

文章编号: 1673-1689(2011)05-0740-05

响应面优化绿色木霉菌培养基

黄雪莲, 于新*

(仲恺农业工程学院 轻工食品学院, 广东 广州 510225)

摘要: 利用响应面分析法对绿色木霉菌的培养基进行优化。通过测量不同营养条件下绿色木霉菌落生长直径研究其生物学特性, 在单因素实验的基础上, 选定葡萄糖添加量、丙氨酸添加量和磷酸二氢钾添加量 3 个因素进行中心组合实验, 建立二次回归方程, 并应用响应面分析法进行优化。结果表明, 绿色木霉菌最佳培养基为葡萄糖 2.11 g/dL、丙氨酸 0.15 g/dL、磷酸二氢钾 0.30 g/dL。在此条件下培养的绿色木霉菌菌落生长直径达到 78.00 mm, 与预测值 77.87 mm 接近(CI>95%)。

关键词: 绿色木霉菌; 培养基; 菌落生长

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Optimization of Medium of *Trichoderma viride* Using Response Surface Methodology

HUANG Xue-lian, YU Xin*

(College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: In this study, response surface methodology (RSM) was used to optimize the medium compositions for *Trichoderma viride* growth with the colony growth diameter of *T. viride* as index. According to the single-factor experiments, three levels of the factors (carbon source addition, nitrogen source addition and phosphorus source addition) were selected for the central composite design to establish a quadric regression equation, and RSM was employed to optimize. The results showed that the optimal conditions for *Trichoderma viride* were 2.11% glucose, 0.15% alanine and 0.3% KH_2PO_4 . Under these conditions, the colony growth diameter of *T. viride* reached at 78.00 mm, which was almost equal to the estimated value 77.87mm (CI>95%).

Key words: *Trichoderma viride*; medium; colony growth

绿色木霉菌(*Trichoderma viride*)属于半知菌亚门(*Deuteromycotina*) 丝孢目(*Hypomycetales*) 丝梗孢科(*Moniliaceae*)的木霉属真菌(*Trichoder-*

ma spp.)。 *Trichoderma* spp 广泛存在于土壤、植物根围、种子、球茎表面等生态环境中, 对多种植物病原菌都有很强的拮抗作用, 尤其对土壤习居菌更

收稿日期: 2010-11-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871765)。

* 通信作者: 于新(1959-), 男, 新疆阿克苏人, 工学硕士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事农产品加工与贮藏方面的研究。Email: yuxin1959@yahoo.com.cn

为有效, 是生物防治的良好材料^[1-3]。关于 *Trichoderma* spp. 的生物防治研究, 主要集中在哈茨木霉菌 (*Trichoderma harzianum*)^[4-5], 而 *T. viride* 则多侧重于其所代谢的酶类研究, 如 *T. Viride* 生产纤维素酶^[6-7], 葡糖苷酶^[8], 木聚糖酶^[9]等。近年来, 也有研究表明 *T. viride* 对某些土传病原真菌有抑制作用^[10-11], 但对其培养基研究还未见报道。作者以 *T. viride* 菌落生长直径为指标, 运用响应面分析法优化 *T. viride* 培养基, 为其开发与应用提供工作基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种 绿色木霉菌(*Trichoderma viride*): 华南农业大学微生物实验室提供。

1.1.2 仪器与试剂 SYQ-DSX-280B 高压灭菌锅: 上海申安医疗器械厂; SW-CJ-IF 型单人双面无菌超净工作台: 苏州净化设备有限公司; LRH-250A 型生化培养箱: 广东省医疗器械厂; 土豆: 市售; 葡萄糖: 分析纯, 广东光华化学厂有限公司; 琼脂粉: 生化试剂, 广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化 切取直径为 5 mm 各试验菌种菌饼, 接种于直径为 90 mm 含 15 mL PDA 培养基的培养皿上, 于 30 °C 活化 5 d。

1.2.2 单因素试验

1) 不同碳源对 *T. viride* 菌落生长的影响: 基本培养基为马铃薯琼脂培养基, 分别添加 0.2 g/dL 以下碳源——葡萄糖、果糖、半乳糖、乳糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、海藻糖、阿拉伯糖、可溶性淀粉, 并设无糖作对照, 配成含不同碳源的培养基。切取直径为 5 mm 的 *T. viride* 菌饼, 接种到各培养基平板上, 每处理重复 3 次, 于 30 °C 恒温培养, 从第 2 天起逐日记录 *T. viride* 菌落生长直径。

2) 碳源添加量对 *T. viride* 菌落生长的影响: 得出的最佳碳源置换 PDA 培养基中的葡萄糖, 其添加量分别为 0、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 g/dL, 方法同上。

3) 不同氮源对 *T. viride* 菌落生长的影响: 在基本培养基中采用最佳碳源及其最佳添加量, 氮源分别采用硝酸钠、硝酸钾、硝酸铵、硫酸铵、蛋白胨、牛肉浸膏、酵母膏、丙氨酸、谷氨酸、尿素, 添加量均为 0.2 g/dL, 设无氮源为空白, 方法同上。

4) 氮源添加量对 *T. viride* 菌落生长的影响: 在基本培养基中采用最佳碳源及其最佳添加量、最

佳氮源, 氮源添加量分别采用 0、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 g/dL, 方法同上。

5) 不同磷源对 *T. viride* 菌落生长的影响: 在基本培养基中采用最佳碳源及其最佳添加量、最佳氮源及其添加量, 磷源分别采用磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸二钾、磷酸二氢钾、磷酸二铵, 添加量均为 0.2 g/dL, 设无磷源为空白, 方法同上。

6) 磷源添加量对 *T. viride* 菌落生长的影响: 在基本培养基中采用最佳碳源及其最佳添加量、最佳氮源及其添加量、最佳磷源, 磷源添加量分别采用 0、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 g/dL。方法同上。

1.2.3 响应面优化试验 依据单因素试验结果, 应用 Central Composite Design (CCD) 试验原理。对葡萄糖添加量、氮源添加量和磷源添加量设计响应面试验。以 *T. viride* 菌落生长直径为指标, 葡萄糖添加量 (X_1)、氮源添加量 (X_2) 和磷源添加量 (X_3) 为自变量, 按方程 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$ 对自变量进行编码, 其中 x_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量的真实值, X_0 为试验中心点处自变量的真实值, ΔX 为自变量的变化步长。

1.2.4 优化工艺的验证 依据验证试验结果, 修正工艺参数, 获得最佳培养基组成, 并测量在此条件下培养的 *T. viride* 菌落生长直径。

1.2.5 数据处理 试验均设 3 次重复, 采用 Design Expert 7.0 对试验数据进行处理与分析。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对 *T. viride* 菌落生长的影响

由图 1 可以看出, 以葡萄糖、果糖为碳源时 *T. viride* 的菌丝生长最好, 培养 2 d 后菌落直径分别为 65.50 mm 和 64.75 mm, 培养到 3 d 即长满整个平板。甘露糖、海藻糖和木糖为碳源时次之, 而半乳糖最差。培养 4 d 后, 除半乳糖外, *T. viride* 在其他碳源培养基上均长满整个平板。培养 5 d 后, *T. viride* 孢子生长较好。但 *T. viride* 所代谢的黄色素因碳源种类而异, 以葡萄糖、果糖、甘露糖和海藻糖最好, 木糖、乳糖和半乳糖次之, 而蔗糖、麦芽糖、阿拉伯糖和可溶性淀粉完全不产黄色素。所以选择葡萄糖为最佳碳源。

2.2 碳源添加量对 *T. viride* 菌落生长的影响

图 2 表明, 培养 2 d 后, *T. viride* 菌落生长直径随着葡萄糖添加量的增加而增大。达到 2.5 g/dL 后, 增加葡萄糖添加量, *T. viride* 菌落直径则基本不变。培养至第 3 天, 除空白外, 其它均长满整个

平板。因此选择 2.5 g/dL 的葡萄糖为碳源最佳添加量。

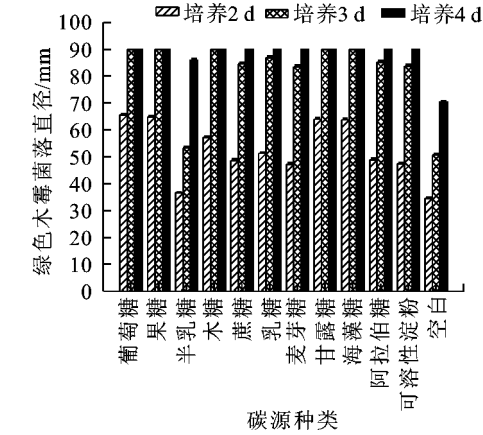


图 1 不同碳源对 *T. viride* 菌落生长的影响
Fig. 1 Effect of different carbon sources on colony growth of *T. viride*

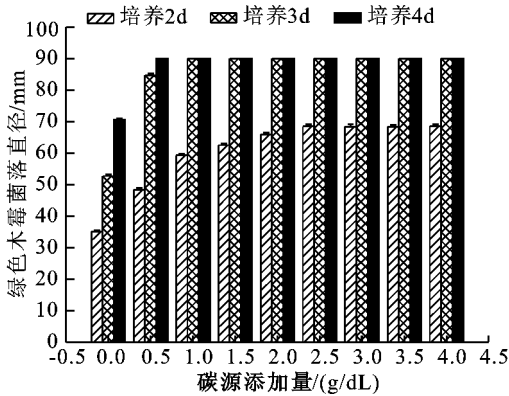


图 2 碳源添加量对 *T. viride* 菌落生长的影响
Fig. 2 Effect of carbon source addition on colony growth of *T. viride*

2.3 不同氮源对 *T. viride* 菌落生长的影响

由图 3 可知, 增加氮源有利于 *T. viride* 菌丝的生长, 以丙氨酸为氮源时生长最好, 培养 2 d 后菌落直径为 71.33 mm, 培养到第 3 天即长满整个平板。

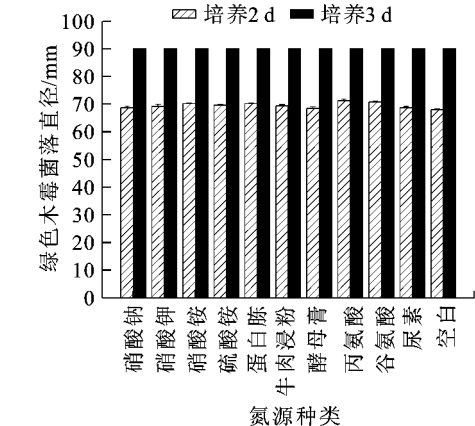


图 3 不同氮源对 *T. viride* 菌落生长的影响
Fig. 3 Effect of different nitrogen sources on colony growth of *T. viride*

2.4 氮源添加量对 *T. viride* 菌落生长的影响

图 4 表明, 随着丙氨酸的添加量逐渐增加, *T. viride* 菌落直径先增大后基本不变。添加 0.25 g/dL 的丙氨酸有利于 *T. viride* 菌丝生长, 培养 2 d 后菌落直径为 73.58 mm, 培养到第 3 天即长满整个平板。因此, 丙氨酸的最佳添加量为 0.25 g/dL。

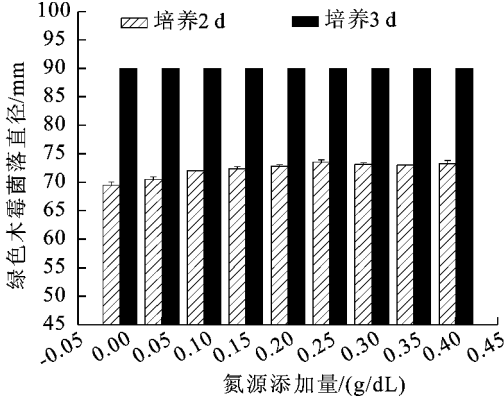


图 4 氮源添加量对 *T. viride* 菌落生长的影响
Fig. 4 Effect of nitrogen source addition on colony growth of *T. viride*

2.5 不同磷源对 *T. viride* 菌落生长的影响

由图 5 可知, 添加磷酸二氢钠和磷酸二氢钾 *T. viride* 菌丝生长较好。而添加磷酸氢二钠、磷酸氢二钾和磷酸氢二铵则反而比空白还差。磷酸二氢钠和磷酸二氢钾为酸性磷源, 磷酸氢二钠、磷酸氢二钾和磷酸氢二铵为碱性磷源。可见, *T. viride* 菌丝的生长及其抑菌作用受培养基 pH 影响, 偏酸性的环境其生长较好。所以选择磷酸二氢钾为最佳磷源。

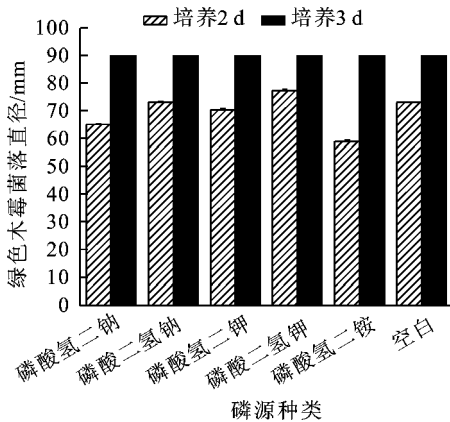


图 5 不同磷源对 *T. viride* 菌落生长的影响
Fig. 5 Effect of different phosphorus sources on colony growth of *T. viride*

2.6 磷源添加量对 *T. viride* 菌落生长的影响

图 6 表明, 随着磷酸二氢钾的添加量增加, *T. viride* 菌落生长直径出现先增大后减小的趋势。进一步反映其培养基 pH 对 *T. viride* 的影响较大。

磷酸二氢钾添加量为 0.2 g/dL 时, 菌落生长情况较理想, 所以磷酸二氢钾的最佳添加量为 0.2 g/dL。

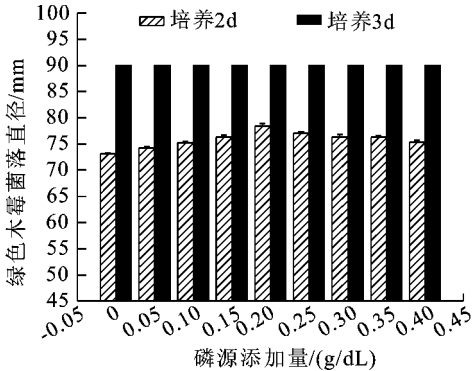


图 6 磷源添加量对 *T. viride* 菌落生长的影响

Fig. 6 Effect of phosphorus source addition on colony growth of *T. viride*

2.7 响应面优化结果分析

利用 Design Expert 7.0 软件的 Central Composite 中心组合设计, 结果见表 1。

表 1 响应面优化试验设计及试验结果

Tab. 1 Project design and experimental results of optimizing test with response surface methodology

序号	因素			菌落生长直径/mm	
	A	B	C	真实值	预测值
	葡萄糖	丙氨酸	磷酸二氢钾		
1	-1.00	1.00	-1.00	71.50	71.66
2	1.00	1.00	1.00	73.50	73.64
3	0.00	0.00	0.00	74.80	74.70
4	0.00	0.00	0.00	74.50	74.70
5	-1.00	-1.00	-1.00	71.17	71.21
6	0.00	1.68	0.00	75.00	74.79
7	-1.00	1.00	1.00	74.50	74.67
8	0.00	0.00	1.68	78.00	77.80
9	1.00	-1.00	-1.00	72.50	72.51
10	0.00	0.00	0.00	74.72	74.70
11	0.00	0.00	0.00	74.20	74.70
12	0.00	-1.68	0.00	75.83	75.78
13	1.00	1.00	-1.00	74.00	74.02
14	1.00	-1.00	1.00	75.25	75.27
15	-1.00	-1.00	1.00	77.20	77.36
16	0.00	0.00	-1.68	73.00	72.95
17	1.68	0.00	0.00	71.00	70.98
18	0.00	0.00	0.00	74.80	74.70
19	-1.68	0.00	0.00	71.00	70.76
20	0.00	0.00	0.00	75.13	74.70

采用 Design Expert 7.0 软件对试验结果进行回归分析, 得到葡萄糖添加量 (X_1)、丙氨酸添加量 (X_2) 和磷酸二氢钾添加量 (X_3) 三个因素对 *T. viride* 菌落生长影响的表征方程如下:

$$Y = 74.70 + 0.064X_1 - 0.29X_2 + 1.44X_3 + 0.27X_1X_2 - 0.85X_1X_3 - 0.78X_2X_3 - 1.35X_1^2 + 0.21X_2^2 + 0.24X_3^2$$

响应面分析中对实验结果进行拟和的二次模型方差分析见表 2。多元相关系数 $R^2 = 0.9896$, 校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9802$, 说明模型对实际情况拟合较好; Prob(P) > F 值小于 0.0001, 表明该模型极显著, 可用来进行响应值预测, 确定最佳培养基组成。

表 2 中心组合设计模型方差分析

Tab. 2 Analysis of variance for the model equation of CCD

类型	平方和	自由度	均方差	F 值	Prob(P) > F
模型	70.65	9	7.85	105.46	< 0.0001
残差	0.74	10	0.050		
失拟性	0.25	5	0.099	0.50	0.7648
总和	71.40	19			

注: ‘Prob(P) > F’ < 0.05 视为显著。

由表 3 可知, B (氮源添加量) 和 C (磷源添加量) 对菌落生长的线性效应均显著, 而 A (葡萄糖添加量) 不显著; AB 、 AC 和 BC 对菌落生长的交互影响均显著; A^2 (葡萄糖添加量的二次项)、 B^2 (氮源添加量的二次项) 和 C^2 (磷源添加量的二次项) 对菌落生长均有重要的曲面影响。

表 3 二次模型回归系数的显著性检验

Tab. 3 Coefficient estimates by the regression quadratic model

模型项	回归系数	标准误差	F 值	Prob(P) > F
截距	74.70	0.11	—	—
A	0.064	0.074	0.76	0.4033
B	-0.29	0.074	15.86	0.0026
C	1.44	0.074	381.31	< 0.0001
AB	0.27	0.096	7.55	0.0206
AC	-0.85	0.096	77.19	< 0.0001
BC	-0.78	0.096	66.22	< 0.0001
A^2	-1.35	0.072	354.28	< 0.0001
B^2	0.21	0.072	8.39	0.0159
C^2	0.24	0.072	10.98	0.0078

注: ‘Prob(P) > F’ < 0.05 视为显著。

2.8 优化工艺的验证

经试验模型分析, 因素 A (葡萄糖添加量)、 B (氮源添加量)、 C (磷源添加量) 最适值分别为: 2.11%、0.15%、0.30%。在此条件下培养的 *T. viride* 菌落生长直径为 78.00 mm, 与预测值 77.87 mm 接近 (CI > 95%)。

3 结 语

试验表明, 培养基对 *T. viride* 菌落生长直径影

响显著。其中碳源的影响最明显,以葡萄糖为最优碳源。当添加氮源后,有利于 *T. viride* 菌丝生长,但氮源种类对其影响较小。磷源种类对 *T. viride* 菌落生长直径也较大,反映出 pH 值是影响 *T. viride* 菌丝生长的重要因素,偏酸性的环境更有利于 *T. viride* 生长,同时钾离子可能有助于 *T. viride* 菌丝生长。通过单因素试验和响应面法优化试验,得到 *T. viride* 培养基的二次多项式回归模型为 $Y = 74.70 + 0.064X_1 - 0.29X_2 + 1.44X_3 + 0.27X_1X_2 - 0.85X_1X_3 - 0.78X_2X_3 - 1.35X_1^2 + 0.21X_2^2 + 0.24X_3^2$ 。经模型方差分析显示,该模型

较好地反映了 3 个因素对 *T. viride* 菌落生长的影响,影响大小为磷酸二氢钾添加量 > 丙氨酸添加量 > 葡萄糖添加量。在本试验中, *T. viride* 培养基为: 马铃薯培养基中添加葡萄糖 2.11 g/dL、丙氨酸 0.15 g/dL、磷酸二氢钾 0.30 g/dL,在此条件下培养 2 d 的 *T. viride* 菌落生长直径为 78.00 mm,与预测值 77.87 mm 接近(CI>95%)。本试验对于绿色木霉培养基组成的研究,有利于得到生长较好的绿色木霉,但有关绿色木霉的抑菌机制及其代谢产物的成分结构还有待于进一步研究。

参考文献(References):

- [1] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 493–494.
- [2] Abolade A A, Chris A O, Awo M A. Control of postharvest rots of banana fruits by conidia and culture filtrates of *Trichoderma asperellum* [J]. **Journal of Plant Protection Research**, 2009, 49(3): 302–308.
- [3] 于新, 田淑慧, 徐文兴, 等. 木霉菌生防作用的生化机制研究进展[J]. 中山大学学报, 2005, (2): 86–90.
YU Xin, TIAN Shu-hui, XU Wen-xing, et al. Progress in the biochemical mechanisms of biocontrol effect research with *Trichoderma* [J]. **Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni**, 2005, (2) 86–90. (in Chinese)
- [4] Mark R M, Kasten D, Robert L J, et al. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biological control of *Fusarium oxysporum* in container-grown Douglas fir seedlings [J]. **New Forests**, 1998, (1): 11–21.
- [5] 吴利民, 陆宁海, 郎剑锋, 等. 哈茨木霉 TR-12 对番茄褐斑病菌的拮抗作用[J]. 西北农业学报, 2006, (6): 186–188.
WU Li-min, LU Ning-hai, LANG Jian-feng, et al. Antagonism of *Trichoderma harzianum* strain TR-12 against *Helminthosporium carposaprum* [J]. **Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica**, 2006, (6): 186–188. (in Chinese)
- [6] 姜绪林, 孙瑶, 杨毅, 等. 绿色木霉固态发酵纤维素酶生物量的测定及发酵培养基的初步优化[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(3): 101–105.
JIANG Xu-lin, SUN Yao, YANG Yi, et al. *Trichoderma viride* biomass assay in the solid fermentation of cellulase and the preliminary optimization of the medium [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(3): 101–105. (in Chinese)
- [7] Farkas V, Labudova I, Ferenczy L. Preparation of mutants of *Trichoderma viride* with increased production of cellulase [J]. **Folia Microbiol**, 1981(26): 129–132.
- [8] Wilhelm M, Sahm H. Purification and characterization of two extracellular β -glucosidases from *Trichoderma viride* ITCC 1433 [J]. **Acta Biotechnol**, 1986(6): 115–121.
- [9] Gupta M N, Guoqiang D, Kaul R, et al. Purification of xylanase from *Trichoderma viride* by precipitation with an anionic polymer Eudragit S 100 [J]. **Biotechnol Techniques**, 1994, (8), 117–122.
- [10] 宋漳, 陈辉. 绿色木霉对土传病原真菌的体外拮抗作用[J]. 福建林学院学报, 2002, (3): 219–222.
SONG Zhang, CHEN Hui. In vitro antagonism of *Trichoderma viride* against the soilborne fungal pathogens [J]. **Journal of Fujian College of Forestry**, 2002, (3): 219–222. (in Chinese)
- [11] 王勇, 王万立, 刘春艳, 等. 绿色木霉 Tr9701 对多种病原菌的抑制作用及其抑病机理[J]. 中国农学通报, 2008, (1): 371–374.
WANG Yong, WANG Wan-Li, LIU Chun-yan, et al. The study on inhibition activities and mechanisms of *Trichoderma viride* Tr9701 [J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**, 2008(1): 371–374. (in Chinese)