

成品酱油微生物污染变质的风险预警

Risk pre-warning of deterioration in finished sauce with microbial contamination

蒋雪薇¹ 叶菁¹ 周尚庭² 许延涛¹ 傅玉林² 陈胜²

JIANG Xue-wei¹ YE Jing¹ ZHOU Shang-ting² XU Yan-tao¹ FU Yu-lin² CHEN Sheng²

(1. 长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410004; 2. 加加食品集团股份有限公司, 湖南 长沙 410600)

(1. College of Chemical & Biological engineering, Changsha University of Science & Technology,

Changsha, Hunan 410004, China; 2. Changsha Jiajia Food Co., Ltd., Changsha, Hunan 410600, China)

摘要:为对微生物污染引起的成品酱油变质进行风险预警, 对比研究了成品变质酱油和未变质酱油中还原糖、总酸、氨态氮以及双乙酰 4 种理化指标。结果表明:耐盐芽胞杆菌污染引起的成品酱油变质, 其理化指标产生较大变化, 其中还原糖含量大幅下降, 总酸、氨态氮以及双乙酰含量明显升高, 经测定还原糖含量降幅 60%, 总酸含量升幅 32%, 氨态氮含量升幅 6.0%、双乙酰含量升幅 20.4% 时, 成品酱油已出现变质现象, 可以判断为变质。

关键词:成品变质酱油; 风险预警; 微生物污染

Abstract: In order to achieve the purpose of the risk pre-warning about the deterioration occurring in the finished sauce with microbial contamination, 4 kinds of physicochemical indexes were compared and analyzed, including the content of reducing sugar, total acid, ammoniacal nitrogen and diacetyl. The results showed that the finished sauce deteriorated because of the contamination of salt-tolerance bacillus, and its physicochemical indexes changed significantly. The reducing sugar content decreased drastically and the content of total acid, ammoniacal nitrogen and diacetyl increased obviously. It can be judged that the sauce is deteriorated while the decreasing amplitude of reducing sugar content reach to 60%, and the increasing amplitude of total acid content reach to 32%, ammoniacal nitrogen content 6.0% and diacetyl content 20.4%.

Keywords: finished deterioration sauce; risk pre-warning; microbial contamination

酱油是中国及东南亚一带使用非常广泛的一种传统调味品^[1]。目前中国酱油的年产量已达到 900 多万 t^[2]。酱油

作为中国调味品行业第一大产业, 在食品经济中占据举足轻重的地位^[3]。近年来中国酱油产业增速十分迅猛, 呈现出十分可观的发展前景。但是, 随着人们食品安全意识的提高, 酱油变质的现象也越来越受重视。由于酱油发酵中食盐的使用量较高, 生产管理比较粗放, 容易出现微生物污染问题^[4], 有些耐盐污染微生物的代谢会导致成品酱油出现酸馊、混浊、涨袋或爆瓶等现象^[5-6]。笔者^[7]在对成品酱油变质原因的研究中发现, 耐盐的芽胞杆菌在微好氧或厌氧条件下能在成品酱油中生长繁殖, 利用酱油中的还原糖等物质代谢并产酸及具有馊味的物质, 同时产气, 致使成品酱油变质。变质的成品酱油在其浓郁的风味掩盖下单纯靠感官分析判断容易出现争议, 难以准确判定并提示风险, 因此, 急需提出客观的指标对其进行界定, 以便生产单位及时发现问题, 实现风险预警。目前, 酱油的理化指标主要用于其质量评定以及分类^[8-9], 变质酱油理化指标变化情况的研究尚未见报道。为此, 本试验拟以成品变质酱油及未变质酱油为研究对象, 分析其氨态氮、还原糖、总酸、双乙酰等重要理化指标, 对比研究上述各项指标的变化规律, 得出基于理化指标的酱油变质界定依据, 为成品酱油变质的判断、风险预警及防控提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品

成品未变质酱油样(A₁~A₅):生抽 20140930、生抽 20141031、生抽 20141004、生抽 20140915、生抽 20141020, 每批次取 20 瓶, 湖南某酱油厂;

成品变质酱油样(B₁~B₅, 微生物污染变质样品):生抽 20140620、生抽 20140630、生抽 20140614、生抽 20140719、生抽 20140829, 每批次取 20 瓶, 湖南某酱油厂;

1.1.2 主要药品及试剂

酒石酸钾钠、NaOH、次甲基蓝:分析纯, 广东光华化学

基金项目:长沙市科技计划重大专项(编号:K1404052-21, K1502032-21); 湖南省科技计划项目(编号:2013FJ4036)

作者简介:蒋雪薇(1972—), 女, 长沙理工大学副教授, 博士, 硕士生导师。E-mail:jxw_72@sina.com

收稿日期:2015—09—14

厂有限公司；

葡萄糖、盐酸、浓硫酸、甲醛、邻苯二胺：分析纯，国药集团化学实有限公司；

硫酸铜(CuSO₄ · 5 H₂ O)：分析纯，西陇化工股份有限公司。

1.1.3 仪器

酸度计：FE28 型，瑞士梅特勒—托利多国际股份有限公司；

磁力搅拌器：79-2 型，金坛市普瑞斯机械有限公司；

紫外分光光度计：Blue Star 型，北京莱伯泰科仪器股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 还原糖测定 按 GB/T 5009.7—2008 执行，成品酱油和变质酱油每批次(20 瓶)测一次，取平均值。

1.2.2 总酸测定 按 GB/T 5009.39—2003 执行，成品酱油和变质酱油每批次(20 瓶)测一次，取平均值。

1.2.3 氨基酸态氮测定 按 GB 18186—2000 的甲醛值法执行，成品酱油和变质酱油每批次(20 瓶)测一次，取平均值。

1.2.4 双乙酰测定 在双乙酰蒸馏装置中加入 100 mL 酱油，加热至微沸，冷凝液收集于盛 2.5 mL 蒸馏水的 25 mL 容量瓶，并定容、摇匀。分别吸取馏出液 10.0 mL 于两支比色管中，样品管加入邻苯二胺溶液 0.50 mL，空白管则不加，充分摇匀后，同时于暗处放置 20~30 min。再向样品管和空白管中分别加入 4 mol/L 盐酸溶液 2.0、2.5 mL，混匀后，于 335 nm 波长下，用 10 mm 玻璃比色皿，以空白调仪器零点，测定其吸光度。比色测定操作须在 20 min 内完成^[10]。成品酱油和变质酱油每批次(20 瓶)测一次，取平均值。双乙酰含量按式(1)计算：

$$X = A_{335} \times 2.4,$$

式中：

X——试样中双乙酰的含量，mg/L；

A₃₃₅——试样在 335 nm 波长下，用 10 mm 比色皿测得的吸光度；

2.4——用 10 mm 比色皿时，吸光度与双乙酰含量的换算系数。

2 结果与分析

2.1 变质酱油还原糖含量变化及原因分析

酱油中的还原糖主要有葡萄糖、甘露糖、半乳糖、麦芽糖等^{[11]5}。还原糖作为一种重要的营养物质，大部分微生物的生长繁殖过程都需要还原糖参与到其代谢途径中，所以还原糖的变化能直观反映出酱油中微生物的生长情况。分别对未变质酱油和变质酱油各 100 瓶(5 批次)进行还原糖含量测定，结果见图 1。由图 1 可知，变质酱油中还原糖含量的平均值为 6.7 g/L，而未变质酱油中还原糖含量的平均值为 31.2 g/L，变质酱油还原糖含量出现大幅下降，平均降幅为 78.5%，最低降幅为 61.5% (样品 B₂)。成品酱油中的还原糖主要来源于制曲及发酵过程中，原料小麦中的淀粉被酶解得到还原糖，这些还原糖一部分在酱油发酵过程中被代谢成为其它产物，另一部分则进入成品酱油中，因此，成品酱油是

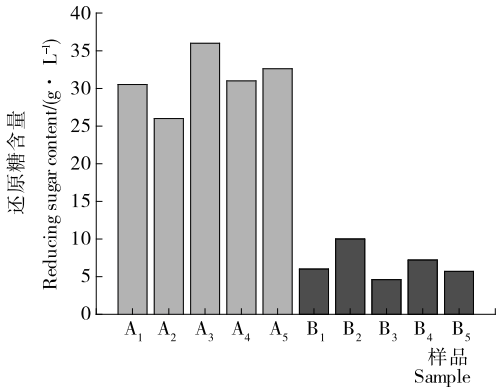


图 1 变质酱油与未变质酱油还原糖含量对比
Figure 1 Comparison of reducing sugar content in deterioration/non-deterioration sauce

具有一定的还原糖含量的。变质酱油由于污染了耐盐的细菌，这些细菌在高盐的成品酱油中生长繁殖并代谢产杂酸及其他代谢产物，大量消耗了酱油中的还原糖，导致还原糖含量大幅下降，因此，可以判断当成品酱油中还原糖含量大幅下降时，有变质的风险，从图 1 最低降幅数据可以看出，还原糖降幅≥60%时，成品酱油可以判断为变质酱油。

2.2 变质酱油总酸含量变化及原因分析

酱油的总酸通常是指酱油中所含有的乳酸、醋酸、琥珀酸等各种有机酸^{[11]5}，其主要是发酵过程中乳酸菌等菌种分解糖类底物而生成的。乳酸、醋酸等有机酸也是酱油重要的风味物质，在一定范围内能增进酱油风味，产生爽口的感觉^[12]。成品酱油污染耐盐细菌后，耐盐细菌能利用酱油中的还原糖在微好氧或厌氧的条件下继续代谢产酸，致使酱油总酸升高，超过中国国标规定值后，给成品酱油带来刺激性的酸味，酱油出现明显的感官变化。由图 2 可知，变质样品中的总酸含量平均值达到 31 g/L，高于 GB/T 4928—2008 的限制标准(25 g/L)，比未变质样品中总酸含量的平均值(20.4 g/L)高 10.6 g/L；可以看出，污染耐盐细菌的变质酱油出现总酸含量的明显升高，其平均升幅为 52.0%，最低升幅为 31.4%。笔者^[7]在前期研究中发现，成品酱油遭巨大芽胞杆菌污染能导致酱油变质，与张晓丽等^[5]的研究结果一致。巨大芽胞杆菌能够在成品酱油中利用还原糖发酵产酸及 CO₂，从而导致污染样品总酸高于未变质酱油。因此，可以判断当成品酱油中总酸含量超过 GB/T 4928—2008 标准限值时，有变质的风险，从图 2 最低升幅数据可以看出，总酸升幅≥32%时，成品酱油可以判断为变质酱油。

2.3 变质酱油氨态氮含量变化及原因分析

酱油中的氨基酸态氮是指以氨基酸形式存在的氮，主要由原料大豆中的蛋白质在米曲霉蛋白酶的作用下水解生成^{[11]1-2}，该值是酿造酱油分级的重要指标之一，与酿造酱油的呈味能力有着重要的关系，也是区分酿造酱油与配制酱油，显示酿造酱油发酵程度及发酵水平的特性指标^[13]。本试验选取一级酱油为研究对象(氨态氮含量≥7.0 g/L^[10])对比研究变质酱油与未变质酱油氨态氮含量的差别，结果见图 3。由图 3 可知，未变质样品的氨态氮含量平均值为 7.528 g/L，

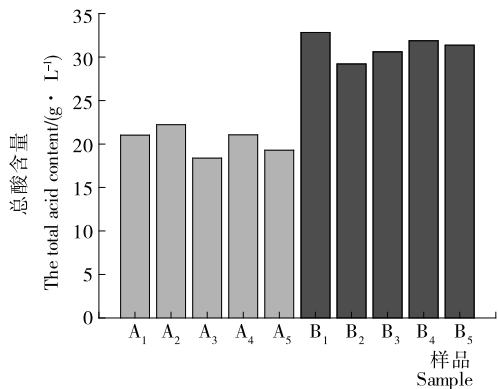


图 2 变质酱油与未变质酱油总酸含量对比

Figure 2 Comparison of total acid content in deterioration/non-deterioration sauce

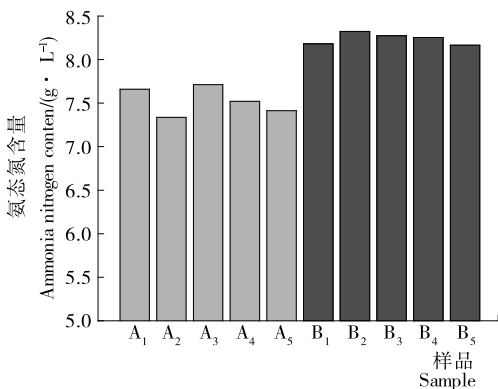


图 3 变质酱油与未变质酱油氨态氮含量对比

Figure 3 Comparison of ammonia nitrogen content in deterioration/non-deterioration sauce

而变质酱油的氨态氮含量比未变质样品中的含量高约 0.7 g/L, 平均值达到 8.239 g/L, 已达到特级酱油标准。

目前, 酱油行业内普遍认为, 酱油中氨基酸态氮含量越高, 酱油的鲜味越好, 品质口感也就越好。但是, 变质酱油的氨态氮含量升高, 风味却变差, 说明氨态氮含量的高低不能完全反应酱油风味的好坏^[14]。受细菌污染的成品酱油氨态氮含量不降反升, 究其原因可能是由于酱油中耐盐污染细菌多为芽胞杆菌^[5-7], 其具有较好的蛋白质分解能力, 能将酱油中的可溶性蛋白质及多肽等大分子含氮物质进一步降解成为氨基酸, 从而导致变质酱油氨态氮含量升高。由图 3 可知, 变质酱油氨态氮含量相比未变质酱油平均升幅为 9.4%, 最低升幅为 5.9%, 可以判断, 成品酱油氨态氮升高可能伴随酱油的变质, 由图 3 氨态氮含量最低升幅数据可以看出, 氨态氮升高约 6.0% 时, 成品酱油可以判断为变质酱油。

2.4 变质酱油双乙酰含量变化及原因分析

双乙酰的稀溶液有奶香味, 但是一旦超过阈值就会产生让人不愉快的馊味^[15]。目前, 对双乙酰的研究大多集中在啤酒或乳制品行业^[16], 酱油中迄今未见相关报道。感官试验对比分析变质酱油与未变质酱油, 可以发现变质样品感官评定结果明显差于未变质酱油, 酱油典型的酱香气味变寡变淡且产生明显的酸馊味。对变质样品及未变质样品馊味物

质——双乙酰进行分析, 其结果见图 4。由图 4 可知, 未变质酱油双乙酰含量平均值为 0.994 6 mg/L, 而变质酱油双乙酰含量的平均值已达 1.240 6 mg/L, 较未变质酱油平均升高了 24.7%, 最低升幅为 20.4%。双乙酰在啤酒中的阈值较小, 约为 0.15 mg/L^[17], 酱油浓郁的酱香对双乙酰的馊味有掩盖及调节作用, 因此, 酱油中双乙酰阈值应远高于啤酒, 故未变质酱油双乙酰含量平均检出为 0.994 6 mg/L 时, 也未出现馊味。当酱油被耐盐芽胞杆菌污染时, 芽胞杆菌具有 VP 试验阳性的生理特征, 即厌氧发酵还原糖产生中性物质——双乙酰的能力强, 能迅速在成品酱油中产生大量的双乙酰, 致使酱油产生了酱香无法掩盖的馊味, 出现变质气味。由图 4 的数据可以看出, 双乙酰含量升幅达 20.4% 时, 成品酱油出现明显馊味, 可以判断为变质酱油。

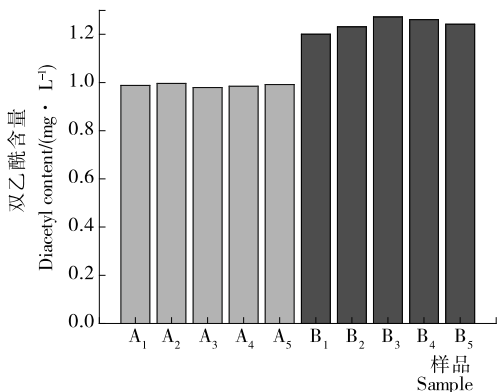


图 4 变质酱油与未变质酱油双乙酰含量对比

Figure 4 Comparison of diacetyl content in deterioration/non-deterioration sauce

3 结论

成品酱油的污染菌一般是耐盐的芽胞杆菌, 其在酱油高渗、微好氧或厌氧环境下繁殖代谢, 利用酱油中的还原糖等物质产酸及馊味物质, 致使成品酱油产生酸馊味而变质。本试验对比研究了成品变质酱油和未变质酱油的还原糖、总酸、氨态氮以及双乙酰等理化指标, 发现耐盐芽胞杆菌污染引起的成品酱油变质会出现还原糖含量大幅下降, 总酸含量、氨态氮含量以及双乙酰含量明显升高的现象, 经测定还原糖含量降幅 60%, 总酸含量升幅 32%, 氨态氮含量升幅 6.0%、双乙酰含量升幅 20.4% 时, 成品酱油已变质, 出现明显的酸馊味。

微生物污染是食品质量安全风险的主要来源, 但目前针对成品酱油变质风险预警的相关研究还未见报道。本试验对比研究了微生物污染引起的成品变质酱油与未变质酱油的相关理化指标, 分析得出了比较合理地判断酱油变质的理化指标数据, 为成品酱油微生物污染引起的变质提供了比较客观的判断依据。今后随着电子鼻、指纹图谱及污染微生物增殖模型预测等技术的应用, 将在变质酱油特征标志性指标及其阈值的确定、变质预测等方面开展深入的研究, 实现成品酱油变质与否的快速无损检测及准确风险预警。

参考文献

[1] Li Ying, Zhao Hai-feng, Zhao Mou-ming, et al. Relationships between antioxidant activity and quality indices of soy sauce: an application of multivariate analysis[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 45(1): 133-139.

[2] 程鹏. 2014 年中国酱油产量统计分析[EB/OL]. (2015-02-04) [2016-05-11]. <http://www.askci.com/news/chanye/2015/02/04/165020koaw.shtml>.

[3] 陈思玺. 我国调味品行业发展分析[J]. 科技创新导报, 2014 (23): 201-204.

[4] Wei Quan-zeng, Wang Hong-bin, Chen Zhi-xin, et al. Profiling of dynamic changes in the microbial community during the soy sauce fermentation process[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2013, 97(20): 9 111-9 119.

[5] 张小丽, 蒋予箭, 李锋. 导致酱油胀袋微生物的分离与鉴[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(7): 51-55.

[6] 郭天文, 叶红. 解决酱油货架期涨袋,爆瓶的探讨[J]. 中国酿造, 2010(3): 138.

[7] 蒋雪薇, 周尚庭, 叶菁, 等. 成品变质酱油中微生物的分离鉴定及变质原因分析[J]. 食品与机械, 2016, 32(2): 46-50.

[8] 王美茜, 孙海燕, 李晓红. 2002 年沈阳市销售酱油理化指标的全面调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(5): 584.

[9] 尤生萍, 肖华志, 孙亚培, 等. 市售酱油常用理化指标的检测分析[J]. 中国调味品, 2011, 36(4): 98-101.

[10] 中国国家标准化管理委员会. GB 18186—2000 酿造酱油[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.

[11] 赵谋明. 调味品[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.

[12] Steinhaus P, Schieberle P. Characterization of the key aroma compounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 6 262-6 269.

[13] Chen Yan-qing, Ni Yong-nian, Kokot Serge. Discriminat ion of Chinese tradit ional soy sauces based on their physico-chemical prop- erties[J]. Science China • Chemistry, 2010, 53(6): 1 406-1 413.

[14] 刘婷婷, 蒋雪薇, 周尚庭, 等. 高盐稀态发酵与低盐固态发酵酱油中次生菌群分析[J]. 食品与机械, 2010, 26(6): 13-17.

[15] 王莉, 林琳, 汪地强, 等. 应用 HS—GC—MS 法分析白酒中的双乙酰[J]. 酿酒科技, 2014(8): 91-93.

[16] 祝美云, 李厚强. 啤酒双乙酰测定影响因素的研究[J]. 食品科 技, 2008(4): 184-186.

[17] 中国国家标准化管理委员会. GB 4927—2008 啤酒[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.

(上接第 32 页)

[11] Le-Bail A, Hamadami N, Bahuaud S. Effect of high-pressure pro- cessing on the mechanical and barrier properties of selected packaging [J]. Packaging Technology and Science, 2006, 19(4): 237-243.

[12] Yoo S, J Lee, C Holloman, et al. The effect of high pressure processing on the morphology of polyethylene films tested by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction and its in- fluence on the permeability of the polymer [J]. Journal of Ap- plied Polymer Science, 2009, 112(1): 107-113.

[13] Largeteau A, Angulo I, Coulet J P, et al. Evaluation of films for packaging applications in high pressure processing [J]. Journal of Physics: Conference Series, 2010, 215(1): 1-11.

[14] Schmerder A, Richter T, Langowski H C, et al. Effect of high hydrostatic pressure on the barrier properties of polyamide-6 films [J]. Brazilian Journal of Medical and Biologial Research, 2005, 38(8): 1 279-1 283.

[15] 龚怡. 超高压和中温的联合作用机理及其应用[D]. 无锡: 江南 大学, 2014: 37-44.

[16] 汪俊涵, 叶盛英, 徐尚和, 等. 高压食品包装材料性能研究进 展[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2011, 29(2): 7-12.

[17] 吴敏. 包装工程实验[M]. 北京: 印刷工业出版社, 2009: 49- 75, 109-110, 188-194.

[18] 张德鹏, 郭敏, 潘国元, 等. 提高 HDPE 阻隔性能的方法[J]. 合成树脂及塑料, 2011, 28(5): 68-72.

[19] 王徽山, 赵江. 水蒸气透过率、透过量与透过系数的应用 [J]. 塑料科技, 2008, 36(5): 70-72.

[20] Fairclough J P A, Conti M. Influence of ultra-high pressure sterilization on the structure of polymer films [J]. Packaging Technology and Science, 2009, 22(5): 303-310.

[21] Seungram Yoo, Holloman C, Tomasko D, et al. Effect of high pressure processing on the thermal and mechanical properties of polyethylene films measured by dynamical mechanical and ten- sile analyses [J]. Packaging Technology and Science, 2013, 27 (3): 169-178.

[22] 丘苑新, 叶盛英, 徐尚和, 等. 超高压处理对食品软包装材料 性能的影响[J]. 食品工业科技, 2005, 26(11): 140-141.

(上接第 66 页)

[12] 田静. 熟肉制品中单增李斯特菌的风险评估及风险管理措施的 研[D]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 23-25.

[13] 张培培. 冷鲜猪肉中主要病原菌检测及单增李斯特菌的生长预 测模型比较[D]. 浙江: 教育出版社, 2011: 50-54.

[14] Koseki S. Microbial Responses Viewer (MRV): a new Com- Base-derived database of microbial responses to food environ- ments[J]. Food Microbiology, 2009, 134(23): 75-82.

[15] Masana M, Baranyi J. Growth/no growth interface of Brocho- thrix thermosphacta as a function of pH and water activity[J]. Food Microbiology, 2000, 17(5): 485-493.

[16] Geeraerd A H, Valdramidis V P. A freeware tool to assess non- log-linear microbial survivor curves [J]. Food Microbiology, 2005, 102(12): 95-105.

[17] McDonald K, Sun D. Predictive food microbiology for the meat industry[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 52(6): 1-27.

[18] Kusisk A, Kera J A, Kernstine K H. Autonomous decision making: A data mining approach[J]. IEEE Transactions on Neural Networks, 2000, 4(4): 274-276.

[19] Alfaro B, Pin C. Modelling the effect of the temperature and carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria in packed fish products[J]. Food Control, 2013, 29(2): 429-437.