)、2.7% ステアリン酸 (C18:0)、53.8% オレイン酸 (C18:1 $\omega$ 9)、29.4% リノール酸 (C18:2 $\omega$ 6)、3.1%  $\alpha$ -リノレン酸 (C18:3 $\omega$ 3)、0.6% エイコセン酸 (C20:0) であった。純グリセロールと酵母エキスについては、それぞれナカライ・テスク (京都, 日本) とオリエンタル酵母 (東京, 日本) から購入した。

標準物質としての 10-ヒドロキシオクタデカン酸 (HYB) および 10-ヒドロキシ-*cis*-12-オクタデセン酸 (HYA) (Fig. 1) は、それぞれ C18:1 $\omega$ 9 と C18:2 $\omega$ 6 から、乳酸菌 *L. plantarum* AKU 1009a (Takeuchi et al., 2015) 由来のオレイン酸ヒドラターゼ (*cla-hy*) 遺伝子 (Accession No. AB671229) を有する組み換え大腸菌の洗浄細胞で作製した (Takeuchi et al., 2015; Takeuchi et al., 2016)。生成物の多くは、菌体外の反応混合物中で生成した。生成物は、SNAP Ultra 10 g シリカカートリッジ (Biotage) を備えた Isolera One (Biotage, Uppsala, Sweden) を用いて室温で精製した。生成物をシリカゲルと混合し、真空デシケーターで乾燥させ、活性粘土、硫酸ナトリウム無水物、シリカゲルの混合物 (1:2:4, w/w) をカートリッジの底に 5 mm の厚さとし、空の使い捨てカートリッジ (Biotage) に装填した。生成物を *n*-ヘキサンとジエチルエーテルで 36 ml/min の流速で 20 % (v/v) のカラムボリューム (CV, 17ml) を 5 回、20-40 % (v/v) を 2 回、そして 40 % (v/v) のジエチルエーテルを 10 回のグラジエントで溶出させた。脂肪酸の検出には、UV 検出器を使用し、波長 200 nm と 225 nm で検出した。

10-オキソオクタデカン酸 (KetoB)、10-オキソ-*cis*-12-オクタデカン酸 (KetoA) (Fig. 1) は、精製した HYB と HYA の水酸基を CrO<sub>3</sub> で酸化する Jones 酸化により得られた (Curtis et al., 1953)。ヒドロキシ脂肪酸 100 mg を 2 ml のアセトンに氷上で溶かした。2.67 % (w/v) CrO<sub>3</sub>、2.3 % (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、80 % (v/v) アセトン水を含む Jones 溶液を、氷上で Jones 溶液のオレンジ色が消えないようにヒドロキシ脂肪酸溶液に添加し、ヒドロキシ脂肪酸を酸化した。その後、イソプロパノールを溶液の色が濃い緑色に変わるまで添加し、溶液をジエチルエーテルで抽出した。ジエチルエーテル層を水で 2 回洗浄し、蒸発させた。オキソ脂肪酸は、上記のクロマトグラフィー法により精製した。

標準株 *Fusarium solani* fsp. *pisi* NBRC 9975 は日本の独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NBRC) から購入した。

### 単離菌株の同定

単離株 D2 について、内部転写スペーサー領域および 5.8S リボソーム DNA 領域 (ITS-5.8S rDNA) の塩基配列によって簡易同定した (White et al., 1990)。D2 株のゲノム DNA を Izumitsu et al. (2012) の方法で抽出し、遺伝子特異的なプライマーペア (Table 1) を用いて ITS-5.8S rDNA を増幅した。ポリメラーゼには複製エラー率が極めて低い PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (TaKaRa, 滋賀, 日本) を用いた。増幅した PCR 産物の塩基配列解析についてはマクロジェン・ジャパン株式会社 (京都, 日本) に委託した。得られた塩基配列から National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) の BLASTn アルゴリズムを用いて *Fusarium* 属近縁種の ITS-5.8S rDNA 遺伝子配列を検索し、CLC sequence viewer (CLC bio, Aarhus, Denmark <http://www.clcbio.com/index.php>) を用いて UPGMA 法により系統樹を作製した。

## 培養条件

D2 株の保存培養には最小培地 (0.2 g/L グルコース、0.2 g/L スクロース、0.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g/L KCl、1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1 g/L  $\text{KNO}_3$ 、20 g/L 寒天、pH 5.7) を用いた。

廃グリセロールおよび純グリセロールを炭素源とした D2 株の脂質生産性および脂肪酸組成を比較評価するために、4% (w/v) 廃グリセロールあるいは 2% (w/v) 純グリセロールと 1% (w/v) の酵母エキスから成る単純培地を用いた。

D2 株の水酸化脂肪酸生産における廃グリセロール濃度の影響を評価するために、2-16% (w/v) の廃グリセロールと 1% (w/v) の酵母エキスからなる廃グリセロール液体培地 (CG 培地) 4 mL を用いた。

微好気条件における水酸化脂肪酸生産性を評価するために、D2 株を 6% CG 培地 10 mL に植菌し、3-7 日間振とう培養した後、静置培養へと移行した。

水酸化脂肪酸の基質となる構造脂質を評価するために、D2 株を 1.5% (w/v) の各構造脂質、2.7% (w/v) 純グリセロール、1% (w/v) 酵母エキスからなる脂質添加培地 4 mL で培養した。構造脂質には、廃グリセロール中の脂肪酸組成に類似した市販のキャノーラ油 (日清オイリオ, 東京, 日本) (Table 2) から変換および精製した遊離脂肪酸 (FFA)、脂肪酸メチルエステル (FAME)、およびトリアシルグリセロール (TAG) を用いた。

上記の培養条件すべてにおいて、温度は 28°C、振とう速度は 300 rpm、培養時間は 7 日とした。

オレイン酸水和酵素遺伝子の発現解析においては、4% CG 培地 4 mL で 2 日間振とう培養した D2 株、および 3 日間振とう後に 1 日間静置培養した D2 株の菌体をそれぞれ水酸化脂肪酸非生産時および生産時の菌体として回収し、RNA 抽出に用いた。

## 脂肪酸分析

総脂質あるいは 110°C で乾燥させた菌体に 10% 塩酸メタノール 2 mL とジクロロメタン 1 mL を加え、55°C で 4 時間反応させて脂肪酸をメチルエステル化した。定量的な評価の際には、内部標準としてトリコサン酸 (C23:0) を用いた。反応後の FAME 抽出には *n*-ヘキサンを用いた。トリメチルシリル (TMS) 誘導体については、FAME と TMS 剤 [ピリジン：ヘキサメチルジシラザン：トリメチルクロロシラン, 9:3:1 (v:v:v)] をスクリーキャップ管内で混合し、60°C で 30 分間インキュベートした後、クロロホルムを用いて抽出した。

脂肪酸組成分析には水素炎イオン化検出器とスプリットインジェクションシステムを装着した GC-2025 ガスクロマトグラフィー (島津製作所, 京都, 日本) を用いた。また、キャピラリーカラムには SPB-1 (30 m×0.25 mm I.D., SUPELCO, PA, USA) を用いた。カラム温度については 200°C で 14 分間維持し、続いて 50°C/min の速度で 300°C まで昇温した後、300°C で 4 分間維持した。注入器と検出器については 300°C 一定とした。また、キャリアガスとしてヘリウムを 2.32 mL/min の流量で使用した。脂肪酸のピークについては、標準物質との保持時間の比較することで同定した。水酸化脂肪酸およびオキシ脂肪酸については、FAME と TMS 誘導体のガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) の結果から化学構造を確認した。マススペクトルについては、The Lipid Web (<https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/masspec.html>; Christie, 2021) で公開されている特徴に従って解析した。GC/MS 装置には GC-2030 Nextis (島津製作所) と GCMS-QP2020 NX (島津製作所) を使用し、*m/z* 50~500 の質量範囲で分析を実施した。GC/MS におけるキャピラリーカラムおよび温度条件は、本項の GC で説明したものと同様とした。

## 遺伝子転写解析

吸引濾過によって集菌した水酸化脂肪酸生産時および非生産時の D2 株菌体を、それぞれ Bio Masher® II (株式会社ニッピ, 東京, 日本) を用いて粉碎した後、RNAiso Plus (TaKaRa, 滋賀, 日本) の付属プロトコルに従って total RNA を抽出した。得られた total RNA を DNase で処理した後、PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて cDNA ライブラリを作製した。

*F. solani* のテレオモルフである *Nectria haematococca* のゲノムデータベース (JGI Genome Portal; <https://genome.jgi.doe.gov/Necha2/Necha2.home.html>, 2019 年 1 月 21 日アクセス) から 2 つの推定オレイン酸水和酵素 Ohy1 (Protein ID: 50153)、および Ohy2 (Protein ID: 52774) の遺伝子配列を入手した。これらの配列データを基に遺伝子特異的なプライマーペアを設計し (Table 1)、cDNA ライブラリを鋳型とした RT-PCR によってそれぞれの遺伝子転写を評価した。

## オレイン酸水和酵素の *in silico* 解析

*N. haematococca* のゲノムデータベースにおける *ohy2* の予想転写配列から、開始コドン上流 100 bp および終止コドン下流 160 bp の位置にプライマーを設計し (Table 1)、cDNA を鋳型とした PCR によって *D2ohy2* における推定オープンリーディングフレーム (ORF) 配列を含む転写領域を増幅した。次に、ゲノムデータを基に ORF 中にアニールする遺伝子特異的プライマーを設計し (Table 1)、精製した *D2ohy2* 転写領域 PCR 断片を鋳型としたシーケンス解析によって、*D2ohy2* の開始コドンおよび終止コドンを決定した。シーケンス解析はマクロジェン株式会社に委託した。

CLC sequence viewer および GENETYX ver.13 (ゼネティックス, 東京, 日

本) を用いて、得られた遺伝子配列から D2Ohy2 のアミノ酸配列を予測し、他生物のオレイン酸水和酵素との比較解析を行った。

### 組換え大腸菌を用いた D2Ohy2 精製

D2 株の cDNA を鋳型として *D2ohy2* ORF 全長配列をクローニングした。コールドショック発現ベクターである pCold TF DNA (TaKaRa) からインバース PCR 法によってトリガーファクター配列を除去し (Table 1)、N 末端に His-tag を付加した組換えタンパク質発現用プラスミドの骨格とした。骨格とする pCold ベクターを *Nde*I および *Bam*HI、インサートに用いる *D2ohy2* ORF 全長配列については PCR 産物を *Nde*I および *Bgl* II で切断し、ライゲーションさせて発現ベクター pCold\_OYH2 を構築した。

*D2ohy2* 遺伝子配列は大腸菌におけるレアコドンを含んでいるため、タンパク質発現宿主にはレアコドン対応の *Escherichia coli* BL21CodonPlus (DE3)-RIPL (Agilent Technologies, California, US) を用いた。組換え大腸菌 BL21 Codon+/pCold\_Ohy2 を LB 培地 [1% ハイポリペプトン (日本製薬, 東京, 日本)、0.5% 酵母エキス、1% NaCl、0.001 N NaOH] に植菌し、OD<sub>600</sub> = 0.5 程度になるまで 37°C で振とう培養した後、15°C で 30 分間冷却した。続けて、イソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) を終濃度 0.2 mM となるように添加し、18°C、125 rpm で 24 時間振とう培養することで目的タンパク質の発現を誘導した。

発現タンパク質の質量についてはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて推定した。分離ゲルは 40% (w/v) アクリルアミド/ビス (和光純薬, 大阪, 日本)、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、10% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、10% 過硫酸アンモニウム (APS) (キシダ化学, 大阪, 日本)、テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) (ナカライ・テス

ク) を用いてゲル濃度が 8%になるよう作製した。濃縮ゲルの作製では、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) の代わりに 0.5 M Tris-Cl (pH 6.8) を用い、その他は分離ゲル作製時と同様の試薬を用いた。組換え大腸菌ペレットにサンプル調製バッファ [120 mM Tris-HCl (pH 6.8)、4.2% SDS、6% 2-メルカプトエタノール、0.04% ブロモフェノールブルー、36% グリセロール]、および泳動バッファ (0.303% トリスヒドロキシメチルアミノメタン、1.441% グリシン、0.1% SDS) をそれぞれ 20  $\mu$ L ずつ加え、99°C で 5 分間ボイルした。次に、8% SDS-PAGE ゲルに各ライセートサンプルを 5  $\mu$ L/lane ずつアプライし、25 mA で 1 時間泳動した。泳動装置にはラピダス・二連ミニスラブ電気泳動槽 AE-6450 (ATTO, 東京, 日本) およびコンスタパワー3500L (ATTO) を用いた。泳動後、クマシーブリリアントブルーR250 を用いてタンパク質を染色した。

組換えタンパク質は N 末端に His-tag を有するため、Ni-NTA Fast Start (QIAGEN, Hilden, Germany) および Amicon®Ultra (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いて精製した。さらに、BCA Protein Assay kit (TaKaRa) による検量線を用いて D2Ohy2 の濃度を決定した。

### D2Ohy2 の諸性質解析

D2Ohy2 の活性における至適温度と至適 pH 条件を検討した。精製酵素 8  $\mu$ g/ $\mu$ L、基質として 0.005% (v/v) C18:1 $\omega$ 9 (脂質の 1/5 量のウシ血清アルブミンを加えて超音波で乳化)、補酵素として 0.1 mM フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) および 5 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) を 50 mM コハク酸緩衝液 (pH 4.0~5.0) または 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 5.0~8.0) と混合し、10~50°C で 30 分間反応を進めた。反応後、Bligh-Dyer 法によって総脂質を抽出し脂肪酸組成分析を行った (Bligh

and Dyer, 1959)。

また、D2Ohy2 の基質特異性を明らかにするためにパルミトレイン酸 (C16:1 $\omega$ 7)、C18:1 $\omega$ 9、C18:2 $\omega$ 6、 $\alpha$ -リノレン酸 (C18:3 $\omega$ 3)、 $\gamma$ -リノレン酸 (C18:3 $\omega$ 6)、リシノール酸 [12(OH)c9-18:1] およびメチルエステル化 C18:1 $\omega$ 9 (C18:1 $\omega$ 9-ME) の 7 つの異なる基質を用いた。精製酵素 100 ng、脂肪酸 20 mM (10 mg ウシ血清アルブミンを加えて超音波で乳化)、0.1 mM FAD、5 mM NADH を 50 mM リン酸カリウム酸緩衝液 (pH 5.0) と混合し、脱気後 45°C の湯浴で 30 分間反応させた。反応液容量は 1 mL とした。反応後、Bligh-Dyer 法によって総脂質を抽出し脂肪酸組成分析を行った (Bligh and Dyer, 1959)。

Table1 本研究で使用したプライマー一覧

Primer	Sequence (5'-3')	Intended use
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Identification
ITS4	TCCITCCGCTTATTGAIATGC	Identification
FsOhy-50153-start_F	ATGGAAGATCCTACGGCTGCG	Transcription analysis of ohy1
FsOhy-50153-end_R	CTAGGTCATCATCGICTTCAAGGC	Transcription analysis of ohy1
FsOhy-52774-start_F	ATGTATTACAGCAAGGGCAACTAC	Transcription analysis of ohy2
FsOhy-52774-end_R	TTAGACCAAGTGATACTCGTGCG	Transcription analysis of ohy2
NhOhy52774Up100	TGCTTCATCGCGTCGATTTG	Sequencing of ohy2
NhOhy52774Dw160	ATGGGCGATCTCTGCATGAG	Sequencing of ohy2
D2-Ohy2seqNt400_F	AAGGACAAGACGCTGAAACC	Sequencing of ohy2
D2-Ohy2seqCt600_R	GGGCTGGTTCTTGAAGTGAG	Sequencing of ohy2
D2-Ohy2-NtHisNdel_F	<u>AACATATG</u> TACTACAGCAAGGGCAACT	Cloning D2ohy2 for pColdTF
D2-Ohy2full-BglII_R	<u>TAGATCTTT</u> AGACCAAATGATACTC	Cloning D2ohy2 for pColdTF
remove_TF_pCold_F	GCGGGTCTGGAAGTTCTGT	remove TF for pColdTF
remove_TF_pCold_R	GTGATGATGATGATGATGCACTTTGTGATTCATGG	remove TF for pColdTF

下線は制限酵素認識配列を示す。

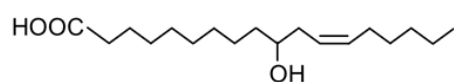


Table 2 炭素源とした菜種油および廃グリセロール中の脂肪酸組成

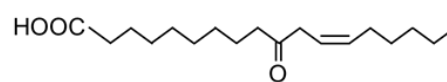
Lipid as a carbon source <sup>a</sup>	Fatty acid composition (%)							
	C16:0	C18:0	C18:1 $\omega$ 9	C18:2 $\omega$ 6	C18:3 $\omega$ 3	C20:0	UK1	UK2
Canola oil	3.8	1.6	66.5	19.2	7.7	1.1	ND <sup>b</sup>	ND
Crude glycerol	10.2	2.7	53.8	29.4	3.1	0.6	ND	ND

<sup>a</sup>Fatty acid compositions of canola oil and crude glycerol used as carbon sources.

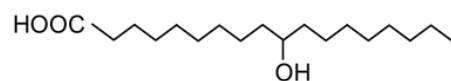
<sup>b</sup>ND, not detected.



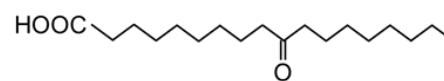
**10-Hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA)**



**10-Oxo-*cis*-12-octadecenoic acid (KetoA)**



**10-Hydroxyoctadecanoic acid (HYB)**



**10-Oxo-octadecanoic acid (KetoB)**

Fig. 1 HYA、HYB、KetoA および KetoB の構造式

## 第4章 結果と考察

### 1) 単離株の脂肪酸組成分析および菌種同定

徳島県で採取した各種の土壌・下水サンプルを 2~4% (w/v) 廃グリセロール、1% (w/v) 酵母エキスおよび 2%寒天を含む CG 寒天培地上に塗布し 28°C で培養した。しかし、CG 培地ではほとんどの微生物の生育が遅かった。この原因として、廃グリセロール中のメタノールなどの生育阻害物質が挙げられた。CG 寒天培地に出現した 100 株以上の酵母・真菌の中から、CG 培地での生育に優れた糸状菌 D2 株を単離した。4%の廃グリセロールを含む CG 培地 (1.8% グリセロール) で培養した D2 株の乾燥菌体重量 (DCW) は 10.2 g/L に達し、純グリセロールあるいはグルコースを炭素源として用いた場合のそれぞれ約 1.7 倍および 2.0 倍であった (Table 3)。さらに、CG 培地で培養した菌体からは、D2 株の主な脂肪酸成分である C16:0、C18:0、C18:1 $\omega$ 9、C18:2 $\omega$ 6、C18:3 $\omega$ 3、C20:0 以外に未同定の脂肪酸 UK1 と UK2 が検出された (Table 3)。これら 2 つの未知脂肪酸は、グルコース含有培地では検出されず、CG 培地で培養した D2 株の総脂肪酸のうちそれぞれ 2.2%と 46.0%を占めた (Table 3)。また、これらの脂肪酸は廃グリセロールからは検出されなかったため、廃グリセロール中の脂肪酸から生成されたと考えられた。廃グリセロールには総脂肪酸当たり C18:1 $\omega$ 9 が 53.8%、C18:2 $\omega$ 6 が 29.4%含まれているが、CG 培地で培養した D2 株菌体では C18:1 $\omega$ 9 および C18:2 $\omega$ 6 がそれぞれ 4.2%および 11.2%であった。このことから、廃グリセロール中のこれらの脂肪酸が UK1 および UK2 に変換されたことが示唆された (Table 3)。純粋なグリセロールで培養すると少量の UK1 および UK2 が検出されたが、これは内因性の脂肪酸が変換されて精製した可能性がある (Table 3)。

Table 3 純グリセロール、廃グリセロールあるいはグルコースを炭素源とした培地で培養した D2 株<sup>a</sup>の乾燥菌体重量および脂肪酸組成

Carbon source	DCW <sup>b</sup> (g/L)	Total fatty acid (g/L)	Fatty acid composition (%) <sup>c</sup>							
			C16:0	C18:0	C18:1 $\omega$ 9	C18:2 $\omega$ 6	C18:3 $\omega$ 3	C20:0	UK1	UK2
Pure glycerol	6.2 $\pm$ 0.3	0.29 $\pm$ 0.07	19.8 $\pm$ 0.4	15.4 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.02	48.2 $\pm$ 0.9	15.1 $\pm$ 0.5	ND <sup>d</sup>	0.4 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1
Crude glycerol	10.2 $\pm$ 0.1	2.18 $\pm$ 0.12	18.4 $\pm$ 0.3	12.2 $\pm$ 0.7	4.2 $\pm$ 0.4	11.1 $\pm$ 1.2	5.3 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.4	46.0 $\pm$ 0.2
Glucose	5.2 $\pm$ 0.5	0.18 $\pm$ 0.02	16.0 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.8	12.4 $\pm$ 0.4	61.9 $\pm$ 0.8	6.1 $\pm$ 0.3	ND	ND	ND

<sup>a</sup>Strain D2 was cultured in the medium containing 2% pure glycerol, 4% crude glycerol (approximately 1.8% glycerol), or 2% glucose, and 1% yeast extract for 7 days. All data are the means  $\pm$  standard deviation (SD) for triplicate samples.

<sup>b</sup>DCW, dry cell weight.

<sup>c</sup>C16:0, palmitic acid; C18:0, stearic acid; C18:1 $\omega$ 9, oleic acid; C18:2 $\omega$ 6, linoleic acid; C18:3 $\omega$ 3,  $\alpha$ -linolenic acid; C20:0, eicosanoic acid.

<sup>d</sup>ND, not detected.

簡易菌種同定の結果、D2 株の ITS-5.8S rDNA 配列 (564 bp) は NCBI データベースに登録されている *Fusarium solani* のものと高い類似性を示し、*F. solani* 7227、*F. striatum* CBS 101573、*F. tenuicristatum* IMI 277708、*F. oxysporum* WPII21-2 のものとそれぞれ 98%、97%、84%、84%の同一性を示した (Fig. 2)。



**Fig. 2** D2 株と *Fusarium* spp. の ITS-5.85 r DNA 配列の系統樹

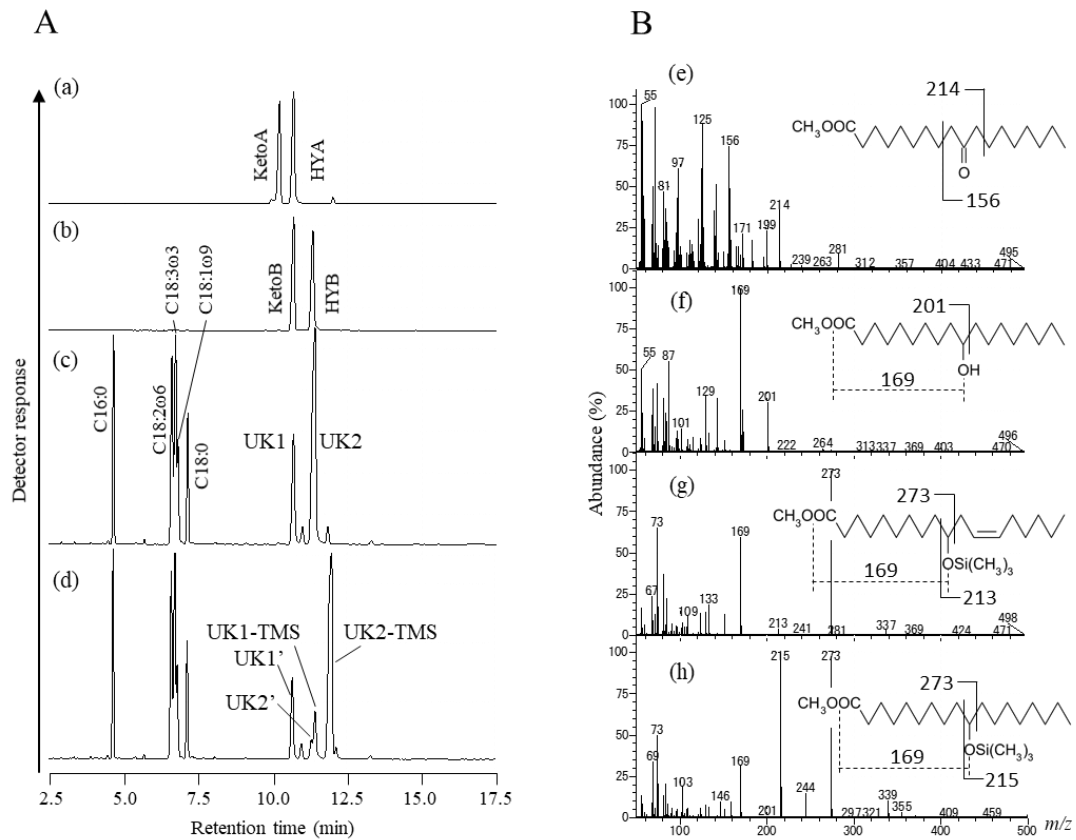
系統樹は D2 株、*Fusarium tenuicristatum* IMI 277708 (Accession No. NR\_169922)、*F. graminearum* CPGWY137D51 (No. KR047057)、*F. longifundum* NRRL 36372 (No. NR\_171059)、*F. oxysporum* FJAT-31099 (No. KU931550)、*F. oxysporum* WP1121-1 (No. MK163440)、*F. fujikuroi* CBS 262.54 (No. MH857321)、*F. citricola* CPC 27805 (No. NR\_172265)、*F. vanettenii* MAFF 840047 (No. AB513852)、*F. proliferatum* strain 144 (No. MK828121)、*F. redolens* T1ST190421511 (No. MN486568)、*F. striatum* CBS 101573 (No. KM231798)、*F. solani* H4470 (No. GU595038)、*F. solani* C219 (No. KU377470)、*F. solani* PCO.30 (No. HQ248197)、*F. solani* 7227 (No. MN922526) の ITS-5.8S rDNA 配列を組み合わせて構築した。アルゴリズムには UPGMA 法を用い、ブーストラップ検定を 1,000 回繰り返した。

## 2) D2 株が生産する脂肪酸の同定

CG 培地で培養した D2 由来の FAME を GC および GC/MS で分析したところ、C16:0、C18:0、C18:1 $\omega$ 9、C18:2 $\omega$ 6、C18:3 $\omega$ 3 などの飽和および不飽和脂肪酸、さらに UK1 と UK2 が検出された (Fig. 3A(c))。GC/MS 分析による UK2 のフラグメントイオンパターンは、GC/MS 化合物ライブラリ内の HYB のものと一致し、UK2 の保持時間も HYB 標準物質と一致した (Fig. 3A(b), (c))。GC/MS 分析では、GC/MS 化合物ライブラリのデータから UK1 はヒドロキシ脂肪酸とオキシ脂肪酸の混合物であることが示唆された。乳酸菌では C18:2 $\omega$ 6 から HYA と KetoA、C18:1 $\omega$ 9 から HYB と KetoB が変換されることが報告されているため (Kishino et al., 2017)、本研究では HYB のみならず HYA、KetoA、KetoB も生成することが考慮された。UK1 の保持時間は KetoB および HYA の標準物質と一致し (Fig. 3A(a)-(c))、UK1 には HYA および KetoB が含まれていることが示唆された。TMS 処理により、全脂肪酸中のヒドロキシ脂肪酸を TMS 誘導体に誘導化し、さらに GC/MS 分析で重複して出現する化合物を分離することができた。全ての FAME を TMS 誘導体に変換すると、UK1-TMS と UK2-TMS の新しいピークが現れた (Fig. 3A(d))。これに伴って小さくなった UK1 と UK2 の 2 つのピークをそれぞれ UK1'、UK2' と名付けた (Fig. 3A(c), (d))。

UK1' の  $m/z$  156 と 214 のフラグメントイオンは、それぞれカルボキシル末端の単結合 8-9 および 11-12 の間で  $\beta$  開裂が生じることを示していた (Fig. 3B(e))。UK1' のフラグメントイオンパターンは、GC クロマトグラムで UK1' と同じ保持時間を示した KetoB メチルエステルのピークパターンと一致した (Fig. 3A(b), (d), 3B(e))。UK2' の  $m/z$  201 のイオンは、単結合 10-11 の間で切断された分子のカルボキシル末端を示していた (Fig. 3B(f))。また、UK2' の  $m/z$  169 のイオンはさらなるフラグメンテーションによってメタノール分子が失われたことを表している (Christie, 2021)。UK2' におけるこれらのフ

ラグメントイオンパターンは、GC クロマトグラムで UK2'と同じ保持時間を示した HYB のピークパターンと一致した (Fig. 3A(b), (d), 3B(f))。次に、UK1-TMS と UK2-TMS の両方で  $m/z$  169 と 273 のイオンが検出された (Fig. 3B(g), (h))。このうち、 $m/z$  273 のイオンは TMS 基が付加された 10-11 間で  $\alpha$  開裂したカルボキシメチル末端側の分子であり、 $m/z$  169 のイオンはさらなるフラグメンテーションで TMS のメチル分子が失われたことを示していた (Fig. 3B(g), (h))。UK2-TMS の  $m/z$  215 のイオンと UK1-TMS の  $m/z$  213 のイオンは TMS 基を含むアシル末端分子を表しており (Fig. 3B(g), (h))、UK1-TMS のメチル末端側の  $m/z$  213 のイオンは、1 つの二重結合の存在を示唆していた。これらの結果から、UK1-TMS と UK2-TMS は、それぞれ HYA と HYB の TMS 誘導体であり、GC クロマトグラムの UK1 ピークには、KetoB メチルエステルと HYA メチルエステルの混合物が含まれていることが示唆された (Fig. 3A(a)-(c))。また、UK2'は TMS 誘導体に変換されなかった未反応の HYB メチルエステルであることが示された (Fig.3A(d), 3B(f))。



**Fig. 3** CG 培地で培養した D2 株由来脂肪酸の (A) GC および (B) GC/MS 分析

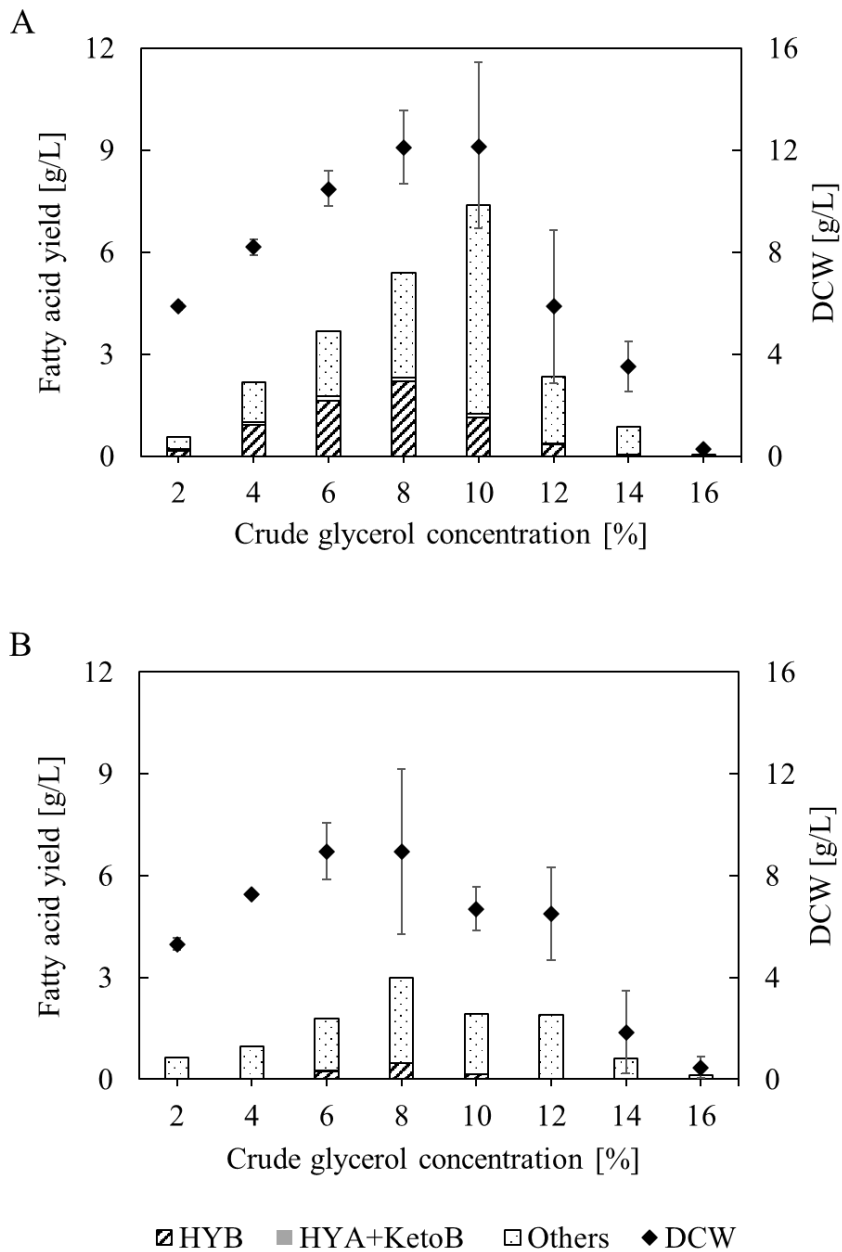
(a) KetoA および HYA メチルエステル標品; (b) KetoB および HYB メチルエステル標品; (c) D2 株由来のメチルエステル化脂質; (d) メチルエステル化脂質の TMS 誘導体; (e) UK1'; (f) UK2'; (g) UK1-TMS; (h) UK2-TMS。

略称: TMS, TMS 誘導体; KetoA, 10-オキシ-*cis*-12-オクタデセン酸; KetoB, 10-オキシオクタデカン酸; HYA, 10-ヒドロキシ-*cis*-12-オクタデセン酸; HYB, 10-ヒドロキシオクタデカン酸。

### 3) 高濃度廃グリセロールを用いた D2 株による水酸化脂肪酸生産

D2 株と対照株とした *F. solani* fsp. *pisi* NBRC 9975 株は CG 培地で良好に生育し、それぞれ 10%と 8%の廃グリセロールを含む CG 培地で最も高い生育を示した (Fig. 4)。D2 株と NBRC 9975 株の HYB 生産量は、8%の廃グリセロールを含む CG 培地で培養した場合に、それぞれ 2.20 g/L (総脂肪酸の 40%) と 0.47 g/L (総脂肪酸の 16%) に達した。両菌株とも HYA よりも HYB を多く生産した。



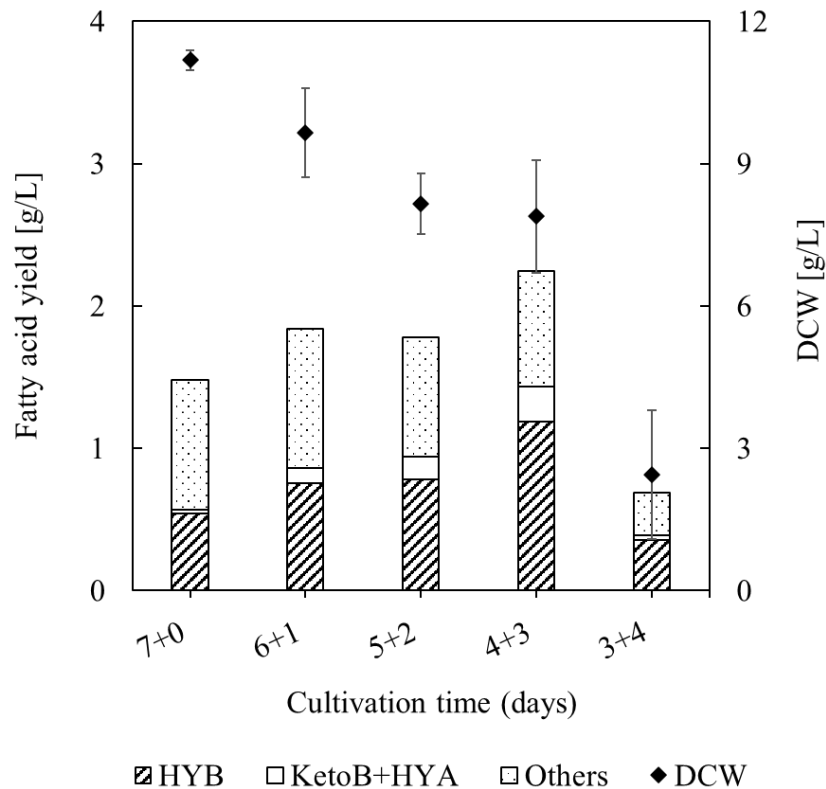


**Fig. 4 (A) D2 株および (B) *F. solani* fsp. *pisi* NBRC 9975 における生育および脂肪酸生産への廃グリセロールの影響**

両株ともに 4 mL の CG 培地で 7 日間振とう培養した。“Others”は C16:0、C18:0、C18:1 $\omega$ 9、C18:2 $\omega$ 6、C18:3 $\omega$ 3、および C20:0 を含む。DCW は乾燥菌体重量を示し、データは平均値 $\pm$ 標準偏差を表す (n = 3)。

#### 4) 微好気条件下における水酸化脂肪酸生産

D2 株を 6%の廃グリセロールを含んだ CG 培地 10 mL で 7 日間振とうおよび静置培養し、DCW と脂肪酸含量を測定した。Fig. 5 に示すように、D2 株の生育度は 7 日間振とう培養 (7+0 days) することで最も高い値を示し、静置培養の期間が長くなるにつれ増殖率は低下した。一方、水酸化脂肪酸は全ての条件で検出され、4 日間振とう培養後に 3 日間静置培養を行った条件 (4+3 days) で最も多かった。4+3 days における HYB 量は 7+0 days よりも 2.2 倍多い 1.19 g/L に達し、総脂肪酸の 53%を占めた。振とう培養後に静置培養を行うと、培地中に菌糸のペレットおよび培地表面に菌糸のマットが形成された (Fig. 6)。このような状態では培養液中の酸素濃度が低下し、微好気的な環境になると考えられる。これらの結果から、D2 株による水酸化脂肪酸生産には微好気的な条件が重要であることが示唆された。



**Fig. 5 D2 株の水酸化脂肪酸生産量に及ぼす振とう培養と静置培養の条件の影響**

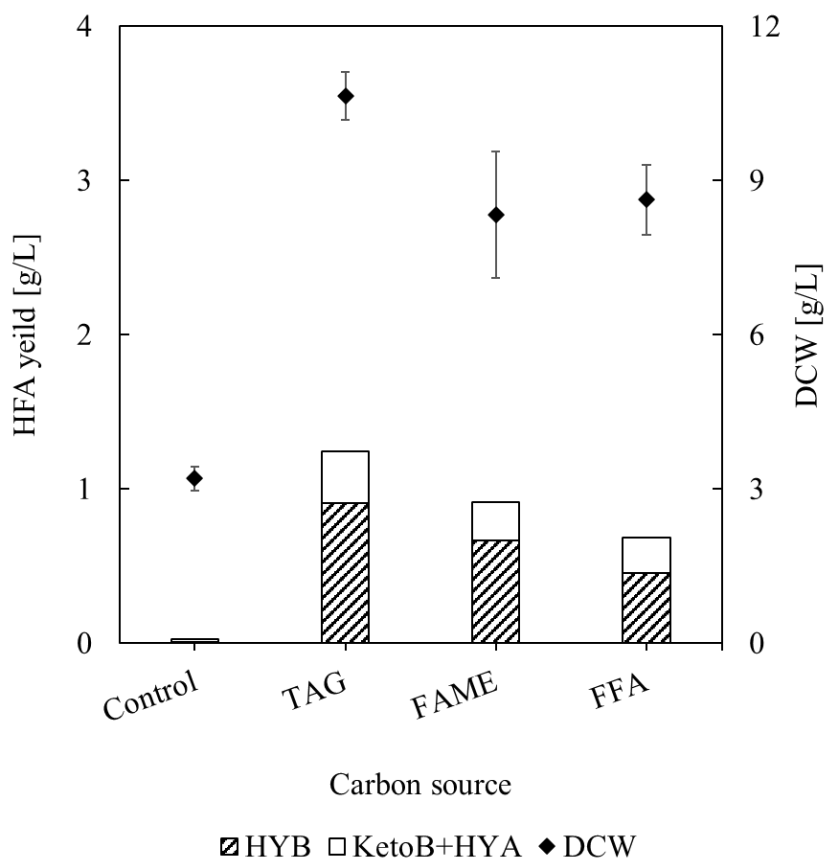
D2 株を 6% の廃グリセロールを含む CG 培地 10 mL で、計 7 日間培養した。培養時間 (X+Y) は、振とう培養条件で X 日間培養した後、静置培養条件で Y 日間培養したことを意味する。"Others" は、C16:0、C18:0、C18:1 $\omega$ 9、C18:2 $\omega$ 6、C18:3 $\omega$ 3、および C20:0 を含む。DCW は乾燥菌体重量を示し、データは平均値 $\pm$ 標準偏差を表す (n = 3)。



**Fig. 6 静置培養後の D2 株菌体**

### **5) 各構造脂質を基質とした HYB 生産**

廃グリセロールには、メタノリシス反応で生成された FAME、エステル結合が乖離した FFA、そして未反応の基質である TAG がわずかに含まれている。これらの構造脂質を炭素源として 15 g/L 添加した結果、TAG を含む培地で DCW が最も高い 10.6 g/L に達した (Fig.7)。さらに、TAG、FAME、FFA 添加条件における HYB 収量は、それぞれ 0.91 g/L、0.66 g/L、0.46 g/L に達した。脂質を添加していないコントロールの菌糸体からは水酸化脂肪酸はわずかしか検出されなかった。



**Fig. 7** 構造脂質含有培地で培養した D2 株の水酸化脂肪酸生産および生育度  
D2 株を 2.7%純グリセロールと 1%酵母エキスの培地 10mL に接種し、2 日  
後にそれぞれの構造脂質を 1.5%添加した。培養条件は、4 日間の振とうと 3  
日間の静置で行った。略称: HFA, 水酸化脂肪酸; DCW, 乾燥菌体重量; TAG,  
トリアシルグリセロール; FAME, 脂肪酸メチルエステル; FFA, 遊離脂肪酸。  
データは平均値±標準偏差を示す (n = 3)。

## 6) 推定オレイン酸水和酵素遺伝子の発現解析

HYB 生産条件および非生産条件由来の cDNA を鋳型に推定的オレイン酸水和酵素遺伝子 *D2ohy1* および *D2ohy2* の増幅を試みた結果、*D2ohy2* において HYB 生産時にのみ転写が確認された (Fig. 8)。一方、*D2ohy1* については HYB 生産との相関は示されなかったが、培養 2 日目において転写が確認された。

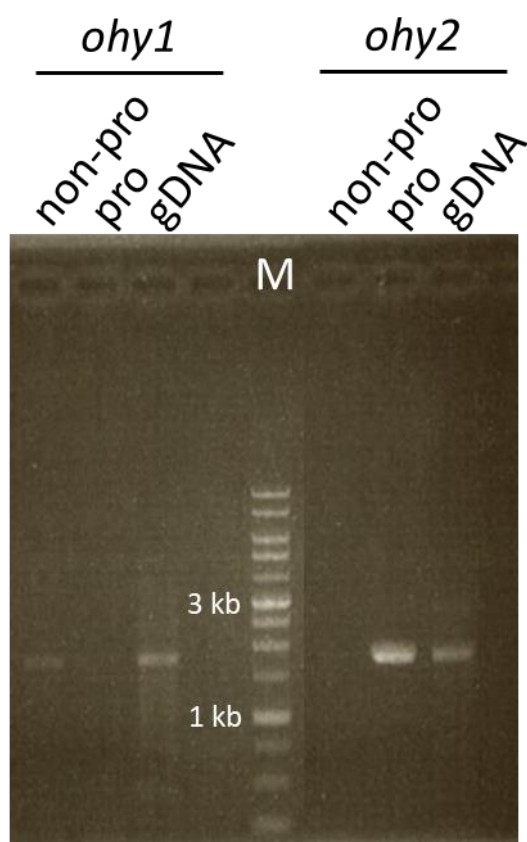


Fig. 8 D2 株由来 *ohy* 遺伝子の転写解析

略称: M, Marker; non-pro, 2 日間振とう培養 cDNA (HYB 非生産時); pro, 3 日間振とう+1 日間静置培養 cDNA (HYB 生産時); gDNA, ゲノム DNA。

## **7) D2Ohy2 における *in silico* 解析**

*D2ohy2* のシーケンス解析結果より、全長 1,758 bp (終止コドン含む) から成る配列を明らかにした。D2Ohy2 と好気性細菌 *Stenotrophomonas maltophilia* の 2 種のオレイン酸水和酵素 OhyA1 および OhyA2 についてアミノ酸配列を比較した結果、D2Ohy2 は OhyA1 と 70%、OhyA2 と 44%の相同性を示した (Fig. 9)。また、*S. maltophilia* のオレイン酸水和酵素において重要とされる FAD 結合モチーフが D2Ohy2 にも保存されていた (Fig. 9)。





## 8) 組換え大腸菌による D2Ohy2 の異種発現

組換え大腸菌 BL21 Codon+/pCold\_Ohy2 のライセートを SDS-PAGE に供した結果、約 60 kDa のタンパク質の過剰発現が確認された (Fig. 10)。D2Ohy2 の推定質量はおよそ 66 kDa であることから、目的タンパク質の発現が示唆された。

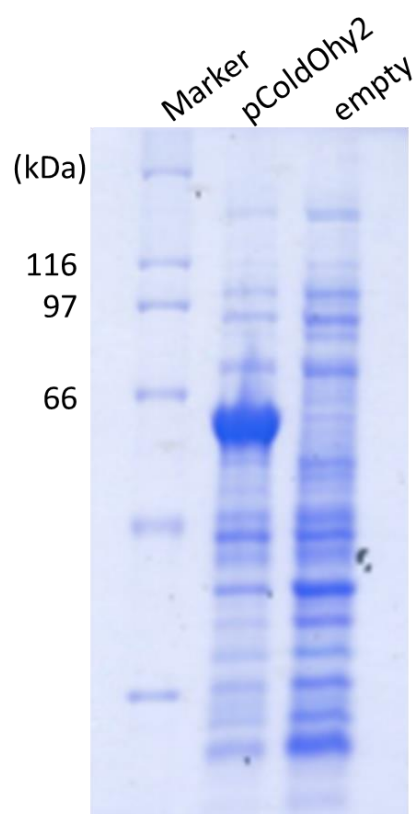


Fig. 10 タンパク質発現を誘導した組換え大腸菌ライセートの SDS-PAGE 解析

## 9) D2Ohy2 活性条件の検討

精製酵素について、オレイン酸水和活性試験によって至適温度を評価した結果、反応温度 45°C で最も高い活性を示した (Fig. 11A)。同様に、至適 pH の評価では、コハク酸緩衝液 (SAB) およびリン酸緩衝液 (KPB) の両方で pH 5.0 の条件で最も高い活性を示した (Fig. 11B)。

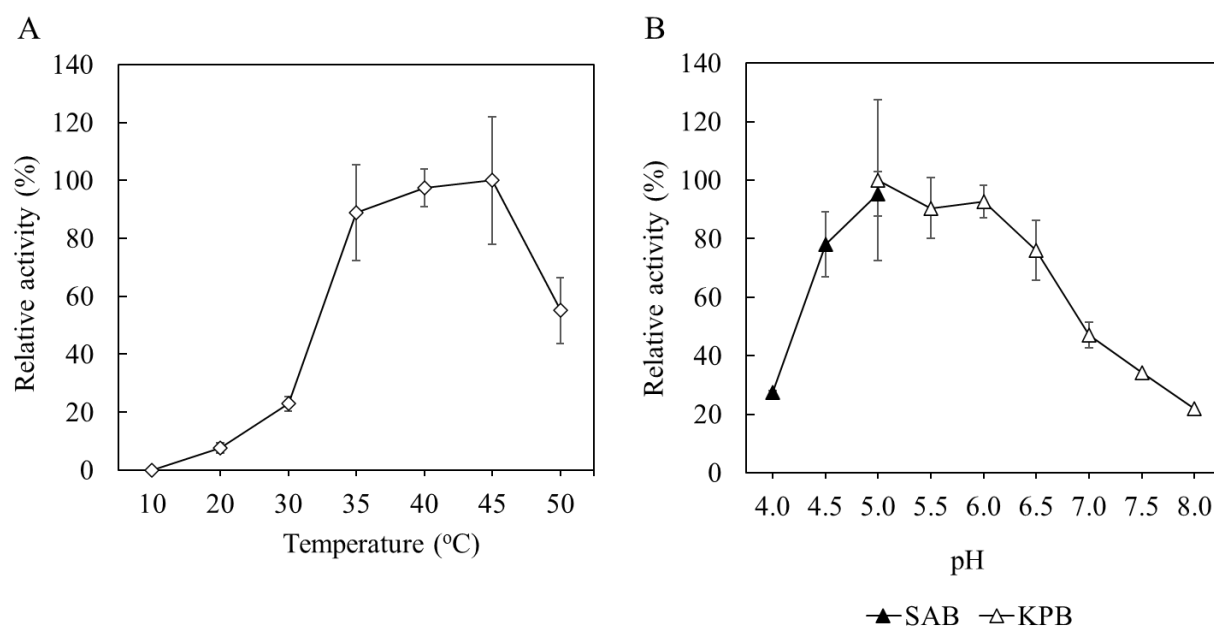


Fig. 11 精製 D2Ohy2 活性における (A) 温度および (B) pH の評価

略称: SAB, コハク酸緩衝液; KPB, リン酸緩衝液。

## 10) D2Ohy2 の基質特異性評価

D2Ohy2 において、5 つの基質に対する特異性を評価した。D2Ohy2 は C18:1 $\omega$ 9、C16:1 $\omega$ 9、C18:3 $\omega$ 6 の順で特異性が高く、C18:2 $\omega$ 6 の変換効率を 100%とした場合、それぞれ約 573%、148%、124%の変換効率を示し、C18:3 $\omega$ 3 のみが C18:2 $\omega$ 6 より低い変換効率を示した (Table 4)。D2Ohy2 と既報のバク

テリア由来水和酵素 CLA-HY (Takeuchi et al., 2015) の基質特異性を比較したところ、C18:2 $\omega$ 6 の活性を 100% とした際に C18:1 $\omega$ 9 に対する特異性はどちらも同様に高かった。一方、CLA-HY と異なり D2Ohy2 は C16:1 $\omega$ 7 と C18:3 $\omega$ 6 に対して C18:2 $\omega$ 6 よりも高い特異性を示した。さらに、12(OH)c9-18:1 に対しても活性を示したことから、D2Ohy2 が CLA-HY と大きく異なる性質を有することが示された。また、メチルエステル化した C18:1 $\omega$ 9 (C18:1 $\omega$ 9-ME) を基質としたところ、ほとんど活性を示さなかった (Table 4)。

Table 4 D2Ohy2 および CLA-HY による水和反応の基質特異性

Substrate	Product	Relative activity (%)		
		D2Ohy2	CLA-HY	
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-Octadecadienoic acid	(Linoleic acid)	10-Hydroxy- <i>cis</i> -12-octadecenoic acid	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>
<i>cis</i> -9-Hexadecenoic acid (C16)	(Palmitoleic acid)	10-Hydroxyhexadecanoic acid	148	44
<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (C18)	(Oleic acid)	10-Hydroxyoctadecanoic acid	573	335
12-Hydroxy- <i>cis</i> -9-octadecenoic acid	(Ricinoleic acid)	10, 12-Dihydroxyoctadecanoic acid	109	0.5
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-Octadecatrienoic acid	( $\alpha$ -Linolenic acid)	10-Hydroxy- <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-octadecadienoic acid	55	29
<i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-Octadecatrienoic acid	( $\gamma$ -Linolenic acid)	10-Hydroxy- <i>cis</i> -6, <i>cis</i> -12-octadecadienoic acid	124	43
<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid - ME <sup>d</sup>	(Oleic acid-ME)	10-Hydroxyoctadecanoic acid	4	

<sup>a</sup>Takeuchi et al., 2015.

<sup>b</sup>The activity of linoleic acid hydration under the condition (0.1 mM FAD, 5 mM NADH; 45°C, pH 5.0, 30 min) was defined as 100%.

<sup>c</sup>The activity of linoleic acid hydration under the condition (0.1 mM FAD, 5 mM NADH; 37°C, pH 5.5, 30 min) was defined as 100%.

<sup>d</sup>ME, methyl ester.

## 第5章 総括

バイオディーゼルや石けんの製造時に大量に排出される廃グリセロールの利用は、深刻な課題である。本研究において廃グリセロール資化性菌として *Fusarium solani* の近縁種である糸状菌 D2 株を単離した。さらに、D2 株は廃グリセロールを含む培地で培養した場合に未知脂肪酸 UK1 および UK2 を著量蓄積した。これらの脂肪酸は廃グリセロールに含まれないことから、廃グリセロール中の脂肪酸を基質とした代謝産物であると考えられた。さらに、UK1 と UK2 は TMS 誘導体化することで UK1'、UK2'、UK1-TMS、UK2-TMS に細分化され、GC/MS 分析によってそれぞれ KetoB、未反応 HYB、HYA、および HYB であることが示された。これまでに様々な油糧微生物において廃グリセロールを栄養源とした脂質生産性が評価されてきたが、これらの真核微生物の脂質からは HYA や HYB は検出されていない (Chang et al., 2015; Dedyukhina et al., 2014; Dobrowolski et al., 2016, 2020; Tchakouteu et al., 2015)。したがって、本研究で得た D2 株は非常にユニークな糸状菌であると言える。

*Elizabethkingia* sp. や *Lactobacillus* sp. などの嫌気性細菌では、脂肪酸ヒドラーターゼが C18:1 $\omega$ 9 と C18:2 $\omega$ 6 をそれぞれ HYB と HYA に変換することが知られている (Kishino and Ogawa, 2017; Todea et al., 2015)。さらに、これらの水酸化脂肪酸は、デヒドロゲナーゼによって KetoB や KetoA などの対応するオキシ脂肪酸に変換される (Kishino and Ogawa, 2017)。D2 株の脂肪酸から KetoB、HYA、HYB が検出されたことから、D2 株は脂肪酸のヒドラーターゼとそれに続くデヒドロゲナーゼを持つことが示唆された。本研究では、HYA から酸化によって生成される KetoA は検出されなかった。KetoA がこの分析条件では不安定なのか、あるいは D2 株で酵素的に代謝されているのか、さらなる研究が必要である。

高濃度の廃グリセロールが水酸化脂肪酸生産に与える影響について、D2

株および対照株として *F. solani* fsp. *pisii* NBRC 9975 株を用いて検討した。廃グリセロールには総脂肪酸のうち C18:1 $\omega$ 9 が 53.8%、C18:2 $\omega$ 6 が 29.4%含まれていた。一方、廃グリセロールを炭素源とした D2 株の菌体内脂質からは C18:1 $\omega$ 9 が 3.2%しか検出されなかったことから、D2 株は C18:1 $\omega$ 9 を効率よく HYB に変換し、総脂肪酸中の C18:1 $\omega$ 9 の割合が減少したと考えられる。また、NBRC 9975 株も D2 株と同様に C18:1 $\omega$ 9 を HYB に変換したことから、*F. solani* 近縁種が普遍的に脂肪酸水和活性を有する可能性が示された。さらに、HYA が検出されたため、これらの糸状菌の脂肪酸水和酵素が C18:1 $\omega$ 9 だけでなく C18:2 $\omega$ 6 も基質とすることが示唆された。D2 株は NBRC 9975 株よりも高濃度の廃グリセロールに耐性を示し、HYB の生産性も高かった。

廃グリセロールはメタノール、石鹼、アルカリ触媒などの不純物を含むため、微生物の生育や付加価値のある製品への変換を阻害することが報告されており (Ardi et al., 2015)、これまでの発酵プロセス研究においても、不純物含有量が少ない 2~8%の廃グリセロールが用いられてきた (Chatzifragkou et al., 2011; Liang et al., 2010; Tang et al., 2009)。一方、D2 株は不純物を多く含む廃グリセロール培地で良好に生育し、多量の HYB を生産したことから、有望な微生物脂質生産株として期待される。

振とう培養を行うと培地中の菌糸量が増加するため、培地中の溶存酸素が極端に少なくなることが予想された。これに加えて静置培養をすることで D2 株の水酸化脂肪酸生産性が向上したことから、脂肪酸水和反応は微好気条件下で進行することが示唆された。振とう培養を 4 日以上続けたところ、菌糸の嵩が増えて培地の流動性が低下した。この状況は、エアレーションが不十分となるため、培地中の溶存酸素量の低下が予想された。そこで、3 日間の振とう後、4 日間の静置培養を行ったところ、培地中には菌糸のペレットが、培地表面には菌糸のマットが形成された (Fig. 6)。このような環境で

は、液体培地中に微好氣的な状態が形成されたと考えられる。これまでのバクテリアにおける研究では、脂肪酸の水和は嫌気状態で効率的に進行していた (Joo et al., 2012; Takeuchi et al., 2015)。このことから、D2 株を静置培養することで、水酸化脂肪酸の生産性が向上したと推測された。*Fusarium spp.*は、無酸素状態でのみ硝酸呼吸を行う細菌性脱窒菌とは異なり、微好氣的な条件で硝酸呼吸を行うことが知られており (Kobayashi et al., 1996)、微好氣的な条件は D2 株のわずかな成長と脂肪酸の水和の進行の両方を可能にすると仮定した。これまでに *Mortierella alpina* (Okuda et al., 2015; Kikukawa et al., 2018; Mo et al., 2021)、*Yarrowia lipolytica* (Liu et al., 2017; Gemperlein et al., 2019)、*Lipomyces starkeyi* (Takaku et al., 2020)、Thraustochytrids (Burja et al., 2006; Patel et al., 2020) などの油糧微生物による機能性脂肪酸の生産は、グルコースを炭素源とする栄養豊富な培地で好氣的な条件で行われている。これらの研究は、糸状菌や酵母などの真核微生物による不飽和脂肪酸を含むトリアシルグリセロールの生産に基づいていた。水酸化脂肪酸 (HYA や HYB など) の生産に関しては、組換え *Es. coli* を用いた酵素変換研究が報告されているが (Joo et al., 2012; Takeuchi et al., 2015)、生細胞を用いた発酵生産の報告はない。本研究は、糸状菌を用いて安価な廃グリセロールから水酸化脂肪酸を発酵生産した初めての報告である。

D2 株は、添加した FAME、FFA、TAG のすべてを同様に水和した。細菌の Ohy 分子モデルでは FFA を基質とすることが示唆されていることから (Demming et al., 2017; Radka et al., 2021; Sun et al., 2021)、D2 株が強力な細胞外リパーゼによって添加脂質を効率的に脱エステル化していることが示唆された。さらに、Ohy の水和活性はアルコール類や塩類によって増強されることが知られており (Bever et al., 2009; Kang et al., 2016; Seo et al., 2013)、廃グリセロール中のメタノールやアルカリ性触媒がそれらに関与している可能性がある。廃グリセロール中の成分を効率的かつ効果的に利用して水酸

化脂肪酸を生産できることは、D2株が有する大きなアドバンテージであると言える。

最も研究が進んでいる *La. plantarum* 由来のオレイン酸水和酵素 CLA-HY では、高い活性を持つ条件は温度範囲が 37~42°C、pH 5.5 とされている (Takeuchi et al., 2015)。その他、*Macrococcus caseolyticus* (Joo et al., 2012) や *S. maltophilia* (Kang et al., 2017)、*Rhodococcus erythropolis* (Lorenzen et al., 2018) などのオレイン酸水和酵素は 25~35°C、pH 6.0~7.2 の範囲で高い活性を示している。一方、D2株由来のオレイン酸水和酵素はこれらのバクテリアよりも高い 45°C および低い pH 5.0 で至適活性を示した。したがって、D2Ohy2 は既知のバクテリア酵素遺伝子とは異なる性質を持つ新たな遺伝子資源であることが示唆された。さらに D2Ohy2 について、C18:1 $\omega$ 9 および C18:1 $\omega$ 9-ME を基質とした場合の変換効率から、基質のカルボキシル末端がメチル基などで修飾された場合に触媒が阻害されることが予測される。用いた 6 つの基質の内、 $\omega$ 3 位に二重結合を有する C18:3 $\omega$ 3 が最も変換効率が低かったことから、脂肪酸内にある二重結合の位置や 12(OH)c9-18:1 の様に鎖中に付加している官能基が酵素触媒に影響を及ぼすことが示唆された。オレイン酸水和酵素はアミノ酸配列に基づいて 11 の相同ファミリー (HFam1-11) に分類されており (Schmid et al., 2016)、D2Ohy2 は *Hydratase Engineering Database* (<https://hyed.biocatnet.de>) 上で最大の相同ファミリーである HFam2 と推定された。HFam2 に属する *La. acidophilus* 由来オレイン酸水和酵素 (*La*-OAH1)、*Desulfomicrobium baculatum* 由来オレイン酸水和酵素 (*Db*-OAH1) および *Gemella morbillorum* 由来オレイン酸水和酵素 (*Gm*-OAH1) は C14:1 や C16:1 の基質に対しても活性が報告されており (Schmid et al., 2016)、同ファミリーに属する D2Ohy2 も C16:1 $\omega$ 7 に対して活性を示すことは妥当であると言える。しかし、12(OH)c9-18:1 に高い活性を示した点は D2Ohy2 の遺伝子資源としての大きな魅力である。

これらの結果から、D2 株が水酸化脂肪酸生産における新たな生物資源であることに加え、遺伝子資源として真菌由来のオレイン酸水和酵素を他の油糧微生物に利用することが期待される。

## 謝辞

本論文の執筆に際し、お世話になった方々にこの場を借りてお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始御懇篤なるご指導をくださいました徳島大学 生物資源産業学部 食料科学コース 櫻谷英治教授、同講座阪本鷹行助教に心より御礼申し上げます。また、お忙しい中ご指導、ご助言いただきました徳島大学 技術支援部 常三島技術部門 友成さゆり様、京都大学 大学院農学研究科 応用生命科学専攻 発酵生理及び醸造学研究室 小川順教授、岸野重信准教授、朴 時範特定研究員、および京都大学 大学院農学研究科 産業微生物講座 竹内道樹特定助教に厚く御礼申し上げます。

最後に、日常の研究を通じて B3 研究室の皆様には多くの助言ならびに助力をいただきました。心より感謝致します。



## 参考文献

- Allen, M., Antwi-Agyei, P., Aragon-Durand, F., Babiker, M., Bertoldi, P., Bind, M., Brown, S., Buckeridge, M., Camilloni, I., Cartwright, A., 2019. Technical Summary: Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. IPCC.
- An, J.U., Oh, D.K., 2013. Increased production of  $\gamma$ -lactones from hydroxy fatty acids by whole *Waltomyces lipofer* cells induced with oleic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8265–8272.
- Apte, J.S., Marshall, J.D., Cohen, A.J., Brauer, M., 2015. Addressing Global Mortality from Ambient PM<sub>2.5</sub>. *Environ. Sci. Technol.* 49, 8057–8066.
- Ardi, M.S., Aroua, M.K., Awanis Hashim, N., 2015. Progress, prospect and challenge in glycerol purification process: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 42, 1164–1173.
- Atabani, A.E., Silitonga, A.S., Badruddin, I.A., Mahlia, T.M.I., Masjuki, H.H., Mekhilef, S., 2012. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 2070–2093.
- Batani, H., Karimi, K., 2016. Biodiesel production from castor plant integrating ethanol production via a biorefinery approach. *Chem. Eng. Res. Des.* 107, 4–12.
- Batani, H., Saraeian, A., Able, C., 2017. A comprehensive review on bio diesel purification and upgrading. *Biofuel Res. J.* 15, 668–690.
- Bevers, L.E., Pinkse, M.W.H., Verhaert, P.D.E.M., Hagen, W.R., 2009. Oleate

- hydratase catalyzes the hydration of a nonactivated carbon-carbon bond. *J. Bacteriol.* 191, 5010–5012.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Burja, A.M., Radianingtyas, H., Windust, A., Barrow, C.J., 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: Screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 1161–1169.
- Cao, Y., Zhang, X., 2013. Production of long-chain hydroxy fatty acids by microbial conversion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3323–3331.
- Cecava, M., Doane, P., Holzgraefe, D., 2008. Application of Crude Glycerin for Improved Livestock Production. US Patent Appl.
- Chang, K.J.L., Paul, H., Nichols, P.D., Koutoulis, A., Blackburn, S.I., 2015. Australian thraustochytrids: Potential production of dietary long-chain omega-3 oils using crude glycerol. *J. Funct. Foods* 19, 810–820.
- Chattopadhyay, T., 2020. Feed Water Heating System by Green Solar Energy: a Proposal. *Int. J. Power Syst.* 5, 106–109
- Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Dietz, D., Doulgeraki, A.I., Nychas, G.J.E., Zeng, A.P., 2011. Production of 1, 3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 101–112.
- Chen, Y.H., Walker, T.H., 2011. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnol. Lett.* 33, 1973–1983.
- Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C., Chen, S., 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal

- fermentation. *Process Biochem.* 42, 1537–1545.
- Chol, C.G., Dhabhai, R., Dalai, A.K., Reaney, M., 2018. Purification of crude glycerol derived from biodiesel production process: Experimental studies and techno-economic analyses. *Fuel Process. Technol.* 178, 78–87.
- Christie, W.W., 2021. The LipidWeb. Mass spectrometry of methyl ester derivatives of fatty acids.
- Cooper, O.R., Parrish, D.D., Stohl, A., Trainer, M., Nedelec, P., Thouret, V., Cammas, J.p., Oltmans, S.J., Johnson, B.J., Tarasick, D., Leblanc, T., McDermid, I.S., Jaffe, D., Gao, R., Stith, J., Ryerson, T., Aikin, K., Campos, T., Weinheimer, A., Avery, M.A., 2010. Increasing springtime ozone mixing ratios in the free troposphere over western North America. *Nature* 463, 344–348.
- Curtis, R.G., Heilbron, S.I., Jones, E.R.H., Woods, G.F., 1953. The chemistry of the triterpenes. Part XIII. The further characterization of polyporenic acid. *A. J. Chem. Soc.* 457–464.
- Dedyukhina, E.G., Chistyakova, T.I., Mironov, A.A., Kamzolova, S.v., Morgunov, I.G., Vainshtein, M.B., 2014. Arachidonic acid synthesis from biodiesel-derived waste by *Mortierella alpina*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 429–437.
- Demming, R.M., Otte, K.B., Nestl, B.M., Hauer, B., 2017. Optimized Reaction Conditions Enable the Hydration of Non-natural Substrates by the Oleate Hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica*. *ChemCatChem* 9, 758–766.
- Dobrowolski, A., Mituła, P., Rymowicz, W., Mirończuk, A.M., 2016. Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 207, 237–243.

- Dou, B., Rickett, G.L., Dupont, V., Williams, P.T., Chen, H., Ding, Y., Ghadiri, M., 2010. Steam reforming of crude glycerol with *in situ* CO<sub>2</sub> sorption. *Bioresour. Technol.* 101, 2436–2442.
- Engleder, M., Pavkov-Keller, T., Emmerstorfer, A., Hromic, A., Schrempf, S., Steinkellner, G., Wriessnegger, T., Leitner, E., Strohmeier, G.A., Kaluzna, I., Mink, D., Schurmann, M., Wallner, S., Macheroux, P., Gruber, K., Pichler, H., 2015. Structure-based mechanism of oleate hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica*. *ChemBioChem* 16, 1730–1734.
- Felizardo, P., Neiva Correia, M.J., Raposo, I., Mendes, J.F., Berkemeier, R., Bordado, J.M., 2006. Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Manage.* 26, 487–494.
- Gemperlein, K., Dietrich, D., Kohlstedt, M., Zipf, G., Bernauer, H.S., Wittmann, C., Wenzel, S.C., Müller, R., 2019. Polyunsaturated fatty acid production by *Yarrowia lipolytica* employing designed myxobacterial PUFA synthases. *Nat. Commun.* 10, 4055.
- Hájek, M., Skopal, F., 2010. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 101, 3242–3245.
- Hou, C., Forman, R.J., 2000. Growth inhibition of plant pathogenic fungi by hydroxyl fatty acids. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24, 275–276.
- Ilham, Z., Saka, S., 2016. Esterification of glycerol from biodiesel production to glycerol carbonate in non-catalytic supercritical dimethyl carbonate. *SpringerPlus* 5, 923.
- Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T., Kitade, Y., Morita, A., Tanaka, C., Gafur, A., Ohta, A., Kawai, M., Yamanaka, T., Neda, H., Ota, Y., 2012. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience.* 53, 396–401.

- Joo, Y.C., Jeong, K.W., Yeom, S.J., Kim, Y.S., Kim, Y., Oh, D.K., 2012. Biochemical characterization and FAD-binding analysis of oleate hydratase from *Macrococcus caseolyticus*. *Biochimie* 94, 907–915.
- Kang, W.R, Park, C.S., Shin, K.C, Kim, K.R., Oh, D.K., 2016. 13-hydroxy-9Z,15Z-Octadecanoic Acid Production by Recombinant Cells Expressing *Lactobacillus acidophilus* 13-Hydrase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 93, 649–655.
- Kang, W.R, Seo, M.J, Shin, K.C, Park, J.B, Oh, D.K., 2017. Comparison of Biochemical Properties of the Original and Newly Identified Oleate Hydratases from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e03351-16.
- Kerr, B.J., Dozier, W.A., Bregendahl, K., 2007. Nutritional value of crude glycerin for nonruminants. *Proceedings of the 23rd Annual Carolina Swine Nutrition Conference*. Raleigh, NC, 6–18.
- Kikukawa, H., Sakuradani, E., Ando, A., Shimizu, S., Ogawa, J., 2018. Arachidonic acid production by the oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4: A review. *J. Adv. Res.* 11, 15–22.
- Kim, B.N., Joo, Y.C., Kim, Y.S., Kim, K.R., Oh, D.K., 2012. Production of 10-hydroxystearic acid from oleic acid and olive oil hydrolyzate by an oleate hydratase from *Lysinibacillus fusiformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 929–937.
- Kishino, S., Ogawa, J., 2017. Novel fatty acid metabolism in lactic acid bacteria and the physiological function of metabolites. *Jpn. J. Lactic Acid Bact.* 28, 58–65.
- Kobayashi, M., Matsuo, Y., Takimoto, A., Suzuki, S., Maruo, F., Shoun, H., 1996. Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *J. Biol. Chem.* 271, 16263–16267.

- Koritala, S., Hou, C., Hesseltine, C., Bagby, M., 1989. Microbial conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 299–304.
- Kumar, L.R., Yellapu, S.K., Tyagi, R.D., Zhang, X., 2019. A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. *Bioresour. Technol.* 293, 122155.
- Lammers, P.J., Kerr, B.J., Honeyman, M.S., Stalder, K., Dozier III, W.A., Weber, T.E., Kidd, M.T., Bregendahl, K., 2008a. Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. *Poult. Sci.* 87, 104–107.
- Lammers, P.J., Kerr, B.J., Weber, T.E., Dozier III, W.A., Kidd, M.T., Bregendahl, K., Honeyman, M.S., 2008b. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 86, 602–608.
- Liang, Y., Cui, Y., Trushenski, J., Blackburn, J. W., 2010. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 7581–7586.
- Lin, M., Horowitz, L.W., Payton, R., Fiore, A.M., Tonnesen, G., 2017. US surface ozone trends and extremes from 1980 to 2014: quantifying the roles of rising Asian emissions, domestic controls, wildfires, and climate. *Atmos. Chem. Phys.* 17, 2943–2970.
- Liu, H.H., Zeng, S.Y., Shi, T.Q., Ding, Y., Ren, L.J., Song, P., Huang, H., Madzak, C., Ji, X.J., 2017. A *Yarrowia lipolytica* strain engineered for arachidonic acid production counteracts metabolic burden by redirecting carbon flux towards intracellular fatty acid accumulation at the expense of organic acids secretion. *Biochem. Eng. J.* 128, 201–209.
- Lorenzen, J., Driller, R., Waldow, A., Qoura, F., Loll, B., Breck, T., 2018.

- Rhodococcus erythropolis* Oleate Hydratase: a New Member in the Oleate Hydratase Family Tree-Biochemical and Structural Studies. *ChemCatChem* 101, 407–414.
- Lu, W., Ness, J.E., Xie, W., Zhang, X., Minshull, J., Gross, R.A., 2010. Biosynthesis of monomers for plastics from renewable oils. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 15451–15455.
- Lundquist, S., 2021. Explaining evenys of strong decoupling from CO<sub>2</sub> and NO<sub>x</sub> emissions in the OECD 1994-2016. *Sci. Total Environ.* 793, 148390.
- Ma, F., Hanna, M.A., 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.* 70, 1–15.
- Mo, B.K.H., Ando, A., Nakatsuji, R., Okuda, T., Takemoto, Y., Ikemoto, H., Kikukawa, H., Sakamoto, T., Sakuradani, E., Ogawa, J., 2021. Characterization of ω<sub>3</sub> fatty acid desaturases from oomycetes and their application toward eicosapentaenoic acid production in *Mortierella alpina*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 85, 1252–1265.
- OECD/FAO, 2021. Biofuels. In: *Agricultural Outlook 2021-2030*, Paris. <https://doi.org/10.1787/19428846-en>. (accessed 15 September 2021).
- Okuda, T., Ando, A., Negoro, H., Muratsubaki, T., Kikukawa, H., Sakamoto, T., Sakuradani, E., Shimizu, S., Ogawa, J., 2015. Eicosapentaenoic acid (EPA) production by an oleaginous fungus *Mortierella alpina* expressing heterologous the Δ<sup>17</sup>-desaturase gene under ordinary temperature. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 1919–1927.
- Patel, A., Rova, U., Christakopoulos, P., Matsakas, L., 2020. Assessment of fatty acids profile and omega-3 polyunsaturated fatty acid production by the oleaginous marine thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. T66 cultivated on volatile fatty acids. *Biomolecules.* 10, 694.

- Pellegrini, L., Arsel, M., Orta-Martínez, M., Mena, C.F., Muñoa, G., 2021. Institutional mechanisms to keep unburnable fossil fuel reserves in the soil. *Energy Policy*. 149, 112029.
- Radka, C.D., Batte, J.L., Frank, M.W., Young, B.M., Rock, C.O., 2021. Structure and mechanism of *Staphylococcus aureus* oleate hydratase (OhyA). *J. Biol. Chem.* 296, 100252.
- Schmid, J., Steiner, L., Fademrecht, S., Pleiss, J., Otte, K.B., Hauer, B., 2016. Biocatalytic study of novel oleate hydratases. *J. Mol. Catal. B Enzyme*. 133, 243-249.
- Seo, M.H., Kim, K.R., Oh, D.K., 2013. Production of a novel compound, 10,12-dihydroxystearic acid from ricinoleic acid by an oleate hydratase from *Lysinibacillus fusiformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8987–8995.
- Slinn, M., Kendall, K., Mallon, C., Andrews, J., 2008. Steam reforming of biodiesel by-product to make renewable hydrogen. *Bioresour. Technol.* 99, 5851–5858.
- Song, J.W., Lee, J.H., Bornscheuer, U.T., Park, J.B., 2014. Microbial Synthesis of Medium-Chain  $\alpha,\omega$ -Dicarboxylic Acids and  $\omega$ -Aminocarboxylic Acids from Renewable Long-Chain Fatty. *Adv. Synth. Catal.* 356, 1782–1788
- Sun, Q.F., Zheng, Y.C., Chen, Q., Xu, J.H., Pan, J., 2021. Engineering of an oleate hydratase for efficient C10-Functionalization of oleic acid. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 537, 64–70.
- Takaku, H., Matsuzawa, T., Yaoi, K., Yamazaki, H., 2020. Lipid metabolism of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 6141–6148.
- Takeuchi, M., Kishino, S., Hirata, A., Park, S.B., Kitamura, N., Ogawa, J., 2015.



- Characterization of the linoleic acid  $\Delta 9$  hydratase catalyzing the first step of polyunsaturated fatty acid saturation metabolism in *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 636–641.
- Talebian-Kiakalaieh, A., Amin, N.A.S., Rajaei, K., Tarighi, S., 2018. Oxidation of bio-renewable glycerol to value-added chemicals through catalytic and electro-chemical processes. *Appl. Energy.* 230, 1347–1379.
- Tan, H.W., Abdul Aziz, A.R., Aroua, M.K., 2013. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27, 118–127.
- Tang, S., Boehme, L., Lam, H., Zhang, Z., 2009. *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. *Biochem. Eng. J.* 43, 157–162.
- Tchakouteu, S.S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A.A., Aggelis, G., Papanikolaou, S., 2015. Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: Strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *J. Appl. Microbiol.* 118, 911–927.
- Todea, A., Hiseni, A., Otten, L.G., Arends, I.W.C.E., Peter, F., Boeriu, C.G., 2015. Increase of stability of oleate hydratase by appropriate immobilization technique and conditions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 119, 40–47.
- Tremblay, A.Y., Montpetit, A., 2017. The in-process removal of sterol glycosides by ultrafiltration in biodiesel production. *Biofuel Res. J.* 4, 559–564.
- Vohra, K., Vodonos, A., Schwartz, J., Marais, E.A., Sulprizio, M.P., Mickley, L.J., 2021. Global mortality from outdoor fine particle pollution generated by fossil fuel combustion: Results from GEOS-Chem. *Environ.*

Res. 195, 110754.

- Volkov, A., Liavonchanka, A., Kamneva, O., Fiedler, T., Goebel, C., Kreikemeyer, B., Feussner, I., 2010. Myosin cross-reactive antigen of *Streptococcus pyogenes* M49 encodes a fatty acid double bond hydratase that plays a role in oleic acid detoxification and bacterial virulence. *J. Biol. Chem.* 285, 10353–10361.
- Wan Isahak, W.N.R., Che Ramli, Z.A., Ismail, M., Jahim, J.M., Yarmo, M.A., 2015. Recovery and Purification of Crude Glycerol from Vegetable Oil Transesterification. *Sep. Purif. Rev.* 44, 250–267.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in: Innis, M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.), *PCR Meth Appl.* San Diego: Academic Press, 315–322.