



## 添加大蒜汁对东北酸菜的影响

孙全敏<sup>1,2,3,4#</sup>, 赵露<sup>1,2,3,4#</sup>, 陈文丽<sup>1,2,3,4</sup>, 吴家明<sup>1,2,3,4</sup>, 迟乃玉<sup>1,2,3,4</sup>, 王晓辉<sup>1,2,3,4\*</sup>,  
张庆芳<sup>1,2,3,4\*</sup>

- 1 大连大学 生命健康学院, 辽宁 大连 116622
- 2 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心, 辽宁 大连 116622
- 3 大连市海洋微生物工程重点实验室, 辽宁 大连 116622
- 4 大连市合成生物学重点实验室, 辽宁 大连 116622

孙全敏, 赵露, 陈文丽, 吴家明, 迟乃玉, 王晓辉, 张庆芳. 添加大蒜汁对东北酸菜的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3345-3365.

SUN Quanmin, ZHAO Lu, CHEN Wenli, WU Jiaming, CHI Naiyu, WANG Xiaohui, ZHANG Qingfang. Effects of adding garlic juice on pickled Chinese cabbage[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3345-3365.

**摘要:**【目的】通过在东北酸菜中添加大蒜汁, 研究不同大蒜汁浓度对东北酸菜发酵过程的影响。【方法】以自然发酵酸菜为对照, 对发酵过程中理化指标和  $OD_{600}$  进行监测, 探究蒜汁浓度对酸菜发酵过程物种丰富度、细菌菌群结构和丰度的影响。利用 16S rRNA 基因高通量测序技术对发酵后期不同蒜汁浓度的酸菜样品测序, 并对蒜风味酸菜进行了模糊数学的感官评价, 从中筛选出发酵性能优良的乳酸菌。【结果】不同大蒜汁浓度对 pH 值与  $OD_{600}$  影响较小, 但可以明显降低“亚硝峰”峰值; 添加 0.2%–0.4% 的蒜汁浓度, 有利于乳植杆菌属(*Lactiplantibacillus*) 的生长且添加蒜汁发酵的物种丰富度高于自然发酵, 0.3% 蒜汁浓度的发酵液物种丰富度最高, 种属数远高于其他浓度; 模糊数学感观评价结果显示, 0.3% 蒜汁酸菜成品品质最好, 能使酸菜呈现更好的感观品质和外观颜色, 观察到物种丰富度高、种属数多的样品和东北酸菜感官评价的结果一致, 并从中筛出一株发酵性能优良乳酸菌, 鉴定为戊糖乳植物杆菌, 其发酵特性为产酸最多、亚硝酸盐降解率最高、还具有一定的耐蒜性。【结论】本研究为乳酸菌发酵剂的开发提供菌种来源, 为蒜风味酸菜产业化奠定理论基础。

资助项目: 中央引导地方科技发展资金(110013); 国家自然科学基金(31500039); 大连市青年科技之星项目(2017RQ155); 国家重点研发计划(2022YFC2805105)

This work was supported by the Central Government's Guidance Fund for Local Scientific and Technological Development Projects (110013), the National Natural Science Foundation of China (31500039), the Dalian City Youth Science and Technology Star (2017RQ155), and the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2805105).

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Xiaohui, wangxiaohui@dlu.edu.cn; ZHANG Qingfang, zqf7566@126.com

Received: 2024-02-28; Accepted: 2024-05-23; Published online: 2024-05-28

关键词：大蒜汁；酸菜；菌群结构；模糊数学；乳酸菌

## Effects of adding garlic juice on pickled Chinese cabbage

SUN Quanmin<sup>1,2,3,4#</sup>, ZHAO Lu<sup>1,2,3,4#</sup>, CHEN Wenli<sup>1,2,3,4</sup>, WU Jiaming<sup>1,2,3,4</sup>, CHI Naiyu<sup>1,2,3,4</sup>, WANG Xiaohui<sup>1,2,3,4\*</sup>, ZHANG Qingfang<sup>1,2,3,4\*</sup>

1 College of Life and Health, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning, China

2 Liaoning Marine Microbial Engineering and Technology Center, Dalian 116622, Liaoning, China

3 Key Laboratory of Marine Microbial Engineering in Dalian City, Dalian 116622, Liaoning, China

4 Key Laboratory of Synthetic Biology in Dalian City, Dalian 116622, Liaoning, China

**Abstract: [Objective]** To study the effects of adding different concentrations of garlic juice on the fermentation of pickled Chinese cabbage. **[Methods]** The physicochemical indicators and  $OD_{600}$  during the fermentation process were measured, and the effects of garlic juice concentration on the richness, community structure, and abundance of bacteria during the fermentation were studied with natural fermentation as the control. The 16S rRNA gene high-throughput sequencing was carried out in the late fermentation stage for the pickled Chinese cabbage samples with the addition of garlic juice at different concentrations. Fuzzy mathematics-based evaluation was conducted for the sensory quality of garlic-flavored samples to select the lactic acid bacterial strains with excellent fermentation performance. **[Results]** Different concentrations of garlic juice had minor effects on the pH and  $OD_{600}$  but significantly reduced the peak value of nitrite. Adding 0.2%–0.4% garlic juice was beneficial for the growth of *Lactiplantibacillus*, and the species richness of the product fermented with the addition of garlic juice was higher than that of the naturally fermented product. The fermentation liquid with the addition of 0.3% garlic juice had the highest species richness, with much higher number of genera than other concentration groups. The product from fermentation with 0.3% garlic juice showcased the best quality, presenting better sensory quality and appearance. The product with high species richness and a large number of genera had good sensory quality. A strain of lactic acid bacteria with excellent fermentation performance was screened out and identified as *Lactiplantibacillus pentosus*, which produced the most acids during fermentation, had the highest nitrite degradation rate, and exhibited tolerance to garlic. **[Conclusion]** This study provides a strain for the development of lactic acid bacteria fermentation agents and lays a theoretical foundation for the industrialization of garlic-flavored pickled Chinese cabbage.

**Keywords:** garlic juice; pickled Chinese cabbage; microbial community structure; fuzzy mathematics; lactic acid bacteria

大蒜(*Allium sativum* L.)是一种常见的香料, 它对身体有许多益处, 根据记载, 埃及、希腊、罗马、中国和印度的古代医学文献都承认大蒜是

许多生理疾病和健康相关疾病的治疗剂, 在中国被用作传统药物的历史悠久<sup>[1]</sup>。大蒜中含有多种生物活性化合物, 如有机硫化物、皂苷、酚类化

合物和多糖<sup>[2]</sup>。大蒜及其生物活性化合物具有广泛药理特性,可以在预防不同类型的疾病方面显示出更好的功效,如抗氧化、抗炎、肾保护、心血管保护、神经保护和肾脏保护等<sup>[3-4]</sup>。大蒜的有机硫化物具有杀菌、抗生物膜、抗毒素和抗群体感应活性<sup>[5]</sup>。大蒜中的活性成分大蒜素起到主要抗菌活性,其可与硫氧还原蛋白还原酶、RNA 聚合酶和乙醇脱氢酶等含有硫醇的酶发生化学作用,从而产生抗菌活性<sup>[3]</sup>。此外大蒜还具有抗癌作用,其作用机制主要有清除自由基、调节免疫系统<sup>[6]</sup>、增加谷胱甘肽 S-转移酶等酶的活性<sup>[7]</sup>、缩小肿瘤体积,以及抑制癌细胞增殖、抗凋亡、逃避肿瘤细胞等行为来抑制癌症的发生<sup>[8-9]</sup>。研究表明,大蒜及其硫衍生物可以抑制肿瘤生长,改变肿瘤的生物行为<sup>[10]</sup>。

在蔬菜生长过程中,其硝酸盐含量受施肥、生长速度和生长条件(包括光照强度、降雨量)等因素的影响,研究表明,多叶蔬菜中硝酸盐含量远高于种子或块茎中的含量,在发酵过程中会被肠杆菌等硝酸盐还原细菌还原为亚硝酸盐,并逐渐上升形成高峰值的“亚硝峰”,然后随着发酵进程的推进其残留量逐渐减少。许多研究表明,一些癌症如乳腺癌、胃癌、甲状腺癌<sup>[11-12]</sup>等都与硝酸盐和亚硝酸盐的摄入量有关。同时硝酸盐和亚硝酸盐的过量摄入还会导致高铁血红蛋白血症的形成,增加乳腺癌、前列腺癌<sup>[13]</sup>、代谢紊乱的风险及一系列疾病的发生<sup>[14-15]</sup>。发酵蔬菜中亚硝酸盐的残留量还受 pH、盐浓度、温度等发酵条件的影响,有研究表明, pH 值和亚硝酸盐浓度呈一定相关性<sup>[16]</sup>;在发酵中添加辅料进行发酵能在一定程度上减少亚硝酸盐积累,其中大蒜、大葱和洋葱中富含的有机硫化物的巯基能与亚硝酸盐反应生成亚硝酸硫酯类化合物<sup>[17]</sup>,减少产品中亚硝酸盐含量。目前,添加大蒜汁对东北酸菜的研究鲜有报道,本研究将酸菜发酵过程

理化指标、高通量、物种丰富度、菌群结构、感官评价、菌种筛选结合到一起,研究了添加蒜汁对东北酸菜的理化性质及微生物菌群的影响,通过感官评价找出最适大蒜汁浓度的东北酸菜发酵产品,并从其发酵汤汁中筛选最优势菌属的乳酸菌,可在工业化生产中作为菌种应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大蒜、新鲜白菜、PET 矿泉水购自大连大学南校门外菜市场。

MRS 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 牛肉膏 10.0, 柠檬酸氢二铵 2.0, 葡萄糖 20.0, 乙酸钠 5.0, 三水磷酸氢二钾 2.0, 七水硫酸镁 0.2, 硫酸锰 0.05, 吐温-80 1 mL/L, pH 6.2±0.2。MRS 固体培养基: 在 MRS 液体培养基基础上加入 18 g 琼脂。MRS-CaCO<sub>3</sub> 培养基: 在 MRS 固体培养基基础上加入 20 g CaCO<sub>3</sub>。LB 培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 7.2±0.2。

pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 恒温摇床, 上海茸研仪器有限公司; 电热恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司; 酶标仪, Labsystems 公司; 电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; DP812 土壤基因组脱氧核糖核酸提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。

### 1.2 酸菜发酵操作流程

#### 1.2.1 蒜汁制备

将新鲜的大蒜去皮,置于紫外下照射 30 min 后,使用榨汁机榨碎,将蒜汁匀浆先后用四层纱布和 45 μm 的滤膜过滤,得到 100%的大蒜汁。

#### 1.2.2 工艺流程

将新鲜大白菜剥去外层坏叶,进行清洗和沥

水,然后切丝混匀并装瓶,之后在瓶中添加大蒜汁和盐水,最后将其封盖并恒温发酵。

### 1.2.3 流程要点

切丝混匀、装瓶:将沥干的大白菜切成0.5–1.0 cm的均匀细丝,注意将白菜帮和菜叶部位混合均匀。选用统一规格的555 mL PET材料制备的瓶子若干作为酸菜发酵瓶。此外盐水与大蒜汁添加量:盐水浓度为1.5%,盐水与白菜质量比为1:1,大蒜汁添加量与盐水体积的百分比分别为0.2%、0.3%、0.4%。

### 1.3 酸菜理化指标测定

每瓶酸菜代表不同浓度同一天数的独立发酵体系,酸菜发酵液作为研究对象,以0 d取样为开始,到第7天结束,测每天的理化指标。pH值测定:pH计进行测定;总酸含量测定:参照GB 12456—2021《食品安全国家标准 食品中总酸的测定》<sup>[18]</sup>;亚硝酸盐含量测定:参照GB 5009.33—2016《食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》<sup>[19]</sup>;微生物总数测定:平板计数法,参照GB 4789.2—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》<sup>[20]</sup>;OD<sub>600</sub>值的测定:使用紫外分光光度计测定在波长600 nm处的吸光度值。

### 1.4 高通量测序

#### 1.4.1 测序样品

取成品后的酸菜发酵液,进行测序。

#### 1.4.2 测序数据质量分析

使用Trimmomatic<sup>[21]</sup>(version 0.33)、Cutadapt、Usearch v10等工具对Illumina高通量测序的数据进行质量过滤,最终得到高质量的序列用于后续分析。

### 1.5 基于模糊数学感观评价体系的建立

参考李玉珍等<sup>[22–25]</sup>的模糊评价的构建步骤对不同浓度蒜汁酸菜成品进行模糊综合评价,并建立评价模型。

### 1.6 乳酸菌的分离鉴定

取上述样品中的发酵液5 mL分别转入装有45 mL生理盐水及玻璃珠的锥形瓶中彻底振荡混匀后进行10<sup>-1</sup>–10<sup>-7</sup>梯度稀释;取各梯度稀释液0.2 mL涂布于MRS-CaCO<sub>3</sub>平板上;30 °C恒温培养48 h后挑取不同形态且钙溶圈(透明圈)大的乳酸菌进行分离纯化,并进行革兰氏染色和过氧化氢酶<sup>[26]</sup>试验,同时对菌株进行4 °C斜面保藏和–80 °C甘油保藏。

### 1.7 乳酸菌性能测定

#### 1.7.1 产酸性能测定

产酸速度的测定:在无菌条件下,分别挑取各菌株单菌落转入MRS液体培养中,30 °C静置培养24 h后,按2%转接量传代一次,培养24 h后用pH计测定pH值。

产酸量的测定:产酸量的测定主要参考王鑫宇<sup>[27]</sup>的实验方法。

#### 1.7.2 亚硝酸盐降解性能测定

参考GB 5009.33—2016《食品安全国家标准 食品中硝酸盐与亚硝酸盐的测定》<sup>[19]</sup>。

#### 1.7.3 抑菌性能测定

抑菌性能测定采用牛津杯双层平板扩散法进行测定,主要参考辛娜等<sup>[28]</sup>的牛津杯扩散法。

### 1.8 乳酸菌的鉴定

在MRS平板上观察菌株的菌落大小、形状、颜色及光滑程度,进行革兰氏染色。并进行16S rRNA基因测序。按照基因组DNA提取试剂盒说明书提取样本DNA,以其为模板,对16S rRNA基因序列进行扩增,引物为细菌16S rRNA基因通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR反应体系(25 μL):2×Phanta Max Mix (p515) 12.5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各1 μL, DNA模板1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。PCR反应条件:95 °C预变性5 min;

94 °C变性 30 s, 57 °C退火 30 s, 72 °C延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C终延伸 10 min。

## 1.9 目的菌株的发酵性能测定

### 1.9.1 生长曲线测定

目的菌株按 2%转接量接入 MRS 培养基中, 30 °C静置培养 24 h。培养期间, 每隔 2 h 取样测定菌液在  $OD_{600}$  处的吸光值, 以培养时间为横坐标,  $OD_{600}$  值为纵坐标绘制生长曲线。

### 1.9.2 温度对菌株生长的影响

将活化好的菌液按 2%的接菌量接入已灭菌的 MRS 液体培养基中, 置于不同温度(10、15、20、25、30、35、40 °C)的恒温培养箱中静置培养 24 h。培养期间, 每隔 4 h 取样并测定菌液在  $OD_{600}$  处的吸光度。

### 1.9.3 初始 pH 对菌株生长的影响

将活化好的菌液按 2%的接菌量接入已灭菌的不同初始 pH 值(2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)的 MRS 液体培养基中, 置于最适温度下的恒温培养箱中静置培养 24 h。培养期间, 每隔 4 h 取样并测定菌液在  $OD_{600}$  处的吸光度。

### 1.9.4 菌株耐盐性

将活化好的菌液按 2%的接菌量接入已灭菌的不同盐浓度(0.0%、1.0%、1.5%、2.0%、4.0%、6.0%、8.0%)的 MRS 液体培养基中, 置于最适温度下的恒温培养箱中静置培养 24 h。培养期间, 每隔 4 h 取样并测定菌液在  $OD_{600}$  处的吸光度。

### 1.9.5 亚硝酸盐降解性能

将活化好的菌液按 2%转接量接入不同亚硝酸盐浓度(0、50、100、150、200 mg/kg)的 MRS 培养基中, 在最适温度下恒温静置培养 24 h 及 48 h 后分别测菌液  $OD_{600}$  值, 并计算亚硝酸盐降解率。

### 1.9.6 菌株拮抗性

在无菌条件下用接菌环挑取目的菌株的单菌落分别与戊糖片球菌、鼠李糖乳杆菌、乳酸乳球菌进行交叉划线, 于最适温度下培养 48 h 后

观察菌株生长情况。

### 1.9.7 菌株的耐蒜性

将浓度为 10%的大蒜汁按试管二倍稀释法稀释成浓度为 5%、2.5%、1.25%、0.625%、0.312% 的培养液<sup>[29]</sup>各 2 mL, 然后取已活化的乳酸菌菌液 0.1 mL 转接至上述各浓度试管中, 并以 2 mL 无菌水作为空白对照, 摇匀, 35 °C恒温静置培养 24 h 后测菌液  $OD_{600}$  值。

### 1.10 统计分析

以上实验均重复 3 次, 结果以平均值±标准差表示, 并用 IBM SPSS Statistics 24 与 OriginPro 2021 对数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度大蒜汁对酸菜发酵的影响

#### 2.1.1 不同浓度大蒜汁对发酵酸菜 pH 值的影响

如图 1 所示, 不同浓度大蒜汁酸菜发酵液 pH 值均呈现下降趋势。发酵 7 d 后, 不同大蒜汁浓度的发酵酸菜 pH 值波动不大, 均保持在 2.9 左右, 说明添加蒜汁发酵对酸菜发酵初期的 pH 值有轻微影响, 到发酵后期对发酵的 pH 值影响不大。

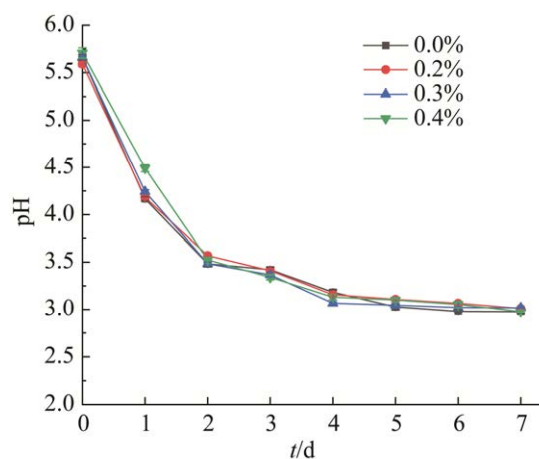


图 1 不同浓度大蒜汁对发酵酸菜 pH 值的影响  
Figure 1 Effect of different concentrations of garlic juice on pH value of fermented pickled cabbage.

### 2.1.2 不同浓度大蒜汁对发酵酸菜总酸含量的影响

如图 2 所示,不同浓度大蒜汁发酵的酸菜总酸含量随着发酵时间的推进保持上升趋势,到发酵后期保持平稳。在发酵初期,添加蒜汁浓度越大,总酸含量越小,发酵 7 d 后,各蒜汁浓度酸菜总酸含量稳定在 9.4 g/kg 左右。

### 2.1.3 不同浓度大蒜汁对发酵酸菜亚硝酸盐含量的影响

如图 3 所示,在发酵第 1 天,均出现不同峰值的“亚硝峰”,峰值随蒜汁浓度的增大而降低,随着发酵时间的延长,酸菜中的亚硝酸盐含量逐渐降低,在发酵后期,亚硝酸盐含量不随蒜汁浓度变化而变化,基本稳定在 3.2 mg/kg 左右。

### 2.1.4 不同浓度蒜汁发酵酸菜中 $OD_{600}$ 值的变化

如图 4 所示,在整个发酵过程中,发酵液  $OD_{600}$  值整体呈上升趋势,到发酵后期,不同浓度蒜汁酸菜的  $OD_{600}$  值增长缓慢。

### 2.1.5 不同浓度蒜汁发酵酸菜中微生物数量的变化

如图 5 所示,在发酵第 0 天不同蒜汁浓度酸

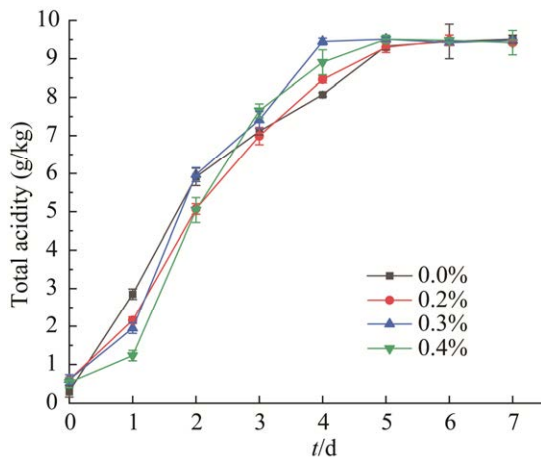


图 2 不同浓度大蒜汁对发酵酸菜总酸含量的影响

Figure 2 Effect of different concentrations of garlic juice on total acid content of fermented pickled cabbage.

菜中的细菌总数差别不大,均在  $6 \lg \text{CFU/mL}$  左右;在发酵第 1 天,未添加蒜汁发酵中的细菌总数高于添加蒜汁的细菌总数,添加蒜汁发酵的细菌总数随着浓度的升高而降低。在发酵后期,细菌总数与乳酸菌总数逐渐保持稳定,乳酸菌总数低于细菌总数。

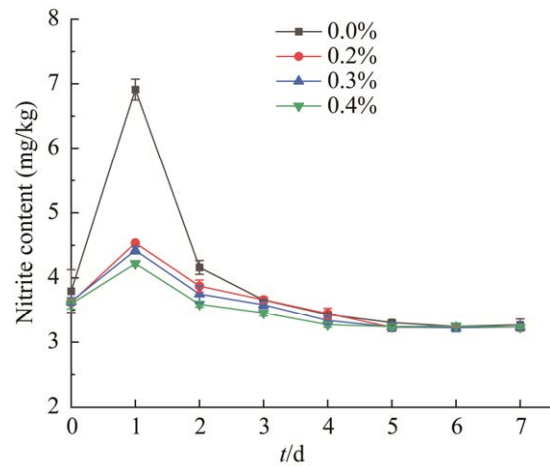


图 3 不同浓度大蒜汁对发酵酸菜亚硝酸盐含量的影响

Figure 3 Effect of different concentrations of garlic juice on nitrite content of fermented sauerkraut.

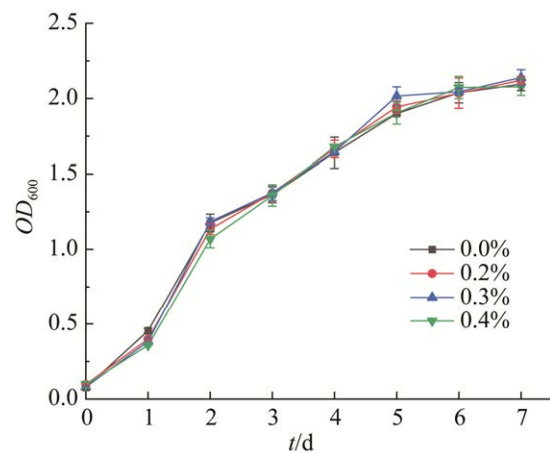


图 4 不同浓度大蒜汁发酵酸菜中  $OD_{600}$  值的变化

Figure 4 Changes of  $OD_{600}$  in pickled cabbage fermented with different concentrations of garlic juice.

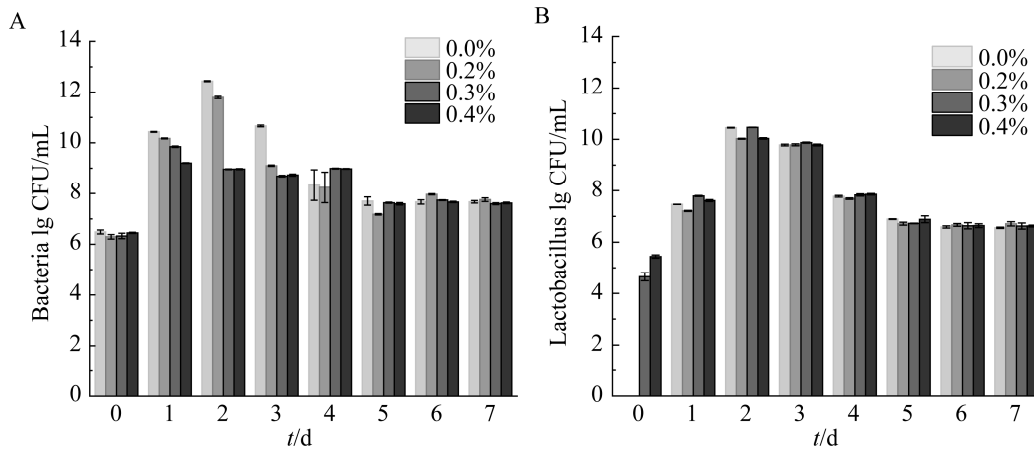


图5 不同浓度大蒜汁发酵酸菜中微生物的动态变化

Figure 5 Dynamic changes of microorganisms in pickled cabbage fermented with different concentrations of garlic juice. A: The change in total bacterial count in sauerkraut fermented with garlic juice of different concentrations over time. B: The change in total lactic acid bacteria count in sauerkraut fermented with garlic juice of different concentrations over time.

## 2.2 不同浓度蒜汁酸菜成品中微生物菌群结构分析

上述结果可知,发酵过程中第7天的各项理化指标趋于稳定,因此取第7天的酸菜发酵液进行高通量测序,设自然发酵的酸菜为CK7,蒜汁浓度为0.2%、0.3%、0.4%的酸菜样品分别为S27、S37、S47。

### 2.2.1 16S rRNA 基因高通量测序结果

通过对样品进行处理后,对得到的数据进行质量评估。各样品测序数据评估结果如表1所示。将原始序列进行拼接、过滤和嵌合体处理等,最后得到有效序列数为62 964、57 969、64 225、59 950条,与原始序列相比,其有效占比分别为78.74%、80.58%、80.44%和74.98%,测序质量较好。

表1 样品高通量测序结果

Table 1 Results of high-throughput sequencing of samples

Sample name	Original sequence (strip)	High-quality sequence (strip)	Sequence after denoising (strip)	Concatenated sequence (strip)	Final sequence (strip)
CK7	79 943	79 690	78 620	77 905	62 964
S27	71 937	71 682	70 401	69 589	57 969
S37	79 846	79 582	78 322	77 403	64 225
S47	79 952	79 697	78 511	77 360	59 950

### 2.2.2 基于操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)的 Venn 图分析

不同浓度蒜汁酸菜成品中OTU与基于OTU的Venn图如图6所示,各样品中酸菜的OTUs大小顺序为S37>S47>S27>CK7,共有核心OTUs 35个,CK7独有OTUs 143个,S27独有OTUs 153个,S37独有OTUs 195个,S47独有OTUs 159个。

### 2.2.3 $\alpha$ 多样性分析

不同浓度蒜汁酸菜成品的稀释性曲线结果如图7所示,不同蒜汁浓度酸菜样品间稀释性曲线S37>S47>S27>CK7,表明添加蒜汁发酵后酸菜中微生物的物种丰富度均高于自然发酵,其中S37酸菜样品微生物丰富度最高。

不同浓度蒜汁酸菜成品的香农指数曲线结果如图8所示,曲线趋于平坦,表明测序数据量

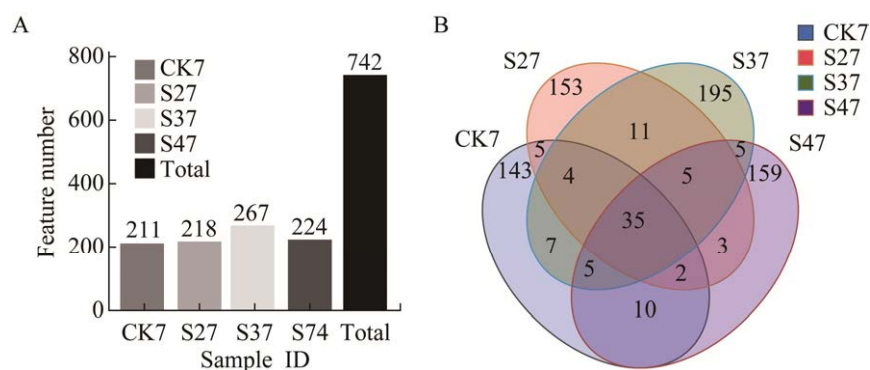


图 6 不同浓度蒜汁酸菜成品中细菌的 OTU 数(A)与 Venn 图(B)

Figure 6 OTU number (A) and Venn diagram (B) of bacteria in pickled cabbage with different concentrations of garlic juice.

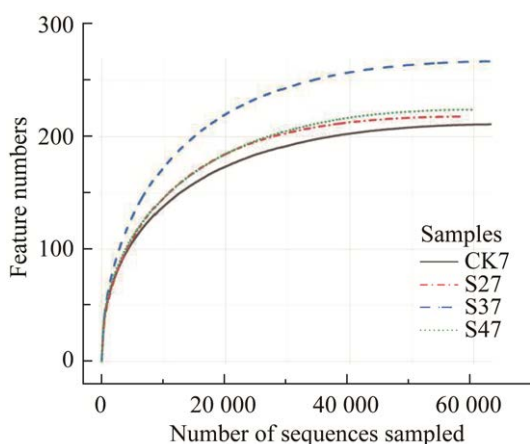


图 7 不同浓度蒜汁酸菜成品中的稀释性曲线

Figure 7 The rarefaction curves of pickled cabbage with different concentrations of garlic juice.

足够大, 特征种类不会随测序量增加而增长。样品间香农指数  $S47 > CK7 > S37 > S27$ , 其中 S47 酸菜样品微生物多样性最高。

各样品中的  $\alpha$  指数如表 2 所示, 在 OTU 水平, 各酸菜成品中 ACE 指数与 Chao1 指数大小顺序均为  $S37 > S47 > S27 > CK7$ 。 $\alpha$  多样性指数结

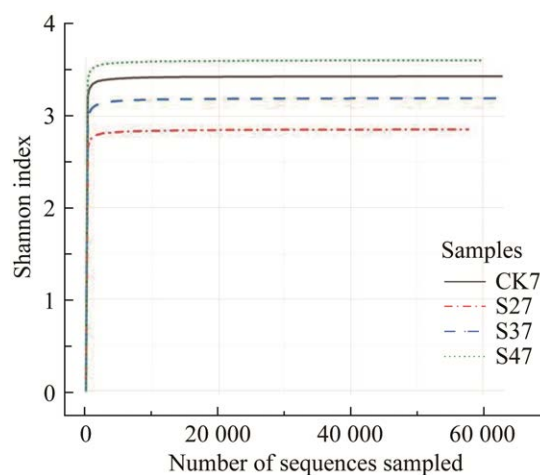


图 8 不同浓度蒜汁酸菜成品中的香农指数曲线

Figure 8 Shannon index curves of pickled cabbage with different concentrations of garlic juice.

果表明添加蒜汁发酵后酸菜中的物种丰富度与物种多样性均高于自然发酵。

#### 2.2.4 不同蒜汁浓度酸菜成品细菌菌群结构分析

将各样品得到的序列数据进行物种注释并进行聚类分析, 得到各等级物种结果如表 3 所示。

表 2  $\alpha$  多样性指数

Table 2 Alpha diversity index

Sample name	OTUs	ACE index	Chao1 index	Simpson index	Shannon index	Coverage rate
CK7	211	211.67	211.02	0.81	3.44	1
S27	218	218.52	218.03	0.69	2.85	1
S37	267	267.58	267.02	0.76	3.20	1
S47	224	224.00	224.00	0.81	3.61	1



表 3 样品各等级物种统计

Table 3 Statistical tables of species of each rank of samples

Sample name	Boundary	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
CK7	1	16	27	60	94	130	136
S27	1	15	26	63	104	135	144
S37	1	18	35	80	127	170	180
S47	1	17	26	60	99	126	136

菌门数上 S37>S47>CK7>S27, 菌属数上 S37>S27>CK7>S47, 物种数上 S37>S27>S47=CK7。

不同浓度蒜汁酸菜成品在门水平上的物种分布如图 9 所示, 在相对丰度排名前 10 的菌门中丰度大于 1.00%的菌门有厚壁菌门(*Firmicutes*) (S27>S37>S47>CK7) (91.59%>89.83%>85.60%>83.53%), 变形菌门(*Proteobacteria*) (CK7>S47>S37>S27) (13.76%>11.90%>6.86%>6.13%), 蓝细菌门(*Cyanobacteria*) (S37>CK7>S27>S47) (1.46%>1.12%>0.98%>0.85%)。可以看到, 所有添加蒜汁发酵后的样品中 *Firmicutes* 丰度均高于未添加蒜汁发酵中的丰度, *Proteobacteria* 丰度均小于未添加蒜汁发酵中的丰度, 表明添加 0.2%–0.4%浓度蒜汁发酵对发酵酸菜中 *Firmicutes* 的生长有利, 对 *Proteobacteria* 的生长不利, 而对 *Cyanobacteria* 来说, 0.3%的蒜汁浓度对其生长有益。

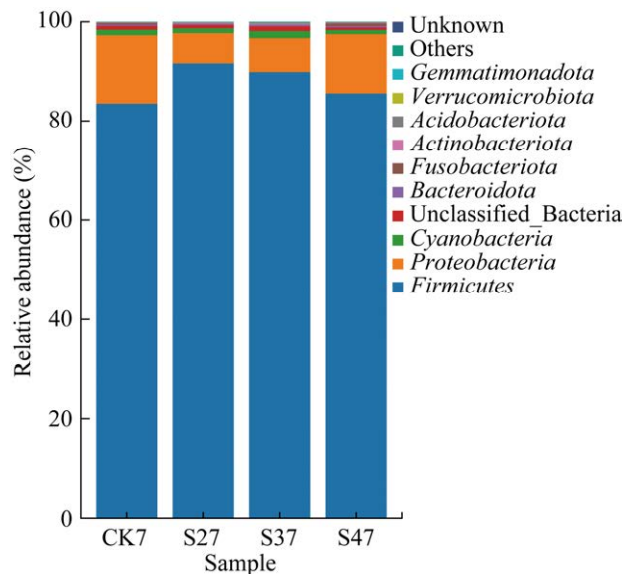


图 9 不同浓度蒜汁酸菜成品中门水平物种分布  
Figure 9 Species distribution at phylum level in pickled cabbage with different concentrations of garlic juice.

不同浓度蒜汁酸菜成品在属水平上的物种分布如图 10 所示, 相对丰度排名前 10 的菌属中丰度大于 1.00%的乳酸菌菌属有乳植杆菌属(*Lactiplantibacillus*) (S27>S37>S47>CK7) (63.08%>53.61%>46.65%>45.03%), 乳球菌属(*Lactococcus*) (CK7>S37>S47>S27) (25.71%>22.60%>11.65%>16.03%), 明串珠菌属(*Leuconostoc*) S47>S37>CK7>S27) (12.11%>5.97%>4.69%>4.68%), 魏斯氏菌属(*Weissella*) (S27>CK7>S47>S37), 片球菌属(*Pediococcus*) (S37>CK7>S27>S47), 乳杆菌属(*Lactobacillus*) (S37>S27>CK7>S47) (1.28%>1.17%>0.76%>0.33%); 其他菌属有拉恩氏菌属(*Rahnella*) (CK7>S37>S27>S47) (2.58%>2.22%>1.16%>0.99%); unclassified\_Enterobacteriaceae (CK7>S47>S27>

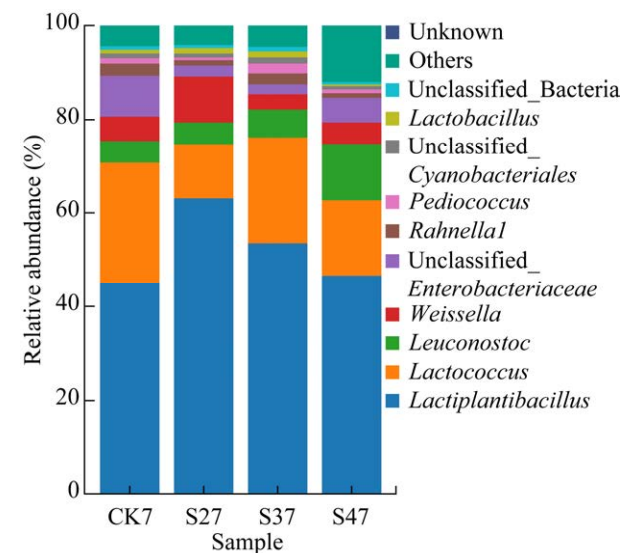


图 10 不同浓度蒜汁酸菜成品中属水平物种分布  
Figure 10 Distribution of horizontal species in pickled cabbage with different concentrations of garlic juice.

S37) (8.63%>5.28%>2.34%>2.11%)。可以看到，添加 0.2%–0.4% 的蒜汁发酵对发酵酸菜中 *Lactiplantibacillus* 和 *Leuconostoc* 的生长有利，对 *Lactococcus*、*Rahnella*、*unclassified\_Enterobacteriaceae* 的生长不利。

2.2.5 基于属水平上的分类学对比分析

不同浓度蒜汁酸菜成品在基于属水平上的

分类学树状图如图 11 所示，根据颜色和饼图面积对比，*Firmicutes* 中饼图面积及颜色占比有主要变化的是 *Lactobacillus*、*Pediococcus*、*Lactococcus*，根据饼图占比，*Lactobacillus* 中 S37 占比最大，S47 占比最小，*Pediococcus* 中 S37 占比最大，*Lactococcus* 中 CK7 占比最大，S27 占比最小。在变形菌门 *Proteobacteria* 中莫拉氏菌科

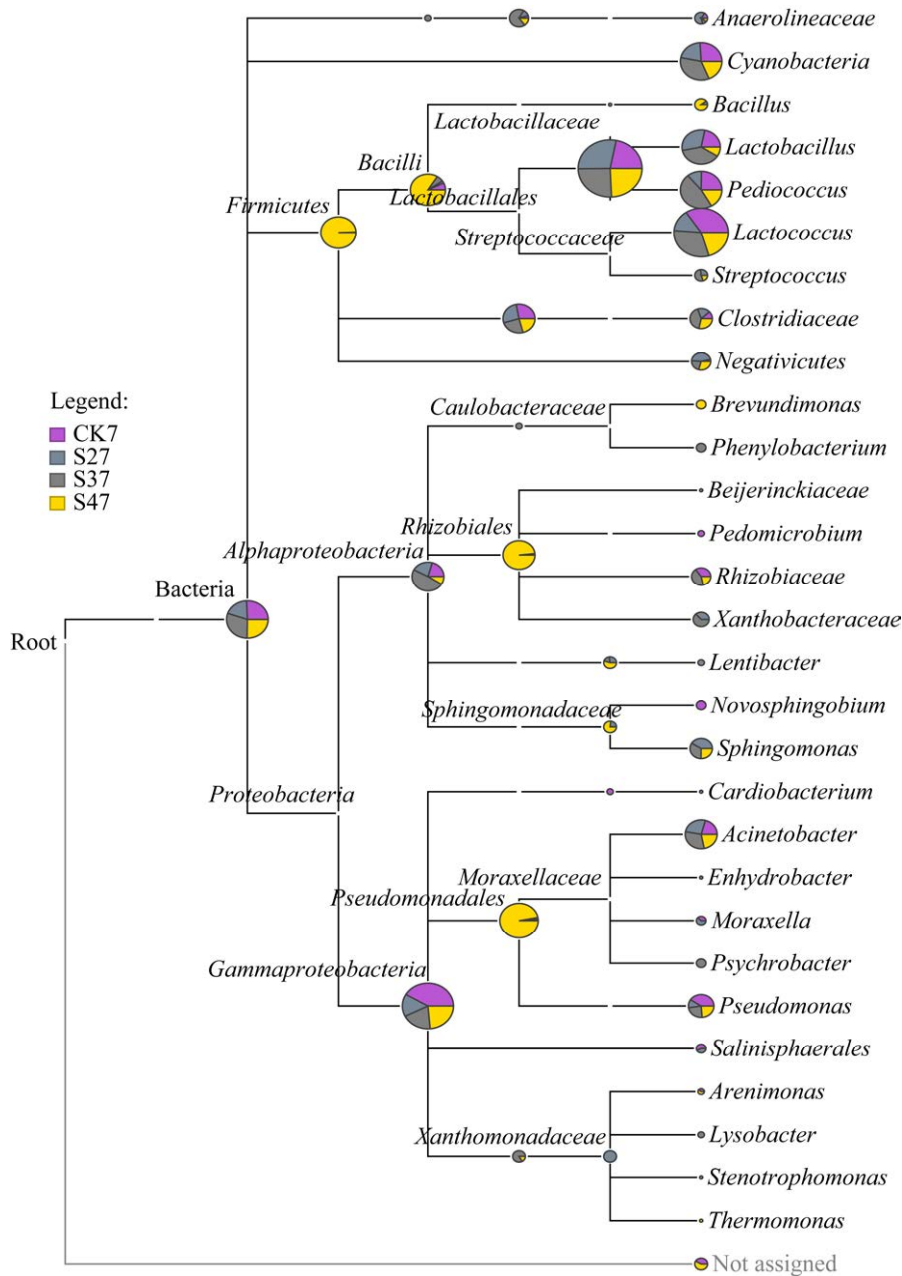


图 11 各酸菜成品的分类学树状图

Figure 11 The taxonomic dendrogram of the pickled cabbage products.

(*Moraxellaceae*)有主要变化的有 *Acinetobacter* 与 *Pseudomonas*, 在 *Acinetobacter* 中 S27 与 S37 占比较大, *Pseudomonas* 中 CK7 占比最大, S27 占比最小。

### 2.3 不同浓度蒜汁酸菜成品感观评价

#### 2.3.1 感官评价指标权重的确定

各项感官评价指标权重(X)计算结果如表 4 所示, 色泽 0.25, 香气 0.26, 滋味 0.29, 质地 0.20, 即  $X=\{0.25, 0.26, 0.29, 0.20\}$ 。

#### 2.3.2 模糊矩阵评价结果

感观评定小组按照评价标准对 4 种不同蒜汁浓度的酸菜成品进行感观评定, 评定结果如表 5 所示, 不同蒜汁浓度的酸菜产品的模糊矩阵分别记为  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 。由表 5 可知, 根据评定小组对  $R_1$  的评价, 对色泽的评价结果显示, 有 6 人认为优秀, 4 人认为良好, 认为一般、较差、差的人数均为 0 人, 则得到 A 色泽 =  $\{0.6 \ 0.4 \ 0.0 \ 0.0 \ 0.0\}$ , 同理可得 A 香气 =  $\{0.1 \ 0.7 \ 0.2 \ 0.0 \ 0.0\}$ , A 滋味 =  $\{0.2 \ 0.5 \ 0.1 \ 0.1 \ 0.1\}$ , A 质地 =  $\{0.1 \ 0.4 \ 0.2 \ 0.2 \ 0.1\}$ , 以此类推得到矩阵  $R_1$ – $R_4$ 。

到不同蒜汁浓度酸菜样品的模糊矩阵分别如下:

$$R_1 = \begin{bmatrix} 0.6 & 0.4 & 0.0 & 0.0 & 0.0 \\ 0.1 & 0.7 & 0.2 & 0.0 & 0.0 \\ 0.2 & 0.5 & 0.1 & 0.1 & 0.1 \\ 0.1 & 0.4 & 0.2 & 0.2 & 0.1 \end{bmatrix} R_2 = \begin{bmatrix} 0.6 & 0.4 & 0.0 & 0.0 & 0.0 \\ 0.3 & 0.6 & 0.1 & 0.0 & 0.0 \\ 0.2 & 0.5 & 0.3 & 0.0 & 0.0 \\ 0.5 & 0.5 & 0.0 & 0.0 & 0.0 \end{bmatrix}$$

表 4 感观评价权重分配表

Table 4 Weight distribution of sensory evaluation

Indicator	Evaluation score					Weighting
	Color	Aroma	Flavor	Texture	Score	
Color	10	4	5	6	25	0.25
Aroma	5	10	5	6	26	0.26
Flavor	7	6	10	6	29	0.29
Texture	3	3	4	10	20	0.20

$$R_3 = \begin{bmatrix} 0.7 & 0.1 & 0.2 & 0.0 & 0.0 \\ 0.6 & 0.3 & 0.1 & 0.0 & 0.0 \\ 0.5 & 0.4 & 0.1 & 0.0 & 0.0 \\ 0.6 & 0.4 & 0.0 & 0.0 & 0.0 \end{bmatrix} R_4 = \begin{bmatrix} 0.7 & 0.3 & 0.0 & 0.0 & 0.0 \\ 0.5 & 0.3 & 0.1 & 0.0 & 0.1 \\ 0.4 & 0.4 & 0.1 & 0.1 & 0.0 \\ 0.5 & 0.3 & 0.0 & 0.2 & 0.0 \end{bmatrix}$$

根据模糊数学综合评定集  $Y_i=X \times R_i$ , 其中权重  $X=\{0.25, 0.26, 0.29, 0.20\}$ ,  $R_i$  为评定关系矩阵, 得到综合评价结果, 如下:

$$Y_1 = X \times R_1 = (0.25, 0.26, 0.29, 0.20) \times \begin{bmatrix} 0.6 & 0.4 & 0.0 & 0.0 & 0.0 \\ 0.1 & 0.7 & 0.2 & 0.0 & 0.0 \\ 0.2 & 0.5 & 0.1 & 0.1 & 0.1 \\ 0.1 & 0.4 & 0.2 & 0.2 & 0.1 \end{bmatrix} = (0.254, 0.507, 0.121, 0.069, 0.049)$$

得到  $Y_1=(0.254, 0.507, 0.121, 0.069, 0.049)$ , 即为蒜汁浓度为 0.0% 酸菜样品的综合评价结果, 该结果表明不添加大蒜汁进行发酵的酸菜成品, 认为其感观品质为优秀的人占 25.4%, 认为其感观品质为良好的人占比 50.7%, 认为其感观品质为一般的人占比 12.1%, 认为其感观品质为较差的人占比 6.9%, 认为其感观品质为差的人占比 4.9%。

同理可得, 其余 3 个样品得到的模糊数学综合评定结果为:  $Y_2=(0.386, 0.501, 0.113, 0.000, 0.000)$ ,  $Y_3=(0.596, 0.299, 0.105, 0.000, 0.000)$ ,  $Y_4=(0.521, 0.329, 0.055, 0.069, 0.026)$ , 根据模糊综合评价总分  $T=V \times Y$  计算得到各样品的综合得分。如样品  $Y_1=(0.254, 0.507, 0.121, 0.069, 0.049)$ , 评价等级  $V=(25, 20, 15, 10, 5)$ , 可计算得出未添加蒜汁发酵的酸菜样品的综合得分为:

$$T_1 = V \times Y_1 =$$

$$(0.254, 0.507, 0.121, 0.069, 0.049) \times \begin{bmatrix} 25 \\ 20 \\ 15 \\ 10 \\ 5 \end{bmatrix} = 19.240$$

同理可得  $T_2=21.365$ ,  $T_3=22.455$ ,  $T_4=21.250$ 。经模糊数学评价法最后得到的综合得分  $Y_3>Y_2>Y_4>Y_1$ ，即在不同浓度蒜汁发酵的酸菜成品中，0.3%蒜汁浓度的酸菜成品综合评定分数最高，其次是0.2%和0.4%蒜汁浓度的酸菜成品，0.0%蒜汁浓度的酸菜成品得分最低。

表 5 不同蒜汁浓度发酵酸菜感观评价结果

Table 5 Sensory evaluation of pickled cabbage fermented with different concentrations of garlic juice

Sample	Indicator	Grade					Sensory evaluation score
		Excellent	Good	Generally	Subpar	Poor	
0.0% $R_1$	Color	6	4	0	0	0	19.240
	Aroma	1	7	2	0	0	
	Flavor	2	5	1	1	1	
	Texture	1	4	2	2	1	
0.2% $R_2$	Color	6	4	0	0	0	21.365
	Aroma	3	6	1	0	0	
	Flavor	2	5	3	0	0	
	Texture	5	5	0	0	0	
0.3% $R_3$	Color	7	1	2	0	0	22.455
	Aroma	6	3	1	0	0	
	Flavor	5	4	1	0	0	
	Texture	6	4	0	0	0	
0.4% $R_4$	Color	7	3	0	0	0	21.250
	Aroma	5	3	1	0	1	
	Flavor	4	4	1	1	0	
	Texture	5	3	0	2	0	

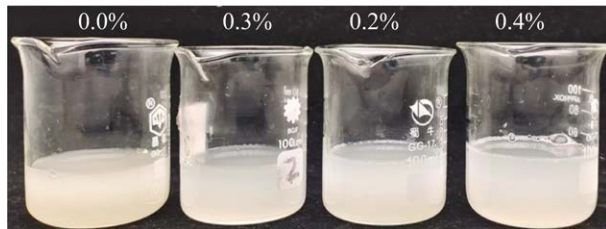


图 12 不同蒜汁浓度酸菜发酵液

Figure 12 Pickled cabbage fermentation broth with different concentrations of garlic juice.

不同蒜汁浓度酸菜成品发酵液如图 12 所示，加入蒜汁进行发酵的酸菜发酵液均比未加入蒜汁发酵的酸菜发酵液澄清。根据模糊数学综合评定得到的结果为添加 0.3%蒜汁浓度进行发酵的酸菜得分最高，其发酵酸菜成品与未添加蒜汁发酵的酸菜成品如图 13 所示，添加蒜汁发酵的酸菜茎边为亮白色，菜叶为亮黄色，外观色泽比未添加蒜汁发酵的酸菜更好，汤汁也更加清澈。大蒜中含有大蒜素，能够使酸菜呈现较好的感官品质与外观颜色，减少质量损失，与代惠芹等<sup>[30]</sup>的研究相符。

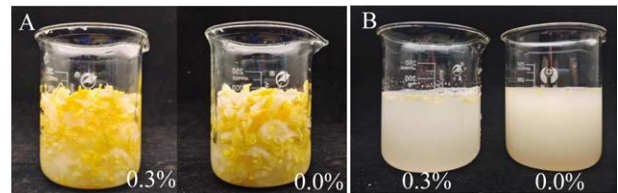


图 13 0.3%蒜汁发酵酸菜成品

Figure 13 Adding 0.3% garlic juice to ferment sauerkraut. A: Different garlic juice concentrations fermentation of sauerkraut finished products. B: Fermentation broth of sauerkraut finished products with different garlic juice concentrations.

## 2.4 感官评价和群落的关系分析

由表 6 可知,感官评价好的样品物种丰富度最高。感官评价中的色、香、味是微生物赋予的,不同的菌具有不同代谢途径、代谢方式,能产生不同的代谢产物,会导致风味不同。本研究表明 0.3%蒜汁浓度的酸菜成品综合评定分数最高,乳酸菌属占比为 88.85%,其中 *Lactiplantibacillus* 为 53.61%、*Lactococcus* 为 22.60%、*Leuconostoc* 为 5.97%、*Weissella* 为 3.28%、*Pediococcus* 为 2.11%、*Lactobacillus* 为 1.28%。在该条件下,

风味最佳的原因可能是乳酸菌属与其他菌属比例恰当,造成色、香、味综合评分最高,在酸菜成品无腐败的情况下,菌属数、丰富度及菌种比例是否与感官评价有一定的关系,它们之间的作用还有待进一步研究。

## 2.5 乳酸菌的分离鉴定及性能测定

上述结果表明,在菌群结构分析中,乳酸菌属在各浓度蒜汁的酸菜中丰度最大,因此从其发酵汤汁中筛选一株发酵性能良好的乳酸菌。按照传统分离菌株的实验操作方法,分离纯化出具有

表 6 不同蒜汁浓度酸菜成品中的各指标含量

Table 6 The content of various indicators in the finished sauerkraut with different garlic juice concentrations

Indicator	0.0%	0.2%	0.3%	0.4%
Sensory evaluation	19.240	21.365	22.455	21.250
Genus	130	135	170	126
Species	136	144	180	136
OTUs	211	218	267	224
ACE index	211.67	218.52	267.58	224.00
<i>Lactiplantibacillus</i> (%)	45.03	63.08	53.61	46.65
<i>Lactococcus</i> (%)	25.71	16.03	22.60	11.65
<i>Leuconostoc</i> (%)	4.69	4.68	5.97	12.11
<i>Weissella</i> (%)	5.25	9.71	3.28	4.63
<i>Pediococcus</i> (%)	1.13	0.56	2.11	0.80
<i>Lactobacillus</i> (%)	0.76	1.17	1.28	0.33
Genus <i>Lactobacillus</i> (%)	82.57	95.23	88.85	76.17

明显透明圈的菌株共 21 株,将所有菌株进行菌落形态观察、过氧化氢酶试验及革兰氏染色。得到 17 株过氧化氢酶试验阴性、革兰氏染色阳性且溶钙圈大的乳酸菌。编号分别为 N1-1、N1-3、SY2-1、SY2-2、SY2-3、SY2-4、DY1-2、DY2-1、DY2-2、DY2-3、DY2-4、DY2-5、DY2-6、DY2-7、DY2-8、DY2-9、DY2-10。

### 2.5.1 产酸速度测定

各菌株培养 24 h 后菌液 pH 值如表 7 所示,空白对照 CK 的 pH 值为 6.200±0.010。所有菌株培养 24 h 后 pH 值均下降至 4.000 以下,菌株 DY2-7 24 h pH 值最低,为 3.160±0.015。

表 7 菌株培养液 pH 值

Table 7 pH value of bacterial culture medium

Strain number	pH value	Strain number	pH value
CK	6.200±0.010	DY2-2	3.210±0.010
SY2-1	3.170±0.010	DY2-3	3.190±0.010
SY2-2	3.200±0.015	DY2-4	3.320±0.017
SY2-3	3.180±0.021	DY2-5	3.390±0.000
SY2-4	3.180±0.011	DY2-6	3.180±0.010
N1-1	3.750±0.015	DY2-7	3.160±0.015
N1-3	3.720±0.006	DY2-8	3.350±0.006
DY1-2	3.290±0.010	DY2-9	3.500±0.021
DY2-1	3.310±0.026	DY2-10	3.180±0.010

### 2.5.2 产酸量测定

各菌株培养 24 h 后菌液的产酸量如表 8 所示,空白对照 CK 产酸量为 0.38 g/kg,菌株 DY2-7 24 h 产酸量最高,达到 19.95 g/kg。

### 2.5.3 亚硝酸盐降解能力测定

各菌株在 24 h 及 48 h 时亚硝酸盐含量及降解率如表 9 所示,在 24 h 时,降解率大于 90.00%

的菌株为 DY1-2 与 DY2-7,降解率分别为 93.54%、94.71%;在 48 h 时,降解率大于 90.00% 的共 15 株,其中菌株 DY1-2 与 DY2-7 在 48 h 时的降解率分别为 94.05%、95.38%。

### 2.5.4 菌株抑菌能力测定

各菌株对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌效果如表 10 所示。17 株乳酸菌发酵液对供试

表 8 菌株产酸量

Table 8 Acid production rate of strains

Strain number	Acid production (g/kg)	Strain number	Acid production (g/kg)
CK	0.38	DY2-2	18.45
SY2-1	19.50	DY2-3	19.35
SY2-2	19.05	DY2-4	16.50
SY2-3	19.12	DY2-5	15.45
SY2-4	18.75	DY2-6	18.45
N1-1	11.55	DY2-7	19.95
N1-3	11.85	DY2-8	16.35
DY1-2	15.60	DY2-9	14.85
DY2-1	16.35	DY2-10	19.05

CK stands for blank control.

表 9 菌株培养液亚硝酸盐含量及降解率

Table 9 Nitrite content and degradation rate of bacterial culture medium

Strain number	24 h		48 h	
	Nitrate content (mg/kg)	Degradation rate (%)	Nitrate content (mg/kg)	Degradation rate (%)
SY2-1	9.900±0.220	86.25	5.120±0.062	92.89
SY2-2	12.120±1.990	83.16	5.240±0.108	92.72
SY2-3	9.930±0.186	86.20	5.220±0.029	92.75
SY2-4	8.580±0.205	88.09	5.060±0.097	92.97
N1-1	60.300±0.186	16.25	50.380±0.699	30.02
N1-3	56.090±1.042	22.10	41.730±0.625	42.04
DY1-2	4.650±0.052	93.54	4.280±0.217	94.05
DY2-1	15.010±0.245	79.15	6.970±1.563	90.32
DY2-2	8.880±0.249	87.67	92.800±0.057	92.80
DY2-3	8.840±0.113	87.72	5.180±0.108	92.80
DY2-4	13.470±0.068	81.29	5.140±0.078	92.86
DY2-5	14.720±0.069	79.57	5.850±0.072	91.88
DY2-6	9.280±0.098	87.11	5.290±0.108	92.66
DY2-7	3.810±0.017	94.71	3.330±0.141	95.38
DY2-8	14.360±0.337	80.05	5.350±0.209	92.57
DY2-9	17.890±0.572	75.15	6.330±0.024	91.20
DY2-10	8.850±0.115	87.71	5.290±0.316	92.65
CK		72.00±0.30		

CK is the blank control, average ± standard deviation.

表 10 菌株抑菌能力

Table 10 Antimicrobial activity of the strains

Strain number	Inhibition zone diameter (cm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
SY2-1	2.000±0.048	2.060±0.104
SY2-2	1.950±0.050	1.920±0.042
SY2-3	2.100±0.055	2.160±0.029
SY2-4	2.060±0.062	2.030±0.058
N1-1	1.760±0.029	1.310±0.029
N1-3	1.710±0.029	1.580±0.050
DY1-2	1.720±0.029	2.190±0.039
DY2-1	1.910±0.029	2.180±0.029
DY2-2	2.080±0.029	1.930±0.029
DY2-3	2.050±0.029	2.110±0.026
DY2-4	1.880±0.029	2.150±0.050
DY2-5	1.880±0.029	2.010±0.029
DY2-6	1.980±0.029	2.200±0.058
DY2-7	2.130±0.029	2.230±0.029
DY2-8	1.900±0.029	2.110±0.029
DY2-9	1.900±0.029	2.180±0.076
DY2-10	2.150±0.050	2.200±0.050
CK	0	0

CK is the blank control, average ± standard deviation, with an Oxford cup diameter of 0.78 cm.

菌株的生长均有抑制作用,在对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径中,菌株 DY2-10 的抑菌圈直径最大,达到(2.150±0.050) cm,菌株 DY2-7 的抑菌圈直径为(2.130±0.029) cm。对大肠杆菌的抑菌圈直径,菌株 DY2-7 的抑菌圈直径达到(2.230±0.029) cm,抑菌作用最强。

### 2.5.5 乳酸菌筛选结果

对筛选得到的菌株进行初筛,初步得到 17 株乳酸杆菌;复筛后菌株 DY2-7 发酵 24 h 后的产酸速度最快, pH 值为 3.160±0.015;产酸量为 19.95 g/kg;在 24 h 与 48 h 时的亚硝酸盐降解率最高,48 h 时亚硝酸盐降解率为 95.38%。在对

致病菌的抑制作用中,菌株 DY2-7 对大肠杆菌的抑制作用最强,对金黄色葡萄球菌的抑制作用稍弱,但抑菌圈直径也达到了(2.130±0.029) cm,研究表明致病性大肠杆菌是韩国过去 18 年中发现的第二大食源性病原体<sup>[27]</sup>,所以对大肠杆菌的抑制能力尤为重要。综合所有结果,选定优势菌株 DY2-7 为下一步实验菌株。

## 2.6 乳酸菌的鉴定

### 2.6.1 乳酸菌的形态鉴定

菌株 DY2-7 菌落形态及革兰氏染色如图 14 所示,菌落圆形,直径约 1.5–3.0 mm,菌落凸起,整体呈乳白色,光滑有光泽,不透明;革兰氏染色为阳性,菌体形态为杆状,约 0.5–1.2 μm,成对排列。

### 2.6.2 乳酸菌的分子生物学鉴定

菌株 DY2-7 琼脂糖凝胶电泳结果如图 15 所示,其 DNA 条带清晰,约 1 500 bp,经测序后菌株 DY2-7 的目的片段为 1 506 bp。

菌株 DY2-7 的系统发育树如图 16 所示,菌株 DY2-7 与 *Lactiplantibacillus pentosus* DSM 20314 形成一小分支,置信度为 97,鉴定为戊糖乳植物杆菌,命名为 *L. pentosus* DY2-7。

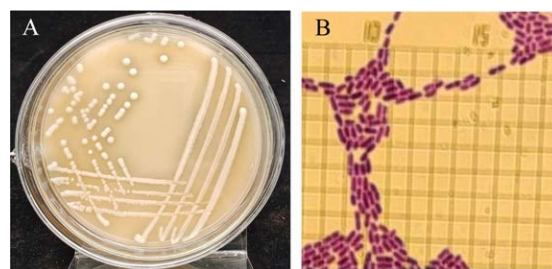


图 14 菌株 DY2-7 菌落形态(A)及革兰氏染色(B) (16×100)

Figure 14 Colony morphology (A) and Gram staining (B) of strain DY2-7 (16×100). A: Colony morphology of strain DY2-7. B: Gram staining of strain DY2-7.

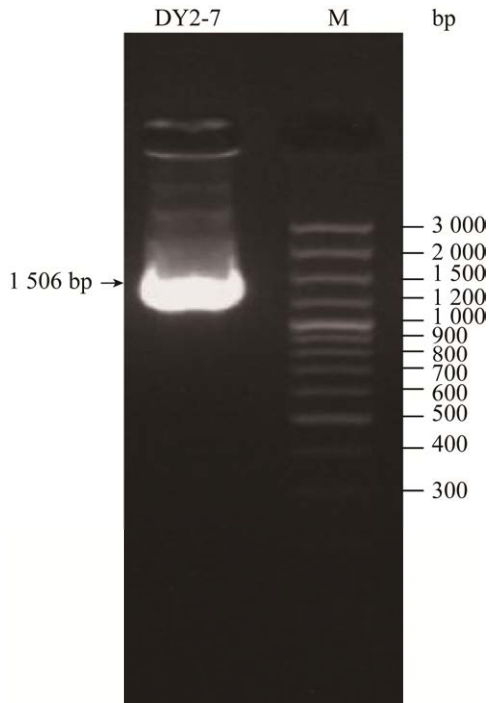


图 15 琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 15 Agarose gel electrophoresis results. M: DNA marker; DY2-7: Target strain.

## 2.7 目的菌株的发酵性能测定

### 2.7.1 生长曲线

如图 17 所示, 在 0–2 h 内, 菌株生长较缓慢处于延迟期; 在 2–18 h 菌株适应生长环境后生长迅速处于对数期; 在 18–24 h 菌液吸光值基本保持不变, 进入稳定期, 在 20 h 时, 菌株 DY2-7 有最大  $OD_{600}$  值  $1.790 \pm 0.007$ 。

### 2.7.2 温度对菌株生长的影响

如图 18 所示, 在 10 °C 时, 菌株  $OD_{600}$  值在 24 h 内基本无变化, 菌株基本不生长; 在 15 °C 时, 增长非常缓慢, 在 20–35 °C 之间时, 菌株生长速度随温度升高而加快, 当培养温度在 40 °C 时, 在 0–8 h 之间菌液的  $OD_{600}$  值大于 35 °C 时的吸光值, 但在 8 h 之后, 菌株菌液  $OD_{600}$  值小于 35 °C 时的吸光值, 说明温度的提高能加快菌株在 0–8 h 的生长速度, 但随着培养时间的延长, 过高的温度会对菌株的生长有抑制作用。根

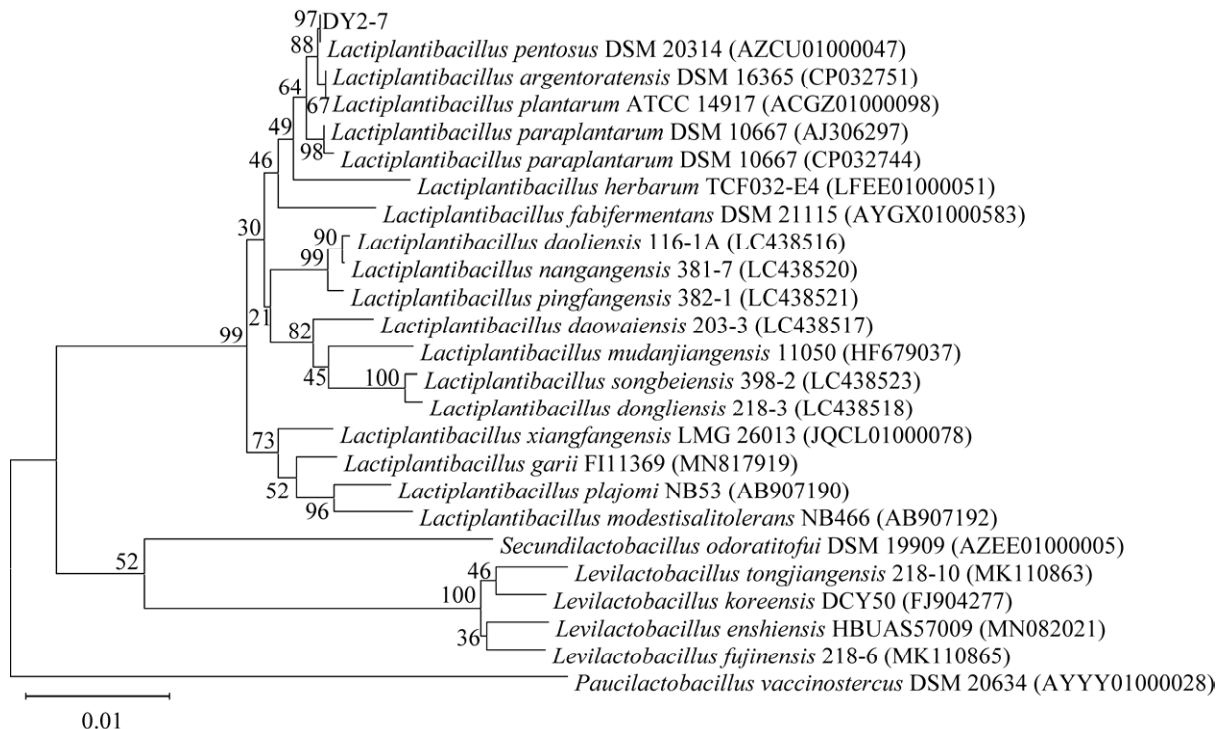


图 16 菌株 DY2-7 系统发育树

Figure 16 Phylogenetic tree of strain DY2-7. The accession numbers of the sequences in GenBank were shown in parentheses, the number at nodes of tree indicates bootstrap confidence. The length of branches represents the evolutionary distance.



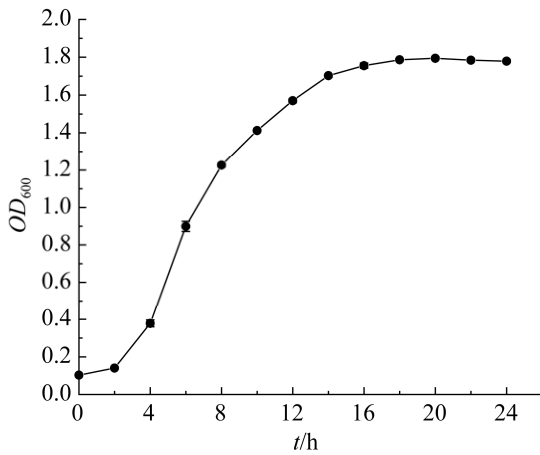


图 17 菌株 DY2-7 生长曲线  
Figure 17 Growth curve of strain DY2-7.

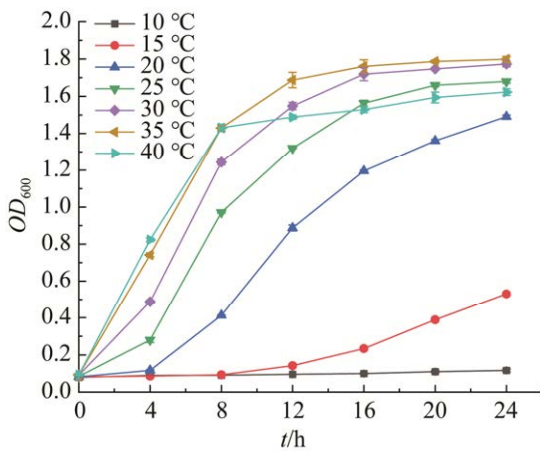


图 18 温度对菌株 DY2-7 生长的影响  
Figure 18 Effect of temperature on the growth of strain DY2-7.

据在不同温度下, 菌株  $OD_{600}$  值的变化可以得出, 当培养温度为  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  时最适合菌株 DY2-7 的生长, 在培养 24 h 后  $OD_{600}$  值最大, 为  $1.800\pm 0.015$ 。

### 2.7.3 初始 pH 对菌株生长的影响

如图 19 所示, 当 pH 值在 3.5–8.0 之间时, 菌株菌液的  $OD_{600}$  值随着 pH 值的增加而增大, pH 值越高, 菌液  $OD_{600}$  值也越大, 说明在此 pH 值范围内, pH 值越高越适合菌株 DY2-7 的生长; 根据不同 pH 值菌株菌液在 24 h 内的  $OD_{600}$  值变

化得出, pH 值为 6.0 时菌株整体生长情况最好, 在 20 h 时有最大  $OD_{600}$  值  $1.800\pm 0.010$ , 说明培养基初始 pH 值为 6.0 时最适合菌株 DY2-7 的生长。

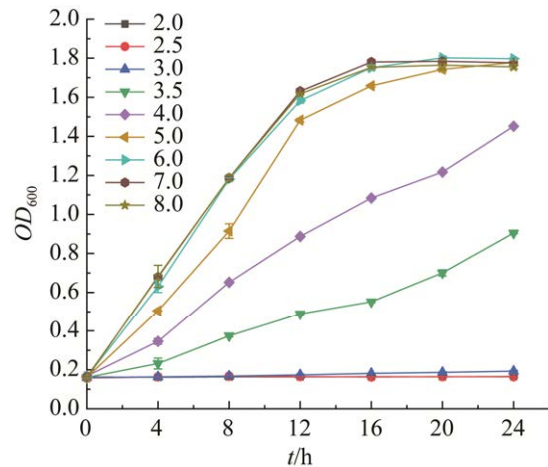


图 19 初始 pH 对菌株 DY2-7 生长的影响  
Figure 19 Effect of initial pH on the growth of strain DY2-7.

### 2.7.4 菌株耐盐性

菌株 DY2-7 的耐盐性如图 20 所示, 当 NaCl 浓度在 0.0%–6.0% 之间时, 随着培养时间的延长, 菌株  $OD_{600}$  值随着 NaCl 浓度的增加而增大。根据生长情况, 菌株 DY2-7 对浓度为 6.0% 以下的 NaCl 均有良好耐受性。

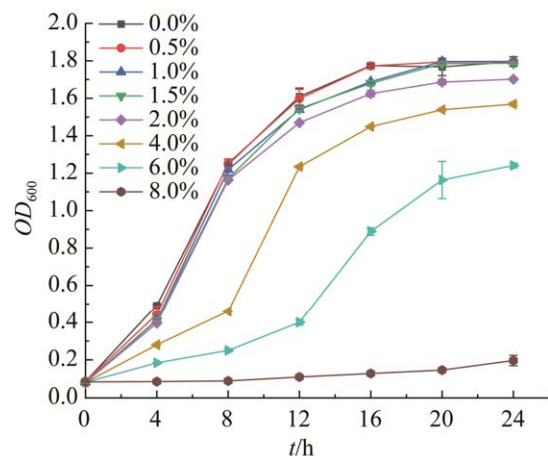


图 20 菌株 DY2-7 耐盐性  
Figure 20 Salt tolerance of strain DY2-7.

### 2.7.5 亚硝酸盐降解性能

不同亚硝酸盐浓度下, 菌株 24 h 对亚硝酸盐的降解率如图 21 所示, 随着亚硝酸盐浓度的增高, 其  $OD_{600}$  值均在 1.6 以上, 表明菌株有良好的耐受性。菌株 DY2-7 对亚硝酸盐的降解率随亚硝酸盐浓度增高而减弱, 但降解率均在 97.00% 以上; 亚硝酸盐浓度为 200 mg/kg 时, 菌株  $OD_{600}$  值为  $1.660 \pm 0.014$ , 降解率为 97.11%, 亚硝酸盐浓度为 50 mg/kg 时, 菌株  $OD_{600}$  值为  $1.720 \pm 0.005$ , 降解率为 99.41%。

### 2.7.6 菌株拮抗性

菌株 DY2-7 与戊糖片球菌、鼠李糖乳杆菌、乳酸球菌之间并无抑制作用, 可以更好地应用于酸菜发酵。

### 2.7.7 菌株耐蒜性

如图 22 所示, 菌液  $OD_{600}$  值随着大蒜汁浓度的升高而降低, 说明特定浓度范围内的大蒜汁对乳酸菌的生长有一定的抑制作用, 当大蒜汁浓度为 0.312% 时吸光值最高。

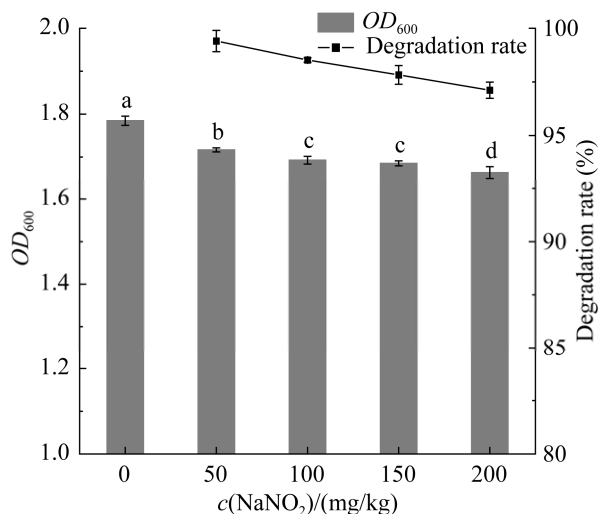


图 21 菌株 DY2-7 亚硝酸盐降解性能

Figure 21 Degradation of nitrite by strain DY2-7. The same letter indicates no significant difference, while different letters indicate significant difference,  $P < 0.05$ .

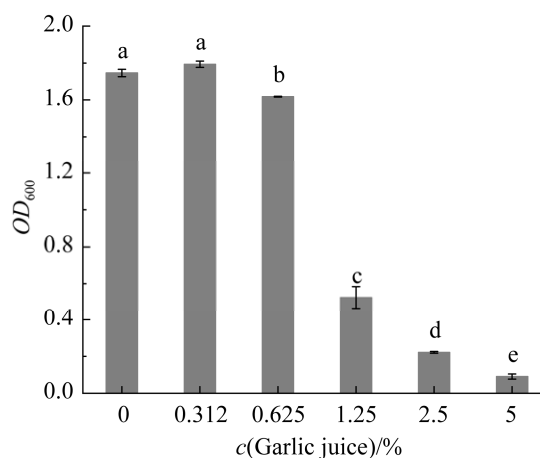


图 22 不同浓度蒜汁对乳酸菌的影响

Figure 22 Effect of different concentrations of garlic juice on lactic acid bacteria. The same letter indicates no significant difference, while different letters indicate significant difference,  $P < 0.01$ .

## 3 讨论与结论

添加不同浓度蒜汁能明显降低“亚硝峰”, 峰值随蒜汁浓度的增大而降低, 细菌总数与乳酸菌总数呈先上升后下降并趋于稳定的趋势。添加蒜汁的酸菜发酵液中, 物种丰富度大于自然发酵, 0.3% 蒜汁酸菜样品在菌属、菌种数上, 均优于其他样品。酸菜样品中含有 *Lactiplantibacillus*、*Lactococcus*、*Leuconostoc*、*Weissella*、*Pediococcus*、*Lactobacillus* 这 6 个乳酸菌属, 其中 *Lactiplantibacillus* 为优势菌属。添加不同浓度蒜汁发酵的酸菜成品进行模糊数学感观评价, 0.3% 蒜汁浓度的酸菜成品综合评定分数最高, 从中筛选出一株发酵性能优良乳酸菌, 鉴定为戊糖乳植物杆菌, 该菌属为乳植杆菌属, 是发酵液中丰富度最高的乳酸菌属类, 命名为 *L. pentosus* DY2-7。

在酸菜发酵过程中会产生亚硝酸盐, 人体摄入过量亚硝酸盐后, 会影响血红蛋白的携氧能力, 导致出现呼吸中枢麻痹等症状, 亚硝酸盐也能在胃中与仲胺、叔胺等结合形成 N-亚硝酸胺

类化合物, 此类化合物有强烈的致癌作用, 与多种癌症的发生存在关联<sup>[31]</sup>。

由本研究图 1 可知, 发酵初期, 对照(自然发酵)的亚硝峰显著高于添加蒜汁的各处理, 说明未添加蒜汁的处理在发酵中会有大量亚硝酸盐产生。然而大蒜汁富含的有机硫化物的巯基能与亚硝酸盐反应生成亚硝酸硫酯类化合物<sup>[17]</sup>, 能减少产品中亚硝酸盐含量, 对亚硝酸盐具有较强的清除效果<sup>[32-34]</sup>, 使添加大蒜汁的发酵菜中亚硝酸盐含量降低。此外, 亚硝酸盐也是一种防腐剂, 能抑制致病菌的生长<sup>[35]</sup>。张庆芳等<sup>[36]</sup>研究证明了添加亚硝酸盐能使东北酸菜中的菌群结构发生变化, 亚硝酸盐的添加会使发酵初期中的微生物多样性及丰度降低, 微生物总量减少, 因此本研究中添加大蒜汁的发酵菜物种丰富度高于自然发酵与大蒜汁添加后的亚硝酸盐降低有关。

用高通量测序和模糊数学对不同蒜汁浓度发酵菜进行分析, 发现 0.3%蒜汁酸菜样品在菌属、菌种数上, 均优于其他样品, 而且 0.3%蒜汁浓度的酸菜成品感官综合评定分数最高, 不同的细菌群落, 具有不同代谢功能, 最终影响发酵菜的色泽、香气、滋味、质地, 本研究将菌群结构与感官评价相结合, 在酸菜成品无腐败的情况下, 菌属数、丰富度及菌种比例是否与感官评价有一定的关系, 它们之间的作用还有待进一步研究。此外, 本研究筛选出的耐蒜的优势菌属 *L. pentosus* DY2-7, 既有优良的发酵特性又有一定的耐蒜能力, 可为乳酸菌发酵剂的开发提供菌种来源, 添加蒜汁发酵能够使酸菜呈现较好的感官品质与外观颜色, 并减少质量损失, 为蒜风味酸菜产业化奠定理论基础。

## 参考文献

- [1] JACOB B, NARENDHIRAKANNAN RT. Role of medicinal plants in the management of diabetes mellitus: a review[J]. 3 Biotech, 2018, 9(1): 4.
- [2] SZYCHOWSKI K, RYBCZYŃSKA-TKACZYK K, GAWEL-BĘBEN K, ŚWIECA M, KARAS M, JAKUBCZYK A, MATYSIAK M, BINDUGA U, GMIŃSKI J. Characterization of active compounds of different garlic (*Allium sativum* L.) cultivars[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2018, 68(1): 73-81.
- [3] EL-SABER BATIHA G, MAGDY BESHBIHY A, G WASEF L, ELEWA YHA, A AL-SAGAN A, ABD EL-HACK ME, TAHA AE, M ABD-ELHAKIM Y, PRASAD DEVKOTA H. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): a review[J]. Nutrients, 2020, 12(3): 872.
- [4] DAVIS SR. An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products: the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic[J]. Mycoses, 2005, 48(2): 95-100.
- [5] BHATWALKAR SB, MONDAL R, KRISHNA SBN, ADAM JK, GOVENDER P, ANUPAM R. Antibacterial properties of organosulfur compounds of garlic (*Allium sativum*)[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 613077.
- [6] TALIB WH. Consumption of garlic and lemon aqueous extracts combination reduces tumor burden by angiogenesis inhibition, apoptosis induction, and immune system modulation[J]. Nutrition, 2017, 43/44: 89-97.
- [7] SAMARANAYAKE MD, WICKRAMASINGHE SM, ANGUNAWELA P, JAYASEKERA S, IWAI S, FUKUSHIMA S. Inhibition of chemically induced liver carcinogenesis in Wistar rats by garlic (*Allium sativum*)[J]. Phytotherapy Research: PTR, 2000, 14(7): 564-567.
- [8] FARHAT Z, HERSHBERGER PA, FREUDENHEIM JL, MAMMEN MJ, HAGEMAN BLAIR R, AGA DS, MU LN. Types of garlic and their anticancer and antioxidant activity: a review of the epidemiologic and experimental evidence[J]. European Journal of Nutrition, 2021, 60(7): 3585-3609.
- [9] de GREEF D, BARTON EM, SANDBERG EN, CROLEY CR, PUMAROL J, WONG TL, DAS N, BISHAYEE A. Anticancer potential of garlic and its bioactive constituents: a systematic and comprehensive review[J]. Seminars in Cancer Biology, 2021, 73: 219-264.
- [10] MITRA S, DAS R, BIN EMRAN T, LABIB RK, Noor-E-Tabassum, ISLAM F, SHARMA R, AHMAD I, NAINU F, CHIDAMBARAM K, ALHUMAYDHI FA, CHANDRAN D, CAPASSO R, WILAIRATANA P.

[1] JACOB B, NARENDHIRAKANNAN RT. Role of medicinal plants in the management of diabetes

- Diallyl disulfide: a bioactive garlic compound with anticancer potential[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 943967.
- [11] ASCHEBROOK-KILFOY B, SHU XO, GAO YT, JI BT, YANG G, LI HL, ROTHMAN N, CHOW WH, ZHENG W, WARD MH. Thyroid cancer risk and dietary nitrate and nitrite intake in the Shanghai women's health study[J]. *International Journal of Cancer*, 2013, 132(4): 897-904.
- [12] BAHADORAN Z, MIRMIRAN P, GHASEMI A, KABIR A, AZIZI F, HADAEGH F. Is dietary nitrate/nitrite exposure a risk factor for development of thyroid abnormality? A systematic review and meta-analysis[J]. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 2015, 47: 65-76.
- [13] CHAZELAS E, PIERRE F, DRUESNE-PECOLLO N, ESSEDDIK Y, de EDELENYI FS, AGAESSE C, de SA A, LUTCHIA R, GIGANDET S, SROUR B, DEBRAS C, HUYBRECHTS I, JULIA C, KESSE-GUYOT E, ALLÈS B, GALAN P, HERCBERG S, DESCHASAUX-TANGUY M, TOUVIER M. Nitrites and nitrates from food additives and natural sources and cancer risk: results from the NutriNet-Santé cohort[J]. *International Journal of Epidemiology*, 2022, 51(4): 1106-1119.
- [14] van den BRAND AD, BEUKERS M, NIEKERK M, van DONKERSGOED G, van der AA M, van de VEN B, BULDER A, van der VOET H, SPRONG CR. Assessment of the combined nitrate and nitrite exposure from food and drinking water: application of uncertainty around the nitrate to nitrite conversion factor[J]. *Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2020, 37(4): 568-582.
- [15] KALAYCI OĞLU Z, ERIM FB. Nitrate and nitrites in foods: worldwide regional distribution in view of their risks and benefits[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(26): 7205-7222.
- [16] ZHOU Q, ZANG SZ, ZHAO ZN, LI XL. Dynamic changes of bacterial communities and nitrite character during northeastern Chinese sauerkraut fermentation[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2018, 27(1): 79-85.
- [17] 刘近周, 林希蕴, 吴孔叨, 彭恕生. 大蒜阻断亚硝胺合成机理的研究[J]. *营养学报*, 1986(4): 327-334. LIU JZ, LIN XY, WU KD, PENG SS. Study on the mechanism of garlic in blocking nitrosamine synthesis[J]. *Nutrition Journal*, 1986(4): 327-334 (in Chinese).
- [18] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中总酸的测定: GB 12456—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021. National Health Commission, State Administration for Market Regulation. National food safety standard - determination of total acidity in food: GB 12456—2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021 (in Chinese).
- [19] 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 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定: GB 5009.33—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission, China Food and Drug Administration. National food safety standard - determination of nitrite and nitrate in food: GB 5009.33—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [20] 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 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission. China Food and Drug Administration. National food safety standard food microbiology examination total colony count determination: GB 4789.2—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [21] BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [22] 李玉珍, 肖怀秋. 模糊数学评价法在食品感官评价中的应用[J]. *中国酿造*, 2016, 35(5): 16-19. LI YZ, XIAO HQ. Application of fuzzy mathematics evaluation method in food sensory evaluation[J]. *China Brewing*, 2016, 35(5): 16-19 (in Chinese).
- [23] 胡璇, 夏延斌. 基于模糊数学的剁椒感官综合评价方法[J]. *食品科学*, 2011, 32(1): 95-98. HU X, XIA YB. An improved sensory comprehensive evaluation method for chopped hot pepper based on fuzzy mathematics[J]. *Food Science*, 2011, 32(1): 95-98 (in Chinese).
- [24] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 感官分析 方法学 总论: GB/T 10220—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Sensory Analysis-Methodology-

- General Guidance: GB/T 10220—2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012 (in Chinese).
- [25] 高欣, 燕平梅, 白小军, 罗周, 刘瑾, 岳虹. 不同大蒜浓度对发酵白菜品质的影响[J]. 中国调味品, 2009, 34(8): 64-67.  
GAO X, YAN PM, BAI XJ, LUO Z, LIU J, YUE H. Study on the influence of concentration of garlic on the quality of fermenting cabbage in the fermentation[J]. China Condiment, 2009, 34(8): 64-67 (in Chinese).
- [26] 付雪. 酸菜生物发酵剂研究[D]. 大连: 大连工业大学硕士学位论文, 2018.  
FU X. Study on the starter of China northeast sauerkraut[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Polytechnic University, 2018 (in Chinese)
- [27] 王鑫宇. 天然发酵酸菜中乳酸菌的分离及发酵特性的评价[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2019.  
WANG XY. Isolation of lactic acid bacteria from naturally fermented sauerkraut and evaluation of fermentation characteristics[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2019 (in Chinese)
- [28] 辛娜, 邓露芳, 郭亮, 黄玉海, 班文杰, 宗文丽, 刘宪辉. 不同乳酸菌和饲料添加剂体外抑菌效果研究[J]. 中国饲料, 2021(19): 29-33.  
XIN N, DENG LF, GUO L, HUANG YH, BAN WJ, ZONG WL, LIU XH. Study on bacteriostatic effect of different *Lactobacillus* and feed additives *in vitro*[J]. China Feed, 2021(19): 29-33 (in Chinese).
- [29] 宋军霞, 祁红兵, 宁文醒. 大蒜汁的抑菌作用及稳定性研究[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(24): 189-192.  
SONG JX, QI HB, NING WX. Study on antibacterial effects of garlic juice and stability[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2021, 49(24): 189-192 (in Chinese).
- [30] 代惠芹, 刘树泽, 高琪, 于海霞, 姚连谋, 乔勇进. 大蒜素处理对双孢菇保鲜效果的影响[J]. 北方园艺, 2022(11): 82-88.  
DAI HQ, LIU SZ, GAO Q, YU HX, YAO LM, QIAO Y J. The effect of allicin treatment on the preservation of *Agaricus bisporus*[J]. Northern Horticulture, 2022(11): 82-88 (in Chinese).
- [31] OMER AK, MOHAMMED RR, AMEEN PSM, ABAS ZA, EKICI K. Presence of biogenic amines in food and their public health implications: a review[J]. Journal of Food Protection, 2021, 84(9): 1539-1548.
- [32] 石飞云, 徐颖, 李启蒙. 大蒜清除亚硝酸盐作用的研究[J]. 食品科技, 2008(2): 182-184.  
SHI FY, XU Y, LI QM. A study on the effect of garlic in removing nitrite[J]. Food technology, 2008(2): 182-184 (in Chinese).
- [33] 孙鹏, 徐璨璨, 孙先锋. 大蒜浸提液对亚硝酸盐清除作用的效果分析[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(3): 702-704.  
SUN P, XU CC, SUN XF. Effect analysis of garlic extract on nitrite removal[J]. Hubei Agricultural Science, 2009, 48(3): 702-704 (in Chinese).
- [34] 赵功玲, 陈惠娟, 陈方娟, 刘亚坤. 不同处理方法对破碎大蒜清除亚硝酸盐能力的影响[J]. 农产品加工(学刊), 2009(12): 63-65.  
ZHAO GL, CHEN HY, CHEN FJ, LIU YK. Effect of different processing methods on the ability of crushed garlic to remove nitrite[J]. Agricultural Product Processing (Journal), 2009(12): 63-65 (in Chinese).
- [35] Majou D, Christeans S. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats[J]. Meat Science, 2018, 145: 273-284.
- [36] 张庆芳, 魏振勇, 于爽, 王严, 周妹静, 迟乃玉, 刘春莹. 亚硝酸盐对东北酸菜细菌菌群丰度及理化指标的影响[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(3): 67-77.  
ZHANG QF, WEI ZY, YU S, WANG Y, ZHOU SJ, CHI NY, LIU CY. Effects of nitrite on bacterial flora abundance and physical and chemical indexes of sauerkraut in Northeast China[J]. China Food Additives, 2024, 35(3): 67-77 (in Chinese).