

Валоризация лигноцеллюлозного отхода – кофейной шелухи

В. В. Мартынов, Т. Н. Щемелинина, Е. М. Анчугова

Институт биологии Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии наук,
г. Сыктывкар
martynov.v.v@ib.komisc.ru
tatanakomi@mail.ru
anchugova@ib.komisc.ru

Аннотация

Лигноцеллюлозные отходы являются наиболее доступным возобновляемым сырьем в мире. Внедрение принципов экономики замкнутого цикла предполагает максимальное извлечение ценных свойств из вторичных ресурсов. Данное исследование ставит своей целью возможность использования кофейной шелухи, единственного отхода жарки кофе, для глубинного культивирования ксилотрофных базидиомицетов с последующим получением ферментов. При глубинном культивировании на кофейной шелухе выявлены интенсификация ростовых процессов и повышенный биосинтез ферментов у мицелия *Fomitopsis pinicola* и *Rhodofomes roseus* в сравнение с твердофазным культивированием. Штамм *Fomitopsis pinicola* преимущественно накапливает целлобиазы (1800 ед/г) и β-глюканазы (1170 ед/г), тогда как штамм *Rhodofomes roseus* – ксиланазы (более 5000 ед/г). Таким образом, кофейная шелуха рекомендуется в качестве перспективного субстрата для культивирования ксилотрофных базидиомицетов с целью получения ферментных препаратов.

Ключевые слова:

кофейная шелуха, питательная среда, ксилотрофные базидиомицеты, ростовые характеристики, ферментативная активность

Введение

В соответствии с принципами экономики замкнутого цикла кофейная шелуха (далее – КШ) является отходом, перспективным для переработки во вторичное сырье и в продукты с добавленной стоимостью (биополимерные композиты для упаковки, сырье и ингредиенты для приготовления функциональных пищевых и косметических продуктов, для производства биобутанола, удобрение для почвы; в качестве иммуностимулятора в аквакультуре) [1–8].

Лигноцеллюлозные отходы – наиболее распространенное возобновляемое сырье в мире. Их сжигание приводит к потере энергоценного ресурса и наносит огромный ущерб окружающей среде. Экологически чистым и перспективным биотехнологическим процессом утилизации таких отходов является выращивание микро- и макроми-

Valorization of coffee silverskin lignocellulosic waste

V. V. Martynov, T. N. Shchemelinina, E. M. Anchugova

Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Syktyvkar
martynov.v.v@ib.komisc.ru
tatanakomi@mail.ru
anchugova@ib.komisc.ru

Abstract

Lignocellulosic waste represents the most abundant renewable raw material globally. The principles of a circular economy can be applied by optimizing the utilization of valuable properties from recycled materials. The objective of this study is to assess the potential of utilizing coffee silverskin, the sole by-product of coffee roasting, for submerged cultivation of xylophilic basidiomycetes with subsequent enzyme production. The growth processes of *Fomitopsis pinicola* and *Rhodofomes roseus* became intensified along with the increased biosynthesis of enzymes in their mycelia in case of submerged cultivation on coffee silverskin, not during solid-phase cultivation. The *Fomitopsis pinicola* strain was observed to preferentially accumulate cellobiases (1800 units/g) and β-glucanases (1170 units/g), whereas the *Rhodofomes roseus* strain was found to accumulate xylanases (over 5000 units/g). Therefore, coffee silverskin can be recommended to be used as a promising substrate for the cultivation of xylophilic basidiomycetes for the production of enzyme preparations.

Keywords:

coffee silverskin, nutrient medium, xylophilic basidiomycetes, growth characteristics, enzymatic activity

цетов. Используемые для этих целей в первую очередь рисовая и пшеничная солома, а также остатки кукурузы и сахарного тростника, являются наиболее распространенным возобновляемым сырьем на планете [9]. Кофейная шелуха, богатая питательными веществами, – отход кофейного производства [8, 10], также представляет потенциальную ценность в качестве дешевого источника углерода для культивирования штаммов грибов для получения ферментов, спрос на которые постоянно растет из-за разнообразия их промышленного применения. По оценкам, производство и применение ферментов на различных рынках должны увеличиться до 17,5 млрд дол. в 2024 г. [11].

Цель работы – оценка кофейной шелухи в качестве субстрата для культивирования ксилотрофных базидио-

мицетов (*Fomitopsis pinicola* и *Rhodofomes roseus*): источников получения ферментов.

Материалы и методы

Для утилизации КШ проводили глубинное и твердофазное культивирование ксилотрофных базидиомицетов. В работе использовали два вида: *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst 1881 и *Rhodofomes roseus* (Alb. & Schwein.) Kotl.&Pouzar 1990. Образцы ксилотрофных базидиомицетов были отобраны в окрестностях г. Сыктывкара. Таксономия и номенклатура таксонов грибов приведены в соответствии с рекомендациями ресурса Index Fungorum (2008–2024). В качестве субстрата использовали КШ, образующуюся после обжарки кофейных зерен. В дополнение к КШ в состав среды входили следующие компоненты: источники азота ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и мочевины) и фосфора (KH_2PO_4), а также микроэлементы ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, CaCl_2), необходимые для роста и синтеза ферментов.

Для расчета радиальной скорости роста и ростового коэффициента проводили твердофазное культивирование в чашках Петри в течение 12 суток. Радиальную скорость роста рассчитывали по следующей формуле:

$$VR = \frac{R_1 - R_0}{t_1 - t_0},$$

где VR – средняя скорость радиального роста, мм/сут; R_1 – радиус колонии в конце роста, мм; R_0 – радиус колонии в начале фазы линейного роста, мм; $t_1 - t_0$ – продолжительность линейной фазы роста, сут.

Для расчета ростового коэффициента (далее – РК) в ходе культивирования определяли высоту, плотность и диаметр колонии. Плотность колонии отмечали по трехбалльной системе: 1 – редкая; 2 – средняя; 3 – плотная. Ростовый коэффициент рассчитывали по формуле [12].

$$PK = \frac{D * h * g}{t},$$

где D – диаметр колонии, мм; h – высота колонии, мм; g – плотность колонии, балл; t – возраст колонии, сут.

Глубинное культивирование проводили в орбитальном шейкере-инкубаторе Biosan ЕС-20/60 при температуре 26 °С и 150 об./мин в течение 16 сут. Периодически осуществляли отбор культуральной жидкости для определения активности целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов (эндо-, экзоглюканаза, целлобиаза, ксиланаза, β -глюканаза) по стандартным методикам, описанным Полюгалиной с соавт. [13].

Для проверки нормальности распределения выборок использовали W -критерий Шапиро-Уилка. Достоверность различий определяли используя U -критерий Манна-Уитни. Уровень значимости $\alpha = 0.05$. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., OK, USA).

Результаты и их обсуждение

Объем отхода производства ООО «Кофе Плюс» (г. Сыктывкар, Республика Коми) – кофейной шелухи – составляет от 800 до 1200 кг в месяц. По своему составу КШ относится в большей степени к лигноуглеводному материалу, доминирующим структурным компонентом в котором является целлюлоза, массовая доля – 23,2 %. Массовая доля водорастворимых пектиновых полисахаридов – 9,8 %, щелочерастворимых гемицеллюлоз – 14,8 %. Пентозаны (ксиланы и арабинаны) относятся к гемицеллюлозам, их массовая доля в КШ составляет 10 %. Вторым основным компонентом КШ является полимер ароматической природы – лигнин с массовой долей 22,6 %. Кофейная шелуха содержит значительное количество (15,1 мас. %) белков. Количество низкомолекулярных веществ, экстрагируемых органическими растворителями, в частности этилацетатом, составляет 7,7 мас. %, а минеральных веществ – 6,9 %.

Кофейная шелуха имеет высокое содержание углерода (38,1 %), кислорода (45,4), водорода (6,1) и относительно низкое содержание азота (2,06), серы (0,24) и хлора (0,042 %), что является типичной характеристикой биомассы [14]. Такой состав объясняется преобладающим содержанием лигноуглеводного комплекса и белков в КШ.

Установлено, что в КШ содержится большое количество макроэлементов (%), из них преобладают Са (49), К (28), Mg (10), S (~5), Na (4), P (менее 1). В составе микроэлементов (мг/кг) КШ обнаружены: Fe (150), Al (69), Mn (57), Ba (51), Sr (48), Cu (38), Zn (9). Остальные микроэлементы присутствовали в следовых количествах.

Таким образом, состав КШ, представленный полимерной (целлюлоза, гемицеллюлоза, лигнин), низкомолекулярной (экстрактивные вещества) и минеральной частями, делает ее наиболее выгодной для использования в качестве субстрата, входящего в питательную среду при культивировании базидиомицетов.

Исследование ферментативной активности базидиомицетов при твердофазном культивировании не целесообразно, поскольку отмечали низкую радиальную скорость роста. Штамм *F. pinicola* формировал очень плотный воздушный мицелий, но медленно колонизировал субстрат (рис. 1 А). Штамм *R. roseus* более активно колонизировал субстрат, но не создавал воздушного мицелия (рис. 1 Б; табл. 1).

При глубинном культивировании отмечали активное разрушение субстрата грибами. Крупные в начале культивирования частицы КШ уже к шестым (*R. roseus*) и восьмым (*F. pinicola*) суткам почти полностью разрушались (рис. 2). В ходе определения ферментативной активности при культивировании на КШ у *F. pinicola* отмечали высокую целлобиазную активность (1800 ед/г) на восьмые сутки культивирования, а также постепенно возрастающую β -глюканазную активность к 16 сут (1170 ед/г), что согласуется с данными [15]. При этом эндо- и экзоглюканазная активности находились на низком уровне, достигая максимума примерно к восьмым суткам (табл. 2).

При культивировании на КШ *R. roseus* отмечали высокие целлобиазная и β -глюканазная (1660 и 1430 ед/г) и низкие эндо- и экзоглюканазные активности. При этом у *R. roseus* наблюдали очень высокую ксиланазную активность (более 5000 ед/г) на шестые сутки культивирования (табл. 3). Ксиланазы находят свое применение в различных отраслях промышленности. К ним относятся текстильная и бумажная промышленность, производство напитков,

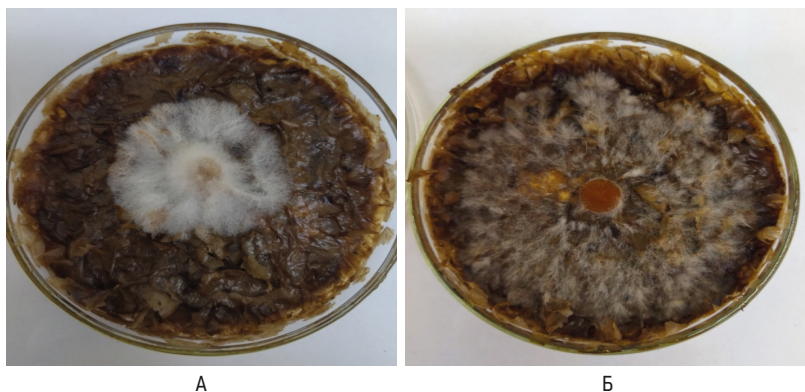


Рисунок 1. Твердофазная ферментация *F. pinicola* (А) и *R. roseus* (Б) на 10-е сутки.
Figure 1. Solid-phase fermentation of *F. pinicola* (A) and *R. roseus* (Б) on cultivation day 10.

Выводы

Выявлено, что активное потребление штаммами *F. pinicola* и *R. roseus* субстрата – кофейной шелухи приводит к накоплению ферментов: штаммом *Fomitopsis pinicola* – целлюлазной и β-глюканазной активностей, штаммом *R. roseus* – ксиланазной активности. Таким образом, кофейная шелуха рекомендуется в качестве перспективного субстрата для культивирования ксилотрофных базидиомицетов с целью получения ферментных препаратов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ростовые характеристики штаммов, культивированных на кофейной шелухе

Таблица 1

Table 1
Growth characteristics of strains cultivated on coffee silverskin

Штаммы /Strains	Радиальная скорость роста, мм/сут	Ростовой коэффициент	Время роста, сут
<i>Fomitopsis pinicola</i>	2,7±0,41	6,6	12
<i>Rhodofomes roseus</i>	4,4±0,3	8,5	12

хлебопекарная промышленность, фармацевтическая промышленность, производство биотоплива [16].

Анализируя полученные данные, можно отметить, что при культивировании на КШ оба штамма активно проявляли целлюлазную, ксиланазную и β-глюканазную активности. Активность эндо- и экзоглюканазы может быть низкой из-за легкодоступности целлюлозы и гемицеллюлозы, входящих в состав КШ для этих ферментов. Активность данных ферментов направлена на деполимеризацию целлюлозы и увеличение ее доступности для целлюлазы, однако возможно, что в ходе обжарки зерен происходит повреждение длинных цепей целлюлозы. Проводимые ранее эксперименты по культивированию данных штаммов грибов на трудноразлагаемом субстрате (кордревесных отходах) выявили более высокую эндоглюканазную активность – 1800 ед/г на восьмые сутки. Однако, при использовании КШ в качестве субстрата общая ферментативная активность культивируемых грибов была выше за меньший период времени.

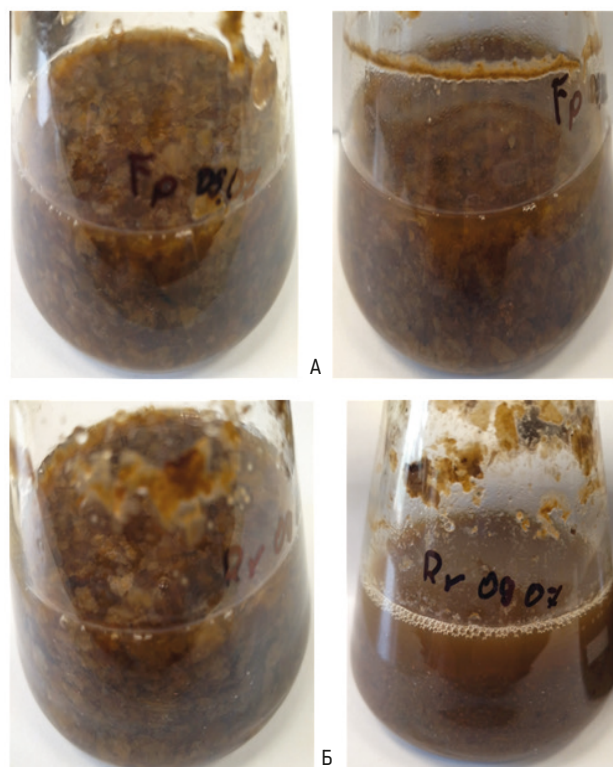


Рисунок 2. Глубинная ферментация *F. pinicola* (А) и *R. roseus* (Б) на вторые и восьмые сутки культивирования.

Figure 2. Submerged fermentation of *F. pinicola* (A) and *R. roseus* (Б) on cultivation days 2 and 8.

Ферментативная активность штамма *F. pinicola*, культивированного на кофейной шелухе

Таблица 2

Enzymatic activity of the *F. pinicola* strain cultivated on coffee silverskin

Table 2

Ферментативная активность, ед/г	Время культивирования, сут					
	2	4	6	8	12	16
Эндоглюканазная	218±4,8 ^a	346±6,4 ^b	425±7,3 ^c	570±8,9 ^d	210±1,4 ^a	208±2,2 ^a
Экзоглюканазная	180±2,5 ^a	203±1,6 ^b	120±1,6 ^c	186±2,7 ^a	139±2,4 ^d	131±3,2 ^e
Целлюлазная	821±33 ^a	1124±17 ^b	1235±24 ^c	1841±38 ^d	1443±14 ^e	1109±43 ^b
Ксиланазная	177±7,2 ^a	191±3,7 ^b	227±6,3 ^c	304±22,7 ^d	578±6,3 ^e	665±22 ^f
β-глюканазная	225±25 ^a	355±8 ^b	650±29 ^c	952±41 ^d	1029±34 ^d	1176±39 ^e

Примечание. Здесь и в табл. 3 буквы указывают на значимые различия ферментативной активности на основе теста Манна-Уитни при $p < 0.05$.
Note. Here and in Table 3 different letters indicate significant differences in the enzymatic activity based on the Mann-Whitney test at $p < 0.05$.

Ферментативная активность штамма *R. roseus*, культивируемого на кофейной шелухе

Table 3

Enzymatic activity of the *R. roseus* strain cultivated on coffee silverskin

Ферментативная активность, ед/г	Время культивирования, сутки					
	2	4	6	8	12	16
Эндоглюканазная	294±5 ^a	483±4 ^b	277±3 ^c	276±4 ^c	226±4 ^d	255±6 ^e
Экзоглюканазная	138±4 ^a	224±1,6 ^b	267±2 ^c	284±4 ^d	208±1,2 ^e	213±4 ^e
Целлюлазная	670±29 ^a	754±13 ^b	787±46 ^b	882±31 ^b	980±10 ^c	1666±58 ^d
Ксиланазная	257±10 ^a	607±8 ^b	5070±124 ^c	4049±72 ^d	736±4 ^e	169±10 ^f
β - глюконазная	174±23 ^a	872±8 ^b	1430±44 ^c	971±50 ^b	697±6 ^d	483±9 ^e

Источники и литература/References

- Garcia, C. V. Spent coffee grounds and coffee silverskin as potential materials for packaging: a review / C. V. Garcia, Y. T. Kim // Journal of Polymers and the Environment. – 2021. – P. 2372–2384. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02067-9>.
- Barbero-López, A. Revalorization of coffee silverskin as a potential feedstock for antifungal chemicals in wood preservation / A. Barbero-López, J. Monzó-Beltrán, V. Virjamo [et al.] // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2020. – Vol. 152. – P. 105011. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105011>.
- Gemechu, F. G. Embracing nutritional qualities, biological activities and technological properties of coffee by-products in functional food formulation / F. G. Gemechu // Trends in Food Science & Technology. – 2020. – Vol. 104. – P. 235–261. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.005>.
- de Mello, V. Recent patent applications for coffee and coffee by-products as active ingredients in cosmetics / V. de Mello, G. A. de Mesquita Júnior, J. G. E. Alvim [et al.] // International Journal of Cosmetic Science. – 2023. – Vol. 45 (3). – P. 267–287. – URL: <https://doi.org/10.1111/ics.12843>.
- Hijosa-Valsero, M. Biobutanol production from coffee silverskin / M. Hijosa-Valsero, J. Garita-Cambronero, A. I. Paniagua-García, R. Díez-Antolínez // Microbial Cell Factories. – 2018. – Vol. 17. – P. 1–9. – URL: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1002-z>.
- Picca, G. Compositing of coffee silverskin with carbon rich materials leads to high quality soil amendments / G. Picca, C. Plaza, E. Madejón, M. Panettieri // Waste and Biomass Valorization. – 2023. – Vol. 14. – P. 297–307. – URL: <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01879-7>.
- Prakash, P. Effect of coffee silverskin enriched diet to enhance the immunological and growth parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) / P. Prakash, H. V. Doan // Archives of Razi Institute. – 2022. – Vol. 77 (3). – P. 1281–1289. – URL: <https://doi.org/10.22092/ARI.2021.356820.1920>.
- Anchugova, A. Biorefinery potential of coffee silverskin: composition and applications / E. Anchugova, E. Udor-atina, E. Kazakova [et al.] // International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture. – 2024. – URL: <https://doi.org/10.57647/ijrowa-b5y0-qf23>.
- Saubenova, M. The input of microorganisms to the cultivation of mushrooms on lignocellulosic waste / M. Saubenova, Y. Oleinikova, A. Sadanov [et al.] // AIMS Agriculture and Food. – 2023. – Vol. 8 (1). – P. 239–277. – URL: <https://doi.org/10.3934/agrfood.2023014>.
- Nzekoue, F. K. Coffee silverskin: Characterization of B-vitamins, macronutrients, minerals and phytosterols / F. K. Nzekoue, G. Borsetta, L. Navarini [et al.] // Food Chemistry. – 2022. – Vol. 372. – P. 131188. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131188>.
- Rodrigues, É. F. Production and purification of amylolytic enzymes for saccharification of microalgal biomass / É. F. Rodrigues, A. M. M. Ficanha, R. M. Dallago [et al.] // Biore-source Technology. – 2017. – Vol. 225. – P. 134–141. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.047>.
- Bonanomi, G. Water extracts of charred litter cause opposite effects on growth of plants and fungi. / G. Bonanomi, F. Ippolito, M. Senatore [et al.] // Soil Biology and Biochemistry. – 2016. – Vol. 92. – P. 133–141. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.10.003>.
- Polygalina, G. V. Opređenje aktivnosti fermentov : Spravochnik [Determination of enzyme activity : Reference book] / G. V. Polygalina, V. S. Cherednichenko, L. V. Rimareva. – Moscow : DeLi print, 2003. – 375 p. [In Russian]
- Mhilu, C. F. Analysis of energy characteristics of rice and coffee husks blends / C. F. Mhilu // International Scholarly Research Notices. – 2014. – Vol. 2014, № 1. – P. 196103. – URL: <https://doi.org/10.1155/2014/196103>.
- Paramjeet, S. Biofuels: Production of fungal-mediated ligninolytic enzymes and the modes of bioprocesses utilizing agro-based residues / S. Paramjeet, P. Manasa, N. Korrapati // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2018. – Vol. 14. – P. 57–71. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.02.007>.
- Shahi, N. Xylanase: a promising enzyme / N. Shahi, A. Hasan, S. Akhtar [et al.] // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. – 2016. – Vol. 8. – P. 334–339.

Благодарность (госзадание):

Работа выполнена при финансировании государственного задания № 1021051101411-4-1.6.23 «Научно обоснованные биотехнологии для улучшения экологической обстановки и здоровья человека на Севере».

Авторы выражают благодарность сотрудникам экоаналитической лаборатории Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, ООО «Кофе Плюс».

Acknowledgements (state task):

The authors are grateful to the staff of the Ecoanalytical Laboratory at the Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ООО "Coffee Plus".

The work was performed within the frames of the state task № 1021051101411-4-1.6.23 "Science-based biotechnologies to improve the environmental situation and human health in the North".

Информация об авторах:

Мартынов Владислав Владимирович – аспирант, инженер лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук; Scopus Author ID – 57218542348, <https://orcid.org/0000-0003-0806-9320> (167982, Российская Федерация, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28. e-mail: martynov.v.v@ib.komisc.ru).

Щемелинина Татьяна Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук; Scopus Author ID – 56711948200, <https://orcid.org/0000-0002-4052-6424> (167982, Российская Федерация, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28; e-mail: tatyana.komi@mail.ru).

Анчугова Елена Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук; Scopus Author ID – 56711975900, <https://orcid.org/0000-0002-7912-3518> (167982, Российская Федерация, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28; e-mail: anchugova@ib.komisc.ru).

About the authors:

Vladislav V. Martynov – Postgraduate Student, Engineer at the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology; Scopus Author ID 57218542348, <https://orcid.org/0000-0003-0806-9320> (Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 28 Kommunisticheskaya st., 167982 Syktyvkar, Komi Republic, Russia; e-mail: martynov.v.v@ib.komisc.ru).

Tatiana N. Shchemelinina – Candidate of Sciences (Biology), Senior Researcher at the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology; Scopus Author ID 56711948200, <https://orcid.org/0000-0002-4052-6424> (Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 28 Kommunisticheskaya st., 167982 Syktyvkar, Komi Republic, Russia; e-mail: tatyana.komi@mail.ru).

Elena M. Anchugova – Junior Researcher at the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology; Scopus Author ID 56711975900, <https://orcid.org/0000-0002-7912-3518> (Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 28 Kommunisticheskaya st., 167982 Syktyvkar, Komi Republic, Russia; e-mail: anchugova@ib.komisc.ru).

Для цитирования:

Мартынов, В. В. Валоризация лигноцеллюлозного отхода – кофейной шелухи / В. В. Мартынов, Т. Н. Щемелинина, Е. М. Анчугова // Известия Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Серия «Экспериментальная биология и экология». – 2024. – № 9 (75). – С. 75–79.

For citation:

Martynov, V. V. Valorizaciya lignocellyuloznogo othoda – kofejnoj sheluhi [Valorization of coffee silverskin lignocellulosic waste] / V. V. Martynov, T. N. Shchemelinina, E. M. Anchugova // Proceedings of the Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Series "Experimental Biology and Ecology". – 2024. – № 9 (75). – P. 75–79.

Дата поступления статьи: 10.09.2024

Прошла рецензирование: 13.09.2024

Принято решение о публикации: 19.09.2024

Received: 10.09.2024

Reviewed: 13.09.2024

Accepted: 19.09.2024