緑藻アナアオサ (*Ulva pertusa*) 揮発性成分の 官能特性の検討

田村啓敏*・中本英喜*・楊 栄華*・杉沢 博*

Characteristic Aroma Compounds in Green Algae (*Ulva pertusa*) Volatiles

Hirotoishi TAMURA*, Hideki NAKAMOTO*, Rong-hua YANG*
and Hiroshi SUGISAWA*

* Department of Bioresource Science, Kagawa University,
Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-07

The essential oils of *Ulva pertusa* were prepared by steam distillation under the reduced pressure, and separated into 6 fractions through a silica-gal column (solvent: pentane/ether). Each fraction was analyzed by a capillary gas chromatograph-mass spectrometer (GC/MS). Sixty compounds were identified by the similarity of GC/MS fragment pattern and retention indices of individual aroma constituents. Eight sulphur containing compounds were detected by GC with a selective detector, flame photometric detector. As the characteristic aroma was smelled in fraction 1 and fraction 3, each component in both fractions was evaluated by GC-sniff test. Thirteen compounds such as dimethyl sulfide, β -ionone, 7-heptadecene and long chain aldehydes were selected as the characteristic aroma constituents of *Ulva pertusa*. Furthermore, as the important compounds, extra 4 compounds having odor unit value more than 1 were added as the important aroma compounds in *Ulva pertusa*. The mixture of 17 compounds prepared along with the GC peak area smelled like a seaweed but not real aroma of the algae. (Received Dec. 5, 1994)

日本中の多くの海岸、特に湾内でみられるアナアオサ (*Ulva pertusa*) は、緑藻植物門アオサ目に属する海藻である。アナアオサは独特の香りを持つためにアオノリの代用品として用いられ、その風味の良さからノリの佃煮の原料として用いられている¹⁾。また、清浄な海岸に打ち寄せられたときに放出されるこの海藻の匂いは、潮の香りに重要な役割を果たしていると考えられている。

アナアオサの揮発性成分に関する研究は、約30年前に片山²⁾が乾燥したアナアオサを使い、30成分を同定している。また、梶原³⁾はアナアオサ精油中において海藻の特徴的香気を有する長鎖アルデヒドを初めて同定した。我々は⁴⁾先に連続蒸留抽出法 (SDE法) を用いてアナアオサより揮発性成分を分離して76成分を同定し、その特徴的成分は脂肪酸由来と考えられる不飽和アルデ

ヒド類であると報告した。

今回減圧水蒸気蒸留法により得たアナアオサ精油成分をGC-Sniffing法による各化合物の官能評価、各化合物の匂いの寄与度合を数値で示すオーダーユニット値の利用によりアナアオサの香気に重要な役割を果たしていると考えられる精油成分を選抜した。

実験方法

1. 実験試料

本研究では1991年3月に香川県庵治町北端の海岸で採取したアナアオサを試料として用いた。

2. 精油の分離

(1) 連続蒸留抽出法

アナアオサ300gを同量の再イオン交換水と共に0°C

* 香川大学農学部生物資源科学科 (〒761-07 香川県木田郡三木町)

で2分間磨砕した。これに内標準物質としてトリデカン¹を1 μ l加えて常圧下での連続蒸留抽出法(以下SDE法と略)により1時間エーテル30mlで蒸留抽出を行った。同量の試料を用いてこの操作をもう一度繰り返し、2回分の抽出液に15gの無水硫酸ナトリウムを加えて、冷暗所(2 $^{\circ}$ C), 24時間放置して脱水した後、Whatman 1-PS濾紙により濾過し、減圧濃縮した。さらに窒素気流下(20 ml/min)で濃縮を行い、精油を得た。収率率2.45 $\times 10^{-3}$ %。

(2) 減圧水蒸気蒸留法

アナアオサ600gを上と同様に調製し、内標準物質としてトリデカン¹を1 μ l加えて40 $^{\circ}$ C, 25 mmHgの条件下で3時間減圧水蒸気蒸留を行った。その時水、氷・食塩、ドライアイス・エタノール、液体窒素の4つのトラップに揮発性成分を捕集した。留出液に塩化ナトリウム40gを加えた後、ジエチルエーテル450ml(150ml $\times$ 3)で抽出した。同量の試料を用いて上述の操作を繰り返した後、得られた2回分の抽出液にSDE法と同様の操作を行い精油を得た。収率率7.65 $\times 10^{-4}$ %。

3. 精油の分画

上述の減圧水蒸気蒸留法により10回分の精油を得た。このとき、トリデカンは加えなかった。この10回分の精油はシリカゲルカラム(10g, 30cm $\times$ 1.2cm)を用いて、ペンタン・エーテル混合溶媒でFig. 1に示すようにFr. 1~Fr. 6の6画分に分画した。

4. 機器及び分析条件

GC: 島津GC-9A及びクロマトパックC-R 3A; カラムFS-WCOTキャピラリーカラムOV-101(50m $\times$ 0.25mm); カラム温度80~200 $^{\circ}$ C(2 $^{\circ}$ C/min); スプリット比1/65; キャリアーガス; N₂ 0.70 ml/min; 気化室温度220 $^{\circ}$ C; 検出器FID及びFPD。

GC/MS: 日本電子JMS-DX 300及びJMA-DA 5000;

Fig. 1 Outline of sample preparation and fractionation

GCの条件, キャリアーガスHe 0.64 ml/min, スプリット比1/100, その他は上に同じ; イオン化EI, 70 eV。

GC-Sniffing: 島津GC-mini 2; カラムFS-WCOTメガボアキャピラリーカラムDB-1(30m $\times$ 0.53mm); カラム温度70~200 $^{\circ}$ C(2 $^{\circ}$ C/min); スプリットレス; キャリアーガス; N₂ 4.0 ml/min; 気化室温度250 $^{\circ}$ C; 検出器FID。

GC-SniffingはカラムをFIDに取り付け、試料のガスクロマトグラムを得て、次にカラムを匂い嗅ぎ装置につなぎ直し、それぞれのクロマトグラムの保持時間を参考にしながら匂いを嗅いだ。匂い嗅ぎでは匂いに対する鼻の疲労を考慮して、匂い嗅ぎは連続して15分間以上は続けないように断続的に行った⁵⁾。精油成分は溶媒で約50%に希釈後、ガスクロマトグラフ装置に0.5 μ l注入し、カラムより溶出する匂い成分を匂い嗅ぎ装置で検出した。

5. 揮発性成分の同定・定量及び官能評価

同定は前報⁴⁾と同様にマススペクトルとGCの保持指標であるRetention Index値(以下RI値と略)との一致により行った。すなわち、GC/MS分析により得られたマススペクトルを同一機種で得た標準物質のそれと比較、データ集⁶⁾との比較、フラグメンテーションの解析により行った。また、各成分のRI値は当研究室で開発したデータベース⁷⁾の数値及び文献値を参考にした。定量は内標準物質のピーク面積と各成分のピーク面積との比により得られたアナアオサ新鮮重あたりの濃度(ppm)を算出して行った。含硫化合物のRI値はFPD検出器を使用し、既知のアルキルメルカプタンのRI値を基に計算した⁸⁾。

また、シリカゲルカラムにより分画した各画分の官能評価は6人のパネラーで2点比較法により行った。

6. GC-Sniffing法による官能評価

全精油及びシリカゲルカラムにより分画した6画分のうちFr. 1, Fr. 3についてGC-Sniffingを行い、一つ一つのピークの匂い特性を評価した。GC-SniffingにはULLRICHらの希釈法⁹⁾も知られるが、我々は操作が簡便な楊らの方法で評価した⁵⁾。また、匂いの表現用語を統一するためにフレーバーホイールを利用した。フレーバーホイールは前報⁴⁾に示したものの用語を一部改良した。匂いの表現用語を花及び果実様、腐敗及び発酵臭、木様、草様、海の香りの5つに大きく分類し、その中でさらに具体的な語句を指定し、計24の語句を使用した。匂い強度は前報⁴⁾と同様に5段階とした。各パネラーにはできるだけこのフレーバーホイール内の語句で、匂い

強度と共に表現してもらった。

7. 各成分のいき値の測定及びオーダーユニットの算出

アナアオサ精油中で同定された成分のうち試薬を入手することができた 38 成分について匂いのいき値を測定した。各成分の標品を 15 ml のメタノールで希釈した後、再イオン交換水で一定濃度に希釈して 45 ml 容の 5 個の容器のうち 2 個に入れた。残り 3 個の容器には再イオン交換水を入れた。これを 6 人のパネラーに匂ってもらい、どの容器に匂いが感じられるかを答えてもらった。パネラーが 2 個とも区別できた場合は、さらに 2, 3 倍ずつ希釈して同様の操作を行い、パネラーが区別できなくなるまで続けた。各パネラーが 2 個とも区別できた濃度の平均値をこの化合物のいき値とした。

各成分のオーダーユニット (U_0) は GUADAGNI¹⁰⁾ の定義に基づいて次の式により求めた。

$$\text{オーダーユニット } (U_0) = \frac{\text{その化合物の濃度(ppm)}}{\text{その化合物のいき値(ppm)}}$$

実験結果および考察

前報では SDE 法により抽出した精油についてその香気特性に重要な成分を主に GC-sniffing 法により決定した⁴⁾。しかし、今回 SDE 法及び減圧水蒸気蒸留法により得られた精油を GC により分析した結果、2 つの精油の揮発性成分組成に違いがみられ、減圧水蒸気蒸留法では高沸点成分の収率が少なかった。2 つの精油の匂いを官能評価 (1 点試験法) により比較した結果、それぞれアナアオサ様の匂いがしたが、SDE 法により得られた精油には 2-エチルフラン、5-メチルフルフラール、2-ベンチルフランなど糖質、脂質の加熱分解物で知られる成分が検出され、加熱臭が強かった。そのため、本論文では減圧水蒸気蒸留法により得られた精油を用い分析を行った。

減圧水蒸気蒸留法を 10 回繰り返して得られた精油の収率は $7.65 \times 10^{-4}\%$ であった。Table 1 にアナアオサ精油中で同定された成分及びその定量分析結果を示した。炭化水素類 13 成分、テルペン類 6 成分、エステル類 1 成分、アルデヒド類 21 成分、アルコール類 9 成分、芳香族化合物 2 成分、含硫化合物 8 成分、計 60 成分が同定された。このうち SDE 法では検出できなかった成分を 15 成分新たに減圧水蒸気蒸留法で検出した。主成分は 7-ヘプタデセン及び (E, E)-2, 4-デカジエナールで、合わせて全精油の約 68% を占めていた。また、炭化水素類

は全体の 51.2%、アルデヒド類は 27.6% を占めていた。

減圧水蒸気蒸留法により得られたアナアオサ精油とシリカゲルカラムにより分画した 6 画分それぞれについて、2 点比較法により官能評価を行った結果、炭化水素類を主に含む Fr. 1 及びアルデヒド類を主に含む Fr. 3 がアナアオサらしい匂いがすることがわかった。各パネラーにその匂いを表現してもらったところ、Fr. 1 は腐敗臭をともなった水の香りで Fr. 3 は海藻、きゅうり様の香りという結果が得られた。アナアオサの特徴的な香気成分を見いだすため全精油及びこれらの 2 つの画分について GC-Sniffing を行った。その結果、35 種の匂いを識別することができた。それぞれのピークの匂いの表現と強度をフレーバーホイールにしたがって決定したところ、Table 2 に示した 13 成分がアナアオサを連想させる海藻様、キュウリ様、ノリ様、水の腐敗臭などの匂いを持っていた。そのうち 10 成分が (E)-2-ノネナールなどの不飽和アルデヒドであった。またジメチルスルフィドはアナアオサを切断したとき最初に感じられる匂いであったため、この成分がアナアオサのトップノートに大きく寄与していると考えられる。

アナアオサ精油中の揮発性成分のうち、いき値を測定できた化合物のオーダーユニットを Table 1 に示した。オーダーユニットは食品中の各匂い成分の濃度をそのいき値で除した値であるため、オーダーユニットが 1 以上の成分がその食品の匂いに直接寄与し、オーダーユニットが大きければ大きいほどその寄与度合が大きいと考えられる。Table 1 に示すようにオクタナール、(E, E)-2, 4-デカジエナールなど 8 成分のオーダーユニットが 1 以上であることがわかった。これにより GC-Sniffing では選出されなかった 1-オクテン-3-オール、オクタナール、(E)-2-デセナール、トリデカナールの 4 成分もアナアオサの匂いに寄与していると考えられた。

GC-Sniffing により示されたアナアオサの特徴的な匂いを持つ 13 成分とオーダーユニットによりアナアオサの匂いに寄与していることが新たに示された 4 成分を加えて、合計 17 成分がアナアオサの特徴的な香気を構成する成分として選ばれた。ここで明らかとなった 17 成分中 (Z, Z)-8, 11, 14-ヘプタデカトリエナールと (Z)-8-ヘプタデカナールを除き、入手可能な 15 成分をアナアオサ精油中に含まれている割合 (GC 分析でのピーク面積%) で調査し、その匂いをアナアオサと比較した。15 成分のうち (Z, Z)-2, 4-デカジエナールと (E, Z or Z, E)-2, 4-デカジエナールは (E, E)-2, 4-デカジエナール量として調査した。その結果、その溶液の匂いは

Table 1 Volatile compounds identified from *Ulva pertusa*

Peak No.	Compounds	Conc. ^a (ppm)	U ₀	Retention index Found	Ref.
1	methanethiol	tr.		—	—
2	ethanethiol	tr.		501	500
3	dimethyl sulfide	tr.		525	527
4	ethyl acetate	0.010	0.002	583	592
5	2-methyl-3-buten-2-ol ^b	0.005	0.00005	602	603
6	dimethyl disulfide	tr.		722	725
7	2-penten-1-ol	0.095	0.086	738	743
8	hexanal	0.005	0.078	771	776
9	(Z)-3-hexen-1-ol	0.044	0.012	830	830
10	hexanol	0.071	0.007	841	844
11	hexanethiol	tr.		901	908
12	benzaldehyde	0.002	0.002	931	930
13	dimethyl trisulfide	tr.		940	949
14	heptanol ^b	0.038	0.089	945	945
15	1-octen-3-ol	0.025	2.5	957	959
16	2,4-heptadienal	0.026		965	965
17	octanal	0.158	1.93	979	981
18	(E,E)-2,4-heptadienal	0.028	0.036	983	980
19	decane ^b	0.003		1 003	1 000
20	benzyl alcohol ^b	0.007	0.00007	1 008	1 005
21	<i>m</i> -cymene	0.007	0.00875	1 012	1 016
22	limonene	0.006	0.002	1 024	1 025
23	(E)-2-octenal	0.017	0.77	1 035	1 031
24	octanol ^b	0.033	0.038	1 048	1 050
25	nonanal	0.021	0.21	1 080	1 085
26	isobutyl disulfide ^b	tr.		1 182	1 178
27	isopentyl sulfide ^b	0.002		1 186	1 190
28	(E,E)-2,4-octadienal	0.004	0.4	1 090	1 087
29	(E,Z)-2,6-nonadienal	0.01	92.86	1 124	1 121
30	(E)-2-nonenal	0.013	10.4	1 133	1 135
31	decanal	0.006	0.086	1 183	1 186
32	(E,E)-2,4-nonadienal	0.005	0.625	1 191	1 190
33	dodecane ^b	0.011		1 199	1 200
34	(Z)-4-decen-6-yne ^b	0.004		1 235	—
35	(E)-2-decenal ^b	0.057	3.35	1 238	1 234
36	(E)-4-decen-6-yne ^b	0.004		1 244	—
37	decanol	0.053	0.068	1 247	1 252
38	(Z,Z)-2,4-decadienal ^b	0.208		1 264	1 267
39	2,4-decadienal	0.034		1 269	—
40	(E,E)-2,4-decadienal	1.469	146.9	1 288	1 289
41	(E)-2-undecenal	0.003		1 339	—
42	undecanol ^b	0.005	0.0071	1 349	1 354
43	dodecanal	0.008	0.145	1 388	1 391
44	1-tetradecene	0.003	0.05	1 395	1 394
45	tetradecane	0.006	0.006	1 398	1 400
46	α -ionone	0.012	0.24	1 407	1 407
47	geranylacetone	0.007	0.0011	1 427	1 431
48	β -ionone	0.037	6.167	1 464	1 462
49	1-pentadecene	0.004	0.0011	1 488	1 490
50	tridecanal	0.083	8.3	1 493	1 495
51	pentadecane	0.045		1 497	1 500
52	hexadecane ^b	0.007		1 597	1 600
53	7-heptadecene	3.775	0.669	1 678	1 676
54	1-heptadecene ^b	0.047	0.006	1 693	1 689
55	pentadecanal	0.021	0.021	1 697	1 694
56	heptadecane	0.006		1 701	1 700
57	octadecane	0.005		1 798	1 800
58	(Z,Z,Z)-8,11,14-heptadecatrienal	0.023		1 852	—
59	(Z)-8-heptadecenal	0.008		1 862	—
60	phytol	0.007	0.0109	2 106	2 105

^a : tr. < 0.001.^b : newly identified compounds (compared with data cited in ref. 4).Column, OV-101 (50 m × 0.25 mm i.d.) ; Oven temp, 80~200°C at 2°C/min ; Carrier Gas, N₂ 0.70 ml/min.

Table 2 Characteristic flavor compounds of *Ulva pertusa*

Compounds	Odor description	Odor intensity
dimethyl sulfide	aonori-like	3
(E,E)-2,4-heptadienal	seaweed-like	2
(E,E)-2,4-octadienal	seaweed-like	2
(E,Z)-2,6-nonadienal	cucumber-like	3
(E)-2-nonenal	cucumber-like	2
(E,E)-2,4-nonadienal	seaweed-like	2
(Z,Z)-2,4-decadienal	seaweed-like	4
2,4-decadienal	seaweed-like	2
(E,E)-2,4-decadienal	seaweed-like	3
β -ionone	nori-like	3
7-heptadecene	water off-flavor	1
(Z,Z,Z)-8,11,14-heptadecatrienal	seaweed-like	1
(Z)-8-heptadecenal	seaweed-like	1

アナアオサの‘新鮮な青くささ’を欠いてはいたが海藻様の匂いを示すことがわかった。以上のことから GC-Sniffing による香気成分の特定のみならず、オーダーユニット値の利用を併用することで天然のアナアオサのにおいのうち海藻様の匂いの構成成分を明らかにできた。現在、アナアオサの匂いの人間に対する神経生理学的作用も検討中である。その結果については別途報告する予定である。

要 約

アナアオサの精油の分離法を連続蒸留抽出法、減圧水蒸気蒸留法により検討したところ、後者の方が適していた。この方法で得られた精油について GC 及び GC/MS 分析により精油成分として 60 成分を同定した。

さらに、得られた精油をシリカゲルカラムにて極性順に 6 画分に分画し、全精油及びアナアオサ様の香気を持つ Fr. 1, Fr. 3 について GC-Sniffing により官能評価を行った。その結果、不飽和アルデヒド類及びジメチルスルフィド等の 13 成分がアナアオサを連想させる匂いを持つことがわかった。また、精油中の各オーダーユニットの算出により、GC-Sniffing で選ばれた成分以外に新たに 4 成分がアナアオサの匂いに寄与していると考えられた。選ばれた成分のうち入手可能な 15 成分から調査

した溶液は海藻様の匂いを示していた。

文 献

- 1) 新崎盛敏・新崎輝子：海草のはなし，（東海大出版会，東京），p. 121（1978）。
- 2) 片山輝久：日水誌，**21**，703（1961）。
- 3) 梶原忠彦・畑中顕和・河合哲夫・石原正和・恒屋知之：日水誌，**53**，1901（1987）。
- 4) SUGISAWA, H., NAKAHARA, K. and TAMURA, H.: *Food Reviews International*, **6**, 573（1990）。
- 5) 楊 栄華・大月ひさこ・田村啓敏・杉沢 博：農化，**61**，1435（1987）。
- 6) Eight Peak Index of Mass Spectra, 3rd ed., Vol. 3, ed. by The Mass Spectrometry Data Center and The Royal Society of Chemistry (Nottingham). p. 2677~5314（1983）。
- 7) 杉沢 博：日本農芸化学会研究小集会「フレーバー研究におけるデータベース利用とその展開」講演要旨集，p. 1，東京（1986）。
- 8) 田村啓敏・杉沢 博：日食工誌，**36**，148（1989）。
- 9) ULLRICH, F. and GROSCH, W.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **184**, 277（1987）。
- 10) GUADAGNI, D.G., OKANO, S., BUTTERY, R.G. and BURR, H.K.: *Food Tech.*, **20**, 166（1966）。

（平成 6 年 12 月 5 日受理）