蕃椒辛味成分に関する研究 (第3報)*

辛味成分の定量 (その1)

小菅貞良, 稲垣幸男 (岐阜大学農学部農芸化学科)

昭和 33 年 10 月 11 日 受理

蕃椒果実の品質は主として外観持に色沢によって等級付けられている現況である。蕃椒果実の辛味成分含量は品種や開花期により異なり、又栽培条件により異なるものの如く、その結果市販蕃椒果実の辛味にときに著しい差異を示すも、辛味成分含量とこれらの関係が明かにされていない。そして辛味料として利用するに際し、その使用量は辛味成分の含量を考慮することなく、ただ経験上から決定されている状態である。従って蕃椒を辛味料として使用する食品に於て、同種の製品でありながらときに著しくその辛味の相違するのを見受けることがある。これらの事実の原因の1として適当なる辛味成分の定量法を欠くことが考えられる。

蕃椒辛味成分の定量法には多数あり、それらを次の3系統に大別することが出来る。即ち Wasicky-Klein⁽¹⁾の辛味の味覚による比較、Fordor⁽²⁾の辛味成分の三塩化オキシバナジウムによる呈色を利用するもの及び Büchi-Hippenmeier⁽³⁾の辛味成分による molybdenum blue 生成反応を利用するもの等である。三塩化オキシバナジウムによるものにはその外に Tice⁽⁴⁾や大島等⁽⁵⁾の研究がある。又 molybdenum blue 系統のものには、North⁽⁶⁾や藤田等⁽⁷⁾の研究がある。前記 Wasicky-Klein 法は味覚に訴えるものであるからその不正確さは免れ難い。三塩化オキシバナジウムによる諸法はその呈色の特異性がさほど高くなく、且つ変色速かなので測定に困難を来す。又 molybdenum blue 系統のものはその呈色の特異性が低いから、その供試液の調製が極めて煩雑なものとなる。

最近筆者等⁽⁸⁻⁹⁾は従来ただ1種とされていた蕃椒辛味成分が2種あることを見出し、それらを単離し、それらの性質について報告した。又 molybdenum blue 生成反応はこれらの辛味成分の外に、蕃椒果実中に比較的多量含まれているアスコルビン酸⁽¹⁰⁾、糖類及びフェノール性物質に陽性であることが多い。よって筆者等は2辛味成分について検討を加え、呈色干渉物質を殆ど含まない供試液を比較的簡単に調製し、安定な燐モリブデン酸-燐タングステン酸による呈色を利用して辛味成分を定量することが出来た。尚前記 North はバニリンを標準品として、同系統の燐モリブデン酸-燐タングステン酸により比色し、蕃椒辛味成分カプサイシンの定量を行ったが、バニリンの分子量はカプサイシンの約1/2であるから、同一吸光度につきカプサイシン量をバニリン量の2倍とした。筆者等は2辛味成分の混合物であるカプサイシンとバニリンとの同一呈色試薬による吸光度比を求め、バニリンを標準品として比色し、辛味成分を定量し得ることを認めた。

実 験 の 部

I. 標準物質とその溶液

カプサイシン(2辛味成分の混合物)、辛味成分I及び同IIはさきに報告⁽⁸⁾した如く本邦産蕃椒果実から単離したもので、それらの融点は夫々 65°, 64.5° 及び 64°。バニリン Busch 社のものを再結。融点 81~82°。

標準物質の溶液： 上記標準物質を Abderhalden 乾燥器中で乾燥した後、1 l に食塩 20 g を含む 0.5 N-苛性ソーダ液に溶解して製した。又稀釈するのにもこのアルカリ液を用いた。

II. 呈色試薬

フェノール類の呈色試薬である Folin-Ciocalteu⁽¹¹⁾ 試薬は白色沈澱を生成するから、それを防止するため次の如く改良した。

燐モリブデン酸-燐タングステン酸溶液： タングステン酸ソーダ $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 g, モリブデン酸ソーダ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25 g, 85%-燐酸 50 cc, 濃塩酸 (比重 1.18) 100 cc 及び水 800 cc を 1.5 l 程のフラスコに入れ、冷却器を附して微かに沸騰、溶解した後、硫酸リチウム $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ と臭素数滴とを加え、4 時間沸騰浴中で加熱して過剰の臭素を除去し、冷後水を加えて 1 l とした。

* Studies on the Pungent Principles of Capsicum. Part III. Determination of the Pungent Principles (1).

By Sadayoshi KOSUGE and Yukio INAGAKI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Gifu University).

酸性磷酸ソーダ溶液： 磷酸二水素ソーダの 1M 溶液を用いた。

第 1 表 加熱時間による吸光度の変化

標準物質	加熱時間(分)	2	3	4	5	7	10
カプサイシン (35.9 γ /5 cc)		0.161	0.174	0.182	0.187	0.202	0.204
パニリン (19.1 γ /5 cc)		0.194	0.212	0.215	0.222	0.231	0.239

第 2 表 両呈色試薬溶液混合後の吸光度の経時変化

標準物質	時間	10分	30分	2 時間	5 時間	10時間	24時間
カプサイシン (30 γ /5 cc)		0.171	0.169	0.171	0.170	0.167	0.162
パニリン (15.9 γ /5 cc)		0.197	0.195	0.192	0.195	0.193	0.170

第 3 表 呈色液吸光度の経時変化

標準物質	時間(分)	10	30	60	90	120	150
カプサイシン (41.9 γ /5 cc)		0.230	0.231	0.230	0.231	0.231	0.233
パニリン (22.5 γ /5 cc)		0.259	0.258	0.259	0.259	0.260	0.261

III. 呈 色

試験管 (1.7×1.7 cm) に前記標準物質の溶液 5 cc 及び燐モリブデン酸-燐タンゲステン酸液と酸性磷酸ソーダ液との混合液 (1:4) 5 cc とを加え、沸騰水中で加熱呈色せしめる。冷後吸光度を測定して、最大吸収部を決定し吸光度の加熱時間による変化、両呈色試薬混合及び呈色後の経時変化を測定した。吸光度は日立光電分光々度計 EPB-A 型を用い、1 cm 液層について測定した。

呈色液の吸収曲線： カプサイシン、辛味成分 I、同 II 及びパニリンについて第 1 図の如き結果を得た。即ちこれら 4 種の標準物質からの吸収曲線は全く同型にして、共に 750 m μ 附近に於て最大吸収を示す。よって 750 m μ に於て吸光度を測定することとした。

加熱時間と吸光度： カプサイシン及びパニリンにつき、加熱時間による呈色液の吸光度の変化を測定して第 1 表の如き結果を得た。即ち加熱開始後吸光度の増加は 7 分前後から緩慢となる。よって加熱時間を 7 分間とした。

第 4 表 呈色試薬調製による吸光度の変化

試薬調製番号	I	II	III
辛味成分と量			
カプサイシン { 20 γ /5 cc	0.119	0.118	0.117
{ 40 γ /5 cc	0.222	0.226	0.222
{ 60 γ /5 cc	0.327	0.334	0.327
パニリン { 10 γ /5 cc	0.122	0.124	0.124
{ 20 γ /5 cc	0.233	0.237	0.236
{ 30 γ /5 cc	0.342	0.350	0.348

第 5 表 辛味成分 I 及び同 II の吸光度

辛味成分 I { γ /5 cc	12.73	25.46	38.19	50.92	63.64
{ 吸光度	0.074	0.147	0.212	0.269	0.341
辛味成分 II { γ /5 cc	11.14	22.28	33.42	44.57	55.71
{ 吸光度	0.066	0.126	0.186	0.239	0.300

第 6 表 辛味成分 I、II 及びカプサイシンの吸光度

辛味成分量	辛味成分 I	同 II	カプサイシン
20 γ /5 cc	0.115	0.113	0.117
40 γ /5 cc	0.218	0.217	0.222
60 γ /5 cc	0.321	0.322	0.327

第 1 図 呈色液の吸収曲線

A. パニリン (28.6 γ /5cc), B. カプサイシン (53.9 γ /5cc), C. 辛味成分 I (50.9 γ /5 cc), D. 辛味成分 II (44.6 γ /5cc).

両呈色試薬混合後の吸光度の経時変化： 呈色試薬の燐モリブデン酸-燐タンゲステン酸液と燐酸二水素ソーダ液とを 1:4 の割合で混合してから一定時間毎に採り、カプサイシン及びパニリンにより呈色せしめ、試薬混合後の吸光度の経時変化を測定して第 2 表の如き結果を得た。即ち両呈色試薬混合後時間の経過に伴い吸光度は漸次減少の傾向を示すも、混合後 0.5~5 時間では殆ど変化しない。よって呈色試薬は両液混合後 0.5~5 時間内のものを使用するようにした。

呈色液吸光度の経時変化： カプサイシン及びパニリンによる呈色液について、その吸光度の経時変化を測定して第 3 表の如き結果を得た。即ち冷却後 10~120 分間では安定で吸光度の測定に適する。

IV. 呈色試薬調製による吸光度の変化

呈色試薬の一つである燐モリブデン酸-燐タングステン酸溶液の組成は完全には同一を期し難いので、市販の 85% 燐酸及び濃塩酸のみを換えた呈色試薬につき、カプサイシン及びバニリンにより呈色せしめ、呈色試薬調製毎に得られた吸光度を比較した(第 4 表)。即ち試薬調製毎にそれによるカプサイシン及びバニリンの与える吸光度には特に著しい差異が認められなかった。尚燐酸塩液は同一のものを使用した。

V. 辛味成分 I, 同 II 及びカプサイシンの吸光度

これら 3 標準物質溶液について後記 VIII の蕃椒辛成分の分析に於けると全く同様に呈色せしめ、その吸光度を測定して第 5 表の如き結果を得た。即ち両辛味成分量($\gamma/5$ cc)は共に吸光度 E と比例する。そしてその関係式は

$$\text{辛味成分 I について} \quad E=0.00515\gamma+0.012 \quad \text{又} \quad \gamma=194E-2.33$$

$$\text{同 II について} \quad E=0.00521\gamma+0.009 \quad \text{又} \quad \gamma=192E-1.77$$

又辛味成分 I 及び II の $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ は夫々 51.5, 52.1 にして、両辛味成分は同一量当り殆ど同一の吸光度を与う。

従って辛味成分の I 及び II の混合物であるカプサイシンは I 及び II と又同一の吸光度を与えることが予想されるが、これら三者に於て同一操作を施して得られた呈色液は第 6 表の如く、同一量に対し殆ど一致した吸光度を与えた。

VI. カプサイシン及びバニリンの検量線

カプサイシンの検量線： カプサイシン溶液に後記 VIII に於けると全く同様に操作して得られた呈色液について、カプサイシン量と吸光度との関係に關し第 7 表の如き結果を得た。

即ちカプサイシン量 ($\gamma/5$ cc) と吸光度 E とは殆ど比例し、上記の実測値から最少自乗法により得られる検量線方程式は

$$E=0.00525\gamma+0.012 \quad \text{又は} \quad \gamma=190.5E-2.29$$

尚検量線は第 2 図 B に示す。

バニリンの検量線： バニリンを標準としてカプサイシンを比色定量する目的を以て、前記カプサイシンと全く同様に操作して、バニリン量と吸光度との関係につき第 8 表のような結果を得た。

即ちバニリン量 ($\gamma/5$ cc) と吸光度 E とは殆ど比例し、その検量線方程式は

$$E=0.0112\gamma+0.012 \quad \text{又は} \quad \gamma=89.0E-1.04$$

尚検量線は第 2 図 A に示す。

VII. カプサイシンとバニリンの関係

カプサイシン及びバニリンの検量線方程式より次の関係式が得られる。

$$\text{カプサイシン量} = 2.13 \times \text{バニリン量}$$

VIII. 蕃椒果実中のカプサイシンの定量

供試液： 風乾蕃椒果実の細刻したもの 1~2 g をソクスレー抽出器中でエーテルを以て約 20 時間抽出し、エーテル回収残渣を四塩化炭素 50cc を加え溶解する。この四塩化炭素溶液の上澄液 10 cc を内容約 100 cc の長型分液漏斗に採り、1 l につき食塩 20 g を含む 0.5 N 醋酸 20 cc を加え振盪後、2 層に分離するをまち下層の四塩化炭素液を分取する。この四塩化炭素液 5cc と前記標準物質の溶解に使った食塩含有アルカリ液の 25 cc (四塩化炭素溶液の 5 倍容)、或は 50 cc (10 倍容) とを共栓試験管 (3×20 cm) に採りよく振盪する。2 層に分離するをまち上層のアルカリ液 5 cc を採り供試液とする。

第 2 図 カプサイシン及びバニリンの検量線

A: バニリン, B: カプサイシン

第 7 表 カプサイシン量と吸光度

カプサイシン量 ($\gamma/5$ cc)	5.99	11.98	17.97	23.96	29.95	35.94	41.93	47.92	53.91	59.90
吸光度 (E)	0.043	0.073	0.109	0.139	0.168	0.202	0.231	0.260	0.297	0.327

第 8 表 バニリン量と吸光度

バニリン量 ($\gamma/5$ cc)	3.18	6.36	9.54	12.72	15.90	19.08	22.26	25.44	28.62	31.80
吸光度 (E)	0.041	0.084	0.117	0.159	0.195	0.232	0.259	0.301	0.328	0.367

第 4 図 供試液のペーパークロマトグラフ
A: エーテル抽出物の四塩化炭素溶液, B: 供試液, C: カプサイシン.

本供試液を塩酸々性となしエーテルを以て抽出し、このエーテルを除去して得られる残渣の四塩化炭素溶液についてのペーパークロマトグラフィは第 4 図の如き結果を与えた。即ち本供試液中では 2 辛味成分の外、前記の呈色試薬による呈色物質が殆ど除去されている。因みに本ペーパークロマトグラフィは 0.2 M-NaOH・0.1 M-Na₂CO₃・0.4 M-NaC₂H₃O₂ 混合液(3:2:5)を用いて展開し、前記呈色試薬の燐モリブデン酸-燐タングステン酸液、次に酸性燐酸塩液を噴霧し、蒸気浴中で加熱呈色せしめたものである。

呈色と吸光度測定: 前記標準物質溶液の呈色と全く同様に供試液 5 cc を試験管(1.7×1.7 cm)に採りこれに燐モリブデン酸-燐タングステン酸液と酸性燐酸ソーダ液との混合液(1:4) 5 cc を加え、沸騰水中で 7 分間加熱呈色せしめ、流水中で 10 分間冷却する。冷後 10~120 分間内に本呈色液の吸光度を測定する。

カプサイシン量の計算: 前記の過程を経て得られる供試液 5 cc 中に来る辛味成分量は、用いる食塩含有アルカリ液が四塩化炭素溶液の 5 倍容の 25 cc のとき原採取試液中の $10/50 \times 5/10 \times 5/25 = 1/50$ となり、10 倍容のときは同様に 1/100 となる。

又本供試液調製過程中に於ける辛味成分の損失量を明かにする目的を以て、純カプサイシンの既知濃度の四塩化炭素溶液について供試液調製と全く同じ操作を施して、供試液中に来たカプサイシン量を示す吸光度を測定した。この際四塩化炭素溶液 5 cc に対し、食塩含有アルカリ液 5 倍容の 25 cc 及び 10 倍容の 50 cc を用いて第 9 表の如き結果を得た。

即ち前記の供試液調製過程を経て、同供試液中に来るカプサイシン量は略濃度に比例する。そしてこれらの関係を図示すると第 3 図のようになる。又上記の実測値から同図の直線の方程式を求めると

食塩含有アルカリ液を 5 倍容用いたとき

第 9 表 供試液中に来るカプサイシンによる吸光度

供試液中のカプサイシン 計算量 ($\gamma/5cc$)	6.3	12.6	18.9	25.2	31.5	37.8	44.1	50.4	56.7	63.0
アルカリ液 5 倍容用いた ときの吸光度 (E)	0.043	0.075	0.103	0.125	0.164	0.193	0.225	0.243	0.279	0.300
同じく 10 倍容用いたと きの吸光度 (E)	0.039	0.073	0.100	0.130	0.159	0.194	0.213	0.240	0.276	0.297

$$E = 0.00460 \gamma + 0.016 \text{ 又は } \gamma = 217.9 E - 3.49$$

又同じく 10 倍容用いたとき

$$E = 0.00455 \gamma + 0.014 \text{ 又は } \gamma = 219.8 E - 3.08$$

これら両式と前記カプサイシンの検量線方程式から、供試液中に来るカプサイシン量はアルカリ液が 5 倍容のときは 87.4%、又 10 倍容のとき 86.7% となる。従って原試料中のカプサイシン量は得られた測定値に夫々 $57 (= 50 \times 100/87.4)$ 或は $115 (= 100 \times 100/86.7)$ を乗ずれば得られる。

又バニリンの比色定量の際はバニリン量に 2.13 を乗ずればカプサイシン量が得られる。

第 3 図 供試液調製過程に於けるカプサイシンの損失

A: 原カプサイシンによる吸光度, B, C: 供試液中に来るカプサイシンによる吸光度にして、B はアルカリ液 5 倍容を、又 C は 10 倍容を用いたもの。

第 10 表 分析結果 (風乾試料)

品 種	カプサイシン含量 (%)	純カプサイシン添加量 (%)	カプサイシン合計量 (%)	カプサイシン合計量測定値 (%)
鷹 の 爪 1	0.16	0.78	0.94	0.93
2	0.60	0.39	0.99	0.96
八 房 1	0.30	0.13	0.43	0.46
2	0.39	0.26	0.65	0.67
本 鷹 1	0.25	0.13	0.38	0.41
2	0.45	0.13	0.58	0.60

本定量法によりカプサイシンの四塩化炭素溶液 (12~60 γ /5 cc) については, 約 6% の誤差範囲内で測定することが出来た. 又蕃椒の代表品種であるタカノツメ及びヤツフサについてカプサイシン量を測定した結果を第 10 表に掲ぐ. 尚アルカリ液は 10 倍容を用いた.

考 察

本邦産蕃椒果実の辛味成分は 2 種あり, それらの辛味は殆ど等しいことは既に報じたところである. 従って蕃椒を辛味料とするときただそれらの合計量を測定すればよい. 而して本法に於ける 2 辛味成分による吸光度は殆ど等しいから, 本法による測定結果は 2 辛味成分の合計量 (即ちカプサイシン量) を与える.

要 約

蕃椒辛味成分の隣モリブデン酸-隣タングステン酸による青色液の吸光度測定に基礎を置く蕃椒果実中の辛味成分の定量法について述べた. 又本法により 2 種の辛味成分合計量 (即ちカプサイシン量) が得られ, それは辛味に比例することを明かにした. 尚バニリンとの比色定量法についても述べた.

終りに臨み御指導を賜った京都大学井上吉之教授並びに岐阜大学高橋悌蔵教授に厚く感謝の意を表します.

(1) R. Wasicky, F. Klein : <i>Festschr. für A. Tschirch.</i> , 1926, 357.	(6) H. North : <i>Anal. Chem.</i> , 21, 934(1949).
(2) K. V. Fordor : <i>Z. Untersuch. Lebensm.</i> , 61, 94 (1931).	(7) 藤田路一, 古谷 力, 川名 明 : 薬誌, 74, 766 (1954).
(3) J. Büchi, F. Hippenmeier : <i>Pharm. Acta. Helv.</i> , 23, 327, 353 (1948).	(8) 小菅貞良, 稲垣幸男, 上原 勤 : 本誌, 32, 578 (1958).
(4) L. F. Tice : <i>Am. J. Pharm.</i> , 105, 325 (1933).	(9) 小菅貞良, 稲垣幸男, 丹羽実徳 : 本誌, 32, 720 (1958).
(5) 大島康義, 白川正治, 松井俊規 : 九大学芸, 13, 159 (1951).	(10) 成田不二雄 : 京城医専, 5, 481 (1935).
	(11) O. Folin, V. Ciocalteu : <i>J. Biol. Chem.</i> , 73, 627 (1922).

ブチル細菌の蛋白分解酵素について (第 3 報)*

アセトン・ブタノール菌蛋白分解酵素活性に及ぼす 2, 3 の物質の影響

土井新次, 金子安之, 内野不二 (名古屋大学農学部農芸化学科)

昭和 33 年 10 月 16 日 受理

著者等は前報^(1,2)において Weizmann タイプのアセトン・ブタノール菌, 東大 314 号菌がトウモロコシ培地に生育, 醗酵する際に培養液中にかなり強力な蛋白分解力を示すことを観察した. このトウモロコシ培地に過剰の炭酸カルシウムを添加して培養すると, この活性は著しく増大することを認め, 本酵素を培養液より分離, 精製し, 精製標品の若干の性質について報告した.

本報においては, 本酵素の性質を詳細に究明するための一助として, 2, 3 の金属イオン, キレート試薬等の阻害剤を用いて, これらの物質の酵素活性に及ぼす影響について試験した.

現在までに, 本実験に使用した菌と同属の *Clostridium* のプロテイナーゼ⁽³⁾ (*Cl. histolyticum*, *Cl. botulinum* 等の病原性のもの) については, その活性に -SH や Fe^{++} の必要なもの, 逆に -SH によって不活性化されるもの, また Ca^{++} を必要とするもの等が知られている. 他属の細菌では *Group A Streptococci* のプロテイナーゼ⁽⁴⁾は還元剤により賦活され, 枯草菌の中性プロテイナーゼ⁽⁵⁾は 2 価金属イオンを活性に要することが知られており, また *Pseudomonas myxogenes*⁽⁶⁾ や *Micrococcus lysodeikticus*⁽⁷⁾ 等の酵素は Ca^{++} を必要とする等, 多数の報告がなされている.

著者等の試験の結果によると, 本酵素は, その活性に多くの clostridia のそれに見られるような -SH の影響は認められず, 2 価金属イオンの或る種のものが必要であると考えられたので, それらの結果について報告する.

* Proteolytic Enzymes of Butyl Bacteria. Part III. The Effect of Several Compounds on the Proteinase Activity of Acetone-Butanol Bacteria.

By Shinji DOI, Yasuyuki KANEKO and Fuji UCHINO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Nagoya University)