

黄酒麦曲微生物总 DNA 提取方法比较

薛景波^{1,2}, 毛 健^{*1,2}, 刘双平^{1,2}

(1. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室,江南大学,江苏 无锡 214122;2. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122)

摘要:为得到高质量提取麦曲总 DNA 的方法,采用 SDS 法、氯化苜法、CTAB 法、超声波法、Soil DNA kit 法、SDS 高盐法及 SDS-CTAB 法对黄酒麦曲中总 DNA 的提取效果进行了比较,通过凝胶电泳、PCR、紫外分光光度计及 Real-time PCR 对不同方法提取产物进行分析得出 7 种方法中 SDS-CTAB 法对于提取麦曲总 DNA 效果最好,蛋白、多糖及小分子等污染较少,DNA 提取的质量浓度达到 149.6 ng/μL,相对于 SDS 法,细菌和真菌模板数分别达到其 2.343 倍和 1.753 倍。

关键词:麦曲;DNA 提取;凝胶电泳;实时定量荧光 PCR

中图分类号:Q 93-3 文献标志码:A 文章编号:1673-1689(2018)02-0217-07

Comparison of Total Microbial DNA Extraction Methods of Wheat Qu

XUE Jingbo^{1,2}, MAO Jian^{*1,2}, LIU Shuangping^{1,2}

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food and Science Technology, Jiang nan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to isolate high quality DNA from Wheat Qu the effect of DNA isolation by seven different methods were evaluated. The extracted DNA was analysed by gel electrophoresis, PCR, ultraviolet spectrophotometry, and real-time fluorescent PCR, respectively. The results showed that SDS-CTAB method has the best effect on the isolation of total DNA of Wheat Qu. This method' products showed less contamination from protein and polysaccharide, the yield of the DNA was reached 149.6 ng/μL and its' relative account of template is almost 2.343 and 1.753 times in bacteria and fungi respectively compared to SDS method.

Keywords: wheat Qu, DNA isolation, gel electrophoresis, real-time PCR

“以麦制曲,用曲酿酒”是中国黄酒的特色,黄酒麦曲是以轧碎的小麦为原料,经过加水拌曲、压块成型并堆放在一定的温度和湿度条件下,富集培养酿酒有益微生物制得的糖化发酵剂^[1]。麦曲在黄

酒制作中不仅提供各种酶系,同时还是黄酒酿制的主要微生物来源,这些微生物在黄酒制作过程中共同作用,最终形成了黄酒独特的风格,因此黄酒麦曲有着“酒之骨”的美誉^[2-4]。

收稿日期:2015-08-11

基金项目:国家自然科学基金项目(31571823)。

* 通信作者:毛 健(1970—),男,陕西丹凤人,教授,工学博士,博士研究生导师,主要从事食品生物技术研究。E-mail:biomao@263.net

引用本文:薛景波,毛健,刘双平.黄酒麦曲微生物总 DNA 提取方法比较[J].食品与生物技术学报,2018,37(02):217-223

黄酒麦曲中微生物的研究一直是麦曲的研究重点,传统的分离培养不仅工作量大,耗时耗力,而且无法全面的了解微生物的组成,利用分子手段研究麦曲则能够避免传统方法的不便。利用分子手段分析一定环境下微生物群落结构时,基因组 DNA 提取的质量对后续的分析有着很大的影响^[5],高质量的提取麦曲中的总 DNA 对全面的剖析麦曲微生物群落结构有着重要作用。

麦曲的制作在自然开放的环境中完成,且制曲时间较长(3 个月左右),微生物来源广泛(制曲用水、小麦、空气微生物等)^[6],造就了麦曲复杂的微生物体系。汪建国^[7]在相关研究中将麦曲制作过程中微生物的生长变化分为孢子发芽期、生长繁殖期和产酶成熟期 3 个阶段,之后麦曲还要经过长时间的放置过程,随着水分含量的降低,麦曲中的大量霉菌、细菌产生孢子、芽孢,而且小麦中丰富的蛋白质、淀粉等杂质易混入提取过程,这些都为基因组的提取带来困难。所以麦曲是一种含有真菌、细菌的营养体、孢子和芽孢的复杂体系,在进行群落结构解析时需要同时获得他们的基因组,然而目前少有专门针对黄酒麦曲中宏基因组提取法方法的报道,为此本研究通过综合比较现有方法优化出一种高质量提取麦曲中总 DNA 方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 麦曲样品 麦曲样品取自浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司,取样后分装于 7℃ 保存。

1.2 麦曲总 DNA 提取及纯化方法

1.2.1 麦曲样品预处理 取 5 g 麦曲样品加 15 mL ddH₂O 置于 50 mL 的离心管中,加入适量玻璃珠,充分振荡 5 min;4℃ 条件下于 KQ700E 超声波清洗器中超声振荡 5 min;200 g 离心 5 min,取上清液 10 000 g 离心 10 min;收集沉淀,加 2 mL ddH₂O 混悬均匀转移至 2 mL EP 管;10 000 g 离心 10 min,得菌沉淀。

1.2.2 麦曲总 DNA 提取方法 方法一:SDS 法,参考 Zhou 等^[8]报道方法,具体步骤如下:

菌沉淀加入 0.5 mL DNA 抽提液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L EDTA, pH 8.0, 100 mmol/L Na₃PO₄, 1.5 mol/L NaCl)混悬,液氮条件下充分研磨菌体,之后加入 10 μL 溶菌酶(50 mg/mL),37℃ 条件下放置 30 min;加入 125 μL 质量分数

10% SDS,立即加入 5 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL),混匀后 65℃ 水浴 2 h(每隔 10 min 上下颠倒混匀样品);6 000 g 离心 10 min,取上清液。

方法二:氯化苄法,参考文献[9]进行操作。

方法三:CTAB 法,参考文献[10]略有改动,具体方法如下:

菌沉淀加入 0.5 mL DNA 抽提液混悬,液氮条件下充分研磨菌体,之后加入 700 μL CTAB 提取缓冲液(质量分数 2% CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 1 mol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L EDTA),其余操作与方法一同。

方法四:超声波法,参考文献[11]进行操作。

方法五:Soil DNA kit 提取法,菌体加入 0.5 mL ddH₂O 混悬后,后续提取操作参照 E.Z.N.A. Soil DNA Kit(美国 OMEGA 公司)说明书。

方法六:SDS 高盐法, DNA 抽提液中 NaCl 浓度提高为 2.5 mol/L,其余操作与方法一同。

方法七:SDS-CTAB 法, SDS 法 65℃ 水浴处理样品 1 h 后加入 700 μL CTAB 缓冲液,混匀后再进行 65℃ 水浴 1 h,其余操作与方法一同。

1.2.3 DNA 纯化方法 提取的 DNA 除了方法 5 以外,其他方法参考文献[12]对 DNA 进行纯化操作。

1.3 麦曲总 DNA 质量检测

1.3.1 电泳检测 用 0.8 g/dL 琼脂糖对所得麦曲总 DNA 进行电泳实验,跑胶完成后用伯乐 DC XR+凝胶成像仪进行拍照观察。

1.3.2 纯度检测 不同方法处理得到的样品用紫外分光光度计于波长 260、280 nm 及 230 nm 处测定吸光值 A_{260} 、 A_{280} 及 A_{230} , 计算比值 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 检测样品纯度。

1.3.3 PCR 检测 将得到的麦曲总 DNA 进行 TouchPCR 扩增,对其中真菌的 18S rDNA 区进行扩增,对细菌的 16S rDNA 区进行扩增。真菌采用张霞等^[13]在相关研究中所用通用引物,上游引物序列为 NS1:5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3',下游引物序列为 NS8:5'-TCCGCAGGTTACCTACGCCA-3',扩增片段大小为 1 700 bp 左右;细菌采用 Delong^[14]在相关研究中所用通用引物,上游引物序列为 27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAC-3',下游引物序列为 1492r:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3',扩增片段大小为 1 500 bp 左右。

真菌 PCR 反应体系如下(20 μL):Taq PCR master mix 10 μL,上下引物各 0.2 μL,模板 1 μL,

补无菌水至 20 μL 。相应 PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min(Touch down PCR,10 个循环,每个循环降低 1 $^{\circ}\text{C}$);94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min(20 个循环);72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 7 min。细菌 PCR 反应体系如下(20 μL):Taq PCR master mix 10 μL ,上下引物各 0.4 μL ,模板 1 μL ,补无菌水至 20 μL 。相应 PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min (Touch down PCR,10 个循环,每个循环降低 1 $^{\circ}\text{C}$);94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min (20 个循环);72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 7 min。PCR 产物用 0.8 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.4 Real-time PCR 检测 采用伯乐 CFX Connect 实时定量 PCR 仪对总 DNA 进行 Real-time PCR 扩增。为比较不同处理方法得到的总 DNA 样品中真菌和细菌相对模板数的大小,本实验以 SDS 法提取得到的总 DNA 样品作为参考制作稀释曲线,稀释倍数分别为 10、50、100、200、500、1 000,细菌 Real-time PCR 采用引物 Eub338F:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' 及 Eub518R:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' 进行扩增^[15],反应体系参考文献[15]进行操作;真菌 Real-time PCR 采用引物 ITS1F:5'-CTTGCTCATTTAGAGGAAGTAA-3' 及 ITS2:5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3' 进行扩增^[16],参反应体系考文献[16]进行操作。

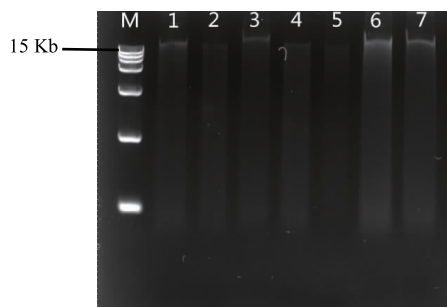
2 结果与分析

2.1 不同提取方法电泳结果比较

7 种不同方法提取麦曲总 DNA 样品以 0.8 g/dL 琼脂糖进行电泳得到的图谱如图 1 所示。不同方法得到的 DNA 片段唯一,片段较为完整,没有杂带,大小 15 Kbp 左右,但不同方法得到的条带在上样量相同的条件下亮度不同,其中 SDS 法、CTAB 法、SDS 高盐法及 SDS-CTAB 法得到的条带较亮且清晰。

2.2 不同提取方法纯度比较

DNA 样品的纯净程度影响着后续 PCR 的结果,由表 1 可以看出,不同处理方法得到的 DNA 样品在纯度的得率上面有着较大的差别。Soil DNA kit 提取法得到的总 DNA 样品的 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 值都偏小,DNA 质量浓度较低,说明此种方法提取的总 DNA 有着蛋白、多糖及各种盐离子的污染,并且



注:M:DL 15 Kbp Marker;1:SDS 法;2:氯化苄法;3:CTAB 法;4:超声波法;5:Soil DNA kit 法;6:SDS 高盐法;7:SDS-CTAB 法。

图 1 7 种不同方法提取麦曲的总 DNA 凝胶电泳分析
Fig. 1 Electrophoresis analysis of total DNA isolated from Wheat Qu samples using 7 different methods

提取效果不佳^[17];SDS 法提取得到的总 DNA 样品质量浓度较高,但 $A_{260}/A_{280}<1.7$, $A_{260}/A_{230}<2.0$,说明存在着蛋白、多糖、盐离子等的污染;氯化苄法、超声波法及 SDS 高盐法提取得到的总 DNA 样品 A_{260}/A_{280} 值在 1.8 左右, $A_{260}/A_{230}<2.0$,说明样品中蛋白去除较为彻底,但存在着多糖等的污染;CTAB 法及 SDS-CTAB 法提取得到的总 DNA 样品 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 值相对较为合适,得到的 DNA 质量浓度较高。

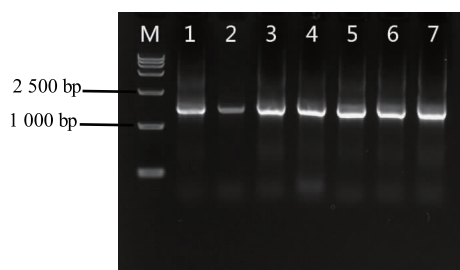
表 1 7 种不同方法提取的总 DNA 产量及纯度

Table 1 Yield and purity of total DNA extracted by 7 different methods

样品	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	DNA 质量浓度/(ng/ μL)
SDS 法提取得到的总 DNA	1.57	1.08	134.9
氯化苄法提取得到的总 DNA	1.87	1.40	88.1
CTAB 法提取得到的总 DNA	1.84	1.94	108.3
超声波法提取得到的总 DNA	1.74	0.78	73.5
Soil DNA kit 法提取得到的总 DNA	1.64	0.66	11.5
SDS 高盐法提取得到的总 DNA	1.73	0.81	110.5
SDS-CTAB 波法提取得到的总 DNA	1.93	1.84	149.6

2.3 不同提取方法 PCR 结果比较

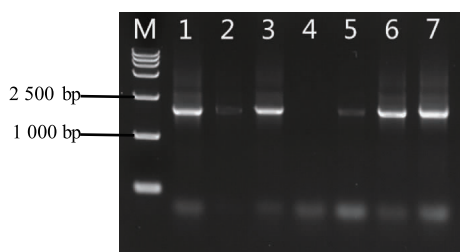
分别利用细菌引物 27f、1492r 及真菌引物 NS1、NS8 对细菌 16S 全序列及真菌的 18S 全序列进行 PCR 扩增,扩增结果进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳得到图谱如图 2、图 3 所示。



注:M;DL 15 Kbp Marker;1:SDS法;2:氯化苄法;3:CTAB法;4:超声波法;5:Soil DNA kit法;6:SDS高盐法;7:SDS-CTAB法。

图2 7种不同方法提取的麦曲总DNA进行细菌PCR扩增电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of bacteria in samples extracted by 7 different methods



注:M;DL 15 Kbp Marker;1:SDS法;2:氯化苄法;3:CTAB法;4:超声波法;5:Soil DNA kit法;6:SDS高盐法;7:SDS-CTAB法。

图3 7种不同方法提取的麦曲总DNA进行真菌PCR扩增电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products of fungi in samples extracted by 7 different methods

从图中可以看出,细菌和真菌相应片段扩增后电泳得到的条带单一,无杂带,说明各自所选通用引物合适,同时细菌扩增条带大小为1500 bp左右,真菌扩增条带大小为1700 bp左右,与相关文献相符^[13-14]。7种方法得到的产物进行细菌PCR扩增后都能得到清晰明亮的条带,但进行真菌PCR得到的结果有着较大的差别,其中超声波法提取得到的样品在真菌PCR时没有得到相应条带,同时氯化苄法及Soil DNA kit法提取得到的样品进行真菌PCR得到的条带较弱。SDS法、CTAB法、SDS高盐法及SDS-CTAB法在细菌和真菌PCR结果中都有着亮而清晰的条带,说明这4种方法对真菌和细菌的提取效果相对于其他3中方法较好。

2.4 不同提取方法 Real-time PCR 结果比较

对SDS法提取的总DNA进行梯度稀释,稀释倍数分别为10、50、100、200、500、1000,进行细菌和真菌Real-time PCR绘制溶解曲线和稀释曲线如图4、图5所示。

由图4、图5可知,以SDS提取的总DNA进行细菌和真菌Real-time PCR所用引物特异性较好,细菌Real-time PCR稀释曲线为 $Y = -3.3379X + 27.835$, $R^2 = 0.999$,扩增效率为99.3%;真菌Real-time PCR稀释曲线为 $Y = -3.1723X + 30.804$, $R^2 = 0.998$,扩增效率为106.6%,均符合后续分析需求。

将不同提取方法所得样品稀释10倍后进行细菌和真菌Real-time PCR测定Ct值比较相对模板量如表2和表3所示。

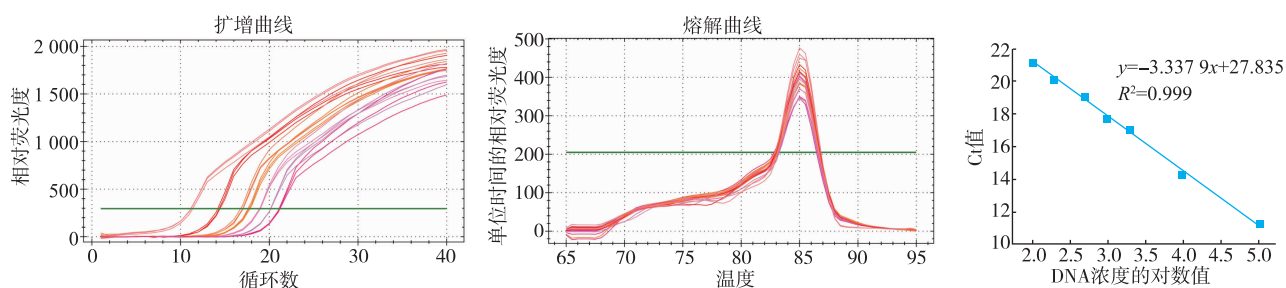


图4 SDS法提取总DNA进行细菌Real-time PCR得到的溶解曲线和稀释曲线

Fig. 4 Melting curve and dilution curve constructed by bacteria Real-time PCR using DNA templates obtained by SDS method

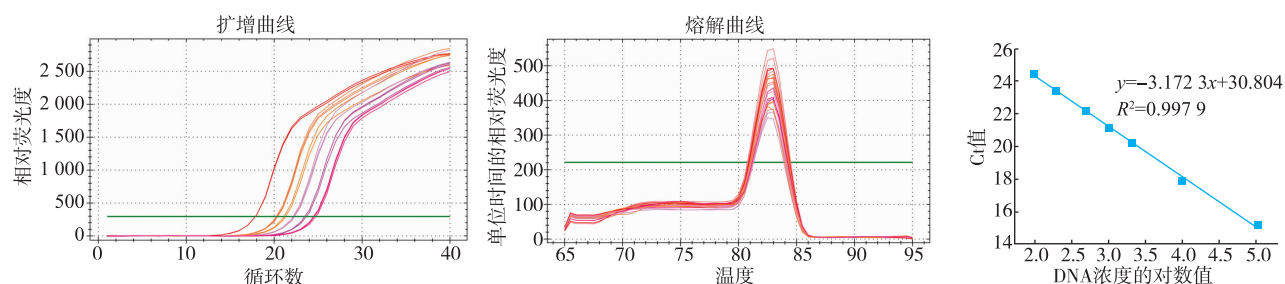


图 5 SDS 法提取总 DNA 进行真菌 Real-time PCR 得到的熔解曲线

Fig. 5 Melting curve and dilution constructed by fungi Real-time PCR using DNA templates obtained by SDS method

表 2 不同提取方法所得样品中细菌相对模板量

Table 2 Relative bacteria template amount in the samples extracted by 7 different methods

不同方法对应的 稀释样品	Ct 值(细菌)	相对模板量
SDS 法	14.32	$1 * M_b$
氯化苳法	16.59	$0.233 * M_b$
CTAB 法	14.62	$0.91 * M_b$
超声波法	17.76	$0.104 * M_b$
Soil DNA kit 法	17.27	$0.146 * M_b$
SDS 高盐法	16.45	$0.258 * M_b$
SDS-CTAB 法	13.67	$1.753 * M_b$

注: M_b 为 SDS 法提取麦曲总 DNA 中细菌的模板量。

表 3 不同提取方法所得样品中真菌相对模板量

Table 3 Relative fungi template amount in the samples extracted by 7 different methods

不同方法对应的 稀释样品	Ct 值(真菌)	相对模板量
SDS 法	17.85	$1 * M_f$
氯化苳法	19.30	$0.423 * M_f$
CTAB 法	18.36	$0.837 * M_f$
超声波法	31.59	$5.652 * 10^{-5} * M_f$
Soil DNA kit 法	21.41	$0.091 * M_f$
SDS 高盐法	18.37	$0.831 * M_f$
SDS-CTAB 法	16.31	$2.343 * M_f$

注: M_f 为 SDS 法提取麦曲总 DNA 中真菌的模板量。

从表 2 和表 3 可以看出, SDS 法、CTAB 法、SDS 高盐法及 SDS-CTAB 法提取得到的总 DNA 中在细菌和真菌模板量上都处于较高水平, 虽然超声波法提取的总 DNA 在细菌 PCR 时条带较亮且清晰, 但进行实时定量 PCR 时得到细菌模板量最少, 可能是 PCR 条件的不同及引物不同的原因, 其中 Soil DNA

kit 法提取得到的真菌模板量相对最少, 这与真菌 PCR 的结果相符, 综合不同样品真菌及细菌 Real-time PCR 结果, SDS-CTAB 法提取得到的样品不论在真菌和细菌的模板数都相对最多, 说明两种方法联用更能有效的提取麦曲中的总 DNA。

3 讨论

黄酒麦曲的制作在开放的自然环境中完成, 微生物种类多且体系杂, 作为黄酒制作的主要微生物来源, 高质量的提取麦曲中微生物的总 DNA 对于分析麦曲微生物组成从而为提高黄酒品质奠定基础有着重要作用。

在提取 DNA 时, 菌体细胞的裂解是提取的关键步骤, 菌体裂解方法一般有以下 3 种: 物理法、化学法、酶解法^[18]。本文研究比较的 7 种方法对 3 种裂解方法都有涉及, 其中溶菌酶是专门作用于微生物细胞壁的水解酶, 对于破坏革兰氏阳性菌的细胞壁有着重要作用。SDS 是一种亲水性的表面活性剂, 能够溶解细胞膜上面的脂类和蛋白质, 从而破坏细胞膜, 并且能够解离细胞中的核蛋白, 与其结合形成沉淀。蛋白酶 K 能够很好的水解与 DNA 结合的蛋白, 在 SDS 的溶液里面更能够很好的发挥作用。CTAB 是一种阳离子表面活性剂, 在高离子强度的溶液中 ($>0.7 \text{ mol/L NaCl}$), CTAB 与蛋白质和多聚糖形成复合物, 只是不能沉淀核酸, 通过有机溶剂抽提, 去除蛋白质、多糖、酚类等杂质后加入乙醇沉淀即可使核酸分离出来^[19]。

本文中研究了 SDS 法和超声波法比较了超声波破碎和液氮研磨对菌体细胞壁及真菌孢子壁的破碎效果, 通过提取率、PCR 验证及 Real-time PCR 分析说明超声波法对于细菌具有一定的提取效果, 但对于真菌的提取效果并不显著, 可能实验所用的

超声波强度不能产生对真菌尤其是以孢子形式存在的真菌细胞壁很好的破壁效果,从而阻碍了后续总 DNA 的提取,且提取得到的样品有较为严重的多糖及其他小分子的污染。土壤与麦曲都是真菌、细菌混杂的微生物体系,有相关文献以 Soil DNA kit 对麦曲中总 DNA 进行提取^[20],本实验对其提取效果进行比较发现 Soil DNA kit 对麦曲总 DNA 的提取效率较低,其提取纯度只有 11.5 ng/ μ L,在 7 种提取方法中显著偏低,相对于超声波法,Soil DNA kit 法提取对真菌和细菌都有一定的效果,但真菌的提取效率也处于较低水平。张中华等^[21]以氯化苜法对麦曲进行了总 DNA 的提取,本实验参考其做法并对提取产物进行检测,纯度检测表明氯化苜法能够很好的除去提取中的蛋白质,但对多糖的清除效果一般,通过提取率检测、PCR 验证及 Real-time PCR 分析表明氯化苜法对麦曲中真菌和细菌都有一定提取效果,这与文献报道相一致。SDS 法对麦曲总 DNA 的提取有着较好的效果,说明 SDS 适用于各种较为复杂的体系,这与 Zhou^[8]的研究相符,但由于麦曲以轧碎的小麦为原料,小麦中的淀粉进入提取体系,在 DNA 提取过程中经过 65 °C 水浴操作,淀粉糊化产生大量多糖干扰提取效果,使得 SDS 法提取的样品有着较多的多糖污染,说明 SDS 法对含有多糖的体系除去多糖效果较差。CTAB 法对于含有多糖等杂质的提取环境有着很好的提取效果,本文中对 CTAB 法提取麦曲总 DNA 效果进行考察表明,相对于 SDS 法,CTAB 法得到的样品澄清透亮,从纯度分析可知,CTAB 法大幅度的减少了多糖对

样品的污染,且蛋白质污染也较少,提取率较高,对于麦曲是一种较好的总 DNA 提取方法。相关文献指出高盐条件下提高了多糖在乙醇溶液中的溶解度,从而达到除去多糖的效果^[22],本实验中比较了 SDS 法以及 SDS 高盐法提取效果,结果发现提高了提取体系的盐浓度后多糖的污染并没有减少,反而更加严重,这与文献结果不相同,但该方法总 DNA 提取率依然处于较高水平。SDS-CTAB 法结合了 SDS 法和 CTAB 法的优势,结果表明,SDS-CTAB 不仅增强了对样品的处理程度,使得到的总 DNA 在质量浓度和模板数都有显著提高,同时很大程度上减少了多糖对样品的污染,但是 2 种方法联合并没有单独用 CTAB 法更具去除多糖的效果,可能是由于 65 °C 水浴 1 h 时更多的淀粉糊化溶解在体系形成更大量的多糖。通过对纯度检测、PCR 验证以及 Real-time PCR 分析都表明,SDS-CTAB 法对于麦曲体系的提取综合效果最好,是最为合适的提取方法。

4 结 语

本研究中通过对 7 种不同提取方法作用于麦曲效果进行比较表明,SDS-CTAB 法联用能够对麦曲起到最佳的提取效果,最终得到总 DNA 样品中 DNA 质量浓度达到 149.6 ng/ μ L,蛋白质、多糖等污染较少,PCR 扩增后电泳得到条带单一明亮,Real-time PCR 结果表明相对于 SDS 法,细菌和真菌模板数分别达到其 2.343 倍和 1.753 倍,是一种适合于黄酒麦曲总 DNA 提取的优良方法。

参考文献:

- [1] 周家骥. 黄酒生产工艺[M]. 第 2 版. 北京:中国轻工业出版社,1996:59-118.
- [2] CAO Yu, LU Jian, FANG Hua, et al. Fungal diversity of Wheat Qu of Shaoxing Rice Wine[J]. **Food Science**, 2008, 29(3): 277-282. (in Chinese)
- [3] 陈亮亮. 黄酒麦曲制曲工艺的优化研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [4] 余培斌. 改善绍兴黄酒麦曲品质的初步研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [5] ZHANG D, LI W, ZHANG S, et al. Evaluation of the impact of DNA extraction methods on BAC bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2011, 53(1): 44-49. (in Chinese)
- [6] CAO Yu, CHEN Jianyao, XIE Guangfa, et al. Study on the factors of fungal community formation during the fermentation course of Wheat Qu[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(5): 95-101. (in Chinese)
- [7] WANG Jianguo. Function of traditional koji in rice wine and its characteristics[J]. **Chinese Brewing**, 2004, (10): 29-31. (in Chinese)
- [8] ZHOU J Z, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. **Applied and Environmental**

- Microbiology**, 1996, 62(2):316-322.
- [9] ZHU Heng, QU Feng, ZHU Lihuang. Isolation of genomic DNAs from fungi using benzyl chloride[J]. **Acta Mycologica Sinica**, 1994, 13(1):34-40. (in Chinese)
- [10] SOARES S, AMARAL J S, OLIVEIRA M B P P, et al. Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification[J]. **Food Control**, 2015, 48: 130-136.
- [11] LI Peng, BI Xuejun, RU Shaoguo. On the influence of DNA extraction from activated sludge for denaturing gradient gel electrophoresis on microbial diversity analysis[J]. **Journal of Safety and Environment**, 2007, 7(2):53-57. (in Chinese)
- [12] NI Zhengfei, XU Wei, DOU Wenfang, et al. Comparison of total microbial DNA extraction methods from solid-culture of Zhenjiang Vinegar[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2010, 50(1):119-125. (in Chinese)
- [13] ZHANG Xia, WU Zhifang, ZHANG Shengchao, et al. Phylogenetic analysis of 18S rDNA sequence of mold from Luzhou- flavor Daqu[J]. **Chin J Appl Environ Biol**, 2011, 17(3):334-337. (in Chinese)
- [14] DELONG E F. Archaea in coastal marine environments[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1992, 89(12):5685-5689.
- [15] GUO X, XIA X, TANG R, et al. Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs[J]. **Anaerobe**, 2008, 14(4):224-228.
- [16] NICOLAISEN M, JUSTESSEN A F, KNORR K, et al. Fungal communities in wheat grain show significant co-existence patterns among species[J]. **Fungal Ecology**, 2014, 11:145-153.
- [17] CAO Nannan, PING Baohong, SI TU bo, et al. Detection and identification of aspergillus with panfungal primers and high-resolution melting curve analysis[J]. **J Trop Med**, 2012, 12(5):589-592. (in Chinese)
- [18] 倪峥飞. 镇江香醋固态发酵过程中酿造微生物强化及醋醅总 DNA 提取方法的初步研究[D]. 无锡:江南大学, 2009.
- [19] YANG Mohua, LI Zhihui, ZHANG Donglin, et al. DNA isolation from pinus massoniana needles[J]. **Journal of Central South University of Forestry & Technology**, 2008, 28(3):39-44. (in Chinese)
- [20] YE Guangbin, LI Danyu, YANG Yuehuan, et al. Study on the succession law of fungal community during the fermentation and storage process of Luzhou-flavor Daqu by PCR-DGGE[J]. **Journal of Sichuan University of Science & Engineering (Natural Science Edition)**, 2013, 26(4):5-9. (in Chinese)
- [21] 张中华. 绍兴黄酒麦曲中微生物群落结构的研究[D]. 无锡:江南大学, 2012.
- [22] WULFF E G, TORRES S, GONZALES Vigil E. Protocol for DNA extraction from potato tubers[J]. **Plant Mol Bio Rep**, 2002, 20:187.

科技信息

日本以蛋清为原料,研发出可应用于医疗食品领域的高强度凝胶材料

2018年1月10日,日本科学技术振兴机构发表消息称,研发出以蛋清为原材料的高强度凝胶材料,该材料的抗压强度为煮鸡蛋的150倍以上。将该技术用于其他蛋白质中,可生产出不残留体内、一定时间后可被人体吸收的医疗材料或新口味食品。

目前,以蛋白质为原材料的新材料替代金属、陶瓷等,作为新一代材料被广泛应用。但蛋白质材料通常通过微生物或细胞培养生产,需要较多时间和费用。因此该研究组开始关注可大量生产的廉价食物蛋白,利用蛋清加热后变成含水凝胶的性质,着手研发新材料。

蛋清经加热形成的凝胶强度低,不适合作为材料使用。其强度低是因为凝胶的结构不均匀。该研究组将蛋清按照一定间隔蓄积之后加热,制作出了结构均匀、强度高的凝胶材料。通过该方法制作的新材料抗压强度最高可达到34.5兆帕斯卡,最高抗压强度相当于1日元硬币上施加1000公斤压力。

具体方法是利用两种离子表面活性剂(一种阴离子表面活性剂和一种阳离子表面活性剂按照一定比例混合)将蛋清中的水相分离,形成透明液体蛋清蓄积体。再加热到70度形成该强度凝胶体,该凝胶体可利用蛋白分解酶进行分解。

该研究成果于2018年1月5日发表在英国科学杂志《NPG Asia Materials》电子版上。

[信息来源]食品伙伴网. 日本以蛋清为原料,研发出可应用于医疗食品领域的高强度凝胶材料 [EB/OL]. (2018-1-12). <http://news.foodmate.net/2018/01/455007.html>