

## PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS A PARTIR DE BORRA DE CAFÉ EMPREGANDO *Rhizopus oryzae*

Érika Confortin Miotto (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ana Elisa Gama, Fernanda Pellegrinello, Francielli Silva dos Santos, Larine Kupski (Orientador), Juliana Ruiz (Coorientador), e-mail: erikaconfortin06@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Tecnologia/Umuarama, PR.

### Ciência de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Palavras-chave:** fermentação em estado sólido, enzimas, celulase.

### Resumo:

A produção industrial de café solúvel e o consumo doméstico são responsáveis pela geração de toneladas de resíduo de borra de café. Sendo assim, a utilização da fermentação em estado sólido, torna-se uma alternativa tanto para a redução do descarte desse resíduo quanto para valorização do mesmo. Com base nesse contexto este trabalho teve como objetivo produzir enzimas lignocelulolíticas durante o processo fermentativo de borra de café com *Rhizopus oryzae*. Para isso, a borra de café foi coletada e submetida ao processo fermentativo com *Rhizopus oryzae* CCT 7560 durante 120 h, sendo retirada uma amostra a cada 24 h e no tempo zero. Com isso, nós determinamos as atividades enzimáticas para as enzimas celulase, lacase e peroxidase, tendo um valor máximo em 24h de 0,574 U/g, em 0h de 0,087 U/g, e em 0h de 0,158 U/g, respectivamente. Assim, conclui-se que a borra de café é uma melhor opção para produzir a enzima celulase.

### Introdução

Por ser uma das bebidas mais populares do mundo, a produção do café gera uma alta quantidade de resíduos, como por exemplo a borra de café. A borra de café apresenta em sua composição lipídios, carboidratos, celulose e compostos fenólicos (MCNUTT, 2019), podendo ser utilizada como substrato em processos fermentativos. A fermentação em estado sólido é definida como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, na ausência (ou quase) de água livre. Neste caso, o microrganismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (KUPSKI et al., 2015).

As enzimas lignocelulolíticas são produzidas por alguns microrganismos sob condições de crescimento específicas. Existem vários complexos

enzimáticos lignocelulolíticos, tais como: celulases (glucanases,  $\beta$ -glucosidases), hemicelulases (xilanases, acetil esterases, etc.) e ligninases (lacases, lignina peroxidase, manganês peroxidase) (FARZANEH *et al.*, 2011).

Dentro deste contexto, este trabalho tem por objetivo avaliar a produção de enzimas lignocelulolíticas durante fermentação em estado sólido da borra de café.

## Materiais e métodos

Os resíduos de borra de café, utilizados como substrato, foram obtidos de descarte doméstico, secos em estufa a 65°C e padronizados para granulometria <0,5mm. A fermentação foi realizada em biorreatores do tipo bandeja. Após esterilização do meio, o substrato foi suplementado com solução nutriente ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g L<sup>-1</sup>,  $\text{MgSO}_4$  1 g L<sup>-1</sup> e  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  1,8 g L<sup>-1</sup>) e inoculado o microrganismo *Rhizopus oryzae* CCT 7560 ( $4 \times 10^6$  esporos/g), ajustando-se a umidade inicial do sistema para 50% (KUPSKI *et al.*, 2015). Os biorreatores foram incubados a 30 °C durante 120 h, sendo retirado um biorreator a cada 24 h de fermentação. Para o tempo zero foi realizado o mesmo procedimento descrito, sem a incubação a 30 °C.

As enzimas foram extraídas das biomassas com NaCl 0,5% a 25 °C e após centrifugação o extrato bruto foi utilizado para determinação do perfil enzimático. A atividade celulolítica foi estimada em termos de celulase total, empregando como substrato papel filtro Whatman N°1 em tampão citrato 50 mM (pH 4,8) a 50 °C, durante 30 min. Uma unidade (U) de atividade de celulase total foi definida como a quantidade (mg) de glicose liberada por min (KUPSKI *et al.*, 2015). A atividade da lacase foi determinada pela reação com ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), em tampão de fosfato de sódio (50 mM, pH 5) a 30 °C. Uma unidade (U) de lacase foi definida como a quantidade de ABTS ( $\mu\text{mol}$ ) oxidado por min (MEZA *et al.*, 2005). A atividade de peroxidase foi determinada através da reação do guaiacol com tampão fosfato de sódio (pH 7,0, 50 mM) e peróxido de hidrogênio 0,08% a 30 °C. Uma unidade de peroxidase foi definida como a quantidade de guaiacol ( $\mu\text{mol}$ ) oxidada por min (GARCIA; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2018).

## Resultados e Discussão

As enzimas lignocelulolíticas são produzidas por alguns microrganismos sob condições de crescimento específicas, usando substratos de baixo valor comercial, como resíduos agroindustriais (FARZANEH *et al.*, 2011). Neste estudo foi avaliada a produção de celulase, lacase e peroxidase. Suas atividades enzimáticas estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Atividades enzimáticas da borra de café e das biomassas fermentadas por *Rhizopus oryzae*.

Amostra	Celulase U/g <sub>b.s</sub>	Lacase U/g <sub>b.s</sub>	Peroxidase U/g <sub>b.s</sub>
NF	0,180	0,006	0,001
Biomassa 0h	0,556	0,087	0,158
Biomassa 24h	0,574	0,027	0,107
Biomassa 48h	0,527	0,024	0,023
Biomassa 72h	0,491	0,029	0,109
Biomassa 96h	0,429	0,008	0,015
Biomassa 120h	0,392	0,035	0,006

**b.s-** base seca. NF- borra não fermentada,

Para a enzima celulase, o NF apresentou uma atividade de 0,180 U/g. Com a fermentação, foi obtido um valor máximo de atividade de 0,574 U/g em 24h. A enzima lacase apresentou uma atividade enzimática menor, para o NF foi observado um valor de 0,006 U/g e, com a fermentação, a atividade mais alta foi de 0,087 U/g em 0h. A enzima peroxidase apresentou um valor de 0,001 U/g para o NF. Para a fermentação, obteve um valor maior também em 0h, com uma atividade de 0,158 U/g.

A celulase é uma enzima que já vem sendo estudada por diferentes autores, em diferentes substratos. No artigo de Farzaneh *et al.*, (2011) foi avaliada a produção de celulase, após três dias de fermentação, em cultivo de *Acidothermus cellulolyticus*. Neste foi verificadas atividades celulásicas de 0,21 UI g<sup>-1</sup>, sendo inferior ao valor encontrado em nosso estudo. No artigo de Kupski *et al.* (2015) também foi avaliada a produção de celulase, após 15h de fermentação, em cultivo de *Rhizopus oryzae*, com 82,5% de farelo de arroz e 17,5% de casca. Neste, foi verificadas atividades celulásicas de 0,5 U/g, também sendo inferior ao valor encontrado em nosso estudo. Esses resultados indicam que o uso da borra de café em processo com *Rhizopus oryzae* é uma alternativa promissora para obtenção dessa enzima que é utilizada em diferentes setores.

## Conclusões

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a borra de café pode ser utilizada para produção de celulase por fermentação em estado sólido, sendo obtida a maior atividade em 24 h de processo.

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao PIBIC/UEM por conceder a bolsa e me dar a oportunidade de participar deste projeto. Agradeço também as minhas orientadoras que sempre estiveram a minha disposição pra ajudar e orientar em todo o processo deste estudo.

## Referências

REZAEI, F. et al. Selection of conditions for cellulase and xylanase extraction from switchgrass colonized by *Acidothermus cellulolyticus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 6, p. 793-803, 2011.

GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. **Food Additives & Contaminants- Part A**, 35, n. 9, p. 1819-1831, Sep 2018.

KUPSKI, L et al. Celulases de *Rhizopus oryzae*: Uma nova abordagem para degradar material lignocelulósico. **Journal of Food Biochemistry**, 39, n. 2, p. 129-138, 2015.

MCNUTT, J. Spent coffee grounds: A review on current utilization. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 71, p. 78-88, 2019.

MEZA, J. C *et al.* Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer. **Process Biochemistry**, 40, n. 10, p. 3365-3371, Oct 2005.