

## — 研究論文 —

# 微細緑藻イカダモ (*Scenedesmus* sp.) のにおいセンシング 培養法の開発に向けた嗅覚官能評価, におい物質の同定, および QCM 型 e-nose ニオイセンサーの基礎的検討

小山 玲音<sup>1</sup>, 出村 幹英<sup>1\*</sup>, 橋詰 賢一<sup>2</sup>, 関根 あゆ美<sup>2</sup>,  
佐藤 克久<sup>3</sup>, 上村 智子<sup>3</sup>, 笹川 智史<sup>1</sup>, 上野 大介<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> 佐賀大学大学院農学研究科 〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町 1 番地

<sup>2</sup> 株式会社アロマビット 〒104-0061 東京都中央区銀座 7-13-6 サガミビル 2 階

<sup>3</sup> 西川計測株式会社 〒151-8620 東京都新宿区代々木 5-22-7 クイントビル 5 階

<sup>4</sup> 鹿児島大学連合農学研究科 〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1 丁目 21 番地

本研究グループでは、微細藻類が発する“におい”を利用した新しい培養技術“においセンシング培養 (Odor Sensing Cultivation: OSC)”の開発を進めている。本研究では国産の新しい農作物として期待されている緑藻イカダモ (*Scenedesmus* sp.) を対象として、嗅覚官能評価、におい物質同定、e-nose ニオイセンサー分析を通じ、OSC 実用化に向けた基礎的データの蓄積を目的とした。イカダモ培養液の嗅覚官能評価の結果、におい強度は 2.1 (何かわかる程度の強さ) であり、においの印象は“お茶、甘い、生臭い”というものであった。該当のにおい物質を化学分析に供試したところ、1-ノナンール、 $\alpha$ -、 $\beta$ -イオノンが同定され、また 2-ウンデセナールおよび酢酸が仮同定された。QCM 型 e-nose ニオイセンサー分析に供試した結果を主成分分析で解析したところ、イカダモ培養液と対照区培養液のにおいは、寄与率の高い 5 種の QCM 型検出素子によって判別が可能であった。

## 1. 背景

近年、微細藻類の再生可能エネルギーに関する様々な取り組みが進められており、とくにバイオ燃料を生産するための研究が精力的になされてきた。その一方で、多くの微細藻類は乾燥体で 50% 近くのタンパク質を含んでおり、栄養豊かな食品として活用できることも明らかとなっている<sup>1)</sup>。すでに養殖現場では魚類用飼料として長く使用されており、近年では代替肉候補として数多くの企業によって開発が進められている。また近年、多くの微細藻類はアスタキサンチンやドコサヘキサエン酸 (DHA) などの機能性成分を生産することが明らかとなり、サプリメントや医薬品としての利用も進められている<sup>1)~3)</sup>。加えて、微細藻類は二酸化炭素吸収効率が高いことから、カーボンニュートラルや SDGs 推進の観点からも利用の拡大が期待されている。そのような背景から、本研究グループでは微細藻類を“新しい工業素材”・“新しい農作物”として位置づけており、微細藻類の培養を広く普及させていくことを目指している。

微細藻類の大量培養の現場では、低労力・低コストの技術が求められており、培養を行う水槽の形状、培地成分中の窒素、リンなど栄養塩類の組成、二酸化炭素の供給方法など、多くの微細藻類バイオマスを得つつ生産コ

ストを低く抑えるという課題について、世界中で研究が推進されている<sup>4),5)</sup>。その際、微細藻類の培養を広く普及させるには、増殖状態や収穫時期などを、簡易かつ客観的に判断できる技術が求められる。一方で、生産現場においては、培養状況 (増殖の程度だけでなく、細胞の生育状況や健康状態の変化、バクテリアの混入、目的外の他種微細藻類の混入など) を包括的かつ簡易的に把握する技術が求められるが、このような総合的な培養状況の把握には顕微鏡や各種センサー (クロロフィル計、濁度計、パーティクルカウンター等) のような高価な装置と、それらを取り扱う技術、またデータを読み解く専門的知識が必要とされてきた。

そのような中、本研究グループでは日ごろの培養作業の中で、微細藻類が増殖の段階に応じて“特徴的なにおい (匂い、臭い、香気: 以後、におい)”を発していることに気がついた。微細藻類の培養状態に応じた特徴的なにおいとそれらに関連する物質 (以後、におい物質) を把握し、簡易に計測できるようになれば、においを利用した培養管理が可能になる。これまでも特定の微細藻類が発するボルネオールやジェオスミンのような悪臭物質が水道水の異臭問題を引き起こしていることや<sup>6)~8)</sup>、いくつかの微細藻類が種ごとに異なる揮発性有機化合物 (VOCs) を発していることが報告されているが<sup>8)~10)</sup>、

\*Corresponding authors : E-mail uenod@cc.saga-u.ac.jp (D Ueno), st8148@cc.saga-u.ac.jp (M Demura)

微細藻類が発するにおい物質を培養状況の把握に活用するという着想はこれまでに例がない。本研究グループでは微細藻類が発する“におい”を利用した新しい培養技術を“においセンシング培養 (Odor Sensing Cultivation: OSC)”と名付けた。将来的に OSC 技術が確立し、微細藻類の増殖の程度だけでなく、細胞の生育状況や健康状態などを総合的かつ簡易的に把握できれば、バイオマス生産工程の効率化による人的・設備的コストの抑制が可能となり、新しい工業素材・農作物としての普及を推進できると期待される。

本研究では OSC の実用化に向けて、生産現場でも簡易ににおいを判別できる手法として“e-nose (イーノーズ)”の利用を検討している。E-nose とは、におい物質の吸着特性に対する選択性の異なる検出素子を複数個搭載した検出デバイスのことであり<sup>11)</sup>、日本語では人工鼻、嗅覚センサー、匂いセンサー (以後、e-nose ニオイセンサー) などと呼ばれている。本研究では、“QCM 型 e-nose ニオイセンサー (アロマコーダー: アロマビット, 東京)”に着目し、微細藻類への応用を進めている。アロマコーダーは Quartz Crystal Microbalance (水晶振動子マイクロバランス: 水晶振動子の微小重量変化を測定する手法: QCM) を検出素子として採用している<sup>12)</sup>。QCM の原理は、水晶振動子の振動数の変化量を計測するものである。水晶振動子の表面には、におい物質に対して吸着特性の異なる膜が蒸着されており、そこににおい物質が吸着すると、重量に比例して水晶振動子の振動数が変化し、その変化量を値として示す。QCM は、従来のニオイセンサーで広く利用されてきた金属酸化半導体と比較して、気体の種類によっては感度や選択性、応答性が高いことが報告されている<sup>13)</sup>。QCM は 1980 年代から開発が進められてきた技術ではあるが、製品化され、市販品として普及し始めたのは比較的近年である。アロマコーダーは検出部に、におい物質に対して吸着特性の異なる 35 種の膜を蒸着した QCM 型検出素子を搭載しており、現状で市販されている汎用ニオイセンサーのなかで 35 種という多数の QCM 型検出素子を搭載しているのは本製品のみである。本製品は QCM 型検出素子の種類が多いことから、選択性の異なる各素子の反応量の違いをパターンとして認識することで、においの違いを高解像度で解析できることが特徴となっている<sup>14)</sup>。アロマコーダーを利用することにより、e-nose ニオイセンサーでは不可能であった“においの違い”を判別し、微細藻類の培養状況を評価可能になると期待される。

ところで、ニオイセンサーによって微細藻類の培養状況を判別できるようになったとしても、そのメカニズムを解析することはできない。将来的な OSC 技術の発展に向け、微細藻類から発せられるにおい物質を同定し、

においの変化を科学的に解明することが求められる。一方で、におい物質の同定には多くの技術的な困難がつきまとう。まず、微細藻類のにおい物質を機器分析に供試した場合には多数の VOCs が検出されると予想されるが、それらの VOCs の中から目的のにおい物質を官能的に特定する“ヒトの嗅覚”が必須となる。加えて、ヒトの嗅覚は物質によって極めて高い感度を示すことから<sup>15)</sup>、ヒトが十分ににおいを感じる濃度であっても分析機器では検出できないことが多い。従って、微細藻類から発せられるにおい物質を大量に捕集・濃縮し、それらを分離・精製し、物質同定するための高感度な分析化学的技術が必要とされる。これらのニーズに対して、すでに本研究グループではにおい物質の同定に特化した“におい物質同定システム (Odor/Aroma Substances Identification System: OASIS)”を構築している。OASIS は、におい物質を“官能的”に検出 (感知) するヒトの嗅覚と、“分析化学的”ににおい物質を分離・検出する技術とを組み合わせた手法であり、“におい嗅ぎガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography-Olfactometry: GC-O)”を主要な技術としている。これまでも本研究グループでは OASIS を活用することで微細藻類スミレモのにおい物質を同定しており<sup>16)</sup>、他にもニンニク<sup>17)~19)</sup>、食品<sup>20)</sup>、ハウスダスト<sup>21)</sup>、工場からの流出油<sup>22)</sup>、河川や海洋の底泥<sup>23),24)</sup>、和牛の皮膚ガス<sup>25)</sup> など、多様なにおい物質を同定してきた。本研究ではこれら技術を駆使することで、微細藻類のにおい物質の同定を試みる。

本研究では OSC 技術の開発に向け、微細藻類の中からイカダモ (*Scenedesmus*) に着目した。イカダモは、近年、藻類バイオマス生産性の高さも注目される微細藻類である<sup>2),3)</sup>。イカダモは世界的に分布する植物プランクトンで、培養が比較的容易であり、またタンパク質を 40% 以上含有することから食品や家畜飼料としての利用が期待されている微細藻類である<sup>1)</sup>。加えてイカダモはドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの高付加価値脂肪酸を生産することが明らかとなり、サプリメントや医薬品としての利用も進められている<sup>2),3)</sup>。従ってイカダモは“国産の新しい農作物”として有望であり、本研究で手始めに取り組む素材として最適であると考え、優先的に着手した。

本研究ではイカダモ培養液を対象とし、嗅覚官能評価、それに関与するにおい物質の同定、QCM 型 e-nose ニオイセンサー分析に取り組み、OSC の実用化に向けた基礎的データの蓄積を目的とした。

## 2. 試料と方法

### 2.1 イカダモの培養法

本研究でもちいたイカダモは、2017 年 6 月 15 日に佐

賀県佐賀市高木瀬町の平尾四丁目池より単離し、クローン化した *Scenedesmus* sp. 培養株 (株名: dSgSce-b) である。本種の属名は廣瀬 (1977) に従って同定し<sup>26)</sup>、詳細は既報で報告済みである<sup>2),3)</sup>。培養は佐賀大学内佐賀市立さが藻類産業研究開発センターの培養室において行った。10Lのポリカーボネート製ボトルに8Lの培地 (ハイポネックス原液を1000倍希釈、株式会社ハイポネックスジャパン、大阪) を入れ、培養条件は、温度25°C、光量子束密度約100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、二酸化炭素を5%含んだ空気を150 mL/minで通気させた。スタート時に、同条件で250 mLのフラスコで培養したイカダモ培養液を添加した。スタート時に添加したイカダモ培養液は、国立環境研究所微生物系統保存施設推奨の無菌検査<sup>27)</sup>を行い、バクテリアの混入がないことを確認した。また培養状況の確認の際は、10Lボトルごとクリーンベンチに持ち込み、サンプリングを行った。対照区として培地のみのボトルをイカダモ試料と同様に処理をした。

上記条件で2020年11月、2021年7月、8月、2022年4月に、イカダモ培養区3試料と対照区1試料を1バッチとして4反復培養した。培養液のクロロフィル蛍光値を携帯型クロロフィル蛍光測定器 (AquaPen-C: Photon Systems Instruments, ドラウソフ, Czech Republic) で定期的に計測し、既報<sup>3)</sup>に基づき増殖についてモニターした。既報<sup>3)</sup>で、培養液中の微細藻類存在量とクロロフィル蛍光値の間に正の相関があることが確かめられているため、本研究では、クロロフィル蛍光値を増殖の指標とした。予備実験により3週目で細胞増殖が定常期に入ることが明らかとなっており、3週目の試料を各種分析に供試した。

## 2.2 パネル選定と嗅覚官能評価法

OASISは、におい物質を官能的に検出 (感知) するヒトの嗅覚と、分析化学的ににおい物質を分離・検出する技術とを組み合わせた一連のシステムである。嗅覚官能評価は、ヒトの嗅覚で捉えたにおいを言葉で表現し、その結果を数値化するための手法であり、OASISの出発点となる手法である。ヒトの嗅覚は個人差があることから嗅覚官能評価の嗅ぎ手 (パネル) の選定には十分な配慮が必要である。パネルの選定は環境省悪臭防止法<sup>28)</sup>に準拠し、5種基準臭 (パネル選定用基準臭、第一薬品産業) を嗅ぎわける嗅覚試験に合格した20代の女性4名、男性4名 (基礎疾患、および喫煙歴は無し) を採用した。なお嗅覚官能評価に際しては、嗅覚測定法安全管理マニュアル<sup>29)</sup>に準じて十分に安全を期した。また実験に使用する試料は一般生活環境に存在するものであること、実験中も途中退席が可能であること、個人データが特定できるような解析は行わないこと、をパネルに説

明し了解を得た後に、本研究グループの管理の下で実施した。

“におい強度” および “においの印象” は、100 mL のイカダモ培養液および対照区培養液を、300 mL 褐色共栓三角フラスコに分取し、10分の静置後にパネルが直接においを嗅いで評価した。におい強度は6段階におい強度表示法 (0: 無臭, 1: やっと感知できる, 2: 何かわかる, 3: 楽に感知できる, 4: 強い, 5: 強烈) で評価し、平均値を採用した。においの印象は自由回答とした。

## 2.3 におい物質の捕集法

におい物質を含む VOCs の捕集法は既報に従った<sup>16)</sup>。VOCs は MonoTrap (RGPS: ジーエルサイエンス, 東京) をもちいて捕集した。200 mL 共栓三角フラスコに50 mL のイカダモ培養液および対照区培養液を分取し、平衡化 (25°Cで1時間) させた後、フラスコのヘッドスペースに MonoTrap を投入して1時間捕集した。VOC を捕集した MonoTrap は、速やかに加熱脱着装置用の脱着管に移して真鍮キャップを取り付けた。試料は4°Cで保管し、3時間以内に機器分析に供試した。

## 2.4 GC-O 分析法およびクロスサーチ

GC-O 分析法は既報に従った<sup>16)</sup>。機器構成は、におい嗅ぎ装置 (スニッフィングポート, OP275: ジーエルサイエンス, 東京) を GC-FID (GC2010Plus: 島津製作所, 京都) に装備したものである (以後、本システムを GC-O/FID)。捕集済み MonoTrap は加熱脱着装置 (ポータブルサーマルディソーパー, HandyTD TD265: ジーエルサイエンス, 東京: ハンディ TD) をもちいて注入した。GC キャピラリカラムは、DB-5MS (長さ60 m, 内径0.32 mm, 膜厚0.5  $\mu\text{m}$ : Agilent J & W, CA, USA: DB5), および異なる液相をもつ InertCap Pure-WAX (長さ60 m, 内径0.32 mm, 膜厚0.5  $\mu\text{m}$ : ジーエルサイエンス, 東京: WAX) をもちいた。本研究では一つの試料を、DB-5MS をもちいた分析 (GC-O/FID (DB5)), および InertCap Pure-WAX カラムをもちいた分析 (GC-O/FID (WAX)) に供試した。GC-O/FID 分析前には、混合アルカン溶液 (C6~C20: ジーエルサイエンス, 東京) を測定することで保持指標 (Retention Index: RI) を算出した。

GC-O/FID 分析を実施するパネルは、事前トレーニングとして同一のイカダモの試料を複数回分析し、良好な再現性が得られた3名 (20代の女性パネル1名、男性パネル2名) を採用した。GC-O/FID 分析でパネルが感知した、においに関する3つの情報 (においを感知した RI, おいへの印象, おいへの強度) は、音声認識ソフ

トウェア (Olfactory Voicegram : ジーエルサイエンス, 東京) をもちいて記録した. それらの GC-O 分析で感知された情報は “におい活性 (Odor activity : OA) と表記した. イカダモ試料の GC-O/FID 分析の結果は, パネル3名が3回ずつ GC-O/FID 分析を実施し, 得られた全員の結果の中で 2/3 以上の割合で保持時間とにおいの印象が一致したものを OA として採用した. 採用された OA は, 続く物質同定の操作に供試した.

## 2.5 GC-MS 分析法

におい物質のマススペクトル取得に向け, ガスクロマトグラフィー質量分析計 (TQ8040 : 島津製作所, 京都 ; 以後, GC-MS) を利用した. GC キャピラリカラムは, GC-O/FID と同じ InertCap Pure-WAX を用い, 分析条件は既報に従った<sup>16)</sup>. MonoTrap に捕集した試料はハンディ TD で注入し, 検出には Electron Impact (EI) スキャンモード ( $m/z$  30-300) をもちいた. GC-O/FID と保持時間を比較するため, 分析前に混合アルカン溶液 (C6~C20) を測定して RI を算出した.

## 2.6 分取・濃縮法

本研究では目的としたにおい物質の高感度分析に向け, GC 分取システム (Gas Chromatography-Fractionation system : 以後, GC-F) を利用した分取・濃縮を実施した. GC-F の分析条件は既報に従った<sup>16)</sup>. GC-F の概要は, GC 用フラクションコレクター (GC 分取装置 : VPS-2800, ジーエルサイエンス, 東京) を GC-FID (GC2010Plus : 島津製作所, 京都) に装備し, 試料は加熱脱着装置 (TurboMatrix650 : Perkin Elmer, MA, USA) をもちいて注入するものである. GC-FID のカラムは, GC-O/FID と同じ DB-5MS をもちいた. 試料からにおい物質を捕集した 25~75 個の MonoTrap を加熱脱着装置で繰り返し注入し (5~15 回注入), 目的の OA を分取して MonoTrap (RGPS) に濃縮した. 分取・濃縮した画分を “分取画分 (Fr)” とした.

## 2.7 物質同定法

本研究ではにおい物質の同定に向け, におい物質に特化したデータベースとして AroChemBase (Alpha MOS, Toulouse, France) を利用した. AroChemBase は約 10 万種のにおい物質に対する “においの印象” と, 一つのおい物質を異なる分離相をもつカラムで計測した RI が登録されており, それらを統合して検索する “AroChemBase クロスサーチ” が可能である. 本研究では一つのイカダモ試料を GC-O/FID (DB5) および GC-O/FID (WAX) で分析していることから, それら分析で得られたにおいの印象と 2 つの RI を AroChemBase ク

ロスサーチに供試した. RI の差異が  $\pm 30$  以内の物質を候補としてリストアップした.

また本研究では AromaOffice (西川計測, 東京) をもちいた解析を試みた. AromaOffice は GC-MS 分析で得られたマスクロマトグラムを対象として, デコンボリューションの後にマススペクトルライブラリ検索 (ライブラリ検索 : NIST14) し, その検索結果の中から登録されているにおい物質の RI が一致したものを候補物質としてリストアップする “AromaOffice アロマサーチ” の利用が可能である. イカダモ試料の GC-MS スキャン分析で得られたマスクロマトグラムを AromaOffice アロマサーチに供試し, ライブラリ検索の一致率が 70% 以上, かつ RI の差異が  $\pm 30$  以内の物質を候補としてリストアップした. AroChemBase クロスサーチおよび AromaOffice アロマサーチを通じて絞り込まれたにおい物質については標準物質を購入し, 試料と同一の条件で分析に供試した. 標準物質を対象とした 2 種のカラム (DB5・WAX) をもちいた GC-O/FID 分析, および GC-MS (WAX) 分析で得られた結果 (両カラムの RI, マススペクトル, においの印象) が, 試料を対象とした分析結果と一致した場合に “同定” とした. いずれかの情報が欠けている場合は “仮同定” とした. 標準物質として, 1-ノナナール,  $\alpha$ -イオノン,  $\beta$ -イオノン (富士フィルム和光純薬, 東京) を購入した.

## 2.8 VOCs の網羅的分析

VOCs の網羅的分析には, 同様に試料のヘッドスペースから捕集した MonoTrap をもちいた. MonoTrap はハンディ TD をもちいて GC-MS (WAX) に注入し, スキャン (EI) で分析した. 分析条件は上述した通りである. 得られたマスクロマトグラムを AromaOffice アロマサーチで解析し, ライブラリ検索の一致率が 70% 以上, かつ RI の差異が  $\pm 30$  以内の物質を仮同定としてリストアップした. また同じ試料を GC-O/FID (WAX) 分析にも供試し, 得られたにおいの印象の RI と, AromaOffice アロマサーチで仮同定された物質の RI が一致したものを統合し, 一覧としてリストアップした.

## 2.9 E-nose ニオイセンサーの分析法

本研究では, QCM 型 e-nose ニオイセンサー (アロマコーダー V2 : アロマビット, 東京) とサンプル調整器 (アロマサンプラー : アロマビット, 東京) をもちいた (本システムを以後, アロマコーダーとする). 分析は空調 (室温約 25°C, 湿度約 50%) のある実験室で, 複数パネルが臭気を感じないことを確認したうえで実施した. 手順として, 20 mL の培養液を 100 mL バイアルに

分取し、2分間の平衡化の後に、ヘッドスペース部をアロマサンプラーでセンサーユニットへ送気した。センサーユニット内には35種のQCM型検出素子が内蔵されており、素子の振動数の変化を10秒間に渡り10ポイント/秒で記録した。得られたデータは、クラウド上の自動解析アプリケーション（Aromalyzer, アロマビット, 東京）<sup>30)</sup>をもちいて解析した。解析には分析時間における最大感度値（最大差分）を採用し、Aromalyzer内で利用できる主成分分析をもちいてグルーピングした。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 イカダモの培養状態

イカダモの顕微鏡写真を図-1に示した。顕微鏡観察の結果、4回の培養においていずれの培養時もイカダモ以外の微細藻類の混入は認められなかった。微細藻類のクロロフィル蛍光値において、予備実験と同様の経過をたどり、1週目には対数増殖期と推定される大幅な増加を示し、3週目では増殖幅が小さくなり定常期に入ったと判断できたことから、3週目の試料を各種分析に供試した。

#### 3.2 嗅覚官能評価

本研究では最もにおいが強いと予想された定常期（3週目）の培養液を嗅覚官能評価に供試した。イカダモの培養液を対象として“におい強度”を評価したところ、“何かわかる程度の強さ”である2.1（範囲：1~3）であった（対照区培養液は0.6：ほぼ無臭）。イカダモ培養液のにおいの印象は、もっとも高頻度（約60%）であったのが“お茶・草刈り”であった（図-2）。続いて、“甘い・甘酸っぱい”が約50%，“生臭い・消毒”が約20%，“その他”が約10%であった。これまでも特定の



図-1 イカダモ (*Scenedesmus* sp.) の顕微鏡写真

微細藻類が悪臭物質（ボルネオールやジェオスミン）を発することにより水道水の異臭問題が引き起こされていることは知られているが<sup>6)~8)</sup>、イカダモに特徴的なにおいがあることを示したのは本報告が初である。結果として、イカダモの発する特徴的なにおいの印象は“お茶、草刈り、甘い、甘酸っぱい、生臭い”というものであり、続くGC-O分析ではこれらにおいをターゲットとして分析を進めることとした。

#### 3.3 におい物質の同定

上述した嗅覚官能評価によって、イカダモの特徴的なにおいは“お茶、草刈り、甘い、生臭い”という印象であることが示されたことから、特徴的なにおい物質を同定するための化学分析に取り組んだ。

第1ステップとして、イカダモ培養液（3週目）のヘッドスペースにMonoTrapを投入してVOCsを捕集し、GC-O/FID（DB5）分析に供試した。イカダモ培養液のアログラムを図-3aに示した。GC-O/FID（DB5）分析では12か所からOAが感知され（対照区培養液で感知されたOAは除外済み）、とくに5か所から再現性の高いOAが感知された。それら5か所のOA（OA-1, -2, -3, -4, -5）におけるにおいの印象は、それぞれ甘い、草・生臭い、草・生臭い、甘い、甘い、というものであり、上述した嗅覚試験で得られたにおいの印象である“お茶、草刈り、甘い、生臭い”とおおよそで一致した。本研究ではこれら5つのOAをイカダモの特徴的なOAにとらえ、物質同定の対象とした。

イカダモのGC-O/FID（DB5）分析によって特徴的なOAが5か所で得られたことから（図-3a）、これらOAの物質同定に着手した。物質同定には2つ以上の異

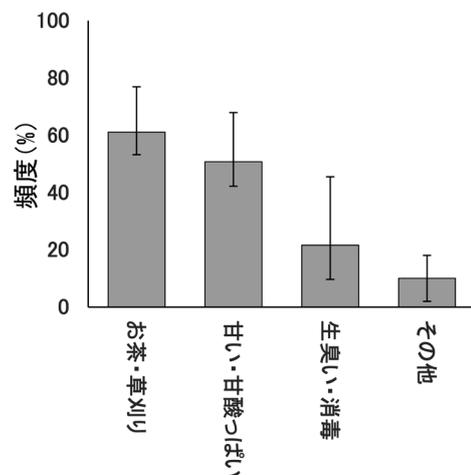


図-2 イカダモ培養液（3週目）における“においの印象”

頻度 (%) は、全パネル人数に対する、その印象を記述したパネル人数の割合。範囲は反復試験（3試料4反復）の標準偏差。

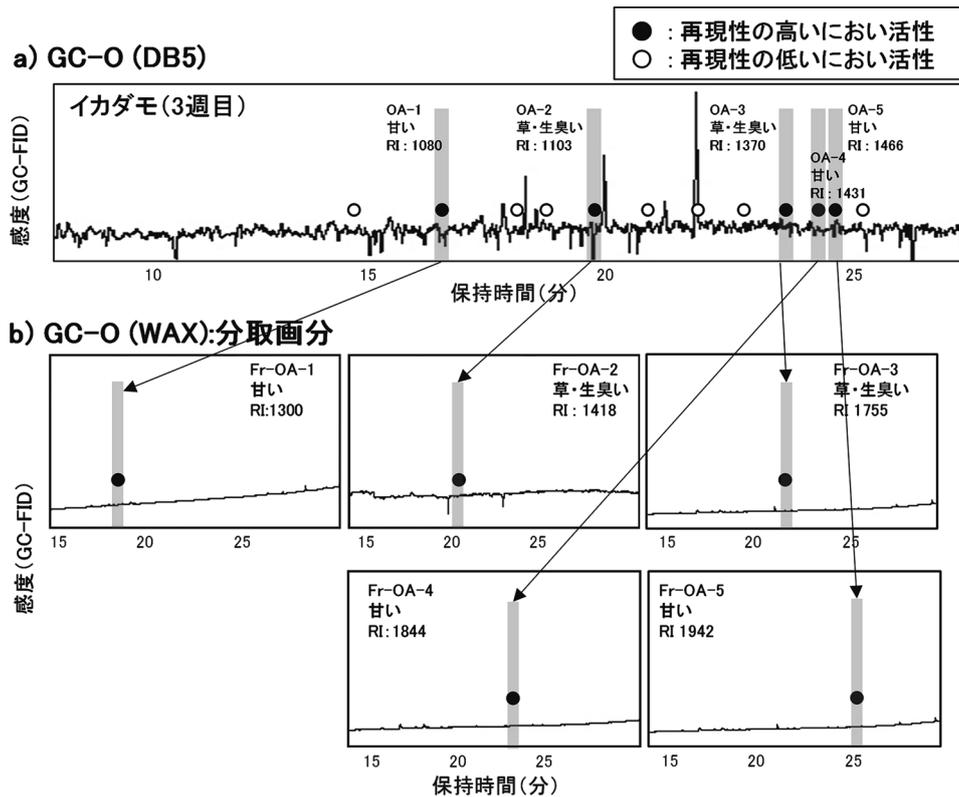


図-3 イカダモ培養液のヘッドスペースから捕集した VOCs の GC-O/FID 分析によるアロマグラム

a) GC-O/FID (DB5) のアロマグラム, b) GC-O/FID (DB5) のにおい活性 (OA) を GC-F で分取し, 分取画分 (Fr) を GC-O/FID (WAX) で分析したアロマグラム. 対照区培養液で検出されたにおい活性は減算済み.

なる分離相をもつカラムで得られた RI が標準物質と一致すること<sup>31)</sup>が要件とされており, 本研究では GC-O/FID (DB5) に加えて GC-O/FID (WAX) 分析に供試した. しかし MonoTrap で捕集した試料を混合物のまま GC-O/FID (WAX) 分析に供試した場合, 保持時間の変化した目的とする OA と, 保持時間の変化した目的以外の OA が複雑に重なりあうことで, 判別が困難になることが多い.

そこで物質同定の第2ステップとして, 目的とする OA を GC-F をもちいて分取・濃縮し, 得られた単離画分である Fr-OA-1~5 を GC-O/FID (WAX) 分析に供試した. GC-O/FID (WAX) 分析の結果, Fr-OA-1, -2, -3, -4, -5 からそれぞれ1ずつの OA が感知され, それらのおい印象はそれぞれ甘い, 草・生臭い, 草・生臭い, 甘い, 甘い, という印象であった (図-3b). それらのおい印象は, GC-F で単離する前の GC-O/FID (DB5) で感知されたものとおおよそ一致していたことから, 適切に単離されていると判断した.

GC-O/FID (DB5 および WAX) 分析によって得られた2つの RI とにおい印象のデータを AroChemBase クロスサーチの検索に供試したところ, 5か所の OA それぞれに複数の候補物質があげられた. RI によるこれ

以上の物質の絞り込みは困難であると判断した.

そこで第3ステップとして, OA のマススペクトル取得に着手した. ヒトの嗅覚は物質によって極めて高い感度を示すため<sup>15)</sup>, GC-O/FID 分析で嗅覚感知された OA をそのままの濃度で GC-MS 分析に供試しても, 明瞭なマススペクトルを得ることはほぼ不可能である. そこで GC-F をもちいて OA を再び分取・濃縮し, 単離画分を GC-MS (WAX) 分析 (EI モード) に供試した. GC-MS (WAX) 分析で得られたマススペクトルを AromaOffice アロマサーチに供試し, GC-O/FID (WAX) 分析で得られた RI と同等の保持時間に見られるピークを検索した. AromaOffice アロマサーチおよび AroChemBase クロスサーチで得られた結果を統合し, 2つ以上の異なる分離相をもつカラムで得られた RI が一致し, かつマススペクトルが一致する物質を検索したところ, Fr-OA-2, -3, -4, -5 において候補物質を絞り込むことができた. 一方で, Fr-OA-1 は物質を絞り込むことができず, 本分析においては保留とした.

第4ステップとして, 上述の手順によって絞り込まれた候補物質の標準物質を購入し, イカダモ試料と同様の条件で GC-O/FID (DB5 および WAX) 分析, および GC-MS (WAX) 分析に供試した.

第5ステップとして、これら結果を総合的に評価し、同定状況を判定した(図-4)。判定の結果、Fr-OA-2、-3、-4、-5はそれぞれ、1-ノナナル、2-ウンデセナル、 $\alpha$ -イオン、 $\beta$ -イオンと同定された。2-ウンデセナルは標準物質が入手不可であったため、Arochem Base クロスサーチおよび AromaOffice アロマサーチのみでの確認となったため仮同定となった。標準物質が得られた1-ノナナル、 $\alpha$ -イオン、 $\beta$ -イオンを等量混合して10名のパネルによって嗅覚官能評価に供試したところ、全パネルからイカダモのにおいに近い印象であるとの回答が得られ、これら3物質は妥当であると判断された。

同定された1-ノナナル、 $\alpha$ -イオン、 $\beta$ -イオンは、これまで藻類から発する一般的なVOCsとして報告されており<sup>9),10),16),32)</sup>、同様の物質がイカダモから検出された例も報告されている<sup>33)</sup>。一方で、2-ウンデセナルが微細藻類から検出されたという例はみられない。その要因として、これまでの微細藻類から発せられるVOCsの報告は、ほとんどがGC-MS分析のみで同定してきたことがあげられる。GC-MSのみをもちいて物質同定をした場合、嗅覚閾値が低い(ヒトの嗅覚で感度が高い)物質は、嗅覚官能評価で感知されていても、濃度が低い場合はGC-MSでは検出できないことが多い。一方、本研究における手法(OASIS)を活用した場合、まずGC-O分析で嗅覚閾値が低い物質を感知し、その後該当のOAをGC-Fで分取・濃縮し、そのうえでGC-MS分析でマススペクトルを得る。従って、物質濃度は微量であっても、嗅覚官能評価結果への寄与率が高

い物質を効果的に同定することが可能である。

一方で、OASISでは特徴的なにおいをもつ物質に着目して物質同定を進めているため、嗅覚閾値が高い(GC-Oでパネルが感知できなかった)物質は、たとえ高濃度であっても同定できない。イカダモが放出しているVOCsを幅広く検出するため、網羅的分析を試みる必要がある。

### 3.4 VOCsの網羅的分析

上述したOASISによる物質同定では、特徴的なにおいをもつ物質に着目して物質同定を進めている。従って嗅覚閾値が高い(GC-Oでパネルが感知できなかった)物質は、たとえ高濃度であっても同定できない。そこでイカダモが放出しているVOCsを幅広く検出するため、本研究では網羅的分析手法を試みた。

イカダモ培養液(3週目)のヘッドスペースにMono Trapを投入してVOCsを捕集し、GC-MS(WAX)をもちいたスキャン(EI)分析に供試した。得られたマスクロマトグラムをAromaOfficeアロマサーチに供試したところ、11物質が仮同定された(表-1)。本分析手法ではAromaOfficeアロマサーチ(WAXカラムのRIとNISTライブラリサーチ)のみで解析しているため、仮同定となっている。検出された物質はアルデヒド類(7物質)の他、エステル類、アルコール類、有機酸類、ピロール類(各1物質)であった。アルデヒド類を主とするこれら物質は、既報で報告されている微細藻類から検出されているVOCsとおよそ一致していた<sup>9),10),16),32)</sup>。

本分析で得られたGC-MS(WAX)の分析結果に、同

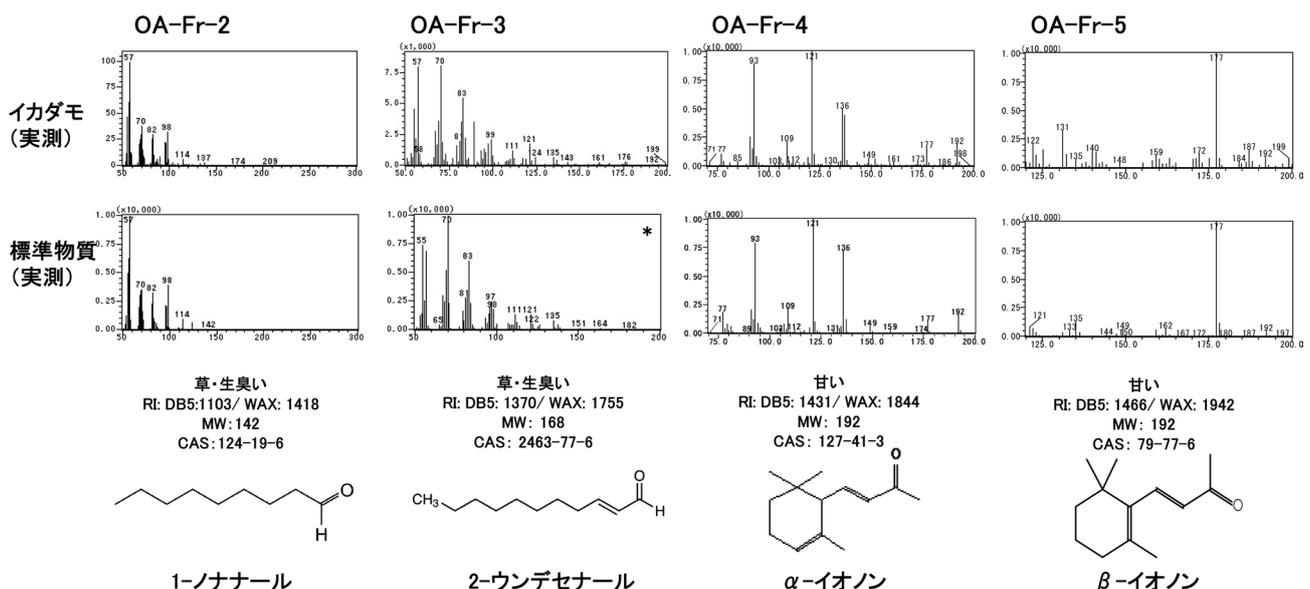


図-4 イカダモのGC-O分析で感知されたにおい活性(OA)に対応するマススペクトルと同定された物質の一覧

OA番号は図-4に対応。RI: GC-Oの実測保持指標; MW: 分子量; CAS: CAS登録番号。\*標準物質が入手不可のためマススペクトルはNISTより引用。

表-1 イカダモ培養液（3週目）のヘッドスペースから捕集した VOCs を対象とした GC-MS (WAX) スキャン (EI) 分析によって仮同定された揮発性物質の一覧

物質名	GC-MS (WAX) 実測		GC-O (WAX) 実測	RI (WAX) データベース	仮同定法 <sup>a</sup>
	RI	RI	においの印象		
1-ペンテン-3-オール	1064			1108	RI (WAX), NIST
ヘキサナール	1089				RI (WAX), NIST, STD
ヘプタナール	1090			1126	RI (WAX), NIST, STD
ヘキサン酸メチルエステル	1173			1185	RI (WAX), NIST
1-オクタナール	1251			1288	RI (WAX), NIST, STD
1-ノナナール	1401	1400	草・生臭い	1392	RI (WAX), RI (DB5), NIST, STD, におい <sup>b</sup>
酢酸	1444	1440	酸っぱい	1450	RI (WAX), NIST, STD, におい
1-デカナール	1505			1500	RI (WAX), NIST, STD
ベンズアルデヒド	1536			1521	RI (WAX), NIST
3-メチル-1-ピロール	1571				RI (WAX), NIST
2-ウンデセナール	1611	1600	草・生臭い	1608	RI (WAX), RI (DB5), NIST, におい <sup>b</sup>

a: RI: 保持指標が実測とデータベースで一致 (RI:  $\pm 30$ ), NIST: マススペクトルライブラリで一致率 $>70\%$ , STD: 標準物質で確認済み, におい: GC-O 分析でにおいの印象がデータベース/標準物質と一致

b: 図-4 において, におい物質として同定/仮同定済み

一試料の GC-O/FID (WAX) 分析で得られたにおいの印象を統合した。その結果, 1-ノナナール, 酢酸, 2-ウンデセナールの RI と重なり, それらにおいの印象もデータベースと一致した (表-1)。また 1-ノナナールと 2-ウンデセナールは上述した同定および仮同定した物質と一致しており, 分析の妥当性が確認された。一方で, 酢酸は GC-O/FID (WAX) の OA と一致がみられているが, GC-O/FID (DB5) 分析では感知されなかった。その要因として, DB5 は微極性カラムであることから強極性物質である酢酸は分離が悪く, GC-O 分析時に感度が極端に低下したものと考えられる。イカダモ培養液の嗅覚官能評価で得られた“甘酸っぱい”という印象には酢酸が寄与していると推察され, その特徴的なにおいは OSC の実用化に向け重要な物質であると考えられる。今後のイカダモにおい物質同定の際は, 酢酸を含む強極性物質をターゲットとした手法として, GC-O/FID (WAX) 分析を第1ステップに採用することを検討している。

ところで, GC-MS 網羅的分析によって検出された VOCs の中で, アルデヒド類, エステル類, アルコール類, ピロール類は GC-O/FID (WAX) の OA と一致しなかった (表-1)。これらは嗅覚閾値が高い (ヒトの嗅覚では感知しにくい) 物質であり, イカダモの特徴的なにおいへの寄与率は低いと考えられるが, アロマコー

ダー QCM 型検出素子には感度を示す可能性がある。将来的なニオイセンサーを活用した OSC の実用化に向け, 同定されたにおい物質だけではなく, 仮同定された VOCs を含めた両物質を対象としていくことが望まれる。イカダモ培養の開始時から完了時までを時系列的に追跡することで, これら物質濃度と培養状態の関係性を明確化していく必要があると考えられる。

### 3.5 E-nose ニオイセンサー分析

イカダモ培養液は特徴的なにおいを持ち, またその他の VOCs を多数放出していることが明らかになったため, QCM 型 e-nose ニオイセンサー (アロマコーダー) 分析によってそのにおいを判別できると期待される。分析にはイカダモ培養液 (3 試料) と対照区培養液をもちい, 各試料を 3 回繰り返し測定に供試した。

アロマコーダー分析で得られた水晶振動子振動数変化値のリアルタイムモニタリングデータをプロットして波形を確認したところ, その挙動は安定しており, 大きなノイズなどは確認されなかった (図-5)。また水晶振動子振動数変化値は 35 種の各 QCM 型検出素子の間で大きく異なり, 物質に対する感度は素子ごとに大きく異なることが示された。またそれぞれの QCM 型検出素子の変化値に着目し, 対照区培養液とイカダモ培養液の間で最大差分値を比較すると, 若干の差が認められた。し

かしデータ量が多いことから目視での判別は困難であったため、全ての QCM 型検出素子 (35 種) で得られた 10 秒間の時系列データを全て Aromalyzer に入力し、最大差分を自動抽出するとともに、その結果を主成分分析で解析した。

主成分分析の結果、イカダモ培養液のプロットにはバラつきがみられたため (図-6a), 繰り返し再現性を確認した。同一試料の繰り返し分析の変動を検証したところ  $5.0 \pm 2.7\%$  であり、また 3 試料間 (3 連培養ボトル間) の変動は  $5.8 \pm 1.6\%$  であった。したがって装置の再現性、および培養ボトル間の安定性は確保されていると判断し、解析を継続した。

次に主成分分析による試料間のデータ分布の違いを検証したところ、主成分 1 と 2 の寄与率がそれぞれ 0.88, 0.067 を示し、イカダモ培養液と対照区培養液は、ほぼ主成分 1 で区別できることが明らかとなった (図-6a)。そこで主成分 1 における負荷量の大きい QCM 型検出素子を確認したところ、素子番号 # 30, # 28,

# 12, # 6, # 1 が、それぞれ 0.92, 0.21, -0.19, -0.17, -0.13 を示し、上位 5 つの QCM 型検出素子ではほぼ説明できることが明らかとなった。これら素子は高極性物質に対して高い感度をもつことが示されており (メーカー内部資料)、今後の指標物質の同定に向けた手掛かりになりうると期待される。

これら 5 つの QCM 型検出素子でイカダモ培養液と対照区培養液が判別できたことから、これらのみをもちいて再解析を試みた。その結果、5 種の QCM 型検出素子の測定データをもちいた結果 (図-6b) は、35 種の QCM 型検出素子の測定データをもちいた結果 (図-6a) とほぼ類似のパターンを示し、イカダモ培養液と対照区培養液は主成分 1 (0.72) で区別できることが明らかとなった。OSC 技術の普及には小型で安価なニオイセンサーが求められるため、廉価版アロマコーダーの

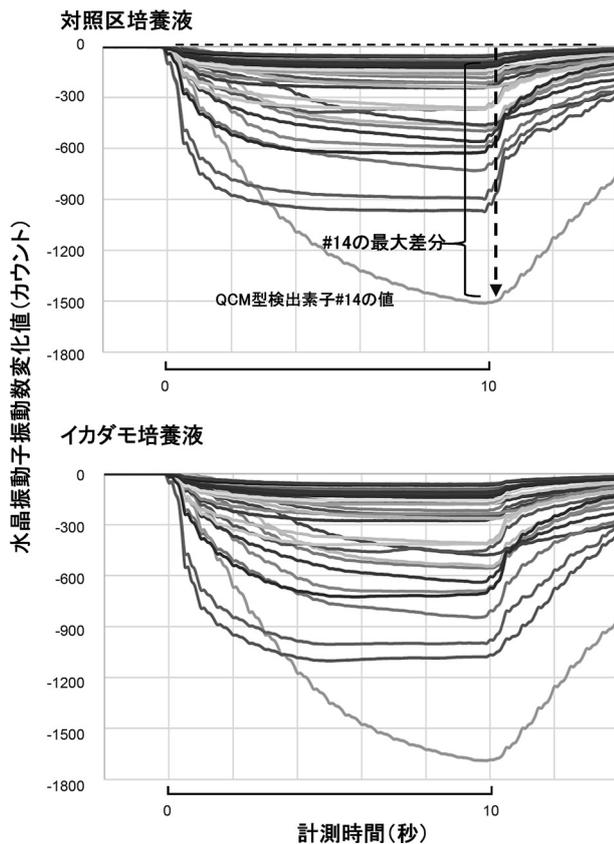


図-5 イカダモ培養液 (3 週目) のヘッドスペースを対象とした QCM 型 e-nose ニオイセンサー (アロマコーダー) 分析で得られた水晶振動子振動数変化値のリアルタイムデータプロットと最大差分値の求め方

対照区 (3 週目) は培地のみのボトルをイカダモ試料と同様に処理したもの。

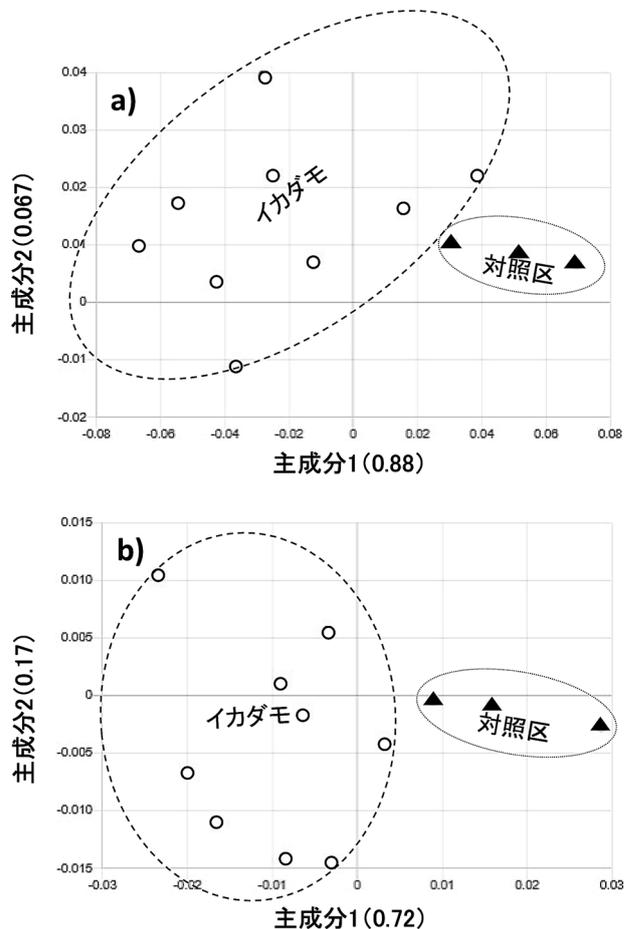


図-6 イカダモ培養液 (3 週目) のヘッドスペースを対象とした QCM 型 e-nose ニオイセンサー (アロマコーダー) 分析による分析結果

a) 全 35 種の QCM 型検出素子から得られた計測値の最大差分を主成分分析で解析した結果、b) 主成分 1 で寄与率の高い 5 種の QCM 型検出素子 (# 1, # 6, # 12, # 28, # 30) のみで再解析した結果。対照区 (3 週目) は培地のみのボトルをイカダモ試料と同様に処理したもの。

作製が課題となる。今回の結果から、寄与率の大きい5種の QCM 型検出素子だけを搭載した廉価版センサーの試作に向けた有力な情報になると期待される。

上述したとおり、嗅覚官能評価によるイカダモ培養液のにおい強度は2.1（何かわかる程度の強さ）であった。従って、当初はアロマコーダー分析での判別は困難であると予想されていたが、実測結果ではイカダモ培養液と対照区培養液を区別可能であった。その要因として、ひとつ目は上述した5種の QCM 型検出素子の検出感度が高く、ヒトの嗅覚で感知しているにおい物質を検出できた可能性があげられる。ふたつ目は、イカダモは嗅覚閾値の高い（ヒトの嗅覚では感知しにくい）物質も同時に発生していることから、それら物質を QCM 型検出素子が感知していることも推察される。現状においては判断できないため、アロマコーダー分析とともに、嗅覚官能評価および化学分析の結果を統合しつつ解釈する必要がある。

#### 4. まとめ

微細藻類は多様な用途で産業的に利用されつつある。本研究グループでは微細藻類を“新しい工業素材”・“新しい農作物”として位置づけている。一方で、微細藻類の培養を広く普及させていくためには、増殖状態や収穫時期などを簡易かつ客観的に判断できる技術が求められる。そのような中、新しい農作物として期待されている微細藻類イカダモ (*Scenedesmus* sp. 培養株) を対象として、本種が発するにおいを利用した培養技術“においセンシング培養 (Odor Sensing Cultivation : OSC)”の開発に取り組んでいる。本研究ではイカダモ培養液を対象とし、嗅覚官能評価、それに関与するにおい物質の同定、e-nose ニオイセンサーによる培養状態の判別に取り組み、将来的な OSC 技術の現場への応用を見据えた基礎的データの蓄積を目的とした。

イカダモ培養液 (3週目) の嗅覚官能評価の結果、におい強度は2.1（何かわかる程度の強さ）であり、においの印象は“お茶、草刈り、甘い、甘酸っぱい、生臭い”というものであった。特徴的なにおいの印象であった“お茶、草刈り、甘い、甘酸っぱい、生臭い”を対象として物質同定を試みたところ、1-ノナナール、 $\alpha$ -イオノン、 $\beta$ -イオノンが同定され、また2-ウンデセナールおよび酢酸が仮同定された。さらに QCM 型 e-nose ニオイセンサー (アロマコーダー) 分析に供試したところ、イカダモ培養液と対照区培養液を判別できることが明らかとなった。

本研究ではニオイセンサーの基礎的検討として、イカダモ培養液と対照区培養液を判別するに留まったが、将来的には培養状況 (増殖の程度だけでなく、細胞の生育

状況や健康状態など) を総合的かつ簡易的に把握する技術が求められる。今後の取り組みとして、イカダモの培養開始時から収穫時までを時系列的に追跡すること、培養状態の変遷を嗅覚官能評価、化学分析、e-nose ニオイセンサー分析の両面から解析していくことが求められる。加えて微細藻類の大量培養現場では、バクテリアや他種微細藻類の混入増殖 (現場では「コンタミ」と呼ばれる) が問題になっている。それらコンタミトラブルを早期発見する技術の確立に向け、イカダモ培養液にバクテリアや他の微細藻類を添加したコンタミ区における“においの変化”も明らかにする必要がある。

これら基礎検討を通じて OSC 技術を確立することができれば、バイオマス生産工程の効率化による人的・設備的コストの抑制が可能となり、国産の新しい工業素材・農作物としての普及を推進する技術になりうると期待される。

#### 謝辞

本研究は科研費 (挑戦的萌芽研究 : 21K19171) の助成によって実施された。イカダモの培養に関して佐賀市の関係者に便宜をはかっていただいた。

**キーワード** : 微細藻類, イカダモ (*Scenedesmus* sp.), 揮発性有機化合物 (VOCs), におい嗅ぎガスクロマトグラフィー (GC-O), QCM 型 e-nose ニオイセンサー

#### 参考文献

- 1) Amorim, M. L., Soares, J., Vieira, B. B., Leite, M. d. O., Rocha, D. N., Aleixo, P. E., Falconi, J. H. H., Xavier Júnior, M. d. L., Albino, L. F. T., Martins, M. A. : Pilot-scale biorefining of *Scenedesmus obliquus* for the production of lipids and proteins, *Sep. Purif. Technol.*, **270**, 118775, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118775>.
- 2) Demura, M., Noma, S., Hayashi, N. : Species and fatty acid diversity of *Desmodesmus* (Chlorophyta) in a local Japanese area and identification of new docosahexaenoic acid-producing species, *Biomass*, **1**, 105-118, 2021. <https://doi.org/10.3390/biomass1020008>.
- 3) 出村幹英, 西島万宥子, 山根百萌, 野間誠司, 林 信行 : 佐賀県佐賀市における自然発生微細藻類集団の長期培養と脂肪酸組成, *日本微生物資源学会誌*, **38**, 1-16, 2022.
- 4) Daneshvar, E., Sik Ok, Y., Tavakoli, S., Sarkar, B., Shaheen, S. M., Hong, H., Luo, Y., Rinklebe, J., Song, H., Bhatnagar, A. : Insights into upstream processing of microalgae: A review, *Bioresour. Technol.*, **329**, 124870, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>.
- 5) Liyanaarachchi, V. C., Premaratne, M., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., Malik, A. : Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and

- biofuels: A review, *Algal Res.*, **57**, 102353, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102353>.
- 6) 土屋 悦, 首藤 紘, 岡本 敏: 藍藻 *Oscillatoria* sp. および河川水中の臭気物質. 2-methylisoborneol, geosmin, *p*-cresol, indole および 3-methylindole の確認, 衛生化学, **25**, 216-220, 1979. <https://10.1248/jhs1956.25.216>.
- 7) 秋葉道宏: 水源における水道水の臭気発生源とその対策, におい・かおり環境学会誌, **39**, 102-107, 2008. <https://10.2171/jao.39.102>.
- 8) Zuo, Z.: Why algae release volatile organic compounds—the emission and roles, *Front. Microbiol.*, **10**, 2019. <https://10.3389/fmicb.2019.00491>.
- 9) Reese, K. L., Fisher, C. L., Lane, P. D., Jaryenneh, J. D., Moorman, M. W., Jones, A. D., Frank, M., Lane, T. W.: Chemical profiling of volatile organic compounds in the headspace of algal cultures as early biomarkers of algal pond crashes, *Sci. Rep.*, **9**, 13866, 2019. <https://10.1038/s41598-019-50125-z>.
- 10) Sartori, R. B., Siqueira, S. F., Maroneze, M. M., Fagundes, M. B., Wagner, R., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E.: Microalgal secondary metabolites: effect of climatic variables, seasons, and photocycles on the biogenesis of volatile organic compounds (VOCs), *J. Appl. Phycol.*, **33**, 1457-1472, 2021. <https://10.1007/s10811-021-02391-6>.
- 11) Arshak, K., Moore, E., Lyons, G. M., Harris, J., Clifford, S.: A review of gas sensors employed in electronic nose applications, *Sens. Rev.*, **24**, 181-198, 2004. [10.1108/02602280410525977](https://doi.org/10.1108/02602280410525977).
- 12) アロマビット: ニオイ識別センサーとは, 2022年7月アクセス. <http://www.aromabit.com/service01/>.
- 13) Gardner, J. W., Bartlett, P. N.: A brief history of electronic noses, *Sens. Actuators B Chem.*, **18**, 210-211, 1994. [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(94\)87085-3](https://doi.org/10.1016/0925-4005(94)87085-3).
- 14) 増田知美, 高橋 恵, 寺田絵里加, 橋詰賢一: ニオイセンサーによるニオイの可視化と人による官能試験との相関性, Workshop on Interactive Systems and Software 講演要旨集, 2022年6月アクセス, 2017. <https://www.wiss.org/WISS2017Proceedings/demo/1-A04.pdf>.
- 15) Leonardos, G., Kendall, D., Barnard, N.: Odor threshold determinations of 53 odorant chemicals, *J. Air Pollut. Control Assoc.*, **19**, 91-95, 1969. <https://doi.org/10.1080/00022470.1969.10466465>.
- 16) 小山玲音, 出村幹英, 野間誠司, 林 信行, 原口智和, 宮本英揮, 笹川智史, 龍田典子, 上野大介: スミレモ *Trentepohlia aurea* (Linnaeus) Martius のにおい嗅ぎガスクロマトグラフィーによるにおい物質の同定, におい・かおり環境学会誌, **52**, 226-232, 2021. <https://doi.org/10.2171/jao.52.226>.
- 17) Matsumoto, M., Ueno, D., Aoyama, R., Sato, K., Koga, Y., Higuchi, T., Matsumoto, H., Nishimuta, K., Haraguchi, S., Miyamoto, H., Haraguchi, T., Yoshiga, T.: Novel analytical approach to find distinctive odor compounds from garlic cloves infested by the potato-rot nematode *Ditylenchus destructor* using gas chromatography-olfactometry (GC-O) with heart-cut enrichment system, *J. Plant Dis. Protect.*, **127**, 537-544, 2020. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00349-3>.
- 18) Koga, Y., Yoshiga, T., Shindo, J.-i., Aoyama, R., Nishimuta, K., Koyama, R., Miyamoto, H., Haraguchi, T., Ryuda, N., Ueno, D.: Identification of specific odour compounds from garlic cloves infected with the potato tuber nematode, *ditylenchus destructor*, using gas chromatography-olfactometry, *Nematol.*, **24**, 55-63, 2021. <https://doi.org/10.1163/15685411-bja10111>.
- 19) 古賀夕貴, 吉賀豊司, 新藤潤一, 青山理絵, 松本英顕, 龍田典子, 原口智和, 宮本英揮, 上野大介: におい嗅ぎ GC を用いるイモグサレセンチュウ感染ニンニクから特徴的に発生するにおい物質の同定, 分析化学, **70**, 427-434, 2021. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.70.427>.
- 20) 松尾美咲, 松元美里, 太田耕平, 佐藤克久, 上村智子, 古藤田信博, 染谷 孝, 上野大介: 海産養殖魚における異臭物質の環境分析化学的アプローチ (におい嗅ぎ GC) による推定, 環境化学, **28**, 51-55, 2018. <https://doi.org/10.5985/jec.28.51>.
- 21) 松元美里, 古賀夕貴, 樋口汰樹, 松本英顕, 西牟田昂, 龍田典子, 上野大介: におい嗅ぎガスクロマトグラフィーを用いたハウスダスト中マイクロバクテリアの検出, におい・かおり環境学会誌, **51**, 319-322, 2020. <https://doi.org/10.2171/jao.51.319>.
- 22) 古賀夕貴, 井手海渡, 松元美里, 樋口汰樹, 市場正義, 上野大介: におい嗅ぎ GC (GC-O) を用いた冠水被害時における油臭の発生源解明, 環境化学, **30**, 29-35, 2020. <https://10.5985/jec.30.29>.
- 23) 松元美里, 上野大介, 阿南光政, 佐藤克久, 長祐 幸: におい嗅ぎ GC (GC-O) を用いた農業用排水路における臭気物質分析の技術的提案, におい・かおり環境学会誌, **51**, 346-352, 2020. <https://doi.org/10.2171/jao.51.346>.
- 24) 松元美里, 野牧秀隆, 川口慎介, 古賀夕貴, 樋口汰樹, 松本英顕, 西牟田昂, 龍田典子, 上野大介: におい嗅ぎ GC (GC-O) を用いた相模湾および小笠原海溝の深海堆積物コアを対象とした人為起源におい物質の検出, 環境化学, **30**, 94-99, 2020. <https://doi.org/10.5985/jec.30.94>.
- 25) 松本英顕, 江原史雄, 小山玲音, 笹川智史, 原口智和, 宮本英揮, 龍田典子, 上野大介: におい嗅ぎガスクロマトグラフを用いた和牛の皮膚ガス分析技術の基礎的検討, におい・かおり環境学会誌, **52**, 233-239, 2021. <https://doi.org/10.2171/jao.52.233>.
- 26) 廣瀬弘幸: 1977, セネデスムス科, “日本淡水藻図鑑”, p364-383, 内田老鶴圃.
- 27) 環境省: 国立環境研究所, 微生物系統保存施設, 無菌検査, 2022年7月アクセス. <https://mcc.nies.go.jp/02introduction.html#section07-1>.
- 28) 環境省: 三点比較式フラスコ法について, [https://www.env.go.jp/air/akushu/olf\\_manual.html](https://www.env.go.jp/air/akushu/olf_manual.html), 2017.
- 29) 環境省: 嗅覚測定法安全管理マニュアル, <https://www.env.go.jp/air/akushu/safety/index.html>, 2002.
- 30) アロマビット: Aromalyzer (アロマライザー): ニオイデータベース構築・解析ソフトウェア, 2022年7月アクセス. <http://www.aromabit.com/20211101aromalyzerjp/>.
- 31) Molyneux, R. J., Schieberle, P.: Compound identifica-

- tion : a Journal of agricultural and food chemistry perspective, *J. Agr. Food Chem.*, **55**, 4625-4629, 2007. <https://doi.org/10.1021/jf070242j>.
- 32) 田村啓敏, 中本英喜, 楊 栄華, 杉沢 博: 緑藻アナアオサ (*Ulva pertusa*) 揮発性成分の官能特性の検討, 日本食品科学工学会誌, **42**, 887-891, 1995. <https://10.3136/nskkk.42.887>.
- 33) Moran, L., Bou, G., Aldai, N., Ciardi, M., Morillas-España, A., Sánchez-Zurano, A., Barron, L. J. R., Lafarga, T. : Characterisation of the volatile profile of microalgae and cyanobacteria using solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry, *Sci. Rep.*, **12**, 3661, 2022. <https://10.1038/s41598-022-07677-4>.

## Sensory evaluation, chemical identification, and QCM-type e-nose analysis of odor compounds from a microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) for development of odor sensing culture method

Reon KOYAMA<sup>1</sup>, Mikihide DEMURA<sup>1\*</sup>, Ken-Ichi HASHIZUME<sup>2</sup>, Ayumi SEKINE<sup>2</sup>, Katsuhisa SATO<sup>3</sup>, Tomoko KAMIMURA<sup>3</sup>, Satoshi SASAGAWA<sup>1</sup>, Daisuke UENO<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Agriculture, Saga University, Honjo-cho 1, Saga, 840-8502, Japan

<sup>2</sup>Aromabit Inc., Sagami building 2F, Chuo-ku Ginza 7-13-6, Tokyo, 104-0061, Japan

<sup>3</sup>Nishikawakeisoku Co.,LTD, Quint building 5F, 3-22-7 Yoyogi Shinjuku-ku Tokyo, 151-8620, Japan

<sup>4</sup>The United Graduate School of Agriculture, Kagoshima University, Korimoto 1-21-24, Kagoshima 890-0065, Japan

**Abstract** Although several microalgae species have been used for industrial purposes, it is generally difficult to visually observe their growth conditions during cultivation. Our group has attempted to develop a way to control algae cultivation, using a method we refer to as “Odor Sensing Cultivation” (OSC). This is a new and simple observation method that is based on the odors produced by algae. In this study, as a representative microalgal species, *Scenedesmus* sp. was employed. Odors produced from its culture were investigated by olfactory evaluation, chemical identification, and “e-nose” analysis. As a result of olfactory evaluation, “green tea”, “sweet”, and “fishy” were the characteristic odors identified from this species. In the chemical analysis, the odors from this species were identified as 1-nonanal,  $\alpha$ -ionone,  $\beta$ -ionone, and tentatively identified as 2-undecenal and acetic acid. Based on the QCM-type e-nose analysis, the odors from this alga and the control medium could be separated. These results suggest that the OSC is applicable as a practical technique for production of this species.

**Key words** : microalga, *Scenedesmus* sp., volatile organic compound (VOC), gas chromatography-olfactometry (GC-O), QCM-type e-nose

(受稿 令和4年6月7日)

(受理 令和4年8月31日)