

**Л.А. Мингазова, Е.В. Крякунова, А.И. Зиятдинов, З.А. Канарская,  
А.В. Канарский, Е.В. Белкина**

## **КОМПЛЕКСНАЯ ПЕРЕРАБОТКА ЛИГНОСУЛЬФОНАТА ИЗ НЕЙТРАЛЬНО-СУЛЬФИТНОГО ЩЕЛОКА С ПОЛУЧЕНИЕМ БИОПРОДУКТОВ КОРМОВОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

*Введение.* Лигноцеллюлозная биомасса, представляющая собой сложную структуру трех видов биополимеров – целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина — является распространенным возобновляемым ресурсом [Zoghlami, Paës, 2019; Scelsi et al., 2021]. В настоящее время микробиологическая обработка материалов из лигноцеллюлозной биомассы привлекает все большее внимание исследователей благодаря многочисленным достоинствам процесса, к которым относятся экономичность, экологичность и высокая склонность к деградации растительных материалов. Биотрансформация каждого из трех вышеперечисленных природных полимеров позволяет получать широкий и многофункциональный набор биопродуктов с добавленной стоимостью: топливо, химикаты и строительные материалы. Особое внимание следует обратить на лигнин, который обладает огромным потенциалом для использования в качестве сырья для получения биотоплива и химической промышленности. Однако лигнин до сих пор практически не востребован в этих отраслях, так как преобразование лигнина в биотопливо и другие продукты с высокой добавленной стоимостью по-прежнему является трудной задачей из-за неоднородности структуры лигнинсодержащей биомассы [Kucharska et al., 2018; Galbe, Wallberg 2019]. В этой связи биотехнологическая обработка лигноцеллюлозной массы может быть направлена на улучшение выхода простых сахаров при одновременном гидролизе всех компонентов растительной клетки, что позволит получать лигнин со специфическими физико-химическими свойствами.

Представляет практический интерес потенциальная возможность использования лигнина и биомассы микроорганизмов, в состав клеточной стенки которых входит хитин-глюкан, для получения кормовых добавок, обладающих адсорбционными свойствами по отношению к микотоксинам. При этом лигнин должен быть нерастворим в физиологических водах желудочно-кишечного тракта животных, так как фрагменты растворимого

лигнина будут осаждаться на слизистых оболочках и эпителии желудочно-кишечного тракта животного, препятствуя эффективному всасыванию питательных веществ. Более того, растворимый лигнин не способствует выведению микотоксинов из организма, увеличивая их накопление, что, как следствие, приводит к интоксикации животного.

В связи с вышесказанным, целесообразным представляется рассмотрение возможности использования лигнинсодержащего субстрата в качестве источника углерода для культивирования мицелиального гриба *R. oryzae* F-1030 – продуцента целлюлолитических ферментов, образующихся при культивировании микроорганизма.

Значительный интерес для практики представляет утилизация лигнина и олигомерных углеводов нейтрально-сульфитных щелоков и лигносульфонатов, которые в настоящее время не используются для производства биопродуктов.

*Цель исследования* – получение биопродуктов кормового назначения посредством биотехнологической обработки лигносульфоната из нейтрально-сульфитного щелока.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- биокаталитическое разделение лигнина и углеводов лигносульфоната с применением ферментов;
- определение возможности микробиологической утилизации простых сахаров лигносульфонатов мицелиальным грибом *Rhizopus oryzae* F-1030 с получением молочной кислоты, лактата кальция и биомассы гриба как источника хитин-глюкана.

*Материалы и методика исследования.* Лигносульфонаты, полученные выпариванием из нейтрально-сульфитных щелоков, образующихся при варке целлюлозы из березы (далее по тексту лигносульфонат), предоставлены ООО «Прикамский картон».

Основные характеристики лигносульфоната представлены в таблице.

### Характеристика используемого сырья

#### Characteristics of used raw materials

Наименование вторичного ресурса ЦБП	Концентрация редуцирующих веществ, %	pH	Содержание сухих веществ, %
Лигносульфонат	9,0±0,5	5,8±0,2	41,5±1,0

Разделение лигнина и углеводов лигносульфоната проводили ферментативным и для сравнения кислотным способами. Ферментативный гидролиз осуществляли в колбах с термостатированием ферментными препаратами:

- Accellerase XC фирмы «DuPont» производства США. Активность эндоглюканазы составляет 1000-1400 СМСU/g, активность ксиланазы – 2500–3800 АВХU/g. Оптимальная температура – 50 °С, оптимальная рН 4,8.

- Accellerase XY фирмы «DuPont» производства США. Активность эндоглюканазы 1000–1400 СМСU/g, активность ксиланазы 20000–30000 АВХU/g. Оптимальная температура 50 °С, оптимальная рН 5,0.

Ферментативная обработка лигносульфоната проводилась при температуре 50±2 °С и 60±2 °С различными концентрациями ферментных препаратов Accellerase XC и Accellerase XY. Продолжительность ферментативного гидролиза лигносульфоната составляла 7±1 сут. вне зависимости от вида и расхода используемого ферментного препарата, а также температуры гидролиза.

При кислотном гидролизе использовалась серная кислота, соответствующая ГОСТ 2184–2013. Кислотный гидролиз проводили 10%-м раствором серной кислоты при температуре 100 °С в течение 2 ч. Соотношение объемов раствора кислоты и пробы составляло 1:1.

Протекание ферментативного и кислотного гидролиза контролировали по содержанию редуцирующих веществ (РВ) в гидролизате. Ферментативный и кислотный гидролиз считали законченными после прекращения увеличения содержания РВ в гидролизатах. Лигнин и гидролизаты разделяли центрифугированием при 7000 об/мин в течение 10 мин.

Полученные гидролизаты, содержащие простые сахара, использовали для получения молочной кислоты, лактата кальция и хитин-глюкана.

В качестве продуцента молочной кислоты использовался штамм *Rhizopus oryzae* ВКПМ F-1030 (далее по тексту *R. oryzae* F-1030), полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Штамм *R. oryzae* F-1030 не является генетически модифицированным штаммом и согласно международной классификации и данным ведущих коллекций (ATCC, DSMZ, CBS) относится к непатогенным для человека микроорганизмам.

Культивирование гриба *R. oryzae* F-1030 проводилось на ферментолизатах лигносульфонатов. Для доведения рН ферментолизатов до 5,5±0,5 использовали 25%-й водный раствор аммиака. Стерилизация питательных

сред проводилась в автоклаве при температуре 115 °С и давлении 1 атм в течение 60 мин. Перед культивированием в состав среды добавляли соли  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  для стимулирования роста биомассы на начальных этапах культивирования. Культуру гриба *R. oryzae* F-1030 в питательную среду вносили фрагментами мицелия, который наращивался в колбе на питательной среде из картофельного отвара в течение 7 сут.

Культивирование гриба *R. oryzae* F-1030 осуществлялось отъемно-доливным методом в колбах объемом 250 мл при непрерывном перемешивании на шейкере-инкубаторе в течение 45 сут. при следующих параметрах процесса: температура 28 °С, перемешивание со скоростью 120 об/мин, рН  $5,5 \pm 0,5$ . В питательной среде и культуральной жидкости контролировали содержание РВ, рН и температуру. При исчерпании РВ в среде отбирали 50% культуральной жидкости и доливали такой же объем стерильной и охлажденной до  $28 \pm 1$  °С питательной среды. Смена питательной среды производилась на 20, 35, 40 сут. культивирования.

Биомассу гриба и содержание сухих веществ определяли гравиметрическим методом после высушивания на влагомере «MX-50» (AND, Япония).

Определение содержания РВ проводили методом, рекомендованным в работе [Морозова и др., 2012].

Определение содержания молочной кислоты проводили методом, рекомендованным в работе [Борщевская и др., 2016] на спектрофотометре марки УФ-1200 при длине волны 400 нм. Для построения калибровочного графика использовали 80% молочную кислоту «ИМП» (Изготовитель «Купавнареактив»).

Выход молочной кислоты определяли по формуле:

$$Q = \frac{K}{P} \times 100\%, \quad (1)$$

где  $Q$  – выход молочной кислоты, %;  $K$  – количество молочной кислоты, г;  $P$  – расход РВ, г.

Молочную кислоту отделяли от культуральной жидкости в форме лактата кальция. Для этого рН культуральной жидкости доводили до 10,0 с помощью гидроксида кальция, затем образовавшийся лактат кальция отделяли центрифугированием при 7000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость концентрировали выпариванием, охлаждали и повторяли процедуру выделения лактата кальция 4 раза. Затем отделенные центрифугированием осадки лактата кальция смешивали, растворяли дистиллированной во-

дой и доводили pH до  $2,0 \pm 0,5$  концентрированной  $H_2SO_4$ . Через 24 ч выпавшую в осадок гипсовую смесь отделяли центрифугированием при 7000 об/мин в течение 15 мин. Далее надосадочную жидкость, содержащую молочную кислоту, дополнительно очищали от гипса фильтрованием.

Для эффективной трансформации полученной биомассы гриба *R. oryzae* F-1030 в хитин-глюкан ее предварительно дезинтегрировали и обрабатывали с использованием гидроксида натрия, соляной кислоты и перекиси водорода согласно методике, предложенной [Мингазова и др., 2020].

Для определения Д-глюкозамина использовался колориметрический метод Эльсона-Моргана [Костина и др., 1978].

*Результаты исследования. Влияние кислотной и ферментативной обработок лигносульфоната на выход редуцирующих сахаров и эффективность разделения простых сахаров и лигнина.*

В ходе проведенных исследований было установлено, что максимальный выход РВ в ферментолизатах, превышающий 60% от конечного значения, достигался по истечении первых 24 ч гидролиза.

Влияние температуры ферментативной обработки лигносульфоната на содержание в ферментолизатах РВ представлено на рис. 1.

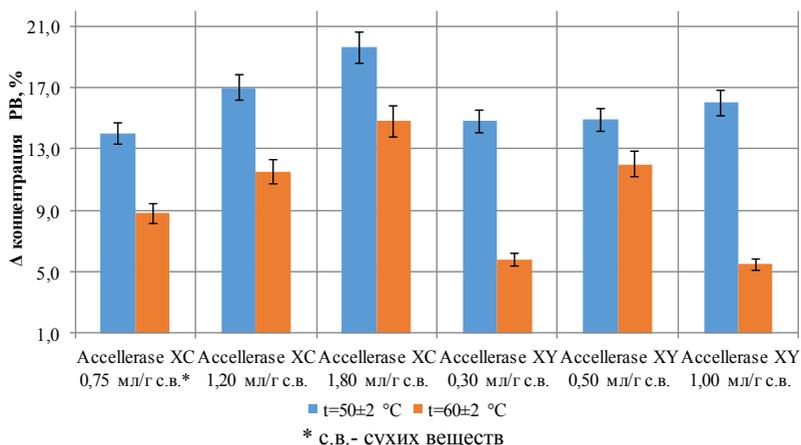


Рис. 1. Изменение содержания РВ в гидролизатах лигносульфонатов при различных условиях ферментативной обработки

Fig. 1. Changes in the RS content in lignosulfonate hydrolyzates under various conditions of enzymatic treatment

Как видно из данных, представленных на рис. 1, при температуре ферментативного гидролиза  $50 \pm 2$  °С наблюдается увеличение содержания РВ в лигносульфонате при увеличении расхода ферментного препарата Accellerase ХС, что подтверждает известную зависимость скорости ферментативной реакции от количества фермента. Поскольку наблюдается увеличение продукта реакции – РВ – при увеличении расхода ферментного препарата Accellerase ХС, то следует предположить, что при любой концентрации ферментного препарата Accellerase ХС субстрат находится в избытке, а все молекулы фермента связаны с субстратом. В свою очередь, при использовании ферментного препарата Accellerase ХУ значимого увеличения выхода РВ при увеличении дозы ферментного препарата не наблюдается, что может свидетельствовать о том, что свободный для расщепления ферментным препаратом субстрат в среде практически отсутствует.

Увеличение температуры ферментативного гидролиза до  $60 \pm 2$  °С не приводит к увеличению выхода РВ по сравнению с гидролизатами, полученными при температуре обработки лигносульфонатов  $50 \pm 2$  °С. Более того, концентрация РВ в гидролизате в случае ферментативной обработки при  $60 \pm 2$  °С повышается в меньшей степени, чем при аналогичных дозах обоих ферментных препаратов при  $50 \pm 2$  °С. Очевидно, уменьшение выхода РВ при температуре обработки  $60 \pm 2$  °С связано с тепловой денатурацией отдельных молекул ферментов в составе ферментных препаратов и, как следствие, с потерей ими ферментативной активности.

При ферментативной обработке лигносульфонатов ферментным препаратом Accellerase ХУ с расходом 1,00 мл/г с.в. выход РВ незначительно отличается от выхода РВ из лигносульфоната, обработанного ферментным препаратом с расходом 0,30 мл/г с.в. Ферментативная обработка лигносульфонатов при  $50 \pm 2$  °С показала, что для гидролиза углеводов достаточно расхода ферментного препарата Accellerase ХУ 0,30 мл/г с.в. Очевидно, при повышении температуры ферментативной обработки до  $60 \pm 2$  °С происходит снижение эффективной концентрации фермента и, как следствие, снижение скорости образования РВ вследствие тепловой денатурации находящегося в излишке в реакционной среде фермента.

В ходе проведенных исследований было установлено, что содержание РВ в лигносульфонатах после кислотного гидролиза увеличивается в среднем в 2,0 раза (с 9 до 19,2%), тогда как после ферментативного гидролиза препаратами Accellerase ХС и Accellerase ХУ в 3,0 и 2,5 раза соответственно. Следовательно, для дальнейшего культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 целесообразно использовать ферментлизаты, полученные при ферментативной обработке лигносульфонатов ферментным препаратом Accellerase ХС.

О полноте гидролиза углеводов в лигносульфонате можно судить по содержанию сухого нерастворимого остатка в гидролизатах. Как видно из данных, представленных на рис. 2, лигносульфонат содержал в своем составе 41,5% сухих нерастворимых веществ. При кислотном гидролизе лигносульфонатов наблюдается снижение концентрации сухих нерастворимых веществ до 17,4%, что связано с частичным осмолением углеводов в результате дегидратации при кислотном катализе и коагуляции коллоидных веществ. Ферментативный гидролиз лигносульфоната ферментным препаратом Accellerase ХС приводит к уменьшению содержания сухого нерастворимого остатка до 14,7%.

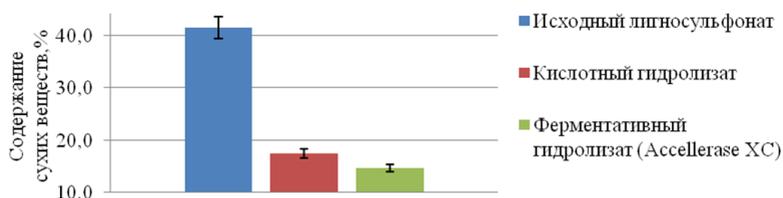


Рис. 2. Изменение содержания сухого нерастворимого остатка в гидролизатах лигносульфонатов

Fig. 2. Changes in the content of dry insoluble residues in lignosulfonate hydrolysates

Для подтверждения нерастворимости нейтрально-сульфитного лигнина проводилось изучение растворимости гидролизатов лигносульфонатов в водно-диоксановой среде, так как известно, что диоксан способствует деполимеризации гидролизного лигнина. Установлено, что полной деполимеризации лигнинов в водно-диоксановой среде не происходит, т.е. в гидролизатах присутствуют нерастворимые формы лигнина.

*Синтез молочной кислоты грибом *R. oryzae* F-1030 на ферментолизатах лигносульфонатов*

Поскольку наибольшее увеличение содержания РВ в лигносульфонате наблюдалось при его обработке ферментным препаратом Accellerase ХС, то именно эти ферментолизаты были использованы для культивирования гриба *R. oryzae* F-1030.

Установлено изменение содержания РВ в питательной среде на основе ферментолизатов, полученных при обработке лигносульфонатов ферментным препаратом Accellerase ХС, при глубинном культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 отъемно-доливным методом (рис. 3).

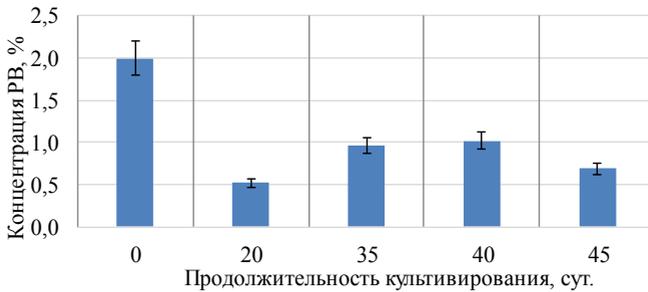


Рис. 3. Изменение потребления РВ грибом *R. oryzae* F-1030 при культивировании на ферментолизатах лигносульфонатов

Fig. 3. Changes in the RS consumption by the fungus *R. oryzae* F-1030 during cultivation on lignosulfonate fermentolysates

Как видно из данных, представленных на рис. 3, при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на ферментолизате лигносульфоната наблюдается закономерное снижение содержания РВ в питательной среде вследствие их ассимиляции клетками гриба-производителя. Однако в начале культивирования заметное снижение содержания РВ наблюдалось только на 6-е сутки, что можно объяснить адаптацией гриба к источникам углерода в среде, а также малыми размерами мицелия. В последующем после смены питательной среды активное потребление РВ клетками гриба наблюдалось уже с 1-х суток культивирования.

На рис. 4 показан выход молочной кислоты при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 в рассматриваемых условиях.

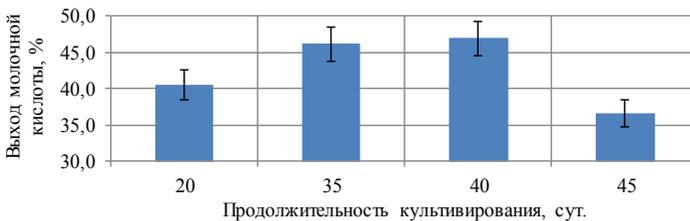


Рис. 4. Выход молочной кислоты при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на ферментолизатах лигносульфонатов

Fig. 4. Lactic acid yield during the cultivation of the fungus *R. oryzae* F-1030 on lignosulfonate fermentolysates

Как видно из данных, представленных на рис. 4, существенное снижение выхода молочной кислоты наблюдается только в заключительные 5 сут. культивирования вследствие замедления работы метаболических путей гриба-продуцента, вызванного его старением. Средний выход молочной кислоты, синтезированной грибом *R. oryzae* F-1030, составил  $42,0 \pm 4,0\%$ .

*Вторичные продукты при микробиологическом синтезе молочной кислоты на основе питательных сред из лигносульфонатов.*

При выделении молочной кислоты из культуральной жидкости образуется лактат кальция, который можно отнести к вторичному продукту в технологии микробиологического синтеза молочной кислоты. Лактат кальция используется в ветеринарии для восстановления кишечного микробиоценоза при дисбиозах животных и для профилактики гипокальциемии коров [Патент № 2593584, 2015].

Перспективным микробиологическим сырьем для получения биоадсорбентов является мицелий гриба *R. oryzae* F-1030, отделяемый от культуральной жидкости, содержащей молочную кислоту. Известно, что мицелий грибов содержит хитин-глюкан, обладающий адсорбционными свойствами [Мингазова и др., 2020].

Установлено, что биомасса гриба-продуцента молочной кислоты по окончании культивирования составила  $1,8 \pm 0,2$  г/дм<sup>3</sup>. Биомасса гриба использовалась для получения хитин-глюкана, ее измельчали и многостадийно обрабатывали щелочью и кислотами, что способствовало более эффективному удалению зольных компонентов. Выход хитин-глюкана и содержание Д-глюкозамина при трехстадийной обработке мицелия гриба *R. oryzae* F-1030 составили  $27,1 \pm 2,7\%$  и  $58,1 \pm 5,8\%$  соответственно [Мингазова и др., 2020].

*Получение биоадсорбента.*

Лигнин, выделенный из лигносульфоната, и хитин-глюкан, выделенный из мицелия гриба *R. oryzae* F-1030, использовались для получения биоадсорбента кормового назначения. Предлагаемая кормовая добавка содержала лигнин и хитин-глюкан в соотношении 1:1. Кормовая добавка рекомендована в качестве потенциального энтеросорбента при микотоксикозах животных, что показано исследованиями ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» при испытании на лабораторных мышах [Мингазова и др., 2020].

*Выводы:*

1. Показано, что обработка лигносульфонатов из нейтрально-сульфитных щелоков ферментными препаратами Accellerase ХС и Accellerase ХУ приводит к образованию нерастворимого лигнина и простых сахаров и их эффективному разделению.

2. Установлено, что ферментоллизаты, полученные из лигносульфонатов нейтрально-сульфитных щелоков, пригодны в качестве источника углерода для синтеза молочной кислоты грибом *R. oryzae* F-1030.

3. Показана возможность использования лигнина лигносульфонатов из нейтрально-сульфитных щелоков и хитин-глиюкана, выделенного из биомассы гриба *R. oryzae* F-1030, для получения кормовой добавки, обладающей адсорбционной способностью к микотоксинам.

*Благодарности.* Работа выполнена с использованием ресурсов ЦКП «Экология, биотехнологии и процессы получения экологически чистых энергоносителей» Поволжского государственного технологического университета, г. Йошкар-Ола при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-674).

### Библиографический список

Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Калинина А.Н., Синеокий С.П. Спектрофотометрическое определение молочной кислоты // Журнал аналитической химии. 2016. Т. 71. № 8. С. 787–790.

Костина А.М., Бабицкая В.Г., Лобанок А.Г. Хитин мицелиальных грибов рода *Penicillium* // Прикладная биохимия и микробиология. 1978. Т. XLV. Вып. 4. С. 586–593.

Мингазова Л.А., Канарская З.А., Семенов Э.И., Канарский А.В. Биосорбент из биомассы гриба *Rhizopus oryzae* F-1030 // Современные проблемы экспериментальной и клинической токсикологии, фармакологии и экологии : Междунар. науч.-практ. конф. Казань, 2021. С. 230–232.

Мингазова Л.А., Крякунова Е.В., Канарская З.А., Канарский А.В. Сравнительный анализ адсорбционных характеристик биосорбентов, полученных последовательной двухстадийной обработкой биомассы гриба *Rhizopus oryzae* F-1030 // Научное обеспечение технологического развития и повышения конкурентоспособности в пищевой и перерабатывающей промышленности : Междунар. науч.-практ. конф. Краснодар, 2020. С. 270–273.

Мингазова Л.А., Канарский А.В., Крякунова Е.В., Канарская З.А. Исследование адсорбционных характеристик биосорбента, полученного трехстадийной обработкой биомассы гриба *Rhizopus oryzae* F-1030 // Современная биотехнология: актуальные вопросы, инновации и достижения: Всерос. онлайн конференция с междунар. участием. Кемерово, 2020. С. 107–108.

Морозова Ю.А., Скворцов Е.В., Алимova Ф.К., Канарский А.В. Биосинтез ксиланаз и целлюлаз грибами рода *Trichoderma* на послеспиртовой барде // Вестник технологического университета. 2012. Т. 15. № 19. С. 120–122.

Пат. № 2593584 С1 Российская Федерация МПК А61К 31/19, А61К 9/20, А61Р 1/00. Средство для восстановления кишечного микробиоценоза при дисби-

огах / Чичерин И.Ю.; заявитель Чичерин И.Ю. Бюл. № 2015130077/15: заявл. 22.07.2015; 11 с. опублик. 10.08.2016.

Galbe M., Wallberg O. Pretreatment for biorefineries: A review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials // *Biotechnology for Biofuels*. 2019. No. 12. P. 1–32.

Kucharska K., Rybarczyk P., Holowacz I., Lukajtis R., Glinka M., Kamiński M. Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes // *Molecules*. 2018. No. 10. P. 1–32. DOI: 10.3390/molecules23112937.

Scelsi E., Angelini A., Pastore C. Deep Eutectic Solvents for the Valorisation of Lignocellulosic Biomasses towards Fine Chemicals // *Biomass*. 2021. No. 1. P. 29–59. Doi.Org/10.3390/Biomass1010003.

Zoghlami A., Paës G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis // *Frontiers in Chemistry*. 2019. Vol.7, no. 874. P. 1–32. DOI: 10.3389/fchem.2019.00874.

### References

Borshchevskaya L.N., Gordeeva T.L., Kalinina A.N., Sineoky S.P. Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of analytical chemistry*, 2016, vol. 71, no. 8, pp. 787–790. (In Russ.)

Galbe M., Wallberg O. Pretreatment for biorefineries: A review of common methods for efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, no. 12, pp. 1–32.

Kostina A.M. Babitskaya V.G., Lobanok A.G. Chitin in filamentous fungi of the genus *Penicillium*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1978. T. XLV, vol. 4, pp. 586–593. (In Russ.)

Kucharska K., Rybarczyk P., Holowacz I., Lukajtis R., Glinka M., Kamiński M. Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules*, 2018, no. 10, pp. 1–32. DOI: 10.3390/molecules23112937.

Mingazova L.A. Kanarsky A.V., Kryakunova E.V., Kanarskaya Z.A. Study of the adsorption characteristics of biosorbent obtained by three-stage processing of the biomass of the fungus *Rhizopus oryzae* F-1030". Modern biotechnology: topical issues, innovations and achievements: All-Russian online conference with international participation. Kemerovo, 2020, pp. 107–108. (In Russ.)

Mingazova L.A., Kanarskaya Z.A., Semenov E.I., Kanarsky A.V. Biosorbent from the biomass of the fungus *Rhizopus oryzae* F-1030. *Modern problems of experimental and clinical toxicology, pharmacology and ecology*: International scientific-practical conference. Kazan, 2021, pp. 230–232. (In Russ.)

Mingazova L.A., Kryakunova E.V., Kanarskaya Z.A., Kanarsky A.V. Comparative analysis of the adsorption characteristics of biosorbents obtained by sequential two-stage processing of the biomass of the fungus *Rhizopus oryzae* F-1030. *Scientific support of technological development and competitiveness in the food and processing*

*industry* : International scientific and practical conference. Krasnodar, 2020, pp. 270–273. (In Russ.)

Morozova Yu.A., Skvortsov E.V., Alimova F.K., Kanarsky A.V. Biosynthesis of xylanases and cellulases by fungi of the genus *Trichoderma* on distillery stillage. *Bulletin of the Technological University*, 2012, vol. 15, no. 19, pp. 120–122. (In Russ.)

Patent No. 2593584 C1 Russian Federation IPC A61K 31/19, A61K 9/20, A61P 1/00. Means for restoring intestinal microbiocenosis in dysbiosis // Chicherin I.Yu.; applicant Chicherin I.Yu. No. 2015130077/15: Appl. 07/22/2015: publ. 08/10/2016. 11 p. (In Russ.)

Scelsi E., Angelini A., Pastore C. Deep Eutectic Solvents for the Valorisation of Lignocellulosic Biomasses towards Fine Chemicals. *Biomass*, 2021, no. 1, pp. 29–59. Doi.org/10.3390/biomass1010003.

Zoghلامي A., Paës G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry*, 2019, vol. 7, no. 874, pp. 1–32. DOI: 10.3389/fchem.2019.00874.

Материал поступил в редакцию 24.10.2022

---

**Мингазова Л.А., Крякунова Е.В., Знатдинов А.И., Канарская З.А., Канарский А.В., Белкина Е.В.** Комплексная переработка лигносульфоната из нейтрально-сульфитного щелока с получением биопродуктов кормового назначения // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2022. Вып. 241. С. 280–294. DOI: 10.21266/2079-4304.2022.241.280-294

При производстве целлюлозы из древесины березы нейтрально-сульфитным способом образуются щелока, которые содержат органические и минеральные вещества. В настоящее время присутствующие в нейтрально-сульфитных щелоках минеральные вещества не регенерируются. Органические вещества и, прежде всего, олигомеры углеводов также не используются. Единственный способ утилизации этих щелоков на предприятии – это получение лигносульфонатов, что указывает на экономическую нерациональность использования ресурсов. В работе рассматривалась возможность разделения лигнина и углеводов лигносульфонатов из нейтрально-сульфитных щелоков биокаталитическим способом с образованием простых сахаров с последующим микробиологическим синтезом молочной кислоты мицелиальным грибом *Rhizopus oryzae* F-1030. После отделения молочной кислоты также остаются вторичные ресурсы – культуральная жидкость на основе ферментолизата лигносульфоната и биомасса гриба – которые предложено утилизировать. В качестве возможного пути утилизации предлагается использование нерастворимой фракции лигнина и биомассы гриба *R. oryzae* F-1030, в состав которой входит хитин-глюкан, для получения кормовых добавок для

сельскохозяйственных животных, обладающих адсорбционными свойствами по отношению к микотоксинам. Показано, что обработка лигносульфоната ферментными препаратами Accellerase XC и Accellerase XY приводит к увеличению содержания в гидролизатах простых сахаров, которые могут быть использованы микроорганизмами в качестве источников углерода. Установлено, что при культивировании на ферментолизатах лигносульфоната из нейтрально-сульфитных щелоков гриб *R. oryzae* F-1030 синтезирует молочную кислоту в среднем в концентрации  $42,0 \pm 4,0\%$ , при этом производя  $1,8 \pm 0,2$  г/дм<sup>3</sup> сухой биомассы. Доказана возможность использования лигнина лигносульфонатов из нейтрально-сульфитных щелоков и хитин-глюкана из биомассы гриба *R. Oryzae* F-1030 в соотношении 1:1 для получения кормовой добавки, обладающей адсорбционной способностью к микотоксинам.

**Ключевые слова:** лигносульфонат, ферментативный гидролиз, простые сахара, гриб *Rhizopus oryzae* F-1030, молочная кислота, нерастворимый лигнин, адсорбент микотоксинов,

**Mingazova L.A., Kryakunova E.V., Ziatdinov A.I., Kanarskaya Z.A., Kanarskii A.V., Belkina E.V.** Complex neutral sulfite liquor lignosulfonate processing to feed bioproducts. *Izvestia Sankt-Peterburgskoj Lesotehniceskoj Akademii*, 2022, iss. 241, pp. 280–294 (in Russian with English summary). DOI: 10.21266/2079-4304.2022.241.280-294

In the cellulose production from birch wood by the neutral sulfite method liquors are formed. These liquors contain organic and mineral substances. At present, minerals content of the neutral sulfite liquors is not regenerated. Organic compounds especially carbohydrate oligomers are also not used anywhere. The only way currently available at the enterprises to utilize these liquors is to obtain lignosulfonates, which indicates the economic irrationality of the resource usage. The paper considered the possibility of separating lignin and lignosulfonate carbohydrates from neutral sulfite liquors by a biocatalytic method with the formation of simple sugars. Subsequently these simple sugars can be used for microbiological synthesis of lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae* F-1030. There are also wastes formed after the lactic acid separation, which also need to be disposed of. These wastes consist of the culture liquid based on the lignosulfonate enzyme lysate and the biomass of the fungus. As a possible way of their utilization, it is proposed to use the insoluble fraction of lignosulfonate lignin and the fungus *R. oryzae* F-1030 biomass, rich with chitin-glucan, to obtain feed additives for farm animals. These additives must have adsorption properties to mycotoxins. It was shown that the treatment of lignosulfonate with enzyme preparations Accellerase XC and Accellerase XY leads to an increase in the content of simple sugars in hydrolysates, which can be used by microorganisms as carbon sources. It was found that the fungus *R. oryzae* F-1030 synthesizes lactic acid at an average concentration of  $42.0 \pm 4.0\%$  per 1 g of assimilated RS during its cultivation on neutral sulfite lignosulfonate enzyme lysates.

During this process,  $1.8 \pm 0.2$  g/dm<sup>3</sup> of fungus dry biomass is also formed. It was proved the possibility of using neutral sulfite liginosulfonate lignin and the biomass of the fungus *R. oryzae* F-1030 in a 1:1 ratio to obtain a feed additive with an adsorption capacity for mycotoxins.

**Key words:** liginosulfonate, enzymatic hydrolysis, simple sugars, fungus *Rhizopus oryzae* F-1030, lactic acid, insoluble lignin, mycotoxin adsorbent

---

**МИНГАЗОВА Лейсан Азатовна** – ассистент кафедры пищевой инженерии Казанского национального исследовательского технологического университета, кандидат технических наук. SPIN-код: 9532-4010. ORCID: 0000-0003-3289-3977

420015, ул. К. Маркса, д. 68, г. Казань, Республика Татарстан, Россия.  
E-mail: zleisan1@mail.ru.

**MINGAZOVA Leysan A.** – PhD (Technical), assistant of the Department of Food Engineering, Kazan National Research Technological University. SPIN-code: 9532-4010. ORCID: 0000-0003-3289-3977

420015. K. Marx str. 68. Kazan. Republic of Tatarstan. Russia. E-mail: zleisan1@mail.ru

**КРЯКУНОВА Елена Вячеславовна** – доцент кафедры пищевой инженерии Казанского национального исследовательского технологического университета, кандидат биологических наук. SPIN-код: 1321-1832. ORCID: 0000-0003-4563-9847

420015, ул. К. Маркса, д. 68, г. Казань, Республика Татарстан, Россия.  
E-mail: oscillatoria@rambler.ru.

**KRYAKUNOVA Elena V.** – PhD (Biology), Associate Professor, Department of Food Engineering, Kazan National Research Technological University. SPIN code: 1321-1832. ORCID: 0000-0003-4563-9847

420015. K. Marx str. 68. Kazan. Republic of Tatarstan. Russia. E-mail: oscillatoria@rambler.ru.

**ЗИАТДИНОВ Айрат Илгизарович** – аспирант кафедры пищевой инженерии Казанского национального исследовательского технологического университета.

420015, ул. К. Маркса, д. 68, г. Казань, Республика Татарстан, Россия.  
E-mail: welder16@mail.ru.

**ZIATDINOV Airat I.** – PhD student of the Department of Food Engineering, Kazan National Research Technological University.

420015. K. Marx str. 68. Kazan. Republic of Tatarstan. Russia. E-mail: welder16@mail.ru.

**КАНАРСКАЯ Зоя Альбертовна** – доцент кафедры пищевой биотехнологии Казанского национального исследовательского технологического университета, кандидат технических наук. SPIN-код: 2787-1694. ORCID: 0000-0002-8194-6185.

420015, ул. К. Маркса, д. 68, г. Казань, Республика Татарстан, Россия. E-mail: zosya\_kanarskaya@mail.ru

**KANARSKAYA Zosya A.** – PhD (Technical), Associate Professor, Department of Food Biotechnology, Kazan National Research Technological University. SPIN code: 2787-1694. ORCID: 0000-0002-8194-6185

420015. K. Marx str. 68. Kazan. Republic of Tatarstan. Russia. E-mail: zosya\_kanarskaya@mail.ru

**КАНАРСКИЙ Альберт Владимирович** – профессор кафедры пищевой биотехнологии Казанского национального исследовательского технологического университета, доктор технических наук, профессор. SPIN-код: 2196-2000. ORCID: 0000-0002-3541-2588

420015, ул. К. Маркса, д. 68, г. Казань, Республика Татарстан, Россия. E-mail: alb46@mail.ru

**KANARSKII Albert V.** – DSc (Technical), Professor of the Department of Food Biotechnology of the Kazan National Research Technological University, SPIN code: 2196-2000. ORCID: 0000-0002-3541-2588

420015. K. Marx str. 68. Kazan. Republic of Tatarstan. Russia. E-mail: alb46@mail.ru

**БЕЛКИНА Екатерина Васильевна** – инженер, заведующий исследовательской лабораторией ООО «Прикамский картон».

614037, ул. Бумажников, д. 1, г. Пермь, Россия. E-mail: ekaterina.belkina@pcbkr.ru

**BELKINA Ekaterina V.** – Engineer, Head of the Research Laboratory of Prikamsky Karton LLC

614037. Bumazhnikov str. 1. Perm. Russia. E-mail: ekaterina.belkina@pcbkr.ru