



## 研究报告

## 少根根霉多样化的生长动力学模型

姚灵丹<sup>1,2</sup> 鞠笑<sup>2</sup> Timothy Y James<sup>3</sup> 刘小勇<sup>\*2</sup> 邱君志<sup>\*1</sup>

1 福建农林大学生命科学学院 福建 福州 350002

2 中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室 北京 100101

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

**摘要:**【背景】少根根霉物种内菌株间生理生化指标存在差异,相应的遗传背景不明,不利于少根根霉生产发酵的进一步应用。【目的】探究不同少根根霉菌株温度-生长动力学模型间的差异,为其群体遗传研究奠定基础,为生产菌株的筛选提供依据。【方法】选取来自欧亚各地的纯种少根根霉为实验材料,通过形态学鉴定,以及 ITS 和 IGS rDNA 分子系统发育重建进行分子鉴定,采用培养基平板培养直接测量法进行温度-生长动力学分析。【结果】少根根霉温度-生长动力学模型呈现丰富的多样性,与各形态和分子系统发育变种基本不具有相关性。菌株间温度-生长速度曲线具有显著性差异。少根根霉生长抑制低温范围、最适生长温度范围、生长抑制高温范围和致死高温范围分别为 4–9、30–37、40–49 和 40–52 °C。菌株 XY00454 和 XY00469 具有良好的高温适应性和较快的生长速度,有开发成为工业发酵菌的潜力。【结论】少根根霉物种仍然处于剧烈的演化之中,种内形态、分子和生理分化较为活跃,但尚未形成任何独立的种群。根据温度适应性的数据可以筛选出发酵生产潜力菌株。

**关键词:** 米根霉, 生理特征, 最适生长温度, 抑制生长温度, 致死温度

Diversity of growth kinetic models for *Rhizopus arrhizus*YAO Ling-Dan<sup>1,2</sup> JU Xiao<sup>2</sup> Timothy Y James<sup>3</sup> LIU Xiao-Yong<sup>\*2</sup> QIU Jun-Zhi<sup>\*1</sup>

1 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

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

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

**Abstract:** [Background] Strains of *Rhizopus arrhizus* vary in physiological and biochemical indicators, but relative genetic background is unclear, hindering their further applications in fermentation. [Objective] This study explored temperature-growth kinetic models among strains of *R. arrhizus* in order to lay a foundation for investigating population genetics and for screening materials potential in production. [Methods] *R. arrhizus* isolated from Asia and Europe were first identified by morphology and then by molecular phylogeny reconstructed with ITS and IGS rDNA. Finally, their temperature-growth kinetics was analyzed by directly measuring colonial diameters on medium plates.

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31670019, 31470156, 31670026); Key Project from Fujian Provincial Department of Science and Technology (2016I0003)

**\*Corresponding authors:** E-mail: LIU Xiao-Yong: liuxiaoyong@im.ac.cn; QIU Jun-Zhi: junzhiqiu@126.com

**Received:** 28-06-2018; **Accepted:** 28-08-2018; **Published online:** 14-09-2018

**基金项目:** 国家自然科学基金(31670019, 31470156, 31670026); 福建省科技计划重点项目(2016I0003)

**\*通信作者:** E-mail: 刘小勇: liuxiaoyong@im.ac.cn; 邱君志: junzhiqiu@126.com

**收稿日期:** 2018-06-28; **接受日期:** 2018-08-28; **网络首发日期:** 2018-09-14

**[Results]** The temperature-growth kinetic models of *R. arrhizus* were diverse, and the curves significantly differ, with less relatedness to morphological and phylogenetic varieties. Lower restraining growth, optimum growth, higher restraining growth, and fatal temperatures were 4–9, 30–37, 40–49, and 40–52 °C, respectively. Strains XY00454 and XY00469 grew rapidly and adapted well to higher temperatures and therefore were potential for industrial production. **[Conclusion]** *R. arrhizus* is still evolving violently and diverging actively in morphology, molecular and physiology, while not developing any independent populations. It is feasible to screen fermentation potential isolates based on thermal adaptability.

**Keywords:** *Rhizopus oryzae*, Physiological characteristics, Optimum growth temperature, Inhibiting growth temperature, Lethal temperature

少根根霉(*Rhizopus arrhizus* A. Fisch. 1892)最常见和应用最广泛的异名为米根霉(*R. oryzae* Went & Prins. Geerl. 1895), 其典型的形态特征为假根不发达但常分枝, 孢囊梗总是直接从气生菌丝或者匍匐菌丝上产生, 长达 15 mm, 孢子囊褐色、球形, 直径长达 140 μm–180 μm, 孢囊孢子有明显可见的纹饰, 配囊柄同形或者异形; 生理上最高生长温度不超过 42 °C<sup>[1]</sup>。少根根霉分为 3 个变种, 即原变种(*R. arrhizus* var. *arrhizus*)、德氏变种 [*R. arrhizus* var. *delemar* (Boidin ex Wehmer & Hanzawa) J.J. Ellis 1985] 和东京变种 [*R. arrhizus* var. *tonkinensis* (Vuill.) R.Y. Zheng & X.Y. Liu 2007]<sup>[1]</sup>。少根根霉广泛存在于自然环境, 包括土壤、粪便、花卉、蘑菇、枯枝落叶、空气和人体。少根根霉能产生多种代谢产物, 如 L-乳酸<sup>[2-3]</sup>、富马酸<sup>[4]</sup>、L-苹果酸<sup>[5-6]</sup>、γ-亚麻酸<sup>[7-8]</sup>、淀粉酶<sup>[9]</sup>、脂肪酶<sup>[10-11]</sup>、果胶酶<sup>[12-13]</sup>、鸢尾酮<sup>[14]</sup>、薯蓣皂苷元<sup>[15]</sup>和 β-葡萄糖苷<sup>[16]</sup>。这些代谢产物常被应用于食品、香料、雌激素、抗肿瘤、抗过敏、抗休克以及糖基化反应。与毛霉门其他物种相比, 少根根霉显示出高应激耐受性<sup>[17]</sup>。少根根霉物种内的形态、分子和生理生化多样性丰富<sup>[18-21]</sup>, 但其遗传背景少有解读, 缺乏必要的生物学基础支撑发酵生产菌株的可持续利用。

微生物生长动力学是运用数学模型分析微生物生长的预测微生物学, 其模型可分为一级、二级和三级模型。一级模型主要用于描述环境中微生物的动态变化。温度-生长动力学模型属于描述环境变化影响一级动力学参数的二级模型之一<sup>[22]</sup>。本研究选取来自欧亚各地的纯种少根根霉作为研究对象,

探究不同少根根霉菌株温度-生长动力学模型间的差异及其规律, 为深入的遗传和进化研究提供基础表型数据, 同时指导生产菌株的筛选和应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试的 69 株少根根霉来自中国、日本、印度、印度尼西亚、葡萄牙和俄罗斯等亚洲和欧洲国家, 基物包括酒曲、空气、土壤、人体皮肤、粪便、蘑菇、面粉、面包、糖纸和植物的花、叶、茎秆、果壳、树皮及其它有机质。菌种保藏于中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 详细信息见表 1。培养基采用 PDA (200 g 土豆熬成土豆汁, 过滤, 加入葡萄糖和琼脂粉各 20 g, 定容至 1 L, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min)。

DNA 提取试剂盒, 长春市志昂生物科技有限公司。恒温培养箱, 宁波海曙赛福实验仪器厂; PCR 仪, MJ 公司。

### 1.2 形态和分子鉴定

将少根根霉接种到 PDA 平板上, 30 °C 恒温培养。挑取菌丝制作水封片, 在显微镜下观察假根、匍匐菌丝、孢囊梗、孢子囊、囊轴和孢囊孢子等形态, 进行形态学分类鉴定, 明确形态变种<sup>[1]</sup>。挑取菌丝, 提取细胞总 DNA, 将 DNA 稀释到适当浓度进行 ITS 和 IGS rDNA 的 PCR 扩增和测序, ITS rDNA 引物为 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')<sup>[23]</sup>, IGS rDNA 引物为 NR5688F (5'-GAGTAGCCTTTGT

表 1 供试少根根霉菌株详细信息

Table 1 Details of *Rhizopus arrhizus* involved in this study

菌株 Strains	基物 Substrates	采样地 Locality	形态学变种 Morphological taxa	分子系统发育变种 Molecular phylogenetic taxa
XY00012	Pod	Germany	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00077	Skinscabs	Hebei, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>delemar</i>
XY00399	Tempeh	Indonesia	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY00406	Koji	Japan	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00409	Soil	Japan	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>tonkinensis</i>
XY00410	Soil	Japan	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>tonkinensis</i>
XY00419	Ragi	Japan	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY00422	Brewery yeast	Indonesia	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY00424	Koji	Japan	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00429	Ragi	Japan	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY00430	Air	Russia	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY00431	Formosan peka, a kind of Chinese yeast	Taiwan, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00434	Chinese yeast	Taiwan, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY00438	Chinese yeast	Zhejiang, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>tonkinensis</i>
XY00454	Air	Russia	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00457	Corn flour	Portugal	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00469	Air	Holland	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00472	Ragi	Indonesia	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00481	Distillery yeast	Taiwan, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00484	Koji	Taiwan, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00485	Chinese yeast	China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00495	Distillery yeast	India	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY00503	Pork	Germany	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY00507	Chinese yeast	Zhejiang, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY00509	Koji	Japan	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01735	Soil	Zhejiang, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY01736	Flour	Hubei, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01737	Flower	Beijing, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY01738	Cake	Guangxi, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY01739	Mud	Guangxi, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY01740	Fruit	Guangxi, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01741	Flower	Shanghai, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY01742	Residue	Jiangxi, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY01745	Air	Beijing, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY01765	Dung	Beijing, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01851	Skin lesion	Shanghai, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>delemar</i>
XY01853	Soil	Gansu, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01857	Flower	Yunnan, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01861	Soil	Yunnan, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>delemar</i>

(待续)

(续表 1)

XY01864	Flower	Yunnan, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01865	Wrapping	Yunnan, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>delemar</i>
XY01874	Grass	Sichuan, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01875	Wrapping	Guizhou, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>delemar</i>
XY01876	Soil	Guizhou, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01880	Soil	Sichuan, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>delemar</i>
XY01887	Twigs and leaves	Shandong, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01892	Flower	Beijing, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01904	Soil	Beijing, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>delemar</i>
XY01907	Soil	Beijing, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01909	Mushroom	Hainan, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>delemar</i>
XY01918	Bark	Henan, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01919	Plant	Chongqin, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01920	Lesion	Hebei, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>delemar</i>
XY01921	Eye socket	Beijing, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01935	Dung	Beijing, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>delemar</i>
XY01946	Chinese yeast	Sichuan, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY01957	Distillery yeast	Guangdong, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY02033	Stem	Zhejiang, China	var. <i>arrhizus</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY02053	Wrapping	Jilin, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>tonkinensis</i>
XY02059	Seeds	Hubei, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY02064	Soil	Jilin, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>tonkinensis</i>
XY02069	Shell	Guangxi, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY02070	Leaves	Guangxi, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY02120	Shell	Hebei, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY02128	Dung	Tibet, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>tonkinensis</i>
XY02152	Bag	Hubei, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY02173	Flour sauce	Beijing, China	var. <i>delemar</i>	var. <i>delemar</i>
XY02343	Air	Beijing, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>
XY02348	Skin	Beijing, China	var. <i>tonkinensis</i>	var. <i>arrhizus</i>

TGCTACG-3')和 RGR-1 (5'-TTCTAGGTGATGGACGGC-3')<sup>[24]</sup>。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 适量模板 DNA (50–100 ng), 正、反向引物各 0.25  $\mu$ mol/L, Tris-HCl (pH 8.0) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, Nonidet P40 0.08%, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, dNTPs 200  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s, 33 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送上海美吉生物医药科技公司进行测序, 测序结果通过 Geneious 8.1.9 分析平台<sup>[25]</sup>进行核对和装配,

并构建 ITS 和 IGS rDNA 最简约(Maximum parsimony)、最大似然(Maximum likelihood)和贝叶斯(Bayesian)分子系统发育树, 明确菌株的分子系统发育分支归属<sup>[26-27]</sup>。

### 1.3 温度-生长动力学分析

采用直接测量法, 将少根根霉接种到 PDA 平板上, 在恒温培养箱中 30 °C 培养 7 d, 除去培养基表面的菌丝和孢子, 用灭菌的玻璃管切割出直径 5 mm 的小块, 接种于 150 mm 的 PDA 平板上。为研究其最适生长温度, 分别于恒温培养箱中 16、

23、30、37 °C 培养, 每 24 h 沿接种点位置的十字划线测量一次生长直径。为研究其致死温度, 分别置于恒温培养箱中 4、9、40、43、46、49 和 52 °C 培养, 确定致死情况。在培养箱中某温度下培养 4 d 未生长, 视为生长停止, 之后移至 30 °C 培养箱中培养 5 d, 如果仍能生长则判定该温度为生长抑制温度, 如果未生长则判定该温度为致死温度。以 30 °C 培养下的生长速度( $V_0$ )为对照, 计算各个温度培养下生长速度的变化率  $R$  ( $R_i = |(V_0 - V_i)/V_0|$ )。变化率越大, 少根根霉生长速度受温度影响越大。使用 R 语言软件绘制少根根霉菌株的温度-生长速度

曲线, 计算曲线相关性矩阵, 使用 Excel 和 SPSS 软件对菌株生长速度进行回归分析、方差齐性检验和显著性分析。以温度为自变量, 生长速度为因变量, 线性和二次项为模型, 进行回归曲线估计; 比较均值进行配对样本  $t$  检验, 分析菌株温度-生长速度模型的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 少根根霉温度适应性

在不同培养温度下, 各少根根霉菌株表现出了不同的适应性。供试菌株的致死温度、生长抑制温度和最适生长温度的结果见表 2。培养温度为 4 °C

表 2 温度实验回归分析

Table 2 Regression analysis of temperature experiments

菌株 Strains	生长抑制温度 Growth inhibition temperature (°C)				实际致死温度 Lethal temperature (°C)	理论最适温度 Theoretical optimum temperature (°C)	理论最大生长速度 Theoretical maximum growth rate (cm/d)
	理论高温 Theoretical highest	实际高温 Actual highest	理论低温 Theoretical lowest	实际低温 Actual lowest			
XY00012	42.3	43	4.8	4	46	30.40	4.30
XY00077	42.6	43	9.0	9	49	33.60	5.40
XY00399	42.4	43	9.2	9	46	32.40	4.50
XY00406	42.5	43	6.4	4	43	30.80	4.20
XY00409	42.7	46	6.8	4	46	32.90	4.50
XY00410	42.4	43	7.2	4	43	33.30	5.00
XY00419	42.5	43	9.3	9	43	33.00	5.60
XY00422	42.3	40	9.4	9	40	32.20	4.60
XY00424	43.4	46	6.4	4	46	32.70	5.00
XY00429	42.3	43	9.3	9	43	30.00	4.00
XY00430	42.2	43	9.2	9	43	30.20	3.80
XY00431	44.4	46	4.5	4	46	30.10	4.30
XY00434	43.0	46	9.4	9	46	30.00	3.50
XY00438	43.5	46	4.9	4	46	32.60	4.00
XY00454	42.9	46	7.1	4	46	31.60	6.00
XY00457	42.6	46	7.5	4	46	31.50	4.90
XY00469	43.3	46	4.6	4	46	33.80	5.70
XY00472	42.8	46	6.3	4	46	32.10	4.70
XY00481	42.6	43	5.2	4	43	32.10	5.40
XY00484	42.9	43	3.7	4	43	32.00	4.80
XY00485	43.1	46	6.9	4	46	33.40	5.30
XY00495	42.4	43	9.2	9	49	31.50	4.90
XY00503	42.6	43	9.1	9	43	33.00	5.00
XY00507	42.9	46	6.6	4	46	32.90	4.40

(待续)

(续表 2)

XY00509	42.5	43	8.1	4	49	31.40	4.20
XY01735	43.0	46	9.2	9	52	34.30	5.50
XY01736	42.4	43	6.2	4	43	32.20	5.80
XY01737	42.5	43	8.9	9	43	33.10	4.70
XY01738	42.5	43	9.0	9	43	33.50	4.60
XY01739	42.4	43	9.2	9	46	33.40	5.40
XY01740	43.0	46	6.1	4	46	31.60	4.80
XY01741	42.5	43	10.4	9	43	33.40	4.90
XY01742	42.7	43	9.4	9	49	32.50	5.10
XY01745	42.7	43	9.4	9	43	32.80	5.20
XY01765	43.6	46	5.6	4	46	30.30	3.60
XY01851	42.8	43	9.3	9	43	33.10	4.60
XY01853	42.7	46	3.9	4	49	31.40	4.30
XY01857	43.0	46	9.1	9	46	30.70	4.40
XY01861	42.8	43	9.1	9	46	33.60	4.80
XY01864	42.6	43	4.5	4	43	32.90	4.00
XY01865	42.7	43	9.4	9	46	33.30	4.90
XY01874	43.3	46	2.8	4	46	32.70	5.10
XY01875	42.7	43	9.3	9	46	33.20	4.90
XY01876	43.5	46	6.0	4	46	31.70	4.90
XY01880	42.8	43	9.3	9	49	33.90	4.90
XY01887	42.7	43	7.8	4	43	33.70	4.70
XY01892	42.7	43	7.2	4	43	32.30	5.30
XY01904	42.6	43	9.1	9	43	34.30	5.70
XY01907	42.8	43	4.7	4	43	33.30	4.70
XY01909	42.6	43	9.2	9	43	32.50	5.10
XY01918	42.7	43	3.8	4	43	33.90	4.90
XY01919	43.4	46	3.4	4	49	33.50	4.60
XY01920	42.8	43	6.2	4	43	33.30	5.00
XY01921	43.3	46	5.9	4	46	33.30	4.50
XY01935	42.4	43	9.3	9	43	32.40	5.00
XY01946	42.4	43	9.0	9	43	30.00	4.30
XY01957	41.1	40	9.0	9	40	30.10	3.90
XY02033	42.7	43	6.2	4	43	31.20	5.10
XY02053	42.7	43	4.4	4	43	34.10	5.50
XY02059	43.5	46	4.3	4	46	33.00	4.50
XY02064	43.0	43	3.0	4	43	34.30	4.60
XY02069	42.5	43	9.0	9	43	33.00	5.00
XY02070	42.4	43	9.1	9	43	33.30	4.70
XY02120	43.4	46	5.3	4	52	33.50	4.90
XY02128	43.3	46	2.4	4	46	32.40	4.40
XY02152	42.6	43	6.9	4	43	32.30	4.10
XY02173	42.2	40	9.2	9	40	30.30	3.60
XY02343	42.6	43	7.7	4	43	33.30	5.00
XY02348	42.4	43	8.1	4	43	33.00	5.20

时,所有菌株都受低温抑制停止生长,在室温下恢复生长,并未致死;9 °C 时,只有 30 株受到低温抑制停止生长;16、23、30 和 37 °C 时,所有菌株都能生长,不受任何抑制,总体平均生长速度分别为 1.40、3.17、4.24 和 4.52 cm/d;40 °C 时,高温致死的有 3 株(XY02173、XY01957、XY00422),其余 66 株均能生长;43 °C 时,高温致死的有 35 株,高温抑制的有 11 株,正常生长的有 23 株;46 °C 时,高温致死的菌有 60 株,受到高温抑制的菌有 9 株,无正常生长的菌株;49 °C 时,高温致死 67 株,高温抑制 2 株;52 °C 时,最后 2 株菌也因高温致死。总体而言,30–37 °C 是绝大多数少根根霉的最适生长温度区间,9 和 40 °C 开始有菌株的生长受到抑制和致死,最高致死温度达到 52 °C;换言之,少根根霉生长抑制低温范围、最适生长温度范围、生长抑制高温范围和致死高温范围分别为 4–9、30–37、40–49 和 40–52 °C。

各温度下生长速度皆快于供试菌株总体平均水平(16、23、30 和 37 °C 平均生长速度分别为 1.40、3.17、4.24 和 4.52 cm/d)的有 4 株(XY00469、XY00454、XY00424、XY01874),生长速度皆慢于平均水平的有 5 株(XY00429、XY02173、XY00430、XY01946、XY01957)。以少根根霉各菌株 30 °C 培养的生长速度为对照,绘制的生长速度变化率见图 1。受到温度变化影响最大的菌株是 XY01957,受到温度变化影响最小的菌株是 XY00438。

## 2.2 少根根霉温度-生长回归分析及动态模型

当低温( $\leq 30$  °C)和高温( $> 30$  °C)分开进行回归分析时得到的方程与实际拟合度优于将所有温度作为整体的回归方程,所以少根根霉温度-生长模型采用分段函数表示。大多数菌株(56 株)的温度-生长模型由两段一元二次函数组成,少数菌株(13 株,如 XY01918、XY02509、XY00469、XY00431)的温度-生长模型由一段一元一次函数与一段一元二次函数组成(结果未展示)。由回归方程推测出少根根霉理论上的抑制低温、最适温度、抑制高温范围分别为 2.4–10.4、30.0–34.4、41.1–44.4 °C,这些

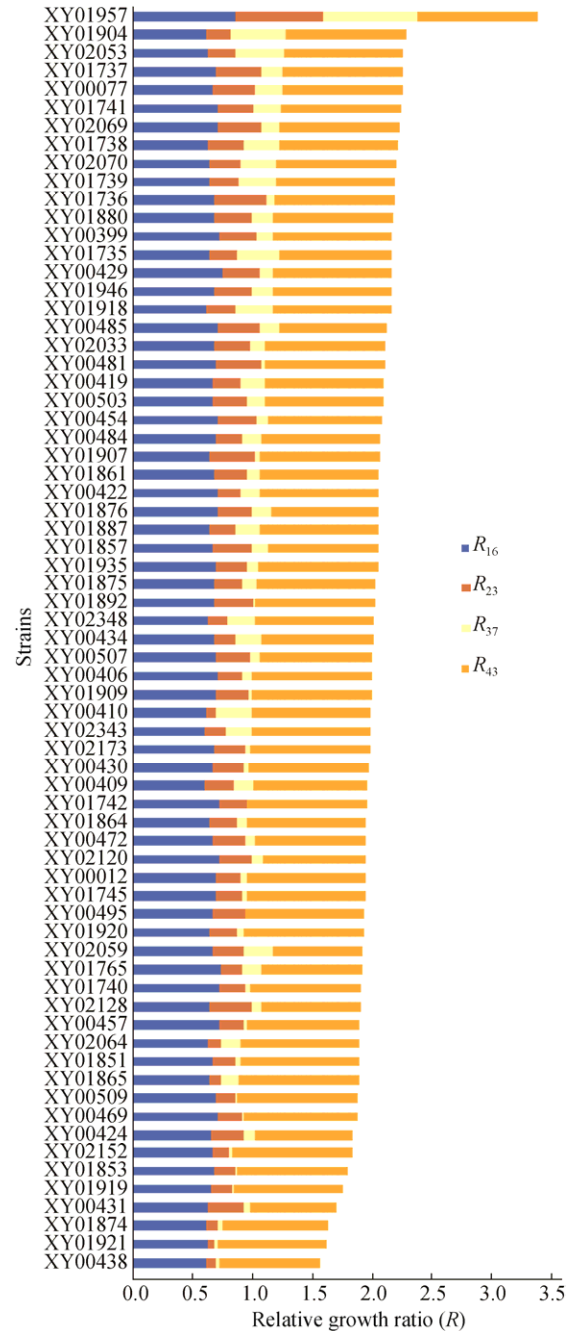


图 1 供试菌株在各培养温度下生长速度的变化率

Figure 1 Growth change rates at various temperature

注:纵坐标为菌株编号,横坐标  $R$  为以 30 °C 为对照,16、23、37、43 °C 培养下,少根根霉生长速度的变化率( $R_i = |(V_0 - V_i)/V_0|$ ),颜色代表不同温度,■ 为 16 °C,■ 为 23 °C,■ 为 37 °C,■ 为 43 °C。

Note: Y-axis is strains, and X-axis  $R$  ( $R_i = |(V_0 - V_i)/V_0|$ ) is the change rate that growth velocity cultured in 16, 23, 37, 43 °C is controlled by 30 °C. Different color shows different temperature, i.e. ■, ■, ■ and ■ represent 16, 23, 37 and 43 °C, respectively.

理论上的数值与实际测定获得的数值(4.0–9.0、30.0–37.0、40.0–49.0 °C)基本相符(表 2)。

### 2.3 温度影响少根根霉菌株生长速度的显著性分析

将生长速度数据按照温度区间分组, 多重显著性差异分析结果见表 3, 除 16 和 40 °C 之间不存在显著性差异( $P>0.05$ )之外, 其余任意 2 个温度之间的少根根霉菌株生长速度存在极显著差异( $P<0.01$ )。

对少根根霉的温度-生长速度曲线进行配对  $t$  检验, 图 2 列出了菌株曲线两两间的  $P$  值, 说明许多菌株在相同温度变化条件下表现出的生长速度变化具有统计学上的差异。

### 2.4 少根根霉变种间温度-生长动态显著性分析

少根根霉 69 株菌的形态和分子系统发育变种鉴定结果见表 1。分子系统发育鉴定结果为原变种(*var. arrhizus*) 35 株、东京变种(*var. tonkinensis*) 6 株、德氏变种(*var. delemar*) 28 株; 形态学鉴定结果为原变种 28 株、东京变种 12 株、德氏变种 29 株; 其中 28 株菌(41%)的形态学鉴定结果与分子鉴定结果不一致。将所有菌株按照分子系统发育变种和形态变种进行温度-生长动态特性的显著性分析, 结果(表 4)表明: 3 个形态变种的菌株在各个温度下均  $P>0.05$ , 说明少根根霉的温度-生长速度差异与其形态变种不相关。3 个分子系统发育变种的菌株在 23 °C 时  $P<0.05$ , 所以 23 °C 时少根根霉的生长速度差异与分子系统发

表 3 不同培养温度下少根根霉生长速度的多重比较

Table 3 Multiple comparison for growth rate of *Rhizopus arrhizus* under different temperature

温度 I Temperature I (°C)	温度 J Temperature J (°C)	均值差 Mean variance (I-J)	标准差 Standard error	显著性 Significance	95%置信区间 95% confidence interval	
					Minimum	Maximum
9	16	-0.50	0.03	0.00	-0.58	-0.42
	23	-1.38	0.04	0.00	-1.50	-1.27
	30	-1.92	0.04	0.00	-2.03	-1.81
	37	-2.06	0.06	0.00	-2.23	-1.89
	40	-0.41	0.05	0.00	-0.57	-0.26
	43	0.12	0.03	0.00	0.04	0.21
16	23	-0.89	0.03	0.00	-0.98	-0.79
	30	-1.42	0.03	0.00	-1.51	-1.33
	37	-1.56	0.05	0.00	-1.72	-1.41
	40	0.08	0.05	0.53	-0.05	0.22
	43	0.62	0.02	0.00	0.56	0.68
23	30	-0.54	0.04	0.00	-0.65	-0.42
	37	-0.68	0.06	0.00	-0.85	-0.51
	40	0.97	0.05	0.00	0.81	1.13
	43	1.51	0.03	0.00	1.41	1.61
30	37	-0.14	0.06	0.18	-0.31	0.03
	40	1.51	0.05	0.00	1.35	1.66
	43	2.05	0.03	0.00	1.95	2.14
37	40	1.65	0.07	0.00	1.45	1.85
	43	2.19	0.05	0.00	2.03	2.34
40	43	0.54	0.05	0.00	0.40	0.68



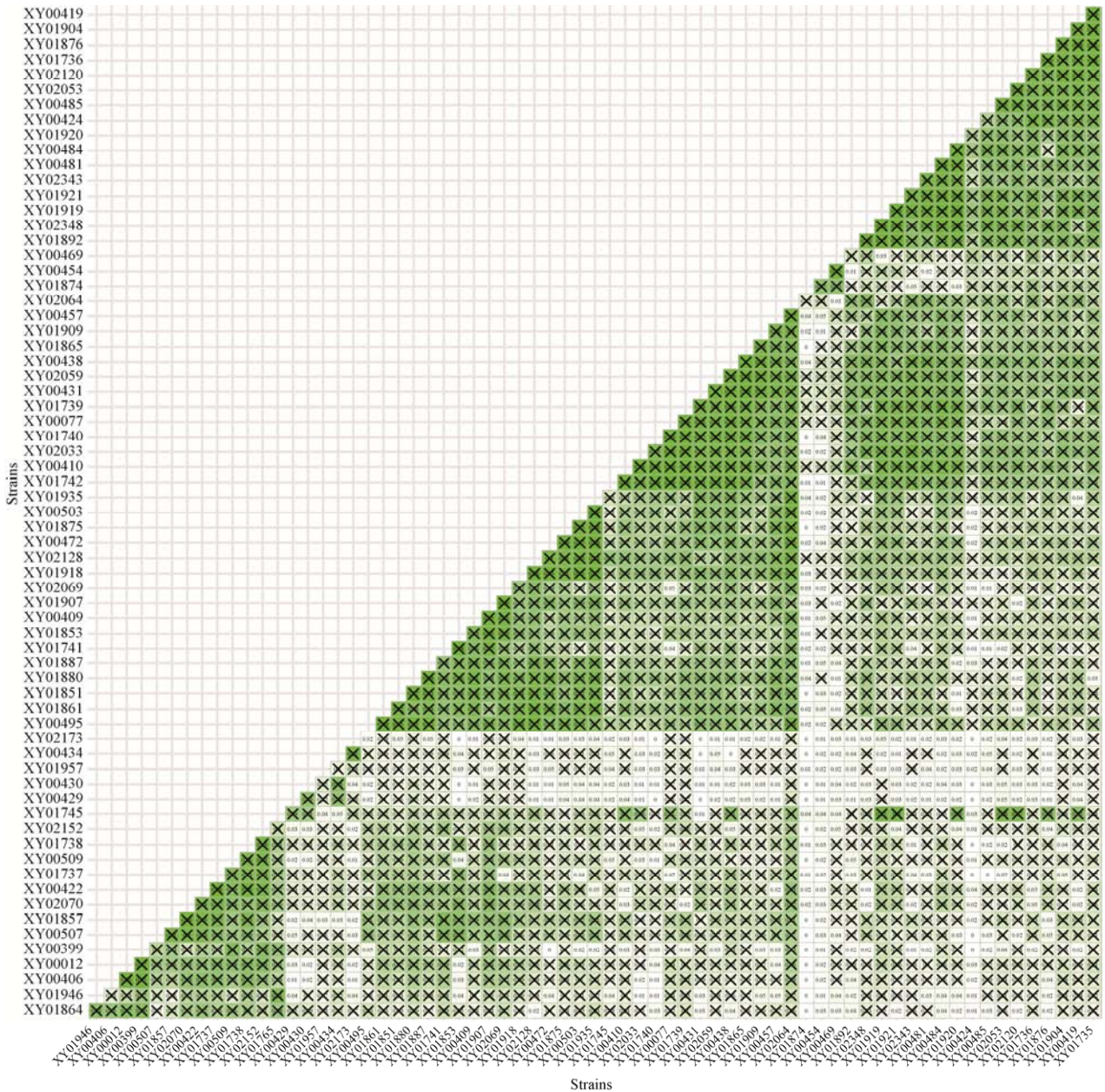


图 2 少根根霉菌株间温度-生长曲线相关性矩阵

Figure 2 Correlation matrix of temperature-growth curves for *Rhizopus arrhizus* strains

注: ×: 差异不显著( $P>0.05$ ), 颜色越深表示  $P$  值越大。

Note: ×: The difference is not significant ( $P>0.05$ ), darker and greater  $P$  value.

育变种具有一定的对应关系;对 3 个系统发育变种数据进行两两比较,原变种和德氏变种间  $P<0.05$ ,东京变种与原变种和德氏变种间均  $P>0.05$ ,说明 23 °C 培养下少根根霉原变种和德氏变种间生长速度存在

显著性差异,其余培养温度下变种间不存在显著性差异,不能作为区分 3 个系统发育变种的分类依据。综上所述,少根根霉菌株的温度-生长速度差异与少根根霉形态学或分子系统发育的变种分类基本无关。

表 4 少根根霉变种间温度-生长动态特性显著性分析

Table 4 Significance analyses of temperature-growth kinetics for three varieties within *R. arrhizus*

分类 Classification	因变量 Dependent variable (°C)	III 平方和 III quadratic sum	DF	均方 Mean square	F	P
分子系统发育变种 Molecular phylogenetic varieties	16	0.17	2	0.09	2.35	0.10
	23	1.84	2	0.92	4.60	0.01
	30	0.13	2	0.06	0.31	0.73
	37	0.43	2	0.22	0.31	0.74
	40	2.56	2	1.28	2.43	0.10
形态学变种 Morphological varieties	16	0.02	2	0.01	1.02	0.37
	23	0.07	2	0.03	0.60	0.55
	30	0.27	2	0.14	2.88	0.06
	37	0.68	2	0.34	2.04	0.14
	40	0.26	2	0.13	0.89	0.41

### 3 讨论与结论

在根霉属专著性研究中已经对之前的最高生长温度进行过综述,认为少根根霉的最高生长温度(生长抑制高温)不超过 42 °C<sup>[1]</sup>,而本文结果显示,在 69 株供试菌种中,只有 3 株菌(XY00422、XY01957、XY02173)的生长抑制高温为 40 °C,达到 43 °C 的菌有 43 株。如果排除接种方法、培养基和培养箱等因素的影响,本文结果基本印证了专著性研究的结果<sup>[1]</sup>。但是,另有 23 株菌的生长抑制高温达到 46 °C 甚至 49 °C,这样的结果在以前的研究中从未提及<sup>[1]</sup>。因此,对于少根根霉来说,其最高生长温度(生长抑制高温)范围应该修订为 40–49 °C。

此前对于培养温度与少根根霉生长关系的研究主要着眼于一株或少数几株少根根霉的生长特性或发酵条件优化<sup>[28-30]</sup>,未见培养温度对大量少根根霉菌株生长速度影响的系统性研究报道。本研究使用 R 语言分析培养温度与少根根霉生长速度间的数学关系,并建立函数模型,即少根根霉温度-生长速度曲线。该函数模型能预测不同少根根霉生长速度随培养温度变化的趋势,可以系统、全面地比较不同少根根霉菌株间温度适应能力的差异。温度-生长速度曲线间的配对 *t* 检验证明,不同的少根根霉菌株对温度变化的适应能力具有统计学意义上

的差异。这种适应性差异由菌株自身特性决定,与形态学变种和分子系统发育变种都基本不具有有一致性,不能作为分类依据。由此可以推测,少根根霉物种仍然处于剧烈的演化之中,种内形态、分子和生理分化较为活跃,但还未形成任何完全独立的种群。虽然如此,但在 23 °C 培养下分子系统发育分类后的少根根霉原变种和德氏变种间生长速度存在显著性差异,因此可以将此特性作为区分这两个分子系统发育变种的重要参考。

本研究的菌株主要为国内的野生型菌株,经过驯化的酿酒菌和分离自病人的致病菌较少,未来的研究中应当更为广泛地收集来自国内外的驯化菌株和致病菌株,使不同来源的菌株数目更趋平衡,利用温度-生长速度曲线进一步探讨少根根霉由自然环境驯化到酿酒环境或者过渡到致病环境的适应性趋势,并在此表型研究的基础上结合比较基因组研究来解析少根根霉群体演化机制。

通过本研究的初步结果,已经能够筛选出一些在未来深入研究和开发利用中值得重点关注的少根根霉菌种材料。比如,研究不同菌株温度适应能力的差异,较好的素材有 6 株,包括对温度变化最不敏感的 3 株(XY00438、XY01921、XY01874)和最敏感的 3 株(XY01904、XY02053、XY01957);研究耐高温胁迫机制的良好素材有 5 株,最高致死

温度 2 株(XY01735、XY02120)和最低致死温度 3 株(XY02173、XY01957、XY00422); 作为发酵菌, 具有潜力的是 XY00454 和 XY00469, 这两株菌在温度-生长速度函数模型中的理论最大速度排名也很高, 在大于 30 °C 的高温下都有较快的实测生长速度, 容易适应生产发酵的温度。

致谢: 感谢本项目组刘红梅实验师在菌种分离和保藏方面提供的帮助, 感谢北方民族大学白宇川和邓鹏程同学在实验过程中给予的帮助。

## REFERENCES

- [1] Zheng RY, Chen GQ, Huang H, et al. A monograph of *Rhizopus*[J]. *Sydowia*, 2007, 59(2): 273-372
- [2] Coban HB, Demirci A. Enhancement and modeling of microparticle-added *Rhizopus oryzae* lactic acid production[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 39(2): 323-330
- [3] Thitprasert S, Songserm P, Boonkong W, et al. Manipulating pyruvate decarboxylase by addition of enzyme regulators during fermentation of *Rhizopus oryzae* to enhance lactic acid production[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 174(5): 1795-1809
- [4] Naude A, Nicol W. Fumaric acid fermentation with immobilised *Rhizopus oryzae*: quantifying time-dependent variations in catabolic flux[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 56: 8-20
- [5] Pimpong V, Ounaeb S, Thitprasert S, et al. Enhanced effectiveness of *Rhizopus oryzae* by immobilization in a static bed fermentor for L-lactic acid production[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 52: 44-52
- [6] Liu Y, Yang Y, Sun T, et al. Optimization of medium components and fermentation conditions for L-malic acid production by *Rhizopus oryzae*[J]. *Food Science*, 2015, 36(11): 100-109 (in Chinese)  
刘亚, 杨英, 孙婷, 等. 米根霉发酵产 L-苹果酸的工艺优化[J]. *食品科学*, 2015, 36(11): 100-109
- [7] Wang WW, Ren PK. Selective breeding of gamma linolenic acid high-yielding strain of *Rhizopus arrhizus* and studies on solid state fermentation conditions[J]. *Mycosystema*, 2002, 21(1): 92-97 (in Chinese)  
王卫卫, 任鹏康. 少根根霉  $\gamma$ -亚麻酸高产菌株选育及发酵条件优化[J]. *菌物系统*, 2002, 21(1): 92-97
- [8] Wang WW, Ren PK, Yan M, et al. Studies on solid state fermentation conditions of GLA lipid from *Rhizopus arrhizus*[J]. *Food Science*, 2002, 23(6): 94-98 (in Chinese)  
王卫卫, 任鹏康, 闫明, 等. 少根根霉  $\gamma$ -亚麻酸固态发酵条件的研究[J]. *食品科学*, 2002, 23(6): 94-98
- [9] Thanh VN, Thuy NT, Chi NT, et al. New insight into microbial diversity and functions in traditional Vietnamese alcoholic fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 232: 15-21
- [10] Guillén M, Benaiges MD, Valero F. Improved ethyl butyrate synthesis catalyzed by an immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase: a comprehensive statistical study by production, reaction rate and yield analysis[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 133(S1): S371-S376
- [11] Ortega S, Máximo MF, Montiel MC, et al. Esterification of polyglycerol with polycondensed ricinoleic acid catalysed by immobilised *Rhizopus oryzae* lipase[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013, 36(9): 1291-1302
- [12] Zheng YX, Wang YL, Pan J, et al. Semi-continuous production of high-activity pectinases by immobilized *Rhizopus oryzae* using tobacco wastewater as substrate and their utilization in the hydrolysis of pectin-containing lignocellulosic biomass at high solid content[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 241: 1138-1144
- [13] He Y, Zheng YX, Pan J, et al. Pectinase production with *Rhizopus oryzae* mycelium immobilized on cotton matrix and treatment of tobacco stem[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2016, 35(5): 1494-1501 (in Chinese)  
何源, 郑羽西, 潘君, 等. 棉布支架固定化米根霉联产果胶酶及用于处理烟梗[J]. *化工进展*, 2016, 35(5): 1494-1501
- [14] Zhang LQ, Gu S, Shao H, et al. Isolation, determination and aroma product characterization of fungus producing irnoe[J]. *Mycosystema*, 1999, 18(1): 49-54 (in Chinese)  
张玲琪, 谷魁, 邵华, 等. 发酵产鸮尾酮真菌的分离鉴定及生香特性的初步研究[J]. *菌物系统*, 1999, 18(1): 49-54
- [15] Li CT, Tian FH, Li JN, et al. Diosgenin biotransformed by *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*[J]. *Mycosystema*, 2012, 31(5): 754-761 (in Chinese)  
李长田, 田风华, 李江楠, 等. 少根根霉原变种发酵生产薯蓣皂苷元[J]. *菌物学报*, 2012, 31(5): 754-761
- [16] Li P, Sun CP, Wang Y, et al. Efficiently regioselective glucosylation of estrogen analogues mediated by fungus *Rhizopus oryzae* AS 3.2380[J]. *Catalysis Communications*, 2017, 97: 106-110
- [17] Singh P, Paul S, Shivaprakash MR, et al. Stress response in medically important Mucorales[J]. *Mycoses*, 2016, 59(10): 628-635
- [18] Kuang Q, Sun M, Shi DL, et al. Study on the L-lactic acid production by ammonia resistant strain *R. oryzae* JS-N02-02[J]. *Biotechnology*, 2005, 15(4): 65-67 (in Chinese)  
匡群, 孙梅, 施大林, 等. 耐氨米根霉发酵生产 L-乳酸的研究[J]. *生物技术*, 2005, 15(4): 65-67
- [19] Lyu CW, Xu Q, Chen J, et al. Physiological characteristics of a high-glucose resistant *Rhizopus oryzae*[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2015, 13(3): 36-40,54 (in Chinese)  
吕春微, 徐晴, 陈姣, 等. 耐高糖米根霉菌株的生理特性[J]. *生物加工过程*, 2015, 13(3): 36-40,54
- [20] Liu YX. Research between pathogens identification and key control techniques of two Jujube Fruit Fungal Diseases in Xinjiang[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2016 (in Chinese)  
刘艳祥. 新疆红枣果实两种真菌病害病原鉴定及关键防治技术研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2016

- [21] Ge HF, Chen GZ. Rhinocerebral mucormycosis caused by *Rhizopus oryzae*: a case report[J]. Journal of Clinical Dermatology, 2015, 44(8): 505-507 (in Chinese)  
葛红芬, 陈官芝. 米根霉致鼻脑毛霉病[J]. 临床皮肤科杂志, 2015, 44(8): 505-507
- [22] Xiu YH. Carbon utilization and growth kinetics of *Shewanella putrefaciens* isolated from fish[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese)  
修艳辉. 鱼源腐败希瓦氏菌生长动力学及碳源代谢研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2017
- [23] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies[A]//Innis MA, Gelfand DH, Gelfand DH, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322
- [24] Liu XY. Preliminary studies on the molecular systematics of *Mucorales*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Sciences Institute of Microbiology, 2008 (in Chinese)  
刘小勇. 毛霉目分子系统学初步研究[D]. 北京: 中国科学院微生物研究所博士学位论文, 2008
- [25] Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data[J]. Bioinformatics, 2012, 28(12): 1647-1649
- [26] Liu XY, Huang H, Zheng RY. Delimitation of *Rhizopus* varieties based on IGS rDNA sequences[J]. Sydowia, 2008, 60(1): 93-112
- [27] Liu XY, Huang H, Zheng RY. Molecular phylogenetic relationships within *Rhizopus* based on combined analyses of ITS rDNA and *pyrG* gene sequences[J]. Sydowia, 2007, 59(2): 235-253
- [28] Yang JG, Zhao ZK, Ma YY. Preparation of pure-species *Rhizopus oryzae* starter and its technical optimization[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2014(9): 33-36,41 (in Chinese)  
杨建刚, 赵中开, 马莹莹. 纯种米根霉种曲的制备及工艺条件优化[J]. 酿酒科技, 2014(9): 33-36,41
- [29] Wang P, Zhang FY. Study on the growth features and the fermenting properties of *Rhizopus oryzae* F6[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2014(3): 21-24 (in Chinese)  
王鹏, 张凤英. 米根霉 F6 生长和发酵特性的研究[J]. 酿酒科技, 2014(3): 21-24
- [30] Li JS, Zhu CL. Contrast of the properties of five quality *Rhizopus* strains and their application[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2005(3): 43-45 (in Chinese)  
李金生, 朱春林. 五株优良根霉的特性比较及其推广应用[J]. 酿酒科技, 2005(3): 43-45