

雷山鱼酱酸中微生物多样性及品质特性分析

张莉娟, 谷新晰, 孙记录, 田洪涛, 卢海强*

(河北农业大学食品科技学院 河北保定 071001)

摘要 采用高通量测序技术对雷山鱼酱酸中的细菌 16S rDNA V3-V4 区进行测序, 采用固相微萃取与气相色谱-质谱联用技术检测鱼酱酸中的挥发性组分, 并利用统计学分析计算其品质特性。经分析, 雷山鱼酱酸中共有 22 个门, 249 个属, 变形菌门 (39.13%) 和厚壁菌门 (30.68%) 是雷山鱼酱酸中的优势细菌门; 节杆菌属 (*Arthrobacter*, 11.246%) 和雷尔氏菌属 (*Ralstonia*, 10.929%) 是优势细菌属。经测定, 雷山鱼酱酸中含有萜烯类 33.65%、醚类 33.53%、醇类 16.45%、酸类 7.82%、酯类 6.47% 等 70 种挥发性成分。其中茴香脑 (23.25%)、右旋萜二烯 (13.12%)、4-烯丙基苯甲醚 (8.52%)、芳樟醇 (8.35%)、山梨酸 (5.96%) 为主要的挥发性成分。鱼酱酸品质分析表明, 有机酸中柠檬酸含量最高为 269.6 mg/kg, 脂肪酸以亚油酸 (0.047 g/100 g) 为主, 氨基酸中以鲜味氨基酸为主要呈味特征。本研究结果为探究鱼酱酸发酵机制, 规范其生产和食品安全提供了理论依据。

关键词 雷山鱼酱酸; 微生物多样性; 挥发性成分; 品质分析

文章编号 1009-7848(2022)04-0350-10 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2022.04.034

雷山鱼酱酸是贵州黔东南苗族自治州雷山县的传统调味品, 是以鲜红椒与当地野生河鱼为主要原料, 配以食盐、生姜、白酒、醪糟、香辛料等辅料, 采用传统的密闭发酵制成。鱼酱酸虽有悠久的加工及食用历史, 但是其研究大多停留在生产技术规范^[1]、加工工艺^[2]、营养成分、矿物质、有机酸和辣椒碱等方面^[3]。目前影响鱼酱酸发酵的微生物区系及挥发性风味物质等还不清楚, 尚缺乏全面、系统的研究, 因而限制了雷山鱼酱酸的标准化生产。

我国是农业大国, 以农产品作为食物的重要来源, 农产品发酵是我国食品加工的重要技术来源之一。因发酵过程中多种微生物的存在, 导致一系列复杂的生化反应, 使产品特性品质不一^[4]。目前, 高通量测序技术已广泛应用于多种发酵食品中的微生物种类多样性的研究, 如马冰涛等^[5]采用高通量测序技术对老白干香型大曲中的微生物进行测序, 通过调控对风味成分贡献较大菌属来提高白酒品质; Liu 等^[6]研究了锦州虾酱发酵过程中, 细菌群落动态变化与挥发性物质动态变化的相互

关系, 探索微生物菌群与挥发性物质之间的影响; 于美娟等^[7]探讨固态发酵鱼中细菌群落多样性与品质的关系, 揭示样品中细菌数量和结构组成与品质的相关性, 以控制加工条件。

固相微萃取 (SPME) 能够减少风味物质的散失^[8], 集采样、萃取、浓缩、进样为一体, 保证了食品风味的完整性, 现广泛应用于食品风味物质的定性、定量分析中。气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 可对复杂有机化合物进行有效分离和定性^[9-11], 作为分析挥发性物质的有效工具, 具有操作简便、高效、灵敏度高等特点。采用 SPME-GC-MS 方法分析鱼酱酸中挥发性物质对样品进行全面观察, 以达到微观分析与宏观处理相结合的风味物质综合分析。

本研究采用高通量测序技术分析雷山鱼酱酸细菌群落组成和结构, 采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术解析鱼酱酸中的风味成分, 探究其主要微生物、关键挥发性成分及品质特性, 为雷山鱼酱酸的标准化生产提供理论支撑。

收稿日期: 2021-04-15

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31501417);

河北省现代农业产业技术体系淡水养殖创新团队建设
项目 (HBCT2018180206)

作者简介: 张莉娟 (1995—), 女, 硕士生

通信作者: 卢海强 E-mail: luhaiqiang@sohu.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雷山鱼酱酸, 贵州省雷山县永乐冷府鱼酱酸食品有限责任公司。

有机酸标准品: 酒石酸、苹果酸、乳酸、柠檬

酸、丁二酸、富马酸,成都市科龙化工试剂厂;17种氨基酸标准品:天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、半胱氨酸、丝氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸,Agilent公司;内标正亮氨酸和异硫氰酸苯酯(PITC),美国Sigma-Aldrich公司。

1.2 仪器与设备

固相微萃取装置,上海安谱科学仪器有限公司;QP2010Plus气相色谱质谱仪,日本岛津公司;JW-3021H台式高速离心机,安徽嘉文仪器设备有限公司;高效液相色谱仪,惠州市华高仪器设备有限公司;高速均质器,上海力辰科技公司;高速粉碎机,上海力辰科技公司。

1.3 试验方法

1.3.1 微生物群落的高通量测序分析

1.3.1.1 基因组DNA提取和PCR扩增 采取雷山鱼酱酸样品10g于5 000×g离心10 min,根据参考文献[12]中的CTAB法并作修改,提取鱼酱酸中的DNA。采用NEB公司的Q5高保真DNA聚合酶,对细菌16S rDNA V3-V4区域进行扩增^[13],细菌V3-V4F:ACTCCTACGGGAGGCAGCA,细菌V3-V4R:GGACTACHVGGGTWTCTAAT。扩增体系(50 μL):5×reaction buffer 10 μL,5×GC buffer 10 μL,d NTP (2.5 mmol/L)2 μL,上游引物(10 μmol/L)1 μL,下游引物(10 μmol/L)1 μL,DNA模板2 μL,dd H₂O 23 μL,Q5 DNA聚合酶1 μL。扩增参数:预变性94℃ 5 min;变性94℃ 30 s,退火55℃ 30 s,延伸72℃ 1 min,30个循环;终延伸72℃ 10 min。

1.3.1.2 Illumina Miseq 测序 使用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(Biomed)对扩增产物进行胶回收纯化。利用荧光试剂Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit,在酶标仪(BioTek,FLx800)定量仪器上对PCR扩增回收产物进行荧光定量。采用Illumina公司的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit制备测序文库,并采用Agilent High Sensitivity DNA Kit进行质检,确保制备的文库有且只有单一的峰,且无接头。使用MiSeq Reagent Kit V3(600个循环)试剂在MiSeq测序仪上对目的片段进行双端测序,为保证测序质量,建议目标片段的

最佳测序长度为200~450 bp^[14-15]。

1.3.1.3 数据处理 测序得到的原始双端测序数据,以FASTQ格式保存。在原始数据中存在一定比例的干扰数据,为了使信息分析的结果更加准确、可靠,采用DADA2方法得到有效数据^[16]。即运用QIIME 2软件对原始数据进行去引物、质量过滤、去噪、拼接、去嵌合体,以100%相似度聚类(或称去重)。经过DADA2质控后产生的去重的序列称为ASVs(Amplicon sequence variants),或称为特征序列,而这些序列在样本中的丰度表称为特征表。最后基于上述分析结果,运用QIIME 2软件和R语言ggplot2包进行物种水平上组成成分分析和可视化,进行Alpha多样性分析^[17]。

1.3.2 鱼酱酸中挥发性物质的测定

1.3.2.1 顶空固相微萃取进样 参照卢靖等^[18]的方法,取2g样品加入到20 mL顶空进样瓶中,密封。60℃水浴加热,平衡10 min,将75 μmol/L PDMS/CAR萃取头插入进样瓶顶空萃取。顶空吸附30 min后,插入GC进样口解吸5 min。

1.3.2.2 GC-MS分析 色谱条件:色谱柱DB-5MS(30 m×0.25 mm,0.25 μm),载气为氦气,流速为1.0 mL/min。升温程序:起始温度32℃,保持5 min;然后以4℃/min的速率升温到130℃;最后以10℃/min的速率升温到200℃。进样口温度250℃。

质谱条件:电子电离(Electron ionization,EI),电子轰击能量为70 eV,扫描范围40~350 m/z^[18]。离子源温度230℃。

利用计算机NIST谱库进行数据检索,各组分相对含量按峰面积归一化法计算^[19]。

1.3.3 鱼酱酸中有机酸的测定 根据《食品安全国家标准 食品有机酸的测定》(GB 5009.157-2016)^[20]中的方法,进行雷山鱼酱酸中有机酸的测定。

1.3.4 雷山鱼酱酸中脂肪酸的测定 根据《食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》(GB 5009.168-2016)^[21]中内标法的方法,对雷山鱼酱酸中的脂肪酸进行测定。

1.3.5 雷山鱼酱酸中氨基酸的测定 用氨基酸液相自动分析仪对雷山鱼酱酸中的氨基酸进行测定。参照Zeng等^[22]的方法并稍做改动,对雷山鱼

酱酸的样品进行处理。流动相的配比和游离氨基酸的标准品可参照华倩^[23]的方法并稍做修改,通过与游离氨基酸标准品相比,根据保留时间和峰面积来计算含量。

2 结果与分析

2.1 微生物多样性分析

2.1.1 微生物的 Alpha 多样性分析 通过细菌 V3-V4 测序,获得 115 616 个序列。运用 QIIME2 软件进行 DADA2 去噪后,获得 102 586 个序列。所得序列在 100% 的相似水平下进行统计分析,获得 1 515 个 ASVs。

Coverage 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数分别用于评估鱼酱酸样品中物种的测序深度、丰度和分布多样性^[24]。Coverage 指数越高,表明样本中序列数据测出越全面;Chao1 指数与样品中微生物群落丰度成正相关;Shannon 指数则与样品微生物多样性有关,数值越大,微生物种类越丰富。由表 1 可知,雷山鱼酱酸样本中微生物 Coverage 指数大于 0.99,说明样品文库中序列基本上都被测出,可进行鱼酱酸样品中大部分微生物多样性的分析,也为后期研究雷山鱼酱酸深层次的生物信息学提供了可信度。

表 1 雷山鱼酱酸菌群微生物多样性指数

Table 1 Microbial diversity index of Thunder mountain fish sauce acid

Chao1	Simpson	Shannon	Goods_ coverage
1515.15	0.970774	7.54824	0.999919

2.1.2 雷山鱼酱酸中不同水平细菌群落组成分析

根据对雷山鱼酱酸样品的测序结果分析可知,样品中共有 22 个细菌门被检出,其种类丰富度较高,所占总序列数差异大。由图 1a(仅展示了前 20 个优势菌门的含量)可知,变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)是鱼酱酸中的优势菌门,相对丰度分别为 39.13% 和 30.68%,占据菌群总量 69.81%。其余为放线菌门(Actinobacteria, 17.47%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 8.09%)、蓝藻门(Cyanobacteria, 1.464%)、软壁菌门(Tenericutes, 1.226%)、栖热菌门(Deinococcus-Thermus,

0.465%)等。近年来,许多研究表明厚壁菌门和变形菌门微生物是高蛋白食品中的优势细菌门,在乳制品^[25]、肉制品^[26]及水产品中都十分常见^[27-28],与本研究结果一致。刘洋等^[29]对四川辣椒酱的研究中,探寻出变形菌门是发酵前期的优势菌门,厚壁菌门是辣椒酱发酵中、后期的优势菌门。在 Zang 等^[30]对中国传统发酵鱼酸鱼发酵过程中微生物群落演替的动态和多样性的研究中,也发现了变形菌门、厚壁菌门是酸鱼发酵过程中的主要优势细菌。在属的水平上,样品共检出 249 个细菌属。如图 1b 所示(只展示了前 20 个优势菌属的含量),节杆菌属(*Arthrobacter*, 11.246%)、雷尔氏菌属(*Ralstonia*, 10.929%)为样品的优势菌群,另外瘤胃菌属(*Ruminococcaceae* UCG-014, 7.343%)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*, 6.639%)、乳杆菌属(*Lactobacillus*, 5.443%)、嗜糖假单胞菌属(*Pelomonas*, 4.945%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 4.402%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 4.214%)、弧菌属(*Vibrimonimonas*, 3.635%)、毛螺旋菌属(*Lachnospiraceae*, 1.939%)等也具有一定的丰富度。节杆菌属可从葡萄糖或其它糖中产生少量酸或不产酸,有的不抗酸。雷尔氏菌对含钾酸盐矿物也有较强的分解能力^[31]。假单胞菌属的细菌多具有分解蛋白质和脂肪的能力,耐盐性的特性让其具有生存优势。然而也有报道证明假单胞菌属会导致腹泻^[32]。乳杆菌属为兼性厌氧菌,广泛分布于自然界中,污染乳制品、肉制品、水产品等高蛋白食品后可引起腐败变质。雷山鱼酱酸样品中的优势菌属与之前报道过的中国传统发酵鱼酸鱼发酵过程中微生物的优势菌属不同,酸鱼主要优势菌属以乳酸菌(*Lactococcus*)、大球菌(*Macrococcus*)和葡萄球菌(*Staphylococcus*)为主,可能是因为酸鱼在发酵过程中以自发酵为主^[33]。传统韩国发酵鱼露(Myeolchi-aekjeot, MA)的细菌群落结构与本研究中观察到的也不同,在发酵过程中,以四联球菌属(*Tetragenococcus*)和盐厌氧菌属(*Halanaerobium*)为主,这种变化主要是由于盐度条件,因为在高盐度下的鱼酱发酵导致各种嗜盐或耐盐微生物的发展^[34]。

2.2 GC-MS 鉴定雷山鱼酱酸挥发性成分

由表 2 可知,雷山鱼酱酸样品中检出挥发性成分 60 余种。主要挥发性成分包括萜烯类、醚类、

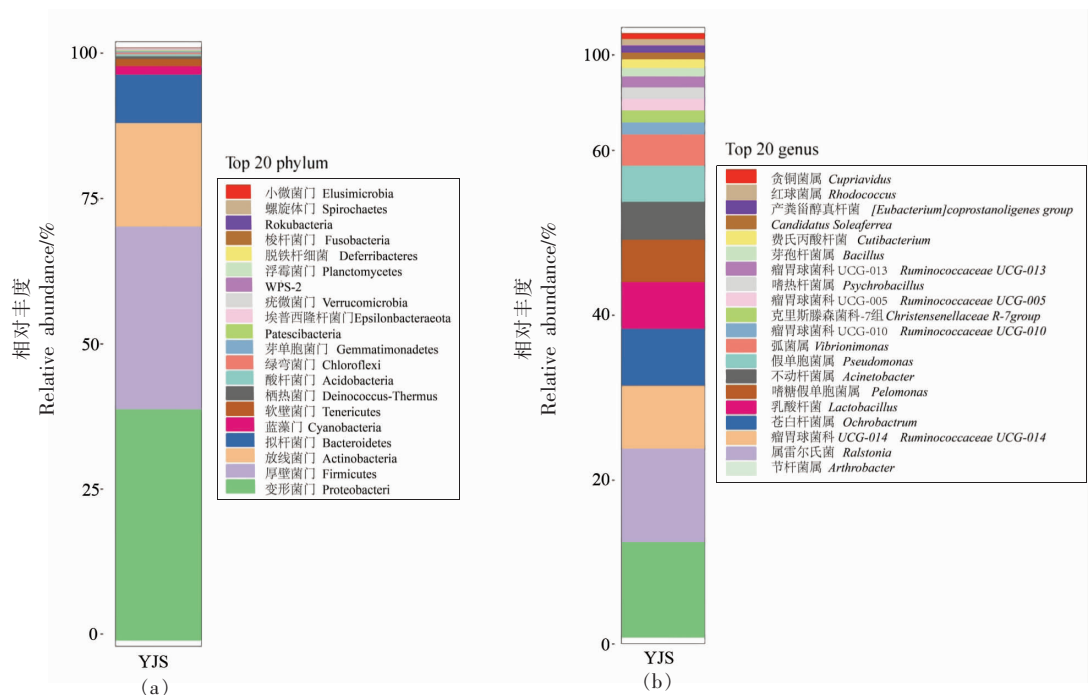


图 1 雷山鱼酱酸中的微生物在门和属水平的分布情况

Fig.1 Distribution of microorganisms in Lei Shan fish sauce acid at phylum level and genus level

醇类、酸类、酯类,各占挥发性成分总量的 33.65%, 33.53%, 16.45%, 7.82%, 6.47%。还有微量挥发性成分,包括芳香族类(0.6%)、酮醛类(0.65%)、烷烃类(0.22%)等物质。萜烯类、醚类是鱼酱酸中主要的挥发性物质,对鱼酱酸风味物质有巨大贡献。本研究检出的多种萜烯类化合物,大多数来自于香辛料^[35]和辣椒^[36]。这类烯烃气味强烈,阈值较低,在鱼酱酸风味的形成过程中提供巨大贡献。且右旋萜二烯(13.12%)、 α -姜黄烯(2.71%)、姜烯(2.41%)等的相对含量较高。右旋萜二烯香气检

出阈值 4~229 $\mu\text{g/kg}$, 呈甜的甜橙和柑橘类风味。蒎烯、香橙烯这些烯烃类物质不仅可以赋予鱼酱酸柑橘香味,在品质提升方面也有很大帮助。含量较高的姜烯、 α -姜黄烯可能与鱼酱酸制作过程中添加的生姜有密切关系,其它萜烯类成分的来源可能是加工过程中添加的辅料,如大料、肉桂、花椒、丁香和砂仁等^[37],是促进鱼酱酸风味形成的主要物质。罗勒烯具有青香、热带果香、菇香、辛香香味、草药味^[38]。

表 2 雷山鱼酱酸中挥发性成分及相对含量测定结果

Table 2 Volatile components and their relative contents in Lei Shan fish sauce sour

化学物名称	CAS 编号	相对含量/%	化学物名称	CAS 编号	相对含量/%
萜烯类			醇类		
蒎烯	7785-70-8	1.00	桉叶油醇	470-82-6	2.72
莰烯	79-92-5	0.40	(\pm)-6-甲基-5-庚烯基-2-醇	1569-60-4	0.80
左旋- β -蒎烯	18172-67-3	0.62	芳樟醇	78-70-6	8.35
桉烯	3387-41-5	2.36	4-萜烯醇	562-74-3	1.47
2-萜烯	554-61-0	0.26	松油醇	8000-41-7	2.19
右旋萜二烯	5989-27-5	13.12	橙花醇	106-25-2	0.74
罗勒烯	13877-91-3	0.79	酯类		
(E)- β -罗勒烯	3779-61-1	0.30	山梨酸乙酯	2396-84-1	0.73
萜品油烯	586-62-9	0.43	癸酸乙酯	110-38-3	0.32

(续表 2)

化学物名称	CAS 编号	相对 含量/%	化学物名称	CAS 编号	相对 含量/%
别罗勒烯	7216-56-0	0.12	苯甲酸乙酯	93-89-0	1.32
反式 α -香柠檬烯	13474-59-4	0.15	水杨酸甲酯	119-36-8	0.58
1-石竹烯	87-44-5	1.21	月桂酸乙酯	106-33-2	0.55
(+)-香橙烯	489-39-4	0.14	十四酸乙酯	124-06-1	0.96
2,6-二甲基-2,6-辛二烯	2792-39-4	0.61	十五酸乙酯	41114-00-5	0.18
4-萹烯	29050-33-7	1.02	棕榈酸乙酯	628-97-7	1.02
1-(1,5-二甲基-4-己烯基)-4-甲基-1,3-环己二烯	451-55-8	0.83	9-十六碳烯酸乙酯	54546-22-4	0.39
(-)- α -古芸烯	489-40-7	0.32	芳香类		
姜烯	495-60-3	2.41	苯甲醇	100-51-6	0.13
1-甲基-4-(1-亚甲基-5-甲基-4-己烯基)环己烯	495-61-4	1.56	间异丙基甲苯	535-77-3	0.47
d-杜松烯	483-76-1	0.93	酚类		
α -石竹烯	6753-98-6	0.53	4-甲基愈创木酚	93-51-6	0.31
α -姜黄烯	644-30-4	2.71	甲基丁香酚	93-15-2	0.12
去氢白菖烯	483-77-2	0.17	4-乙基愈创木酚	2785-89-9	0.16
樟脑	464-49-3	0.11	酮醛类		
硅胶	118-65-0	0.16	崖柏酮	1125-12-8	0.11
1,2-二硫烯	288-26-6	0.31	4-甲氧基苯甲醛	123-11-5	0.35
1-甲基-4-(1-甲基乙基)-1,4-环己二烯	99-85-4	0.75	苯甲醛	100-52-7	0.19
醚类			其它		
氯沙坦甲基醚	1195-79-5	1.06	山梨酸	110-44-1	5.96
4-烯丙基苯甲醚	140-67-0	8.52	丙酸	79-09-4	0.10
茴香脑	104-46-1	23.25	4-己烯酸	35194-36-6	1.76
二烯丙基二硫醚	2179-57-9	0.62	2-甲基四癸烷	1560-95-8	0.22

本研究中检出的 4 种醚类，其中相对含量最高的是茴香脑(23.25%)，是产生酱香的重要物质^[37]，具有浓郁的茴香气，略微甜味。

在此鱼酱样品中醇类的种类相对较为丰富，醇类通常具有芳香、蘑菇香、酸败和土气味，对鱼酱的发酵有着重要作用。芳樟醇贡献百合花香气，且沸点低，属于上等的天然香料；松油醇，具有紫丁香的香气，这些醇类物质赋予了鱼酱酸温和、纯正的香气。芳樟醇、4-萹烯醇等阈值较低，对风味的形成贡献较大^[39]。酸类具有醋味和酸味，是微生物发酵的主要产物，来源于糖类的分解或者氨基酸代谢。鱼酱酸中的山梨酸具有防腐保鲜作用，可以维持鱼酱酸的品质，在食品、化妆品、农药、烟草等行业中都被广泛应用^[38]。酸类物质大部分来自于碳水化合物的分解产物，还有一部分来自于氨

基酸的代谢产物。鱼酱酸中酯类化合物可能是来源于原料中的小河鱼被多种微生物发酵代谢，或者是在发酵过程中的产物酸与醇发生酯化反应，贡献食品特殊的水果香味^[40]，如苯甲酸乙酯稍带有水果气味，也是促进鱼酱酸风味形成的重要物质。酮类一般是在美拉德反应、氨基酸降解或其更深层次反应生成，且适量的酮类会贡献甜的花香和果香风味。苯甲醛在鱼类产品中普遍存在，表现为令人愉快的杏仁味，并通过 Strecker 降解途径从苯丙氨酸产生，或通过氧化降解途径产生亚麻酸。

2.3 雷山鱼酱酸产品品质分析

2.3.1 雷山鱼酱酸中有机酸的分析

有机酸可以在大分子物质水解以及微生物发酵下产生，可以为发酵食品提供独特的风味^[41]，改变其它风味物

质的味感。雷山鱼酱酸中的酸类物质来源于鱼酱酸发酵过程中饱和脂肪酸的氧化降解。酸类物质既是香味物质又是呈味物质，能够影响鱼酱酸的酸味和甜味,从而对鱼酱酸的品质产生影响。经检测,雷山鱼酱酸样品中主要有机酸为柠檬酸,含量为 269.6 mg/kg。在叶陵等^[42]测定自然发酵辣椒有机酸的结果中,柠檬酸含量最高,且此研究表明辣椒中原有的柠檬酸、苹果酸等共同赋予了传统腌辣椒丰富、爽口、滋润的酸味,表明雷山鱼酱酸中产生的柠檬酸也可能来自原料中的辣椒。周晓琴等^[3]在以 4 种代表性的鱼酱酸为研究对象测其有机酸时,主要有机酸为乳酸,而且 4 种不同来源的鱼酱酸中乳酸含量差异显著，导致这种现象可能是由于原料来源、环境微生物和发酵时间的不同。华倩^[23]在研究中也表明鱼酱酸中含有少量柠檬酸，而且适当浓度的柠檬酸不仅可以提高产品的风味品质,还能赋予鱼酱酸产品丰富的滋味特征。

2.3.2 雷山鱼酱酸中脂肪酸的分析 脂肪酸是脂肪酸氧化的底物，可以在氧气含量充足的情况下氧化分解生成大量能量，对产品呈香和人体供能至关重要。另外，脂肪酸还是食品的重要组成成分，有降血压、降血脂、抗血栓等作用,其中不饱和脂肪酸具有预防动脉粥样硬化的作用^[43]。经过分析，检测出雷山鱼酱酸样品中的脂肪酸为亚油酸(0.047 g/100 g)、油酸(0.0424 g/100 g)、棕榈酸(0.035 g/100 g)、 α -亚麻酸(0.0131 g/100 g)、硬脂酸(0.00946 g/100 g)、棕榈油酸(0.00692 g/100 g)、肉豆蔻酸(0.00484 g/100 g)。这与华倩^[23]在接种微生物发酵剂对鱼酱酸品质提升的研究中测定的脂肪酸成分相似。亚油酸作为人体的 2 种必

需脂肪酸之一，参与生物合成类二十烷酸物质作为前体可以合成花生四烯酸。曾有研究表明,亚油酸能参与胆固醇代谢形成亚油酸胆固醇酯，在保护心血管健康,预防动脉粥样硬化方面,具有很好的作用^[44]。油酸、棕榈酸是单不饱和脂肪酸，油酸在延缓动脉硬化上也有一定作用，对高糖和高血脂病人具有很好的保健作用^[45]。棕榈酸可以降低血脂、降血压、促进血液微循环,从而预防和减少心血管疾病的发生^[46]。肉豆蔻酸会提高血胆固醇含量,若超过一定的量则不利于人体健康。

2.3.3 雷山鱼酱酸中氨基酸的分析 游离氨基酸是鱼酱酸滋味的重要来源，也是挥发性风味的重要前体物质。由表 3 可知,雷山鱼酱酸中游离氨基酸总量占 3.91%。呈味氨基酸在口感方面起至关重要的作用,依照氨基酸呈味特征分析,雷山鱼酱酸样品中的氨基酸可分成鲜、甜和苦 3 类。从表 3 中得出,谷氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸为雷山鱼酱酸中的主要游离氨基酸。谷氨酸、天门冬氨酸对鲜味特征有直接贡献作用，二者含量占总游离氨基酸的 26.09%,决定了鲜味在鱼酱酸呈味过程中起主导作用。在张文华等^[47]对银鱼鱼酱酸的研究中，谷氨酸和天冬氨酸含量最高，分别为 0.42%和 0.32%,这与本研究的检测结果相似。对雷山鱼酱酸甜味有直接贡献的为丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、赖氨酸等。亮氨酸、精氨酸、缬氨酸等在苦味方面有直接影响。在鱼酱酸样品中共检测出人体必需氨基酸 6 种，其中亮氨酸含量为 0.3%,是必需氨基酸含量中最高的,它可以与异亮氨酸和缬氨酸一起调节血糖，为身体组织提供能量。

表 3 雷山鱼酱酸中游离氨基酸的组成及质量分数

Table 3 The composition and percentage content of free amino acid in Lei Shan fish sauce sour

名称	呈味	质量分数/%	名称	呈味	质量分数/%
天门冬氨酸(Asp)	鲜味	0.43	缬氨酸	苦味	0.21
谷氨酸	鲜味	0.59	蛋氨酸	甜味	0.04
丝氨酸	甜味	0.16	胱氨酸	—	0.03
精氨酸	苦味	0.27	异亮氨酸	苦味	0.17
甘氨酸	鲜/甜味	0.36	亮氨酸	苦味	0.30
苏氨酸	甜味	0.17	苯丙氨酸	苦味	0.17
脯氨酸	甜味	0.25	组氨酸	苦味	0.07
丙氨酸	鲜/甜味	0.32	赖氨酸	甜味	0.27
酪氨酸	苦味	0.11	氨基酸总量		3.91

3 结论

本研究通过高通量基因测序技术,对雷山鱼酱酸中微生物的多样性和丰度进行鉴定,研究发现雷山鱼酱酸含有22个细菌门,249个细菌属。变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)是主要的细菌门,占了鱼酱酸中细菌门总数的69.81%。节杆菌属(*Arthrobacter*)和雷尔氏菌属(*Ralstonia*)为鱼酱酸的优势菌属,占鱼酱酸细菌属中的22.18%,充分说明雷山鱼酱酸中细菌属的多样性和丰富度较高。同时利用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术,共检测出鱼酱酸中的挥发性成分70种,萜烯类、醚类、醇类、酸类、酯类这5类主要挥发性成分的含量占挥发性成分的97.92%。并检测出雷山鱼酱酸中的主要有机酸柠檬酸为269.6 mg/kg,含量最高的脂肪酸为亚油酸(0.047 g/100 g),主要呈味氨基酸为鲜味氨基酸。本研究为雷山鱼酱酸的微生物多样性研究和风味探究,以及品质改良提供了科学依据,能够丰富人们对雷山鱼酱酸的现有认识,同时也为鱼酱酸的安全生产和工业化生产提供理论指导。

参 考 文 献

- [1] 邹大维,熊建军,刘桂琼. 鱼酱酸调味料生产技术规范研究[J]. 现代食品, 2017(18): 10-13.
ZOU D W, XIONG J J, LIU G Q. Study on technical specifications for producing acid seasoning sauce[J]. Modern Food, 2017(18): 10-13.
- [2] 张文华,周江菊,袁玮. 苗族传统食品鱼酱酸制作工艺分析[J]. 中国酿造, 2009(8): 131-134.
ZHANG W H, ZHOU J J, YUAN W. Analysis of manufacturing process of traditional fermented food fish sauce-acid of Miao nationality[J]. China Brewing, 2009(8): 131-134.
- [3] 周晓琴,石庆楠,陈中爱. 凯里特色鱼酱酸品质特性研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(3): 87-91.
ZHOU X Q, SHI Q N, CHEN Z A. Study on quality characteristics of typical fish sauce acid from Kaili[J]. China Condiment, 2020, 45(3): 87-91.
- [4] ALKEMA W, BOEKHORST J, WELS M, et al. Microbial bioinformatics for food safety and production[J]. Briefings in Bioinformatics, 2016, 17(2): 283-292.
- [5] 马冰涛,范恩帝,李泽霞,等. 老白干香型白酒制曲过程中微生物多样性及其与风味成分的关系[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(16): 7-16.
MA B T, FAN E D, LI Z X, et al. Relationship between microbial diversity and flavor components in koji production of Laobaigan-flavor liquor[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(16): 7-16.
- [6] LIU Z, WANG Z, SUN J, et al. The dynamics of volatile compounds and their correlation with the microbial succession during the traditional solid-state fermentation of Gutian Hong Qu glutinous rice wine[J]. Food Microbiology, 2020, 86: 103347.
- [7] 于美娟,谭欢,马美湖,等. 传统固态发酵鱼中细菌群落多样性与品质特征分析[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 86-95.
YU M J, TAN H, MA M H, et al. Bacterial community diversity and quality characteristics in traditional solid-fermented fish[J]. Food Science, 2017, 38(8): 86-95.
- [8] WANG Y, YANG C, LI S, et al. Volatile characteristics of 50 peaches and nectarines evaluated by HP-SPME with GC-MS[J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 356-364.
- [9] ANTONIO M, PAOLA S, MARINO C, et al. Characterization of donkey milk and metabolite profile comparison with human milk and formula milk[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 74: 427-433.
- [10] WELDEGERGIS B T, VILLIERS A D, CROUCH A M. Chemometric investigation of the volatile content of young South African wines[J]. Food Chemistry, 2011, 128(4): 1100-1109.
- [11] KIM H, CADWALLADER K R, KIDO H, et al. Effect of addition of commercial rosemary extracts on potent odorants in cooked beef[J]. Meat Science, 2013, 94(2): 170-176.
- [12] 付琳琳,曹郁生,李海星,等. 应用PCR-DGGE技术分析泡菜中乳酸菌的多样性[J]. 食品与发酵工业, 2005(12): 103-105.
FU L L, CAO Y S, LI H X, et al. The diversity of lactic acid bacteria from traditional Chinese pickles by PCR-DGGE[J]. Food and Fermentation Industries, 2005(12): 103-105.
- [13] WANG H, QIN X J, MI S, et al. Contamination of yellow-feathered broiler carcasses: Microbial diversity and succession during processing[J]. Food Micro-

- biology, 2019, 83: 18–26.
- [14] 陈伟, 李杨, 谷新晰, 等. 腌制臭鸡蛋中微生物多样性分析及关键物质含量测定[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 158–165.
- CHEN W, LI Y, GU X X, et al. Diversity of microbial community and key substances in naturally fermented stinky egg[J]. Food Science, 2020, 41(22): 158–165.
- [15] YE J, JOSEPH S D, JI M, et al. Chemolithotrophic processes in the bacterial communities on the surface of mineral-enriched biochars[J]. The ISME Journal, 2017, 11(5): 1087–1101.
- [16] CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN M J, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature Methods, 2016, 13(7): 581–583.
- [17] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2011, 7(5): 335–336.
- [18] 卢靖, 刘平, 张丽珠, 等. 腐乳发酵过程挥发性风味成分的变化[J]. 食品科学, 2014, 35(16): 175–179.
- LU J, LIU P, ZHANG L Z, et al. Changes in volatile flavor compounds in Sufu during fermentation[J]. Food Science, 2014, 35(16): 175–179.
- [19] FAN H P, ZHENG X L, AI Z L, et al. Analysis of volatile aroma components from Mantou fermented by different starters[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2018, 42(6): e13627.
- [20] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品有机酸的测定: GB 5009.157–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017: 1–6.
- National Health and Family Planning, National food safety standards determination of food organic acids: GB 5009.157–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017: 1–6.
- [21] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定: GB 5009.168–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017: 1–20.
- National Health and Family Planning, Commission China Food and Drug Administration. National food safety standards Determination of fatty acids in food: GB 5009.168–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017: 1–20.
- [22] ZENG X, XIA W, JIANG Q, et al. Biochemical and sensory characteristics of whole carp inoculated with autochthonous starter cultures[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2015, 24(1): 52–67.
- [23] 华倩. 接种微生物发酵剂对鱼酱酸品质提升研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- HUA Q. Study on quality improvement of fish sauce acid by inoculating microbial starter [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [24] 刘玥佳, 韩业君, 彭文君, 等. 基于高通量测序技术分析蜂粮微生物多样性[J]. 食品科学, 2020, 41(10): 94–100.
- LIU Y J, HAN Y J, PENG W J, et al. Analysis of microbial community diversity in bee bread by high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2020, 41(10): 94–100.
- [25] 张敏, 张艳, 黄丽丽, 等. 基于 16S rDNA 高通量测序方法比较新疆西北部地区乳品中微生物的多样性[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 27–33.
- ZHANG M, ZHANG Y, HUANG L L, et al. Application of 16S rDNA high-throughput sequencing for comparative study of the microbial diversity of dairy products from western and northern Xinjiang, China[J]. Food Science, 2017, 38(20): 27–33.
- [26] 宋相宇, 李鸣, 王虎虎, 等. 高通量测序分析白切鸡菌群多样性[J]. 食品科学, 2020, 41(17): 246–252.
- SONG X Y, LI M, WANG H H, et al. Analysis of bacterial community diversity of soft-boiled chicken by high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2020, 41(17): 246–252.
- [27] 李春生, 王悦齐, 李来好, 等. 传统鱼露发酵过程中细菌群落演替及其挥发性风味形成的影响分析[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 85–92.
- LI C S, WANG Y Q, LI L H, et al. Bacterial community succession during fermentation of Chinese fish sauce and its effect on formation of volatile flavor components[J]. Food Science, 2018, 39(24): 85–92.
- [28] 赵凤, 李小义, 张效平. 鲟鱼发酵过程中微生物的演替变化分析[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(3): 67–75.
- ZHAO F, LI X Y, ZHANG X P. Bacterial community succession analysis of fermented sturgeon at different stages [J]. Journal of Food Science and

- Technology, 2019, 37(3): 67-75.
- [29] 刘洋, 丁悦, 孙劲松, 等. 基于高通量测序对四川辣椒酱自然发酵过程中细菌群落结构演替规律的研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 81-86.
- LIU Y, DING Y, SUN J S, et al. Succession of bacterial community structure during Sichuan chili sauce natural fermentation analyzed by high-throughput sequencing[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(24): 81-86.
- [30] ZANG J H, XU Y S, XIA W S, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession during fermentation of Suan yu, a Chinese traditional fermented fish, determined by high throughput sequencing[J]. Food Research International, 2018, 111: 565-573.
- [31] 赵飞. 南京龙山钾矿物表生细菌的生物多样性及其与含钾矿物相互作用的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- ZHAO F. Study on the biological diversity and interaction between bacteria and potassium-bearing minerals in Longshan, Nanjing[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.
- [32] COIA J E, JOHNSTON Y, STEERS N J, et al. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 66(1/2): 63-69.
- [33] ZENG X F, XIA W S, JIANG Q X, et al. Effect of autochthonous starter cultures on microbiological and physico-chemical characteristics of Suan yu, a traditional Chinese low salt fermented fish[J]. Food Control, 2013, 33(2): 344-351.
- [34] LEE S H, JUNG J Y, JEON C O. Bacterial community dynamics and metabolite changes in myeolchi-aekjeot, a Korean traditional fermented fish sauce, during fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 203: 15-22.
- [35] BIS-SOUZA C V, PATEIRO M, DOMINGUEZ R, et al. Volatile profile of fermented sausages with commercial probiotic strains and fructooligosaccharides[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(12): 5465-5473.
- [36] WANG J, WANG R, XIAO Q, et al. SPME/GC-MS characterization of volatile compounds of Chinese traditional-chopped pepper during fermentation[J]. International Journal of Food Properties, 2019, 22(1): 1863-1872.
- [37] 臧明伍, 王宇, 韩凯, 等. 北京清真酱牛肉挥发性风味化合物的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8): 70-73, 357.
- ZANG M W, WANG Y, HAN Y, et al. Study on volatile flavor compounds of Beijing moslemic braised beef with soy sauce[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(8): 70-73, 357.
- [38] 杨瑞香, 马丽娅, 王宇. 基于 SPME/GC-MS 对清油麻辣火锅底料挥发性风味成分分析[J]. 食品工业, 2020, 41(6): 310-313.
- YANG R X, MA L Y, WANG Y. Analysis of volatile flavor components of oily spicy hot pot seasoning based on SPME/GC-MS[J]. The Food Industry, 2020, 41(6): 310-313.
- [39] 刘洋, 张宁, 徐晓兰, 等. SDE/GC-MS 分析火锅底料的挥发性风味成分[J]. 中国食品学报, 2014, 14(2): 283-291.
- LIU Y, ZHANG N, XU X L, et al. Analysis of volatile compounds in chafingdish by simultaneous distillation extraction with gas chromatography mass spectroscopy[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(2): 283-291.
- [40] 赵馨馨, 崔梦君, 董蕴, 等. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析巴东地区豆瓣酱中微生物多样性[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 297-303.
- ZHAO X X, CUI M J, DONG Y, et al. Analysis of microbial diversity in Badong bean paste by Illumina Miseq high throughput sequencing technology[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(9): 297-303.
- [41] 于筱雨, 方佳兴, 向琴, 等. 响应面法优化郫县豆瓣中有机酸的提取工艺及 HPLC 定量分析[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 286-291.
- YU X Y, FANG J X, XIANG Q, et al. Extraction optimization by response surface methodology and HPLC analysis of organic acids from Pixian broad bean paste[J]. Food Science, 2019, 40(4): 286-291.
- [42] 叶陵, 王晶晶, 王蓉蓉, 等. 剁辣椒发酵过程中菌群与有机酸变化规律分析[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 116-121.
- YE L, WANG J J, WANG R R, et al. Changes in microflora and organic acid contents during the fermentation of chopped pepper[J]. Food Science, 2018, 39(6): 116-121.
- [43] 赵明, 翁珣. ω -3 多不饱和脂肪酸对肿瘤治疗有益

- 还是有害[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2016, 3(2): 91-94.
- ZHAO M, WENG X. Are ω -3 polyunsaturated fatty acids beneficial or harmful to tumor therapy [J]. Electronic Journal of Metabolism and Nutrition of Cancer, 2016, 3(2): 91-94.
- [44] 王辉明, 吕志强, 陈嘉鹏. 北沙参的脂肪酸特征及产地差异性分析[J]. 中国海洋药物, 2020, 39(3): 58-63.
- WANG H M, LV Z Q, CHEN J P. Characteristics of fatty acids in *Glehniae Radix* from different producing areas [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2020, 39(3): 58-63.
- [45] 唐迪, 邹烨, 仰榴青. GC-MS 分析木瓜籽油中的脂肪酸组成[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(10): 301-302.
- TANG D, ZHOU Y, YANG L Q. Analysis of fatty acid composition in Papaya seed Oil by GC-MS [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(10): 301-302.
- [46] 雷占兰. 柏脂生物柴油副产物棕榈酸甲酯分提开发应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- LEI Z L. Development and application of methyl palmitate as by-product of Tallow biodiesel[D]. Nanchang: Nanchang University, 2007.
- [47] 张文华, 袁玮, 蒋天智, 等. 银鱼鱼酱酸制作及品质分析[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(36): 20720-20721, 20742.
- ZHANG W H, YUAN W, JIANG T Z, et al. Manufacturing process and quality evaluation of whitebait fish sauce-acid[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(36): 20720-20721, 20742.

Analysis of Microbial Diversity and Quality Characteristic of Leishan Fish Sauce Acid

Zhang Lijuan, Gu Xinxi, Sun Jilu, Tian Hongtao, Lu Haiqiang*

(College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei)

Abstract In this study, high-throughput sequencing technology was used to sequence the bacterial 16S rDNA V3-V4 region in Leishan fish sauce acid, solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were used to detect fish sauce. Volatile components in acid, and used statistical analysis to calculate its quality characteristics. According to the analysis, there were 1 515 ASVs, 22 phylum and 249 genera of Leishan fish sauce acid. Proteobacteria (39.13%) and Firmicutes (30.68%) were the main bacterial phylum in Leishan fish sauce acid. *Arthrobacter* (11.246%) and *Ralstonia* (10.929%) were the main bacterial genera. Seventy volatile components including terpenes (33.65%), ethers (33.53%), alcohols (16.45%), acids (7.82%) and esters (6.47%) in Leishan fish sauce acid were detected by SPME combining GC-MS. Among them, anethole (23.25%), *d*-limonene (13.12%), 4-methoxyallylbenzene (8.52%), linalool (8.35%) and sorbic acid (5.96%) were the main volatile components. In the quality analysis of fish sauce acid, the highest content of citric acid in organic acids was 269.6 mg/kg, the main fatty acid was linoleic acid (0.047 g/100 g), and the umami amino acid was the main flavor characteristic of amino acids. In this study, the microflora structure and volatile components of Leishan fish sauce acid were identified for the first time, which provided a theoretical basis for exploring the fermentation mechanism of Leishan fish sauce acid and standardizing its production and food safety.

Keywords Leishan fish sauce acid; microbial diversity; volatile compounds; quality analysis