



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Βελτιστοποίηση της παραγωγής βιολιπαντικών ουσιών
μέσω ενζυμικής μετεστεροποίησης μικροβιακών και φυτικών λιπιδίων

Αικατερίνη Γλυκερία Δ. Ζυγουράκη

Επιβλέπων καθηγητής:
Αποστόλης Κουτίνας, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2024**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Βελτιστοποίηση της παραγωγής βιολιπαντικών ουσιών
μέσω ενζυμικής μετεστεροποίησης μικροβιακών και φυτικών λιπιδίων

Optimization of biolubricants production via enzymatic transesterification
of microbial and plant oils

Αικατερίνη Γλυκερία Δ. Ζυγουράκη

Εξεταστική Επιτροπή:

Αποστόλης Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

Θεοφανία Τσιρώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Βελτιστοποίηση της παραγωγής βιολιπαντικών ουσιών μέσω ενζυμικής μετεστεροποίησης μικροβιακών και φυτικών λιπιδίων

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη έγινε παραγωγή και βελτιστοποίηση βιολιπαντικών ουσιών μέσω ενζυμικής διεργασίας με χρήση φυτικών λιπιδίων, τα οποία προέρχονταν από στερεά απόβλητα καφέ (Spent Coffee Grounds-SCGs), αλλά και μικροβιακών λιπιδίων τα οποία παράχθηκαν μέσω ζύμωσης του ελαιογόνου μικροοργανισμού *Cryprococcus curvatus*.

Το έλαιο του καφέ διαχωρίστηκε αποτελεσματικά από τα απόβλητα του καφέ με τη χρήση εξανίου και στη συνέχεια τελέστηκε εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό αέρος. Για την παραγωγή του μικροβιακού ελαίου πραγματοποιήθηκε κλειστή καλλιέργεια της ελαιογόνου ζύμης *C. curvatus* ATCC 20509. Έγινε ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων που περιέχονται στο μικροβιακό λίπος πραγματοποιήθηκε με χρήση αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC) και προσδιορισμός του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN).

Τα έλαια υποβλήθηκαν σε ενζυμική υδρόλυση με προσθήκη της λιπάσης Lipomod 34MDP (*C. rugosa*), με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,1 M (pH 8) σε αναλογία 1:1 (v/v). Το υπό μαγνητική ανάδευση σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο Στην περίπτωση του μικροβιακού ελαίου πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της υδρόλυσης, με προσθήκη 0,5%, 1% και 2% ενζύμου και η βέλτιστη ποσότητα ενζύμου που επιλέχθηκε ήταν η χαμηλότερη.

Στη συνέχεια τα υδρολυμένα έλαια υποβλήθηκαν σε ενζυμική εστεροποίηση με χρήση των πολυολών τριμεθυλοπροπάνιο (TMP) ή νεοπεντυλογλυκόλη (NPG) (Sigma-Aldrich), υπό μαγνητική ανάδευση σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο, με προσθήκη των ενζύμων Lipomod 34MDP ή Novozyme 435, σε θερμοκρασία που διέφερε ανάλογα με τον ενζυμικό καταλύτη, και με προσθήκη απιονισμένου νερού σε αναλογία. Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση ως προς τη μοριακή αναλογία του ελαίου προς την αλκοόλη, το είδος του ενζύμου, τη θερμοκρασία της αντίδρασης, την προσθήκη νερού και το ποσοστό του ενζύμου που χρησιμοποιείται.

Τέλος, κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης, αλλά και της εστεροποίησης, συλλέχθηκαν δείγματα σε τακτά χρονικά διαστήματα, τα οποία ελέγχθηκαν ως προς την οξύτητά τους, προκειμένου να ελεγχθεί η πορεία της υδρόλυσης. Ο προσδιορισμός της οξύτητας έγινε με διάλυμα NaOH, παρουσία δείκτη φαινολοφθαλεΐνης, με σκοπό τον περαιτέρω προσδιορισμό της απόδοσης μετατροπής μέσω της μείωσης της οξύτητας των δειγμάτων με την πάροδο του χρόνου.

Επιστημονική περιοχή: Βιομηχανική βιοτεχνολογία

Λέξεις κλειδιά: βιολιπαντικά, ένζυμα, βελτιστοποίηση, μικροβιακό έλαιο, απόβλητα καφέ, έλαιο καφέ

Optimization of biolubricants production via enzymatic transesterification of microbial and plant oils

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

ABSTRACT

In the present study, the production and optimization of bio-lubricants was carried out through an enzymatic process, using plant lipids derived from Spent Coffee Grounds (SCGs) as well as microbial lipids produced by fermentation of the oleaginous microorganism *Cryprococcus curvatus*.

The coffee oil was efficiently separated from the coffee waste using hexane and then the solvent was evaporated under vacuum. Closed culture of the oleaginous yeast *C. curvatus* ATCC 20509 was carried out for the production of the microbial oil. Analysis of the methyl esters of fatty acids contained in the microbial fat was carried out using Gas Chromatography (GC) and determination of free amino acid nitrogen (FAN). The oils were hydrolysed enzymatically with the Lipomod 34MDP lipase (*C. rugosa*), with 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8) at a ratio of 1:1 (v/v). The samples were stirred magnetically in a heated water bath. In the case of the microbial oil, hydrolysis was optimized by adding 0.5%, 1% and 2% enzyme and the optimum amount of enzyme was considered to be the lowest.

The hydrolysed samples were then esterified enzymatically using the polyols trimethylpropane (TMP) or neopentylglycol (NPG) (Sigma-Aldrich), under magnetic stirring in a heated water bath, with the addition of the enzymes Lipomod 34MDP or Novozyme 435, at various temperatures, with the addition of water. Optimisation was carried out in terms of the molar ratio of oil to alcohol, the type of enzyme, the temperature of the reaction, the addition of water and the percentage of enzyme used.

Samples were collected at regular intervals during the hydrolysis and also during the esterification process, and their acidity was monitored in order to control the hydrolysis process. The acidity was determined with NaOH solution in the presence of a phenolphthalein indicator, in order to further determine the conversion efficiency by decreasing the acidity of the samples over time. 0

Scientific area: Industrial biotechnology

Keywords: biolubricants, enzymes, optimization, microbial oil, coffee waste, coffee oil

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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 Βιοοικονομίας».

Φτάνοντας στο τέλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών, θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπων μου, κ. Απόστολο Κουτίνα, για την ανάθεση του θέματος της παρούσας μελέτης αλλά και για την εξαιρετικά σημαντική επιστημονική καθοδήγηση και την συνεργασία του. 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, χωρίς την σταθερή και άρρηκτη καθοδήγηση και στήριξη της οποίας δεν θα μπορούσε να έχει εκπονηθεί η συγκεκριμένη μεταπτυχιακή μελέτη, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Εύα Γεωργιάδου, της οποίας η στήριξη σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν ιδιαίτερα πολύτιμη. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Νίκο Γιαννάκη και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου και τους συμφοιτητές μου που ήταν πάντα δίπλα μου με τις συμβουλές και την καθοδήγηση τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και την οικογένειά μου για τη κατανόηση και τη στήριξη τους κατά όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Με την άδεια μου η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την εξεταστική επιτροπή μέσα απολογισμικό αντίχενυση λογοκλοπής που διαθέτει το γεωπονικό πανεπιστήμιο αθηνών και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	10
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	12
1. Εισαγωγή	13
1.1 Η κυκλική οικονομία και η συμμετοχή των αποβλήτων τροφίμων.....	13
1.2 Αξιοποίηση αποβλήτων καφέ	15
1.2.1 Εφαρμογές προϊόντων προστιθέμενης αξίας αποβλήτων καφέ.....	17
1.3 Το μικροβιακό έλαιο	20
1.3.1 Παραγωγή μικροβιακού ελαίου	24
1.3.2 Εφαρμογές μικροβιακού ελαίου	27
1.4 Βιολιπαντικά	30
1.4.1 Οι περιβαλλοντικές συνέπειες χρήσης συμβατικών λιπαντικών ...	31
1.4.2 Βελτιστοποίηση Βιωσιμότητας: ο ρόλος βιολιπαντικών στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας	33
2. Σκοπός της μελέτης	45
3. Υλικά και Μέθοδοι	46
3.1 Πρώτες ύλες	46
3.2 Μικροοργανισμός	46
3.3 Υπόστρωμα Προκαλλιέργειας	46
3.4 Βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	47
3.5 Εκχύλιση ελαίων	47
3.5.1 Φυτικό έλαιο καφέ.....	47
3.5.2 Μικροβιακό έλαιο.....	48
3.6 Παραγωγή βιολιπαντικών με χρήση φυτικού ελαίου καφέ και μικροβιακού λίπους ως πρώτη ύλη	48
3.6.1 Ενζυμικοί βιοκαταλύτες.....	48

3.6.2	Υδρόλυση και εστεροποίηση φυτικού ελαίου καφέ και μικροβιακού ελαίου μέσω ενζυμικής αντίδρασης για παραγωγή βιολιπαντικών	49
3.6.3	Βελτιστοποίηση συνθηκών εστεροποίησης του φυτικού ελαίου και του μικροβιακού λίπους για παραγωγή βιολιπαντικών	50
3.7	Αναλυτικές τεχνικές.....	52
3.7.1	Προσδιορισμός βαθμού εστεροποίησης του ελαίου προς παραγωγή βιολιπαντικών ουσιών.....	52
3.7.2	Ποσοτικός Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας	53
3.7.3	Ποσοτικός Προσδιορισμός Ενδοκυτταρικού Μικροβιακού Ελαίου	53
3.7.4	Προσδιορισμός σύστασης των μεθυλεστέρων των ελεύθερων λιπαρών οξέων	54
3.7.5	Προσδιορισμός σακχάρων.....	55
3.7.6	Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN).....	55
4	Αποτελέσματα και Συζήτηση	57
4.1	Βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού ελαίου σε βιοαντιδραστήρα	57
4.2	Ενζυμική υδρόλυση φυτικού ελαίου καφέ και μικροβιακού ελαίου	58
4.2.1	Ενζυμική υδρόλυση τριγλυκεριδίων ελαίου καφέ.....	58
4.2.2	Ενζυμική υδρόλυση τριγλυκεριδίων μικροβιακού ελαίου	60
4.3	Ενζυμική εστεροποίηση για τη παραγωγή βιολιπαντικών.....	62
4.3.1	Φυτικό έλαιο καφέ.....	62
4.3.2	Μικροβιακό έλαιο μικροοργανισμού <i>C. curvatus</i>	72
4.3.3	Επίδραση d-λεμονενίου κατά την εστεροποίηση	74
5	Συμπεράσματα	77
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και περιεκτικότητα σε λίπος (Πηγή: (Muniraj et al. 2015).....	24
Πίνακας 2. Μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων θρεπτικού μέσου	47
Πίνακας 3 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους από το μικροοργανισμό <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509.....	58
Πίνακας 4 Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου φυτικού ελαίου καφέ και μικροβιακού ελαίου σε εστέρες με χρήση d-λεμονενίου ως διαλύτης.....	75
Πίνακας 5 Βιβλιογραφική ανασκόπηση παραγωγής βιολιπαντικών.....	76

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (□) και FAN (▲) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακού ελαίου (◆) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχής ζύμωσης με τη χρήση του μικροοργανισμού <i>C. curvatus</i>	57
Διάγραμμα 2. Απόδοση μετατροπής (%) της υδρόλυσης του ελαίου καφέ με 1% Lipomod 34MDP σε συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης (h) για 24h.	59
Διάγραμμα 3. Απόδοση μετατροπής (%) της ενζυμικής υδρόλυσης του μικροβιακού ελαίου με διαφορετικά ποσοστά ενζύμου Lipomod 34MDP.	61
Διάγραμμα 4. Απόδοση μετατροπής (%) της υδρόλυσης του μικροβιακού ελαίου με 1% Lipomod 34MDP σε συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης (h) για 24h.	61
Διάγραμμα 5. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ σε εστέρες, με την αλκοόλη TMP σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες με τα ένζυμα Lipomod 34MDP και Novozyme 435.	63
Διάγραμμα 6. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ σε εστέρες, με την αλκοόλη NPG σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες με τα ένζυμα Lipomod 34MDP και Novozyme 435.	64
Διάγραμμα 7. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ σε εστέρες με χρήση διαφορετικών αλκοολών και το ένζυμο Novozyme 435 σε διαφορετικές θερμοκρασίες.	67
Διάγραμμα 8. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ σε εστέρες με χρήση διαφορετικών αλκοολών και το ένζυμο Novozyme 435 με προσθήκη νερού σε διαφορετικές συγκεντρώσει.	69
Διάγραμμα 9. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ σε εστέρες με χρήση διαφορετικών αλκοολών και το ένζυμο Novozyme 435 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 0,1%, 1% και 4%.	70
Διάγραμμα 10. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου μικροβιακού ελαίου σε εστέρες, με την αλκοόλη TMP σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες με τα ένζυμα Lipomod 34MDP και Novozyme 435.	73
Διάγραμμα 11. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου μικροβιακού ελαίου σε εστέρες, με την αλκοόλη NPG σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες με τα ένζυμα Lipomod 34MDP και Novozyme 435.	74

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Σπατάλη τροφίμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση. (Πηγή: Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2023).....	14
Εικόνα 2. Ο καρπός του καφέ (Wintgens, 2004).	17
Εικόνα 3. Διαδικασία εκχύλισης ελαίου καφέ από στερεά απόβλητα (α), ενζυμικής υδρόλυσης (β) και εστεροποίησης με την αλκοόλη τριμεθυλοπροπάνιο (TMP) (γ) (Unugul et al., 2020).....	19
Εικόνα 4. Διαδοχικά βήματα που οδηγούν στη βιοσύνθεση των λιπιδίων de novo σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε συνθήκες περιορισμένου αζώτου συνθήκες (Papanikolaou & Aggelis, 2011a).	26
Εικόνα 5. Οδοί που επεριέχονται στη διάσπαση της γλυκερόλης από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. TAGs: τριακυλογλυκερόλες - 3-HPA: 3-υδροξυπροπιονάλδεϋδη - (α)-(γ) συστήματα μεταφοράς πυρουβικού οξέος από το κυτταρόλυμα στο μιτοχόνδριο και αντίστροφα- (δ) σύστημα μεταφοράς κιτρικού και μηλικού οξέος από το κυτταρόλυμα στο μιτοχόνδριο και αντίστροφα - ACL: ATP-κιτρική λυάση - FAS: συνθετάση των λιπαρών οξέων - ICDH: ισοκιτρική αφυδρογονάση - MDc: μηλική αφυδρογονάση (κυτταροπλασματική), MDm: μηλική αφυδρογονάση (μιτοχονδριακή) - ME: NADPH+-μηλικό ένζυμο - PD: πυρουβική αφυδρογονάση - CS: κιτρική συνθάση, ICL: ισο-κιτρική λυάση- GK: κινάση της γλυκερόλης- GDHt: αφυδρατάση της γλυκερόλης - GDH: αφυδρογονάση της γλυκερόλης - 3-P-GDH: 3-P-γλυκερόλη. DHAK: κινάση της δι-υδροξυακετόνης - PDOR: οξειδοαναγωγή της 1,3-προπανοδιόλης- FD: οξειδοαναγωγή της φερρεδοξίνης. Τα μονοπάτια περιγράφονται στο (Papanikolaou et al., 2008).	27
Εικόνα 6. Βιοδιύλιση παράπλευρων ρευμάτων της βιομηχανίας τροφίμων για την παραγωγή βιολογικά βασισμένων ελαιοχημικών ουσιών από μικροβιακό έλαιο (Papadaki et al., 2018).	28
Εικόνα 7. Σύνοψη διαφόρων οδών μέσω των οποίων τα λιπαρά οξέα μικροβιακού λίπους μετατρέπονται σε ανανεώσιμα προϊόντα και οι τελικές τους χρήσεις (Probst, 2016). ..	29
Εικόνα 8. Αντιδράσεις ορισμένων χημικών τροποποιήσεων των φυτικών ελαίων (α) μετεστεροποίηση (β) οστεοποίηση (γ) εποξείδωση (δ) υδρόλυση + εστεροποίηση (ε) υδρογόνωση (στ) κετονισμός (Kurre & Yadav, 2023).....	36
Εικόνα 9. Υδροεστεροποίηση: (A) υδρόλυση της τριακυλογλυκερόλης ακολουθούμενη από (B) εστεροποίηση των λιπαρών οξέων που απελευθερώνονται με μια αλκοόλη. Η	

διεργασία μπορεί να είναι καταλύεται από μία ή δύο διαφορετικές λιπάσες (Monteiro et al., 2023).	38
Εικόνα 10 Δομή αλκοόλης 2,2-Dimethylpropane-1,3-diol (NPG)	50
Εικόνα 11 Δομή αλκοόλης 2-ethyl-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol (TMP)	50
Εικόνα 12. Τελικό προϊόν εστεροποίησης (βιολιπαντικό) του ελαίου.καφέ.....	71

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

SCGs	Στερεά απόβλητα καφέ (Spent Coffee Grounds)
TAGs	Τριακυλογλυκερόλες
HPLC	High-performance liquid chromatography
GC	Gas chromatography
NADH	Νικοτάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο
FADH	Φλαβόινο αδένινο νουκλεοτίδιο (Flavin adenine dinucleotide)
NADPH	Φωσφορικό νικοτάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο
NAD⁺	Ισοκιτρική αφυδρογονάση
ATP	Τριφωσφορική αδενοσύνη (adenosine triphosphate)
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη (adenosine diphosphate)
AMP	Μονοφωσφορική αδενοσύνη (adenosine monophosphate)
TCA	Κύκλος τρικαρβοξυλικών οξέων
FAs	Λιπαρά οξέα
FFAs	Ελεύθερα λιπαρά οξέα
SCO	Single cell oil, μονοκυτταρικό έλαιο
TMP	Τριμεθυλοπροπάνιο
NPG	Νεοπεντυλογλυκόλη
PE	Πενταερυθριτόλη
Ακετυλο-Coa	Ακετυλοσυνένζυμο Α
FAMEs	Εστέρες ελεύθερων λιπαρών οξέων (Fatty Acid Methyl Esters)

1 Εισαγωγή

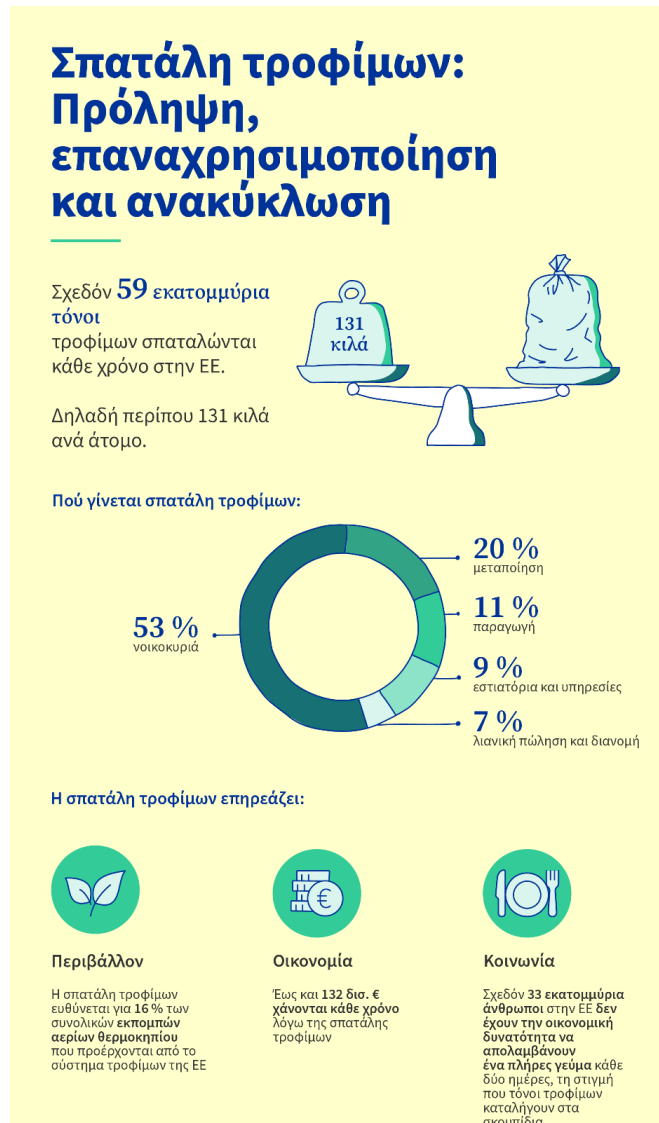
1.1 Η κυκλική οικονομία και η συμμετοχή των αποβλήτων τροφίμων

Ο ανεξέλεγκτος αυξανόμενος πληθυσμός του πλανήτη έχει επιφέρει μια αναπόφευκτη εκτίναξη των αναγκών για τροφή, ταυτόχρονα με μια σειρά φαινομένων παγκοσμίως. Αυτά περιλαμβάνουν τον διπλασιασμό της παγκόσμιας κατανάλωσης υλικών, την αύξηση της ζήτησης για καύσιμα, όπως και την αυξημένη ζήτηση προϊόντων καθημερινής χρήσης που παράγονται από την πετροχημική βιομηχανία. Συνεπώς, παρατηρείται συγχρόνως μια αύξηση της παραγωγής αποβλήτων ανά κεφαλή, η οποία συνοδεύεται από αυξημένες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου και ποικίλες άλλες σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Carorusso, Carece, and De Bari 2021). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) υπολογίζεται πως παράγονται ετησίως περισσότεροι από 2.2 δις τόνοι αποβλήτων, ποσότητα που προβλέπεται να αυξηθεί κατά 70% έως το 2050. Η διαχείριση των απορριμμάτων αντιπροσωπεύει περίπου το 3% των παγκόσμιων εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου (Clark and Deswarte 2008). Έτσι δημιουργείται η ανάγκη για αναθεώρηση της ευρωπαϊκής νομοθεσίας σχετικά με τη διαχείριση των αποβλήτων (European Parliament 2021, 2023).

Ως σπατάλη τροφίμων ορίζεται η τροφή που είναι κατάλληλη για κατανάλωση από τον άνθρωπο η οποία απορρίπτεται, είτε εάν κρατηθεί μετά την ημερομηνία λήξης της, είτε όχι, είτε εάν αφεθεί να αλλοιωθεί. Η απώλεια τροφίμων ορίζεται ως η μείωση της μάζας (ξηρά ουσία) ή της διατροφικής αξίας (ποιότητας) της τροφής, η οποία προοριζόταν εξ αρχής για ανθρώπινη κατανάλωση (HLPE 2014). Η σπατάλη και η απώλεια τροφίμων αποτελούν έννοιες οι οποίες απασχολούν την επιστημονική κοινότητα όλο και περισσότερο τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς περίπου το 1/3 των τροφίμων που παράγονται παγκοσμίως τα οποία προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση χάνεται ή σπαταλάται (Carorusso et al. 2021).

Η σπατάλη τροφίμων προκαλεί τεράστιες οικονομικές, κοινωνικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση παράγονται περίπου 59 εκατομμύρια τόνοι αποβλήτων τροφίμων κάθε χρόνο, με εκτιμώμενη ζημία ύψους 132 δισ. ευρώ. Το 10% περίπου των τροφίμων που φτάνουν στο λιανικό εμπόριο, εστιατόρια, υπηρεσίες εστίασης και νοικοκυριά καταλήγουν στα σκουπίδια. Παράλληλα, περίπου 32,6 εκατομμύρια άνθρωποι αντιμετωπίζουν οικονομικές δυσκολίες για ένα ποιοτικό γεύμα κάθε δεύτερη ημέρα (Εικόνα 1). Τα απόβλητα τροφίμων συνεισφέρουν σε

τεράστιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις, αντιστοιχώντας σε 252 εκατομμύρια τόνους ισοδυνάμου CO₂, περίπου 16% των συνολικών εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου στην ΕΕ. Αν τα απόβλητα τροφίμων ήταν κράτος μέλος, θα ήταν η πέμπτη σημαντικότερη πηγή εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου. Επιπλέον, η σπατάλη τροφίμων επιβαρύνει τους περιορισμένους φυσικούς πόρους, όπως η χρήση γης και νερού (European Commission 2023).



Εικόνα 1. Σπατάλη τροφίμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση. (Πηγή: Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2023)

Η πίεση που ασκείται στο περιβάλλον λόγω της απόρριψης αποβλήτων, σε συνδυασμό με τη διαρκή αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, επιβάλλει την επιταχυνόμενη ανάγκη για την ανάπτυξη πιο βιώσιμων συστημάτων παραγωγής και

χρήσης των πόρων (Zhang, Dhir, and Kaur 2022). Η κυρίαρχη ιδέα σήμερα είναι η αναδιοργάνωση του υφιστάμενου γραμμικού μοντέλου παραγωγής. Αυτό το τρέχον μοντέλο βασίζεται ουσιαστικά στην τριπλή δυναμική της "χρήσης, παραγωγής, απόρριψης," το οποίο πλέον δεν ανταποκρίνεται στις σύγχρονες ανάγκες. Η τάση είναι η αντικατάστασή του με ένα κυκλικό σύστημα βιοοικονομίας (Carorusso et al. 2021). Η κυκλική οικονομία αναδύεται ως το νέο πρότυπο σύστημα παραγωγής, επιδιώκοντας να αντικαταστήσει την έως τώρα υπάρχουσα γραμμική οικονομία. Βασίζεται στις αρχές της ανανέωσης των φυσικών συστημάτων και της συνεχούς χρήσης των προϊόντων, των προμηθειών και των υλικών, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τα απόβλητα και μειώνοντας τη μόλυνση του περιβάλλοντος (Zhang et al. 2022). Η επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση προϊόντων έχει τη δυνατότητα να ελαχιστοποιήσει τη χρήση φυσικών πόρων, να μειώσει τη διαταραχή των οικοσυστημάτων, και να περιορίσει την απώλεια της βιοποικιλότητας. Ταυτόχρονα, συνεισφέρει στη μείωση των ετήσιων εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου (European Parliament 2023).

Η μείωση των αποβλήτων τροφίμων είναι στενά συνδεδεμένη με τη μείωση της χρήσης πόρων που απαιτούνται για την παραγωγή τροφής. Μέσω της αποτελεσματικής διαχείρισης των πόρων θα μειωθούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις της παραγωγής και της κατανάλωσης τροφίμων. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει αντιμετωπίσει σοβαρά το ζήτημα των αποβλήτων τροφίμων, και η πρόληψη της δημιουργίας τους αποτελεί βασικό στοιχείο του νέου "Πακέτου Κυκλικής Οικονομίας" της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Το πακέτο αυτό περιλαμβάνει ένα σχέδιο δράσης για την Κυκλική Οικονομία στην ΕΕ και προβλέπει χρονοδιάγραμμα υλοποίησης των προτεινόμενων δράσεων, καθώς και σχετικές νομοθετικές προτάσεις για τα απόβλητα. Η ΕΕ και τα κράτη μέλη έχουν αναλάβει δεσμεύσεις για την επίτευξη των Στόχων Βιώσιμης Ανάπτυξης, περιλαμβανομένου του στόχου για τη μείωση κατά το ήμισυ της σπατάλης τροφίμων κατά κεφαλήν στο λιανικό εμπόριο και στο επίπεδο των καταναλωτών έως το 2030, καθώς και τη μείωση των απωλειών τροφίμων κατά την παραγωγή και την εφοδιαστική αλυσίδα (European Commission 2017).

1.2 Αξιοποίηση αποβλήτων καφέ

Σήμερα, λόγω της αύξησης του πληθυσμού, οι τρόποι παραγωγής και κατανάλωσης δημιουργούν τεράστιες ποσότητες αποβλήτων παγκοσμίως. Η

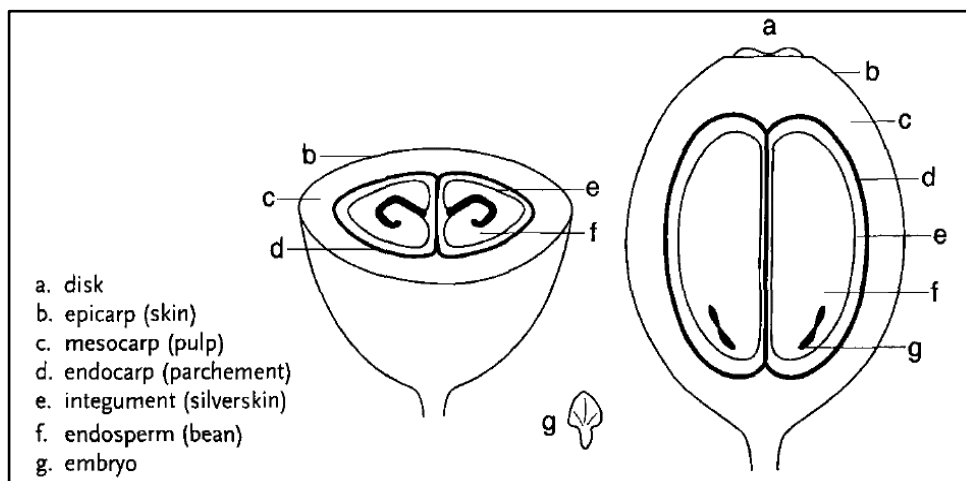
αποτελεσματική διαχείριση αυτών των υπολειμμάτων είναι ζωτικής σημασίας για την ελαχιστοποίηση των αρνητικών περιβαλλοντικών επιπτώσεων.

Ένα από τα πιο δημοφιλή και καταναλώσιμα ροφήματα παγκοσμίως είναι ο καφές (Birkenberg and Birner 2018). Καλλιεργείται σε περισσότερες από 70 χώρες και είναι το δεύτερο πιο εμπορεύσιμο προϊόν στον κόσμο μετά το πετρέλαιο. Αξίζει να σημειωθεί πως σχεδόν το 50% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής καφέ είναι επεξεργασμένος καφές ή διαλυτός στιγμιαίος καφές (Zuorro and Lavecchia 2012; Mussatto et al. 2011). Τα απόβλητα του καφέ (SCGs) αναφέρονται στα παραπροϊόντα που παράγονται κατά τη διαδικασία εφοδιασμού καφέ στην αλυσίδα τροφίμων. Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Καφέ, κατά την περίοδο 2020/2021, η παγκόσμια κατανάλωση καφέ έφθασε τους 167,2 εκατομμύρια σάκους των 60 κιλών. Αυτό υποδηλώνει αύξηση κατά 1,9% σε σχέση με την προηγούμενη περίοδο κατανάλωσης καφέ το 2019/2020, όπου η κατανάλωση ήταν 164,13 εκατομμύρια σάκους των 60 κιλών (International Coffee Organization 2021).

Η παραγωγή, επεξεργασία και χρήση του καφέ από το στάδιο του καρπού μέχρι το τελικό προϊόν που καταναλώνεται συνεπάγεται με τη συσσώρευση σημαντικών ποσοτήτων υποπροϊόντων και αποβλήτων του. Το σπερόδερμα του καφέ (coffee silverskin) και τα SCGs αποτελούν τα δύο κύρια απόβλητα που παράγονται από την βιομηχανία του καφέ (Bomfim et al. 2022). Το σπερόδερμα είναι το εξωτερικό δέρμα του καφέ που απομακρύνεται κατά την καβούρδιση των κόκκων (Εικόνα 2). Παρά την αρχική του χρήση ως απόβλητο, προσελκύει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές, όπως η παραγωγή βιοκαυσίμων, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών. Τα SCGs προέρχονται από την εκχύλιση των κόκκων του καφέ και αποτελούνται από υπολείμματα κόκκων (Titiri et al. 2023; Giannakis et al. 2023; Leow et al. 2021; Karmee 2018; Mussatto et al. 2011). Οι φρέσκοι κόκκοι καφέ, κατά την προετοιμασία ενός ροφήματος, έρχονται σε επαφή με ζεστό νερό ή ατμό υπό πίεση για την εκχύλιση των αρωματικών και άλλων επιθυμητών συστατικών. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στα απόβλητα καφέ (SCGs), τα οποία περιέχουν υψηλά ποσοστά υγρασίας (Obruca et al. 2015). Κατόπιν της εκχύλισης του καφέ, οι χρησιμοποιημένοι κόκκοι αποτελούν μια εξαιρετικά πολύτιμη πηγή σακχάρων, φυτικού ελαίου, αντιοξειδωτικών, και άλλων ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Συγκεκριμένα, τα SCGs περιλαμβάνουν κυρίως κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, περίπου 50% του ξηρού βάρους τους, ενώ η μαννόζη, η γαλακτόζη και η αραβινόζη αποτελούν τα τρία κύρια

συστατικά της ημικυτταρίνης. Η λιγνίνη και η πρωτεΐνη αποτελούν τα επόμενα συστατικά σε υψηλό ποσοστό, περίπου 20%, με το φυτικό έλαιο να ακολουθεί (McNutt and He 2019). Ένας μέσος όρος 0,65 kg αποξηραμένων υπολειμμάτων καφέ παράγονται από 1 kg πράσινου κόκκου καφέ (Κοοκος 2018) και περίπου 2 kg SCGs λαμβάνονται ως απόβλητα στην αλυσίδα εφοδιασμού καφέ από 1 kg διαλυτού καφέ (Battista et al. 2020). Όσον αφορά στην Ελλάδα, είναι η 12^η χώρα παγκοσμίως στην κατανάλωση του καφέ με 5,5 kg ανά άτομο (Uddin et al. 2019).

Η παρουσία σημαντικών ποσοτήτων ουσιών με δυνητική προστιθέμενη αξία στα απόβλητα του καφέ, καθώς και η ανάγκη αποτελεσματικής διαχείρισης αυτών των αποβλήτων, έχουν γίνει αντικείμενο αρκετών μελετών τα τελευταία χρόνια.



Εικόνα 2. Ο καρπός του καφέ (Wintgens, 2004).

1.2.1 Εφαρμογές προϊόντων προστιθέμενης αξίας αποβλήτων καφέ

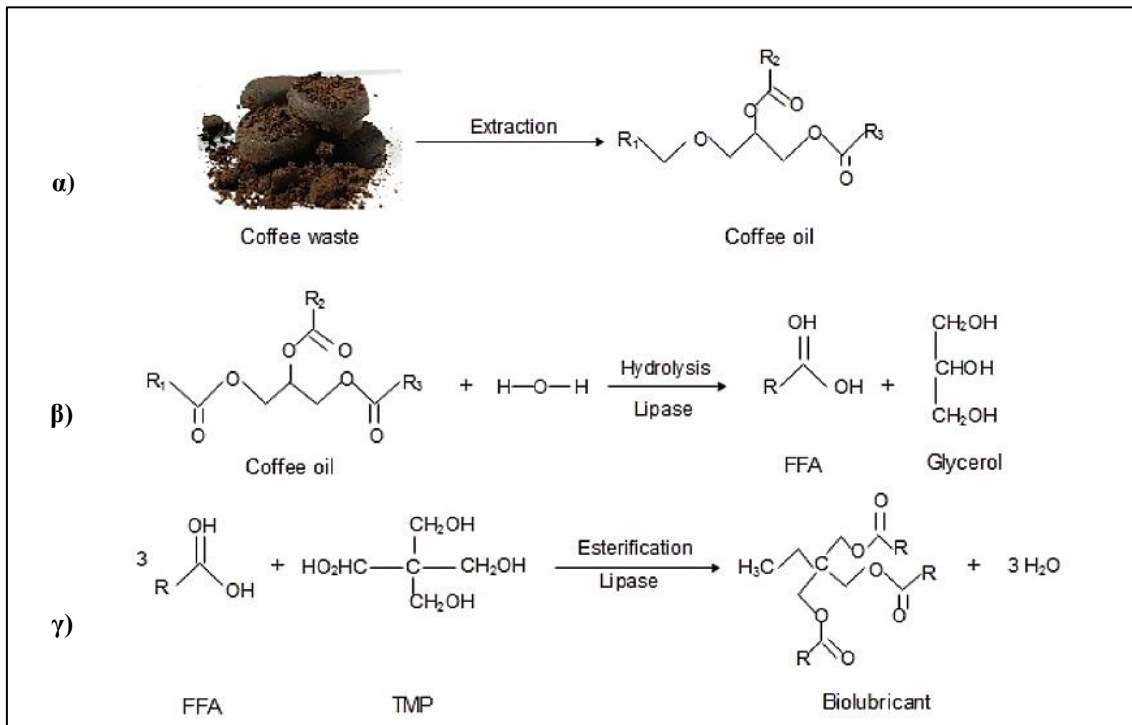
Λόγω της αυξημένης οικονομικής δραστηριότητας που απαιτείται για την ικανοποίηση των σύγχρονων ανθρώπινων αναγκών, η αξιοποίηση των αποβλήτων τροφίμων για την παραγωγή βιοκαυσίμων, βιοχημικών προϊόντων και βιοπολυμερών αποκτά εξαιρετική σημασία. Ιδιαίτερα, η διαχείριση των στερεών αποβλήτων καφέ αντιμετωπίζει περιβαλλοντικά προβλήματα, καθώς περιλαμβάνει υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών συστατικών. Ορισμένα από αυτά, όπως η καφεΐνη, οι ταννίνες και οι πολυφαινόλες, αποδεικνύονται τοξικά για το περιβάλλον. Ως εκ τούτου, η εναπόθεση των αποβλήτων καφέ σε χωματερές είναι όχι μόνο αναποτελεσματική από οικονομική άποψη, αλλά και ανεπιθύμητη από περιβαλλοντικής πλευράς. Επομένως, η αποτελεσματική αξιοποίηση τους έχει καταστεί αναγκαία τα τελευταία χρόνια.

Τα απόβλητα του καφέ περιλαμβάνουν φαινολικές ενώσεις (Ioannidou et al. 2020), οι οποίες διαθέτουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Αυτές οι ιδιότητες ανοίγουν τον δρόμο για μια ευρεία γκάμα πιθανών εφαρμογών στη βιομηχανία φαρμάκων και υγειονομικής περίθαλψης. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται στην παραγωγή καλλυντικών, λειτουργικών τροφίμων, καθώς και προσθέτων προστιθέμενης αξίας στη βιομηχανία τροφίμων (Karmee 2018). Παράλληλα, τα εκχυλίσματα φαινολικών ενώσεων από τα απόβλητα του καφέ έχουν επιδείξει αντικαρκινικές και αντιαλλεργικές ιδιότητες, οι οποίες συνδέονται με την παρουσία του χλωρογενικού οξέος (Panusa et al. 2013).

Τα απόβλητα του καφέ είναι πλούσια σε λιπίδια (10-20%), τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοντίζελ και ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή βιοπολυμερών (Ioannidou et al. 2020; Obruca et al. 2015). Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα που προσδιορίζονται στο φυτικό έλαιο του καφέ είναι το λινελαϊκό οξύ ($^{Δ9,12}C18:2$), το παλμιτικό οξύ ($C16:0$), το ελαϊκό οξύ ($^{Δ9}C18:1$), το στεατικό ($C18:0$) και το λινολενικό ($^{Δ9,12,15}C18:3$) (Giannakis et al. 2023; Oliveira et al. 2005; Phimsen et al. 2016). Ο Kookos (2018) διερεύνησε την τεχνοοικονομική και περιβαλλοντική εκμετάλλευση των στερεών αποβλήτων καφέ για την παραγωγή βιοντίζελ, χρησιμοποιώντας το φυτικό έλαιο του καφέ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαδικασία ήταν δύσκολα οικονομικά βιώσιμη, ακόμη και σε χώρες με μεγάλο πληθυσμό και ισχυρή οικονομία. Στη μελέτη περιλαμβανόταν η παραγωγή γλυκερόλης ως το κύριο παραπροϊόν της διαδικασίας, καθώς και η εκμετάλλευση των εναπομεινάντων κόκκων καφέ χωρίς λάδι για την παραγωγή ενέργειας μέσω καύσης.

Η αξιοποίηση των SCGs ως πηγής λιπιδίων στη βιομηχανία καυσίμων και λιπαντικών σε σύγκριση με τη χρήση συμβατικών πρώτων υλών όπως η σόγια και η ελαιοκράμβη συνεισφέρει στη μείωση του ανταγωνισμού του συγκεκριμένου βιομηχανικού τομέα με τους διατροφικούς πόρους και τη βιομηχανία τροφίμων (Vardon et al. 2013). Έτσι υπολογίζεται πως η χρήση αυτού του ελαίου για την παραγωγή βιοκαυσίμου θα μπορούσε να οδηγήσει στην παραγωγή περίπου 0,9 εκατομμυρίων τόνων βιοκαυσίμων (Phimsen et al. 2016). Επιπλέον, το φυτικό έλαιο του καφέ έχει χρησιμοποιηθεί σε δερματολογικά σκευάσματα (Marto et al. 2016) και ως υπόστρωμα για την παραγωγή πολύ (υδροξυαλκανοϊκών) εστέρων (PHAs) ως πηγή άνθρακα (Kovalcik et al. 2018; Obruca et al. 2015). Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται η πειραματική διαδικασία εκχύλισης ελαίου καφέ από αποξηραμένα στερεά απόβλητα,

χρησιμοποιώντας εξάνιο ως διαλύτη. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε είτε με τη συμβατική πειραματική μέθοδο, είτε με τη μέθοδο Soxhlet. Στη συνέχεια, παρουσιάζεται η ενζυμική υδρόλυση του ελαίου καφέ, με χρήση λιπάσης για την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων και γλυκερόλης. Τέλος, παρουσιάζεται η ενζυμική εστεροποίηση, κατά την οποία τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που παρήχθησαν από την υδρόλυση αντιδρούν με την αλκοόλη τριμεθυλοπροπάνιο (TMP) για την παραγωγή εστέρων βιολιπαντικών.



Εικόνα 3. Διαδικασία εκχύλισης ελαίου καφέ από στερεά απόβλητα (α), ενζυμικής υδρόλυσης (β) και εστεροποίησης με την αλκοόλη τριμεθυλοπροπάνιο (TMP) (γ) (Unugul et al., 2020).

Η υψηλή περιεκτικότητα των αποβλήτων καφέ σε υδατάνθρακες, ειδικότερα σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, καθώς και σε λιγνίνη, τα καθιστά ιδανικά για την παραγωγή υδρολυμάτων πλούσιων σε σάκχαρα. Η προεπεξεργασία των SCGs με αραιό οξύ, όπως περιγράφηκε από τους Hudeckova et al. (2018) και η επακόλουθη ενζυμική υδρόλυση, οδηγούν στην παραγωγή υδρολύματος με συνολική περιεκτικότητα 38,3 g/L σε σάκχαρα. Οι μέθοδοι προεπεξεργασίας και υδρόλυσης αποδεικνύονται ζωτικές για την απελευθέρωση και αξιοποίηση των υδατανθράκων που περιέχονται στα απόβλητα του καφέ. Αυτές οι διαδικασίες επιτρέπουν την παραγωγή διάφορων προϊόντων, όπως

σάκχαρα, βιοκαύσιμα ή άλλες χημικές ενώσεις, αξιοποιώντας αποτελεσματικά τα υπολείμματα αυτά.

Τα υδρολύματα από τα SCGs έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς για την παραγωγή ποικίλων προϊόντων ζύμωσης, συμπεριλαμβανομένων μικροβιακών ελαίων, βιοαιθανόλης, γαλακτικού οξέος και PHAs (Mavria et al. 2022; Hudeckova et al. 2018; Burniol-Figols et al. 2016). Η μελέτη των Mavria et al. (2022) εξέτασε την παραγωγή μικροβιακού ελαίου πλούσιου σε καροτενοειδή από μικροβιακό έλαιο που παρήχθη με τη χρήση υδρολύματος SCGs, χρησιμοποιώντας τον μικροοργανισμό *Rhodospiridium toruloides* σε κωνικές φιάλες. Σε παρόμοια κατεύθυνση, οι Hudeckova et al. (2018) εφάρμοσαν ζύμωση με το *Lactobacillus rhamnosus* σε υδρόλυμα SCGs, παράγοντας 25,7 g/L γαλακτικού οξέος με υψηλή απόδοση μετατροπής 0,98 g γαλακτικού οξέος ανά g καταναλωθέντων σακχάρων. Επιπλέον, το βακτηριακό στέλεχος *Burkholderia cepacia* αποδείχτηκε αποτελεσματικό για την παραγωγή PHB, χρησιμοποιώντας υδρόλυμα SCGs που προέκυψε μετά από επεξεργασία με θειικό οξύ και ενζυμική υδρόλυση (Obruca et al. 2014).

Το στερεό απόβλητο του καφέ, αποτελώντας εξαιρετική πηγή πολύτιμων συστατικών, ανοίγει τον δρόμο για τη δημιουργία ενός καινοτόμου βιοδυλιστηρίου. Μέσω αυτού, μπορούν να γίνει διαχωρισμός και αποτελεσματική εκμετάλλευση των υψηλών προστιθέμενης αξίας συστατικών που περιέχονται στο στερεό απόβλητο. Η διαδικασία εκχύλισης και διαχείρισης των αποβλήτων καφέ γίνεται σήμερα πρόκληση και ευκαιρία, ειδικά όταν αξιοποιούνται για την παραγωγή προϊόντων που μπορούν να συμβάλουν στη βιώσιμη ανάπτυξη. Η εκχύλιση φυτικών ελαίων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων και βιολιπαντικών. Το υδρόλυμα που προκύπτει από τα απόβλητα του καφέ μπορεί να αξιοποιηθεί για τη ζύμωση, παράγοντας προϊόντα όπως μικροβιακά έλαια, βιοαιθανόλη, γαλακτικό οξύ, και PHB. Συνοπτικά, η εξειδικευμένη διαχείριση των αποβλήτων καφέ δεν αποτελεί μόνο πράξη κατά της περιβαλλοντικής ρύπανσης, αλλά επίσης μια πηγή καινοτομίας και οικονομικής ανάπτυξης.

1.3 Το μικροβιακό έλαιο

Παρά το γεγονός ότι η ικανότητα των μικροοργανισμών να παράγουν έλαια έχει παρατηρηθεί για περίπου 150 χρόνια, μέχρι πρότινος αμφισβητούνταν η οικονομική τους ανταγωνιστικότητα σε σύγκριση με τα φυτικά έλαια (Caporusso et al. 2021). Τα

τελευταία χρόνια όμως, παράλληλα με την ανάπτυξη της κυκλικής βιοοικονομίας, παρατηρείται ταυτόχρονα και αυξημένο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των ελαιογόνων μικροοργανισμών. Αυτοί αποτελούν μια ενδιαφέρουσα επιλογή για τη δημιουργία προϊόντων από διάφορες πηγές άνθρακα, εισάγοντας παράλληλα νέες προοπτικές στον τομέα της κυκλικής βιοοικονομίας.

Το μικροβιακό έλαιο, γνωστό και ως μονοκυτταρικό έλαιο (Single Cell Oil-SCO), αναφέρεται σε έναν δευτερογενή μεταβολίτη, η παραγωγή του οποίου είναι δυνατό να επιτευχθεί από μια πληθώρα μικροοργανισμών, όπως μικροφύκη και ζυμομύκητες (π.χ. *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium*, *Candida*, *Rhodotoroula*, *Rhizopus*, *Trichosporon*, *Yarrowia*), και μύκητες (π.χ. *Mortierella*, *Cunninghamella*) (Athenaki et al. 2018; Koutinas et al. 2014; Papanikolaou and Aggelis 2011a, 2011b). Οι ζυμομύκητες ανήκουν στην κατηγορία των μονοκύτταρων μικροοργανισμών. Μεταξύ των ποικίλων ειδών ζυμομυκήτων, ένα μικρό ποσοστό ανήκει στην κατηγορία αυτών που έχουν τη δυνατότητα να παράγουν λίπος ενδοκυτταρικά. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί ονομάζονται ελαιογόνοι και δύναται να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% (w/w) επί του ξηρού τους βάρους (Ageitos et al. 2011) και μπορούν να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικά λιπίδια έως και 70% επί του ξηρού βάρους της βιομάζας τους (Πίνακας 1) (Kitcha et al., 2011). Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των ελαιογόνων ζυμών είναι η αποθήκευση του μεγαλύτερου ποσοστού των λιπιδίων τους με την μορφή τριακυλογλυκερολών –TAGs (σε ποσοστό 90%). Τα εν λόγω λιπίδια είναι γνωστά ως μονοκυτταρικά έλαια (SCO-Single Cell Oil). Οι τριακυλογλυκερόλες γνωστές ως αποθηκευτικά λιπίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ, καθώς τα λιπαρά οξέα που τα αποτελούν (κυρίως C16:0 και C18:0 λιπαρά οξέα) είναι συναφή με εκείνα των φυτικών ελαίων (Giannakis et al. 2023).

Οι ελαιογόνες ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν με σχετικά γρήγορους ρυθμούς, έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε υποστρώματα με διαφορετικές πηγές άνθρακα και να παράγουν υψηλές ποσότητες βιομάζας και λίπους και, το κυριότερο, δεν ανταγωνίζονται την παραγωγή των τροφίμων. Ειδικότερα λόγω της αυξημένης ζήτησης καυσίμων που παράγονται από πρώτες ύλες φυτικής προέλευσης, δημιουργείται πρόβλημα με τις γεωργικές εκτάσεις και τροφοδοτείται το θέμα της επισιτιστικής ανασφάλειας, έτσι η έρευνα έχει πλέον μετατοπιστεί προς τις λεγόμενες «πρώτες ύλες τρίτης γενιάς» (Sreeharsha, Dubey, and Mohan 2023), όπου παράγονται τα λεγόμενα

“καύσιμα τρίτης γενιάς”, τα οποία αποτελούν λύση για την συνεχώς αυξανόμενη τιμή του πετρελαίου.

Το κόστος παραγωγής των μικροβιακών ελαίων μπορεί να μειωθεί χρησιμοποιώντας χαμηλού κόστους πηγές άνθρακα (Caporusso et al. 2021). Μια μεγάλη ποικιλία πρώτων υλών μηδενικού ή ακόμη και αρνητικού κόστους έχει εξεταστεί και έχει χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για τη βιώσιμη παραγωγή μικροβιακών ελαίων. Η έρευνα σχετικά με τη χρήση αυτών των πρώτων υλών έχει επικεντρωθεί κυρίως στην ακατέργαστη γλυκερίνη, στα υγρά απόβλητα ή στα παραπροϊόντα που προέρχονται από την επεξεργασία των τροφίμων (π.χ. τυρόγαλα, κλάσματα μελάσσας, στερεά απόβλητα ζάχαρης και ψωμιού, ληγμένοι χυμοί, απόβλητα ελαιοτριβείων, απόβλητα ζαχαροπλαστικής κ.λπ.), απόβλητα αγροβιομηχανικών και αγροχημικών διεργασιών, λιγνοκυτταρινικά υποστρώματα κλπ. (Athenaki et al. 2018; Koutinas et al. 2014).

Τα μικροβιακά έλαια θεωρούνται ίσως τα πιο κυρίαρχα για την αντικατάσταση των ορυκτών ελαίων με στόχο την παραγωγή βιοκαυσίμων και βιολιπαντικών λόγω του ότι παρουσιάζουν τις περισσότερες ομοιότητες ως προς τα φυτικά έλαια (Patel et al. 2020). Το προφίλ των λιπαρών οξέων των μικροβιακών ελαίων είναι παρεμφερές αυτού των φυτικών ελαίων, με αποτέλεσμα να είναι ενδιαφέρουσες εναλλακτικές για αντικατάσταση των δεύτερων. Τα λιπαρά οξέα που παράγονται από ελαιογόνες ζύμες περιλαμβάνουν το παλμιτικό οξύ (C16:0), το παλμιτολεϊκό οξύ (C16:1), το στεαρικό οξύ (C18:0), το ελαϊκό οξύ (C18:1) και το λινολεϊκό οξύ (C18:2). Επιπλέον, παρατηρούνται και σε μικρότερες ποσότητες το μυρηστικό οξύ (C14:0) και το λινολενικό οξύ (C18:3) (Caporusso et al. 2021; Papadaki, Fernandes, Chatzifragkou, Aguiéiras, Da Silva, et al. 2018).

Οι Giannakis et al. (2023) ανέπτυξαν με επιτυχία ένα καινοτόμο βιοδιυλιστήριο, χρησιμοποιώντας υπολείμματα καφέ (SCGs) και υπολείμματα φλούδας πορτοκαλιού (OPR) για την παραγωγή μικροβιακού ελαίου και προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Η παραγωγή μικροβιακού ελαίου πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδρατήρα χωρητικότητας 30 L, χρησιμοποιώντας υδρόλυμα OPR-SCGs, με αποτέλεσμα η συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων να φτάνει σε ποσοστό έως 56,7% επί του ξηρού βάρους της βιομάζας. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ομοιότητας του μικροβιακού ελαίου που παράχθηκε σε αυτή τη μελέτη με αντίστοιχες μελέτες, ενώ εκτιμήθηκαν οι ιδιότητες του βιοντίζελ με χρήση προβλεπτικών εξισώσεων, αποδεικνύοντας γενικά τη συμμόρφωσή τους προς τα όρια που καθορίζονται από τα Ευρωπαϊκά πρότυπα.

Επιπρόσθετα, οι Papadaki et al. (2018) ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν τη βιοδιεργασία για την παρασκευή βιολιπαντικών με βάση το μικροβιακό έλαιο που παράγεται από ρεύματα αποβλήτων επεξεργασίας τροφίμων. Τα μικροβιακά έλαια που παρήχθησαν από τις ζύμες *C. curvatus* και *R. toruloides* παρουσίαζαν προφίλ χαμηλών ακόρεστων λιπαρών οξέων και επιλέχθηκαν για τη μετέπειτα σύνθεση εστέρων. Πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση του μικροβιακού ελαίου η οποία απέδωσε ελεύθερα λιπαρά οξέα, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις εστεροποίησης μεταξύ του υδρολυμένου μικροβιακού ελαίου και δύο πολυολών, της νεοπεντυλογλυκόλης (NPG) και του τριμεθυλοπροπανίου (TMP). Οι εστεροποιήσεις παρουσίασαν υψηλές αποδόσεις μετατροπής (>80%) (Papadaki, Fernandes, Chatzifragkou, Aguiéiras, Da Silva, et al. 2018).

Τον τελευταίο καιρό, το ενδιαφέρον της επιστημονικής και βιομηχανικής κοινότητας έχει επικεντρωθεί στη δυνατότητα αξιοποίησης του μικροβιακού ελαίου για την παραγωγή ελαιοχημικών και καυσίμων. Ανάμεσα στα προϊόντα που μπορούν να παραχθούν συγκαταλέγονται τα βιοκαύσιμα, οι εστέρες κηρών, τα βιολιπαντικά, καθώς και προϊόντα όπως σαπούνια, πλαστικά, μογιές, απορρυπαντικά, λάστιχα, πρόσθετα σε τρόφιμα, καλλυντικά και άλλα (Caporusso et al. 2021; Patel et al. 2020; Papadaki, Fernandes, Chatzifragkou, Aguiéiras, Da Silva, et al. 2018).

Μικροοργανισμοί	Περιεκτικότητα σε λίπος (% ξηρού βάρους)
Μικροφύκη	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-23
Βακτήρια	
<i>Arthrobacter</i> sp.	>40
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24
Ζύμες	
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Μύκητες	
<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Mortierella vinacea</i>	66

Πίνακας 1 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και περιεκτικότητα σε λίπος (Πηγή: (Muniraj et al. 2015)).

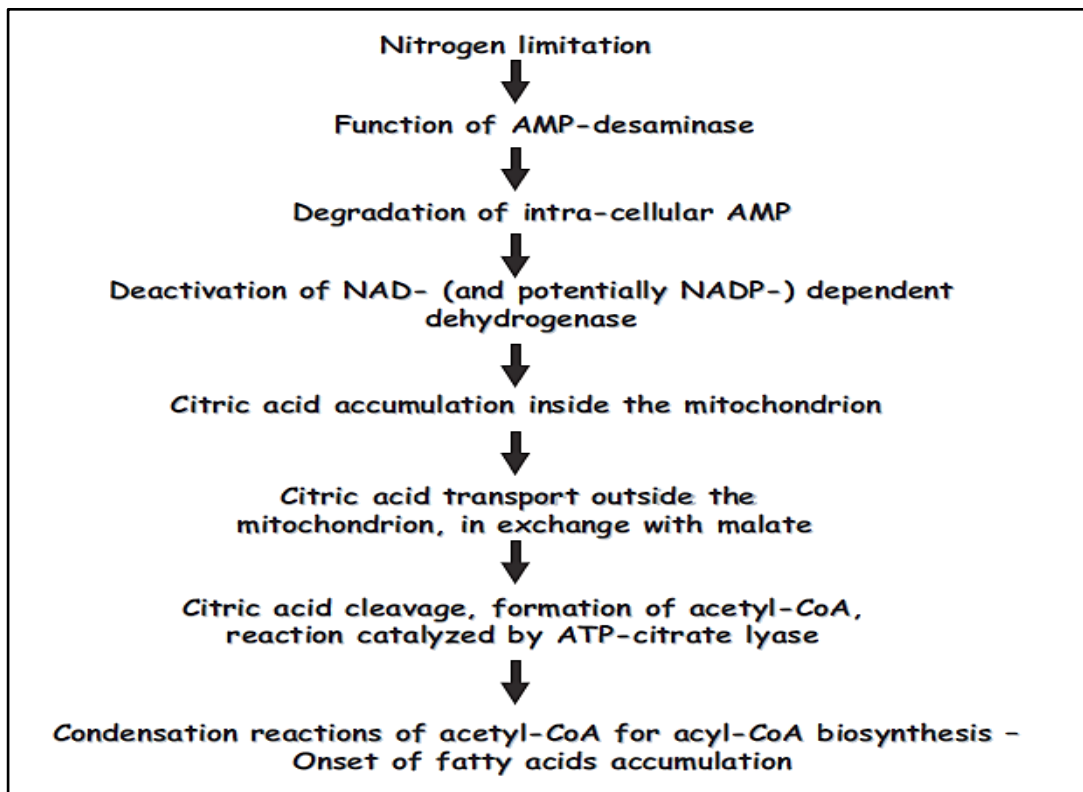
1.3.1 Παραγωγή μικροβιακού ελαίου

Οι ζύμες έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε διάφορες πηγές άνθρακα και να παράγουν κυτταρική βιομάζα και λιπίδια. Οι πηγές αυτές μπορεί να είναι η γλυκόζη, η ξυλόζη, η γλυκερόλη, το άμυλο, διάφορα υδρολύματα κυτταρίνης, ή και βιομηχανικά και αστικά οργανικά απόβλητα (Thevenieau and Nicaud 2013). Σε όλες τις περιπτώσεις,

η κυριότερη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί συσσώρευση λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι η ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης διαφόρων μεταβολιτών εκτός του άνθρακα, η οποία πραγματοποιείται μέσω της εξάντλησης ορισμένων θρεπτικών συστατικών στο μέσο καλλιέργειας. Συχνότερα η συσσώρευση λιπιδίων από σάκχαρα γίνεται υπό συνθήκες περιορισμού του αζώτου ή ορισμένες φορές και άλλων θρεπτικών συστατικών στο θρεπτικό μέσο και παρουσία περίσσειας άνθρακα. Οι συνθήκες αυτές οδηγούν στην ταχεία μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και την σταδιακή μείωση του ρυθμού αφομοίωσης του άνθρακα, οπότε ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών στρέφεται προς την παραγωγή λιπιδίων, διαδικασία η οποία ονομάζεται "de novo" συσσώρευση λιπιδίων (Koutinas et al. 2014; Papanikolaou and Aggelis 2011a).

Όταν εξαντλείται ένα βασικό θρεπτικό συστατικό από το ενδοκυτταρικό περιβάλλον, συνήθως το άζωτο, η περίσσεια του υποστρώματος άνθρακα συνεχίζει να αφομοιώνεται και να μετατρέπεται σε αποθησαυριστικά λιπίδια. Τελικά όμως τα κύτταρα σταματούν να πολλαπλασιάζονται, καθώς το άζωτο το οποίο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, είναι σε έλλειψη και ο μεταβολισμός στρέφεται απευθείας στη σύνθεση λιπιδίων με αποτέλεσμα τη δημιουργία τριακυλογλυκερολών (TAGs) στο εσωτερικό των κυττάρων με μορφή διακριτών σταγονιδίων ελαίου (Thevenieau and Nicaud 2013; Ratledge 2004). Σε οργανισμούς που λειτουργούν με αυτόν τον τρόπο, όπως οι ζύμες, ο ρυθμός ανάπτυξης είναι πιθανώς συχνά χαμηλότερος από τον εγγενή ρυθμό βιοσύνθεσης λιπιδίων (Thevenieau and Nicaud 2013). Ο ενδιάμεσος κυτταρικός μεταβολισμός των ελαιογόνων μικροοργανισμών στους οποίους η συσσώρευση λιπιδίων πραγματοποιείται λόγω της εξάντλησης του αζώτου από το υπόστρωμα της καλλιέργειας, παρουσιάζεται στην Εικόνα 4 (Papanikolaou and Aggelis 2011a). Υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί παράγουν μεγάλες ποσότητες ενδιάμεσων προϊόντων του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) ή αλλιώς του κύκλου του Krebs, όπως το κιτρικό οξύ και το ισοκιτρικό οξύ, τα οποία δεν καταβολίζονται περαιτέρω μέσω του κύκλου TCA. Στην πραγματικότητα, η εξάντληση του αζώτου οδηγεί σε ταχεία μείωση της συγκέντρωσης της ενδοκυτταρικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP), η οποία διασπάται περαιτέρω προκειμένου να προσφερθεί άζωτο στον μικροοργανισμό. Η μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της AMP

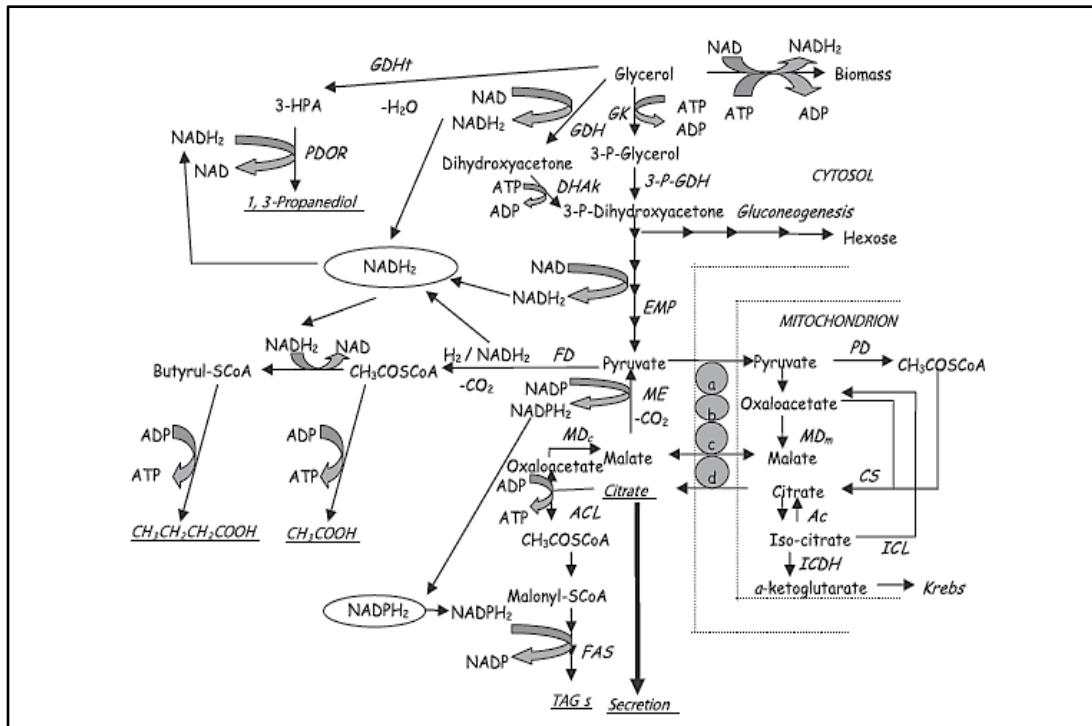
μεταβάλλει τη λειτουργία του κύκλου TCA (Koutinas et al. 2014; Papanikolaou and Aggelis 2011a).



Εικόνα 4. Διαδοχικά βήματα που οδηγούν στη βιοσύνθεση των λιπιδίων de novo σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε συνθήκες περιορισμένου αζώτου συνθήκες (Papanikolaou &

Η ισοκιτρική αφυδρογονάση (NAD^+) και σε διάφορες περιπτώσεις NADP^+ , είναι το ένζυμο που ευθύνεται για τη μετατροπή του ισοκιτρικού σε α-κετογλουταρικό οξύ. Χάνει τη δραστηριότητά της, καθώς ενεργοποιείται αλλοστερικά από το ενδοκυττάριο AMP με αποτέλεσμα την κατεύθυνση του μεταβολισμού προς τη συσσώρευση κιτρικού οξέος εσωτερικά του μιτοχονδρίου. Όταν η ενδομιτοχονδριακή συγκέντρωση κιτρικού οξέος φτάσει σε μια κρίσιμη τιμή, τότε αυτό εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα σε ανταλλαγή με το μηλικό (Koutinas et al. 2014; Papanikolaou and Aggelis 2011a).

Στο κυτταρόπλασμα το κιτρικό οξύ διασπάται από την ATP-κιτρική λυάση, ένα πολύ σημαντικό ένζυμο κλειδί της διαδικασίας συσσώρευσης λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, σε ακετυλοσυνένζυμο Α (ακετυλο-CoA) και οξαλοξικό οξύ. Τέλος το ακετυλο-CoA, μέσω μιας αντίστροφης διαδικασίας β-οξείδωσης, παράγει κυτταρικά λιπαρά οξέα και στη συνέχεια τριγλυκερίδια (Koutinas et al. 2014; Papanikolaou and Aggelis 2011a). Μια σχηματική αναπαράσταση του πρότυπου

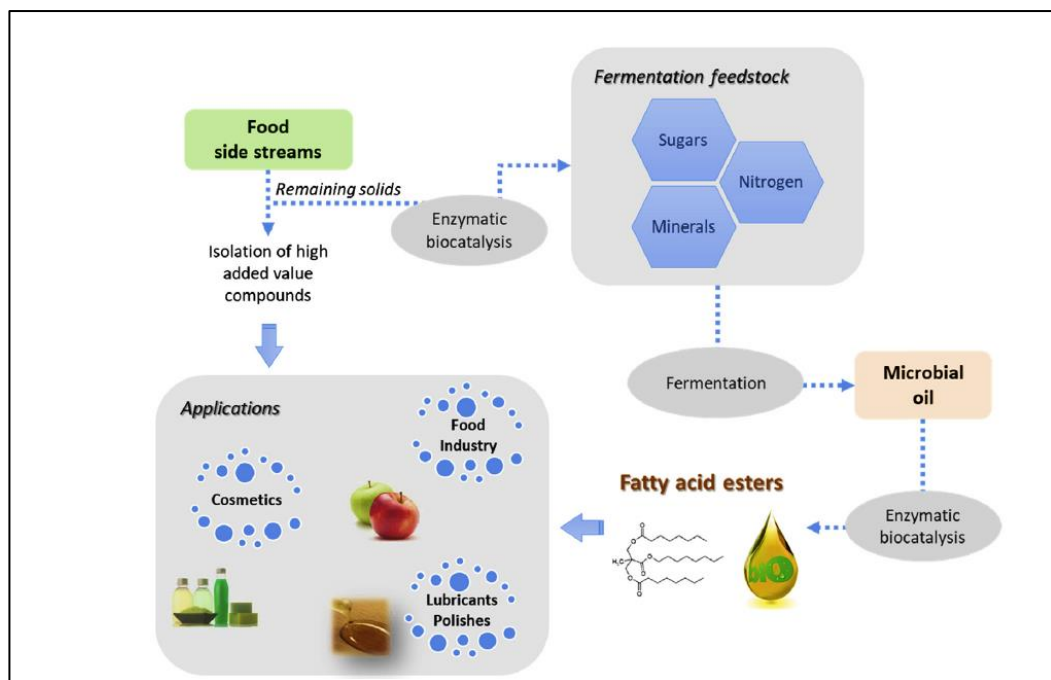


Εικόνα 5. Οδοί που επεριέχονται στη διάσπαση της γλυκερόλης από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. TAGs: τριακυλογλυκερόλες - 3-HPA: 3-υδροξυπροπιονάλδεϋδη - (α)-(γ) συστήματα μεταφοράς πυρουβικού οξέος από το κυτταρόλυμα στο μιτοχόνδριο και αντίστροφα- (δ) σύστημα μεταφοράς κιτρικού και μηλικού οξέος από το κυτταρόλυμα στο μιτοχόνδριο και αντίστροφα - ACL: ATP-κιτρική λιάση - FAS: συνθετάση των λιπαρών οξέων - ICDH: ισοκιτρική αφυδρογονάση - MDc: μηλική αφυδρογονάση (κυτταροπλασματική), MDm: μηλική αφυδρογονάση (μιτοχονδριακή) - ME: NADPH+-μηλικό ένζυμο - PD: πυρουβική αφυδρογονάση - CS: κιτρική συνθάση, ICL: ισο-κιτρική λιάση- GK: κινάση της γλυκερόλης- GDHt: αφυδρατάση της γλυκερόλης - GDH: αφυδρογονάση της γλυκερόλης - 3-P-GDH: 3-P-γλυκερόλη. ενδιάμεσου μεταβολισμού και της βιοσύνθεσης των λιπιδίων de novo παρουσιάζεται στην Εικόνα 5 (Papanikolaou et al. 2008).

1.3.2 Εφαρμογές μικροβιακού ελαίου

Τα ελαιοχημικά προϊόντα αποτελούν ουσιαστικά χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή προϊόντων προσωπικής φροντίδας, βιοπλαστικών, λιπαντικών, βιοκαυσίμων και άλλων. Κατά κύριο λόγο, παράγονται από φυτικά έλαια, τα τελευταία χρόνια όμως η επικείμενη μετάβαση προς πιο βιώσιμες πρακτικές έχει καταστήσει τη μελέτη των μικροβιακών λιπιδίων πρωτεύουσας σημασίας ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων και ελαιοχημικών. Παρόλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί ότι η έρευνα σε αυτόν τον τομέα βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο. Η

διαρκής ανάπτυξη των τεχνολογιών και η συνεχής έρευνα συμβάλλουν στην εξέλιξη της κατανόησής μας για τις δυνατότητες και τα οφέλη που προσφέρουν τα μικροβιακά λιπίδια ως πρώτη ύλη. Αυτή η πρόοδος αποτελεί σημαντικό βήμα προς την ανάπτυξη βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον επιλογών στον τομέα των ελαιοχημικών προϊόντων (Papadaki, 2018; Probst et al., 2016). Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται η ενζυμική παραγωγή ελαιοχημικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως εστέρες κηρών και βιολιπαντικά, χρησιμοποιώντας το μικροβιακό έλαιο ως πρώτη ύλη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αξιοποίησης διαφόρων δευτερευόντων ροών της βιομηχανίας τροφίμων (Papadaki, 2018).



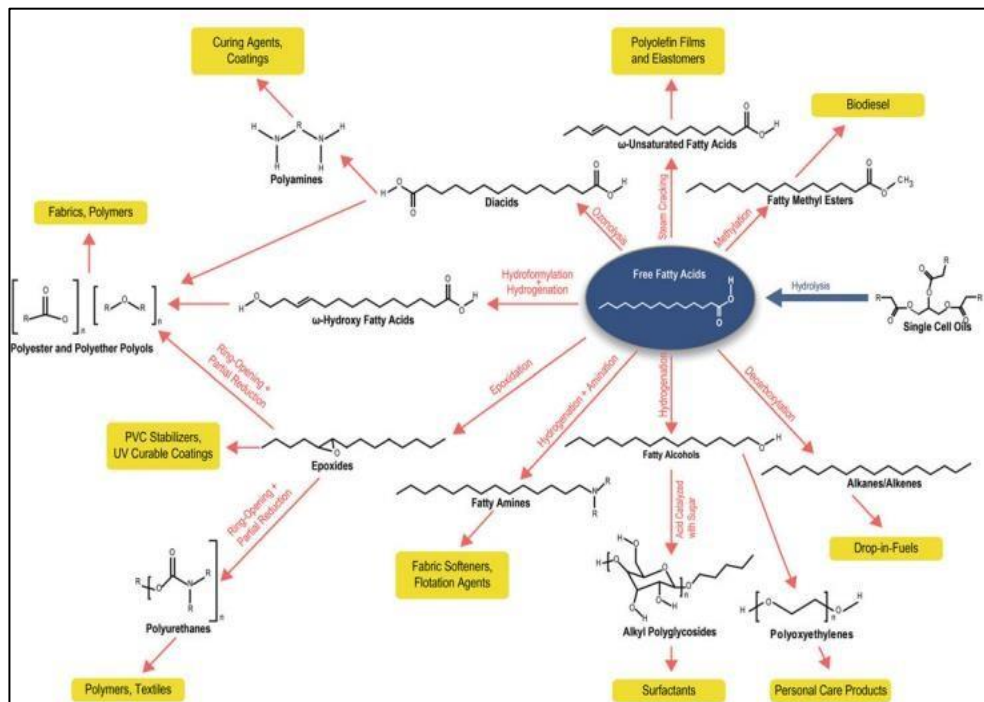
Εικόνα 6. Βιοδιύλιση παράπλευρων ρευμάτων της βιομηχανίας τροφίμων για την παραγωγή βιολογικά βασισμένων ελαιοχημικών ουσιών από μικροβιακό έλαιο (Papadaki et al., 2018).

Οι Ma et al. (2021) πραγματοποίησαν εστεροποίηση για την παραγωγή βιολιπαντικών, χρησιμοποιώντας μικροβιακό έλαιο από τη ζύμη *Rhodotorula glutinis* και την αλκοόλη TMP. Η απόδοση σε τριεστέρα έφτασε έως και 89%, ενώ παρουσιάστηκε ικανοποιητική απόδοση λίπανσης σε χαμηλές θερμοκρασίες (Ma et al. 2021). Οι Papadaki et al. (2018) παρουσίασαν μια αποτελεσματική ενζυμική διαδικασία σύνθεσης εστέρων βιολιπαντικών από μικροβιακά έλαια των *C. curvatus* και *R. toruloides*, χρησιμοποιώντας τις αλκοόλες NPG και TMP. Αυτή η διαδικασία οδήγησε σε απόδοση μετατροπής έως και 88%. Γενικά, συμπεράθηκε ότι οι εστέρες

βιολιπαντικών που παράχθηκαν είναι ικανά να υποκαταστήσουν αποτελεσματικά τα συμβατικά λιπαντικά (Papadaki, Fernandes, Chatzifragkou, Aguiéiras, Da Silva, et al. 2018).

Τα μικροβιακά λιπίδια επιπλέον αντιπροσωπεύουν μια πολλά υποσχόμενη πηγή για την παραγωγή κηρών. Οι κηροί είναι εστέρες μακράς αλυσίδας που αποτελούνται από λιπαρά οξέα, εστεροποιημένα με λιπαρές αλκοόλες. Αποτελούν σημαντική πρώτη ύλη για διάφορες εφαρμογές, όπως κερί, λιπαντικά, επιστρώσεις, συσκευασία, τρόφιμα και καλλυντικά (Papadaki et al., 2018). Οι (Wenning et al. 2017) έχουν αναφέρει επιτυχημένη παραγωγή εστέρων κηρών μέσω γενετικά τροποποιημένου στελέχους του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Wenning et al. 2017).

Παράλληλα, οι Papadaki et al. (2018) έχουν δείξει ότι μικροβιακά λιπίδια που προέρχονται από τους μικροοργανισμούς *C. curvatus*, *L. starkeyi* και *R. toruloides* παράγουν εστέρες κηρών με ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των φυσικών εστέρων. Αυτό υποδεικνύει τη δυνητική χρήση τους σε εφαρμογές τροφίμων (Papadaki, 2018). Οι προαναφερθείσες μελέτες ανοίγουν τον δρόμο για την αξιοποίηση αυτών των μικροβιακών λιπιδίων ως βιώσιμη πηγή για τη βιομηχανία κηρών και άλλων σχετικών προϊόντων (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Σύνοψη διαφόρων οδών μέσω των οποίων τα λιπαρά οξέα μικροβιακού λίπους μετατρέπονται σε ανανεώσιμα προϊόντα και οι τελικές τους χρήσεις (Probst, 2016).

Τέλος, το έλαιο που παράγεται από τους ελαιοπαραγωγικούς μικροοργανισμούς αποτελεί αντικείμενο μελέτης ως βιώσιμη πρώτη ύλη για την παραγωγή του λεγόμενου βιοκαυσίμου "2ης γενιάς" (Muniraj et al. 2015; Papanikolaou and Aggelis 2011b). Οι Zhu et al. (2008) πραγματοποίησαν μετατροπή του μικροβιακού ελαίου του *Trichosporon fermentans* σε βιοκαύσιμο μέσω κατάλυσης, όπου σημειώθηκε υψηλή απόδοση ίση με 92% (Zhu, Zong, and Wu 2008). Οι Duarte et al. (2015) πραγματοποίησαν παραγωγή βιοκαυσίμου από το έλαιο της ζύμης *Candida* sp. σε σύστημα διαλύτη, επιτυγχάνοντας παρόμοια αποτελέσματα με το φυτικό έλαιο (Duarte et al. 2015). Σε παρόμοια μελέτη, οι Soccol et al. (2017) παρήγαγαν μικροβιακό έλαιο, χρησιμοποιώντας τον μικροοργανισμό *R. toruloides*. Αυτό το μικροβιακό έλαιο χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια μέσω μετεστεροποίησης για την παραγωγή βιοκαυσίμου. Το παραγόμενο βιοκαύσιμο αποδείχθηκε οικονομικά ανταγωνιστικό και με δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σε μη τροποποιημένους κινητήρες καυσίμων (Soccol et al. 2017).

1.4 Βιολιπαντικά

Ο όρος βιολιπαντικά αναφέρεται σε λιπαντικά που είναι εξίσου ευαίσθητα στη βιοαποικοδόμηση και μη τοξικά για τον άνθρωπο και το υδάτινο περιβάλλον. Ένα βιολιπαντικό μπορεί να παραχθεί είτε από φυτικά έλαια, όπως το έλαιο κραμβέλας, είτε να προέρχεται από συνθετικούς εστέρες που παράγονται από τροποποιημένα ανανεώσιμα έλαια, ή ακόμη και από προϊόντα που βασίζονται σε ορυκτά λάδια (Salimon, Salih, and Yousif 2010).

Η λίπανση αναφέρεται στη διαδικασία μείωσης της φθοράς μεταξύ επιφανειών που βρίσκονται κοντά μεταξύ τους και κινούνται, με τη χρήση ενός λιπαντικού που παρεμβάλλεται μεταξύ τους. Το λιπαντικό έχει το ρόλο να μεταφέρει ή να συμβάλει στη μεταφορά του φορτίου μεταξύ των επιφανειών, δημιουργώντας πίεση. Ωστόσο, η χρήση παραδοσιακών λιπαντικών που βασίζονται στο πετρέλαιο έχει το μειονέκτημα της μη ανανεώσιμης προέλευσης και της τοξικότητας προς το περιβάλλον. Η τάση προς τη χρήση βιολιπαντικών οφείλεται στην ανάγκη για χρησιμοποίηση βιομάζας αντί για μη ανανεώσιμων πετροχημικών. Έχουν ερευνηθεί διάφορες ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως πρωτεΐνες, φύλλα δένδρων, φύκη, φυτικά λίπη, πολτό καφέ, ιλύς χαρτοποιίας και άλλα αγροτικά κατάλοιπα, για τη δημιουργία βιοπλαστικών, βιοντίζελ, βιολιπαντικών, βιοπροσροφητικών, βιοδιεγερτικών και βιοαιθανόλης. Αυτά τα προϊόντα χρησιμοποιούνται επιτυχώς σε εμπορικό επίπεδο σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες. Πολλές

έρευνες έχουν διεξαχθεί για τη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φυτικών λιπών, προκειμένου να ανταγωνιστούν με τα πετρελαιοειδή λιπαντικά. Αρκετά βιολιπαντικά έχουν αναπτυχθεί με επιτυχία για διάφορους βιομηχανικούς τομείς (Panchal et al. 2017).

Οι βιολιπαντικές ουσίες παράγονται μέσω της διαδικασίας εστεροποίησης ή μετεστεροποίησης, κατά την οποία ένα λιπαρό οξύ ή τριγλυκερίδιο, ή ο μεθυλεστέρας τους, αντιδρά με μία πολυόλη. Αυτή η επανάληψη διαδικασίας είτε συμβαίνει χημικά, χρησιμοποιώντας οξύ ή βάση ως καταλύτη, είτε με τη χρήση ενζύμων (Salimon et al. 2014). Αν και η αγορά των ενζύμων είναι υψηλού κόστους, η διεργασία θεωρείται πιο φιλική προς το περιβάλλον σε σχέση με τη χημική, καθώς δεν απαιτεί χρήση διαλυτών και υψηλής ενέργειας. Τα ένζυμα που είναι κατάλληλα για αυτές τις βιομετατροπές είναι οι λιπάσες, οι οποίες μπορούν να εστεροποιούν ή να μετεστεροποιούν λιπαρές ύλες με πολυόλες, παράγοντας τους επιθυμητούς εστέρες. Κοινές πολυόλες που χρησιμοποιούνται για αυτές τις εστεροποιήσεις είναι η νεοπεντυλογλυκόλη (Neopentyl glycol, NPG), το τριμεθυλοπροπάνιο (Trimethylolpropane, TMP), η πενταερυθριτόλη (Pentaerythritol, PE) κλπ. (Cecilia et al. 2020; da Silva, Habert, and Freire 2012). Μέχρι στιγμής, οι περισσότερες έρευνες έχουν επικεντρωθεί κυρίως στη χρήση του TMP λόγω του χαμηλού κόστους και του χαμηλού σημείου τήξης σε σύγκριση με τις άλλες πολυόλες. Μέχρι σήμερα, οι πηγές λιπαρής ύλης που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιολιπαντικών από TMP περιλαμβάνουν το φοινικέλαιο, το κραιβέλαιο, το σογιέλαιο, το ηλιέλαιο, το καστορέλαιο και άλλα (da Silva et al. 2012).

1.4.1 Οι περιβαλλοντικές συνέπειες της χρήσης των συμβατικών λιπαντικών

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η ανησυχία για την κλιματική αλλαγή και τα συναφή προβλήματα που ανακύπτουν λόγω αυτής, μαζί με τον επιταχυνόμενο ρυθμό εξάντλησης των ορυκτών ελαίων, κατασκευάζουν μια συνεχώς αυξανόμενη ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια. Ως αποτέλεσμα, η ανάγκη για περιβαλλοντικά φιλικές και βιώσιμες επιλογές, σε σύγκριση με τις υφιστάμενες πρακτικές σε διάφορους τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας, γίνεται ολοένα και πιο επιτακτική (Arriah et al. 2022). Στον τομέα της βιοτεχνολογίας αναπτύσσονται σήμερα νέοι πυλώνες της επιστήμης οι οποίοι έχουν ως βάση τις διεργασίες οι οποίες στηρίζονται σε ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και στην «πράσινη» βιοτεχνολογία, με σκοπό τη δημιουργία μιας νέας βιώσιμης οικονομίας (Sjöström 2006).

Τα λιπαντικά αποτελούν οργανικές χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορους τομείς όπως η βιομηχανία, η γεωπονία, η γεωργία, η αλιεία, οι κινητήρες οχημάτων και διάφορα μηχανήματα. Συνήθως προσφέρονται σε υγρή μορφή, αλλά μπορούν επίσης να είναι στερεά, ημιστερεά ή σε μορφή αερολύματος. Η κύρια λειτουργία τους είναι η μείωση της τριβής μεταξύ δύο ή περισσότερων επιφανειών, τόσο σε οικιακή χρήση (π.χ. λάδι τηγανίσματος) όσο και σε εφαρμογές βιομηχανικού χαρακτήρα. Χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της οξείδωσης των μεταλλικών επιφανειών, την προστασία από τη διάβρωση, και την ελαχιστοποίηση της φθοράς, ενώ λειτουργούν ως θερμικοί αγωγοί, προστατεύοντας τις επιφάνειες από τη σκόνη και το νερό. Στη βιομηχανία συμβάλλουν σημαντικά στην αύξηση του χρόνου ζωής των μηχανημάτων (Perera et al. 2022; Karmakar, Ghosh, and Sharma 2017).

Τα λιπαντικά παράγονται από μια ποικιλία υγρών πρώτων υλών και χημικών προσθέτων. Σύμφωνα με το χαρακτηριστικό συστατικό από το οποίο παράγονται, μπορούν να χωριστούν σε τρεις βασικές κατηγορίες:

1. Λιπαντικά προερχόμενα από ορυκτές πρώτες ύλες: Προέρχονται από την εκχύλιση του πετρελαίου και αποτελούν την πιο κοινή κατηγορία λιπαντικών.
2. Συνθετικά λιπαντικά: Παράγονται με χημική τροποποίηση από υλικά όπως η σιλικόνη, οι συνθετικοί εστέρες και άλλα χημικά συστατικά, προσφέροντας εξειδικευμένες ιδιότητες.
3. Βιολιπαντικά ή πράσινα λιπαντικά: Προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές και είναι φιλικά προς το περιβάλλον. Συνήθως παράγονται από βιομάζα όπως φυτικά λίπη, προσφέροντας βιώσιμες επιλογές.

Αυτές οι κατηγορίες καλύπτουν μια ευρεία γκάμα λιπαντικών που καλύπτουν τις διάφορες ανάγκες σε διάφορους τομείς (Perera et al. 2022; Karmakar et al. 2017).

Τα λιπαντικά που παράγονται από την πετροχημική βιομηχανία είναι τα πιο ευρέως διαδεδομένα παγκοσμίως, καθώς αποτελούν περίπου το 95% της συνολικής παραγωγής. Η σταθερή σύστασή τους και η προσιτή τιμή τους συμβάλλουν σημαντικά στην ευρεία αποδοχή και χρήση τους (Perera et al. 2022; Cecilia et al. 2020; Karmakar et al. 2017). Το 2020, η παγκόσμια αγορά λιπαντικών ανήλθε σε περίπου 35 εκατομμύρια τόνους, με τη ζήτηση να προβλέπεται να αυξηθεί κατά περίπου 2% έως το 2026 (Mendes, Soares, and Tardioli 2023). Στην Ευρώπη, συγκεκριμένα, η ετήσια χρήση λιπαντικών ανέρχεται σε 5,2 εκατομμύρια τόνους. Από αυτήν τη συνολική ποσότητα, περίπου 1,2

εκατομμύρια τόνοι εκπέμπονται άμεσα στο περιβάλλον, προκαλώντας ρύπανση σε έδαφος, νερό και αέρα (Appiah et al. 2022; Sharma, Sachan, and Sinha 2018; Garcés, Martínez-Force, and Salas 2011).

Η απορροή των λιπαντικών στο περιβάλλον, κυρίως εκείνων που προέρχονται από την πετροχημική βιομηχανία, αντιπροσωπεύει μια σημαντική απειλή για τον πλανήτη (McNutt and He 2016). Η εκτεταμένη χρήση τους έχει οδηγήσει σε σοβαρά περιβαλλοντικά ζητήματα, με κύρια απειλή την υποβάθμιση της ποιότητας του εδάφους και των υδάτων. Επιπλέον, αυτά τα χημικά συχνά περιλαμβάνουν βαρέα μέταλλα ή θεϊκές ενώσεις που είναι εξαιρετικά βλαβερές για το περιβάλλον (Karmakar et al. 2017; Perera et al. 2022). Για παράδειγμα, υπολογίζεται ότι 1 kg λιπαντικού προερχόμενο από ορυκτά έλαια μπορεί να μολύνει ένα εκατομμύριο λίτρα νερού, επιφέροντας μακροχρόνιες επιπτώσεις στο περιβάλλον (Perera et al. 2022; Bolina, Gomes, and Mendes 2021; McNutt and He 2016). Επιπλέον, η εκπομπή ρυπογόνων ουσιών από τα συμβατικά λιπαντικά στον αέρα μπορεί να προκαλέσει ατμοσφαιρική ρύπανση και να επηρεάσει την ποιότητα του αέρα που αναπνέουμε. Συνεισφέρουν επομένως αρνητικά στην ατμοσφαιρική ρύπανση, ενώ πολλές έρευνες έχουν αποδείξει επιβλαβείς επιπτώσεις των λιπαντικών στην υγεία του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων αναπνευστικών και δερματικών προβλημάτων, καθώς και καρκινογόνων επιδράσεων (Appiah et al. 2022; Cecilia et al. 2020).

Συνεπώς, η χρήση των συμβατικών λιπαντικών επιφέρει εκτεταμένες περιβαλλοντικές επιπτώσεις, δημιουργώντας την απαίτηση για αναζήτηση και εφαρμογή εναλλακτικών λύσεων, πιο βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον.

1.4.2 Βελτιστοποίηση Βιωσιμότητας: Ο Ρόλος των βιολιπαντικών στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας

Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, η περιβαλλοντική ρύπανση που προκαλείται από τη χρήση συμβατικών λιπαντικών θεωρείται ως ιδιαίτερα επικίνδυνη (Appiah et al. 2022). Για αυτούς τους λόγους, τόσο η επιστημονική κοινότητα όσο και η βιομηχανία επιδιώκουν την αντικατάσταση των συμβατικών λιπαντικών με προϊόντα που είναι πιο φιλικά προς το περιβάλλον. Αυτό έχει στόχο τόσο τον περιορισμό της υπερεκμετάλλευσης των ορυκτών πόρων όσο και τη μείωση των επιπτώσεων στο περιβάλλον και στην ανθρώπινη υγεία, συμβάλλοντας, έτσι, στη μείωση του φαινομένου του θερμοκηπίου και άλλων περιβαλλοντικών προβλημάτων (Clark and Deswarte 2008).

Η χρήση ελαίων φυτικής προέλευσης για την παραγωγή βιολιπαντικών αποτελεί μία από τις προτεινόμενες εναλλακτικές λύσεις από την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια. Τα ελαία αυτά, είτε είναι βρώσιμα είτε όχι, παρουσιάζουν χημικές ιδιότητες παρεμφερείς με αυτές των ορυκτών ελαίων. Επιπλέον, διαθέτουν ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα σε ό,τι αφορά την απόδοση και την παραγωγικότητά τους (Perera et al. 2022).

Σήμερα, από τα συνολικά 5,2 εκατομμύρια τόνους λιπαντικών που παράγονται στην Ευρώπη, το ποσοστό του 2-4% προέρχεται από φυτικές πηγές, το οποίο είναι σημαντικά χαμηλό (Appiah et al. 2022; Garcés et al. 2011).

Συμπληρωματικά, παρατηρείται ότι στην αγορά υπάρχουν διαθέσιμα βιοκαύσιμα, με το 59% να προέρχεται από λάδι ελαιοκράμβης, το 25% από σογιέλαιο, το 10% από φοινικέλαιο και το 5% από ηλιέλαιο. Παρόλα αυτά, τα εδώδιμα έλαια δεν μπορούν να αντικαταστήσουν πλήρως τα ορυκτά ελαία, καθώς οι ανάγκες για τροφή αυξάνονται, αυξάνοντας παράλληλα και τον κίνδυνο επισιτιστικής κρίσης. Αυτό οδηγεί σε περιορισμένη χρήση των εν λόγω ελαίων για την παραγωγή βιοκαυσίμων και βιολιπαντικών. Επιπλέον, ο οικονομικός ανταγωνισμός που δημιουργείται επιδρά αυξητικά στις τιμές των τροφίμων, καθιστώντας ανεφάρμοστη τη χρήση αυτών των ελαίων για βιοκαύσιμα και βιολιπαντικά (Patel et al. 2020; Perera et al. 2022).

Επομένως, η έρευνα σήμερα, αλλά και στο άμεσο μέλλον, κατευθύνεται προς την ανάπτυξη βιοαποικοδομήσιμων και μη τοξικών βιολιπαντικών, με στόχο την πρόληψη της μόλυνσης και τη μείωση της εξάρτησης από τα ορυκτά έλαια και τα παράγωγά τους. Αυτή η προσέγγιση αποτελεί σημαντικό βήμα προς μια πιο βιώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον χρήση των λιπαντικών (Garcés et al. 2011). Επειδή τα βιολιπαντικά διαθέτουν μη τοξικό χαρακτήρα, είναι δυνατή η χρήση τους σε πιο ευαίσθητα οικοσυστήματα, όπως τα θαλάσσια και τα δασικά, όπου υφίστανται αυστηρές νομοθεσίες και κανονισμοί. Με βάση αυτά τα δεδομένα, προβλέπεται ότι η ζήτηση για βιολιπαντικά θα αυξηθεί σημαντικά στα επόμενα χρόνια, ειδικά σε εφαρμογές που σχετίζονται με υδραυλικά και μηχανικά λάδια, ηλεκτρικές συσκευές και άλλες τεχνολογικές εφαρμογές (Sarma and Vinu 2022).

Για την αντικατάσταση των εδώδιμων ελαίων στην παραγωγή βιολιπαντικών, επιστημονικές έρευνες προτείνουν διάφορες εναλλακτικές λύσεις με τη μορφή μη εδώδιμων ελαίων, όπως το καστορέλαιο, το λιναρέλαιο, το μικροβιακό έλαιο, καθώς και έλαια από αποβλήτα της βιομηχανίας τροφίμων, όπως το έλαιο από απόβλητα καφέ και

άλλα παρόμοια (Perera et al. 2022). Τα έλαια που προέρχονται από απόβλητα, ωστόσο, συνήθως χρειάζονται επεξεργασία για καθαρισμό, καθώς κυρίως αποτελούνται από τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια και μονοακυλογλυκερίδια, ενώ περιλαμβάνουν και υψηλά ποσοστά ελεύθερων λιπαρών οξέων. Αυτά τα ελεύθερα λιπαρά οξέα επηρεάζουν σημαντικά την οξειδωτική σταθερότητα των ελαίων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της γήρανσης (Patel et al. 2020).

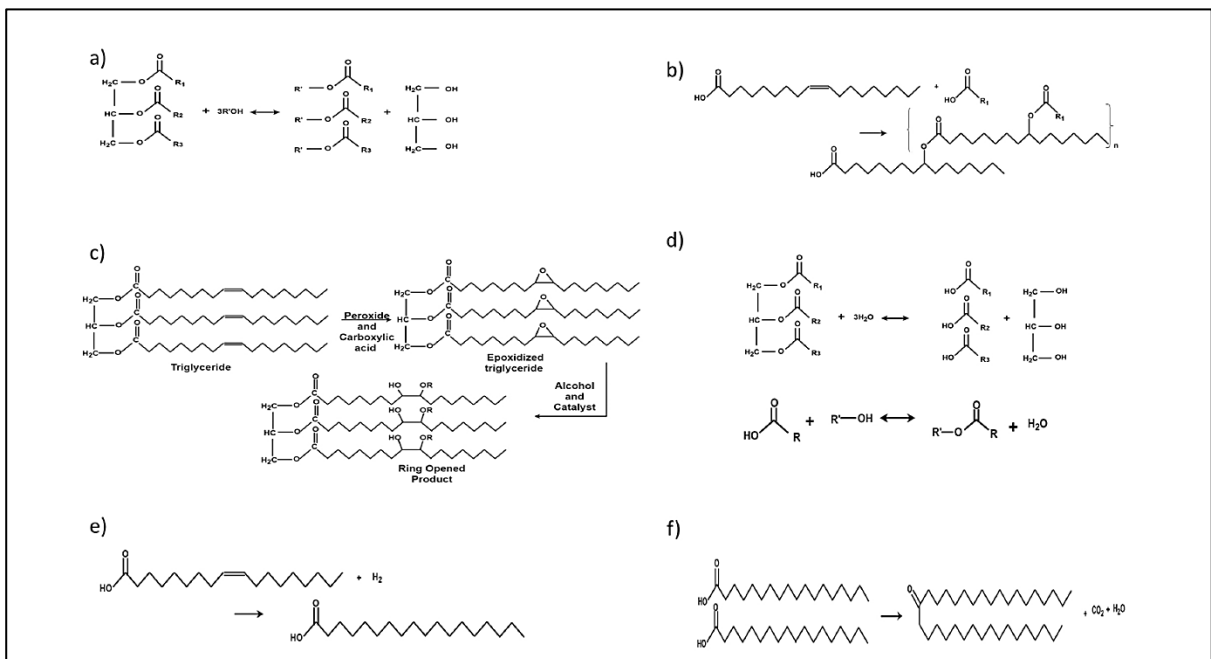
1.4.2.1 Μέθοδοι παραγωγής βιολιπαντικών

Η παραγωγή βιολιπαντικών αποτελεί έναν σημαντικό τομέα που εστιάζει στη δημιουργία λιπαντικών προϊόντων με βάση φυσικούς πόρους και ανανεώσιμα υλικά. Οι επιστημονικές έρευνες σε αυτόν τον τομέα επικεντρώνονται στην ανάπτυξη καινοτόμων διαδικασιών παραγωγής που είναι περιβαλλοντικά φιλικές και οδηγούν σε προϊόντα υψηλής απόδοσης. Η άμεση χρήση απόβλητων ελαίων ως βιολιπαντικά δεν είναι δυνατή, παρά τις καλές λιπαντικές τους ιδιότητες, καθώς χαρακτηρίζονται από χαμηλή οξειδωτική και υδρολυτική σταθερότητα και μη επαρκή απόδοση σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για το λόγο αυτό συνηθέστερα εφαρμόζεται παραγωγή συνθετικών εστέρων βιολιπαντικών, οι οποίοι παράγονται μέσω διεργασιών τροποποίησης των διαφόρων ειδών λιπών ή ελαίων (Guedes Júnior et al. 2022). Η σύνθεση εστέρων, μέσω της μετατροπής τους από μικροοργανισμούς, αλκοόλες, πολυαλκοόλες, πολυγλυκόλες κλπ, είναι σε θέση να τροποποιήσει ένα φυσικό έλαιο με τέτοιο τρόπο ώστε το συντιθέμενο βιολιπαντικό να παρουσιάζει θερμική αλλά και οξειδωτική σταθερότητα, αντοχή στη φθορά και ιδιότητες λιπαντικού συχνά καλύτερες από αυτές που παρουσιάζουν τα ορυκτέλαια (Cecilia et al. 2020).

Η χημική τροποποίηση των ελαίων έχει εφαρμοστεί με επιτυχία μέσω διάφορων διεργασιών, όπως η υδρόλυση, η υδρογόνωση, η εποξείδωση, η εστεροποίηση, η μετεστεροποίηση, η αποκαρβοξυλίωση, η αποκαρβονυλίωση, η υδροϊσομερίωση, ο κετονισμός κλπ. (Bolina et al. 2021; Monteiro et al. 2023). Ορισμένες από αυτές παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 8.

Η εστεροποίηση με χημικούς καταλύτες αποτελεί την απλούστερη και πιο συχνή τεχνική σύνθεσης βιολιπαντικών ελαίων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η εστεροποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων με λιπαρές αλκοόλες ή πολυόλες έχει πραγματοποιηθεί κυρίως με χημικούς καταλύτες, ιδίως οξέα (π.χ., θειικό, υδροχλωρικό κλπ.), προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός σαπώνων που παράγονται με τη χρήση αλκαλικών

καταλυτών. Τόσο η χημική όσο και η ενζυμική παραγωγή βιολιπαντικών έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές, ωστόσο η χρήση χημικών καταλυτών έχει αρκετούς περιορισμούς, καθώς αποφέρουν συχνά ανεπιθύμητα αποτελέσματα, όπως η οξείδωση του τελικού προϊόντος, η μόλυνση του προϊόντος από τον καταλύτη, η ανάγκη πρόσθετων σταδίων καθαρισμού για το τελικό προϊόν, οι συνθήκες αντίδρασης υψηλής θερμοκρασίας (αυξημένο ενεργειακό κόστος και κόστος παραγωγής) κλπ., εξαιτίας των οποίων θεωρούνται και λιγότερο φιλικό προς το περιβάλλον (Monteiro et al. 2023; Abd Wafti et al. 2022; Perera et al. 2022; Bolina et al. 2021). Η ενζυμική μετατροπή θεωρείται γενικά πιο φιλική προς το περιβάλλον (Perera et al. 2022).

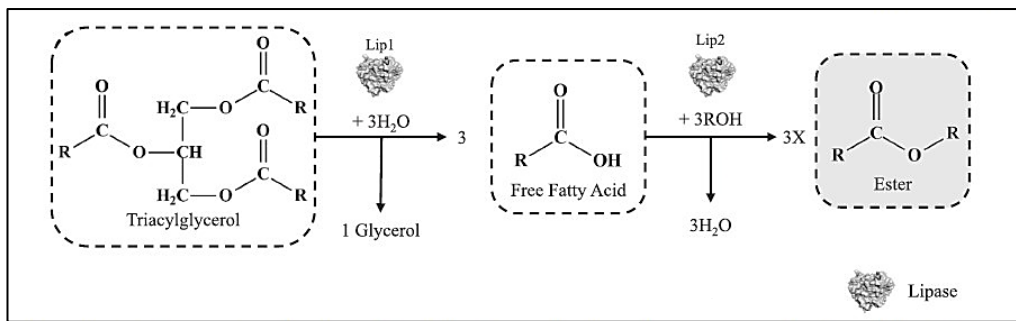


Εικόνα 8. Αντιδράσεις ορισμένων χημικών τροποποιήσεων των φυτικών ελαίων (α) μετεστεροποίηση (β) οστεοποίηση (γ) εποξείδωση (δ) υδρόλυση + εστεροποίηση (ε) υδρογόνωση (στ) κετονισμός (Kurre & Yadav, 2023).

Η εναλλακτική προσέγγιση που προτείνεται λοιπόν τα τελευταία χρόνια είναι η χρήση ενζύμων ως βιοκαταλυτών, η οποία αποτελεί μια μακροχρόνια λύση που θα μπορούσε να παρακάμψει τις προαναφερθείσες δυσκολίες (Abd Wafti et al. 2022; Perera et al. 2022). Τα τελευταία χρόνια λοιπόν προτιμάται η ενζυμική μετατροπή των πρώτων υλών μέσω διάφορων διεργασιών, όπως είναι η εστεροποίηση, η μετεστεροποίηση, η υδρο-εστεροποίηση, η εποξείδωση και η διάνοιξη δακτυλίου, οι οποίες συχνά αποτελούνται από ένα έως και τέσσερα στάδια (Mendes et al. 2023; Monteiro et al. 2023; Guedes Júnior et al. 2022; Bolina et al. 2021). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία διεργασίες

ενός σταδίου όπως είναι η άμεση ενζυμική μετεστεροποίηση των TAGs με πολυόλες, απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες ή και μεγάλη χρονική διάρκεια αντίδρασης ώστε να αποφέρουν παραγωγική απόδοση εξίσου υψηλή με τις διεργασίες δύο σταδίων. Έτσι διεργασίες δύο σταδίων, όπως η υδρο-εστεροποίηση, θεωρούνται τελικά πιο εύχρηστες και αποδοτικές (Mendes et al. 2023; Monteiro et al. 2023; Gryglewicz, Muszyński, and Nowicki 2013).

Η εστεροποίηση αποτελεί την αντίστροφη αντίδραση της υδρόλυσης, κατά την οποία ένα ελεύθερο λιπαρό οξύ και οι επιθυμητές αλκοόλες χωρίς καμία περαιτέρω τροποποίηση, αποτελούν τις πρώτες ύλες (Monteiro et al. 2023). Αντίστοιχα, η υδροεστεροποίηση είναι μια στρατηγική παραγωγής εστέρων κατά την οποία τα έλαια ή τα λίπη υποβάλλονται πρώτα σε ένα στάδιο χημικής ή ενζυμικής υδρόλυσης των TAGs με στόχο την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs) και γλυκερόλης (Εικόνα 9). Στη συνέχεια τα FFAs καθαρίζονται και τελικά εστεροποιούνται με γραμμικές ή διακλαδισμένες αλκοόλες, ή και πολυόλες, και πάλι με χρήση χημικού ή ενζυμικού καταλύτη (Mendes et al. 2023; Monteiro et al. 2023). Η μέθοδος της υδροεστεροποίησης, όπως αναφέρθηκε, είναι η διεργασία δύο σταδίων που επιλέγεται συχνότερα για την παραγωγή βιολιπαντικών, επειδή παρέχει τη δυνατότητα χρήσης ως πρώτων υλών μη εξευγενισμένων, ακατέργαστων και χρησιμοποιημένων απόβλητων ελαίων χαμηλού κόστους (Mendes et al. 2023; Guedes Júnior et al. 2022; Carvalho et al. 2021; Barbosa et al. 2021). Κατά τη διάρκεια της υδροεστεροποίησης υπάρχει έλλειψη ανταγωνιστικής αλκοόλης για την παραγωγή του εστέρα-στόχου, καθώς η γλυκερόλη εξαλείφεται, αφήνοντας τις προστιθέμενες κάθε φορά αλκοόλες ως μοναδική επιλογή για την δημιουργία των εστέρων του βιολιπαντικού, οδηγώντας σε μια πιο αποδοτική αντίδραση (Monteiro et al. 2023). Οι συνθετικοί εστέρες που προκύπτουν έχουν χαμηλότερα σημεία ροής από το αρχικό έλαιο, ενώ παράλληλα διατηρούν τον βιοαποικοδομήσιμο χαρακτήρα και τις λιπαντικές ιδιότητες του αρχικού ελαίου (Aguieiras et al. 2020).



Εικόνα 9. Υδροεστεροποίηση: (Α) υδρόλυση της τριακυλογλυκερόλης ακολουθούμενη από (Β) εστεροποίηση των λιπαρών οξέων που απελευθερώνονται με μια αλκοόλη. Η διεργασία μπορεί να είναι καταλύεται από μία ή δύο διαφορετικές λιπάσες (Monteiro et al., 2023).

Τα ένζυμα αποτελούν τη βέλτιστη επιλογή όσον αφορά την αειφόρα τεχνολογία και την ανάπτυξη μιας πιο πράσινης βιομηχανίας και οικονομίας. Η ενζυμική κατάλυση αποφέρει υψηλά ποσοστά μετατροπής εστέρων, εύκολη ανάκτηση του ενζυμικού καταλύτη, ενώ παράλληλα προσδίδει βιοαποικοδομήσιμο χαρακτήρα και ενισχύει την ανάπτυξη τεχνολογικά καθαρών διαδικασιών παραγωγής εξαιτίας των ήπιων συνθηκών αντίδρασης που απαιτούνται, της υψηλής ειδικότητας και του υψηλού βαθμού καθαρότητας των παραγόμενων προϊόντων (Guedes Júnior et al. 2022; Perera et al. 2022; Bolina et al. 2021; Papadaki, Fernandes, Chatzifragkou, Agueiras, Da Silva, et al. 2018). Στις ενζυμικές διεργασίες συνήθως εφαρμόζεται χαμηλότερη θερμοκρασία αντίδρασης (<80°C), η οποία μεταφράζεται σε χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας, ενώ αποτρέπει παράλληλα το σχηματισμό παραπροϊόντων λόγω της θερμικής αποικοδόμησης και της έλλειψης ελέγχου της αντίδρασης (Abd Wafti et al. 2021). Ωστόσο, παρά το μεγάλο ενδιαφέρον και τη ζήτηση για ενζυμικές λιπάσες, η χρήση τους ακόμα δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη σήμερα, καθώς τα τελευταία χρόνια μόνο το 3% των βιομηχανικών διεργασιών πραγματοποιούνται με χρήση ενζύμων κυρίως λόγω του υψηλού τους κόστους (Perera et al. 2022; Barbosa et al. 2021).

Οι λιπάσες απομονώνονται από πλήθος μικροοργανισμών όπως είναι οι ζύμες, τα βακτήρια και οι μύκητες, αλλά και από φυτά, ή και το πάγκρεας των ζώων και επιτελούν την υδρόλυση των εστερικών δεσμών των λιπαρών οξέων με τη γλυκερόλη και το φυσιολογικό υπόστρωμα στο οποίο δρουν είναι οι τριακυλογλυκερόλες. Για το λόγο αυτό πολλές εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα στη βιομηχανία παραγωγής βιοκαυσίμων και βιολιπαντικών (Mendes et al. 2023; Adlercreutz 2013). Το ευρύ φάσμα

της ειδικότητας τους και ο βιώσιμος χαρακτήρας τους τις καταστούν κατάλληλες για ποικίλες εφαρμογές, τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο (Mendes et al. 2023; Barbosa et al. 2021; Bolina et al. 2021; Fernandes et al. 2021; Guimarães et al. 2021; Aguiéiras et al. 2020; Adlercreutz 2013).

Για τη σύγχρονη βιομηχανία μεγαλύτερο ενδιαφέρον αποκτούν πλέον οι μικροβιακές λιπάσες, των οποίων η πολύ-λειτουργικότητα σε μια ποικιλία φυσικών και μη φυσικών υποστρωμάτων, τις καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες για τη βιομηχανική παραγωγή προϊόντων όπως τα βιολιπαντικά, στα οποία συχνά γίνεται χρήση χημικών υποστρωμάτων όπως είναι η TMP, η NPG κλπ. (Mendes et al. 2023). Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες λιπάσες για την διαδικασία παραγωγής βιολιπαντικών πραγματοποιείται κατά προτίμηση με τη χρήση μη ειδικών εμπορικών λιπασών, σε μορφή σκόνης, συνήθως από στελέχη της *Candida sp.* 99-125 και *C. rugosa*, και Novozyme 435 (λιπάση Β της *C. antarctica* - CALB) (Mendes et al. 2023), οι οποίες έχουν εφαρμοστεί σε μελέτες βιολιπαντικών με βάση το κραιμβέλαιο, το σογιέλαιο και το καστορέλαιο κλπ. (Abd Wafti et al. 2021).

1.4.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία παραγωγής βιολιπαντικών

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κατά τη διαδικασία παραγωγής ελαιοχημικών προϊόντων από έλαια, είναι απαραίτητο να τροποποιηθούν οι φυσικές χημικές δομές των εστέρων των ελαίων, γνωστών ως τριγλυκερίδια (TAGs) (Appiah, et al., 2022). Το προφίλ των λιπαρών οξέων είναι κρίσιμο στη διαδικασία παραγωγής βιολιπαντικών, καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις ιδιότητες των παραγόμενων ουσιών. Παράγοντες όπως το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας και ο βαθμός ακορεστότητας των λιπαρών οξέων αποτελούν κομβικούς παράγοντες που επηρεάζουν τις ιδιότητες των βιολιπαντικών ουσιών, όπως η τριβή, η θερμική σταθερότητα, καθώς και η οξειδωτική σταθερότητα (Bolina et al. 2021; Gryglewicz et al. 2013). Η μείωση του βαθμού ακορεστότητας βελτιώνει την οξειδωτική σταθερότητα, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει το σημείο τήξης. Τα έλαια που περιέχουν μονοακόρεστα λιπαρά οξέα επιδεικνύουν τη βέλτιστη οξειδωτική σταθερότητα και διατηρούν ικανοποιητικές ιδιότητες σε χαμηλές θερμοκρασίες (Gryglewicz et al. 2013).

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, διάφορα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης, όπως το προφίλ των λιπαρών οξέων, καθώς και παράγοντες της αντίδρασης, όπως η αναλογία της αλκοόλης προς το υπόστρωμα, η θερμοκρασία αντίδρασης, η

περιεκτικότητα σε νερό, το είδος του καταλύτη και η περιεκτικότητα αυτού, αλλά και ο ρυθμός ανάδευσης επηρεάζουν σημαντικά τη διαδικασία παραγωγής εστέρων βιολιπαντικών (Abd Wafti et al. 2022; Appiah et al. 2022). Συνεπώς, παρακάτω θα αναλυθούν διάφοροι παράγοντες.

1.4.2.2.1 Αλκοόλες

Οι αλκοόλες αποτελούν σημαντική κατηγορία πρώτων υλών για την παραγωγή βιολιπαντικών. Ο τύπος και η ποιότητα των αλκοολών που χρησιμοποιούνται στην διαδικασία επηρεάζουν σημαντικά τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Συγκεκριμένα, η αναλογία της αλκοόλης προς το υπόστρωμα, η επιλογή του τύπου αλκοόλης και η καθαρότητά της είναι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα και τις επιδόσεις του βιολιπαντικού προϊόντος.

Η διαδικασία μετατροπής διάφορων ελαίων με αλκοόλες συμβάλλει στην ενίσχυση της σταθερότητας των βιολιπαντικών, αφαιρώντας ένα άτομο υδρογόνου που βρίσκεται στη θέση του τριγλυκεριδίου (Mendes et al. 2023; Gryglewicz et al. 2013). Ανάμεσα στις πολυόλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιολιπαντικών συγκαταλέγονται η TMP, η PE, και η NPG, κ.ά. Οι εστέρες αυτών των αλκοολών διακρίνονται για την εξαιρετική ρευστότητά τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ενώ δεν είναι κατάλληλες για χρήση σε ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες, κρίνονται κατάλληλες για λιγότερο ακραίες εφαρμογές (Heikal et al. 2017). Συνολικά, η TMP χρησιμοποιείται εκτενώς για την παραγωγή βιολιπαντικών λόγω του χαμηλού σημείου τήξης της, που κυμαίνεται περίπου στους 58°C, και της σχετικά οικονομικής τιμής της. Φαίνεται να ενισχύει τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των βιολιπαντικών, καθώς και τη σταθερότητα της θερμικής οξείδωσης (Kurre and Yadav 2023; Monteiro et al. 2023).

Επιπλέον, η σύνθεση των βιολιπαντικών επηρεάζεται από τη μοριακή αναλογία της πολυόλης προς το υπόστρωμα. Οι αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης είναι αντιστρεπτές αντιδράσεις με αποτέλεσμα η ισορροπία να επιτυγχάνεται πριν από την πλήρη μετατροπή του υποστρώματος (Appiah et al. 2022). Οι αλκοόλες μπορούν να λειτουργήσουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς των λιπασών, προκαλώντας την αναστολή ή τη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Αυτό συμβαίνει κατά τη διεξαγωγή αντιδράσεων μετεστεροποίησης, όπου η προσθήκη αλκοόλης μπορεί να επηρεάσει την πορεία των αντιδράσεων, καθορίζοντας εάν θα παραχθούν εστέρες ή εάν θα ανασταλεί η ενζυμική δραστηριότητα των λιπασών (Adlercreutz 2013; da Silva 2011). Η αυξημένη

μοριακή αναλογία της αλκοόλης προς τα TAGs χρησιμοποιείται για να ενισχυθεί η επαφή μεταξύ των μορίων της αλκοόλης και των TAGs. Αυτό συμβαίνει με σκοπό την πλήρη ολοκλήρωση της αντίδρασης. Σύμφωνα με έρευνες, στον τομέα της παραγωγής βιοκαυσίμων, η αύξηση της μοριακής αναλογίας της αλκοόλης προς το έλαιο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγικότητας και της καθαρότητας του τελικού παραγόμενου καυσίμου (Appiah et al. 2022).

Οι Greco-Duarte et al. (2017) διεξήγαγαν μετατροπή ελεύθερων λιπαρών οξέων από καστορέλαιο (COFFA) με τις αλκοόλες NPG, TMP ή PE σε μοριακές αναλογίες αλκοόλης προς έλαιο 2.5:1, 3.75:1 και 5:1. Σημείωσαν διαφορετικές αποδόσεις μετατροπής για κάθε αλκοόλη. Η NPG παρουσίασε απόδοση με εύρος από 55%-90% περίπου σε 96 ώρες αντίδρασης, ανάλογα με τον ενζυμικό καταλύτη που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά. Όσον αφορά την TMP, η απόδοση που παρατηρήθηκε ήταν 13%-98% περίπου, ανάλογα και πάλι με το ένζυμο κατάλυσης. Όσον αφορά την PE, η μέγιστη απόδοση ήταν περίπου 75% και παρατηρήθηκε μόνο όταν έγινε χρήση της λιπάσης Lipomod 34MDP (Greco-Duarte et al. 2017). Αντίστοιχα, οι Ma et al. (2021) πραγματοποίησαν ενζυμική εστεροποίηση του μικροβιακού ελαίου του μικροοργανισμού *R. glutinis* με τριμεθυλοπροπάνιο (TMP) με σκοπό την παραγωγή βιολιπαντικών. Οι αναλογίες που εφαρμόστηκαν ήταν λιπαρό οξύ:αλκοόλη 2,8:1-3,8:1 στα πλαίσια της βελτιστοποίησης των συνθηκών της αντίδρασης και τελικά επετεύχθη απόδοση τριεστέρα της TMP σε ποσοστό σχεδόν 90% (Ma et al. 2021). Οι Cavalcanti et al. (2018) πραγματοποίησαν εστεροποίηση ελεύθερων λιπαρών οξέων υδρολυμένου ελαίου σόγιας με τις πολυόλες NPG, TMP, και PE με τρεις διαφορετικές λιπάσες. Η αναλογία που επιλέχθηκε ως βέλτιστη ήταν FFAs:πολυόλη 3,75:1 και τα τελικά προϊόντα σημείωσαν διαφορετική απόδοση μετατροπής για κάθε αλκοόλη, ανάλογα και με το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση (Cavalcanti et al. 2018).

1.4.2.2.2 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά τόσο τον αρχικό ρυθμό της αντίδρασης όσο και τη σταθερότητα του ενζύμου κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις (Trivedi et al. 2015). Σε οποιαδήποτε αντίδραση, η αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ιξώδους του διαλύματος και τη βελτίωση της διαλυτότητας της ένωσης, προωθώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. Ειδικά στην παραγωγή βιολιπαντικών σε δύο στάδια, η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά την κινητική ενέργεια της αντίδρασης, επηρεάζοντας τόσο το ρυθμό, όσο και την παραγωγικότητα

του παραγομένου βιολιπαντικού. Συνεπώς, η θερμοκρασία της αντίδρασης αποτελεί έναν κρίσιμο παράγοντα που επηρεάζει την κατάλυση που πραγματοποιείται από τις λιπάσες (Appiah et al. 2022; Unugul et al. 2020; Kim et al. 2019). Παρόλο που η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να επιφέρει αύξηση του ρυθμού αντίδρασης, υπάρχει κίνδυνος παραμόρφωσης της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου και σημαντικής μείωσης της καταλυτικής του δραστηριότητας όταν η θερμοκρασία υπερβεί ένα συγκεκριμένο όριο. Η βέλτιστη θερμοκρασία κάθε ενζύμου εξαρτάται από διάφορα χαρακτηριστικά, όπως το είδος του ενζύμου, ο διαλύτης, το pH του μέσου αντίδρασης και άλλοι παράγοντες (Guedes Júnior et al. 2022; Kim et al. 2019).

Σε έρευνα των Kim et al. (2019), διερευνήθηκαν θερμοκρασίες εστεροποίησης στο εύρος 40°C-80°C και παρατηρήθηκε πως η απόδοση μετατροπής ήταν υψηλότερη στους 40°C-60°C, σταθερή στους 60°C-70°C, ενώ ξεκίνησε να μειώνεται απότομα καθώς η θερμοκρασία ξεπέρασε τους 70°C (Kim et al. 2019). Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Unugul et al. (2020), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή βιολιπαντικών μέσω εστεροποίησης του ελαίου καφέ με χρήση λιπάσης σε εύρος θερμοκρασίας 35°C-65°C και κατέληξαν πως η βέλτιστη θερμοκρασία της αντίδρασης ήταν περίπου στους 55°C (Unugul et al. 2020).

1.4.2.2.3 Νερό

Στη βελτιστοποίηση μιας ενζυμικής διεργασίας, ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε νερό κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αποτελεί κρίσιμο παράγοντα. Γενικά, η περιεκτικότητα του νερού σε αντιδράσεις που καταλύονται από λιπάσες αποτελεί σημαντικό παράγοντα επίδρασης. Σε κάθε ενζυμική αντίδραση υπάρχει ένα κατώτατο όριο περιεκτικότητας σε νερό, κάτω από το οποίο τα ένζυμα δεν θα είναι σε θέση να διατηρήσουν την καταλυτική τους δραστηριότητα. Αυτό το κρίσιμο όριο περιεκτικότητας σε νερό είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της τρισδιάστατης διαμόρφωσης του ενζύμου, η οποία αποτελεί προϋπόθεση για την καταλυτική του δραστηριότητα (Kim et al. 2019; Trivedi et al. 2015).

Η ιδανική περιεκτικότητα σε νερό στο μέσο αντίδρασης ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με το συγκεκριμένο ένζυμο και την πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται. Επομένως, απαιτείται η βελτιστοποίηση αυτής της παραμέτρου κατά περίπτωση (Cavalcanti et al. 2018). Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η προσθήκη νερού στα πρώτα στάδια της εστεροποίησης, ακόμα και σε ποσοστά του επιπέδου 0,1%-1%, μπορεί να επηρεάσει

θετικά την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου και να ενθαρρύνει την εστεροποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων από την αλκοόλη. Ωστόσο, στο επόμενο στάδιο, η υπερβολική παρουσία νερού, εάν δεν απομακρυνθεί, μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στην αντίδραση, λόγω της υδρόλυσης τόσο του υποστρώματος, όσο και των παραγόμενων προϊόντων της αντίδρασης (Monteiro et al. 2023; Cavalcanti et al. 2018; Gryglewicz et al. 2013).

Οι Unugul et al. (2020) σε μελέτη παραγωγής βιολιπαντικών όπου πραγματοποιήθηκε εστεροποίηση ελαίου καφέ με προσθήκη νερού έως 10%, σημείωσαν την βέλτιστη μετατροπή με μηδενική προσθήκη νερού. Οι Gryglewicz et al. (2013) σημείωσαν επίσης απόδοση μετατροπής του επιπέδου 70% του κραμβέλαιου σε άνυδρη εστεροποίηση. Παρόμοια αποτελέσματα σημείωσαν και οι da Silva, (2011), σε μελέτη με βάση το κραμβέλαιο, προσθήκη νερού 1% και απόδοση 87% (da Silva 2011).

1.4.2.2.4 Συγκέντρωση ενζύμου

Ο καθορισμός της βέλτιστης ποσότητας προσθήκης ενζύμου είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την επίτευξη της μέγιστης αποτελεσματικότητας της αντίδρασης. (Kim et al. 2019). Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται στην αντίδραση είναι απαραίτητο να μεταβάλλεται ανάλογα με τη μάζα του υποστρώματος, καθώς επικρατεί η γνωστή σχέση κλειδιού-κλειδαριάς μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος, χάρη στην οποία περισσότερα μόρια λιπαρών οξέων της λιπάσης αποδίδονται σε λιγότερο χρόνο (Unugul et al. 2020). Αν και ο ρυθμός της αντίδρασης αυξάνεται ανάλογα με την ποσότητα προσθήκης του ενζύμου, είναι εξαιρετικά σημαντικό να προσδιοριστεί η βέλτιστη ποσότητα ενζύμου με σκοπό τη μείωση των δαπανών και την εξασφάλιση της οικονομικής εφικτότητας της διαδικασίας (Unugul et al. 2020; Kim et al. 2019). Σε πρόσθεση, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι πολυόλες συχνά λειτουργούν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς των λιπασών. Επομένως, η ποσότητα της αλκοόλης που προστίθεται στην αντίδραση μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα του ενζύμου (Adlercreutz, 2013).

Οι Unugul et al. (2020) πραγματοποίησαν βελτιστοποίηση της εστεροποίησης σε έλαιο από απόβλητα καφέ με τη λιπάση Novozyme 435, σε ποσοστά προσθήκης έως 20%. Σημείωσαν βέλτιστη απόδοση μετατροπής 42% με προσθήκη του ενζύμου 5%. Η αύξηση της ποσότητας του ενζύμου οδήγησε πρώτα σε αύξηση της απόδοσης μετατροπής, όμως όταν το ένζυμο προστέθηκε σε υψηλότερο ποσοστό, η απόδοση παρουσίασε μείωση (Unugul et al. 2020). Παρομοίως οι Fernandes et al. (2018),

αξιολόγησαν την παραγωγή βιολιπαντικών από απόσταγμα αποβλήτων φοινικέλαιου με διαφορετικές συγκεντρώσεις της Lipomod 34MDP, σε ποσοστά 0,5%-4%, με τις αλκοόλες TMP και NPG (Fernandes et al. 2018). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι Aguiéiras et al. (2020) με τη χρήση των ενζύμων Novozyme 435 (*C. antarctica*) και Lipozyme RM IM (*R. miehei*) (Aguieiras et al. 2020). Αντίθετα, οι Wafti et al. (2021) πραγματοποίησαν μελέτη με τις λιπάσες Lipomod 34MDP (*C. rugosa*) και Lipozyme IM 20 (*R. miehei*) με υψηλότερες συγκεντρώσεις από 10%-50% (Abd Wafti et al. 2021).

2 Σκοπός της μελέτης

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε η παραγωγή βιολιπαντικών χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη φυτικό έλαιο καφέ και μικροβιακό έλαιο του ελαιογόνου μικροοργανισμού *C. curvatus* ATCC 20509.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση του φυτικού ελαίου από στερεά απόβλητα καφέ, χρησιμοποιώντας το εξάνιο ως διαλύτη. Πραγματοποιήθηκε επίσης ημισυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα υπό περιορισμό σε άζωτο για την παραγωγή μικροβιακού ελαίου από τον ελαιογόνο μικροοργανισμό *C. curvatus* ATCC 20509.

Η παραγωγή των βιολιπαντικών διακρίνεται σε δύο κύρια στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης του ελαίου, χρησιμοποιώντας το ένζυμο Lipomod 34MDP ως καταλύτη. Κατά το δεύτερο στάδιο, παραλήφθηκαν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, και στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ενζυμική εστεροποίησή τους μελετώντας δύο πολυόλες, το τριμεθυλοπροπάνιο (TMP) και τη νεοπεντυλογλυκόλη (NPG). Κατά τη διαδικασία της εστεροποίησης μελετήθηκε η χρήση των ενζύμων Lipomod 34MDP και Novozyme 435 για την παραγωγή του τελικού προϊόντος, ενώ μελετήθηκαν διαφορετικές συνθήκες όπως: λόγος ελαίου προς αλκοόλη, θερμοκρασία, ποσοστό νερού κατά την εστεροποίηση και ποσοστό ενζύμου.

Μέσω του προσδιορισμού της οξύτητας υπολογίστηκε η απόδοση μετατροπής μεταξύ του αρχικού υποστρώματος και του τελικού προϊόντος.

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Πρώτες ύλες

Ως πρώτες ύλες στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυτικό έλαιο καφέ, το οποίο εκχυλίστηκε από τα στερεά απόβλητα καφέ, και μικροβιακό έλαιο που παράχθηκε μέσω ζύμωσης της ελαιογόνου ζύμης *C. curvatus* ATCC 20509.

3.2 Μικροοργανισμός

Για την πραγματοποίηση της ημι-συνεχούς ζύμωσης προς την βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων χρησιμοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *C. curvatus* ATCC 20509. Μακροχρόνια αποθήκευση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία -80°C σε διάλυμα γλυκερόλης (50%, v/v) προκειμένου να διατηρηθούν βιώσιμα τα κύτταρα για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, εφόσον κάτω από τέτοιες συνθήκες οι διάφορες λειτουργίες αναστέλλονται.

3.3 Υπόστρωμα Προκαλλιέργειας

Η ανάπτυξη του εμβολίου πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες 500 mL (Erlenmeyer baffled flasks) με ενεργό όγκο 100 mL. Το θρεπτικό μέσο αποτελείτο από γλυκόζη, πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης, όλα σε συγκέντρωση 10 g/L. Όλα τα υλικά και τα θρεπτικά μέσα αποστειρώθηκαν στους 121°C για 20 λεπτά, με την πηγή άνθρακα να αποστειρώνεται ξεχωριστά από τα υπόλοιπα θρεπτικά. Οι αποστειρωμένες κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής με ένα φιαλίδιο cryovial, στο οποίο φυλασσόταν το εναιώρημα κυττάρων. Στη συνέχεια, οι εμβολιασμένες προκαλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (Shaker, New Brunswick Sc, USA) υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ($30\pm 1^{\circ}\text{C}$) και ανάδευσης (180 ± 5 rpm) για περίπου 24 ώρες. Στη συνέχεια, το εμβόλιο (10%, v/v) προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης υπό ασηπτικές συνθήκες.

3.4 Βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού ελαίου σε ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα

Για την παραγωγή επαρκούς ποσότητας μικροβιακού ελαίου πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 6.7 L (Bioengineering, RALF Advanced) με ενεργό όγκο 3 L. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε εμπορική γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση πηγής άνθρακα ~100 g/L. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου αποτελείτο από 6 g/L εκχύλισμα ζύμης και μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Το pH ήταν σταθερό στο $6\pm 0,2$ και η θερμοκρασία της ζύμωσης διατηρείτο σταθερή στους 30°C. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιούνταν με αυτόματη προσθήκη 10M NaOH όταν χρειαζόταν. Ο ρυθμός ανάδευσης στο βιοαντιδραστήρα ήταν σταθερός στα 600 rpm με σταθερή παροχή αερισμού στο 1 vvm. Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υγρό της ζύμωσης ήταν περίπου στα 20 g/L πραγματοποιούνταν προσθήκη πυκνού διαλύματος γλυκόζης (συγκέντρωσης ~750 g/L).

Πίνακας 2. Μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων θρεπτικού μέσου

Σύσταση θρεπτικού μέσου	
KH ₂ PO ₄ (g/L)	7
Na ₂ HPO ₄ (g/L)	2,5
FeCl ₃ · 6H ₂ O (g/L)	0,15
MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/L)	1,5
MnSO ₄ · H ₂ O (g/L)	0,06
ZnSO ₄ · H ₂ O (g/L)	0,02
CaCl ₂ · 2H ₂ O (g/L)	0,015

3.5 Εκχύλιση ελαίων

3.5.1 Φυτικό έλαιο καφέ

Τα στερεά απόβλητα καφέ (SCGs), που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή του ελαίου, συλλέχθηκαν από τοπικά καταστήματα εστίασης σε νωπή μορφή και δεν προέρχονται από μία συγκεκριμένη ποικιλία καφέ. Μετά τη συλλογή, τα SCGs

υποβλήθηκαν σε διαδικασία ξήρανσης στους 80°C μέχρι να απομακρυνθεί η υγρασία. Η εκχύλιση του φυτικού ελαίου καφέ από τα SCGs πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εξάνιου σε αναλογία στερεού προς υγρό 1:10 (w/v) υπό την επίδραση υπερήχων σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά. Τα SCGs παρέμειναν στο εξάνιο για 72 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διήθηση για την πλήρη απομάκρυνση των στερεών. Το υγρό εκχύλισμα εξατμίστηκε υπό κενό στους 40°C χρησιμοποιώντας έναν περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary evaporator, BUCHI, R-114), από όπου παραλήφθηκε το φυτικό έλαιο του καφέ.

3.5.2 Μικροβιακό έλαιο

Μετά την ολοκλήρωση της ημι-συνεχούς καλλιέργειας στο βιοαντιδραστήρα, ακολουθεί η διαδικασία παραλαβής των κυττάρων ζύμης πλούσια σε μικροβιακό έλαιο. Αρχικά, το υγρό της ζύμωσης μεταφέρεται σε ένα δοχείο ζέσεως και θερμαίνεται στους 80°C με σκοπό την θανάτωση των κυττάρων. Στη συνέχεια, το υγρό φυγοκεντρείται αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου (Sorvall Lynx 6000 Centrifuge) με ταχύτητα 10.000 rpm για 10 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται, η βιομάζα ξεπλένεται δύο φορές με απιονισμένο νερό, και μεταφέρεται σε κατάλληλα δοχεία του λυοφιλιωτή (freeze dryer) για την απομάκρυνση της υγρασίας. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας ξήρανσης, η βιομάζα κονιορτοποιείται και αποθηκεύεται μέχρι την επόμενη χρήση.

3.6 Παραγωγή βιολιπαντικών με χρήση φυτικού ελαίου καφέ και μικροβιακού λίπους ως πρώτη ύλη

3.6.1 Ενζυμικοί βιοκαταλύτες

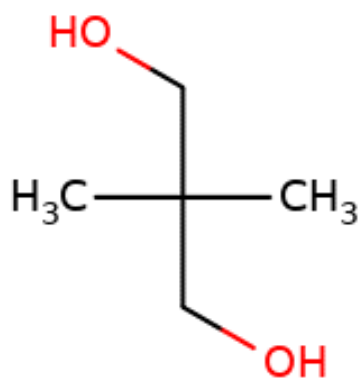
Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν οι λιπάσες Novozyme 435 (λιπάση B από τη *C. antarctica*) προσδεδεμένη σε μακροπορώδη ακρυλική ρητίνη και Lipozyme®. Η λιπάση B από τη *C. antarctica* παρασκευάστηκε στο Biochemistry Department and Polymer Engineering Laboratory/Engopol of the Federal University of Rio de Janeiro στην Βραζιλία ενώ η λιπάση Lipomod 34MDP (προερχόμενη από τη *C. rugosa*), αγοράστηκε από την εταιρεία Biocatalysts Ltd. και παρασχέθηκε ευγενικά επίσης από το Biochemistry Department and Polymer Engineering Laboratory / Engopol of the Federal University of Rio de Janeiro στην Βραζιλία.

3.6.2 Υδρόλυση και εστεροποίηση φυτικού ελαίου καφέ και μικροβιακού ελαίου μέσω ενζυμικής αντίδρασης για την παραγωγή βιολιπαντικών

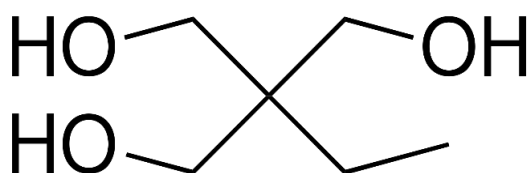
Η εστεροποίηση του φυτικού ελαίου καφέ και του μικροβιακού λίπους πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: α) το έλαιο υδρολύθηκε, και β) τα ελεύθερα λιπαρά οξέα απομονώθηκαν και υποβλήθηκαν σε εστεροποίηση μέσω ενζυμικής αντίδρασης για την παραγωγή βιολιπαντικών. Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμα εμπορικά πρότυπα για όλα τα λιπαρά οξέα που απαιτούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων προϊόντων μέσω αερίου χρωματογραφίας (GC), το στάδιο υδρόλυσης του λίπους αποτελεί απαραίτητο βήμα, επιτρέποντας τον έμμεσο ποσοτικό προσδιορισμό μέσω της διαφοράς στην οξύτητα μεταξύ των ληφθέντων δειγμάτων.

Αναλυτικά, για την υδρόλυση του φυτικού ελαίου και του μικροβιακού λίπους προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,1 M (pH 8.0) σε αναλογία 1:1 (v/v) και 2% (w/w) από την εμπορική λιπάση Lipomod TM 34MDP (Biocatalysts Inc., USA) ώστε να γίνει η αντίδραση στους 30°C για 24 h. Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με προσθήκη εξανίου. Το μίγμα τοποθετείται σε διαχωριστική χοάνη για τον διαχωρισμό της οργανικής (λίπος, ελεύθερα λιπαρά οξέα και διαλύτης) και της υδατικής (γλυκερόλη, ρυθμιστικό διάλυμα και ένζυμα) φάσης. Μετά τον διαχωρισμό, παραλήφθηκε η οργανική φάση και σε περιστροφικό εξατμιστήρα διαχωρίστηκαν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα από τον διαλύτη. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης συλλέγονται δείγματα σε τακτά χρονικά διαστήματα και ελέγχονται ως προς την οξύτητά τους, προκειμένου να ελεγχθεί η πορεία της υδρόλυσης.

Το δεύτερο στάδιο αποτελείται από την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων του φυτικού ελαίου και του μικροβιακού λίπους με μία πολυόλη. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι 2,2-Dimethylpropane-1,3-diol (NPG) και η 2-ethyl-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol (TMP). Η πολυόλη NPG περιέχει δύο υδροξυλομάδες και το μοριακό της βάρος είναι 104,15 g/mol (Εικόνα 10), ενώ η πολυόλη TMP περιέχει τρεις υδροξυλομάδες και το μοριακό της βάρος είναι 134,17 g/mol (Εικόνα 11).



Εικόνα 10 Δομή αλκοόλης 2,2-Dimethylpropane-1,3-diol (NPG)



Εικόνα 11 Δομή αλκοόλης 2-ethyl-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol (TMP)

3.6.3 Βελτιστοποίηση συνθηκών εστεροποίησης του φυτικού ελαίου και του μικροβιακού λίπους για παραγωγή βιολιπαντικών

3.6.3.1 Φυτικό έλαιο καφέ

Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιαλίδια των 50 mL, χρησιμοποιώντας 0,5 g ή 1 g δείγματος και την πολυόλη, υπό μαγνητική ανάδευση σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο με τη χρήση των ενζύμων Lipomod 34MDP και Novozyme 435. Η ποσοτικοποίηση του βαθμού εστεροποίησης του υδρολυμένου λίπους πραγματοποιήθηκε έμμεσα με τον προσδιορισμό της διαφοράς της οξύτητας μεταξύ των ληφθέντων δειγμάτων και περιγράφεται αναλυτικά στο κεφ. 3.7.1.

Για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε αρχικά μελέτη εστεροποίησης σε διάφορες μοριακές αναλογίες του υδρολυμένου ελαίου (FFAs) προς τις δύο πολυόλες/αλκοόλες. Για την TMP, οι μοριακές αναλογίες που εφαρμόστηκαν ήταν FFAs:TMP 3:1, 1:3 και 1:5, ενώ για την NPG οι μοριακές αναλογίες ήταν FFAs:NPG 2:1, 1:4 και 1:6.

Οι υπόλοιπες παράμετροι παρέμειναν σταθερές. Η προσθήκη του ενζύμου ήταν 4% (w/w, βάσει του συνολικού βάρους των υπόλοιπων αντιδρώντων) και πραγματοποιήθηκε τόσο για το Lipomod 34MDP όσο και για το Novozyme 435. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 45°C για το Lipomod 34MDP και στους 70°C για το Novozyme 435, ενώ παράλληλα εφαρμόστηκε συνεχής μαγνητική ανάδευση. Επιπλέον, η προσθήκη απιονισμένου νερού ήταν 1% (w/w) για όλα τα δείγματα. Οι παραπάνω πειραματικές συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της επίδρασης των διάφορων μοριακών αναλογιών στην εστεροποίηση και για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών παραγωγής βιολιπαντικών.

Έγινε η επιλογή της ιδανικής μοριακής αναλογίας για κάθε αλκοόλη, καθώς και η προτίμηση του πιο αποδοτικού ενζυμικού καταλύτη, σηματοδοτώντας το επόμενο στάδιο της βελτιστοποίησης της παραγωγής βιολιπαντικών.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων με στόχο τη βελτιστοποίηση των συνθηκών θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της εστεροποίησης. Δοκιμάστηκαν θερμοκρασίες στους 50°C, 70°C και 90°C, καθώς εφαρμόζονταν συνεχής μαγνητική ανάδευση. Ως ενζυμικός καταλύτης χρησιμοποιήθηκε το Novozyme 435 σε ποσοστό 4% (w/w), ενώ οι αναλογίες των πολυολών ήταν FFAs:TMP 1:5 και FFAs:NPG 1:6. Η προσθήκη απιονισμένου νερού ήταν 1% (w/w) για όλα τα δείγματα.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η προσθήκη απιονισμένου νερού σε ποσοστά 1%, 5% και 10% αντίστοιχα. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 70°C, ενώ οι αναλογίες των πολυολών ήταν FFAs:TMP 1:5 και FFAs:NPG 1:6 αντίστοιχα. Το ποσοστό προσθήκης του ενζύμου Novozyme 435 παρέμεινε σταθερό στο 4% (w/w).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση ως προς την προσθήκη του ενζύμου Novozyme 435. Δοκιμάστηκαν διάφορα ποσοστά προσθήκης, συγκεκριμένα 0,1% (w/w), 1% (w/w) και 4% (w/w). Η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή στους 70°C, ενώ οι αναλογίες των πολυολών ήταν FFAs:TMP 1:5 και FFAs:NPG 1:6 αντίστοιχα. Η προσθήκη απιονισμένου νερού που επιλέχθηκε ήταν 1% για όλα τα δείγματα.

Δείγματα συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια όλων των εστεροποιήσεων. Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση προκειμένου να διαχωριστεί το ένζυμο από το προϊόν που περιείχε τους εστέρες πολυόλης, καθώς και τα άκωρεστα συστατικά που δεν αντέδρασαν, όπως η περίσσεια αλκοόλης και τα λιπαρά οξέα. Η ποσοτικοποίηση του βαθμού εστεροποίησης του υδρολυμένου ελαίου

πραγματοποιήθηκε έμμεσα, με τον προσδιορισμό της διαφοράς της οξύτητας μεταξύ των ληφθέντων δειγμάτων.

3.6.3.2 Μικροβιακό έλαιο

Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιαλίδια των 50 mL, χρησιμοποιώντας 0,5 g ή 1 g δείγματος και την πολυόλη, υπό μαγνητική ανάδευση σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο με τη χρήση των ενζύμων Lipomod 34MDP και Novozyme 435.

Για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε εστεροποίηση υπό διάφορες μοριακές αναλογίες του υδρολυμένου ελαίου (FFAs) προς τις δύο πολυόλες, TMP και NPG. Οι υπόλοιπες παράμετροι παρέμειναν σταθερές, με προσθήκη ενζύμου 4% (w/w, βάσει συνολικού βάρους αντιδραστήριων) τόσο για το Lipomod 34MDP όσο και για το Novozyme 435. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 45°C για το Lipomod 34MDP και στους 70°C για το Novozyme 435 υπό μαγνητική ανάδευση, ενώ η προσθήκη απιονισμένου νερού ήταν σταθερά στο 1% (Βελτιστοποιημένες συνθήκες).

3.7 Αναλυτικές τεχνικές

3.7.1 Προσδιορισμός βαθμού εστεροποίησης του ελαίου προς παραγωγή βιολιπαντικών ουσιών

Η ποσοτικοποίηση του βαθμού εστεροποίησης του υδρολυμένου μικροβιακού λίπους πραγματοποιήθηκε έμμεσα με τον προσδιορισμό της διαφοράς της οξύτητας μεταξύ των ληφθέντων δειγμάτων. Τα δείγματα ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια προστίθενται 40 mL διαλύματος αιθανόλης και ακετόνης σε αναλογία 1:1 και ακολουθούσε τιτλοδότηση με 0,04 M NaOH, παρουσία δείκτη φαινολοφθαλεΐνης.

Αρχικά, υπολογίστηκε η οξύτητα των δειγμάτων με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Οξύτητα (\%)} = \frac{V \times M \times FA}{w}$$

Όπου, V είναι ο όγκος του NaOH που καταναλώθηκε (L), M η συγκέντρωση του NaOH (0,04 M), FA είναι το μοριακό βάρος των ελεύθερων λιπαρών οξέων, και το w είναι το βάρος του δείγματος (g). Το μοριακό βάρος των λιπαρών οξέων υπολογίστηκε

περίπου 271,6 g/mol για την ζύμη *C. curvatus* και 263,2 g/mol για το έλαιο καφέ, βάση της σύστασης των δύο ελαίων.

Στη συνέχεια ο βαθμός εστεροποίησης για κάθε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της αντίδρασης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Βαθμός εστεροποίησης (\%)} = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$$

Όπου, A_i είναι οξύτητα των λιπαρών οξέων και A_f η οξύτητα του προϊόντος.

3.7.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός κυτταρικής βιομάζας

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 στο 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.

3.7.3 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 κονιοροποιείται και προστίθεται μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης αναλογίας 2:1 (Folch, Lees, and Stanley 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. Τέλος το δείγμα αφήνεται σε συνθήκες σκότους, για την αποφυγή της φωτο-οξείδωσης 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 εξάτμιστήρα (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.

3.7.4 Προσδιορισμός σύστασης των μεθυλεστέρων των ελεύθερων λιπαρών οξέων

Η ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων που περιέχονται στο μικροβιακό λίπος πραγματοποιήθηκε με χρήση αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC). Αυτή η μέθοδος απαιτεί τη μετατροπή των λιπαρών οξέων σε μεθυλεστέρες (Fatty Acid Methyl Esters, FAMES), λόγω της υψηλότερης τους πτητικότητας και της χαμηλής πολικότητάς τους σε σύγκριση με τα λιπαρά οξέα. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η μετατροπή, προστίθενται 0,5 g μικροβιακού ελαίου σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα χωρητικότητας 10 mL, και προστίθενται 5 mL κανονικού επτανίου χρωματογραφικής καθαρότητας και 1 mL μεθανολικού διαλύματος KOH 2M. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται για 30 δευτερόλεπτα και αφήνονται ακίνητοι για 15 λεπτά. Κατά το πέρας αυτού του χρόνου, δημιουργούνται δύο φάσεις και 0,5 mL λαμβάνονται από την ανώτερη οργανική φάση, όπου περιέχονται οι μεθυλεστέρες, για ανάλυση.

Ο προσδιορισμός των FAMES πραγματοποιήθηκε σε μηχανή 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 CH₂Cl₂, 47885-U, Merck).

3.7.5 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 H₂SO₄ 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).

3.7.6 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 νινυδρίνη (2,2-διϋδροξυϊνδανο-1,3-διόνη) σε pH 6-7 και το παραγόμενο χρώμα φωτομετρείται στα 570 nm. Η νινυδρίνη είναι ένας οξειδωτικός παράγοντας που προκαλεί οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση των α-αμινοξέων, σε μία αντίδραση που παράγονται αμμωνία (NH₃), διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), και μία αλδεΰδη 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.

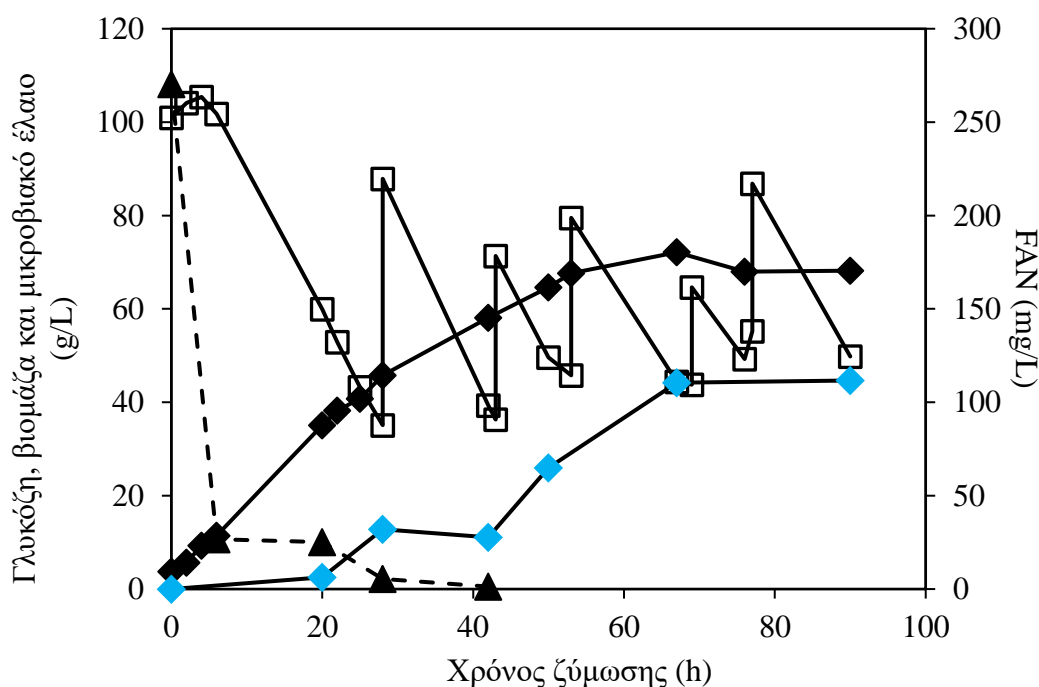
Για την υλοποίηση της μεθόδου, σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος, 0,5 mL αντιδραστήριου χρώσης (Color Reagent: 49,71 g Na₂HPO₄·2H₂O, 5 g νινυδρίνης, 3 g φρουκτόζη ως αναγωγική ουσία, 60 g KH₂PO₄ για ρύθμιση pH και συμπλήρωση μέχρι το 1L με dH₂O). Το μίγμα αναδεύεται καλά σε vortex, οι σωλήνες πωματίζονται και οδηγούνται προς βρασμό για 16 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη σε παγόλουτρο για 20 λεπτά και προσθήκη αντιδραστηρίου αραίωσης (Αντιδραστήριο αραίωσης-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 πρότυπη καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως πρότυπο διάλυμα γλυκίνης. Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε άζωτο εκφράστηκε σε mg/L FAN με βάση την καμπύλη αναφοράς.

4 Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού ελαίου σε βιοαντιδραστήρα

Ο μικροοργανισμός *C. curvatus* 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 γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες (Διάγραμμα 1). Η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 100,9 g/L ενώ η αρχική συγκέντρωση FAN ήταν 270,3 mg/L, όπου και καταναλώθηκε τις πρώτες ώρες της ζύμωσης. Στις 67 ώρες της ζύμωσης, η συγκέντρωση της βιομάζας έφτασε στα 72 g/L με τη μέγιστη παραγωγή μικροβιακού λίπους να είναι ίση με 44,2 g/L, ποσοστό που αντιστοιχεί σε 59,66% w/w λιποπεριεκτικότητα. Η απόδοση και παραγωγικότητα της ζύμωσης ήταν 0,24 g/g και 0,66 g/(L·h), αντίστοιχα.



Διάγραμμα 1. Κινητική κατανάλωσης γλυκόζης (□) και FAN (▲) καθώς και της παραγωγής βιομάζας (◆) και μικροβιακού ελαίου (◆) κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης με τη χρήση του μικροοργανισμού *C. curvatus*.

Τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στο μικροβιακό έλαιο που παράχθηκε χρησιμοποιώντας γλυκόζη ως πηγή άνθρακα κατά την ημι-συνεχή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 για διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης. Τα κύρια λιπαρά οξέα ήταν το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1), το παλμιτικό οξύ (C16:0), το λινολεϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και το στεατικό οξύ (C18:0).

Πίνακας 3 Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους από το μικροοργανισμό *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509

Χρόνος ζύμωσης (h)	C16:0	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{9,12,15}$ C18:3	Άλλα
42	29,3	8,1	45,3	11,3	1,5	4,5
50	26,3	12,5	50,1	6,7	1,6	2,8
67	19,9	16,0	53,6	8,8	1,3	0,4

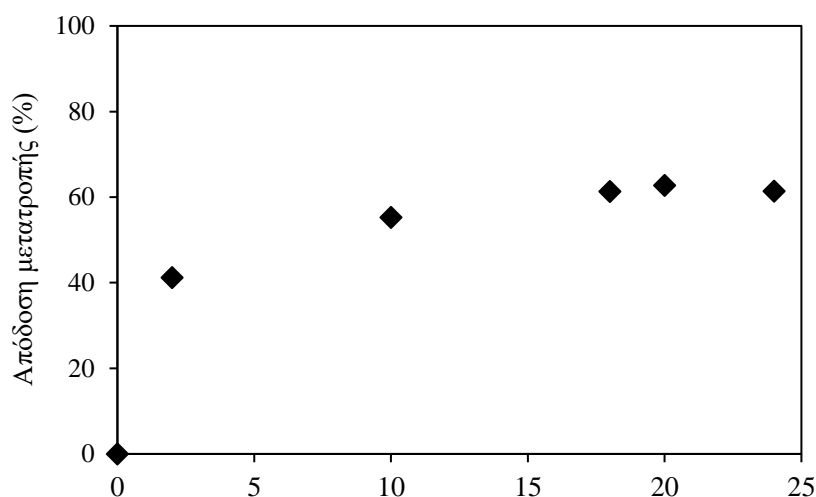
4.2 Ενζυμική υδρόλυση φυτικού ελαίου καφέ και μικροβιακού ελαίου

4.2.1 Ενζυμική υδρόλυση τριγλυκεριδίων ελαίου καφέ

Αρχικά το έλαιο καφέ υδρολύθηκε με τη χρήση του ενζυμικού καταλύτη Lipomod 34MDP (*Candida rugosa*), με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο ελεγχόμενης θερμοκρασίας στους 30°C και όταν η θερμοκρασία σταθεροποιήθηκε προστέθηκε το ένζυμο Lipomod 34MDP, υπό μαγνητική ανάδευση. Η αντίδραση διήρκησε 24 ώρες και στο τέλος τερματίστηκε με την προσθήκη εξανίου. Στη συνέχεια το μείγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου συλλέχθηκε το ανώτερο στρώμα, που περιείχε τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και το διαλύτη. Η απομάκρυνση του εξανίου πραγματοποιήθηκε με εξάτμιση υπό κενό σε περιστροφικό εξάτμιστήρα στους 50°C.

Κατά την ενζυμική υδρόλυση του ελαίου παράγονται ελεύθερα λιπαρά οξέα τα οποία οδηγούν στην αύξηση της οξύτητας του δείγματος. Συλλέχθηκαν δείγματα, τα οποία τιτλοδοτήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό της οξύτητας και της ποσοστιαίας απόδοσης μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ. Η αρχική οξύτητα του ελαίου καφέ ήταν 36% και μετά από 24 ώρες αυξήθηκε και έφτασε σε ποσοστό 71%. Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζεται η απόδοση μετατροπής του ελαίου καφέ προς παραγωγή

ελεύθερων λιπαρών οξέων, χρησιμοποιώντας 1% (w/w) του ενζύμου Lipomod 34MDP, εντός των 24 ωρών της αντίδρασης. Η απόδοση αυτή έφτασε το 61,4% στις 24 ώρες.



Διάγραμμα 2. Απόδοση μετατροπής (%) της υδρόλυσης του ελαίου καφέ με 1% lipomod 34MDP σε συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης (h) για 24h.

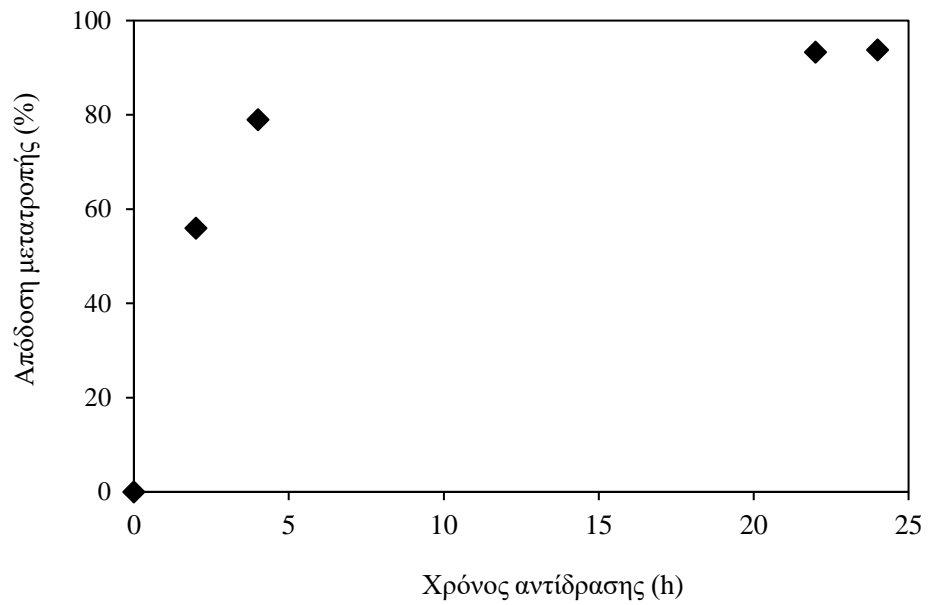
Συνολικά στη βιβλιογραφία τα ποσοστά της απόδοσης της ενζυμικής υδρόλυσης των φυτικών ελαίων που παρουσιάζονται είναι σημαντικά χαμηλότερα από αυτό που σημειώθηκε στη παρούσα μελέτη. Οι Unugul et al. (2020) διεξήγαγαν έρευνα για την παραγωγή βιολιπαντικών από έλαιο αποβλήτων καφέ, με προσθήκη 0,8% της λιπάσης Lipozyme TL-IM (*Thermomyces lanuginosus*) και σημείωσαν 31% περιεκτικότητα σε FFAs, ενώ παράλληλα παρατήρησαν πως όταν η ποσότητα του καταλύτη αυξανόταν περισσότερο δεν παρατηρήθηκε αύξηση της περιεκτικότητας σε FFAs. Ενώ θεωρητικά θα έπρεπε η αύξηση του ενζύμου να οδηγεί σε ανάλογη αύξηση των FFAs, στην πραγματικότητα γίνεται κορεσμός του ενζύμου, με αποτέλεσμα εάν προστεθεί μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου, η αντίδραση να παρεμποδίζεται και τελικά η ταχύτητα της να επιβραδύνεται (Unugul et al. 2020). Σε αντίστοιχη μελέτη, οι Freitas et al. (2007) μελέτησαν την ενζυμική υδρόλυση σογιέλαιου με τις λιπάσες CRL (*C. rugosa*) και Lipolase (*Thermomyces lanuginosa*), σε ποσοστά ενζύμου 1% και 3% στους 40°C, επιτυγχάνοντας ποσοστά απόδοσης μετατροπής των FFAs 50%-70% εντός των πρώτων 24 h της ενζυμικής υδρόλυσης. Σε μια άλλη έρευνα, το καστορέλαιο υποβλήθηκε σε υδρόλυση από ενδογενείς λιπάσες για την παραγωγή FFAs, επιτυγχάνοντας την απελευθέρωση περίπου 93% των λιπαρών οξέων μετά από μία ώρα αντίδρασης (Greco-Duarte et al. 2017).

4.2.2 Ενζυμική υδρόλυση τριγλυκεριδίων μικροβιακού ελαίου

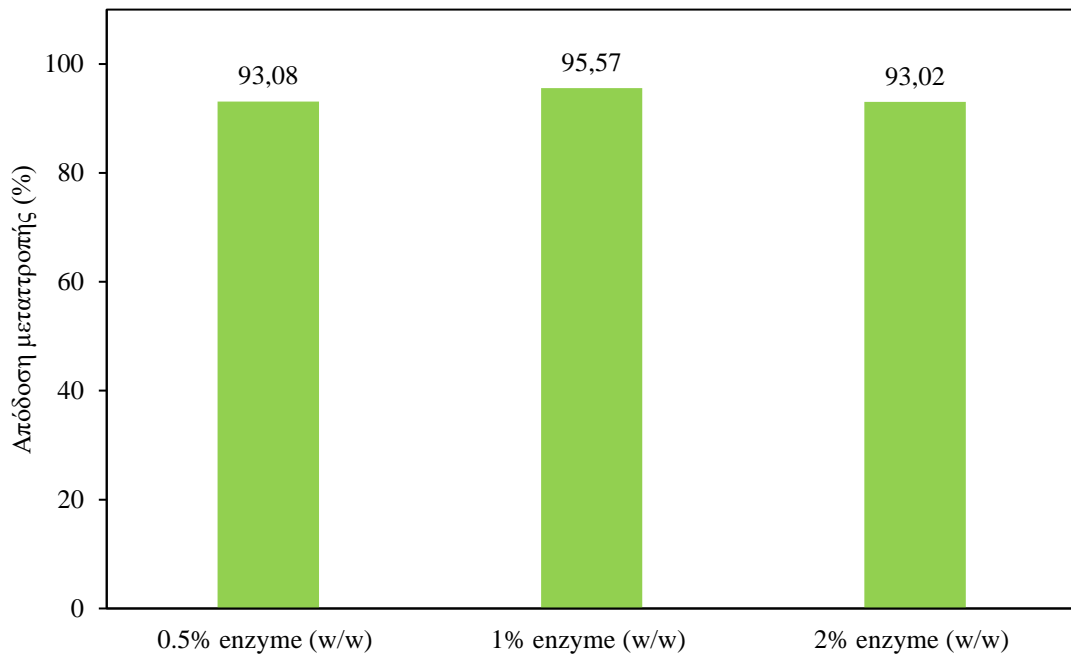
Για την ενζυμική υδρόλυση των τριγλυκεριδίων του μικροβιακού ελαίου, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία όπως και στην περίπτωση του ελαίου του καφέ, όπως αναφέρεται προηγουμένως. Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η απόδοση μετατροπής των εστέρων του μικροβιακού ελαίου του *C. curvatus* προς παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων με χρήση του ενζύμου Lipomod 34MDP σε συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης. Παρατηρούμε ότι η απόδοση μετατροπής της υδρόλυσης του μικροβιακού ελαίου έφτασε σε ποσοστό 95,57% με προσθήκη ενζύμου 1% στις 24 ώρες. Στην περίπτωση του μικροβιακού ελαίου η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με την ενζυμική υδρόλυση του ελαίου του καφέ. Παρόμοια αποτελέσματα σημείωσαν οι Papadaki et al. (2018) σε έρευνα τους με σκοπό την παραγωγή βιολιπαντικών από μικροβιακό έλαιο του *C. curvatus*. Διεξήγαγαν ενζυμική υδρόλυση με χρήση του ενζύμου Lipomod 34MDP σε ποσοστό 2% και παρατηρήθηκε αύξηση της οξύτητας από 11% σε 96% κατά διάρκεια 24 ωρών ενζυμικής υδρόλυσης.

Στο Διάγραμμα 4 απεικονίζονται συνολικά οι ποσοστιαίες συγκεντρώσεις 0,5%, 1% και 2% Lipomod 34MPD, οι οποίες εφαρμόστηκαν με σκοπό την επίτευξη της υδρόλυσης του μικροβιακού ελαίου. Η υδρόλυση με 2% Lipomod 34MPD έφτασε σε ποσοστό 93,79% και πάλι κοντά στις 24 h. Τέλος απόδοση μετατροπής του μικροβιακού ελαίου του *C. curvatus* προς παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων με προσθήκη 0,5% του ίδιου ενζύμου για 24h υδρόλυσης η μέγιστη απόδοση μετατροπής ήταν 93,02%. Η αρχική οξύτητα του μικροβιακού ελαίου πριν την υδρόλυση ήταν 4,66 %, έπειτα από 24 ώρες αυξήθηκε σε ποσοστό 69,68%.

Οι αποδόσεις μετατροπής όσον αφορά και τα τρία ποσοστά ενζύμου δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις. Μπορεί να εξαχθεί λοιπόν το συμπέρασμα πως η προσθήκη Lipomod 34MPD, σε ποσοστό 0,5% είναι ικανή να οδηγήσει σε αποδόσεις μετατροπής της υδρόλυσης του μικροβιακού ελαίου ανάλογες των δύο υψηλότερων αναλογιών που δοκιμάστηκαν, δηλαδή 1% και 2%.



Διάγραμμα 4. Απόδοση μετατροπής (%) της υδρόλυσης του μικροβιακού ελαίου με 1% *Lipomod 34MDP* σε συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης (h) για 24h.



Διάγραμμα 3. Απόδοση μετατροπής (%) της ενζυμικής υδρόλυσης του μικροβιακού ελαίου με διαφορετικά ποσοστά ενζύμιου *Lipomod 34MDP*.

4.3 Ενζυμική εστεροποίηση για τη παραγωγή βιολιπαντικών

4.3.1 Φυτικό έλαιο καφέ

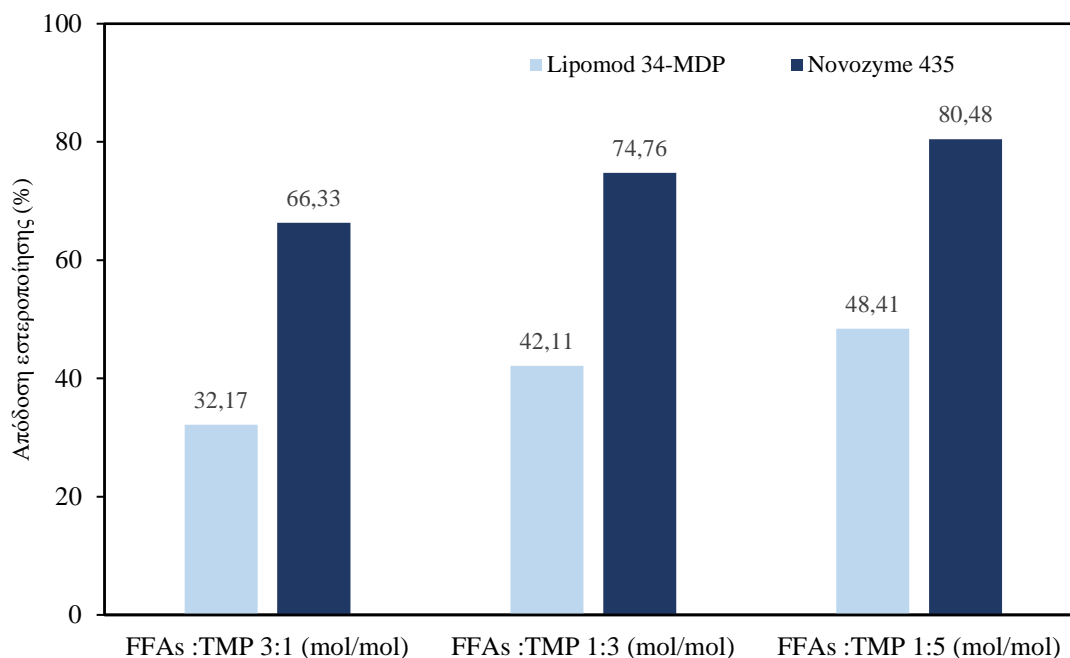
Η εστεροποίηση του υδρολυμένου φυτικού ελαίου του καφέ μελετήθηκε χρησιμοποιώντας δύο πολυόλες, την TMP και την NPG, καθώς και τα ένζυμα Lipomod 34MDP και Novozyme 435, όπως προαναφέρθηκε. Οι αντιδράσεις εστεροποίησης πραγματοποιήθηκαν υπό συνεχή ανάδευση σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο και είχαν διάρκεια περίπου 48 ώρες. Κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων, συλλέχθηκαν δείγματα για τον προσδιορισμό της απόδοσης μετατροπής των ελεύθερων λιπαρών οξέων του υδρολυμένου ελαίου σε βιολιπαντικό. Η απόδοση μετατροπής (%) υπολογίστηκε μέσω του υπολογισμού της διαφοράς οξύτητας, με τη χρήση 0,05M NaOH με προσθήκη δείκτη φαινολοφθαλεΐνης.

4.3.1.1 Μοριακή αναλογία ελαίου προς αλκοόλη

Αρχικά, η εστεροποίηση πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή διαφορετικών μοριακών αναλογιών υδρολυμένου ελαίου (FFAs) προς τις δύο αλκοόλες. Για την TMP, οι μοριακές αναλογίες που εφαρμόστηκαν ήταν FFAs:TMP 3:1, 1:3 και 1:5 αντίστοιχα, ενώ για την NPG, οι μοριακές αναλογίες ήταν FFAs:NPG 2:1, 1:4 και 1:6 αντίστοιχα.

Σε όλες τις περιπτώσεις προστέθηκε 4% Lipomod 34MDP ή Novozyme 435. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 45°C για την περίπτωση του Lipomod 34MDP και 70°C για την περίπτωση του Novozyme 435, υπό μαγνητική ανάδευση. Επιπλέον, προστέθηκε 1% απιονισμένο νερό.

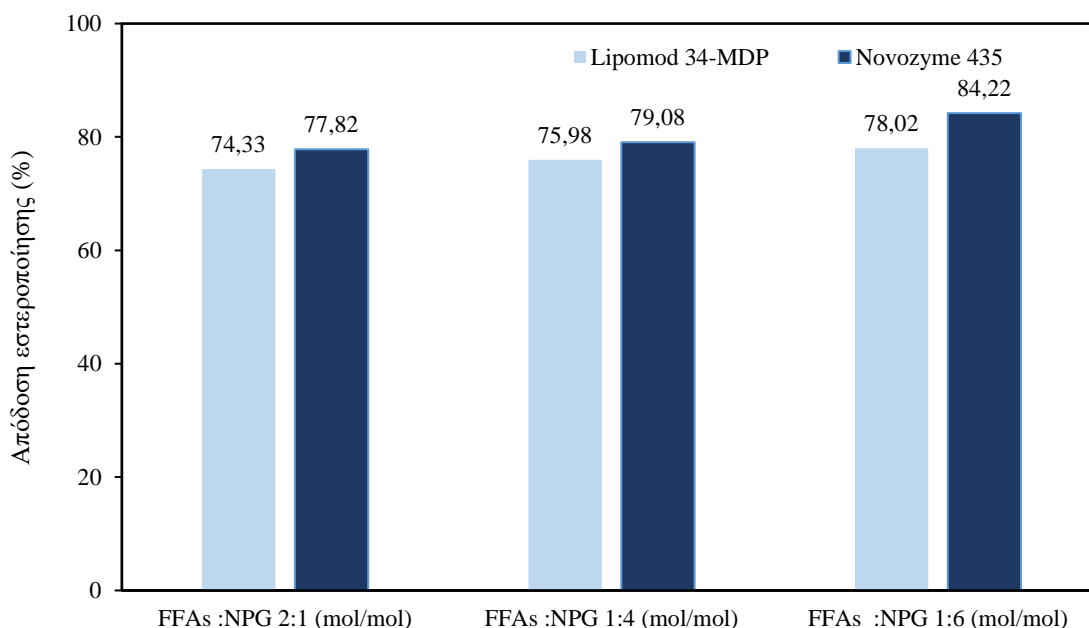
Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζεται η απόδοση εστεροποίησης του υδρολυμένου ελαίου καφέ χρησιμοποιώντας την αλκοόλη TMP σε μοριακές αναλογίες FFAs:TMP 3:1, 1:3 και 1:5 (mol/mol), και για τα δύο ένζυμα που μελετήθηκαν. Παρατηρείται ότι η μέγιστη απόδοση εστεροποίησης του ελαίου σε βιολιπαντικό επιτυγχάνεται με την αλκοόλη TMP σε αναλογία 1:5 και με χρήση του ενζύμου Novozyme 435, φτάνοντας το 80,48%. Σε αντίθεση, η υψηλότερη απόδοση μετατροπής με το Lipomod 34MDP είναι σημαντικά χαμηλότερη ίση με 48,41% στην ίδια μοριακή αναλογία.



Διάγραμμα 5. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ σε εστέρες, με την αλκοόλη TMP σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες με τα ένζυμα Lipomod 34MDP και Novozyme 435.

Η απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ με την αλκοόλη NPG με μοριακές αναλογίες FFAs:NPG 2:1, 1:4, και 1:6 (mol/mol) και με τα ένζυμα Lipomod 34MDP και Novozyme 435, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 6. Τη μέγιστη απόδοση μετατροπής του ελαίου σε βιολιπαντικό με χρήση της NPG την παρουσιάζει η αναλογία FFAs:NPG 1:6 και με χρήση της λιπάσης Novozyme 435 (84,22%). Η μέγιστη απόδοση της NPG με τη Lipomod 34MDP ήταν 78,02%, ποσοστό που είναι σχεδόν διπλάσιο από την απόδοση του ίδιου ενζύμου όταν χρησιμοποιήθηκε η TMP. Συνολικά στην παραγωγή βιολιπαντικού από έλαιο καφέ μεταξύ των δύο αλκοολών η NPG παρουσίασε

ποσοστό απόδοσης τα οποία ήταν ανώτερα του 74% τόσο όταν έγινε χρήση του ενζύμου Lipomod 34MDP, όσο και όταν έγινε η χρήση του ενζύμου Novozyme 435.



Διάγραμμα 6. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ σε εστέρες, με την αλκοόλη NPG σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες με τα ένζυμα Lipomod 34MDP και Novozyme 435.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, επιλέχθηκε η λιπάση Novozyme 435 ως το πιο αποδοτικό ένζυμο, καθώς κατέγραψε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά στις αντιδράσεις εστεροποίησης σε σύγκριση με το ένζυμο Lipomod 34MDP. Οι βέλτιστες μοριακές αναλογίες για τις διάφορες αλκοόλες καθορίστηκαν σε FFAs:TMP 1:5 (mol/mol), επιτυγχάνοντας μέγιστη απόδοση μετατροπής 80,48%, και FFAs:NPG 1:6 (mol/mol), με μέγιστη απόδοση μετατροπής 84,22%. Η χαμηλότερη απόδοση της TMP πιθανώς να εξηγείται από τη χαμηλότερη διαλυτότητα της συγκεκριμένης αλκοόλης στα FFAs (Fernandes et al., 2021). Γενικά το Novozyme 435 θεωρείται ως σήμερα ένας από τους πιο αποτελεσματικούς βιοκαταλύτες τόσο στην παγκόσμια βιομηχανία, όσο και στον ερευνητικό τομέα (Abd Wafti et al., 2022; Abd Wafti et al., 2021).

Παρόμοια ποσοστά στην ενζυμική εστεροποίηση για την παραγωγή βιολιπαντικών παρουσιάστηκαν και σε άλλες έρευνες σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Οι Fernandes et al. (2018) παρήγαγαν βιολιπαντικά με χρήση της λιπάσης Lipomod 34MDP από απόσταγμα απόβλητων φοινικέλαιου χρησιμοποιώντας την NPG αλλά και την TMP, και σημείωσαν μέγιστες αποδόσεις του επιπέδου 87% και 94% αντίστοιχα. Παρομοίως,

με χρήση της λιπάσης Novozyme 435 με την TMP σε φυτικό έλαιο ως υπόστρωμα, η μέγιστη μετατροπή ήταν περίπου 84% (Kim et al., 2019). Οι Linko et al. (1997) διεξήγαγαν μελέτη για τη παραγωγή λιπαντικών χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το κραμβέλαιο. Πραγματοποίησαν εστεροποίηση εφαρμόζοντας μοριακή αναλογία 3,5:1 (FFAs:TMP) με διάρκεια 66 h και επιτεύχθηκε απόδοση μετατροπής σε ποσοστό 75%. Επίσης σε ενζυμική εστεροποίηση κραμβέλαιου με χρήση της λιπάσης της *C. rugosa* σε ποσοστό 3.4%, σημείωσαν απόδοση του επιπέδου του 87% σε αντίδραση διάρκειας 5 ωρών σε βιοαντιδραστήρα, με μοριακή αναλογία ελαίου:αλκοόλης 1:2.8, προσθήκη νερού 1% και σταθερή θερμοκρασία στους 37°C (da Silva, 2011). Παρομοίως οι Uosukainen et al. (1998) κατέγραψαν απόδοση μετατροπής 75% με χρήση της TMP και κραμβέλαιου μετά από αντίδραση 24 ωρών που πραγματοποιήθηκε σε μοριακή αναλογία κραμβέλαιο:TMP 3:1 και θερμοκρασία (37 °C), αλλά με υψηλότερη συγκέντρωση της λιπάσης της *Candida rugosa* (40%). Επιπλέον, οι Unugul et al. (2020) διαπίστωσαν πως η μοριακή αναλογία FFAs:TMP 3:1 ήταν αυτή που παρείχε την κατάλληλη στοιχειομετρία ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή μετατροπή του ελαίου καφέ σε εστέρα. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, όσον αφορά την αντίδραση της εστεροποίησης, όσο υψηλότερη είναι η μοριακή αναλογία που χρησιμοποιείται, τόσο μειώνεται η μετατροπή των FFAs σε εστέρες και άρα τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του ελεύθερων λιπαρών οξέων παραμένουν στο τελικό προϊόν. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός πως με κάθε μονάδα αύξησης της μοριακής αναλογίας του ελαίου προς αλκοόλη προκαλεί αύξηση της ποσότητας του οξέος που παραμένει στο περιβάλλον μετά την αντίδραση (Unugul et al. 2020).

Σε μελέτη τους οι Akerman et al. (2011) συμπέραναν πως η μοριακή αναλογία ελαϊκού οξέος:TMP δύναται να επηρεάσει τη σύνθεση του τελικού προϊόντος κυρίως σε ότι αφορά τις σχετικές αναλογίες της αλκοόλης ως μονοεστέρα, διεστέρα ή τριεστέρα. Για τη ολοκληρωτική εστεροποίηση της TMP προς τους επιθυμητούς τριεστέρες, η μοριακή αναλογία που επιλέχθηκε ήταν η μοριακή αναλογία ελαϊκού οξέος:TMP 3:1 Σε χαμηλότερη αναλογία το αποτέλεσμα ήταν ένα μείγμα από μονοεστέρες και διεστέρες, το οποίο επηρεαζόταν και από τις υπόλοιπες παραμέτρους της αντίδρασης (Akerman et al., 2011).

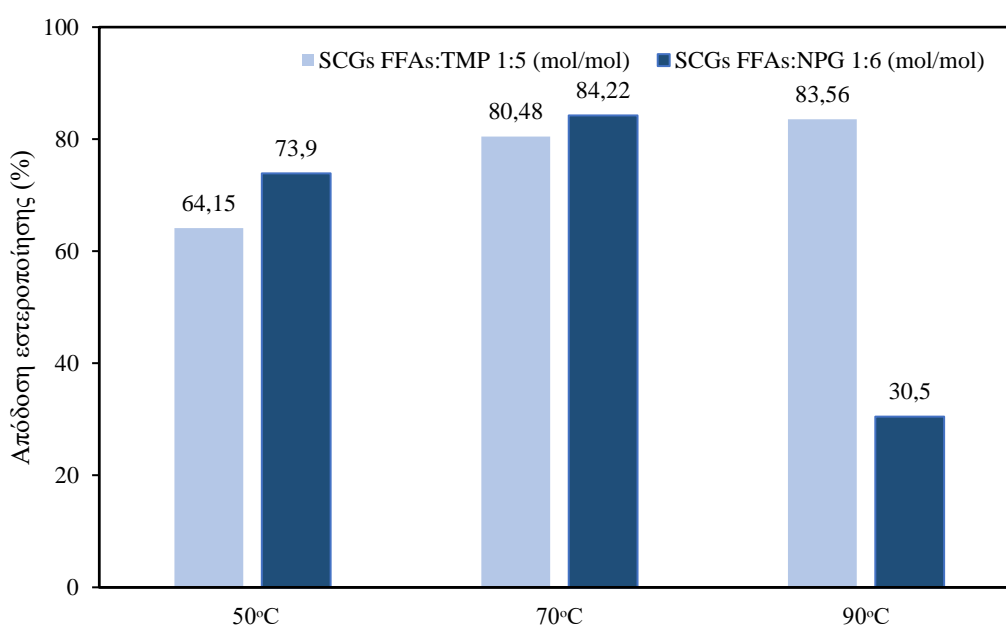
4.3.1.2 Θερμοκρασία

Στη συνέχεια, η παράμετρος της θερμοκρασίας επιλέχθηκε ως μεταβλητή βελτιστοποίησης για το ένζυμο Novozyme 435. Τα δείγματα ελαίου καφέ υποβλήθηκαν σε εστεροποίηση σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: 50°C, 70°C και 90°C αντίστοιχα, υπό μαγνητική ανάδευση. Οι επιλεγμένες θερμοκρασίες επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία και το εύρος των θερμοκρασιών που είναι γνωστό ότι ευνοούν το συγκεκριμένο ένζυμο. Σε όλες τις περιπτώσεις, το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε σε ποσοστό 4% (w/w), ενώ η μοριακή αναλογία ελαίου προς αλκοόλη επιλέχθηκε σύμφωνα με τις βέλτιστες τιμές, δηλαδή FFAs:TMP 1:5 και FFAs:NPG 1:6. Επιπλέον, προστέθηκε απιονισμένο νερό σε ποσοστό 1%.

Στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζονται οι διάφορες αποδόσεις εστεροποίησης που επιτεύχθηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες. Παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας από 50°C σε 90°C, η απόδοση εστεροποίησης αυξάνεται από 64,15% σε 83,56%, αντίστοιχα, όταν χρησιμοποιήθηκε TMP. Όταν χρησιμοποιήθηκε η αλκοόλη NPG, η απόδοση εστεροποίησης αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας από 50°C (73,9%) σε 70°C (84,22%). Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας στους 90°C επηρέασε αρνητικά την απόδοση εστεροποίησης (30,5%).

Παρόμοια αποτελέσματα δημοσίευσαν σύμφωνα με την βιβλιογραφία και οι Kim et al. (2019), με την απόδοση μετατροπής της εστεροποίησης να φτάνει στο μέγιστο σημείο στο εύρος θερμοκρασιών 40°C-60°C, να μένει σταθερή στους 60°C-70°C και να μειώνεται δραστικά καθώς η θερμοκρασία ξεπέρασε τους 70°C έως και τους 80°C. Παράλληλα σε έρευνα των Akerman et al. (2011) με προσθήκη 2% Novozyme 435 παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μόνο διεστέρων και τριεστέρων σε όλες τις θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν (60°C-100°C), με τους διεστέρες να επικρατούν στους 60-70°C και τους τριεστέρες να επικρατούν στην υψηλότερη θερμοκρασία (100°C) (Akerman et al., 2011). Οι Unugul et al. (2020) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στην εστεροποίηση του ελαίου καφέ με χρήση της λιπάσης Lipozyme TL-IM (*T. lanuginosus*) σε εύρος θερμοκρασίας 35°C-65°C και επέλεξαν ως βέλτιστη θερμοκρασία για την επίτευξη της επιθυμητής απόδοσης τους 55°C. Στις χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας το ένζυμο δεν παρουσίαζε επαρκώς υψηλή απόδοση της αντίδρασης, ενώ σε τιμές υψηλότερες της βέλτιστης θερμοκρασίας το ένζυμο υπέστη μετουσίωση και απενεργοποιήθηκε, με αποτέλεσμα η απόδοση της εστεροποίησης να παρουσιαστεί μειωμένη (Unugul et al. 2020). Παρομοίως σε έρευνα των Akerman et al. (2011) η

αύξηση της θερμοκρασίας εστεροποίησης του ελαϊκού οξέος με την TMP και τη λιπάση Novozyme 435 (λιπάση B της *C. antarctica*) αρχικά είχε ως αποτέλεσμα αυξημένο ρυθμό αντίδρασης και αυξημένη απόδοση μετατροπής αλλά τελικά, μετά το πέρας 24 h, δεν οδήγησε σε ικανοποιητικό βαθμό απόδοσης μετατροπής του υποστρώματος. Οι Fernandes et al. (2018) μελέτησαν επίσης τη θερμοκρασία της εστεροποίησης. Η θερμοκρασία μελετήθηκε στο εύρος από 40°C έως 50°C και οι αποδόσεις της εστεροποίησης που επιτεύχθηκαν ήταν παρόμοιες. Συγκεκριμένα, σημειώθηκαν αποδόσεις μεταξύ 82%-89% για τους εστέρες της TMP και 87-90% για τους εστέρες της NPG (Fernandes et al., 2018).



Διάγραμμα 7. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ σε εστέρες με χρήση διαφορετικών αλκοολών και το ένζυμο Novozyme 435 σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

4.3.1.3 Ποσοστό νερού (% w/w) κατά την εστεροποίηση

Μετά την ολοκλήρωση της βελτιστοποίησης της μοριακής αναλογίας ελαίου προς αλκοόλη και θερμοκρασίας για τις διάφορες αλκοόλες, επιλέχθηκε το ποσοστό νερού στην αντίδραση της εστεροποίησης ως παράμετρος βελτιστοποίησης. Οι ποσότητες νερού που εξετάστηκαν ήταν 1%, 5% και 10%. Η θερμοκρασία 70°C επιλέχθηκε για αυτό το σετ πειραμάτων, ενώ οι αναλογίες των πολυολών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν FFAs:TMP 1:5 και FFAs:NPG 1:6, αντίστοιχα. Η προσθήκη του ενζύμου Novozyme 435 ήταν 4% (w/w) σε όλες τις περιπτώσεις.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8, παρατηρείται ότι η απόδοση εστεροποίησης δεν επηρεάζεται σημαντικά από το ποσοστό νερού κατά την αντίδραση της εστεροποίησης. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε 1% ποσοστό νερού με τη χρήση της NPG, η απόδοση εστεροποίησης που επιτεύχθηκε ήταν ίση με 84,22%. Αυξάνοντας το ποσοστό νερού κατά 10 φορές, η απόδοση εστεροποίησης που επιτεύχθηκε ήταν 84,68%, χωρίς να παρουσιαστεί δηλαδή σημαντική διαφορά στην απόδοση μετατροπής. Αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε επίσης όταν χρησιμοποιήθηκε και η TMP κατά την εστεροποίηση (Διάγραμμα 8).

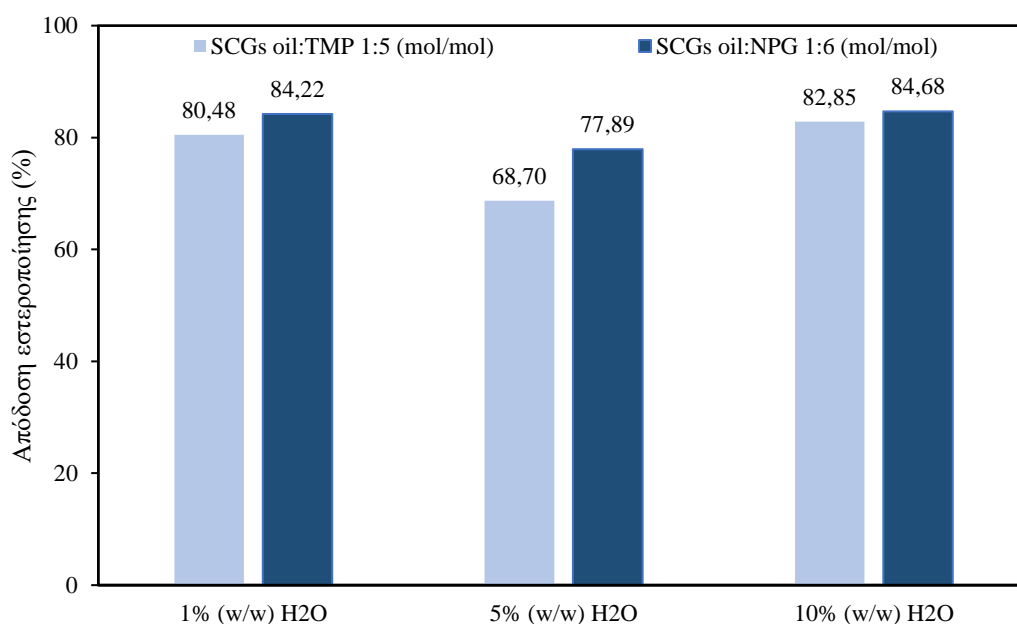
Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία σε ορισμένες περιπτώσεις, η προσθήκη νερού σε χαμηλά ποσοστά, επιπέδου ακόμα και 1%, στο μέσο αντίδρασης έχει προκαλέσει σημαντική αύξηση του ρυθμού μετατροπής, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, η επίδραση ήταν ελαφρώς αρνητική. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το νερό είναι προϊόν της αντίδρασης και η προσθήκη του θα έπρεπε να επιφέρει μείωση της απόδοσης, η θετική επίδραση του νερού στην αντίδραση είναι δυνατόν να οφείλεται στη βελτιωμένη διαλυτοποίηση των πολυολών στο μέσο αντίδρασης, οι οποίες είναι στερεές και με χαμηλή διαλυτότητα στα υδρόφοβα FFAs. Η ιδανική περιεκτικότητα σε νερό στο μέσο αντίδρασης ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το ένζυμο και την πρώτη ύλη και, συνεπώς, πρέπει να βελτιστοποιείται κατά περίπτωση (Cavalcanti et al. 2018; Unugul et al. 2020). Επιπλέον, η λιπάση της *C. rugosa* φαίνεται να διατηρεί τη συνθετική της δραστηριότητα ακόμη και παρουσία σημαντικών ποσοτήτων νερού, αντίθετα, η δραστηριότητα της λιπάσης Novozyme 435 συνήθως αναστέλλεται από την παρουσία νερού, ακόμη και όταν αυτό παράγεται κατά την αντίδραση εστεροποίησης (Cavalcanti et al. 2018).

Οι Unugul et al. (2020) πραγματοποίησαν εστεροποίηση σε έλαιο καφέ με προσθήκη νερού 0%-10% και σημείωσαν την βέλτιστη μετατροπή όταν δεν προστέθηκε καθόλου νερό. Στη συγκεκριμένη έρευνα το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς οφείλεται στην σύσταση του ελαίου του καφέ και θεωρείται πως η αρχική ποσότητα νερού που υπάρχει στο έλαιο καφέ είναι επαρκής για την πραγματοποίηση των πρώτων σταδίων της εστεροποίησης. Οι Gryglewicz et al. (2013) σημείωσαν επίσης απόδοση μετατροπής του επιπέδου 70% του κραμβέλαιου σε άνυδρη εστεροποίηση. Οι Da Silva, 2011 σε μελέτη με χρήση ελαίου κραμβέλαιου και προσθήκη νερού 1% σημείωσαν απόδοση επιπέδου 87%. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης λοιπόν συμβαδίζουν με αυτά της βιβλιογραφίας (da Silva 2011). Επομένως, συμπεραίνεται πως η προσθήκη νερού στα

πρώτα στάδια της εστεροποίησης μπορεί να επιδράσει θετικά στην καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου, αλλά στη συνέχεια είναι πιθανό να δρα παρεμποδιστικά εφόσον δεν απομακρυνθεί.

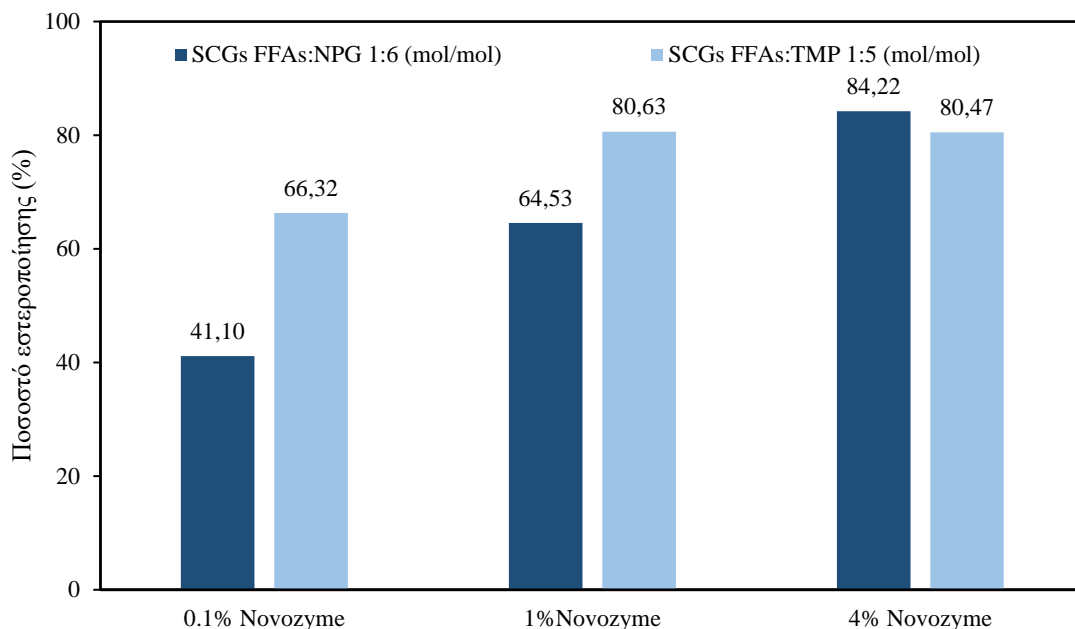
4.3.1.4 Ποσοστό ενζύμου (% w/w) κατά την εστεροποίηση

Τέλος, μελετήθηκε η αντίδραση της εστεροποίησης ως προς την ποσότητα του ενζύμου που προστέθηκε. Δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις ενζύμου, συγκεκριμένα 0,1% (w/w), 1% (w/w) και 4% (w/w), χρησιμοποιώντας το ενζύμο Novozyme 435, ως το αποδοτικότερο. Η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 70°C, ενώ οι αναλογίες των πολυολών ήταν FFAs:TMP 1:5 και FFAs:NPG 1:6 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 8. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ σε εστέρες με χρήση διαφορετικών αλκοολών και το ένζυμο Novozyme 435 με προσθήκη νερού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Στο Διάγραμμα 9 παρουσιάζονται οι αποδόσεις εστεροποίησης που επιτεύχθηκαν με την προσθήκη διαφορετικών ποσοστών ενζύμου (% w/w). Παρατηρείται ότι με την αύξηση του ποσοστού του ενζύμου, αυξάνεται και η απόδοση εστεροποίησης. Η μέγιστη απόδοση εστεροποίησης, που είναι 84,22%, επιτεύχθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε 4% ένζυμο με τη χρήση της NPG ως αλκοόλη.



Διάγραμμα 9. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου καφέ σε εστέρες με χρήση διαφορετικών αλκοολών και το ένζυμο Novozyme 435 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 0,1%, 1% και 4%.

Οι Unugul et al. (2020) πραγματοποίησαν βελτιστοποίηση της εστεροποίησης σε έλαιο από απόβλητα καφέ με τη Novozyme 435 σε ποσοστά προσθήκης ενζύμου από 0%-20%. Σημείωσαν 42% βέλτιστη απόδοση μετατροπής όταν η προσθήκη του ενζύμου που πραγματοποιήθηκε ήταν 5%. Επιπλέον, παρατήρησαν πως η αύξηση της ποσότητας του ενζύμου οδήγησε αρχικά σε αύξηση της μετατροπής του εστέρα, όμως στη συνέχεια, όταν το ένζυμο προστέθηκε σε ποσοστό υψηλότερο του 5%, η μετατροπή του εστέρα παρουσίασε μείωση. Συμπεραίνεται πως χαμηλότερες ποσότητες ενζύμου έχουν ως αποτέλεσμα υψηλότερη απόδοση του (Unugul et al. 2020).

Παρομοίως σε έρευνα των Fernandes et al. (2018), που χρησιμοποίησαν απόσταγμα αποβλήτων του φοινικέλαιου, αξιολογήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις της λιπάσης Lipomod 34MDP (*C.rugosa*), σε ποσοστά μεταξύ 0,5%-4%. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν για 24 h στους 45 °C με τις αλκοόλες TMP και NPG. Για προσθήκη 3% (w/w) του ενζύμου οι αποδόσεις εστεροποίησης ήταν 82% για την NPG και 70% για την TMP. Με χρήση 4% του βιοκαταλύτη, οι αποδόσεις βελτιώθηκαν περαιτέρω, έως και 94%. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι Aguiéiras et al. (2020). Στη μελέτη τους χρησιμοποίησαν 4% w/w Novozyme 435 (*C.antarctica*) και Lipozyme RM

IM (*R.miehei*) για την υψηλότερη απόδοση μετατροπής, έως και 90%, εστέρων της NPG από μεθυλεστέρα σόγιας και καστορέλαιου (Aguieiras et al. 2020).

Αντίστοιχα σε μελέτη των Akerman et al. (2011) πραγματοποιήθηκε εστεροποίηση του ελαϊκού οξέος με TMP με χρήση 2% λιπάσης της *Candida antarctica* στους 60°C με διάρκεια αντίδρασης τις 50 h. Με προσθήκη 5% της λιπάσης Novozyme 435 σημειώθηκε ίση αναλογία μονοεστέρων και διεστέρων μαζί με ένα μικρό ποσοστό τριεστέρων, ενώ αντίθετα με χρήση 0,5% της λιπάσης παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της εστεροποίησης, όπου μεγάλα ποσοστά του υποστρώματος δεν μετατράπηκαν σε εστέρες, ενώ σημειώθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά μονοεστέρων από ότι διεστέρων. Στην ίδια έρευνα, με ενδιάμεση προσθήκη του επιπέδου 2% Novozyme 435 η απόδοση μετατροπής της αντίδρασης ήταν περίπου 80%, ενώ σχηματίστηκαν μόνο διεστέρες και τριεστέρες σε όλες τις θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν. Στην περίπτωση όπου ο καταλύτης ήταν σε περίσσεια οι τριεστέρες ήταν το κύριο προϊόν (Akerman et al., 2011). Προηγούμενες μελέτες με χρήση λιπασών όπως η Lipomod 34MDP (*C.rugosa*) και Lipozyme IM 20 (*R. miehei*) υποστήριζαν ότι υψηλή συγκέντρωση ενζύμου του επιπέδου 10-50% (w/w) ήταν απαραίτητη για υψηλή απόδοση παραγωγής 95-98%, δεδομένα τα οποία έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (Abd Wafti et al. 2021).



Εικόνα 12. Τελικό προϊόν εστεροποίησης (βιολιπαντικό) του ελαίου.καφέ.

4.3.2 Μικροβιακό έλαιο μικροοργανισμού *C. curvatus*

Η εστεροποίηση του υδρολυμένου μικροβιακού ελαίου πραγματοποιήθηκε μελετώντας και τις δύο πολυόλες (TMP, NPG) καθώς και τα ένζυμα Lipomod 34MDP και Novozyme 435. Οι αντιδράσεις εστεροποίησης πραγματοποιήθηκαν υπό μαγνητική ανάδευση σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο και είχαν διάρκεια 48 ώρες. Καθ' όλη τη διάρκεια συλλέχθηκαν δείγματα για τον προσδιορισμό της ποσοστιαίας απόδοσης μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου σε βιολιπαντικό, δηλαδή εστέρες λιπαρών οξέων με τις πολυόλες. Ο προσδιορισμός της απόδοσης μετατροπής (%) και σε αυτή τη μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσω του υπολογισμού της διαφοράς στην οξύτητα μεταξύ του υποστρώματος και του προϊόντος, με την τιτλοδότηση να γίνεται με διάλυμα 0,05 M NaOH και προσθήκη δείκτη φαινολοφθαλεΐνης.

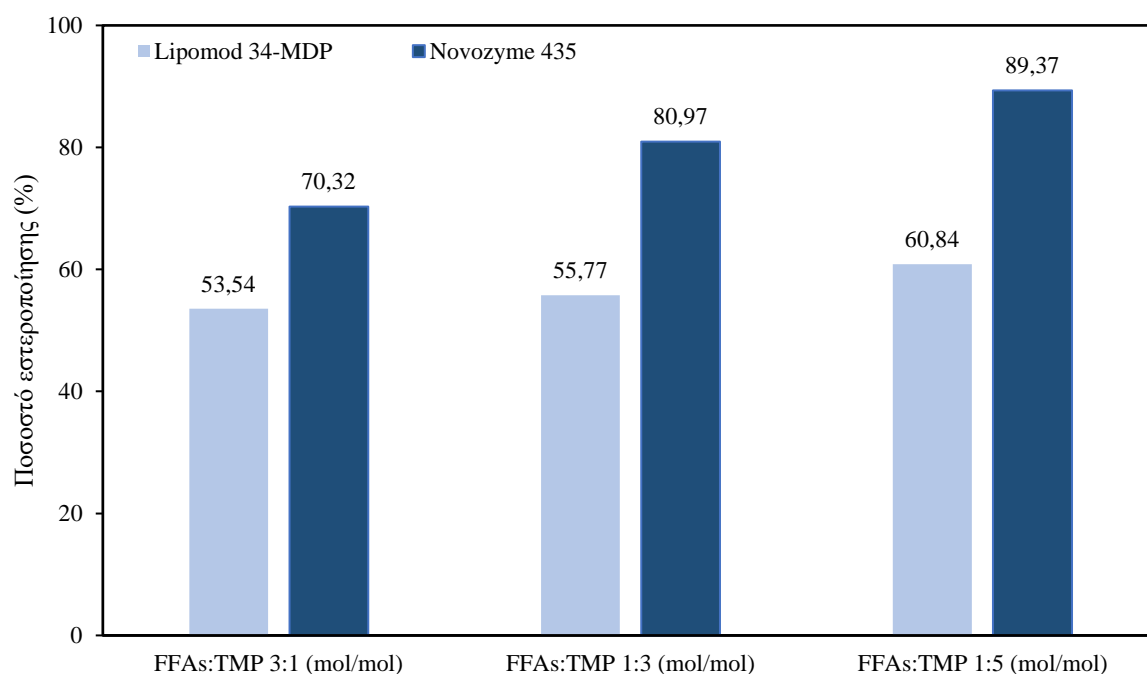
4.3.2.1 Μοριακή αναλογία ελαίου προς αλκοόλη

Λαμβάνοντας υπόψη τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από τη σειρά πειραμάτων με το φυτικό έλαιο του καφέ, πραγματοποιήθηκε μελέτη για τις διαφορετικές αναλογίες ελαίου προς αλκοόλη, χρησιμοποιώντας μικροβιακό έλαιο ως υπόστρωμα.

Συνεπώς, η εστεροποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαφορετικών μοριακών αναλογιών του υδρολυμένου μικροβιακού ελαίου (FFAs) προς τις δύο αλκοόλες. Για την TMP, οι μοριακές αναλογίες ήταν FFAs:TMP 3:1, 1:3 και 1:5, αντίστοιχα, ενώ για την NPG, οι μοριακές αναλογίες ήταν FFAs:NPG 2:1, 1:4 και 1:6, αντίστοιχα. Για κάθε μοριακή αναλογία προστέθηκε 4% Lipomod 34MDP ή 4% Novozyme 435. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 45°C για το Lipomod 34MDP και 70°C για το Novozyme 435, υπό μαγνητική ανάδευση. Επιπλέον, προστέθηκε απιονισμένο νερό σε ποσοστό 1%, σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν στην υποενότητα 4.2.1.

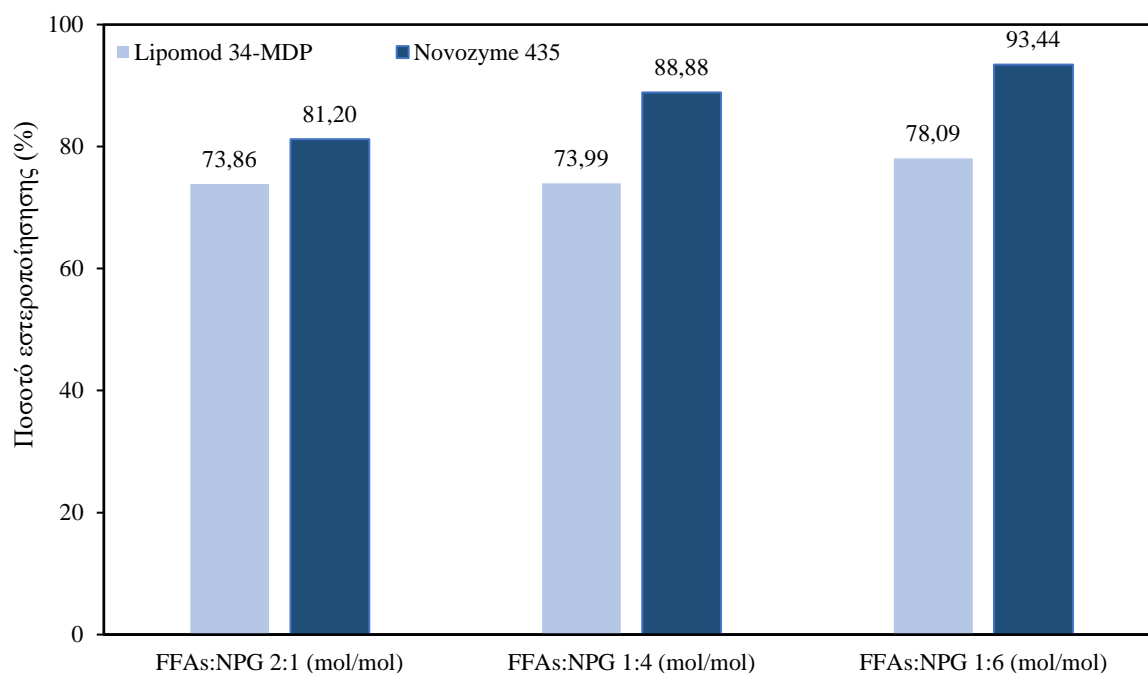
Στο Διάγραμμα 10 παρουσιάζεται η απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου μικροβιακού ελαίου του *C. curvatus*, χρησιμοποιώντας την αλκοόλη TMP σε μοριακές αναλογίες FFAs:TMP 3:1, 1:3 και 1:5 (mol/mol), με τα ένζυμα Lipomod 34MDP και Novozyme 435. Παρατηρείται ότι η μέγιστη απόδοση μετατροπής του ελαίου σε βιολιπαντικό προκύπτει με την αλκοόλη TMP σε αναλογία 1:5, και σε συνδυασμό με τη χρήση της λιπάσης Novozyme 435 (Διάγραμμα 10). Σε αυτή την περίπτωση το ποσοστό εστεροποίησης έφτασε στο 89,37%. Αντίστοιχα, η υψηλότερη απόδοση εστεροποίησης

με το ένζυμο Lipomod 34MDP παρουσιάστηκε στην ίδια αναλογία και ήταν ίση με 60,84%. Οι υψηλότερες αποδόσεις εστεροποίησης χρησιμοποιώντας την αλκοόλη NPG παρουσιάστηκαν στην μοριακή αναλογία FFAs:NPG 1:6 και με το ένζυμο Lipomod 34MDP και Novozyme 435 ίσες με 78,09% και 93,44%, αντίστοιχα (Διάγραμμα 11).



Διάγραμμα 10. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου μικροβιακού ελαίου σε εστέρες, με την αλκοόλη TMP σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες με τα ένζυμα Lipomod 34MDP και Novozyme 435.

Στη βιβλιογραφία οι έρευνες σχετικά με την ενζυμική παραγωγή βιολιπαντικών από μικροβιακό έλαιο είναι ελάχιστα. Σύμφωνα με έρευνα των Papadaki et al. (2018) η υψηλότερη απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου μικροβιακού ελαίου του *R.toruloides* σε εστέρες TMP και NPG επιτεύχθηκε στην περίπτωση των NPG-εστέρων με ποσοστό 85,7% έναντι των TMP-εστέρων με ποσοστό 82,9% μετά από 24 h, ενώ στις 72 h αυξήθηκε σε 88% για τους NPG-εστέρες και 83% για τους TMP-εστέρες (Papadaki, Fernandes, Chatzifragkou, Aguiéiras, Da Silva, et al. 2018).



Διάγραμμα 11. Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου μικροβιακού ελαίου σε εστέρες, με την αλκοόλη NPG σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες με τα ένζυμα *Lipomod 34MDP* και *Novozyme 435*.

Επίδραση d-λεμονενίου κατά την εστεροποίηση

Σε συνθήκες βελτιστοποιημένης εστεροποίησης τόσο για το φυτικό έλαιο του καφέ όσο και το μικροβιακό έλαιο, μελετήθηκε η επίδραση του d-λεμονενίου στην ενζυμική αντίδραση. Συγκεκριμένα, το ποσοστό του νερού αντικαταστάθηκε με d-λεμονένιο σε ποσοστό 1%, w/w.

Κατά τη χρήση τόσο του φυτικού ελαίου του καφέ όσο και του μικροβιακού ελαίου, όταν αντί για νερό χρησιμοποιήθηκε d-λεμονένιο, παρατηρήθηκε ότι η απόδοση εστεροποίησης ήταν παρόμοια με αυτή που επιτυγχάνεται όταν χρησιμοποιείται νερό. Συγκεκριμένα τα ποσοστά που επιτεύχθηκαν για τις διαφορετικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Το d-λεμονένιο αποτελεί έναν οργανικό διαλύτη που προέρχεται από το φυσικό συστατικό των εσπεριδοειδών. Η χρήση του ως διαλύτη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω της φιλικότητάς του προς το περιβάλλον και της αποτελεσματικότητάς του σε διάφορες εφαρμογές, όπως για παράδειγμα και σε αυτή την μελέτη για την παραγωγή βιολιπαντικών. Ωστόσο, ένα ουσιαστικό πρόβλημα που έχει παρατηρηθεί και στην παρούσα μελέτη είναι η δυσκολία στην απομάκρυνσή του, λόγω του υψηλού σημείου βρασμού του, που ανέρχεται στους

175°C. Η υψηλή θερμοκρασία αυτή αυξάνει τη δυσκολία στη διαδικασία απομάκρυνσης, προκαλώντας προβλήματα σε εφαρμογές όπου η αφαίρεση του διαλύτη απαιτείται. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το ζήτημα, απαιτείται εμβάθυνση σε μια αναλυτική μελέτη που θα εξετάσει τις διάφορες μεθόδους απομάκρυνσης του d-λεμονένιου, καθώς και την ανάπτυξη πιθανών λύσεων που θα βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας.

Πίνακας 4 Απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου φυτικού ελαίου καφέ και μικροβιακού ελαίου σε εστέρες με χρήση d-λεμονένιου ως διαλύτη

Έλαιο	Συνθήκες εστεροποίησης	Ποσοστό εστεροποίησης (%)
Φυτικό έλαιο καφέ	FFAs:TMP 1:5; 4% (w/w) Novozyme 435, 70°C, 1% d-λεμονένιο	78,93
	FFAs:NPG 1:6; 4% (w/w) Novozyme 435, 70°C, 1% d-λεμονένιο	83,52
Μικροβιακό έλαιο <i>C. curvatus</i>	FFAs:TMP 1:5; 4% (w/w) Novozyme 435, 70°C, 1% d-λεμονένιο	90,32
	FFAs:NPG 1:6; 4% (w/w) Novozyme 435, 70°C, 1% d-λεμονένιο	90,69

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζεται βιβλιογραφική ανασκόπηση παραγωγής βιολιπαντικών με αποτελέσματα άλλων μελετών όσο αφορά την απόδοση εστεροποίησης χρησιμοποιώντας τόσο χημικές όσο και ενζυμικές μεθόδους παραγωγής.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είτε με το φυτικό έλαιο του καφέ είτε με το μικροβιακό έλαιο, είναι ενθαρρυντικά, καθώς τα επιτευχθέντα ποσοστά εστεροποίησης είναι υψηλά και εναρμονίζονται με τα αντίστοιχα εύρη που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία (Πίνακας 5).

Πίνακας 5 Βιβλιογραφική ανασκόπηση παραγωγής βιολιπαντικών

Υπόστρωμα	Πολυόλη	Λόγος ελαίου:Πολυόλη	Καταλύτης εστεροποίησης	Απόδοση μετατροπής	Βιβλιογραφία
Rubber seed oil	TMP	3:1	p-toluene sulfonic acid	71,0	(Kamarudin et al. 2020)
Castor oil	2-ethyl 1-hexanol	3:1	Titanium isopropoxide	93,0	(Encinar et al. 2020)
Karanja oil	TMP	4:1	Sulphuric acid	90,97	(Sharma, Sachan, and Trivedi 2018)
Palm Kernel oil	Ethylene glycol	1:3	Sodium methoxide	95,33	(Mohammed et al. 2018)
<i>R. toruloides</i> oil	TMP/NPG	3:1/2:1	Lipomod 34MDP	85,7/82.9	(Papadaki, Fernandes, Chatzifragkou, Aguierras, da Silva, et al. 2018)
<i>C. curvatus</i> oil	TMP/NPG	3:1/2:1	Lipomod 34MDP	79.9/82.7	(Papadaki, Fernandes, Chatzifragkou, Aguierras, da Silva, et al. 2018)

5 Συμπεράσματα

Η βιομηχανία τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί προς την παραγωγή «πράσινων» λιπαντικών, τόσο εξαιτίας της περιβαλλοντικής ευαισθητοποίησης η οποία έχει αρχίσει να επικρατεί σε κοινωνικό επίπεδο, όσο και εξαιτίας της αυστηρής περιβαλλοντικής νομοθεσίας που θεσπίζεται, αλλά και του υψηλού κόστους διάθεσης των λιπαντικών παλαιάς τεχνολογίας. Τα λιπαντικά αυτά συμβάλλουν στην αξιοποίηση των παραγόμενων αποβλήτων, στη μείωση της παραγωγής τους και συνολικά στην προστασία του περιβάλλοντος. Το εγχείρημα της παραγωγής λιπαντικών με πρώτη ύλη πιο βιώσιμες πρώτες ύλες έλκει κατ' επέκταση το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Ένας από τους κυριότερους περιορισμούς είναι το υψηλό κόστος, το οποίο καθιστά δύσκολη την εφαρμογή της νέας τεχνολογίας σε μεγάλη κλίμακα και είναι ανάγκη να αντιμετωπιστεί. Βρώσιμα έλαια, φυτικής ή μη φυτικής προέλευσης, ή έλαια παράγωγα αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων αποτελούν τις πιο συχνά επιλεγμένες πηγές τριγλυκεριδίων, οι οποίες είναι δυνατόν να παρέχουν μια εναλλακτική λύση σε σχέση με τις πηγές βρώσιμων ελαίων, τόσο οικολογικά όσο και οικονομικά. Παράλληλα, η έρευνα στρέφεται και προς τη χρήση ενζυμικών καταλυτών οι οποίοι είναι πλήρως φιλικό προς το περιβάλλον. Η βελτιστοποίηση της χρήσης της ενζυμικής μεθόδου είναι σημαντική, ιδίως λόγω του εξαιρετικά υψηλού της κόστους (Perera et al. 2022).

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη εξέτασε τη διαδικασία εστεροποίησης του υδρολυμένου ελαίου καφέ και μικροβιακού ελαίου, χρησιμοποιώντας διάφορες μοριακές αναλογίες FFAs και διερεύνησε τη χρήση δύο διαφορετικών αλκοόλων (TMP και NPG) και ενζύμων. Επιπλέον, εξετάστηκαν διάφοροι παράμετροι κατά τη διαδικασία εστεροποίησης, όπως η θερμοκρασία, το ποσοστό ενζύμου, και το ποσοστό νερού. Τέλος, το ποσοστό νερού αντικαταστάθηκε με τη χρήση του d-λεμονένιου ως διαλύτη. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν τη σημαντική επίδραση αυτών των παραμέτρων στην απόδοση μετατροπής του ελαίου σε βιολιπαντικό.

Η βελτιωμένη απόδοση στην εστεροποίηση του ελαίου καφέ σε βιολιπαντικό επιτυγχάνεται μέσω διάφορων παραμέτρων. Καταρχάς, η αλκοόλη FFAs:TMP σε αναλογία 1:5, σε συνδυασμό με το ενζύμο Novozyme 435, επέτρεψε την επίτευξη της υψηλότερης απόδοσης στο 80,48%. Επίσης, η μέγιστη απόδοση με τη χρήση αλκοόλης NPG επιτεύχθηκε στην αναλογία FFAs:NPG 1:6, φτάνοντας σε ποσοστό 84,22%. Κατόπιν, εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, με τη βέλτιστη να

παρουσιάζεται στους 70°C. Η χρήση της βέλτιστης αναλογίας αλκοολών σε συνδυασμό με αυτή τη θερμοκρασία οδήγησε σε υψηλή απόδοση στην εστεροποίηση. Όσον αφορά τα ποσοστά νερού (1%, 5%, και 10%), παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στην απόδοση μετατροπής του υδρολυμένου ελαίου σε εστέρες. Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση της ποσότητας του ενζύμου Novozyme 435 στην αντίδραση εστεροποίησης. Η μέγιστη απόδοση επιτεύχθηκε όταν προστέθηκε 4% ενζύμου, ενώ δοκιμάστηκαν και άλλες συγκεντρώσεις (0,1% και 1%). Ανάμεσα σε αυτές, το 4% ενζύμου Novozyme 435 αναδείχθηκε ως η πιο αποδοτική συγκέντρωση, οδηγώντας σε ποσοστό εστεροποίησης της τάξης του 84,22% κατά τη χρήση της NPG ως αλκοόλης.

Όσο αφορά τη χρήση του d-λεμονένιο ως διαλύτη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην απόδοση εστεροποίησης, ήταν παρόμοια με αυτή που επιτυγχάνεται όταν χρησιμοποιείται νερό. Ωστόσο το υψηλό σημείο βρασμού του, που ανέρχεται στους 175°C, καθιστά την απομάκρυνσή του δύσκολη, προκαλώντας προβλήματα σε εφαρμογές όπου η αφαίρεση του διαλύτη απαιτείται.

Συμπερασματικά, οι προοπτικές εξέλιξης των βιολιπαντικών στο μέλλον οφείλουν να επικεντρωθούν σε ορισμένους πολύ συγκεκριμένους στόχους όπως είναι η εύρεση εναλλακτικών φιλικών προς το περιβάλλον πρώτων υλών, στην ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής, οικονομικής και βιώσιμης τεχνολογίας παραγωγής των νέων λιπαντικών και στη βελτίωση των χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων λίπανσης αυτής. Τα έλαια από απόβλητα τροφίμων είναι μια πιθανή λύση η οποία λειτουργεί ευνοϊκά ως προς την αξιοποίηση των αποβλήτων. Παράλληλα, η παραγωγή μικροβιακού ελαίου και η ενζυμική μετατροπή των ελαίων είναι δυνατόν να δώσουν επίσης επιθυμητά αποτελέσματα αλλά είναι απαραίτητη η μείωση του κόστους παραγωγής και χρήσης, με σκοπό την ευρύτερη εφαρμογή τους στη βιομηχανία.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abd Wafti, Robiah Yunus, Harrison Lik Nang Lau, Thomas Shean Yaw Choong, and Suraini Abd-Aziz. 2022. 'Enzymatic Synthesis of Palm Oil-Based Trimethylolpropane Ester as Biolubricant Base Stock Catalyzed by Lipozyme 435'. *Energy* 260:125061. doi: 10.1016/j.energy.2022.125061.
- Abd Wafti, Robiah Yunus, Harrison Lik Nang Lau, Thomas Choong Shean Yaw, and Suraini Abdul Aziz. 2021. 'Immobilized Lipase-Catalyzed Transesterification for Synthesis of Biolubricant from Palm Oil Methyl Ester and Trimethylolpropane'. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 44(11):2429–44. doi: 10.1007/s00449-021-02615-6.
- Adlercreutz, Patrick. 2013. 'Immobilisation and Application of Lipases in Organic Media'. *Chemical Society Reviews* 42(15):6406. doi: 10.1039/c3cs35446f.
- Ageitos, Jose Manuel, Juan Andres Vallejo, Patricia Veiga-Crespo, and Tomas G. Villa. 2011. 'Oily Yeasts as Oleaginous Cell Factories'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(4):1219–27. doi: 10.1007/s00253-011-3200-z.
- Aguieiras, Érika C. G., Elisa D. C. Cavalcanti, Priscila R. Da Silva, Valéria F. Soares, Roberto Fernandez-Lafuente, Charles Lima Bessa Assunção, José André C. Da Silva, and Denise M. G. Freire. 2020. 'Enzymatic Synthesis of Neopentyl Glycol-Bases Biolubricants Using Biodiesel from Soybean and Castor Bean as Raw Materials'. *Renewable Energy* 148:689–96. doi: 10.1016/j.renene.2019.10.156.
- Akerman, Cecilia Orellana, Anna E. V. Hagström, M. Amin Mollaahmad, Stefan Karlsson, and Rajni Hatti-Kaul. 2011b. 'Biolubricant Synthesis Using Immobilised Lipase: Process Optimisation of Trimethylolpropane Oleate Production'. *Process Biochemistry* 46(12):2225–31. doi: 10.1016/j.procbio.2011.08.006.
- Appiah, Godfred, Samuel Kofi Tulashie, Ephraim Edem Amoah Akpari, Eldon R. Rene, and Daniel Dodoo. 2022. 'Biolubricant Production via Esterification and Transesterification Processes: Current Updates and Perspectives'. *International Journal of Energy Research* 46(4):3860–90. doi: 10.1002/er.7453.
- Athenaki, M., C. Gardeli, P. Diamantopoulou, S. S. Tchakouteu, D. Sarris, A. Philippoussis, and S. Papanikolaou. 2018. 'Lipids from Yeasts and Fungi: Physiology, Production and Analytical Considerations'. *Journal of Applied Microbiology* 124(2):336–67. doi: 10.1111/jam.13633.
- Barbosa, Milson S., Cintia C. C. Freire, Luma M. S. Brandão, Ernandes B. Pereira, Adriano A. Mendes, Matheus M. Pereira, Álvaro S. Lima, and Cleide M. F. Soares. 2021. 'Biolubricant Production under Zero-Waste Moringa Oleifera Lam Biorefinery Approach for Boosting Circular Economy'. *Industrial Crops and Products* 167:113542. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113542.

- Battista, Federico, Elli Maria Barampouti, Sofia Mai, David Bolzonella, Dimitris Malamis, Konstantinos Moustakas, and Maria Loizidou. 2020. 'Added-Value Molecules Recovery and Biofuels Production from Spent Coffee Grounds'. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 131:110007. doi: 10.1016/j.rser.2020.110007.
- Birkenberg, Athena, and Regina Birner. 2018. 'The World's First Carbon Neutral Coffee: Lessons on Certification and Innovation from a Pioneer Case in Costa Rica'. *Journal of Cleaner Production* 189:485–501. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.03.226.
- Bolina, Iara C. A., Raphael A. B. Gomes, and Adriano A. Mendes. 2021. 'Biolubricant Production from Several Oleaginous Feedstocks Using Lipases as Catalysts: Current Scenario and Future Perspectives'. *BioEnergy Research* 14(4):1039–57. doi: 10.1007/s12155-020-10242-4.
- Bomfim, Anne Shayene Campos De, Daniel Magalhães De Oliveira, Eric Walling, Alexandre Babin, Grégory Hersant, Céline Vaneckhaute, Marie-Josée Dumont, and Denis Rodrigue. 2022. 'Spent Coffee Grounds Characterization and Reuse in Composting and Soil Amendment'. *Waste* 1(1):2–20. doi: 10.3390/waste1010002.
- Burniol-Figols, Anna, Katarzyna Cenian, Ioannis V. Skiadas, and Hariklia N. Gavala. 2016. 'Integration of Chlorogenic Acid Recovery and Bioethanol Production from Spent Coffee Grounds'. *Biochemical Engineering Journal* 116:54–64. doi: 10.1016/j.bej.2016.04.025.
- Caporusso, Antonio, Angela Capece, and Isabella De Bari. 2021. 'Oleaginous Yeasts as Cell Factories for the Sustainable Production of Microbial Lipids by the Valorization of Agri-Food Wastes'. *Fermentation* 7(2):50. doi: 10.3390/fermentation7020050.
- Carvalho, Wagner C. A., Jaine H. H. Luiz, Roberto Fernandez-Lafuente, Daniela B. Hirata, and Adriano A. Mendes. 2021. 'Eco-Friendly Production of Trimethylolpropane Triesters from Refined and Used Soybean Cooking Oils Using an Immobilized Low-Cost Lipase (Eversa® Transform 2.0) as Heterogeneous Catalyst'. *Biomass and Bioenergy* 155:106302. doi: 10.1016/j.biombioe.2021.106302.
- Cavalcanti, Elisa D. C., Érika C. G. Agueiras, Priscila R. Da Silva, Jaqueline G. Duarte, Eliane P. Cipolatti, Roberto Fernandez-Lafuente, José André C. Da Silva, and Denise M. G. Freire. 2018. 'Improved Production of Biolubricants from Soybean Oil and Different Polyols via Esterification Reaction Catalyzed by Immobilized Lipase from *Candida Rugosa*'. *Fuel* 215:705–13. doi: 10.1016/j.fuel.2017.11.119.
- Cecilia, Juan Antonio, Daniel Ballesteros Plata, Rosana Maria Alves Saboya, Francisco Murilo Tavares De Luna, Celio L. Cavalcante, and Enrique Rodríguez-Castellón. 2020. 'An Overview of the Biolubricant Production Process: Challenges and Future Perspectives'. *Processes* 8(3):257. doi: 10.3390/pr8030257.

- Clark, James H., and Fabien E. I. Deswarte. 2008. *Introduction to Chemicals from Biomass*. Chichester (GB): Wiley.
- Duarte, Susan Hartwig, Gonzalo Lázaro Del Peso Hernández, Albert Canet, Maria Dolors Benaiges, Francisco Maugeri, and Francisco Valero. 2015. 'Enzymatic Biodiesel Synthesis from Yeast Oil Using Immobilized Recombinant Rhizopus Oryzae Lipase'. *Bioresource Technology* 183:175–80. doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.133.
- Encinar, José María, Sergio Nogales-Delgado, Nuria Sánchez, and Juan Félix González. 2020. 'Biolubricants from Rapeseed and Castor Oil Transesterification by Using Titanium Isopropoxide as a Catalyst: Production and Characterization'. *Catalysts* 2020, Vol. 10, Page 366 10(4):366. doi: 10.3390/CATAL10040366.
- European Commission. 2017. *EU Actions against Food Waste*.
- European Commission. 2023. *Frequently Asked Questions: Reducing Food Waste in the EU*.
- European Parliament. 2021. *Circular Economy: MEPs Call for Tighter EU Consumption and Recycling Rules*.
- European Parliament. 2023. *Circular Economy: Definition, Importance and Benefits*.
- Fernandes, Keysson V., Elisa D. C. Cavalcanti, Eliane P. Cipolatti, Erika C. G. Aguiéiras, Martina C. C. Pinto, Fernanda A. Tavares, Priscila R. Da Silva, Roberto Fernandez-Lafuente, Sara Arana-Peña, José Carlos Pinto, Charles L. B. Assunção, José André C. Da Silva, and Denise M. G. Freire. 2021. 'Enzymatic Synthesis of Biolubricants from By-Product of Soybean Oil Processing Catalyzed by Different Biocatalysts of Candida Rugosa Lipase'. *Catalysis Today* 362:122–29. doi: 10.1016/j.cattod.2020.03.060.
- Fernandes, Keysson Vieira, Aikaterini Papadaki, José André Cavalcanti Da Silva, Roberto Fernandez-Lafuente, Apostolis A. Koutinas, and Denise Maria Guimarães Freire. 2018. 'Enzymatic Esterification of Palm Fatty-Acid Distillate for the Production of Polyol Esters with Biolubricant Properties'. *Industrial Crops and Products* 116:90–96. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.02.058.
- Folch, Jordi, M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. 'A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES'. *Journal of Biological Chemistry* 226(1):497–509. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5).
- Freitas, Larissa, Tânia Bueno, Victor H. Perez, Júlio C. Santos, and Heizir Ferreira De Castro. 2007. 'Enzymatic Hydrolysis of Soybean Oil Using Lipase from Different Sources to Yield Concentrated of Polyunsaturated Fatty Acids'. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(12):1725–31. doi: 10.1007/s11274-007-9421-8.

- Garcés, Rafael, Enrique Martínez-Force, and Joaquín J. Salas. 2011. 'Vegetable Oil Basestocks for Lubricants'. *Grasas y Aceites* 62(1):21–28. doi: 10.3989/gya.045210.
- Giannakis, Nikos, Miguel Carmona-Cabello, Aikaterini Makri, David Leiva-Candia, Katiana Filippi, Chrysanthi Argeiti, Chrysanthi Pateraki, M. P. Dorado, Apostolis Koutinas, and Eleni Stylianou. 2023. 'Spent Coffee Grounds and Orange Peel Residues Based Biorefinery for Microbial Oil and Biodiesel Conversion Estimation'. *Renewable Energy* 209:382–92. doi: 10.1016/j.renene.2023.01.110.
- Greco-Duarte, J., E. D. Cavalcanti-Oliveira, J. A. C. Da Silva, R. Fernandez-Lafuente, and D. M. G. Freire. 2017. 'Two-Step Enzymatic Production of Environmentally Friendly Biolubricants Using Castor Oil: Enzyme Selection and Product Characterization'. *Fuel* 202:196–205. doi: 10.1016/j.fuel.2017.04.036.
- Gryglewicz, Stanisław, Marcin Muszyński, and Janusz Nowicki. 2013. 'Enzymatic Synthesis of Rapeseed Oil-Based Lubricants'. *Industrial Crops and Products* 45:25–29. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.11.038.
- Guedes Júnior, José G. E., Fernanda R. Mattos, Guilherme J. Sabi, Wagner C. A. Carvalho, Jaine H. H. Luiz, Érika C. Cren, Roberto Fernandez-Lafuente, and Adriano A. Mendes. 2022. 'Design of a Sustainable Process for Enzymatic Production of Ethylene Glycol Diesters via Hydroesterification of Used Soybean Cooking Oil'. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10(1):107062. doi: 10.1016/j.jece.2021.107062.
- Guimarães, José Renato, Letícia Passos Miranda, Roberto Fernandez-Lafuente, and Paulo Waldir Tardioli. 2021. 'Immobilization of Eversa® Transform via CLEA Technology Converts It in a Suitable Biocatalyst for Biolubricant Production Using Waste Cooking Oil'. *Molecules* 26(1):193. doi: 10.3390/molecules26010193.
- Heikal, Ebtisam K., M. S. Elmelawy, Salah A. Khalil, and N. M. Elbasuny. 2017. 'Manufacturing of Environment Friendly Biolubricants from Vegetable Oils'. *Egyptian Journal of Petroleum* 26(1):53–59. doi: 10.1016/j.ejpe.2016.03.003.
- HLPE. 2014. *Food Losses and Waste in the Context of Sustainable Food Systems. A Report by the High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security*. Rome.
- Hudeckova, H., M. Neureiter, S. Obruca, S. Frühauf, and I. Marova. 2018. 'Biotechnological Conversion of Spent Coffee Grounds into Lactic Acid'. *Letters in Applied Microbiology* 66(4):306–12. doi: 10.1111/lam.12849.
- International Coffee Organization. 2021.
- Ioannidou, Sofia Maria, Chrysanthi Pateraki, Dimitrios Ladakis, Harris Papapostolou, Maria Tsakona, Anestis Vlysidis, Ioannis K. Kookos, and Apostolis Koutinas. 2020. 'Sustainable Production of Bio-Based Chemicals and Polymers via Integrated Biomass Refining and Bioprocessing in a Circular Bioeconomy

Context'. *Bioresource Technology* 307:123093. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123093.

- Kamarudin, Nurazreen Shazwin Binti, Harumi Veny, Nailah Fasihah Binti Sidek, Faisal Abnisa, Rozana Azrina Sazali, and Noorhaliza Aziz. 2020. 'Investigation on Synthesis of Trimethylolpropane (TMP) Ester from Non-Edible Oil'. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis* 15(3):808–17. doi: 10.9767/BCREC.15.3.8862.808-817.
- Karmakar, Gobinda, Pranab Ghosh, and Brajendra Sharma. 2017. 'Chemically Modifying Vegetable Oils to Prepare Green Lubricants'. *Lubricants* 5(4):44. doi: 10.3390/lubricants5040044.
- Karmee, Sanjib Kumar. 2018. 'A Spent Coffee Grounds Based Biorefinery for the Production of Biofuels, Biopolymers, Antioxidants and Biocomposites'. *Waste Management* 72:240–54. doi: 10.1016/j.wasman.2017.10.042.
- Kim, Heejin, Nakyung Choi, Yangha Kim, Hak-Ryul Kim, Junsoo Lee, and In-Hwan Kim. 2019. 'Immobilized Lipase-Catalyzed Esterification for Synthesis of Trimethylolpropane Triester as a Biolubricant'. *Renewable Energy* 130:489–94. doi: 10.1016/j.renene.2018.06.092.
- Kitcha, Suleeporn, and Benjamas Cheirsilp. 2011. 'Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source'. *Energy Procedia* 9:274–82. doi: 10.1016/j.egypro.2011.09.029.
- Kookos, I. K. 2018. 'Technoeconomic and Environmental Assessment of a Process for Biodiesel Production from Spent Coffee Grounds (SCGs)'. *Resources, Conservation and Recycling* 134:156–64. doi: 10.1016/j.resconrec.2018.02.002.
- Koutinas, Apostolis A., Anestis Vlysidis, Daniel Pleissner, Nikolaos Kopsahelis, Isabel Lopez Garcia, Ioannis K. Kookos, Seraphim Papanikolaou, Tsz Him Kwan, and Carol Sze Ki Lin. 2014. 'ChemInform Abstract: Valorization of Industrial Waste and By-Product Streams via Fermentation for the Production of Chemicals and Biopolymers'. *ChemInform* 45(22):chin.201422288. doi: 10.1002/chin.201422288.
- Kovalcik, Adriana, Dan Kucera, Petra Matouskova, Iva Pernicova, Stanislav Obruca, Michal Kalina, Vojtěch Enev, and Ivana Marova. 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. doi: 10.1016/j.jece.2018.05.028.
- Kurre, Santosh Kumar, and Jitendra Yadav. 2023. 'A Review on Bio-Based Feedstock, Synthesis, and Chemical Modification to Enhance Tribological Properties of Biolubricants'. *Industrial Crops and Products* 193:116122. doi: 10.1016/j.indcrop.2022.116122.

- Leow, Yihao, Pek Yin Michelle Yew, Pei Lin Chee, Xian Jun Loh, and Dan Kai. 2021. 'Recycling of Spent Coffee Grounds for Useful Extracts and Green Composites'. *RSC Advances* 11(5):2682–92. doi: 10.1039/D0RA09379C.
- Lie, S. 1973. 'The Ebc-Ninhydrin Method For Determination Of Free Alpha Amino Nitrogen'. *Journal of the Institute of Brewing* 79(1):37–41. doi: 10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x.
- Linko, Y. Y., T. Tervakangas, M. Lämäsä, and P. Linko. 1997. 'Production of Trimethylolpropane Esters of Rapeseed Oil Fatty Acids by Immobilized Lipase'. *Biotechnology Techniques* 11(12):889–92. doi: 10.1023/A:1018410316231.
- Ma, Xiaotian, Yao Zhang, Zijia Song, Kun Yu, Changliu He, and Xu Zhang. 2021. 'Enzyme-Catalyzed Synthesis and Properties of Polyol Ester Biolubricant Produced from *Rhodotorula Glutinis* Lipid'. *Biochemical Engineering Journal* 173:108101. doi: 10.1016/j.bej.2021.108101.
- Marto, J., L. F. Gouveia, B. G. Chiari, A. Paiva, V. Isaac, P. Pinto, P. Simões, A. J. Almeida, and H. M. Ribeiro. 2016. 'The Green Generation of Sunscreens: Using Coffee Industrial Sub-Products'. *Industrial Crops and Products* 80:93–100. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.11.033.
- Mavria, Aikaterini, Erminta Tsouko, Styliani Protonotariou, Aristeidis Papagiannopoulos, Maria Georgiadou, Dimitrios Selianitis, Stergios Pispas, Ioanna Mandala, and Apostolis A. Koutinas. 2022. 'Sustainable Production of Novel Oleogels Valorizing Microbial Oil Rich in Carotenoids Derived from Spent Coffee Grounds'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 70(35):10807–17. doi: 10.1021/acs.jafc.2c03478.
- McNutt, Josiah, and Quan (Sophia) He. 2016. 'Development of Biolubricants from Vegetable Oils via Chemical Modification'. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 36:1–12. doi: 10.1016/j.jiec.2016.02.008.
- McNutt, Josiah, and Quan (Sophia) He. 2019. 'Spent Coffee Grounds: A Review on Current Utilization'. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 71:78–88. doi: 10.1016/j.jiec.2018.11.054.
- Mendes, Adriano A., Cleide M. F. Soares, and Paulo W. Tardioli. 2023. 'Recent Advances and Future Prospects for Biolubricant Base Stocks Production Using Lipases as Environmentally Friendly Catalysts: A Mini-Review'. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39(1):25. doi: 10.1007/s11274-022-03465-4.
- Mohammed, IS, M. Aliyu, SM Dauda, and AA Balami. 2018. 'Synthesis and Optimization Process of Ethylene Glycol-Based Bio-Lubricant from Palm Kernel Oil (PKO)'.
- Monteiro, Rodolpho R. C., Ángel Berenguer-Murcia, Javier Rocha-Martin, Rodrigo S. Vieira, and Roberto Fernandez-Lafuente. 2023. 'Biocatalytic Production of Biolubricants: Strategies, Problems and Future Trends'. *Biotechnology Advances* 68:108215. doi: 10.1016/j.biotechadv.2023.108215.

- Muniraj, Iniya Kumar, Siva Kumar Uthandi, Zhenhu Hu, Liwen Xiao, and Xinmin Zhan. 2015. 'Microbial Lipid Production from Renewable and Waste Materials for Second-Generation Biodiesel Feedstock'. *Environmental Technology Reviews* 4(1):1–16. doi: 10.1080/21622515.2015.1018340.
- Mussatto, Solange I., Ercília M. S. Machado, Silvia Martins, and José A. Teixeira. 2011. 'Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues'. *Food and Bioprocess Technology* 4(5):661–72. doi: 10.1007/s11947-011-0565-z.
- Obruca, Stanislav, Pavla Benesova, Dan Kucera, Sinisa Petrik, and Ivana Marova. 2015. 'Biotechnological Conversion of Spent Coffee Grounds into Polyhydroxyalkanoates and Carotenoids'. *New Biotechnology* 32(6):569–74. doi: 10.1016/j.nbt.2015.02.008.
- Obruca, Stanislav, Pavla Benesova, Sinisa Petrik, Jana Oborna, Radek Prikryl, and Ivana Marova. 2014. 'Production of Polyhydroxyalkanoates Using Hydrolysate of Spent Coffee Grounds'. *Process Biochemistry* 49(9):1409–14. doi: 10.1016/j.procbio.2014.05.013.
- Oliveira, Alessandra L. De, Paulo Marcio Cruz, Marcos N. Eberlin, and Fernando A. Cabral. 2005. 'Brazilian Roasted Coffee Oil Obtained by Mechanical Expelling: Compositional Analysis by GC-MS'. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25(4):677–82. doi: 10.1590/S0101-20612005000400009.
- Panchal, Tirth M., Ankit Patel, D. D. Chauhan, Merlin Thomas, and Jigar V. Patel. 2017. 'A Methodological Review on Bio-Lubricants from Vegetable Oil Based Resources'. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 70:65–70. doi: 10.1016/j.rser.2016.11.105.
- Panusa, Alessia, Antonio Zuorro, Roberto Lavecchia, Giancarlo Marrosu, and Rita Petrucci. 2013. 'Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(17):4162–68. doi: 10.1021/jf4005719.
- Papadaki, Aikaterini. 2018. 'Valorisation of Renewable Resources Produced by Sugarcane Mills and Oilseed Processing Industries via Microbial and Enzymatic Processes for the Production of Fumaric Acid, Wax Esters, Biolubricants and Oleogels'. doi: 10.12681/eadd/45523.
- Papadaki, Aikaterini, Keysson Vieira Fernandes, Afroditi Chatzifragkou, Erika Cristina Gonçalves Aguiéiras, José André Cavalcanti Da Silva, Roberto Fernandez-Lafuente, Seraphim Papanikolaou, Apostolis Koutinas, and Denise Maria Guimarães Freire. 2018. 'Bioprocess Development for Biolubricant Production Using Microbial Oil Derived via Fermentation from Confectionery Industry Wastes'. *Bioresource Technology* 267:311–18. doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.016.
- Papadaki, Aikaterini, Keysson Vieira Fernandes, Afroditi Chatzifragkou, Erika Cristina Gonçalves Aguiéiras, José André Cavalcanti da Silva, Roberto Fernandez-Lafuente, Seraphim Papanikolaou, Apostolis Koutinas, and Denise Maria

- Guimarães Freire. 2018. 'Bioprocess Development for Biolubricant Production Using Microbial Oil Derived via Fermentation from Confectionery Industry Wastes'. *Bioresource Technology* 267:311–18. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2018.07.016.
- Papanikolaou, Seraphim, and George Aggelis. 2011a. 'Lipids of Oleaginous Yeasts. Part I: Biochemistry of Single Cell Oil Production'. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(8):1031–51. doi: 10.1002/ejlt.201100014.
- Papanikolaou, Seraphim, and George Aggelis. 2011b. 'Lipids of Oleaginous Yeasts. Part II: Technology and Potential Applications'. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(8):1052–73. doi: 10.1002/ejlt.201100015.
- Papanikolaou, Seraphim, Stylianos Fakas, Michel Fick, Isabelle Chevalot, Maria Galiotou-Panayotou, Michael Komaitis, Ivan Marc, and George Aggelis. 2008. 'Biotechnological Valorisation of Raw Glycerol Discharged after Bio-Diesel (Fatty Acid Methyl Esters) Manufacturing Process: Production of 1,3-Propanediol, Citric Acid and Single Cell Oil'. *Biomass and Bioenergy* 32(1):60–71. doi: 10.1016/j.biombioe.2007.06.007.
- Patel, Alok, Dimitra Karageorgou, Emma Rova, Petros Katapodis, Ulrika Rova, Paul Christakopoulos, and Leonidas Matsakas. 2020. 'An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and Their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industries'. *Microorganisms* 8(3):434. doi: 10.3390/microorganisms8030434.
- Pateraki, Chrysanthi, Aikaterini Papadaki, Apostolis Koutinas, and Vasiliki Kachrimanidou. 2019. 'Biorefinery Engineering'. Pp. 879–92 in *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier.
- Perera, Madhavi, Jinyong Yan, Li Xu, Min Yang, and Yunjun Yan. 2022. 'Bioprocess Development for Biolubricant Production Using Non-Edible Oils, Agro-Industrial Byproducts and Wastes'. *Journal of Cleaner Production* 357:131956. doi: 10.1016/j.jclepro.2022.131956.
- Phimsen, Songphon, Worapon Kiatkittipong, Hiroshi Yamada, Tomohiko Tagawa, Kunlanan Kiatkittipong, Navadol Laosiripojana, and Suttichai Assabumrungrat. 2016. 'Oil Extracted from Spent Coffee Grounds for Bio-Hydrotreated Diesel Production'. *Energy Conversion and Management* 126:1028–36. doi: 10.1016/j.enconman.2016.08.085.
- Probst, Kyle V., Leslie R. Schulte, Timothy P. Durrett, Mary E. Rezac, and Praveen V. Vadlani. 2016. 'Oleaginous Yeast: A Value-Added Platform for Renewable Oils'. *Critical Reviews in Biotechnology* 36(5):942–55. doi: 10.3109/07388551.2015.1064855.
- Ratledge, Colin. 2004. 'Fatty Acid Biosynthesis in Microorganisms Being Used for Single Cell Oil Production'. *Biochimie* 86(11):807–15. doi: 10.1016/j.biochi.2004.09.017.

- Salimon, Jumat, Bashar Mudhaffar Abdullah, Rahimi M. Yusop, and Nadia Salih. 2014. 'Synthesis, Reactivity and Application Studies for Different Biolubricants'. *Chemistry Central Journal* 8(1):16. doi: 10.1186/1752-153X-8-16.
- Salimon, Jumat, Nadia Salih, and Emad Yousif. 2010. 'Biolubricants: Raw Materials, Chemical Modifications and Environmental Benefits'. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112(5):519–30. doi: 10.1002/ejlt.200900205.
- Sarma, Rakesh, and Ravikrishnan Vinu. 2022. 'Current Status and Future Prospects of Biolubricants: Properties and Applications'. *Lubricants* 10(4):70. doi: 10.3390/lubricants10040070.
- Sharma, Umesh Chandra, Sadhana Sachan, and Shishir Sinha. 2018. 'Analysis of Viscosity-Temperature Behaviour of Karanja Oil Trimethylolpropane Ester Bio-Lubricant Base Stock'. *Asian Journal of Chemistry* 30(4):790–94. doi: 10.14233/ajchem.2018.20997.
- Sharma, Umesh Chandra, Sadhana Sachan, and Rakesh Kumar Trivedi. 2018. 'Viscous Flow Behaviour of Karanja Oil Based Bio-Lubricant Base Oil'. *Journal of Oleo Science* 67(1):105–11. doi: 10.5650/JOS.ESS17140.
- da Silva, Jose Andre Cavalcanti. 2011. 'Biodegradable Lubricants and Their Production Via Chemical Catalysis'. in *Tribology - Lubricants and Lubrication*, edited by C.-H. Kuo. InTech.
- da Silva, José André Cavalcanti, Alberto Cláudio Habert, and Denise Maria Guimarães Freire. 2012. 'A Potential Biodegradable Lubricant from Castor Biodiesel Esters'. *Lubrication Science* 25(1):53–61. doi: 10.1002/lis.1205.
- Sjöström, Jesper. 2006. 'Green Chemistry in Perspective—Models for GC Activities and GC Policy and Knowledge Areas'. *Green Chem.* 8(2):130–37. doi: 10.1039/B511316D.
- Soccol, Carlos Ricardo, Carlos José Dalmas Neto, Vanete Thomaz Soccol, Eduardo Bittencourt Sydney, Eduardo Scopel Ferreira Da Costa, Adriane Bianchi Pedroni Medeiros, and Luciana Porto De Souza Vandenberghe. 2017. 'Pilot Scale Biodiesel Production from Microbial Oil of *Rhodosporidium Toruloides* DEBB 5533 Using Sugarcane Juice: Performance in Diesel Engine and Preliminary Economic Study'. *Bioresource Technology* 223:259–68. doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.055.
- Sreeharsha, Rachapudi Venkata, Namrata Dubey, and S. Venkata Mohan. 2023. 'Orienting Biodiesel Production towards Sustainability and Circularity by Tailoring the Feedstock and Processes'. *Journal of Cleaner Production* 414:137526. doi: 10.1016/j.jclepro.2023.137526.
- Thevenieau, France, and Jean-Marc Nicaud. 2013. 'Microorganisms as Sources of Oils'. *OCL* 20(6):D603. doi: 10.1051/ocl/2013034.

- Titiri, Eleni, Katiana Filippi, Nikos Giannakis, Anestis Vlysidis, Apostolis Koutinas, and Eleni Stylianou. 2023. 'Optimisation of Alkaline Pretreatment of Spent Coffee Grounds for Microbial Oil Production by *Cryptococcus Curvatus*'. *Biochemical Engineering Journal* 193:108841. doi: 10.1016/j.bej.2023.108841.
- Trivedi, Jayati, Mounika Aila, Chandra Dutt Sharma, Piyush Gupta, and Savita Kaul. 2015. 'Clean Synthesis of Biolubricant Range Esters Using Novel Liquid Lipase Enzyme in Solvent Free Medium'. *SpringerPlus* 4(1):165. doi: 10.1186/s40064-015-0937-3.
- Uddin, M. N., K. Techato, M. G. Rasul, N. M. S. Hassan, and M. Mofijur. 2019. 'Waste Coffee Oil: A Promising Source for Biodiesel Production'. *Energy Procedia* 160:677–82. doi: 10.1016/j.egypro.2019.02.221.
- Unugul, Tuba, Togayhan Kutluk, Bahar Gürkaya Kutluk, and Nurcan Kapucu. 2020. 'Environmentally Friendly Processes from Coffee Wastes to Trimethylolpropane Esters to Be Considered Biolubricants'. *Journal of the Air & Waste Management Association* 70(11):1198–1215. doi: 10.1080/10962247.2020.1788664.
- Vardon, Derek R., Bryan R. Moser, Wei Zheng, Katie Witkin, Roque L. Evangelista, Timothy J. Strathmann, Kishore Rajagopalan, and Brajendra K. Sharma. 2013. 'Complete Utilization of Spent Coffee Grounds To Produce Biodiesel, Bio-Oil, and Biochar'. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 1(10):1286–94. doi: 10.1021/sc400145w.
- Wenning, Leonie, Tao Yu, Florian David, Jens Nielsen, and Verena Siewers. 2017. 'Establishing Very Long-chain Fatty Alcohol and Wax Ester Biosynthesis in *Saccharomyces Cerevisiae*'. *Biotechnology and Bioengineering* 114(5):1025–35. doi: 10.1002/bit.26220.
- Zhang, Qingyu, Amandeep Dhir, and Puneet Kaur. 2022. 'Circular Economy and the Food Sector: A Systematic Literature Review'. *Sustainable Production and Consumption* 32:655–68. doi: 10.1016/j.spc.2022.05.010.
- Zhu, L. Y., M. H. Zong, and H. Wu. 2008. 'Efficient Lipid Production with *Trichosporonfermentans* and Its Use for Biodiesel Preparation'. *Bioresource Technology* 99(16):7881–85. doi: 10.1016/j.biortech.2008.02.033.
- Zuorro, Antonio, and Roberto Lavecchia. 2012. 'Spent Coffee Grounds as a Valuable Source of Phenolic Compounds and Bioenergy'. *Journal of Cleaner Production* 34:49–56. doi: 10.1016/j.jclepro.2011.12.003.