

## 微生物强化对椒坯发酵群落多样性及性质的影响

梁如<sup>1</sup>, 黄钧<sup>1</sup>, 张立强<sup>1</sup>, 崔瑞迎<sup>1</sup>, 吴重德<sup>1</sup>, 廖昌明<sup>4</sup>, 李红<sup>4</sup>, 周荣清<sup>1,2,3\*</sup>

1(四川大学 轻纺与食品学院, 四川 成都, 610065) 2(国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州, 645000)

3(四川大学 制革清洁技术国家工程实验室, 四川 成都, 610065) 4(成都鑫鸿望食品有限公司, 四川 成都, 611741)

**摘要** 描述了应用磷脂脂肪酸(phosphoric acid fatty acids, PLFAs)及聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)技术研究微生物强化发酵椒坯群落多样性变化的规律。研究表明, 高盐发酵使椒坯的细菌生物量显著降低; 对于强化的样品, 因所使用的菌株及强化方式不同, 其群落多样性及优势菌差异显著, 假丝酵母菌 *Candida versatilis* 强化提高了椒坯总生物量, 鲁氏酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 则相反; 共培养强化提高了椒坯以 *Tetragenococcus* 和 *Zygosaccharomyces* 为主的优势菌的生物量, 同时发现嗜盐四链球菌 *Tetragenococcus halophilus* 对 *Vagococcus* 具有明显的抑制作用。理化研究表明, 不同强化方式使样品的总酸(TA)、还原糖(RS)和氨基态氮(FN)等参数略有差异。不同强化方式对挥发性组分贡献不同, 其中, 共培养强化使椒坯挥发性组分总含量提高了 28.46%。该研究揭示了强化发酵对椒坯微生物群落和品质的影响规律, 对微生物强化技术在传统发酵的应用有一定的指导作用。

**关键词** 微生物群落; 共培养强化; 挥发性组分; 磷脂脂肪酸(phosphoric acid fatty acids, PLFAs); 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)

辣椒(*Capsicum annum* L.)是在墨西哥、印度和中国等多个国家普遍种植的一年生或多年生的草本植物, 常被作为香辣型蔬菜直接食用或是许多发酵调味品的原料。其中, 辣椒酱就以辣椒为原料发酵而成的具有独特的辛辣味、鲜艳色泽和质地的佐餐调味品<sup>[1-2]</sup>, 同时也是郫县豆瓣等调味品的中间制品。高盐发酵是我国辣椒酱生产的主要工艺, 辣椒本身产生的内源酶及发酵过程中自然混入的多种微生物对辣椒酱独特的品质形成有重要贡献。因此, 高盐环境、季节影响和亚硝酸盐易积累等因素是妨碍产业集约化生产的技术难题。微生物强化发酵技术是解决这一难题的有效尝试, 最近发表的有关纯种强化发酵报道<sup>[3-7]</sup>, 证实了纯种强化有益于产品品质的改善。然而, 因辣椒的品种、产地和栽培技术的差异会影响辣椒碱和辣椒素的含量, 从而对微生物的生长繁殖作用各异<sup>[8-9]</sup>, 所以难以应用可培养技术了解强化菌株的作用规律及优化强化工艺。本文报道了基于磷脂脂肪酸(phosphoric acid fatty acids, PLFAs)及变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)免

培养技术研究了假丝酵母 *Candida versatilis*、鲁氏酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 和嗜盐四链球菌 *Tetragenococcus halophilus* 及 3 株微生物共培养对椒坯微生物群落结构的影响规律, 同时研究了椒坯总酸、氨基态氮和游离氨基酸等理化指标及挥发组分的变化, 揭示了菌株间的作用特点, 对科学认识强化椒坯发酵和强化工艺的优化具有指导和借鉴作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 微生物、培养基及培养条件

微生物: 耐盐酵母菌 *C. versatilis* CGMCC 3790 和 *Z. rouxii* CGMCC 3791; 耐盐乳酸菌 *T. halophilus* CGMCC 3792。本实验室分离并保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。

种子培养基: (1) 酵母菌: 含 120 g/L NaCl 的 YM 培养基<sup>[9]</sup>; (2) 乳酸菌: 含 90 g/L NaCl 的 MRS 培养基<sup>[10]</sup>。YM 和 MRS 培养基的 pH 分别调为 5.0、7.0 于 115 ℃ 灭菌 15 min 后, 分别从活化的菌株斜面试管中挑 2~3 环, 分别置于 30 ± 1 ℃ 和 37 ± 1 ℃ 的培养箱中静置培养至对数期。

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 原料与样品制备

干辣椒(美国红, 甘肃, 2013 年)经挑选、清洗、

第一作者: 在读博士研究生(周荣清教授为通讯作者, E-mail: zhourqing@scu.edu.cn)。

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(31171742); 四川省科技支撑计划(2014SZ0129)

收稿日期: 2015-08-15, 改回日期: 2015-09-11

浸泡和粉碎后,分别将盐分和水分调至约 15% 和 63%。分别将 *T. halophilus*、*C. versatilis* 和 *Z. rouxii* 的纯培养物接种到椒坯中,初始菌浓分别为  $5.2 \times 10^7$  CFU/g (CS4)、 $4.1 \times 10^6$  CFU/g (CS5) 和  $5.3 \times 10^6$  CFU/g (CS6)。将另一部分接种 *T. halophilus* 纯培养物(初始菌浓为  $5.2 \times 10^7$  CFU/g)椒坯发酵至 pH5.8 以下时,再接入 *Z. rouxii* 和 *C. versatilis* 纯培养物,使其浓度分别为  $4.8 \times 10^6$  CFU/g 和  $5.8 \times 10^6$  CFU/g (CS3)。未做任何处理椒坯为自然发酵组 (CS2)。将制备好的椒坯置于常温环境中发酵 30 d,每隔 6 d 搅拌 1 次,CS1 为未发酵椒坯样品。

### 1.2.2 理化指标的检测

水分测定:GB/5009.3—2010 的第一法(直接干燥法);NaCl 含量的测定:GB/T 12457—2008;FN 的测定:GB/T 5009.39;TA 的测定:GB/T 12456—2008(以乳酸计);RS 的测定:GB/T 5009.7—2008(直接滴定法)。游离氨基酸(FAA)的检测:精确称取样品 5.00 g,研磨后,蒸馏水定容至 50 mL,取 10 mL 滤液,加 5 mL 10% 三氯乙酸溶液,室温静置 2 h 后,离心 ( $10\,000 \times g$ , 4 °C) 10 min,上清液经 0.45 mm 滤膜过滤并适当稀释后,用自动氨基酸检测仪(A300, membrane Pure GmbH,德国)检测 FAA 的含量。

### 1.2.3 挥发性组分检测

采用顶空-固相微萃取气相色谱-质谱法(HS-SPME-GC-MS)测定样品的挥发性组分<sup>[11]</sup>。称取研磨至膏状的样品 0.50 g 于顶空瓶中,加入内标辛酸和辛酸甲酯各 10  $\mu$ L,60 °C 平衡 15 min,插入固相微萃取头(CAR/PDMS,85  $\mu$ m, supelco, USA),萃取 45 min。然后在进样口中解吸 3 min,检测挥发性组分。色谱条件:色谱柱为 HP-INNOWAX 毛细管色谱柱(30.0 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m, J&W, USA);升温程

序:40 °C 保持 5 min,以 4 °C/min 升至 100 °C,再以 6 °C/min 升至 230 °C,保持 10 min,进样口温度 250 °C;载气为高纯氮气,流速 1.0 mL/min;离子源温度和连接线温度分别为 230 和 250 °C;EI 电子能量为 70 eV;质量扫描范围 35 ~ 400 amu。

### 1.2.4 PLFAs

样品中 PLFAs 提取和分析,参考文献<sup>[12-13]</sup>所述的方法提取样品中 PLFAs,检测条件:色谱柱为 HP-INNOWAX 毛细管色谱柱(30.0 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m, J&W, USA)进样口为高纯氮气温度 250 °C,进样量 0.5  $\mu$ L,分流比 10:1;载气和连接线流速 1.0 mL/min;起始柱温 40 °C,保持 2 min,再以 5 °C/min 升至 220 °C,保持 10 min;质谱(EI)的电子能量 70 eV;离子源温度 230 °C;扫描范围 35 ~ 400 amu。

### 1.2.5 PCR-DGGE

称取 5.00 g 样品,转移至装有无菌玻珠的离心管中,加入 20 mL PBS (0.1 mol/L, pH8.0),涡旋振荡分散后,离心 10 min ( $800 \times g$ , 4 °C),相同 PBS 洗涤沉淀物 2 次,汇集的上清液离心 ( $10\,000 \times g$ , 4 °C) 10 min,弃上清液,洗涤菌团 3 次,转移到 1.5 mL 的 EP 管中, -20 °C 保存待用。参考文献<sup>[14]</sup>所述方法提取总 DNA,经试剂盒(Universal DNA Purification Kit, Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd.)纯化后,用表 1 中所示的引物,按参考文献<sup>[15-18]</sup>所述方法完成巢氏 PCR。按参考文献<sup>[19-20]</sup>进行 DGGE 分析。切割具有代表性条带,加入适量 ddH<sub>2</sub>O 后置于 4 °C 冰箱中过夜,收集 DNA 溶出片段,经 1% 琼脂糖电泳检测纯度后,送样至上海生工进行测序分析。将有效的 DNA 序列与 NCBI 的 BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) 以及 RDP CLASSIFIER (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) 数据库的序列比对获得最近亲缘关系相关菌株信息。

表 1 所用引物对其序列  
Table 1 Primers used and sequence

| 检测目标 | 引物对   | 序列(5'-3')   |
|------|-------|---|
| 细菌   | 第一轮   | 27f 5'-AGACTTTGATCCTGGCTCAG-3'  |
|      | 1492r | 5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3'  |
|      | 第二轮   | 357f-GC <sup>1)</sup> 5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTACGGGAGGCAGCAG-3' |
|      | 517r  | 5'-ATTACCGCGCTGCTGC-3'  |
| 真菌   | 第一轮   | NL1 5'-GCATATCAATAAGCGCGGAGGAAAAG-3'  |
|      | NL4   | 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'   |
|      | 第二轮   | NL1-GC 5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCATATCAATAAGCGCGGAGGAAAAG-3'       |
|      | LS2   | 5'-ATTCCCAACAACCTCGACTC-3'  |

注:1)下划线碱基为 GC 夹。

2.2.5 数据处理

挥发性组分的鉴定及数据处理:通过待测样品组分质谱数据与标准谱库(NIST05)比对,匹配度大于800(最大为1 000)的物质予以报道,采用峰面积归一化法(内标法)确定样品中各检出物质的含量,挥发性组分含量以平均值±标准偏差( $n=3$ )。

PLFAs 鉴定及数据处理:通过待测样品各组分质谱图与 NIST05 标准谱库比对,以及保留时间与 37 种 FAME 标准品 (Accustandard, USA) 保留时间的比较,确定 PLFAs 组成;采用内标 (19:0) 归一化法计算各组分的含量,样品中 PLFAs 含量用 nmol/g dw 表示。参考文献<sup>[21]</sup>所述的方法命名 PLFAs,参考文献<sup>[22-24]</sup>所述方法估算其菌群的构成及相对含量,含量以平均值±标准偏差( $n=3$ )。

DGGE 多样性指数:将 DGGE 光密度数据导入 ZZSTAT 软件 (v2010),计算细菌和真菌的多样性指数。

采用 SPSS 16.0 软件 (SPSS, USA) 进行不同样品间的聚类分析,距离计算方法为欧氏距离和样品间的差异性分析 (两因素方差分析 Two-way ANOVA, Duncan's test,  $P<0.05$ )。

2 结果与讨论

2.1 对细菌群落多样性的影响

2.1.1 基于 PLFAs 的椒坯细菌群落多样性的变化

样品中共检出了 8 种 PLFAs,碳链长度在 14~18 之间,总 PLFAs 含量依次是 CS1 (4.78 nmol/g) > CS5 (1.15 nmol/g) > CS3 (1.06 nmol/g) > CS2 (0.79 nmol/g) > CS4 (0.78 nmol/g) > CS6 (0.59 nmol/g)。包括直链和支链饱和、单不饱和及多不饱和 4 类 PLFAs,其中直链饱和及多不饱和 PLFA 比例较高,所占比例分别在 40.33%~46.09% 和 27.32%~44.09%。其中,i14:0,16:0和 18:2 $\omega$ 9,11 为优势 PLFAs。

椒坯菌群及生物量估算结果表明,与初始样品比较,发酵椒坯的 G+、G-菌和真菌含量及其比例变化显著( $P<0.05$ ),强化致使 G+ 菌和真菌为优势菌,除 CS6 外,各样品间的生物量无显著差异 ( $P<0.05$ )(表 2)。自然发酵使细菌生物量减少,G+ 菌为绝对优势菌群。与自然发酵相比 *C. versatilis* 和 *Z. rouxi* 单独强化使椒坯中 G+ 和 G-菌生物量降低,且 *C. versatilis* 使真菌的生物量增加,*Z. rouxi* 则相反,这可能是代谢产物乙醇、有机酸等的抑制及底物竞争性消耗等所致,但二者的菌群差异的原因有待深入探讨。由于 *T. halophilu* 产生有机酸的抑菌作用,使真菌的生物量降低。共培养则使总生物量和真菌量略有提高。

表 2 样品间微生物群落的区别

Table 2 Difference of microbial communities in samples

| 微生物      | CS1                           | CS2                        | CS3                        | CS4                        | CS5                        | CS6                        |
|----------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| G +      | 0.35 ± 0.07 <sup>a1),2)</sup> | 0.19 ± 0.03 <sup>bc</sup>  | 0.24 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 0.19 ± 0.02 <sup>bc</sup>  | 0.16 ± 0.03 <sup>bc</sup>  | 0.12 ± 0.01 <sup>c</sup>   |
| G -      | 0.014 ± 0.005 <sup>a</sup>    | ND <sup>3)</sup>           | 0.007 ± 0.000 <sup>b</sup> | 0.005 ± 0.003 <sup>b</sup> | 0.004 ± 0.002 <sup>b</sup> | 0.003 ± 0.002 <sup>b</sup> |
| 总细菌      | 0.71 ± 0.08 <sup>a</sup>      | 0.34 ± 0.07 <sup>bc</sup>  | 0.45 ± 0.03 <sup>b</sup>   | 0.33 ± 0.04 <sup>bc</sup>  | 0.45 ± 0.15 <sup>b</sup>   | 0.23 ± 0.05 <sup>c</sup>   |
| 总真菌      | 0.42 ± 0.01 <sup>a</sup>      | 0.22 ± 0.06 <sup>bc</sup>  | 0.29 ± 0.08 <sup>b</sup>   | 0.20 ± 0.03 <sup>bc</sup>  | 0.46 ± 0.05 <sup>a</sup>   | 0.19 ± 0.03 <sup>c</sup>   |
| 好氧菌      | 0.35 ± 0.10 <sup>a</sup>      | 0.008 ± 0.001 <sup>b</sup> | 0.03 ± 0.03 <sup>b</sup>   | 0.003 ± 0.000 <sup>b</sup> | 0.04 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.002 ± 0.001 <sup>b</sup> |
| 厌氧菌      | 0.38 ± 0.07 <sup>a</sup>      | 0.22 ± 0.04 <sup>bc</sup>  | 0.27 ± 0.05 <sup>b</sup>   | 0.21 ± 0.04 <sup>bc</sup>  | 0.18 ± 0.06 <sup>bc</sup>  | 0.13 ± 0.06 <sup>c</sup>   |
| G + /G - | 25.00                         | - <sup>4)</sup>            | 34.29                      | 38.00                      | 40.00                      | 40.00                      |
| 总细菌/总真菌  | 1.69                          | 1.55                       | 1.55                       | 1.65                       | 0.98                       | 1.21                       |
| 厌氧菌/好氧菌  | 1.09                          | 27.50                      | 9.00                       | 70.00                      | 4.50                       | 65.00                      |

注: <sup>1)</sup> 含量表示为平均值±标准差 nmol/g dw; <sup>2)</sup> 同一行中不相同字母表示差异显著 (Duncan's test,  $P<0.05$ ); <sup>3)</sup> ND 表示未检出; <sup>4)</sup> 表示未计算。

2.1.2 基于 PCR-DGGE 的微生物群落结构的研究

细菌 DGGE 图谱 (图 1a) 的多样性指数分析结果表明,自然发酵使 S 和 H 指数减少,D 指数增加,强化发酵则使 D 指数减小,S 和 H 指数增大。因菌株性质和不同强化方式不同,致使样品的微生物群落多样性亦有差异,*C. versatili* 和共培使 S 和 H 的增幅高于 *T. halophilus* 和 *Z. rouxi*,D 指数则降幅较大 (表 3)。据 DGGE 图谱的强度特征聚为两簇,CS5

(*C. versatili*) 是一簇,其余样品的聚为另一簇,相似度大于 59.60%,CS2 和 CS6 相似性接近而聚相同亚簇,CS3 和 CS4 因 *T. halophilus* 参与强化,其代谢物有效抑制了杂菌,结构类似聚为相同亚簇 (图 1b)。

测序结果在 NCBI 和 RDP CLASSIFIER 中检索比亲缘性的结果表明 (表 4),细菌涉及 3 个不同科 (*Enterobacteriaceae*、*Enterococcaceae* 和 *Bacillaceae*),由 *Pantoea*、*Tetragenococcus*、*Vagococcus*、*Bacillus* 和 *Enter-*

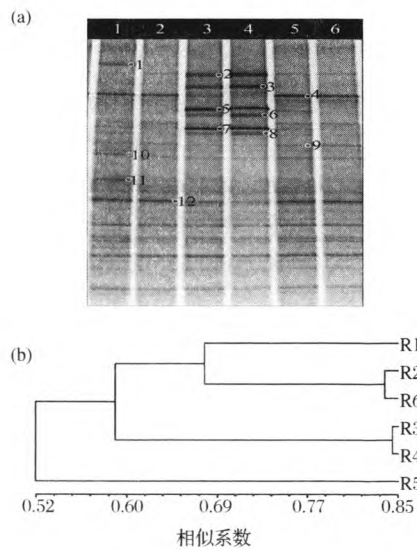
obacter 等 5 个属构成。CS1 所含的 4 个属的细菌 (*Pantoea*/条带 1、*Vagococcus*/条带 4 和条带 12、*Enterobacter*/条带 10 和条带 11), *Vagococcus* 属菌为 CS2 的优势菌。*Tetragenococcus* 属菌是 CS3 和 CS4 的优势菌(条带 3 和条带 5-8),这与接入的 *T. halophilus* 的强耐盐性、高的繁殖率和具有竞争性抑制自然混入细菌等特性有关。*Vagococcus* (条带 4 和条带 12)和 *Bacillus*(条带 9)为 CS5 和 CS6 的优势菌,这可能是 *Z. rouxii* 和 *C. versatilis* 的代谢产物如乙醇和有机酸等对细菌抑制作用所致。*Bacillus* 是兼性厌氧菌,起始时耗氧迅速,致使溶氧降低,有益于厌氧菌繁殖,产生的有机酸,降低了椒坯的 pH 值,致使 *E. asburiae* 和 *E. cloacae* 等致病菌<sup>[25]</sup> 消失,产生的水解酶促进了蛋白质、多种糖类等的降解<sup>[26]</sup>。由此可见椒坯的高盐微生物强化发酵不仅能改善风味,也能抑制或消除杂菌。可能因 *T. halophilus* 对 *Vagococcus* 有较强的抑制作用,在 CS3 和 CS4 均未检出 *Vagococcus*。

表 3 不同样品细菌和真菌多样性指数  
Table 3 Bacterial and fungal diversity index of different samples

| 样品<br>编号 | 多样性指数     |            |              |           |            |              |
|----------|-----------|------------|--------------|-----------|------------|--------------|
|          | 细菌        |            |              | 真菌        |            |              |
|          | 丰度<br>(S) | 优势度<br>(D) | 香农-<br>维纳(H) | 丰度<br>(S) | 优势度<br>(D) | 香农-<br>维纳(H) |
| CS1      | 16        | 0.065      | 2.749        | 12        | 0.102      | 2.380        |
| CS2      | 13        | 0.081      | 2.538        | 13        | 0.095      | 2.454        |
| CS3      | 19        | 0.059      | 2.892        | 15        | 0.085      | 2.587        |
| CS4      | 16        | 0.075      | 2.674        | 13        | 0.097      | 2.449        |
| CS5      | 19        | 0.055      | 2.921        | 15        | 0.085      | 2.585        |
| CS6      | 15        | 0.070      | 2.684        | 13        | 0.097      | 2.445        |

表 4 细菌和真菌 DNA 测序及与 BLAST 和 RDP 数据库比对结果  
Table 4 Bacteria and fungal sequence alignment with BLAST and RDP search tools

|    | 条带编号  | 最大相似菌株 (BLAST)                        | 序列号        | 相似度/% | 系统分类关系 (RDP)             |
|----|-------|---------------------------------------|------------|-------|--------------------------|
| 细菌 | 1     | <i>Pantoea agglomerans</i>            | AB971371.1 | 100   | <i>Pantoea</i>           |
|    | 2,7   | <i>Tetragenococcus halophilus</i>     | AP012046.1 | 100   | <i>Tetragenococcus</i>   |
|    | 3,5   | <i>Tetragenococcus halophilus</i>     | KJ699143.1 | 100   | <i>Tetragenococcus</i>   |
|    | 4     | <i>Vagococcus fluvialis</i>           | KJ882410.1 | 98    | <i>Vagococcus</i>        |
|    | 6     | <i>Tetragenococcus halophilus</i>     | KJ699142.1 | 100   | <i>Tetragenococcus</i>   |
|    | 8     | <i>Tetragenococcus halophilus</i>     | AP012046.1 | 99    | <i>Tetragenococcus</i>   |
|    | 9     | <i>Bacillus subtilis</i>              | KM068047.1 | 99    | <i>Bacillus</i>          |
|    | 10    | <i>Enterobacter cloacae</i>           | CP009854.1 | 100   | <i>Enterobacter</i>      |
|    | 11    | <i>Enterobacter asburiae</i>          | KF901493.1 | 100   | <i>Enterobacter</i>      |
|    | 12    | <i>Vagococcus fluvialis</i>           | KJ882410.1 | 99    | <i>Vagococcus</i>        |
| 真菌 | 1,5,9 | <i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i> | AM947682.1 | 99    | <i>Zygosaccharomyces</i> |
|    | 2,6,7 | <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>       | CU928181.1 | 100   | <i>Zygosaccharomyces</i> |
|    | 3,10  | <i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i> | AM947682.1 | 100   | <i>Zygosaccharomyces</i> |
|    | 4,8   | <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>       | CU928181.1 | 99    | <i>Zygosaccharomyces</i> |



1-6 泳道分别表示 CS1-CS6 号样品; R1-6 分别对应 CS1-CS6 号样品

图 1 样品间细菌 DGGE 图谱 (a) 和聚类分析 (b)  
Fig. 1 DGGE profile of bacteria (a) and Hierarchical cluster analyses (b) in sample

真菌 DGGE 图谱 (图 2a) 多样性指数分析结果表明,自然发酵、*T. halophilu* 和 *C. versatilis* 强化使 S 和 H 指数略增,而 D 指数略减,*Z. rouxii* 与共培强化则使 S 和 D 指数减小,H 指数增加 (表 3)。聚类分析的结果表明,样品间的群落结构相似度较高,原料和自然发酵的样品聚为一簇 (相似度 > 84.69%),纯种强化聚为另一簇 (相似度 > 84.88%)。酵母菌强化 (CS3、CS5 和 CS6) 聚为亚簇 (相似度 > 90.92%), *C. versatilis* 因其功能是发酵后期产酯,所以另聚为一

小簇(图 3b)。测序结果结果表明(表 4),所有样品中只检出 *Z. rouxii* 和 *Z. pseudorouxii* 两种酵母菌。在 CS3 和 CS5 号中虽然采用了 *C. versatilis* 强化,测序的结果未检出。可能是椒坏的环境不适合其大量繁殖或 DNA 提取方法等限制<sup>[16]</sup>,详细原因待进一步探讨。

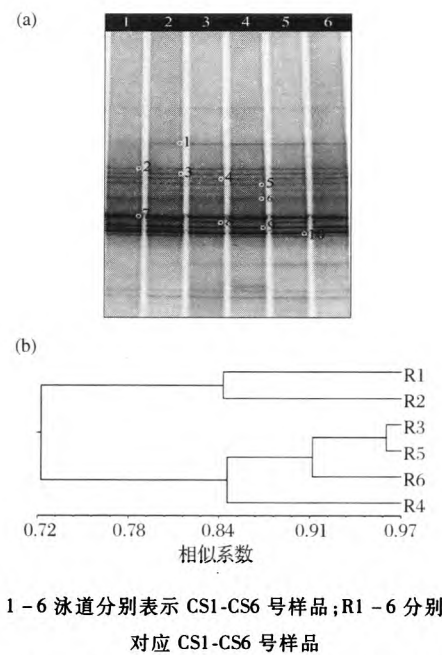


图 2 真菌 DGGE 图谱(a)和聚类分析(b)  
Fig. 2 DGGE profile of fungal(a) and Hierarchal cluster analyses(b) in samples

2.2 对理化性质的影响

表 5 为不同强化方式样品发酵结束时理化指标,发酵过程中因水分蒸发,需间歇补水,导致水分和盐分含量略有波动。*T. halophilus* 和 *C. versatilis* 强化,使椒坏的 TA、FN 和 RS 含量略有增高 ( $P < 0.05$ ),*Z. rouxii* 强化使 TA 的含量略有减少 ( $P < 0.05$ ),可能与 *Z. rouxii* 在椒坏中快速生长繁殖有关。共培养强化对 TA、FN 和 RS 含量无明显影响 ( $P < 0.05$ )。

2.2.1 对游离氨基酸含量的影响

检测各样品中的 FAA 的结果表明(表 6),自然发酵使检出的 17 种 FAA 中 15 种 FAA 增加,其中, Thr、Ser、Ala、Met、Ile 和 Arg 的增幅超过 20%;相对自然发酵,*T. halophilus* 强化使 16 种 FAA 的含量增加,与样品中 FN 含量变化一致,其中 His 增加了 4 倍,Arg 的含量减少了 15.13%,增幅超过 20% 以上的包括 Asp (29.56%)、Thr (49.65%)、Glu (57.85%)、Gly (45.95%) 等 11 种 FAAs;*Z. rouxii* 和 *C. versatilis* 的强化使 Thr、Ser、Asn、Gly、Ala、Met、Ile、Phe、Trp 和 Arg 等 11 种 FAA 含量降低,但使 Glu 的含量分别提高了 27.53% 和 34.78%,Lys 的含量分别提高了 13.68% 和 21.05%;共培强化则使 Glu 提高了 20.17%,Cys 和 lys 分别提高了 16.41% 和 13.68%。

表 5 不同样品理化性质的区别  
Table 5 Difference of physiochemical properties in samples

| 理化指标                              | CS2                        | CS3                       | CS4                        | CS5                       | CS6                        |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 水分/%                              | 63.41 ± 0.41 <sup>1)</sup> | 65.03 ± 0.52 <sup>a</sup> | 64.23 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 62.28 ± 0.32 <sup>d</sup> | 63.24 ± 0.32 <sup>c</sup>  |
| 盐分/%                              | 17.76 ± 0.88 <sup>a</sup>  | 15.84 ± 0.00 <sup>c</sup> | 16.36 ± 0.08 <sup>bc</sup> | 17.43 ± 0.20 <sup>a</sup> | 16.99 ± 0.00 <sup>ab</sup> |
| TA/[g 乳酸 · (100g) <sup>-1</sup> ] | 0.68 ± 0.01 <sup>c</sup>   | 0.69 ± 0.01 <sup>c</sup>  | 0.87 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.76 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.66 ± 0.01 <sup>d</sup>   |
| FN/[g · (100g) <sup>-1</sup> ]    | 0.09 ± 0.00 <sup>bc</sup>  | 0.10 ± 0.00 <sup>b</sup>  | 0.12 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.10 ± 0.00 <sup>b</sup>  | 0.08 ± 0.01 <sup>c</sup>   |
| RS/[g · (100g) <sup>-1</sup> ]    | 0.59 ± 0.01 <sup>c</sup>   | 0.69 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.72 ± 0.00 <sup>a</sup>   | 0.69 ± 0.00 <sup>b</sup>  | 0.60 ± 0.00 <sup>c</sup>   |

注:<sup>1)</sup> 同一行中不同字母表示有显著的差别(Duncan's test,  $P < 0.05$ )。

2.3 对挥发性组分的影响

各种样品共检出了 50 种不同挥发性组分,包含 1 种酸、9 种醇、17 种酯、4 种醛、8 种酮、5 种酚、1 种吡嗪及 5 种其他组分。自然发酵分别使醇和醛类组分分别从 266.24 mg/kg,19.44 mg/kg 增加到 464.82 mg/kg 和 129.62 mg/kg。相对自然发酵,*T. halophilus* 的强化,醇、酯组分略减,酚类组成稍增(图 3),致使总挥发组分含量略减。*Z. rouxii* 和 *C. versatilis* 的强化,使椒坏中的醇组分含量增加、酯类和其它类组分略增,酚类减少,醛类略减,前者使酮

类和烷烃类组分略减少,而后者则是使之稍增(图 4)。*Z. rouxii*、*C. versatilis* 和 *T. halophilus* 的共培养强化则使挥发组分总的含量提高了 28.46%,达到 1764.93 mg/kg。醇类和酯类组分分别增加了 38.09% 和 40.92%,酚类组分降低了 31.92%。苯乙醇,从 330.66 mg/kg 增加到 447.05 mg/kg,但其比例略有减少,相对比例增幅较大是异丁醇,提高了 5.2 倍,其次是 4-甲基-戊醇和 3-甲基-丁醇。酯类组分中含量较高的 4 种组分,依次为辛酸乙酯(24.10%) > 月桂酸乙酯(20.87%) > 棕榈酸乙酯(13.69%) > 肉桂酸



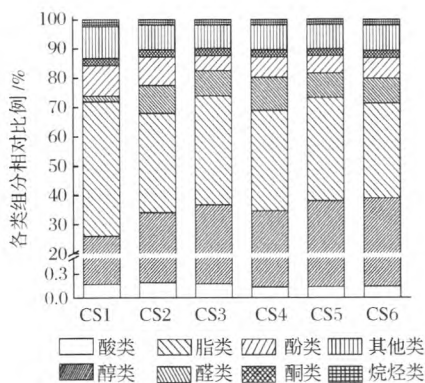
乙酯(13.54%)。强化作用使其乙酸异戊酯和辛酸-3-甲基丁酯增幅最高,分别是7.78倍和1.88倍,葵酸、辛酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、顺-9-十六烯酸、月桂酸、十五碳酸、苯乙酸乙酯、壬酸和己酸等9种酸的乙酯

组分的增幅超过了30%。在检出的酚类组分中,苯酚的含量从87.85 mg/kg降至34.88 mg/kg,降幅为60.30%,而4-乙基愈创木酚,4-乙烯基愈创木酚和4-乙基苯酚则有较大的增幅。

表 6 不同样品中游离氨基酸含量  
Table 6 Content of free amino acid in different samples

| 氨基酸名称      | 含量/[mg·(100g) <sup>-1</sup> ]干基 |                          |                          |                          |                          |                          |
|------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|            | CS1                             | CS2                      | CS3                      | CS4                      | CS5                      | CS6                      |
| 天门冬氨酸(Asp) | 30.2±0.65 <sup>cd1)</sup>       | 33.7±2.43 <sup>bc</sup>  | 36.53±2.63 <sup>b</sup>  | 43.70±2.58 <sup>a</sup>  | 35.45±1.25 <sup>b</sup>  | 28.35±1.69 <sup>d</sup>  |
| 苏氨酸(Thr)   | 5.74±0.05 <sup>c</sup>          | 7.21±0.06 <sup>b</sup>   | 6.97±0.06 <sup>b</sup>   | 10.79±0.21 <sup>a</sup>  | 7.09±0.11 <sup>b</sup>   | 5.87±0.26 <sup>c</sup>   |
| 丝氨酸(Ser)   | 46.67±0.56 <sup>d</sup>         | 57.12±2.98 <sup>b</sup>  | 51.31±2.67 <sup>c</sup>  | 64.72±2.72 <sup>a</sup>  | 47.61±2.01 <sup>cd</sup> | 46.09±0.41 <sup>d</sup>  |
| 天冬氨酸(Asn)  | 131.88±1.71 <sup>c</sup>        | 151.55±3.49 <sup>b</sup> | 147.27±3.39 <sup>b</sup> | 169.50±5.59 <sup>a</sup> | 148.80±4.78 <sup>b</sup> | 133.46±0.31 <sup>c</sup> |
| 谷氨酸(Glu)   | 14.40±0.82 <sup>a</sup>         | 8.28±0.05 <sup>c</sup>   | 9.95±0.06 <sup>d</sup>   | 13.07±1.31 <sup>b</sup>  | 10.56±0.17 <sup>cd</sup> | 11.16±0.17 <sup>c</sup>  |
| 甘氨酸(Gly)   | 4.20±0.37 <sup>c</sup>          | 4.81±0.04 <sup>b</sup>   | 4.94±0.04 <sup>b</sup>   | 7.02±0.14 <sup>a</sup>   | 4.47±0.05 <sup>c</sup>   | 4.26±0.08 <sup>c</sup>   |
| 丙氨酸(Ala)   | 6.51±0.36 <sup>c</sup>          | 7.89±0.01 <sup>b</sup>   | 7.43±0.01 <sup>c</sup>   | 9.18±0.19 <sup>a</sup>   | 7.13±0.00 <sup>d</sup>   | 6.70±0.00 <sup>e</sup>   |
| 缬氨酸(Val)   | 3.13±0.14 <sup>c</sup>          | 3.26±0.02 <sup>c</sup>   | 3.49±0.02 <sup>b</sup>   | 4.34±0.17 <sup>a</sup>   | 3.61±0.01 <sup>b</sup>   | 3.22±0.02 <sup>c</sup>   |
| 半光氨酸(Cys)  | 3.63±0.24 <sup>d</sup>          | 3.90±0.13 <sup>c</sup>   | 4.54±0.16 <sup>b</sup>   | 5.22±0.14 <sup>a</sup>   | 4.36±0.00 <sup>b</sup>   | 1.83±0.08 <sup>e</sup>   |
| 蛋氨酸(Met)   | 5.52±0.38 <sup>c</sup>          | 6.78±0.48 <sup>b</sup>   | 6.73±0.48 <sup>b</sup>   | 9.01±0.82 <sup>a</sup>   | 6.51±0.00 <sup>b</sup>   | 5.97±0.05 <sup>bc</sup>  |
| 异亮氨酸(Ile)  | 6.12±0.33 <sup>c</sup>          | 7.66±0.69 <sup>b</sup>   | 7.01±0.63 <sup>bc</sup>  | 9.99±0.55 <sup>a</sup>   | 7.03±0.01 <sup>bc</sup>  | 6.54±0.65 <sup>c</sup>   |
| 酪氨酸(Tyr)   | 4.40±0.19 <sup>c</sup>          | 5.11±0.18 <sup>b</sup>   | 5.12±0.18 <sup>b</sup>   | 6.79±0.29 <sup>a</sup>   | 5.11±0.01 <sup>b</sup>   | 4.70±0.03 <sup>c</sup>   |
| 苯丙氨酸(Phe)  | 5.98±0.13 <sup>c</sup>          | 6.37±0.02 <sup>b</sup>   | 5.84±0.01 <sup>d</sup>   | 7.93±0.04 <sup>a</sup>   | 5.72±0.05 <sup>c</sup>   | 5.15±0.00 <sup>f</sup>   |
| 组氨酸(His)   | 0.17±0.00 <sup>c</sup>          | 0.16±0.00 <sup>d</sup>   | 0.09±0.00 <sup>f</sup>   | 0.80±0.00 <sup>a</sup>   | 0.21±0.00 <sup>b</sup>   | 0.14±0.01 <sup>c</sup>   |
| 色氨酸(Trp)   | 31.37±0.02 <sup>b</sup>         | 34.01±0.19 <sup>a</sup>  | 31.33±0.18 <sup>b</sup>  | 34.07±0.27 <sup>a</sup>  | 31.88±0.50 <sup>b</sup>  | 28.70±1.63 <sup>c</sup>  |
| 赖氨酸(Lys)   | 0.87±0.01 <sup>c</sup>          | 0.95±0.02 <sup>c</sup>   | 1.08±0.02 <sup>c</sup>   | 1.20±0.03 <sup>a</sup>   | 1.08±0.02 <sup>c</sup>   | 1.15±0.04 <sup>b</sup>   |
| 精氨酸(Arg)   | 0.96±0.02 <sup>b</sup>          | 1.19±0.04 <sup>a</sup>   | 1.00±0.04 <sup>b</sup>   | 1.01±0.05 <sup>b</sup>   | 0.83±0.04 <sup>c</sup>   | 1.02±0.07 <sup>b</sup>   |

注:1)同一行中不同字母表示存在显著的差别(两因素方差分析,Duncan's test,P<0.05)。



编号1-6分别代表CS1-CS6  
图3 样品间各类挥发性组分的比例

Fig.3 Different ratio of volatile components in samples

### 3 结论

基于PLFAs和DGGE所获得互补的强化的信息,定量表征了不同菌株强化的特点及对微生物群落多样性的影响规律。*Z. rouxii* CGMCC 3791在椒坯中具有较强的繁殖能力,而*C. versatilis* CGMCC 3790则较弱。*T. halophilus* CGMCC 3792强化能有效地抑制

其它细菌,尤其是对*Vagococcus*的抑制。椒坯的发酵具有“自净化”(灭杂菌)和改善了品质的作用,不同强化对方式TA、FN、RS和FAA及各种挥发组分含量的影响,因所用菌株的生理特性的不同而异。3种微生物共培强化对TA、FN和RS的含量无明显影响,醇类和酯类组分为主的挥发组分的含量显著提高,而酚类组分则有所减少。

### 参 考 文 献

- [1] AHMED J,SHIVHARE U S,RAGHAVAN G S V. Rheological characteristics and kinetics of colour degradation of green chilli puree [J]. Journal of Food Engineering,2000,44(4):239-244.
- [2] GOVINDARAJAN V S,RAJALAKSHMI D, CHAND N,et al. Capsicum-production,technology, chemistry, and quality. Part IV. Evaluation of quality [J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition,1987,25(3):185-282.
- [3] 万春秋,刘德忠. 乳酸菌在干辣椒发酵中的应用[J]. 中国调味品,2015,40(1):52-56.
- [4] 杨玉新,任花,李丹. 辣椒酱复合菌种发酵工艺的研究[J]. 中国酿造,2011,30(8):162-164.

- [5] 余有贵,曹智华,曾传广,等.乳酸菌强化发酵生产辣椒酱的工艺研究[J].中国酿造,2009,28(12):94-97.
- [7] 胡小华,孙琳杰,王宇平,等.干红辣椒制作发酵型辣椒酱的工艺研究[J].食品科技,2008,33(6):129-130.
- [8] OMOLO M A, WONG Z, MERGEN A K, et al. Antimicrobial properties of Chili peppers[J]. Journal of Infectious Diseases and Therapy, 2014, 2(4). doi: 10. 4172/2332 - 0877. 1000145.
- [9] GONZÁLEZ-QUIJANO G K, DORANTES-ALVAREZ L, HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ H, et al. Halotolerance and survival kinetics of lactic acid bacteria isolated from jalapeño pepper(*Capsicum annuum* L.) fermentation[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(8):1545-1553.
- [10] 沈萍,陈向东.微生物学试验(第4版)[M].北京:高等教育出版社,2007:245.
- [11] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999:51-128.
- [12] GAO Xian-li, CUI Chun, ZHAO Hai-feng, et al. Changes in volatile aroma compounds of traditional Chinese-type soy sauce during moromi fermentation and heat treatment[J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(4):889-898.
- [13] ZELLES L, BAI Q Y. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1993, 25(4):495-507.
- [14] WHITE D C, STAIR J O, RINGELBERG D B. Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1996, 17(3):185-196.
- [15] ZHOU J, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2):316-322.
- [16] KIM T W, LEE J H, KIM S E, et al. Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131(2):265-271.
- [17] MATSUYAMA T, Y NAKAJIMA, K MATSUYA, et al. Bacterial community in plant residues in a Japanese paddy field estimated by RFLP and DGGE analyses[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(2):463-472.
- [18] THANH V N, TUAN D A. Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters(banh men) as determined by PCR-mediated DGGE[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 128(2):268-273.
- [19] ABE M, TAKAOKA N, IDEMOTO Y, et al. Characteristic fungi observed in the fermentation process for Puer tea[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(2):199-203.
- [20] MUYZER G, DE Waal E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3):695-700.
- [21] HARUTA S, KONDO M, NAKAMURA K, et al. Microbial community changes during organic solid waste treatment analyzed by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 60:224-231.
- [22] FROSTAGARD Å, TUNLID A, BÅÅTH E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally to different metals exposed heavy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(11):3605-3617.
- [23] ZELLES L. Identification of single cultured micro-organisms based on their whole-community fatty acid profiles, using an extended extraction procedure[J]. Chemosphere, 1999, 39(4):665-682.
- [24] BARDGETT R D, HOBBS P J, FROSTEGÅRD Å. Changes in soil fungal: bacterial ratios following reductions in the intensity of management of upland grassland[J]. Biology and Fertility of Soils, 1996, 22:261-264.
- [25] WHITE D C, DAVIS W M, NICKELS J S, et al. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate[J]. Oecologia, 1979, 40:51-62.
- [26] 张海.大豆酱发酵过程中乳酸菌和酵母菌的作用[J].中国调味品,1993(6):14-20.
- [27] 黄备,金卫红,徐海刚,等.不同环境温度下的大肠杆菌数量监测及生存机制研究[J].浙江海洋学院学报(自然科学版),2002(2):22-24.

## Effect of strengthen fermentation on the microbial diversity and the physicochemical properties of minced chilli (*Capsicum annum*)

LIANG Ru<sup>1</sup>, HUANG Jun<sup>1</sup>, ZHANG Li-qiang<sup>1</sup>, CUI Rui-ying<sup>1</sup>,  
WU chong-de<sup>1</sup>, LIAO Chang-ming<sup>4</sup>, LI Hong<sup>1</sup>, ZHOU Rong-qing<sup>1,2,3\*</sup>

1 (College of light industry, Textile & Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

2 (National Research Center of solid-state Brewing, Luzhou 646000, China)

3 (National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Production, Chengdu 610065, China)

4 (Chengdu Xin-Hong Wang Food Co. Ltd., Chengdu 611741, China)

**ABSTRACT** In the present research, the changes of the microbial community diversity in the strengthening fermented minced chilli (*Capsicum annum* L.) were investigated by phospholipid fatty acids (PLFAs) combined with polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). The result showed that total biomass of bacteria was decreased significantly through high-salt fermentation. The difference of microbial community diversity and dominant strains was also observed due to the difference of strains inoculated and the strengthening patterns. Total biomass was increased by *Candida versatilis*, while that was decreased by *Zygosaccharomyces rouxii*, and that of the co-culturing sample, which were mainly composed of *Tetragenoccus* and *Zygosaccharomyces*, was increased compared with natural fermentation. It was worthy to note that *Tetragenoccus halophilus* showed significant inhibition effect on *Vagococcus*. The physicochemical properties of various samples, which were major titratable acidity (TA), reduce sugar (RS) and free amino nitrogen (FN), were slightly different due to the divergence of microorganisms inoculated. The influences of strengthening patterns on total content of volatile components were different, especially co-culturing sample showed the highest augment about 28.46% compared with natural fermentation. The results of this study suggested that not only the microorganisms but also the strengthen patterns had significant effect on the microbial community and the quality of minced chilli.

**Key words** microbial community; co-culturing; volatile compounds; PLFAs; PCR-DGGE