

贾庆超, 李妍. 黑蒜类黑精的超声提取工艺优化及其稳定性和抗氧化性研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(19): 235-243. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110227

JIA Qingchao, LI Yan. Study on Optimization of Ultrasonic Extraction Technology, Stability and Antioxidation of Melanoidin from Black Garlic[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(19): 235-243. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110227

· 工艺技术 ·

黑蒜类黑精的超声提取工艺优化及其稳定性和抗氧化性研究

贾庆超, 李 妍

(郑州科技学院食品科学与工程学院, 河南郑州 450000)

摘 要:以黑蒜为原料, 采用超声法提取黑蒜中的类黑精, 并对提取工艺条件进行优化。选取乙醇体积分数、料液比、超声时间和超声温度四个影响因素进行单因素实验, 在此基础上, 采用正交试验优化最佳提取工艺, 同时对黑蒜类黑精的稳定性和抗氧化活性进行研究。结果表明, 超声法提取黑蒜类黑精的最佳工艺参数为: 乙醇体积分数为 10%、料液比为 1:7、超声时间为 40 min、超声温度为 70 ℃, 此条件下得率为 3.465%。稳定性研究结果表明, 温度高于 50 ℃ 时, 类黑精稳定性不好, 而 -15 ℃ 冷冻和 4 ℃ 冷藏条件下, 类黑精呈现较好的稳定性。氧化剂 H_2O_2 和还原剂 Na_2SO_3 、甜味剂、暗光对黑蒜类黑精稳定性无显著影响, 直射光、酸味剂、强酸 pH2~4 和弱碱 pH8~10, 则会使其稳定性降低, 而金属离子 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 会与其发生络合反应。质量分数小于 2% 时的山梨酸钾和苯甲酸钠会降低类黑精的稳定性, 而 0.05% 的苯甲酸钠和 0.1% 的山梨酸钾对类黑精稳定性影响很小, 可作为类黑精食品的防腐剂。黑蒜类黑精的 DPPH·清除率和 ·OH 清除率与浓度呈正相关, 原提取液稀释 10 倍时 (0.842 mg/mL), 分别高达 92% 和 76%, 说明黑蒜类黑精有较强的抗氧化性。超声提取有利于类黑精的溶出, 节约提取时间, 提取率高, 提取的类黑精抗氧化性强, 具有较大的应用前景。

关键词:黑蒜, 类黑精, 超声, 提取工艺, 稳定性, 抗氧化性

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)19-0235-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110227



本文网刊:

Study on Optimization of Ultrasonic Extraction Technology, Stability and Antioxidation of Melanoidin from Black Garlic

JIA Qingchao, LI Yan

(School of Food Science and Engineering, Zhengzhou University of Science and Technology, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Using black garlic as raw material, the melanoidin in black garlic was extracted by ultrasonic method, and the extraction conditions were optimized. On the basis of the single factor experiments, the volume fraction of ethanol, the ratio of material to liquid, the ultrasonic time and the ultrasonic temperature were selected to optimize the optimum extraction process by orthogonal experiments. At the same time, the stability and antioxidant activity of black garlic melanoidin were studied. The results showed that the optimum technological parameters for the extraction of melanoidin from black garlic by ultrasonic method were as follows: The volume fraction of ethanol was 10%, the ratio of material to liquid was 1:7, the ultrasonic time was 40 min, and the ultrasonic temperature was 70 ℃. Under these conditions, the yield was 3.465%. The results of stability study showed that when the temperature was higher than 50 ℃, the stability of melanoidin was not good, while under the conditions of -15 ℃ freezing and 4 ℃ freezing, the melanoidin showed good stability. Oxidizing agent H_2O_2 and reducing agent Na_2SO_3 , sweetener and dark light had no significant effects on the stability of black garlic melanoidin, the direct light, sour agent, strong acid pH2~4 and weak base pH8~10 reduced its stability, while metal ions

收稿日期: 2022-11-24

基金项目: 河南省教育厅高等学校重点研究项目 (22B550021); 郑州科技学院 2022 年校级科研项目 (XJKY08); 郑州科技学院 2023 年大学生创新创业项目 (DC202356)。

作者简介: 贾庆超 (1981-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 黑蒜食品研究与开发, E-mail: someone0803@163.com。

Zn^{2+} and Fe^{2+} had complex reaction with them. When the mass fraction was less than 2%, potassium sorbate and sodium benzoate would reduce the stability of melanoidin, while 0.05% sodium benzoate and 0.1% potassium sorbate had little effect on the stability of melanoidin, and could be used as preservatives for melanin food. The DPPH· and ·OH clearance rate of black garlic melanoidin were positively correlated with the concentration, when the original extract was diluted 10 times (0.842 mg/mL), it was up to 92% and 76%, respectively, indicating that black garlic melanoidin had strong antioxidant activity. Ultrasonic extraction of melanoidin would be beneficial to the dissolution of melanoidin, which could save extraction time and improve extraction rate. The melanoidin under ultrasonic extraction have strong antioxidant activity and great application prospects.

Key words: black garlic; melanoidin; ultrasound; extraction process; stability; antioxidant activity

黑蒜是新鲜大蒜在一定温度和湿度条件下经过一定时间热处理发生褐变反应而形成的加工食品^[1],是公认的天然保健食品^[2-5],口感柔软香甜,深受人们喜爱。类黑精是由食品加工、保存过程中发生美拉德反应形成的一种结构复杂、聚合度不等的高分子聚合物混合物^[6]。Heloua 等^[7]研究类黑精在肠道中的作用,发现其可以抑制肠道中的肠杆菌,同时具有抗炎作用。Rurián 等^[8]研究表明,类黑精具有较强的抑菌能力,当其浓度较高时,对一些细菌如对革兰氏阳性菌可以直接将细菌致死,而对于其他有害细菌如幽门螺旋杆菌等同样具有抑制作用。Langner 等^[9]证实类黑精对人体肠道癌细胞具有抑制作用,癌细胞的细胞分裂受到类黑精的影响,进而引起细胞凋亡。同时亦有研究表明类黑精可以调节胃肠道功能、预防肥胖,清肠排毒、促进铁吸收、降血压、降血糖等生理活性^[10]。由于黑蒜中的类黑精主要来自于其加工过程中的美拉德反应^[8],虽然目前国内外关于黑蒜类黑精的提取及功能活性做了大量的研究,但黑蒜加工工艺的不同及美拉德反应的复杂性导致类黑精的结构及活性差异较大^[11],为了更好地研究及开发利用黑蒜类黑精的生物活性,黑蒜中类黑精的提取成为热点。

目前,国内外对食品中类黑精的提取分离技术主要有有机溶剂提取法、沉淀法、酶提取法、大孔吸附树脂法等^[11-13],而这些传统的提取方法存在提取时间长、提取不充分、产品得率不理想等问题^[14-16]。近年来,超声波辅助提取法在提取类黑精方面展现出巨大的潜力,不但可以大幅提升类黑精的提取率,还可以较大程度缩短提取时间^[17-19],深受业界人士的青睐。郝日礼等^[17]采用超声辅助法提取酒糟中类黑精,并与未经超声提取的进行对比,发现超声提取率提高了 40% 左右。

目前,有关黑蒜中类黑精的研究却并不多见,且提取法以溶剂浸提法为主^[15],故本研究首次选用超声辅助法提取黑蒜中的类黑精,考察提取溶剂乙醇体积分数、料液比、超声时间、超声温度 4 个因素对类黑精提取量的影响,并对黑蒜类黑精的稳定性和抗氧化活性进行研究,为黑蒜类黑精的开发利用提供理论依据,拓宽黑蒜的加工领域。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑蒜 网购自山东省济宁市金乡县;苯甲酸钠、

山梨酸钾(食品级) 六月食品配料商行;柠檬酸(食品级) 潍坊英轩实业有限公司;无水氯化钙、氯化镁、氯化钾、硫酸亚铁、过氧化氢 天津市致远化学试剂有限公司;亚硫酸钠、抗坏血酸、氢氧化钠 天津市恒兴化学试剂有限公司;氯化锌 汕头市西陇化工有限公司;邻二氮菲 天津市大茂化学试剂厂;磷酸二氢钠 郑州市派尼化学试剂厂;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 福州飞净生物科技有限公司;无水乙醇 天津市永大化学试剂有限公司;葡萄糖 天津市科密欧化学试剂有限公司;盐酸 洛阳昊华化学试剂有限公司;蔗糖 广州市全华大化学试剂有限公司;以上试剂均为分析纯。

BSA124S 电子天平 赛多利斯科学仪器有限公司;PXSJ-216 离子分析仪 上海仪点科学仪器股份有限公司;DHG-90301ALr 恒温干燥箱 上海科恒实业发展有限公司;Anke TDL-50B 离心机 上海安亭科学仪器厂制造;HH-4 电热恒温水浴箱 北京市永光明医疗仪器有限公司;KQ5200DE 数控超声波清洗仪器 昆山市超声设备有限公司;UV-2800H 紫外分光光度计 尤尼柯仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 单因素实验 采用超声法提取黑蒜类黑精,提取流程:准确称取 5.00 g 黑蒜样品,按一定料液比加入乙醇水溶液,研磨成浆状于一定温度的条件下超声一定时间后,取出冷却过滤,以 4000 r/min 离心 10 min,取上清液,稀释一定倍数后在 420 nm 处测定吸光度 A ^[15]。

分别考察提取溶剂乙醇体积分数、料液比、超声时间、超声温度四个因素对类黑精提取量的影响^[17]。单因素实验基础添加量分别为乙醇体积分数 10%,料液比(黑蒜质量 g:提取剂的体积 mL)1:5,超声温度 55 °C,超声时间 30 min。

参考王月丽^[15]的研究方法,提取剂乙醇体积分数 5 个水平为 0%、10%、20%、40%、70%,料液比 5 个水平为 1:1、1:3、1:5、1:7、1:10,超声温度 5 个水平为 25、40、55、70、100 °C;参考时川等^[19]的方法,超声时间 5 个水平为 0、10、20、30、40、50 min。

提取剂乙醇体积分数、超声时间和超声温度、料液比四个因素的类黑精提取量以 AV 表示^[11], A 表示吸光度, V 表示料液比。

1.2.2 正交试验设计 在单因素实验的基础上,以 AV 的值作为指标,对提取剂乙醇体积分数、料液比、超声时间和超声温度四个因素进行四因素三水平正交试验,表 1 为正交试验因素水平表。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Orthogonal test factor level table

水平	因素			
	A乙醇体积分数 (%)	B料液比 (g:mL)	C超声时间 (min)	D超声温度 (℃)
1	0	1:3	20	40
2	10	1:5	30	55
3	20	1:7	40	70

1.2.3 黑蒜类黑精稳定性的研究 根据正交试验得到的最优加工条件制备黑蒜类黑精提取液,再分别探究光照、温度、金属离子、pH、食品添加剂、氧化剂还原剂、防腐剂对黑蒜类黑精稳定性的影响。

1.2.3.1 光照 参考徐文秀等^[20]的方法并略作改动,准确量取 3 份黑蒜类黑精提取液 0.2 mL 于 10 mL 比色管中,用蒸馏水定容至 10 mL,春季 5 月,天气晴,室温 25 ℃ 左右,上午 10:00 至实验结束,分别置于室内自然光、室外直射光、避光条件下存放,每隔 1 h 取样,在 420 nm 处测吸光度,探究不同的光照条件对黑蒜类黑精稳定性的影响。

1.2.3.2 温度 参考徐文秀等^[20]的方法并略作改动,准确量取 8 份类黑精提取液 0.2 mL 于 10 mL 比色管中,用蒸馏水定容至 10 mL,分别置于温度为 40、50、60、70、80 ℃ 的水浴锅中保温,另外两份分别置于冷冻温度-15 ℃ 和冷藏温度 4 ℃ 的温度下存放,每隔 1 h 取样,在 420 nm 处测吸光度,探究不同温度对黑蒜类黑精稳定性的影响。

1.2.3.3 金属离子 参考相玉秀等^[21]的方法并略作改动,准确量取 5 份类黑精粗提取液 0.2 mL 分别于 10 mL 比色管中,其中一份蒸馏水定容至 10 mL,作空白对照。其余 4 份分别用 0.01、0.05、0.10、0.5 mol/L 的氯化钙溶液定容至 10 mL,静置 5 min,在 420 nm 处测吸光度,观察现象。按以上方法分别探究氯化镁、氯化锌、氯化钾、硫酸亚铁对黑蒜类黑精稳定性的影响。

1.2.3.4 pH 参考相玉秀等^[21]的方法并略作改动,准确量取 5 份类黑精粗提取液 0.2 mL 于 10 mL 比色管中,分别用以 HCl 和 NaOH 配置的 pH 为 2、4、6、8、10 的溶液定容至 10 mL,静置 5 min,在 420 nm 处测吸光度,观察现象,探究不同 pH 对黑蒜类黑精稳定性的影响。

1.2.3.5 食品添加剂 参考时川等^[19]的方法,准确量取 6 份类黑精粗提取液 0.2 mL 于 10 mL 比色管中,分别用质量分数为 0%、2%、4%、6%、8%、10% 的葡萄糖溶液定容至 10 mL,并在 420 nm 波长处测吸光度值。按以上方法,将上述葡萄糖溶液换为蔗糖溶

液、柠檬酸溶液、抗坏血酸溶液,探究食品添加剂对黑蒜类黑精稳定性的影响。

1.2.3.6 氧化还原剂 参考时川等^[19]方法并略作改动,准确量取 6 份类黑精粗提取液 0.2 mL 于 10 mL 比色管中,分别用质量分数为 0%、2%、4%、6%、8%、10% 的 H₂O₂ 溶液定容至 10 mL,并在 420 nm 处测吸光度值。按以上方法,将上述 H₂O₂ 溶液换为 Na₂SO₃ 溶液,探究氧化剂还原剂对黑蒜类黑精稳定性的影响。

1.2.3.7 防腐剂 参考时川等^[19]的方法并略作改动,准确量取 6 份类黑精粗提取液 0.2 mL 于 10 mL 比色管中,分别用质量分数为 0%、2%、4%、6%、8%、10% 的苯甲酸钠溶液定容至 10 mL,并在 420 nm 处测吸光度。按以上方法,将上述苯甲酸钠溶液换为山梨酸钾溶液,探究防腐剂对黑蒜类黑精稳定性的影响。

1.2.4 黑蒜类黑精的抗氧化活性

1.2.4.1 待测溶液配制 由正交试验得到的最优加工条件制备黑蒜类黑精提取液,根据最终提取液的体积及醇沉后得到的类黑精的质量,得到类黑精原液的浓度为 8.42 mg/mL,参考王明慧等^[14]等研究方法,分别稀释 10、20、30、40、50 倍,测定不同稀释倍数下类黑精的抗氧化活性指标。

抗氧化性测定以 V_C 为阳性对照,准确称取 0.8420 g 抗坏血酸,定容至 100 mL 容量瓶中,得到浓度为 8.42 mg/mL 的 V_C 溶液,分别稀释 10、20、30、40、50 倍,得到与类黑精浓度一致的 V_C 溶液。

1.2.4.2 黑蒜类黑精的 DPPH·清除能力 参考王明慧等^[14]的方法,取不同稀释倍数溶液 1.0 mL 于试管中,分别加入 0.3 mL 0.4 mmol/L DPPH·无水乙醇溶液,再加入 2.0 mL 蒸馏水,混匀后常温避光反应 30 min,于紫外分光光度计 517 nm 处测定其吸光值为 A₁;以蒸馏水代替上述不同稀释倍数溶液测定吸光值为 A₀;无水乙醇代替 DPPH·溶液测定的吸光值为 A₂;以蒸馏水代替样品溶液、无水乙醇代替 DPPH·溶液,作空白实验调零,清除率由以下公式得出:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

1.2.4.3 黑蒜类黑精的·OH 清除能力 参考赵晓娟等^[22]的方法,分别向 10 mL 比色管中加入 0.05 mol/L pH7.4 的磷酸缓冲溶液,6 mmol/L 的邻二氮菲溶液 0.5 mL,充分混匀后,加入 6 mmol/L 的硫酸亚铁溶液 0.5 mL,加入后立即混匀,然后向其加入 0.5 mL 的不同稀释倍数溶液,充分混匀后加入 0.1% 的过氧化氢溶液 0.5 mL,用蒸馏水定容至 10 mL,在 37 ℃ 恒温水浴 1 h,于 536 nm 波长处测定吸光度 F₁,同时用等体积的蒸馏水代替样品溶液重复上述步骤,测定吸光度 F,用等体积的蒸馏水代替样品溶液及过氧化氢溶液,测定吸光度 F₀,计算·OH 清除率:

$$\cdot\text{OH}\text{清除率}(\%) = \frac{F_1 - F}{F_0 - F} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

1.3 数据处理

单因素实验结果以平均值 $\pm$ 标准误差来表示, SPSS 21.0 用于数据方差分析及误差值的结果计算, Origin 2018 用于误差折线图的绘制。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 提取剂乙醇体积分数 由图 1 可知,随着乙醇体积分数的增加,黑蒜类黑精的吸光度呈先上升后下降的趋势,其中在乙醇体积分数为 10% 时吸光度达到最高,黑蒜类黑精的提取量达到最大;随着乙醇体积分数的进一步增加,黑蒜类黑精吸光度明显下降,其中在乙醇体积分数为 70% 时吸光度最低,提取效果最差,乙醇体积分数为 10% 时提取黑蒜类黑精的效果显著优于其他浓度。这是因为一定浓度的乙醇有助于沉淀溶液中的游离蛋白质等亲水性杂质,使提取液易于过滤,利于增强类黑精的溶解性,增加提取效果^[23]。因此,本实验将选取 0%、10%、20% 的乙醇体积分数作为正交试验浓度。王月丽^[15]采用浸提法提取黑蒜类黑精的单因素实验中,最佳浸提剂也为 10% 的乙醇水溶液。

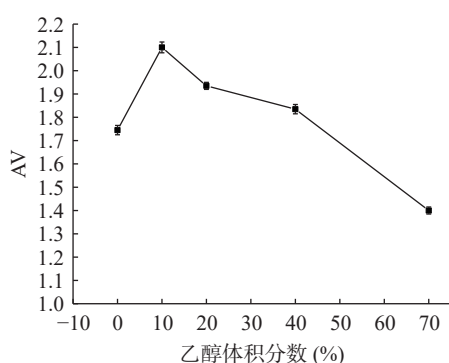


图 1 乙醇体积分数对黑蒜类黑精提取效果的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on extraction of black garlic melanoidin

2.1.2 料液比 由图 2 可知,随着料液比的增加,黑蒜类黑精的提取量呈先上升后下降的趋势,当料液比为 1:1 时,提取效果最差,当料液比为 1:5 时,类黑精提取效果明显增大,达到最佳。继续增加料液比,

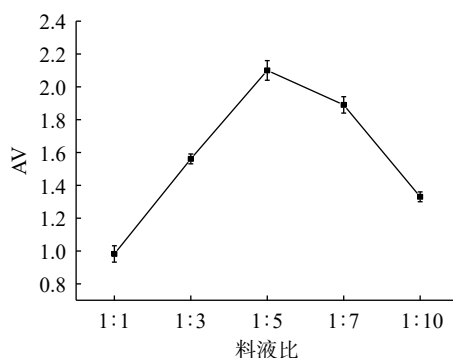


图 2 料液比对黑蒜类黑精提取效果的影响

Fig.2 Effects of solid-liquid ratio on extraction of black garlic melanoidin

提取效果反而下降。原因应是随着料液比的增加,提取溶剂量增加,溶液与物料之间传质速率会有增加,有助于类黑精的提取,但当料液比增加到一定程度时,溶剂量过大致使提取效率下降,提取时间会有所延长,且长时间的浸泡,易使提取液中的杂质增多,会阻碍类黑精的溶解^[24]。因此,选取料液比为 1:3、1:5、1:7 作为正交试验料液比。

2.1.3 超声时间 由图 3 可知,随着超声时间的增加,黑蒜类黑精吸光度呈先上升后下降的趋势,超声时间在 30 min 时,吸光度达到最大,提取效果最好。在超声 10 min 时,超声时间过短,导致提取不充分,随着时间的增加,超声波产生的机械热效应和空化效应可以使黑蒜类黑精提取效果也越来越好^[25],但超声时间过长,超声波的机械剪切力会破坏色素分子的化学键,使黑蒜类黑精的结构遭到破坏,吸光度减小^[15],因此,本实验选取 20、30、40 min 作为正交试验超声时间。王月丽^[15]采用浸提法提取黑蒜类黑精的单因素实验中,选取的最佳浸提时间为 1 h,而本实验采用的超声法,则在保证提取率的前提下大大节约了时间,同时与郝日礼等^[17]采用超声辅助提取酒糟类黑精的单因素实验中,所得到的最佳超声时间相一致。

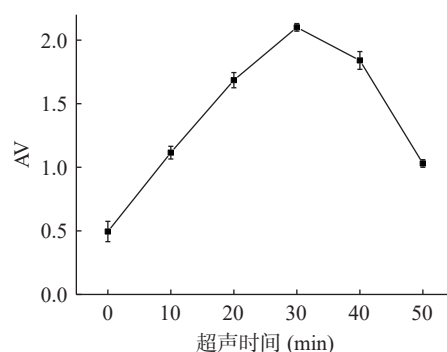


图 3 超声时间对黑蒜类黑精提取效果的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic time on extraction of black garlic melanoidin

2.1.4 超声温度 由图 4 可知,随着提取温度的增加,黑蒜类黑精提取量显著增加,在 55 °C 时达到最大,随后又开始下降,温度的增加,有利于提高分子间的相互作用,增大溶解度以及扩散速率^[14],但过高的

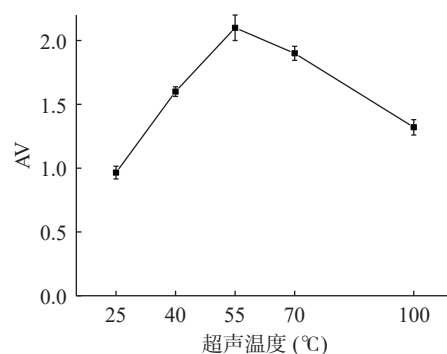


图 4 超声温度对黑蒜类黑精提取效果的影响

Fig.4 Effects of ultrasonic temperature on extraction of black garlic melanoidin

温度, 又会破坏黑蒜类黑精的结构导致提取效果降低, 因此, 本实验选用 40、55、70 ℃ 作为正交试验超声温度。

2.2 正交试验

根据单因素实验结果, 对提取剂乙醇体积分数、料液比、超声时间、超声温度 4 因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 结果如表 2。

表 2 正交试验结果
Table 2 The results of orthogonal experiment

实验号	因素				结果 (AV值)
	A乙醇体积分数	B料液比	C超声时间	D超声温度	
1	1(0%)	1(1:3)	1(20 min)	1(40 ℃)	1.113
2	1	2(1:5)	2(30 min)	2(55 ℃)	0.732
3	1	3(1:7)	3(40 min)	3(70 ℃)	2.120
4	2(10%)	1	2	3	1.645
5	2	2	3	1	1.206
6	2	3	1	2	1.725
7	3(20%)	1	3	2	1.916
8	3	2	1	3	0.937
9	3	3	2	1	1.221
K_1	3.965	4.674	3.775	3.540	
K_2	4.576	2.875	3.598	4.373	
K_3	4.074	5.066	5.242	4.702	
k_1	1.322	1.558	1.258	1.180	
k_2	1.525	0.958	1.199	1.458	
k_3	1.358	1.687	1.747	1.567	
R	0.203	0.729	0.548	0.387	
较优水平	A_2	B_3	C_3	D_3	
因素主次	$B>C>D>A$				

由表 2 可知, 对黑蒜类黑精提取效果影响大小顺序为料液比>超声时间>超声温度>乙醇体积分数。最佳水平组合为 $A_2B_3C_3D_3$, 即选取乙醇体积分数为 10%, 料液比为 1:7, 超声时间 40 min, 超声温度为 70 ℃。王月丽^[15]采用溶剂浸提法从黑蒜中提取类黑精, 最优工艺为 10% 的乙醇, 料液比为 1:3, 浸提温度为 70 ℃, 浸提时间为 1 h。因本研究是利用超声在介质中前进所产生的机械效应提取黑蒜类黑精, 说明在此条件下 1:7 的料液比更有利于溶剂扩散和提高传导速率, 体积 10% 的乙醇水溶液更有利于水溶性黑蒜类黑精的溶出, 进而节约提取时间。在此条件下, 准确称取 50.0000 g 黑蒜, 制备的类黑精提取液, 参考 Wu 等^[26]的方法, 运用醇沉原理得到干燥的类黑精固体 1.7325 g, 除以黑蒜总质量 50.0000 g, 类黑精得率为 3.465%。Wu 等^[26]利用热搅拌水浸提法提取黑蒜类黑精, 经过响应面法优化后, 提取时间为 38 min, 与本实验结果基本相同, 但料液比为 1:21, 提取液体积为本研究的 4 倍左右, 说明以乙醇水溶液为浸提液, 采用超声法提取类黑精可使提取液使用量大大降低, 同时 Wu 等^[26]研究的类黑精得率为 1.79%, 显著低于本研究得率。Zhao 等^[27]在常温 25 ℃ 下, 采用高压水浸渍法提取黑蒜类黑精, 最优方案为压力 300 MPa, 提取时间 5 min, 虽然

提取时间比本研究有较大缩短, 但其对设备条件要求较苛刻, 且其类黑精得率为 2.68%, 低于本研究类黑精得率。

2.3 黑蒜类黑精稳定性的研究

2.3.1 光照 由图 5 可知, 随着光照时间的延长, 直射光下的黑蒜类黑精吸光度明显下降, 而室内和避光处的黑蒜类黑精吸光度变化不大, 说明直射光对黑蒜类黑精稳定性的影响最大, 且光照时间越长, 黑蒜类黑精稳定性越低, 5 h 后类黑精吸光度保留率就降到了 70%, 这可能是直射光的光度较强, 使黑蒜类黑精结构遭到破坏的缘故^[26-27]。研究表明, 黑蒜类黑精是在高温(高于 60 ℃)高湿条件下由游离的氨基酸与还原糖发生美拉德反应而产生的, 所以类黑精分子在常温、高温条件下稳定性较好^[28-29], 而本研究是在室温下(25 ℃ 左右)进行的, 因此室内直射光使得类黑精稳定性变差应是黑蒜类黑精易在直射光下发生光解作用。因此, 黑蒜类黑精最好在阴暗避光处进行保存, 避免直射光对类黑精造成破坏。赵一梦等^[28]同样探究了光照对黑蒜类黑精稳定性的影响, 得出在日照条件下, 类黑精吸光度随时间的增加而明显下降的结论, 本实验与其结论一致。

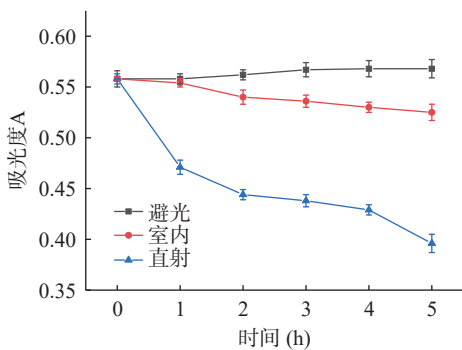


图 5 光照对黑蒜类黑精稳定性的影响
Fig.5 Effects of sunlight on stability of black garlic melanoidin

2.3.2 温度 a.加热对黑蒜类黑精稳定性的影响: 由图 6 可知, 在同一加热温度下, 随着时间的延长, 黑蒜类黑精的吸光度呈下降趋势; 在同一加热时间下, 随着加热温度的上升, 黑蒜类黑精吸光度也呈下降趋势。在加热温度为 40 和 50 ℃ 时, 黑蒜类黑精的吸光度降幅不大, 稳定性较好; 加热温度大于 50 ℃ 时, 随着时间的延长, 黑蒜类黑精吸光度降幅相对增大, 尤其是在 80 ℃ 的加热温度下, 降幅最大, 但此时黑蒜类黑精的吸光度保留率值仍高达 89%, 这是因为黑蒜是在高温高湿条件下发酵而成的, 类黑精则是在这个过程中由羰基化合物和氨基化合物发生美拉德反应, 经过复杂的历程而最终生成黑色的大分子物质^[24], 所以综合来看, 黑蒜类黑精的热稳定性较好。时川^[18]探究的温度对黑变红枣枣皮类黑精稳定性的研究中, 得出黑变红枣枣皮类黑精的热稳定差, 在 40~70 ℃ 时, 类黑精吸光度保留率值跌破了 20% 左右, 与黑变红枣枣皮类黑精相比, 黑蒜类黑精的热稳定性更好。

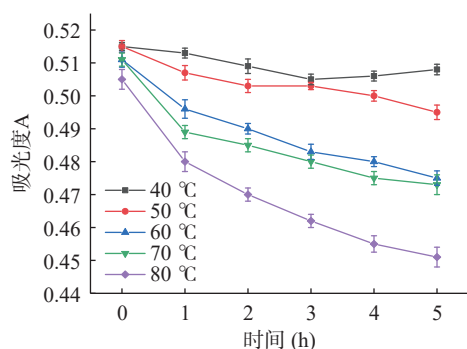


图6 加热对黑蒜类黑精稳定性的影响

Fig.6 Effects of heating on stability of black garlic melanoidin

b.冷藏和冷冻对黑蒜类黑精稳定性的影响: 由图7可知,在 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷冻和 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷藏条件下,随着时间的延长,类黑精吸光度值虽呈现上升趋势,但均变化幅度不大,尤其是冷冻变化幅度更小,说明低温条件有利于黑蒜类黑精的稳定性,且冷冻更加有利于类黑精的稳定性,因此黑蒜类黑精在低温方面应用前景更好。时川^[18]探究的室温和冷藏温度对黑变红枣枣皮类黑精稳定性的影响研究的结论中,也说明了较低温度与冷藏条件对黑变红枣枣皮类黑精稳定性无显著影响,与本研究结论一致。

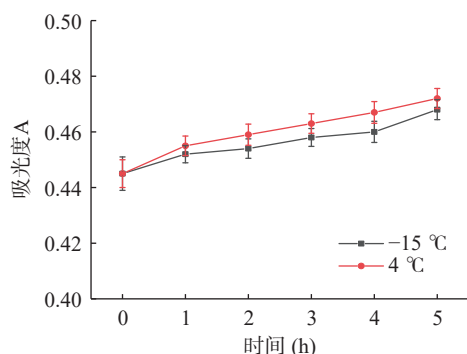


图7 低温对黑蒜类黑精稳定性的影响

Fig.7 Effects of low temperature on stability of black garlic melanoidin

2.3.3 金属离子 由图8可知,随着金属离子浓度的增加, K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 溶液的黑蒜类黑精吸光度值趋于稳定状态,说明 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对黑蒜类黑精稳定

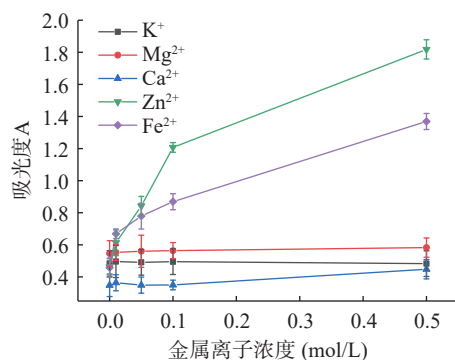


图8 金属离子对黑蒜类黑精稳定性的影响

Fig.8 Effects of metal ions on the stability of black garlic melanoidin

性无显著影响。而加入了 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 的黑蒜类黑精溶液,吸光度显著上升,且在实验过程中,溶液出现浑浊,放置1 h后,有沉淀生成,这可能是因为 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 与黑蒜类黑精发生了络合反应^[28],说明 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对黑蒜类黑精的稳定性有显著影响,应避免与其直接接触。

2.3.4 pH 由图9可知,随着pH的增加,黑蒜类黑精吸光度呈现先上升后下降的趋势,pH为2~4时,吸光度变化明显,pH在4~7时,吸光度增幅平缓,黑蒜类黑精较为稳定,在pH为8时,黑蒜类黑精吸光度增大,此时溶液颜色加深,稳定性变差,在pH为10时,吸光度又有所下降,溶液颜色又变浅。研究表明,pH变化幅度越小,类黑精越稳定^[29],说明弱酸及中性环境对黑蒜类黑精稳定性无较大影响,在强酸和弱碱条件下较不稳定。张燕等^[30]研究pH对番木瓜色素稳定性影响指出,番木瓜色素在酸性和中性条件下比较稳定,而在碱性条件下不稳定,陈小梅等^[31]对栀子紫色素稳定性的研究结论中表明色素在酸碱条件下较为敏感,最好保存于弱酸环境中,由于不同的色素有不同的组成结构和性质,pH对其影响也有所不同。

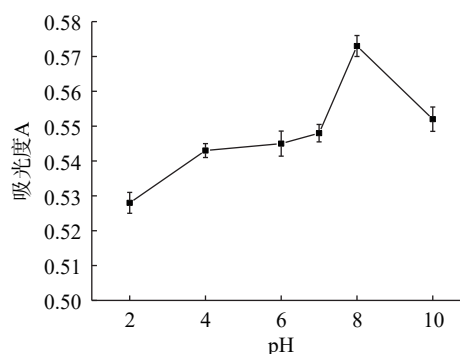


图9 pH对黑蒜类黑精稳定性的影响

Fig.9 Effects of pH on stability of black garlic melanoidin

2.3.5 食品添加剂对黑蒜类黑精稳定性的影响 a.甜味剂对黑蒜类黑精稳定性的影响: 由图10可知,随着葡萄糖和蔗糖质量分数的增加,黑蒜类黑精吸光度呈现下降趋势,但幅度不大,尤其是蔗糖质量分数为

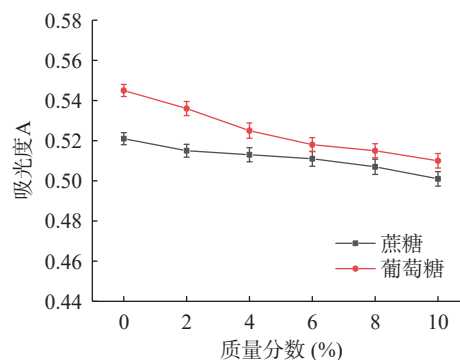


图10 甜味剂对黑蒜类黑精稳定性的影响

Fig.10 Effects of sweeteners on stability of black garlic melanoidin

2%~6% 和葡萄糖添加量 4%~8% 时,吸光度降低幅度仅为 0.002 和 0.003,幅度更小,说明葡萄糖和蔗糖对黑蒜类黑精稳定性影响不大。赵一梦等^[28]探究葡萄糖、蔗糖对黑蒜类黑精稳定性的影响的实验中,得出黑蒜类黑精随着蔗糖浓度的增加,吸光度并没有明显变化的结论,与本研究结果一致。

b.酸味剂对黑蒜类黑精稳定性的影响:由图 11 可知,随着柠檬酸和抗坏血酸浓度的增加,黑蒜类黑精吸光度值却呈逐渐下降趋势,这可能与柠檬酸和抗坏血酸的酸性有关。有研究表明,抗坏血酸和柠檬酸的水溶液均呈现酸性,浓度越大,酸性越强,pH 越低^[30,32]。所以随着二者浓度的增加,溶液 pH 有所下降,吸光度降低,根据 2.3.4 研究结论,柠檬酸和抗坏血酸对黑蒜类黑精稳定性有一定影响。

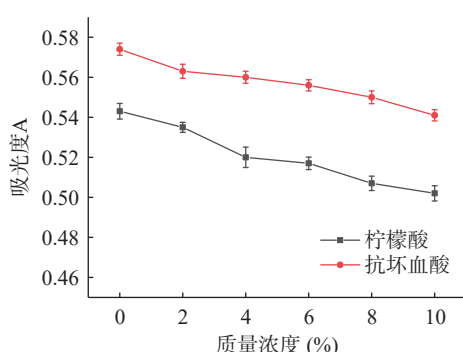


图 11 酸味剂对黑蒜类黑精稳定性的影响

Fig.11 Effects of acid agent on stability of black garlic melanoidin

2.3.6 氧化剂还原剂对黑蒜类黑精稳定性的影响

由图 12 可知,随着 H_2O_2 和 Na_2SO_3 浓度的增加,质量分数 0%~10% 时,黑蒜类黑精吸光度趋势稳定, Na_2SO_3 和 H_2O_2 吸光度最大值与最小值相差仅分别为 0.01 和 0.007,变化幅度很小,说明对黑蒜类黑精稳定性影响不大^[27-28]。赵一梦等^[28]探究氧化剂还原剂对黑蒜类黑精稳定性的影响的实验中,得出黑蒜类黑精随着氧化剂浓度的增加,吸光度下降的结论。而彭松林等^[24]研究 Na_2SO_3 对卤烤鸭类黑精稳定性影响表明,还原剂 Na_2SO_3 可适当提升卤烤鸭类黑精稳定性。本实验与其实验结论存在差异性,这应该是本

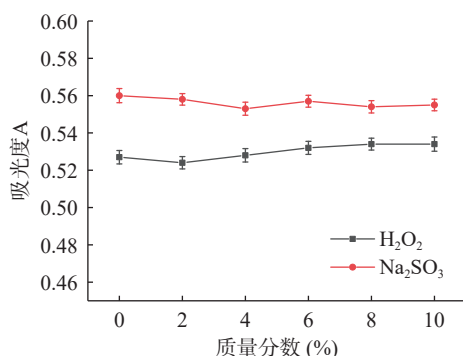


图 12 氧化还原剂对黑蒜类黑精稳定性的影响

Fig.12 Effects of oxidizing and reducing agent on the stability of black garlic melanoidin

实验选取的氧化剂浓度低,在更高浓度氧化剂的条件下,类黑精更容易被氧化。

2.3.7 防腐剂对黑蒜类黑精稳定性的影响 由图 13 可知,随着防腐剂苯甲酸钠和山梨酸钾浓度的增加,当质量分数达到 2% 时,吸光度显著降低,而 2%~4%,吸光度变化不大,说明质量分数小于 2% 时,苯甲酸钠和山梨酸钾对黑蒜类黑精稳定性影响较大,稳定性降低,而 GB 2760—2014《食品添加剂使用标准》规定苯甲酸钠和山梨酸钾作为防腐剂最大使用量为 0.05% 和 0.1%,由图 13 可知,二者添加量吸光度均变化很小,分别降低 0.001 和 0.002,此时苯甲酸钠和山梨酸钾防腐剂对类黑精稳定性无显著影响,可作为类黑精食品防腐剂。质量分数 2%~4% 时,黑蒜类黑精稳定性几乎没有变化,质量分数 4%~8% 时吸光度显著增加,这说明质量分数 4%~8% 的山梨酸钾和苯甲酸钠对黑蒜类黑精均有一定的增色作用^[18]。这与时川^[18]的研究结果是一致的。当质量分数大于 8% 时,吸光度变化不大,说明质量分数增大到一定程度时,苯甲酸钠和山梨酸钾对黑蒜类黑精的增色作用不明显。

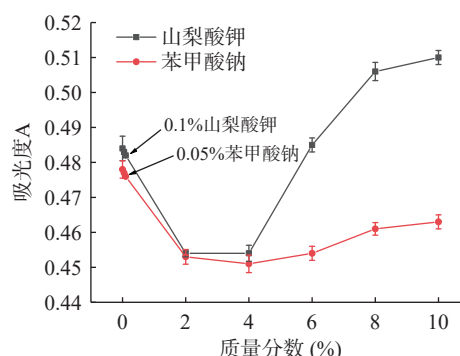


图 13 防腐剂对黑蒜类黑精稳定性的影响

Fig.13 Effects of preservatives on the stability of black garlic melanoidin

2.4 黑蒜类黑精的抗氧化活性

2.4.1 黑蒜类黑精的 DPPH·清除能力 DPPH·是可以接受氢自由基或电子的自由基,因此 DPPH·清除能力常用来评价物质抗氧化能力^[30]。由图 14 可知,随着稀释倍数的增加,黑蒜类黑精的 DPPH·清除率明显呈下降趋势,与 V_C 的清除率差距逐渐增大,在原提取液的基础上稀释 10 倍时,类黑精浓度为 0.842 mg/mL,清除率达 92%,清除率越大,表明物质抗氧化活性越高^[28],此时与 V_C 清除率差距亦最小,说明黑蒜类黑精具有较强的抗氧化活性,并随浓度的增大而增强。赵一梦等^[28]采用高静水压辅助提取黑蒜类黑精,并探究不同浓度下类黑精的 DPPH·清除率,随着浓度的增加,当浓度达到 1.5 mg/mL 时, DPPH·清除率稳定于 64.6%,低于本实验采用超声法提取的黑蒜类黑精 DPPH·清除率 92%,其原因可能在于通过超声法提取得到的类黑精与酚酸的相对含量增加,使得 DPPH·清除能力增强^[28]。

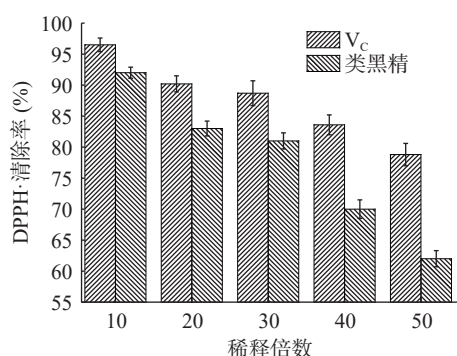


图 14 黑蒜类黑精的 DPPH·清除能力

Fig.14 DPPH· scavenging ability of black garlic melanoidin

2.4.2 黑蒜类黑精的·OH清除能力 羟自由基(·OH)具有较强的得电子能力,会诱导 DNA 链断裂和碱基改性从而引起如癌症等一系列疾病,抗氧化性的物质可以直接清除羟自由基,减少羟自由基的产生量^[22]。由图 15 可知,随着稀释倍数的增加,黑蒜类黑精的 OH 自由基清除率明显呈下降趋势,与 V_C 清除率差距逐渐增大,在原液的基础上稀释 10 倍时,类黑精浓度为 0.842 mg/mL,清除率最高达 76%,此时与 V_C 清除率差距亦最小,说明黑蒜类黑精具有较强的抗氧化活性,并随浓度的增大而增强。王月丽^[15]采用溶剂浸提法提取黑蒜中的类黑精,并对不同浓度下黑蒜类黑精的 OH 自由基清除率进行实验,结果表明,·OH 清除率随质量浓度增加而增强,当类黑精浓度为 1.0 mg/mL 时,最高清除率在 70% 左右,低于本实验结果,其原因应该是在超声波作用下,类黑精在溶解过程中,释放出更多的不稳定的酚羟基^[15]。

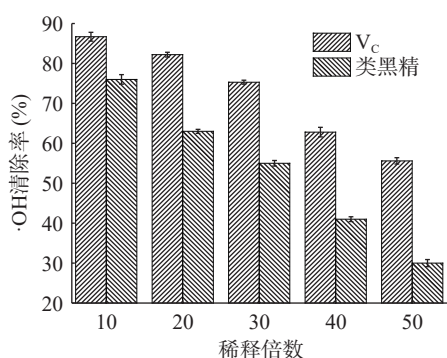


图 15 黑蒜类黑精的·OH清除能力

Fig.15 ·OH scavenging ability of black garlic melanoidin

3 结论

类黑精生物活性强,为了更好地研究及利用黑蒜类黑精的生物活性,以黑蒜为原料,采用超声法提取黑蒜类黑精。结果表明,超声法提取黑蒜类黑精的最佳工艺参数为:乙醇体积分数为 10%、料液比为 1:7、超声时间为 40 min、超声温度为 70 ℃。稳定性研究结果表明,温度高于 50 ℃ 时,类黑精稳定性不好,而-15 ℃ 冷冻和 4 ℃ 冷藏条件下,类黑精呈现较好的稳定性。氧化剂 H₂O₂ 和还原剂 Na₂SO₃、甜味剂、暗光对黑蒜类黑精稳定性无显著影响,直射

光、酸味剂、强酸 pH2~4 和弱碱 pH8~10,则会使其稳定性降低。金属离子 Zn²⁺和 Fe²⁺会发生络合反应。质量分数小于 2% 时的山梨酸钾和苯甲酸钠会降低类黑精的稳定性,而 0.05% 的苯甲酸钠和 0.1% 的山梨酸钾对类黑精稳定性影响很小,可作为类黑精食品的防腐剂。黑蒜类黑精的 DPPH·清除率和·OH 清除率与浓度成正相关,原提取液稀释 10 倍(0.842 mg/mL)时,分别高达 92% 和 76%,说明黑蒜类黑精有较强的抗氧化性。本实验创新用超声法从黑蒜中提取类黑精,利用超声波技术来强化提取分离过程,缩短提取时间、节约成本,为类黑精物质提取和应用提供可靠的理论依据和技术方法。

参考文献

- [1] 马力. 黑蒜精深加工工艺及发酵过程中成分变化研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2021. [MA L. Study on the changes of main nutrients and antioxidant activity of black garlic during processing[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2021.]
- [2] 徐保立, 郑晓冬, 郑华伟, 等. 黑蒜加工工艺及预处理技术研究进展[J]. 中国果菜, 2019, 39(12): 41-43, 48. [XU B L, ZHENG X D, ZHENG H W, et al. Research progress on processing technology and pretreatment techniques of black garlic[J]. China Fruit & Vegetable, 2019, 39(12): 41-43, 48.]
- [3] AMOAJ K, LIE H, DONG X H, et al. Effects of varying dietary black garlic supplementation on the growth, immune response, digestive and antioxidant activities, intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* and its resistance to *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. Aquacult Nutr, 2021, 27(5): 1699-1720.
- [4] CHEN C Y, TSAI T Y, CHEN B H. Effects of black garlic extract and nanoemulsion on the deoxy corticosterone acetate-salt induced hypertension and its associated mild cognitive impairment in rats[J]. Antioxidants, 2021, 10(10): 1-12.
- [5] 王卉, 郝冰玉. 关于黑蒜的营养成分、功效、作用的研究[J]. 黑龙江科学, 2017, 8(4): 2-6. [WANG H, HAO B Y. Research on nutritional components, efficacy and function of black garlic[J]. Heilongjiang Science, 2017, 8(4): 2-6.]
- [6] 安东. 黑蒜加工工艺的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011. [AN D. Study on processing technology of black garlic[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2011.]
- [7] HELOUA C, DENISB S, SPATZA M, et al. Insights into bread melanoidins: Fate in the upper digestive tract and impact on the gut microbiota using *in vitro* system[J]. Food and Function, 2015, 6(4): 175-181.
- [8] RURIÁN-HENARES J A, MORALES F J. Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane-damage mechanism[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(7): 2357-2362.
- [9] LANGNER E, NUNES FM, POZAROWSKI P, et al. Antiproliferative activity of melanoidins isolated from heated potato fiber (potex) in giloma cell culture model[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(6): 2708-2716.
- [10] 温丹华, 李鑫, 黄登宇. 食品中类黑精的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2004-2009. [WEN D H, LI X, HUANG D Y. Research progress on melanoidins in food[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(9): 2004-2009.]
- [11] 吴剑夫. 黑蒜类黑精结构鉴定及生物活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2021. [WU F J. Study on the structure identification and biological activity of melanoidin from black garlic[D].

Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2021.]

[12] LI Y, JIA X, TANG N, et al. Melanoidins, extracted from chinese traditional vinegar powder, inhibit alcohol-induced inflammation and oxidative stress in macrophages via activation of SIRT1 and SIRT3[J]. *Food Funct*, 2021, 12(17): 8120–8129.

[13] 赵一梦, 邓云, 赵艳云. 食品中类黑精的提取分离研究进展[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2018, 36(6): 15–20.

[ZHAO Y M, DEN Y, ZHAO Y Y. Research progress on extraction and isolation of melanoidins from food[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science Edition)*, 2018, 36(6): 15–20.]

[14] 王明慧, 闫佳, 韩永斌, 等. 糯米藕类黑精提取工艺及其体外的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(10): 223–228.

[WANG M H, YAN J, HAN Y B, et al. Extraction and antioxidant activity of melanoidin in lotus root filled with sticky rice[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(10): 223–228.]

[15] 王月丽. 黑蒜类黑精的提取、分离及其抗氧化活性研究[D]. 天津: 天津理工大学, 2020. [WANG Y L. Study on extraction, isolation and antioxidant activity of black garlic like melanin [D]. Tianjin: Tianjin University of Technology, 2020.]

[16] 王超南, 董霞, 鹿美霞, 等. 板栗非酶促褐变产物类黑精的研究[J]. 北京农学院学报, 2015, 30(3): 112–115. [WANG C N, DONG X, PANG M X, et al. Melanoidins in non-enzymatic browning products of *Castanea mollissima* [J]. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2015, 30(3): 112–115.]

[17] 郝日礼, 郑佳佳, 朱传合. 超声辅助提取酒糟类黑精的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(6): 71–75. [HAO R L, ZHENG J J, ZHU C H. Optimization for ultrasonic-assisted extraction of melanoidin from vinasse[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45(6): 71–75.]

[18] 时川. 黑变红枣枣皮类黑精的提取与稳定性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019. [SHI C. Study on extraction and stability of melanin from jujube skin [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2019.]

[19] 时川, 高琳, 孙欣, 等. 响应面法优化黑变红枣枣皮类黑精细胞破碎和水浴联动提取工艺[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(4): 43–48. [SHI C, GAO L, SUN X, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction and combined water bath and cell disruption of blacken jujube peel melanoidin[J]. *Food and Nutrition in China*, 2019, 25(4): 43–48.]

[20] 徐文秀, 韩鹏燕. 紫槐花色素稳定性研究[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(2): 82–88. [XU W X, HAN Y P. Study on stability of *Robinia pseudoacacia* f. *decaisneana* pigment[J]. *China Food Additives*, 2020, 31(2): 82–88.]

[21] 相玉秀, 杨铁金, 相玉琳. 山里红果皮红色素的提取、稳定性检测及其应用研究[J]. 榆林学院学报, 2021, 31(6): 38–42. [XIANG Y X, YANG T J, XIANG Y L. Extraction, stability detection and application of red pigment from red pericarp of mountain red fruit[J]. *Journal of Yulin University*, 2021, 31(6): 38–42.]

[22] 赵晓娟, 吴均, 陈佳昕, 等. 苦荞纳豆酱的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2014, 35(13): 122–126. [ZHAO X J, WU J, CHEN J

X, et al. Antioxidant activity of tartary buckwheat natto[J]. *Food Science*, 2014, 35(13): 122–126.]

[23] 宋永, 赵丹丹, 李少芳, 等. 东北大豆酱中色素物质提取方法的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(4): 188–189, 194. [SONG Y, ZHAO D D, LI S F, et al. Study on extraction of pigment from northeast soy sauce[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(4): 188–189, 194.]

[24] 彭松林, 潘成磊, 康梦瑶, 等. 卤烤鸭中类黑精的提取及其抗氧化活性与化学稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 22–29. [PENG S L, PAN C L, KANG M Y, et al. Extraction, antioxidant activity and chemical stability of melanoidin extract from stewed roast duck[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(2): 22–29.]

[25] 任云, 尹芳芳, 朱晓敏, 等. 超声辅助提取黄庐色素及其性能[J]. 印染助剂, 2020, 37(2): 36–41. [REN Y, YIN F Q, ZHU X M, et al. Ultrasonic assisted extraction of pigment from cotinus coggygia and its performance[J]. *Textile Auxiliaries*, 2020, 37(2): 36–41.]

[26] WU J F, YAN J, ZHANG M. Evaluation on the physico-chemical and digestive properties of melanoidin from black garlic and their antioxidant activities *in vitro* [J]. *Food Chemistry*, 2021 (340): 1–9.

[27] ZHAO Y M, JIANG Y L, DING Y F, et al. High hydrostatic pressure-assisted extraction of high-molecular-weight melanoidins from black garlic: Composition, structure, and bioactive properties [J]. *Journal of Food Quality*, 2019, 10: 1–9.

[28] 赵一梦, 丁彦方, 邓云. 黑蒜类黑精高静水压辅助提取工艺及其抗氧化性和稳定性研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2019, 37(5): 76–82. [ZHAO Y M, DING Y F, DENG Y. Optimization of high hydrostatic pressure assisted extraction of melanoidins from black garlic and its anti-oxidation and stability[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science Edition*, 2019, 37(5): 76–82.]

[29] LIU C F, LU L D, YANG C J, et al. Effects of thermal treatment on alliin and its related sulfides during black garlic processing [J]. *LWT*, 2022, 159: 1–8.

[30] 张燕, 张洪斌. 红心番木瓜色素提取及稳定性[J]. 食品工业, 2021, 42(6): 146–150. [ZHANG Y, ZHANG H B. The extraction and stability of pigment from *Carica papaya* L. red pulp[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(6): 146–150.]

[31] 陈小梅, 黄为民, 陈桂芳, 等. 栀子紫色素制备及其稳定性研究[J]. 中国食品添加剂, 2014(3): 120–124. [CHEN X M, HUANG W M, CHEN G F, et al. Study on preparation and stability of gardenia purple pigment[J]. *China Food Additives*, 2014(3): 120–124.]

[32] 唐丽, 雷岷, 季杨, 等. 柠檬酸对肉兔生产性能、血液生化指标和肌肉氨基酸的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(3): 254–258.

[TANG L, LEI M, JI Y, et al. Effects of citric acid on production performance, blood biochemical indicators, and muscle amino acids in meat rabbits[J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry*, 2023, 59(3): 254–258.]