

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240301001

食醋中 γ -氨基丁酸的检测及变化规律研究

张芳^{1,2}, 耿思奕¹, 韩华凤¹, 刘嘉慧¹, 刘冠卉^{1*}, 郑博强^{2*}, 屠洁³

(1. 江苏科技大学粮食学院, 镇江 212100; 2. 广西农业职业技术大学食品药品研究院, 南宁 530007;
3. 江苏科技大学生物技术学院, 镇江 212100)

摘要: **目的** 建立快速准确检测高酸度食醋中 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)含量的方法。**方法** 建立高效液相色谱法检测食醋中 GABA 含量的方法并进行方法学验证, 通过检测不同原料、酿造方法、发酵阶段、贮藏时间的 32 种食醋样品, 分析 GABA 变化规律。**结果** 该方法在 0.01~1.00 mg/mL 范围内线性关系良好, R^2 为 0.9992, 精密度试验相对标准偏差小于 2.0%, 回收率在 96.4%~103.0% 之间, 精密度和准确性均符合方法学要求。不同原料食醋的 GABA 含量差异显著($P<0.05$), 谷物醋含量最高; 传统发酵工艺和菌种酿造的食醋 GABA 高于液体发酵、纯菌种发酵食醋($P<0.05$); 秋季醋 GABA 含量高于冬季醋($P<0.05$); 醋酸发酵阶段的 GABA 累积量高于酒精发酵($P<0.05$), 适当陈酿可提高产品中 GABA 含量; 商品醋中 GABA 的衰减符合一级动力学反应; 发芽糙米醋的 GABA 含量是未发芽糙米醋的 2.29 倍, 是精米醋的 4.73 倍。**结论** 所建立的检测方法 GABA 出峰时间为 12 min, 分离度大于 2, 可快速、准确分析食醋中 GABA。食醋中 GABA 含量与食醋原料、工艺、菌种、生产季节、贮藏时间等相关。以多种谷物或发芽谷物为原料, 采用传统固态发酵工艺, 秋季酿制, 并适当延长陈酿时间有利于食醋中 GABA 的生成。

关键词: γ -氨基丁酸; 醋; 高效液相色谱法; 变化规律

Study on detection and changing rules of γ -aminobutyric acid in vinegar

ZHANG Fang^{1,2}, GENG Si-Yi¹, HAN Hua-Feng¹, LIU Jia-Hui¹, LIU Guan-Hui^{1*},
ZHENG Bo-Qiang^{2*}, TU Jie³

(1. School of Grain Science and Technology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212100, China;
2. Institute of Food and Drug Research, Guangxi Vocational University of Agriculture, Nanning 530007, China;
3. School of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212100, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid and accurate method for detecting the content of γ -aminobutyric acid (GABA) in vinegar with high acidity. **Methods** A method for the determination of GABA in vinegar by high performance liquid chromatography was established and its methodology was verified. By detecting 32 kinds of vinegar samples with different raw materials, brewing methods, fermentation stages and storage time, the change law

基金项目: 苏州市农业科技创新项目(SNG2022029)、广西农业科技项目(Z202014)

Fund: Supported by the Suzhou Agricultural Science and Technology Innovation Project (SNG2022029), and the Guangxi Agricultural Science and Technology Project (Z202014)

*通信作者: 刘冠卉, 硕士, 副教授, 主要研究方向为粮食生物技术与功能性食品。E-mail: liuguanh@163.com

郑博强, 高级工程师, 主要研究方向为农产品精深加工。E-mail: 458870656@163.com

*Corresponding author: LIU Guan-Hui, Master, Associate Professor, Jiangsu University of Science and Technology, No.666, Changhui Road, Dantu District, Zhenjiang 212000, China. E-mail: liuguanh@163.com

ZHENG Bo-Qiang, Senior Engineer, Institute of Food and Drug Research, Guangxi Vocational University of Agriculture, Nanning 530007, China. E-mail: 458870656@163.com

of GABA was analyzed. **Results** The linear relationship of this method was good in the range of 0.01–1.00 mg/mL, R^2 was 0.9992, the precision test relative standard deviation was less than 2.0%, and the recovery rates were 96.4%–103.0%. The precision and accuracy met the requirements of methodology. The content of GABA in vinegar from different raw materials was significantly different ($P<0.05$), and the content of grain vinegar was the highest. GABA of vinegar brewed by traditional fermentation technology and strains was higher than that of vinegar fermented by liquid fermentation and pure strains ($P<0.05$). The content of GABA in autumn vinegar was higher than that in winter vinegar ($P<0.05$). The accumulation of GABA in acetic acid fermentation stage was higher than that in alcohol fermentation ($P<0.05$), and proper aging could increase the GABA content in the product. The attenuation of GABA in commercial vinegar accords with the first-order kinetic reaction; the GABA content of germinated brown rice vinegar was 2.29 times that of ungerminated brown rice vinegar and 4.73 times that of polished rice vinegar. **Conclusion** The establish detection method has a peak time of 12 min and a resolution greater than 2, and can be used for rapid and accurate analysis of GABA in vinegar. The GABA content of vinegar depends on raw material, process, fermentation strains, season of production and storage time. Using a variety of grains or germinated grains as raw materials, the use of traditional solid-state fermentation, autumn fermentation and an appropriate length of maturation are beneficial to the production of GABA in vinegar.

KEY WORDS: γ -aminobutyric acid; vinegar; high performance liquid chromatography; changing rules

0 引言

食醋是以粮食、水果或酒类为原料,经微生物发酵制成的酸性液体调味料。酿造原料、发酵菌种和酿造工艺决定了食醋中有机酸、氨基酸、无机盐以及多酚等其他有机物的种类与含量^[1-2]。随着消费者对健康生活的需求增长,食醋产品正从单纯的酸味调节剂逐渐向营养、保健产品升级^[3]。国内外对食醋中活性物质的研究主要集中在 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、多酚、川芎嗪等物质的富集以及生理功能验证方面^[4-6]。

GABA 是一种小分子量、非蛋白质氨基酸,它是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经递质^[7],具有改善睡眠、增强肝肾功能、辅助降血压和降血糖、抗焦虑、抗肿瘤等多种生理活性^[8-10],被广泛用于医药和保健食品中。GABA 的常用检测方法有 Berthelot 比色法^[11]、氨基酸分析仪法^[12]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[13]。比色法易受样品中色素、显色液稳定性及游离氨等干扰;氨基酸分析仪的价格与使用费用高、检测耗时长,难以在企业普及。HPLC 具有样品用量少、测量结果准确的特点,但不同研究对象的 pH、杂质不同,液相条件均有区别。此外,不同样品的预处理方法和衍生化方法也会影响测量的准确度和效率。因此,学者们对稻米^[14]、茶叶^[13]、豆类^[15]等食品采用了不同的衍生化和洗脱程序。测量数据的准确性对研究 GABA 生成与累积机制至关重要。

目前,关于食醋中 GABA 的研究主要集中在采用微生物发酵法和植物富集法合成 GABA 上。例如,赵天行等^[16]

用自行筛选的葡糖杆菌发酵蜜柑汁,制备了 GABA 含量为 182.3 mg/100 mL 的蜜柑醋;胡俊君等^[17]采用发芽苦荞制备了 GABA 含量为 234 mg/100 mL 的苦荞醋,均是利用微生物或植物体内的谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)将原料中的 *L*-谷氨酸催化脱羧生成 GABA。但关于食醋中 GABA 检测方法的研究尚未见报道,生产原料、发酵工艺及贮藏时间对食醋 GABA 含量的影响也需深入研究。因此,本研究旨在建立一套精准、快速的 HPLC 检测食醋中 GABA 含量的方法,通过检验各种食醋及不同酿造阶段的样品,分析 GABA 的变化规律。为食醋的品质评价提供数据支持,并为研发高 GABA 食醋产品奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验样品为 16 种市购醋: A1~16。3 种实验室自酿醋: 未发芽糙米醋、发芽糙米醋、粳米醋(菌种: 黄酒曲安琪酵母股份有限公司; 酿醋醋酸菌: 上海迪发酿造生物制品有限公司); 13 种醋厂提供的醋样: 发芽糙米醋(醋厂酿制)、桑果醋(液体发酵)、酒水、醃卤、有色生醋、醋罐底部沉淀、2 月酿造食醋、9 月酿造食醋、贮藏不同时间的食醋(标记为 B1~5); 酿造菌种为小曲和大曲; 南粳稻谷, 实验室垄谷、精米和糙米发芽。

GABA(纯度 $\geq 99\%$)、糖化酶(10 万 U/g)(上海源叶生物有限公司); 2,4-二硝基氟苯(2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB, 纯度 $\geq 98\%$, 上海麦克林生化科技有限公司); 乙腈(色谱级, 美国 Tedia 公司); 甲醇(色谱级)、无水碳酸钠、

碳酸氢钠、磷酸二氢钾、氢氧化钠、冰醋酸、乙酸钠(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司);四氢呋喃(纯度 $\geq 99.9\%$,安徽泽升科技有限公司安徽耐吉化学)。

1.2 仪器与设备

JHH-4 数显恒温水浴锅(金坛市可杰仪器厂);5804R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);EE28 型 pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Mettler PC 440 万分之一分析天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司];Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统、ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)(美国 Agilent 公司);JLG-IIA 砻谷机(中储粮成都储藏研究院有限公司);LTJM-160 稻谷精米机(上海青浦绿洲公司)。

1.3 方法

1.3.1 GABA 检测方法

样品衍生:因 GABA 对紫外吸收和电化学不灵敏,故采用衍生化方法进行测定。常用的衍生试剂有邻苯二甲醛(*o*-phthalaldehyde, OPA)、异硫氰酸苯酯(phenyl isothiocyanate, PITC)、丹磺酰氯^[18]、DNFB 等。其中,OPA 的衍生产物极不稳定会迅速分解,PITC 的毒性高、过量的 PITC 对色谱柱有害^[15],丹磺酰氯价格昂贵。DNFB 衍生产物稳定,是一种常用的检测氨基酸的衍生化试剂。故本研究采用 DNFB 作为衍生试剂。将样品 10000 r/min 离心 10 min 后,按照上清液:碳酸氢钠为 1:20 的体积比混合,取混合液 0.5 mL,加入 0.3 mL 的 DNFB,密封摇匀,60 $^{\circ}$ C 水浴暗反应 1 h 后,冷却至室温,再加入 0.5 mL pH 7.0 的磷酸二氢钾缓冲液,黑暗中放置 15 min,过 0.22 μ m 滤膜待用。

HPLC 条件:ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);波长 360 nm,进样量 5 μ L,流速 1 mL/min,柱温 35 $^{\circ}$ C。流动相 A:0.05 mol/L 的乙酸钠缓冲溶液(用体积分数 2%冰醋酸调 pH 为 5.7,四氢呋喃含量为 5%),流动相 B:80%乙腈;洗脱程序为:0~7 min, A:18%~25%;7~14 min, A:25%~27%;14~17 min, A:27%~100%;17~20 min, A:100%~18%。

1.3.2 酿醋工艺

实验室酿醋工艺^[19]:首先是酒精发酵,将米浸泡 15 h 后蒸煮 30 min,待自然冷却至 35 $^{\circ}$ C 左右时淋饭,然后按照 20 U/g 加入糖化酶,再按米重的 0.8% 加入黄酒曲,并搅拌均匀打散、保持 28 $^{\circ}$ C 发酵;其次是醋酸发酵,向酒醪中加入麸皮和醋酸菌菌剂(120 g 菌剂/100 kg 米),从第 3 d 开始翻醅直至测定总酸含量达到 3.5 g/100 mL 时封醅 7 d;最后为制醋汁,淋醋,套淋 3 次,并按照醋汁重量加糖 0.8%、盐 0.3%、炒米色 0.8%,得到成品;成品中总酸含量(以乙酸计)在 5 g/100 mL 以上。工厂酿醋工艺:为镇江香醋传统固态发酵工艺。

1.4 数据处理

采用 IBM SPSS Statistics 22 进行数据统计分析,多重比较采用 Student-Newman-Keuls 法,2 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表明在统计学上有显著性差异;采用 Origin Pro 2021 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

将 0.5 mg/mL 的 GABA 标准品衍生化后进行全波长扫描,图形显示最大吸收峰在波长 350~450 nm 之间(图 1),吸收峰区分明显,周围无干扰,最大吸收波长为 360 nm。因此,以 360 nm 作为 HPLC 的检测波长。

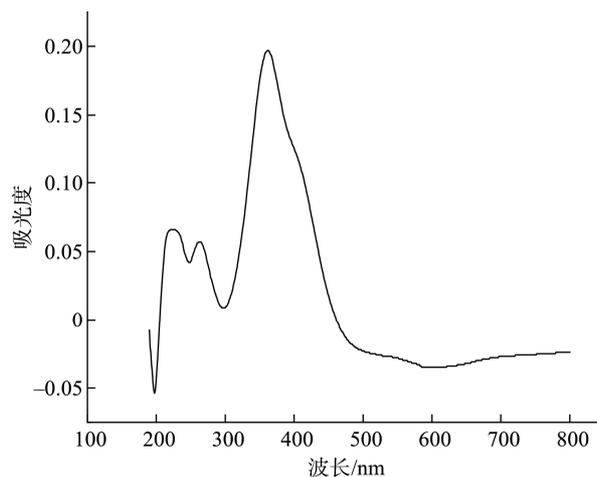


图1 GABA吸收光谱

Fig.1 Absorption spectrum of GABA

2.2 HPLC 方法优化

分别采用不同流动相、进样量、进样流速、洗脱方式、洗脱程序等对加标醋样进行检测,以检测时间、出峰时间、分离度和拖尾因子等指标综合评价,优化 HPLC。在表 1 中列出其中的典型方案,参照桑叶^[11]和茶叶^[20]中 GABA 的液相检测方法,检测时间长、拖尾严重,经试验改进优选出方案 6 为检测方法,其检测时间短、出峰时间快,分离度好,拖尾因子小。参照赵顺华等^[21]检测谷物醋中氨基酸含量的 HPLC 方法,WANG 等^[22]检测柿子醋中游离氨基酸的 HPLC 方法,分别在醋样中加入三氯乙酸、磺基水杨酸进行预处理,然后取离心的上清液 DNFB 衍生化并检测,发现回收率在 40%~70%之间,其可能原因是蛋白质和其他生物大分子沉淀过程中,吸附了大量的 GABA。这表明 HPLC 的样品预处理方法直接影响检测结果的准确,后期采用高速离心后衍生化和进样检测。

表 1 检测方案优化
Table 1 Elution scheme optimization

方案	流动相	洗脱方式	进样量/ μL	检测时间/min	出峰时间/min	分离度	拖尾因子	参考文献
1	乙酸钠/甲醇	梯度洗脱	10	90	19.615	10.44	3.531	[11]
2	乙酸钠/乙腈	梯度洗脱	10	60	27.009	2.48	2.25	[20]
3	乙酸钠/乙腈	梯度洗脱	10	35	18.581	2.06	1.76	
4	乙酸钠/乙腈	梯度洗脱	10	35	16.077	1.33	1.02	
5	乙酸钠/乙腈	梯度洗脱	10	20	12.058	2.45	1.15	
6	乙酸钠/乙腈	梯度洗脱	5	20	11.896	2.52	1.05	
7	乙酸钠/乙腈	梯度洗脱	5	15	12.680	2.88	1.16	

2.3 标准曲线的绘制

用 4 g/100 mL 的冰醋酸配制 0.5 mg/mL 的 GABA 标准品溶液。另取醋样, 并加入 GABA 标准品作为加标醋样。均按照 1.3 节的方法衍生化处理并进样检测。如图 2 所示, 分别在 11.894 min、11.896 min、11.898 min 发现目标峰; 分离度分别为 3.69、2.52、3.67, 目标峰与邻近峰分离效果明显, 且信号强度增加显著, 表明该检测条件适宜。据文献报道, DNFB 柱前衍生法测定桑叶中 GABA 出峰时间为 33 min^[23], 丹磺酰氯衍生法测定糙米粉中 GABA 耗时需 50 min^[14]、测定韩国泡菜中 GABA 出峰时间为 24 min^[24], 茚甲氧羰酰氯衍生法测定豆类中 GABA 耗时 57 min, 出峰时间约为 40 min^[15]。本研究耗时短, 出峰较快, 适合样品快速检验。

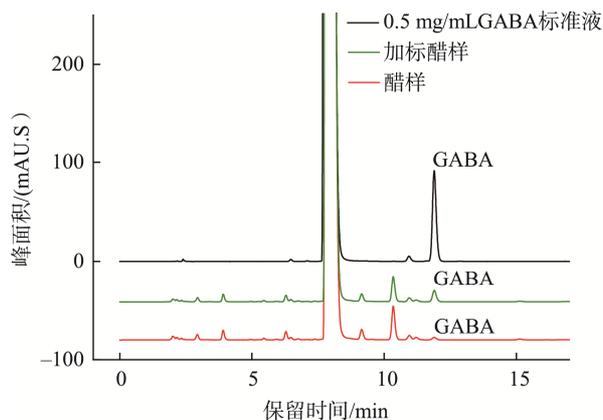


图2 标准品、醋样、加标醋样的色谱图对比

Fig.2 Comparison of chromatograms of standard sample, vinegar sample and standard vinegar sample

用 4 g/100 mL 的冰醋酸配制 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、0.60、0.80、1.00 mg/mL 的 GABA 系列标准品溶液, 根据 1.3 节的方法衍生处理后进样检测。以峰面积作为纵坐标(Y), GABA 标准品质量浓度作为横坐标(X, mg/mL)绘制标准曲线, 得到线性方程为 $Y=836.78X+9.6148$, R^2 为 0.9992, GABA 含量在 0.01~1.00 mg/mL 范围内线性关系良好。检出限(limit of detection, LOD)为 1.6 $\mu\text{g/mL}$, 定量

限(limit of quantitation, LOQ)为 5.3 $\mu\text{g/mL}$, 表明该方法具有较高的灵敏度。

2.4 精密度试验

随机选 2 种醋样, 编号醋 1 和醋 2。醋 1 在第 1 d 和第 8 d 各检测 6 次, 醋 2 在第 1 d 和第 2 d 各检测 6 次, 分别为其日内精密度和日间精密度。结果如表 2 所示, 醋 1 和醋 2 的日内精密度和日间精密度的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)均在 2.0%以内, 表明精密度良好, 此方法具有良好的稳定性。

表 2 精密度试验($n=6$)
Table 2 Precision of the colorimetric ($n=6$)

样品	日内精密度		日间精密度		平均 RSDs/%
	GABA/(mg/mL)	RSDs/%	GABA/(mg/mL)	RSDs/%	
醋 1	1.086±0.014	1.3	1.106±0.018	1.6	1.3
醋 2	0.174±0.002	1.3	0.174±0.003	1.9	0.1

2.5 准确性试验

随机取 3 种醋样, 编号醋 3、4、5, 并分别加入 GABA 标准品, 衍生处理后进样检测。结果如表 3 所示, 测得平均回收率在 96.4%至 103.0%之间, RSD 值均小于 2.0%, 符合中国药典检测标准^[25], 表明此测定方法准确可行。

表 3 回收率试验($n=3$)
Table 3 Recovery of the colorimetric ($n=3$)

样品	GABA/(mg/mL)	加标水平/(mg/mL)	回收率/%	RSDs/%
醋 3	0.245	0.194	101.3	1.2
		0.243	103.0	0.9
		0.275	102.3	0.0
醋 4	0.159	0.150	102.2	0.9
		0.200	96.4	0.4
		0.233	99.1	0.6
醋 5	0.015	0.013	98.8	1.1
		0.025	101.9	0.9
		0.125	97.9	1.3

2.6 检测方法应用与 GABA 生成规律分析

GABA 检测结果如表 4 所示。在市场购买的 16 种醋样中,完全以谷物为原料的 A1、2、3、5、7、8、10 的 GABA 含量(均值为 0.243 mg/mL)显著高于以水果和果汁为主料的 A6、9、16 的 GABA 含量(均值为 0.048 mg/mL) ($P<0.05$);而以白糖、食用酒精、果葡糖浆为主料的 A12、13、14、15 中未能检测出 GABA,在以大米、白糖和果葡糖浆为主料的 A11 中,GABA 含量只有 0.015 mg/mL。A4 中 GABA 含量仅为 0.013 mg/mL。食醋的原料、菌种、发酵方式、酿造工序均影响着食醋中 GABA 的含量。我国传统食醋多为粮食发酵产物,大米、糯米、高粱、小麦等原料的蛋白质含量多在 8%~15%之间^[26];小麦麸皮的蛋白质含量高达 18%^[27]。参与发酵的微生物来源于曲、原料、辅料和所处环境,涉及曲霉、酵母、乳酸菌、醋酸菌等。在食醋酿造过程中,原料蛋白质在各种微生物协同作用下降解,生成了大量氨基酸。镇江香醋经 30 d 的封醋,氨基酸含量提高 6.2%,其中谷氨酸是香醋封醋前后均较多的氨基酸,含量为 587 mg/L^[28],这为 GABA 的生成提供了底物。多种微生物参与了复杂的食醋发酵体系,并以谷氨酸为底物转化生成 GABA^[22]。果醋是以各种含糖类的水果或果汁为原料酿制而成,但苹果、葡萄、桑葚等水果中的蛋白质含量一般在 1%以下^[26],所以果醋中的 GABA 较少。以白糖、果葡糖浆、酒精为主料的食醋,因蛋白质含量过低,故生成的 GABA 未能达到检出限。进一步分析,A1、A7、A8 的 GABA 含量较高,在 0.3 mg/mL 以上。A7 产自四川,GABA 含量最高,其原料是小麦为主的 5 种谷物和麦麸皮;A8 产自山西,其原料是以高粱为主的 3 种谷物和麦麸皮。而以糯米、大米为主的其他品牌食醋中,GABA 含量较低。A1 虽以糯米为原料,但 GABA 含量达 0.371 mg/mL,这可能与特殊的红曲菌种有关,余永建等^[29]曾在镇江香醋制作过程中加入红曲菌和植物乳杆菌,使得 GABA 含量达 0.5 mg/mL。赵顺华等^[21]研究发现,山西陈醋、福建红曲醋、镇江香醋中 GABA 含量依次减小,这与本研究结果一致。

如表 4 所示,采用同品种的南粳稻谷,分别酿造成精米醋、糙米醋和发芽糙米醋,3 种米醋中 GABA 含量差异显著($P<0.05$)。相对于经碾磨的精米,糙米的蛋白质含量更高^[30];同时由于糙米表面完整的皮层限制了米粒的吸水能力和体积膨胀程度^[31],制作糙米醋的周期更长,长时间的发酵也能进一步提高糙米醋的 GABA 含量。糙米发芽后的 GABA 是原糙米的 2.92 倍^[31],这使得发芽糙米醋的 GABA 是未发芽糙米醋的 2.29 倍,是精米醋的 4.73 倍。同时,结果表明,在醋厂中以小曲和大曲酿造的大缸发芽糙米醋,其 GABA 含量是实验室自制发芽糙米醋的 2.43 倍。这与所使用的菌种、发酵环境和发酵时间有关。传统的固态发酵使用的小曲和大曲是复合菌种,其中有曲霉、根霉、毛霉、酵母、醋酸菌、乳酸菌、芽孢杆菌等各种微生物^[19,32];

表 4 不同食醋样品的 GABA 含量
Table 4 GABA content in different samples

醋样品	产地	主要原料	GABA 含量/(mg/mL)
A1	福建泉州	糯米、红曲	0.371±0.006
A2	江苏镇江	糯米、麦麸、粳米	0.130±0.003
A3	江苏镇江	糯米、麦麸、大米、大曲	0.174±0.003
A4	湖南岳阳	大米,高粱,小麦,豌豆,玉米,麸皮	0.013±0.001
A5	浙江湖州	大米	0.121±0.000
A6	德国	苹果汁	0.017±0.001
A7	四川阆中	小麦,玉米,大米,高粱,荞麦,麸皮	0.412±0.001
A8	山西太原	高粱,大麦,豌豆,麸皮	0.339±0.005
A9	河南郑州	鲜柿子	0.092±0.009
A10	山东烟台	糯米、粳米、麦麸	0.151±0.007
A11	山东济南	大米、白糖、果葡糖浆、浓缩苹果汁	0.015±0.009
A12	广东佛山	白砂糖、食用酒精、黑米、大米	ND
A13	广东佛山	果葡糖浆、浓缩苹果汁、白砂糖、食用酒精、大米	ND
A14	韩国	食用酒精、浓缩苹果汁	ND
A15	江苏镇江	食用酒精(玉米、水)	ND
A16	意大利	葡萄酒、浓缩葡萄酒	0.036±0.005
精米醋	实验室酿制	南粳精米、麸皮、酒曲、醋酸菌	0.075±0.002 ^d
糙米醋	实验室酿制	南粳糙米、麸皮、酒曲、醋酸菌	0.155±0.003 ^c
发芽糙米醋	实验室酿制	发芽南粳糙米、麸皮、酒曲、醋酸菌	0.355±0.007 ^b
发芽糙米醋	醋厂酿制	发芽南粳糙米、麸皮、米糠、小曲、大曲	0.862±0.004 ^a
桑果醋	果醋车间	桑葚、糖浆、安琪果酒酵母、醋酸菌	ND
酒水	镇江醋厂	糯米、酒曲	0.041±0.007 ^d
醋卤	镇江醋厂	糯米、麸皮、米糠、小曲、大曲	0.123±0.003 ^b
有色生醋	镇江醋厂	糯米、麸皮、米糠、小曲、大曲	0.099±0.006 ^c
醋罐底部沉淀	镇江醋厂	糯米、麸皮、米糠、小曲、大曲	0.332±0.005 ^a
2月酿造食醋	镇江醋厂	糯米、麸皮、米糠、小曲、大曲	0.263±0.007 ^b
9月酿造食醋	镇江醋厂	糯米、麸皮、米糠、小曲、大曲	0.415±0.005 ^a

注: ND 表示未检出;不同小写字母表示具有统计学差异($P<0.05$),下同。

而实验室自酿食醋使用的是酵母和醋酸菌的商业纯菌种。各种微生物的 GAD 活力不同,复合菌种对谷氨酸脱羧转化为 GABA 更有利。传统食醋的发酵周期长,如镇江香醋制作周期在 60 d、其中醋酸发酵和陈酿在 30~40 d,山西陈醋醋酸发酵和陈酿在 20~30 d^[19],长时间的发酵可使得 GABA 含量进一步累积。而实验室自酿食醋因规模小、菌种单一,周期约 15 d,所以虽然同样采用的是南粳大米,但是自酿食醋中 GABA 含量低($P<0.05$)。果醋和以白糖、酒精为原料的食醋,多采用液体发酵方式,发酵时间短、菌种相对单一,这也是它们的 GABA 含量低于谷物醋的原因之一。

由表 4 可知,在固态发酵食醋的生产中,不同阶段产物的 GABA 含量具有统计学差异($P<0.05$),酒水的 GABA 含量为 0.041 mg/mL,醃卤的 GABA 含量为 0.123 mg/mL,有色生醋的 GABA 含量为 0.099 mg/mL。表明糯米经酒精发酵和醋酸发酵,其 GABA 不断累积,且醋酸发酵为 GABA 主要增长阶段。这是由于经前期的酒精发酵,蛋白质降解,酒水中富含游离的谷氨酸,然后经过长时间的醋酸封醃发酵,可产生大量的 GABA。此结果与陈春旭^[33]的结论一致,但与陈涛等^[34]的研究结论不同,这可能是由于两种食醋的醋酸发酵工艺不同。醋罐底部沉淀的 GABA 显著高于罐装醋($P<0.05$),表明随着存放时间的延长,食醋中的 GABA 会吸附在沉淀物上而沉降。从表 4 还可知,9 月酿造的食醋 GABA 含量显著高于 2 月酿造的食醋($P<0.05$),这可能是 9 月温度接近微生物中 GAD 酶的适宜温度、酶活力高;也与不同季节的微生物菌群差异显著有关^[32]。

如表 5 所示,商品醋 A8 经过不同的贮藏时间后,其 GABA 含量均有下降。在取样时间范围内,A8 的 GABA 浓度自然对数($\ln C$)和贮藏天数(T)成负相关关系, $R^2=0.9993$,符合一级动力学反应,半衰期 $T_{1/2}=693$ d,表明食醋中 GABA 的衰减仅与 GABA 浓度的一次方有关,即当食醋中 GABA 含量高时,衰减快。

对醋厂贮藏的各种食醋进行检测,B5 含量仅有 0.077 mg/mL,随着贮藏时间的延长,醋中的蛋白质进一步降解和谷氨酸的转化,使得 B5~B2 的 GABA 含量依次增加。任晓荣等^[35]研究了镇江香醋的总氨基酸含量,发现 8 年陈酿最高、5 年次之、3 年最低;对于谷氨酸,5 年陈酿醋最高,8 年次之、3 年最低。但贮藏时间最长的 B1 的 GABA 含量显著低于 B2 ($P<0.05$),这可能是 GABA 与还原糖发生了美拉德反应所致。李丹亚等^[36]研究镇江香醋,发现总氨基酸含量在陈酿 6 年间不断下降。也就是说,所贮藏的醋,一方面仍有微生物转化谷氨酸生成 GABA,另一方面 GABA 与还原糖发生美拉德反应,或吸附在其他不溶物上沉淀而减少。

表 5 贮藏时间对 GABA 含量的影响

Table 5 Effects of storage time on GABA content

醋样品	产地	主要原料	GABA 含量/(mg/mL)
A8 采购日	山西太原	高粱,大麦,豌豆,麸皮	0.339±0.005 ^a
采购贮藏 255 d	山西太原	高粱,大麦,豌豆,麸皮	0.258±0.003 ^b
采购贮藏 314 d	山西太原	高粱,大麦,豌豆,麸皮	0.245±0.003 ^c
衰减曲线		$\ln C=-0.0017T-1.0816, R^2=0.9993$	
B1 2012 年	江苏镇江醋厂	糯米、麸皮、米糠、小曲、大曲	0.348±0.005 ^b
B2 2018 年	江苏镇江醋厂	糯米、麸皮、米糠、小曲、大曲	0.748±0.052 ^a
B3 2019 年	江苏镇江醋厂	糯米、麸皮、米糠、小曲、大曲	0.240±0.016
B4 2020 年	江苏镇江醋厂	糯米、麸皮、米糠、小曲、大曲	0.198±0.001
B5 2023 年	江苏镇江醋厂	糯米、麸皮、米糠、小曲、大曲	0.077±0.007

3 结论

本研究建立了食醋中 GABA 的 HPLC-紫外检测方法,此方法出峰时间为 12 min,精密度相对标注偏差小于 2.0%,回收率 96.4%~103.0%,表明精密度和准确度均良好,适用于食醋等高酸度食品的大批量检测。检测并分析了 32 种食醋样品的 GABA 含量,结果表明,食醋中 GABA 含量与食醋原料、工艺、菌种、生产季节、贮藏时间等相关。谷物醋的 GABA 含量高于果醋($P<0.05$),以白糖、酒精为原料的醋中 GABA 含量不能检出;复合菌种酿造醋的 GABA 含量高于单一菌种所制的醋($P<0.05$);秋季醋的 GABA 含量高于冬季醋($P<0.05$);GABA 在酒精发酵和醋酸发酵阶段均有生成,且主要在醋酸发酵期生成;适当延长陈酿期可以增加食醋中 GABA 含量;商品醋中 GABA 含量随贮藏时间延长不断下降。同时结果表明,发芽糙米醋的 GABA 含量是未发芽糙米醋的 2.29 倍,是精米醋的 4.73 倍。综上所述,以多种谷物或发芽谷物为原料,采用传统固态发酵法生产有利于食醋中 GABA 的生成。本研究为食醋品质的分析与研究提供了方法支持,并在解析 GABA 变化规律的基础上为食醋的生产调控和功能性开发提供参考。

参考文献

- [1] ZHANG GR, LI L, LIU J, *et al.* Comparing the metabolite components of Sichuan Sun vinegar and other kinds of vinegar based on non-targeted metabolomic [J]. LWT, 2022, 164: 113640.
- [2] 杨晓璇,李阳,马宁,等.基于气相色谱-离子迁移谱法分析食醋中挥发性风味物质[J].食品安全质量检测学报,2023,14(4): 213-221.
YANG XX, LI Y, MA N, *et al.* Gas chromatography-ion mobility spectrometry based on the analysis of volatile flavor substances in

- vinegar [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(4): 213–221.
- [3] SOHOULI MH, KUTBI E, AI MASRI MK, *et al.* Effects of vinegar consumption on cardiometabolic risk factors: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Eur J Integ Med*, 2022, 55: 102176.
- [4] XIA T, ZHANG B, DUAN WH, *et al.* Nutrients and bioactive components from vinegar: A fermented and functional food [J]. *J Func Foods*, 2020, 64: 103681.
- [5] REN MM, WANG XY, TIAN CR, *et al.* Characterization of organic acids and phenolic compounds of cereal vinegars and fruit vinegars in China [J]. *J Food Process Pres*, 2017, 41(3): 1–7.
- [6] 王宗敏, 白桦, 王辛禹, 等. 食醋中功能物质及其研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(11): 196–204.
- WANG ZM, BAI H, WANG XY, *et al.* Research progress of functional substances in vinegar [J]. *Food Sci*, 2023, 44(11): 196–204.
- [7] 段静, 李硕, 李莉, 等. 在线柱前衍生高效液相色谱法测定古树红茶中的 γ -氨基丁酸[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(15): 4038–4042.
- DUAN J, LI S, LI L, *et al.* Determination of gamma-aminobutyric acid in Gushu black tea by on-line pre-column derivation-high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(15): 4038–4042.
- [8] DIEZ-GUTIÉRREZ L, SAN VICENTE L, R.BARRÓN LJ, *et al.* Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market [J]. *J Funct Foods*, 2020, 64: 103669.
- [9] ZAREIAN M, OSKOUIEAN E, MAJIDNASAB M, *et al.* Production of GABA-enriched idli with ACE inhibitory and antioxidant properties using *Aspergillus oryzae*: The antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats [J]. *Food Funct*, 2020, 11(5): 4304–4313.
- [10] OHM JB, LEE C, CHO K. Germinated wheat: Phytochemical composition and mixing characteristics [J]. *Cereal Chem*, 2016, 93(6): 612–617.
- [11] 汤彩云, 王涛, 屠洁, 等. 比色法与 HPLC 法对比测定桑叶茶中 γ -氨基丁酸的含量[J]. *食品科学*, 2018, 39(24): 256–260.
- TANG CY, WANG T, TU J, *et al.* Determination of γ -aminobutyric acid in mulberry leaf tea by colorimetric method and HPLC method [J]. *Food Sci*, 2018, 39(24): 256–260.
- [12] ZHANG DR, WEI N, LIU Z, *et al.* Transcriptome analysis reveals the molecular mechanism of GABA accumulation during quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.) germination [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(41): 12171–12186.
- [13] LIU Y, LUO LY, LIAO CX, *et al.* Effects of brewing conditions on the phytochemical composition, sensory qualities and antioxidant activity of green tea infusion: A study using response surface methodology [J]. *Food Chem*, 2018, 269(15): 24–34.
- [14] LUO XY, TAO Y, HAN YB, *et al.* Effect of static magnetic field treatment on γ -aminobutyric acid content and sensory characteristics of germinated brown rice cake [J]. *Food Chem*, 2022, 404(Pt B): 134709.
- [15] ZHUANG KY, ZHANG JL, FAN CL, *et al.* Determination of γ -aminobutyric acid in fermented soybean products by HPLC coupled with pre-column derivatization [J]. *J Food Compos Anal*, 2023, 119: 105248.
- [16] 赵天行, 陈福生, 陈涛, 等. 一种棕色、富含 γ -氨基丁酸蜜柑醋的制作及其品质分析[J]. *中国酿造*, 2021, 40(5): 205–209.
- ZHAO TX, CHEN FS, CHEN T, *et al.* Preparation and quality analysis of tangerine vinegar rich in gamma-aminobutyric acid [J]. *China Bre*, 2021, 40(5): 205–209.
- [17] 胡俊君, 李云龙, 李红梅, 等. 高含量 γ -氨基丁酸和D-手性肌醇苦荞醋的研制[J]. *粮油食品科技*, 2017, 25(6): 10–12.
- HU JJ, LI YL, LI HM, *et al.* Preparation of buckwheat vinegar with high content of gamma-aminobutyric acid and D-chiral inositol [J]. *Sci Technol Cere Oils Foods*, 2017, 25(6): 10–12.
- [18] YANG RQ, GUO QH, GU ZX. GABA shunt and polyamine degradation pathway on γ -aminobutyric acid accumulation in germinating fava bean (*Vicia faba* L.) under hypoxia [J]. *Food Chem*, 2013, 136(1): 152–159.
- [19] 许正宏, 陆震鸣, 史劲松. 食醋酿造原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2018.
- XU ZH, LU ZM, SHI JS. Principle and technology of vinegar brewing [M]. Beijing: Science Press, 2018.
- [20] YE YL, YAN JN, CUI JL, *et al.* Dynamic changes in amino acids, catechins, caffeine and gallic acid in green tea during withering [J]. *J Food Compos Anal*, 2018, 66: 98–108.
- [21] 赵顺华, 朱胜虎. 四种传统谷物醋氨基酸组成特征的对比[J]. *中国酿造*, 2023, 42(8): 97–101.
- ZHAO SH, ZHU SH. Comparison of amino acid composition characteristics of four traditional grain vinegars [J]. *China Brew*, 2023, 42(8): 97–101.
- [22] WANG DH, WANG MY, CAO LW, *et al.* Changes and correlation of microorganism and flavor substances during persimmon vinegar fermentation [J]. *Food Biosci*, 2022, 46: 101565.
- [23] 湛珍, 刘青茹, 张晓伟, 等. 高效液相色谱法测定桑叶 γ -氨基丁酸和谷氨酸[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(3): 162–166.
- CHEN Z, LIU QR, ZHANG XW, *et al.* Determination of γ -aminobutyric acid and glutamic acid in mulberry leaves by high performance liquid chromatography [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(3): 162–166.
- [24] WU QL, SHAH N. Gas release-based prescreening combined with reversed-phase HPLC quantitation for efficient selection of high- γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(2): 790–797.
- [25] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部). 2020年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Four parts). 2020 edition [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [26] 杨月欣. 中国食物成分表. 第六版[M]. 北京: 北京大学医学出版社有限公司, 2019.
- YANG YX. Chinese food ingredient list. The sixth edition [M]. Beijing: Peking University Medical Press Co., Ltd., 2019.
- [27] 赵琦, 赵妍. 碱法提取紫小麦麸皮蛋白质的条件优化[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2019, 40(3): 7–12.
- ZHAO Q, ZHAO Y. Optimization of extraction conditions of purple wheat bran protein by alkaline method [J]. *J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 2019, 40(3): 7–12.
- [28] 李信, 陈雯, 熊锋, 等. 不同封醋时间对镇江香醋品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(17): 33–42.
- LI X, CHEN W, XIONG F, *et al.* Effects of different sealing times on the quality of Zhenjiang balsamic vinegar [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(17): 33–42.
- [29] 余永建, 张叔萍, 赵顺华, 等. 利用红曲菌及植物乳酸杆菌生产功能性

- 镇江香醋工艺的研究[J]. 中国调味品, 2010, 35(12): 68–70.
YU YJ, ZHANG SP, ZHAO SH, *et al.* Study on the production of functional Zhenjiang balsamic vinegar by *Monascus* and *Lactobacillus plantarum* [J]. China Cond, 2010, 35(12): 68–70.
- [30] 姚哲. 大米的碾磨程度与品种对黄酒酿造品质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
YAO Z. Effect of rice milling degree and variety on the brewing quality of rice wine [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [31] 张芳, 于非凡, 韩华凤, 等. 粳糯糙米发芽工艺优化及发芽糙米品质分析[J]. 食品科技, 2023, 48(7): 124–130.
ZHANG F, YU FF, HAN HF, *et al.* Optimization of japonica glutinous brown rice germination process and quality analysis of germinated brown rice [J]. Food Sci Technol, 2023, 48(7): 124–130.
- [32] 叶晓婷. 不同季节镇江香醋风味品质差异性及与微生物菌群演替的相关性研究[D]. 镇江: 江苏科技大学, 2023.
YE XT. Study on the difference of flavor quality of Zhenjiang balsamic vinegar in different seasons and its correlation with microbial community succession [D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology, 2023.
- [33] 陈春旭. γ -氨基丁酸高含量谷物醋的研制及其抗氧化功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
CHEN CX. Preparation of grain vinegar with high content of γ -aminobutyric acid and its antioxidant function [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.
- [34] 陈涛, 桂青, 郭俊陆, 等. 传统工艺山西老陈醋发酵及熏蒸过程中风味与功能成分的变化分析[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 15–20.
CHEN T, GUI Q, GUO JL, *et al.* Analysis on changes of flavor and functional components of Shanxi aged vinegar during fermentation and fumigation [J]. China Brew, 2017, 36(2): 15–20.
- [35] 任晓荣, 王宏霞, 孙晓琪, 等. 不同陈酿年份镇江香醋品质指标和功能成分的比较[J]. 中国酿造, 2023, 42(5): 85–90.
REN XR, WANG HX, SUN XQ, *et al.* Comparison of quality indexes and functional components of Zhenjiang balsamic vinegar from different aging years [J]. China Brew, 2023, 42(5): 85–90.
- [36] 李丹亚, 许泓瑜, 陆震鸣, 等. 镇江香醋在陈放过程中功能因子的变化规律研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(7): 219–220.
LI DY, XU HY, LU ZM, *et al.* Study on changes of functional factors of Zhenjiang balsamic vinegar during aging [J]. Sci Technol Food Ind, 2008, 29(7): 219–220.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介



张 芳, 主要研究方向为粮油食品检测。
E-mail: 1021529935@qq.com



刘冠卉, 硕士, 副教授, 主要研究方向为粮食生物技术与功能性食品。
E-mail: liuguanh@163.com



郑博强, 高级工程师, 主要研究方向为农产品精深加工。
E-mail: 458870656@163.com