

マングローブ域からの(R)-3-ヒドロキシ酪酸資化菌の分離とその特性

常盤豊、世嘉良宏斗、市場俊雄

沖縄県中城湾内のマングローブ域3ヶ所から、(R)-3-ヒドロキシ酪酸の資化菌として、*Halomonas* 属、*Paracoccus* 属および *Pseudomonas* 属の微生物を分離した。(R)-3-ヒドロキシ酪酸資化菌の中には、生分解性プラスチックとして注目されるポリ(R)-3-ヒドロキシ酪酸を生産する微生物、また、1,3-ブタンジオールやインドールを代謝できる微生物も存在した。インドールを転換する微生物の中には、インジゴ様の粒子を生成する菌株も存在した。

1 はじめに

マングローブは、熱帯から亜熱帯地域の河口汽水域に形成される森林のことであり、沖縄県では、西表島の仲間川河口、石垣島の名蔵アンパル、宮古島の島尻などに広大なマングローブが発達している。沖縄本島においても、漫湖、億首川河口、大浦湾、慶佐次湾などに比較的広いマングローブが形成されている。また、湾の中など波の影響が少ない海岸でもマングローブ植物が生育するところもある。



図1 慶佐次湾に広がるマングローブ林

図1は、沖縄県国頭郡東村の慶佐次湾のヒルギ林を示す。一般に、マングローブ域では栄養源が豊富なため、ヒルギ類の植物のほかに、シオマネキやウミナ、トビハゼ、シギなどの多くの生きものが生息する豊かな生態系が構成されている。マングローブ林の広い部分は、満潮のときには海水に浸かり、有機物が多い海水や地中では好気性微生物とともに乳酸菌などの(通性)嫌気性微生物が盛んに活動している。

最近、琉球地域の伝統染織に広く使われている藍染め液には、(通性)嫌気性の乳酸菌とともに好気性の *Halomonas* 属の細菌が共存しており、マングローブ域とも類似していることが明らかになってきた¹⁾。また、藍染め液は、pH10以上の高いアルカリ性であるため、藍染め液中の乳酸菌や *Halomonas* 属の細菌も好アルカリ性(アルカリ耐性)を示す。さらに、*Halomonas* 属の細菌は、嫌気あるいは微好気的環境において、菌体内に蓄積したポリ(R)-3-ヒドロキシ

酪酸(PHB)を(R)-3-ヒドロキシ酪酸(R-3HB)に分解して菌体外に放出することも報告されている²⁾。R-3HBは、現在、生分解性プラスチックや抗生物質、医薬品の原料として注目されているが、R-3HBはヒトの血液中にも常に存在する重要なエネルギー源の一つである。今回、通気状態が周期的に変動する生態系におけるR-3HBの役割を解明するため、マングローブ域からR-3HB資化菌を分離し、その特性について検討した。

2 実験方法

2-1 試薬および機器

微生物の分離および培養には、ペプトン(Becton, Dickinson and Company)、酵母エキス(Becton, Dickinson and Company)、酢酸ナトリウム(関東化学)、塩化ナトリウム(ナカライテスク)、塩化カルシウム二水和物(和光純薬工業)、硫酸第一鉄七水和物(和光純薬工業)、リン酸水素ナトリウム(和光純薬工業)、リン酸二水素ナトリウム(和光純薬工業)、硫酸マグネシウム(関東化学)、モリブデン(VI)酸二ナトリウム二水和物(和光純薬工業)、タングステン(VI)酸ナトリウム二水和物(和光純薬工業)、硫酸マンガン(II)五水和物(ナカライテスク)、水酸化ナトリウム(和光純薬工業)、炭酸ナトリウム(和光純薬工業)、炭酸水素ナトリウム(和光純薬工業)、D-グルコース(和光純薬工業)、1,3-ブタンジオール(東京化成)、インドール(和光純薬工業)、寒天(和光純薬工業)を使用した。HPLC用移動相には、脱イオン水、硫酸(和光純薬工業)を使用した。HPLC分析用標準試薬には、クロトン酸(和光純薬工業)、L-乳酸(Sigma-Aldrich)、D-グルコース(和光純薬工業)を使用した。

HPLC分析は、送液システム(Waters 600 controller)、オートサンプラー(Waters 717 plus Autosampler)、カラムオープン(Waters CHM)、脱気システム(Waters SDM)、RI検出器(Waters 410 Differential Refractometer)、UV検出器(Shimadzu SPD-6AV)、イオン交換カラム(Bio-Rad Aminex HPX-87H, 7.8×300mm)を用いて行った。

分光光度計は、UV/VIS Spectrophotometer V-550(日本分光)を使用した。

2-2 R-3HBの調製

R-3HBは、*Cupriavidus necator* 由来 PHB からブタノリスにより得た(R)-3-ヒドロキシ酪酸ブチルエステルをイオン交換樹脂(DIAION PK228)で加水分解して調製した。

2-3 培地組成

培地の組成は蒸留水 1L に対して、酵母エキス 0.1g、硫酸アンモニウム 1.0g、リン酸水素二カリウム 1.6g、リン酸二水素カリウム 0.2g、硫酸マグネシウム 0.2g、塩化ナトリウム 0.1g、塩化カルシウム二水和物 20mg、硫酸第一鉄七水和物 16mg、モリブデン(VI)酸二ナトリウム二水和物 0.5mg、タングステン(VI)酸ナトリウム二水和物 0.5mg、硫酸マンガン(II)五水和物 0.5mg を含む基本培地に、R-3HB 2.0g(あるいは1,3-ブタンジオール 2.5g)を添加した。また、PHBの生産用培地としては、硫酸アンモニウムを除いた基本培地に酵母エキス 0.15g、ペプトン 1.0g およびグルコース 30g を追加した。pH は水酸化ナトリウムと炭酸-重炭酸緩衝液を用いて調整した。平板培地は上述の培地に寒天 15g を加えて固めたものを用いた。

さらに、インドールの代謝を調べるための培地は、上記の基本培地にインドール 0.2g とペプトン 1.0g を添加し、pH7.5 に水酸化ナトリウムで調整したものを用いた。

2-4 R-3HB 資化菌の集積と分離

R-3HB 資化菌の1次集積は、中城湾埋め立て地の肝高橋から州崎橋までの間のマングローブ域3ヶ所(MNG-①新港公園前、MNG-②沖縄健康バイオテクノロジー研究開発センター前、MNG-③沖縄県工業技術センター前)の泥混じりの海水試料 0.5ml を、pH 7.5 と pH10 に調整した 4.5ml 液体培地に添加して、30℃で5日間振とう培養を行った。同じ条件で2次集積は3日間、3次集積は16時間振とう培養を行った後、希釈して寒天平板に塗布し生育させ、R-3HB 資化菌の分離を行った。また、比較として、マングローブ域の海水が一部流入している河川水(KSN-④)およびマングローブ域から約50m離れた県工業技術センターの庭土(OITC-⑤)および今帰仁村古宇利島の砂浜の海藻(SW-⑥)の試料からもR-3HBの資化菌の集積と分離を行った。

2-5 分離菌株の16S rRNA 系統解析

寒天培地または液体培地で培養した分離株の菌体を prepGEM bacteria (ZyGEM) で処理してから遠心分離し、上清を分け取って DNA 粗抽出液とした。これを Bacterial 16S rDNA PCR Kit (タカラバイオ) の PCR 用反応試薬およびプライマーミックス試薬と混合してサーマルサイクラー(BIO-RAD, MyCycler)でPCR処理することにより、

16S rRNA 遺伝子領域を増幅した。得られた PCR 産物は NucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL) で精製し、チップ型電気泳動装置(Agilent, Bioanalyzer 2100)で純度および収量を確認した。16S rRNA 遺伝子のうち解析した上流側約 500bp の塩基配列について、BLAST プログラムを用いてデータベース(DDBJ/EMBL/GenBank)上の配列と相同性検索を行い、細菌の種類を推定した。

2-6 菌体内の PHB 含量の測定

菌体に含まれる PHB は、濃硫酸でクロトン酸に変換して定量した。具体的には、30℃で3日間振とう培養した培養液から遠心分離により集菌した菌体を生理食塩水で洗浄した後、105℃で5時間乾燥した。乾燥菌体に濃硫酸 0.5ml を添加して 100℃で1時間分解した後、4N 水酸化ナトリウム 4.5ml を添加して、室温冷却した(pH1~2)。冷却後、0.45 μm のフィルターでろ過してから、HPLC 分析により定量した。

2-7 インドール代謝物とインジゴの分析

インドール代謝物の吸光波長は、分光光度により測定した。インドールからのインジゴの生成は、日本ウォーターズ社製の ACQUITY UPLC H-CLASS を使用して確認した。

2-8 R-3HB、1,3-ブタンジオールなどの定量

分離菌株のコロニーから1白金耳をとり、0.2%R-3HB あるいは0.25%1,3-ブタンジオールを含む液体培地に接種して、R-3HB の場合は3日間、1,3-ブタンジオールの場合は5日間、30℃で振とう培養した後、培養液を 0.45 μm のフィルターでろ過して、HPLC 分析により残存 R-3HB あるいは1,3-ブタンジオールを定量した。

3 実験結果および考察

3-1 藍染め液とマングローブ域の微生物の類似性

図2に藍染め液と亜熱帯マングローブ域の類似性を示した。

藍染め液は、一般に、*Alkalibacterium* 属に代表される通性嫌気性の好アルカリ性乳酸菌とともに *Halomonas* 属に代表される好気性・好アルカリ性の乳酸資化菌が存在する微生物共生系であることが明らかになってきた¹⁾。前者は嫌気環境で糖から乳酸を生産するとともに藍(インジゴ)の還元を行い、後者は好気環境で藍染め液に蓄積した乳酸を資化するとともに PHB を蓄積して共生系を安定に維持するのに役立っていると考えられる。

また、*Halomonas* 属の多くの細菌は、嫌気的な条件で菌体に蓄積した PHB を分解して、菌体外へモノマーの R-3HB を放出することが知られている。読谷山花織や知

花織の藍染め液には、R-3HB を分解する *Nesterenkonia* 属、*Citricoccus* 属、*Dietzia* 属、*Microbacterium* 属、*Bacillus* 属などの微生物が存在することを報告した¹⁾。

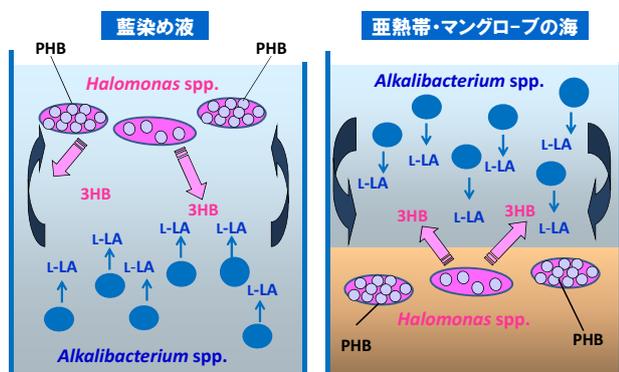


図 2 藍染め液とマングローブ域の類似性

一方、亜熱帯マングローブ域やその周辺については、藍還元能がある好アルカリ性乳酸菌の *Alkalibacterium* 属³⁾ や *Amphibacillus* 属¹⁾、*Oceanobacillus* 属¹⁾などの微生物が分離されている^{4,5)}。また、好気性の *Halomonas* 属¹⁾および *Bacillus* 属¹⁾の微生物もマングローブ域から分離されている。

藍染め液は、1日に1～2回、人為的に攪拌することにより、また、マングローブ域では、1日に2回繰り返される満潮と干潮の潮位の変化により、嫌気環境と好気環境が周期的に繰り返されている。

以上のことから、藍染め液とマングローブ域は、生息する微生物や周期的に通気状態が変動することなど類似していることが理解できる。

3-2 R-3HB 資化菌の探索

マングローブ域から R-3HB 資化菌を分離してその特性を検討することは、通気状態が周期的に変動するマングローブ域や藍染め液の生態系における R-3HB の役割を解明するのに必要である。

中城湾埋め立て地の肝高橋から州崎橋までの間のマングローブ域3ヶ所 (MNG-①、MNG-②、MNG-③) の泥混じりの海水試料を好気的に集積培養した場合、R-3HB 資化菌として、pH7.5 および pH10 においてそれぞれ6株、3株を分離することができた。

また、マングローブ域に隣接する河川水 (KSN-④) や庭土 (OITC-⑤)、古宇利島の海藻 (SW-⑥) からも R-3HB 資化菌として計7株が分離できた。

図3に、マングローブ域3ヶ所およびマングローブに隣接する庭土からの R-3HB 資化菌のコロニーを示した。0.2%R-3HB を含む液体培地 (pH10) で 30℃、16 時間振とう培養した培養液を $10^4 \sim 10^6$ 倍に希釈して、0.1ml を同

じ組成の寒天平板に塗布し、30℃で3日間好気的に培養したものである。

3次集積培養後、それぞれの寒天平板上には、異なる微生物と思われるコロニーが1～3種類ほど観察された。

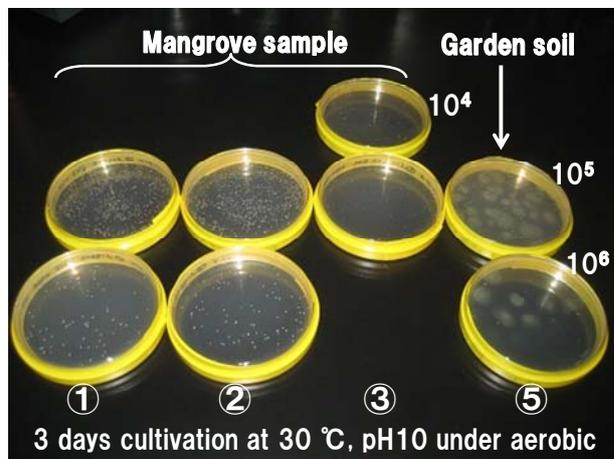


図3 マングローブ域3ヶ所と庭土からの R-3HB 資化菌のコロニー

3-3 R-3HB 資化菌の同定

マングローブ域3ヶ所からの分離菌9株およびマングローブ域の近隣や海藻からの分離菌7株について、16S rRNA 遺伝子解析による簡易同定を行い、その結果を図4に示した。図中のそれぞれの菌株名の後の数字は、分離菌株と標準菌株を比較した塩基配列の一致度をパーセントで示したものである。

R-3HB 資化菌として、マングローブ域3ヶ所からは、pH7.5 の集積において *Pseudomonas* 属と *Paracoccus* 属、pH10 の集積において *Halomonas* 属と *Paracoccus* 属の微生物が分離された。一方、マングローブ域の近隣からは、pH7.5 の集積において *Pseudomonas* 属や *Achromobacter* 属、*Acinetobacter* 属、pH10 の集積において *Pseudomonas* 属と *Bacillus* 属の微生物が分離された。また、海藻からは pH7.5 の集積において *Pseudomonas* 属の微生物が分離されている。pH7.5 と pH10 で、共通する属の微生物も分離されているが、*Halomonas* 属と *Bacillus* 属の微生物は、pH10 のみの集積から取得された。OITC-⑤の土壌試料からは、4属の微生物が分離されたが、*Pseudomonas* 属はマングローブ域と共通していた。分離された R-3HB 資化菌の中に、*Pseudomonas indoloxydans* や *Acinetobacter tondooii* などインドール代謝に関係する微生物が含まれるのが特徴的である。

MNG-① pH 7.5		pH10	
-Lt-1	<i>Pseudomonas mendocina</i> 98.76	-Mw-1	<i>Halomonas mongoliensis</i> 98.87
-Mp-1	<i>Paracoccus aestuarii</i> 98.63	-Mp-2	<i>Paracoccus aestuarii</i> 98.45
MNG-②			
-Lt-1	<i>Pseudomonas indoloxydans</i> 98.76	-lb-1	<i>Halomonas mongoliensis</i> 98.87
-Mw-2	<i>Pseudomonas indoloxydans</i> 97.23		
MNG-③			
-Lt-2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 98.77		
-My-3	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 99.23		
KSN-④			
-My-1	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> 99.08		
OITC-⑤			
-Sw-1	<i>Achromobacter ruhlandii</i> 95.08	-Lt-1	<i>Pseudomonas indoloxydans</i> 98.46
-Mw-1	<i>Acinetobacter tondoi</i> 97.97	-Mw-2	<i>Bacillus pseudofirmus</i> 99.23
SW-⑥			
-Lt-1	<i>Pseudomonas oleovorans</i> 97.22		
-Lt-2	<i>Pseudomonas indoloxydans</i> 97.38		

図4 マングローブ域とその隣接部等からの分離菌

3-4 分離した R-3HB 資化菌の特性

表1には、マングローブ域やその隣接部、海藻から分離した R-3HB 資化菌の特性について示した。

表1 R-3HB 資化菌の特性

Isolated strain	Remained		0.02% Indole		PHB/Cell (g/L)
	R-3HB	1,3-BD	Growth	particle Blue	
pH10					
① <i>Halomonas mongoliensis</i>	1.78		—		0.0/0.2
① <i>Paracoccus aestuarii</i>	1.07	2.43	—		0.3/1.1
② <i>Halomonas mongoliensis</i>	2.08	2.44	—		0.0/0.3
⑤ <i>Pseudomonas indoloxydans</i>	0.41	0.00	—		0.0/0.3
⑤ <i>Bacillus pseudofirmus</i>	0.00	2.53	—		0.0/0.7
pH7.5					
① <i>Pseudomonas mendocina</i>	0.00	0.16	+	1	0.0/0.7
① <i>Paracoccus aestuarii</i>	0.00		+	0	0.0/0.3
② <i>Pseudomonas indoloxydans</i>	0.00	0.16	+	5	0.0/0.7
② <i>Pseudomonas indoloxydans</i>	0.00	0.26	+	10	0.0/0.8
③ <i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.00	0.57	+	2	—/0.2
③ <i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.91	2.54	—	0	—/0.0
④ <i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	0.08	0.68	+	0	—/0.0
⑤ <i>Achromobacter ruhlandii</i>			+	0	—/0.0
⑤ <i>Acinetobacter tondoi</i>	0.00		+	Many	
⑥ <i>Pseudomonas oleovorans</i>	0.00	0.24	+	0	0.0/0.6
⑥ <i>Pseudomonas indoloxydans</i>	0.00	0.48	+	0	0.0/0.5

マングローブ域から分離した *Pseudomonas* 属の MNG-①-Lt-1 株、MNG-②-Lt-1 株、MNG-②-Mw-2 株、MNG-③-Lt-2 株、および *Paracoccus* 属の MNG-①-Mp-1 株は、30℃、3日間の振とう培養により 0.2% R-3HB を完全に消費した。また、マングローブ域の近隣より分離した好アルカリ性（アルカリ耐性）*Bacillus* 属の OITC-⑤-Mw-2 株、*Acinetobacter* 属の OITC-⑤-Mw-1 株、海藻より分離した *Pseudomonas* 属の SW-⑥-Lt-1 株および SW-⑥-Lt-2 株なども 30℃、3日間の振とう培養により 0.2% R-3HB を完全に消費した。

一方、R-3HB 資化菌の中で、*Paracoccus* 属の MNG-①-Mp-2 株は、菌体内に乾燥菌体当たり 27% の PHB を蓄積した。今回分離した *Halomonas* 属の MNG-①-Mw-1 株および MNG-②-lb-1 株には PHB の蓄積が認められなかったが、一般には、多くの *Halomonas* 属の菌株は PHB を蓄積することが知られている。菌体内に貯蔵物質として PHB を蓄積する微生物は、PHB の分解産物である R-3HB を資化できるのは当然と考えられる。また、PHB は海洋や嫌

気的な環境でも優れた分解性を示す生分解性プラスチックとして注目されているが、PHB 分解菌と R-3HB 資化菌との関係にも興味を持たれる。

次に、R-3HB の代謝関連化合物である 1,3-ブタンジオールについては、マングローブ域から分離した *Pseudomonas* 属の MNG-①-Lt-1 株、MNG-②-Lt-1 株、MNG-②-Mw-2 株および MNG-③-Lt-2 株は、30℃、5日間の振とう培養により 0.25% の 1,3-ブタンジオールを高い割合で消費した。また、マングローブ域の近隣より分離した好アルカリ性（アルカリ耐性）*Pseudomonas* 属の OITC-⑤-Lt-1 株は、30℃、5日間の振とう培養により 0.25% の 1,3-ブタンジオールを完全に消費した。その他、海藻より分離した *Pseudomonas* 属の SW-⑥-Lt-1 株および SW-⑥-Lt-2 株なども 30℃、5日間の振とう培養により 1,3-ブタンジオールをかなりの割合で消費した。

R-3HB 資化菌を利用して、ラセミ体の 1,3-ブタンジオールや 3-ヒドロキシ酪酸（3HB）から 1,3-ブタンジオールや 3HB の光学活性体が効率的に生産できるかどうかは今後の課題である。

3-5 R-3HB 資化菌のインドール代謝

さらに、R-3HB 資化菌のインドール代謝能について検討した。pH7.5 における集積培養により分離した大部分の R-3HB 資化菌は、0.02% のインドールを含む培地で 30℃ 3日間培養すると良く生育し、培養液を淡黄色に変化させた。淡黄色に変化した培養液を 25℃ で 4日間静置すると、*Pseudomonas* 属の MNG-①-Lt-1 株、MNG-②-Lt-1 株、MNG-②-Mw-2 株、MNG-③-Lt-2 株および *Acinetobacter* 属の OITC-⑤-Mw-1 株は多くのインジゴ様粒子を生成した。特に、*Pseudomonas* 属の MNG-②-Mw-2 株と *Acinetobacter* 属の OITC-⑤-Mw-1 株は多くのインジゴ様粒子を生成した。

図5は、*Acinetobacter* 属の OITC-⑤-Mw-1 株を 0.02% インドールを含む培地で 30℃、17時間好気的に培養した培養液である。培養液は淡黄色に変化して 304 nm と 370 nm に吸収ピークを示した。また、培養液表面の泡には紺色の粒子が認められた。この紺色粒子は、日本ウォーターズ社製の ACQUITY UPLC H-CLASS により、インジゴであることを確認した。

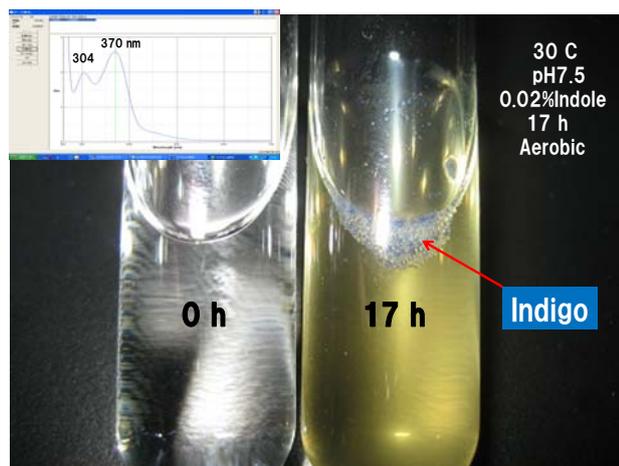


図5 分離菌株によるインドールからインジゴの生産

このことから、図6に示すように、インドールは *Acinetobacter* 属の OITC-⑤-Mw-1 株の菌体内あるいは表面で酵素の作用を受けて、インジカンあるいはインドキシルに変換され、最終的にはインドキシルが化学的に酸化されてインジゴが生成したと考えられる。

高橋らは、すでに、秋田県黒川油田から分離した *Acinetobacter calcoaceticus* BT8 株によるインドールからのインジゴ生産について報告している⁶⁾。

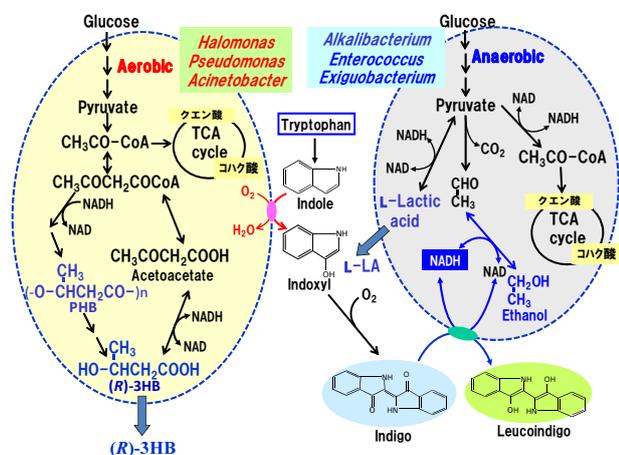


図6 R-3HB 資化菌によるインジゴの生産

3-6 まとめ

今回、藍染め液とマングローブ域の微生物学的な類似性に注目して、通気状態が周期的に変動する生態系における R-3HB の役割を解明するため、マングローブ域やその近隣、海藻から R-3HB 資化菌を分離し、その特性について検討した。

R-3HB 資化菌として、マングローブ域から *Halomonas* 属、*Paracoccus* 属および *Pseudomonas* 属の微生物を分離することができた。また、マングローブ域の近隣や海藻からは、*Pseudomonas* 属の他に、*Acinetobacter* 属や *Bacillus*

属、*Achromobacter* 属の微生物が分離できた。好気性微生物にとって、R-3HB は嫌気的環境下における優れた栄養源であるのかも知れない。

R-3HB 資化菌の中には、R-3HB の代謝関連化合物である 1,3-ブタンジオールを資化できる微生物や、R-3HB の重合体である PHB を生産できる微生物も存在した。

また、R-3HB 資化菌として、マングローブ域やその近隣および海藻から分離した微生物のなかには、インドール代謝に関わる *Pseudomonas indoloxydans* や *Acinetobacter todoi* に代表される種々の菌株が存在していた。さらに、インドールからインジゴ様の粒子を生成する株も存在していたので、R-3HB 資化菌によるインドールからインジゴの生成機構についても考察した。

4 おわりに

図7には、沖縄県本部町で古くから行われてきたリュウキュウアイ浸漬液からの藍染料の製造過程を示した。

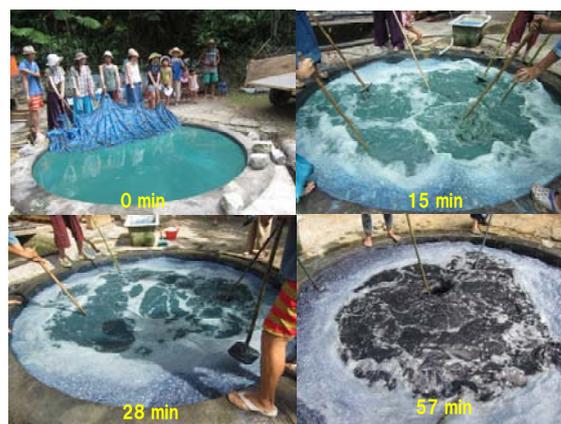


図7リュウキュウアイ浸漬液からの泥藍の製造

図7の0分は、浸漬液から植物体を除去した直後のインドキシルを含む抽出液であり、明るい緑色（エメラルドグリーン）を呈している。図中の15分、28分、57分はそれぞれ攪拌時間であり、インドキシルが酸化されてインジゴに変換されていく過程を示している。抽出液の色が深緑を経て、紺色に変化していくのがよくわかる。

マングローブ域とその近隣から、R-3HB 資化菌として分離した菌株の中に、インドールをインドキシルに変換してインジゴを生成する微生物が存在することが明らかになった。このことから、有機物が豊富なマングローブ域やその近隣においても、必須アミノ酸であるトリプトファン（魚卵に特に多く含まれる）からインドールを経てインドキシル、インジゴへの化学変化が展開されている可能性がある。亜熱帯珊瑚礁の海の色には、海底や浮遊物による太陽光線の反射や散乱現象だけでなく、微生物の代謝物の関与もあるのではないかとと思われる。

R-3HB は、生分解性プラスチックや抗生物質、医薬品の原料として注目されているが、図 8 に示すように、ヒトにおいても大変重要な物質であり、グルコースと同様に、常に血液の中に一定量が含まれている⁷⁾。R-3HB とグルコースに乳酸を加えた三つの代謝物のバランスは、酸素濃度が周期的に変化する微生物生態系にとっても重要と思われる。



図 8 ヒトにおける R-3HB の機能

現在、R-3HB は、バイオリファイナリーの主ターゲット物質として大変注目されている。今後さらに、バイオマスから R-3HB を効率的に生産するための研究開発が必要である。

本研究は「バイオマスからの高機能化学物質生産技術の実証 (2012 技 002)」の一環として行ったものである。

参考文献

- 1) 常盤豊、世嘉良宏斗、市場俊雄、琉球地域の伝統産業「藍染め」に関わる微生物の特性－宮古島、久米島、沖縄本島の藍染め液について－、沖縄県工業技術センター平成 24 年度研究報告書、**15**、13-21 (2013)
- 2) Y. Kawata, K. Kawasaki, Y. Shigeri: Efficient secreted production of (R)-3-hydroxybutyric acid from living *Halomonas* sp. KM-1 under successive aerobic and microaerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **96**, 913-920 (2012)
- 3) M. Ishikawa et. al.: *Alkalibacterium thalassium* sp. nov., *Alkalibacterium pelagium* sp. nov., *Alkalibacterium kapii* sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria isolated from marine organisms and salted foods collected in Japan and Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1215-1226 (2009)
- 4) K. Aino, T. Narihiro, K. Minamida, Y. Kamagata, K.

Yoshimune, I. Yumoto: Bacterial community characterization and dynamics of indigo fermentation.

FEMS Microbiol. Ecol., **74**, 174-183 (2010)

- 5) 世嘉良宏斗、常盤豊、照屋全才、市場俊雄、好アルカリ性乳酸生産微生物の探索 (I)、沖縄県工業技術センター平成 21 年度研究報告書、**12**、1-4 (2010)
- 6) 高橋巧佑、上松仁、微生物変換によるインジゴの生産－菌株の分離と諸性質－、秋田高専研究紀要 **44**、75-80 (2009)
- 7) G. F. Cahill: Fuel Metabolism in Starvation. *Annu. Rev. Nutr.* **26**, 1-22 (2006)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。