

均匀试验优化黑蒜提取液的抗氧化活性

刘瑞山, 梁治军, 周文权, 齐强强

(河南省淼雨饮品股份有限公司, 河南 焦作 454191)

摘要:以 DPPH 自由基清除率为指标,利用均匀试验考察了提取温度、时间、pH 和底物质量比对黑蒜提取液抗氧化活性的影响.结果表明,pH 对黑蒜提取液抗氧化活性具有显著影响($p < 0.05$).黑蒜提取液制取的最佳工艺条件为:提取温度 40 °C,提取时间 30 min,pH = 3.0,黑蒜与去离子水的质量比(g : mL)为 1 : 25,此时对 DPPH 自由基的清除率为 92.65%,与理论值的相对误差 3.59%.

关键词:黑蒜;抗氧化活性;均匀试验

中图分类号:TS202.3 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2014.02.005

Antioxidant activity optimization of black garlic extract based on uniform design

LIU Rui-shan, LIANG Zhi-jun, ZHOU Wen-quan, QI Qiang-qiang
(He'nan Miaoyu Beverage Co., Ltd., Jiaozuo 454191, China)

Abstract: With DPPH radical-scavenging rate as the indicator, the effects of temperature, time, pH value and substrates mass ratio on the antioxidant activity of black garlic extract were studied by using the uniform design. The result showed that the pH value had a significant influence ($p < 0.05$) on the antioxidant activity of black garlic extract, and the optimal extracting conditions were temperature 40 °C, retention time 30 min, pH = 3.0 and mass ratio of black garlic to deionized water 1 : 25 (g : mL). Under these conditions, the DPPH radical-scavenging rate was 92.65%, which had a relative error of 3.59% to the theoretical value.

Key words: black garlic; antioxidant activity; uniform design

0 引言

大蒜,又名独蒜、胡蒜,是百合科葱属草本植物的地下鳞茎.大蒜作为传统烹饪和药用材料已有几千年的使用历史,具有良好的抗菌、抗病毒、降血糖、解毒、降血脂、抗癌、抗肿瘤等生物活性功能^[1-5],能够增加机体中血浆抗凝血活性,防止动脉粥样硬化^[6].

大蒜的功能特性取决于其独特的活性化合物,

尤其是有机硫化物^[7-8].当大蒜组织被破碎后,由于细胞结构遭到破坏,细胞液中的蒜氨酸酶(S-烷基-L-半胱氨酸亚砷酶)与细胞质中的蒜氨酸(S-烯丙基半胱氨酸亚砷)相遇,在蒜氨酸酶的催化作用下,蒜氨酸转化为大蒜素(二烯丙基硫代亚磺酸酯),大蒜素不稳定,又进一步转化为大蒜辣素(二烯丙基二硫化物)、大蒜新素(二烯丙基三硫化物)和阿霍烯等多种有机硫化物^[9-11].

大蒜经过一定条件的发酵处理后,整个蒜瓣都

收稿日期:2014-01-09

作者简介:刘瑞山(1975—),男,河南省漯河市人,河南省淼雨饮品股份有限公司工程师,主要研究方向为食品工程及应用.

呈现出黑色,因此被称为黑蒜或发酵黑蒜.经过发酵后的黑蒜酸甜适口,口感柔软类似果脯,食后没有吃生大蒜所特有的辣味和臭味,而且生理功能大大提高.据报道,黑蒜具有极强的抗氧化能力,黑蒜乙醇提取液的超氧化物歧化酶(SOD)活力、过氧化氢清除能力和多酚含量分别是新鲜大蒜提取液的13倍、10倍和7倍,具有较强的抗氧化能力^[12].本文拟以水为提取溶剂,利用均匀试验设计研究提取温度、时间、pH以及质量比对黑蒜提取液抗氧化活性的影响,以期为黑蒜的进一步研究及开发提供一定的理论依据.

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

大蒜,市售;DPPH 自由基(1,1-二苯基-2-苦肼基自由基),分析纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司产.

HS-800型恒温恒湿箱,南京泰斯特试验设备有限公司产;HH-S6型数显恒温水浴锅,河南金博仪器制造有限公司产;UV-2102PC紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司产;PHS-3C精密pH计,上海精密科学仪器有限公司产;AL104电子分析天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 黑蒜的制备

原料挑选→浸泡清洗→通风晾干→装盘→65℃,相对湿度70%发酵60d→杀菌消毒→包装→成品

1.2.2 单因素试验 将黑蒜提取液样品依次分为温度组、时间组、pH组和质量比组,其不同制备条件如下.

1)温度组:分别准确称取5g黑蒜于250mL三角瓶中,按质量比1:20(g:mL)加入去离子水,用6mol/L的NaOH调整溶液pH为6.0,密封后分别置于20℃,30℃,40℃,50℃,60℃,70℃,80℃和90℃恒温水浴锅中提取60min.提取结束后将样品迅速置于冰水中冷却,然后进行抽滤,滤液置于冰箱中冷藏备用.

2)时间组:分别准确称取5g黑蒜于250mL三角瓶中,按质量比1:20(g:mL)加入去离子水,用6mol/L的NaOH调整溶液pH为6.0,密封后置于60℃恒温水浴锅中提取10min,30min,60min,

90min,120min,150min,180min和210min.提取结束后将样品迅速置于冰水中冷却,然后进行抽滤,滤液置于冰箱中冷藏备用.

3)pH组:分别准确称取5g黑蒜于250mL三角瓶中,按质量比1:20(g:mL)加入去离子水,分别用4mol/L的HCl溶液和6mol/L的NaOH调整溶液pH为3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0,11.0和12.0,密封后置于60℃恒温水浴锅中提取60min.提取结束后将样品迅速置于冰水中冷却,然后进行抽滤,滤液置于冰箱中冷藏备用.

4)质量比组:分别准确称取5g的黑蒜于250mL三角瓶中,按质量比1:10,1:15,1:20,1:25和1:30(g:mL)加入去离子水,用6mol/L的NaOH调整溶液pH为6.0,密封后置于60℃恒温水浴锅中提取60min.提取结束后将样品迅速置于冰水中冷却,然后进行抽滤,滤液置于冰箱中冷藏备用.

1.2.3 DPPH 自由基清除能力的测定 以DPPH自由基清除率作为黑蒜提取液抗氧化活性的评价指标,其测定参考S. H. Kim等^[13]的方法.取1mL样品溶液和4mL0.2mmol/L的DPPH酒精溶液,剧烈摇晃使其充分混合均匀,置于室温避光条件下反应30min.然后在517nm条件下测定吸光度值,记为 A_s .相同操作条件下,以1mL去离子水代替样品溶液,作为控制组,测定其在517nm条件下的吸光度值,记为 A_c .黑蒜提取液对DPPH自由基清除率用以下公式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

DPPH 自由基是一种含发色团的化合物,可以直接与抗氧化活性物质所提供的氢原子提取形成稳定的DPPH-H分子,从而达到清除自由基的目的^[14].单因素试验中黑蒜提取液的抗氧化活性变化如图1—图4所示.

由图1—图4可见,温度组,黑蒜提取液对DPPH 自由基的清除率随提取温度的升高而增大;时间组,在前60min内,黑蒜提取液的抗氧化活性随时间延长而显著增强,对DPPH 自由基的清除率由15.53%增加到56.37%,此后则随提取时间的延长而缓慢增大;pH组,黑蒜提取液在酸性环境中具

有较高的抗氧化活性,而当 $pH > 7.0$ 时,随着 pH 的增大,黑蒜提取液的抗氧化能力急剧下降,并在 $pH \geq 10.0$ 时失去抗氧化能力;质量比组,当黑蒜与去离子水的质量比为 $1 : 10$ ($g : mL$) 时,提取液的抗氧化活性最强.

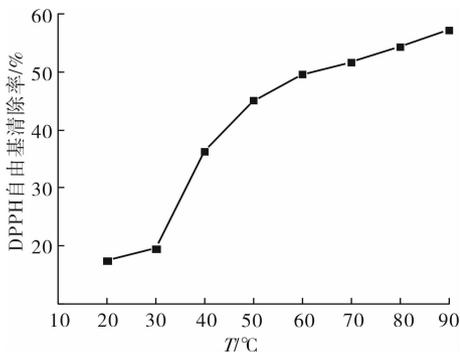


图1 温度对黑蒜提取液抗氧化活性的影响

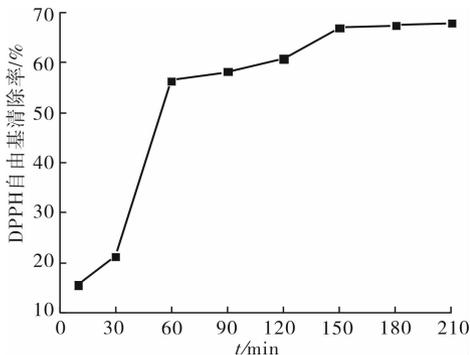


图2 时间对黑蒜提取液抗氧化活性的影响

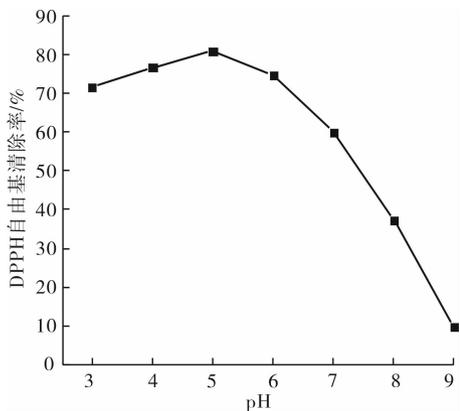


图3 pH对黑蒜提取液抗氧化活性的影响

2.2 均匀试验

2.2.1 均匀试验因素水平设计 综合以上单因素实验结果,以 DPPH 自由基清除率为检测指标,以温度 X_1 ,时间 X_2 ,pH 值 X_3 和黑蒜与去离子水质量比 X_4 为因素的 $U_6^*(6^4)^{[15]}$ 均匀试验因素水平见表 1.

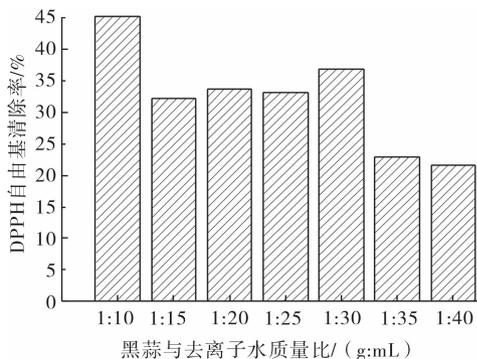


图4 质量比对黑蒜提取液抗氧化活性的影响

表1 $U_6^*(6^4)$ 均匀试验因素水平表

水平	$X_1/^\circ\text{C}$	X_2/min	X_3	$X_4/(g : mL)$
1	40(1)	60(2)	5(3)	1 : 35(6)
2	50(2)	120(4)	8(6)	1 : 30(5)
3	60(3)	180(6)	4(2)	1 : 25(4)
4	70(4)	30(1)	7(5)	1 : 20(3)
5	80(5)	90(3)	3(1)	1 : 15(2)
6	90(6)	150(5)	6(4)	1 : 10(1)

2.2.2 均匀试验结果 根据均匀试验表,分别在相应条件下得到黑蒜提取液样品,并测定其对 DPPH 自由基的清除率 (Y),试验结果见表 2.

2.2.3 软件分析 采用 Mathematics 4.0 软件对均匀试验结果进行分析,得到的结果见表 3 和表 4.

表2 均匀试验结果

试验号	$X_1/^\circ\text{C}$	X_2/min	X_3	$X_4/(g : mL)$	$Y/\%$
1	40	60	5	1 : 35	47.61
2	50	120	8	1 : 30	15.58
3	60	180	4	1 : 25	78.32
4	70	30	7	1 : 20	32.99
5	80	90	3	1 : 15	83.93
6	90	150	6	1 : 10	11.57

表3 均匀试验分析结果参数表

方程项目	估计值	标准误差	T 值	P 值
1	42.43	12.110 9	3.834	0.162 4
$X_1 \times X_2$	-0.000 5	0.000 4	-1.392	0.396 6
X_3	-15.583	0.731 9	-21.289	0.029 9
X_4	8.342 2	0.926 8	9.001	0.070 4
X_4^2	0.172 3	0.019 8	-8.717	0.072 7

首先按一元线性方程回归分析,发现 4 个因素对自由基清除率的影响都不显著,一次考虑删去最不显著的单因素(X_1, X_2),然后继续进行回归分析,结果表明,pH 对黑蒜提取液抗氧化活性具有显著影响($p < 0.05$),影响抗氧化活性的主次顺序依次为:

pH 值 > 质量比 > 温度 > 时间.

表4 均匀试验分析结果方差分析表

项目	自由度	偏差平方和	均方差	F 值	P 值
模型	4	4 751.17	1 187.79	135.721	0.064 279 4
误差	1	8.751 72	8.751 72		
总体	5	4 759.92			

回归方程: $Y = 42.43 - 0.000 5X_1 \times X_2 - 15.583X_3 + 8.342 2X_4 - 0.172 3X_4^2$. 在测试条件范围内, 经过计算后最佳优化条件为: 提取温度 40 ℃, 提取时间 30 min, pH = 3.0, 黑蒜与去离子水质量比(g : mL) 为 1 : 25. 此时黑蒜提取液抗氧化活性最强, 对 DPPH 自由基的理论清除率为 96.10%. 经试验验证在此优化条件下得到的黑蒜提取液对 DPPH 自由基的清除率为 92.65%, 与理论值的相对误差 3.59%, 远超过各试验值. 说明均匀试验优化后的最优条件制备黑蒜提取液具有最强的抗氧化活性, 优化结果可靠.

3 结论

不同因素对黑蒜提取液的抗氧化活性影响不同. 单因素试验表明, 黑蒜提取液的抗氧化活性随提取温度的升高和时间的延长而逐渐增强; 酸性环境有利于黑蒜提取液的抗氧化活性, 而碱性环境则抑制其抗氧化活性, 当 pH ≥ 10 时, 则完全抑制黑蒜提取液的抗氧化活性; 当黑蒜与去离子水质量比(g : mL) 为 1 : 10 时, 黑蒜提取液的抗氧化活性最强. 均匀试验表明, pH 对黑蒜提取液抗氧化活性具有显著影响($p < 0.05$), 影响黑蒜提取液抗氧化活性的因素顺序是 pH > 质量比 > 温度 > 时间; 黑蒜提取液抗氧化活性的最佳工艺条件为: 提取温度 40 ℃, 提取时间 30 min, pH = 3.0, 黑蒜与去离子水的质量比(g : mL) 为 1 : 25, 且在此条件下验证黑蒜提取液的抗氧化活性的最强.

参考文献:

[1] Khoo Y, Aziz Z. Garlic supplementation and serum cholesterol: a metaanalysis [J]. J Clin Pharm Ther, 2009, 34:133.

- [2] Pal R, Vaiphei K, Sikander A, et al. Effect of garlic on isoniazid and rifampicin-induced hepatic injury in rats [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12:636.
- [3] Shinkawa H, Takemura S, Minamiyama Y, et al. S-allyl-cysteine is effective as a chemopreventive agent against porcine serum-induced hepatic fibrosis in rats [J]. Osaka City Med, 2009, 55: 61.
- [4] 何荣海, 马海乐. 大蒜辣素超声辅助提取的试验研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(2):147.
- [5] 陆广念, 朱志雄, 宋晓敏. 常见蔬菜抗氧化活性与总酚含量的研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(9): 68.
- [6] Ackermann R T, Mulrow C D, Ramirez G, et al. Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors [J]. Arch Int Med, 2001, 161:813.
- [7] Chowdhury R, Dutta A, Chaudhuri S R, et al. In vitro and in vivo reduction of sodium arsenite induced toxicity by aqueous garlic extract [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46:740.
- [8] 周广勇, 缪冶炼, 陈介余, 等. 黑大蒜贮藏中主要成分和自由基清除能力的变化 [J]. 中国食品学报, 2010, 10(6):64.
- [9] Das I, Saha T. Effect of garlic on lipid peroxidation and antioxidation enzymes in DMBA-induced skin carcinoma [J]. Nutrition, 2009, 25:459.
- [10] 陆茂松, 闵吉梅, 王夔. 大蒜有机硫化物的研究(II) [J]. 中草药, 2002, 33(12):1059.
- [11] Rivlin R S. Historical perspectives on the use of garlic [J]. J Nutr, 2001, 131:954.
- [12] Sato E, Kohno M, Hamano H, et al. Increased antioxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2006, 61:157.
- [13] Kim S H, Jung E Y, Kang D H, et al. Physical stability, antioxidative properties, and photoprotective effects of a functionalized formulation containing black garlic extract [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2012, 117:104.
- [14] 章银良, 周文权. 均匀试验优化酪蛋白-木糖美拉德提取产物的抗氧化活性 [J]. 食品工业, 2013, 13(1):27.
- [15] 潘丽军, 章银良. 试验设计与数据处理 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2008.