

- 913 超好熱菌 *Thermococcus profundus* の色素依存性 L-プロリン脱水素酵素：特徴と L-プロリン分析への応用  
(徳島大・工・生物工) ○大島 敏久, 高松嘉則、里村武範、布浦直樹、櫻庭 春彦

【目的】色素依存性脱水素酵素は、DCIP (2,6-dichlorophenol indophenol) などを電子受容体として、アミノ酸、有機酸などの脱水素反応を触媒する一群の酵素である。これらの多くは細胞膜に存在する電子伝達系の初発酵素として生体エネルギー生産系に関与している。これらはバイオセンサー用酵素として、利用面に高い潜在性を有するが、膜結合性のものが多く、安定性に課題がある。本研究では、安定性の高い酵素の生産が期待できる超好熱菌において、色素依存性 L-プロリン脱水素酵素を見だし、*T. profundus* DSM 9503 から精製し、特徴を明らかにした。また、本酵素の L-プロリンの定量への利用を検討した。

【方法、結果】嫌氣的に 82°C で約 18 時間培養して得た *T. profundus* DSM 9503 の細胞抽出液から本酵素を電気泳動的に均一に精製した。本酵素は、分子質量が 160 kDa で、40, 50 kDa の 2 種類の異なるサブユニットからなる  $\alpha 2 \beta 2$  構造をとる。本酵素は 70°C、10 分間の熱処理でも失活せず、高い耐熱性を示した。本酵素の電子供与体として L-プロリンのみが作用し、電子受容体としては DCIP の他にフェリシアン化カリウムなども作用した。本酵素反応の最適 pH は 7.5 付近に存在し、反応の最適温度は 70°C 以上に認められた。本酵素の可視部の吸収スペクトルはフラビン酵素としての特徴を示し、酵素抽出液の HPLC では FAD が検出された。さらに、本酵素を用いて L-プロリンの定量分析を行ったところ、L-プロリン濃度 (< 2.5mM) と酵素活性の間に直線関係が認められ、L-プロリンの酵素分析が可能であることが分かった。

Dye-linked L-proline dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*: characterization and application to the L-proline determination

○Toshihisa Ohshima, Yoshinori Takamatsu, Takenori Satomura, Naoki Nunoura, Haruhiko Sakuraba (Dept. of Biol. Sci. & Technol., The Univ. of Tokushima)

【Key words】dye-linked L-proline dehydrogenase, hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus profundus*, FAD dependent dehydrogenase, L-proline determination.

- 914 グリーンケミストリー L-アスパラギン酸の新しい製造方法(3)

○向山正治、仙波 尚、安田信三、大花夕希子、下山文興、岡田出穂、松本幸治、川上彰 (日本触媒)

【目的】生分解性ポリマー、生分解性キレート剤などの生分解性材料の原料として、廃液を排出しない、グリーンな L-アスパラギン酸の大量生産プロセスを開発する。

【方法及び効果】大腸菌アスパルターゼ遺伝子をセルフクローニングした組換え体をイオン交換樹脂表面にコーティングする方法で固定化した。フマル酸換算で 20% のフマル酸アンモニウム基質液 (pH 8.5) を 20°C LHSV=10 で通し連続反応を行ったところ 1 年以上にわたって転化率 99% 以上を維持することができた。また L-アスパラギン酸の晶析にフマル酸を用いるための条件を検討したところ、加温した L-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液にフマル酸を添加すると一旦均質な溶液になり、その後 L-アスパラギン酸のみが析出することがわかった。反応液からの L-アスパラギン酸の回収率は約 75% であり L-アスパラギン酸結晶の純度は 99.2% であった。濾液は濃縮、フマル酸、アンモニア水を追加することで基質液として繰り返し使用が可能であった。

【将来の展開】L-アスパラギン酸を用いた生分解性の材料の開発 グリーンプロセスでグリーンプロダクトを作る  
Green chemistry New enzymatic production process of L-Aspartic acid(3)

○Masaharu Mukouyama, Hisashi Semba, Shinzo Yasuda, Yukiko Ohana, Fumioki Shimoyama, Izuho Okada, Koji Matsumoto, Akira Kawakami (NIPPON SHOKUBAI CO., Ltd)

【Key Word】Green chemistry, L-Aspartic acid, Aspartase, Immobilized enzyme, continuous reaction, crystallization