

超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の耐熱性アスパラギン酸ラセマーゼ及び耐熱性 L-アスパラギン酸オキシダーゼを用いた D- および L-アスパラギン酸の新規酵素定量法

鷺尾 翼¹⁾, 老川 典夫^{1,2)†}

(¹⁾関西大学化学生命工学部生命・生物工学科*, (²⁾関西大学先端科学技術推進機構*)

(受付 2017 年 9 月 11 日, 受理 2017 年 9 月 28 日)

Novel enzymatic quantification method of D- and L-aspartic acid using two thermostable enzymes from hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis* DSM 5473: L-aspartate oxidase and aspartate racemase

Tsubasa WASHIO¹⁾, Tadao OIKAWA^{1,2)}

¹⁾Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University*

²⁾Kansai University High Technology Research Center*

Summary

We developed a novel enzymatic quantification method of D- and L-aspartic acid using two thermostable enzymes from hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis* DSM 5473: L-aspartate oxidase (*TL-LASPO*) and aspartate racemase (*TL-AspR*). The concentration of L-aspartic acid existing originally in a sample (L-Asp [o]) was measured spectrophotometrically at 515 nm with a coupling reaction of *TL-LASPO* and horseradish peroxidase in the presence of phenol and 4-aminoantipyrine. The total concentration of D- and L- aspartic acid in a sample (L-Asp [t]) was measured using *TL-LASPO* reaction system after conversion of D-aspartic acid in a sample into L-aspartic acid using *TL-AspR*. Both calibration curves for measurement of D- and L-aspartic acid concentration were linear from 0 to 600 μM. The concentration of D-aspartic acid was calculated by subtracting L-Asp [o] from L-Asp [t]. We measured the D- and L-aspartic acid concentrations in sake and black vinegar using the enzymatic method. The concentrations of D- and L-aspartic acid in sake and black vinegar measured with the present method were well agreed with those measured with high-performance liquid chromatography. Accordingly, our novel enzymatic quantification method of D- and L-aspartic acid is expected to be useful for measurement of D- and L-aspartic acid in various foods and biological samples.

L-アミノ酸は生体内に豊富に存在し、様々な生理機能を持ち、結合態としてはタンパク質の構成要素として主に機能しているが、近年の研究によって、その鏡像異性体である D-アミノ酸も生体内に存在し様々な生理的機能を持つことが明らかとなってきた。例えば、D-セリンは哺乳動物の脳内に存在し、神経伝達に関与する N-メチル D-アスパラギン酸 (NMDA) 型受容体のコアゴニストとして機能することや記憶や学習に関与することが明らかとなっている¹⁾。また、D-アスパラギン酸は、メラトニンやテストステロンなどのホルモンの分泌や生合成の制御に関与することが明らかとなっている^{2,3)}。生体内の D-アミノ

酸は体内でアミノ酸ラセマーゼなどの酵素によって生合成される^{4,6)} ほか、食品中の D-アミノ酸を摂取することによって体外から取り込まれると考えられる^{7,8)}。これまでに、様々な食品中、特に日本酒やワインなどの発酵食品中に豊富に D-アミノ酸が含まれていることをわれわれは明らかにしている^{9,10)}。また、われわれは、食品中に含まれる D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸が日本酒の味質の向上に寄与することを明らかにしており、D-アスパラギン酸は、肌の老化抑制効果を示すことも明らかとなっている^{11,12)}。

一般に D- 及び L-アミノ酸の定量法としては、試料中の

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

†連絡先 (Corresponding Author), 老川典夫 大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

実験方法

アミノ酸を蛍光ジアステレオマー誘導体化して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分析する HPLC 法と、試料中の測定対象とするアミノ酸に特異的に作用する酵素を用いて定量する酵素法が主に利用されている。HPLC 法では、最少検出感度が約 0.1 μM と低く高感度な分析が可能であるが、食品サンプルのような mM オーダーで多種類のアミノ酸を含むサンプル中の D- 及び L- アミノ酸の分析には、数十～数百倍もの高い倍率で試料を希釈する必要があり、段階的な希釈操作による系統誤差が大きくなるという欠点がある。一方、酵素法では、最少検出感度は低いが試料中の数十 μM から数百 μM のアミノ酸を希釈することなく定量することができ、食品中の D- 及び L- アミノ酸の分析には、この点で酵素法は HPLC 法より優れている。また、酵素法は、HPLC 法に比べて高額な分析装置が不要であり、操作が簡便なことも大きな利点である。これまでにいくつかのアミノ酸について酵素法を用いた定量法が報告されているが^{13,14)}、アスパラギン酸ラセマーゼと L-アスパラギン酸オキシダーゼを用いた D- 及び L-アスパラギン酸の酵素定量法については報告例がない。

先にわれわれは、超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 のアスパラギン酸ラセマーゼ (TL-AspR)¹⁵⁾ と L-アスパラギン酸オキシダーゼ (TL-LASPO)¹⁶⁾ がアスパラギン酸に対する高い基質特異性と熱に対する高い安定性を有することを明らかにした。これらの耐熱性酵素は、反応や保存中に熱による変性や失活の影響を受けにくく、また反応温度の適応範囲も広いことから、保存性の高い定量用酵素試薬として有用であると考えられる。そこで本研究では、これらの耐熱性 2 酵素 (TL-AspR 及び TL-LASPO) を用いた D- 及び L-アスパラギン酸の新規酵素定量法を開発することを目的としている (Fig. 1)。

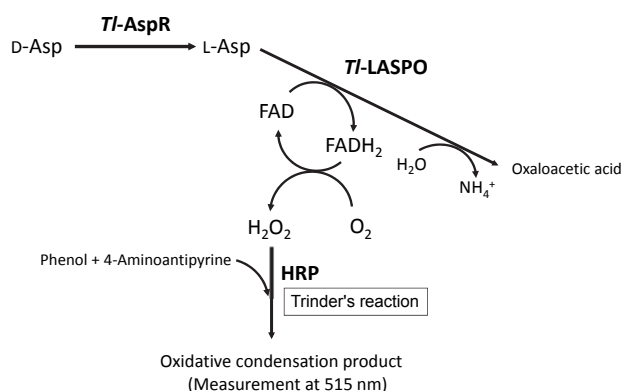


Fig. 1 Principle of enzymatic quantification method of D- and L-aspartic acid using two thermostable enzymes from hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis* DSM 5473: L-aspartate oxidase and aspartate racemase

TL-LASPO: L-aspartate oxidase from *Thermococcus litoralis* DSM 5473

TL-AspR: aspartate racemase from *Thermococcus litoralis* DSM 5473

HRP: Horseradish peroxidase

1. 実験材料

Thermococcus litoralis DSM 5473 由来アスパラギン酸ラセマーゼ (TL-AspR) と L-アスパラギン酸オキシダーゼ (TL-LASPO) はそれぞれ既報の方法に従い調製した^{15,16)}。D-アスパラギン酸及び L-アスパラギン酸はナカライテスク株式会社から購入した。西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP, 製品番号 169-10791, 100 U/mg)、4-アミノアンチピリンは和光純薬工業株式会社から購入した。N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン (TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン (MAOS) は株式会社同仁化学研究所から購入した。その他の試薬は全て特級を用い、和光純薬株式会社、関東化学株式会社、株式会社同仁化学研究所から購入した。

2. *Thermococcus litoralis* DSM 5473 のアスパラギン酸ラセマーゼと L-アスパラギン酸オキシダーゼを用いた D- 及び L-アスパラギン酸の定量

まず、250 mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB), pH 7.0, 0.25 mM FAD, 8.0 mM フェノール, 1.0 mM 4-アミノアンチピリンを含む水溶液を調製した (混合液 A)。次に試料 (50 μL) をマイクロチューブ (Greiner Bio-One, 製品番号 616201, 1.5 mL 容) に入れ、混合液 A (50 μL)、脱イオン水 (130 μL) を加えて十分攪拌した。マイクロチューブの蓋をしっかりと閉じ、ドライサーモユニット (タイテック株式会社・DTU-1B) を用いて 70°C で 5 min、プレインキュベートした。

試料中の L-アスパラギン酸濃度の測定は、上記プレインキュベート後、50 mM KPB, pH 7.0 に溶解した 1.6 mg/mL (0.8 U) HRP (5 μL) 及び 10.2 mg/mL TL-LASPO (0.6 U, 15 μL) をそれぞれ添加しマイクロチューブの蓋をしっかりと閉じ、ドライサーモユニットを用いて 70°C でインキュベートし反応を開始した。30 min 後、マイクロチューブを氷上で冷却し、反応液の 515 nm における吸光度を、紫外可視分光光度計 (日本分光・JASCO V-630) を用いて測定した ($\text{Abs}_{[\text{Sample}(\text{L-Asp})]}$)。ブランクは、試料の代わりに等量の脱イオン水を用いて反応液を調製したもの、TL-LASPO の代わりに等量の 20 mM KPB, pH 7.0 を用いて反応液を調製したもの及び HRP の代わりに等量の 20 mM KPB, pH 7.0 を用いて反応液を調製したものを試料と同様に反応させた後、それぞれの吸光度を測定し、 $\text{Abs}_{[\text{Sample}(\text{L-Asp})]}$ 、 $\text{Abs}_{[\text{TL-LASPO}(\text{L-Asp})]}$ 、 $\text{Abs}_{[\text{HRP}(\text{L-Asp})]}$ とした。 $\text{Abs}_{[\text{Sample}(\text{L-Asp})]}$ からブランクの中で、最も値の大きい $\text{Abs}_{[\text{TL-LASPO}(\text{L-Asp})]}$ を差し引いた値 $\{\text{Abs}_{[\text{Sample}(\text{L-Asp})]} - \text{Abs}_{[\text{TL-LASPO}(\text{L-Asp})]}\}$ を $\text{Abs}_{[\text{L-Asp}]}$ とした。試料中の L-アスパラギン酸濃度 ($\text{L-Asp} [\text{o}]$) は、試料として標準 L-アスパラギン酸水溶液 (0, 100, 200, 400, 600 μM) を用いて横軸に $\text{L-Asp} [\text{o}] (\mu\text{M})$ 、縦軸に $\text{Abs}_{[\text{L-Asp}]}$ をとり作成した検

量線を用いて算出した。測定は少なくとも3回繰り返し行った。

試料中のD-アスパラギン酸濃度は、試料中のD-アスパラギン酸を *TL-AspR* で等量のL-アスパラギン酸に変換後上記の方法でL-アスパラギン酸濃度 ($L\text{-Asp}[t]$) の測定を行い、 $L\text{-Asp}[t]$ から $L\text{-Asp}[o]$ を差し引くことにより算出した。 $L\text{-Asp}[t]$ の測定は、上記L-アスパラギン酸濃度の定量と同様に調製した混合液Aのプレインキュベート後、50 mM KPB, pH 7.0に溶解した1.6 mg/mL (0.8 U) HRP (5 μ L), 10.2 mg/mL *TL-LASPO* (0.6 U, 15 μ L) をそれぞれ添加した後、さらに50 mM KPB, pH 7.0に溶解した7.5 μ g/mL *TL-AspR* (2.2 U, 20 μ L) を加えてマイクロチューブの蓋をしっかりと閉じ、ドライサーモユニットを用いて70°Cでインキュベートし反応を開始した。30 min 後、マイクロチューブを氷上で冷却し反応を停止後、反応液の515 nmにおける吸光度を測定した ($Abs_{[Sample(D\text{-}Asp + L\text{-}Asp)]}$)。ブランクは、試料の代わりに等量の脱イオン水を用いて反応液を調製したもの、*TL-LASPO* の代わりに等量の20 mM KPB, pH 7.0を用いて反応液を調製したもの及びHRPの代わりに等量の20 mM KPB, pH 7.0を用いて反応液を調製したものを試料と同様に反応させた後それぞれの吸光度を測定し、 $Abs_{[Sample(D\text{-}Asp + L\text{-}Asp)]}$ 、 $Abs_{[TL\text{-}LASPO(D\text{-}Asp + L\text{-}Asp)]}$ 、 $Abs_{[HRP(D\text{-}Asp + L\text{-}Asp)]}$ とした。 $Abs_{[Sample(D\text{-}Asp + L\text{-}Asp)]}$ からブランクの中で、最も値の大きい $Abs_{[TL\text{-}LASPO(D\text{-}Asp + L\text{-}Asp)]}$ を差し引いた値 $\{Abs_{[Sample(D\text{-}Asp + L\text{-}Asp)]} - Abs_{[TL\text{-}LASPO(D\text{-}Asp + L\text{-}Asp)]}\}$ を $Abs_{[D\text{-}Asp + L\text{-}Asp]}$ とした。試料中の $L\text{-Asp}[t]$ は、試料として標準D-アスパラギン酸水溶液 (0, 100, 200, 400, 600 μ M) を用いて測定を行い、横軸に $L\text{-Asp}[t]$ 、縦軸に $Abs_{[D\text{-}Asp + L\text{-}Asp]}$ をとり作成した検量線を用いて算出した。測定は少なくとも3回繰り返し行った。

3. 高速液体クロマトグラフィー法を用いたD-及びL-アスパラギン酸の定量

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた試料中のD-及びL-アスパラギン酸の定量は、既報の方法に従った⁹⁾。試料として標準DL-アスパラギン酸水溶液 (1, 2, 5, 10, 15 μ M) を用いて横軸に標準DL-アスパラギン酸濃度、縦軸にエリア面積をとり作成した検量線を用いて算出した。測定は少なくとも3回繰り返し行った。

4. D-アスパラギン酸定量に及ぼすL-アスパラギン酸の影響

一般に、食品中のD-アスパラギン酸はL-アスパラギン酸より含有量が著しく少なく、総アスパラギン酸含有量に対するD-アスパラギン酸含有量のDL比 ($D/[D+L]\%$) は著しく低くなる。そこで、DL比 ($D/[D+L]\%$) の低いサンプル中のD-アスパラギン酸が本酵素法で定量できることを確認するため、D-アスパラギン酸含量が50%以下の100 μ M DL-アスパラギン酸溶液 (DL比 ($D/[D+L]\%$) = 5, 10, 25, 50) をそれぞれ調製し、上記2の酵素法を用い

てこれらの溶液中のD-及びL-アスパラギン酸を定量した。

5. 反応系に用いるトリンダー試薬の検討

本酵素定量法では、Fig. 1に示す原理に基づき *TL-AspR* と *TL-LASPO* の共役反応により生成する過酸化水素を、HRPの存在下で4-アミノアンチピリンとフェノールと反応させ、生成する酸化縮合物の吸光度を測定することによりD-及びL-アスパラギン酸を定量する。この過酸化水素、4-アミノアンチピリン、フェノールとHRPとの反応は、トリンダー (Trinder) らによって開発され、トリンダー反応と呼ばれる¹⁷⁾。また、トリンダー反応におけるフェノールなどの水素供与体はトリンダー試薬と呼ばれる。一般に、トリンダー反応で生成する酸化縮合物の検出波長や検出感度は、トリンダー試薬の種類を変えることにより変化することが知られている。そこで上記2の酵素法の反応系に用いるトリンダー試薬を検討するため、8.0 mM フェノールの代わりに4.0 mM *N*-エチル-*N*-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン (TOOS) または8.0 mM *N*-エチル-*N*-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン (MAOS) を用いてそれぞれ45°Cで40 min または70°Cで30 min 反応を行い、それぞれ550 nm または630 nm における吸光度変化から、標準L-アスパラギン酸 (0, 15, 50, 125, 250 μ M) 水溶液及び標準D-アスパラギン酸 (0, 15, 50, 125, 250 μ M) 水溶液を用いて同様に反応させ、上記2と同様に $L\text{-Asp}[o]$ 及び $L\text{-Asp}[t]$ の定量用の検量線を作成した。測定は少なくとも3回繰り返し行った。

6. 食品中のD-及びL-アスパラギン酸の定量

TL-AspR 及び *TL-LASPO* を用いたD-及びL-アスパラギン酸の新規酵素定量法の有効性を確認するため、モデル食品分析試料として当研究室で保有している日本酒 (試料番号: 0204) 1 試料と黒酢 (試料番号: 004) 1 試料を用いて、上記2の酵素法と上記3のHPLC法を用いてそれぞれの試料中のD-及びL-アスパラギン酸の定量を行い、両測定法の分析結果を比較した。

結果と考察

TL-AspR 及び *TL-LASPO* を用いたD-及びL-アスパラギン酸の新規酵素定量法の最適反応時間を検討したところ、標準反応条件として設定した70°C, pH 7.0では、D-及びL-アスパラギン酸いずれを基質とした場合でも20分で A_{515} が一定となり、70°Cで20分以上反応すれば反応が終了しており、この条件下ではD-及びL-アスパラギン酸を定量できることが明らかとなった (Fig. 2)。そこでD-及びL-アスパラギン酸標準液を試料として本酵素法によるL-アスパラギン酸とD-アスパラギン酸定量のための $L\text{-Asp}[o]$ 及び $L\text{-Asp}[t]$ の検量線をそれぞれ作成したところ、いずれの検量線も0-600 μ Mの範囲で直線性が得ら

れた (Fig. 3A, Fig. 3B)。以上の結果, 上記方法 2 に記載の方法を用いることにより, 試料中の 0-600 μM L-アスパラギン酸, 0-600 μM の D-アスパラギン酸を定量できることが明らかとなった。

試料中の高濃度の L-アスパラギン酸が本酵素定量法に及ぼす影響を検討したところ, 100 μM 標準 D,L-アスパラギン酸水溶液 (DL 比 (D/[D+L])% = 5, 10, 25, 50) のいずれの溶液中の D-及び L-アスパラギン酸の定量も可能であることが明らかとなった (Table 1)。したがって, 本酵素は, HPLC 法では測定が困難な DL 比 (D/[D+L])% の小さい試料中の D-アスパラギン酸も定量できることが明らかとなった。

本酵素法の反応系に用いるトリンダー試薬としてフェノールの代わりに TOOS を用いて, L-アスパラギン酸と D-アスパラギン酸定量のための L-Asp [o] 及び L-Asp [t] の検量線をそれぞれ作成したところ, いずれの検量線も 0-250 μM の範囲で直線性が得られた (Fig. 5A, Fig. 5B)。TOOS をトリンダー試薬として用いた場合, フェノールを用いた場合より長い反応時間が必要なことなど, 今後反応条件の検討がさらに必要であると考えられるが, フェノールを用いた場合に比べて, 検出感度が高く, また長波長側での測定が可能となることから, 試料中の D-及び L-アスパラギン酸濃度の低いサンプルや, 試料中の物質が

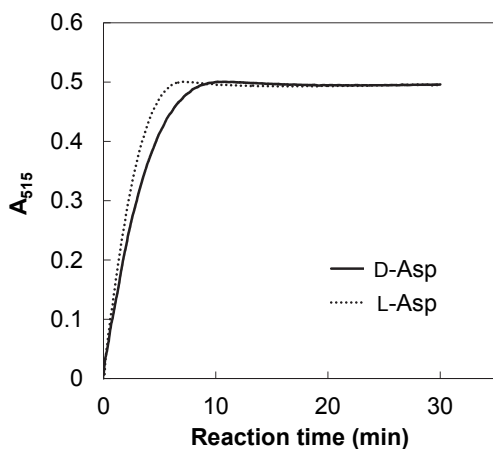


Fig. 2 Effect of reaction time on enzymatic quantification method of D- and L-aspartic acid
Dashed line: substrate, L-aspartate; concentration, 600 μM .
Solid line: substrate, D-aspartate; concentration, 600 μM .

Table 1 Effect of ratio of D-aspartic acid concentration to D- plus L-aspartic acid concentration in standard aspartic acid solution on measurement of D- and L- aspartic acid by enzymatic method

Theoretical values in standard solutions			Experimental values (μM)		
D-Asp (μM)	L-Asp (μM)	D/(D+L)%	L-Asp[t]	L-Asp[o]	D-Asp
5.0	95.0	5.0	98.5 \pm 1.3	95.3 \pm 1.0	3.2 \pm 1.7
10.0	90.0	10.0	94.9 \pm 0.6	86.8 \pm 6.3	8.1 \pm 6.3
25.0	75.0	25.0	96.7 \pm 0.8	75.0 \pm 1.8	21.7 \pm 1.9
50.0	50.0	50.0	95.4 \pm 0.8	50.0 \pm 1.5	45.4 \pm 1.7

n=3

500 nm 付近に吸収を持つ場合に有効であると考えられる。一方 MAOS を用いた場合, 今回用いた 70°C, 30 min の反応条件では, MAOS の安定性に問題があったと考えられ, うまく測定することができなかった (データ未掲載)。

当研究室で保存している日本酒 (試料番号: 0204) と黒酢 (試料番号: 004) 中の D- 及び L-アスパラギン酸濃度を, 本酵素法を用いて測定した (Table 2)。また, 同一試料中の D- 及び L-アスパラギン酸濃度を HPLC 法で測定し, 検量線 (Fig. 4A, Fig. 4B) から D- 及び L-アスパラギン酸濃度を算出した (Table 2)。その結果, いずれの試料中の D- 及び L-アスパラギン酸濃度も酵素法と HPLC 法でよく一致した (Table 2)。したがって, 本酵素法は, 食品中の D- 及び L-アスパラギン酸の定量法として適応可能であることが明らかとなった。

これまでに, D-アミノ酸の酵素定量法としては, 酵母 *Rhodotorula gracilis* の D-アミノ酸オキシダーゼの T60A, Q144R, K152E, M213G 変異型酵素を用いたバイオセンサーによる試料中の総 D-アミノ酸の定量¹⁸⁾, 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の D-セリンデヒドラターゼを用いた D-セリン定量¹⁹⁾, *Ureibacillus thermophaericus* のメソ-ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼの変異型酵素 D-アミノ酸デヒドロゲナーゼを用いた D-イソロイシンの定量²⁰⁾ などが報告されている。また, D-アスパラギン酸の酵素定量法として *Cryptococcus humicolus* の D-アスパラギン酸オキシダーゼと *Pseudomonas* sp. のオキサロ酢酸デカルボキシラーゼを用いた方法²¹⁾ について報告されているが, アスパラギン酸ラセマーゼと L-アスパラギン酸オキシダーゼの共役反応を利用した D-アスパラギン酸と L-アスパラギン酸の酵素定量法の報告例はなく, 本報告が最初の例である。本研究では, 超好熱アーキア *T. litoralis* DSM 5473 由来 *Tl-AspR* と *Tl-LASPO* の 2 つの耐熱性酵素を用いて D- 及び L-アスパラギン酸の新規酵素定量法を開発することに成功した。本酵素法は, 特に L-アスパラギン酸含有量の高い食品中の D-アスパラギン酸の定量に有効であり, 今後, 食品中の D-アスパラギン酸をはじめとする様々な試料中の D-アスパラギン酸及び L-アスパラギン酸の定量への応用が期待される。

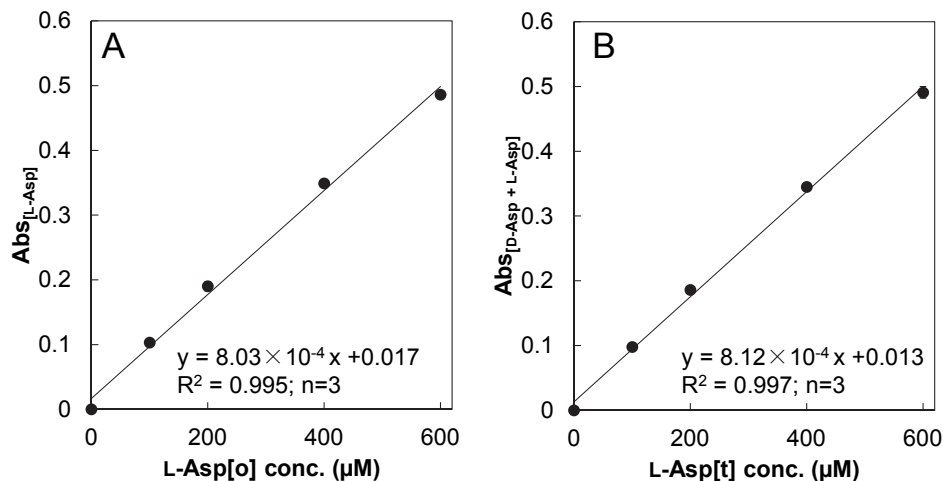


Fig. 3 The calibration curves of L-Asp[o] and L-Asp[t] for measurement of L-aspartate and D-aspartate concentrations using enzymatic quantification method
 A. L-Asp[o]
 B. L-Asp[t]

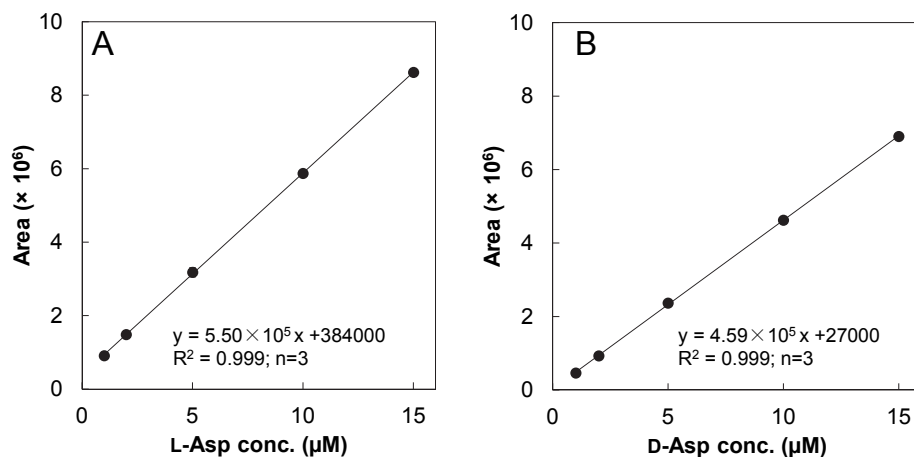


Fig. 4 The calibration curves for measurement of L- aspartate and D-aspartate concentrations using HPLC
 A. L- Aspartate
 B. D- Aspartate

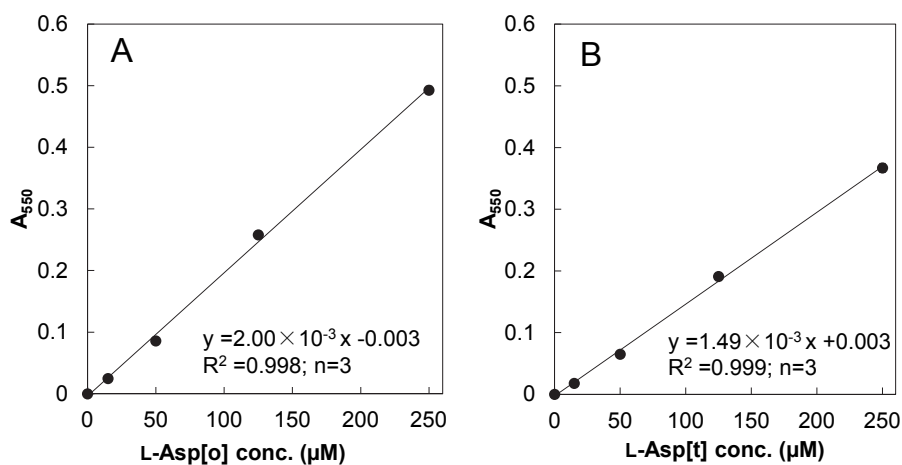


Fig. 5 The calibration curves of L-Asp[o] and L-Asp[t] for measurement of L- aspartate and D- aspartate concentrations using enzymatic quantification method in the presence of TOOS as a Trinder's reagent
 A. L-Asp[o]
 B. L-Asp[t]

Table 2 Comparison of enzymatic method with HPLC method for measurements of D- and L-aspartic acids in food

Sample	Method	Concentration (μM)		
		D-Asp +L-Asp	L-Asp	D-Asp
Sake (No.0204)	Enzymatic HPLC	$1,991 \pm 56$	$1,690 \pm 40$	301 ± 69
		$2,117 \pm 35$	$1,837 \pm 34$	281 ± 40
Black vinegar (No.004)	Enzymatic HPLC	$1,172 \pm 41$	925 ± 48	247 ± 64
		$1,138 \pm 3.2$	878 ± 3.1	261 ± 4.4

n=3

謝 辞

本研究は、「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成 25 年度～平成 29 年度）」によって実施されたものである。

参考文献

- 1) Hashimoto A, Oka T. (1997) Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. *Prog Neurobiol.* 52 (4): 325-353.
- 2) Takigawa Y, Homma H, Lee JA, Fukushima T, Santa T, Iwatsubo T, Imai K. (1998) D-aspartate uptake into cultured rat pinealocytes and the concomitant effect on L-aspartate levels and melatonin secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 248 (3): 641-647.
- 3) D'Aniello A, Di Cosmo A, Di Cristo C, Annunziato L, Petrucelli L, Fisher G (1996) Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life Sci* 59 (2): 97-104.
- 4) Gogami Y, Ito K, Kamitani Y, Matsushima Y, Oikawa T. (2009) Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase, *Phytochemistry*, 70: 380-387.
- 5) Matsui D, Oikawa T, Arakawa N, Osumi S, Lausberg F, Stabler N, Freudi R, Eggeling L. (2009) A periplasmic, pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid racemase in *Pseudomonas taetrolens*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83: 1045-1054.
- 6) Oikawa T, Tauch A, Schaffer S, Fujioka T. (2006) Expression of *alr* gene from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in *Escherichia coli* and molecular characterization of the recombinant alanine racemase. *J. Biotechnol.* 125: 503-512.
- 7) Morikawa A1, Hamase K, Inoue T, Konno R, Zait-su K. (2007) Alterations in D-amino acid levels in the brains of mice and rats after the administration of D-amino acids. *Amino Acids.* 32 (1): 13-20.
- 8) Nagata Y1, Konno R, Niwa A. (1994) Amino acid levels in D-alanine-administered mutant mice lacking D-amino acid oxidase. *Metabolism.* 43 (9): 1153-1157.
- 9) Gogami Y, Okada K, Oikawa T. (2011) High-performance liquid chromatography analysis of naturally occurring D-amino acid in sake. *J. Chromatogr B,* 879, 3259-3267.
- 10) Kato S, Ishihara T, Hemmi H, Kobayashi H, Yoshimura T. (2011) Alterations in D-amino acid concentrations and microbial community structures during the fermentation of red and white wines. *J Biosci Bioeng.* 111 (1): 104-108.
- 11) Okada K, Gogami Y, Oikawa T. (2013) Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake, *Amino Acids*, 44, 489-498.
- 12) 芦田 豊. 東條洋介. 島田正一郎. 岡村智恵子. 三田真史. 浜瀬健司. (2011) 皮膚における D-アミノ酸の存在とその生理活性. *Bio industry*, 28 (2) : 40-44.
- 13) Kusakabe H, Midorikawa Y, Fujishima T. (1984). Methods for determining L-glutamate in soy sauce with L-glutamate oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48 (1), 181-184.
- 14) Sugawara A, Matsui D, Yamada M, Asano Y, Isobe K. (2014). New enzymatic methods for selective assay of L-lysine using an L-lysine specific decarboxylase/oxidase from *Burkholderia* sp. AIU 395. *J Biosci Bioeng.* 119 (3): 369-374.
- 15) Washio T, Kato S, Oikawa T. (2016). Molecular cloning and enzymological characterization of pyridoxal 5'-phosphate independent aspartate racemase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* DSM 5473. *Extremophiles.* 20 (5): 711-721.
- 16) Washio T, Oikawa T. (2017). Thermostable and highly specific L-aspartate oxidase from *Thermococcus litoralis* DSM 5473: cloning, overexpression, and enzymological properties. *Extremophiles.* DOI: 10.1007/s00792-017-0977-4

- 17) Trinder P (1969) Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem.* 6: 24-27.
- 18) Rosini E, Molla G, Rossetti C, Piloni MS, Pollegioni L, Sacchi S. (2008) A biosensor for all D-amino acids using evolved D-amino acid oxidase. *J Biotechnol.* 135 (4): 377-384.
- 19) Ito T, Takahashi K, Naka T, Hemmi H, Yoshimura T. (2007) Enzymatic assay of D-serine using D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem.* 371 (2): 167-172.
- 20) Akita H, Imaizumi Y, Suzuki H, Doi K, Ohshima T. (2014) Spectrophotometric assay of D-isoleucine using an artificially created D-amino acid dehydrogenase. *Biotechnol Lett.* 36 (11): 2245-2248.
- 21) Kato S, Ikuta T, Hemmi H, Takahashi S, Kera Y, Yoshimura T. (2012) Enzymatic assay for D-aspartic acid using D-aspartate oxidase and oxaloacetate decarboxylase *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76 (11), 2150-2152.