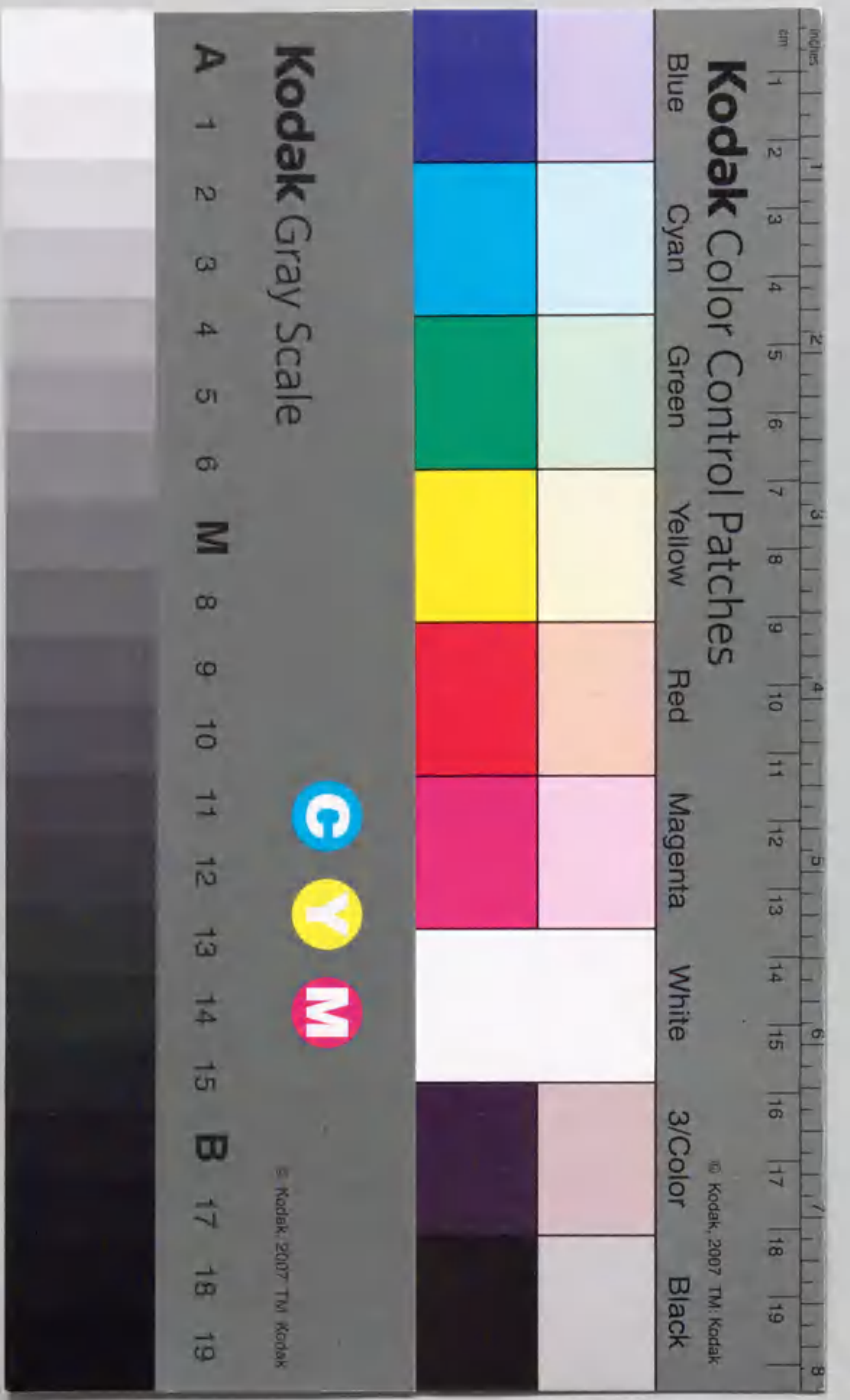


閏相系における
ケトースのサミノカルボニル反応
に関する研究

西堀 すき江



報告番号 乙 第 4648 号

①

固相系における
ケトースのアミノカルボニル反応
に関する研究

西堀 すき江

目次

略語一覧

第1章 序論

要約	1
1-1 食品の機能	1
1-2 食品の二次機能	1
1-3 近年の食品の動向	2
1-4 異性化糖	3
1-5 食品の褐変	3
1-6 非酵素的褐変	4
1-7 アルドースとアミノ化合物による反応	7
1-8 ケトースとアミノ化合物による反応	9
1-9 アミノカルボニル反応由来のフレーバー	12
1-10 アミノカルボニル反応由来の生体機能調節因子	23
1-11 本論文の目的	23

第2章 焙焼クッキーの香気に関する加熱生成物

要約	26
2-1 序	26
2-2 クッキー焙焼中における色の変化	27
2-3 焙焼クッキー中の加熱生成物	30
2-4 加熱生成物の変化	30
2-5 クッキー原材料の加熱による P5、P6 の生成	30
2-6 加熱時間の増加に伴う P5、P6 の変化	34
2-7 考察	34

第3章 フレーバー成分の同定

要約	39
3-1 序	39
3-2 焙焼クッキーの香気に関する生成物	39
3-3 P5 及び P6 の同定	40
3-4 各クッキー素材の混合物の焙焼による DDMP 及び HMF 生成	49
3-5 タンパク質またはアミノ酸とフルクトース混合物の加熱による DDMP と HMF 生成	51
3-6 クッキー中の DDMP、HMF 生成に及ぼす炭酸水素ナトリウムの影響	51
3-7 考察	55

第4章 焙焼クッキーの品質に及ぼす単糖、オリゴ糖の影響	
要約	58
4-1 序	58
4-2 ペントースを添加したクッキーからの香気物質	59
4-3 ヘキソースを添加したクッキーからの香気物質	59
4-4 二糖類、三糖類を添加したクッキーからの香気物質	62
4-5 クッキーの品質に及ぼすグルコース、フルクトース、スクロース添加の影響	62
4-6 クッキードウに用いる炭酸水素ナトリウムの影響	70
4-7 糖を添加したクッキー表面の斑点に及ぼすデンプンの影響	70
4-8 クッキーの品質に及ぼす各種糖の影響	71
第5章 各種アミノ酸とフルクトースの反応	
要約	72
5-1 序	72
5-2 アミノ基の位置の相違による影響	72
5-3 アミノ酸の炭素鎖の長さの相違による影響	73
5-4 各種アミノ酸、及びそのアミノ酸誘導体による影響	77
5-5 糖に対するアミノ酸量の影響	77
5-6 考察	80
第6章 DDMP生成に対するpHの影響	
要約	84
6-1 序	84
6-2 pH調製したオポアルブミンとフルクトースによるDDMPの生成	84
6-3 グルタミン酸とフルクトース混合物への炭酸水素ナトリウム添加効果	85
6-4 考察	85
第7章 焙焼クッキー中のフレーバーの成分	
要約	92
7-1 序	93
7-2 ガスクロマトグラフィー/マススペクトルによる加熱生成物の分析及び同定	93
7-3 β -アラニンと、フルクトース、またはグルコースの反応中のマルトール生成の有無	96
7-4 β -アラニンと、フルクトース、またはグルコースの反応中に形成される主要物質の変化	97

7-5	HPLCによるDDAFの単離・同定	100
7-6	N-置換したピリジニール及びピロール誘導体の生成	109

第8章	クッキーのモデル系における香気生成機構	
要約		121
8-1	序	121
8-2	糖とアミノ酸の反応からの生成物の単離・同定	122
8-3	糖とアミノ酸からのDDMPとアマドリ化合物の生成	130
8-4	各種アマドリ化合物からのDDMP生成	130
8-5	フルクトースとβ-アラニンの混合物から生成されるDDMPとHMFに及ぼす加熱温度の影響	134
8-6	考察	134

第9章	総括	141
-----	----	-----

実験の部		
第1部	実験機器、試薬、及び実験方法	148
第2部	機器分析データ	159

参考文献		161
------	--	-----

謝辞

報文目録

参考報文目録

略語一欄

Ac.P3	acetylated peak 3
Ac.P5	acetylated peak 5
Ac.P11	acetylated peak11
B.P.	baking powder
BSA	bovine serum albumin
DDAF	2,3-dihydro-3,4-dihydroxy-5-acetylfuran
DDMP	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(<i>H</i>)-pyran-4-one
3DG	3-deoxyglucosone 11
EI	electron ionization (電子衝撃イオン化法)
FAB	fast atom bombardment (高速原子衝撃法)
FAC	amadori compound from fructose with β -alanine
fructose- β -alanine	1-deoxy-1- β -alanino-D-fructose
fructose- <i>N</i> α - <i>t</i> -Boc-lysine	1-deoxy-1- <i>N</i> α - <i>tert</i> -butoxycarbonyl-lysino-D-fructose
fructose- ρ -toluidine	1-deoxy-1- ρ -toluidino-D-fructose
GAC	amadori compound from glucose with β -alanine
GC	gas chromatography
HHMF	4-hydroxy-2-hydroxymethyl-5-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanone
HMF	5-hydroxymethylfurfural
HPLC	high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
IR	infrared spectroscopy (赤外分光)
MS	mass spectrometry (質量分析)
<i>N</i> α - <i>t</i> -Boc-lysine	<i>N</i> α - <i>tert</i> -butoxycarbonyl-lysine
3NFHP	3-{ <i>N</i> -(2-formyl-5-hydroxymethylpyrrol-1-yl)}-propionic acid
3NMDTP	3-{ <i>N</i> -(2-methyl-3,6-dihydro-4,5,6-trihydroxypyridinyl)}-propionic acid
NMR	nuclear magnetic resonance (核磁気共鳴)
ODS	octadecylsilane
OPD	o-phenylenediamine
QD	quinoxaline derivation
RI	refractive index (示差屈折)
SI	silica gel
TFA	trifluoroacetic acid
UV	ultraviolet spectroscopy (紫外分光)

第1章 序論

1-1 食品の機能

食品の研究は時代と共に変遷している [1]。20世紀前半に行われた食品研究の多くは、主として栄養化学者による食品の栄養価に関する研究で、ビタミンや必須アミノ酸などが発見され、輝かしい成果が上げられた。しかし食品の価値は栄養価だけではなく、色、味、匂い、テクスチャーなどが人の嗜好に適合しているかによっても決る。このため、多くの食品化学研究者により、食品の化学的、物理的性質など、食品の品質形成に関する基礎的な研究が進められてきた。この様な経緯から、長い間、栄養化学者による食品の栄養学的特性の研究と、食品化学者による食品の嗜好的特性の研究とが食品研究の二分野を形成していた。

最近になって、食品には上の2つの主要な特性のいずれとも異なる第3の特性が存在することが提唱され、食品の重要な特性として各方面から注目されている。この新しく見いだされた食品の特性は、生理機能調節作用と呼ばれるもので、人の身体の免疫系、内分泌系、神経系などのさまざまな生理機能に影響を与えて、健康の管理と維持に重要な役割をもつものと考えられている。また、この新しい食品の特性は、藤巻ら [2] により食品の三次機能という名称が付けられた。食品分野への三次機能という名称の導入と共に、これまでの栄養学的特性と嗜好的特性のそれぞれも、一次機能、二次機能という名称で呼ばれるようになった。

1-2 食品の二次機能

食品は薬品とは異なることから、人の嗜好を満足させなければならない。食品には、味覚や臭覚の応答に関わる機能も要求されることから、この食品の二次機能のことを感覚機能ともいう。食品の二次機能には食品の成分や性状と、食品評価の生体機序という両面の多くの因子が関与している。

多様な食品がそれぞれ人の感覚にどのように働きかけるかを評価する場合、取り上げなければならない感覚要素としては、味覚、臭覚、温度覚、触圧覚(テクスチャー、舌ざわり、歯ごたえ、肌合いなど)、視覚(色、形、大きさなど)など

の外観覚、及び食品を噛んだ時の音や骨振動の感覚、胃の伸展あるいは収縮による身体内部からの感覚情報、さらに血液や体液の性状や代謝活動によって誘起される空腹感、満腹感などの内臓感覚などがある。食品の嗜好性あるいは評価は、その食品についての過去の食体験(学習効果)や体調(疲労、睡眠、運動、労働など)、健康状態、生活環境(温度、湿度、高度など)なども十分考慮する必要がある。ここでは、特に食品がもつ種々の化学的性質と食品の嗜好性の間の関係を食品化学的立場より考える。

1-3 近年の食品の動向

近年、科学技術の進歩には目を見張るものがある。特にバイオテクノロジー、新素材、エレクトロニクスなどは、いわゆるハイテクノロジーの中心となる技術開発分野として画期的な成果を期待され、世の関心を集めている。食品素材の主要素は生物体である。従って、その生産、加工、保存など、さまざまな場面に生物機能が重要なかわりをもっている。そのため、原料の生産、新素材の開発、省エネルギー、資源の有効利用などさまざまな面からバイオテクノロジーは不可欠の技術で、食品工業界に広く普及している。

これらのバイオテクノロジーの恩恵を受け、豊かな食の世界を楽しむことが出来るようになった一方では肥満防止、成人病予防を望んでいる人達がいる。これからの社会環境の中で、高齢者の保健、働く女性の健康と美容、健常者の健康増進などは、さらに日常茶飯事として定着していくと考えられる。その根幹にある食生活においても健康嗜好は当然のこととなり、ひいてはそれの盛られない食品は置き去りにされていくと考えられる。

このような社会情勢から、シュガーレス、カロリーオフ、低脂肪などの低エネルギー食品(近年ライト食品と称される)が次々と登場し、特にアメリカにおいては過半数の国民が何らかの形のライト食品 [3] を愛用している。このライト食品嗜好は特に甘味料に向けられ、甘いものは即砂糖、砂糖即肥満・成人病、砂糖即う蝕という概念から抜け切れず、低エネルギー性甘味料、あるいは低う蝕性

甘味料への期待と必要性がますます高まって行くと考えられる。

一般に低エネルギー性甘味料と称するが、どの程度のエネルギーならば低いというのか定かではないが、 $1\text{g} = 4\text{kcal}$ (16.74kJ) を基準に、これより低エネルギー値と思われる、小腸でほとんど吸収されない糖質甘味量及び高甘味度甘味料を、低エネルギー甘味料という [4]。

1-4 異性化糖

日常生活において甘味は欠くことのできないものである。甘味の基本になっているものはスクロースで、これは砂糖黍などの植物に蓄積されているものを原料にしている。砂糖の1人あたりの年間消費量は約 20kg であるが、消費者の砂糖離れの現象にともなって砂糖に似た甘味をもち、エネルギーになりにくい糖質が求められている。

デンプンを酸あるいは酵素で加水分解するとグルコースができる。これは1911年にキルヒホフによって発見され、日本では1960年に酵素を用いたグルコースの製造法が世界に先駆けて確立された。しかし、グルコースの甘味度は砂糖の70%と低く、甘味を高める研究が行われた。グルコースと全く同じ分子式のフルクトースは甘味が砂糖の130~170%であることから、グルコースをフルクトースに異性化する方法の研究が進められた。

異性化糖にはブドウ糖・果糖液糖や果糖・ブドウ糖液糖と呼ばれ、第一世代の異性化糖(フルクトース42%、グルコース52%、その他6%)と、第二世代の異性化糖(フルクトース含量55%のもの)とがある。これらはアメリカや日本ですでに大量につくられ、乳酸飲料、ソフトドリンク、アイスクリーム、パン、ケーキ、果実缶詰、佃煮などに広く使われている。異性化糖は液状で取り扱えることができ、コストの面でも砂糖より低価格である。

1-5 食品の褐変

食品を加工したり保蔵する場合、食品成分間に種々の複雑な化学反応が生じ、

食品の色や香など品質に種々の影響を与える。この中で最も普遍的な反応は褐変反応である。この褐変は味噌、醤油などのその食品特有の色調を形成する場合もあるが、果汁などにみられるように品質の劣化をもたらす場合も多く、食品の品質管理の上で非常に大きな問題である。褐変は果物、野菜、芋類の切断面などに見られる酵素的褐変と、還元糖を含む食品などの加熱、保蔵中に見られる非酵素的褐変に大別される。

1-6 非酵素的褐変

この非酵素的褐変は、さらにカラメル化とアミノカルボニル反応に分かれる。前者は糖や少糖などを単独で加熱した場合の褐変である。後者は食品中に広く見られる非酵素的褐変で、アミノ化合物とカルボニル化合物との間に容易に起きる食品成分間反応に基づくものである。この反応は一般的にアミノカルボニル反応、またはメイラード反応といわれ、1912年にLouis Maillard [5] が糖とアミノ酸混合液を加熱し、著しく褐変することを報告して以来メイラード反応と呼ばれ、各方面で研究が進められている。メイラード反応、すなわちアミノカルボニル反応の褐変反応機構については1953年Hodge [6] の提出した機構がほとんど唯一のものとして定説のように認められてきた (Fig. 1-1、1-2)。反応の一方はアミノ酸、ペプチド、タンパク質などのアミノ化合物で、他方は還元糖、不飽和脂肪酸、フェノール、アスコルビン酸などの酸化により生成するカルボニル化合物で、共に食品中や生体中に普遍的に存在する基本的な成分である。その影響は、単にメラノイジンと呼ばれる褐変物質を生成するばかりでなく、多くの食品の加工調理時に見られる特有のフレーバーの生成や、タンパク質を中心とする食品物性の変化、及び栄養生理学的影響をもたらす、さらには変異原の生成などにも関与することが知られ、食品の品質形成や劣化に関係する最も重要な成分間反応であることは明らかである。

Initial stage

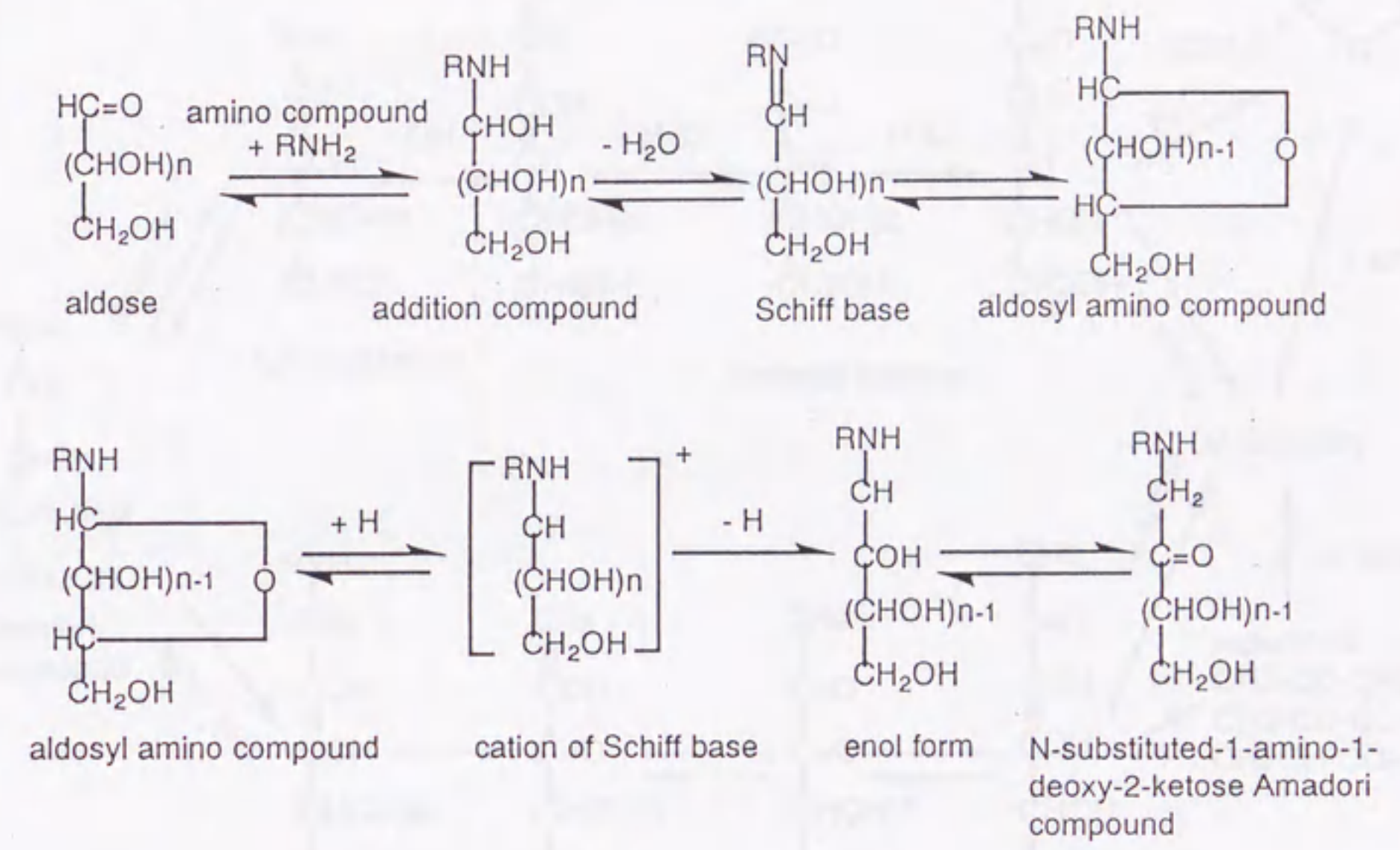


Fig. 1-1 Pathway of the Maillard reaction (Hodge, 1953)

Intermediate stage

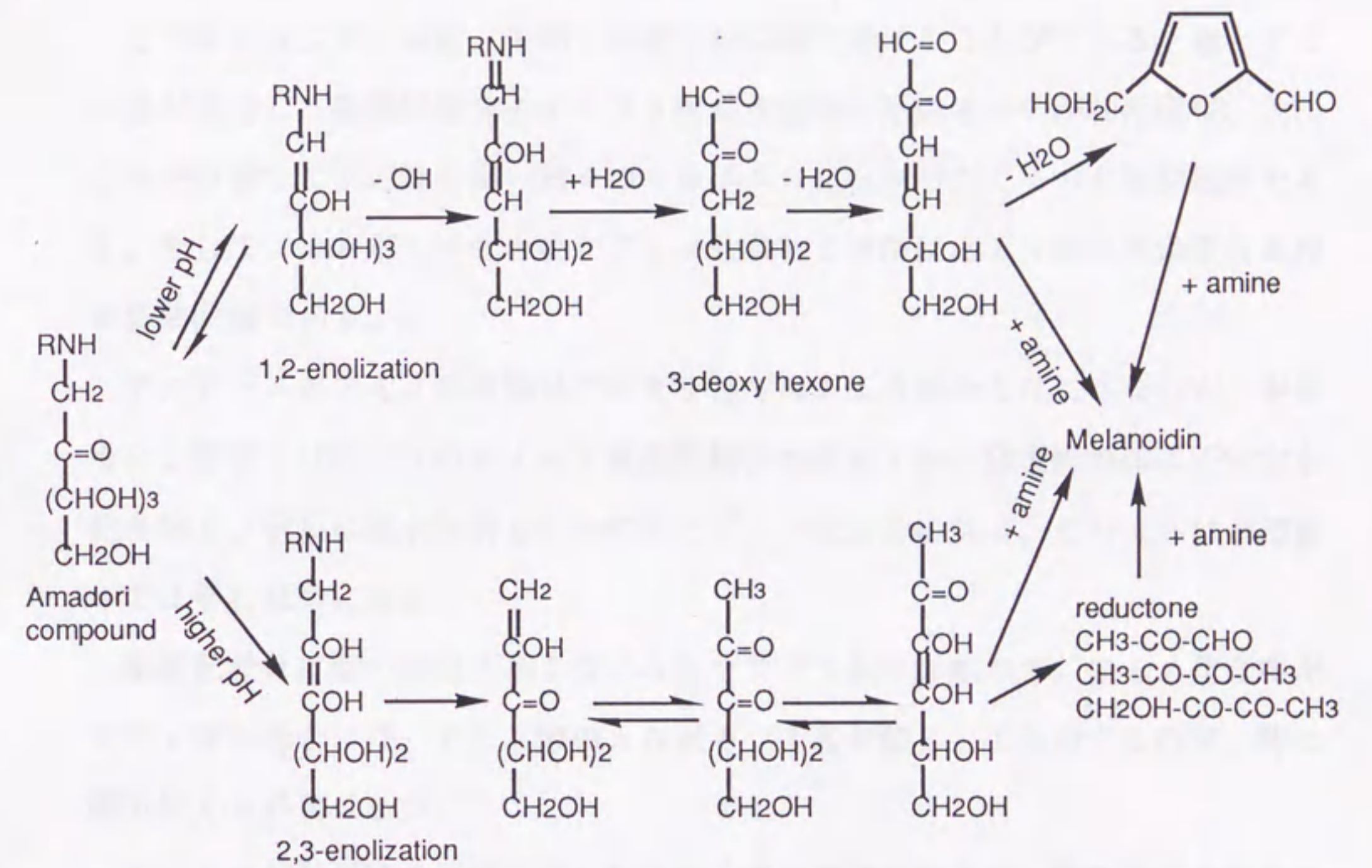


Fig. 1-2 Pathway of the Maillard reaction (Hodge, 1953)

1-7 アルドースとアミノ化合物による褐変反応

アルドースとアミノ化合物による反応は、数多い褐変反応の中で最も一般的なものであり、研究もよく行われ、色々な褐変反応を理解するうえで基礎になる[7]。そこで、一般的に報告されているこの反応の概略について言及すると下記のようになる。

この反応は大きく初期、中期、終期の三段階に分けることができる。糖とアミノ基が結合して窒素配糖体やアマドリ転移生成物を形成するのが初期段階、次にこれが分解して反応性の高い種々のカルボニル化合物を生じるのが中期段階である。そして、カルボニル化合物がアミノ化合物と再度反応して褐色色素を作るのが終期段階である。

アルドースとアミノ化合物はアルカリ性ではあまり縮合を起こさないが、中性ないし酸性では縮合反応によって窒素配糖体を形成する。窒素配糖体は不安定な化合物で、容易に加水分解して元の糖とアミノ化合物に戻る。この反応は水溶液中では平行状態にある。

窒素配糖体は酸の触媒作用を受けるとアマドリ転移を起こす。アミノ化合物がアミノ酸の場合には、アミノ酸のカルボキシル基が酸として作用するので、特に酸を加える必要はない。

アマドリ転移反応の機構に関してはいくつかの説があるが、最も妥当と思われるものを Fig. 1-3 に示した。すなわち、窒素配糖体は酸(プロトン、 H^+)の作用で、まず、インモニウムイオンを形成し、エナミノールを経由してアマドリ転移生成物になる。このものはグルコースとアミノ酸の場合はフルクトースアミノ酸と通称される。

ヘキソースの場合はたいてい安定なピラノース型として分離されるが、ときにはケト型として分離される場合もある。ペントースの場合は炭素が1分子少ないので環状になりやすく、多くの場合、ケト型として存在するようである。

アマドリ転移生成物は一般に窒素配糖体よりはるかに安定な化合物であるが、中間体であるエナミノールはアミノレダクトンであるため不安定で、色々な分解反

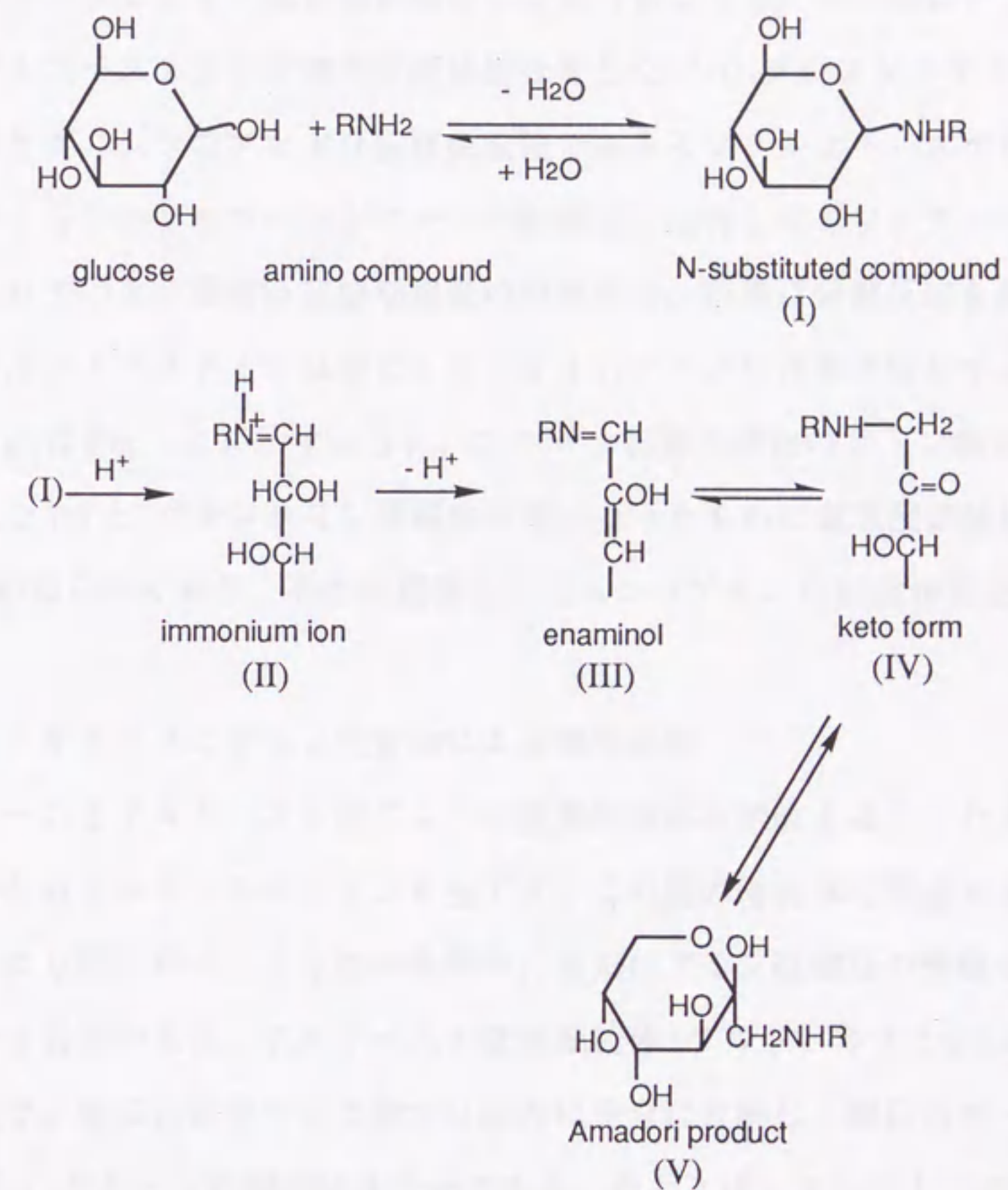


Fig. 1-3 Mechanism of the Amadori rearrangement (中林ら, 1967)

応を起こす。これは分解しても元のアルドースには戻らない。アマドリ転移生成物は弱アルカリ性で、強い還元力を示すが、これはエナミノールの形成によるものである。

アルドースとアミノ化合物が結合したものとしては、その他にアンモニア1分子にグルコース2分子が窒素配糖体結合をしたジ-D-グルコシルアミンや、グルコースとグリシンのアマドリ転移生成物であるモノフルクトースグリシン、さらにもう1分子のグルコースがアマドリ転移型に結合したジフルクトースグリシンが知られている。後者は重要な褐変の中間体で、容易に分解反応を起こす。また、モノフルクトースアミンは逆にもう1分子のアミノ化合物と結合することができる。これは Fig. 1-4 に示すように、アマドリ転移生成物のケトン基に窒素配糖体結合した (I) と、グルコサミン誘導体の形になったものに窒素配糖体結合をした (II) とが知られており、その中間体としてエンジアミンの形成が推定されている。

1-8 ケトースとアミノ化合物による褐変反応

ケトースもアルドースと同じように窒素配糖体を形成する。たとえばフルクトースからはフルクトシルアミンを生ずる。この種の結合体を形成する傾向はアルドースより弱いので、より強い条件か、またはアミン塩酸塩や酢酸などの触媒を添加する必要がある。アルドースの窒素配糖体(アルドシルアミン)はいずれも不安定で、室温に放置すると数カ月以内に完全に分解し、褐色のタール状になるが [8]、ケトースの配糖体は安定である。たとえば、フルクトースとアニリンや *p*-トルイジンの配糖体である *N*-フェニル-、及び *N-p*-トリル-D-フルクトシルアミンは、室温に2年間放置しても変化しなかったという [9]。ケトシルアミンは、アルドシルアミンと同様に、弱い酸によって元のケトースとアミノ化合物に戻る。ケトシルアミンもアマドリ転移と同様の反応を起こす。これをハインズ転移と呼んでいる。ハインズ転移 [10] も 1,2-エノール化を経由して起こるので、フルクトースからはグルコースとマンノースの立体配置を有するアミノ誘導体を生ずる (Fig. 1-5)。これはフルクトースがアルカリ性下でグルコース、マンノー

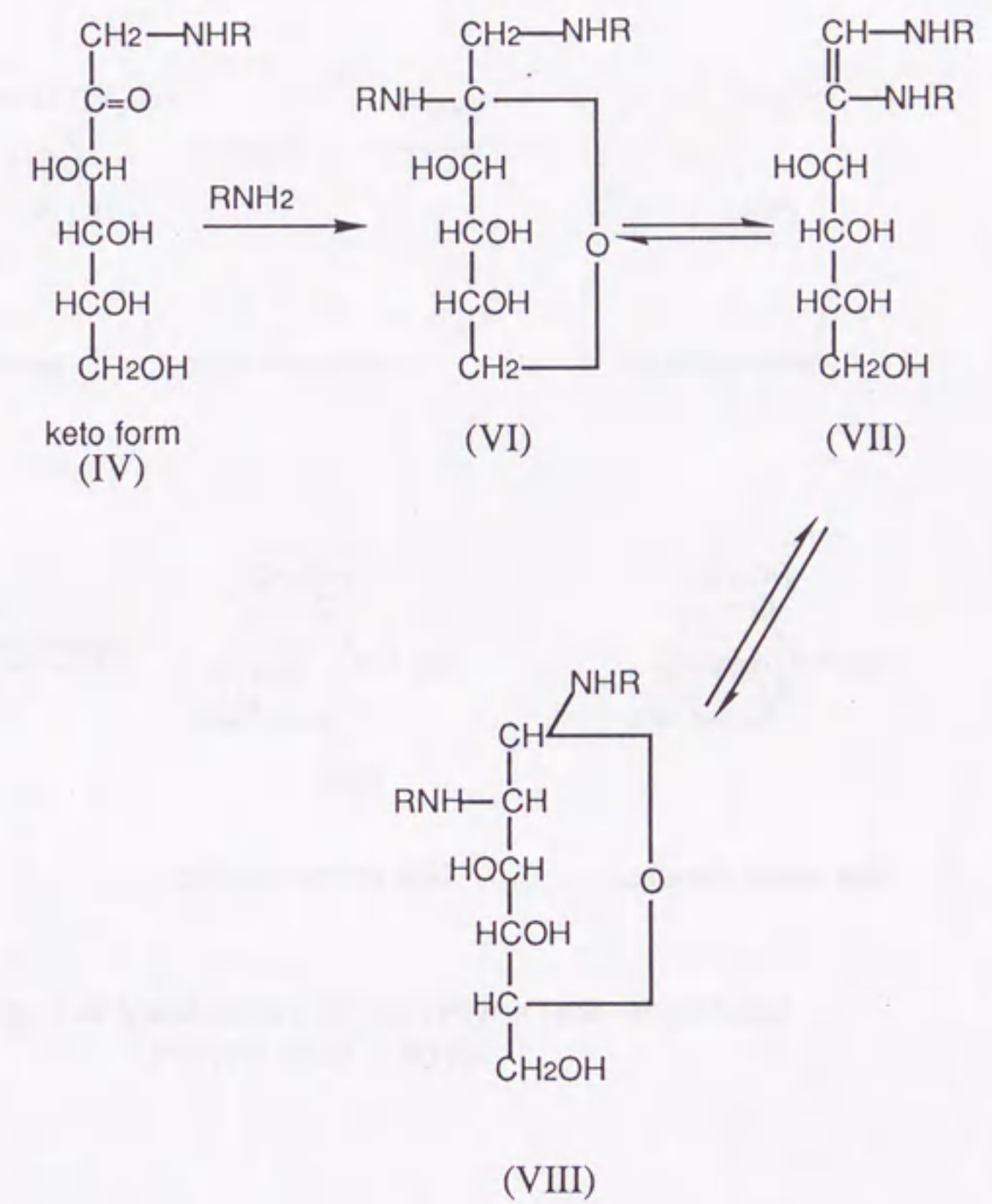


Fig. 1-4 Mechanism of carbonyl compounds (中林ら, 1967)

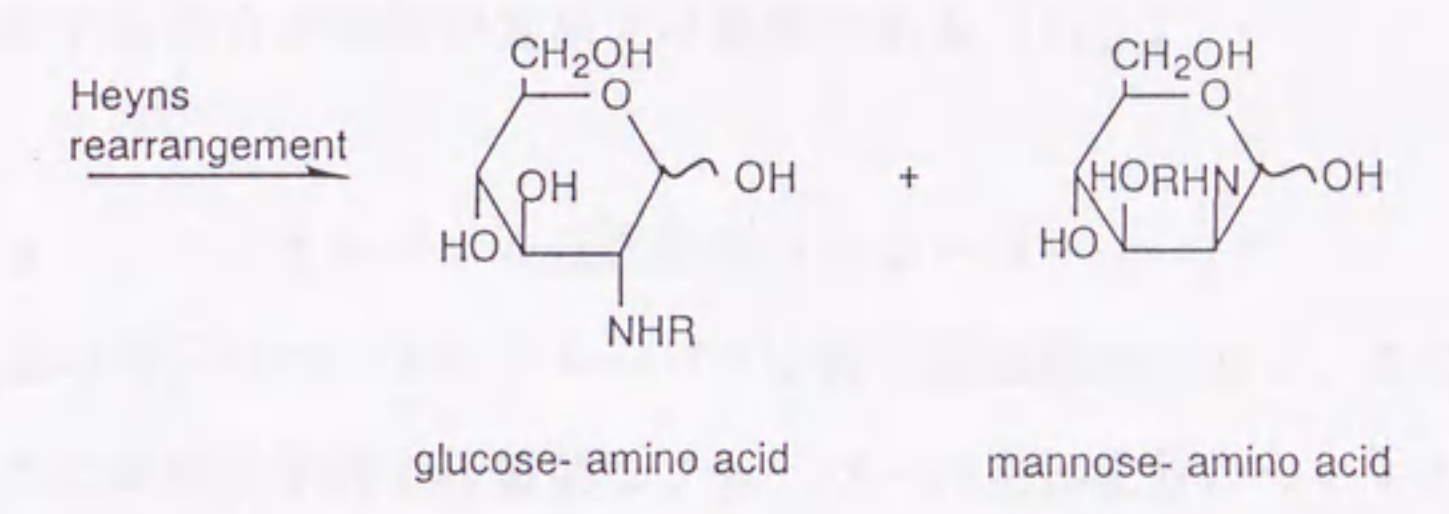
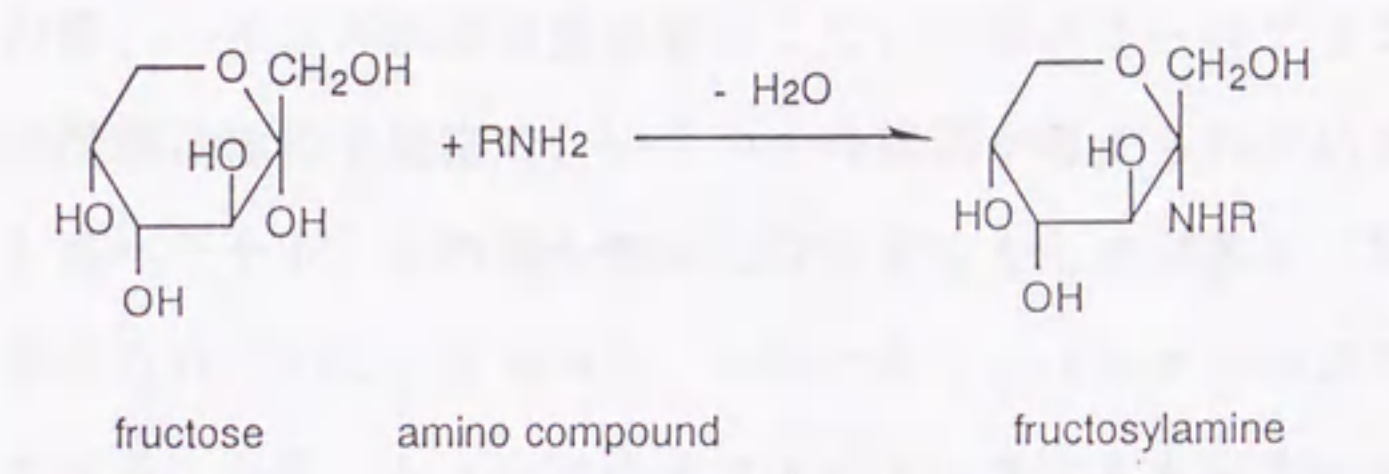


Fig. 1-5 Mechanism of the Heyns rearrangement (Heyns *et al.*, 1957)

ス、フルクトースの混合物を生じるのと同じ機構によるものである (Fig. 1-6)。

ハインズ転移の結果生ずるグルコースアミノ酸やマンノースアミノ酸は、グルコサミンと同様の性質を有しており、比較的安定な化合物である。例えば、還元力もグルコースに近く、フルクトースアミノ酸より弱い。2N酢酸中で 100 ~ 115℃に加熱すると、フルクトースとアミノ酸を生ずる。

この他、ハインズ転移の生成物として、フルクトースアミンが一部生じる。この生成機構は極めて複雑で、いくつかの経路が考えられている。

以上述べたケトースの結合体は比較的安定なものが多く、褐変の中間体ではないと考えられている。もちろん、一部に生じるフルクトースアミノ酸は褐変の中間体である。一方、ケトース自身はアルドースよりも不安定で褐変し易く、ケトースそのものが分解してカルボニル化合物を生じ、これがアミノ化合物と反応して褐変する場合が実際の食品では重要である [11]。

1-9 アミノカルボニル反応由来のフレーバー

食品の嗜好性の中でもフレーバーは特に認識感度が高く、主に低分子化合物であるため比較的単純で特徴的なフレーバーの主要成分についての化学的知見はかなり早くから明らかになっていた。そして、近年の機器分析の高度の発達によって超微量成分までもが明らかになってきた。しかし、食品の加工過程におけるフレーバーの形成や変化は非常に複雑で、なお化学的解明の及ばないことが多い [11]。

保蔵、加工、調理された食品におけるフレーバー生成機構は、酵素的褐変反応と非酵素的褐変反応、及びそれらの複合反応が主流と考えられる。そのうち非酵素的褐変反応の主要なものは、いわゆるメイラード反応 [5] と呼ばれるアミノカルボニル反応である。古来からの食品の加工貯蔵時の品質変化にこの反応が関与していることを示したのは 1908 年 A. R. Ling [12] で、麦芽を加熱して褐変化と特有のフレーバーの生成が認められたことを報告している。これはアミノ酸と糖の反応によることを L. C. Maillard が明らかにした [5]。我が国では 1920 年

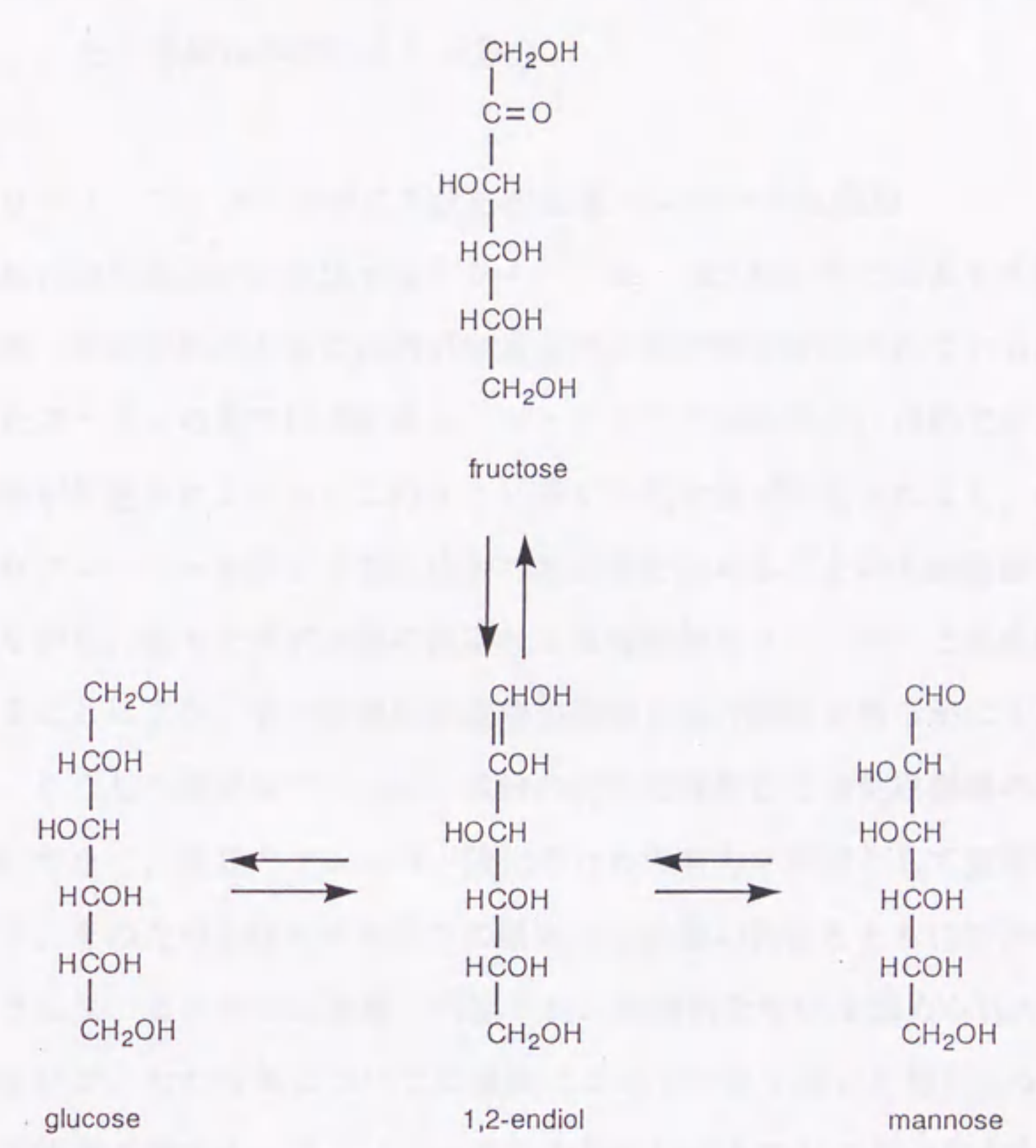


Fig. 1-6 Isomerization of fructose (並木ら, 1975)

代に、黒野、赤堀らが醤油フレーバーや日本酒のフレーバーの研究においてアミノカルボニル反応が関与していることを指摘した [13]。しかし、反応機構は反応原材料からの推定で報告されていて、中間物を確認していることは少ないので [11]、その詳細は不明のことが多い。

1-9-1 アミノカルボニル反応の主要フレーバー生成物

食品の加熱加工中に生成するフレーバーは、GC-MS などにより多数の化合物が単離・同定され、ときには数百に及ぶ化合物が明らかにされている。例えば焙煎したコーヒーの香では 700 以上、ピーナッツで 300 以上、焼肉では 500 以上の化合物が同定されている。このように多くの化合物が同定されると、いずれが特徴的なフレーバーを現す主要生成物であるかを定めることは大変困難である。しかしながら、色々なモデル系の反応による特徴的なフレーバーと生成物を比較検討することにより、その特徴的生成物の同定と成分構成を明らかにすることができる。こうした研究はフレーバー成分の化学的解析とその生成機構の推定に必要なだけでなく、食品のフレーバー強化のための有力な手段として実用的にも重要である。そのため各種モデル系での研究では多数の報告とともに特許も多い。

こうして、これまでに単離・同定され、特徴的な匂いを認められた化合物は非常に多いが、ただ香気については濃度によってかなり違った匂いとなることが多いので注意を要する。アミノカルボニル反応によるフレーバーの主なタイプと、その特徴的生成物の構造を、Hodge [14, 15] は Fig. 1-7、1-8 のように分類している。最近の膨大な知見においても、基本的にはこれに準じて考えられるので、Fig. 1-9 ~ 1-13 のようにアミノカルボニル反応によるフレーバー主要生成物を分類した [11]。

1-9-2 含酸素複素環化合物

フラノン、ピラノンで代表される環状エノロンにはカラメル臭の主要成分とされるものが多い (Fig. 1-8、1-9)。フラン誘導体も多数同定されている。フラン

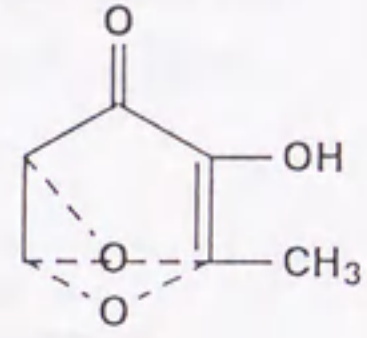
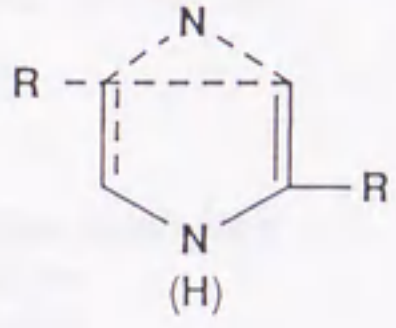
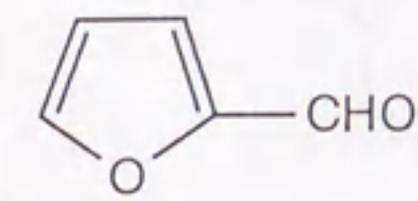
Aromas :	Caramel	Corny, Nutty, Bready
Structures:	Cyclic Enolones	N-Heterocyclics
		
Classes of Compounds:	Cyclopentenolones Cyclohexenolones "Furenolones" Pyrones	Pyrazines Pyrroles Pyrrolines Δ^2 -Piperidines

Fig. 1-7 Aroma and structure classification of browned flavor compounds (Part 1) (Hodge *et al*, 1972)

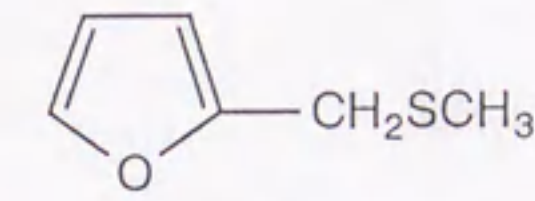
Aromas :	<u>Burnt</u> pungent, empyreumatic	<u>Variable</u> aldehydic, ketonic
Structures:	<u>Polycarbonyls</u> α, β -Unsat'd Aldehydes $-C:O-C;O-, =\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-CHO$	<u>Monocarbonyls</u> R-CHO, R-C:C-CH ₃
Examples of Compounds:	Glyoxal Pyruvaldehyde Diacetyl Mesoxalic dialdehyde Acrolein Crotonaldehyde	Strecker aldehydes isobutyric isovaleric methional 2-Furaldehydes 2-Pyrrole aldehydes C3-C6 methyl ketones

Fig. 1-8 Aroma and structure classification of browned flavor compounds (Part 2) (Hodge *et al*, 1972)

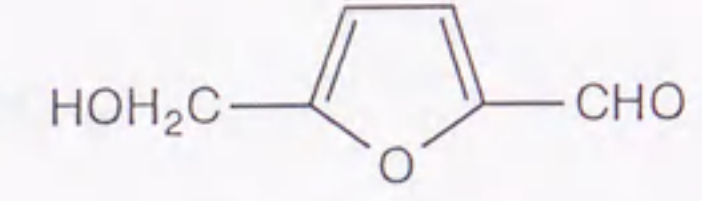
Furans



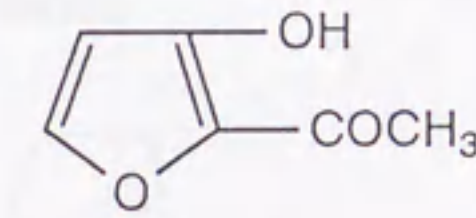
Pungent
Sweet



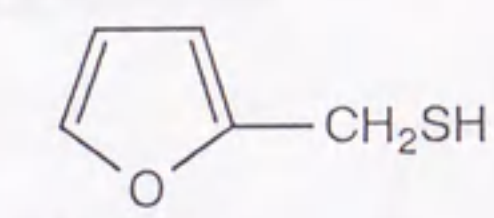
Coffee-like



None
Bitter

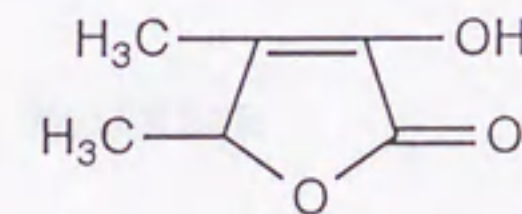


Pungent
Sour sweet



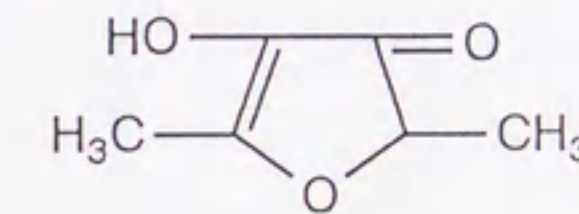
Coffee-like
Caramelic-coffee-like 0.04 ppb/w

Furanones



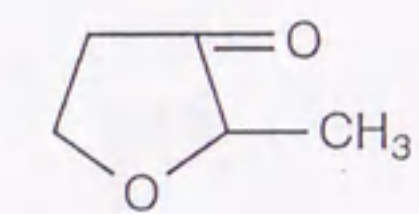
(Sotolon)

Caramel
Burnt 0.01 ppb/w



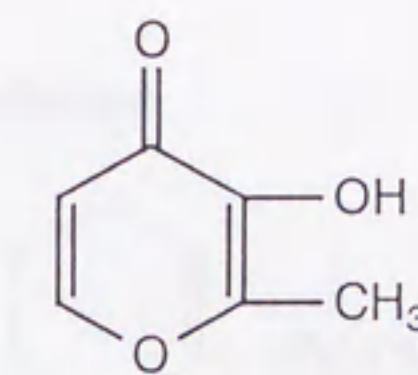
(Franeol)

Fragrant, Caramel
Burning Sweet 0.04 ppb/w



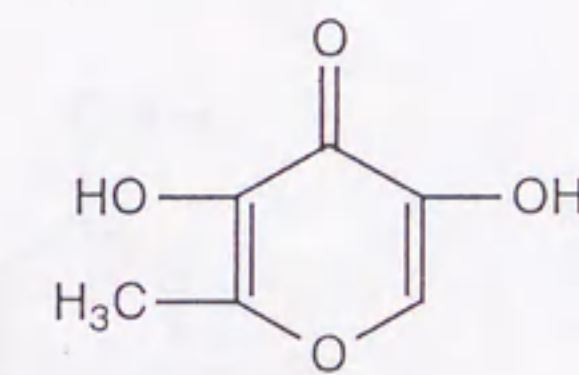
Sweet, Roasted

4H-Pyran-4-ones



(Maltol)

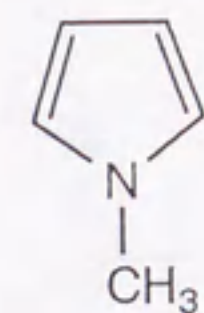
Warm fruity
Bitter, Sweetish



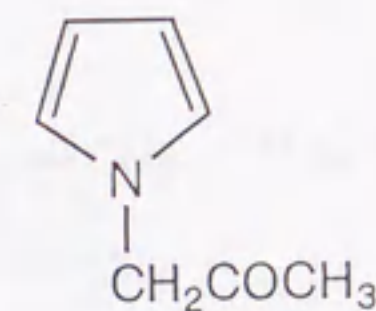
Oderless

Fig. 1-9 アミノカルボニル反応により生成するフレーバーの主要化合物
(並木、1988)

Pyrroles

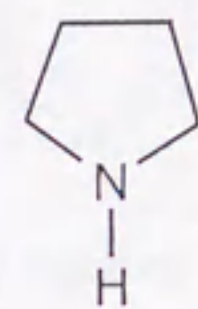


Smoky tarry

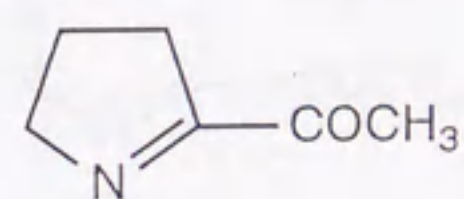


Bready

Pyrrolidines

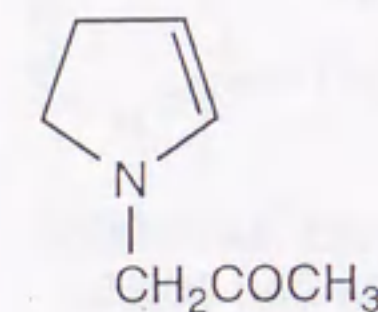


Bread-like



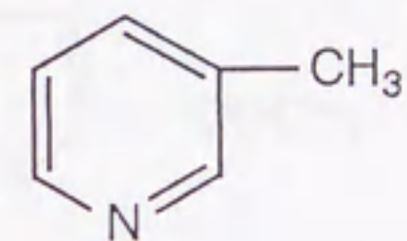
Rice

1-Pyrrolines

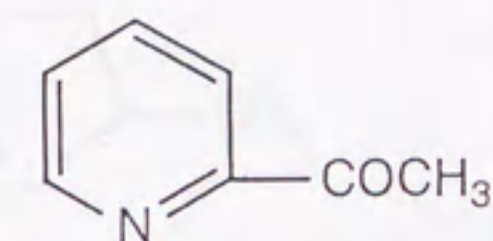


Bready

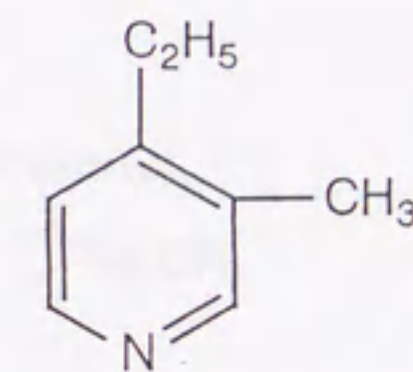
Pyridines



Green

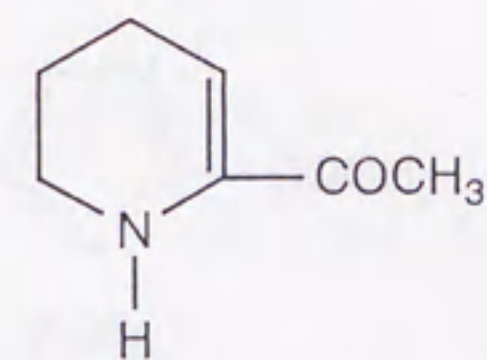


Popcorn, Bready

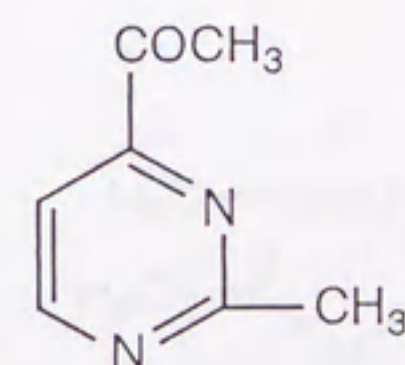


Sweet, Nutty

Pyperideines



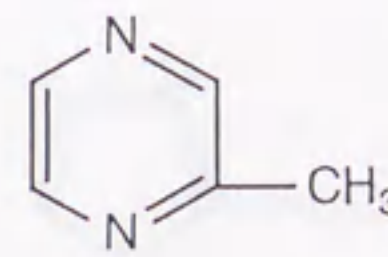
Cracker-like 1.6 ppb/w



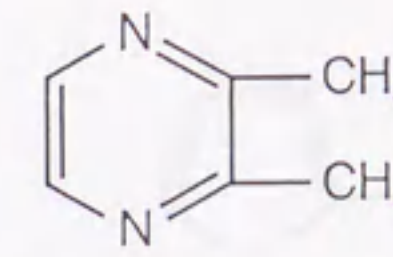
Grilled-note

Fig. 1-10 アミノカルボニル反応により生成するフレーバーの主要化合物 (並木、1988)

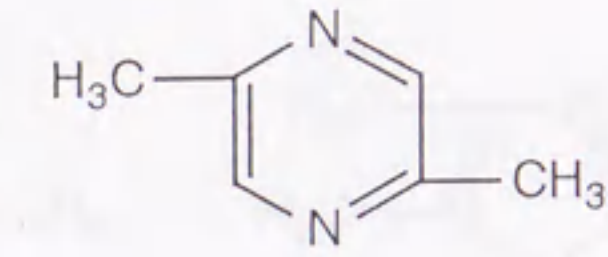
Pyrazines



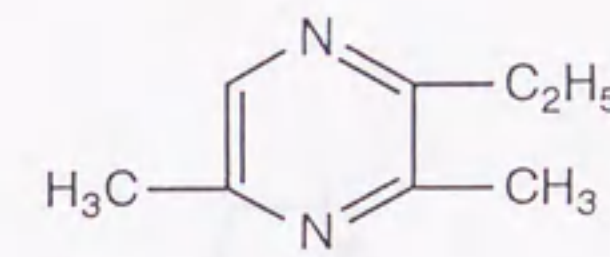
Nutty
Roasted peanuts



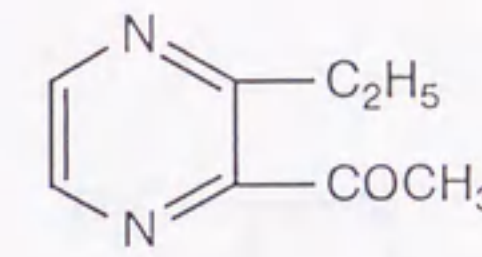
Nutty, Green



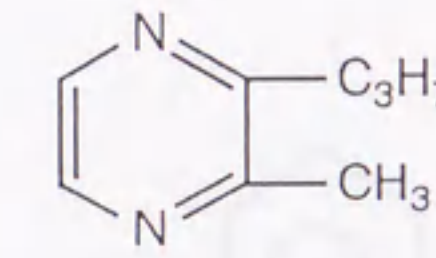
Grassy (1 ppb/w)
Chocolate, Potato chips



Nutty roasted (1 ppb/w)
Steak

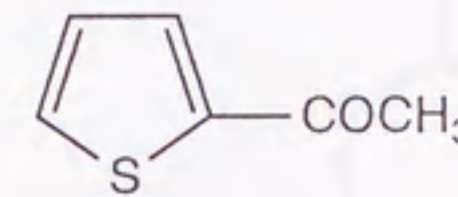


Vegetable
Potatos

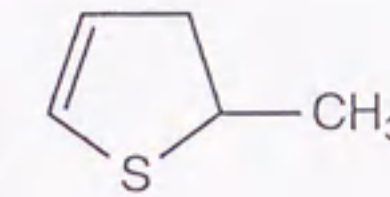


Potato-like, Earthy
(0.006 ppb/w)
Bell pepper

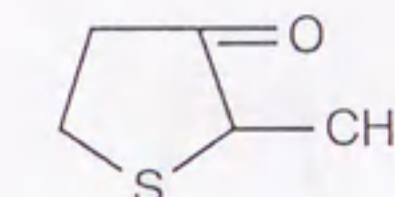
Thiophenes



Mustard-like,
Onion-like
(0.08 ppb/w)

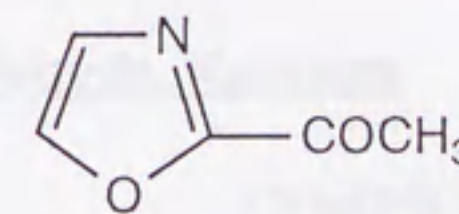


Heated onion

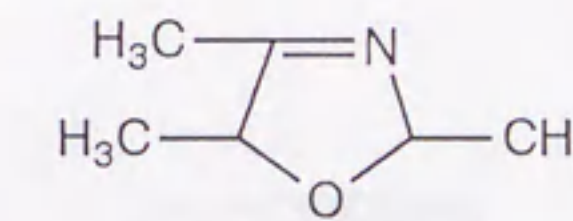


Green burnt

Oxazoles



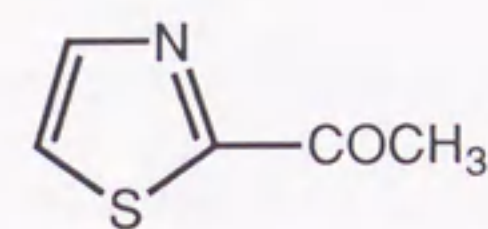
Nutty



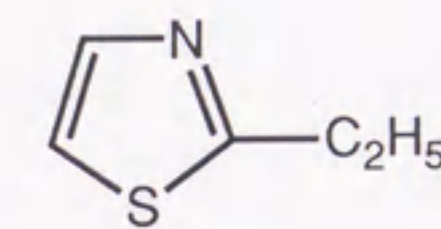
Nutty

Fig. 1-11 アミノカルボニル反応により生成するフレーバーの主要化合物
(並木、1988)

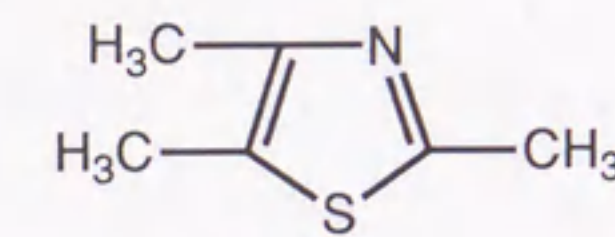
Thiazoles



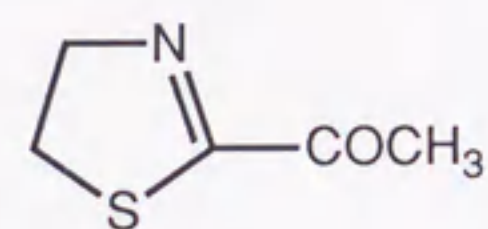
Cereal bready
Popcorn-like



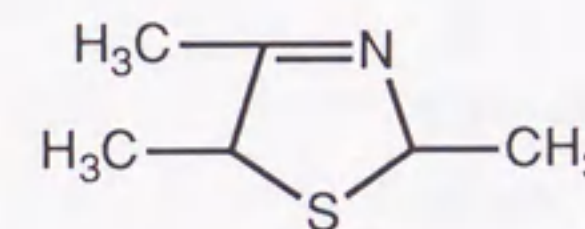
Green, Nutty



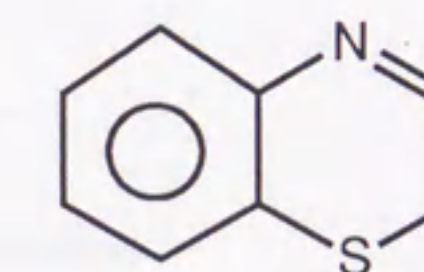
Cocoa, Nutty



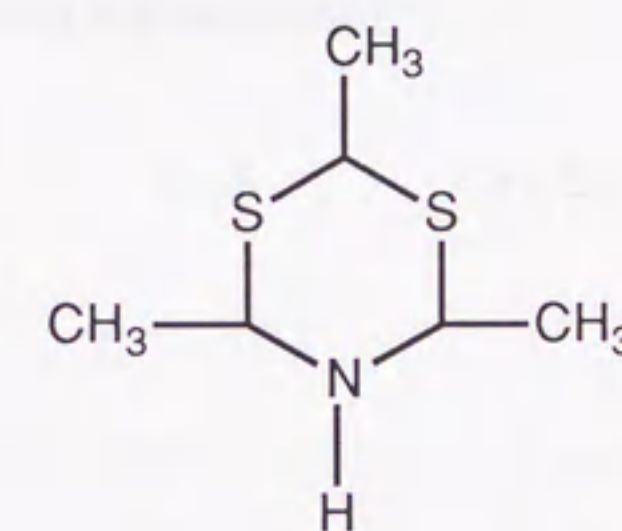
Cracker-like



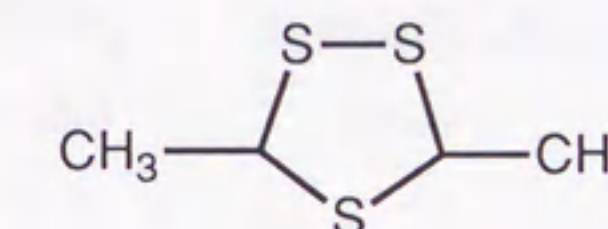
Nutty



Rubber like

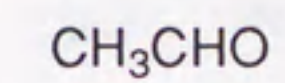


Roast-beef

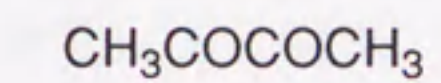


Boiled beef, Onion-like

Aldehyde, Ketones



Pungent



Pungent buttery

Fig. 1-12 アミノカルボニル反応により生成するフレーバーの主要化合物 (並木, 1988)



Faint labels and descriptions for the structures above.



Faint labels and descriptions for the structures above.

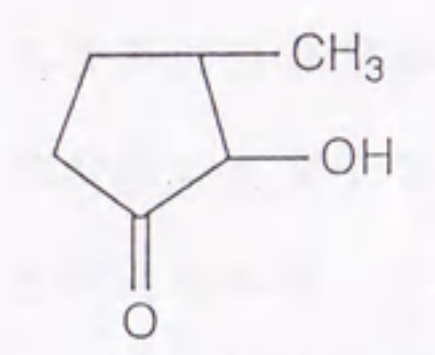
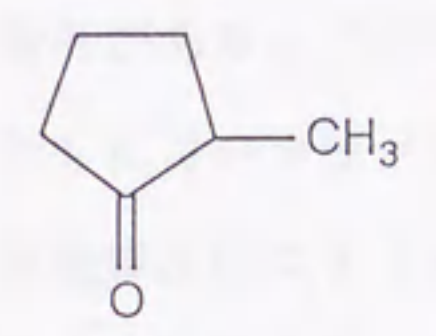


Faint labels and descriptions for the structures above.

Faint text at the bottom of the left page.

Faint text at the bottom of the left page.

Cyclopentanones



(cyclotene)
Fragrant, Caramel-like
Sweet

Sulfur compounds

H_2S	CH_3SH	CH_3SSCH_3	$C_3H_7SSC_3H_7$
		Onion-like	Onion

$(CH_2=CHCH_2S)_2$	$i-C_4H_9SH$
Garlic	Onion beef

Fig. 1-13 アミノカルボニル反応により生成するフレーバーの主要化合物 (並木、1988)

誘導体の代表的な物質であるフルフラールは、糖の強酸性条件での脱水環化によっても生成するが、糖とアミノ酸とのアミノカルボニル反応で1,2-エノール構造を経由し、さらに脱水を経て生成する。この反応は酸性でアマドリ化合物にプロトンが付加することによって起きる。フルフラールは刺激臭があるが、濃度が低ければやや甘いパン香がする。5-ヒドロキシメチルフルフラール (HMF) は焦げ臭をもち苦みがある。アセチルフランや5-フルフリルアルコールその他もやや焦げ臭とともに甘いカラメル臭がするものが多い。フラン類は糖からのアミノ化合物の塩基触媒反応により生成するものと考えられる。システアミンと糖を反応させるとフラン誘導体ができるが、グリオギザールやアセトアルデヒドとは生成しない。

フラノン、ピラノンにはマルトール、イソマルトールのように甘いカラメル臭の主体をなすと考えられるものが多い。これらの生成についてはアマドリ化合物から2,3-エノール化により1-デオキシオソンを経て生成すると推定されている。アマドリ化合物からのフラノン、ピラノンの生成機構については Ledl ら [16] の研究がある。

1-9-3 含窒素複素環化合物

多くの食品の焦げ臭や焙焼香の主成分は、アルキルピラジンをはじめとする多くの含窒素複素環化合物であり、代表的なアミノカルボニル反応生成物である。

ピロール類はベンツアルデヒド様の匂いがあり、コーヒーその他の多くの加熱食品のフレーバー成分として見いだされている [17, 18]。ピロール化合物は一般にデオキシオソンとアミノ化合物、またはフラン化合物とアミノ化合物の反応から生成するといわれている。N-アセチルピロールはグルコースとヒドロキシプロリンの反応で生成し、クッキー様、またはマッシュルーム様の匂いがするといわれる [19]。プロリン及びヒドロキシプロリンと糖のアミノカルボニル反応はパンの匂いを生成するモデル系として注目されている。Tressel らはその一連の研究において多数のピロール関連化合物を分離・同定している [20 ~ 26]。

1-10 アミノカルボニル反応由来の変異原及び抗変異原物質

アミノカルボニル反応由来の生成物を含有している食品を日常的に摂取している場合、健康への影響が問題になる。

食品の加熱加工調理中に Trp-P、Glu-P、IQ など種々の新規変異原物質の生成が見いだされ、発癌性も確かめられたことから、社会的にも大きな関心が払われた。しかし、これらは数百度の高温で処理されたもので、日常の食生活に即した条件ではなかった。

一般の食品の加工調理においては、種々の化学的、物理的变化が起こるが、特に主要なものは成分間の相互反応であり、その中でも最も広範に、しかも比較的温和な条件下で起こる代表的なものにアミノカルボニル反応がある。この反応由来の生成物の変異原性が検討されている [27]。その中で低分子の反応生成物、すなわちフルフラール、ジカルボニル、ピロールアルデヒドなどには弱いながら変異原性が認められ [28]、栄養価の低下も起こっていると報告されている。

一方、日常的に多用される食品である味噌、醤油、乾燥果実、コーヒー、紅茶、ウーロン茶、黒砂糖、糖蜜、パンなどにメラノイジンが多量に含有されている。そこで、アミノカルボニル反応由来のメラノイジンの活性酸素消去作用、抗酸化作用、抗菌作用、変異原性抑制作用、食物繊維様作用などが検討されはじめている [29～31]。

1-11 本論文の目的

1912年に Louis Maillard が糖とアミノ酸混合液を加熱し、著しく褐変することを報告して以来長期に渡り研究が進められてきたアミノカルボニル反応ではあるが [32～36]、日常的に認められる反応であること、特に食品の分野では香気生成、品質劣化など広範に関与する反応であることなどから、いまだ重要な反応であることに変わりがない。一方、近年特に活発に多方面で生体を意識したアミノカルボニル反応の研究も進められている [37～42]。

アミノカルボニル反応についての多くの研究は、食品系、生体系いずれにおいても、糖とアミノ酸またはタンパク質などの反応を主としたモデル系で研究が行われてきた [32 ~ 36]。さらに、従来反応の均一性、糖の溶解などの点から、溶液系で行われたものが多い [35、36]。また、アミノカルボニル反応におけるアミノ酸は種々のものが使用されているが、糖に関してはグルコースが用いられてきた。

フルクトースはスクロースの構成糖として、またフルクトースそのままの形で一般の食品中に含まれている。さらに、食品加工時に甘味を付加するものとして、砂糖や異性化糖、フルクトースなどが頻度高く使用されている。しかし、アルドースの場合と異なりケトースの反応は複雑であることから、フルクトースについての反応機構はいまだ明らかにされていない点が多い。Hodge [6] は、フルクトースのアミノカルボニル反応はアミノ基がフルクトースのカルボニル基と反応し、1,2-エンジオール構造、ハインズ転移を経由し反応が進むと報告している (Fig. 1-5)。しかしながら、著者のフルクトースを用いた反応系において、加熱反応生成物中に2,3-ジヒドロ-3,4-ジヒドロキシ-6-メチル-4(H)-ピラン-4-オン (DDMP) や、2,3-ジヒドロ-3,5-ジヒドロキシ-5-アセチルフラン (DDAF) などメチル基を有する化合物が同定された。特に、DDMP は今回の反応系における主たる生成物であった。フルクトースを出発の糖とした場合、ハインズ転移を経る系がアミノカルボニル反応の主要経路であるならば、生成物中にアルデヒド基をもつ物質が多く確認されるはずである。そのため、これらの反応経路には疑問が残る。

一方、食品の加熱による好ましい生成物として対象となるものが香気物質であることから、従来、アミノカルボニル反応生成物の分析方法としては、GC-MS が主流を占めていた。しかしながら、GC-MS 分析を用いた物質の確認では、フラグメントや保持時間を既知物質と比較検討することで物質の同定をすることになる。この方法による物質の構造決定は、ある部分で推定の域をでない。近年、優れた充填剤の開発などから HPLC を使い、反応生成物の単離・精製が簡単にできるようになり、精製度の高い物質が得られるようになった。こうして得られ

た物質は FAB-MS、EI-MS、NMR など数種の分析機器を用い分析され、より明解な、かつ詳細な構造解析が可能になった。本研究の中での構造決定は主にこの方法で行った。今回の実験の当初、Hodge [43] 以来クッキーの香気物質として広く知られているマルトールが全く確認できず、検出方法を色々検討した。しかし、HPLC、GC いずれの分析方法においても標品のマルトールは検出されるが、実際の加熱反応生成物中にマルトールは確認できなかった。そして、GC-MS により検出された物質のフラグメンテーションや Yaylayan [44] とのディスカッションの結果、マルトールは GC-MS 分析中の二次生成物であると推定した。

このようにアミノカルボニル反応、特にフルクトースを糖として用いた場合の反応経路にまだ未知の部分があり、さらに、初期に行われた分析機器の検出限界などから反応生成物が異なって同定されている可能性もある。そこで、著者は幅広く食品加工への応用を考え、低水分系、固相系の加工食品であるクッキーを実験対象にし、タンパク質やアミノ酸の種類、加熱時間、pH などの面から加熱中における反応生成物、特に品質に大きな影響を与えるフレーバーに寄与する物質について広く検討することを目的として研究を行った。また、実際の食品系及びモデル実験では、アミノカルボニル反応で糖として一般的に用いられているグルコースとともにフルクトースをはじめ数種類の五単糖、六単糖、二糖類、三糖類などを用い、それらの加熱生成物と生成経路を明らかにすることを目的として研究を行った。

第2章 焙焼クッキーの香気に関する加熱生成物

要約

クッキー焙焼中における加熱生成物の変化についてクッキー原材料の面から検討した。クッキードウは小麦粉、卵、バター、糖を用いて調製して150℃で10分間焙焼した。クッキーは焙焼後メタノール/水(3:1, v/v)で抽出し、抽出物をHPLCで分析した。一般的に、香気物質の抽出はエーテル、ジクロールメタンなどが用いられるが、この実験においてはメタノール/水系を用いた。実験に先だててエーテル、メタノール、メタノール/水などで反応生成物を抽出し、その抽出物をHPLCで分析して抽出溶媒の検討を行った。その結果、メタノール/水で抽出した場合が最も加熱反応生成物が多く、芳香も有していたため、メタノール/水系の抽出液中にもかなりの香気物質が存在することが示唆された。また、反応生成物の単離・精製及び同定することを考え、取扱易いメタノール/水系を用いることにした。

クッキーを焙焼すると加熱時間の増加に伴って波長281～295 nm付近の吸収が高くなり、この変化はクッキー原材料の一つである糖の影響を強く受けていた。最も変化の顕著であった波長283 nmを検出波長として、焙焼したクッキーからの加熱生成物についてHPLCで分析すると1～10のピークが得られた。特にピーク3(P3)、5(P5)、6(P6)が顕著であった。これらのピークの同定については第3章、及び第7章で述べるが、P3は2,3-ジヒドロ-3,4-ジヒドロキシ-5-アセチルフラン(DDAF)、P5は2,3-ジヒドロ-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-4(H)-ピラン-4-オン(DDMP)、P6は5-ヒドロキシメチルフルフラール(HMF)であった。

DDMPはクッキーの加熱初期段階に生成され、20分後までは一定増加するが、その後増加が緩慢になった。HMFは最初の生成量は少ないが、30分を過ぎると急激に増加した。HMFは糖単独の加熱によっても生成した。また、DDMPは糖に卵白を添加した時に増加することが認められた。

2-1 序

食品を加熱する場合食品成分間に複雑な化学反応が生じ、色や香など食品の品質に種々の影響を与える。その代表的なものがアミノカルボニル反応で、1912年に L. Maillard [5] が糖とアミノ酸混合液を加熱し、著しく褐変することを報告して以来各方面で研究が進められている [6, 45]。しかし、一般的にこれらの研究は糖とアミノ酸またはタンパク質などの反応を主としたモデル系 [32 ~ 34] で、また溶液系 [35, 36] で行われたものが多い。ここでは幅広く食品加工への応用を考え、低水分系、固相系の加工食品であるクッキーを実験対象とし、加熱中の変化をクッキーに添加される各種の原材料の面から検討し、クッキーの品質に関与する加熱生成物について検討した。

具体的にはクッキーに添加される糖類、デンプン、卵、バター、膨化剤などのクッキー素材を用い、それらがクッキーフレーバーに与える影響について検討した。

2-2 クッキー焙焼中における色の変化

薄力粉、糖、バター、卵を用いたクッキー生地 of 焙焼中の変化を Fig. 2-1 に示した。その結果、フルクトース及びグルコース添加の何れのクッキーにおいても焙焼時間の増加にともなって UV 吸収が高くなり、281 ~ 295 nm に最大吸収波長を認めた。

そこで、281 ~ 295 nm での最大吸収波長の増大に及ぼすクッキー原材料の影響を調べるために、特に変化の顕著であった波長 283 nm を検出波長とし、各原材料を 150 °C、10 分間加熱後抽出した溶液と、未加熱の原材料から抽出した溶液の吸収を測定した。その結果、Table 2-1 に示すようにフルクトース、スクロースなど糖による変化が最も大であることを認めた。特にフルクトースを加熱した場合の吸収が著しく増大した。

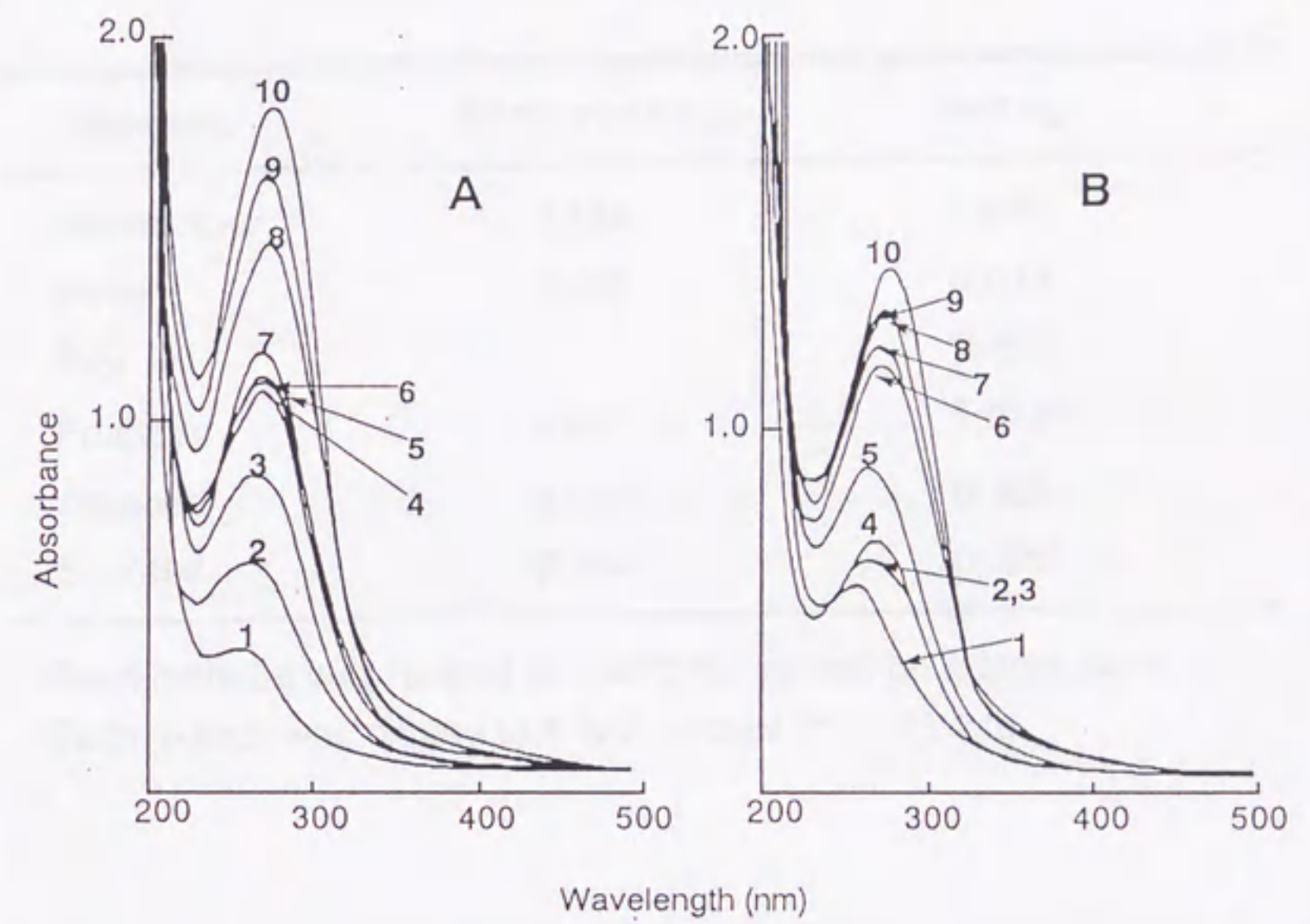


Fig. 2-1 UV absorption spectra for cookies baked at 150°C. The heating times given for each curve are in minutes. Sugar constituent in cookies was A: fructose and B: glucose.



Table 2-1 Absorption (283 nm) of the extracts from materials of cookie dough during heating.

Materials	Without heating	Heating
Wheat flour	0.568	0.535
Butter	0.498	0.042
Egg	-	0.495
Fructose	0.017	1.015*
Glucose	0.004	0.038
Sucrose	0.004	0.325

Each material was heated at 150°C for 10 min on a block bath. Each extract was diluted to 5 fold, except "*" to 25 fold.

2-3 焙焼クッキー中の加熱生成物

糖としてフルクトースを用いて調製したクッキーの焙焼中の加熱生成物を検討するために、焙焼クッキーからの抽出液を HPLC (検出波長は先の実験と同様に波長 283 nm) で分析したところ、Fig. 2-2 に示すように 1~10 のピークが得られ、その中で特に P3、P5、P6 が顕著であった。

糖の加熱生成物の中で 283 nm 付近に吸収をもつ物質として HMF が存在すると考えられるため、HMF の標品を同条件で分析した。その結果、Fig. 2-2 に示すように HMF は P6 の保持時間と一致したため、P6 を HMF と推定した。

2-4 加熱生成物の変化

クッキー焙焼中に生成される P5、P6 の加熱条件による生成量の変化を検討するためにクッキー焙焼条件を加熱時間、加熱温度の面から検討した。そして、Fig. 2-3 に示す結果を得た。

A に示すようにクッキーを 1~120 分間加熱すると、加熱初期段階では P5 の生成量が多く、20 分以上加熱すると P6 の生成量が急激に増加することが認められた。

また、B に示すように、加熱温度を通常のクッキーの焙焼温度である 150 °C より 50~100 °C 上昇させると、急激に P6 の生成量が増加する傾向があった。P5 も生成量が増加したが P6 のように顕著ではなかった。

グルコースとフルクトースを比較すると、いずれもフルクトースの方が加熱生成物の生成量が多かった。

2-5 クッキー原材料の加熱による P5、P6 の生成

P5、P6 の生成に寄与するクッキー原材料について検討するために、それぞれのクッキー原材料を加熱し、P5、P6 の生成量を測定した。その結果、フルクトースが単独で加熱された時 P6 の顕著な生成が認められた (Fig. 2-4)。しかし、P5 はいずれのクッキー原材料も単独で加熱した場合には検出できなかった。

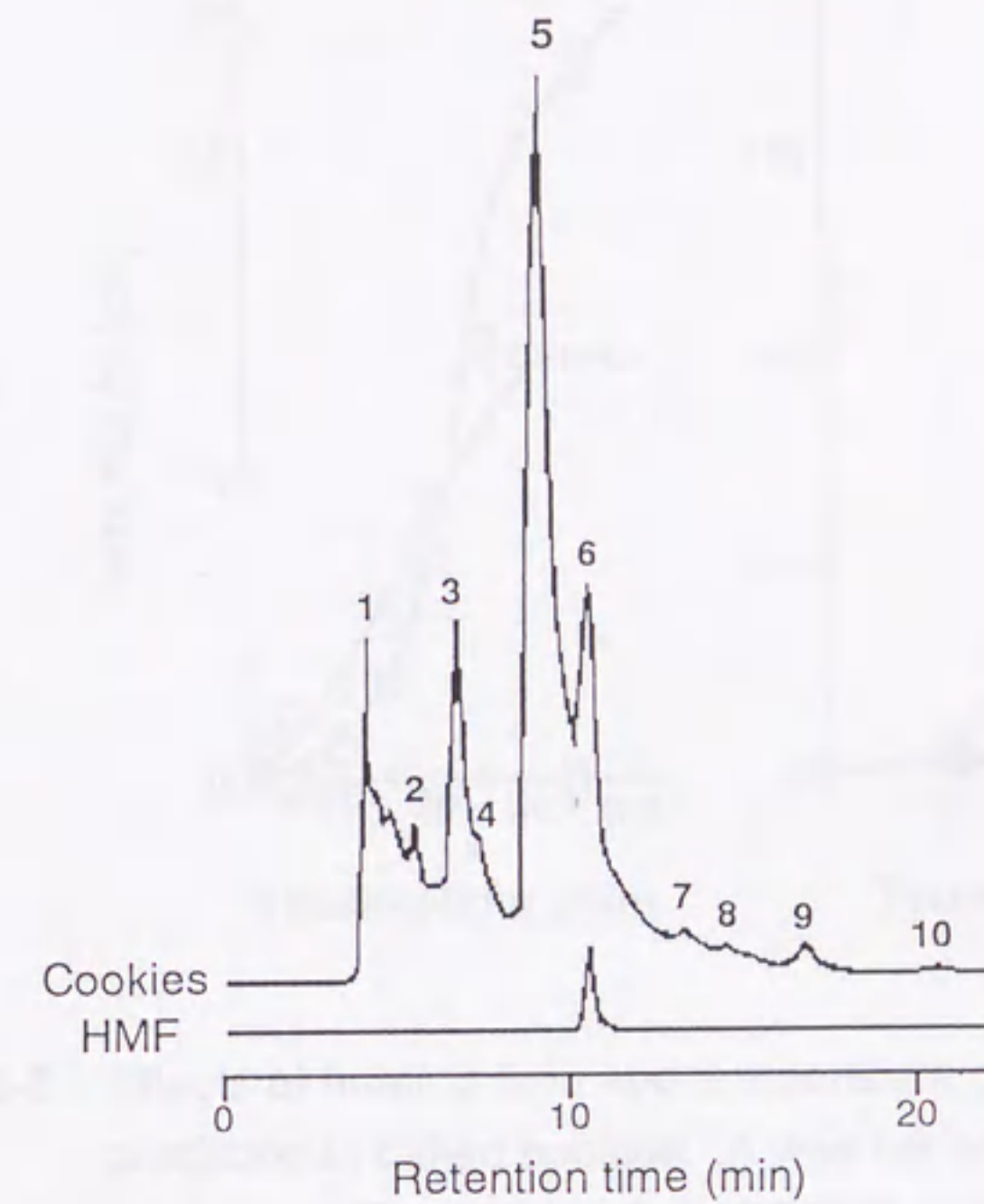


Fig. 2-2 High performance liquid chromatogram of the products from baked cookies added fructose at 150°C for 10 min. Chromatographic conditions: column; DEVELOSIL ODS-5 (4.6 mm i.d. x 250 mm), mobile phase; H₂O-MeOH (6 : 1 v/v) flow rate; 0.8 ml/min, UV detection; 283 nm, chart speed; 5 mm/min.

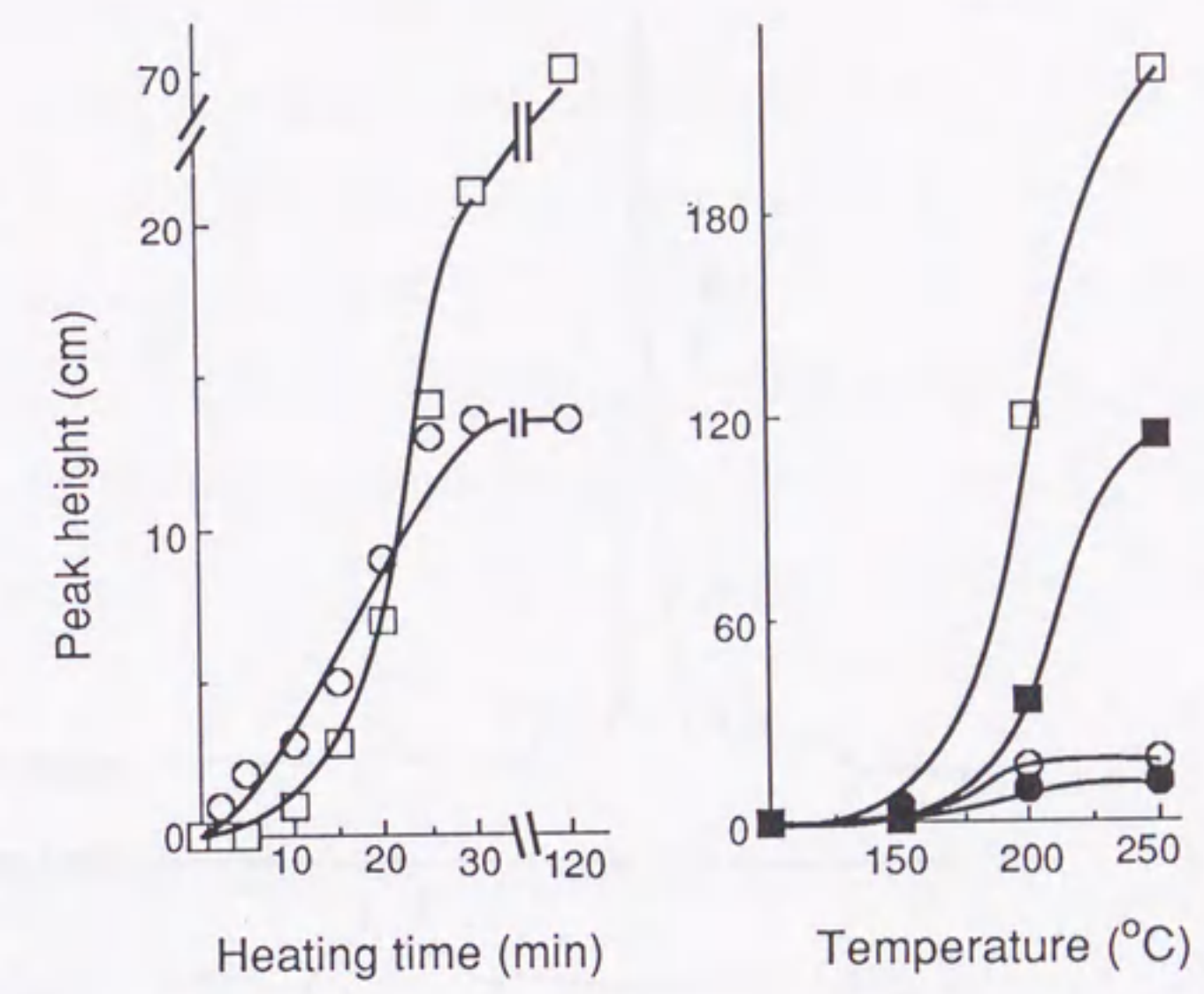
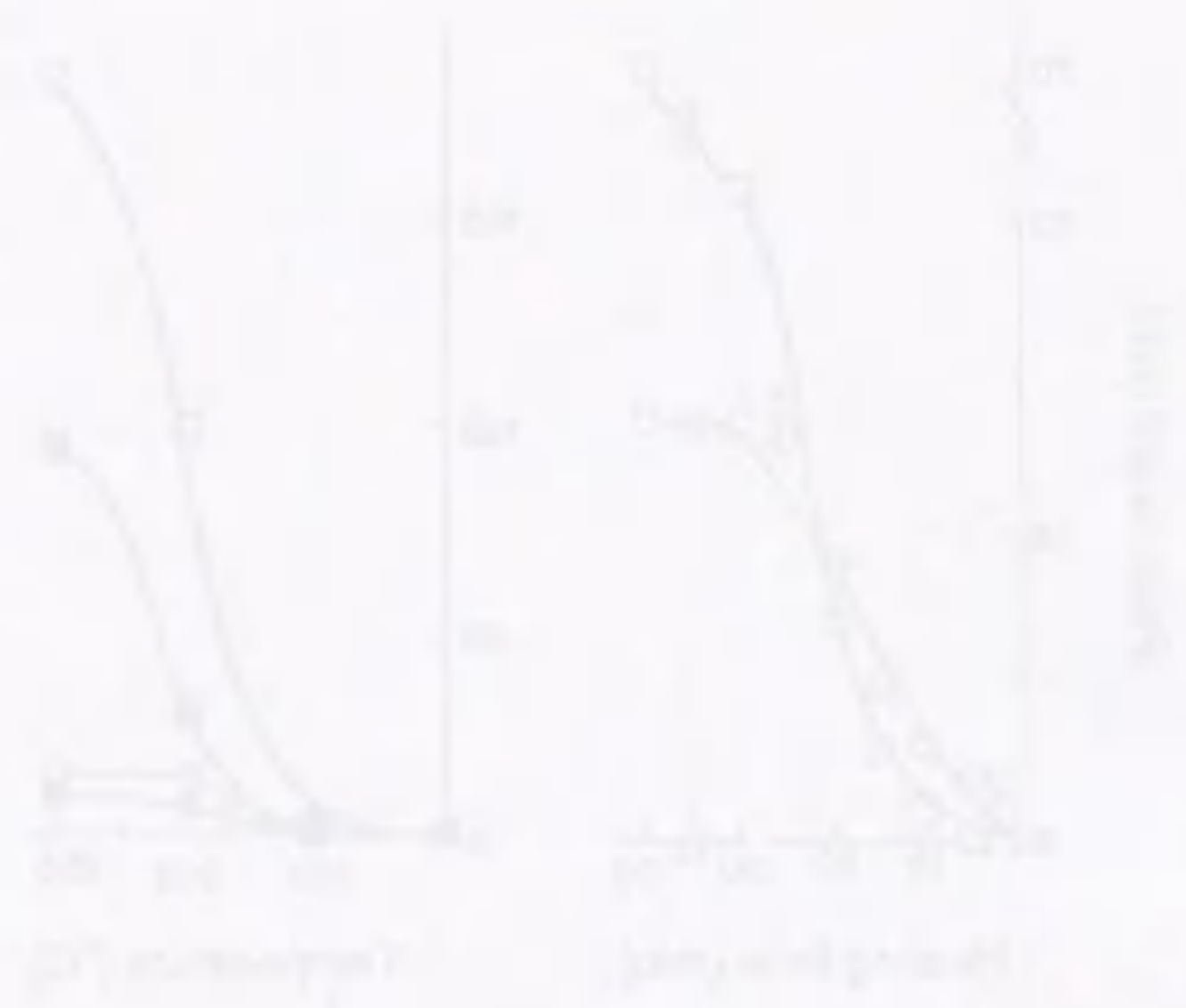


Fig. 2-3 Effects of heating time and temperature on peak 5 and 6 produced in baked cookies. A was baked at 150°C for 1-120 min. B was baked at 150, 200 and 250°C for 10 min. HPLC conditions are the same as the previous footnote.

○: peak 5 of fructose, ●: peak 5 of glucose
 □: peak 6 of fructose, ■: peak 6 of glucose



Faint, illegible text located below the bleed-through chromatograms on the left page.

Faint, illegible text located at the top of the right page, likely bleed-through from the reverse side.

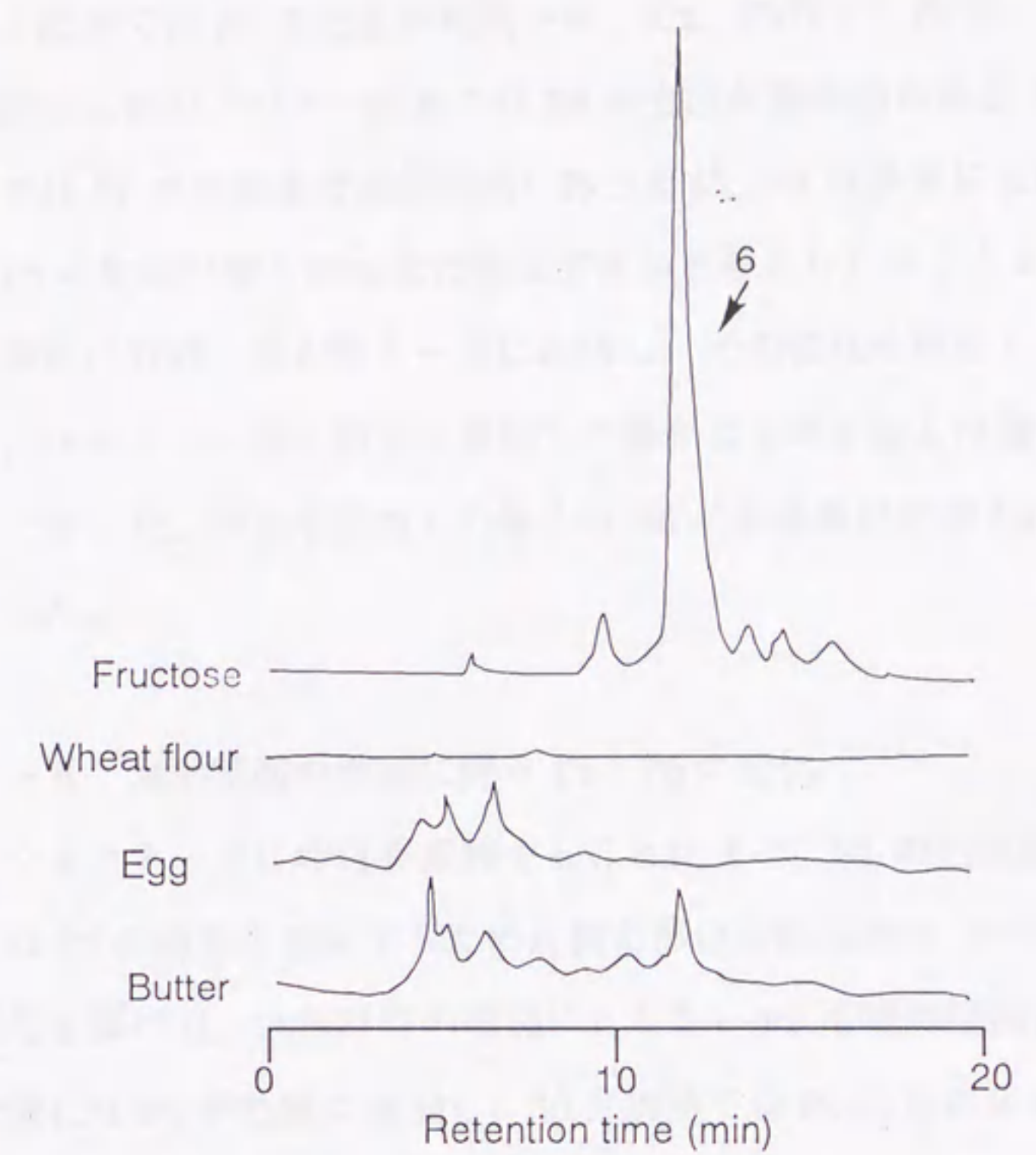


Fig.2-4 High performance liquid chromatogram of the products from baked cookies' materials baked at 150°C for 10 min. Chromatographic conditions: column; DEVELOSIL ODS-5 (4.6 mm i.d. x 250 mm), mobile phase; H₂O:MeOH (6 : 1 v/v), detection; 283 nm, chart speed; 5 mm/min.

次に、原材料を併用した時の P5、P6 の生成を検討するために、糖に炭酸水素ナトリウム、バター、卵のそれぞれをクッキー調製における配合割合に準じて添加し、それぞれの混合物を150℃、10分間加熱した (Fig. 2-5)。炭酸水素ナトリウム添加では P6 の生成が抑制され、C2、C3などと推定される低分子物質の生成が認められた。バター添加では P6 の生成が糖単独の場合より促進された。卵添加では P6 の生成量は抑制傾向にあったが、P5 は多量に生成された。

P5 の生成が糖と卵由来の物質であると考えられることから、さらに卵を卵白と卵黄に分け、フルクトースに添加し、その変化を検討した (Fig. 2-6)。その結果、フルクトースに卵黄を添加した場合は全卵を加えた場合より P6 の生成量が多くなった。卵白を添加した場合は P6 の生成量は抑制され、P5 の生成量が多くなった。

2-6 加熱時間の増加に伴う P5、P6 の変化

フルクトースに卵白を添加することにより、P5 の生成量が増加することから、この P5 の消長を検討するために糖と卵白の混合物を10~30分間加熱し、その変化を調べた。加熱時間の増加にともない P5 も増加傾向にあったが、加熱20分後には P6 が急激に増加し、30分加熱では P6 の方が高くなった (Fig. 2-7)。

これらの香に関しては、P5 はクッキーとして好ましい香であり、P6 はあまり好ましくない香であった。

2-7 考察

Berryら [46] は、乾燥した粉末オレンジの貯蔵中における褐変と香の劣化の主成分として HMF を同定し、Shawら [47] は HMF の前駆物質がフルクトースであると考え、モデル実験として酸性の糖溶液を加熱し、その加熱生成物について生成機構を検討した。van Dam [48] はさらに HMF は脱水され、レブリン酸やギ酸となり、これが一緒に存在していると報告している。また、醤油のような加工食品に色や香の付与のため、糖の加熱により得られるカラメルが利用され

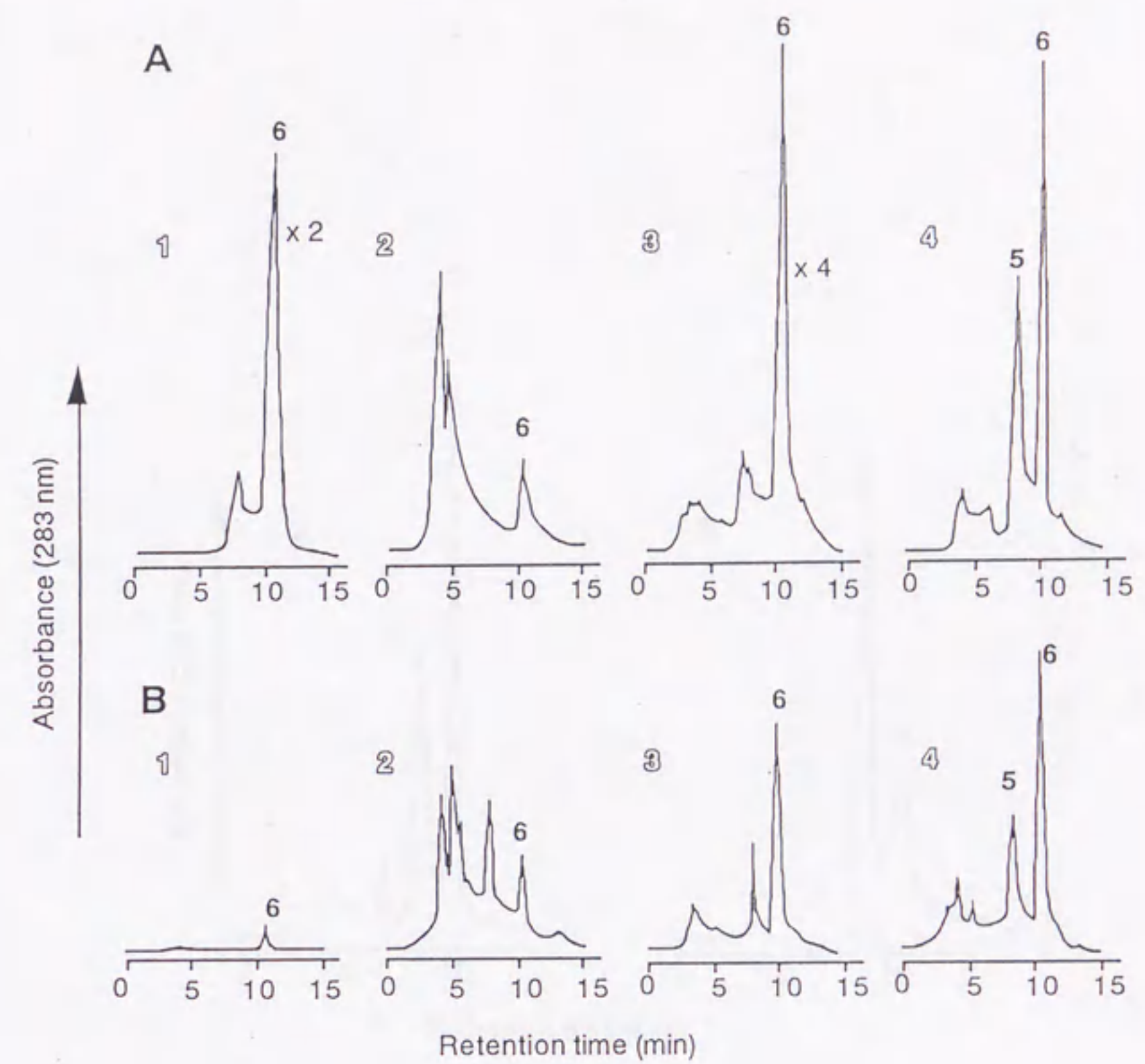


Fig. 2-5 High performance liquid chromatogram of the products from sugar baked with various cookies' materials at 150°C for 10 min. Chromatographic conditions: column; DEVELOSil ODS-5 (250 mm x 4.6 mm i.d.), mobile phase; H₂O-MeOH (6 : 1 v/v) 0.8 ml/min, UV detection; 283 nm, chart speed; 5 mm/min. A: fructose, B: glucose. 1: sugar only, 2: sugar and NaHCO₃, 3: sugar and butter, 4: sugar and egg.

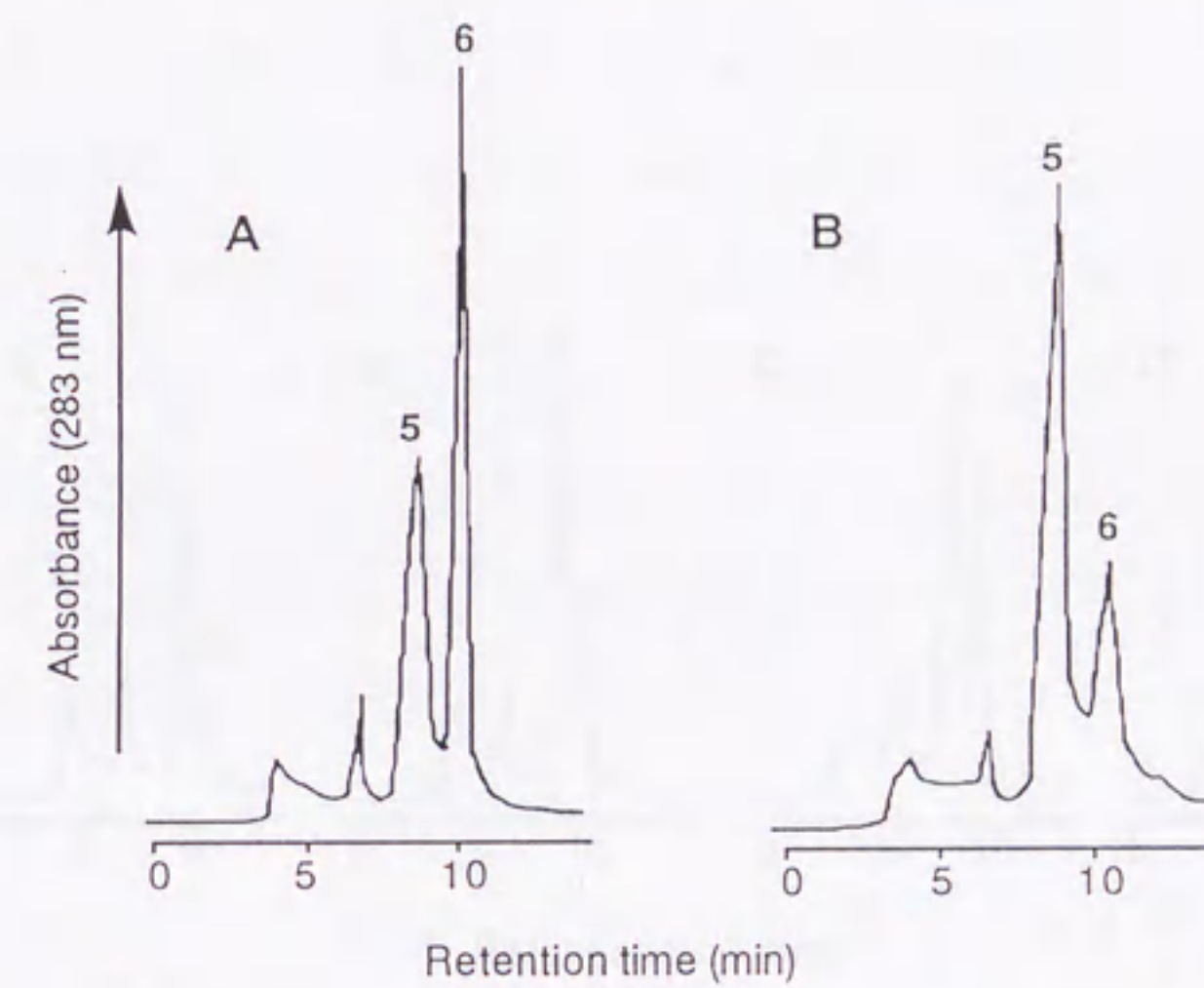


Fig. 2-6 High performance liquid chromatogram of the products from fructose and egg baked at 150°C for 10 min. Chromatographic conditions: column; DEVELOSIL ODS-5 (4.6 mm i.d. x 250 mm), mobile phase; H₂O-MeOH (6 : 1 v/v), flow rate; 0.8 ml/min, UV detection; 283 nm, chart speed; 5 mm/min. A: fructose and egg yolk, B: fructose and egg white.

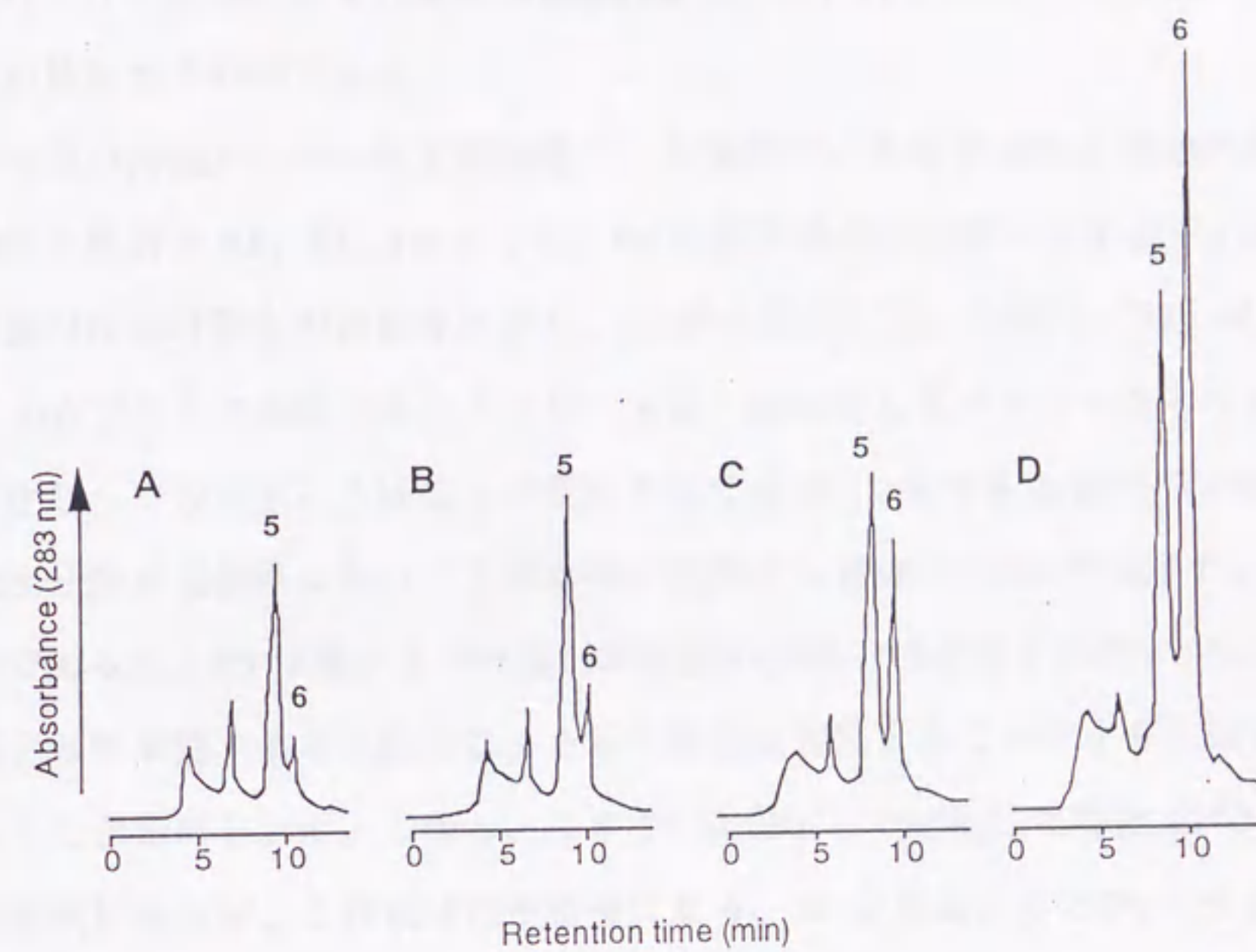


Fig. 2-7 High performance liquid chromatogram of the products from fructose and egg white baked at 150°C for various times. Chromatographic conditions: column; DEVELOSIL ODS-5 (4.6 mm i.d. x 250 mm), mobile phase; H₂O-MeOH (6 : 1 v/v), flow rate; 0.8 ml/min, UV detection; 283 nm, chart speed; 5 mm/min. Heating time, A:10 min, B:15 min, C: 20 min, D: 30 min.

ているが、これらの香気成分については石津の報告がある [49]。森田ら [50] はみりんの加熱生成物中に HMF を同定している。しかし、これらはいずれも溶液系での反応である。

クッキーなどの焙焼による加熱生成物は、低水分の状態が生ずるものであるが、このような低水分系での研究は Hayashi ら [51] のグルコース/グリシン系での報告が見られるのみである。

今回の焙焼クッキーを実験対象とした実験で、著者が HPLC の分析結果から認めた顕著な P3、P5、P6 のうち、P6 は糖単独の加熱時にも生成される物質で、標品の保持時間との比較などから、HMF と推定した。山崎ら [52] は砂糖溶液を 160 °C 以上に加熱するとスクロースは一部転化してグルコースとフルクトースを生じ、フルクトースはさらに脱水されて HMF を生ずると述べているが、この低水分系の実験系においても糖単独の加熱から HMF が主に生成され、同様の結果であった。P5 は各クッキー原材料単独の加熱では生成されないが、糖と卵を混合して加熱すると生成され、さらに卵白と加熱することにより生成量が増大することが認められた。しかし、この P5 は 150 °C で加熱した場合 20 分までは増加傾向にあるが、その後増加が緩慢になり、30 分を過ぎると P6 の生成量の方が多くなった。

第3章 フレーバー成分の同定

要約

小麦粉、卵、バター、糖、炭酸水素ナトリウムなどを用いたクッキーの香気成分について研究を行った。クッキーからのメタノール/水抽出物を HPLC で分析し、10ヶのピークを確認した。それらの中で2つのメインピークを単離・精製し、構造決定を行った。その結果、これらのピークは DDMP と HMF であることが明らかになった。DDMP はクッキーのフレーバーとして重要な物質である。

タンパク質と糖との反応の結果、クッキー様香気をもつ DDMP はオボアルブミンとフルクトースの反応から最も顕著に生成された。アミノ酸とフルクトースをクッキー調製時の配合割合で混合して加熱反応させると、ヒスチジン、アルギニンの塩基性アミノ酸において顕著な DDMP 生成が認められた。その他、アラニンやプロリンとの反応においても DDMP が多く生成された。この物質の生成はタンパク質やアミノ酸の添加によって影響されること、特にタンパク質の中ではオボアルブミン、アミノ酸の中ではプロリンとアルギニン、ヒスチジンが DDMP 生成を促進した。

3-1 序

クッキー中の DDMP 生成は糖の種類によって異なり、ヘキソースとアミノ酸の反応、特にフルクトース、グルコースとの反応において顕著に生成されることが明らかになった。そこで、糖としては最も大量に DDMP を生成するフルクトースとグルコースを用い、各種のクッキー素材との反応を検討した。さらに、DDMP 生成に関与すると考えられるタンパク質やアミノ酸について、それらの種類が DDMP 生成に及ぼす影響も検討した。

3-2 焙焼クッキーの香気に関する生成物

一般的に、食品の香気物質やフレーバーに関与する物質は非極性溶媒で抽出さ

れ、GCやGC-MSで分析される。しかし、今回はこれらの生成物をメタノール/水系で抽出し、HPLCで分析した(Fig. 3-1)。この系は焙焼した食品の香気中、HMFなどの極性物質も抽出し易いと言われている(JeuringとKuppers [53])。

第2章でも述べたように、加熱反応生成物の抽出液をHPLCにより分析し、10ヶのピークを確認した(Fig. 3-1)。P3、P5、P6が顕著なピークとして検出され、特にP5はクッキー焙焼中における主たる生成物であった。P5とP6は、HPLC(ODS-5/30、ODS-10)で単離・精製した。P5は甘い香を持っていたが、P6はあまり好ましくない匂いであった。P5とP6は色のない、粘濁な物質で、室温に放置しておくで褐変した。

3-3 P5及びP6の同定

同定したP5とP6のメタノール中の極大吸収波長はそれぞれ295 nmと283 nmであった。FAB-MSによる分析によって、それらの物質は144(Fig. 3-2、3)と126(Fig. 3-8)の分子量を持つことを確認した。また、P6は標品のHMFのMSスペクトル、及びHPLC分析結果との比較によってHMFと同定した。P5はCDCl₃を用いた¹³C-NMRのデータ(Fig. 3-4)から、6個の炭素を持っていることを確認した(15.6、67.5、71.4、130.1、165.0、188.2 ppm)。また、アセチル化したP5のEI-MSのデータ(Fig. 3-7)から、2個の水酸基が含まれることが分かった(M/z 228 [M⁺]、186、144)。同じく、アセチル化したP5の¹H-NMRは1個のメチル基(1.99、3H、s)、2個のアセチル基(2.11、3H、s; 2.20、3H、s)、1個の非等価のメチレン基(4.39、1H、q; 4.53、1H、q)、1個のメチン基(5.41、1H、q)の存在を示していた。また、IRの測定から(Fig. 3-6)、2個のアセチルカルボニル基(Max 1760 cm⁻¹)と、 α 、 β -不飽和カルボニル基(1700、1628 cm⁻¹)の存在が明らかになった。これらのスペクトルのデータをMillsら [54]、Njorogeら [55]、Fisherら [56]によるデータとの比較によって、P5をDDMPと同定した。Millsら [54]はこのDDMPが加熱による脱水でマルトールに転換されると報告している。しかし、この変化は、150℃の加熱においては確認する

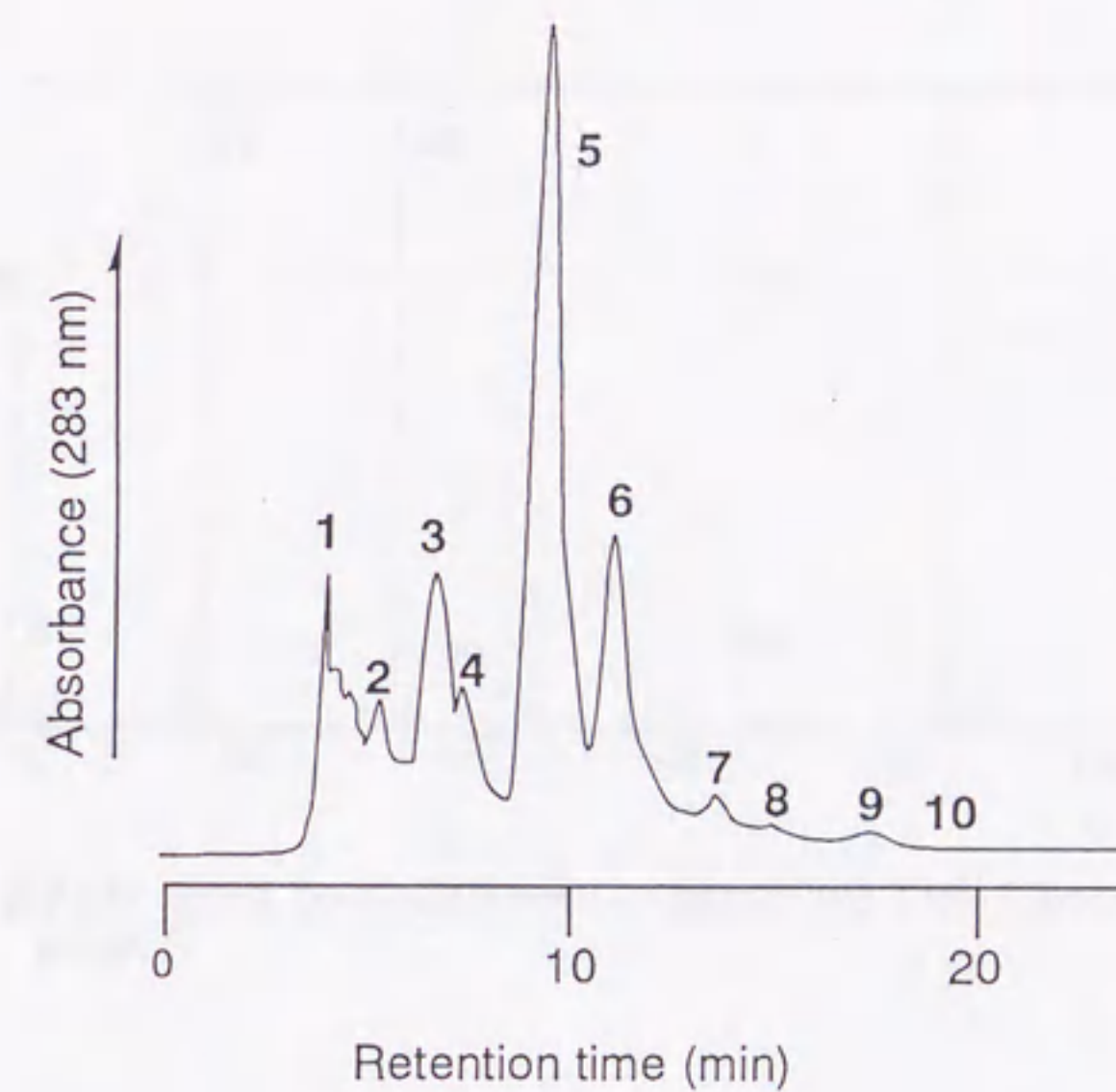


Fig. 3-1 High performance liquid chromatogram of products from cookies baked with fructose at 150 °C for 10 min. Chromatographic conditions: column; DEVELOSIL ODS-5 (4.6 mm i.d. x 250 mm), mobile phase; H₂O-MeOH (6 : 1 v/v), flow rate; 0.8 ml/min, UV detection; 283 nm, chart speed; 5 mm/min. (3); 2,3-dihydro-3,4-dihydroxy-5-acetylfuran, (5); 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one, (6); 5-hydroxymethylfurfural, (10); maltol.

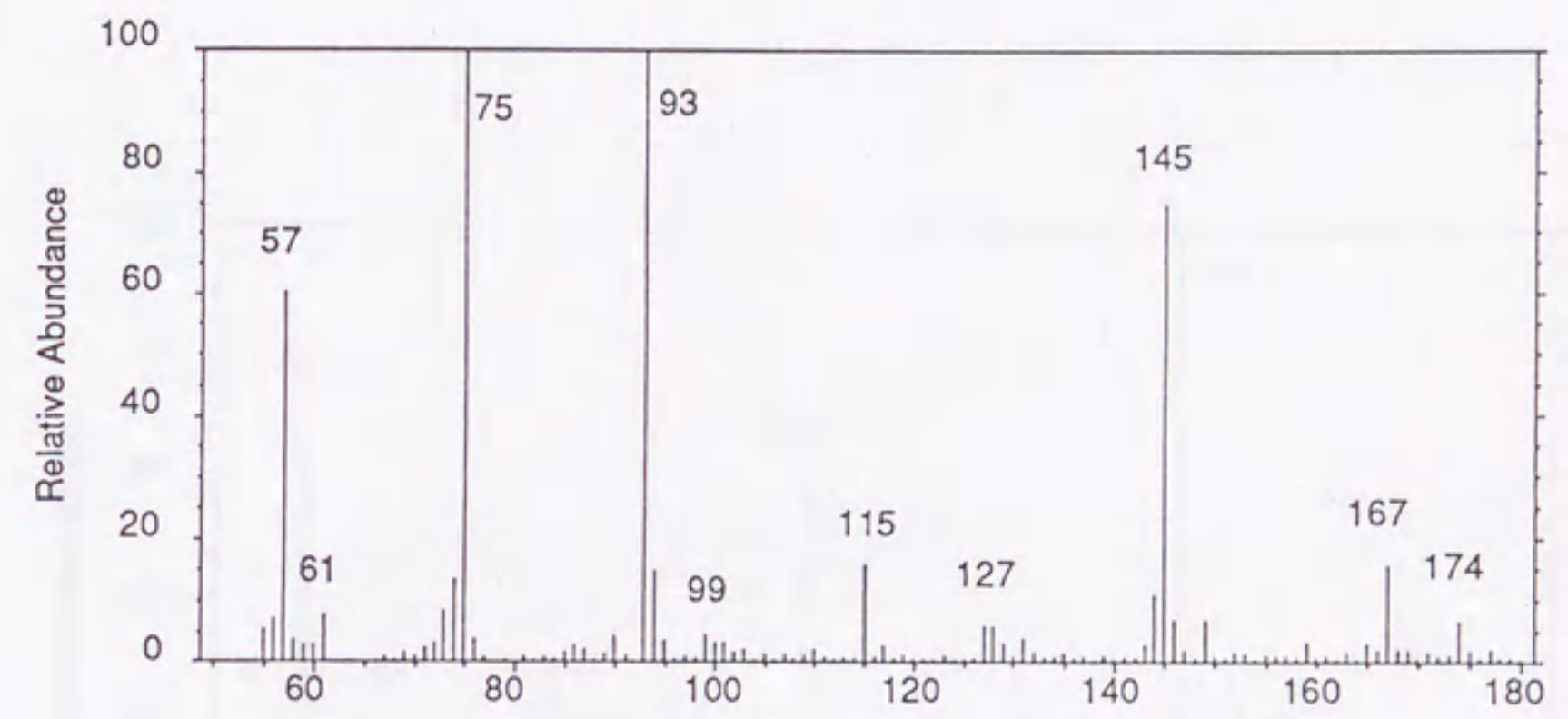


Fig. 3-2 Fast atom bombardment-mass (FAB-MS) spectrum of peak 5

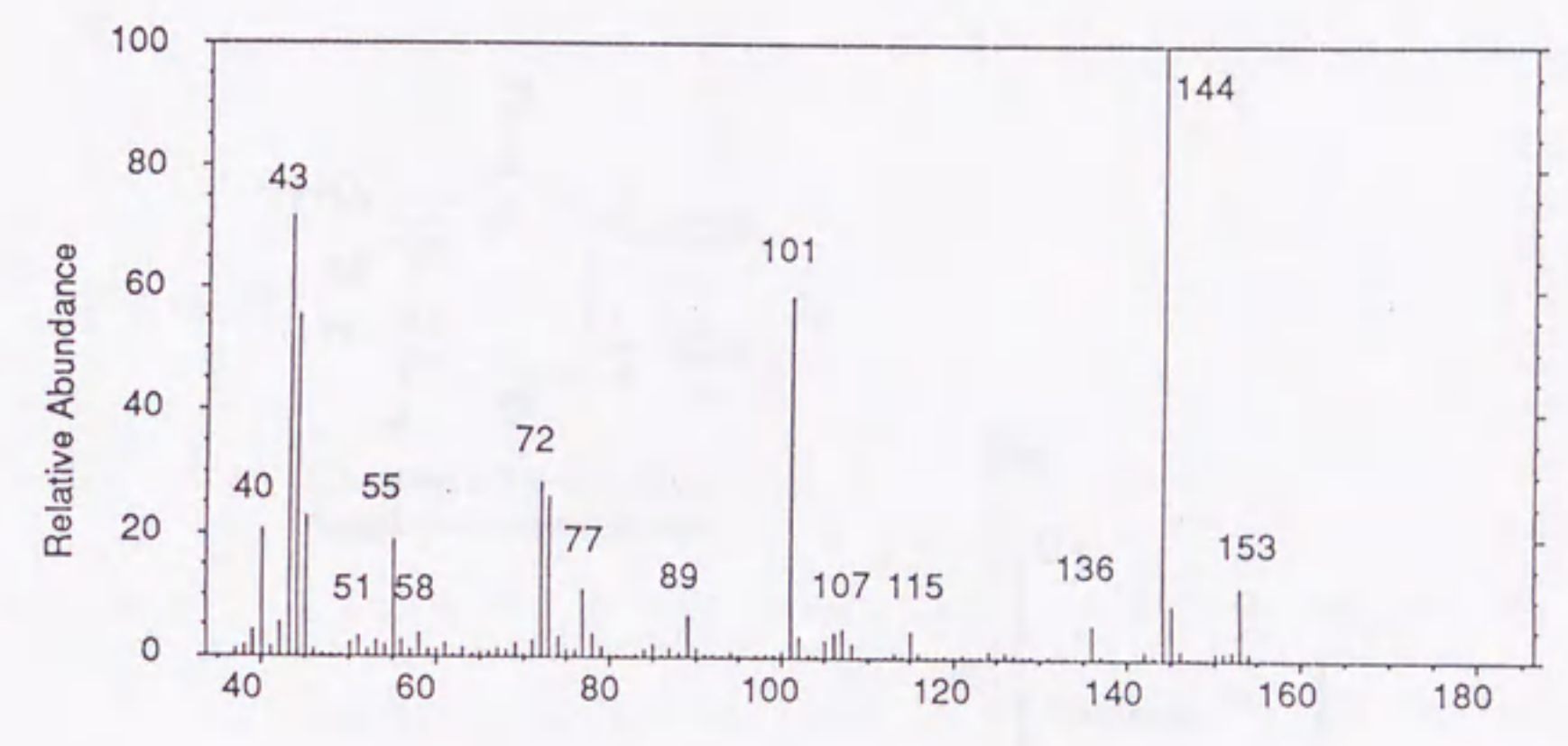


Fig. 3-3 Electron impact-mass (EI-MS) spectrum of peak 5

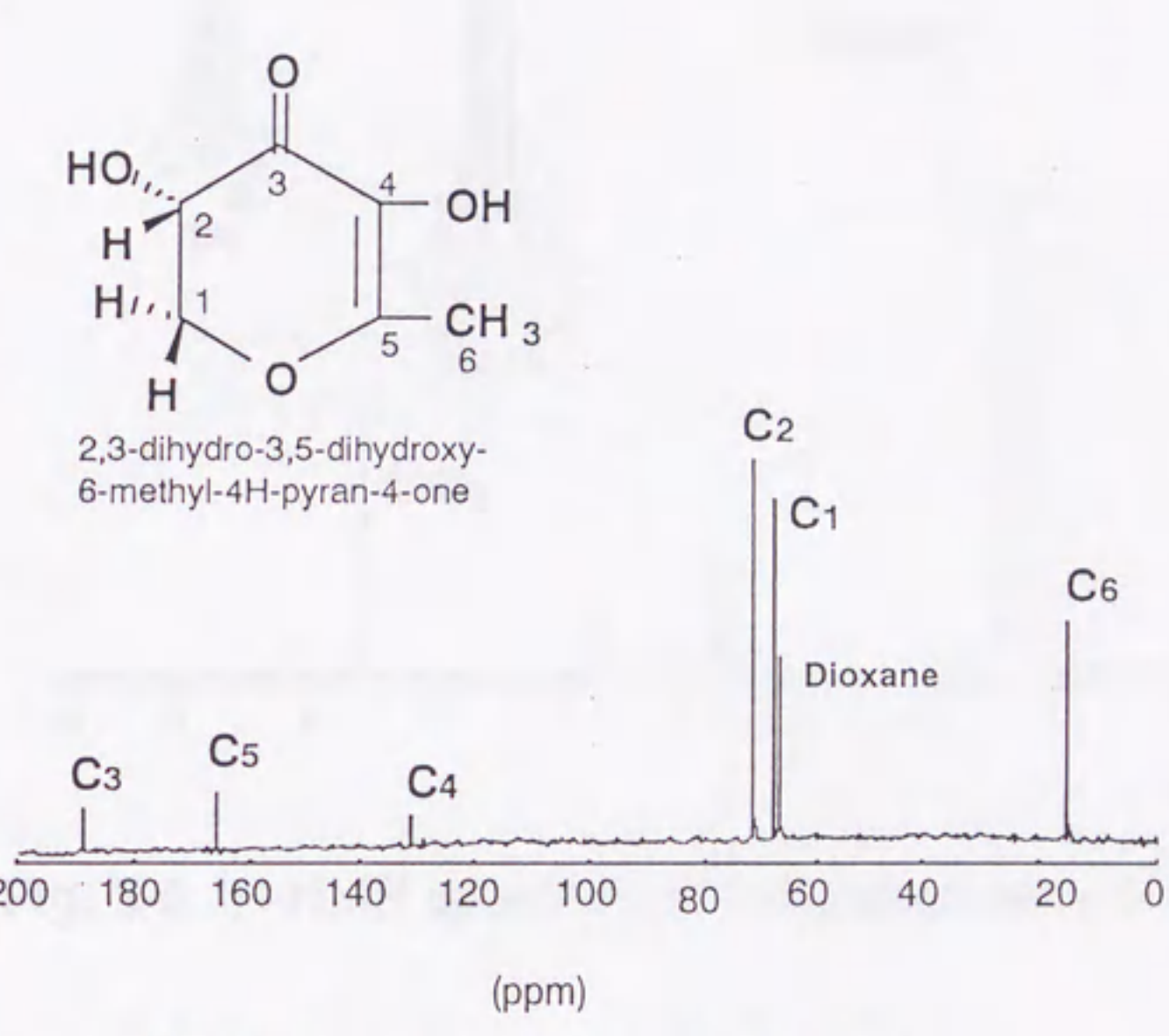


Fig. 3-4 ¹³C-NMR spectrum of peak 5 in CDCl₃

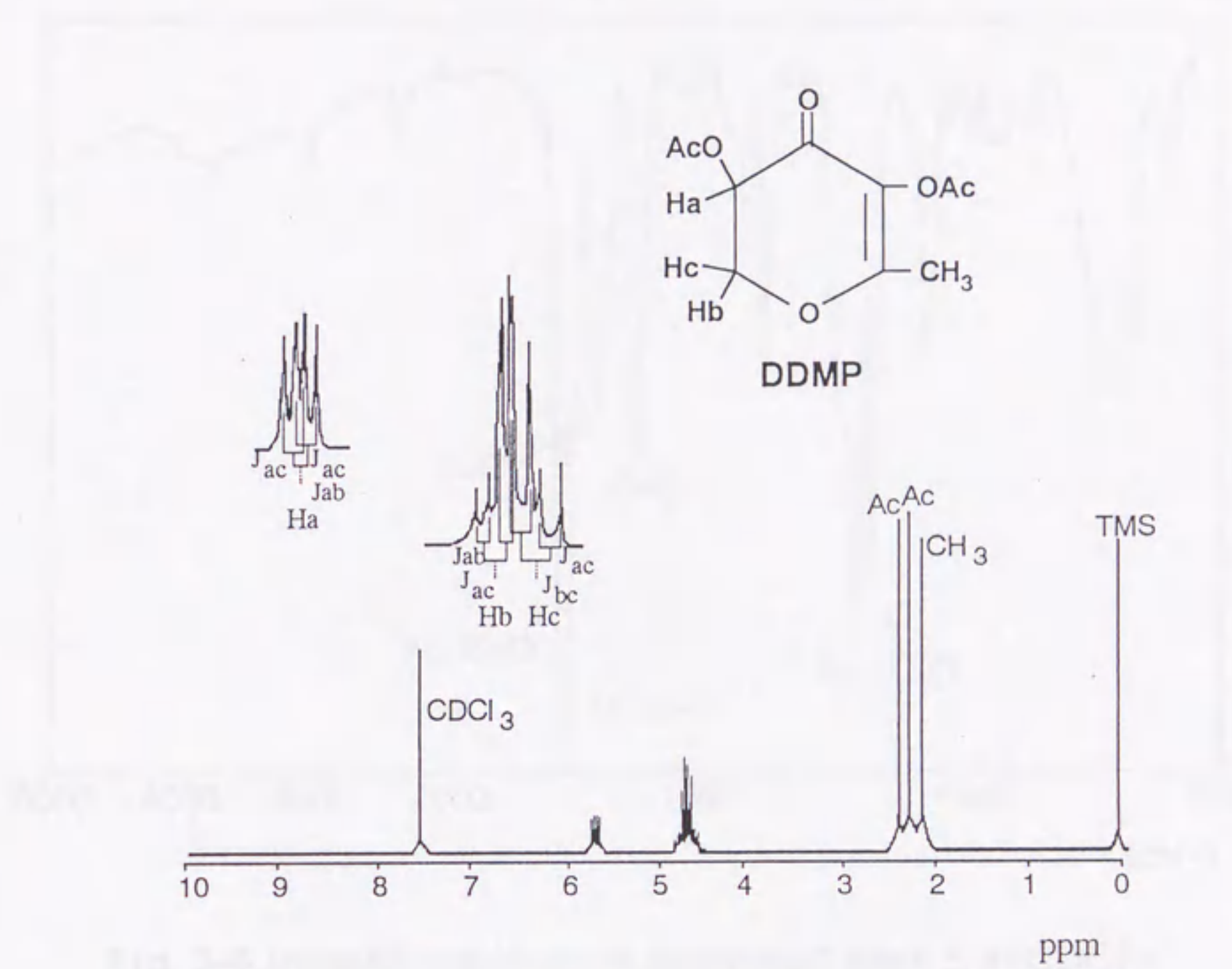
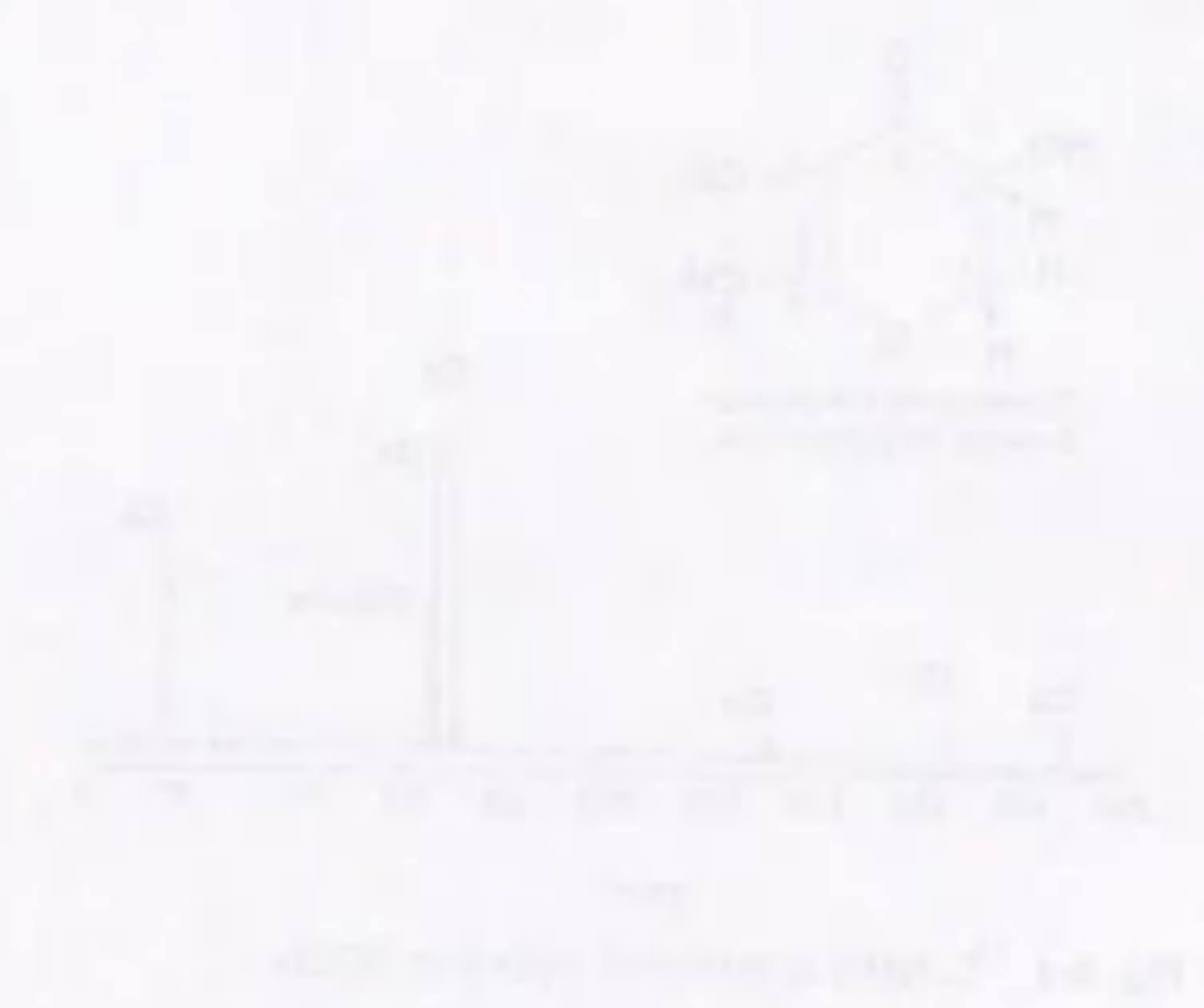


Fig. 3-5 ¹H-NMR spectrum of acetylated peak 5 in CDCl₃

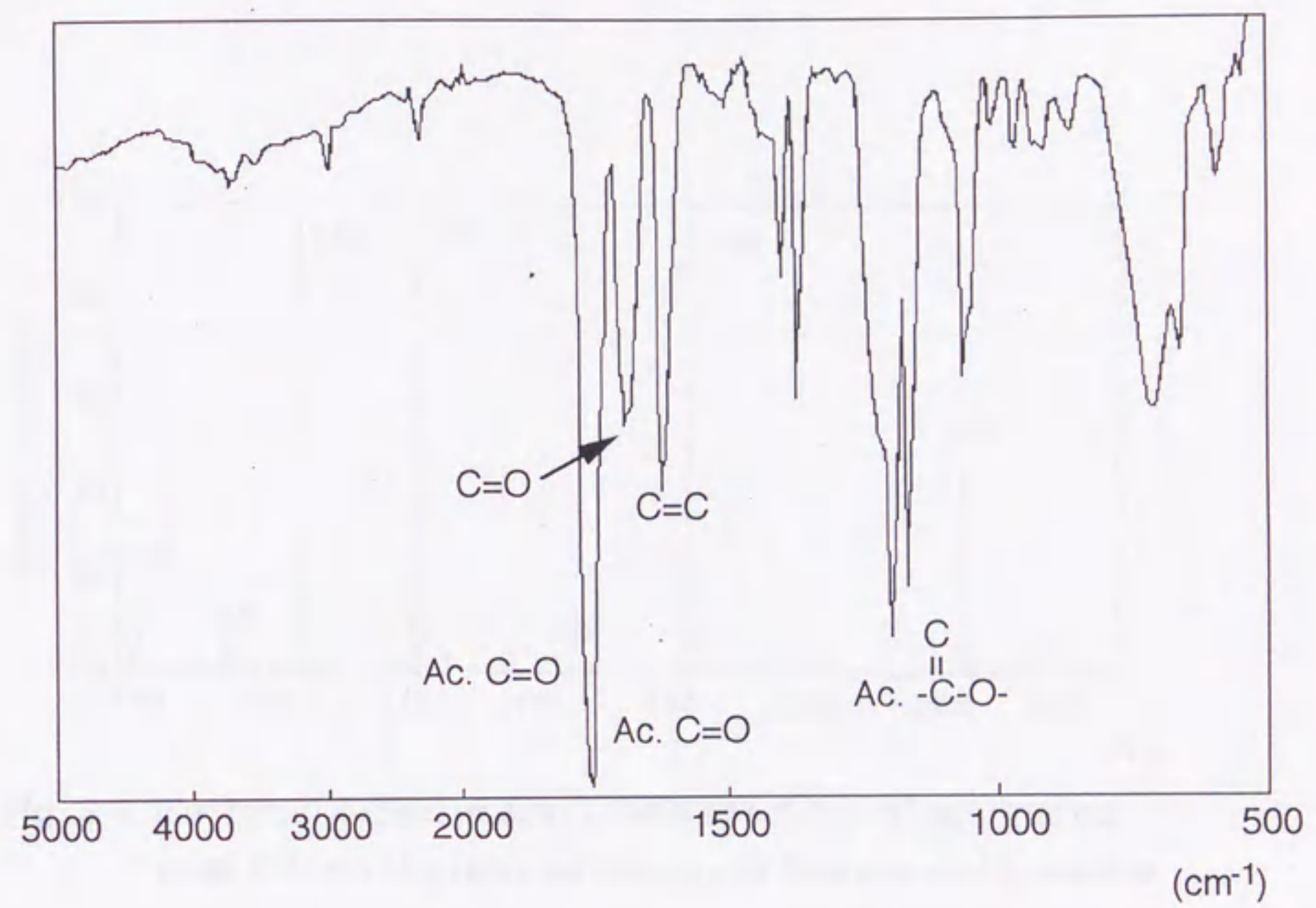


Fig. 3-6 Infrared spectrum of acetylated peak 5 in CDCl₃

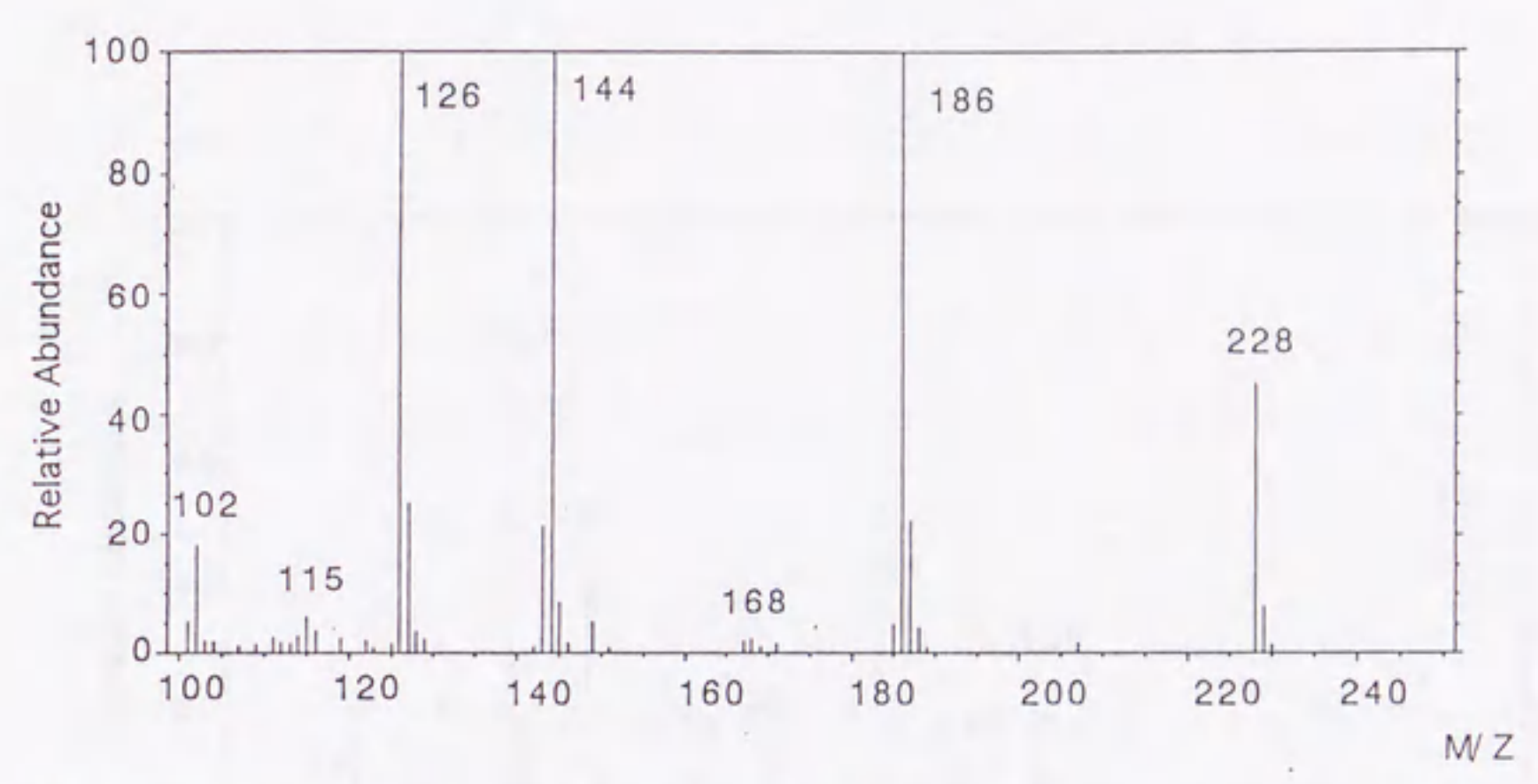
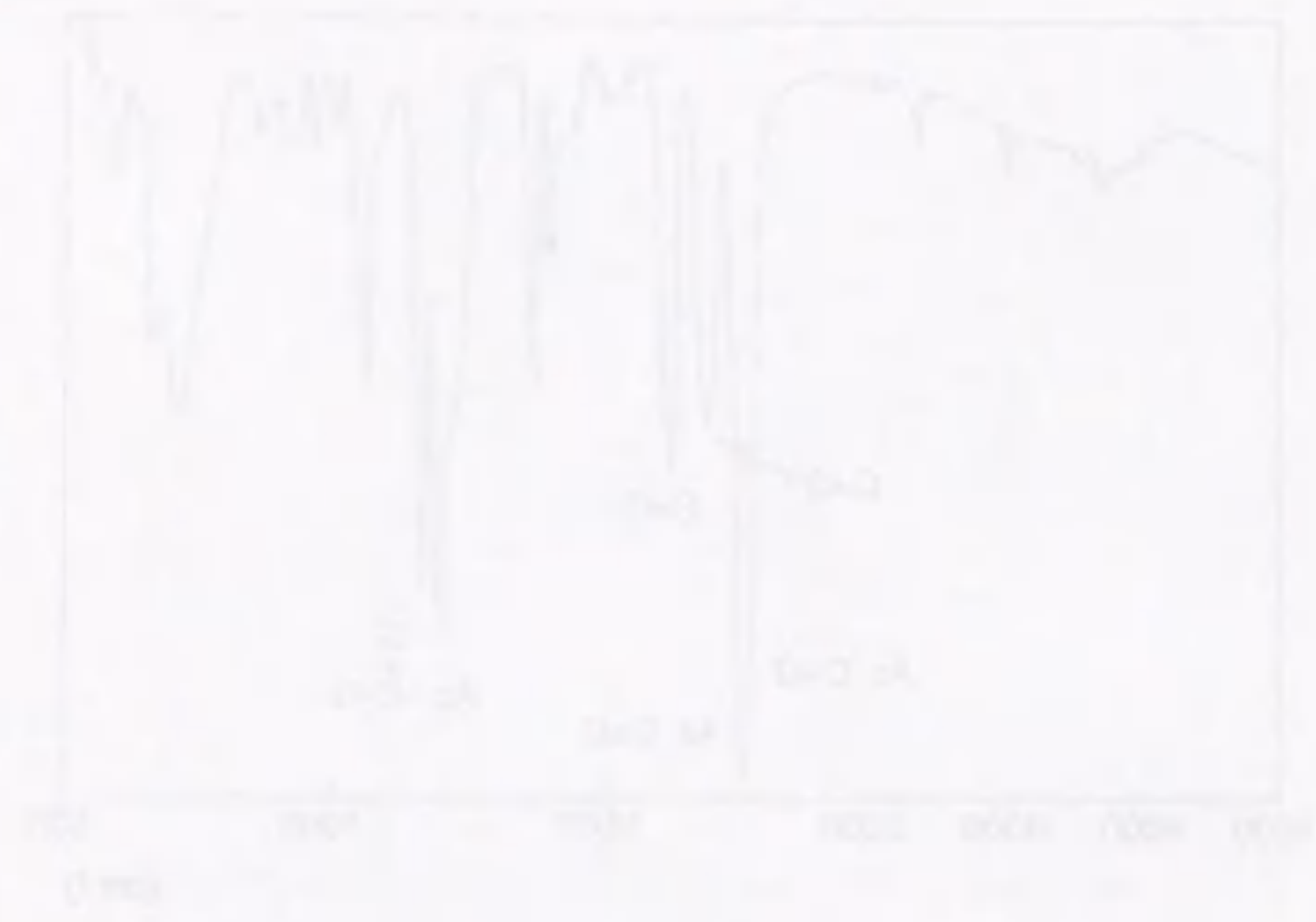


Fig. 3-7 Electron impact-mass (EI-MS) spectrum of acetylated peak 5 from the reacted mixture of fructose and β -alanine

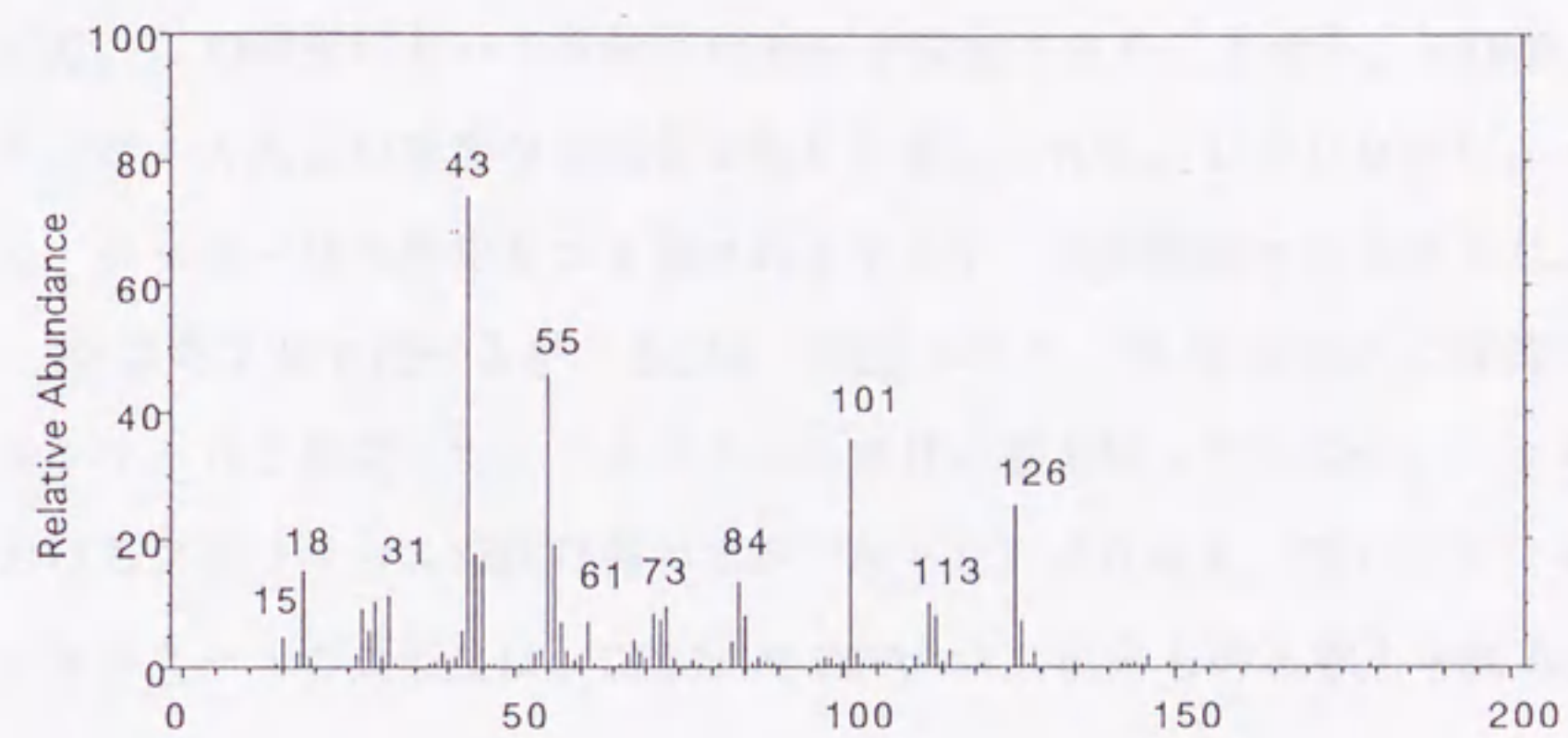


Fig. 3-8 Electron impact-mass (EI-MS) spectrum of peak 6 from the reacted mixture of fructose and β -alanine

ことができなかった。Parliment [57] は、DDMP をマイクロエーブオーブンで加熱したプロリンとグルコースの反応からも同定している。また、Gianturco [58] はコーヒーの香中から見つけている。Harries [59] は DDMP を強いキノンのような焦げた香であると述べ、Severin と Seilmeier [60] や Jurch [61] はカラメルのような香であると報告している。しかし、DDMP は Shaw ら [62、63] によって、室温では香がないと判定され、その後、多くの研究者が彼の論文を引用し、オーダレスとしている。しかし、この実験系で繰り返し行なった HPLC による精製や、150 °C の短時間加熱によっても変化することなく甘い香が確認された。この研究において多量の DDMP が測定されたことから、DDMP はアミノカルボニル反応の重要な中間体であると考えられる。しかしながら、一般的に甘く、クッキー様の香をもつと言われるマルトールは確認できなかった。

P3 は第7章で述べるが、DDAF と同定された。P8 は HPLC の保持時間からフルフラールと推定した。フルフラールは甘い香を持っているが、クッキー調製におけるフルフラール形成は極わずかであった。それゆえ、焼いたクッキー香へのフルフラールの貢献度は、DDMP や DDAF より低いものと考えられる。

3-4 各クッキー素材の混合物の焙焼による DDMP 及び HMF 生成

各種のクッキー素材の混合物を固相系で加熱し、DDMP と HMF の生成について調べた。クッキー素材と各種の混合物を 150 °C で 10 分間、乾燥状態で加熱した。Table 3-1 に示すように、フルクトース単独加熱からは HMF が生成されたが、フルクトース以外の単一素材の加熱からは DDMP と HMF はいずれも生成されなかった。しかしながら、フルクトースまたはグルコースとクッキー素材の混合物では、DDMP と HMF の生成が見られた。DDMP 生成はグルコースよりもフルクトースの方が顕著で、フルクトースと卵、または卵白の混合物は他の物質のどれよりも DDMP 生成を促進した。また、炭酸水素ナトリウムと糖の加熱ではわずかに DDMP を生成した。この DDMP は糖のアルカリ (Shaw ら [62])、または酸 (Shaw ら [47]) との処理、あるいは、アミノカルボニル反応 (Njoroge ら [55])

Table 3-1 Formation of DDMP and HMF from cookie materials baked at 150°C for 10 min.

materials	DDMP ^a	HMF ^b
fructose	-	0.056
glucose	-	-
wheat flour	-	-
egg	-	-
butter	-	-
fructose and NaHCO ₃	0.19	0.017
fructose and butter	0.10	0.071
fructose and egg	0.46	0.027
fructose and egg yolk	0.26	0.048
fructose and egg white	0.40	0.012
glucose and NaHCO ₃	0.05	0.005
glucose and butter	0.04	0.042
glucose and egg	0.23	0.015
glucose and egg yolk	0.22	0.069
glucose and egg white	0.31	0.018

a.Amount of 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one was mg/100mg sugar.

b.Amount of 5-Hydroxymethylfurfural was mg/100mg sugar.

で生成されることが知られている。他方、HMFの生成量は糖とクッキー素材の脂肪、例えば、バター、卵黄などとの加熱によって顕著に増加した。

3-5 タンパク質またはアミノ酸とフルクトース混合物の加熱による DDMP と HMF 生成

DDMPの形成はフルクトースと卵白との反応により促進されたことから、どのようなタンパク質やアミノ酸がDDMPを生成し易いかを調べた。

最初に、オボアルブミン、リゾチーム、牛血清アルブミン(BSA)、カゼインなどのタンパク質とフルクトースの混合物を150℃で10分間加熱し、DDMPとHMFの生成量を測定した。その結果、Fig. 3-9に示すようにDDMP生成量はオボアルブミンの添加によって顕著に増加し、BSA、カゼイン、リゾチームの順にDDMP生成量は減少した。DDMP生成に対して、HMFの生成は上と逆の順序で顕著に増加した。

種々のアミノ酸のDDMP生成に及ぼす影響はFig. 3-10に示した。アルギニン、ヒスチジン、プロリン、アラニンとフルクトースの混合物は、加熱によってDDMPを顕著に生成した。

3-6 クッキー中の DDMP、HMF 生成に及ぼす炭酸水素ナトリウムの影響

炭酸水素ナトリウムは一般的にパンやケーキの調製時にドウに加えられる。炭酸水素ナトリウムを添加したドウも、添加しないドウから調製したクッキー中に認められるDDMPとHMFを生成するかどうかをHPLCとUVスペクトル分析を用いて検討した。その結果、HPLC分析の保持時間、UV吸収(λ_{max})が一致したことから、炭酸水素ナトリウムを添加したドウにもDDMP及びHMFの生成を確認することができた。さらに、DDMPについてはFAB-MSで分子量を測定し、145 [M^+ +1]のフラグメントが得られた(Fig. 3-11)。これらの結果から、炭酸水素ナトリウムを添加した場合も、添加しない場合と同様にDDMP及びHMFが生成されていることが明らかになった。

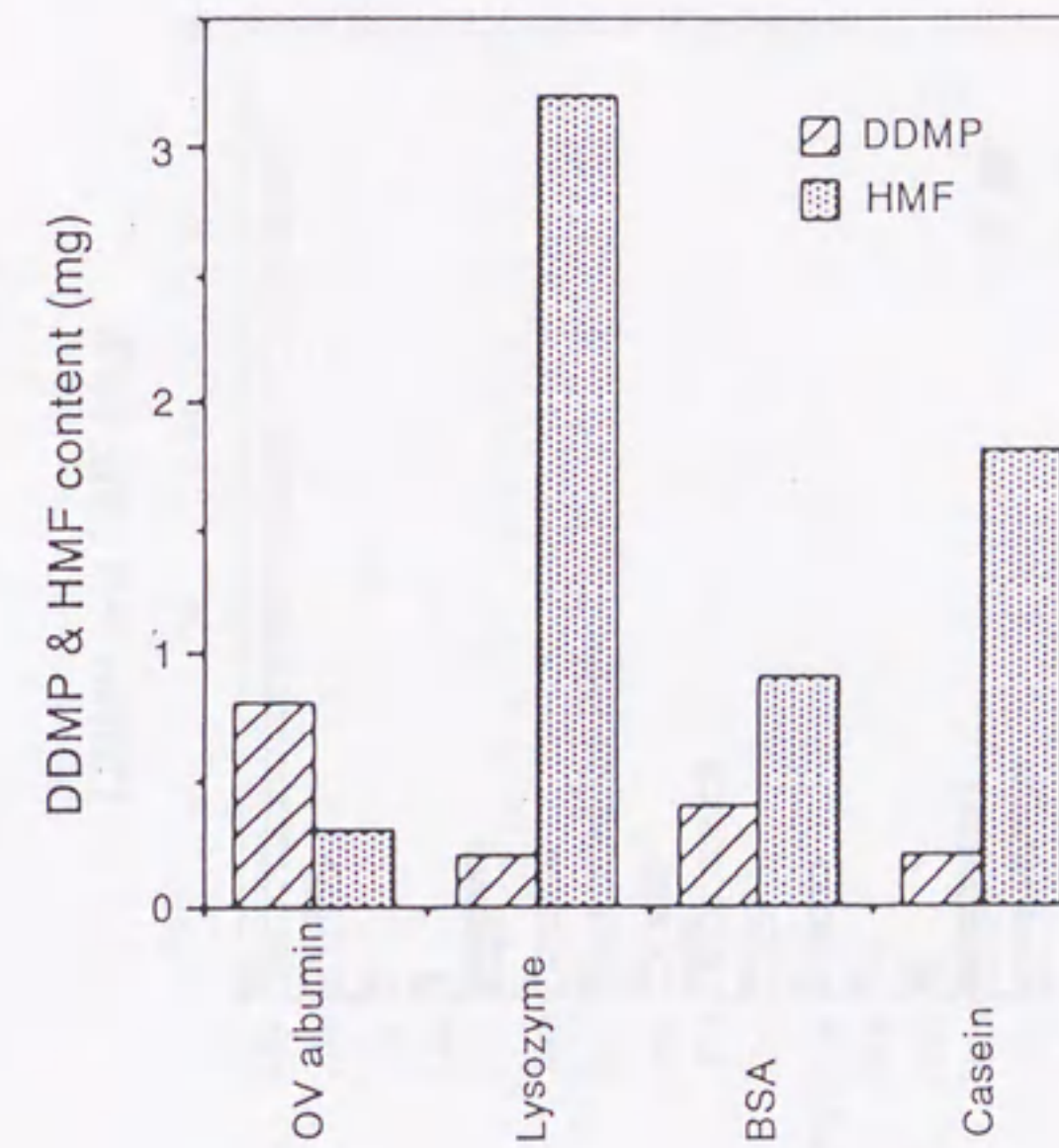


Fig. 3-9 Comparison of DDMP and HMF from fructose with various proteins heated at 150°C for 10 min. DDMP; 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one, HMF; 5-hydroxymethylfrufural, BSA; bovine serum albumin.

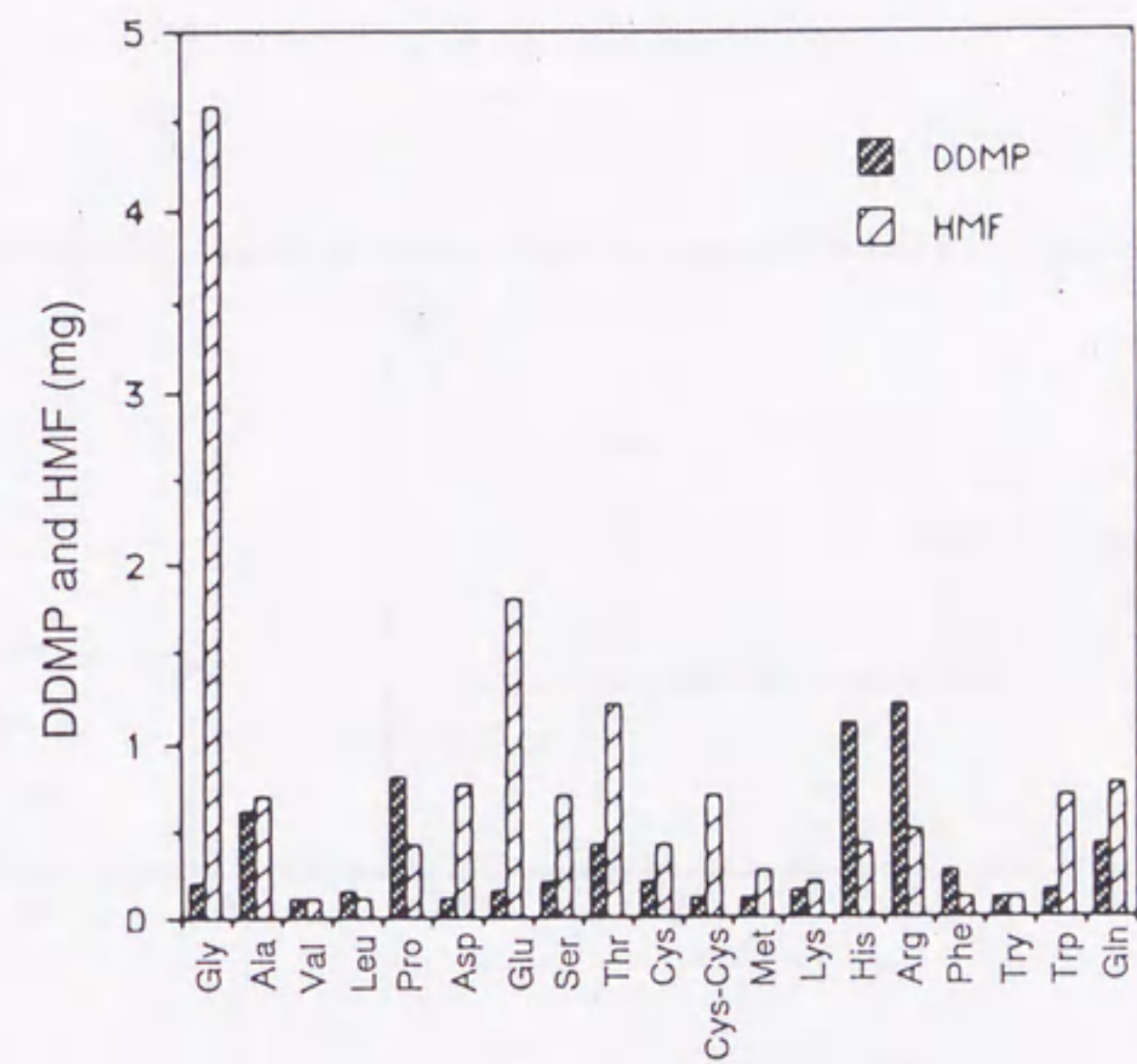


Fig. 3-10 Comparison of DDMP and HMF from fructose with various amino acids heated at 150 °C for 10 min. DDMP; 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-4-pyran-4-one, HMF; 5-hydroxymethylfurfural.

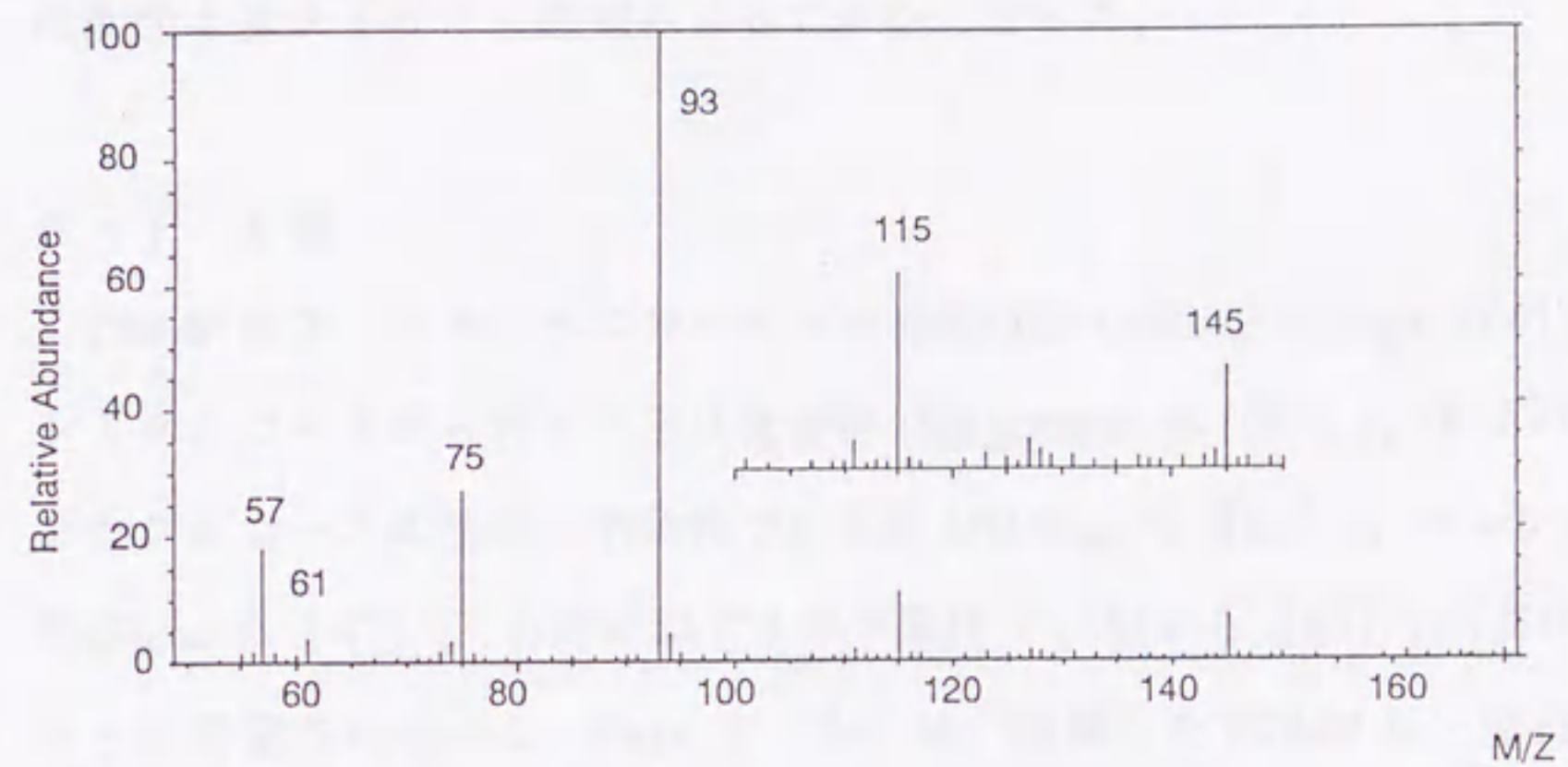


Fig. 3-11 Fast atom bombardment-mass (FAB-MS) spectrum of peak 5 from the reacted mixture of fructose and β -alanine with sodium bicarbonate.

クッキードウに炭酸水素ナトリウムを添加した場合と、しない場合の DDMP と HMF の生成量を Table 3-2 に示す。フルクトースとグルコースのそれぞれを用いて炭酸水素ナトリウム添加の効果を見ると、DDMP の生成量の違いはあまり大きくなかった。これらの結果から、焙焼したクッキー中の DDMP 生成は、糖単独の加熱よりも主にアミノカルボニル反応に起因するものと考えられた。少なくとも DDMP 生成の中間物質、すなわち、1-デオキシ-D-エリスロ-2,3-ヘキソジウロース (Fisher [56]) や、2,4-ジケトン (Njoroge ら [55]) はフルクトースとタンパク質またはアミノ酸の反応によって生成されることが考えられる。HMF の生成は炭酸水素ナトリウム添加によって少なくなった。

3-7 考察

DDMP はアミノカルボニルタイプの褐変反応 (Mills と Hodge [64])、プロリンとグルコースからのアマドリ化合物 (Shigematsu ら [65])、ネオペンチルアミンとグルコースの生理学的条件での反応 (Njoroge ら [55])、フルクトースの酸性 (Shaw ら [47])、あるいはアルカリ条件下 (Shaw ら [63]) における分解産物として同定されている。Shaw ら [54] は、精製した DDMP は、室温で匂いがないと報告している。さらに、Mills と Hodge [64] は、DDMP が長く加熱されると脱水され、マルトールを生成し、特に酸性下で顕著であることを報告している。

この研究中 HPLC で DDMP の精製を行なったが、DDMP の甘い香は変化しなかった。また、マルトールは HPLC による単離・精製過程において確認できなかった。さらに、精製した DDMP を 150 °C で加熱しても、DDMP からマルトールの生成は認められなかった。これらの結果は、DDMP そのものが焙焼フレーバーを形成する重要な物質であることを示している。また、DDMP の脱水によるマルトール生成には、単に加熱によるだけでなく食品加工中の何か他のファクターが必要であると考えられる。そのことは、Shaw ら [62] が、DDMP を無水ベンゼン中でチオニールクロライドとピリジンと一緒に反応させると、優先的にマルトールが生成されると報告していることから示唆される。

Table 3-2 Formation of DDMP and HMF from cookie materials baked at 150°C for 10 min.

products	fructose		glucose	
	without NaHCO ₃	with NaHCO ₃	without NaHCO ₃	with NaHCO ₃
DDMP ^a	0.21	0.24	0.16	0.19
HMF ^b	0.02	0.01	0.07	0.02

a.Amount of 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one was mg/100 mg sugar.

b.Amount of 5-Hydroxymethylfurfural was mg/100 mg sugar.

クッキー調製中における DDMP は糖単独の分解ではなく、糖とタンパク質、またはアミノ酸とのアミノカルボニル反応を通して主に生成される。さらに、クッキー素材の中で、他のタンパク質源に比べて卵白やオボアルブミンは DDMP 生成能が高く、HMF 生成能が低かった (Fig. 3-9)。この傾向はタンパク質の代りに用いたアミノ酸、特にヒスチジン、アルギニン、プロリンの場合でも同様であった (Fig. 3-10)。これらのアミノ酸やタンパク質が DDMP を生成する機構についてはまだ明らかになっていない。DDMP と HMF はアマドリ化合物から 1-メチル-2,3-ヘキソジウロース、3-デオキシ-D-エリスロヘキソスロースを経由して、アミノカルボニル反応中にそれぞれ生成されると報告されている (Shaw ら [47]、Hodge ら [45]、Njoroge ら [55])。これらの両方の反応経路はアマドリ化合物中のアミノ酸残基によってコントロールされているようである。さらに、たいへん興味深いことは DDMP と HMF の生成が逆の関係にあることと、大量の DDMP がヒスチジン、アルギニン、プロリンのそれぞれとフルクトースの反応から形成され易いことである。