



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της παραγωγής μικροβιακού λίπους με χρήση υδρολύματος
αποβλήτων καφέ και φλοιών πορτοκαλιού

Νικόλαος Β. Γιαννάκης

Επιβλέπων Καθηγητής:

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της παραγωγής μικροβιακού λίπους με χρήση υδρολύματος
αποβλήτων καφέ και φλοιών πορτοκαλιού

"Study of microbial oil production using coffee waste hydrolysate
and orange peels"

Νικόλαος Β. Γιαννάκης

Εξεταστική Επιτροπή:

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής ΓΠΑ

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

Μελέτη της παραγωγής μικροβιακού λίπους με χρήση υδρολύματος αποβλήτων καφέ και φλοιών πορτοκαλιού

ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μηχανικής & Επεξεργασίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετάβαση της χημικής βιομηχανίας προς την εποχή της κυκλική βιοοικονομίας μέσω της ανάπτυξη καινοτόμων και βιώσιμων βιοδιεργασιών έχει ως σκοπό την ελαχιστοποίηση της χρήσης ορυκτών πόρων. Η βιοτεχνολογική παραγωγή προϊόντων από ανανεώσιμες πρώτες ύλες έχει ως στόχο την ενίσχυση της βιωσιμότητας. Συγκεκριμένα, η καλλιέργεια ελαιογόνων ζυμών σε υπόστρωμα από αγρο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα, για την παραγωγή μικροβιακών ελαίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή πληθώρας προϊόντων αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική προσέγγιση στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας και της βιωσιμότητας.

Στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκε το οργανικό κλάσμα στερεών αποβλήτων και συγκεκριμένα τα στερεά απόβλητα που προκύπτουν κατά την εκχύλιση του καφέ (Spent Coffee Grounds-SCGs) και οι φλοιοί των στυμμένων πορτοκαλιών, για τον διαχωρισμό συστατικών προστιθέμενης αξίας. Το φυτικό έλαιο διαχωρίστηκε αποτελεσματικά με την χρήση οξικού αιθυλεστέρα ως πράσινος διαλύτης, και στη συνέχεια τα φαινολικά συστατικά του SCGs εκχυλίστηκαν με αιθανόλη υπό την επίδραση υπερήχων και έπειτα από υδροθερμική προκατεργασία το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε ενζυμική υδρόλυση. Από τους φλοιούς των πορτοκαλιών εκχυλίστηκαν τα ελεύθερα σάκχαρα. Τόσο το υδρόλυμα του καφέ όσο και τα ελεύθερα σάκχαρα των φλοιών των πορτοκαλιών χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα σε μικροβιακές ζυμώσεις για την βιοτεχνολογική παραγωγή λιπιδίων με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296.

Επίσης, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509, *L. starkeyi* DSM 70296 και *R. toruloides* NRRL Y-27012 αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναπτυχθούν και παράγουν μικροβιακά λιπίδια σε συνθετικό υπόστρωμα με διαφορετικές πηγές άνθρακα σε κλειστές καλλιέργειες, ενώ οι δύο πρώτοι αξιολογήθηκαν και σε ημισυνεχείς καλλιέργειες σε συνθετικό υπόστρωμα με πηγή

άνθρακα γλυκόζη και ξυλόζη. Όλοι οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν και παράγααν λίπος, αποτελούμενο κυρίως από λιπαρά οξέα Δ^9 C18:1, C16:0, C18:0 και $\Delta^{9,12}$ C18:2, σε όλα τα διαφορετικά υποστρώματα. Στις ημισυνεχείς ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296 η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας που επιτεύχθηκε ήταν 107,79 g/L με περιεκτικότητα σε λίπος, 51,03% w/w, ενώ με τον *C. curvatus* ATCC 20509 επιτεύχθηκε μία από τις υψηλότερες περιεκτικότητες σε λίπος της τάξης του 62,5% με την συγκέντρωση της βιομάζας να φτάνει στα 70,4 g/L.

Επιστημονική Περιοχή: Αξιοποίηση αποβλήτων βιομηχανιών τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: Απόβλητα καφέ, απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού, μικροβιακό λίπος

Study of microbial oil production using coffee waste hydrolysate and orange peels

*MSc Food Science and Technology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Processing and Engineering*

ABSTRACT

The transition of the chemical industry into the era of the circular bioeconomy, which aims to minimize the use of fossil resources, can be achieved through the development of novel sustainable bioprocesses. Biotechnological production of products from renewable feedstocks will enhance and improve the sustainability of bio-based chemicals. In particular, the cultivation of oleaginous yeasts for microbial oil production through the valorization of agro-industrial substrate, that can be used as an intermediate product for the production of different value-added products and chemicals is an important approach in the context of circular economy and sustainability.

In the present study, the biowaste fraction of municipal solid waste, and more specifically the spent coffee grounds (SCGs) wastes from coffee extraction and the orange peels, were used for the recovery of value-added components and microbial oil production. The oil fraction from SCGs was efficiently extracted with ethyl acetate as green solvent and subsequently the phenolic components of SCGs were extracted with aqueous mixture containing ethanol under sonication. Subsequently, the residual solids were hydrothermal pretreated, and afterwards enzymatic hydrolysis was subjected. In the case of orange peels the free sugars were extracted. Both, the produced coffee hydrolysate and the free sugars from orange peels were used as carbon source for microbial oil with the microorganism *L. starkeyi* DSM 70296.

The oleaginous yeast strains *C. curvatus* ATCC 20509, *L. starkeyi* DSM 70296, and *R. toruloides* NRRL Y-27012 were evaluated for their ability to grow in batch cultures on a synthetic medium with various commercial carbon source for microbial oil production. *C. curvatus* and *L. starkeyi* were also evaluated in fed-batch cultures using synthetic medium and a mixture of glucose:xylose as carbon source. All microorganisms were efficiently grew and produced microbial oil, consisting mainly of C18:1, C16:0, C18:0, and C18:2 fatty acids on the different carbon sources. In the fed-batch fermentations performed with the microorganism *L. starkeyi* DSM 70296, a

maximum biomass concentration of 107.785 g/L was obtained with a lipid content of 51.03% w/w, while in case of *C. curvatus* ATCC 20509 the lipid content was reached 62.5% w/w with a biomass concentration of 70.4 g/L.

Scientific area: Food waste valorisation

Keywords: Spent coffee grounds, orange peels, microbial oil

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 αρχικά να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Απόστολο Κουτίνα για την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης, την καθοδήγηση και την συνεργασία, καθώς και για την αμέριστη εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου όλο αυτό το διάστημα. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τους κ. Παπανικολάου Σεραφείμ και κ. Νικόλαο Στοφόρο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την μεταδιδάκτορα Ελένη Στυλιανού, η οποία συνέβαλε τα μέγιστα στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας και ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει σε οτιδήποτε χρειαζόμουν, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Κατιάνα Φιλιππή και την μεταδιδάκτορα Χρυσάνθη Πατεράκη, η αρωγή των οποίων υπήρξε εξαιρετικά πολύτιμη.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που ήταν πάντα στην διάθεσή μου, συμβουλευόντάς με και καθοδηγώντας με, όποτε παρέστη ανάγκη. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου, την κοπέλα μου και τους φίλους μου, για την ανιδιοτελή συμπαράσταση και την αμέριστη κατανόηση που έδειξαν- και συνεχίζουν να δείχνουν- καθ' όλο το διάστημα των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΙΚΩΝ.....	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	xiv
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ	xvi
1 Εισαγωγή	1
1.1 Βιοδιύλιστήριο	1
1.1.1 Ανάπτυξη βιοδιυλιστηρίων με χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών.....	4
1.2 Αξιοποίηση του οργανικού κλάσματος στερεών αστικών απορριμμάτων	6
1.2.1 Απόβλητα καφέ.....	8
1.2.1.1 Εφαρμογές προϊόντων προστιθέμενης αξίας αποβλήτων καφέ	12
1.2.2 Απόβλητα φρούτων και ειδικότερα εσπεριδοειδών.....	15
1.2.2.1 Απόβλητα πορτοκαλιών	15
1.2.2.1 Εφαρμογές προϊόντων προστιθέμενης αξίας αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού.....	16
1.3 Λιπίδια.....	17
1.3.1 Βιοσύνθεση Μικροβιακού λίπους από ζύμες (Single Cell Oil, SCO).....	19
2 Σκοπός μελέτης.....	23
3 Υλικά και Μέθοδοι	24
3.1 Πρώτες ύλες	24
3.2 Διαχωρισμός Προϊόντων Υψηλής Προστιθέμενης Αξίας.....	24
3.2.1 Στερεά απόβλητα καφέ	24

3.2.1.1	Φυτικό έλαιο.....	24
3.2.1.2	Εκχύλιση Φαινολικών Ενώσεων.....	25
3.2.1.3	Εκχύλιση ελεύθερων σακχάρων με νερό.....	25
3.3	Υδροθερμική προ επεξεργασία SCGs άνευ λίπους και φαινολικών και ενζυμική υδρόλυση.....	25
3.3.1	Προσδιορισμός απόδοσης ενζυμικής υδρόλυσης ημικυτταρίνης και κυτταρίνης.....	26
3.4	Μικροοργανισμοί.....	27
3.5	Υπόστρωμα Προκαλλιέργειας.....	27
3.6	Θρεπτικό μέσο για τη βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις.....	28
3.7	Θρεπτικό μέσο για τη βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ημισυνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα.....	29
3.8	Αναλυτικές μέθοδοι.....	30
3.8.1	Προσδιορισμός Υγρασίας.....	30
3.8.2	Προσδιορισμός Τέφρας.....	30
3.8.3	Προσδιορισμός Εκχυλίσμων Συστατικών.....	30
3.8.4	Προσδιορισμός των δομικών πολυσακχαριτών και λιγνίνης.....	32
3.8.5	Προσδιορισμός Πρωτεΐνης.....	34
3.8.6	Ποσοτικός Προσδιορισμός κυτταρικής μάζας.....	36
3.8.7	Ποσοτικός Προσδιορισμός Ενδοκυτταρικού Μικροβιακού Ελαίου.....	36
3.8.8	Προσδιορισμός Λιπαρών Οξέων.....	38
3.8.9	Προσδιορισμός Σακχάρων.....	40
3.8.10	Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN).....	40
3.8.11	Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου.....	43
3.8.12	Προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά.....	43

4	Αποτελέσματα και Συζήτηση	45
4.1	Σύσταση του αποβλήτου της εκχύλισης του καφέ (SCGs).....	45
4.2	Εκχύλιση φυτικού ελαίου και φαινολικών συστατικών του καφέ (SCGs).....	46
4.2.1	Εκχύλιση φυτικού ελαίου του καφέ.....	46
4.2.1	Εκχύλιση φαινολικού περιεχομένου του αποβλήτου του καφέ.....	47
4.2.2	Σύσταση του αποβλήτου της εκχύλισης του καφέ (SCGs) μετά την απαγωγή φυτικού ελαίου και φαινολικών ενώσεων	49
4.2.3	Υδροθερμική προεπεξεργασία και ενζυμική παραγωγή υδρολύματος SCGs πλούσιο σε σάκχαρα.....	50
4.3	Εκχύλιση ελεύθερων σακχάρων των φλοιών πορτοκαλιού με νερό.....	51
4.4	Αξιοποίηση αποβλήτων για τη βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296 52	
4.5	Ισοζύγια μάζας προτεινόμενης διεργασίας	56
4.6	Βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες.....	57
4.6.1	Καλλιέργειες <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 σε υπόστρωμα με διαφορετικές πηγές άνθρακα	57
4.6.2	Καλλιέργειες <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296 σε υπόστρωμα με διαφορετικές πηγές άνθρακα	61
4.6.3	Καλλιέργειες <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα με διαφορετικές πηγές άνθρακα	66
4.6.4	Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακού λίπους κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις.....	69
4.7	Βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα.....	71
4.7.1	Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα με τον μικροοργανισμό <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	71

4.7.2	Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα με τον μικροοργανισμό <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296	73
4.7.3	Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακού λίπους κατά τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις	77
5	Συμπεράσματα	79
	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	82

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων θρεπτικού μέσου	29
Πίνακας 2. Χημική σύσταση του καφέ.....	45
Πίνακας 3. Διεργασίες προσδιορισμού ολικού περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά	48
Πίνακας 4. Σύσταση του κλάσματος του αποβλήτου SCGs μετά την εκχύλιση του φυτικού ελαίου και των φαινολικών συστατικών.....	50
Πίνακας 5. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους	54
Πίνακας 6. Συνοπτικά αποτελέσματα της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων από τους διαφορετικούς μικροοργανισμούς και διαφορετικές πηγές άνθρακα.....	55
Πίνακας 7. Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων με διαφορετικές πηγές άνθρακα με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>C. curvatus</i>	61
Πίνακας 8. Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων με διαφορετικές πηγές άνθρακα με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>L. starkeyi</i>	65
Πίνακας 9. Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων με διαφορετικές πηγές άνθρακα με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>R. toruloides</i>	69
Πίνακας 10. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους από τους διαφορετικούς μικροοργανισμούς	70
Πίνακας 11. Βιβλιογραφική ανασκόπηση ζυμώνσεων σε βιοαντιδραστήρα των μικροοργανισμών <i>C. curvatus</i> και <i>L. starkeyi</i>	76
Πίνακας 12. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους κατά τις ημι-συνεχείς ζυμώνσεις	78

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΙΚΩΝ

Σχήμα 1 Καμπύλη αναφοράς της γλυκίνης με τη μέθοδο FAN	43
Σχήμα 2 Καμπύλη αναφοράς ισοδύναμων καφεϊκού οξέος	44
Σχήμα 3 Σύσταση λιπαρών οξέων (% w/w) φυτικού ελαίου SCGs υπό την επίδραση υπερήχων με εκχύλιση από εξάνιο	47
Σχήμα 4 Κινητική παραγόμενων ολικών σακχάρων (●), Γλυκόζης (○), Ξυλόζης (●), Μαννόζης (●), Αραβινόζης (●) και Γαλακτόζης (●) κατά την ενζυμική υδρόλυση του SCGs με υδροθερμική προ επεξεργασία	51
Σχήμα 5 Κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων φλοιών πορτοκαλιού (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>L. starkeyi</i> DSM 70296	52
Σχήμα 6 Κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων υδρολύματος SCGs (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>L. starkeyi</i> DSM 70296	53
Σχήμα 7 Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>C. curvatus</i> ATCC 20509	58
Σχήμα 8 Κινητική κατανάλωσης μαννόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>C. curvatus</i> ATCC 20509	59
Σχήμα 9 Κινητική κατανάλωσης ξυλόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>C. curvatus</i> ATCC 20509	60
Σχήμα 10 Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>L. starkeyi</i> DSM 70296	62
Σχήμα 11 Κινητική κατανάλωσης μαννόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>L. starkeyi</i> DSM 70296	63

Σχήμα 12 Κινητική κατανάλωσης ξυλόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◊) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....	64
Σχήμα 13 Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◊) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012.....	66
Σχήμα 14 Κινητική κατανάλωσης μαννόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◊) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012.....	67
Σχήμα 15 Κινητική κατανάλωσης ξυλόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◊) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012.....	68
Σχήμα 16 Κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◊) σε ημι-συνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>C. curvatus</i> ATCC 20509	72
Σχήμα 17 Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (◊) και ξυλόζης (◆) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>C. curvatus</i> ATCC 20509.....	72
Σχήμα 18 Κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◊) σε ημι-συνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....	74
Σχήμα 19 Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (◊) και ξυλόζης (◆) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....	74

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Σύγκριση συμβατικού δυλιστηρίου με βιοδυλιστήριο (Clark & Deswarte, 2015) (τροποποιημένο).....	3
Εικόνα 2. Ισοζύγια μάζας και προτεινόμενο βιοδυλιστήριο για την αξιοποίηση φλοιών πορτοκαλιού (Tsouko et al., 2020)	6
Εικόνα 3. Προβλεπόμενη παραγωγή αποβλήτων ανά περιοχή του πλανήτη (εκατομμύρια τόνοι/έτος) (Worldbank, 2019).....	7
Εικόνα 4. Εσωτερική απεικόνιση του καρπού του καφέ.....	9
Εικόνα 5. Επεξεργασία του καρπού του καφέ (a) και οι παραγόμενες δευτερογενείς ροές (b) (Murthy & Naidu, 2012).....	10
Εικόνα 6. Διαχωρίσιμα συστατικά από το απόβλητο της εκχύλισης του καφέ (SCGs) (Saratale et al., 2020).....	11
Εικόνα 7. Αριθμός δημοσιεύσεων ανά χρόνο σχετικά με τις δυνατότητες ανακύκλωσης των αποβλήτων της βιομηχανίας καφέ (Atabani et al., 2019).....	12
Εικόνα 8. Οδοί αξιοποίησης του αποβλήτου του καφέ (SCGs) (Saratale et al., 2020)..	14
Εικόνα 9. Παραγωγή πορτοκαλιών κατά την περίοδο 2019/2020 (Πηγή: Statista, 2020)	15
Εικόνα 10. Εσωτερική απεικόνιση του πορτοκαλιού.....	16
Εικόνα 11. Μηχανισμός αντίδρασης μετατροπής των γλυκεριδίων σε μεθυλεστέρες και των λιπαρών οξέων σε σάπωνες	39
Εικόνα 12. Διάσταση και αντίδραση των σαπώνων με μεθανόλη προς παραγωγή μεθυλικών εστέρων.....	39
Εικόνα 13. Αντίδραση νινυδρίνης με ελεύθερη αμινομάδα προς παραγωγή έγχρωμου συμπλόκου.	41
Εικόνα 14. Μηχανισμός αντίδρασης νινυδρίνης με ελεύθερη αμινομάδα προς παραγωγή έγχρωμου συμπλόκου.	42
Εικόνα 15. Ισοζύγια μάζας και προτεινόμενη διεργασία για το βιοδυλιστήριο του καφέ	57

Εικόνα 16. Μορφολογική απεικόνιση των κυττάρων στο μικροσκόπιο κατά την ημισυνεχή ζύμωση του μικροοργανισμού <i>C. curvatus</i> ATCC 20509	73
Εικόνα 17. Μορφολογική απεικόνιση των κυττάρων στο μικροσκόπιο κατά την ημισυνεχή ζύμωση του μικροοργανισμού <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....	75

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

SCGs	Στερεά απόβλητα καφέ (Spent Coffee Grounds)
HPLC	High-performance liquid chromatography
GC	Gas chromatography
db	Επί ξηρού (Dry basis)
NADH	Νικοτάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο (Nicotinamide adenine dinucleotide)
FADH	Φλαβόινο αδένινο νουκλεοτίδιο (Flavin adenine dinucleotide)
NADPH	Φωσφορικό νικοτάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
ATP	Τριφωσφορική αδενοσύνη (adenosine triphosphate)
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη (adenosine diphosphate)
AMP	Μονοφωσφορική αδενοσύνη (adenosine monophosphate)
PDC	Σύμπλεγμα της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (pyruvate dehydrogenase complex)
ICDH	Ισοκιτρική αφυδρογονάση (isocitrate dehydrogenase)
TCA	Κύκλος τρικαρβοξυλικών οξέων
FAS	Συνθετάση λιπαρών οξέων (Fatty acid synthetase)
ACP	Πρωτεΐνη μεταφοράς ακυλομάδας (Acyl carrier protein)
MDH	Αφυδρογονάση του μηλικού (malate dehydrogenase)

1 Εισαγωγή

1.1 Βιοδιϋλιστήριο

Σήμερα, το πρόβλημα της κλιματικής αλλαγής και οι προκλήσεις για την προστασία του περιβάλλοντος, είναι πρωτοφανούς κλίμακας και απαιτούν συντονισμένη και συστημική δράση. Για τον λόγο αυτό η Ευρωπαϊκή ένωση αλλά και άλλοι παγκόσμιοι θεσμοί έχουν θεσπίσει αυστηρούς κανονισμούς για την επίτευξη φιλόδοξων στόχων. Οι στόχοι αυτοί αποτυπώνονται στο «European Green Deal», μία φιλόδοξη ατζέντα προκειμένου η Ευρωπαϊκή Ένωση να καταστεί κλιματικά ουδέτερη μέχρι το 2050. Για να καταστεί ο στόχος αυτός νομικά δεσμευτικός, η Επιτροπή πρότεινε τον Ευρωπαϊκό Νόμο για το Κλίμα, ο οποίος θέτει επίσης έναν νέο, πιο φιλόδοξο καθαρό στόχο μείωσης των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, τουλάχιστον -55% έως το 2030 σε σύγκριση με τα επίπεδα του 1990. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την ευαισθητοποίηση του κοινού, έχουν ανοίξει τον δρόμο για την υιοθέτηση εναλλακτικών οδών τόσο για την παραγωγή προϊόντων, όσο και για την παραγωγή ενέργειας, η οποία σήμερα είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του 75% των αερίων θερμοκηπίου στην Ευρωπαϊκή Ένωση (European commission, 2021). Σε παγκόσμιο επίπεδο, με την συμφωνία του Παρισιού, που τέθηκε σε ισχύ από το 2016, οι 196 συμμετέχουσες χώρες δεσμεύτηκαν για την μείωση της αύξησης της θερμοκρασίας της γης και έθεσαν ως στόχο την αύξηση της κατά λιγότερο από 2°C μέχρι το 2050 (United Nations, 2015). Το μέγιστο συνολικό όριο εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου που μπορούν να έχουν απελευθερωθεί στην ατμόσφαιρα μέχρι την καταληκτική ημερομηνία προκειμένου να επιτευχθεί ο παραπάνω στόχος, είναι 750 γιγατόνοι. Μόνο το 2018 το σύνολο των αερίων του θερμοκηπίου που απελευθερώθηκαν, ήταν περίπου 60 γιγατόνοι (Olhoff & Christensen, 2018).

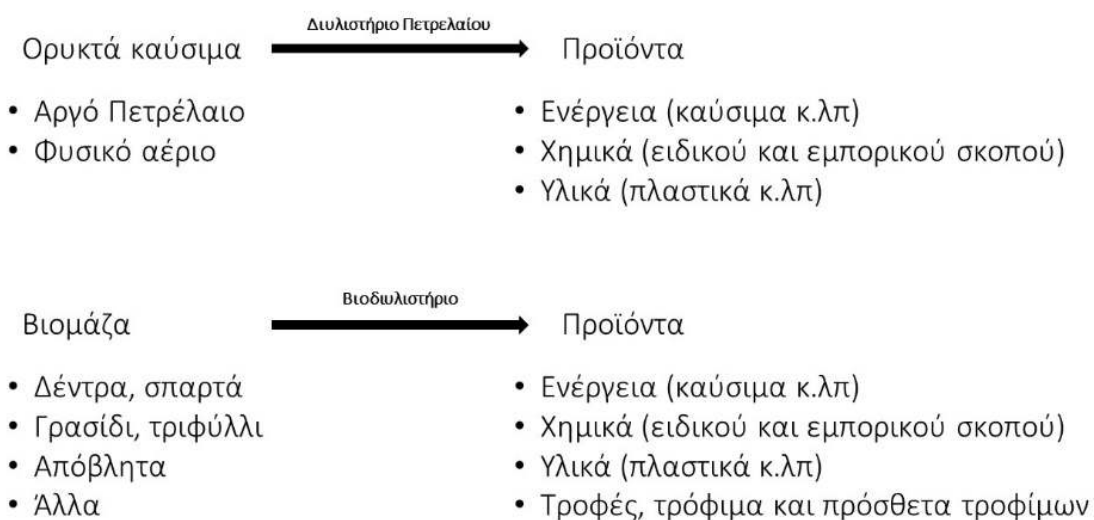
Μεγάλο μέρος των εκπεμπόμενων αερίων του θερμοκηπίου, και συγκεκριμένα το 14%, προέρχεται από τις μεταφορές. Παράλληλα, ο αριθμός των οχημάτων (>6 t) σε παγκόσμια κλίμακα αυξάνεται και αναμένεται να διπλασιαστεί μέσα στα επόμενα 20 με 25 χρόνια, από 1 σε 2 δισεκατομμύρια μονάδες. Σύμφωνα με τις προβλέψεις, το μερίδιο των ηλεκτροκίνητων οχημάτων αναμένεται μεν να αυξηθεί, ωστόσο το γεγονός αυτό, ακόμα και αν ο ηλεκτρισμός προέρχεται εξ ολοκλήρου από ανανεώσιμες πηγές

ενέργειας, δεν είναι αρκετό προκειμένου να επιτευχθεί ανθρακική ουδετερότητα των μεταφορών μέχρι το 2050 (Unglert et al., 2020).

Συνεπώς, η στροφή από τα ορυκτά καύσιμα στα βιοκαύσιμα αποτελεί ιδανική λύση, ειδικά για την ανάγκη των μεταφορών. Βέβαια, η μετάβαση από μια οικονομία με βάση τους ορυκτούς σε μια οικονομία με βάση τους βιογενείς πόρους απαιτεί την πλήρη αξιοποίηση των επιστημονικών καινοτομιών στην υποδομή της χημικής βιομηχανίας (Koutinas et al., 2014).

Κατά συνέπεια, αναπτύσσονται συνεχώς νέες ιδέες και τεχνολογίες για την παραγωγή όχι μόνο καυσίμων, αλλά και οργανικών χημικών, πολυμερών, και άλλων υλικών από βιομάζα. Η λευκή βιοτεχνολογία, δηλαδή η βιοτεχνολογική έρευνα που αφορά την βιομηχανική παραγωγή προϊόντων, θα μπορούσε να παρέχει τα απαραίτητα εργαλεία για την εφαρμογή αυτών των ιδεών στα βιοδιυλιστήρια, τα οποία έχουν προσδιοριστεί ως κρίσιμα σημεία για την επίτευξη των στόχων παραγωγής εναλλακτικών καυσίμων (Office of energy efficiency and renewable energy, 2021). Σε κάθε περίπτωση, προκειμένου να καθίσταται αειφόρος, η παραγωγή χημικών, βιοπολυμερών και καυσίμων θα πρέπει να εξαρτάται πλήρως από τον ανανεώσιμο άνθρακα.

Τα βιοδιυλιστήρια είναι εγκαταστάσεις ή δίκτυο εγκαταστάσεων που, ανάλογα με τα συμβατικά διυλιστήρια της βιομηχανίας πετρελαίου, αξιοποιούν ροές αποβλήτων και υποπροϊόντων από υφιστάμενους βιομηχανικούς τομείς καθώς και το οργανικό κλάσμα των αστικών αποβλήτων μετατρέποντάς τα σε πόρους για την παραγωγή πρώτων υλών, είτε μέσω διαχωρισμού των συστατικών προστιθέμενης αξίας είτε μέσω μικροβιακών ζυμώσεων, οδηγώντας τελικά στην παραγωγή μίας πληθώρας χημικών ουσιών, βιογενών υλικών καθώς και ενέργειας, μεγιστοποιώντας με αυτό τον τρόπο την αξία της βιομάζας (Εικόνα 1) (Clark & Deswarte, 2015; Koutinas et al., 2014).



Εικόνα 1. Σύγκριση συμβατικού διυλιστηρίου με βιοδιυλιστήριο (Clark & Deswarte, 2015) (τροποποιημένο)

Παράλληλα, η ανάπτυξη των βιοδιυλιστηρίων οφείλει να υπηρετεί και τους τρεις πυλώνες της βιώσιμης ανάπτυξης. Έτσι, πέρα από την περιβαλλοντική, θα πρέπει να δοθεί σημασία και στην οικονομική βιωσιμότητα, η οποία μέχρι σήμερα αναβάλλει την πλήρη υιοθέτηση τους, καθώς και στην κοινωνική υπευθυνότητα που αποτελεί τον τρίτο πυλώνα.

Οι μεγάλες προκλήσεις που συναντώνται στην παρούσα κατάσταση των βιοδιυλιστηρίων είναι η αποδοχή τους από την αγορά, η διαθεσιμότητα πρώτων υλών, ο μεγάλος όγκος προϊόντων που απαιτείται για την κάλυψη της ζήτησης καθώς και το πολύ υψηλό κεφάλαιο επένδυσης, χωρίς η επένδυση να συνοδεύεται πάντα από αντίστοιχη ανταποδοτικότητα. Επιπροσθέτως, διάφορες άλλες, τεχνικές, οικολογικές, οικονομικές και κοινωνικές προκλήσεις εντοπίζονται σε όλο το μήκος της παραγωγικής αλυσίδας βιοδιυλιστηρίων, όπως η χρήση γης, η επισιτιστική ασφάλεια κ.α. (Katakojwala & Mohan, 2021)

Στο πλαίσιο αυτό, η κατάλληλη επιλογή της πρώτης ύλης που θα χρησιμοποιηθεί για παραγωγή προϊόντων στα βιοδιυλιστήρια, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την υπερπήδηση ορισμένων από τα προαναφερθέντα προβλήματα και την τελική

βιωσιμότητα του όλου εγχειρήματος, αφού το κόστος προμήθειας αυτής καθώς και το κόστος προκατεργασίας της, καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τα οικονομικά στοιχεία της επένδυσης.

Η αξιοποίηση αποβλήτων, όπως αυτά από βιομηχανίες που χρησιμοποιούν φρούτα και λαχανικά, από ζυθοποιεία, από οινοποιεία, από την επεξεργασία των ζαχαρότευτλων, η ακατέργαστη γλυκερόλη που προκύπτει από την παραγωγή βιοντίζελ, τα απόβλητα από τις βιομηχανίες χαρτοπολτού καθώς και το οργανικό κλάσμα των αστικών αποβλήτων φαίνεται να αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την παραγωγή προϊόντων στα βιοδυλιστήρια (Ioannidou et al., 2020).

1.1.1 Ανάπτυξη βιοδυλιστηρίων με χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών

Τα τελευταία χρόνια, πλήθος ερευνών εστιάζει στην ανάπτυξη καινοτόμων βιοδυλιστηρίων με την χρήση ακατέργαστων πρώτων υλών.

Η κλασμάτωση του πολτού σακχαρότευτλων για την παραγωγή πηκτινών, φαινολικών συστατικών καθώς και υδρολύματος πλούσιου σε σάκχαρα με τελικό σκοπό την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, έχει μελετηθεί από τους Alexandri et al. (2019).

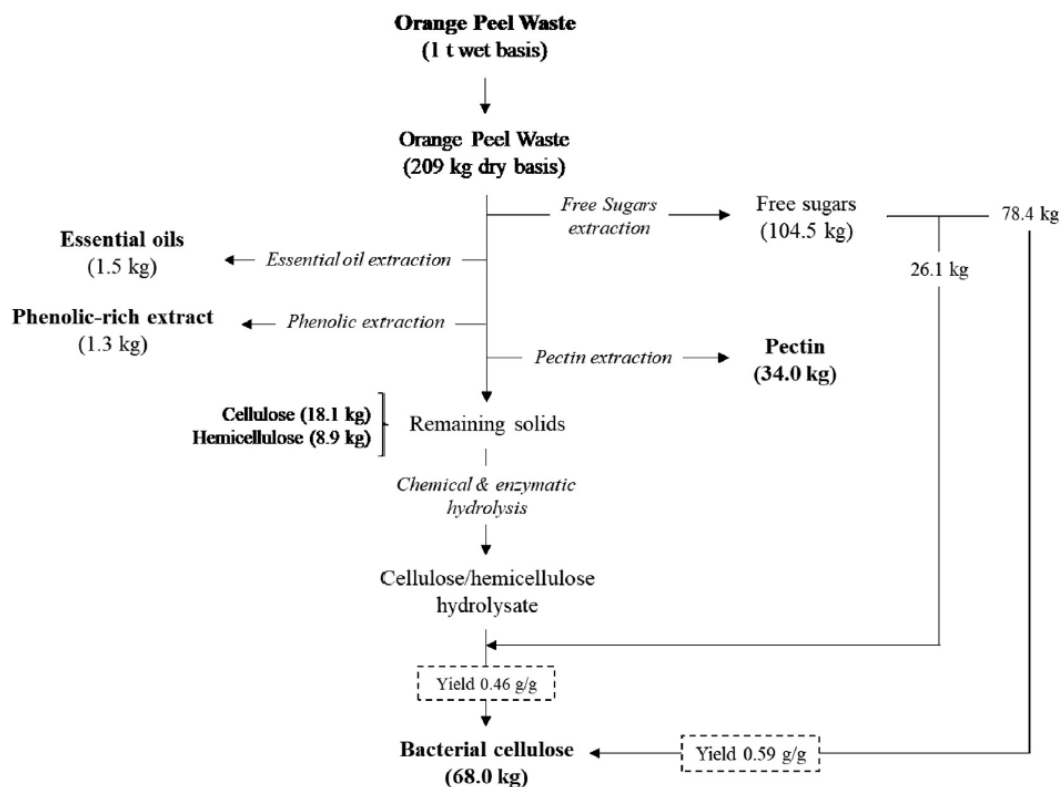
Οι Filippi et al. (2022) παρουσίασαν μία ολοκληρωμένη ανάπτυξη βιοδυλιστηρίου για την αξιοποίηση αποβλήτων οινοποιείου καταλήγοντας στην απομόνωση ή παραγωγή φαινολικών εκχυλισμάτων, φυτικού ελαίου, αιθανόλης, τρυγικού οξέος, συμπυκνωμένων ταννίνων, βακτηριακής κυτταρίνης και ηλεκτρικού οξέος, ενώ οι Stylianiou et al. (2020) χρησιμοποίησαν ως υπόστρωμα το στερεό κλάσμα αστικών αποβλήτων για την βιοτεχνολογική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με τη χρήση βακτηριακών στελεχών.

Η τεχνοοικονομική και περιβαλλοντική αξιολόγηση της εκμετάλλευσης του φυτικού ελαίου του καφέ για την παραγωγή βιοντίζελ μελετήθηκε επίσης (Kookos, 2018). Στην μελέτη συμπεριλήφθηκε και η παραγωγή γλυκερόλης που προκύπτει ως παραπροϊόν στην παραγωγή βιοντίζελ καθώς και η εκμετάλλευση των κόκκων του ελεύθερου από λάδι καφέ για την παραγωγή ενέργειας μέσω της καύσης τους. Η διεργασία καθίσταται οικονομικά βιώσιμη μόνο αν πραγματοποιηθεί σε μεγάλο παραγωγικό επίπεδο με την επίτευξη της αντίστοιχης οικονομίας κλίμακας, κάτι που είναι δύσκολο να επιτευχθεί ακόμα και από χώρες με μεγάλο πληθυσμό και ανεπτυγμένη οικονομία, ενώ η

περιβαλλοντική απόδοση του εγχειρήματος αποδείχτηκε συγκρινόμενη με τις μέχρι τώρα καλύτερες τεχνολογίες παραγωγής βιοντίζελ.

Γενικότερα, όσον αφορά την περίπτωση των βιοκαυσίμων ή άλλων βιοπροϊόντων από βιομάζα, οι επενδύσεις των βιοδιυλιστηρίων είναι βιώσιμες μόνο σε ορισμένα επίπεδα παραγωγής για την επίτευξη οικονομιών κλίμακας. Η παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως τα αντιοξειδωτικά, συνήθως συνδέεται με μικρές κλίμακες, ενώ στην περίπτωση της παραγωγής ενέργειας και προϊόντων διατροφής, όπως σάκχαρα, απαιτούνται μεγάλες κλίμακες, αφού η προστιθέμενη αξία δεν είναι εξίσου μεγάλη. Αυτό συμβαίνει επειδή η καθαρή παρούσα αξία (NPV) και το κόστος παραγωγής είναι μεγέθη πολύ ευαίσθητα στην κλίμακα παραγωγής καθώς όταν αυτή αυξάνεται, η κατανάλωση ενέργειας και οι τιμές του εξοπλισμού δεν αυξάνονται με τον ίδιο ρυθμό. Συνεπώς, η συμπαραγωγή ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας είναι απαραίτητη προκειμένου να καταστεί βιώσιμη η επένδυση. Περιορισμοί ως προς την κλίμακα της παραγωγής επιβάλλονται και από τη διαθεσιμότητα πρώτων υλών, ειδικά όταν υπάρχει ανταγωνισμός ως προς την διαθεσιμότητά τους, όπως συμβαίνει όταν οι πρώτες ύλες μπορούν να χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα (Moncada & Aristizábal, 2016).

Οι Tsouko et al., (2020) μελέτησαν την ανάπτυξη ενός βιοδιυλιστηρίου χρησιμοποιώντας φλοιούς πορτοκαλιών από καταστήματα εστίασης. Για τον σκοπό αυτό, διαχωρίστηκαν από τους φλοιούς των πορτοκαλιών όλα τα συστατικά προστιθέμενης αξίας. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν τα αιθέρια έλαια, το φαινολικό περιεχόμενο καθώς και οι πηκτίνες, ενώ ακολούθησε ζύμωση με την χρήση των ελεύθερων σακχάρων, των φλοιών πορτοκαλιού και υδρολυμάτων που προέκυψαν από χημικές ή ενζυμικές υδρολύσεις των ελεύθερων από πηκτίνες φλοιών, προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Το διάγραμμα ροής της διεργασίας που πρότειναν, καθώς και τα ισοζύγια μάζας απεικονίζονται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2. Ισοζύγια μάζας και προτεινόμενο βιοδιυλιστήριο για την αξιοποίηση φλοιών πορτοκαλιού (Tsouko et al., 2020)

Με βάση τα προαναφερθέντα, το στερεό απόβλητο που προκύπτει από την εκχύλιση του καφέ (SCGs) όπως και τα απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού από τα καταστήματα εστίασης αποτελούν, εξαιρετικό υπόστρωμα για την εφαρμογή ενός βιοδιυλιστηρίου για τον διαχωρισμό όλων των συστατικών προστιθέμενης αξίας που εμπεριέχονται σε αυτό αφού, όντας απόβλητο δεν ανταγωνίζεται με τα τρόφιμα όσον αφορά τις χρήσεις γης.

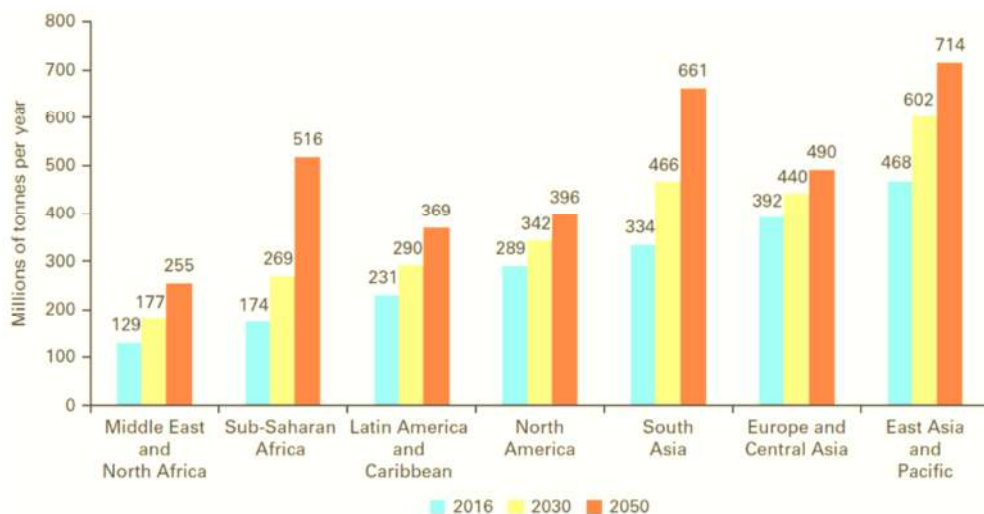
1.2 Αξιοποίηση του οργανικού κλάσματος στερεών αστικών απορριμμάτων

Η αξιοποίηση αποβλήτων και υποπροϊόντων για τη βιοτεχνολογική παραγωγή χημικών, βιοπολυμερών, βιοκαυσίμων και βιοδραστικών ενώσεων αποτελεί σημαντικό στόχο για τη βιομηχανική μετάβαση προς την εποχή της κυκλικής βιοοικονομίας (Koutinas et al., 2014). Στο πλαίσιο μιας οικονομίας που βασίζεται σε βιογενή προϊόντα, υπάρχει μια ανεκμετάλλευτη δυνατότητα του οργανικού κλάσματος στερεών αστικών απορριμμάτων να γίνει πρώτη ύλη επόμενης γενιάς στη μελλοντική βιομηχανία ζύμωσης (Matsakas et al., 2017).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση τα αστικά στερεά απόβλητα ορίζονται ως εξής: «Τα αστικά απόβλητα παράγονται κυρίως από νοικοκυριά, αν και περιλαμβάνουν παρόμοια απόβλητα από πηγές όπως το εμπόριο, τα γραφεία και οι δημόσιοι οργανισμοί. Η ποσότητα των παραγόμενων αστικών αποβλήτων αποτελείται από απόβλητα που συλλέγονται από τις δημοτικές αρχές ή από άλλους φορείς για λογαριασμό τους και διατίθενται μέσω του συστήματος διαχείρισης αποβλήτων» (European Environment Agency, 2013).

Συνεπώς, στα αστικά στερεά απόβλητα περιλαμβάνονται κυρίως: τα οικιακά απορρίμματα, τα απόβλητα από εμπορικές δραστηριότητες και δραστηριότητες που τα παραγόμενα απορρίμματα μοιάζουν με τα οικιακά (Matsakas et al., 2017).

Σε παγκόσμια κλίμακα, τα ποσοστά παραγωγής αποβλήτων αυξάνονται. Το 2016, 2,01 δισεκατομμύρια τόνοι στερεών αποβλήτων, παράγονταν παγκοσμίως, ποσό που αντιστοιχεί σε 0,74 κιλά ανά άτομο και ανά ημέρα. Με την ταχεία αύξηση του πληθυσμού, η ετήσια παραγωγή αποβλήτων αναμένεται να αυξηθεί κατά 70% από τα επίπεδα του 2016 σε 3,40 τόνους το 2050 όπως φαίνεται και από το διάγραμμα στην Εικόνα 3 (Worldbank, 2019).



Εικόνα 3. Προβλεπόμενη παραγωγή αποβλήτων ανά περιοχή του πλανήτη (εκατομμύρια τόνοι/έτος) (Worldbank, 2019).

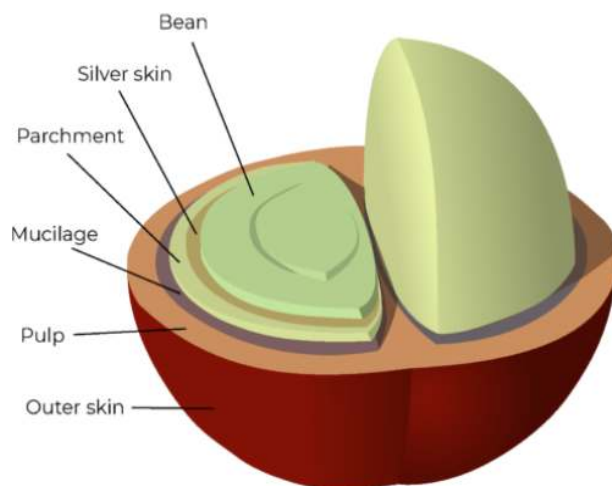
Παράλληλα, τα κακώς διαχειριζόμενα απόβλητα μπορούν να οδηγήσουν στην διάδοση ασθενειών, ενώ συμμετέχουν στην παγκόσμια κλιματική αλλαγή μέσω της παραγωγής μεθανίου. Οι εκπομπές αερίων από απόβλητα, έφταναν ποσοστά της τάξης του 3%–4% των εκπεμπόμενων αερίων του θερμοκηπίου (GHG) παγκοσμίως το 2006. Παράλληλα

η αζωτορύπανση που προκαλείται από τα απόβλητα είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας με μακροπρόθεσμο αντίκτυπο, αφού ενδέχεται να προκαλέσει ασθένειες και ανισορροπίες θρεπτικών ουσιών στα κοντινά υδάτινα σώματα, προκαλώντας το φαινόμενο του ευτροφισμού. Έτσι σήμερα, τα ανεπτυγμένα κράτη έχουν θεσπίσει νομοθεσία για την αντιμετώπιση της ανεξέλεγκτης απόρριψης των αστικών αποβλήτων. Συγκεκριμένα για την ΕΕ, το Πακέτο Κυκλικής Οικονομίας έχει θέσει στόχους τουλάχιστον 65% ανακύκλωση και μέγιστο 10% για την υγειονομική ταφή όλων στερεών αστικών αποβλήτων έως το 2030 (Chen et al., 2020). Γίνεται λοιπόν σαφές, η ανάγκη διαχείρισης αλλά και εκμετάλλευσης του οργανικού κλάσματος των αστικών αποβλήτων, τόσο για λόγους που αφορούν την προστασία του περιβάλλοντος αλλά πλέον και για νομοθετικούς λόγους.

1.2.1 Απόβλητα καφέ

Ο καφές είναι ένα από τα πιο δημοφιλή ροφήματα στον κόσμο και η εμπορική σημασία του αυξάνεται διαρκώς αφού αποτελεί το 2^ο σε κατάταξη εμπορεύσιμο αγαθό μετά το πετρέλαιο (Campos-Vega et al., 2015; Obruca et al., 2015). Τον Οκτώβριο του 2021 οι παγκόσμιες εξαγωγές καφέ ανήλθαν σε 412733 τόνους (9,68 εκατομμύρια σακούλες) (ICO, 2021). Όσον αφορά στην Ελλάδα, είναι η 12η χώρα παγκοσμίως στην κατανάλωση του καφέ με 5,5 kg ανά άτομο (Uddin et al., 2019).

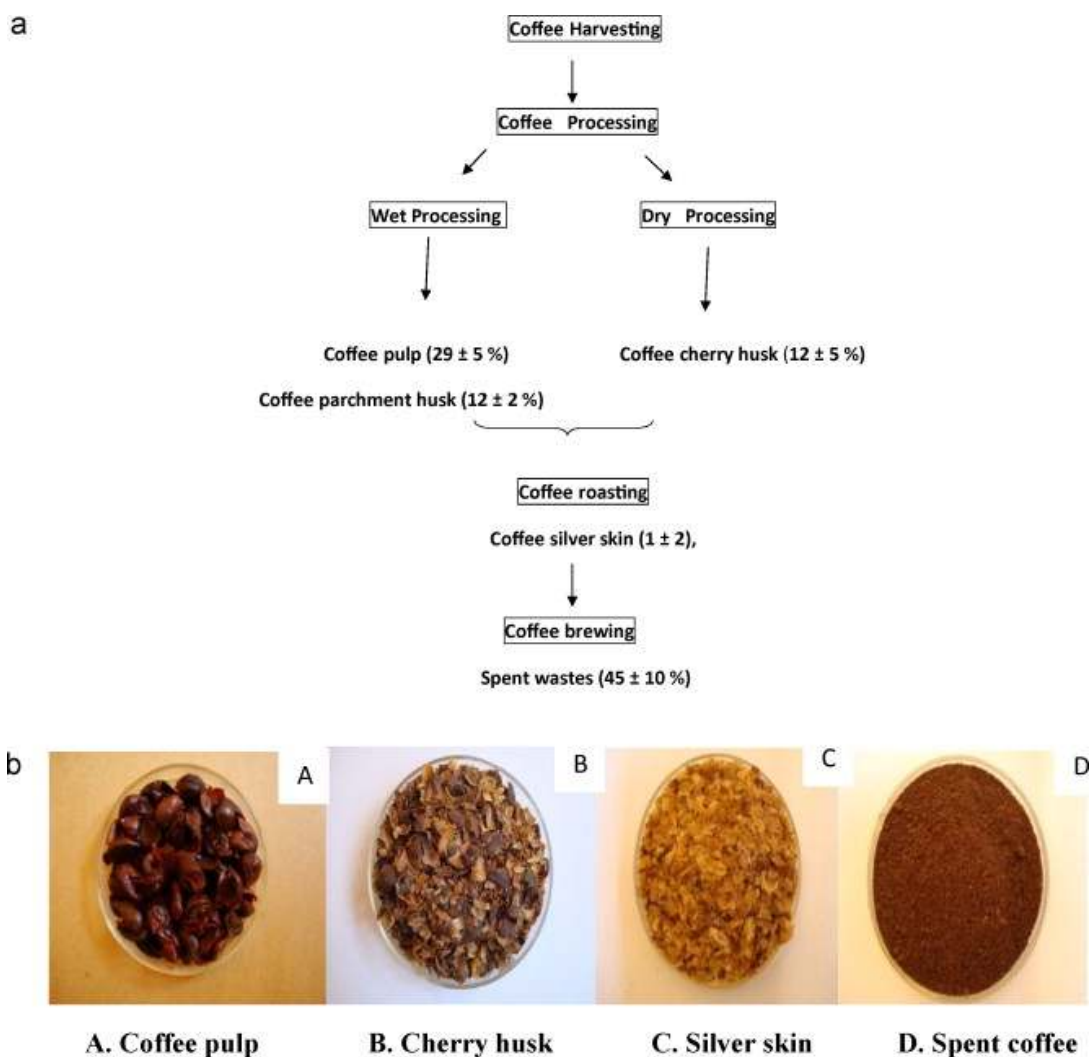
Ο καρπός του καφέ αποτελείται από έναν πράσινο εξωτερικό φλοιό, ο οποίος όταν ωριμάζει αποκτά ένα βαθύ κόκκινο χρώμα και περιέχει το μεσοκάρπιο και το πυρηνόκαρπο κόκκο, που χωρίζεται σε δύο ημισφαίρια που εμπεριέχουν το ενδοκάρπιο. Κάθε ημισφαίριο καλύπτεται από το σπερματόδεμα (silverskin) όπως αναπαρίσταται στην Εικόνα 4 (Alves et al., 2017).



Εικόνα 4. Εσωτερική απεικόνιση του καρπού του καφέ

Οι δύο κύριες ποικιλίες που καλλιεργούνται για εμπορική παραγωγή είναι οι *Coffea Arabica* και *Coffea canephora*, με τον καφέ *Arabica* που προέρχεται από την πρώτη να καταλαμβάνει το 75% της παγκόσμιας παραγωγής.

Για την παραλαβή των κόκκων του καφέ αφαιρείται το περικάρπιο και περιστασιακά και το σπερματόδεμα (silverskin). Συνολικά, υπολογίζεται ότι 650 kg αποβλήτων καφέ παράγονται ανά τόνο πράσινου κόκκου, κάτι το οποίο εξαρτάται από τον τρόπο προεπεξεργασίας του καφέ. Ένα συνοπτικό διάγραμμα ροής απεικονίζεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Επεξεργασία του καρπού του καφέ (a) και οι παραγόμενες δευτερογενείς ροές (b) (Murthy & Naidu, 2012)

Το σπερόδερμα (coffee silverskin) και το SCGs είναι τα δύο κύρια απόβλητα που παράγονται από την βιομηχανία του καφέ (Mussatto, Machado, et al., 2011). Κατά την παραγωγή ενός ροφήματος καφέ, οι φρέσκοι κόκκοι έρχονται σε επαφή με θερμό νερό ή ατμό κάτω από συνθήκες κατάλληλες για την εκχύλιση των αρωματικών και άλλων επιθυμητών συστατικών. Ως αποτέλεσμα προκύπτει ένα στερεό απόβλητο με καθορισμένο σχήμα κόκκων, μεγάλο ποσοστό υγρασίας και οργανικών συστατικών (Obruca et al., 2015). Συγκεκριμένα, για την παραγωγή ενός kg ροφήματος καφέ παράγονται 2 kg κόκκων καφέ με την μορφή υγρού στερεού αποβλήτου (SCGs), ενώ το 2014 περίπου 9 εκατομμύρια τόνοι SCGs εναποτέθηκαν σε χωματερές (Karmee, 2018; Murthy & Naidu, 2012). Το φαινόμενο αυτό, θα πρέπει να αποφεύγεται αφού το κατάλοιπο της εκχύλισης του καφέ περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών

συστατικών, ορισμένα από τα οποία, όπως η καφεΐνη οι ταννίνες και οι πολυφαινόλες, είναι τοξικά για το περιβάλλον, ενώ και από οικονομικής πλευράς, η εναπόθεση των αποβλήτων του καφέ σε χωματερές είναι ασύμφορη. Για όλα τα προαναφερθέντα, έχουν μελετηθεί διαφορετικοί τρόποι διαχείρισης του αποβλήτου.

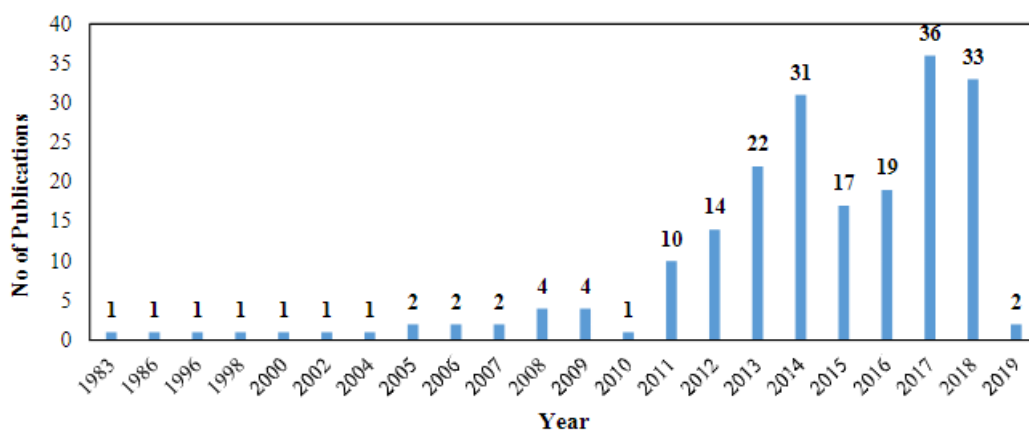
Μετά την εκχύλιση του καφέ, οι χρησιμοποιημένοι κόκκοι είναι πολύτιμη πηγή σακχάρων, φυτικού ελαίου, αντιοξειδωτικών και άλλων ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Αξίζει να σημειωθεί, βέβαια, πως όπως και τα περισσότερα απόβλητα, η σύσταση των κόκκων του καφέ κυμαίνεται και εξαρτάται κυρίως από έναν μεγάλο αριθμό μεταβλητών, μεταξύ αυτών, οι συνθήκες διήθησης, οι συνθήκες καλλιέργειας καθώς και ο τύπος του καφέ που χρησιμοποιείται.

Τα απόβλητα καφέ αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη και ημικυτταρίνη σε αθροιστικό ποσοστό περίπου 50% επί του ξηρού τους βάρους, ενώ η μαννόζη, η γαλακτόζη και η αραβινόζη είναι τα τρία κύρια συστατικά της ημικυτταρίνης. Η λιγνίνη και η πρωτεΐνη αποτελούν τα επόμενα σε αφθονία συστατικά με ποσοστό περίπου 20% με το φυτικό έλαιο να ακολουθεί (Ballesteros et al., 2014; Cruz et al., 2012; McNutt, 2019). Εκτενέστερη αναφορά στην σύσταση των χρησιμοποιημένων κόκκων του καφέ γίνεται στο εδάφιο των αποτελεσμάτων, ωστόσο τα συστατικά που δύνανται να απομονωθούν παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.

Η ύπαρξη σημαντικών ποσοτήτων ουσιών που μπορούν να διαχωριστούν ως προϊόντα προστιθέμενης αξίας στο SCGs καθώς και η ανάγκη διαχείρισης του αποβλήτου έχουν γίνει αντικείμενο αρκετών μελετών τα τελευταία χρόνια (Εικόνα 7).



Εικόνα 6. Διαχωρίσιμα συστατικά από το απόβλητο της εκχύλισης του καφέ (SCGs) (Saratale et al., 2020)



Εικόνα 7. Αριθμός δημοσιεύσεων ανά χρόνο σχετικά με τις δυνατότητες ανακύκλωσης των αποβλήτων της βιομηχανίας καφέ (Atabani et al., 2019)

1.2.1.1 Εφαρμογές προϊόντων προστιθέμενης αξίας αποβλήτων καφέ

Τα SCGs έχουν βρει εφαρμογή για την παραγωγή απορροφητικών ουσιών (Castro et al., 2011), για την παραγωγή προσθετικών ουσιών σε πολυμερή, ως πρόσθετα σε ζωοτροφές, καθώς έχουν υψηλή διατροφική αξία, ωστόσο τα φαινολικά συστατικά και η καφεΐνη πρέπει να βρίσκονται σε ποσοστό χαμηλότερο του 2,5% (Janissen & Huynh, 2018), καθώς και ως λίπασμα αφού πρώτα έχουν αφαιρεθεί τα τοξικά για το περιβάλλον συστατικά (Gomes et al., 2014). Τα φαινολικά συστατικά που περιέχονται στο SCGs εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού μπορούν χρησιμοποιηθούν ως αντιοξειδωτικά (Mussatto, Ballesteros, et al., 2011) ως πρόσθετα σε τρόφιμα και ως φαρμακευτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση (López-Barrera et al., 2016). Παράλληλα, εκχυλίσματα φαινολικών ενώσεων από SCGs έχουν εμφανίσει αντικαρκινικές και αντιαλλεργικές ιδιότητες που σχετίζονται με την ύπαρξη του χλωρογενικού οξέος (Panusa et al., 2013).

Το SCGs και ειδικά το λιπαρό του κλάσμα έχει αξιολογηθεί ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως βουτανόλη, βιοντίζελ, καύσιμα pellets, αιθανόλη και βιοαέριο (Atabani et al., 2019; Battista et al., 2020; Caetano et al., 2014; Haile, 2014; Kwon et al., 2013; Liu et al., 2017; Park et al., 2016; Vardon et al., 2013). Η παραγωγή βιοντίζελ από το φυτικό έλαιο του SCGs, μπορεί να γίνει με τέσσερις τρόπους. Με μετεστεροποίηση με αλκαλική ή όξινη ή ενζυμική κατάλυση, ή βιοκατάλυση με την χρήση μικροοργανισμών όπως *Candida rugose*, *Porcine pancreas*, *Pseudomonas*

fluorescens, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizopus delemar*, *Thermomyces lanuginosus*, *Geotrichum candidum* και *Candida rugosa*, με καταλυτική αντίδραση δύο σταδίων, όπου αρχικά πραγματοποιείται όξινη υδρόλυση ακολουθούμενη από αλκαλική υδρόλυση, με μη καταλυτική μετεστεροποίηση και τέλος με *in situ* μετεστεροποίηση, όπου το βιοντίζελ παράγεται απευθείας από SCGs χωρίς προηγούμενη εκχύλιση του φυτικού ελαίου (Atabani et al., 2019; Liu et al., 2017; Park et al., 2016; Tuntiwattananarun et al., 2017). Το φυτικό έλαιο του καφέ έχει μελετηθεί επίσης και ως προς την αξιοποίησή του σε δερματολογικά σκευάσματα (Marto et al., 2016), καθώς και ως υπόστρωμα για την παραγωγή πολύ-ύδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων (PHAs) (Cruz et al., 2012; Kovalcik et al., 2018; Obruca et al., 2015; Obruca et al., 2014; Saratale et al., 2020). Ως προς την παραγωγή ενέργειας, έχει μελετηθεί η χρήση του SCG για την παραγωγή καύσιμου pellet. Το SCG αποδείχθηκε εξαιρετικό καύσιμο σε σύγκριση με βιομάζες διαφορετικής προέλευσης καθώς απελευθερώνει υψηλή θερμότητα καύσης, κάτι που υποδεικνύει ότι η βιομηχανία του καφέ θα μπορούσε να είναι ενεργειακά αυτόνομη (Silva et al., 1998). Ωστόσο η καύση καθαρού SCGs χωρίς την ύπαρξη άλλης πηγής βιομάζας στο μίγμα μειώνει την αποδοτικότητα του καυστήρα ενώ παράλληλα οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή αερίων και μικροσωματιδίων (Limousy et al., 2013).

Στην Εικόνα 8 παρουσιάζονται διάφορες πιθανές οδοί αξιοποίησης του αποβλήτου SCGs, μέσα από την διύλιση και παραγωγή, μέσω μικροβιακών ζυμώσεων, ουσιών προστιθέμενης αξίας.

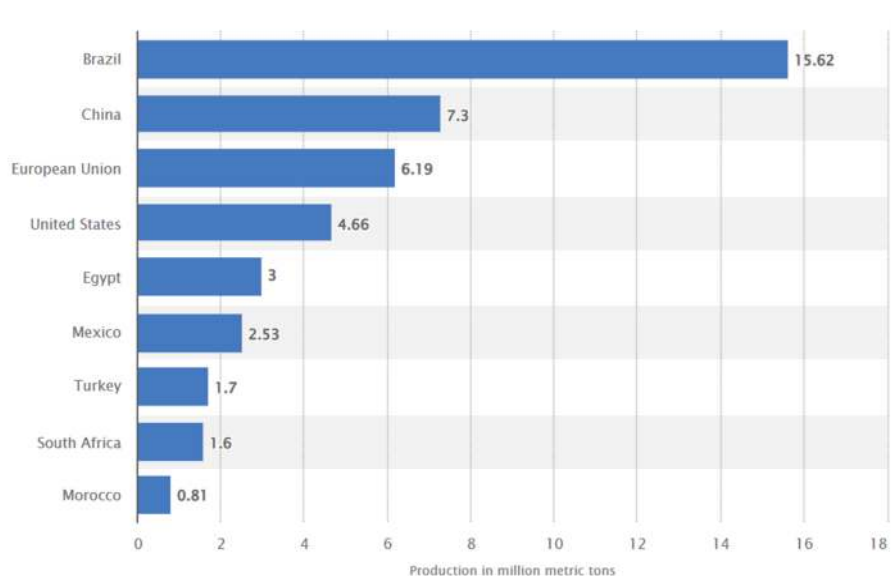
Στο πλαίσιο αυτό, έχει μελετηθεί και η αξιοποίηση του SCGs για την παραγωγή βιοελαίου μέσω πυρόλυσης ή υδροθερμικής υγροποίησης. Η πυρόλυση είναι μια φυσικοχημική μέθοδος θερμικής αποσύνθεσης οργανικών ουσιών, που λαμβάνει χώρα σε αδρανή ατμόσφαιρα (π.χ. άζωτο) και σε υψηλές θερμοκρασίες (γενικά μεταξύ 500°C και 1000°C). Τα κύρια προϊόντα είναι στερεά (στάχτη και άνθρακας), υγρά (φάση βιοελαίου και νερό) και αέρια (υδρογονάνθρακες μικρού μοριακού βάρους και άλλα αέρια). Η υδροθερμική υγροποίηση (hydrothermal liquification), που αναφέρεται επίσης ως ένυδρη πυρόλυση, είναι μια διαδικασία θερμοχημικού αποπολυμερισμού σε κλειστό σύστημα για τη μετατροπή της υγρής βιομάζας σε ακατέργαστο βιοέλαιο σε συνθήκες μετρίως υψηλής θερμοκρασίας (συνήθως 200-400°C) και σε υψηλή πίεση (συνήθως 10-25 MPa) (Massaya et al., 2019; Zhang & Chen, 2018). Το βιοέλαιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση στο πετρέλαιο, τόσο σε ενεργειακό επίπεδο

1.2.2 Απόβλητα φρούτων και ειδικότερα εσπεριδοειδών

Τα απόβλητα φρούτων αποτελούν ένα μεγάλο μέρος των αστικών στερεών απορριμμάτων. Τα εσπεριδοειδή είναι η πιο άφθονη καλλιέργεια φρούτων παγκοσμίως, με την ετήσια παραγωγή να εκτιμάται το 2010, στα 157 εκατομμύρια τόνους. Μεταξύ 1970 και 2019, η παγκόσμια παραγωγή εσπεριδοειδών αυξήθηκε σημαντικά από 39,6 εκατομμύρια τόνους σε 157 εκατομμύρια τόνους αυξανόμενη με ετήσιο ρυθμό που έφτασε στο 10,47% το 1980 και στη συνέχεια μειώθηκε στο 3,59% το 2019 (USDA, 2019).

1.2.2.1 Απόβλητα πορτοκαλιών

Κατά την περίοδο 2019/2020, η Βραζιλία ήταν ο κορυφαίος παγκόσμιος παραγωγός πορτοκαλιού, με όγκο παραγωγής 15,62 εκατομμυρίων τόνων. Εκείνο το έτος, ο παγκόσμιος όγκος παραγωγής φρέσκων πορτοκαλιών ανήλθε σε περίπου 46,06 εκατομμύρια τόνους. Ακολουθεί η Κίνα με ετήσια παραγωγή 7,2 εκατομμύρια τόνους και στην συνέχεια η Ευρώπη με 6,19 εκατομμύρια τόνους (Εικόνα 9).

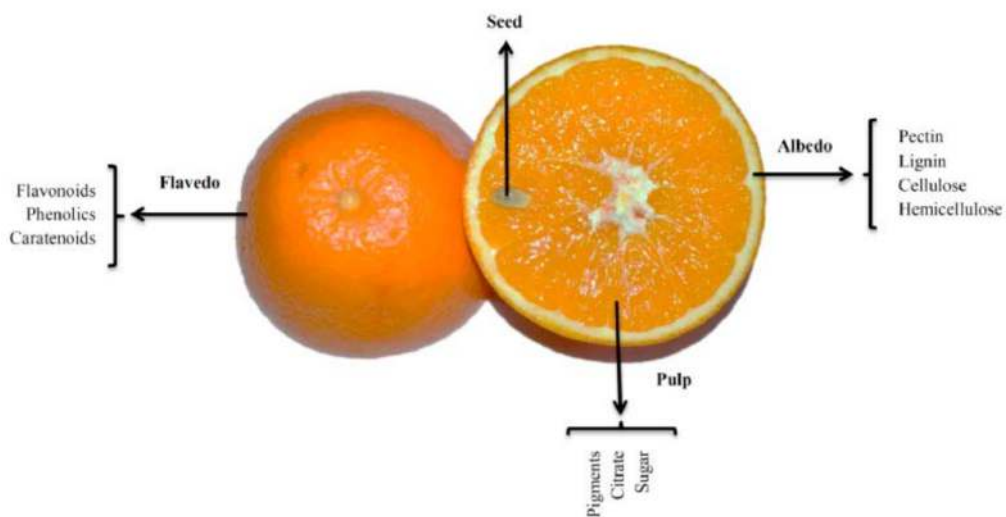


Εικόνα 9. Παραγωγή πορτοκαλιών κατά την περίοδο 2019/2020 (Πηγή: Statista, 2020)

Τα απόβλητα επεξεργασίας των φρούτων εσπεριδοειδών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του ότι περιέχουν ποσότητες βιοδραστικών ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας (Εικόνα 10) και επειδή υπάρχει μια ποικιλία επιλογών

αξιοποίησής τους στους διάφορους βιομηχανικούς τομείς των τροφίμων, καλλυντικών αλλά και φαρμάκων (Russo et al., 2021). Κατά την διεργασία χυμοποίησης των εσπεριδοειδών, περίπου το 50% του βάρους των επεξεργασμένων καρπών απορρίπτεται ως απόβλητο, το οποίο αποτελείται από φλοιούς, υπολείμματα χυμοποίησης και σπόρους (Pleissner et al., 2016).

Τα σάκχαρα, τα αιθέρια έλαια (με κύριο το d-λιμονένιο), οι πηκτίνες και τα φαινολικά συστατικά αποτελούν τα κύρια προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας που παραλαμβάνονται από τα απόβλητα πορτοκαλιών (Mohsin et al., 2021). Τα υπολείμματα φλούδας πορτοκαλιού από βιομηχανικές διεργασίες περιέχουν ελεύθερα σάκχαρα (30-36%, επί ξηρή βάση, db), κυτταρίνη (18-20%, επί ξηρή βάση, db), ημικυτταρίνη (14-16%, επί ξηρή βάση, db), πηκτίνη (20-22%, επί ξηρή βάση, db), λιγνίνη (5-7%, επί ξηρή βάση, db), πρωτεΐνη (έως 8%, επί ξηρή βάση, db) και αιθέρια έλαια (0,3-0,5%, επί ξηρή βάση, db) (De la Torre, Martin-Dominguez, et al., 2019).



Εικόνα 10. Εσωτερική απεικόνιση του πορτοκαλιού

1.2.2.1 Εφαρμογές προϊόντων προστιθέμενης αξίας αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού

Η παραλαβή και εφαρμογή βιοδραστικών ουσιών από τα απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού δύναται να αυξήσει το οικονομικό κέρδος των εν λόγω βιομηχανιών.

Πιο συγκεκριμένα, στα εσπεριδοειδή περιέχονται περίπου 400 διαφορετικά αιθέρια έλαια, η σύσταση των οποίων αποτελείται από 85–99% πτητικά και 1–15% μη-πτητικά

συστατικά. Το d-λιμονένιο αποτελεί το κυρίαρχο αιθέριο έλαιο στα εσπεριδοειδή (73.9-97% (β/β αιθέριου ελαίου). Είναι μια ανανεώσιμη χημική ουσία με πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, όπως χρήση ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, πράσινο διαλύτης, ως ρητίνη και κόλλα, ως διαλύτης εκχύλισης για φυσικά προϊόντα καθώς και ως δραστικός παράγοντας για λειτουργικά προϊόντα (Ozturk et al., 2019; Putnik et al., 2017; Satari & Karimi, 2018). Επιπρόσθετα, οι χρωστικές οι οποίες εμπεριέχονται στους φλοιούς εσπεριδοειδών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά πρόσθετα και ν' αντικαταστήσουν τις συνθετικές χρωστικές κυρίως στην βιομηχανία τροφίμων. Οι κυριότερες χρωστικές στους φλοιούς εσπεριδοειδών είναι τα καροτενοειδή, των οποίων η περιεκτικότητα μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος των εσπεριδοειδών. Οι πολυφαινόλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά αντιοξειδωτικά στους τομείς των τροφίμων, της φαρμακευτικής, της ιατρικής και της διατροφής (Tsouko et al., 2019). Επίσης τα εσπεριδοειδή είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, με τους φλοιούς να έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες σε σχέση με το εδώδιμο μέρος. Τέλος, η πηκτίνη αποτελεί σημαντικό ποσοστό στο φλοιό των εσπεριδοειδών. Είναι ένας φυσικός παράγοντας δημιουργίας γέλης και χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων ως πηκτωματοποιητής και ως μέσο πάχυνσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι βιοδραστικές ουσίες της πηκτίνης (Putnik et al., 2017).

1.3 Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι οργανικά μόρια που απαντώνται στην φύση και μπορούν να απομονωθούν κατά την εκχύλιση κυττάρων ή ιστών με την χρήση οργανικών διαλυτών. Συνεπώς, η ταυτοποίηση μίας ουσίας ως λιπαρής γίνεται με βάση την διαλυτότητά της (φυσική ιδιότητα) και όχι με βάση την ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων. Ταξινομούνται σε δύο γενικές κατηγορίες ανάλογα με την ύπαρξη ή μη εστερομάδας στο μόριο. Αυτά που περιέχουν εστερικό δεσμό μπορούν να υδρολυθούν (λίπη, κήροι), ενώ αυτά που δεν περιέχουν εστερομάδες δεν υδρολύονται (στεροειδή) (McMurry, 2012). Για τους περισσότερους οργανισμούς αποτελούν την κύρια μορφή αποθήκευσης της ενέργειας ενώ αποτελούν και βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Παράλληλα, εξειδικευμένα λιπίδια λειτουργούν ως χρωστικές, όπως το καροτένιο, ως συμπαραγοντες, όπως η βιταμίνη Κ, ως απορρυπαντικά, ως μεταφορείς, ως ορμόνες, ως εξωκυττάριοι και ενδοκυττάριοι αγγελιοφόροι καθώς και ως γέφυρες για μεμβρανικές

πρωτεΐνες. Συνεπώς, η ικανότητα βιοσύνθεσης λιπιδίων είναι απαραίτητη σε όλους τους μικροοργανισμούς (Nelson et al., 2008).

Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι μικροοργανισμοί οι οποίοι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες έχουν την δυνατότητα βιοσύνθεσης και συσσώρευσης λίπους ενδοκυτταρικά σε ποσοστό άνω του 20% επί του ξηρού τους βάρους. Τα λιπίδια αυτά ονομάζονται αποθησαυριστικά και δεν έχουν κάποιο δομικό ρόλο όπως τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών (Ratledge, 1994). Αυτοί οι μικροοργανισμοί, που μπορεί να είναι βακτήρια, μύκητες, ζύμες, κυανοβακτήρια ή άλγη, ονομάζονται ελαιογόνοι και συνήθως είναι μη παθογόνοι, ενώ η σύσταση του λίπους που συσσωρεύουν είναι παρόμοια με τα λίπη και τα έλαια που απαντώνται στα λαχανικά (Koutinas et al., 2014; Ratledge, 1994; Ratledge, 2004; Ratledge & Cohen, 2008). Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, συνήθως αλλά όχι αποκλειστικά, ανήκουν σε γένοι όπως *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotoroula*, *Rhizopus*, *Trichosporon*, *Lipomyces* and *Yarrowia* (Ratledge & Tan, 1990). Οι ζύμες αυτές έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν λιπίδια σε ποσοστό άνω το 40% επί του ξηρού τους βάρους, ενώ ιδιαίτερα σε συνθήκες περιορισμού ενός από τα θρεπτικά στοιχεία του υποστρώματος μπορούν να φτάσουν μέχρι και το ποσοστό του 70%. Το ενδοκυτταρικό λίπος αποτελείται κατά 80-90% από τριακυλογλυκερόρες (τριγλυκερίδια) και σε ένα μικρό ποσοστό από στερυλεστέρες, που ονομάζονται ουδέτερα λιπίδια. Τα αποθησαυριστικά αυτά λιπίδια εντοπίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων σε ειδικά διαμερίσματα που ονομάζονται λιποσώματα (lipid body-LB), τα οποία περιβάλλονται από μία στοιβάδα φωσφολιπιδίων στην οποία ενσωματώνονται διάφορες πρωτεΐνες που επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες (Fujimoto & Parton, 2011; Papanikolaou & Aggelis, 2010). Τέλος αξίζει να σημειωθεί πως το λιπαρό περιεχόμενο των λιποσωμάτων καθώς και η σύσταση των ίδιων των λιποσωμάτων διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ειδών (Beopoulos et al., 2011).

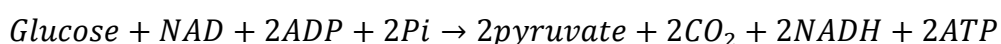
Τα τελευταία χρόνια εντοπίζεται αυξανόμενο ενδιαφέρον για την παραγωγή αυτού του είδους μικροβιακών ελαίων και λιπών μέσω της καλλιέργειας ελαιογόνων μικροοργανισμών σε διάφορες πηγές ανανεώσιμου άνθρακα, καθώς οι χρήσεις τους περιλαμβάνουν την παραγωγή βιοντίζελ, όταν η σύσταση των λιπαρών οξέων είναι παρόμοια με αυτών των φυτών, φαρμακευτικές ή διατροφικές χρήσεις, όταν το μικροβιακό έλαιο είναι πλούσιο σε σπάνια πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το

αραχιδονικό και το γ-λινολενικό, και χρήσεις στην χημική βιομηχανία (Koutinas et al., 2014).

1.3.1 Βιοσύνθεση Μικροβιακού λίπους από ζύμες (Single Cell Oil, SCO)

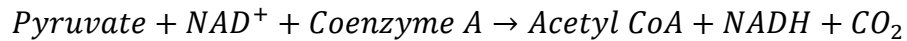
Ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό των ελαιογόνων ζυμών είναι η ικανότητά τους να παρέχουν συνεχώς ακέτυλο-CoA και επαρκές απόθεμα NADPH, τα οποία είναι σημαντικά για την σύνθεση μικροβιακού λίπους (Ratledge, 2004). Η απαραίτητη ποσότητα του συμπαραγόντα ακέτυλο-CoA μπορεί να παραχθεί από διάφορες πηγές, μεταξύ των οποίων λιπαρά οξέα, αμινοξέα και σάκχαρα και η σύνθεση του μικροβιακού λίπους μπορεί να λάβει χώρα με δύο τρόπους ανάλογα με το υπόστρωμα, είτε *de novo* είτε *ex novo*. Η *ex novo* σύνθεση λιπαρών οξέων είναι συνδεδεμένη με την ύπαρξη υδρόφοβων υποστρωμάτων και προϋποθέτει την υδρόλυση και την αφομοίωση τους ακολουθούμενη από την σύνθεση νέων ακυλογλυκερολών. Η *de novo* βιοσύνθεση, περιλαμβάνει την βιοσύνθεση των πρόδρομων ενώσεων των λιπαρών οξέων, όπως το ακέτυλο-CoA και το μαλόνυλο-CoA, τα οποία στην συνέχεια επιμηκύνονται σε αλυσίδες C14-C16 ανάλογα με τα ένζυμα που έχει στην διάθεσή του ο μικροοργανισμός. Οι ακέτυλο-CoA εστέρες που σχηματίζονται, μετατρέπονται στην συνέχεια σε τριγλυκερίδια και στερυλεστέρες και αποθηκεύονται στα λιπосώματα (Beopoulos et al., 2011). Η συσσώρευση του λίπους πυροδοτείται από την περίσσεια πηγής άνθρακα και ελλείψει ενός περιοριστικού παράγοντα (συνήθως του αζώτου) από το μέσο της καλλιέργειας. Έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένες ζύμες, όπως ορισμένα στελέχη της ζύμης *Rhodospiridium toruloides*, συσσωρεύουν λίπος και εν τη απουσία φωσφόρου ή και θείου ως περιοριστικό παράγοντα (Wu et al., 2010; Wu et al., 2011). Όταν η συγκέντρωση του περιοριστικού παράγοντα μειωθεί κάτω από ένα κρίσιμο σημείο, η περίσσεια της πηγής άνθρακα που καταναλώνεται από το κύτταρο δεν προορίζεται για την ανάπτυξη του κυττάρου, αλλά ο μεταβολισμός ανακατευθύνεται προς την κατεύθυνση της συσσώρευσης λίπους.

Πιο αναλυτικά, στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς, τα σάκχαρα μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκόλυσης, σύμφωνα με την αντίδραση:

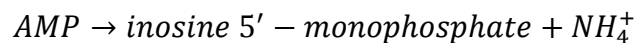


Πυροσταφυλικό οξύ μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια και μετατρέπεται σε ακέτυλο-CoA, προκειμένου να συμμετέχει στον κύκλο του Krebs, με την δράση του ενζύμου

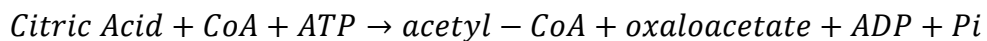
σύμπλεγμα της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (pyruvate dehydrogenase complex- PDC), σύμφωνα με την αντίδραση:



Στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, η χαμηλή συγκέντρωση της πηγής του αζώτου οδηγεί στην αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου AMP απαμινάση, η οποία καταναλώνει την AMP παράγοντας ιόντα αμμωνίου (NH_4^+) προκειμένου να τροφοδοτηθούν τα κύτταρα με το απαραίτητο για αυτά άζωτο, σύμφωνα με την αντίδραση:

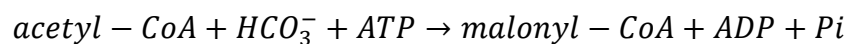


Καθώς μειώνεται η ποσότητα της AMP παρεμποδίζεται η δράση του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (isocitrate dehydrogenase-ICDH), η οποία ενεργοποιείται αλλοστερικά από την AMP, με αποτέλεσμα να μη λαμβάνει χώρα η μετατροπή του ισοκιτρικού σε α-κετογλουταρικό οξύ στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος Krebs). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα το ισοκιτρικό να μετατρέπεται εκ νέου σε κιτρικό μέσω του ενζύμου ακονιτάση του ισοκιτρικού και το συσσωρευόμενο κιτρικό μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του μεταφορέα μηλικού-κιτρικού. Το κιτρικό οξύ στο κυτταρόπλασμα διασπάται από την ATP κιτρική λυάση (ATP citrate lyase-ACL) απελευθερώνοντας ακέτυλο-CoA και οξαλοξικό σύμφωνα με την αντίδραση:



Το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται σε μηλικό οξύ μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού (malate dehydrogenase- MDH) και μεταφέρεται πίσω στα μιτοχόνδρια προκειμένου να κλείσει ο κύκλος του μεταφορέα κιτρικού-μηλικού.

Το πρώτο βήμα για την αναβολική διεργασία σύνθεσης των λιπαρών οξέων, είναι η μετατροπή του ακέτυλο-CoA σε μία δραστικότερη ένωση, το ακέτυλο-ACP (acyl carrier protein), το οποίο στη συνέχεια συνδέεται με ένα ένζυμο συνθετάσης, το οποίο θα καταλύσει το επόμενο στάδιο της συμπύκνωσης. Παράλληλα, ένα διαφορετικό μόριο ακέτυλο-CoA υπόκειται μία αντίδραση καρβοξυλίωσης με την βοήθεια του ενζύμου ACC (ακέτυλο-CoA καρβοξυλάση- acetyl-CoA carboxylase) σε μηλότυλο-CoA σύμφωνα με την αντίδραση:



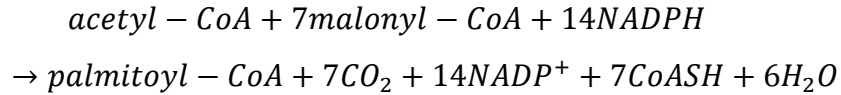
Σε αυτό το στάδιο συμμετέχει το συνένζυμο βιοτίνη, το οποίο συνδέεται με ένα υπόλειμμα λυσίνης του ενζύμου καρβοξυλάση και δρα ως μεταφορέας CO₂.

Η αντίδραση αυτή θεωρείται το καθοριστικό βήμα για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων καθώς ενεργοποιείται από την περίσσεια κιτρικού οξέος μόνο στα ελαιογόνα είδη. Το μηλόνυλο-CoA με άλλη μία αντίδραση θειολοεστερικής ανταλλαγής μετατρέπεται στο δραστικότερο μηλόνυλο-ACP.

Την αντίδραση αυτή ακολουθεί η σύνθεση των λιπαρών οξέων η οποία πραγματοποιείται με την βοήθεια ενός πολυενζυμικού συμπλόκου, της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (fatty acid synthetase-FAS). Η αντίδραση περιλαμβάνει την συμπύκνωση της ενεργοποιημένης ακετυλομάδας (ακέτυλο-ACP) με την ενεργοποιημένη μηλονυλομάδα (μηλόνυλο-ACP) για τον σχηματισμό μίας ακετοακετυλικής ομάδας. Η αντίδραση αυτή είναι μία συμπύκνωση Claisen και οδηγεί στην απελευθέρωση ενός μορίου διοξειδίου του άνθρακα. Στην συνέχεια, το ακετοακέτυλο-ACP ανάγεται από το NADPH (φωσφορικό νικοτινάμιδο αδένινο νουκλεοτίδιο). Ακολουθεί αφυδάτωση του προϊόντος (β-υδροξυ θειολο εστέρας) με αποτέλεσμα την δημιουργία διπλού δεσμού στο μόριο, ο οποίος ανάγεται περαιτέρω από το NADPH προς βουτύρυλο ACP. Η βιοσύνθεση λιπιδίων απαιτεί λόγο ακέτυλο-CoA προς NADPH 1:2 (Ratledge, 2014). Το NADPH που είναι απαραίτητο για την ολοκλήρωση των αναγωγικών διεργασιών παρέχεται είτε μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών, είτε από το μηλικό ένζυμο (malic enzyme-MAE) στον κύκλο αντιδράσεων πυροσταφυλικού/οξαλοξικού/μηλικής τρανσυδρογονάσης (Tai & Stephanopoulos, 2013).

Η σύνοψη των παραπάνω αντιδράσεων είναι η συνένωση δύο ακέτυλοομάδων προς μία βουτυρυλο ομάδα με τέσσερα άτομα άνθρακα. Περαιτέρω συμπύκνωση της ενεργοποιημένης βουτυριλο-ACP με άλλο ένα μόριο μηλονυλο-ACP έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός μορίου με έξι άτομα άνθρακα, ενώ κάθε επανάληψη της ίδιας διαδικασίας οδηγεί στην προσθήκη δύο ακόμα ατόμων άνθρακα στην αλυσίδα έως ότου σχηματιστεί το παλμιτικό οξύ (C16:0). Περαιτέρω επιμήκυνση της αλυσίδας επιτυγχάνεται με αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν, με την διαφορά ότι δότης των δύο ατόμων άνθρακα είναι το ακέτυλο-CoA και όχι το μηλόνυλο-ACP.

Η απλοποιημένη μορφή της παραπάνω διεργασίας περιγράφεται από την αντίδραση:



Όσον αφορά τον βαθμό ακορεστότητας των παραγόμενων λιπαρών οξέων, η εισαγωγή διπλών δεσμών στα μόρια επιτελείται από ειδικές πρωτεΐνες που ονομάζονται αποκορεσμάσες (desaturases). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υδρόφοβες και δεσμευμένες στην μεμβράνη. Οι πιο κοινές αποκορεσμάσες (desaturases) που εντοπίζονται στις ζύμες είναι οι Δ9 και Δ12. Η Δ9 καταλύει την εισαγωγή ενός διπλού δεσμού σε κορεσμένο λιπαρό οξύ (C16 ή C18). Η Δ12 καταλύει την εισαγωγή ενός δεύτερου διπλού δεσμού μεταξύ των ανθράκων 12 και 13 στο ελαϊκό οξύ μετατρέποντάς το σε λινελαϊκό οξύ. Η Δ15, όταν υπάρχει, μετατρέπει το λινελαϊκό σε γ-λινολενικό (Beopoulos et al., 2011)

Οι ολοκληρωμένες λιπαρές αλυσίδες μεταφέρονται στην συνέχεια στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή στα λιποσώματα για την τελική συναρμολόγηση των τριάκυλογλυκερολών (τριγλυκεριδίων), μέσω της οδού Kennedy (Beopoulos et al., 2011; McMurry, 2012; Nelson et al., 2008; Papanikolaou & Aggelis, 2011; Sutanto et al., 2018; Tai & Stephanopoulos, 2013).

2 Σκοπός μελέτης

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε αξιοποίηση του οργανικού κλάσματος στερεών αστικών απορριμμάτων (απόβλητων καφέ και φλοιών στυμμένων πορτοκαλιών) προς τη βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων.

Σε πρώτο στάδιο αναπτύχθηκε μια διεργασία δύο σταδίων για το διαχωρισμό προϊόντων προστιθέμενης αξίας από τα απόβλητα καφέ. Αρχικά μελετήθηκε η εκχύλιση του φυτικού ελαίου με τη χρήση οξικού αιθυλεστέρα, ενός διαλύτη που θεωρείται πράσινος και διαδοχικά πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση του φαινολικού περιεχομένου του καφέ. Στα εναπομείναντα στερεά πραγματοποιήθηκε υδροθερμική προεπεξεργασία και επακόλουθη ενζυμική υδρόλυση για την παραγωγή υδρολύματος καφέ πλούσιου σε σάκχαρα. Από τους φλοιούς στυμμένων πορτοκαλιών παραλήφθηκαν μετά από εκχύλιση με νερό τα ελεύθερα σάκχαρα. Τα δύο διαφορετικά ρεύματα (υδρόλυμα καφέ και ελεύθερα σάκχαρα φλοιών πορτοκαλιού) χρησιμοποιήθηκαν για την βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων.

Σε δεύτερο στάδιο, τρεις διαφορετικοί ελαιογόνοι μικροοργανισμοί (*C. curvatus* ATCC 20509, *L. starkeyi* DSM 70296 και *R. toruloides* NRRL Y-27012) εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναπτυχθούν και να παράγουν μικροβιακά λιπίδια σε συνθετικό υπόστρωμα με διαφορετικές πηγές άνθρακα (γλυκόζη, ξυλόζη και μαννόζη). Οι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296 μελετήθηκαν περαιτέρω σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα με σκοπό την αύξηση της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων.

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Πρώτες ύλες

Ως πρώτες ύλες για την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν απόβλητα φλοιών στυμμένων πορτοκαλιών και στερεά απόβλητα καφέ.

Τα στερεά απόβλητα καφέ (SCGs) που χρησιμοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν κατά την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, συλλέχθηκαν από τοπικά καταστήματα εστίασης και δεν αποτελούνται από μία συγκεκριμένη ποικιλία καφέ. Το SCGs και τα απόβλητα φλοιών στυμμένων πορτοκαλιών παραλήφθηκαν από τα καταστήματα σε νωπή μορφή. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ξήρανση τους στους 40°C έως ότου η υγρασία να είναι σε επίπεδα χαμηλότερα του 10%. Στη συνέχεια, ο καφές και τα απόβλητα φλοιών στυμμένων πορτοκαλιών αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20°C) μέχρι να αναλυθούν και να αξιοποιηθούν περαιτέρω.

3.2 Διαχωρισμός Προϊόντων Υψηλής Προστιθέμενης Αξίας

3.2.1 Στερεά απόβλητα καφέ

3.2.1.1 Φυτικό έλαιο

Η εκχύλιση του φυτικού ελαίου των SCGs πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλυτών διαφορετικής πολικότητας και περιβαλλοντικού αποτυπώματος (εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας) σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:10 (w/v) υπό την επίδραση υπερήχων σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά. Στην συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρο για 10 min στους 4°C, 9000 rpm (Hettich Universal 320) και διηθήθηκε για την πλήρη απομάκρυνση των στερεών συστατικών από το υγρό εκχύλισμα. Το υγρό εκχύλισμα εξατμίστηκε υπό κενό στους 40°C (Rotary evaporator, BUCHI, R-114) σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη. Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας του δείγματος σε φυτικό έλαιο (g oil/100g SCGs) και της απόδοσης της ανάκτησης του φυτικού ελαίου (RY, %) χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εξισώσεις 1 και 2:

$$Y = (W_{oil}/W_{SCG}) \times 100 \quad (1)$$

$$\%RY = (W_{oil}/W_{total\ oil\ content}) \times 100 \quad (2)$$

όπου W_{oil} (g) το βάρος του φυτικού ελαίου που εκχυλίστηκε, W_{SCGS} (g) η αρχική ποσότητα του δείγματος SCGS και $W_{total\ oil\ content}$ (g) η ποσότητα φυτικού ελαίου που εκχυλίστηκε από το SCGS με τη μέθοδο Soxhlet.

3.2.1.2 Εκχύλιση Φαινολικών Ενώσεων

Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από ξηρό δείγμα SCGS βάρους 5g, πραγματοποιήθηκε με την χρήση αιθανόλης 70% (v/v) σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:10 και 1:5 (w/v) υπό την επίδραση υπερήχων σε υδατόλουτρο για διάρκεια 20 min. Με το πέρας της εκχύλισης, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του στερεού κλάσματος με διήθηση και στη συνέχεια το υγρό εκχύλισμα υπέστη εξάτμιση υπό κενό (Rotary evaporator, BUCHI, R-114) σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη στους 40°C. Τα φαινολικά συστατικά παραλήφθηκαν από την σφαιρική φιάλη με τη χρήση μεθανόλης (10 mL) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι περαιτέρω ανάλυσης.

3.2.1.3 Εκχύλιση ελεύθερων σακχάρων με νερό.

Καθώς τα ελεύθερα σάκχαρα αποτελούν ένα από το κύρια συστατικά των φλοιών πορτοκαλιού και εφόσον δύνανται να αποτελέσουν πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη ελαιογόνων μικροοργανισμών και την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, κρίθηκε απαραίτητη η έκπλυση των φλοιών πορτοκαλιού με νερό, με σκοπό την εκχύλιση των ελεύθερων σακχάρων.

Ως δείγμα χρησιμοποιήθηκε ξηρό δείγμα πολτοποιημένων φλοιών πορτοκαλιού. Η αναλογία στην οποία πραγματοποιήθηκε η αραίωση του, ήταν 1:10 (w/v), υπό ανάδευση στους 40°C για 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των στερεών. Το υπερκείμενο το οποίο προέκυψε αναλύθηκε μέσω HPLC με σκοπό να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε σάκχαρα.

3.3 Υδροθερμική προ επεξεργασία SCGs άνευ λίπους και φαινολικών και ενζυμική υδρόλυση

Η προ επεξεργασία του SCGs άνευ λίπους και φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με υδροθερμική διεργασία στους 140°C για 1 ώρα σε αναλογία στερεού-υγρού 1:10 w/v. Σε φιάλες Duran των 100 mL τοποθετήθηκε προζυγισμένη ποσότητα SCGs άνευ λίπους και φαινολικών συστατικών και προστέθηκε η αντίστοιχη

ποσότητα απιονισμένου νερού με σκοπό την επίτευξη της αναλογίας στερεού προς υγρό 1:10 w/v. Οι φιάλες στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αυτόκαυστο για 1 ώρα στους 140°C. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση με τη χρήση εμπορικών ενζύμων. Για την διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκε μίγμα εμπορικών ενζύμων, το οποίο περιείχε καρβοξυμεθυλκυτταρινάση (CMCase) (70 U/mL ενζύμου), β-γλυκοσιδάση (80 U/mL ενζύμου), μαλτάση (130 U/ml ενζύμου) και ξυλανάση (55 U/mL ενζύμου). Ως μονάδα ενεργότητας (unit, U) του ενζύμου ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να παραχθεί 1 μmol σακχάρου σε 1min.

Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Duran όγκου 100 mL, στους 50°C με αρχική συγκέντρωση στερεών 100 g/L. Το pH ρυθμιζόταν στο 4,8-5,0 καθ' όλη τη διάρκεια της υδρόλυσης με 5 M NaOH ή 5 M HCl. Αρχικά προστέθηκε ποσότητα ενζύμου που περιείχε 2,8 U CMCase ανά g SCGs, 3,3 U β-γλυκοσιδάση ανά g SCGs, 5,2 U μαλτάση ανά g SCGs και 2,2 U ξυλανάση ανά g SCGs. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενο λουτρό υπό συνεχή ανάδευση στα 150 rpm (Hotplate stirrer MSH-20D, Witeg, Germany), ενώ πραγματοποιούνταν λήψη δειγμάτων υπό ασηπτικές συνθήκες για την ανάλυση των σακχάρων.

3.3.1 Προσδιορισμός απόδοσης ενζυμικής υδρόλυσης ημικυτταρίνης και κυτταρίνης

Η απόδοση της ημικυτταρίνης και κυτταρίνης στην ενζυμική υδρόλυση εκφράστηκε ως το ποσοστό απελευθέρωσης μονομερών σακχάρων και υπολογίζεται από τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\text{Απόδοση κυτταρίνης (\%)} = \frac{C_{\text{γλυκόζης}} \times R}{C_{\text{ημικυτταρίνης}}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Απόδοση ημικυτταρίνης (\%)} = \frac{C_{\text{μονομερών ημικυτταρίνης}} \times R}{C_{\text{ημικυτταρίνης}}} \times 100 \quad (4)$$

Όπου $C_{\text{μονομερών ημικυτταρίνης}}$ το άθροισμα των συγκεντρώσεων της γαλακτόζης της μαννόζης και της αραβινόζης μετά την ενζυμική υδρόλυση σε g, $C_{\text{ημικυτταρίνης}}$ η αρχική συγκέντρωση της ημικυτταρίνης του προεπεξεργασμένου SCGs σε g, $C_{\text{κυτταρίνης}}$ η αρχική συγκέντρωση της κυτταρίνης του προεπεξεργασμένου SCGs σε g και R ο συντελεστής διόρθωσης κατά την ενζυμική υδρόλυση (0,9 για γλυκόζη, γαλακτόζη και μαννόζη και 0,88 για την αραβινόζη).

3.4 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη για την πραγματοποίηση των ζυμώσεων χρησιμοποιήθηκαν μικροοργανισμοί που ανήκουν στην κατηγορία των ζυμών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι ζύμες *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Germany), *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 (American Type Culture Collection-ATCC, Manassas, Virginia, U.S.A.) και ο μικροοργανισμός *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 (ARS Culture Collection-NRRL, Peoria, Illinois, U.S.A.). Στους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς μακροχρόνια αποθήκευση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα γλυκερόλης (50% (v/v)), σε συνθήκες κατάψυξης (-80°C).

3.5 Υπόστρωμα Προκαλλιέργειας

Η παρασκευή και ανάπτυξη της προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες 500 mL (Erlenmeyer baffled flasks) πληρωμένες μέχρι τα 100 mL με θρεπτικό μέσο αποτελούμενο από 10 g/L γλυκόζη, 10 g/L πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης. σε συγκέντρωση επίσης 10 g/L. Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν στους 121°C για 20 min, με την πηγή άνθρακα να αποστειρώνεται ξεχωριστά. Οι αποστειρωμένες κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Laminar) με ένα φιαλίδιο (Cryovial), στο οποίο φυλασσόταν το εναιώρημα κυττάρων. Στην συνέχεια, οι εμβολιασμένες προκαλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (Shaker, New Brunswick Sc, USA) υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (30 ± 1 °C) και ανάδευσης (180 ± 5 rpm). Η διάρκεια της επώασης διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ζυμών που μελετήθηκαν. Στην περίπτωση του μικροοργανισμού *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 οι κωνικές φιάλες επώαστηκαν για 44-48 ώρες, ενώ στην περίπτωση των *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 και *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 οι κωνικές φιάλες επώαστηκαν για 24 περίπου ώρες. Στη συνέχεια κάτω από ασηπτικές συνθήκες το εμβόλιο (10%, v/v) προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης.

3.6 Θρεπτικό μέσο για τη βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις

Οι τρεις ζύμες που προαναφέρθηκαν εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά λίπος σε συνθετικό υπόστρωμα με διαφορετική πηγή άνθρακα. Τα διαφορετικά σάκχαρα που εξετάστηκαν ήταν η γλυκόζη, η μαννόζη και η ξυλόζη. Πιο συγκεκριμένα η σύσταση του υποστρώματος ήταν: εμπορική πηγή άνθρακα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L, ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης 1 g/L και βακτηριακή πεπτόνη 2 g/L. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων όπου η συγκέντρωση αυτών παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Η προαναφερθείσα σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος αντιστοιχεί σε λόγο άνθρακα προς άζωτο $C/N = 70$. Το σύνολο των ζυμώσεων έλαβε χώρα σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχής ζυμώσεις με τον μικροοργανισμό *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 με τη χρήση του υδρολύματος καφέ και των ελεύθερων σακχάρων φλοιών πορτοκαλιού ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, με την προσθήκη πηγής αζώτου και αλάτων ανάλογα με τις υπόλοιπες κλειστές καλλιέργειες

Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση στις 180 rpm και σε θερμοκρασίας 30°C. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης το pH του υποστρώματος ρυθμιζόταν στο 5.8-6.0 με τη χρήση NaOH 5M. Και σε αυτή την περίπτωση τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν στους 121°C για 20 min. Η πηγή άνθρακα και η πηγή αζώτου να αποστειρώθηκαν ξεχωριστά και προστέθηκαν ασηπτικά στο υγρό της ζύμωσης πριν τον εμβολιασμό.

Πίνακας 1. Μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων θρεπτικού μέσου

Σύσταση θρεπτικού μέσου	
KH_2PO_4 (g/L)	7
Na_2HPO_4 (g/L)	2,5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0,15
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	1,5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0,06
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0,02
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0,015

3.7 Θρεπτικό μέσο για τη βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα

Οι μικροοργανισμοί που αξιολογήθηκαν ως πιο αποτελεσματικοί ως προς την ικανότητα συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους στις ασυνεχείς ζυμώσεις στις κωνικές φιάλες, στη συνέχεια εξετάστηκαν σε ημι-συνεχή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα. Πιο συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 και *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 καλλιεργήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 6.7 L (Bioengineering, RALF Advanced) με ενεργό όγκο 3 L. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης σε αναλογία 2:1, ενώ η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν τα 100 g/L. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου αποτελείτο από 6 g/L εκχύλισμα ζύμης και μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 3.5. Τα εν λόγω πειράματα, καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης υπήρχαν σταθερές συνθήκες pH στο 6.0 και θερμοκρασίας (30°C). Η ρύθμιση του pH πραγματοποιούνταν με αυτόματη προσθήκη 5M NaOH. Ο ρυθμός ανάδευσης στο βιοαντιδραστήρα ρυθμίστηκε στα 150-450 rpm, προκειμένου να διατηρηθεί το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου (DO) στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα στο 20% με σταθερό αερισμό στο 1 vvm. Όταν η συγκέντρωση των σακχάρων στο υγρό της ζύμωσης ήταν περίπου στα 20 g/L πραγματοποιούνταν προσθήκη πυκνού διαλύματος γλυκόζης και ξυλόζης (συγκέντρωσης ~650 g/L).

3.8 Αναλυτικές μέθοδοι

3.8.1 Προσδιορισμός Υγρασίας

Για τον υπολογισμό του ποσοστού της περιεχόμενης υγρασίας, σε προζυγισμένο δοχείο τοποθετείται ποσότητα καφέ, το σύνολο ζυγίζεται και τοποθετείται στον φούρνο στους 115°C για 24 ώρες. Στην συνέχεια, το δείγμα μεταφέρεται στον αφυγραντήρα μέχρι σταθερού βάρους και ζυγίζεται.

3.8.2 Προσδιορισμός Τέφρας

Για τον υπολογισμό της τέφρας, δείγμα καφέ μεταφέρεται σε πυρακτωμένες και προζυγισμένες κάψες πορσελάνης και τοποθετείτε στον φούρνο στους 80°C μέχρι την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας. Αφού το δείγμα ζυγιστεί, οι κάψες πορσελάνης τοποθετούνται στον φούρνο της αποτέφρωσης όπου πυρώνονται στους 550-600°C μέχρι να γίνει η αποτέφρωση (6 ώρες). Στην συνέχεια οι κάψες πορσελάνης μεταφέρονται σε αφυγραντήρα και αφού επανέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στο εσωτερικό του αφυγραντήρα, ζυγίζονται και η τέφρα υπολογίζεται ως το ανόργανο κλάσμα που απέμεινε στην κάψα πορσελάνης. Το ποσοστό της τέφρας υπολογίζεται ως το βάρος της τέφρας διαιρούμενο με το βάρος του δείγματος μετά την αφαίρεση της υγρασίας στους 80°C, σύμφωνα με την εξίσωση 5:

$$\% \text{ Τέφρα} = (\text{Τέφρα (g)} / \text{Βάρος ξηρού δείγματος (g)}_{80^{\circ}\text{C}}) \times 100 \quad (5)$$

3.8.3 Προσδιορισμός Εκχυλίσμων Συστατικών

Προκειμένου να ακολουθήσει ο προσδιορισμός της σύστασης του καφέ, είναι απαραίτητη η απαγωγή των εκχυλίσμων συστατικών από το δείγμα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω εκχύλισης Soxhlet. Κατά την υλοποίηση της κλασικής μορφής της εκχύλισης Soxhlet το δείγμα τοποθετείται σε μία ειδική πορώδη θήκη (thimble), οποία μεταφέρεται σε ειδική υποδοχή της συσκευής Soxhlet, τον θάλαμο εκχύλισης. Στο κάτω μέρος της συσκευής τοποθετείται μία σφαιρική φιάλη, η οποία περιέχει το διαλύτη που χρησιμοποιείται από την εκχύλιση. Ο διαλύτης θερμαίνεται από θερμαντικό μανδύα και οι ατμοί φθάνουν μέσω ενός πλάγιου σωλήνα στον θάλαμο εκχύλισης, όπου συμπυκνώνονται και διαβρέχουν το δείγμα. Όταν ο διαλύτης φθάσει σε ένα συγκεκριμένο ύψος στην θάλαμο εκχύλισης, δημιουργείται σιφωνισμός και ο

διαλύτης μαζί με την ουσία που εκχύλισε, επιστρέφει στην σφαιρική φιάλη. Η όλη διαδικασία συνεχίζεται μέχρι όλα τα εκχυλίσματα συστατικά να παραληφθούν από τον διαλύτη. Η εκχύλιση Soxhlet παρουσιάζει ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα. Καθώς το δείγμα έρχεται σε επαναλαμβανόμενη επαφή με φρέσκο- ακόρεστο διαλύτη, μεταβάλλεται συνεχώς ο συντελεστής μεταφοράς μάζας. Παράλληλα, το δείγμα δεν έρχεται απευθείας σε επαφή με πηγή θερμότητας, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει κίνδυνος καύσης του δείγματος (De Castro & Priego-Carote, 2010).

Η διαδικασία της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Sluiter et al. (2005). Για την υλοποίηση της διαδικασίας, αρχικά σε στεγνή και προζυγισμένη σφαιρική φιάλη προστίθενται πέτρες βρασμού και το σύνολο ζυγίζεται. Στην συνέχεια ζυγίζεται το thimble και στο εσωτερικό του τοποθετείται το ξηρό δείγμα καφέ. Το thimble πωματίζεται με βαμβάκι, διπλώνεται προκειμένου να σφραγιστεί και το σύνολο ζυγίζεται. Ανάλογα με το συστατικό του δείγματος που θέλουμε να εκχυλίσουμε επιλέγουμε τον κατάλληλο διαλύτη. Έτσι, για την εκχύλιση των λιπαρών υλών ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι το εξάνιο, για την εκχύλιση των υδατοδιαλυτών συστατικών υπερκάθαρο νερό ενώ για την εκχύλιση των συστατικών που είναι διαλυτά στην αιθανόλη, επιλέγεται η τελευταία. Στην προζυγισμένη σφαιρική φιάλη τοποθετούνται 190 ml διαλύτη, το δείγμα και η σφαιρική μεταφέρονται στην συσκευή Soxhlet και ξεκινάει η διαδικασία της εκχύλισης. Ο θερμοκρατικός μανδύας ρυθμίζεται σε θερμοκρασία τέτοια ώστε να επιτυγχάνονται 4-5 σιφωνισμοί την ώρα και η εκχύλιση πραγματοποιείται για 24 ώρες. Στην περίπτωση που ο διαλύτης που είχε υπολογιστεί για την εκχύλιση ήταν το νερό, τότε το εκχύλισμα τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη, συμπληρώνεται μέχρι τα 200 ml με υπερκάθαρο νερό και εξετάζεται μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Αν είναι απαραίτητο να ακολουθήσει και εκχύλιση των συστατικών που είναι διαλυτά στην αιθανόλη, τότε το thimble με το δείγμα του καφέ παραμένει στην υποδοχή της συσκευής Soxhlet και σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη προστίθεται αιθανόλη περιεκτικότητας 70% (v/v) και ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιεγράφηκε προηγουμένως. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας το εκχύλισμα της αιθανόλης αφαιρείται, εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary evaporator, BUCHI, R-114) και το υπόλειμμα ζυγίζεται. Το ίδιο πράττεται και για την εκχύλιση των λιπαρών συστατικών του δείγματος. Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης, αφαιρείται και το thimble και τοποθετείται στον φούρνο

μέχρι ξηρού βάρους οπότε και ζυγίζεται. Η περιεκτικότητα του δείγματος σε εκχυλίσιμα συστατικά, εκφράζεται ως ο λόγος του βάρους των τελευταίων, προς το βάρος του ξηρού δείγματος που τοποθετήθηκε στην συσκευή Soxhlet προς εκχύλιση.

3.8.4 Προσδιορισμός των δομικών πολυσακχαριτών και λιγνίνης

Για την ανάλυση της σύστασης των δομικών υδατανθράκων και της λιγνίνης στην πρώτη ύλη SCGs χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κατά Sluiter et al., 2008 (Sluiter et al., 2008), η οποία προϋποθέτει στερεά σωματίδια με συγκεκριμένο εύρος μεγέθους. Έτσι, η ξηρή βιομάζα SCGs κοσκινίζεται με την χρήση κόσκινων 1 mm και 0,25 mm. Το κλάσμα που παραμένει στα κόσκινα μεγέθους 0,25 mm παραλαμβάνεται και ζυγίζεται ποσότητα ίση με 0,3 g. Παράλληλα, το δείγμα που χρησιμοποιείται για την μέθοδο θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από εκχυλιζόμενες ουσίες, έτσι στο δείγμα έχει προηγηθεί εκχύλιση Soxhlet.

Η ποσότητα του δείγματος υπόκειται σε όξινη υδρόλυση δύο σταδίων. Συγκεκριμένα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φιάλες αναεροβίωσης, στα οποία πραγματοποιήθηκε προσθήκη 3 mL H₂SO₄ 72% (v/v) και παρέμειναν στους 30°C για 1 h υπό ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Μετά την πάροδο του χρόνου, πραγματοποιήθηκε αραίωση του διαλύματος του H₂SO₄ σε τελική συγκέντρωση 4% v/v, με την προσθήκη 84 mL υπερκάθαρου H₂O σε κάθε δείγμα, με αποτέλεσμα ο συνολικός όγκος του κάθε δείγματος να φτάσει στα 86,73 mL. Στη συνέχεια ακολουθεί το δεύτερο στάδιο της υδρόλυσης, το οποίο προϋποθέτει την τοποθέτηση των σφραγισμένων φιαλών αναεροβίωσης στο αυτόκαυστο για 60 min στους 121°C. Παράλληλα με τα δείγματα, όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για διάλυμα σακχάρων γνωστής συγκέντρωσης (Calibration Verification Standard-CVS), για τον υπολογισμό του ποσοστού των σακχάρων που απομακρύνονται κατά την όξινη υδρόλυση (sugar recovery standards- SRS). Μετά το πέρας τις 1 h τα δείγματα διηθήθηκαν υπό κενό με την χρήση ειδικών προζυγισμένων φίλτρων (Glass fibers). Τα φίλτρα μαζί με όλη την ποσότητα των στερεών δειγμάτων μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένες κεραμικές κάψες, τοποθετήθηκαν στον φούρνο (80°C, 24h) για την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας και στη συνέχεια στον αφυγραντήρα μέχρι να επανέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος οπότε και ζυγίστηκαν. Τέλος, τα δείγματα αποτεφρώθηκαν στους

560°C για 4h και από τη διαφορά των δυο ζυγίσεων μεταξύ 80°C και 560°C υπολογίζεται η ποσότητα της αδιάλυτης λιγνίνης (AIL, %).

Το υγρό κλάσμα που απομονώθηκε κατά την διήθηση υπό κενό, ογκομετρήθηκε και φωτομετρήθηκε μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis (Jasco V-530) στα 290 nm αφού πρώτα ελέγχθηκε φωτομετρικά το μέγιστο της απορρόφησης. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε διαλυτή λιγνίνη (ASL, %) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την εξίσωση 6:

$$ASL(\%) = (abs \times V \times Dil / \epsilon \times M \times pathlength) \times 100 \quad (6)$$

όπου, *abs* η απορρόφηση του δείγματος, *V* ο όγκος του φιλτραρισμένου δείγματος, *Dil* η αραιώση, *E* η απορροφητικότητα της βιομάζας στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, *M* η μάζα του στερεού δείγματος που ζυγίζεται στο αρχικό στάδιο και *pathlength* το πάχος της κυψελίδας που χρησιμοποιείται για την φωτομέτρηση.

Η συνολική ποσότητα της λιγνίνης (δείγματος ελεύθερου από εκχυλιζόμενες ουσίες) υπολογίζεται ως:

$$\%Λιγνίνη = \%AIL + \%ASL \quad (7)$$

Για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των δομικών υδατανθράκων του δείγματος χρησιμοποιήθηκε Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) εξοπλισμένη με στήλη Shodex SP0810 στους 60°C και ρυθμό ροής 0,6 mL/min με υπερκάθαρο νερό ως κινητή φάση. Αναλυτικά, 10 mL διηθήματος από το κάθε δείγμα απομονώθηκαν και εξουδετερώθηκαν με CaCO₃ μέχρι το pH να φτάσει στα όρια 5,0-5,5 για να αποφευχθεί η κατακρήμνιση των σακχάρων σε υψηλότερο pH. Το εξουδετερωμένο διάλυμα φυγοκεντρήθηκε (10 min, 9000 rpm, 4°C) και το υπερκείμενο φιλτραρίστηκε (0,02 μm) οπότε και ακολούθησε ο προσδιορισμός των σακχάρων μέσω HPLC.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των σακχάρων αρχικά υπολογίζεται το ποσοστό ανάκτησης τους, διαιρώντας την αναγνωριζόμενη από την HPLC συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος σακχάρων πριν την κατεργασία στο αυτόκαυστο, με την παρατηρούμενη συγκέντρωση μετά (sugar recovery standards- SRS) σύμφωνα με την εξίσωση (8):

$$\% R_{sugar} = \frac{\text{συγκέντρωση παρατηρούμενη μέσω HPLC } \left(\frac{mg}{L}\right)}{\text{συγκέντρωση προτύπου } \left(\frac{mg}{L}\right)} \times 100 \quad (8)$$

Όπου % R_{sugar} το ποσοστό ανάκτησης του κάθε σακχάρου μετά την κατεργασία με το αυτόκαυστο· και όπου συγκέντρωση προτύπου, η συγκέντρωση του συγκεκριμένου σακχάρου στο πρότυπο διάλυμα πριν την κατεργασία με το αυτόκαυστο.

Το παραπάνω ποσοστό ανάκτησης σακχάρων, χρησιμοποιείται προκειμένου να γίνει διόρθωση της παρατηρούμενης συγκέντρωσης του κάθε σακχάρου του εξεταζόμενου δείγματος, συνυπολογίζοντας στον τύπο και την πιθανή αραίωση του δείγματος, εξίσωση (9):

$$\text{Συγκέντρωση σακχάρου υδρολυμένου δείγματος} = \frac{\text{Συγκέντρωση σακχάρου HPLC} \times \text{Αραίωση}}{\% R_{sugar} / 100} \quad (9)$$

Στην συνέχεια, προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση των πολυμερών των σακχάρων, πριν τις υδρολύσεις, χρησιμοποιείται ένας διορθωτικός συντελεστής που συνυπολογίζει την απώλεια ενός μορίου νερού κατά την δημιουργία ενός γλυκοζυτικού δεσμού. Ο συντελεστής αυτός ισούται με 0,88 (132/150) για σάκχαρα με 5 άτομα άνθρακα (ξυλόζη και αραβινόζη) και 0,9 (162/180) για σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα (γλυκόζη, γαλακτόζη και μαννόζη). Έτσι προκύπτει η συγκέντρωση των εκάστοτε πολυσακχαριτών σε g/L, η οποία ανάγεται σε % περιεκτικότητα επί του αρχικού ξηρού δείγματος. Μέσω της συγκέντρωσης της γλυκόζης, που υπολογίζεται όπως περιεγράφηκε, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της κυτταρίνης, ενώ το σύνολο των συγκεντρώσεων των υπολοίπων πολυσακχαριτών αποτελεί την ημικυτταρίνη.

3.8.5 Προσδιορισμός Πρωτεΐνης

Για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Kjeldahl. Η μέθοδος Kjeldahl περιλαμβάνει μια διεργασία τριών σταδίων που αποτελείται από την χώνευση, την απόσταξη και την τιτλοδότηση. Η πέψη του οργανικού υλικού επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας πυκνό H_2SO_4 , υψηλή θερμοκρασία, Na_2SO_4 , για να αυξηθεί το σημείο βρασμού και έναν καταλύτη για να επιταχυνθεί η αντίδραση. Αυτή η διαδικασία μετατρέπει το σύνολο του αζώτου στο δείγμα σε θειικό αμμώνιο. Το υπόλειμμα εξουδετερώνεται με την προσθήκη $NaOH$, που μετατρέπει το θειικό αμμώνιο σε αμμωνία, η οποία αποστάζεται και συλλέγεται σε

μια φιάλη υποδοχής που περιέχει περίσσεια βορικού οξέος, σχηματίζοντας βορικό αμμώνιο. Στη συνέχεια, ανιόντα βορικού οξέος που σχηματίζονται, τιτλοδοτούνται με οξύ με τη χρήση κατάλληλου δείκτη τελικού σημείου για την εκτίμηση της συνολικής περιεκτικότητας του δείγματος σε άζωτο. Μετά τον προσδιορισμό του συνολικού αζώτου, απαιτείται η χρήση ενός συγκεκριμένου συντελεστή μετατροπής για τη μετατροπή της μετρούμενης περιεκτικότητας σε άζωτο, σε περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Οι περισσότερες πρωτεΐνες περιέχουν 16% άζωτο, επομένως ο συντελεστής μετατροπής είναι 6,25 (Goulding et al., 2020)(Jiang et al., 2014).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε μονάδα απόσταξης Kjeltex TM 8100 (Foss, Denmark). Ξηρό δείγμα ζυγίστηκε με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών σε ρυζόχαρτο και τοποθετήθηκε σε σωλήνα πέψης. Με δοσομετρητή (Bottle top dispenser) έγινε προσθήκη 25 mL H₂SO₄ και προστέθηκε μία ταμπλέτα Kjeldahl που περιέχει Na₂SO₄ 96,5% ,CuSO₄ 1,5% και Se 2,0%. Τα ίδια αντιδραστήρια προστέθηκαν και για το τυφλό δείγμα. Η χώνευση διεξήχθη στους 430°C για 1 h και αφού οι σωλήνες επανήλθαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ακολούθησε το στάδιο της απόσταξης. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται αυτόματη προσθήκη 30 mL H₂O και 100 mL NaOH (40%, w/v). Το υγρό που προκύπτει μετά την απόσταξη συλλέγεται σε κωνική φιάλη στην οποία έχει προστεθεί προηγουμένως 50 mL διαλύματος βορικού οξέος με σύσταση 40 g βορικού οξέος, 7 mL δείκτη ερυθρό του μεθυλίου (0,1%) και 10 mL δείκτη πράσινο της βρωμοκρεσόλης (0,1%) για ένα λίτρο διαλύματος. Τέλος, ακολούθησε η τιτλοδότηση των βορικών ανιόντων με πρότυπο διάλυμα HCl κανονικότητας 0,1 N. Ο όγκος του πρότυπου διαλύματος HCl που καταναλώνεται κατά την τιτλοδότηση μεταφράζεται σε συνολική ποσότητα αζώτου σύμφωνα με την εξίσωση 10:

$$\text{Άζωτο(\%)} = \frac{((\text{mL δειγματος} - \text{mL τυφλού}) * N * 1,4007) / \text{mg ξηρού δείγματος}}{100} \quad (10)$$

όπου N η κανονικότητα του διαλύματος HCl, mL δείγματος τα mL 0,1 N HCl που καταναλώθηκαν κατά την τιτλοδότηση του δείγματος και mL τυφλού τα mL 0,1 N HCl που καταναλώθηκαν κατά την τιτλοδότηση του τυφλού δείγματος.

Στη συνέχεια, το ποσοστό της πρωτεΐνης που περιέχεται στο δείγμα υπολογίζεται από την εξίσωση 11:

$$\text{Πρωτεΐνη (\%)} = \text{Άζωτο(\%)} \times 6,25 \quad (11)$$

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

3.8.6 Ποσοτικός Προσδιορισμός κυτταρικής μάζας

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της βιομάζας πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του ξηρού βάρους. Κατά την ανάλυση, δείγμα όγκου 2ml (με επανάληψη), μεταφέρεται σε φιαλίδιο Eppendorf και φυγοκεντρείται (10000 rpm, 10 min, 4°C). Στη συνέχεια πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με χρήση απιονισμένου νερού και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται ξανά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το στερεό μεταφέρεται στον φούρνο για την απομάκρυνση της υγρασίας και τελικά στον αφυγραντήρα μέχρι σταθερού βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και εκφράζεται σε g/L.

3.8.7 Ποσοτικός Προσδιορισμός Ενδοκυτταρικού Μικροβιακού Ελαίου

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ενδοκυτταρικού λίπους, σε πρώτο στάδιο απαιτείται η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης της βιομάζας και η εκχύλιση του λίπους με την χρήση οργανικού διαλύτη. Πιο συγκεκριμένα, δείγμα υγρής καλλιέργειας (50 mL), φυγοκεντρείται (9000 rpm, 4°C, 10 min) και στην συνέχεια ξεπλένεται με τη χρήση απιονισμένου νερού και τοποθετείται σε προζυγισμένο φιαλίδιο (McCartney). Το δείγμα μεταφέρεται σε λυοφιλιωτή (freeze dryer), για την απομάκρυνση της υγρασίας και ζυγίζεται με σκοπό τον προσδιορισμό της ξηρής βιομάζας. Στην συνέχεια το δείγμα κονιορτοποιείται και προστίθεται μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης αναλογίας 2:1 (Folch et al., 1957). Το φιαλίδιο σφραγίζεται αεροστεγώς. Έπειτα, στο δείγμα επιδρούν υπέρηχοι σε λουτρό (BANDELIN; SONOPLUS Ultrasonic Homogenizers) για 30 λεπτά προκειμένου να υποβοηθηθεί η διάρρηξη των κυττάρων εξαιτίας των μεγάλων διατμητικών τάσεων που αναπτύσσονται (Lee et al., 2017). Τέλος το δείγμα αφήνεται σε συνθήκες σκότους, για την αποφυγή της φωτο-οξειδωσης των λιπαρών οξέων, για τουλάχιστον 72 ώρες.

Με την πάροδο του απαραίτητου χρονικού διαστήματος, το μίγμα διηθείται με την χρήση διπλού διηθητικού χαρτιού, στο εσωτερικό προζυγισμένης σφαιρικής φιάλης εξάτμισης. Το στερεό δείγμα ξηραίνεται στον φούρνο στους 80°C και μεταφέρεται στον αφυγραντήρα προκειμένου να επεξεργαστεί περαιτέρω, ενώ η σφαιρική φιάλη οδηγείται προς εξάτμιση υπό κενό σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary evaporator, BUCHI, R-114) στους 50°C για την απομάκρυνση των πτητικών διαλυτών. Το μικροβιακό λίπος παραλαμβάνεται εντός της κωνικής φιάλης, η οποία τοποθετείται στον φούρνο στους 50°C για 30 min και κατόπιν στον αφυγραντήρα μέχρι να επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τελικά, ζυγίζεται για τον προσδιορισμό της μάζας του περιεχομένου λίπους. Η ποσότητα αυτή, που προέρχεται από καθορισμένο όγκο δείγματος ανάγεται τελικά σε g λίπους ανά λίτρο καλλιέργειας, ενώ επίσης προσδιορίζεται η επί της % περιεκτικότητα λίπους της κυτταρικής βιομάζας, σύμφωνα με την εξίσωση 12 :

$$\% \text{περιεκτικότητα σε λίπος} = \left(\frac{\text{g λίπους}}{\text{g βιομάζας}} \right) \times 100 \quad (12)$$

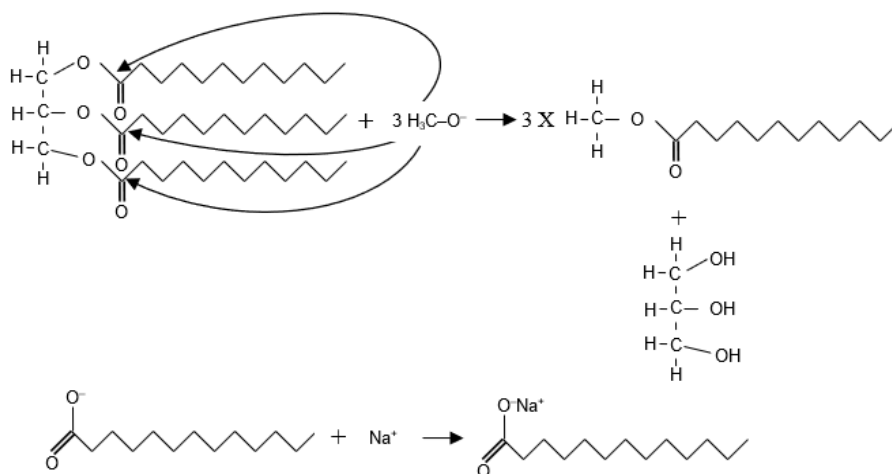
Η βιομάζα που ανακτήθηκε μετά την εκχύλιση των λιπιδίων δύναται να περιέχει επιπλέον ποσότητα λίπους, αφού είναι πιθανό να μην έχει διαρρηχθεί το σύνολο των λυοφιλωμένων κυττάρων. Προκειμένου να προσδιοριστεί το σύνολο του λίπους που περιέχεται στο υπόλειμμα αυτό, σε προζυγισμένο φιαλίδιο McCartney προστίθενται, για κάθε 500 mg υπολειμματικής βιομάζας, 6 ml HCl συγκέντρωσης 4M. Το μίγμα θερμαίνεται στους 80°C για μία ώρα υπό ανάδευση. Αφού το μίγμα επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται 6 ml μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης με αναλογίας 2:1 (Folch et al., 1957), οπότε σχηματίζεται ένα τριφασικό σύστημα στο οποίο η πάνω φάση είναι η όξινη υδατική φάση, στην μέση βρίσκονται τα υπολείμματα των κυττάρων, ενώ η κάτω φάση είναι η οργανική, αποτελούμενη από το μίγμα διαλυτών Folch και διαλυμένο σε αυτό το εναπομείναν λίπος. Η οργανική φάση απομονώνεται με την χρήση πιπέτας και τοποθετείται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη. Το πτητικό μίγμα διαλυτών Folch, εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα και η φιάλη με το περιεχόμενο λίπος τοποθετείται στον φούρνο στους 80°C για 1 h και στην συνέχεια στον αφυγραντήρα μέχρι σταθερού βάρους, οπότε και ζυγίζεται. Το λίπος υπολογίζεται μέσω της διαφοράς του βάρους της φιάλης (Tarja et al., 2012). Το βάρος του λίπους που απομονώνεται, διαιρείται με το

βάρος της κυτταρικής βιομάζας από την οποία εξάχθηκε, αφού σε αυτή προστεθεί το λίπος που εξάχθηκε με την μέθοδο Folch σύμφωνα με την εξίσωση 13:

$$\%Oil_{HCl} = \frac{g\ oil_{HCl}}{g\ DCW + (g\ DCW * \%oil_{Folch})} \quad (13)$$

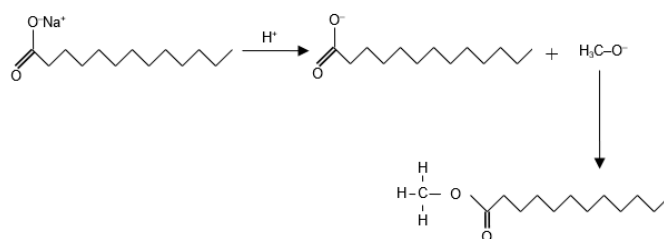
3.8.8 Προσδιορισμός Λιπαρών Οξέων

Ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιείται μέσω αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography-GC). Η μέθοδος απαιτεί τη πρότερη μετατροπή των λιπαρών οξέων σε μεθυλεστέρες (Fatty Acid Methyl Esters-FAMES), εξαιτίας της μεγαλύτερης πτητικότητας καθώς και της μικρότερης πολικότητάς τους έναντι των αντίστοιχων λιπαρών οξέων. Η αντίδραση της μεθυλεστεροποίησης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη γενικευμένη μέθοδο από (Paranikolaou et al., 2001), η οποία αποτρέπει την μετατροπή των *cis* ισομερών των λιπαρών οξέων σε *trans*. Η διαδικασία αποτελείται από δύο διακριτά στάδια. Στο πρώτο, που πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον, συντελείται μετατροπή των γλυκεριδίων σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης, με ταυτόχρονη μετατροπή των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε σάπωνες νατρίου σύμφωνα με την αντίδραση στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11. Μηχανισμός αντίδρασης μετατροπής των γλυκεριδίων σε μεθυλεστέρες και των λιπαρών οξέων σε σάπωνες

Στο δεύτερο στάδιο, το οποίο πραγματοποιείται σε όξινο περιβάλλον, οι σάπωνες που προέκυψαν στο προηγούμενο στάδιο δίστανται και στην συνέχεια αντιδρούν με μεθανόλη, μετατρέπομενοι σε μεθυλικούς εστέρες σύμφωνα με την Εικόνα 12.



Εικόνα 12. Διάσταση και αντίδραση των σαπώνων με μεθανόλη προς παραγωγή μεθυλικών εστέρων

Για την εφαρμογή της μεθόδου, 100 mg λιπιδίων μεταφέρονται σε σφαιρική φιάλη και προστίθενται 10 ml διαλύματος μεθοξειδίου του νατρίου (MeONa), που περιέχει φαινολοφθαλεΐνη ως δείκτη, μαζί με πέτρες βρασμού. Εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το σύστημα θερμαίνεται μέχρι ήπιου βρασμού σε μανδύα για 20 min. Μετά την πάροδο του απαιτούμενου χρόνου προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικής μεθανόλης, μέχρι το pH του μίγματος να γίνει όξινο, κάτι που γίνεται ορατό μέσω του αποχρωματισμού του δείγματος και ο βρασμός συνεχίζεται για 20 λεπτά επιπλέον. Τέλος, προστίθεται απιονισμένο νερό για τον τερματισμό της αντίδρασης και το μίγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη, όπου πραγματοποιείται εκχύλιση των

μεθυλεστέρων μαζί με 6 ml εξανίου. Η οργανική φάση αφυδατώνεται με τη βοήθεια Na_2SO_4 και παραλαμβάνεται σε φιαλίδιο.

Ο προσδιορισμός των FAMES πραγματοποιήθηκε σε μηχανήμα αέριας χρωματογραφίας Shimadzu, Nexis GC-2030 εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη (AOC-20i plus) με στήλη Mega-Wax (30 m×0,25 mm, film thickness 0,25 μm MEGA Srl) και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) με ήλιο ως φέρον αέριο (1,1 mL/min). Το πρόγραμμα του φούρνου ρυθμίστηκε με αρχική θερμοκρασία 100°C, στη συνέχεια ο φούρνος θερμαινόταν στους 200°C με αναλογία 5°C/λεπτό και μετά στους 245°C με αναλογία 3°C/λεπτό όπου παρέμεινε για 2 λεπτά. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ρυθμίστηκε στους 250°C. Η ταυτοποίηση των FAMES έγινε με αναφορά σε πρότυπο (Supelco® 37 Component FAME Mix, 10 mg/mL σε CH_2Cl_2 , 47885-U, Merck).

3.8.9 Προσδιορισμός Σακχάρων

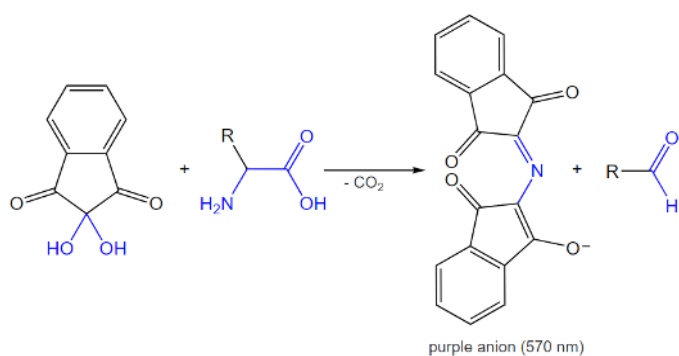
Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) με τη χρήση συστήματος SHIMADZU UFLC XR εξοπλισμένη με στήλη Rezex ROA-Organic H⁺ και ανιχνευτή Shimadzu RI. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα H_2SO_4 συγκέντρωσης 10 mM, η ροή κατά την ανάλυση των δειγμάτων ήταν καθορισμένη στο 0,6 mL/min, με τη θερμοκρασία στήλης να είναι στους 65°C. Από την στήλη περνούσαν 10 μL δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 24 min.

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων χρησιμοποιήθηκε επίσης κατά περιπτώσεις και στήλη Shodex SP0810 σε σύστημα Shimadzu στους 60°C με ροή υπερκάθαρου νερού σαν κινητή φάση (0,6 mL/min).

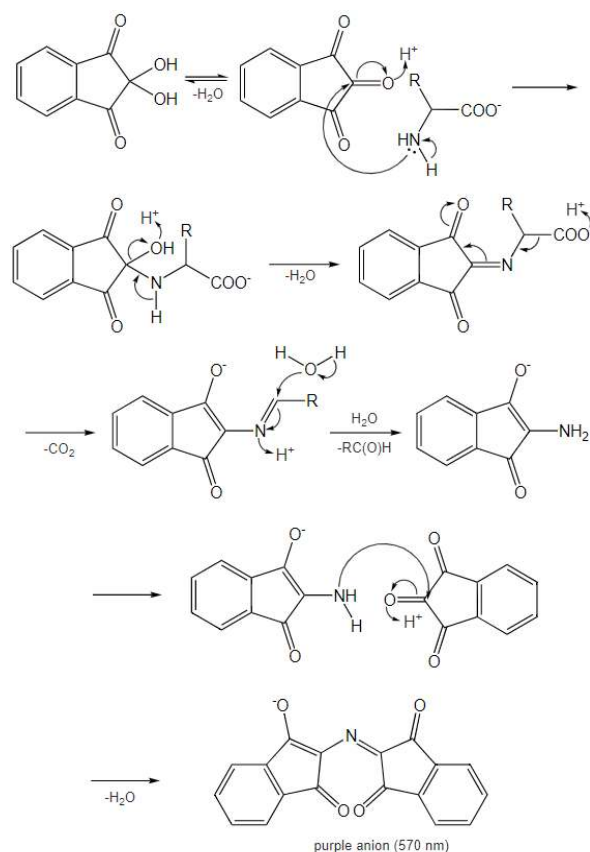
3.8.10 Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN)

Ο προσδιορισμός του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο (Lie, 1973). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, το αραιωμένο δείγμα θερμαίνεται με νυνιδρίνη (2,2-διϋδροξυϊνδανο-1,3-διόνη) σε pH 6-7 και το παραγόμενο χρώμα φωτομετρείται στα 570 nm. Η νυνιδρίνη είναι ένας οξειδωτικός παράγοντας που προκαλεί οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση των α-αμινοξέων, σε μία αντίδραση που παράγονται αμμωνία (NH_3), διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), και μία αλδεύδη με ένα

άτομο άνθρακα λιγότερο από το αρχικό αμινοξύ. Η ανηγμένη νινυδρίνη στην συνέχεια αντιδρά με την μη ανηγμένη μορφή της νινυδρίνης και την αμμωνία που απελευθερώνεται, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο μπλε χρώματος με μέγιστο απορρόφησης στα 570 nm. Καθώς η νινυδρίνη συνδέεται μέσω του ατόμου οξυγόνου της στο αμινοτελικό άκρο του αμινοξέος, μόνο η αμμωνία και οι πρωτοταγείς αμίνες μπορούν να αντιδράσουν παράγοντας το χαρακτηριστικό σύμπλοκο. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα καθώς και ο μηχανισμός αυτής, απεικονίζονται στις Εικόνα 13 και Εικόνα 14 αντίστοιχα.

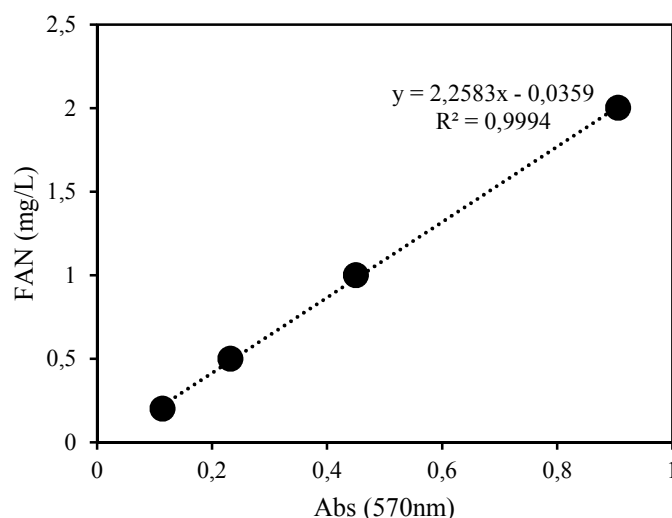


Εικόνα 13. Αντίδραση νινυδρίνης με ελεύθερη αμινομάδα προς παραγωγή έγχρωμου συμπλόκου.



Εικόνα 14. Μηχανισμός αντίδρασης νινδρίνης με ελεύθερη αμινομάδα προς παραγωγή έγχρωμου συμπλόκου.

Για την υλοποίηση της μεθόδου, σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος, 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (Color Reagent: 49,71 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g νινδρίνης, 3 g φρουκτόζη ως αναγωγική ουσία, 60 g KH_2PO_4 για ρύθμιση pH και συμπλήρωση μέχρι το 1L με dH_2O). Το μίγμα αναδεύεται καλά σε vortex, οι σωλήνες ποματίζονται και οδηγούνται προς βρασμό για 16 λεπτά. Ακολουθεί ψύξη σε παγόλουτρο για 20 λεπτά και προσθήκη αντιδραστηρίου αραιώσης (Αντιδραστήριο αραιώσης-FAN Dilution: 2 g KIO_3 διαλύονται σε 616 mL dH_2O και συμπλήρωση μέχρι τι 1L με αιθανόλη) Το μίγμα αναδεύεται στο Vortex για 20 δευτερόλεπτα και στην συνέχεια φωτομετρείται σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-Vis (Jasco V-530) στα 570 nm. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται 1 mL απιονισμένου νερού, ενώ η διαδικασία πραγματοποιείται δύο φορές για κάθε δείγμα. 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 με βάση την καμπύλη αναφοράς.



Σχήμα 1. Καμπύλη αναφοράς της γλυκίνης με τη μέθοδο FAN

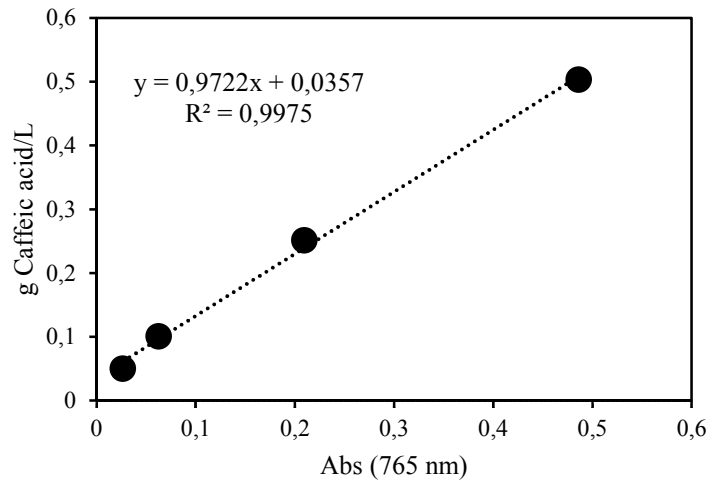
3.8.11 Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου

Για τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου που περιέχεται στις μικροβιακές καλλιέργειες, 5 ml κατάλληλα αραιωμένου δείγματος προστίθενται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί η διαδοχική προσθήκη 0,4 mL υπερχλωρικού οξέος 60%, 0,3 mL ασκορβικού οξέος 1% και 0,4 mL μολυβδαινικού αμμωνίου 5%. Μετά την προσθήκη του κάθε αντιδραστηρίου, το μίγμα αναδεύεται στο Vortex για 10 δευτερόλεπτα. Το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά, οπότε και εμφανίζεται μπλε χρώμα. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 730 nm και η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου (mg/L) υπολογίζεται με βάση την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως πρότυπο διάλυμα όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4).

3.8.12 Προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά

Το ολικό περιεχόμενο των μεθανολικών και αιθανολικών εκχυλισμάτων σε φαινολικά συστατικά προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu, σύμφωνα με τους Faustino et al. (2010) και Papageorgiou et al. (2008). Για την ανάλυση, 50 μ L κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος, 450 mL απιονισμένο νερό και 2,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu συγκέντρωσης 0,2 N αναμιγνύονται σε δοκιμαστικό σωλήνα, αναδεύονται για 1 λεπτό και αφήνονται σε κατάσταση ηρεμίας για 8 λεπτά.

Στη συνέχεια, προστίθενται 2 mL διαλύματος Na_2CO_3 συγκέντρωσης 75 g/L, και το μίγμα αφήνεται σε σκοτεινό μέρος για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για τον υπολογισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου, το δείγμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 765 nm με την χρήση φασματοφωτομέτρου διπλής δέσμης UV-Vis (Jasco V-530) και οι απορροφήσεις ενσωματώνονται σε καμπύλη βαθμονόμησης καφεϊκού οξέος. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος ανά g ξηρού δείγματος.



Σχήμα 2. Καμπύλη αναφοράς ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος

4 Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Σύσταση του αποβλήτου της εκχύλισης του καφέ (SCGs)

Οι κόκκοι του καφέ που παραλήφθηκαν μετά την εκχύλιση αναλύθηκαν ως προς την χημική τους σύσταση. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η συνολική σύσταση του SCGs κατά βάρος ξηρού δείγματος αποβλήτου καφέ καθώς και η σύγκρισή της με τη βιβλιογραφία. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά, δομικών πολυσακχαριτών, λιγνίνης και πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η υγρασία του αποβλήτου προσδιορίστηκε στο 61,4% και η τέφρα στο 1,76%. Η περιεκτικότητα του SCGS σε φυτικό έλαιο ήταν 12,23%, ενώ η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά ήταν 9,5%. Όσον αφορά τους δομικούς πολυσακχαρίτες, το μεγαλύτερο κλάσμα που προσδιορίστηκε στο SCGs ήταν η ημικυτταρίνη (28,93% w/w) με επιμέρους σύσταση 1,03% w/w ξυλάνη, 8,86% w/w γαλακτάνη, 1,88% w/w αραβινάνη και 17,16% w/w μαννάνη, ενώ η κυτταρίνη και λιγνίνη ανήλθαν σε ποσοστό 10,58% w/w και 28,13% w/w, αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Χημική σύσταση του καφέ

Συστατικά (w/w _{dry} , %)	Παρούσα μελέτη	Βιβλιογραφία	Βιβλιογραφική αναφορά
Τέφρα	1,76	0,4-2,2	(Mata et al., 2018)
Πρωτεΐνη	14,78	6,7-13,7	(Franca & Oliveira, 2009; Mata et al., 2018)
Φυτικό έλαιο	12,23	10,0-15,0	(Franca & Oliveira, 2009; Mata et al., 2018; Murthy & Naidu, 2012; Uddin et al., 2019)
Κυτταρίνη	10,58	8,6-15,3	(Mata et al., 2018; Murthy & Naidu, 2012)
Ημικυτταρίνη	28,93	30,0-39,0	(Ballesteros et al., 2014; Bekalo & Reinhardt, 2010; Mata et al., 2018; Murthy & Naidu, 2012; Obruca et al., 2015)
<i>Αραβινάνη</i>	1,88	1,7	
<i>Μαννάνη</i>	17,16	21,2	
<i>Γαλακτάνη</i>	8,86	13,8	(Mussatto, Carneiro, et al., 2011)
<i>Ξυλάνη</i>	1,03		
Λιγνίνη	28,13	23,9-33,6	(Ballesteros et al., 2014; Mata et al., 2018;)

4.2 Εκχύλιση φυτικού ελαίου και φαινολικών συστατικών του καφέ (SCGs)

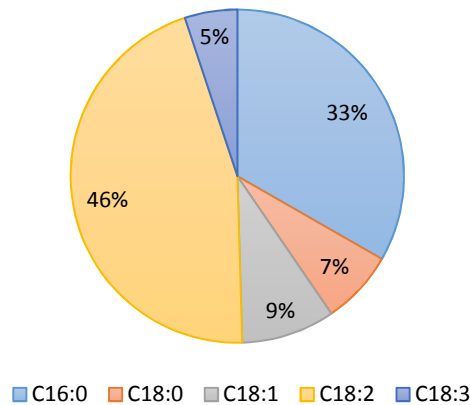
4.2.1 Εκχύλιση φυτικού ελαίου του καφέ

Η εκχύλιση του φυτικού ελαίου του καφέ συναντάται βιβλιογραφικά με την εφαρμογή διάφορων μεθόδων όπως η χρήση υπερκρίσιμου CO₂, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα ή υπερήχους, η εκχύλιση Soxhlet (McNutt, 2019) και μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαφόρων διαλυτών όπως αιθανόλη, εξάνιο, επτάνιο και μεθανόλη (Battista et al., 2020). Στην παρούσα μελέτη η εκχύλιση του φυτικού ελαίου στο πλαίσιο του βιοδιωλιστηρίου πραγματοποιήθηκε με την χρήση εξανίου καθώς και οξικού αιθυλεστέρα, ενός διαλύτη που μπορεί να χαρακτηριστεί πράσινο, υποβοηθούμενη από υπερήχους και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση με το ποσοστό λίπους που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Soxhlet κατά τον προσδιορισμό της σύστασης του αποβλήτου SCGs.

Όσον αφορά την εκχύλιση με το εξάνιο υπό την επίδραση υπερήχων για 30 λεπτά, εκχυλίστηκε το 73,98% επί του ολικού φυτικού ελαίου όπως προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου Soxhlet. Επιπρόσθετα η κατεργασία με τον οξικό αιθυλεστέρα κάτω από τις ίδιες συνθήκες, οδήγησε στην υψηλότερη απόδοση εκχύλισης του φυτικού ελαίου ίση με 79,44% σε σχέση με την συνολική περιεκτικότητα σε έλαιο που είχε ο καφές που εξετάστηκε. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν ότι το εξάνιο αλλά και ο οξικός αιθυλεστέρας είναι αποτελεσματικοί διαλύτες ως προς την ανάκτηση του φυτικού ελαίου από το SCGs (Πίνακας 2).

Στην συνέχεια, το φυτικό έλαιο που απομονώθηκε από το SCGs με τη χρήση εξανίου εστεροποιήθηκε και αναλύθηκε μέσω αέριας χρωματογραφίας ως προς την σύστασή του σε λιπαρά οξέα σύμφωνα με το εδάφιο 3.8.8. Το κυρίαρχο λιπαρό οξύ στο φυτικό έλαιο του καφέ που προσδιορίστηκε ήταν το λινελαϊκό οξύ (^{Δ9,12}C_{18:2}) καθώς εντοπίζεται σε ποσοστό 45,38%. Ακολουθεί το παλμιτικό οξύ (C_{16:0}) με ποσοστό 33,29%, το ελαϊκό οξύ (^{Δ9}C_{18:1}) με ποσοστό 9,09% το στεαρικό (C_{18:0}) με ποσοστό 7,16% και τέλος το λινολενικό (^{Δ9,12,15}C_{18:3}) με ποσοστό 5,08% (Σχήμα 3). Μελέτη της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στους σπόρους καφέ πραγματοποιήθηκε επίσης από τους Dussert et al. (2008). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα κύρια λιπαρά οξέα στους κόκκους καφέ είναι το λινελαϊκό οξύ (^{Δ9,12}C_{18:2}) με ποσοστό 45,2% και το

παλμιτικό οξύ ($C_{16:0}$) με ποσοστό 33,4%. Ακολουθούν σε χαμηλότερο ποσοστό το ελαιϊκό οξύ ($^{\Delta 9}C_{18:1}$) (8,9%) και στεαρικό οξύ ($C_{18:0}$) (7,0%), ενώ σε χαμηλότερο ποσοστό εντοπίζεται το αραχιδονικό οξύ ($^{\Delta 5,8,11,14}C_{20:4}$) και λινολενικό οξύ ($^{\Delta 9,12,15}C_{18:3}$) σε ποσοστό 2,2% και 1,7%, αντίστοιχα.



Σχήμα 3. Σύσταση λιπαρών οξέων (% w/w) φυτικού ελαίου SCGs υπό την επίδραση υπερήχων με εκχύλιση από εξάνιο

4.2.1 Εκχύλιση φαινολικού περιεχομένου του αποβλήτου του καφέ

Οι πολυφαινολικές ενώσεις των φυτών αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά με την ικανότητα να αποτρέπουν την ανάπτυξη καρκίνου. Οι κόκκοι του εκχυλισμένου καφέ περιέχουν αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως το χλωρογενικό οξύ και τα παράγωγά του, οι οποίες είναι σκόπιμο να απομονωθούν καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων ή ως πρόσθετα σε διάφορες διεργασίες. Σύμφωνα με τους Zuorro & Lavecchia, (2012) περίπου το 90% του φαινολικού εκχυλίσματος του καφέ μπορεί να παραληφθεί με την χρήση υδατικής αιθανόλης ως διαλύτη, ενώ για την ανάκτηση του υπόλοιπου ποσοστού μπορεί να γίνει με χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών. Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί και με την χρήση μεθανόλης ως διαλύτη, ωστόσο η χρήση της αποφεύγεται εξαιτίας της μεγάλης τοξικότητάς της (Karmee, 2018).

Στην βιβλιογραφία, η εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων έχει πραγματοποιηθεί με τον συνδιασμό διάφορων διαλυτών και διαφορετικών τεχνικών, όπως παρατίθεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Διαργασίες προσδιορισμού ολικού περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά

Μέθοδος	Συνθήκες	TPC ¹ (mg _{GAE} /g)	DPPH ²	Βιβλιογραφία
Εκχύλιση με υπερκρίσιμο νερό	179 °C, 36 min 14.1 g _{SCGS} /L _{H2O}	88,34	38.28 mmol TE/100	(Xu et al., 2015)
Εκχύλιση με βρασμό	10 min, 10g _{SCGS} /L _{H2O}	5,66	ND ³	(Sant'Anna et al., 2017)
Εκχύλιση με αιθανόλη-υποβοηθούμενη από υπερήχους	40 °C, 34 min, 17 ml _{EtOH} /g _{SCGS}	36,17	ND ³	(Al-Dhabi et al., 2017)
Εκχύλιση με μεθανόλη-υποβοηθούμενη από υπερήχους	56% MeOH, 60 min	24	173	(Severini et al., 2017)
Εκχύλιση με μεθανόλη	60% MeOH, 40 ml _{MeOH} /g _{SCGS}	16	ND ³	(Mussatto, Carneiro, et al., 2011)
Εκχύλιση με αιθανόλη	60% EtOH, 60 °C, 30 min,	6,33-28,6	ND ³	(Panusa et al., 2013)
Εκχύλιση με αιθανόλη	70% EtOH, 50 °C, 2 h, 40 ml _{EtOH} /g _{SCGS}	17,09-9,98	ND ³	(Zuorro & Lavecchia, 2012)
Εκχύλιση με αιθανόλη	60% EtOH, 70 °C, 40 min, 10 ml _{EtOH} /g _{SCGS}	52 (mg _{CAE} /g)	15.2%	(Burniol-Figols et al., 2016)
Εκχύλιση με αιθανόλη υποβοηθούμενη από υπερήχους	70% EtOH, 25 °C, 20 min, 10ml _{EtOH} /g _{SCG}	7,33		Παρούσα μελέτη
Εκχύλιση με αιθανόλη υποβοηθούμενη από υπερήχους	70% EtOH, 25 °C, 20 min, 5 ml _{EtOH} /g _{SCG}	6,3		Παρούσα μελέτη

¹TPC: Συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά

²DPPH: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical

³ND: Not determined, Δεν προσδιορίστηκε

Στην παρούσα μελέτη, όπως αναφέρθηκε και στο εδάφιο 3.2.1.2, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των φαινολικών συστατικών του καφέ σε διαφορετικές αναλογίες, με την χρήση διαλύματος αιθανόλης 70% (v/v) και υπό την επίδραση υπερήχων. Στην εκχύλιση με αναλογία 10 ml αιθανόλης ανά γραμμάριο απολιπασμένου SCGs, το εκχύλισμα που απομονώθηκε αντιστοιχεί στο 9,55% w/w επί του αρχικού δείγματος και το φαινολικό του περιεχόμενο ανέρχεται σε 7,33 mg_{CAE}/g_{SCG}. Αντίστοιχα, για την εκχύλιση σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:5, το εκχύλισμα αντιστοιχούσε στο 5,37% επί του αρχικού ξηρού δείγματος και το φαινολικό του περιεχόμενο προσδιορίστηκε σε 6,3 mg_{CAE}/g_{SCG}.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, για τον διαχωρισμό των προϊόντων για την διαδικασία του βιοδιωλιστηρίου, χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 1:10 (w/v) καθώς είχε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό ανάκτησης του φαινολικού περιεχομένου, εξοικονομώντας παράλληλα σημαντικές ποσότητες διαλύτη έναντι μεγαλύτερων αναλογιών.

4.2.2 Σύσταση του αποβλήτου της εκχύλισης του καφέ (SCGs) μετά την απαγωγή φυτικού ελαίου και φαινολικών ενώσεων

Η σύσταση του κλάσματος του αποβλήτου SCGs μετά την εκχύλιση του φυτικού ελαίου και των φαινολικών συστατικών προσδιορίστηκε και παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Έτσι, η τέφρα προσδιορίστηκε στο 1,94%, η πρωτεΐνη στο 15,24%, η κυτταρίνη στο 12,10%, η λιγνίνη στο 31,81% και η ημικυτταρίνη στο 33,53% με επιμέρους σύσταση: 2,34% ξυλάνη, 5,93% γαλακτάνη, 3,00% αραβινάνη και 22,24% μαννάνη. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η σύσταση του αποβλήτου του καφέ μετά την εκχύλιση του φυτικού ελαίου και των φαινολικών συστατικών.

Πίνακας 4. Σύσταση του κλάσματος του αποβλήτου SCGs μετά την εκχύλιση του φυτικού ελαίου και των φαινολικών συστατικών

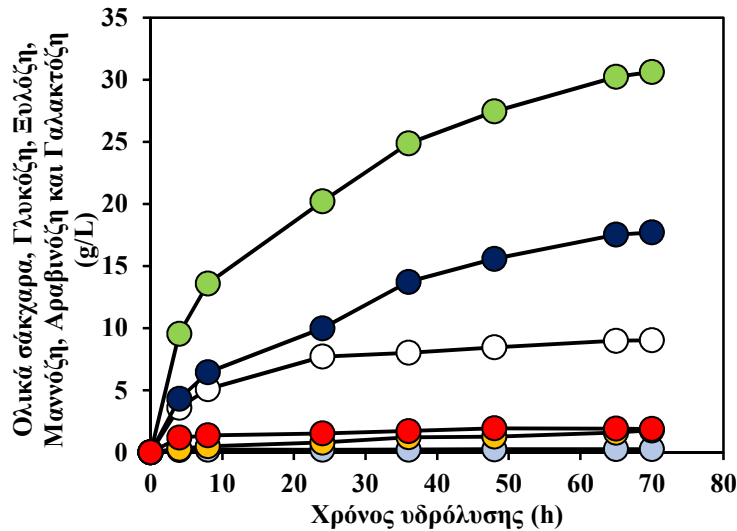
Συστατικά	SCGs χωρίς φυτικό έλαιο και φαινολικά συστατικά (% w/w _{dry sample})
Τέφρα	1,94
Πρωτεΐνη	15,24
Κυτταρίνη	12,10
Ημικυτταρίνη	33,53
<i>Αραβινάνη</i>	3,00
<i>Μαννάνη</i>	22,24
<i>Γαλακτάνη</i>	5,93
<i>Ξυλόνη</i>	2,34
Λιγνίνη	31,81

4.2.3 Υδροθερμική προεπεξεργασία και ενζυμική παραγωγή υδρολύματος SCGs πλούσιο σε σάκχαρα

Για την παραγωγή υδρολύματος από SCGs, πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση στο στερεό κλάσμα που προέκυψε μετά τον διαχωρισμό των συστατικών προστιθέμενης αξίας. Η εφαρμογή της υδροθερμικής προκατεργασίας που προηγήθηκε, αποσκοπεί στην απελευθέρωση των σακχάρων, κυρίως των μονομερών της ημικυτταρίνης και στην αύξηση της απόδοσης της παραγωγής σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση που θα ακολουθήσει.

Η κινητική των παραγόμενων σακχάρων της ενζυμικής υδρόλυσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 4. Η συνολική παραγωγή σακχάρων έφτασε στα 30,6 g/L στις 70 ώρες υδρόλυσης, με την μαννόζη να υδρολύεται στο μεγαλύτερο ποσοστό (17,7 g/L), ενώ ακολουθεί η συγκέντρωση της γλυκόζης, η οποία έφτασε στα 9,02 g/L. Μικρότερες ποσότητες γαλακτόζης, αραβινόζης και ξυλόζης παράχθηκαν ίσες με 1,77 g/L, 1,88 g/L και 0,25 g/L, αντίστοιχα. Το ποσοστό υδρόλυσης κυτταρίνης έφτασε στο 67,08% και

της ημικυτταρίνης στο 56,70% (Ξυλόνης 9,38%, Γαλακτάνης 26,79%, Μαννάνης 71,65%, Αραβιννάνης 55,0%).



Σχήμα 4. Κινητική παραγόμενων ολικών σακχάρων (●), Γλυκόζης (○), Ξυλόζης (●), Μαννόζης (●), Αραβινόζης (●) και Γαλακτόζης (●) κατά την ενζυμική υδρόλυση του SCGs με υδροθερμική προ επεξεργασία

4.3 Εκχύλιση ελεύθερων σακχάρων των φλοιών πορτοκαλιού με νερό

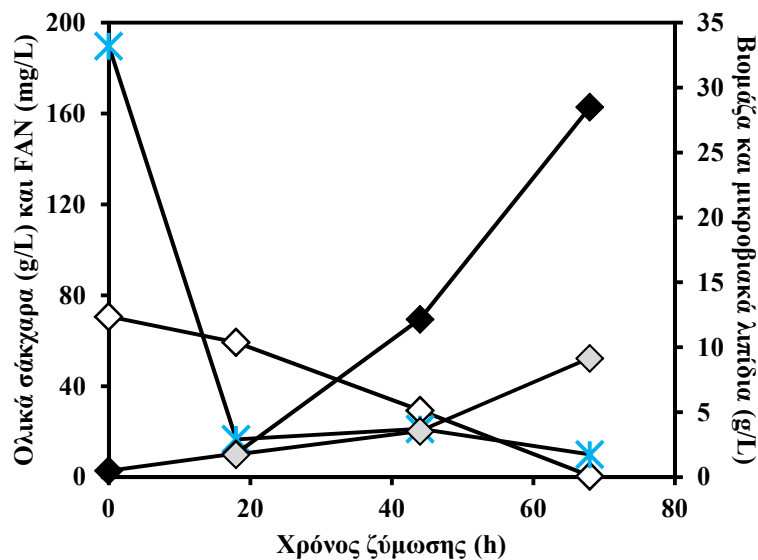
Τα απόβλητα φλοιών στυμμένων πορτοκαλιών περιέχουν περίπου 80% υγρασία, ενώ η ξηρή μάζα τους, περιέχει 29,10 % ελεύθερα σάκχαρα επί ξηρού αποβλήτου φλοιών πορτοκαλιού. Τα ελεύθερα σάκχαρα που αποτελούν ένα σημαντικό κλάσμα στο απόβλητο φλοιών πορτοκαλιού παραλήφθηκαν έπειτα από εκχύλιση με νερό, σύμφωνα με το εδάφιο 0. Μετά την εκχύλιση και αφού το υπερκείμενο διαχωρίστηκε από το στερεό κλάσμα, η ανάλυση του πρώτου έδειξε ότι περιείχε μίγμα σακχάρων σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης. Η συγκέντρωση σουκρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης ήταν 20,77 %, 41,53 %, και 37,70 % επί ξηρού, αντίστοιχα.

Τα ποσοστά αυτά συμβαδίζουν και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου το ολικό ποσό σακχάρων κυμαίνεται από 15,0 μέχρι 47,8% επί ξηρού και εξαρτάται από την ποικιλία του πορτοκαλιού και το στάδιο της ωρίμανσης του (De la Torre, Acedos, et al., 2019; Mantzouridou et al., 2015; Tsouko et al., 2020).

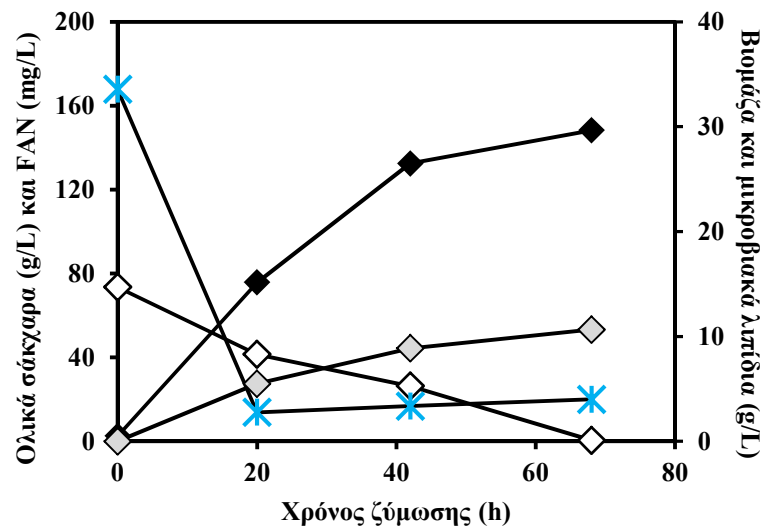
4.4 Αξιοποίηση αποβλήτων για τη βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις με τη χρήση του μικροοργανισμού *Lipomyces starkeyi* DSM 70296

Η βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τα ελεύθερα σάκχαρα αποβλήτων φλοιών πορτοκαλιού και υδρόλυμα SCGs ως πηγή άνθρακα, σε ασυνεχείς ζυμώσεις με τη χρήση του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ζύμωση με την χρήση των ελεύθερων σακχάρων που απομονώθηκαν από τα απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού (Σχήμα 5). Το θρεπτικό υγρό της ζύμωσης εμπλουτίστηκε με προσθήκη πηγών αζώτου και αλάτων, όπως και στην περίπτωση των συνθετικών υποστρωμάτων. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή του λίπους έφτασε 9,16 g/L στις 68 ώρες ζύμωσης, σημειώνοντας απόδοση 0,13 g/g και λιποπεριεκτικότητα 31,92% w/w. Το FAN καταναλώθηκε στις πρώτες 20 ώρες ζύμωσης και η συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε στα 28,5 g/L στις 68 ώρες ζύμωσης.



Σχήμα 5. Κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων φλοιών πορτοκαλιού (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◊) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296



Σχήμα 6. Κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων υδρολύματος SCGs (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296

Στο Σχήμα 6, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ζύμωσης με τη χρήση υδρολύματος SCGs ως πηγή άνθρακα. Η ζύμωση αυτή διήρκησε συνολικά 68 ώρες και η παραγωγή του λίπους έφτασε στα 10,64 g/L με συγκέντρωση βιομάζας 29,65 g/L και περιεκτικότητα λίπους ίση με 35,93% w/w. Η απόδοση και παραγωγικότητα που επιτεύχθηκαν στις 68 ώρες ζύμωσης ήταν 0,14 g/g και 0,16 g/(L·h), αντίστοιχα.

Από την ανάλυση του προφίλ των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων περιείχαν λιπαρά οξέα με 10 έως 22 άτομα άνθρακα, τα κυριότερα των οποίων ήταν τα κορεσμένα λιπαρά οξέα παλμιτικό οξύ (C16:0), στεατικό οξύ (C18:0), το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (C18:1) και το πολυακόρεστο λινελαϊκό οξύ (C18:2) (Πίνακας 5). Επιπρόσθετα, σε χαμηλότερα ποσοστά βρέθηκαν τα οξέα λαυρικό, μυριστικό, μυριστελαϊκό και παλμιτελαϊκό. Το ελαϊκό οξύ (C18:1) ήταν το κύριο λιπαρό οξύ σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ ακολουθεί το παλμιτικό οξύ (C16:0) το οποίο κυμάνθηκε από 22,5% έως 35%.

Πίνακας 5. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους

Πηγή άνθρακα	Χρόνος ζύμωσης (h)	C16:0	Δ^9 C16:1	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	Άλλα
Ελεύθερα σάκχαρα	44	31,75	4,69	5,41	42,97	9,90	5,26
φλοιών πορτοκαλιού	68	26,06	0,60	9,20	51,83	8,83	4,03
Υδρόλυμα SCGs	42	27,28	0,87	7,51	51,86	9,94	2,54
	68	26,03	2,30	7,30	50,16	8,29	5,78

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων και της αντίστοιχης απόδοσης και παραγωγικότητας με τη χρήση εμπορικών σακχάρων, ελεύθερων σακχάρων φλοιών πορτοκαλιού και υδρολύματος SCGs από τον μικροοργανισμό *L. starkeyi*.

Όπως φαίνεται όλα τα στελέχη είναι ικανά να παράγουν μικροβιακά λιπίδια τόσο στο συνθετικό υπόστρωμα με εμπορικά σάκχαρα όσο και με τη χρήση ελεύθερων σακχάρων φλοιών πορτοκαλιού και υδρολύματος SCGs. Η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων κυμαίνεται σε τιμές 5,34-11,86 g/L με μέγιστη παραγωγή ίση με 11,86 g/L, η οποία παρατηρήθηκε στην περίπτωση με πηγή άνθρακα μαννόζης με το στέλεχος ζύμης *C. curvatus* ATCC 20509. Αντίθετα, ο μικροοργανισμός *L. starkeyi* DSM 70296 σημείωσε μειωμένη απόδοση 0,07 g/g και παραγωγικότητα 0,08 g/(L·h) στη περίπτωση όπου η ξυλόζη χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα, τα ελεύθερα σάκχαρα φλοιών πορτοκαλιού και το πλούσιο σε σάκχαρα υδρόλυμα SCGs που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα σε ασυνεχείς ζυμώσεις δύναται να αξιοποιηθούν για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, όπως τα μικροβιακά λιπίδια.

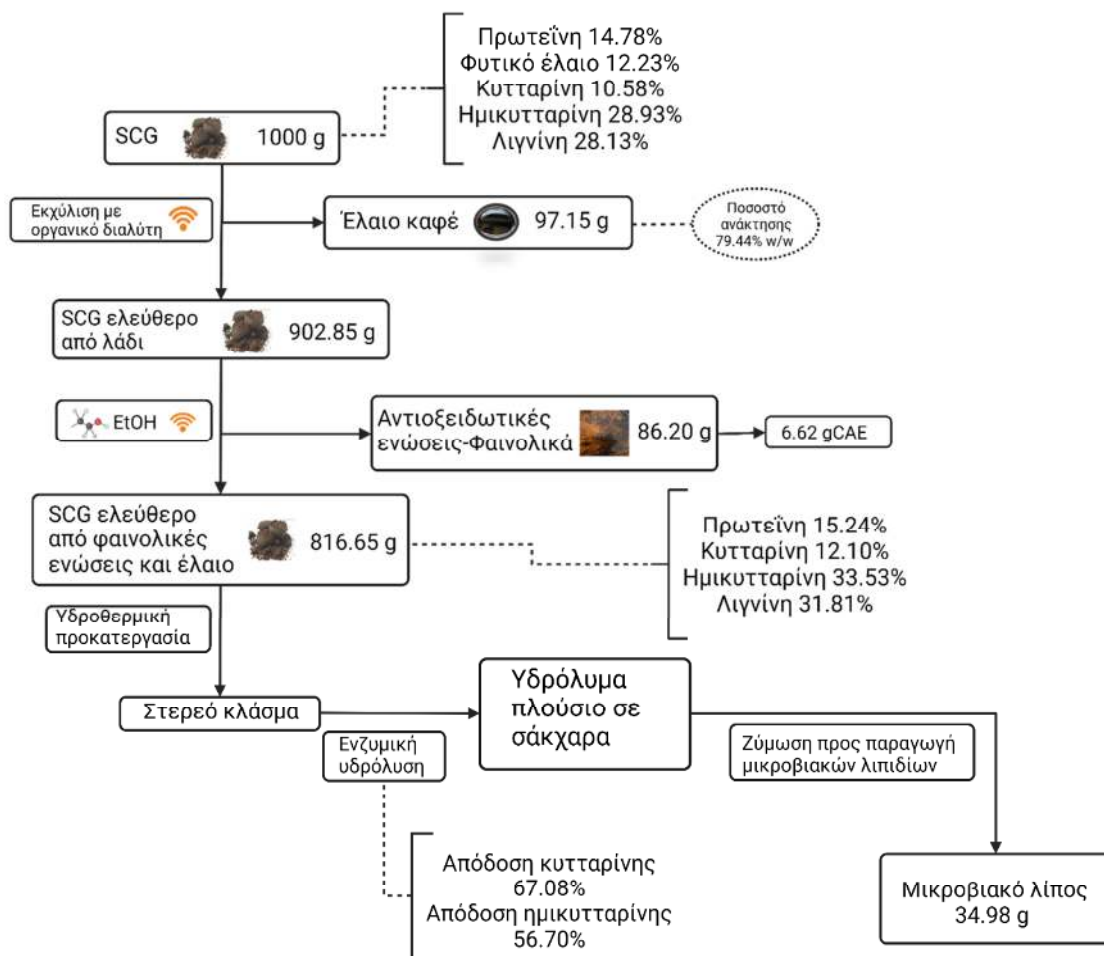
Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα σε κωνικές φιάλες οι μικροοργανισμοί *L. starkeyi* DSM 70296 και *C. curvatus* ATCC 20509 επιλέχθηκαν για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις υπό αερόβιες συνθήκες.

Πίνακας 6. Συνοπτικά αποτελέσματα της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων από τους διαφορετικούς μικροοργανισμούς και διαφορετικές πηγές άνθρακα

Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	Βιομάζα (g/L)	Περιεκτικότητα σε λίπος (%)	Λίπος (g/L)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/(L·h))
<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296	Γλυκόζη	22,20	37,98	8,43	0,13	0,12
	Ξυλόζη	15,44	34,56	5,34	0,07	0,08
	Μαννόζη	19,69	34,20	6,73	0,10	0,10
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	Γλυκόζη	28,13	41,95	11,80	0,16	0,18
	Ξυλόζη	26,31	44,94	11,82	0,17	0,18
	Μαννόζη	27,68	43	11,86	0,16	0,29
<i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y-27012	Γλυκόζη	23,05	39,06	9,01	0,14	0,13
	Ξυλόζη	22,75	35,12	7,35	0,11	0,05
	Μαννόζη	25,97	30,68	7,97	0,12	0,16
<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296	Ελεύθερα σάκχαρα φλοιών πορτοκαλιού	28,5	31,92	9,16	0,13	0,13
	Υδρόλυμα SCGs	29,65	35,93	10,65	0,14	0,16

4.5 Ισοζύγια μάζας προτεινόμενης διεργασίας

Για τον υπολογισμό των ισοζυγίων μάζας της διεργασίας που προτείνεται για τον διαχωρισμό των συστατικών προστιθέμενης αξίας από το SCGs, η όλη διεργασία πραγματοποιήθηκε με 1000 g ξηρού αρχικού δείγματος SCGs Εικόνα 15. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση του φυτικού ελαίου του καφέ με οξικό αιθυλεστέρα όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2.1.1. Η εκχύλιση οδήγησε στην παραγωγή 97,15 g φυτικού ελαίου του καφέ που αντιστοιχεί σε ποσοστό 9,71% w_{oil}/w_{SCG} . Το ποσοστό ανάκτησης επί του ελαίου που απομονώθηκε από την μέθοδο Soxhlet ήταν το 79,44%. Το στερεό κλάσμα που προέκυψε από την εκχύλιση του λαδιού, είχε βάρος 902,85 g. Ακολούθησε η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών όπως περιγράφηκε στο εδάφιο 3.2.1.2. Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού, είχαν απομείνει 816,65 g υπολείματος κόκκων καφέ. Από την εκχύλιση διαχωρίστηκαν 86,20 g φαινολικών συστατικών η αντιοξειδωτική ικανότητα των οποίων προσδιορίστηκε στα 6,62 g καφεϊκού οξέος. Στην συνέχεια, το υπόλειμα καφέ χωρίς έλαιο και αντιοξειδωτικά (816,65 g) υπέστη υδροθερμική προκατεργασία και στην συνέχεια ενζυμική υδρόλυση για την παραγωγή υδρολύματος πλούσιο σε σάκχαρα σύμφωνα με το εδάφιο 4.2.3. Η αξιοποίηση του υδρολύματος SCGs για την βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους από το στέλεχος *L. starkeyi* DSM 70296 οδηγεί σε παραγωγή ίση με 34,98 g. Η προτεινόμενη διεργασία καθώς και τα ισοζύγια μάζας που προέκυψαν παρουσιάζονται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15. Ισοζύγια μάζας και προτεινόμενη διεργασία για το βιοδιυλιστήριο του καφέ

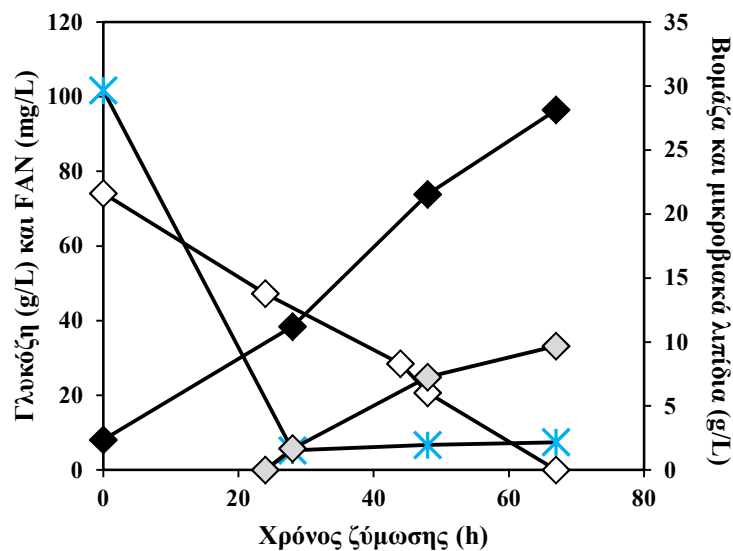
4.6 Βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες

4.6.1 Καλλιέργειες *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 σε υπόστρωμα με διαφορετικές πηγές άνθρακα

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κωνικές φιάλες με τη χρήση του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509 σε υποστρώματα με διαφορετικές πηγές άνθρακα. Ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε συνθετικό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη, ξυλόζη και μαννόζη, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου 70 g/L. Ως

πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση 1 g/L, μαζί με βακτηριολογική πεπτόνη σε συγκέντρωση 2 g/L, που αντιστοιχεί σε αναλογία C/N=70.

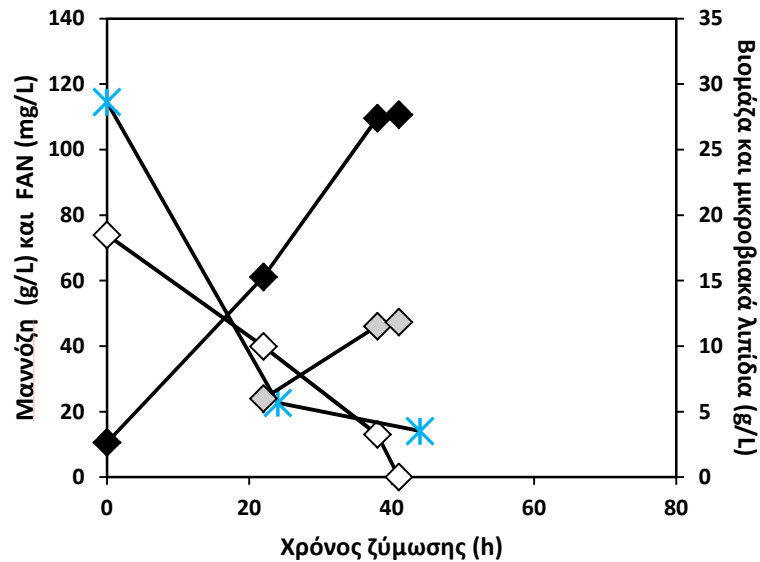
Κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509 σε γλυκόζη, η αρχική συγκέντρωση του σακχάρου ήταν 74,1 g/L και καταναλώθηκε πλήρως στις 67 ώρες ζύμωσης. Η αρχική συγκέντρωση FAN ήταν 101,6 mg/L και καταναλώθηκε (6,5 mg/L) μέχρι τις 24 ώρες ζύμωσης, οπότε και ξεκίνησε η ενδοκυτταρική λιποσυσσώρευση. Η μέγιστη παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων έφτασε τα 11,80 g/L ύστερα από 67 ώρες ζύμωσης με αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας 28,13 g/L και ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων 42% (Σχήμα 7). Στις ίδιες ώρες η απόδοση παραγωγής ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους έφτασε στα 0,16 g λίπους ανά g ολικών σακχάρων και η παραγωγικότητα στα 0,18 g/(L·h).



Σχήμα 7. Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509

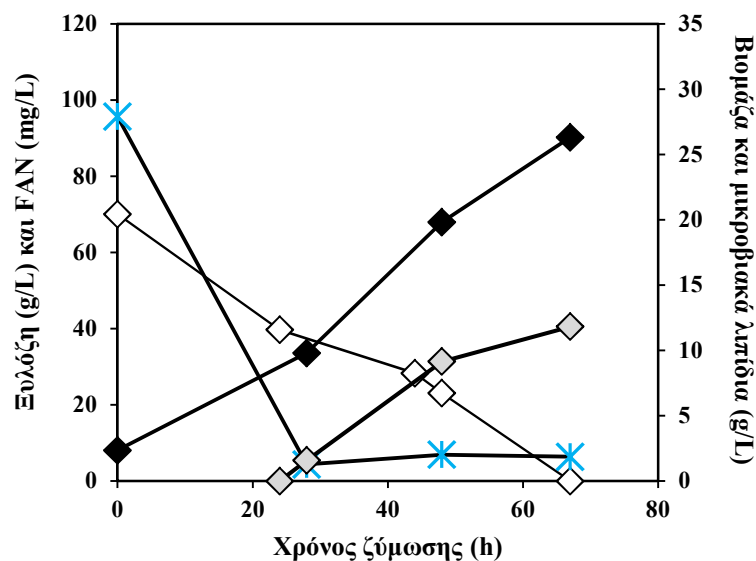
Στην ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με μαννόζη ως πηγή άνθρακα (Σχήμα 8), η τελευταία καταναλώθηκε σε μικρότερο χρονικό διάστημα, και πιο συγκεκριμένα στις 41 ώρες της ζύμωσης. Η αρχική συγκέντρωση FAN ήταν 114,5 mg/L, καταναλώθηκε μέχρι τα 16 mg/L στις 22 ώρες και παρέμεινε σταθερή μέχρι το τέλος της ζύμωσης (14,5 mg/L). Η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (11,86 g/L) παρατηρήθηκε στις 41 ώρες

ζύμωσης με αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας ίση με 27,68 g/L και ενδοκυτταρικό λίπος 43%. Η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,16 g λιπιδίων ανα g αρχικών σακχάρων με παραγωγικότητα 0,29 g/(L·h) στις 41 ώρες.



Σχήμα 8. Κινητική κατανάλωσης μαννόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509

Στην αντίστοιχη ζύμωση σε συνθετικό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα ξυλόζης (Σχήμα 9), η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε ικανοποιητικά ύστερα από 67 ώρες ζύμωσης, ενώ το FAN (95,6 mg/L) καταναλώθηκε σχεδόν ποσοτικά στις 28 πρώτες ώρες της ζύμωσης. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε στα 26,31 g/L και το ενδοκυτταρικό λίπος στα 11,82 g/L στις 67 ώρες ζύμωσης. Στις ίδιες ώρες, η απόδοση παραγωγής ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους έφτασε στα 0,17 g λίπους ανά αρχικών σακχάρων και η παραγωγικότητα στα 0,18 g/(L·h).



Σχήμα 9. Κινητική κατανάλωσης ξυλόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509

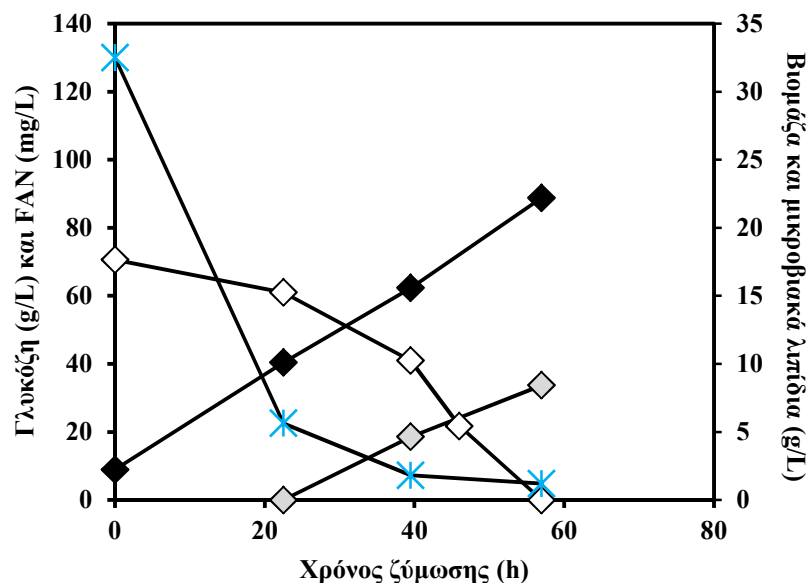
Στην μελέτη των Gong et al., (2013), χρησιμοποιώντας γλυκόζη ως πηγή άνθρακα με τη χρήση του μικροοργανισμού *C. curvatus* η παραγωγή βιομάζας έφτασε στα 20 g/L, ενώ αντίστοιχα το ποσοστό περιεκτικότητας σε λίπος έφτασε στο 53,2% w/w, όταν η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 35 g/L. Στην ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης 74,1 g/L, επιτεύχθηκε υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας της τάξης των 28,132 g/L με χαμηλότερη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού λίπους της τάξης του 41,95% w/w. Όσον αφορά την καλλιέργεια με πηγή άνθρακα ξυλόζη με αρχική συγκέντρωση 70 g/L, οι (Diamantopoulou et al., 2020), με τη χρήση του στελέχους NRRL Y-1511 παρατήρησαν συγκέντρωση βιομάζας της τάξης του 17,4 g/L με ενδοκυτταρική συγκέντρωση λίπους της τάξης του 46,6% w/w. Στην συγκεκριμένη έρευνα, ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης, αμφότερα σε συγκεντρώσεις 2 g/L. Αντιπαραβάλλοντας τα αποτελέσματα που εξάχθηκαν στην παρούσα έρευνα, όπου παρατηρήθηκε συγκέντρωση βιομάζας 26,31 g/L με ενδοκυτταρική συγκέντρωση λιπιδίων 44,94% με αρχική συγκέντρωση σακχάρου επίσης 70 g/L, παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας με ανάλογη συγκέντρωση ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Βιβλιογραφική ανασκόπηση ζυμώσεων που έχουν πραγματοποιηθεί με την χρήση του μικροοργανισμού *C. curvatus* παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων με διαφορετικές πηγές άνθρακα με τη χρήση του μικροοργανισμού *C. curvatus*

Πηγή άνθρακα	Αρχική συγκέντρωση σακχάρων (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Περιεκτικότητα σε λίπος (%)	Βιβλιογραφία
Γλυκόζη-Ξυλόζη	40-20	25,5	40,7	(Gong et al., 2016)
Γλυκόζη-Ξυλόζη-Γλυκερόλη	40-20-30	34,4	48,7	(Gong et al., 2016)
Ξυλόζη-Γλυκερόλη	30-30	25,8	38,8	(Gong et al., 2016)
Γλυκόζη	35	20	53,2	(Gong et al., 2013)
Γλυκόζη	30	-	57	(Görner et al., 2016)
Ξυλόζη	30	-	50	(Kourist et al., 2015)
Ξυλόζη	70	17,4	46,6	(Diamantopoulou et al., 2020)
Γλυκόζη-Ξυλόζη-Αραβινόζη-Γαλακτόζη	3,2-14-3,7-0,8	15,6	27,1	(Yu et al., 2011)

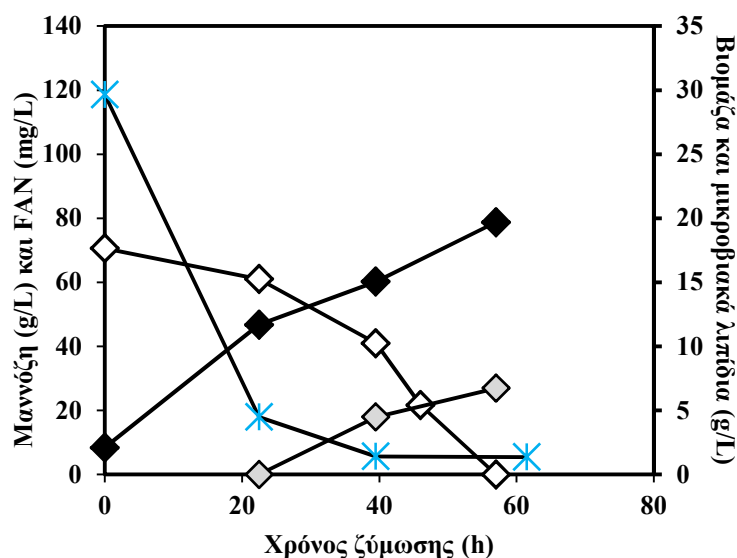
4.6.2 Καλλιέργειες *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 σε υπόστρωμα με διαφορετικές πηγές άνθρακα

Στην συνέχεια εξετάστηκε ο μικροοργανισμός *L. starkeyi* DSM 70296 ως προς την ικανότητά του να αναπτυχθεί σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα γλυκόζης, μαννόζης και ξυλόζης. Αρχικά, στην ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με την χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα (Σχήμα 10), η αρχική συγκέντρωση του σακχάρου προσδιορίστηκε στα 65,46 g/L και καταναλώθηκε πλήρως μέσα σε 57 ώρες ζύμωσης. Η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους στο διάστημα αυτό έφτασε στα 8,43 g/L με απόδοση παραγωγής προϊόντος 0,13 g/g και παραγωγικότητα 0,12 g/(L·h) ενώ, η συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε στα 22,20 g/L. Η λιποπεριεκτικότητα έφτασε σε ποσοστό ίσο με 37,98%. Η αρχική συγκέντρωση FAN προσδιορίστηκε στα 130 mg/L και μέχρι και την 39η ώρα της ζύμωσης είχε μειωθεί στα 7,3 mg/L.



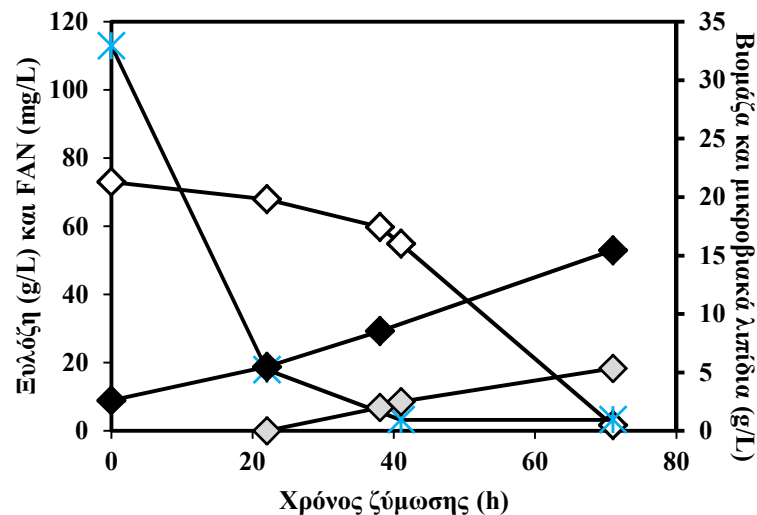
Σχήμα 10. Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◊) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296

Στο Σχήμα 11, που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ζύμωσης για το στέλεχος *L. starkeyi* DSM 70296 με πηγή άνθρακα μαννόζη. Η αρχική συγκέντρωση του σακχάρου προσδιορίστηκε στα 70,63 g/L και για την πλήρη κατανάλωσή του χρειάστηκαν 57 ώρες ζύμωσης. Στο διάστημα αυτό η συγκέντρωση του μικροβιακού λίπους έφτασε στα 6,73 g/L με αντίστοιχη συγκέντρωση βιομάζας στα 19,69 g/L, αναλογία που αντιστοιχεί σε 34,20% λιποπεριεκτικότητα. η απόδοση παραγωγής ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους έφτασε στα 0,10 g λίπους ανά g αρχικών σακχάρων και η παραγωγικότητα στα 0,10 g/(L·h).



Σχήμα 11. Κινητική κατανάλωσης μαννόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296

Όσο αφορά τη ζύμωση με εμπορικό υπόστρωμα ξυλόζης (Σχήμα 12) παρουσιάστηκε η χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας και μικροβιακού λίπους. Η παραγωγή του μικροβιακού λίπους έφτασε στα 5,34 g/L. Η βιομάζα έφτασε στα 15,44 g/L και ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων 34,20% w/w. Η αρχική συγκέντρωση FAN προσδιορίστηκε στα 112,95 g/L και καταναλώθηκε μέχρι την 41η ώρα της ζύμωσης. Χρησιμοποιώντας ξυλόζη ως πηγή άνθρακα η απόδοση παραγωγής ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους έφτασε στα 0,074 g λίπους ανά αρχικών σακχάρων και η παραγωγικότητα στα 0,075 g/(L·h).



Σχήμα 12. Κινητική κατανάλωσης ξυλόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◊) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296

Στην μελέτη των Tsakona et al. (2016), με την χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα, με αρχική συγκέντρωση 106 g/L (C/N=311), επιτεύχθηκε συγκέντρωση βιομάζας 21,6 g/L με περιεκτικότητα σε λίπος 34,8% w/w. Αντίστοιχα, στην μελέτη των Tsouko et al. (2017) παρατηρήθηκε συγκέντρωση βιομάζας 20,26 g/L με ενδοκυτταρική συγκέντρωση λιπιδίων 35,5% w/w, ενώ ο λόγος άνθρακα προς άζωτο κατά την αρχή της ζύμωσης ήταν 80 g/g. Η απόδοση παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προσδιορίστηκε στα 0,127 g/g και η παραγωγικότητα στα 0,076 g/(L·h). Στην παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε στα 22 g/L με συγκέντρωση λιπιδίων της τάξης του 38% w/w, ποσοστό ελαφρώς μεγαλύτερο σε σχέση με τις προαναφερθέντες μελέτες. Η απόδοση παραγωγής προϊόντος ήταν όπως προαναφέρθηκε 0,13 g/g, ενώ η παραγωγικότητα στο 0,12 g/(L·h), μέγεθος αντίστοιχο με αυτό που παρατηρήθηκε βιβλιογραφικά.

Όσον αφορά τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε πηγή άνθρακα με πηγή άνθρακα την ξυλόζη, οι Tsouko et al. (2017) με λόγο άνθρακα προς άζωτο 81, παρατήρησαν συγκέντρωση βιομάζας της τάξης του 20,7 g/L με 27,5% περιεκτικότητα σε μικροβιακό λίπος, με απόδοση 0,116 g/g και παραγωγικότητα 0,047 g/(L·h). Σε αντιπαραβολή, στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε μικρότερη συγκέντρωση βιομάζας της τάξης του 15,44 g/L με υψηλότερη όμως περιεκτικότητα σε μικροβιακό λίπος στο 34,56% w/w,

σημαντικά μικρότερη απόδοση παραγωγής μικροβιακού λίπους 0,074 g/g, αλλά παραγωγικότητα 0,075 g/(L·h).

Στην ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε μαννόζη ως πηγή άνθρακα, οι Tsouko et al., (2017) επιτεύχθηκε παραγωγή βιομάζας 22,4 g/L και παραγωγικότητα 0,059 g/(L·h) και απόδοση παραγωγής μικροβιακού λίπους ίση με 0,143 g/g, έναντι 19,68 g/L με περιεκτικότητα 34,19% w/w, απόδοση παραγωγής προϊόντος 0,10 g/g και παραγωγικότητα 0,095 g/(L·h) που παρατηρήθηκαν στην παρούσα έρευνα. Βιβλιογραφική ανασκόπηση ζυμώσεων που έχουν πραγματοποιηθεί με την χρήση του μικροοργανισμού *L.starkeyi* παρουσιάζεται στον Πίνακα 8.

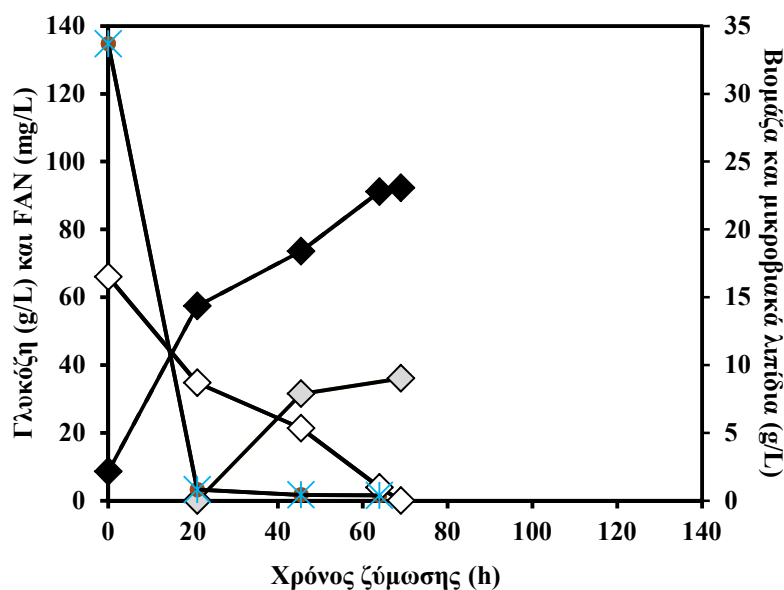
Πίνακας 8. Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων με διαφορετικές πηγές άνθρακα με τη χρήση του μικροοργανισμού *L. starkeyi*

Πηγή άνθρακα	Βιομάζα (g/L)	Περιεκτικότητα σε λίπος (%)	Βιβλιογραφία
Γλυκόζη	21,6	34,8	(Tsakona et al., 2016)
Ξυλόζη	12,32	35,02	(Tapia et al., 2012)
Αλευρούχο απόβλητο	30,05	40,4	(Tsakona et al., 2014)
Συνθετικό μέσο	21,6	34,8	(Tsakona et al., 2014)
Γλυκερόλη	13,6	22,79	(Leiva-Candia et al., 2015)
Υδρόλυμα ηλιοτροπίου	16,5	30,3	(Leiva-Candia et al., 2015)
Ακατέργαστη Γλυκερόλη	9,0	3,7	(Tchakouteu et al., 2015)
Ακατέργαστη Γλυκερόλη	34,4	35,9	(Tchakouteu et al., 2015)
Αραβινόζη	12,7	29,1	
Ξυλόζη	20,7	27,5	
Γαλακτόζη	21,2	33,1	(Tsouko et al., 2017)
Μαννόζη	22,4	31,7	
Γλυκόζη	20,26	35,5	

4.6.3 Καλλιέργειες *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα με διαφορετικές πηγές άνθρακα

Επίσης μελετήθηκε η ανάπτυξη και η συσσώρευση μικροβιακών λιπιδίων με τη χρήση του μικροοργανισμού *R. toruloides* NRRL Y-27012. Ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα γλυκόζη, ξυλόζη και μαννόζη με αρχική συγκέντρωση περίπου 70 g/L, που αντιστοιχεί σε αναλογία C/N=70 g/g.

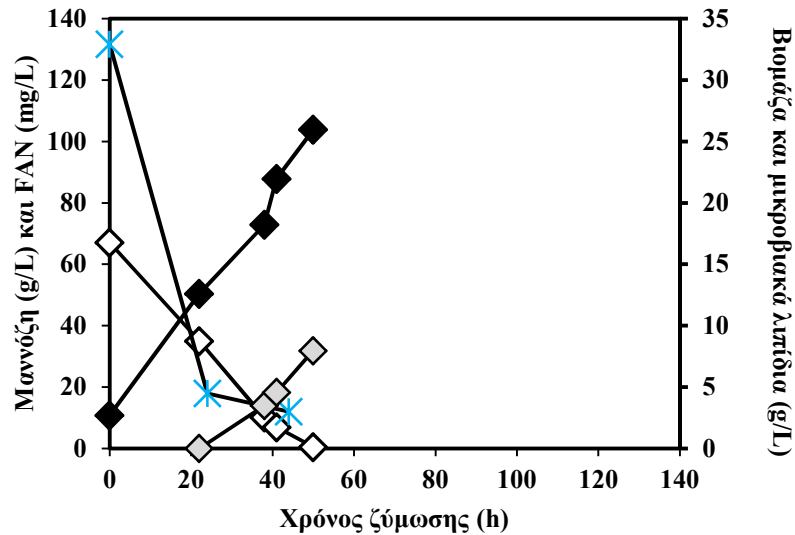
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 13 το μικροβιακό στέλεχος κατανάλωσε πλήρως τη γλυκόζη στις 57 ώρες ζύμωσης. Η πηγή αζώτου καταναλώθηκε ως επί το πλείστον κατά τις πρώτες 24 ώρες και η συγκέντρωσή της παρέμεινε σταθερή στην συνέχεια καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Η συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε στα 23,05 g/L με την περιεκτικότητά της σε λίπος να φτάνει στο 39,07% w/w. Η απόδοση και παραγωγικότητα της ζύμωσης έφτασαν 0,14 g/g και 0,13 g/(L·h), αντίστοιχα.



Σχήμα 13. Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◊) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *R. toruloides* NRRL Y-27012

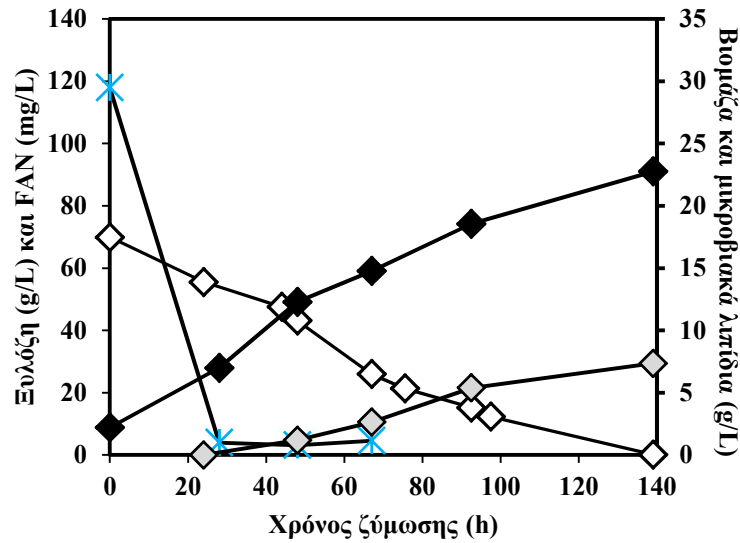
Κατά την ανάπτυξη του *R. toruloides* NRRL Y-27012 σε μαννόζη (Σχήμα 14), η αρχική συγκέντρωση σακχάρου ήταν 67,03 g/L και καταναλώθηκε μέσα σε 50 ώρες. Η μεγαλύτερη ποσότητα ελεύθερων αμινομάδων (FAN), καταναλώθηκε στις 24 πρώτες ώρες της ζύμωσης. Η βιομάζα έφτασε στα 25,97 g/L και το ενδοκυτταρικό λίπος στα

7,97 g/L στις 50 ώρες ζύμωσης. Η απόδοση παραγωγής ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους έφτασε στα 0,12 g λίπους ανά g αρχικών σακχάρων και η παραγωγικότητα στα 0,16 g/(L·h).



Σχήμα 14. Κινητική κατανάλωσης μαννόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *R. toruloides* NRRL Y-27012

Στο Σχήμα 15 παρουσιάζεται η παραγωγή μικροβιακού λίπους με πηγή άνθρακα ξυλόζη. Η ασυνεχής ζύμωση διήρκησε 139 ώρες και η παραγωγή του λίπους έφτασε στα 7,35 g/L. Η συγκέντρωση της βιομάζας στο τέλος της ζύμωσης έφτασε στα 22,75 g/L με την περιεκτικότητα του λίπους να φτάνει σε ποσοστό ίσο με 35,12% w/w. Η απόδοση της παραγωγής μικροβιακού λίπους έφτασε στο 0,11 g/g και η παραγωγικότητα στο 0,05 g/(L·h).



Σχήμα 15. Κινητική κατανάλωσης ξυλόζης (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◊) σε ασυνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *R. toruloides* NRRL Y-27012

Οι Carmona-Cabello et al. (2021) πραγματοποίησαν ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες με τον μικροοργανισμό *R. toruloides* NRRL Y-27012 σε πηγή άνθρακα γλυκόζη με διαφορετικές αναλογίες C/FAN. Σε αναλογία 60 g/g παρατηρήθηκε συγκέντρωση βιομάζας 30,4 g/L με λιποπεριεκτικότητα 14,01%, σε αναλογία 120 g/g τα μεγέθη αυτά είχαν τις τιμές 26,5 g/g και 14,45% αντίστοιχα, ενώ σε αναλογία 180 g/g_{FAN}, η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 26,3 g/L με περιεκτικότητα σε ενδοκυτταρικό λίπος 23,5% w/w. Στην καλλιέργεια που αναπτύχθηκε σε πηγή άνθρακα την γλυκόζη, στην παρούσα έρευνα, η συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε στα 23 g/L με περιεκτικότητα σε ενδοκυτταρικό λίπος της τάξης του 39,07% w/w, ποσοστό σημαντικά υψηλότερο.

Όσον αφορά την ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε ξυλόζη, οι Diamantopoulou et al. (2020) παρατήρησαν συγκέντρωση βιομάζας 15,6 g/L με 19,5% w/w περιεκτικότητα σε λίπος. Στην παρούσα έρευνα επιτεύχθηκε συγκέντρωση βιομάζας 22,75 g/L με 35,11% w/w λιποπεριεκτικότητα αντίστοιχα.

Πίνακας 9. Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων με διαφορετικές πηγές άνθρακα με τη χρήση του μικροοργανισμού *R. toruloides*

Πηγή άνθρακα	Αρχική συγκέντρωση σακχάρων (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Περιεκτικότητα σε λίπος (% w/w)	Βιβλιογραφία
Ξυλόζη	70	15,6	19,5	(Diamantopoulou et al., 2020)
Γλυκόζη	80	30,4	14,01	(Carmona-Cabello et al., 2021)
Γλυκόζη	80	26,5	14,45	(Carmona-Cabello et al., 2021)
Γλυκόζη	80	26,3	23,5	(Carmona-Cabello et al., 2021)

4.6.4 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακού λίπους κατά τις ασυνεχείς ζυμώσεις

Ο Πίνακας 10 απεικονίζεται το προφίλ των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων για όλους τους μικροοργανισμούς στις ασυνεχείς ζυμώσεις που διεξήχθησαν με τις διαφορετικές εμπορικές πηγές άνθρακα. Παρατηρείται ότι το κυρίαρχο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό (C18:1) του οποίου το ποσοστό κυμάνθηκε μεταξύ 45,30% και 59,56%, ενώ ακολούθησε το παλμιτικό οξύ (C16:0) με εύρος από 18,35% έως 37,25%. Στην συνέχεια ακολουθεί το λινελαϊκό οξύ (C18:2), ενώ σε χαμηλότερα ποσοστά μικρότερα του 10% της σύστασης του μικροβιακού λίπους εντοπίζονται το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1) και το στεαρικό οξύ (C18:0).

Πίνακας 10. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους από τους διαφορετικούς μικροοργανισμούς

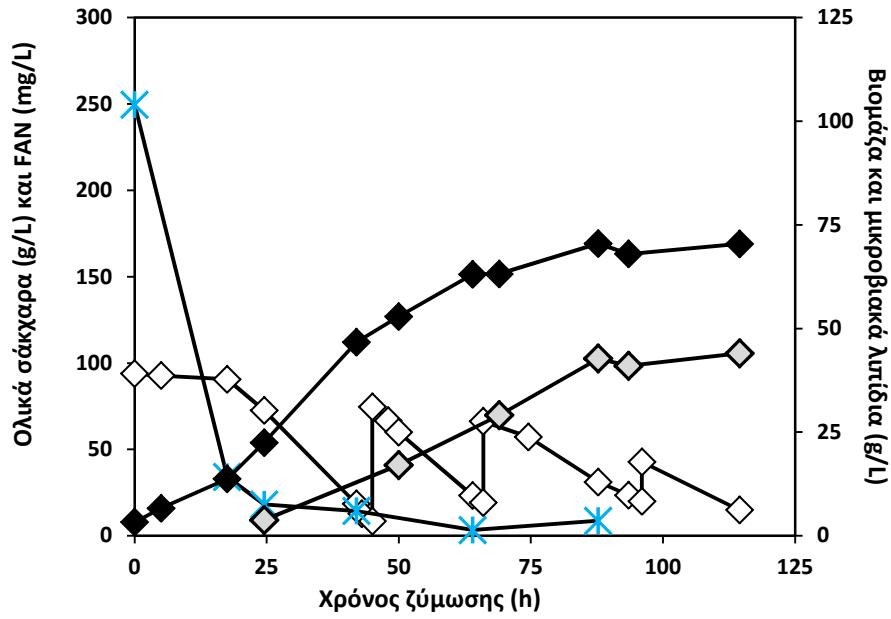
Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	Χρόνος ζύμωσης (h)	C16:0	Δ^9 C16:1	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	Άλλα	
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Γλυκόζη	48	25,13	2,02	5,25	50,23	13,2	4,35	
		67	21,23	0,98	6,85	53,26	11,21	5,69	
	Μαννόζη	22	18,35	0,58	9,63	53,25	13,25	4,9	
		41	28,80	0,00	9,73	51,55	7,16	1,73	
	Ξυλόζη	48	22,13	1,02	7,25	52,32	10,89	6,38	
		67	22,51	0,98	8,85	50,13	11,81	5,72	
	<i>L. starkeyi</i> DSM 70296	Γλυκόζη	39,5	35,88	2,72	6,27	48,33	2,40	3,80
			47	37,25	3,25	6,12	48,52	1,69	3,11
Μαννόζη		39,5	29,80	3,10	6,89	45,30	9,63	4,80	
		57	30,2	1,52	7,69	50,2	5,6	4,02	
Ξυλόζη		43	30,49	0,30	2,00	51,64	13,42	2,16	
		71	30,23	0,98	2,85	50,12	10,2	5,69	
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012	Γλυκόζη	45,5	28,90	0,21	4,89	49,52	10,20	5,96	
		69	27,31	0,75	5,02	50,89	11,23	4,58	
	Μαννόζη	41	22,01	0,56	4,53	55,12	12,26	5,51	
		50	19,46	0,00	5,16	59,56	9,59	5,86	
	Ξυλόζη	67	25,63	0,39	8,25	55,36	6,32	4,05	
		139	28,32	0,48	6,50	54,48	6,50	3,71	

4.7 Βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα

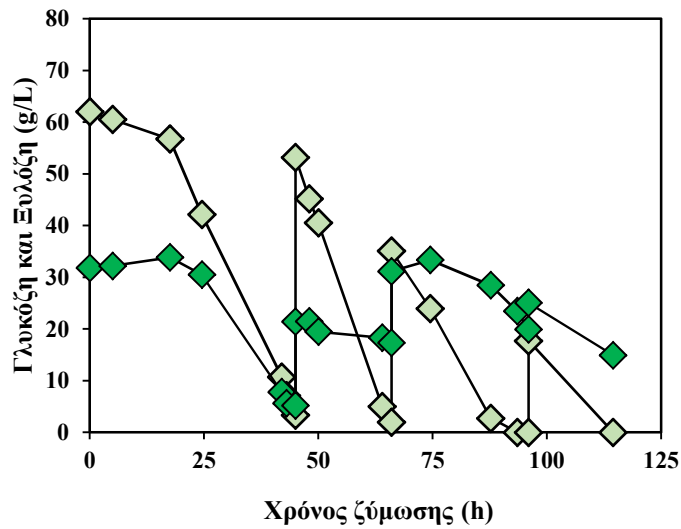
4.7.1 Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα με τον μικροοργανισμό *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509

Ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509 καλλιεργήθηκε σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα χωρητικότητας 6,7 L (Bioengineering, RALF Advanced) με αρχικό ενεργό όγκο 3 L σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα μίγμα γλυκόζης και ξυλόζης (2:1) υπό αερόβιες συνθήκες (Σχήμα 16). Η αρχική συνολική συγκέντρωση σακχάρων ήταν 93,83 g/L (62,03 g/L γλυκόζη και 31,8 g/L ξυλόζη, αντίστοιχα) και η αρχική συγκέντρωση FAN ήταν 249,65 mg/L. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης ο μικροοργανισμός καταναλώνει την γλυκόζη με ταχύτερο ρυθμό σε σύγκριση με την ξυλόζη, κάτι που είχε ως αποτέλεσμα η αναλογία των δύο σακχάρων να μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης (Σχήμα 17). Παρουσία γλυκόζης και ξυλόζης, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί γενικά μεταβολίζουν τα σάκχαρα διαδοχικά (πρώτα γλυκόζη και μετά ξυλόζη), καθώς η γλυκόζη καταστέλλει την αξιοποίηση άλλων σακχάρων που προκαλείται από το μηχανισμό καταστολής άνθρακα καταβολίτη (Carbon Catabolite Repression, CCR) ή/και αλλοστερικό ανταγωνισμό για τους μεταφορείς του σακχάρου (Hu et al., 2011). Αυτή η διαδοχική κατανάλωση των σακχάρων από τους μικροοργανισμούς πιθανό να έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση της διάρκειας της ζύμωσης και την αναποτελεσματική κατανάλωση των υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγικότητα (Zaldivar et al., 2001).

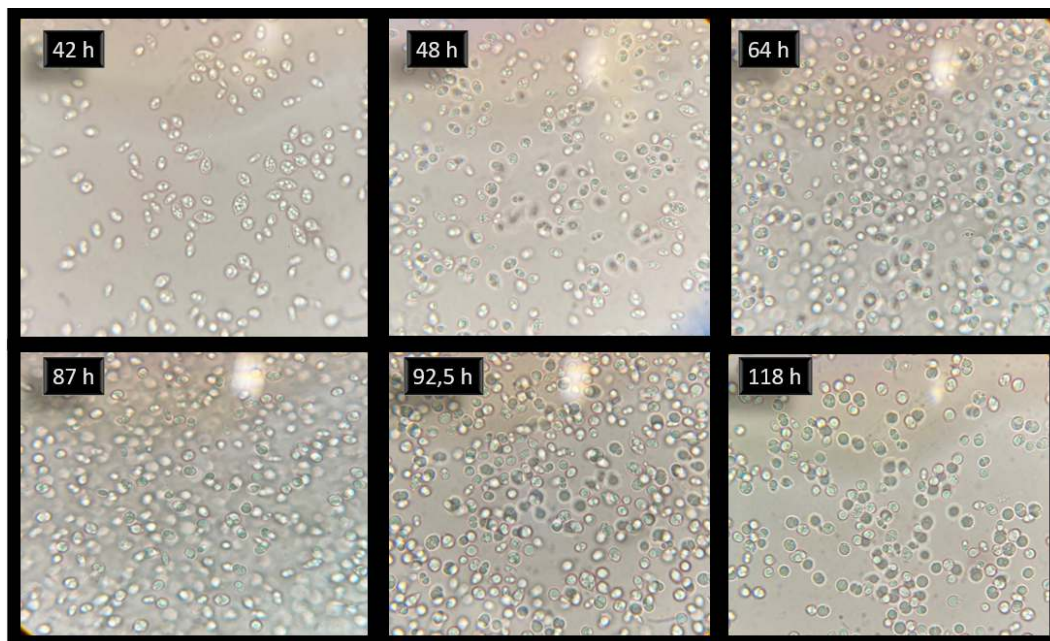
Κατά την ημι-συνεχή ζύμωση η συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε στα 70,5 g/L στις 88 ώρες ζύμωσης και στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή. Η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους ξεκίνησε στις 24 περίπου ώρες διάστημα κατά το οποίο η συγκέντρωση FAN είχε μειωθεί στα 18 mg/L. Η τελική συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού λίπους έφτασε στα 42,73 g/L στις 88 ώρες, που αντιστοιχεί σε λιποπεριεκτικότητα 60,6% w/w, και παρέμεινε πρακτικά σταθερή μέχρι και τις 114,5 ώρες. Η απόδοση παραγωγής του προϊόντος έφτασε στα 0,24 g λίπους ανά g καταναλωθέντων σακχάρων και η παραγωγικότητα στις 88 ώρες στα 0,49 g/(L·h).



Σχήμα 16. Κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ημι-συνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509



Σχήμα 17. Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (◆) και ξυλόζης (◆) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509



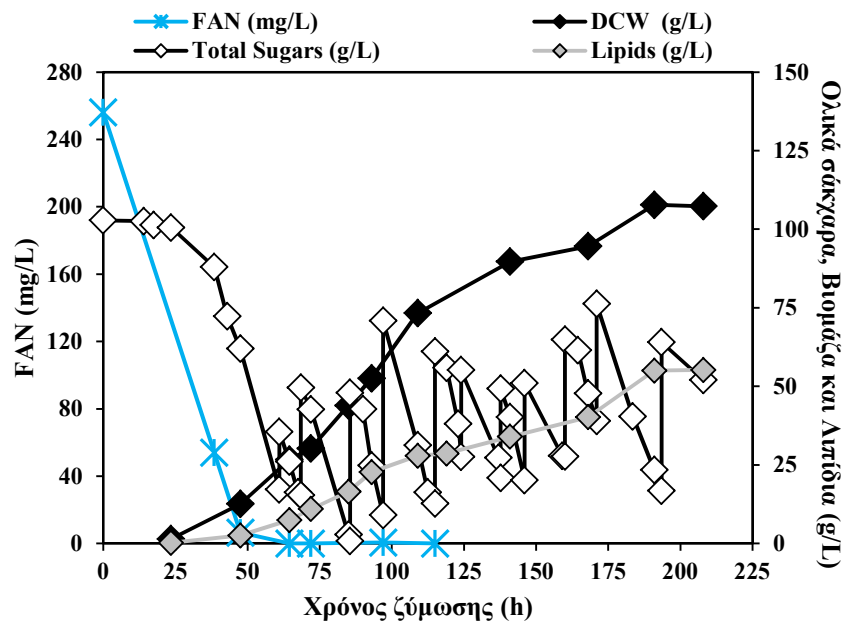
Εικόνα 16. Μορφολογική απεικόνιση των κυττάρων στο μικροσκόπιο κατά την ημι-συνεχή ζύμωση του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509

Στην Εικόνα 16 απεικονίζεται η αλλαγή στην μορφολογία του κυττάρου του μικροοργανισμού κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Παρατηρείται ότι αρχικά ο μικροοργανισμός έχει άμορφο σχήμα ενώ καθώς η ζύμωση προχωράει και παράγεται ενδοκυτταρικά το λίπος, το σχήμα γίνεται πιο σφαιρικό. Τα λιποσωματίδια διακρίνονται με πράσινο χρώμα στο εσωτερικό των κυττάρων.

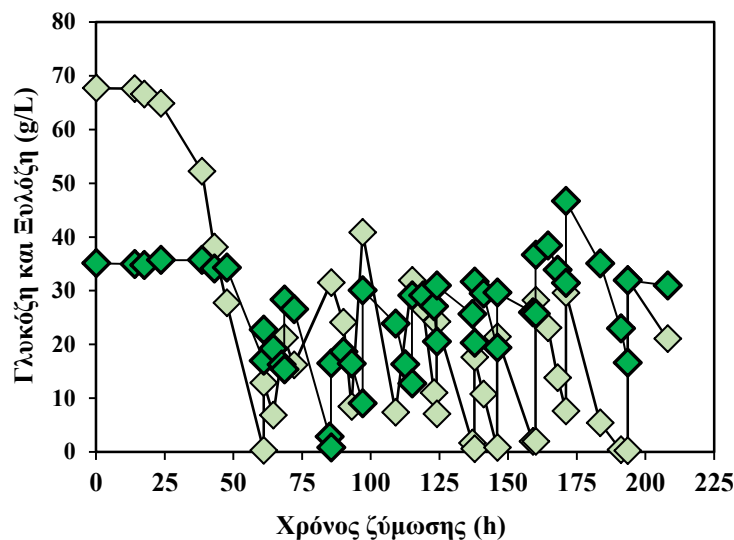
4.7.2 Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα με τον μικροοργανισμό *Lipomyces starkeyi* DSM 70296

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα με τη χρήση του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 18, η ζύμωση διήρκησε περισσότερο από την αντίστοιχη ζύμωση με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509. Στις 191 ώρες ζύμωσης παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση λίπους (54,99 g/L) με βιομάζα 107,79 g/L, και σημειώνοντας υψηλή περιεκτικότητα 51,03% w/w. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, ο μικροοργανισμός κατανάλωσε αρχικά πλήρως την ποσότητα της γλυκόζης που είχε προστεθεί και κατόπιν ξεκίνησε η κατανάλωση της ξυλόζης, φαινόμενο το οποίο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε 0,12 g/g και η παραγωγικότητα 0,29 g/(L·h) στις 191 ώρες ζύμωσης.

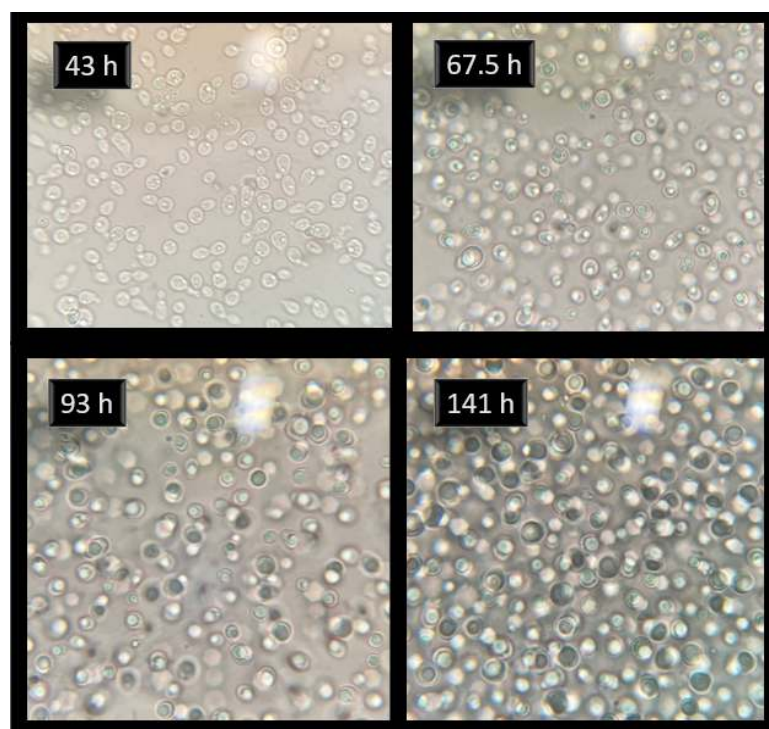
Στην Εικόνα 17 φαίνεται η πορεία της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296, όπως έγινε αντιληπτή από το μικροσκόπιο. Οι πράσινες κηλίδες που διακρίνονται στο εσωτερικό των κυττάρων σηματοδοτούν την ύπαρξη ενδοκυτταρικού λίπους, η οποία οπτικά αυξάνεται καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης.



Σχήμα 18. Κινητική κατανάλωσης ολικών σακχάρων (◇) και FAN (*) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακών λιπιδίων (◆) σε ημι-συνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296



Σχήμα 19. Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (◆) και ξυλόζης (◆) κατά την ημι-συνεχή ζύμωση με τη χρήση του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296



Εικόνα 17. Μορφολογική απεικόνιση των κυττάρων στο μικροσκόπιο κατά την ημι-συνεχή ζύμωση του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296

Αρκετές μελέτες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή μικροβιακού ελαίου με τη χρήση αυτών των δύο μικροοργανισμών (Πίνακας 11).

Σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις με την χρήση του μικροοργανισμού *C. curvatus* οι Meo et al. (2017) παρατήρησαν σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκόζης, παραγωγή 35,8 g/L βιομάζας με 56,7% w/w περιεκτικότητα σε λίπος και απόδοση παραγωγής λίπους 0,11 g/g. Η αρχική συγκέντρωση σακχάρου ήταν 20 g/L και ο αρχικός λόγος άνθρακα προς άζωτο ρυθμίστηκε στο 15 g/g με την χρήση θειικού αμμωνίου ως πηγή αζώτου. Οι Hassan et al. (1996), ελέγχοντας τον ταυτόχρονο περιορισμό σε άζωτο και σίδηρο, παρατήρησαν συγκέντρωση βιομάζας 70 g/L με περιεκτικότητα σε λιπίδια της τάξης του 50% w/w. Στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε μία από τις υψηλότερες περιεκτικότητες σε λίπος της τάξης του 62,5% w/w με την συγκέντρωση της βιομάζας να φτάνει στα 70,4 g/L έχοντας ως πηγή άνθρακα μίγμα γλυκόζης με ξυλόζη.

Όσον αφορά στην ημι-συνεχή ζύμωση με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296, στην μελέτη των Tapia et al., (2012), το μίγμα σακχάρων περιείχε 30% γλυκόζη και

70% Ξυλόζη, ενώ κατά την διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιούνταν προσθήκη πηγής αζώτου με την μορφή νιτρικών αλάτων και εκχυλίσματος ζύμης παράλληλα με την τροφοδοσία των σακχάρων. Η συγκέντρωση της κυτταρικής βιομάζας έφτασε στα 76 g/L με 43,85% w/w περιεκτικότητα σε ενδοκυτταρικά λιπίδια. Οι Anschau et al. (2014) πέτυχαν συγκέντρωση βιομάζας 85,4 g/L με 48,9% w/w λιποπεριεκτικότητα. Στην παρούσα έρευνα η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας που επιτεύχθηκε με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* σε συνθήκες ημι-συνεχούς καλλιέργειας, ήταν 107,785 g/L με περιεκτικότητα σε λίπος, 51,03% w/w. Ανάλογες τιμές με την χρήση του ίδιου στελέχους πέτυχαν και οι (Tsakona et al., 2014) με την χρήση υδρολύματος από αλευρούχα απόβλητα ως πηγή θρεπτικών συστατικών. Συγκεκριμένα παρατήρησαν παραγωγή βιομάζας ίση με 109,8 g/L με 58,7% w/w περιεκτικότητα σε λίπος και παραγωγικότητα της τάξης του 0,4 g/(L·h), έναντι 0,29 g/(L·h) που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 11. Βιβλιογραφική ανασκόπηση ζυμώσεων σε βιοαντιδραστήρα των μικροοργανισμών *C. curvatus* και *L. starkeyi*

Μικροοργανισμός	Διεργασία ζύμωσης	Πηγή άνθρακα	Βιομάζα (g/L)	Περιεκτικότητα σε λίπος (%)	Βιβλιογραφία
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Ημι-συνεχής	Γλυκόζη	15,1	44,3	(Awad et al., 2019)
	Ημι-συνεχής	Γλυκόζη	70	50	(Hassan et al., 1996)
	Ημι-συνεχής	Μαννόζη	13,7	52,8	(Awad et al., 2019)
	Ημι-συνεχής	Γλυκερόλη	118,0	25,0	(Meesters et al., 1996)
<i>C. curvatus</i> DSM 11815	Ημι-συνεχής	Γλυκόζη	35,8	56,7	(Meo et al., 2017)
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	Ασυνεχής	Ξυλόζη	26,1	29,9	(Diamantopoulou et al., 2020)
<i>L. starkeyi</i> DSM 70296	Ημι-συνεχής (Repeated)	Γλυκόζη, Ξυλόζη	85,4	48,9	(Anschau et al., 2014)
	Ημι-συνεχής	Γλυκόζη, Ξυλόζη	76,0	43,85	(Tapia et al., 2012)
<i>L. starkeyi</i>	Ημι-συνεχής	Γλυκόζη, Ξυλόζη	13,0	48,0	(Anschau & Franco, 2015)
<i>L. starkeyi</i>	Ημι-συνεχής	Γλυκόζη	21,2	52,0	(Bonturi et al., 2015)

4.7.3 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων μικροβιακού λίπους κατά τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις

Κατά τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις που διεξήχθησαν πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης του μικροβιακού ελαίου (Πίνακας 12).

Αρχικά, η ανάλυση της σύστασης πραγματοποιήθηκε για 3 δείγματα που αντιστοιχούν σε διαφορετικές ώρες ζύμωσης και συγκεκριμένα για τις ώρες 24, 87 και 114,5 ώρες κατά την ημι-συνεχή ζύμωση του *C. curvatus* ATCC 20509. Όσον αφορά την σύσταση του ελαίου στην 24η ώρα της ζύμωσης, το κυρίαρχο λιπαρό οξύ είναι το στεατικό οξύ (C18:0) με ποσοστό 7,10% επί του συνόλου, ακολουθούμενο από το παλμιτικό (C16:0) με ποσοστό 26,7% και το λινελαϊκό (C18:2) με ποσοστό 19,37%. Άλλα λιπαρά οξέα εντοπίζονται σε αθροιστικό ποσοστό 1,51%. Η αναλογία των λιπαρών οξέων δεν διαφοροποιείται σημαντικά στην 87η ώρα της ζύμωσης και παραμένει πρακτικά σταθερή μέχρι το τέλος της, στις 114,5 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, στην 87η ώρα το μικροβιακό έλαιο αποτελείται κυρίως από ελαϊκό οξύ (C18:1), σε ποσοστό 48,72%. Ακολουθεί το παλμιτικό (C16:0) με ποσοστό 27,88% το στεατικό οξύ (C18:0) με ποσοστό 15,08% και το λινελαϊκό (C18:2) με ποσοστό 5,96%. Άλλα λιπαρά οξέα κατέχουν το 1,67% επί του συνόλου. Ανάλογη σύσταση προσδιορίζεται και στις 114,5 ώρες της ζύμωσης, όπου το μεγαλύτερο ποσοστό καταλαμβάνει το ελαϊκό οξύ (C18:1) σε ποσοστό 49,69%, ακολουθούμενο από το παλμιτικό (C16:0) με ποσοστό 24,48% το στεατικό οξύ (C18:0) με ποσοστό 16,67% και το λινελαϊκό (C18:2) με ποσοστό 5,86%. Άλλα λιπαρά οξέα εντοπίζονται στο δείγμα σε συνολικό ποσοστό 1,45%.

Η ανάλυση της σύστασης του μικροβιακού ελαίου του *L. starkeyi* DSM 70296 πραγματοποιήθηκε σε αυτή την περίπτωση για 2 δείγματα που αντιστοιχούν σε διαφορετικές ώρες ζύμωσης και συγκεκριμένα για τις ώρες 47,5 και 191. Όσον αφορά την σύσταση του ελαίου στην 47,5^η ώρα της ζύμωσης, το λιπαρό οξύ που εντοπίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό είναι το ελαϊκό οξύ (C18:1) με ποσοστό 42,75% επί του συνόλου, ακολουθούμενο από το παλμιτικό (C16:0) με ποσοστό 36,44% και το λινελαϊκό (C18:2) με ποσοστό 13,56%. Το στεατικό οξύ εμφανίζεται σε ποσοστό 4,15%, ενώ άλλα λιπαρά οξέα εντοπίζονται σε αθροιστικό ποσοστό 1,05%. Αντίστοιχα με την περίπτωση του μικροοργανισμού *C. curvatus*, και εδώ, η αναλογία των λιπαρών οξέων δεν διαφοροποιείται στην 191^η ώρα. Πιο συγκεκριμένα, στην 87η ώρα το μικροβιακό έλαιο αποτελείται κυρίως από ελαϊκό οξύ (C18:1), σε ποσοστό 43,92%.

Ακολουθεί το παλμιτικό (C16:0) με ποσοστό 34,96% το στεατικό οξύ (C18:0) με ποσοστό 8,96% και το λινελαϊκό (C18:2) με ποσοστό 1,08%. Αύξηση παρατηρείται στο ποσοστό του παλμιτελαϊκού οξέος (C16:1) σε 3,38%, ενώ λιπαρά οξέα εντοπίζονται σε ποσοστό 1,41%.

Πίνακας 12. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους κατά τις ημι-συνεχείς ζυμώσεις

Μικροοργανισμός	Χρόνος ζύμωσης (h)	C16:0	Δ^9 C16:1	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	Άλλα
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	24	26,70	0,00	7,10	45,26	19,37	1,51
	87	27,88	0,00	15,08	48,72	5,96	1,67
	114.5	24,48	0,61	16,67	49,69	5,857	1,85
<i>L. starkeyi</i> DSM 70296	47.5	36,44	0,00	4,15	42,75	13,56	1,05
	191	34,96	3,38	8,96	43,92	1,08	1,45

5 Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη, αξιοποιήθηκε το οργανικό κλάσμα στερεών αποβλήτων και συγκεκριμένα τα στερεά απόβλητα που προκύπτουν από την εκχύλιση του καφέ και οι φλοιοί στυμμένων πορτοκαλιών, για την παραγωγή λιπιδίων μέσω μικροβιακών ζυμώσεων.

Αρχικά, τα συστατικά προστιθέμενης αξίας που εμπεριέχονται στον απόβλητο στερεό καφέ, διαχωρίστηκαν μέσω μίας διεργασίας δύο σταδίων που περιλαμβάνει την εκχύλιση του φυτικού ελαίου με τη χρήση του πράσινου διαλύτη οξικού αιθυλεστέρα στο πρώτο στάδιο ακολουθούμενη από εκχύλιση του φαινολικού περιεχομένου του καφέ μέσω εκχύλισης με αιθανόλη. Τα υπολειπόμενα στερεά υποβλήθηκαν σε υδροθερμική προεπεξεργασία και στην συνέχεια σε ενζυμική υδρόλυση για την παραγωγή υδρολύματος καφέ. Παράλληλα, από τους φλοιούς των στυμμένων πορτοκαλιών εκχυλίστηκαν τα ελεύθερα σάκχαρα με την χρήση νερού ως διαλύτη. Τόσο το υδρόλυμα καφέ όσο και τα ελεύθερα σάκχαρα που απομονώθηκαν από τους φλοιούς πορτοκαλιών, χρησιμοποιήθηκαν για την βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων.

Στην συνέχεια, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509, *L. starkeyi* DSM 70296 και *R. toruloides* NRRL Y-27012 αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναπτυχθούν και να παράγουν μικροβιακά λιπίδια σε συνθετικό υπόστρωμα με διαφορετικές πηγές άνθρακα (γλυκόζη, ξυλόζη και μαννόζη). Οι μικροοργανισμοί *C. curvatus* ATCC 20509 και *L. starkeyi* DSM 70296, οι οποίοι έδειξαν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα στις πρώτες ζυμώσεις μελετήθηκαν περαιτέρω σε ημι-συνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα. Μετά το τέλος των μικροβιακών ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση ανάλυση της σύστασης των λιπαρών οξέων του μικροβιακού ελαίου.

Πιο συγκεκριμένα, τα πιο σημαντικά συμπεράσματα που προέκυψαν από την συγκεκριμένη μεταπτυχιακή μελέτη ήταν τα εξής:

- Ο οξικός αιθυλεστέρας ως πράσινος διαλύτης αποδείχθηκε καλύτερος διαλύτης για την εκχύλιση του φυτικού ελαίου του καφέ απομονώνοντας το 79,44% w/w του συνολικού ελαίου (μέσω προσδιορισμού με την μέθοδο Soxhlet) έναντι του 73,98% w/w που απομονώθηκε με τη χρήση εξανίου.

- Η αναλογία 1:10, SCGs προς αιθανόλη για την απομόνωση των φαινολικών ενώσεων από τους χρησιμοποιημένους κόκκους καφέ, έδειξε καλύτερα αποτελέσματα έναντι της αναλογίας 1:5.
- Οι ζυμώσεις με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509 σε γλυκόζη, μαννόζη και ξυλόζη, απέδωσαν 28,132 g/L μικροβιακής βιομάζας με 41,94% w/w περιεκτικότητα σε λίπος, 27,70 g/L μικροβιακής βιομάζας με 30,55% w/w περιεκτικότητα σε λίπος και 26,31 g/L μικροβιακής βιομάζας με 44,94% w/w περιεκτικότητα σε λίπος αντίστοιχα.
- Οι ζυμώσεις με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296 σε γλυκόζη, μαννόζη και ξυλόζη, απέδωσαν 22,20 g/L μικροβιακής βιομάζας με 37,97% w/w περιεκτικότητα σε λίπος, 19,68 g/L μικροβιακής βιομάζας με 34,19% w/w περιεκτικότητα σε λίπος και 15,44 g/L μικροβιακής βιομάζας με 34,56% w/w περιεκτικότητα σε λίπος αντίστοιχα.
- Οι ζυμώσεις με τον μικροοργανισμό *R. toruloides* NRRL Y-27012 σε γλυκόζη, μαννόζη και ξυλόζη, απέδωσαν 23,06 g/L μικροβιακής βιομάζας με 39,07% w/w περιεκτικότητα σε λίπος, 25,96 g/L μικροβιακής βιομάζας με 30,68% w/w περιεκτικότητα σε λίπος και 22,75 g/L μικροβιακής βιομάζας με 35,12% w/w περιεκτικότητα σε λίπος αντίστοιχα.
- Στις ημισυνεχείς ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με τον μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509 επιτεύχθηκε μία από τις υψηλότερες περιεκτικότητες σε λίπος της τάξης του 62,5% με την συγκέντρωση της βιομάζας να φτάνει στα 70,4 g/L.
- Στις ημισυνεχείς ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με τον μικροοργανισμό *L. starkeyi* DSM 70296 η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας που επιτεύχθηκε ήταν 107,78 g/L με περιεκτικότητα σε λίπος, 51,03% w/w.

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα επιτεύχθηκαν ικανοποιητικές συγκεντρώσεις μικροβιακών λιπιδίων. Παρόλα αυτά περαιτέρω μελέτη πρέπει να πραγματοποιηθεί με σκοπό την βελτίωση της βιοτεχνολογικής παραγωγής λιπιδίων μελετώντας διάφορους παράγοντες όπως τη βελτιστοποίηση του θρεπτικού μέσου ζύμωσης, την αναλογία C/N στρατηγική και τη σύσταση τροφοδοσίας. Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δοθεί στη βελτίωση του αερισμού (μέσω του *k_{La}*) κατά τα στάδια κυτταρικής ανάπτυξης και συσσώρευσης λιπιδίων. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη ενός

ολοκληρωμένου βιοδιυλιστηρίου βασισμένο στα απόβλητα φλοιών πορτοκαλιού για την ανάκτηση ελεύθερων σακχάρων, πηκτικών, αντιοξειδωτικών και ελαίων, χρήζει ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και θα πρέπει να μελετηθεί ως προς την αξιολόγηση της βιωσιμότητας της διεργασίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.
- Alexandri, M., Schneider, R., Papapostolou, H., Ladakis, D., Koutinas, A., & Venus, J. (2019). Restructuring the conventional sugar beet industry into a novel biorefinery: fractionation and bioconversion of sugar beet pulp into succinic acid and value-added coproducts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *7*(7), 6569-6579.
- Alves, R. C., Rodrigues, F., Nunes, M. A., Vinha, A. F., & Oliveira, M. B. P. (2017). State of the art in coffee processing by-products. In *Handbook of coffee processing by-products* (pp. 1-26). Elsevier.
- Anschau, A., & Franco, T. T. (2015). Cell mass energetic yields of fed-batch culture by *Lipomyces starkeyi*. *Bioprocess and biosystems engineering*, *38*(8), 1517-1525.
- Anschau, A., Xavier, M. C., Hernalsteens, S., & Franco, T. T. (2014). Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource Technology*, *157*, 214-222.
- Atabani, A., Ala'a, H., Kumar, G., Saratale, G. D., Aslam, M., Khan, H. A., Said, Z., & Mahmoud, E. (2019). Valorization of spent coffee grounds into biofuels and value-added products: Pathway towards integrated bio-refinery. *Fuel*, *254*, 115640.
- Awad, D., Bohnen, F., Mehlmer, N., & Brueck, T. (2019). Multi-factorial-guided media optimization for enhanced biomass and lipid formation by the oleaginous yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosus*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *7*, 54.
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and bioprocess technology*, *7*(12), 3493-3503.
- Battista, F., Barampouti, E. M., Mai, S., Bolzonella, D., Malamis, D., Moustakas, K., & Loizidou, M. (2020). Added-value molecules recovery and biofuels production

- from spent coffee grounds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 110007.
- Bekalo, S. A., & Reinhardt, H.-W. (2010). Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. *Materials and structures*, 43(8), 1049-1060.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.-M., & Gaillardin, C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(4), 1193-1206.
- Bonturi, N., Matsakas, L., Nilsson, R., Christakopoulos, P., Miranda, E. A., Berglund, K. A., & Rova, U. (2015). Single cell oil producing yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium toruloides*: selection of extraction strategies and biodiesel property prediction. *Energies*, 8(6), 5040-5052.
- Burniol-Figols, A., Cenian, K., Skiadas, I. V., & Gavala, H. N. (2016). Integration of chlorogenic acid recovery and bioethanol production from spent coffee grounds. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 54-64.
- Caetano, N. S., Silva, V. F., Melo, A. C., Martins, A. A., & Mata, T. M. (2014). Spent coffee grounds for biodiesel production and other applications. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 16(7), 1423-1430.
- Campos-Vega, R., Loarca-Pina, G., Vergara-Castaneda, H. A., & Oomah, B. D. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 24-36.
- Carmona-Cabello, M., García, I., Papadaki, A., Tsouko, E., Koutinas, A., & Dorado, M. (2021). Biodiesel production using microbial lipids derived from food waste discarded by catering services. *Bioresource Technology*, 323, 124597.
- Castro, C. S., Abreu, A. L., Silva, C. L., & Guerreiro, M. C. (2011). Phenol adsorption by activated carbon produced from spent coffee grounds. *Water Science and Technology*, 64(10), 2059-2065.
- Chen, D. M.-C., Bodirsky, B. L., Krueger, T., Mishra, A., & Popp, A. (2020). The world's growing municipal solid waste: Trends and impacts. *Environmental Research Letters*, 15(7), 074021.

- Clark, J., & Deswarte, F. (2015). The biorefinery concept: an integrated approach. *Introduction to chemicals from biomass*, 1-29.
- Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., Morais, S., & Casal, S. (2012). Espresso coffee residues: a valuable source of unextracted compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(32), 7777-7784.
- De Castro, M. L., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography A*, 1217(16), 2383-2389.
- De la Torre, I., Acedos, M., Ladero, M., & Santos, V. (2019). On the use of resting *L. delbrueckii* spp. *delbrueckii* cells for D-lactic acid production from orange peel wastes hydrolysates. *Biochemical Engineering Journal*, 145, 162-169.
- De la Torre, I., Martin-Dominguez, V., Acedos, M., Esteban, J., Santos, V., & Ladero, M. (2019). Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(15), 5975-5991.
- Diamantopoulou, P., Stoforos, N. G., Xenopoulos, E., Sarris, D., Psarianos, D., Philippoussis, A., & Papanikolaou, S. (2020). Lipid production by *Cryptococcus curvatus* growing on commercial xylose and subsequent valorization of fermentation waste-waters for the production of edible and medicinal mushrooms. *Biochemical Engineering Journal*, 162, 107706.
- Dussert, S., Laffargue, A., de Kochko, A., & Joët, T. (2008). Effectiveness of the fatty acid and sterol composition of seeds for the chemotaxonomy of Coffea subgenus Coffea. *Phytochemistry*, 69(17), 2950-2960.
- European Commission, 2021. https://ec.europa.eu/info/energy-climate-change-environment_en (accessed 2.1.2022)
- European Environment Agency, 2013. <https://www.eea.europa.eu/publications/managing-municipal-solid-waste> (accessed 29.12.2021)

- 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.
- Filippi, K., Papapostolou, H., Alexandri, M., Vlysidis, A., Myrtsi, E. D., Ladakis, D., Pateraki, C., Haroutounian, S. A., & Koutinas, A. (2022). Integrated biorefinery development using winery waste streams for the production of bacterial cellulose, succinic acid and value-added fractions. *Bioresource Technology*, *343*, 125989.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, *226*(1), 497-509.
- Franca, A. S., & Oliveira, L. S. (2009). Coffee processing solid wastes: current uses and future perspectives. *Agricultural wastes*, *9*, 155-189.
- Fujimoto, T., & Parton, R. G. (2011). Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *3*(3), a004838.
- Gomes, T., Pereira, J. A., Ramalhosa, E., Casal, S., & Baptista, P. (2014). Effect of fresh and composted spent coffee grounds on lettuce growth, photosynthetic pigments and mineral composition. VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas,
- Gong, Z., Shen, H., Wang, Q., Yang, X., Xie, H., & Zhao, Z. K. (2013). Efficient conversion of biomass into lipids by using the simultaneous saccharification and enhanced lipid production process. *Biotechnology for biofuels*, *6*(1), 1-12.
- Gong, Z., Zhou, W., Shen, H., Zhao, Z. K., Yang, Z., Yan, J., & Zhao, M. (2016). Co-utilization of corn stover hydrolysates and biodiesel-derived glycerol by *Cryptococcus curvatus* for lipid production. *Bioresource Technology*, *219*, 552-558.
- Görner, C., Redai, V., Bracharz, F., Schrepfer, P., Garbe, D., & Brück, T. (2016). Genetic engineering and production of modified fatty acids by the non-conventional oleaginous yeast *Trichosporon oleaginosus* ATCC 20509. *Green Chemistry*, *18*(7), 2037-2046.

- Goulding, D., Fox, P., & O'Mahony, J. (2020). Milk proteins: an overview. *Milk Proteins*, 21-98.
- Haile, M. (2014). Integrated valorization of spent coffee grounds to biofuels. *Biofuel Research Journal*, 1(2), 65-69.
- Hassan, M., Blanc, P. J., Granger, L.-M., Pareilleux, A., & Goma, G. (1996). Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*, 31(4), 355-361.
- Hu, C., Wu, S., Wang, Q., Jin, G., Shen, H., & Zhao, Z. K. (2011). Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnology for biofuels*, 4(1), 1-8.
- ICO, 2021. <https://www.ico.org/> (accessed 26.12.2021)
- Ioannidou, S. M., Pateraki, C., Ladakis, D., Papapostolou, H., Tsakona, M., Vlysidis, A., Kookos, I. K., & Koutinas, A. (2020). Sustainable production of bio-based chemicals and polymers via integrated biomass refining and bioprocessing in a circular bioeconomy context. *Bioresource Technology*, 307, 123093.
- Janissen, B., & Huynh, T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 128, 110-117.
- Jiang, B., Tsao, R., Li, Y., & Miao, M. (2014). Food safety: Food analysis technologies/techniques.
- Karmee, S. K. (2018). A spent coffee grounds based biorefinery for the production of biofuels, biopolymers, antioxidants and biocomposites. *Waste management*, 72, 240-254.
- Katakojwala, R., & Mohan, S. V. (2021). A critical view on the environmental sustainability of biorefinery systems. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 27, 100392.
- Kookos, I. (2018). Technoeconomic and environmental assessment of a process for biodiesel production from spent coffee grounds (SCGs). *Resources, Conservation and Recycling*, 134, 156-164.

- Kourist, R., Bracharz, F., Lorenzen, J., Kracht, O. N., Chovatia, M., Daum, C., Deshpande, S., Lipzen, A., Nolan, M., & Ohm, R. A. (2015). Genomics and transcriptomics analyses of the oil-accumulating basidiomycete yeast *Trichosporon oleaginosus*: insights into substrate utilization and alternative evolutionary trajectories of fungal mating systems. *MBio*, *6*(4), e00918-00915.
- Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Garcia, I. L., Kookos, I. K., Papanikolaou, S., Kwan, T. H., & Lin, C. S. K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, *43*(8), 2587-2627.
- Kovalcik, A., Kucera, D., Matouskova, P., Pernicova, I., Obruca, S., Kalina, M., Enev, V., & Marova, I. (2018). Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *6*(2), 3495-3501.
- Kwon, E. E., Yi, H., & Jeon, Y. J. (2013). Sequential co-production of biodiesel and bioethanol with spent coffee grounds. *Bioresource Technology*, *136*, 475-480.
- Lam, M. K., Khoo, C. G., & Lee, K. T. (2019). Scale-up and commercialization of algal cultivation and biofuels production. In *Biofuels from algae* (pp. 475-506). Elsevier.
- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., & Oh, Y.-K. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, *244*, 1317-1328.
- Leiva-Candia, D., Tsakona, S., Kopsahelis, N., Garcia, I., Papanikolaou, S., Dorado, M., & Koutinas, A. (2015). Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for integrated synthesis of microbial oil and value-added co-products. *Bioresource Technology*, *190*, 57-65.
- Lie, S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, *79*(1), 37-41.
- Limousy, L., Jeguirim, M., Dutournié, P., Kraiem, N., Lajili, M., & Said, R. (2013). Gaseous products and particulate matter emissions of biomass residential boiler fired with spent coffee grounds pellets. *Fuel*, *107*, 323-329.

- Liu, Y., Tu, Q., Knothe, G., & Lu, M. (2017). Direct transesterification of spent coffee grounds for biodiesel production. *Fuel*, *199*, 157-161.
- López-Barrera, D. M., Vázquez-Sánchez, K., Loarca-Piña, M. G. F., & Campos-Vega, R. (2016). Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. *Food chemistry*, *212*, 282-290.
- Mantzouridou, F. T., Paraskevopoulou, A., & Lalou, S. (2015). Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste. *Biochemical Engineering Journal*, *101*, 1-8.
- Marto, J., Gouveia, L., Chiari, B., Paiva, A., Isaac, V., Pinto, P., Simões, P., Almeida, A., & Ribeiro, H. (2016). The green generation of sunscreens: Using coffee industrial sub-products. *Industrial Crops and Products*, *80*, 93-100.
- Massaya, J., Pereira, A. P., Mills-Lamprey, B., Benjamin, J., & Chuck, C. J. (2019). Conceptualization of a spent coffee grounds biorefinery: a review of existing valorisation approaches. *Food and Bioproducts Processing*, *118*, 149-166.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2018). Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. *Bioresource Technology*, *247*, 1077-1084.
- Matsakas, L., Gao, Q., Jansson, S., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2017). Green conversion of municipal solid wastes into fuels and chemicals. *Electronic Journal of Biotechnology*, *26*, 69-83.
- McMurry, J. (2012). *Οργανική χημεία*. Πανεπιστημιακές Έκδοσεις Κρήτης.
- McNutt, J. (2019). Spent coffee grounds: A review on current utilization. *Journal of industrial and engineering chemistry*, *71*, 78-88.
- Meesters, P., Huijberts, G., & Eggink, G. (1996). High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied microbiology and biotechnology*, *45*(5), 575-579.
- Meo, A., Priebe, X. L., & Weuster-Botz, D. (2017). Lipid production with *Trichosporon oleaginosus* in a membrane bioreactor using microalgae hydrolysate. *Journal of Biotechnology*, *241*, 1-10.

- Mohsin, A., Hussain, M. H., Zaman, W. Q., Mohsin, M. Z., Zhang, J., Liu, Z., Tian, X., Salim-ur-Rehman, Khan, I. M., & Niazi, S. (2021). Advances in sustainable approaches utilizing orange peel waste to produce highly value-added bioproducts. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-20.
- Moncada, J., & Aristizábal, V. (2016). Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 122-134.
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and recycling*, 66, 45-58.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173-179.
- Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2011). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate polymers*, 83(2), 368-374.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and bioprocess technology*, 4(5), 661-672.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Obruca, S., Benesova, P., Kucera, D., Petrik, S., & Marova, I. (2015). Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New biotechnology*, 32(6), 569-574.
- 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*, 98(13), 5883-5890.
- Office of energy efficiency and renewable energy, 2021. <https://www.energy.gov/eere/bioenergy/development-integrated-biorefineries> (accessed 30.12.2021)

- Olhoff, A., & Christensen, J. M. (2018). Emissions gap report 2018.
- Ozturk, B., Winterburn, J., & Gonzalez-Miquel, M. (2019). Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. *Biochemical Engineering Journal*, *151*, 107298.
- 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.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *112*(6), 639-654.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *113*(8), 1031-1051.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., & Marc, I. (2001). Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek*, *80*(3), 215-224.
- Park, J., Kim, B., & Lee, J. W. (2016). In-situ transesterification of wet spent coffee grounds for sustainable biodiesel production. *Bioresource Technology*, *221*, 55-60.
- Pleissner, D., Qi, Q., Gao, C., Rivero, C. P., Webb, C., Lin, C. S. K., & Venus, J. (2016). Valorization of organic residues for the production of added value chemicals: A contribution to the bio-based economy. *Biochemical Engineering Journal*, *116*, 3-16.
- Primaz, C. T., Schena, T., Lazzari, E., Caramao, E. B., & Jacques, R. A. (2018). Influence of the temperature in the yield and composition of the bio-oil from the

pyrolysis of spent coffee grounds: Characterization by comprehensive two dimensional gas chromatography. *Fuel*, 232, 572-580.

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., Lorenzo, J. M., & Shpigelman, A. (2017). Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citrus wastes—A review. *Molecules*, 22(5), 680.

Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In *Technological advances in improved and alternative sources of lipids* (pp. 235-291). Springer.

Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.

Ratledge, C. (2014). The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems. *Biotechnology letters*, 36(8), 1557-1568.

Ratledge, C., & Cohen, Z. (2008). Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology*, 20(7), 155-160.

Ratledge, C., & Tan, K.-H. (1990). Oils and fats: production, degradation and utilization by yeasts. *Yeast biotechnology and biocatalysis*, 223-254.

Russo, C., Maugeri, A., Lombardo, G. E., Musumeci, L., Barreca, D., Rapisarda, A., Cirimi, S., & Navarra, M. (2021). The Second Life of Citrus Fruit Waste: A Valuable Source of Bioactive Compounds. *Molecules*, 26(19), 5991.

Sant’Anna, V., Biondo, E., Kolchinski, E. M., da Silva, L. F. S., Corrêa, A. P. F., Bach, E., & Brandelli, A. (2017). Total polyphenols, antioxidant, antimicrobial and allelopathic activities of spend coffee ground aqueous extract. *Waste and biomass valorization*, 8(2), 439-442.

Saratale, G. D., Bhosale, R., Pugazendhi, A., Mahmoud, E., Sirohi, R., Bhatia, S. K., Atabani, A., Mulone, V., Yoon, J.-J., & Shin, H. S. (2020). A review on valorization of spent coffee grounds (SCG) towards biopolymers and biocatalysts production. *Bioresource Technology*, 123800.

- Satari, B., & Karimi, K. (2018). Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conservation and Recycling*, 129, 153-167.
- Severini, C., Derossi, A., & Fiore, A. G. (2017). Ultrasound-assisted extraction to improve the recovery of phenols and antioxidants from spent espresso coffee ground: a study by response surface methodology and desirability approach. *European Food Research and Technology*, 243(5), 835-847.
- Silva, M., Nebra, S., Silva, M. M., & Sanchez, C. (1998). The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. *Biomass and Bioenergy*, 14(5-6), 457-467.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, 1617(1), 1-16.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2005). Determination of extractives in biomass. *Laboratory analytical procedure (LAP)*, 1617, 1-9.
- Statista, 2020. <https://www.statista.com/statistics/1044840/major-orange-producers-worldwide/> (accessed 9.1.2022)
- Stylianou, E., Pateraki, C., Ladakis, D., Cruz-Fernández, M., Latorre-Sánchez, M., Coll, C., & Koutinas, A. (2020). Evaluation of organic fractions of municipal solid waste as renewable feedstock for succinic acid production. *Biotechnology for biofuels*, 13(1), 1-16.
- Sutanto, S., Zullaikah, S., Tran-Nguyen, P. L., Ismadji, S., & Ju, Y.-H. (2018). *Lipomyces starkeyi*: its current status as a potential oil producer. *Fuel Processing Technology*, 177, 39-55.
- Tai, M., & Stephanopoulos, G. (2013). Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic engineering*, 15, 1-9.
- Tapia, E., Anschau, A., Coradini, A. L., Franco, T. T., & Deckmann, A. C. (2012). Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. *AMB express*, 2(1), 1-8.

- Tchakouteu, S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of applied microbiology*, *118*(4), 911-927.
- Tsakona, S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Kookos, I. K., & Koutinas, A. A. (2014). Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Biotechnology*, *189*, 36-45.
- Tsakona, S., Skiadaresis, A. G., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Kookos, I. K., & Koutinas, A. A. (2016). Valorisation of side streams from wheat milling and confectionery industries for consolidated production and extraction of microbial lipids. *Food chemistry*, *198*, 85-92.
- Tsouko, E., Alexandri, M., Fernandes, K. V., Freire, D. M. G., Mallouchos, A., & Koutinas, A. A. (2019). Extraction of phenolic compounds from palm oil processing residues and their application as antioxidants. *Food Technology and Biotechnology*, *57*(1), 29.
- Tsouko, E., Kachrimanidou, V., Dos Santos, A. F., Lima, M. E. d. N. V., Papanikolaou, S., de Castro, A. M., Freire, D. M. G., & Koutinas, A. A. (2017). Valorization of by-products from palm oil mills for the production of generic fermentation media for microbial oil synthesis. *Applied biochemistry and biotechnology*, *181*(4), 1241-1256.
- Tsouko, E., Maina, S., Ladakis, D., Kookos, I. K., & Koutinas, A. (2020). Integrated biorefinery development for the extraction of value-added components and bacterial cellulose production from orange peel waste streams. *Renewable Energy*, *160*, 944-954.
- Tsouko, E., Papadaki, A., Papapostolou, H., Ladakis, D., Natsia, A., Koutinas, A., Kampioti, A., Eriotou, E., & Kopsahelis, N. (2020). Valorization of Zante currant side-streams for the production of phenolic-rich extract and bacterial cellulose: a novel biorefinery concept. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *95*(2), 427-438.

- Tuntiwiwattanapun, N., Monono, E., Wiesenborn, D., & Tongcumpou, C. (2017). In-situ transesterification process for biodiesel production using spent coffee grounds from the instant coffee industry. *Industrial Crops and Products*, *102*, 23-31.
- Uddin, M., Techato, K., Rasul, M., Hassan, N., & Mofijur, M. (2019). Waste coffee oil: A promising source for biodiesel production. *Energy Procedia*, *160*, 677-682.
- Unglert, M., Bockey, D., Bofinger, C., Buchholz, B., Fisch, G., Luther, R., Mueller, M., Schaper, K., Schmitt, J., & Schroeder, O. (2020). Action areas and the need for research in biofuels. *Fuel*, *268*, 117227.
- United Nations, 2015. https://unfccc.int/sites/default/files/english_paris_agreement.pdf (accessed 8.1.2022)
- USDA, 2019. <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade> (accessed 8.1.2022)
- Vardon, D. R., Moser, B. R., Zheng, W., Witkin, K., Evangelista, R. L., Strathmann, T. J., Rajagopalan, K., & Sharma, B. K. (2013). Complete utilization of spent coffee grounds to produce biodiesel, bio-oil, and biochar. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *1*(10), 1286-1294.
- Worldbank, 2019. <https://www.worldbank.org/en/topic/urbandevelopment/brief/solid-waste-management> (accessed 9.1.2022)
- Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X., & Zhao, Z. K. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, *101*(15), 6124-6129.
- Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q., & Zhao, Z. K. (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource Technology*, *102*(2), 1803-1807.
- Xu, H., Wang, W., Liu, X., Yuan, F., & Gao, Y. (2015). Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica L.*) by subcritical water extraction. *Industrial Crops and Products*, *76*, 946-954.

- Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K. M., & Chen, S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*, *102*(10), 6134-6140.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., & Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied microbiology and biotechnology*, *56*(1), 17-34.
- Zhang, Y., & Chen, W.-T. (2018). Hydrothermal liquefaction of protein-containing feedstocks. In *Direct Thermochemical Liquefaction for Energy Applications* (pp. 127-168). Elsevier.
- Zuorro, A., & Lavecchia, R. (2012). Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, *34*, 49-56.

f