



УДК 663.15

DOI: 10.37482/0536-1036-2020-2-146-158

**СИНТЕЗ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ ГРИБОМ *Rhizopus oryzae* F-1030
НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ИЗ СУЛЬФИТНЫХ ЩЕЛОКОВ***Л.А. Мингазова, аспирант; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3289-3977>**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>**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>*

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
ул. К. Маркса, д. 68, г. Казань, Республика Татарстан, Российская Федерация, 420015;
e-mail: zleisan1@mail.ru, alb46@mail.ru, oscillatoria@rambler.ru,
zosya_kanarskaya@mail.ru

Существующие в настоящее время способы получения и выделения молочной кислоты недостаточно эффективны и приводят к образованию большого количества загрязняющих окружающую среду отходов, переработка которых экономически невыгодна. При этом половина мирового объема производства молочной кислоты осуществляется микробиологическим методом, основанном на сбраживании таких ценных сахаросодержащих субстратов, как сахароза, меласса, рафинадная патока, сахарный сироп и др. Применение сахаросодержащих субстратов значительно увеличивает себестоимость конечного продукта. Для решения экономической и экологической проблем производства молочной кислоты необходимо пересматривать существующую сырьевую базу и вводить в молочнокислое производство более дешевые и доступные источники углеводов, например сульфитные щелока, образующиеся при варке целлюлозы. В свою очередь, для повышения экономической эффективности целлюлозно-бумажного производства следует максимально полно использовать такие побочные продукты российских предприятий целлюлозно-бумажной промышленности, как сульфитные щелока, которые в химическом отношении являются комплексом неорганических и органических соединений, содержащим, в частности, моно- и олигосахариды. Рассмотрена зависимость выхода молочной кислоты, синтезируемой грибом-продуцентом *R. oryzae* F-1030 на питательных средах, приготовленных на основе сульфитных щелоков, от используемого метода культивирования. При отъемно-доливном методе культивирования по мере исчерпания сахаров в среде производилась замена культуральной жидкости на аналогичный объем стерильной питательной среды при сохранении биомассы гриба-продуцента, при периодическом методе культивирования по мере исчерпания сахаров в среде синтезированная молочная кислота осаждалась гашеной известью, а восстановление редуцирующих веществ в культуральной жидкости достигалось добавлением концентрированного сульфитного щелока. Установлено, что наибольший выход молочной кислоты наблюдается при использовании отъемно-доливного метода культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 на питательной среде на основе сульфитного щелока, приготовленной по технологии, рекомендованной в промышленности при подготовке питательных сред для культивирования дрожжей. При невозможности провести полную про-

мышленную предварительную обработку сульфитного щелока от содержащихся в нем вредных примесей рекомендуется использовать периодический метод культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 для получения большего выхода молочной кислоты.

Для цитирования: 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. DOI: 10.37482/0536-1036-2020-2-146-158

Ключевые слова: сульфитный щелок, *R. oryzae*, отъемно-доливной метод культивирования, периодический метод культивирования, молочная кислота.

Введение

Молочная кислота является одним из промышленно важных продуктов с быстро расширяющимся рынком потребления [23]. В настоящее время она широко применяется в пищевой промышленности, при протравном крашении, в кожевенном производстве, для получения лекарственных и косметических средств, пластификаторов [16, 20]. Однако основные производственные мощности молочной кислоты сосредоточены в странах Азии. Поэтому развитие российского производства представляется достаточно перспективным в ближайшие несколько лет. Производство молочной кислоты в промышленных масштабах осуществляется микробиологическим синтезом, основанным на сбраживании углеводсодержащего сырья, в частности крахмала [17, 19]. В Российской Федерации применение молочной кислоты в качестве исходного сырья ограничено ее высокой стоимостью на нашем рынке при относительно невысоком качестве. Поэтому необходимо модернизировать существующую отечественную технологию производства молочной кислоты, расширить сырьевую базу для молочнокислой ферментации, заменить дефицитные источники углеводов на более дешевые и доступные, например на отходы деревоперерабатывающей промышленности и сельского хозяйства.

В связи с этим сульфитные щелока являются перспективными ресурсами для производства молочной кислоты микробиологическим методом, так как они представляют собой источник низкомолекулярных углеводов, необходимых для роста микроорганизмов. Сульфитные щелока, непосредственно отобранные при варке целлюлозы, не пригодны для жизнедеятельности микроорганизмов по следующим причинам [14]:

в этих средах нет легко усваиваемых соединений азота и недостаточно фосфорных соединений;

отсутствуют биостимуляторы роста и витамины;

в значительном количестве содержатся такие вредные примеси, как фурфурол, 5-метилфурфурол, диоксид серы, формальдегид и др.

Среди веществ в составе сульфитных щелоков, получаемых при варке древесины хвойных пород, присутствуют: лигносульфонаты – 55...60 % (от сухих веществ), углеводы (содержание всех моно- и олигосахаридов определяется по редуцирующим веществам (РВ)) – 28...32 %, органические кислоты – 11...12 %, экстрактивные вещества и другие компоненты – 1 %. К экстрактивным веществам относятся: фенолы – 25 %, нейтральные вещества – 30 %, кислоты – 45 % [9]. В щелоках сульфитных варок древесины ели углеводы практически полностью представлены моносахарида-

ми, из которых гексозы составляют 2/3 всех сахаров. Сульфитные щелока из древесины хвойных пород содержат следующие простые сахара (% к сумме углеводов): манноза – 48 %, ксилоза – 22 %, галактоза – 10 %, глюкоза – 9 %, арабиноза – 6 %, рамноза – 5 %. Летучие органические кислоты в бисульфитных щелоках на 85...92 % представлены уксусной кислотой с небольшим количеством муравьиной кислоты, а нелетучие – альдоновыми, уроновыми и углеводсульфоновыми кислотами [11]. При этом уроновые кислоты могут быть восстановлены до альдоновых кислот, а те, в свою очередь, до моносахаридов [10]. Углеводсульфоновые кислоты практически невозможно отделить от лигносульфоновых кислот [13].

Содержащиеся в необработанном сульфитном щелоке фурфурол и оксиметилфурфурол ингибируют дыхание и накопление биомассы, формальдегид и соли тяжелых металлов даже при незначительных концентрациях значительно задерживают размножение микроорганизмов [14]. Однако основным вредно действующим на микроорганизмы фактором сульфитного щелока является диоксид серы, который обладает ярко выраженным фунгистатическим и фунгицидным действием [8].

Поэтому для создания оптимальных условий жизнедеятельности микроорганизмов сульфитные щелока подвергают предварительной очистке. Подготовка щелока к биохимической переработке осуществляется по следующей технологической схеме [12]:

- улавливание целлюлозного волокна;
- десульфитация и удаление летучих веществ;
- окисление сульфитов и фенолов (совмещается со 2-й стадией при использовании для удаления летучих веществ горячего воздуха);
- нейтрализация;
- введение питательных веществ;
- осветление и охлаждение.

Содержание углеводов в щелоках сульфитной варки определяют по выходу РВ, в которые входят все карбонильные соединения щелока, при этом несакхарные РВ составляют 10...15 % от общей массы. Известно, что содержащиеся карбонильные группы несакхарные вещества сульфитного щелока вступают в реакцию с диоксидом серы, гидросульфитом и сульфитом раньше сахаров и образуют более стойкие, чем сахара, карбонилгидросульфитные соединения. Таким образом, при массовой доле РВ в щелоке сульфитной варки древесины ели 2,5...2,8 % и суммарном массовом содержании соединений SO_2 0,20...0,22 % все сахара находятся в щелоке в несвязанном виде и доступны для биохимической переработки [11].

Так как сульфитные щелока содержат вещества, которые приводят к инактивации клеток микроорганизмов, необходимо проводить поиск продуцентов молочной кислоты, способных адаптироваться в питательных средах на основе сульфитных щелоков. В качестве продуцентов молочной кислоты используют различные штаммы бактерий рода *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* и *Leuconostoc* и грибов рода *R. oryzae* и *Mucor* [18, 21, 22].

Подбор штамма-продуцента молочной кислоты – важный этап биотехнологического процесса, основным критерием которого служит способность к синтезу целевого продукта. Ответственное направление работ по оптимизации производства молочной кислоты – изучение биологических свойств штам-

мов-продуцентов, их селекция и оптимизация параметров управления процессом биосинтеза. Также важным является изучение и оптимизация условий роста отобранных культур микроорганизмов и эффективности процесса кислотообразования. Посредством таких факторов, как источники азота и углерода, рН, температура, способ культивирования, можно влиять на титр культуры-продуцента молочной кислоты и ее продуктивность [15].

Мицелиальные грибы относятся к наиболее перспективным продуцентам молочной кислоты для технического коммерческого потребления. В частности, преимуществом применения гриба *R. oryzae* является его устойчивость к высоким концентрациям молочной кислоты, которая синтезируется им в основном в L-форме [24]. В случае данного продуцента могут быть использованы среды с более низким содержанием питательных веществ [25].

Цель данной работы – определение влияния способа культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 на питательных средах, приготовленных на основе сульфитных щелоков, на выход молочной кислоты.

Для достижения цели необходимо решить следующие задачи:

определить влияние отъемно-доливного метода культивирования на синтез молочной кислоты грибом *R. oryzae* F-1030 на питательных средах, приготовленных на основе сульфитных щелоков;

определить влияние периодического метода культивирования на синтез молочной кислоты грибом *R. oryzae* F-1030 на питательных средах, приготовленных на основе сульфитных щелоков;

обосновать влияние состава питательной среды на основе сульфитных щелоков и условий культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 на синтез молочной кислоты.

Объекты и методы исследования

В экспериментах использовали продуцент молочной кислоты – штамм *R. oryzae* F-1030 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Культуру гриба *R. oryzae* F-1030 хранили на картофельно-глюкозном агаре, приготовленном из 200 г мелкоизмельченного картофеля, 20 г агара, 20 г глюкозы и 1 л воды. Нарастивание мицелия гриба *R. oryzae* F-1030 проводили методом поверхностного культивирования на картофельно-глюкозном отваре, в 1 л которого содержалось 20 г глюкозы. Продолжительность поверхностного культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 при температуре 28...30 °С составляла 7 дн.

Для культивирования продуцента молочной кислоты *R. oryzae* F-1030 использовали питательные среды, приготовленные из сульфитного щелока, предоставленного ОАО «Выборгская целлюлоза».

Сульфитные щелока, полученные варкой древесины ели на натриевом основании при начальном рН 2,5, подготавливали для биохимической переработки двумя способами.

Согласно первому способу сульфитные щелока очищали по технологии, рекомендованной в промышленности при подготовке питательных сред для культивирования дрожжей и включающей следующие стадии [14]:

1. улавливание мелкого целлюлозного волокна;
2. удаление летучих ядовитых веществ (фурфурола, сернистого ангидрида, формальдегида и др.) из щелока посредством продувки его горячим воздухом;

3. нейтрализация минеральных и большей части органических кислот и доведение рН до 6,0 известковым молоком;

4. обогащение среды азотом и фосфором посредством внесения сульфата аммония в количестве 0,8...0,9 г/100 мл и фосфата калия в количестве 0,03...0,05 г/100 мл.

После подготовки данная питательная среда на основе сульфитного щелока (далее – питательная среда 1) содержала 10...11 % сухих веществ, 50...70 г/л РВ и имела рН 6,0.

Согласно второму способу те же неочищенные сульфитные щелока подготавливали к биохимической переработке без стадии удаления летучих веществ посредством продувки горячим воздухом по следующей схеме:

1. улавливание мелкого целлюлозного волокна;

2. нейтрализация большей части органических кислот и доведение рН до 6,0 гашеной известью;

3. обогащение среды азотом и фосфором посредством внесения сульфата аммония в количестве 0,8...0,9 г/100 мл и фосфата калия в количестве 0,03...0,05 г/100 мл.

После такой подготовки данная питательная среда на основе сульфитного щелока (далее – питательная среда 2) имела рН 6,0 и содержала 10...11 % сухих веществ, 50...70 г/л РВ.

Стерилизацию питательных сред проводили автоклавированием при температуре 115 °С в течение 60 мин.

Посевной материал, состоящий из части мицелия, вносили в колбы, содержащие питательную среду на основе сульфитного щелока. Выращивание продуцентов осуществляли методом поверхностного культивирования при температуре (28±2) °С и непрерывном перемешивании. В питательных средах и культуральной жидкости контролировали содержание РВ, молочной кислоты, а также рН, температуру. При отъемно-доливном методе культивирования по мере исчерпания сахаров в среде отбирали культуральную жидкость и добавляли равный объем стерильной питательной среды, при периодическом методе культивирования – проводили осаждение синтезированной молочной кислоты внесением в культуральную жидкость стерильной гашеной извести и доведением рН до 7,5. Содержание РВ в культуральной жидкости увеличивали за счет концентрированного сульфитного щелока.

рН питательных сред и культуральной жидкости определяли с помощью лабораторного рН-метра рН-150МИ. Содержание РВ в питательных средах и культуральной жидкости находили по методике [5], содержание молочной кислоты в культуральной жидкости – титриметрическим методом по методике [3].

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. Надосадочную жидкость выпаривали, охлаждали и повторно выделяли лактат кальция. Указанную обработку надосадочной жидкости повторяли до полного осаждения молочной кислоты.

Осадок лактата кальция диспергировали в дистиллированной воде и доводили рН концентрированной серной кислотой до 1,5...2,5. Выпавшую гипсовую смесь отделяли центрифугированием, а надосадочную жидкость, содержащую молочную кислоту, дополнительно очищали от гипса фильтрованием.

Для статистической обработки результатов экспериментов использовали программу Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования отражены на рис. 1, где представлена динамика синтеза молочной кислоты грибом *R. oryzae* F-1030 на питательных средах 1 и 2, приготовленных на основе сульфитных щелоков, которые очищались от вредных примесей двумя указанными выше способами.

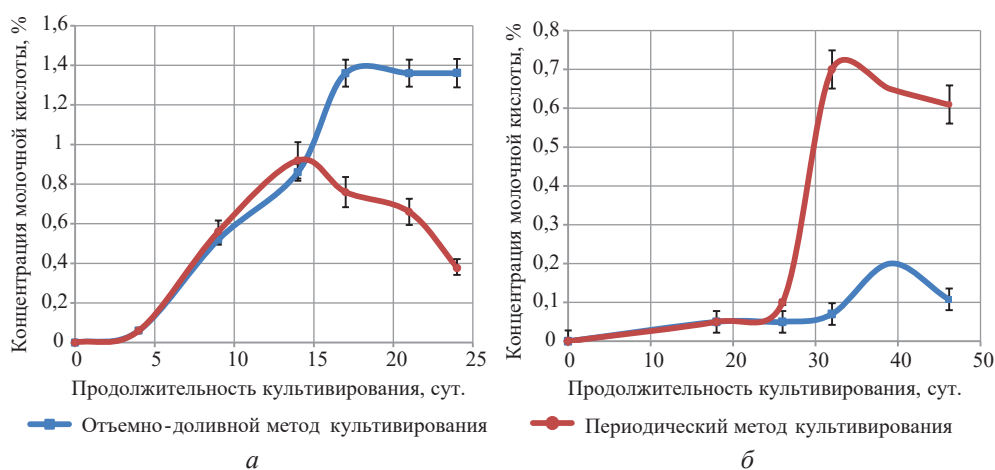


Рис. 1. Динамика синтеза молочной кислоты грибом *R. oryzae* F-1030 отъемно-доливным и периодическим методами на питательных средах 1 (а) и 2 (б)

Fig. 1. Dynamics of the lactic acid synthesis by the fungus *R. oryzae* F-1030 on the nutrient media 1 (a) and 2 (b) using the semicontinuous culture and the batch culture methods

В результате проведенных экспериментов было установлено, что гриб *R. oryzae* F-1030 примерно в 2 раза быстрее адаптируется к питательной среде 1, на которой заметный рост его начинается на 10 сут. раньше, чем на среде 2, и сопровождается более сильным развитием мицелия и более ранним достижением периода спорообразования. Более медленный рост мицелия на питательной среде 2, возможно, связан с тем, что она содержит большее количество вредных примесей. Среди этих примесей – различные производные серы (массовое содержание связанного SO_2 в щелоках сульфитной варки составляет около 1 % [11]), так как предварительная обработка среды 2 не включала продувку горячим воздухом, которая позволяет удалить до 50 % всех соединений серы в щелоке, а также летучие органические соединения.

Как видно из данных, представленных на рис. 1, максимум синтеза молочной кислоты на питательной среде 1 приходится на 15 сут. от начала культивирования, что соответствует переходу гриба-продуцента в стационарную фазу развития, на среде 2 – он наблюдается лишь на 35 сут. Последующее незначительное снижение количества синтезируемой молочной кислоты связано с процессами старения гриба-продуцента и замедлением его метаболических процессов.

При культивировании гриба отъемно-доливным методом происходила регулярная полная замена культуральной жидкости на свежую питательную среду, в результате чего недостатка в питательных веществах, необходимых для

обеспечения жизненных процессов гриба-продуцента и синтеза экзопродукта, не наблюдалось. Поскольку питательная среда 1 содержит меньше вредных веществ и, соответственно, лучше подготовлена для жизнедеятельности микроорганизма по сравнению со средой 2, то при культивировании на ней гриба *R. oryzae* F-1030 отъемно-доливным методом объемная доля синтезируемой молочной кислоты составила 1,4 % от общего объема культуральной жидкости. Это значительно выше, чем при культивировании гриба-продуцента аналогичным методом на питательной среде 2, содержащей большее количество вредных примесей, включая различные соединения серы. При культивировании гриба на питательной среде 2 отъемно-доливным методом стационарная фаза роста наступала позднее, что обуславливало недостаточное развитие мицелия. Данный эффект, видимо, связан с необходимостью продуценту каждый раз при замене среды заново приспосабливаться к ней и инактивировать находящиеся в этой среде вредные примеси.

При периодическом методе культивирования статистически значимых различий в количестве синтезируемой молочной кислоты в зависимости от способа приготовления питательной среды не наблюдается. В среднем объемная доля синтезируемой грибом *R. oryzae* F-1030 молочной кислоты составила 0,8 % от общего объема культуральной жидкости. При таком методе культивирования гриба-продуцента происходит на одной и той же среде весь промежуток времени с периодической подпиткой среды простыми сахарами в составе концентрированного сульфитного щелока. Концентрирование щелока проводилось выпариванием жидкости на кипящей водяной бане, что позволяло очищать питательную среду 2 от избытка производных серы и других летучих органических соединений. Это исключает необходимость повторного приспособления гриба к неблагоприятным факторам питательной среды 2, как в случае культивирования отъемно-доливным методом.

Содержание сахаров в щелоке контролируется по РВ [5]. На рис. 2 представлена динамика изменения содержания РВ при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на питательных средах 1 и 2.

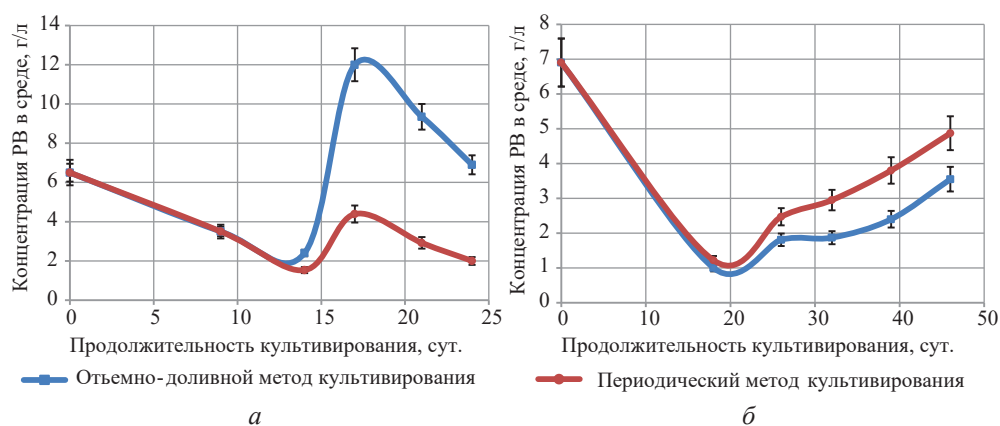


Рис. 2. Динамика изменения РВ при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 отъемно-доливным и периодическим методами на питательных средах 1 (а) и 2 (б)

Fig. 2. Change dynamics in reducing substances while cultivation of the fungus *R. oryzae* F-1030 by the semicontinuous culture and the batch culture methods on the nutrient media 1 (a) and 2 (b)

Установлено, что на начальных этапах культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 наблюдается закономерное снижение содержания РВ как в питательной среде 1, так и в питательной среде 2 независимо от используемого метода культивирования. На начальном этапе роста, когда биомасса гриба незначительна и он еще приспосабливается к условиям среды, для удовлетворения своих физиологических потребностей в сахарах грибу достаточно содержащихся в сульфитных щелоках моносахаридов. По мере роста биомассы гриба отмечается некоторое возрастание содержания РВ. Это, возможно, связано с началом использования грибом *R. oryzae* F-1030 олигосахаров, дающих при гидролизе глюкозу. Известно, что при мягкой варке сульфитной целлюлозы гидролиз гемицеллюлоз происходит не до конца и в сульфитном щелоке содержатся олигосахариды. Таким образом, в результате инверсии содержание усваиваемых микроорганизмами сахаров может увеличиться в 1,7...2,0 раза [2]. Известно, что грибы рода *Rhizopus* обладают рядом ферментов целлюлазного комплекса. Вследствие дефицита углеводов клетка испытывает дефицит энергии, в результате чего в ней повышается содержание цАМФ (циклического аденозинмонофосфата) – сигнального вещества дефицита энергии, в результате чего снимается репрессия генов, кодирующих гидролитические ферменты [7]. Очевидно, что по мере истощения моносахаров в среде гриб начинает гидролизовать β -1,4-гликозидные связи в молекулах, содержащихся в сульфитных щелоках олигосахаридов, вплоть до образования глюкозы.

Ниже представлена динамика изменения рН при выращивании гриба *R. oryzae* F-1030 на питательных средах 1 и 2 (рис. 3).

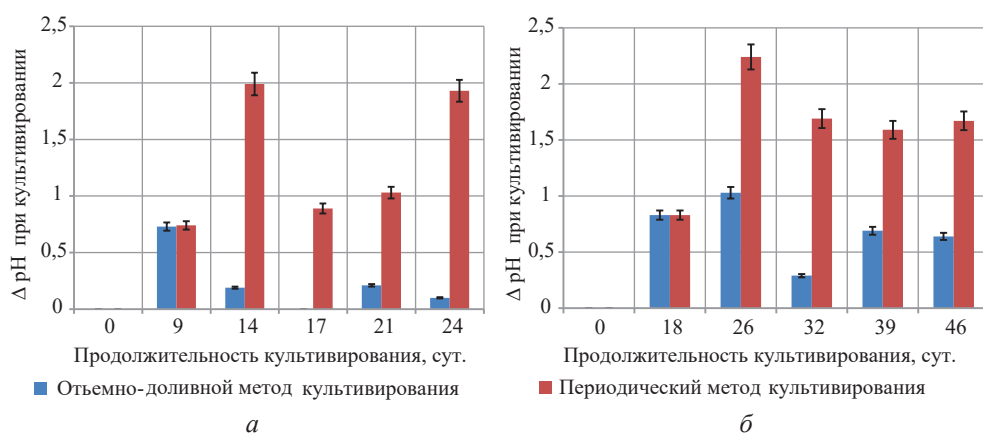


Рис. 3. Изменение рН при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 отъемно-доливым и периодическим методами на питательных средах 1(а) и 2(б)

Fig. 3. The change in pH during cultivation of the fungus *R. oryzae* F-1030 by the semicontinuous culture and the batch culture methods on the nutrient media 1 (a) and 2 (b)

Как видно из результатов, представленных на рис. 3, при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на питательной среде 1 наблюдается гораздо большее увеличение содержания РВ при использовании отъемно-доливого метода. В этом случае в каждой контрольной точке у гриба-производителя происходит полная замена культуральной жидкости на новую питательную среду. Соответственно, продукты обмена веществ, замедляющие физиологические процессы гриба, в том числе и уже активированный синтез целлюлаз, в среде отсутствуют. При периодическом методе культивирования на питательной

среде 1 происходит некоторое восполнение РВ за счет внесения малого объема концентрированной среды 1. Однако в этом случае выращивание гриба происходит в одной и той же питательной среде, в которой накапливаются продукты обмена веществ, что снижает синтез молочной кислоты из-за необходимости поддержания физиологических процессов жизнедеятельности микроорганизма (см. рис. 1).

В случае культивирования гриба-продуцента на питательной среде 2, менее подготовленной для поддержания физиологических потребностей микроорганизма, наблюдался более длительный начальный этап снижения содержания РВ и более медленное последующее увеличение их содержания в питательной среде, чем при выращивании гриба на среде 1. При использовании данной питательной среды периодический метод культивирования оказался более эффективен, чем отъемно-доливной, так как не происходило полной замены питательной среды на исходную с содержащимися в ней вредными примесями.

Одним из важных факторов, определяющих нормальный рост клеток микроорганизма и его биосинтетические возможности, является рН питательной среды. Известно, что при переходе рН в область неблагоприятных значений микроорганизм прекращает расти даже в тех случаях, когда все остальные условия оптимальны. Изменение рН питательной среды влияет на накопление конечных продуктов обмена веществ в культуральной жидкости [4], на скорость поступления в клетку питательных веществ, активность ферментов, синтез белка и витаминов [6].

При использовании периодического метода культивирования наблюдаются большие изменения рН питательной среды между соседними контрольными точками, чем в случае применения отъемно-доливного метода. Это, очевидно, связано с накоплением в среде конечного продукта – молочной кислоты, а также диссоциацией содержащихся в сульфитных щелоках солей сульфоновых кислот, которые образуются при присоединении сульфитов по двойным связям и(или) к гидроксильным группам лигнина [1].

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

Питательную среду, приготовленную на основе сульфитных щелоков с удалением летучих веществ, целесообразно использовать при отъемно-доливном методе культивирования гриба *R. oryzae* F-1030, в котором наблюдается больший выход молочной кислоты при меньших колебаниях рН и большем содержании РВ в питательной среде.

В процессе синтеза молочной кислоты культивированием гриба *R. oryzae* F-1030 периодическим методом возможно применение питательных сред на основе сульфитных щелоков как с удалением, так и без удаления летучих органических веществ.

При наличии в среде вредных примесей рекомендуется использовать периодический метод культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 для получения большего выхода молочной кислоты.

Заключение

При современном производстве молочной кислоты существует проблема, обусловленная заменой дефицитных источников углеводов на более дешевые

субстраты. В качестве доступных по цене субстратов могут использоваться сульфитные щелока, получаемые на целлюлозно-бумажном производстве как побочный продукт сульфитной варки целлюлозы. По своему составу они представляют собой сложный комплекс органических и неорганических соединений, органические соединения в которых представлены в основном углеводами и солями лигносульфоновых кислот. Комплексная переработка органических веществ сульфитного щелока позволяет наиболее полно использовать нецеллюлозные компоненты древесины для получения таких важных продуктов, как белковые кормовые дрожжи, этиловый спирт, жидкая и твердая углекислота, растворители и органические кислоты, ванилин и др., поэтому рассмотренная в данной работе возможность его применения в качестве питательной среды для синтеза молочной кислоты является оправданным решением.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что использование питательной среды, подготовленной на основе сульфитного щелока, обработанного принятым в промышленности методом, может обеспечить клетки гриба *R. oryzae* F-1030 необходимыми питательными веществами, что позволяет грибу-продуценту давать больший выход молочной кислоты в отъемно-доливном методе культивирования. При использовании питательной среды на основе сульфитного щелока, подвергнутого неполной обработке, более высокий выход молочной кислоты наблюдается в случае применения периодического метода культивирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Голомб Л.М. Физико-химические основы технологии выпускных форм красителей. Ленинград: Химия, 1974. 224 с. [Golomb L.M. *Physics and Chemistry of the Technology of Commercial Dyes*. Leningrad, Khimiya Publ., 1974. 224 p.]
2. Грачева И.М., Гаврилова Н.Н., Иванова Л.А. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров. М.: Пищевая пром-сть, 1980. 448 с. [Gracheva I.M., Gavrilova N.N., Ivanova L.A. *Technology of Microbial Protein Preparations, Amino Acids and Fats*. Moscow, Pishchevaya promyshlennost' Publ., 1980. 448 p.]
3. Григорьева Р.З., Куракин М.С. Товароведение продовольственных товаров. Кемерово: КемТИПП, 2008. 115 с. [Grigor'yeva R.Z., Kurakin M.S. *Food Commodity Science*. Kemerovo, KemTIPP Publ., 2008. 115 p.]
4. Зиганшин Д.Д., Сироткин А.С. Особенности глубинного и поверхностного культивирования грибов *Trichoderma* для получения биопрепаратов на основе клеток гриба // Вестн. технол. ун-та. 2017. Т. 20, № 10. С. 155–158. [Ziganshin D.D., Sirotkin A.S. Features of the Deep and Surface Cultivation of *Trichoderma* Fungi for Obtaining Biological Products Based on Fungal Cells. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta* [Herald of Kazan Technological University], 2017, vol. 20, no. 10, pp. 155–158].
5. 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.]
6. Корнеева О.С., Мотина Е.А., Яковлева С.Ф., Яковлев А.Н. Влияние условий культивирования на рост биомассы *Yarrowia lipolytica* – продуцента кормового белка // Вестн. ВГУИТ. 2016. № 1. С. 182–185. [Korneeva O.S., Motina E.A., Yakovleva S.F., Yakovlev A.N. Effect of Culture Conditions on the Growth of Biomass *Yarrowia lipolytica* – Producing Protein Feed. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologiy* [Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies], 2016, no. 1, pp. 182–185]. DOI: [10.20914/2310-1202-2016-1-182-185](https://doi.org/10.20914/2310-1202-2016-1-182-185)

7. Левина Е.А., Атыкян Н.А., Ревин В.В. Влияние источников углеродного и азотного питания на биосинтез целлюлаз грибами *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D и *Trichoderma viride* ВКМ F-1131 // Вестн. ВГУ. Сер.: Химия. Биология. Фармация. 2016. № 1. С. 85–93. [Levina E.A., Atykyan N.A., Revin V.V. The Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Production of Cellulases by Fungi *Lentinus tigrinus* VKM F-3616 D and *Trichoderma viride* VKM F-1131. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya* [Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy], 2016, no. 1, pp. 85–93].
8. Мухин В.А. Влияние сернистого ангидрида на ксилотрофные грибы // Биоразнообразие и биоресурсы Урала и сопредельных территорий: материалы II междунар. конф., Оренбург, 17–18 дек. 2002 г. Оренбург: Изд-во ОГПУ, 2002. 196 с. [Mukhin V.A. The Influence of SO₂ on Wood-Destroying Fungi. *Biodiversity and Biological Resources of the Urals and Adjacent Territories: Materials of II International Conference, Orenburg, December 17–18, 2002*. Orenburg, OGPU Publ., 2002. 196 p.]. DOI: [10.13140/RG.2.1.3291.8806](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3291.8806)
9. Новожилов Е.В. Оценка биоресурса сульфитных щелоков как сырья для производства кормовых дрожжей // Изв. вузов Лесн. журн. 1999. № 2-3. С. 180–188. [Novozhilov E.V. Evaluation of Sulfite Liquors Bioresource as Raw Material for Nutrient Yeast Production. *Lesnoy Zhurnal* [Russian Forestry Journal], 1999, no. 2-3, pp. 180–188]. URL: <http://lesnoizhurnal.ru/upload/iblock/ab7/ab7f2300221c7ded546d5483246aa51a.pdf>
10. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с. [Ovchinnikov Yu.A. *Bioorganic Chemistry*. Moscow, Prosveshcheniye Publ., 1987. 815 p.].
11. Переработка сульфатного и сульфитного щелоков / под ред. Б.Д. Богомолов [и др.]. М.: Лесн. пром-сть, 1989. 360 с. [Processing of Sulfate and Sulfite Liquors. Ed. by B.D. Bogomolov et al. Moscow, Lesnaya promyshlennost' Publ., 1989. 360 p.].
12. Смирнов Р.Е. Производство сульфитных волокнистых полуфабрикатов. СПб.: СПбГТУРП, 2010. 146 с. [Smirnov R.E. *Production of Sulphite Pulp*. Saint Petersburg, SPbGTURP Publ., 2010. 146 p.].
13. Химия углеводородов нефти / под ред. Б.Т. Брукса [и др.]. М.: Гостоптехиздат, 1959. Т. 3. 583 с. [Chemistry of Petroleum Hydrocarbons. Ed. by B.T. Brooks et al. Moscow, Gostoptekhizdat Publ., 1959, vol. 3. 583 p.].
14. 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.].
15. Шинкарев С.М., Самуйленко А.Я., Неминущая Л.А., Скотникова Т.А., Павленко И.В., Рубцова Г.Н., Канарский А.В., Мингазова Л.А. Совершенствование микробиологического синтеза молочной кислоты // Вестн. технол. ун-та. 2017. Т. 20, № 18. С. 165–170. [Shinkarev S.M., Samujlenko A.I., Neminuschiy L.A., Skotnikova T.A., Pavlenko I.V., Rubtsova G.N., Kanarskiy A.V., Mingazova L.A. Improvement of Microbiological Synthesis of Lactic Acid. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta* [Herald of Kazan Technological University], 2017, vol. 20, no. 18, pp. 165–170].
16. Abd Alsaheb R.A., Aladdin A., Othman N.Z., Abd Malek R., Mei Leng O., Aziz R. et al. Lactic Acid Applications in Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, vol. 7, iss. 10, pp. 729–735.
17. Ghaffar T., Irshad M., Anwar Z., Aqil T., Zulifqar Z., Tariq A. et al. Recent Trends in Lactic Acid Biotechnology: A Brief Review on Production to Purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 2014, vol. 7, iss. 2, pp. 222–229. DOI: [10.1016/j.jrras.2014.03.002](https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.03.002)
18. Khalid K. An Overview of Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Biosciences*, 2011, vol. 1, no. 3, pp. 1–13.
19. Komesu A., Oliveira J.A.R.d., Martins L.H.d.S., Wolf Maciel M.R., Maciel Filho R. Lactic Acid Production to Purification: A Review. *BioResources*, 2017, vol. 12(2), pp. 4364–4383.

20. Martineza F.A.C., Balciunas E.M., Salgado J.M., Gonzalez J.M.D., Converti A., Oliveira R.P.D.S. Lactic Acid Properties, Applications and Production: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, vol. 30, iss. 1, pp. 70–83. DOI: [10.1016/j.tifs.2012.11.007](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007)
21. Rattanachaiakunsopon P., Phumkhachorn P. Lactic Acid Bacteria: Their Antimicrobial Compounds and Their Uses in Food Production. *Annals of Biological Research*, 2010, vol. 1(4), pp. 218–228.
22. Rhee S.J., Lee J.-E., Lee C.-H. Importance of Lactic Acid Bacteria in Asian Fermented Foods. *Microbial Cell Factories*, 2011, vol. 10, art. S5. DOI: [10.1186/1475-2859-10-S1-S5](https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S5)
23. Simion A.I., Grigoras C.G., Bardaşu L.E., Dabija A. Modelling of the Thermo-physical Lactic Acid Aqueous Solutions. Density and Viscosity. *Food and Environment Safety*, 2012, vol. XI, iss. 4, pp. 49–58.
24. Wu X., Jiang S., Liu M., Pan L., Zheng Z., Luo S. Production of L-Lactic Acid by *Rhizopus Oryzae* Using Semicontinuous Fermentation in Bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, vol. 38, pp. 565–571. DOI: [10.1007/s10295-010-0804-8](https://doi.org/10.1007/s10295-010-0804-8)
25. Yuwa-amornpitak T., Chookietwattana K. L-Lactic Acid Production from Cassava Starch by Thermotolerant *Rhizopus microsporus* LTH23. *Journal of Biological Sciences*, 2014, vol. 14, iss. 4. pp. 284–291. DOI: [10.3923/jbs.2014.284.291](https://doi.org/10.3923/jbs.2014.284.291)

LACTIC ACID SYNTHESIS BY FUNGUS *Rhizopus oryzae* F-1030 ON GROWTH MEDIA BASED ON SULPHITE LIQUORS

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

A.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>

E.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>

Z.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>

Kazan National Research Technological University, ul. K. Marksa, 68, Kazan, Republic of Tatarstan, 420015, Russian Federation; e-mail: zleisan1@mail.ru, alb46@mail.ru, oscillatoria@rambler.ru, zosya_kanarskaya@mail.ru

Lactic acid is an industrially important product with an expanding consumer market. However, lactic acid production and isolation methods used at the present time are not effective enough, lead to the formation of large amounts of polluting waste and their recycling is economically unprofitable. At the same time, a half of the world's lactic acid production is carried out by the microbiological method based on the fermentation of such costly sugar-containing substrates as sucrose, molasses, treacle, sugar syrup, etc. These sugar-containing substrates usage significantly increases the final product cost. In order to solve the economic and environmental problems of lactic acid production it is necessary to revise the current raw material source and put cheaper and readily available sources of carbohydrates, such as sulphite liquor formed during sulphite pulping, into the lactic acid production. In turn to enhance the economic efficiency of the Russian pulp and paper production it is necessary to use such paper production by-products as sulphite liquor to the fullest extent possible. Sulphite liquor is a chemical complex of inorganic and organic compounds such as mono- and oligosaccharides. The article considers the dependence of the output of lactic acid synthesized on the sulphite liquor medium by the fungus *R. oryzae* F-1030 on the used method of cultivation. In case of the semicontinuous culture method, the culture liquid was replaced with the similar volume of the sterile growth medium with the fungus biomass saving when the sugars in the medium were depleted. In case of the batch culture method, the synthesized

lactic acid was precipitated with calcium hydroxide and the reducing substances recovery in the culture liquid was achieved by adding concentrated sulphite liquor when the sugars in the medium were depleted. The study demonstrates that the largest amount of synthesized lactic acid is obtained when using the semicontinuous method for cultivation of the fungus on the sulphite liquor medium prepared according to the technology recommended in the industry during preparation growth media for yeast cultivation. If it is impossible to carry out a full industrial pre-treatment of sulphite liquor, it is recommended to use the batch culture method for the fungus in order to obtain more synthesized lactic acid.

For citation: Mingazova L.A., Kanarsky A.V., Kryakunova E.V., Kanarskaya Z.A. Lactic Acid Synthesis by the Fungus *Rhizopus Oryzae* F-1030 on Growth Media Based on Sulphite Liquors. *Lesnoy Zhurnal* [Russian Forestry Journal], 2020, no. 2, pp. 146–158. DOI: 10.37482/0536-1036-2020-2-146-158

Keywords: sulphite liquor, *R. oryzae*, semicontinuous culture method, batch culture method, lactic acid.

Поступила 26.08.19 / Received on August 26, 2019
