

发酵辣椒中的微生物及其风味物质研究进展

贺子玉¹, 何心¹, 胡楠¹, 易有金^{1*}, 夏菠^{1*}, 朱树清², 朱利红³, 朱妮娜⁴

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128) (2. 汝城县繁华食品有限公司, 湖南郴州 424100)
(3. 汝城县鑫利食品有限公司, 湖南郴州 424100) (4. 张家界洞溪七姊妹辣椒开发有限公司, 湖南张家界 427209)

摘要: 发酵辣椒即利用微生物在厌氧条件下的分解作用产生各种代谢产物, 经过一系列的生物化学变化及物理变化, 形成的具有独特发酵风味的辣椒制品。发酵辣椒作为一种传统的辣椒制品, 香辣酸脆, 开胃可口, 符合大众口味, 但由于传统自然发酵菌群不明、结果不可控等因素, 接种发酵成为目前研制发酵辣椒的热点方法, 更是制备具有优良风味的发酵辣椒的关键。该研究介绍了发酵辣椒中的微生物多样性及其检测方法, 总结了发酵辣椒中的风味物质, 经综合分析得: 发酵辣椒中的微生物以乳酸杆菌属和酵母菌属为主, 产生酯类、醇类、酸类、烯炔类、醛类等众多复杂的香气成分, 烷烃类、烯炔类和萜醇类物质在未发酵成熟的辣椒中是主要呈香物质, 同样是辣椒发酵后的部分香气成分, 赋予了发酵辣椒独特的花香、果香等香气特征。该研究重点阐述了影响发酵辣椒中风味物质的因素, 主要包括发酵原料、发酵方法、发酵菌种、发酵盐度、发酵温度、发酵时间等几个方面, 其中发酵原料、发酵菌种以及发酵盐度对于发酵辣椒风味的生成至关重要, 此外, 该研究还指出了目前研究过程中存在的问题及对未来的展望, 以期发酵辣椒工业化发展提供理论基础。

关键词: 发酵辣椒; 微生物; 检测方法; 风味物质

文章编号: 1673-9078(2023)08-334-342

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.8.0984

Research Progress on the Microorganisms and Flavor Substances in Fermented Pepper

HE Ziyu¹, HE Xin¹, HU Nan¹, YI Youjin^{1*}, XIA Bo^{1*}, ZHU Shuqing², ZHU Lihong³, ZHU Nina⁴

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)
(2. Rucheng Fanhua Food Co. Ltd., Chenzhou 424100, China) (3. Rucheng Xinli Food Co. Ltd., Chenzhou 424100, China)
(4. Zhangjiajie Dongxi Qizimei Pepper Development Co. Ltd., Zhangjiajie 427209, China)

Abstract: The fermented pepper is a kind of pepper product with unique fermentation flavor, which is produced via decomposition by microorganisms under anaerobic conditions to produce various metabolites then undergoing a series of biochemical and physical changes. As a traditional pepper product, fermented pepper is aromatic, spicy, sour, crispy, appetizing and delicious, which meet the public taste. However, due to factors such as unknown microbial communities and uncontrollable production results related to traditional natural fermentation, at present inoculation fermentation has become a hot method for the development of fermented pepper, which is also the key to preparing fermented pepper with excellent flavor. In this paper, the microbial diversity and associated detection methods of fermented capsicum are introduced, and the flavor substances of fermented pepper are summarized. Comprehensive analyses revealed that *Lactobacillus* and yeast are the main

引文格式:

贺子玉,何心,胡楠,等.发酵辣椒中的微生物及其风味物质研究进展[J].现代食品科技,2023,39(8):334-342

HE Ziyu, HE Xin, HU Nan, et al. Research progress on the microorganisms and flavor substances in fermented pepper [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 334-342

收稿日期: 2022-08-05

基金项目: 湖南省重点研发计划项目(2021NK2014); 湖南省研究生创新科研项目(CX20220683); 长沙市自然科学基金资助项目(kq2202224); 湖南农业大学研究生创新科研项目(2021.63); 湖南农业大学第三批重大科研项目(创新团队培育工程2019); 湖南农业大学“双一流”学科建设项目(SYL2019061)

作者简介: 贺子玉(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: 2311091206@qq.com; 共同第一作者: 何心(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: 1806195572@qq.com

通讯作者: 易有金(1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物资源开发与利用, E-mail: yiyoujin@163.com; 共同通讯作者: 夏菠(1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物源天然产物开发与利用, E-mail: julinomber2@sina.com

microorganisms in the fermented pepper, which produce many complex aroma components such as esters, alcohols, acids, alkenes and aldehydes. Alkanes, alkenes and terpene alcohols are the main aromatic substances in unfermented and mature peppers, which are also part of the aroma components after fermentation, giving fermented peppers unique aroma characteristics such as floral aroma and fruity aromas. This paper place an emphasis on the factors affecting the flavor substances of the fermented pepper, including raw materials for fermentation, fermentation method, fermentation strain(s), salinity for fermentation, fermentation temperature and fermentation time, among which, raw materials, strains and salinity are very important for the generation of fermented pepper flavor. In addition, the existing problems in the current research process and the prospects for the future are pointed out in this paper, in order to provide a theoretical basis for the industrial development of fermented pepper.

Key words: fermented pepper; microorganism; detection method; flavor substances

发酵辣椒即利用微生物在无氧条件下的分解作用产生各种有机酸、氨基酸态氮、挥发性香气等风味物质,使得新鲜辣椒逐渐熟化,从而获得一种具有独特发酵风味的辣椒制品。按照原料和制作方法的不同,发酵辣椒可分为剁辣椒(湖南)、泡辣椒(四川)、糟辣椒(贵州、云南、重庆)、辣椒酱(湖南、广西、贵州)、鲑辣椒(湘西、张家界)、盐渍辣椒(湖南、河北)等;剁辣椒主要是将新鲜脆嫩的朝天椒洗净去蒂、晾干水分后,剁碎成1~2 cm的小段,加入适量食盐、白酒等拌匀后装坛,厌氧发酵一月以上。泡辣椒是将新鲜辣椒洗净放入坛中,添加或不添加辅料,于食盐水泡渍发酵而成。糟辣椒是将肉质厚实、辣味适中的新鲜红辣椒洗净晾干,辅以姜、蒜在干净木盆中用刀反复剁碎至米粒大小,再加入盐、糖、白酒等拌匀,装坛密封,自然发酵15 d即可作为调料用。辣椒酱是将成熟红辣椒或干辣椒剁成碎末,按照喜好加入食用油、蒜末、姜末、白酒以及其他调味香辛料等,搅拌均匀进行发酵或非发酵工艺制备而成。鲑辣椒是将新鲜的红辣椒洗净剁碎,与玉米粉或大米粉按照2:1的比例混合,添加食盐、生姜调味,装坛液封自然发酵而成。盐渍辣椒是需要将红辣椒中加入大量食盐腌制,食盐量一般在15%以上,腌制发酵一段时间后再进行脱盐重新调味而成。发酵辣椒又分为自然发酵和接种发酵两种方法,由于传统自然发酵过程中的菌群不明、易产生不良风味物质,导致发酵结果不可控,接种发酵成为了目前研制发酵辣椒的热点方法。人工接种可以有效避免杂菌的污染,使发酵菌种快速成为优势菌,明确发酵辣椒中主要的微生物群落,是制备具有优良风味发酵辣椒的关键。因此本文简述了发酵辣椒中的微生物多样性及其检测方法,重点介绍了发酵辣椒中的风味物质及其影响因素,并指出了目前研究过程中存在的问题及对未来的展望,以期为该行业的发展提供参考。

1 发酵辣椒中的微生物及其检测方法

1.1 发酵辣椒中的微生物多样性

微生物贯穿辣椒发酵的整个过程,发酵菌群的结构和演替决定了代谢物的类型和数量,以及发酵辣椒中所含挥发性物质的多样性和组成,从而形成了特定的风味。所以,充分了解辣椒发酵过程中的微生物群落演替对于明确接种发酵菌种是至关重要的。

1.1.1 发酵辣椒中的细菌

发酵辣椒中细菌种类丰富,数量繁多,由于原料、发酵方法以及季节和地域的不同,发酵辣椒中的优势细菌属会存在部分差异性,主要由乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、明串珠菌属(*Leucanostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等厚壁菌门(*Firmicutes*)、肠杆菌属(*Enterobacteriaceae*)、*Rosenbergiella*、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)等变形菌门(*Proteobacteria*)及隶属于放线菌门(*Actinobacteria*)的棒状杆菌属(*Corynebacterium*)构成^[1,2],它们彼此之间相互竞争成为不同发酵时期的优势菌。

采用454焦磷酸测序技术研究不同品种盐渍辣椒(15%以上盐度)中的细菌多样性,从门的水平上讲,盐渍辣椒主要都是以厚壁菌门和变形菌门为主,拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门等占比较少,其中占比较大的蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)只存在于切碎辣椒样品中,可能主要源于辣椒本身;从属的水平上讲,盐渍辣椒中优势菌属为乳球菌属(*Lactococcus*)和根瘤菌属(*Rhizobium*),盐渍米椒中优势菌属为盐厌氧菌属(*Halanaerobium*)、海螺菌属(*Marinospirillum*)、色盐杆菌属(*Chromohalobacter*)、盐单胞菌属、乳球菌属等占80%以上^[3]。研究表明,盐渍辣椒随着保存

时间的延长,细菌群落逐渐被嗜盐单胞菌属、嗜盐弧菌属、假单胞菌属、色盐杆菌属等菌属代替,盐度和发酵总酸可能是影响微生物群落变化的关键因素^[4]。

中低盐度的辣椒为乳酸菌提供了有利的发酵环境,辣椒盐度与乳酸菌的相对丰度呈负相关,有研究采用 Illumina HiSeq 技术检测了 10% 低盐度的辣椒,在发酵过程中,变形菌门数量逐渐减少,厚壁菌门成为优势菌门,其中魏斯氏菌属在开始发酵的阶段起着重要作用,能够快速积累乳酸达到一个微酸的环境,从而抑制了低盐环境下杂菌的生长,其中假单胞菌和肠杆菌等一些腐败致病菌也随着发酵酸度的增加而减少,随后乳酸杆菌属成为优势细菌属^[5]。

1.1.2 发酵辣椒中的真菌

由于厌氧和酸性条件,发酵辣椒中的真菌在数量和种类上明显少于细菌,主要由隶属于子囊菌门(Ascomycota)的假丝酵母属(*Candida*)、有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、德巴利氏酵母属(*Debaryomyces*)、链格孢属(*Alternaria*)、枝孢属(*Cladosporium*)、曲霉菌属(*Aspergillus*)以及隶属于担子菌门(Basidiomycota)的汉纳酵母属(*Hannaella*)、隐球酵母属(*Cryptococcus*)、红酵母菌属(*Rhodotorula*)等构成^[6,7]。发酵过程中的优势真菌以酵母菌为主,在发酵第三天有孢汉逊酵母属成为优势菌属,第七天达到高峰,发酵 20 d 后有孢汉逊酵母属、德巴利氏酵母属、毕赤酵母成为主要优势真菌^[8]。此外,有研究通过 Illumina Miseq 检测发现朝天椒中存在链格孢菌和枝孢菌,这可能是辣椒中的内生真菌,这类真菌会随发酵的竞争抑制而含量下降^[9]。

1.2 发酵辣椒中的微生物检测方法

1.2.1 PCR-DGGE 技术

起初的一代测序为聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE),是通过扩增样品基因组 DNA,再利用聚丙烯酰胺凝胶中变性剂浓度梯度的不同,有效分离 DNA 序列,然后通过测序、相似性比对对菌群指纹图谱中的条带进行物种鉴定^[10]。有研究用 PCR-DGGE 技术对发酵辣椒样品中的乳酸杆菌属进行多样性物种解析,发现了植物乳杆菌、发酵乳杆菌、耐酸乳杆菌和短乳杆菌等五种菌^[11]。该方法成本低、灵敏度高、简单快速。

1.2.2 高通量测序技术

近些年,随着分子生物技术的不断发展,高通量测序作为新一代测序技术,广泛应用于微生物多样性

的分析。高通量测序分为 16S rDNA、18S rDNA 和 ITS 测序,18S rDNA 和 ITS 测序主要应用于样品中真核微生物的检测,目前用于检测发酵辣椒菌属最常用的 16S rDNA 主要是以 Illumina 中的 MiSeq 和 HiSeq 测序平台以及 454 焦磷酸测序为主的二代测序^[12]。利用 Illumina Miseq 测序技术检测盐水(0.5%~3.5%盐度)自然发酵 10 d 的辣椒,发现其中蓝藻菌门(40.6%)、厚壁菌门(37.0%)和变形菌门(16.6%)占 90% 以上^[13],充分揭示了自然发酵辣椒中的主要细菌门类占比。采用 Illumina HiSeq 技术研究可知,魏斯氏菌属在第三天大幅度增长至 62.85%,随后比例下降,乳酸杆菌属成为发酵辣椒中主要的细菌属,占比 76.55%^[5],深入剖析了辣椒发酵过程中的细菌群落动态。

1.2.3 宏基因组测序技术

高通量测序技术促进了组学技术的发展,相较于高通量测序,宏基因组测序技术可对每个测序样本进行功能基因注释、样本间差异分析、代谢途径预测等^[12]。利用宏基因组学技术发现,15%~20%盐度发酵辣椒中的抗生素抗性基因(Antibiotic Resistance Genes, ARG(s))(主要宿主是肠杆菌科)和组氨酸激酶(与耐盐性相关)更多^[14],表明高盐样本中可能存在更多的肠杆菌菌株,从宏基因组角度建议了消费者选择低盐辣椒酱更有利于人体健康。

综上所述,目前 PCR-DGGE 技术、高通量测序技术、宏基因组测序技术等是从基因层面全面检测分析发酵辣椒中菌群多样性的常见方法,相较于传统纯培养技术,能很好地分析不能在培养基上生长的微生物,直观地体现了发酵辣椒微生物多样性。但不同方法之间各有优缺点,如 PCR-DGGE 技术能够同时检测大量发酵辣椒样品中的微生物,Li 等^[15]采用 PCR-DGGE 技术同时检测了九个自然发酵四个月的辣椒样品,主要为乳杆菌属、芽孢杆菌属、魏斯氏菌属、嗜盐葡萄球菌属(*Tetragococcus halophilus*)和肠杆菌科等菌群,揭示了发酵辣椒中的核心菌属类型,但 PCR-DGGE 技术对于丰度较低的物种未检测出来。而 Zhao 等^[8]用 18S rDNA 和 454 焦磷酸测序技术精确分析了辣椒发酵过程中的真菌菌群比例变化,其中有孢汉逊酵母属占比 69.25%、毕赤酵母占比 8.95%、汉斯德巴氏酵母菌占比 6.22%、红酵母属(*Rhodotorula*)占比 1.31%、未分类菌属占比 12.23%(<1%的类群),且毛孢子菌属从起初的 24.11% 下降到最小的 0.1%,高通量测序技术对于丰度低于 0.000 1% 的痕量菌也能够准确检出,被广泛应用于检测发酵辣椒中的微生物多样性。二代测序因检测区域的局限性只能鉴定到微生物属水平,随着高通量测序技术的发展,目前三代测序可以进行

16S rDNA 基因全长序列检测,完成种水平的鉴定。宏基因组测序技术在定义和算法上还不够完善,对于数据处理技术要求较高^[16],需要投入大量人力财力,所以目前运用该方法进行发酵辣椒微生物多样性及功能基因分析的研究较少。在实际应用中该如何选择这些检测方法,需要考虑测序预期达到的种属水平,是否需要进行功能基因注释以及性价比等因素。

2 发酵辣椒中的风味物质及其影响因素

2.1 发酵辣椒中的风味物质

2.1.1 发酵辣椒中的滋味物质

发酵辣椒中的滋味物质:有机酸、辣椒素类物质、氨基酸态氮、糖类、盐等,体现了酸、辣、鲜、甜、咸五种味感。乳酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、酒石酸、琥珀酸等有机酸赋予了发酵辣椒独特的酸感,不同有机酸的组成及比例之间的差异导致了酸味的异同,这部分酸味主要来源于乳酸菌、产酸芽孢杆菌等微生物^[17];辣椒素类物质随辣椒的熟化而逐渐降低;氨基酸态氮在微生物和酶的作用下增多,相关研究表明,棒状杆菌可以产生谷氨酸等鲜味物质^[18];辣椒本身及加工中添加的糖在发酵时被消耗而减少;食盐含量体现了咸味,在发酵时基本无变化或稍降低(成分渗透释放水分所致)^[19]。

2.1.2 发酵辣椒中的挥发性成分

发酵辣椒中的挥发性风味物质主要来源于不同的辣椒原料以及菌种的代谢产物,采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术(Headspace-Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry, HS-SPME-GC-MS)可检测出,小米辣椒发酵 90 d 后共有 66 种挥发性成分,主要为酯类、萜类,分别为 28 种、17 种,其中己酸乙酯、乙酸己酯、庚酸乙酯、 β -石竹烯、(Z)-4-癸烯酸乙酯等是该发酵辣椒特征香气成分,呈菠萝香、甜果香、青香等,并表明这些香气物质与辣椒发酵中的乳酸菌属和假丝酵母属有显著相关性^[20]。张毅等^[21]检测了十五个市售剁辣椒中的风味物质,共得出 81 种风味成分,主要为酯、醇、酸类,结合电子鼻技术发现风味好的剁辣椒中乙酸乙酯、乳酸乙酯以及芳香类等物质较高,且乙醇、醋酸以及有机硫化物等的含量偏低。可见不同的发酵辣椒样品中风味物质大同小异,对发酵辣椒香气贡献较大的是酯类化合物,主要为发酵辣椒提供了部分的清香,其次包括醇类、酸类、烯炔类、醛类、烷炔类、酮类等众多复杂的香气成分,每种成分所产生的香气阈值不同,有的成分含量十分低,但阈值高,所以单从相对含量

不能完全反映发酵辣椒风味特征,而是各种物质之间相互平衡,它们的协同作用构成了发酵辣椒的特殊风味。由于发酵菌种、温度和时间、盐度、发酵的方法以及原料的不同,会使得挥发性物质在种类和含量上产生一定的差异,制备优良风味的发酵辣椒需要考虑这些关键因素。

2.2 影响发酵辣椒中风味物质的因素

2.2.1 发酵原料

发酵底物为微生物提供了所需要的代谢物质,原料本身富含大量营养物质和风味成分,选择产生风味物质较多较好的辣椒品种有利于发酵辣椒特征风味的形成。通过研究,10%盐度自然发酵的朝天椒和线椒中的香气物质分别为 74 种、36 种,证实以朝天椒为原料做剁辣椒,所得的挥发性成分化合物数量比线椒更多;其次发现以朝天椒为原料发酵 4 周的剁辣椒主要香气成分是萜烯类、酯类、醛类等,愈创木酚、肉豆蔻醛、反-2-辛烯醛等是主要的特征风味物质,以线椒为原料发酵 4 周的剁辣椒主要香气成分为醇类、烯炔类、酮类、酯类等,芳樟醇、乙醇等是主要的特征风味物质^[22]。发酵辣椒风味特征虽有类似,但各组分的强度因品种差异而有所不同,如以成都二荆条、贵州黄平县线椒为原料发酵辣椒中酯类物质含量较高,成都野山椒、小米辣、美人椒、墨西哥辣椒等发酵以炔类物质含量为较高^[23],贵州大方县皱椒、施秉县线椒等以醇类物质含量较高^[24,25],内蒙古北京红、千斤红和金塔辣椒等以烯炔类物质含量较高^[26],为发酵辣椒品种的选择提供了实践参考。

对于同一品种不同产地的发酵辣椒,在感官和风味物质上也有一定的差异。以陕西、四川、云南等不同产地种植的小米椒为对象,发酵后四川辣椒的辣椒素含量显著高于陕西和云南辣椒,发酵结束时陕西辣椒的挥发性成分与种类最多(54 种),口感最佳,其中醇类和酯类物质含量显著增加,在第 15 天达到最大值^[27]。此差异性可能是因为不同区域的地理气候造成,如丰富的光照可以促进辣椒红素的积累,充足的降水量有利于辣椒植株的生长和辣椒素的合成,以及土壤所含的磷、氮和钾等微量元素均影响着辣椒本身风味的形成^[26]。有研究证实了不同地区的农家剁辣椒在挥发性成分上差异显著,如异己酸乙酯是安化乐安(LA)、怀化洪江(HJ)、宁乡(NX)剁辣椒主要香气成分,异戊酸乙酯是安化东坪(DP)剁辣椒中主要香气成分,2-甲基丁酸是浏阳(LY)剁辣椒的主要香气成分,乙酸乙酯是邵阳(SY)剁辣椒主要香气成分^[28],具有一定的地方特色。

2.2.2 发酵方法

辣椒发酵主要分为自然发酵和接种发酵两种,接种发酵可以明显缩短辣椒发酵的时间。同一发酵时间下,接种发酵加快了发酵速率,游离氨基酸含量高于自然发酵^[29]。有研究接种 6%的植物乳杆菌发酵辣椒能快速降低 pH 值,更快产生较多的有机酸,如乳酸、甲酸、乙酸、苹果酸等,尤其乳酸含量大幅度升高,而自然发酵具有较高含量的柠檬酸和琥珀酸、草酸^[30]。柠檬酸作为发酵辣椒产生青气味的主要来源之一,在自然发酵中常因为发酵时间不够、发酵迟缓,导致这类有机酸在未成熟的发酵辣椒中较高,而在接种发酵中这类有机酸会被微生物代谢降低,使发酵辣椒逐渐熟化^[31]。

自然发酵的风味会较为单一,接种发酵通过菌种代谢可以加强发酵辣椒中挥发性物质的释放。研究证明乳酸菌发酵辣椒的风味物质较自然发酵中多,风味物质分别有 48 种、43 种,且乳酸菌发酵中酮类的种类和含量高于自然发酵,如 2-甲基环戊酮、3-羟基-2-丁酮、乙酸、水杨酸甲酯等相对含量较多^[32],增添了干酪奶香和果香。

接种发酵不仅可以提高发酵辣椒的营养风味品质,还可以通过抑制杂菌的生长从而抑制亚硝酸盐、生物胺等的生成。相关研究表明,接种植物乳酸杆菌制备的发酵辣椒,与自然发酵辣椒相比,pH 值和总酸会显著降低,亚硝酸盐含量比对照组低 15.36%,生物胺含量在接种发酵中显著降低,其中组胺和酪胺分别降低了 29.98%和 35.11%^[33,34]。

2.2.3 发酵菌种

接种不同的菌种,对于发酵辣椒中风味物质的形成起着决定性作用。如同型发酵菌乳酸链球菌、植物乳杆菌等发酵糖类产生乳酸,异型发酵菌肠膜明串珠菌、短乳杆菌、发酵乳杆菌等发酵糖类可以产生乙醇、乙酸,从而影响着有机酸的积累;发酵辣椒中的假单胞菌属与大多数醛密切相关,尤其与 3-甲基丁醛、2-甲基丁醛、苯乙醛、2-乙酰吡咯、5-甲基糠醛和 5-甲基-2-苯基-2-己烯醛显著相关^[15]。相关研究人员通过转录组测序技术分析了发酵辣椒中的植物乳杆菌、戊糖片球菌、戊糖乳杆菌的产香代谢通路,戊糖片球菌合成乙偶姻、双乙酰及 2,3-丁二醇能力较强,而乙醛、乙酸及脂肪酸代谢相关基因在戊糖乳杆菌中表达很高,植物乳杆菌具有高产乙醛能力,将其接种于辣椒中,乙偶姻含量高于同期自然发酵辣椒^[35],使得发酵辣椒风味更醇厚。

但有研究发现,接种植物乳杆菌会使发酵辣椒中的微生物多样性下降,导致其与多数挥发性化合物呈负相关关系,使得发酵辣椒产品风味单一,但乳酸克

鲁维酵母与植物乳杆菌共发酵对发酵辣椒的风味影响很大,其中有 24 种挥发性化合物的香气活度值(Odour Activity Value, OAV) >1,其中 OAV 大于 100 的有 12 种,乳酸克鲁维酵母的加入使发酵辣椒的感官品质得到了提升,乙酸苯乙酯(浓郁的甜香和玫瑰香气)、2-甲基丁酸乙酯(强烈的苹果香气)等是其在发酵辣椒中的特征风味物质^[36]。总的来说,目前用于接种发酵的菌种主要是以不同乳杆菌为优势菌的纯种或复配发酵,辅以添加酵母菌、芽孢杆菌等菌种提高发酵辣椒风味和改善发酵品质,不同菌种接种发酵辣椒中的相关挥发性香气物质如下表 1 所示。

此外,不同菌种发酵在产酸量、抑菌性、亚硝酸盐含量以及产 γ -氨基丁酸(γ -Aminobutyric Acid, GABA)能力等方面也有所差异,如发酵乳杆菌与食果糖乳杆菌的产酸量最高,乳链球菌和戊糖乳杆菌抑菌效果最好,食果糖乳杆菌与乳酸片球菌产 GABA 能力最强,纯种接种乳酸菌亚硝酸盐含量均低于空白组,乳酸片球菌产亚硝酸盐含量最低,为 1.7 mg/kg^[37],该研究在发酵辣椒菌种的选择和品质稳定性上提供了实验基础。

2.2.4 发酵盐度

添加的盐度过低会导致风味不足,过高则涩味明显。采用 HS-SPME-GC-MS 分析不同盐度发酵辣椒中的风味物质,经对比发现:10%盐度(22 种) >15%盐度(21 种) >20%盐度(18 种) >25%盐度(15 种)^[44],可见盐度越高挥发性风味物质种类越少,其中二甲基硫醚、乙酸正丙酯、丙醇、2-丙烯-1-醇等是 10%盐度发酵辣椒中独有的挥发性成分,感官评价表现为酸甜香,风味品质突出,而 15%盐度发酵辣椒体现在色泽较好、酱香浓郁,20%~25%盐度发酵辣椒则鲜咸味较为突出,可能是因为食盐可与氨基酸如谷氨酸和天冬氨酸作用形成钠盐,增强了发酵辣椒鲜味^[45]。发酵作用随盐度的增加而变得缓慢,食盐的添加量决定着发酵辣椒中微生物的数量和种类,是影响风味物质形成的关键因素之一,研究表明不同盐度(5%、10%、15%、20%)辣椒发酵一个月,酸类物质相对含量高低顺序为 5%盐度(4.94%) >10%盐度(2.56%) >15%盐度(2.55%) >20%盐度(2.02%),20%高盐发酵辣椒中酸类物质较低,但随发酵时间的延长也有所增加,存在轻微的发酸作用^[46]。

传统的发酵辣椒是以高盐高渗环境、酸性环境、厌氧环境抑制微生物生长为主,当添加食盐量大于 20%以上时,是一种发酵非常缓慢的腌渍方法。食盐质量分数高会抑制乳酸菌和部分微生物的生长发酵,随着发酵辣椒食盐质量分数的增加,总酸和有机酸含

量下降,且发酵辣椒食盐质量分数越高,挥发出来的乙醇越多^[47]。这与蒋立文等^[48]研究的高盐辣椒品质结果一致,其表明醇类、酯类是构成高盐辣椒(16%~29%)主要香气物质,酸类、醛类和酮类物质含量均较低,乙醇含量超过总香气物质的一半以上,可能与酵母菌

和耐盐微生物发酵有关;如酵母菌可以发酵葡萄糖产生乙醇和二氧化碳外,还能产生甘油、戊醇、异戊醇、丁醇、异丁醇等醇和各种酯类^[49]。高盐和乙醇的生成起到了抑制杂菌的生长,避免了产酸过多,防止辣椒品质变差,增强了辣椒制品的耐藏性。

表1 不同菌种接种发酵辣椒中的挥发性香气物质

Table 1 Main volatile compounds in fermented pepper inoculated with different strains

发酵菌种	香气类别	相关特征香气物质	主要香气描述	文献
植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	烃类、酯类、 醛类等	苜烯、水芹烯、正己酸乙酯、乙酸香叶酯、 水杨酸甲酯、亚油酸乙酯、棕榈酸乙酯、 橙花叔醇酯、肉豆蔻醛、乙醛等	花香、果香、木香等	[38]
发酵乳杆菌 (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	酯类、醇类、 烯炔类等	辛酸乙酯、乙酸乙酯、亚油酸乙酯、乳酸乙酯、 (E)-2-己烯-1-醇、苯乙醇、芳樟醇、香叶醇、 β-石竹烯、D-柠檬烯、苯乙酮等	白兰地酒香、花香、 果青香等	[39]
戊糖片球菌 (<i>Pediococcus pentosaceus</i>)	酯类、醇类、 烯炔类、酸类等	异丁酸己酯、乙酸乙酯、水杨酸甲酯、 乙酸异戊酯、芳樟醇、异戊醇、2,3-丁二醇、 α-松油醇、月桂烯、雪松烯、香树烯、乙酸、 L-乳酸、β-二氢紫罗兰酮、α-紫罗兰酮、 3-羟基-2-丁酮等	菠萝、苹果青香、 铃兰香、清香等	[35]
类布氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus parabuchneri</i>)	酯类、醇类、 苯及其衍生物等	十六酸乙酯、十六酸甲酯、十八酸甲酯、 十八-9-烯酸甲酯、3-甲基丁烷-1-醇、 辛烷-2-醇、2-苯乙醇、十四烷-1-醇、 2-甲氧基苯酚、2-甲氧基-4-乙烯基苯酚等	果味、甜香、 玫瑰花香等	[40]
鲁氏结合酵母菌 (<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>)	醇类、酯类等	乙醇、2,3-丁二醇、苯乙醇、芳樟醇、 异戊醇、α-松油醇、十六酸乙酯、 (Z)-4-癸烯酸乙酯、棕榈酸乙酯等	酒香、甜香、木香、 玫瑰香等	[41]
凝结芽孢杆菌 (<i>Bacillus coagulans</i>)	酯类、醇类、 酸类等	十六酸乙酯、十二酸乙酯、亚麻酸乙酯、 亚油酸乙酯、油酸乙酯、十四酸乙酯、 正戊醇、2-甲基丁酸、丙酸等	芳香气味的、水果香、 奶香等	[42]
植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)、 嗜酸乳杆菌 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>)	酯类、酸类、 醇类、烯炔类等	庚酸乙酯、癸酸乙酯、棕榈酸甲酯、 苯甲酸乙酯、乙酸乙酯、正癸酸、丙酸、 正癸酸、丙酸、α-松油醇、乙醇、枯醛、 己醛、异松油烯、2-辛酮等	菠萝香、香蕉水、 紫丁香花香味、 辛辣香等	[43]
发酵乳杆菌 (<i>Lactobacillus fermentum</i>)、 嗜酸乳杆菌 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>)、 植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	酯类、烯炔类、 醇类、酸类等	苯甲酸乙酯、辛酸乙酯、乳酸乙酯、 乙酸己酯、亚油酸乙酯、β-蒎烯、 异松油烯、D-柠檬烯、香树烯、芳樟醇、 香叶醇、苯乙醇、顺式-亚麻酸、辛酸、 己酸、苯乙醛、壬醛、2-庚酮、苯乙酮、 3-庚烯-2-酮等	柠檬橙子果香、 铃兰香、松木香、 乳酸味等	[43]
植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)、 发酵乳杆菌 (<i>Lactobacillus fermentum</i>)、 副干酪乳杆菌 (<i>Lactobacillus paracasei</i>)	酮类、醇类、酸类、 醛类、其他等	2-甲基环戊酮、3-羟基-2-丁酮、1-辛醇、 芳樟醇、正己醇、异辛醇、顺-2-戊烯-1-醇、 3-甲基-3-戊醇、乙酸、己酸、壬醛、视黄醛、 水杨酸甲酯、愈创木酚等	奶香、干酪香、 果香等	[32]

2.2.5 发酵时间

随着发酵时间的延长,发酵辣椒中的风味物质如辣椒素、有机酸、还原糖、氨基酸态氮、挥发性香气等,会在微生物和酶的作用下而变化^[50]。如辣椒素含量的下降,可能与发酵过程中链格孢菌受乳酸菌产酸抑制有关,链格孢菌是一类能产生辣椒素的辣椒内生真菌^[51],而辣椒素又是一种碱性物质,随着有机酸的生成逐渐被中和,使得最终发酵的产品变得柔和、诱人、不那么刺鼻^[52]。

大多数乳酸菌具有产生乳酸或乙酸的能力,有研究将10%盐度红辣椒在30℃暗处发酵32d,经高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)检测发现,乙酸占总有机酸的43.37%^[53],可能是自然发酵过程中异型乳酸发酵菌和酵母菌为优势菌产生,苹果酸和草酸含量随发酵时间先上升后下降,而柠檬酸的含量则呈波动趋势,柠檬酸和苹果酸可能来自曲霉属和酵母菌属,菌群之间相互作用导致了有机酸在发酵过程中不断变化。发酵过程中有机酸的释放不仅会降低pH值,还可参与乳酸乙酯、乙酸乙酯和其他芳香化合物的形成,也是导致部分有机酸含量变化的原因之一^[31]。

发酵24d的辣椒经顶空-气相色谱-离子迁移谱(Headspace-gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometry, HS-GC-IMS)检测发现,随着发酵的进行,己酸异戊酯、辛酸甲酯、 γ -丁内酯、苯乙醛、甲磺酸和E-2己烯醇含量明显减少,可能是发酵酸度的升高使得这些酯类水解,2-甲基丁酸、2-甲基丙酸、芳樟醇、乙醇和乙酸乙酯等挥发性化合物增加^[54],减少了辛辣刺激味的同时增加了菠萝果香、花香气味。相关分析表明,毕赤酵母属可产生2-甲基丁酸、3-甲基丁酸、苯乙醇和亚油酸乙酯等酸、醇、酯类风味物质,产生的甜香可以显著改善发酵辣椒质量^[8]。

以二荆条辣椒作为原料发酵40d,该发酵辣椒的pH值随发酵时间从5.21降至3.81,总酸含量随发酵第0天的4.53g/kg升高到第40天的7.86g/kg,亚硝酸盐含量从开始时的35.10mg/kg降到第40天的7.54mg/kg^[55]。还有研究利用嗜酸乳杆菌和乳双歧杆菌于辣椒中25℃发酵15d,发现亚硝酸盐的含量在发酵末期含量远低于国家标准,但在第7天时达到峰值,呈先上升后下降的趋势^[56];因此,确定发酵终点时,应综合考虑滋味物质的累积、挥发性风味物质的形成以及亚硝酸盐等有害物质的含量。

2.2.6 发酵温度

温度的高低主要影响发酵菌种的生长活性,从而间接影响发酵辣椒风味物质的形成。经研究,乳杆菌

在先高温后低温发酵模式(35℃5d~30℃5d~25℃5d)发酵效果最好,其中pH值和酸度下降趋势较明显,由于前期35℃较25℃更适合乳杆菌生长发酵,使得乳酸菌快速成为优势菌,在前3天pH值就降到了3.4,第15天亚硝酸盐含量最低,维生素C含量最高,而先低温后高温发酵模式(25℃5d~30℃5d~35℃5d)第12天才达到成熟要求^[57]。发酵的温度会直接影响微生物体内的酶活力及生长代谢,应根据菌种特性,选择合适的发酵温度才有利于风味物质的形成。

3 总结与展望

国内外集中对发酵辣椒中的微生物多样性及其风味物质进行了研究分析,虽然取得了一些成绩,但目前发酵辣椒主要集中在传统手工制作或工业化风味调配、高盐发酵辣椒(微发酵辣椒)的生产较多,未见菌种应用于发酵辣椒制品大规模生产的相关报道,菌种的应用生产还需要综合考虑菌种选择、菌制剂制备以及生产成本、运输储存等问题,希望在今后的研究中能得到应用技术上的突破。

其次,高盐发酵辣椒加工后脱盐处理会产生大量的盐渍辣椒水,通常以废液的形式排放,不仅对环境造成了严重的污染,还造成了辣椒本身营养物质的损失以及食盐的浪费。另外,经高盐腌渍的辣椒水洗脱盐后风味物质损失严重,需要再次使用添加剂调配风味。因此,在保护环境安全、减小水资源浪费、节约成本和保证风味品质的基础上,选择中低盐度发酵辣椒是辣椒加工技术发展的方向和重点。

此外,目前接种发酵主要集中在菌种调配、工艺优化、感官影响、风味物质检测等方面的研究,未来可以从基因组、代谢组、转录组的角度,研究不同辣椒品种发酵、不同菌之间的配比变化等,对发酵辣椒中挥发性风味产生的直接影响。利用转录组测序技术分析不同发酵辣椒样品mRNA的转录水平,研究特定生物学过程中差异基因的表达情况并通过软件进行功能注释,进一步了解不同菌株在代谢途径中相关基因的表达情况,结合多组学联用对代谢产物进行比较分析,从而深入解析微生物共生互作产生风味物质的机制,为开发菌种强化发酵和精准调控发酵辣椒风味品质提供重要依据。

参考文献

- [1] 宁明,赵馨馨,董蕴,等.基于IlluminaMiSeq测序技术不同地区辣椒酱细菌多样性分析[J].中国调味品,2020,45(2):58-63.
- [2] 韩俊燕,赵国忠,赵建新,等.发酵辣椒细菌多样性的

- 16S rDNA 测序分析[J].中国食品学报,2018,18(5):246-251.
- [3] 黄嘉欣.盐渍辣椒微生物多样性分析及优良乳酸菌选育[D].长沙:湖南农业大学,2019.
- [4] Chen M, Qin Y, Deng F, et al. IlluminaMiSeq sequencing reveals microbial community succession in salted peppers with different salinity during preservation [J]. Food Research International, 2021, 143: 110234.
- [5] Wang J, Wang R, Xiao Q, et al. Analysis of bacterial diversity during fermentation of Chinese traditional fermented chopped pepper [J]. Letters in Applied Microbiology, 2019, 69(5): 346-352.
- [6] 武亚婷,杜木英,何欢欢,等.基于高通量测序技术分析新疆不同地区自然发酵辣椒酱微生物群落多样性[J].食品与发酵工业,2019,45(21):221-228.
- [7] 赵玲艳,黄嘉欣,杨剑,等.盐渍辣椒真菌多样性分析[J].中国食品学报,2021,21(4):310-317.
- [8] Zhao L, Li Y, Jiang L, et al. Determination of fungal community diversity in fresh and traditional chinese fermented pepper by pyrosequencing [J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(24): w273.
- [9] Xu X, Wu B, Zhao W, et al. Shifts in autochthonous microbial diversity and volatile metabolites during the fermentation of chili pepper (*Capsicum frutescens* L.) [J]. Food Chemistry, 2021, 335: 127512.
- [10] 曹晨霞,韩琬,张和平.第三代测序技术在微生物研究中的应用[J].微生物学通报,2016,43(10):2269-2276.
- [11] Liang T, Xie X, Wu L, et al. Microbial communities and physiochemical properties of four distinctive traditionally fermented vegetables from north china and their influence on quality and safety [J]. Foods, 2022, 11(1): 21.
- [12] 陈镜如,边鑫,杨杨,等.中国传统发酵食品微生物多样性研究进展[J].中国调味品,2022,47(2):205-210.
- [13] 尚雪娇,折米娜,邓长阳,等.恩施市 3 种泡辣椒样品中细菌多样性研究[J].中国酿造,2019,38(2):53-57.
- [14] Li Z, Dong L, Zhao C, et al. Metagenomic insights into the changes in microbial community and antimicrobial resistance genes associated with different salt content of red pepper (*Capsicum annuum* L.) sauce [J]. Food Microbiology, 2020, 85: 103295.
- [15] Li Z, Dong L, Huang Q, et al. Bacterial communities and volatile compounds in doubanjiang, a Chinese traditional red pepper paste [J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(6): 1585-1594.
- [16] 彭玺,冯凯,厉舒祯,等.宏基因组学技术与微生物群落多样性分析方法[J].科技导报,2022,40(3):99-111.
- [17] 叶陵,李勇,王蓉蓉,等.我国传统发酵蔬菜中乳酸菌多样性的研究进展[J].食品科学,2018,39(15):296-301.
- [18] 沈馨,王艳,代凯文,等.基于 Miseq 高通量测序技术的辣椒酱核心细菌类群研究[J].食品研究与开发,2018,39(10):151-157.
- [19] Ryu J, Kim E, Kim M, et al. Physicochemical characteristics and microbial communities in gochujang, a traditional Korean fermented hot pepper paste [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 620478.
- [20] 尹小庆,汤艳燕,阚建全,等.小米辣鲜辣椒发酵过程中风味物质及微生物多样性的变化[J].食品与发酵工业,2020,46(5):74-82.
- [21] 张毅,杨成聪,余雅倩,等.市售剁辣椒风味品质的评价[J].食品研究与开发,2018,39(23):129-133.
- [22] 罗凤莲,夏延斌,欧阳建勋.自然发酵剁椒的可挥发性物质分析[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2014,40(1):101-107.
- [23] 张淼,刘佳,肖富权,等.电子舌结合顶空固相萃取-气相色谱-串联质谱法分析四川 5 种泡辣椒风味物质[J].食品安全质量检测学报,2022,13(7):2236-2245.
- [24] 陆宽,王雪雅,孙小静,等.电子鼻结合顶空 SPME-GC-MS 联用技术分析贵州不同品种辣椒发酵后挥发性成分[J].食品科学,2018,39(4):199-205.
- [25] 孙小静,王雪雅,蓬桂华,等.不同辣椒品种对辣椒酱发酵品质的影响[J].中国酿造,2017,36(9):55-59.
- [26] 彭黎,黄钧,黄家全,等.不同产地和品种辣椒的特性差异分析[J].食品研究与开发,2021,42(13):159-167.
- [27] 吴旋,阚晓波,徐怀德,等.植物乳杆菌发酵的不同地区辣椒品质分析[J].中国食品学报,2022,22(7):319-327.
- [28] 肖何,王蓉蓉,陈梦娟,等.湖南不同地区农家剁辣椒风味成分比较分析[J].食品工业科技,2022,43(22):310-318.
- [29] Wang Y, Zhou H, Ding S, et al. Changes in free amino acids of fermented minced peppers during natural and inoculated fermentation process based on HPLC-MS/MS [J]. Journal of Food Science, 2020, 85(9): 2803-2811.
- [30] 罗凤莲,夏延斌,文新昱.不同发酵条件对剁辣椒中有机酸种类及含量的影响[J].食品科技,2015,40(11):48-52.
- [31] 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.
- [32] Kimjihong.调味辣椒酱的制备条件的研究[D].扬州:扬州大学,2020.
- [33] 王新惠,夏艳丽,张雅琳,等.植物乳酸杆菌对辣椒酱品质的影响[J].中国调味品,2020,45(4):44-46.
- [34] 夏学超,于金换,曲桂武.强化发酵对辣椒中生物胺及理化指标影响的研究[J].食品科技,2021,46(10):13-18.
- [35] 杨剑.传统发酵辣椒产香微生物的选育及产香机理研究[D].长沙:湖南农业大学,2020.

- [36] 唐鑫,张艺馨,刘卫红,等.外源接菌对发酵辣椒微生物群落和挥发性风味化合物的影响[J].食品科学,2023,44(10):132-141
- [37] 王雪雅,吴华丽,丁筑红,等.纯种乳酸菌接种发酵辣椒综合品质特性研究[J].中国酿造,2016,35(9):119-124.
- [38] 叶陵.植物乳杆菌 W-4 的分离鉴定及其发酵剁辣椒研究[D].长沙:湖南农业大学,2017.
- [39] 许弯,刘伟,胡小琴,等.湖南剁辣椒中优良乳酸菌的筛选鉴定及其发酵辣椒汁风味研究[J].食品工业科技,2020,41(8):96-103.
- [40] Lee S M, Lee J Y, Cho Y J, et al. Determination of volatiles and carotenoid degradation compounds in red pepper fermented by *Lactobacillus parabuchneri* [J]. Journal of Food Science, 2018, 83(8): 2083-2091.
- [41] 徐浩.发酵脆鲜风味剁辣椒发酵剂的制备及应用[D].长沙:湖南农业大学,2013.
- [42] 方俊,陈怡,蒋立文,等.不同菌株接入盐渍辣椒汁和干辣椒混合体系发酵风味物质的比较[J].中国酿造,2021,40(1):111-117.
- [43] 史婷,高甜甜,刘伟,等.不同发酵剂对剁辣椒品质的影响[J].食品与发酵工业,2022,48(15):144-153.
- [44] 赵驰,朱永清,董玲,等.不同盐度四川辣椒酱挥发性成分分析[J].中国调味品,2019,44(10):161-164.
- [45] 罗凤莲,夏延斌,欧阳建勋,等.剁辣椒发酵过程中滋味物质的变化[J].食品科学,2013,34(3):21-24.
- [46] 张群,郑井元,郑金玉,等.顶空固相微萃取-气相色谱联用质谱法分析“三味”剁辣椒和原料的挥发性成分[J].食品安全质量检测学报,2018,9(21):5678-5687.
- [47] 吴凯,覃业优,蒋立文,等.不同质量分数食盐腌渍艳红辣椒的风味物质分析[J].食品科学,2021,42(24):175-182.
- [48] 蒋立文,石聪,覃业优,等.高盐辣椒坯的品质研究[J].食品与生物技术学报,2020,39(7):91-98.
- [49] Yang Q, Yao H, Liu S, et al. Interaction and application of molds and yeasts in Chinese fermented foods [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 12: 664850.
- [50] Ye Z, Shang Z, Li M, et al. Effect of ripening and variety on the physiochemical quality and flavor of fermented Chinese chili pepper (Paojiao) [J]. Food Chemistry, 2022, 368: 130797.
- [51] Devari S, Jaglan S, Kumar M, et al. Capsaicin production by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus from *Capsicum annum*; LC-ESI-MS/MS analysis [J]. Phytochemistry, 2014, 98: 183-189.
- [52] Ye Z, Shang Z, Zhang S, et al. Dynamic analysis of flavor properties and microbial communities in Chinese pickled chili pepper (*Capsicum frutescens* L.): a typical industrial-scale natural fermentation process [J]. Food Research International, 2022, 153: 110952.
- [53] Xu X, Wu B, Zhao W, et al. Correlation between autochthonous microbial communities and key odorants during the fermentation of red pepper (*Capsicum annum* L.) [J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103510.
- [54] Chen Y, Xu H, Ding S, et al. Changes in volatile compounds of fermented minced pepper during natural and inoculated fermentation process based on headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(7): 3362-3379.
- [55] 夏艳丽.特色辣椒酱开发及其微生物群落特征分析[D].成都:成都大学,2020.
- [56] 徐清萍,张如霞,张锋,等.影响发酵辣椒酱品质因素探讨[J].中国调味品,2019,44(6):70-72.
- [57] 边昊,雷镇欧.不同发酵温度模式对辣椒酱品质影响研究[J].中国调味品,2019,44(5):119-123.