

<平成26年度助成>

## 鮎、牡蠣の香りの水晶振動子を用いた 定性評価に関する基礎研究

一橋 和義<sup>1), 2)</sup>・永井 伊作<sup>3)</sup>・倉橋 みどり<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学生物生産工学研究センター、<sup>2)</sup>東洋大学総合情報学部、<sup>3)</sup>岡山大学大学院自然科学研究科

### イントロダクション

本研究の目的は、香りがその食材の価値を大きく決める水産物である鮎と牡蠣の香り成分を探索し、その香りを QCM (Quartz Crystal Microbalance) と呼ばれる水晶振動子を用いた香り計測装置を作成して数値化しようとするものである。

もし、鮎や牡蠣の香りを手軽にその生息環境で計測、評価できれば、その商品価値やまた香りによる彼らの餌の状態や水質などの生息環境をその場で評価できるであろう。

香りや匂い成分の分析手段として、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用いる一般的な方法があるが、この計測器は高価だけでなく、対象とする香りの存在する現場に持ち込んで手軽に測定する用途には適さない。別の手法に基づく機器として、QCM を用いた質量測定に基づく香り計測装置がある<sup>1)</sup>。この装置は、香り分析を行う場所を GC-MS より柔軟に選択でき、また対象とする香り成分に特化した感応膜を開発することで効率的な香り測定を行うことができる。そこで、本研究では、鮎と牡蠣の香り成分の探索とともに、水晶振動子を用いた香り計測システムを開発し、鮎と牡蠣の香りに特化した感応膜を開発するための環境を構築した。

鮎と牡蠣の香り成分の探索については、例えば鮎では 2,6-nonadienal (キュウリ様臭)、3,6-nonadien-1-ol (スイカ、メロン様臭) などが主な成分として報告されているが<sup>2)</sup>、本研究では、GC-MS を用

いた新たな計測方法を用いて新たな香り成分を探索した。そして、見つかった複数の香り成分に関して、試作した感応膜への吸着状態を測定し、香りセンサの開発に役立つデータ収集を行った。また感覚が豊かな共感覚者を被験者とした牡蠣の香りの印象評価を行った。

水産物食材の良否に大きくかかわる香りを、QCM を用いて数値化し比較できることを示したことで、本研究成果が実用的な QCM 香りセンサの開発にチャレンジできることを明らかにした。以下、鮎と牡蠣の香り成分の探索と開発した香り計測装置を用いた計測結果を報告する。

### 1. ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) を用いた鮎の香りの生息流域、河川による評価

全国清流利き鮎大会に入賞歴のある河川の鮎と養殖鮎の香り成分探索を行った。静岡県狩野川中流域、狩野川上流域、岐阜県馬瀬川中上流域で友釣りにより捕獲された縄張りアユを試料とした計測の例を示す。鮎は鮮度を保ったまま冷凍保存 (-20 ~ -30℃) され、研究室に移送後分析時まで冷凍保存 (-60℃) された。計測時に解凍し、各アユの表皮 1.0 g を 20 ml のバイアル瓶に入れて密封し、バイアル瓶に不活性化チューブを刺し、試料濃縮用の吸着剤入りの注射針を装着したガス採集器でバイアル瓶から気体 100 ml を採取し、試料を濃縮した後、GC-MS を用いて香り成分を分析した。注入口温度: 250℃、キャリアガス: He、イオン化法: EI 法、GC 昇温条件: 40℃ (5 min 保持) → 10℃/min → 250℃ (9 min 保持) として計測を行った。

結果として、狩野川、馬瀬川の鮎から検出された揮発成分として21本のピークが確認された(Fig.1)。それぞれの鮎で確認されたピークをライブラリ検索により成分を推定しTable 1にまとめた。ピークは確認されたが不明2成分も含まれている。各成分の番号は、Fig.1のピークの番号に対応する。

2,6-nonadienal や 3,6-nonadien-1-ol などの鮎特有の香り成分が検出され、特に馬瀬川のアユは他のものに比べこれらの成分のほか、かんきつ類に

特有の limonene やスパイスの成分の  $\beta$ -myrcene が検出された(Table 1)。その他、利き鮎大会に入賞した他の河川の鮎の香りや養殖鮎の香りの分析結果を参照し、方法3で用いる香り成分の選択を行った。

## 2. 牡蠣の香りの色による評価とSD法によるアンケートとGC-MSによる比較

何らかの共感覚(ある感覚刺激が実際に他の感覚を誘発する現象)をもつ11人(男性2名、女性

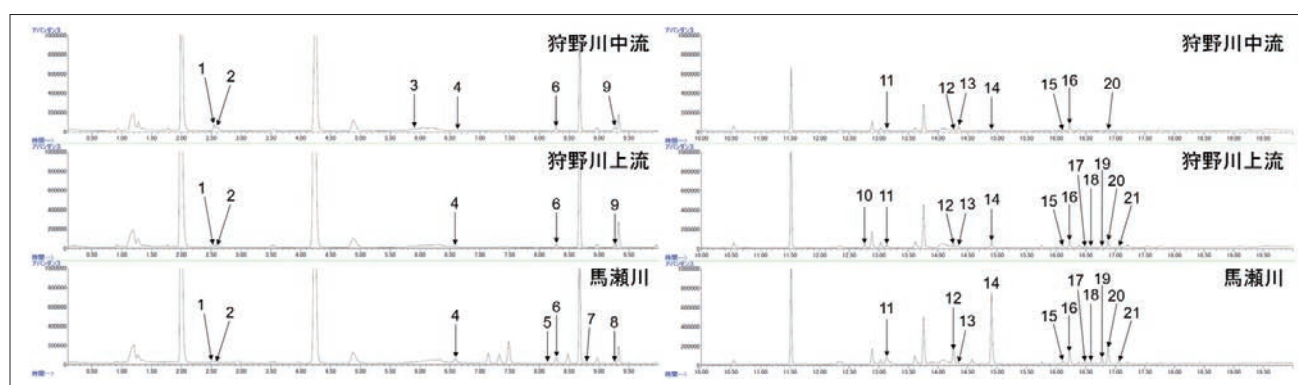


Fig.1 狩野川中流、狩野川上流、馬瀬川中上流の鮎の香りの成分のトータルイオンクロマトグラムによる比較  
縦軸：相対強度、横軸：時間(分)、矢印の1～21の番号はTable 1のピーク番号に対応する。  
左図が0～10分で現れた揮発成分のピーク、右図は10～20分で現れた揮発成分のピークである。

Table 1 狩野川、馬瀬川の鮎の香り成分の比較

ピーク番号	成分名	狩野川 中流	狩野川 上流	馬瀬川	香り**
1	2-methylbutanal	○	○	○	麦芽臭
2	3-methylbutanal	○	○	○	麦芽臭
3	—	○	-*	-*	—
4	1,3,5-octatriene	○	○	○	チーズ、プラスチック様
5	$\beta$ -Myrcene	-*	-*	○	スパイシー、樹脂様
6	1-penten-3-ol	○	○	○	芝様、グリーン
7	limonene	-*	-*	○	柑橘様、フルーティ
8	—	-*	-*	○	—
9	3-methylbutanol	○	○	-*	麦芽臭、ワイン様、バナナ様
10	1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-benzene	-*	○	-*	調理牛肉様
11	1-octen-3-ol	○	○	○	マツタケ様
12	2-nonenal	○	○	○	グリーン、獣脂様
13	1-pentadecene	○	○	○	やや脂肪～フローラル様
14	2,6-nonadienal	○	○	○	キュウリ様、緑の葉様
15	3-nonen-1-ol	○	○	○	グリーンメロン、マッシュルーム様
16	heptadecane	○	○	○	脂肪様 (アユでは悪い匂い)
17	6-nonen-1-ol	-*	○	○	グリーン、青白いメロン
18	8-heptadecene	○	○	○	苔、土くさい(アユでは悪い匂い)
19	3-heptadecene	○	○	○	(アユでは悪い匂い)
20	3,6-nonadien-1-ol	○	○	○	キュウリ、メロンの皮
21	2,6-nonadien-1-ol	-*	○	○	ドライグリーン、キュウリ

\*: 他のサンプルで推定した保持時間にトータルイオンクロマトグラフ上に同様のピークが確認できなかった成分

\*\* : 文献で報告されている香りの評価

8名、年代：10～40代)の被験者に対して、産地の異なる5種類の真牡蠣の香りをブラインドで嗅いでいただき、イメージされる色彩と13項目(好き-嫌い、まずい-おいしい、暗い-明るい、小さい-大きい、女性的-男性的、柔らかい-硬い、丸い-角張った、賢い-馬鹿な、醜い-美しい、心地よい-不快な、滑らかな-ざらついた、高い-低い、品のある-下品な)からなるSD法アンケートに答えていただき得られた得点の平均値と標準偏差をグラフにまとめた(Fig.2-1)。また、各牡蠣の香りを嗅いだ後にマンセル色彩表により答えられた色にもっとも近いものを表計算ソフトの色で置き換え8名分の香りに対する色彩イメージを得た(Table 2)。さらに、アンケート項目で統計的な有意差の確認された項目を有する牡蠣についてGC-MSによる香り成分の計測を行い成分の違いを示した(Fig.2-2)。牡蠣をまるごと複数個ホモジナイズして試料を得た点と、温度条件(試料を加熱し香り成分を吸着材に回収、注入口温度260℃、40℃(3min保持)→4℃/min→140℃→10℃/min→280℃(3min保持))が鮎の場合の計測法とは異なる。

### 3. 水晶振動子を用いた香り計測システムの開発

#### 3-1 装置の特徴

複数ある水晶振動子間で測定の違いが生じないように、すべての振動子の配置が構造的に同一であるセンサチャンバを設計した。また、チャンバ内の温度、湿度、圧力も併せて測定・記録することで、香り測定値への影響を考察できる装置とした。

#### 3-2 装置の概要

QCM法は水晶振動子の電極両面に特定の香り成分に反応する感応膜をキャストしたものをを用いて、香り分子の吸着量に応じた周波数の減少から香りの量を評価する手法である。本装置ではセンサチャンバ内に収めた8つの水晶振動子(基本周波数9MHz)の周波数変化を8チャンネルの周波

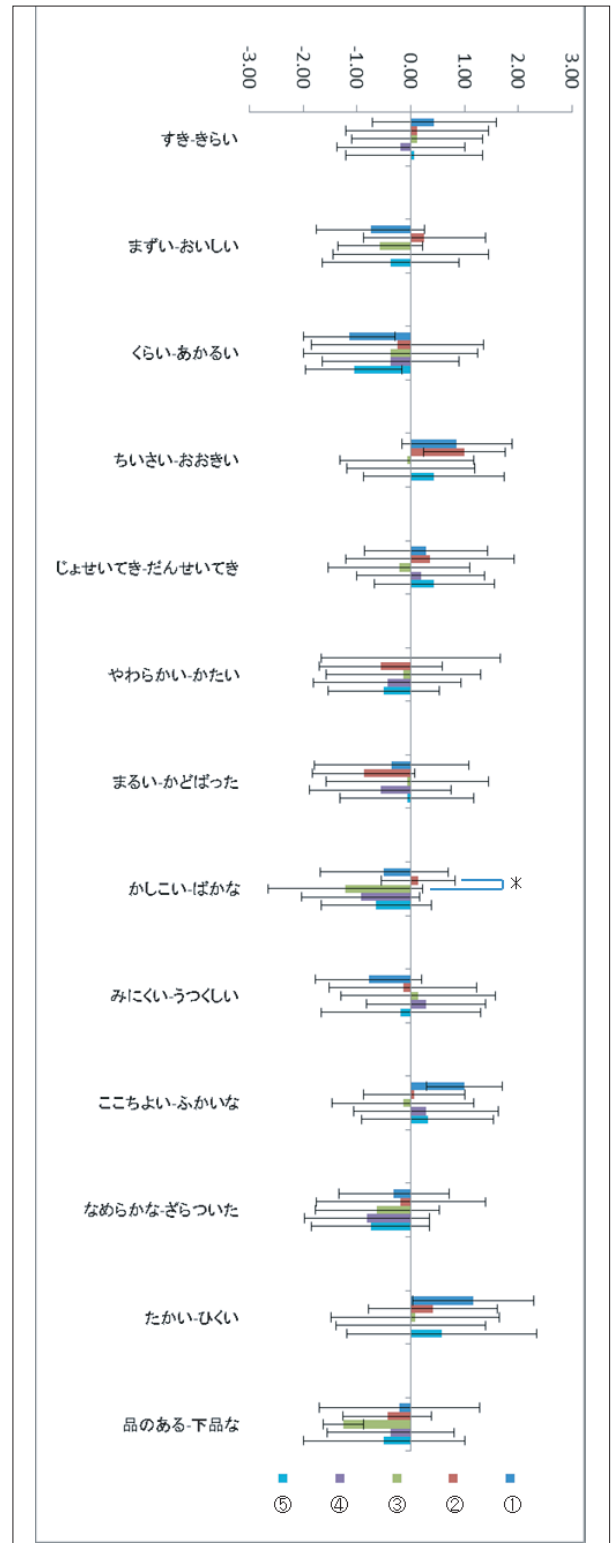


Fig. 2-1 牡蠣の香りの印象評

棒グラフは各項目の得点の平均値とエラーバーは標準偏差を示す。項目の上下は縦軸方向の数字の大きさ+ーに対応させて表記している。SD法によるアンケート結果(各項目でN=6～8)についてKruskal-Wallisの順位検定法(自由度4、N=6～8、有意水準0.05)を用いて統計的検定を行った結果、各項目で5種類の牡蠣による印象の評価に有意差は確認されなかった(Fig.2-1)。「賢さ」について反対傾向にある②と③の牡蠣についてU検定を用いて検定を行った結果、統計的な有意差が確認された(\*: N=7, p<0.05)。共感覚者は五感の刺激に対して性格、人格といった強いイメージを持つことがある。

Table 2 共感覚者の牡蠣の香りの色彩イメージ

異なる5種類の産地の牡蠣について8名の共感覚者(女性)がそれぞれの香りから想起される色を回答した。(匂い→色):匂いに色を知覚できる共感覚者である。Aは1日目のグループ、Bは2日目のグループを示す。-:回答が得られなかったものを示す。②と③の牡蠣は比較的薄い色で②のほうが明るい色彩が多い傾向にある。産地①の牡蠣は全体的にくすんだ色で表現され、④と⑤は濃い色で比較的暗めの色が多いが様々な色が見られた。被験者A2とB3は匂いを色として知覚する共感覚者であり、②、⑤は緑系統の色、③は薄い青~薄い紫、④は薄い灰色など共通点が見られた。

被験者(共感覚者)	年代	性別	①(産地)	②	③	④	⑤
A1(匂い→色)	-	男	-	-	-	-	-
A2(匂い→色)	20	女	薄緑	鮮緑	薄紫	薄灰	鮮緑
A4	40	女	薄青	薄青		薄灰	薄茶
A3	20	女	薄緑	薄緑	薄黄	鮮緑	薄灰
A5	20	女	薄青	鮮青	鮮緑	薄紫	薄灰
B1	-	男	-	-	-	-	-
B2	-	女	-	-	-	-	-
B3(匂い→色)	10	女	薄青	鮮緑	薄青	薄灰	鮮緑
B4	10	女	鮮緑	鮮黄	薄緑	鮮橙	鮮紅
B5	20	女	黒	鮮緑	薄黄	鮮茶	鮮青
B7	20	女	薄灰	鮮黄	-	薄青	鮮緑

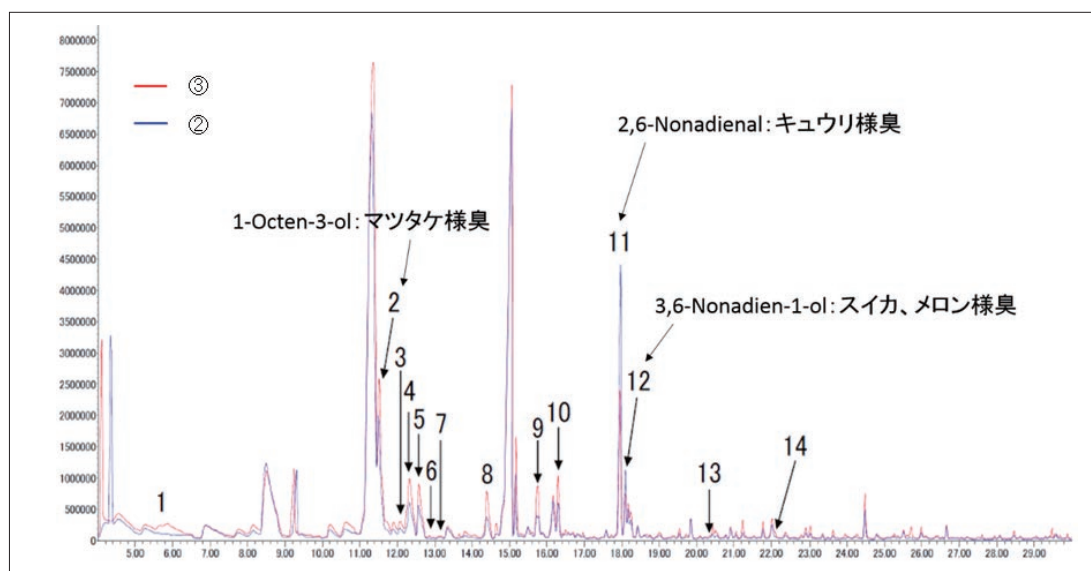


Fig. 2-2 産地③(赤色)と②(青色)の真牡蠣の香り成分のGC-MSによる比較

横軸:時間(分)、縦軸:相対値:③の牡蠣は②よりも1-Octen-3-ol(マツタケ様臭)が強く、②の牡蠣は③よりも2,6-Nonadienal(キュウリ様臭)、3,6-Nonadien-1-ol(スイカ、メロン様臭)が強い。これらの成分の微妙なバランスにより香りの印象が異なると考えられる。

数カウンタにより測定する。感応膜の素材として様々な物質を試すときに、複数チャンネルでの測定は感応膜開発の効率を上げる。Fig.3-1に開発した計測装置の外観、Fig.3-2(a)に装置を構成する機器を示す。装置はセンサチャンバを中心に、内部循環用ポンプPB、クリーニング用ポンプPAが接続される構造を持つ。試料は循環流路に設けられた注入口にマイクロシリンジを刺して注入する。香りを測定する際は2つのバルブV1およびV2を閉じて循環状態で行う。測定後は両バルブ

を開くことでシリカゲルとフィルタを通過した外気によりチャンバ内およびQCMのクリーニングが行えるため、実験を繰り返すことが容易に行える。

### 3-3 センサチャンバ

すべてのQCMが同時かつ同一条件でセンシングするため、QCMが同心円状に配置された円筒型のセンサチャンバ(容積167ml)を設計した。このセンサチャンバの内部をFig.3-2(b)に示す。また、チャンバ内における気体の流れをFig.3-2(c)に示す。香りを含んだ気体はチャンバのカバー上



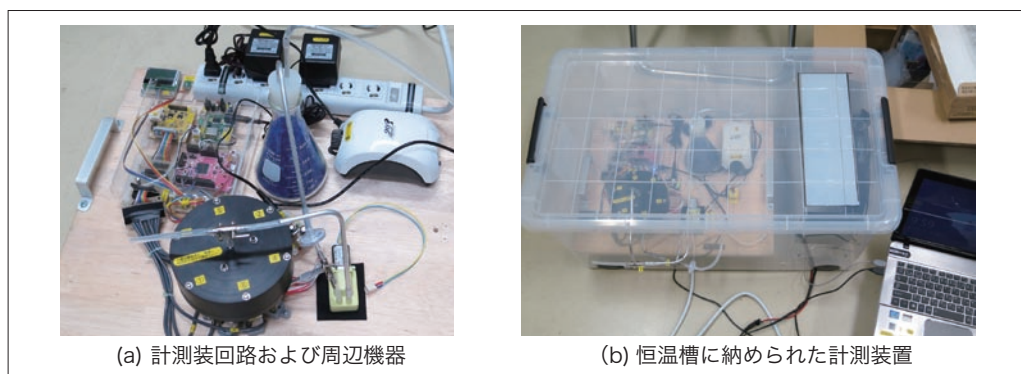


Fig. 3-1 香り計測装置の外観

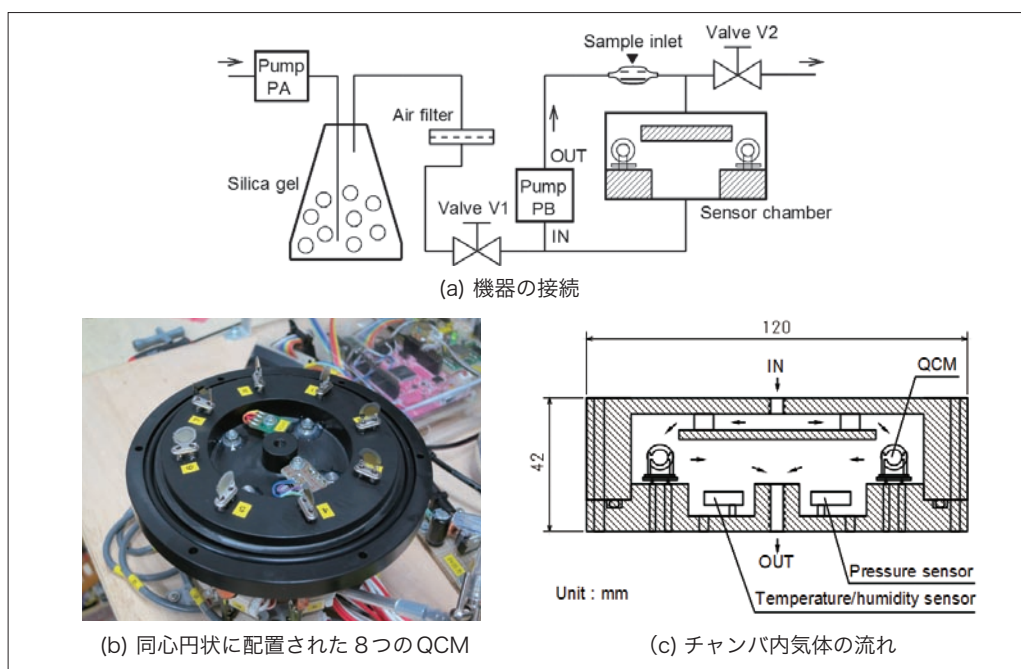


Fig. 3-2 香り計測装置の構造

部中央から流入後、内部の円板により全方向へ拡散させられ、各QCMと一斉に接触する。QCM周囲を通過した後、気体は再び1つに集められチャンバ下部より流出し、流路を循環した後、再び流入口に戻ってくる。流出口の両側に温度・湿度センサ(SHT-25)および圧力センサ(LPS331AP)が配置される。これらのセンサにより、温度に関して分解能0.01℃、精度±0.2℃、湿度に関して分解能0.04% RH、精度±1.8% RH、気圧に関して分解能0.000244hPa、精度±0.1hPaの計測が0.5s周期で行われる。

### 3-4 周波数カウンタおよびソフトウェア

QCMの振動数変化は8チャンネル周波数カウンタ回路により計測される。この周波数カウンタ

の回路構成をFig. 3-3に示す。QCM毎に発振回路が接続され、その信号はフォトカプラを經由して周波数カウンタへ入力される。発振回路にはフォトカプラや周波数カウンタの電源とは別の独立した電源が供給されるため、ノイズ等の影響を受けない安定した発振が確保される。周波数カウンタには設計者が所望のデジタル回路を組み込めるFPGA(Field Programmable Gate Array)が使用されており、市販の周波数カウンタを複数台並べるよりはるかに省スペースかつ低コストである。FPGAのためのクロックには温度補償水晶発振器(KSS DTCXO-15A, 40MHz, 安定度 $\pm 0.3 \times 10^{-6}\%$  /  $-30 \sim 80^\circ\text{C}$ )を用いて安定した計測を確保した。このFPGAは各QCMの振動数を分解能1Hz、0.5s

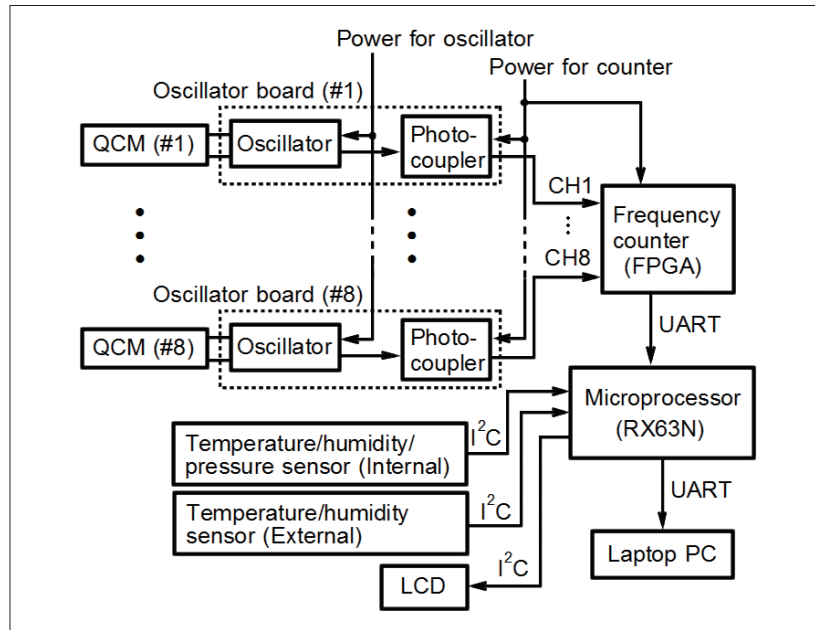


Fig. 3-3 周波数カウンタの構成

周期で計測し、マイコン (RX63N) へ送信する。マイコンは振動数の計測値を温湿度センサおよび圧力センサの計測値とともにPCへ送信する。PC上では開発した専用ソフトウェアにより計測値の画面へのグラフ描画およびファイルへの保存が行われる。ソフトウェアの実行画面例を Fig.3-4 に示す。このソフトウェアは装置の接続がなくてもデータファイルの読み込みおよびグラフ表示は可能であり、グラフの報告書への貼り付けも容易に行える。

### 3.5 香り成分の評価実験

鮎、牡蠣の香り成分で以下の重要なもの (Table 3 参照) を選択した後、これらの成分を吸着しそうな有機化合物7種類を感応膜として水晶振動子に塗布し、それぞれのチャンネルにセットした (1CH; polyethylene glycol 200, 2CH; dioctyl. Phthalate, 3CH; diisononyl phthalate, 4CH; diisodecyl phthalate, 5CH; diisodecyl 4-cyclohexene-1,2-dicarboxylate, 6CH; cholesterol, 7CH; ethyl cellulose, 8CH; Control : 感応膜なし)。

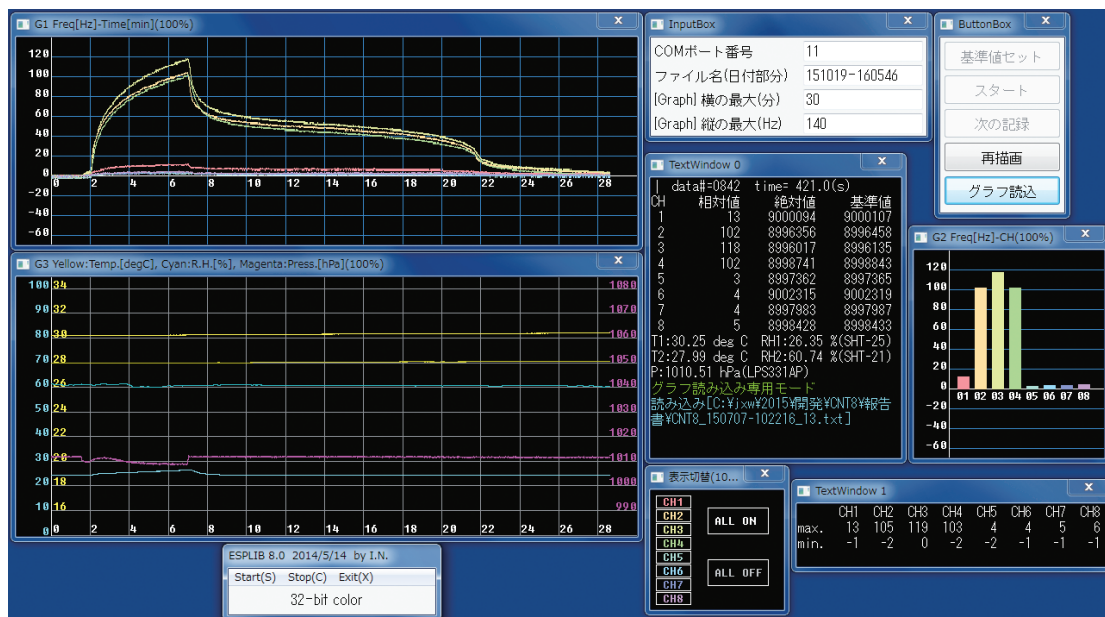


Fig. 3-4 ソフトウェアの実行画面例

Table 3 各香り成分に対する7チャンネルの周波数変化の最大または最小値

香り成分	1CH	2CH	3CH	4CH	5CH	6CH	7CH	分子式	分子量
1-octen-3-ol		200	100	100	150		300	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	128.22
cis-6-nonen-1-ol		20	20	10	120		250	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	142.24
trans-2,cis-6-nonadien-1-ol		20	5	3	20		200	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	140.22
3,6-nonadien-1-ol (mixture of isomers)			3		6		30	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	140.23
trans-2-nonenal	10	120	90	90	80		140	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	140.23
myrcene		125	75	80	100		90	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> (70%)	136.24
D-limonen	8	150	100	105	115		110	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24
cis-3-nonen-1-ol	60	110	110	95	80		325	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	142.24
trans-2-octen-1-ol	50	50	50	50	60	25	160	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	128.22
2-methylbutanal	25	25	10	10	5	3	50	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86.13
trans-2,cis-6-nonadienal	25	100	70	70	70	-20	100	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	138.21
amyl acetate (Start)	75	125	75	100	50	25	160	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130.19
amyl acetate (End)	25	110	75	75	100	-20	130	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130.19

CHの列の単位: Hz 左端の列は香り成分 右端は分子量: g

7CHはすべての香り成分を程度の差はあるが吸着しやすい。6CHは限られた香り成分に吸着するが吸着性が乏しい。  
amyl acetate (Start), (End): 基準の香り物質として、実験の開始時と終了時に計測した。

各香り成分を順に測定システム内の循環路に注入し、周波数変化のデータを取得した結果、7種類の感応膜はそれぞれ香り成分、濃度を捉え、その特徴ある曲線を描いた(Fig.3-5)。なお、Table 3は選択した香り成分について標品の原液1μLを計測機器に注入したときの各チャンネルの振動数の最大変化値を示す。

7種類の感応膜は、選定した香り成分に対して異なる吸着量を示す周波数変化を生じさせており、装置自体は精度良く機能していると考えられる。また感応膜に関しては、ethyl celluloseが選択したすべての香り成分に対する吸着性が良いことから、今後celluloseの化学修飾や他の分子との複合化により、目的とする香り成分を効果的に捉

えられる感応膜の開発の可能性が示された。また香り吸着剤の使用による低濃度の香り成分の分析の可能性も示された。

### まとめ

本研究において、鮎および牡蠣の複数の香り成分の化学構造を特定し、これらの成分を選択的に吸着する複数の香り感応膜をもつQCM作成した。これらのQCMに香り成分をかざすとき、複数のQCMはそれぞれの香り成分に対して選択的に吸着し、異なる振動数変化値を示した。得られた複数の変化値を総合処理し、良質の香りを持つ鮎および牡蠣がどのような生息環境で得られるか、またこれらの水産物の養殖においてどのような餌を

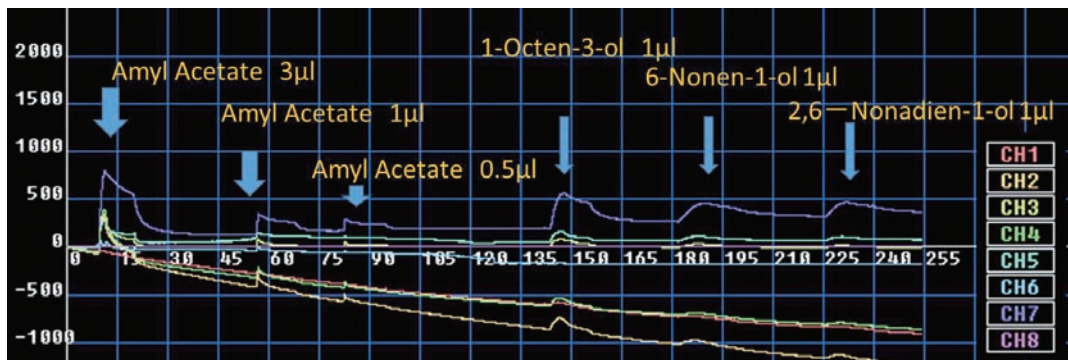


Fig. 3-5 各香り提示条件における各チャンネルの水晶振動子の周波数変化

横軸: 時間 (sec) 縦軸: 周波数変化 (Hz)

特にAmyl Acetateについては濃度依存的に周波数が下がっている。グラフは香り物質が吸着して振動子の周波数が下がる+側にその周波数分増加するように描かれている。特に7chのethyl celluloseは周波数変化が大きく、また安定した挙動を示していることがわかる。ベースラインが下がっているものは感応膜が脱落していると考えられる。これらから装置が極めて上手く作動していることが分かった。

与えるべきかなどの示唆を与えることができる。したがって、今後、さらに選択的な香り感応膜を探し、より高感度の実用的なQCM香りセンサの製作にチャレンジしてゆきたい。また、他の分野への応用も考えてゆきたい。

#### 謝 辞

材料科学技術振興財団の皆様、岡山大学の廣田和弘名誉教授、柴田光宣技術専門職員、仁科勇太准教授、また馬瀬川漁協の皆様、原島宏至先生及び原島先生のスタッフの皆様、東京大学の皆様、被験者になってくださった共感覚を持つ皆様、

東洋大学の皆様、Danielle Marie Huffman 様、James Davidson 様、斎藤アリーナ様、斎藤 環様、公益財団法人浦上食品・食文化振興財団の皆様、その他多くの方々にお世話になりました。この場を借り、厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 永井伊作, 藤田慎二, 廣田和弘: 多チャンネル水晶振動子においセンサ自動計測システム, *Aroma Research*, 5(1), pp.62-67, 2004.
- 2) 平野敏行, 章超樺: 淡水魚の香気-アユの香りはどのようにして生成されるか-, *化学と生物*, 31, 7, pp.426-428, 1993.



## Basic research about the stability estimation of the fragrances of oysters and ayu fishes using QCM (Quartz Crystal Microbalance)

Kazuyoshi Ichihashi<sup>1,2)</sup>, Isaku Nagai<sup>3)</sup>, Midori Kurahashi<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>*Biotechnology Research Center, The University of Tokyo*

<sup>2)</sup>*Faculty of Information Sciences and Arts, Toyo University*

<sup>3)</sup>*Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University*

### Abstract

The purpose of this study was to identify fragrances of good-quality oysters and ayu fishes using gas chromatography mass spectroscopy (GC-MS) analysis, and to develop a basic mechanism of measuring device using QCM (Quartz Crystal Microbalance) to measure and estimate the fragrance of oysters and Ayu fishes easily.

We investigated chemical compositions of the fragrance of Ayu fish (*Plecoglossus altivelis*). Ayu fish were caught in the upper and the upper-middle area of the Kano River in Shizuoka Prefecture and in the upper-middle area of the Maze River in Gifu Prefecture, Japan. We analyzed the fragrance of these Ayu fishes using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) and compared the fragrance composition among samples. 2,6-Nonadienal and 3,6-nonadien-1-ol, which are signature fragrance compositions of Ayu, were identified in all samples. Peak levels of these compositions were higher in samples from the Maze River. In particular, limonene and  $\beta$ -myrcene were identified only in samples from the Maze River.

We identified fragrance of good-quality oysters in combination with color imagination, semantical difference questionnaires and GC-MS analysis. By sensing of color elicited by fragrance and Semantic Differential (SD) method, eleven subjects with synesthesia estimated fragrance of five kinds of oysters (*Crassostrea gigas*) from five different production areas in Japan were carried out. Statistical difference was represented between two production areas in the point of “clever-unaware impression” in the SD method. The fragrance of these two kinds of oysters were analyzed using GC-MS. Especially, peak levels of 1-octen-3-ol, 2,6-nonadienal and 3,6-nonadien-1-ol were different between these oysters. The color perception between these oysters was similar. In conclusion, intensity balance of 1-octen-3-ol, 2,6-nonadienal and 3,6-nonadien-1-ol is one of the very important factors for the estimation of the odor of oysters relating to elevated perception.

Considering these experiments conducted by us and previous researches, eleven chemical materials including limonene, 2,6-nonadien-1-ol, 6-nonen-1-ol, 1-octen-3-ol, 3,6-nonadien-1-ol, 2,6-nonadienal, 2-methylbutanal, 2-nonenal, myrcene, 3-nonen-1-ol and 2-octen-1-ol were selected as important fragrance chemical compositions of oyster and Ayu. We originally developed a fragrance measuring device using QCM. Seven kinds of 1-propanol solutions including polyethylene glycol 200, dioctyl phthalate, diisononyl phthalate, diisodecyl phthalate, diisodecyl 4-cyclohexene-1, 2-dicarboxylate, cholesterol and ethyl cellulose were applied as sensitive membrane to both surface of QCM in each. One QCM was control QCM with no sensitive membrane. Temperature and relative humidity in a sensor chamber were monitored simultaneously in the experiment. Frequency change responses of each QCM were measured in each injection of 1 $\mu$ l material of eleven important fragrance compositions of oyster and Ayu to the device. Response curves were represented on PC monitor by originally developed software. Each injection of fragrance material showed characteristic curve and response level. We could ensure that the measuring device worked very well and we could achieve to develop basic system of fragrance measuring device using QCM. Especially, ethyl cellulose showed rich response to all fragrance materials. We consider that making various type of chemical modification and complex compound of ethyl cellulose bring us more effective sensitive membrane. We need further research to achieve practical use.