

## 镇江香醋固态发酵醋醅中微生物总 DNA 提取方法比较

倪峥飞<sup>1,2</sup>, 许伟<sup>2</sup>, 窦文芳<sup>1</sup>, 许泓瑜<sup>1</sup>, 许正宏<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>江南大学医药学院制药工程实验室, 无锡 214122)

(<sup>2</sup>江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122)

**摘要:**【目的】为了更加全面地分析我国传统固态发酵过程中微生物群落的多样性和演替情况,本文以镇江香醋固态发酵为例,对比研究了11种不同的总DNA提取法对醋醅中总DNA提取的影响。【方法】使用紫外分光光度计法和荧光定量PCR(Real time Quantitative PCR)测定了不同提取方法得到的醋醅样品总DNA的产量与纯度,采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)法对固态发酵中细菌和真菌的多样性进行了分析。【结果】醋醅总DNA得率最高可达 $93.2 \pm 1.5 \mu\text{g/g}$ 干醅,细菌总数最高达到 $1.73 \times 10^{13} \text{ copies} \cdot (\text{g 干醅})^{-1}$ ,真菌总数最高达到 $6.49 \times 10^{12} \text{ copies} \cdot (\text{g 干醅})^{-1}$ 。不同的提取方法对DGGE结果有明显的影响,6种基于SDS裂解的方法所获得的条带较多。【结论】结果表明,液氮研磨+溶菌酶+SDS高盐抽提法(方法3)为最优的醋醅总DNA提取方法。

**关键词:** 食醋固态发酵; DNA提取; 荧光定量PCR; 变性梯度凝胶电泳

**中图分类号:**      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0119-07

我国传统酿醋工艺多采用开放式固态发酵,在发酵过程中存在着一个由细菌、酵母菌、霉菌等组成的复杂的微生物体系,微生物群落的结构与成品醋的质量和风味等有着密切的关系<sup>[1]</sup>。全面地研究固态发酵过程中微生物的多样性以及群落演替情况,有助于更深入地探究我国传统固态发酵的工艺机理,进而进一步解析微生物群落结构与产品质量及风味等物质形成之间的关系。由于受到传统纯培养方法局限性的影响,近年来微生物分子生态学技术被越来越广泛地应用于传统发酵食品的微生物多样性研究当中,如变性梯度凝胶电泳技术(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)<sup>[2-3]</sup>、荧光原位杂交技术(Fluorescent in situ hybridization, FISH)<sup>[4]</sup>、随机扩增多态性DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)<sup>[5-6]</sup>、

限制性片段多态性分析(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)<sup>[7]</sup>等技术。研究表明,在对特定环境中的微生物群落进行分析的时候,由于受到提取的样品总DNA质量的影响,常常会造成对环境微生物丰度的低估<sup>[8]</sup>。

镇江香醋是我国传统固态发酵酿醋的典型代表,其醋醅除酒醪外,还采用了稻壳、麸皮等固态原料,在发酵过程中产生了大量有机酸、氨基酸、以及醇类、醛类、酮类、酚类等物质<sup>[9-10]</sup>。微生物吸附在醋醅颗粒上会对总DNA提取造成一定困难,多糖和多酚类等杂质的存在会干扰后续PCR实验<sup>[11]</sup>,从而影响群落分析结果的可靠性。目前还没有一种标准的DNA提取方法适用于醋醅这一特殊基质,如何使醋醅中所有细胞裂解、充分释放DNA,有效去除杂质,得到可以进行分子生物学操作的高纯度

**基金项目:** 国家863前沿探索项目(2007AA02Z203); 国家十一五科技支撑计划(2006BAD27B09-3, 2008BA163B06); 教育部新世纪人才支持计划(NCET-07-0380); 江南大学食品科学与技术国家重点实验室目标导向课题(SKLF-MB-200801)

\* 通信作者。Tel: +86510-85918206; E-mail: zhengxu@jiangnan.edu.cn

**作者简介:** 倪峥飞(1984-)男,江苏无锡人,硕士研究生,研究方向为微生物代谢调控与代谢产物。E-mail: nz984629@163.com

**收稿日期:** 2009-08-03; **修回日期:** 2009-09-29

DNA 是研究镇江香醋醋醅群落结构与功能关系的关键所在。为此,本文结合国内外报道,设计并改进了 11 种总 DNA 的提取方法,从 DNA 产量及纯度,所提取的细菌和真菌生物量及其多样性等方面对提取方法进行了比较和评价,确定了适合镇江香醋醋醅特性的总 DNA 提取方法,为进一步采用分子生态学技术对食醋发酵过程中微生物群落的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 样品来源及理化性质:**从距醋醅表面 10 cm 处取镇江恒顺香醋醋酸发酵第 7 d 醋醅样品,冰盒低温保藏运送至实验室后  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存。醋醅 pH 3.8,含水量 62.3%,采样点温度  $42^{\circ}\text{C}$ 。

**1.1.2 主要试剂(盒):**细菌基因组 DNA 提取试剂盒 GK1071 (Generay 公司)、真菌基因组 DNA 提取试剂盒 Cat# BSC14S1 (Bioer 公司)、SYBR *Premix Ex Taq* 酶购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 醋醅总 DNA 的提取

**1.2.1 样品预处理:**取 2 g 醋醅样品,用 20 mL 0.1 mol/L 的 PBS (pH 7.0) 悬浮,加入玻璃珠,vortex 充分振荡 5 min;  $200 \times g$  离心 5 min,收集上清(含菌体),弃取沉淀;洗涤 3 次;  $9000 \times g$  高速离心 5 min。弃上清,收集沉淀。收集的菌体用 5 mL 0.1 mol/L 的 PBS (pH 7.0) 悬浮,  $9000 \times g$  离心;洗涤 3 次;洗净的菌体悬浮在 1 mL PBS (pH 7.0) 中,用枪吹打后 vortex 振荡均匀,转入 1.5 mL EP 管中,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存。

**1.2.2 细胞破碎:**根据是否将醋醅样品预处理,将细胞破碎方式分为原位破碎和异位破碎。(1)原位破碎:方法 1(液氮研磨法):称取 2 g 醋醅,在研钵中加入液氮充分研磨,转移至离心管并加入 6 mL DNA 抽提缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 100 mmol/L EDTA, 100 mmol/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 1.5 mol/L NaCl),迅速置于  $65^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h,每隔 15 - 20 min 轻轻颠倒几下,室温  $6000 \times g$  离心 10 min,收集上清。方法 2(液氮研磨 + SDS 高盐抽提法):称取 2 g 醋醅,在研钵中加入液氮充分研磨,以下操作同方法 5。方法 3(液氮研磨 + 溶菌酶 + SDS 高盐抽提法):在 DNA 提取液中加入 100  $\mu\text{L}$  溶菌酶(50 mg/mL),其他操作同方法 2。方法 4(溶菌酶 + SDS 高盐抽提法)在 DNA 提取液中加入 100  $\mu\text{L}$  溶菌酶(50 mg/mL),其他操作同方法 5。方法 5(SDS 高盐抽提法):参照

(Zhou, 1996)<sup>[12]</sup> 的报道改进,称取 2 g 醋醅,转移至 50 mL 离心管。向离心管中加入 6 mL DNA 抽提缓冲液,于 225 r/min 摇床上  $37^{\circ}\text{C}$  摇动 30 min。向离心管中加入 1.5 mL 10% SDS,  $65^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h,每隔 15 - 20 min 轻轻颠倒几下,室温  $6000 \times g$  离心 10 min。收集上清。方法 6(蛋白酶 K + SDS 高盐抽提法):在 DNA 提取液中加入 30  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K (20 mg/mL),其他操作同方法 5。方法 7(石英砂研磨 + SDS 高盐抽提法):称取 2 g 醋醅,在研钵中加入 1 g 石英砂充分研磨,其他操作同方法 5。(2)异位破碎:方法 8(真菌基因组 DNA 抽提试剂盒法):具体步骤按说明书操作。方法 9(SDS 高盐抽提法):具体操作参照方法 5。方法 10(超声破碎法):具体步骤参照(Fykse, 2003)<sup>[13]</sup> 的报道。方法 11(细菌基因组 DNA 提取试剂盒法)具体步骤按说明书操作。

**1.2.3 DNA 提取纯化:**采用以上 9 种方法(除方法 8、11 外)得到的细胞裂解液用等体积的氯仿-异戊醇(24 : 1 体积比)抽提一次,以 0.6 倍体积的异丙醇室温沉淀 1 h,  $16000 \times g$  离心 20 min,收集核酸沉淀,用冷的 70% 乙醇洗涤沉淀, DNA 沉淀干燥后溶于 100  $\mu\text{L}$  TE 中,加入终浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase A,并在  $37^{\circ}\text{C}$  下水浴消化 2 h,以去除 RNA,置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。此外,2 种试剂盒均按照说明书操作,进行 DNA 的提取纯化。

分别采取上述 11 种方法提取醋醅样品的总 DNA,每种方法重复 3 次。

### 1.3 DNA 产量以及纯度的测定

用紫外分光光度计于 260 nm 和 280 nm 波长下测定粗提总 DNA 的吸光值  $A_{260}$  和  $A_{280}$ ,并计算出  $A_{260}/A_{280}$  值。通过  $A_{260}$  计算 DNA 的产量;  $A_{260}/A_{280}$  值评价 DNA 的纯度。

### 1.4 Real-time PCR<sup>[14-15]</sup>

Real-time PCR 扩增采用 Chromo4 荧光定量 PCR 仪 (MJ 公司)。SYBR *Premix Ex Taq* 酶购自 TaKaRa 公司。细菌通用引物:  $P_1$ : 5'-CCTACGGG AGGCAGCAG-3';  $P_2$ : 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'。细菌 PCR 扩增条件:  $94^{\circ}\text{C}$  10 s;  $94^{\circ}\text{C}$  5 s,  $58^{\circ}\text{C}$  15 s,  $72^{\circ}\text{C}$  15 s, 40 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  5 min; 真菌通用引物:  $Y_1$ : 5'-GCGGTAATTCCAGCTCCAATAG-3';  $Y_2$ : 5'-GCCACAAGGACTCAAGGTTAG-3'。真菌 PCR 扩增条件:  $94^{\circ}\text{C}$  10 s;  $94^{\circ}\text{C}$  5 s,  $56^{\circ}\text{C}$  15 s,  $72^{\circ}\text{C}$  15 s, 45 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  5 min, 荧光产物在每个循环的最后一步进行检测。为了检测样品中细菌和真菌的总数,荧光信号检测的线性范围为  $10^3 - 10^{12}$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

## 1.5 PCR 扩增

用 Muzyer 等人所用的引物<sup>[16]</sup>来扩增细菌 16S rDNA  $V_3$  区, 在正向引物  $P_2$  的 5' 端加了 GC 发夹, 序列如下:  $P_2$ : 5'-[CGCCCGCCGCGCGCGCGGCGCGGGCGGGGGCACGGGGGG] CCTACGGGAGGCAGCAG-3';  $P_3$ : 5'-ATTACCGC GGCTGCTGG-3'。PCR 反应体系和反应条件参照文献<sup>[17]</sup>进行。

用 Shin Haruta 等人所用的引物 NS3-YM951r<sup>[2]</sup>来扩增真菌 18S rDNA, 对应 *Saccharomyces cerevisiae* 18S rDNA 553F 到 935R 的位点, 可以扩增 18S rDNA 约 398 bp 的片段, 在正向引物 NS3 的 5' 端加了 GC 发夹, 序列如下: NS3: 5'-[CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGGG] GCAAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3'; YM951r: 5'-TTG GCAAATGCTTTTCGC-3'。PCR 反应体系和反应条件参照文献<sup>[2]</sup>进行。

为了去除单链和异源双链的污染, 分别将以上第一轮 PCR 的扩增产物作为模板进行 5 个循环的 re-conditioning PCR。

## 1.6 DGGE 分析

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并用 DNA Quant TM 200 浓度仪 (Hofer Pharmacia Biotech) 测定 DNA 浓度, 上样量为 200 ng。DGGE 采用 Bio-rad D Code 电泳系统, 电泳条件为: 8% 聚丙烯酰胺凝

胶, 细菌 PCR 产物凝胶变性梯度为 30% -50%, 真菌 PCR 产物凝胶变性梯度为 10% - 50% (100% 变性剂浓度为 7 M 尿素, 40% 甲酰胺), 电泳缓冲液为  $1 \times$  TAE, 60°C, 200 V 电压电泳 4 h, SYBR Green I 染色 45 min, UVI 凝胶成像系统 (UVItec) 成像。DGGE 指纹图谱用 Quantity One 软件做聚类分析。

## 1.7 统计分析

1.3 和 1.4 实验结果表示为平均值  $\pm$  标准误差 (SE)。数据采用单侧方差分析 (one-way ANOVA), 当  $F$  值为显著时, 再用 Duncan's test 测定各组之间差异的显著性。  $P < 0.05$  为具有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 DNA 产量及纯度

从 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果可见, 11 种方法均能提取到醋醅微生物的总 DNA, 且所得到的 DNA 片段长度都在 23 kb 左右。原位提取方法的醋醅 DNA 得率明显高于异位提取法的醋醅 DNA 得率, 其中方法 3 所提取得到的醋醅 DNA 平均得率最高, 为  $93.2 \pm 1.5 \mu\text{g/g}$  干醅, 与其他原位提取方法的 DNA 得率具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。方法 11 提取的醋醅 DNA 的得率最低, 仅为  $3.7 \pm 1.5 \mu\text{g/g}$  干醅 (图 1)。

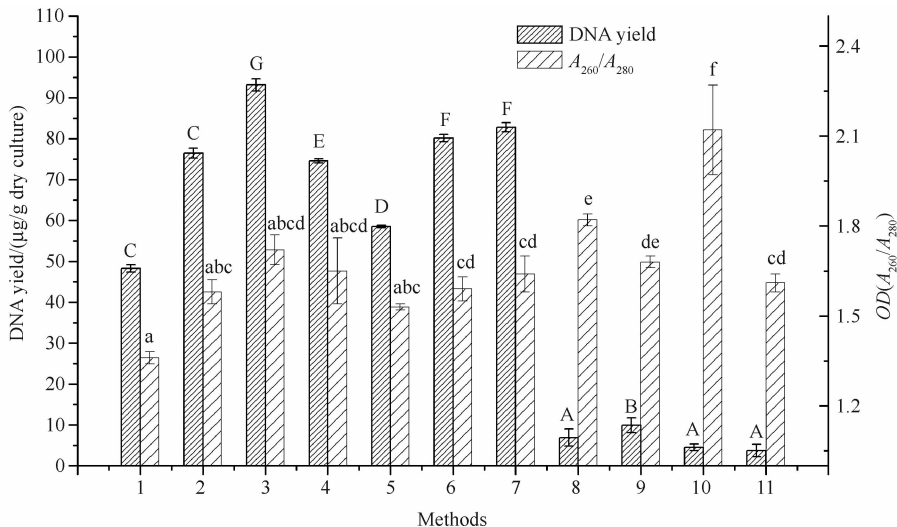


图 1 不同方法提取的总 DNA 产量及纯度

Fig. 1 Yield and purity of total DNA extracted by different methods

In situ methods: 1: Grinding in liquid nitrogen; 2: Grinding in liquid nitrogen + SDS lysis; 3: Grinding in liquid nitrogen + lysozyme + SDS lysis; 4: Lysozyme + SDS lysis; 5: SDS lysis; 6: Proteinase K + SDS lysis; 7: Grinding in quartz sand + SDS lysis; Ex situ methods: 8: Biospin kit; 9: SDS lysis; 10: Ultrasonic lysis; 11: Genaray kit; Groups with the same letter indicate no significant difference.

纯 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  为 1.8, 低于 1.8 则表明 DNA 中有蛋白质污染。DNA 纯度检测结果表明

(图 1), 11 种方法中方法 8 所提取的 DNA 纯度最高,  $A_{260}/A_{280}$  为 1.82, 其次为方法 3。方法 1 的蛋白

质污染较严重,而方法 10 的  $A_{260}/A_{280}$  大于 2,显示有较明显的 RNA 污染。

## 2.2 Real-time PCR

采用 Real-time PCR 对上述 11 种 DNA 提取方法所得的总 DNA 中的细菌和真菌生物量进行分析,结果如图 2 所示。从图中我们发现,原位提取方法

得到的生物量较异位高,其中又以方法 3 得到的生物量为最高,细菌总数达到  $1.73 \times 10^{13}$  copies  $\cdot$  (g 干酪) $^{-1}$ ,真菌总数达到  $6.49 \times 10^{12}$  copies  $\cdot$  (g 干酪) $^{-1}$ ,并且与其他原位提取方法的定量结果具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

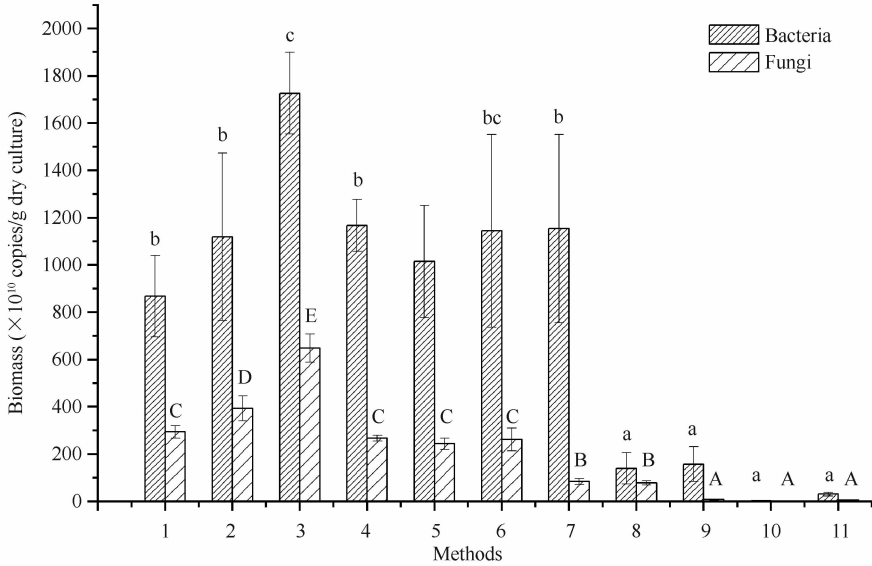


图 2 细菌和真菌的定量 PCR 结果

Fig. 2 Quantitative Real-time PCR results for bacteria and fungi. Method 1-11 are the same as indicated in Fig. 1. Groups with the same letter indicate no significant difference.

## 2.3 DGGE 分析

将 PCR 产物真空冷冻干燥,加 30  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 溶

解,DNA 浓度仪测定浓度,按照 200 ng 上样量上样进行 DGGE 分析。结果如图 3 所示。

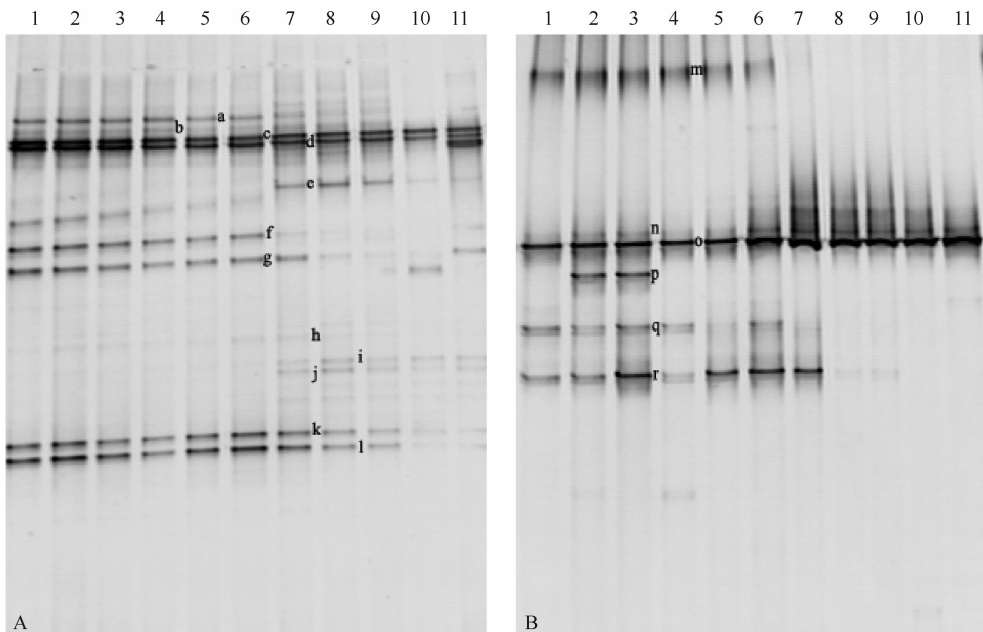


图 3 细菌 PCR 产物的 DGGE(A) 和真菌 PCR 产物的 DGGE(B)

Fig. 3 DGGE profile of bacterial PCR products (A) and fungal PCR products (B). Method 1-11 are the same as indicated in Fig. 1.

从细菌 DGGE 图谱(图 3 - A)来看,条带 c、d 亮度较高,代表了醋醅细菌群落中的优势条带,条带 f、g 没有被异位提取法检测到,条带 k、i 在异位提取法的图谱均较弱。从真菌 DGGE 图谱(图 3 - B)来看,条带 o 亮度尤其高,代表了醋醅真菌群落中的优势条带,条带 m、n、p、q、r 均没有被异位提取方法检测到,并且条带 p 只被方法 2、3 检测到。

图 4 和表 2 是通过生物学软件 Quantity One 对 DGGE 图谱进行的聚类分析和 Shannon-Wiener 指数分析结果。聚类分析结果表明(图 4),不同提取方法所获得的 DNA PCR-DGGE 结果有一定差异,其中

真菌 PCR-DGGE 的聚类分析显示原位提取方法所获图谱的相似性都较高。运用 Shannon-Wiener 指数对各种醋醅总 DNA 提取方法的 PCR-DGGE 图谱结果中的微生物多样性进行分析,根据公式  $H = -\sum [ni / N \ln(ni / N)]$  计算各种醋醅总 DNA 提取方法的 PCR-DGGE 结果的 Shannon-Wiener 指数。结果表明(表 2),原位提取方法得到的细菌 PCR-DGGE 的 Shannon-Wiener 指数差异不明显,但较异位提取高,在 2.01 - 2.28 范围内;在对真菌的 Shannon-Wiener 指数分析中,我们发现方法 3 的真菌 PCR-DGGE 的 Shannon-Wiener 指数最高,为 1.64。

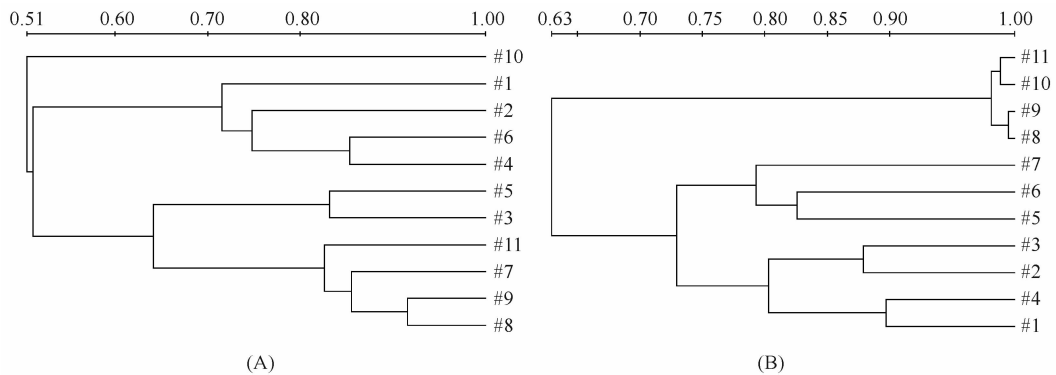


图 4 11 种方法对醋醅提取的 DNA 的 16S rDNA (A) 和 18S rDNA (B) PCR-DGGE 的相似性分析

Fig. 4 Cluster analysis of 16S rDNA (A) and 18S rDNA (B) PCR-DGGE of DNA extracted from sample by eleven methods. Note: Method 1-11 are the same as indicated in Fig. 1.

表 2 11 种方法的 PCR-DGGE 分析的 Shannon 多样性指数

Table 2 Shannon diversity index of PCR-DGGE of DNA extracted by eleven methods

Method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
16S rDNA PCR-DGGE	2.25	2.28	2.17	2.1	2.09	2.07	2.01	1.88	1.59	1.53	1.58
18S rDNA PCR-DGGE	1.43	1.57	1.64	1.24	1.3	1.43	1.23	0.67	0.65	0.67	0.63

Note: Method 1-11 are the same as indicated in Fig. 1.

### 3 讨论

镇江香醋开放式固态发酵过程中,大量微生物附着于由稻壳和麸皮组成的基质上生长,通过其代谢作用分泌大量的以醋酸为主的代谢产物,赋予镇江香醋独特的风味。由于醋醅本身及其微生物的复杂性,常规分析微生物的方法如平板计数、生物量测定等方法准确性受到了极大的限制。Real-time PCR 由于其敏感性好、特异性高,能够简便、高效地对食品中特定微生物进行定量分析。PCR-DGGE 技术是近几年来广泛应用于传统发酵食品研究的分子生态学方法之一。应用这两种技术来评价不同提取方法对醋醅总 DNA 的提取效果对于后续分子生态学研究的开展具有可靠的现实意义<sup>[2-3,18]</sup>。

从镇江香醋醋醅中提取 DNA 的方法可以分为两类,一类是原位提取法,在醋醅中直接裂解微生物体,再提取 DNA;另一类是异位提取法,先将微生物菌体与醋醅颗粒分开,再提取 DNA。在本文研究的 11 种 DNA 提取方法中(其中包括 7 种原位提取法和 4 种异位提取法),紫外分光光度计定量和 Real-time PCR 的结果显示异位提取法所获得的 DNA 总量明显低于原位提取方法,PCR-DGGE 分析结果表明异位法提取的 DNA 所反映的微生物多样性也明显低于原位提取方法。可能原因之一是微生物牢固地吸附在基质颗粒上,难于被洗脱,导致部分菌体不能成功被收集<sup>[19]</sup>。尤其值得指出的是,方法 5 和 9 的差别之处只是原异位破碎方式的不同,但却造成了两种方法在 DNA 产量、Real-time PCR、DGGE 图谱等方面比较上的较大差异。

在醋醅 DNA 的提取过程中,醋醅中菌体细胞的裂解是其中的关键步骤。目前,复杂样品中微生物细胞裂解的方法主要包括以下 3 种:物理法(如液氮研磨、超声波破碎、玻璃珠研磨震荡、冻融等);化学法(如表面活性剂 SDS、热酚、高盐、异硫氰酸胍处理等);酶解法(裂解酶、溶菌酶、蛋白酶 K 等)。不同的方法细胞裂解程度不同,可根据不同的试验综合利用上述方法。根据后续的分子生态学以及宏基因组研究的需要,除了要求所提取的醋醅 DNA 得率高、纯度高之外,DNA 片段的完整性是后续研究结果数据可靠的保证。细胞破碎时,化学法裂解细胞较温和,不易将大片段 DNA 打断,但是裂解可能不充分。因而本文设计了以 SDS 高盐抽提法为主,物理法(液氮研磨、石英砂研磨)和酶解法(溶菌酶、蛋白酶 K)为辅的 6 种组合方法,并与液氮研磨、超声破碎等物理法以及 2 种商用 DNA 抽提试剂盒进行对照。实验结果表明,基于 SDS 高盐抽提法的 6 种改良方法在 DNA 产量,细菌和真菌的生物量,以及微生物群落丰度方面较之物理法、试剂盒法都显示出明显的优势。这与 Zhou 等<sup>[12]</sup>报道的基于 SDS 的细胞裂解方法适合复杂环境样品微生物总 DNA 提取一致。

本文比较了 11 种 DNA 提取方法,其中方法 3(液氮研磨 + 溶菌酶 + SDS 高盐抽提法)从 DNA 产量、纯度和微生物多样性等方面优于其他方法,适用于进一步采用分子生态学技术(DGGE)对镇江香醋醋酸发酵过程中的微生物群落的研究,为进一步探索醋醅中微生物群落结构与风味物质形成的关系奠定了基础。

## 参考文献

- [ 1 ] 许伟, 张晓君, 李崎, 等. 微生物分子生态学技术在传统发酵食品行业中的应用研究进展. *食品科学 (Food Science)*, 2007, 28 (12): 521-525.
- [ 2 ] Haruta S, Ueno S, Egawa I, et al. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 109: 79-87.
- [ 3 ] Aquilanti L, Santarelli S, Silvestri G, et al. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 120 (1-2): 136-145.
- [ 4 ] Ercolini D, Hill PJ, Dodd CER. Bacterial community structure and location in Shilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (6): 3540-3548.
- [ 5 ] Nanda K, Taniguchi M, Ujike S, et al. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 17: 986-990.
- [ 6 ] Di Maro E, Ercolini D, Coppola S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117 (2): 201-210.
- [ 7 ] Prieto C, Jara C, Mas A, et al. Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 115 (3): 348-355.
- [ 8 ] de Liphthay JR, Enzinger C, Johnsen K, et al. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36 (10): 1607-1614.
- [ 9 ] 张丽娟, 许伟, 许泓瑜等. 恒顺香醋固态发酵过程中有机酸的变化分析. *中国调味品 (China Condiment)*, 2009, 34 (2): 106-109.
- [ 10 ] 黄达明, 杨勇, 张志才. 不同发酵期和陈酿期镇江香醋香气成分的变化. *中国酿造 (China Brewing)*, 2008, 9: 56-61.
- [ 11 ] Demeke T, Adams RP. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques*, 1992, 12: 332-334.
- [ 12 ] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (2): 316.
- [ 13 ] Fykse EM, Olsen JS, Skogan G. Application of sonication to release DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55 (1): 1-10.
- [ 14 ] Guo XL, Xia XJ, Tang RY, et al. Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs. *Anaerobe* 2008, 14 (4): 224-228.
- [ 15 ] Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (7): 4117-4120.
- [ 16 ] Muyzer G, de Waal EC, Ulterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695-700.

- [17] Haruta S, Kondo M, Nakamura K, et al. Microbial community changes during organic solid waste treatment analyzed by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60: 224-231.
- [18] Jara C, Mateo E, Mas A, et al. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 128 (2): 336-341.
- [19] Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 4715-4724.
- [20] Krsek M, Wellington EMH. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 39 (1): 1-16.

## Comparison of Total Microbial DNA Extraction Methods from Solid-culture of Zhenjiang Vinegar

Zhengfei Ni<sup>1,2</sup>, Wei Xu<sup>2</sup>, Wenfang Dou<sup>1</sup>, Hongyu Xu<sup>1</sup>, Zhenghong Xu<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

(<sup>2</sup> State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To analyze the diversity and succession of microbes during traditional solid-state fermentation. Taking Zhenjiang vinegar for example, we compared 11 methods for extracting genomic DNA from microbes in solid-culture of Zhenjiang vinegar. [ **Methods** ] The yield and purity of the DNA were measured by ultraviolet spectrophotometer and real-time PCR. The bacterial and fungal diversity during solid-state fermentation was analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). [ **Results** ] The highest extraction yield of total DNA was  $93.2 \pm 1.5 \mu\text{g/g}$  dried culture. The quantity of bacteria and fungi reached to the maximum of  $1.73 \times 10^{13}$  copies  $\cdot (\text{gram dried culture})^{-1}$  and  $6.49 \times 10^{12}$  copies  $\cdot (\text{gram dried culture})^{-1}$ , respectively. The community patterns revealed by DGGE were noticeably influenced by the DNA extraction methods. Hereinto, six methods of SDS-based DNA extraction resulted in the larger number of DNA bands. [ **Conclusion** ] The results showed that the most effective method was SDS high salt extraction combined with grinding in liquid nitrogen and lysozyme lysis.

**Keywords:** Vinegar solid-state fermentation; DNA extraction, Real time Quantitative PCR; Denaturing gradient gel electrophoresis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (863 Program) (2007AA02Z203), the Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program during the Eleventh Five-Year Plan Period (2006BAD27B09-3, 2008BAI63B06), the Program for New Century Excellent Talents in University of China (NCET-07-0380), the Program of State Key Laboratory of Food Science and Technology (SKLF-MB-200801)

\* Corresponding author. Tel.: +86 510 85918206; Fax: +86 510 85918206; Email: zhenghuxu@jiangnan.edu.cn

Received: 3 August 2009/Revised: 29 September 2009