



少根根霉产孢能力、变种与发酵产物的相关性

刘晓玲^{1,2#}, 鞠笑^{1,2#}, 贾碧丝¹, Timothy Y James³, 乔敏^{4*}, 刘小勇^{1*}

1 中国科学院微生物研究所, 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 密西根大学生态与进化生物系, 美国 安娜堡 MI 48109-1048

4 云南大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650091

刘晓玲, 鞠笑, 贾碧丝, Timothy Y James, 乔敏, 刘小勇. 少根根霉产孢能力、变种与发酵产物的相关性. 微生物学报, 2022, 62(3): 1131–1149.

Liu Xiaoling, Ju Xiao, Jia Bisi, Timothy Y James, Qiao Min, Liu Xiaoyong. The correlations of fermentation metabolites with sporulation capability and varieties of *Rhizopus arrhizus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1131–1149.

摘要: 【目的】探究少根根霉不同生态环境、不同地理位置、不同产孢能力和不同分类学变种的发酵产物多样性及相关性, 为工业生产提供指导。【方法】代表性的 68 株少根根霉菌株于糯米培养基中进行液态发酵, 利用高效液相色谱法测定各种发酵产物浓度, 计算发酵产物间的 Pearson 相关系数, 通过多因素方差分析和主成分分析解析各类菌株与发酵特性的相关性。【结果】总计检测到 7 种发酵产物, 按照产量均值百分比从高到低分别是葡萄糖(70.96%)、乙醇(17.87%)、乳酸(6.63%)、麦芽糖(1.80%)、苹果酸(1.46%)、富马酸(0.92%)和甘油(0.36%)。麦芽糖独立代谢, 其余 6 种产物分为 2 组, 组间负相关: 第一组为葡萄糖、乳酸和甘油, 组内正相关; 第二组为乙醇、苹果酸和富马酸, 组内正相关。发酵特性与生态环境、地理位置的相关性较低, 但与产孢能力、分类学变种高度相关。SM 无孢菌株的发酵能力显著强于 SM 产孢菌株, 尤其是菌株 XY01957 的葡萄糖产量高达 138.30 g/L, 具有出色的生产潜力。原变种和东京变种的富马酸、苹果酸产量

基金项目: 国家自然科学基金(31970009); 科技部科技基础性工作专项(2014FY210400); 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题(2019KF002)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970009), by the National S & T Basic Work Program of China (2014FY210400) and by the Grant from State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan University (2019KF002)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. LIU Xiaoyong, Tel/Fax: +86-10-64807527, E-mail: liuxiaoyong@im.ac.cn; QIAO Min, Tel: +86-871-65032538, E-mail: qiaoming@ynu.edu.cn

Received: 8 July 2021; Revised: 4 August 2021; Published online: 30 December 2021

较低，而乳酸和甘油产量较高；德氏变种与前两个变种区分明显，富马酸、苹果酸产量较高，而乳酸和甘油产量较低。【结论】本研究发现少根根霉发酵产物之间以及发酵产物和产孢能力、分类学变种之间高度相关，为群体遗传学研究奠定了良好的基础；本研究筛选出优质的发酵菌株，为发酵工业提供了坚实的支撑。

关键词：米根霉；德氏根霉；鲁氏淀粉霉；乳酸；富马酸

The correlations of fermentation metabolites with sporulation capability and varieties of *Rhizopus arrhizus*

LIU Xiaoling^{1,2#}, JU Xiao^{1,2#}, JIA Bisi¹, TIMOTHY Y James³, QIAO Min^{4*}, LIU Xiaoyong^{1*}

1 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109-1048, USA

4 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

Abstract: [Objective] In order to provide guidance for industrial production, this study investigated the diversity and correlation of metabolites among *Rhizopus arrhizus* strains in different ecological habitats, in different geographical locations, with different sporulation capacities, and of different taxonomic varieties. **[Methods]** Sixty-eight representative strains of *R. arrhizus* were inoculated in glutinous rice media for liquid fermentation, and the yields of secondary metabolites were determined by high-performance liquid chromatography. Pearson correlation coefficients between fermentation products were calculated. The correlation between strains and fermentation characteristics was assessed by multivariate analysis of variance and principal component analysis. **[Results]** A total of seven fermentation products were detected, including glucose (average yield in percentage: 70.96%), ethanol (17.87%), lactic acid (6.63%), maltose (1.80%), malic acid (1.46%), fumaric acid (0.92%), and glycerin (0.36%). Maltose was metabolized independently, while the other six were divided into two groups with a negative inter-group correlation. The first group contained glucose, lactic acid, and glycerol, which were positively correlated with each other. The second group included ethanol, malic acid, and fumaric acid, also showing positive correlations. Fermentation characteristics were significantly correlated with sporulation capacities and taxonomic varieties, while slightly with ecological habitats and geographical locations. The strains not producing spores in synthetic mucor liquid medium had significantly stronger fermentation ability of than the SM spore-producing strains. In particular, strain XY01957 had the potential for industrial production since it could produce glucose at a yield as much as 138.30 g/L. The varieties *arrhizus* and *tonkinensis* had lower content of fumaric acid and malic acid while higher content of lactic acid and glycerin, whereas *delemar* was obviously opposite to the two varieties above with respect to all these components. **[Conclusion]** This study demonstrated high correlations among fermentation metabolites, sporulation capacities, and taxonomic varieties of *R. arrhizus*, laying a sound

foundation for population genetic research. Some high-quality strains were screened out, providing solid support for the fermentation industry.

Keywords: *Rhizopus oryzae*; *Rhizopus delemar*; *Amylomyces rouxii*; lactic acid; fumaric acid

少根根霉(*Rhizopus arrhizus* A. Fisch. 1892), 在世界范围内广泛使用的另外一个名称是米根霉(*R. oryzae* Went & Prins. Geerl. 1895)。该物种是传统接合菌的核心类群, 隶属于毛霉目根霉科的根霉属^[1], 存在于土壤、空气、食物等多种基物和人体内, 能够导致毛霉病^[2-3]。此外, 作为美国食品药品监督管理局(FDA)认证的公认安全(generally regarded as safe, GRAS)生物, 少根根霉环境适应能力强, 生长迅速, 能高效转化多种碳氮源底物, 是重要的食品和饮品发酵菌^[4-6]。

少根根霉能够产生多种淀粉酶, 可使淀粉转化为可发酵性糖, 比如, 葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖。发酵过程中也能产生酒精, 在酿酒业广泛应用^[5,7]; 发酵过程中还能产生乳酸、富马酸和苹果酸等有机酸^[8-10], 使酿造的酒具有独特的风味。此外, 少根根霉是脂肪酶的重要生产菌, 能够水解脂肪酸链产生醛、酯、酮和萜等多种芳香性化合物, 用于含油脂食品的增香等^[11]。目前已有许多研究通过优化发酵工艺、选育或者基因工程改造菌株来提高少根根霉的发酵产能^[12-14]。通过发酵工艺的优化, 少根根霉发酵的糖化酶活力达 197 U/mL^[15], 乳酸产量达 69 g/L^[16], 富马酸产量达 31 g/L 或者 47 g/L^[10,17]。为了选育具有生产潜力的菌株, 常常模拟发酵条件进行筛选^[18]。发酵工程菌株的构建方面, 代表性的出发菌株为 ATCC 20344^[19], 其突变体 FM19 在葡萄糖培养基中富马酸产量提高到 49 g/L^[20], 其突变体 G80 在粗甘油培养基中富马酸产量仍然高达 26 g/L^[13]。

少根根霉在世界广泛分布, 具有丰富的物

种内多样性^[21-22], 多样性的潜在出发菌株亟待发掘。除初始分离的地理位置和生态上的多样性以外, 少根根霉具有多样化的表型和基因型。该物种在分类学上包含 3 个变种, 即原变种(*R. arrhizus* var. *arrhizus* A. Fisch. 1892)、东京变种(*R. arrhizus* var. *tonkinensis* (Vuill.) R.Y. Zheng & X.Y. Liu 2007)和德氏变种(*R. arrhizus* var. *delemar* (Boidin ex Wehmer & Hanzawa) J.J. Ellis 1984)^[23-25]。长期适应发酵环境的少根根霉沿着两个方向演化: 有的在形态上退化, 不再产生无性孢子囊, 称为鲁氏形态型(*Rouxii* type), 一些学者将这类少根根霉称为鲁氏淀粉霉^[26-27]; 有的在生化上特化, 产生大量的乳酸, 而很少产生富马酸和苹果酸, 称为产乳酸生化组(LA group), 一些学者将这类少根根霉称为德氏根霉^[21,28-29]。在 Zheng 等^[23]的根霉属专著中, 鲁氏淀粉霉是少根根霉原变种的异名, 德氏根霉是少根根霉德氏变种的异名。

本研究选取具有不同的产孢能力, 不同的生态环境, 形态上属于不同的变种, 来自不同的地理区域的少根根霉 68 株, 涵盖了鲁氏形态型和产乳酸生化组。通过对其发酵糯米产生的多种产物进行分析, 了解菌株间的差异, 揭示种内发酵性能多样性和相关性, 为优质工业生产出发菌株的筛选奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株

供试 68 株菌(表 1)分离自全球 22 个国家, 涵盖亚洲、欧洲、北美洲、南美洲、非洲和大洋洲等 6 个大洲, 来源于土壤、空气、酒曲和

表 1 供试少根根霉菌株原始信息

Table 1 Original information of involved strains of *Rhizopus arrhizus*

Strains	Ecologies	Continents	Countries	Initial sources
XY00012	Wild	Europe	Germany	Rotten pod of <i>Liliaceae</i>
XY00077	Clinical	Asia	China	Skin scabs
XY00406	Domesticated	Asia	Japan	Koji
XY00409	Wild	Asia	Japan	Soil
XY00419	Wild	Asia	Japan	Ragi
XY00424	Domesticated	Asia	Japan	Koji
XY00438	Domesticated	Asia	China	Chinese yeast
XY00457	Wild	Europe	Portugal	Corn flour
XY00495	Domesticated	Asia	India	Distillery yeast
XY00507	Domesticated	Asia	China	Chinese yeast
XY01735	Wild	Asia	China	Soil
XY01736	Wild	Asia	China	Flour
XY01737	Wild	Asia	China	Flower
XY01738	Wild	Asia	China	Cake
XY01745	Wild	Asia	China	Air
XY01857	Wild	Asia	China	Flower
XY01864	Wild	Asia	China	Flower
XY01865	Wild	Asia	China	Sweet wrapping
XY01874	Wild	Asia	China	Grass
XY01875	Wild	Asia	China	Wrapping paper
XY01876	Wild	Asia	China	Soil
XY01880	Wild	Asia	China	Soil
XY01919	Wild	Asia	China	Plant
XY01920	Clinical	Asia	China	Lesion
XY01921	Clinical	Asia	China	Eye socket
XY01957	Domesticated	Asia	China	Distillery yeast
XY02053	Wild	Asia	China	Sweet wrapping
XY02064	Wild	Asia	China	Soil
XY02120	Wild	Asia	China	Shell
XY02128	Wild	Asia	China	Dung
XY03778	Domesticated	Africa	Tanzania	<i>Vigna unguiculata</i>
XY03779	Wild	Europe	UK	Lake mud
XY03782	Wild	Asia	Indonesia	Ragi
XY03786	Wild	Europe	Cyprus	<i>Vicia faba</i> seedling
XY03787	Wild	Africa	Egypt	<i>Allium</i>
XY03788	Wild	Asia	India	<i>Gossypium</i>
XY03789	Wild	Asia	Malaysia	Honey dew
XY03790	Wild	Asia	Yemen	<i>Gossypium</i> root
XY03792	Domesticated	Asia	Malaysia	Soy sauce
XY03793	Wild	Asia	Malaysia	<i>Pinus caribaea</i>

(待续)

(续表 1)

XY03794	Wild	Asia	India	Cotton lint
XY03795	Wild	Africa	Egypt	<i>Arachis hypogaea</i>
XY03796	Wild	Asia	Jordan	<i>Allium</i>
XY03797	Wild	Oceania	Papua New Guinea	Radio set
XY03798	Wild	South America	Venezuela	<i>Carica papaya</i> fruit
XY03799	Wild	Europe	UK	Mouldy bran
XY03800	Wild	Asia	Philippines	Soil
XY03802	Wild	Asia	Philippines	Soil
XY03803	Wild	Asia	Philippines	Soil
XY03804	Wild	Africa	Sudan	Dung
XY03805	Domesticated	Asia	Indonesia	Ragi-tempe
XY03806	Clinical	North America	USA	Clinical
XY03808	Wild	North America	USA	Sweet potato
XY03809	Wild	Asia	Pakistan	Dung
XY03810	Clinical	North America	USA	Clinical
XY03813	Wild	North America	USA	Soil
XY03815	Wild	Africa	Uganda	Peanuts
XY03816	Wild	Asia	Philippines	Soil
XY03819	Wild	Asia	India	Insect
XY03820	Wild	Asia	Iran	Onion
XY03821	Wild	Asia	Indonesia	Leaf
XY03822	Wild	Africa	South Africa	Soil
XY03824	Wild	Asia	Philippines	Soil
XY03825	Wild	Asia	Indonesia	Soil
XY03826	Wild	Asia	Indonesia	Soil
XY03827	Wild	Asia	Indonesia	Soil
XY03829	Wild	Asia	Pakistan	Dung
XY03830	Wild	Asia	Indonesia	Food

人体等多种基物, 根据起始生态环境, 少根根霉分为驯化型、致病型和野生型等 3 个生态群体。所有菌株均保藏并活化自中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室菌种库。

1.2 形态学与分子生物学鉴定

结合形态学与分子生物学的方法进行菌种鉴定和变种划分。形态上, 观察假根、匍匐菌丝、孢囊梗、孢子囊、囊托、囊轴和孢囊孢子等结构, 根据 Zheng 等^[23]的分类标准进行形态学鉴定。从分子水平上, 提取细胞总 DNA, 对 ITS 和 IGS rDNA 进行 PCR 扩增与测序, 构建

最简约(maximum parsimony)分子系统发育树确定分类学变种的分类地位, 详细方法参考鞠笑等的文献^[30]。

1.3 产孢能力测定

对鉴定为少根根霉的菌株在毛霉合成液体培养基(synthetic mucor, SM: 葡萄糖 20 g/L、天门冬素 2 g/L、磷酸氢二钾 0.5 g/L、七水硫酸镁 0.25 g/L 和维生素 B₁ 0.5 mg/L)中进行产孢能力测定。将保存的菌种首先接种到麦芽提取物琼脂培养基(malt extract agar, MEA: 麦芽提取物 20 g/L、蛋白胨 1 g/L、葡萄糖 20 g/L 和琼脂

20 g/L)平板上, 30 °C 恒温培养 2 d。刮掉气生菌丝后, 用 200 μ L 移液器吸头敞口切入, 获得相同直径(5 mm)含菌培养基, 接种到含有 20 mL 毛霉合成液体培养基(SM)的 250 mL 三角瓶中, 30 °C 恒温箱中静置培养 8 d。小心去除三角瓶中的液体培养基, 加入 50 mL 无菌水, 用玻璃棒剧烈搅拌帮助孢子囊破裂释放孢囊孢子, 用 8 层纱布过滤菌丝, 获得孢囊孢子悬浮液, 4 °C 保藏备用。对于在毛霉合成液体培养基(SM)中不产孢的菌株, 则转接至麦芽提取物琼脂培养基(MEA)以收集孢子。用血球计数板在蔡司 IMAGER A2-M2 显微镜下统计孢子浓度。

1.4 糯米发酵

将前面获得的孢子悬浮液用于糯米发酵, 选取代表不同产孢能力、不同变种、不同生态类群和不同地理位置的 5 株菌(XY00012、XY00077、XY00406、XY00438 和 XY03795)进行发酵预实验。在 250 mL 三角瓶中装入 50 g 糯米(安徽省合肥市安徽燕之坊食品有限公司, 碳水化合物、蛋白质和脂肪含量分别为 76.0%、7.3%和 1.5%), 加入 80 mL 蒸馏水, 封口后在高压灭菌锅中 1×10^5 Pa, 121 °C 灭菌 20 min。将适当体积的孢子悬浮液接种到灭菌的糯米培养基中, 补充无菌水至总体积 100 mL, 使接种后孢子浓度为 6.25×10^4 个/mL, 封口膜密封后置于 30 °C 恒温摇床 140 r/min 连续培养, 每天测定发酵产物浓度, 绘制发酵曲线确定发酵稳定期。正式实验时, 所有实验菌株发酵至稳定期(8 d)后, 抽取 2 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 10 min, 重复离心 1 次, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤上清液, 装入高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)样品瓶中, 4 °C 保存备用。每株菌设置 3 个技术重

复; 2 个对照: 对照 1 为无菌水加糯米, 对照 2 为无菌水加孢子悬浮液。

1.5 HPLC 测定

对糖类、有机酸类和醇类物质的测定采用高效液相色谱法(HPLC), 选用 LC-20A 液相色谱仪(Shimadzu, Japan, <https://www.shimadzu.com/>)、Aminex HPX-87H Column 300 mm \times 7.8 mm 液相色谱柱(Bio-Rad, USA, <https://www.bio-rad.com/>)、RID-20A 示差折光检测器(Shimadzu), 流动相为减压除气的 5 mmol/L 硫酸, 流速 0.6 mL/min, 进样量 20 μ L, 柱温 60 °C, 检测时间 30 min。

1.6 发酵产物浓度分析

色谱纯糖类标准品精确称量前于 40 °C 烘箱中干燥 24 h, 其他标准品直接称量。用流动相 5 mmol/L 硫酸配制母液(乙醇 160 g/L、甘油 20 g/L、麦芽糖 6 g/L、葡萄糖 6 g/L、乳酸 3 g/L、富马酸 3 g/L 和苹果酸 3 g/L), 取母液和流动相 5 mmol/L 硫酸各 20 mL 于 50 mL 离心管混匀, 得到第 1 个梯度稀释液, 依次 2 倍稀释至第 6 个梯度。HPLC 测定母液和各梯度稀释液的出峰时间和峰面积, 并用 Microsoft Excel 2016 绘制峰面积对浓度的标准曲线($r^2 > 0.99$)。计算标准曲线公式, 将 HPLC 测定得到的原始峰面积换算为浓度, 计算每株菌 3 个技术重复的平均值、标准差和标准误, 采用平均值绘制发酵产物浓度条形图、百分含量饼图和箱形图。

1.7 多样性分析

在 Excel 2010 软件中以每株菌第 8 天发酵产物浓度平均值来分析少根根霉种内发酵产物的丰度和多度。发酵产物种类数记为丰度, 而多度等级参照 Drude 7 级制并加以修改, 当多度 > 75% 时认为极多, 50%–75% 很多, 25%–50% 多, 5%–25% 尚多, 2.5%–5.0% 不多, 1.0%–2.5%

稀少, <1.0%极少^[31]。统计多度为尚多及以上等级的发酵产物浓度分布情况,利用 Excel 2010 筛查出极端离群菌株并将其剔出后续的相关性分析。

1.8 相关性分析

利用软件 SPSS Statistics 19^[32]计算各种发酵产物浓度之间的 Pearson 相关性系数矩阵,并采用 95%和 99%的置信区间进行显著性双侧检验。利用软件 Cytoscape 3.8.2^[33]进行数据可视化,将 7 种发酵产物及两两相关系数导入,用不同颜色表示不同种类的发酵产物,不同线型表示不同的相关性关系,绘制相关性网络图。Pearson 相关系数 $|r| < 0.33$ 、 $0.33 \leq |r| < 0.66$ 和 $|r| \geq 0.66$ 分别处理为弱、中等和强相关。

利用 SPSS 对各发酵产物及发酵产物均值(表示总发酵能力)分别与产孢能力、生态群体、变种和地理位置进行多因素方差分析,当 $P < 0.05$ 时认为具有显著性差异, $P < 0.01$ 时认为具有极显著差异。各分组间差异显著或极显著的发酵产物用于主成分分析和热图绘制。采用 SDV 法(singular value decomposition)计算主成分,利用多元数据的可视化聚类网站 ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>)作图^[34],并以 95%置信度绘制预测椭圆。并利用发酵产物浓度在 ClustVis 网站上绘制热图,采用相关距离(correlation distance)和平均连锁(average linkage)进行聚类,适当调整颜色数值范围,选用红蓝两个颜色的渐变表示发酵产物浓度的相对高低。

2 结果与分析

2.1 菌株类群

供试 68 株菌经形态学与分子生物学鉴定确定为原变种 25 株,德氏变种 31 株,东京变种 12 株;毛霉合成液体培养基(SM)上产孢菌种 60 株,SM 无孢菌种 8 株(表 2)。

2.2 发酵产物多样性

发酵预实验结果表明,发酵 1 d 后开始糖化,5 株菌的 7 种发酵产物浓度在第 1–7 天整体呈上升趋势,个别菌株的个别产物如 XY00012 发酵产葡萄糖的浓度稍有波动,而第 8–10 天各菌株的各发酵产物浓度基本不再变化,浓度曲线趋于平缓(图 1),表明第 8 天已经完全液化,故在正式实验中,发酵 8 d 后取样进行浓度测定。本研究中少根根霉糯米培养基发酵的产物丰度为 7,检测到葡萄糖、麦芽糖、苹果酸、富马酸、乳酸、乙醇和甘油(图 2)。发酵产物多度方面(图 2B),葡萄糖产量很多,占发酵产物总量的 70.96%;乙醇(17.87%)和乳酸(6.63%)产量尚多;麦芽糖(1.80%)和富马酸(1.46%)产量稀少;甘油(0.92%)和苹果酸(0.36%)产量极少。菌株 XY01957 发酵产物总量最高,达到 171.47 g/L(图 2A 中第 1 位);菌株 XY03822、XY00012、XY01737、XY01736、XY00507 和 XY03829 等 6 个菌株各自的发酵产物总量较高,分别为 140.10、128.23、127.11、125.43、106.09 和 99.01 g/L(图 2A 中第 2–7 位);接下来是发酵产物总量中等且呈连续分布的 60 个菌株(88.03–33.89 g/L,图 2A 中第 8–67 位);菌株 XY03797 发酵产物总量最低(23.26 g/L,图 2A 中最后一位),发酵产物种类最少,不产生乳酸、富马酸、苹果酸、甘油和葡萄糖,仅产生乙醇和麦芽糖,其乙醇产量没有特别之处,但其麦芽糖产量在所有菌株中位列第一(18.42 g/L),只有 1 株菌 XY00507 较为接近(10.25 g/L,图 2A 中第 6 位),其余菌株与其差异较大,在 0.40–3.51 g/L 范围内呈连续分布。统计乙醇和乳酸的含量分布情况,没有发现极端离群菌株;统计葡萄糖含量发现 XY01957 属于极端离群菌株(138.30 g/L,图 2C 中葡萄糖最右边的离群点),在后续相关性分析中将其所有

表 2 供试少根根霉菌株产孢能力与分类学鉴定

Table 2 Sporulation abilities and taxonomic identification of involved strains of *Rhizopus arrhizus*

Strains	Sporulation on SM	Varieties	ITS accession No.	IGS accession No.
XY00012	No	<i>arrhizus</i>	MN955400	MN970608
XY00077	Yes	<i>delemar</i>	MN955399	MN970607
XY00406	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955398	MN970606
XY00409	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955397	MN970605
XY00419	Yes	<i>delemar</i>	MN955396	MN970604
XY00424	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955395	MN970603
XY00438	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955394	MN970602
XY00457	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955393	MN970601
XY00495	Yes	<i>delemar</i>	MN955392	MN970600
XY00507	No	<i>arrhizus</i>	MN955391	MN970599
XY01735	Yes	<i>delemar</i>	MN955390	MN970598
XY01736	No	<i>arrhizus</i>	MN955389	MN970597
XY01737	No	<i>delemar</i>	MN955388	MN970596
XY01738	Yes	<i>delemar</i>	MN955387	MN970595
XY01745	Yes	<i>delemar</i>	MN955386	MN970594
XY01857	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955385	MN970593
XY01864	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955384	MN970592
XY01865	Yes	<i>delemar</i>	MN955383	MN970591
XY01874	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955382	MN970590
XY01875	Yes	<i>delemar</i>	MN955381	MN970589
XY01876	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955380	MN970588
XY01880	Yes	<i>delemar</i>	MN955379	MN970587
XY01919	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955378	MN970586
XY01920	Yes	<i>delemar</i>	MN955377	MN970585
XY01921	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955376	MN970584
XY01957	No	<i>arrhizus</i>	—	—
XY02053	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955375	MN970583
XY02064	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955374	MN970582
XY02120	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955373	MN970581
XY02128	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955372	MN970580
XY03778	Yes	<i>delemar</i>	MN955371	MN970579
XY03779	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955370	MN970578
XY03782	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955369	MN970577
XY03786	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955368	MN970576
XY03787	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955367	MN970575
XY03788	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955366	MN970574
XY03789	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955365	MN970573
XY03790	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955364	MN970572
XY03792	Yes	<i>delemar</i>	MN955363	MN970571
XY03793	Yes	<i>delemar</i>	—	—
XY03794	No	<i>delemar</i>	MN955362	MN970570
XY03795	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955361	MN970569

(待续)

(续表 2)

XY03796	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955360	MN970568
XY03797	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955359	MN970567
XY03798	Yes	<i>delemar</i>	MN955358	MN970566
XY03799	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955357	MN970565
XY03800	Yes	<i>delemar</i>	MN955356	MN970564
XY03802	Yes	<i>delemar</i>	MN955354	MN970562
XY03803	Yes	<i>arrhizus</i>	–	MN970561
XY03804	Yes	<i>delemar</i>	MN955353	MN970560
XY03805	Yes	<i>delemar</i>	MN955352	MN970559
XY03806	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955351	MN970558
XY03808	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955350	MN970557
XY03809	Yes	<i>delemar</i>	MN955349	MN970556
XY03810	Yes	<i>delemar</i>	MN955348	MN970555
XY03813	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955347	MN970554
XY03815	Yes	<i>delemar</i>	MN955346	MN970553
XY03816	Yes	<i>delemar</i>	MN955345	MN970552
XY03819	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955344	MN970551
XY03820	Yes	<i>arrhizus</i>	MN955343	MN970550
XY03821	Yes	<i>tonkinensis</i>	MN955342	MN970549
XY03822	No	<i>delemar</i>	MN955341	MN970548
XY03824	Yes	<i>delemar</i>	MN955340	MN970547
XY03825	Yes	<i>delemar</i>	MN955339	MN970546
XY03826	Yes	<i>delemar</i>	MN955338	MN970545
XY03827	Yes	<i>delemar</i>	MN955337	MN970544
XY03829	No	<i>delemar</i>	MN955336	MN970543
XY03830	Yes	<i>delemar</i>	MN955335	MN970542

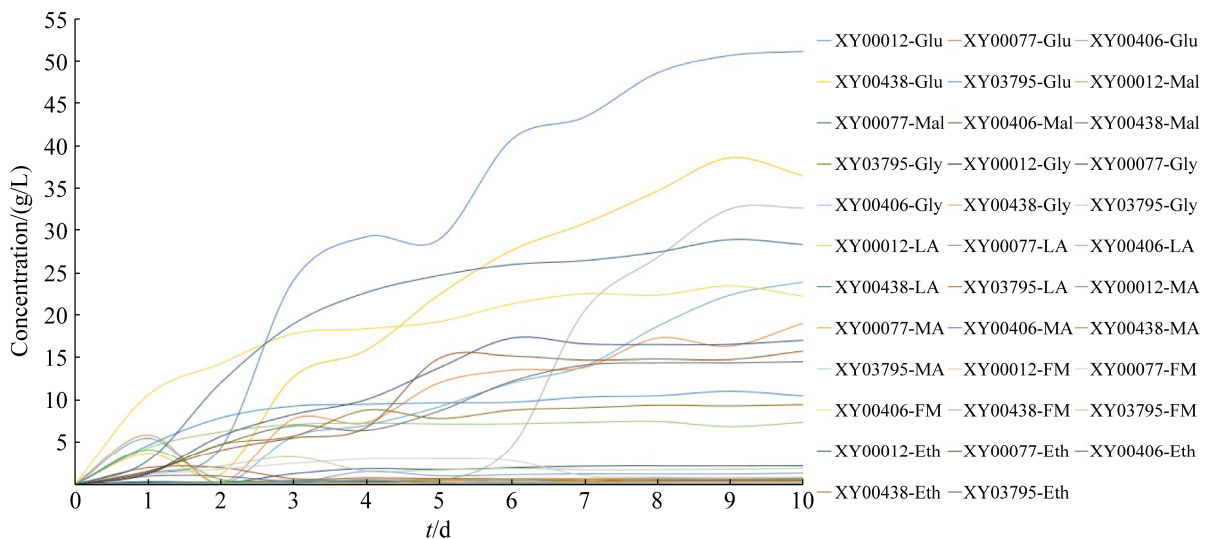


图 1 发酵预实验 7 种发酵产物的浓度曲线

Figure 1 The concentration curve of seven fermentation metabolites. Glu: glucose; Mal: maltose; Gly: glycerin; LA: lactic acid; MA: malic acid; FM: fumaric acid; Eth: ethanol.

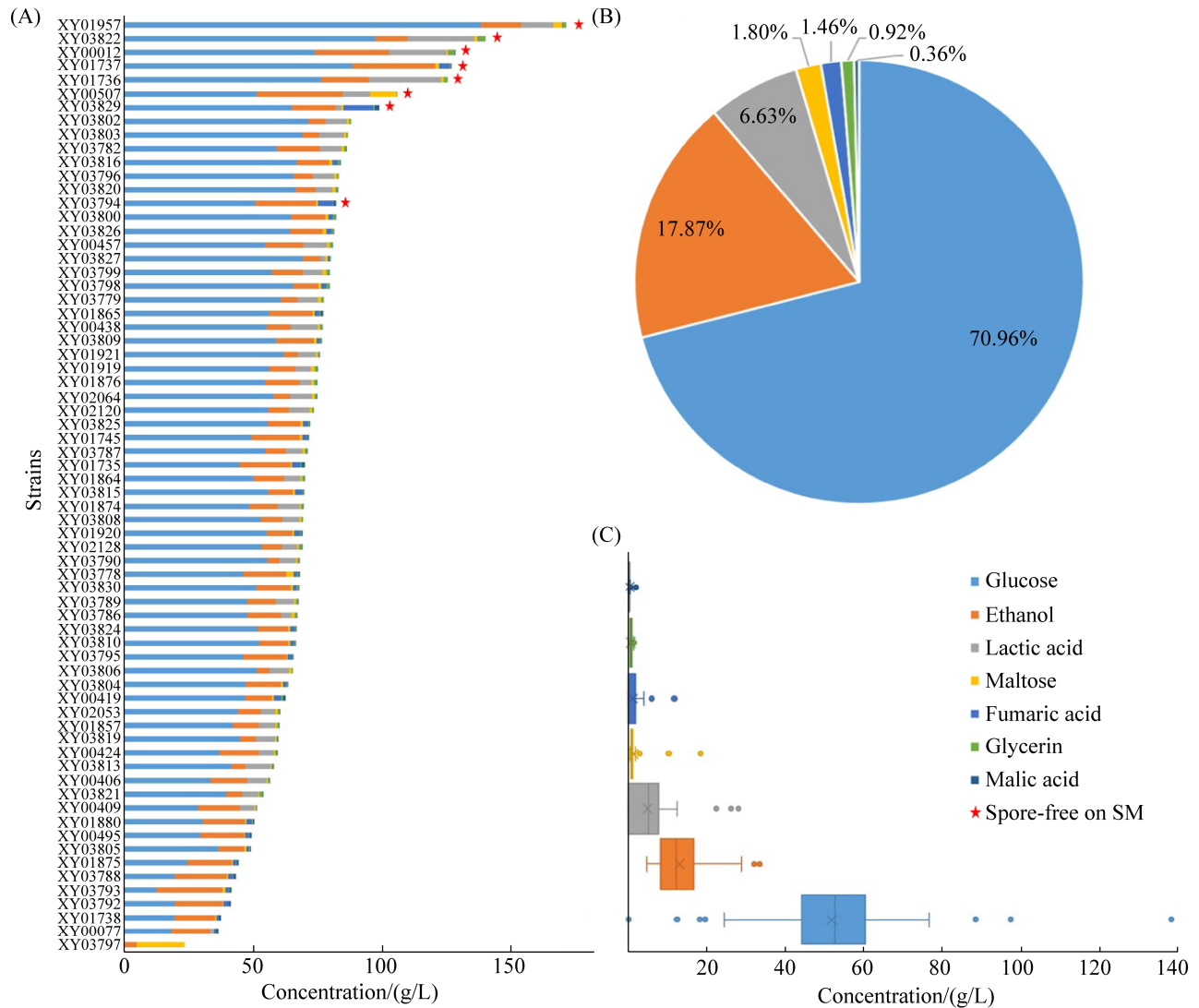


图 2 少根根霉 68 株菌 7 种发酵产物浓度概况

Figure 2 The overview of concentrations of seven fermentation metabolites by 68 strains of *Rhizopus arrhizus*. A: a bar chart; B: a percentage pie chart; C: a box plot.

数据予以删除, 麦芽糖、甘油、富马酸和苹果酸含量整体偏低, 其极端离群值不予处理。

2.3 发酵产物相关性

麦芽糖和其他发酵产物之间的相关性均较弱 ($|r| < 0.33$), 基本属于独立代谢(图 3A)。其余 6 种发酵产物之间存在明显的相关性, 共有 9 对中等或强相关(图 3B): 正相关 6 对, 分别是富马酸与苹果酸($r=0.78$), 甘油与乳酸($r=0.76$), 甘油与葡萄糖($r=0.68$), 乳酸与葡萄糖($r=0.46$),

乙醇与苹果酸($r=0.43$), 乙醇与富马酸($r=0.35$), 其中前 3 对为强相关; 负相关 3 对, 分别是乳酸与苹果酸($r=-0.43$), 乳酸与富马酸($r=-0.42$), 甘油与苹果酸($r=-0.37$)。因此, 这 6 种产物可以分为 2 组: 第一组为葡萄糖、乳酸和甘油, 相互间存在正相关(r 范围为 $0.46-0.76$); 第二组为乙醇、苹果酸和富马酸, 相互间也存在正相关(r 范围为 $0.35-0.78$); 两组之间则存在明显的负相关(r 范围为 $-0.43- -0.37$)。

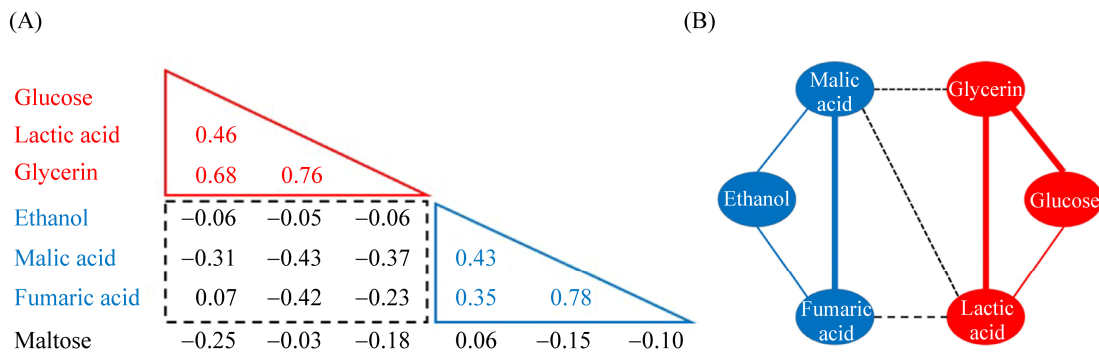


图 3 少根根霉发酵产物相关性

Figure 3 The correlation among fermentation metabolites by *Rhizopus arrhizus*. A: Pearson correlation coefficients; B: correlation network. The weak correlation has a correlation coefficient of $|r| < 0.33$ and is not shown; The moderate correlation (regular line) has a correlation coefficient of $0.33 \leq |r| < 0.66$; The strong correlation (bold line) has a correlation coefficient of $|r| \geq 0.66$. Solid and dashed lines indicate positive and negative correlations, respectively.

2.4 菌株类群与发酵特性的相关性

2.4.1 产孢能力与发酵特性的相关性

多因素方差分析结果(表 3)表明, 发酵总能力以及发酵产葡萄糖、乙醇、乳酸、麦芽糖和甘油的能力在 SM 不同产孢能力的菌株之间差异极显著($P < 0.01$), SM 无孢菌株显著高于 SM 产孢菌株, 除 XY03794 之外, 发酵产物总浓度分别为 106.09–171.47 g/L 和 23.26–99.01 g/L。然而, 苹果酸和富马酸在 SM 不同产孢能力的菌株之间无显著差异($P > 0.05$)。对 67 株菌的上

述 6 组显著相关的数据进行主成分分析 (principal components analysis, PCA) 提取出 2 个主成分, 贡献率分别为 51.9% 和 18.8%, 累计贡献率达到 70.7%。第一主成分(PC1)中葡萄糖($r = -0.50$)、乳酸($r = -0.44$)、甘油($r = -0.51$)和平均值($r = -0.53$)的相关系数较大, 是对第一主成分影响最大的特征向量, 说明 PC1 可能是由它们几个组成的一个综合指标。而 PC2 主要代表乙醇($r = -0.84$)和麦芽糖($r = -0.46$)。从图 4A 可以看出 SM 不同产孢能力菌株的 95% 置信椭圆基本

表 3 少根根霉发酵产物及发酵能力方差分析结果(P 值)

Table 3 Results (P values) of variance analysis of fermentation products and fermentation capacity of *Rhizopus arrhizus*

Products	Sporulation	Ecologies	Varieties	Geographies
Maltose	0.000**	0.000**	0.807	0.000**
Glucose	0.004**	0.469	0.633	0.025*
Fumaric acid	0.391	0.933	0.000**	0.112
Malic acid	0.937	0.841	0.050*	0.608
Lactic acid	0.000**	0.005**	0.000**	0.000**
Glycerin	0.000**	0.033*	0.011*	0.000**
Ethanol	0.000**	0.035*	0.194	0.185
Mean	0.000**	0.777	0.286	0.011*

*: significant difference; **: extremely significant difference.

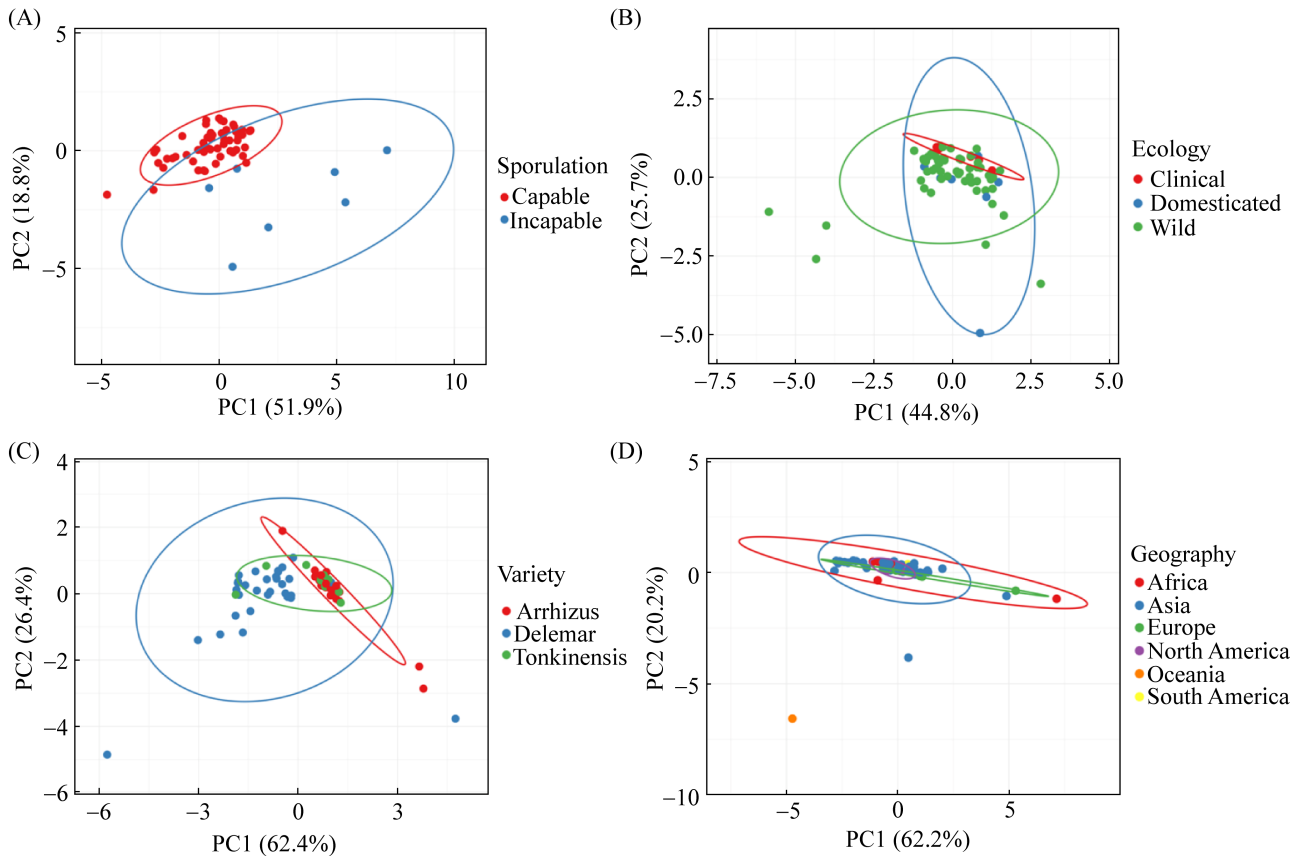


图 4 少根根霉 67 株菌株发酵产物的 PCA 分析

Figure 4 The principal component analysis (PCA) of fermentation metabolites by 67 strains of *Rhizopus arrhizus*. A: sporulation capacities; B: ecological populations; C: varieties; D: geography.

可以分开, 相较于 SM 产孢菌株, SM 无孢菌株在 PC1 得分较高, 而在 PC2 得分较低。热图 5A 同样显示了 SM 不同产孢能力菌株间发酵特性的差异。

2.4.2 生态群体与发酵特性的相关性

多因素方差分析(表 3)表明, 乳酸和麦芽糖在不同生态群体间差异极显著, 乙醇和甘油在不同生态群体间差异显著, 其热图如图 5B。对上述 4 种发酵产物进行 PCA 分析共提取出 2 个主成分, 贡献率分别为 44.8% 和 25.7%, 累计贡献率达到 70.5%。第一主成分(PC1)主要为乳酸($r=-0.68$)和甘油($r=-0.70$), 第二主成分(PC2)主要代表乙醇($r=-0.72$)和麦芽糖($r=-0.66$)。不同

生态类型菌株的 95% 置信椭圆无法分开, 野生型在 PC1 上的得分范围较大, 驯化型在 PC2 上的得分范围较大(图 4B)。这样的得分范围也反映出个别菌株的特异性, 比如 XY03822、XY00012 和 XY01736 等 3 个野生型菌株发酵产乳酸和甘油显著高于其他菌株, 而驯化型菌株 XY00507 发酵产乙醇和麦芽糖显著高于其他菌株(图 5B)。

2.4.3 分类学变种与发酵特性的相关性

多因素方差分析结果(表 3)表明, 不同变种间乳酸和富马酸产量差异极显著, 甘油和苹果酸在不同变种间差异显著。对上述 4 种发酵产物进行 PCA 分析共提取出 2 个主成分, PC1 代

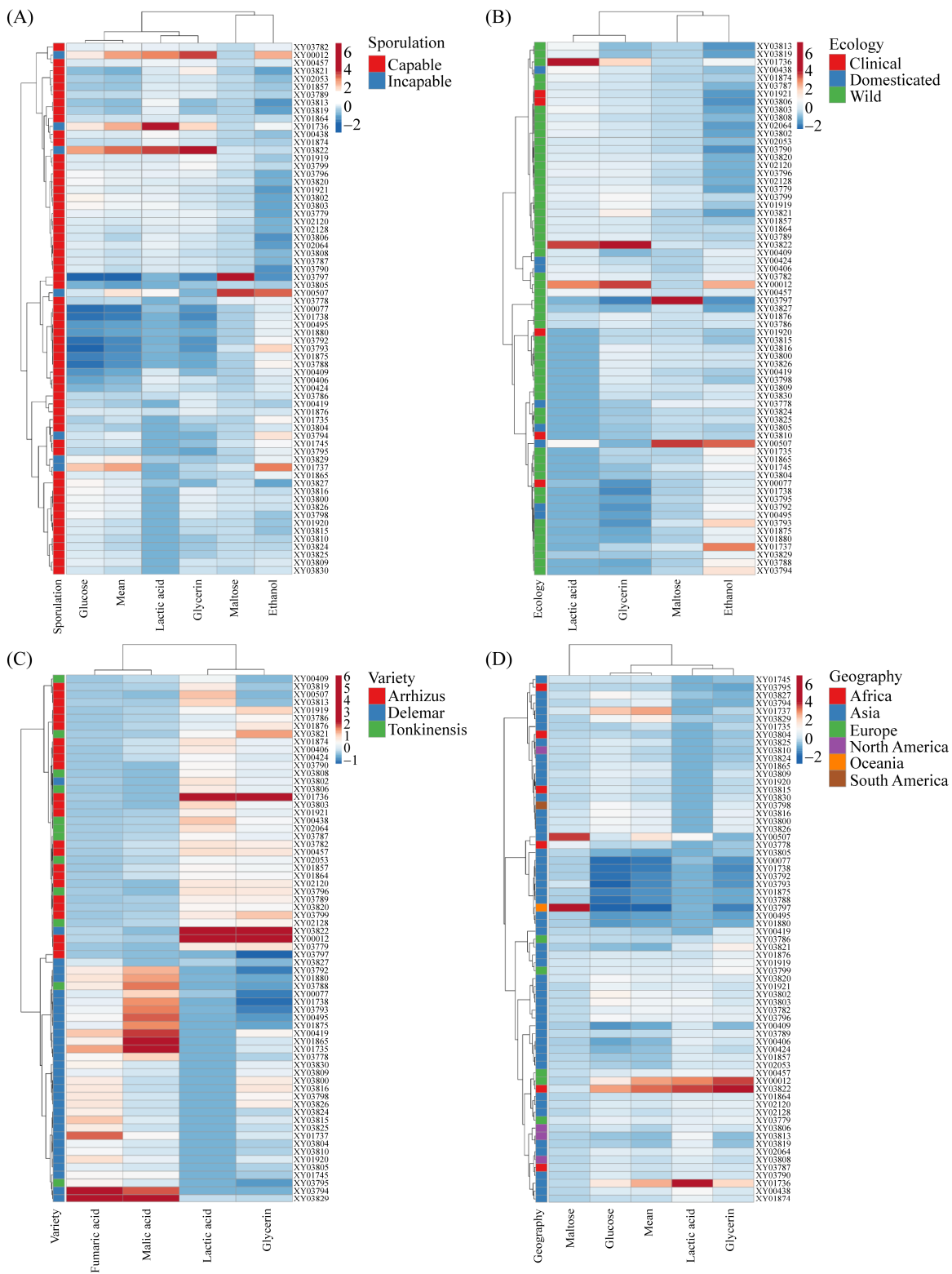


图 5 少根根霉发酵产物相关性分析热图

Figure 5 The heatmap of the correlation analysis of the fermentation products of *Rhizopus arrhizus*. A: sporulation capacities; B: ecology; C: varieties; D: geography.

表富马酸、苹果酸、乳酸和甘油, 相关系数分别为 0.49、0.52、-0.52 和 -0.47, PC2 也代表富马酸、苹果酸、乳酸和甘油, 相关系数分别为 -0.54、-0.44、-0.42 和 -0.58, PC1 和 PC2 的贡献率分别为 62.4% 和 26.4%, 累计贡献率达到 88.8%。原变种与东京变种在第一主成分上的得分明显高于德氏变种(图 4C)。其热图(图 5C)表明少根根霉变种与上述 4 种发酵产物之间有较为明显的聚类对应关系。少根根霉的 3 个变种可以聚为两个分支, 除了菌株 XY03795 和 XY03788, 少根根霉原变种与东京变种聚在一起; 而除菌株 XY03802 和 XY03822 以外的德氏变种聚为另一类。由图中可知, 德氏变种分支的富马酸和苹果酸产量较高, 而乳酸和甘油产量较低, 原变种与东京变种分支则恰好相反。

2.4.4 菌株初始分离时的地理位置与菌株发酵特性的相关性

多因素方差分析结果(表 3)表明不同地理来源的菌株乳酸、麦芽糖和甘油产量差异极显著, 葡萄糖产量和发酵能力差异显著, 进行 PCA 分析时提取出 2 个主成分, 贡献率分别达到 62.2% 和 20.2%, 累计贡献率为 82.4%, PC1 主要代表乳酸($r=-0.44$)、葡萄糖($r=-0.50$)、均值($r=-0.52$)和甘油($r=-0.51$), PC2 主要代表麦芽糖($r=-0.95$)。不同来源菌株的 95% 置信椭圆无法分开(图 4D), 相同地理位置的菌株在两个主成分上得分差异均较大, 具有菌株特异性, 其中 XY03822、XY00012 和 XY01736 的总发酵能力和发酵产乳酸、葡萄糖和甘油的能力显著高于其他菌株, XY00507 和 XY03797 的发酵产麦芽糖的能力显著高于其他菌株(图 5D)。

3 讨论与结论

3.1 主要发酵产物及其功能分析

本研究采用同步糖化法, 以糯米为底物,

利用纯种少根根霉菌株进行液态摇瓶发酵, 经过 8 d 的发酵后, 最终检出的主要发酵产物有糖类 2 种(麦芽糖和葡萄糖), 有机酸 3 种(乳酸、富马酸和苹果酸), 醇类 2 种(甘油和乙醇)。比较以上种类的发酵产物含量可知, 少根根霉在发酵过程中, 最突出的是其发酵产葡萄糖的能力(图 2), 这是由于少根根霉既能产糖化酶也能产 α -淀粉酶和 β -淀粉酶, 但是不同菌株产酶性能不同, 所产酶的特性也不同, 总体而言根霉产上述 3 种淀粉酶能力均较强且酶活力高^[35-36]。其中 α -淀粉酶和 β -淀粉酶水解淀粉最终产物以麦芽糖为主, 并产生少量的葡萄糖, 而糖化酶几乎可以将淀粉理论值地转为葡萄糖^[35]。XY01957 的葡萄糖产量可达到 138.30 g/L (27.66 g/100 g 糯米), 且本次供试菌株中葡萄糖含量在 60 g/L 以上的菌株有 16 株, 说明这些少根根霉菌株可能具有较高的糖化酶活力, 是米酒发酵的适宜菌株。除 XY01921 为临床菌株外其余 15 株菌株均为来自土壤或其他自然环境中的野生菌株。野生型菌株可能由于生长环境更为多样, 底物种类丰富, 因而具有更高的糖化能力。菌株 XY03797 较为特别, 其发酵产物中含有较高浓度的麦芽糖和乙醇而未检测到葡萄糖, 表明该菌株麦芽糖酶或 α -葡萄糖苷酶活性较低。工业上常依靠少根根霉的糖化能力进行各种发酵, 而根霉发酵能力除了与本身的糖化力有关外还与其生长速度有关, 在发酵过程中, 根霉边生长、边产酶、边糖化。因此根霉发酵能力不能完全采用酶活力表示, 而采用产物量表示。为了提高各个菌株产物量的可比性, 尽量避免菌株生长量的差异, 本研究严格控制了孢子接种量。

本研究测定的发酵产物中乙醇是产量第二高的物质, 最高浓度可达 33.40 g/L, 这说明少根根霉不仅具有突出的糖化能力, 能够将淀粉

高效地转化为可发酵性糖, 而且具备将可发酵性糖转化为酒精的能力。由此可见, 在糯米酒酿造过程中, 少根根霉具有纯种发酵的潜力^[18]。相比于传统工艺, 纯种根霉曲具有糖化发酵力高、制作周期短和生产成本低等显著优势, 单因素实验和响应面实验也证明了纯种米根霉酒曲制造工艺的可靠性和实用性^[37]。同时, 少根根霉也是我国传统白酒酿造所需酒曲中的重要功能菌株和优势菌株^[38-39], 除了传统认为的少根根霉的糖化作用外, 其产酒作用也不可忽视。Karimi 等^[40]以酸预处理后的稻壳为底物, 添加纤维素酶, 用纯种少根根霉进行发酵, 得到乙醇产率为 74%, 最大乙醇浓度为 19.25 g/L; Abedinifar 等^[41]报道了少根根霉能够利用预处理的稻草, 并以与酿酒酵母(最常用于乙醇发酵的啤酒酵母)相似的产量(0.33-0.41 g/g)生产乙醇; 张凤英等^[42]以纯根霉曲 2-2 酿酒和加了酵母的根霉曲对照进行糖化发酵, 结果表明, 纯根霉虽然在发酵前期较为迟缓, 但发酵结束时其酒精含量与对照无显著差异。本研究结果为少根根霉出色的产酒精能力提供了新的强有力的证明。

乳酸是制药和食品工业中广泛应用的功能产品, 而少根根霉由于营养要求粗放, 菌丝体大而易于分离, L-乳酸纯度高, 易于精制, 成为乳酸生产的重要菌株^[43]。目前对于少根根霉产乳酸发酵进程中工艺条件的优化以及菌体形态的控制已经有所研究。Yin 等^[44]在气升式发酵罐内利用米根霉发酵玉米淀粉直接生产 L-乳酸, 发酵 3 d 后乳酸浓度可达 102 g/L。孙小龙和付永前^[45]对高产乳酸的少根根霉突变株进行了碳代谢流分析, 发现不同形态菌体的碳代谢流明显发生变化, 其中均匀球状菌体碳代谢流更易于 L-乳酸合成。乳酸是我国传统酒曲发酵工艺中的重要风味物质, 而少根根霉一直在其

中发挥着不容忽视的重要作用^[39,46], 本研究结果中少根根霉的乳酸产量最高可达到 28.1 g/L, 占发酵产物总含量的 6.63%, 是含量第三高的物质, 也充分证明了少根根霉在糯米发酵中对乳酸产量的重要贡献。

3.2 发酵产物相关性与代谢调控

Abe 等^[28]发现富马酸和苹果酸之间正相关, 两者与乳酸负相关, 因此将少根根霉分为产富马酸-苹果酸组(FMA 组)和产乳酸组(LA 组)。本研究进一步确认了这种关联, 并发现了更多的发酵产物相关性(图 3): 7 种发酵产物分为 3 组, 第一组为葡萄糖、乳酸和甘油, 彼此之间为正相关; 第二组为乙醇、富马酸和苹果酸, 彼此之间为正相关; 第三组为麦芽糖。前两组之间负相关而与第三组麦芽糖无显著相关性。

少根根霉的糖分解代谢过程中, 主要包括糖酵解途径(Embden-Meyerhof-Parnas pathway, EMP)和三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)。葡萄糖首先经过 EMP 转换为丙酮酸, 基质内的丙酮酸还可独立地继续生成乙醇、乳酸、苹果酸和富马酸; 进入线粒体内的丙酮酸可以通过生成乙酰辅酶 A 进入 TCA 循环^[43,45,47]。苹果酸是富马酸代谢过程的前体物质, 因而两者为正相关关系。乳酸与细胞基质内的苹果酸-富马酸合成途径为竞争关系, 所以乳酸与两者均为负相关关系。少根根霉的甘油合成过程, 是以糖酵解的中间产物起始合成的, 是糖代谢过程的重要分支途径, 葡萄糖作为糖代谢过程的起始物, 葡萄糖含量越高, 流向甘油代谢通路的中间产物越多, 因此葡萄糖与甘油为正相关关系。鉴于甘油和乳酸的正相关关系, 已有利用少根根霉转化甘油生产乳酸的研究, 成本较低, 乳酸产量可达到 48 g/L, 是指导工业化生产的良好营养来源^[48]。对于发酵产物相关性的研究, 可以为少根根霉代谢通路的调控提供

新的依据和思路^[13,49], 可以为工业化生产提供新的代谢路径的参考^[50], 与基因组分析相结合, 也有助于确定基因位点之间的关联。

3.3 无孢菌株的发酵特性

本研究发现 SM 无孢菌株大多具有较强的发酵能力, 发酵产物总含量最高的 7 株少根根霉均为 SM 无孢菌株。如图 2A 所示, XY01957、XY03822、XY00012、XY01737、XY01736、XY00507 和 XY03829 等 7 个菌株的发酵能力较强, 且在毛霉合成液体培养基(SM)中均无产孢能力。而本研究涉及的 SM 无孢菌株总共才 8 株, 除上面 7 株外, 剩下的一株是 XY03794, 其发酵能力也不低, 排在第 14 位, 达到 82.20 g/L。Ellis 等^[26]和 Wang 等^[27]将不产孢的少根根霉认为是鲁氏淀粉霉, 而且将这一物种限定为发酵环境, 本研究发现的这 8 株 SM 无孢菌株应该属于这一类群, 但是其来源并不限定于发酵环境, 只有 2 株来源于发酵环境, 剩余 6 株全部来自自然环境。

产孢能力弱的菌株, 能够利用底物的能力更强, 可以将同化底物得到的能量更多地用于产生自身生长必需的多种重要产物, 而不是用于细胞复制和有性生殖。产孢能力强的菌株, 随着发酵进程的进行, 受到营养胁迫时, 会消耗同化底物产生的能量用于繁殖, 而使得产生的发酵产物浓度降低。由此可见, 无孢菌株能更好地应用于发酵工业的环境并高产所需的发酵产物, 因此本研究发现的 7 株发酵能力强的 SM 无孢菌株具有良好的生产潜力, 丰富了目前少根根霉发酵工业的菌株资源并为发酵菌株的筛选提供了指导。

早年, 分类学家将在大米和木薯发酵物上生长的菌丝几乎为白色, 应用于食品工业的真菌命名为鲁氏淀粉霉^[26-27], 直到 Ellis^[51]进行了 DNA 测定, 确认其与少根根霉属于同一个物

种, 鲁氏淀粉霉只是其中一个异名。这说明无孢菌株可能是由于长期在酒曲环境中并无产孢需求的自然选择下, 或是营养丰富的野生环境中并未受到压力胁迫, 在少根根霉种内发生了演化。本研究结果也支持这一结论, SM 无孢菌株在 PCA 分析时并没有聚为一个相对独立的类群, 而是分散为离群值(图 4A), 所以少根根霉中的不产孢类群尚未演化为独立的变种。

3.4 德氏变种的分类学地位

通过发酵特性的差异对少根根霉进行分类, 已经早有研究。根据有机酸产量的不同, 可以将少根根霉分为 2 个类群, 产乳酸的德氏根霉类群(*R. delemmer*)和产苹果酸-富马酸的米根霉类群(*R. oryzae*)^[21,28-29]。Saito 等^[21]研究发现, 产苹果酸-富马酸的米根霉(*R. oryzae*)细胞内具有乳酸脱氢酶 A (*ldhA*)和乳酸脱氢酶 B (*ldhB*), 而产乳酸的德氏根霉(*R. delemmer*)则缺失乳酸脱氢酶 A (*ldhA*)。目前对这两个类群的分类, 有两种不同的看法。Abe 等^[28]基于 ITS、Act1、EF-1 α 和 AFLP, 结合乳酸和富马酸发酵情况, 对 13 株少根根霉构建系统发育树, 并且认为应该将少根根霉划分为独立的两个种。而 Chibucos 等^[52]对包含米根霉(*R. oryzae*)和德氏根霉(*R. delemmer*)在内的 38 株能引起毛霉菌病的真菌进行了基于 76 个直源基因蛋白的系统发育分析, 结果米根霉(*R. oryzae*)和德氏根霉(*R. delemmer*)在系统进化树上并没有区分开。因此, 我们倾向于认为米根霉(*R. oryzae*)和德氏根霉(*R. delemmer*)并不是两个独立的种, 而是少根根霉群体水平上(*R. arrhizus*)的原变种(var. *arrhizus*)和德氏变种(var. *delemmer*)两个变种。德氏变种较原变种的糖化能力弱, 其在发酵特性上的差异说明少根根霉在演化过程中形成了丰富的种内多样性, 是群体遗传和比较基因组学研究的良好材料。本研究结果也支持了德氏变

种在发酵特性上的特殊性。表型特征以及菌株基因信息与特定基因片段甚至是全基因组水平遗传信息相结合, 是群体遗传学研究的重要思路 and 手段^[53-54], 有助于帮助我们解决少根根霉在进化过程中的变种形成规律和物种迁移等问题, 从而解析少根根霉群体演化机制, 为其在发酵工业中更好地应用提供指导。

致谢: 感谢中国科学院微生物研究所菌种保藏中心和真菌学次级代谢平台对本研究的支持; 感谢微生物研究所陈保送博士在 HPLC 方面提供的帮助。

参考文献

- [1] Roskov Y, Ower G, Orrell T, Nicolson D, Bailly N, Kirk PM, Bourgoin T, DeWalt RE, Decock W, Van Nieukerken EJ, Penev L. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. <https://www.catalogueoflife.org>. Accessed on Jan 27, 2021.
- [2] Kwon JH, Kim J, Kim WI. First report of *Rhizopus oryzae* as a postharvest pathogen of apple in Korea. *Mycobiology*, 2011, 39(2): 140–142.
- [3] Cheng Y, Gao Y, Liu XY, Wang GY, Zhang GQ, Gao SQ. Rhinocerebral mucormycosis caused by *Rhizopus arrhizus* var. *tonkinensis*. *Journal De Mycologie Medicale*, 2017, 27(4): 586–588.
- [4] Rani R, Ghosh S. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. *Bioresource Technology*, 2011, 102(22): 10641–10649.
- [5] 刘金梅, 张凤英. 根霉在发酵工业与环境科学中的研究进展. *生物技术通报*, 2013(11): 26–33.
Liu JM, Zhang FY. Research progress of *Rhizopus* in fermentation industry and environmental science. *Biotechnology Bulletin*, 2013(11): 26–33. (in Chinese)
- [6] Abd Razak DL, Abd Rashid NY, Jamaluddin A, Sharifudin SA, Abd Kahar A, Long K. Cosmeceutical potentials and bioactive compounds of rice bran fermented with single and mix culture of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 2017, 16(2): 127–134.
- [7] Dung NTP. Defined fungal starter granules for purple glutinous rice wine. The Netherlands: Wageningen University, DPhil thesis, 2004.
- [8] Jin B, Huang LP, Lant P. *Rhizopus arrhizus* — a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L(+)-lactic acid. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(23): 1983–1987.
- [9] 田三德, 吴艳娜, 徐新丽. 混合发酵法生产 L-苹果酸的工艺研究及浅析. *食品科技*, 2009, 34(3): 232–234, 239.
Tian SD, Wu YN, Xu XL. Research on the hybrid fermentation to develop L-malic acid. *Food Science and Technology*, 2009, 34(3): 232–234, 239. (in Chinese)
- [10] Das RK, Brar SK. Enhanced fumaric acid production from brewery wastewater and insight into the morphology of *Rhizopus oryzae* 1526. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(6): 2974–2988.
- [11] Gunecer O, Demirkol A, Yuceer YK, Togay SO, Hosoglu MI, Elibol M. Production of flavor compounds from olive mill waste by *Rhizopus oryzae* and *Candida tropicalis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2017, 48(2): 275–285.
- [12] Zhang BH, Yang ST. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae*: effects of overexpressing *fumR* gene on cell growth and fumaric acid biosynthesis from glucose. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 2159–2165.
- [13] Huang D, Wang R, Du WJ, Wang GY, Xia ML. Activation of glycerol metabolic pathway by evolutionary engineering of *Rhizopus oryzae* to strengthen the fumaric acid biosynthesis from crude glycerol. *Bioresource Technology*, 2015, 196: 263–272.
- [14] Xu Q, Liu Y, Li S, Jiang L, Huang H, Wen JP. Transcriptome analysis of *Rhizopus oryzae* in response to xylose during fumaric acid production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 39(8): 1267–1280.
- [15] 林晓庆, 黄志清, 刘志彬, 张雯, 倪莉. 米根霉液态发酵产糖化酶工艺条件研究. *酿酒科技*, 2014(9): 9–13.
Lin XQ, Huang ZQ, Liu ZB, Zhang W, Ni L. Optimization of the technical process for the production of glucoamylase by liquid fermentation of *Rhizopus oryzae*. *Liquor-Making Science & Technology*, 2014(9): 9–13. (in Chinese)
- [16] Wang Z, Wang YL, Yang ST, Wang RG, Ren HQ. A novel honeycomb matrix for cell immobilization to enhance lactic acid production by *Rhizopus oryzae*.

- Bioresource Technology*, 2010, 101(14): 5557–5564.
- [17] Liu H, Hu HR, Jin YH, Yue XM, Deng L, Wang F, Tan TW. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9#. *Bioresource Technology*, 2017, 233: 30–33.
- [18] 和晶晶, 伍时华, 伍保龙, 王琨, 应玲云, 夏杰, 黄翠姬, 易弋. 高糖化力米根霉的筛选和鉴定. *中国调味品*, 2014, 39(10): 1–6, 14.
He JJ, Wu SH, Wu BL, Wang K, Ying LY, Xia J, Huang CJ, Yi Y. Screening and identification of high saccharifying *Rhizopus oryzae*. *China Condiment*, 2014, 39(10): 1–6, 14. (in Chinese)
- [19] Roa Engel CA, Straathof AJJ, Zijlmans TW, Gulik WM, Wielen LAM. Fumaric acid production by fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(3): 379–389.
- [20] Yu SZ, Huang D, Wen JP, Li S, Chen YL, Jia XQ. Metabolic profiling of a *Rhizopus oryzae* fumaric acid production mutant generated by femtosecond laser irradiation. *Bioresource Technology*, 2012, 114: 610–615.
- [21] Saito K, Saito A, Ohnishi M, Oda Y. Genetic diversity in *Rhizopus oryzae* strains as revealed by the sequence of lactate dehydrogenase genes. *Archives of Microbiology*, 2004, 182(1): 30–36.
- [22] Londoño-Hernández L, Ramírez-Toro C, Ruiz HA, Ascacio-Valdés JA, Aguilar-Gonzalez MA, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. *Rhizopus oryzae* — ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 257: 110–127.
- [23] Zheng RY, Chen GQ, Huang H, Li XY. A monograph of *Rhizopus*. *Sydowia*, 2007, 59(2): 273–282.
- [24] Liu XY, Huang H, Zheng RY. Delimitation of *Rhizopus* varieties based on IGS rDNA sequences. *Sydowia*, 2008, 60(1): 93–112.
- [25] Dolatabadi S, De Hoog GS, Meis JF, Walther G. Species boundaries and nomenclature of *Rhizopus arrhizus* (syn. *R. oryzae*). *Mycoses*, 2014, 57: 108–127.
- [26] Ellis JJ, Rhodes LJ, Hesseltine CW. The genus amylomyces. *Mycologia*, 1976, 68(1): 131–143.
- [27] Wang HL, Swain EW, Hesseltine CW. Glucoamylase of *Amylomyces rouxii*. *Journal of Food Science*, 1984, 49(4): 1210–1211.
- [28] Abe A, Oda Y, Asano K, Sone T. *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers. *Mycologia*, 2007, 99(5): 714–722.
- [29] Kito H, Abe A, Sujaya In, Oda Y, Asano K, Sone T. Molecular characterization of the relationships among *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus oryzae*, and *Rhizopus delemar*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(4): 861–864.
- [30] 鞠笑, 张明哲, 赵恒, 刘泽, 贾碧丝, Timothy Y. James, 乔敏, 刘小勇. 基因组 SNP 揭示少根根霉种群结构. *菌物学报*, 2020, 39(12): 2285–2303.
Ju X, Zhang MZ, Zhao H, Liu Z, Jia BS, James T, Qiao M, Liu XY. Genomic SNPs reveal population structure of *Rhizopus arrhizus*. *Mycosystema*, 2020, 39(12): 2285–2303. (in Chinese)
- [31] 方精云, 王襄平, 沈泽昊, 唐志尧, 贺金生, 于丹, 江源, 王志恒, 郑成洋, 朱江玲, 郭兆迪. 植物群落清查的主要内容、方法和技术规范. *生物多样性*, 2009, 17(6): 533–548.
Fang JY, Wang XP, Shen ZH, Tang ZY, He JS, Yu D, Jiang Y, Wang ZH, Zheng CY, Zhu JL, Guo ZD. Methods and protocols for plant community inventory. *Biodiversity Science*, 2009, 17(6): 533–548. (in Chinese)
- [32] IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows. Version 19.0, Armonk, NY: IBM Corp, 2010.
- [33] Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*, 2010, 27(3): 431–432.
- [34] Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W566–W570.
- [35] 龙可, 赵中开, 马莹莹, 杨建刚. 酿酒根霉菌研究进展. *现代食品科技*, 2013, 29(2): 443–447.
Long K, Zhao ZK, Ma YY, Yang JG. Progresses of researches on *Rhizopus* for liquor-making. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(2): 443–447. (in Chinese)
- [36] 刘长虹, 韩旭. 少根根霉对醇子馒头品质的影响. *食品研究与开发*, 2009, 30(9): 14–18.
Liu CH, Han X. The effect of *Rhizopus arrhizus* on the quality of steamed bread. *Food Research and Development*, 2009, 30(9): 14–18. (in Chinese)
- [37] 刘宁, 张昆, 何皓, 李霜, 嵇松扬, 黄和. 响应面法优化少根根霉发酵合成富马酸. *食品与发酵工业*, 2008, 34(7): 64–67.
Liu N, Zhang K, He H, Li S, Ji SY, Huang H. Optimizing fermentation conditions for fumaric acid using response surface analysis. *Food and Fermentation Industries*, 2008, 34(7): 64–67. (in Chinese)

- [38] 王旭亮, 王异静, 王德良, 张五九. 白酒发酵高糖化性能霉菌的筛选及鉴定. 酿酒科技, 2012(9): 22–28.
Wang XL, Wang YJ, Wang DL, Zhang WJ. Screening and identification of mold strains with high saccharifying properties for improving ethanol fermentation efficiency in liquor production. *Liquor-Making Science & Technology*, 2012(9): 22–28. (in Chinese)
- [39] 刘凡, 周新虎, 陈翔, 陈坚, 堵国成, 方芳. 洋河浓香型白酒发酵过程酒醅微生物群落结构解析及其与有机酸合成的相关性. 微生物学报, 2018, 58(12): 2087–2099.
Liu F, Zhou XH, Chen X, Chen J, Du GC, Fang F. Microbial community of fermented grains and its correlation with organic acids biosynthesis during Yanghe strong-aroma liquor manufacturing process. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(12): 2087–2099. (in Chinese)
- [40] Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 40(1): 138–144.
- [41] Abedinifar S, Karimi K, Khanahmadi M, Taherzadeh MJ. Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 2009, 33(5): 828–833.
- [42] 张凤英, 董开发, 涂瑾. 根霉酒精发酵特性的研究. 食品科学, 2002, 23(8): 158–159.
- [43] 赵宏宇, 赵靖, 郑春丽, 白云. 米根霉乳酸发酵的研究进展. 天津化工, 2007, 21(1): 7–9.
- [44] Yin PM, Nishina N, Kosakai Y, Yahiro K, Pakr Y, Okabe M. Enhanced production of L(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 84(3): 249–253.
- [45] 孙小龙, 付永前. 米根霉复合诱变筛选高产 L-乳酸的形态突变菌株及碳代谢流分析. 江苏农业科学, 2019, 47(1): 294–299.
Sun XL, Fu Yongqian. Screening of morphological mutant strains with high yield of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* complex mutagenesis and carbon metabolic flux analysis. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(1): 294–299. (in Chinese)
- [46] Yan SB, Wang SC, Wei GG, Zhang KG. Investigation of the main parameters during the fermentation of Chinese Luzhou-flavour liquor. *Journal of the Institute of Brewing*, 2015, 121(1): 145–154.
- [47] Wright BE, Longacre A, Reimers J. Models of metabolism in *Rhizopus oryzae*. *Journal of Theoretical Biology*, 1996, 182(3): 453–457.
- [48] Vodnar DC, Dulf FV, Pop OL, Socaciu C. L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* NRRL 395 on biodiesel crude glycerol. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 92.
- [49] 何皓, 李霜, 徐晴, 张凯, 黄和. 放线菌酮对米根霉积累 L-苹果酸代谢途径的调控作用. 过程工程学报, 2009, 9(1): 153–156.
He H, Li S, Xu Q, Zhang K, Huang H. Effect of cycloheximide on regulation of metabolic pathway for L-malic acid accumulation by *Rhizopus oryzae*. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2009, 9(1): 153–156. (in Chinese)
- [50] Zhou YQ, Nie KL, Zhang X, Liu SH, Wang M, Deng L, Wang F, Tan TW. Production of fumaric acid from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhizopus arrhizus*. *Bioresource Technology*, 2014, 163: 48–53.
- [51] Ellis JJ. Species and varieties in the *Rhizopus arrhizus-Rhizopus oryzae* group as indicated by their DNA complementarity. *Mycologia*, 1985, 77(2): 243–247.
- [52] Chibucos MC, Soliman S, Gebremariam T, Lee H, Daugherty S, Orvis J, Shetty AC, Crabtree J, Hazen TH, Etienne KA, Kumari P, O'Connor TD, Rasko DA, Filler SG, Fraser CM, Lockhart SR, Skory CD, Ibrahim AS, Bruno VM. An integrated genomic and transcriptomic survey of mucormycosis-causing fungi. *Nature Communications*, 2016, 7: 12218.
- [53] Lackner G, Möbius N, Scherlach K, Partida-Martinez LP, Winkler R, Schmitt I, Hertweck C. Global distribution and evolution of a toxinogenic *Burkholderia-Rhizopus* symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(9): 2982–2986.
- [54] Duan SF, Han PJ, Wang QM, Liu WQ, Shi JY, Li K, Zhang XL, Bai FY. The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. *Nature Communications*, 2018, 9: 2690.

(本文责编 李磊)