

超滤对大蒜中蒜氨酸和大蒜多糖的分离效果研究

张民, 雷娜, 陈倩娟, 朱体政, 幸福

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 研究了超滤对大蒜中蒜氨酸和大蒜多糖的分离效果。通过高效液相凝胶色谱测定了大蒜中糖类物质的分子量分布, 根据检测结果选择合适的超滤膜; 分别研究了料液浓度、压力、加水量、中空纤维膜组件的污染和清洗方法对超滤效果的影响。结果表明, 大蒜的糖类物质中 M_n 大于 4880 Da 的占 95% 以上, 截留分子量为 4000 Da 的中空纤维膜组件对蒜氨酸和大蒜多糖分离的最佳条件为: 蒜氨酸浓度 2.003 mg/mL, 压力 68.9 kPa, 加水量 1.5 倍, 该条件下蒜氨酸通过率为 81.7%, 大蒜中糖类物质的通过率为 19.9%; 使用后的滤膜对蒜氨酸的通过率为 16.8%, 仅为原通过率的 20.6%; 采用蒸馏水清洗滤膜后, 蒜氨酸通过率提高到 56.6%, 恢复为原通过率的 69.3%; 采用蒸馏水和 NaOH 溶液混合清洗滤膜后, 蒜氨酸通过率提高到 79.5%, 恢复为原通过率的 97.3%。

关键词: 蒜氨酸; 多糖; 超滤; 分离

中图分类号: TS202.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-2513(2011)01-0137-04

Separation of alliin and polysaccharides in garlic by ultrafiltration

ZHANG Min, LEI Na, CHEN Qian-juan, ZHU Ti-zheng, XING Fu

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457)

Abstract The separation effects of ultrafiltration on alliin and polysaccharides in garlic were studied. The molecular weight distribution of garlic carbohydrates was detected by HPLC and ultrafiltration membrane was selected according to HPLC results. The influence of feed concentration, pressure, water addition, the pollution situation and cleaning method of the filter on the separation effects were explored. The results showed that M_n of 95% carbohydrates in garlic was higher than 4880 Da. The optimum parameters of ultrafiltration membrane with 4000 MWCO (Molecular Weight Cut-off) on separation were as follows: 2.003 mg/mL of alliin, 68.9 kPa and 1.5 times of water. With these parameters, the passing rate of alliin and polysaccharides were 81.7% and 19.9%, respectively. The alliin passing rate by the ultrafiltration membrane was 16.8%, only reached 20.6% of its original. After the contaminated ultrafiltration membrane cleaned by distilled water, the passing rate of alliin was 56.6%, up to 69.3% of the original. Furthermore, when the membrane being cleaned with distilled water and sodium hydroxide solution, the passing rate of alliin was 79.5%, which restored it to 97.3% of the original.

Key words alliin; polysaccharide; ultrafiltration; separation

收稿日期: 2010-11-16

经费来源: 十一五国家科技支撑计划重点项目子课题 (2006BAD27B03)。

作者简介: 张民 (1972-), 男 (汉族), 博士, 副教授, 研究方向: 食品化学与保健食品。

蒜氨酸 (蒜碱, S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷, S-Allyl-L-cysteinesulfoxide, allin) 的分子式为 $C_6H_{11}O_3SN$, 相对分子量为 177.22, 熔点为 $163.5^{\circ}C$, 主要存在于大蒜鳞茎的细胞中^[1]。蒜氨酸是完整、未受损大蒜里面含量最丰富的有机硫化物。当细胞受损时, 蒜氨酸和存在于大蒜中不同部位的蒜氨酸酶接触即被转化为蒜辣素, 此物质非常不稳定, 迅速降解为相关的有机硫化物^[2-3]。由于蒜氨酸具有多种生物活性, 因而成为近年来的研究热点。除蒜氨酸外, 大蒜中还含有大量的糖类, 是蒜氨酸纯化的主要影响物质。文中研究了超滤对蒜氨酸和大蒜多糖的分离效果, 为蒜氨酸的高效纯化提供一种可行的技术方法。

1 材料与方法

1.1 主要原料与试剂

大蒜: 山东杂交蒜, 山东一品农产集团提供; 蒜氨酸标准品: 美国 Fluka, $\geq 90\%$; 甲醇: 天津市康科德科技有限公司, 色谱纯; 三重蒸馏水: 自制; 硅藻土: 天津市大茂化学试剂厂, 化学纯。

1.2 主要仪器

超滤机: Cole-Palmer Instrument Company; 中空纤维膜组件: 天津爱生膜过滤技术有限公司; 高效液相色谱仪: 美国兰博公司; 高效液相色谱系统 (LC-20AT): 日本岛津公司; 高效液相示差折光检测器 (RLO-10Z): 日本岛津公司; 高效液相色谱柱 (Shodex SB-804HQ): 日本岛津公司; CJ-5002A 型榨汁机: 佛山市德区亿龙电器科技有限公司; 电热恒温水浴锅: 北京市长风仪器仪表公司; 多管架自动平衡离心机: 长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大蒜液的制备

称取去皮的新鲜大蒜 400g, 加 2000mL 的蒸馏水, $100^{\circ}C$ 水浴加热灭酶 40min, 快速冷却, 打浆, 静置 30min, 加硅藻土离心, 取上清液过滤, 备用。

1.3.2 超滤膜的选择

采用高效液相色谱法^[4]检测大蒜多糖的分子

量分布, 根据检测结果选择超滤膜。高效液相色谱条件为: Shodex SB-804HQ 色谱柱; 柱温 $30^{\circ}C$; 检测池温度 $30^{\circ}C$; 以三蒸水为流动相; 流速 $0.8mL/min$; 示差折光检测器检测。

1.3.3 蒜氨酸浓度对超滤效果的影响

一次超滤: 蒜氨酸溶液的浓度分别调为 $4.000mg/mL$ 、 $2.003mg/mL$ 和 $1.333mg/mL$, 各取 500mL 在 $68.9kPa$ 条件下对大蒜液进行超滤, 当浓缩倍数为 2 倍时, 停止超滤, 通过高效液相色谱法^[5]测定蒜氨酸通过率, 糖通过率采用苯酚-硫酸法^[6]测定。

二次超滤: 在压力为 $68.9kPa$ 加水量为 0.5 倍条件下分别对上述一次超滤截留液进行超滤, 当浓缩倍数为 2 倍时, 停止超滤, 高效液相色谱法测定蒜氨酸通过率, 苯酚-硫酸法测定糖通过率。

浓缩倍数是指物料总体积与截留液体积之比^[7]。

1.3.4 压力对超滤效果的影响

一次超滤: 将蒜氨酸溶液的浓度调为 $2.003mg/mL$, 取 500mL 分别在 $34.5kPa$ 、 $68.9kPa$ 和 $103.4kPa$ 条件下超滤, 当浓缩倍数为 2 倍时, 停止超滤, 高效液相色谱法测定蒜氨酸通过率, 苯酚-硫酸法测定糖通过率。

二次超滤: 在加水量为 0.5 倍条件下分别对上述一次超滤截留液进行超滤, 当浓缩倍数为 2 倍时, 停止超滤, 高效液相色谱法测定蒜氨酸通过率, 苯酚-硫酸法测定糖通过率。

1.3.5 加水量对超滤效果的影响

将蒜氨酸的浓度调为 $2.003mg/mL$, 取 500mL 在 $68.9kPa$ 条件下超滤至浓缩倍数为 2 倍 (一次超滤); 在一次超滤截留液中加入 0.5 倍的蒸馏水, $68.9kPa$ 条件下超滤至浓缩倍数为 2 倍 (二次超滤); 在二次超滤截留液中加入 0.5 倍的蒸馏水, $68.9kPa$ 条件下超滤至浓缩倍数为 2 倍 (三次超滤); 在三次超滤截留液中加入 0.5 倍的蒸馏水, $68.9kPa$ 条件下超滤至浓缩倍数为 2 倍 (四次超滤), 分别测定各级超滤的蒜氨酸通过率和糖通过率。

1.3.6 中空纤维膜组件的污染测定

按 1.3.5 的方法超滤 500mL 大蒜液后, 再次取 500mL 大蒜液按 1.3.5 的方法连续操作, 测定

蒜氨酸和糖的通过率。

1.3.7 中空纤维膜组件的清洗方法研究

蒸馏水清洗效果研究: 按 1.3.5 的方法超滤完 500mL 大蒜液后, 用蒸馏水对膜组件进行正向和反向冲洗 60m in 取 500mL 大蒜液按 1.3.5 的方法操作, 测定蒜氨酸和糖的通过率;

蒸馏水 - NaOH 溶液 - 蒸馏水混合清洗效果研究: 首先用蒸馏水对膜组件进行正向和反向冲洗, 至废液中不再有混浊物出现, 再用 pH 为 10 的 NaOH 溶液进行正向和反向冲洗, 至中空膜组件的内外流出液 pH 与 NaOH 溶液 pH 一致时继续清洗 10m in 最后改用蒸馏水清洗, 至中空膜组件内外流出液的 pH 达到中性时止, 共清洗 60m in 取 500mL 大蒜液按 1.3.5 的方法连续操作, 测定蒜氨酸和糖的通过率。

2 结果与讨论

2.1 大蒜多糖分子量的测定和超滤膜的选择

采用高效液相色谱法对大蒜多糖分子量进行了测定, 结果见表 1。

从表 1 可知, 大蒜液中数均分子量大于 4880 的大蒜多糖占 95% 以上。因此, 选择截留分子量为 4000 的超滤膜进行超滤条件的研究。

表 1 大蒜多糖分子量分布结果

总计	数均 (Mn)	重均 (Mw)	Mw / Mn	%
1	5073107	23710808	4.67382	25.7028
2	1408206	1445416	1.02642	4.5016
3	741476	767928	1.03568	3.6178
4	237745	261452	1.09972	5.5555
5	90631	94069	1.03794	1.4923
6	4880	10077	2.06506	54.761
7	264	331	1.25268	2.9786
8	45	52	1.14728	0.9329
9	1	1	1.42821	0.2419
10	0	0	1.4315	0.2156

2.2 超滤条件研究结果

表 2 为 500mL 不同浓度的大蒜液在 68.9kPa 条件下的超滤情况。通过表中数据可知一次超滤时, 浓度为 2.003mg/mL 的蒜氨酸溶液通过率最大, 糖通过率最低, 超滤时间居中, 当浓度增大时, 超滤时间加长, 通过率也大大降低, 糖通过率确有所增加, 可能是由于大蒜液中大蒜多糖浓度随之增加导致滤膜堵塞造成; 二次超滤时, 初始浓度为 2.003mg/mL 的蒜氨酸溶液通过率最大, 超滤时间也最短。

表 2 蒜氨酸浓度对超滤效果的影响

蒜氨酸浓度 (mg/mL)		4.000	2.003	1.333
一次超滤	超滤通过时间 (m in)	180	125	55
	蒜氨酸通过率 (%)	2.8	24.7	21.7
	多糖通过率 (%)	11.6	10.5	15.8
二次超滤	超滤通过时间 (m in)	122	21	58
	蒜氨酸通过率 (%)	32.3	43.9	36.2
	多糖通过率 (%)	15.6	15.4	17.8
总超滤时间 (m in)		302	146	113
蒜氨酸总通过率 (%)		35.1	68.6	57.9
多糖总通过率 (%)		27.2	25.9	33.6

表 3 为蒜氨酸浓度为 2.003mg/mL 的 500mL 大蒜液在不同压力下的超滤效果, 从表中数据可

知一次超滤时压力为 68.9kPa 的超滤蒜氨酸通过率最大, 糖通过率居中。当压力为 103.4kPa 时,

超滤时间虽然最短,但通过率最小,可能是压力太大易导致滤膜堵塞的原因,压力为 34.5kPa时,

超滤时间则最长;二次超滤时压力为 68.9kPa的蒜氨酸通过率最大,超滤效果最好。

表 3 压力对超滤效果的影响

压力 (kPa)	34.5	68.9	103.4
一次超滤			
超滤通过时间 (min)	189	125	31
蒜氨酸通过率 (%)	20.6	24.7	15.7
糖通过率 (%)	7.6	10.5	12.4
二次超滤			
超滤通过时间 (min)	132	21	44
蒜氨酸通过率 (%)	30.3	43.9	23.7
糖通过率 (%)	10.9	15.4	16.3
总超滤时间 (min)	321	146	75
蒜氨酸总通过率 (%)	50.9	68.6	39.4
多糖总通过率 (%)	18.5	25.9	28.7

表 4 为蒜氨酸浓度为 2.003mg/mL 的 500mL 大蒜液在 68.9kPa 条件下,加水量对其超滤效果的影响。从表中可知,当加水量为 1.5 倍时,蒜

氨酸通过率可达 81.7%,糖通过率为 19.9%,为了减小后续实验负担,减少蒜氨酸损失,将加水量定为 1.5 倍。

表 4 加水量对超滤效果的影响

加水量 (倍)	蒜氨酸通过率 (%)	糖通过滤 (%)	通过时间 (min)
0 (一次超滤)	32.6	10.5	112
0.5 (二次超滤)	32.4	6.2	46
0.5 (三次超滤)	9.6	1.9	91
0.5 (四次超滤)	7.1	1.3	58
总计	1.5	81.7	19.9

表 5 为清洗方式对蒜氨酸通过率的影响。在使用完超滤膜后,不经任何清洗直接再次使用,蒜氨酸的通过率是 16.8%,仅为原通过率的 20.6%,说明大蒜中多糖分子和其它一些杂质的附着造成膜的堵塞,导致蒜氨酸通过率明显下

降;采用蒸馏水清洗后,蒜氨酸通过率提高到 56.6%,恢复为原通过率的 69.3%,说明该清洗方法对清除膜表面的附着层杂质有一定的效果;采用混合清洗的方法对膜组件进行清洗后,蒜氨酸通过率为 79.5%,恢复为原通过率的 97.3%。

表 5 清洗方式对超滤效果的影响

清洗方式	蒜氨酸通过率 (%) (原通过率的百分比 %)	糖通过滤 (%) (原通过率的百分比 %)	通过时间 (min)
不经清洗	16.8 (20.6)	3.9 (19.6)	519
蒸馏水清洗	56.6 (69.3)	14.1 (70.9)	423
蒸馏水 /NaOH 溶液混合清洗	79.5 (97.3)	19.2 (96.5)	312

(下转第 159 页)

空干燥得到精制的黄白色多糖 20.73g 其含量测定按 2.2.3 方法进行, 结果表明番石榴叶多糖含量为 95.64%。

5 结果与讨论

(1) 本研究通过正交试验法, 通过考察水浴提取法的时间, 温度, 物料比等因素, 优选出了水浴法从番石榴叶中提取多糖的最佳工艺, 即按 1:30 的料水比进行萃取, 在 80℃ 恒温下 3h 提取, 重复 3 次。

(2) 本研究采用 Diaion HP-20 大孔吸附树脂吸附法以及醇沉法对所提取的粗多糖进行了进一步的纯化。考察了 Diaion HP-20 大孔树脂对番石榴叶多糖的纯化能力。

最后通过苯酚-硫酸法对所得的多糖进行含量测定。结果表明 Diaion HP-20 大孔树脂对番石榴叶粗多糖的吸附量为 50g/L, 能够有效分离纯化番石榴叶粗多糖, 醇沉法以及 Diaion HP-20 大孔吸附树脂吸附法相结合的纯化过程对番石榴叶多糖分离纯化效果良好, 该方法回收率高, 能够得到纯度为 95.64% 的多糖化合物。

参考文献:

- [1] 韦巍, 李雪华. 多糖的研究进展 [J]. 国外医学药学分册, 2005, 32 (3): 179-184
- [2] 吴翠云, 汪河滨, 李万福, 白红进. 黑果枸杞叶片重多糖提取研究 [J]. 食品科学与开发, 2009, 30 (12): 1-4
- [3] 张晓静, 刘会东. 植物多糖提取分离及药理作用的研究进展 [J]. 时针国医国药, 2003, 14 (8): 495.
- [4] 陈继培. 番石榴的药用价值 [J]. 药膳食疗, 2005, 5: 32
- [5] liang Q, Qian H, Yao W. Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection [J]. Journal European of mass spectrometry, 2005, 11: 93-101
- [6] Qian H, Nhorimbere V. Antioxidant power of phytochemicals from psidium guajava leaf [J]. Journal of science, 2004, 5: 675-683.
- [7] 戈延茹, 曹恒杰, 张晓兰, 卞炯, 等. 桑黄多糖的提取工艺 [J]. 食品科学与开发, 2009, 3 (12): 57-60.
- [8] 王莉, 鲁建江, 刘志勇. 微波辅助提取红景天多糖及含量测定的研究 [J]. 中国药理学, 2002, 20 (2): 227-253
- [9] sevag M G, lackan D B, Smolens J. The isolation of the components of streptococcal nucleoprotein in serologically active form [J]. Journal of biological chemistry, 1938, 124: 425-436
- [10] 刘光海. 金银花多糖的提取与精制及含量测定 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29 (11): 33-34.

(上接第 140 页)

3 结论

大蒜液中数均分子量大于 4880 的大蒜多糖占 95% 以上。截留分子量为 4000 的超滤膜超滤的最佳工作条件为: 蒜氨酸浓度为 2.08mg/mL, 压力为 68.9kPa, 每 500mL 蒜液加水量为 1.5 倍, 循环超滤 4 次, 此条件下蒜氨酸通过率可达 81.7%, 多糖通过率为 19.9%。使用后的超滤膜, 蒜氨酸通过率降为 16.8%, 仅为原通过率的 20.6%; 采用蒸馏水-NaOH 溶液-蒸馏水混合清洗的方式清洗滤膜后, 蒜氨酸通过率提高到 79.5%, 恢复为原通过率的 97.3%。

参考文献:

- [1] 黄雪松, 宴日安. 利用新鲜大蒜生产结晶蒜氨酸 [J]. 食品科学, 2004, 25 (11): 200-203

- [2] IAmault JP, Christides N, Mandon et al. High performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, alliin and dipeptide precursor in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 991: 69-75.
- [3] Kil Sun Yoo, Leonard M Pike. Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in Allium species [J]. Scientia Horticulturae, 1998, 75: 1-10.
- [4] 张民, 秦培军, 陈倩娟. 大蒜多糖提取分离工艺及分子量分布研究 [J]. 食品与发酵工业, 2009, 35 (7): 160-163
- [5] 陈倩娟, 张民, 刘玉柱, 等. 蒜氨酸酶灭活方法研究 [J]. 食品科技, 2009, 34 (6): 228-231
- [6] 魏绍云, 齐慧玲, 王继伦, 等. 苯酚-硫酸法测定白及多糖 [J]. 天津化工, 2000 (3): 35-36
- [7] 魏雪生, 张志军, 李淑芳, 等. 灵芝水浸提液超滤条件的研究 [J]. 保鲜与加工, 2009, 53 (4): 45-48.