

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20620071150897

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

药用植物提取物在防治酱油发酵染菌
和酱油防腐中的应用研究

Studies on the Effects of the Medicinal Plant Extracts
against Microbes in Sauce Fermentation and Antisepsis

邵文尧

指导教师姓名: 李 清 彪 教 授

专业名称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2 0 1 0 年 月

论文答辩日期: 2 0 1 0 年 月

学位授予日期: 2 0 1 0 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010年8月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

酱油发酵属敞开式发酵，染菌在目前不可避免，只能通过改善发酵环境和控制人为污染来减少染菌程度，酱油发酵染菌影响着酱油的品质和产量。另一方面，化学合成类食品防腐剂由于对人体健康存在着威胁使酱油的防腐也越来越引发重视，因此已产生了使用安全天然代替品的迫切要求。本论文主要研究药用植物提取物在防治发酵染菌和生酱油防腐中的应用。

以酱油发酵的主发酵菌米曲霉和主要的污染杂菌毕赤氏酵母、枯草芽孢杆菌为对象，采用滤纸片法测定了 118 种植物提取物对三菌株的抗菌性能。结果表明，乌梅、大黄、丁香、石榴皮 4 种药用植物提取物对枯草芽孢杆菌和毕赤氏酵母均有强烈抑制作用；黄连和山茱萸提取物对枯草芽孢杆菌有强烈抑制作用，女贞子和麻黄提取物对毕赤氏酵母有强烈抑制作用；以上 8 种药用植物提取物对米曲霉均无抑制作用。

采用比浊法和细胞干重法进一步研究了乌梅和丁香等提取物对毕赤氏酵母、枯草芽孢杆菌和米曲霉的抑制效果。结果显示乌梅、丁香和黄连提取物均能有效抑制枯草芽孢杆菌生长，且浓度越高，抑制效果越好，低浓度的乌梅、丁香和黄连反而促进枯草芽孢杆菌生长，在相同浓度下，黄连提取物有效抑菌时间最长；石榴皮、乌梅、丁香、女贞子、麻黄、大黄 6 种药用植物提取物均能有效抑制毕赤氏酵母生长，且浓度越高，抑制效果越好，低浓度的药用植物提取物反而促进毕赤氏酵母生长。

进一步测定乌梅和丁香等提取物对毕赤氏酵母和枯草芽孢杆菌的最低抑菌浓度(minimum inhibition concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimal bacteriocidal concentration, MBC)，结果显示，乌梅与黄连提取物对枯草芽孢杆菌的 MIC 与 MBC 相同且最低，分别为 1.12 g/L 和 2.24 g/L，丁香提取物略高，对枯草芽孢杆菌的 MIC 为 1.48 g/L，MBC 为 5.92 g/L。乌梅与丁香提取物对毕赤氏酵母的 MIC 相同且最小，均为 31.0 g/L，乌梅提取物对毕赤氏酵母的 MBC 为 62.5 g/L，丁香提取物对毕赤氏酵母的 MBC 为 125.0 g/L。

研究混合培养时乌梅和丁香等提取物对主发酵菌米曲霉和主杂菌毕赤氏酵母、枯草芽孢杆菌生长的影响，结果表明，米曲霉和毕赤氏酵母、枯草芽孢杆菌混合培养时，MIC 和 MBC 的乌梅提取物对米曲霉的生长几乎不抑制，对毕赤氏

酵母、枯草芽孢杆菌有较强抑制。乌梅提取液的自然 pH 偏酸，当将其调至中性时，对生产菌和杂菌均无抑制作用，由此推测乌梅的有效抑菌成分可能是某种酸性物质。

分别添加 MIC 的石榴皮 (62.5 g/L)、乌梅 (31.0 g/L)、丁香 (31.0 g/L)、女贞子 (62.5 g/L)、麻黄 (125.0 g/L)、大黄 (62.5 g/L) 六种药用植物提取物于酱油中，使酱油中氨基态氮含量较未添加前提高了 10% 左右，同时赋予酱油较深的颜色。丁香和石榴皮并能增加酱油特殊香气。

考察石榴皮和乌梅等提取物对酱油防腐效果的影响，结果显示，添加石榴皮、乌梅、丁香、女贞子、麻黄、大黄六种药用植物提取物后的生酱油，杂菌被有效杀灭；乌梅、丁香、石榴皮提取物防腐效果强于苯甲酸钠。MIC 和 MBC 的石榴皮、乌梅、丁香、女贞子、麻黄、大黄六种药用植物提取物添加进生酱油后可延长酱油的保质期至大于 2 年，达到国家食品安全规定的酱油保质期 (≥ 6 个月)。

关键词：酱油发酵；染菌；药用植物；防腐；保质期

Abstract

The bacteria-induced contamination in the soy sauce fermentation process has long been an issue, conventional solutions to which often involve either optimization of the fermentation conditions or the addition of antibiotics. Nonetheless, on one hand, a variety of practical problems have arisen as a consequence of antibiotic abusing, including the increased resistance of the bacteria towards antibiotics. On the other hand, though preservatives can efficiently prevent fungi or bacteria contamination and extend the shelflife of foods, chemically synthesized preservatives were found to be harmful to human health. Therefore, safer and natural alternatives are of great need. Medicinal plants, due to their remarkable biological activities, have greatly interested the scientific communities and been widely studied in antibiotic researches. In this thesis, the antibiotic activity and applications of the medicinal plant extracts were investigated for soy sauce fermentation and preservation.

The antibiotic activities of 118 plant extracts against three microorganism strains, including the main fermentation strain *Aspergillus oryzae*, and the contaminating strains *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis*, were studied using the filter paper disk tests. The results showed that extracts of ebony, rhubarb clove and megranate peel presented strong growth-inhibition effects on *Bacillus subtilis* and *Pichia pastoris*. As well, *Bacillus subtilis* was significantly inhibited by extracts of coptis and cornel, while growth of *Pichia pastoris* was seriously suppressed by fructus ligustri lucidi and *Ephdra vulgaris*. In addition, no impact towards *Aspergillus oryzae* was observed for all of the above plant extracts .

To further study the anti-bacterial activity towards the above three bacteria, turbidimetry and cell dry weight methods were employed. The results verified the efficient inhibition effects of ebony, clove and coptis on growth of *Bacillus subtilis* while coptis possessed the longest time of inhibition under the same concentration. The inhibition effect increased with increasing extract concentration, yet ebony, clove and coptis of low concentration was found to promote the growth of *Bacillus subtilis*. Megranate peel, ebony, clove, *Ephdra vulgaris*, rhubarb could all efficiently inhibit the

growth of *Pichia pastoris* with similar activity. which also increased with increasing extract concentration. As well, such extracts of low concentration could also enhance the growth of *Pichia pastoris*.

Minimal inhibition concentration (MIC) of Ebony and clove extracts and minimal bacteriocidal concentration (MBC) against *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis* were measured, respectively. Ebony and coptis had the lowest MIC and MBC (1.12 g/L and 2.24 g/L, respectively) against *Bacillus subtilis* while for Clove extract, its MIC and MBC against *Bacillus subtilis* were 1.48 g/L and 5.92 g/L, respectively. Ebony and clove extracts also had the lowest MIC (both 31.0 g/L) against *Pichia pastoris* while MBC of Ebony and Clove extract against *Pichia pastoris* was 62.5 and 125.0 g/L. respectively.

Furthermore, the inhibition effects of Ebony and clove extracts on the main fermentation strain, i. e. , *Aspergillus oryzae* and two main contaminating strains i. e. , *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis*, were studied in detail. It was found that, when the three strains were co-cultured together, ebony extract with MIC or MBC had no inhibition on the growth of *Aspergillus oryzae*, but led to strong inhibition against the growth of *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis*. As ebony extract was acidic and no inhibition effect on these three microorganisms was observed when the extract was neutralized in pH, . hence active components in ebony extract might be an organic acid.

It was also found that the addition of megranate peel, ebony, clove, fructus ligustri, ephdra vulgaris, rhubarb led to the darkening of soy source in color, whereas no obvious changes in pH value was observed. And clove and megranate peel conferred a special flavour to soy source. Contrary to the decrement of the content of amino nitrogen after addition of sodium benzoate, the content of amino nitrogen and the nutrient components in the sauce were increased after addition of medicinal plant extracts.

What is more, the preservative effects of extracts of granatum ebony *etc.* were also investigated. It was found that microorganisms in crude soy source was efficiently eliminated after Pasteurization or after being treated by extracts of

granatum, ebony, clove, fructus ligustri, ephdra vulgaris, or rhubarb. Ebony, clove, granatum had demonstrated better preservative capability than sodium benzoate. Further investigation showed that extract of 6 plants, granatum, ebony, clove, fructus ligustri, ephdra vulgaris, rhubarb with MIC and MBC could efficiently prolong the preservation period of the soy sauce, which was even longer than that of the commercial product, e. g. , 2 years for the Dark Soy Sauce. The conservation period was far beyond the national food safety requirement (no less than 6 months).

Key words: soy sauce fermentation, fungi contamination, The Medicinal Plants, antiseptis, conservation period

目 录

摘 要	I
Abstract	I
第一章 文献综述	1
1.1 酱油发酵染菌与防治	1
1.1.1 酱油发酵的发展现状	1
1.1.2 酱油发酵的原料	1
1.1.3 酱油发酵生产菌	2
1.1.4 酱油发酵染菌与防治	3
1.2 生酱油腐败与防腐	5
1.2.1 生酱油腐败原因与危害	6
1.2.2 生酱油防腐现状	7
1.3 药用植物及其抗菌活性的应用	9
1.3.1 黄酮类	10
1.3.2 皂苷类	10
1.3.3 生物碱	11
1.3.4 挥发油类	11
1.3.5 糖类	12
1.3.6 其他	13
1.4 本研究的意义与内容	13
第二章 药用植物提取物控制酱油发酵染菌	15
2.1 引言	15

2.2 实验材料与方法	15
2.2.1 试剂和仪器	15
2.2.2 菌种	15
2.2.3 培养基	15
2.2.4 药用植物	15
2.2.5 实验方法	15
2.3 结果与讨论	18
2.3.1 药用植物对生产菌及杂菌生长的影响	18
2.3.2 药用植物在酱油发酵中 MIC 及 MBC	32
2.3.3 乌梅、黄连及丁香对米曲霉的抑制效果	39
2.3.4 药用植物对混合培养生产菌及杂菌生长的影响	41
2.4 本章小结	44
第三章 药用植物提取物在生酱油防腐上的应用	45
3.1 引言	45
3.2 实验材料与方法	45
3.2.1 试剂和仪器	45
3.2.2 菌种	45
3.2.3 培养基	45
3.2.4 药用植物	45
3.2.5 实验方法	45
3.3 结果与讨论	46
3.3.1 六种药用植物和防腐剂对毕赤氏酵母的 MIC 和 MBC	46
3.3.2 六种药用植物和防腐剂对酱油理化指标的影响	47
3.3.3 六种药用植物和防腐剂对酱油的防腐效果	48

3.3.4 六种药用植物对酱油保质期的影响.....	49
3.4 本章小结	51
第四章 结论与建议.....	52
4.1 结论.....	52
4.2 建议.....	53
参考文献.....	54
附录一 主要试剂规格、用途.....	58
附录二 主要仪器规格、用途.....	60
在读期间发表的论文	61
致 谢.....	62

Contents

Abstract	I
Chapter 1 Introduction	1
1. 1 Bacterial contaminantion in Sauce Fermentation and its control	1
1. 1. 1 Background of Sauce fermentation.....	1
1. 1. 2 Raw materials for Sauce fermentation.....	1
1. 1. 3 Bacteria for Sauce fermentation.....	2
1. 1. 4 Contamination in Sauce fermentation and its control.....	3
1. 2 Decay of soy sauce and its prevention	5
1. 2. 1 Causes led to decay of soy sauce and its hazardards	6
1. 2. 2 Currention antiseptis of soy sauce.....	7
1. 3 Medicinal Plants and their antimicrobial activities	9
1. 3. 1 Flavonoids.....	10
1. 3. 2 Saponins.....	10
1. 3. 3 Alkaloid.....	11
1. 3. 4 Volatile Oils.....	11
1. 3. 5 Carbonhydrate.....	12
1. 3. 6 Others.....	13
1. 4 Aims and content of this thesis	13
Chapter 2 Application of The Medicinal Plant Extracts in	
bacteria-contamination control in sauce fermentation	15
2. 1 Introduction	15
2. 2 Materials and methods	15
2. 2. 1 Chemical reagents and apparatuses	15
2. 2. 2 Strains.....	15

2. 2. 3 Media	15
2. 2. 4 Medicinal Plants.....	15
2. 2. 5 Experimental methods	15
2. 3 Results and discussion	18
2. 3. 1 Effects of The Medicinal Plant extracts on microbes in sauce fermentation	18
2. 3. 2 The MIC and MBC of Medicinal Plants extracts in sauce fermentation	32
2. 3. 3 Inhabition effects of Medicinal Plants extracts on the <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i>	40
2. 3. 4 Effects of Medicinal Plants extracts on mixture of three microbes ...	41
2. 4 Summary.....	44
Chapter 3 Application of Medicinal Plants extracts in antisepsis in sauce fermentation	45
3. 1 Introduction.....	45
3. 2 Materials and methods	45
3. 2. 1 Chemical reagents and apparatuses	45
3. 2. 2 Strains.....	45
3. 2. 3 Media	45
3. 2. 4 Medicinal Plants.....	45
3. 2. 5 Experimental methods	45
3. 3 Results and discussion	46
3. 3. 1 The MIC and MBC sof six Medicinal Plants and preservatives	46

3. 3. 2 Effects of six Medicinal Plants on the physicochemical properties of sauce.....	47
3. 3. 3 Antisepsis effects of six Medicinal Plants on soy sauce	48
3. 3. 4 Effects of six Medicinal Plants on the preservation time of soy sauce	49
3. 4 Summary.....	51
Chapter 4 Conclusions and suggestions.....	52
4. 1 Conclusions.....	52
4. 2 Suggestions.....	53
References.....	54
Appendix I.....	58
Appendix II.....	60
List of publications.....	61
Acknowledgements.....	62

第一章 文献综述

1.1 酱油发酵染菌与防治

现代发酵工业要求纯种培养，不仅培养基以及发酵罐、管道等须经严格灭菌以除去各种杂菌，而且在需氧发酵中通入的空气也需经过除菌处理。只有这样，才能确保生产不受杂菌污染，从而保证生产菌的旺盛生长。发酵染菌能给生产带来严重危害，轻者影响产量或产品质量，重者导致倒罐，甚至停产。染菌是发酵工业一直以来不能彻底解决的问题，特别是敞开式发酵，因此如何解决此问题是发酵工业的重点工作之一^[1]。

1.1.1 酱油发酵的发展现状

酱油是以大豆或豆粕等植物蛋白质为主要原料，辅以面粉、小麦粉或麸皮等淀粉质原料，经微生物的发酵作用，成为一种含有多种氨基酸和适量食盐，具有特殊色泽、香气和滋味的调味品^[2]。酱油色泽红褐色，有独特酱香，滋味鲜美，有助于促进食欲，是中国的传统调味品^[3]。

从世界范围说，我国是酱油生产起源最早的国家^[4]。据史书记载，我国远在周朝时期就有用肉类、鱼类为原料，生产多种多样的酱，统称为“醢”。《周礼》“治官之属六十六”中就有“醢人”的官职；《史记》记述“通都大邑醢千瓮”；北魏时期的贾思勰著《齐民要术》一书记载了利用黄衣（米曲霉）制酱的方法和技艺，书中记有“酱清”、“豆酱清”，是指以大豆为原料制成的酱油。中国历史上最早使用“酱油”名称是在宋朝，林洪著《山家清供》中有“韭叶嫩者，用姜丝、酱油、滴醋拌食”的记述^[5]。此外，古代酱油还有其他名称，如清酱、豆酱清、酱汁、酱料、豉油、豉汁、淋油、柚油、晒油、座油、伏油、秋油、母油、套油、双套油等。公元 754 年后，酱油生产技术随鉴真大师传至日本。后又相继传入朝鲜、越南、泰国、马来西亚、菲律宾等国^[4]。

全世界酱油产量是 800 万吨，我国占 500 万吨，广州佛山的海天酱油以 40 万吨的年产量稳居行业第一。酱油已经成为大多数东南亚国家日常生活必不可少的调味品，也越来越受到其他地区和国家的欢迎。

1.1.2 酱油发酵的原料

酱油主要分为酿造酱油、配制酱油两大类。酿造酱油是以大豆、小麦为原料，经过微生物天然发酵制成的具有特殊色、香、味的液体调味品。配制酱油是以

酿造酱油为主体，与调味液、食品添加剂等配制而成的液体调味品^[6]。酿造酱油是经微生物发酵制成的，没有毒副作用，其酱香、醋香浓厚。而配置酱油可能含有具有毒副作用的三氯丙醇，所以目前在酱油行业中绝大多数是酿造酱油。

酿造酱油的主要原料蛋白质或淀粉质经微生物酶解之后生成各种氨基酸，是酱油呈鲜味的主要原因。历来传统酿造都以大豆为主，解放后随着科学技术的发展，人们发现大豆里的脂肪对酿制酱油作用不大，为了合理地利用资源，节约油脂，目前我国大部分酿造厂已普遍采用脱脂大豆（如豆饼，豆粕等）。由于脱脂前处理时将大豆压扁，破坏了大豆的细胞膜，因此在吸水、蒸煮工序都比未处理的大豆容易，霉菌也容易渗透进去，酶的作用和分解也快。除了蛋白质原料外，部分酿造厂还使用淀粉质原料，如小麦和麸皮等。小麦是世界上分布最广，种植面积最大的主要粮食作物之一，小麦中的碳水化合物中除主要含有70%的淀粉外，还富含麦胶蛋白质，是产生谷氨酸的主要成分，有利于改善酱油风味。

1.1.3 酱油发酵生产菌

酱油发酵包括传统酿造工艺和现代发酵工艺，传统工艺采用多菌种曲高盐发酵，现代工艺采用单菌种曲低盐或无盐发酵，目前国内普遍采用固态低盐发酵，占酱油总产量的80%^[7,8]。酱油生产中的制曲工艺过程是酱油酿造的重要环节。没有质量优良的曲子，就不会酿造出品质优良的酱油。制曲是酿造酱油的基础，种曲的优劣直接影响大曲的品质，最终影响原料的利用率和酱油的出品率。米曲霉作为单菌种曲普遍应用于现代工艺，传统工艺中的多菌种曲大部分也是空气中的米曲霉^[9,10]。

种曲即制曲所用的种子。几千年来传统的酱油生产是不接种子的，而是利用空气中的野生微生物，制曲时间长至6-7天，甚至10天。这些野生微生物中，包括米曲霉、黄曲霉、根霉、毛霉、青霉、红曲霉、黑曲霉以及其它各类细菌、酵母等。其中有害菌类、无益菌类白白消耗原料、影响酱油产率，有害菌类还会危及人们健康。近代发现黄曲霉、寄生曲霉可产生黄曲霉毒素，是一种致癌物质，在霉变的玉米、花生、豆饼中常有检出此毒素，所以传统工艺利用野生微生物是不安全的^[11]。目前普遍使用的固态低盐发酵均采用米曲霉单菌种曲^[12]。

米曲霉 *Aspergillus oryzae* (*Asp. oryzae*) 为半知菌亚门，丝孢纲，丝孢目，从梗孢科，曲霉属真菌中的一个常见种。米曲霉菌落生长快，10天后

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库