

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

ペントース、ヘキソース、二糖類、三糖類を添加したクッキーの品質形成について検討した。クッキードウは小麦粉、卵、バター、糖、炭酸水素ナトリウムを用いて調製し、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。ペントース添加クッキーから顕著なピークが検出され、フルフラールと同定した。ペントース以外の糖を含むクッキーからはDDAF、DDMP、HMFが検出された。DDAFとDDMPはヘキソースを含むクッキーにおいて特に顕著であった。DDAFの同定については第7章で述べるが、このDDAFとDDMPは、甘い、クッキーらしいフレーバーを有する。このような結果から、甘味料としてヘキソースをクッキーに添加することは、好ましいクッキーフレーバーを形成するために有効である。クッキーの物理的な特性、すなわち、膨化度、形、色、表面の状態などに関する研究において、各種糖を添加したクッキー間の相違は糖の融点、溶解度の違いによることが明らかになった。この実験を通して、フルクトースをクッキーに添加することは、クッキーの物理的な特性やフレーバーの両面に好ましい効果を及ぼすことが明らかになった。

4-1 序

第2章の実験でクッキーのフレーバー形成に糖と卵が大きな影響を与えることが示唆されたため[66]、さらにペントース、ヘキソース、二糖類、三糖類の糖を用いて糖の種類がクッキーフレーバー、クッキーの形状にどのような影響を与えるかについて検討した。

4-2 ペントースを添加したクッキーからの香気物質

リボース、キシロースやアラビノースなどのペントースを添加したクッキーを150℃、10分間オーブンで加熱した。香気成分はメタノール/水系で抽出し、HPLCで分析した。リボースやキシロースを添加したクッキーはフルフラールを大量に生成した(Fig. 4-1)。この物質の最大吸収波長は279 nm (in water)で、分子量は96であった。さらにUV、MS、NMRスペクトルや、HPLCで標品との保持時間の比較などからフルフラールと同定した。フルフラールは刺激性のある甘い香をもつが、一般的なクッキーやキャラメルとの香とは異なっていた。しかし、ペントースを添加したクッキーにおいては、フルフラールの形成は甘い香を付加し、クッキーの品質を高める効果があるように思われた。

4-3 ヘキソースを添加したクッキーからの香気物質

DDAF、DDMPとHMFはマンノース、フルクトースやグルコースなどヘキソースを添加したクッキー中の主たる生成物(Fig. 4-2)であった。マンノース添加クッキーにおいては、特にHMFが生成された。フルクトース添加のクッキーにおいては、DDAFとDDMPが多く生成されてHMFの生成はわずかであった。グルコース添加クッキーもDDAFとDDMPを生成したが、フルクトース添加クッキーよりは少なかった。HMFは苦く、やや焦げ臭を示した。しかし、DDAFとDDMPは甘い香とクッキー様のフレーバーを示した。DDAFとDDMPはそれぞれイソマルトールとマルトールの前駆物質と報告されている[67]。この研究から、クッキーの香として好まれる甘いフレーバーの生成のために、フルクトース添加は有効であることが明らかになった。

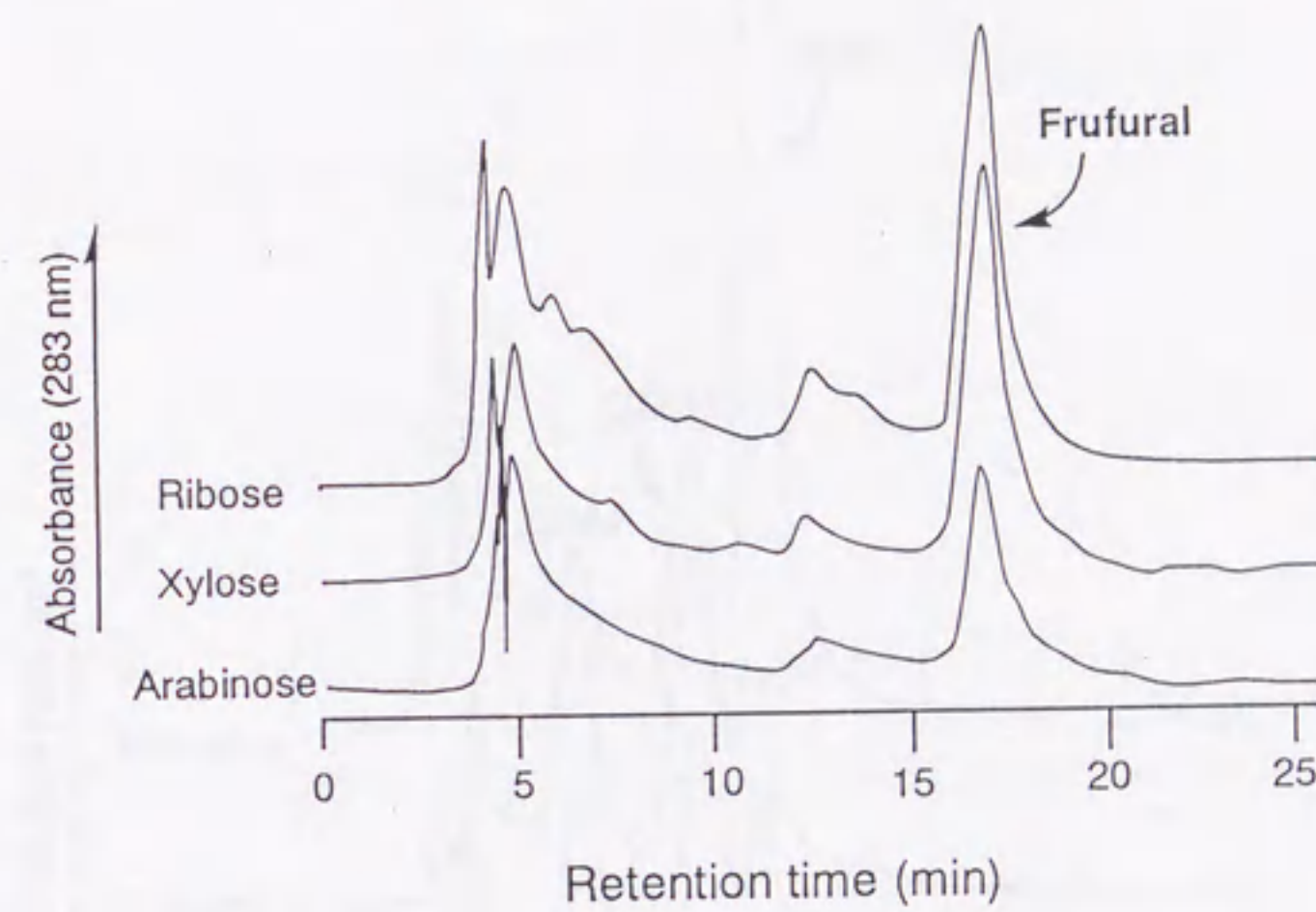


Fig. 4-1 High performance liquid chromatogram of extracts from cookies baked with various pentose at 150°C for 10 min. Chromatographic conditions : column; DEVELOSIL ODS-5 (4.6 mm i.d. x 250 mm), mobile phase; H₂O-MeOH (6 : 1 v/v), flow rate; 0.8 ml/min, UV detection; 283 nm, chart speed; 5 mm/min.

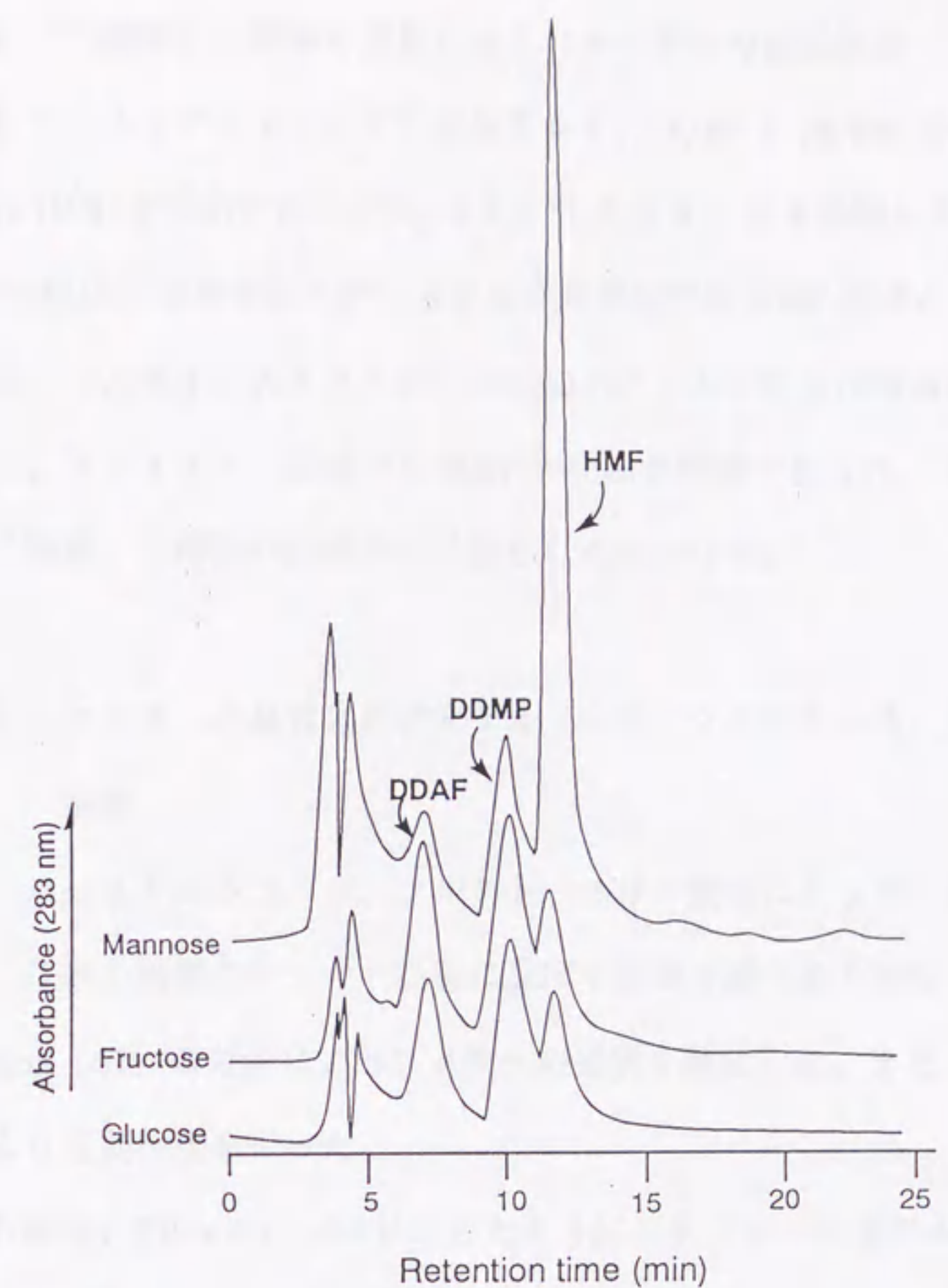


Fig. 4-2 High performance liquid chromatogram of extracts from cookies baked with various hexose at 150°C for 10 min. Chromatographic conditions : column; DEVELOSil ODS-5, (4.6 mm i.d. x 250 mm), mobile phase; H₂O-MeOH (6 : 1 v/v), flow rate; 0.8 ml/min, UV detection; 283 nm, chart speed; 5 mm/min. DDAF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

4-4 二糖類と三糖類を添加したクッキーからの香気物質

マルトースをクッキードウに添加すると、DDAF と DDMP の生成は少なく、多量の HMF が検出された (Fig. 4-3)。セルビオースを添加したクッキーでは HMF の形成は認められたが、スクロース添加では HMF はほとんど検出されなかった。セルビオースとスクロース添加のクッキーからは微量の DDMP が検出された。ラフィノース添加では HMF の生成が顕著であった。フルフラールの生成は二糖類、三糖類の加熱からは認められなかった。

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

スクロースやグルコース、フルクトースは一般的にクッキー製造に用いられている。これら糖類のクッキー品質に及ぼす影響を調べるために、Yamazaki と Donelson [67] の方法によりクッキーの形状を測定した。また、Caul [68] の方法により官能検査を行った。

その結果、Table 4-1、4-2 に示したように、スクロースやグルコース、フルクトースを添加しクッキーを調製すると、口触りや形、色が異なった。特にグルコースを添加したクッキーは、フルクトースやスクロースを添加したクッキーと口触り、クッキーの形、クッキーの表面の斑点、しわなどの点で異なっていた。Fig. 4-4、4-5 に示すように、グルコースを添加したクッキーは水平方向に広がりやすく、垂直方向へ膨張する傾向がみられた。しかし、その表面はフルクトースやスクロース添加クッキーと比べるとしわが多く生成された。また、グルコース添加クッキーは三種類の中で最も柔らかく、最も乾燥しにくいように思われた。これらのグルコース添加クッキーの物理的状態は、クッキーのテクスチャーとして好ましくないものである。フルクトース添加クッキーは水平方向に広がり、ス

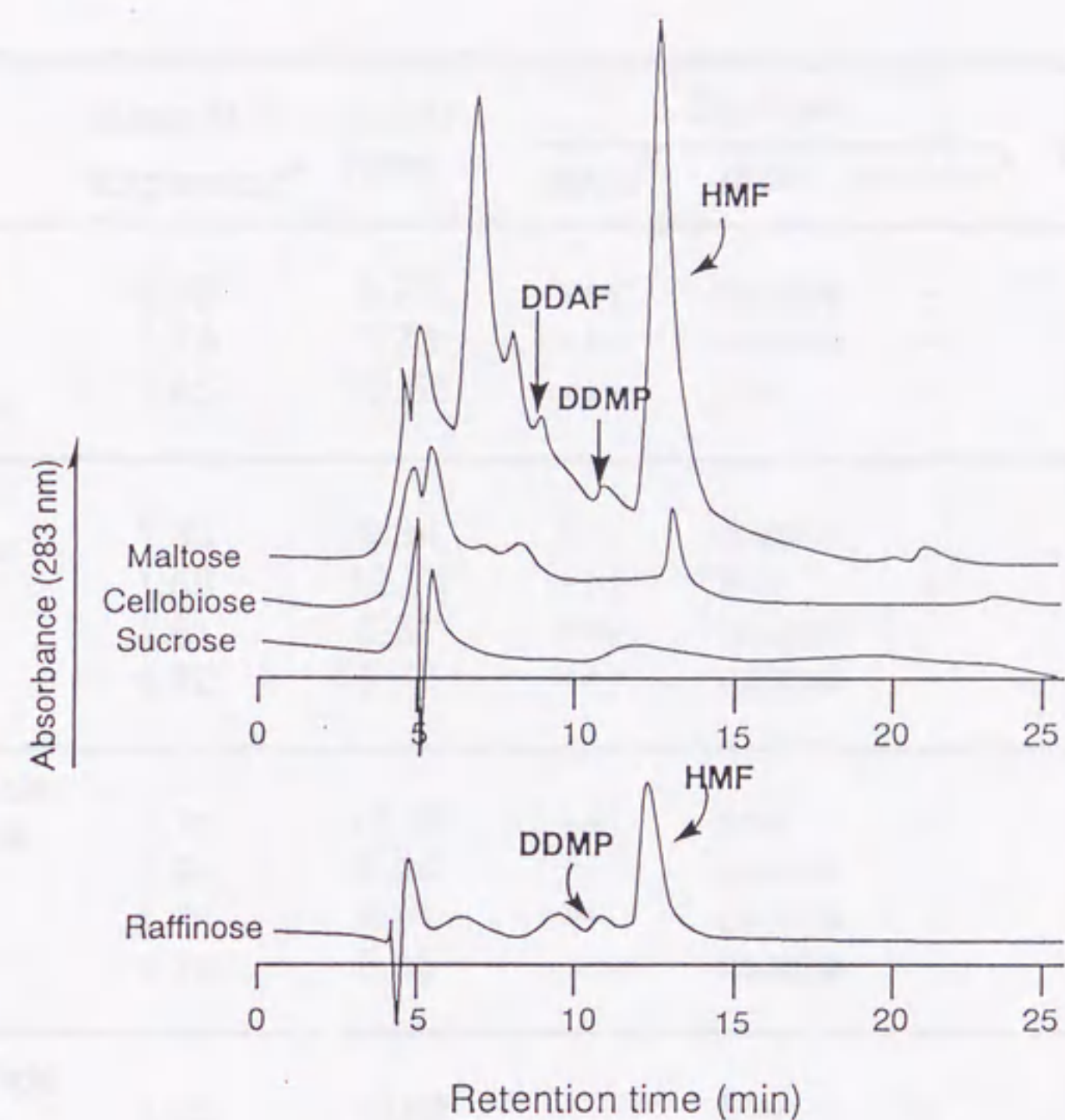


Fig. 4-3 High performance liquid chromatogram of extracts from cookies baked with various di- and trisaccharide at 150°C for 10 min. Chromatographic conditions: column; DEVELOSIL ODS-5 (4.6 mm i.d. x 250 mm), mobile phase; H₂O-MeOH (6 : 1 v/v), flow rate; 0.8 ml/min, UV detection; 283 nm, chart speed;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

Table 4-1 Effect of Addition of Various Sugars on the Quality of Baked Cookies Containing Sodium Bicarbonate.

Sugar	Ratio of Expansion ^a	Height (mm)	Surface			Texture ^b	Color ^c O.D.(420 nm)
			spots ^d	grain	wrinkles ^e		
Pentose							
Xylose	1.70	6.70	+++	coarse	-	D/H	0.193
Ribose	1.73	6.73	+++	coarse	-	D/H	0.354
Arabinose	1.65	12.55	+++	fine	+	W/S	0.163
Hexose							
Galactose	1.84	6.84	+++	coarse	-	D/H	0.153
Glucose	1.68	12.68	+++	fine	+	W/S	0.042
Mannose	1.81	6.81	+++	coarse	-	D/H	0.264
Fructose	1.72	6.72	+++	coarse	-	D/H	0.160
Disaccharide							
Cellobiose	1.70	12.70	++	fine	+	W/S	0.032
Lactose	1.94	6.94	++	coarse	-	D/H	0.052
Maltose	1.71	6.81	++	coarse	-	D/H	0.015
Sucrose	1.70	6.80	-	coarse	-	D/H	0.013
Trisaccharide							
Raffinose	1.62	12.62	-	fine	+	W/S	0.078

^a Based on the cookie dough shaped into 5 x 30 mm, diam.

^b W/S = wet and soft, D/H = dry and hard.

^c Extract from 10 g of the baked cookie with 50 ml of methanol-water (3 : 1 v/v).

^{d, e} symbols represent : +++; prominently present, ++; clearly present, +; barely present, -; not present.

TABLE 4-1
Effect of wheat flour and potato starch on the surface condition of cookies containing various sugar, with or without sodium bicarbonate.

Sugar	Flour	Surface		Spot ^a	Wrinkles ^b
		Spot ^a	Wrinkles ^b		
Glucose	Wheat flour	-	+	-	+
	Wheat flour + NaHCO ₃	+++	+++	+++	+++
	Potato flour	-	-	-	-
	Potato flour + NaHCO ₃	+++	-	+++	-
Fructose	Wheat flour	-	-	-	-
	Wheat flour + NaHCO ₃	+++	-	+++	-
	Potato flour	-	-	-	-
	Potato flour + NaHCO ₃	+++	-	+++	-
Sucrose	Wheat flour	-	-	-	-
	Wheat flour + NaHCO ₃	-	-	-	-
	Potato flour	-	-	-	-
	Potato flour + NaHCO ₃	-	-	-	-

Table 4-2 Effect of wheat flour and potato starch on the surface condition of cookies containing various sugar, with or without sodium bicarbonate.

materials	surface		
	spot ^a	wrinkles ^b	
glucose	wheat flour	-	+
	wheat flour + NaHCO ₃	+++	+++
	potato flour	-	-
	potato flour + NaHCO ₃	+++	-
fructose	wheat flour	-	-
	wheat flour + NaHCO ₃	+++	-
	potato flour	-	-
	potato flour + NaHCO ₃	+++	-
sucrose	wheat flour	-	-
	wheat flour + NaHCO ₃	-	-
	potato flour	-	-
	potato flour + NaHCO ₃	-	-

^{a, b} Symboles represent : +++; prominently present, +; barely present, -; not present.

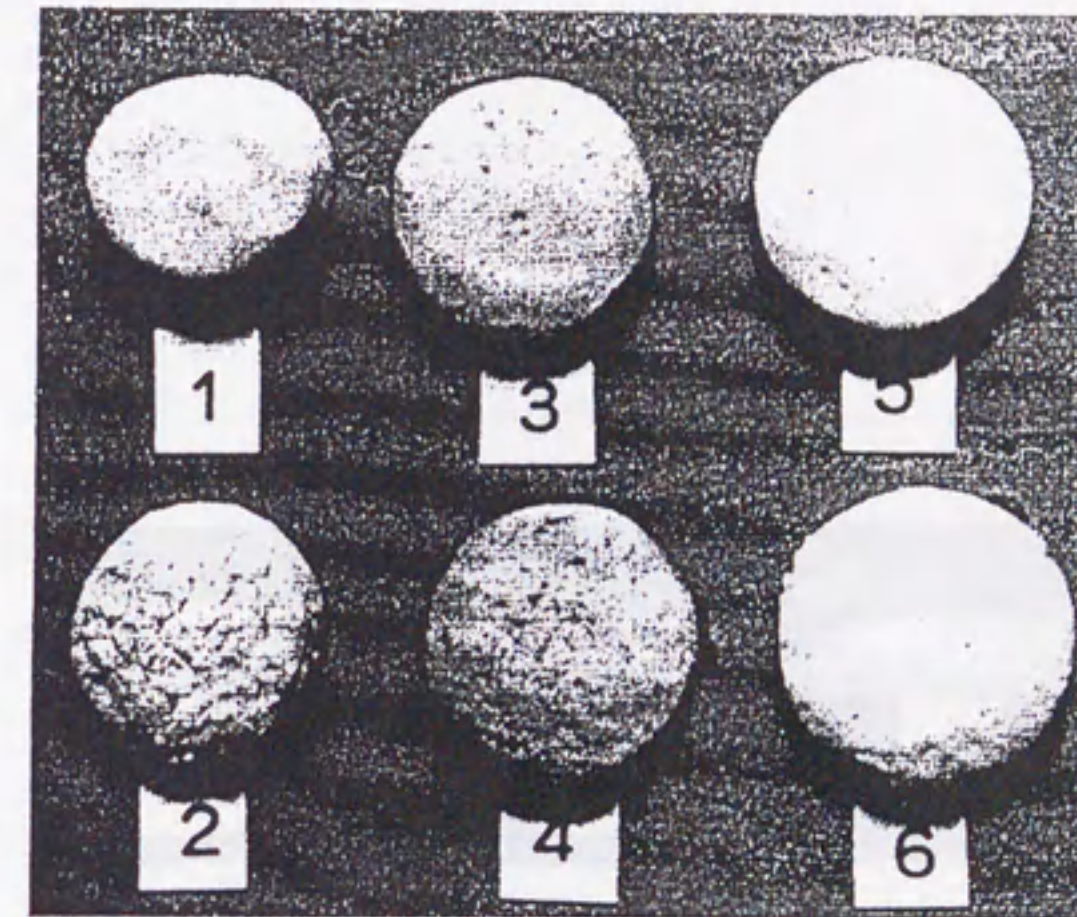


Fig. 4-4 Surface of cookies baked with various sugars with or without NaHCO_3 at 150°C for 10 min. 1, Glucose; 2, glucose and NaHCO_3 ; 3, fructose; 4, fructose and NaHCO_3 ; 5, sucrose; 6, sucrose and NaHCO_3 .



Fig. 4-4 Cross of cookies baked with various sugars and NaHCO₃ at 150 °C for 10 min. 1, Glucose and NaHCO₃; 2, fructose and NaHCO₃; 3, sucrose and NaHCO₃; 4, sucrose and NaHCO₃; 5, sucrose and NaHCO₃; 6, sucrose and NaHCO₃.



Fig. 4-5 Cross of cookies baked with various sugars and NaHCO₃ at 150 °C for 10 min. 2, Glucose and NaHCO₃; 4, fructose and NaHCO₃; 6, sucrose and NaHCO₃.

クローズ添加のクッキーの形状によく似ていた。また、フルクトース添加のクッキーは中心部まで十分乾燥していて、ショートネスもよく、スクローズ添加のクッキーと同様であった。ショートネスとはクッキーやパイの様な歯もろく、くだけ易い食べ物の状態を表している。このショートネスがよいということは、クッキーのテクスチャーとしては好ましい要素である。

クッキーに小麦粉の代りとしてじゃがいもデンプンを用い、グルコースを添加してクッキーを作った場合、クッキーの表面にしわは生じなかった。一般的にクッキーなどの菓子類を調製する場合はグルテン含量の少ない薄力粉が用いられる。しかし、さらにグルテンの影響を少なくするために多くの研究者らは [69 ~ 73] 種々の検討を行った。そして、塩素処理をした小麦粉や卵、クエン酸、塩酸カルシウム、硫酸アルミニウムなどはグルテン形成を押えて、クッキーの品質を高めると報告している。Nagao ら [73] はタンパク質含量が焙焼した製品の品質に密接に関係し、低タンパク質含量は菓子の製造に好ましい影響を与えると報告している。同じ様に、Gaines と Donelson [72] は小麦粉中のタンパク質含量はエンゼルケーキの柔らかさと横への広がりに影響を与えると報告している。

他方、藤井ら [74、75] は小麦粉に水を加えるとグリアジンとグルテインからグルテンが形成され、クッキードウが調製された時小麦粉のペントザンから粘性の高い物質が形成されると報告している。このような二次生成物によりクッキーの状態は粘着状態となり、水分の多い状態になる。これらの研究は、グルコースで調製されたクッキー中のグルテン形成が、クッキーが水平方向へ広がりにくく、垂直方向に膨化して高くなることや、クッキーの表面のしわの生成に関与していることを示している。また、ペントザン由来の物質はクッキーを水分含量の多い状態にすることに関係していると推測される。

グルコース添加クッキーとフルクトース添加クッキーの物理的な特性を比較す

ると有意な差が見られた ($P < 0.001$)。特にクッキーの高さ、きめ、しわ、口触りの点で顕著であった。これはグルコースとフルクトースの融点の違いによると考えられる。すなわち、グルコースの融点は $146.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ で、フルクトースの融点は $102\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $104\text{ }^{\circ}\text{C}$ である。一方、グルコースとスクロースの間の差は、スクロースの $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ における溶解度は $203\text{ g}/100\text{ g}$ であり、グルコースの溶解度は $46\text{ g}/100\text{ g}$ であることから溶解度の違いによるのかもしれない。Abboud と Hosney [76] や Curley と Hosney [77]、Doescher と Hosney [78]、Doescher ら [79] はクッキーがスクロースを用いて調製された時、焙焼の速い段階で水平方向に広がり、脱水が促進され、歯もろくなると報告している。また、Abboud と Hosney [76] は、スクロースやフルクトース添加クッキーは、グルコース添加のクッキーよりその高い溶解度と低い融点のため、より速い段階で横に広がると報告している。そのため、スクロースとフルクトース添加クッキーの表面は、グルコース添加のクッキーより横へ広がった、平らなクッキーになる。これらの結果は、スクロースやフルクトース添加のクッキーの水分が速く減少し、グルコース添加のクッキーよりも乾燥してもろい状態になるものと考えられた。グルコースの高い融点と低い溶解度のために、グルコースを添加したクッキーは加熱初期にはほとんど横に広がらず、最終段階で上に膨れたかもしれない。このようことから、クッキー表面のしわとクッキーの水分含量の多い状態は、グルコース添加のクッキードウの加熱中に生じていると考えられる。しかしながら、この結果は、Doescher と Hosney [78、79] の行ったグルコースシロップやフルクトースシロップを添加して調製したクッキーのデータとは一致しなかった。彼らは、スクロースシロップを添加したクッキードウは、グルコースシロップやフルクトースシロップを添加したクッキードウより、横に多く広がったと報告している。明らかに、糖シロップを添加したクッキーは、我々の行った糖の結晶をクッキーに添加した固相系

での結果と異なっていた。クッキーの伸展性に影響を与えるグルコースの低い溶解度は、糖シロップ添加の実験では問題とならないであろう。

4-6 クッキードウに用いる炭酸水素ナトリウムの影響

炭酸水素ナトリウムは、普通、クッキーを膨化させるためにクッキードウに加えられる。クッキードウへの炭酸水素ナトリウムの添加は DDMP の生成量を少し増加させた [80] が、一方でクッキー表面の色や斑点生成に大きな影響を与えた。

フルクトースを添加して焼いたクッキーの色は、三種類の糖を添加したクッキー中で最も褐変した。スクロースを添加したクッキーの表面の色は最も薄い色だった。フルクトース添加とグルコース添加クッキーでは、焙焼中にクッキーの表面に斑点ができた。しかし、スクロース添加のクッキーの表面には、斑点は認められなかった。グルコースを用い、さらに炭酸水素ナトリウムを添加したクッキーは三種類のクッキーのうち最も上に膨れた。そして、炭酸水素ナトリウムを用いなかったグルコース添加のクッキーより、表面のしわが多くなった。フルクトース添加とスクロース添加のクッキードウに、さらに炭酸水素ナトリウムを用いた場合クッキーはより横へ広がった。これはクッキーとして好ましい現象である。

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

茶色の斑点が炭酸水素ナトリウムを用いたグルコース添加とフルクトース添加のクッキーに認められたことから、小麦粉の代わりにじゃがいもデンプンを用いて検討した。しかしながら、小麦粉の代わりにじゃがいもデンプンを用いた場合にも、グルコース添加とフルクトース添加クッキーに斑点が認められた (Table 4-1)。これらの結果から、小麦粉とじゃがいもデンプンの違いは斑点の形成に関

わっていないことが明らかになった。他方、じゃがいもデンプンをクッキーに用いた場合、グルコース添加によるクッキー表面のしわは、炭酸水素ナトリウムの使用、不使用のいかんにかかわらず形成されなかった。

4-8 クッキーの品質に及ぼす各種糖の影響

クッキードウにグルコースとフルクトースを添加した場合、クッキーの表面に褐色の斑点が生成されることや、グルコース添加のクッキードウに小麦粉が使われる場合クッキー表面にしわが形成されることから、斑点としわに及ぼす糖類の影響を検討した。ペントースとヘキソース、及びスクロースを除く二糖類を添加したクッキーに斑点が認められた。特にペントースとヘキソースを添加したクッキーに多くの斑点が認められた。スクロースと三糖類のラフィノース添加のクッキーには、褐色の斑点は認められなかった。以上のことから、斑点の生成には還元糖の存在が必要であり、いわゆるアミノカルボニル反応が関与しているものと考えられた。

クッキー表面のしわの形成に関してはアラビノース、グルコース、セロビオース、ラフィノース添加のクッキーにおいて認められた。このしわに関しては、単糖類と二糖類の間に有意な差は認められなかった。先に述べたように、しわは糖類の高い融点と低い溶解度に起因すると考えられる。

色々な種類の糖類を添加したクッキーの褐変度に関しては、Table 4-1 に示した。リボースを添加したクッキーは最も褐変した。次いで、マンノースが高くなった。ペントースは全体的にヘキソースより褐変しやすかった。スクロースを添加したクッキーは薄い褐色だった。クッキーに好ましい色をつけるためには、ペントースやグルコース以外のヘキソースが有効であることが示唆された。

第5章 各種アミノ酸とフルクトースの反応

要約

クッキーからの好ましい香気の生成がクッキー素材である糖と卵の反応から生成することから、各種のタンパク質及びアミノ酸を糖と反応させて香気生成に関する成分間反応について検討した。その結果、DDMPを比較的生成量し易いアミノ酸と、HMF生成量の多いアミノ酸があった。アミノ酸はアミノ基の位置により反応性が異なり、一般的に α 位にアミノ基をもつ α -アミノ酸より、 β 、 γ 位にアミノ基をもつアミノ酸の方が着色など反応性が高いと報告されている。そこで、さらにアミノ基の位置や炭素鎖の長さなどについて検討した。

その結果、アミノ基を α 位にもつアミノ酸より β 位のアミノ酸との反応からの方がDDMPを多く生成した。しかし、アミノ基を γ 位にもつアミノ酸とフルクトースの反応では、 β -アミノ酸の場合よりもDDMP生成量は少なかった。炭素鎖に関しては、グリシンより炭素数の1個多いアラニンの方がDDMPを多く生成したが、それ以上長くなるとむしろDDMP生成は減少した。

5-1 序

第2、3章で述べたように、クッキー原材料の中でクッキーのフレーバー形成に大きな影響を及ぼすものは糖とタンパク質であった[66、80、81]。また、アミノ酸の種類によりフレーバー、特にDDMP形成が大いに異なることが明らかになった。そこで、どのようなアミノ酸が最も効率よくDDMPを生成するのかを調べるために、アミノ基の位置やアミノ酸の炭素鎖の長さ、アミノ基の数などが異なるアミノ酸を用いてフルクトースと混合し、150℃の高温で10分間加熱して反応させて香気や着色度に関して検討した。

5-2 アミノ基の位置の相違による影響

5-2-1 α 、 β 位による違い

一般にアミノカルボニル反応は α 位より β 位にアミノ基をもつアミノ酸の方が反応性が高いと報告されている [82]。そこで、糖としてはフルクトースを用い、アミノ酸としては α 及び β -アラニンを用いてアミノ基の位置による差異が DDMP の生成に及ぼす影響を検討することにした。具体的には α 及び β -アラニン 1 mmol とフルクトース 1 mmol を混合し、試験管に入れて 150 °C のブロック・ヒーター中で 10 分間加熱した。

その結果、アラニンとフルクトースとの反応については、 β 位にアミノ基をもつ β -アラニンとフルクトースの場合に DDMP の生成量が多くなった (Fig. 5-1)。また、焦げ臭のする HMF の生成量も多くなった。

5-2-2 α 、 β 、 γ 位による違い

アラニンの場合と同様に、 α 、 β 、 γ -アミノ酪酸それぞれ 1 mmol とフルクトース 1 mmol を用いて DDMP 生成に及ぼすアミノ基の位置の影響について検討した。その結果、 α 、 β 、 γ -アミノ酪酸におけるアミノ基の位置による差は顕著ではなかった (Fig. 5-2)。Lentoら [82] はアミノカルボニル反応による着色度はアミノ基がカルボキシル基からもっとも離れた γ -アミノ酪酸が最も強いと報告しているが、DDMP 生成は γ 位より β 位にアミノ基をもつ β -アミノ酪酸とフルクトースの反応においてやや高くなる傾向にあった。着色度に関しても、フルクトースと反応するアミノ酸がアラニンである場合とアミノ酪酸である場合とは異なっていた (Fig. 5-3)。アラニンに関しては β 位にアミノ基がある方が値が大きくなったが、アミノ酪酸の場合は β 、 γ -アミノ酪酸の方が値が低くなった。

5-3 アミノ酸の炭素鎖の長さの相違による影響

炭素鎖の長さが DDMP 生成に及ぼす影響を検討するためにグリシン、 α -アラニン、 α -アミノ酪酸、 α -アミノカプロン酸、 α -アミノカプリル酸を各 1 mmol 用いてフルクトース 1 mmol と加熱した。その結果、 α -アラニンとフルクトースの反応において最も DDMP の生成量が多かった。次いで α -アミノ酪酸の場合が

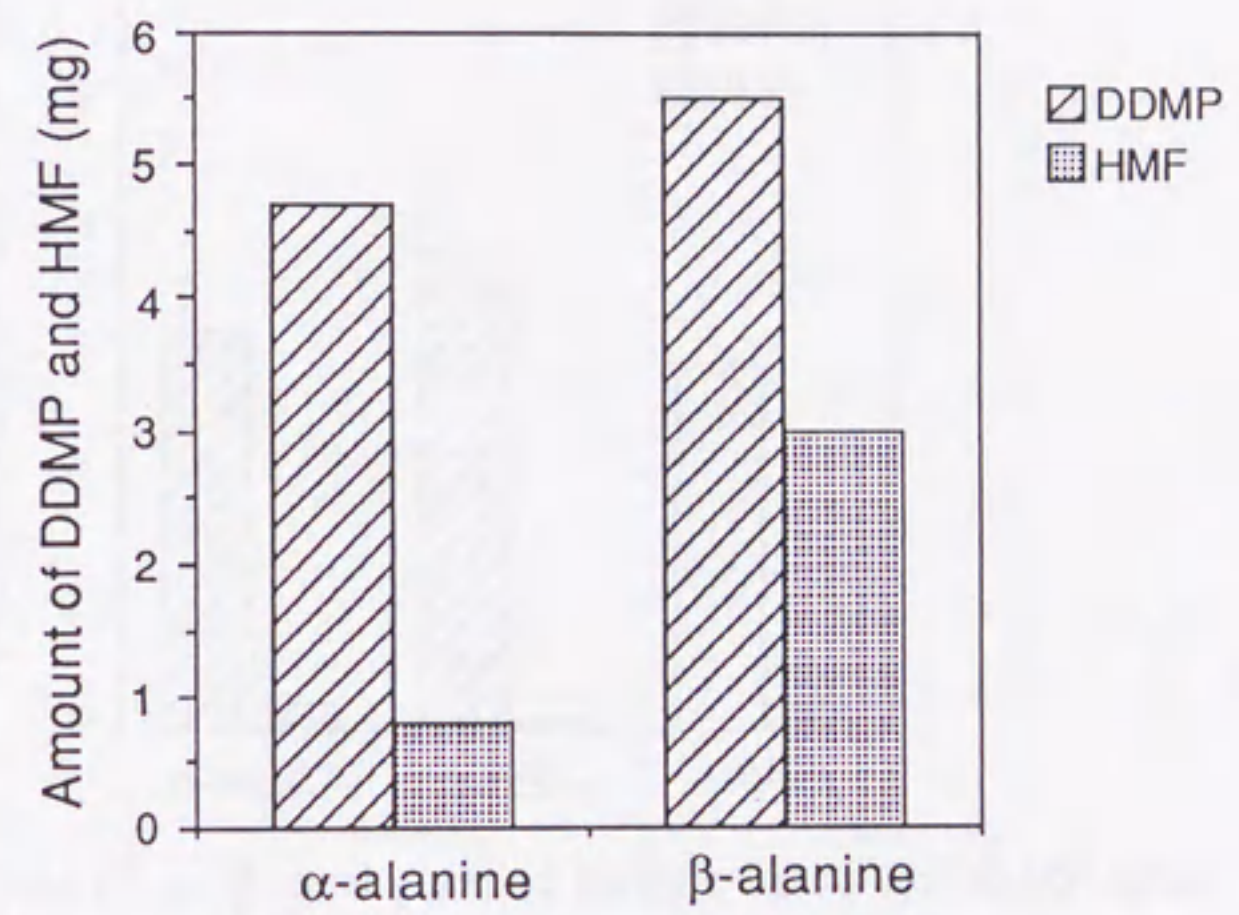


Fig. 5-1 Effects of α - and β -alanine on DDMP and HMF formation from fructose heated at 150°C for 10 min. DDMP; 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one, HMF; 5-hydroxymethylfurfural.

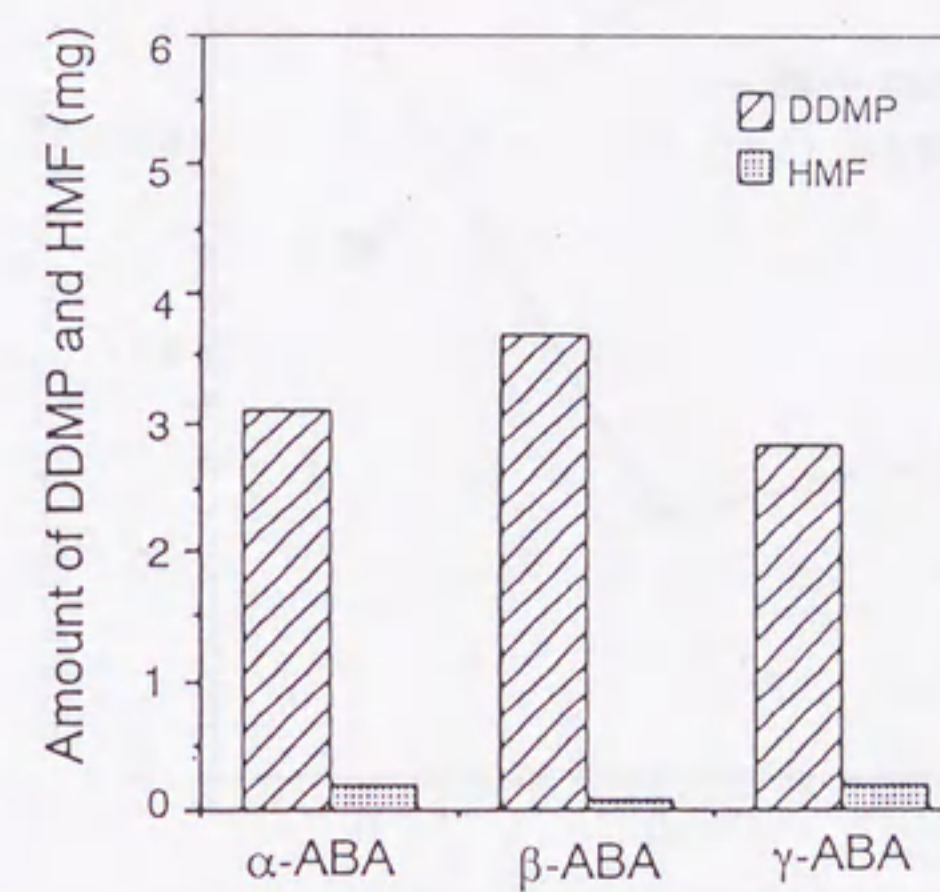


Fig. 5-2 Effects of α -, β - and γ -amino butyric acids on DDMP and HMF formation from fructose heated at 150°C for 10 min. DDMP; 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one, HMF; 5-hydroxymethylfurfural. α -ABA; α -amino butyric acids, β -ABA; β -amino butyric acids, γ -ABA; γ -amino butyric acids.

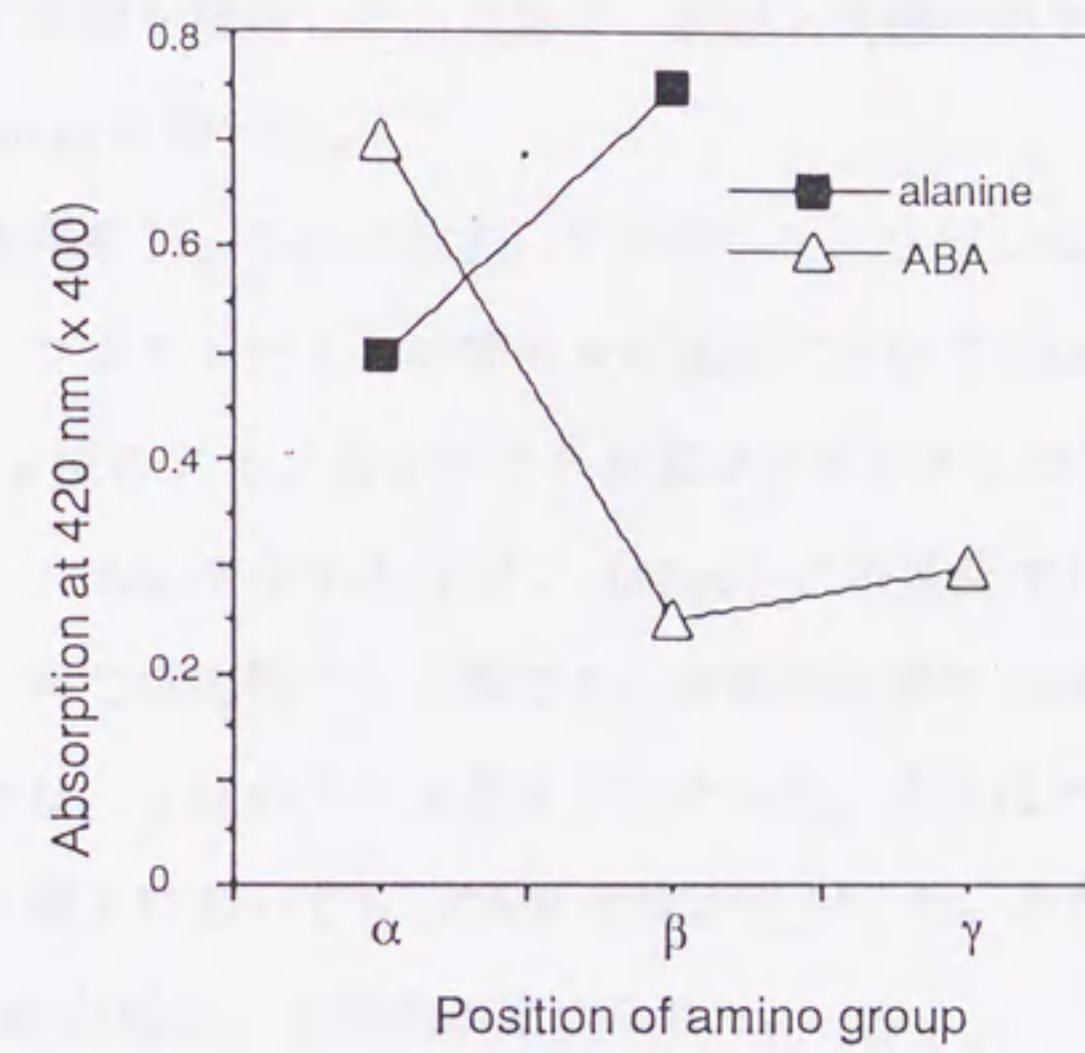


Fig. 5-3 Changes on UV (420 nm) absorption of α -, β - and γ -amino butyric acids (ABA).

多くなった。更に炭素鎖が長くなると DDMP 形成は減少する傾向が見られた (Fig. 5-4)。

5-4 アミノ酸及びアミノ酸誘導体による影響

アルギニン、ヒスチジン、リジン、及びその誘導体、プロリン、ヒドロキシプロリン、イミダゾールなど各種アミノ酸とフルクトースを用いて DDMP 生成に及ぼす影響を検討した。反応は、前記と同様に各アミノ酸 1 mmol とフルクトース 1 mmol を用いた。

その結果を Fig. 5-5 に示す。アルギニン、リジンの様な強い塩基性アミノ酸の場合は、フルクトースとの等モルの反応において DDMP の生成量が少なかった。しかし、 α 位のアミノ基をアセチル基でブロックした $N\alpha$ -アセチルアルギニン (AArg) や $N\alpha$ -アセチルリジン (ALys) との反応では DDMP の生成は顕著に増加した。同じ塩基性アミノ酸でも、遊離の状態では DDMP 生成量が多いヒスチジンの場合は、 α 位のアミノ基をアセチル化、またはベンゾイル化するといずれの保護基の導入においても DDMP 生成が減少した。また、DDMP 生成の減少と反対に HMF が増加する傾向が認められた。

複素環式アミノ酸であるヒスチジン、プロリンなどが他のアミノ酸と比べて比較的 DDMP 生成量が多いことから、ヒドロキシプロリン、イミダゾールについて検討した。その結果、ヒドロキシプロリンはプロリンと同様の DDMP 生成能を有していたが、イミダゾールに関しては DDMP 生成には顕著な影響は認められなかった。

5-5 糖に対するアミノ酸量の影響

5-5-1 アルギニンの場合

アルギニン 0 ~ 3 mmol とフルクトース 1 mmol をそれぞれ反応させ、DDMP と HMF の生成量を検討した (Fig. 5-6)。

その結果、DDMP 生成はアルギニン 0.2 mmol の場合が最も高くなった。しか

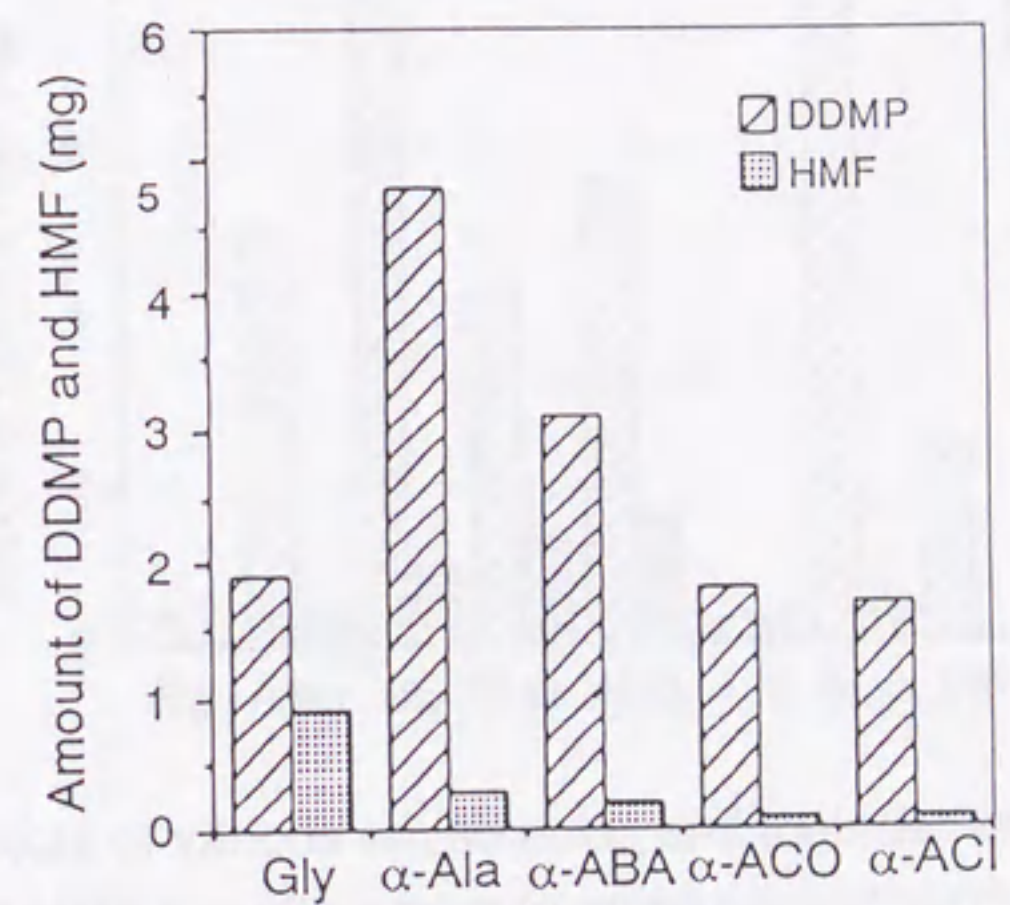


Fig. 5-4 Effects of various α -amino acids on DDMP and HMF formation from fructose heated at 150°C for 10 min. DDMP; 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one, HMF; 5-hydroxymethylfurfural. Gly; glycine, α -Ala; α -alanine, α -ABA; α -amino butyric acid, α -ACO; amino caproic acid, α -ACI; α -amino caprylic acid.

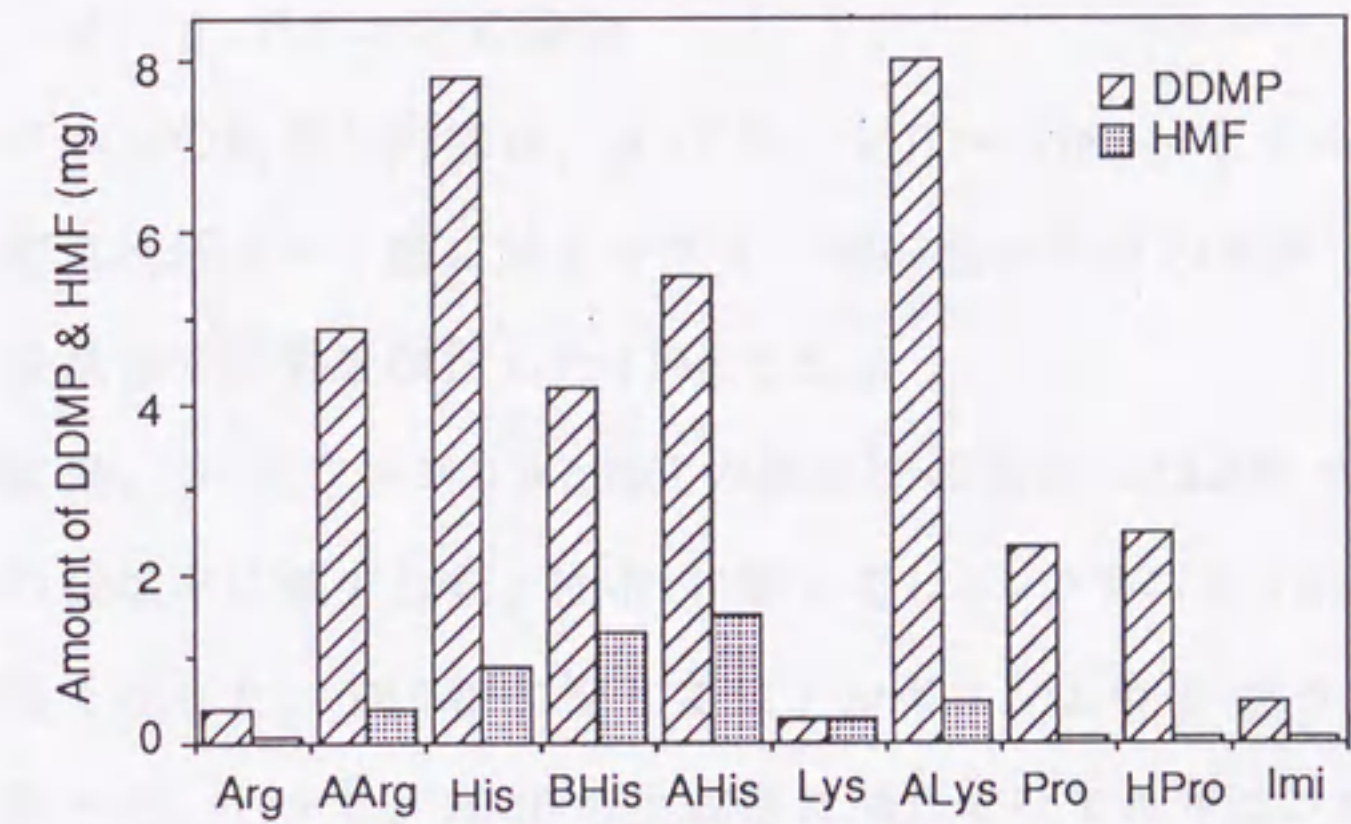


Fig. 5-5 Effects of various amino acids and their derivatives on DDMP and HMF formation from fructose heated 150°C for 10 min. DDMP; 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one, HMF; 5-hydroxymethylfurfural. Arg; arginine, AArg; acetyl-arginine, His; histidine, BHis; benzoyl-histidine, AHis; acetyl-histidine, Lys; lysine, ALys; acetyl-lysine, Pro; proline, HPro; hydroxy-proline, Imi; imidazole.

し、アルギニン量が 0.4 mmol を越えると急激に DDMP 生成量が低下した。

HMF の生成量は微量で、アルギニン量による変化は認められなかった。

420 nm での褐変度の測定ではアルギニン 1 mmol の場合まで急速に上昇するが、その後はアルギニン量が増加しても上昇率は緩慢であった。

5-5-2 β -アラニンの場合

アルギニンの場合と同様に、 β -アラニン 0 ~ 3 mmol とフルクトース 1 mmol をそれぞれ反応させて糖に対するアミノ酸の混合比が DDMP と HMF 生成、及び褐変度に及ぼす影響を検討した (Fig. 5-6)。

その結果、 β -アラニン 0.6 mmol の混合比の場合に DDMP の生成量は最大となり、その後徐々に減少した。HMF に関しては β -アラニン 1 mmol の場合最も生成量が高くなった。DDMP に関してはアルギニンより β -アラニンの生成量の方が多くなった。しかし、HMF の生成量に関してはアルギニンではほとんど検出されなかった。

5-6 考察

Lento ら [82] はアミノカルボニル反応は α 位より末端位にアミノ基をもつアミノ酸の方が褐変し易いと報告している。今回の DDMP 生成の場合もアラニンに関しては、 β -アラニンとフルクトースの反応において着色度が高くなった。また、 β -アラニンとフルクトースの反応からの DDMP 生成の方が、 α -アラニンの場合からより DDMP 生成は多くなった (Fig. 5-1)。

しかしながら、アミノ酪酸に関しては Fig. 5-2 に示すように、 β -アミノ酪酸とフルクトースの反応において α や γ -アミノ酪酸の場合より DDMP が高くなる傾向があった。褐変度 (抽出液) に関しては α -アミノ酪酸が最も高く、 β や γ -アミノ酪酸で低くなった (Fig. 5-3)。しかし、加熱反応後の混合物の肉眼的な着色は、 α -アミノ酪酸より β や γ -アミノ酪酸の方が黒変し、反応が進んでいるように見受けられた。これらの結果から、アミノ酪酸に関してはアミノ基とカルボキ

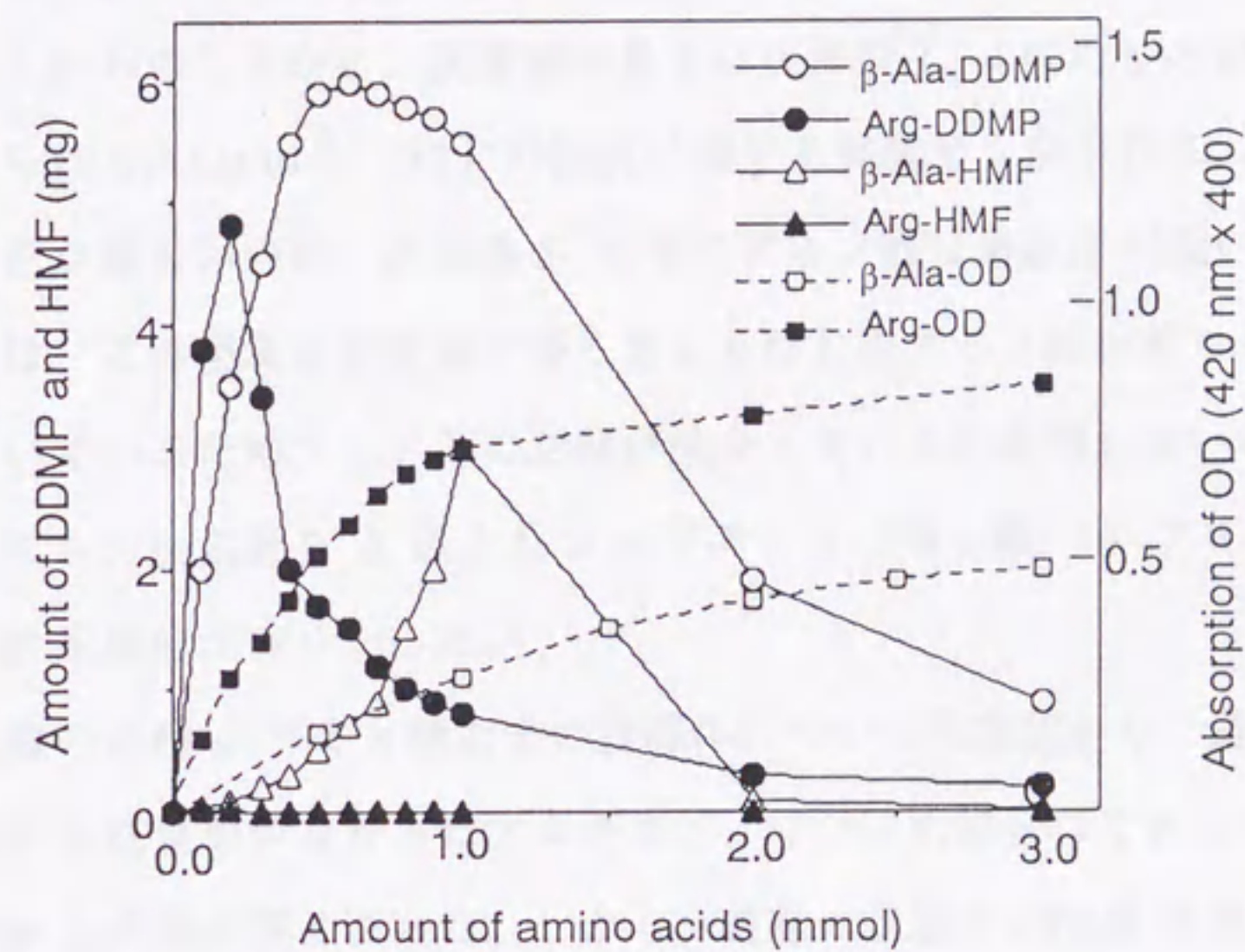


Fig. 5-6 Effects of basic and neutral amino acids on the DDMP formation and the color in the reaction of amino acids and fructose heated at 150°C for 10 min. DDMP; 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one, β -Ala-DDMP; the amount of DDMP from the reaction of β -alanine and fructose, Arg-DDMP; the amount of DDMP from the reaction of arginine and fructose, β -Ala-HMF; the amount of HMF from the reaction of β -alanine and fructose, Arg-HMF; the amount of HMF from the reaction of arginine and fructose, β -Ala-OD; OD of the extracts from the reaction of β -alanine and fructose, Arg-OD; OD of the extracts from the reaction of arginine and fructose.

シル基の距離に相関は認められなかった。また、両末端にアミノ基がある場合に比べ炭素鎖の中間にアミノ基がある場合の方が DDMP 生成において反応性が高かった。

α 位にアミノ基をもつアミノ酸に関して炭素鎖の長さが DDMP 生成に及ぼす影響を見ると、アラニンとフルクトースの反応において最も DDMP 生成量が多くなった。しかし、それ以上に炭素鎖が長くなると DDMP 生成量が少なくなった。これらのことから、炭素鎖の長さは炭素数 3、4 個のものが反応性が高いと考えられる。Lento ら [82] の褐変に関する実験でも炭素数 3、4 個のアミノ酸が着色が最も強いが、炭素数 5、6 個のアミノ酸は着色度が低いと報告している。彼らは、この現象を炭素鎖が長くなるとむしろアミノ基がカルボキシル基により近づいているためアミノ基の影響が減少していると説明している。今回の実験においても、炭素数を 5 以上もつ α -アミノカプロン酸、 α -アミノカプリル酸は DDMP 生成量が少なかった。

遊離の各種 α -アミノ酸とその誘導体についての実験から、遊離の状態では DDMP 生成量が少なかったアルギニン、リジンの場合はそれらのアセチル体では DDMP 生成量が高くなった。しかし、遊離の状態では DDMP 生成量が多いヒスチジンの場合は、アセチル基、ベンゾイル基のいずれの誘導体とフルクトースの反応においても DDMP の生成量は少なくなった。プロリンに関しては、ヒドロオキシプロリンと DDMP 生成量に大きな差は認められなかった。

一般に塩基性アミノ酸はアミノカルボニル反応を促進すると報告されている。しかし、アルギニン、リジンにおいてこの法則が当てはまらなかった。そこで、更に詳しく DDMP の生成を、糖に対する使用量を変化させることで検討すると、アルギニンの場合はフルクトース 1 mmol に対して 0.2 mmol の場合が最も DDMP 生成量が高くなった。一方、アラニンの場合は 0.6 mmol の場合が最も生成量が高くなった。このことから、クッキーのモデル実験としての 10 分、150 °C の加熱反応においてフルクトースと等モルのアルギニンではアルギニン量が多すぎると推定される。リジン、アルギニンは、糖との反応に参与するアミノ基を 2 個有

[Faint, illegible Japanese text]

するため反応が速く進行し、10分加熱ではDDMP量は少なくなったと考えられる。また今回は触れていないが、アミノ基のpKa値がDDMP生成に関与しているのかも知れない。

以上のことから、DDMP生成に最も効率のよいのはβ-アラニンであるが、コスト面で食品添加物として用いるには問題がある。α-アラニンの添加はコスト面、供給面からも添加物として適当であるし、DDMP生成に有効であると考えられる。

第6章 DDMP 生成に対するpHの影響について

要約

DDMP 生成に及ぼす pH の影響を検討するために pH 3 ~ 9 に調製したオボアルブミンとフルクトースを混合して加熱反応を行った。また、グルタミン酸とフルクトースの混合物に炭酸水素ナトリウムを 0 ~ 3 mmol 添加し、同様に加熱反応を行った。その結果、pH 6.0 付近で最も DDMP の生成量が多くなった。これらのことから、DDMP が効率よく生成される pH は中性付近であることが明らかになった。

6-1 序

糖とアミノ酸の反応は、一般的に pH によって種々の影響を受けるといわれている。今回の実験においても、DDMP の生成がタンパク質やアミノ酸の種類によって大きく異なっていた。特に塩基性アミノ酸であるヒスチジン、アルギニン、及び中性アミノ酸であるアラニン、プロリンなどのアミノ酸と糖との反応で最も顕著に DDMP が生成され、また、アスパラギン酸、グルタミン酸など酸性アミノ酸から HMF が多量に生成されることから、DDMP、HMF 生成に及ぼす糖とアミノ酸の反応時における pH について検討した。

6-2 pH を調整したオボアルブミンとフルクトース混合物からの DDMP の生成

100 mg のオボアルブミンを試験管に入れ、0.1N-塩酸、及び水酸化ナトリウム水溶液を用い pH 3 ~ 9 に調整し、その後凍結乾燥した。凍結乾燥した各 pH のオボアルブミンに 1 mmol のフルクトースを加え、前法と同様に 150 °C で 10 分間

加熱し、DDMP、HMFの形成を検討した。

その結果、Fig. 6-1に示すようにpH 3の場合はHMFが優先的に形成され、DDMPは僅かに形成されたのみであった。しかし、pH 4以上の反応ではHMFの生成量は急激に少なくなり、pH 5以上になるとDDMPの生成量の方が多くなった (Fig. 6-1)。pH 調整を行わなかったオボアルブミンと糖との反応における経時変化はFig. 6-2に示すように増加のみであった。

6-3 フルクトースとグルタミン酸の混合物への炭酸水素ナトリウム添加効果

フルクトースとグルタミン酸を各1 mmolずつ混合したものに、炭酸水素ナトリウムを0~3 mmol添加しDDMPに及ぼす影響を検討した (Fig. 6-3)。

その結果、炭酸水素ナトリウム0.5 mmol添加の場合が最もDDMPの生成量が多くなり、その時のpHは6.0であった。しかし、さらに添加量が増加してもDDMPの生成量は増加せず、むしろ減少傾向がみられた。このことから、DDMPの生成に関しては、反応時におけるpHが必ずしもアルカリ側である場合にその生成量が増加するのではないことが確認された。また、420 nmでの吸収は炭酸水素ナトリウム添加量が1 mmolの時に最も褐変が強くなった。しかしながら、それ以上添加量が増加するとDDMPと同様に減少する傾向にあった。

6-4 考察

水系でのアミノカルボニル反応において、酸性 (pH 2以下)、またはアルカリ性下 (pH 9以上) では反応は加水分解の方に傾き結合は起こりにくいが、中性付近 (pH 4~9) では還元性基とアミノ基との間に縮合が起こり、模式的に示すとFig. 6-4のようになるといわれている [83]。これによると、まず最初に窒素配糖体の縮合物が生成され、その後アマドリ転移を起こす。このアマドリ転移反応

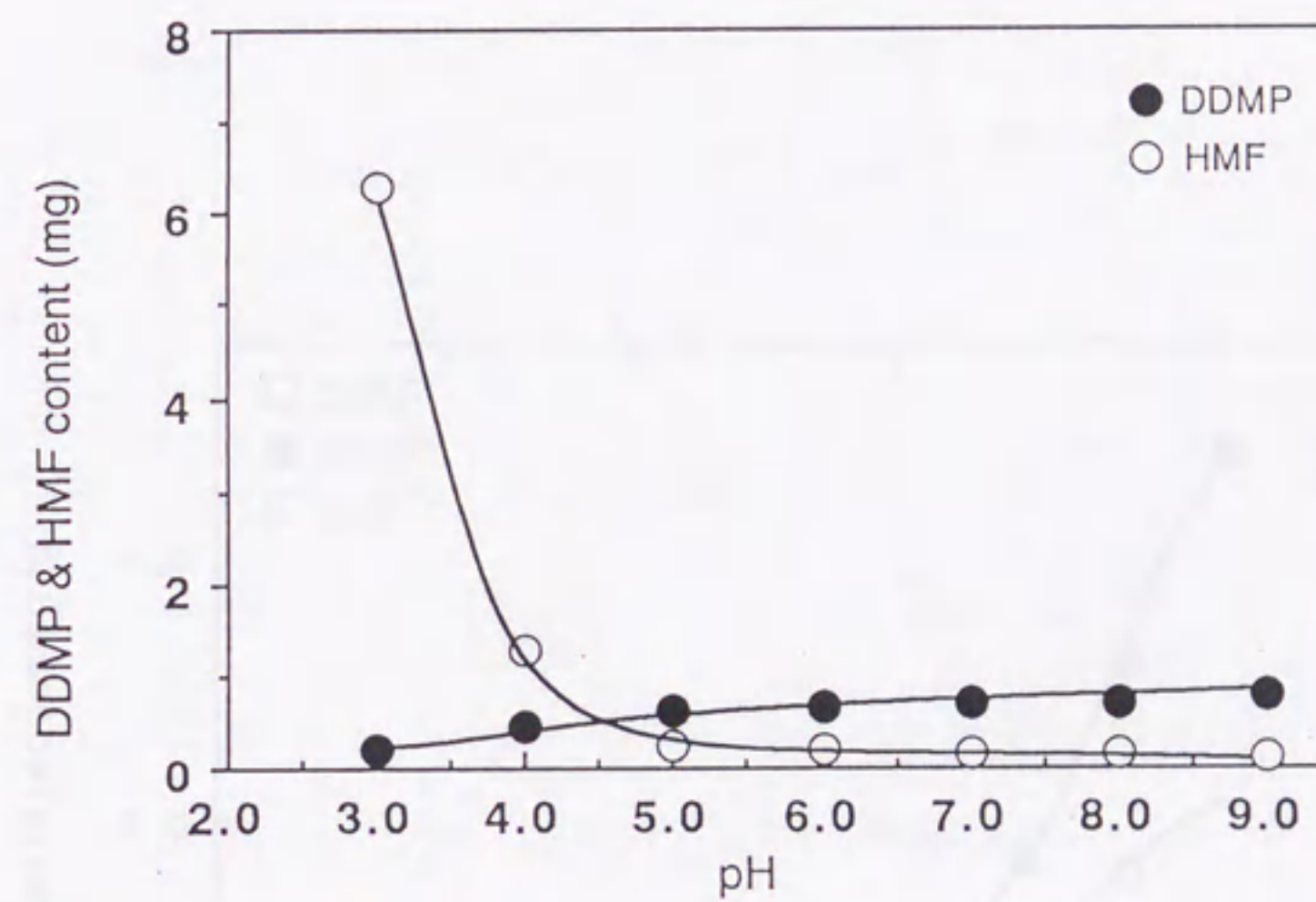


Fig. 6-1 Formation of DDMP and HMF from fructose with Ovalbumin prepared from pH 3 to 9

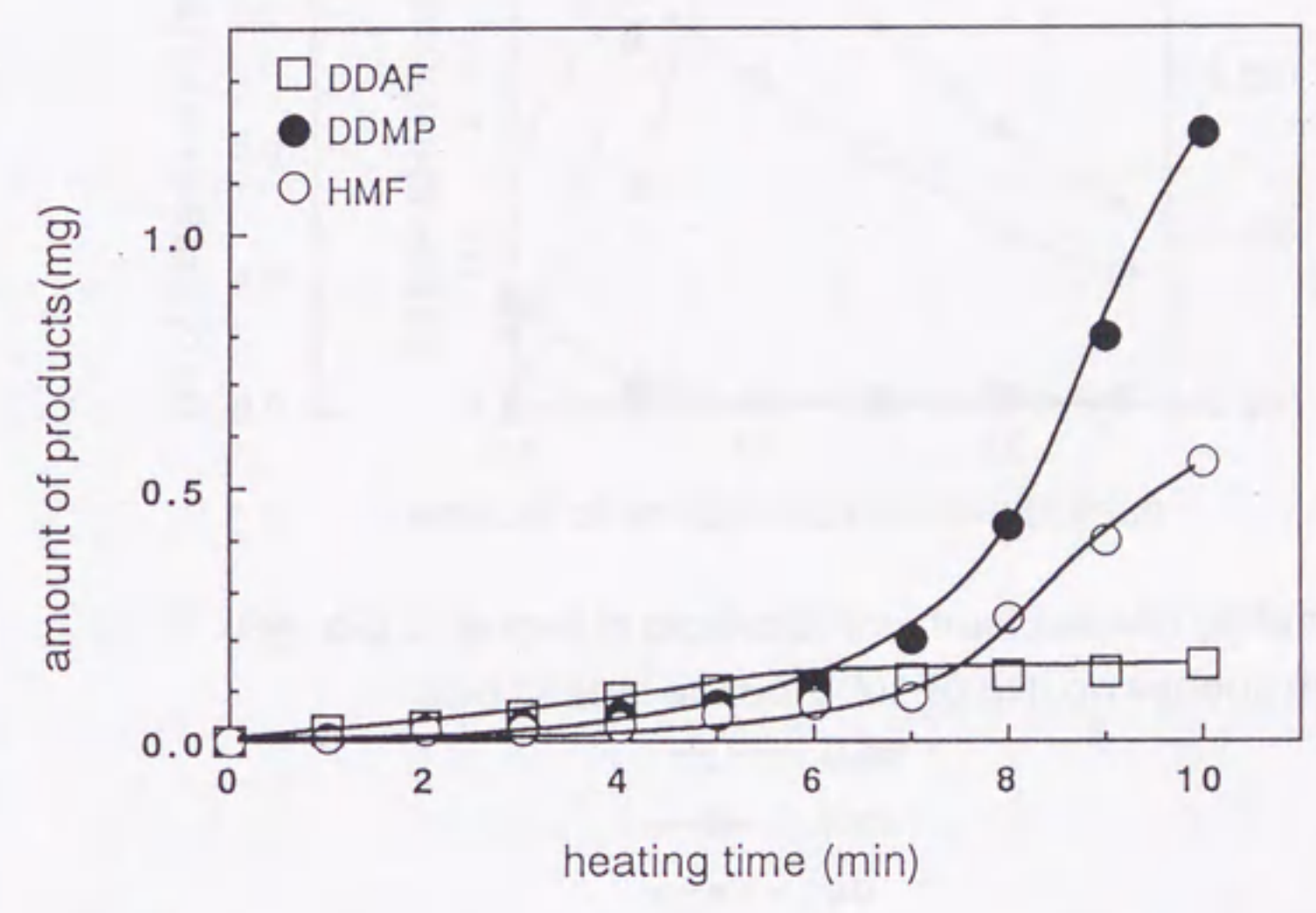
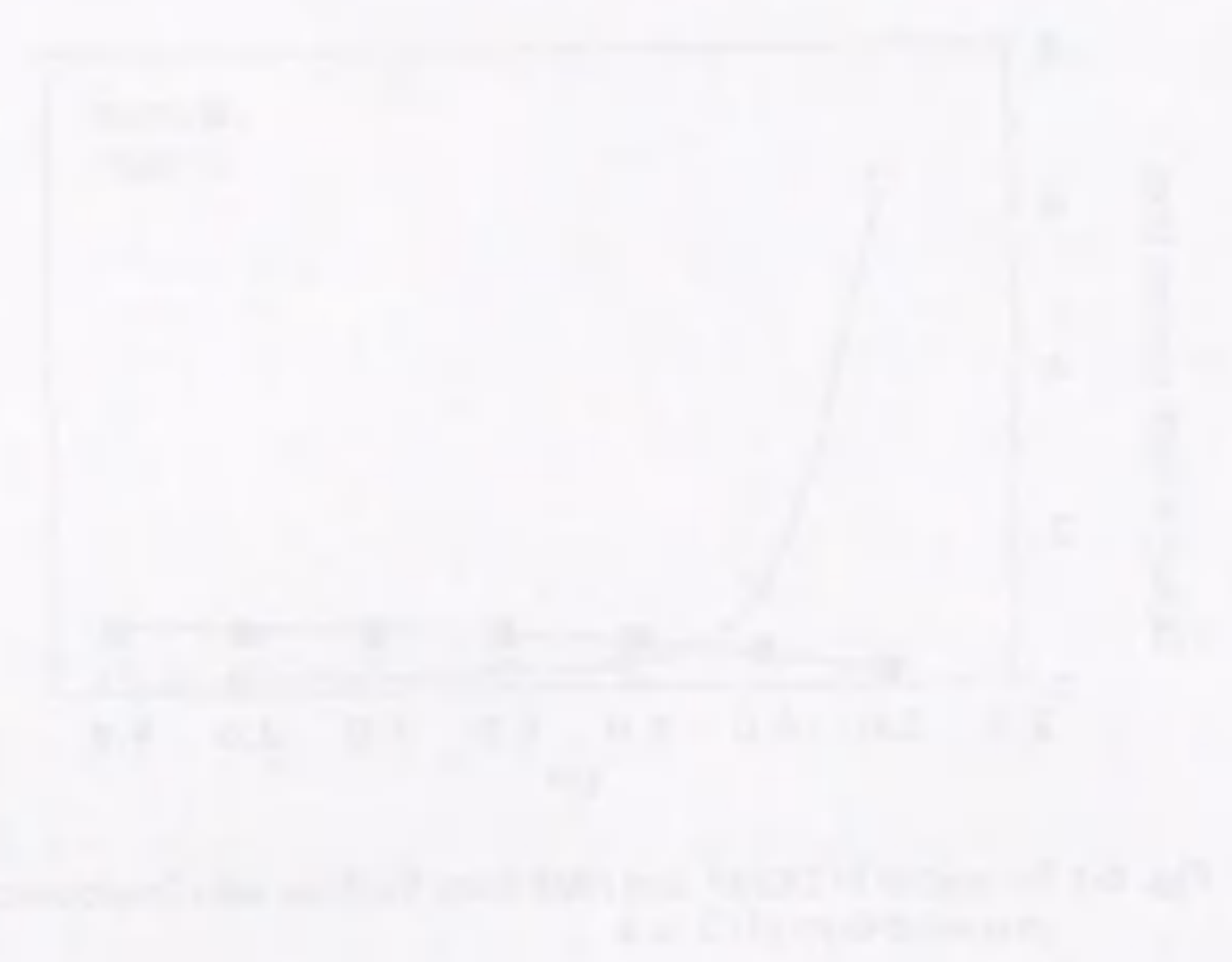


Fig. 6-2 Amount of the products from fructose with Ovalbumin heated at 150 °C for 10 min

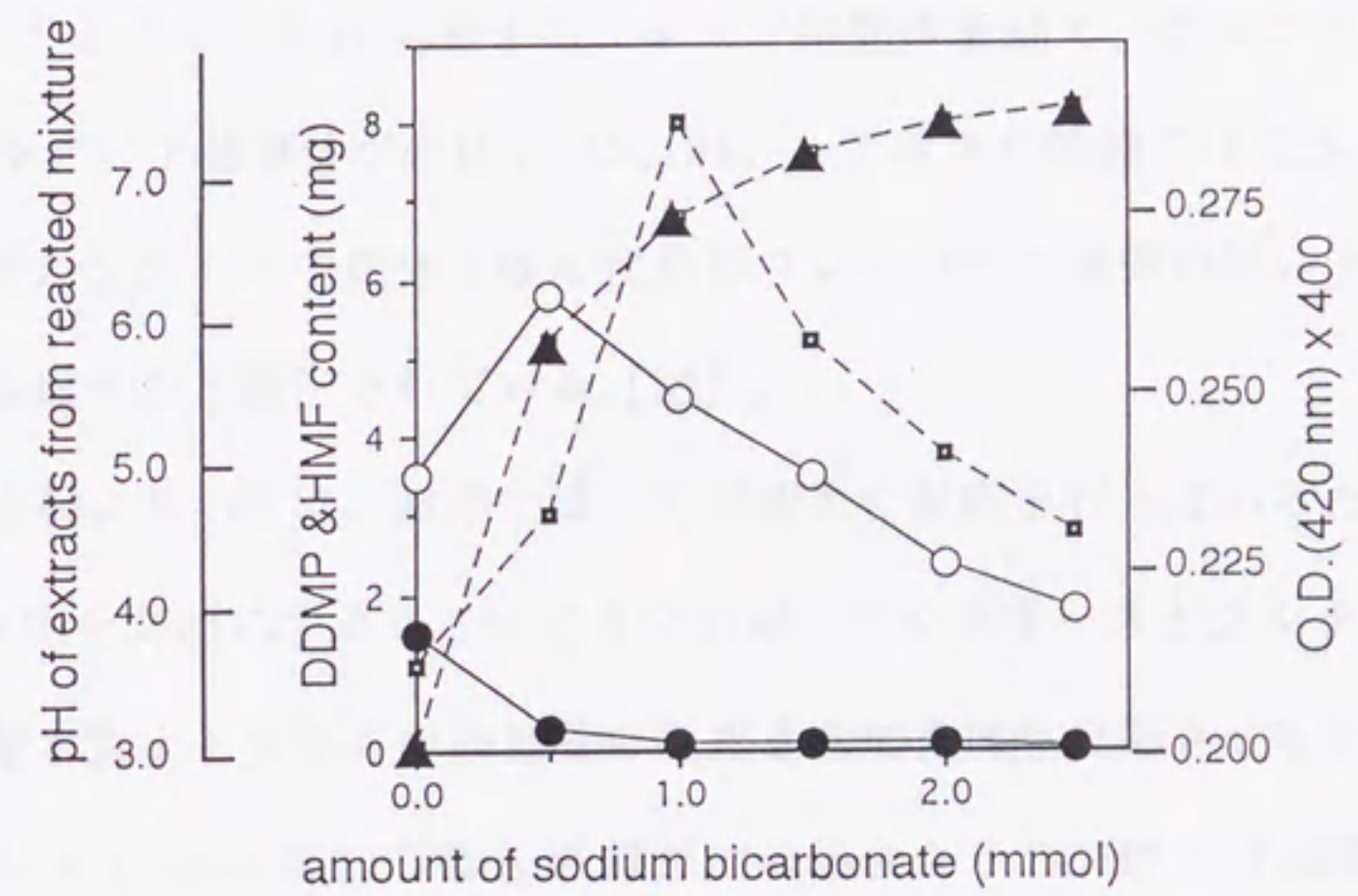
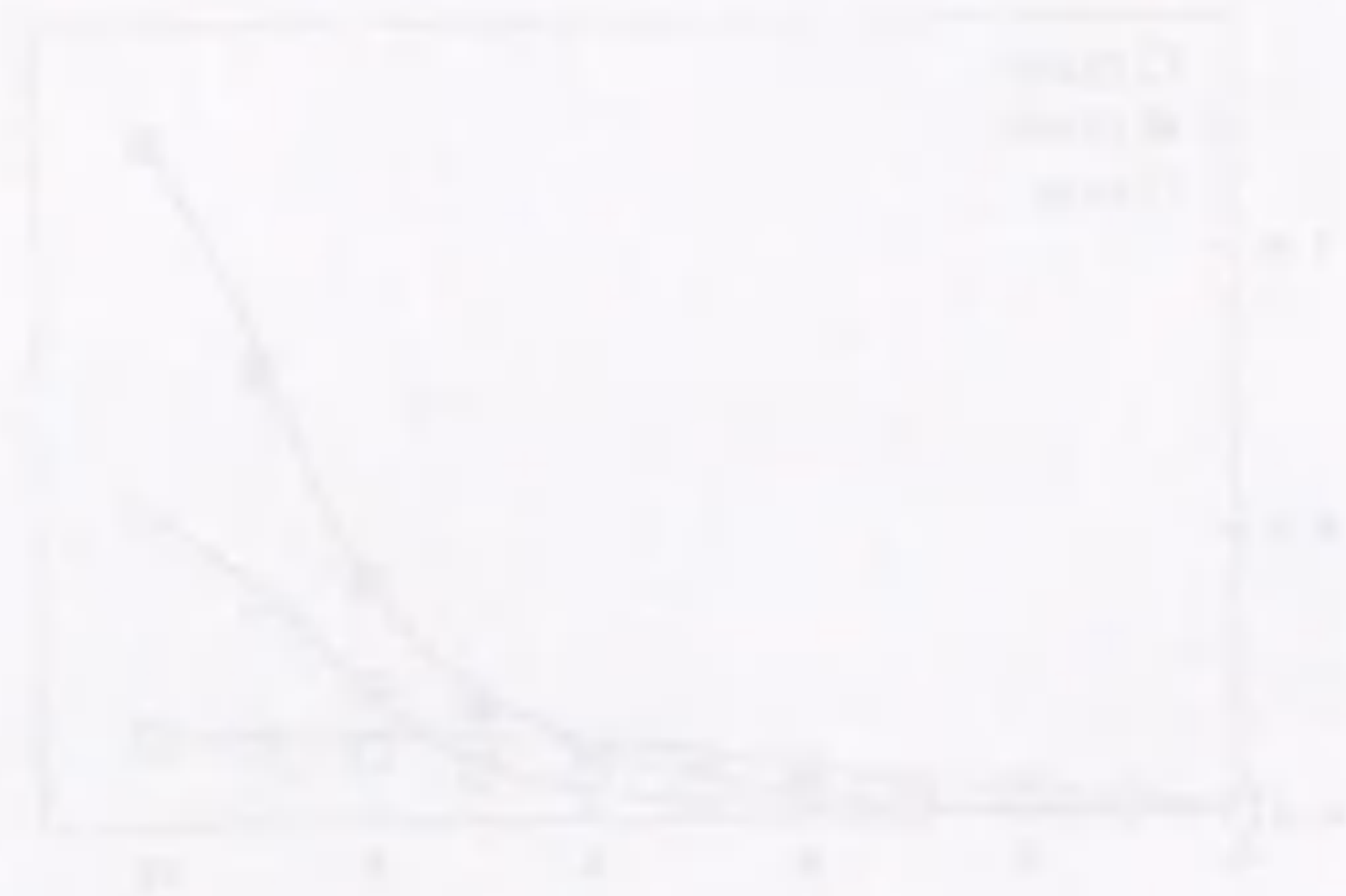


Fig. 6-3 Changes in products from fructose with glutamic acid heated at 150°C for 10 min on various pH.

- DDMP
- HMF
- O.D.
- ▲ pH

は Fig. 6-5 に示すように、窒素配糖体のシッフ塩基がエノール化し、アルドースからケトースの 1-アミノ誘導体を生ずる反応である [84]。このエノール化はシッフ塩基の pK_a 値が 5 ~ 7 であるために中性付近で容易にプロトン化を受け、次いで 1,2-エナミノールが生ずることによる。すなわち、アミノ基の関与によって還元糖がエノール化しやすくなると考えられる。一般的に、酸性側では Fig. 6-5 の 1,2-エナミノールから 3-デオキシオソン中間体を経て、フルフラールやピロール-2-アルデヒド誘導体が生成し [8, 84]、アルカリ性側では 2,3-エンジオールからメチルジケトン中間体を経て食品のフレーバーに関係の深い 3-フラノン誘導体が生成すると報告されている [85]。

今回の実験においては、水系ではなく固相系で反応を行っているため、一概に pH や pK_a 値を問題にすることはできないが、フルクトースとグルタミン酸の混合物に炭酸水素ナトリウムの添加量を変化させ加え加熱反応させると、炭酸水素ナトリウム 0.5 mmol 添加の場合が無添加の場合より DDMP の生成量が多くなった。加熱反応させた試料に蒸留水 1 ml を加え、その pH を測定すると pH 6.0 付近であった。これらのことから、固相系において炭酸水素ナトリウムを添加して pH が中性付近になると、DDMP の生成量が 1/3 増加したと考えられる。しかし、アルギニン (pK_a 値 10.75) やヒスチジン (pK_a 値 7.59) の様に高い pK_a 値のアミノ酸とフルクトースの反応からも DDMP 生成が多いことから、固相系においては pK_a 値や pH 値とは異なる要因も考えられる。いずれにしても、フルクトースと中性アミノ酸や塩基性アミノ酸との加熱反応から DDMP が多く生成されたことから、これらの反応においては 2,3-エンジオールを経由する反応が優先されるものと考えられる。

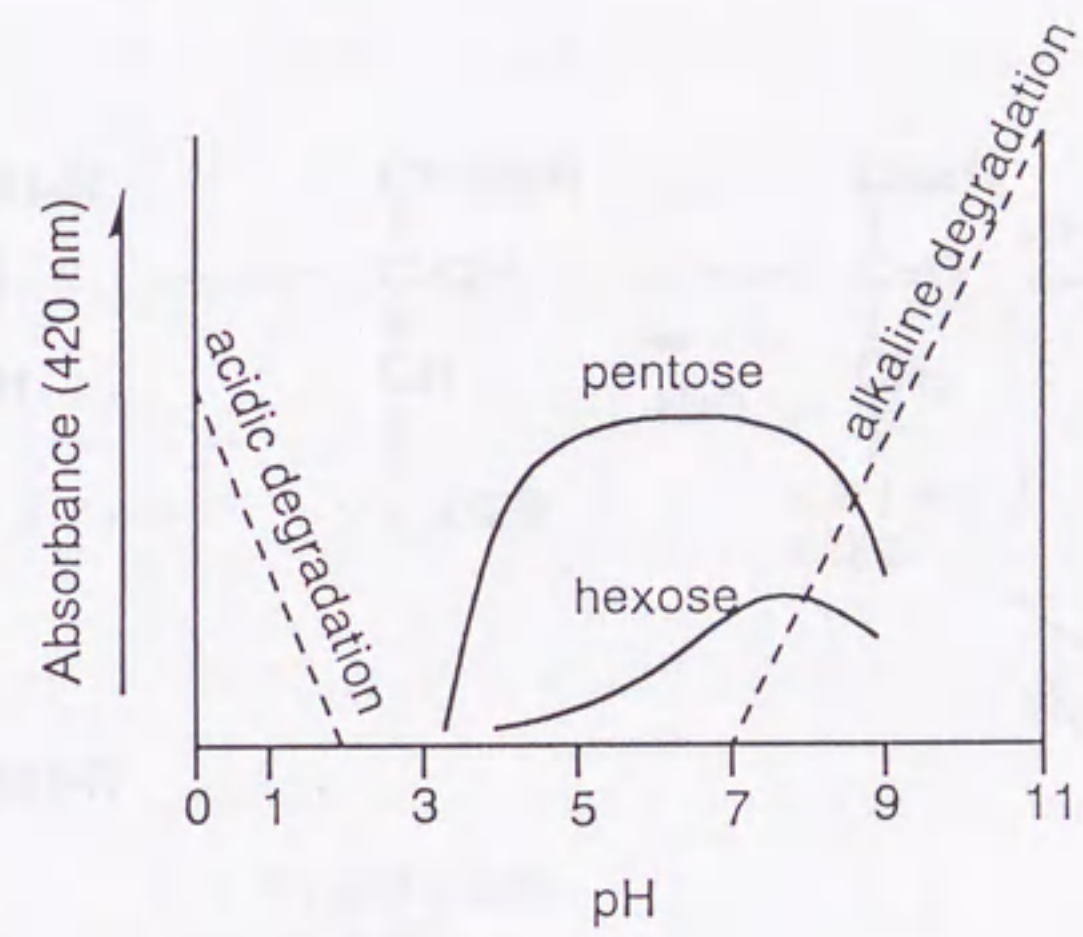


Fig. 6-4 Relation of pH to degradation and browning of sugar in Maillard reaction (並木ら, 1980).

— browning
 ---- degradation

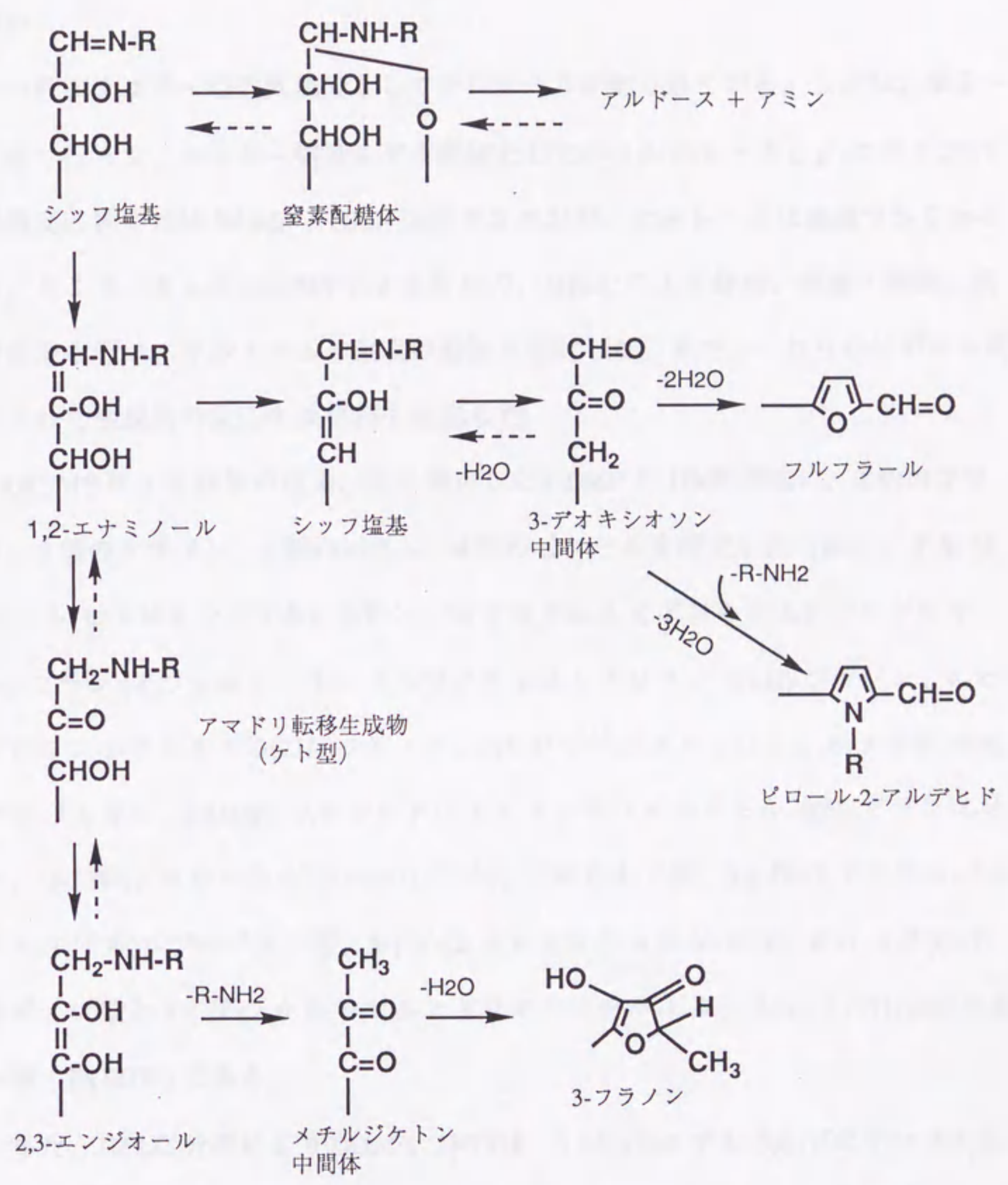


Fig. 6-5 アルドースとアミンによる反応の主要経路 (Kato et al. 1977)

第7章 焙焼クッキー中のフレーバーの成分

要約

一般にクッキーの香気成分としてマルトールが知られている。しかし、第2～5章で行った、クッキー焙焼モデル実験としてのフルクトースと β -アラニンの加熱反応物中には DDMP と HMF は検出されたが、マルトールは確認できなかった。そこで、さらに GC-MS による分析や、HPLC による分析、単離・精製、及び同定を行い、マルトールの生成の有無を検討した。また、これらの分析から同定された生成物の反応生成経路を推定した。

GC-MS による分析の結果、先に同定した DDMP や HMF の他に、2個のフラン、2個のフラノン、3個のピラン、4個のピロールを同定した [86]。すなわち、2-(ヒドロキシメチル)-フラン、2-(アセチル-3-ヒドロキシ-4,5-ジヒドロキシ)-フラン (イソマルトール)、2,5-ジメチル-4-ヒドロキシ-3(2*H*)-フラノン、4-ヒドロキシ-2-アセチル-3(2*H*)-フラノン、2,3-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-6-メチル-4(*H*)-ピラン-4-オン、DDMP、2,3-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-6-ホルミル-4(*H*)-ピラン-4-オン、3-{*N*-(2-ホルミル-ピロール-1-イル)}-プロピオン酸、3-{*N*-(2-アセチル-ピロール-1-イル)}-プロピオン酸、3-{*N*-(2-ホルミル-5-メチル-ピロール-1-イル)}-プロピオン酸と 3-{*N*-(2-ホルミル-5-ヒドロキシメチル-ピロール-1-イル)}-プロピオン酸 (3NFHP) である。

また、HPLC 分析により DDAF、3NFHP、3-{*N*-(2-メチル-3,6-ジヒドロ-4,5,6-トリヒドロキシルピリジニル)}-プロピオン酸 (3NMDTP)、3-デオキシグルコン (3DG) を同定した [66、80、81、86]。

この系では、DDMP が最も多く生成された [66、80、81、86]。一般的に、クッキーの香気物質とされているマルトール [55、62] は、GC-MS と HPLC 分析

のいずれにおいても検出できなかった。

7-1 序

従来、食品の加熱フレーバーの研究は GC-MS を用い分析、構造決定が行われてきた。また、これらの研究においては糖とアミノ酸を用いたモデル実験で行われることが多かった。アミノ酸としては α -アラニン [87]、 β -アラニン [88]、グリシン [89、90]、プロリン [57、91] など種々のアミノ酸が用いられてきたが、基質として用いられる糖はグルコースが主流を占めていた。

今回は基質の糖としてフルクトースを用い、アミノ酸としては最も DDMP を生成した β -アラニンを用いモデル実験を行った。また、実際のクッキー原材料を用いた実験も行い、これらの反応から得られた各種のフレーバー物質について HPLC、GC-MS、FAB-MS などにより分析した。

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

各種のアミノ酸や糖との加熱反応から生じる物質について検討するために、クッキー焙焼のモデルとしてフルクトースと β -アラニンを加熱反応させ、その反応生成物をジクロールメタン 1 ml で抽出し、GC-MS を用いて分析した (Fig. 7-1)。

その結果、2 個のフラン、2 個のフラノン、3 個のピラン、4 個のピロールが同定された (Table 7-1)。グルコースとアミノ酸の反応からのピロール化合物の生成はすでに報告されている [92、93、94、95]。しかしながら、早瀬と加藤 [96] はグルコースとアミノ酸の反応からのピロール化合物の生成は、糖とアミノ酸によるアマドリ転移を経て 3-デオキシグルコソンを形成し、その後アミノ酸が C2 に再度結合し、ピロール化合物を形成すると報告している。しかし、今回のフル

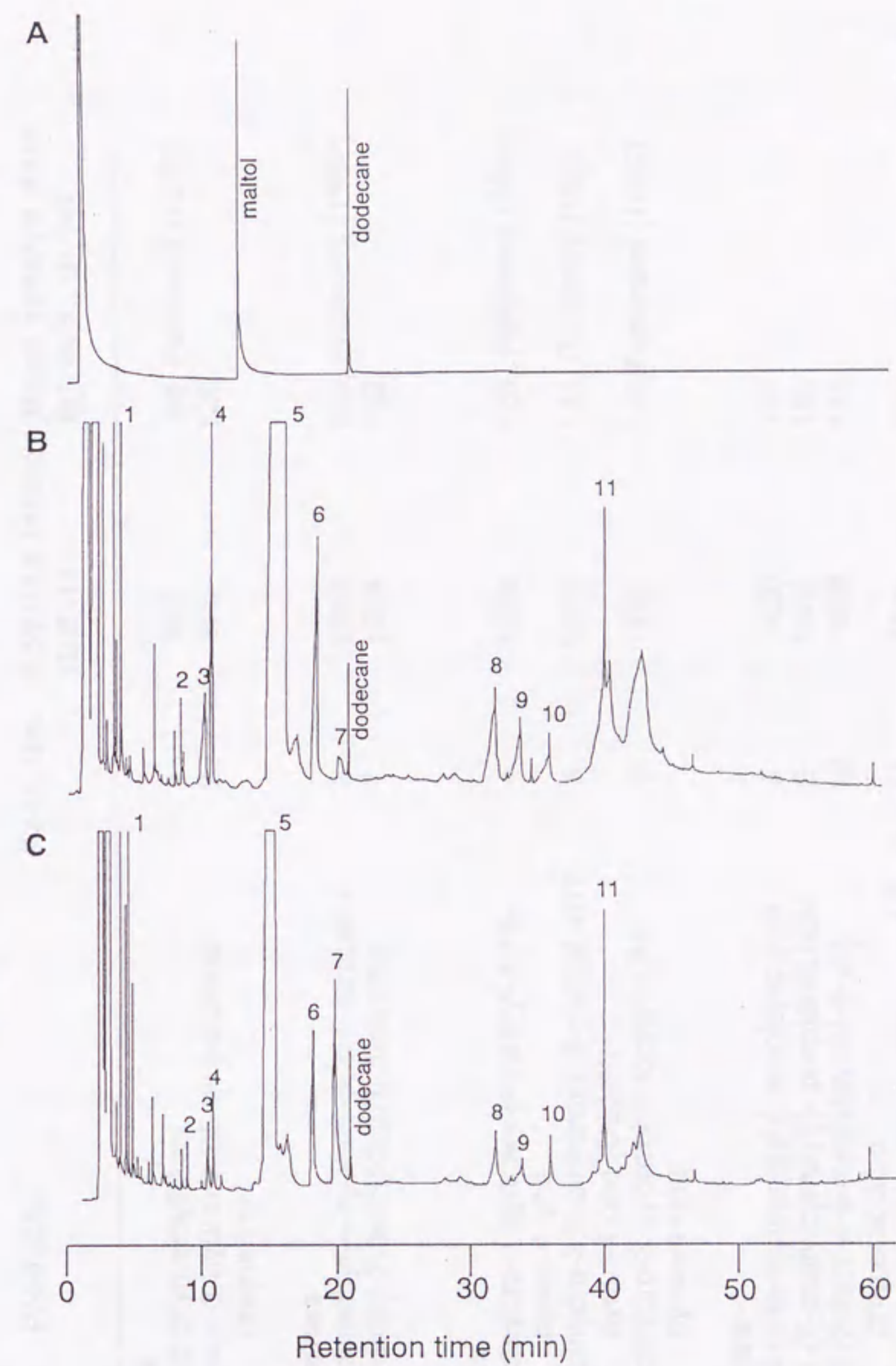


Fig. 7-1 Gas chromatogram of authentic sample and model system extract. A; maltol, B; the extracts from the reaction of fructose and β -alanine, C; the extracts from the reaction of glucose and β -alanine. GC column; a 30 m x 0.25 mm (i.d.) fused silica capillary column bonded and cross-linked with DB-1 (film thickness 0.25 μ m), temperature program; 50 $^{\circ}$ C for 8 min, 50-250 $^{\circ}$ C at 4 $^{\circ}$ C/min, isothermal hold at 250 $^{\circ}$ C. Internal standard is dodecane.

Table 7-1 Compounds of the Volatile Flavor Identified in the Reaction of Fructose and β -Alanine

Products	Peak No.	Kovates Index (DB-1)	Mass spectra data, M^+ m/e , or ref
furans			
2-hydroxymethylfuran	1	865	98, Parliment (1992)
2-acetyl-3-hydroxy-4,5-dihydrofuran (isomaltol)	2	995	126
furanones			
2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2 <i>H</i>)-furanone	3	1030	128, Parliment (1992)
4-hydroxy-2-acetyl-3(2 <i>H</i>)-furanone	7	1093	142
pyrans			
2,3-dihydro-3-hydroxy-6-methyl-4(<i>H</i>)-pyran-4-one	4	1036	126, Parliment (1992)
2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(<i>H</i>)-pyran-4-one (DDMP)	5	1123	144, Parliment (1992)
2,3-dihydro-3-hydroxy-6-formyl-4(<i>H</i>)-pyran-4-one	6	1165	142, Parliment (1992)
pyrroles			
3-[N-(2-formylpyrrolyl)]-propionic acid	8	1450	167
3-[N-(2-acetylpyrrolyl)]-propionic acid	9	1508	181
3-[N-(2-formyl-5-methylpyrrol-1-yl)]-propionic acid	10	1568	181
3-[N-(2-formyl-5-hydroxymethylpyrrol-1-yl)]-propionic acid	11	1700	197

クトースとアミノ酸との反応からは、ピロール化合物が反応初期段階において速やかに形成されることか、3-デオキシグルコソンを經由しない経路が推測された。DDMPは最も多く生成され、一般的にクッキーの香気成分として報告されているマルトール [54、62] については、先の HPLC 分析の結果と同様、その生成を確認することができなかった。以上の結果から、クッキーの主たる加熱生成物は DDMP であると考えられた [80、81、86、97、98]。

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の生成の有無

マルトールは3-ヒドロキシ-2-メチル-4(H)-ピラン-4-オンの構造をもち、一般的に甘い香気を有し、カラメル様のフレーバーを示すものとして知られている。マルトールは食べ物の品質を向上させるために、香料として食品加工にも用いられている。Patton [99] はマルトースまたはラクトースをグリシンと水溶液中で加熱した際に、マルトールの生成を確認したと報告している。また、Hodge [45] は、マルトールは糖から非酵素的に形成されるとし、その形成メカニズムも報告している。長い間、マルトール [55、62] はクッキーのモデルシステムにおいて主要な生成物であるとして注目されてきた。しかし、近年、アミノカルボニル反応に関する研究の中で、マルトールを検出した報告はほとんどみられない [100、101]。HPLC を用いた著者のクッキー焙焼についてのモデル実験では、マルトールはほとんど確認できなかった [66、81、86]。また、GC を用いた実験においても、Kovats Index (1065.4) [97] の位置にマルトールのピークが確認できず、GC-MS においてもマルトールの生成は認められなかった。Yaylayan と Mandeville [44] は、マルトールはアマドリ化合物の MS 測定中エレクトリック・インパクトによっても生じる、すなわち、マルトールは二次的生成物である

と報告している。

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

β -アラニン 89 mg とフルクトースまたはグルコース 180 mg の混合物を 150 °C で 4~8 分間加熱した。その結果、この反応において生成される香気物質は、グルコースよりもフルクトースを用いた方が多かった (Fig. 7-2)。フルクトースを用いた場合、DDMP は、4~6 分の間に最も生成したが、加熱時間が 8 分を越えると DDMP 形成は減少した。グルコースと β -アラニンの場合、加熱時間が長くなるにしたがって徐々に増加していった。この結果、フルクトースと β -アラニンの反応は、グルコースと β -アラニンの反応よりかなり速く進行していることが推測された。

β -アラニンを添加したフルクトース、またはグルコースから形成される主たる物質は同じであった。しかし、それぞれの物質の生成量は 2 つの反応の間で相当異なっていた。Fig. 7-3 は両方の反応系における主な生成物の形成についての推定メカニズムである。構造中にメチル基をもつ生成物の 5 と 6 は、フルクトースを使用することによって、より多く生成された。他方、生成物 7 はグルコースと β -アラニンの反応中に生じる重要な物質である。この結果は、フルクトースのアミノカルボニル反応がグルコースの反応と異なることを示している。グルコースの反応はアマドリ化合物を経由することを示唆しているが、フルクトースの反応はハインズ転移 [10, 102] を経由していることが推測される。ハインズ経路とはフルクトースなどのケトースとアミノ基を有するアミノ酸、ペプチド、タンパク質などの物質の間で生ずるアミノカルボニル反応で、糖の C2 のカルボニル基にアミノ基が結合し、シッフ塩基を経て進む反応である。

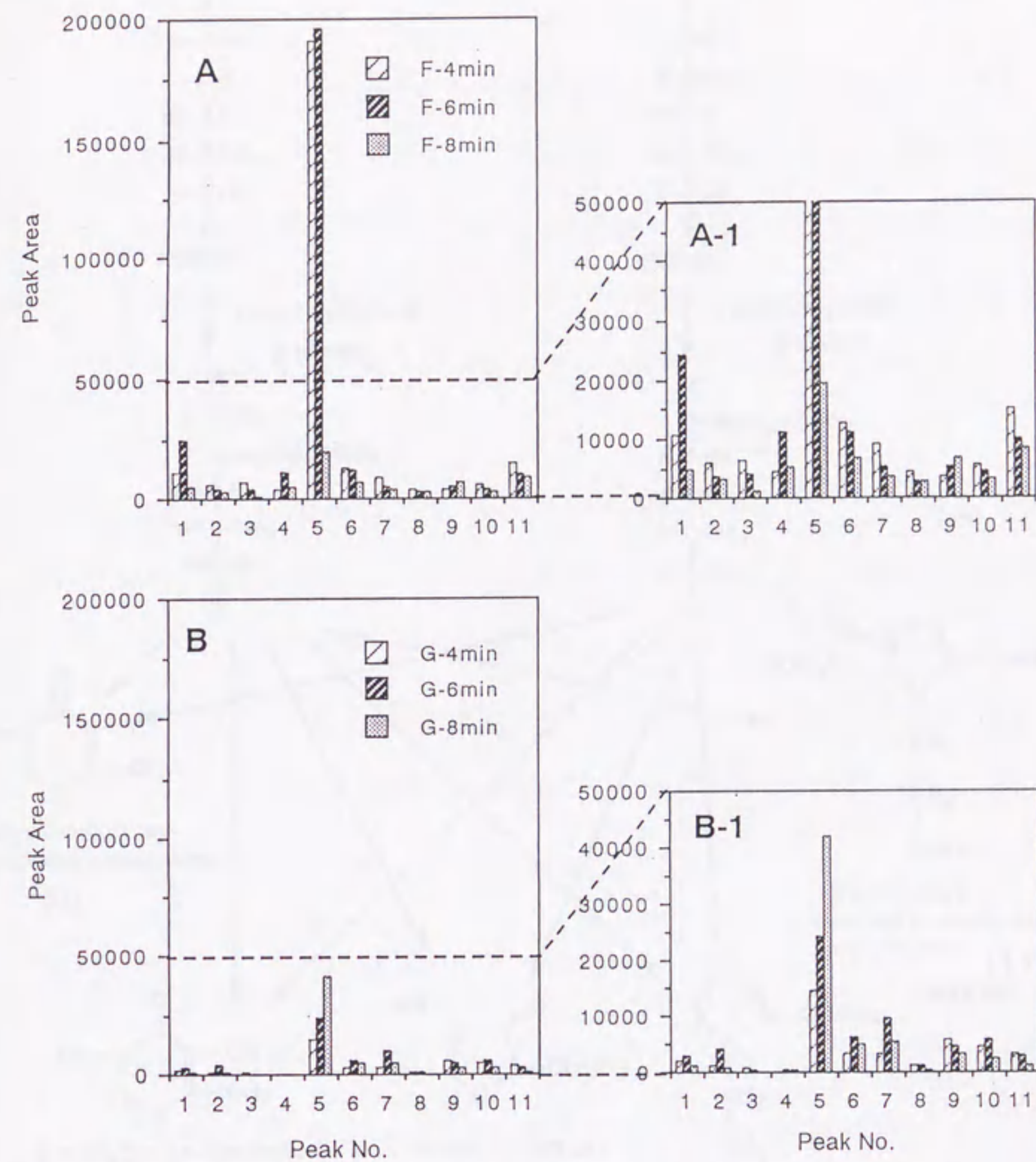


Fig. 7-2 Volatile compounds from the reaction of fructose or glucose with β -alanine. (A) extracts from the reaction of fructose and β -alanine, (B) extracts from the reaction of glucose and β -alanine.

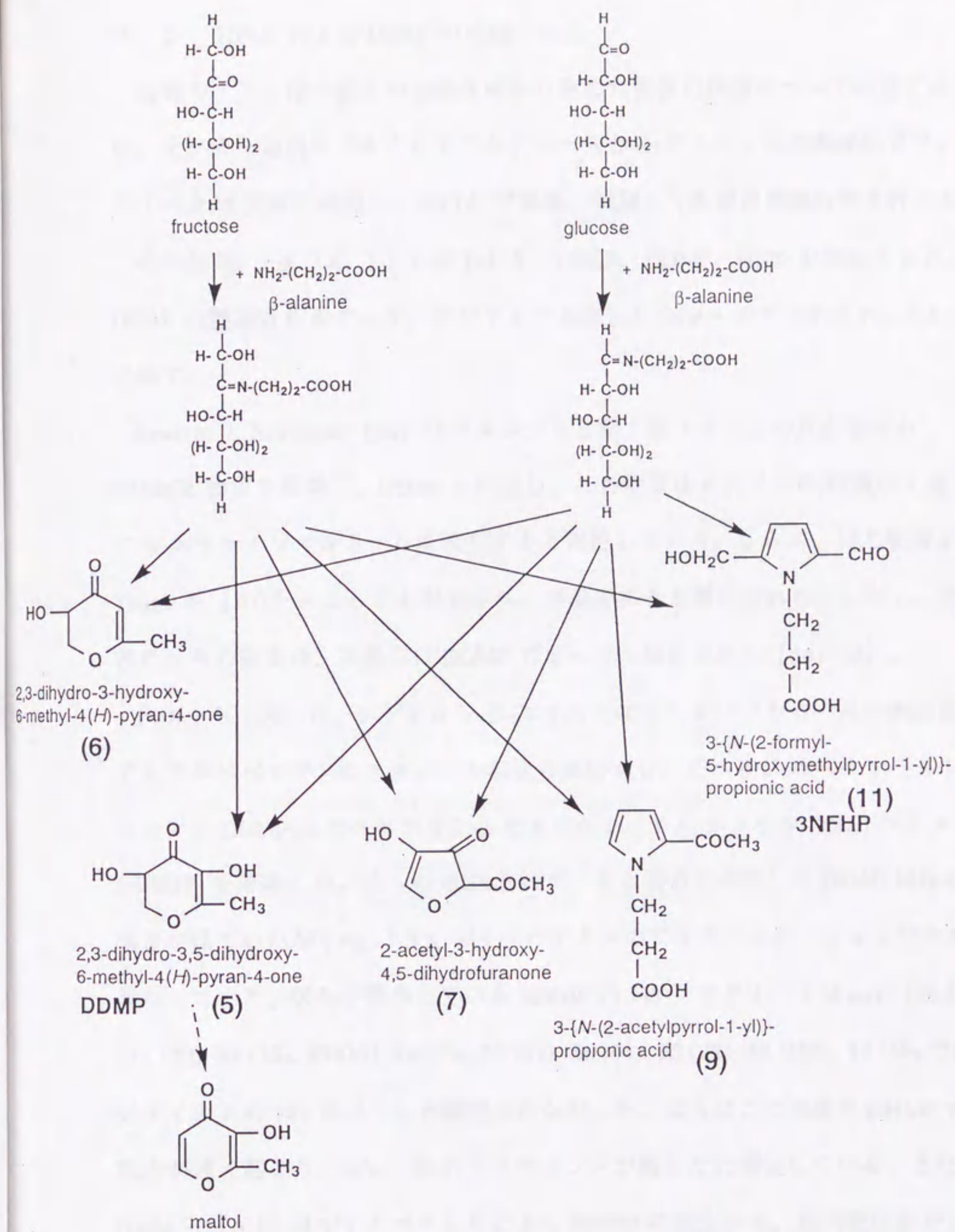


Fig. 7-3 Proposed mechanism of main compounds in the reaction of either fructose or glucose with β -alanine.

7-5 HPLC による DDAF の単離・同定

各種のアミノ酸や糖との加熱反応から生じた物質の構造について検討するために、クッキー焙焼モデルとしてフルクトースと β -アラニンを加熱反応させ、メタノール/水溶液で抽出し、HPLCで単離・精製して各種の機器分析を行った。

その結果、Fig. 7-4、7-5 に示すようにDDAF、DDMP、HMF が同定された。DDAF の機器分析のデータ、及びアセチル化した DDAF のデータを Fig. 8-6 ~ 11 に示す。

Severin と Seilmeier [60] はグルコースと第1級アミンとの反応物から $C_6H_8O_4$ 物質を単離し、DDAF と同定し、この物質はメタノール/塩酸中で速やかに *o*-メチルイソマルトールに変化すると報告している。さらに、同じ物質が Tatum ら [103] によっても同定され、無臭であると報告された。しかし、その後これらの物質は、実際には DDMP であったと修正された [54、62]。

Fisher ら [56] は、1-デオキシ-D-エリスロ-2,3-ヘキソジウロースの水溶液とアセチルピペリジンのエタノール溶液の反応から、ピペリジノ-ヘキソースレダクトンと DDMP、4-ヒドロキシ-2-ヒドロキシメチル-5-メチル-3(2*H*)-フラノン (HHMF) を単離した。彼らの HHMF のデータと著者の単離した DDAF は極めて構造が似ていたが (Fig. 7-5)、MS スペクトルのフラグメンテーションが大きく異なっていた。彼らが報告している HHMF の MS フラグメントは m/z : 126 (12), 111 (20), 98 (35), 85 (33), 84 (73), 57 (52), 56 (44), 55 (22), 43 (100), 42 (34) であり、分子イオンの 144 はほとんど確認されなかった。彼らはこの現象を HHMF から脱水が速く起こり、 m/z : 126 のフラグメントが現れたと報告している。また、Hiebl ら [101] は UV スペクトルによる HHMF の測定から、極大吸収値が 254 nm であると報告している。著者が同定した DDAF と彼らの HHMF のデータとの比較から、DDAF は HHMF とは異なることが明らかであった。

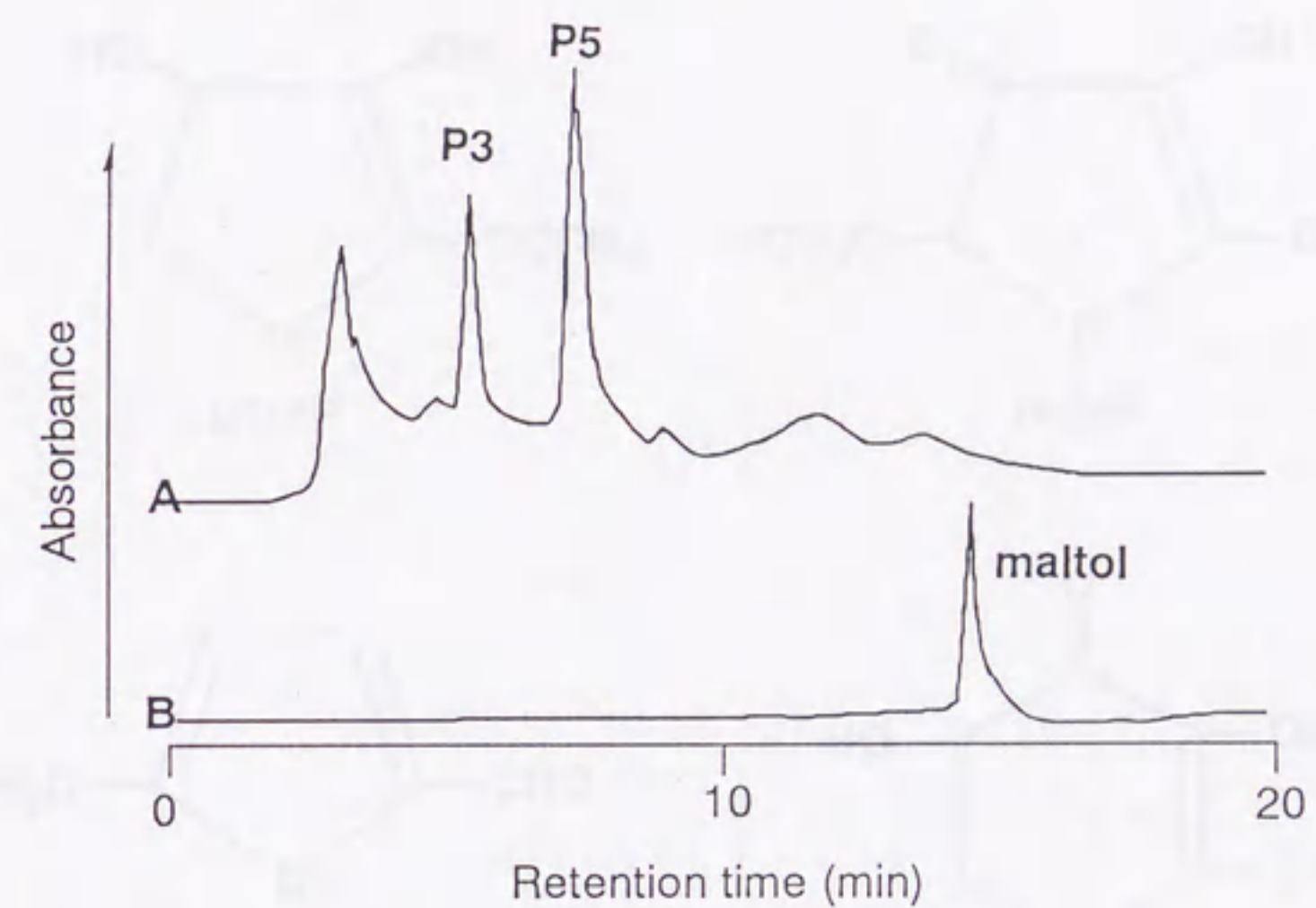


Fig. 7-4 HPLC profile of products (A) from the reaction mixture of D-fructose and β -alanine, and maltol (B). P3 was identified as 2,3-dihydro-3,4-dihydroxy-5-acetyl-furan (DDAF). P5 was 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one (DDMP). Chromatographic conditions: column; Develosil ODS-5, 250 mm x 4.6 mm i.d., mobile phase; H₂O-MeOH (6:1 v/v) 0.8 ml/min, UV detection; 283 nm.

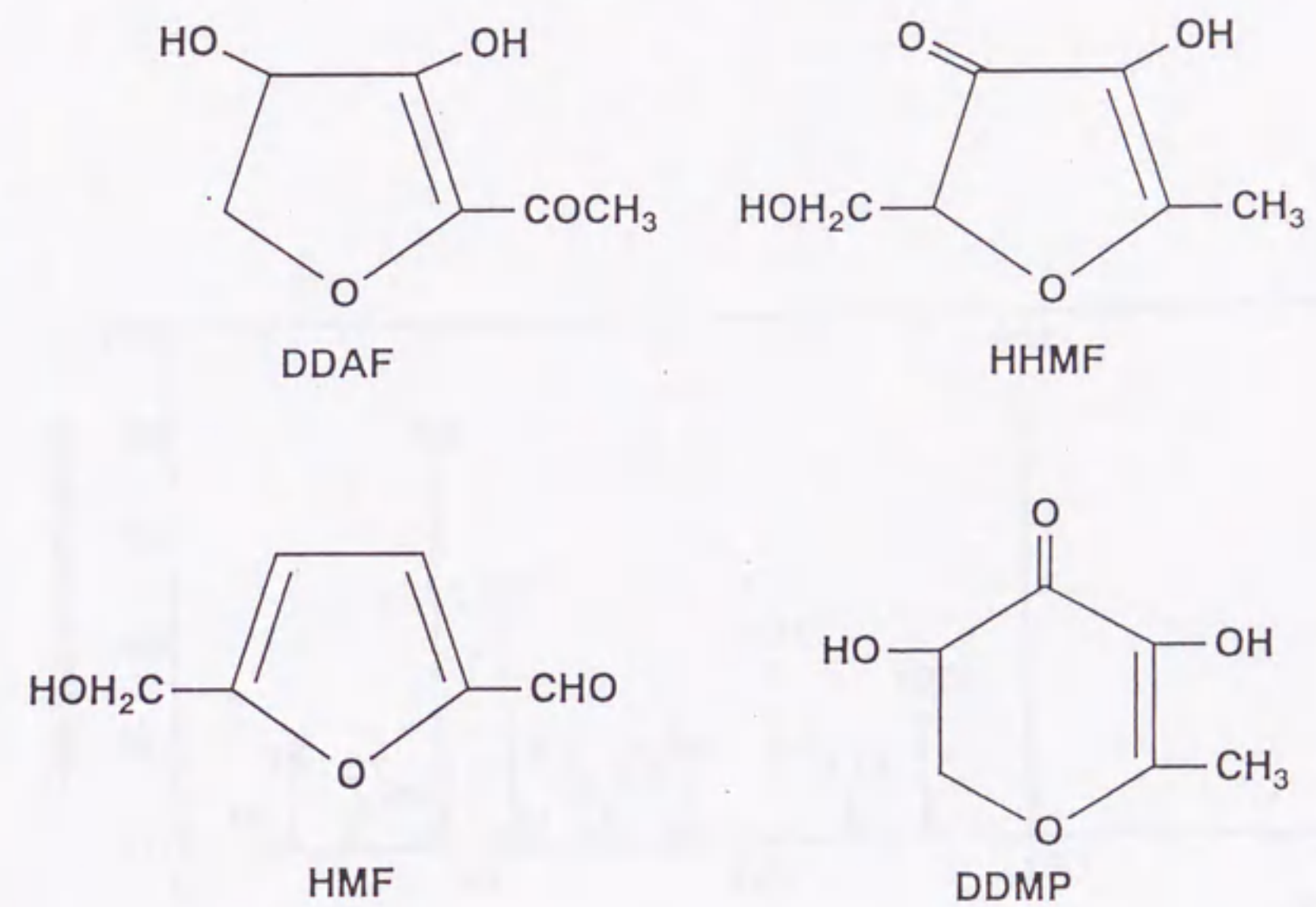


Fig. 7-5 The structures of DDAF, HHMF, DDMP and HMF. DDAF; 2,3-dihydro-3,4-dihydroxy-5-acetylfuran, HHMF; 4-hydroxy-2-hydroxymethyl-5-methyl-3(2*H*)-furanone, DDMP; 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one, HMF; 5-hydroxymethylfurfural.

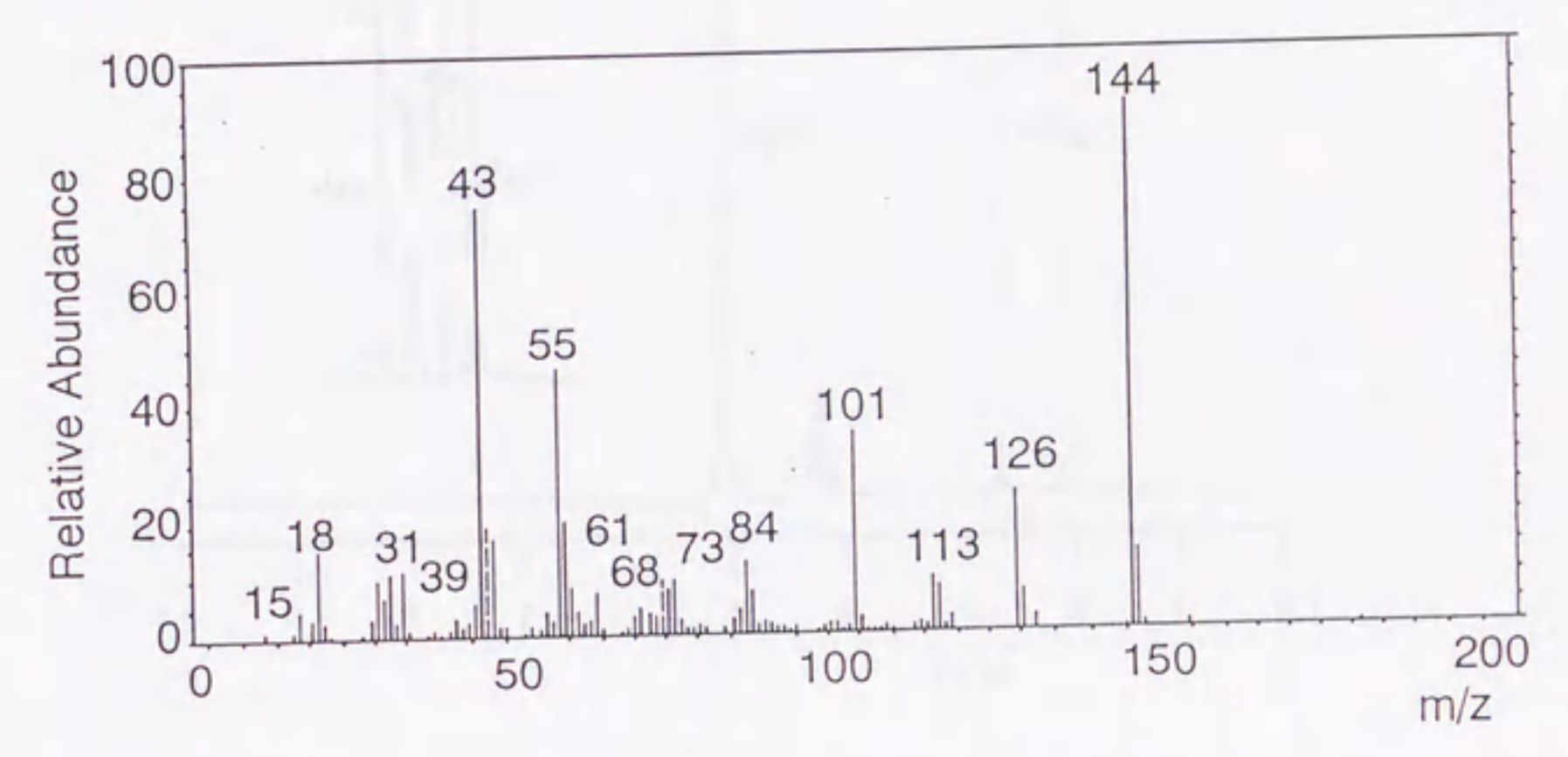


Fig. 7-6 Electron impact-mass (EI-MS) spectrum of peak 3 from the reacted mixture of fructose and β -alanine.



Faint, illegible text or a caption located below the spectrum on the left page.

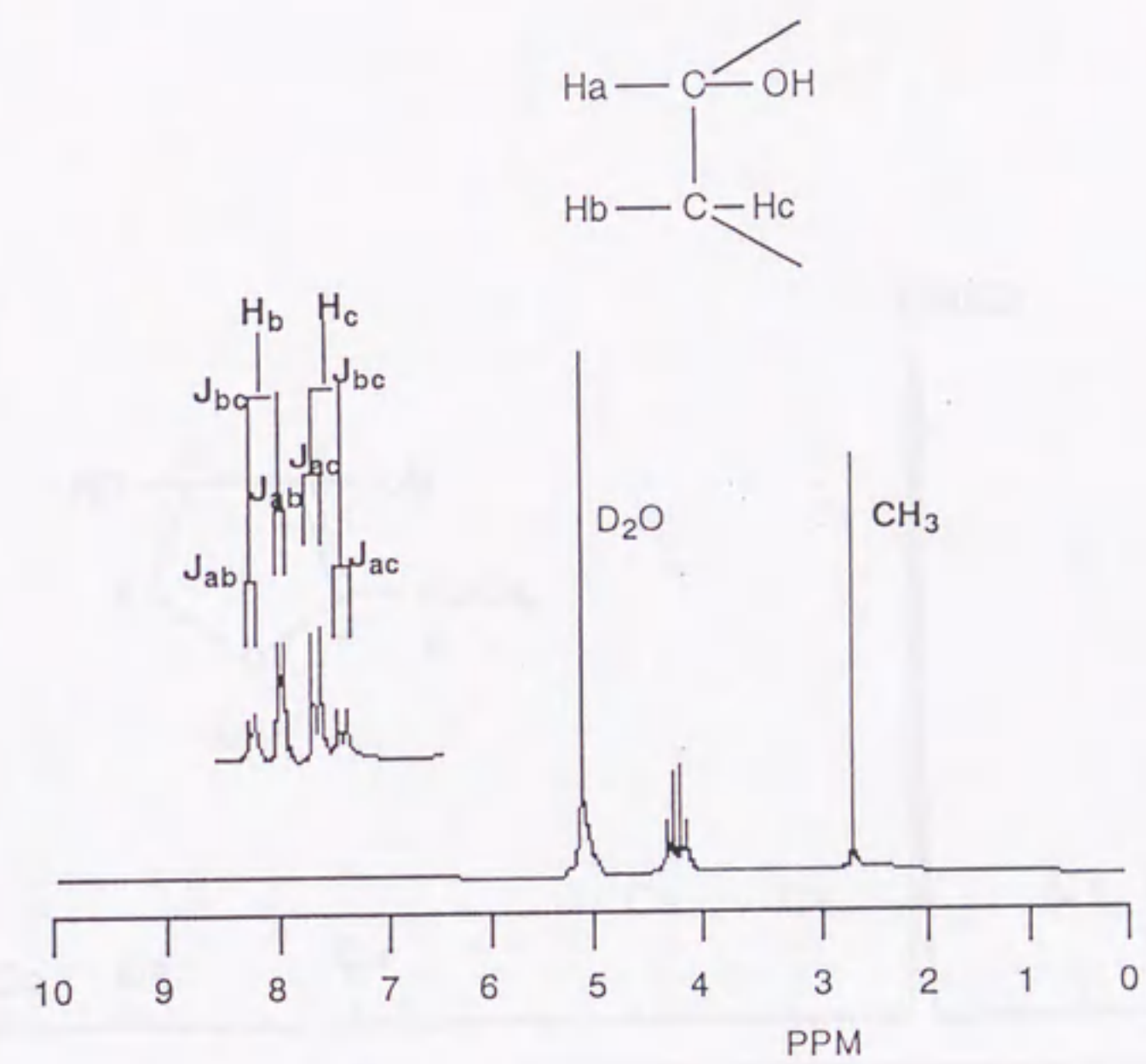


Fig. 7-7 ¹H-NMR spectrum of peak 3 in D₂O

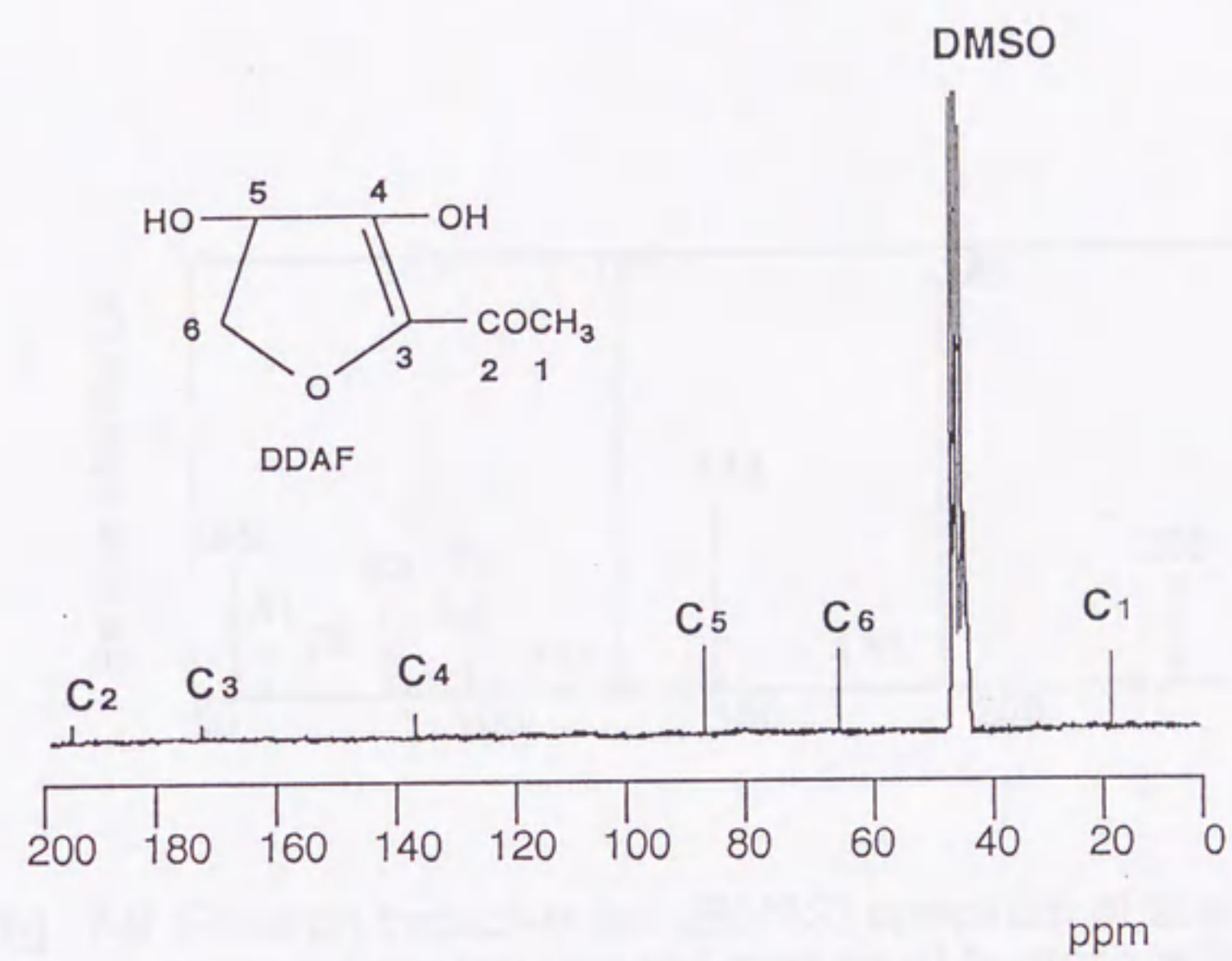


Fig. 7-8 ¹³C-NMR spectrum of peak 3 in DMSO

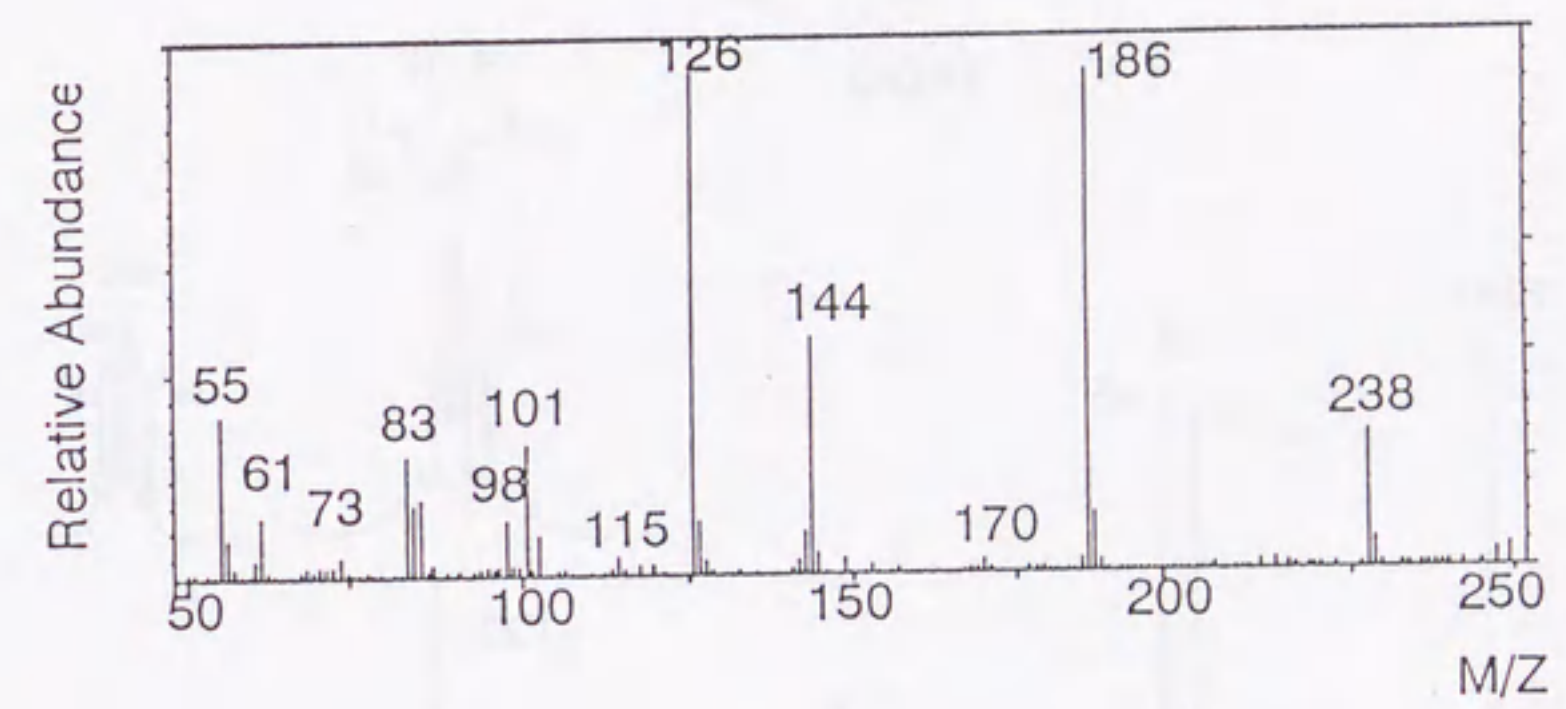
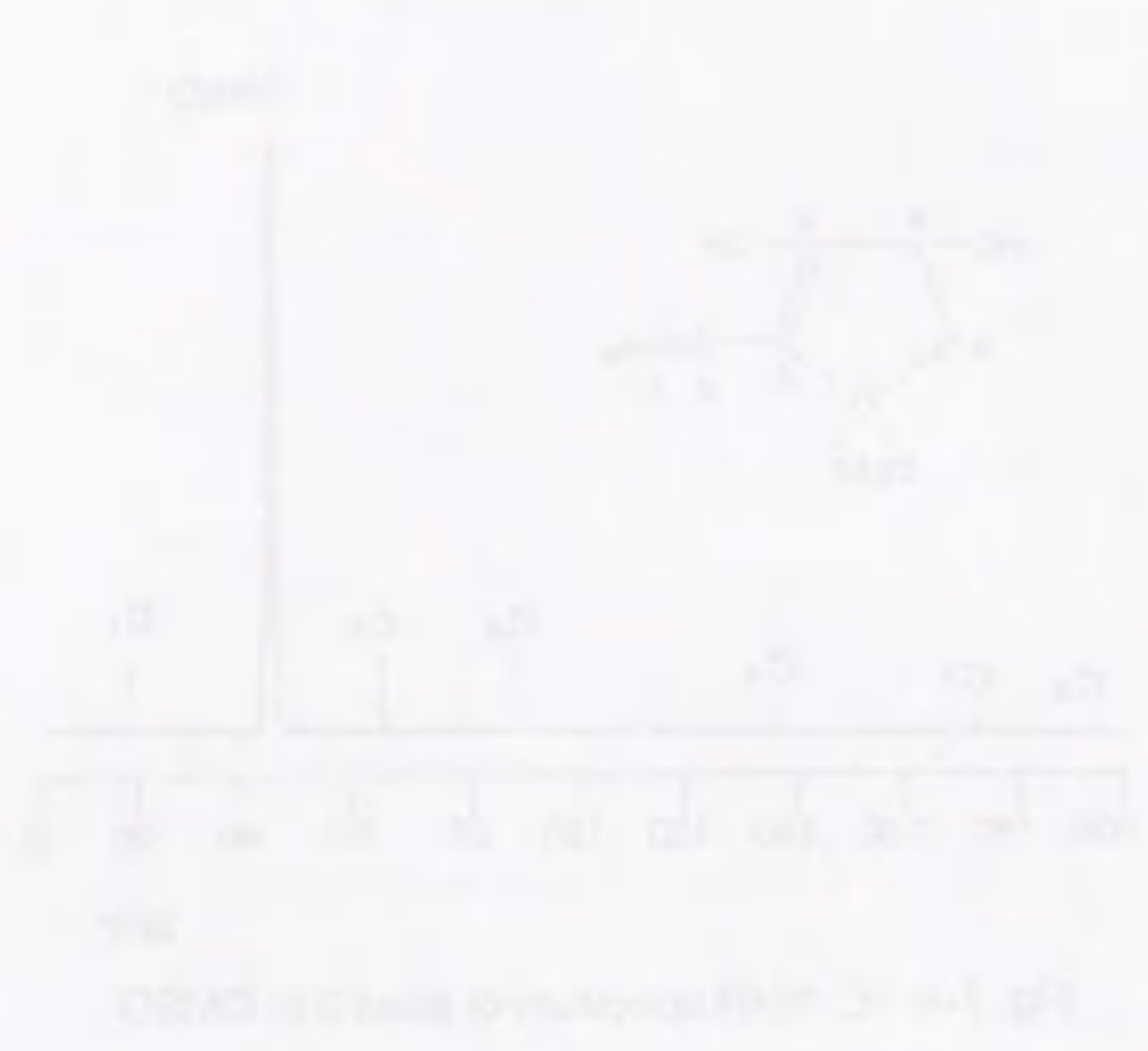


Fig. 7-9 Electron impact-mass (EI-MS) spectrum of acetylated peak 3 from the reacted mixture of fructose and β -alanine

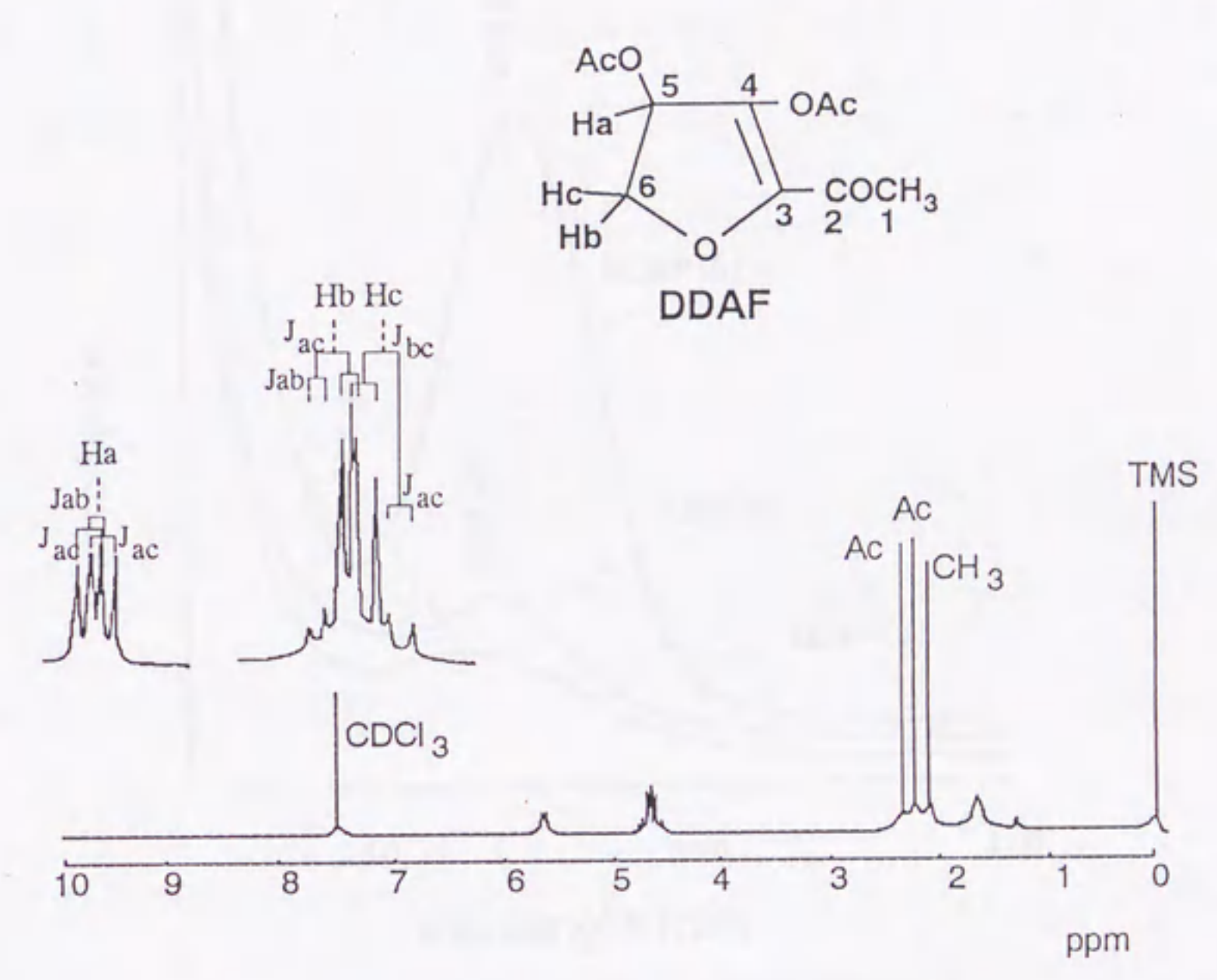


Fig. 7-10 ¹H-NMR spectrum of acetylated DDAF in CDCl₃

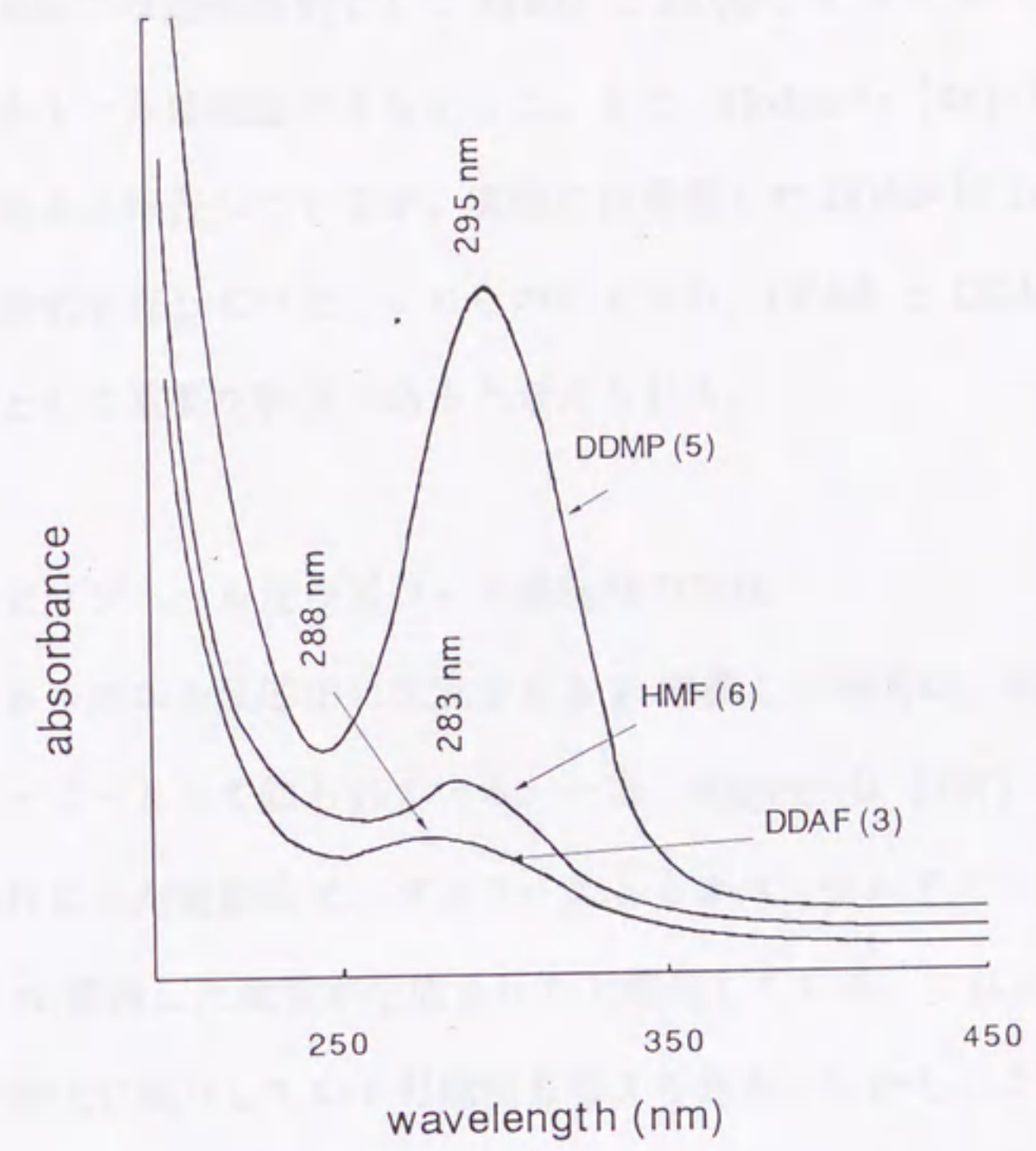


Fig. 7-11 UV spectrum of products from baked cookies with fructose

一方、約 30 年前より、マルトールやイソマルトールがパンの香気成分であると報告されている [103、104]。さらに、マルトールとイソマルトールは他の研究者によって色々の食品から単離された [105、106]。しかし、今回のクッキーのモデル実験では焙焼香気として DDMP と DDAF、イソマルトールは同定されたが、マルトールは確認できなかった。また、Hodge ら [45] は DDMP はオーダレスであると報告しているが、実際には精製した DDMP は DDAF と同様、室温で強い香気を有していた。これらのことから、DDMP と DDAF はクッキーの焙焼香気として重要な物質であると考えられる。

7-6 ピリジニール及びピロール誘導体の生成

アミノカルボニル反応中に生成される N-置換した物質は、加熱処理をした食品のフレーバーとして知られている。一方、Njoroge ら [107] は pH や温度を生理学的条件にした実験系で、グルコースとネオペンチルアミンを非酵素的に反応させると N-置換した物質が生成されたと報告している。これらの反応は、糖尿病患者や老化に関与している可能性も考えられる。しかし、これらの反応経路はまだ明らかになっていないので、多方面からの研究が必要と考えられる。

今回の実験では、フルクトースと β -アラニンの加熱反応物の 2 分加熱、4 分加熱から得られた抽出物を HPLC により分析し、Fig. 7-12 に示すようなクロマトグラムを得た。さらに、4 分加熱の抽出物を分取用カラムで分析すると、Fig. 8-13 に示すような結果が得られる。そこで、DDMP、HMF、DDAF 以外の比較的生成量の多い P4 及び P11 を単離・精製し、NMR や FAB-MS などの機器分析を行なって構造決定を行ない (Fig. 7-14 ~ 17)、3NFHP と 3NMDTP であることを確認した (Fig. 7-18)。

窒素を含む環状化合物は食品やタバコの重要なフレーバーの 1 つである [108]。

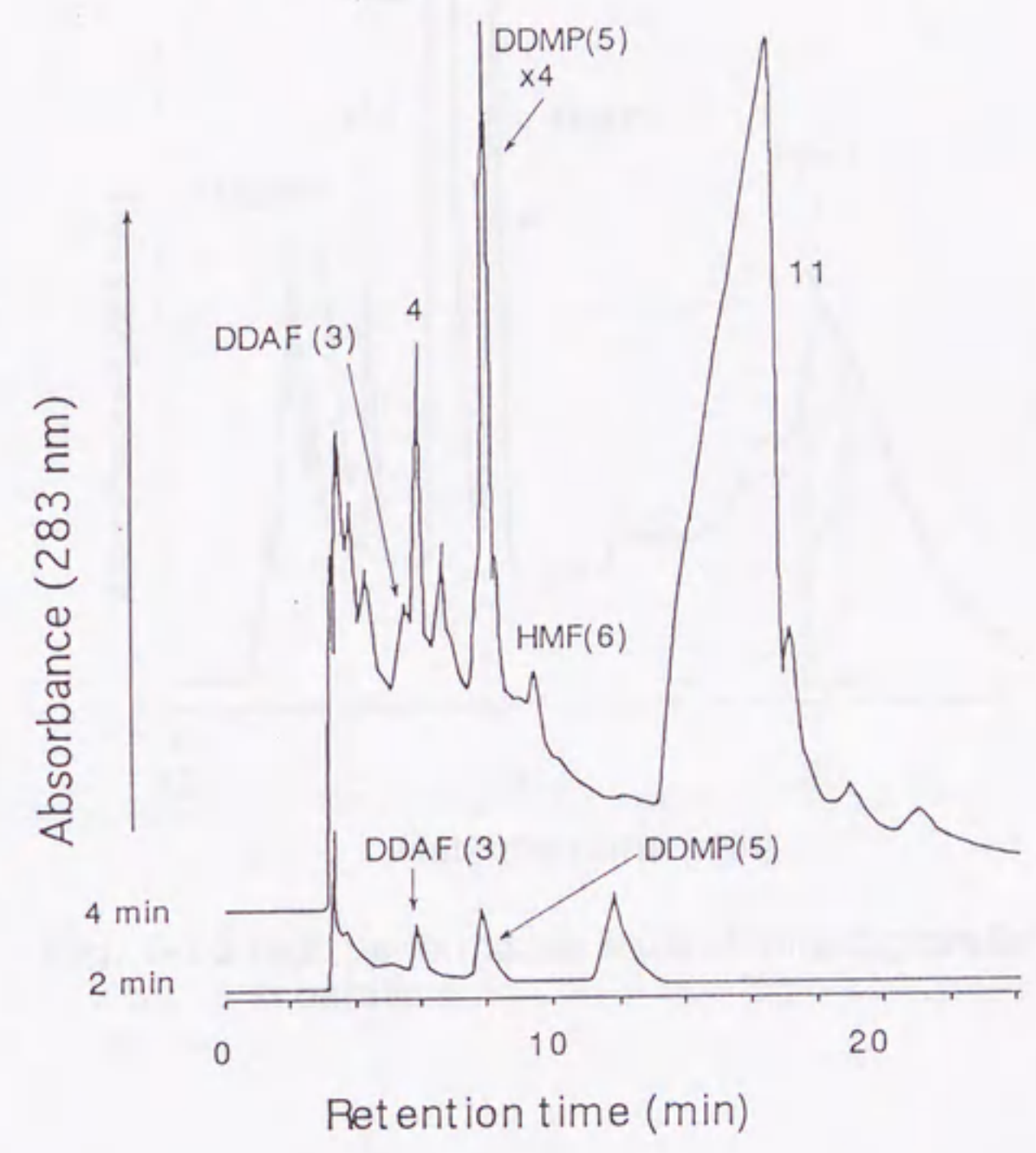


Fig. 7-12 High performance liquid chromatogram of extract from heating of fructose with β -alanine. Chromatographic conditions: column; DEVELOSIL ODS-5 (4.6 mm i.d. x 250 mm), mobile phase; H₂O-MeOH (6:1 v/v), UV detection; 283 nm, chart speed; 5 mm/min.

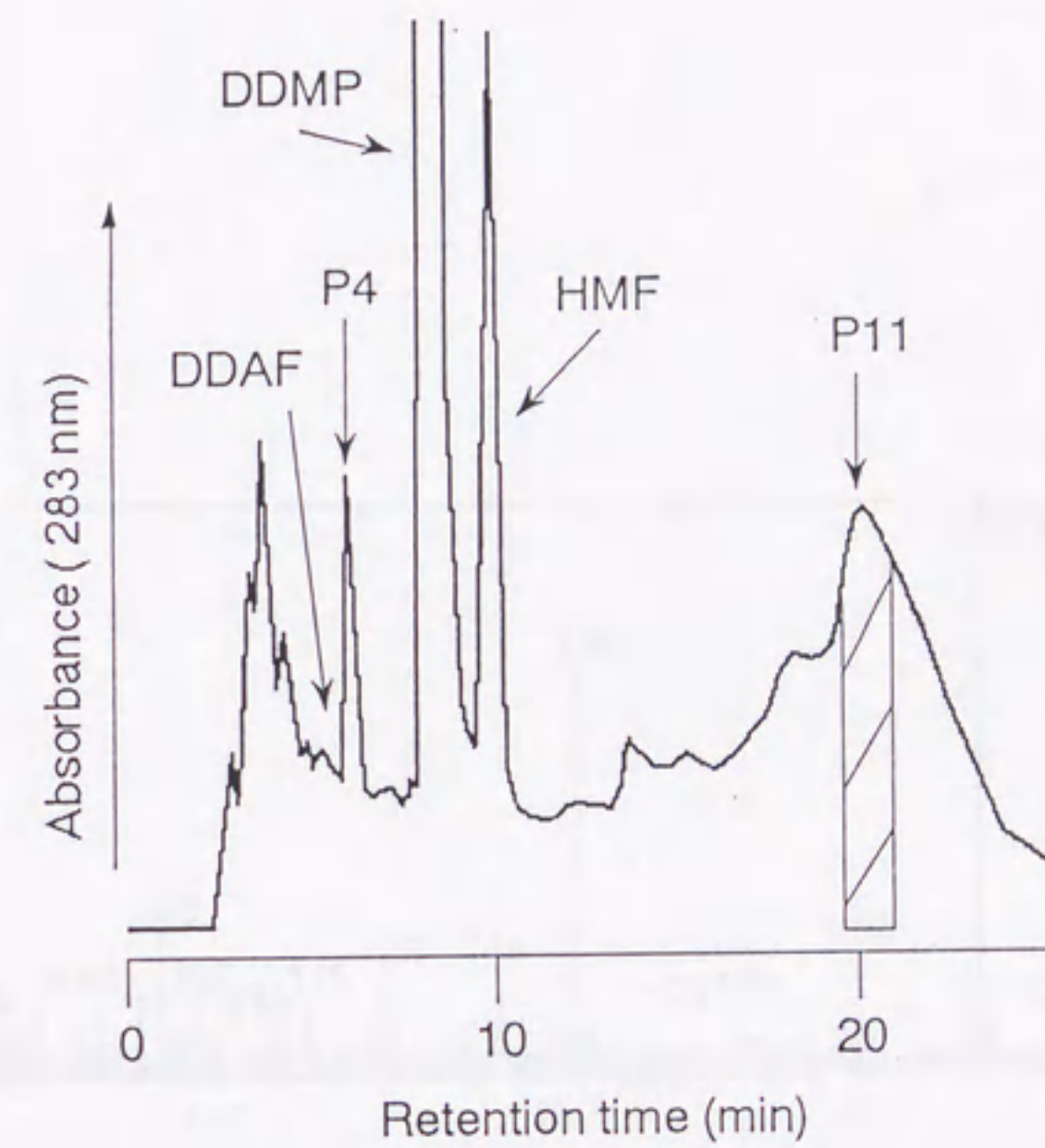


Fig. 7-13 High performance liquid chromatogram for separation.

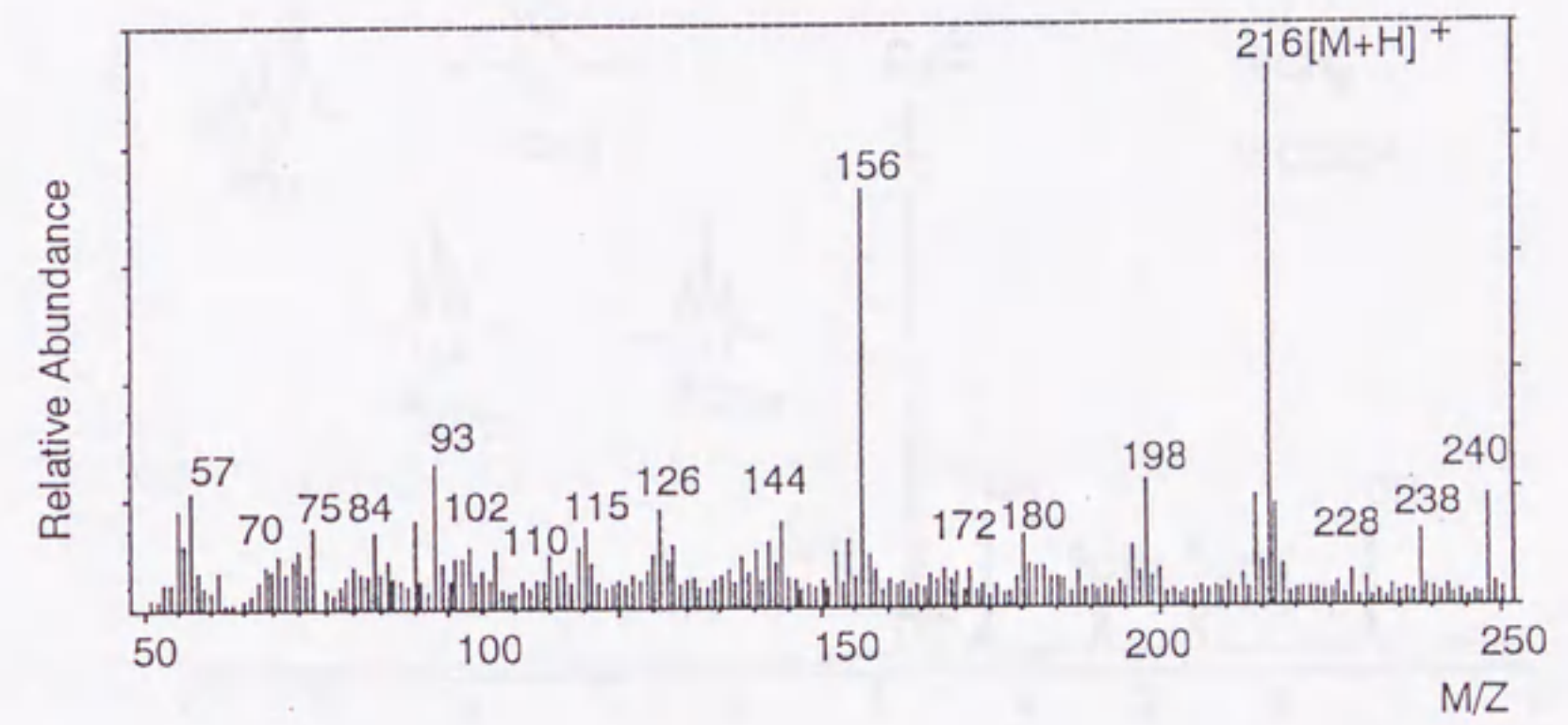


Fig. 7-14 Fast atom bombardment-mass (FAB-MS) spectrum of peak 4

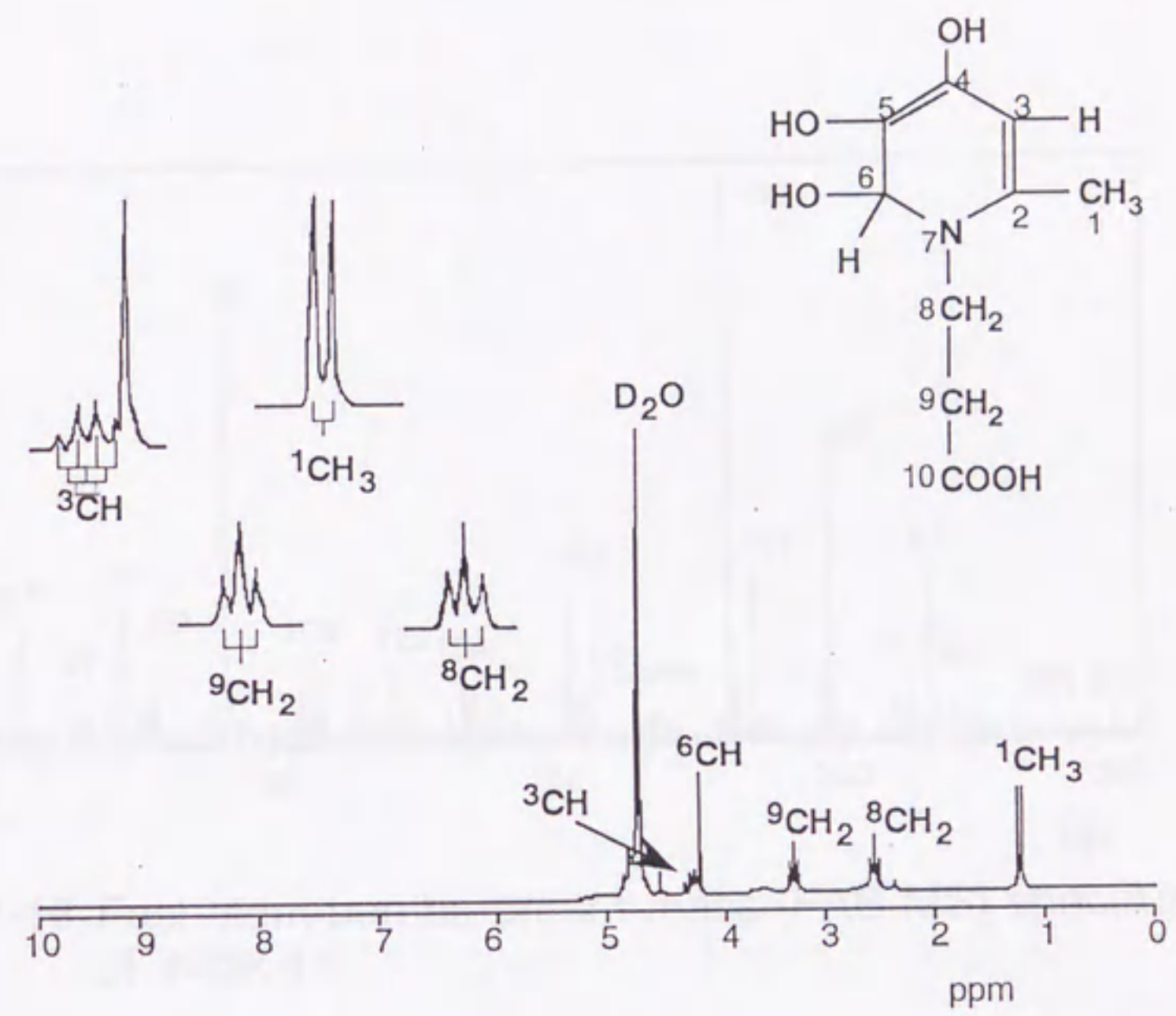


Fig. 7-15 ¹H-NMR spectrum of peak 4 in D₂O

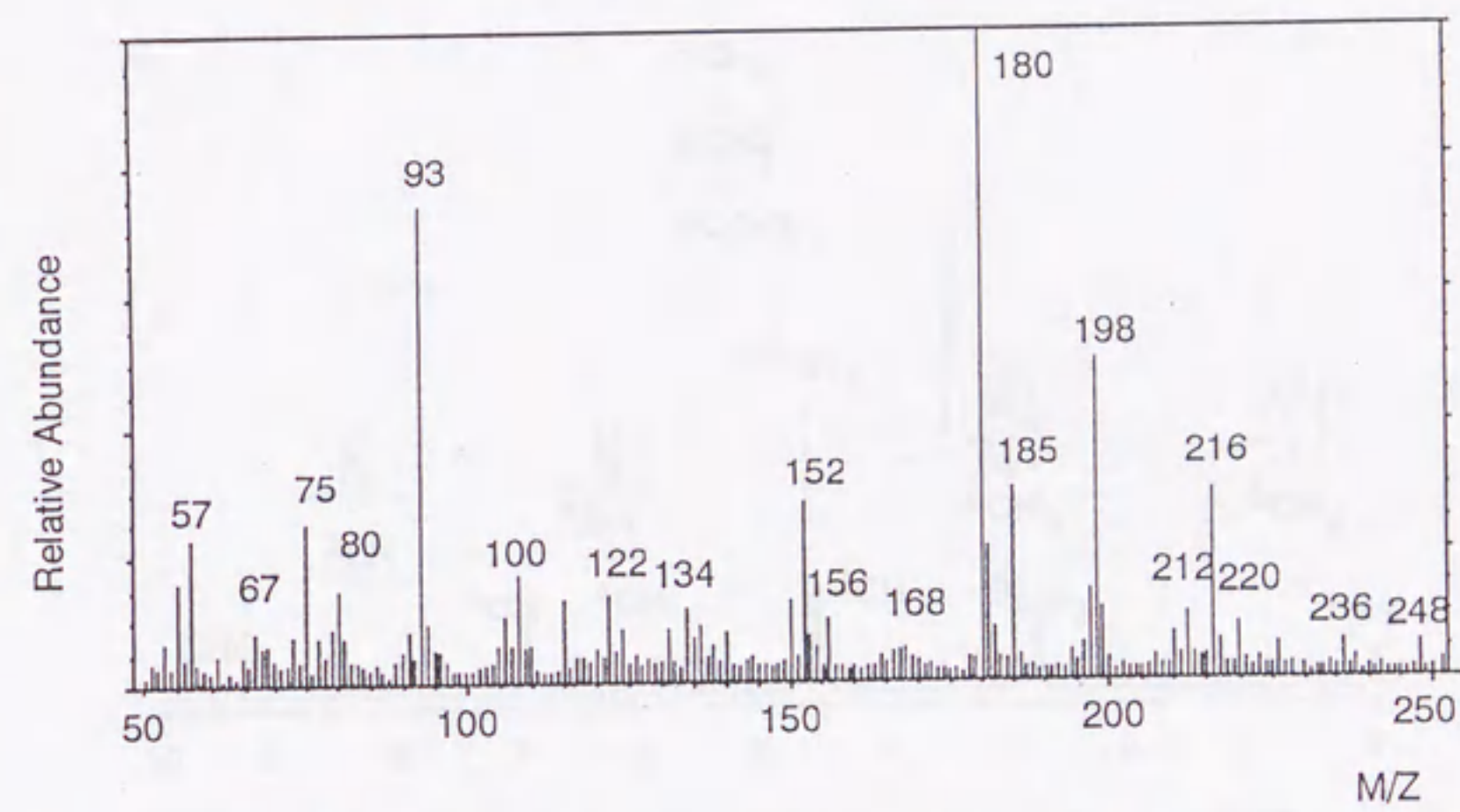


Fig. 7-16 Fast atom bombardment-mass (FAB-MS) spectrum of peak 11

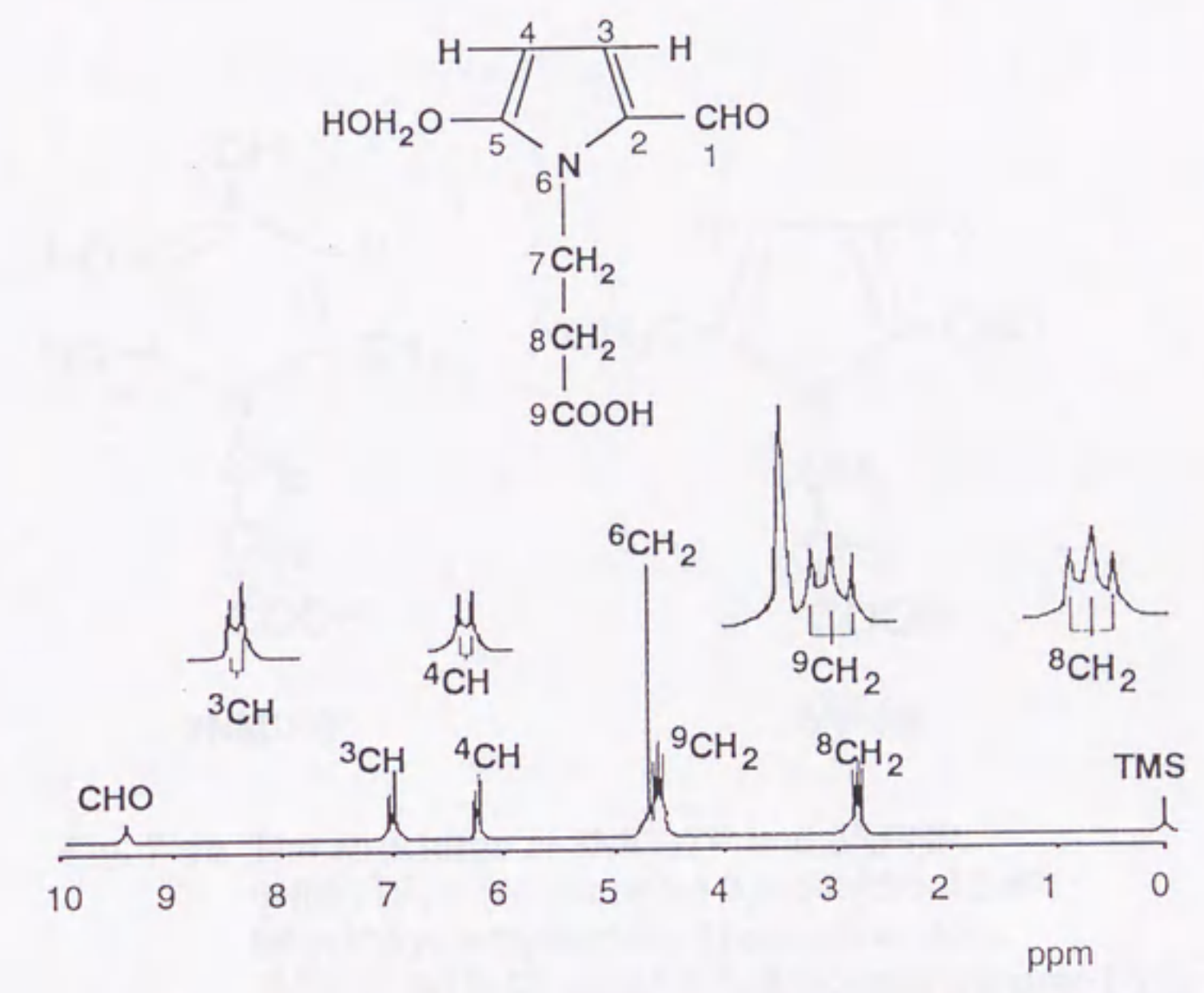
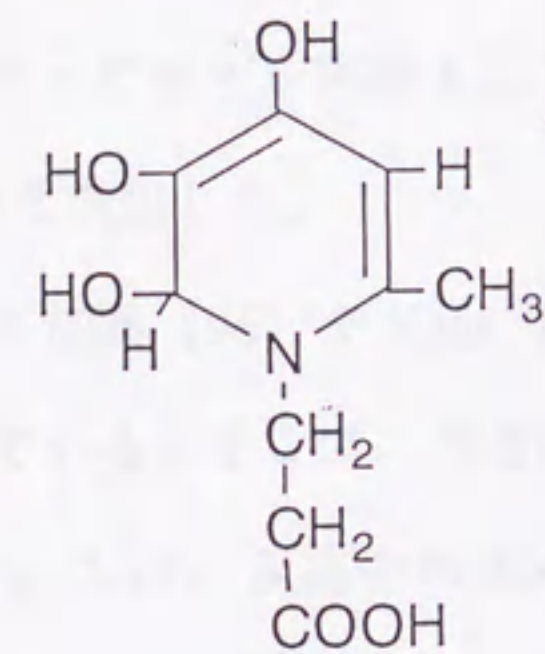
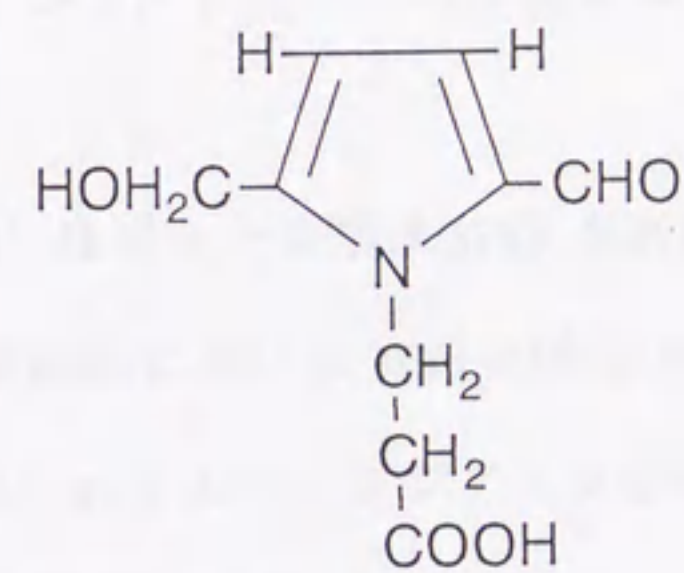


Fig. 7-17 ¹H-NMR spectrum of peak 11 in D₂O



3NMDTP



3NFHP

Fig. 7-18 The structures of 3NMDTP and 3NFHP.
 3NMDTP; 3-{N-(2-methyl-3,6-dihydro-4,5,6-trihydroxymethylpyridinyl)}-propionic acid,
 3NFHP; 3-{N-(2-formyl-5-hydroxymethylpyrrol-1-yl)}-propionic acid.

また、3NFHPはクッキー様焙焼香気も示した。Katoら [109]、Nakayamaら [110] と Nimoniyaら [111] はメタノールや水溶液中でのアルドースとアミノ酸の反応からN-置換したピロール-2-アルデヒド、即ち、N-*n*-ブチルピロール-2-カルボキシアルデヒド、 ϵ -(2-ホルミル-5-ヒドロキシメチル-ピロール-1-イル)-ノルロイシン、4-(2-ホルミル-5-ヒドロキシメチル-ピロール-1-イル)-酪酸などの生成について報告している。今回の実験では、フルクトースと β -アラニンの反応をクッキーのモデル実験として、水やメタノールの存在しない固相系で行ない3NFHPを検出した。

早瀬と加藤 [96] や Kato [93] はピロール類は3DGを経由し、生成されると報告している。そこで、著者の反応系における3DGの存在の有無について検討した (Fig. 7-19)。反応中の3DGは *o*-フェニレンジアミンでキノキサリン誘導体とし [111、112]、HPLCでその存在を確認した。さらに、HPLCで単離・精製した3DG画分をFAB-MSで分析し、その分子量が m/z 162であることを確認し、固相系においても3DGが存在することを確認した。フルクトースと β -アラニンの加熱反応中におけるこれらの物質の生成量の変化を Fig. 7-20 に示す。3NFHPは加熱初期から生成され、加熱後4分を過ぎると減少したが、3NMDTPは加熱後4分位から生成され始め、6分で最高値に達し、その後減少した。3NFHPと3NMDTPのいずれもクッキー加熱条件の初期から中期にかけて生成し、後半には減少した。これらのことから、フルクトースとアミノ酸の反応では、N-置換した物質、特に3NFHPはフルクトースのハインズ転移により直接形成されるものと考えられる。

3NMDTPは3NFHPと比べやや遅く生成される (Fig. 7-20)。Ledlら [113] はピラノンが第1級アミンの存在のもとでピリジニウムベタインに誘導され、このピリジニウムベタインはピリドンの形に簡単に変化すると報告している。グル

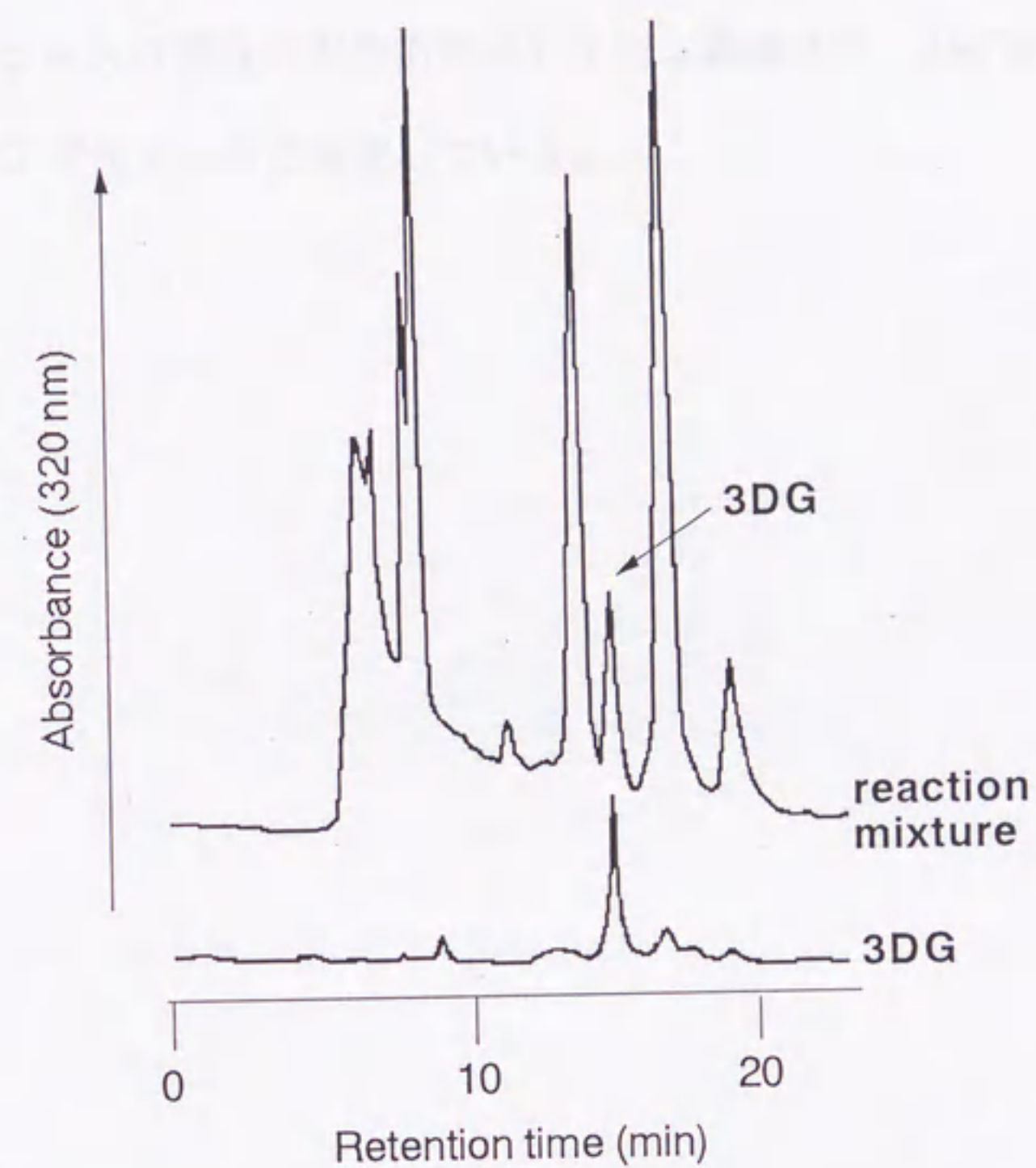
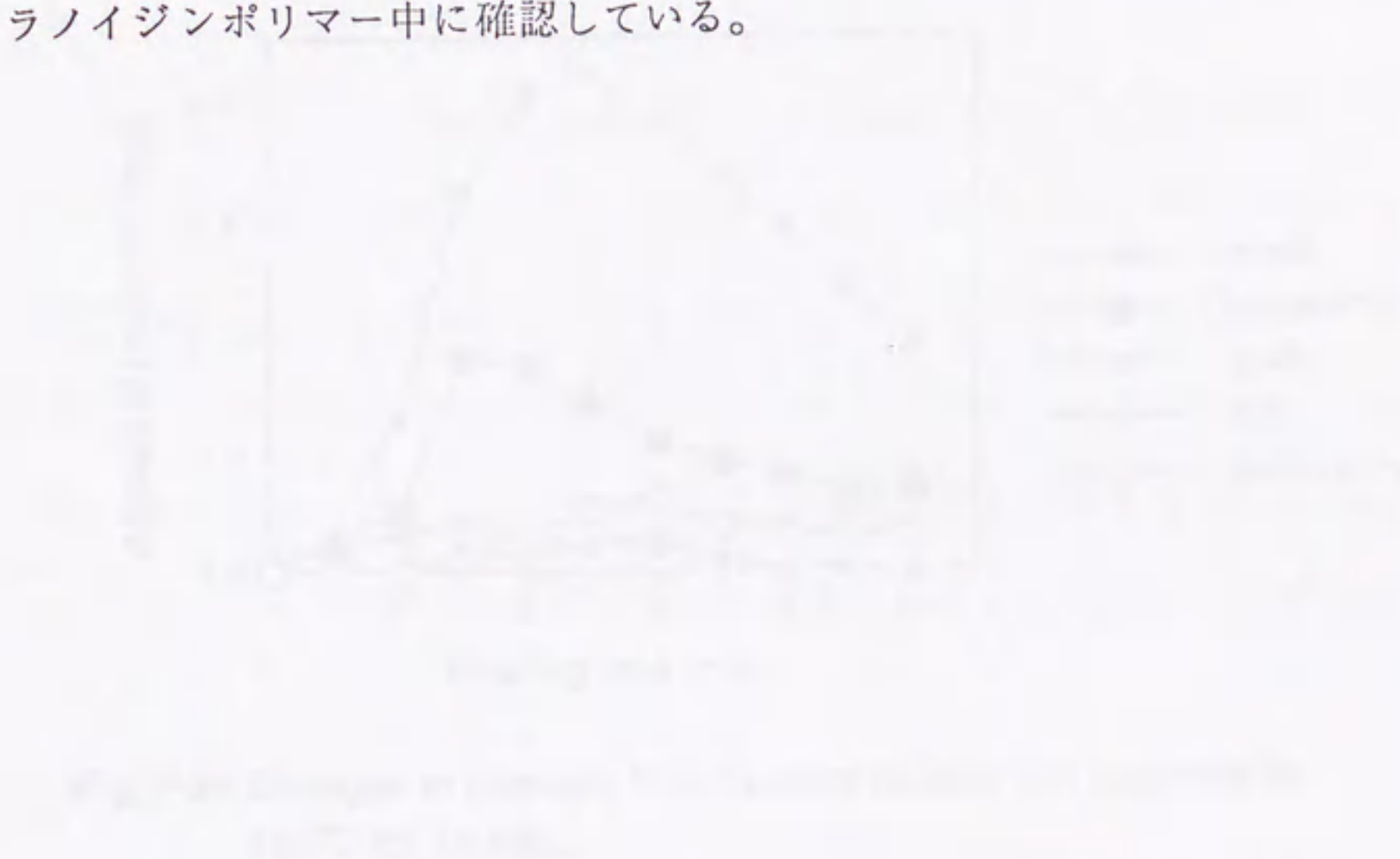


Fig. 7-19 High performance liquid chromatogram of the quinoxaline derivatives of reaction mixture and authentic 3DG using DEVELOSIL ODS-5 (8 x 250 mm), mobile phase; 0.1 % TFA-CH₃OH-CH₃CN (8:2:1 v/v), flow rate; 1.5 ml/min, UV detection; 320 nm.

コースとアミノ酸からの 3NMDTP は β -ピラノンからピリジニウムベタインを経由して生成されるのかもしれない。しかし、出発の糖がフルクトースである著者の系においては、1-メチル-2- β -アラニノ-ヘキソースの様な中間体を通して生成されると思われる。Hashiba [114] はメラノイジンや Fe^{2+} を 30 ppm 含むアミノ酸とグルコースの褐色の混合物中にピリジン類縁体や、3NFHP と 3NMDTP をメラノイジンポリマー中に確認している。



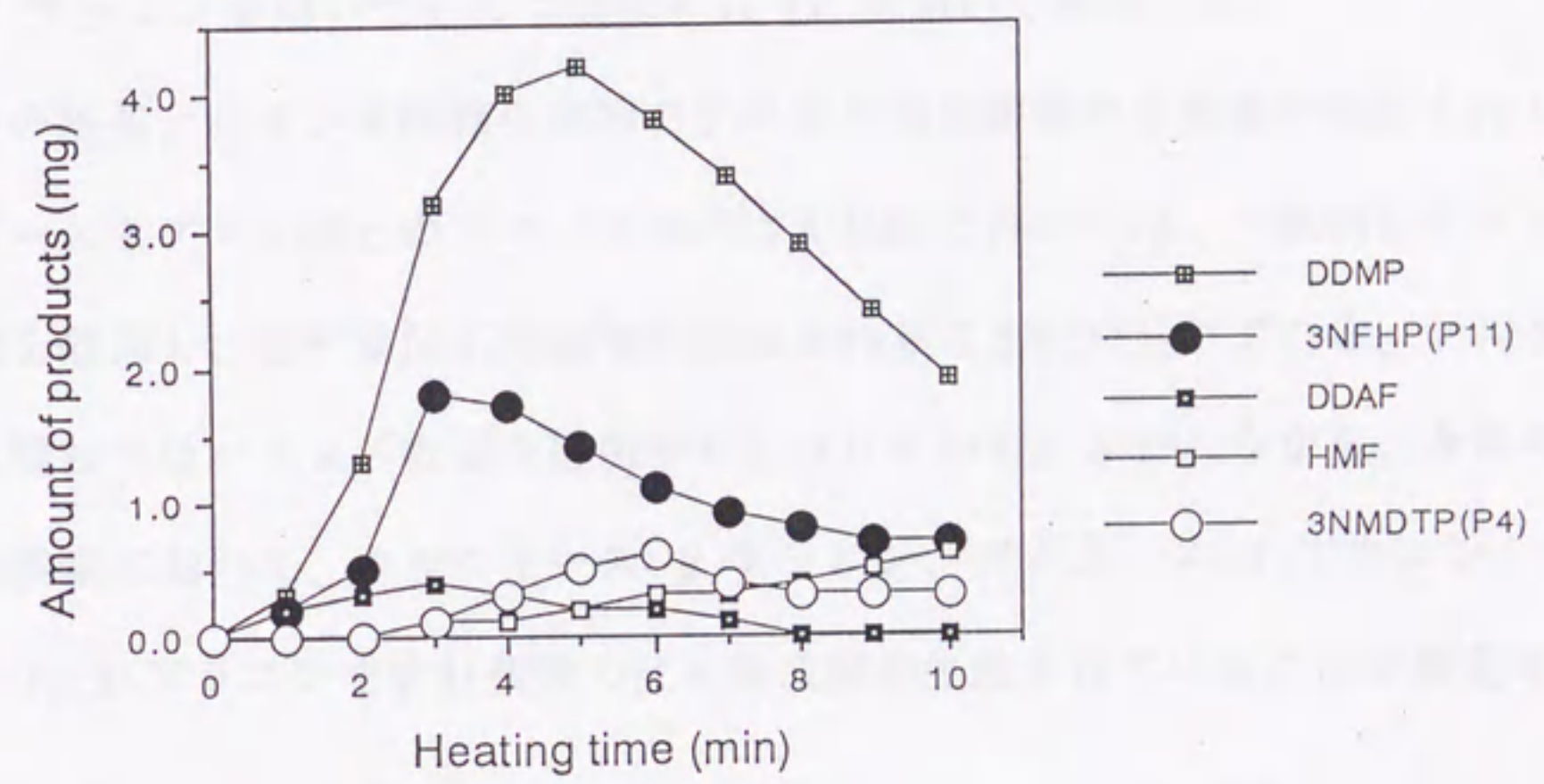


Fig. 7-20 Changes in products from fructose heated with β -alanine at 150°C for 10 min.