



邢胜利,宋丽丽,张志平,等. 高产纤维素酶的里氏木霉液态发酵培养基条件优化[J]. 轻工学报,2022,37(1):20-25.
XING S L, SONG L L, ZHANG Z P, et al. Optimization of liquid-state fermentation medium conditions for high yield cellulase by *Trichoderma reesei* [J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(1): 20-25.
DOI:10.12187/2022.01.003

高产纤维素酶的里氏木霉液态发酵培养基条件优化

邢胜利¹, 宋丽丽^{2,3}, 张志平^{2,3}, 魏涛^{2,3}, 马歌丽^{2,3}, 邢进¹, 黎园¹, 杨旭^{2,3}

1. 江苏合拓环境技术有限公司, 江苏 无锡 214000;
2. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;
3. 郑州市代谢工程和系统生物学重点实验室, 河南 郑州 450001

摘要:以天然原料作为培养基主要成分,采用 Plackett-Burman (PB)、最陡爬坡和 Box-Behnken (BB) 试验设计及响应面 (RSM) 分析,对高产纤维素酶的里氏木霉液态发酵培养基进行优化。结果表明:最优发酵培养基条件为豆饼粉添加量 2.140%,麸皮添加量 1.88%,蛋白胨添加量 0.30%,在此条件下,里氏木霉发酵液中的纤维素酶活力可达 (42.62 ± 1.30) U/mL;发酵后期(5 d),随着里氏木霉菌丝体大量生长,纤维素酶活力不断提高;制备的纤维素粗酶液可降解玉米秸秆中的纤维素和半纤维素,产生游离的葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、纤维二糖等可发酵性糖。

关键词:里氏木霉;液态发酵;纤维素酶;发酵培养基

中图分类号:TS245.9;Q814 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2022)01-0020-06

0 引言

自然界存在的大量农业废弃物(如玉米秸秆、小麦秸秆、稻草、麸皮等)是转化生物基化学品(如乙醇、丁醇、L-乳酸等)的潜在原料^[1],其主要成分(如纤维素、半纤维素等)可被纤维素酶降解产生可发酵单糖(如葡萄糖、木糖等),并通过微生物发酵生产相应的产品^[2]。纤维素酶是由外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶组成的复合酶,通过协同催化作用将纤维素和半纤维素转化为可发酵性糖^[3]。同传统物化处理方式相比,纤维素酶水解纤维

素和半纤维素具有转化率高、副产物少、反应条件温和、能耗低等优点^[4]。目前,木质纤维类原料生化转化的主要问题是纤维素酶用量大且成本高^[5],如何降低纤维素酶的生产成本,是促进纤维素酶在多个领域更广泛应用的重要课题。业界普遍认为,里氏木霉是目前分泌纤维素酶能力最强的微生物,在纤维素酶发酵产业应用广泛^[6]。

培养基可为微生物的生长和代谢产物的形成提供必需的营养物质和能量,是影响发酵水平的关键因素^[7]。传统纤维素酶液态发酵多采用纯纤维素及其衍生物(如结晶纤维素、羧甲基纤维素钠或纸

收稿日期:2021-04-16

基金项目:河南省科技攻关计划项目(212102110310);河南省高等学校重点科研项目(20B416003);郑州轻工业大学博士启动科研基金项目(0123-13501050066)

作者简介:邢胜利(1981—),男,河南省信阳市人,江苏合拓环境技术有限公司工程师,主要研究方向为废水处理。E-mail:1065438771@qq.com

通信作者:杨旭(1982—),男,河南省信阳市人,郑州轻工业大学讲师,博士,主要研究方向为生物技术。E-mail:yangxu@zzuli.edu.cn

浆等)作为发酵培养基成分^[8-9]。为降低生产成本,近年来逐步出现了利用天然原料替代高成本工业产品用作发酵培养基成分产纤维素酶的报道,如利用豆饼粉、麸皮、甘蔗渣、橡木或各种农作物秸秆等进行发酵产酶,结果表明天然原料在纤维素酶生产上具有经济可行性^[10-11]。

基于此,本文以天然原料(豆饼粉、麸皮等)为培养基主要营养成分,采用 Plackett-Burman (PB)、最陡爬坡和 Box-Behnken (BB) 试验设计及响应面 (RSM) 分析对纤维素酶发酵培养基进行系统优化,并进行酶解验证,拟筛选影响纤维素酶活力的显著因素及其最适添加量,以期提高里氏木霉 Rut-C30 (*Trichoderma reesei* Rut-C30) 的发酵产酶水平,为纤维素酶的液态发酵生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

里氏木霉 Rut-C30, 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC)。

1.2 主要材料与试剂

蒸汽爆破玉米秸秆, 河南天冠集团有限公司产; 马铃薯、豆饼粉和麸皮, 购于郑州市某菜市场; 葡萄糖、尿素、蛋白胨、结晶纤维素、 KH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 CaCl_2 、 MgSO_4 、吐温 80、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 均为分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司产。

1.3 主要仪器与设备

LDZF-30KB-III 型高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂产; THZ-100 型摇床、TY2014003876 型无菌操作台, 上海一恒科学仪器有限公司产; TDL-5-A 型高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂产; Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技公司产; LIDA PHS-3C 型 pH 计, 上海理达仪器厂产; HH-S 型恒温水浴锅, 郑州科华仪器设备有限公司产; UV-2012PC 型紫外分光光度计, 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司产。

1.4 主要培养基及其培养条件

菌种保藏培养基: 马铃薯提取液 1.0 L, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 15.0 g, pH 值保持自然。马铃薯提取

液: 取去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加去离子水 1.0 L 煮沸 30 min, 滤去马铃薯块, 添加去离子水将滤液定容至 1.0 L。

种子培养基: 葡萄糖 10 g, 尿素 0.3 g, 蛋白胨 0.75 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, KH_2PO_4 2.0 g, CaCl_2 0.06 g, MgSO_4 0.06 g, 吐温 80 2 mL, 微量元素溶液 0.2 mL, 添加去离子水定容至 1 L, pH 值调至 5.50。微量元素溶液组成为: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.003 7 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 4 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001 6 g, 添加去离子水定容至 1 L。

产酶培养基: 将种子培养基中的葡萄糖换为结晶纤维素, 其他成分保持不变, 即得。

1.5 实验方法

1.5.1 粗酶液的制备 将里氏木霉 Rut-C30 菌株接种于菌种保藏培养基上, 于 28 °C 条件下培养 96 h 后, 用接种环刮取表面孢子并接入 100 mL 种子培养基 (250 mL 三角瓶) 中, 于 28 °C、175 r/min 条件下培养 46 h, 即得种子液; 将种子液以 5% 的接种量接入液体产酶培养基 (250 mL 三角瓶), 于 28 °C、250 r/min 条件下发酵 168 h 后, 将发酵液于 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 10 min, 上清液即为纤维素酶粗酶液。

1.5.2 酶活力的测定方法 酶活力依据 QB 2583—2003^[12] 进行测定。

1.5.3 酶解实验方法 为了考查纤维素酶对木质纤维素原料的酶解效果, 对蒸汽爆破玉米秸秆进行酶解实验。称取一定量的原料置于三角瓶中, 加入 pH 值为 4.8 的柠檬酸缓冲液和适量纤维素酶, 将三角瓶置于 50 °C 恒温振荡水浴中, 于 200 r/min 条件下振荡酶解 48 h 后, 将酶解液加热至 100 °C 进行灭活处理, 于 5000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液用滤膜过滤, 通过液相色谱分析酶解产物。

1.5.4 酶解液单糖组成测定 酶解液中葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、纤维二糖等物质采用高效液相色谱进行测定, 具体方法为: 液体样品经 0.22 μm 滤膜过滤; 分析柱为 Biorad Aminex HPX-87H 柱 (300 mm × 7.8 mm); 流动相为 0.05 mol/L H_2SO_4 溶液, 流速为 0.5 mL/min; 柱温为 65 °C。

1.5.5 PB 试验设计 分别选取豆饼粉添加量、麸

皮添加量、结晶纤维素添加量、蛋白胨添加量、 KH_2PO_4 添加量、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量、 CaCl_2 添加量和 MgSO_4 添加量(依次记为 X_1 — X_8)这 8 个因素的高低 2 个水平,选用 $\text{Factors} = 8, \text{Runs} = 12$ 进行 PB 试验设计,其因素和水平见表 1。以纤维素酶活力为响应值(记为 Y_1),通过比较各因素的显著性水平,筛选对酶活力影响较显著的因素。

表 1 PB 试验设计因素和水平表

Table 1 The factors and levels of PB test design %

水平	因素							
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8
-1	3.000	3.000	4	0.300	0.20	0.20	0.050	0.050
1	3.375	3.375	5	0.375	0.25	0.25	0.062	0.062

1.5.6 最陡爬坡试验设计 根据 PB 试验及其分析结果设计最陡爬坡试验,对显著因素进行梯度设计,其余不显著的因素,在 PB 分析结果中是正效应的取高水平,是负效应的取低水平。

1.5.7 BB 试验设计 采用 SAS V9.2 软件中的 BB 试验设计模拟 RSM 模型,以最陡爬坡试验最优结果为中心点,以纤维素酶活力为响应值(记为 Y_2)。根据 BB 试验设计原理设计三因素三水平 RSM 分析试验,共 12 个试验点,3 个中心点重复试验。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基条件优化结果分析

2.1.1 PB 试验结果分析 PB 试验设计方案与结果见表 2, PB 试验结果对纤维素酶活力影响的统计分析见表 3。由表 3 可知,豆饼粉添加量、麸皮添加量和蛋白胨添加量均对纤维素酶活力呈负效应且影响显著($P < 0.1$),可作为主要影响因素进行最陡爬坡试验设计和 BB 试验设计。其他不显著因素, KH_2PO_4 添加量、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量、 CaCl_2 添加量和 MgSO_4 添加量对纤维素酶活力呈正效应,取高水平;结晶纤维素添加量对纤维素酶活力呈负效应,取低水平^[13]。

2.1.2 最陡爬坡试验结果分析 因 PB 试验结果中豆饼粉添加量、麸皮添加量和蛋白胨添加量均呈显著负效应,故最陡爬坡试验设计中三者水平都应减小。最陡爬坡试验设计方案与结果见表 4。由表 4 可知,纤维素酶活力在第 3 组达到最大值 21.42 U/mL,故

表 2 PB 试验设计方案与结果

Table 2 PB test design and results

编号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	$Y_1 / (\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	5.31
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1.58
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	5.16
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1.14
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1.42
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	4.22
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	4.62
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	6.07
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	7.90
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	7.22
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	6.08
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	7.96

表 3 PB 试验结果对纤维素酶活力影响的统计分析

Table 3 Statistical analysis of the PB test results on cellulase activity

因素	效应	T	P	重要性排序
X_1	-0.954	-3.69	0.035	1
X_2	-0.707	-2.73	0.072	3
X_3	-0.318	-1.23	0.306	4
X_4	-0.746	-2.88	0.064	2
X_5	0.299	1.15	0.332	5
X_6	0.207	0.80	0.482	6
X_7	0.156	0.60	0.590	8
X_8	0.206	0.80	0.484	7

注:采用置信度 90%,即 $P < 0.1$ 为影响显著。

表 4 最陡爬坡试验设计方案与结果

Table 4 Steepest climbing test design and results

编号	X_1	X_2	X_4	pH 值	酶活力/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	3.000	3.10	0.31	3.99	16.96
2	2.625	2.82	0.28	3.88	18.91
3	2.250	2.54	0.25	3.20	21.42
4	1.875	2.26	0.22	2.99	16.29
5	1.500	1.99	0.19	2.88	10.99
6	1.125	1.71	0.16	3.02	8.17
7	0.750	1.43	0.13	4.41	4.82
8	0.375	1.15	0.10	3.06	3.52
9	0	0.87	0.07	2.65	0.75

以第 3 组作为响应面试验的中心点。

2.1.3 BB 试验结果分析 BB 试验设计的因素和水平见表 5, BB-RSM 矩阵与实验结果见表 6。

表5 BB试验设计的因素和水平表

Table 5 The factors and levels of BB test design %

水平	因素		
	X_1	X_2	X_4
-1	2.000	2.04	0.20
0	2.250	2.54	0.25
1	2.500	3.04	0.30

表6 BB-RSM 矩阵与实验结果

Table 6 The BB-RSM program and test results

试验号	X_1	X_2	X_4	pH 值	$Y_2/(U \cdot mL^{-1})$
1	-1	-1	0	2.95	27.71
2	-1	1	0	2.93	29.78
3	1	-1	0	3.14	28.36
4	1	1	0	3.20	21.95
5	0	-1	-1	2.81	34.27
6	0	-1	1	3.08	38.55
7	0	1	-1	2.88	31.67
8	0	1	1	3.03	32.05
9	-1	0	-1	2.96	30.81
10	1	0	-1	2.99	37.67
11	-1	0	1	2.73	38.05
12	1	0	1	3.20	23.25
13	0	0	0	2.95	40.68
14	0	0	0	2.87	41.02
15	0	0	0	2.83	40.59

通过 SAS V9.2 软件对 BB 试验数据及模拟的 RSM 模型进行分析,该模型的相关系数 R^2 为 0.961 6,表明模型的拟合程度较好。一般认为 R_{adj}^2 至少要大于 0.850 0^[14],而本试验校正系数 R_{adj}^2 为 0.892 6,表明 89.26% 试验数据的变异性能够用此模型解释,试验误差小,应用 RSM 法优化发酵培养基工艺条件是可行的,具有参考性。

利用 SAS V9.2 软件中的 RSM 分析得到最优发酵培养基条件为:豆饼粉添加量 2.140%,麸皮添加量 1.88%,蛋白胨添加量 0.30%,该条件下预测里

氏木霉发酵液中纤维素酶活力为 41.75 U/mL。在最优发酵培养基条件下进行 3 次验证实验,里氏木霉发酵液中纤维素酶活力为 (42.62 ± 1.30) U/mL。

2.2 发酵过程中里氏木霉的形态变化分析

里氏木霉液态发酵过程中的形态变化见图 1。由图 1 可以看出,发酵初期(3 d),里氏木霉菌丝为初级菌丝,形态呈细丝状,孢子囊很少,且该时期纤维素酶活力上升很慢;发酵后期(5 d),里氏木霉菌丝为次级菌丝,大量的分支和孢子囊开始出现,纤维素酶活力增长迅速。纤维素酶的产生与次级菌丝密切相关,一般认为丝状真菌蛋白的分泌主要发生在菌丝顶点处^[15]。S. Velkovska 等^[16]在研究里氏木霉 RUT-C30 初级菌丝与次级菌丝形态特征的变化时指出,只有次级菌丝才能生产纤维素酶。因此,在液态发酵过程中,需要控制好发酵条件以维持里氏木霉的蛋白分泌能力。

2.3 酶解实验结果分析

在纤维素降解过程中,首先是纤维素酶分子吸附到纤维素表面,由内切葡聚糖酶在葡聚糖链的随机位点水解底物,产生短链纤维素和纤维低聚糖;然后由外切葡聚糖酶从短链纤维素和纤维低聚糖的非还原性端进行水解,主要产物为纤维二糖;最后由 β -葡萄糖苷酶将纤维二糖水解成葡萄糖^[17-18]。里氏木霉发酵液中的纤维素酶组成常存在 β -葡萄糖苷酶活力较低的情况,导致酶解过程中纤维二糖积累,降低酶解效率^[19]。纤维素酶酶解玉米秸秆的高效液相色谱图如图 2 所示。由图 2 可以看出,在最优产酶培养基条件下,纤维素酶的酶解液中含少量纤维二糖,表明里氏木霉发酵液中纤维素酶体系的 β -葡萄糖苷酶含量不足,这在一定程度上成为整个纤维素酶系有效降解纤维素底物从而生成葡萄糖的

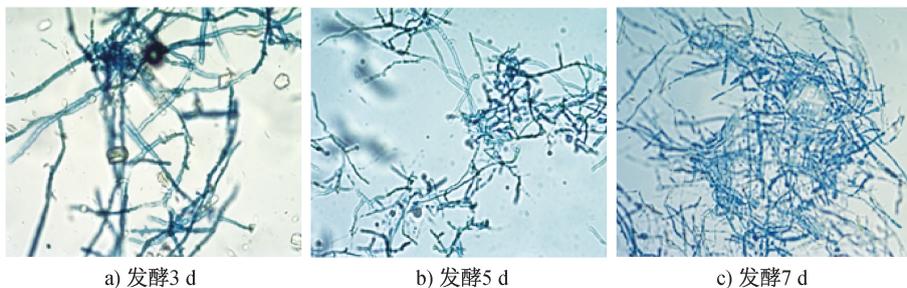


图1 里氏木霉液态发酵过程中的形态变化

Fig. 1 The morphology changes of *Trichoderma reesei* during liquid-state fermentation

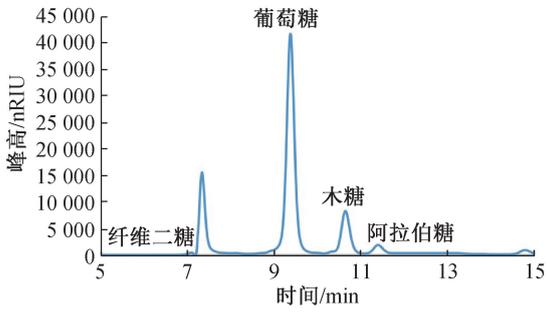


图2 纤维素酶酶解玉米秸秆的高效液相色谱图
Fig. 2 High performance liquid chromatogram of corn stover hydrolyzed by crude cellulase solution

瓶颈^[20-21]。由于玉米秸秆中含有一定的半纤维素,在纤维素酶解作用下,也会降解产生少量木糖、阿拉伯糖等单糖。

3 结论

本文选取豆饼粉添加量、麸皮添加量、结晶纤维素添加量、蛋白胨添加量、 KH_2PO_4 添加量、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量、 CaCl_2 添加量和 MgSO_4 添加量 8 个因素,通过 PB 试验、最陡爬坡试验和 BB 试验优化得到里氏木霉最优发酵培养基条件为豆饼粉添加量 2.140%,麸皮添加量 1.88%,蛋白胨添加量 0.30%,在此条件下,里氏木霉发酵液中的纤维素酶活力可达 (42.62 ± 1.30) U/mL。里氏木霉发酵过程中需要控制好发酵条件以产生大量分支和孢子囊,维持里氏木霉的纤维素酶蛋白分泌能力。以该优化培养基发酵制备的纤维素粗酶液水解玉米秸秆中的纤维素和半纤维素可得游离葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、纤维二糖等可发酵性糖。后续研究需要利用分子生物学等技术手段将不同来源的高效 β -葡萄糖苷酶基因在里氏木霉中表达,以提高 β -葡萄糖苷酶活力,增强里氏木霉产纤维素酶降解天然纤维素底物的能力。

参考文献:

[1] 徐晓,程驰,袁凯,等. 里氏木霉产纤维素酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2021,41(1):52-61.
[2] 任俊莉,刘慧莹,王孝辉,等. 木质纤维素资源化主要途径及半纤维素优先资源化利用策略[J]. 生物加工过程,2020,18(1):1-12.
[3] SONG L L, LIU X X. Research progress of cellulase [J]. Asian Agricultural Research, 2019, 11 (3):74-77,82.

[4] AHMED A, BIBI A. Fungal cellulase; production and applications: minireview [J]. International Journal of Health and Life-Sciences, 2018, 4(1):19-36.
[5] LI F Y, QIN F Y, CAI C, et al. Effect of cellulase on the UCST behavior of sulfobetaine zwitterionic surfactants and the cellulase recovery mechanism [J]. Sustainable Energy & Fuels, 2021, 5(3):750-757.
[6] MENG Q S, LIU C G, ZHAO X Q, et al. Engineering *Trichoderma reesei* Rut-C30 with the overexpression of *egl1* at the *ace1* locus to relieve repression on cellulase production and to adjust the ratio of cellulolytic enzymes for more efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass [J]. Journal of Biotechnology, 2018, 285:56-63.
[7] 刘培洋,刘芳,蔡亚慧,等. 产 γ -聚谷氨酸解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 培养基组分优化研究 [J]. 轻工学报,2018,33(3):30-38.
[8] MALIK W A, KHAN H M, JAVED S. Bioprocess optimization for enhanced production of bacterial cellulase and hydrolysis of sugarcane bagasse [J/OL]. BioEnergy Research, 2021, 1-14 [2021-02-26]. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12155-021-10259-3>.
[9] YAN Z L, CAO X H, LIU Q D, et al. A shortcut to the optimization of cellulase production using the mutant *Trichoderma reesei* YC-108 [J]. Indian Journal of Microbiology, 2012, 52(4):670-675.
[10] WANG P P, LIU T, LIU Y N, et al. *In-situ* and real-time probing cellulase biosensor formation and its interaction with lignosulfonate in varied media [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2020, 329:129114.
[11] BENTIL J A, THYGESEN A, MENSAH M, et al. Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation [J]. Applied Microbiology and Biotechno-

- logy, 2018, 102(14): 5827–5839.
- [12] 中华人民共和国国家发展和改革委员会. 纤维素酶制剂: QB 2583—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [13] 武英才, 李娜, 田威, 等. 响应面法优化阿卡波糖发酵培养基[J]. 沈阳药科大学学报, 2011(11): 898–905.
- [14] HENIKA R G. Simple and effective system for use with response surface methodology [J]. Cereal Sci Today, 1972, 17: 309–334.
- [15] WOSTEN H A B, MOUKHA S M, SIETSMA J H, et al. Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger* [J]. Microbiology, 1991, 137: 2017–2023.
- [16] VELKOVSKA S, MARTEN M R, OLLIS D F. Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT-C30 [J]. Journal of Biotechnology, 1997, 54(2): 83–94.
- [17] LI F Y, QIN F Y, CAI C, et al. Effect of cellulase on the UCST behavior of sulfobetaine zwitterionic surfactants and the cellulase recovery mechanism [J]. Sustainable Energy & Fuels, 2021, 5(3): 750–757.
- [18] LI F Y, QIN F Y, PANG Y X, et al. Synthesis of a UCST-type zwitterionic polymer for efficiently recycling cellulase at room temperature [J]. Green Chemistry, 2021, 23(7): 2738–2746.
- [19] XIANG J Y, WANG X Q, SANG T, et al. Cellulase production from *Trichoderma reesei* RUT C30 induced by continuous feeding of steam-exploded *Miscanthus lutarioriparius* [J]. Industrial Crops and Products, 2021, 160: 113129.
- [20] DEY P, RANGARAJAN V, SINGH J, et al. Current perspective on improved fermentative production and purification of fungal cellulases for successful biorefinery applications: A brief review [J/OL]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2021, 1–29 [2021–01–06]. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13399-020-01227-6>.
- [21] MHUANTONG W, CHAROENSRI S, POONSRI-SAWAT A, et al. High quality *Aspergillus aculeatus* genomes and transcriptomes: A platform for cellulase activity optimization toward industrial applications [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 8: 607176.

Optimization of liquid-state fermentation medium conditions for high yield cellulase by *Trichoderma reesei*

XING Shengli¹, SONG Lili^{2,3}, ZHANG Zhiping^{2,3}, WEI Tao^{2,3}, MA Geli^{2,3}, XING Jin¹, LI Yuan¹, YANG Xu^{2,3}

1. Jiangsu Hetuo Environmental Technology Co., Ltd., Wuxi 214000, China;

2. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

3. Zhengzhou Key Laboratory of Metabolic Engineering and Systems Biology, Zhengzhou 450001, China

Abstract: The liquid-state fermentation medium conditions of *Trichoderma reesei* of high yield cellulase were optimized with natural agricultural products as the main raw materials by different test design methods, such as the Plackett-Burman (PB), steepest climbing, Box-Behnken (BB) and response surface method (RSM) analysis. The results showed that the optimal fermentation medium conditions for enzyme production were soybean meal 2.140%, wheat bran 1.88%, peptone 0.30%. Under these conditions, the cellulase activity of the fermentation broth could reach (42.62±1.30) U/mL. In the later stage of fermentation (5 d), with the large growth of mycelium, the cellulase activity increased continuously. The crude enzyme solution could degrade cellulose and hemicellulose in corn straw to produce fermentable sugars such as free glucose, xylose, arabinose and cellobiose.

Key words: *Trichoderma reesei*; liquid-state fermentation; cellulase; fermentation medium