

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19171

研究課題名(和文)新しい農作物である微細藻類の“匂いセンシング技術”による培養法の開発

研究課題名(英文) Development of odor sensing culture method for microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) as novel agricultural crops

研究代表者

上野 大介 (Ueno, Daisuke)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：60423604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本グループでは、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。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、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-ノナナル、2-ウンデセナル、 $\alpha$ -イオノンが同定され、また酢酸が仮同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅覚官能評価によるにおいの印象と理化学分析を併用することで、イカダモの収穫適期を把握できるだけでなく、細胞増殖の活性や健康状態、バクテリアの混入、他種の微細藻類の混入など、総合的な培養状態の変化を判別できる技術の可能性が示された。将来的に生産現場においてOSCを活用するためには、官能的/理化学的な指標に対する“判別基準”が必要となる。現在、生産現場と同等の大量培養条件の実験を計画しており、イカダモの多面的な培養状態の変化と、嗅覚官能評価および化学分析結果との関連性を検証し、OSCに向けた判別基準の策定が望まれる。

研究成果の概要(英文)：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. 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, 2-undecenal,  $\alpha$ -ionone,  $\beta$ -ionone, and tentatively identified as acetic acid. These results suggest that the OSC is applicable as a practical technique for production of this species.

研究分野：におい農学

キーワード：微細藻類 イカダモ 分析化学 におい嗅ぎガスクロマトグラフ

### 1. 研究開始当初の背景

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、これまでも微細藻類からバイオ燃料を生産するための研究がなされてきた。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む栄養豊かな食品でもあることから、**微細藻類は新しい農作物としても期待されている。**

申請者らは微細藻類を新しい農作物としてとらえており、藻類を低コストに大量培養し、生産された藻類は地元産業である畜産業の飼料として消費することを計画している。そのため従来のような単一種の藻類を特殊な設備で培養する方式ではなく、地元の風土に合った土着藻類を選抜し、地元生産者が培養できるよう簡易化した栽培技術の確立が望まれる。本グループでは藻類の専門家である出村特任

准教授（佐賀大学・研究協力者）がすでに“**佐賀産微細藻類**”を選抜し、野外での培養法も検証済みである。しかし**微細藻類の培養は、ある程度まで増殖すると濃い緑色になってしまい、増殖の程度や病害の発生などを目視で判定できないことが課題であった。**将来的に農作物として普及させるためには、特殊な機器類を利用せずに簡易に培養状況を判定できる手法が必要となる。そのような中、日ごろの培養事件の中で、藻類は成長段階に応じて特徴的な匂いがあることに気づき、“**匂い**”で**培養状態をセンシングする技術の着想を得た(図 1-1)**。これまでも藻類の培養状態に応じて特徴的な匂いがあることは知られているが、その匂いを培養状況のセンシング技術に利用するという着想はこれまでに例がない。もし培養状態ごとの特徴的な匂い成分を特定できれば、見た目に頼らない“**匂いセンシング技術**”による容易な培養管理が可能となる。そこで予備実験として増殖期における**佐賀産微細藻類の匂い成分の同定に取り組み、2-nonenal を同定済みである(図 1-2)**。一方で、藻類の匂いは数 10 種の匂い成分の混合物であるため、各培養段階における多様な匂い成分を同定していくことが課題となった。

### 2. 研究の目的

本研究では“**匂いセンシング技術**”の開発に向けた基礎的検討として、**佐賀産微細藻類の培養状態に応じた匂い成分を分析化学的に同定することを目的とした。**

### 3. 研究の方法

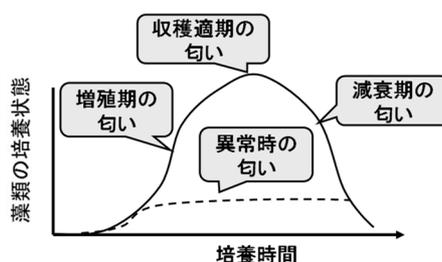


図 1-1 本研究の概念図。微細藻類の簡易な栽培管理法の開発に向け、藻類の培養状態ごとの匂いを利用した“**匂いセンシング技術**”の開発を目指す。

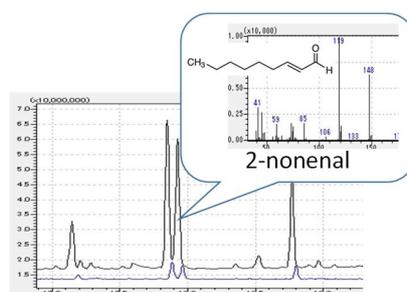


図 1-2 予備実験として同定した、増殖期の佐賀産微細藻類から発する匂い成分のひとつである 2-nonenal。

本研究では“匂いセンシング技術”の開発に向けた基礎的検討として、佐賀産微細藻類の培養状態に応じた匂い成分を分析化学的に同定することを目的としている。目的遂行のため以下の2項目に取り組む。

### 佐賀産微細藻類の培養:

佐賀産微細藻類の培養と試料提供は、出村幹英特任准教授（佐賀大学・さが藻類産業研究開発センター・研究協力者）が担当する。出村特任准教授は微細藻類の培養およびその利用に関する研究を専門としており、すでに佐賀県の土着藻類から有用な“佐賀産微細藻類”を選別済みである（図 3-1）。さらに 2017 年よりそれら藻類の培養法について検討を重ね、野外での大量培養が可能であることを実証している。培養している佐賀産微細藻類は顕微鏡観察やセンサー類によって培養状態が常時監視されていることから、それぞれの**各培養状態（増殖期、収穫適期、衰退期、異常時）の試料提供をうけることが可能**である。藻類の専門家である出村特任准教授より試料提供を受けられることは、藻類の匂い研究を推進する上で大きなアドバンテージを有しているといえる。

### 匂い成分の化学分析:

佐賀産微細藻類から発生する匂い成分の化学分析（物質同定）は上野（佐賀大学・代表）が担当する。匂い成分は、揮発性物質用の固相吸着剤（MonoTrap, GLS）をもちいて藻類が発する匂い成分を直接捕集する。捕集した匂い成分は、匂い嗅ぎガスクロマトグラフィー（GC-O）、GC フラクションコレクター、ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）をもちいて分離・同定する。本研究では**ヒトの嗅覚をもちいて匂い成分を検出する GC-O を利用しており（図 3-2）、GC-MS だけでは検出できない微量の匂い成分の検出が可能である**。本分析により佐賀産微細藻類の匂い成分を 10 物質同定することを目指す。

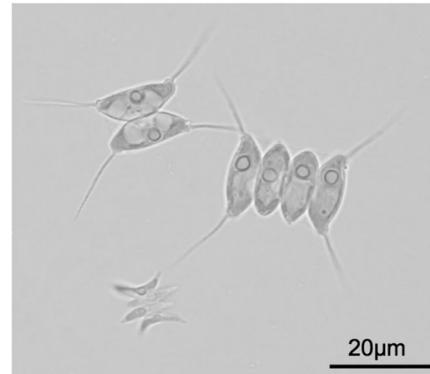


図 3-1 気候風土に適応した自然発生藻類である佐賀産微細藻類。写真は優占種であるイカダモ。

### におい嗅ぎガスクロマトグラフィー



図 3-2 ヒトの嗅覚をもちいて検出する匂い嗅ぎガスクロマトグラフィー（GC-O）による分析の様子。GC-MS では検出できない微量な匂い成分の検出可能である。

## 4. 研究成果

### 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。

## 嗅覚官能評価

本研究では最も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(6-8)、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-0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。

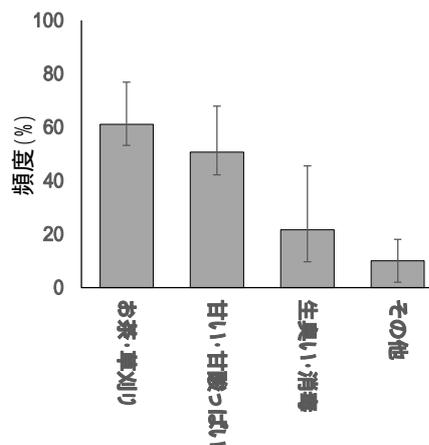


図4-1 イカダモ培養液(3週目)における“においの印象”。頻度(%)は、全パネル人数に対する、その印象を記述したパネル人数の割合。範囲は反復試験(3試料4反復)の標準偏差。

## 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。

各種分析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-0A-2, -3, -4, -5はそれぞれ、1-ノナナール、2-ウンデセナール、-イオノン、-イオノンと同定された。2-ウンデセナールは標準物質が入手不可であったため、ArochemBase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-ノナナール、-イオノン、-イオノンを等量混合して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4物質は妥当であると判断された。

同定された1-ノナナール、-イオノン、-イオノンは、これまでも藻類から発する一般的なVOCsとして報告されており(32, 9, 10, 16)、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(33)。一方で、2-ウンデセナールが微細藻類から

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-0 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-0 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。

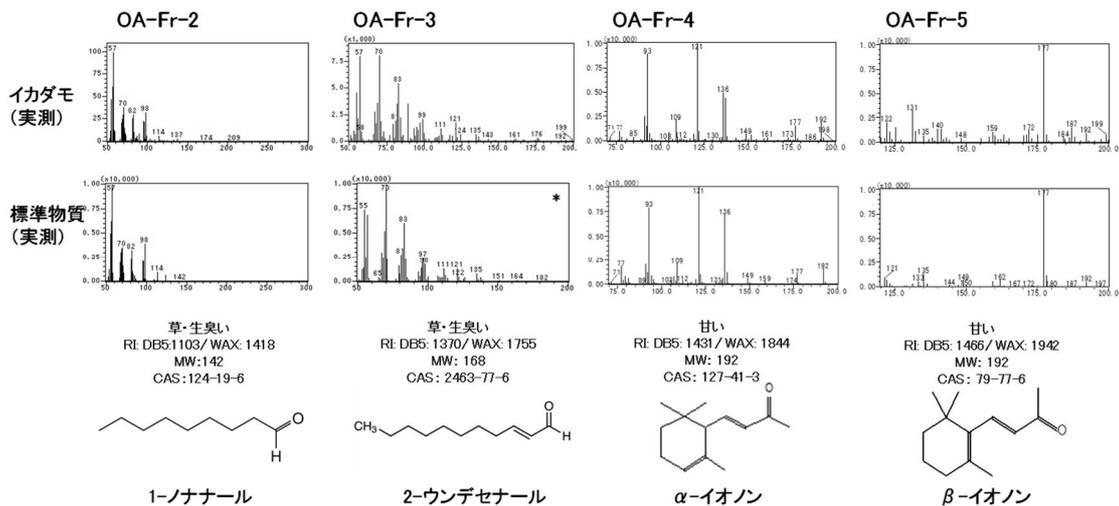


図-3 イカダモの GC-0 分析で感知されたにおい活性(OA)に対応するマススペクトルと同定された物質の一覧。OA 番号は図-4 に対応。RI: GC-0 の実測保持指標; MW: 分子量; CAS: CAS 登録番号。\*標準物質が入手不可のためマススペクトルは NIST より引用。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 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	4. 巻 52
2. 論文標題 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	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 におい・かおり環境学会誌	6. 最初と最後の頁 226 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2171/jao.52.226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 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	4. 巻 52
2. 論文標題 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	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 におい・かおり環境学会誌	6. 最初と最後の頁 233 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2171/jao.52.233	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 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	4. 巻 70
2. 論文標題 におい嗅ぎGCを用いるイモグサレセンチュウ感染ニンクから特徴的に発生するにおい物質の同定	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 427 ~ 434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.70.427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishimuta, K., Ueno, D., Takahashi, S., Kuwae, M., Tsugeki, N.K., Kadokami, K., Miyawaki, T., Matsukami, H., Kuramochi, H., Miyamoto, H., Haraguchi, T., Ryuda, N., Sakai, S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Contaminants of emerging concern detected by comprehensive target analysis in a sediment core collected from Osaka Bay, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Pollut. Effects Control	6. 最初と最後の頁 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35248/2375-4397.21.9.283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishimuta Kou, Ueno Daisuke, Takahashi Shin, Kuwae Michinobu, Kadokami Kiwao, Miyawaki Takashi, Matsukami Hidenori, Kuramochi Hidetoshi, Higuchi Taiki, Koga Yuki, Matsumoto Hideaki, Ryuda Noriko, Miyamoto Hideki, Haraguchi Tomokazu, Sakai Shin-Ichi	4. 巻 272
2. 論文標題 Use of comprehensive target analysis for determination of contaminants of emerging concern in a sediment core collected from Beppu Bay, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 115587 ~ 115587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envpol.2020.115587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo, Y., Nakai, K., Tatsuta, N., Inanami, O., Yamamoto, K., Mizukawa, H., Nagasaka, H., Mizutani, F., Chisaki, Y., Aiba, T., Ohba, T., Watanabe, I., Nabeshi, H., Higuchi, T., Koga, Y., Matsumoto, H., Nishimuta, K., Miyamoto, H., Haraguchi, T., Ryuda, N., Ueno, D.	4. 巻 6
2. 論文標題 Using the larvae of caddisfly as a biomonitor to assess the spatial distribution and effective half-life of radiocesium in riverine environments in Fukushima, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physics Open	6. 最初と最後の頁 100060 ~ 100060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physo.2021.100060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koga Yuki, Yoshiga Toyoshi, Shindo Jun-ichi, Aoyama Rie, Nishimuta Kou, Koyama Reon, Miyamoto Hideki, Haraguchi Tomokazu, Ryuda Noriko, Ueno Daisuke	4. 巻 24
2. 論文標題 Identification of specific odour compounds from garlic cloves infected with the potato tuber nematode, <i>Ditylenchus destructor</i> , using gas chromatography-olfactometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 55 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 龍田 典子, 居石 優子, 古賀 夕貴, 坂本 唯乃, 三谷 果穂, 阿部 紘乃, 上野 大介, 染谷 孝	4. 巻 75
2. 論文標題 阿蘇地域で生産される野草堆肥および その施用土壌等における拮抗菌の分布と性状	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 土と微生物	6. 最初と最後の頁 70 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18946/jssm.75.2_70	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tazunoki Yuhei, Tokuda Makoto, Sakuma Ayumi, Nishimuta Kou, Oba Yutaro, Kadokami Kiwao, Miyawaki Takashi, Ikegami Makihiko, Ueno Daisuke	4. 巻 292
2. 論文標題 Comprehensive analyses of agrochemicals affecting aquatic ecosystems: A case study of Odonata communities and macrophytes in Saga Plain, northern Kyushu, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 118334 ~ 118334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envpol.2021.118334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------