



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ – ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΒΙΟ-ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Αξιοποίηση αποβλήτων καφέ για την παραγωγή προϊόντων υψηλής
προστιθέμενης αξίας και μεταβολικών προϊόντων

Σταυρούλα Α. Μπαλτουμά

Επιβλέπων Καθηγητής:

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2020**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Αξιοποίηση αποβλήτων καφέ για την παραγωγή προϊόντων υψηλής
προστιθέμενης αξίας και μεταβολικών προϊόντων

“Utilization of coffee waste for the production of high added value products
and metabolic products”

Σταυρούλα Α. Μπαλτουμά

Εξεταστική Επιτροπή:

Κουτίνας Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

Ευαγγελίου Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αξιοποίηση αποβλήτων καφέ για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και μεταβολικών προϊόντων

ΠΜΣ Επεξεργασία, Συντήρηση και Βιοτεχνολογικές Διεργασίες Τροφίμων – Ανάπτυξη Προϊόντων Βιο-οικονομίας

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης ερευνήθηκε η δυνατότητα της αξιοποίησης των στερεών αποβλήτων καφέ (SCG) για το διαχωρισμό συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας και τη βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (BDO) και ακετοΐνης μέσω της ανάπτυξης ενός σύγχρονου βιοδιυλιστηρίου.

Η αξιοποίηση του SCG για την παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων (πρωτεασών, φυτασών, β-γλυκοσιδάσης και κυτταρινάσης) σε συνδυασμό με δύο υποστρώματα, το πίτυρο σίτου και το οργανικό κλάσμα αστικών στερεών απορριμμάτων (OFMSW), μελετήθηκε χρησιμοποιώντας το μύκητα *Aspergillus awamori* σε δύο αναλογίες SCG:πίτυρο και SCG:OFMSW (75:25 και 50:50 κ.β.) με αρχική υγρασία 65 %. Η μέγιστη παραγωγή πρωτεασών (15 U/g) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα SCG:OFMSW στην αναλογία 75:25. Η χρήση SCG:πίτυρο και SCG:OFMSW σε αναλογία 50:50 οδήγησε στη μέγιστη παραγωγή φυτασών (334 U/g) και β-γλυκοσιδάσης (21 U/g) αντίστοιχα. Η εκχύλιση του φυτικού ελαίου με απόδοση 99,2% επιτεύχθηκε με χρήση εξάνιου, ενώ η ανάκτηση των φαινολικών συστατικών επιτεύχθη με υδατικό διάλυμα αιθανόλης (70 % κ.ο.). Η μέγιστη ανάκτηση φαινολικών συστατικών (1 g γραμμοϊσοδύναμα χλωρογενικού οξέος ανά 100 g SCG) επιτεύχθηκε σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:20 και διάρκεια εκχύλισης 20 min.

Η προεπεξεργασία του SCG μέσω αλκαλικής και υδροθερμικής διεργασίας για την αποδόμηση της λιγνοκυτταρινούχας δομής μελετήθηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες και αναλογίες στερεού προς υγρό με σκοπό τη βελτιστοποίηση παραγωγής σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση. Σημαντική απομάκρυνση στερεών παρατηρήθηκε στην περίπτωση της αλκαλικής προεπεξεργασίας με αποτέλεσμα τη μείωση της συνολικής απόδοσης παραγωγής σακχάρων από την ημικυτταρίνη και την κυτταρίνη. Η υδροθερμική επεξεργασία στους 140 °C σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:20 (w/v) και η αξιοποίηση του υγρού κλάσματος της προεπεξεργασίας κατά την ενζυμική υδρόλυση οδήγησαν σε υψηλή συνολική απόδοση μετατροπής κυτταρίνης (65,1%) και ημικυτταρίνης (60,7%) σε μονοσακχαρίτες.

Το πλούσιο σε μονοσακχαρίτες υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα σε κλειστές και ημισυνεχείς ζυμώσεις για παραγωγή BDO και ακετοΐνης. Το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus amyloliquefaciens* 105 αξιολογήθηκε για παραγωγή ακετοΐνης, ωστόσο επιτεύχθηκε μικρή παραγωγή (9,7 g/L). Μέγιστη παραγωγή BDO (73,3 g/L), με παραγωγικότητα (2,33 g/L/h) και απόδοση (0,30 g/g), επιτεύχθηκε από το βακτηριακό στέλεχος *Enterobacter ludwigii* 204 σε ημι-συνεχή ζύμωση.

Επιστημονική περιοχή: Αξιοποίηση αποβλήτου καφέ

Λέξεις κλειδιά: απόβλητο καφέ, ενζυμική υδρόλυση, ζύμωση

Utilization of coffee waste for the production of high added value products and metabolic products

MSc Food Processing, Preservation and Biotechnological Processes – Development of Bio-Economy Products

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Food Engineering and Processing

ABSTRACT

An integrated biorefinery has been developed to exploit the potential of spent coffee grounds (SCG) to produce value-added products (enzymes, antioxidants, oil) acetoin and 2,3-butanediol (BDO).

Initially, SCG with wheat bran and SCG with the organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW) at different ratios (75:25 and 50:50 w/w) were evaluated to produce crude enzymes by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. Maximum proteases production (15 U/g) was obtained at SCG:OFMSW (75:25 w/w). The evaluation of SCG:wheat bran and SCG:OFMSW at ratio of 50:50 (w/w) led to maximum phytase activity (334 U/g) and β -glucosidase activity (21 U/g) respectively. Successive extractions of phenolics and oil were carried out using standard methods. Soxhlet extraction using hexane as solvent led to high oil recover yield of 99.2 %. Antioxidant extraction was carried out using aqueous ethanol solution (70 % v/v). Total phenolic content of 1 g chlorogenic acid equivalent/100 g SCG was reached at solid to liquid ratio of 1:20 after 20 min extraction duration.

Alkaline and liquid hot water (LHW) pretreatments of SCG were studied at different temperatures and solid to liquid ratios to degrade the lignocellulose structure. Significant removal of lignin was achieved under alkaline pretreatment; However, the subsequent enzymatic hydrolysis of pretreated solids resulted in low overall hydrolysis yield of cellulose and hemicellulose. LHW pretreatment at 140 °C followed by enzymatic hydrolysis proved to be a suitable alternative method for efficient hydrolysis of cellulose and hemicellulose. The highest cellulose (65.1%) and hemicellulose (60.7%) yield were obtained via enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated SCG.

SCG hydrolysates were used as the sole carbon source for BDO and acetoin production. Enhanced BDO concentration (73.3 g/L) with conversion yield of 0.30 g/g and productivity of 2.33 g/L/h was achieved in fed-batch fermentation using the bacterial strain *Enterobacter ludwigii* 204. The production of acetoin by *Bacillus amyloliquefaciens* using the SCG hydrolysate led to low final concentration (9.7 g/L). The proposed biorefinery valorizes SCG to produce enzymes, antioxidants, oil and BDO.

Scientific area: Utilization of coffee waste

Keywords: coffee waste, enzyme hydrolysis, fermentation

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου: Επεξεργασία, Συντήρηση και Βιοτεχνολογικές Διεργασίες Τροφίμων – Ανάπτυξη Προϊόντων Βιο-οικονομίας».

Φτάνοντας στο τέλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στο κ. Κουτίνα Απόστολο για την ανάθεση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης, για την καθοδήγηση και συνεργασία, καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ. Παπανικολάου Σεραφείμ και κα. Ευαγγελίου Βασιλική για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την μεταδιδάκτορα Σοφία Μάινα η οποία με βοήθησε με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας και ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει με οτιδήποτε χρειαζόμουν.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που ήταν πάντα στην διάθεσή μου, όποτε τους χρειάστηκα.

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της».

Πίνακας περιεχομένων

ABSTRACT	4
Ευχαριστίες	5
Πίνακας περιεχομένων	7
Συνοπτομογραφίες	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Ανανεώσιμες πρώτες ύλες- Βιοδιυλιστήριο	11
1.2 Λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα	11
1.3 Προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας.....	12
1.4 Απόβλητα καφέ	13
1.5 Τεχνολογίες αξιοποίησης υπολειμμάτων καφέ	16
1.5.1 Εκχύλιση προϊόντων προστιθέμενης αξίας.....	16
1.5.2 Παραγωγή ενζύμων.....	18
1.5.3 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση	19
1.5.4 Βιοδιυλιστήριο.....	19
1.5.5 Άλλες χρήσεις.....	20
1.6 2,3-βουτανοδιόλη και ακετοΐνη	21
1.7 Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης	22
1.7.1 Μικροοργανισμοί.....	23
1.7.2 Υποστρώματα για τη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης	24
2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	25
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
3.1 Πρώτη ύλη.....	26
3.2 Μικροοργανισμοί.....	26
3.2.1 Μύκητας για παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων	26
3.2.2 Βακτήρια για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης.....	26
3.3 Ζύμωση στερεής κατάστασης	27
3.4 Εκχύλιση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.....	28
3.4.1 Φαινολικές ενώσεις.....	28
3.4.2 Φυτικό έλαιο	28
3.4.3 Πρωτεΐνη	28
3.5 Προεπεξεργασία του SCG.....	30
3.5.1 Χημική προεπεξεργασία του SCG με αλκαλικό διάλυμα	30
3.5.2 Υδροθερμική προεπεξεργασία του SCG	31

3.6	Ενζυμική υδρόλυση	31
3.7	Ζύμωση για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης.....	32
3.7.1	Παρασκευή υγρού εμβολίου.....	32
3.7.2	Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης	33
3.7.3	Ζύμωση κλειστής καλλιέργειας για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης	33
3.7.4	Ζύμωση ημι-συνεχούς καλλιέργειας.....	33
3.8	Αναλυτικές μέθοδοι	34
3.8.1	Υγρασία.....	34
3.8.2	Τέφρα	34
3.8.3	Φυτικό έλαιο	34
3.8.3.1	Ποσοτικός προσδιορισμός φυτικού ελαίου	34
3.8.3.2	Προσδιορισμός λιπαρών οξέων του φυτικού ελαίου	35
3.8.4	Πρωτεΐνη	35
3.8.5	Αντιοξειδωτικά	36
3.8.5.1	Προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά.....	36
3.8.5.2	Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	36
3.8.6	Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας	36
3.8.7	Προσδιορισμός των δομικών πολυσακχαριτών και λιγνίνης.....	38
3.8.8	Προσδιορισμός σακχάρων και μεταβολικών προϊόντων.....	40
3.8.9	Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων	40
3.8.10	Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων	41
3.8.11	Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου	42
3.8.12	Προσδιορισμός ολικών στερεών απομάκρυνσης κατά την προεπεξεργασία	42
3.8.13	Προσδιορισμός ποσοστού απομάκρυνσης λιγνίνης, ημικυτταρίνης και κυτταρίνης κατά την προεπεξεργασία	43
3.8.14	Προσδιορισμός ολιγομερών	43
3.8.15	Προσδιορισμός απόδοσης ενζυμικής υδρόλυσης ημικυτταρίνης και κυτταρίνης	43
3.8.16	Προσδιορισμός συνολικής απόδοσης υδρόλυσης ημικυτταρίνης και κυτταρίνης.....	44
3.8.17	Προσδιορισμός βακτηριακής βιομάζας.....	44
3.9	Ισοζύγια μάζας.....	44
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
4.1	Σύσταση αποβλήτων καφέ	45
4.2	Αξιοποίηση αποβλήτων καφέ προς παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων	46
4.3	Εκχύλιση φυτικού ελαίου και φαινολικών συστατικών.....	47

4.3.1	Εκχύλιση φυτικού ελαίου	47
4.3.2	Εκχύλιση φαινολικών συστατικών	48
4.4	Διαχωρισμός πρωτεΐνης	48
4.5	Προεπεξεργασία αποβλήτων καφέ	50
4.5.1	Προεπεξεργασία με αλκαλικό διάλυμα	50
4.5.2	Υδροθερμική προεπεξεργασία	53
4.6	Ενζυμική υδρόλυση	55
4.6.1	Ενζυμική υδρόλυση προεπεξεργασμένου SCG με αλκαλικό διάλυμα.....	55
4.6.2	Ενζυμική υδρόλυση προεπεξεργασμένου SCG με υδροθερμική επεξεργασία.....	58
4.7	Συγκριτική αξιολόγηση προεπεξεργασίας και ενζυμικής υδρόλυσης.....	60
4.8	Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης	62
4.8.1	Ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας.....	62
4.8.2	Ημισυνεχής ζύμωση για παραγωγή ακετοΐνης	64
4.8.3	Ημισυνεχής ζύμωση για παραγωγή BDO.....	64
4.9	Ισοζύγια μάζας προτεινόμενης διεργασίας.....	67
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	69
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72

Συντομογραφίες

ΑΠΥ	Ανανεώσιμες Πρώτων Υλών
BDO	2,3-βουτανοδιόλη
DPPH	2,2-diphenyl-L-picrylhydrazl
FAN	Άζωτο που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες αμινοξέων και πεπτιδίων (Free Amino Nitrogen)
OFMSW	Οργανικό κλάσμα αστικών στερεών απορριμμάτων (Municipal solid wastes)
SCG	Στερεό υπόλειμμα καφέ (Spent Coffee Grounds)
TS	Ολικά στερεά απομάκρυνσης (Total Solids)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ανανεώσιμες πρώτες ύλες- Βιοδιυλιστήριο

Στη σύγχρονη βιομηχανική πρακτική το μεγαλύτερο μέρος των παραγόμενων χημικών προέρχεται από την πετροχημική βιομηχανία. Δεδομένων των οικονομικών και περιβαλλοντικών επιπτώσεων το ερευνητικό ενδιαφέρον σε διεθνές, ευρωπαϊκό αλλά και σε εθνικό επίπεδο έχει στραφεί στην αξιοποίηση ανανεώσιμων πρώτων υλών (ΑΠΥ) μέσω χημικών και βιοτεχνολογικών μεθόδων. Πηγές ΑΠΥ αποτελεί το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων και υπολειμμάτων καθώς και το κλάσμα των υπολειμμάτων της βιομηχανίας τροφίμων.

Η χρήση της υπολειμματικής βιομάζας είναι απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθούν οι στόχοι για την παραγωγή προϊόντων (καυσίμων, χημικών κ.α.) και τη μείωση της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης (Lestinsky et al., 2016). Η ανάπτυξη σύγχρονων βιοδιυλιστηρίων που ενσωματώνουν διεργασίες ανάκτησης προϊόντων προστιθέμενης αξίας και βιομετρατροπής της βιομάζας για παραγωγή καυσίμων, ενέργειας και χημικών αποτελεί σημαντική πρόκληση στην σύγχρονη εποχή.

1.2 Λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα

Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα αποτελεί το πιο άφθονο, ανανεώσιμο και φθινό πόρο στη Γη, αποτελώντας το 50% της παγκόσμιας βιομάζας. Η σύσταση της βιομάζας είναι κατά βάση ίδια και αποτελείται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη, όπου η περιεκτικότητα τους διαφέρει στα διάφορα είδη βιομάζας.

Η κυτταρίνη χαρακτηρίζεται ως γραμμικό ομοπολυμερές το οποίο αποτελείται από μονάδες γλυκόζης συνδεδεμένες με β -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Στη φυσική της μορφή είναι σχετικά ανθεκτική και σταθεροποιημένη. Ωστόσο, μέσω της χρήσης μεθόδων προεπεξεργασίας και κυτταρινολυτικών ενζύμων, η κυτταρίνη μπορεί να διασπαστεί σε γλυκόζη.

Η ημικυτταρίνη είναι ένα ετερογενές πολυμερές αποτελούμενο από πεντόζες (ξυλόζη και αραβινόζη), εξόζες (γλυκόζη, μαννόζη και γαλακτόζη) και οξέα σακχάρων (γλυκουρονικά και γαλακτουρονικά οξέα) (Hendriks and Zeeman, 2009). Η ποικιλία και η ποσότητα εξαρτάται από την πηγή της λιγνοκυτταρινούχας πρώτης ύλης. Δομικά είναι πιο πολύπλοκη από την κυτταρίνη, καθώς αποτελείται από διάφορους τύπους. Εκτός από τη διαφορά στη σύσταση, η ημικυτταρίνη αποτελείται από μικρότερα μήκη αλυσίδων με αρκετές διακλαδώσεις συγκρινόμενη με την κυτταρίνη (Moxley and Zhang, 2007).

Η λιγνίνη είναι ένα σύνθετο διακλαδισμένο αρωματικό πολυμερές το οποίο συνδέεται με τα ινίδια κυτταρίνης και την ημικυτταρίνη. Η λιγνίνη καθίσταται σημαντικό εμπόδιο στην αποικοδόμηση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης λόγω των ακανόνιστων δεσμών και της μη επαναλαμβανόμενης σειράς των συστατικών της. Επομένως, η σύνδεση αυτή της λιγνίνης καθιστά αρκετά ανθεκτικά και άκαμπτα τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά εμποδίζοντας σημαντικά και την ενζυμική αποικοδόμηση τους. Τέλος, όπως και με τα συστατικά της ημικυτταρίνης, η αναλογία των συστατικών της δομής της λιγνίνης ποικίλει ανάλογα με την πηγή της λιγνοκυτταρινούχας ύλης.

1.3 Προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας

Για να θεωρηθεί μία προεπεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας επιτυχής, προϋποθέτει την τήρηση συγκεκριμένων παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν την αύξηση της απόδοσης παραγωγής σακχάρων κατά το στάδιο της υδρόλυσης, την αποφυγή της αποικοδόμησης ή απώλειας υδατανθράκων και την παραγωγή ελαχίστων παραπροϊόντων τα οποία θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν τη μετέπειτα υδρόλυση και ζύμωση (Galbe et al. 2007). Επιπλέον, το κόστος κατανάλωσης ενέργειας και αναλωσίμων (π.χ. οξέα, καυστικά αλκάλια κ.α.) πρέπει να λαμβάνεται υπόψη.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την προεπεξεργασία διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες: φυσικές (άλεση, εξώθηση, μικροκύματα), φυσικοχημικές (έκρηξη ατμού, έκρηξη CO₂, υδροθερμική, υγρό ζεστό νερό), χημικές (οξύ, αλκαλικό ή ιοντικό διάλυμα, οζονόλυση) και βιολογικές. Οι χημικές προεπεξεργασίες χρησιμοποιούν διάφορες χημικές ενώσεις όπως οξέα, καυστικά αλκάλια, υπεροξειδία αλλά και άλλους οργανικούς διαλύτες, συμβάλλοντας έτσι στη διάσπαση των δεσμών λιγνίνης-υδατανθράκων και στην απομάκρυνση αυτών (Balat et al. 2008).

Η χημική και αλκαλική προεπεξεργασία είναι οι πιο δημοφιλείς μέθοδοι για την υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας. Η όξινη υδρόλυση σε ήπιες συνθήκες οδηγεί κυρίως στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης σε μονοσακχαρίτες. Η αποτελεσματική χημική υδρόλυση λαμβάνει χώρα σε υψηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, θερμοκρασίες άνω των 100 °C οδηγούν στο σχηματισμό τοξικών ενώσεων όπως η φουρφουράλη και η 5-υδροξυμεθυλφουρφουράλη που δρουν ως αναστολείς στη μεταγενέστερη ενζυμική και μικροβιακή μετατροπή.

Η αλκαλική προεπεξεργασία βασίζεται στις επιδράσεις της προσθήκης αραιών βάσεων στη βιομάζα. Μία από τις πιο γνωστές αλκαλικές προεπεξεργασίες είναι αυτή της χρήσης

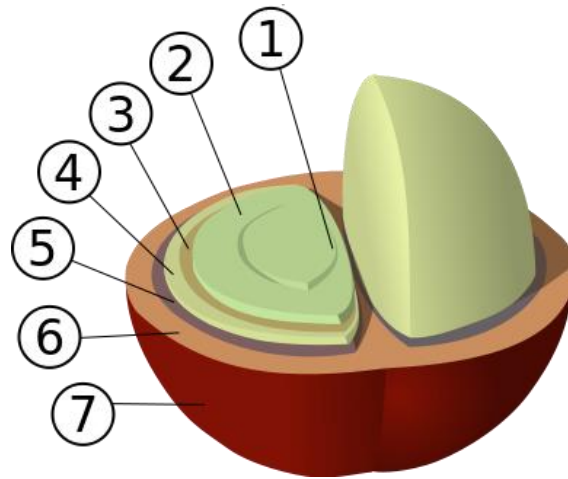
του υδροξειδίου του νατρίου η οποία έχει ως αποτέλεσμα αρκετές δομικές τροποποιήσεις της λιγνοκυτταρινούχας ύλης που είναι επωφελείς για την μετέπειτα ενζυμική υδρόλυση. Οι δεσμοί που συνδέουν το προστατευτικό φράγμα λιγνίνης με ημικυτταρίνη σπάνε. Ανάλογα με τις συνθήκες προεπεξεργασίας, η λιγνίνη αποικοδομείται εν μέρει ή πλήρως και μπορεί να εμφανιστεί αποικοδόμηση του κλάσματος της ημικυτταρίνης. Η προεπεξεργασία με χρήση υδροξειδίου του νατρίου διογκώνει επίσης τα σωματίδια λιγνοκυτταρινούχας ύλης οδηγώντας σε αύξηση της επιφάνειας και μεγαλύτερη προσβασιμότητα στην κυτταρίνη. Επιπροσθέτως, είναι πιθανό να μειωθεί ο βαθμός πολυμερισμού και κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης, αυξάνοντας την ενζυμική απόδοση παραγωγής μονοσακχαριτών (Wang et al., 2018).

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου προεπεξεργασίας εξαρτάται από την περιεκτικότητα της βιομάζας σε λιγνίνη, ημικυτταρίνη, κυτταρίνη καθώς και τις παραμέτρους (θερμοκρασία, αναλογία στερεού προς υγρό, διάρκεια, συγκέντρωση αντιδραστηρίου) της προεπεξεργασίας.

1.4 Απόβλητα καφέ

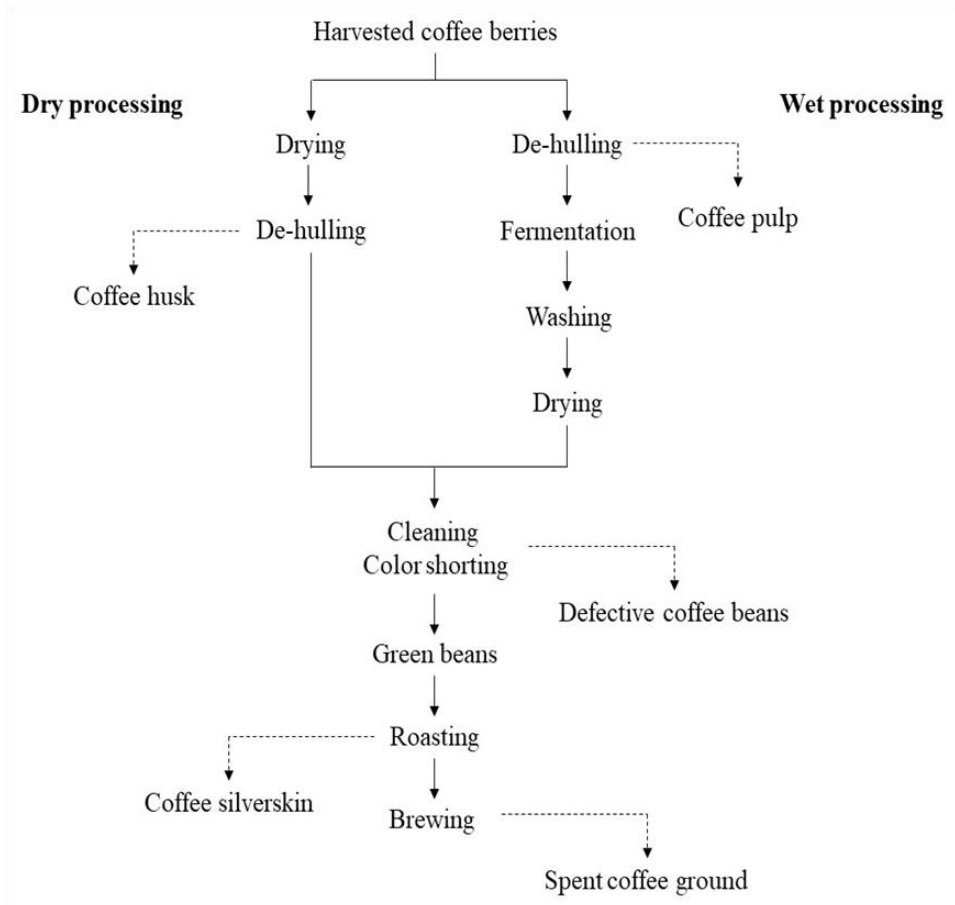
Ο καφές είναι το δεύτερο μεγαλύτερο εμπορεύσιμο αγαθό στον κόσμο παράγοντας μεγάλη ποσότητα αποβλήτων κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του. Αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα γεωργικά προϊόντα παγκοσμίως, για χρήση ως ρόφημα και καλλιεργείται σε περίπου 80 χώρες παγκοσμίως. Οι δύο κύριες ποικιλίες που καλλιεργούνται για εμπορική παραγωγή είναι οι *Coffea arabica* και *Coffea canephora* (Panusa et al., 2013). Συγκεκριμένα 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, συγκεκριμένα το εξωκάρπιο, το μεσοκάρπιο (πούλπα), το σπερμόδεσμα, το ενδοκάρπιο και το περίβλημα/περίσπερμα (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., 2011).



Εικόνα 1 Εσωτερική απεικόνιση του καρπού του καφέ, 1: έμβryo (κύριος καρπός), 2: ενδόσπερμα, 3: σπερμόδεσμα, 4: ενδοκάρπιο, 5: μεμβράνη πηκτίνης, 6: μεσοκάρπιο, 7: περίβλημα/περίσπερμα (Πηγή: <https://commons.wikimedia.org/>)

Όσον αφορά την επεξεργασία του καφέ, οι καρποί που λαμβάνονται μετά την συγκομιδή, επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας ξηρή, υγρή και ημι-ξηρή επεξεργασία (Εικόνα 2). Ο φλοιός του καφέ (Coffee husks-CHs) και η πούλπα του καφέ (Coffee pulp-CP), μαζί με τους ελαττωματικούς κόκκους, λαμβάνονται σαν στερεό υπόλειμμα μετά την αποφλοιώση των καρπών του καφέ. Ανάλογα με τη μέθοδο επεξεργασίας τα στερεά υπολείμματα έχουν διαφορετικές ορολογίες: πούλπα ή φλοιός (Pandey et al., 2000). Η πούλπα του καφέ είναι το παραπροϊόν που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια της υγρής επεξεργασίας του καφέ και αντιστοιχεί στο 29% του ολόκληρου κόκκου του καφέ, ενώ οι φλοιοί προκύπτουν από την ξηρή επεξεργασία και αποτελούν το 12% του κόκκου του καφέ (Murthy and Naidu, 2012a). Η ξηρή μέθοδος, που χρησιμοποιείται συνήθως για το Robusta, είναι τεχνολογικά απλούστερη σε σύγκριση με την υγρή μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται γενικά για κόκκους καφέ Arabica. Το περισπέρμιο (Coffee silverskin-CS) είναι το λεπτό περίβλημα του κόκκου του καφέ που παράγεται κατά το ψήσιμο του καφέ (Mussato et al., 2011a). Το στερεό υπόλειμμα μετά την εκχύλιση του καφέ (Spent coffee ground - SCG), μαζί με το CS αποτελούν τις κύριες ροές αποβλήτων της βιομηχανίας καφέ (Mata et al., 2017). Υπολογίζεται ότι 650 kg αποβλήτων SCG παράγονται από 1 τόνο πράσινων καρπών καφέ (Pfluger et al., 1975). Σύμφωνα με το International Coffee Organization (2017/2018), 9,5 εκατομμύρια τόνοι καφέ παράχθηκαν κατά την περίοδο 2017/2018. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το 50% της παγκόσμιας παραγωγής καφέ χρησιμοποιείται για την παρασκευή διαλυτού καφέ, περίπου 3 τόνοι αποβλήτων SCG παρήχθησαν κατά την περίοδο 2017/2018.



Εικόνα 2 Μέθοδοι επεξεργασίας του καφέ και παραγόμενα παραπροϊόντα (προσαρμογή από Alves et al., 2017 και Franca and Oliveira, 2019)

Το SCG είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, πρωτεΐνες, δομικούς πολυσακχαρίτες (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη), λιγνίνη και φυτικό έλαιο. Συγκεκριμένα, το SCG χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη (33%), κυτταρίνη (8,6-15,3%) και ημικυτταρίνη (36%). Η περιεκτικότητα του SCG σε πρωτεΐνη κυμαίνεται μεταξύ 6,7% και 13,7%. Επιπλέον, το SCG χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικό έλαιο και φαινολικές ενώσεις. Η σύσταση των συστατικών αυτών ποικίλλει καθώς εξαρτάται άμεσα από την ποικιλία του καφέ (Ballesteros et al., 2014).

Καθώς η παγκόσμια παραγωγή καφέ αυξάνεται λόγω της υψηλής κατανάλωσης, αντίστοιχα η ποσότητα SCG αυξάνεται ραγδαία παγκοσμίως. Η απόρριψη των SCG αποτελεί σοβαρό περιβαλλοντικό πρόβλημα λόγω της τοξικότητάς τους και της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε οργανική ύλη. Μία από τις πιο συνηθισμένες πρακτικές διάθεσης των SCG είναι η υγειονομική ταφή. Οι χώροι υγειονομικής ταφής είναι γνωστοί για τη μεγάλη συμβολή στα αέρια του φαινομένου του θερμοκηπίου, λόγω της περιεκτικότητάς σε οργανικό άνθρακα που μετατρέπεται σε αναερόβιες συνθήκες κυρίως σε μεθάνιο.

Γενικότερα τα απόβλητα των τροφίμων και συγκεκριμένα του καφέ προκαλούν αρκετά προβλήματα στη διαχείριση των αποβλήτων λόγω των οργανικών ουσιών που βιοδιασπώνται υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη ρύπανση του εδάφους, των υδάτων και του αέρα.

Άλλες πρακτικές διάθεσης των SCG που ακολουθούνται είναι η χρήση ως πρόσθετο λιπασμάτων, η παραγωγή ενέργειας μέσω καύσης και η ενσωμάτωση σε ζωοτροφές. Η ενσωμάτωση του SCG σε ζωοτροφές έχει εφαρμοστεί με περιορισμό λόγω της τοξικής δραστηριότητας των τανινών σε υψηλές συγκεντρώσεις (Scully et al., 2016). Επιπλέον, η χρήση τους ως λίπασμα δεν συνιστάται εξαιτίας του υψηλού περιεχομένου του SCG σε φαιολικές ενώσεις όπως η καφεΐνη, οι τανίνες και οι πολυφαινόλες (Obruca et al., 2014).

Η υψηλή περιεκτικότητα του SCG σε υδατάνθρακες, λιπαρές ύλες και πρωτεΐνες, καθιστά το απόβλητο ως μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη για την ανάκτηση και παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας στα πλαίσια ενός βιοδιυλιστηρίου παίζοντας σημαντικό ρόλο σε διάφορες βιομηχανίες και εμπορικούς κλάδους, όπως τα τρόφιμα, φάρμακα ή καλλυντικά. Η αξιοποίηση των SCG δεν αντιπροσωπεύει μόνο μια θεωρητικά οικονομικά εφικτή διαδικασία αλλά και μια φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση για την μείωση των παραγόμενων αποβλήτων.

1.5 Τεχνολογίες αξιοποίησης υπολειμμάτων καφέ

1.5.1 Εκχύλιση προϊόντων προστιθέμενης αξίας

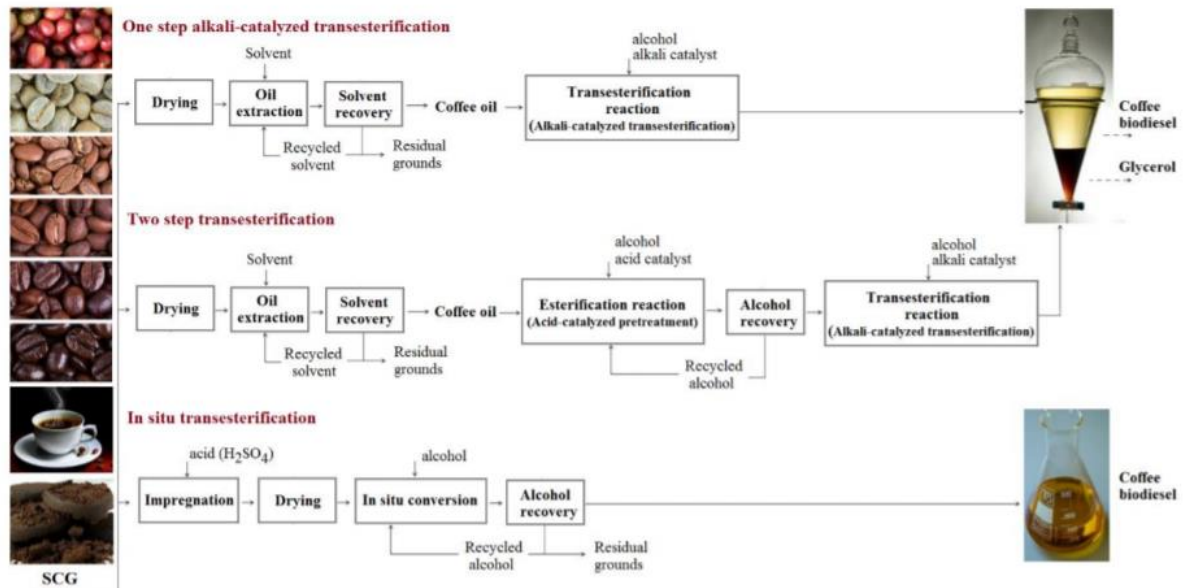
Η ανάκτηση ή παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας από το SCG (φυσικά αντιοξειδωτικά, βιταμίνες, ένζυμα, λιπίδια, πρωτεΐνες, χρωστικές ουσίες) δύναται να αποτελέσει σημαντική διέξοδο εμπορικής αξιοποίησης στη φαρμακευτική βιομηχανία, στη βιομηχανία καλλυντικών και στη βιομηχανία τροφίμων.

Η ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων αποτελεί μια πολύ ενδιαφέρουσα προσέγγιση αξιοποίησης του SCG. Το SCG χρησιμοποιείται ως πολύτιμη πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών και ειδικότερα για την ανάκτηση των φαιολικών ενώσεων, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω ως συμπληρώματα διατροφής, για τρόφιμα, για υγειονομική περίθαλψη και για εφαρμογές φαρμακευτικών προϊόντων (Mussatto et al., 2011b, Bravo et al., 2012). Επιπλέον, οι φαιολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των ευεργετικών τους επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου, όπως μια προστατευτική δράση κατά των χρόνιων ασθενειών (καταρράκτη, εκφυλισμό του σακχαρώδη διαβήτη, καρκίνο και καρδιαγγειακές παθήσεις) τα οποία

αποδίδονται στην αντιοξειδωτική τους δράση. Εκχυλίσματα από SCG έχουν παρουσιάσει αντικαρκινικές και αντι-αλλεργικές ιδιότητες, οι οποίες σχετίζονται με την παρουσία των φαινολικών ενώσεων όπως το χλωρογενικό οξύ στη σύνθεσή τους (Panusa et al., 2013). Η εξαγωγή αντιοξειδωτικών φαινολικών ενώσεων από το SCG μπορεί να θεωρηθεί ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση για τη λήψη αυτών των σημαντικών βιομηχανικών συστατικών από μια τόσο χαμηλού κόστους πρώτη ύλη (Mussatto et al., 2011a).

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του SCG σε φυτικό έλαιο, πολλές μελέτες εστιάζουν στην ανάκτηση των φυτικών ελαίων και την εστεροποίηση τους προς παραγωγή βιοντίζελ. Η εφαρμογή του φυτικού ελαίου σε δερματολογικά σκευάσματα έχει επίσης μελετηθεί από τους Marto et al. (2016). Η αξιοποίηση του φυτικού ελαίου για παραγωγή πολύ-υδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων και χρωστικών μέσω μικροβιακών ζυμώσεων έχει επίσης μελετηθεί (Cruz et al., 2014; Obruca et al., 2014; Obruca et al., 2010). Η εκχύλιση του φυτικού ελαίου από το SCG γίνεται μέσω της συμβατικής εκχύλισης, της εκχύλισης με Soxhlet και της υπερκρίσιμης εκχύλισης. Στη συμβατική εκχύλιση οι κόκκοι καφέ αναμιγνύονται με εξάνιο ή διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια αναδεύονται έντονα και μεταφέρονται σε διαχωριστική χοάνη. Η οργανική στιβάδα διαχωρίζεται και εξατμίζεται υπό μειωμένη πίεση για να ληφθεί το φυτικό έλαιο. Από την άλλη πλευρά η εκχύλιση Soxhlet έχει βρεθεί πιο αποτελεσματική από τη συμβατική διαδικασία εκχύλισης. Ο κύριος περιορισμός τέτοιων μεθόδων είναι η χρήση πτητικών οργανικών διαλυτών, οι οποίοι είναι επιβλαβείς για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία γεγονός που καθιστά απαραίτητη την ανάπτυξη μεθόδων πράσινης εκχύλισης του φυτικού ελαίου. Ως εναλλακτική πράσινη μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα ($scCO_2$) για την εξαγωγή του φυτικού ελαίου από το SCG (Calixto et al., 2011).

Το φυτικό έλαιο του SCG μετά την εκχύλιση μετατρέπεται σε βιοντίζελ με τη χρήση χημικών και βιοκαταλυτικών μεθόδων (Εικόνα 3). Οι πιο γνωστοί καταλύτες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή βιοντίζελ μέσω μετεστεροποίησης είναι τα καυστικά αλκάλια KOH και NaOH, ενώ όταν υπάρχουν ελεύθερα λιπαρά οξέα στο φυτικό έλαιο απαιτείται χρήση των οξέων H_2SO_4 και HCl. Η μετεστεροποίηση του ελαίου από το SCG έχει πραγματοποιηθεί με χρήση NaOH (Oliveira et al., 2009) ή KOH (Kondamudi et al., 2008). Η σύνθεση του βιοντίζελ μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας καταλυτική διαδικασία δύο σταδίων (Haile, 2014). Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες όπου αρχικά έγινε εστεροποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων με χρήση οξέος και το μείγμα πλούσιο σε τριγλυκερίδια που προέκυψε μετεστεροποιήθηκε σε βιοντίζελ (Haile, 2014).



Εικόνα 3 Αξιοποίηση του φυτικού ελαίου του SCG για παραγωγή βιοντίζελ (Blinová, et al., 2017)

Επιπλέον, το φυτικό έλαιο που εξάγεται από τα απόβλητα καφέ μπορεί να σαπωνοποιηθεί και να εξουδετερωθεί για να σχηματίσει ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες για τη σύνθεση ειδικών χημικών ουσιών, όπως βινυλεστέρες λιπαρών οξέων, εστέρες λιπαρών οξέων με ασκορβικό οξύ μεταξύ άλλων παραγώγων (Rufford et al., 2008, Plaza et al., 2012, Obruca et al., 2014).

Η αξιοποίηση του φυτικού ελαίου για παραγωγή πολυ-(υδροξυ-αλκανοϊκών) εστέρων και βιογενών χρωστικών ουσιών μέσω μικροβιακών ζυμώνσεων έχει επίσης μελετηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία (Cruz et al., 2014; Obruca et al., 2014; Obruca et al., 2010).

1.5.2 Παραγωγή ενζύμων

Η αξιοποίηση των αποβλήτων του καφέ για την παραγωγή ενζύμων έχει μελετηθεί σε ζυμώσεις στερεής κατάστασης. Η πούλπα του καφέ χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή πολυγαλακτουρονάσης μέσω ζύμωσης στερεής κατάστασης με τον *Aspergillus niger* Thiegem (Frómeta et al., 2020). Μέγιστη παραγωγή πολυγαλακτουρονάσης (60 U/mL) σημειώθηκε σε συνθήκες υγρασίας 60% και pH 5,5 κατά τη διάρκεια της 7^{ης} ημέρας ζύμωσης.

Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί απόβλητα βιομηχανίας καφέ σε συνδυασμό με άλλα απόβλητα ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή α-αμυλάσης. Συγκεκριμένα μίγμα πούλπας και φλοιού κερασιών αξιοποιήθηκε για την παραγωγή α-αμυλάσης από το στέλεχος

Nerrospona crassa (Ashok et al., 2000). Υπό συνθήκες υγρασίας 60%, pH 4,5, θερμοκρασία 27 °C, χρόνος ζύμωσης (5 ημέρες) και προεπεξεργασία με ατμό, το μυκητιακό στέλεχος *N. crassa* παρήγαγε 7084 U/g ξηρού υποστρώματος και 6342 U/g ξηρού υποστρώματος α-αμυλάσης σε πολύ καφέ και απόβλητα μικτού καφέ αντίστοιχα (Murthy and Naidu, 2009).

1.5.3 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση

Οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές στον τομέα της διαχείρισης βιομηχανικών υπολειμμάτων προάγουν την αειφόρο ανάπτυξη της οικονομίας στην χώρα. Το εμπόδιο που αφορά τα παραπροϊόντα επεξεργασίας τροφίμων, είναι η προεπεξεργασία για την παραγωγή πλούσιου σε σάκχαρα υδρόλυμα που δύναται να αξιοποιηθεί για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων (Mussatto et al., 2011b).

Τα απόβλητα καφέ δεδομένου της υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες αποτελούν ιδανική πρώτη ύλη για παραγωγή βιοαιθανόλης (Mussatto et al., 2011a,b, Choi et al., 2012, Tehrani et al., 2015, Gurram et al., 2016). Αρχικά η λιγνοκυτταρινούχα πρώτη ύλη προεπεξεργάζεται ώστε να ληφθούν τα ελεύθερα σάκχαρα. Η υδρόλυση αυτή πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας μεθόδους που καταλύονται από οξύ, βάση αλλά και ένζυμα. Η περαιτέρω μικροβιακή μετατροπή προς παραγωγή βιοαιθανόλης έχει μελετηθεί με τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (Mussatto et al. 2011b).

Λόγω της παρουσίας σακχάρων, πρωτεϊνών, λιγνίνης, κυτταρίνης και ημικυτταρίνης στα SCG έχει μελετηθεί η μικροβιακή μετατροπή τους σε χρωστικές. Συγκεκριμένα υδρολυμένο απόβλητο καφέ έχει καταναλώθηκε ως υπόστρωμα για την παραγωγή καροτενοειδών (Obruca et al., 2015). Η παραγωγή βιογενών χρωστικών με τη χρήση υδρολυμάτων από απόβλητα καφέ έχει μελετηθεί από τους Petrik et al., 2014. Μέγιστη παραγωγή χρωστικών (12,59 mg/L) παρατηρήθηκε από το μικροβιακό στέλεχος *Sporobolomyces roseus* σε υδρόλυμα SCG.

1.5.4 Βιοδιωλιστήριο

Χρησιμοποιώντας προηγμένες χημικές και βιοτεχνολογικές μεθόδους, τα απόβλητα καφέ μπορούν να μετατραπούν σε διάφορα βιοκαύσιμα, όπως, βιοντίζελ, αιθανόλη, βιοέλαιο και βιοαέριο. Συγκεκριμένα στα πλαίσια του βιοδιωλιστηρίου, έχει εξεταστεί η παραγωγή βιοντίζελ, η οποία προκύπτει από εκχύλιση του ελαίου του SCG και μετεστεροποίηση του ελαίου. Το σημαντικότερο είναι πως το βιοντίζελ από τα απόβλητα του καφέ περιέχει φυσικά αντιοξειδωτικά και φαινολικά, τα οποία αποτρέπουν την οξείδωση του κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά του (Kondamudi et al., 2008). Αυτό

έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους παραγωγής και διάθεσης, καθώς η χρήση πρόσθετων εμπορικών αντιοξειδωτικών για τη σταθεροποίηση του βιοντίζελ δεν είναι απαραίτητη.

Υπάρχουν αρκετές δυνατότητες για τη μετατροπή του SCG σε καύσιμα. Με την εξαγωγή του φυτικού ελαίου από το SCG, η βιομάζα που απομένει είναι πρώτη ύλη για παραγωγή βιο-ελαίου και αιθανόλης. Επιπλέον, το SCG χωρίς φυτικό έλαιο αφού υδρολυθεί, παραλαμβάνεται και χρησιμοποιείται ως θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών καθώς είναι πλούσιο σε ελεύθερα σάκχαρα. Αντίστοιχα, τα έλαια που περιέχονται ενδοκυτταρικά στην μικροβιακή μάζα μπορούν να μετατραπούν σε βιοντίζελ. Τέλος, η γλυκερόλη που παράγεται κατά την παρασκευή βιοντίζελ μπορεί να μετατραπεί με χρήση λιπάσης για την παρασκευή δομημένων τρι-, δι- και μονο-γλυκεριδίων και από την άλλη πλευρά το ακατέργαστο υποπροϊόν γλυκερίνης μπορεί να αξιοποιηθεί για παραγωγή βιο-ελαίου και βιοϋδρογόνου (Obruca et al., 2015).

Στα πλαίσια της ανάπτυξης βιοδιυλιστηρίου έχει εξεταστεί η παραγωγή βιοντίζελ και η παραγωγή καυσίμων με την μορφή στερεών καυσίμων (pellets) από το SCG (Kondamudi et al., 2008; Karmee, 2018). Επιπλέον έχει μελετηθεί η παραγωγή βιοντίζελ και εδαφοβελτιωτικού όπως και η συμπαραγωγή βιοντίζελ και βιοαιθανόλης (Kwon et al., 2013; Rocha et al., 2014). Τέλος, έχουν γίνει μελέτες για τη δυνατότητα του *Halomonas halophila* να παράγει πολύ(υδροξυ-αλκανοϊκούς) εστέρες από ζυμώσιμα σάκχαρα που προέρχονται από SCGs. (Kovalcik et al., 2018).

1.5.5 Άλλες χρήσεις

Το SCG έχει αξιολογηθεί για τη χρήση του ως λίπασμα καθώς αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη πηγή θρεπτικών συστατικών που θα μπορούσε να βελτιώσει τη δομή του εδάφους, τον αερισμό και τη βελτίωση της παραγωγής αγροτικών προϊόντων. Ωστόσο, η χρήση του SCG στη γεωργία ως συμπλήρωμα θρεπτικών ουσιών απαιτεί παραπάνω επιστημονικά δεδομένα.

Άξιο τονισμού είναι πως το SCG θεωρείται πολύτιμο υλικό για τη διαδικασία κομποστοποίησης λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων των θρεπτικών συστατικών και της αναλογίας άνθρακα/αζώτου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η άμεση εφαρμογή του SCG σε αστικά εδάφη μειώνει σημαντικά την ανάπτυξη των φυτών (Hardgrove and Livesley, 2016). Αντιθέτως, υπάρχουν αναφορές ότι το κομποστοποιημένο SCG θα έπρεπε να εφαρμοστεί στο έδαφος αντί για φρέσκο, προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη

ενίσχυση/ενεργοποίηση του εδάφους, καθώς και να αυξηθεί η πρόσληψη θρεπτικών ουσιών από τα καλλιεργημένα φυτά (Low et al., 2015).

Επιπλέον, έχει εξεταστεί η χρήση του SCG ως συστατικό τροφίμων και η εφαρμογή του σε προϊόντα αρτοποιίας. Μελέτες έδειξαν ότι το SCG είναι μια φυσική πηγή αντιοξειδωτικών, αδιάλυτων ινών, βασικών αμινοξέων, χαμηλών γλυκαιμικών σακχάρων, ανθεκτικών στη θερμική επεξεργασία τροφίμων και της διαδικασίας πέψης (Martinez-Saez et al., 2017). Ακόμα έχει διερευνηθεί η χρήση του SCG ως προσροφητικό για την απομάκρυνση βαφών, βαρέων μετάλλων και ρύπων (Anastopoulos et al., 2017). Συγκεκριμένα διάφορα βαρέα μέταλλα όπως Cd (II), Cu (II), Pb (II), Cr (VI), Ni (II) και Zn (II) μπορούν να απομακρυνθούν με τη χρήση αποβλήτων καφέ, καθώς έχουν χρησιμοποιηθεί κόκκοι καφέ επεξεργασμένοι πρώτα με υδροξείδιο του νατρίου ως βιοαπορροφητικό για την απομάκρυνση του Cu (II) από υδατικά διαλύματα. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι λειτουργικές ομάδες καρβοξυλίου και υδροξυλίου που υπάρχουν στα απόβλητα καφέ είναι υπεύθυνες για την απομόνωση του χαλκού (Davila-Guzman et al., 2013).

1.6 2,3-βουτανοδιόλη και ακετοΐνη

Η 2,3-βουτανοδιόλη (BDO) είναι ένα προϊόν προστιθέμενης αξίας το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης πληθώρας εφαρμογών της στη βιομηχανία (Celinska and Grajek, 2009). Η BDO απαντάται σε τρεις ισομερείς μορφές: (2R, 3R) -BDO (levo- ή D -), (2S, 3S) -BDO (dextro- ή L -) και (2R, 3S) -BDO (meso-). Η BDO χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικό γεύσης λόγω της βουτυρώδους γεύσης που προσδίδει (Bartowsky and Henschke, 2004) και η μετατροπή της σε 1,3-βουταδιένιο χρησιμοποιείται στην παραγωγή ελαστικών. Επιπλέον, λόγω της βακτηριοστατικής δράσης της χρησιμοποιείται ως συντηρητικό. Μια ακόμα χρήση της είναι ως υγρό πρόσθετο στα καύσιμα, αλλά και ως διαλύτης στη σύνθεση ρητινών (Celinska and Grajek, 2009). Τέλος, η BDO καθώς και τα παράγωγα της παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών όπως η παραγωγή εκτυπωτικών μελανιών, καπνογόνων, πλαστικών καθώς επίσης αρωμάτων και φαρμακευτικών σκευασμάτων (Garg and Jain, 1995).

Η BDO παράγεται μέσω χημικής είτε βιοτεχνολογικής παραγωγής. Η συνήθης πρακτική για την παραγωγή της BDO είναι μέσω της χημικής μετατροπής του βουτενίου. Λόγω των περιβαλλοντικών επιπτώσεων, της χαμηλής απόδοσης μετατροπής, του υψηλού κόστους και της χαμηλής ασφάλειας σε εφαρμογές τροφίμων και καλλυντικών έχουν γίνει εναλλακτικές

μέθοδοι παραγωγής BDO μέσω βιοτεχνολογικής μετατροπής αξιοποιώντας παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων και λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα.

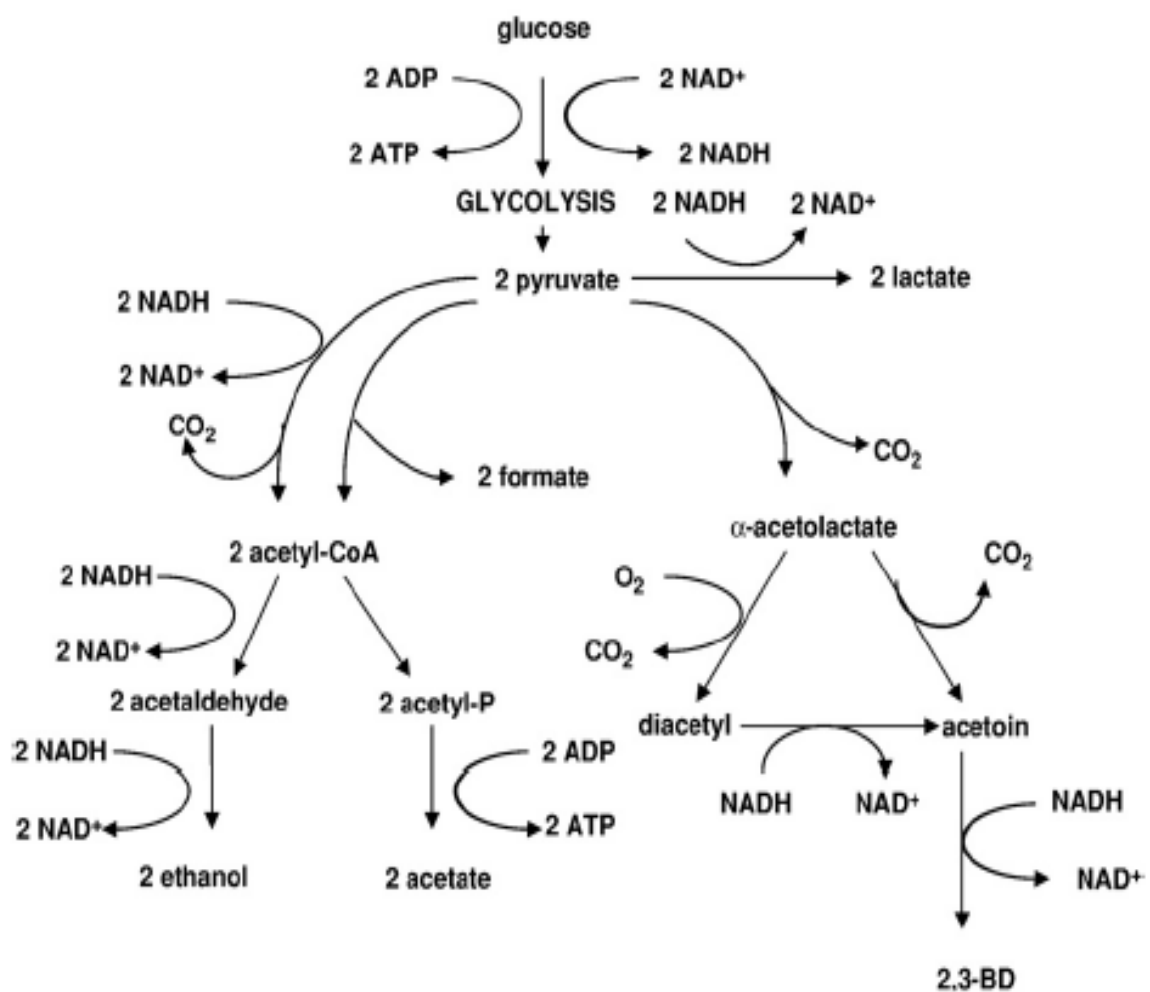
Η ακετοΐνη είναι μία από τις 30 πιο ελπιδοφόρες χημικές ουσίες στην εποχή της βιοοικονομίας που παράγονται από σάκχαρα μέσω ζύμωσης σύμφωνα με το Υπουργείο Ενέργειας των ΗΠΑ. Η ακετοΐνη απαντάται σε δυο χειρόμορφα εναντιομερή, το S- (dextro) και το R- (levo). Η ακετοΐνη είναι ένα κιτρινωπό υγρό με μυρωδιά γιαουρτιού και γεύση λιπαρού κρεμώδους βουτύρου με ευρύ φάσμα εφαρμογών (Cui et al., 2018). Χρησιμοποιείται κυρίως σε τρόφιμα ως ενισχυτικό γεύσης και ως συστατικό στη σύνθεση γεύσεων φράουλας, βατόμουρου, βανίλιας, βουτύρου, καρύδας, καφέ και φρούτων. Λόγω του μέτριου σημείου βρασμού (148°C σε 1 atm), η ακετοΐνη χρησιμοποιείται ως πρόσθετα στο τσιγάρο. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία καλλυντικών ως αρωματικοί παράγοντες και ως πρόδρομος για τη σύνθεση χημικών ενώσεων. Ως βιοδραστική ένωση, έχει μεγάλες δυνατότητες στους τομείς της μικροβιολογίας, της βοτανικής και της γεωργίας (Xiao and Lu, 2014).

1.7 Βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης

Η βιοτεχνολογική παραγωγή της BDO και της ακετοΐνης στηρίζεται κυρίως σε μικροβιακές ζυμώσεις με χρήση διαφόρων υποστρωμάτων. Μία ποικιλία μονοσακχαριτών (εξόζες ή πεντόζες) μπορούν να ζυμωθούν προς παραγωγή BDO (Syu, 2001). Ως πηγή άνθρακα των ζυμώσεων συνήθως χρησιμοποιείται γλυκόζη ή σακχαρόζη (Jansen et al., 1984). Ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής παραγόμενης BDO ανά γραμμάριο καταναλισκόμενης γλυκόζης είναι 0.5 g/g (Jansen et al., 1984; Mccall and Georgi, 1954).

Το μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης της BDO από γλυκόζη απεικονίζεται στο Διάγραμμα 1. Αρχικά οι μονοσακχαρίτες μεταβολίζονται από τα βακτήρια σε πυροσταφυλικό. Το πυροσταφυλικό σχηματίζεται από την γλυκόζη μέσω της πορείας της γλυκόλυσης (οδός Embden-Meyerhof-Parnas), ενώ στην περίπτωση των πεντοζών το πυροσταφυλικό σχηματίζεται μέσω συνδυασμού του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών και της οδού Embden-Meyerhof-Parnas (Jansen et al., 1984). Ο σχηματισμός πυροσταφυλικού οδηγεί στην παραγωγή BDO αλλά και σε μίγμα παραπροϊόντων όπως οξικό, γαλακτικό, μυρμηκικό και ηλεκτρικό οξύ καθώς επίσης αιθανόλης και ακετοΐνης. Για τη βιοσύνθεση της BDO από το πυροσταφυλικό εμπλέκονται τρία βασικά ένζυμα, η συνθετάση του α-ακετογαλακτικού, η αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού και η αφυδρογονάση της 2,3-βουτανοδιόλης (Ji et al., 2011). Τα κύρια ένζυμα για την σύνθεση

της ακετοΐνης είναι τα 2-ακετογαλακτασυνθάση (ALS) και 2-ακετογαλακτική αποκαρβοξυλάση (ALDC), το οποίο μετατρέπει 2 γραμμομόρια πυροσταφυλικού σε 1 γραμμομόριο ακετοΐνης. Με την δράση της BDO αφυδρογονάσης (BDH), η ακετοΐνη μετατρέπεται σε BDO και η BDH βοηθά στην μετατροπή του διακετυλίου σε ακετοΐνη. Η τελική συγκέντρωση της BDO και της ακετοΐνης καθώς και των παραπροϊόντων εξαρτάται από το μικροοργανισμό και τις συνθήκες της εκάστοτε ζύμωσης (Celińska and Grajek, 2009).



Διάγραμμα 1 Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής BDO και ακετοΐνης (Celińska & Grajek 2009)

1.7.1 Μικροοργανισμοί

Οι κύριοι μικροοργανισμοί που παράγουν BDO μέσω μικροβιακών ζυμώσεων είναι στελέχη βακτηρίων. Τα είδη που ανήκουν στο γένος *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* και

Serratia θεωρούνται οι πιο υποσχόμενοι για τη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης. Άλλα βακτηριακά στελέχη όπως τα *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus Subtilis*, *Brevibacillus brevis* S1, *Corynebacterium glutamicum*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Klebsiella terrigena*, *Streptococcus faecalis* (Mallonee and Speckman, 1988), *Enterobacter cloacae* (Saha and Bothast, 1999), *Bacillus licheniformis* (Perego et al., 2000), *Bacillus amyloliquefaciens* (Alam et al., 1990), *Aerobacter indologenes* (Mickelson and Werkman, 1938), *Rhizobacterium Pseudomonas chlororaphis* O6 (Cho et al., 2008) και *Chlamydomonas perigranulata* (Celińska and Grajek, 2009) έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία για παραγωγή BDO.

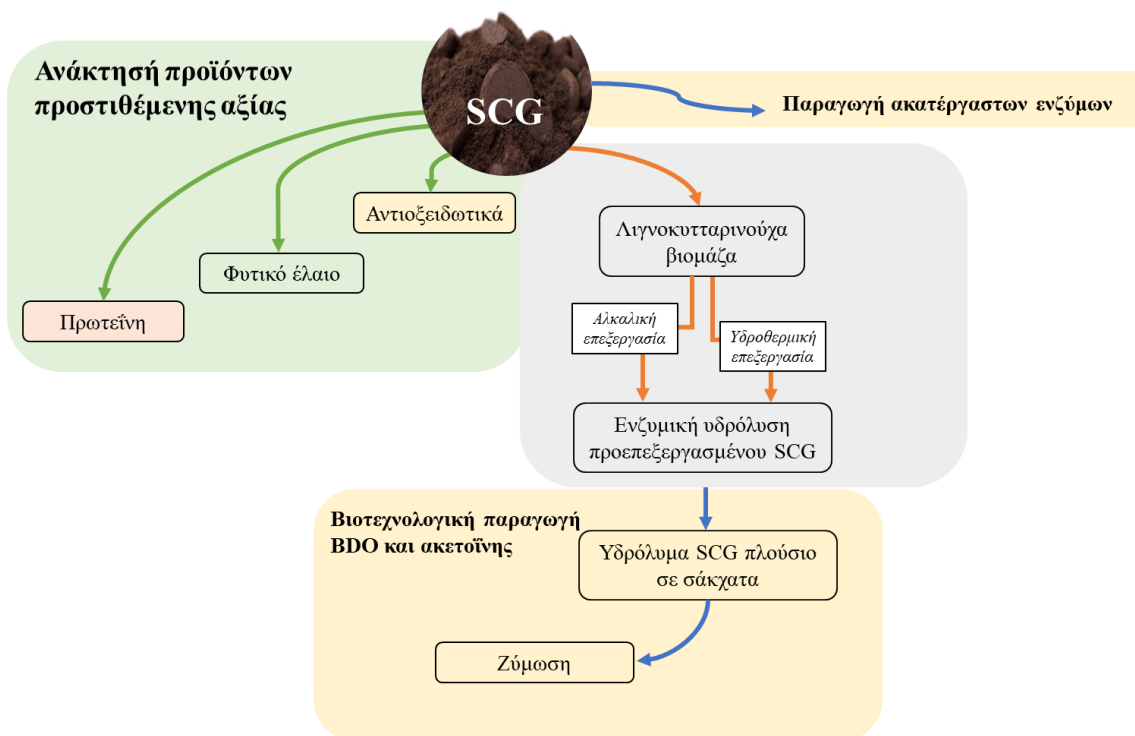
Τα πιο γνωστά είδη που παράγουν ακετοΐνη ανήκουν στο γένος *Bacillus* (Celińska and Grajek, 2009). Γενικά, τα παραγόμενα ισομερή των BDO και ακετοΐνης εξαρτώνται από τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται. Γενικά, ένα μείγμα δύο στερεοϊσομερών BDO (meso και L-) σχηματίζεται από στελέχη *Klebsiella* και *Enterobacter*, ενώ ένα μείγμα meso- και D- παράγεται από τα *Bacillus* (Celińska and Grajek, 2009). Τα στελέχη του παραγωγού ακετοΐνης συσσωρεύουν κυρίως το (R) –ισομερές (Xiao and Xu 2007).

1.7.2 Υποστρώματα για τη βιοτεχνολογική παραγωγή της 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης

Βασικό κριτήριο για την παραγωγή της BDO και ακετοΐνης αποτελεί το κόστος του υποστρώματος, γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη χρήση φθηνών πρώτων υλών. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες πηγές άνθρακα για τη βιοτεχνολογική τους παραγωγή όπως εξόζες και πεντόζες (γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, λακτόζη και σακχαρόζη), μη κυτταρινούχα και κυτταρινούχα υποστρώματα. Ιδανική λύση αποτελεί η βιομετατροπή των αποβλήτων όπως γλυκερόλη, ορός γάλακτος ή γεωργικά υπολείμματα και της περίσσειας βιομάζας όπως προϊόντα υδρόλυσης ξύλου (Celinska and Grajek, 2009).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι η αξιοποίηση των στερεών αποβλήτων καφέ (SCG) για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας και η βιοτεχνολογική παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης μέσω του σχεδιασμού ενός σύγχρονου βιοδιωλιστηρίου. Αρχικά, το SCG σε συνδυασμό με OFMSW χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων. Στη συνέχεια ανακτήθηκαν τα προϊόντα προστιθέμενης αξίας (φαινολικές ενώσεις και φυτικό έλαιο) από το SCG. Το υπολειπόμενο στερεό προεπεξεργάστηκε μέσω αλκαλικής και υδροθερμικής διεργασίας για τη διάσπαση και αποδόμηση της λιγνοκυτταρινούχας δομής. Τα στερεά προεπεξεργασμένα υπολείμματα υδρολύθηκαν ενζυμικά για την παραγωγή υδρολύματος πλούσιου σε σάκχαρα. Το πλούσιο σε μονοσακχαρίτες υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα σε κλειστές και ημισυνεχείς ζυμώσεις για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης (BDO) και ακετοΐνης (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2 Πειραματική πορεία της μελέτης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πρώτη ύλη

Τα στερεά απόβλητα καφέ μετά την εκχύλιση (SCG) που χρησιμοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη συλλέχθηκαν από χώρο εστίασης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και ανήκουν στην ποικιλία Robusta. Το SCG λαμβάνεται αμέσως μετά την εκχύλιση του καφέ, σε νωπή μορφή, έπειτα ακολουθεί ξήρανση 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 ανάλυση και αξιοποίηση.

3.2 Μικροοργανισμοί

3.2.1 Μύκητας για παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων

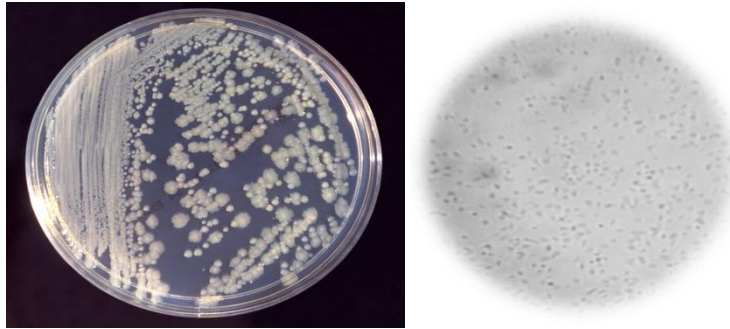
Το στέλεχος *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων στις ζυμώσεις στερεής κατάστασης. Το στέλεχος του μύκητα διατηρείται στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό μορφή σπορίων σε γυάλινα φιαλίδια με άμμο στους 4 °C.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, ο μύκητας ενυδατώθηκε και μέσω διαδοχικών αραιώσεων και επίστρωσης ανανεώθηκε σε καλλιέργειες στερεής μορφής. Έπειτα από επώαση στους 30 °C τα ανεπτυγμένα σπόρια του μύκητα παραλήφθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια με γλυκερόλη στους -80 °C.

Για την προετοιμασία του εμβολιαστικού υλικού, κωνικές των 250 mL πληρωμένες με 100 mL θρεπτικό υλικό με σύσταση: 2% άγαρ, 2% πίτυρο σίτου και 3% ηλιάλευρο εμβολιάστηκαν με ένα φιαλίδιο με τα σπόρια και επώαστηκαν για 5 ημέρες στους 30 °C.

3.2.2 Βακτήρια για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης

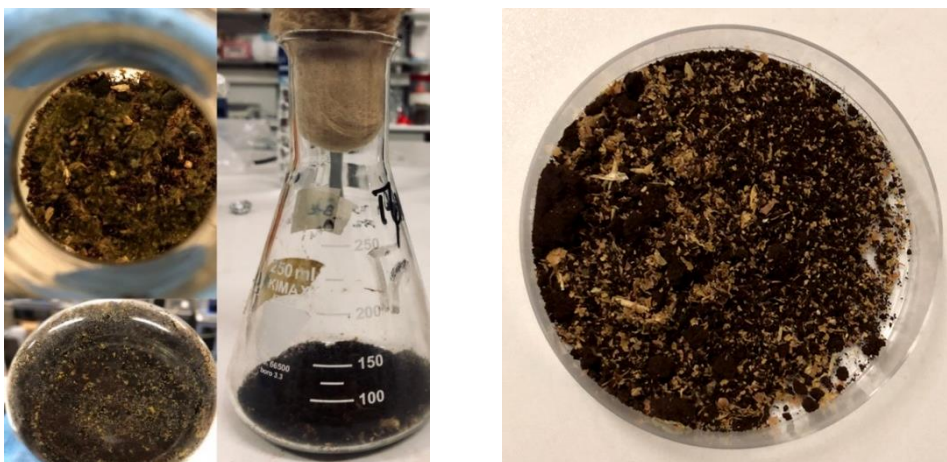
Τα βακτηριακά στελέχη *Enterobacter ludwigii* 204, *Klebsiella michiganensis* 207 και *Bacillus amyloliquefaciens* 105 χρησιμοποιήθηκαν για παραγωγή BDO (Εικόνα 4). Τα βακτηριακά στελέχη ανήκουν στην τράπεζα του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμη και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και διατηρούνται στους -80 °C με υγρό θρεπτικό μέσο



Εικόνα 4: Βακτηριακά στελέχη για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

3.3 Ζύμωση στερεάς κατάστασης

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL στις οποίες προστέθηκαν συνολικά 5g στερεού SCG με πίτυρο και SCG με αστικά απόβλητα σε δύο διαφορετικές αναλογίες 50:50 και 75:25 (κ.β.) (Εικόνα 5). Ακολουθούσε ο εμβολιασμός με εναιώρημα σπορίων του μύκητα. Για τη δημιουργία του εναιωρήματος χρησιμοποιήθηκαν 50 mL απιονισμένο νερό και Tween 90 (0,01% v/v) για κάθε κωνική με τον ανεπτυγμένο μύκητα, ακολουθούμενη από έντονη ανάδευση με αποστειρωμένα μικρά γυαλικά σφαιρίδια, με σκοπό την ομοιόμορφη διασπορά των σπορίων του μύκητα. Η ποσότητα του εμβολίου για κάθε κωνική φιάλη ζύμωσης στερεάς κατάστασης αντιστοιχούσε σε 10^6 - 10^8 CFU (Koutinas et al., 2001), γεγονός που επιβεβαιώθηκε με άμεση μικροσκοπική μέτρηση μικροβιακών κυττάρων με τη χρήση αιματοκυτομέτρου Thomas και η ποσότητα του καθορίστηκε για επίτευξη υγρασίας 65%. Μετά τον εμβολιασμό οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 30 °C. Όλα τα υλικά, σκεύη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν στους 120 °C για 20 min.



Εικόνα 5: Ζύμωση στερεάς κατάστασης

3.4 Εκχύλιση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας

3.4.1 Φαινολικές ενώσεις

Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για χρονικό διάστημα 20 min χρησιμοποιώντας λιοφιλωμένο δείγμα 5 g και υδατικό διάλυμα αιθανόλης (70%, κ.ο.) σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:20 (w/v). Με το πέρας της εκχύλισης, τα φαινολικά εκχυλίσματα φιλτράρονται για να διαχωριστεί το στερεό κλάσμα και εξατμίζονται υπό κενό (Rotary evaporator, BUCHI, R-114) στους 40 °C. Έπειτα οι φαινολικές ενώσεις παραλαμβάνονται με 10 mL μεθανόλη και αποθηκεύονται στους -20 °C για περαιτέρω ανάλυση.

3.4.2 Φυτικό έλαιο

Η εκχύλιση του φυτικού ελαίου του SCG πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλυτών διαφορετικής πολικότητας (εξάνιο, προπανάλη και αιθανικός αιθυλεστέρας) σε αναλογία στερεού:υγρού 1:20 (w/v) υπό ανάδευση για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας του χρόνου εκχύλισης, το μίγμα διηθείται για το διαχωρισμό του διαλύτη από το στερεό. Στη συνέχεια ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό στους 60 °C με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα κενού (Rotary evaporator, BUCHI, R-114). Η απόδοση φυτικού ελαίου (Y , g oil/100 g SCGs) και η απόδοση ανάκτησης φυτικού ελαίου (R_Y , %) υπολογίστηκαν βάσει τις εξισώσεις 1 και 2.

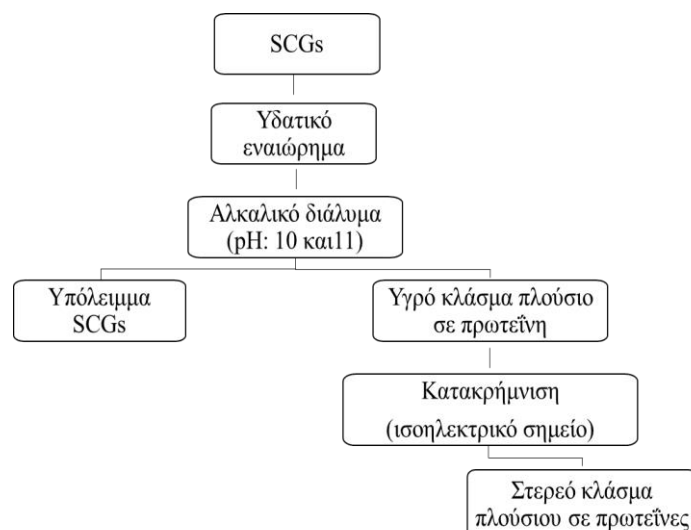
$$Y = \left(W_o / W_{SCG} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$R_Y = \left(W_o / W_s \right) \times 100 \quad (2)$$

όπου W_o (g) το βάρος του φυτικού ελαίου που εκχυλίστηκε, W_{SCG} (g) η ποσότητα του SCG και W_s η ποσότητα φυτικού ελαίου που εκχυλίστηκε από το SCG με τη μέθοδο Soxhlet.

3.4.3 Πρωτεΐνη

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε μέσω της διαλυτοποίησής τους σε υδατικό διάλυμα για την μεταβολή της διαλυτότητας τους ακολουθούμενη από καταβύθιση τους με ρύθμιση του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 3: Πειραματική πορεία για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών του SCG

Κατά το στάδιο της διαλυτοποίησης ακολούθησαν διεργασίες με χρήση διαλυμάτων, θερμική ή/και μηχανική επεξεργασία όπως αναφέρονται στον Πίνακα 1. Αναλυτικότερα συγκεκριμένη ποσότητα SCG χωρίς φαινολικά αναμείχθηκε με απιονισμένο νερό για τη δημιουργία υδατικού εναιωρήματος. Ακολούθησε η αλκαλική διεργασία του υδατικού εναιωρήματος σύμφωνα με τον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Διεργασίες διαχωρισμού πρωτεϊνών

	Αναλογία στερεού υγρού	Αλκαλική επεξεργασία	Κατακρήμιση
Διεργασία 1	1:20 (w/v)	Ρύθμιση του pH στο 10 ή στο 11 με την προσθήκη διαλύματος NaOH 5 M και ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 h.	Ρύθμιση του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο (3,5) με την προσθήκη διαλύματος HCl 5 M
Διεργασία 2α	1:20 (w/v)	Ρύθμιση του pH στο 10 με την προσθήκη διαλύματος NaOH 5 M και ανάδευση στους 50 °C για 3 h.	Ρύθμιση του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο (3,5) με προσθήκη διαλύματος HCl 5 M
Διεργασία 2β			Φιλτράρισμα και ρύθμιση του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο (3,5) με προσθήκη διαλύματος HCl 5 M
Διεργασία 3	1:6 (w/v)	Διαλυτοποίηση του στερεού σε διάλυμα NaOH 0,1 M και ανάδευση στους 60 °C για 1 h.	Ρύθμιση του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο (3,5) με προσθήκη διαλύματος HCl 5 M

Μετά το πέρας της αλκαλικής διεργασίας, το στερεό κλάσμα διαχωρίστηκε από το υγρό με φυγοκέντριση για 15 min, στις 9.000 rpm και στους 4 °C (Hettich Universal 320). Το στερεό υπόλειμμα SCG ξηράθηκε στους 80 °C και το υπερκείμενο συλλέχθηκε για τη μετέπειτα

διαδικασία κατακρήμνισης. Μετά τη διαδικασία κατακρήμνισης τα διαλύματα παρέμειναν στο ψυγείο για 12 h ώστε να ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός. Ακολούθησε φυγοκέντριση για το διαχωρισμό του πρωτεϊνικού κλάσματος και υγρού κλάσματος για 15 min, στις 9.000 rpm και στους 4 °C (Hettich Universal 320). Το πρωτεϊνικό κλάσμα συλλέχθηκε και λυοφιλιώθηκε.

Το ποσοστό πρωτεΐνης στο στερεό κλάσμα που διαχωρίστηκε από το SCG ως προς τη συνολική ποσότητα του στερεού κλάσματος πλούσιου σε πρωτεΐνες (Y_{ppe} , %) εκφράστηκε βάσει της σχέσης:

$$Y_{protein\ purity\ in\ extract} = Y_{ppe} = \frac{Protein\ in\ crude\ protein-rich\ extract\ (g)}{Crude\ protein-rich\ extract\ (g)} \times 100$$

Το ποσοστό των πρωτεϊνών στο στερεό κλάσμα που διαχωρίστηκε από το SCG ως προς την συνολική ποσότητα πρωτεϊνών που περιέχεται στο αρχικό στερεό κλάσμα SCG (Y_{ep} , %) εκφράστηκε με χρήση της σχέσης:

$$Y_{extracted\ protein} = Y_{ep} = \frac{Protein\ in\ crude\ protein-rich\ extract\ (g)}{Protein\ in\ SCG\ (g)} \times 100$$

3.5 Προεπεξεργασία του SCG

3.5.1 Χημική προεπεξεργασία του SCG με αλκαλικό διάλυμα

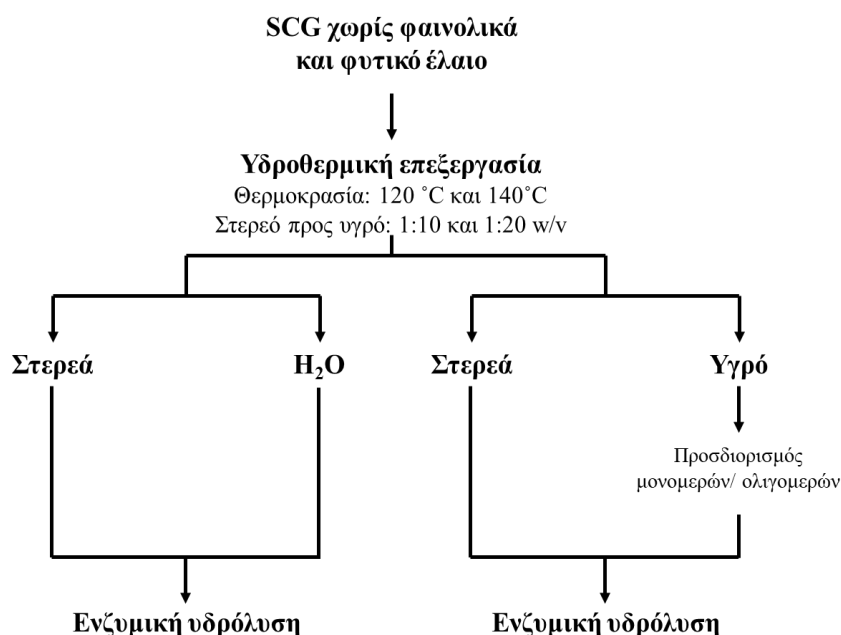
Η χημική προεπεξεργασία με τη χρήση αλκαλικού διαλύματος NaOH μελετήθηκε έτσι ώστε να αποδομηθεί η πολύπλοκη λιγνοκυτταρινική δομή του εξεταζόμενου υλικού, με σκοπό να βελτιωθεί η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης του επόμενου σταδίου. Κατά τη χημική προεπεξεργασία εξετάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις NaOH (0,5-2% w/v) σε δύο αναλογίες στερεού υγρού (1:10 και 1:20 w/v). Αναλυτικά η πορεία της πειραματικής διεργασίας παρουσιάζεται παρακάτω.

Σε φιάλες Duran των 250 mL τοποθετήθηκε SCG χωρίς φυτικό έλαιο και προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα διαλύματος NaOH για την επίτευξη αναλογίας στερεού προς υγρού 1:10 και 1:20 (w/v). Συγκεκριμένα για την αναλογία 1:10 προστέθηκαν 100 mL διαλύματος 0,5, 1 και 2% w/v NaOH και αντίστοιχα για την αναλογία 1:20 προστέθηκαν 200 mL 0,5, 1 και 2% w/v NaOH. Οι φιάλες στη συνέχεια αναδεύτηκαν χειροκίνητα για την πλήρη διασπορά του διαλύματος στο στερεό και ακολούθως τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο για 60 min στους 121 °C. Μετά το πέρας της υδρόλυσης, έγινε διαχωρισμός των δυο κλασμάτων με τη χρήση σίτας (0,2 μm). Τα στερεά που προέκυψαν ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό για την εξουδετέρωση του υπολειπόμενου NaOH. Ακολούθησε ξήρανση στους 80 °C για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό τους.

Οι συγκεντρώσεις NaOH 0,5 και 1% w/v σε αναλογία στερεού υγρού 1:10 εξετάστηκαν και σε θερμοκρασία 90 °C ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία.

3.5.2 Υδροθερμική προεπεξεργασία του SCG

Η υδροθερμική προεπεξεργασία μελετήθηκε με σκοπό την διαλυτοποίηση του SCG, την αλλαγή της σύνθεσης των κυτταρικών τοιχωμάτων και την απελευθέρωση σακχάρων (κυρίως μονομερή ημικυτταρίνης). Κατά την υδροθερμική προεπεξεργασία εξετάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες (120 °C και 140 °C) σε δύο αναλογίες στερεού υγρού (1:10 και 1:20 w/v). Σε φιάλες Duran των 250 mL τοποθετήθηκε SCG χωρίς φυτικό έλαιο και προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα απιονισμένου H₂O για την επίτευξη αναλογίας στερεού προς υγρού 1:10 και 1:20 w/v. Οι φιάλες στη συνέχεια αναδεύτηκαν χειροκίνητα για την πλήρη διασπορά του διαλύματος στο στερεό και ακολούθως τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο για 60 min στους 140 °C και 120 °C. Μετά το πέρας της υδρόλυσης, έγινε διαχωρισμός των δυο κλασμάτων με τη χρήση διηθητικού ηθμού. Ακολούθησε ξήρανση του στερεού κλάσματος στους 80 °C για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό τους. Ενώ το υγρό κλάσμα μελετήθηκε ως προς τα παραγόμενα μονομερή και ολιγομερή και χρησιμοποιήθηκε στην μετέπειτα ενζυμική υδρόλυση όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4.



Διάγραμμα 4 Πειραματική πορεία υδροθερμικής επεξεργασίας

3.6 Ενζυμική υδρόλυση

Μετά το στάδιο της αλκαλικής και της υδροθερμικής προεπεξεργασίας πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση του προεπεξεργασμένου στερεού. Ο πρωταρχικός

στόχος της ενζυμικής υδρόλυσης ήταν η μετατροπή του μεγαλύτερου ποσοστού της ημικυτταρίνης και κυτταρίνης σε μονομερή σάκχαρα με τη χρήση εμπορικών ενζύμων. Στις ενζυμικές υδρολύσεις των στερεών που προέκυψαν από την υδροθερμική προεπεξεργασία, χρησιμοποιήθηκε το υγρό της υδροθερμικής προεπεξεργασίας για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης για σύγκριση. Επιπλέον, SCG άνευ φυτικού ελαίου και φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση των επιμέρους μεθόδων προεπεξεργασίας. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης ήταν το Viscozyme® L (Sigma-Aldrich) και η β-γλυκοσιδάση (Sigma-Aldrich).

Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε McCartney όγκου 25 mL όπου τοποθετήθηκε συγκεκριμένη ποσότητα προεπεξεργασμένου SCG και κατάλληλη ποσότητα H₂O με ρυθμισμένο pH στο 5 για την επίτευξη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L. Αντίστοιχα στα δείγματα της υδροθερμικής προεπεξεργασίας ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη χρήση απιονισμένου H₂O είτε το υγρό κλάσμα της υδροθερμικής επεξεργασίας. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μL/g SCG Viscozyme® L και μετά το πέρας 5 h 0,005 U/g SCG β-γλυκοσιδάση. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη ανάδευση (Hotplate stirrer MSH-20D, Witeg, Germany) στους 50 °C και 150 rpm για 96 h. Ανά 24 h παραλήφθηκε ασηπτικά δείγμα για την ανάλυση των σακχάρων. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε και σε στερεό SCG άνευ φυτικού ελαίου για σύγκριση.

3.7 Ζύμωση για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

3.7.1 Παρασκευή υγρού εμβολίου

Η παρασκευή του υγρού εμβολίου πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες με 50 mL θρεπτικό υλικό. Για τα βακτηριακά στελέχη *E. ludwigii* 204 και *K. michiganensis* 207 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Trypticase Soy Broth (TSB). Για το βακτηριακό στέλεχος *B. amyloliquefaciens* 105 το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την προκαλλιέργεια είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L): 10 γλυκόζη, 10 βακτηριακή πεπτόνη, 5 εκχύλισμα ζύμης και 5 NaCl. Οι κωνικές εμβολιάστηκαν με ένα φιαλίδιο που περιείχε το εναιώρημα κυττάρων και επώαστηκαν για 15-16 h υπό ανάδευση στις 180 rpm και σε θερμοκρασία 30 °C για τα βακτηριακά στελέχη *E. ludwigii* 204 και *K. michiganensis* 207 και 40 °C για το βακτηριακό στέλεχος *B. amyloliquefaciens* 105. Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί.

3.7.2 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης

Για τα βακτηριακά στελέχη *E. ludwigii* 204 και *K. michiganensis* 207 η σύσταση του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε στις ζυμώσεις ήταν η εξής (σε g/L): 7,2 (NH₄)₂SO₄, 6 (NH₄)HPO₄, 0,4 KOH, 0,5 EDTA, 0,3 MgSO₄·7H₂O, 0,09 CaCl₂·2H₂O, 0,02 FeSO₄·7H₂O, 0,007 ZnSO₄·7H₂O, 0,003 MnSO₄·7H₂O. Για το βακτηριακό στέλεχος *B. amyloliquefaciens* 105 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό με την ακόλουθη σύσταση (σε g/L): 0,5 KH₂PO₄, 2 K₂HPO₄, 0,3 KCl, 0,0252 MnSO₄·H₂O. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν μείγμα από εμπορική γλυκόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη και μαννόζη με αρχική συγκέντρωση 40 g/L. Η αναλογία των μονομερών σακχάρων ήταν 0.25:0.25:0.04:0.47 με σκοπό την επίτευξη αντίστοιχης αναλογίας σακχάρων με το ενζυμικό υδρόλυμα. Το ενζυμικό υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε επίσης ως πηγή άνθρακα σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας. Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν πριν την χρήση τους στους 121 °C για 20 min, ενώ το ενζυμικό υδρόλυμα αποστειρώθηκε με τη χρήση φίλτρου (0,2 μm). Η πηγή αζώτου καθώς και η πηγή αλάτων αποστειρώθηκαν ξεχωριστά και προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο υπό ασηπτικές συνθήκες.

3.7.3 Ζύμωση κλειστής καλλιέργειας για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης

Οι κλειστές ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες 500 mL πληρωμένες με 100 mL θρεπτικό υλικό και 10% v/v εμβολίου. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση στις 180 rpm, σε θερμοκρασία 30 °C για τα βακτηριακά στελέχη *E. ludwigii* 204 και *K. michiganensis* 207 και 40 °C για το βακτηριακό στέλεχος *B. amyloliquefaciens* 105 και pH 6,3. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν και τα αποτελέσματα παραστούν τη μέση τιμή.

3.7.4 Ζύμωση ημι-συνεχούς καλλιέργειας

Οι ζυμώσεις ημι-συνεχούς καλλιέργειας πραγματοποιήθηκαν για παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης με τα βακτηριακά στελέχη *E. ludwigii* 204 και *B. amyloliquefaciens* 105 αντίστοιχα. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα όγκου 2 L (Labfors 4, Infors HT, Switzerland) με ενεργό όγκο 0,7 L (Εικόνα 6). Οι συνθήκες ζύμωσης για την παραγωγή ακετοΐνης με το βακτηριακό στέλεχος *P. amylolyticus* 105 ήταν 800 rpm, 1 nvm, pH 6,3 και θερμοκρασία 40 °C, ενώ για την παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με το βακτηριακό στέλεχος *E. ludwigii* 204 ήταν 400 rpm, 1 nvm, pH 6,3 και θερμοκρασία 33,3 °C. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου ήταν ίδια όπως αναφέρεται παραπάνω (Ενότητα 3.7.2). Πυκνό διάλυμα συμπυκνωμένου υδρολύματος (400 g/L) προστέθηκε όταν η

συγκέντρωση των σακχάρων στο υγρό της ζύμωσης ήταν περίπου 10 g/L με σκοπό να διατηρείται σε αυτό το επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης.



Εικόνα 6: Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα όγκου 2 L (Labfors 4, Infors HT, Switzerland)

3.8 Αναλυτικές μέθοδοι

3.8.1 Υγρασία

Το ποσοστό υγρασίας προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο AOAC 952.10 (AOAC, 2000) στους 115 °C για 24 ώρες. Το δείγμα μεταφέρεται σε αφυγραντήρα μέχρι σταθερού βάρους και ζυγίζεται.

3.8.2 Τέφρα

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.

3.8.3 Φυτικό έλαιο

3.8.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός φυτικού ελαίου

Το φυτικό έλαιο του αποβλήτου προσδιορίστηκε μέσω εκχύλισης με διάταξη Soxhlet χρησιμοποιώντας πετρελαϊκό αιθέρα (AACC, 1983). Μετά την εξάτμιση του διαλύτη υπό

κενό, τα φυτικά έλαια μεταφέρθηκαν σε αφυγραντήρα μέχρι σταθερού βάρους για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

3.8.3.2 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων του φυτικού ελαίου

Η ανάλυση της σύστασης των λιπαρών οξέων πραγματοποιείται με την μετατροπή του λίπους σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAMES) μέσω αντίδρασης μεθυλεστεροποίησης με μεθοξειδίου του νατρίου ακολουθούμενη από αντίδραση εστεροποίησης με μεθανόλη (HCl ως καταλύτης). Ο προσδιορισμός των FAMES έγινε με αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography-GC) Fisons 8060 εξοπλισμένη με στήλη chrompack (60 m × 0.32 mm) και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας με ήλιο ως φέρον αέριο (2 mL/min). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ξεκίνησε από τους 50 °C, ανέβηκε στους 200 °C με ρυθμό 25 °C/min (1 min), έπειτα αυξήθηκε στους 240 °C με ρυθμό 3 °C/min και τελικά αυξήθηκε στους 250 °C με ρυθμό 25 °C/min όπου παρέμεινε για 3 min. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ήταν 250 °C. Τα FAMES ταυτοποιήθηκαν με αναφορά σε πρότυπο (Supelco® 37 Component FAME Mix, 10 mg/mL σε CH₂Cl₂, 47885-U, Merck).

3.8.4 Πρωτεΐνη

Η μέθοδος Kjeldahl χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης. Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία στάδια: της καύσης, της απόσταξης και της τιτλοδότησης και στηρίζεται στην ολική μετατροπή των αζωτούχων συστατικών σε αμμωνιακά άλατα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται η μονάδα απόσταξης Kjeltex TM 8100 (Foss, Denmark). Ξηρό δείγμα γνωστού βάρους (0,5 g) εισάγεται σε σωλήνα πέψης με 25 mL H₂SO₄ και καταλύτη που περιέχει 3,5 g K₂SO₄ και Cu₂SO₄. Αντίστοιχη πορεία ακολουθείται για το τυφλό δείγμα. Η πέψη των δειγμάτων διεξάγεται στους 430 °C για 1 h και ακολούθως οι σωλήνες ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί το στάδιο της απόσταξης με αυτόματη προσθήκη 30 mL H₂O και 100 mL NaOH (40%, w/v). Τέλος, ακολουθεί η τιτλοδότηση βορικού αμμωνίου με πρότυπο διάλυμα HCl και δείκτη μίγμα ερυθρού του μεθυλίου και πράσινου της βρωμοκρεσόλης. Ο όγκος του πρότυπου διαλύματος HCl που καταναλώνεται μετατρέπεται σε συνολική ποσότητα αζώτου σύμφωνα με τη Σχέση 3.

$$\text{Αζωτο(\%)} = \frac{(\text{mL δειγματος} - \text{mL τυφλού}) \times N \times 1,4007}{\text{mg δειγματος}} \quad (3)$$

όπου N η κανονικότητα του διαλύματος HCl 0,1N, mL δείγματος η κατανάλωση σε mL 0,1N HCl για την τιτλοδότηση του δείγματος, mL τυφλού η κατανάλωση σε mL 0,1N HCl για την τιτλοδότηση του τυφλού δείγματος, mg δείγματος το βάρος του δείγματος.

Το ποσοστό πρωτεΐνης υπολογίζεται βάση της Σχέσης 4.

$$\text{Πρωτεΐνη (\%)} = \text{Άζωτο(\%)} \times 6,25 \quad (4)$$

όπου 6,25 ο συντελεστής μετατροπής του οργανικού αζώτου σε πρωτεΐνες.

3.8.5 Αντιοξειδωτικά

3.8.5.1 Προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά

Το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις των μεθανολικών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu σύμφωνα με τους Faustino et al. 2010 και Papageorgiou et al. 2008. Εν συντομία, 50 μL κατάλληλα αραιωμένου φαινολικού εκχυλίσματος, 450 mL απιονισμένο νερό and 2,5 mL 0,2N Folin-Ciocalteu αντιδραστήριο μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, αναδεύονται για 1 λεπτό και αφήνονται σε κατάσταση ηρεμίας για 8 min. Εν συνεχεία, 2 mL διαλύματος Na_2CO_3 (75 g/L) προστίθενται στο μίγμα και αφήνονται σε συνθήκες σκότους για 90 min και σε θερμοκρασία δωματίου. Οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε μήκος κύματος 765 nm με την χρήση φασματοφωτομέτρου διπλής δέσμης UV-Vis (Jasco V-530) και ενσωματώθηκαν σε καμπύλη βαθμονόμησης χλωρογενικού οξέος. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg ισοδυνάμων χλωρογενικού οξέος ανά g ξηρού υλικού.

3.8.5.2 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων προσδιορίζεται με βάση την ικανότητά τους να δεσμεύουν την οργανική νιτρική ρίζα 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) σύμφωνα με τους Scherer and Godoy (2009). Εν συντομία, 100 μL κατάλληλου αραιωμένου δείγματος προστίθενται σε 3,9 mL διαλύματος DPPH (80,1 μM σε μεθανόλη) και αφήνονται σε συνθήκες σκότους και σε θερμοκρασία δωματίου για 90 λεπτά. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 517 nm έναντι μεθανόλης ως τυφλού δείγματος, με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-Vis (Jasco V-530). Ένα διάλυμα 100 μL μεθανόλης και 3,9 mL DPPH χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας. Ο δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Scherer and Godoy (2009).

3.8.6 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας

Καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης στερεάς κατάστασης προσδιορίστηκαν τα ακόλουθα ένζυμα: i) πρωτεάσες, ii) φυτάσες, iii) β -γλυκοσιδάσες, iv) κυτταρινάσες και v) γαλακτομανάνες. Η θερμοκρασία επώασης ορίστηκε και αυτή με βάση την άριστη θερμοκρασία δράσης των ενζύμων, δηλαδή τους 55 $^{\circ}\text{C}$. Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής

ενεργότητας, ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται από τους Wang et al. (2008) με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα αναμειχθηκαν 2,5-3 g στερεού από την κωνική φιάλη ζύμωσης στερεής κατάστασης με 40 mL απιονισμένου H₂O σε μπλέντερ κουζίνας για περίπου 2 min. Ακολούθησε φυγοκέντριση του μείγματος για 10 min, στις 10.000 rpm και στους 5 °C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρισης αποτελούσε το ακατέργαστο ένζυμο και χρησιμοποιήθηκε στη μετέπειτα διαδικασία. Συγκεκριμένα παραλήφθηκαν 0,5 mL ακατέργαστου ενζύμου και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 0,5 mL απιονισμένο H₂O και 1 mL του αντίστοιχου διαλύματος υποστρώματος κάθε φορά, μέσα σε υδατόλουτρο στους 55 °C για 15-30 min. Αντίστοιχα τοποθετήθηκε για κάθε υπόστρωμα τυφλό δείγμα, το οποίο περιείχε 1 mL υποστρώματος και 1 mL απιονισμένο H₂O. Παράλληλα ελήφθησαν δείγματα 2 mL στο χρόνο t₀ (πριν την υδρόλυση με το υπόστρωμα) και προστέθηκαν 2 mL τριχλωροξικού οξέος (TCA) 5% w/v. Μετά την υδρόλυση στα τυφλά δείγματα και στα δείγματα τελικού χρόνου t₃₀ προστέθηκε αντίστοιχη ποσότητα τριχλωροξικού οξέος (TCA) 5% w/v για την αδρανοποίηση των ενζύμων.

Η ενεργότητα της πρωτεάσης προσδιορίστηκε με μέτρηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων αμινομάδων αζώτου που παρήχθησαν κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης 0,75% w/v καζεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφόρου 0,2 M, pH 7 και 55 °C εντός 30 min. Μία μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (U) πρωτεάσης ορίστηκε ως η ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 1 μg αζώτου ελεύθερων αμινομάδων σε 1 min υπό τις συνθήκες δοκιμασίας.

Η εκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας κυτταρινάσης έγινε έμμεσα με τη μέτρηση των παραγόμενων αναγωγικών σακχάρων που προέκυψαν από τη δράση της. Αυτά προσδιορίστηκαν ποσοτικά μέσω της μεθόδου του δινιτρο-σαλικυλικού οξέος (DNS). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε καρβόξυ-μεθυλ-κυτταρίνη (CMC) 2% w/v. Η ενεργότητα της κυτταρινάσης προσδιορίστηκε με μέτρηση της συγκέντρωσης γλυκόζης που παράχθηκε κατά την διάρκεια της υδρόλυσης 1% w/v καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος 0,2 M, pH 5 και 55 °C εντός 30 min. Μία μονάδα (U) ενεργότητας κυτταρινάσης ορίστηκε ως η ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 1 μg γλυκόζης σε 1 min υπό τις συνθήκες δοκιμασίας.

Η ενεργότητα της φυτάσης προσδιορίστηκε με μέτρηση της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου που παρήχθη κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης 0,2% w/v φυτικό οξύ σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος 0,2 M, pH 5 και 55 °C εντός 15 min. Μία μονάδα (U) ενεργότητας της φυτάσης ορίζεται ως η ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 1 μg ανόργανου φωσφόρου σε 1 min υπό τις συνθήκες δοκιμασίας.

Η ενεργότητα της β-γλυκοσιδάσης προσδιορίστηκε με μέτρηση της συγκέντρωσης γλυκόζης που παράχθηκε κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης 0,5% w/v κελοβιόζη σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος 0,2 M, pH 5 και 55 °C εντός 15 min. Μία μονάδα (U) ενεργότητας της β-γλυκοσιδάσης ορίστηκε ως η ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 1 μg γλυκόζης σε 1 min υπό τις συνθήκες δοκιμασίας.

Η ενεργότητα της γαλακτομανάνης προσδιορίστηκε με μέτρηση της συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων (γλυκόζης, γαλακτόζης και μαννόζης) που παράχθηκε κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης 1% w/v (gum) σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος 0,2 M, pH 5 και 55 °C εντός 30 min. Μία μονάδα (U) ενεργότητας της γαλακτομανάνης ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 1 μg γαλακτόζης-μαννόζης σε 1 min υπό τις συνθήκες δοκιμασίας.

3.8.7 Προσδιορισμός των δομικών πολυσακχαριτών και λιγνίνης

Η μέθοδος ανάλυσης των δομικών υδατανθράκων και της λιγνίνης που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία (Sluiter et al., 2008) προαπαιτεί στερεά σωματίδια με συγκεκριμένο εύρος μεγέθους. Πιο συγκεκριμένα, η ξηρή βιομάζα διαχωρίζεται με την χρήση κόσκινων No 6 (1 mm) και έπειτα No 24 (0,25 mm) σύμφωνα με τους Hames et al., 2008. Το στερεό κλάσμα που παραμένει στα κόσκινα μεγέθους 0,25 mm παραλαμβάνεται και ακολουθεί ανάλυση των δομικών υδατανθράκων και της λιγνίνης.

Πραγματοποιήθηκε όξινη υδρόλυση (72% κ.ο. H₂SO₄) δύο σταδίων για την κλασμάτωση της βιομάζας σε μορφές που είναι πιο εύκολα προσδιορίσιμες. Αρχικά 0,3g κάθε δείγματος τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια με 3mL H₂SO₄ 72%. Τα σωληνάκια παρέμειναν στους 30 °C για 1 h με ανάδευση κάθε 5 min. Μετά το πέρας της ανάδευσης, γίνεται αραιώση του όξινου διαλύματος σε 4%, με την προσθήκη 84 mL απεσταγμένου H₂O σε κάθε δείγμα και ακολουθεί παραμονή των δειγμάτων στο αυτόκαυστο για 60 min στους 121 °C. Η διαδικασία της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε και για διάλυμα σακχάρων γνωστής συγκέντρωσης για τον υπολογισμό του ποσοστού των επιμέρους σακχάρων που απομακρύνονται με τη διαδικασία της όξινης υδρόλυσης. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό με ειδικά προζυγισμένα φίλτρα. Τα φίλτρα με τα στερεά δείγματα τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένες κεραμικές κάψες και ακολούθησε ξήρανση στους 80 °C για 24h. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, ζυγίστηκαν αφού πρώτα έλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους 560 °C για 4h. Από τη διαφορά των δυο ζυγίσεων μεταξύ 80 °C και 560 °C υπολογίζεται η ποσότητα της αδιάλυτης

λιγνίνης (AIL, %). Το υγρό κλάσμα ογκομετρήθηκε και συλλέχθηκε για τον προσδιορισμό της διαλυτής λιγνίνης και των δομικών υδατανθράκων. Ο προσδιορισμός της διαλυτής λιγνίνης έγινε με φασματοσκοπία UV-Vis (320 nm). Το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ως έχει χωρίς αραίωση με την προϋπόθεση η απορρόφηση να είναι μεταξύ 0,7-1,0. Ο υπολογισμός της διαλυτής λιγνίνης (ASL, %) έγινε μέσω της Σχέσης 5.

$$ASL(\%) = \frac{UVabs \times V \times Dilution}{\epsilon \times M \times pathlength} \quad (5)$$

όπου, UVabs η απορρόφηση του δείγματος, V ο όγκος του διηθήματος, Dilution η αραίωση (αν πραγματοποιήθηκε), ϵ η απορροφητικότητα της βιομάζας που χρησιμοποιείται για το συγκεκριμένο μήκος κύματος, M η μάζα του στερεού δείγματος που ζυγίζεται στο αρχικό στάδιο, pathlength το βήμα του φωτόμετρου σε cm.

Η συνολική ποσότητα της λιγνίνης υπολογίζεται ως:

$$\text{Λιγνίνη (\%)} = AIL + ASL$$

Ο προσδιορισμός των δομικών υδατανθράκων έγινε μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) εξοπλισμένη με στήλη Shodex SPO810 στους 60 °C και ρυθμό ροής 1 mL/min με απεσταγμένο νερό ως κινητή φάση. Για κάθε εξεταζόμενο δείγμα, 10 mL διηθήματος τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως και ακολούθησε εξουδετέρωση με CaCO₃ έως pH 5-5,5 υπό συνεχή ανάδευση. Το εξουδετερωμένο διάλυμα συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε φυγόκεντρο ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. (10 min, 9000 rpm, 4 °C) Το υπερκείμενο διαυγές υγρό παραλήφθηκε και φιλτραρίστηκε (0,02 μm) για τον προσδιορισμό των σακχάρων μέσω HPLC.

Η ποσότητα της κυτταρίνης υπολογίζεται από τη Σχέση 6:

$$\text{Κυτταρίνη (\%)} = \frac{(C \text{ (g/L)} \times L) \times V \times R}{M} \quad (6)$$

όπου, C η συγκέντρωση της γλυκόζης, L το ποσοστό γλυκόζης που απομακρύνεται μέσω της όξινης υδρόλυσης, V ο όγκος του διηθήματος, M η μάζα του στερεού δείγματος που ζυγίζεται στο αρχικό στάδιο, R ο συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης ($M_{\text{Κυτταρίνης}}/M_{\text{γλυκόζης}} = 162/180$).

Η ποσότητα της ημικυτταρίνης υπολογίζεται από τη Σχέση 7:

$$\text{Ημικυτταρίνη (\%)} = \frac{(C \text{ (g/L)} \times L) \times V \times R}{M} \quad (7)$$

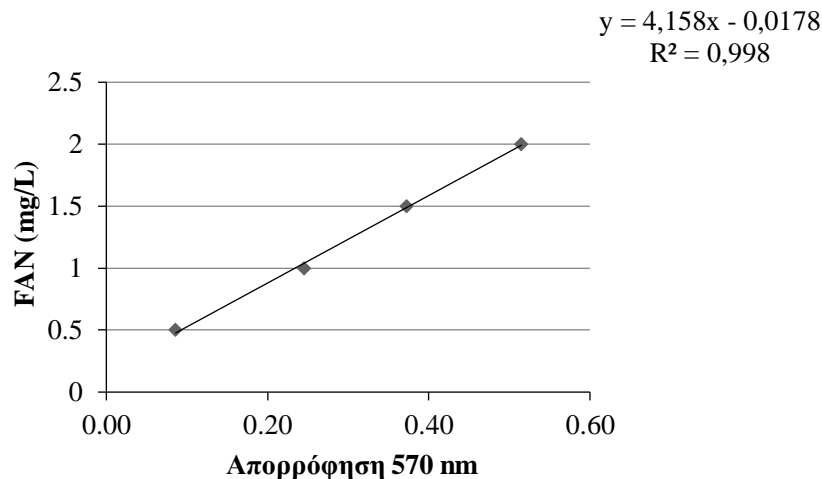
όπου, C η συγκέντρωση των σακχάρων της ημικυτταρίνης (γαλακτόζη, μαννόζη, αραβινόζη), L το ποσοστό των επιμέρους σακχάρων της ημικυτταρίνης που απομακρύνονται μέσω της όξινης υδρόλυσης, V ο όγκος του διηθήματος, M η μάζα του στερεού δείγματος που ζυγίζεται στο αρχικό στάδιο, R ο συντελεστής διόρθωσης της συγκέντρωσης γαλακτόζης, μαννόζης και αραβινόζης (0,9, 0,9 και 0,88 αντίστοιχα).

3.8.8 Προσδιορισμός σακχάρων και μεταβολικών προϊόντων

Η συγκέντρωση των σακχάρων προσδιορίστηκε με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (HPLC) με τη χρήση του συστήματος SHIMADZU UFLC XR εξοπλισμένη με στήλη Shodex SPO810 στους 60 °C και ρυθμό ροής 1 mL/min με απεσταγμένο νερό ως κινητή φάση. Η συγκέντρωση των μεταβολικών προϊόντων κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων προσδιορίστηκε μέσω HPLC εξοπλισμένη με στήλη Phenomenex ROA στους 65 °C και ρυθμό ροής 0,6 mL/min με 0,5 mM H₂SO₄ ως κινητή φάση.

3.8.9 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων

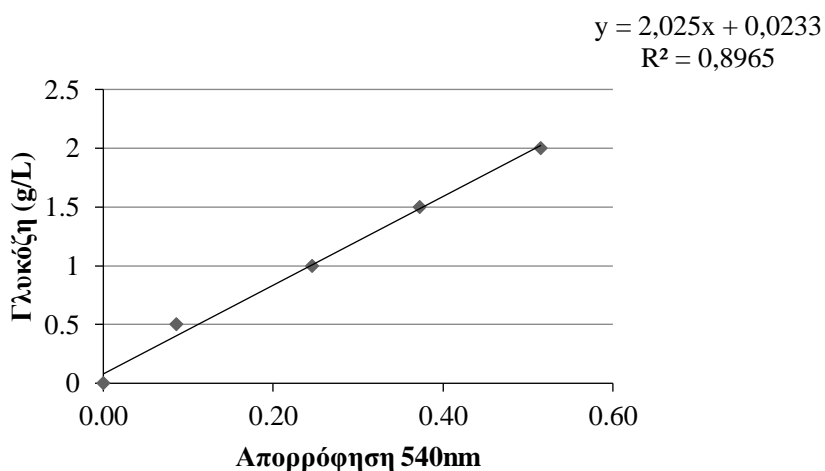
Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, free Amino Nitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie 1973). Συγκεκριμένα, προστέθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 16 min, ακολουθώντας ψύξη των δειγμάτων μέσα σε νερό στους 20 °C για 20 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσεως και αναδεύτηκαν μέχρι την αλλαγή χρώματος. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer) στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα περιείχε 1 mL απιονισμένου H₂O αντί για δείγμα, και η απορρόφηση του αφαιρέθηκε από τις απορροφήσεις των δειγμάτων. Η συγκέντρωση του δείγματος σε άζωτο υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα γλυκίνης. Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε άζωτο εκφράστηκε σε mg/L FAN βάση την καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5 Καμπύλη αναφοράς της γλυκίνης με τη μέθοδο FAN

3.8.10 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων

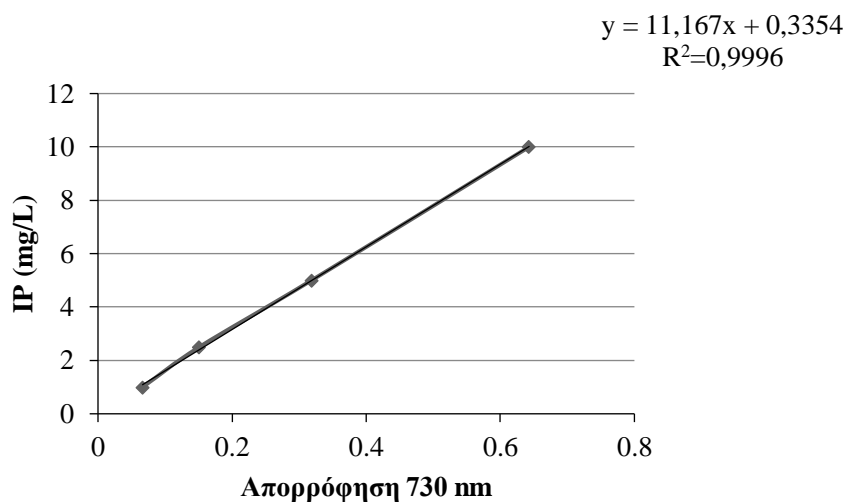
Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας των κυτταρινασών, ακολούθησε προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων που παράγονται μέσω της φωτομετρικής μεθόδου του δινιτρο-σαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959). Συγκεκριμένα προστέθηκαν 0,5 mL δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS σε δοκιμαστικό σωλήνα, ακολούθησε ανάδευση και θέρμανση στους 100 °C για 5 min ακριβώς και ψύξη αμέσως με H₂O (20 °C). Έπειτα προστέθηκαν 5 mL απιονισμένου H₂O, αναδεύτηκαν και οι απορροφήσεις φωτομετρήθηκαν στα 540 nm. Η συγκέντρωση του δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε με βάση την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 6) εκφρασμένη σε g/L.



Διάγραμμα 6 Καμπύλη αναφοράς αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS

3.8.11 Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας των φυτασών πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του παραγόμενου ανόργανου φωσφόρου. Η διαδικασία προσδιορισμού περιλαμβάνει την προσθήκη 0,5 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα και 0,4 mL υπερχλωρικού οξέος 60%, ακολούθησε ανάδευση για 10 sec. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,3 mL ασκορβικού οξέος 1%, ακολούθησε ανάδευση των 10 sec και έπειτα προστέθηκαν 0,4 mL μολυβδαινικού αμμωνίου 5%. Τέλος αναδεύτηκαν για άλλα 10 sec και οι απορροφήσεις φωτομετρήθηκαν στα 730 nm. Η συγκέντρωση του δείγματος σε ανόργανο φώσφορο (mg/L) υπολογίστηκε με βάση την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 7) χρησιμοποιώντας ως πρότυπο διάλυμα όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4).



Διάγραμμα 7 Καμπύλη αναφοράς ανόργανου φωσφόρου

3.8.12 Προσδιορισμός ολικών στερεών απομάκρυνσης κατά την προεπεξεργασία

Το στερεό που συλλέχθηκε μετά την προεπεξεργασία με αλκαλικό διάλυμα NaOH και την υδροθερμική προεπεξεργασία τοποθετήθηκε σε προζυγισμένα δισκία και στη συνέχεια σε φούρνο ξήρανσης στους 80 °C για 24h. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως ζυγίστηκαν για τον υπολογισμό των ολικών στερεών απομάκρυνσης (TS, %) βάση της Σχέσης 8.

$$TS (\%) = \frac{\text{αρχικό στερεό (g)} - \text{τελικό στερεό (g)}}{\text{αρχικό στερεό (g)}} \times 100 \quad (8)$$

3.8.13 Προσδιορισμός ποσοστού απομάκρυνσης λιγνίνης, ημικυτταρίνης και κυτταρίνης κατά την προεπεξεργασία

Ο προσδιορισμός του ποσοστού απομάκρυνσης των δομικών πολυσακχαριτών και της λιγνίνης υπολογίστηκε βάση της διαφοράς μάζας των προς εξέταση συστατικών πριν και μετά την προεπεξεργασία βάση της Σχέσης 9:

$$\text{Απομάκρυνση (\%)} = \frac{M_{\text{αρχικό}} - M_{\text{τελικό}}}{M_{\text{αρχικό}}} \times 100 \quad (9)$$

όπου $M_{\text{αρχικό}}$ η μάζα σε (g) κάθε εξεταζόμενου συστατικού πριν την προεπεξεργασία και $M_{\text{τελικό}}$ η μάζα σε (g) κάθε εξεταζόμενου συστατικού των ολικών στερεών που απομένουν μετά την προεπεξεργασία.

3.8.14 Προσδιορισμός ολιγομερών

Ο προσδιορισμός των ολιγομερών στο υγρό κλάσμα μετά την υδροθερμική προεπεξεργασία έγινε έμμεσα βάση τη μέθοδο των Gu et al. 2020. Αναλυτικότερα, έγινε υδρόλυση με H_2SO_4 (4%) στους 121 °C για 60 min και η συγκέντρωση των μονομερών σακχάρων προσδιορίστηκε μέσω HPLC εξοπλισμένη με στήλη Shodex SPO810.

3.8.15 Προσδιορισμός απόδοσης ενζυμικής υδρόλυσης ημικυτταρίνης και κυτταρίνης

Η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης εκφράστηκε ως το ποσοστό απελευθέρωσης των μονομερών σακχάρων και υπολογίζεται σύμφωνα με τις Σχέσεις 10 και 11 αντίστοιχα:

$$\text{Απόδοση κυτταρίνης (\%)} = \frac{C_{\text{γλυκόζης}} \times R}{C_{\text{κυτταρίνης}}} \times 100 \quad (10)$$

$$\text{Απόδοση ημικυτταρίνης (\%)} = \frac{C_{\text{μονομερών ημικυτταρίνης}} \times R}{C_{\text{ημικυτταρίνης}}} \times 100 \quad (11)$$

όπου C μονομερών ημικυτταρίνης το άθροισμα των συγκεντρώσεων της γαλακτόζης, μααννόζης και αραβινόζης μετά την ενζυμική υδρόλυση (g/L), C ημικυτταρίνης η αρχική συγκέντρωση της ημικυτταρίνης του προεπεξεργασμένου SCG (g/L), C κυτταρίνης η αρχική συγκέντρωση της κυτταρίνης του προεπεξεργασμένου SCG (g/L) και R ο συντελεστής διόρθωσης κατά την ενζυμική υδρόλυση (0,9 για γλυκόζη, γαλακτόζη και μααννόζη και 0,88 για αραβινόζη).

3.8.16 Προσδιορισμός συνολικής απόδοσης υδρόλυσης ημικυτταρίνης και κυτταρίνης

Η συνολική απόδοση υδρόλυσης ημικυτταρίνης και κυτταρίνης εκφράστηκε ως το ποσοστό απελευθέρωσης των μονομερών σακχάρων και υπολογίζεται σύμφωνα με τις Σχέσεις 12 και 13 αντίστοιχα:

$$\text{Συνολική απόδοση κυτταρίνης (\%)} = \frac{\text{Cγλυκόζης} \times \text{R}}{\text{Cκυτταρίνης}} \times 100 \quad (12)$$

$$\text{Συνολική απόδοση ημικυτταρίνης (\%)} = \frac{\text{Cμονομερών ημικυτταρίνης} \times \text{R}}{\text{Cημικυτταρίνης}} \times 100 \quad (13)$$

όπου C μονομερών ημικυτταρίνης το άθροισμα των συγκεντρώσεων της γαλακτόζης, μαννόζης και αραβινόζης μετά την ενζυμική υδρόλυση (g/L), C ημικυτταρίνης η αρχική συγκέντρωση της ημικυτταρίνης του SCGs (g/L), C κυτταρίνης η αρχική συγκέντρωση της κυτταρίνης του SCGs (g/L) και R ο συντελεστής διόρθωσης κατά την ενζυμική υδρόλυση (0,9 για γλυκόζη, γαλακτόζη και μαννόζη και 0,88 για αραβινόζη).

3.8.17 Προσδιορισμός βακτηριακής βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βακτηριακής βιομάζας έγινε άμεσα με μέτρηση του ξηρού βάρους. Πιο συγκεκριμένα, για διάφορα χρονικά σημεία της ζύμωσης έγινε λήψη 3 mL δείγματος εκ των οποίων τα 2 mL τοποθετήθηκαν σε erpendorf των 2 mL και ακολούθησε φυγοκέντριση (10.000 rpm, 5 min). Έπειτα έγινε έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό και εκ νέου φυγοκέντριση. Στη συνέχεια έγινε μεταφορά της βιομάζας σε προζυγισμένα φιαλίδια τα οποία τοποθετήθηκαν σε φούρνο προς ξήρανση (80 °C) μέχρι σταθεροποίησης του βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκε σε ζυγό ακρίβειας 4 δεκαδικών ψηφίων και εκφράζεται σε g/L.

3.9 Ισοζύγια μάζας

Τα ισοζύγια μάζας της προτεινόμενης διεργασίας υπολογίστηκαν λαμβάνοντας ως αρχική ποσότητα SCG τα 100 g. Για κάθε στάδιο υπολογίστηκε το ποσοστό της λιγνίνης, κυτταρίνης και ημικυτταρίνης που απομένει. Στη συνέχεια υπολογίστηκε το συνολικό ισοζύγιο της προτεινόμενης διεργασίας λαμβάνοντας τις αποδόσεις που επιτεύχθηκαν στις επιμέρους διεργασίες.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Σύσταση αποβλήτων καφέ

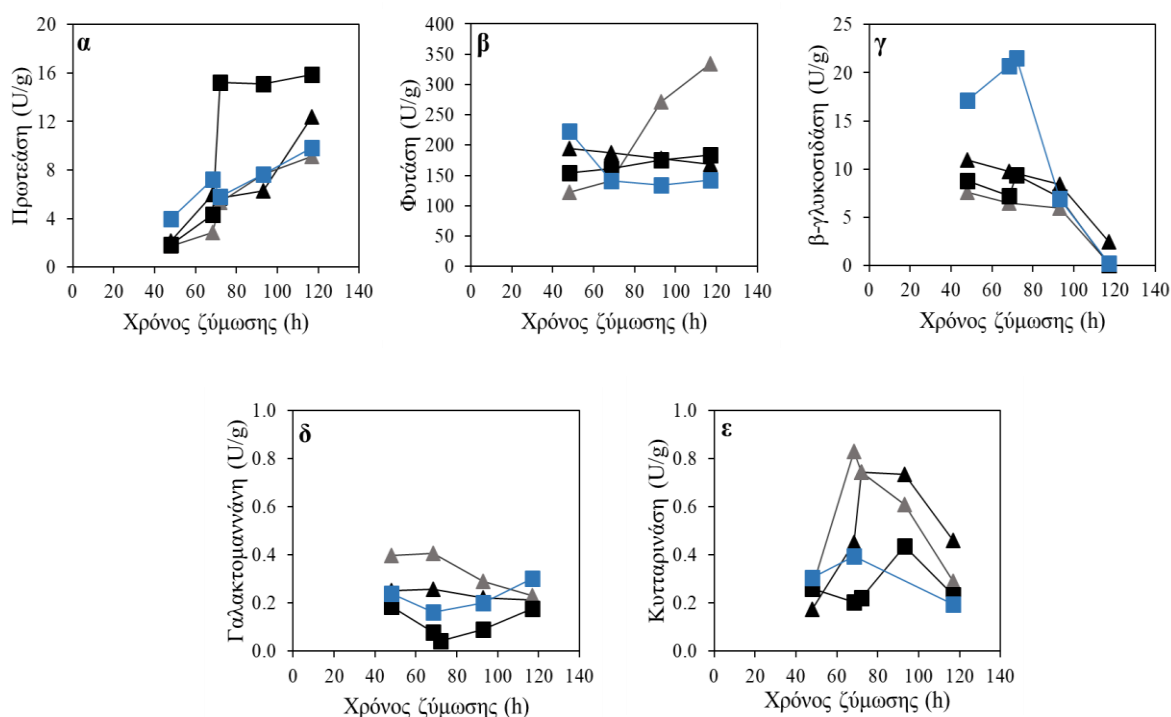
Το στερεό απόβλητο που προέκυψε ύστερα από την εκχύλιση του καφέ (SCG) χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη στην παρούσα μελέτη. Το SCG είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, πρωτεΐνες, δομικούς πολυσακχαρίτες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη), λιγνίνη και φυτικό έλαιο. Η σύσταση των συστατικών εξαρτάται άμεσα από την ποικιλία του καφέ όπως και από τη διαδικασία που ακολουθείται για το καβούρδισμα του (Ballesteros et al., 2014). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται συνολικά η σύσταση του SCG καθώς και αναφορές από την ευρύτερη βιβλιογραφία. Παρατηρείται ότι το SCG είναι πλούσιο σε φυτικό έλαιο (12,7%), πρωτεΐνη (13,3%), λιγνίνη (29,2%) και ημικυτταρίνη (35,9%). Το κυριότερο κλάσμα των δομικών πολυσακχαριτών που προσδιορίστηκε στο SCG της παρούσας εργασίας ήταν η ημικυτταρίνη (35,9%), ενώ η κυτταρίνη ανήλθε σε 10,0%. Υψηλότερες τιμές ημικυτταρίνης έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά (36,7 - 40%). Η ανάλυση των δομικών μονάδων της ημικυτταρίνης έδειξε την παρουσία κυρίως μαννόζης (24,5%) και σε μικρότερο ποσοστό γαλακτόζης (10,7%).

Πίνακας 2 Χημική σύσταση του SCG

Συστατικά (wt, %)	Παρούσα μελέτη	Mata et al., 2017
Υγρασία	60,7 ± 0,23	1,18 – 65,7
Τέφρα	1,5 ± 0,05	0,43 – 2,2
Φυτικό έλαιο	12,7 ± 0,48	10,0 – 15,0
Πρωτεΐνη	13,3 ± 0,52	6,7 – 13,7
Φαινολικά*	1,0 ± 0,03	
Λιγνίνη	25,01 ± 0,58	32,5 – 33,6
Αδιάλυτη Λιγνίνη	24,38 ± 0,44	30,9 – 31,9
Διαλυτή Λιγνίνη	0,6 ± 0,15	-
Ημικυτταρίνη	35,9 ± 0,74	36,7
Γαλακτόζη	10,7 ± 0,54	13,8
Μαννόζη	24,5 ± 0,19	21,2
Αραβινόζη	0,7 ± 0,05	1,7
Κυτταρίνη	10,03 ± 0,06	8,6 – 15,3

4.2 Αξιοποίηση αποβλήτων καφέ προς παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων

Η αξιοποίηση του SCG μελετήθηκε αρχικά για την παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων μέσω ζυμώσεων στερεής κατάστασης σε συνδυασμό με δύο υποστρώματα, το πίτυρο σίτου που προκύπτει ως παραπροϊόν της άλεσης σιτηρών και το οργανικό κλάσμα στερεών αστικών απορριμμάτων (OFMSW). Η παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων μελετήθηκε με το μύκητα *Aspergillus awamori* σε δύο αναλογίες SCG:πίτυρο και SCG:OFMSW (75:25 και 50:50 w/w) με αρχική υγρασία 65%. Στο Διάγραμμα 8 παρουσιάζεται η μεταβολή της ενεργότητας των ενζύμων (πρωτεάση, φυτάση, γαλακτομαννάνη, κυτταρινάση και β-γλυκοσιδάση) εκφρασμένα σε U/g ξηρού υποστρώματος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στερεής κατάστασης στα υποστρώματα SCG με OFMSW και SCG με πίτυρο.



Διάγραμμα 8 Συγκριτική αξιολόγηση των παραγόμενων ακατέργαστων ενζύμων στα υποστρώματα (▲) SCG: πίτυρο (75:25), (▲) SCG: πίτυρο (50:50), (■) SCG: OFMSW (75:25), και (■) SCG: OFMSW (75:25)

Όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 8α, όλα τα υποστρώματα είναι κατάλληλα για την παραγωγή των πρωτεασών. Μέγιστη παραγωγή πρωτεασών (15 U/g) εμφανίζεται στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε SCG και OFMSW σε αναλογία 75:25 (κ.β.). Η παραγωγή πρωτεασών στα υπόλοιπα υποστρώματα ακολούθησε αντίστοιχη πορεία με μέγιστη παραγωγή που κυμάνθηκε από 9,1-12,4 U/g στις 120 h. Στο Διάγραμμα 8β παρουσιάζεται η κινητική των παραγόμενων φυτασών καθ' όλη τη διάρκεια των στερεών καλλιιεργειών.

Αντίστοιχη παραγωγή παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από την περίπτωση του SCG με πίτυρο 50:50 (κ.β.) όπου σημειώνεται αύξηση των παραγόμενων φυτασών καθ' όλη τη διάρκεια της στερεής καλλιέργειας. Η μέγιστη παραγωγή φυτασών που επιτεύχθηκε ήταν 334 U/g στις 117 h στερεής καλλιέργειας στο υπόστρωμα SCG με πίτυρο σε αναλογία 50:50 (κ.β.). Η παραγωγή της β-γλυκοσιδάσης (Διάγραμμα 8γ) ακολούθησε αντίστοιχη πορεία σε όλα τα υποστρώματα εκτός από την περίπτωση του υποστρώματος SCG με OFMSW σε αναλογία 50:50 (κ.β.) όπου παρατηρήθηκε αύξηση των παραγόμενων ενζύμων μεταξύ 50-80 h με μέγιστη παραγωγή 21 U/g. Μικρή παραγωγή γαλακτομαννανών παρατηρήθηκε σε όλα τα υποστρώματα όπου κυμάνθηκε μεταξύ 0,2-0,4 U/g (Διάγραμμα 8δ). Τέλος, μικρή παραγωγή κυτταρινασών παρατηρήθηκε στις ζυμώσεις στερεής καλλιέργειας όπου κυμάνθηκε μεταξύ 0,3-0,4 U/g στο υπόστρωμα SCG με OFMSW και 0,3-0,8 U/g στο υπόστρωμα SCG με πίτυρο (Διάγραμμα 8ε).

Αντίστοιχες μελέτες αξιοποίησης των αποβλήτων του καφέ για την παραγωγή ενζύμων σε ζυμώσεις στερεής κατάστασης δεν έχουν γίνει εκτεταμένα. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί η χρήση πούλπας του καφέ για παραγωγή πολυγαλακτουρονάσης μέσω ζύμωσης στερεής κατάστασης με τον *Aspergillus niger Thiegem* στην οποία σημειώθηκε μέγιστη παραγωγή πολυγαλακτουρονάσης (60 U/mL) σε συνθήκες υγρασίας 60% και pH 5,5 κατά τη διάρκεια της 7^{ης} ημέρας ζύμωσης (Frómota et al., 2020). Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί απόβλητα βιομηχανίας καφέ σε συνδυασμό με άλλα απόβλητα ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή α-αμυλάσης. Συγκεκριμένα μίγμα πούλπας και φλοιού καφέ αξιοποιήθηκε για την παραγωγή α-αμυλάσης από το στέλεχος *Nerrospona crassa* (Ashok et al., 2000). Μέγιστη παραγωγή α-αμυλάσης (7084 και 6342 U/g) επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα προεπεξεργασμένου με ατμό πολτού καφέ και αποβλήτων μικτού καφέ σε υγρασία 60%, pH 4,5, θερμοκρασία 27 °C (Murthy and Naidu 2009)

4.3 Εκχύλιση φυτικού ελαίου και φαινολικών συστατικών

4.3.1 Εκχύλιση φυτικού ελαίου

Οι κύριες μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση του φυτικού ελαίου από το SCG είναι η απλή εκχύλιση με διαλύτη και η εκχύλιση Soxhlet. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, η εκχύλιση με μικροκύματα και η εκχύλιση υπερκρίσιμο ρευστού έχουν επίσης αξιολογηθεί για εκχύλιση του φυτικού ελαίου του SCG (Muangrat, and Pongsirikul, 2019). Αν και η εκχύλιση Soxhlet είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη και αποτελεσματική τεχνική, η παρατεταμένη διάρκεια εκχύλισης και οι απώλειες του διαλύτη περιορίζουν τη βιομηχανική εφαρμογή αυτής της μεθόδου.

Στην παρούσα μελέτη η απλή εκχύλιση με διαλύτη αξιολογήθηκε για την αποτελεσματική ανάκτηση του φυτικού ελαίου και συγκρίθηκε με την εκχύλιση Soxhlet. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με χρήση εξάνιου σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:20 (β.ο.). Υψηλή απόδοση 10,7 g φυτικού ελαίου/100 g SCG επιτεύχθηκε σε χρονικό διάστημα εκχύλισης 2 h, η οποία αντιστοιχεί σε απόδοση ανάκτησης φυτικού ελαίου ίση με 92,2% σε σχέση με την εκχύλιση Soxhlet. Το έλαιο SCG που εκχυλίστηκε με εξάνιο αποτελείται κυρίως από παλμιτικό οξύ (43,3%) και λινολεϊκό οξύ (38,9%) ακολουθούμενο από ελαϊκό οξύ (7,7%) και στεατικό οξύ (5,6%).

Τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που αποδεικνύουν ότι το εξάνιο είναι αποτελεσματικός διαλύτης για την ανάκτηση του φυτικού ελαίου (Somnuk et al., 2017). Η απόδοση εκχύλισης φυτικού ελαίου με απλή μέθοδο εκχύλισης κυμαίνεται από 7,5-14,7 g έλαιο ανά 100 g SCG (Samnuk et al., 2017). Η απλή μέθοδος εκχύλισης είναι αποτελεσματική εναλλακτική λύση έναντι των πολύπλοκων εκχυλίσεων για να επιτευχθεί υψηλή απόδοση με περιορισμένη κατανάλωση διαλύτη σε μικρή διάρκεια εκχύλισης καθιστώντας την μια οικονομικά αποδοτική και εύκολη στη χρήση μέθοδο.

4.3.2 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών

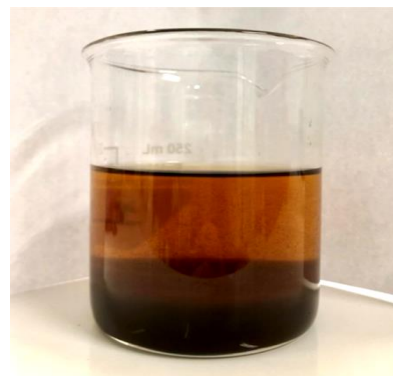
Η χρήση αιθανόλης ως διαλύτη έχει ευρέως μελετηθεί για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από στερεά απόβλητα (Rajha et al., 2014). Βάση της διεθνούς βιβλιογραφίας, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70% (κ.ο.) για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:20 (w/v). Το ποσοστό του φαινολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε ίσο με 10 mg γραμμοισοδύναμα γαλλογενικού οξέος ανά 1 g SCG. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος SCG ήταν υψηλότερη από 1, κατατάσσοντας το ως ισχυρό αντιοξειδωτικό.

Τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν με τη μελέτη των Mussato et al. (2011a), όπου το μεθανολικό εκχύλισμα SCG έδειξε ολική περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις 11-18 mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος/g SCG. Υψηλότερες τιμές (33,8 mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος/g SCG) έχουν αναφερθεί από τους Al-Dhabi et al. (2017) μέσω εκχύλισης με μικροκύματα (244 W, 40 °C, 34 min και 1:17 g/mL).

4.4 Διαχωρισμός πρωτεΐνης

Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι διαχωρισμού πρωτεϊνών από στερεά απόβλητα είναι η εκχύλιση με διαλύτη, η εκχύλιση μέσω αλκαλικού διαλύματος και κατακρήμνιση στο ισοηλεκτρικό σημείο μέσω οξίνισης, η υπερδιήθηση και η εκχύλιση με άλας. Οι παράγοντες

που επηρεάζουν την απόδοση της μεθόδου είναι η αναλογία όγκου διαλύτη/στερεών, το pH, ο χρόνος και η φύση του διαλύτη. Αν και το SCG περιέχει σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης (13-17%), δεν έχουν αναφερθεί προηγούμενες μελέτες για την ανάκτηση της. Βάση της διεθνούς βιβλιογραφίας για υποστρώματα αντίστοιχης σύστασης, μελετήθηκαν διαφορετικές διεργασίες διαλυτοποίησης των πρωτεϊνών όπως περιγράφονται στον Πίνακα 3 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καταβύθιση με ρύθμιση του pH στο 3,5 (Εικόνα 7). Το ποσοστό πρωτεΐνης στο στερεό κλάσμα που διαχωρίστηκε από το SCG ως προς τη συνολική ποσότητα του στερεού κλάσματος πλούσιου σε πρωτεΐνες (Y_{ppe}) και το ποσοστό των πρωτεϊνών στο στερεό κλάσμα που διαχωρίστηκε από το SCG ως προς την συνολική ποσότητα πρωτεϊνών που περιέχεται στο αρχικό στερεό κλάσμα SCG (Y_{ep}) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.



Εικόνα 7 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών ύστερα από ρύθμιση pH στο 3,5.

Πίνακας 3 Ποσοστό πρωτεϊνών στο στερεό κλάσμα ως προς τη συνολική ποσότητα του στερεού κλάσματος (Y_{ppe}) και ως προς το αρχικό στερεό κλάσμα SCG (Y_{ep})

	Y_{ppe} (%)	Y_{ep} (%)
Διεργασία 1	21,5	1,49
Διεργασία 2α	19,2	2,70
Διεργασία 2β	30,0	3,22
Διεργασία 3	18,9	6,03

Όπως παρατηρείται η αύξηση της θερμοκρασίας αύξησε το ποσοστό των πρωτεϊνών στο στερεό κλάσμα που διαχωρίστηκε από το SCG ως προς την συνολική ποσότητα πρωτεϊνών που περιέχεται στο αρχικό στερεό κλάσμα SCG (Y_{ep}) κατά 81,2%, ενώ το ποσοστό πρωτεΐνης στο στερεό κλάσμα που διαχωρίστηκε από το SCG ως προς τη συνολική ποσότητα του στερεού κλάσματος πλούσιου σε πρωτεΐνες (Y_{ppe}) κυμάνθηκε σε ίδιες τιμές (Διεργασίες 1 και 2α). Το φιλτράρισμα πριν την καταβύθιση αύξησε την καθαρότητα των πρωτεϊνών (30%), ενώ το ποσοστό πρωτεϊνών που διαχωρίστηκαν από το αρχικό στερεό SCG ήταν αντίστοιχο με τη διεργασία χωρίς φιλτράρισμα (Διεργασία 2β). Στην περίπτωση

όπου κατά το στάδιο της διαλυτοποίησης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα NaOH 0,1 M παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του ποσοστού πρωτεϊνών που διαχωρίστηκαν από το αρχικό στερεό SCG (Διεργασία 3).

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε υψηλή καθαρότητα δεν ήταν εφικτός και γι' αυτό το λόγο το τελικό κλάσμα δεν μπορεί να αξιοποιηθεί σε εμπορικές εφαρμογές που απαιτούν χρήση κλάσματος πρωτεϊνών υψηλής καθαρότητας.

4.5 Προεπεξεργασία αποβλήτων καφέ

Το SCG είναι πλούσιο σε πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από μαννάνες ή γαλακτομαννάνες, αραβινογαλακτάνες και κυτταρίνη. Η ημικυτταρίνη και η κυτταρίνη αντιστοιχούν σχεδόν στο μισό του ξηρού υλικού. Οι ημικυτταρίνες αποτελούνται από μαννόζη, γαλακτόζη και αραβινόζη (Campos-Vega et al., 2015). Αν και το SCG είναι πλούσιο σε υδατάνθρακες, η εξαγωγή μονοσακχαριτών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Η προεπεξεργασία είναι απαραίτητο βήμα για την αποτελεσματική αξιοποίηση των πολυσακχαριτών.

Φυσικές, χημικές, φυσικοχημικές και βιολογικές προεπεξεργασίες έχουν χρησιμοποιηθεί για να μετατραπούν οι σύνθετες δομές της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα (Wang et al., 2018). Η αποτελεσματικότητα της προεπεξεργασίας σχετίζεται με την ποσότητα ζυμώσιμων σακχάρων με τον ελάχιστο σχηματισμό παραπροϊόντων που δρουν παρεμποδιστικά στην υδρόλυση ή στη μετέπειτα ζύμωση. Επιπλέον, το κόστος ενεργειακών και χημικών εισροών πρέπει να ληφθεί υπόψη για την απόδοση της διαδικασίας. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η προεργασία του SCG άνευ φυτικού ελαίου με χρήση αλκαλικού διαλύματος και η υδροθερμική προεπεξεργασία.

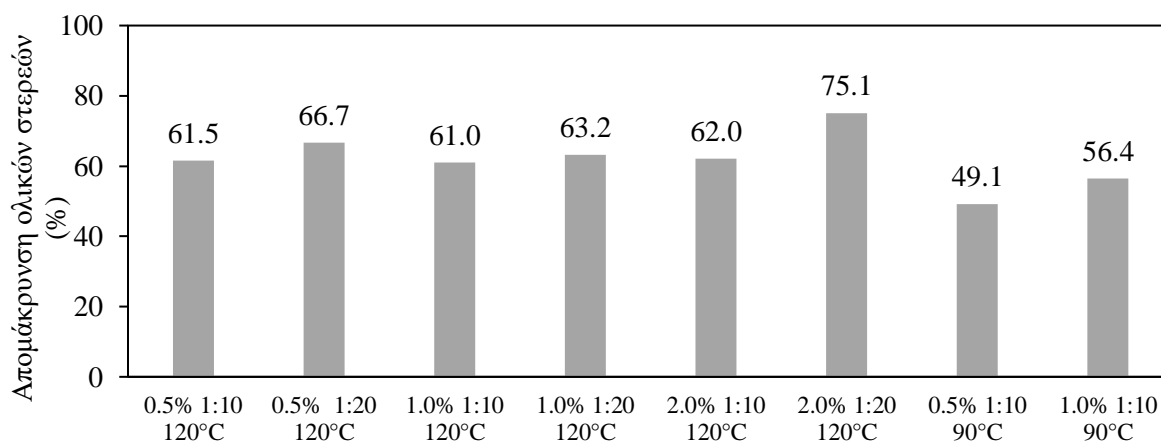
4.5.1 Προεπεξεργασία με αλκαλικό διάλυμα

Η αλκαλική προεπεξεργασία μελετήθηκε με τη χρήση NaOH σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,5, 1,0 και 2,0%) σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:10 και 1:20 στους 120 °C. Προεπεξεργασία στους 90 °C επίσης μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις NaOH 0,5% και 1,0% και σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:10. Η σύσταση του SCG άνευ φυτικού ελαίου και των προεπεξεργασμένων με αλκαλικό διάλυμα στερεών παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4 Ανάλυση στερεού κλάσματος προεπεξεργασμένου δείγματος με αλκαλικό διάλυμα NaOH

	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Λιγνίνη (%)
SCG άνευ φυτικού ελαίου	11,3	35,0	25,0
0,5% NaOH 1:10	16,9	43,8	21,7
1% NaOH 1:10	15,9	43,5	19,3
2% NaOH 1:10	15,8	39,9	13,9
0,5% NaOH 1:20	13,6	43,3	23,2
1% NaOH 1:20	16,6	41,7	18,4
2% NaOH 1:20	17,0	45,4	15,5
0,5% NaOH 1:10	15,7	44,3	24,0
1% NaOH 1:10	18,7	46,9	21,1

Όπως φαίνεται, η προεπεξεργασία με αραιό NaOH στους 120 °C είχε ως αποτελέσματα σημαντική απομάκρυνση ολικών στερεών έως και 75,1%. Σε αναλογία στερεού υγρού 1:10 και αραιό διάλυμα NaOH (0,5 και 1% w/v) παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό απομάκρυνσης (61,5 και 61,0% αντίστοιχα) (Διάγραμμα 9). Στην περίπτωση της προεπεξεργασίας με αραιό διάλυμα NaOH (0,5 και 1% w/v) σε αναλογία στερεού υγρού 1:10 στους 90 °C παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό απομάκρυνσης ολικών στερεών (49,1 και 56,4% αντίστοιχα).

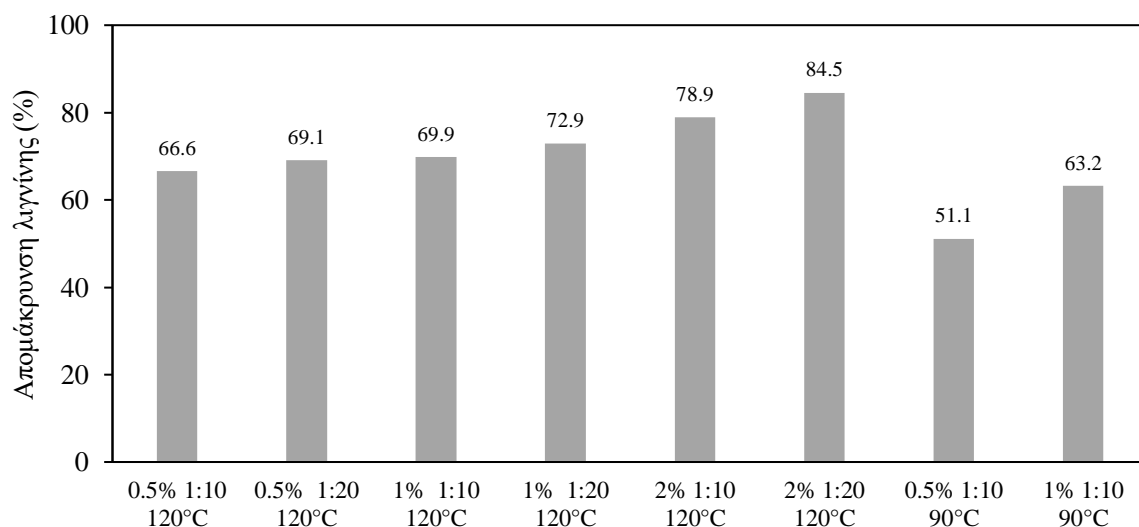


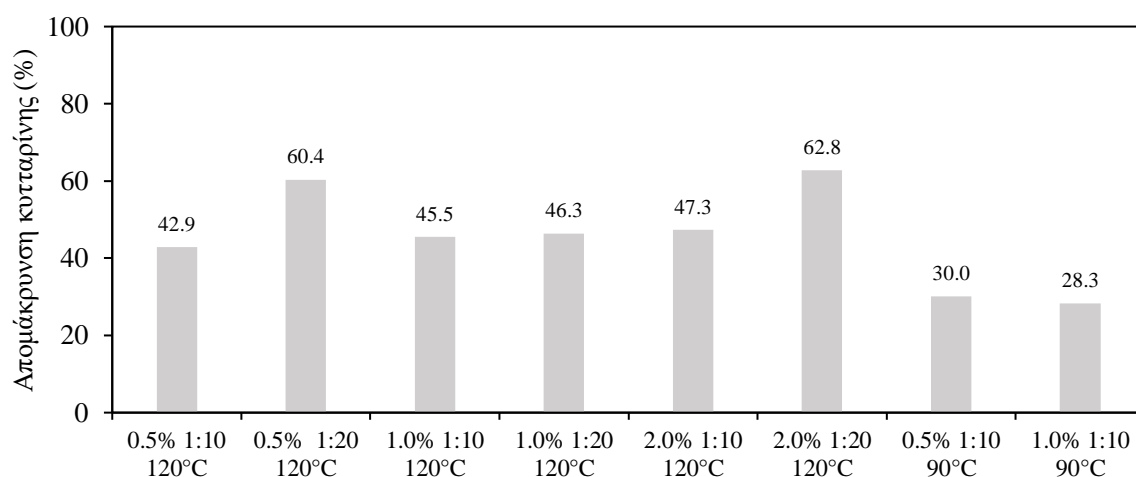
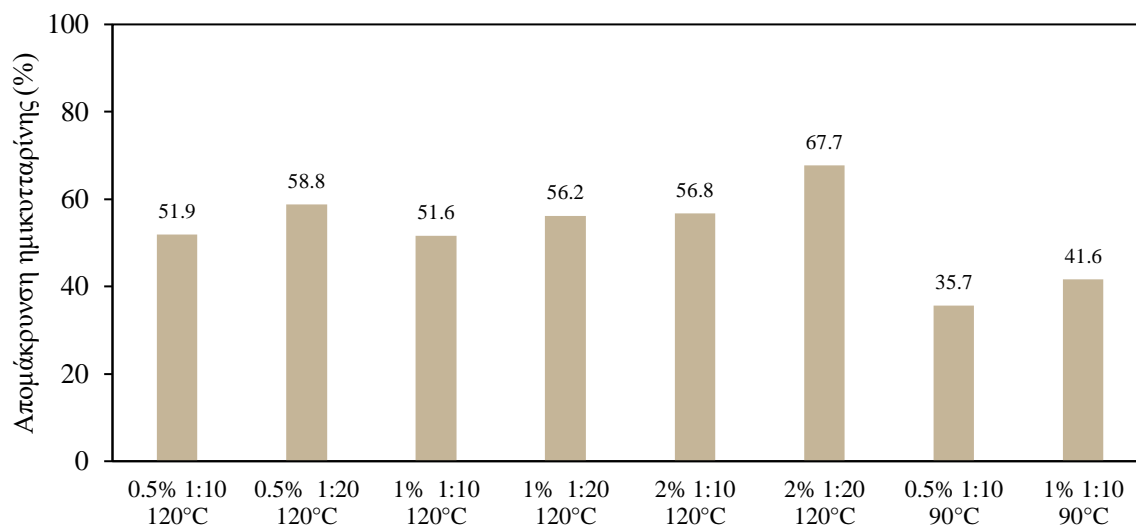
Διάγραμμα 9 Ποσοστό απομάκρυνσης ολικών στερεών κατά την αλκαλική προεπεξεργασία

Η προεπεξεργασία στους 120 °C με αραιό αλκαλικό διάλυμα NaOH, προκάλεσε σημαντική μείωση της λιγνίνης έως και 84,5% (Διάγραμμα 10). Σε αναλογία στερεού υγρού 1:10 και αραιό διάλυμα NaOH (0,5 και 1% w/v) παρατηρήθηκε ποσοστό απομάκρυνσης

λιγνίνης 66,6 και 69,9% αντίστοιχα. Ωστόσο σημαντική είναι και η απομάκρυνση ημικυτταρίνης και κυτταρίνης. Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι η προεπεξεργασία με αραιό αλκαλικό διάλυμα NaOH, προκάλεσε σημαντική μείωση του κυτταρινικού περιεχομένου έως και 62,8%. Σε αναλογία στερεού υγρού και αραιό διάλυμα NaOH 1:10 (0,5 και 1% w/v) παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό απομάκρυνσης (42,6% και 45,2% αντίστοιχα). Τέλος, παρατηρείται σημαντικότερη μείωση του ημικυτταρινικού περιεχομένου στην περίπτωση της προεπεξεργασίας με αραιό αλκαλικό διάλυμα NaOH 2% (67,7%), ακολουθώντας με μικρότερα ποσοστά απομάκρυνσης στις υπόλοιπες περιπτώσεις.

Στην περίπτωση της προεπεξεργασίας με αραιό διάλυμα NaOH (0,5 και 1% w/v) σε αναλογία στερεού υγρού 1:10 στους 90°C παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό απομάκρυνσης του λιγνινικού περιεχομένου (51,1 και 63,2% αντίστοιχα). Ωστόσο σημειώθηκε απομάκρυνση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης. Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι η προεπεξεργασία με αραιό διάλυμα NaOH (0,5 και 1% w/v) σε αναλογία στερεού υγρού 1:10 στους 90 °C προκάλεσε μείωση του ημικυτταρινούχου περιεχομένου κατά 35,7% και 41,6% αντίστοιχα και του κυτταρινικού κατά 30% και 28,3% αντίστοιχα. Επομένως, όπως έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες, η θερμοκρασία στην οποία διεξάγεται η αλκαλική επεξεργασία της κυτταρίνης μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αλλαγές στη δομή της. Συγκεκριμένα, οι χαμηλές έως μέτριες θερμοκρασίες (<100 °C) είναι επιθυμητές για την αλκαλική προεπεξεργασία, δεδομένου ότι η κυτταρίνη επηρεάζεται ελάχιστα σε αυτές τις θερμοκρασίες (Knill and Kennedy, 2003). Ωστόσο, σε υψηλότερες θερμοκρασίες (≥ 100 °C), η κυτταρίνη είναι πιθανότερο να υποστεί σημαντική υποβάθμιση και δομικές μεταβολές.





Διάγραμμα 10 Ποσοστό απομάκρυνσης λιγνίνης, ημικυτταρίνης και κυτταρίνης κατά την αλκαλική προεπεξεργασία

4.5.2 Υδροθερμική προεπεξεργασία

Η σύσταση του SCG άνευ φυτικού ελαίου ύστερα από την υδροθερμική προεπεξεργασία παρουσιάζεται στον Πίνακα 5. Όπως παρατηρείται η υδροθερμική προεπεξεργασία είχε μικρή απομάκρυνση ολικών στερεών (TS) τόσο στην περίπτωση των 120 °C όσο και στους 140 °C. Σε αναλογία στερεού υγρού 1:10 στους 120 °C παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό απομάκρυνσης (13,2%) σε σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό απομάκρυνσης στους 140 °C (25,8%). Στην υψηλότερη θερμοκρασία (140 °C) και σε αναλογία στερεού υγρού 1:20 παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης ολικών στερεών (24,2%) σε σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό απομάκρυνσης στους 120 °C (15,5%).

Πίνακας 5 Ανάλυση στερεού κλάσματος προεπεξεργασμένου δείγματος με υδροθερμική προεπεξεργασία

		TS (%)	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Λιγνίνη (%)	Ολιγοσακχαρίτες (%)
SCG άνευ φυτικού ελαίου			11,3	35,0	25,0	-
1:10	120 °C	13,2	13,4	30,0	28,8	2,1
1:20		15,5	13,1	33,6	29,0	5,3
1:10	140 °C	25,8	15,2	34,0	33,0	1,8
1:20		24,2	14,9	33,3	31,0	5,8

Αναφορικά με τη σύσταση των επιμέρους συστατικών παρατηρείται ότι η υδροθερμική προεπεξεργασία δεν επηρεάζει τα ποσοστά της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης. Ωστόσο, σημαντική είναι η παραγωγή ολιγοσακχαριτών. Στην αναλογία στερεού προς υγρό το ποσοστό των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών ήταν μεταξύ 1,8-2,1%, ενώ στην αναλογία στερεού προς υγρό 1:20 (w/v) σημειώθηκε παραγωγή από 5,3-5,8%. Τα υδατικά διαλύματα που προέκυψαν μετά την υδροθερμική προεπεξεργασία αναλύθηκαν ως προς τα παραγόμενα παραπροϊόντα, ωστόσο σε κανένα από τα διαλύματα δεν ανιχνεύτηκε παραγωγή παραπροϊόντων.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η υδροθερμική προεπεξεργασία είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα λόγω της φιλικής προς το περιβάλλον τεχνολογίας, δεδομένου ότι ο μόνος διαλύτης είναι το ζεστό συμπιεσμένο νερό (150-240° C), εξαλείφοντας προβλήματα με τη διάβρωση και το λειτουργικό κόστος (Boussarsar et al., 2009, Silva et al., 2011, Da Cruz et al., 2012). Κατά τη διάρκεια της υδροθερμικής προκατεργασίας, η αποικοδόμηση του ημικυτταρινικού κλάσματος λαμβάνει χώρα μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από ιόντα υδρογόνου. Αυτή η αποικοδόμηση πραγματοποιείται επιλεκτικά και διευκολύνει την απομάκρυνση των μονο- και ολιγοσακχαριτών από ημικυτταρίνες, αφήνοντας τα κλάσματα κυτταρίνης και λιγνίνης με μικρή μεταβολή (Garrote et al., 2001, Jiang and Xu, 2016).

Η υδροθερμική προεπεξεργασία υπό ήπιες συνθήκες έχει αποδειχθεί ότι είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την ανάκτηση αντιοξειδωτικών πολυφαινολών από SCG (Conde and Mussatto, 2016). Σε μια διαφορετική έρευνα, η υδροθερμική εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε αποτελεσματικά για το διαχωρισμό των αντιοξειδωτικών ενώσεων από τους πράσινους κόκκους καφέ, και τα εκχυλίσματα εκροής αποδείχθηκαν κατάλληλα για προϊόντα διατροφής (Sato et al., 2018). Ωστόσο δεν έχει μελετηθεί η υδροθερμική προεπεξεργασία για την απολιγνινοποίηση του SCG.

4.6 Ενζυμική υδρόλυση

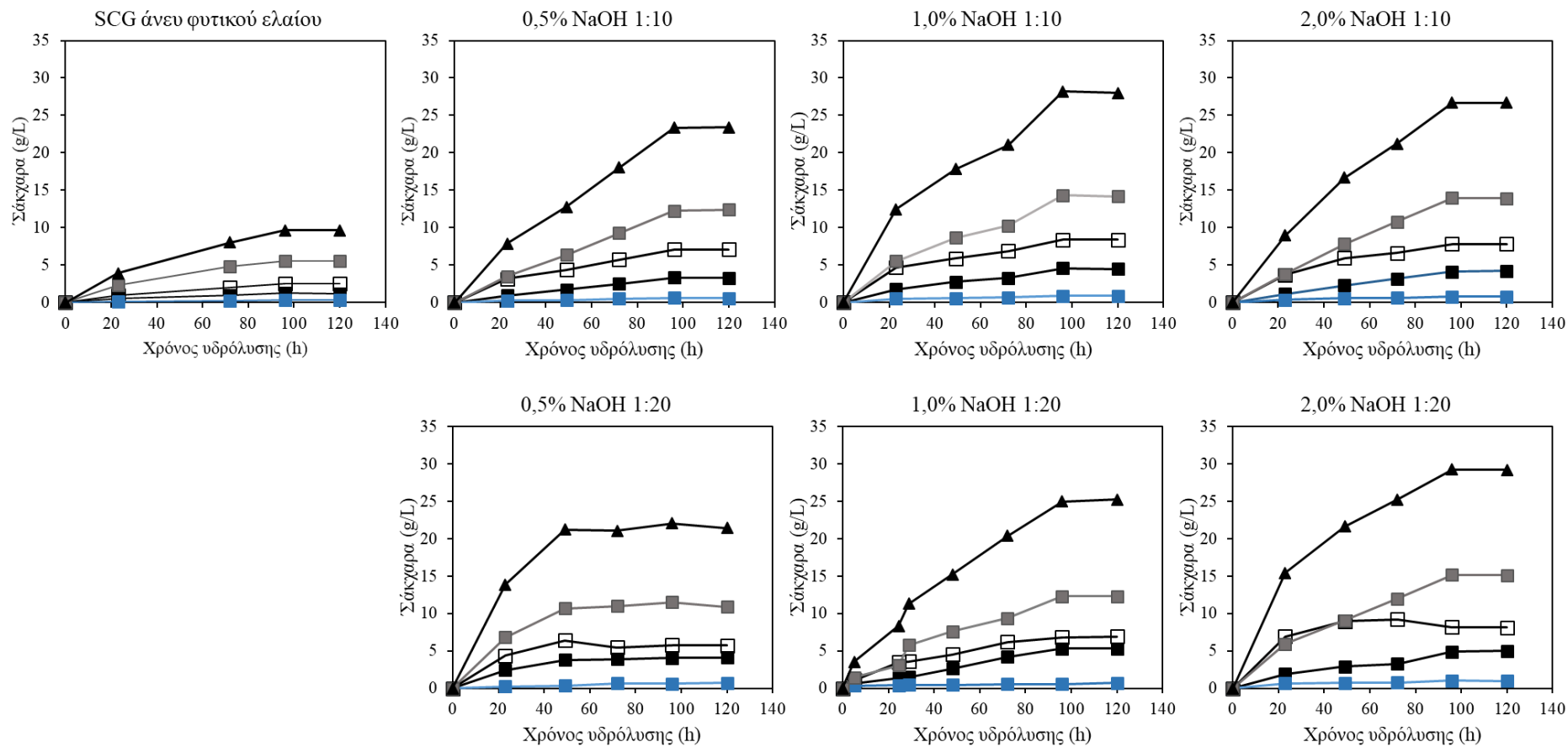
4.6.1 Ενζυμική υδρόλυση προεπεξεργασμένου SCG με αλκαλικό διάλυμα

Τα στερεά κλάσματα SCG που προέκυψαν από την προεπεξεργασία με αλκαλικό διάλυμα NaOH στους 120 °C και στους 90 °C υδρολύθηκαν ενζυμικά με στόχο τη μετατροπή του μεγαλύτερου ποσοστού της ημικυτταρίνης και κυτταρίνης σε μονομερή σάκχαρα. SCG άνευ φυτικού ελαίου χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση. Οι τελικές συγκεντρώσεις των επιμέρους μονομερών σακχάρων παρουσιάζονται στον Πίνακα 6, ενώ οι κινητικές των ενζυμικών υδρολύσεων των στερεών που προέκυψαν από την αλκαλική προεπεξεργασία στους 120 °C και 90 °C απεικονίζονται στο Διάγραμμα 11 και 12 αντίστοιχα.

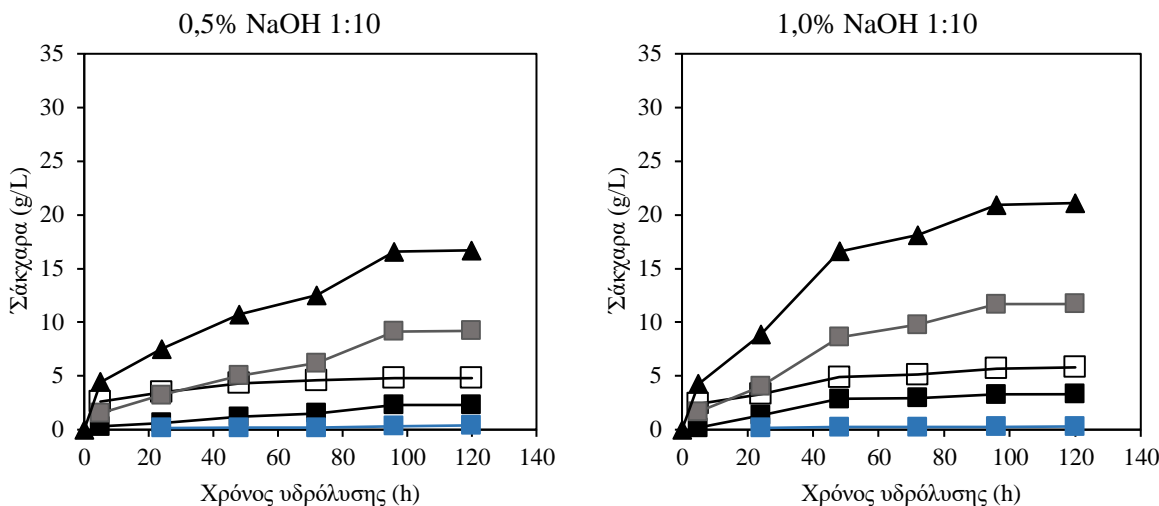
Όπως παρατηρείται η αλκαλική προεπεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ενζυμικής υδρόλυσης συγκριτικά με το SCG χωρίς προεπεξεργασία. Στα στερεά κλάσματα SCG που υποβλήθηκαν σε αλκαλική προεπεξεργασία στους 120 °C παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή μονομερών σακχάρων όπου κυμάνθηκε μεταξύ 22,0-29,3 g/L. Χαμηλότερες τιμές συνολικών σακχάρων παρατηρήθηκαν στις υδρολύσεις των στερεών κλασμάτων που προεπεξεργάστηκαν στους 90 °C (16,6-20,9 g/L). Σε όλες τις περιπτώσεις, το κυριότερο σάκχαρο ήταν η μαννόζη ακολουθούμενο από τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη.

Πίνακας 6 Τελική συγκέντρωση σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση του SCG άνευ φυτικού ελαίου και των προεπεξεργασμένων με αλκαλική προεπεξεργασία στερεών SCG

Συνθήκη προεπεξεργασίας	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Αραβινόζη (g/L)	Μαννόζη (g/L)	Συνολικά σάκχαρα (g/L)
SCG άνευ φυτικού ελαίου	2,5	1,3	0,3	5,5	9,7
0.5% NaOH 1:10	7,1	3,3	0,6	12,3	23,3
1% NaOH 1:10	8,4	4,6	0,9	14,4	28,2
2% NaOH 1:10	7,8	4,1	0,8	14,0	26,7
0.5% NaOH 1:20	5,8	4,1	0,6	11,5	22,0
1% NaOH 1:20	6,8	5,3	0,6	12,3	25,0
2% NaOH 1:20	8,2	4,9	1,0	15,2	29,2
0.5% NaOH 1:10	4,8	2,3	0,3	9,1	16,6
1% NaOH 1:10	5,7	3,3	0,3	11,7	20,9

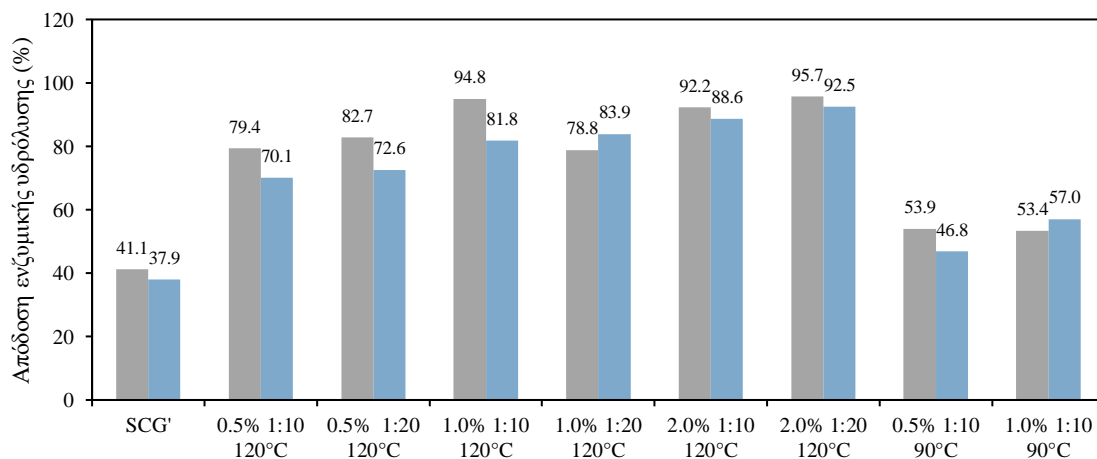


Διάγραμμα 11 Κινητικές παραγόμενης μαννόζης (■), γαλακτόζης (■), αραβινόζης (■), γλυκόζης (□) και συνολικών σακχάρων (▲) κατά την ενζυμική υδρόλυση του SCG άνευ φυτικού ελαίου και των προεπεξεργασμένων SCG σε θερμοκρασία 120 °C



Διάγραμμα 12: Κινητικές παραγόμενης μαννόζης (■), γαλακτόζης (■), αραβινόζης (■), γλυκόζης (□) και συνολικών σακχάρων (▲) κατά την ενζυμική υδρόλυση του SCG άνευ φυτικού ελαίου και των προεπεξεργασμένων SCG σε θερμοκρασία 90 °C.

Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων και λαμβάνοντας υπόψιν τα ποσοστά ημικυτταρίνης και κυτταρίνης του προεπεξεργασμένου SCG (Πίνακας 4) υπολογίστηκαν οι συντελεστές απόδοσης ενζυμικής υδρόλυσης ημικυτταρίνης και κυτταρίνης (Διάγραμμα 13).



Διάγραμμα 13 Απόδοση ενζυμικής υδρόλυσης κυτταρίνης (γκρί) και ημικυτταρίνης (μπλέ) (*SCG': SCG άνευ φυτικού ελαίου και φαινολικών)

Όπως παρατηρείται η προεπεξεργασία με αλκαλικό διάλυμα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης υδρόλυσης τόσο της κυτταρίνης όσο και της ημικυτταρίνης. Υψηλή αποικοδόμηση

της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης που κυμαίνεται από 70 έως 92,5% και από 78,8 έως 95,7% αντίστοιχα παρατηρείται στα προεπεξεργασμένα στερεά SCG στους 120 °C. Στην περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης μετά την αλκαλική προεπεξεργασία στους 90 °C παρατηρείται μικρότερη αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης και της κυτταρίνης που κυμαίνεται από 46,8 έως 57% και από 53,4 έως 53,9% αντίστοιχα. Μεγαλύτερη απόδοση υδρόλυσης τόσο της ημικυτταρίνης όσο και της κυτταρίνης παρατηρείται στην περίπτωση όπου το SCG επεξεργάστηκε με 2% NaOH σε αναλογία στερεού υγρού 1:20. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μεγαλύτερη απομάκρυνση της λιγνίνης κατά το στάδιο της προεπεξεργασίας (ποσοστό απομάκρυνσης 84,5%).

4.6.2 Ενζυμική υδρόλυση προεπεξεργασμένου SCG με υδροθερμική επεξεργασία

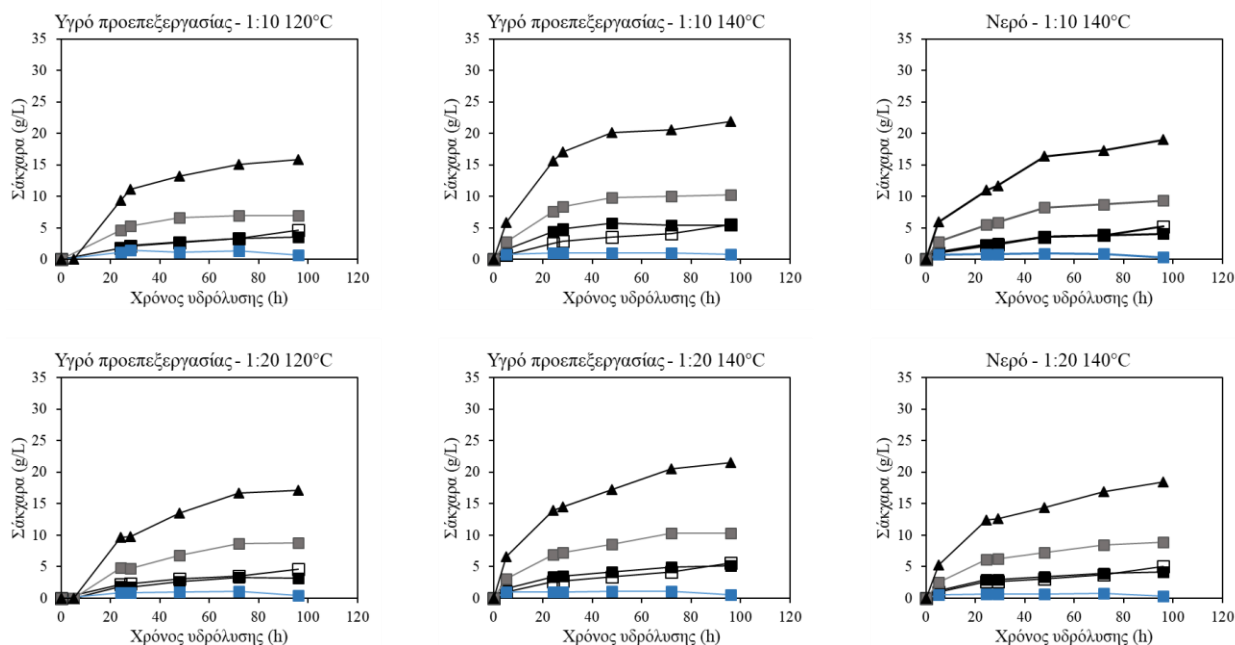
Τα στερεά υπολείμματα SCG και υγρά ρεύματα που προέκυψαν από την προεπεξεργασία SCG με υδροθερμική επεξεργασία στους 120 °C και στους 140 °C υδρολύθηκαν ενζυμικά με στόχο τη μετατροπή του μεγαλύτερου ποσοστού της ημικυτταρίνης και κυτταρίνης σε μονομερή σάκχαρα (Διάγραμμα 4). Επιπλέον, τα στερεά υπολείμματα SCG που προέκυψαν από τη υδροθερμική προεπεξεργασία στους 140 °C χρησιμοποιήθηκαν σε ενζυμική υδρόλυση με τη χρήση νερού. Οι τελικές συγκεντρώσεις των επιμέρους μονομερών σακχάρων της ενζυμικής υδρόλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 7, ενώ οι κινητικές των ενζυμικών υδρολύσεων απεικονίζονται στο Διάγραμμα 14.

Πίνακας 7 Τελική συγκέντρωση σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση του SCG άνευ φυτικού ελαίου και των προεπεξεργασμένων με υδροθερμική προεπεξεργασία στερεών SCG

Υγρό κλάσμα κατά την ενζυμική υδρόλυση	Συνθήκη προεπεξεργασίας του SCG	Γλυκόζη (g/L)	Γαλακτόζη (g/L)	Αραβινόζη (g/L)	Μαννόζη (g/L)	Συνολικά σάκχαρα (g/L)
	SCG άνευ φυτικού ελαίου	2,5	1,3	0,3	5,5	9,7
Υγρό υδροθερμικής προεπεξεργασίας	1:10 120°C	4,7	3,6	0,7	7,0	15,9
	1:20 120°C	4,7	3,2	0,5	8,8	17,1
	1:10 140°C	5,5	5,4	0,8	10,2	21,9
	1:20 140°C	5,6	5,2	0,5	10,3	21,6
Νερό	1:10 140°C	5,3	4,1	0,3	9,3	19,0
	1:20 140°C	5,1	4,2	0,3	8,9	18,5

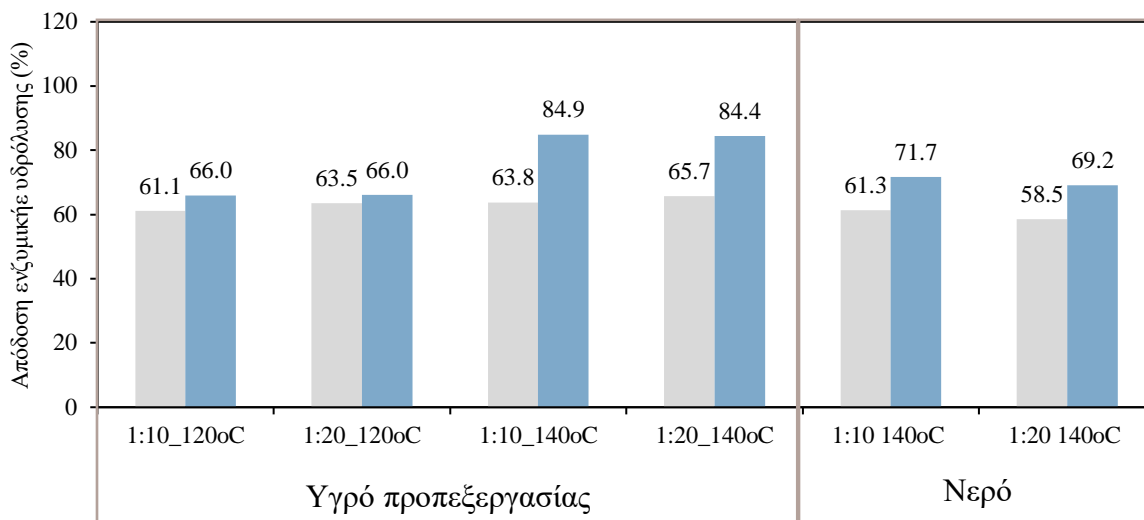
Όπως παρατηρείται η υδροθερμική προεπεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ενζυμικής υδρόλυσης συγκριτικά με το SCG χωρίς προεπεξεργασία. Στα στερεά κλάσματα SCG

που υποβλήθηκαν σε υδροθερμική προεπεξεργασία στους 120 °C με το υγρό της υδροθερμικής προεπεξεργασίας παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή μονομερών σακχάρων όπου κυμάνθηκε μεταξύ 15,9-17,1 g/L. Υψηλότερες τιμές συνολικών σακχάρων παρατηρήθηκαν στις υδρολύσεις των στερεών κλασμάτων που προεπεξεργάστηκαν στους 140 °C (21,6-21,9 g/L). Στην περίπτωση των στερεών κλασμάτων SCG που υποβλήθηκαν σε υδροθερμική προεπεξεργασία στους 140 °C με νερό παρατηρήθηκε μικρότερη παραγωγή συνολικών σακχάρων, γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη ολιγοσακχαριτών στο υγρό της υδροθερμικής προεπεξεργασίας.



Διάγραμμα 14 Κινητικές παραγόμενης μαννόζης (■), γαλακτόζης (■), αραβινόζης (■), γλυκόζης (□) και συνολικών σακχάρων (▲) κατά την ενζυμική υδρόλυση του SCG με υδροθερμική προεπεξεργασία σε θερμοκρασία 120 °C και 140 °C

Στον Διάγραμμα 15 παρουσιάζονται οι συντελεστές απόδοσης ενζυμική υδρόλυσης ημικυτταρίνης και κυτταρίνης λαμβάνοντας υπόψιν τα ποσοστά ημικυτταρίνης και κυτταρίνης του προεπεξεργασμένου SCG (Πίνακας 5).

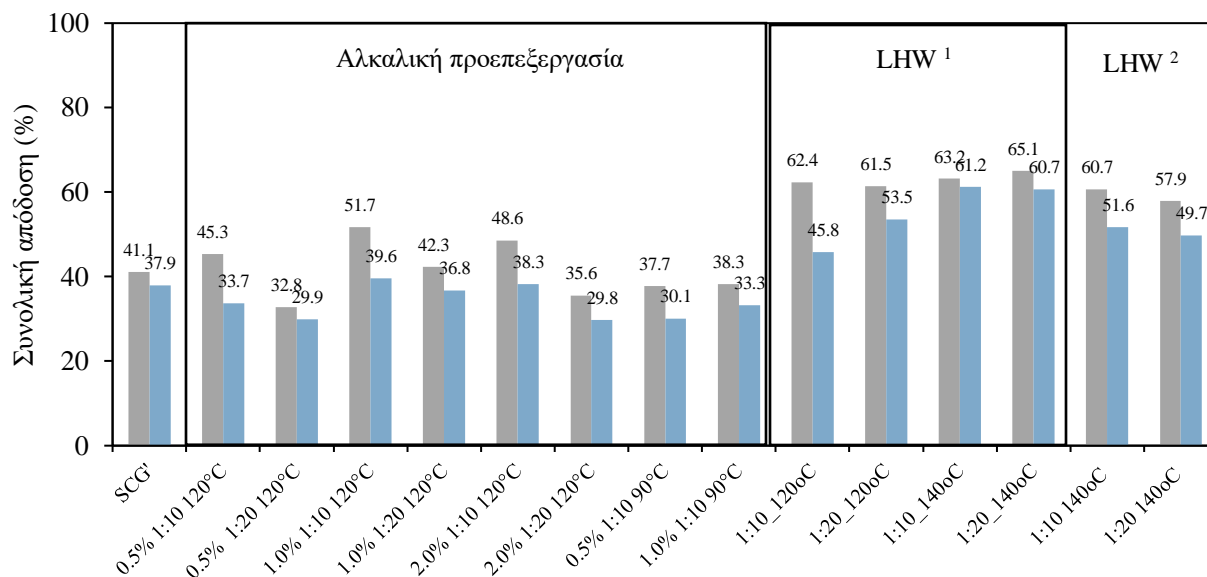


Διάγραμμα 15 Αποδόση ενζυμικής υδρόλυσης κυτταρίνης (γκρί) και ημικυτταρίνης (μπλέ)

Η υδροθερμική προεπεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της απόδοσης υδρόλυσης τόσο της κυτταρίνης όσο και της ημικυτταρίνης. Υψηλή αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης (84,9%) και της κυτταρίνης (63,8-65,7%) παρατηρείται στα προεπεξεργασμένα στερεά SCG στους 140 °C με το υγρό της υδροθερμικής προεπεξεργασίας. Στην αντίστοιχη περίπτωση της υδροθερμικής υδρόλυσης στους 120 °C παρατηρείται μικρότερη αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης (66%) και αντίστοιχη αποικοδόμηση της κυτταρίνης (61,1 και 66%). Τέλος, στην περίπτωση όπου το SCG υδρολύθηκε υδροθερμικά με νερό παρατηρήθηκε υψηλή αποδόμηση της ημικυτταρίνης που κυμαίνεται από 69,2 έως 71,7%, αντίστοιχο ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης παρατηρήθηκε και στις δυο αναλογίες.

4.7 Συγκριτική αξιολόγηση προεπεξεργασίας και ενζυμικής υδρόλυσης

Στο Διάγραμμα 16 παρουσιάζεται η ενζυμική μετατροπή της κυτταρίνης και ημικυτταρίνης του αρχικού SCG και των προεπεξεργασμένων SCG με αλκαλική υδρόλυση και υδροθερμική επεξεργασία βάση την αρχική σύσταση του SCG και λαμβάνοντας υπόψιν τις απώλειες στερεών κατά την προεπεξεργασία.



Διάγραμμα 16 Συνολική απόδοση ενζυμικής υδρόλυσης κυτταρίνης (γκρί) και ημικυτταρίνης (μπλέ) (*SCG': SCG άνευ φυτικού ελαίου και φαινολικών, LHW¹ SCG από υδροθερμική προεπεξεργασία και χρήση του υγρού κλάσματος κατά την ενζυμική υδρόλυση, LHW² SCG από υδροθερμική προεπεξεργασία και χρήση νερού κατά την ενζυμική υδρόλυση υδροθερμική προεπεξεργασία)

Όπως παρατηρείται η απόδοση μετατροπής κυτταρίνης και ημικυτταρίνης στο μη επεξεργασμένο SCG ήταν 41,1% και 37,9% αντίστοιχα. Η αλκαλική προεπεξεργασία σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:10 συνέβαλλε σε μικρό ποσοστό αύξησης της απόδοσης της κυτταρίνης. Αντίθετα η απόδοση ενζυμικής υδρόλυσης της ημικυτταρίνης ήταν χαμηλότερη σε όλες τις περιπτώσεις, δεδομένου της σημαντικής απώλειας ημικυτταρίνης κατά το στάδιο της προεπεξεργασίας.

Η υδροθερμική προεπεξεργασία βοήθησε σημαντικά την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Το ποσοστό υδρόλυσης της κυτταρίνης κυμάνθηκε από 57,9-65,1% σε όλες τις περιπτώσεις. Η απόδοση υδρόλυσης της ημικυτταρίνης επηρεάστηκε σημαντικά από τη θερμοκρασία κατά την υδροθερμική προεπεξεργασία. Συγκεκριμένα, στους 120 °C το ποσοστό υδρόλυσης της ημικυτταρίνης ήταν χαμηλό (45,8-53,5%), ενώ στην περίπτωση που η υδροθερμική πραγματοποιήθηκε στους 140 °C η απόδοση υδρόλυσης της ημικυτταρίνης αυξήθηκε έως και 71,7%. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα, για την παραγωγή

υδρολύματος πλούσιο σε σάκχαρα επιλέχθηκε η υδροθερμική προεπεξεργασία σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:20 και θερμοκρασία 140 °C.

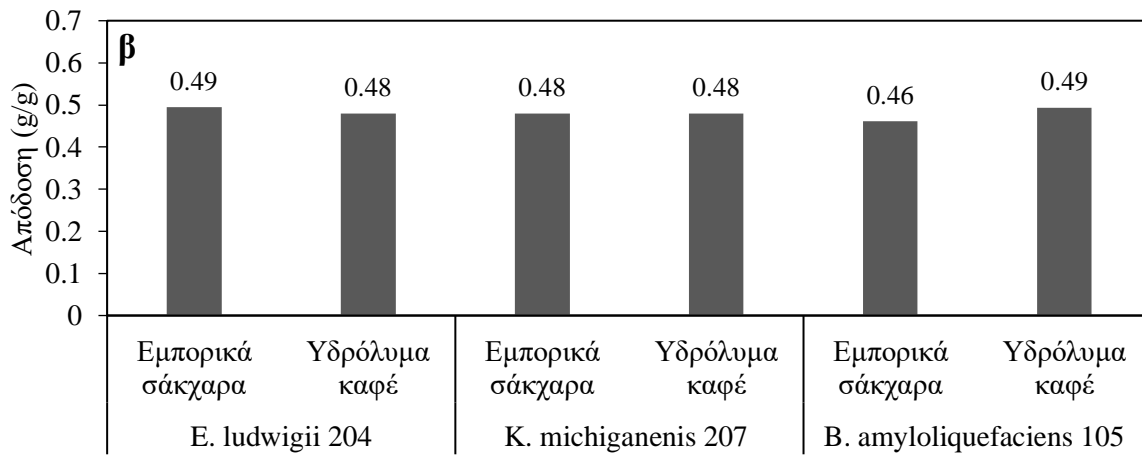
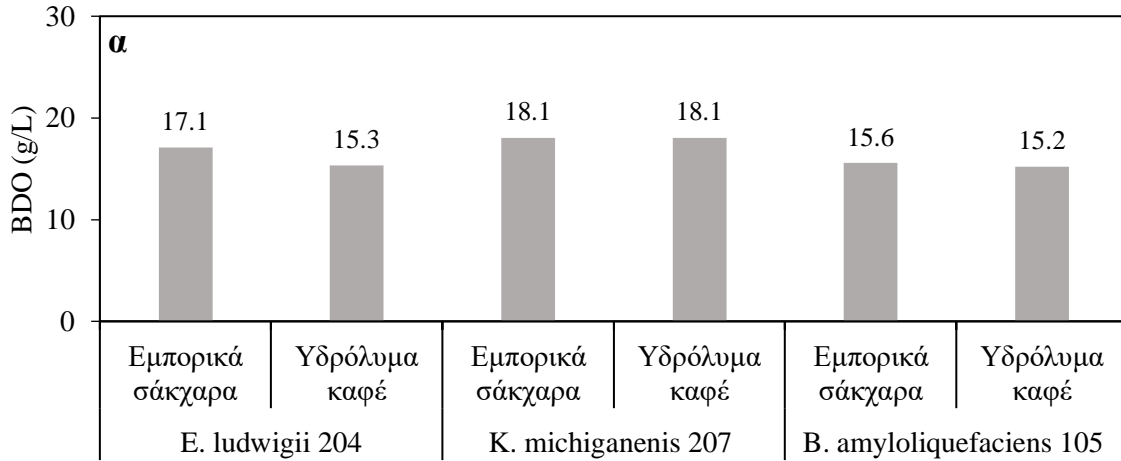
4.8 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και ακετοΐνης

4.8.1 Ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας

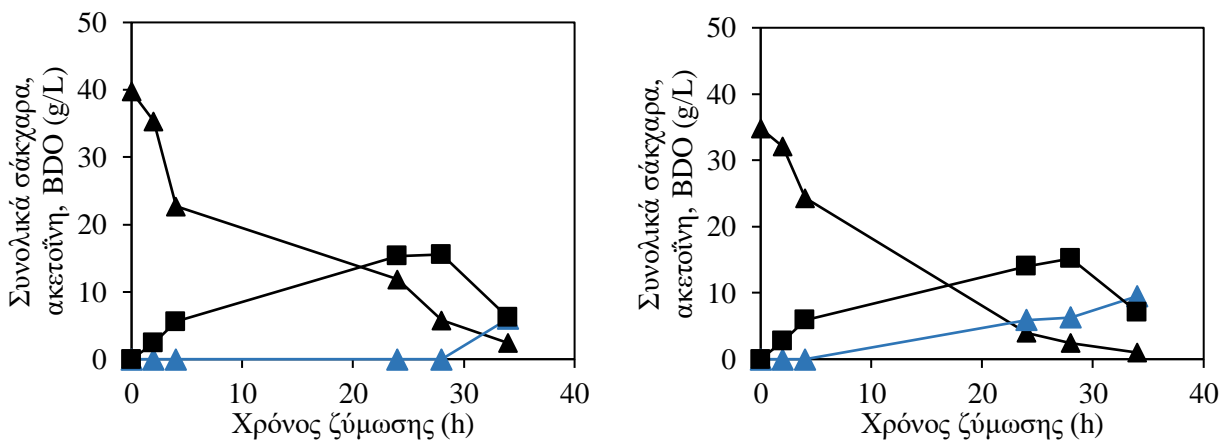
Η βιοτεχνολογική παραγωγή της BDO με τα βακτηριακά στελέχη *E. ludwigii* 204, *K. michiganensis* 207 και *B. amyloliquefaciens* 105 μελετήθηκε αρχικά σε ζυμώσεις κλειστής καλλιέργειας με συνθετικό υπόστρωμα και υδρόλυμα SCG. Στο Διάγραμμα 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παραγωγής της BDO και της αντίστοιχης απόδοσης (g BDO/g καταναλωθέντος υποστρώματος) με τη χρήση εμπορικών σακχάρων και υδρολύματος SCG.

Όπως φαίνεται όλα τα βακτηριακά στελέχη παράγουν BDO τόσο στο συνθετικό υπόστρωμα με εμπορικά σάκχαρα όσο και στο υδρόλυμα SCG. Η παραγωγή της BDO κυμαίνεται σε αντίστοιχες τιμές (15,2-18,1 g/L) με μέγιστη παραγωγή 18,1 g/L, η οποία παρατηρήθηκε από το βακτηριακό στέλεχος *K. michiganensis* 207 και στα δύο υποστρώματα. Αντίστοιχες τιμές απόδοσης BDO σημειώθηκαν από τα βακτηριακά στελέχη *E. ludwigii* 204 και *K. michiganensis* 207 στα δύο υποστρώματα. Αντίθετα, το βακτηριακό στέλεχος *B. amyloliquefaciens* 105 σημείωσε μειωμένη απόδοση (0,46 g/g) στην περίπτωση του συνθετικού υποστρώματος συγκριτικά με το υδρόλυμα SCG. Η παραγωγή ακετοΐνης παρέμεινε χαμηλή (2,3-3 g/L) για τα βακτηριακά στελέχη *E. ludwigii* 204 και *K. michiganensis* 207, ενώ σημαντική αύξηση της παραγόμενης ακετοΐνης παρατηρήθηκε στην περίπτωση του *B. amyloliquefaciens* 105 μετά την εξάντληση της πηγής άνθρακα (Διάγραμμα 18).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα το βακτηριακό στέλεχος *E. ludwigii* 204 επιλέχθηκε για την παραγωγή BDO. Σύμφωνα με αποτελέσματα άλλων μελετών (Maina et al., 2019) η παραγωγή της ακετοΐνης σημειώνεται υπό αερόβιες συνθήκες καθώς και μετά την εξάντληση της πηγής άνθρακα όπου μετατρέπεται η παραγόμενη BDO σε ακετοΐνη. Για το λόγο αυτό το βακτηριακό στέλεχος *B. amyloliquefaciens* 105 επιλέχθηκε για παραγωγή ακετοΐνης σε ημισυνεχή ζύμωση.



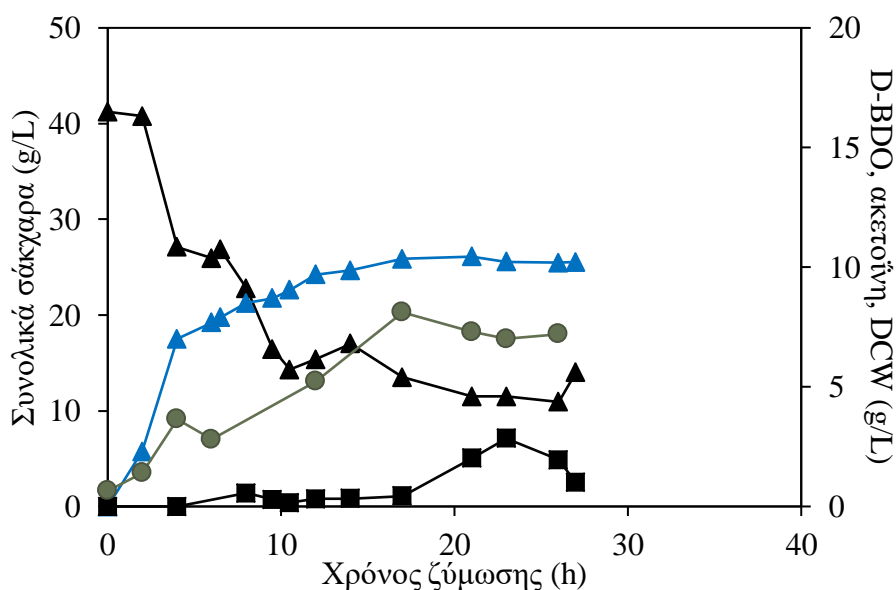
Διάγραμμα 17 Παραγωγή BDO και απόδοση σε εμπορικά σάκχαρα και υδρόλυμα SCG.



Διάγραμμα 18 Κινητική κατανάλωσης συνολικών σακχάρων (▲), παραγωγής BDO (■) και ακετοΐνης (▲) από το *B. amyloliquefaciens* 105 σε συνθετικό υπόστρωμα (α) και σε υδρόλυμα SCG (β)

4.8.2 Ημισυνεχής ζύμωση για παραγωγή ακετοΐνης

Προκειμένου να μελετηθεί η παραγωγή της ακετοΐνης με το βακτηριακό στέλεχος *B. amyloliquefaciens* 105, πραγματοποιήθηκε ζύμωση ημισυνεχής καλλιέργειας υπό αερόβιες συνθήκες. Στο Διάγραμμα 19 παρουσιάζεται η κατανάλωση των σακχάρων καθώς και η παραγωγή της ακετοΐνης, της D-BDO και της βιομάζας. Κατά το πρώτο στάδιο της ζύμωσης παρατηρείται αύξηση της παραγόμενης ακετοΐνης (9,7 g/L) και στη συνέχεια παραμένει σταθερή. Μετά το στάδιο αυτό η κατανάλωση του υποστρώματος παραμένει σταθερή και παρατηρείται αύξηση της παραγόμενης βιομάζας.

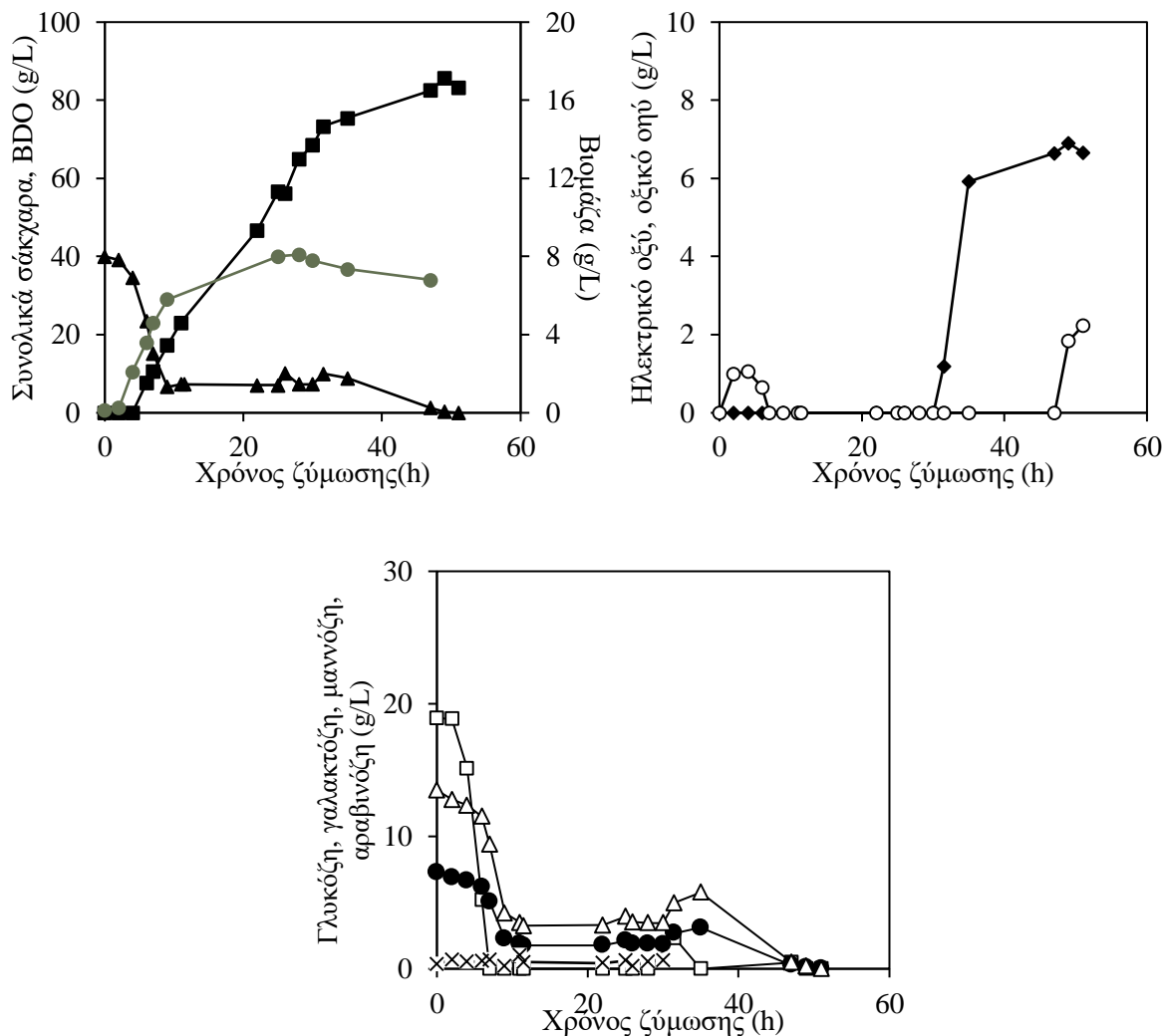


Διάγραμμα 19 Κινητική κατανάλωσης συνολικών σακχάρων (▲), παραγωγής D-BDO (■), ακετοΐνης (▲) και βακτηριακής μάζας - DCW (●) από το *B. amyloliquefaciens* 105 κατά την ημισυνεχή ζύμωση σε υδρόλυμα SCG

4.8.3 Ημισυνεχής ζύμωση για παραγωγή BDO

Η παραγωγή της BDO με το βακτηριακό στέλεχος *E. ludwigii* 204 μελετήθηκε σε ζύμωση ημισυνεχούς καλλιέργειας με υδρόλυμα SCG (Διάγραμμα 20). Όπως φαίνεται η παραγωγή της BDO κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (31,5 h) είναι εκθετική και στη συνέχεια παρατηρείται μειωμένη παραγωγή που έφτασε τα 85,6 g/L. Οι υψηλότερες τιμές παραγωγικότητας και απόδοσης, 2,33 g/L/h και 0,30 g/g αντίστοιχα, σημειώθηκαν στις 31,5 h με υψηλή συγκέντρωση

BDO (73,3 g/L). Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 20, η βακτηριακή μάζα αυξάνεται μέχρι τις 28 h και στη συνέχεια παραμένει σταθερή, ενώ αντίθετα η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και οξικού οξέος σημειώνεται κατά το τελευταίο στάδιο της ζύμωσης.



Διάγραμμα 20 Κινητική κατανάλωσης συνολικών σακχάρων (▲), γλυκόζης (□), γαλακτόζης (●), μαννόζης (Δ), αραβινόζης (×), παραγωγής D-BDO (■), ακετοΐνης (▲), ηλεκτρικού οξέος (◆), οξικού οξέος (○) και βιομάζας (●) από το *E. ludwigii* 204 κατά την ημισυνεχή ζύμωση σε υδρόλυμα καφέ

Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία, ωστόσο οι συνθήκες ζύμωσης καθώς και το βακτηριακό στέλεχος επιδρά στην παραγόμενη BDO (Πίνακας 8).

Πίνακας 8 Παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης με χρήση διαφορετικών μικροοργανισμών και υποστρωμάτων

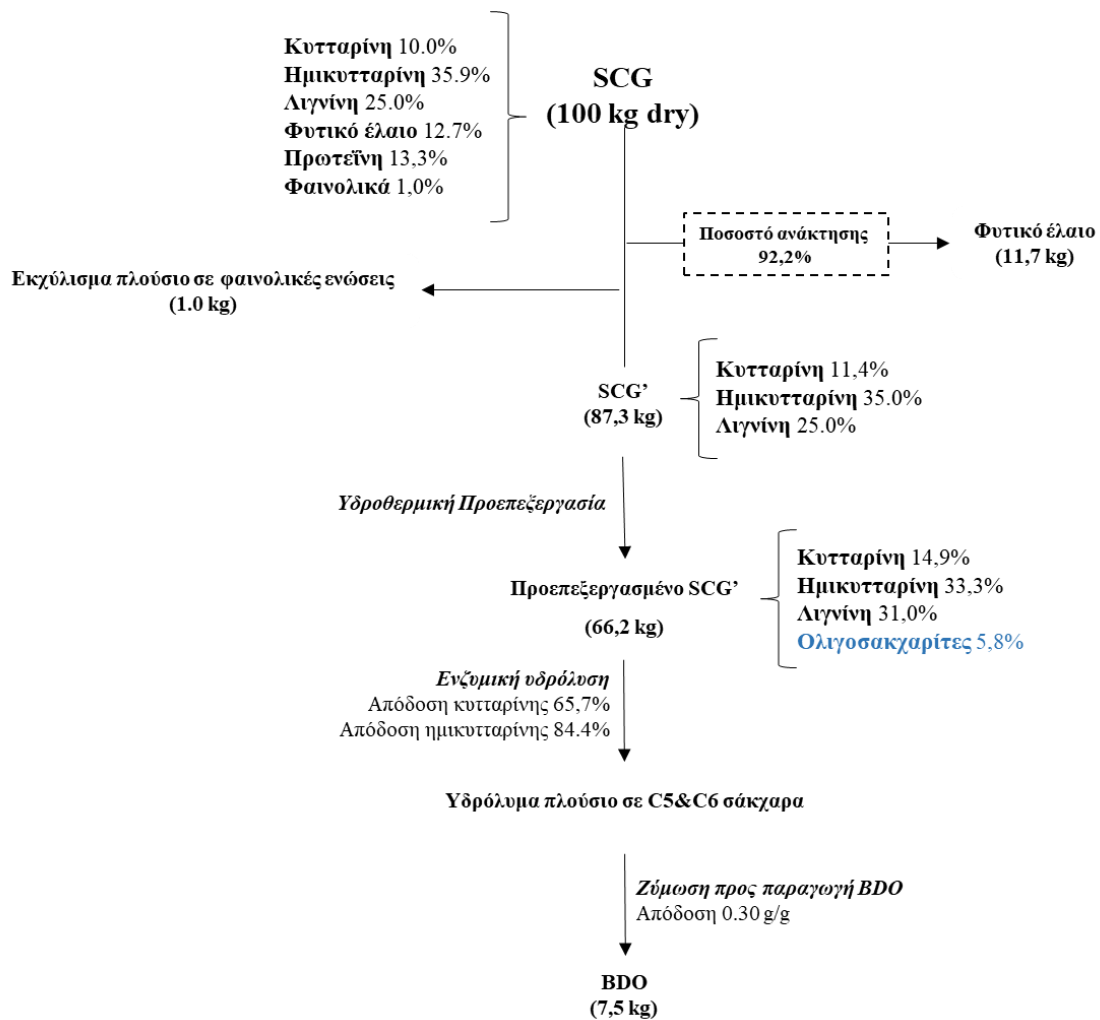
Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	BDO (g/L)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Σύστημα καλλιέργειας	Αναφορά
<i>P. polymyxa</i> ATCC 12321	Υδρόλυμα καλαμποκιού	18,8	0,31	1,13	Συνεχής ζύμωση	Ma et al., 2018
<i>B. licheniformis</i> X10	Υδρόλυμα καλαμποκιού	74,0	0,47	2,10	Ημισυνεχής ζύμωση	Li et al., 2014b
<i>E. cloacae</i> SDM	Λιγνοκυτταρινούχο υδρόλυμα	119,4	0,48	2,34	Ημισυνεχής ζύμωση	Li et al., 2015
<i>S. marcescens</i> H30	Υδρόλυμα σόργου	109,4	0,42	1,40	Ημισυνεχής ζύμωση	Yuan et al., 2017
<i>E. ludwigii</i>	Υδρόλυμα φρούτων	50,0	0,40		Ημισυνεχής ζύμωση	Liakou et al., 2017
<i>E. ludwigii</i>	Υδρόλυμα SCG	73,3	0,30	2,33	Ημισυνεχής ζύμωση	Παρούσα μελέτη

Σε μελέτη των Li et al. (2014) το βακτηριακό στέλεχος *B. licheniformis* παρήγαγε 74 g/L BDO με παραγωγικότητα 2.1 g/L/h σε υδρόλυμα καλαμποκιού. Το στέλεχος έδειξε υψηλή ανθεκτικότητα στους παρεμποδιστές που υπάρχουν στο λιγνοκυτταρινικό υδρόλυμα όπως η φουρφουράλη, η βανιλίνη, το μυρμηκικό και το οξικό οξύ. Οι Ma et al. (2018) μελέτησαν την αξιοποίηση της υδρόλυσης καλαμποκιού σε τρεις τρόπους ζύμωσης για το D-BDO χρησιμοποιώντας το *Paenibacillus polymyxa*. Σε ημισυνεχή ζύμωση σημειώθηκε υψηλή παραγωγή BDO (46,1 g/L), ωστόσο η παραγωγικότητα ήταν σχετικά χαμηλή. Σημαντική αύξηση της παραγωγικότητας επιτεύχθηκε με συνεχή ζύμωση όπου έφτασε τα 1,13 g/L/h. Το γενικά τροποποιημένο στέλεχος *E. cloacae* έχει χρησιμοποιηθεί για παραγωγή BDO σε λιγνοκυτταρινούχο υδρόλυμα σημειώνοντας υψηλή παραγωγή και παραγωγικότητα (119,4 g/L και π 2,34 g/L/h, αντίστοιχα) (Li et al., 2015). Υδρόλυμα φρούτων έχει αξιοποιηθεί από το

βακτηριακό στέλεχος *E. Ludwigii* για παραγωγή BDO (Liakou et al., 2017). Μέγιστη συγκέντρωση BDO (50 g/L) με υψηλή απόδοση (0,40 g/g) σημειώθηκε σε ημισυνεχή καλλιέργεια.

4.9 Ισοζύγια μάζας προτεινόμενης διεργασίας

Στο Διάγραμμα 21 παρουσιάζεται το ισοζύγιο μάζας της προτεινόμενης διεργασίας με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Η αξιοποίηση SCG (100 kg) μέσω της ανάπτυξης σύγχρονου βιοδιυλιστηρίου οδηγεί στο διαχωρισμό 1 kg εκχυλίσματος πλούσιο σε φαινολικά συστατικά και 11,7 kg φυτικό έλαιο καφέ. Το στερεό υπόλειμμα SCG χωρίς φαινολικές ενώσεις και φυτικό έλαιο μετά από υδροθερμική προεπεξεργασία (αναλογία στερεού προς υγρό 1:20, 140 °C) και ακόλουθη ενζυμική υδρόλυση οδηγεί στην παραγωγή πλούσιου σε C5 και C6 σάκχαρα. Λαμβάνοντας υπόψιν τις αποδόσεις μετατροπής κυτταρίνης (65,1%) και ημικυτταρίνης (60,7%), 25,1 kg μονομερών σακχάρων προκύπτουν από το SCG. Η αξιοποίηση του υδρολύματος για τη βιοτεχνολογική παραγωγή BDO από το βακτηριακό στέλεχος *E. ludwigii* 204, οδηγεί σε 7,5 kg BDO.



Διάγραμμα 21 Ισοζύγιο μάζας προτεινόμενης διεργασίας αξιοποίησης του SCG

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το SCG αποτελεί σημαντικό υπόλειμμα της βιομηχανίας τροφίμων καθώς είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και διαφορετικές βιοδραστικές ενώσεις. Το SCG συγκεκριμένα αποτελεί πηγή πολυφαινολών, φυτικού ελαίου και δομικών πολυσακχαριτών. Η σύσταση του SCG εξαρτάται άμεσα από την ποικιλία του καφέ όπως και από τη διαδικασία που ακολουθείται για το καβούρδισμα του (Ballesteros et al., 2014).

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, ερευνήθηκε η δυνατότητα της αξιοποίησης του SCG για την ανάπτυξη σύγχρονου βιοδιωλιστηρίου. Συγκεκριμένα αναπτύχθηκαν μέθοδοι ανάκτησης των προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (φαινολικές ενώσεις και φυτικό έλαιο), η παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων, η παραγωγή υδρολύματος πλούσιο σε σάκχαρα και η βιοτεχνολογική παραγωγή BDO και ακετοΐνης.

Η αξιοποίηση του SCG για την παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων σε συνδυασμό με δύο υποστρώματα, το πίτυρο και το OFMSW, μελετήθηκε χρησιμοποιώντας το μύκητα *Aspergillus awamori* σε δύο αναλογίες SCG:πίτυρο και SCG:OFMSW (75:25 και 50:50) με αρχική υγρασία 65%. Σε όλα τα υποστρώματα παρατηρήθηκε παραγωγή πρωτεασών, φυτασών και β-γλυκοσιδάσης. Συγκεκριμένα, μέγιστη παραγωγή πρωτεασών (15 U/g) εμφανίστηκε στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε SCG και OFMSW σε αναλογία 75:25. Η μέγιστη παραγωγή φυτασών που επιτεύχθηκε ήταν 334 U/g στις 117 h στερεής καλλιέργειας στο υπόστρωμα SCG με πίτυρο σε αναλογία 50:50. Η παραγωγή της β-γλυκοσιδάσης ακολούθησε αντίστοιχη πορεία σε όλα τα υποστρώματα εκτός από την περίπτωση του υποστρώματος SCG με OFMSW σε αναλογία 50:50 όπου παρατηρήθηκε αύξηση των παραγόμενων ενζύμων μεταξύ 50-80 h με μέγιστη παραγωγή 21 U/g. Μικρή παραγωγή γαλακτομαννανών παρατηρήθηκε σε όλα τα υποστρώματα όπου κυμάνθηκε μεταξύ 0,2-0,4 U/g. Τέλος, μικρή παραγωγή κυτταρινασών παρατηρήθηκε στις ζυμώσεις στερεής καλλιέργειας όπου κυμάνθηκε μεταξύ 0,3-0,4 U/g στο υπόστρωμα SCG με OFMSW και 0,3-0,8 U/g στο υπόστρωμα SCG με πίτυρο.

Η ανάκτηση των προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας μελετήθηκε βάση της διεθνούς βιβλιογραφίας. Αναλυτικότερα, η εκχύλιση του φυτικού ελαίου με απόδοση 99,2% επιτεύχθηκε με απλή εκχύλιση με εξάνιο, ενώ η ανάκτηση των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με αιθανόλη (70%, v/v). Μέγιστη ανάκτηση φαινολικών συστατικών (1 g γραμμοισοδύναμα χλωρογενικού οξέος ανά 100 g SCG) επιτεύχθηκε σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:20 και

διάρκεια εκχύλισης 20 min. Η ανάκτηση της πρωτεΐνης των αποβλήτων του καφέ μελετήθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές διεργασίες. Η διεργασία με την αλκαλική επεξεργασία (ρύθμιση του pH στο 10 με την προσθήκη διαλύματος NaOH 5M και ανάδευση στους 50 °C για 3h), το φιλτράρισμα και στη συνέχεια η ρύθμιση του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο με προσθήκη διαλύματος HCl 5M, οδήγησε σε υψηλή απόδοση διαχωρισμού πρωτεϊνών σε σχέση με την πρωτεΐνη που περιέχεται στο αρχικό SCG (17,8%). Ενώ το φιλτράρισμα πριν την καταβύθιση αύξησε την καθαρότητα των πρωτεϊνών (30%), ωστόσο απαιτείται περαιτέρω μελέτη έτσι ώστε να επιτευχθεί αύξηση της απόδοσης διαχωρισμού των πρωτεϊνών και της καθαρότητας του κλάσματος πλούσιου σε πρωτεΐνες.

Μελετήθηκε η αξιοποίηση του εναπομείναντος υπολείμματος SCG για την παραγωγή υδρολύματος πλούσιου σε σάκχαρα. Αναλυτικότερα, αξιολογήθηκαν δύο μέθοδοι προεπεξεργασίας (αλκαλική και υδροθερμική) με σκοπό την αύξηση της απόδοσης κατά την ενζυμική υδρόλυση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και οι δύο μέθοδοι συνέβαλαν στην αύξηση της ενζυμικής υδρόλυσης τόσο της κυτταρίνης όσο και της ημικυτταρίνης. Σημαντική απομάκρυνση στερεών παρατηρήθηκε στην περίπτωση της αλκαλικής προεπεξεργασίας με αποτέλεσμα την μείωση της συνολικής απόδοσης της υδρόλυσης ημικυτταρίνης και κυτταρίνης. Μικρότερη επίδραση στη λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα είχε η υδροθερμική επεξεργασία, ωστόσο η μετέπειτα ενζυμική υδρόλυση οδήγησε σε σημαντική αύξηση της συνολικής απόδοσης. Συγκεκριμένα, η υδροθερμική επεξεργασία στους 140 °C σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:20 w/v και η αξιοποίηση του υγρού κλάσματος της προεπεξεργασίας κατά την ενζυμική υδρόλυση οδήγησαν σε υψηλή συνολική απόδοση κυτταρίνης (65,1%) και ημικυτταρίνης (60,7%).

Το υδρόλυμα πλούσιο σε μονομερή σάκχαρα που προέκυψε από την υδρόλυση του προεπεξεργασμένου SCG με υδροθερμική επεξεργασία στους 140 °C χρησιμοποιήθηκε για τη βιοτεχνολογική παραγωγή ακετοΐνης και BDO. Αρχικά, μελετήθηκαν τρία βακτηριακά στελέχη σε κλειστές ζυμώσεις. Αντίστοιχη παραγωγή BDO παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις. Για την περαιτέρω αξιολόγηση πραγματοποιήθηκαν ημι-συνεχείς ζυμώσεις υπό αερόβιες συνθήκες. Το βακτηριακό στέλεχος *B. amyloliquefaciens* 105 αξιολογήθηκε για παραγωγή ακετοΐνης, ωστόσο επιτεύχθηκε μικρή παραγωγή (9,7 g/L). Η αξιοποίηση υδρολύματος πλούσιου σε μαννόζη και γαλακτόζη δεν έχει μελετηθεί προηγουμένως για παραγωγή ακετοΐνης. Περαιτέρω μελέτη απαιτείται για την αξιοποίηση του υδρολύματος SCG για παραγωγή ακετοΐνης. Για την παραγωγή BDO μελετήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *E. ludwigii* 204 σε ημι-συνεχή ζύμωση. Μέγιστη

παραγωγή BDO (85,6 g/L) επιτεύχθηκε στις 46 h. Υψηλότερη τιμή παραγωγικότητας (2,33 g/L/h) και απόδοσης (0,30 g/g) με ικανοποιητική παραγωγή BDO (73,3 g/L) επιτεύχθη νωρίτερα στις 31,5 h. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί προηγουμένως στη διεθνή βιβλιογραφία χρησιμοποιώντας λιγνοκυτταρινούχο υδρόλυμα.

Η δυνατότητα της αξιοποίησης του SCG για την ανάπτυξη σύγχρονου βιοδιωλιστηρίου προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και BDO αποτελεί πιθανή διέξοδο για τη διαχείριση διαφόρων αποβλήτων και παραπροϊόντων το οποίο αποτελεί μείζονος σημασίας πρόβλημα στη σύγχρονη αλλά και μελλοντική βιοοικονομία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, μέσω της αξιοποίησης 100 kg SCG δύναται να παραχθούν 11,7 kg φυτικού ελαίου καφέ, 1 kg εκχυλίσματος πλούσιο σε φαινολικά συστατικά και 7,5 kg BDO. Περαιτέρω μελέτη απαιτείται για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού των προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας καθώς και την ενζυμική υδρόλυση. Τεχνο-οικονομική αξιολόγηση και μελέτη των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της προτεινόμενης διεργασίας θα πρέπει να μελετηθούν για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας της διεργασίας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acevedo, F., Rubilar, M., Scheuermann, E., Cancino, B., Uquiche, E., Garces, M., et al. (2013). Spent coffee grounds as a renewable source of bioactive compounds. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 7(3), 420e428.

Alam, S., Capit, F., Weigandg, W.A., Hongq, J., (1990). Kinetics of 2,3-Butanediol Fermentation by *Bacillus amyloliquejizciens*: Effect of Initial Substrate Concentration and Aeration 71–84.

Al-Dhabi, N. A., Ponmurugan, K., & Jeganathan, P. M. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 206-213.

Al-Hamamre, Z., Foerster, S., Hartmann, F., Kroger, M., & Kaltschmitt, M. (2012). Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*, 96, 70e76.

Alves, R. C., F. Rodrigues, M. A. Nunes, A. F. Vinha and M. B. P. P. Oliveira. (2017). State of the art in coffee processing by-products. In: *Handbook of Coffee Processing*. Ch. 1. Elsevier Inc., Amsterdam, Netherlands, pp. 1-26.

American Association of Cereal Chemists Inc (AACC), (1983). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. 8th ed., St. Paul, MN, USA.

Anastopoulos, I., Karamesouti, M., Mitropoulos, A.C., Kyzas, G.Z., (2017). A review for coffee adsorbents. *J Mol Liq*. 229, 555–565.

Ashok P, Soccol CR, Nigam P, Brand D, Mohan R and Roussos S, Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocessing. *Biochem Eng J6*: 153 - 162 (2000).

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2000. *Official Methods of Analysis*, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, USA, Vol. 2.

Balat M., B. H. (2008). Progress in bioethanol progressing. *Progress in Energy and Combustion Science*; 34, pp. 551-573.

Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I., (2014). Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food Bioprocess Technology* 7

(12),3493–3503.

Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., (2004). The “buttery” attribute of wine diacetyl desirability spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 235–252.

Blinová, L., Bartošová, A., & Sirotiak, M. (2017). Biodiesel production from spent coffee grounds. *Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology*, 25(40), 113-121.

Boussarsar, H., Rogé, B., Mathlouthi, M., (2009). Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresour. Technol.* 100, 6537–6542.

Bravo, J., Juaniz, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L. W., De Pena, et al. (2012). Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), 12565-12573.

Calixto, F., Fernandes, J., Couto, R., Hernández, E.J., Najdanovic-Visak, V., Simões, P.C., (2011). Synthesis of fatty acid methyl esters via direct transesterification with methanol/carbon dioxide mixtures from spent coffee grounds feedstock. *Green Chem.* 13 (5), 1196–1202.

Campos-Vegaa, Guadalupe Loarca-Pina, Hayde A. Vergara-Castaneda and B. Dave Oomah. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Food science and technology* 45:24-36.

Celinska E., Grajek W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol- Current state and prospects. *Biotechnology Advances* 27:715-725.

Cho, S.M., Kang, B.R., Han, S.H., Anderson, A.J., Park, J., Lee, Y., Cho, B.H., Yang, K., Ryu, C., Kim, Y.C., (2008). 2R, 3R-Butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, Is Involved in Induction of Systemic Tolerance to Drought in *Arabidopsis thaliana* 21, 1067–1075.

Choi, I.S., Wi, S.G., Kim, S.-B., Bae, H.-J., (2012). Conversion of coffee residue waste into bioethanol with using popping pretreatment. *Bioresour. Technol.* 125, 132–137.

Conde, T., & Mussatto, S. I. (2016). Isolation of polyphenols from spent coffee grounds and silverskin by mild hydrothermal pretreatment. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*,

46(4), 406-409.

Cruz, M. V., Paiva, A., Lisboa, P., Freitas, F., Alves, V. D., Simoes, P., et al. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology. *Bioresource Technology*, 157, 360-363.

Cui, Z. F., Shi, J., Wan, C. X., & Li, Y. B. (2018). Comparison of alkaline- and fungi-assisted wet storage of corn stover. *Bioresource Tech.*, 109, 98-104.

Da Cruz, S.H., Nichols, N.N., Dien, B.S., Saha, B.C., Cotta, M.A., (2012). Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse using response surface methodology improves digestibility and ethanol production by SSF. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 439–447.

Davila- Guzman, Soto-Regalato E., Rangel-Mendez J. (2013). Copper Biosorption by Spent Coffee Ground: Equilibrium, Kinetics, and Mechanism. 41(6) :557-564.

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.

Faustino, L., Viktor, M.J., Rose, S.H., Viljoen-Bloom, M., van Zyl, W.H., Basaglia, M., Cagnin, L., Casella, S., (2010). Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases. *Biotechnol. Bioeng.* 112 (9), 1751–1760.

Franca S. and Oliveira S. (2009). Discrimination between roasted coffee, roasted corn and coffee husks by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy. *Food science and technology* 50: 715-722.

Frómeta, R. A. R., Sánchez, J. L., & García, J. M. R. (2020). Evaluation of coffee pulp as substrate for polygalacturonase production in solid state fermentation. *Emirates Journal of Food and Agriculture*.

Galbe M., Z. G. (2007). Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*; 108, pp. 41-65.

Garg S. K. and Jain A. (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresource Technology* 5:03-109.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C., (2001). Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. *Process Biochem.* 36, 571–578.

Gu, J., Pei, W., Tang, S., Yan, F., Peng, Z., Huang, C., ... & Yong, Q. (2020). Procuring biologically active galactomannans from spent coffee ground (SCG) by autohydrolysis and enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 572-580.

Gurram, R., Al-Shannag, M., Knapp, S., Das, T., Singasaas, E., Alkasrawi, M., (2016). Technical possibilities of bioethanol production from coffee pulp: a renewable feedstock. *Clean Technol. Envir.* 18 (1), 269–278.

Haile, M., (2014). Integrated valorization of spent coffee grounds to biofuels. *Biofuel Research Journal* 2, 65-69.

Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, A., Sluiter, J., & Templeton, D., (2008). Preparation of samples for compositional analysis. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, 1617.

Hansen A.T. Mads, K. J. (2008). Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw (*Triticum aestivum* L.)- The impact of lignin relocation and plant tissues on enzymatic accessibility. *Bioresource Technology*, pp. 2804-2811.

Hardgrove, S. J., & Livesley, S. J. (2016). Applying spent coffee grounds directly to urban agriculture soils greatly reduces plant growth. *Urban Forestry & Urban Greening*, 18, 1-8.

Hendriks, A.T. and Zeeman, G. (2009). Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*, 100, 10-18.

International coffee organization. Διαθέσιμο: <http://www.ico.org> (4 Αυγούστου, 2020)

Jansen, N., Flickinger, M.C., Tsao, G.T., (1984). Production of 2,3-Butanediol from D-Xylose by XXVI, 362–369.

Ji, X.-J., Huang, H., Ouyang, P.-K., (2011). Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. *Biotechnol. Adv.* 29, 351–64.

Jiang, W., Xu, J., (2016). A novel stepwise pretreatment on corn stalk by alkali deacetylation and liquid hot water for enhancing enzymatic hydrolysis and energy utilization efficiency. *Bioresour. Technol.* 209, 115–124.

Karmee S. (2018). A spent coffee grounds based biorefinery for the production of biofuels,

biopolymers, antioxidants and biocomposites. *Waste Management* 72: 240-254.

Knill J. and Kennedy F (2003). Degradation of cellulose under alkaline conditions. *Carbohydrate Polymers* 51 (2003) 281–300.

Kondamudi, N., Mohapatra, S. K., & Misra, M. (2008). Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(24), 11757-11760.

Kondamudi, N., Mohapatra, S.K., Misra, M., (2008). Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 56, 11757-11760.

Koutinas A., Belafi-Bako K., Kabiri-Badr A., Toth A., Gubicza L., Webb C., (2001). Enzymatic hydrolysis of polysaccharides: hydrolysis of starch by an enzyme complex from fermentation by *Aspergillus awamori*. *Food and bioproducts processing* 79 (1), 41-44.

Kovalcik, A., Obruca, S., & Marova, I. (2018). Valorization of spent coffee grounds: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 110, 104-119.

Kwon, E.E., Yi, H., Jeon, Y.J., (2013). Sequential co-production of biodiesel and bioethanol with spent coffee grounds. *Bioresource Technology* 136, 475-80.

Lestinsky, P., Palit, A., (2016). Wood pyrolysis using Aspen plus simulation and industrial applicable model. *GeoScience Engineering* 62, 11-16.

Li B., Smith B., Hossain Md. M., (2014). Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method, *Separation and Purification Technology* 48: 182–188.

Li, L., Chen, C., Li, K., Wang, Y., Gao, C., Ma, C., & Xu, P. (2014). Efficient simultaneous saccharification and fermentation of inulin to 2, 3-butanediol by thermophilic *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. *Applied and environmental microbiology*, 80(20), 6458-6464.

Li, L., Li, K., Wang, Y., Chen, C., Xu, Y., Zhang, L. & Xu, P. (2015). Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2R, 3R)-2, 3-butanediol from lignocellulose-derived sugars. *Metabolic engineering*, 28, 19-27.

Liakou, V., Pateraki, C., Palaiogeorgou, A. M., Kopsahelis, N., de Castro, A. M., Freire, D. M. G., ... & Koutinas, A. (2018). Valorisation of fruit and vegetable waste from open markets for the production of 2, 3-butanediol. *Food and Bioproducts Processing*, 108, 27-36.

Lie, S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen.

Journal of the Institute of Brewing, 79(1), 37-41.

Low, J. H., Rahman, W. A. W. A., & Jamaluddin, J. (2015). The influence of extraction parameters on spent coffee grounds as a renewable tannin resource. *Journal of Cleaner Production*, 101, 222-228.

Ma, C., Wang, A., Qin, J., Li, L., Ai, X., Jiang, T., Tang, H., Xu, P., (2018). Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 49–57.

Martinez-Saez et al., (2017) 'Use of spent coffee grounds as food ingredient in bakery products.', *Food Chem.*, 216, 114–22

Mata T, Martinsa A., Nídia S. Caetano. (2017). Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. *Bioresourse Technology* 247: 1077-1084.

Mccall, K.B., Georgi, C.E., (1954). The Production of 2, 3-Butanediol by Fermentation of sugar beet molasses1 355–359.

Mickelson M. and Werkman H., (1938). Influence of pH on the dissimilation of glucose by *Aerobacter indologenes*.

Moxley G, Zhang Y H P. (2007). More accurate determination of acid labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification. *Energy & Fuels*, 21, 3684– 3688.

Muangrat, R., & Pongsirikul, I. (2019). Recovery of spent coffee grounds oil using supercritical CO₂: Extraction optimisation and physicochemical properties of oil. *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 334-346.

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

Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012b). Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 897-903.

Mussatto, S. I., Ballesteros, L.F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011a). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173-179.

Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2011b). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate*

Polymers, 83(2), 368-374.

Obruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svoboda, Z. (2010). Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*, 32(12), 1925-1932.

Obruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svoboda, Z., Eremka, L., & Marova, I. (2014). Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1e8.

Oliveira, R. C., Oliveira, L. S., Franca, A. S., & Augusti, R. (2009). Evaluation of the potential of SPME-GC-MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley. *Journal of Food Composition and analysis*, 22(3), 257-261.

Pandey A., «Handbook of plant-based biofuels» CRC Press Taylor & Francis Group Hu, G., Heitmann, J. A., and Rojas, O. J. (2009) «Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues» *BioRes.* 3(1), 270- 294.

Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., & Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 6(2), 153-162.

Panusa, A., Zuorro, 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.

Perego, P., Converti, a., Del Borghi, a., Canepa, P., (2000). 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industry residues. *Bioprocess Eng.* 23, 613–620.

Petrik, S., Obruca, 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.

Pfluger, R. A. (1975). Soluble coffee processing. In C. L. Mantell(Ed.),Solid wastes: origin, collection, processing, and disposal.New York: Wiley.

Plaza, M.G., Gonzalez, A.S., Pevida, C., Pis, J.J., Rubiera, F., (2012). Valorisation of spent coffee grounds as CO₂ adsorbents for postcombustion capture applications. *Applied Energy* 99, 273-279.

Pushpa S. Murthy , M. Madhava Naidu, Pullabhatla Srinivas, (2009). Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 8, 1246-1249.

Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2014). A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International*, 65, 462-468.

Rajha, H. N., El Darra, N., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R. G., & Louka, N. (2014). Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid-liquid ratio, particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process. *Food and Nutrition Sciences*.

Rocha, M.V.P., De Matos, L.J.B.L., De Lima, L.P., Da Silva Figueiredo, P.M., Lucena, I.L., Femandes, F.A.N., Gonçalves, L.R.B., (2014). Ultrasound-assisted production of biodiesel and ethanol from spent coffee grounds. *Bioresource Technology* 167, 343-348.

Rufford, T.E., Hulicova-Jurcakova, D., Zhu, Z., Lu, G.Q., (2008). Nanoporous carbon electrode from waste coffee beans for high performance supercapacitors. *Electrochem. Commun.* 10 (10), 1594–1597.

Saha B.C and Bothast R.J, (1999). Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1, 321–326.

Sato T., Takahata T., Honma T. et al., (2018). “Hydrothermal extraction of antioxidant compounds from green coffee beans and decomposition kinetics of 3-o-caffeoylquinic acid,” *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 57, no. 22, pp. 7624–7632.

Scherer, R., & Godoy, H. T., (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.

Scully, D. S., Jaiswal, A. K., & Abu-Ghannam, N. (2016). An investigation into spent coffee waste as a renewable source of bioactive compounds and industrially important sugars. *Bioengineering*, 3(4), 33.

Silva, V.F.N., Arruda, P.V., Felipe, M.G.A., Gonçalves, A.R., Rocha, G.J.M., (2011). Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 809–817.

Sluiter A., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., and Templeton D., (2005). Determination of Extractives in Biomass. Technical Report NREL/TP-510-42619.

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.

Somnuk, K., Eawlex, P., & Prateepchaikul, G. (2017). Optimization of coffee oil extraction from spent coffee grounds using four solvents and prototype-scale extraction using circulation process. *Agriculture and Natural Resources*, 51(3), 181-189.

Syu, M.-J., (2001). Biological production of 2,3-butanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 10–18.

Taherzadeh M.J., K. K. (2007). Acid- based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*(2) , pp. 472-99.

Tehrani, N.F., Aznar, J.S., Kiros, Y., (2015). Coffee extract residue for production of ethanol and activated carbons. *Journal of Cleaner Production* 91, 64-70.

Teresa Conde & Solange I. Mussatto (2016). Isolation of polyphenols from spent coffee grounds and silverskin by mild hydrothermal pretreatment, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46:4, 406-409.

Torres-Valenzuela, M. T., Cordova-López, J., RodríguezSerrano, G., Roussos, S., Ramírez-Coronel, Ma. A., Favela-Torres, E. and Saucedo-Castañeda, G., (2011). Enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. *Food Technol. Biotechnol.*, 49(3), 369-373.

Wang, Q., Wang, X., Wang, X., & Ma, H. (2008). Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 43(3), 280-286.

Wang, Z., Wu, G., & Jönsson, L. J. (2018). Effects of impregnation of softwood with sulfuric acid and sulfur dioxide on chemical and physical characteristics, enzymatic digestibility, and fermentability. *Bioresource technology*, 247, 200-208.

Wu, D., Xiao, L., Ba, Y., Wang, H., Zhang, A., Wu, X., Niu, M., Fang, K., (2017). The Recovery of Energy, Nitrogen and Phosphorous from Three Agricultural Wastes by Pyrolysis. *Energy Procedia* 105, 1263-1269.

Xiao C., R. Bolton, W.L. Pan. (2007). Lignin from rice straw Kraft pulping: Effects on soil aggregation and chemical properties. *Bioresource Technology* 98, 1482–1488.

Xiao, Z., & Lu, J. R. (2014). Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: a review. *Biotechnology advances*, 32(2), 492-503.

Xiao, Z., & Xu, P. (2007). Acetoin metabolism in bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 33(2), 127-140.

Yuan, J., He, Y. Z., Guo, Z. W., Gao, H. F., Chen, F. B., Li, L. Z., ... & Zhang, L. Y. (2017). Utilization of sweet sorghum juice for efficient 2, 3-butanediol production by *Serratia marcescens* H30. *BioResources*, 12(3), 4926-4942.

Πηγή: <https://commons.wikimedia.org/>