

# 黑大蒜发酵过程中功能性成分以及抗氧化活性的动态变化研究

崔春兰, 郑虎哲\*, 田跃, 张泽林

(江苏食品药品职业技术学院, 江苏淮安 223003)

**摘要:**采用五阶段发酵法制备黑大蒜,并研究了发酵各阶段黑大蒜的功能性成分的动态变化。结果表明,第一阶段是还原糖含量、抗氧化物质和活性的增强阶段,还原糖含量、总多酚含量、总黄酮类含量、DPPH自由基清除能力以及FRAP铁还原抗氧化力相比新鲜大蒜分别增加了12、4、7、7、7倍;第二阶段是大蒜中的蒜氨酸转换为S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷的过程,S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷的含量比新鲜大蒜增加了12倍;第三阶段是促进大蒜转变为“黑”大蒜的过程;第四阶段和第五阶段是发酵完善和后熟阶段。

**关键词:**发酵黑大蒜,功能性成分,抗氧化活性,动态变化

## Effect of fermentation stage on functional compounds and antioxidant capacity change of black garlic

CUI Chun-lan, ZHENG Hu-zhe\*, TIAN Yue, ZHANG Ze-lin

(Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College, Huai'an 223003, China)

**Abstract:** In order to product black garlic from fresh garlic, five-stage fermentation techniques had been used and dynamic changes of functional compounds during fermentation stage were measured. The results indicated that the first fermentation stage strongest affect on reducing sugar content and antioxidant activities. Reducing sugar content, total phenolic content, total flavonoid content, DPPH and FRAP activities increased by about 12, 4, 7, 7 and 7 times, respectively, compared with fresh garlic. The second fermentation stage strongest affect on alliin and S-allyl-L-cysteine contents, that S-allyl-L-cysteine content increased by about 12 times, compared with fresh garlic. The third fermentation stage strongest affect on Maillard reaction efficiency. In addition, the fourth and fifth fermentation stage strongest affect on post-fermentation efficiency.

**Key words:** black garlic; functional compounds; antioxidant activity; dynamic change

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)16-0151-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.16.023

大蒜是百合科葱属植物(*Allium Sativum* L.)的鳞茎,在东南亚的大部分国家是一种常见的烹饪调味品及健康产品,它具有抗菌消炎、抗氧化、免疫调节等作用,因此也被称为“植物药之最”<sup>[1]</sup>。但过多生吃大蒜,易动火,耗血,影响视力,对胃肠道也有刺激作用。所以,阴虚火旺,患有胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、肾炎、心脏病和便秘者不宜多吃。因此,大蒜新产品及其加工技术一直是人们关心和研究的热点。近年来,发酵黑大蒜受到学者和消费者的广泛关注。发酵黑大蒜是用新鲜的生蒜,带皮放在高温高湿的发酵箱里,让其自然发酵制成的食品,它在保留生大蒜原有成分的基础上,使生大蒜的抗氧化、抗酸化功效提高了数十倍,又把新鲜大蒜本身的蛋白质

大量转化为人体每天所必需的17种氨基酸进而被人体迅速吸收,对增强人体免疫力、恢复人体疲劳,保持人体健康起到巨大地积极作用,对糖尿病<sup>[2]</sup>、高血压<sup>[3]</sup>、高血脂<sup>[4]</sup>以及癌症<sup>[5]</sup>都有非常显著的防治功效,而且味道酸甜,食后无蒜味,不上火,是速效性的保健食品<sup>[6]</sup>。

自黑大蒜研发以来,在日本、韩国、新加坡等地迅速风靡。目前国内也有一些相关发明专利技术<sup>[4-5]</sup>。但是大部分专利只涉及制作工艺,并没有揭示出黑大蒜发酵过程中各种成分的变化规律,特别是营养物质(如还原糖、氨基酸等)、功能性成分(如总多酚、S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷等)以及抗氧化活性。开发具有保健功效的黑大蒜的核心工艺是发酵过程中温

收稿日期:2014-11-20

作者简介:崔春兰(1976-),女,硕士,讲师,研究方向:功能性食品开发,E-mail:tigercel@163.com。

\* 通讯作者:郑虎哲(1974-),男,博士,副教授,研究方向:功能性食品开发,E-mail:huzhezhe@163.com。

基金项目:江苏省《2014年度高等学校大学生实践创新训练计划项目》(201413104003Y);江苏省青蓝工程资助项目(苏教师(2014)23号)。

度、相对湿度、时间等参数的确定。如发酵处理稍微不慎,生产出的“黑大蒜”中各种抗氧化物质含量和抗氧化活性不会显著增加,因此,进一步完善黑大蒜发酵工艺很有必要。本试验重点研究黑大蒜发酵过程中还原糖等营养成分以及总多酚等抗氧化物质的动态变化以及规律,为进一步优化黑大蒜发酵工艺提供技术和科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与amp;仪器

**黑大蒜** 本试验以2013年江苏省淮安地区产新鲜白皮14~16瓣大蒜为原料,采用专利技术<sup>[1]</sup>加工成黑大蒜,在大蒜发酵的各个阶段采集样品,并保存于-10℃的冷藏库内,供试验用;乙腈为色谱纯;其他试剂均采用优级纯以上;蒜氨酸(纯度为98%)和S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷(纯度为98%)购于Sigma公司。

**kbf p720型恒温恒湿培养箱** 济南贝思生物科技有限公司; **HH-8型恒温水浴锅** 江苏省金坛市环宇科学仪器厂; **759S型紫外-可见分光光度计** 上海棱光技术有限公司; **Shimadzu LC-6A型高效液相色谱仪** 日本Shimadzu公司。

### 1.2 发酵工艺

黑大蒜的发酵工艺分五阶段进行,第一阶段的发酵温度79℃,相对湿度90%,70 h;第二阶段的发酵温度50℃,相对湿度90%,45 h;第三阶段的发酵温度90℃,相对湿度90%,20 h;第四阶段的发酵温度52℃,相对湿度40%,80 h;第五阶段是25℃室温下放置100 h。

### 1.3 还原糖含量和总氨基酸含量的测定

还原糖含量的测定选用DNS比色法<sup>[2]</sup>,在540 nm下测吸光值。以葡萄糖为标准样品绘制标准曲线。总氨基酸含量采用陈凯等<sup>[3]</sup>的方法测定。在568 nm处测吸光度。

### 1.4 总多酚和总黄酮含量的测定

总多酚含量的测定采用Folin-Ciocalteu法,用没食子酸(Gallic acid)作标准曲线,样品总多酚含量以每克样品达到同样吸光度所需的没食子酸的毫克数(mg GAE/g)表示<sup>[4]</sup>。总黄酮含量测定参照Jia等<sup>[5]</sup>的方法,以每克样品达到同样吸光度所需的槲皮素(Quercetin)的毫克数(mg QE/g)表示。

### 1.5 抗氧化活性的测定

DPPH(1,1-二苯基苦基苯肼)自由基清除能力的测定采用Lim等<sup>[6]</sup>的方法,并以Trolox为标准物质进行检测。样品DPPH活性以达到同样吸光度所需的Trolox的毫摩尔数表示(mmol TE/g)。FRAP(ferric reducing-antioxidant power,铁还原抗氧化力)的测定采用Shahrokh等<sup>[7]</sup>的方法,并以Trolox为标准物质进行检测,FRAP活性以达到同样吸光度所需的Trolox的毫摩尔数表示(mmol TE/g)。

### 1.6 蒜氨酸和S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷含量的测定

称取5 g大蒜试样并捣碎,用80 mL蒸馏水洗入100 mL容量瓶中,至80℃水浴中保温2 h,取出,冷却,定容,过滤,备用。蒜氨酸和S-烯丙基-L半胱氨酸亚

砷含量的测定采用高效液相色谱法,色谱柱选用RP C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,Alltech Co,USA);流动相为20 mmol/L磷酸二氢钠、10 mmol/L庚烷磺酸钠(A)和乙腈、10 mmol/L庚烷磺酸钠(B);流速为0.2 mL/min;检测器为紫外光检测器;检测波长为210 nm;进样量为20 μL。蒜氨酸和S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷对照品的峰面积-浓度回归方程分别为 $y=44759x-10115$ 和 $y=92144x-1033.7$ 。

### 1.7 统计分析

采用SAS软件系统进行数据处理,数据结果以平均数±标准差( $n=3$ )表示,ANOVA过程做差异显著性测验,并进行多组样本间差异显著性分析( $p<0.05$ )。

## 2 结果与amp;讨论

### 2.1 黑大蒜发酵阶段的确立

发酵黑大蒜是在高温、高湿的环境下长时间自然发酵而成的一种保健食品,即发酵过程不是利用微生物发酵,而是在高温高湿条件下,自身组织遭到破坏后,自身物质所发生的物理化学反应,特别是美拉德反应起了关键作用<sup>[8]</sup>。美拉德反应是十分复杂的化学过程,反应历程、反应产物的性质及结构受氨基酸及糖种类、性质的影响,而且还与反应时pH、温度、相对湿度、时间以及金属离子等有关<sup>[9]</sup>。美拉德反应通常分为三个阶段,即反应的早期阶段、中间阶段以及末期阶段<sup>[10]</sup>。罗仓学等<sup>[11]</sup>、Bae等<sup>[12]</sup>从不同时间、不同温度研究黑蒜发酵工艺。周广勇等<sup>[13]</sup>对黑大蒜贮藏过程中主要成分和抗氧化能力的变化研究表明,贮藏100~120 d后,各项理化指标保持相对稳定。本研究经过前期的试验,将美拉德反应分为五个阶段,即把中间阶段和末期阶段各分为两个阶段,最终确定第一阶段的发酵温度79℃,相对湿度90%,70 h;第二阶段的发酵温度50℃,相对湿度90%,45 h;第三阶段的发酵温度90℃,相对湿度90%,20 h;第四阶段的发酵温度52℃,相对湿度40%,80 h;第五阶段是25℃室温下放置100 h。

### 2.2 黑大蒜发酵过程中还原糖和总氨基酸含量的变化

黑大蒜发酵过程中还原糖和总氨基酸含量的变化如图1所示。随着发酵时间的增加,大蒜中的还原糖含量呈持续上升趋势,特别是在第一阶段和第三阶段的还原糖含量增加明显,从发酵前的0.7 g/100g分别增加到3.5 g/100g和6.8 g/100g。孙宝华等<sup>[13]</sup>的研究成果表明还原糖是美拉德反应的主要物质,其单糖的生成速度显著高于双糖的生成速度。本研究结果也证明这一点,在第二阶段温度降低引起还原糖增量的降低,随着第三阶段提高发酵温度,还原糖的生成速度明显提高。在整个发酵过程中氨基酸含量也持续上升,从发酵前的1.3 g/100g增加到第五阶段的7.8 g/100g。这是因为经长时间的发酵和熟成使大蒜中所含的蛋白质被分解为氨基酸;碳水化合物被分解为更具营养的糖类物质。孙宝华等<sup>[13]</sup>表示发酵温度影响氨基酸的生成量,各阶段的温度相差10℃时氨基酸生成速度相差3~5倍。Sung<sup>[15]</sup>分四个

阶段研究黑大蒜过程中氨基酸含量的变化,得到与本研究相似的结果。另外,随着发酵时间的延长,新鲜大蒜逐渐变黑,特别是从第三阶段开始,大蒜表面由于失水以及美拉德反应引起蛋白黑素的逐渐形成<sup>[5]</sup>。

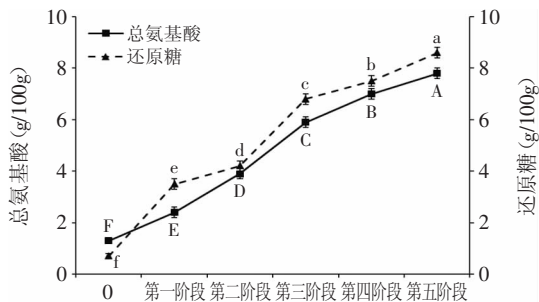


图1 黑大蒜发酵过程中还原糖和总氨基酸含量的变化

Fig.1 The changes in the reducing sugar content and total amino acid content of garlic during fermentation

注:小写字母和大写字母分别代表还原糖和总氨基酸在  $p < 0.05$  水平上显著差异。

### 2.3 黑大蒜发酵过程中总多酚和总黄酮含量的变化

黑大蒜发酵过程中总多酚和总黄酮含量的变化如图2所示。由图2可见,随着发酵时间的增加,大蒜中的总多酚和总黄酮含量呈持续上升趋势,特别是在第一阶段增加显著 ( $p < 0.05$ ),从发酵前的1.51 mg GAE/g和0.58 mg QE/g分别增加到3.33 mg GAE/g和2.04 mg QE/g。发酵到第五阶段时,总多酚和总黄酮含量分别达到6.01 mg GAE/g和4.15 mg QE/g,比新鲜大蒜分别高出4倍和7倍。孙月娥等<sup>[16]</sup>指出大蒜中多酚类物质的主要成分为没食子酸类化合物,在受热过程中,大分子化合物发生分解,生成小分子物质,释放出更多含有酚羟基的化合物,因而使多酚类物质的含量得到提高。Sung<sup>[15]</sup>则解释总多酚和总黄酮含量增加的原因是在高温、高湿条件下新鲜大蒜中的其他化合物转化的结果。

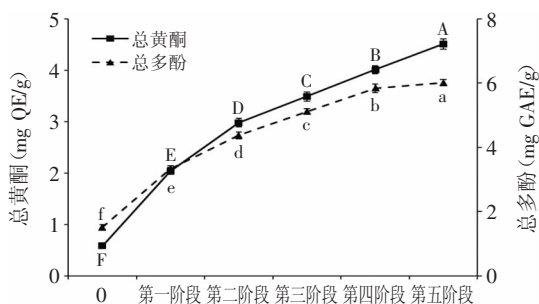


图2 黑大蒜发酵过程中总多酚和总黄酮含量的变化

Fig.2 The changes in the total polyphenol content and flavonoid content of garlic during fermentation

注:小写字母和大写字母分别代表总多酚和总黄酮在  $p < 0.05$  水平上显著差异。

### 2.4 黑大蒜发酵过程中抗氧化活性的变化

黑大蒜发酵过程中抗氧化活性的变化如图3所

示。可以看出黑大蒜的抗氧化能力比新鲜大蒜显著增强 ( $p < 0.05$ )。其中,铁还原抗氧化力变化更显著。新鲜大蒜的铁还原抗氧化力和DPPH自由基清除率分别为50.8 mmol TE/g和41.8 mmol TE/g。在发酵第三阶段时,黑大蒜对铁还原抗氧化力和DPPH自由基清除能力趋于稳定,分别为287.4 mmol TE/g和223.4 mmol TE/g。发酵到第五阶段时,自由基清除能力分别达到351.1 mmol TE/g和289.7 mmol TE/g。孙宝华等<sup>[13]</sup>提出黑大蒜中美拉德反应产物,如氨基酸以及糖的增加是抗氧化能力显著提高的直接原因,孙月娥等<sup>[16]</sup>指出随着美拉德反应的进行,多酚类物质的增加也是其抗氧化能力增加的原因之一。本研究结果与Kim等<sup>[17]</sup>、王玉荣等<sup>[18]</sup>研究结果相似,即大蒜在发酵过程中,DPPH自由基清除能力明显提高,并且与多酚含量的变化有一定的关系。

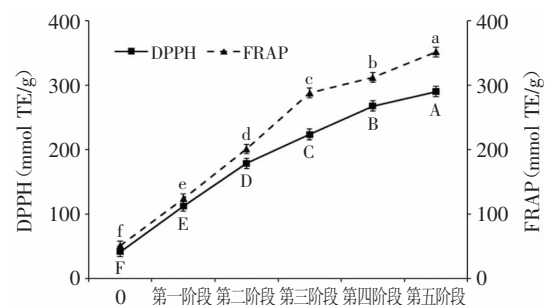


图3 黑大蒜发酵过程中FRAP和DPPH的变化

Fig.3 The changes in the FRAP and DPPH of garlic during fermentation

注:小写字母和大写字母分别代表FRAP和DPPH在  $p < 0.05$  水平上显著差异。

### 2.5 黑大蒜发酵过程中蒜氨酸和S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷的变化

大蒜的主要功效成分之一是含硫有机化合物,完整大蒜中含有 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸和半胱氨酸亚砷等两种硫化物。烯丙基半胱氨酸亚砷大约占半胱氨酸亚砷的80%,当完整大蒜细胞受损时,蒜酶释出,催化蒜氨酸产生硫代亚磺酸酯即大蒜辣素。大蒜辣素不稳定,进一步分解形成S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷等水溶性含硫化合物和烯丙基硫化物等脂溶性含硫化合物<sup>[3]</sup>。由图4和图5可知,新鲜大蒜中的蒜氨酸含量为5.4 mg/g,随着大蒜的发酵其含量急剧下降,第五阶段时含量降到1.7 mg/g。与之产生鲜明对比的是S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷的改变,从新鲜大蒜中的0.5 mg/g增加到6.1 mg/g。这是因为经长时间的发酵和熟成,新鲜大蒜中含有的蒜氨酸物质通过发酵还原为更具抗氧化能力的S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷物质。钟成等<sup>[19]</sup>报道,新鲜大蒜在美拉德反应过程中,大蒜中不稳定蒜氨酸转化成S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷,使黑蒜的体外抗氧化作用高于新鲜大蒜。另外,从图4可知,作为美拉德反应产物,除了S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷,还增加了其他未知样,如U1、U2等,推断这些产物对提高黑大蒜的抗氧化作用也起了一定作用。

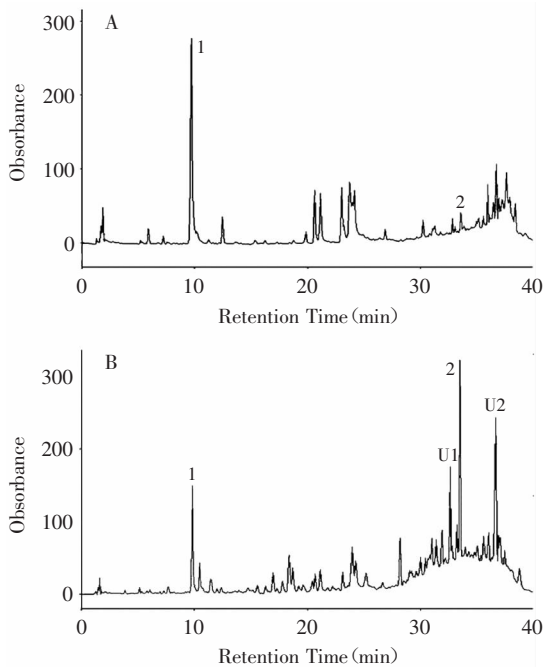


图4 利用高效液相色谱仪检测新鲜大蒜(A)和发酵黑大蒜(B)中蒜氨酸和S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷含量

Fig.4 HPLC chromatograms of alliin and S-allyl-L-cysteine in flesh garlic (A) and black garlic (B)

注: 1: 蒜氨酸; 2: S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷; U1和U2: 未知样。

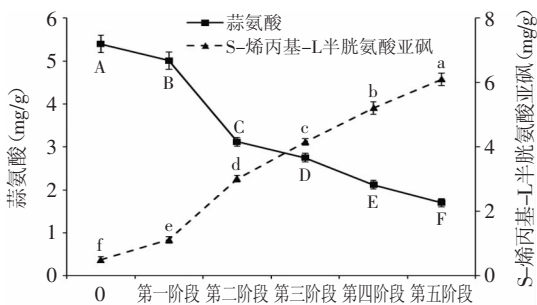


图5 黑大蒜发酵过程中蒜氨酸和S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷的变化

Fig.5 The changes in the alliin and S-allyl-L-cysteine of garlic during fermentation

注: 小写字母和大写字母分别代表S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷和蒜氨酸在 $p < 0.05$ 水平上显著差异。

### 3 结论

本试验分五个发酵阶段研究黑大蒜发酵过程中各种营养成分及功能性成分的动态变化以及规律。结果表明, 第一阶段是制作发酵黑大蒜的关键环节, 是还原糖含量、抗氧化物质和活性的增强阶段; 第二阶段是大蒜中含有的硫磺类化合物蒜氨酸转换为S-烯丙基-L半胱氨酸亚砷等硫化物的过程; 第三阶段是促进大蒜转变为“黑”大蒜的过程, 也是影响糖、酸含量的阶段; 第四阶段是发酵完善阶段; 第五阶段作为后熟阶段。本研究为进一步优化黑大蒜发酵工艺提供技术和科学依据。

### 参考文献

- [1] 罗仓学, 苏东霞, 陈树雨. 液态黑蒜发酵工艺优化[J]. 农业工程学报, 2013, 29(18): 292-297.
- [2] 祝炳俏, 吴海歌, 刘媛媛, 等. 黑蒜抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(10): 58-60.
- [3] BAE S E, CHO S Y, WON Y D, et al. Changes in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 55: 397-402.
- [4] 贾培起. 一种新型发酵食品黑大蒜: 中国, 201110351014.4 [P]. 2011-11-09.
- [5] 郑虎哲, 崔春兰. 发酵黑大蒜的生产方法: 中国, 201410026690.8 [P]. 2014-01-21.
- [6] 孙伟伟, 曹维强, 王静. DNS法测定玉米秸秆中总糖[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(6): 120-123.
- [7] 陈凯, 寰月, 田源, 等. 板蓝根中总氨基酸含量测定方法的改进[J]. 食品与药品, 2012, 14(1): 25-28.
- [8] SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTOS R M. Analysis of total phenolic and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent[J]. Methods in Enzymology, 1999(299): 152-178.
- [9] JIA Z S, TANG M C, WU J M. Determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals[J]. Food Chemistry, 1999, 64(4): 555-559.
- [10] LIM Y Y, LIM T T, TEE J J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study[J]. Food Chemistry, 2007, 103(3): 1003-1008.
- [11] SHAHROKH K, RONG T, DJAMILA R, et al. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008(21): 396-401.
- [12] 吴惠玲, 王志强, 韩春, 等. 影响美拉德反应的几种因素研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 441-444, 440.
- [13] 孔保华, 李菁, 刘骞. 美拉德反应产物抗氧化机理及影响因素的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(11): 9-13.
- [14] 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): 64-71.
- [15] SUNG Nak-Ju. Black Garlic characteristic of functional Compounds and Antioxidant Capacity[J]. Food Preservation and Processing Industry, 2008, 7(1): 45-53.
- [16] 孙月娥, 吕丹娜, 王卫东, 等. 美拉德反应对大蒜抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 119-123.
- [17] KIM J S, KANG O J, GWEON O C. Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps[J]. Journal of functional foods, 2013: 80-86.
- [18] 王玉荣, 曲田丽, 高敏, 等. 黑蒜的简易制备及其抗氧化活性的测定[J]. 食品科技, 2014, 39(1): 268-271, 276.
- [19] 钟成, 徐国娟, 吴晓英, 等. 保压时间对黑蒜部分营养成分和抗氧化作用的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(3): 49-52, 136.