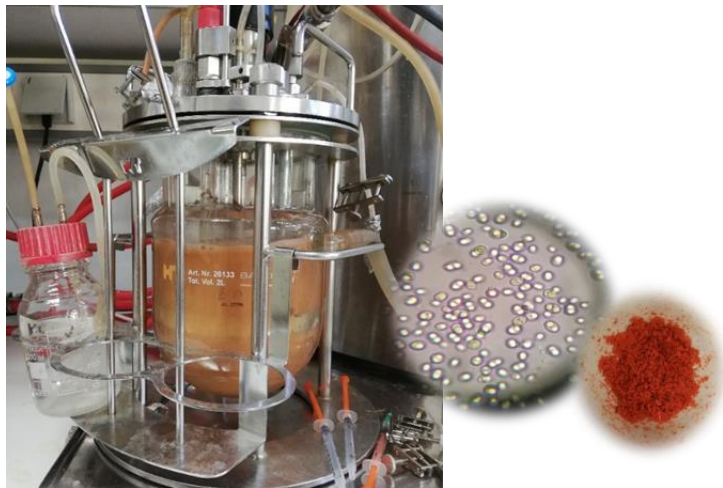


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΜΣ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Αξιοποίηση αποβλήτων καφέ προς παραγωγή
μικροβιακού λίπους και βιοχρωστικών**



Ελένη Μαρία Β. Αναγνωστοπούλου

Επιβλέπων Καθηγητής: Κουτίνας Αποστόλης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα
2020

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αξιοποίηση αποβλήτων καφέ προς παραγωγή μικροβιακού λίπους και
βιοχρωστικών

“Spent Coffee Grounds valorization for microbial oil and carotenoids
production”

Ελένη Μαρία Β. Αναγνωστοπούλου

Εξεταστική επιτροπή:

Κουτίνας Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

Μαντάλα Ιωάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αξιοποίηση αποβλήτων καφέ προς παραγωγή μικροβιακού λίπους και βιοχρωστικών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων

Περίληψη

Η αυξημένη ευαισθητοποίηση του κοινού και η θέσπιση αυστηρών κανονισμών για την παραγωγή προϊόντων που βασίζονται σε ορυκτές πρώτες ύλες, έχουν ανοίξει το δρόμο για εναλλακτικούς και ανανεώσιμους πόρους, που μπορούν να παρέχουν καθαρή ενέργεια και «πράσινες» χημικές ουσίες με υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα. Το στερεό απόβλητο που προκύπτει από την εκχύλιση του καφέ (Spent Coffee Grounds-SCG) θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ανάκτηση και παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας.

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η ικανότητα παραγωγής μικροβιακού λίπους και βιοχρωστικών με την χρήση SCG ως θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης. Το SCG αρχικά, υπεβλήθη σε προεπεξεργασία με μικροκύματα, υπό διαφορετικούς συνδυασμούς ισχύος και διάρκειας επεξεργασίας με διαφορετικούς διαλύτες, καθώς και διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις στερεών. Στόχος ήταν να μελετηθεί η επίδραση των προαναφερθέντων παραγόντων στην επακόλουθη ενζυμική υδρόλυση του προεπεξεργασμένου SCG. Πιο συγκεκριμένα, το προεπεξεργασμένο SCG, μετατράπηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης για παραγωγή μικροβιακού λίπους και βιοχρωστικών, με τη χρήση εμπορικών ενζύμων. Οι ενζυμικές υδρολύσεις αξιολογήθηκαν ως προς διαφορετικές αρχικές ενζυμικές ενεργότητες. Επιπλέον εξετάστηκε η ανάπτυξη στρατηγικής κατά την οποία το νερό των ενζυμικών υδρολύσεων προερχόταν από το υγρό ρεύμα της προεπεξεργασίας με μικροκύματα. Οι μέγιστες αποδόσεις υδρόλυσης κυτταρίνης (0,75 g υδρολυθείσας κυτταρίνης/g ολικής κυτταρίνης) και ημικυτταρίνης (0,5 g υδρολυθείσας ημικυτταρίνης/g ολικής ημικυτταρίνης) επιτεύχθηκαν υπό συνθήκες μικροκυμάτων 400 W, 15 min, με αρχική συγκέντρωση SCG 50 g/L. Η εφαρμογή υψηλής ισχύος (>600 W) και παρατεταμένων χρόνων παραμονής οδήγησε σε μερική αποδόμηση των σακχάρων και συνεπώς σε μείωση της αποδοτικότητας της επακόλουθης ενζυμικής υδρόλυσης. Το ενζυμικό υδρόλυμα με την μεγαλύτερη απόδοση ως προς τα ολικά παραγόμενα σάκχαρα, αξιοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα και αζώτου για την διεξαγωγή ζυμώσεων προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Ζυμώσεις ασυνεχούς καλλιέργειας με το στέλεχος ζύμης *Rhodosporidium toruloides* DSM 444 πραγματοποιήθηκαν αρχικά σε συνθετικά υποστρώματα με τη χρήση γλυκόζης, μαννόζης και γαλακτόζης, προς παραγωγή μικροβιακού λίπους και καροτενοειδών. Και οι τρεις πηγές άνθρακα καταναλώθηκαν επαρκώς από το μικροοργανισμό. Η μέγιστη παραγωγή μικροβιακού λίπους παρατηρήθηκε με τη χρήση συνθετικής γλυκόζης (16,25 g/L), ενώ η μέγιστη παραγωγή βιοχρωστικών ίση με 131,3 μg/g βιομάζας επετεύχθη σε συνθετική μαννόζη. Εν συνεχεία, ζυμώσεις κλειστού τύπου με τη χρήση ενζυμικών υδρολυμάτων προερχόμενων από SCG, είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή 28,1 g/L βιομάζας (Total Dry Weight-TDW), 11,1 g/L συγκέντρωση λιπιδίων και 304,6 μg/g βιομάζας βιοχρωστικών. Στην περίπτωση πειραμάτων ημισυνεχούς λειτουργίας που πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα, επετεύχθηκε μέγιστη παραγωγή TDW ίση με 45,8 g/L με ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων 52,4%, ενώ η παραγωγή βιοχρωστικών ανήλθε σε 432,8 μg/g βιομάζας.

Τα απόβλητα επεξεργασίας καφέ θεωρούνται σημαντικοί και πολλά υποσχόμενοι ανανεώσιμοι πόροι για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως χημικές ενώσεις, φαρμακευτικά προϊόντα και βιοκαύσιμα. Η κλασμάτωση των αποβλήτων και η εφαρμογή καινοτόμων βιοτεχνολογικών διεργασιών αποτελούν απαραίτητες προϋποθέσεις για την πλήρη αξιοποίηση των αποβλήτων και την ανάπτυξη καινοτόμων βιοδιυλιστηρίων.

Επιστημονική περιοχή: Αξιοποίηση αποβλήτων τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: Απόβλητο εκχύλισης καφέ, Προεπεξεργασία με μικροκύματα, Ενζυμική υδρόλυση, *Rhodosporidium toruloides* DSM 444, Μικροβιακό λίπος, Καροτενοειδή, Ζυμώσεις ημισυνεχούς λειτουργίας

Spent Coffee Grounds valorization for microbial oil and carotenoids production

Department of Food Technology and Human Nutrition
Laboratory of Engineering and Food Process

Abstract

Increased public awareness and the establishment of strict policy regulations for fossil-based processes have paved the way towards alternative resources that provide clean energy, «green» chemicals, and biofuels. Spent coffee grounds (SCG), that are the solid residues deriving from coffee brewing, could be used as a renewable substrate for the recovery and production of value-added products, in the context of circular economy.

In this study, SCG was utilized as a fermentation substrate for the production of microbial oil and carotenoids. SCG was initially pretreated via microwave applying different combinations of power and processing duration, solvents, and different initial solid concentrations. The aim of this experimental study was the evaluation of the aforementioned factors on the subsequent enzymatic hydrolysis of the pretreated SCG. More specifically, the pretreated SCG was converted into a fermentation substrate for the production of microbial oil and carotenoids, through enzymatic processes using commercial enzymes. Enzymatic hydrolysis was evaluated in terms of different initial enzymatic activities. Furthermore, a two-step strategy was developed applying water derived from microwave processing to the subsequent enzymatic hydrolysis. The maximum hydrolysis yields of cellulose (0,75 g hydrolyzed cellulose/g total cellulose) and hemicellulose (0,5 g hydrolyzed hemicellulose/g total hemicellulose) were obtained via microwave pretreatment at 400 W, 15 min reaction duration and initial solids concentration of 50 g/L. The application of high power (>600 W) and prolonged duration led to partial sugars degradation and reduction of the subsequent enzymatic hydrolysis efficiency.

Enzymatic hydrolysate derived from SCG, were further applied as sources of carbon, nitrogen and minerals in fermentations for the production of value-added products. Initially, batch fermentations were performed using commercial substrates including glucose, mannose and galactose, for microbial oil and carotenoids production, using *Rhodospiridium toruloides* DSM 444. The carbon sources were adequately consumed by the microorganism with the maximum production of microbial oil achieved with

commercial glucose (16,3 g/L), and the maximum production of carotenoids (131,3 µg / g biomass) obtained using synthetic mannose. Subsequent batch fermentations using SCG hydrolysate led to the production of 28,1 g/L TDW, lipid concentration of 11,1 g/L, and carotenoids of 304,6 µg/g TDW. Regarding fed-batch fermentations that were performed in a bench-top bioreactor, the highest TDW concentration was determined equal to 45,8 g/L with an intracellular lipid content of 52,4%, while the carotenoids production reached 432,8 µg / g TDW.

Coffee processing waste should be considered as important and highly promising renewable resources for the production of value-added products, such as chemicals, pharmaceutical products and biofuels. The fractionation of waste streams and the application of biotechnological processes will lead to efficient valorization of wastes and the development of innovative biorefinery concepts.

Scientific area: Valorization of food waste

Keywords: Spent coffee grounds, Microwave pretreatment, Enzymatic hydrolysis, *Rhodosporidium toruloides* DSM 444, Microbial oil, Carotenoids, Fed-batch fermentations

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, καθώς και στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αποστόλη Κουτίνα, για την εμπιστοσύνη του και την ανάθεση αυτού του τόσο ενδιαφέροντος θέματος της μεταπτυχιακής μου μελέτης, όπως επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον κ. Σεραφείμ Παπανικολάου και την κα Ιωάννα Μαντάλα. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην μεταδιδάκτορα ερευνήτρια Ερμίντα Τσούκο για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια και τις συμβουλές που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την συμπαράσταση και κατανόηση που έδειξαν καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

Συντομογραφίες

ACL: ATP-citrate lyase

AGAT: 1-acyl-G-3-Pacyltransferase

ALA: α-linolenic acid

AMP: Adenosinemonophosphate

CAGR: CompoundAnnualGrowthRate

CH: Coffee Husks

CoA: CoenzymeA

CP: Coffee Pulp

CS: Coffee Silverskin

DAG: Diacylglycerol

DMAPP: Dimethylallyldiphosphate

EFB: Empty fruit bunch

FAMES: Fatty Acid Methyl Esters

FAN: Free Amino Nitrogen

FID: Flame Ionization Detector

G-3-P: Glycerol-3-phosphate

GAT: G-3-Pacyltransferase

GC: Gas Chromatography

GGPP: Geranylgeranylpyrophosphate

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA

HPLC: High-performance liquid chromatography

IMP: Inosine monophosphate

IPP: Isopentenylidiphosphate

LA: Linoleic acid

LED: Light emitting diode

LHW: Liquid hot water

LPA: Lysophosphatidic acid

MAV: Mevalonate pathway
MK: Mevalonate kinase
MW: Microwave
NAD⁺: Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP⁺: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PA: Phosphatidic acid
PAP: Phosphatidic acid phosphohydrolase
PFA: Perfluoroalkoxy-alkane
PHAs: Polyhydroxyalkanoates
PMD: Mevalonate diphosphate decarboxylase
PMK: Phosphomevalonate kinase
SCG: Spent Coffee Grounds
SEs: Steryl esters
TAGs: Triacylglycerols
TDW: Total Dry Weight
TKN: Total Kjeldahl Nitrogen
TPC: Total Phenolic Content

Περιεχόμενα

Περίληψη	2
Συνοπτομογραφίες	7
1. Εισαγωγή	12
<i>1.1. Απόβλητα καφέ</i>	14
<i>1.2. Μέθοδοι προ-επεξεργασίας της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας – Η περίπτωση εφαρμογής της τεχνολογίας μικροκυμάτων</i>	16
<i>1.3. Βιοχημεία της συσσώρευσης λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς</i>	21
<i>1.3.1. Μονοπάτι βιοσύνθεσης λιπιδίων</i>	22
<i>1.3.2. Σύνθεση τριακυλογλυκερόλης</i>	24
<i>1.3.3. Αποικοδόμηση των αποθηκευτικών λιπιδίων</i>	25
<i>1.3.4. Μικροοργανισμοί και μικροβιακό λίπος</i>	25
<i>1.4. Καροτενοειδή</i>	26
<i>1.4.1. Βιοσύνθεση των καροτενοειδών</i>	28
<i>1.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση καροτενοειδών στις ζύμες</i>	30
<i>1.4.3. Αλληλεπίδραση λίπους και καροτενοειδών</i>	31
<i>1.5. Ανάπτυξη βιοδιυλιστηρίων με την χρήση αποβλήτων καφέ</i>	32
2. Σκοπός παρούσας μελέτης	35
3. Υλικά και μέθοδοι	36
<i>3.1. Ανανεώσιμες πρώτες ύλες</i>	36
<i>3.2. Μικροοργανισμοί, ανανέωση, συντήρηση και προκαλλιέργεια</i>	36
<i>3.3. Ανάκτηση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από SCGs</i>	36
<i>3.4. Κατεργασία με μικροκύματα</i>	37
<i>3.5. Ενζυμική υδρόλυση προς παραγωγή αζώτου ελεύθερων αμινομάδων και σακχάρων</i>	38
<i>3.6. Ζυμώσεις προς παραγωγή μικροβιακού λίπους και καροτενοειδών</i>	39
<i>3.7. Αναλυτικές μέθοδοι</i>	40
<i>3.7.1. Προσδιορισμός υγρασίας και τέφρας</i>	40
<i>3.7.2. Προσδιορισμός των δομικών υδατανθράκων και λιγνίνης στην βιομάζα</i>	40
<i>3.7.3. Προσδιορισμός φυτικού ελαίου</i>	41
<i>3.7.4. Προσδιορισμός ελεύθερων αζώτου αμινοξέων</i>	41
<i>3.7.5. Προσδιορισμός συνολικού αζώτου Kjeldahl</i>	42
<i>3.7.6. Προσδιορισμός πηγών άνθρακα</i>	42
<i>3.7.7. Προσδιορισμός βιομάζας και μικροβιακού ελαίου</i>	43

3.7.8.	<i>Προσδιορισμός καρροτενοειδών</i>	43
3.7.9.	<i>Προσδιορισμός λιπαρών οξέων του μικροβιακού ελαίου</i>	44
3.7.10.	<i>Προσδιορισμός συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών</i>	45
3.7.11.	<i>Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας</i>	45
4.	Αποτελέσματα και συζήτηση	47
4.1.	<i>Σύσταση του αποβλήτου της εκχύλισης του καφέ (SCG)</i>	47
4.2.	<i>Επίδραση της προεπεξεργασίας του SCG μέσω μικροκυμάτων στην σύστασή του</i>	48
4.3.	<i>Ενζυμική υδρόλυση προς παραγωγή σακχάρων</i>	49
4.3.1.	<i>Επίδραση διαφορετικών συνθηκών επεξεργασίας με μικροκύματα στην αποδοτικότητα των ενζυμικών υδρολύσεων</i>	49
4.3.2.	<i>Επίδραση διαφορετικών διαλυτών προεπεξεργασίας και αρχικών ενζυμικών ενεργοτήτων στην αποδοτικότητα των ενζυμικών υδρολύσεων</i>	51
4.4.	<i>Ενζυμική υδρόλυση προς παραγωγή σακχάρων και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων</i>	54
4.5.	<i>Μικροβιακές ζυμώσεις προς παραγωγή μικροβιακού λίπους και καρροτενοειδών</i>	57
4.5.1.	<i>Ζυμώσεις κλειστού τύπου</i>	57
4.5.2.	<i>Ζυμώσεις ημιδιαλείποντος έργου</i>	62
4.6.	<i>Σύγκριση με βιβλιογραφία- Μικροβιακό λίπος και καρροτενοειδή από διάφορα στελέχη ζυμών σε ανανεώσιμες πρώτες ύλες</i>	64
4.7.	<i>Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους</i>	67
5.	Συμπεράσματα	69
6.	Βιβλιογραφία	71

1. Εισαγωγή

Η αυξημένη ευαισθητοποίηση του κοινού και η θέσπιση αυστηρών κανονισμών για την παραγωγή προϊόντων που βασίζεται σε ορυκτές πρώτες ύλες, έχουν ανοίξει το δρόμο για εναλλακτικούς πόρους, που μπορούν να παρέχουν βιοκαύσιμα και πράσινες χημικές ουσίες με υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα. Η έρευνα έχει επικεντρωθεί κυρίως σε ανανεώσιμα υλικά, που μπορούν να βρεθούν σε αφθονία, έχουν χαμηλό κόστος και δεν ανταγωνίζονται την τροφική αλυσίδα. Η βιωσιμότητα των παραγωγικών συστημάτων θα μπορούσε να επιτευχθεί με την συμπαραγωγή βιοκαυσίμων και χημικών ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας, προσομοιώνοντας τα διωλιστήρια πετρελαίου. Η κλασμάτωση και βιομετατροπή της ανανεώσιμης βιομάζας σε χημικά και βιοχημικά ενδιάμεσα, που παρέχονται περαιτέρω σε ένα εύρος άλλων τελικών προϊόντων, είναι υψίστης σημασίας για την επίτευξη της βιωσιμότητας. Η βιομηχανική βιοτεχνολογία, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης και της καθιέρωσης καινοτόμων τεχνολογιών και βιοτεχνολογικών οδών, είναι το κλειδί για την αειφόρο παραγωγή καυσίμων, χημικών ουσιών και πολυμερών, δημιουργώντας την εποχή της βιο-οικονομίας.

Τα λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα π.χ το στερεό ρεύμα που προκύπτει από την επεξεργασία του καφέ, είναι ανεπαρκώς χρησιμοποιούμενα ρεύματα παραπροϊόντων με χαμηλή θρεπτική αξία και συνεπώς περιορισμένες εφαρμογές. Οι έως τώρα συμβατικές στρατηγικές διαχείρισης αυτών των ρευμάτων συμπεριλαμβανομένων των ζωοτροφών, της κομποστοποίησης, της αναερόβιας χώνευσης, της εναπόθεσης σε χώρους υγειονομικής ταφής και της αποτέφρωσης, δημιουργούν πολύ υψηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα ή/και παρουσιάζουν μεγάλη κατανάλωση ενέργειας συνοδευόμενο από υψηλό κόστος (MurthyandNaidu, 2012)

Το 2018, η Ευρωβουλή υιοθέτησε το μέτρο της Κυκλικής Οικονομίας, θέτοντας νομικά δεσμευτικούς στόχους για την ανακύκλωση των αποβλήτων και την μείωση της υγειονομικής ταφής. Το μέτρο περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, την τροποποίηση της Οδηγίας για την υγειονομική ταφή (1999/31/EC) και της Οδηγίας πλαισίου για τα απόβλητα (2008/98/EC). Τα κράτη μέλη θα πρέπει να διασφαλίσουν ως το 2030, ότι τα απόβλητα που είναι κατάλληλα για ανακύκλωση ή άλλη ανάκτηση, δε θα επιτρέπεται να απορρίπτονται. Η χρήση των χώρων υγειονομικής ταφής θα πρέπει να γίνεται κατ' εξαίρεση και όχι κανονικά. Η οδηγία 2018/851 απαιτεί από τα κράτη

μέλη να βελτιώσουν τα συστήματα διαχείρισης των αποβλήτων τους και να διασφαλίσουν ότι τα απόβλητα αξιολογούνται σαν πρώτη ύλη για την παραγωγή υλικών (<https://ec.europa.eu/environment/circular-economy/>).

Οι καλλιέργειες καφέ καταλαμβάνουν εκατομμύρια εκτάρια καλλιεργήσιμης γης παγκοσμίως. Οι αγροτοβιομηχανικές δραστηριότητες που απαιτούνται για την επεξεργασία τους οδηγούν στην παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων ροών παραπροϊόντων, συνιστώντας πηγή μεγάλης περιβαλλοντολογικής μόλυνσης. Αρκετά κλάσματα αποβλήτων όπως το στερεό που προκύπτει μετά την εκχύλιση του καφέ (Spent Coffee Grounds-SCG), έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία (περίπου 70%) διευκολύνοντας την διαδικασία αποσύνθεσής τους. Υπολογίζεται ότι 1 t καθαρού κατεργασμένου καφέ, έχει τον ίδιο περιβαλλοντικό αντίκτυπο με 273 m³ ακατέργαστων οικιακών λυμάτων, ενώ χρειάζονται 8,4 m³ νερό για κάθε t επεξεργασμένου καρπού (Chanakya and Alwis, 2004).

Τα παραπροϊόντα του καφέ θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως υποστρώματα για την ανάκτηση και παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας. Αυτό περιλαμβάνει διάφορες διεργασίες, όπως μεθυλεστεροποίηση, υδρόλυση, ζύμωση και πυρόλυση, για την μετατροπή των SCG σε βιοκαύσιμα (κυρίως βιοαέριο, βιοαιθανόλη, βιο-έλαιο, βιοντίζελ), καθώς και σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως βιοενεργές ενώσεις, βιοάνθρακα (biochar), καροτενοειδή, πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκούς εστέρες (polyhydroxyalkanoates -PHAs) και την ανάκτηση, καφεΐνης και αντιοξειδωτικών ουσιών (Kavitha et al., 2020).

Η παραγωγή μικροβιακού λίπους αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό ερευνητικό τομέα των τελευταίων δεκαετιών. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εύρεση οικονομικά βιώσιμων, εναλλακτικών οδών για την παραγωγή βιοκαυσίμων από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, έχει οδηγήσει στην αναζήτηση ετερότροφων (ζύμες και μύκητες) ή φωτότροφων (μικροφύκη) οργανισμών, ικανών να συσσωρεύουν υψηλές ποσότητες λιπιδίων, μαζί με υψηλές αποδόσεις βιομετατροπής (Papanikolaou and Aggelis, 2010).

Η ανάγκη αντικατάστασης των πετροχημικών προϊόντων με βιοπροϊόντα έχει ανοίξει το δρόμο για έρευνα και ανάπτυξη της χρήσης των φυτικών ελαίων για την παραγωγή ελαιοχημικών, λόγω της μη τοξικής και βιοδιασπώμενης φύσης τους. Η χρήση των

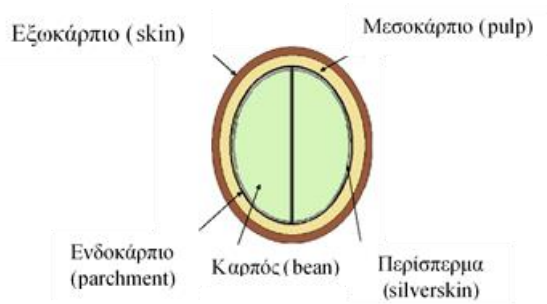
μικροβιακών λιπιδίων σαν πρόδρομες ενώσεις για την σύνθεση ελαιοχημικών, μπορεί να θεωρηθεί μία υποσχόμενη οδός, ειδικά μέσω της έννοιας του βιοδιυλιστηρίου.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η ικανότητα παραγωγής μικροβιακού ελαίου και βιοχρωστικών με τη χρήση στερεού αποβλήτου καφέ (SCG), μέσω ανάπτυξης κατάλληλης στρατηγικής, αξιοποιώντας και συνδυάζοντας καινοτόμες βιοδιεργασίες.

1.1. Απόβλητα καφέ

Ο καφές είναι ένα από τα σημαντικότερα γεωργικά προϊόντα παγκοσμίως, που χρησιμοποιούνται σαν ροφήματα. Οι *Coffea Arabica* και *Coffea canephora* είναι οι δύο κύριες ποικιλίες, που καλλιεργούνται για εμπορική παραγωγή (Panusa et al., 2013). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Καφέ, η παραγωγή καφέ παγκοσμίως έφτασε τις 170,6 εκατομμύρια σακούλες το 2018 (ICO, 2019). Η ποικιλία *Arabica*, που προέρχεται από την *C. arabica*, καταλαμβάνει το 75-80% της παγκόσμιας παραγωγής, ενώ η *C. Canephora* είναι γνωστή ως καφές Robusta.

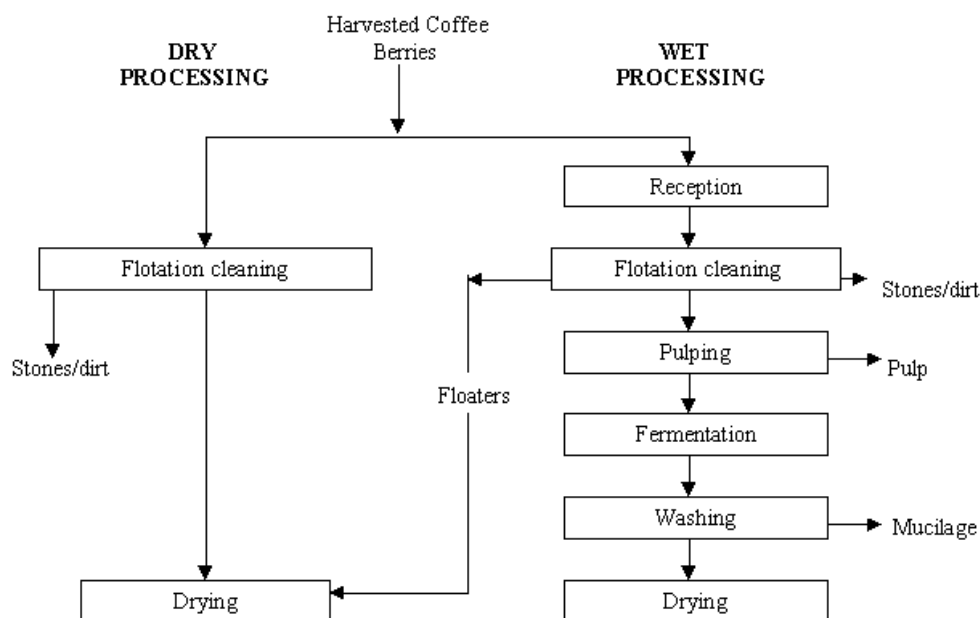
Ο καρπός του καφέ αποτελείται από πέντε στρώματα και πιο συγκεκριμένα το εξωκάρπιο, το μεσοκάρπιο, το ενδοκάρπιο και το περίβλημα/περίσπερμα για να ληφθούν οι κόκκοι του καφέ (Εικόνα 1) (Alves et al., 2017). Οι πράσινοι κόκκοι καφέ αποτελούν το 50-55% των ώριμων καρπών, ενώ το υπόλοιπο μέρος παράγεται σαν ρεύμα παραπροϊόντων (Franca and Oliveira, 2009). Τα παραπροϊόντα του καφέ συμπεριλαμβανομένων αυτών που προέρχονται από την επεξεργασία μετά την συγκομιδή, το ψήσιμο του καφέ και την παρασκευή του ροφήματος καφέ, αντιστοιχούν στο 80% του συνολικού όγκου (Torres-Valenzuela et al., 2019).



Εικόνα 1 Διαμήκης διατομή του καρπού του καφέ (Mussato et al., 2011)

Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του καφέ, οι καρποί που λαμβάνονται μετά την συγκομιδή, επεξεργάζονται μέσω ξηρής, υγρής και ημι-ξηρής επεξεργασίας (Σχήμα

1). Οι φλούδες του καφέ (Coffee husks-CHs) και ο πολτός του καφέ (Coffee pulp-CP), μαζί με τους ελαττωματικούς κόκκους, λαμβάνονται σαν στερεό υπόλειμμα μετά την αποφλοιώση των καρπών του καφέ. Ο πολτός του καφέ είναι ένα παραπροϊόν που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια της υγρής επεξεργασίας του, και αντιστοιχεί στο 29% ολόκληρου του κόκκου, ενώ οι φλούδες παράγονται από την ξηρή επεξεργασία και καταλαμβάνουν περίπου το 12% του κόκκου (Murthy and Naidu, 2012). Το περισπέρμιο (Coffee silverskin-CS) είναι το λεπτό περίβλημα του κόκκου του καφέ που παράγεται κατά το ψήσιμο του καφέ (Mussato et al., 2011). Περίπου 30 kg CS παράγονται από 4 t βιομηχανικής παραγωγής καφέ (Alves et al., 2017). Τα απόβλητα καφέ που προκύπτουν μετά την εκχύλιση του καφέ (Spent coffee grounds- SCG), παραλαμβάνονται σαν στερεό υπόλειμμα, και μαζί με το CS αποτελούν τις κύριες ροές αποβλήτων της βιομηχανίας καφέ (Mata et al., 2018). Περίπου το 50% της παγκόσμιας παραγωγής καφέ χρησιμοποιείται για την παρασκευή διαλυτού καφέ, οδηγώντας στην παραγωγή περίπου 6 εκατομμυρίων t αποβλήτων SCG σε ετήσια βάση (Aristizábal-Marulanda et al., 2017). Υπολογίζεται ότι για κάθε 1 t διαλυτού καφέ, παράγονται 1,5 ταποβλήτου SCG (Echeverria and Nuti, 2017). Επιπλέον, 650 kg αποβλήτων SCG παράγονται από 1 t πράσινων καρπών καφέ (Karmee et al., 2018).



Σχήμα 1 Διάγραμμα ροής υγρής και ξηρής κατεργασίας του καφέ (FAO, 2000)

Οι ροές των παραπροϊόντων του καφέ είναι πλούσιες σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια, καφεΐνη και πολυφαινόλες, με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη να

αποτελούν τα κυρίαρχα συστατικά όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Η χημική σύσταση των παραπροϊόντων του καφέ εξαρτάται άμεσα από την γεωγραφική προέλευση και την ποικιλία του καφέ. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη καταλαμβάνει το 18-19 % του κλάσματος του CS και το 6,7-13,7% του SCG, ενώ επίσης το SCG είναι πλούσιο σε λιπίδια (10-15 %). Αρκετά υψηλή είναι η περιεκτικότητα των παραπροϊόντων του καφέ σε υδατάνθρακες (έως και 89%), ενώ στο SCG κυρίαρχη είναι η ημικυτταρίνη με περιεκτικότητα 36,7% και η κυτταρίνη με 8,6-15,3%. Μεγάλη περιεκτικότητα κυτταρίνης παρατηρείται και στο κλάσμα του CP (63%) και ημικυτταρίνης στο κλάσμα του CH (24-45%). Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι το απόβλητο SCG έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε λιγνίνη (33%).

Πίνακας 1 Χημική σύσταση (% κ.β., επί ξηρού) των παραπροϊόντων του καφέ

Συστατικό	CH	CP	CS	SCG
Τέφρα ^{1,6}	3.0-7.0	-	-	0.4-2.2
Πρωτεΐνη ^{1,2,6}	8.0-11.0	4.0-12.0	18.0-19.0	6.7-13.7
Λιπίδια ^{1,3,5,6}	0.5-3.0	1.0-2.0	1.6-3.3	10.0-15.0
Υδατάνθρακες ^{1,3}	58.0-85.0	45.0-89.0	30.0-80.0	-
Κυτταρίνη ^{3,6}	19.0-26.0	63.0	18.0	8.6-15.3
Ημικυτταρίνη ^{3,4,6}	24.0-45.0	2.3	13.0	36.7
Λιγνίνη ^{3,6}	18.0-30.0	17.5		32.5-33.6
Μέταλλα ³	3.0-7.0	-	-	-
Καφεΐνη ^{1,6}	1.0	1.0	0.8-1.4	0.02-0.45.0
Ταννίνες ^{1,6}	5.0	1.0-9.0	-	0.02

¹ Narita et al., 2017; ² Franca and Oliveira 2009; ³ Murthy and Naidu, 2012; ⁴ Bekalo and Reinhardt, 2010; ⁵ Bessada et al., 2018; ⁶ Mata et al., 2018

1.2. Μέθοδοι προ-επεξεργασίας της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας – Η περίπτωση εφαρμογής της τεχνολογίας μικροκυμάτων

Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα αποτελεί την πιο άφθονη ανανεώσιμη οργανική πρώτη ύλη στη φύση. Η μετατροπή της σε βιογενή προϊόντα περιλαμβάνει την υδρόλυση της κυτταρίνης σε αφομοιώσιμων από τους μικροοργανισμούς πηγών άνθρακα, μέσω ενζύμων που διασπούν την κυτταρίνη, και την ζύμωση των σακχάρων αυτών μέσω

ζυμών ή βακτηρίων προς παραγωγή διάφορων μεταβολικών προϊόντων. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την υδρόλυση της κυτταρίνης συμπεριλαμβάνουν το πορώδες (πρόσβαση στην επιφάνεια) των λιγνοκυτταρινούχων υλικών, την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και την περιεκτικότητα της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης. Η παρουσία της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης καθιστούν δύσκολη την πρόσβαση των κυτταρινασών στην κυτταρίνη, μειώνοντας την απόδοση της υδρόλυσης (McMillan, 1994). Έτσι η προ-επεξεργασία αποτελεί απαραίτητο βήμα για την βελτίωση της υδρόλυσης, απομακρύνοντας μέρος της λιγνίνης, μειώνοντας την κρυσταλλικότητα της κυτταρίνης και αυξάνοντας το πορώδες του υλικού. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η προεπεξεργασία είναι ένα από τα πιο δαπανηρά βήματα για την μετατροπή της λιγνοκυτταρικής βιομάζας σε αφομοιώσιμες πηγές άνθρακα, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων ώστε να καταστεί η διεργασία πιο αποτελεσματική και οικονομικά αποδοτική. Διάφορες φυσικοχημικές (αυτοϋδρόλυση, ammonia fiber explosion, CO₂ explosion), χημικές (οζονόλυση, χημική υδρόλυση, αλκαλική υδρόλυση, οξειδωτική απολιγνινοποίηση) και βιολογικές μέθοδοι (ενζυμική διάσπαση ημικυτταρίνης και λιγνίνης μέσω μικροοργανισμών) έχουν μελετηθεί σχετικά με την προεπεξεργασία της λιγνοκυτταρικής βιομάζας, με στόχο τη βελτιστοποίηση της υδρόλυσης και ανάκτησης των σακχάρων ή τη βελτίωση της ενζυμικής σακχαροποίησης, την αποφυγή αποικοδόμησης ή απώλειας υδατανθράκων, την ελαχιστοποίηση των παρεμποδιστικών παραπροϊόντων και την βιωσιμότητα του κόστους (Sun and Cheng, 2002).

Η κατεργασία με μικροκύματα (Microwave- MW) αποτελεί μία αποτελεσματική τεχνική, καθώς ενισχύει τη στοχευμένη και ταχεία θέρμανση του προϊόντος, αφού υπάρχει άμεση επαφή μεταξύ του υλικού και του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου που παράγεται από τα μικροκύματα. Επιπλέον, η χρήση των μικροκυμάτων μπορεί να μεταβάλλει την υπερδομή της κυτταρίνης, να αποσυνθέσει τη λιγνίνη και την ημικυτταρίνη και να διευκολύνει την πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων στο λιγνοκυτταρινούχο υπόστρωμα (Conesa et al., 2016). Ο συνδυασμός της θέρμανσης με μικροκύματα με διάφορα χημικά (π.χ. αλκάλια) διευκολύνει την ανάπτυξη πολλών μεθόδων προεπεξεργασίας.

Η ημικυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που περιλαμβάνει ξυλογλυκάνες, ξυλάνες, γαλακτάνες, αραβινάνες, μαννάνες και γλυκομαννάνες. Ο πιο σημαντικός

βιολογικός ρόλος της ημικυτταρίνης είναι η ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος, αλληλεπιδρώντας με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη. Όπως και η κυτταρίνη, μπορεί να αποικοδομηθεί σε μονοσακχαρίτες για την παραγωγή αφομοιώσιμων από τους μικροοργανισμούς πηγών άνθρακα. Η χρήση αραιών αλκαλικών διαλυμάτων δύναται να διευκολύνει τη διάσπαση ολόκληρων πολυμερών του τοιχώματος, μέσω της διάσπασης των δεσμών υδρογόνου και των ομοιοπολικών δεσμών, οδηγώντας στην αποτελεσματική απομάκρυνση της λιγνίνης (Zhu et al., 2016).

Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει μεθόδους προ-κατεργασίας με μικροκύματα που έχουν εφαρμοστεί στην ευρύτερη βιβλιογραφία σε διάφορους τύπους λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας. Οι Ma et al. (2009) χρησιμοποίησαν σχεδιασμό Box – Behnken και μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης για την βελτιστοποίηση της προ-κατεργασίας άχρου ρυζιού με μικροκύματα. Μετά την προεπεξεργασία με μικροκύματα ακολούθησε ενζυμική υδρόλυση με εμπορικές κυτταρινάσες. Οι μέγιστες αποδόσεις της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της τελικής σακχαροποίησης αυξήθηκαν κατά 30,6%, 43,3% και 30,3% αντίστοιχα, υπό τις βέλτιστες συνθήκες (680 Watt, 24 min και 75 g/L συγκέντρωση στερεών). Η χημική ανάλυση της σύστασης του άχρου σίτου επιβεβαίωσε ότι η προ-κατεργασία με μικροκύματα μπορεί να διασπάσει το σύμπλεγμα λιγνίνη- ημικυτταρίνη και να απομακρύνει μερικώς την λιγνίνη.

Οι Amini et al. (2018) ανέπτυξαν μία ήπια και οικονομικά αποδοτική μέθοδο προκατεργασίας του πριονιδίου προερχόμενου από τον *Eucalyptus regnans* για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης των σακχάρων μέσω ενζυμικής υδρόλυσης. Διερευνήθηκε η ακτινοβολήση με μικροκύματα και χρήση νερού ως διαλύτη. Υπό τις βέλτιστες συνθήκες των 30 min, 500 Watt, 180 °C και αναλογία στερεού προς υγρό 4:100, η απόδοση των σακχάρων ήταν 3,5 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με την συμβατική κατεργασία με υγρό ζεστό νερό (Liquid hot water- LHW) κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, η πλήρης απελευθέρωση των C₅ και C₆ σακχάρων επιτεύχθηκε ύστερα από επίδραση με μικροκύματα ακολουθούμενη από ενζυμική υδρόλυση, σε σύγκριση με την απελευθέρωση μόλις του 4% των σακχάρων χωρίς προεπεξεργασία και του 31% των σακχάρων μετά από προεπεξεργασία με LHW.

Οι Conesa et al. (2016) μελέτησαν τη επίδραση με μικροκύματα για να βελτιώσουν τη σακχαροποίηση των αποβλήτων από ανανά. Εφαρμόστηκαν διαφορετικές εντάσεις

MW (170, 340, 510, 680 και 850 W) και χρόνοι έκθεσης (1-20 min). Τιμές ισχύος υψηλότερες των 680 W και παρατεταμένοι χρόνοι έκθεσης οδήγησαν σε διάσπαση των σακχάρων και μείωση της αποτελεσματικότητας της επακόλουθης ενζυμικής υδρόλυσης. Η παρουσία παρεμποδιστών στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης συνδέθηκε με τις παρατεταμένες προ-κατεργασίες με μικροκύματα. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι οι ήπιες μέθοδοι προ-επεξεργασίας με μικροκύματα (10 min, 510 W) μπορεί να προωθήσουν μικροδομικές αλλαγές, που ενισχύουν την ενζυμική απόδοση, ενώ οι πιο έντονες μέθοδοι θα μπορούσαν να αυξήσουν την συμπύκνωση των ιστών και να μειώσουν την αποτελεσματικότητα της ενζυμικής κατεργασίας.

Οι Jackowiak et al. (2011) βελτιστοποίησαν την προ-κατεργασία με μικροκύματα για την διαλυτοποίηση και την αναερόβια βιοαποικοδόμηση του άχρου σίτου, χρησιμοποιώντας ένταση ισχύος μεταξύ 400 και 1600 W. Η μέγιστη θερμοκρασία και πίεση ήταν 260 °C και 33 bars αντίστοιχα. Η μέγιστη απόδοση της παραγωγής μεθανίου επιτεύχθηκε στους 150 °C με 28% βελτίωση σε σύγκριση με δείγμα χωρίς κατεργασία. Οι Jin et al. (2016) προεπεξεργάστηκαν πριονίδι κατάλπης με μικροκύματα και την χρήση νερού, NaOH, και Ca(OH)₂ ως διαλύτες για ενίσχυση της μετέπειτα ενζυμικής υδρόλυσης. Μετά από ενζυμική υδρόλυση διάρκειας 48 h το προεπεξεργασμένο δείγμα με μικροκύματα και Ca(OH)₂, έδειξε την υψηλότερη απόδοση σε ανάγοντα σάκχαρα. Η περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη και λιγνίνη στο πριονίδι κατάλπης μειώθηκε μετά από την προεπεξεργασία μικροκυμάτων και αλκαλικών διαλυμάτων. Η παρατήρηση του SEM έδειξε ότι η επιφάνεια του πριονιδίου που κατεργάστηκε με μικροκύματα-Ca(OH)₂ υπέστη την πιο σοβαρή διάβρωση. Οι βέλτιστες συνθήκες (μέγεθος σωματιδίων 40 mesh size, συγκέντρωση στερεού 22,5 g/L, 400 W, 6 min) της προκατεργασίας με μικροκύματα- Ca(OH)₂ οδήγησαν σε 682% αύξηση της απόδοσης των αναγόντων σακχάρων, σε σύγκριση με το μη επεξεργασμένο πριονίδι κατάλπης.

Οι Ravindran et al. (2017) αξιολόγησαν την προ-κατεργασία με μικροκύματα (αναλογία στερεού προς υγρό 1:10 w/v, 1% NaOH) των SCGs, για να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση σακχάρων. Εφαρμόστηκαν διάφορες τιμές ισχύος (240 W, 400 W, 560 W και 800 W) και διαφορετικοί χρόνοι παραμονής (30 με 120 s). Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, η ενζυμική υδρόλυση των προεπεξεργασμένων με μικροκύματα SCGs (0,5 min, 800 W) οδήγησε σε 1,7 φορές υψηλότερη απόδοση

αναγόντων σακχάρων, σε σύγκριση με ακατέργαστο απόβλητο καφέ. Οι Singh et al. (2012) εφάρμοσαν την προ-επεξεργασία με μικροκύματα σε άχυρο σίτου χρησιμοποιώντας 2,75% (w/v) NaOH σε αρχική συγκέντρωση στερεού 100 g/L και χρόνο παραμονής 22,5 min, 800 W. Υπό αυτές τις συνθήκες, η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης έφτασε 82%. Σε μία άλλη μελέτη, εφαρμόστηκε προ-επεξεργασία μικροκυμάτων-αλκαλίων σε απόβλητα σακχαροκάλαμου χρησιμοποιώντας 1% NaOH στα 600 W για 4 min. Ύστερα από ενζυμική υδρόλυση του προεπεξεργασμένου υλικού επιτεύχθηκε μία απόδοση αναγόντων σακχάρων ίση με 0,665g/g ξηρής μάζας (Binod et al., 2012).

Οι Nomanbhay et al. (2013) βελτιστοποίησαν την προεπεξεργασία με μικροκύματα για απόβλητα της παραγωγής φοινικέλαιου (empty fruit bunches-EFB) χρησιμοποιώντας συνδυασμό μικροκυμάτων και NaOH ως διαλύτη. Υπό τις βέλτιστες συνθήκες (3% NaOH, 180 W, 12 min) κατέστη δυνατή η απομάκρυνση της λιγνίνης κατά 74% ενώ οι απώλειες σε ολοκυτταρίνη (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) ήταν χαμηλές (24,5%). Η ενζυμική σακχαροποίηση των EFB βελτιώθηκε σημαντικά ύστερα από την απομάκρυνση περισσότερης λιγνίνης και ημικυτταρίνης ενισχύοντας την προσβασιμότητα των ενζύμων στην κυτταρίνη.

Πίνακας 2 Τεχνολογία μικροκυμάτων ως μέθοδος προ-επεξεργασίας της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας

Πρώτες ύλες	Συνθήκες προ-επεξεργασίας	Αποτελέσματα	Βιβλιογραφία
Άχυρο ρυζιού	H ₂ O, 680 W, 24 min, συγκέντρωση στερεού 75 g/L	απόδοση συνολικής σακχαροποίησης: 30.3%	Ma et al., 2009
Πριονίδι	H ₂ O, 500 W, 30 min, 180 °C, συγκέντρωση στερεού 40 g/L	απόδοση σακχάρων 3.5 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με LHW	Amini et al., 2018
Απόβλητα ανανά	H ₂ O, 510 W, 10 min	μικροδομικές αλλαγές ενισχύουν την αποδοτικότητα των ενζύμων	Conesa et al., 2018
Άχυρο σίτου	H ₂ O, 400 – 600 W, 260 °C, 33 bars, συγκέντρωση στερεού 37,5 g/L	αύξηση της απόδοσης παραγωγής μεθανίου κατά 28% σε σύγκριση με ακατέργαστο δείγμα	Jackowiak et al., 2011
Πριονίδι φυτού κατάληψη	Μικροκύματα -Ca(OH) ₂ , συγκέντρωση στερεού 22,5 g/L, 400 W, 6 min	αύξηση απόδοσης αναγόντων σακχάρων κατά 682% σε σύγκριση με ακατέργαστο πριονίδι	Jin et al., 2016
SCGs	1% NaOH, συγκέντρωση στερεού 100 g/L, 0,5 min, 800 W	1,7-φορές υψηλότερη απόδοση αναγόντων σακχάρων σε σύγκριση με ακατέργαστο απόβλητο καφέ	Ravindran et al., 2017
Άχυρο σίτου	2,75% NaOH, συγκέντρωση στερεού 100 g/L, 800 W, 22,5 min	82% στην απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης	Singh et al., 2012
Απόβλητο παραγωγής φοινικέλαιου	3% NaOH, 180 W, 12 min	σάκχαρα 411mg/g	Nomanbhay et al., 2013
Απόβλητο σακχαροκάλαμου	1% NaOH, 600 W, 4 min	0.665 g/g ξηρής βιομάζας	Binod et al., 2012

1.3. Βιοχημεία της συσσώρευσης λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς

Το μικροβιακό λίπος είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης και αναφέρεται σε ενδοκυτταρικά αποθηκευτικά λιπίδια, που αποτελούνται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες (TAGs). Άλλα συστατικά που είναι παρόντα στο μικροβιακό έλαιο είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα ουδέτερα λιπίδια, δηλαδή μονοακυλογλυκερόλες, διακυλογλυκερόλες και στερυλ-εστέρες, στερόλες και πολικά κλάσματα, όπως φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια και γλυκολιπίδια (Paranikolaou and Aggelis, 2011). Τα λιπίδια παράγονται από όλους τους έμβιους μακρο- και μικροοργανισμούς, έχοντας ουσιαστικούς δομικούς και λειτουργικούς ρόλους, όπως την σύνθεση διαπερατών μεμβρανών κυττάρων και οργανυλίων στην μορφή μίας διπλοστοιβάδας λιπιδίων (Bogdanov et al., 2014).

Όταν χρησιμοποιούνται C₅ και C₆ πηγές άνθρακα για την παραγωγή μικροβιακού λίπους, η συσσώρευση των λιπιδίων στα μικροβιακά κύτταρα ή στα μυκήλια (γνωστή ως *de novo* συσσώρευση λιπιδίων), πυροδοτείται από την εξάντληση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο, επιτρέποντας τη μετατροπή των σακχάρων σε αποθηκευτικά λιπίδια (Papanikolaou and Aggelis, 2011). Αντίθετα, όταν η ανάπτυξη πραγματοποιείται σε υδρόφοβες πηγές άνθρακα (π.χ. λίπη, έλαια), η συσσώρευση των αποθηκευτικών λιπιδίων (γνωστή ως *ex novo* συσσώρευση λιπιδίων) είναι μία κύρια αναβολική διαδικασία, που συμβαίνει ταυτόχρονα με την παραγωγή βιομάζας άνευ λιπιδίων, ανεξάρτητα από την εξάντληση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο (Fickers et al., 2005).

Τα λιπίδια που παράγονται από ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποτελούνται κατά κύριο λόγο από ουδέτερα κλάσματα, κυρίως τριακυλογλυκερόλες (triacylglycerols-TAGs) και σε μικρότερο βαθμό, στερυλεστέρες (steryl esters- SEs) (Ratledge and Wynn, 2002). Σε κάθε περίπτωση, η συσσώρευση των αποθηκευτικών λιπιδίων συνοδεύεται από μορφολογικές αλλαγές στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, καθώς μεγάλα σφαιρίδια λιπιδίων μπορεί να εμφανιστούν κατά τη φάση συσσώρευσης των λιπιδίων. Τα αποθηκευτικά λιπίδια που δεν μπορούν να ενσωματωθούν σε διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων, συγκεντρώνονται ώστε να σχηματίσουν έναν υδρόφοβο πυρήνα ή αλλιώς «λιπιδικά σωματίδια» (Mlickova et al., 2004). Τα αποθηκευτικά λιπίδια χρησιμεύουν ως δότες ενέργειας για το κύτταρο, καλύπτοντας τις ενεργειακές απαιτήσεις για τη συντήρηση και τον πολλαπλασιασμό τους, δεδομένου ότι όλα τα ουσιαστικά θρεπτικά συστατικά είναι διαθέσιμα στο περιβάλλον της ζύμωσης.

1.3.1. Μονοπάτι βιοσύνθεσης λιπιδίων

Η *de novo* συσσώρευση των κυτταρικών λιπιδίων είναι μία αναβολική βιοχημική διαδικασία κατά την οποία, χάρη σε μία σειρά αντεστραμμένων αντιδράσεων της β-οξειδωσης, το ακέτυλο συνένζυμο A (coenzyme A-CoA), που παράγεται από τον ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό, πυροδοτεί τη σύνθεση των ενδοκυτταρικών λιπαρών οξέων. Τα λιπαρά οξέα στη συνέχεια θα εστεροποιηθούν για τη σύνθεση δομικών (φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια κλπ.) και αποθεματικών λιπιδίων (TAGs και SEs) (Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2009).

Το ακέτυλο -CoA είναι πρόδρομο μόριο για τη βιογένεση των ενδοκυτταρικών λιπαρών οξέων. Στα μικροφύκη και τους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς το

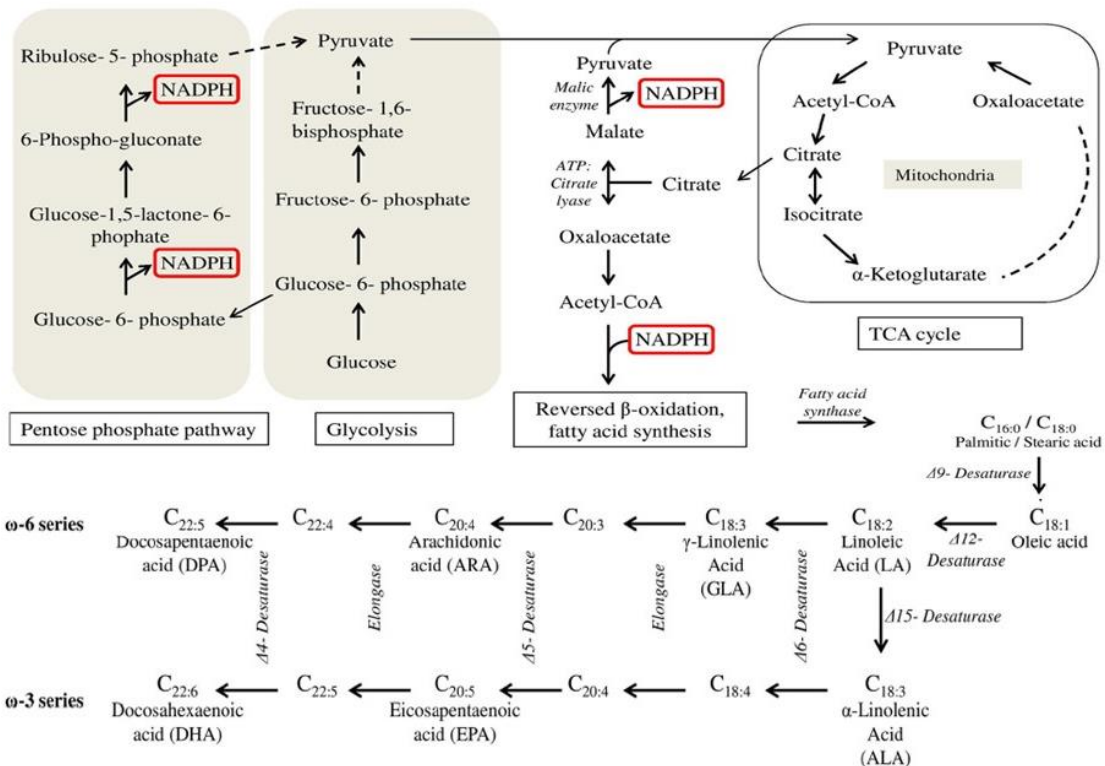
ακέτυλο-CoA συντίθεται από το οξικό άλας από το ένζυμο συνθάση του ακέτυλο-CoA. Στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, ο δότης του ακέτυλο-CoA είναι το κιτρικό, το οποίο γίνεται διαθέσιμο στο κυτταρόπλασμα μετά από μία σειρά βιοχημικών γεγονότων, που προκαλούνται από περιοριστικές συνθήκες στο θρεπτικό μέσο (κυρίως αζώτου) (Ratledge and Wynn, 2002). Αυτός ο περιορισμός, προκαλεί μία ταχεία μείωση της ενδοκυτταρικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine monophosphate -AMP), καθώς, λόγω της απαμινάσης της AMP, ο μικροοργανισμός διασπά την AMP σε μονοφωσφορική ινοσίνη (inosine monophosphate -IMP) και ιόντα NH_4^+ για χρήση αζώτου με τη μορφή ιόντων NH_4^+ ως συμπληρωματική πηγή αζώτου, απαραίτητη για τη σύνθεση υλικών του κυττάρου (Evans and Ratledge, 1985).

Η απότομη μείωση της ενδοκυτταρικής AMP τροποποιεί την λειτουργία του κύκλου του Krebs. Η δράση της ισοκιτρικών αφυδρογονασών τόσο του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (nicotinamide adeninedinucleotide - NAD^+), όσο και του φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (nicotinamide adeninedinucleotidephosphate - NADP^+) (ένζυμα υπεύθυνα για την μετατροπή του ισοκιτρικού σε α-κετογλουταρικό οξύ) χάνεται, καθώς αυτά ενεργοποιούνται αλλοστερικά από την ενδοκυτταρική AMP, γεγονός που οδηγεί στην συσσώρευση κιτρικού μέσα στο μιτοχόνδριο (Botham and Ratledge, 1979; Evans and Ratledge, 1985).

Το κιτρικό διασπάται από την ATP-κιτρική λυάση (ATP-citrate lyase-ACL), ένζυμο κλειδί για την διαδικασία συσσώρευσης λιπιδίων, σε ακέτυλο-CoA και οξαλοξικό, με το ακέτυλο-CoA να μετατρέπεται, μέσω μίας αντιστροφής της διαδικασίας της β-οξειδωσης, σε κυτταρικά λιπαρά οξέα. Η απουσία ή η δυσλειτουργία της ACL μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού, η οποία στη συνέχεια είτε απελευθερώνεται στο μέσο ανάπτυξης, είτε συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, προκαλώντας αναστολή του καταβολικού μονοπατιού της γλυκόλυσης (π.χ. στο επίπεδο της φωσφοφρουκτοκινάσης), που ευνοεί τη βιοσύνθεση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών.

Γενικά, η παραγωγή του κιτρικού οξέος από στελέχη που παράγουν κιτρικό είναι μία διαδικασία που πραγματοποιείται όταν η ποσότητα αζώτου στο μιτοχόνδριο εξαντλείται (μεταβολικό φαινόμενο overflow), ενώ οι μελέτες για τις δράσεις των

ενδοκυτταρικών ενζύμων και τις συγκεντρώσεις των συνενζύμων έχουν ταυτοποιήσει και διευκρινίσει εν μέρη τα βιοχημικά γεγονότα που οδηγούν στην βιοσύνθεση του κιτρικού οξέος (Morgunov et al., 2004) και πράγματι έχει αποδειχθεί ότι η έκκριση του κιτρικού οξέος και η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους είναι διαδικασίες όμοιες στα πρώτα τους στάδια.



Σχήμα 2 Βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στους ελαιογόνους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς και βιοσύνθεση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μέσω του μεταβολισμού του α-λινολενικού οξέος (α-linolenic acid -ALA) και του λινολεϊκού οξέος (linoleic acid-LA) (Ochsenreither et al. 2016)

1.3.2. Σύνθεση τριακυλογλυκερόλης

Τα λιπαρά οξέα μπορεί να απελευθερωθούν από φωσφολιπίδια και να χρησιμοποιηθούν σαν δομικά στοιχεία για διάφορα λιπίδια, συμπεριλαμβανομένων των αποθηκευτικών TAGs, μέσω της οδού Kennedy (ακυλίωση α- φωσφορικής γλυκερόλης) (Davies and Holdsworth, 1992; Müllner and Daum, 2004). Μετά τη βιοσύνθεση των λιπαρών -CoA εστέρων, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα ενεργοποιούνται από το CoA και χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για την ακυλίωση της αλυσίδας της γλυκερόλης για τη σύνθεση των TAGs. Σε πρώτο στάδιο, η 3-φωσφορική γλυκερόλη

(glycerol-3-phosphate-G-3-P) ακυλιώνεται από την 3-P-G ακυλοτρανσφεράση (G-3-Pacyltransferase –GAT) στην θέση sn-1 για να δώσει 1-ακυλο-G-3-P (λυσοφωσφατιδικό οξύ) (lysophosphatidic acid-LPA), το οποίο στη συνέχεια ακυλιώνεται από την ακυλοτρανσφεράση του λυσοφωσφατιδικού (που επίσης ονομάζεται 1-ακυλο-3-G-P ακυλοτρανσφεράση) (1-acyl-G-3-P acyltransferase-AGAT) στην sn-2 για να δώσει φωσφατιδικό οξύ (phosphatidic acid -PA). Ακολουθεί αποφωσφορυλίωση του PA από την φωσφουδρολάση του φωσφατιδικού οξέος (phosphatidic acid phosphohydrolase -PAP) για να δώσει διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol –DAG). Στο τελικό στάδιο η DAG ακυλιώνεται από την ακυλοτρανσφεράση της διακυλογλυκερόλης προς παραγωγή των TAGs (Davies and Holdsworth, 1992; Müllner and Daum, 2004).

1.3.3. Αποικοδόμηση των αποθηκευτικών λιπιδίων

Η αποικοδόμηση των αποθηκευτικών λιπιδίων πραγματοποιείται σε περιπτώσεις που οι πηγές άνθρακα εξαντλούνται από το θρεπτικό μέσο ζύμωσης ή όταν ο ρυθμός πρόσληψής τους είναι αρκετά χαμηλός (Paranikolaou and Aggelis 2011). Το μονοπάτι της β-οξειδωσης απαιτεί λιπάση και υδρολάσες των στερυλεστέρων για τη διάσπαση των εστέρων, καθώς και οξειδάσες του ακυλο-CoA. Η αποικοδόμηση των λιπιδίων στα μικροφύκη μπορεί να προκύψει κάτω από συνθήκες απουσίας φωτός (Bellou et al., 2016).

1.3.4. Μικροοργανισμοί και μικροβιακό λίπος

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να χαρακτηριστούν ως ελαιογόνοι, στην περίπτωση που μπορούν να συσσωρεύσουν μικροβιακό λίπος σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% του συνολικού κυτταρικού ξηρού τους βάρους. Γενικά, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί είναι ευκαρυώτες, συμπεριλαμβάνοντας φύκη, ζύμες και μύκητες (Ratlidge, 1991). Ανάλογα με το ελαιογόνο στέλεχος και την μέθοδο καλλιέργειας, τα μικροβιακά λιπίδια μπορεί να παρουσιάσουν διαφοροποιημένη σύνθεση λιπαρών οξέων, που οδηγεί σε παραγωγή λιπιδικών σκελετών με ποικίλες ιδιότητες. Η σύνθεση των μικροβιακών λιπιδίων είναι παρόμοια με αυτή των φυτικών ελαίων, δηλαδή αποτελούνται από μία μακριά αλυσίδα κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων (Vincente et al., 2009). Το μικροβιακό λίπος αποτελείται κυρίως από TAGs, με μία σύνθεση λιπαρών οξέων πλούσια σε C18 και C16 λιπαρά οξέα και πιο συγκεκριμένα,

παλμιτικό (16:0), παλμιτελαϊκό (16:1), στεαρικό (18:0), ελαϊκό (18:1) και λινελαϊκό (18:2) οξύ (Meng et al., 2009). Το μικροβιακό λίπος που παράγεται από το *Rhodospiridium toruloides* αποτελείται κυρίως από ελαϊκό (περίπου 48%) και παλμιτικό οξύ (περίπου 33%), πλησιάζοντας τη σύνθεση του φοινικέλαιου (Leiva-Candia et al., 2015).

Υπάρχουν πολλά μικροφύκη, ζύμες (όπως *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Trichosporon*), μύκητες (όπως *Mortierella*, *Cunninghamella*) και βακτήρια (όπως *Rhodococcus*, *Mycobacterium*), που μπορούν να συσσωρεύσουν υψηλές ποσότητες μικροβιακού λίπους. Ανάμεσα στους διάφορους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, το είδος *Rhodospiridium* έχει μελετηθεί ευρέως για την παραγωγή μικροβιακού λίπους μέσω της αξιοποίησης ενός επαρκούς εύρους πηγών άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος *R. toruloides* παρουσιάζει πλεονεκτήματα συγκριτικά με άλλες ελαιογόνες ζύμες, συμπεριλαμβάνοντας τον ταχύ πολλαπλασιασμό και την υψηλή συσσώρευση λιπιδίων σε πηγές χαμηλού κόστους (Xu and Liu, 2017). Μπορεί να συσσωρεύσει έως και το 60% του συνολικού κυτταρικού ξηρού του βάρους σε λιπίδια, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή βιοντίζελ. Ο μηχανισμός που καθιστά τη ζύμη ικανή να παράγει έλαιο, βασίζεται στο γεγονός ότι διαθέτει το βιοχημικό μονοπάτι της β-οξειδωσης, ένα σύστημα συνθάσης λιπαρών οξέων και το ένζυμο ATP κιτρική λυάση (Lee et al., 2016). Οι Leiva-Candia et al. (2015) ανέφεραν παραγωγή μικροβιακού λίπους μεταξύ 18,1- 19,2 g/L, με τη χρήση διαφορετικών υδρολυμάτων ηλίανθου, που προέκυψαν από την κλασμάτωση ηλίανθου, μαζί με καθαρή γλυκερόλη ως πηγές άνθρακα της ζύμωσης. Επιπλέον, ένας ακόμη παράγοντας που συμβάλλει στην υψηλή παραγωγή μικροβιακού λίπους του *R. toruloides* είναι η παρουσία του μονοπατιού βιοσύνθεσης καρροτενοειδών. Συγκεκριμένα η ζύμη έχει τη φυσική ικανότητα να παράγει πολύτιμα καρροτενοειδή, όπως β-καροτένιο, τορουλένιο και τορουλαροδίνη (Lee et al., 2016).

1.4. Καροτενοειδή

Τα καρροτενοειδή αποτελούν μία ποικίλη κατηγορία χρωστικών (κόκκινο έως κίτρινο χρώμα), που είναι λιπόφιλα και αδιάλυτα στο νερό. Έχουν μία κεντρική δομή που αποτελείται από ένα τετρατερπένιο (C40) με μία σειρά από συζευγμένους διπλούς δεσμούς. Μέχρι τώρα, έχουν βρεθεί πάνω από 700 τύποι καρροτενοειδών, με 50 από αυτά να είναι πρόδρομα μόρια της βιταμίνης Α. Τα καρροτενοειδή διακρίνονται για τις

αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και χρωστικές τους ιδιότητες (Lee et al., 2016). Μπορεί να έχουν μόνο άνθρακα και υδρογόνο στη δομή τους (καροτένια) ή να έχουν ένα ή περισσότερα άτομα οξυγόνου (ξανθόφυλλα). Η πλειοψηφία των καροτενοειδών είναι τετραπρενοειδή, τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά προστατευτικά μεμβράνης, που απομακρύνουν τις ρίζες O₂ και υπεροξυλίου. Η βιολογική δραστηριότητα, και κυρίως οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των καροτενοειδών εξαρτώνται από τη χημική τους δομή, δηλαδή από τον αριθμό των συζευγμένων διπλών δεσμών, τις δομικές τελικές ομάδες και τους υποκαταστάτες που περιέχουν οξυγόνο (Cadroso et al., 2017).

Το β-καροτένιο είναι μία από τις πιο γνωστές χρωστικές και χρησιμοποιείται ευρέως σε φάρμακα, προϊόντα υγείας, πρόσθετα τροφίμων, καλλυντικά, πρόσθετα ζωοτροφών και άλλα προϊόντα. Το β-καροτένιο είναι λιπόφιλο, κίτρινο-πορτοκαλί καροτενοειδές, με 11 συζευγμένους διπλούς δεσμούς και 2 ομάδες ρετινυλίου (δακτύλιος β-ιονόνης). Ο μεγάλος αριθμός διπλών δεσμών στην αλυσίδα, καθώς και οι δακτύλιοι το καθιστούν επιρρεπές στο να οξειδώνεται από ελεύθερες ρίζες, γεγονός που του αποδίδει αντιοξειδωτική ιδιότητα και ενισχύει την χρησιμότητά του στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Για ιατρικούς σκοπούς, το β-καροτένιο χρησιμεύει στην πρόληψη του καρκίνου, των όγκων και των καρδιαγγειακών νοσημάτων (Tang et al., 2019). Επιπλέον, μπορεί να διασπαστεί σε δύο μόρια βιταμίνης A, η οποία είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της ωχράς κηλίδας και την διατήρηση του επιθηλιακού ιστού (Lee et al., 2016).

Ως εκ τούτου, τα καροτενοειδή έχουν μεγάλη ζήτηση στον κλάδο των καλλυντικών, των τροφίμων και των φαρμάκων. Σύμφωνα με τα δεδομένα που δημοσιεύτηκαν στην αναφορά «Carotenoids Market Size» το 2018, η παγκόσμια αγορά καροτενοειδών ανήλθε το 2018 στα USD \$ 1,40 δις και υπολογίζεται να φτάσει τα USD \$ 1,9 δις μέχρι το 2026 με ετήσιο ρυθμό αύξησης (Compound Annual Growth Rate-CAGR) 3,75%.

Τα καροτενοειδή μπορούν να παραληφθούν από φρούτα και λαχανικά, όπως καρότα και τομάτες, όμως λόγω των χαμηλών ρυθμών ανάπτυξής τους, των μεγάλων αναγκών σε εκτάσεις γης και της επιρρέπειας τους στις καιρικές συνθήκες, τα περισσότερα καροτενοειδή συντίθενται με χημικό τρόπο. Μία μικρή ποσότητα παραλαμβάνεται από μικροοργανισμούς που παράγουν καροτενοειδή με φυσικό

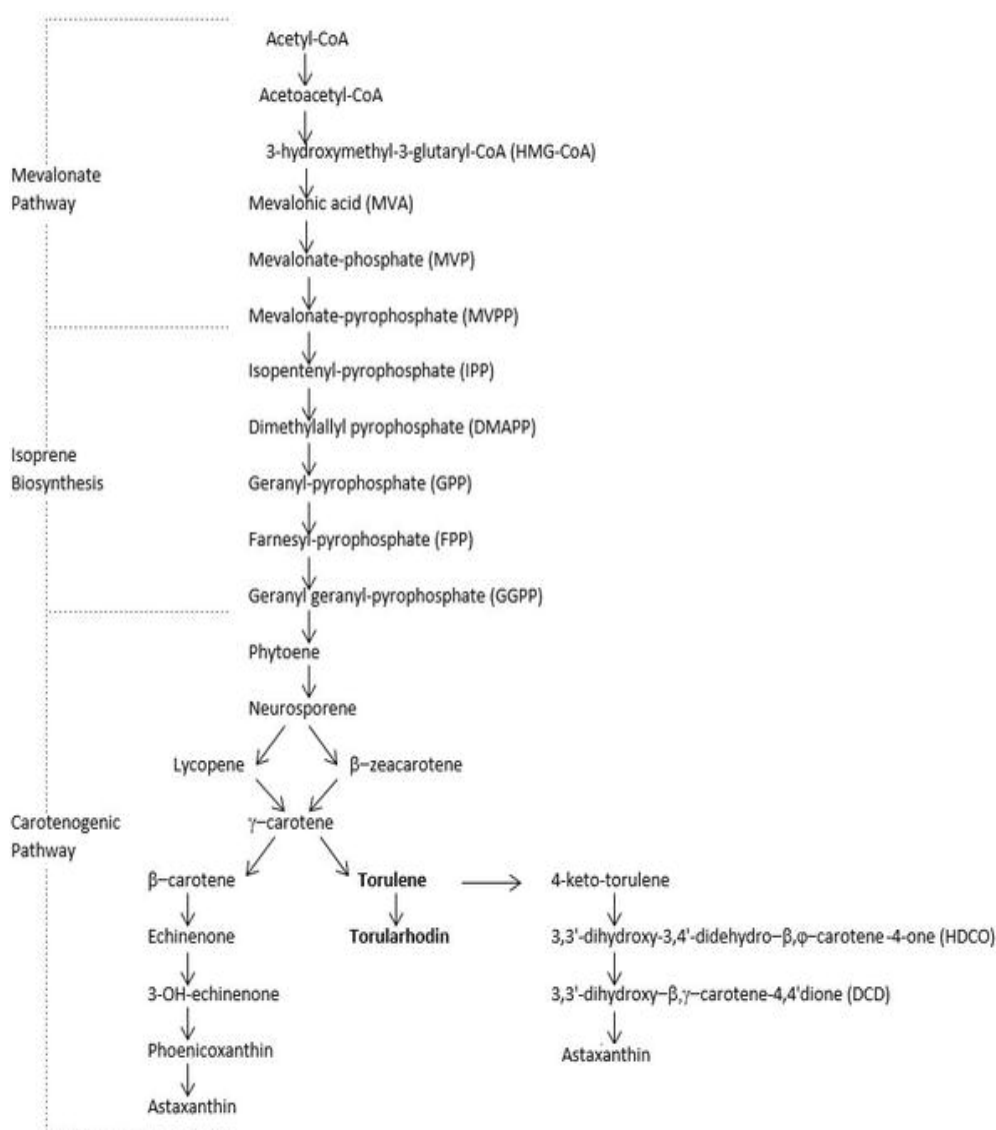
τρόπο, όπως τα μικροάλλα, τα βακτήρια και οι ζύμες (Lee et al., 2016). Η χημική σύνθεση των καρτενοειδών, μπορεί να έχει αρνητικό αντίκτυπο στο περιβάλλον και στην υγεία των καταναλωτών. Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη για την ανάπτυξη βιοτεχνολογικών μεθόδων παραλαβής καρτενοειδών. Η μικροβιακή παραγωγή καρτενοειδών είναι εφικτή με τη χρήση υποστρωμάτων χαμηλού κόστους ή υποστρωμάτων που προέρχονται από βιομηχανικά απόβλητα, οδηγώντας στη μείωση του κόστους παραγωγής. Όλες οι συνθήκες μίας τέτοιας παραγωγής θα μπορούσαν να ελεγχθούν και να βελτιστοποιηθούν, ειδικά γνωρίζοντας το μεταβολικό μονοπάτι του μικροοργανισμού που θα χρησιμοποιηθεί (Cadroso et al., 2017).

1.4.1. Βιοσύνθεση των καρτενοειδών

Η βιοσύνθεση των καρτενοειδών ακολουθεί μία σειρά συνεχών συμπυκνώσεων ισοπρενοειδών ενώσεων σε φυτοένιο, το πρώτο άχρωμο καρτενοειδές στο μεταβολικό μονοπάτι τους (Tang et al., 2019). Στις ζύμες, το ακέτυλο-CoA αποτελεί το βασικό μόριο στον κεντρικό μεταβολισμό του άνθρακα, το οποίο δε χρησιμοποιείται μόνο για την βασική κυτταρική λειτουργία, όπως τον μεταβολισμό της ενέργειας, των λιπιδίων και των αμινοξέων, αλλά αποτελεί και το πρόδρομο μόριο για τον σχηματισμό ισοπρενοειδών ενώσεων (Bu et al., 2017). Όλα τα ισοπρενοειδή προέρχονται από το διφωσφορικό ισοπεντύλιο (isopentenyl diphosphate-IPP) και το ισομερές του διφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (dimethyl-allyl-diphosphate-DMAPP).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3, αυτές οι ενώσεις παράγονται μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού (mevalonate pathway-MAV), το οποίο είναι κυρίως παρόν στα αρχαία, τους μύκητες και άλλους ευκαρυώτες. Το μονοπάτι του μεβαλονικού ξεκινάει με την συμπύκνωση δύο μορίων ακετυλο-CoA από το ένζυμο θειολάση προς την παραγωγή ακετοακέτυλο-CoA. Στη συνέχεια ένα ακόμη μόριο ακετυλο-CoA συμπυκνώνεται με το ακετοακέτυλο-CoA για την παραγωγή 3-υδροξυ-3-μεθυλο-γλουταρυλο-CoA (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA -HMG-CoA) από το ένζυμο συνθάση του HMG-CoA. Το μεβαλονικό οξύ σχηματίζεται από το HMG-CoA, με τη χρήση του NADPH ως συμπράγοντα, από την ρεδοκτάση του HMG-CoA. Δύο κινάσες, η κινάση του μεβαλονικού (mevalonatekinase-MK) και η φωσφομεβαλονικήκινάση (phosphomevalonate-kinase- PMK), καταλύουν στη συνέχεια τη φωσφορυλίωση του μεβαλονικού προς την παραγωγή 5-διφωσφορικού μεβαλονικού (5-diphosphate -Mev-PP). Το τελευταίο βήμα στο MAV για τον σχηματισμό του IPP είναι μία

προκαλούμενη από ATP αποκαρβοξυλίωση, καταλύομενη από την αποκαρβοξυλάση του διφωσφορικού μεβαλονικού (mevalonate-diphosphate-decarboxylase -PMD). Η ισομερίωση του IPP από την ισομεράση του διφωσφορικού ισοπεντυλίου οδηγεί στην δημιουργία του DMAPP και την έναρξη της βιοσύνθεσης των ισοπρενοειδών (Niu et al., 2017). Μια σειρά αντιδράσεων οδηγούν στον σχηματισμό του πυροφωσφορικού γερανυλίου-γερανυλίου (geranyl-geranyl-pyrophosphate-GGPP), που περιέχει 20 άτομα άνθρακα. Η συμπύκνωση δύο μορίων GGPP καταλύεται από τη συνθάση του φυτοενίου και οδηγεί στο σχηματισμό του φυτοενίου (πρώτη ένωση με 40 άτομα άνθρακα στο μονοπάτι).



Σχήμα 3 Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης καροτενοειδών από ζύμες (Zoz et al., 2015)

Το φυτοένιο αφυδρογονώνεται συνεχώς και ο συζευγμένος διπλός δεσμός επεκτείνεται μέχρι το σχηματισμό του νευροσπορενίου και συνεπώς του λυκοπενίου ή του β-ζεακαροτενίου. Στη συνέχεια σχηματίζεται το γ-καροτένιο ως αποτέλεσμα της αντίδρασης κυκλοποίησης του λυκοπενίου, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε β-καροτένιο μετά από μία ακόμη αντίδραση κυκλοποίησης που καταλύεται από την κυκλάση του β-λυκοπενίου. Το μόριο του γ-καροτενίου αποτελεί πρόδρομο μόριο και για τη σύνθεση του τορουλενίου (Kot et al., 2016).

1.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση καροτενοειδών στις ζύμες

Η βιοτεχνολογική σύνθεση των καροτενοειδών επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που εμπλέκονται στη διεργασία, οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν τις αποδόσεις και το κόστος των διεργασιών. Η πηγή άνθρακα αποτελεί την πιο μελετημένη παράμετρο, που επηρεάζει τη σύνθεση των καροτενοειδών. Ο μεταβολισμός των ζυμών εξαρτάται από το είδος της πηγής άνθρακα στο μέσο ζύμωσης. Η γλυκόζη και άλλα ζυμώσιμα σάκχαρα μεταβολίζονται μέσω της γλυκολυτικής οδού και στη συνέχεια μέσω αλκοολικής ζύμωσης, ακόμη και με οξυγόνο. Άλλες πηγές άνθρακα, όπως η αιθανόλη και το ηλεκτρικό οξύ μεταβολίζονται μέσω της οξείδωσης του ακετυλο-CoA για την είσοδό του στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Έχει αναφερθεί ότι πηγές άνθρακα όπως η αιθανόλη προκαλούν αύξηση στην σύνθεση καροτενοειδών (Johnson et al., 1979; Marcoleta et al., 2011; Gu et al., 1997).

Το φως είναι άλλος ένας παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την παραγωγή καροτενοειδών, καθώς ενισχύει την καροτενογένεση (Goodwin, 1993). Οι μικροοργανισμοί χρειάζεται να προστατευθούν από το φως και η παραγωγή καροτενοειδών αποτελεί έναν φωτοπροστατευτικό μηχανισμό (Raja et al., 2007). Η παραγωγή καροτενοειδών επηρεάζεται θετικά από το λευκό φως και η συγκέντρωση των καροτενοειδών εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού. Επιπλέον, η παραγωγή καροτενοειδών σχετίζεται με την αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων που εμπλέκονται στην καροτενογένεση (Mathews, 1965). Οι Moline et al. (2010) μελέτησαν την σχέση μεταξύ των καροτενοειδών, της εργοστερόλης και της κυτταρικής ανθεκτικότητας στο υπεριώδες φως, σε στελέχη *R. Mucilaginosa*. Όπως αναφέρθηκε, τα στελέχη που είχαν την ικανότητα να παράγουν υψηλότερες συγκεντρώσεις χρωστικών έδειξαν μεγαλύτερη επιβίωση, ενώ παρατηρήθηκε ότι η

υψηλότερη παραγωγή τορουλαροδίνης βελτιώνει την επιβίωση των ζυμών στο υπεριώδες φως.

Η θερμοκρασία επιδρά επίσης στην παραγωγή καροτενοειδών από ζύμες, καθώς επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων και την παραγωγή μεταβολιτών και δρα αλλάζοντας τα βιοσυνθετικά μονοπάτια, συμπεριλαμβάνοντας την καροτενογένεση (Orosa et al., 2005). Οι Malisorn and Suntornsuk (2008) βελτιστοποίησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή καροτενοειδών και βιομάζας στη ζύμη *Rhodotorula glutinis*, αναφέροντας μέγιστη παραγωγή στους 29 °C και 30 °C αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους Hayman et al. (1974), η θερμοκρασία ρυθμίζει την συγκέντρωση των ενζύμων που εμπλέκονται στην παραγωγή καροτενοειδών, και συνεπώς ελέγχονται τα επίπεδα καροτενοειδών στους μικροοργανισμούς.

Η καροτενογένεση είναι αερόβια διεργασία και ο ρυθμός παροχής αέρα στην καλλιέργεια των ζυμών είναι ουσιαστικός παράγοντας για την αφομοίωση του υποστρώματος, τον ρυθμό ανάπτυξης, την κυτταρική μάζα και την καροτενογένεση. Επίσης, η μείωση των επιπέδων οξυγόνου επηρεάζει την παραγωγή καροτενίων ή ξανθόφυλλων, λόγω οξειδωσης των καροτενίων σε ασταξανθίνη, κανταξανθίνη και άλλα (Johnson et al., 1979).

Σύμφωνα με τους Saenge et al. (2011) ο αερισμός είχε σημαντική επίδραση στην παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας όταν αυξήθηκε από 0 σε 2 vvm, ενώ η μέγιστη βιομάζα και απόδοση παραγωγής λιπιδίων ήταν 8,17 g/L και 4,32 g/L αντίστοιχα.

Τα μεταλλικά ιόντα και άλατα (Ba, Fe, Mg, Ca, Zn and Co) θεωρείται επίσης ότι πυροδοτούν την παραγωγή καροτενοειδών από την *R. glutinis* (Komemushi et al., 1994). Η επίδραση των ιχνοστοιχείων αποδίδεται στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων ενζύμων της καροτενοσύνθεσης (Hayman et al., 1974).

1.4.3. Αλληλεπίδραση λίπους και καροτενοειδών

Η βιοσύνθεση των λιπιδίων είναι στενά συνδεδεμένη με την βιοσύνθεση των καροτενοειδών προς όφελος του μικροοργανισμού. Μία έρευνα όπου χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ζύμης *Rhodotorula glutinis* έδειξε πως τόσο τα καροτενοειδή, όσο και τα λιπίδια ξεκίνησαν να συσσωρεύονται σε μεγάλες ποσότητες, όταν εφαρμοζόταν υψηλός λόγος άνθρακα- αζώτου στις συνθήκες

καλλιέργειας (Braunwold et al., 2013). Αυτό υποδηλώνει ότι τα καροτενοειδή και τα λιπίδια ρυθμίζονται με παρόμοιο τρόπο. Μία έρευνα με χρήση τεχνολογίας omics, έδειξε πως σε συνθήκες περιορισμού του αζώτου, όπου επιτεύχθηκε υψηλή συσσώρευση λιπιδίων, τέσσερα γονίδια σχετικά με τη σύνθεση των καροτενοειδών ήταν επίσης ενεργοποιημένα (Zhu et al., 2012). Σε μία άλλη πρόσφατη έρευνα, αποδείχθηκε ότι ο λόγος που το στέλεχος *R.toruloides* παρουσιάζει υψηλή παραγωγή λιπιδίων και καροτενοειδών οφείλεται στην ανακατεύθυνση του ακετυλο-CoA από τον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων στο μονοπάτι βιοσύνθεσης καροτενοειδών και λιπιδίων. Τα συμπεράσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το μονοπάτι σύνθεσης των καροτενοειδών τείνει να συγχρονίζεται με το μονοπάτι σύνθεσης των λιπιδίων, και οδηγούν στην υπόθεση ότι αυτό συμβαίνει προς όφελος του μικροοργανισμού. Η παρουσία ενός μεγάλου πολυενίου του μορίου του καροτενοειδούς, αλληλεπιδρά με τα υδρόφοβα τμήματα των λιπιδίων στην διπλή στοιβάδα των λιπιδικών μεμβρανών (Cvetkovic et al., 2013) και χρησιμεύει ως φωτοπροστασία για το κύτταρο κατά της οξειδωσής του (Gruszecki et al., 2005). Επίσης, δομικά τα καροτενοειδή βοηθούν τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών της μεμβράνης, δρώντας ως συμπαράγοντες, ενώ η αλληλεπίδραση των λιπιδίων με τα καροτενοειδή βοηθά στη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου (Porona et al., 2013). Συνεπώς, φαίνεται πως η ταυτόχρονη παραγωγή καροτενοειδών και λιπιδίων είναι ωφέλιμη για την διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του κυττάρου.

1.5. Ανάπτυξη βιοδιωλιστηρίων με την χρήση αποβλήτων καφέ

Το βιοδιωλιστήριο είναι η βιώσιμη επεξεργασία της βιομάζας σε ένα φάσμα εμπορεύσιμων προϊόντων και παραγωγής ενέργειας. Η ανάπτυξη των βιοδιωλιστηρίων με βάση τη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα για την παραγωγή χημικών, βιοπολυμερών και προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, μέσω της κλασμάτωσης της ανανεώσιμης βιομάζας (Alexandri et al., 2016), θα μπορούσε να ανοίξει το δρόμο για καινοτόμες τεχνολογίες καθώς και οικονομικά βιώσιμες διεργασίες ζύμωσης. Η καθιέρωση παγιωμένων βιοδιεργασιών σε συμβατικές βιομηχανικές εγκαταστάσεις είναι εξαρτώμενη από την εκμετάλλευση όλων των υπολειπόμενων ρευμάτων που παράγονται ως παραπροϊόντα, υποπροϊόντα ή απόβλητα. Η επιλογή ενός αποδοτικού μικροβιακού στελέχους, μιας χαμηλού κόστους και πλούσιας σε θρεπτικά συστατικά και άφθονης πρώτης ύλης, καθώς και η βελτιστοποίηση των παραμέτρων που

καθορίζουν τις εμπλεκόμενες βιοδιεργασίες συμπεριλαμβανομένου του σχεδιασμού του βιοαντιδραστήρα, θεωρούνται κρίσιμοι παράγοντες για την επιτυχημένη και οικονομικά εφικτή εφαρμογή των βιοδιεργασιών.

Τα βιοδυλιστήρια είναι δυναμικά συστήματα και ο επιτυχής σχεδιασμός τους προϋποθέτει αξιολόγηση και ανάλυση των οικονομικών, περιβαλλοντικών και κοινωνικών παραγόντων των διαδικασιών που αναπτύσσονται και εφαρμόζονται. Οι Kookos et al. (2018) πραγματοποίησαν μία τεχνοοικονομική και περιβαλλοντική αξιολόγηση της παραγωγής βιοντίζελ με τη χρήση ελαίου που εκχύλισαν από τα SCGs, συμπεριλαμβάνοντας την παραγωγή γλυκερόλης (παραπροϊόν από την διεργασία παραγωγής βιοντίζελ) και την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας στην προτεινόμενη διεργασία. Η οικονομική βιωσιμότητα της προτεινόμενης διεργασίας θα μπορούσε να επιτευχθεί μόνο αν η εφαρμογή γίνει σε μεγάλη κλίμακα, ενώ η περιβαλλοντική απόδοση όσον αφορά στις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου και στη χρήση μη ανανεώσιμης ενέργειας ήταν συγκρίσιμη με τις μέχρι σήμερα καλύτερες διαθέσιμες τεχνολογίες παραγωγής βιοντίζελ. Το επίπεδο κλίμακας των διεργασιών είναι υψίστης σημασίας για τον επιτυχή σχεδιασμό των βιοδυλιστηρίων, λαμβάνοντας υπόψη πως η καθαρή παρούσα αξία και τα κόστη παραγωγής συνδέονται με τη διαδικασία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η κατανάλωση ενέργειας της κλίμακας και το μέγεθος του εξοπλισμού δεν αυξάνονται με τον ίδιο ρυθμό όπως η κλίμακα της παραγωγής. Συνεπώς, η συμπαραγωγή ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας, είναι προϋπόθεση για την βιωσιμότητα των διεργασιών (Moncada and Aristizábal, 2016).

Οι Vardon et al. (2013) αξιολόγησαν την εξ' ολοκλήρου χρήση των SCGs για την παραλαβή βιοντίζελ, βιο-ελαίου και βιοάνθρακα, σαν τελικά προϊόντα. Τα λιπίδια που ανακτώνται από τα SCGs μετεστεροποιήθηκαν σε βιοντίζελ. Τα μείγματα βιοντίζελ B5 και B20 πληρούσαν τις προϋποθέσεις του προτύπου ASTM. Το κλάσμα που προέκυψε, κατεργάστηκε περεταίρω μέσω πράσινης αργής πυρόλυσης για την παραγωγή βιο-ελαίου και βιοάνθρακα. Ο παραγόμενος βιοάνθρακας αναμειγμένος με λίπασμα οδήγησε σε αύξηση πάνω από δύο φορές της απόδοσης της καλλιέργειας σόργου σε σύγκριση με δοκιμές που περιείχαν μόνο λίπασμα. Η προοπτική του βιοάνθρακα ως βελτιωτικό εδάφους αποδείχθηκε. Οι Ktori et al. (2018) επίσης χρησιμοποίησαν ανανεώσιμα SCGs για την ανάκτηση βιο-ελαίου, άνθρακα και βιοαερίου μέσω πυρόλυσης. Μία μέγιστη απόδοση βιο-ελαίου (36%) και άνθρακα

(29%) επιτεύχθηκε στους 540 °C, ενώ η απόδοση του αερίου έφτασε στο μέγιστο στους 700 °C. Η χαμηλή τιμή θέρμανσης (13.3 MJ/m³) του βιοαερίου, το κατατάσσει στα καύσιμα μεσαίου επιπέδου, κατάλληλου για εφαρμογή σε κινητήρες, τουρμπίνες και λέβητες για παραγωγή ενέργειας.

Στην μελέτη των Obruca et al. (2015), ολόκληρη η βιομάζα του SCG χρησιμοποιήθηκε για βιώσιμη παραγωγή PHAs και καροτενοειδών μέσω ανάπτυξης βιοδιυλιστηρίου. Το έλαιο που εκχυλίστηκε από τα SCGs χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή PHAs, ενώ τα στερεά υπολείμματα υποβλήθηκαν σε ενζυμική κατεργασία για την παραγωγή θρεπτικού μέσου ζύμωσης για παραγωγή καροτενοειδών με τη ζύμη *Sporobolomyces roseus*.

2. Σκοπός της παρούσας μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση της δυνατότητας παραγωγής μικροβιακού λίπους και καροτενοειδών από ανανεώσιμες πρώτες ύλες προερχόμενες από τη βιομηχανία του καφέ, και πιο συγκεκριμένα το στερεό απόβλητο προερχόμενο από την διεργασία εκχύλισης καφέ. Αναπτύχθηκε μία στρατηγική δύο σταδίων προς παραγωγή θρεπτικού υποστρώματος ζύμωσης και εν συνεχεία μελετήθηκε η χρήση του προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και καροτενοειδών.

Το στερεό απόβλητο SCG προεπεξεργάστηκε με μικροκύματα υπό διαφορετικές συνθήκες ισχύος και χρόνου παραμονής, με διαφορετικούς διαλύτες και αρχικές συγκεντρώσεις στερεού, με στόχο την βελτιστοποίηση των επακόλουθων ενζυμικών υδρολύσεων προς μεγιστοποίηση των συγκεντρώσεων ολικών σακχάρων και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων.

Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου με το στέλεχος ζύμης *Rhodospiridium toruloides* DSM 444 διεξήχθησαν αρχικά και μελετήθηκαν σε εμπορικά θρεπτικά μέσα, ενώ ακολούθησαν ζυμώσεις ημιδιαλείποντος έργου σε βιοαντιδραστήρα.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Ανανεώσιμες πρώτες ύλες

Τα SCG που χρησιμοποιήθηκαν ως ανανεώσιμο υπόστρωμα ζύμωσης για την παραγωγή μικροβιακού λίπους προμηθεύτηκαν από χώρο εστίασης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και ανήκουν στην ποικιλία Robusta. Τα SCGs παραλαμβάνονταν αμέσως μετά την εκχύλιση του καφέ, σε νωπή μορφή. Έπειτα ξηραίνονται στους 40 °C μέχρι η υγρασία να φτάσει σε επίπεδα χαμηλότερα από 10% w/w και εν συνεχεία αποθηκεύονται σε καταψύκτες (-20 °C) μέχρι περαιτέρω ανάλυσης.

3.2. Μικροοργανισμοί, ανανέωση, συντήρηση και προκαλλιέργεια

Το μικροβιακό στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 προμηθεύτηκε από το Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Η ανανέωση του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε σε γυάλινους σωλήνες (slants) με θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε (w/v) 1% εκχύλισμα ζύμης, 1% πεπτόνη, 1% γλυκόζη και 2% άγαρ. Οι γυάλινοι σωλήνες με το ανεπτυγμένο στέλεχος ζύμης συντηρούνταν στους 4 °C μέχρι περαιτέρω χρήσεως.

Σε 250 mL Erlenmeyer κωνικές φιάλες παρασκευάστηκε υγρή προ-καλλιέργεια ίδιας σύστασης με τα slants, απουσία άγαρ, και επωάστηκαν στους 30 °C για 24 έως 48 ώρες. Η προκαλλιέργεια με το ανεπτυγμένο στέλεχος ζύμης χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως εμβόλιο (10% v/v) για τις ζυμώσεις κλειστού τύπου και ημιδιαλείποντος έργου που ακολούθησαν. Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη ζύμωση αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο (Systec, VX-150).

3.3. Ανάκτηση προϊόντων προστιθέμενης αξίας από SCGs

Τα SCG μετά την απομάκρυνση της υγρασίας, επεξεργάστηκαν αρχικά για την απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων και στη συνέχεια του φυτικού ελαίου που περιέχουν. Για την απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων, στα SCGs προστέθηκε αιθανόλη καθαρότητας 70% σε αναλογία 1:10 w/v και το δείγμα κατεργάστηκε με υπερήχους (BANDELIN; SONOPULS Ultrasonic Homogenizers) για 30 min σε συνθήκες 120 W. Στη συνέχεια, το δείγμα διηθήθηκε και το στερεό υπόλειμμα

χρησιμοποιήθηκε για περεταίρω επεξεργασία για εκχύλιση του ελαίου, ενώ το υγρό ρεύμα των φαινολικών εξατμίστηκε υπό κενό (Rotary evaporator, BUCHI, R-114) στους 40 °C. Οι φαινολικές ενώσεις παραλήφθηκαν με 10 mL μεθανόλη και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C για προσδιορισμό συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών (3.7.10) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (3.7.11). Στο στερεό ρεύμα προστέθηκε εξάνιο σε αναλογία 1:20 w/v και το δείγμα παρέμεινε σε σκοτεινό μέρος για 2 ημέρες, ώστε να επιτευχθεί πλήρης εκχύλιση του φυτικού ελαίου. Σε αυτό το στάδιο ακολούθησε η διήθηση προς διαχωρισμό του οργανικού διαλύτη που περιείχε το έλαιο και των στερεών υπολειμμάτων SCG (άνευ φαινολικών και ελαίου), τα οποία εν συνεχεία επεξεργάστηκαν με μικροκύματα. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ελαίου ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό στους 40 °C και η τελική συγκέντρωση του ελαίου εκφράστηκε ως g φυτικού ελαίου/ g SCG. Η ποσοτικοποίηση του φυτικού ελαίου έγινε επιπλέον με τη χρήση πετρελαϊκού αιθέρα όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.7.3.

3.4. Κατεργασία με μικροκύματα

Τα SCGs άνευ φαινολικών ενώσεων και ελαίων, υποβλήθηκαν σε κατεργασία με μικροκύματα (MARS 5; Version 194A05; CEM corporation) μέγιστης ισχύος 1600 W. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες (Perfluoroalkoxy-alkane –PFA). Η αρχική συγκέντρωση των δειγμάτων ήταν 50 g/L. Διάφοροι πειραματικοί συνδυασμοί δοκιμάστηκαν, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3. Οι απώλειες νερού από τους σωλήνες μετά την κατεργασία, μετρήθηκαν με ογκομέτρηση του περιεχομένου του κάθε σωλήνα. Μετά την κατεργασία, τα δείγματα διηθήθηκαν για το διαχωρισμό του στερεού από το υγρό. Το στερεό ξηράνθηκε στους 40 °C, ενώ το υγρό συλλέχθηκε για προσδιορισμό της συγκέντρωσης των σακχάρων που προέκυψαν, καθώς και για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης μετά την κατεργασία με μικροκύματα.

Πίνακας 3 Πειραματικοί συνδυασμοί που εφαρμόστηκαν για την κατεργασία των SCG με μικροκύματα

Ισχύς (Watt)	Χρόνος (min)	Διαλύτης
400	15	νερό
800	10	νερό
800	15	νερό
400	15	0,1 M NaOH

3.5. Ενζυμική υδρόλυση προς παραγωγή αζώτου ελεύθερων αμινομάδων και σακχάρων

Τα στερεά SCG που προέκυψαν ύστερα από κάθε πειραματικό συνδυασμό διάρκειας προεπεξεργασίας, ισχύος και διαλύτη, υποβλήθηκαν σε ενζυμική υδρόλυση προς παραγωγή πηγών άνθρακα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διάσπαση της κυτταρίνης ήταν η β-γλυκοσιδάση (b-glucosidase from almonds-Sigma-Aldrich-5000 U) και εμπορική κυτταρινάση (Cellulase from *Aspergillus* sp.-Sigma-Aldrich), ενώ για τη διάσπαση της ημικυτταρίνης χρησιμοποιήθηκαν εμπορικές ημικυτταρινάσες (Viscozyme-Sigma-Aldrich). Η αρχική ενεργότητα ενζύμων που χρησιμοποιήθηκε ήταν 25 U/g κυτταρίνης β-γλυκοσιδάση, 25 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης, ημικυτταρινάσες. Τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν από τους πειραματικούς συνδυασμούς 400 W, 15 min με τη χρήση νερού και 0,1M NaOH (βλ. Πίνακα 3) υποβλήθηκαν σε ενζυμική υδρόλυση με διπλάσια ποσότητα ενζύμων από τα προαναφερθέντα (50 U/g κυτταρίνης β-γλυκοσιδάση και 50 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης ημικυτταρινάσες). Η αρχική συγκέντρωση των κατεργασμένων με μικροκύματα SCG ήταν 50 g/L στα πειράματα και οι συνθήκες υδρόλυσης ήταν 50 °C (θερμαινόμενη εστία με μαγνητικό αναδευτήρα-witeg MSH-20D), 96 h και 150 rpm.

Επόμενα πειράματα υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την παραγωγή αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen-FAN) με τη χρήση εμπορικών πρωτεασών (Protease from *Aspergillus oryzae*- Sigma Aldrich). Η ενζυμική

ενεργότητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 12 U/g στερεών και αρχική συγκέντρωση στερεών ήταν 50 g/L. Οι συνθήκες υδρόλυσης ήταν 50 °C, 150 rpm, 96 h και pH 5,5.

Τέλος, ακολούθησαν υδρολύσεις προς ταυτόχρονη παραγωγή σακχάρων και FAN με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις στερεών (50 g/L, 75 g/L, 100 g/L). Οι συνθήκες υδρόλυσης ήταν 50 °C, 150 rpm, 96 h και pH 5,5. Οι ενζυμικές ενεργότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 12 U/g πρωτεάσες, 50 U/g κυτταρίνης β-γλυκοσιδάση και 50 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης ημικυτταρινάσες.

Για όλα τα πειράματα υδρόλυσης γινόταν συλλογή δειγμάτων ανά τακτά χρονικά διαστήματα προς ανάλυση των πηγών άνθρακα και FAN.

3.6. Ζυμώσεις προς παραγωγή μικροβιακού λίπους και καροτενοειδών

Το θρεπτικό μέσο ζύμωσης σε όλες τις περιπτώσεις είχε την εξής σύσταση (g/L): 60-100 πηγή άνθρακα, (7,0) KH_2PO_4 , (2,5) Na_2HPO_4 , (1,5) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (0,15) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (0,15) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (0,06) $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, (0,02) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και (3) εκχύλισμα ζύμης. Το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από προ-καλλιέργεια όπως προαναφέρθηκε (10%, v/v). Το pH ρυθμίστηκε στο 6.0 προσθέτοντας 1 M HCl ή 1 M NaOH όταν χρειαζόταν.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις ασυνεχούς λειτουργίας με τη χρήση εμπορικών πηγών άνθρακα (γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη), ενζυμικών υδρολυμάτων προερχόμενα από ανανεώσιμο υπόστρωμα SCG (βλ. κεφ.3.5) και προσομοιωμένο υπόστρωμα ενζυμικών υδρολυμάτων ως προς τη σύσταση των σακχάρων τους για λόγους σύγκρισης. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες (250 mL), που είχαν ενεργό όγκο 50 mL και επώαστηκαν στους 30 °C, στα 180 rpm για 7 μέρες.

Ακολούθησαν ζυμώσεις ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα πάγκου (Labfors 4, Infors HT) με ενεργό όγκο 1 L και σταθερή θερμοκρασία στους 30 °C. Το pH διατηρούταν στο 6.0 με τη χρήση 5M NaOH. Το πείραμα ξεκίνησε υπό ασυνεχείς συνθήκες με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 100 g/L. Δύο σει πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν. Στη μία περίπτωση το αρχικό θρεπτικό μέσο ζύμωσης ήταν ενζυμικό υδρόλυμα SCG, ενώ στη δεύτερη περίπτωση ήταν προσομοιωμένο υπόστρωμα όσον αφορά τη σύσταση των σακχάρων. Όταν η συγκέντρωση σακχάρων έφτασε στα 30 g/L, εφαρμόστηκε τροφοδοσία (feeding), ενώ ο ρυθμός τροφοδοσίας

ρυθμιζόταν κάθε φορά ανάλογα με την καταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού. Η ολική συγκέντρωση σακχάρων στο feeding ήταν 480-500 g/L, ενώ η σύσταση ήταν προσομοιωμένη ως προς τα σάκχαρα σύμφωνα με το υδρόλυμα από SCG (βλ. κεφ. 3.5).

Τα δείγματα που λαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα αναλύονταν για προσδιορισμό σακχάρων, FAN, καρροτενοειδών και μικροβιακού λίπους.

3.7. Αναλυτικές μέθοδοι

3.7.1. Προσδιορισμός υγρασίας και τέφρας

Το ποσοστό υγρασίας προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο AOACC 952.10 στους 115 °C για 24 ώρες. Το δείγμα μεταφέρεται σε αφυγραντήρα μέχρι σταθερού βάρους και ζυγίζεται.

Ο προσδιορισμός της τέφρας γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο Sluiter et al., 2005 εκφραζόμενη ως το ποσοστό υπολειμμάτων που απομένουν μετά από ξηρή οξείδωση στους 550 έως 600°C.

3.7.2. Προσδιορισμός των δομικών υδατανθράκων και λιγνίνης στην βιομάζα

Η μέθοδος ανάλυσης των δομικών υδατανθράκων υδατάνθρακες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη) και της λιγνίνης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Sluiter et al., 2008), προαπαιτεί στερεά σωματίδια με συγκεκριμένο εύρος μέγεθος. Πιο συγκεκριμένα, η βιομάζα ξηράνθηκε στους 40 °C και διαχωρίστηκαν κατάλληλου μεγέθους σωματίδια με την χρήση αρχικά κόσκινων No 6 (1 mm) και έπειτα No 24 (0,25 mm) σύμφωνα με τους Hames et al., 2008. Το στερεό κλάσμα που κάθισε στα κόσκινα μεγέθους 0,25 mm παραλήφθηκε και ακολούθησε η αφαίρεση των εκχυλίσμων συστατικών (υδατοδιαλυτά συστατικά και διαλυτά στην αιθανόλη συστατικά) από την βιομάζα. Αποξηραμένο δείγμα γνωστού βάρους (περίπου 2 g) τοποθετήθηκε σε βαμβακερά φυτόγυα και ακολούθησε διαδικασία εκχύλισης σε διάταξη Soxhlet αρχικά με δις απεσταγμένο νερό (190 mL για 6-24 ώρες) και έπειτα με αιθανόλη (190 mL καθαρή αιθανόλη για 6-24 ώρες). Η θερμοκρασία του συστήματος ρυθμίστηκε ώστε να πραγματοποιούνται 6-10 κύκλοι σιφωνισμού ανά ώρα. Η ποσοτικοποίηση των εκχυλίσμων συστατικών γίνεται σύμφωνα με τους Sluiter et al., 2005.

Στη συνέχεια, η βιομάζα άνευ εκχυλίσμων ξηράνθηκε στους 40 °C και ακολούθησε ανάλυση των δομικών υδατανθράκων και της λιγνίνης σύμφωνα με τους Sluiter et al., 2008.

Πραγματοποιήθηκε όξινη υδρόλυση (72% w/w H₂SO₄) δύο σταδίων για την κλασμάτωση της βιομάζας σε μορφές που είναι πιο εύκολα προσδιορίσιμες. Η λιγνίνη κλασματώθηκε σε αδιάλυτο και διαλυτό στο οξύ υλικό. Η διαλυτή στο οξύ λιγνίνη προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία UV-Vis (320 nm). Κατά την υδρόλυση οι δομικοί υδατάνθρακες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη) υδρολύονται στα μονομερή τους, τα οποία είναι διαλυτά στο υγρό της υδρόλυσης και ποσοτικοποιήθηκαν μέσω HPLC (3.7.6) .

3.7.3. Προσδιορισμός φυτικού ελαίου

Το έλαιο από τα SCGs εκχυλίστηκε από τα ξηρά δείγματα μέσω διάταξης Soxhlet χρησιμοποιώντας πετρελαϊκό αιθέρα σύμφωνα με εγκεκριμένες μεθόδους AACC (30-25). Μετά την εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό, τα φυτικά έλαια μεταφέρονται σε αφυγραντήρα μέχρι σταθερού βάρους και ζυγίζονται.

3.7.4. Προσδιορισμός ελεύθερων αζώτου αμινοξέων

Τα ελεύθερα αζώτου αμινοξέα (FAN) στις ζυμώσεις προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη φωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης (Lie, 1973). Η συγκέντρωση των ελεύθερων αζώτου αμινοξέων αναφέρεται στο άζωτο που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων και των πεπτιδίων. Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε ως εξής: 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος προστέθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και στη συνέχεια προστέθηκε 0,5 mL αντιδραστηρίου color. Επίσης παρασκευάστηκε τυφλό δείγμα με νερό στη θέση του δείγματος. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε βραστό νερό για 16 λεπτά και στη συνέχεια σε πάγο για 20 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2,5 mL αντιδραστηρίου dilution και όλα τα δείγματα αναδεύτηκαν στο vortex για 20 δευτερόλεπτα. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο στα 570 nm. Η ποσότητα των FAN (mg/L) υπολογίστηκαν με βάση την πρότυπη εξίσωση ($y=4,158x-0,017$, $R^2=0,99$).

3.7.5. Προσδιορισμός συνολικού αζώτου Kjeldahl

Η συνολική περιεκτικότητα σε άζωτο Kjeldahl (Total Kjeldahl Nitrogen- TKN) μετρήθηκε με τη χρήση μονάδας απόσταξης Kjeltex TM 8100 (Foss, Denmark). Η μέθοδος βασίζεται στην πλήρη μετατροπή των αρχικών μορφών αζώτου σε άλατα αμμωνίου. Συγκεκριμένα, 0,5 g ξηρού δείγματος εισήχθησαν σε σωλήνα πέψης μαζί με 25 mL H₂SO₄ και ένα δισκίο καταλύτη που περιείχε 3,5 g K₂SO₄ και Cu₂SO₄. Ένα τυφλό δείγμα παρασκευάστηκε όπως προαναφέρθηκε. Η πέψη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στους 430 °C για 1 h και στη συνέχεια οι σωλήνες ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε απόσταξη με την αυτόματη προσθήκη 30 mL H₂O και 100 mL NaOH (40 % w/w).

Η συνολική περιεκτικότητα σε άζωτο Kjeldahl (TKN) υπολογίστηκε ως εξής:

$$N(\%) = \frac{(V_s - V_b) \times N \times 14.007 \times 100}{W_s}$$

Όπου, V_s = ο όγκος (mL) 0.1N HCl, που καταναλώθηκε για το δείγμα

V_b = όγκος (mL) 0.1N HCl, που καταναλώθηκε για το τυφλό δείγμα

N = κανονικότητα του HCl

W_s = βάρος (mg) του δείγματος

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη υπολογίστηκε ως εξής:

$$P(\%) = N(\%) \times 6.25$$

Όπου, 6.25: συντελεστής βασιζόμενος στο ποσοστό αζώτου που περιέχεται στην πρωτεΐνη (16%).

3.7.6. Προσδιορισμός πηγών άνθρακα

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC). Όλα τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρούνταν και στην συνέχεια φιλτράρονταν με την χρήση φίλτρων whatman που διαθέτουν μεμβράνη διαμέτρου οπών 0,2 μm. Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε ήταν Shimadzu, με Shimadzu RI ανιχνευτή και Rezex ROA-Organic acid H⁺ στήλη (στατική φάση). Η θερμοκρασία της στήλης ήταν 65 °C και η κινητή φάση ήταν 10 mM H₂SO₄, με

ροή διαλύτη 0,6 mL/min. Οι μονοσακχαρίτες προσδιορίστηκαν επίσης με στήλη Shodex SPO810 στους 60°C και με ροή 1 mL/min υπερκάθαρου νερού σαν κινητή φάση.

3.7.7. Προσδιορισμός βιομάζας και μικροβιακού ελαίου

Ο προσδιορισμός της συνολικής ξηρής βιομάζας (Total dry weight-TDW) πραγματοποιήθηκε μετά από επαναλαμβανόμενη έκπλυση και φυγοκέντριση της παραχθείσας μικροβιακής βιομάζας, η οποία στη συνέχεια ξηράνθηκε στους 80 °C για 24 ώρες και τοποθετήθηκε σε αφυγραντήρα.

Πριν την εκχύλιση του λίπους, η ξηρή βιομάζα επεξεργάστηκε μηχανικά ώστε να γίνει σκόνη και στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα χλωροφορμίου/μεθανόλης (2:1 v/v) για την εκχύλιση του λίπους (Folch et al., 1957). Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό σε προζυγισμένες φιάλες εξάτμισης και το λίπος προσδιορίστηκε βαρομετρικά από τη διαφορά του βάρους μετά την εξάτμιση. Στη συνέχεια, για πλήρη εκχύλιση του λίπους ακολούθησε χημική διάσπαση της υπολειπόμενης βιομάζας από το προηγούμενο στάδιο, μέσω θερμικής κατεργασίας με HCl (Tarja et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, η ξηρή βιομάζα που προέκυψε από την εκχύλιση με Folch, αναμείχθηκε σε αναλογία 300 mg βιομάζα σε 4 mL 2 M HCl και το μείγμα υποβλήθηκε στους 80 °C για 30-45 λεπτά. Έπειτα το μείγμα αφηνόταν να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και γινόταν ισόποση (v/v) προσθήκη διαλύματος Folch. Ύστερα από έντονη ανάδευση το σύστημα αφηνόταν να διαχωριστούν η υδατική με την οργανική φάση. Τέλος γινόταν προσεκτική παραλαβή της οργανικής φάσης που περιείχε το λίπος και το λίπος προσδιοριζόταν όπως προαναφέρθηκε. Το συνολικό λίπος των ζυμώσεων προέκυψε από την πρόσθεση των αποτελεσμάτων των δύο κατεργασιών.

3.7.8. Προσδιορισμός καροτενοειδών

Ο προσδιορισμός των καροτενοειδών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους (Freitas et al., 2014) ως εξής: 10mL υγρό ζύμωσης φυγοκεντρήθηκαν (9000 rpm, 4 °C, 10 min) για διαχωρισμό βιομάζας και ακολούθησε έκπλυση (2 φορές) με απιονισμένο νερό για πλήρη καθαρισμό από υπολείμματα καλλιέργειας. Η καθαρή βιομάζα λυοφιλιώθηκε και εμβάπτιστηκε σε 4 mL διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη εστία με αναδευτήρα (Witeg MSH-20D)

και παρέμειναν στους 30 °C στα 120 rpm σε σκοτεινό μέρος για όλο το βράδυ. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση των δειγμάτων και το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε περιέκτες McCurtney, ενώ στην υπολειπόμενη βιομάζα προστέθηκαν ακόμη 2 mL DMSO και επανατοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα και παρέμειναν για 2 ώρες (120 rpm, 30 °C) ώστε να πραγματοποιηθεί η δεύτερη εκχύλιση των καροτενοειδών. Στα δύο υπερκείμενα (εκχύλισμα καροτενοειδών) προστέθηκαν 4 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Στην υπολειπόμενη βιομάζα προστέθηκε 1 mL πετρελαϊκού αιθέρα ακολούθησε ανάδευση μέχρι πλήρους αποχρωματισμού της βιομάζας, φυγοκέντριση και τέλος το υπερκείμενο προστέθηκε στο εκχύλισμα των καροτενοειδών. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mL ακετόνης και 2 mL NaCl και το μείγμα αναδευτήκε ελαφρώς. Έπειτα το μείγμα που προέκυψε αφέθηκε σε ηρεμία για να διαχωριστεί σε δύο φάσεις. Τέλος η οργανική φάση που περιείχε τα καροτενοειδή συλλέχθηκε με προσοχή και φωτομετρήθηκε στα 450 nm (φασματοφωτόμετρο UV-Vis διπλής δέσμης-JascoV-530) και για το μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε τυφλό δείγμα πετρελαϊκού αιθέρα. Όλες οι κατεργασίες των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτός. Η συνολική συγκέντρωση καροτενοειδών εκφράστηκε σε μg ισοδύναμων β-καροτενίου ανά γραμμάριο συνολικής ξηρής βιομάζας με τη χρήση της εξίσωσης των Lopes et. al. (2017):

$$\text{Ολικά καροτενοειδή} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{A \times V \times 10000}{E \times w}$$

Όπου A η απορρόφηση στα 450 nm, V ο όγκος του πετρελαϊκού αιθέρα σε mL, E ο συντελεστής απόσβεσης 1% (2592 για τον πετρελαϊκό αιθέρα) και w η συνολική ξηρή βιομάζα του δείγματος.

3.7.9. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων του μικροβιακού ελαίου

Η ανάλυση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους πραγματοποιήθηκε μέσω παραγωγής μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Methyl Esters-FAMES), όπου πραγματοποιείται μεθυλεστεροποίηση με χρήση μεθοξειδίου του νατρίου (MeONa) και στη συνέχεια εστεροποίηση με τη χρήση μεθανόλης με καταλύτη το HCl. Ο προσδιορισμός των FAMES πραγματοποιήθηκε μέσω Αέριας Χρωματογραφίας (Gas Chromatography-GC) Fisons 8060, που ήταν

εξοπλισμένη με στήλη Chrompack (60m× 0.32 mm) και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector-FID) με χρήση ηλίου ως φέρον αέριο (2mL/min). Το πρόγραμμα του φούρνου ρυθμίστηκε με αρχική θερμοκρασία 50 °C, στη συνέχεια ο φούρνος θερμαινόταν στους 200 °C με αναλογία 25 °C/λεπτό, μετά στους 240 °C με αναλογία 3 °C/λεπτό και τέλος στους 250 °C με αναλογία 25 °C/λεπτό και παρέμενε για 3 λεπτά. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ρυθμίστηκε στους 250 °C. Τα FAMES ταυτοποιήθηκαν έχοντας ως σημείο αναφοράς ένα πρότυπο δείγμα (Supelco® 37 Component FAME Mix, 10 mg/mL in CH₂Cl₂, 47885-U, Merck).

3.7.10. Προσδιορισμός συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών

Η συνολική περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών (Total Phenolic Content-TPC) των μεθανολικών εκχυλισμάτων (βλ. κεφ. 3.3) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Tsouko et al., 2019). Συγκεκριμένα, 50 μL εκχυλίσματος, 450 mL απιονισμένου νερού και 2,5 mL 0,2N αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα, αναδεύτηκαν για 1 min και παρέμειναν για 8 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2 mL υδατικού διαλύματος Na₂CO₃ (75 g/L) και το μείγμα παρέμεινε σε σκοτεινό μέρος για 90 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Η απορρόφηση (σε σχέση με ενός τυφλού δείγματος, που παρασκευάστηκε προσθέτοντας μεθανόλη αντί για δείγμα) μετρήθηκε στα 765 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου UV-Vis διπλής δέσμης (JascoV-530) και συγκρίθηκε με μία πρότυπη καμπύλη χλωρογενικού οξέος ($y=1.9459x-0.0086, R^2=0,981$). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg ισοδύναμων χλωρογενικού οξέος ανά g ξηρής μάζας.

3.7.11. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο απομάκρυνσης ελεύθερης ρίζας DPPH, όπως προτείνεται από τους Scherer and Godoy (2009). Πιο συγκεκριμένα, 100 μL κατάλληλα αραιωμένου μεθανολικού εκχυλίσματος προστέθηκαν σε 3,9 mL διαλύματος DPPH (80,1 μM σε μεθανόλη) και παρέμειναν σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου για 90 min. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 517 nm με τυφλό δείγμα μεθανόλης, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου UV-Vis διπλής δέσμης (JascoV-530, Tokyo, Japan). Ένα μείγμα που αποτελούταν από 100 μL μεθανόλης και 3,9 mL DPPH χρησιμοποιήθηκε

σαν τυφλό δείγμα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα (AAI) υπολογίσθηκε ως εξής σύμφωνα με τους Scherer and Godoy (2009):

$$AAI = \frac{\text{Final concentration of DPPH } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}{IC_{50}\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}$$

Όπου, IC₅₀: συγκέντρωση που παρέχει 50% παρεμποδισμό.

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1. Σύσταση του αποβλήτου της εκχύλισης του καφέ (SCG)

Το SCG αναλύθηκε ως προς τη σύστασή του σε υδατάνθρακες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη), πρωτεΐνη, λίπος, φαινολικά συστατικά, λιγνίνη, τέφρα και υγρασία, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4, ενώ παρατίθεται και το εύρος τιμών των αντίστοιχων συστατικών που βρέθηκε στη βιβλιογραφία και αφορά στο ίδιο απόβλητο. Το SCG παρουσίασε υψηλό ποσοστό υγρασίας (60,7%), ενώ ήταν πλούσιο σε λίπος (10,7%), πρωτεΐνη (13,3%), λιγνίνη (25,0%) και ημικυτταρίνη (38,3%). Υψηλότερες τιμές λιγνίνης με εύρος 32,5-33,6% έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά. Το κλάσμα της κυτταρίνης ήταν ίσο με 10,0%, ενώ παρόμοιες τιμές (8,6-15,3) έχουν αναφερθεί και στη βιβλιογραφία. Η ημικυτταρίνη αποτελούταν από γαλακτόζη (11,3%) και μαννόζη (27,1%).

Πίνακας 4 Σύσταση του αποβλήτου SCG και παράθεση βιβλιογραφικών τιμών

Συστατικά (% κ.β. επί ξηρού)	Πειραματικά δεδομένα	Βιβλιογραφία ¹
Υγρασία ²	60,7 ± 0,23	
Τέφρα	1,5 ± 0,05	0,4-2,2
Λίπος	10,7 ± 0,41	10,0-15,0
Πρωτεΐνη	13,3 ± 0,62	6,7-13,7
Φαινολικά	1,0 ± 0,01	
Λιγνίνη	25,04 ± 0,91	32,5-33,6
Αδιάλυτη Λιγνίνη	24,38	
Διαλυτή Λιγνίνη	0,6	
Ημικυτταρίνη	38,3 ± 1,22	36,7
Γαλακτόζη	11,3	
Μαννόζη	27,1	
Κυτταρίνη	10,03 ± 0,35	8,6-15,3

¹ Narita et al., 2017; Franca and Oliveira 2009; Murthy and Naidu, 2012; Bekalo and Reinhardt, 2010; Bessada et al., 2018; Mata et al., 2018

² κ.β. % επί υγρού

4.2. Επίδραση της προεπεξεργασίας του SCG μέσω μικροκυμάτων στη σύστασή του

Τα SCGs άνευ φαινολικών και ελαίου (βλ. κεφ. 3.3) υποβλήθηκαν σε θερμική κατεργασία με μικροκύματα σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες (βλ. κεφ. 3.4, Πίνακας 3), που επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία. Η προεπεξεργασία του στερεού για 15 min και 800 W κρίθηκε ακατάλληλη για περαιτέρω διερεύνηση, καθώς οι αποδόσεις των επακόλουθων ενζυμικών υδρολύσεων, ήταν πολύ χαμηλές (Πίνακας 6). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η εφαρμογή υψηλών ισχύων και παρατεταμένων χρόνων παραμονής μπορεί να οδηγήσει σε μερική αποδόμηση των σακχάρων και συνεπώς σε μείωση της αποδοτικότητας της επακόλουθης ενζυμικής υδρόλυσης. Στον Πίνακα 5 παρατίθενται τα ισοζύγια μάζας όσον αφορά το κλάσμα αποβλήτου SCG μετά από επεξεργασία με μικροκύματα υπό διαφορετικές συνθήκες.

Πίνακας 5 Ισοζύγια μάζας όσον αφορά το κλάσμα αποβλήτου SCG ύστερα από προεπεξεργασία με μικροκύματα (MW) σε διαφορετικές συνθήκες

Συστατικά (g)	Αρχικό SCG	SCG άνευ λίπους και φαινολικών	MW SCG (400 W, 15 min, H ₂ O)	MW SCG (800 W, 10 min, H ₂ O)	MW SCG (400 W, 15 min, NaOH)
Λιγνίνη	25,04	23,37	14,91	13,53	3,94
Ημικυτταρίνη	38,3	35,4	26,61	26,08	20,13
Κυτταρίνη	10,03	8,87	7,33	7,74	6,53
Πρωτεΐνη	13,32	11,79	8,68	8,9	3,96
Φαινολικά	1				
Λίπος	10,7				
Τέφρα	1,49	1,32	1,21	1,29	1,19
Μάζα	99,88	80,75	62,47	63,77	41,21
% κ.β. απώλειες					
Λιγνίνη		6,56	36,19	42,09	83,12
Ημικυτταρίνη		7,60	24,82	26,32	43,13
Κυτταρίνη		11,49	17,35	12,76	26,39
Πρωτεΐνη		11,52	26,38	24,52	66,36

Η τελική μάζα (g) στον Πίνακα 5, αναφέρεται στην διαφορά της μάζας του SCG άνευ φαινολικών και ελαίου πριν την προεπεξεργασία και της μάζας του εναπομένουτος

SCG μετά από κάθε κατεργασία. Όσον αφορά στο προεπεξεργασμένο SCG, παρουσιάστηκαν κάποιες απώλειες στον προσδιορισμό της σύστασης λόγω αδυναμίας προσδιορισμού της μάζας ορισμένων συστατικών. Συγκεκριμένα, στις συνθήκες 400 W, 15min, H₂O δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί το 5,97% της σύστασης, στα 800 W, 10 min, H₂O υπήρξε αδυναμία προσδιορισμού του 9,8% της σύστασης και τέλος στα 400 W, 15 min, NaOH δεν ήταν εφικτή η ποσοτικοποίηση του 11,2% της σύστασης. Αυτές οι απώλειες της τάξης του 10%, μπορεί να οφείλονται στην εφαρμογή υπερήχων, που εφαρμόστηκαν για την απομάκρυνση των φαινολικών συστατικών (βλ.κεφ. 3.3).

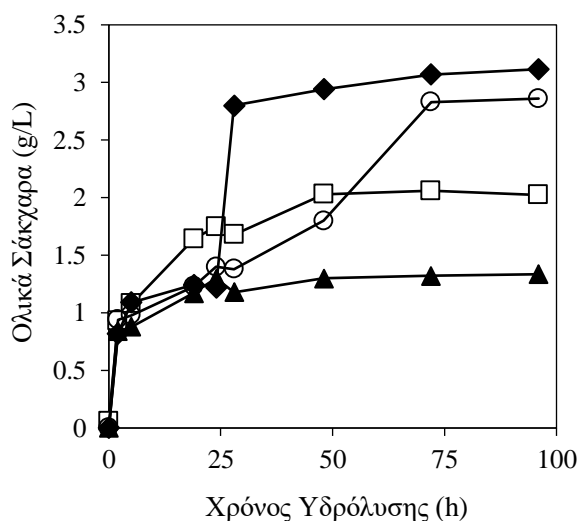
Στον Πίνακα 5 απεικονίζεται η αρχική μάζα του SCG και οι διαδοχικές απώλειες μάζας μετά από κάθε κατεργασία. Η μεγαλύτερη απώλεια μάζας (49% κ.β.) παρατηρήθηκε στην περίπτωση που το NaOH χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης, ενώ στην περίπτωση του νερού οι απώλειες μάζας περιορίστηκαν στο 21% κ.β.. Η κατεργασία με νερό και στις δύο εφαρμοζόμενες τιμές ισχύος είχε ως αποτέλεσμα περιορισμένες απώλειες σε κυτταρίνη (12,8-17,31%) και ημικυτταρίνη (24,8-26,3%), ενώ οι απώλειες σε πρωτεΐνη κυμάνθηκαν μεταξύ 24,5-26,4%. Στην περίπτωση χρήσης NaOH, οι απώλειες όλων των συστατικών ήταν αρκετά αυξημένες. Πιο συγκεκριμένα οι απώλειες σε λιγνίνη ανήλθαν στα 83,1%, σε πρωτεΐνη στα 66,4% και σε ημικυτταρίνη στα 43,1%.

4.3. Ενζυμική υδρόλυση προς παραγωγή σακχάρων

4.3.1. Επίδραση διαφορετικών συνθηκών επεξεργασίας με μικροκύματα στην αποδοτικότητα των ενζυμικών υδρολύσεων

Μετά την προεπεξεργασία των SCGs με μικροκύματα υπό διαφορετικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση, όπου τα υποστρώματα αξιολογήθηκαν ως προς την παραγωγή σακχάρων, που προέκυψαν από τη διάσπαση της κυτταρίνης σε γλυκόζη και της ημικυτταρίνης σε μαννόζη, γαλακτόζη και αραβινόζη. Στον πρώτο πειραματικό κύκλο αξιολογήθηκαν οι ενζυμικές υδρολύσεις υποστρωμάτων μετά από προεπεξεργασία με μικροκύματα και νερό ως διαλύτη. Υπόστρωμα SCG άνευ φαινολικών και φυτικού ελαίου χωρίς προεπεξεργασία, υποβλήθηκε σε ενζυμική υδρόλυση για λόγους σύγκρισης. Η αρχική ενζυμική ενεργότητα που εφαρμόστηκε ήταν όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3.5. Στο Διάγραμμα 1 φαίνεται η παραγωγή ολικών σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση για κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά.

Στην περίπτωση των 400 W και 15 min παρήχθησαν 2,8 g/L ολικά σάκχαρα, ύστερα από 28 ώρες υδρόλυσης, ενώ παρατηρήθηκε ελάχιστη αύξηση ολικών σακχάρων καθ' όλη τη διάρκεια της ενζυμικής υδρόλυσης (3,1 g/L σακχάρων ύστερα από 96 ώρες). Στην περίπτωση των 800 W και 10 min η μέγιστη παραγωγή σακχάρων (2,83 g/L) επιτεύχθηκε ύστερα από 72 ώρες υδρόλυσης. Χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν όσον αφορά στο υπόστρωμα SCG χωρίς κατεργασία. Η προεπεξεργασία του στερεού για 15 min και 800 W κρίθηκε ακατάλληλη για περαιτέρω διερεύνηση, καθώς οι αποδόσεις των ενζυμικών υδρολύσεων, ήταν πολύ χαμηλές (Πίνακας 6). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η εφαρμογή υψηλών ισχύων και παρατεταμένων χρόνων παραμονής μπορεί να οδηγήσει σε μερική αποδόμηση των σακχάρων και συνεπώς σε μείωση της απόδοσης της επακόλουθης ενζυμικής υδρόλυσης.



Διάγραμμα 1 Παραγωγή ολικών σακχάρων μέσω ενζυμικής υδρόλυσης με εμπορικά ένζυμα (β -γλυκοσιδάση και Viscozyme) χρησιμοποιώντας ως αρχικό υπόστρωμα, SCG (□) άνευ λίπους και φαινολικών, (◆) προεπεξεργασμένο με 400 W και 15 min, (○) προεπεξεργασμένο με 800 W και 10 min και (▲) προεπεξεργασμένο με 800 W και 15 min.

Στον Πίνακα 6 παρατίθενται οι αποδόσεις των ενζυμικών υδρολύσεων εκφρασμένες σε g υδρολυμένης κυτταρίνης ή ημικυτταρίνης/ 100 g συνολικής κυτταρίνης ή ημικυτταρίνης του εκάστοτε υποστρώματος μετά από κάθε προεπεξεργασία. Οι μέγιστες αποδόσεις υδρόλυσης κυτταρίνης (18%) και ημικυτταρίνης (8%) παρατηρήθηκαν στην περίπτωση των 400 W και 15 min. Ελαφρώς χαμηλότερες

αποδόσεις επιτεύχθηκαν στην περίπτωση των 800 W και 10 min (15,2 % για την κυτταρίνη και 7,9% για την ημικυτταρίνη). Συνεπώς, τα 400 W επιλέχθηκαν για περαιτέρω πειραματικές δοκιμές, καθώς οι συνθήκες των 800 W κρίνονται αρκετά πιο ενεργοβόρες καθιστώντας τη διεργασία οικονομικά μη βιώσιμη.

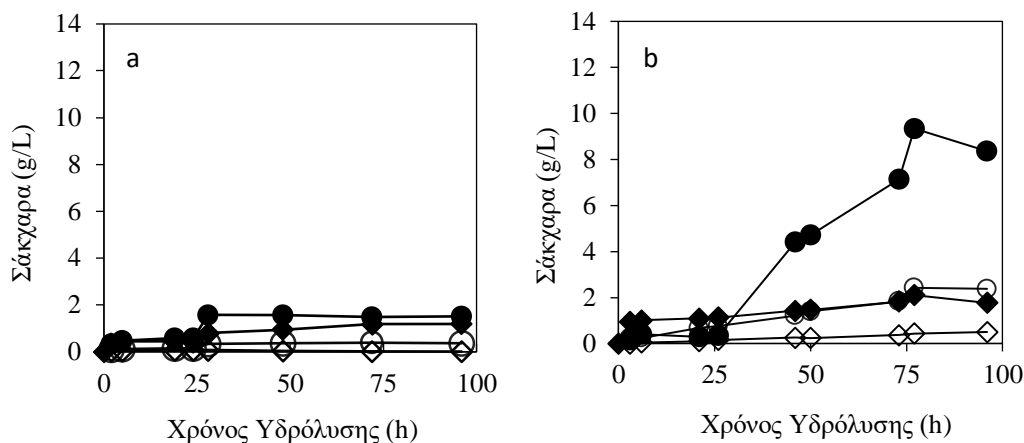
Πίνακας 6 Αποδοτικότητα ενζυμικών υδρολύσεων με τη χρήση διαφορετικά κατεργασμένων υποστρωμάτων SCG

SCG	Απόδοση υδρόλυσης κυτταρίνης (% κ.β.) ¹	Απόδοση υδρόλυσης ημικυτταρίνης (% κ.β.) ¹
Untreated	6,9	7,0
400 W (15')	18,0	8,0
800 W (10')	15,2	7,9
800 W (15')	6,6	3,4

¹g υδρολυμένης κυτταρίνης ή ημικυτταρίνης/ 100 g συνολικής κυτταρίνης ή ημικυτταρίνης του εκάστοτε υποστρώματος μετά από κάθε προεπεξεργασία

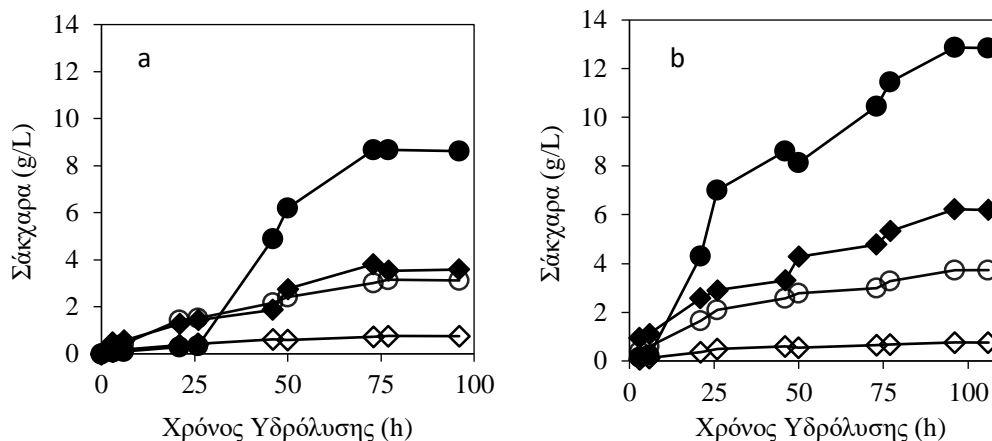
4.3.2. Επίδραση διαφορετικών διαλυτών προεπεξεργασίας και αρχικών ενζυμικών ενεργοτήτων στην αποδοτικότητα των ενζυμικών υδρολύσεων

Στη συνέχεια, ακολούθησαν ενζυμικές υδρολύσεις στις οποίες διπλασιάστηκε η ενζυμική ενεργότητα. Η κατεργασία του SCG που εφαρμόστηκε ήταν 400 W και 15 min με διαλύτη απιονισμένο νερό (βλ. κεφ. 3.5). Στο Διάγραμμα 2, απεικονίζονται τα επιμέρους σάκχαρα που παρήχθησαν μετά την ενζυμική υδρόλυση του SCG με διαφορετικές ποσότητες ενζύμου. Όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 2b, ο διπλασιασμός της ενζυμικής ενεργότητας οδήγησε σε αύξηση των ολικών παραγόμενων σακχάρων κατά 4,7 φορές. Πιο συγκεκριμένα, η μαννόζη ανήλθε στα 9,34 g/L, ακολουθούμενη από την γαλακτόζη (2,42 g/L), την γλυκόζη (2,1 g/L) και την αραβινόζη (0,43 g/L).



Διάγραμμα 2 Παραγωγή επιμέρους σακχάρων μέσω ενζυμικής υδρόλυσης με εμπορικά ένζυμα (β -γλυκοσιδάση και Viscozyme) χρησιμοποιώντας ως αρχικό υπόστρωμα SCG ύστερα από κατεργασία με μικροκύματα με διαλύτη απιονισμένο νερό σε συνθήκες 400 W και 15 min και ενζυμική ενεργότητα a. 25 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης b. 50 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης: (♦) Γλυκόζη, (●) Μαννόζη, (○) Γαλακτόζη και (◇) Αραβινόζη.

Σε επόμενο σετ πειραμάτων, αξιολογήθηκε διάλυμα 0,1 M NaOH ως διαλύτης για κατεργασία με μικροκύματα (400 W και 15 min). Οι ενζυμικές υδρολύσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο ενζυμικές ενεργότητες, όπως προαναφέρθηκε. Όπως απεικονίζεται στο Διάγραμμα 3b, ύστερα από 96 ώρες υδρόλυσης, τα ολικά σάκχαρα προσδιορίστηκαν ίσα με 23,6 g/L, με τη μαννόζη να ανέρχεται στα 12,87 g/L, τη γλυκόζη στα 6,23 g/L, τη γαλακτόζη στα 3,72 g/L και τέλος την αραβινόζη στα 0,76 g/L. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις σακχάρων (16,2 g/L) παρατηρήθηκαν στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε η μισή ποσότητα ενζύμου.



Διάγραμμα 3 Παραγωγή επιμέρους σακχάρων μέσω ενζυμικής υδρόλυσης με εμπορικά ένζυμα (β-γλυκοσιδάση και Viscozyme) χρησιμοποιώντας ως αρχικό υπόστρωμα SCG ύστερα από κατεργασία με μικροκύματα με διαλύτη διάλυμα NaOH 1% σε συνθήκες 400 W και 15 min και ενζυμική ενεργότητα (a) 25 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης και (b) 50 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης: (◆) Γλυκόζη, (●) Μαννόζη, (○) Γαλακτόζη και (◇) Αραβινόζη.

Η εφαρμογή αρχικής ενζυμικής ενεργότητας ίσης με 50 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης φάνηκε να οδηγεί σε αυξημένες αποδόσεις ενζυμικής υδρόλυσης είτε με τη χρήση νερού είτε με τη χρήση διαλύματος NaOH ως διαλύτες προεπεξεργασίας του υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 7, στην περίπτωση όπου ο διαλύτης ήταν το NaOH, επιτεύχθηκαν μέγιστες αποδόσεις υδρόλυσης κυτταρίνης (70,5%) και ημικυτταρίνης (63,5%), ενώ στην περίπτωση που ο διαλύτης ήταν το νερό, μετά από 77 ώρες υδρόλυσης, η απόδοση υδρόλυσης της κυτταρίνης ήταν 32% και της ημικυτταρίνης 51,1%. Παρά την μεγαλύτερη απόδοση της υδρόλυσης, η προεπεξεργασία του στερεού με διαλύτη το NaOH, οδηγεί σε αρκετά μεγάλες απώλειες στερεών (49% κ.β.), συγκριτικά με την χρήση του νερού ως διαλύτη (βλ. κεφ. 4.2, Πίνακας 5). Επιπλέον, σε αυτή την περίπτωση, παρατηρούνται μεγάλες απώλειες πρωτεΐνης (66,4% κ.β.), γεγονός που περιορίζει την δυναμικότητα των επακόλουθων ενζυμικών υδρολύσεων προς παραγωγή αζώτου ελεύθερων αμινομάδων. Συνεπώς, το SCG προεπεξεργασμένο με μικροκύματα σε συνθήκες 400 W και 15 min με διαλύτη απιονισμένο νερό, κρίθηκε το πιο κατάλληλο για περαιτέρω πειράματα ενζυμικών υδρολύσεων.

Πίνακας 7 Αποδοτικότητα των ενζυμικών υδρολύσεων, κατά τις οποίες η προεπεξεργασία της πρώτης ύλης με μικροκύματα έγινε με τη χρήση διαφόρων διαλυτών (νερό ή NaOH).

SCG	Απόδοση υδρόλυσης κυτταρίνης (% κ.β.) ³	Απόδοση υδρόλυσης ημικυτταρίνης (% κ.β.) ³	Ολικά σάκχαρα (g/L)	Χρόνος υδρόλυσης (h)
400 W (15') ¹	18,0	8,0	3,11	72
400 W (15') ²	32,01	51,16	14,29	77
NaOH 400 W(15') ¹	43,01	45,39	16,23	73
NaOH 400 W(15') ²	70,47	63,55	23,58	96

¹ ενζ. Ενεργότητα : 25 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης

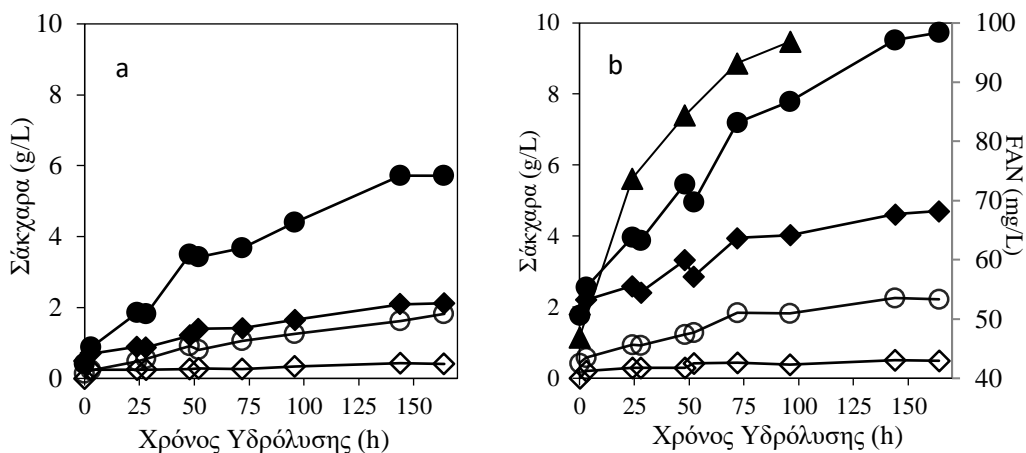
² ενζ. Ενεργότητα : 50 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης

³g υδρολυμένης κυτταρίνης ή ημικυτταρίνης/ 100 g αρχικής κυτταρίνης ή ημικυτταρίνης

4.4. Ενζυμική υδρόλυση προς παραγωγή σακχάρων και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων

Το προεπεξεργασμένο SCG (400 W, 15 min), υπεβλήθη εκ νέου σε ενζυμικές υδρολύσεις με τη χρήση εμπορικών κυτταρινασών, β-γλυκοσιδάσης, καθώς και ημικυτταρινασών (προς παραγωγή σακχάρων) (Διάγραμμα 4a) ή συνδυασμό όλων των προαναφερθέντων με πρωτεάσες (προς παραγωγή σακχάρων και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων) (Διάγραμμα 4b). Σε αυτό το σειτ πειραμάτων, το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την ενζυμική υδρόλυση ήταν αυτό που προέκυψε από την προεπεξεργασία του στερεού με μικροκύματα στα 400 W για 15 min, σε αντίθεση με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Κεφάλαιο 4.3, στα οποία το στερεό διηθούταν και γινόταν προσθήκη φρέσκου νερού για τις επακόλουθες ενζυμικές υδρολύσεις. Στην περίπτωση του συνδυασμού των ενζύμων (κυτταρινασών, ημικυτταρινασών, πρωτεασών) επιτεύχθηκε αρκετά υψηλότερη παραγωγή επιμέρους σακχάρων, σε σχέση με την περίπτωση που δεν χρησιμοποιήθηκαν πρωτεάσες (Διάγραμμα 4a). Πιο συγκεκριμένα, ύστερα από 144 ώρες υδρόλυσης, η μαννόζη έφτασε τα 9,53 g/L, η γλυκόζη τα 4,62 g/L, η γαλακτόζη τα 2,26 g/L και η αραβινόζη τα 0,53 g/L. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη συνεργιστική δράση που πιθανώς αναπτύσσεται μεταξύ των ενζύμων και η οποία ενισχύει και βελτιώνει την

υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Στην περίπτωση που δεν χρησιμοποιήθηκαν πρωτεάσες, η συγκέντρωση της μαννόζης ανήλθε στα 5,72 g/L, της γλυκόζης στα 2,09 g/L, ακολούθησε η γαλακτόζη με 1,61 g/L και η αραβινόζη με 0,43 g/L. Οι μέγιστες αποδόσεις υδρόλυσης κυτταρίνης (75%) και ημικυτταρίνης (50%) επιτεύχθηκαν στην περίπτωση συνδυασμού των ενζύμων, ενώ στην περίπτωση απουσίας των εμπορικών πρωτεασών παρατηρήθηκαν χαμηλότερες αποδόσεις (34,1% υδρόλυση κυτταρίνης και 31,7% υδρόλυση ημικυτταρίνης) (Πίνακας 8).

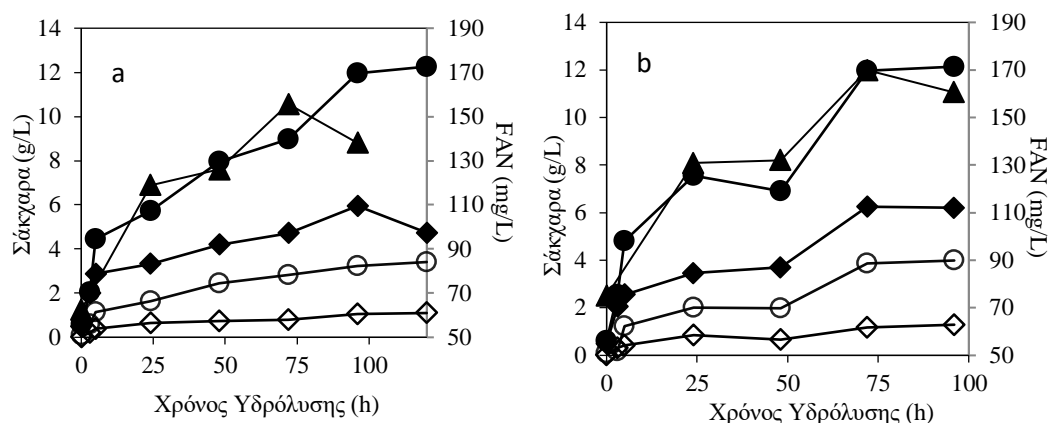


Διάγραμμα 4 Ενζυμική υδρόλυση χρησιμοποιώντας ως αρχικό υπόστρωμα SCG ύστερα από κατεργασία με μικροκύματα με διαλύτη νερό σε συνθήκες 400 W και 15 min και ενζυμική ενεργότητα 50 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης: (a) Παραγωγή επιμέρους σακχάρων μέσω ενζυμικής υδρόλυσης με τη χρήση β-γλυκοσιδάσης, κυτταρινασών, ημικυτταρινασών (b) Παραγωγή επιμέρους σακχάρων και FAN μέσω ενζυμικής υδρόλυσης με τη χρήση β-γλυκοσιδάσης, κυτταρινασών, ημικυτταρινασών και πρωτεασών: (◆) Γλυκόζη, (●) Μαννόζη, (○) Γαλακτόζη, (◇) Αραβινόζη και (▲) FAN

Ακολούθησαν πειράματα στα οποία αξιολογήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των στερεών (50 g/L, 75 g/L, 100 g/L) στην αποδοτικότητα των ενζυμικών υδρολύσεων. Όπως απεικονίζεται στο Διάγραμμα 5a και 5b, οι μέγιστες τιμές των επιμέρους σακχάρων στις 96 και 72 ώρες αντίστοιχα είναι παρόμοιες, ενώ τα ολικά σάκχαρα έφτασαν τα 22,2 g/L για αρχική συγκέντρωση στερεού 75 g/L και τα 23,3 g/L για 100 g/L. Παρατηρήθηκε ότι όσο αυξανόταν η αρχική συγκέντρωση

στερεών, μειωνόταν η αποδοτικότητα των ενζυμικών υδρολύσεων. Πιο συγκεκριμένα, η απόδοση της κυτταρίνης στην περίπτωση των 50 g/L ήταν 75%, ενώ σταδιακά μειώθηκε στο 64,7% και 51% αντίστοιχα με τη χρήση αρχικού SCG 75 g/L και 100 g/L. Ίδια τάση παρατηρήθηκε και στην απόδοση της ημικυτταρίνης, η οποία μειώθηκε από 50% σε 34,8% σε αρχικές συγκεντρώσεις 50 g/L και 100 g/L αντίστοιχα (Πίνακας 8).

Στα Διαγράμματα 4b, 5a και 5b απεικονίζεται η παραγωγή FAN κατά τη διάρκεια ενζυμικών υδρολύσεων. Οι αποδόσεις μετατροπής FAN προς TKN ήταν σχετικά χαμηλές σε όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις και κυμάνθηκαν μεταξύ 4,1 έως 6,8%. Το ολικό FAN στις 52 ώρες υδρόλυσης στην περίπτωση των 50 g/L αρχικών στερεών, προσδιορίστηκε ίσο με 159 mg/L, ποσότητα ικανοποιητική για την πραγματοποίηση των μικροβιακών ζυμώσεων προς παραγωγή μικροβιακού λίπους και καροτενοειδών.



Διάγραμμα 5 Παραγωγή επιμέρους σακχάρων και FAN μέσω ενζυμικής υδρόλυσης με εμπορικά ένζυμα (β-γλυκοσιδάση, Viscozyme, πρωτεάσες) χρησιμοποιώντας ως αρχικό υπόστρωμα SCG ύστερα από κατεργασία με μικροκύματα με διαλύτη νερό σε συνθήκες 400 W και 15 min και ενζυμική ενεργότητα 50 U/g κυτταρίνης και ημικυτταρίνης και 12 U/g στερεού και αρχική συγκέντρωση στερεού (a) 75 g/L και (b) 100 g/L : (◆) Γλυκόζη, (●) Μαννόζη, (○) Γαλακτόζη, (◇) Αραβινόζη και (▲) FAN

Στον Πίνακα 8 συνοψίζονται όλες οι διαφορετικές συνθήκες των ενζυμικών υδρολύσεων στις οποίες υπεβλήθη το SCG. Με βάση όλες τις παραπάνω

πειραματικές δοκιμές, το υπόστρωμα που υπέστη προεπεξεργασία με μικροκύματα σε συνθήκες 400 W και 15 min, διαλύτη το απιονισμένο νερό και αρχική συγκέντρωση στερεού 50 g/L, και στη συνέχεια υπεβλήθη σε ενζυμική υδρόλυση με συνδυασμό εμπορικών ενζύμων, θεωρήθηκε το πιο αποδοτικό υπόστρωμα, για περαιτέρω χρήση στις επακόλουθες μικροβιακές ζυμώσεις για παραγωγή μικροβιακού λίπους και καρροτενοειδών.

Πίνακας 8 Σύνοψη των αποτελεσμάτων των διαφορετικών ενζυμικών υδρολύσεων που πραγματοποιήθηκαν με υπόστρωμα στερεό απόβλητο SCG

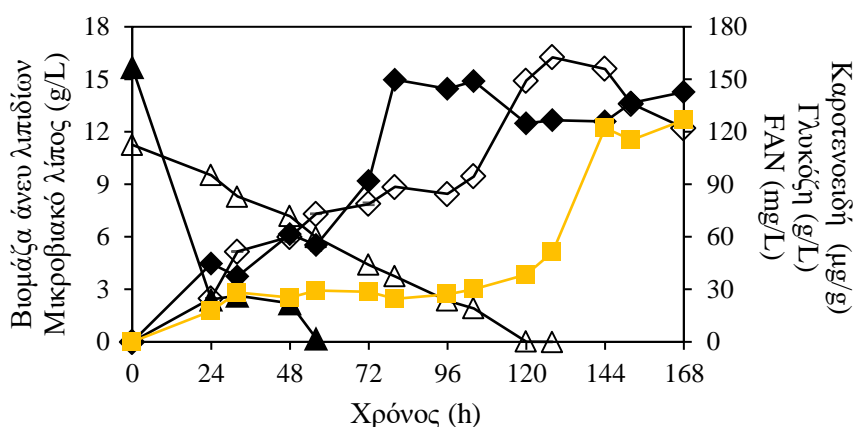
Κατεργασία με μικροκύματα	Διαλύτης ενζυμικής υδρόλυσης	Ένζυμα	Συγκέντρωση SCG (g/L)	Απόδοση υδρόλυσης κυτταρίνης (% κ.β.)	Απόδοση υδρόλυσης ημικυτταρίνης (% κ.β.)	Συνολικά σάκχαρα (g/L)	Χρόνος υδρόλυσης (h)
Μη επεξεργασμένο SCG	Νερό	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, β-γλυκοσιδάση	50	7,10	5,80	2,06	72
νερό, 400 W, 15 min	Νερό	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, β-γλυκοσιδάση	50	32,01	51,16	14,29	77
νερό, 800 W, 10 min	Νερό	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, β-γλυκοσιδάση	50	15,20	7,90	2,83	72
νερό, 800 W, 15 min	Νερό	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, β-γλυκοσιδάση	50	6,60	3,40	1,34	72
0,1 M NaOH, 400 W, 15 min	Νερό	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, β-γλυκοσιδάση	50	70,47	63,55	23,58	96
νερό, 400 W, 15 min	νερό microwave	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, β-γλυκοσιδάση	50	34,11	31,71	9,85	144
νερό, 400 W, 15 min	νερό microwave	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, β-γλυκοσιδάση, πρωτεάσες	50	75,02	50,02	16,92	144
νερό, 400 W, 15 min	νερό microwave	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, β-γλυκοσιδάση, πρωτεάσες	75	64,73	44,28	22,21	96
νερό, 400 W, 15 min	νερό microwave	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, β-γλυκοσιδάση, πρωτεάσες	100	51,00	34,78	23,28	72

4.5. Μικροβιακές ζυμώσεις προς παραγωγή μικροβιακού λίπους και καρροτενοειδών

4.5.1. Ζυμώσεις κλειστού τύπου

Το στέλεχος της ζύμης *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 αξιολογήθηκε για την ικανότητά του να αναπτυχθεί σε υποστρώματα συνθετικής γλυκόζης, μαννόζης και

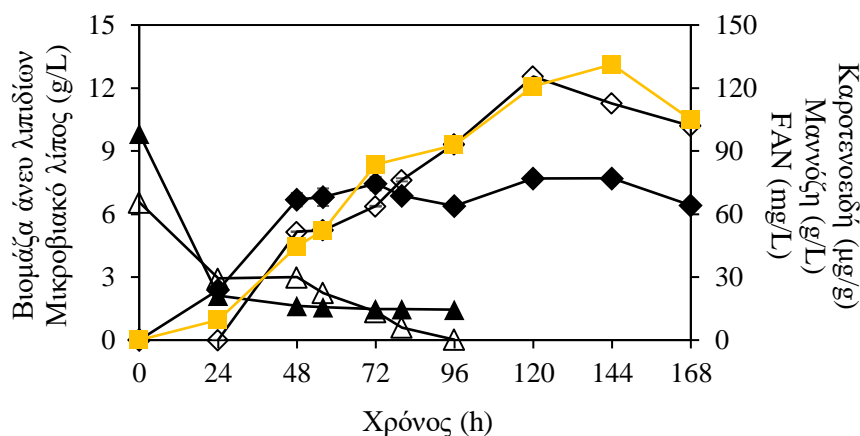
γαλακτόζης και να παράγει μικροβιακό λίπος και καροτενοειδή. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4 το μικροβιακό στέλεχος κατανάλωσε ικανοποιητικά τη γλυκόζη φτάνοντας τα 0,23 g/L στις 120 h ζύμωσης. Το αρχικό FAN ήταν 156,84 mg/L και καταναλώθηκε (2,1 mg/L) μετά από 56 h ζύμωσης. Η μέγιστη παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων έφτασε τα 16,25 g/L ύστερα από 128 h ζύμωσης με αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας 27,2 g/L και ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων 64%. Η απόδοση της ζύμωσης ως προς την παραγωγή λιπιδίων ήταν 0,14 g λιπιδίων/ g αρχικών σακχάρων και η παραγωγικότητα 0,13 g/L*h. Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 4, η ποσότητα της βιομάζας άνευ λιπιδίων σταθεροποιήθηκε μετά από 104 h ζύμωσης με εύρος από 12,5-15 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση καροτενοειδών παρατηρήθηκε μετά από 168 h ζύμωσης ίση με 126,7 μg/g ολικής ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 6 Κατανάλωση γλυκόζης, αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, βιομάζας άνευ λιπιδίων και καροτενοειδών κατά τη διάρκεια ζύμωσης κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες με το στέλεχος ζύμης *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 : (◇) Μικροβιακό λίπος, (◆) Βιομάζα άνευ λιπιδίων, (Δ) Γλυκόζη, (▲) FAN, (■) Καροτενοειδή

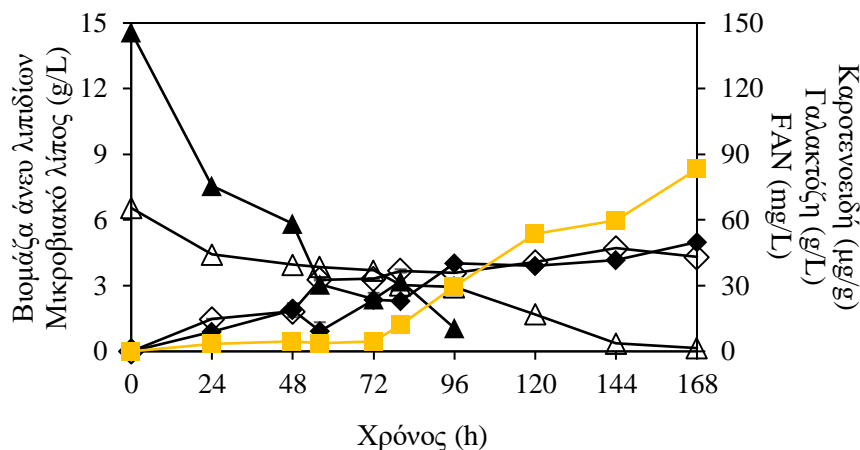
Όσον αφορά την ζύμωση με εμπορικό υπόστρωμα μαννόζης (Διάγραμμα 5), το σάκχαρο μαννόζη καταναλώθηκε πλήρως ύστερα από 96 h ζύμωσης. Η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (12,55 g/L) παρατηρήθηκε μετά από 96 h ζύμωσης, με αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας 18,92 g/L και ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων 66,33%. Η απόδοση της ζύμωσης ως προς την παραγωγή λιπιδίων ήταν 0,19 g λιπιδίων/ g αρχικών σακχάρων με παραγωγικότητα 0,13 g/L*h. Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 5, η ποσότητα της βιομάζας άνευ λιπιδίων σταθεροποιείται μετά από 48 h ζύμωσης με εύρος από 6,4-7,7 g/L, γεγονός που δικαιολογείται από την εξάντληση

του FAN (21,19 mg/L) στον αντίστοιχο χρόνο. Η μέγιστη συγκέντρωση καροτενοειδών παρατηρήθηκε μετά από 144 h ζύμωσης και προσδιορίστηκε ίση με 131,3 μg/g ολικής ξηρής βιομάζας.



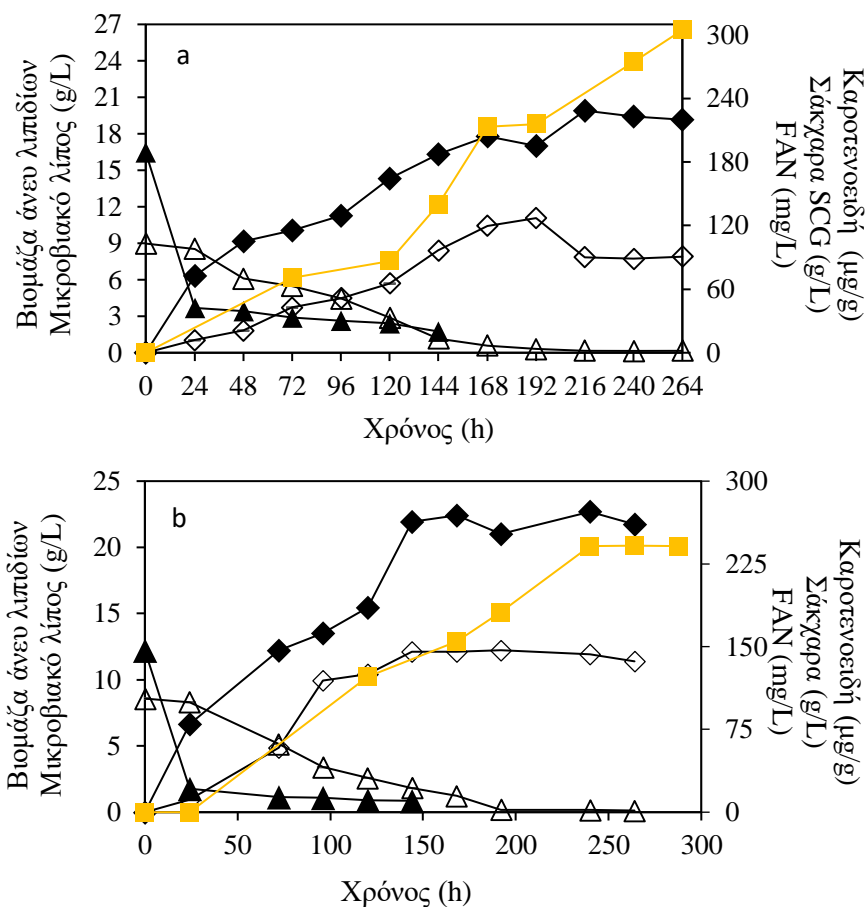
Διάγραμμα 7 Κατανάλωση μαννόζης, αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, βιομάζας άνευ λιπιδίων και καροτενοειδών κατά τη διάρκεια ζύμωσης κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες με το στέλεχος ζύμης *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444: (◇) Μικροβιακό λίπος, (◆) Βιομάζα άνευ λιπιδίων, (Δ) Μαννόζη, (▲) FAN, (■) Καροτενοειδή

Στην αντίστοιχη ζύμωση με εμπορικό υπόστρωμα γαλακτόζης (Διάγραμμα 6), η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε ικανοποιητικά φτάνοντας τα 1,5 g/L ύστερα από 168 h ζύμωσης, ενώ το FAN καταναλώθηκε (10,59 mg/L) μετά από 96 h ζύμωσης. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ίση με 11,12 g/L επιτεύχθηκε ύστερα από 144 ώρες ζύμωσης με ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων ίσο με 42,5. Η άνευ λιπιδίων βιομάζα, όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 6, σταθεροποιήθηκε μετά από 96 h ζύμωσης με εύρος από 3,9-5 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση καροτενοειδών σε αυτή την περίπτωση ήταν 83,22 μg/g ολικής ξηρής βιομάζας μετά από 168 h ζύμωσης.



Διάγραμμα 8 Κατανάλωση γαλακτόζης, αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, βιομάζας άνευ λιπιδίων και καροτενοειδών κατά τη διάρκεια ζύμωσης κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες με το στέλεχος ζύμης *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444: (◇) Μικροβιακό λίπος, (◆) Βιομάζα άνευ λιπιδίων, (Δ) Γαλακτόζη, (▲) FAN, (■) Καροτενοειδή

Ακολούθησε ζύμωση κλειστού τύπου με θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης το ενζυμικό υδρόλυμα από SCG (βλ. κεφ. 3.4). Το υδρόλυμα ήταν ένα πλήρες θρεπτικό μέσο ως προς τις απαιτήσεις του μικροοργανισμού σε πηγές αζώτου. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9a, τα σάκχαρα καταναλώθηκαν σχεδόν εξολοκλήρου μετά από 192 h ζύμωσης, ενώ το FAN καταναλώθηκε (39,31 mg/L) μετά από 48 h ζύμωσης. Η άνευ λιπιδίων βιομάζα, σταθεροποιήθηκε μετά από 144 h ζύμωσης με εύρος 16,3 έως 19,9 g/L. Η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων που επιτεύχθηκε ήταν 11,1 g/L με αντίστοιχη ποσότητα βιομάζας 28,09 g/L και ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων ίσο με 39,4 %. Η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,11 g λιπιδίων/g ολικών σακχάρων και η παραγωγικότητα 0,06 g/L*h. Η μέγιστη συγκέντρωση καροτενοειδών ίση με 304,63 µg/g ολικής ξηρής βιομάζας επιτεύχθηκε ύστερα από 264 h ζύμωσης. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ζύμωση κλειστού τύπου με εμπορικά σάκχαρα που προσομοιώνουν την σύσταση του αποβλήτου SCG ως προς την πηγή άνθρακα για λόγους σύγκρισης. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9b, η μέγιστες συγκεντρώσεις λιπιδίων (12,1 g/L) και βιομάζας (34 g/L) ήταν ελαφρώς αυξημένες, ενώ όσον αφορά στα καροτενοειδή, η παραγωγή τους ήταν αρκετά χαμηλότερη (263,1 µg/g ολικής ξηρής βιομάζας).



Διάγραμμα 9 Κατανάλωση σακχάρων του αποβλήτου SCG και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και παραγωγή μικροβιακού ελαίου, βιομάζας άνευ λιπιδίων και καροτενοειδών κατά τη διάρκεια ζύμωσης κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες με το στέλεχος ζύμης *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444: (a) Ενζυμικό υδρόλυμα SCG (b)Εμπορικό θρεπτικό μέσο προσομοιωμένο ως προς τη σύσταση των σακχάρων του ενζυμικού υδρολύματος SCG: (◇) Μικροβιακό λίπος, (◆) Βιομάζα άνευ λιπιδίων, (Δ) Σάκχαρα, (▲) FAN, (■) Καροτενοειδή

Στον Πίνακα 9 παρατίθενται και συγκρίνονται τα αποτελέσματα των παραπάνω μικροβιακών ζυμώσεων κλειστού τύπου. Όσον αφορά τα συνθετικά σάκχαρα, το πιο αποδοτικό υπόστρωμα για την παραγωγή μικροβιακού λίπους ήταν η εμπορική γλυκόζη όπου η συγκέντρωση των λιπιδίων έφτασε τα 16,3 g/L, ενώ ως προς την παραγωγή καροτενοειδών η μέγιστη συγκέντρωση επιτεύχθηκε με τη χρήση μαννόζης (131,3 µg/g ολικής ξηρής βιομάζας). Η μέγιστη παραγωγή καροτενοειδών

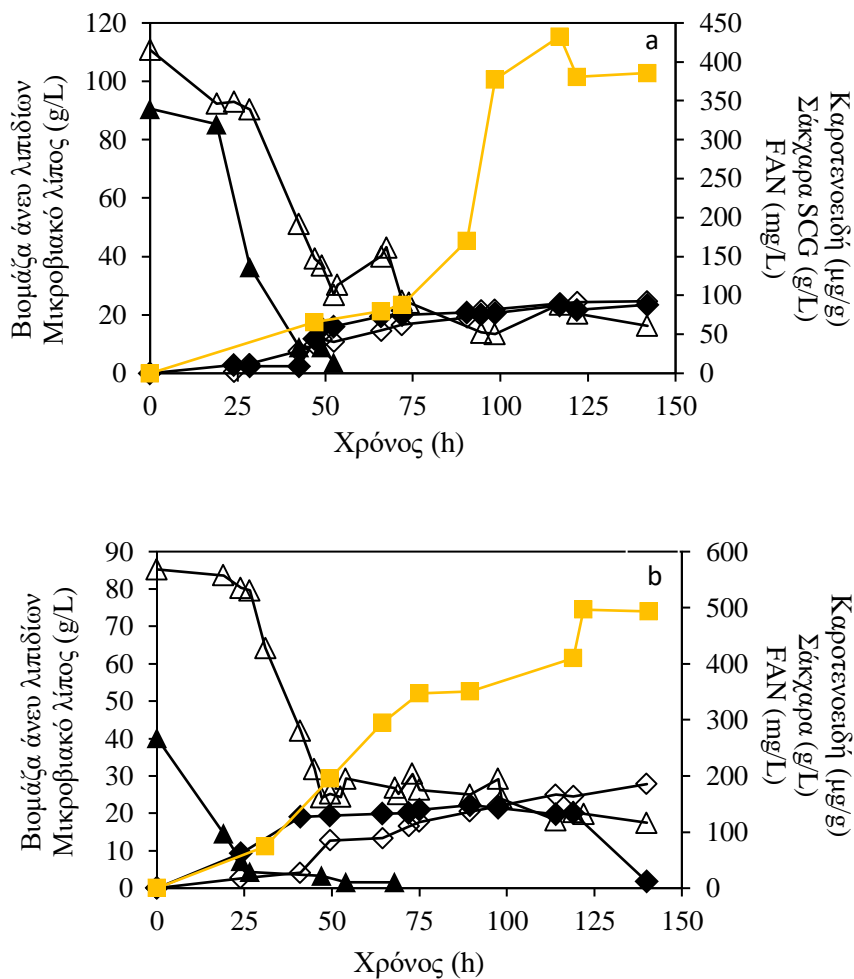
επιτεύχθηκε με θρεπτικό υπόστρωμα το ενζυμικό υδρόλυμα SCG, καθιστώντας το ως ένα ικανοποιητικό μέσο, πλήρες σε θρεπτικές πηγές άνθρακα και αζώτου.

Πίνακας 9 Συγκριτική μελέτη παραγωγής μικροβιακού λίπους και καροτενοειδών σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε διαφορετικές εμπορικές πηγές άνθρακα, καθώς και σε υδρόλυμα SCG, με το μικροβιακό στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444.

Υπόστρωμα	Ξηρή βιομάζα (g/L)	Λιπίδια (g/L)	Συσσωρευση λιπιδίων (%)	Απόδοση % κ.β.	Παραγωγικότητα (g/L*h)	Καροτενοειδή (μg/g βιομάζας)
Γλυκόζη	27,2	16,25	64,04	0,14	0,13	126,74
Μαννόζη	18,92	12,55	66,33	0,19	0,13	131,3
Γαλακτόζη	11,2	4,72	42,46	0,07	0,03	83,22
Υδρόλυμα SCG	28,09	11,07	39,41	0,11	0,06	304,63
Προσομοίωση SCG	34,03	12,1	35,6	0,12	0,08	263,1

4.5.2. Ζυμώσεις ημιδιαλείποντος έργου

Σε αυτό το στάδιο της πειραματικής πορείας, πραγματοποιήθηκε ζύμωση ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα πάγκου, με θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης το υδρόλυμα του στερεού αποβλήτου SCG ως πηγή άνθρακα, αζώτου και λοιπών θρεπτικών στοιχείων. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 10a, όταν η συγκέντρωση των σακχαρών έφτασε τα 39,37 g/L, ξεκίνησε η παροχή του feeding με ρυθμό τέτοιο ώστε τα ολικά σάκχαρα του υδρολύματος να διατηρούνται σε εύρος περίπου 20-40 g/L. Το FAN καταναλώθηκε (33,9 mg/L) μετά από 49 h ζύμωσης, με τη βιομάζα άνευ λιπιδίων να σταθεροποιείται μετά από 52,5 h ζύμωσης με εύρος από 19,6 έως 23,5 g/L. Το μικροβιακό λίπος έφτασε τη μέγιστη συγκέντρωση ίση με 24,0 g/L, με αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας 45,8 g/L και ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων 52,4%. Η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,11 g λιπιδίων/ g καταναλωθέντων σακχάρων, με παραγωγικότητά της ήταν 0,21 g/L*h. Η μέγιστη συγκέντρωση βιοχρωστικών επιτεύχθηκε μετά από 142 h ζύμωσης ίση με 432,8 μg/g ολικής ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 10 Κατανάλωση σακχάρων, αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και παραγωγή μικροβιακού ελαίου, βιομάζας άνευ λιπιδίων και καροτενοειδών κατά τη διάρκεια ζύμωσης συνεχούς λειτουργίας με το στέλεχος ζύμης *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444: (a) Ενζυμικό υδρόλυμα SCG, (b) Εμπορικό θρεπτικό μέσο προσομοιωμένο ως προς τη σύσταση των σακχάρων του ενζυμικού υδρολύματος SCG

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ζύμωση ημιδιαλείποντος έργου με εμπορικά σάκχαρα που προσομοίωναν τη σύσταση του υδρολύματος του SCG ως προς την πηγή άνθρακα. Η προσομοιωμένη ζύμωση παρουσίασε παρόμοιες συγκεντρώσεις μικροβιακού λίπους (24,5 g/L), βιομάζας (44,4 g/L), και καροτενοειδών (496,5 μg/g ολικής ξηρής βιομάζας) (Διάγραμμα 10b). Επίσης οι τιμές απόδοσης και παραγωγικότητας δεν παρουσίασαν αλλαγές (Πίνακας 10).

Πίνακας 10 Συγκριτική μελέτη παραγωγής μικροβιακού ελαίου και καροτενοειδών σε ζυμώσεις ημισυνεχούς λειτουργίας με τη χρήση ενζυμικών υδρολυμάτων από SCG, όπως και εμπορικού θρεπτικού μέσου προσομοιωμένο στη σύσταση σακχάρων του SCG

Υπόστρωμα	Ξηρή βιομάζα (g/L)	Λιπίδια (g/L)	Συσσώρευση λιπιδίων (%)	Απόδοση % κ.β.	Παραγωγικότητα (g/L*h)	Καροτενοειδή (μg/g βιομάζας)
Υδρόλυμα SCG	45,79	24	52,41	0,11	0,21	432,87
Προσομείωση SCG	44,38	24,56	55,35	0,12	0,21	496,53

4.6. Σύγκριση με βιβλιογραφία- Μικροβιακό λίπος και καροτενοειδή από διάφορα στελέχη ζυμών σε ανανεώσιμες πρώτες ύλες

Οι κόκκινες ζύμες που ανήκουν στα γένη *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Rhodosporidium* και *Sporidiobolus* (i.e. *Rhodosporidium diobovatum*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus johnsonii*, *Sporidiobolus metaroseus*, *Sporidiobolus pararoseus* και *Sporidiobolus salmonicolorn*) δύναται να συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες καροτενοειδών (Manazzu et al., 2015).

Όσον αφορά στα γένη *Rhodotorula* και *Rhodosporidium*, και τα δύο έχει αναφερθεί ότι παράγουν καροτενοειδή, περιλαμβάνοντας κυρίως β-καροτένιο, τορουλένιο και τορουλαροδίνη, σε αναλογίες που είναι άμεσα εξαρτώμενες από τις συνθήκες ζύμωσης. Η παραγωγή καροτενοειδών από αυτά τα είδη θεωρείται χαμηλή όταν η παραγωγή φτάνει τα 100 μg/g ξηρής βιομάζας, μέτρια όταν παίρνει τιμές έως 500 μg/g και υψηλή στην περίπτωση που η παραγωγή καροτενοειδών ξεπερνά τα 500 μg/g (Mata-Gomez et al., 2014).

Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει τη συσσώρευση καροτενοειδών να ποικίλει μεταξύ 200-350 μg/g ή ακόμη και χαμηλότερα, όσον αφορά στελέχη ελαιογόνων ζυμών καλλιεργούμενων σε ανανεώσιμες πρώτες ύλες (Cipolatti et al., 2019; Han et al., 2016; Cheng and Yang 2016; Petrik et al., 2013). Ενδεικτικά, ο *Sporidiobolus pararoseus* έδειξε αυξημένη ικανότητα να παράγει ταυτόχρονα μικροβιακό λίπος (51 g/L) πλούσιο σε ελαϊκό οξύ (72,5 %), καθώς επίσης και καροτενοειδή (328 μg/g) με

υψηλή αντιοξειδωτική σταθερότητα, όταν καλλιεργούταν σε θρεπτικό μέσο με βάση την γλυκόζη και υδρολύμα αραβοσίτου (Han et al., 2016).

Η μέγιστη παραγωγή καροτενοειδών έχει αναφερθεί μέχρι τώρα από τους Saenge et al. (2011) σε ζυμώσεις ημισυνεχούς λειτουργίας με το στέλεχος *R. Glutinis* χρησιμοποιώντας καθαρή γλυκερόλη (Πίνακας 11). Υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες, επιτεύχθηκε η υψηλότερη παραγωγή λιπιδίων (6,1 g/L) με ενδοκυτταρική λιποπεριεκτικότητα 60,7% και συσσώρευση καροτενοειδών ίση με 13.396 μg/g. Υψηλή συσσώρευση καροτενοειδών (7.823,8 μg/g) επιτεύχθηκε σε πειράματα ημισυνεχούς λειτουργίας με τη χρήση καθαρής γλυκερόλης και το στέλεχος *Sporidiobolus pararoseus*. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα και βελτιστοποιήθηκαν (6,0 vvm; 60% διαλυτότητα οξυγόνο; 10.000 Lux ακτινοβολία φωτός). Σε συνδυασμό με την υψηλή παραγωγή καροτενοειδών, επιτεύχθηκε 34% συσσώρευση λιπιδίων με υψηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ (80%) (Manowattana et al., 2018). Σε άλλη έρευνα, η ζύμη *R.toruloides* NRRLY-1091 αναπτύχθηκε σε υδρολύματα άχυρο σίτου, φτάνοντας μέγιστη συσσώρευση καροτενοειδών ίση με 1.370,5 μg/g ξηρής βιομάζας και συγκέντρωση μικροβιακών λιπιδίων ίση με 3,6 g/L (Liu et al., 2020). Στην ίδια μελέτη, το στέλεχος ζύμης καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα συνθετικών σακχάρων, γλυκόζης και ξυλόζης, και έφτασε συσσώρευση καροτενοειδών 1.820,5 μg/g ξηρής βιομάζας. Οι Manova et al. (2012) ανέφεραν την μέγιστη παραγωγή β-καροτενίου σε ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε αντιδραστήρα 2 L. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος *R. glutinis* παράγαγε 1.480,2 μg β-καροτενίου/g, ενώ το *S. roseus* κατάφερε να φτάσει τα 2.896,2 μg β-καροτενίου/ g όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης με βάση το τυρόγαλο. Η ζύμη *R. mucilaginoso* οδήγησε σε παραγωγή β-καροτενίου ίση με 1.856,4 μg/g σε καλλιέργειες όπου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα πατάτας σε συνδυασμό με 5% αλάτι, ως παράγοντα ενίσχυσης της παραγωγής καροτενοειδών. Τα στερεά απόβλητα μετά την εκχύλιση του καφέ αναφέρθηκαν ως ένα αρκετά ικανοποιητικό υπόστρωμα για την παραγωγή καροτενοειδών. Η μέγιστη συγκέντρωση καροτενοειδών (29,9 mg/L) επιτεύχθηκε σε ζυμώσεις ημισυνεχούς λειτουργίας με το μικροοργανισμό *Sporobolomyces roseus* (Petrik et al., 2014).

Στην παρούσα μελέτη, η ζύμη *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444, αναπτύχθηκε ικανοποιητικά σε θρεπτικό υπόστρωμα ενζυμικού υδρολύματος SCG. Στην

περίπτωση ζυμώσεων κλειστού τύπου, η μέγιστη συγκέντρωση του μικροβιακού λίπους ανήλθε στα 11,1 g/L, με αντίστοιχη παραγωγή καροτενοειδών ίση με 8,2 mg/L. Σε ζυμώσεις ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα, η συγκέντρωση των μικροβιακών λιπιδίων αυξήθηκε κατά 2,2 φορές (24 g/L), ενώ η συγκέντρωση καροτενοειδών προσδιορίστηκε ίση με 19,8 mg/L.

Πίνακας 11 Παραγωγή μικροβιακού λίπους καροτενοειδών από διάφορα στελέχη ζυμών

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Τύπος ζύμωσης	Μικροβιακό λίπος (g/L)	Καροτενοειδή (μg/gTDW)	Καροτενοειδή (mg/L)	Βιβλιογραφία
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-1091	υδρολύματα άχυρου σίτου	Κωνικές φιάλες	3,36	1370,5	24,6	Liu et al., 2020
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-1091	συνθετικά σάκχαρα	Κωνικές φιάλες	0,36	1820,5	8,14	
<i>R. glutinis</i> CCY 20-2-26	Ορός γάλακτος	Βιοαντιδραστήρας 2 L		1480,2	51,22	Marova et al. 2012
<i>R. mucilaginososa</i> CCY 20-7-31	Πατάτα /αλάτι		-	1856,4	55,9	
<i>S. roseus</i> CCY 19-4-8	Ορός γάλακτος			2896,2	29,4	
<i>R. glutinis</i> TISTR 5159	Καθαρή γλυκερόλη	Fed-batch/ 1.37 L stirred tank bioreactor	6,1	13396,1	135,3	Seange et al., 2011
<i>S. pararoseus</i> CCTCC M 2010326	Γλυκόζη, Corn steep liquor		51	328	27,9	Han et al., 2016
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> KM281507	Καθαρή γλυκερόλη	Fed-batch/ 3 L airlift bioreactor	-	7823,8	151,0	Manowattana et al., 2018
		Shake flasks		1259	12,59	
<i>S. roseus</i> CCY 19-6-4	SCG	Batch bioreactor	-	1046,7	15,7	Petrik et al., 2014
		Fed-batch bioreactor		812,5	29,9	
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Ενζυμικό υδρόλυμα SCG	Shake flasks	11,1	304,63	8,2	Παρούσα μελέτη

Fed-batch bioreactor	24,0	432,8	19,8
-------------------------	------	-------	------

4.7. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους

Στον Πίνακα 12 απεικονίζεται το προφίλ των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων για όλες τις περιπτώσεις των ζυμώσεων που διεξήχθησαν. Το κυριότερο λιπαρό οξύ ήταν το ελαϊκό (18:1), του οποίου το ποσοστό κυμάνθηκε από 48%-63,1%, ενώ ακολούθησε το παλμιτικό οξύ (16:0) με εύρος από 27,3% έως 42,3%. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα, ήταν το μυριστικό οξύ (14:0), το παλμιτελαϊκό οξύ (16:1), το στεαρικό οξύ (18:0) και το λινελαϊκό οξύ (18:2), των οποίων τα ποσοστά ήταν μικρότερα του 10% της σύστασης του μικροβιακού λίπους.

Πίνακας 12 Προφίλ μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους που παρήχθη κάτω από διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης

Είδος Ζύμωσης	Θρεπτικό υπόστρωμα	Χρόνος Ζύμωσης (h)	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2
Κλειστού τύπου	Μαννόζη	48	3,68	35,54	1,44	3,69	50,37	5,29
		80	1,76	29,25	0,77	2,38	59,38	6,83
		144	1,6	27,29	1,01	2,15	60	7,9
Κλειστού τύπου	Γλυκόζη	24	1,73	29,98	1,02	7,85	54,95	4,47
		80	1,85	29,37	1,28	8,98	54,83	3,69
		144	1,79	28,43	1,21	10,95	53,06	4,54
Κλειστού τύπου	Γαλακτόζη	24	1,96	30,53	0,64	9,09	51,28	5,61
		72	3,59	30,37	3,95	7,26	48,65	6,16
		144	2,89	33	1,31	5,58	47,99	9,23
Κλειστού τύπου	Υδρόλυμα SCG	72	3,59	38,39	0,14	2,1	51,85	4
		120	2,11	29,78	0,71	1,25	60	6,1
		216	2,68	30,3	0,8	0,61	58,5	7,1
Κλειστού τύπου	Προσομοίωση SCG	72	3,55	38,85	1,30	1,30	54,83	
		144	2,65	32,13	1,08	0,47	63,11	0,50
		240	2,14	33,05	0,94	0,97	60,01	2,87
Ημιδιαλείποντος έργου	Προσομοίωση SCG	64	3,35	42,28	0,2	0,5	48,51	5,17
		114	4,05	39,7	0,47	0,89	47,48	7,38
		119	2,53	34,02	0,33	1,87	54,43	6,81
Ημιδιαλείποντος έργου	Υδρόλυμα SCG	49	1,56	38,18	0,32	0,15	58,89	0,89
		90	2,46	32,95	0,71	0,39	56,3	7,17
		122	2,12	30,47	0,7	1,1	60,66	5,03

5. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκαν ρεύματα αποβλήτων προερχόμενα από την εκχύλιση του καφέ, πιο συγκεκριμένα SCG, για την παραγωγή μικροβιακού λίπους και καροτενοειδών. Αναπτύχθηκε διεργασία δύο σταδίων, κατά την οποία αρχικά μελετήθηκε η παραγωγή θρεπτικού υποστρώματος ζύμωσης μέσω προεπεξεργασίας με μικροκύματα και επακόλουθων ενζυμικών υδρόλυσεων. Κατά το δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκαν μικροβιακές ζυμώσεις με θρεπτικό υπόστρωμα το SCG προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και καροτενοειδών. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παραπάνω μελέτη ήταν τα εξής:

- Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η προεπεξεργασία του SCG με μικροκύματα υπό 400 W και 15 min, με διαλύτη το νερό και επακόλουθη ενζυμική υδρόλυση με συνδυασμό εμπορικών κυτταρινασών, ημικυτταρινασών και πρωτεασών ήταν η πιο αποτελεσματική ως προς τις αποδόσεις υδρόλυσης κυτταρίνης (0,75 g υδρολυθείσας κυτταρίνης/g ολικής κυτταρίνης) και ημικυτταρίνης (0,5 g υδρολυθείσας ημικυτταρίνης/g ολικής ημικυτταρίνης) .
- Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης προεπεξεργασίας το διάλυμα 0,1 M NaOH προσδιορίστηκαν μεγάλες απώλειες στερεού (49% w/w) και πιο συγκεκριμένα τα ποσοστά απωλειών ανήλθαν σε 43,1% w/w ημικυτταρίνης, 26,4% w/w κυτταρίνης και 66,4% w/w πρωτεΐνης.
- Η εφαρμογή υψηλών ισχύων (>600 W) και παρατεταμένων χρόνων παραμονής οδήγησε σε μερική αποδόμηση των σακχάρων και συνεπώς σε μείωση της αποδοτικότητας της επακόλουθης ενζυμικής υδρόλυσης.
- Το στέλεχος ζύμης *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444, κρίθηκε ικανοποιητικό, καθώς μεταβόλισε επαρκώς όλες τις πηγές άνθρακα που εφαρμόστηκαν ως υπόστρωμα ζύμωσης.
- Όσον αφορά τις ζυμώσεις κλειστού τύπου με εμπορικά σάκχαρα, το πιο αποδοτικό υπόστρωμα για την παραγωγή μικροβιακού λίπους ήταν η γλυκόζη όπου η συγκέντρωση των λιπιδίων έφτασε τα 16,3 g/L, ενώ ως προς την παραγωγή καροτενοειδών η μέγιστη συγκέντρωση επιτεύχθηκε με τη χρήση μαννόζης (131,3 μg/g ολικής ξηρής βιομάζας).

- Στις ζυμώσεις ημιδιαλείποντος έργου σε βιοαντίδραστήρα, με θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης ενζυμικό υδρόλυμα SCG, η μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους ίση με 24,0 g/L επιτεύχθηκε ύστερα από 177 h, με αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας 45,8 g/L, και μέγιστη συγκέντρωση βιοχρωστικών ίση με 432,8 μg/g ολικής ξηρής βιομάζας.

Στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκαν ικανοποιητικές συγκεντρώσεις μικροβιακού λίπους σε συνδυασμό με την παραγωγή βιοχρωστικών συγκριτικά με την ευρύτερη βιβλιογραφία. Περεταίρω μελέτη πρέπει να διεξαχθεί με σκοπό την βελτιστοποίηση της βιοδιεργασίας παραγωγής μικροβιακού λίπους και καροτενοειδών, εξετάζοντας διάφορους παράγοντες όπως επίδραση οργανικών και ανόργανων πηγών αζώτου, αναλογία C/N, έντασης φωτός και θερμοκρασίας. Επιπλέον, η ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου βιοδιυλιστηρίου βασισμένου σε απόβλητα SCG για την ανάκτηση φυτικού ελαίου, αντιοξειδωτικών και την παραγωγή μικροβιακού λίπους και καροτενοειδών, χρήζει ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, ειδικά όταν αυτό συνδυαστεί με την πραγματοποίηση τεχνοοικονομικής μελέτης.

6. Βιβλιογραφία

Alexandri, M., Papapostolou, H., Komaitis, M., Stragier, L., Verstraete, W., Danezis, G. P., & Koutinas, A. A. (2016). Evaluation of an integrated biorefinery based on fractionation of spent sulphite liquor for the production of an antioxidant-rich extract, lignosulphonates and succinic acid. *Bioresource Technology*, *214*, 504-513.

Alves, R. C., Rodrigues, F., Nunes, M. A., Vinha, A. F., & Oliveira, M. B. P. (2017). State of the art in coffee processing by-products. In *Handbook of coffee processing by-products* (pp. 1-26). Academic Press.

Amini, N., Haritos, V. S., & Tanksale, A. (2018). Microwave assisted pretreatment of eucalyptus sawdust enhances enzymatic saccharification and maximizes fermentable sugar yield. *Renewable energy*, *127*, 653-660.

Aristizábal-Marulanda, V., Chacón-Perez, Y., & Alzate, C. A. C. (2017). The biorefinery concept for the industrial valorization of coffee processing by-products. In *Handbook of Coffee Processing By-Products* (pp. 63-92). Academic Press.

Bekalo, S. A., & Reinhardt, H. W. (2010). Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. *Materials and structures*, *43*(8), 1049-1060.

Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E., Aggeli, D., Elazzazy, A. M., Baeshen, M. N., & Aggelis, G. (2016). Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Current opinion in Biotechnology*, *37*, 24-35.

Bessada, S. M., C Alves, R., & PP Oliveira, M. B. (2018). Coffee silverskin: A review on potential cosmetic applications. *Cosmetics*, *5*(1), 5.

Binod, P., Satyanagalakshmi, K., Sindhu, R., Janu, K. U., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2012). Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. *Renewable Energy*, *37*(1), 109-116.

Bogdanov, M., Dowhan, W., & Vitrac, H. (2014). Lipids and topological rules governing membrane protein assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1843*(8), 1475-1488.

- Botham, P. A., & Ratledge, C. (1979). A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms. *Microbiology*, 114(2), 361-375.
- Braunwald, T., Schwemmlin, L., Graeff-Hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R., Holmes, W. E., & Claupein, W. (2013). Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6581-6588.
- Bu, X., Sun, L., Shang, F., & Yan, G. (2017). Comparative metabolomics profiling of engineered *Saccharomyces cerevisiae* lead to a strategy that improving β -carotene production by acetate supplementation. *PloS one*, 12(11).
- Cardoso, L. A., Karp, S. G., Vendruscolo, F., Kanno, K. Y., Zoz, L. I., & Carvalho, J. C. (2017). Biotechnological production of carotenoids and their applications in food and pharmaceutical products. In *Carotenoids* (p. 125). InTechOpen.
- Chanakya, H. N., & De Alwis, A. A. P. (2004). Environmental issues and management in primary coffee processing. *Process Safety and Environmental Protection*, 82(4), 291-300.
- Cheng, Y. T., & Yang, C. F. (2016). Using strain *Rhodotorulamucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 61, 270-275.
- Cipolatti, E. P., Remedi, R. D., dos Santos Sá, C., Rodrigues, A. B., Ramos, J. M. G., Burkert, C. A. V., ... & de Medeiros Burkert, J. F. (2019). Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101208.
- Conesa, C., Seguí, L., Laguarda-Miró, N., & Fito, P. (2016). Microwaves as a pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of pineapple industrial waste for bioethanol production. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 203-213.
- Cvetkovic, D., Fiedor, L., Wisniewska-Becker, A., & Markovic, D. (2013). Organization of carotenoids in models of biological membranes: current status of knowledge and research. *Current Analytical Chemistry*, 9(1), 86-98.

- Davies, R. J., & Holdsworth, J. E. (1992). Synthesis of lipids in yeasts: Biochemistry, physiology and production. *Adv. Appl. Lipid Res*, 1(11).
- Echeverria, M. C., & Nuti, M. (2017). Valorisation of the residues of coffee agro-industry: perspectives and limitations. *The Open Waste Management Journal*, 10(1).
- Evans, C. T., & Ratledge, C. (1985). The role of the mitochondrial NAD⁺: isocitrate dehydrogenase in lipid accumulation by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *Canadian journal of microbiology*, 31(9), 845-850.
- Faustino, H., Gil, N., Baptista, C., & Duarte, A. P. (2010). Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. *Molecules*, 15(12), 9308-9322.
- Fickers, P., Benetti, P. H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M. S., & Nicaud, J. M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS yeast research*, 5(6-7), 527-543.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- Franca, A.S. and Oliveira, L.S. (2009). Coffee processing solid wastes: current uses and future perspectives. *Agricultural wastes*, 9, 155-189.
- Freitas, C., Nobre, B., Gouveia, L., Roseiro, J., Reis, A., & da Silva, T. L. (2014). New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch growth. *Process Biochemistry*, 49(4), 554-562.
- Goodwin, T. W. (1993). [29] Biosynthesis of carotenoids: An overview. In *Methods in enzymology* (Vol. 214, pp. 330-340). Academic Press.
- Gruszecki, W. I., & Strzałka, K. (2005). Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1740(2), 108-115.
- Gu, W., An, G. H., & Johnson, E. A. (1997). Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(2), 114-117.

- Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, A., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Preparation of samples for compositional analysis. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, 1617.
- Han, M., Xu, Z. Y., Du, C., Qian, H., & Zhang, W. G. (2016). Effects of nitrogen on the lipid and carotenoid accumulation of oleaginous yeast *Sporidiobolus pararoseus*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39(9), 1425-1433.
- Hannibal, L., Lorquin, J., D'Ortoli, N. A., Garcia, N., Chaintreuil, C., Masson-Boivin, C., ... & Giraud, E. (2000). Isolation and Characterization of Canthaxanthin Biosynthesis Genes from the Photosynthetic Bacterium *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS278. *Journal of bacteriology*, 182(13), 3850-3853.
- Hayman, E. P., Yokoyama, H., Chichester, C. O., & Simpson, K. L. (1974). Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *Journal of bacteriology*, 120(3), 1339-1343.
- Himmel, M. E., Baker, J. O., & Overend, R. P. (1994). *Enzymatic conversion of biomass for fuels production* (pp. 292-324). Washington, DC: American Chemical Society.
- Jackowiak, D., Bassard, D., Pauss, A., & Ribeiro, T. (2011). Optimisation of a microwave pretreatment of wheat straw for methane production. *Bioresource technology*, 102(12), 6750-6756.
- Jin, S., Zhang, G., Zhang, P., Li, F., Wang, S., Fan, S., & Zhou, S. (2016). Microwave assisted alkaline pretreatment to enhance enzymatic saccharification of catalpa sawdust. *Bioresource technology*, 221, 26-30.
- Johnson, E. A., & Lewis, M. J. (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Microbiology*, 115(1), 173-183.
- Karmee, S. K. (2018). A spent coffee grounds based biorefinery for the production of biofuels, biopolymers, antioxidants and biocomposites. *Waste management*, 72, 240-254.
- Kavitha, S., Kannah, R. Y., Kumar, M. D., Preethi, J., & Atabani, A. E. (2020). Biorefinery of spent coffee grounds waste: Viable pathway towards circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 122821.

Komemushi, S., Sakaki, H., Yokoyama, H., & Fujita, T. (1994). Effects of Barium and Other Metals on the Growth of AD-lactic Acid Assimilating Yeast, *Rhodotorula glutinis* No. 21. *JOURNAL OF ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS JAPAN*, 22, 583-583.

Kookos, I. K. (2018). Technoeconomic and environmental assessment of a process for biodiesel production from spent coffee grounds (SCGs). *Resources, Conservation and Recycling*, 134, 156-164.

Kot, A. M., Błażej, S., Kurcz, A., Gientka, I., & Kieliszek, M. (2016). *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(14), 6103-6117.

Ktori, R., Kamaterou, P., & Zabaniotou, A. (2018). Spent coffee grounds valorization through pyrolysis for energy and materials production in the concept of circular economy. *Materials Today: Proceedings*, 5(14), 27582-27588.

Lee, J. J. L., & Chen, W. W. N. (2016). The Production, Regulation, and Extraction of Carotenoids from *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 10(2), 1-2.

Lee, J. J., Chen, L., Cao, B., & Chen, W. N. (2016). Engineering *Rhodospiridium toruloides* with a membrane transporter facilitates production and separation of carotenoids and lipids in a bi-phasic culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(2), 869-877.

Leiva-Candia, D. E., Tsakona, S., Kopsahelis, N., Garcia, I. L., Papanikolaou, S., Dorado, M. P., & Koutinas, A. A. (2015). Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for integrated synthesis of microbial oil and value-added co-products. *Bioresource Technology*, 190, 57-65.

Lie, S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37-41.

Liu, Z., Feist, A. M., Dragone, G., & Mussatto, S. I. (2020). Lipid and carotenoid production from wheat straw hydrolysates by different oleaginous yeasts. *Journal of Cleaner Production*, 249, 119308.

Lopes, N. A., Remedi, R. D., dos Santos Sá, C., Burkert, C. A. V., & de Medeiros Burkert, J. F. (2017). Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *Food Science and Biotechnology*, 26(3), 759-766.

Ma, H., Liu, W. W., Chen, X., Wu, Y. J., & Yu, Z. L. (2009). Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. *Bioresource technology*, 100(3), 1279-1284.

Malisorn, C., & Suntornsuk, W. (2008). Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology*, 99(7), 2281-2287.

Mannazzu, I., Landolfo, S., Da Silva, T. L., & Buzzini, P. (2015). Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(11), 1665-1673.

Manowattana, A., Techapun, C., Watanabe, M., & Chaiyaso, T. (2018). Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol into lipids and carotenoids by an oleaginous red yeast *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 in an airlift bioreactor. *Journal of bioscience and bioengineering*, 125(1), 59-66.

Marcoleta, A., Niklitschek, M., Wozniak, A., Lozano, C., Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2011). Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC microbiology*, 11(1), 190.

Marova, I., Carnecka, M., Haliénova, A., Certik, M., Dvorakova, T., & Haronikova, A. (2012). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, 95, S338-S342.

Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S. (2018). Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. *Bioresource Technology*, 247, 1077-1084.

Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 12.

Mathews, M. M., & Krinsky, N. I. (1965). The relationship between carotenoid pigments and resistance to radiation in non-photosynthetic bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 4(4), 813-817.

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34(1), 1-5.

Mlíčková, K., Roux, E., Athenstaedt, K., d'Andrea, S., Daum, G., Chardot, T., & Nicaud, J. M. (2004). Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), 3918-3924.

Moliné, M., Flores, M. R., Libkind, D., del Carmen Diéguez, M., Farías, M. E., & van Broock, M. (2010). Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(8), 1145-1151.

Moncada, J., & Aristizábal, V. (2016). Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 122-134.

Morgunov, I. G., Solodovnikova, N. Y., Sharyshev, A. A., Kamzolova, S. V., & Finogenova, T. V. (2004). Regulation of NAD⁺-Dependent isocitrate dehydrogenase in the citrate producing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry (Moscow)*, 69(12), 1391-1398.

Müllner H, Daum G. (2004), 'Dynamics of neutral lipid storage in yeast', *Acta Biochim Polonica*, 51, 323-347

Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and recycling*, 66, 45-58.

Mussatto, S. I., Machado, E. M., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 661.

Niu, F. X., Lu, Q., Bu, Y. F., & Liu, J. Z. (2017). Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids: carotenoids and isoprenoid-based biofuels. *Synthetic and systems biotechnology*, 2(3), 167-175.

- Nomanbhay, S. M., Hussain, R., &Palanisamy, K. (2013). Microwave-assisted alkaline pretreatment and microwave assisted enzymatic saccharification of oil palm empty fruit bunch fiber for enhanced fermentable sugar yield. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 3(1), 7.
- Obruca, S., Benesova, P., Kucera, D., Petrik, S., &Marova, I. (2015). Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *Newbiotechnology*, 32(6), 569-574.
- Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., & Syldatk, C. (2016). Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in microbiology*, 7, 1539.
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., & Abalde, J. J. B. T. (2005). Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 96(3), 373-378.
- Panusa, A., Zuurro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., & Petrucci, R. (2013). Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(17), 4162-4168.
- Papageorgiou, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou, M., & Komaitis, M. (2008). Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(16), 7254-7264.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2009). Biotechnological valorisation of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology*, 21(4), 83-87.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(6), 639-654.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1031-1051.

- Petrik, S., Marova, I., Haronikova, A., Kostovova, I., & Breierova, E. (2013). Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production—a comparative screening study. *Annals of microbiology*, 63(4), 1537-1551.
- Petrik, S., Obruča, S., Benešová, P., & Márová, I. (2014). Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. *Biochemical engineering journal*, 90, 307-315.
- Popova, A. V., & Andreeva, A. S. (2013). Carotenoid–lipid interactions. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* (Vol. 17, pp. 215-236). Academic Press.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., & Rengasamy, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), 517-523.
- Ratledge, C. (1991). Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnologica*, 11(5), 429-438.
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 51, 1-52.
- Ravindran, R., Jaiswal, S., Abu-Ghannam, N., & Jaiswal, A. K. (2017). Two-step sequential pretreatment for the enhanced enzymatic hydrolysis of coffee spent waste. *Bioresource technology*, 239, 276-284.
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 46(1), 210-218.
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.
- Singh, A., & Bishnoi, N. R. (2012). Enzymatic hydrolysis optimization of microwave alkali pretreated wheat straw and ethanol production by yeast. *Bioresource technology*, 108, 94-101.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. L. A. P. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, 1617(1), 1-16.

- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2005). Determination of extractives in biomass. *Laboratory analytical procedure (LAP)*, 1617.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.
- Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y., & He, Z. (2019). Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production. *Journal of microbiology and biotechnology*, 29(4), 507-517.
- Tapia, E., Anschau, A., Coradini, A. L., Franco, T. T., & Deckmann, A. C. (2012). Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. *AMB express*, 2(1), 64.
- Torres-Valenzuela, L. S., Ballesteros-Gómez, A., Sanin, A., & Rubio, S. (2019). Valorization of spent coffee grounds by supramolecular solvent extraction. *Separation and Purification Technology*, 228, 115759.
- Tsouko, E., Alexandri, M., Vieira Fernandes, K., Guimarães Freire, D. M., Mallouchos, A., & Koutinas, A. A. (2019). Extraction of phenolic compounds from palm oil processing residues and their application as antioxidants. *Food technology and biotechnology*, 57(1), 29-38.
- Vardon, D. R., Moser, B. R., Zheng, W., Witkin, K., Evangelista, R. L., Strathmann, T. J., ... & Sharma, B. K. (2013). Complete utilization of spent coffee grounds to produce biodiesel, bio-oil, and biochar. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(10), 1286-1294.
- Wei, Y., Li, J., Shi, D., Liu, G., Zhao, Y., & Shimaoka, T. (2017). Environmental challenges impeding the composting of biodegradable municipal solid waste: A critical review. *Resources, Conservation and Recycling*, 122, 51-65.
- Xu, J., & Liu, D. (2017). Exploitation of genus *Rhodospiridium* for microbial lipid production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 54.
- Zhu, Z., Zhang, S., Liu, H., Shen, H., Lin, X., Yang, F., ... & Zhao, Z. K. (2012). A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature communications*, 3(1), 1-12.

Zoz, L., Carvalho, J. C., Soccol, V. T., Casagrande, T. C., & Cardoso, L. (2015). Torularhodin and torulene: bioproduction, properties and prospective applications in food and cosmetics-a review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(2), 278-288.