[農化 第 38 卷, 第 4 号, p.231~236, 1964]

清酒の香気成分に関する研究 (第 8 報)*

p-オキシ安息香酸およびそのエステル, フタル酸エステルの分離と同定

山 本 淳, 大 森 大 陸 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 34 年 12 月 14 日 受 理

緒 言

化学活性樹脂の一つとしてハイドロキノ-ホルマリン樹脂 (以下 Hq-F 樹脂と略す) の有する選択吸着性と, あらかじめ醸造酒の精製に使用した後, 熱エタノールで抽出, 再活性化した非選択的な吸着性を示す再生活性炭を用いる新しい吸着法によって, 清酒約 1 kl より捕集した香気成分の分離と同定によって, 16 種におよぶ新しい微量成分を始め, 数多くの香気成分の存在を見出し, すでに報告⁽¹⁾した。

さらに, これらの諸成分を市販の合成清酒に微量添加してその香り効果を検した結果, 清酒香気の構成についても幾つかの新しい知見を得ることができたが, 同時に自然な感を害うことなく, 添加合成清酒に顕著な芳香を付与することができた。この結果, 本研究の目的である清酒香気の実用化, すなわち, 合成清酒の品質の向上に一步近づくことができたが, 嗜好品として完成された姿においてのみ実用化が可能となるこの種の研究では, ここに加えた諸成分だけでは未だに不足する成分があって, これだけで直ちに実用化の域に達し得ない現状である。

一方, 吸着法で捕集した香気成分が元の清酒中のほぼ全量であることは, 吸着前後の香気あるいはおのおの減圧蒸留液の紫外外部吸収の変化, および捕集成分による香気の復元試験の結果からも明らかである⁽¹⁾。このことから, 添加香気に不足する成分は, これまでの研究で未着手の分野として残した高沸点, あるいは不揮発性の諸成分と, ごく低沸点の未同定成分を解明することが最も容易な方法と考えられる。このために, 手始めとして

Hq-F 樹脂による吸着捕集成分のうち不揮発性酸性区分の分離と同定を行った結果, 清酒成分として新たに *p*-オキシ安息香酸およびそのエステル, フタル酸エステルの存在を明らかにすることができた。この結果, 清酒の醸造に際し, その醸酵の機作にも新しい問題を提起するものとして, 以下これらの結果を報告する。

実 験 の 部

1. Hq-F 樹脂による捕集不揮発性酸性区分の分別

清酒 910 l に投入した自製の Hq-F 樹脂 1.6 kg は 7 日後に濾別し, 水洗した後水蒸気蒸留によって吸着成分の脱離を行ったが, 水蒸気蒸留の終わった樹脂は熱速かに濾別して, 不揮発性の脱着成分を含む母液と分った。ここに得られた熱濾液は減圧濃縮し, 残渣を *n*-ブタノールで抽出, 抽出ブタノール液は 10% 炭酸ソーダと振って不揮発性の酸性成分を分った。このようにして得た不揮発性酸性成分はエーテルで抽出して, エーテルに可溶性, 焦香に類する芳香を持った目的物約 5 g を得た。ついで, 同試料を横塚ら⁽²⁾の方法に従ってクロロホルム-1% 磷酸緩衝液による向流分配法によって, それぞれ 20 の区分に分ったが, これらの操作はすでに第 1 報⁽³⁾に図示した。

分配各画分はそれぞれ, クロロホルム層は芒硝で脱水した後クロロホルムを留去し, また, 磷酸緩衝液層は硫酸微酸性とした後エーテルで抽出して分画試料を得た。ついで, これらの各画分を東洋濾紙 No. 50 に付して 1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノールで 1 夜上昇展開した後, 2536 Å, 3650 Å の紫外燈で検したが, この結果, 磷酸緩衝液の原点および 2 番目の画分 B₁, B₂ 並びにクロロホルム層の最先端 C₁₉, C₂₀ の両区分は収量も比較的多く, また, 磷酸緩衝液層の B₃~B₁₇ およびクロロホルム層の C₃~C₁₇ の区分はサリチル酸を主体として他に少量の未知成分が混じたものであることを知った。すなわち, 向流分配によって, 混在したサリチル酸をほぼ完全に除去

* Studies on the Flavors in Sake. Part VIII. Separation and Identification of Phthalic Acid Ester, *p*-Oxybenzoic Acid and its Ester. By Atsushi YAMAMOTO and Tairiku ÔMORI (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokyo Research Laboratory)

第1図 向流分配法による不揮発酸の分別結果
東洋濾紙 No. 50; 1.5N-NH₃ 飽和 *n*-BuOH

した。(1) 親水性に富む燐酸緩衝液の原点区分。(2) クロロホルムとともに最先端まで移動した疎水性のクロロホルム区分。(3) サリチル酸を主成分とする中間区分の三区分に大別できたもので、これらの結果を第1図に示す。

このうち、(1) の B₁ および B₂ はペーパークロマトグラフィーによって検した結果、ほとんど差異が認められないので、両者を合し、常法に従ってエチルエステルとした後、生成エステルを3% 苛性カリと振って、その中の弱酸性エステルを分った。ついで、弱酸性エステルを3% 苛性カリメタノール液と4時間還流して得た遊離酸は、その分別の過程より推して不揮発性のフェノールカルボン酸あるいはケト酸と考えられる。同区分をペーパークロマトグラフィーで検した結果を第2図に示す。すなわち、2536 Å および 3650 Å の紫外燈で検した結果、蛍光あるいは吸収を示す5成分より成ることを知った。さらに B.P.B., 1% 塩化第2鉄のクロロホルム溶液-10% ピリジンによるフェノール発色, 2,4-DNPH 試薬 (2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬) によるカルボニル発色を検した結果、原点に接して淡紅色の蛍光を示す spot, R_F 0.13 の 2536 Å の紫外燈で顕著な吸収を示す spot, および R_F 0.45 の紫外燈で青色の蛍光発色を呈する三者が、顕著な B.P.B. およびフェノール発色を示し、いずれもカルボニル発色を認めることはできなかった。これらの結果、以上の3成分はいずれもフ

第2図 B₁~2, C₁₉~20 の酸性エステル水解酸

ェノールカルボン酸と考えられるが、この中でも特に R_F 0.13 の紫外燈吸収を示す spot は各種呈色より推して、その存在量も多く、また R_F およびフェノール発色の色調より清酒成分としてこれまでに見出されたフェノールカルボン酸に該当しない新しい成分と考えられる。この故に、2536 Å の紫外燈吸収で容易に他成分と識別できる同成分をペーパークロマトグラフィーの手法に従って分別した。すなわち、前に得た弱酸性エステル加水分解生成酸を東洋濾紙 No. 50 上に帯状に付して、1.5N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノールで展開後、紫外燈の吸収に従って切抜き、細切後2% 炭酸ソーダ液で抽出した。このようにして得た粗試料は、今一度同様の操作を繰返して精製し、目的試料 45 mg を得た。しかし、その同定に際してでき得る限り試料が多いことが望ましいので、同じ Hq-F 樹脂による捕集成分の中で検索を行った結果、向流分配の C₁₉, C₂₀ の合併試料より 3% 苛性カリ液で抽出した弱酸性成分を加水分解して得た遊離酸の中に、目的試料と全く同様の R_F , 各種発色を示すフェノールカルボン酸が存在することを知った。これらの結果を第2図に示す。また、この区分の加水分解生成酸の中に、 R_F 0.14 の吸収の直下、 R_F 0.06 に顕著な紫外燈吸収を示す未知成分が存在し、B.P.B. で顕著な有機酸発色を示すが、フェノール発色には呈色せず、ペーパークロマトグラフィーの挙動から推して、従来知られていない新しい有機酸成分と目されるものである。これらの結果に従って、前と同様にペーパークロマトグラフィーの手法により、顕著な吸収を示す2成分をそれぞれ分別し、 R_F 0.14 の吸収帯から 14.8 mg の目的物を、また R_F 0.06 の吸収帯から 23.5 mg の分別粗結晶を得た。このようにして得た両試料、並びに前に B₁, B₂ の合併試料より分別した未知のフェノールカルボン酸についてペーパークロマトグラフィーを行って検した。これら結果を第1表に示す。すなわち B₁~2, C₁₉~20 の全く独立した区分から得た R_F 0.13, R_F 0.14 に吸収を示す未知のフェノールカルボン酸の両者はすべての性質が全く一致し、同一物であることは確かである。またこの結果、目的とするフェノールカルボン酸の一部、および R_F 0.06 の顕著な紫外燈吸収を示す未知酸がともに、クロロホルム層の最先端まで移動した疎水性の挙動から推して元の清酒中とともにエステルとして存在することが明らかになり、遊離酸として存在するものとの間の量比まで知ることができた。

第 1 表 B₁~2, C₁₉~20 より分別した試料の各種呈色

試料区分	R _F	収量 mg	紫外燈 (2536 Å)	B.P.B.	1% FeCl ₃ in CHCl ₃ +10% Pyridine	Diazonium <i>p</i> - Nitroanilin 試薬
B ₁ ~2	0.13	45.0	吸収	卅	黄 褐 色	鮮 赤 色
C ₁₉ ~20	0.14	14.8	吸収	卅	黄 褐 色	鮮 赤 色
	0.06	23.5	吸収	卅		

2. 分別フェノールカルボン酸の同定

このようにして得た約 60 mg の分別試料は熱水から 2 回再結晶を繰返した後, まずその I.R. を検した結果, 3420 cm⁻¹ の -OH; 2860, 2560 cm⁻¹ のカルボン酸特有の等間隔小吸収; 1682 cm⁻¹ のカルボニルの吸収; 1613 cm⁻¹ のベンゼン核の特性吸収; 1250 cm⁻¹ のカルボン酸二量体の面内 -OH 振動; 932 cm⁻¹ の同面外振動; 855, 779 cm⁻¹ のベンゼン核の隣接二水素の吸収等から, 比較的簡単な構造を持ったフェノールカルボン酸が想定される. このうち特に, 1682 cm⁻¹ のカルボニル吸収はベンゼン核あるいは二重結合に直接隣接した -COOH 基の存在を示すものであるが, この場合, 二重結合に由来した吸収が見当たらないことから, 同吸収がベンゼン核に直結した -COOH 基の存在を示している. また, 855 cm⁻¹, 779 cm⁻¹ のベンゼン核隣接二水素の吸収は *p*-位の置換体を示すもので, これらの結果から, 最も簡単な化合物として *p*-オキシ安息香酸が想定される. この結果に従って, 市販の *p*-オキシ安息香酸を熱水から再結晶して得た標品と, 前の I.R. を比較した結果を第 3 図に示す. すなわち, 両者の吸収は細部に到るまで完全に一致

し, 分別した不明のフェノールカルボン酸が *p*-オキシ安息香酸であることは確かである. さらに, これを確かめるために, 両者の融点, 混融試験, 元素分析, 分子量の測

定, 紫外部吸収, ペーパークロマトグラフィーによる両者の R_F, 各種呈色を検した結果を第 2 表に示す. これらの結果, ここに分別した不明のフェノールカルボン酸

第 2 表 分別試料および *p*-オキシ安息香酸の諸性質

	分別試料	<i>p</i> -オキシ安息香酸
融 点	210°	213°
混 融 試 験	混融して m. p. 210°	(Calc.) 60.87%
元素分析 { C % H %	60.53% 4.40	4.38
分 子 量 (マイクロラスト法)	135	138
紫 外 部 吸 収 (λ _{max})	250.5mμ	250.5mμ
赤 外 吸 収	両者細部に至るまで完全に一致	
ペーパークロマト グラフィー	東洋濾紙 No. 50, 1.5N-NH ₃ 飽和 n-ブタノール	
R _F	0.13	0.13
紫外燈 { 2536 Å 3650 Å	吸 収 灰黒色	吸 収 灰黒色
B. P. B.	卅	卅
1% FeCl ₃ in CHCl ₃ +10% Pyridine	黄褐色	黄褐色
<i>p</i> -Nitroaniline 試薬	鮮赤色	鮮赤色
Sulfanilic acid 試薬	鮮黄色	鮮黄色

第 3 図 分別フェノールカルボン酸の I.R. による同定

— 分別フェノールカルボン酸 *p*-オキシ安息香酸

第4図 分別未知酸結晶の I.R. による同定

— 分別未知酸結晶 o-フタル酸

が, 清酒成分として従来全く知られていない α -オキシ安息香酸であることが確実に証明できた。

3. R_F 0.06 の未知酸の同定

ペーパークロマトグラフィーの手法によって, R_F 0.06 の吸収部分より得た 23.5 mg の粗結晶は熱水から2回再結晶を繰返し, 白色の針状結晶 16.5 mg を得た。同結晶は 199° で激しく発泡して熔融する。発泡後の白色の針状結晶は融点 128° , また, 発泡前後の秤量によりその減量は 10.6% の測定値を得た。つぎに, ラスト法により再結晶精製結晶の分子量を測定して, 分子量 165 の値を得たが, これより発泡により逃散した気体の重量は 17.4 g となり, 1 分子の未知酸結晶の熱分解によって 1 分子の水が逃散したと考えられる。

再結晶精製結晶の I.R. を測定した結果, 2675 cm^{-1} , 2555 cm^{-1} のカルボン酸特有の小吸収; 1690 cm^{-1} のカルボニル吸収; 1598 cm^{-1} のベンゼン核の特性吸収; 1290 cm^{-1} のカルボン酸二量体の面内 -OH 振動; 908 cm^{-1} のカルボン酸二量体の面外 -OH 振動; 805 cm^{-1} , 749 cm^{-1} のベンゼン核多置換体の吸収からベンゼン核に2つ以上の置換基を有するカルボン酸が推定される。このうち, 1690 cm^{-1} のカルボニル吸収はベンゼン核あるいは二重結合に隣接したカルボン酸の特性吸収であるが, 二重結合の存在に由来する吸収は全く見出せず, この吸収がベンゼン核に隣接したカルボン酸に由来することは明らかである。また, 805 cm^{-1} , 749 cm^{-1} の吸収はベンゼン核の多置換体であることを示しているが, -OH,

第3表 未知酸結晶およびフタル酸の諸性質

	未知酸結晶	フタル酸
分 解 点	199°	199°
融 点(無水物)	128°	128°
混融試験(無水物)	混融して m.p. 128°	(Calc.) 57.77%
元素分析 { C %	57.51%	57.77%
{ H %	3.61	3.62
分 子 量 (マイクロラスト法)	165	166
紫 外 吸 収 (λ_{max})	229, 282 m μ	229, 282 m μ
赤 外 吸 収	両者細部に至るまで完全に一致	
ペーパークロマト グラフィ	東洋濾紙 No. 50, 1.5N-NH ₃ 飽和 n-ブタノール	
R_F	0.06	0.06
紫外燈(2536 Å)	吸 収	吸 収
B. P. B.	卅	卅

-OCH₃, -CH₃, -CH₂R 等天然物中に広く見出される置換基に相当する吸収は全く見出すことができない。このような I.R. の測定の結果と熱分解前後の融点, 分子量, 逃散気体の減量の測定結果から, 分別未知酸が自然界できわめて稀に見出されているフタル酸が予想されるもので, 市販の無水フタル酸を2% 炭酸ソーダ溶液と3時間還流した後, 常法に従って生成酸を分離し, 熱水から1回再結晶を行ったフタル酸の既知試料の I.R. と比較した結果, 両者の I.R. は細部に到るまで完全に一致し, 未知の分離カルボン酸の結晶がフタル酸であることは確実である。これらの結果を第4図に示す。さらに, 同結晶の熔融分解によって得た無水物と市販の無水フタル酸

を減圧昇華により製精した標品を混融して m. p. 128° で融点の降下を認めず, 未知酸結晶がフタル酸であることが証明された. 同結晶の紫外外部吸収, ペーパークロマトグラフィーによる同定の結果と併せて, これらの結果を第 3 表に示す.

結果並びに考察

このように, 清酒成分として新たに見出した *p*-オキシ安息香酸およびそのエステル, フタル酸エステルのうち, *p*-オキシ安息香酸はすでに葡萄酒⁽⁴⁾に存在が報告されているが, これらの酸およびエステルの香味を検査するために, *p*-オキシ安息香酸, 同エチルエステル, フタル酸モノエチルエステルのそれぞれを 1.5 mg/l 市販合成酒に添加して喇酒の結果, いずれも香, 味共に効果は認められなかった.

一方, *p*-オキシ安息香酸は黴あるいはバクテリアなどの微生物によるチロシン⁽⁵⁾, 糖類⁽⁶⁾, あるいはリグニン関連物質として各種フェノール類⁽⁷⁾などの代謝に関与して, 自然界にかなり広くその存在が知られている. また, 高級アルコール類とのエステルは顕著な抗菌性あるいは抗黴性を有することが知られており, 特に清酒の火落防止にも効果が認められている⁽⁸⁾もので, わが国においてもすでに保存の目的で食品添加物の一つとして, その使用が許可されている.

このように微生物などの代謝に広く関与する *p*-オキシ安息香酸あるいはそのエステルが一方で抗菌性を有することが, 清酒中の微量成分としていかなる役割りを果たしているのか, また, 清酒中で同酸が生成する経路を明らかにすることは, 清酒香気の生成あるいは醸造過程における醗酵の機作を覗う上で重要な知見と考えられる. すなわち, 清酒中でその約 1/4 がエステルとして存在することは, 同酸の生成過程で醗酵代謝の最終過程まで生体内で反応が進行したことを示しており, また, その前駆物質については, すでにそれらの存在を明らかにした *p*-オキシ桂皮酸⁽⁹⁾, *p*-オキシベンツアルデヒド⁽¹⁰⁾が関与するであろうことは容易に考えられる. このことは, 清酒醸造の過程でチロシンの醗酵代謝の経路に, 今まで知られていない新しい代謝経路が存在することを示している. 清酒醸造過程で, チロシンの醗酵代謝によってチロゾールが生成することは早くから知られており⁽¹¹⁾, またこのたびの清酒成分の研究の過程においても, 著量のチロゾールを分別し得て, 酵母によるチロシンの醗酵代謝が主として Krebs⁽¹²⁾ による酸化型のアミノ酸代謝の機

作に従って資化されることはまちがいないが, あらたに *p*-オキシ安息香酸の証明によって, すでに *Vibrio* あるいは *Pseudomonas*⁽⁵⁾ などで知られているようにチロシンの β -oxidation による *p*-オキシ安息香酸の生成に類した代謝機作に従って, その一部が資化されると考えられる. しかし, この場合, β -oxidation と全く同一の機作で進行するものとすれば, すでにその存在を明らかにした *p*-オキシ桂皮酸, *p*-オキシベンツアルデヒドの生成を説明できないし, また, 清酒中で *p*-オキシ安息香酸の約 1/4 がエステルとして存在することにも疑問が持たれる. すなわち Krebs path way と全く別な酵素系に属すると考えられる β -oxidation によって生成した *p*-オキシ安息香酸が同じ生体内で容易にエステル化されるものとすれば, 清酒醸造の過程で生成する他の有機酸, すなわち, 糖代謝に由来した乳酸あるいはコハク酸などにおいても, *p*-オキシ安息香酸におけると同程度までエステル化が進行しても良いはずであるが, 清酒中における乳酸エステルの量は約 1 mg/l 程度で全乳酸量に比して著しく少なく, この場合は糖代謝に由来した乳酸よりもむしろアラニンの醗酵代謝に由来した乳酸の一部がエステル化したと考える方が妥当である. これらのことから, 清酒中の *p*-オキシ安息香酸はチロシンから *p*-オキシベンツアルデヒドを経て生成したと考えるのが妥当であり, 事実, チロシンあるいは *p*-オキシベンツアルデヒドを添加して醗酵させた醗酵液から *p*-オキシ安息香酸およびそのエステルの存在を確かめ, これらのことを裏づけることができたが, これらの結果については後報に詳述する予定である.

つぎに, フタル酸エステルの存在は, 醸造物成分として, これまでに全くその報告は見出されない. しかし, 同酸のヒドロキシ誘導体は *Penicillium* 属の黴の糖代謝生産物の一つとして報告⁽¹³⁾されており, 糖から acetate を経てフラグメントの再合成により生成する機作が明らかにされている. 一方, 本研究によって従来全く知られていなかった清酒中の微量成分の多くを明らかにすることができたが, これらの諸成分はいずれもその前駆物質が容易に推定されるものである. ただ, 前にも見出したフェルラ酸⁽¹⁴⁾と同様に, この度のフタル酸も米中のリグニン物質あるいは配糖体などに由来することは充分考えられるところである.

また, フタル酸モノエステルは広く合成樹脂の可塑剤の一つとして使用され, 特に塩化ビニル製品には多量添

加されていることは良く知られた事実である。このため本研究に使用した昭和32年度醸造の清酒について、その醸造あるいは貯蔵、輸送の過程で塩化ビニル製品との接触の機会を調べたが、現場の酒造家は塩化ビニル製品による独特の異臭が付与されることをおそれて、全く使用の形跡はなかった。しかし、念のため市販の硬質塩化ビニルパイプの破砕物100gを20%エタノール液500mlと室温、3日間振盪抽出し、抽出液に苛性ソーダ0.5gを加えて減圧濃縮し、残渣を硫酸微酸性とした後エーテルで抽出し、抽出物の全量を東洋濾紙No. 50に付して1.5N-NH₃飽和n-ブタノールで1夜展開の後、2536 Å^mの紫外燈で検したが、相当するR_Fには全く吸収は見出されず、B.P.B.の発色も判然としなかった。このことから、20%以下のアルコール濃度の清酒が長時間塩化ビニル製品と接触しても、可塑剤として添加されたフタル酸モノエステルの溶出はほとんど無視してさしつかえないものと考えられるが、このたび新たに見出したフタル酸エステルの生成の経路等については、今後の研究により解明したい所存である。

本研究の一部は昭和38年度本会大会で発表した。

- (1) A. Yamamoto : *Agr. and Biol. Chem.*, **25**, 744 (1961).
- (2) 浅尾保夫, 横塚 保 : 本誌, **32**, 617 (1958).
- (3) 山本 淳 : 本誌, **35**, 616 (1961).
- (4) G. Guimberteau, E. Partal : *Ann. Fals. Experi. Chim.*, **54**, 330 (1961).
- (5) F. C. Happold : *Biochem. Soc. Symposia*, **5**, 85 (1950).
- (6) E. L. Tatum, S. R. Gross, G. Earensvärd, L. Garnjobst : *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.*, **40**, 271 (1954).
- (7) M. E. K. Henderson : *J. gen. Microbiol.*, **26**, 155 (1961).
- (8) 橋田 度, 寺本四郎, 向井 稷 : 醸工誌, **36**, 499 (1958).
- (9) 山本 淳 : 本誌, **35**, 819 (1961).
- (10) 山本 淳 : 本誌, **35**, 824 (1961).
- (11) 高橋偵造 : 東京帝国大学農科大学紀要, **7**, No. 2.
- (12) H. A. Krebs : *Biochem. J.*, **29**, 1620 (1935).
- (13) E. W. Basset, S. W. Tanebaum : *Experientia*, **14**, 38 (1958).
- (14) 山本 淳他 : 本誌, **35**, 715 (1961).