

## 臭豆腐发酵过程中丙酸形成的机制

嵇晨<sup>1</sup>, 周溯<sup>1</sup>, 韩晓华<sup>2</sup>, 屠鹏程<sup>1</sup>, 叶翔<sup>1</sup>, 阎芙洁<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学生物系统工程与食品科学学院 杭州 310012

<sup>2</sup>祖名豆制品股份有限公司 杭州 310051)

**摘要** 为探究臭豆腐发酵过程中丙酸产生的原因及机制,采用宏基因组学对卤水和臭豆腐中微生物组成进行分析鉴定。与丙酸含量极低的“对照卤水”相比,1号臭豆腐卤水中产丙酸的丙酸杆菌属种类和丰度整体上升,其中丙酸杆菌科细菌 NML\_160184 的丰度上升 7.6 倍,产酸丙酸杆菌的丰度上升 4.7 倍,丙酸杆菌\_细菌的丰度上升 3.8 倍。与 2 号臭豆腐相比,1 号成品豆腐中产丙酸的丙酸杆菌属种类和丰度也显著增加,丙酸杆菌科细菌 P6A17 的丰度上升 59.4 倍,未分类丙酸杆菌科的丰度上升 54.9 倍,丙酸杆菌\_细菌的丰度上升 47 倍,假丙酸杆菌\_massiliense 的丰度上升 29.7 倍。采用非靶向代谢组学分析卤水中微生物代谢产物和功能,结果发现不同卤水的微生物组成的代谢活动有显著差异,臭豆腐中丙酸水平的差异极有可能是受卤水中微生物的种类和代谢活动的影响。结论:臭豆腐中检出丙酸是因发酵过程中微生物自然产生而非人为添加,不同来源的卤水产丙酸菌的种类和丰度也不同,最后产品的丙酸含量也会呈现显著差异。

**关键词** 臭豆腐; 丙酸; 高效液相色谱法(HPLC); 宏基因组学; 非靶向代谢组学

**文章编号** 1009-7848(2023)05-0352-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.035

丙酸又称甲基乙酸,是一种无色或微黄色,有着奶酪味和酸臭气味的挥发性脂肪酸。对人、畜基本无害,被广泛应用于谷物、饲料和食品的防腐保鲜中<sup>[1]</sup>。丙酸及其衍生物(钙、钠和钾盐)还可用在食品中作为化学添加剂。丙酸的生产方式主要有两种:一是化学合成法,主要以石油为原料,经过丙醛氧化或乙烯羟基化得到<sup>[2]</sup>;二是微生物代谢法,通过丙酸杆菌代谢得到<sup>[3]</sup>。臭豆腐是我国典型的发酵食品之一,富含易被人体吸收的蛋白质和氨基酸,具有很高的营养价值。臭豆腐分为发酵型和非发酵型,传统发酵型臭豆腐的卤水通常由蔬菜及香辛料,以一定的配比自然发酵而成<sup>[4-6]</sup>。卤水发酵过程中,微生物扮演着十分重要的角色,尤其乳酸菌,其组成、含量对卤水风味的形成及营养价值的提升起着决定性的作用<sup>[7-8]</sup>。

宏基因组学(也称微生物环境基因组学)采用新一代高通量测序技术(如 Roche 454 GS FLX+、Illumina HiSeq 2000 测序等)直接对样品中微生物的总 DNA 进行测序,无需对微生物进行分离培养,即可以检出低丰度的微生物,操作速度

快,结果准确。目前,宏基因组学已广泛应用于肠道微生物、土壤微生物和海洋微生物研究<sup>[9]</sup>。在食品微生物菌群研究方面,基于 16S rDNA 基因 V1~V3 区的宏基因组技术,分析了韩国泡菜微生物群落结构及动态变化,揭示泡菜这一传统发酵食品酿造过程中微生物的演替规律与代谢产物之间的联系<sup>[10]</sup>。代谢组学是继基因组学、转录组学、蛋白质组学后出现的新兴组学技术,是系统生物学的重要组成部分。代谢组学从整体角度出发,运用现代检测技术对尽可能多的微生物代谢产物和功能进行分析比较,目前,代谢组学在微生物领域应用日益广泛<sup>[11]</sup>。刘皓皓等<sup>[12]</sup>基于代谢组学分析平菇栽培用培养料发酵过程中代谢物的变化;王越男等<sup>[13]</sup>研究了代谢组学在乳酸菌发酵食品和功能食品中的应用,为利用代谢组学分析比较微生物代谢功能和产物提供了参考。

目前国内关于臭豆腐发酵的研究,主要集中在卤水发酵过程中香气成分的分析以及主要发酵菌株的研究,而对于卤水发酵过程中某一单一成分研究较少。丙酸是臭豆腐中常见成分之一,近年来,臭豆腐中丙酸含量超标问题不断出现。本文通过宏基因组学和代谢组学分析,探究臭豆腐发酵过程中丙酸形成的原因及其机制,阐明臭豆腐中丙酸含量超标现象的原因,丙酸是发酵过程中丙

收稿日期: 2022-05-15

第一作者: 嵇晨,女,硕士

通信作者: 阎芙洁 E-mail: fjyan@zju.edu.cn

酸杆菌属产生,还是人为添加,为发酵臭豆腐的安全性与否提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

不同厂家的臭豆腐、不同地区的卤水;甲醇(分析纯级),国药集团化学试剂有限公司;乙腈、甲酸、异丙醇(色谱纯级),阿拉丁化学试剂公司;DNA 提取试剂盒,美国 Omega Bio-tek 公司。

### 1.2 仪器与设备

东森 040S 型超声波清洗机,深圳市品凰科技有限公司;Vortex Mixer XW-80A 型涡旋仪,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;KD200 型氮吹仪,杭州奥盛仪器有限公司;NanoDrop2000c 超微量紫外分光光度计,UltiMate3000 高效液相色谱仪,赛默飞公司;Covaris M220 DNA 破碎仪,上海土森视觉科技有限公司;TBS-380 荧光计,美国 TurnerBioSystems 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 HPLC 法测定臭豆腐及卤水中的丙酸含量

1.3.1.1 臭豆腐和卤水中丙酸的提取 采用直接浸提法<sup>[14-15]</sup>。准确称取 5 g(精确至 0.01 g)试样于 100 mL 烧杯中,加水 20 mL,加入 1 mol/L 磷酸溶液 0.5 mL,混匀,经超声浸提 10 min,用 1 mol/L 磷酸溶液调 pH 值至 3,转移试样至 50 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。将试样全部转移至 50 mL 塑料离心管中,以不低于 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,待测。

1.3.1.2 标准溶液的配制 准确吸取 5.0 mL 标准储备液于 50 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,配制质量浓度为 1.0 mg/mL 的标准工作液,备用。

1.3.1.3 标准曲线的绘制 准确吸取标准工作液 0.25,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 和 5.0 mL 至 10 mL 容量瓶中,各加入 1 mol/L 磷酸溶液(pH 4.5)0.2 mL,用水定容 10 mL,混匀。其丙酸标准溶液的最终质量浓度分别为 0.025,0.05,0.1,0.2,0.3,0.4 和 0.5 mg/mL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,按质量浓度从低到高进样,以质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.3.1.4 高效液相色谱条件 采用 C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm),流动相:1.5 g/L 磷酸氢二铵溶

液(pH 2.7~3.5),流速 1.0 mL/min,柱温 25 ℃,进样量 20 μL,检测波长 214 nm<sup>[16-17]</sup>。

#### 1.3.2 宏基因组分析卤水和臭豆腐中微生物组成

1.3.2.1 DNA 提取 利用试剂盒进行样品 DNA 抽提。完成基因组 DNA 抽提后,用荧光检测仪检测 DNA 浓度,用超微量紫外分光光度计检测 DNA 纯度,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。通过 DNA 破碎仪将 DNA 片段化,筛选约 400 bp 的片段,构建 PE 文库。

1.3.2.2 构建 PE 文库 使用 NEXTflex™ Rapid DNA-Seq(Bioo Scientific,美国)建库,具体流程:①接头链接;②使用磁珠筛选去除接头自连片段;③用 PCR 扩增进行文库模板的富集;④磁珠回收 PCR 产物得到最终的文库。

1.3.2.3 桥式 PCR 和测序 委托上海美吉生物医药科技有限公司使用 Illumina NovaSeq/Hiseq Xten(Illumina,美国)测序平台进行宏基因组测序。

#### 1.3.3 非靶向代谢组学分析不同地区卤水中微生物的代谢功能和产物

1.3.3.1 样品处理 准确移取 200 μL 样品至 1.5 mL 离心管中,加入 800 μL 提取液( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}=1:1$ ),含 0.02 mg/mL 的内标(L-2-氯苯丙氨酸);涡旋混匀 30 s 后,低温超声提取 30 min。将样品静置于 -20 ℃,30 min。取出样品,13 000×g,4 ℃离心 15 min,移取上清液,氮气吹干。加入 120 μL 复溶液( $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=1:1$ )复溶。再次涡旋混匀 30 s 后低温超声萃取 5 min。13 000×g,4 ℃离心 10 min,移取上清液至带内插管的进样小瓶中,上机分析。同时,每个样本分别移取 20 μL 上清液,混合后作为质控样本。

1.3.3.2 LC-MS 检测 采用超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱 UHPLC -Q Exactive HF-X 系统进行 LC-MS 检测。色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.8 μm, 美国 Waters 公司);流动相 A 为 95%水+5%乙腈(含 0.1%甲酸),流动相 B 为 47.5%乙腈+47.5%异丙醇+5%水(含 0.1%甲酸),进样量 2 μL,柱温 40 ℃。样品经电喷雾电离,分别采用正、负离子扫描模式采集质谱信号。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同厂家的臭豆腐及不同地区卤水中的丙酸含量

图1显示不同厂家的臭豆腐和不同地区卤水中丙酸的含量。1号发酵前豆腐胚中的丙酸含量很低,约0.026 mg/g;而1号成品臭豆腐中的丙酸含量约1.32 mg/g,明显高于不同厂家的2号臭豆腐成品中的丙酸含量(0.56 mg/g),但均低于国家限定标准(2.5 g/kg)<sup>[18]</sup>。测定不同地区卤水中的丙酸含量,结果如图1b所示。对照组卤水的丙酸含

量远低于标准曲线,几乎无法检出。剩下3组卤水(1号臭豆腐、富阳、绍兴)的丙酸含量分别为6.35,6.25 mg/mL和8.13 mg/mL,都相对较高,这可能是由于不同企业臭豆腐生产过程中发酵工艺不同所致。1号臭豆腐卤水中的丙酸含量约是成品中的5倍。丙酸作为一种食品添加剂在使用时须明确标出,然而在1号臭豆腐中并未人为添加丙酸。为此推测,1号臭豆腐中丙酸含量高是因发酵过程中使用的卤水中产丙酸的微生物多所致。

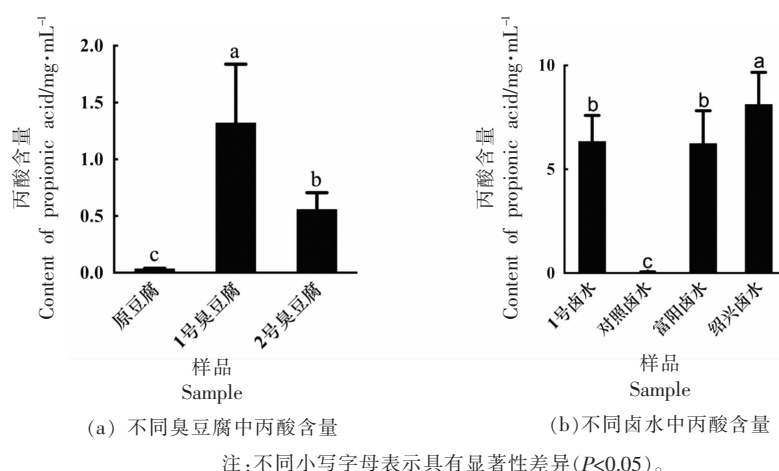


图1 不同厂家的臭豆腐和不同地区卤水中的丙酸含量

Fig.1 Propionic acid content in stinky tofu from different manufacturers and brines in different regions

### 2.2 宏基因组学分析臭豆腐和卤水中的微生物组成

2.2.1 微生物组成概况 为了证实丙酸含量高是卤水中产丙菌数量和种类多所致的推测,对不同来源的成品臭豆腐和卤水中微生物菌群进行宏基因组鉴定。由图2、3可知1号臭豆腐卤水中微生物种类和数量与其它卤水相比有一定的差异,其卤水中共鉴定出16 724株菌,与对照(丙酸含量最低)相比,其中丰度上升的菌株有10 680株,丰度下降的有6 043株。

不同厂家的成品臭豆腐经菌群分析可知,1号臭豆腐中微生物种类和数量与2号臭豆腐相比有一定的差异,共鉴定出12 848株菌,与2号臭豆腐相比,其中丰度上升的菌株有7 374株,丰度下降的有5 474株。

2.2.2 产丙酸菌群丰度的变化 丙酸杆菌,是无芽孢、革兰氏阳性的兼性厌氧菌,作为益生菌的应

用极广泛,具有食品发酵剂,抑制病原微生物,维持肠道菌群平衡,促进其它益生菌增殖,抗炎,提高机体免疫力等益生功能。丙酸杆菌的主要代谢产物为丙酸,又被称作甲基乙酸,是一种重要的天然有机弱酸。其中典型的产丙酸菌株是费氏丙酸杆菌和产酸丙酸杆菌<sup>[19]</sup>。

为进一步证实丙酸含量高是由卤水中产丙菌数量和种类导致的,对卤水和臭豆腐成品中产丙酸菌群丰度进行分析。

2.2.2.1 与对照卤水相比,1号臭豆腐卤水中产丙酸菌株丰度变化(1号/对照) 从表1可知,与丙酸含量极低的对照卤水相比,1号臭豆腐卤水中产丙酸的丙酸杆菌属种类和丰度整体上升。种类上,1号臭豆腐卤水样品中新增丙酸杆菌\_sp.\_JV5菌株,丰度上升无穷多倍。丰度上,除4个菌株丰度略有下降,绝大多数丙酸杆菌的丰度显著增加,丙酸杆菌科\_细菌\_NML\_160184的丰度上升7.6

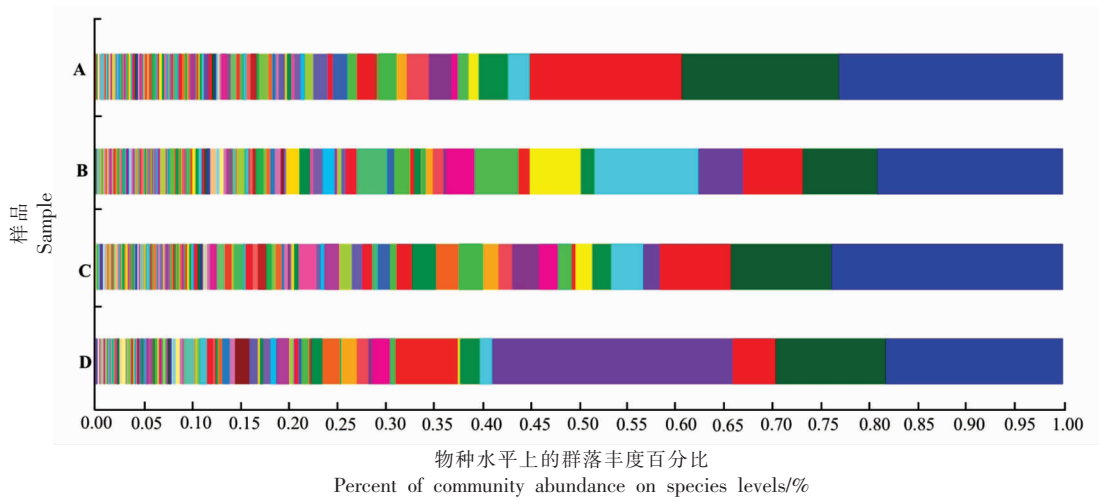


图 2 卤水中微生物组成  
Fig.2 Microbial composition in brine

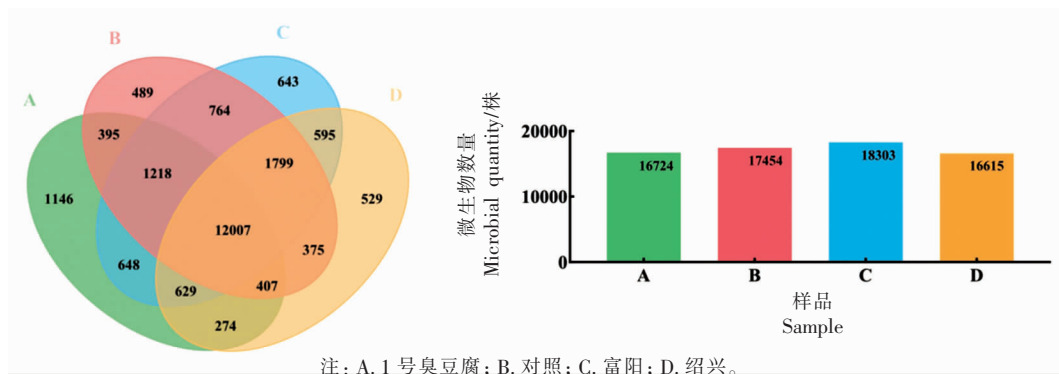


图 3 样本与菌种维恩图  
Fig.3 Venn diagram of sample and strain

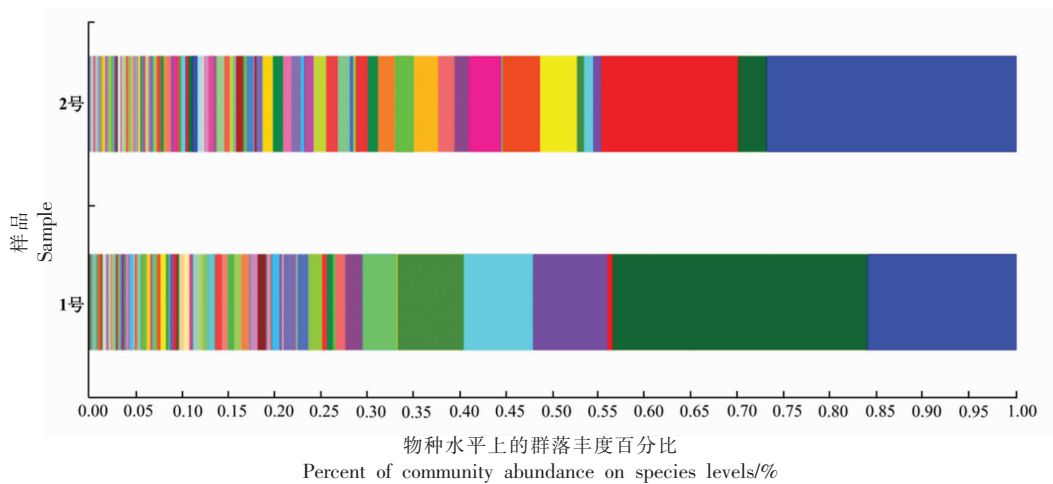


图 4 成品豆腐中微生物组成  
Fig.4 Microorganism composition in finished tofu

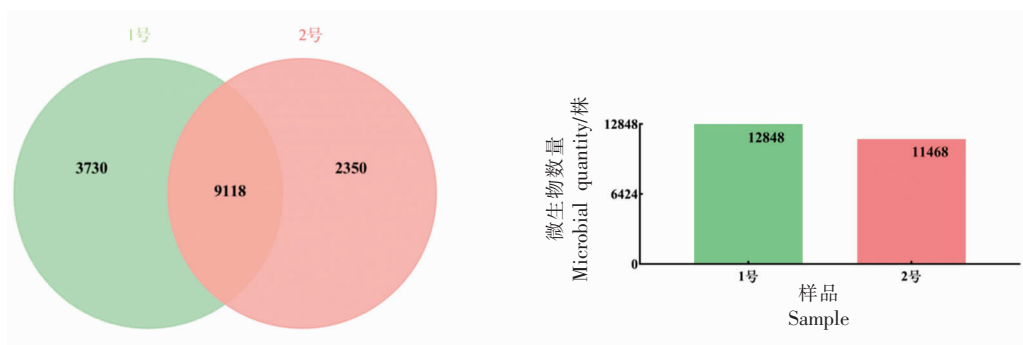


图5 样本与菌种维恩图

Fig.5 Venn diagram of samples and strains

倍,产酸丙酸杆菌的丰度上升 4.7 倍,丙酸杆菌\_细菌的丰度上升 3.8 倍等。此外,还分析了 1 号臭豆腐卤水中典型的有害微生物的变化,发现与其它卤水相比,丰度略有下降,如蜡状芽孢杆菌

(*Bacillus cereus*) 降至 0.37 倍,肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica*)降至 0.45 倍,埃希氏大肠杆菌降至 0.59 倍。

表 1 与对照卤水相比,1 号臭豆腐卤水中产丙酸菌株丰度的变化

Table 1 The changes in the abundance of propionic acid-producing strains in No. 1 stinky tofu brine compared with other brines

菌株名称	菌株中文名	变化倍数
<i>Propionibacterium</i> _sp._JV5	丙酸杆菌_sp._JV5	∞(无穷多倍)
<i>Propionibacteriaceae</i> _bacterium_NML_160184	丙酸杆菌科_细菌_NML_160184	7.6
<i>Acidipropionibacterium</i> _acidipropionici	产酸丙酸杆菌	4.7
<i>Propionibacteriales</i> _bacterium	丙酸杆菌_细菌	3.8
unclassified_f__ <i>Propionibacteriaceae</i>	未分类_f__丙酸杆菌科	3.1
<i>Pseudopropionibacterium</i> _propionicum	假丙酸杆菌_丙酸	3.1
<i>Propionibacteriaceae</i> _bacterium_ES.041	丙酸杆菌科_细菌_ES.041	2.1
<i>Pseudopropionibacterium</i> _massiliense	假丙酸杆菌_massiliense	2.0
<i>Propionibacteriaceae</i> _bacterium_NML_130396	丙杆菌科_细菌_NML_130396	2.0
<i>Propionibacterium</i> _sp.	丙酸杆菌属	1.9
<i>Propionibacteriaceae</i> _bacterium_P6A17	丙酸杆菌科_细菌_P6A17	1.8
<i>Propionibacterium</i> _freudenreichii	丙酸杆菌_费氏	1.8
<i>Propionibacterium</i> _cyclohexanicum	丙酸杆菌	1.8
<i>Propionibacterium</i> _australiense	丙酸杆菌_澳大利亚	1.6
<i>Propionibacteriaceae</i> _bacterium	丙酸杆菌科_细菌	0.6
<i>Propionibacterium</i> _sp._4572_24	丙酸杆菌_sp._4572_24	0.4
<i>Acidipropionibacterium</i> _virtanenii	酸性丙酸杆菌_virtanenii	0.3
<i>Propionibacteriaceae</i> _bacterium_NML_150081	丙酸杆菌科_细菌_NML_150081	0.1

2.2.2.2 与 2 号臭豆腐相比,1 号臭豆腐中产丙酸菌株丰度变化(1 号/2 号) 从表 2 可知,与“2 号臭豆腐”相比,1 号成品臭豆腐中产丙酸的丙酸杆菌属种类和丰度也显著增加。种类上,1 号成品臭

豆腐中新增了丙杆菌科\_细菌\_NML\_130396、丙酸杆菌科\_细菌\_NML\_160184、未分类\_g\_丙酸杆菌和丙酸杆菌共 4 个菌株,丰度均上升了无穷多倍。丰度上,除 2 个菌株丰度略有下降,多数丙



表 2 与 2 号臭豆腐相比,1 号臭豆腐中产丙酸菌株丰度变化

Table 2 Compared with No. 2 stinky tofu, changes in the abundance of propionic acid-producing strains in No. 1 stinky tofu

菌株名称	菌株中文名	变化倍数
<i>Propionibacteriaceae_bacterium_NML_130396</i>	丙杆菌科_细菌_NML_130396	∞(无穷多倍)
<i>Propionibacteriaceae_bacterium_NML_160184</i>	丙酸杆菌科_细菌_NML_160184	∞(无穷多倍)
<i>unclassified_g_Propionibacterium</i>	未分类_g_丙酸杆菌	∞(无穷多倍)
<i>Propionibacterium_cyclohexanicum</i>	丙酸杆菌	∞(无穷多倍)
<i>Propionibacteriaceae_bacterium_P6A17</i>	丙酸杆菌科_细菌_P6A17	59.4
<i>unclassified_f_Propionibacteriaceae</i>	未分类_f_丙酸杆菌科	54.9
<i>Propionibacteriales_bacterium</i>	丙酸杆菌_细菌	47.0
<i>Pseudopropionibacterium_massiliense</i>	假丙酸杆菌_massiliense	29.7
<i>Propionibacterium_freudenreichii</i>	丙酸杆菌_freudenreichii	4.8
<i>Pseudopropionibacterium_propionicum</i>	假丙酸杆菌_丙酸	2.5
<i>Propionibacterium_sp.</i>	丙酸杆菌属	1.7
<i>Propionibacteriaceae_bacterium</i>	丙酸杆菌科_细菌	0.8
<i>Acidipropionibacterium_acidipropionici</i>	酸性丙酸杆菌	0.2

酸杆菌的丰度急剧增加,丙酸杆菌科\_细菌\_P6A17的丰度上升 59.4 倍,未分类\_f\_丙酸杆菌科的丰度上升 54.9 倍,丙酸杆菌\_细菌的丰度上升 47 倍,假丙酸杆菌\_massiliense 的丰度上升 29.7 倍等。

综合上述 2 个产丙酸菌株丰度变化表,可以得出,无论是 1 号臭豆腐卤水还是 1 号成品臭豆腐中,产丙酸的关键菌丙酸杆菌的多个菌株丰度都显著上升,且卤水和成品臭豆腐中部分产丙酸菌的变化趋势一致,即上升显著。由此可知,1 号成品臭豆腐中丙酸含量高,是因卤水中富含产丙酸的丙酸杆菌属的菌株所致。这些菌株在发酵过程中产生大量的代谢产物包括丙酸,进而使成品中丙酸含量增加。

2.2.3 1 号成品臭豆腐富含丙酸杆菌的原因 相比其它厂家产品,1 号臭豆腐中丙酸含量高,可能是由于卤水中产丙酸菌的丰度在发酵过程中较高所致。丙酸杆菌属是兼性厌氧菌,在有氧环境下进行有氧呼吸并大量繁殖,在无氧环境下进行无氧呼吸,一般不繁殖。丙酸发酵主要发生在厌氧阶段,葡萄糖分解成丙酸、乙酸,同时生成维生素 B<sub>12</sub>。在好氧阶段,氧的存在不利于丙酸的生成。此外,丙酸杆菌属的最适生长温度范围是 30~37 ℃,

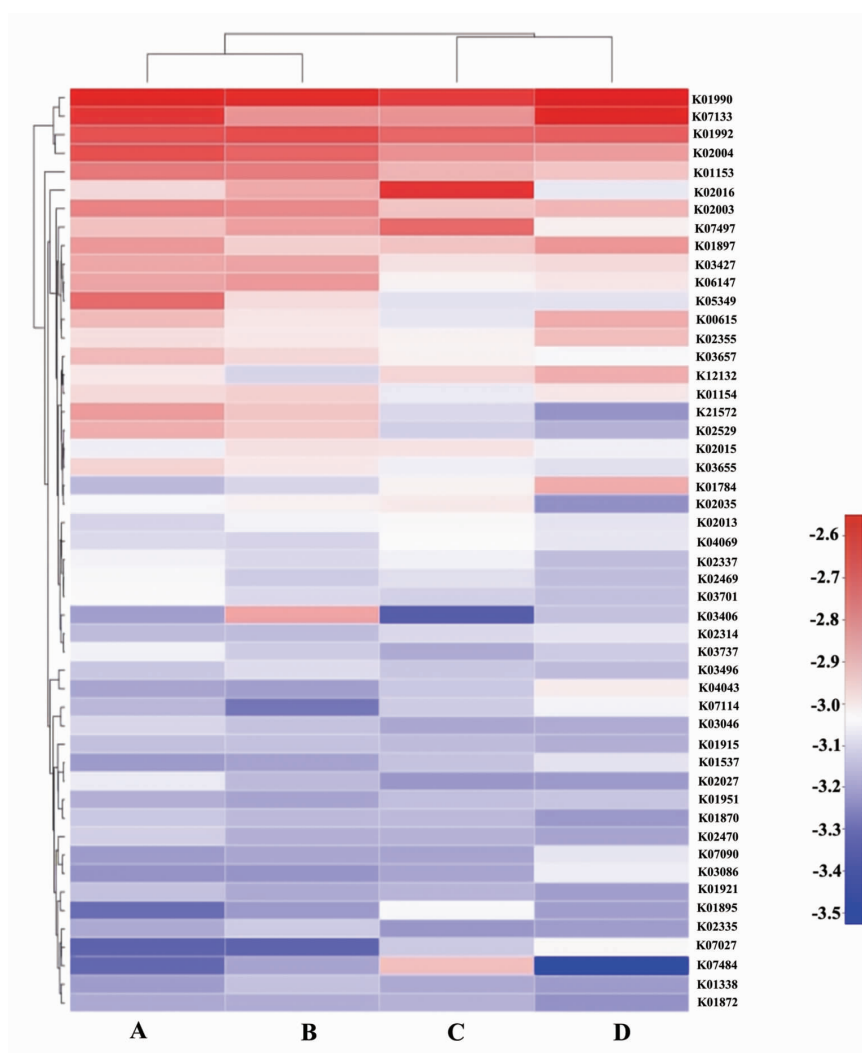
推测 1 号臭豆腐中丙酸含量高,可能是因为卤水卤制豆腐时,发酵前期暴露于空气中的时间长或卤制豆腐环境温度过高,提供了丙酸杆菌大量繁殖的良好条件,导致丙酸杆菌数量增多;发酵中、后期因氧气消耗,卤水中、下层形成厌氧环境,促进丙酸发酵,导致丙酸积累<sup>[20-21]</sup>。若要降低丙酸杆菌的生长量和丙酸含量,发酵过程中应适当控制发酵环境中的氧气量和发酵温度。

### 2.3 不同厂家卤水中微生物功能和代谢产物

为了进一步探究不同地区卤水中微生物的总代谢活动的差异,利用代谢组学对卤水微生物的代谢功能和代谢产物进行对比分析,结果如图 6~8 所示。

图 6 显示基于非靶向代谢组学比较卤水中微生物组成的代谢功能。不同地区的卤水中微生物的代谢功能在 KO1872 和 KO1990 相对一致,而在其它方面存在差异,从而导致臭豆腐发酵过程中代谢产物不同。

此外,对不同地方卤水的代谢产物及其组成进行分析,得出 1 号臭豆腐卤水较其它卤水,藏花素 3(Crocin 3)到拉米夫定 S-氧化物(Lamivudline sulfoxide)的产物最多。PCA 分析表明各组卤水间微生物代谢物有显著差异。



注: A. 1号臭豆腐; B. 对照; C. 富阳; D. 绍兴。

图6 卤水中微生物组成的代谢功能比较

Fig.6 Metabolic function comparison of microbial composition in brine

### 3 结论

相比于原豆腐,1号臭豆腐成品中丙酸含量高达1.32 mg/g,且其卤水中丙酸含量约为成品中的5.6倍。成品豆腐中丙酸含量高可能是由于豆腐卤制发酵所致。宏基因组学分析发现1号成品臭豆腐和卤水中产丙酸杆菌属的菌株种类增加,丰度显著升高且变化一致,代谢产生大量丙酸,致检测到的丙酸含量较高。非靶向代谢组学分析表明,不同卤水在发酵过程中微生物的代谢活动和功能具有显著差异,从而导致最终代谢产物不同。成品臭豆腐中丙酸含量的差异极有可能是受其影响。臭豆腐中检出丙酸是由于发酵过程中微生物

自然产生而非人为添加,不同来源的卤水因产丙酸菌的种类和丰度不同,产品中的丙酸含量也会呈现显著差异。

### 参 考 文 献

- [1] 尹继广. 食品添加剂丙酸钙的生产工艺优化研究[J]. 河北化工, 2006, 29(10): 33-35.  
YIN J G. Study on the optimization of the production process of food additive calcium propionate[J]. Hebei Chemical, 2006, 29(10): 33-35.
- [2] 罗超, 李逢慧, 程天印, 等. 丙酸、丙酸钙对饲料霉

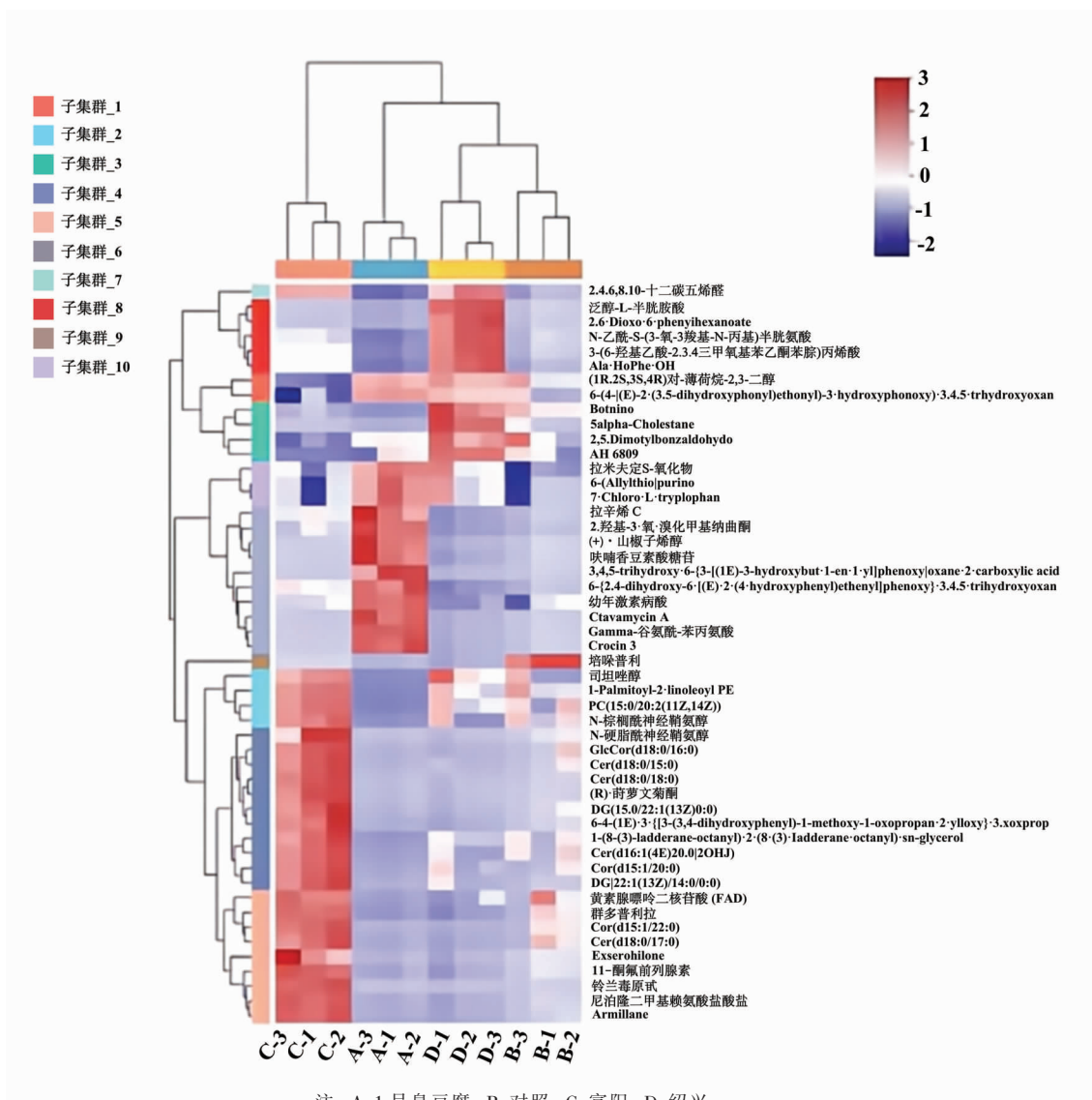


图 7 卤水中微生物组成的代谢产物比较

Fig.7 The comparison of metabolites of microbial composition in brine

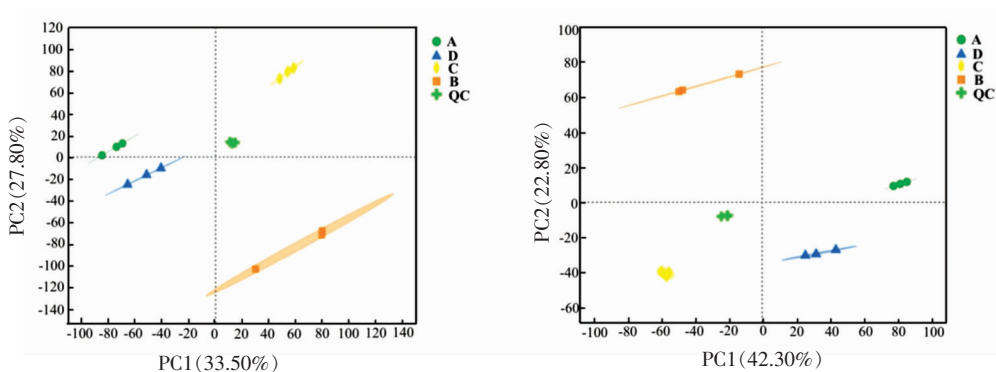


图 8 代谢产物组成 PCA 分析

Fig.8 PCA analysis of metabolite composition



- 变效果的比较[J]. 湖南畜牧兽医, 2008, 2(3): 12-14.
- LUO C, LI F H, CHENG T Y, et al. Comparison of the effects of propionic acid and calcium propionate on feed mildew [J]. Hunan Animal Husbandry and Veterinary, 2008, 2(3): 12-14.
- [3] 杨海鹏, 王自强, 张丽平, 等. 丙酸发酵过程中四种有机酸快速、简便的分析方法[J]. 中国酿造, 2016, 35(5): 107-110.
- YANG H P, WANG Z Q, ZHANG L P, et al. A quick and easy analysis method for four organic acids in the fermentation process of propionic acid [J]. China Brewing, 2016, 35(5): 107-110.
- [4] 顾渭忠. 一种油炸臭豆腐中药卤汁的制作方法: CN102018215A[P]. 2011-04-20.
- GU W Z. A preparation method of traditional Chinese medicine brine of fried stinky tofu: CN102018215A[P]. 2011-04-20.
- [5] 范博望, 任翊, 樊青青, 等. 臭豆腐卤水中的主要发酵菌株及发酵研究[J]. 生物化工, 2021, 7(2): 52-54.
- FAN B W, REN Y, FAN Q Q, et al. Study on the main fermentation strains and fermentation of stinky tofu brine[J]. Biochemical, 2021, 7(2): 52-54.
- [6] HOU J, GU J S, HE G Q, et al. Research progress of volatile flavor compounds in stinky tofu [J]. Science & Technology of Food Industry, 2017, 38(16): 314-317.
- [7] ZHAO G Z, XIE X F, CHEN W, et al. Microbial species of stinky tofu brine and the inoculated fermentation[J]. China Brewing, 2017, 36(2): 21-24.
- [8] 卢义伯, 潘超, 祝义亮. 臭豆腐发酵菌种的筛选与鉴定[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 246-249.
- LU Y B, FAN C, ZHU Y L. Screening and identification of stinky tofu fermentation strains [J]. Food Science, 2007, 28(6): 246-249.
- [9] 聂志强, 韩玥, 郑宇, 等. 宏基因组学技术分析传统食醋发酵过程微生物多样性[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 198-203.
- NIE Z Q, HAN Y, ZHENG Y, et al. Analysis of microbial diversity in traditional vinegar fermentation process by metagenomics technology [J]. Food Science, 2013, 34(15): 198-203.
- [10] JUNG J Y, LEE S H, KIM J M, et al. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(7): 2264-2274.
- [11] 王希越, 李秋颖, 田媛媛. 微生物代谢组学研究应用进展[J]. 科技风, 2016(19): 70.
- WANG X Y, LI Q Y, TIAN Y Y. Progress in research and application of microbial metabolomics [J]. Technology Wind, 2016(19): 70.
- [12] 刘皓皓, 刘芹, 崔筱, 等. 基于代谢组学分析平菇栽培用培养料发酵过程中代谢物的变化[J]. 中国瓜菜, 2021, 34(4): 21-30.
- LIU H H, LIU Q, CUI X, et al. Metabolomics analysis of changes in metabolites during fermentation of culture medium for oyster mushroom cultivation[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2021, 34(4): 21-30.
- [13] 王越男, 孙天松. 代谢组学在乳酸菌发酵食品和功能食品中的应用[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(5): 27-31.
- WANG Y N, SUN T S. Application of metabonomics in lactic acid bacteria fermented food and functional food[J]. China Dairy Industry, 2017, 45(5): 27-31.
- [14] 张秀君, 孙钱钱, 乔双, 等. 菠菜叶绿素提取方法的比较研究[J]. 作物杂志, 2011(3): 57-59.
- ZHANG X J, SUN Q Q, QIAO S, et al. Comparative study on extraction methods of spinach chlorophyll[J]. Crops, 2011(3): 57-59.
- [15] 郑娟梅, 莫紫梅, 刘珈伶, 等. 浸提法与凯氏定氮法测定湿米粉中双乙酸钠含量的比较[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(17): 93-95.
- ZHENG J M, MO Z M, LIU J L, et al. Comparison of extraction method and kjeldahl method for determination of sodium diacetate in wet rice noodles[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(17): 93-95.
- [16] 钱兵, 张燕, 李莎, 等. 反高效液相色谱法测定丙酸发酵液中的有机酸[J]. 分析化学, 2007, 35(11): 1651-1653.
- QIAN B, ZHANG Y, LI S, et al. Determination of organic acids in propionic acid fermentation broth by reverse high performance liquid chromatography [J]. Analytical Chemistry, 2007, 35(11): 1651-1653.
- [17] 冯德明, 张洋, 赵惠明, 等. 反相高效液相色谱法测定黄酒中的有机酸[J]. 中国酿造, 2009, 28(3): 157-161.
- FENG D M, ZHANG Y, ZHAO H M, et al. Deter-

- mination of organic acids in rice wine by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *China Brewing*, 2009, 28(3): 157-161.
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760-2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard, food additives use standard: GB 2760-2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [19] PIWOWAREK K, LIPINSKA E, HAC-SZYMANCZUK E, et al. *Propionibacterium* spp. -source of propionic acid, vitamin B<sub>12</sub>, and other metabolites important for the industry [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(2): 515-538.
- [20] 孙贵朋, 张雪娇, 王妍, 等. 臭豆腐卤液中细菌多样性研究[J]. *现代食品科技*, 2010, 26(10): 1087-1091.
- SUN G P, ZHANG X J, WANG Y, et al. Study on bacterial diversity in stinky tofu brine[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(10): 1087-1091.
- [21] 虞镇激, 胡会萍, 李里特. 浙江绍兴臭豆腐卤液中微生物菌群的分析[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(14): 183-187.
- YU Z W, HU H P, LI L T. Analysis of microbial flora in the steep juice of Zhejiang Shaoxing stinky tofu[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(14): 183-187.

### The Mechanisms of Propionic Acid Formation in the Fermentation of Stinky Tofu

Ji Chen<sup>1</sup>, Zhou Su<sup>1</sup>, Han Xiaohua<sup>2</sup>, Tu Pengcheng<sup>1</sup>, Ye Xiang<sup>1</sup>, Yan Fujie<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012

<sup>2</sup>Zu Ming Bean Products Co. Ltd., Hangzhou 310051

**Abstract** The content of propionic acid in No. 1 stinky tofu detected by HPLC was about 1.32 mg/g, which was higher than the content of propionic acid in No. 2 stinky tofu from different manufacturers (0.56 mg/g), and the content of propionic acid in tofu embryos before fermentation was very low, about 0.026 mg/g, but the content of propionic acid in brine was as high as 6.35 mg/mL. As a food additive, propionic acid must be marked on the packaging if it is added during the production process, but the No. 1 stinky tofu manufacturer did not artificially add propionic acid. Therefore, this experiment aimed to explore the causes and mechanisms of production of propionic acid during the fermentation of stinky tofu. Using metagenomics to analyze and identify the microbial composition in brine and stinky tofu, it was found that compared with the 'control brine' with very low propionic acid content, the species and abundance of *Propionibacterium* that produced propionic acid in No. 1 stinky tofu brine increased overall. Among them, the abundance of *Propionibacteriaceae\_bacterium\_NML\_160184* had increased by 7.6 times, the abundance of *Acidipropionibacterium\_acidipropionici* acidigenes has increased by 4.7 times, and the abundance of *Propionibacterium\_bacteria* has increased by 3.8 times. Compared with No. 2 stinky tofu, the species and abundance of *Propionibacterium* producing propionic acid in No. 1 finished tofu also increased significantly. The abundance of *Propionibacteriaceae\_bacterium\_P6A17* increased by 59.4 times, and the abundance of unclassified\_f\_ *Propionibacteriaceae* increased by 54.9 times. The abundance of *Propionibacteriales\_bacterium* increased by 47 times, and the abundance of *Pseudopropionibacterium\_massiliense* increased by 29.7 times. Non-targeted metabolomics analysis of the microbial metabolites and functions in brine found that the metabolic activities of different brine microbial compositions were significantly different. The difference in propionic acid levels in stinky tofu was most likely due to the types and metabolic activities of the microorganisms in the brine. In summary, the detection of propionic acid in stinky tofu was due to the natural production of microorganisms during the fermentation process rather than artificial addition. Due to the different types and abundance of propionic acid-producing bacteria in brines from different sources, the propionic acid content of the final product will also showed significant differences.

**Keywords** stinky tofu; propionic acid; high performance liquid chromatography (HPLC); metagenomics; non-targeted metabolomics