

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2026.05.014

哈茨木霉 CBS226.95 的分离鉴定及产几丁质酶工艺优化

宋 武, 苗 敏, 祝红艳, 吴子睿, 徐 雨

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘 要:在植物病害的防治中,生物防治具有安全和环保的优点,丝状真菌哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)及其近缘种能抑制多种植物病原菌的生长。文章从腐烂的猕猴桃果实中获得一株分离菌株 CBS226.95,并对分离株进行体外拮抗试验,通过形态学及 *ITS*、*BenA* 和 *TEF1* 多基因序列方法对分离株进行鉴定,以单因素实验和响应面试验设计对菌株几丁质酶生产的发酵条件进行优化。结果显示,分离株能够抑制葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、拟茎点霉菌(*Diaporthe*)和灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的生长,抑制率分别为 45.35%、44.99%、47.31%。综合形态学特征和系统发育分析结果可确定菌株 CBS226.95 为哈茨木霉。单因素实验和响应面试验分析结果发现,菌株 CBS226.95-4 发酵的最适碳源为葡萄糖,最适氮源为蛋白胨,最佳发酵条件为培养温度 33.23 °C、培养时间 4.11 d、pH 值 6.108。该菌株的分离鉴定及发酵条件优化为木霉的生防应用和几丁质酶的工业化生产提供了技术支持。

关键词:分离鉴定;哈茨木霉菌;几丁质酶;发酵优化

中图分类号:Q93

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2026)05-0669-10

Isolation and identification of *Trichoderma harzianum* CBS226.95 and optimization of the process for the production of chitinase

SONG Wu, MIAO Min, ZHU Hongyan, WU Zirui, XU Yu

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: In the plant disease management, biological control offers distinct advantages in terms of safety and environmental friendliness. Filamentous fungi such as *Trichoderma harzianum* and its related strains exhibit broad-spectrum inhibitory effects against various plant pathogens. A fungal strain CBS226.95 was isolated from decayed kiwifruit and evaluated through *in vitro* antagonist assays. The strain identification was confirmed through morphological features and sequencing information of multiple genes, including *ITS*, *BenA*, and *TEF1*. Subsequently, fermentation conditions of CBS226.95 were optimized to improve chitinase production by employing a one-factor-at-a-time approach followed by a response surface methodology design. The results demonstrated that CBS226.95 significantly inhibited the growth of plant pathogens *Botryosphaeria dothidea*, *Diaporthe*, and *Botrytis cinerea*, exhibiting inhibition rates of 45.35%, 44.99%, and 47.31%, respectively. Through a comprehensive integration of morphological traits and phylogenetic analyses, CBS226.95 was identified as *Trichoderma harzianum*. The one-factor-at-a-time and response surface experiments revealed glucose as the optimal carbon source and peptone as the preferred nitrogen source for increasing fermentation efficiency of CBS226.95-4. Additionally, the most favorable fermentation conditions were determined to be a temperature of 33.23 °C, a duration of 4.11 days, and a pH level of 6.108. The isolation, identification, and optimization of fermentation conditions of *Trichoderma harzianum* CBS226.95-4 provide technical support for the biocontrol application of *Trichoderma* and the industri-

收稿日期:2024-03-14;修回日期:2024-04-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31970345)

作者简介:宋 武(1997—),男,安徽六安人,合肥工业大学硕士生;

苗 敏(1982—),女,山西曲沃人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:minmiao@hfut.edu.cn.

al production of chitinase.

Key words: isolation and identification; *Trichoderma harzianum*; chitinase; fermentation optimization

木霉菌因其具有抑制病原菌并促进植物生长的作用,在农业生长和病害防治中广泛应用^[1]。生防木霉菌属可以抑制包括镰刀菌、菌核病菌、灰霉菌等多种植物病原真菌和卵菌的生长^[2-4]。木霉菌属主要通过以下 4 种机制发挥抑制作用:① 竞争作用,木霉菌与病原菌竞争营养物质(如碳、氮和铁)或占据空间^[5];② 重寄生作用,木霉菌寄生于病原菌菌丝上,并产生木霉孢子将病原菌全部覆盖^[6];③ 产生抗菌类物质,木霉菌产生挥发性或不挥发性的抗生素物质(如肽类)来抵抗病原菌^[7];④ 产生细胞壁溶解酶类,木霉菌分泌各种降解酶来破坏病原菌细胞壁^[8]。此外,木霉菌属还可以通过诱导植物抗性反应间接预防病原菌感染^[9]。哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)因其更有效的抑菌能力,成为植物病害管理中最常使用的木霉菌种之一^[10],哈茨木霉通过多种机制作用于病原菌发挥抑制作用,几丁质酶活性是其抗真菌行为过程中的必要方面之一^[11],已被用于生产二十多种商业推广生物防治剂^[12]。

木霉可以合成多种胞外次级代谢产物以实现其抑菌作用,其中分解病原菌细胞壁成分的降解酶(几丁质酶、葡聚糖酶、蛋白酶、纤维素酶和木聚糖酶)在拮抗作用中起重要作用。几丁质是大多数真菌细胞壁的主要组成部分^[13],木霉菌属的几丁质溶解系统包括多种几丁质酶^[14]。已明确的哈茨木霉的胞外几丁质酶包括 Chit42、Chit33 和 Chit46^[15-17],它们以其分子量命名,纯化或异源表达的上述 3 种几丁质酶能有效地抑制植物病原真菌的生长^[18]。因此,木霉菌的抑制活性与其产生胞外细胞壁降解酶的能力呈正相关^[19],增强真菌细胞壁降解酶的能力可以提高木霉菌的生物防治潜能。

近年来,涉及 Plackett-Burman 设计和响应面法(response surface methodology, RSM)等统计方法被广泛应用在过程和介质优化方面。这些方法也可用于使用最少的试验来分析各种物理化学参数之间的相互作用。Plackett-Burman 设计允许从大量变量中筛选出主要因素,并且可以在进一步优化中保留这些信息。RSM 是统计技术的集合,可用于设计试验、构建模型、评估不同因素的影响以及寻找所研究因素的最佳条件以获得理想的响应^[20]。据报道,碳源、氮源、接种物大小、初始 pH 值、温度和发酵时间等因素都会影响

产酶过程,从而影响产几丁质酶的效率。

本研究从腐烂猕猴桃样品中分离得到具有多种抑菌活性的内生真菌,通过形态学、分子生物学、进化树构建等方法鉴定其为哈茨木霉,命名为 *Trichoderma harzianum* CBS226. 95;并通过 Plackett-Burman 设计确定影响哈茨木霉 CBS226. 95-4 产几丁质酶的发酵条件变量,使用响应面方法进一步优化显著变量的水平。该研究为哈茨木霉 CBS226. 95-4 的生产应用提供了一定的理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试菌株有葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、拟茎点霉菌(*Diaporthe*)和灰霉菌(*Botrytis cinerea*),均由本实验室保藏;猕猴桃采购于商业种植果园,选取健康无伤果实;葡萄糖、琼脂、蛋白胨、氢氧化钠、六烷基三甲基溴化铵(CTAB)等均购于国药集团化学试剂有限公司;2×Taq 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) StarMix、DNA Ladder Mix Marker、PCR 引物、几丁质、N-乙酰-D-氨基葡萄糖(NAG)、35-二硝基水杨酸均购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 主要仪器

本实验所用仪器主要有:PK-S22 恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);ABI-2720 96 孔热循环 PCR 仪(Thermo Fisher Scientific Inc.);Multiskan Go 全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific Inc.);DA1-180M 生物显微镜(亚速旺(上海)贸易有限公司);MJX-100B-Z 微生物培养箱(上海博讯实业有限公司);ST20S pH 计(奥豪斯国际贸易(上海)有限公司)。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(去皮马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L)。去皮土豆切碎加入 600 mL 水,煮沸 15 min 后过滤,滤液中加入葡萄糖和琼脂,补水至 1 000 mL,121 °C 灭菌 20 min。

产酶培养基。培养基成分为葡萄糖 7 g/L,蛋白胨 2 g/L,营养盐溶液 50 mL,微量元素盐溶液 1 mL,115 °C 灭菌 30 min。营养盐溶液组成:

KH_2PO_4 20 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g/L; 微量元素盐溶液组成: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.6 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.7 g/L。

2%胶体几丁质的制备。取 2 g 几丁质溶解于 85%的磷酸溶液, 30 °C 孵育 36 h 至完全溶解, 加入去离子水形成不溶性胶体, 反复水洗胶体沉淀至中性, 加入 100 mL 去离子水待用。

3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂成分为: 酒石酸钠钾 91 g/L, 3,5-二硝基水杨酸 3.15 g/L, 氢氧化钠 20 g/L, 苯酚 2.5 g/L, 无水亚硫酸钠 2.5 g/L。棕色瓶中避光保存, 4 °C 保存 1 周后使用。

1.4 方法

1.4.1 菌株的分离方法

健康猕猴桃果实 4 °C 存储 4 个月, 软腐病果实经 75%无水乙醇表面消毒 10 s, 1%次氯酸钠消毒 1 min, 无菌蒸馏水冲洗 5 遍处理; 从腐烂的猕猴桃病健交界处切取小块带皮果肉并平铺在含有 0.05% (体积分数) 链霉素的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养; 25 °C 培养 5 d 后, 通过菌丝尖端培养法将菌落生长边缘的菌丝体转移至 PDA 平板中 25 °C 培养 1 周; 新生菌落通过菌丝尖端方法多次转移, 最终获得单菌落培养物。

1.4.2 体外拮抗试验

使用文献[21]方法评估分离株对病原菌葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、拟茎点霉菌(*Diaporthe*)和灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的拮抗作用。将 7 日龄分离株的菌饼(5 mm)放置在 PDA 平板上距外围 1 cm 处, 并将相同大小的 7 日龄测试病原菌的菌饼(5 mm)放置在分离株的对立侧。使用仅接种有病原菌(5 mm)的培养基作为对照, 每个处理重复 3 次。接种平板在(28±3) °C 下生长, 3 d 后测量菌丝的抑制率, 抑制率计算公式如下:

$$I = \frac{C-T}{T} \times 100\%,$$

其中: I 为抑制率; C 为对照中病原菌的径向生长长度; T 为病原菌在分离株存在下的径向生长长度。

1.4.3 菌株的鉴定

1) 形态学鉴定。分离纯化的单菌落转接至 PDA 培养基中, 灭菌盖玻片以 45°斜插入菌落边缘的 PDA 培养基, 以便菌丝体在盖玻片上延伸。25 °C 培养 3 d, 取出盖玻片, 显微镜观察菌丝的形态, 包括菌丝的大小、颜色、长度、分生孢子梗、瓶

梗、分生孢子等。

2) 分子生物学鉴定。分离纯化的单菌落转接至 PDA 中 25 °C 培养 7 d, 收集菌株菌丝, 液氮研磨, CTAB 法提取基因组 DNA。PCR 扩增获得菌株的内转录间隔区(ITS)、 β -微管蛋白(*BenA*)、翻译延伸因子 1 α (*TEF1*)的基因片段^[22-23]。PCR 扩增体系: 2×Taq PCR StarMix 25 μL , 模板 DNA 1 μL , 上、下游引物各 2 μL , 补无菌水到 50 μL 。PCR 扩增引物见表 1 所列, 扩增条件如下: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 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南京擎科生物科技有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 网站中进行比对分析, 在分析结果中选取同源性较高的相关序列进行多重序列比对, 并利用 MEGA7.0 软件中的邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物名称	引物序列
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG
BenA	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTGGC
TEF1	EF1-728F	CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCCTTACC

1.4.4 几丁质酶活的测定

对文献[24]方法进行改进, 通过测定胶体几丁质作为底物释放的还原糖来测定几丁质酶活性。1 mL 上清发酵液和 1 mL 底物(含有 500 μL 2% 胶体几丁质和 500 μL 的 50 mmol/L pH 值为 6.0 磷酸盐缓冲液)混合并在 37 °C 下孵育 60 min; 3 000 r/min 离心 10 min 后, 将 1 mL 上清液和 1 mL DNS 试剂混合并煮沸 15 min; 冷却后, 在 535 nm 测定产物 N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)的吸光度值。

使用文献[25]描述的方法构建 NAG 的标准曲线, 回归方程如下:

$$Y = 0.5044X - 0.024,$$

其中, Y 和 X 分别代表 A_{535} 和 NAG 物质的量。该方程的相关系数(r)为 0.998 9, 表明溶液中的 NAG 物质的量与 A_{535} 呈高度正相关。1 个单位的酶活性定义为在 1 min 内释放 1 μmol 的 NAG 所需的酶量^[26]。

1.5 产酶条件优化

实验前期通过诱变获得了一株高产几丁质酶的突变菌株 CBS226.95-4, 通过响应面优化进一

步提高其几丁质酶活力。

1.5.1 单因素实验

优化前发酵条件:哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 在 PDA 培养基活化培养至产生大量绿色孢子,血球计数板统计孢子活菌数量并将其稀释至 5×10^6 CFU/mL 待用。将 1 mL 分生孢子液接种至含有 50 mL 产酶培养基的 250 mL 三角瓶中,在 28 °C、180 r/min 震荡培养 4 d,即获得哈茨木霉的几丁质酶发酵原液。

通过 DNS 法测定不同发酵条件下菌株发酵液的几丁质酶活力,确定最佳发酵参数。采用“一次性”方法对物理和营养条件进行优化。在其他因素不变的情况下,对 8 种不同的碳源(5 g/L 的葡萄糖、胶体几丁质、蔗糖、果糖、半乳糖、木糖、麦芽糖和乳糖)、3 种有机氮源(2 g/L 的蛋白胨、牛肉膏和酵母粉)、3 种无机氮源(2 g/L 的硫酸铵、硝酸铵和氯化铵)进行了逐一评估,并评估了温度(24、28、32、36、40 °C)、时间(2、3、4、5、6 d)和 pH 值(4、5、6、7、8、9)对酶活性的影响。参数优化进行了 3 组独立实验,取其平均值为最终结果。

1.5.2 响应面优化试验

根据 Box-Behnken 试验设计原理,以 3 个显著影响因素(培养时间、培养温度和 pH 值)作为变量,每个因子分别设置低(-1)、中(0)和高(1) 3 个水平,采用三因素三水平进行响应面试验设计^[27],本文设计方案见表 2 所列。使用 Design-Expert 8.0.6 软件进行数据分析,确定产几丁质酶菌株 CBS226.95-4 的最佳产酶工艺。在最佳产酶条件下培养哈茨木霉菌株,测定其产生的几丁质酶的活力,验证响应面试验的优化结果。

表 2 Box-Behnken 试验设计

水平	因子		
	培养温度/°C	培养时间/d	pH 值
-1	28	3	5
0	32	4	6
1	36	5	7

1.6 数据处理

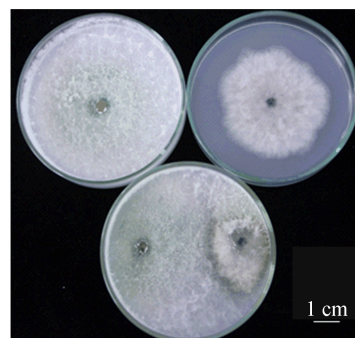
利用 MEGA7.0 软件构建系统发育树,用 Design-Expert 8.0.6 软件对响应面数据进行,分析采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件绘制图。

2 结果与分析

2.1 体外拮抗试验分析

大多数木霉菌株通过限制菌丝体扩增发挥强

效的抗真菌活性。分离株的体外拮抗试验如图 1 所示。



(a) 分离株与葡萄座腔菌拮抗试验



(b) 分离株与拟茎点霉菌拮抗试验



(c) 分离株与灰霉菌拮抗试验

图 1 分离株的体外拮抗试验结果

由图 1 可知,本研究的木霉分离菌株对葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、拟茎点霉菌(*Diaporthe*)和灰霉菌(*Botrytis cinerea*)这 3 种猕猴桃软腐病原真菌都具有抑制作用。

分离株对不同病原真菌的抑制率如图 2 所示。

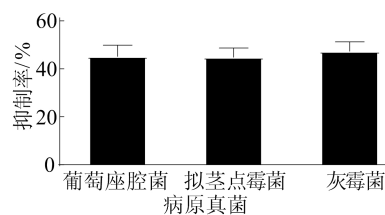


图 2 分离株对不同病原真菌的抑制率

由图 2 可知,分离株对葡萄座腔菌、拟茎点霉

菌、灰霉菌 3 种病原真菌抑制率分别为 45.35%、44.99%、47.31%，其中分离株对灰霉菌的抑制作用最高。拮抗试验表明木霉分离菌是一种有效的生防木霉菌种。

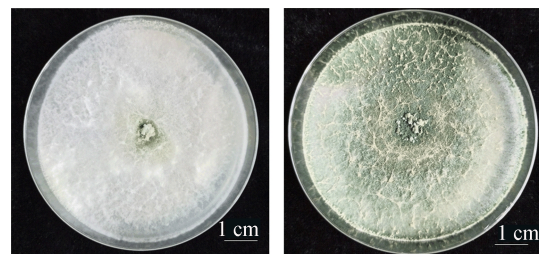
2.2 形态学鉴定结果分析

菌株 CBS226.95 在 PDA 培养基中培养的形态特征如图 3 所示。

由图 3 可知,菌株 CBS226.95 在 PDA 培养基中生长较快,培养 3 d 已扩展至整个平板,菌丝初始为白色,后逐渐变为绿色,培养至第 7 天时菌丝颜色呈现为深绿色,无明显气味。

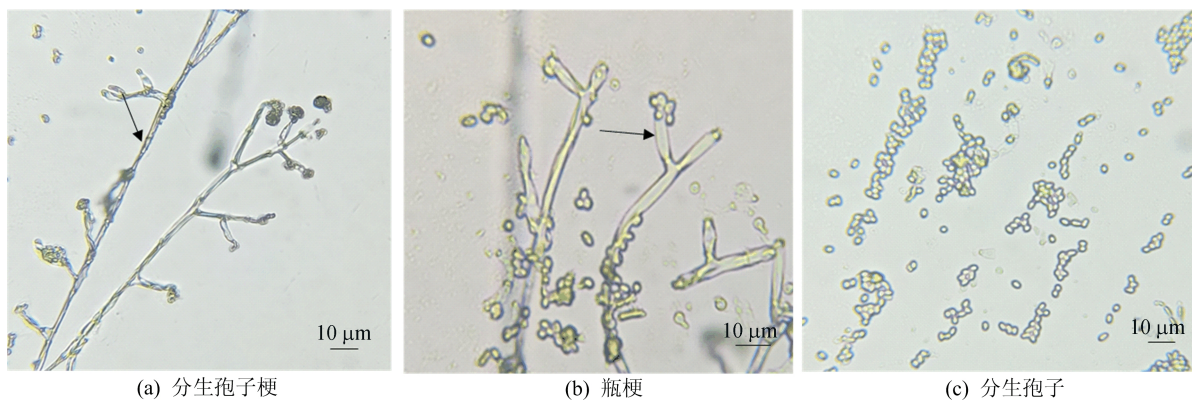
对分离株进行显微结构分析,结果如图 4 所示。由图 4 可知,该菌丝的分枝较多并向外延展,

形成分生孢子梗,分生孢子梗多为对称分布,分支角度较小,多为锐角,分支末端为产孢子的瓶状小梗。分生孢子着生在瓶状小梗的顶端,为绿色球形孢子。



(a) 生长 3 d 的菌落形态特征 (b) 生长 7 d 的菌落形态特征

图 3 菌落的形态特征



(a) 分生孢子梗

(b) 瓶梗

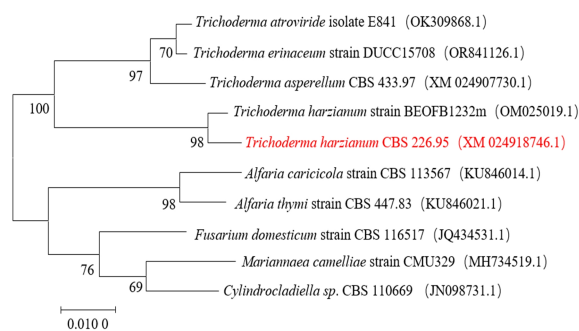
(c) 分生孢子

图 4 菌落的微观形态特征

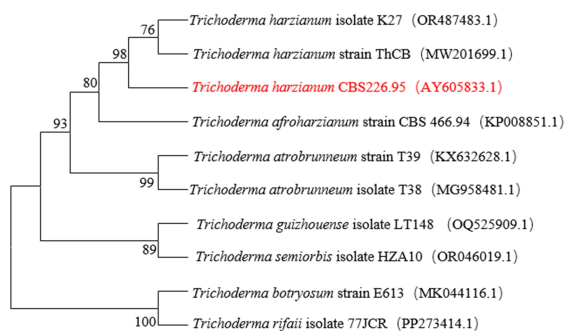
2.3 分子生物学鉴定结果分析

提取菌株 CBS226.95 的基因组 DNA,PCR 扩增获得 ITS 基因并测序,通过 NCBI 数据库中的 BLAST,发现其与木霉属 *Trichoderma harzianum* (MT378439.1)、*Trichoderma afroharzianum* (OM515014.1)、*Trichoderma lixii* (OR355825.1)、*Trichoderma aureoviride* (MF780863.1)、*Trichoderma asperellum* (MF408449.1) 的菌株相似性高达 100%。为了进一步确定该菌株,分别以真菌物种鉴定常用的 2 个基因 *BenA* 基因和 *TEF1* 基因构建系统发育树。构建的系统发育树如图 5 所示。

由图 5 可知:以 *BenA* 基因序列构建系统发育树,发现菌株 CBS 226.95 与 *Trichoderma harzianum* BEOFB1232m 以 98% 的自展支持率聚为一个分支;以 *TEF1* 基因序列构建系统发育树,发现菌株 CBS 226.95 与 K27 和 ThCB 共 2 株 *T. harzianum* 以 98% 的自展支持率聚为一个分支。综合形态学和系统发育分析确定菌株为哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)。



(a) *BenA* 基因序列构建的系统发育树



(b) *TEF1* 基因序列构建的系统发育树

图 5 菌株 CBS226.95 基于不同基因序列构建的系统发育树

2.4 产酶条件优化分析

2.4.1 单因素实验结果

哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 分泌几丁质酶的能力受培养基成分和培养条件的影响,本文探究了 5 种不同的单因素以确定本菌的最优产酶单因素参数。单因素实验结果如图 6 所示。图 6a 中:1 表示葡萄糖;2 表示胶体几丁质;3 表示蔗糖;4 表示果糖;5 表示半乳糖;6 表示木糖;7 表示麦芽糖;8 表示乳糖。图 6b 中:1 表示蛋白胨;2 表示酵母粉;3 表示牛肉膏;4 表示硫酸铵;5 表示硝酸铵;6 表示氯化铵。

由图 6a 可知,哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 各种碳源的培养基均可以产出几丁质酶,以葡萄糖作为碳源,发酵所得到的几丁质酶活最高,木糖次之,麦芽糖最差。因此,将葡萄糖作为哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 发酵摇瓶优化实验的碳源。

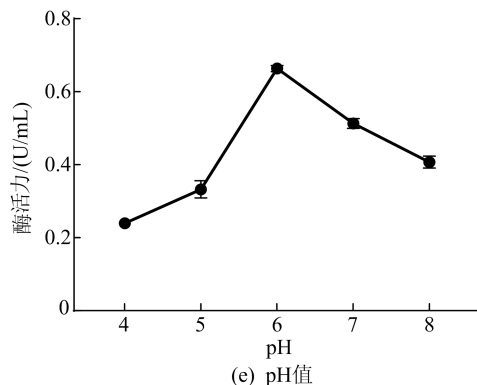
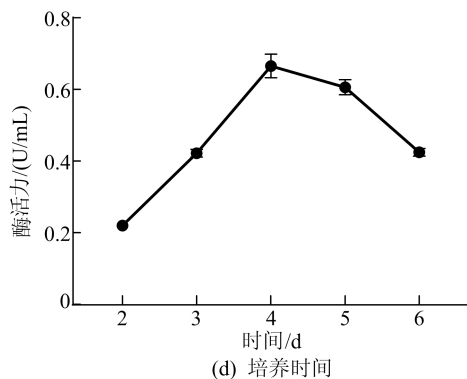
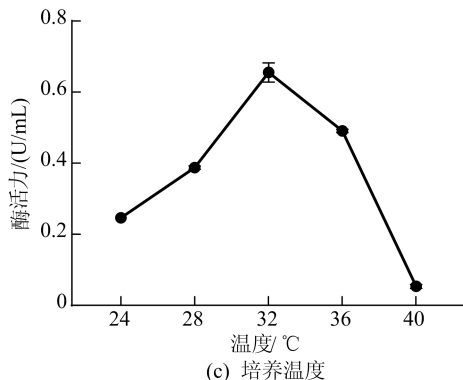
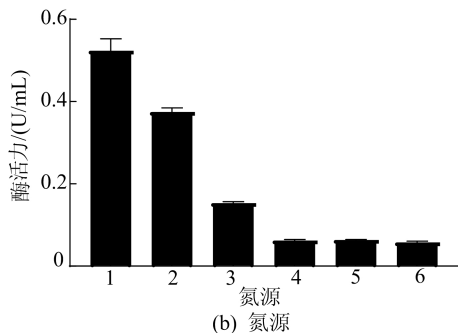
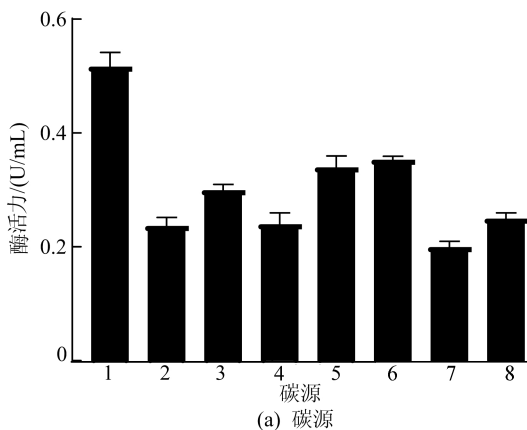


图 6 不同发酵条件对菌株产几丁质酶活力的影响

由图 6b 可知,不同氮源对哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 发酵产酶影响呈现出差异性,蛋白胨作为发酵氮源的几丁质酶活最高,酵母粉、牛肉膏次之,而硫酸铵、硝酸铵、氯化铵无机试剂作为唯一氮源的培养基几乎不能诱导哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 产出几丁质酶。因此,选择蛋白胨作为哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 摇瓶发酵条件优化的最佳氮源。

由图 6c 可知,温度对发酵的影响是多方面的,主要影响细胞生长、发酵液的性质、产物形成等。温度过低,菌丝生长慢且容易生成孢子,不利于产酶;温度过高则极易导致菌丝生长过快,迅速衰老。当培养温度在 24~32℃ 时,哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 的发酵液中的几丁质酶活力随温度升高而升高,当菌株培养温度高于 32℃ 时,几丁质酶活力开始降低。因此选择温度为 32℃ 作为最佳产酶温度。

由图 6d 可知,时间对哈茨木霉 CBS226.95-4 发酵产酶的影响较大,2~4 d 内,发酵液中几丁质酶活力逐渐升高。菌株培养 2 d 时,酶活力为 0.22 U/mL,而培养 4 d 时,酶活力达到峰值,酶活力为 0.65 U/mL,较 2 d 时上升了 2.93 倍。因此最佳培养时间选择 4 d。

由图 6e 可知,当发酵培养基中 pH 值为 5~7

时,菌株的发酵液中的产几丁质酶活力相对较高。当培养基的 pH 值为 4 或 8 时,几丁质酶活力较低,根据酶活力选择 pH 值为 6 作为最佳产酶条件。

2.4.2 响应面优化试验结果

几丁质酶产量的优化使用响应面分析法,根据单因素实验结果及前期试验,固定碳源为葡萄糖,氮源为蛋白胨。选择对几丁质酶产量影响较大的因素分别是培养温度、培养时间和 pH 值。中心组合设计水平、编码及试验结果见表 3 所列。

表 3 响应面分析方案及结果

试验号	培养温度/℃	培养时间/d	pH 值	酶活力/(U/mL)
1	28	3	6	0.41
2	36	3	6	0.48
3	28	5	6	0.46
4	36	5	6	0.58
5	28	4	5	0.31
6	36	4	5	0.44
7	28	4	7	0.41
8	36	4	7	0.51
9	32	3	5	0.34
10	32	5	5	0.41
11	32	3	7	0.48
12	32	5	7	0.42
13	32	4	6	0.65
14	32	4	6	0.66
15	32	4	6	0.64
16	32	4	6	0.68
17	32	4	6	0.67

各因素经过回归拟合,得到哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 产生几丁质酶的响应可以通过以下二次回归模型表示:

$$Y = 0.6600 + 0.0525A + 0.0200B + 0.0400C + 0.0125AB - 0.075AC - 0.0325BC - 0.0863A^2 - 0.0912B^2 - 0.1563C^2,$$

其中:Y 表示几丁质酶酶活力;A 表示培养时间;B 表示培养温度;C 表示 pH 值。

对二次回归模型进行方差分析(ANOVA),结果见表 4 所列。表 4 中, $R^2=0.9842$, $R_{adj}^2=0.9638$ 。

所建立的模型极显著($P<0.05$),表明该模型具有较高的可靠性,不存在失拟因素,没有明显的偏差。 F 值越大, P 值越低,测试因子对哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 几丁质酶产生的影响越大。A 和 C 的 P 值分别为 0.0003 和 0.0017,表明培养时间和 pH 值对哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 几丁质酶产生的影响极显著。B 的 P 值为 0.0434,

表明培养温度对哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 几丁质酶产生的影响显著。因此,3 个因子对几丁质酶产生的影响顺序从大到小依次为培养时间(A)、pH 值(C)、培养温度(B)。AB、AC 和 BC 这 3 个因子组合的 P 值分别为 0.3129、0.5349、0.0255,表明 AB、AC 组合对哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 几丁质酶产生的相互影响差异不显著。BC 组合对哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 几丁质酶产生的相互影响差异显著。 A^2 、 B^2 和 C^2 的 P 值均小于或等于 0.0001,表明 A、B、C3 个因子的二次项对哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 几丁质酶的产生有显著影响。

表 4 几丁质酶活性回归模型的方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.2301	9	0.2301	48.36	<0.0001	**
A	0.0220	1	0.0220	41.72	0.0003	**
B	0.0032	1	0.0032	6.05	0.0434	*
C	0.0128	1	0.0128	24.22	0.0017	**
AB	0.0006	1	0.0006	1.18	0.3129	
AC	0.0002	1	0.0002	0.4257	0.5349	
BC	0.0042	1	0.0042	7.99	0.0255	*
A^2	0.0313	1	0.0313	59.26	0.0001	**
B^2	0.0315	1	0.0315	66.33	<0.0001	**
C^2	0.1028	1	0.1028	194.48	<0.0001	**
剩余项	0.0037	7	0.0005			
失拟项	0.0027	3	0.0009	3.6	0.1239	不显著
纯误差	0.0010	4	0.0003			
总误差	0.2338	16				

注:*表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$ 。

不同因子之间的交互影响的三维曲面和等高线图如图 7 所示。

从图 7a 可以看出,当 pH 值处于最佳值 6.108 时,培养温度与培养时间之间的相互作用对酶活力的影响不显著($P=0.3129$),因为回归方程中的模型系数项 AB 是正符号,所以具有正向影响。观察等高线其形状大致为圆形,这反映了培养温度和培养时间对几丁质酶活力的影响相互独立。

从图 7b 可以看出,当培养时间处于最佳值(4.11 d)时,培养温度与 pH 值之间的相互作用对酶活性的影响不显著($P=0.5349$),但回归方程中模型项 AC 的负号,表明这 2 个因素的组合可能会对酶活性产生负面影响。

从图 7c 可以看出,当培养温度处于最佳值(33.23 ℃)时,培养时间与 pH 值对几丁质酶活力的交互影响是显著的($P=0.0255$),因为回归

方程中模型项 BC 为负号,所以对酶活性有负面影响。等高线的轮廓形状呈椭圆形,表明培养温度和 pH 值之间有交互作用。

根据软件 Design-Expert 8.0 的分析,可得出菌株哈茨木霉 CBS226.95-4 产几丁质酶的最优条件为培养温度 33.23 °C,培养时间 4.11 d, pH 值 6.108,在该最优条件下,预测的最佳几丁质酶活力为 0.067 13 U/mL。

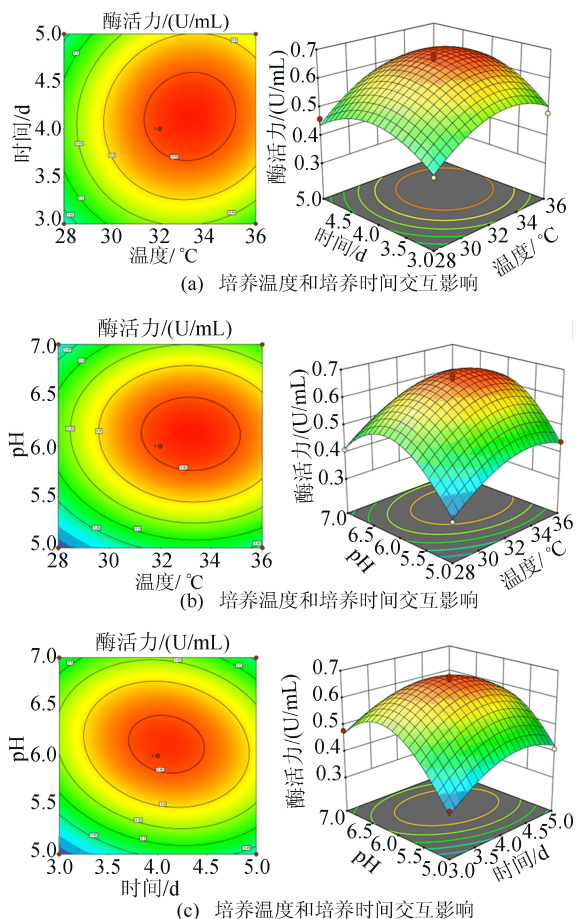


图 7 不同因子交互影响的三维曲面和等高线图

2.4.3 验证试验结果

在考虑到实际操作的基础上,对模型的准确性进行验证,将软件分析得出的最佳发酵条件调整为培养温度 33.2 °C,培养时间 4.1 d, pH 值 6.1。根据该条件进行验证性试验,得出最终产几丁质酶活力为 0.663 5 U/mL,与理论值的误差为 1.18%。表明试验结果与模型相符,证明该模型能较好地模拟和预测哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 产几丁质酶的发酵培养条件,且具有一定的实践指导意义。考虑微生物生产发酵的实际情况,采取发酵的条件为温度 33 °C,发酵时间 4 d 和 pH 值为 6。

3 讨 论

木霉菌在农业和病害防治中应用广泛,一些木霉菌可以作为酶、抗生素、植物生长促进剂和商业生物杀菌剂的来源,具有重要的经济价值。因此,木霉菌的准确鉴定是功能确定和推广应用的基础,传统鉴定方法主要基于形态学特征,但形态学特征的鉴定严重依赖于真菌学专业知识水平^[28],并且经常导致错误发生^[29]。因此,分子方法对于在物种水平上鉴定木霉菌至关重要。利用内转录间隔区(ITS)、DNA 导向的 RNA 聚合酶第一大亚基(RPB1)、 β -微管蛋白(*BenA*)和翻译延伸因子基因 1 α (*TEF1*)^[30-33]的基因序列特性,可以有效地鉴定真菌的菌属特性。*ITS* 基因座具有强大的 PCR 扩增能力和高分类覆盖率等优点,常被用于菌株物种鉴定的首选基因^[34],但是 *ITS* 基因在木霉属种间相对保守,通常难以区分亲缘关系较近的物种^[35]。使用 *ITS* 基因序列对本研究分离出的菌株 CBS226.95 进行分析,表明菌株的 *ITS* 序列与 *Trichoderma harzianum*、*Trichoderma afroharzianum*、*Trichoderma lixii* 序列相似度为 100%,无法确定种属特性。因此,对木霉菌物种的准确鉴定采取结合形态学特征和多基因分子系统发育分析。本研究利用 *BenA* 和 *TEF12* 个基因的信息,通过构建系统发育进化树对分离菌种进行联合鉴定,结果显示菌株 CBS226.95 与 BEOFB1232m、K27、ThCB 共 3 株 *T. harzianum* 聚为一个分支。综合形态学和系统发育分析确定菌株为哈茨木霉 CBS 226.95 (*Trichoderma harzianum*)。

木霉菌分泌的几丁质酶被认为在拮抗真菌活性中起重要作用^[36]。为了进一步提高本研究分离鉴定的哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 产几丁质酶的能力,研究优化了其发酵优化条件。通常,不同菌种生产几丁质酶的培养基不完全相同,培养基成分和培养条件的差异性影响几丁质酶的产生^[37-38]。使用基于试验设计的统计方法能够评估培养基组分和变量(如培养温度、培养时间、碳源和氮源等)对酶生产的影响,可以更好地理解被评估变量之间可能的相互作用。本研究建立的模型分析了碳源、氮源、培养温度、培养时间、pH 值对哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 产几丁质酶活性的影响。实验选择葡萄糖作为唯一碳源时,对哈茨木霉 CBS226.95-4 产生几丁质酶有着关键的影响,几丁质酶活力达到 0.516 U/mL,显著高于其他碳源对哈茨木霉

CBS226.95-4 产几丁质酶的影响。同样,氮源也是影响几丁质酶产生的最重要因素,实验显示蛋白胨为最合适的氮源,这与文献[39]研究结果一致。不同菌种的最适碳源、氮源类型不一定是相同的,黏质沙雷氏菌 G3-1 产几丁质酶的最适碳源为乳糖^[40],酸橙内生菌 Bt028 产几丁质酶的最适氮源为酵母粉^[41]。培养基成分和培养条件组合的统计优化可以极大改善菌种几丁质酶的产生,在过去的几十年中,尽管已有关于优化几丁质酶生产的研究^[42],但有关哈茨木霉的几丁质酶优化研究有限,限制了生防哈茨木霉的抗菌能力应用。本研究通过相应面优化系统,分析了哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 的最优产酶条件,为该菌株在拮抗病原真菌的应用中提供了技术信息。

本研究主要从菌株筛选、抑菌能力、发酵条件优化等方面进行了研究,虽然取得了一些初步成果,但对于哈茨木霉 CBS226.95-4 产几丁质酶发酵的优化体系能否在工业生产的发酵罐中进行扩大发酵培养,还需要对这些实验参数进行进一步探究,未来可进一步研究哈茨木霉菌株 CBS226.95-4 产几丁质酶的粗酶液的酶学性质,并可以对粗酶液进行分离纯化及对其分子量进行测定,从而获得纯化的几丁质酶。

[参 考 文 献]

- VERMA M, BRAR S K, TYAGI R D, et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp. panoply of biological control[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 37: 1-20.
- ERAZO J G, PALACIOS S A, PASTOR N, et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanut brown root rot caused by *Fusarium solani* RC 386[J]. Biological Control, 2021, 164: 104774.
- ZHANG F, GE H, GUO N, et al. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 100: 64-74.
- HEWEDY O A, ABDEL LATEIF K S, SELEIMAN M F, et al. Phylogenetic diversity of *Trichoderma* strains and their antagonistic potential against soil-borne pathogens under stress conditions[J]. Biology (Basel), 2020, 9: 189.
- GÜÇLÜ T, ÖZER N. *Trichoderma harzianum* antagonistic activity and competition for seed colonization against seed-borne pathogenic fungi of sunflower[J]. Letter Applied Microbiology, 2022, 74: 1027-1035.
- MUKHERJEE P K, MENDOZA-MENDOZA A, ZEILINGER S, et al. Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases[J]. Fungal Biology Reviews, 2022, 39: 15-33.
- HOU X, SUN R, FENG Y, et al. Peptaibols: diversity, bioactivity, and biosynthesis[J]. Microbiology Engineering Journal, 2022, 2: 100026.
- KUBICEK C P, MACH R L, PETERBAUER C K, et al. *Trichoderma*: from genes to biocontrol[J]. Plant Pathology, 2001, 83: 1123.
- WOO S L, HERMOSA R, LORITO M, et al. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture[J]. Natural Reviews Microbiology, 2023, 21(5): 312-326.
- RUSH T A, SHRESTHA H K, GOPALAKRISHNAN MEENA M, et al. Bioprospecting *Trichoderma*: a systematic roadmap to screen genomes and natural products for biocontrol applications[J]. Frontier Fungal Biology, 2021, 2: 716511.
- CARILLO P, WOO S L, COMITE E, et al. Application of *Trichoderma harzianum*, 6-pentyl- α -pyrone and plant biopolymer formulations modulate plant metabolism and fruit quality of plum tomatoes[J]. Plants, 2020, 9: 771.
- WOO S L, RUOCCO M, VINALE F, et al. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture[J]. Open Mycol, 2014, 8: 71-126.
- BROWN H E, ESHER S K, ALSPAUGH J A. Chitin: a "hidden figure" in the fungal cell wall[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2020, 425: 83-111.
- GHASEMI S, SAFAIE N, SHAHBAZI S, et al. The role of cell wall degrading enzymes in antagonistic traits of *Trichoderma virens* against *Rhizoctonia solani*[J]. Iranian Journal of Biotechnology, 2020, 18(4): e2333.
- WOO S, DONZELLI B, SCALA F, et al. Disruption of the ech42 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. Mol[J]. Plant-Microbe Interact, 1999, 12: 419-429.
- DE LAS MERCEDES DANA M, LIMÓN M C, MEJÍAS R, et al. Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum*[J]. Curr Genet, 2001, 38: 335-342.
- DENG J J, SHI D, MAO H H, et al. Heterologous expression and characterization of an antifungal chitinase (Chit46) from *Trichoderma harzianum* GIM 3. 442 and its application in colloidal chitin conversion[J]. International Journal of Biomolecules, 2019, 134: 113-121.
- WU Q, BAI L, LIU W, et al. Construction of a *Streptomyces lydicus* A01 transformant with a chit42 gene from *Trichoderma harzianum* P1 and evaluation of its biocontrol activity against *Botrytis cinerea*[J]. Microbiology, 2013, 51(2): 166-173.
- RAI S, KASHYAP P L, KUMAR S, et al. Identification, characterization and phylogenetic analysis of antifungal *Trichoderma* from tomato rhizosphere[J]. Springerplus, 2016, 5: 1939.
- RASTOGI N K, NGUYEN L T, JIANG B, et al. Improve-

- ment in texture of pressure-assisted thermally processed carrots by combined pretreatment using response surface methodology[J]. Food Bioprocess Technical, 2010, 3: 762-771.
- [21] DENNIS C, WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction[J]. Trans Br Mycol Soc, 1971, 57: 363-369.
- [22] LIU Q, LI S, LIANG C K, et al. Isolation and identification of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici*[J]. Microbiology China, 2019, 46(4): 741-751.
- [23] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553-556.
- [24] TOHARISMAN A, SUHARTONO M T, SPINDLER-BARTH M, et al. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2[J]. World Journal of Microbial Biotechnology, 2005, 21: 733-738.
- [25] 胡基华, 陈静宇, 曹旭, 等. 高产几丁质酶的粘质沙雷氏菌株的诱变选育[J]. 东北林业大学学报, 2016, 44(3): 106-109.
- [26] WANG D, LI A, HAN H, et al. A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes[J]. International Journal of Biology, 2018, 116: 863-868.
- [27] 黎英, 陈雪梅, 严月萍, 等. 超声波辅助酶法提取红腰豆多糖工艺优化[J]. 农业工程学报, 2015, 31(15): 293-301.
- [28] ALEXANDER B D, PFALLER M A. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses[J]. Clinical Infectious Diseases, 2006, 43: S15-S27.
- [29] SANGOI A R, ROGERS W M, LONGACRE T A, et al. Challenges and pitfalls of morphologic identification of fungal infections in histologic and cytologic specimens: a ten-year retrospective review at a single institution[J]. American Journal of Clinical Pathology, 2009, 131(3): 364-375.
- [30] BRUNS T D, WHITE T J, TAYLOR J W. Fungal molecular systematics[J]. Annu Rev Ecol Syst, 1991, 22(1): 525-564.
- [31] O'DONNELL K, ROONEY A P, PROCTOR R H, et al. Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria[J]. Fungal Genet Biology, 2013, 52: 20-31.
- [32] FRISVAD J C, SAMSON R A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*; a guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins[J]. Studies in Mycology, 2004, 49: 1-174.
- [33] JAMES T Y, KAUFF F, SCHOCH C L, et al. Reconstructing the early evolution of *Fungi* using a six-gene phylogeny[J]. Nature, 2006, 443(7113): 818-822.
- [34] LEAW S N, CHANG H C, SUN H F, et al. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(3): 693-699.
- [35] IRINYI L, SERENA C, GARCIA-HERMOSO D, et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database-the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi[J]. Med Mycol, 2015, 53(4): 313-337.
- [36] LIMON M C, PINTOR-TORO J A, BENITEZ T. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase[J]. Phytopathology, 1999, 89: 254-261.
- [37] DAHIYA N, TEWARI R, TIWARI R P, et al. Chitinase production in solid-state fermentation by *Enterobacter* sp. NRG4 using statistical experimental design[J]. Curr Microbiol, 2005, 51: 222-228.
- [38] OUZA R F, SOARES R M A, NASCIMENTO R P, et al. Effect of different carbon sources on endochitinase production by *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Curr Microbiol, 2005, 51: 16-21.
- [39] 鞠婷. 高产几丁质酶菌株 EBI-001 全基因组分析及发酵工艺优化[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020.
- [40] 郑家敏, 梁燕辉, 朱凡, 等. 高产几丁质酶菌株的诱变选育及发酵条件的优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 88-95.
- [41] 徐勤茜, 张泽宇, 陶雪婷, 等. 酸橙内生菌 *Bacillus thuringiensis* Bt028 产几丁质酶的发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2022, 43(11): 151-158.
- [42] SINGH A K, GHODKE I, CHHATPAR H S. Optimization of medium constituents for improved chitinase production by *Paenibacillus* sp. D1 using statistical approach[J]. Letter Applied Microbiology, 2009, 49: 708-714.

(责任编辑 闫杏丽)