

西藏地区青稞酒曲微生物群落结构及多样性分析

张二豪, 奉综涛, 何萍, 刘盼盼, 简阅, 徐雨婷, 禄亚洲, 罗章*
(西藏农牧学院 食品科学学院 西藏林芝 860000)

摘要 为分析西藏地区青稞酒曲中微生物群落结构组成差异, 基于高通量测序技术对西藏 7 个地区青稞酒曲中的微生物群落结构组成及多样性进行分析。结果表明, 青稞酒曲中富含丰富的微生物类群, 且细菌多于真菌; 那曲(NQ)样品细菌多样性最高, 昌都(CD)样品真菌多样性最高; 青稞酒曲中的优势细菌菌群为乳酸杆菌属、明串珠菌属和魏斯氏菌属, 优势真菌菌群为根霉属和曲霉属, 不同地区青稞酒曲中优势微生物类群存在一定的共性和差异性。主成分分析表明, NQ、阿里(AL)、日喀则(RKZ)和山南(SN)样品间细菌群落结构相似, CD、林芝(LZ)和拉萨(LS)样品间细菌群落结构相似; AL、NQ、LS、LZ 和 SN 样品中的真菌群落聚为一类, 而 CD 和 RKZ 各聚为一类。LEfSe 差异判别分析表明, 不同地区青稞酒曲中均有各自的标志性细菌类群, 真菌菌群除 SN 样品外, 其它地区均有标志性真菌类群。结论: 西藏不同地区青稞酒曲中的微生物群落结构组成存在明显差异。本研究为进一步开发利用益生微生物类群和复合型酒曲的制备提供了理论依据。

关键词 青稞酒曲; 高通量测序; 细菌群落; 真菌群落; 多样性

文章编号 1009-7848(2024)05-0381-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.032

青稞(*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hook. f.)是禾本科大麦属一年生草本植物, 主要分布于青藏高原地区, 是藏民族四宝之首——糌粑的主要原料。青稞作为藏民族重要的粮食作物, 其富含丰富的蛋白质、氨基酸、维生素和膳食纤维等, 此外, 青稞中富含的 β -葡聚糖, 极具药用价值, 素有“天然食品之王”之称^[1-3]。

青稞酒是以青稞为原料, 以青稞酒曲为糖化发酵剂酿造而成, 其独特的口感深受藏民族的喜爱, 被誉为“高原明珠、酒林奇葩”^[4]。酒曲作为酿造酒的核心, 是酒的发酵剂、糖化剂和生香剂。酒曲作为一个“多菌、多酶”的微生物制品, 其微生物群落结构组成及其代谢功能特性决定了酒的品质^[5-7]。研究酒曲微生物群落结构组成, 对改善酒曲品质, 提高白酒产量和质量具有重要意义。高通量测序技术因具有准确性高、通量大、客观准确, 可全面地分析样品的微生物群落结构组成和多样性的特点, 而被广泛用于微生物群落结构的研究^[8]。袁亦舟等^[9]采用高通量测序技术和纯培养技术分析了

青稞酒曲中微生物群落结构组成和多样性。陈申习等^[10]利用高通量测序技术分析了清香型和酱香型酒曲真菌群落结构, 发现根霉属、曲霉属和假丝酵母属等是酒曲中的优势真菌属。谷晓东等^[11]对 6 种黄酒酒曲进行高通量测序, 结果发现 6 种酒曲的微生物群落结构组成差异较大。唐鳧秋等^[12]分析 8 种中、日酒曲的微生物多样性时发现中国酒曲以根霉属、糖多孢菌属和横梗霉属为主, 而日本酒曲以曲霉属为主。目前有关国内酒曲的研究较多, 而有关西藏不同地区青稞酒曲微生物群落结构及多样性的研究尚未见报道。

酒曲微生物群落结构组成及其代谢功能特性受环境因素影响较大, 如温度、底物种类和 pH 值等^[13-14]。西藏特殊的地理位置与环境及青稞中特殊的营养物质, 势必孕育了特殊的酒曲微生物群落结构。本研究采用高通量测序技术分析西藏不同地区青稞酒曲中微生物群落结构组成及多样性, 旨在为开发最优青稞酒曲提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

分别从西藏 7 个地区收集青稞酒曲样品 (表 1), 每个地区采集 3 份样品, 研磨混匀后, 一式 3 份, 置于-80℃冰箱保存备用, 样品采集信息如表 1 所示。

收稿日期: 2023-05-12

基金项目: 西藏自治区生物技术一流专业建设项目(2022-007); 西藏自治区自然科学基金项目(XZ202101ZR0117G)

第一作者: 张二豪, 男, 硕士, 高级实验师

通信作者: 罗章 E-mail: luozhang1759@xza.edu.cn

表1 样品采集点信息

Table 1 Information of sampling site

样品采集点	经纬度	海拔/m
昌都(CD)	29°41'24'' N, 98°35'6'' E	3 868
阿里(AL)	33°25'11'' N, 79°39'6'' E	4 260
那曲(NQ)	31°27'36'' N, 92°2'13'' E	4 479
拉萨(LS)	29°57'2'' N, 91°12'3'' E	3 813
林芝(LZ)	29°37'25'' N, 94°23'1'' E	2 961
山南(SN)	28°35'17'' N, 90°10'34'' E	5 032
日喀则(RKZ)	29°15'23'' N, 88°53'46'' E	3 841

DNeasy Plant Mini Kit 提取试剂盒,美国 Qiagen 公司;2×Taq PCR Mix(KT201)、大量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (DP210),天根生化科技(北京)有限公司;琼脂糖、真菌和细菌通用引物,美国 Invitrogen 公司。

1.2 仪器与设备

3H25RI 型智能高速冷冻离心机,湖南赫西仪器装备有限公司;NanoDrop2000 微量分光光度计,美国 Thermo 公司;IMS-20 制冰机,上海精密仪器仪表有限公司;T100 型 PCR 仪、TD-GelX 1520 凝胶成像系统,美国 Bio-rad 公司;WS600 电泳仪,万生博朗电子有限公司;UPT-I-5T 优普系列超纯水器,四川优普超纯科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 总 DNA 提取 根据 DNeasy Plant Mini Kit 提取试剂盒操作说明提取酒曲样品总 DNA,并用微量分光光度计和 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测样品总 DNA 的质量、浓度和纯度。

1.3.2 PCR 扩增和测序 分别使用通用引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[11] 扩增细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区,使用真菌内源转录间隔区(Internally transcribed spacer, ITS)通用引物 ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) 和 ITS2R (GCTGCGTTCATCGATGC)^[11] 扩增真菌 ITS1 区。参考谷晓东等^[11]的方法进行 PCR 扩增,使用凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物,PCR 产物送至上海派森诺科技股份有限公司进行高通量测序。

1.3.3 数据分析 利用 QIIME2 (2019.4)软件^[15] 对下机后的原始数据进行去引物、质量过滤、去

噪、拼接和质控后,使用 R 语言对样本中的高质量序列进行长度分布统计,在 97%相似度水平,使用 Vsearch (v2.13.4)软件^[16]对高质量序列进行聚类以获得操作分类单元 (Operational taxonomic units, OTUs)代表序列。利用 QIIME2 (2019.4)软件,基于真菌 UNITE 数据库(Release 8.0, <https://unite.ut.ee/>)^[17]和细菌 Greengenes 数据库(Release 13.8, <http://greengenes.secondgenome.com/>)^[18]分别对样品真菌和细菌 OTUs 代表序列进行物种分类学注释。利用 QIIME2 (2019.4)软件和 R 语言进行分类学组成、Alpha 多样性、Beta 多样性和 LEfSe(LDA Effect Size)差异分析。

2 结果与分析

2.1 样品高通量测序结果分析

高通量测序结果见表 2。由表 2 可知,7 个地区青稞酒曲共产生 386 575 条细菌有效序列,其中,CD、AL、NQ、LS、LZ、SN 和 RKZ 分别产生 56 474, 47 686, 47 088, 60 960, 75 002, 62 113, 37 252 条细菌有效序列,平均序列碱基长度为 430 bp;7 个地区青稞酒曲共产生 536 938 条真菌有效序列,其中,CD、AL、NQ、LS、LZ、SN 和 RKZ 分别产生 76 991, 78 014, 79 230, 76 919, 77 619, 76 738, 71 427 条真菌有效序列,平均序列碱基长度为 254 bp。7 个地区青稞酒曲微生物测序覆盖度在 99.42%~100%范围,说明此次测序数据合理,能反映真实青稞酒曲微生物的群落结构信息。在 97%相似度水平,不同地区青稞酒曲共产生 4 186 个细菌 OTUs 和 227 个真菌 OTUs,其中,CD、AL、NQ、LS、LZ、SN 和 RKZ 所产生的细菌 OTUs 数分别为 327, 1 027, 1 257, 765, 306, 852, 1 031 个,所产生的真菌 OTUs 数分别为 40, 52, 62, 53, 40, 37, 58 个。不同地区青稞酒曲所获得的 OTUs 数不同,所产生的 OTUs 数量顺序为: NQ>RKZ>AL>SN>LS>CD>LZ (细菌), NQ>RKZ>LS>AL>CD=LZ>SN (真菌),说明西藏不同地区青稞酒曲微生物群落结构组成存在差异。韦恩图能够直观展示不同样品间共有和独有的 OTUs 数,也直观反映了不同样品中的 OTUs 数的差异性^[19]。通过韦恩图对不同地区青稞酒曲中微生物群落结构组成进行分析(图 1),CD、AL、NQ、LS、LZ、SN 和

RKZ 样品独有的细菌 OTUs 数分别为 128,617, 882,473,137,533,705 个, 共有的 OTUs 数为 27 个, 占总 OTUs 数的 0.65%(图 1a);CD、AL、NQ、LS、LZ、SN 和 RKZ 样品独有的真菌 OTUs 数分别

为 19,30,36,27,12,17,33 个, 共有的 OTUs 数为 4 个, 占总 OTUs 数的 1.76%(图 1b), 说明西藏不同地区青稞酒曲微生物群落结构组成存在明显差异。

表 2 西藏不同地区青稞酒曲中微生物菌群高通量测序结果

Table 2 The results of high throughput sequencing of microbial community in the highland barley koji from different region of Tibet

样品	有效序列数/条		平均碱基长度/bp		测序覆盖率/%		OTU 数量/个	
	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌
CD	56 474	76 991	430	254	99.82	100	327	40
AL	47 686	78 014	430	254	99.60	100	1 027	52
NQ	47 088	79 230	430	254	99.42	100	1 257	62
LS	60 960	76 919	430	254	99.62	100	765	53
LZ	75 002	77 619	430	254	99.83	100	306	40
SN	62 113	76 738	430	254	99.63	100	852	37
RKZ	37 252	71 427	430	254	99.62	100	1 031	58

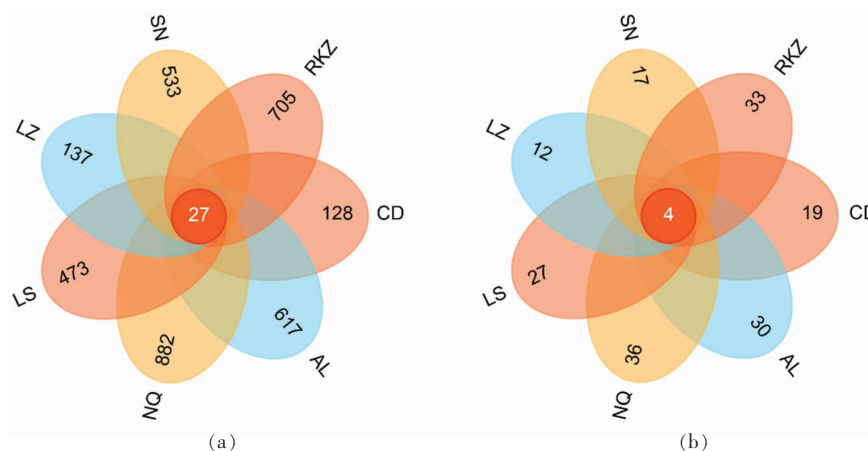


图 1 西藏不同地区青稞酒曲中细菌(a)和真菌(b)OTUs 的差异性

Fig.1 The variability of bacterial (a) and fungal (b) OTUs in the highland barley koji from different region of Tibet

2.2 样品微生物 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性反映了生境内物种丰富度和多样性, 包括 Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数。Chao1 指数值越大, 表明物种丰富度越高; Shannon 指数值越大, Simpson 指数值越小, 表明物种多样性越高^[20]。本文的 Simpson 指数是指样品中抽取不同物种的概率, 因此 Simpson 指数值越高, 表明多样性指数越高, 不同地区青稞酒曲微生物 Alpha 多样性分析结果见图 2。由图 2a 可知, NQ 样品细菌丰富度最高, 其次是 AL、RKZ、LS、SN 和

LZ、CD 样品细菌丰富度最低; 由图 2b 和 2c 可知, NQ 样品细菌多样性最高, 其次是 AL、SN、LS、RKZ 和 LZ、CD 样品细菌多样性最低。由图 2d 可知, NQ 样品真菌丰富度最高, 而 SN 样品真菌丰富度最低; 由图 2e 和 2f 可知, CD 样品真菌多样性最高, 其次是 RKZ、LZ、LS、SN 和 NQ, AL 样品真菌多样性最低。以上结果表明, 西藏不同地区青稞酒曲中细菌和真菌丰富度和多样性存在明显差异, 这可能与西藏不同地区的环境和制曲材料等因素有关。

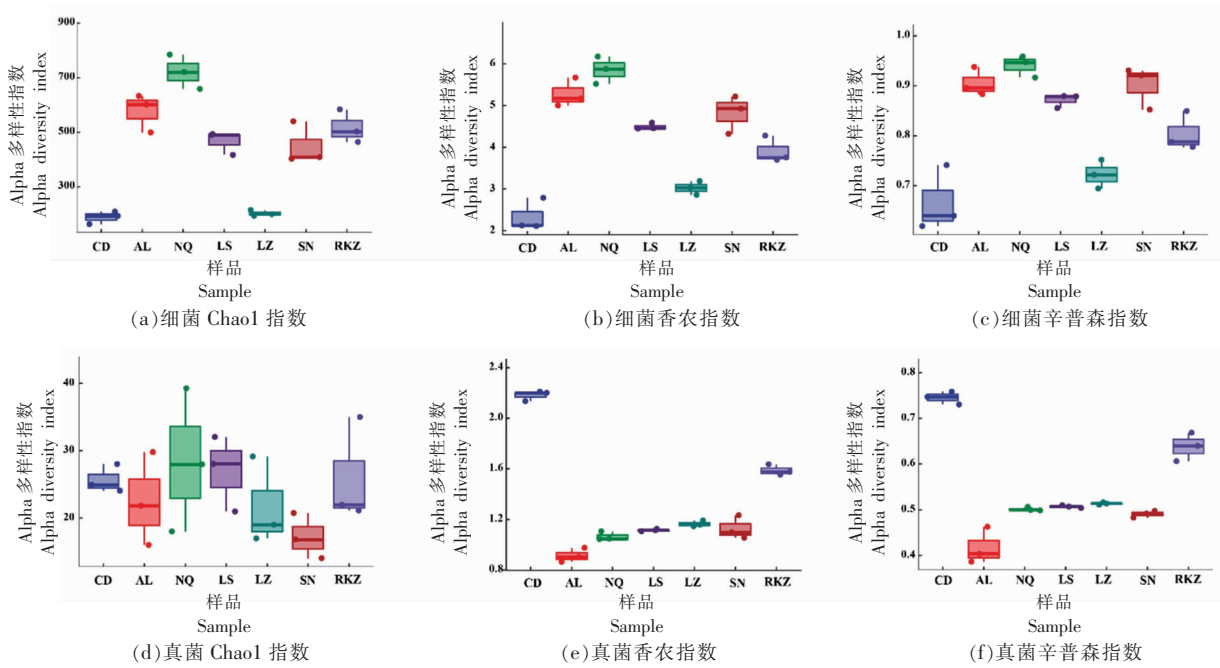


图 2 西藏不同地区青稞酒曲中微生物群落 Alpha 多样性分析结果

Fig.2 The results of Alpha diversity indexes of microbial community in the highland barley koji from different region of Tibet

2.3 样品微生物种群归类分析

基于真菌 UNITE 数据库^[17]和细菌 Greengenes 数据库^[18]分别对样品真菌和细菌 OTUs 代表序列进行物种分类学注释。西藏不同地区青稞酒曲中细菌和真菌在各等级归类结果见表 3，由表 3 可知，在属分类水平，不同地区青稞酒曲中细菌属和真菌属种类差异较大，细菌属数量顺序为 SN>NQ>AL>RKZ>LS>CD>LZ，真菌属数量顺序为

NQ>LZ>LS>RKZ>CD>AL>SN。有研究表明，酿造环境(空气)、曲坯培养过程中的内生环境因素，如温度、水分和酸度等影响酒曲微生物的群落组成和丰度^[21-23]。西藏传统青稞酒曲培养过程均为开放式自然发酵，且多为自制酒曲，这可能是导致西藏不同地区青稞酒曲中微生物群落结构组成差异较大的原因。

表 3 西藏不同地区青稞酒曲中微生物菌群归类分析结果

Table 3 Classified analysis of microbial taxa detected in the highland barley koji from different region of Tibet

样品	门/个		纲/个		目/个		科/个		属/个	
	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌
CD	9	4	15	10	24	11	34	14	48	15
AL	10	4	15	9	24	13	39	15	59	14
NQ	8	5	13	11	29	15	48	21	63	24
LS	9	4	14	10	25	11	36	18	53	19
LZ	10	4	15	9	23	13	31	18	39	20
SN	11	4	19	7	37	9	57	9	88	12
RKZ	9	4	16	9	28	14	39	17	55	18

2.4 基于门分类水平样品微生物群落结构组成

在门分类水平，西藏不同地区青稞酒曲中细

菌和真菌群落结构组成见图 3。由图 3a 可知，不同地区青稞酒曲中细菌共鉴定到 16 个门，其中厚壁

菌门(Firmicutes)是西藏不同地区青稞酒曲的优势细菌门,厚壁菌门在 CD 和 LZ 样品中的相对丰度分别为 99.48%和 99.64%,而变形菌门(Proteobacteria)在 AL、NQ、LS、SN 和 RKZ 样品的丰度比较高,其相对丰度分别为 20.42%、37.02%、12.19%、30.74%、6.13%,这与谷晓东等^[11]和吴树坤等^[24]的研究结果较为一致。梭菌纲(Clostridia)和芽孢杆菌纲(Bacilli)是厚壁菌门的主要组成部分,对环境具有较强的适应性^[25],这可能是导致厚壁菌门是西藏不同地区青稞酒曲中绝对优势细菌门的主要原因。由图 3b 可知,不同地区青稞酒曲中真菌共鉴定到 6 个门,其中子囊菌门(Ascomycota)是

CD、NQ、LS 和 RKZ 样品中的优势真菌门,其相对丰度分别为 67.08%、51.78%、54.95%、74.67%,且毛霉菌门(Mucoromycota)在以上样品中的相对丰度也比较高,其相对丰度分别为 32.81%、48.08%、44.96%、25.12%;毛霉菌门是 AL、LZ 和 SN 样品中的优势真菌门,其相对丰度分别为 70.07%、53.42%、50.06%,且子囊菌门在以上样品中的相对丰度也比较高,其相对丰度分别为 29.83%、46.46%、49.83%。总体而言,子囊菌门和毛霉菌门是西藏不同地区青稞酒曲中的优势真菌门,这与张会敏等^[26]、谷晓东等^[11]的研究结果一致。

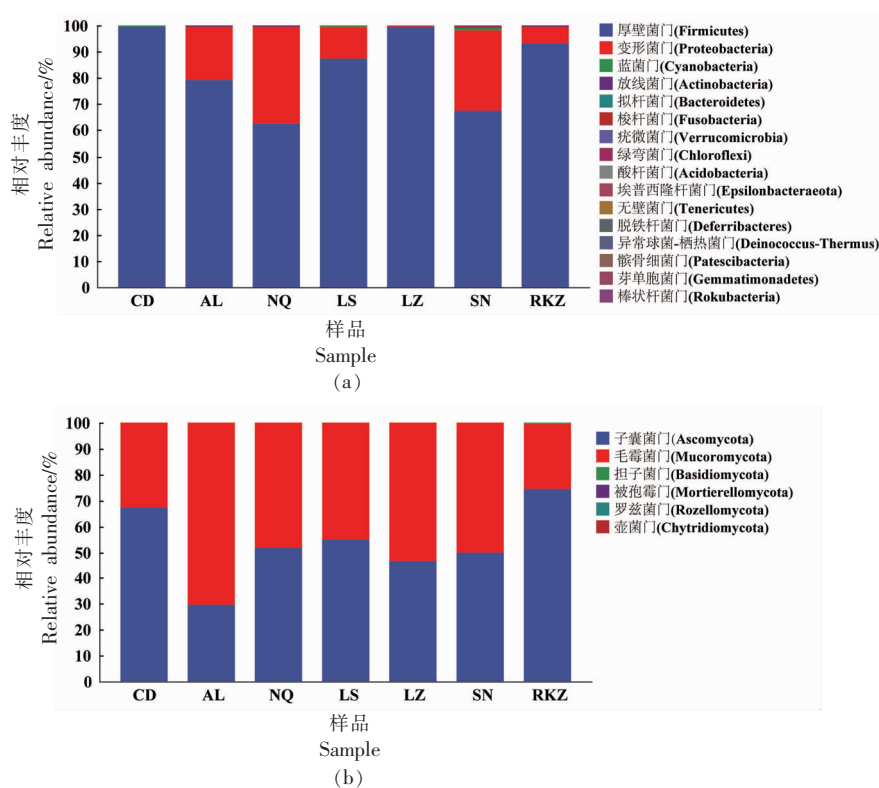


图 3 基于门分类水平西藏不同地区青稞酒曲中细菌(a)及真菌(b)的群落结构组成

Fig.3 Composition of bacterial (a) and fungal (b) community in the highland barley koji from different region of Tibet at phylum level

2.5 基于属分类水平样品微生物群落结构组成

在属分类水平,基于相对丰度前 20 的细菌和真菌群落结构组成见图 4。由图 4a 可知,样品细菌平均相对丰度>1%的有 9 个,分别是乳酸杆菌属(*Lactobacillus*, 48.54%)、明串珠菌属(*Leuconostoc*, 12.36%)、魏斯氏菌属(*Weissella*, 11.73%)、乳

酸球菌属(*Lactococcus*, 6.78%)、泛菌属(*Pantoea*, 6.57%)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*, 2.32%)、醋杆菌属(*Acetobacter*, 1.57%)、肠球菌属(*Enterococcus*, 1.10%)和科萨克氏菌属(*Kosakonia*, 1.05%),其中明串珠菌属和魏斯氏菌属是 NQ 样品中的优势菌属,其相对丰度分别为 33.03%和

19.86%;乳酸杆菌属是 CD 和 LZ 样品中的优势细菌属,其相对丰度分别为 99.00%和 99.25%;魏斯氏菌属、乳酸杆菌属和明串珠菌属是 AL 样品中的优势菌属,其相对丰度分别为 33.47%,23.96%,17.56%;乳酸杆菌属、明串珠菌属和醋杆菌属是 LS 样品中的优势菌属,其相对丰度分别为 69.88%,13.09%,10.57%;乳酸杆菌属、泛菌属和明串珠菌属是 SN 样品中的优势菌属,其相对丰度分别为 36.87%,26.56%,21.65%;RKZ 样品中的优势细菌属是乳酸球菌属(41.24%)、魏斯氏菌属(24.88%)和葡萄球菌属(15.87%),以上结果表明,西藏不同地区青稞酒曲中的优势细菌属存在明显差异,这与吴树坤等^[24]的研究结果差异较大,这可能与西藏不同地区特殊的地理环境和气候等因素有关。白酒酿造过程中常见的细菌有乳酸杆菌、乳酸球菌和醋酸菌等,有研究表明,乳酸杆菌属中的乳酸菌会促进糖类转化为乳酸,而乳酸进一步酯化后形成的乳酸乙酯是白酒的主要香气物质之一,而含量过高会影响酒的口感^[27],CD 和 LZ 样品中的乳酸杆菌属是绝对优势菌属,这可能会影响青稞酒的口感;魏斯氏菌属属于一类产乳酸细菌,广泛分布于发酵食品中,是酿酒中的重要微生物,其产生的乳酸有利于乳酸乙酯的形成和酒质的稳定^[28];具有产乳酸和胞外多糖功能的乳酸球菌,可使食品具有独特的风味^[29];肠球菌属能加速发酵进程、蛋白水解和脂类物质的形成,使食品具有良

好的风味^[30-31];明串珠菌属在自然界中广泛分布,有研究表明,明串珠菌对启动豆酱的发酵具有重要作用^[32],同时能产生多种风味物质,影响发酵食品的风味^[33]。白酒酿造是一个复杂的微生物发酵过程,微生物群落多样性越高,白酒的口感和品质就越丰富、越高^[27]。西藏不同地区青稞酒曲中含有不同丰度的乳酸杆菌属、明串珠菌属、魏斯氏菌属、乳酸球菌属、葡萄球菌属、醋杆菌属和肠球菌属等细菌,这些微生物在青稞酒酿造过程中可能扮演着重要角色。

由图 4b 可知,样品真菌平均相对丰度>1%的有 4 个,分别为毕赤酵母属(*Pichia*,2.51%)、根霉菌属(*Rhizopus*,46.36%)、曲霉菌属(*Aspergillus*,5.00%)和威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*,3.60%)。根霉菌属、威克汉姆酵母属和毕赤酵母属是 CD 样品中的优势真菌属,其相对丰度分别为 32.81%,25.15%,17.08%;根霉菌属是 AL、NQ、LS、LZ 和 SN 样品中的优势真菌属,其相对丰度分别为 70.07%,48.08%,44.96%,53.42%,50.06%;RKZ 样品中的优势真菌属是根霉菌属(25.12%)和曲霉菌属(33.05%),说明西藏不同地区青稞酒曲优势真菌属存在一定的共性和差异。袁亦舟等^[9]研究发现根霉属、曲霉属、线虫草属和酵母属是青稞酒曲中主要的真菌类群,这与本研究结果相似。曲霉作为一种丝状真菌,在自然界中广泛存在,其在白酒酿造过程中能产生高级醇类、脂类等风味

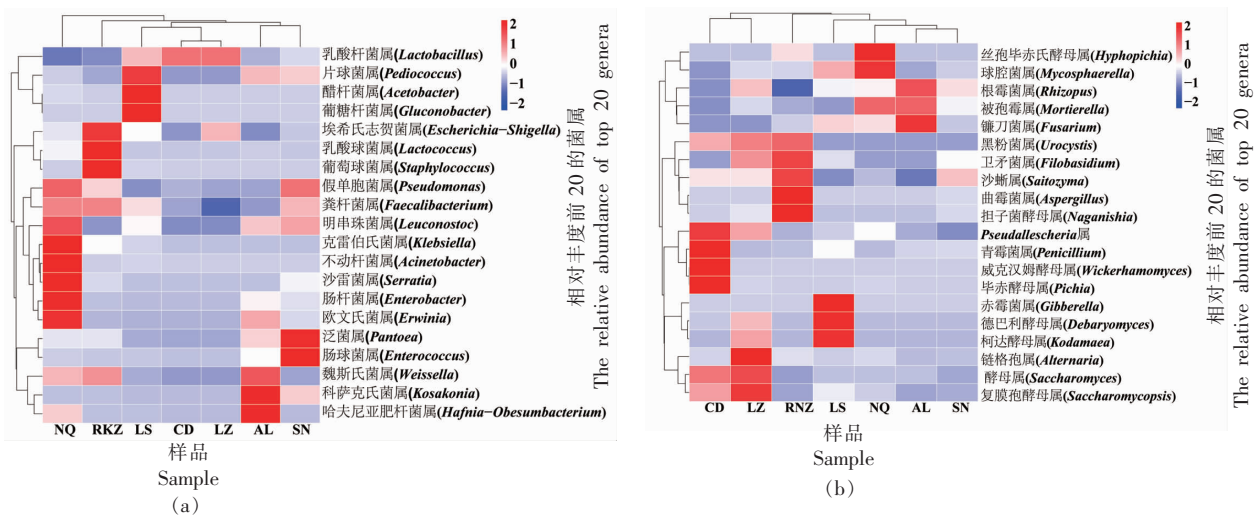


图 4 基于相对丰度前 20 的西藏不同地区青稞酒曲中细菌(a)和真菌(b)属热图聚类分析结果

Fig.4 Heatmap of the top 20 in relative abundance of bacterial (a) and fungal (b) community in the highland barley koji from different region of Tibet at genus level

物质^[34],同时能分泌多种酶类,如淀粉酶、蛋白酶和糖化酶等^[24],对白酒的产香和产酒具有重要作用;根霉菌作为一种强糖化能力的霉菌,能产生多种影响酒类风味的物质,是我国酒曲微生物的重要组成部分^[35];毕赤酵母具有发酵能力强、产高级醇类、脂类和酸类等物质的优点,在酿酒过程中发挥着重要作用^[36-37]。西藏不同地区青稞酒曲中的优势真菌类群主要有根霉菌属、曲霉菌属、威克汉姆酵母属和毕赤酵母属,说明这些真菌在酿酒过程中发挥着重要作用。然而,西藏青稞酒曲与中国其它大曲中的优势真菌菌群存在明显差异,这可能与曲坯制作温度和环境等因素有关,如浓香型大曲制备过程中需高温处理,导致嗜热真菌属丰度较高,而不耐高温的霉菌和酵母菌含量较低^[27],西藏青稞酒曲制备过程中则在常温条件下进行。

2.6 样品微生物 Beta 多样性分析

为了分析西藏不同地区青稞酒曲微生物群落结构组成差异,对西藏不同地区青稞酒曲中细菌

和真菌群落进行主成分分析(Principal component analysis, PCA),结果见图 5。由图 5a 可知,在细菌群落中,主成分分析 1 和主成分分析 2 的解释度分别为 75.0%和 12.4%,合计 87.4%,能较好地地区分西藏不同地区青稞酒曲细菌群落结构,NQ、AL 和 SN 样品位于同一象限,说明这 3 个地区的青稞酒曲细菌群落结构组成较为相似,CD 和 LZ 样品位于同一象限,说明这 2 个地区的青稞酒曲细菌群落结构相似,而 RKZ 和 LS 分别位于不同象限。由图 5b 可知,在真菌群落中,主成分分析 1 和主成分分析 2 的解释度分别为 47.9%和 33.6%,合计 81.5%,能较全面地解释样品间真菌群落组成差异,根据主成分分析结果,不同地区青稞酒曲样品可归为 3 类,即 AL、NQ、LS、LZ 和 SN 样品为一类,CD 和 RKZ 各为一类。综上所述,西藏不同地区青稞酒曲中微生物群落结构存在差异,这可能与青稞酒曲制作环境等因素有关。

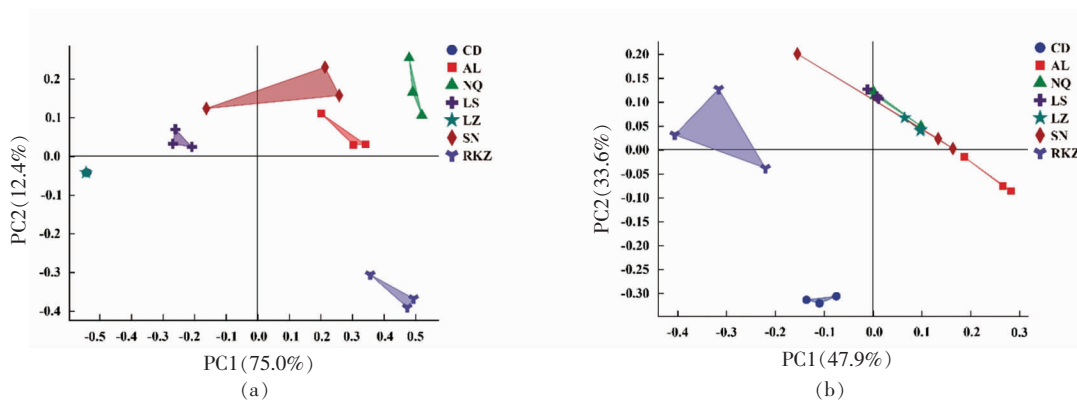


图 5 西藏不同地区青稞酒曲中细菌(a)和真菌(b)主成分分析

Fig.5 Principal component analysis of bacterial (a) and fungal (b) community in the highland barley koji from different region of Tibet

2.7 样品微生物 LEfSe 差异判别分析

基于 LEfSe (LDA Effect Size) 差异分析方法对西藏不同地区青稞酒曲中差异细菌和真菌菌群进行分析,如图 6 所示,AL 样品中魏斯氏菌属、科萨克氏菌属和 *Trabulsilla* 属等 4 个细菌属显著富集,*Turicibacter* 属在 CD 样品中显著富集, α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、Acetobacterales 目和醋酸杆菌科(Acetobacteraceae)等在 LS 样品中显著富集,乳酸杆菌科(Lactobacillaceae)、乳酸杆菌属

和厚壁菌门在 LZ 样品中显著富集,伽马变形菌纲(Gammaproteobacteria)和肠杆菌目(Enterobacteriales)等在 NQ 样品中显著富集,链球菌科(Streptococcaceae)、乳球菌属和芽孢杆菌目(Bacillales)等在 RKZ 样品中显著富集,泛菌属、肠球菌科(Enterococcaceae)和肠球菌属等在 SN 样品中显著富集。由图 7 可知,根霉科(Rhizopodaceae)、毛霉菌纲(Mucoromycetes)和毛霉目(Mucorales)等在 AL 样品中显著富集,威克汉姆酵母属、法夫酵母科

(Phaffomycetaceae)和毕赤酵母科(Pichiaceae)在CD样品中显著富集,赤霉菌属(*Gibberella*)、赤壳科(Nectriaceae)和肉座菌目(Hypocreales)等在LS样品中显著富集,复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*)和复膜孢酵母科(Saccharomycopsidaceae)在LZ样品中显著富集,丝孢毕赤氏酵母属(*Hyphopichia*)在NQ样品中显著富集,子囊菌门、曲

霉属和散囊菌纲(Eurotiomycetes)等在RKZ样品中显著富集。以上结果表明,西藏各地区青稞酒曲均有标志性差异细菌类群,而除SN样品外,其它地区均有标志性差异真菌类群,这些标志性差异微生物类群可能与各地区酒曲加工环境、温度和材料等因素密切相关。

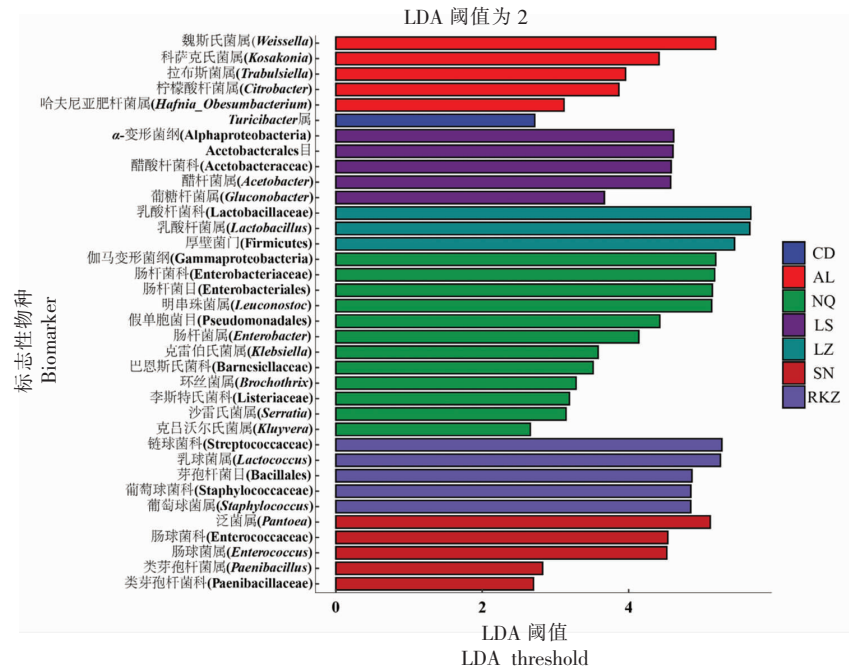


图6 西藏不同地区青稞酒曲中细菌群落 LefSe 分析

Fig.6 LEfSe analysis of bacterial community in the highland barley koji from different region of Tibet

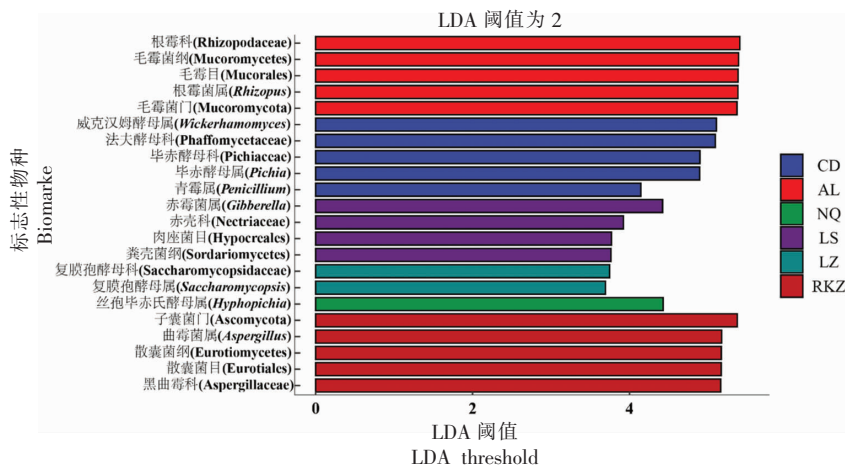


图7 西藏不同地区青稞酒曲中真菌群落 LefSe 分析

Fig.7 LEfSe analysis of fungal community in the highland barley koji from different regions of Tibet

3 结论

西藏不同地区青稞酒曲中微生物群落结构组

成研究表明,青稞酒曲中富含丰富的微生物类群,且细菌菌群数量显著高于真菌。西藏不同地区青

稞酒曲中微生物多样性存在差异,其中NQ样品中细菌丰富度和多样性最高,CD样品中细菌丰富度和多样性最低;NQ样品中真菌丰富度最高,而SN样品最低;CD样品中真菌多样性最高,而AL样品最低。在门分类水平上,厚壁菌门是西藏不同地区青稞酒曲中的优势细菌门,子囊菌门和毛霉菌门是西藏不同地区青稞酒曲中的优势真菌门;在属分类水平,西藏不同地区青稞酒曲中的优势细菌属主要有乳酸杆菌属、明串珠菌属、魏斯氏菌属、乳酸球菌属、泛菌属、葡萄球菌属、醋杆菌属、肠球菌属和科萨克氏菌属,优势真菌属主要有根霉菌属、曲霉菌属和威克汉姆酵母属,西藏不同地区青稞酒曲中优势微生物类群存在一定的共性和差异性。主成分分析表明,NQ、AL、RKZ和SN样品间的细菌群落结构组成较为相似,而CD、LZ和LS样品间的细菌群落结构相似;AL、NQ、LS、LZ和SN样品中的真菌群落结构组成相似,而与CD和RKZ差异较大。LEfSe差异判别分析表明,西藏不同地区青稞酒曲中均有各地区的标志性细菌类群,除SN样品外,其它地区均有标志性真菌类群。西藏不同地区青稞酒曲中的微生物群落结构存在一定差异,这可能与地理环境和制曲方式等因素有关。本研究通过对西藏不同地区青稞酒曲微生物群落结构组成的研究,为进一步开发利用益生微生物类群和复合型酒曲的制备提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 邓俊琳,朱永清,陈建,等.青稞萌动过程中 β -葡聚糖、 γ -氨基丁酸和多酚的含量研究[J].中国粮油学报,2018,33(7):19-25.
DENG J L, ZHU Y Q, CHEN J, et al. Contents of β -glucan, γ -aminobutyric acid and polyphenol in highland barley during germination[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2018, 33(7): 19-25.
- [2] 罗静,李玉锋,胥霞.青稞中的活性物质及功能研究进展[J].食品与发酵工业,2018,44(9):300-304.
LUO J, LI Y F, XU X. Research progress of bioactive components in hullless barley[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(9): 300-304.
- [3] 龚凌霄,曹文燕,张英,等.青稞麸皮提取物抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究及成分分析[J].食品科学,2017,38(6):179-184.
GONG L X, CAO W Y, ZHANG Y, et al. Anti- α -glucosidase activities and bioactive components of Tibetan hull-less barley bran extracts[J]. Food Science, 2017, 38(6): 179-184.
- [4] 赵生玉,王芳.透视互助青稞酒独特风格的成因[J].酿酒科技,2011(7):76-78.
ZHAO S Y, WANG F. Investigation on the formation of the special styles of huzhu highland barley wine[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2011(7): 76-78.
- [5] 余乾伟.传统白酒酿造技术[M].北京:中国轻工业出版社,2010:61-69.
YU Q W. Chuantong Baijiu niangzao jishu[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2010: 61-69.
- [6] 吴树坤,谢军,程铁轡,等.不同地区浓香型大曲质量指标与细菌群落相关性研究[J].食品研究与开发,2019,40(4):158-164.
WU S K, XIE J, CHENG T Y, et al. Correlation between quality index and bacterial community of Luzhou flavor Daqu[J]. Food Research and Development, 2019, 40(4): 158-164.
- [7] 赵金松,张良,孙啸涛,等.酱香型大曲微生物群落特征与理化指标的相关性研究[J].基因组学与应用生物学,2019,38(1):199-204.
ZHAO J S, ZHANG L, SUN X T, et al. Study on the correlations between microbial community characteristics and physicochemical indicators of Maotai-flavor Daqu [J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(1): 199-204.
- [8] 牡丹,解修超,邓百万,等.谢村黄酒酒曲微生物多样性分析及产 γ -氨基丁酸能力的初步研究[J].食品与发酵工业,2019,45(19):144-150.
DU D, XIE X C, DENG B W, et al. Microbial diversity and γ -aminobutyric acid production ability of Xiecun Huangjiu wheat Qu[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(19): 144-150.
- [9] 袁亦舟,张伟国,徐建中.青稞酒曲微生物多样性分析及米根霉制曲条件优化[J].食品与发酵工业,2018,44(5):39-45.
YUAN Y Z, ZHANG W G, XU J Z. Investigation of the microbial diversity in Highland barley Qu and optimization of the Koji-making condition with *Rhi-*

- zopus oryzae*[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(5): 39–45.
- [10] 陈申习, 宿智新, 张磊, 等. 基于高通量测序的清香型和酱香型酒曲真菌群落特征研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 49–53.
- CHEN S X, SU Z X, ZHANG L, et al. Fungal community characteristics of light-flavor and sauce-flavor Jiuqu based on high throughput sequencing[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 49–53.
- [11] 谷晓东, 刘怡琳, 席晓丽. 等. 基于高通量测序技术对6种黄酒酒曲中微生物多样性的研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(16): 148–157.
- GU X D, LIU Y L, XI X L, et al. Microbial diversity in six kinds of Huangjiu koji based on high-throughput sequencing techniques [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(16): 148–157.
- [12] 唐曼秋, 夏巧, 吴正云, 等. 基于宏基因组学技术的八种中日酒曲微生物多样性对比分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(5): 233–239.
- TANG M Q, XIA Y, WU Z Y, et al. Comparative analysis on microbial diversity on eight kinds of Chinese jiuqu and Japanese koji based on metagenomics technology[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(5): 233–239.
- [13] 王鹏, 吴群, 徐岩. 中国白酒发酵过程中的核心微生物群及其与环境因子的关系[J]. 微生物学报, 2018, 58(1): 142–153.
- WANG P, WU Q, XU Y. Core microbiota in Chinese liquor fermentation and associations with environmental factors [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(1): 142–153.
- [14] WANG S L, WU Q, NIE Y, et al. Construction of synthetic microbiota for reproducible flavor compound metabolism in Chinese light-aroma-type liquor produced by solid-state fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(10): e03090–18.
- [15] CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN M J, et al. Dada2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature Methods, 2016, 13(7): 581–583.
- [16] EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194–2200.
- [17] KOLJALG U, NILSSON R H, ABARENKOV K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi[J]. Molecular Ecology, 2013, 22(21): 5271–5277.
- [18] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(D1): D590–D596.
- [19] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996.
- [20] 刘玥佳, 韩业君, 彭文君, 等. 基于高通量测序技术分析蜂粮微生物多样性[J]. 食品科学, 2020, 41(10): 94–100.
- LIU Y J, HAN Y J, PENG W J, et al. Analysis of microbial community diversity in bee bread by high throughput sequencing[J]. Food Science, 2020, 41(10): 94–100.
- [21] LI P, LIN W F, LIU X, et al. Environmental factors affecting microbiota dynamics during traditional solid-state fermentation of Chinese Daqu starter[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1237.
- [22] DU H, WANG X S, ZHANG Y H, et al. Exploring the impacts of raw materials and environments on the microbiota in Chinese Daqu starter[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 297: 32–40.
- [23] WANG H Y, XU Y. Effect of temperature on microbial composition of starter culture for Chinese light aroma style liquor fermentation[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 60(1): 85–91.
- [24] 吴树坤, 谢军, 卫春会, 等. 四川不同地区浓香型大曲微生物群落结构比较[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 144–152.
- WU S K, XIE J, WEI C H, et al. Comparison of microbial community structure of starter cultures (Daqu) for Luzhou-flavor liquor in different regions of Sichuan[J]. Food Science, 2019, 40(14): 144–152.
- [25] WOLF M, MULLER T, DANDEKAR T, et al. Phylogeny of firmicutes with special reference to mycoplasma (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2004, 54(3): 871–875.
- [26] 张会敏, 王杰, 何宏魁, 等. 利用非培养技术初步

- 解析古井贡酒大曲真核微生物群落结构[J]. 食品工业, 2014, 35(6): 158-162.
- ZHANG H M, WANG J, HE H K, et al. Preliminary analysis on eukaryotic bacterial communities in Gujinggong Daqu through culture-free approaches[J]. The Food Industry, 2014, 35(6): 158-162.
- [27] 马楠. 白酒酿造微生物的生物多样性归纳分析研究[J]. 酿酒科技, 2022(3): 105-110.
- MA N. Diversity analysis of Baijiu-making microorganisms[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2022(3): 105-110.
- [28] 李中华, 段雄波, 李金钟. 魏斯菌属细菌的分类与鉴定新进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(8): 721-723.
- LI Z H, DUAN X B, LI J Z. Recent advances in the classification and identification of *Weissella* bacteria [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2006, 27(8): 721-723.
- [29] 尤新. 功能性发酵制品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 14-16.
- YOU X. Functional fermented products[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998: 14-16.
- [30] DRAHOVSKÁ H, KOCÍŇCOVÁ D, SEMAN M, et al. PCR-based methods for identification of *Enterococcus* species [J]. Folia Microbiologica, 2002, 47(6): 649.
- [31] MORENO M R F, SARANTINOPOULOS P, TSAKALIDOU E, et al. The role and application of *Enterococci* in food and health[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 106(1): 1-24.
- [32] 张颖, 孙慧君, 武俊瑞, 等. 豆酱不同发酵阶段细菌群落多样性及动态变化分析[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 30-35.
- ZHANG Y, SUN H J, WU J R, et al. Diversity and dynamic changes of the bacterial community during fermentation of soybean paste[J]. Food Science, 2017, 38(14): 30-35.
- [33] POGACIC T, MAILLARD M B, LECLERC A, et al. *Lactobacillus* and *Leuconostoc volatiles* in cheese conditions [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(5): 2335-2346.
- [34] 徐佳, 邱树毅, 胡宝东, 等. 酱香型白酒酿造过程中霉菌的功能性研究[J]. 酿酒, 2015, 42(5): 32-38.
- XU J, QIU S Y, HU B D, et al. Research on function of the mold in maotai-flavor liquor brewing [J]. Liquor Making, 2015, 42(5): 32-38.
- [35] 龙可, 赵中开, 马莹莹, 等. 酿酒根霉菌研究进展[J]. 现代食品科技, 2013, 29(2): 443-447.
- LONG K, ZHAO Z K, MA Y Y, et al. Progresses of researches on rhizopus for liquor-making[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(2): 443-447.
- [36] 黄永光, 谌永前, 吴广黔, 等. 酱香白酒堆积发酵过程酒醅中酵母菌的分析研究[J]. 酿酒科技, 2013(6): 8-13.
- HUANG Y G, CHEN Y Q, WU G Q, et al. Analysis of yeast strains in fermented grains during stacking fermentation of jiang-flavor liquor [J]. Liquor-making Science & Technology, 2013(6): 8-13.
- [37] 庞博. 酱香型大曲酒酿造过程酵母微生态及功能菌株筛选[D]. 贵阳: 贵州大学, 2014.
- PANG B. Yeast microecology and functional strain screening in the brewing process of maotai flavor Daqu liquor[D]. Guiyang: Guizhou University, 2014.

Microbial Community Structure and Diversity of Highland Barley Koji in Tibet

Zhang Erhao, Feng Zongtao, He Ping, Liu Panpan, Jian Yue, Xu Yuting, Lu Yazhou, Luo Zhang*
(College of Food Science, Tibet Agriculture and Animal Husbandry University, Linzhi 860000, Tibet)

Abstract In order to study the difference in microbial communities in the highland barley koji from different regions of Tibet, the high throughput sequencing technology was used to analyze microbial community composition and diversity. The results showed that the microorganism groups were rich, and the numbers of bacteria were more than fungus. Bacterial diversity in Naqu (NQ) was the highest, and the fungal diversity in Changdu (CD) was the highest. The dominant bacterial genera were *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* in the highland barley koji, the dominant fungal genera were *Rhizopus* and *Aspergillus* in the highland barley koji. The microbial community composition in the highland barley koji

from different regions of Tibet were certain commonalities and differences. Principal component analysis showed that the bacterial community composition of NQ, Ali (AL), Rikaze (RKZ) and Shannan (SN) were similar, while that of CD, (Linzhi) LZ and (Lhasa) LS were similar, fungal community of AL, NQ, LS, LZ and SN were clustered into one group, while the CD and RKZ were clustered into one group, respectively. The analysis of the LDA Effect Size showed that there was a bacterial biomarker in all samples, and a fungal biomarker in all samples except for SN sample. In the conclusion, the microbial community composition in the highland barley koji from different regions of Tibet was different. These results could provide theoretical bases for the further development and utilization of probiotic microbial groups and the preparation of mixed jiuqu.

Keywords highland barley koji; high throughput sequencing; bacterial community; fungal community; diversity