

# Optimization of Preparation Process and Industrial Preparation of *Trichoderma viride* Strain

Guofu Yan\*, Baocheng Li, Ning Zhao, Panke Yang, Jie Tang

Beijing Leili Marine Bioindustry Inc., Beijing

Email: \*39129557@qq.com

Received: Sep. 7<sup>th</sup>, 2018; accepted: Sep. 23<sup>rd</sup>, 2018; published: Sep. 30<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

In the industrial production of *Trichoderma viride*, the storage cycle of the producing strain is too short, the strain is more serious, the color of the spore is shallow, the yellow green is changed, the process of seed production is too long and the quality of the final product is affected. Based on the original formula, the fermentation process was optimized by orthogonal experiment and verification experiment. Finally, the optimum fermentation medium of solid seed was determined: millet 35%, corn flour 25%, seaweed active powder 10%, bran 30%, and inorganic salt 0.8%. In the above optimized solid medium of *Trichoderma* green, the color of conidia changed from light green to dark green, and the maximum yield of conidia could reach  $7.7 \times 10^9/g$  (dry culture). The results showed that the optimized mycelium content was 1.25 times higher than that of the original mycelium in 300 L liquid fermentor at 30 h fermentation period.

## Keywords

*Trichoderma viride*, Solid Fermentation, Inoculum Size, Sporulation, Mycelium

# 绿色木霉菌种制备工艺优化与工业化制备考察

严国富\*, 李宝成, 赵宁, 杨攀科, 汤洁

北京雷力海洋生物新产业股份有限公司, 北京

Email: \*39129557@qq.com

收稿日期: 2018年9月7日; 录用日期: 2018年9月23日; 发布日期: 2018年9月30日

\*通讯作者。

## 摘要

在绿色木霉活菌制剂的工业化生产中, 生产菌种的保存周期过短, 菌种退化较为严重, 斜面孢子颜色变浅、向黄绿转变, 制种工艺流程过长, 影响最终产品质量。本实验基于原配方工艺, 通过正交实验及验证实验等方法对发酵工艺进行优化, 最终确定最佳固体种子发酵培养基组成: 小米35%, 玉米粉25%, 海藻活性粉10%, 麸皮30%, 无机盐0.8%。在上述优化的绿色木霉固体培养基中, 分生孢子颜色由浅绿转为深绿, 分生孢子最大产量可达到 $7.7 \times 10^9$ 个/克(干培养物)。经实验证明, 300 L液体发酵罐生产时的菌丝体在发酵周期30 h时, 优化后的菌丝含量是优化前儿的1.25倍。

## 关键词

绿色木霉, 固体发酵, 接种量, 产孢量, 菌丝体

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

目前以农业可持续发展为旨的植物病虫害生物防治[1] [2] [3], 在农业生产中起着越来越重要的作用。绿色木霉菌(*Trichoderma viride*)是一类具有重要经济意义的生防有益菌, 对多种引发土传病害的病原菌具有抑制作用, 其作用机制已得到广泛深入的研究和报道, 但是对其规模化生产的应用技术相关报道较少。目前生产的木霉菌剂多为分生孢子制剂, 通常采用固体发酵或液[4]、固两相发酵生产, 孢子产量被作为衡量发酵优劣的核心指标。固态发酵[5] [6] [7] [8] [9]是获得大量真菌孢子的最好方法, 通过固态发酵产生的孢子质量较高。孢子在干燥或紫外照射等环境下的抵抗性更强, 贮存后孢子的存活率较高, 并且发酵产品干燥后可直接制备成菌剂, 工艺流程短, 工艺环节少, 生产成本更低, 产品质量更可靠[10]。在实际生产过程中绿色木霉生产比较繁琐, 特别是在液、固两相发酵的生产过程中, 通常是通过2%~3%液体种子或大量的克氏瓶斜面种子接种液体发酵罐后, 接种固体培养基进行固体发酵生产绿色木霉制剂。

## 2. 实验材料与方法

### 2.1. 实验材料

供试菌株: 经中国科学院微生物研究所鉴定为绿色木霉(*Trichoderma viride*), 菌株编号: LLM-001。

PDA 培养基[11] ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、23 g 琼脂。121℃灭菌 30 min, 备用。

液体培养基( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 北京雷力海洋生物新产业股份有限公司自制。

固体培养基( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 北京雷力海洋生物新产业股份有限公司自制。

### 2.2. 实验仪器

DT2000A 型电子天平(江苏省常熟市意欧仪器仪表有限公司)

高压灭菌锅(江阴滨江医疗设备有限公司, LS-B35L-1 型)

单人净化工作台(北京利康达科技发展有限公司, SW-CJ-1D 型)

恒温培养箱(北京永光明医疗仪器有限公司, DHP-500 型)

显微镜(重庆市奥普光学仪器有限公司, UB100i)  
恒温振荡器(太仓豪诚实验仪器制造有限公司, THZ-D;TCYQ)  
离心机(上海安亭科学仪器厂, TDL-40D)

### 2.3. 实验试剂

葡萄糖(北京化工厂)  
琼脂粉(石狮市环球琼胶工业有限公司)  
硫酸镁(北京化工厂)  
磷酸氢二钾(北京化工厂)

### 2.4. 实验方法

1) 菌种活化。将 PDA [11]培养基均匀分装在试管中, 于 121℃ 灭菌 30 min, 冷却至室温, 摆置成斜面, 在超净工作台上无菌操作接 4℃ 保藏的绿色木霉菌种, 29℃ 培养, 培养时间为 7 d。

2) 液体种子培养。使用 250 ml 量筒将 200 ml 液体培养基分装入 500 ml 三角瓶中, 于 121℃ 灭菌 30 min, 冷却至室温后接入活化菌种, 置于恒温振荡器中 29℃ 180 r·min<sup>-1</sup> 下培养 24 h。

3) 孢子制备。将 PDA 培养基分装约 70 ml/250ml 克氏瓶中, 于 121℃ 灭菌 30 min, 冷却至室温, 在超净工作台上无菌操作接种后, 置于 29℃ 恒温培养箱静置培养 7 d, 用刮下斜面孢子使用无菌水制成孢子悬液, 经实验室血球计数检测结果为: 平均每个克氏瓶的孢子总数约为 150 亿个。

4) 根据正交表设计的 4 种固体培养基。麸皮、海藻活性粉、玉米粉、稻壳组分称量并搅拌均匀, 定量装入 500 ml 三角瓶中, 于 121℃ 灭菌 1 h, 接入培养周期 24 h 的液体种子, 置于恒温培养箱中 29℃ 静置培养, 每日翻动一次三角瓶, 发酵 5 d 后取出, 干燥后测定孢子数量。

5) 三角瓶摇床实验验证, 液体培养基 200 ml 经 250 ml 量筒分装 500 ml 三角瓶中, 于 121℃ 灭菌 30 min, 根据各处理的接种量接种发酵。

处理 1 (对照)液体种子接种量 0.015%;  
处理 2 正常液体接种量 2%;  
处理 3 正常固体克氏瓶接种量约 2250 个/ml;  
处理 4 固体孢子接种量 0.015%;

于 29℃ 180 r·min<sup>-1</sup> 摇床上培养。离心机 4000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min 离心去上清液, 万分之一天平精确称量, 按不同发酵周期检测单位体积的菌丝体湿重。

6) 车间液体发酵罐发酵验证。

## 3. 结果和分析

### 3.1. 固体培养基配方选择

提提培养基以麸皮为氮源发酵培养基[12] [13] [14] [15]的最佳有机氮源, 玉米粉与麸皮的水平比例为 1:1 [5] [6] [7] [8], 另外添加硫酸镁、碳酸钙 0.8%, pH 值自然。本实验以原有固体培养基配方为基础, 通过正交设计优化固体培养基组分麸皮、玉米粉、细稻壳、海藻活性粉的含量, 选择最佳含量(表 1)。

通过正交设计实验设计结果如表 2。

试验目的找出试验结果因素影响的主次顺序, 从表 2 的极差 R 的大小顺序排除的因素的主次顺序为:  
主→次

C、A、B、D

**Table 1.** Factor level  
**表 1.** 因素水平

因素	水平		
	1	2	3
A 小米	25%	30%	35%
B 玉米粉	20%	25%	30%
C 海藻活性粉	10%	15%	20%
D 麸皮	20%	25%	30%

**Table 2.** Orthogonal design table  $L_9 (3^4)$   
**表 2.** 正交设计表  $L_9 (3^4)$

试验号	列号	1	2	3	4	固体发酵物中的孢子数目 $10^9$ 个/克
1		A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	4.2
2		A <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	3.5
3		A <sub>1</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>3</sub>	1.2
4		A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	4.4
5		A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	1.9
6		A <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	5.6
7		A <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>2</sub>	2.5
8		A <sub>3</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	7.7
9		A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	6.3
T1		8.9	11.1	17.5	12.4	
T2		11.9	13.1	14.2	11.6	T = 37.3
T3		16.5	13.1	5.6	13.3	
R		7.6	2.0	11.9	1.7	

最优化培养基组分为： $A_3B_2C_1D_3$  和  $A_3B_3C_1D_3$ ，根据原料成本优先选择  $A_3B_2C_1D_3$  作为生产配方。

### 3.2. 正交实验数据结果方差分析

方差来源	$S_j$	$f_j$	$\frac{S_j}{f_j}$	$F = \frac{S_j/f_j}{S_e/f_e}$	显著性
A	9.76	2	4.88	20.77	显著
B	0.88	2	0.44	1.87	不显著
C	25.15	2	12.58	53.51	显著
D	0.47	2	0.24	1	不显著

查表  $F_{0.05}(2,2) = 19.00$   $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ ，故因素 C、A 作用显著，因素 B、D 作用不显著，与前面极差分析结果一致。

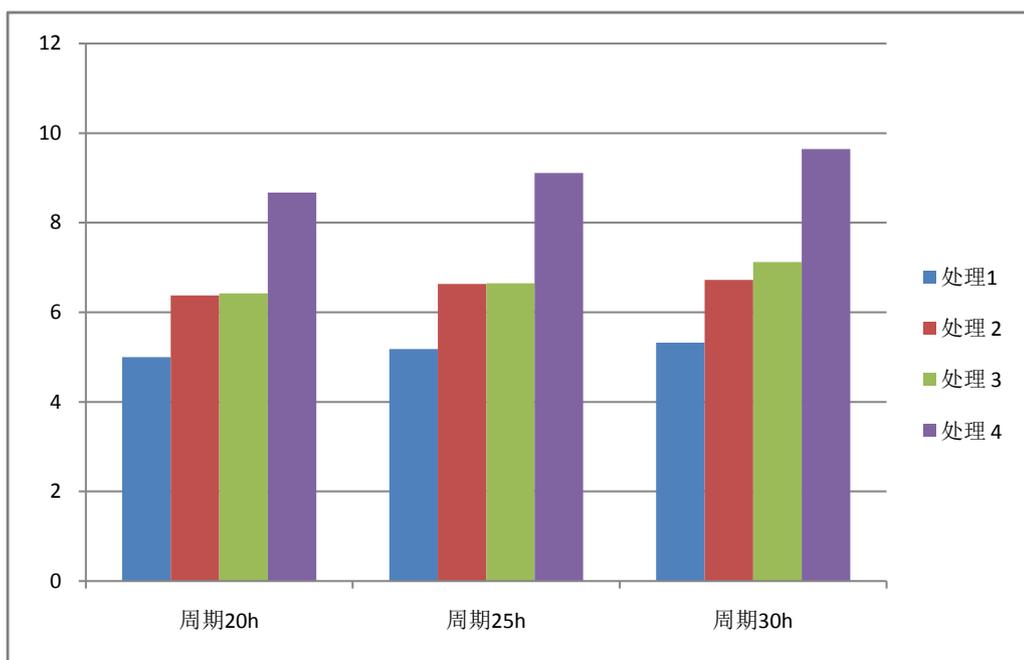
### 3.3. 实验验证

- 1) 摇瓶实验，通过 200 ml/500ml 三角瓶摇瓶培养后同发酵周期取样菌丝体含量检测结果，见表 3。
- 2) 三角瓶摇瓶实验，不同发酵周期检测菌丝体湿重(g/40ml)，直方图见图 1。
- 3) 优化菌种工艺通过 300 L 种子罐发酵验证，与原工艺发酵周期菌丝体含量检测对比结果，见表 4。

**Table 3.** Triangle bottle shake bottle culture experiment verification test results summary

**表 3.** 三角瓶摇瓶培养实验验证检测结果汇总

结果 \ 周期	20h	25h	30h
处理 1	5.23 g/40ml	5.30 g/40ml	5.52 g/40ml
处理 1	4.97 g/40ml	5.14 g/40ml	5.03 g/40ml
处理 1	4.87 g/40ml	5.11 g/40ml	5.41 g/40ml
处理 2	6.12 g/40ml	6.46 g/40ml	6.41 g/40ml
处理 2	6.72 g/40ml	7.08 g/40ml	7.13 g/40ml
处理 2	6.30 g/40ml	6.35 g/40ml	6.61 g/40ml
处理 3	6.90 g/40ml	6.65 g/40ml	7.06 g/40ml
处理 3	6.05 g/40ml	6.53 g/40ml	7.17 g/40ml
处理 3	6.30 g/40ml	6.78 g/40ml	7.13 g/40ml
处理 4	8.95 g/40ml	9.41 g/40ml	9.52 g/40ml
处理 4	8.30 g/40ml	8.51 g/40ml	9.89 g/40ml
处理 4	8.75 g/40ml	9.41 g/40ml	9.52 g/40ml



**Figure 1.** Detection of hypha wet weight by different fermentation periods

**图 1.** 不同发酵周期检测菌丝体湿重

**Table 4.** 300 L seed tank experiment verification test results summary**表 4.** 300 L 种子罐实验验证检测结果汇总

结果 \ 周期	20 h	25 h	30 h
1 批	6.23 g/40ml	7.30 g/40ml	7.52 g/40ml
2 批	6.97 g/40ml	7.14 g/40ml	8.03 g/40ml
3 批	6.87 g/40ml	7.11 g/40ml	8.41 g/40ml
4 批	9.05 g/40ml	9.41 g/40ml	9.82 g/40ml
5 批	9.30 g/40ml	9.51 g/40ml	10.12 g/40ml
6 批	9.75 g/40ml	9.71 g/40ml	9.92 g/40ml

#### 4. 结论

本实验通过正交实验固体发酵制种提高单位物质的孢子数量,优化后的固体培养基组分为:小米 35%,玉米粉 25%,海藻活性粉 10%,麸皮 30%,分生孢子的最大产量可达到  $7.7 \times 10^9$  个/克(干培养物)。本实验优化后的工艺缩短了菌种员在菌种制备、菌种纯度验证以及车间种子罐接种的工作量,制种、验证和接种时间由原来的 2 h 减少至 25 min,并且有效控制了菌种的同步性,使得种子罐发酵时绿色木霉孢子的萌发时间统一、菌丝体对数生长期基本一致,同时尽可能的降低染菌几率。通过液体摇瓶验证菌丝体含量明显提升,特别是车间 300 L 的液体发酵罐生产应用数据表明,将接种量由原来的液体菌种 2% 或克氏瓶斜面种子 12 个,改进为现在固体菌种接种量为 0.015% 后,液体发酵在发酵周期 30 h 时的菌丝体含量较原工艺同时期的菌丝体含量提升了 1.25 倍。本优化工艺可大幅度提高工业化生产效率。

#### 参考文献

- [1] 王刚,沈永红,刘凤英,等.绿色木霉 TW-3 菌株对绿豆立枯病的生物防治[J].河南大学学报,2007,37(6):622-625.
- [2] 周红姿,李宝聚,刘开启,等.绿色木霉对黄瓜灰霉病的防治作用[J].北方园艺,2003(5):64-65.
- [3] Liu, S.W. and Guo, Z.J. (2004) Construction of Biological Control Strain of *Trichoderma viride* and Study of Their Ability to Induce Plant Disease Resistance. *Journal of Zhejiang University*, No. 4, 416-417.
- [4] 冯卫华,黄东升,蒋雨,等.绿色木霉菌液态培养条件的定向控制[J].中国食品学报,2011,11(6):84-88.
- [5] 林元山,张曙光,梁智群.绿色木霉菌固态发酵稻草秸秆产纤维素酶的研究[J].湖南农业科学,2007(3):46-48.
- [6] 刘时轮,李勇,傅俊范,等.绿色木霉株 Tv04-2 固体发酵条件研究[J].华北农学报,2008,23(增刊):244-247.
- [7] 张良,纪明山,张玉芬,等.绿色木霉 TR-8 发酵工艺条件筛选[J].沈阳农业大学学报,2005,36(4):494-496.
- [8] 王英姿,祁之秋,魏松红,等.绿色木霉菌固体发酵培养基优化组合正交筛选[J].植物保护,2007,33(2):61-63.
- [9] Bai, Z.H., Jin, B., Li, Y.J., et al. (2008) Utilization of Winery Wastes for *Trichoderma viride* Biocontrol Agent Production by Solid State Fermentation. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 353-358. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)60055-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)60055-8)
- [10] 夏斯琴,王伟.绿色木霉 T4 的固体发酵工艺及其制剂稳定性的研究[J].化学与生物工程,2008,25(12):52-56.
- [11] 董义伟,李大平,等.纤维素酶的固态发酵及酶学性质的研究[J].天然产物研究与开发,2007(19):393-395,409.
- [12] 肖龙龙,张崇玉,付责中.绿色木霉产孢条件的优化[J].山地农业生物学报,2012,31(1):36-39.
- [13] 刘霞,王燕,安磊,等.绿色木霉发酵条件的优化[J].中国食品添加剂,2009(3):100-103.
- [14] 刘颖,张玮玮,王馥.绿色木霉产纤维素酶发酵条件的研究[J].食品工业科技,2008,29(3):128-130.
- [15] 黄雪莲,于新.响应面优化绿色木霉培养基[J].食品与生物技术学报,2011,30(5):740-744.

**知网检索的两种方式：**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[amb@hanspub.org](mailto:amb@hanspub.org)