

蒜片加工液原液及发酵液主要化学成分分析

刘国伟,高园园,张龙平,任艳云,李印峰,张成刚,谭 贺,李思琦,朱春雨

(济宁市农业科学研究院,山东济宁 272031)

摘要:蒜片加工过程中产生大量废液,而大蒜中含有许多生物活性成分,为对其利用提供依据,通过气相色谱-质谱联用和液相色谱-质谱方法对蒜片加工原液和发酵液的化学成分进行分析。结果表明,蒜片加工原液中易挥发性功能性成分主要为二烯丙基二硫化物、2-乙烯基-4H-1,3-二噻烯等含硫化合物,发酵液中易挥发性成分主要为甲基-L-吡喃阿拉伯糖苷以及正丁酸、正戊酸等;蒜片加工原液中难挥发性成分主要为 γ -L-谷氨酰-S-(2-丙烯基)-L-半胱氨酸,发酵液中难挥发性成分主要为 illisimoid A 和 5'-(羟基磺酰氧基)茉莉酸。蒜片加工原液中易挥发和不易挥发成分可以作为提取有效活性物质的来源。

关键词:蒜片加工;原液;发酵液;易挥发性成分;难挥发性成分

中图分类号:S633.4

文献标志码:A

论文编号:cjas2020-0272

Main Chemical Components of Garlic Slice Processing Liquid and Fermentation Broth

LIU Guowei, GAO Yuanyuan, ZHANG Longping, REN Yanyun, LI Yinfeng, ZHANG Chenggang,

TAN He, LI Siqi, ZHU Chunyu

(Jining Institute of Agricultural Sciences, Jining 272031, Shandong, China)

Abstract: A large amount of waste liquid is produced in the processing of garlic slices. The research aims to provide a basis for the comprehensive utilization of this waste liquid which has lots of bioactive components. We analyzed the bioactive components of the processing liquid and the fermentation broth by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The results show that the processing liquid of garlic slices mainly contains volatile sulfur-containing compounds such as diallyl disulfide (DADS), 2-vinyl-4H-1,3-dithiene (vinylthiins) and so on. The volatile components in the fermentation broth include methyl-l-arabinopyranoside, butyric acid and pentanoic acid. The processing liquid of garlic slices contains non-volatile components, mainly γ -L-glutamyl-S-(2-propenyl)-L-cysteine, and illisimoid A and 5'-(hydroxysulfonyloxy) jasmonic acid are the main non-volatile components in the fermentation broth. The volatile and non-volatile components in the processing liquid of garlic slices can be used as the source of effective active substances.

Keywords: processing of garlic slices; processing liquid; fermentation broth; volatile components; non-volatile components

0 引言

大蒜含有的挥发性化合物和非挥发性化合物具有

许多杀菌、消炎、抗癌的功能性成分^[1-2]。蒜片加工过程中,需要注入大量水冲洗加工刀片以保证加工产品不

基金项目:财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助(CARS-24-G-11);2020年山东省农业良种工程项目“优质专用鳞茎类蔬菜(葱姜蒜)突破性新品种选育”子课题“优质专用大蒜突破性新品种选育”;2020年济宁市重点研发计划“优质高产专用大蒜种质资源创新研究与利用”;第二届济宁市现代农业产业发展大蒜创新团队。

第一作者简介:刘国伟,男,1979年出生,山东济宁人,高级农艺师,硕士研究生,研究方向:大蒜育种与栽培学。通信地址:272031 山东省济宁市济岱路9号 济宁市农科院, Tel:0537-2036916, E-mail:lgw_8303@163.com。

通讯作者:任艳云,女,1970年出生,山西沁县人,研究员,博士研究生,研究方向:蔬菜育种与生态高效栽培。通信地址:272031 山东省济宁市济岱路9号 济宁市农科院, Tel:0537-2036916, E-mail:renyanyun@126.com。

收稿日期:2020-12-15,修回日期:2021-08-03。

与刀片粘连,同时在脱水过程中要排出加工液,加工废液中含有大量大蒜水溶性功能成分,为一种高浓度有机废水,COD值很高,极易产生硫化物等刺激性气体,同时造成水生生物死亡,污染环境^[3]。国内外已有较多对蒜片加工废液处理的研究方案,但对于其功能性化学成分分析、资源再次利用的研究较少^[4-5]。笔者利用GC-MC(气相色谱-质谱联用)和UPLC-Triple-TOF/MS(高效液相色谱-电喷雾质谱联用)技术对蒜片加工原液(未经处理的蒜片加工废液)和发酵液(蒜片加工原液在密闭罐中接入酵母菌发酵60天)的挥发性和非挥发性主要功能性成分进行分析,旨在为其资源利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

本研究于2017—2018年在山东省金乡县济宁市农科院大蒜试验基地和济宁市农业科学研究院进行。

1.2 试验材料与仪器

1.2.1 试验材料 蒜片加工废液原液和发酵液由金乡县大蒜种植加工基地提供。

1.2.2 主要仪器 GC-MS 气相色谱-质谱联用仪(美国Agilent公司); UPLC- Triple- TOF/MS 系统包含Acquity™ ultra型高效液相色谱仪(美国Waters公司)、Triple TOF 5600+型飞行时间质谱,配有电喷雾离子源(美国AB SCIEX公司);Eppendorf minispan离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2.3 气相色谱-质谱试验处理及条件 各取原液和发酵液样品10 mL,分别用10 mL乙醚萃取2次,分别合并滤液,并减压浓缩至剩余少量液体,液体分别转移至2 mL量瓶中,用乙醚稀释至刻度,摇匀,备用。

色谱柱Agilent HP-5MS,30 m×0.25 mm×0.25 μm,进样口温度270℃,1 mL/min恒流(He),分流比(20:1),升温程序,50℃保持4 min,10℃/min升至300℃,保持10 min。MS检测器温度280℃,扫描范围m/z(质谱扫

表1 梯度洗脱程序

时间/min	A.0.1%甲酸水溶液/%	B.0.1%甲酸乙腈/%
0	95	5
2	95	5
25	50	50
35	5	95
37	5	95
40	95	5

描中质子数与电荷数的比值)30~550。

1.2.4 液相色谱-质谱试验处理及条件 原液和发酵液各取2 mL,10000 r/min离心20 min,取上清液用于测试。流动相A为0.1%甲酸水溶液,B为0.1%甲酸乙腈,流速0.8 mL/min,检测波长254 nm。色谱柱安捷伦ZORBAX-SB C₁₈(100 mm×4.6 mm i.d.,1.8 μm),进样量5 μL,柱温箱30℃。表1为流动相为0.1%甲酸水溶液和0.1%甲酸乙腈2种不同极性的溶剂,通过改变流动相中各溶剂组成的比例改变流动相的极性,使每个流出的组分都有合适的容量因子k,从而使样品中的所有组分可在最短时间内实现最佳分离。

UPLC-Triple-TOF 5600+飞行时间液质联用仪:负离子扫描模式,扫描范围m/z 100~1500,雾化气(GS1)50 psi,雾化气(GS2)50 psi,气帘气(CUR)35 psi,离子源温度(TEM)550℃,离子源电压(IS)-4500 V,一级扫描去簇电压(DP)100 V、聚焦电压(CE)10 V;二级扫描使用TOF MS~ Product Ion~ IDA模式采集质谱数据,CID能量为-20、-40、-60 V,进样前用CDS泵做质量轴校正,使质量轴误差小于0.0002%。

2 结果与分析

2.1 蒜片加工原液和发酵液易挥发性成分分析

对蒜片加工原液和发酵液的易挥发性成分在HP-5色谱柱上进行GC-MS测定,得到原液和发酵液的气质色谱图,见图1~2。

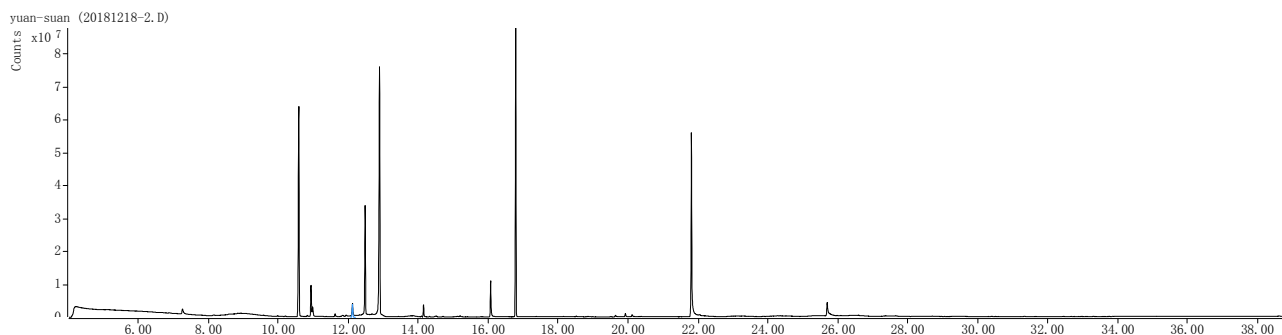


图1 蒜片加工原液气质色谱图

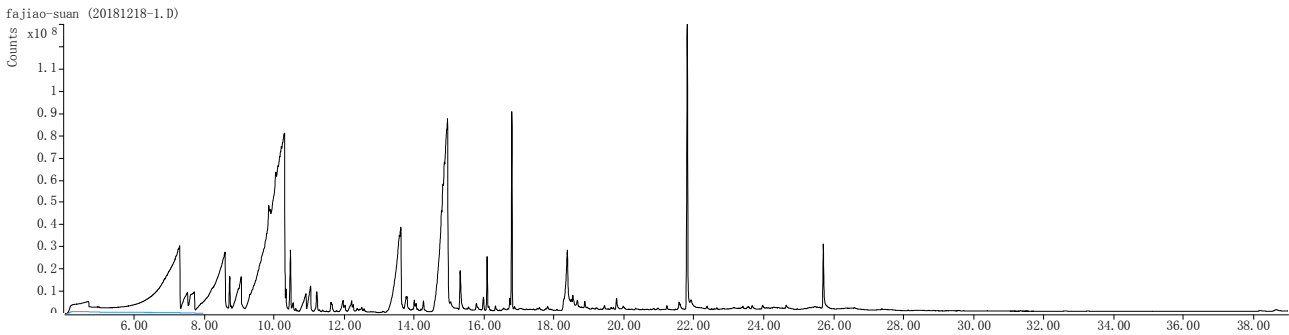


图2 蒜片加工发酵液气质色谱图

原液中共检测到易挥发性成分 54 种,包括含硫化物(17 种)、芳香类化合物(14 种)、烃类化合物(7 种)、酯类化合物(5 种)、酸类化合物(2 种)、醇类化合物(2 种)、酮类化合物(1 种)、酚类化合物(1 种)、其他化合物(5 种)。定量分析使用 Hewlett-Parkard 软件按面积归一化法计算各组分相对百分含量,根据计算出的相对含量进行排序,相对含量较大的化合物(表 2)为二烯丙基二硫化物、2-乙烯基-4*H*-1,3-二噻烯、2,6-二叔丁基对甲酚、邻苯二甲酸二丁酯、4-甲基-2,4-双(对羟基苯基)戊-1-烯。其中二烯丙基二硫化物、2-乙烯基-4*H*-1,3-二噻烯为具有生物活性的二硫化物,在蒜片加工原液中含量较多。

发酵液中共检测到易挥发性成分 122 种,包括酸类化合物(37 种)、酯类化合物(16 种)、芳香类化合物(11 种)、醇类化合物(10 种)、含硫化物(8 种)、酮类化合物(8 种)、酚类化合物(7 种)、烃类化合物(6 种)、醚类化合物(2 种)、醛类化合物(1 种)、其他化合物(16 种)。定量分析使用 Hewlett-Parkard 软件按面积归一化法计算各组分相对百分含量,根据计算出的相对含

量进行排序,相对含量较大的化合物(表 2)为正丁酸、正戊酸、甲基-*L*-吡喃阿拉伯糖苷、环丁基己基酯、苯乙酸、氢化肉桂酸、邻苯二甲酸二丁酯。

2.2 蒜片加工原液和发酵液难挥发性成分分析

经 UPLC-Q-TOF-MS 分析,得到原液和发酵液总离子流图(图 3~4),根据质谱提供化合物信息以及相关的文献数据,共鉴定出 4 种主要化合物结构,其中原液 2 种、发酵液 2 种。

2.2.1 蒜片加工原液难挥发主要化学成分分析

(1)化合物 1 解析。该化合物的出峰时间为 7.099 min (被分离样品组分从进样开始到柱后出现该组分浓度极大值时的时间), $[M-H]^-$ 为 m/z 289.0857,根据高分辨质谱结果拟合的分子式为 $C_{11}H_{18}N_2O_5S$,根据二级质谱 171、153、128、73(质谱扫描中质子数与电荷数的比值)等氨基酸类化合物的特征离子,通过 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索和推测该化合物为 γ -*L*-谷氨酰-S-(2-丙烯基)-*L*-半胱氨酸 [γ -*L*-glutamyl-S-(2-propenyl)-*L*-cysteine]。

(2)化合物 2 解析。该化合物的出峰时间为 9.583 min,

表 2 蒜片加工原液及发酵液主要可挥发性化学成分及其相对含量

分类	序号	化合物	分子式	相对含量/%
蒜片加工原液	1	二烯丙基二硫化物	$C_6H_{10}S_2$	10.01
	2	2-乙烯基-4 <i>H</i> -1,3-二噻烯	$C_6H_8S_2$	16.16
	3	2,6-二叔丁基对甲酚	$C_{15}H_{24}O$	16.46
	4	邻苯二甲酸二丁酯	$C_{16}H_{22}O_4$	28.29
	5	4-甲基-2,4-双(对羟基苯基)戊-1-烯	$C_{24}H_{36}O_2Si_2$	13.21
蒜片加工发酵液	1	正丁酸	$C_4H_8O_2$	16.79
	2	正戊酸	$C_5H_{10}O_2$	10.71
	3	甲基- <i>L</i> -吡喃阿拉伯糖苷	$C_6H_{12}O_5$	35.46
	4	环丁基己基酯	$C_{12}H_{20}O_4$	5.89
	5	苯乙酸	$C_8H_8O_2$	5.87
	6	氢化肉桂酸	$C_9H_{10}O_2$	4.82
	7	邻苯二甲酸二丁酯	$C_{16}H_{22}O_4$	6.57

BPC from YUAN-SUAN-NEG.wiff (sample 1) - Sample002, Experiment 1, -TOF MS (100 - 2000)

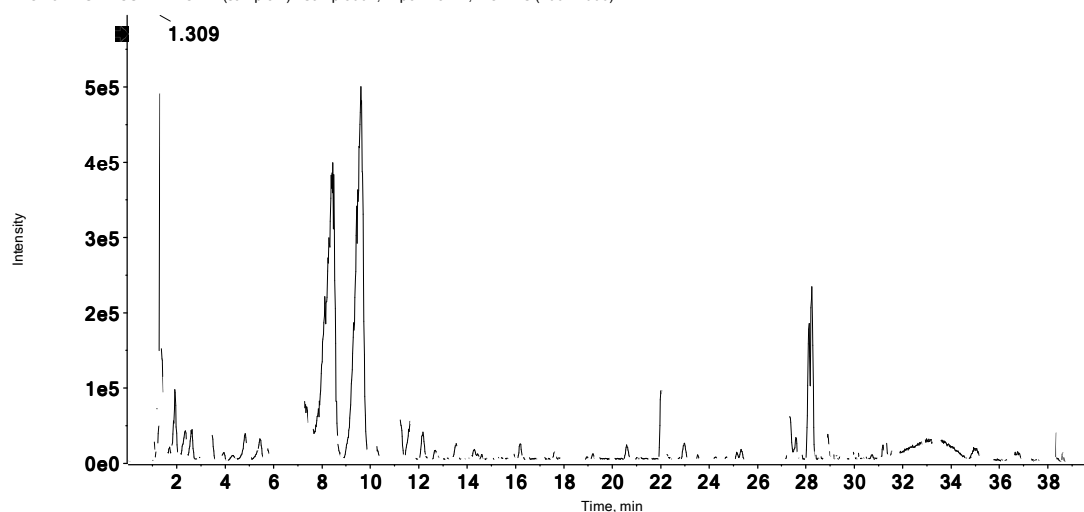


图3 蒜片加工原液液质色谱图

BPC from FAJIAO-SUAN-NEG.wiff (sample 1) - Sample001, Experiment 1, -TOF MS (100 - 2000)

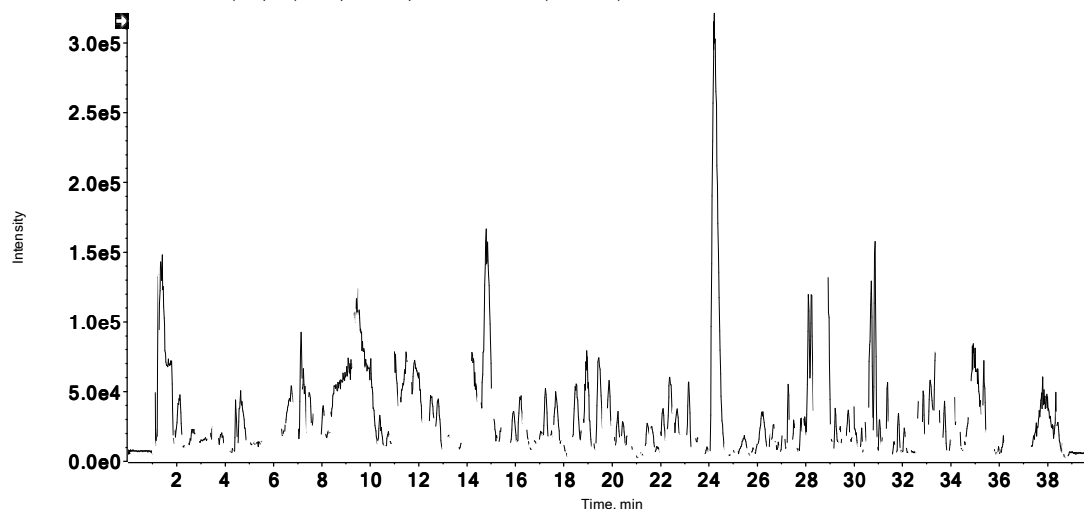


图4 蒜片加工发酵液液质色谱图

[M-H]⁻为m/z293.1137,根据高分辨质谱结果拟合的分子式为C₁₄H₁₈N₂O₅,根据二级质谱164、147(质谱扫描中质子数与电荷数的比值)等氨基酸类化合物的特征离子,通过Scifinder和Reaxy数据库检索和推测该化合物为L-g-谷氨酰-L-苯丙氨酸(L-g-Glutamyl-L-phenylalanine)。

2.2.2 蒜片加工发酵液难挥发主要化学成分分析

(1)化合物1解析。该化合物的出峰时间为14.48 min, [M-H]⁻为m/z 253.0724,根据高分辨质谱结果拟合的分子式为C₁₂H₁₄O₆,根据二级质谱121、105、77(质谱扫描中质子数与电荷数的比值)等酚酸类化合物的特征离子,通过Scifinder和Reaxy数据库检索和推测该化合物为illisimoid A。

(2)化合物2解析。该化合物的出峰时间为

24.211 min, [M-H]⁻为m/z 305.0699,根据高分辨质谱结果拟合的分子式为C₁₂H₁₈O₇S,根据二级质谱79.9、225、210(质谱扫描中质子数与电荷数的比值)等磺酸酯类化合物的特征离子,通过Scifinder和Reaxy数据库检索和推测该化合物为5'-(羟基磺酰氧基)茉莉酸[5'-(hydroxysulphonyloxy)jasmonic acid]。

3 蒜片加工原液和发酵液对蔬菜病害的影响

根据前人研究,大蒜中含有较多抑菌、杀菌的活性成分,基于此,于2019年在金乡县济宁市农科院大蒜试验基地,采用本研究中蒜片加工原液和发酵液兑水稀释成100倍液,于大白菜幼苗期、莲座期、结球期,胡萝卜幼苗期、叶生长盛期和肉质根生长期,芥菜幼苗期、叶生长盛期和抽薹期每隔10~15天喷施于作物根部周边土壤,对照为常规井水灌溉、不施农药处理。于

大白菜结球后期、胡萝卜肉质根生长期和芥菜抽薹期调查病害的病株率。

由表3可知,与对照相比,蒜片加工原液能够显著降低大白菜软腐病、霜霉病,胡萝卜和芥菜软腐病的病株率,表明蒜片加工原液能够显著抑制大白菜、胡萝卜和芥菜真菌病害的发病率,而蒜片加工发酵液与对照之间差异不显著,表明发酵液中不含有或含有较少抑制十字花科蔬菜真菌病害病原菌的成分。

表3 蒜片加工原液和发酵液对十字花科蔬菜主要病害的影响 %

处理	大白菜		胡萝卜		芥菜	
	软腐病病株率	霜霉病病株率	软腐病病株率	黑斑病病株率	软腐病病株率	黑腐病病株率
原液	2.88b	0.82b	0.52b	0	1.45b	0
发酵液	10.26a	7.95a	2.17a	0	7.19a	0
CK	11.54a	5.13a	3.74a	0	9.26a	0

注:数据后不同小写字母分别表示差异达0.05显著水平。

等,而蒜片加工液对以上部分菌种具有杀灭作用,处理起来较为棘手。据报道,现已有用厌氧折流板反应器-曝气生物滤池组合工艺来处理蒜片加工废水等方法^[6]。

蒜片废液内有机物质来源于大蒜,大蒜富含各种有机物质,因而挖掘利用大量蒜片加工废液中的有用物质对于保护环境、变废为宝等都具有重要意义。

本研究表明,蒜片加工原液中种类较多的易挥发性化合物为含硫化合物,其中含量较多的二烯丙基二硫化物、2-乙基-4*H*-1,3-二噻烯为具有生物活性的二硫化物,其在大蒜中含量同样较多,据研究,天然有机硫化物对动物体内的致癌物质有防御作用,抗癌作用主要依赖于烯丙基和巯基团,抗癌作用随着硫原子数目的增加而增强。基于此,蒜片加工产生的大量原液可以作为大蒜鳞茎提取含硫化合物等生物活性物质的代替品,这对于减少环境污染、变废为宝等具有重要意义。

蒜片加工发酵液中易挥发性成分主要为甲基-*L*-吡喃阿拉伯糖苷以及正丁酸、正戊酸等酸类物质,多为化工用品原料或中间物质。

4.2 蒜片加工原液和发酵液中难挥发性成分分析

经检测, γ -*L*-谷氨酰-S-(2-丙烯基)-*L*-半胱氨酸(GSAC)在蒜片加工原液中含量较多,GSAC是大蒜中含量较多的非挥发性二肽化合物,是合成大蒜素等功能性成分的主要底物^[7-14],没有大蒜的强烈刺激气味,且水溶性好,易于加工。相关学者研究证实,GSAC是大蒜中的一种活性成分,能够抑制肝纤维化,GSAC在

4 结论

4.1 蒜片加工原液和发酵液中易挥发性成分分析

蒜片加工形成的废水为富含COD和有机硫化物的有机废水,没有有毒物质,但是直接排入其他水源中会消耗水中大量的溶解氧,造成水源中的氧气迅速消耗,水生生物缺氧,同时硫化物发酵产生臭气,形成水体污染。由于蒜片加工液中含有大量的灭菌物质,其他废液处理中常有硝化细菌、反硝化细菌、芽孢杆菌

体外能够抑制肝星状细胞增殖,对肝形状细胞具有抑制作用^[15-18]。

蒜片加工发酵液中难挥发性成分主要为酚酸类化合物 illisimoid A 以及 5'-(羟基磺酰氧基)茉莉酸,其中 illisimoid 经研究为一种神经保护天然物资,对 SH-SY5Y 细胞中氧葡萄糖剥夺诱导的细胞损伤起到神经保护作用,相关学者已在八角茴香果实中分离得到。

5 讨论

研究证实,大蒜鳞茎的浸提物活性成分主要为二烯丙基二硫化物(DADS)、二烯丙基三硫化物(DATS)、二甲基二硫醚(DMDS)等有机硫化物。有机硫化物具有较强的抗菌消炎作用,是当前发现的天然植物中抗菌作用最强的一种,对多种真菌、杆菌、球菌、病毒、阴性细菌及革兰氏阳性菌等有明显抑制和杀灭作用。蒜片加工原液中富含二烯丙基二硫化物、2-乙基-4*H*-1,3-二噻烯等为具有生物活性的二硫化物,可以作为提取相应生物活性物质的基础来源。

程智慧等^[19]研究发现大蒜鳞茎粗提物对黄瓜枯萎病菌具有抑制作用。祁高展等^[20]研究发现大蒜鳞茎浸提液中活性成分二烯丙基三硫化物和二甲基二硫醚对苹果炭疽病菌丝生长和孢子萌发均具有抑制活性,在质量浓度为200 mg/mL时其对病原物菌丝生长和孢子萌发的抑制率均达到100%。其他学者也有相关研究证实大蒜提取物黄瓜、番茄、辣椒等病害具有抑制作用^[21-27]。笔者采用蒜片加工废液稀释后随水浇灌多种十字花科蔬菜,初步研究表明,与对照普通灌溉相比,十字花科的真菌性病害显著减少,以往研究大多认为,

大蒜鳞茎产生的浸提液对蔬菜等作物病害具有抑制作用,本研究以蒜片加工液为原料,证实其同样对相关病害具有抑制作用,这为蒜片加工企业产生的大量废水处理提供了一条突破性的利用途径,但本研究结果的试验时间相对较短,还需要进一步验证。

参考文献

- [1] MARCHESE A, BARBIERIR, SANCHES- SILVA A, et al. Antifungal and antibacterial activities of allicin: a review[J]. Trends in food science & technology, 2016, 52: 49-56.
- [2] AMAGAS H, PETESCH B L, MATSUURA H, et al. Intake of garlic and its bioactive components[J]. The Journal of nutrition, 2001, 131(3): 955S-962S.
- [3] 吴洋, 夏梦颖, 汤鲁宏. 蒜片加工废水及其膜浓缩液的含硫挥发成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(1): 190-195.
- [4] 丁赫. 膜方法处理蒜片加工废水的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- [5] 李亚利. 大蒜皮化学成分及其提取物抗氧化活性研究[D]. 开封: 河南大学, 2015.
- [6] 宋卫国. 大蒜提取液有效成分抑菌活性及其作用机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2004.
- [7] 刘永忠, 龚千锋, 魏学新. 大蒜挥发油主要化学成分的药理作用研究进展[J]. 江西医学院学报, 1998, 10(1): 44-45.
- [8] 裘迪红, 董敏明, 张芝芬. 大蒜的抗菌作用及制品[J]. 食品研究与开发, 2001, 22(5): 20-21.
- [9] 宋卫国, 李宝聚, 刘开启. 大蒜化学成分及其抗菌活性机理研究进展[J]. 园艺学报, 2004, 31(2): 263-268.
- [10] 王建, 贾斌. 大蒜油中大蒜素等含硫化合物的气相色谱-质谱法测定[J]. 中国饲料, 2001, 23: 29.
- [11] 王晓玲, 温普红. 大蒜中大蒜辣素含量的测定[J]. 宝鸡文理学院学报, 1999, 19(4): 23-25.
- [12] 席荣英, 张积霞. 大蒜油微量元素及抗菌活性测定[J]. 新乡医学院学报, 1999, 16(4): 301-302.
- [13] 于新蕊, 丛月珠. 大蒜的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 1994, 26(3): 158-160.
- [14] 葛保胜, 王秀道, 石滨. 药用大蒜提取物的超临界 CO₂ 萃取研究[J]. 中成药, 2002, 24(8): 571-573.
- [15] YOSHIDA H. An organosulfur compound isolated from oil-macerated garlic extract, and its antimicrobial effect[J]. Bioscience biotechnology and biochemistry, 1999, 63(3): 588-590.
- [16] KAMEL A, SALEH M. Recent studies on the chemistry and biological activities of the organosulfur compounds of garlic (*Allium sativum*). Studies in Natural Products Chemistry[J]. Bioactive natural products (Part D), 2000, 23: 455-485.
- [17] 张笔觅. γ -L-谷氨酰-S-烯丙基-L-半胱氨酸对肝星状细胞线粒体功能的影响[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(35): 220-222.
- [18] 朱兰香, 陈卫昌, 许春芳. 大蒜素对二甲基亚硝胺诱发的肝纤维化大鼠的保护作用[J]. 中草药, 2004, 35(12): 13842-13871.
- [19] 程智慧, 宋莉, 孟焕文. 大蒜鳞茎粗提物对黄瓜枯萎病的抑菌作用和防病效果[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(5): 113-118.
- [20] 祁高展. 大蒜鳞茎浸提液活性成分及对苹果炭疽病菌的抑制作用[J]. 河南农业大学学报, 2020, 54(1): 59-63.
- [21] 林辰壹, 郑成锐, 程智慧. 新疆吉木萨尔白皮蒜提取液对瓜类病原菌抑杀效应的研究[J]. 新疆农业大学学报, 2002, 25(2): 53-56.
- [22] 林辰壹, 程智慧. 大蒜提取液对食用菌的作用[J]. 广州微量元素科学, 1997, 24(4): 343-347.
- [23] 吴凤芝, 孟立君, 文景芝. 黄瓜根系分泌物对枯萎病菌菌丝生长的影响[J]. 中国蔬菜, 2002(5): 26-27.
- [24] 徐建华, 利荣千, 王建波. 黄瓜不同抗病品种感染镰刀菌枯萎病菌后几种酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1995, 25(3): 239-242.
- [25] 马惠玲, 弓弼, 漆录平, 等. 不同蒜素制剂对果实病原菌抑菌能力的研究[J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(3): 81-85.
- [26] 宋卫国, 李宝聚, 石延霞, 等. 大蒜提取物抑制番茄灰霉菌活性测定[J]. 中国蔬菜, 2013, 1(8): 21-22.
- [27] 廖静静, 刘屹湘, 杨敏, 等. 大蒜挥发物和浸提液对辣椒疫霉菌的抑菌活性分析[J]. 云南农业大学学报, 2014, 29(3): 337-345.