

自然发酵厚皮菜菌群结构及风味品质分析

于世娇¹, 李 帅¹, 翁佩芳¹, 吴祖芳^{1*}, 刘亚楠^{2,3*}

(¹ 宁波大学食品科学与工程系 浙江-马来西亚农产品加工与营养联合研究实验室

食品微生物与营养健康省级重点实验室 浙江宁波 315832

² 中国商业联合会食品重点有害物质检测与风险防范重点实验室

宁波市食品重点有害物质检测、控制与预警重点实验室

宁波市产品与食品质量检测研究院(宁波市纤维检验所) 浙江宁波 315048

³ 南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

摘要 为了探究传统自然发酵四川厚皮菜的微生物体系及其风味品质,采用高通量测序和生物信息学相关技术,解析发酵厚皮菜的微生物菌群结构及菌群间的生物学关系。通过液相色谱法测定其有机酸的种类及含量,采用顶空固相微萃取(HS-SPME)与气相色谱-飞行时间质谱联用(GC-TOFMS)技术分析其挥发性风味成分。结果表明:该发酵厚皮菜的主要优势菌群为乳杆菌属、未分类蓝细菌属、盐单胞菌属及慢乳杆菌属;该发酵厚皮菜中含乙酸、柠檬酸、乳酸等 6 种有机酸,且其中乳酸含量最高为 470.50 mg/100 mL;挥发性风味物质中酸类物质相对含量最高,主要是乙酸,其次是 2-辛醇等醇类和乳酸乙酯等酯类物质。本研究阐明了发酵四川厚皮菜菌群结构与其风味物质形成的相关性,为进一步改善传统发酵厚皮菜工艺及接种控制规模化生产等提供理论依据。

关键词 自然发酵; 菌群结构; 有机酸; 风味品质

文章编号 1009-7848(2025)01-0359-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.034

厚皮菜(*Beta vulgaris* var. *cicla* L.)是藜科甜菜属二年生草本植物,具有耐旱、耐寒及耐盐碱等特点^[1-2]。厚皮菜是甜菜的一个变种,属于叶用甜菜,又名苕苕菜、海白菜、猪鬃菜、牛皮菜等,其中富含生物活性物质、植物色素、类黄酮和矿物质等,具有抗氧化和免疫调节特性^[3]。厚皮菜中富含膳食纤维和蛋白质,还含有抗氧化剂 α -硫辛酸,能够降低葡萄糖水平并增加胰岛素敏感性^[4],因此厚皮菜对糖尿病具有潜在的预防和辅助治疗作用^[5]。我国四川、湖南、湖北、广东等地都有食用厚皮菜的做法。四川自然发酵的厚皮菜味道咸酸,口感脆生,色泽鲜亮,开胃提神,深受人们喜爱。家庭发酵一般将根部去掉后,摆放至容器中,一层菜加一层盐循环,加入辅料后用石头压好密封,阴凉处存放 1 周即可食用。由于家庭生产条件不完善,因此厚皮菜的质量可能非常不稳定,原料中的天然

微生物会影响终产品的理化性质、菌群结构及风味组成^[6],无法保证发酵厚皮菜的品质。传统自然发酵厚皮菜的发酵过程复杂且不明确,难以判断其发酵周期,需研究阐明其微生物多样性及风味品质。

高通量测序是用于探索微生物群落结构的下一代测序技术。该技术克服了传统培养方法的缺点,大大缩短了分析时间,并可以对完整的微生物组成进行全面的认识,已被用于分析各种食品中微生物群落的多样性^[7-9]。气相色谱-飞行时间质谱(Gas chromatography-time-of-flight mass spectrometer, GC-TOFMS)具有扫描速度快和离子采集效率高等特点,由于飞行时间质谱在理论上无质量限制,因此该技术可广泛应用于食品领域的研究。He 等^[10]对 65 个白酒样品通过固相微萃取(Solid phase micro extraction, SPME)提取挥发性化合物,随后通过全二维气相色谱-飞行时间质谱(Comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, GC \times GC-TOFMS)进行分析,结果证明此方法可较好地地区分白酒样品的香气和来源(区域)。

收稿日期: 2024-01-19

基金项目: 宁波市重点研发计划项目(2022Z176)

第一作者: 于世娇,女,硕士生

通信作者: 吴祖芳 E-mail: wzfwf@163.com

刘亚楠 E-mail: yliu98@126.com

本研究以自然发酵成熟四川厚皮菜为原料,采用高通量测序技术分析自然发酵厚皮菜中微生物群落组成和多样性,探究发酵厚皮菜中的关键菌种,对核心门和属进行相关性分析,并对发酵厚皮菜中的有机酸、挥发性物质等风味物质进行分析。为探究发酵厚皮菜微生物菌群结构对风味物质形成机理提供重要参考,为后续生产工艺优化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

发酵厚皮菜卤水样品,采自四川当地家庭自然发酵泡菜。于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。取5个平行,命名为SC1,SC2,SC3,SC4,SC5。TGuide S96 基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;琼脂糖电泳试剂盒,北京博美富鑫科技有限公司;OMEGA DNA 纯化试剂盒,北京鸿跃创新科技有限公司;KOD FX Neo (TOYOBO)、Phusion HF MM,北京百灵克生物科技有限责任公司;磷酸二氢钾、磷酸(分析纯级)、甲醇(色谱纯级),上海麦克林生化科技股份有限公司;乳酸、柠檬酸、苹果酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸,阿拉丁试剂(上海)有限公司;2-辛醇,TCl。

1.2 仪器与设备

Synergy HTX 酶标仪, GeneCompang Limited 基因有限公司;Vortex-2G560E 涡旋振荡器,美国 Scientific Industries Inc;veriti96well9902 梯度基因扩增仪,爱普拜斯应用生物系统贸易(上海)有限公司;3-16P 24 孔离心机,德国赛多利斯公司;BE-1100 四维旋转混匀仪,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;1260 型液相色谱仪、7890B 气相色谱仪、5977B 质谱仪,安捷伦有限公司。

1.3 方法

1.3.1 高通量测序 用 TGuideS96 基因组 DNA 提取工具箱提取样本核酸,用酶标仪测定提取出的核酸浓度,按照测定数据进行扩增,利用质量分数为 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳测定扩增后的 PCR 产物的完整性。根据保守区设计引物 F:ACTCC TACGGGAGGCAGCA;R:GGACTACHVGGGTWTC TAAT。在引物末端加上测序接头进行 PCR。PCR

的反应条件:预变性($95\text{ }^{\circ}\text{C}$)5 min,变性($95\text{ }^{\circ}\text{C}$)30 s,退火($50\text{ }^{\circ}\text{C}$)30 s,循环 25 次,延伸($72\text{ }^{\circ}\text{C}$)40 s,终延伸($72\text{ }^{\circ}\text{C}$)7 min,将 PCR 产物放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏,备用。高通量测序得到的原始图像数据文件,去除接头序列、模糊序列和嵌合序列^[11-12],得到最终有效数据。

1.3.2 有机酸的测定 将 10 mL 超净水加入到 5 mL 发酵厚皮菜汁液中,超声 20 min,在 10 000 r/min 下离心 15 min,用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤上清液,再转进 1.5 mL 安瓿瓶,上机检测。色谱柱:AgilentTC-C18 ($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}\times 5\text{ }\mu\text{m}$);检测器:VWD 检测器;检测波长 210 nm;流动相:0.01 mol/L 磷酸二氢钾:甲醇为 98:2 (磷酸调 pH 值至 2.5);流速 0.8 mL/min;进样量 20 μL ;柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。称取柠檬酸、苹果酸、乳酸、琥珀酸、酒石酸各 100 mg,乙酸 100 μL 用流动相溶解并定容至 25 mL 容量瓶中,得到 0.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 乙酸,0.4 mg/mL 酒石酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸的有机酸混合标准母液,用流动相稀释 0,2,4,5,10,20,25,50,100 倍,再用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后,进样,根据峰面积和质量浓度的关系绘制标准曲线。

1.3.3 挥发性物质测定 在 20 mL 顶空瓶中加入 100 μL 发酵厚皮菜汁液,再加入 10 μL 2-辛醇为内标。萃取温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$;预热时间 15 min;萃取时间 30 min;解析时间 4 min;色谱柱:DB-Wax ($30\text{ m}\times 250\text{ }\mu\text{m}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$);柱流速 1 mL/min,不分流进样;柱箱升温程序 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 4 min,以 $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 $245\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 5 min;进样口温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$;离子源温度 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$;四极杆温度 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$;质量范围:20~400 m/z ;溶剂延迟 0 min。按以上条件编辑方法后,启动仪器开始孵化,之后萃取解吸进入气相色谱-飞行时间质谱联用仪,分析并收集数据。

1.4 数据处理

通过 matplotlib_1.4.3,python2 (matplotlib-v1.5.1),MEGAN v5.8.1,picrust2 (2.3.0) 等软件和数据库分析数据,通过 Mothur 软件进行 Rarefaction、Shannon 分析,GrappPad Prism 9.5.1 对其余数据进行处理。利用 SPSS 19 软件进行 Spearman 相关性分析($P<0.05$)。使用 Chroma TOF 软件(V 4.3x, LECO)和 NIST 库对质谱数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 高通量测序结果

2.1.1 发酵厚皮菜样品序列分析 使用 Illumina 高通量测序技术对整个样品 16S rRNA 的 V3-V4 区域进行测序,共获得 355 180 条序列,OTU 覆盖率为 100%,说明样品中的微生物物种全部被检测出来,可以很好地反映出样品中的菌种数据。各平行样品的 OTU 数量(图 1a)和 Venn 图分析结果显

示(图 1b),各平行样品的 OTU 数量分别为 343, 457, 357, 402, 323; 5 个样品之间共有 OTU 数量为 80 个。采用 SILVA 作为参照数据库,通过对这些特征序列的分类学研究,获取各个特征所对应的物种分类学信息,在不同分类等级上(门、纲、目、科、属)分析其群落组成。样品中的微生物被鉴定为 19 个门,32 个纲,86 个目,147 个科,215 个属。

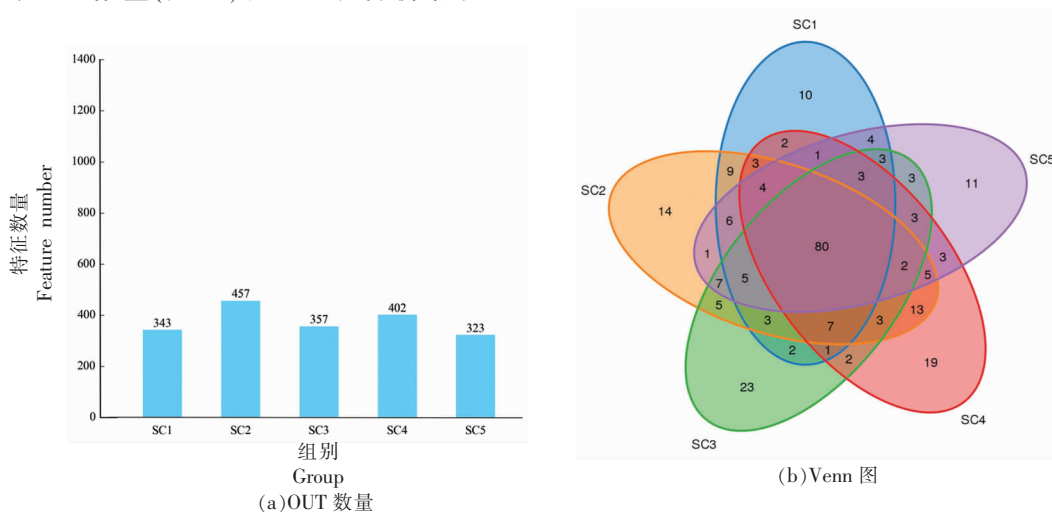


图 1 发酵四川厚皮菜样品的 OTU 数量和 Venn 图

Fig.1 The number of OTUs and Venn diagram of fermented Sichuan Swiss Chard samples

2.1.2 发酵厚皮菜的细菌多样性分析 通过构建稀释曲线,可以计算出 Feature 丰度,以反映样品的物种丰富度。如果稀释曲线趋于平缓,这表明有足够的数,更表明结果反映了样品中实际的微生物多样性。如图 2a 和 2b 所示,除个别样品外,当随机选取序列数目几近 10 000 时,稀释曲线和

Shannon 曲线近乎平坦,纵轴上的 Feature 数量也比较稳定,达到饱和状态,这说明测序数目合理,而且随着序列数目的增加,发酵厚皮菜叶中的细菌多样性变化也不大,可以充分反映出发酵厚皮菜叶中大部分的微生物多样性。

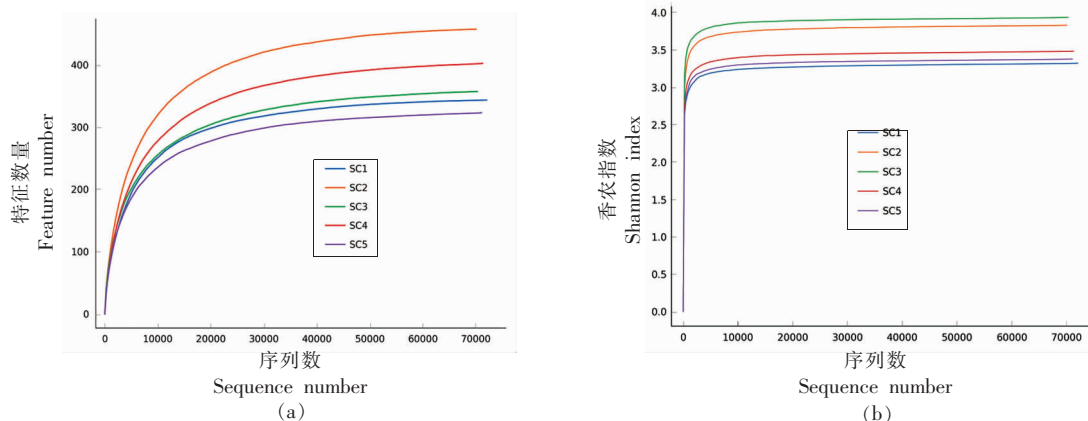


图 2 发酵四川厚皮菜菌群的稀释曲线和 Shannon 指数曲线

Fig.2 Dilution curve and Shannon index curve of bacterial in fermented Sichuan Swiss Chard

2.1.3 Alpha 多样性 Alpha 多样性是在一定环境或生态系统中所具有的生物多样性,它体现了物种的丰富度和均匀度及序列水平。Chao1 和 Ace 两指数代表物种多样性,即生物体的数量。Shannon 和 Simpson 指数是反映物种多样性的重要指标,其大小与样本中物种的丰度、均一度有关。当种类数量相同时,群落内所有种类的均一性越大,代表群落的多样性越高,Shannon 和 Simpson 指数的数值越大,代表群落的多样性越高^[13],而二者的

区别在于 Shannon 指数对少数稀缺物种更为敏感,Simpson 指数对优势物种的丰度更为敏感。此外,覆盖率(Coverage)越高,样品中检测到该物种的可能性就越大。如表 1 所示,细菌的 Feature 总数为 323~457,Chao1 指数为 324~457.0244,Shannon 和 Simpson 指数范围分别为 3.3218~3.9353 和 0.6953~0.7734,根据各指数结果表明,发酵厚皮菜样品菌群丰度较高,各样本之间菌属丰富度差异较小。

表 1 发酵四川厚皮菜样品菌群多样性指数

Table 1 Diversity index of bacterial in fermented Sichuan Swiss Chard samples

样品	Feature 数	ACE 指数	Chao1 指数	Simpson 指数	Shannon 指数	Coverage 指数
SC1	343	343.0000	343.0000	0.6953	3.3218	1.0000
SC2	457	457.5109	457.0244	0.7520	3.8314	1.0000
SC3	357	358.4764	357.2857	0.7734	3.9353	0.9999
SC4	402	403.6873	402.4167	0.7150	3.4832	0.9999
SC5	323	324.9256	324.0000	0.7039	3.3783	0.9999

根据物种丰度表和物种注释表,计算其在门水平、属水平相对丰度比例,门、属水平代表性强且分类清晰便于比较。如图 3 所示,发酵厚皮菜样品在门水平上细菌种类分别是厚壁菌门、变形菌门、蓝藻细菌、放线菌门、拟杆菌门、弯曲菌门、酸杆菌门、梭杆菌门和热脱硫杆菌门等。5 个样本检测结果基本相似,从门水平上,发酵厚皮菜中厚壁菌门相对丰度超过 70%,说明该地区的发酵厚皮菜主要贡献菌群为厚壁菌门,其它优势菌还包括

变形菌门、蓝藻细菌和放线菌门。这些结果与之前的研究一致^[14-15],即在其它发酵蔬菜产品,如腌萝卜和酸菜中,前 2 个门被鉴定为厚壁菌和变形杆菌。Wang 等^[16]对芥菜泡菜的细菌群落结构进行研究,发现发酵中期高盐阶段样品中 75.15%的 OTU 被归类为变形杆菌门和厚壁菌门,在门水平上,被定义为核心微生物群。Yang 等^[7]在研究重庆萝卜泡菜微生物群落动态时发现,厚壁菌门和变形菌门被定义为核心菌群,是所有样品中相对丰度大

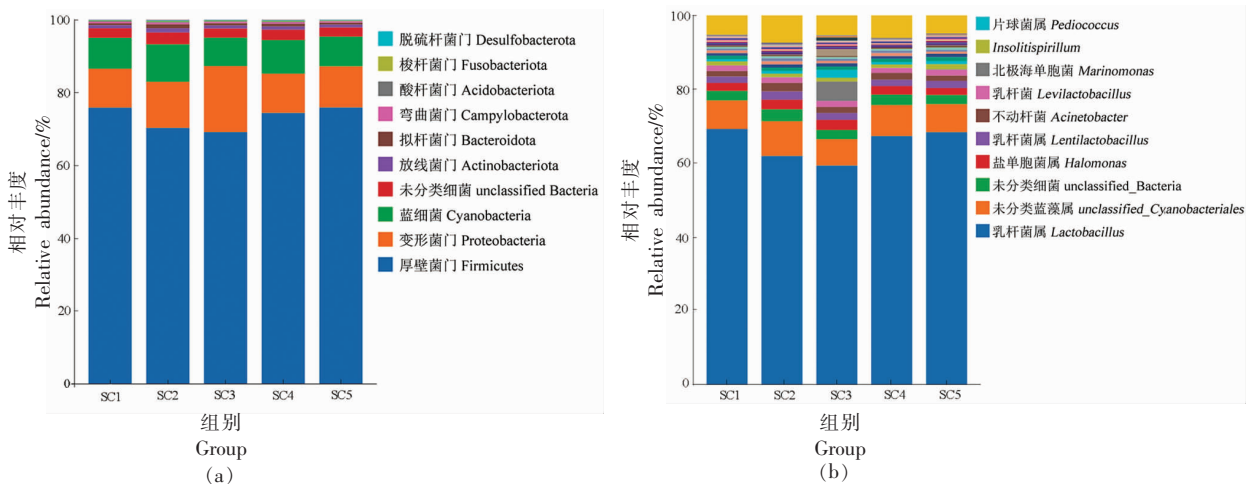


图 3 细菌相对丰度柱状图

Fig.3 Columnar diagram of relative abundance of bacteria

于 1% 的 2 个主要细菌门。

在属水平上, 发酵厚皮菜中有相当多种类丰富且平均含量相对较高的菌属, 它们分别是乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、未分类蓝细菌 (*unclassified_Cyanobacteriales*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*)、慢乳杆菌属 (*Lentilactobacillus*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、促生乳杆菌属 (*Levilactobacillus*)、海单胞菌属 (*Marinomonas*)、片球菌属 (*Pediococcus*) 和 *Companilactobacillus* 等, 其平均相对丰度分别为 65.23%, 8.05%, 1.90%, 1.77%, 1.48%, 1.10%, 0.98%。可以发现, 发酵厚皮菜菌群结构中, 乳杆菌属占绝对优势, 其次是未分类蓝细菌属、盐单胞菌属和慢乳杆菌属。乳杆菌属是四川泡菜中公认的优势菌群, 这与利用传统发酵方法测定四川泡菜微生物群落的结果较为一致^[17]。而

Wang 等^[18]在研究泡菜时发现, 在发酵后期核心微生物植物乳杆菌占主导地位, 而魏斯氏菌等耐酸性较弱的微生物进一步减少。

2.1.4 种群相关性网络分析 为进一步研究上述主要微生物之间的相互关系, 选取属水平上 80 个菌属, 根据每个样品中各菌属丰度及变化, 使用 Spearman 算法进行物种间的相关性分析 (包括正相关和负相关) 和计算, 并进行统计检验。细菌菌群间的相关性分析表明, 大部分细菌菌属间存在着明显的正向调控机制 ($P < 0.05$); 在所有细菌中, 有 71 种菌属之间存在着极显著的正相关关系, 29 种菌属间存在着极显著的负相关关系, 这种相互间的生物联系是发酵动力学、风味动力学形成与调节的基础。高相关性节点是微生物网络中的 1 个微生物个体, 其与特定数目的其它微生物个体

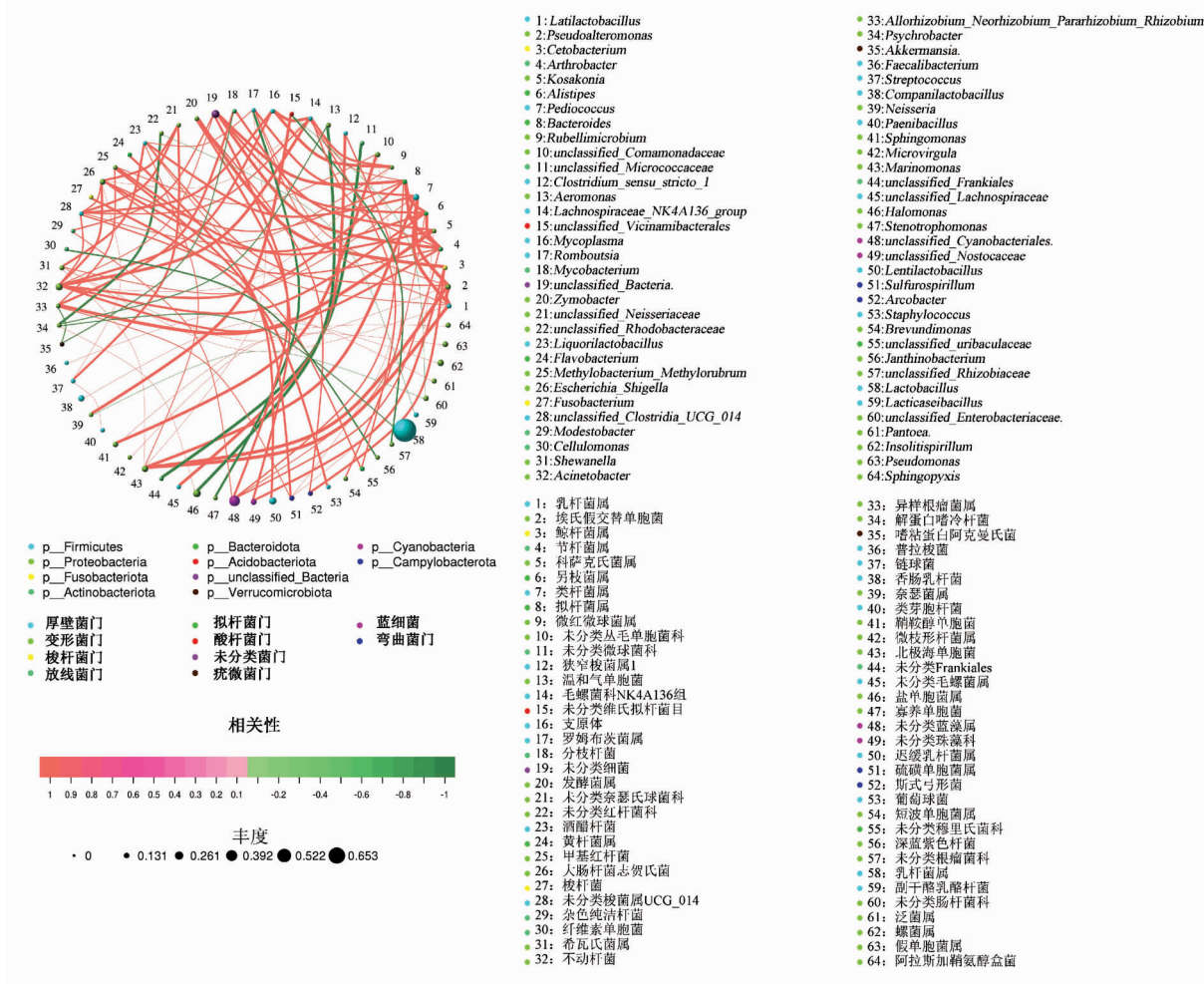


图 4 发酵四川厚皮菜样品细菌菌群相关性网络图

Fig.4 Correlation network diagram of bacterial communities in fermented Sichuan Swiss Chard samples

之间存在较强的相关性，它也被称为中心节点(Hub)。Hubs 的类型和数量可以从某种意义上反映出某一特殊环境中微生物群落结构的稳定情况^[19]。从发酵厚皮菜细菌菌群的相关性网络(图 4)中发现乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 有 1 个负相关 Hub (此处是指与其它 5 个属的微生物存在负相关关系的节点)。乳杆菌属(*Lactobacillus*)与盐单胞菌属(*Halomonas*)、植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus*)、乳酪杆菌属(*Lacticaseibacillus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、艾克曼菌属(*Akkermansia*)之间呈显著负相关性($P<0.05$)。乳杆菌属代谢碳水化合物能力较强，产生的大量乳酸会造成环境酸度增加，从而影响其它微生物的生长；此外乳杆菌属部分菌株的代谢物特别是细菌素等具有抑菌作用^[20]，这可能是导致乳杆菌属与其它菌属呈现明显负相关性的重要原因。

未分类蓝细菌 (*unclassified_Cyanobacteriales*)、埃希氏菌_志贺氏菌(*Escherichia_Shigella*)、*unclassified_Muribaculaceae*、*unclassified_Nostocaceae* 是网络图中的正相关 Hubs (此处表示与其它 4 个属的微生物存在正相关关系的节点)。不动杆菌属(*Acinetobacter*)与节杆菌属(*Arthrobacter*)、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* 都呈显著正相关($P<0.05$)，与分枝杆菌属(*Mycobacterium*)呈显著负相关($P<0.05$)。链球菌(*Streptococcus*)与埃希氏菌_志贺氏菌(*Escherichia_Shigella*)、*unclas-*

sified_Muribaculaceae、*unclassified_Clostridia_UCG_014*、另枝菌属(*Alistipes*)和 *unclassified_Neisseriaceae* 呈显著正相关($P<0.05$)。

2.1.5 Picrust2 功能预测分析 利用 Picrust2 软件对 16S 序列进行分析，从而推断出该物种中的功能基因。经基因注释得到了 44 条 KEGG 代谢通路，所有通路之间 $P<0.05$ ，差异显著。如图 5 所示，对二级功能层进行分析，代谢通路图、碳水化合物代谢、膜转运、核苷酸代谢、氨基酸代谢、翻译、能量代谢、复制和修复、辅因子和维生素的代谢等二级功能层在发酵厚皮菜样品中富集，相对丰度均在 3.7%以上，表明这些富集基因在发酵中具有显著作用^[21]，且对人体有一定的保健作用^[22]。氨基酸的代谢和生物合成增强了发酵过程中风味和香气化合物的产生^[23]。

而二级功能层中物质依赖性、心血管疾病和感官系统途径相对丰度较低，均小于 0.01%。此外虽然也观察到与人类疾病相关的一些途径的预测，但它们的丰度太低，无法产生重大影响^[24]。作为优势菌属的乳酸杆菌维持着多种代谢途径，这些途径表现为一个复杂的网络。每个网络途径都涉及针对特定底物的独特细菌酶。特定乳酸杆菌代谢特征和植物酶活性的协同作用可能会增加植物化学物质的生物利用度和生物活性，可能导致功能性微生物代谢物数量显著增加，这可能对人类健康产生有益影响^[25]。



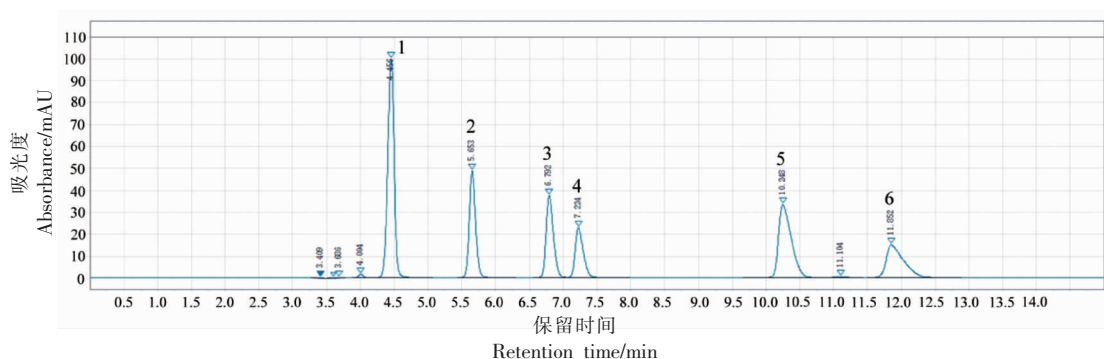
图 5 KEGG 代谢途径分析图

Fig.5 KEGG metabolic pathway analysis diagram

2.2 发酵厚皮菜风味品质分析

2.2.1 发酵厚皮菜有机酸分析 对不同浓度的 6 种有机酸(酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸)标准品混合溶液进行液相色谱分析(图 6),其标准曲线的线性相关性分析如表 2 所示。由图 6 和表 2 可知,6 种有机酸标准品分离效果良好,其标准曲线相关系数均在 0.9969 以上,6 种有机酸峰面积与含量之间存在一定的线性关系。对发酵厚皮菜中的有机酸分析结果如图 7 所示,乳酸、

柠檬酸和乙酸 3 种有机酸在发酵四川厚皮菜样品中的含量相对较高,其中,乳酸含量最高,其平均值达到 470.50 mg/100 mL,其次是柠檬酸,而酒石酸、苹果酸、琥珀酸这 3 种有机酸含量较低,其平均值均低于 20 mg/100 mL。可以说明通过乳酸菌发酵可使发酵蔬菜具备防腐保鲜功能,使食品中微生物保持稳定,其特有的酸味也可为食物增色^[26]。



注:1. 酒石酸,2. 苹果酸,3. 乳酸,4. 乙酸,5. 柠檬酸,6. 琥珀酸。

图 6 有机酸标准样品分离图

Fig.6 Organic acid standard sample separation diagram

表 2 有机酸标准曲线的线性相关性

Table 2 Linear correlation of organic acid standard curve

有机酸	线性范围/(mg/mL)	回归方程	相关系数(R^2)
酒石酸	0.040~4.000	$Y = 2287.42X + 29.0914$	0.9998
苹果酸	0.040~4.000	$Y = 1105.42X + 0.658379$	0.9999
乳酸	0.040~4.000	$Y = 997.495X + 8.68246$	0.9999
乙酸	0.040~4.000	$Y = 695.120X - 2.78682$	0.9999
柠檬酸	0.040~4.000	$Y = 1558.66X + 42.6178$	0.9969
琥珀酸	0.040~4.000	$Y = 969.244X + 0.150121$	0.9999

乳酸作为一种重要的有机酸,其在发酵厚皮菜中含量最高。蔬菜发酵主要是乳酸发酵,同时伴随少量酒精发酵。然而,随着发酵时间的延长,乳酸产生速率一般会明显变慢,主要是因为随着 pH 值的降低,抑制了乳酸菌的生长,从而抑制了乳酸的生成^[27]。在发酵中后期,乙酸含量均降低,这可能是由于乙酸和一些醇类发生酯化反应生成酯类,这也是形成发酵蔬菜特色风味的重要途径之一^[28]。酒石酸、苹果酸、琥珀酸 3 种酸虽然含量较低,但对发酵厚皮菜风味形成仍有一定的贡献。发酵开始时,柠檬酸和苹果酸的增加可能与微生物三羧

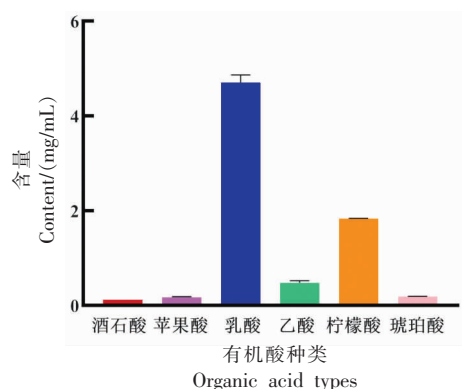


图 7 样品中各有机酸平均含量

Fig.7 Average content of organic acids in samples

酸循环的代谢途径有关,在此期间,中间产物柠檬酸和苹果酸暂时积累^[29],随着发酵时间的延长,当发酵底物的还原糖几乎被耗尽时,柠檬酸和苹果酸被用作碳源来维持微生物的正常生理代谢^[30-31]。酒石酸终含量较低,其原因可能是以乳酸菌为主导的发酵体系,在发酵过程中会产生大量的乳酸,而高酸度则会抑制其活性,从而使其所产的酒石酸含量降低^[32]。

乳酸菌产生的有机酸对发酵蔬菜的酸味和香气起着至关重要的作用^[33]。乳酸、乙酸和琥珀酸是所有腌制蔬菜样品中发现的主要和常见的有机酸。它们都含有通过EMP途径将丙酮酸转化为乳酸的基因,如编码L-乳酸脱氢酶的基因;由糖酵解途径中的乙酰辅酶A连接酶(ADP-forming)和乙醇脱氢酶催化还可产生乙酸和乙醇,生成影响发酵厚皮菜风味的关键物质^[34]。

2.2.2 发酵厚皮菜挥发性成分分析 自然发酵厚皮菜由于发酵菌株的多样性和不确定性,挥发性物质组成丰富。由表4可知,挥发性化合物主要包括酸类、醇类、酮类、烃类、酯类、醛类、芳香族和腈类物质等。从种类上看,酸类、酯类和醇类物质最丰富;从挥发性物质含量上看,酸类丰度最大,其次是醇类和酯类。发酵蔬菜的主要挥发性风味物质不仅与类型和含量有关,还与挥发性物质敏感性的阈值相关,风味阈值越小,对发酵厚皮菜风味影响越大^[26]。

乳酸菌发酵后,产生丰度最高的酸性挥发性物质中,含量最高的是乙酸,主要通过乳酸菌异型乳酸发酵即葡萄糖代谢的HMP途径产生。发酵成熟后产生的异丁酸和戊酸等新化合物有利于果香味的产生^[35]。醇类物质含量仅次于酸类物质,是形成发酵厚皮菜风味的重要组成部分之一。如检测到的乙醇具有酒香,苯乙醇具有新鲜面包气味和甜玫瑰般的花的气味等^[36],由于其风味阈值较大,对发酵厚皮菜的风味影响不大;而不饱和醇因其风味阈值低,较大程度上影响了发酵厚皮菜的风味,如检测到的 α -松油醇为食用香精,具紫丁香味^[37],桉叶油醇多用于医药、食品香料以及防腐剂,为发酵厚皮菜提供了草药香、樟脑香的香气,芳樟醇提供淡淡的铃兰花香以及浓郁的青香等^[38]。此外,2-辛醇被检测到为丰度最高的醇类物

质,其具有椰子、蘑菇和核桃的香气^[39]。酯类在为发酵蔬菜提供典型的果香和花香方面起着重要作用^[31]。酯类物质中含量最高的为乳酸乙酯,主要被认为是产生甜美、水果香气的化合物,适量时有醇厚感^[40]。酯在发酵过程中一般随发酵时间的延长而增加,会产生果味、甜味和花香味,其阈值较低^[41],其中2-羟基丙酸乙酯、乙酸苯乙酯、乙酸乙酯、丙酸乙酯、十六酸乙酯、丁酸乙酯具有朗姆酒、水果和奶油^[42]、甜香、玫瑰果香、蜂蜜样香气^[43]、弱蜡香、果爵^[44]、类似菠萝、香蕉香气^[45]等。

微生物发酵作用是形成发酵蔬菜挥发性风味成分的重要途径。蔬菜在发酵过程中主要有乳酸发酵、酒精发酵和醋酸发酵。作为优势菌属的乳酸菌是发酵过程中形成发酵蔬菜独特香气的主要微生物^[46],乳酸菌发酵有2个阶段,异型乳酸菌发酵阶段和同型乳酸菌发酵阶段,乳酸菌通过2个阶段的发酵最终生成乳酸和少量的乙醇、乙酸、乳酸乙酯、丙酸、丁酸、甲烷,还有微量的硫化氢^[47];在发酵后期缺氧的条件下,酵母菌发酵生成乙醇,生成的乙醇又经过醋酸发酵氧化生成醋酸。这一系列的微生物发酵作用赋予发酵蔬菜丰富的挥发性香气。结合对四川发酵厚皮菜的高通量测序结果,发现乳酸杆菌为厚皮菜发酵过程的核心菌群,乳酸杆菌发酵显著提高了发酵厚皮菜挥发性化合物的定性和定量含量($P<0.05$)。然而,并非所有挥发性化合物都对发酵厚皮菜的感官特性表现出显著影响,香气品质的改善可能与一些有效的、低阈值的痕量挥发性化合物有关^[48]。

3 结论

通过高通量测序结合发酵四川厚皮菜的稀释曲线及相对丰度图,可以看出该地区发酵厚皮菜的细菌组成比较丰富,共检出19个门,32个纲,86个目,147个科,215个属;乳杆菌属、未分类蓝细菌属、盐单胞菌属和慢乳杆菌属为该发酵厚皮菜的主要优势菌群,协同发酵出具有地方特色的厚皮菜。此外,对该发酵厚皮菜风味品质分析得到,发酵厚皮菜中含有6种有机酸,其中乳酸是发酵四川厚皮菜酸感形成的主要因素,在有机酸中含量最高,酒石酸、苹果酸和琥珀酸含量略低,起到改善酸感作用;从发酵厚皮菜中检测出的挥发

表 3 发酵四川厚皮菜中挥发性物质的种类

Table 3 Types of volatile substances in fermented Sichuan Swiss Chard samples

类别	挥发性物质	类别	挥发性物质
酸类	乙酸		正十三烷
	异丁酸		十二烷
	丙酸		正十三烷
	3-甲基丁酸		2,4,5-三甲基-1,3-二氧戊环
	正戊酸		右旋萜二烯
	己酸		α -萜品烯
	邻苯二甲酸		1-甲基-4-(1-甲基乙基)-1,4-环己二烯
	α -羟基-环己基甲酸		4-甲基-1-(1-甲基乙基)-双环[3.1.0]己-2-烯
	2-甲基戊酸	酯类	乳酸乙酯
	2-乙基己酸		2-羟基-4-甲基戊酸乙酯
醇类	2-辛醇		2-羟基丙酸乙酯
	alpha-松油醇		乙酸苯乙酯
	苯乙醇		乙酸乙酯
	3-甲基-1-丁醇		2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇二异丁酸酯
	4-萜烯醇		乳酸异戊酯
	芳樟醇		川芎内酯
	乙醇		丙酸乙酯
	正己醇		邻苯二甲酸二丁酯
	桉叶油醇	丁二酸二乙酯	
	1-丙醇	(S)-(-)-乳酸异丙酯	
苜醇	十六酸乙酯		
3-苯丙醇	正己酸乙酯		
2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇二异丁酸酯	N-氯二氟乙酰基-乙酯		
2-丁醇	2-(5-甲基-5-乙烯基四氢呋喃-2-基)丙烷-2-基碳酸乙酯		
甲醇	alphi-戊基-gama-丁内酯		
顺- α,α -5-三甲基-5-乙烯基四氢化呋喃-2-甲醇	4-羟基丁酸内酯		
小茴香醇	丁酸乙酯		
2-甲基丙醇	gamma-己内酯		
1,3,3-三甲基双环[2,2,1]庚-2-醇	醛类	苯甲醛	
2-甲基丙醇		(Z)-2-庚烯醛	
1-丁醇		2,5-二羟基苯甲醛	
糠醇		2,4-二甲基苯甲醛	
2-茨醇		3-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基)-2-丙烯醛	
3-甲硫基丙醇		乙醛	
2-庚醇		(E, E)-2,4-庚二烯醛	
2-(4-甲基苯基)丙-2-醇		芳香族	2-甲氧基-4-甲基苯酚
4-(1-甲基乙基)环己醇			2,4-二叔丁基苯酚
1-辛烯-3-醇			4-乙基-2-甲氧基苯酚
2-乙基-己醇	2-甲氧基-苯酚		
trans-罗勒烯醇	4-乙基苯酚		
2-辛酮	苯酚		
3-羟基-2-丁酮	4-甲基苯酚		
3-甲基-6-(1-甲基乙基)-2-环己烯-1-酮	腈类	苯代丙腈	
3-丁基-1(3H)-异苯并呋喃酮		3-丁腈	
1-庚烯-3-酮		4-(甲硫基)-正丁腈	
2-丁酮		5-(甲硫基)-戊腈	
烃类		十甲基环五硅氧烷	其它
	十二甲基环六硅氧烷	2-乙酰基呋喃	
	环己硅氧烷		

性化合物中,以主要影响发酵厚皮菜风味的酸类、醇类、酮类、烃类、酯类、醛类等化学物质作为参考,对其相对含量及阈值进行比较,结果表明酸类物质含量最高,其次是醇类物质和酯类物质。本研究促进了自然发酵四川厚皮菜微生物菌群结构和风味品质相关性的基础研究,在一定程度上验证了发酵厚皮菜的风味主要由乳酸杆菌发酵代谢产生,从而为发酵厚皮菜的后续生产及直投式复合发酵菌剂的研究提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] NAVNIDHI C, KOMAL K, PARAS S, et al. Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review[J]. Food Chemistry, 2019, 272: 192–200.
- [2] EMAN A, SOBHY E, OMA YMA S, et al. Nutritional evaluation of beetroots (*Beta vulgaris* L.) and its potential application in a functional beverage[J]. Plants (Basel, Switzerland), 2020, 9(12): 1752.
- [3] LJUBICA I, IVANA M, ANA T, et al. Nutritional and phytochemical content of Swiss chard from Montenegro, under different fertilization and irrigation treatments[J]. British Food Journal, 2019, 121(2): 411–425.
- [4] YANG Y, LI W, LIU Y, et al. Alpha-lipoic acid attenuates insulin resistance and improves glucose metabolism in high fat diet-fed mice[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2014, 35(10): 1285–1292.
- [5] MAGDA G, PETER F, ERALDA A, et al. Bioactive compounds and nutritional composition of Swiss chard (*Beta vulgaris* L. var. *ciela* and *flavescens*): A systematic review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 61(20): 3465–3480.
- [6] YANG Y L, FAN Y, LI T, et al. Microbial composition and correlation between microbiota and quality -related physiochemical characteristics in Chongqing radish Paocai[J]. Food Chemistry, 2022, 369: 130897.
- [7] YANG G X, CAO J L, XU H Y, et al. Bacterial diversity and community structure in Chongqing radish Paocai brines revealed using PacBio single-molecule real-time sequencing technology[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(9): 3234–3245.
- [8] CHIBUNDU N, KOLAWOLE I, OBINNA T, et al. High-throughput sequence analyses of bacterial communities and multi-mycotoxin profiling during processing of different formulations of Kunu, a traditional fermented beverage[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3282.
- [9] LIANG H P, CHEN H Y, ZHANG W X, et al. Investigation on microbial diversity of industrial Zha-cai Paocai during fermentation using high-throughput sequencing and their functional characterization [J]. LWT, 2018, 91: 460–466.
- [10] HE X, HENRYK H. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry (GC×GC-TOFMS) in conventional and reversed column configuration for the investigation of Baijiu aroma types and regional origin[J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1636: 461774.
- [11] EVAN B, JAI R, MATTHEW R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 852–857.
- [12] BENJAMIN J, PAUL J, MICHAEL J, et al. DA-DA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature Methods, 2016, 13(7): 581–583.
- [13] ELIZABETH A, HEIDI H, SEAN C, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome[J]. Science (New York, N.Y.), 2009, 324(5931): 1190–1192.
- [14] RAO Y, TAO Y F, CHEN X S, et al. The characteristics and correlation of the microbial communities and flavors in traditionally pickled radishes[J]. LWT, 2020, 118(C): 108804.
- [15] LIANG H P, HE Z, WANG X Y, et al. Effects of salt concentration on microbial diversity and volatile compounds during Suancai fermentation[J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103537.
- [16] WANG D D, CHEN G, TANG Y, et al. Correlation between autochthonous microbial communities and flavor profiles during the fermentation of mustard green Paocai (*Brassica juncea* Coss.), a typical industrial-scaled salted fermented vegetable[J]. LWT, 2022, 172: 114212.
- [17] LIU Z G, PENG Z, HUANG T, et al. Comparison

- of bacterial diversity in traditionally homemade Paocai and Chinese spicy cabbage[J]. *Food Microbiology*, 2019, 83: 141–149.
- [18] WANG D D, CHEN G, TANG Y, et al. Effect of non-core microbes on the key odorants of Paocai[J]. *LWT*, 2022, 172: 114211.
- [19] 胡小霞, 黄永光, 蒋想, 等. 清酱香型白酒陶坛发酵细菌群落结构多样性分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(8): 130–138.
- HU X X, HUANG Y G, JIANG X, et al. Bacterial community structure and diversity during fermentation of Chinese Fen–Maotai–flavored liquor in pottery jars[J]. *Food Science*, 2020, 41(8): 130–138.
- [20] SAMSON B, KOSHY P. Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermentin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 125–143.
- [21] MI T, JIN Y, CHE Y L, et al. Profiling the composition and metabolic functions of microbial community in pellicle-forming radish Paocai[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2023, 388: 110087.
- [22] 黄娟, 黄燕燕, 冯立科, 等. 自然发酵的岭南桑葚果酒的细菌多样性分析[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(3): 329–338.
- HUANG J, HAUNG Y Y, FENG L K, et al. Analysis of bacterial diversity in Lingnan characteristic mulberry wine of different natural fermentation cycles[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(3): 329–338.
- [23] AN F Y, LI M, ZHAO Y, et al. Metatranscriptome-based investigation of flavor-producing core microbiota in different fermentation stages of Da-jiang, a traditional fermented soybean paste of Northeast China[J]. *Food Chemistry*, 2020, 343: 128509.
- [24] JYOTI P, SOUVIK D, PYNHUNLANG K, et al. Shotgun metagenomics of Cheonggukjang, a fermented soybean food of Korea: Community structure, predictive functionalities and amino acids profile[J]. *Food Research International*, 2022, 151: 110904.
- [25] PASQUALE F, RAFFAELLA D, MARCO G. Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: Get out of the labyrinth[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 49: 64–72.
- [26] 黄道梅. 不同盐度的工业化盐渍萝卜多菌协同发酵过程中菌相变化与风味品质变化研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- HUANG D M. Study on the changes of bacterial phase and flavor quality during the co-fermentation of industrial salted radish with different salinities[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2015.
- [27] XIANG W L, ZHANG N D, LU Y, et al. Effect of *Weissella cibaria* co-inoculation on the quality of Sichuan pickle fermented by *Lactobacillus plantarum* [J]. *LWT*, 2020, 121(C): 108975.
- [28] ZHOU M Z, ZHENG X, ZHU H J, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* enriched with organic/inorganic selenium on the quality and microbial communities of fermented pickles [J]. *Food Chemistry*, 2021, 36: 130495.
- [29] XIONG T, PENG F, LIU Y Y, et al. Fermentation of Chinese sauerkraut in pure culture and binary co-culture with *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* [J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2014, 59(2): 713–717.
- [30] HADJA D, HONORÉ G, MICHEL D, et al. Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 256: 11–19.
- [31] YAN Y H, ZHANG F, CHAI Z Y, et al. Mixed fermentation of blueberry pomace with *L. rhamnosus* GG and *L. plantarum*-1: Enhance the active ingredient, antioxidant activity and health-promoting benefits[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 131: 110541.
- [32] 马艺荧, 孙波, 张宇, 等. 东北酸菜不同发酵时间有机酸变化及其对产品酸感的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(5): 45–50.
- MA Y Y, SUN B, ZHANG Y, et al. Changes of organic acids in Northeast sauerkraut at different fermentation time and its effect on product acidity[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(5): 45–50.
- [33] XIAO Y S, XIONG T, PENG Z, et al. Correlation between microbiota and flavours in fermentation of Chinese Sichuan Paocai[J]. *Food Research International*, 2018, 114: 123–132.

- [34] ZHANG S Y, SHANG Z X, LIU Z J, et al. Flavor production in fermented chayote inoculated with lactic acid bacteria strains: Genomics and metabolomics based analysis[J]. Food Research International, 2023, 163: 112224.
- [35] MARTYNA N, NATALIA D. Flavour generation during lactic acid fermentation of *Brassica* vegetables—literature review[J]. Applied Sciences, 2022, 12(11): 5598.
- [36] 赵畅雯, 潘晓倩, 成晓瑜, 等. 产香酵母发酵面团挥发性风味物质分析[J]. 中国酿造, 2023, 42(1): 147-154.
- ZHAO C W, PAN X Q, CHENG X Y, et al. Analysis of volatile flavor compounds in dough fermented by aroma-producing yeast[J]. China Brewing, 2023, 42(1): 147-154.
- [37] 郝明玉. 直投式发酵泡菜与自然发酵泡菜的比较研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- HAO M Y. Comparative study on direct vat set fermentation pickles and natural fermentation pickles [D]. Nanchang: Nanchang University, 2013.
- [38] 董天宇, 齐楠, 刘芮嘉, 等. 青花椒与红花椒关键风味物质的对比分析[J]. 精细化工, 2023, 40(4): 869-877.
- DONG T Y, QI N, LIU R J, et al. Comparative analysis of key flavor substances of green and red pepper[J]. Fine Chemicals, 2023, 40(4): 869-877.
- [39] 苗君莅, 莫蓓红, 高红艳, 等. 植物乳杆菌 SP-3 对干酪挥发性风味物质的影响[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(3): 31-33.
- MIAO J L, MO B H, GAO H Y, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* SP-3 on volatile flavour compound of cheese[J]. China Dairy Industry, 2010, 38(3): 31-33.
- [40] 牛云蔚, 朱全, 肖作兵. 茅台酒香气组成及关键香气成分间的协同作用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 215-226.
- NIU Y W, ZHU Q, XIAO Z B. The aroma composition and synergistic effect among key aroma compounds in Moutai Baijiu[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(10): 215-226.
- [41] LIAO H, LUO Y, HUANG X L, et al. Dynamics of quality attributes, flavor compounds, and microbial communities during multi-driven-levels chili fermentation: Interactions between the metabolome and microbiome[J]. Food Chemistry, 2022, 405(Pt B): 134936.
- [42] ZHUANSUN W, XU J, LI Z Q, et al. Dynamic changes in the microbial community, flavour components in Jiupei of a novel Maotai-Luzhou-flavoured liquor under various Daqu blending modes and their correlation analysis[J]. LWT, 2022, 172: 114167.
- [43] 何东梅, 马宇, 黄永光, 等. 机械化酱香型轮次基酒风味结构及特征酯类化合物解析[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 269-275.
- HE D M, MA Y, HUANG Y G, et al. Flavor composition and characteristic esters in mechanized sauce-flavor Baijiu base liquors from fermentation rounds[J]. Food Science, 2021, 42(10): 269-275.
- [44] ZANG J, YU D W, LI T R, et al. Identification of characteristic flavor and microorganisms related to flavor formation in fermented common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Food Research International, 2022, 155: 111128.
- [45] 陈杰, 黄晓媛, 钱敏, 等. 基于 GC-IMS 分析四种辣椒酱中的挥发性风味物质[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(11): 173-182.
- CHEN J, HUANG X Y, QIAN M, et al. Analysis of volatile flavor compounds in four chili sauces by GC-IMS[J]. China Food Additives, 2021, 32(11): 173-182.
- [46] LORN D, NGUYEN T, HO H, et al. Screening of lactic acid bacteria for their potential use as aromatic starters in fermented vegetables[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 350: 109242.
- [47] 李雪, 和兴萍, 陈丹, 等. 乳酸菌发酵混合蔬菜的初步研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(9): 176-179.
- LI X, HE X P, CHEN D, et al. Preliminary research of lactic acid bacteria fermentation of mixed vegetables[J]. China Brewing, 2016, 35(9): 176-179.
- [48] ZHAO X X, TANG F X, CAI W C, et al. Effect of fermentation by lactic acid bacteria on the phenolic composition, antioxidant activity, and flavor substances of jujube-wolfberry composite juice [J]. LWT, 2023, 184: 114884.

Analysis of Bacterial Flora Structure and Flavor Quality of Spontaneous Fermentation Swiss Chard

YU Shijiao¹, LI Shuai¹, WENG Peifang¹, WU Zufang^{1*}, LIU Yanan^{2,3*}

(¹Department of Food Science and Engineering, Zhejiang-Malaysia Joint Research Laboratory for Agricultural Product Processing and Nutrition, Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Nutritional Health, Ningbo University, Ningbo 315832, Zhejiang

²Key Laboratory of Detection and Risk Prevention of Key Hazardous Materials in Food, China General Chamber of Commerce, Ningbo Key Laboratory of Detection, Control, and Early Warning of Key Hazardous Materials in Food, Ningbo Academy of Product and Food Quality Inspection (Ningbo Fibre Inspection Institute), Ningbo 315048, Zhejiang

³College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract In order to explore the complex microbial system and volatile flavor components in the traditional fermentation process of Sichuan Swiss Chard, high-throughput sequencing and bioinformatics related technologies were used to comprehensively analyze the microbial flora structure of the Swiss Chard and its relation among the microbial species. The types and contents of organic acids in the Swiss Chard were determined by liquid chromatography. At the same time, headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-time of flight mass spectrometry (GC-TOFMS) were used to systematically analyze the volatile flavor components of Sichuan Swiss Chard samples. The results showed that the main contributors to the flora were *Lactobacillus*, *unclassified-Cyanobacteria*, *Halomonas* and *Lentilactobacillus*. The Swiss Chard contain six organic acids including tartaric acid, lactic acid, acetic acid and so on. And the highest content of lactic acid was 470.50 mg/100 mL. The relative content of acids in volatile flavor substances was the highest, mainly acetic acid, followed by alcohols such as 2-octanol and esters such as ethyl lactate. This study clarified the correlation between the microbial community structure and the formation of flavor substances in Sichuan fermented kimchi, aiming to provide a theoretical basis for further improving the traditional fermented kimchi process and large-scale production of inoculation control.

Keywords spontaneous fermentation; bacterial flora structure; organic acid; flavor quality