

Л.А. Мингазова, Е.В. Крякунова, А.Р. Галиева, З.А. Канарская,
А.В. Канарский, И.В. Кручина-Богданов, Е.В. Белкина

**ВЛИЯНИЕ СПОСОБА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ГРИБА *RHIZOPUS ORIZAE* F-1030
НА ГИДРОЛИЗАТАХ НЕЙТРАЛЬНО-СУЛЬФИТНОГО ЩЕЛОКА
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИНТЕЗА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ**

Введение. Молочная кислота находит широкое применение в косметической, пищевой, фармацевтической, медицинской и химической промышленности. Молочная кислота также используется в производстве акриловых полимеров и пропиленгликоля, используемых в упаковке и маркировке [Fan et al., 2009].

В настоящее время более 90% молочной кислоты производится путем микробной ферментации источников углерода, представленных в основном сахарами питательной среды. Для регуляции ферментативного производства молочной кислоты немаловажное значение имеет подбор таких факторов, как температура, pH, концентрация питательных веществ в субстрате и концентрация конечного продукта. Минеральные вещества, витамины и азот, доступные в виде неорганических соединений, также необходимы для роста микроорганизмов и синтеза молочной кислоты [Rawoof et al., 2020].

К микроорганизмам, основным продуктом ферментации которых является молочная кислота, относятся мицелиальные грибы рода *Rhizopus*. Показано, что *Rhizopus oryzae* способны синтезировать молочную кислоту на различных углеродсодержащих субстратах, включая отходы офисной бумаги, пшеничную солому и другие сложноутилизируемые субстраты [Saito et al., 2012]. Однако в зависимости от природы субстрата, вязкости питательной среды, видовой принадлежности микроорганизмов, используемых для получения высокого выхода искомого продукта, необходимо осуществлять подбор режимов ферментации.

В производстве молочной кислоты широко используют периодический режим ферментации, характеризующийся простотой реализации, относительно высоким выходом искомого продукта и минимальным количеством поллютантов. Однако недостатком периодического режима является постепенное истощение питательной среды, ограничивающее физиологиче-

скую активность микроорганизмов, что обуславливает низкую продуктивность процесса ферментации [Abdel-Rahman et al., 2013]. Поэтому для компенсации нехватки нутриентов в питательной среде возможно осуществлять или асептическое добавление лимитирующих питательных веществ без удаления ферментационной среды, или замену истощенной питательной среды равным объемом свежей среды, содержащей все необходимые питательные вещества.

Себестоимость производства молочной кислоты на 40-70% состоит из стоимости исходного сырья-субстрата [Tejayadi et al., 1995]. Использование рафинированных сахаров, таких как глюкоза и сахароза, в качестве сырья для производства молочной кислоты экономически нецелесообразно. Поэтому поиск дешевого сырья для ферментативного производства молочной кислоты является актуальной научной проблемой. Для обеспечения экономической эффективности используемое в производстве молочной кислоты сырье должно обеспечить высокий выход конечного продукта, меньшее образование побочных продуктов и минимальное загрязнение окружающей среды. Таким образом, использование для производства молочной кислоты отходов, содержащих сбраживаемый сахар, позволит снизить себестоимость производства молочной кислоты [Dumbrepatil et al., 2008].

Лигноцеллюлозная биомасса представляет собой широко распространенный, но практически не используемый в промышленности природный источник углерода. Из-за сложного строения лигноцеллюлозных материалов их применение в биотехнологической индустрии не представляется возможным без предварительной обработки, позволяющей удалить лигнин и гемицеллюлозу, а также снизить кристалличность целлюлозы и увеличить пористость лигноцеллюлозных материалов.

В связи с вышесказанным, лигноцеллюлозная биомасса может рассматриваться как перспективный субстрат, способный удовлетворить огромный спрос на производство молочной кислоты [Baruah et al., 2018]. Однако на практике сложно осуществить микробиологическое производство молочной кислоты из лигноцеллюлозных материалов, так как большинство микроорганизмов не способно расщеплять лигноцеллюлозу. К проблемам производства молочной кислоты из лигноцеллюлозных материалов также следует отнести образование ингибирующих процесс побочных продуктов, ингибирование субстратом и по типу обратной связи, а также процедуры разделения и очистки.

Решением проблемы микробиологического производства молочной кислоты на лигноцеллюлозных материалах может служить применение в

качестве питательной среды для культивирования микроорганизмов-продуцентов молочной кислоты таких вторичных ресурсов целлюлозно-бумажной промышленности, как щелока. Поскольку щелока содержат простые и олигомерные сахара – потенциальные источники углерода для жизнедеятельности микроорганизмов, то их применение в качестве питательной среды для микробиологического синтеза молочной кислоты позволит снизить себестоимость промышленного производства молочной кислоты.

Цель работы – определить условия культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 на нейтрально-сульфитных щелоках (НСЩ), позволяющие получить оптимальное соотношение прироста биомассы и количества синтезируемой молочной кислоты.

Задачи:

1. Изучить динамику изменения pH питательной среды на основе НСЩ при культивировании на них гриба *R. oryzae* F-1030 периодическим и отъемно-доливным способом.

2. Изучить динамику изменения концентрации редуцирующих веществ (РВ) в питательной среде на основе НСЩ при культивировании на них гриба *R. oryzae* F-1030 периодическим и отъемно-доливным способом.

3. Определить влияние периодического и отъемно-доливного способа культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 на питательной среде на основе НСЩ на выход молочной кислоты.

4. Определить влияние периодического и отъемно-доливного способа на прирост биомассы гриба *R. oryzae* F-1030 при культивировании его на питательной среде на основе НСЩ.

Материалы и методика исследования. Объектом исследования являлся мицелиальный гриб *R. oryzae* штамм ВКПМ F-1030. Штамм был предоставлен Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов.

Первоначально выращивание биомассы гриба *R. oryzae* F-1030 осуществляли твердофазным культивированием музейной культуры на картофельно-глюкозном агаре при температуре 28–30 °С в течение 7 суток. Картофельно-глюкозный агар содержал 20 г глюкозы, 20 г бактериологического агара на 1000 см³ картофельного отвара.

Синтез молочной кислоты осуществлялся грибом *R. oryzae* F-1030 при культивировании на питательной среде на основе гидролизатов НСЩ, полученного при производстве целлюлозы высокого выхода из древесины березы в ООО «Прикамский картон». Используемый в работе исходный НСЩ имел pH 5,3±0,2, содержал 2,5±0,3% редуцирующих веществ и 9,4±0,5% сухих веществ.

Для увеличения содержания простых сахаров производили химическую и биохимическую модификацию НСЦ. При химической модификации НСЦ обрабатывали равным объемом 10%-го раствора соляной кислоты (ГОСТ 857-95) при температуре 100 °С в течение 2 ч. Биохимическая модификация НСЦ производилась с помощью ферментного препарата Revitalenz® 200 («DuPont», США) при температуре 50,0±0,2 °С, pH 5,0–6,0. Активность целлюлазы в препарате Revitalenz® 200 составляла 2000–3000 ABXU/g.

Гидролизаты подвергали центрифугированию при 7000 об/мин в течение 10 мин. Для культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 использовали супернатант, pH которого доводили до 5,6±0,1 с помощью 25% водного раствора аммиака.

Культивирование гриба *R. oryzae* F-1030 на гидролизатах НСЦ (pH 5,6±0,1) производили отъемно-доливным и периодическим способом при температуре 28,0±1,0 °С и непрерывном перемешивании со скоростью 120 об./мин. Биомассу гриба в питательную среду вносили фрагментом мицелия в количестве 5,0±0,5% от общего объема питательной среды. В качестве источников азота, фосфора, серы, калия в питательные среды перед началом культивирования вносили 0,04 моль/л (NH₄)₂SO₄ и 3 ммоль/л KН₂PO₄.

При отъемно-доливном способе через каждые 5 суток культивирования производилась замена 50% культуральной жидкости на равное количество свежей питательной среды для компенсации количества РВ, затраченных грибом *R. oryzae* F-1030 для синтеза молочной кислоты и набора биомассы.

При периодическом способе через каждые 5 суток производили добавление концентрированной стерильной питательной среды для увеличения концентрации РВ. Поскольку при периодическом способе культивирования происходит постепенное истощение питательной среды, то для компенсации возможного дефицита источников фосфора и азота в ферментолитат при внесении концентрата НСЦ также добавляли соли (NH₄)₂SO₄ и KН₂PO₄. Параллельно проводили культивирование гриба *R. oryzae* F-1030 периодическим способом на ферментолитате НСЦ без промежуточного добавления солей (NH₄)₂SO₄ и KН₂PO₄.

Определение pH питательной среды и культуральной жидкости проводили на pH-метре pH-150МИ.

Определение содержания РВ в питательной среде и культуральной жидкости проводили фотометрическим методом [Морозова и др., 2012].

Выделение молочной кислоты из культуральной жидкости проводили методом, описанным в работе [Мингазова и др., 2020].

Определение содержания молочной кислоты проводили методом, рекомендованным в работе [Борщевская и др., 2016].

Определение выхода молочной кислоты проводили методом, рекомендованным в работе [Мингазова и др., 2021а].

Варианты культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 на гидролизатах НСЦ представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Варианты культивирования гриба *Rhizopus oryzae* F-1030
на гидролизатах нейтрально-сульфитного щелока**

**Cultivating variants for the *Rhizopus oryzae* F-1030 fungus
on neutral-sulfite liquor hydrolysates**

Вариант культивирования	Питательная среда	Способ культивирования
1	Кислотный гидролизат нейтрально-сульфитного щелока	Периодический
2		Отъемно-доливной
3	Ферментализат нейтрально-сульфитного щелока, полученный при обработке ферментным препаратом Revitalenz® 200	Периодический
4		Периодический с добавлением солей $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4
5		Отъемно-доливной

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты исследования. В результате проведенных исследований было установлено, что гриб *R. oryzae* F-1030 не способен осуществлять процессы роста и синтеза искоемых метаболитов при культивировании на питательной среде на основе исходного НСЦ, что, очевидно, связано с низким содержанием в данном субстрате простых сахаров – потенциальных источников углерода, необходимых для нормальной физиологической и метаболической активности продуцента. Следовательно, на начальном этапе культивирования гриб необходимо обеспечить простыми сахарами, увеличения концентрации которых в питательной среде на основе НСЦ можно достичь посредством их каталитической обработки раствором соляной кислоты или целлюлолитическими ферментами.

Как было показано в предыдущих публикациях авторов [Мингазова и др., 2021б], содержание РВ в НСЦ после кислотного гидролиза увеличи-

вается в среднем в 3 раза, тогда как после ферментативного гидролиза – в среднем в 2 раза.

Культивирование гриба *R. oryzae* F-1030 с целью получения молочной кислоты осуществлялось на кислотных гидролизатах и ферментализатах НСЦ отъемно-доливным и периодическим способом согласно вариантам, представленным в табл. 1.

Питательная среда, используемая для культивирования микроорганизмов, должна иметь определенное значение pH, так как этот показатель регулирует физико-химические свойства и биологическую активность белков и нуклеиновых кислот микроорганизма-продуцента. Поэтому для оптимального протекания культивирования необходимо поддерживать pH питательной среды на оптимальном для микроорганизма уровне, при котором наиболее активно протекают процессы его жизнедеятельности. Для используемого в данной работе гриба *R. oryzae* F-1030 оптимальным является pH в пределах 4,5–6,0, при pH 7,7 и выше метаболическая активность гриба значительно замедляется. Поскольку полученные в результате каталитической обработки гидролизаты НСЦ имели низкий pH, физиологически не подходящий для жизнедеятельности гриба, то проводили повышение pH гидролизатов НСЦ 25%-м водным раствором аммиака до $5,6 \pm 0,1$.

Динамика изменения pH гидролизатов НСЦ при культивировании на них гриба *R. oryzae* F-1030 представлена на рис. 1.

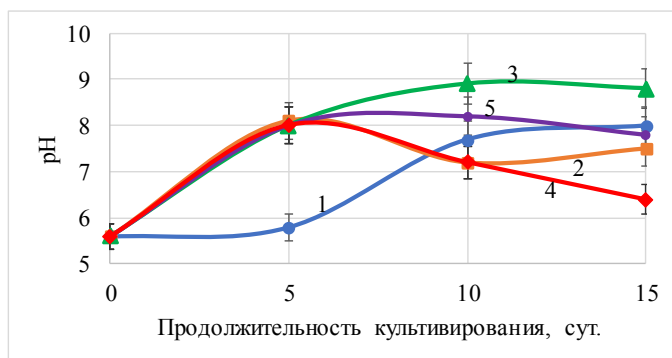


Рис. 1. Динамика изменения pH гидролизатов нейтрально-сульфитных щелочков при культивировании на них *R. oryzae* F-1030

Fig. 1. pH changes in neutral sulfite liquor hydrolysates during *R. oryzae* F-1030 cultivation

Как видно из данных, представленных на рис. 1, в процессе культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 на гидролизатах НСЦ происходит постепенное подщелачивание питательной среды. Увеличение pH среды может быть обусловлено следующими причинами:

- деградация белков и аминокислот НСЦ, сопровождаемая выделением аммиака;
- увеличение концентрации карбонат-ионов в питательной среде вследствие аэробного дыхания микроорганизмов, сопровождающегося выделением углекислого газа.

Наблюдаемое к концу культивирования некоторое подкисление питательной среды, очевидно, связано с накоплением в среде конечного продукта – молочной кислоты.

Поскольку гидролизаты НСЦ имели высокое процентное содержание РВ, то в целях оптимизации их усвоения клетками гриба *R. oryzae* F-1030 проводилось разбавление гидролизатов дистиллированной водой до начального содержания РВ $2,0 \pm 0,1\%$.

Динамика изменения содержания РВ в гидролизатах НСЦ при культивировании на них гриба *R. oryzae* F-1030 представлена на рис. 2.

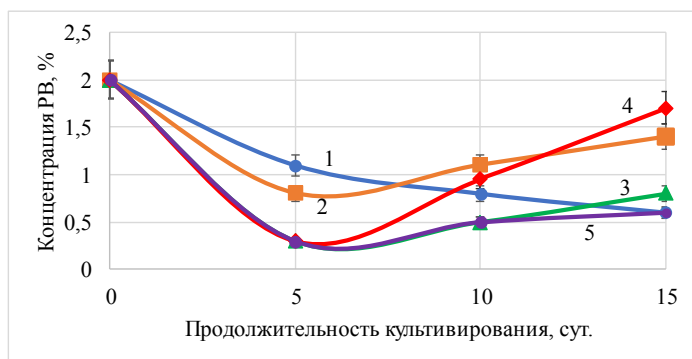


Рис. 2. Динамика изменения содержания редуцирующих веществ в гидролизатах нейтрально-сульфитных щелоков при культивировании на них *R. oryzae* F-1030

Fig. 2. Level of reducing substances in neutral sulfite liquor hydrolysates during *R. oryzae* F-1030 growth

Как видно из данных, представленных на рис. 2, наблюдается закономерное снижение содержания РВ в питательных средах на основе гидроли-

затов НСЦ вследствие ассимиляции их грибом *R. oryzae* F-1030 в процессе культивирования. Как известно, РВ, представленные в основном простыми сахарами, используются микроорганизмами в качестве источников углерода для набора биомассы и синтеза искомого продукта – молочной кислоты [Ха и др., 2019]. Наибольшая ассимиляция РВ грибом-продуцентом наблюдается в первые 5 суток культивирования, что, очевидно, связано с процессами активного роста биомассы гриба и его приспособлением к существованию в гидролизатах НСЦ. В последующие 5–10 суток культивирования ассимиляция РВ происходит в меньшей степени, что объясняется следующими причинами:

- замедление процесса набора биомассы грибом *R. oryzae* F-1030;
- активация целлюлолитических ферментов гриба *R. oryzae* F-1030 (целлюлазы и ксиланазы) и, как следствие, увеличение общей концентрации РВ в питательной среде в результате расщепления присутствующих в гидролизатах НСЦ олигомеров глюкозы и ксилозы до простых сахаров;
- сокращение общей физиологической активности гриба *R. oryzae* F-1030 вследствие естественных процессов старения культуры.

Однако установлено, что при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на кислотном гидролизате периодическим способом (кривая 1 на рис. 2) наблюдается постепенное снижение содержания РВ в питательной среде без выхода на плато. Поскольку при кислотном гидролизе произошло значительное изменение углеводного состава НСЦ вследствие расщепления остаточных гемицеллюлоз до моносахаров, которые гриб планомерно ассимилирует в процессе культивирования, то отсутствие доступных для расщепления ксиланазой и целлюлазой гриба олигосахаров в кислотном гидролизате НСЦ исключает возможность увеличения концентрации РВ в питательной среде за счет действия собственных целлюлолитических ферментов. В случае культивирования гриба на кислотном гидролизате отъемно-доливным способом (кривая 2 на рис. 2) наблюдается некоторое сокращение ассимиляции РВ вследствие необходимости микроорганизму после каждой замены среды заново приспосабливаться к изменившимся условиям окружающей среды, что замедляет его метаболическую активность, ускоряет старение продуцента и, как следствие, снижает продуктивность синтеза молочной кислоты.

Показано, что при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на ферментализатах НСЦ (кривые 3–5 на рис. 2) существенных различий в количестве ассимилируемых РВ в зависимости от способа культивирования

(периодический или отъемно-доливной) не наблюдается. Однако добавление в питательную среду на основе ферментолита НСЦ солей $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 (кривая 4 на рис. 2) приводит к сокращению потребления РВ, сопровождаемому высоким выходом биомассы гриба.

Динамика выхода молочной кислоты при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на гидролизатах НСЦ представлена на рис. 3.

Как видно из данных, представленных на рис. 3, наибольшее увеличение выхода молочной кислоты наблюдается в первые 5 сут. культивирования, тогда как в последующие 10 сут. выход молочной кислоты достигает максимума. Минимальный выход молочной кислоты наблюдается при культивировании гриба на кислотных гидролизатах НСЦ отъемно-доливным способом (кривая 2 на рис. 3), что коррелирует с медленным изменением pH питательной среды и низким уровнем ассимиляции РВ.

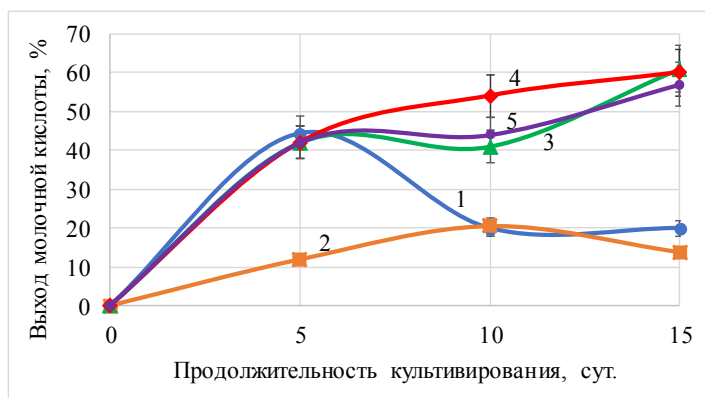


Рис. 3. Динамика выхода молочной кислоты при культивировании *R. oryzae* F-1030 на гидролизатах нейтрально-сульфитных щелоков

Fig. 3. Lactic acid yield in neutral sulfite liquor hydrolysates during *R. oryzae* F-1030 growth

Установлено, что при культивировании гриба на кислотном гидролизате периодическим способом (кривая 1 на рис. 3) высокий выход молочной кислоты в первые 5 сут. культивирования сменяется спадом в последующие 10 сут., в результате чего общий выход молочной кислоты при таком способе культивирования также незначителен. Статистически значимых различий в количестве синтезируемой молочной кислоты при куль-

тивировании гриба на ферментоллизате НСЦ (кривые 3–5 на рис. 3) в зависимости от способа культивирования и наличия дополнительных источников азота, фосфора, серы, калия обнаружено не было.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, наименьший выход молочной кислоты наблюдается при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на кислотных гидролизатах НСЦ как периодическим, так и отъемно-доливным способом. Такой эффект, видимо, связан с полным гидролизом олигосахаров НСЦ до простых сахаров при использовании в качестве гидролизующего агента раствора соляной кислоты. Простые сахара, определяемые как РВ в данной работе, быстро ассимилируются клетками гриба в первую треть времени культивирования и расходуются в основном на прирост биомассы. На последующих этапах культивирования на кислотных гидролизатах наблюдается снижение выхода молочной кислоты и замедление прироста биомассы гриба вследствие нехватки доступных источников углерода и энергии в среде.

Таблица 2

Влияние способа культивирования на продуктивность *R. oryzae* F-1030

The cultivation method effect on *R. oryzae* F-1030 productivity

Питательная среда	Сухая биомасса, г/дм ³	Общий выход молочной кислоты, %
1	2	3
Периодический способ культивирования		
Гидролизат, полученный при обработке НСЦ раствором соляной кислоты	3,4±0,5	28,1±2,5
Ферментоллизат, полученный при обработке НСЦ ферментным препаратом Revitalenz® 200	6,6±0,5	47,0±4,5
Ферментоллизат, полученный при обработке НСЦ ферментным препаратом Revitalenz® 200 с добавлением солей (NH ₄) ₂ SO ₄ и KH ₂ PO ₄	9,1±1,0	51,6±5,0
Отъемно-доливной способ культивирования		
Гидролизат, полученный при обработке НСЦ раствором соляной кислоты	13,6±3,5	15,4±1,5
Ферментоллизат, полученный при обработке НСЦ ферментным препаратом Revitalenz® 200	2,0±0,2	46,2±4,5

Установлено, что наибольший выход молочной кислоты достигается при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на ферментоллизате НСЩ с добавлением солей $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 . Однако высокий выход молочной кислоты сопровождается и высоким выходом биомассы гриба, так как очевидно, что избыток азота, фосфора, серы, калия стимулирует пролиферацию клеток мицелия. При микробиологическом производстве молочной кислоты утилизация биомассы гриба-продуцента является экономически невыгодной проблемой, решение которой значительно увеличит себестоимость продукта. Поэтому при промышленном производстве молочной кислоты использование дополнительных источников азота, фосфора, серы, калия, усиливающих прирост биомассы, авторы считают нерациональным.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов, было установлено, что оптимальное соотношение высокого выхода молочной кислоты и низкого прироста биомассы может быть получено при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на ферментоллизате НСЩ отъемно-доливным способом.

Выводы.

1. Определено, что в начальный период культивирования гриба на гидролизатах НСЩ наблюдается подщелачивание питательной среды, тогда как в заключительный – подкисление. Изменение рН питательной среды связано с накоплением различных метаболитов на разных стадиях физиологической зрелости гриба-продуцента.

2. Установлено, что в процессе культивирования на гидролизатах НСЩ наблюдается постепенное снижение количества РВ, ассимилируемых грибом *R. oryzae* F-1030, что может быть связано как с замедлением процессов роста биомассы гриба, так и с активацией собственных целлюлолитических ферментов гриба, что привело к увеличению общей концентрации РВ в питательной среде.

3. Статистически значимых различий в количестве синтезируемой молочной кислоты при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на ферментоллизате НСЩ в зависимости от способа культивирования обнаружено не было. При этом культивирование гриба *R. oryzae* F-1030 на кислотном гидролизате НСЩ периодическим способом предпочтительнее.

4. Показано, что на прирост биомассы гриба *R. oryzae* F-1030 при культивировании его на питательной среде на основе гидролизатов НСЩ в большей степени оказывает влияние состав питательной среды, зависящий от вида гидролизующего агента и добавления солей $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 ,

тогда как подтверждения влияния способа культивирования на выход биомассы гриба обнаружено не было.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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. DOI: 10.7868/S004445021608003X.

Мингазова Л.А., Канарский А.В., Крякунова Е.В., Канарская З.А. Синтез молочной кислоты грибом *Rhizopus oryzae* F-1030 на питательных средах из сульфитных щелоков // ИВУЗ. Лесной журнал. 2020. № 2. С. 146–158. DOI: 10.37482/0536-1036-2020-2-146-158.

Мингазова Л.А., Крякунова Е.В., Канарская З.А., Канарский А.В. Применение сульфитных щелоков в качестве питательной среды для культивирования продуцента молочной кислоты *Rhizopus oryzae* F-1030 // ИВУЗ. Лесной журнал. 2021а. № 5. С. 163–173. DOI: 10.37482/0536-1036-2021-5-163-173.

Мингазова Л.А., Крякунова Е.В., Канарская З.А., Канарский А.В., Кручина-Богданов И.В., Белкина Е.В. Влияние гидролитической обработки на содержание редуцирующих веществ в нейтрально-сульфитных щелоках // Химия растительного сырья. 2021б. № 3. С. 309–316. DOI: 10.14258/jcrpm.2021039160.

Морозова Ю.А., Скворцов Е.В., Алимова 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.

Ха Т.З., Канарская З.А., Канарский А.В., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Влияние источника углерода на синтез биомассы и экзополисахаридов бактериями *Paenibacillus mucilaginosus* // ИВУЗ. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. № 3. С. 509–518. DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-509-518.

Abdel-Rahman M.A., Tashiro Y., Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes // Biotechnology Advances. 2013. Vol. 31. P. 877–902. Doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002.

Baruah J., Nath B.K., Sharma R., Kumar S., Deka R.C., Baruah D.C., Kalita E. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products // Frontiers in Energy Research. 2018. Vol. 6. P. 1–19. Doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141.

Dumbrepatil A., Adsul M., Chaudhari S., Khire J., Gokhale D. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation // Applied and Environmental Microbiology. 2008. Vol. 74. P. 333–335. DOI: 10.1128/AEM.01595-07.

Fan Y., Zhou C., Zhu X. Selective catalysis of lactic acid to produce commodity chemicals // Catalysis Reviews: Science and Engineering. 2009. Vol. 51. P. 293–324. Doi.org/10.1080/01614940903048513.

Rawoof S.A.A., Kumar P.S., Vo D.-V.N., Devaraj K., Man, Y., Devaraj T., Subramanian S. Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation // *Environmental Chemistry Letters*. 2020. Vol. 19. P. 539–556. Doi.org/10.1007/s10311-020-01083-w.

Saito K., Hasa Y., Abe H. Production of lactic acid from xylose and wheat straw by *Rhizopus oryzae* // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012. Vol. 114. P. 166–169. Doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.03.007.

Tejayadi S., Cheryan M. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995. Vol. 43. P. 242–248.

References

Abdel-Rahman M.A., Tashiro Y., Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 2013, vol. 31, pp. 877–902. Doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002.

Baruah J., Nath B.K., Sharma R., Kumar S., Deka R.C., Baruah D.C., Kalita E. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Frontiers in Energy Research*, 2018, vol. 6, pp. 1–19. Doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141.

Borshchevskaya L.N., Gordeeva T.L., Kalinina A.N., Sineoky S.P. Spektrofotometricheskoe opredelenie molochnoj kisloty. *Zhurnal analiticheskoy himii*, 2016, vol. 71, no. 8, pp. 787–790. DOI: 10.7868/S004445021608003X. (In Russ.)

Dumbrepatil A., Adsul M., Chaudhari S., Khire J., Gokhale D. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, vol. 74, pp. 333–335. DOI: 10.1128/AEM.01595-07.

Fan Y., Zhou C., Zhu X. Selective catalysis of lactic acid to produce commodity chemicals. *Catalysis Reviews: Science and Engineering*, 2009, vol. 51, pp. 293–324. Doi.org/10.1080/01614940903048513.

Ha D.T., Kanarskaya Z.A., Kanarsky A.V., Shcherbakov A.V., Shcherbakova E.N. Vliyanie istochnika ugleroda na sintez biomassy i ekzopolisaharidov bakteriyami *Paenibacillus mucilaginosus*. *IVUZ. Prikladnaya himiya i biotekhnologiya*, 2019, vol. 9, no. 3, pp. 509–518. DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-509-518. (In Russ.)

Mingazova L.A., Kanarsky A.V., Kryakunova E.V., Kanarskaya Z.A. Sintez molochnoj kisloty gribom *Rhizopus oryzae* F-1030 na pitatel'nyh sredah iz sul'fitnyh shchelokov. *IVUZ. Lesnoj zhurnal*, 2020, no. 2, pp. 146–158. DOI: 10.37482/0536-1036-2020-2-146-158. (In Russ.)

Mingazova L.A., Kryakunova E.V., Kanarskaya Z.A., Kanarsky A.V. Primenenie sul'fitnyh shchelokov v kachestve pitatel'noj sredy dlya kul'tivirovaniya producenta molochnoj kisloty *Rhizopus oryzae* F-1030. *IVUZ. Lesnoj zhurnal*, 2021a, no. 5, pp. 163–173. DOI: 10.37482/0536-1036-2021-5-163-173. (In Russ.)

Mingazova L.A., Kryakunova Ye.V., Kanarskaya Z.A., Kanarskiy A.V., Kruchina-Bogdanov I.V., Belkina YE.V. Vliyanie gidroliticheskoy obrabotki na sodержanie reduciruyushchih veshchestv v nejtral'no-sul'fitnyh shchelokah. *Himiya rastitel'nogo syr'ya*, 2021b, no. 3, pp. 309–316. DOI: 10.14258/jcprm.2021039160. (In Russ.)

Morozova Yu.A., Skvortsov E.V., Alimova F.K., Kanarsky A.V. Biosintez ksilanaz i cellyulaz gribami roda *Trichoderma* na poslespirtovoj barde. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta*, 2012, Vol. 15, no. 19, pp. 120–122. (In Russ.)

Rawoof S.A.A., Kumar P.S., Vo D.-V.N., Devaraj K., Man, Y., Devaraj T., Subramanian S. Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation. *Environmental Chemistry Letters*, 2020, vol. 19, pp. 539–556. Doi.org/10.1007/s10311-020-01083-w.

Saito K., Hasa Y., Abe H. Production of lactic acid from xylose and wheat straw by *Rhizopus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, vol. 114, pp. 166–169. Doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.03.007.

Tejayadi S., Cheryan M. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, vol. 43, pp. 242–248.

Материал поступил в редакцию 27.10.2023

Мингазова Л.А., Крякунова Е.В., Галиева А.Р., Канарская З.А., Канарский А.В., Кручина-Богданов И.В., Белкина Е.В. Влияние способа культивирования гриба *Rhizopus oryzae* F-1030 на гидролизатах нейтрально-сульфитного щелока на эффективность синтеза молочной кислоты // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2024. Вып. 250. С. 405–422. DOI: 10.21266/2079-4304.2024.250.405-422

Производство молочной кислоты в промышленном масштабе ведется в основном путем микробиологической ферментации сахаросодержащего сырья. При этом стоимость субстрата для промышленного производства молочной кислоты определяет практически половину стоимости всего производства. Использование индивидуальных сахаров в качестве источника углерода для микробиологического синтеза молочной кислоты приводит к сильному удорожанию производства. Лигноцеллюлозная биомасса является одним из наиболее распространенных природных возобновляемых источников углерода, применение которой в биотехнологическом производстве в качестве сахаросодержащего субстрата ограничено отсутствием у большинства промышленных штаммов микроорганизмов целлюлолитических ферментов. Мицелиальный гриб *Rhizopus oryzae* является промышленным продуцентом молочной кислоты, способным метаболизировать лигноцеллюлозу. Рост микроорганизмов, потребление субстрата и выход молочной кислоты

определяется активностью метаболизма клеток продуцента и зависит от условий культивирования. Регуляция микробиологического производства молочной кислоты осуществляется изменением таких факторов среды, как температура, pH, концентрация питательных веществ в субстрате и концентрация конечного продукта. В работе осуществлялся подбор условий культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 на нейтрально-сульфитных щелоках, позволяющие получить оптимальное соотношение биомассы и количества синтезируемой молочной кислоты. Показано, что кислотность питательной среды зависит от концентрации метаболитов, продуцируемых грибом на разных стадиях физиологической зрелости. Изменение содержания редуцирующих веществ в питательной среде обусловлено скоростью роста клеток гриба *R. oryzae* F-1030 и активностью целлюлолитических ферментов. Статистически значимых различий в количестве синтезируемой молочной кислоты и приросте биомассы в зависимости от способа культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 на ферментализате нейтрально-сульфитного щелока выявлено не было. На прирост биомассы гриба *R. oryzae* F-1030 оказывает влияние как вид гидролизующего агента (кислота или ферментный препарат), так и состав питательной среды, в частности наличие солей азота, фосфора, серы, калия. При культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на кислотном гидролизате нейтрально-сульфитного щелока рекомендуется использовать периодический способ культивирования.

Ключевые слова: нейтрально-сульфитный щелок, кислотный гидролиз, ферментативный гидролиз, гриб *Rhizopus oryzae* F-1030, молочная кислота, периодический способ культивирования, отъемно-доливной способ культивирования.

Mingazova L.A., Kryakunova E.V., Galieva A.R., Kanarskaya Z.A., Kanarskii A.V., Kruchina-Bogdanov I.V., Belkina E.V. The fungus *Rhizopus oryzae* F-1030 cultivating mode on neutral sulfite liquor hydrolysates affects the lactic acid synthesis efficiency. *Izvestia Sankt-Peterburgskoj Lesotekhnicheskoy Akademii*, 2024, iss. 250, pp. 405–422 (in Russian with English summary). DOI: 10.21266/2079-4304.2024.250.405-422

The industrial lactic acid production is based on microbiological fermentation of sugar-containing feedstock. Generally, the price on the substrate controls almost half the cost of the entire production. The use of pure individual sugars as a carbon source for the microbiological lactic acid synthesis leads to a significant rise in production expenses. Lignocellulosic biomass is one of the most common natural renewable sources of carbon, the use of which in biotechnological production as a carbohydrate-containing substrate is limited mostly due to the lack of cellulolytic enzymes in most strains of microorganisms used on industrial scale. The filamentous fungus *Rhizopus oryzae* is an industrial lactic acid producing microorganism capable of metabolizing lignocellulose. The growth of microbial mass, substrate consumption rate and lactic

acid yield are controlled by the metabolic activity of the producer cells, the latter depending on the cultivation mode. The microbiological lactic acid production regulation is carried out by changing such factors of nutrient medium as temperature, pH, nutrient concentration in the substrate and the final product concentration. The work involved the conditions' selection for fungus *R. oryzae* F-1030 cultivation on neutral sulfite liquor, which made it possible to attain the optimal ratio of biomass and the synthesized lactic acid yield. It has been shown that the nutrient medium acidification is affected by the physiological maturity of the fungus. The level of reducing substances in the nutrient medium is controlled by the growth rate of the fungus *R. oryzae* F-1030 cells and the activity of its cellulolytic enzymes. There were no statistically significant differences in the amount of synthesized lactic acid and biomass growth depending on the mode of the fungus *R. oryzae* F-1030 cultivation on the neutral sulfite liquor after treatment with externally added enzymes. The growth of fungus *R. oryzae* F-1030 biomass is influenced by both the type of hydrolyzing agent (acid or enzyme) and the composition of the nutrient medium, in particular the presence of nitrogen, phosphorus, sulfur, and potassium salts. The batch cultivation mode was demonstrated as optimal for the fungus *R. oryzae* F-1030 to grow on the neutral sulfite liquor after acid hydrolysis.

Keywords: neutral sulfite liquor, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, fungus *Rhizopus oryzae* F-1030, lactic acid, batch cultivation method, weaning-topping cultivation method.

МИНГАЗОВА Лейсан Азатовна – старший преподаватель 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), Senior Lecturer 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, К. Маркса, д. 68, Казань, Республика Татарстан, Россия. E-mail: oscillatoria@rambler.ru

ГАЛИЕВА Айгуль Рафиковна – ассистент кафедры пищевой инженерии Казанского национального исследовательского технологического университета.

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

GALIEVA Aigul R. – Assistant of the Department of Food Engineering, Kazan National Research Technological University.

420015, К. Маркса, д. 68, Казань, Республика Татарстан, Россия. E-mail: af.signal@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 of the Department of Food Biotechnology, Kazan National Research Technological University. SPIN code: 2787-1694. ORCID: 0000-0002-8194-6185

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

КРУЧИНА-БОГДАНОВ Игорь Вадимович – генеральный директор ООО «АМТ», кандидат химических наук.

194021, пер. Институтский, д. 5Б, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: igogo011@gmail.com

KRUCHINA-BOGDANOV Igor V. – PhD (Chemical), General manager of AMT LLC.

194021. Institutskiy per. 5B. St. Petersburg. Russia. E-mail: igogo011@gmail.com

БЕЛКИНА Екатерина Васильевна – инженер-технолог, заместитель директора по качеству ООО «Прикамский картон».

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

BELKINA Ekaterina V. – Process Engineer, Deputy Director for Quality of Prikamsky Karton LLC.

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