

УДК 663.15

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЦЕЛЛЮЛАЗНУЮ И КСИЛАНАЗНУЮ АКТИВНОСТИ ГРИБА *RHIZOPUS ORYZAE* F-1030

© Л.А. Мингазова^{1*}, Е.В. Крякунова¹, А.Р. Галиева¹, З.А. Канарская¹, А.В. Канарский¹,
Е.В. Белкина²

¹ Казанский национальный исследовательский технологический университет, ул. Толстого, 8, Казань, 420015, Россия, zleisan1@mail.ru

² ООО «Прикамский картон», ул. Бумажников, 1, Пермь, 614037, Россия

Работа посвящена изучению взаимосвязи активности целлюлазных и ксиланазных ферментов и выхода молочной кислоты, синтезируемой грибом *Rhizopus oryzae* F-1030 при культивировании на питательных средах на основе каталитически модифицированных нейтрально-сульфитных щелоков. Показано, что гриб *R. oryzae* F-1030 при культивировании глубинным методом способен синтезировать ксиланазные и целлюлазные ферменты, расщепляющие полисахариды питательной среды до легкодоступных для ассимилирования грибом простых сахаров. Соответственно, гриб *R. oryzae* F-1030 может рассматриваться в качестве перспективного объекта биотехнологии для биоконверсии вторичных ресурсов производства целлюлозы. Установлено, что уровень экспрессии целлюлазных и ксиланазных ферментов клетками гриба *R. oryzae* F-1030 зависит от типа субстрата. Поскольку в древесине березы преобладают олигомеры ксилана, то и ксиланазная активность гриба проявляется сильнее, чем целлюлазная. Отмечено, что выход молочной кислоты при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на каталитически модифицированном нейтрально-сульфитном щелоке зависит от специфичности действия гидролизующего катализатора (соляная кислота, ферментные препараты Revitalenz® 200, Accellerase XC, Accellerase XY). В качестве питательной среды для микробиологического синтеза молочной кислоты грибом *R. oryzae* F-1030 целесообразно использовать предварительно биокатализически обработанный щелок нейтрально-сульфитной варки древесины березы.

Ключевые слова: нейтрально-сульфитный щелок, катализ ферментативный, катализ кислотный, гриб *R. oryzae* F-1030, целлюлаза, ксиланаза, молочная кислота.

Для цитирования: Мингазова Л.А., Крякунова Е.В., Галиева А.Р., Канарская З.А., Канарский А.В., Белкина Е.В. Влияние условий культивирования на целлюлазную и ксиланазную активности гриба *Rhizopus oryzae* F-1030 // Химия растительного сырья. 2024. №1. С. 301–309. DOI: 10.14258/jcprm.20240112909.

Введение

В промышленной биотехнологии в качестве источника углерода для культивирования микроорганизмов преимущественно используются питательные среды, приготовленные из сырья растительного происхождения [1–3]. К растительным ресурсам, которые являются источником углерода при культивировании микроорганизмов, относят солому злаковых культур, тростник, однолетние травянистые растения и многолетние древесостои. Принято классифицировать эти источники углерода как лигноцеллюлозное сырье. Получение питательных сред из растительного сырья сводится к механической, гидробаротермической, химической и биокаталитической обработке с получением простых сахаров [4–9].

Промышленно освоенным способом получения простых сахаров из лигноцеллюлозного сырья является кислотный гидролиз с использованием в качестве катализатора разбавленной серной кислоты [10]. Несмотря на высокий выход простых сахаров, получаемый при кислотном гидролизе лигноцеллюлозного сырья, следует обратить внимание и на существенные недостатки способа. При кислотном гидролизе лигноцеллюлозного сырья образуются олигомерные углеводы, для превращения которых в простые сахара нужна дополнительная конверсия при высокой температуре. При кислотном гидролизе клетчатка полностью не гидролизует и образует с лигнином лигноцеллюлозу, применять которую возможно только в качестве топлива.

* Автор, с которым следует вести переписку.

В биотехнологии нашли применение в качестве источника углерода сульфитные щелока. Однако по экологическим причинам производство сульфитной целлюлозы практически ликвидируется и, соответственно, этот сырьевой источник для получения питательных сред в биотехнологии практически недоступен. Промышленные предприятия перепрофилируются на бисульфитные и нейтрально-сульфитные способы получения целлюлозы. Следует отметить, что затраты на приготовление питательных сред из щелоков, образующихся при производстве целлюлозы, значительно ниже, чем получение из лигноцеллюлозных материалов простых сахаров кислотным способом. Исходя из этого перспективно применение в биотехнологии в качестве источника углерода нейтрально-сульфитных щелоков (НСЩ), богатых преимущественно олигомерными углеводами. В то же время существует нерешенная в настоящее время проблема превращения олигомеров НСЩ в простые сахара для их дальнейшего применения в биотехнологии. В этой связи весьма актуален поиск микроорганизмов, способных синтезировать ферменты для гидролиза олигомерных углеводов до простых сахаров и одновременно необходимые биопродукты. Результаты опубликованных ранее работ подтверждают возможность реализации предлагаемых технологических решений [11].

Цель настоящей работы – определение взаимосвязи выхода молочной кислоты и активностей целлюлазных и ксиланазных ферментов, синтезируемых мицелиальным грибом *Rhizopus oryzae* F-1030, при культивировании на питательных средах на основе каталитически модифицированных щелоков нейтрально-сульфитной варки древесины березы.

Известно, что мицелиальные грибы рода *Rhizopus* способны синтезировать ферменты, позволяющие гидролизовать целлюлозу и гемицеллюлозу. Синтез целлюлаз и ксиланаз значительно повышается при наличии в среде специфических веществ-индукторов – продуктов неполного расщепления целлюлозы и гемицеллюлозы [12]. А так как НСЩ содержат большое количество олигомерных сахаров – потенциальных субстратов для экзоферментов гриба, то проводилось изучение влияния действия целлюлолитических ферментов штамма *R. oryzae* F-1030 на изменение содержания редуцирующих веществ (РВ) в питательных средах на основе каталитически модифицированных щелоков нейтрально-сульфитной варки древесины березы и, как следствие, на синтез из этих РВ молочной кислоты грибом-продуцентом.

Экспериментальная часть

Объектом исследования являлся мицелиальный гриб *Rhizopus oryzae* штамм ВКПМ F-1030, представленный Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов. Штамм *R. oryzae* F-1030 – представитель класса зигомикетов – является непатогенным для человека микроорганизмом-продуцентом молочной кислоты. Посевной материал получали выращиванием музейной культуры на твердой питательной среде из картофельно-глюкозного агара при температуре 28–30 °С в течение 7 дней (до полного зарастания поверхности среды). Картофельно-глюкозный агар содержал 20 г глюкозы, 20 г бактериологического агара на 1000 см³ картофельного отвара.

Источником углерода в питательной среде для культивирования микромицета являлся нейтрально-сульфитный щелок (НСЩ), полученный при производстве целлюлозы высокого выхода из древесины березы в ООО «Прикамский картон». Используемый в работе нейтрально-сульфитный щелок имел pH 5.3±0.2, содержал 2.5±0.3% редуцирующих веществ и 9.4±0.5% сухих веществ.

Предварительно установлено, что при культивировании на питательной среде из исходного НСЩ физиологическая активность гриба отсутствует, что предположительно связано с низким содержанием простых сахаров. Необходимо обеспечить гриб потенциальными источниками углерода, которые он мог бы ассимилировать для включения в процессы метаболизма и использовать для набора биомассы прежде, чем станет способен синтезировать достаточно целлюлолитических ферментов для гидролиза имеющихся в среде олигосахаров.

Для увеличения содержания моносахаридов НСЩ обрабатывали каталитически раствором соляной кислоты и биокаталитически-целлюлолитическими ферментами.

Кислотный гидролиз присутствующих в НСЩ олигосахаров проводили 10% раствором соляной кислоты, соответствующей ГОСТ 857-95. Условия проведения гидролиза: температура – 100 °С, средняя продолжительность – 2 ч, соотношение раствора кислоты и щелока – 1 : 1.

Биокаталитическая обработка НСЩ проводилась по методике, приведенной в работе [13], с использованием ферментных препаратов:

– Accellerase XC фирмы «DuPont» производства США. Активность эндоглюканазы 1000–1400 СМСУ/г, активность ксиланазы 2500–3800 АВХУ/г. Оптимальная температура 50–65 °С, рН 5–6.

– Accellerase XY фирмы «DuPont» производства США. Активность эндоглюканазы 1000–1400 СМСУ/г, активность ксиланазы 20.000–30.000 АВХУ/г. Оптимальная температура 50–65 °С, рН 5–6.

– Revitalenz® 200 фирмы «DuPont» производства США. Активность целлюлазы 2000–3000 АВХУ/г. Оптимальная температура 50±0.2°С, рН 5–6.

Варианты каталитической обработки НСЦ представлены в таблице 1.

Степень гидролиза олигосахаров НСЦ определяли по изменению содержания РВ, представленных в основном простыми сахарами. Окончание гидролиза соответствовало окончанию увеличения содержания РВ в гидролизате.

Определение содержания РВ проводили фотометрическим методом с применением 3,5-динитросалициловой кислоты [14].

Гидролизаты разделяли на надосадочную жидкость и осадок центрифугированием при 7000 об./мин в течение 10 мин. Для культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 использовали супернатант, рН которого доводили до 5.5±0.5 с помощью 25% водного раствора аммиака.

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

Размножение гриба *R. oryzae* F-1030 осуществляли вегетативным способом посредством внесения 5.0±0.5% мицелия от общего объема питательной среды. Культивирование проводили отъемно-доливным способом, периодически заменяя половину питательной среды при исчерпывании содержания РВ в культуральной жидкости. Условия культивирования: температура – 28.0±1.0 °С, непрерывное перемешивание со скоростью 120 об./мин, рН среды – 5.5±0.5.

Определение активностей целлюлазы и ксиланазы гриба *R. oryzae* F-1030 проводили по методике, приведенной в работах [15, 16].

Анализ углеводного состава гидролизатов проводили методом газожидкостной хроматографии три-метилсилильных производных [17].

Выделение молочной кислоты из культуральной жидкости проводили методом, описанным в работе [18]. Определение содержания и выход молочной кислоты проводили методом, рекомендованным в работе [19].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы Microsoft Excel.

Обсуждение результатов

Было установлено, что в результате гидролиза НСЦ катализаторами различной природы наблюдается повышение концентрации РВ в разной степени (табл. 1). Наибольший прирост РВ наблюдается при варианте каталитической обработки НСЦ №1, средний – при варианте 2, наименьшие – при вариантах 3–5. Методом газожидкостной хроматографии было установлено, что увеличение содержания РВ в гидролизатах было вызвано именно увеличением содержания простых сахаров, которые были представлены в кислотном гидролизате в основном ксилозой и галактозой (27.6±2.0% и 24.5±2.0% соответственно), тогда как в ферментализатах содержание ксилозы достигало 89.4% от общего количества определяемых простых сахаров. Таким образом, очевидно, что гидролизаты по сравнению с исходным НСЦ содержали гораздо большее количество доступных для ассимиляции микроорганизмом РВ, поэтому модифицированные шелока могут быть использованы в качестве питательной среды для культивирования гриба *R. oryzae* F-1030.

Таблица 1. Влияние вида гидролизующего агента на увеличение содержания РВ в НСЦ

Вариант обработки	Гидролизующий катализатор	Доза гидролизующего катализатора, мл/г с.в.	ΔРВ, %
1	10% раствор HCl	100	6.0±0.5
2	Ферментный препарат Revitalenz® 200	0.35	4.3±0.5
3	Ферментный препарат Accellerase XC	0.50	3.2±0.5
4	Ферментный препарат Accellerase XY	0.50	3.1±0.5
5	Ферментный препарат Accellerase XY с добавлением солей (NH ₄) ₂ SO ₄ и KH ₂ PO ₄	0.50	3.1±0.5

Последующее культивирование гриба *R. oryzae* F-1030 на гидролизатах НСЦ подтвердило их пригодность для использования в качестве питательной среды: наблюдался заметный прирост биомассы гриба на всех типах гидролизатов. Однако в каталитически модифицированных щелоках нейтрально-сульфитной варки древесины березы содержание РВ было слишком высоким, что негативно сказывалось на физиологической активности гриба. Поэтому для облегчения ассимиляции РВ клетками гриба *R. oryzae* F-1030 концентрация РВ в гидролизатах доводилась до $2.0 \pm 0.1\%$.

Влияние природы гидролизатов НСЦ на активность целлюлолитических ферментов ксиланаз гриба *R. oryzae* F-1030 и на выход молочной кислоты представлено на рисунке 1.

Питательная среда, используемая для культивирования микроорганизма, должна обеспечивать потребности данного микроорганизма в питательных веществах и энергии, которые он мог бы использовать для набора биомассы и синтеза полезных для человека экзопродуктов. Поэтому в микробиологические питательные среды при необходимости добавляют растворы неорганических солей – источники азота, фосфора, серы, калия в виде солей серной и фосфорной кислот [20]. В данной работе добавляли 0.04 М/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 3 мМ/л KH_2PO_4 .

Установлено, что присутствие неорганических солей в питательных средах на основе НСЦ не оказывает заметного влияния на конечный выход молочной кислоты, поэтому на рисунке 1 представлены результаты культивирования гриба только на одном варианте гидролизатов с добавлением неорганических солей (вариант 5 в таблице 1). Отмечено, что при культивировании гриба на этом варианте гидролизата целлюлазная активность гриба была ниже в среднем в 1.5 раза по сравнению с аналогичным гидролизатом без добавления солей (вариант 4 в таблице 1). Полученный эффект свидетельствует о перенасыщении питательной среды азотом, обогащение среды которым произошло в результате предварительной обработки щелока раствором аммиака, а также солями серной кислоты – известного ингибитора активности целлюлазы.

Из представленных на рисунке 1а результатов видно, что в целом активность целлюлаз гриба выражена незначительно независимо от варианта гидролизата, используемого для культивирования. Это, видимо, связано с незначительным содержанием олигомеров целлюлозы, обладающих доступными для гидролиза целлюлазами гриба гликозидными связями, так как основная их часть была расщеплена до простых сахаров в процессе кислотного или ферментативного гидролиза.

Наибольшая активность целлюлаз наблюдается у гриба *R. oryzae* F-1030 при культивировании на четвертом варианте гидролизатов, наименьшая – на варианте 1, так как, по-видимому, обработка щелока раствором соляной кислоты привела практически к полному расщеплению олигомеров целлюлозы. Разница в активности целлюлазных ферментов, вероятно, объясняется разным количеством гликозидных связей, которые становятся доступными для расщепления целлюлазами гриба при деструкции олигомеров целлюлозы разными типами гидролизующих катализаторов. Более того, на всех анализируемых гидролизатах НСЦ гриб демонстрировал постепенное наращивание продукции целлюлаз в процессе, что, очевидно, связано с постепенным истощением в среде доступных для ассимиляции простых сахаров, которые микроорганизм мог получить только посредством гидролиза находящихся в среде олигомеров целлюлозы.

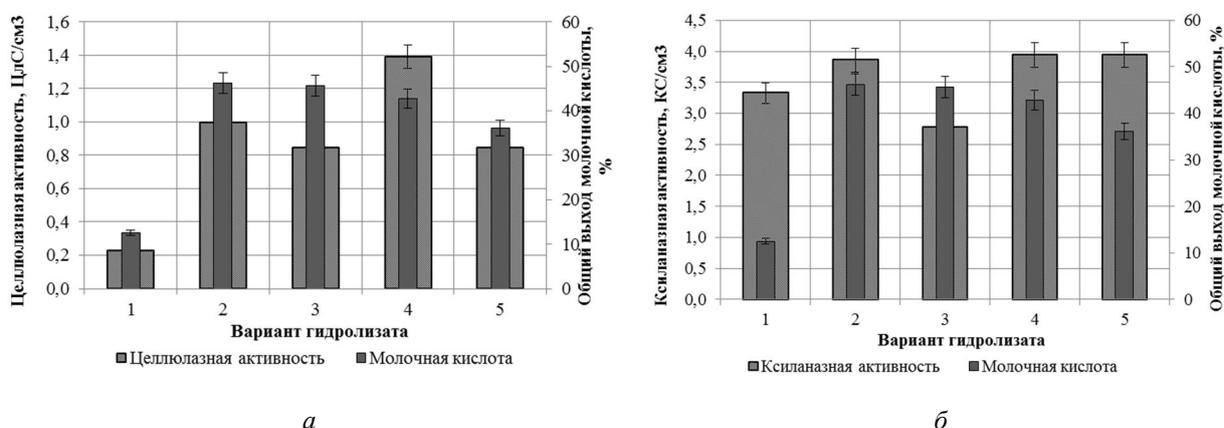


Рис. 1. Влияние ферментативной активности гриба *R. oryzae* F-1030 на выход молочной кислоты при культивировании на гидролизатах НСЦ, где: а) целлюлазная активность; б) ксиланазная активность

При культивировании на гидролизатах НСЦ гриб *R. oryzae* F-1030 демонстрировал достаточно высокие уровни ксиланазной активности независимо от варианта каталитического гидролиза (рис. 1б), что, очевидно, связано с преобладанием именно олигомеров ксиланов в древесине березы. Наибольшую ксиланазную активность гриб *R. oryzae* F-1030 показывал на вариантах гидролизатов 2, 4, 5, наименьшую – на варианте 3. При культивировании на варианте 1 гриб проявлял средний уровень активности ксиланаз, что опять же связано с разным содержанием в гидролизатах доступных для расщепления ксиланазами гриба 1,4- β -D-ксилозидиновых связей в олигомерах ксилана.

Таким образом, было установлено, что для гриба *R. oryzae* F-1030 характерен достаточно высокий выход молочной кислоты при культивировании на всех использованных в работе вариантах гидролизатов НСЦ. При этом целлюлазная активность гриба незначительна, тогда как фермент ксиланазу клетки гриба синтезируют в достаточно большом количестве. Поскольку обе ферментативные системы в клетках гриба функционируют одновременно, то можно сделать вывод, что количество вырабатываемого целлюлолитического фермента каждого типа регулируется лишь количеством доступного для расщепления субстрата – олигомеров глюкозы и ксилозы. Древесина березы, при варке которой образовался нейтрально-сульфитный щелок, богата именно олигомерами ксилана, поэтому преобладание ксиланазной активности в клетках гриба *R. oryzae* F-1030 становится закономерным явлением.

Следовательно, на основании полученных результатов можно заключить, что лигноцеллюлозосодержащие субстраты НСЦ подвержены расщеплению ферментными системами гриба *R. oryzae* F-1030. В результате работы комплекса целлюлолитических ферментов гриба происходит насыщение питательной среды на основе НСЦ простыми сахарами (ксилозой, глюкозой), которые могут использоваться метаболическими путями гриба в качестве источников углерода для синтеза молочной кислоты.

В таблице 2 представлена зависимость выхода молочной кислоты, продуцируемой грибом *R. oryzae* F-1030 на различных вариантах гидролизатов НСЦ, и биомассы гриба от наличия в среде РВ, представленных простыми сахарами. Поскольку молочнокислое брожение, осуществляемое микроорганизмами, в частности, грибом *R. oryzae* F-1030, заключается в превращении простых сахаров через ряд промежуточных продуктов в молочную кислоту, то конечный выход молочной кислоты зависит не только от количества присутствующих в среде простых сахаров, но и от типа преобладающего сахара. Глюкоза является основным субстратом, используемым микроорганизмами для осуществления молочнокислого брожения. Однако при наличии в среде большого количества ксилозы в отсутствие доступных молекул глюкозы ферментативные системы грибов способны осуществлять синтез молочной кислоты по обходному пути [21].

Эффективность микробиологического синтеза биопродуктов зависит как от конечного выхода продукта, так и от количества субстрата, затраченного на синтез. Субстратом для синтеза молочной кислоты служат РВ, представленные, в частности, такими простыми сахарами, как глюкоза и ксилоза. Таким образом, чем выше выход молочной кислоты и меньше расход РВ, тем эффективнее процесс.

Как видно из данных, представленных в таблице 2, высокий выход молочной кислоты не всегда прямо пропорционален высокой концентрации РВ в питательной среде. При культивировании на варианте 1 гриб демонстрирует крайне низкий общий выход молочной кислоты при высокой концентрации остаточных РВ, которые представлены на $46.9 \pm 4.5\%$ ксилозой. В целом, в ходе культивирования на варианте 1 происходило постепенное накопление РВ в среде, более того, этот тип гидролизатов характеризовался достаточно высоким начальным содержанием глюкозы ($15.3 \pm 1.5\%$ глюкозы в варианте 1 против 3.4–8.2% глюкозы в остальных вариантах) и практически в 2 раза меньшим – ксилозы. Высокий начальный уровень глюкозы способствовал не только высокому выходу молочной кислоты на начальном этапе культивирования гриба на варианте 1 при минимальной активности собственных целлюлаз, но и набору биомассы. Однако постепенное истощение доступной глюкозы в среде привело к необходимости грибу переключиться на ассимиляцию олигомеров ксилозы и наращиванию производства ксиланазных ферментов. Нехватка простых сахаров в среде вызвала углеродное голодание гриба, резкое падение уровня синтезируемой молочной кислоты и, как следствие, преждевременное старение и гибель продуцента. Таким образом, наблюдаемый в конце культивирования высокий уровень РВ, появившихся в среде в результате действия ксиланаз, не способствовал увеличению выхода молочной кислоты, так как мицелий гриба физиологически уже не был способен производить искомый продукт в больших количествах и мог ассимилировать РВ лишь на поддержание собственной жизнедеятельности.

Таблица 2. Влияние вида гидролитической обработки НСЦ на продуктивность гриба *R. oryzae* F-1030

Вариант обработки	Начальное содержание РВ, %	Конечное содержание РВ, %	Выход молочной кислоты, %	Сухая биомасса, г/дм ³	Общая продолжительность культивирования, сут.
1	2.0±0.1	1.4±0.10	12.5±1.5	13.6±3.5	18±2
2		0.65±0.05	46.2±4.5	2.0±0.2	38±2
3		0.75±0.05	45.6±4.5	4.4±0.5	22±1
4		0.39±0.05	42.8±4.5	1.6±0.2	50±2
5		0.02±0.01	36.1±3.5	3.4±0.3	35±1

При культивировании на вариантах 2–5 гриб демонстрировал высокий выход молочной кислоты около 40.0%, однако имелись различия в уровнях активности целлюлолитических ферментов и остаточном содержании РВ в культуральной жидкости. Так, при культивировании гриба на варианте 2 наблюдается постепенное накопление РВ в питательной среде при достаточно высоком уровне ксиланазной и целлюлазной активностей гриба. Остаточные простые сахара, определяемые в культуральной жидкости после окончания синтеза молочной кислоты, представлены на 43.5±4.5% ксилозой и на 4.7±0.5% глюкозой. При культивировании гриба на варианте 3 также происходит постепенное накопление РВ в среде, однако в культуральной жидкости отсутствуют глюкоза и ксилоза, доступные для ассимиляции грибом. Целлюлазная и ксиланазная активность гриба на данном типе гидролизата также относительно низкая, что свидетельствует о недостатке доступных для расщепления олигомеров. Дефицит глюкозы и ксилозы в питательной среде в данном случае не привел к значительному снижению выхода молочной кислоты, но спровоцировал преждевременное старение и гибель продуцента. При культивировании на варианте 4 гриб показал относительно высокие уровни активности обоих целлюлолитических ферментов, но при этом количество доступных РВ в среде постепенно уменьшалось, что свидетельствует об их практически полной ассимиляции клетками гриба. Остаточные РВ в культуральной жидкости были представлены глюкозой (1.2±0.2%) и ксилозой (64.3±6.5%). Данные сахара использовались грибом для поддержания высокого выхода молочной кислоты на всем протяжении культивирования. Более того, на данном типе гидролизата продолжительность жизни гриба и, следовательно, продолжительность синтеза молочной кислоты были наибольшими. Однако культивирование гриба на 5-м варианте гидролизата, отличающемся от варианта 4 наличием дополнительных солей (NH₄)₂SO₄ и КН₂РO₄, привело к снижению выхода молочной кислоты при достаточно высоких активностях целлюлаз и ксиланаз. Относительно низкий выход молочной кислоты сопровождался полным исчерпанием доступных РВ в питательной среде и сокращением времени жизни гриба, что еще раз подтверждает токсический эффект, оказываемый на физиологическую активность гриба избытка солей серной кислоты и азота.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что при культивировании на ферментализатах НСЦ гриб демонстрирует высокий выход молочной кислоты при относительно низком приросте биомассы, проблема утилизации которой при микробиологическом производстве молочной кислоты остается открытой. Относительно низкий выход молочной кислоты, сопровождаемый высоким приростом биомассы при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на кислотных гидролизатах, позволяет отнести данный способ получения молочной кислоты к неэффективным производствам.

Заключение

Мицелиальный гриб *R. oryzae* F-1030 обладает целлюлазной и ксиланазной активностями, вследствие чего может использоваться в качестве питательного субстрата целлюлозосодержащее сырье, в том числе вторичные ресурсы производства целлюлозы – щелока, получаемые при нейтрально-сульфитной варке древесины березы. Мицелиальный гриб *R. oryzae* F-1030 представляется перспективным продуцентом для получения молочной кислоты в промышленных условиях.

Финансирование

Работа выполнена с использованием ресурсов центра коллективного пользования «Экология, биотехнологии и процессы получения экологически чистых энергоносителей» Поволжского государственного технологического университета при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-674).

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Siddeeg S.M., Tahoon M.A., Ben Rebah F. Agro-industrial waste materials and wastewater as growth media for microbial biofloculants production: a review // *Materials Research Express*. 2019. Vol. 7, no. 1. Pp. 1–17. DOI: 10.1088/2053-1591/ab5980.
2. Das A., Ringu T., Ghosh S., Pramanik N. A comprehensive review on recent advances in preparation, physicochemical characterization, and bioengineering applications of biopolymers // *Polymer Bulletin*. 2022. Pp. 1–66. DOI: 10.1007/s00289-022-04443-4.
3. Alaswad S.O., Mahmoud A.S., Arunachalam P. Recent Advances in biodegradable polymers and their biological applications: A brief review // *Polymers*. 2022. Vol. 14. Pp. 1–15. DOI: 10.3390/polym14224924.
4. Herrera J.D., Aguirre J.C., Castaño V.D. Physical-chemical characteristics determination of potato (*Solanum phureja* Juz. & Bukasov) starch // *Acta Agronómica*. 2017. Vol. 66, no. 3. Pp. 323–330. DOI: 10.15446/acag.v66n3.52419.
5. Geşicka A., Borkowska M., Białas W., Kaczmarek P., Celińska E. Production of raw starch-digesting amylolytic preparation in *Yarrowia lipolytica* and its application in biotechnological synthesis of lactic acid and ethanol // *Microorganisms*. 2020. Vol. 8, no. 5. Article 717. DOI: 10.3390/microorganisms8050717.
6. Russo G.L., Langellotti A.L., Martín-García B., Verardo V., Romano R., Sacchi R., Masi P. New biotechnological production of EPA by *Pythium irregular* using alternative sustainable media obtained from food industry by-products and waste // *Sustainability*. 2023. Vol. 15, no. 2. Article 1147. DOI: 10.3390/su15021147.
7. Sharma S., Tsai M.-L., Sharma V., Sun P.-P., Nargotra, P., Bajaj B.K., Chen C.-W., Dong C.-D. Environment friendly pretreatment approaches for the bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value-added products // *Environments*. 2023. Vol. 10, no. 1. Article 6. DOI: 10.3390/environments10010006.
8. Narron R.H., Han Q., Park S., Chang H.M., Jameel H. Lignocentric analysis of a carbohydrate-producing lignocellulosic biorefinery process // *Bioresource Technology*. 2017. Vol. 241. Pp. 857–867. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.207.
9. Singhvi M., Zinjarde S., Kim B.-S. Sustainable Strategies for the Conversion of Lignocellulosic Materials into Biohydrogen: Challenges and Solutions toward Carbon Neutrality // *Energies*. 2022. Vol. 15, no. 23. Article 8987. DOI: 10.3390/en15238987.
10. Świątek K., Gaag S., Klier A., Kruse A., Sauer J., Steinbach D. Acid hydrolysis of lignocellulosic biomass: sugars and furfurals formation // *Catalysts*. 2020. Vol. 10, no. 4. Article 437. DOI: 10.3390/catal10040437.
11. Ле Ань Туан, Банницына Т.Е., Канарский А.В., Качалкин А.В., Максимова И.А. Ферментативная активность и эффективность синтеза белка дрожжами *Debaryomyces hansenii* и *Guehomyces pullulans* при глубокой твердофазной ферментации свекловичного жома // *Вестник технологического университета*. 2015. Т. 18, №15. С. 243–248.
12. Liao H., Li S., Wei Z., Shen Q., Xu Y. Insights into high-efficiency lignocellulolytic enzyme production by *Penicillium oxalicum* GZ-2 induced by a complex substrate // *Biotechnology for Biofuels*. 2014. Vol. 7. Article 162. DOI: 10.1186/s13068-014-0162-2.
13. 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*. 2021. №3. С. 309–317. DOI: 10.14258/jcprm.2021039160.
14. Морозова Ю.А., Скворцов Е.В., Алимova Ф.К., Канарский А.В. Биосинтез ксиланаз и целлюлаз грибами рода *Trichoderma* на послеспиртовой барде // *Вестник технологического университета*. 2012. Т. 15, №19. С. 120–122.
15. Adney B., Baker J. Measurement of cellulase activities // *Laboratory analytical procedure*. 1996. 11 p.
16. Bailey M., Biely J., Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity // *Journal Biotechnol.* 1992. Vol. 23, no. 3. Pp. 257–270.
17. Orata F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis // *Advanced Gas Chromatography Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. 2012. Pp. 83–108.
18. 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 // *Известия высших учебных заведений. Лесной журнал*. 2020. №2. С. 146–158.
19. 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 // *Известия высших учебных заведений. Лесной журнал*. 2021. №5. С. 163–173.
20. Степаненко И.С., Ямашкин С.А., Жукова Н.В., Слaстников Е.Д., Масейкина А.А. Изучение биологической активности калиевых солей замещенных пирроло[2,3-f]- и [3,2-f]хинолинкарбоновых кислот // *Современные проблемы науки и образования*. 2020. №6. С. 153.

21. Розанов А.С., Котенко А.В., Акбердин И.Р., Пельтек С.Е. Рекомбинантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* для получения этанола из растительной биомассы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18, №4/2. С. 989–998.

Поступила в редакцию 26 апреля 2023 г.

После переработки 6 июля 2023 г.

Принята к публикации 23 августа 2023 г.

Mingazova L.A.^{1*}, Kryakunova E.V.¹, Galieva A.R.¹, Kanarskaya Z.A.¹, Kanarskiy A.V.¹, Belkina E.V.² INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON CELLULASE AND XYLANASE ACTIVITY OF *RHIZOPUS ORYZAE* F-1030

¹ Kazan National Research Technological University, Tolstogo st., 8, Kazan, 420015, Russia,

e-mail: zleisan1@mail.ru

² LLC «Prikamskiy karton», Bumazhnikov st., 1, Perm, 614037, Russia

The paper examines the relationship between the activity of cellulase and xylanase enzymes and the lactic acid yield which was synthesized by the fungus *Rhizopus oryzae* F-1030 during its cultivation on a culture medium based on catalytically modified neutral sulfite liquors. It was shown that in cultivating by the deep method the fungus *R. oryzae* F-1030 synthesizes xylanase and cellulase enzymes that break down polysaccharides in a nutrient medium to simple sugars which are easily accessible for assimilation by the fungus. Accordingly, the fungus *R. oryzae* F-1030 can be used as a promising biotechnological object for the bioconversion of cellulose production secondary resources. It was found that the level of cellulase and xylanase expression in *R. oryzae* F-1030 depends on the type of substrate. The xylanase activity of the fungus is more pronounced than the cellulase activity since xylan oligomers predominate in birch wood. It was noted that the lactic acid yield during the cultivation of the fungus *R. oryzae* F-1030 on a catalytically modified neutral sulfite liquor depends on the action specifics of the hydrolyzing catalyst. As a nutrient medium for the microbiological synthesis of lactic acid the fungus *R. oryzae* F-1030 can use biocatalytically treated liquors of birch wood neutral sulfite pulping.

Keywords: neutral sulfite liquor, catalyzing enzyme, acid catalysis, fungus *R. oryzae* F-1030, cellulase, xylanase, lactic acid.

For citing: Mingazova L.A., Kryakunova E.V., Galieva A.R., Kanarskaya Z.A., Kanarskiy A.V., Belkina E.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 1, pp. 301–309. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20240112909.

References

1. Siddeeg S.M., Tahoon M.A., Ben Rebah F. *Materials Research Express*, 2019, vol. 7, no. 1, pp. 1–17. DOI: 10.1088/2053-1591/ab5980.
2. Das A., Ringu T., Ghosh S., Pramanik N. *Polymer Bulletin*, 2022, pp. 1–66. DOI: 10.1007/s00289-022-04443-4.
3. Alaswad S.O., Mahmoud A.S., Arunachalam P. *Polymers*, 2022, vol. 14, pp. 1–15. DOI: 10.3390/polym14224924.
4. Herrera J.D., Aguirre J.C., Castaño V.D. *Acta Agronómica*, 2017, vol. 66, no. 3, pp. 323–330. DOI: 10.15446/acag.v66n3.52419.
5. Gęsicka A., Borkowska M., Białas W., Kaczmarek P., Celińska E. *Microorganisms*, 2020, vol. 8, no. 5, article 717. DOI: 10.3390/microorganisms8050717.
6. Russo G.L., Langellotti A.L., Martín-García B., Verardo V., Romano R., Sacchi R., Masi P. *Sustainability*, 2023, vol. 15, no. 2, article 1147. DOI: 10.3390/su15021147.
7. Sharma S., Tsai M.-L., Sharma V., Sun P.-P., Nargotra, P., Bajaj B.K., Chen C.-W., Dong C.-D. *Environments*, 2023, vol. 10, no. 1, article 6. DOI: 10.3390/environments10010006.
8. Narron R.H., Han Q., Park S., Chang H.M., Jameel H. *Bioresource Technology*, 2017, vol. 241, pp. 857–867. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.207.
9. Singhvi M., Zinjarde S., Kim B.-S. *Energies*, 2022, vol. 15, no. 23, article 8987. DOI: 10.3390/en15238987.
10. Swiątek K., Gaag S., Klier A., Kruse A., Sauer J., Steinbach D. *Catalysts*, 2020, vol. 10, no. 4, article 437. DOI: 10.3390/catal10040437.
11. Le An Tuan, Bannitsyna T.Ye., Kanarskiy A.V., Kachalkin A.V., Maksimova I.A. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta*, 2015, vol. 18, no. 15, pp. 243–248. (in Russ.).
12. Liao H., Li S., Wei Z., Shen Q., Xu Y. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, vol. 7, article 162. DOI: 10.1186/s13068-014-0162-2.
13. Mingazova L.A., Kryakunova E.V., Kanarskaya Z.A., Kanarskiy A.V., Kruchina-Bogdanov I.V., Belkina E.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2021, no. 3, pp. 309–317. DOI: 10.14258/jcprm.2021039160. (in Russ.).

* Corresponding author.

14. Morozova Yu.A., Skvortsov E.V., Alimova F.K., Kanarsky A.V. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta*, 2012, vol. 15, no. 19, pp. 120–122. (in Russ.).
15. Adney B., Baker J. *Laboratory analytical procedure*, 1996. 11 p.
16. Bailey M., Biely J., Poutanen K. *Journal Biotechnol.*, 1992, vol. 23, no. 3, pp. 257–270.
17. Orata F. *Advanced Gas Chromatography Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, 2012, pp. 83–108.
18. Mingazova L.A., Kanarskiy A.V., Kryakunova Ye.V., Kanarskaya Z.A. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Lesnoy zhurnal*, 2020, no. 2, pp. 146–158. (in Russ.).
19. Mingazova L.A., Kryakunova Ye.V., Kanarskaya Z.A., Kanarskiy A.V. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Lesnoy zhurnal*, 2021, no. 5, pp. 163–173. (in Russ.).
20. Stepanenko I.S., Yamashkin S.A., Zhukova N.V., Slastnikov Ye.D., Maseykina A.A. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*, 2020, no. 6, pp. 153. (in Russ.).
21. Rozanov A.S., Kotenko A.V., Akberdin I.R., Pel'tek S.Ye. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*, 2014, vol. 18, no. 4/2, pp. 989–998. (in Russ.).

Received April 26, 2023

Revised July 6, 2023

Accepted August 23, 2023

Сведения об авторах

Мингазова Лейсан Азатовна – ассистент, заведующая лабораторией, zleisan1@mail.ru

Крякунова Елена Вячеславовна – кандидат технических наук, доцент, oscillatoria@rambler.ru

Галиева Айгуль Рафиковна – аспирант, af.signal@mail.ru

Канарская Зосья Альбертовна – кандидат технических наук, доцент, zosya_kanarskaya@mail.ru

Канарский Альберт Владимирович – доктор технических наук, профессор, alb46@mail.ru

Белкина Екатерина Васильевна – заведующая исследовательской лабораторией, Ekaterina.Belkina@PCBK.ru

Information about authors

Mingazova Leysan Azatovna – assistant, head of laboratory, zleisan1@mail.ru

Kryakunova Elena Vyacheslavovna – candidate of technical sciences, associate professor, oscillatoria@rambler.ru

Galieva Aigul Rafikovna – graduate student, af.signal@mail.ru

Kanarskaya Zosya Albertovna – candidate of technical sciences, associate professor, zosya_kanarskaya@mail.ru

Kanarsky Albert Vladimirovich – doctor of technical sciences, professor, alb46@mail.ru

Belkina Ekaterina Vasilievna – head of the research laboratory, Ekaterina.Belkina@PCBK.ru