

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN9630

計畫名稱：以模式控制來模擬、鑑定一原生性腐敗菌
(*Chryseomonas luteola*)在海蝦貯存期間所生成之氣味關鍵物質

執行期間：96年1月1日至96年12月31日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：傅世貴

子計畫主持人：

執行單位：生活系

中華民國97年03月20日

一、摘要

台灣是一個海島型國家，海產的食用與養殖佔我國民生消費與生產所得皆具有相當重要的地位。蝦子的養殖、遠洋捕撈與進出口貿易更是漁業最主要的經濟命脈之一，而蝦子的新鮮度常常成為漁業貿易間紛爭來源，傳統微生物測定法雖然可以準確地測定蝦子的新鮮度，但往往曠日廢時，所以如何以快速方法來公正客觀的檢測出蝦子的新鮮度正是解決貿易爭端、提高漁業競爭力的重要課題。本研究將針對一常見於海蝦身上的腐敗菌(*Chryseomonas lutoela*)進行研究，以實驗室模組來控制蝦子貯存時可能之變因，來觀測腐敗菌在蝦子貯存期間的作用與所釋放出的氣味物質，進而藉由精密儀器與關鍵氣味物質分析技術(GC-O)來尋找出蝦子在腐敗過程中所可能釋放的關鍵性氣味物質。以期在後續的實驗中能夠配合電子鼻或快速氣味物質感測元件的開發來完成本實驗之目的。本實驗完成後更可以成為往後農業、食品甚至環境相關領域快速分析、鑑定的模式，運用電子感測元件進行快速分析。

二、簡介

海產的新鮮度的研究是一門基礎研究，雖然不像生技產業等這麼受到注目，但是這些基礎研究在提升我國傳統產業的價值也是非常重要的。尤其像台灣這種海島型國家，對於來自海洋取之不絕的天然

資源尤其應該重視與愛惜。在過去數十年間，無論在漁獲、進出口、養殖漁業等在台灣不管在內需或是外銷都扮演著支撐台灣基礎產業的經濟命脈之一，而海產的新鮮度常常成為漁業貿易間紛爭來源，傳統微生物測定法雖然可以準確地測定海產的新鮮度，但往往曠日廢時，所以如何以快速方法來公正客觀的檢測出海產的新鮮度正是解決貿易爭端、提高漁業競爭力的重要課題。

根據研究發現導致海產腐敗的因素主要來自於微生物與這些生物體內的酵素作用，而微生物的生長是導致海產腐敗的最主要因素，以蝦子為例，導致蝦子腐敗的微生物來自於蝦子被捕獲前所生長的环境，與捕獲後處理、貯藏的污染，常常被發現的蝦子腐敗菌有 *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Bacillus* 等，據發現在這些為生物中以嗜冷菌 (psychrotrophic) *Pseudomonas* 為最常見的腐敗菌。*Chryseomonas lutoela* 原本被歸類為 *Pseudomonas* 屬叫 *Pseudomonas lutoela*，1987 年被重新歸類為 *Chryseomonas* 屬，被發現在諸多蝦子的腐敗菌中能夠產生最強烈的腐敗氣味，是蝦子在腐敗過程中產生臭味的最主要來源。

在科學未昌明之前，視覺與嗅覺是分辨食物新鮮度的最原始方法也是最快速的方法，但始終無法提供客觀、公正的數據來作為交易的依據，隨著技術的日新月異，微生物測定法、氨氣含量測定法等相

繼被開發出來。傳統微生物測定法雖然可以準確地測定蝦子的新鮮度，但往往曠日廢時，所以如何以快速方法來公正客觀的檢測出蝦子的新鮮度正是解決貿易爭端、提高漁業競爭力的重要課題。

人工嗅覺技術(或是電子鼻)是一種近二十年來才被開發出來的快速分析方法，它利用如氧化金屬(MetalOxides)、高分子混合碳黑(Carbon Black)或是動物嗅覺細胞(Piezoelectric)薄膜所製成的電子感測元件，當氣體分子與這些薄膜接觸時，會導致薄膜導電性的改變，藉由量測導電度改變可以去定量這些氣體分子，目前人工嗅覺技術的發展已經相當成熟，國際上也有一些穩定可靠的電子鼻產品，如Cyrano Science 所推出的 Cyranose 320、Gerstel Inc. Co. 發展的 ChemSensor System、Alpha MOS 公司所生產的 FOX 2000, 3000, 與 4000 等產品，這些電子鼻產品也被成功的應用在各項分析工作，如牛奶風味之分析、威士忌酒品質年份的鑑定、不同品種、產地柳橙汁之鑑別、台灣茶葉風味之鑑定等實驗工作，據研究指出，人工嗅覺技術已經是一種相當穩定、可靠的技術。

為提升傳統水產業的價值、加速水產品進、出口檢驗速度與消弭商業紛爭，一套確實可靠、操作簡單並且快速的方法來檢測水產品新鮮度是必須的。

本計畫以蝦子為實驗模式，藉由接種腐敗菌 *Chryseomonas lutoela*

來研究在不同條件下，蝦子腐敗時所釋放出的氣味物質，再藉由使用氣相層析(GC)與質譜儀(GC-MS)將氣味物質之成分鑑定出來，並配合一些特殊技術如 Gas Chromatography – Olfactometry (GC-O)、Aroma Extraction Dilution Analysis (AEDA)、Osme 等可以找出眾多氣味物質中構成蝦子腐敗臭味的關鍵物質，再配合電子感測元件的設計，可以製造出專門用來檢測魚、蝦、貝類水產品新鮮度的電子鼻。



三、實驗方法與步驟

本計畫以蝦子為模型粗分為兩部份，微生物驗證部份與關鍵氣味物質的鑑定：

(一) 微生物驗證部份

蝦子身上得到腐敗菌 *Chryseomonas lutoela*：使用已經經過驗證、商業化的微生物鑑定套件如 API 20 E and API 20 NE，從控制環境下得到腐敗菌 *Chryseomonas lutoela*。買自菌種中心之 *Chryseomonas lutoela* 將會用來作為對照組，用來比較從蝦子身上所純化得到的 *Chryseomonas lutoela* 菌株之效力。

(二) 關鍵氣味物質之鑑定

(1) Inoculation of Shrimp：

在控制溫度及環境下(分別模擬天然貯存以及冷藏條件)，依照實驗組以及對照組分別將腐敗菌 *Chryseomonas lutoela* 菌株接種到經過處理的蝦子受體上，來模擬在控制條件下蝦子受到 *Chryseomonas lutoela* 菌株作用的影響。

(2) 關鍵氣味物質鑑定：

分別以頂空固相微萃取技術(Solid Phase MicroExtraction/SPME)配合 Static Headspace Analysis、Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS)、SPME/Gas Chromatography Olfactometry (SPME-GCO)、

Osme Analysis 等技術來分析在控制條件下 *Chryseomonas lutoela* 菌株所釋放出之氣味物質，並鑑定出蝦子在腐敗期間所產生的關鍵氣味以及成分。

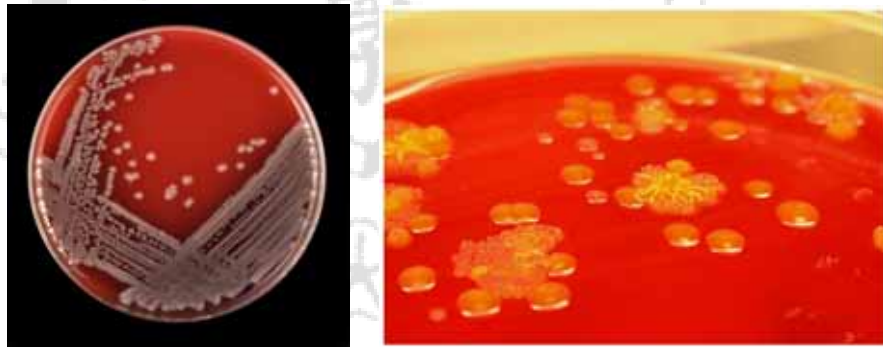
(三) 統計分析：

本研究之實驗數值均為三重複，以統計分析系統 Statistical Analysis System (SAS)軟體進行統計分析，以 ANOVA 程序作變異分析，並且以 Duncan's Multiple Range tests 作顯著性差異的比較($P < 0.05$)。



四、結果與討論

購買自台南市場的海蝦，放置於室溫三日任其腐敗，經過 Brain Heart Infusion (BHI) 培養基以及 *Pseudomonas* Isolation (PI) 培養基培養、畫線培養、純化經過顯微鏡與商用快速鑑定套件 API 20 E 以及 API 20 NE (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, MO) 篩選得到腐敗菌 *Chryseomonas lutoela*。此外購買自新竹食品工業發展研究所菌種中心之 *Chryseomonas lutoela* (*Pseudomonas lutoela* ATCC 43273) 用來作為對照組，用來比較從蝦子身上所純化得到的 *Chryseomonas lutoela* 菌株之效力。



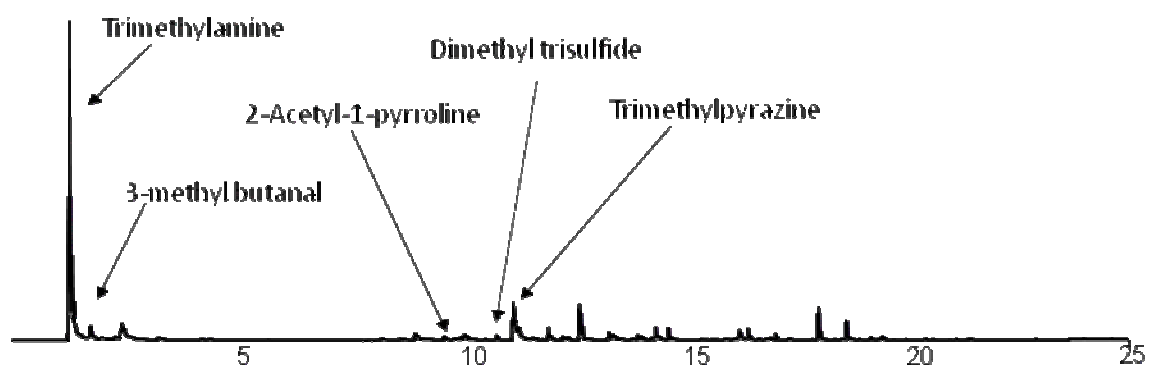
圖一、*Chryseomonas lutoela* (*Pseudomonas lutoela* ATCC 43273)



圖二、API 20 E 以及 API 20 NE

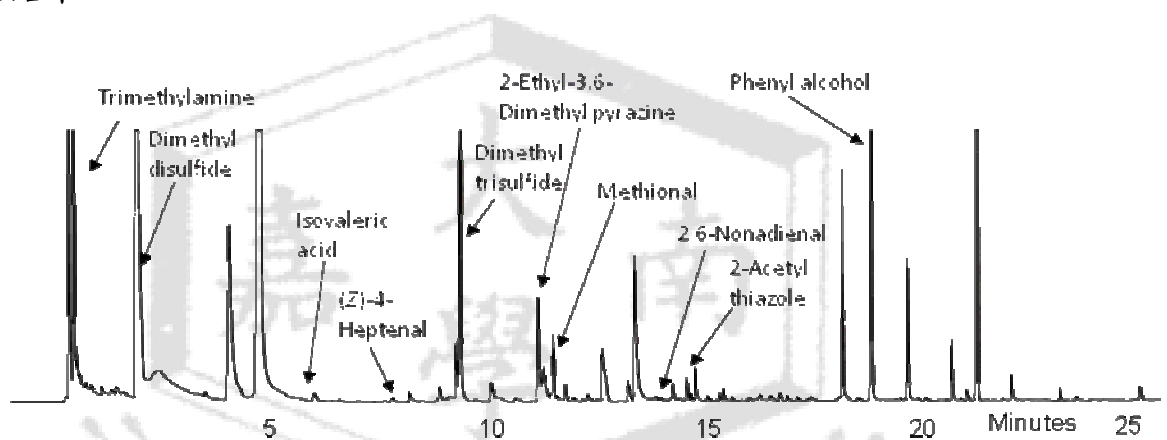
Chryseomonas lutoela 於 1985 年被重新分類為假單孢菌屬 (Pseudomonadaceae) 而改名為 *Pseudomonas lutoela*，是一種革蘭氏陰性菌，在顯微鏡下呈現微微彎曲的短桿狀，常被發現於生活週遭的食物或是環境中(Holt et al. 1994)。尤其在腐敗的魚貝類(Liston, 1980; Leita, 1983)、雞肉(Freeman et al., 1976)或是牛奶(walker, 1988; Hayes, 2002)中。

分別在室溫(23 °C)及冷藏(-7 °C)環境下，依照實驗組以及對照組分別將腐敗菌 *Chryseomonas lutoela* 菌株接種到經過處理的蝦子受體上，再分別以頂空固相微萃取技術 (Solid Phase MicroExtraction/SPME) 配合 Static Headspace Analysis、Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS)、SPME/Gas Chromatography Olfactometry (SPME-GCO)、Osme Analysis 等技術來分析在控制條件下 *Chryseomonas lutoela* 菌株所釋放出之氣味物質，並鑑定出蝦子在腐敗期間所產生的關鍵氣味以及成分，其結果如下：



圖三、新鮮蝦子(對照組)之氣相層析/質譜分析圖譜

圖三為對照組，為新鮮蝦子經氣相層析儀與質譜儀以及 Osme 官能分析所分析之結果，其關鍵氣味物質分別為 trimethylamine, 3-methyl butanal, 2-acetyl-1-pyrroline, dimethyl trisulfide, 以及 trimethylpyrazine。表一 與 圖四為將 *Chryseomonas lutoela* 接種到經過處理的蝦子受體後經氣相層析儀與質譜儀以及 Osme 官能分析所分析之結果。



圖四、經接種 *Chryseomonas lutoela* 之蝦子的氣相層析/質譜分析圖譜

其關鍵氣味物質分別為 trimethylamine, dimethyl disulfide, isovaleric acid, 4-heptenal, dimethyl trisulfide, methional, 2-acetyl-thiazole, 以及 phenyl alcohol 等。

其中以 dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, methional 等硫化物氣味物質以及短鏈脂肪酸 isovaleric acid, butyric acid 等是經過 *Chryseomonas lutoela* 菌株作用後所釋放出造成蝦子迄未改變之氣味物質。

no.	component	KI ^a		aroma descriptor
		Wax	DB-5ms	
1	trimethylamine	< 700	<500	Fishy, ammonia
2	methanethiol	< 700	<500	Garbage/cabbage
3	3-methyl butanal	916	627	Dark chocolate
4	2,3-butanedione	988	621	Buttery
5	pyrrolidine	1007	n.a.	Raw egg/bloody
7	methyl, 3-methylbutanoate	1023	n.a.	Fruity/floral
8	ethyl butyrate	1028	800	Fruity
9	dimethyl disulfide	1035	n.a.	Onion/sulfurous
10	thiophene	1047	n.a.	Skunky, coffee
11	2-methylthiophene	1084	n.a.	Sulfurous
14	3-methyl-1-butanol	1164	n.a.	Dark chocolate
15	isovaleric acid	1193	872.	Sweaty
16	(Z)-4-heptenal	1249	906	Rancid/fishy
17	1-octen-3-one	1302	974	Mushroom/solvent
18	2-methyl-3-furanthi ol	1320	871	Cooked rice/meaty
19	2-acetyl-1-pyrroline	1340	918	Popcorn
20	2,4,5-trimethyl thiazole	1348	n.a.	Metalic/stale
21	dimethyl trisulfide	1364	969	Cabbage/cat urine
22	(Z)-1,5-octadien-3-o ne	1379	977	Metallic/garlic
23	2,3,5-trimethylpyraz ine	1404	1004	Nutty, earthy
24	(E)-2-octenal	1421	1060	Minty, nutty
25	2-ethyl-3,5-dimeth ylpyrazine	1440	1085	Corn chip/dusty
26	methional	1458	904	Soy sauce/potato
29	(E,Z)-2,6-nonadien al	1597	1150	Cucumber
30	2-acetyl-3-methyl pyrazine	1624	1089	Popcorn/stale
31	2-acetylthiazole	1649	1027	Popcorn/corn chip
32	furfuryl alcohol	1653	811	Vitamin/sulfurous
33	butanoic acid	1679	826	Rancid/sweaty/stale
36	2-acetyl-2-thiazolin e	1764	1105	Popcorn
37	phenylethyl alcohol	1906	1112	Alcohol/floral
38	phenylmethyl alcohol	1910	n.a.	Rosy/floral
39	phenol	1956	973	Stale/plastic
41	furaneol	2023	1070	Cotton candy
42	<i>p</i> -cresol	2098	1103	Barney
43	<i>o</i> -aminoaceto phenone	2227	1309	Floral/stench

表一、經接種 *Chryseomonas lutoela* 之蝦子的氣相層析/質譜分析

五、參考文獻

- Acree, T. E.; Barnard, J.; Cunningham, D. G. A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chem.* **1984**, *41*, 1698-1703.
- Amoore, J. E.; Forrester, L. J.; Buttery, R. G. Specific anosmia to 1-pyrroline: the spermous primary odor. *J. Chem. Ecol.* **1975**, *1*, 299-302.
- Angel, S.; Basker, D.; Kanner, J.; Juven, B. J. Assessment of shelf life of fresh water prawns stored at 0 °C. *J. Food Technol.* **1981**, *16*, 357-366.
- Baek, H. H.; Cadwallader, K. R. Enzymic hydrolysis of crayfish processing byproducts. *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 929-935.
- Baek, H. H.; Cadwallader, K. R. Character-impact aroma compounds of crustaceans. In *Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods*; Shahidi, F.; Cadwallader, K. R., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1997; pp 85-94.
- Botta, J. R. Freshness quality of seafoods: a review. In *Seafoods Chemistry, Processing Technology and Quality*; Shahidi, F. and Botta, J. R., Eds.; Blackie Academic & Professional: London, **1994**; pp. 140-167.
- Brenner, D.J.; Farmer III, J.J.; Fanning, G.R.; Steigerwalt, A.G.; Klykken, P.; Wathen, H.G.; Hickman, F.W.; Ewing, W.H. Deoxyribonucleic acid relatedness of *Proteus* and *Providencia* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1978**, *28*, 269-282.
- Cann, D. C. Bacteriological of shellfish with reference to international trade. In *Handling Processing and Marketing*

of Tropical Fish. Tropical Products Institute: London, England, 1977; pp 377-394.

Cobb III, B. F.; Vanderzant, C. Biochemical changes in shrimp inoculated with *Pseudomonas*, *Bacillus* and a coryneform bacterium. *J. Milk Food Technol.* **1971**, *34*, 533-540.

Cobb III, B. F.; Alaniz, I.; Thompson, C. A. Biochemical and microbial studies on shrimp: volatile nitrogen and amino nitrogen analysis. *J. Food Sci.* **1973**, *38*, 431-436.

Collins, C. H. and Lyne, P. M. *Microbiological methods*. Butterworths, Boston, USA. **1976**.

Cox, N. A.; Lovell, R. T. Identification and characterization of the microflora and spoilage bacteria in freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*). *J. Food Sci.* **1973**, *38*, 679-681.

Da Silva, M. A. A. P.; Elder, V.; Lederer, C. L.; Lundahl, D. S.; McDaniel, M. R. Flavor properties and stability of a corn-based snack: relating sensory, gas chromatography, and mass spectrometry data. *Dev. Food Sci.* **1993**, *33* (Shelf Life Studies of Foods and Beverages), 707-738.

Hanfman, D. T. Freshwater shrimp and prawns. *Quick Bibliogr. Ser. Natl. Agric. Libr. U. S.* **1987**, *87-18*, 1-7.

Hartman, G. J.; Carlin, J. T.; Scheide, J. D.; Ho, C.-T. Volatile products formed from the thermal degradation of thiamin at high and low moisture levels. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 1015-1018.

Hayes, W.; White, C. H.; Drake, M. A. Sensory aroma characteristics of milk spoilage by *Pseudomonas* species. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 448-454.

Holt, J.G., ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA **1986**.

Holt, J.G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams, S. T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*; The Williams and Wilkins Co.: Baltimore, USA, **1994**.

Josephson, D. B.; Lindsay, R. C.; Stuiber, D. A. Identification of compounds characterizing the aroma of fresh whitefish (*Corogonus clupeaformis*). *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 326.

Josephson, D. B.; Lindsay, R. C.; Stuiber, D. A. Biogenesis of lipid-derived volatile aroma compounds in the emerald shiner (*Notropis atherinoides*). *J. Agric. Food Chem.* **1984b**, *32*, 1347-1352.

Josephson, D. B.; Lindsay, R. C.; Stuiber, D. A. Volatile compounds characterizing the aroma of fresh Atlantic and Pacific oysters. *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 5-9.

Josephson, D. B.; Lindsay, R. C. Enzymatic generation of volatile aroma compounds from fresh fish. In *Biogenesis of aromas*; Parliament, T. H., Croteau, R., Eds.; ACS symposium series: American Chemical Society: Washington, DC, **1986**; pp 201-219.

Josephson, D. B.; Lindsay, R. C. Olafsdottir, G. In *seafood quality determination*. Elsevier Science Publishers: Amsterdam, **1987**; pp 27-47.

Karahadian, C.; Lindsay, R. C. Role of oxidative processes in the formation and stability of fish flavors. In *Flavor Chemistry: Trends and Developments*; Teranishi, R., Buttery, R. G., Shahidi, F., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, **1989**; pp 60-75.

Kikuchi, T.; Wada, S.; Suzuki, H. Significance of volatile bases and volatile acids in the development of off-flavor of fish

meat. *Eiyō to Shokuryō*. **1976**, 29, 147-152.

Kobatake, M.; Tonogai, Y.; Ito, Y. Proteolytic and lipolytic activities of bacteria isolated from spoiled seafoods. *Natl. Inst. Hyg. Sci. (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*. **1987**, 28, 30-35.

Kubota, K.; Kobayashi, A.; Yamanishi, T. Some sulfur-containing compounds in cooked odor concentrate from boiled Antarctic krills (*Euphausia superba* Dana). *Agric. Bio. Chem.* **1980**, 44, 2677-2682.

Regenstein, J. M.; Schlosser, M. A.; Samson, A.; Fey, M. Chemical changes of trimethylamine oxide during fresh and frozen storage of fish. In *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*; Martin, R.E., Flick, G. J., Hebard, C. E., Ward, D. R., Eds.; AVI Publishing Co.: Westport, CT, 1982; pp 137-149.

Roberts, D. D.; Acree, T. E. Gas chromatography-olfactometry of glucose-proline Maillard reaction products. *ACS Symp. Ser.* **1994**, 543(*Thermally Generated Flavors*), pp.71-79.

Sumner, J. L.; Gorczyca, E.; Cohen, D.; Brady, P. Do fish from tropical waters spoil rapidly in ice than fish from temperature waters? *Food Technol.* **1984**, 36, 328.

Van der Vossen, J.; Hofstra, H. DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, 33, 35-49.