

УДК 663.15

DOI: 10.37482/0536-1036-2021-5-163-173

## ПРИМЕНЕНИЕ СУЛЬФИТНЫХ ЩЕЛОКОВ В КАЧЕСТВЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ *Rhizopus oryzae F-1030*

Л.А. Мингазова, аспирант; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3289-3977>

Е.В. Крякунова, канд. биол. наук, доц.; ResearcherID: [Z-3038-2019](https://orcid.org/0000-0003-4563-9847),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4563-9847>

З.А. Канарская, канд. техн. наук, доц.; ResearcherID: [AAG-2997-2020](https://orcid.org/0000-0002-8194-6185),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8194-6185>

А.В. Канарский, д-р техн. наук, проф.; ResearcherID: [O-8113-2016](https://orcid.org/0000-0002-3541-2588),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3541-2588>

Казанский национальный исследовательский технологический университет, ул. К. Маркса, д. 68, Казань, Республика Татарстан, Россия, 420015; e-mail: zleisan1@mail.ru, Oscillatoria@rambler.ru, zosya\_kanarskaya@mail.ru, alb46@mail.ru

---

Оригинальная статья / Поступила в редакцию 19.04.20 / Принята к печати 26.06.20

---

**Аннотация.** Мицелиальные грибы *Rhizopus oryzae* хорошо известны своей способностью гидролизовать полисахариды растительного происхождения. Эти грибы широко используют для производства различных продуктов, таких как органические кислоты (молочная кислота, фумаровая кислота), этанол и гидролитические ферменты (гликоамилазы, полигалактуроназы). Для синтеза экзопродуктов *R. oryzae* необходимы различные источники углерода, богатые 5- и 6-углеродными сахарами. При производстве молочной кислоты микробиологическим методом в промышленных масштабах применяют дорогостоящее растительное сахаросодержащее сырье, а это существенно увеличивает конечную стоимость продукта. В статье показано, что в качестве альтернативного источника углерода для микробиологического синтеза молочной кислоты можно использовать более дешевые субпродукты целлюлозно-бумажного производства – сульфитные щелока. Они содержат большое количество углеводов – продуктов неполного гидролиза целлюлозы – гемицеллюлоз, моно- и олигомерных сахаров. Состав сульфитных щелоков позволяет рассматривать их в качестве потенциального субстрата для синтеза молочной кислоты микробиологическим методом. Изучена зависимость выхода молочной кислоты от состава питательной среды на основе сульфитного щелока и метода культивирования гриба *R. oryzae F-1030*. В качестве дополнительных источников азота и фосфора в питательную среду вносили  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Использованы два способа культивирования: отъемно-доливный, когда по мере истощения редуцирующих сахаров полностью заменяли питательную среду; периодический, в этом случае недостаток редуцирующих сахаров в среде компенсировали добавлением упаренного сульфитного щелока. Поскольку питательная среда на основе сульфитного щелока содержит продукты неполного гидролиза целлюлозы и ксиланы, определяли ксиланазную и целлюлазную активность гриба *R. oryzae F-1030*, что позволило судить об эффективности усвоения им содержащихся в питательной среде углеводов. Установлено, что для получения большего выхода молочной кислоты культивирование гриба *R. oryzae F-1030* на питательной среде из сульфитного щелока целесообразнее проводить отъемно-доливным способом, при этом добавление минеральных источников азота и фосфора практически не влияет на конечный выход молочной кислоты.

**Для цитирования:** 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* // Изв. вузов. Лесн. журн. 2021. № 5. С. 163–173. DOI: 10.37482/0536-1036-2021-5-163-173

**Благодарность:** Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Экология, биотехнологии и процессы получения экологически чистых энергоносителей» Поволжского государственного технологического университета.

**Ключевые слова:** сульфитный щелок, *Rhizopus oryzae*, молочная кислота, целлюлаза, ксиланаза, отъемно-доливной способ культивирования, периодический способ культивирования.

## APPLYING SULFITE LIQUORS AS A NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION OF LACTIC ACID PRODUCER *Rhizopus oryzae F-1030*

**Leysan A. Mingazova**, Postgraduate Student; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3289-3977>

**Elena V. Kryakunova**, Candidate of Biology, Assoc. Prof.; ResearcherID: [Z-3038-2019](https://orcid.org/0000-0003-4563-9847),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4563-9847>

**Zosya A. Kanarskaya**, Candidate of Engineering, Assoc. Prof.; ResearcherID: [AAG-2997-2020](https://orcid.org/0000-0002-8194-6185),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8194-6185>

**Albert V. Kanarsky**, Doctor of Engineering, Prof.; ResearcherID: [O-8113-2016](https://orcid.org/0000-0002-3541-2588),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3541-2588>

Kazan National Research Technological University, ul. K. Marksa, 68, Kazan, Republic of Tatarstan, 420015, Russian Federation; e-mail: [zleisan1@mail.ru](mailto:zleisan1@mail.ru), [Oscillatoria@rambler.ru](mailto:Oscillatoria@rambler.ru), [zosya\\_kanarskaya@mail.ru](mailto:zosya_kanarskaya@mail.ru), [alb46@mail.ru](mailto:alb46@mail.ru)

---

Original article / Received on April 19, 2020 / Accepted on June 26, 2020

---

**Abstract.** The filamentous fungi *Rhizopus oryzae* are well known for their ability to hydrolyze plant polysaccharides. Representatives of this species are widely used for the production of various products, such as organic acids (lactic acid, fumaric acid), ethanol, and hydrolytic enzymes (glucoamylases, polygalacturonases). Various carbon sources such as pentose and hexose sugars are used for the synthesis of *R. oryzae* exoproducts. Expensive plant sugar-containing raw materials are used in the lactic acid production by the microbiological method, which significantly increases the final cost of the product. The article demonstrates the possibility of using cheaper by-products of pulp and paper production such as sulphite liquors as an alternative source of carbon for microbiological synthesis of lactic acid. Sulphite liquors contain a large amount of carbohydrates – products of incomplete hydrolysis of cellulose such as hemicelluloses, mono- and oligomeric sugars. The composition of sulfite liquors allows us to consider them as a potential substrate for the synthesis of lactic acid by using different microorganisms. The paper considers the dependence of the lactic acid yield on the composition of the nutrient medium based on sulfite liquor and the cultivation method of the fungus *R. oryzae F-1030*. As additional sources of nitrogen and phosphorus,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  were introduced to the nutrient medium. The fungus *R. oryzae F-1030* was cultivated by two methods: the semicontinuous culture method, when the nutrient medium was completely replaced after depletion of the reducing sugars in it; the batch culture method, when the lack of reducing sugars in the medium was compensated by the addition of concentrated sulfite liquor. Since the nutrient medium based on sulfite liquor contains the products of incomplete cellulose hydrolysis and xylans, the xylanase and cellulase activities of the fungus *R. oryzae F-1030* were measured in order to determine its absorption degree of carbohydrates, contained in the nutrient medium. It was found that it is more expedient to use

the semicontinuous method for the fungus *R. oryzae* F-1030 cultivation on a nutrient medium based on sulfite liquor in order to obtain more synthesized lactic acid. The addition of mineral sources of nitrogen and phosphorus has practically no effect on the final yield of lactic acid.

**For citation:** Mingazova L.A., Kryakunova E.V., Kanarskaya Z.A., Kanarsky A.V. Applying Sulfite Liquors as a Nutrient Medium for Cultivation of Lactic Acid Producer *Rhizopus oryzae* F-1030. *Lesnoy Zhurnal* [Russian Forestry Journal], 2021, no. 5, pp. 163–173. DOI: 10.37482/0536-1036-2021-5-163-173

**Acknowledgements:** The work was carried out using the equipment of the Center for Collective Use “Ecology, Biotechnology and Processes for Producing Environmentally Friendly Energy Carriers” of the Volga State University of Technology.

**Keywords:** sulphite liquor, *Rhizopus oryzae*, lactic acid, cellulase, xylanase, semicontinuous culture method, batch culture method.

### Введение

Молочная, или 2-гидроксипропановая кислота, открытая шведским химиком К.В. Шееле в 1780 г., является наиболее широко встречающейся гидроксикарбоновой кислотой [13]. В настоящее время известны 2 способа синтеза молочной кислоты: химический и микробиологический. Органический синтез молочной кислоты осуществляется на основе различных предшественников (ацетальдегид, уксусная кислота, ацетонитрил и др.) Однако получаемая при органическом синтезе молочная кислота является рацемической, содержащей в равном количестве правые и левые изомеры молочной кислоты, что затрудняет применение синтетической молочной кислоты [21].

Микробиологический (ферментативный) способ синтеза молочной кислоты основан на сбраживании сахаросодержащих субстратов [14] и имеет преимущества по сравнению с синтетическим способом, поскольку дает на выходе молочную кислоту с более высокой стереохимической чистотой. Молочная кислота, полученная микробиологически, находит широкое применение в пищевой промышленности, что обусловлено уникальными свойствами этой кислоты, позволяющими использовать ее в качестве ароматизатора, окислителя и ингибитора роста бактерий [2]. В косметической промышленности молочную кислоту применяют для создания уникальной структуры увлажняющих кремов [11, 28, 29]. Модифицированная поли-L-молочная кислота позволяет изготавливать протезы, сохраняющие необходимую прочность в организме человека в течение длительного времени [6]. Для кормления сельскохозяйственных животных существуют премиксы, стимулирующие рост, которые содержат молочную кислоту [7].

В настоящее время наблюдается тенденция к увеличению объемов использования молочной кислоты в технических целях [9, 23]. Перспективным является ее применение в производстве биополимеров [15, 17, 20], в том числе строительных материалов [19, 24].

Потребности мирового рынка в молочной кислоте удовлетворяют преимущественно компании, которые производят этот продукт микробиологическим синтезом. В качестве продуцентов молочной кислоты используют разнообразные виды бактерий, грибов и дрожжей [8, 10, 22, 25].

Совершенствование технологии микробиологического синтеза молочной кислоты обусловлено необходимостью снижения себестоимости производства. В настоящее время для получения молочной кислоты широко применяют такие дорогостоящие сахаросодержащие субстраты, как картофель, кукуруза, ячмень, меласса, сахарный сироп и т. п., что приводит к значительному увеличению себестоимости продукта [27]. В этой связи поиск доступных и дешевых сырьевых источников для синтеза молочной кислоты актуален. В качестве такого сырьевого источника может рассматриваться сульфитный щелок, получаемый при производстве целлюлозы сульфитным способом, содержащий продукты частичного гидролиза целлюлозы и ксиланы. Эффективность культивирования молочной кислоты на питательных средах, содержащих олигомерные углеводы, будет определяться ферментативной активностью продуцента молочной кислоты – мицелиального гриба *Rhizopus oryzae F-1030*, а также составом питательной среды и способом культивирования.

Цель работы – определить зависимость выхода молочной кислоты от состава питательной среды на основе сульфитного щелока и способа культивирования гриба *R. oryzae F-1030*. Задачи – установить целлюлазную и ксиланазную активность гриба *R. oryzae F-1030* при культивировании, его способность утилизировать олигомерные углеводы с последующим синтезом молочной кислоты; выявить зависимость выхода молочной кислоты от минеральных источников азота и фосфора; оценить влияние отъемно-доливного и периодического способов культивирования на выход молочной кислоты.

#### Объекты и методы исследования

Штамм *R. oryzae F-1030*, продуцент молочной кислоты, был получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Культуру гриба выращивали на картофельно-глюкозном агаре при температуре 28...30 °С в течение 7 дней. Состав картофельного агара: 200 г мелкоизмельченных клубней картофеля, 20 г глюкозы, 20 г агара, 1000 см<sup>3</sup> воды. Использовали питательные среды, приготовленные из сульфитного щелока, предоставленного ОАО «Выборгская целлюлоза».

Сульфитный щелок очищали и готовили для выращивания микроорганизмов по стандартной схеме, рекомендованной в промышленности для культивирования дрожжей [12]. Биохимическая подготовка питательных сред включала следующие стадии: улавливание мелкого целлюлозного волокна; удаление летучих веществ из щелока посредством продувки горячим воздухом; доведение pH до 6,0 известковым молоком; добавление 8–9 г/дм<sup>3</sup> сульфата аммония и 0,3–0,5 г/дм<sup>3</sup> однозамещенного фосфата калия. После завершения предварительной подготовки питательная среда содержала 10...11 % сухих веществ, 28,7 г/л редуцирующих веществ и имела pH 5,8.

Стерилизацию питательных сред проводили автоклавированием при температуре 115 °С в течение 60 мин. Выращивание *R. oryzae F-1030* осуществляли внесением части мицелия в питательную среду и последующим культивированием при температуре 28±2 °С и непрерывном перемешивании. В культуральной жидкости контролировали pH, температуру, содержание редуцирующих веществ, концентрацию молочной кислоты.

Культивирование гриба проводили в 4 стадии, окончание каждой стадии определяли по полному истощению редуцирующих (восстанавливающих) веществ в питательной среде. Продолжительность 1-й стадии составляла  $14 \pm 0,5$  дн., 2-й –  $12 \pm 2$  дн., 3-й –  $12 \pm 3$  дн., 4-й –  $10 \pm 3$  дн.

Использованы 2 способа культивирования *R. oryzae F-1030*: отъемно-доливной и периодический. При отъемно-доливном способе культивирования по мере исчерпания редуцирующих сахаров в среде полностью отбирали культуральную жидкость и доливали аналогичный объем стерильной питательной среды. К половине образцов в начале культивирования и при каждой смене среды добавляли сульфат аммония и однозамещенный фосфат калия для большего обогащения среды азотом и фосфором. В ходе процесса культивирования гриба периодическим способом вносили простые сахара в составе упаренного сульфитного щелока. По окончании 4-й стадии проводили осаждение синтезированной молочной кислоты внесением в культуральную жидкость стерильной гашеной извести для доведения рН до 7,5. К половине исследуемых образцов в начале культивирования также добавляли сульфат аммония и однозамещенный фосфат калия.

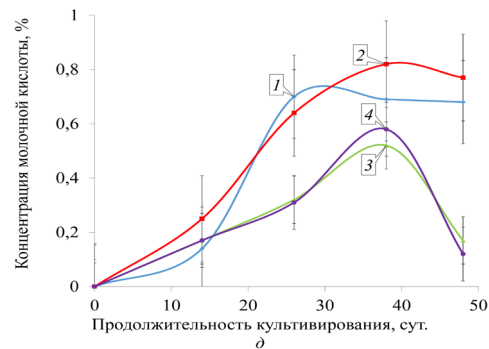
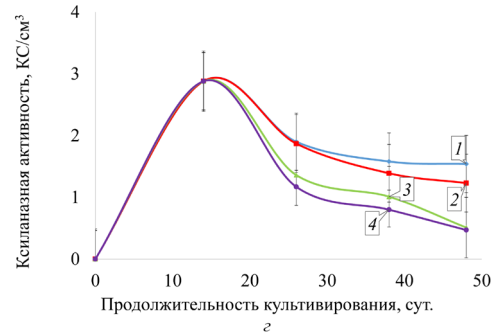
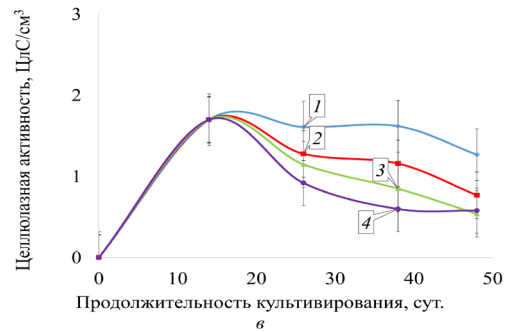
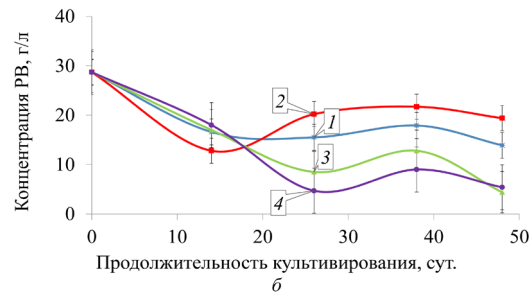
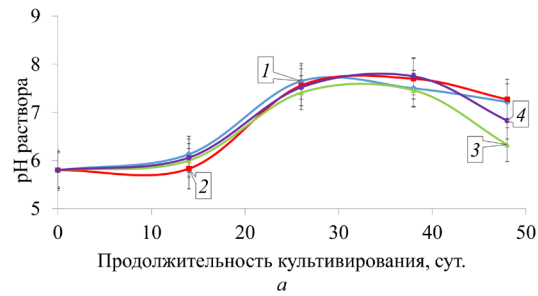
Измерение рН проводили с помощью лабораторного рН-метра рН-150МИ в каждой контрольной точке до отбора пробы и после доведения рН среды до значения 7,5. Содержание редуцирующих веществ (РВ) в питательной среде и культуральной жидкости определяли по методике [3]; ксиланазную активность *R. oryzae F-1030* – по стандартной методике (ГОСТ Р 55302–2012), основанной на количественном определении редуцирующих (восстанавливающих) сахаров, образующихся в результате действия фермента ксиланазы на ксилан [18]; целлюлазную активность – по ГОСТ Р 55293–2012, через определение редуцирующих сахаров, образующихся под действием фермента целлюлазы на субстрат натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы [16]; содержание молочной кислоты в культуральной жидкости – спектрофотометрическим методом [1].

Извлечение молочной кислоты из культуральной жидкости осуществляли переводом ее в лактат кальция при добавлении гашеной извести и доведении рН до 10,0. Образовавшийся лактат кальция отделяли центрифугированием.

Осадок лактата кальция диспергировали в дистиллированной воде и доводили рН концентрированной серной кислотой до 1,5...2,5. Выпавший сульфат кальция отделяли центрифугированием, а содержащую молочную кислоту надосадочную жидкость дополнительно очищали от гипса фильтрованием через бумажный фильтр. Математическую обработку полученных экспериментальных результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel.

#### *Результаты исследования и их обсуждение*

Высокую скорость роста микроорганизмов полезных метаболитов определяет наличие в питательной среде достаточного количества соединений углерода и азота, а также минеральных веществ, содержащих фосфор, калий, натрий и т. п. Питательные среды, используемые для культивирования микроорганизмов, должны быть сбалансированы по составу, изотоничны по концентрации растворенных веществ и оптимальны по уровню рН. По окончании каждой стадии культивирования контролировали рН среды (см. рисунок а).



Динамика изменения pH (а), содержания РВ (б), целлюлазной (в), ксиланазной (г) активностей гриба *R. oryzae F-1030* и динамика синтеза им молочной кислоты (д) при культивировании на питательных средах на основе сульфитного щелока: отъемно-доливным способом с добавлением (1) и без добавления (2)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; периодическим способом с добавлением (3) и без добавления (4)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Dynamics of changes in pH (a), content of reducing agents (б), cellulase (в) and xylanase (г) activities of the fungus *R. oryzae F-1030* and dynamics of lactic acid synthesis (д) by the fungus during cultivation on the nutrient media based on sulfite liquor: by the semicontinuous culture method with (1) and without (2) addition of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; by the batch culture method with (3) and without (4) addition of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$



Как видно из данных, представленных на рисунке *a*, характер изменения рН питательных сред на основе сульфитного щелока не зависит от применяемого способа культивирования *R. oryzae F-1030*. В течение первых 14 сут. (1-я стадия) оптимальный для роста гриба рН =  $5,8 \pm 0,5$  не изменяется, затем происходит незначительное подщелачивание среды до рН =  $7,5 \pm 0,3$  (вызванное, вероятнее всего, формированием лактата кальция), в результате реакция образующейся молочной кислоты с кальцием, избыточное содержание которого в растворе сохраняется на протяжении следующих 25 сут. (2-я и 3-я стадии), продолжается до исчерпывания катионов кальция в среде. Последующее снижение рН среды объясняем накоплением молочной кислоты, активно синтезируемой грибом *R. oryzae F-1030*. Расхождения в значениях рН среды наблюдали только на 35-й день (4-я стадия), когда начинался процесс старения гриба. При периодическом способе культивирования более выраженное снижение рН на конечных этапах культивирования, очевидно, связано с истощением имеющихся в среде минеральных солей, в частности соединений азота и фосфора, и накоплением молочной кислоты. При отъемно-доливном способе культивирования снижение рН было менее выражено, т. к. в начале каждой стадии проводили полную замену питательной среды.

В качестве источника углерода низшие грибы используют в первую очередь простые углеводы – гексозы и пентозы. Грибы ассимилируют азот как из органических, так и из неорганических соединений, таких как белки, аминокислоты, соли аммония, нитраты и т. д. Для компенсации возможного дефицита источников фосфора и азота в питательные среды добавляли сульфат аммония и однозамещенный фосфат калия.

Как видно из рисунка *б*, в начальный период культивирования происходит закономерное снижение содержания РВ в питательной среде, связанное с ассимиляцией их грибом *R. oryzae F-1030* в качестве источника углерода. Однако примерно со 2-й стадии содержание РВ растет, что более выражено при отъемно-доливном способе культивирования.

Многие микроскопические грибы, включая *R. oryzae*, имеют ферменты, способные гидролизовать целлюлозу и гемицеллюлозу. Целлюлаза представляет собой комплекс ферментов, которые могут осуществлять гидролиз гликозидных связей в различных лигноцеллюлозных субстратах. Целлюлазы делят на 3 основных класса: эндо-1,4-β-D-глюканаза, экзо-1,4-β-глюканаза и β-D-глюкозидаза. Ксиланы – самый распространенный класс гемицеллюлоз. Ксиланаза гидролизует связи β-1,4 в основной цепи ксилана с образованием коротких олигомеров, гидролизующихся с образованием отдельных единиц ксилозы под действием β-ксилозидазы. Грибы значительно увеличивают синтез целлюлаз и ксиланаз при наличии в среде специфических веществ-индукторов, как правило, являющихся продуктами неполного гидролиза субстрата [5, 26].

Как видно из данных, представленных на рисунках *в* и *г*, в течение 1-й стадии культивирования гриб *R. oryzae F-1030* обладает наибольшей активностью целлюлазных и ксиланазных ферментов, т. к. в среде находится большое количество доступных для расщепления субстратов – олигомеров целлюлозы и ксилозы. На более поздних стадиях наблюдается закономерное снижение ферментативной активности гриба, более выраженное при периодическом способе культивирования, что связано с истощением питательной среды. В случае применения

отъемно-доливного способа культивирования снижение активности целлюлаз и ксиланаз гриба не так сильно проявляется, потому что на каждой стадии происходит полное обновление питательной среды и доступные для расщепления ферментами гриба субстраты не истощаются. Постепенное снижение ферментативной активности гриба в данном случае, вероятно, связано с его старением.

Характер изменения ферментативной активности гриба *R. oryzae F-1030* согласуется с некоторым ростом содержания РВ в питательной среде, начиная с середины 1-й стадии культивирования, когда после истощения имеющихся в изначальной питательной среде простых сахаров происходит образование новых за счет расщепления олигомеров целлюлозы и ксилозы ферментными системами гриба.

Основным продуктом, синтезируемым грибом *R. oryzae F-1030*, является молочная кислота. Для ее синтеза гриб использует различные источники углерода, богатые гексозными и пентозными сахарами, такие как различные виды крахмала, гидролизаты древесины, ксилоза и т. п. [27].

На рисунке *д* показано, что на протяжении первых 3 стадий культивирования происходит постепенное увеличение количества синтезируемой грибом *R. oryzae F-1030* молочной кислоты. При этом отъемно-доливной способ не дает постепенного снижения концентрации молочной кислоты, выделяемой грибом в культуральную жидкость, в отличие от периодического способа. Стабилизация количества синтезируемой грибом молочной кислоты на конечной стадии культивирования при использовании отъемно-доливного способа объясняется наличием в питательной среде достаточного количества сахаров для синтеза молочной кислоты даже стареющими клетками гриба.

Суммарный выход биомассы гриба и молочной кислоты по окончании 4 стадий культивирования представлен в таблице. Завершение культивирования после 4-й стадии связано с замедлением скорости утилизации РВ и синтеза молочной кислоты грибом *R. oryzae F-1030*, это объясняется его старением.

**Итоговый выход биомассы и молочной кислоты в зависимости от способа культивирования гриба *R. oryzae F-1030***

Способ культивирования*	Сухая биомасса, г/дм <sup>3</sup>	Выход молочной кислоты, %	Концентрация молочной кислоты, г/дм <sup>3</sup>
1	9,1±0,5	40,8±2,0	6,5±0,5
2	6,9±0,5	32,8±2,0	5,9±0,5
3	9,2±0,5	29,5±2,0	3,0±0,5
4	9,6±0,5	33,5±2,0	3,0±0,5

\*Цифра соответствует номеру на рисунке.

При отъемно-доливном способе культивирования, что отражают данные таблицы, наблюдали больший выход молочной кислоты, чем при использовании периодического способа. Добавление в питательную среду сульфата аммония и однозамещенного фосфата калия при отъемно-доливном способе культивирования привело к лучшему усвоению РВ и большему приросту биомассы. Однако значительного увеличения конечной концентрации молочной кислоты не происходило. В случае применения периодического способа культивирования существенных отличий в приросте биомассы и выходе молочной кислоты



в зависимости от наличия в питательной среде дополнительных солей не выявили.

Таким образом, для культивирования гриба *R. oryzae F-1030* на питательной среде на основе сульфитного щелока целесообразнее использовать отъемно-доливной способ, при этом добавление сульфата аммония и однозамещенного фосфата калия не влияет на конечный выход молочной кислоты. Полученные результаты дополняют ранее опубликованные авторами [4].

#### Выводы

Определено наличие у гриба *Rhizopus oryzae F-1030* целлюлазной и ксиланазной активностей, связанных с ферментативным гидролизом имеющихся в питательной среде на основе сульфитного щелока гемицеллюлоз и увеличением концентрации доступных для гриба редуцирующих веществ.

Внесение в состав питательной среды сульфата аммония и однозамещенного фосфата калия не влияет на конечный выход молочной кислоты. Питательную среду обогащали минеральными источниками азота и фосфора, что достаточно для поддержания физиологической активности гриба *R. oryzae F-1030* на высоком уровне. При отъемно-доливном способе культивирования гриба *R. oryzae F-1030* выход молочной кислоты выше, чем при периодическом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Калинина А.Н., Синеокий С.П. Спектрофотометрическое определение молочной кислоты // Журнал аналит. химии. 2016. Т. 71, № 8. С. 787–790. Borshchevskaya L.N., Gordееva T.L., Kalinina A.N., Sineokii S.P. Spectrophotometric Determination of Lactic Acid. *Zhurnal analiticheskoy khimii* [Journal of Analytical Chemistry], 2016, vol. 71, no. 8, pp. 787–790. DOI: <https://doi.org/10.7868/S004445021608003X>
2. Евелева В.В., Новицкая И.Б., Черпалова Т.М., Никулина И.Д. Технологические инновации в производстве пищевой молочной кислоты // Пищевая пром-сть. 2014. № 4. С. 26–28. Eveleva V.V., Novitskaya I.B., Cherpalova T.M., Nikulina I.D. Technological Innovations in Production of Food Lactic Acid. *Pishchevaya promyshlennost'* [Food Industry], 2014, no. 4, pp. 26–28.
3. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1970. 343 с. Korenman I.M. *Photometric Analysis. Methods for Determination of Organic Compounds*. Moscow, Khimiya Publ., 1970. 343 p.
4. 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 // Изв. вузов. Лесн. журн. 2020. № 2. С. 146–158. Mingazova L.A., Kanarsky A.V., Kryakunova E.V., Kanarskaya Z.A. Lactic Acid Synthesis by Fungus *Rhizopus oryzae F-1030* on Growth Media Based on Sulphite Liquors. *Lesnoy Zhurnal* [Russian Forestry Journal], 2020, no. 2, pp. 146–158. DOI: <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2020-2-146-158>
5. Морозова Ю.А., Скворцов Е.В., Алимова Ф.К., Канарский А.В. Биосинтез ксиланаз и целлюлаз грибами рода *Trichoderma* на послеспиртовой барде // Вестн. Казан. технол. ун-та. 2012. Т. 15, № 19. С. 120–122. Morozova Yu.A., Skvortsov E.V., Alimova F.K., Kanarsky A.V. The Biosynthesis of Xylanase and Cellulase by Fungi of *Trichoderma* Genus on DDGS. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of the Technological University], 2012, vol. 15, no. 19, pp. 120–122.
6. Намханов В.В., Будаев Б-Ж.А., Товаршинов А.И., Борбоев Л.В. Влияние материалов зубных протезов на органы полости рта // Вестн. БГУ. 2009. № 12. С. 143–149. Namhanov V.V., Budaev B-Zh.A., Tovarshinov A.I., Borboev L.V. Influence of Materials

of Dental Artificial Limbs on Bodies of Oral Cavity. *Vestnik Buryatskogo gosuniversiteta* [BSU bulletin], 2009, no. 12, pp. 143–149.

7. Никанова Л.А. Влияние органических кислот на продуктивность, резистентность, микробиоценоз кишечника и биохимические показатели сыворотки крови свиней // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32, № 7. С. 65–67. Nikanova L.A. Influence of Organic Acids on Productivity, Resistance, Intestinal Microbiocenosis and Biochemical Parameters of Blood Serum of Pigs. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK* [Achievements of Science and Technology of AIC], 2018, vol. 32, no. 7, pp. 65–67. DOI: [10.24411/0235-2451-2018-10715](https://doi.org/10.24411/0235-2451-2018-10715)

8. Новожилов Е.В. Оценка биоресурса сульфитных щелоков как сырья для производства кормовых дрожжей // Изв. вузов. Лесн. журн. 1999. № 2-3. С. 179–188. Novozhilov E.V. Assessment of Sulfite Liquors Bioresource as a Raw Material for Nutrient Yeast Production. *Lesnoy Zhurnal* [Russian Forestry Journal], 1999, no. 2-3, pp. 179–188. URL: [http://lesnoizhurnal.ru/upload/iblock/eea/179\\_188.pdf](http://lesnoizhurnal.ru/upload/iblock/eea/179_188.pdf)

9. Няникова Г.Г., Комиссарчик С.М., Хрусталёва М.В. Исследование условий культивирования *Rhizopus oryzae* для получения молочной кислоты и биосорбента // Изв. СПбГТИ (ТУ). 2012. Т. 17, № 43. С. 56–60. Nyankova G.G., Komissarchik S.M., Khrustaleva M.V. A Study of the *Rhizopus oryzae* Cultivation Conditions for Lactic Acid and Biosorbent Preparation. *Izvestiya SPbGTI (TU)* [Bulletin of St PbSIT (TU)], 2012, vol. 17, no. 43, pp. 56–60. DOI: <https://doi.org/10.1002/chin.201240145>

10. Самуйленко А.Я., Гринь С.А., Еремец В.И., Шинкарев С.М., Неминущая Л.А., Скотникова Т.А., Лермонтов С.А., Зимагулова Л.А., Галиева А.Р. Тенденции развития производства молочной кислоты // Вестн. технол. ун-та. 2017. Т. 20, № 1. С. 162–166. Samujlenko A.Ya., Grin S.A., Eremets V.I., Shinkarev S.M., Neminuschiy L.A., Skotnikova T.A., Lermontov S.A., Zimagulova L.A., Galieva A.R. Lactic Acid Production Trends. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of the Technological University], 2017, vol. 20, no. 1, pp. 162–166.

11. Филиппова В.Н. Фруктовые кислоты. Их роль в косметике // Сервис в России и за рубежом. 2007. Т. 2, № 2. С. 163–165. Filippova V.N. Fruit Acids and Their Role in Cosmetics. *Servis v Rossii i za rubezhom* [Services in Russia and abroad], 2007, vol. 2, no. 2, pp. 163–165.

12. Шарков В.И., Сапотницкий С.А., Дмитриева О.А., Туманов И.Ф. Технология гидролизных производств. М.: Лесн. пром-сть, 1973. 407 с. Sharkov V.I., Sapotnitskiy S.A., Dmitriyeva O.A., Tumanov I.F. *Technology of Hydrolysis Production*. Moscow, Lesnaya promyshlennost' Publ., 1973. 407 p.

13. Abd Alsaheb R.A., Aladdin A., Othman N.Z., Malek R.A., Leng O.M., Aziz R., El Enshasy H.A. Lactic Acid Applications in Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, vol. 7, iss. 10, pp. 729–735.

14. Abdel-Rahman M.A., Tashiro Y., Sonomoto K. Recent Advances in Lactic Acid Production by Microbial Fermentation Processes. *Biotechnology Advances*, 2013, vol. 31, iss. 6, pp. 877–902. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>

15. Abdel-Rahman M.A., Xiao Y., Tashiro Y., Wang Y., Zendo T., Sakai K., Sonomoto K. Fed-Batch Fermentation for Enhanced Lactic Acid Production from Glucose/Xylose Mixture without Carbon Catabolite Repression. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, vol. 119, iss. 2, pp. 153–158. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.07.007>

16. Adney B., Baker J. *Measurement of Cellulase Activities*. Technical Report NREL/TP-510-42628. Golden, CO, National Renewable Energy Laboratory, 2008. 8 p.

17. Ahring B.K., Traverso J.J., Murali N., Srinivas K. Continuous Fermentation of Clarified Corn Stover Hydrolysate for the Production of Lactic Acid at High Yield and Productivity. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, vol. 109, pp. 162–169. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.012>

18. Bailey M.J., Biely J., Poutanen K. Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity. *Journal of Biotechnology*, 1992, vol. 23, iss. 3, pp. 257–270. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J)
19. Choudhary J., Singh S., Nain L. Thermotolerant Fermenting Yeast for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Lignocellulosic Biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2016, vol. 21, pp. 82–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.007>
20. Gao C., Ma C., Xu P. Biotechnological Routes Based on Lactic Acid Production from Biomass. *Biotechnology Advances*, 2011, vol. 29, iss. 6, pp. 930–939. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.022>
21. Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, vol. 26, iss. 2–4, pp. 87–107. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00155-6)
22. Kleerebezem R., van Loosdrecht M.C.M. Mixed Culture Biotechnology for Bioenergy Production. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, vol. 18, iss. 3, pp. 207–212. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.05.001>
23. Komesu A., Rocha de Oliveira J.A., da Silva Martins L.H., Wolf Maciel M.R., Maciel Filho R. Lactic Acid Production to Purification: A Review. *BioResources*, 2017, vol. 12, no. 2, pp. 4364–4383. DOI: <https://doi.org/10.15376/biores.12.2.Komesu>
24. Nakano S., Ugwu C.U., Tokiwa Y. Efficient Production of D-(–)-Lactic Acid from Broken Rice by *Lactobacillus delbrueckii* Using Ca(OH)<sub>2</sub> as a Neutralizing Agent. *Bioresource Technology*, 2012, vol. 104, pp. 791–794. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.017>
25. Nancib A., Nancib N., Boudrant J. Production of Lactic Acid from Date Juice Extract with Free Cells of Single and Mixed Cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 25, pp. 1423–1429. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0029-z>
26. Ofongo R.T.S., Ohimain E.I., Iyayi E.A. Cellulase and Hemicellulase Activity under Submerged Fermentation of Rice Mill Feed by Fungi. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2019, vol. 4, iss. 1, pp. 233–239. DOI: <https://doi.org/10.22161/ijeab/4.1.35>
27. Taherzadeh M.J., Fox M., Hjorth H., Edebo L. Production of Mycelium Biomass and Ethanol from Paper Pulp Sulfite Liquor by *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, 2003, vol. 88, iss. 3, pp. 167–177. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00010-5)
28. Wee Y.-J., Kim J.-N., Ryu H.-W. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, vol. 44, no. 2, pp. 163–172.
29. Yadav A.K., Chaudhari A.B., Kothari R.M. Bioconversion of Renewable Resources into Lactic Acid: An Industrial View. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, vol. 31, no. 1, pp. 1–19. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388550903420970>