

# 哈茨木霉液体发酵工艺研究

## Liquid Fermentation Technology of *Trichoderma harzianum*\*

刘梅<sup>1</sup> 乔敏<sup>2</sup> 徐同<sup>1</sup> 张克勤<sup>2</sup>

(1 浙江大学农业与生物技术学院植物保护系,杭州 310029)

(2 云南大学工业微生物发酵工程重点实验室,昆明 650091)

中图分类号: Q 949.331.06 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2000)03-0279-03

木霉 (*Trichoderma* spp.) 是自然界最常见的拮抗生物,它对多种植物病原菌均有拮抗作用,尤其是对土传植物病原真菌如白绢病菌 (*Sclerotium rolfsii*),立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*),腐霉菌 (*Pythium* spp.),镰刀菌 (*Fusarium* spp.) 等。国外已有不同类型的木霉生防制剂问世,深入研究木霉的大规模发酵工艺条件,对于促进我国应用生防制剂防治植物病害,提高作物产量,减轻环境污染具有重要的意义。

### 1 材料和方法

#### 1.1 供试菌株

哈茨木霉 NF9 菌株 (*Trichoderma harzianum* NF9),由浙江大学植物病理教研室徐同教授分离、保存。

#### 1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA),糖蜜-酵母粉基础培养基:每升含 30 g 糖蜜,5 g 酵母粉。

#### 1.3 试验条件

摇瓶试验条件:温度 28℃,转速 100 r/min。所有糖蜜-酵母粉培养基 pH 为 5.7。

#### 1.4 摇瓶实验

每 250 mL 摇瓶装 100 mL 培养基,设计 6 变量 3 水平的正交实验,在旋转式摇床上振荡培养

5 d,检测其中分生孢子和厚垣孢子的产量。所设计的变量、水平如表 1 所示。

表 1 正交实验的变量、水平

Tab. 1 Factor and level of orthogonal design

变量	1	2	3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O/mg·L <sup>-1</sup>	20	100	200
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O/g·L <sup>-1</sup>	0.5	1.25	2.0
NaNO <sub>3</sub> /g·L <sup>-1</sup>	1.0	5.0	7.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /g·L <sup>-1</sup>	1.0	2.5	4.0
糖蜜/g·L <sup>-1</sup>	20	30	50
酵母粉/g·L <sup>-1</sup>	2.5	5.0	10

#### 1.5 正交实验结果的验证实验

在 PDA 培养基上培养 5 d 的孢子洗脱(每皿 10 mL 无菌水),接种 1 mL 于每瓶基础培养基中振荡培养 50 h,作为种子接种于对照培养基和工作培养基中,对照培养基为基础培养基,工作培养基为根据正交实验确定的培养基,接种量为 14%,于不同的时间取样分析其中分生孢子的产生情况。

#### 1.6 发酵罐中发酵工艺研究

菌株在 PDA 上培养 5 d,将其孢子洗脱,接种于摇瓶中培养 40 h,培养物再接种于摇瓶中培养 20 h,培养物作为种子直接接种于发酵罐。发酵罐容积 20 L,所用培养基为根据正交实验确定的培养基,培养基装量 14 L,接种量 14%,发酵过程保

\* 收稿日期: 2000-04-18

基金项目:云南大学微生物发酵工程重点实验室开放基金资助

作者简介:刘梅(1975-),女,山东高密市人,在读硕士研究生,主要从事植物病理学研究。

持溶解氧浓度 10% ~ 20%, 温度 28℃, 搅拌速度 ~ 1.0 bar, 采用加入菜子油的方法消泡。  
200 ~ 350 r/min, 通气量 5 ~ 15 L/min, 罐压(外)0

表 2 正交实验结果与分析

Tab. 2 Result and analysis of orthogonal experiment

变量		A	B	C	D	E	F
		MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	NaNO <sub>3</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	糖蜜	酵母粉
分生孢子 10 <sup>6</sup> ·mL <sup>-1</sup>	I/6	26.07	26.70	24.30	29.98	62.51	39.89
	II/6	37.22	41.14	31.48	32.41	30.95	31.36
	III/6	35.39	30.84	42.92	36.28	5.22	27.43
厚垣孢子 10 <sup>6</sup> ·mL <sup>-1</sup>	I/6	2.92	3.28	3.24	3.03	3.25	2.82
	II/6	3.36	3.49	3.37	3.35	3.16	3.36
	III/6	3.10	2.61	2.78	3.01	2.98	3.21
极差	分	11.15	14.44	18.62	6.30	57.30	12.46
	厚	0.44	0.88	0.59	0.34	0.27	0.54

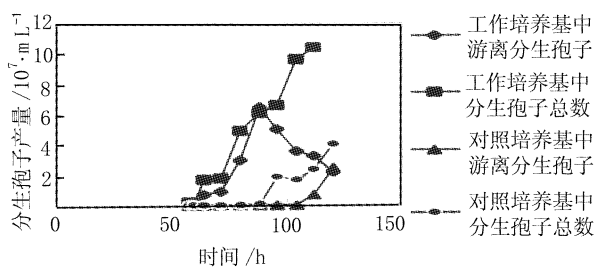


图 1 验证实验结果

Fig. 1 Results from verification experiment

1.7 pH 的测定采用精密 pH 试纸; 发酵液总糖测定采用 3,5 - 二硝基水杨酸法; 孢子数测定采用血球计数板计数法。

### 1.8 后处理

测量发酵产物的总体积, 发酵产物经两层滤纸抽滤除去发酵废液, 固体物经 40℃ 烘箱烘干, 即得发酵粗产物, 测其干重。

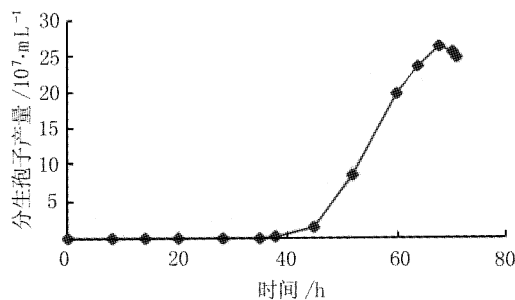


图 2 发酵过程分生孢子变化

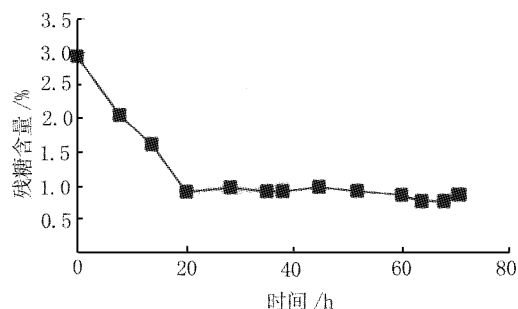
Fig. 2 Conidia production by *T. herzianum* NF9 in fermentation process

图 3 发酵过程残糖含量变化

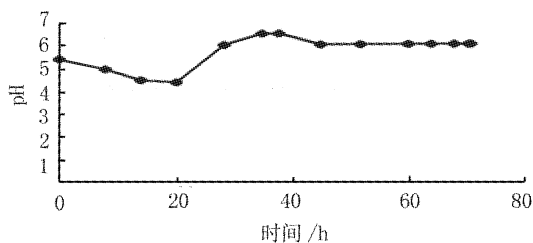
Fig. 3 Carbohydrate concentration in fermentation process of *T. herzianum* NF9

图 4 发酵过程 pH 的变化

Fig. 4 pH change in fermentation process of *T. harzianum* NF9

## 2 结果与分析

### 2.1 正交实验结果与分析

由表2可以看出糖蜜,酵母粉,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  对分生孢子的产生都是显著性的影响因素,同时考虑到厚垣孢子的产量,选定的用于发酵的培养基为  $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_2\text{E}_1\text{F}_2$ , 即每升培养基中含糖蜜 20 g, 酵母粉 5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.25 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.0 g,  $\text{NaNO}_3$  7.0 g。

## 2.2 验证实验结果与分析

由图1可以看出,对照培养基中分生孢子产生的较晚,工作培养基中分生孢子产生的较早,而且量大,其中游离的分生孢子数在88 h后逐渐减少,所以采收时间定在88 h。

## 2.3 发酵过程孢子含量、残糖含量、pH变化

图2结果表明,哈茨木霉 NF9 菌株的分生孢子在发酵38 h后开始产生,此后孢子数目呈指数上升趋势,68 h达到最高峰,68 h后逐渐减少,所以在发酵68 h后采收。

图3结果表明,培养液中残糖含量0~14 h逐渐下降,17.5 h后变化不明显,68 h后含量达到最低值,此后有所上升。

由图4可以看出,发酵过程中,最初pH逐渐下降,到20 h达到最低值(4.4),20 h以后逐渐回升,32 h达到最高值(6.5),并一直持续到41 h,此后pH下降到6.0,并一直持续到发酵结束。

## 2.4 终产量

最终得发酵液总体积10.4 L,干重产量为115.9 g。

## 3 讨论

3.1 由摇瓶正交实验结果可以看出,培养基中碳源物质、氮源物质和各种矿质元素的浓度可以对哈茨木霉的生长产生显著的影响,糖蜜的含量对分生孢子的产量影响尤其显著。糖蜜的用量为2%,既可以提高分生孢子的产量,又可以降低生产成本。

3.2 应用糖蜜-酵母粉培养基在20 L发酵罐中发酵生产哈茨木霉 NF9 菌株,68 h以后,发酵液中分生孢子含量可达  $2.6 \times 10^8/\text{mL}$  发酵液,而 G. C. Papavizas 等1984年在实验室条件下模拟工业化生产条件发酵哈茨木霉 Th-58 菌株,3 d后可得  $3.6 \times 10^9/\text{g}$  干重,其中包括分生孢子、厚垣孢子以及未成熟的厚垣孢子,按100 mL发酵液产生1 g干重来计算,本实验所得产率明显高于 G. C. Papavizas 等所得的产率。

3.3 发酵开始0~17.5 h内,残糖含量明显下降,这一时期菌体大量增殖,消耗了大量的糖。17.5 h后残糖含量很低,并且变化不明显,这一时期营养物质的缺乏是导致分生孢子大量产生的部分原因,68 h分生孢子含量达到高峰值,残糖含量达到最低值,68 h以后,分生孢子含量有所下降,残糖含量有所上升,表明供试菌株已经进入衰亡期,残糖含量的上升可能是部分细胞自溶所致。