

アオノリ香気特性および香気成分の品種間・産地間 差異の解析

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2014-11-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山本, 正芳 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00007985

静岡大学 博士論文

Analysis of volatile compounds and the aroma character in Aonori produced in several geographic areas

アオノリ香気特性および香気成分の品種間・産地間差異の解析

2013年12月

大学院 自然科学系教育部

バイオサイエンス専攻

山本 正芳

博士學位論文目次

山 本 正 芳

審査申請論文名

アオノリ香気特性および香気成分の品種間・産地間差異の解析

Title of Thesis:

Analysis of volatile compounds and the aroma character in Aonori produced in several geographic areas

目 次

第 1 章 序 論	1 頁
1. 1. 1 海苔	1 頁
1. 1. 2 アオノリ	3 頁
1. 2 海藻の味成分	7 頁
1. 3. 1 海藻の生理活性物質	8 頁
1. 3. 2 カロテノイド	10 頁
1. 3. 3 β -カロテンの熱分解物	16 頁
1. 3. 4 カロテノイド酸化開裂酵素とアポカロテノイド	19 頁
1. 4 海藻の香気成分	22 頁
1. 5. 1 香気成分分析法	29 頁
1. 5. 2 揮発性化合物の抽出	30 頁
第 2 章 SPME-GC-MS を用いた 4 種のアオノリの香気成分同定	35 頁
2. 1 序論	35 頁
2. 2 方法	36 頁
2. 2. 1 原料	36 頁
2. 2. 2 SPME の抽出条件検討と GC-MS 分析プレ試験	37 頁
2. 2. 3 官能評価の方法	39 頁
2. 2. 4 分析・解析方法	40 頁
2. 3 結果及び考察	42 頁

2. 3. 1	SPME の抽出条件検討と GC-MS 分析プレ試験	42	頁
2. 3. 2	官能評価	50	頁
2. 3. 3	GC-MS 分析・解析	51	頁
第 3 章	四万十川産スジアオノリの香りに寄与する鍵化合物の同定	62	頁
3. 1	序論	62	頁
3. 2	原料	63	頁
3. 3	方法	64	頁
3. 3. 1	官能評価 (Aroma Extraction Dilution Analysis)	64	頁
3. 3. 2	四万十川産スジアオノリの揮発性化合物の同定	67	頁
3. 4	結果及び考察	68	頁
第 4 章	博士論文のまとめ	73	頁
4. 1	結論	73	頁
4. 2	参考文献	74	頁
4. 3	謝辞	88	頁

第1章 序論

1. 1. 1 海藻

地表の 71%は海である。地球上の生命体は、この生育環境に由来する[1]。海中で起こった進化は、海洋性の無脊椎動物や海藻、微生物を含む生物の多種多様性を生んだ。この非常に大きな多様性のため、主に海藻から得られた天然産物は、特に研究されてきた。

海藻は古来より薬、食品や調味料として利用されてきた[2, 3]。しかし、海藻を想起させる成分やその生成メカニズムについてはほとんどわかっていなかった。近年になって、著しく機器分析技術が進歩したため、生の海藻の香気成分について研究されるようになり、海洋や海藻を想起させる香りに寄与率の高い化合物及びその生成の仕組みなどが明らかになってきた。そして、今もなお、海藻の多くは食材、化粧品や染料として重要である。さらに、生化学的活性物質の源としての価値も見出されている。その上、日本食は、無形文化遺産として世界遺産に登録され、世界的に日本食が注目される中、島国である日本の海藻の食文化についても注目度が増すことが予想される。

海藻は、そのサイズにより微細藻類（直径 0.2-2 μ m）と大型藻類(微細藻類より大きく 60m までの長さ)に分けられる[4,5]。大型藻類は、沿岸部で大量に育ち、陸生植物にある独特の器官（根、茎、葉）がない単純な構造をしている。海藻本来の特質とは異なるところで、広大な海における急速な培養、急速な生育やタンパク質、ポリフェノール、色素のような生物活性物質の生産を培養条件の操作により制御する可能性は、重要な性状である[5,6]。生息地に関して特異的な色素の存在によれば、海藻は、緑藻類、褐藻類、赤藻類に分類される[5, 7]。それ故に、褐藻類と赤藻類が光の制限されたとても深い地域で生育するが[8]、緑藻類は、沿岸部であふれて大量の光エネルギーを吸収できる。培養生産されている量は、アスコフィラムノドサム

のような褐藻類は全体量に対して 59%、赤藻類が 40%、緑藻類が 1%未満と推定されている[7]。

現在、微細藻類は 750~800 万トンが年間に生産され、その評価額は 550~600 億ドルに相当する[9]。海藻は世界に広く分布しており、日本のみならず、中国、韓国をはじめ、オーストラリア南部、ニュージーランド、ポリネシアや南アフリカで主に消費されている[10]。一方で、食文化とは異なり、現代人に多いストレスによる病気の治療法の一つとして、アロマテラピーが注目されるようになった。また、香りがもたらす心理的、生理的作用から、集中力を高めたり、和らげる目的で仕事や日常生活にも香りが利用されている。このように、近年、香りに対する関心は非常に高まり、香気成分に関する研究も進められるようになった。

以上のような背景があるにも関わらず、日本の歴史や文化と密接にかかわり、香りに関する関心が高まった今、海藻の中でも日本人に馴染み深いアオノリの香気成分分析に関する報告は意外に少なく、本研究を始めるきっかけとなった。また、アオノリの芳醇な香りが、どのような香気成分の構成であり、寄与率の高い鍵となる香気化合物は何か、異なる種類のアオノリを用いてその解明を試みた。更に、昨今の日本の食品業界では、食品表示偽装、産地偽装が大きな話題となり、日本国内でその波紋を広げている。そこで本研究は、さらに、より簡便で実用的な産地判別の分析・解析手法の開発促進に貢献するためにも、進めたいと考えた。

1. 1. 2 アオノリ

一般的に、海藻の中でアオノリと呼ばれているのは、アオノリ (*Ulva*)、ヒトエグサ (*Monostroma*) の混合物である。これらの緑藻の *Monostroma latissimum* や *Ulva prolifera* は商業スケールで培養されている。採取後、天日乾燥や異物を除去して販売される。価格や収穫量は、毎年の需要と供給のバランスによって変わる。アオノリ製品の1つを図1に示す [11]。

次に、3種類のアオノリの栄養成分を表1に示した [11]。ここで、アオノリ属 (*Green laver (Enteromorpha spp.)*) は、アオサ属 (*Sea lettuce (Ulva spp.)*) と藻体の構造が異なるため別属とされているが、現在では DNA 分析などによりアオサ属へ含まれている。これら3種は、すべて青い海苔、アオノリとして同じように販売されている。表1において、これらのタンパク質含量は20~26%で、15~23%がミネラル分である。*Ulva* 属や *Monostroma* 属とは対照的に、*Enteromorpha* 属では Ca や Fe 含量がより高く、Na 含量が低い。粗脂肪含量は、一般的にとっても低いが、*Ulva* 属と *Enteromorpha* 属では特に低い。表1に記載したビタミンB群の含量は、一般的な野菜より高く、*Enteromorpha* 属は最も高い。ビタミンAも同じく高く、ホウレンソウの約半分である。

また、日本食品標準成分表五訂成分表によると、乾燥アオノリの主成分は糖質であり、乾燥固形量あたり61.8%含まれる。また、蛋白質が20.0%、灰分17.9%であるが、脂質は0.3%と少ない。更に、主成分の糖質の約70%以上は食物繊維であり、主に多糖類であることが知られている。そして、灰分の約50%以上は食塩含量に相当する。次いでナトリウムが20.9~22.4%、カリウムが4.0~17.1%、マグネシウムが4.4~17.1%、カルシウムが2.6~4.6%である。以上の日本食品標準成分表五訂成分表に記載された一般成分値は、標準な値である。つまり、同じ海藻であっても、実際の採取場所、採取時期、採取深度などによっても異なる。また、同じ採取条件であって

も、その年の水温や日照量など種々の生育環境によっても影響されるため、その点を考慮して参考としなければいけない。

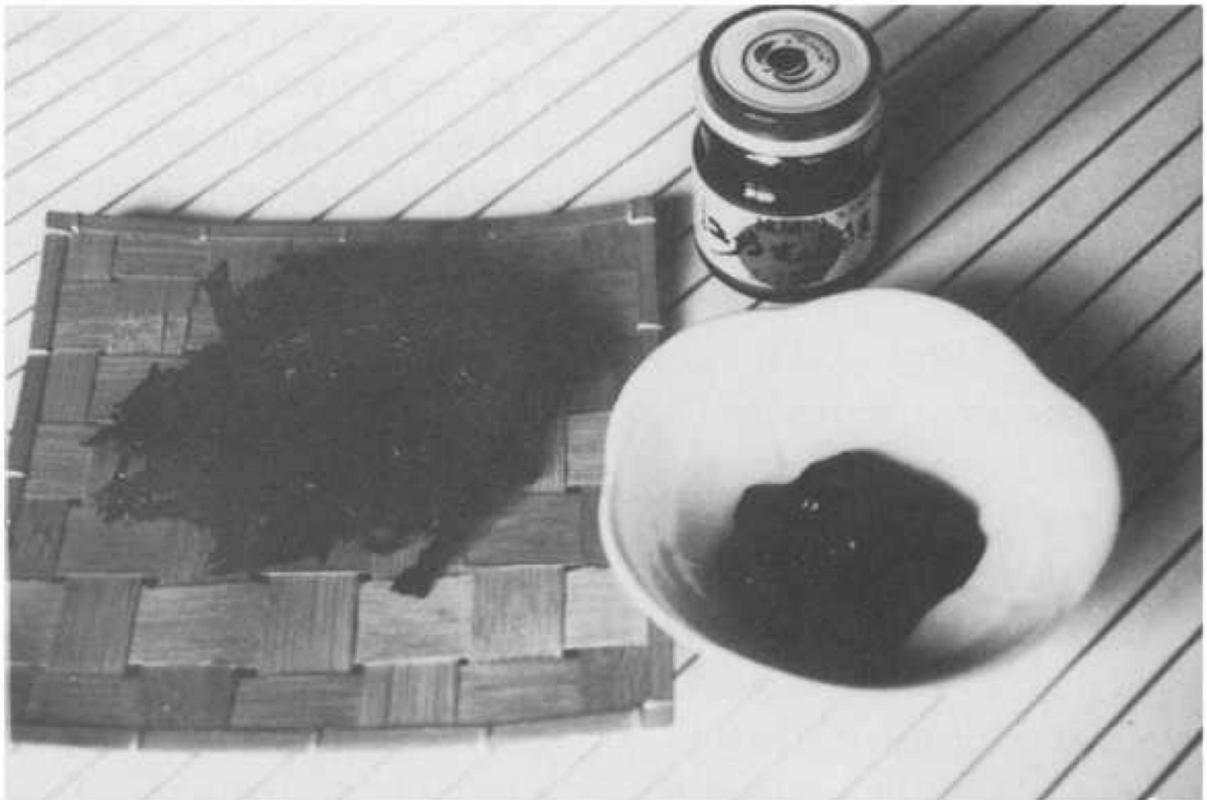


図1. アオノリ製品. [11]

表 1. 乾燥重量当たりの官能アオノリの栄養成分 [11]

	Proximate composition (%)				Minerals					Vitamins					
	Protein	Lipid	Carbohydrate		Ash	Ca	P	Fe	Na	K	A activity	B ₁	B ₂	Niacin	C
			Non-fibrous	Fiber		(%)	(%)	(ppm)	(%)	(%)	(IU)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
Sea lettuce (<i>Ulva</i> spp.)	26.1	0.7	46.1	5.1	22.6	1.12	0.094	62	3.183	0.731	590	0.8	5.7	118	120
Green laver (<i>Enteromorpha</i> spp.)	19.5	0.3	58.1	6.8	15.2	0.91	0.80	350	0.57	3.50	13000	6.0	20.5	65	432
Hitoegusa (<i>Monostroma</i> spp.)	20.0	1.2	57.2	6.7	14.9	0.69	0.20	25	1.80	0.81	2700	4.3	13.3	35	540

1. 2 海藻の味成分

海藻にはビタミンやミネラル以外の栄養素はあまりないとされ、従来の食品栄養学では栄養価の高い食品ではなかった。それは、消化・吸収されやすい栄養素が少ないためである。しかしながら、近年、ダイエタリーをキーワードとした低カロリー食品の価値が上がり、食物繊維の栄養生理効果が明確となってから、海藻は見直されてきている。また、海外でも日本食が注目されているので、寿司と共に普及した海苔だけでなく、海藻の健康食としての認識も広がっている。海藻にはグルタミン酸、アスパラギン酸などの旨み成分や甘みをもつグリシン、アラニン、プロリンなどが多く含まれているため、日本では出汁として良く利用されている。しかし、アオノリは昆布などと比べると味はなく、出汁としての価値は低く、多くは風味付けとして利用されている。また、海藻類は捕食されないように化学物質を分泌している。例えば、アルギン酸を多量に含む褐藻類を好んで食するアワビ類に対して、フロログルシノールで構成するフロロタンニン[12, 13]があり、強い渋みを感じる。

1. 3. 1 海藻の生理活性物質

海藻はかなり昔から食用を中心として利用されてきた。それは、海藻には、健康を維持、増強させるために必要な成分が多く含まれており、何らかの形で体感性があったことにより、伝承されてきたのではないかと思われる。例えば、沖縄県では、高齢者の食生活を調査した結果、摂取頻度の高い海藻利用が、動物試験により糖代謝の改善やコレステロール低下作用に効果がある可能性が示唆されている [14]。

これは、機能性を有する成分、つまり、生理活性物質による効果への影響が大きいと考えられる。これらの機能性に関する研究は 1950 年頃から始まり、知見の積み重ねや分析技術の進歩につれて、比較的近年になって明らかにされたものが多い。分析技術の進歩と共に、今後、この分野の研究は更なる発展を遂げ、人類の食のみならず、健康、エネルギー、肥料など多くの分野での有効利用とその効果の恩恵を早く受けられることが期待される。

一般に、生理活性物質とは生物体の生命活動を助長し、制御し、また、維持する化学物質とされており、生命や生体の恒常性の維持のため、生体内で産生したり、利用する化学物質のことを指す。海藻成分であるフコイダンの免疫賦活効果、レクチンの細胞凝集効果 [15]、フロロタンニン [12, 13]、フコキサンチンの抗酸化作用 [13]、タウリンの神経伝達物質として交感神経の興奮を抑え、副交感神経の働きを助ける機能など近年では、特に、海藻由来の生理活性物質として注目を集めている。

緑藻類では、カロテノイド、フラボノイド、ポリフェノール、脂肪酸など、がん予防の可能性のように、医療や食品産業において健康に良い、多くの生理活性物質が豊富に含まれている [16]。その中でもカロテノイドは、藻類に豊富に含まれて太陽光の吸収を目的としており、緑藻類との関係性が高い。産業として、カロテノイドは食用色素（日用品、飲料など）や飼料添加物、化粧品、薬剤として使用されている。特に、今日では、天然産物に対する消費者の需要が増加している。海藻由来のカロ

テノイドの生産は、他原料と比べて多くのメリットがある。たとえば、安くて、簡易、環境にやさしいことが挙げられる。原料不足の心配がなく、抽出効率、歩留りともに良い。最近では、その抗酸化特性やフリーラジカルの影響がある慢性疾患の発生を減少する能力に関連して、食事性カロテノイドにも注目が集まっている。おそらく、カロテノイドは、種々のメカニズムで一重項酸素のダメージを消すことにより、酸化ストレスから細胞を守るのであろう。それゆえ、海藻由来のカロテノイドは、海藻の生理活性物質を話す上で、潜在的機能性物質の研究において、もっとも注目すべき天然資源の一つである [13]。

1. 3. 2 カロテノイド

光合成生物として海藻は、異なる数種のクロロフィルやカロテノイドの合成ができる [18,19]。今日、カロテノイドの生産は、海藻のバイオテクノロジーにおいて、もっとも成功した活動の一つである。その理由は、カロテノイド合成品は、より生産コストは低いという事実にもかかわらず [19]、化学合成品に代わる天然物の需要の高さである。商業的な海藻の収穫量の増加も、環境にとって都合がよいと考えることができる。その理由は、光合成である。たとえば、二酸化炭素を吸収する生物の培養は、温室効果ガスの排出を制限できる。カロテノイドは、初めて天然色素として使用されたものの一つである。カロテノイドは、いくつかの鳥、昆虫、海洋動物と同じようにいろいろな果物、野菜、花の明るい色の原因である [20, 21]。

大型藻類の染料は、最近、褐藻類（例えば、*Laminaria spp.*、*Undaria pinnatifida* [7, 22, 23, 24]）や赤藻（例えば、*Corallina elungata* [25]）に含まれる天然のカロテノイドを研究されている。商業的カロテノイドの産生に適した微細藻類の染料は、*Dunaliella salin*、*Chlorella spp.*、*Haematococcus pluvialis* や *Spirulina spp.* [5, 26, 27] である。カロテノイドは、乾燥物質あたり 1-2g/kg のレベルで微細藻類で生じる。

生合成の機能にとって、カロテノイドは、シアノバクテリアで明るい光から守るため [28, 29]、細胞膜に存在する間に、チラコイド膜で色素タンパク質複合体を形成するタンパク質と結合する必要がある。海藻中でカロテノイドは、光合成の明期の間、補助的に光を捕捉する色素として、また、一重項酸素やフリーラジカルのような活性酸素種を除去することにより、過度な光の消失から光合成機構を守る原因物質として機能するようである [25, 30, 31]。β-カロテンは、保護機能があり、その他のカロテノイドは、主に光を捕捉する機能があるかもしれない [17]。海藻中でカロテノイドは、屈光性や走光性も一因となりえる [32]。さらに、光や温度もしくは、塩濃度のような環境的、培養的ストレス下で、いくつかの微細藻類は、それら自体を

防御するため、カロテン生成工程を通して活性化した二次代謝産物を産生する能力がある。それにもかかわらず、海藻中のカロテン生成の合成経路は情報が少ない。なぜならば、遺伝子と使用される酵素がまだ、明確になっていないからである [17]。

カロテノイドは、食品、飼料産業で広く使用されている (図 2)。近年では、商業分野への応用ができる抗酸化性、抗炎症性の特性に関して食事性カロテノイドが注目を集めている。

カロテノイドはプロビタミン A 活性がある。カロテノイドは、天然で見つかった。それらの内、約 40 種類は、吸収され、代謝され、人体内で利用される。そして、約 6 種類は通常、血清中で検出される [33]。人間や動物はカロテノイドを最初から生合成することはできない。これらは、食品から供給されるか、一部、前駆体から代謝反応を通して修飾される [34,35]。いくつかのカロテノイド、約 10%は、ビタミン A (レチノール) へ代謝される。ビタミン A の前駆体として働くそのようなカロテノイドは、酸化型官能基はなく、11 個のポリエン鎖と少なくとも 1 つ β 環を持たなければいけない [36]。これらのカロテノイドでは、共通して β -クリプトキサンチンやいくつかのカロテノイド分解物のようないくつかのキサントフィルと同じように、 α -カロテンや β -カロテンを含んでいる [37, 38, 39]。カロテノイドの全ての分子は、レチノール (ビタミン A) へ変換されるレチナールを 2 つ産生するので、 β -カロテンは、最も高いプロビタミン A 活性を持つ。そのような手順は、酵素 β , β -カロテン-15, 15'-モノオキシゲナーゼにより触媒される酸化を通して得られる [18, 36]。北アメリカとヨーロッパ数国に住む 50 万人の女性の調査から推定された β -カロテンの 1 日の平均摂取量は、2~7mg の間であった [40]。 β -カロテンのプロビタミン A 活性は、100%になると評価された [41]。人間や地球上に住む動物の中では、 β -カロテンは、主に肝臓で蓄えられる一方で、海洋動物内では、生殖腺に蓄えられるので、海洋動物にとって、 β -カロテンは、繁殖に必須である [37]。過度の β -カロテンは、体内の

脂肪組織で蓄えられ、安全性に問題はないが肌が黄色になる [42]。

表 2 には、大型海藻、微細藻類由来の最も一般的なカロテノイド誘導体のいくつかを示した。伝統的に、カロテノイドは、自然色の向上剤としての特性のために、食品、飼料産業で使われてきた。しかしながら、 β -カロテンやカンタキサンチン、アスタキサンチン、ルテイン [7, 43]のように商業的に利用されてきたのはわずかである。アスタキサンチンは、とても強い抗酸化物質でビタミン C や E、その他のカロテノイドよりも効果が高い [44, 45]。特にアスタキサンチンの抗酸化力は、 β -カロテン、ルテイン、ゼアキサンチン、カンタキサンチンよりも約 10 倍、 α -トコフェロールよりも 500 倍以上にもなる。フコキサンチンは、天然のカロテノイドの全体の生産の 10%以上を占める [35, 46]。アスコフィラムノドサムやラミナリア種など褐藻類の葉緑体中に存在するカロテノイドである [7]。褐藻類に含まれるカロテノイドの大部分はフコキサンチンである。特徴として、フコキサンチンは、他のカロテノイドが、ほとんど抗酸化力を無くす酸素欠乏状態でも、まれなアレン構造を含むため、抗酸化物質として働くことである。 β -カロテンは、最も普及している食品着色料の一つであり、紫外線放射により引き起こされる胃腸ガン、関節炎、早期老化のような、いろいろ疾患に関与するフリーラジカルの有害効果の調整を助ける強い抗酸化力がある。ルテインとゼアキサンチンは、多くの研究により、人の眼の黄斑の正常な視覚機能のメンテナンスや黄色の主要な色素であることが示されている [47, 48]。なぜならば、カロテノイドの抗酸化活性が、光化学反応のどんな副作用からも保護するためである。特に 65 歳以上の人で黄斑変性症、視力の低下を取り戻せない主な原因は、ルテインとゼアキサンチンの低レベルと関連付けた [49, 50]。

アスタキサンチンやフコキサンチン、 β -カロチン、ルテインやゼアキサンチンのような海藻由来のカロテノイドは、革新的な潜在的機能性物質の研究において、主要な天然資源となるだろう。今日、これらの天然のカロテノイドは、合成したカロ

テノイドよりも好まれ、化粧品や薬剤と同じように食品や飼料業界でも応用例を探している。これらの海藻由来のカロテノイドの有益な利用を生かし、確認や開発のため、将来、更なる研究が必要になる。

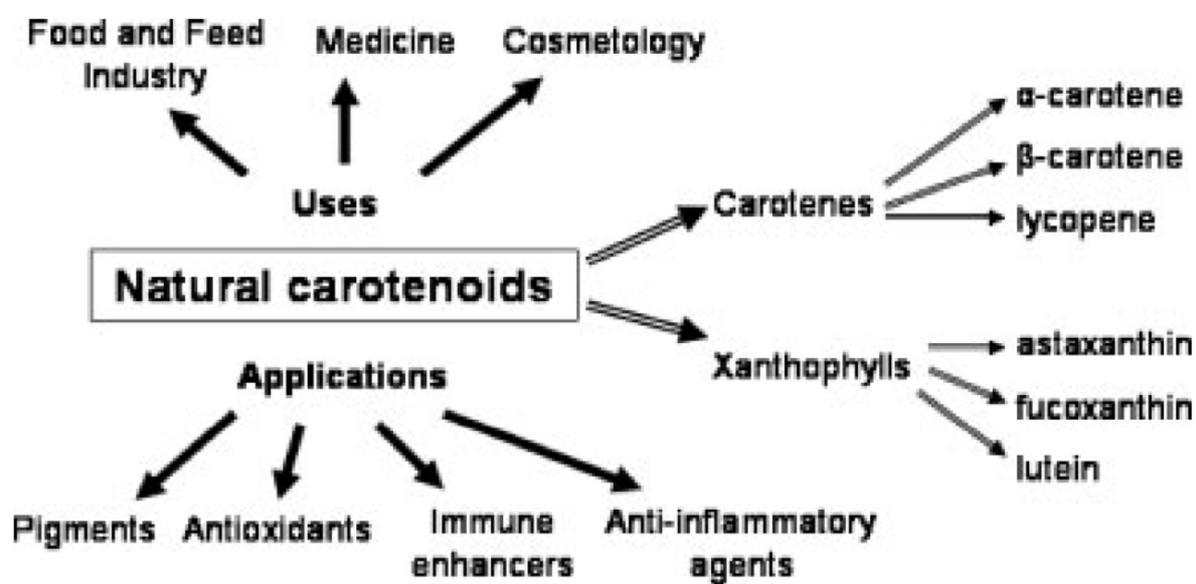


図 2. 海藻由来の天然カロテノイド分布、生物学的機能と応用. [13]

表 2. 大型藻類と微細藻類由来の主なカロテノイド誘導体 [13]

Algae	Carotenoids
Macroalgae	
<i>Phaeophyta</i> (brown algae) e.g. <i>Laminaria</i> spp.	Fucoxanthin, β -carotene, violaxanthin
<i>Rhodophyta</i> (red algae) e.g. <i>Porphyra</i> spp.	β -Carotene, lutein, zeaxanthin
<i>Chlorophyta</i> (green algae) e.g. <i>Ulva fenestrare</i>	α -Carotene, neoxanthin, violaxanthin, siphonoxanthin
Microalgae	
<i>Dunaliella salina</i>	β -Carotene, α -carotene, zeaxanthin
<i>Hematococcus pluvialis</i>	Astaxanthin, canthaxanthin, lutein
<i>Chlorella</i> spp.	Astaxanthin, lutein, β -cryptoxanthin, canthaxanthin
<i>Scenedesmus</i> spp.	Lutein, β -carotene
<i>Spirulina</i> spp.	β -Carotene, zeaxanthin

1. 3. 3 β-カロテンの熱分解物

生茶葉から抽出したカロテノイドと同じように β-カロテンの純品を製茶工程で行われる温度に類似させて 90℃、120℃、150℃で加熱し、その生成物は、川上 [51]により、GC-MS を用いて分析された。

その結果、40 の熱分解物が分離され (表 3)、そのうち主要な成分として 2, 6, 6-トリメチル-2-ヒドロキシ-シクロヘキサノン、β-シクロシトラール、β-イオノン、5, 6-エポキシ-β-イオノン、ジヒドロアクチニジオライド、2, 6, 6-トリメチル-2, 3-エポキシ-シクロヘキシリデン-1-アセトアルデヒドを同定し、2, 6, 6-トリメチル-2-ヒドロキシ-シクロヘキサノン-1-アルデヒドを推定した (表 4)。これらの化合物は、すべてヨノン環を有しており、β-カロテンより生成したと考えられる。加熱温度により各香気成分の生成量に大きな差がみられ、官能評価結果と一致していた。つまり、90℃では、5, 6-エポキシ-β-イオノンの比率が高いため花様の香りが強く、150℃のもの、よりもさらに増加した。2, 6, 6-トリメチル-2-ヒドロキシ-シクロヘキサノン、2, 6, 6-トリメチル-2-ヒドロキシ-シクロヘキサノン-1-アルデヒド、ジヒドロアクチニジオライドの比率が高く重厚な香りが形成され、中間の 120℃は、両方の香りと β-シクロシトラールによる青苦い香りを有していた。以上の結果は、製茶行程中における加熱温度が香気形成に与える影響が大きいことを示している。アオノリの乾燥工程は、天日干しが多いため、そこまで加熱はされないとしても、海藻中に多く含まれるカロテノイドが、熱分解物の影響を避けられないものとする。

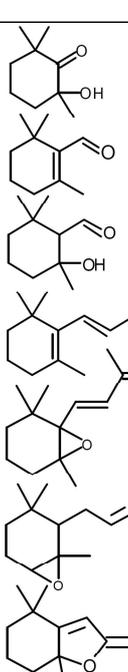
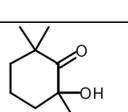
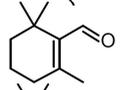
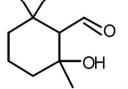
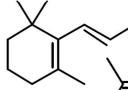
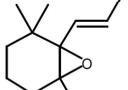
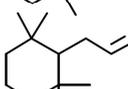
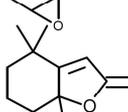
表 3. β -カロテンの熱分解生成物 [51]

Peak No.	t_R (min)	Compound	Peak area (%)			Detection ^a
			90°C	120°C	150°C	
1	7.0	<i>n</i> -Tridecane	0.2	0.2	0.5	
2	7.3	2, 6, 6-Trimethyl-cyclohexanone	0.2	0.1	0.5	trace
3	8.0	2-Methyl-2-hepten-4-one	0.2	0.2	0.5	
4	8.8	2, 6, 6-Trimethyl-cyclohex-2-enone	0.4	0.1	0.5	
5	9.0	<i>n</i> -Tetradecane	0.2	0.1	0.2	
7	11.4	Benzaldehyde	0.2	0.6	0.5	
8	11.6	Unknown	0.7	1.6	2.4	
9	11.9	Unknown ($M^+ - 140$)	1.4	1.9	2.2	
10	13.6	2, 6, 6-Trimethyl-2-hydroxy-cyclohexanone	3.8	3.5	9.2	+
11	14.3	β -Cyclocitral	0.8	2.9	1.0	trace
12	14.7	Unknown ($M^+ - 168$)	0.3	0.1	0.2	
15	17.1	Ionene	0.2		0.5	
18	21.9	2, 6, 6-Trimethyl-2-hydroxy-cyclohexane-1-aldehyde ^b	4.6	2.2	14.9	+
19	22.1	Benzylalcohol	0.2		1.5	
20	23.1	Unknown ($M^+ - 208$)	0.5		1.0	
21	23.4	Unknown ($M^+ - 166$)	0.6	0.3	1.2	
22	23.7	BHT (artifact)	—	—	—	
23	24.6	β -Ionone	2.5	7.9	1.5	+
27	26.5	5, 6-Epoxy- β -ionone	24.3	17.1	9.0	+
30	30.0	2, 6, 6-Trimethyl-2, 3-epoxy-cyclohexyliden-1-acetaldehyde	2.5	2.0	2.0	
33	32.7	β -Damascone	0.2		0.2	
35	34.3	α -Cadinol	1.1	2.0	0.3	
36	34.6	Unknown ($M^+ - 166$)	4.9	3.0	2.1	
38	36.1	Unknown ($M^+ - 168$)	1.5		0.5	
39	37.9	Dihydroactinidiolide	35.5	42.2	45.4	+
40	38.9	Alkylbenzene	0.2		0.2	
42	41.9	3-Keto- β -ionone	1.4	1.5	0.2	

^a Detection in thermal degradation products of carotenoids extract from tea leaves.

^b Tentative identification. Peak 18 m/z 43(100), 109(98), 69(96), 86(64), 71(34), 127(20), 170(2).

表 4. 熱分解による β -カロテンの主な生成物 [51]

Compound		Peak area (%)			Flavor
		90°C	120°C	150°C	
2, 6, 6-Trimethyl-2-hydroxy cyclohexanone		3.8	3.5	9.2	Greenish & citrusy
β -Cyclocitral		0.8	2.9	1.0	Greenish & citrusy
2, 6, 6-Trimethyl-2-hydroxy Cyclohexane-1-aldehyde		4.6	2.2	14.9	Floral like geraniol
β -Ionone		2.5	7.9	1.5	Violet-like
β -Ionone-5, 6-epoxide		24.3	17.1	9.0	Sweet violet-like
2, 6, 6-Trimethyl-2-epoxy cyclohexyliden-1-acetaldehyde		2.5	2.0	2.0	Hay-like
Dihydroactinidiolide		35.5	42.2	45.4	Sweet peachy aroma
Total		74.0	77.8	83.0	

1. 3. 4 カロテノイドの酵素分解とアポカロテノイド

カロテノイドは、前述したように熱分解することが知られているが、動植物内では、カロテノイド酸化開裂酵素 (CCDs: Carotenoid cleavage dioxygenases) によって、分解され、アポカロテノイドを生合成している。この酵素は、カロテノイドをアポカロテノイドへ酸化開裂する酵素である。この酸化開裂酵素は、広く分布しており、Marasco ら [52] により CCD1 をコードする遺伝子は、シアノバクテリア (*Nostoc* sp. PCC 7120) から初めて同定された。この酵素は、不揮発性のカロテノイドやアポカロテノイドの長鎖の開裂を触媒する。そして、数多くの CCDs をコードする遺伝子が見つけられた [53]。

カロテノイド開裂酵素に関しては、その多種多様な酵素活性が、単にそれぞれの生物活性を持つアポカロテノイドの形成に専念するかどうか、それらの C₄₀ 前駆体の恒常性の管理にも重要な貢献をしているかどうかわかっていない。言い換えると、カロテノイドの蓄積が、光化学過程もしくは、酸化ストレスの条件のため、主に C₄₀ カロテノイドの破壊もしくは損傷により制限されるかもしれない。カロテノイドは、抗酸化剤としてよく知られているが、活性酸素種の消去だけでなく、酸化ストレスの条件下において、カロテノイド自身を犠牲にする働きがあるかもしれない。実際に、紫外線、熱、次亜塩素酸塩やヒトの血液から白血球調合液を含む物理的もしくは化学的ストレスの条件に、インビトロでカロテノイドをさらすことは、短鎖アポカロテノイド (C₁₃ イオノンや C₁₀ 誘導体) や長鎖アポカロテノイド (C₃₅, C₃₀, C₂₅, C₂₀) の両方を β-カロテンから生成させた[54]。また、リコピンや β-カロテンを基質として、酸化剤や金属ポルフィリンを使って化学的酸化システムをテストした。結果として、激しい酸化条件では、すべての二重結合は、非特異的に開裂することが示された[55]。酸化開裂産物へのカロテノイドのある一定の損失は、集光性の効果が、ほのかな明かりに中で最大化される必要があり、そして、光防護活性のため、強い

光の下で急に減少するとき、大いに期待される。しかしながら、秋の葉の黄色やオレンジ色の持続から、おそらく、光化学的カロテノイド分解は、低いということがわかる[56]。

カロテノイド由来の揮発性化合物は、最も潜在的な芳香化合物の一つであり、果物、野菜、加工食品の匂いとして貢献している。これらの化合物は種々の海藻からも放たれており、水生植物の香りに影響する。生物学的アプローチとして、最近、Baldermann ら [57] により、緑藻からカロテノイド酸化開裂酵素の同定や C₁₃-アポカロテノイドとその生物学的活性についての報告があった。Baldermann らは、緑藻であるヒラアオノリ (*Ulva compressa* (L.) Nees) より、遠心沈殿クロマトグラフィーやらせん状チューブ支援ローター (a spiral tubing support rotor) を装備した高速向流クロマトグラフィーシステム (a high-speed counter-current chromatography : spHSCCC) を用いて、カロテノイド開裂酵素の単離、同定を実施した。これは、spHSCCC を用いて天然物から活性酵素を分離した初めての研究である。酵素は、精製された画分より、相対的に 65 と 75kDa の 2 種類の蛋白質として含まれていた。精製された酵素は、β-カロテンやβ-アポ-8'-カロテナールを開裂してβ-イオンを生成することができた。また、報告のあった生物学的活性とは、カロテノイドの分解物である C₁₃-アポカロテノイドやそれらの代謝物が示す成長調整効果である。

揮発性のアポカロテノイドは、海藻における生合成や機能について、まだ明らかにされていない。この 10 年間、アポカロテノイドを生成するカロテノイド酸化開裂酵素 (CCDs) の同定や定性に特別な興味が注がれていた。これらの酵素は、カロテノイドの主鎖の二重結合を選択的に開裂するため、その基質の広範囲を利用できる。

近年、Baldermann らは、日本で調味料として使われ、培養もされている緑藻のヒラアオノリ (*Ulva compressa*) より、CCD 様の酵素を同定した [57]。CCD1 と CCD4 とと思われる酵素も、植物体で同定、定性した。海藻由来の酵素は、カロテノイドや

アポカロテノイドを基質として利用して、 β -イオノンを生合成する。豊富な量の 7, 8-ジヒドロ- β -イオノンの生合成は、主に 2 ステップで行われる。それは、 β -カロテンの酸化開裂により β -イオノンが生合成され、同じく特異的酵素により β -イオノンが還元され 7, 8-ジヒドロ- β -イオノンとなる 2 つのステップである。 β -イオノンや 7, 8-ジヒドロ- β -イオノンなどの揮発性アポカロテノイドは、その香気としての重要性だけでなく、さらなる生物学的機能を証明することに特別な興味注がれた。 β -イオノンなどの揮発性アポカロテノイドのいくつかは、とりわけ、強い匂いを持つだけでなく、ホルモンや受粉媒介者の誘引物質、他感物質として機能することができると報告されている [57]。

1. 4 海藻の香気成分

植物由来の「みどりの香り」と「磯の香り」は、ともに酸素の存在下に 20 億年前に獲得された酸素添加酵素であるリポキシゲナーゼ (図 3) によって、初めて生合成された [58]。

海浜には、人の心を落ち着かせたり、爽快な気分させる効果がある。これは、主に磯の香りや波の音、リズムそして涼風など、人の視覚、聴覚、嗅覚、触覚への刺激が引き起こしているものと考えられる。大多数の日本人にとって、磯の香りは馴染み深い、その特徴的な化合物が何で、どのような香気成分によって構成され、ハワイや沖縄など地域差があるのかなのか、まだわかっていないことが多い。

海藻の主要な香気成分である揮発性有機化合物は、高い蒸気圧と小から中程度の親水性を持つ低分子の化合物であり、大気中へ自由に放たれるように細胞膜を横断できる。そして、揮発性有機化合物は、植物にとって防御システムや繁殖を可能とするような取り巻く環境との相互作用や情報伝達として働く。海藻類で同定されたいくつかの化合物群は、高等植物と昆虫の関係に重要な役割を担うことが知られている [59]。

また、揮発性有機化合物の生成は、種の生理と密接に関連している。海藻は無生殖性の生物であり、ライフサイクルの中で非生物のストレス（ミネラル組成や海水の温度、日照時間など）に対応しなければ生きていけない。このように、同じ種でも異なる生育環境は揮発性有機化合物の異なる組成や特性に影響する。

さらに、海藻の揮発性成分は、広範囲にわたる二次代謝産物を産生するために、治療薬剤への応用について、長期にわたって研究されてきた。炭化水素類、テルペン類、脂肪酸類、アルコール類、アルデヒド類、ケトン類、ポリフェノール類、ハロゲン化物や含硫化合物は海藻に分布している [59]。

話は変わるが、海藻由来と考えられる香気成分が沿岸域や海浜の大気中に検出さ

れているという研究報告がある。確かに磯の香りの構成成分としては、ジメチルスルフィドが有名である。この成分は、緑藻のアオサやアオノリなどに含まれるジメチル- β -プロピオチンが酵素により開裂して、抗菌性のあるアクリル酸と共に生成する。牛肉に特徴的に含まれるトリチオランやしいたけに特徴的に含まれるレンチオニンといった環状ポリスルフィドも、いくつかの赤藻で発見されている [60]。この他、硫化水素、メチルメルカプタン、モノスルフィド、トリスルフィドなどの含硫化合物が、海藻の特徴的な匂い成分になっていることがある。

このような海藻に特徴的な香气成分の中には、褐藻中で見つけられたディクチオプテレン類がある。これらは、日本沿岸に生育するヘラヤハズやシワヤハズなどにも含まれることが分かっているが、特に褐藻の性フェロモンとしての役割を果たしていることが明らかになり注目された。これらは、アラキドン酸の 9 位に酵素が不可してヒドロペルオキシドが生成し、酵素によって開裂してディクチオプテレン C' など性フェロモンを生成する生合成経路まで明らかにされつつある[61]。

近年、日本沿岸の至る所に生育しているアナアオサ、ヒトエグサ、スジアオノリなどの主成分とされる長鎖不飽和アルデヒド類は、相当する脂肪酸からその α -位に分子状酵素により付加し、オキシリピンの一種である 2-ヒドロペルオキシドが生じ、これが脱炭酸することにより生合成するメカニズムが明らかになった (図 4)。

梶原 [58]によると、ワカメは、食用海藻の中で最も消費量が多く、ほとんどの日本人が口にする褐藻である。水蒸気蒸留すると特有の香りを持つ精油が得られ、GC-MS 分析の結果、キュベノール(13)が 90%もの割合で含まれていることがわかった。ヤハズ (Dictyopteris) の一種であるスジヤハズは、海藻よりも海洋を想起させる香りであるが、それは、ディクチオプテレン A (図 5, (1))、B (図 5, (2))、C' (図 5, (3))、D' (図 5, (4))、ディクチオプロレン (図 5, (6))、ネオディクチオプロレン (図 5, (7))、ディクチオプロレノール (図 5, (8))、ネオディクチオプロレノール

(**図 5**, (9)) などから構成される。アサクサノリは 100 種類以上の揮発性成分からなる複合香である。アサクサノリ系、スサビノリ系の板ノリ乾燥品、生ノリ、ノリ糸状体から得る精油から β -シクロシトラール (**図 5**, (14))、 β -イオノン (**図 5**, (17))、ジヒドロアクチニジオライド (**図 5**, (16)) などアポカロテノイドが主成分であった。アオサ、ヒトエグサ、スジアオノリなどの緑藻も大量に食べられているが、その揮発性成分は、(7Z, 10Z)-ヘキサデカジエナール、(8Z)-ヘプタデセナール (**図 5**, (10))、(8Z, 11Z)-ヘプタデカジエナール (**図 5**, (11))、(8Z, 11Z, 14Z)-ヘプタデカトリエナール (**図 5**, (12)) などの長鎖アルデヒド類が主成分である。ワカメと並び水産業で重要な褐藻である昆布、例えばミツイシコンブでは、キュベノールはワカメの 10 分の 1 程度しか含まず、(2E)-ノネナール、2-ノネノール、テトラデカン酸など脂肪酸から生合成される化合物が主要香気成分である。また、アポカロテノイドも寄与しており、例えば 11-アポカロテノイドである β -シクロシトラール (**図 5**, (14)) と β -ホモシクロシトラール (**図 5**, (15)) やジヒドロアクチニジオライド (**図 5**, (16)) が挙げられる。また、性フェロモンとしてラモキシレン (**図 5**, (5)) があるコンブの培養液から発見され、その化学構造も明らかにされた。この他、食用昆布の特徴的な香気成分として 7-ヘプタデセンが知られている[60]。

Okano ら [62] は、海藻中の 7-ヘプタデセンとフィトールの含有率の季節変動について研究し、7-ヘプタデセンは、夏場を除くと、通常、かなりの量が含まれていることが分かった。本試験においても、全てのサンプルから大量に検出されている。緑藻であるアナアオサ (*Ulva pertusa*) では、ヘキサナール、(E, E) - 2, 4 - ヘプタジエナール、2, 4 - デカジエナール、ペンタデカナール、(Z, Z) - 8, 11 - ヘプタデカジエナール、(Z, Z, Z) - 8, 11, 14 - ヘプタデカトリエナール、(Z) - 8 - ヘプタデセナール、(Z, Z) - 9, 12 - オクタデカジエナールが、乾燥前の海苔の主要なアルデヒド類であり、これらの炭素鎖 17 の不飽和アルデヒドはキュウリやタバコの葉 [60] と同じ青っぽい、

草のような特徴的な匂いがする。また、これらのアルデヒドは、炭素鎖 18 の不飽和脂肪酸よりリポキシゲナーゼにより生成し、閾値が低い。淡水魚の特徴的な香気成分として知られている(*Z, E*)-2, 6-ノナジエンアルが含まれていたことも興味深い [60]。

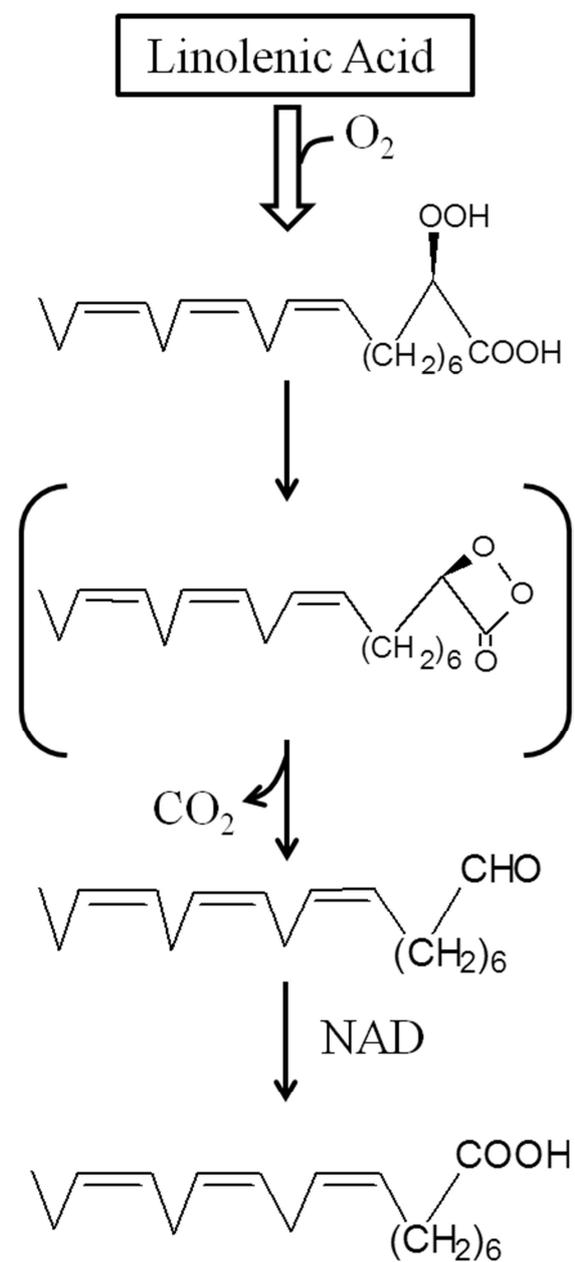


図 4. 褐藻類の脂肪酸由来 2-ヒドロキシペルオキシド介在長鎖アルデヒド合成機構

[58]

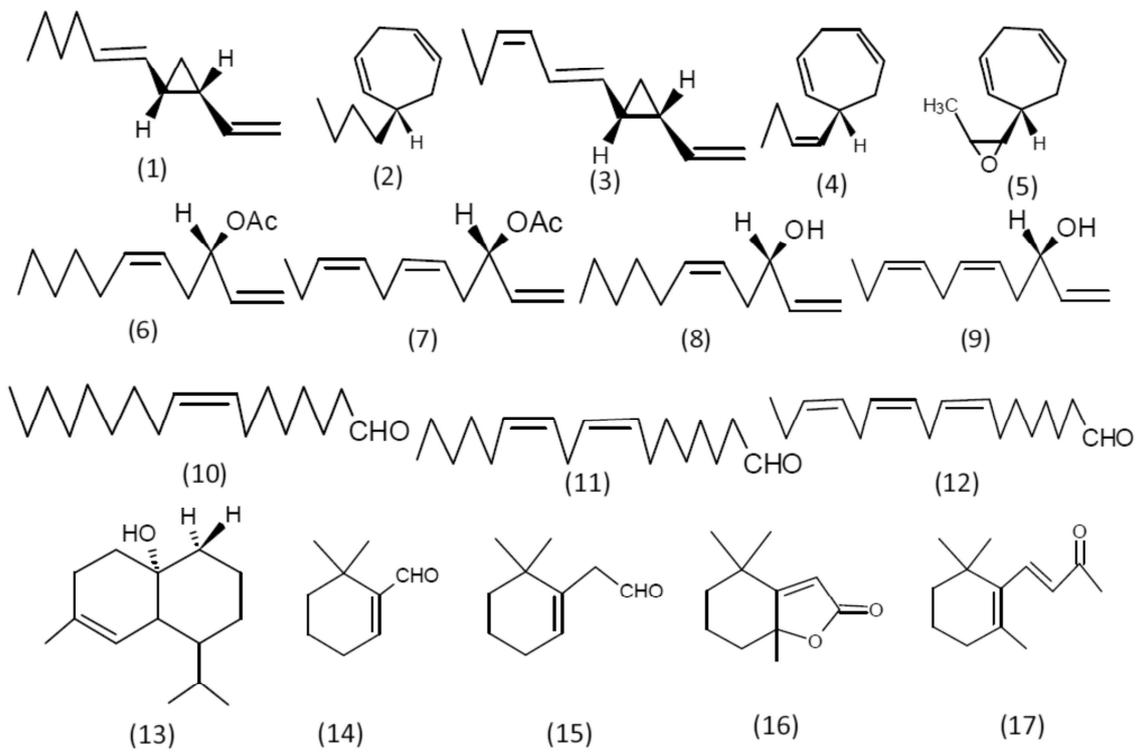


図 5. 海藻香気成分の構造式. [58]

1. 5. 1 香気成分分析法

植物による揮発性有機化合物の生成はよく知られている。しかしながら、緑藻、褐藻、赤藻により生成する揮発性有機化合物については、数グループしか研究していない。水蒸気蒸留とクロマトグラフ法（たとえば GC-MS）を合わせた分析による従来の抽出法と同じようにヘッドスペースの香気成分の捕集や SPME 法は、植物や海藻から得られる揮発性香気成分の研究に、大変な進歩をもたらした。海藻中で発見された主要な揮発性化合物は、炭化水素、テルペン類、フェノール類、アルコール類、アルデヒド類、ケトン類、エステル類、脂肪酸類、ハロゲンもしくは含硫化合物である。ここでは、揮発性有機化合物を抽出・同定するための各種方法は、以下に述べる [59]。

1. 5. 2 揮発性化合物の抽出

藻類から揮発性化合物を抽出する方法はいくつかある。それらの工程の基本的な目的は、もっとも高品質な物質の最大の回収率を得ることである。溶媒抽出や水蒸気蒸留、電子レンジ抽出、超臨界流体抽出、ヘッドスペース抽出は、藻類サンプルを用いた揮発性成分分析の抽出法として一般的に使用されてきた。

まず、水蒸気蒸留は、Clevenger や Dean-Stark のような多くの異なる装置を利用する、もっとも一般的な揮発性の有機化合物の抽出法である。水蒸気蒸留は、蒸気圧により揮発性有機化合物の揮発を促進するため、代表的には 4 時間、水蒸気を使用して揮発性成分を抽出する。水蒸気蒸留法は高度な抽出法ではない。時間はかかるし、低い抽出効率や揮発性化合物のロスなどのデメリットな点もある。さらに、温度上昇や水蒸気の使用は、天然成分の一部、もしくは完全分解 [63] の原因となりえる。

次に、集束マイクロ波支援水蒸気蒸留抽出法は、近年、エッセンシャルオイルの抽出法として注目されてきた。代替抽出技術としてマイクロ波の使用は、1986 年、Ganzler ら [64] によって初めて報告された。赤外線温度捕獲と変調器が備わった電子レンジは集束マイクロ波支援水蒸気蒸留抽出法のために使用された。海藻または、溶媒抽出物は、電子レンジと接続できる Clevenger もしくは Dean-Stark 装置へ水と混ぜられた。そして、マイクロ波エネルギーは、単なる水蒸気蒸留法 [63] よりもより早く揮発性有機化合物を揮発することができる。水素結合の振動する工程となるため、マトリックス中の溶媒の浸透を高めるイオンの移動や分子の双極子の回転を誘発した結果として、抽出された成分は溶解する。揮発性有機化合物の化学的構造は、論理上は類似していると思われる。しかしながら、このことは、全部解明されなかった。抽出工程でマイクロ波を使用することは、短時間で高い抽出効率を引き起こし、より低コストの運用が可能となる。一方で、集束マイクロ波支援水蒸気蒸

留抽出法の使用への懸念事項は、マイクロ波照射にさらされる時間が延びるほど、サンプル劣化の可能性があることです。照射力とは抽出時間は、高収率でエッセンシャルオイルを得るためにコントロールされる。

また、溶媒抽出法 (Solvent Extraction) は、3つのカテゴリーに分けられる。つまり、固体-液体、液体-液体、気体-液体の系である。植物原料の揮発性有機化合物の抽出の場合、固体-液体抽出は、もっとも一般的な実験系である。固体-液体抽出は、固体マトリクス分解の依存性や溶媒へ放出される化合物の量に影響する選定溶媒との強烈な接触が特徴である [65]。溶媒とサンプルの比率、溶媒のタイプ、抽出時間と温度は、このタイプの抽出で研究された。溶媒とサンプル比の効果は、異なる原料を用いて多くの著者によって研究された。質量移動の原理によると、溶媒を使用するにもかかわらず、著者らは、高比率であるほど得られる固形量は高いことがわかっている。溶媒の対応はもっとも研究された要因である。水素結合受容体傾向、水素結合供与対傾向、極性、非極性、双極子モーメント、誘電率、粘度、表面張力凝集エネルギー密度 (溶解度の2乗と等しい) を含む、多くの溶媒のパラメーターは、抽出液中で干渉する。Gu et al.らは、2004年、最も利用される96の溶媒の特性をまとめた [66]。抽出時間と温度は、一連の工程のエネルギーコストを最小にするために、最適化する重要なパラメーターである。しかしながら、溶媒中抽出法には多くのデメリットがある。それは、異なる抽出段階の間、揮発性有機化合物が損失してしまうこと、抽出物のさらなる濃縮が必要にあることなどが挙げられる。サンプルの劣化は、環境汚染や人工物の構造を引き起こす原因となる。

ヘッドスペース抽出は揮発性成分の構造を壊さない方法である。揮発性成分の統計データのより現実的な概念は、藻類[38]を用いて述べられた。この方法では、揮発性サンプルの構成成分は、まず気相へ移され、ガスキピラリーカラムによるその後の分析に供される。ヘッドスペース法は、溶媒は不要で、より少ない原料で使用で

き、微量から多量まで揮発性有機化合物を抽出できる。ヘッドスペース法の抽出条件の最適化は、異なる温度、平衡化、抽出時間のテストが必要となるかもしれない。静的ヘッドスペース法 (Static Headspace : SHS 法)、ダイナミックヘッドスペース法 (Dynamic Headspace : DHS 法)、固相マイクロ抽出法 (Solid Phase Microextraction : SPME 法) からなる。

静的ヘッドスペース分析は、低いまたは中程度の拡散定数である測定物質に適している。これらの原料とは、例えば、油溶性ガスと同じように、生態学的に重要な水溶液の揮発性芳香族化合物やハロゲン化炭化水素、テルペン類、低分子メルカプタン類、スルフィド類、ジスルフィド類、カルボニル化合物やエーテル類である。この抽出法は、二相間の質量交換と考えられ、不均一な系における化合物の分布パラメーターを決定する拡散定数の知識が必要である。

単相のガス抽出法の手順はとてもシンプルである。この方法では、原料はセプタムで閉ざされた容器の中に入れられ、多くの場合、容器は、温度調節可能なオープン中に入れられる。この分析系では、放出された揮発性の有機化合物は、トラップで吸着される。そして、定温条件で相平衡されたとき、揮発性有機化合物飽和雰囲気の一部は、シリンジで除かれ、分析のために GC-MS へ注入する。

これは、最少量のサンプルにおける簡便な溶媒不要の技術である。しかしながら、濃縮工程がないため、分析感度が低い。シリンジは、手動のサンプリングに適している。しかし、自動化が難しく、GC カラムインジェクションへ抽出された系から移動する間、ヘッドスペースのサンプルはいくらか損失する可能性がある。この分析系の他のデメリットは、気相抽出法 [67] の分析の応用に対して、実用性が限られていることである。

動的ヘッドスペース法は、おそらくもっとも広く使用されている気相のサンプリング手法です。実験スケールやプラントスケールにおいても、その適応性のために

使用されてきた。一方で、この適応性は、より複雑な器具類やサンプリング手順、良いサンプリングの再現性を得るいくつかのパラメーターの高い標準化や定量分析 [68] のための複雑な手順が必要となる。

動的ヘッドスペース技術は、容器に入った固体もしくは液体サンプルの上もしくは中に不活性ガス（通常ヘリウム）を連続的に流すことによりサンプルから揮発性成分を分離する。分析は、種々の原料の吸着剤を仕掛ける間、例えば、揮発性有機化合物を濃縮するテナックスのように、検出のため必要とされた揮発性有機化合物の量の回収を考慮に入れて、キャリアガスが容器中を循環するもしくは、容器から押し出す。この工程の後、脱離工程が必要となる。それは、一般的に熱脱離工程である。

定量分析は徹底的なガス抽出が必要となる。これは、サンプルの特性（サイズ、粘度、拡散、振とうする可能性など）や良い感度に依存し、多かれ少なかれ時間が必要となる。そして、選択性は、適したサンプリング時間や適した吸着剤が適用された [69] ときに達成される。

固相マイクロ抽出法は、Pawliszyn ら [70, 71] により考案された。従来のヘッドスペースサンプリング法の代替が、ヘッドスペース固相マイクロ抽出法（HSSPME）である。SPME の異なるタイプの吸着剤が導入がされてから、それぞれが適した異なるグループの検体を抽出するために使用された。非極性コーティングは、例えばポリジメチルシロキサンや濃縮炭化水素である一方で、極性コーティングは、例えばポリアクリル酸塩や Carbowax のようにフェノールやカルボン酸を容易に保持する。7~100 μm の厚さのポリアクリル酸塩、ポリジメチルシロキサン、ジビニルベンゼンや Carboxen のように最も使われるファイバーである。そして、検体（吸着容量、容易な脱離、無化学反応性、熱安定性）の吸着親和性の影響は、いろいろなサンプルにおいて微量有機化合物の検出を改善するもしくは、抽出法に対して、興味ある揮

揮発性有機化合物の最適化をすることは、重要な鍵として使用された。Mills や Walker は、2000 年に揮発性、半揮発性化合物の抽出のため、いくつなの商業販売されているコーティングされたファイバーのリストを与えた。このヘッドスペース SPME 法のサンプリング方法は、抽出と濃縮を一つの段階へまとめることで、高い分析能力やより少ないサンプル操作 [71, 72] をもたらした。抽出は、針のようにコートされた不活性ファイバーへの揮発性成分の吸脱着に基づく。ヘッドスペース SPME 法では、事前に決められた時間、密閉されたフラスコ中で揮発性香気成分のガスにさらされる。その後、SPME のシリンジは除かれ、そのファイバーは、GC の注入口へ挿入される。揮発性有機化合物は、熱により脱離してクロマトグラフのカラムへ供される。ファイバーから揮発性有機化合物の熱による脱離は、溶媒を必要としない。しかしながら、一度しか注入することはできない。

SPME ファイバーは、便利な技術 [71] となるために洗練されたコーティングシステムを必要としない。しかし、時間と吸着温度の最適化は、抽出において良い結果や高い再現性を得るのに必要である。

第2章 SPME-GC-MS を用いた4種のアオノリの香気成分同定

2.1 序論

ある国や地域では、高品質な緑藻（日本のアオノリを含む）を生産するという評価を受けており、とても高価な値段をつけられるものがある。日本においては、高知県四万十川流域や徳島県吉野川流域は高付加価値産物の採れる地域である。そこで、昨今の産地偽装や食品表示偽装が問題となっている日本では、特に、これらの商業的産物の真偽には非常に興味が深まっている。それにもかかわらず、今日まで消費者は、海苔のトレーサビリティーシステム導入などによる産地判別のための製品情報、食品表示などを信頼しなければいけなかった [73]。それしか選択肢がなかった。

そこで、GC-MS 分析技術と多変量解析は、偽の食材の分布を測定する重要なツールとなっており、紅茶、オリーブオイル、はちみつ、チーズやワイン[74, 75, 76, 77, 78, 79, 80]の真偽判別にも利用される。

我々は、ここで新たに、標的物質がない場合における、多変量分析による SPME-GC-MS の利用について報告する。今回用意した4つの産地の異なるアオノリを分析サンプルとして用いて、その香気性成分分析とそのプロファイリング（組成及び組成比）によって、重大な差異を検出した。このような差異は、産地判別の指標として、多変量解析の利用により同定できるということを示唆している。

2. 2 方法

2. 2. 1 原料

商業的にアオノリとして購入したサンプルである *Ulva prolifera* (2種)、*Ulva linza*、*Monostroma nitidum* は、官能評価に使用された。これらはそれぞれ、岡山県(*Ulva prolifera*)、徳島県(*Ulva prolifera*)、愛媛県(*Ulva linza*)、静岡県産(*Monostroma nitidum*)のものであった。商業販売されるアオノリは、全て日本の卸売代理店から購入した。サンプルは、気密性の高いプラスチックバックに入れて、冷暗所に保管した。官能評価したのと同じサンプルは、分析するために液体窒素を用いて細かく粉砕して使用した。

2. 2. 2 SPME の抽出条件検討と GC-MS 分析プレ試験

ポリジメチルシロオキサンファイバー (100 μ m) を使用し、メーカーの推奨に従って分析するために調整された。プレ試験として、Monotrap や溶媒抽出 (ジクロロメタン、ジエチルエーテル) と SPME 法を比較したが、同一サンプル量から溶媒抽出ではピーク検出せず、Monotrap では SPME のそれと比べてピークが小さく、簡便性と吸着量の点で SPME 法を採用した。サンプル量は当初 2g であったが、量が多すぎてハンドリング性が悪く 200mg へ変更された。SPME 分析に影響する条件としては、抽出時間、吸着時間、内部標準化合物 (エチルデカノエート) の添加量を検討した。抽出時間は 60 $^{\circ}$ C で 1, 3, 6, 16, 20, 24 時間の 6 点で実施された。ポリジメチルシロオキサンファイバー (100 μ m) への吸着時間は、60 $^{\circ}$ C で 30, 60, 90 分間の 3 点で行われた。また、内部標準の添加量は、200mg のサンプルに対して、0.086、0.86、1.72、4.3、8.6nM の 5 点で、それぞれ 1 μ l を添加した。最適条件での分析時にサンプルピークと同等レベルのピークエリアとなるように調整された。抽出時間は、200mg のサンプルを、40cm³ バイアルに入れ、内部標準として 1 μ l のエチルデカノエートを混ぜ、針が貫通できるポリテトラフルオロエチレン/シリコン製セプタムとアルミキャップで密閉した。それぞれのアオノリサンプルは、60 $^{\circ}$ C で設定時間 (抽出検討時間)、平衡化した後、SPME の針でセプタムを貫通させた。更に、ファイバーは、設定時間 (吸着検討時間)、サンプルのヘッドスペース中にさらして香気成分を吸着、捕集させた。抽出時間後、ファイバーは針の中へ戻されるとすぐに、GC のインジェクションポートへ挿入され、230 $^{\circ}$ C、1 分間の条件で吸着成分を脱着させた。

分析条件が決まったことから、4 種類のサンプル分析 (プレ試験) を行い、サンプル缶の分析結果に差異傾向があるか確認するため、SPME から脱着した香気成分は、GC-MS (System: Class-5000 workstation, MS: Shimazu GC-MSQP5000) に供して分析された。そして、シリカキャピラリーカラム (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness

(Supelco, Bellefonte, PA, USA))である Supelcowax¹⁰TMにより分離した。インジェクションは、スプリットレスモードにて 1 分間、230°Cの条件で、SPME インサートを用いて行われた。GC 測定温度設定は、初期温度である 50°Cから 160°Cまで昇温速度 3°C min⁻¹、160°Cから 240°Cまでは 10°C min⁻¹で昇温された。マススペクトルは、*m/z* 50 から 280 までの質量範囲の化合物を 70eV で走査した。また、統計分析は、XL-STAT (Version2013, Addinsoft, New York, USA)により処理された。

2. 2. 3 官能評価の方法

官能評価は、一般に消費されるアオノリを用いて、トレーニングを積んでいないパネリストたちによって実施された。この試験において、嗜好尺度は、色、味、総合的な良し悪しを評価した。なお、パネリストは、26歳から40歳の男性6名、女性3名で実施した。嗜好尺度は、9段階あり、総合的評価（好き嫌い）、緑色（濃淡）、味（強弱）として実施した。より精度を増すため、パネリストは、それぞれのアオノリサンプルの匂いがどのような質の香りだったか、9点の匂いの項目（animalic、floral、spicy、fatty、green-note、marine-like、fresh(watery)、powdery、leather-like）を設けて9段階（強弱）で評価した。サンプルは、ガラスビーカーでランダムにパネリストへ提供された。官能評価手順は、パネリストに説明した後、試験を実施した。

2. 2. 4 分析・解析方法

ポリジメチルシロキサンファイバー (100 μm) は SPME マニュアルフォルダーに取り付けられた。全てのファイバーは、メーカーの推奨に従って分析するために調整された。SPME 分析に影響する条件 (抽出方法、抽出時間、抽出温度) は検討された。検討結果、各 200mg のサンプルは、40 cm^3 バイアルに入れ、内部標準として 1 μg のエチルデカノエートを混ぜ、針が貫通できるポリテトラフルオロエチレン/シリコン製セプタムとアルミキャップで密閉した。それぞれのアオノリサンプルは、60 $^{\circ}\text{C}$ 、60 分間で平衡化した後、SPME の針でセプタムを貫通させた。更に、ファイバーは、60 分間、サンプルのヘッドスペース中にさらして香気成分を吸着、捕集させた。抽出時間後、ファイバーは針の中へ戻されるとすぐに、GC のインジェクションポートへ挿入され、230 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分間の条件で吸着成分を脱着させた。

各アオノリサンプルから SPME に捕集した香気成分は、GC-MS (System: Class-5000 workstation, MS: Shimazu GC-MSQP5000) に供して分析された。そして、シリカキャピラリーカラム (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness (Supelco, Bellefonte, PA, USA)) である Supelcowax¹⁰TM により分離した。インジェクションは、スプリットレスモードにて 1 分間、230 $^{\circ}\text{C}$ の条件で、SPME インサートを用いて行われた。GC 測定温度設定は、初期温度である 50 $^{\circ}\text{C}$ から 160 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温速度 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ 、160 $^{\circ}\text{C}$ から 240 $^{\circ}\text{C}$ までは 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ で昇温された。マススペクトルは、 m/z 50 から 280 までの質量範囲の化合物を 70eV で走査した。また、溶出時間の指標は、同条件にて C11-C30 n -アルカンシリーズ (GL Science) を用いた分析後に算出された。揮発性成分は、リファレンスデータベース (NIST Mass Spectral Data 98' edition) により、質量スペクトルを比較することで暫定的に同定された。化合物の分子量は、個々のマススペクトルや溶出指標 (Retention Indices : RI)、溶出時間 (Retention Time : RT) に寄与する。加えて、極めて高純度の標準物質 (Reference compounds) を用いて、同定結果を確認す

るために使用した。さらに、香気特性は、すでに報告されている記述に基づいて決定した[81, 82, 83]。

各化合物のピークエリアは、内部標準である Ethyldecanoate との比較され、ピークエリア比を算出された。同定された揮発性化合物は、アルカン、アルケン、ケトン、アルデヒド、含硫化合物、アルコール、エステルというように異なる化合物群に分類された。未同定の化合物はこの分析から除かれている。各々の化合物群のピークエリアは、全体のピークエリアに対する割合として算出された。統計分析は、XL-STAT (Version2013, Addinsoft, New York, USA)により処理された。

2. 3 結果と考察

2. 3. 1 SPME の抽出条件と GC-MS 分析プレ試験

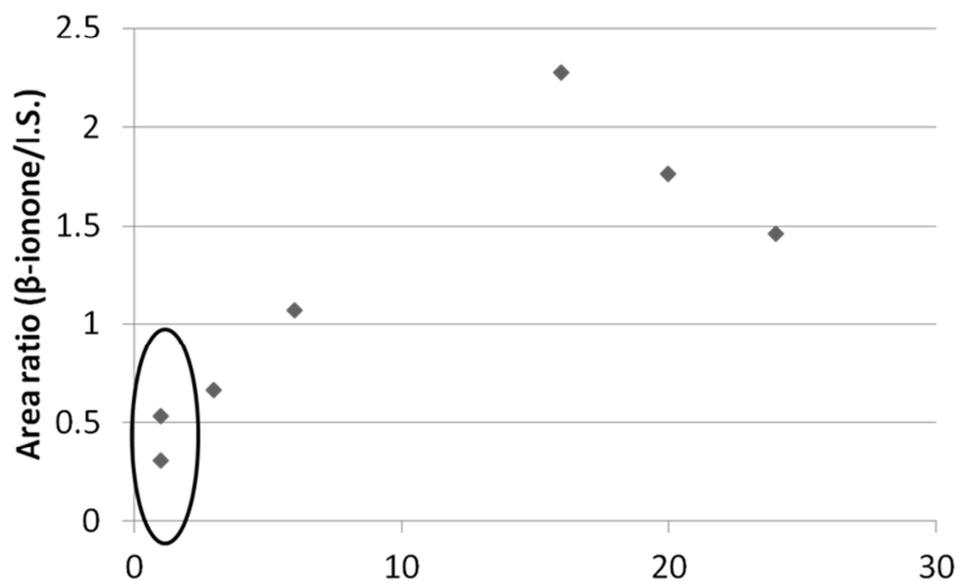
抽出時間は最長 16 時間まで揮発性成分含量は増加した (図 1)。しかしながら、高温で長時間、揮発性成分をさらすことは、カロテノイドの熱分解等を引き起こすため、可能な限り短時間で処理されるべきである。今回は、十分な量のピークが検出できていると判断し、抽出時間は 1 時間とした。

吸着時間は、少なくとも 90 分間、揮発性成分含量は増加し続けた (図 2)。しかし、これも抽出時間と同じ理由で熱分解をできる限り回避するため、解析するために十分な量が検出されており、その吸着効率からも吸着時間は 60 分間に決定した。

内部標準化合物 (エチルデカノエート) の添加量は、サンプルの揮発性成分のピークエリアと類似している 8.6nM とすることに決定した (表 1)。

SPME を用いたアオノリの GC-MS 分析条件 (表 2) として、サンプルから揮発性成分は 60°C で 1 時間抽出され、60°C で 1 時間、樹脂に吸着させる。内部標準化合物の添加量は、サンプル 200mg に対して、8.6nM で 1 μ l とした。その他の分析条件は表 6 に記載した。その分析条件で標準誤差は 2.6~8.8% (表 3) であり、メーカー保証の誤差以内 (10% 以下) であることを確認した。これをもって、SPME の分析条件の設定確認とした。その他、添加する際は、最後の一滴までサンプル瓶の壁などへ付着させることなく、添加することが誤差を少なくさせる。また、室内雰囲気やパラフィルム等実験道具や環境で、サンプル以外の香気の吸着させない様に心がけた。

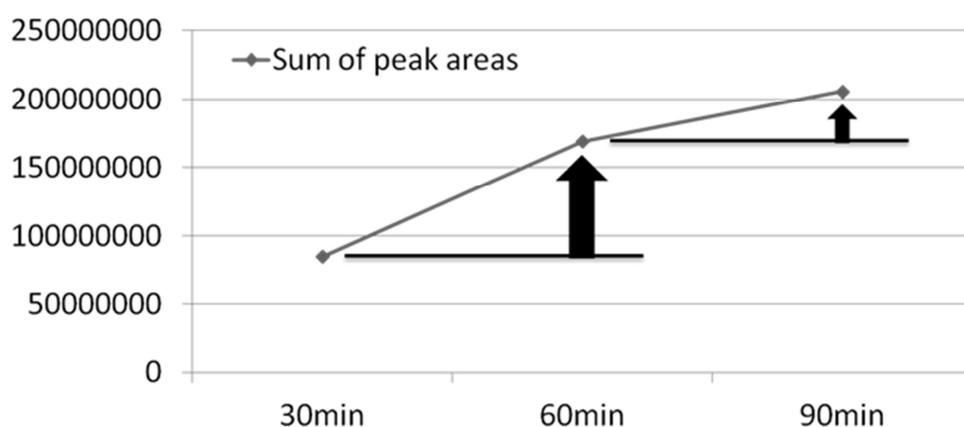
分析のプレ試験として 4 種類のサンプル間の香り成分の差異傾向の有無を確認した。クロマトグラムを比較した結果 (図 3)、それぞれの傾向は異なっていることが示唆された。更に、主成分分析を行い、サンプル間の香り成分の傾向が異なる可能性が高いことを確認した (図 4)。この結果を受けて、GC-MS 分析結果から各香り成分を同定し、解析していくことを決定した。



The amount of volatiles are increasing until 16 hours at least.
 However carotenoid degradation occurs at high temperatures.
 So extraction time was selected shorter to minimize thermal and chemical degradation reactions.

図 1. ピークエリア比による抽出時間の影響.

Adsorption time	30 min	60 min	90 min
Total peak area	85081243	169190088	205985669



Total peak area of volatiles are increasing until 90 min at least.
 And it is enough to detect major peaks in 60min at least.
 So adsorption time was selected shorter to minimize thermal and chemical degradation reactions.

図 2. SPME への吸着時間に対する吸着量の依存性.

表 1. 内部標準試薬の添加量の調整

I.S.*concentration	0.086 nM	0.86 nM	1.72 nM	4.3 nM	8.6 nM
I.S.*content	0.017 µg	0.17 µg	0.34 µg	0.85 µg	1.7 µg
Peak area of I.S.*	n.d.	85094	250241	541601	1418090

1 µl of 8.6 nM ethyldecanoate is added to 0.2 g sample as the internal standard.
The peak area of ethyldecanoate is similar with our target compounds.

表 2. SPME を用いたアオノリの GC-MS 分析条件

- Extraction time 1 h
- Extraction temperature 60 °C
- Adsorption time 1 h
- Adsorption temperature 60 °C
- Sample amount 200 mg
- Internal standard 8.6 nM
- SPME fiber PDMS 100 μm
- GC conditions
 - Injector temperature 230 °C
 - Carrier gas flow rate 1.7 ml/min
 - Detector voltage 1.0 kV
 - Injection Mode Splitless

Temperatue program	Rate (temp./min)	temperature	Holding time
1	— — —	50.0	3.0
2	3.0	160.0	0.0
3	10.0	240.0	8.0

表 3. 最適化した SPME 法の実験誤差

Production area		Peak Area	I.S.	Area/I.S.	Average	Standard Dev.	Error (%)
Okayama	n=1	6735320	1029905	6.539749			
	n=2	8330605	1294370	6.436031	6.651754	0.288519525	4.34
	n=3	7539885	1080293	6.979481			
Ehime	n=1	6201468	397640	15.59568			
	n=2	4901347	276118	17.75091	17.29286	1.5208006	8.79
	n=3	3485071	188057	18.53199			
Tokushima	n=1	6915797	1018206	6.792139			
	n=2	5038978	777379	6.482009	6.330183	0.553707917	8.75
	n=3	4318557	755468	5.7164			
Shizuoka	n=1	8187440	52428	156.1654			
	n=2	6796138	43505	156.2151	153.885	3.992903241	2.59
	n=3	6769299	45348	149.2745			

Experimental errors were shown from 2.59 to 8.79% in triplicate as error of standard deviation.

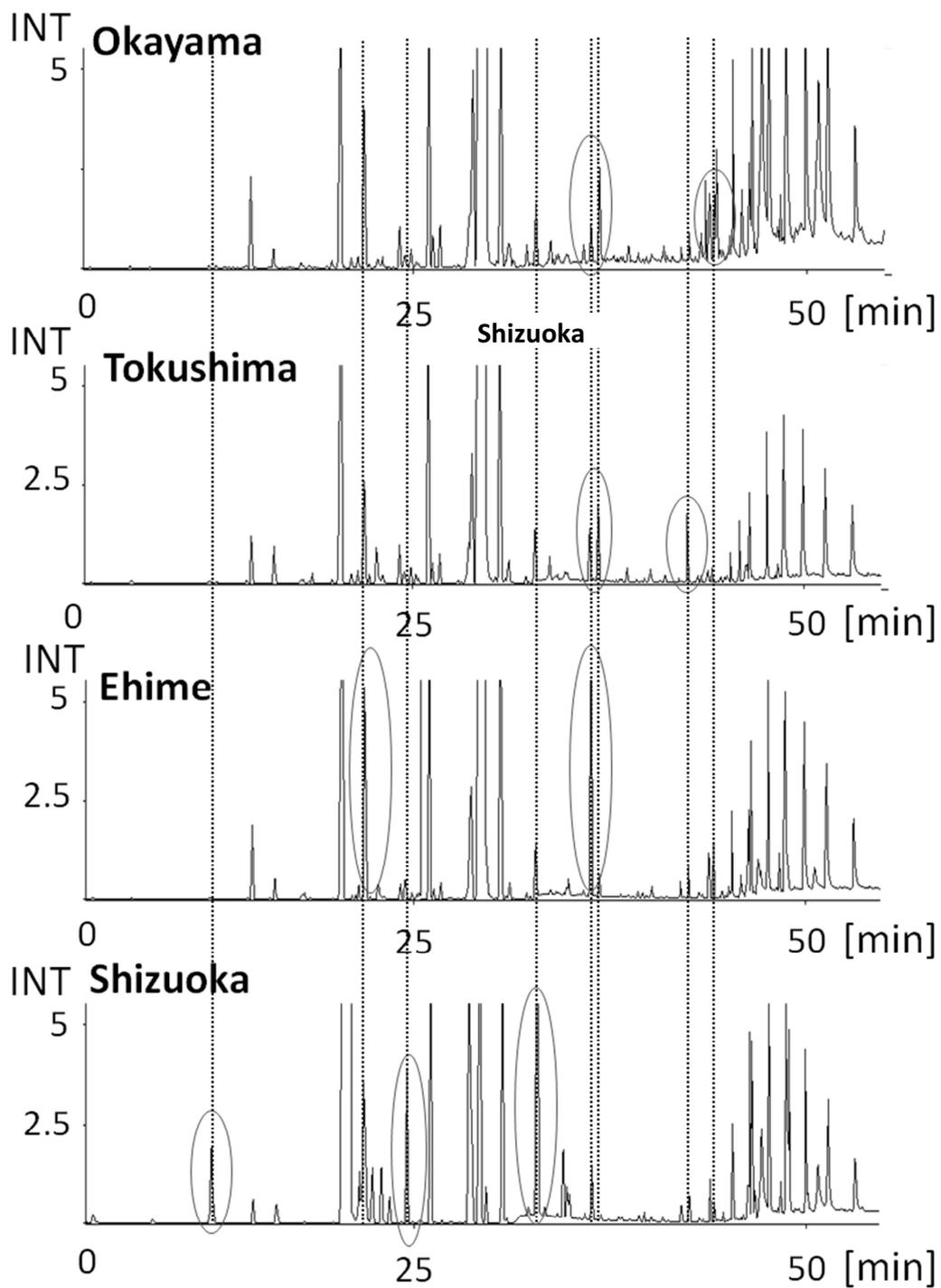


図3. 異なるアオノリサンプルの GC-MS 分析によるクロマトグラム比較.

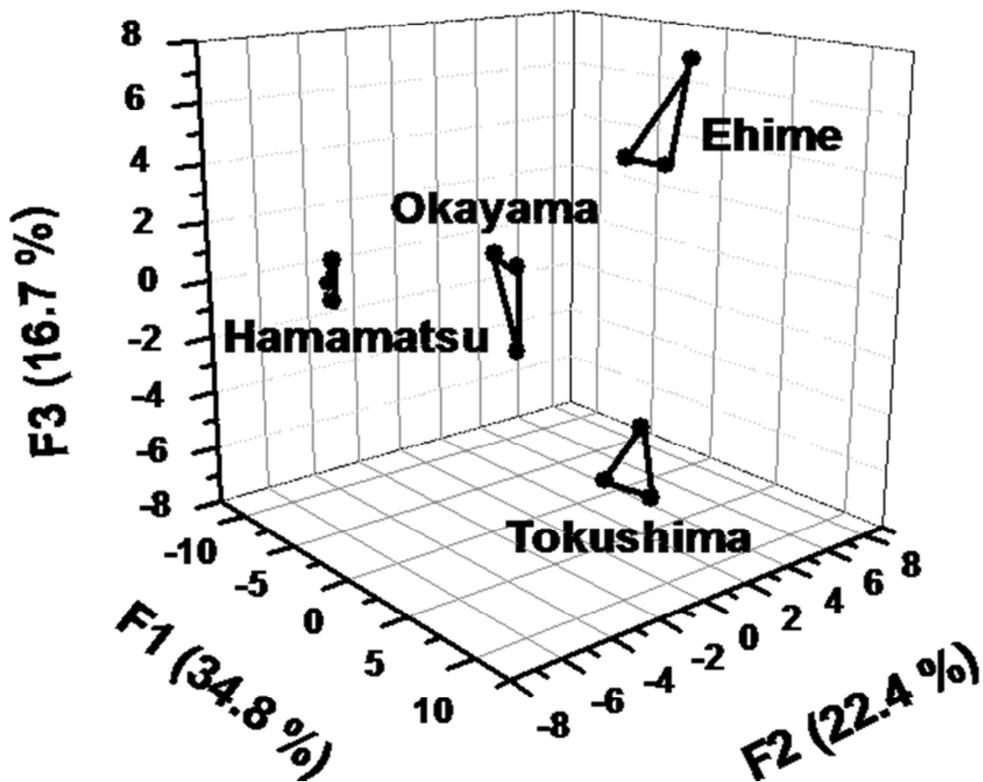


図4. 異なるアオノリサンプルを用いた主成分分析結果.

GC-MSにて検出された112ピークを標準化合物とのピークエリア比で基にプロファイリングを実施した。サンプルはここに3回ずつGC-MS分析した。データは、XLSTATを用いて主成分分析を実施した。

2. 3. 2 官能評価

アオノリサンプルの官能評価結果、総合評価（**図 5**）において、その差異を識別することができないことが示された。味と色においても同じ結果であった。さらに、9点の匂いの項目評価（**図 6**）においても、岡山県、徳島県、愛媛県産のアオノリに差異は認められなかったが、静岡県産アオノリだけは、green-note、marine-like、fresh (watery)、powdery の項目において、他サンプルとの差異が認められた。

結果として、一般的に訓練を受けていない人が、官能評価だけで商業的に販売されているアオノリは区別できない。または、とても困難である。単に、分類学上異なる岡山県産、徳島県産スジアオノリ (*Ulva prolifera*) と愛媛県産ウスバアオノリ (*Ulva linza*) に対して、静岡県産ヒトエグサ (*Monostroma nitidum*) が少し異なるという結果が得られたにすぎない。揮発性化合物は、藻類の香りの構成成分である。それゆえ、藻類の揮発性化合物が研究され、例えば、最近の文献[59, 81, 82, 83]に記載されるように、褐藻や赤藻の揮発性代謝産物が評価され、報告されることは当然のことである。

多変量解析を伴う GC-MS 分析技術は、多くの食品の真偽、その信頼性を確認するために利用されることができる。この研究においても、その分析技術で、異なる国産アオノリサンプルを識別できるか確認すべきであると考えた[84]。

2. 3. 3 GC-MS 分析・解析

本試験では、4 種のアオノリから共通して 41 化合物が同定され、アルカン類、アルケン類、ケトン類、アルデヒド類、含流化合物、アルコール類、エステル類として化合物群に分類された (表 4)。これらの化合物は、アミノ酸、脂肪酸、カロテノイドを含む異なる前駆体に由来する。アルカン類やアルケン類 (例えば *tetradecene*、*pentadecene*、*hexadecene*、*octadecene*) を含む炭化水素は、4 種の内、岡山県、徳島県、愛媛県の 3 種のサンプルにおいて豊富に含まれていた (図 7)。アルケン類の相対的な濃度は、アオサ目の異なる藻類間で変わる。アオサ属の緑藻は、岡山県で 95%、徳島県で 92.3%、愛媛県で 89.4% と豊富であった。一方、静岡県産のヒトエグサ属の緑藻は、アルケン類をたった 6.3% しか含まない。アルデヒド類の相対含量は、この反対の傾向があることがわかった。岡山県、徳島県、愛媛県産の緑藻サンプルはそれぞれ 0.2%、0.1%、0.1% ととても低いのに対して、静岡県産の緑藻サンプルは、91.5% と豊富に含まれていた。

脂肪酸由来のヘプタデセンは、全てのサンプルにおいて量的に主要な香気成分として同定された。7-ヘプタデセンは海洋性緑藻類 (*Ulva pertusa* や *Chara vulgaris*) において主要香気成分の一つとして報告され、食用昆布の特徴的な化合物として知られている。水の不快な匂いにも寄与している[60][85]。海藻中で 7-ヘプタデセンとフィトールの濃度は季節変動する。7-ヘプタデセンは夏場を除き、一年中、大量に存在する[62]。ケトン類、含流化合物やエステル類は、全てのサンプル中で類似した濃度であった。

主成分分析は、4 種類のアオノリサンプルの特徴的な香りに寄与する Key となる揮発性成分を同定した。図 8 は、factor2 に対する factor1 の相関円を示し、アオノリサンプルの独特の香気特性に寄与する主要揮発性成分の同定に貢献した。

我々の分析より、静岡県産アオノリにとって重要な化合物であるベンズアルデヒ

ドは、アミノ酸生合成に由来すると考えられ、甘く、アーモンドや果物、花の香りを有し閾値が低い（350-3500ppb）ことが特徴として挙げられる。また、いろいろな食品中で、グリコシド結合した前駆体から遊離する。加えて、濃度が製造工程中に増加することが、例えば、リンゴピューレの生産やごま種子のローストなどで報告されている[86]。

トリデカン、ペンタデセン、ベンズアルデヒド、ヘキサデカン、ドデカンは静岡県産アオノリに関連する香気成分として同定された。また、揮発性アポカロテノイドの占める割合が研究に用いた藻類種においては非常に高かった。藻類中のカロテノイド由来の香気化合物の重要性は、以前報告されている。強力な香気化合物である β -イオノンのような揮発性アポカロテノイドは、例えば、*Ulothrix fimbriata* や *Asakusa Nori (Poryphyra tenera)* [87, 88] のように藻類の分類群の多様性により作り出された。化学的生成経路は別として[51]、酵素のような、機能的カロテノイド解裂は、藻類中[89]で、揮発性アポカロテノイドの生成に寄与する。

2, 2, 6-トリメチルシクロヘキサノン、(E, Z)-3, 5-オクタジエン-2-オン、2, 6, 6-トリメチル-2-ヒドロキシシクロヘキサノン、 α -イオノン、 β -イオノン、 β -イオノンエポキシドは岡山県、徳島県産アオノリに豊富に含まれていた。ジヒドロアクチニジオライドは、徳島県産アオノリの揮発性成分のプロファイル解析する上で重要な化合物である。この化合物は、緑茶でも重要な香気成分であり、桃のような甘い匂い[51]が特徴的である。加えて、 β -シクロシトラールとフィトールは、岡山県と徳島県産のアオノリの香りに寄与する特徴的な化合物である。それらの化合物は、それぞれフレッシュで花の香り [90] がする。 β -シクロシトラール、 β -イオノンや β -イオノンエポキシドのようなケトン類とフィトールは、カロテノイドの分解を介して生成した。 α -イオノンは、スマレや木の香りがする。 β -イオノンは、スマレのような匂いや海藻特有の香りがする。 β -イオノンエポキシドは、甘い、ベリー類の香りがする。

これらの化合物は、とても閾値が低いことが特徴的な重要な香気成分である。例えば、 β -イオノン¹は、0.007ppm [91] の臭気強度である。 β -イオノンは、岡山県、徳島県、愛媛県、静岡県産のアオノリに各々12.5%、15.7%、5.9%、0.7%含まれていた。

更に、2, 2, 6-トリメチルシクロヘキサノン、ベンズアルデヒド、2, 6, 6-トリメチル-2-ヒドロキシシクロヘキサノン、 β -シクロシトラール、5, 6-エポキシ- β -イオノンやジヒドロアクチニジオライドなどの β -カロテンの熱分解物は、以前報告されている [51]。今回の試験で用いられるようなアオノリ製品は、通常、異物を選別除去した後、天日干し乾燥して充填包装する。 β -カロテンの熱分解と類似するような反応は、おそらく、アオノリの天日干し乾燥工程中で起こり、アオノリ製品の品質に大きな影響を与えていると推測する。また、アポカロテノイドの構造的特徴に基づき、酵素的に生成したのではなく、主にアオノリ乾燥工程におけるカロテノイドの熱分解により生成されていると考えられる。芳香族アミノ酸由来と考えられるベンズアルデヒドは、静岡県産アオノリ (*Monostroma nitidum*) にのみ、多く含まれる特徴的な化合物であった。アポカロテノイドの存在は、*Ulva prolifera*, *Ulva linza*, *Monostroma nitidum* を識別する上で、最も重要な指標の一つである。そのほかの香気化合物として、ヘキサデカン酸メチルエステルやリノレン酸メチルエステルを含む脂肪酸メチルエステル類が静岡県産アオノリに豊富に含まれている。リノレン酸メチルエステルは、(E, Z)-3, 5-オクタジエン-2-オンの前駆体となり、最も香りの強い香気化合物の一つである [92]。この化合物は、タラの肝油やアナアオサ (*Ulva pertusa*) 中でも発見されており、メロンのような香りがする。本研究においては、(E, Z)-3, 5-オクタジエン-2-オンは、全てのサンプルで検出され、岡山県と徳島県産のアオノリ (*Ulva prolifera*) でより豊富に含まれていた。4種類のアオノリサンプルの総合的な特徴を説明するためには、更なる研究を行い、各単独成分の寄与率の証明 (希釈分析) や未知化合物の同定が必要である。

既知化合物の多変量解析は、サンプル間で異なる総合的な特徴を説明するため、質量スペクトルデータに基づいて実施された。PCA (Principle Component Analysis) は、11 の固有ベクトルで得られた 41 種類の相関行列からなる変換データセットを用いて実施された。5 つの因子は、ばらつきの合計の 92.39% を説明している。これは 41 個の揮発性化合物が 4 種の異なるスジアオノリサンプルの総合的な特徴を説明できることを示している。因子 1 は、ばらつきの合計の 48.13%、因子 2 は 20.14% を説明している。両因子は、共に、植物学的起源に基づくアオノリの識別を可能にした。しかし、今回、地理的起源に基づく識別は明確にできなかった (図 9)。更なる研究は、より多くの検体数を用いて再現性を確認すべきであり、GCMS 以外の試験装置 (安定同位体比質量分析 (Isotope Ratio-MS : IR-MS)) についても考慮に入れて進めるべきである。

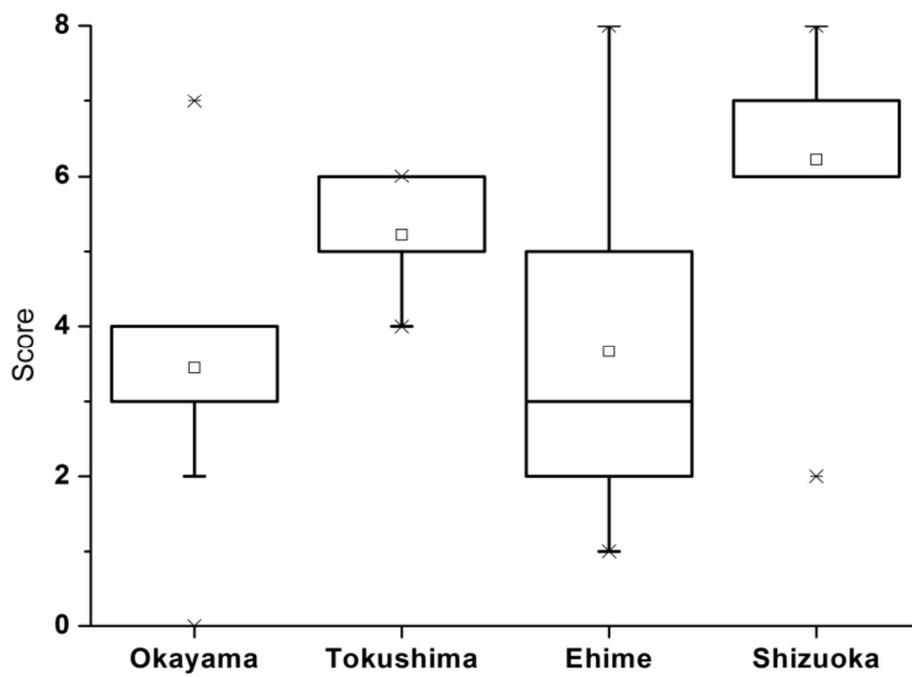


図 5. アオノリサンプルの官能評価（総合評価）. [84]

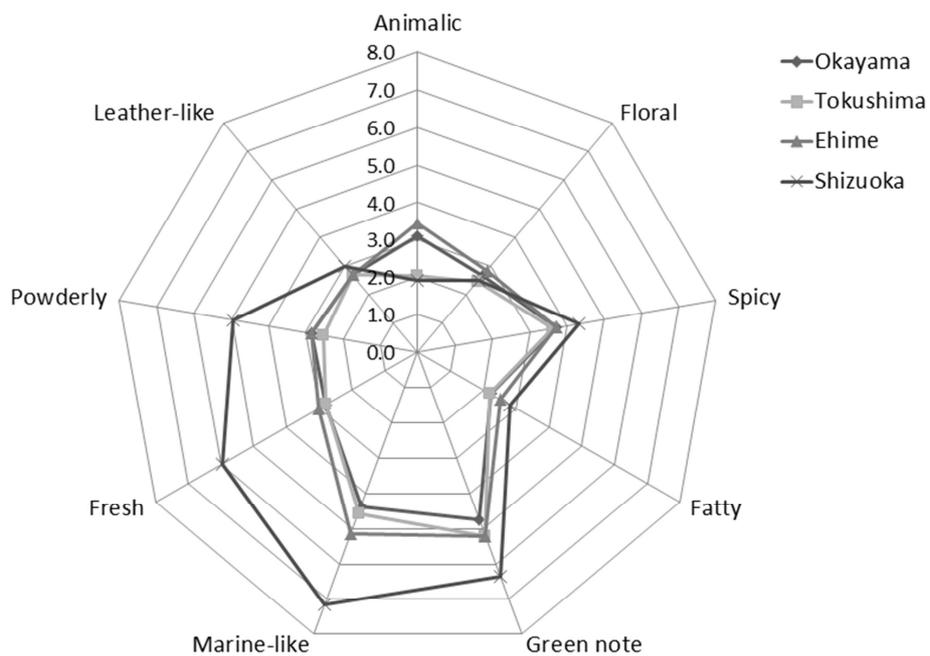


図 6. アオノリサンプルの官能的特徴. [84]

匂いの系統 9 項目 (animalic, floral, spicy, fatty, green note, marine-like, fresh (watery), powderly and leather-like) について、パネリストの評価を実施した。

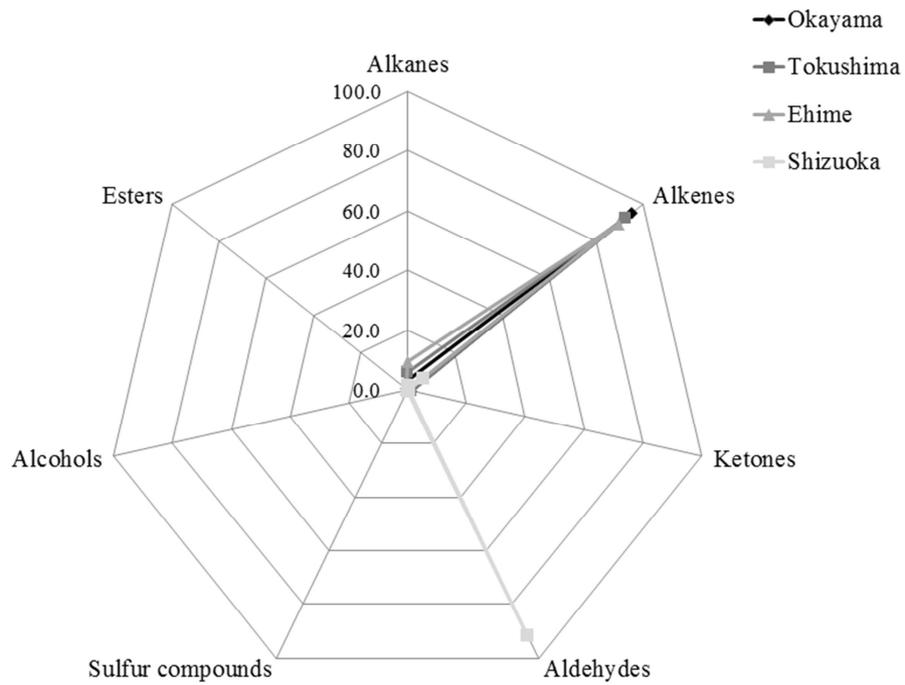


図 7. 異なるアオノリサンプルにおける相対濃度(n=3)での揮発性成分の比較. [84]

表 4. 異なるアオノリの揮発性成分とその相対含量 (内部標準とのエリア比) [84]

No.	Volatile compounds	Formula	Class	Relative contents (% averaged GC peak area ratio (n=3))										
				Origin	Odor description	R.I.	Okayama	STD	Tokushima	STD	Ehime	STD	Shizuoka	STD
1	Dodecane	C10H22	Alkanes		Alkane (B)	1185	ND		ND		ND		1.2	0.010
2	Tridecane	C13H28	Alkanes	Fatty acids	Alkane (B)	1297	0.6	0.0003	0.6	0.0008	ND		23.2	0.0298
3	2,2,6-Trimethylcyclohexanone	C9H16O	Ketones	Carotenoids	Camphoraceous tobacco notes; thujone-like (A)	1308	0.7	0.0011	0.7	0.0026	ND		ND	
4	Tetradecane	C14H30	Alkanes	Fatty acids	Alkane (B)	1397	3.9	0.0020	11.4	0.0097	7.1	0.0158	6.0	0.0065
5	Tetradecene	C14H28	Alkenes			1444	0.5	0.0013	0.9	0.0005	2.1	0.0025	ND	
6	Pentadecane	C15H32	Alkenes		Alkane (B)	1502	83.6	0.0622	251.1	0.1181	420.5	0.6057	ND	
7	(E, E)-3,5-Octadien-2-one	C8H12O	Ketones	Fatty acids, carotenoids	Almond (C)	1517	ND		ND		ND		ND	
8	Benzaldehyde	C7H5O	Aldehydes	Amino acids	Sweet, strong almond (A) almond, burnt sugar (B)	1517	1.7	0.0028	2.3	0.0068	0.9	0.0015	3777.3	7.4504
9	Pentadecene isomer 1	C15H30	Alkenes			1523	2.4	0.0028	3.6	0.0025	4.7	0.0057	11.7	0.0326
10	Pentadecene isomer 2	C15H30	Alkenes			1546	0.7	0.0011	2.3	0.0025	1.0	0.0010	0.5	0.0028
11	Dimethyl sulfoxide	C2H6OS	Sulfur compounds	Amino acids		1557	8.2	0.0457	16.5	0.0944	8.0	0.0500	12.3	0.0221
12	(E, Z)-3,5-Octadien-2-one	C8H12O	Ketones	Fatty acids, carotenoids	Melon-like (C)	1567	2.7	0.0100	2.1	0.0065	0.6	0.0052	0.3	0.0029
13	Pentadecene isomer 3	C15H30	Alkenes			1576	ND		ND		ND		5.1	0.0085
14	2,6,6-Trimethyl-2-hydroxycyclohexanone	C9H16O2	Ketones	Carotenoids	Sweet tobacco-like aroma with herbaceous undertones (A)	1594	8.6	0.0237	9.6	0.0223	4.1	0.0053	ND	
15	Hexadecane	C16H34	Alkanes		Alkane (B)	1601	4.3	0.0089	5.6	0.0122	7.7	0.0144	28.2	0.0563
16	β -Cyclocitral	C10H16O	Aldehydes	Carotenoids	Fresh (B)	1612	3.5	0.0085	3.5	0.0074	1.4	0.0010	ND	
17	Hexadecene isomer 1	C16H32	Alkenes			1619	1.2	0.0010	2.5	0.0027	2.1	0.0025	ND	
18	Hexadecene isomer 2	C16H32	Alkenes			1624	0.9	0.0024	1.1	0.0026	2.2	0.0004	ND	
19	Safranal	C10H14O	Aldehydes	Carotenoids		1637	ND		ND		ND		ND	
20	Heptadecane	C17H36	Alkanes		Alkane (B)	1707	56.1	0.0610	25.2	0.0936	25.5	0.2227	12.4	0.0993
21	7-Heptadecene	C17H34	Alkenes			1722	2909.7	1.0740	4003.3	3.3306	395.4	5.5587	155.5	0.3312
22	Heptadecene isomer 1	C17H34	Alkenes			1733	1.8	0.0193	ND		12.0	0.0030	7.0	0.0169
23	Heptadecadiene isomer 1	C17H32	Alkenes			1757	103.4	0.0604	139.2	0.1109	148.7	0.1725	64.3	0.1246
24	Heptadecadiene isomer 2	C17H32	Alkene			1766	1.0	0.0021	1.2	0.0018	0.5	0.0047	0.7	0.015
25	Heptadecadiene isomer 3	C17H32	Alkenes			1769	4.3	0.0022	2.2	0.0011	0.8	0.0074	0.7	0.0104
26	Heptadecadiene isomer 4	C17H32	Alkenes			1772	3.8	0.0037	5.3	0.0036	5.9	0.0041	1.1	0.0198
27	Heptadecadiene isomer 5	C17H32	Alkenes			1779	0.8	0.0022	ND		0.3	0.0059	0.5	0.0091
28	Octadecane	C18H38	Alkanes		Alkane (B)	1801	3.0	0.0051	1.6	0.0042	3.2	0.0089	2.1	0.0059
29	Octadecene	C18H36	Alkenes			1817	11.2	0.0072	12.8	0.0059	18.1	0.0085	0.9	0.0081
30	α -Ionone	C13H20O	Ketones	Carotenoids	Warm, woody, violet-floral (A)	1842	4.6	0.0039	5.6	0.0139	1.8	0.0085	ND	
31	Nonadecane	C19H40	Alkanes		Alkane (B)	1898	2.9	0.0119	1.1	0.0039	2.0	0.0029	0.7	0.0033
32	β -Ionone	C13H20O	Ketones	Carotenoids	Warm, woody, dry (A)	1927	12.5	0.1087	15.7	0.0144	5.9	0.0040	0.7	0.0031
33	Maltol	C6H6O3	Ketones		Caramel-butterscotch (A) caramel (B)	1960	0.6	0.0082	ND		ND		1.0	0.0059
34	β -Ionone epoxide	C13H20O2	Ketones	Carotenoids	Sweet berry (A)	1980	2.1	0.0181	2.8	0.0025	0.9	0.0006	ND	
35	Methyl tetradecanoate	C15H30O2	Esters		Faint onion, honey (A), orris (A) (B)	2010	0.9	0.0051	0.0	0.0000	1.3	0.0017	1.7	0.0036

Table 1 continue						Relative contents (% averaged GC peak area ratio (n=3))								
No.	Volatile compounds	Formula	Class	Origin	Odor description	R.I.	Okayama	STD	Tokushima	STD	Ehime	ST D	Shizuoka	ST D
36	Pentadecanal	C15H30O	Aldehydes		Fresh (B)	2034	1.8	0.0103	3.1	0.0033	1.8	0.0103	ND	
37	6, 10, 14-Trimethyl-2-pentadecanone	C18H36O	Ketones	Carotenoids		2139	2.9	0.0168	6.7	0.0174	7.0	0.0160	7.4	0.0427
38	Hexadecanoic acid, methylester	C17H34O2	Esters	Fatty acids		2217	5.2	0.0210	2.2	0.0038	9.0	0.0133	2.2	0.0029
39	Dihydroactinidiolide	C11H16O2	Ketones	Carotenoids	Musky or coumarin-like (A)	2347	3.0	0.0363	8.4	0.0199	4.2	0.0022	0.4	0.0034
40	Methyl linolenate	C19H32O2	Esters	Fatty acids		2566	4.1	0.0390	2.7	0.0063	7.3	0.0268	3.4	0.0057
41	Phytol	C20H40O	Alcohols	Chlorophyll	Faint floral (A) flower (B)	2580	2.8	0.0191	1.2	0.0050	0.9	0.0023	0.7	0.0071

A: Food and Agriculture Organization of the United Nations (<http://www.fao.org>), B: Flavornet (<http://www.flavornet.org>), C: Hu & Pun, 2000

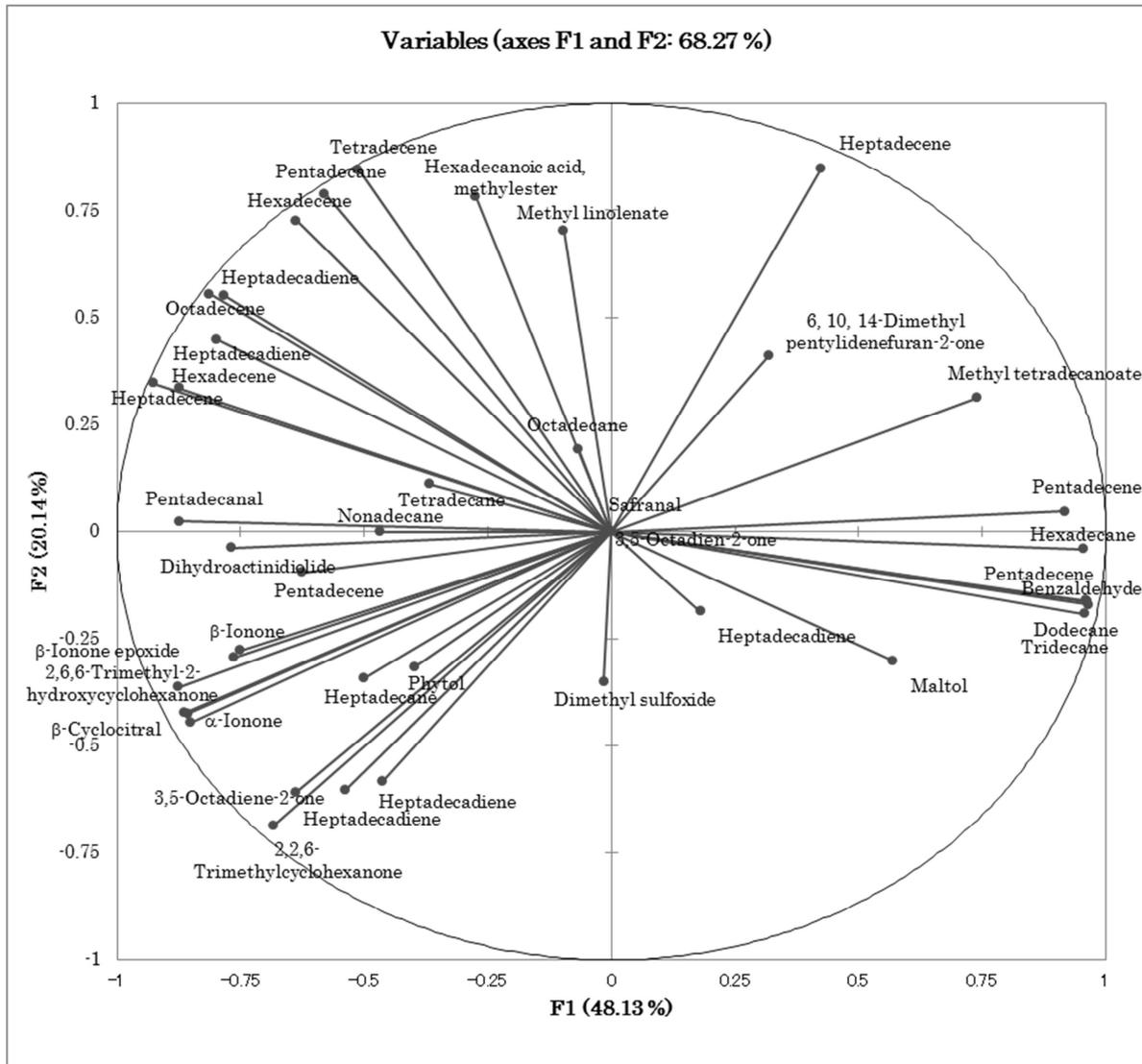


図 8. 異なるアオノリサンプル由来の揮発性化合物の相関円. [84]

プロファイリングは、41 化合物の内部標準に対するピークエリア比に基づいて実施された。各サンプルは、個々に 3 回ずつ分析された。データは、XL-STAT 2013.2.を用いて主成分分析を実施された。

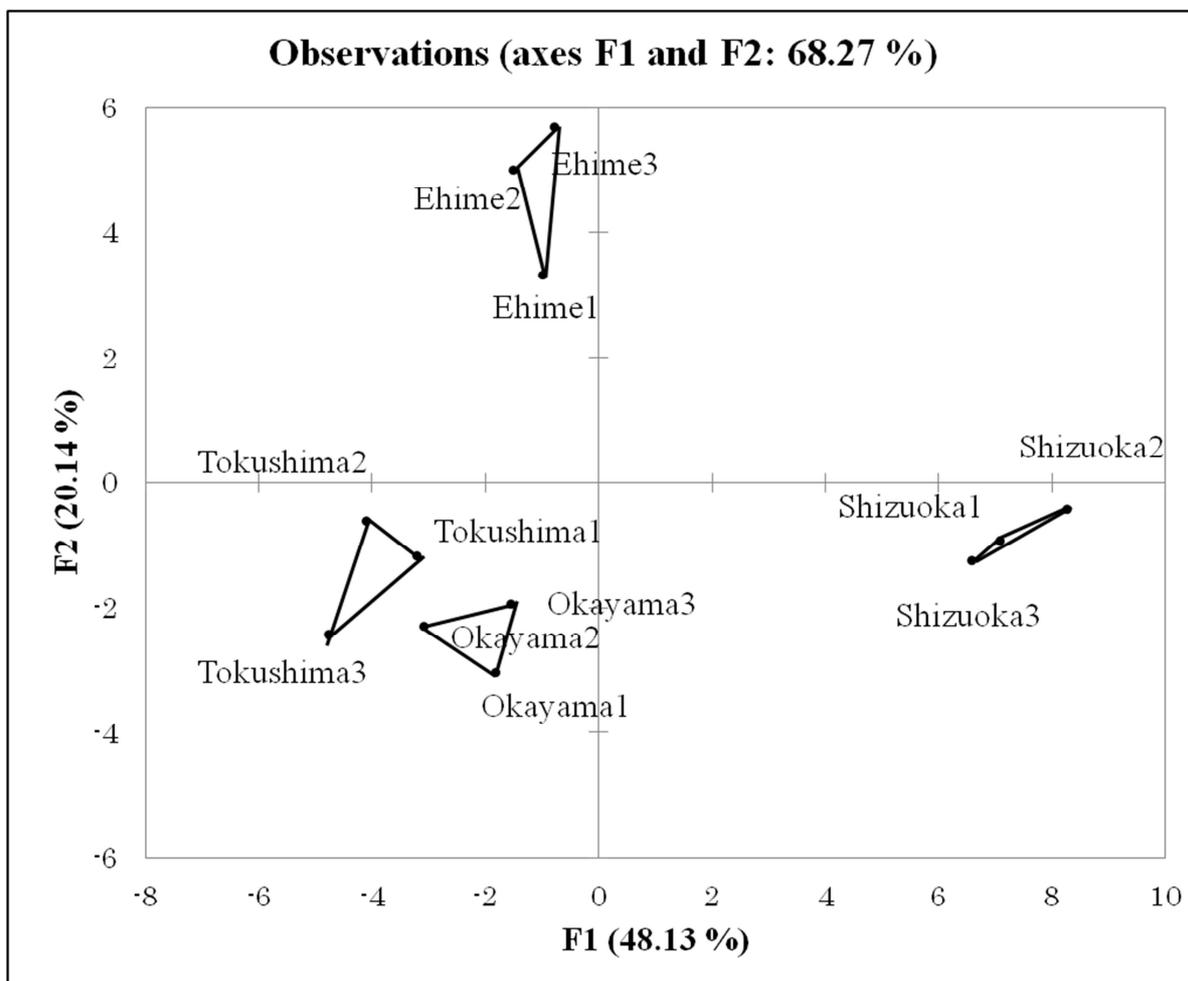


図9. 異なるアオノリサンプルの多変量解析結果 (スコアリングプロット) . [84]

プロファイリングは、41化合物の内部標準に対するピークエリア比に基づいて実施された。各サンプルは、個々に3回ずつ分析された。データは、XL-STAT 2013.2.を用いて主成分分析を実施された。

第 3 章 四万十川産スジアオノリの香りに寄与する鍵化合物の同定

3. 1 序論

日本において、最高級品とされるアオノリは、高知県四万十川流域で採れる天然のスジアオノリ (*Ulva prolifera*) である。このアオノリの香りに貢献度の高い揮発性化合物を同定することは、水中植物が放つ香気成分の生物学上の働きを検討する上でも、一つのカギとなるかもしれない。また、多品種のアオノリへの香りの付与や高級なアオノリの香りをマッチングさせることなど、応用研究にも繋がる可能性が考えられる。

アオノリの特徴的な良い香りに貢献している香気成分の同定のため、SPME 法より多くの香気成分及び重要と思われる香気成分を分析が可能で、より有効な香気成分の抽出法として、高真空蒸留法 (SAFE: Solvent-Assisted Flavor Evaporation) による香気成分の捕集、GCMS 分析・解析を行う。SAFE は SPME と異なり、減圧下で、より低温状態で香気成分を回収できるため、化合物が熱分解を起こすリスクが少なくなり、より正確に天然物由来の香気成分の抽出が可能になると期待される。原料としては、高品質である四万十川産アオノリを用意して、アオノリの特徴的な良い香りに貢献していると想定される香気成分の同定を試みる。

3. 2 原料

国内最高級品質と評されるアオノリとして購入した四万十川産スジアオノリ (*Ulva prolifera*) は、分析用サンプルとして、機密性の高いアルミバックに入れて、冷蔵保管した。分析するためには、液体窒素を用いて細かく粉砕した後、使用した。

3. 3 方法

3. 3. 1 官能評価 (Aroma Extraction Dilution Analysis)

スジアオノリ (*Ulva prolifera*) 160g に等倍量を加水した後、15 分間、水分がなじむのを待つ。次に、予め、サンプルの香気成分捕集に向いているかジエチルエーテルと比較した結果、選択されたジクロロメタンは、2L を加え、約 50°C で液量が約 200ml になるまで常圧蒸留を行った。その後、Solvent Assisted Flavor Evaporation

(SAFE) 装置を用いて、減圧下で 60g まで濃縮した。さらに、ビグリュウカラム付ガラス器具にて、3.7g まで常圧濃縮してエッセンシャルオイルとした (表 1)。

アオノリサンプルから調製したエッセンシャルオイルは、GC-MS (System: Agilent6890N/ Agilent5975B/ ODP3) に供して分析された。そして、シリカキャピラリーカラム (60 m × 0.25 mm 0.25 μm film thickness) である InertCapWAX により分離した。インジェクションは、スプリットレスモードにて 2 分間、230°C の条件で、シリンジにより供された。GC-Olfactometry の分析条件としては、40°C で 2 分間保持した後、5°C/min で 230°C まで昇温し、達温後、1 時間、230°C のまま保持する昇温プログラムを用いて分析された (表 2)。

臭度測定は、スニッフィングポートを用いて、ヒト嗅覚により感じた溶出時間とその香りの特徴を記録した。測定用サンプル (エッセンシャルオイル) は、徐々に希釈していき、最後の数個しか嗅ぐことができなくなるまで続けられた。実際には、希釈なし、4 倍希釈、16 倍希釈、64 倍希釈、256 倍希釈、1024 倍希釈したものについて臭度測定を実施した。

表 1. スジアオノリのエッセンシャルオイル調製手順

四万十川産スジアオノリ (dry matter) 160g
水 160g

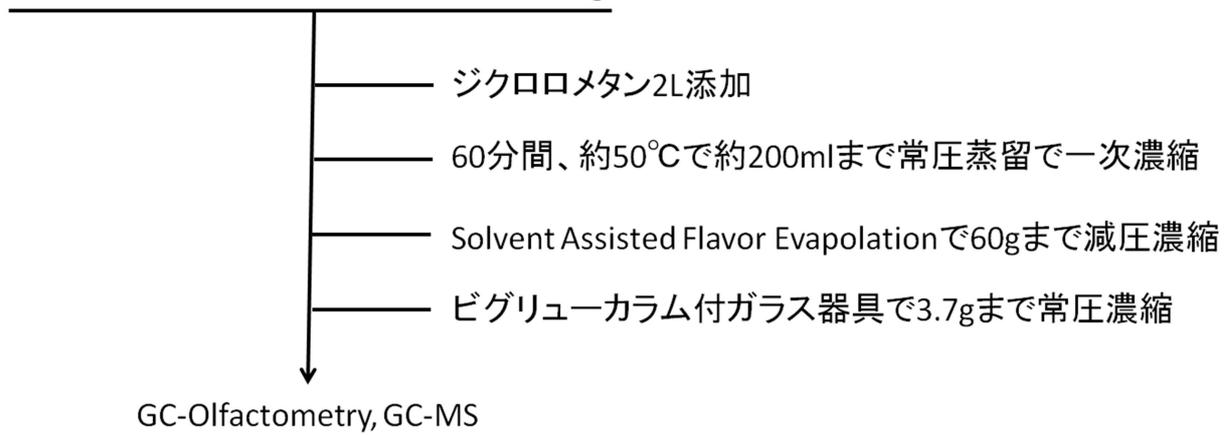


表 2. スジアオノリの GC-O 分析条件

システム : Agilent 6890N / Agilent 5975B / ODP3

カラム : InertCapWAX (60m × 0.25mm × 0.25 μ m)

注入口 : 250 $^{\circ}$ C

流量 : 1.6ml / min

温度 : 40 $^{\circ}$ C (2min hold) to 230 $^{\circ}$ C (5 $^{\circ}$ C / min)

3. 3. 2 四万十川産スジアオノリの揮発性化合物の同定

官能評価 (Aroma Extraction Dilution Analysis) と同様に、サンプル調製を行った。つまり、スジアオノリ (*Ulva prolifera*) 160g に等倍量を加水した後、15 分間、水分がなじむのを待つ。次に、予め、サンプルの香気成分捕集に向いているカジエチルエーテルと比較した結果、選択されたジクロロメタンは、2L を加え、約 50°C で液量が約 200ml になるまで常圧蒸留を行った。その後、Solvent Assisted Flavor Evaporation (SAFE) 装置を用いて減圧下で 60g まで濃縮した。さらにビグリュウカラム付ガラス器具にて 3.7g まで常圧濃縮してエッセンシャルオイルとした (表 1)。

アオノリサンプルから SPME に捕集した香気成分は、GC-MS (System: Class-5000 workstation, MS: Shimadzu GC-MSQP5000) に供して分析された。そして、シリカキャピラリーカラム (60 m × 0.25 mm 0.25 μm film thickness) である DB-WAX (Agilent) により分離した。インジェクションは、スプリットレスモードにて 1 分間、230°C の条件で、シリンジを用いて行われた。GC 測定温度設定は、初期温度である 40°C で 5 分間保持した後、220°C まで昇温速度 3°C min⁻¹ で昇温された。マススペクトルは、*m/z* 50 から 280 までの質量範囲の化合物を 70eV で走査した。

また、溶出時間の指標は、同条件にて C11-C30 *n*-アルカンシリーズ (GL Science) を用いた分析後に算出された。揮発性成分は、リファレンスデータベース (NIST Mass Spectral Data 98' edition) により、質量スペクトルを比較することで暫定的に同定された。化合物の分子量は、個々のマススペクトルや溶出指標 (Retention Indices : RI)、溶出時間 (Retention Time : RT) に寄与する。加えて、極めて高純度の標準物質 (Reference compounds) を用いて、同定結果を確認するために使用した。GC-MS 分析結果と GC-O 結果を照合して、本試験のアオノリの特徴的な匂いに寄与する香気成分を同定する。

3. 4 結果及び考察

原料としては、高品質である四万十川産アオノリを用意して、香気成分として 58 化合物を同定した (表 3)。同定結果としては、SPME を用いたアオノリの香気成分分析と比較して、ジメチルスルフィドが検出された。これは、カラムの長さが 60m と 2 倍になったことによる分離能力向上により、溶媒ピークと重ならなかったためと考えられた。ジメチルスルフィドは、強い磯の香りが特徴的な化合物であるが、本試験においては 16 倍希釈まで嗅ぐことができ、寄与率は予想よりも高くはなかった。また、前駆体である Dimethyl- β -propiotetin からは、ジメチルスルフィドの他、アクリル酸も生成する。アオノリにおいて、アクリル酸の存在は、例えば、分析系でジメチルスルフィドが検出されなくても、その生成量を相対的に示唆するために利用できるかもしれない。その他、全体の同定数が 58 化合物に増加して、炭化水素類の数が減り、アルコール類や酸類の化合物が多く検出されている。

更に、GC-O 分析による臭度測定の結果を加えて、アオノリの特徴的な良い香りに貢献していると想定される香気成分の同定を試みた (図 1)。結果として、最も寄与率の高い化合物は、ベンズアルデヒド、 β -イオノン、 β -イオノンエポキシドと推定した。まず、ベンズアルデヒドは、甘く、アーモンドや果物、花の香りを有し閾値が低い (350-3500ppb) ことが特徴として挙げらる。また、先の試験 (第 2 章) においても、静岡県産アオノリの香気特性として重要な化合物であり、アミノ酸生合成に由来すると考えられる。次に、 β -イオノンは、スミレのような匂いや海藻特有の香りがする。 β -イオノンエポキシドは、甘い、ベリー類の香りがする。これらの化合物は、とても閾値が低いことが特徴的な重要香気成分である。先の章でも述べたが、 β -イオノンは、0.007ppm [90]の臭気強度である。これらは、海藻に豊富に含まれるカロテノイドに由来するカロテノイド分解物である。これらの化合物は、4 種アオノリの差異分析においても特徴的な化合物と考えられており、本研究が、更なる

アオノリの香気特性の解明や差異分析の基礎をなすことができると考えている。また、更なる研究は、より多くの検体数を用いて再現性を確認すべきであり、未同定化合物の同定を進める必要がある。加えて、GC-MS 以外の試験装置（安定同位体比質量分析 (Isotope Ratio-MS : IR-MS)）、アプローチによる確認についても考慮に入れて進めるべきである。

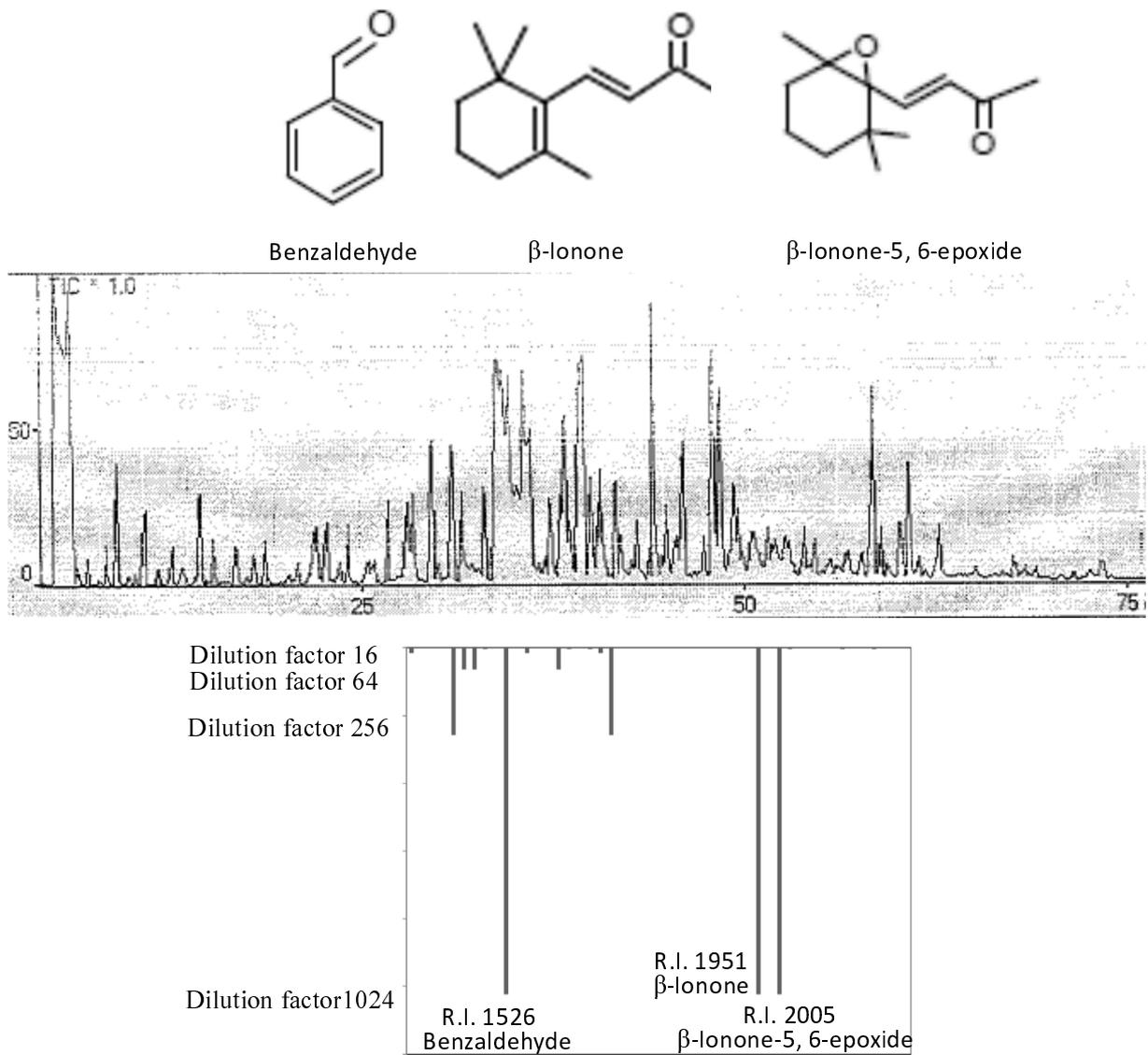


図.1 アオノリの GC-MS クロマトグラムと希釈係数.

表 3. 四万十川産スジアオノリの揮発性成分と希釈係数

No.	Volatile compounds	Formula	Class	Origin	R.I.	Dilution Factor
1	Dimethyl sulfide	C2H6S2	Sulfur compounds	Dimethyl- β -propiotetin	895	16
2	(<i>E</i>)-1,2-dichloroethane	C2H2Cl2	Alcohols		920	
3	Pentanal	C5H10O	Aldehydes		995	
4	1-Penten-3-one	C5H8O	Ketones		1025	
5	Toluene	C6H5CH3	Alkene		1040	
6	Dimethyl disulfide	C2H6S2	Sulfur compounds		1069	
7	Hexanal	C6H12O	Aldehydes		1081	
8	(<i>E</i>)-3-Penten-2-one	C5H8O	Ketones		1121	
9	2-Hexenal	C6H10O	Aldehydes		1138	
10	1-Penten-3-ol	C5H10O	Alcohols		1160	
11	Heptanal	C7H14O	Aldehydes		1182	
12	2-Hexenal	C6H10O	Aldehydes		1215	
13	2-Pentyl furan	C9H14O	Ethers		1240	
14	(<i>Z</i>)-4-Heptenal	C7H12O	Aldehydes		1254	
15	1-Pentanol	C5H12O	Alcohols		1230	
16	trans-2-(2-Pentyl) furan	C9H12O	Ethers		1302	
17	(<i>E</i>)-2-Penten-1-ol	C5H10O	Alcohols		1317	
18	(<i>Z</i>)-2-Penten-1-ol	C5H10O	Alcohols		1325	
19	6-Methyl-5-hepten-2-one	C8H14O	Ketones		1340	
20	3-Pentanol	C5H12O	Alcohols		1345	
21	1-Hexanol	C6H14O	Alcohols		1360	
22	1-Hydroxy-2-butanone	C4H8O	Ketones		1377	
23	Tetradecane	C14H30	Alkane		1402	
24	(<i>E, E</i>)-2, 4-Hexadienal	C6H8O	Aldehydes		1405	
25	3, 5-Octadiene-2-ol	C8H12O	Alcohols		1412	
26	(<i>E</i>)-2-Octenal	C8H14O	Aldehydes		1434	
27	1-Octen-3-ol	C8H16O	Alcohols		1456	
28	Heptadienal	C7H10O	Aldehydes		1468	256
29	Heptadienal	C7H10O	Aldehydes		1492	
30	Heptadienal	C7H10O	Aldehydes		1496	
31	Pentadecane	C15H32	Alkanes		1500	
32	(<i>E, E</i>)-3, 5-Octadiene-2-one	C8H12O	Ketones	Fatty acid, Carotenoids	1525	
33	Benzaldehyde	C7H6O	Aldehydes	Amino acids	1526	1024
34	(<i>E</i>)-2-Nonenal	C9H16O	Aldehydes		1541	
35	Propanoic acid	C3H6O2	Acids		1543	
36	Propanoic acid	C3H6O2	Acids		1553	
37	(<i>E, E</i>)-Octadiene-2-one	C8H12O	Ketones	Fatty acids, Carotenoids	1577	
38	Dimethyl sulfoxide	C2H6OS	Sulfur compounds		1596	
39	Dimethyl cyclohexanol	C8H16O	Alcohols		1614	
40	β -cyclocitral	C10H16O	Aldehydes	Carotenoids	1630	16
41	Acrylic acid	C3H4S2	Acids	Dimethyl- β -propiotetin	1636	64

Table 1 continue						Tentative
No.	Volatile compounds	Formula	Class	Origin	R.I.	Dilution Factor
42	Heptadecane	C17H36	Alkanes		1725	
43	8-Heptadecene	C17H34	Alkenes		1729	
44	Pentanoic acid	C5H10O2	Acids		1748	
45	6, 9-Heptadecadiene	C17H32	Alkenes		1761	
46	(<i>E, E</i>)-2, 4-Decadienal	C10H16O	Aldehydes		1773	
47	2, 4-Decadienal	C10H16O	Aldehydes		1819	
48	Hexanoic acid	C6H12O2	Acids		1853	
49	α -Ionone	C13H20O	Ketones	Carotenoids	1862	256
50	Dimethyl sulfone	C2H6O2S	Sulfur compounds		1910	
51	β -Ionone	C13H21O	Ketones	Carotenoids	1951	1024
52	Heptanoic acid	C7H14O2	Acids		1692	
53	β -Ionone-5, 6-epoxide	C13H20O2	Ketones	Carotenoids	2005	1024
54	Tetradecanal	C14H28O	Aldehydes		2035	
55	Octanoic acid	C8H16O2	Acids		2077	
56	6, 10, 14-Trimethyl-2-pentadecanone	C18H36O	Ketones	Carotenoids	2133	
57	(<i>Z</i>)-9-Hexadecenoic acid, methylester	C17H32O2	Esters	Fatty acids	2253	
58	Dihydroactinidiolide	C11H16O2	Ketones	Carotenoids	2370	4

第 4 章 博士論文のまとめ

4. 1 結論

4 種の異なる国産（岡山県産、徳島県産、愛媛県産、静岡県産）アオノリサンプルの揮発性成分プロファイルは、ここに初めて記述された。多変量解析は、植物学的起源に基づくアオノリの識別をすることが可能である。しかしながら、今回、地理的起源に基づく識別は確認できなかった。本研究に用いたアオノリにおいて、アオノリ間の香気特性の差異に関して、揮発性アポカロテノイドとベンズアルデヒドの貢献度が高かった。そして、アポカロテノイドの構造的特徴に基づき、酵素反応ではなく、アオノリ乾燥工程におけるカロテノイドの熱分解により主に生成されていると思われる。アミノ酸由来と考えられるベンズアルデヒドは、静岡県産アオノリ (*M. nitidum*) にのみ、多く含まれる特徴的な化合物であった。

また、四万十川産乾燥スジアオノリの香りに寄与率の高い香気化合物は、ここに初めて記述された。アオノリのエッセンシャルオイルを SAFE 装置により、より熱分解が進みにくい状態で調製することができ、GC-O、GC-MS 分析に供した。乾燥した天然の高級アオノリの芳醇な香りとして、より寄与率の高い香気化合物の推定を行った結果、ベンズアルデヒド、 β -イオノン、 β -イオノン-5, 6-エポキシドである可能性が高いことがわかった。これらの化合物は、4 種アオノリの差異分析においても特徴的な化合物と考えられており、本研究が、更なるアオノリの香気特性の解明や差異分析の基礎をなすことができると考えている。

更なる研究は、より多くの検体数を用いて再現性を確認すべきであり、未同定化合物の同定を進める必要がある。加えて、GC-MS 以外の試験装置（安定同位体比質量分析 (Isotope Ratio-MS : IR-MS)）、アプローチによる確認についても考慮に入れて進めるべきである。

4. 2 参考文献

1. B. Haefner, "Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates", *Drug Discov. Today*, Vol. 18, No. 12, pp536-544, 2003.
2. R. A. Hill, "Marine natural products", *Ann. Rep. Prog. Chem., Sec. B: Org. Chem.*, Vol. 100, pp 168-189, 2004.
3. P. Fink, "Ecological functions of volatile organic compounds in aquatic systems", *Mar. Freshw. Behav. Phy.*, Vol. 40, No. 3, pp. 155-68, 2007.
4. M. M. Harlin, and W. M. Darley, "The algae: an overview", in *Algae and Human Affairs* edited by C. A. Lembi, and J. R. Waaland, Cambridge University Press, pp. 3-27, 1988.
5. S. Lordan, R. P. Ross, and C. Stanton, "Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases", *Mar. Drugs*, Vol. 9, pp. 1056-1100, 2011.
6. E. Christaki, M. Karatzia, and P. F. Paneri, "The use of algae in animal nutrition", *J. Hellenic Vet. Med. Soc*, Vol. 61, pp. 267-276, 2010.
7. K. Miyashita, S. Nishikawa, F. Beppu, M. T. Abe, and M. Hosokawa, "The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds", *Sci. Food Agric.*, Vol.91, pp1166-1174, 2011.

8. A. Bocanegra, S. Bastida, J. Benedi, S. Rodenas, and F. J. Sanchez Muniz, "Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds", *J. Med. Food*, Vol.12, pp. 236-258, 2009.
9. N. Dudavera, F. Negre, D. A. Nagegowda, and I. Orlova, "Recent Advances and Future Perspectives", *Crit. Rev. Plant Sci.*, Vol. 25, pp.417-440, 2006.
10. T. Wiesemeier, and M. Hay, G. and Pohnert, "The potential role of wound activated volatile release in the chemical defence of the brown alga *Dictyota dichotoma*: Blend recognition by marine herbivores", *Aquat. Sci.*, Vol. 69, pp. 403-412, 2007.
11. Z. Kamenarska, A. Ivanova, R. Stancheva, M. Stoyneva, K. Stefanov, S. D. Konaklieva, and S. Popov, "Volatile compounds from some Black Sea red algae and their chemotaxonomic application", *Bot. Mar.*, Vol. 49, pp. 47-56, 2006.
12. T. Shibata et al., "Antioxidant and radical scavenging activities of brown algal phlorotannins." *Developments in Applied Phycology*, Vol. 2, pp. 255-261, 2009.
13. E. Christaki, E. Bonos, L. Giannenas, and P.Florou-Paneri, "Functional properties of carotenoids originating from algae", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 93, pp. 5-11, 2013.

14. S. Miyagi and H. Sho, "Diet of the Aged in Okinawa and the Influence of Frequently Eaten Seaweeds on the Lipid and Sugar Metabolism of Rats", *Japan society of home economics*, Vol.41, No.10, pp. 965-973, 1990.
15. L. R. Almodovar and L. G. Boyd, "Agglutinins in marine algae for human erythrocytes", *Transfusion*, Vol. 6, pp. 82-83, 1966.
16. B. Sivathanu and S. Palaniswamy, "Purification and characterization of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* by HPLC-NMR and LC-MS-APCI", *Biomedicine & Preventive Nutrition*, Vol. 2, No. 4, pp. 276-282, 2012.
17. S. Takaichi, "Carotenoids in algae: Distributions, biosynthesis and functions", *Mar. Drugs*, Vol. 9, pp. 1101-1118, 2011.
18. A. Cuttriss, CI. Cazzonelli, ET. Wurtzel, and BJ. Pogson, "Carotenoids", *Adv. Botanic Res.*, Vol. 58, pp. 1-36, 2011.
19. JA. Del Campo, M. Garcia Gonzalez, MG. Guerrero, "Outdoor cultivation on microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.74, pp. 1163-1174, 2007.
20. A. Ben-Amotz, and R. Fishler, "Analysis of carotenoids with emphasis on 9-*cis*- β -carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel", *Food Chem.*, Vol. 62, pp. 515-520, 1998.

21. L. Gouveia, and J. Empis, “Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage condition”, *Innov. Food Sci. Emerging Technol.*, Vol. 4, pp. 227-233, 2003.
22. A. Rodriguez-Beltrando de Quiros, MA. Lage-Yusty, and J. Lopez-Hernandez, “Determination of human consumption”, *Food Chem.*, Vol.121, pp. 634-638, 2010.
23. MB. Allen, “The carotenoids of algae: Pigments from some Cryptomonads, a Heterokont and some Rhodophyceae”, *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 34, pp. 259-267, 1964.
24. H. Maeda, M. Hosokawa, T. Sashima, K. Funayama, and K. Miyashita, “Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissue”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 332, pp. 392-397, 2005.
25. R. Esteban, B. Martinez, B. Fernandez-Marin, JS. Becerril, and I. Garcia-Plazaola, “Carotenoid composition in Rhodophyta: Insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*”, *Eur. J. Phycol.*, Vol. 44, pp. 221-230, 2009.
26. M. Munawer Khan, and M. Mazharuddin Khan, “Production of carotenoids (antioxidants/colourant) in *Spirulina platensis* in response to indole acetic acid (IAA)”, *Int. J. Eng. Sci. Technol.*, Vol. 3, pp. 4973-4979, 2011.

27. EW. Becker, "Microalgae: Biotechnology and Microbiology", Cambridge University Press, 1994.
28. TM. Kana, PM. Glibert, R. Goericke, and NA. Welschmeyer, "Zeaxanthin and β -carotene in *Synechococcus* WH7803 repond differently to irradiance", *Limnol. Oceanogr.*, Vol. 33, pp. 1623-1627, 1998.
29. K. Masamoto, O. Zsiros, and Z. Gombos, "Accumulation of zeaxanthin in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Stain PCC 7942 grown under high light condition", *J. Plant Physiol.*, Vol. 155, pp. 136-138, 1999.
30. K. Murthy, A. Vanitha, J. Rajesha, M. Swamy, P. Sowmya, and GA. Ranishankar, "In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunalliela salina*, a green microalga", *Life Sci.*, Vol. 76, pp. 1381-1390, 2005.
31. A. Ben-Amotz, J. Gressel, and M. Avron, "Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition", *J. Phycol.*, Vol. 23, pp. 176-181, 1987.
32. MA. Borowitzka, "Vitamins and fine chemicals from micro-algae, in *Micro-algal Biotechnology* edited by MA. Borowitzka and LJ. Borowitzka", Cambridge University Press. pp. 153-196, 1988.

33. G. Britton, and F. Khachik, "Carotenoids in food, in *Carotenoids, Nutrition and Health*, Vol. 5, edited by G. Britton, H. Pfander and S. Liaaen-Jensens", Birkhausr Verlag, Basel, pp. 45-66, 2009.
34. S. Liaaen-Jensen, "Carotenoids in Food Chain, in *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*, Vol. 3, edited by G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander", Birkhauser, Basel, pp.359-371, 1998.
35. T. Matsuno, "Aquatic animal carotenoids", *Fish Sci.*, Vol. 67, pp. 771-783, 2001.
36. E. Fernandez-Garcia, I. Carvajal-Lerida, M. Jaren-Galan, J. Garrido-Fernandez, A. Perez-Galvez, and D. Hornero-Mendez, "Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities", *Food Res. Int.*, Vol. 46, pp. 438-450, 2012.
37. T. Maoka, "Carotenoids in marine animals", *Mar. Drugs*, Vol. 9, pp. 278-293, 2011.
38. MI. Minguez-Mosquera, and D. Hornero-Mendez, "Changes in provitamin A during paprika processing", *J. Food Protect.*, Vol. 60, pp. 853-857, 1997.
39. I. Jaswiri, D. Noviendri, RF. Hasrini, and F. Octavianti, "Carotenoids: Sources, medical properties and their application in food and nutraceutical industry", *J. Med. Plants Res.*, Vol. 5, pp. 7119-7131, 2011.

40. A. Koushik, DJ. Hunter, D. Spiegelman, KE. Anderson, JE. Buring, JL. Freudenheim *et al.*, “Intake of the major carotenoids and the risk of epithelial ovarian cancer in a pooled analysis of 10 cohort studies”, *Int. J. Cancer*, Vol. 119, pp. 2148-2154, 2006.
41. RD. Graham, and JM. Rosser, “Carotenoids in staple foods: Their potential to improve human nutrition”, *Food Nutr. Bull.*, Vol. 21, pp. 405-409, 2000.
42. W. Stahl, U. Jungmann, L. von Laar, M. Schietzel, H. Sies, *et al.*, “Increased dermal carotenoid levels assessed by noninvasive reflection spectrophotometry correlate with serum levels in women ingesting beta-carotene”, *J. Nutr.*, Vol. 128, pp. 903-907, 1998.
43. C. Vilchez, E. Forjan, M. Cuaresma, F. Bedmar, I. Garbayo, and JM. Vega, “Marine carotenoids: Biological functions and commercial applications”, *Mar. Drugs*, Vol. 9, pp. 319-333, 2011.
44. P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert, “Commercial applications of microalgae”, *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 101, pp. 87-97, 2006.
45. TM. Mata, AA. Martins, and NS. Caetano, “Microalgae for biodiesel production and other applications: A review”, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, Vol. 14, pp. 217-232, 2010.
46. D. Kekman, EK. Posner, KJ. McDermid, NK. Tabandera, PR. Wright, and AD. Wright, “Antioxidant activity of Hawaiian marine algae”, *Mar. Drugs*, Vol. 10, pp. 403-426, 2012.

47. F. Khachik, FF. De Moura, DY. Zhao, CP. Aebischer, and PS. Bernstein, "Transformation of selected carotenoids in plasma, liver, and ocular tissues of humans and in nonprimate animal models", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, Vol. 43, pp. 3383-3392, 2002.
48. M. Le, and L. Xiao-Ming, "Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health", *J. Sci. Food Agric.*, Vol. 90, pp. 2-12, 2010.
49. MD. Snodderly, "Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins", *Am. J. Clin. Nutr.*, Vol. 62, pp. 1448-1461, 1995.
50. DS. Friedman, BJ. O'Colmain, B. Munoz, SC. Tomany, C. McCarty, PT. De Jong, *et al.*, "Prevalence of age-related macular degeneration in the United States", *Arch. Ophthalmol.*, Vol. 122, pp. 564-572, 2004.
51. M. Kawakami, "Ionone Series Compounds from β -Carotene by Thermal Degradation in Aqueous Medium", *Nippon Nogeikagaku Kaishi* Vol.56, No.10, pp917-921, 1982.
52. E. K. Marasco, K. Vay, and C. Schmidt-Dannert, "Identification of Carotenoid Cleavage Dioxygenases from *Nostoc* sp. PCC 7120 with Different Cleavage Activities", *J. Biol. Chem.*, Vol. 281, pp. 31583-31593, 2006.
53. H. Cui, Y. Wang, and S. Qin, "Genomewide Analysis of Carotenoid Cleavage Dioxygenases in Unicellular and Filamentous Cyanobacteria", *Comp. Funct. Genomics* 2012, Article ID 164690, doi: 10.1155/2012/164690.

54. W. Siems, C. Salerno, C. Crifo, O. Sommerburg and I. Wiswedel, “ β -Carotene Degradation Products – Formation, Toxicity and Prevention of Toxicity” in *Food factors for health promotion*, ed. T. Yoshikawa, Forum Nutr., Karger, Basel, Vol. 61, pp. 75-86, 2009.
55. M. Carail, and C. Caris-Veyrat, “Carotenoid oxidation products: From villain to saviour?”, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 78, pp. 1493-1503, 2006.
56. M. H. Walter, and D. Strack, “Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions” *Nat. Prod. Rep.*, Vol. 28, pp. 663-692, 2011.
57. S. Baldermann, M. Yamamoto, Z. Yang, T. Kawahashi, K. Kuwanom, and N. Watanabe, “C₁₃-Apocarotenoids: More than Flavor Compounds?”, In *Carotenoid Cleavage Products*, Chapter 7, pp. 73-80, ACS Symposium Series, Volume 1134, 2013.
58. T. Kajiwara, “21 世紀初頭の藻学の現況”, *The Japanese society of Phycology*, 日本藻類学会創立 50 周年記念出版 pp. 132-135, 2002.
59. V. Gressler, P. Colepicolo, and E. Pinto, “Useful Strategies for Algal Volatile Analysis”, *Current Analytical Chemistry*, Vol. 5, pp. 271-292, 2009.
60. H. Sugisawa, K. Nakamura, and H. Tamura, “The aroma profile of the volatiles in marine green algae (*Ulva pertusa*),” *Food Reviews International*, Vol. 6 No. 4, pp. 573-589, 1990.

61. T. Kajiwara, K. Kodama, A. Hatanaka, and K. Matsui, "Volatile compounds from Japanese marine brown algae", In *Bioactive Volatile Compounds from Plants*, Chapter 9 pp. 103-120, ACS Symposium Series, Volume 525, 1993.
62. M. Okano, and T. Aratani, "Constituents in marine algae-I: Seasonal variation of sterol, hydrocarbon, fatty acid, and phytol fractions in *Ulva pertusa*", *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, vol. 45, pp. 389-393, 1979, (in Japanese).
63. M.T. Golmakani, and K. Rezaei, "Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Zataria multiflora* Boiss", *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, Vol. 110, pp. 448-454, 2008.
64. K. Ganzler, A. Salgo, and K. Valko, "Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography", *J. Chromatogr. A*, Vol. 371, pp. 299-306, 1986.
65. M. Savova, H. Bart, and I. Seikova, "Enhancement of mass transfer in solid-liquid extraction by pulsed field", *J. Univ. Chem. Technol. Metall.*, Vol. 40, No. 4, pp. 329-334, 2005.
66. C. H. Gu, H. Li, R. B. Gandhi, K. Raghavan, "Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening", *Int. J. Pharm.*, Vol. 283, pp.117-125, 2004.
67. A. G. Vitenberg, "Equilibrium model in the description of gas extraction and headspace analysis", *J. Anal. Chem.*, Vol. 58, No.1, pp. 2-15, 2003.

68. C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, B. Sgorbini, and P. Rubiolo, "Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices", *J. Chromatogr. A*, Vol. 1184, pp. 220-233, 2008.
69. M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, "Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma", *J. Chromatogr. A*, Vol. 881, pp. 569-581, 2000.
70. R. P. Belardi, and J. B. Pawliszyn, "The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns", *Water Poll. Res. J. Canada*, Vol. 24, No. 1, pp. 179-191, 1989.
71. C. L. Arthur, and J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers", *Anal. Chem.*, Vol. 62, No. 19, pp. 2145-2148, 1990.
72. J. O'Reilly, Q. Wang, L. Setkova, J. P. Hutchinson, Y. Chen, H. L. Lord, and C. M. Linton, "Automation of solid-phase microextraction", *J. Sep. Sci.*, Vol. 28, No. 15, pp. 2010-2022, 2005.
73. Food Marketing & Research Information Center,
<http://www.fmric.or.jp/trace/nori/index.htm>
74. P. Poinot, J. Grua-Priol, G. Arvisenet, C. Rannou, M. Semenou, A. Le Bail, and C. Prost, "Optimisation of HS-SPME to study representativeness of partially baked bread odorant extracts", *Food Research International*, vol. 40, No. 9, pp. 1170-1184, 2007.

75. D. M. A. M. Luykx, and S. M. Van Ruth, “An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food”, *Food Chemistry*, vo. 107, pp. 897–911, 2008.
76. R. Liu, K. Xiong, Y. C. Luo, and X. Z. Dai, “Changes in volatile compounds of a native Chinese chilli pepper (*Capsicum frutescens* var) during ripening”, *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 44, pp. 2470-2475, 2009.
77. I. Silva, M. Rocha, and M. A. Coimbra, “Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry methodology for analysis of volatile compounds of marine salt as potential origin biomarkers”, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 635, pp. 167-174, 2009.
78. K. Tananuwong, and S. Lertsiri, “Changes in volatile aroma compounds of organic fragrant rice during storage under different conditions”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 90, pp. 1590-1596, 2010.
79. K. Kaseleht, E. Leitner, and T. Paalme, “Determining aroma-active compounds in Kama flour using SPME-GC/MS and GC-olfactometry”, *Flavor and Fragrance Journal*, Vol. 26, pp. 122-128, 2011.
80. A. Prades, R. Assa, M. Dornier, J. P. Pain, and R. Boulanger, “Characterisation of the volatile profile of coconut water from five varieties using an optimized HS-SPME-GC analysis”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 92, pp. 2471-2478, 2012.

81. Food & Agriculture Organization of the United Nations,
<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-flav/en/>
82. Flavornet, <http://www.flavornet.org/>
83. S. P. Hu, and B. S. Pan, “Modification of fish oil aroma using a macroalgal lipoxygenase”,
Journal of the American Oil Chemists’ Society, Vol. 77, No. 4, pp. 343–348, 2000.
84. M. Yamamoto, S. Baldermann, K. Yoshikawa, A. Fujita, N. Mase, and N. Watanabea,
“Determination of volatile compounds in four commercial samples of Japanese green
algae using solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry”, *The
World Scientific Journal, Analytical Chemistry*, Volume 2014 (2014), Article ID 289780, 8
pages
85. A. Rzama, B. Arreguy-San-Miguel, and M. Ettalibi, “Lipids metabolites and essential oil
from the green alga *Chara vulgaris*”, *Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc)*, Vol. 22, No. 2, pp.
65-70, 2002.
86. Y. H. Hui, “Handbook of fruit and vegetable flavors”, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken,
New Jersey, 2010.
87. P. Fink, E. Elert, and F. J. Jüttner, “Volatile foraging kairomones in the littoral zone;
Attraction of an herbivorous freshwater gastropod to algal odors”, *Journal of Chemical
Ecology*, Vol. 32, No. 9, pp. 1867–1881, 2006.

88. I. Flament, and G. Ohloff, "Volatile constituents of algae: Odoriferous constituents of seaweeds and structure of nor-terpenoids identified in Asakusa-Nori flavor", In J. Adda (Ed.) *Progress in Flavor Research, Proceedings of the 4th Weurman Flavour Research Symposium* pp. 281-300, Elsevier, 1985.
89. S. Baldermann, A. N. Mulyadi, Z. Yang, A. Murata, P. Fleischmann, P. Winterhalter, M. Knight, T. M. Finn, and N. Watanabe, "Application of centrifugal precipitation chromatography and high-speed counter-current chromatography equipped with a spiral tubing support rotor for the isolation and partial characterization of carotenoid cleavage-like enzymes in *Enteromorpha compressa* (L.) Nees", *Journal of Separation Science*, Vol. 34, pp. 2759-2764, 2011.
90. R. P. Yu, L. P. Wang, S. F. Wu, J. S. Che, and Y. M. Liu, "Analysis of Volatile Compounds in Algal Bloom Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Sniffing" *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 38, No.9. pp. 1349-1352, 2010.
91. R. G. Buttery, R. Teranishi, L. C. Ling, and J. G. Turnbaugh "Quantitative and sensory studies on tomato paste volatiles", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 38, pp. 336-340, 1990.
92. F. Ullrich, and W. Grosch, "Identification of the most intense odor compounds formed during autoxidation of methyl linolenate at room temperature", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. 65, No. 8, pp. 1313-1317, 1988.

4. 3 謝辞

私は、静岡大学工学部に所属される私の指導教官 渡辺 修治 教授には、三度、素晴らしい機会を与えて頂きました。価値ある御指導、御助言、御支援、御鞭撻、忍耐に対して、特別な思い入れもあり、深く感謝致します。さらに、静岡大学農学部 轟 泰司 教授、大西 利幸 准教授、また、共同研究先の静岡大学工学部 間瀬 暢之 准教授の御支援に感謝致します。

加えて私は、ポツダム大学 Susanne Baldermann 教授には、心からの御指導、御助言、御支援、御鞭撻を頂き大変感謝致します。さらに、長谷川香料株式会社 藤田 明博士、吉川 啓輔博士を始めとする関係者の皆様には、GC-MS を用いた香気成分分析において、格別の機会、御指導を頂き、深く感謝致します。

私は、さらに、静岡大学 農学部にも所属されていた河橋 辰哉氏、石田 晴香女史、同部に所属される友村 美穂女史、神田 桃代女史、土屋 諒氏に対しても、その御支援に感謝致します。

私は、本研究に取り組み、また、本研究を完了する機会をくださった焼津水産化学工業株式会社 山本 和広氏、斎藤 滋氏、松田 秀喜博士、又平 芳春博士、大橋 弘明氏に心より感謝致します。また、山田 潤氏、渡仲 匡明氏、久保村 大樹博士、服部 武史博士、奥川 高康氏、増井 綾乃女史、稲森 美奈子女史、三ツ石 純子女史、戸石 千広氏、岡田 知子女史、中富 毅氏、鈴木 昌友氏を始めとする関係者の皆様に、御助言や御支援、激励を頂き、感謝致します。

私は、有限会社カネツ杉浦商店（静岡県浜松市）様に、頂いたアオサ (*Monostroma nitidum*) を研究に使用させて頂き、感謝致します。また、アオノリサンプル提供に協力してくれた西村青果株式会社（高知県吾川郡）、株式会社磯駒海苔（静岡県静岡市）、原田海藻有限会社（静岡県藤枝市）にも感謝致します。

更に、官能評価についての価値ある議論の機会をくださった Bernhard Brückner 博士

や全てのパネリストたちの御支援に感謝致します。

最後に私は、これまでの寛大な支援を頂いた私の妻 山本 良子 と家族に感謝
致します。

山本 正芳