つぎのエステルが得られた。

マレイン酸ジメチルエステル bp 92~94°C/15 mmHg

マレイン酸ジエチルエステル bp 104~109°C/15 mmHg

最後のマレイン酸ジエチルエステルの赤外スペクトルは、フマ

ル酸ジエチルエステルの混在を示し、純品は得られなかった。

酢酸およびプロピオン酸では、同様の方法を用いてもエステル化は促進されなかった。

コウジ酸発酵の促進剤としての *n*-プロピルアルコールの効果^{*1,*2}

(昭和 46 年 7 月 5 日 受理)

川手 昭平^{*3}・福尾 剛志^{*3}・宮本 一郎^{*4}

1 緒 言

前報¹⁾で *Asp. oryzae* によるコウジ酸発酵培地に *n*-プロピルアルコールを添加すると、0.5 vol % (以下 % とする) 以下では孢子発芽、菌糸生育を促進するが、それ以上では逆に阻害し、一方比生産速度は 1~1.5% 添加まで比例的に増大するため、この中間の 1% 前後に特異的な強い発酵促進領域があることを述べた。

コウジ酸発酵におけるアルコールの効果については、主としてエチルアルコールの資化性や促進性を述べた研究がいくつかみられるが^{2~4)}、その生理的作用とコウジ酸生産との関係について論じたものは少ない⁵⁾。

コウジ酸発酵は一種の酸化発酵であるから、*n*-プロピルアルコールの発酵促進性は菌の呼吸に対する何らかの影響として観察されるであろう。そこで著者は *n*-プロピルアルコール添加発酵についてその培養経過を詳しく追究すると同時に、それが孢子発芽時および培養菌体の呼吸活性におよぼす影響、並びに菌体の呼吸時におけるアルコールの存在の影響について調べ、これがコウジ酸生産経過と深い関係にあることを知ったので報告する。

2 実験 方 法

2.1 使用菌株および培養方法

Asp. oryzae M-128 菌, BK-2 培地, 回転ふりまぜ培養, 培養温度 30°C, その他前報^{1,6)}に準ずる。

2.2 測定法

コウジ酸その他の測定は前報⁶⁾による。

呼吸活性の測定法: Warburg 検圧計による (30°C)。胞子の場合には水懸濁液とし、測定時に BK-2 組成になるように調製した培地と混合して検圧。培養菌体の場合は回転ふりまぜ培養菌体を口過、洗浄後、懸濁状態で 24 時間飢餓培養 (ふりまぜ), 再び洗浄, 懸濁液とし、検圧時に呼吸基質溶液, Sørensen リン酸塩緩衝液 (測定時 1/100 mol/l, pH 5.29) と混合。同時に自家呼吸も測定。

3 実験 結 果

3.1 発酵経過の解析

BK-2 およびこれに *n*-プロピルアルコール 1% 添加の 2 種の培地を用い、17 日間回転ふりまぜ培養を行なった発酵経過を表 1 に示した。比増殖速度, 比生産速度 (図 1) は図微分で求めた。

3.2 孢子発芽時の呼吸に及ぼす *n*-プロピルアルコールの影響

前記 2 種の培地による孢子発芽時および初期の菌糸伸長の際の呼吸活性を図 2 に示した。発芽点を点線で内挿した。発芽点以降の RQ はいずれも 1.1 であった。

3.3 *n*-プロピルアルコール添加培養菌体の呼吸活性

前記 2 種の培地によるふりまぜ培養で経時的に菌体をとって測定した Q_{O₂} の経過を図 3 に示した。呼吸基質はブドウ糖 (検圧時濃度 0.02 mol/l) とし、*n*-プロピルアルコールは加えていない。

表 1 コウジ酸発酵経過

<i>n</i> -PrOH 添加濃度 (vol %)	培養 日数 (day)	糖消費率 (%)	菌体重量 (g/l)	比増殖速 度 (day ⁻¹)	コウジ酸 生産量 (g/l)	比生産速 度 (day ⁻¹)
0	1	2.3	0.96	3.46	0.0	0.00
	2	11.9	3.34	0.40	3.3	1.78
	3	24.2	4.16	0.18	11.8	2.16
	4	32.9	4.82	0.12	19.5	1.39
	6	56.1	5.79	0.06	30.6	0.96
	9	83.2	6.33	0.02	44.9	0.58
	13	95.4	6.68	0.00	53.8	0.18
1.0	17	100.0	6.50	0.00	56.9	0.09
	1	1.4	0.11	6.57	0.0	0.00
	2	10.7	1.68	0.76	0.7	1.50
	3	20.0	2.59	0.29	5.2	2.89
	4	29.4	3.42	0.16	16.1	3.07
	6	66.8	4.08	0.07	33.6	2.32
	9	94.4	4.63	0.02	59.2	0.94
	13	100.0	4.69	0.00	62.4	-0.11
	17	100.0	4.92	0.00	58.7	-0.24

*1 この報文を「コウジ酸発酵に関する研究 (第 4 報)」とする。

*2 前報 (第 3 報), 川手昭平, 小池美苗, 福尾剛志, 米沢千秋, 司辻忠信, 工化, 72, 518 (1969)。

*3 Shohei KAWATE, Tsuyoshi FUKUO 関西大学工学部応用化学科: 大阪府吹田市千里山。

*4 Ichiro MIYAMOTO 中川電機 (株): 大阪府東大阪市高井田本通 3-22。

1) 川手昭平, 小池美苗, 福尾剛志, 米沢千秋, 司辻忠信, 工化, 72, 518 (1969)。

2) 坂口謹一郎, 農化, 8, 265 (1932)。

3) D. Barnard, F. Challenger, *J. Chem. Soc.*, 1949, 110。

4) 野々村誠一, 榎本五男, 辰巳忠次, 農化, 34, 732 (1960)。

5) 米津英司, 野々村誠一, 辰巳忠次, 日本農芸化学会昭和 43 年度大会講演 (1968)。

6) 川手昭平, 小池美苗, 福尾剛志, 橋場義彦, 市川智弘, 工化, 72, 513 (1969)。

図1 コウジ酸比生産速度
実線：BK-2・*n*-PrOH 培地，破線：BK-2 培地

図2 胞子発芽時の呼吸に及ぼす *n*-PrOH の影響
胞子数： 5.59×10^6

図3 *n*-プロピルアルコール添加培養菌体の呼吸活性
実線：BK-2・*n*-PrOH 培地培養菌体，破線：BK-2 培地培養菌体

図4 菌体の呼吸時における *n*-プロピルアルコールの効果
実線：BK-2・*n*-PrOH 培地培養菌体，破線：BK-2 培地培養菌体
呼吸基質：○ブドウ糖 + *n*-PrOH, × *n*-PrOH, △ブドウ糖

3.4 菌体の呼吸時における *n*-プロピルアルコールの効果

前記2種の培地によるふりまぜ培養菌体について、呼吸基質としてブドウ糖 0.066 mol/l, *n*-プロピルアルコール 0.132 mol/l, ブドウ糖 0.033 mol/l + *n*-プロピルアルコール 0.066 mol/l の3種類を用いて Q_{O_2} を測定した結果を図4に示した。なおブドウ糖濃度 0.066 mol/l は炭素基準で *n*-プロピルアルコール 1 vol % (0.132 mol/l) に合わせたものである。

4 考 察

表1の発酵経過を見るに、初期の糖の消費は *n*-プロピルアルコール添加区が無添加区より遅れ、これに対応して添加区では菌体生育およびコウジ酸生産の誘導期が延びるが（無添加区：添加区（日数）でそれぞれ 0.6 : 0.9, 1.6 : 2.6）、中期以降は添加区の方が消費が大となり、コウジ酸生産は無添加区より非常に早くかつ大となる。一方菌体生育量は全期間を通じて添加区が低い。

図2で発芽時の呼吸に対しては *n*-プロピルアルコールは阻害的で発芽点が約1時間遅れ、その後の初期生育も抑制している（検鏡による発芽率などは前報¹⁾参照）。しかし表1の比増殖速度は *n*-プロピルアルコール添加区が常に高い値を示している。つまり *n*-プロピルアルコールは胞子発芽時に阻害的に働き、20時間前後までの生育の遅れが、生成菌体の比増殖速度が高いにもかかわらず全期間を通じて無添加区より低い菌体量を与えることになるのであろう。

次に培養菌体の呼吸活性（図3）は、24時間値を除いてそれ以降 *n*-プロピルアルコール添加区が無添加区をはるかに上回っている。また添加区でコウジ酸生産のピーク以後もこの活性が高いことはコウジ酸分解が早いことの裏付けとなる。

比生産速度（図1）はピークが無添加区で3日、添加区で4日であること以外はこの菌体呼吸活性と同様な傾向を示した。

さらに菌体の呼吸時に *n*-プロピルアルコールが存在する場合について図4によれば、ブドウ糖単独、*n*-プロピルアルコール単独、ブドウ糖 + *n*-プロピルアルコールの3種の基質に対して、菌体培養時の *n*-プロピルアルコール添加の有無にかかわらず、*n*-プロピルアルコールはブドウ糖より呼吸基質としてまさり、かつブドウ糖との併用はさらに呼吸を促進することがわかった。

以上の結果、*n*-プロピルアルコールの添加は *Asp. oryzae* の胞子の発芽および初期の生育を抑制遅延させるが、生育した菌体は呼吸活性、したがって比増殖速度および基質酸化能としての比生産速度が著しく強化されている。比増殖速度と比生産速度を合わせて考えればその形は非常によく菌体の呼吸活性（図3）に一致することからみて、菌体の呼吸能とコウジ酸生産能とはきわめて深い関係にあると考えられる。そこで *n*-プロピルアルコールによって生育した呼吸能の高い菌体は、何らかの要因、たとえばその毒性に関連して基質の完全酸化能は抑えられているが、部分酸化能またはコウジ酸への酸化系は強化されるため、菌体の生育はあまり大とならずコウジ酸の蓄積のみを増大しているのであろう。かつ培養中 *n*-プロピルアルコールの存在がさらにこれを促進すると考えられる。

（昭和45年4月，日本化学会第23年会発表）