

# 超声辅助酶法制备大蒜素的工艺研究

莫英杰, 王 静, 曹雁平, 孙宝国\*  
(北京工商大学化学与环境工程学院, 北京 100037)

**摘 要:** 采用混合均匀设计优化超声场强辅助酶解技术制备大蒜素的工艺条件。结果表明, 大蒜素得率最高时的工艺条件为: 酶解温度 35℃, 酶解时间 30min, 料水比 1:1.5(W/V), 超声频率 50kHz, 超声强度 0.4W/cm<sup>2</sup>。在此优化条件下进行萃取, 大蒜素的最高得率为 1.3mg/g (相对原料), 较非超声条件下的酶解得率提高了 15.83%。

**关键词:** 大蒜素; 超声辅助酶解; 混合均匀设计

## Study on Ultrasound-assisted Enzymatic Preparation of Allicin

MO Ying-jie, WANG Jing, CAO Yan-ping, SUN Bao-guo\*  
(School of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037, China)

**Abstract:** When garlic is broken, the endogenous alliinase existing in cytoplasm and its natural substrate, alliin, existing in vacuole will contact each other and react, and then allicin will be formed. Based on this, allicin can be prepared by pounding garlic and then keeping the pounded garlic at suitable temperature for some time. In the present study, ultrasound was applied to preparation of allicin. The ultrasound-assisted enzymatic preparation technology of allicin were optimize by mixed-level uniform design. The results showed that the optimum preparation conditions were as follows: hydrolysis temperature 35 °C, reaction time 30 min, ratio of garlic to water 1:1.5 (W/V), ultrasonic frequency 50 kHz, and ultrasonic intensity 0.4 W/cm<sup>2</sup>. Under these conditions, the allicin yield was up to 1.3 mg/g garlic, increased by 15.83%, compared to the non-ultrasound-assisted enzymatic preparation technology.

**Key words:** allicin; ultrasound-assisted enzymatic preparation; mixed-level uniform design

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)10-0042-04

大蒜素是大蒜中的主要活性成分。当大蒜破碎后, 位于细胞质中的内源蒜氨酸酶就会与位于液泡中的蒜氨酸(蒜氨酸酶的天然底物)相互接触, 二者经  $\beta$ -消除和去氨基作用而形成的一种具有强烈辛辣味的有机硫化物<sup>[1-3]</sup>。大蒜素具有广谱抗菌消炎作用, 能降低血液中的胆固醇、抑制血小板的形成、抗动脉硬化、预防和治疗高血脂及血栓, 还可以阻止亚硝胺在人体内的合成, 具有良好的防癌效果和保健功能<sup>[4-5]</sup>。因此, 大蒜素作为药物和保健品的开发具有广阔的应用前景。

超声波是弹性介质中的一种机械波, 功率超声是一种能量形式, 可用于影响或改变媒介的性质。超声波在传播过程中, 对介质的影响主要有三个方面: 温度升高、机械作用及空化作用<sup>[6]</sup>。超声波作用于酶分子时, 会促进酶分子的构象发生改变。一种是正向的, 使酶的生物活性加强, 这说明超声使酶分子的构象更加合

理; 另一种是负向的, 超声使酶分子的构象区域不合理, 从而导致酶本身生物活性受到阻碍, 表现出酶活性下降甚至失活<sup>[6-7]</sup>。不同的酶分子有不同的立体构象, 相同酶分子在不同环境下也会有不同的构象。不同的酶分子或处于不同环境条件下的酶分子对超声波能量作用有不同敏感性<sup>[7-8]</sup>。

本实验采用混合均匀设计优化超声场强辅助酶解技术制备大蒜素的工艺条件, 以期为大蒜素的工业化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜大蒜 市购。

DTNB、Hepes Sigma 公司; 其他试剂(均为分析纯) 北京化学试剂公司。

收稿日期: 2008-07-17

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA102306)

作者简介: 莫英杰(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品风味化学及调味技术。E-mail: moyingjie0312@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 孙宝国(1961-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品香料。E-mail: sunbg@btbu.edu.cn

## 1.2 仪器与设备

JXD-02 超声处理器 北京金星超声波设备技术有限公司; HR7633 PHILIPS 多功能食品加工机; Spectrumbab 53 紫外可见分光光度计 上海棱光技术有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 大蒜素提取工艺

大蒜→去皮→洗净→捣碎→酶解→溶剂萃取→离心分离→上清液→减压浓缩→大蒜浓缩液→超滤除杂→冷冻干燥→大蒜素产品

### 1.3.2 大蒜素得率的测定

采用比色法测定大蒜素得率<sup>[9-10]</sup>。其计算公式为:

$$C = \frac{\Delta A_{412} \times \beta}{2 \times 14150}$$

式中: C 为大蒜素的含量(mol/ml);  $\beta$  为半胱氨酸溶液的稀释倍数;  $\Delta A_{412}$  为与大蒜素反应前后半胱氨酸吸光度之差。

### 1.3.3 非超声条件下大蒜素含量的测定

酶解时间 30min, 酶解温度 35℃, 料水比为 1:1.5 (大蒜:水, W/V), pH6.5, 然后用 95% 乙醇以料液比 1:4 (大蒜:95% 乙醇, W/V) 在 30℃ 下萃取 1.5h, 测定大蒜素的含量。

### 1.3.4 超声酶解单因素试验

分别确定不同的酶解时间、温度、超声频率、超声强度对大蒜素得率的影响。

### 1.3.5 混合均匀设计试验优化超声酶解条件<sup>[11]</sup>

对酶解时间、酶解温度、超声频率、超声强度四个因素采用三水平混合均匀设计试验进行优化, 试验方案见表 1。

表 1 混合均匀设计试验方案

Table 1 Mixed-level uniform design scheme for optimizing ultrasound-assisted enzymatic preparation conditions

因素	$x_1$ 时间(min)	$x_2$ 强度(W/cm <sup>2</sup> )	$x_3$ 温度(℃)	$x_4$ 频率(kHz)
N-1	35	0.3	40	135
N-2	35	0.4	30	40
N-3	25	0.2	35	40
N-4	30	0.3	35	50
N-5	25	0.4	40	50
N-6	30	0.2	30	135

## 2 结果与分析

### 2.1 超声酶解时间对大蒜素得率的影响

超声酶解时间分别取 20、25、30、35min, 酶解温度 35℃, 料水比 1:1.5, 超声强度 0.2W/cm<sup>2</sup>, 超声频率 50kHz, 然后用 95% 乙醇以料液比 1:4 在 30℃ 下萃取 1.5h, 分析不同酶解时间对大蒜素得率的影响。

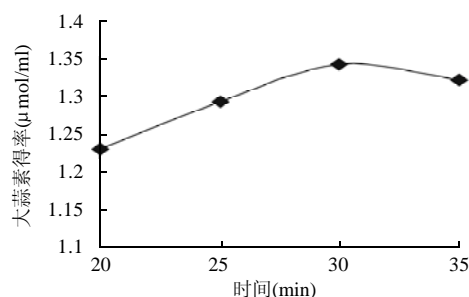


图 1 酶解时间对大蒜素得率的影响

Fig.1 Effects of hydrolysis time on alliin yield

由图 1 可以看出, 大蒜素的得率随超声酶解时间的增加呈先增大后减小的趋势。当超声酶解时间达到 30min 时, 大蒜素得率最高。超声酶解时间过短, 蒜氨酸转化为大蒜素不充分, 而超声酶解时间过长, 大蒜素又容易挥发或者转化为其他副产物, 影响其得率和品质。

### 2.2 超声强度对大蒜素得率的影响

超声强度分别取 0.1、0.2、0.3、0.4W/cm<sup>2</sup>, 酶解温度 35℃, 酶解时间 30min, 料水比 1:1.5, 超声频率 50kHz, 然后用 95% 乙醇以料液比 1:4 在 30℃ 下萃取 1.5h, 分析不同超声强度对大蒜素得率的影响。

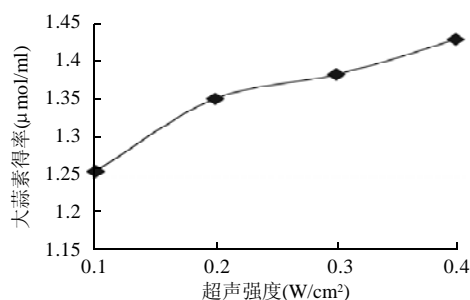


图 2 超声强度对大蒜素得率的影响

Fig.2 Effects of ultrasonic intensity on alliin yield

从图 2 可以看出, 大蒜素得率随超声强度的升高而增大, 当强度为 0.4W/cm<sup>2</sup> 时, 大蒜素的得率最高。说明超声酶解强度大时, 改变酶的分子构象有利于大蒜素的形成。

### 2.3 超声酶解温度对大蒜素得率的影响

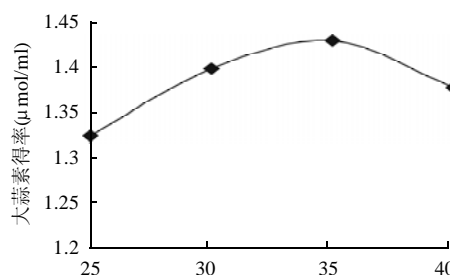


图 3 酶解温度对大蒜素得率的影响

Fig.3 Effects of hydrolysis temperature on alliin yield

超声酶解温度分别取 25、30、35、40℃, 酶解时间 30min, 料水比 1:1.5, 超声强度 0.4W/cm<sup>2</sup>, 超声频率 50kHz, 然后用 95% 的乙醇以料液比 1:4 在 30℃ 下萃取 1.5h, 分析不同酶解温度对大蒜素得率的影响。

从图 3 可以看出, 大蒜素的得率随超声酶解温度的增大呈先增后降的趋势。当酶解温度为 35℃ 时, 大蒜素的得率最高。温度太低, 蒜氨酸酶的活性较低, 不利于大蒜素的生成, 而温度太高, 大蒜素又不稳定, 容易转化成其他副产物。

## 2.4 超声频率对大蒜素得率的影响

超声频率分别取 28、40、50、135kHz, 酶解时间 30min, 酶解温度 35℃, 料水比 1:1.5, 超声强度 0.4W/cm<sup>2</sup>, 然后用 95% 乙醇以料液比 1:4 在 30℃ 下萃取 1.5h, 分析不同超声频率对大蒜素得率的影响。

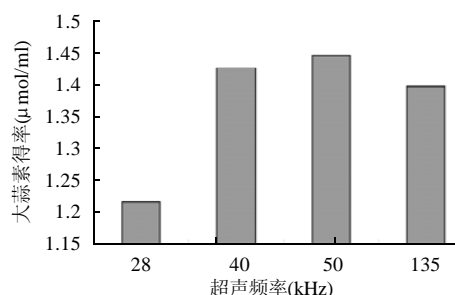


图4 超声频率对大蒜素得率的影响

Fig.4 Effects of ultrasonic frequency on alliin yield

从图 4 可以看出, 大蒜素得率随超声酶解频率的增加呈现出先增后降的趋势, 当超声频率为 50kHz 时, 大蒜素的得率最高。原因可能是随着超声频率的增加, 酶和底物分子的碰撞频率也增大, 使得反应速度加快, 大蒜素得率增高, 而当超声频率过大时, 酶分子构象进一步改变, 酶活性反而降低, 影响了大蒜素的生成。

## 2.5 超声酶解条件优化

利用 DPS 系统软件处理试验数据, 由偏最小二乘法得回归方程:

$$y=0.8062131+0.182131x_1+0.108393x_2+0.108298x_3+0.179125x_4-0.023061x_1^2-0.011175x_2^2-0.015442x_3^2-0.029462x_4^2+0.002127x_1x_2-0.017330x_1x_3-0.026844x_1x_4-0.014653x_2x_3-0.012311x_2x_4+0.003131x_3x_4$$

数据标准化后模型误差平方和(R<sup>2</sup>)为 0.9807, 说明回归方程所代表的回归曲线与观测值间的拟合很好, 因为回归曲线解释了 y 值与其平均数的总离差平方和的 98.07%, 只有 1.93% 是回归方程未作解释的, 这部分可以归之于偶然因素的变动(如超声场强的不均匀性等)。超声场强酶解条件对大蒜素得率影响的因素分布如图 5 所示。

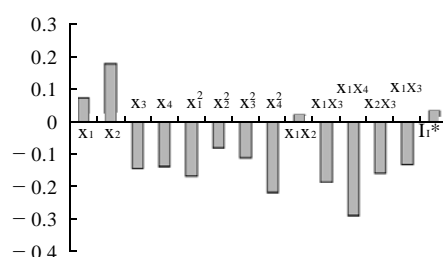


图5 超声酶解对大蒜素得率影响的因素分布

Fig.5 Distribution of effects of ultrasound-assisted enzymatic preparation conditions on alliin yield

由图 5 中标准化回归系数可以看出, 在单因素中, 各因素影响程度由大到小排序为: 强度>温度>频率>时间; 其中强度的影响显著, 温度的影响比较明显, 然后是频率, 相比较而言, 时间的影响是最小的。在双因素共同作用中, 时间-频率(负相关)共同作用的影响最明显, 时间-温度共同作用的影响其次, 且其共同作用的影响程度高于单因素的影响, 其他双因素组合作用的影响均未超过不明显水平。最优指标的各个因素组合如表 2 所示, 目标函数值为 1.450 μmol/ml, 通过实验验证为 1.449 μmol/ml, 两者结果非常吻合。

表2 超声场强酶解处理最优指标

Table 2 Optimum conditions of ultrasound-assisted enzymatic preparation of alliin

因素	x <sub>1</sub> 时间(min)	x <sub>2</sub> 强度(W/cm <sup>2</sup> )	x <sub>3</sub> 温度(℃)	x <sub>4</sub> 频率(kHz)
最佳组合	2	3	2	2
对应的试验条件	30	0.4	35	50

## 2.6 超声酶解前后大蒜素得率的对比

在其他条件一致的情况下, 分析了超声酶解和非超声酶解对大蒜素得率的影响。如图 6 所示, 在非超声酶解时, 反应体系中大蒜素的浓度为 1.25mol/ml, 得率为 1.1mg/g(相对原料), 而在超声酶解条件下, 反应体系中大蒜素的浓度为 1.449 μmol/ml, 得率为 1.3mg/g(相对原料), 得率相对提高了 15.83%。

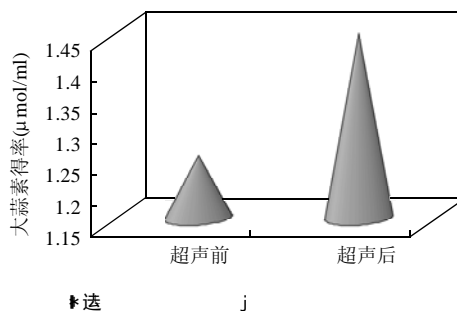


图6 超声酶解前后大蒜素得率的对比

### 3 结 论

通过超声辅助酶解,在酶解时间 30min、酶解温度 35℃、料水比(大蒜:水, W/V)1:1.5、超声频率 50kHz、超声强度 0.4W/cm<sup>2</sup> 的条件下,以 95% 乙醇在 30℃、料液比(大蒜:95% 乙醇, W/V)1:4 时萃取 1.5h,大蒜素的得率达到了 1.3mg/g(相对原料),相对非超声酶解提高了 15.83%。由此可见超声辅助酶解显著提高了大蒜素的得率。

#### 参考文献:

- [1] BLOCK E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium*-Implications for the organic chemistry of sulfur[J]. *Angew Chem*, 1992, 31(9): 1135-1178.
- [2] SHIMON L J W, RABINKOV A, MIRON T, et al. Alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*): crystallization and preliminary X-ray characterization[J]. *Acta Crystallographica Biological Crystallography*, 2002, 58(8): 1335-1337.
- [3] JANSEN H, MUELLER B, KNOBLOCH K. Alliin lyase from garlic, *Allium sativum*: investigations on enzyme/substrate, enzyme/inhibitor interactions, and on a new coenzyme[J]. *Planta Medica*, 1989, 55(5): 440-445.
- [4] DURAK I, KAVUTCU M, AVTAC B, et al. Effects of garlic extract consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in humans with high blood cholesterol[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2004(15): 373-377.
- [5] ANKRI S, MIRELMAN D. Antimicrobial properties of allicin from garlic[J]. *Microbes and Infection*, 1999(2): 125-129.
- [6] BARTON S, BULLOCK C, WEIR D. Effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996, 18(3): 190-194.
- [7] 谢振伟, 但德忠, 赵燕, 等. 超声波辅助萃取技术在样品预处理中的应用[J]. *化学通报*, 2005, 68(8): 1-3.
- [8] 林仲茂. 20 世纪功率超声在国内外的的发展[J]. *声学技术*, 2000, 19(2): 101-104.
- [9] HAN J, LAWSON L, HAN G, et al. Spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates[J]. *Analytical Biochemistry*, 1995, 225(1): 157-160.
- [10] 李瑜, 许时婴. 分光光度法测定大蒜提取物中硫代亚磺酸酯[J]. *食品与机械*, 2004, 2(3): 51-53.
- [11] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002.