

## Evaluating the extraction of oil and sugars from spent coffee grounds

Hanh M. Ho<sup>2</sup>, Ha L. N. Tran<sup>2</sup>, Truc T. T. Tran<sup>2</sup>, Anh T. V. Nguyen<sup>1</sup>, & Ly T. P. Trinh<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>3</sup>Khai Minh Technology Group, Ho Chi Minh City, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: January 09, 2022

Revised: February 25, 2022

Accepted: February 27, 2022

#### Keywords

Bioactive compounds

Coffee oil

Enzymatic hydrolysis

Mannose

Spent coffee grounds

#### \*Corresponding author

Trinh Thi Phi Ly

Email: phily@hcmuaf.edu.vn

### ABSTRACT

About six million tons of spent coffee grounds are discharged into the environment every year. Spent coffee grounds contain many useful components such as polysaccharides, protein, and bioactive compounds. This research aimed to exploit the important products such as coffee oil, sugar and phenolic compounds from spent coffee grounds, contributing to improve the economic efficiency of the coffee industry and reducing the environmental pollution. Coffee oil was extracted using four different methods including maceration, Soxhlet, ultrasonic-assisted and microwave-assisted extraction. The solid residue from the oil extraction process was hydrolyzed by Cellulast and Viscozyme enzyme. Monosaccharides, total phenolic content, and antioxidant activity in the hydrolysate were measured and evaluated. The results showed that ultrasonic-assisted extraction gave the highest yield of coffee oil of 9.64%; the coffee oil had a density of 0.94 kg/L; the acid value of 7.80 mg KOH/g; saponification value of 16.33 mg KOH/g and ester value of 8.57 mg KOH/g. The highest enzymatic hydrolysis yield was obtained by using 2% Viscozyme within 24 h. The spent coffee ground hydrolysate contained 2016.4 mg/L reducing sugars including 464.2 mg/L mannose; 947.1 mg/L glucose and 256.3 mg/L galactose; 401.70 mg/L total phenolic content and showed the antioxidant activity of 564.3 mg/L ascorbic acid equivalent. This study demonstrated a feasible process to obtain 96 kg of coffee oil, 48 kg of sugar and 10 kg of phenolic compounds from 1 ton of dry spent coffee grounds.

**Cited as:** Ho, H. M., Tran, H. L. N., Tran, T. T. T., Nguyen A. T. V., & Trinh, L. T. P. (2022). Evaluating the extraction of oil and sugars from spent coffee grounds. *The Journal of Agriculture and Development* 21(1), 28-39.

## Nghiên cứu chiết dầu và thu nhận đường từ bã cà phê

Hồ Mỹ Hạnh<sup>2</sup>, Trần Lê Nhật Hạ<sup>2</sup>, Trần Thị Thanh Trúc<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Vân Anh<sup>1</sup>  
& Trịnh Thị Phi Ly<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh học và Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Khoa Khoa Học Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Công Ty Cổ Phần Tập Đoàn Công Nghệ Khai Minh, TP. Hồ Chí Minh

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 09/01/2022

Ngày chỉnh sửa: 25/02/2022

Ngày chấp nhận: 27/02/2022

#### Từ khóa

Bã cà phê

Dầu cà phê

Đường mannose

Hợp chất phenolic

Thủy phân cà phê

#### \*Tác giả liên hệ

Trịnh Thị Phi Ly

Email: phily@hcmuaf.edu.vn

### TÓM TẮT

Mỗi năm có khoảng 6 triệu tấn bã cà phê thải ra môi trường. Bã cà phê chứa nhiều thành phần có giá trị như polysaccharide, protein và các hợp chất phenolic nhưng chưa được sử dụng hợp lý. Mục đích của nghiên cứu này là khai thác những sản phẩm có giá trị như dầu và đường có hoạt tính sinh học từ bã cà phê, góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế của ngành công nghiệp cà phê đồng thời góp phần giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường. Dầu cà phê được chiết bằng bốn phương pháp khác nhau bao gồm ngâm chiết tĩnh, Soxhlet, sử dụng sóng siêu âm và chiết xuất có hỗ trợ vi sóng. Phần bã sau khi tách dầu sẽ tiếp tục được thủy phân bằng enzyme Cellulast và Viscozyme. Dịch thủy phân được phân tích thành phần đường đơn, hợp chất phenolic tổng số và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả cho thấy, phương pháp sử dụng sóng siêu âm cho hàm lượng dầu cao nhất 9,64%; dầu cà phê có tỷ trọng 0,94 kg/L; chỉ số acid 7,80 mg KOH/g; chỉ số xà phòng hóa 16,33 mg KOH/g và chỉ số este 8,57 mg KOH/g. Hiệu suất thủy phân cao nhất khi xử lý bã cà phê với 2% Viscozyme sau 24 giờ. Dịch thủy phân bã cà phê chứa 2016,4 mg/L đường khử bao gồm 464,2 mg/L mannose; 947,1 mg/L glucose và 256,3 mg/L galactose; 401,7 mg/L phenolic tổng số và hoạt tính chống oxy hóa tương đương 564,3 mg/L vitamin C. Kết quả nghiên cứu cho thấy, có thể thu nhận 96 kg dầu cà phê, 48 kg đường và 10 kg hợp chất phenolic từ 1 tấn bã cà phê khô.

### 1. Đặt Vấn Đề

Cà phê hiện nay đang là mặt hàng giao dịch nhiều thứ hai trên thế giới chỉ sau dầu mỏ và là loại đồ uống phổ biến chỉ sau nước. Theo ước tính của Tổ chức Cà phê Quốc tế (ico.org), trong giai đoạn 2019 - 2020 toàn thế giới tiêu thụ 169,34 triệu bao cà phê (1 bao có trọng lượng tương đương 60 kg). Theo ước tính, 1 tấn cà phê nhân có thể tạo ra 650 kg chất thải và 1 kg cà phê dùng cho sản xuất cà phê hòa tan thì thải ra 2 kg chất thải ướt (Mata & ctv., 2018). Do đó, tổng lượng bã thải ra lên tới 6 triệu tấn trong giai đoạn 2019 - 2020. Riêng tại Việt Nam, thị trường tiêu thụ nội địa đạt 200.000 tấn cà phê/năm và thải ra khoảng 120.000 tấn bã cà phê. Ở Việt Nam, bã cà phê thường được dùng để làm giá thể trồng

cây, phân bón hoặc làm chất đốt. Một lượng lớn bã cà phê không được xử lý gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng.

Theo Cruz & ctv. (2012), bã cà phê chứa từ 7 đến 16% hàm lượng dầu. Dầu cà phê thường dùng trong mỹ phẩm, có tác dụng ngăn ngừa lão hóa da hoặc được chuyển hóa thành diesel sinh học. Dầu cà phê chứa các acid béo, caffeine và các hợp chất phenolic (Chai & ctv., 2021), có khả năng khử mùi, thanh lọc không khí và diệt khuẩn hiệu quả; giúp tinh thần thư giãn, tỉnh táo, rất phù hợp cho không gian phòng làm việc và xe hơi. Bã cà phê được cấu tạo từ các thành phần chính là hemicellulose (39,1%), cellulose (12,4%) và lignin (23,9%) (Mussatto & ctv., 2011). Polysaccharide trong bã cà phê chủ yếu là galactomannan và arabinogalactan, hai thành phần này đã được nghiên

cứ thủy phân để tạo đường cho quá trình lên men sản xuất bioethanol và thu nhận mannose để bổ sung vào thực phẩm, đồ uống và thuốc điều trị bệnh (Rocha & ctv., 2014; Hu & ctv., 2016; Woldesenbet & ctv., 2016). Một số nghiên cứu chiết dầu cà phê để sản xuất dầu diesel sinh học, phần bã còn lại sau khi chiết dầu chiếm 85-93% khối lượng bã ban đầu chủ yếu chứa polysaccharides mà chưa được khai thác sử dụng (Cruz & ctv., 2012). Phần bã này thải ra môi trường và gây ô nhiễm nghiêm trọng nếu không được xử lý. Polysaccharide trong bã cà phê có thể được thủy phân thành đường đơn như mannose, galactose và glucose bằng acid hoặc enzyme. Quá trình thủy phân bằng acid sinh ra các sản phẩm phân hủy không mong muốn và khó ứng dụng vào thực phẩm. Thủy phân bằng enzyme là phương pháp thân thiện với môi trường, an toàn, không có sản phẩm phụ và được ứng dụng rộng rãi trong ngành thực phẩm. Dịch thủy phân bã cà phê chứa chủ yếu đường mannose, glucose và galactose. Mannose là đường có năng lượng thấp hơn glucose và saccharose nên được sử dụng rộng rãi trong thực phẩm và công nghiệp phụ gia thực phẩm. Ngoài ra, mannose được chứng minh có nhiều lợi ích với sức khỏe như với hệ thống miễn dịch, bệnh đái tháo đường, bệnh đường ruột và nhiễm trùng đường tiết niệu. Mannose là nguyên liệu ban đầu để tổng hợp các chất kích thích miễn dịch (immunostimulator), chất chống khối u (anti-tumor agent), vitamin và D-mannitol (Wu & ctv., 2019).

Việc tổng hợp mannose hóa học và chiết xuất từ thực vật không đáp ứng được nhu cầu sử dụng trong công nghiệp hiện nay. Ngoài ra, bã cà phê còn chứa caffeine 0,007 - 0,5%, các hợp chất polyphenol 8,8 - 14,4 mg GA/g (Cruz & ctv., 2012; Rochín-Medina & ctv., 2018; Seo & Park, 2019). Polyphenol có mặt trong cả dầu và dịch thủy phân từ bã cà phê. Hợp chất này được biết đến là nhóm chất có khả năng chống oxy hóa, kháng viêm, kháng vi khuẩn và nấm.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành chiết dầu bằng các phương pháp khác nhau nhằm tìm kiếm một phương pháp có khả năng triển khai trên qui mô lớn. Ngoài ra, phần bã cà phê còn lại sau chiết dầu được sử dụng để thủy phân thành các loại đường có giá trị. Việc nghiên cứu phát triển các sản phẩm từ bã cà phê không những giúp tăng thêm giá trị kinh tế cho ngành công nghiệp cà phê, cải thiện thu nhập cho người nông dân, mà còn giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Vật liệu

Bã cà phê pha máy thu từ một số cửa hàng pha chế và chế biến cà phê trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh từ tháng 10/2020 - 12/2021. Tất cả mẫu bã được sấy khô ở 50°C và bảo quản kín.

Enzyme Cellulast (700 EGU/g) và Viscozyme (100 FBG/g) được cung cấp bởi Novozyme; các loại thuốc thử 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 3,5- Dinitrosalicylic acid (DNS), Anthrone, Folin-Ciocalteu của Merck; dung môi n-hexane và các hóa chất cần thiết khác.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Xác định các chỉ tiêu hóa lí của bã cà phê

Mẫu bã cà phê sau sấy khô được xác định các chỉ tiêu hóa lí bao gồm độ ẩm, độ tro, hàm lượng protein thô lần lượt theo các tiêu chuẩn TCVN 10788:2015, TCVN 8124:2009/ISO 2171 : 2007, TCVN 10791:2015.

Thành phần carbohydrate trong bã cà phê được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC Agilent 1200 Infinity II) theo qui trình của Sluiter & ctv. (2012).

#### 2.2.2. Các phương pháp ly trích dầu từ bã cà phê

Dầu cà phê được chiết xuất bằng bốn phương pháp:

1. Phương pháp Soxhlet (SOX) thực hiện với tỉ lệ 1:20 (w/v) đun trong 4 giờ ở 60°C.
2. Phương pháp chiết xuất bằng siêu âm (UAE) được tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết (15, 30 và 45 phút), nhiệt độ (30°C, 40°C và 50°C) với tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:5 (w/v).
3. Phương pháp chiết xuất có hỗ trợ vi sóng (MAE) được bố trí khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ (60°C, 70°C và 80°C) và thời gian chiết xuất (20, 30 và 40 phút). Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:3 (w/v).

Tất cả mẫu dầu được thu bằng cách lọc qua giấy lọc có chứa Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và loại bỏ dung môi bằng máy cô quay chân không (Heidolph) ở 50°C, 330 mbar. Hàm lượng dầu được tính trên mẫu khô kiệt theo công thức sau:

$$W = \frac{m_1 - m_0}{m \times (1 - w\%)} \times 100 (\%)$$

Trong đó:

$m_1$  (g): tổng khối lượng bình cầu và dầu sau sấy khô

$m_0$  (g): khối lượng bình cầu ban đầu

$m$  (g): khối lượng mẫu cà phê sử dụng

$w$  (%): độ ẩm của mẫu

**2.2.3. Xác định các chỉ tiêu hóa lí trong dầu bã cà phê**

Các chỉ tiêu hóa lí trong dầu cà phê cần xác định gồm tỷ trọng, chỉ số acid (AV), chỉ số xà phòng hóa (SV) và chỉ số este hóa. Tỷ trọng dầu cà phê được xác định theo TCVN 6117:2010/ISO 6883 : 2007, xác định AV theo TCVN 6127:2010 và TCVN 6126:2015/ISO 3457:2013 áp dụng cho SV. Chỉ số este tính bằng hiệu giữa SV và AV.

**2.2.4. Thủy phân bã cà phê bằng enzyme**

Bã cà phê sau khi chiết dầu được sấy khô và thủy phân bằng enzyme Cellulast (700 EGU/g) và Viscozyme (100 FBG/g). Bảng 1 thể hiện ba nghiệm thức được bố trí với các loại enzyme khác nhau gồm Cellulast (NT1), Viscozyme (NT2), Cellulast kết hợp với Viscozyme (NT3) và một nghiệm thức không sử dụng enzyme dùng làm đối chứng (NT0). Tỷ lệ enzyme/cơ chất là 2%. Thủy phân bã cà phê theo qui trình của Nguyen & ctv. (2019). Sử dụng 1 g mẫu đã chiết dầu kết hợp với 25 mL dung dịch đệm sodium citrate 0,05 M có pH 4,8 - 5,0; sau đó thêm enzyme vào từng nghiệm thức. Quá trình thủy phân thực hiện ở 50°C trong bể lắc ổn nhiệt Julabo với thời gian 24 giờ. Quá trình thủy phân được theo dõi bằng cách định lượng đường khử ở các thời điểm 0; 3; 6; 9; 12 và 24 giờ.

**Bảng 1.** Bố trí nghiệm thức thủy phân bã cà phê

Tên nghiệm thức	Tỷ lệ enzyme: cơ chất (%v/w)	
	Cellulast	Viscozyme
NT0	0	0
NT1	2	0
NT2	0	2
NT3	1	1

**2.2.5. Xác định nồng độ đường khử trong dịch thủy phân**

Đường khử giải phóng từ quá trình thủy phân được xác định dựa trên phản ứng màu giữa đường khử với thuốc thử 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (Nguyen & ctv., 2019). Phản ứng được tiến hành bằng cách cho 1 mL dịch thủy phân đã pha loãng kết hợp với 1 mL DNS. Hỗn hợp trên được cho phản ứng bằng cách đun trong nước sôi 5 phút và hạ nhiệt nhanh trong nước lạnh để dừng phản ứng. Sau khi mẫu nguội hoàn toàn thì thêm 3 mL nước cất, lắc đều và đo độ hấp thụ ở bước sóng 505 nm. Glucose được sử dụng làm chất chuẩn, dãy các nồng độ gồm 100, 200, 300, 400, 500 mg/L. Xây dựng đồ thị chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và độ hấp thụ. Đo độ hấp thụ của mẫu thử để xác định được lượng đường khử tương ứng trong mẫu.

**2.2.6. Khảo sát thành phần dịch thủy phân bã cà phê**

Các loại đường như mannose, galactose và glucose trong dịch thủy phân được xác định bằng kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp (Agilent 1200 Infinity II). Cột Rezex RPM- Monosaccharide Pb+2 (8%) có kích thước 100 x 7.8 mm được ổn định ở 40°C. Đầu dò chiết suất (RI) được gia nhiệt ở 80°C. Pha động là nước với tốc độ dòng 0,2 mL/phút.

Phenolic tổng số trong dịch thủy phân được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử sau khi cho mẫu phản ứng màu với thuốc thử Folin - ciocalteu (Trinh & ctv., 2018). Tiến hành định lượng phenolic tổng số bằng cách cho 100 µL mẫu thử phản ứng với 100 µL Folin-Ciocalteu ủ trong 5 phút; sau đó thêm 300 µL Na<sup>2</sup>CO<sup>3</sup> 20% và nước để đạt thể tích 5 mL. Để mẫu tại phòng tối 60 phút và đo độ hấp thụ bằng máy quang phổ UV-Vis ở bước sóng 760 nm. Xây dựng đồ thị chuẩn biểu diễn mối liên hệ giữa nồng độ chất chuẩn và độ hấp thụ tương ứng. Chất chuẩn được sử dụng là gallic acid (GA) ở các nồng độ 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm và 250 ppm. Kết quả nồng độ phenolic tổng số được biểu diễn dưới dạng mg gallic acid/L.

Khả năng chống oxy hóa của dịch thủy phân được đánh giá bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH với chất chuẩn là ascorbic acid (AA). Tiến hành phản ứng bằng cách cho 1 mL DPPH (OD=1,1±0,02) vào 1 mL dịch thủy phân đã pha loãng. Hỗn hợp được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng

trong 20 phút, sau đó đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm bằng máy UV-Vis. Ascorbic acid (AA) được sử dụng làm chất chuẩn ở các nồng độ 100, 200, 300, 500 và 1000 ppm. Kết quả biểu diễn khả năng chống oxy hóa của dịch thủy phân bằng lượng ascorbic acid tương đương (mg AA/L) (Trinh & ctv., 2018).

### 2.3. Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Minitab 16 và biểu diễn dưới dạng trung bình  $\pm$  SD.

## 3. Kết Quả và Thảo Luận

### 3.1. Các chỉ tiêu hóa lý của bã cà phê

Các chỉ tiêu hóa lý được xác định trong bã cà phê bao gồm độ ẩm, độ tro, hàm lượng Nitơ tổng, protein thô và thành phần carbohydrate.

**Bảng 2.** Các chỉ tiêu hóa lý của mẫu bã cà phê

Chỉ tiêu	Hàm lượng (%)
Độ ẩm	11,03 $\pm$ 0,03
Độ tro	1,92 $\pm$ 0,02
Nitơ	2,29 $\pm$ 0,03
Protein	14,34 $\pm$ 0,14
Glucose	9,09 $\pm$ 0,54
Galactose	11,79 $\pm$ 0,78
Mannose	30,39 $\pm$ 1,69

Kết quả thể hiện trong Bảng 2 cho thấy bã cà phê có hơn 50% carbohydrate trong đó đường mannose là thành phần chính chiếm 30,39%, tiếp theo là galactose (11,79%) và glucose (9,09%). Bã cà phê còn chứa lượng lớn protein (14,34%), có thể được xử lý để bổ sung dinh dưỡng cho động vật nuôi. Độ tro đại diện cho tổng hàm lượng của các chất khoáng có trong nguyên liệu chiếm 1,92%. Hàm lượng tro và protein được quan tâm khi sử dụng các chất thải hữu cơ làm phân bón thực vật. Hiện tại bã cà phê được xử lý để làm phân bón hữu cơ ở nhiều nông trại. Các chỉ tiêu hóa lý và thành phần bã cà phê trong nghiên cứu này cũng tương đồng với các báo cáo trước đây (Cruz & ctv., 2014; Osorio-Arias & ctv., 2019; Passos & ctv., 2019). Ngoài ra bã cà phê còn chứa dầu và các hợp chất phenolic mà chúng tôi sẽ khảo sát trong những thí nghiệm tiếp theo.

### 3.2. Hiệu suất chiết dầu từ bã cà phê bằng các phương pháp khác nhau

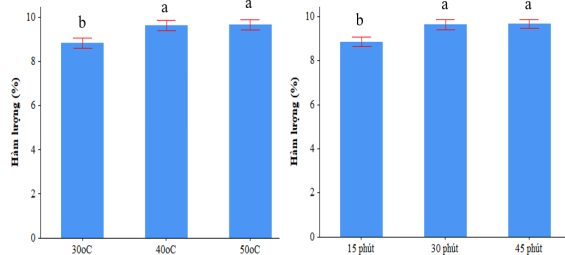
Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng ba phương pháp khác nhau để chiết dầu gồm phương pháp Soxhlet, phương pháp chiết xuất bằng sóng siêu âm (UAE) và chiết xuất dưới sự hỗ trợ của vi sóng (MAE). Chiết dầu bằng Soxhlet là phương pháp phổ biến, dễ thực hiện, không cần đầu tư nhiều trang thiết bị nhưng thời gian thường kéo dài. Các phương pháp chiết xuất hiện đại thường có hiệu quả cao và rút ngắn thời gian, nhưng tốn nhiều chi phí đầu tư trang thiết bị. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp Soxhlet làm phương pháp đối chứng nên không khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chiết dầu mà sử dụng điều kiện tối ưu của nghiên cứu trước đó (Hibbert & ctv., 2019) là 60°C trong 4 giờ. Chúng tôi cũng tiến hành chiết dầu bằng phương pháp Soxhlet đến 8 giờ và hàm lượng dầu không có khác biệt có ý nghĩa thống kê với hàm lượng dầu ở 4 giờ. Vì vậy chúng tôi chọn 4 giờ là thời gian tối ưu để chiết dầu bằng phương pháp Soxhlet. Nghiên cứu chiết xuất dầu cà phê tập trung vào các phương pháp hiện đại, có hiệu quả trong thời gian ngắn đồng thời giảm thiểu lượng dung môi sử dụng.

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của phương pháp UAE đến hiệu suất chiết dầu

Chiết xuất bằng sóng siêu âm là phương pháp hiện đại, cho hiệu quả cao, và có thể thực hiện trên qui mô lớn. Thời gian và nhiệt độ là hai yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình chiết xuất. Ở thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng dầu cho thấy hàm lượng dầu tăng từ 8,84 đến 9,64% khi kéo dài thời gian chiết từ 15 đến 30 phút. Tuy nhiên hàm lượng dầu tăng không đáng kể từ 9,64% đến 9,67% khi kéo dài thời gian chiết đến 45 phút, hàm lượng dầu thu nhận ở 30 và 45 phút không có khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Chúng tôi chọn thời gian chiết dầu 30 phút cho các thí nghiệm tiếp theo. Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất. Kết quả cho thấy, nhiệt độ tăng thì hiệu suất chiết dầu cũng tăng lên, lần lượt là 8,82% ở 30°C; 9,64% ở 40°C và 9,67% ở 50°C (Hình 1).

Tuy nhiên, hàm lượng dầu chiết ở 40°C và 50°C không có khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Điều kiện tối ưu để chiết dầu trong nghiên cứu này là 40°C trong 30 phút. Hàm lượng dầu cà

phê dao động trong khoảng rộng từ 7 – 16% tùy vào nguồn nguyên liệu và phương pháp chiết xuất (Cruz & ctv., 2012). Chúng tôi đã tiến hành chiết dầu cà phê trên 11 mẫu khác nhau đã thu thập ở địa bàn TP.HCM bằng phương pháp UAE, kết quả cho thấy hàm lượng dầu dao động từ 7,5% đến 13,6%. Có thể thấy nguồn nguyên liệu ảnh hưởng nhiều đến hàm lượng dầu (Al-Hammanre & ctv., 2012; Jenkins & ctv., 2014). Rocha & ctv. (2014) đã chiết dầu cà phê Arabica bằng UAE ở 60°C trong 45 phút và thu được 12% dầu.



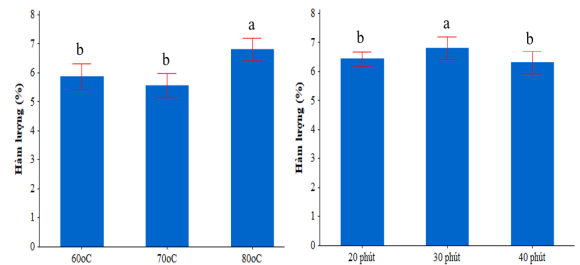
**Hình 1.** Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hiệu suất chiết dầu bằng UAE.

Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**3.2.2. Ảnh hưởng của phương pháp MAE đến hiệu suất chiết dầu**

Chiết xuất dưới sự hỗ trợ của vi sóng là phương pháp chiết hiện đại, có hiệu quả cao trong chiết xuất các hợp chất tự nhiên và thực hiện trong thời gian ngắn. Thí nghiệm chiết dầu cà phê bằng MAE được bố trí khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ (tại 60°C, 70°C và 80°C) và thời gian (trong 20, 30 và 40 phút). Thời gian chiết xuất là 30 phút được sử dụng cố định trong các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ. Kết quả cho thấy, hàm lượng dầu đạt giá trị cao nhất là 6,81% chiết xuất ở 80°C và có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ) so chiết xuất ở 60°C và 70°C (Hình 2). Nhiệt độ chiết xuất ở 80°C được chúng tôi tiếp tục sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên hiệu suất chiết dầu. Hàm lượng dầu đạt giá trị cao nhất sau 30 phút với hiệu suất 6,81%, và có khác biệt có ý nghĩa với các thí nghiệm khác ( $P < 0,05$ ). Do đó, điều kiện chiết xuất tối ưu cho phương pháp MAE được lựa chọn là chiết xuất ở 80°C trong 30 phút. Trong phương pháp MAE, nhiệt gia tăng nhanh chóng nhờ tương tác lưỡng cực của các dung môi phân cực, do đó làm tăng hiệu quả của quá trình trích ly trong thời

gian ngắn hơn so với các phương pháp khác. Tuy nhiên, dung môi dùng để chiết dầu trong nghiên cứu này là n-hexan không phân cực nên phương pháp MAE có thể không phù hợp để chiết dầu. Chúng tôi thử nghiệm thay đổi dung môi chiết là ethanol, kết quả cho thấy hàm lượng dầu tăng đáng kể, nhưng ethanol là dung môi phân cực hòa tan rất nhiều các hợp chất khác trong bã cà phê như polyphenol và melanoidin làm cho dầu cà phê có màu nâu đậm và đặc sánh hơn so với dầu chiết bằng n-hexan. Một số nghiên cứu đã báo cáo hàm lượng dầu cà phê chiết bằng MAE khá cao từ 11,5% - 15,1% (Obruca & ctv., 2014; Hibbert & ctv., 2019). Có thể nguồn nguyên liệu khác nhau là yếu tố dẫn đến đến hàm lượng dầu có sự khác biệt đáng kể trong các nghiên cứu.



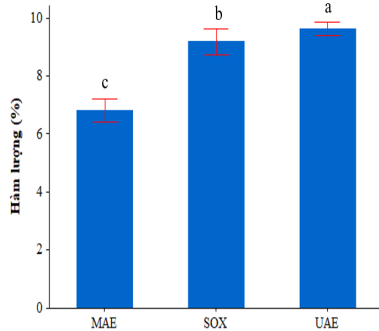
**Hình 2.** Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian tới hiệu suất chiết dầu bằng MAE.

Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**3.2.3. Hiệu quả chiết dầu của các phương pháp**

Kết quả chiết dầu bằng các phương pháp UAE, MAE và SOX được thực hiện phân tích ANOVA bằng phần mềm Minitab 16. Từ Hình 3, có thể thấy phương pháp chiết UAE và SOX có hiệu suất cao vượt trội (cao nhất lần lượt là 9,64% và 9,18%) so với phương pháp MAE (6,81%). Hiệu suất dầu chiết bằng phương pháp UAE cao nhất và có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các phương pháp còn lại. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Goh & ctv. (2020), hàm lượng dầu cà phê đạt giá trị cao nhất khi chiết bằng phương pháp UAE trong 30 phút, kế tiếp là phương pháp SOX trong 3 giờ. SOX là phương pháp chiết dầu được sử dụng phổ biến nhất, có hiệu quả nhưng tốn nhiều thời gian, dung môi và năng lượng hơn UAE. Thời gian chiết dầu bằng phương pháp SOX trong một số nghiên cứu lên đến 8 giờ với tỉ lệ mẫu:dung môi là 1:15 - 1:25 (Efthymiopoulos & ctv., 2017; Hanif & ctv.,

2019). Trong khi đó chiết dầu bằng UAE chỉ thực hiện trong 15 - 45 phút với tỉ lệ mẫu:dung môi thấp 1:3 - 1:5 (Rocha & ctv., 2014). Do đó, chúng tôi chọn phương pháp UAE để chiết dầu cho các thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 3.** Hàm lượng dầu cà phê từ các phương pháp chiết khác nhau.

Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

### 3.3. Các chỉ tiêu hóa lí của dầu cà phê

Dầu cà phê được chiết bằng hai phương pháp có hiệu quả nhất là UAE và SOX sẽ được xác định các chỉ tiêu hóa lí. Tỷ trọng dầu được tính theo đơn vị là kg/L, đơn vị này thể hiện cho khối lượng của dầu trong 1 lít thể tích. Các chỉ tiêu còn lại gồm chỉ số acid (AV), chỉ số xà phòng (SV) và chỉ số este là các chỉ số đại diện cho chất lượng dầu. Chỉ số acid là số mg KOH cần để trung hòa các gốc acid béo tự do trong 1 g dầu. Chỉ số AV càng cao có nghĩa là hàm lượng acid béo tự do trong dầu cao, tuy nhiên các acid béo này dễ bị oxy hóa có thể dẫn đến suy giảm chất lượng nếu dầu không được bảo quản tốt (Istiningrum & ctv., 2017). Dầu có chỉ số AV càng thấp thì càng bền và chất lượng càng cao. Bảng 3 thể hiện các chỉ số của dầu cà phê chiết bởi dung môi n-hexan bằng phương pháp SOX và UAE. Tỷ trọng của dầu bã cà phê chiết bằng UAE là 0,94 kg/L cao hơn so với SOX (0,84 kg/L), điều này có thể được giải thích dựa trên khối lượng phân tử của chất béo chứa trong dầu, khối lượng phân tử lớn sẽ làm tỷ trọng dầu cao. Phương pháp Soxhlet chiết dầu trong thời gian dài (4 giờ), trong khi đó UAE chỉ tiến hành trong 30 phút, thời gian chiết dầu kéo dài làm cho triglycerid bị phân hủy thành acid béo có khối lượng phân tử nhỏ hơn (Bart & ctv., 2010; Hanif & ctv., 2019). Dầu chiết bằng UAE có các chỉ số AV, SV và chỉ số este lần lượt

là 7,80; 16,33 và 8,57 mg KOH/g; và 7,59; 17,20 và 9,70 mg KOH/g đối với dầu chiết bằng SOX.

Các chỉ số của dầu thu nhận từ hai phương pháp này không có khác biệt có ý nghĩa thống kê. Chỉ số acid trong nghiên cứu này tương đương với báo cáo của Al-Hamamre & ctv. (2012), trong đó AV của dầu chiết bằng phương pháp Soxhlet là 7,3 mg KOH/g. Các chỉ số của dầu chiết từ bã cà phê được báo cáo dao động trong khoảng rộng, phụ thuộc vào nguồn nguyên liệu, cách xử lý nguyên liệu và phương pháp chiết xuất. Theo nghiên cứu của Hanif & ctv. (2019), chỉ số AV và SV lần lượt là 44,47 mg KOH/g và 176,40 mg KOH/g cao hơn nhiều so với các chỉ số của dầu cà phê trong nghiên cứu này, có thể là do tác giả đã thu thập nguyên liệu từ nhà máy chế biến cà phê hòa tan, trong đó cà phê được xử lý bằng nước nóng tại nhiệt độ cao 160 - 180°C và áp suất 14 - 16 bar. Trong khi đó, chúng tôi sử dụng bã cà phê thu thập ở các cửa hàng pha chế nên cà phê thường sẽ được xử lý ở nhiệt độ và áp suất thấp hơn. Nhiệt độ xử lý nguyên liệu cao hoặc nhiệt độ quá trình chiết dầu cao thường làm tăng chỉ số acid. Chỉ số AS trong nghiên cứu này thấp so với nhiều công bố trước đây chứng tỏ dầu càng bền và có chất lượng cao. Chỉ số SV ở nghiên cứu này thấp hơn so với kết quả khác có thể là do sự hiện diện của các acid béo mạch dài hay triacylglycerol có khối lượng phân tử lớn (Bart & ctv., 2010; Hanif & ctv., 2019).

### 3.4. Ảnh hưởng của enzyme đến quá trình thủy phân

Bã cà phê sau khi chiết dầu chứa chủ yếu là polysaccharide được thủy phân bằng enzyme. Kết quả cho thấy, nồng độ đường khử tăng ở cả 4 nghiệm thức (Hình 4). Ở NT0 không có bổ sung enzyme, sau 24 giờ thủy phân thì nồng độ đường tăng lên không đáng kể (từ 129,9 mg/L lên 304,2 mg/L); NT1 có bổ sung enzyme Cellulast 2% thì hiệu suất thủy phân tăng lên rõ hơn trong 12 giờ đầu, nhưng cao nhất chỉ gấp 1,8 lần so với đối chứng ở cùng thời điểm 24 giờ. Ở NT2, có thể thấy Viscozyme mang lại hiệu suất thủy phân rất cao, nồng độ đường khử tăng nhanh trong 9 giờ đầu và đạt hơn 2000 mg/L, gấp 6,6 lần nghiệm thức đối chứng (giai đoạn sau tăng không đáng kể). NT3 sử dụng kết hợp 2 loại enzyme Cellulast và Viscozyme cũng cho hiệu quả thủy phân khá tốt, đạt cao nhất khoảng 1200 mg/L trong 9 - 24 giờ, gấp gần 4 lần nghiệm thức đối chứng.

**Bảng 3.** Các chỉ số của dầu từ bã cà phê chiết bằng phương pháp SOX và UAE

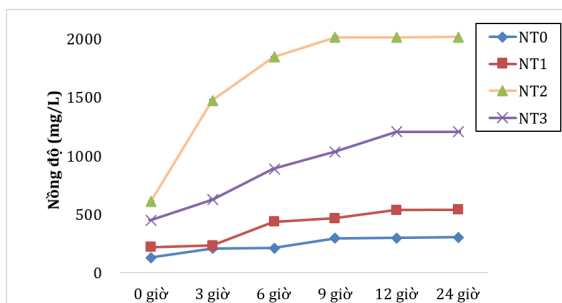
Phương pháp	Tỷ trọng (kg/L)	Chỉ số acid (mg KOH/g)	Chỉ số xà phòng (mg KOH/g)	Chỉ số este (mg KOH/g)
SOX	0,84 ± 0,00	7,59 ± 0,11	17,20 ± 0,74	9,70 ± 0,84
UAE	0,94 ± 0,00	7,80 ± 0,12	16,33 ± 0,87	8,57 ± 0,86

Viscozyme là enzyme thương mại có thành phần gồm  $\beta$ -glucanase, pectinase, hemicellulase và xylanase; trong khi Cellulast chỉ chứa cellulase. Bã cà phê chứa các polysaccharide chính như galactomannan, arabinogalactan và cellulose, Viscozyme là một hỗn hợp enzyme thủy phân cả hemicellulose và cellulose, do đó mang lại hiệu suất thủy phân cao hơn Cellulast. Như vậy, trong nghiên cứu này NT2 sử dụng Viscozyme 2% là nghiệm thức cho nồng độ đường khử cao nhất với 2016,4 mg/L trong 24 giờ thủy phân, tương đương với hàm lượng đường là 53,8 mg/g nguyên liệu và hiệu suất thủy phân polysaccharide đạt khoảng 9,76%. Hiệu suất thủy phân trong nghiên cứu này được ghi nhận thấp hơn so với một số nghiên cứu trước đây như 17% trong báo cáo của Jooste & ctv. (2013); 14,79% trong báo cáo của Bhaturiwala & Modi (2020). Đa số các nghiên cứu đều tiến hành tiền xử lý bã cà phê bằng nhiều phương pháp khác nhau nhằm loại bỏ các thành phần không mong muốn và phá vỡ cấu trúc của bã cà phê làm cho enzyme dễ dàng tiếp cận với cơ chất và tăng hiệu suất thủy phân (Jooste & ctv., 2013; Nguyen & ctv., 2019). Tiền xử lý là một quá trình rất quan trọng mà chúng tôi sẽ thực hiện trong nghiên cứu tiếp theo.

**3.5. Thành phần dịch thủy phân**

**3.5.1. Hàm lượng phenolic tổng số và hoạt tính chống oxy hóa**

Ngoài đường khử thì dịch thủy phân còn chứa các hợp chất phenolic và thể hiện khả năng chống oxy hóa. Hình 5 cho thấy hàm lượng phenolic tổng số và hoạt tính chống oxy hóa tăng trong quá trình thủy phân bã cà phê sau chiết dầu. Hàm lượng phenolic tổng số tăng nhanh chóng từ 221,1 mg GA/L đến 369,5 mg GA/L trong giai đoạn từ 3 giờ đến 6 giờ thủy phân, sau đó tăng chậm và đạt giá trị cao nhất sau 24 giờ với nồng độ 401,7 mg GA/L. Khả năng chống oxy hóa của dịch thủy phân tính theo nồng độ acid ascorbic tăng từ 348,6 mg/L tại 3 giờ tới 564,3 mg/L sau 24 giờ thủy phân. Theo báo cáo của Choi & ctv. (2017), bã cà phê chứa nhiều hợp chất phenolic bao gồm acid chlorogenic, acid gallic và acid protocatechuic. Các hợp chất này thường được chiết bằng dung môi và quyết định khả năng chống oxy hóa của dịch chiết. Sử dụng các enzyme có khả năng phá hủy thành tế bào thực vật như cellulase, hemicellulase, pectinase làm giải phóng các hợp chất tự nhiên bên trong tế bào, vì vậy hàm lượng các hợp chất này tăng theo thời gian trong quá trình thủy phân (Puri & ctv., 2012). Phương pháp chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học bằng cách sử dụng các loại enzyme cũng là một xu hướng gần đây vì những ưu điểm của phương pháp này như an toàn, không tồn dư hóa chất trong sản phẩm và thân thiện với môi trường. Anuar & ctv. (2020) đã dùng enzyme pectinase chiết các hợp chất chống oxy hóa trong bã cà phê, kết quả thu được hàm lượng phenolic tổng số là 267,2 mg GA/L thấp hơn kết quả của chúng tôi trong nghiên cứu này. Pectinase là enzyme thủy phân pectin, một thành phần chiếm tỉ lệ cao trong vỏ cà phê nhưng ít hiện diện trong bã cà phê. Việc sử dụng Viscozyme chứa các loại enzyme khác nhau như  $\beta$ -glucanase, pectinase, hemicellulase và xylanase trong nghiên cứu của chúng tôi đã mang lại hiệu quả cao hơn chỉ sử dụng pectinase. Sử dụng enzyme còn giải

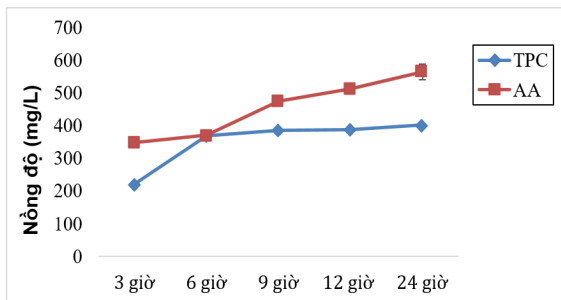


**Hình 4.** Nồng độ đường khử trong quá trình thủy phân.

NT0: Đối chứng; NT1: Cellulast (2%); NT2: Viscozyme(2%); NT3: Cellulast (1%)+Viscozyme(1%)



phóng các hợp chất flavonoid trong bã cà phê như quercetin, kaempferol, rutin và các hợp chất khác như catechin, epigallocatechin, p-coumaric acid, myricetin, vì vậy hoạt tính chống oxy hóa cũng tăng trong quá trình thủy phân (Anuar & ctv., 2020). Như vậy quá trình thủy phân bã cà phê không những giải phóng đường mà còn chiết được các hợp chất phenolic có hoạt tính chống oxy hóa. Thành phần dịch thủy phân sau 24 giờ chứa 2016,4 mg/L đường khử; 401,7 mg GA/L phenolic tổng số và hoạt tính chống oxy hóa tương đương 564,3 mg ascorbic acid/L.



**Hình 5.** Nồng độ phenolic tổng số và hoạt tính chống oxy hóa trong dịch thủy phân.

TPC: Phenolic tổng số, AA: Hoạt tính chống oxy hóa biểu diễn bằng nồng độ ascorbic acid.

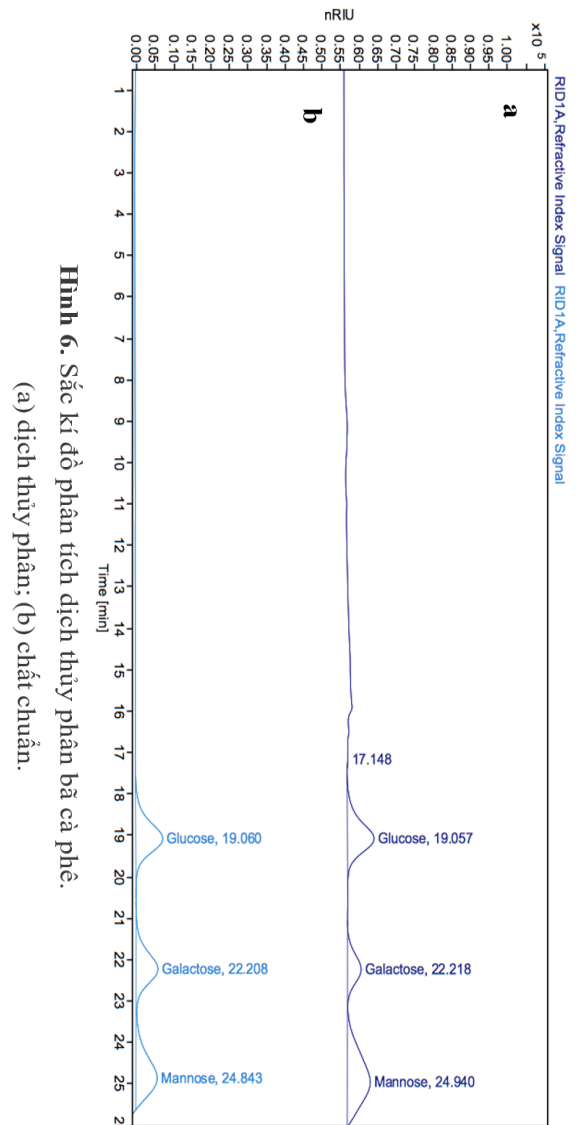
### 3.5.2. Thành phần đường đơn trong dịch thủy phân

Kết quả phân tích đường trong dịch thủy phân bã cà phê của NT2 ở mẫu 24 giờ tìm thấy 3 loại đường đơn là mannose, glucose và galactose (Hình 6). Trong đó glucose chiếm tỉ lệ lớn nhất với 47,1% trên tổng lượng đường khử (947,1 mg/L); đường mannose chiếm 23,2% (464,2 mg/L) và 12,7% đường galactose (256,3 mg/L) (Bảng 4).

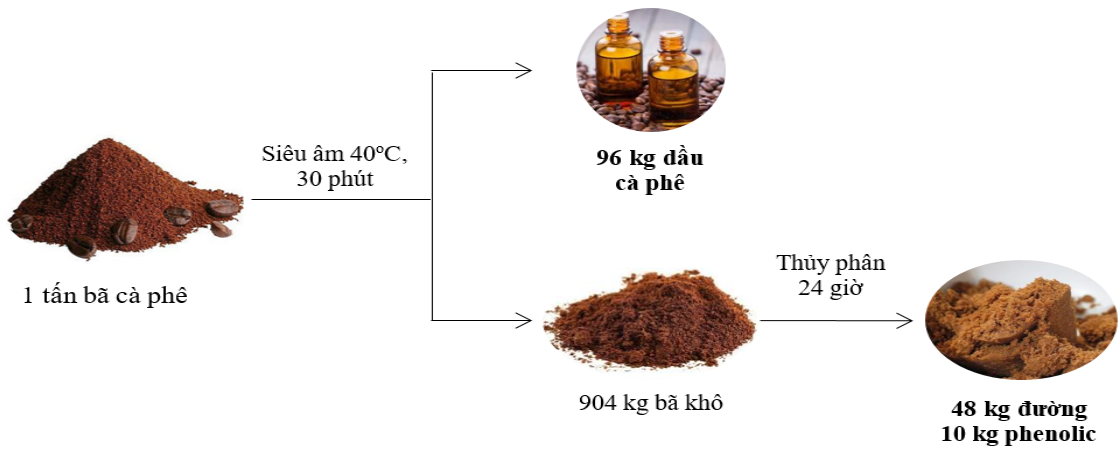
**Bảng 4.** Nồng độ các loại đường đơn trong dịch thủy phân 24 giờ ở nghiệm thức 2

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Tỉ lệ (%)
Mannose	464,2 ± 4,0	23,2%
Glucose	947,1 ± 5,1	47,1%
Galactose	256,3 ± 3,8	12,7%

Kết quả này có sự khác biệt so với các nghiên cứu của Chiyanzu & ctv. (2014) với 24,17% glucose, 24,67% mannose và 2,17% galactose; 46,8%



**Hình 6.** Sắc kí độ phân tích dịch thủy phân bã cà phê. (a) dịch thủy phân; (b) chất chuẩn.



**Hình 7.** Quy trình thu nhận dầu và đường từ bã cà phê.

mannose, 30,4% galactose và 19,0% glucose được báo cáo bởi Mussatto & ctv. (2011). Nguyên nhân là do bã cà phê trong nghiên cứu này không trải qua bước tiền xử lý nên lượng đường glucose thu nhận được bao gồm cả glucose tự do hòa tan (free sugar). Vì vậy glucose là loại đường chính được tìm thấy trong nghiên cứu này. Bã cà phê chứa polysaccharide chính là galactomannan nên đường đơn thu nhận sau thủy phân bao gồm galactose và mannose. Trong đó, mannose thường được biết đến như một loại đường chức năng có các đặc tính sinh lý và hoạt tính sinh học tuyệt vời. Mannose được ứng dụng trong thực phẩm và đồ uống, được chứng minh làm giảm tốc độ phát triển của tế bào khối u (Gonzalez & ctv. 2018), điều trị bệnh nhiễm trùng đường tiết niệu (Kyriakides & ctv., 2020) và thiếu men mannose phosphate isomerase (de Lonlay & Seta, 2009). Thông thường tiền xử lý bã cà phê sẽ loại bỏ đường tự do hòa tan phần lớn là glucose nên đường mannose chiếm tỉ lệ cao nhất trong dịch thủy phân (Nguyễn & ctv., 2019). Tuy nhiên nghiên cứu này đã thu nhận được 47,1% đường glucose nên chúng tôi đề xuất sử dụng dịch thủy phân bã cà phê để ứng dụng trong nuôi cấy vi sinh vật. Ngoài ra có thể giảm tỉ lệ nguyên liệu: dung dịch đậm trong qui trình thủy phân để tăng nồng độ đường phù hợp với các ứng dụng tiếp theo. Việc sử dụng các loại enzyme khác nhau cũng ảnh hưởng đến khả năng thủy phân các liên kết khác nhau trong các polysaccharide dẫn đến thành phần và hàm lượng các loại đường khác nhau.

Từ những kết quả trên chúng tôi ước tính hiệu quả thu nhận một số sản phẩm có giá trị từ bã cà phê như Hình 7.

## 4. Kết luận và Kiến nghị

### 4.1. Kết luận

Phương pháp chiết bằng siêu âm ở 40°C trong 30 phút cho hiệu quả trích ly dầu cao nhất đạt 9,64%. Dầu cà phê chiết bằng phương pháp siêu âm có tỷ trọng, chỉ số acid, chỉ số este và chỉ số xà phòng hóa lần lượt là 0,94 kg/L, 7,80 mg KOH/g, 8,57 mg KOH/g và 16,33 mg KOH/g.

Enzyme Viscozyme đem lại hiệu quả thủy phân cao nhất giải phóng tối đa 2016,4 mg/L đường khử, tương đương 53,8 mg/g bã cà phê khô. Dịch thủy phân sau 24 giờ chứa 401,7 mg GA/L phenolic tổng số; 947,1 mg/L glucose; 464,2 mg/L mannose; 256,3 mg/L galactose và khả năng chống oxy hóa tương đương 564,3 mg ascorbic acid /L.

Áp dụng phương pháp chiết dầu và thủy phân như nghiên cứu này có thể thu nhận được 96 kg dầu, 48 kg đường và gần 10 kg hợp chất polyphenols từ một tấn bã cà phê khô.

### 4.2. Kiến nghị

Hiệu quả thủy phân polysaccharide còn thấp, bã cà phê cần được xử lý để nâng cao hiệu quả quá trình thủy phân. Ngoài ra, cần tiến hành các thử nghiệm thủy phân bằng nhiều loại enzyme khác nhau để nâng cao hiệu suất thủy phân.

Dịch thủy phân bã cà phê đã được sử dụng để lên men sản xuất cồn sinh học. Do vậy chúng tôi đề xuất thử nghiệm sử dụng dịch thủy phân bã cà phê như môi trường để nuôi cấy tăng sinh một số loài vi sinh vật có lợi khác.

## Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

## Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu này là một phần của đề tài nghiên cứu khoa học và công nghệ cấp cơ sở mã số CS-SV20-CNSH-01 được cấp kinh phí bởi Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM.

## Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Al-Hamamre, Z., Foerster, S., Hartmann, F., Kroger, M., & Kaltschmitt, M. (2012). Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel* 96, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.01.023>
- Anuar, K., Zin, M., Juhari, N. H., Hasmadi, M., Smedley, K. L., & Zainol, M. K. (2020). Influence of pectinase-assisted extraction time on the antioxidant capacity of Spent Coffee Ground (SCG). *Food Research* 4(6), 2054-2061. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(6\).270](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(6).270)
- Bart, J. C. J., Palmeri, N., & Cavallaro, S. (2010). Emerging new energy crops for biodiesel production. In Bart, J. C. J., Palmeri, N., & Cavallaro, S. (Eds.). *Biodiesel Science and Technology* (226-284). Sawston, Cambridge, UK: Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845697761.226>
- Bhatariwala, A. R., & Modi, H. A. (2020). Extraction of oligosaccharides and phenolic compounds by roasting pretreatment and enzymatic hydrolysis from spent coffee ground. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 8(4), 75-81. <https://doi.org/10.7324/JABB.2020.80412>
- Chai, W. Y., Krishnan, U. G., Sabaratnam, V., & Tan, J. B. L. (2021). Assessment of coffee waste in formulation of substrate for oyster mushrooms *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus florida*. *Future Foods* 4, 100075. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100075>
- Chiyanzu, I., Brienzo, M., García-Aparicio, M., Agudelo, R., & Gorgens, J. (2014). Spent coffee ground mass solubilisation by steam explosion and enzymatic hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 90(3)449-458. <https://doi.org/10.1002/jctb.4313>
- Choi, B., & Koh, E. (2017). Spent coffee as a rich source of antioxidative compounds. *Food Science and Biotechnology* 26, 921-927. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0144-9>
- Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., Morais, S., & Casal, S. (2012). Espresso coffee residues: A valuable source of unextracted compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(32), 7777-7784. <https://doi.org/10.1021/jf3018854>
- de Lonlay, P., & Seta, N. (2009). The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib. *Biochimica Biophysica Acta* 1792(9), 841-843. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.11.012>
- Eftymiopoulos, I., Hellier, P., Ladommatos, N., Kay, A., & Mills-Lampthey, B. (2019). Effect of solvent extraction parameters on the recovery of oil from spent coffee grounds for biofuel production. *Waste Biomass Valorization* 10(2), 253-264. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0061-4>
- Goh, B. H. H., Ong, H. C., Chong, C. T., Chen, W.-H., Leong, K. Y., Tan, S. X., & Lee, X. J. (2020). Ultrasonic assisted oil extraction and biodiesel synthesis of spent coffee ground. *Fuel* 261, 116121. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116121>
- Gonzalez, P. S., O'Prey, J., Cardaci, S., Barthet, V. J. A., Sakamaki, J., Beaumatin, F., Roseweir, A., Gay, D. M., Mackay, G., Malviya, G., Kania, E., Ritchie, S., Baudot, A. D., Zunino, B., Mrowinska, A., Nixon, C., Ennis, D., Holey, A., Millan, D., McNeish, I. A., Sansom, O. J., Edwards, J., & Ryan, K. M. (2018). Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy. *Nature* 563(7733), 719-723. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0729-3>
- Hanif, M., Harahap, F. A. U., Heru, H., Darni, Y., & Ginting, S. Br. (2019). Extraction and characterization of coffee oil from instant-coffee waste. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan* 8(1), 59-64. <https://doi.org/10.15294/jbat.v8i1.18619>
- Hibbert, S., Welham, K., & Zein, S. H. (2019). An innovative method of extraction of coffee oil using an advanced microwave system: in comparison with conventional Soxhlet extraction method. *SN Applied Sciences* 1, 1467. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1457-5>
- Hu, X., Shi, Y., Zhang, P., Miao, M., Zhang, T., & Jiang, B. (2016). d-Mannose: properties, production, and applications: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15. doi: 10.1111/1541-4337.12211
- Istiningrum, R. B., Saepuloh, A., Jannah, W., & Aji, D. W. (2017). Measurement uncertainty of ester number, acid number and patchouli alcohol of patchouli oil produced in Yogyakarta. *AIP Conference Proceedings* 1823(1), 020080. <https://doi.org/10.1063/1.4978153>
- Jenkins, R. W., Stageman, N. E., Fortune, C. M., & Chuck, C. J. (2014). Effect of the type of bean, processing, and geographical location on the biodiesel produced from waste coffee grounds. *Energy Fuels* 28(2), 1166-1174. <https://doi.org/10.1021/ef4022976>
- Jooste, T., Garcia-Aparicio, M. P., Brienzo, M., van Zyl, W. H., & Gorgens, J. F. (2013). Enzymatic hydrolysis of spent coffee ground. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169(8), 2248-2262. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0134-1>
- Kyriakides, R., Jones, P., & Somani, B. K. (2020). Role of D-mannose in the prevention of recurrent urinary tract infections: evidence from a systematic review of the literature. *European Urology Focus* 7(5), 1166-1169. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2020.09.004>

- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2018). Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. *Bioresource Technology* 247, 1077-1084. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.106>
- Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology* 4(5), 661. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0565-z>
- Nguyen, Q. A., Cho, E. J., Lee, D. S., & Bae, H. J. (2019). Development of an advanced integrative process to create valuable biosugars including manno-oligosaccharides and mannose from spent coffee grounds. *Bioresource Technology* 272, 209-216. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.018>
- Obruca, S., Benesova, P., Petrik, S., Oborna, J., Prikryl, R., & Marova, I. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry* 49(9), 1409-1414. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.013>
- Osorio-Arias, J., Delgado-Arias, S., Cano, L., Zapata, S., Quintero, M., Nuñez, H., Ramírez, C., Simpson, R., & Vega-Castro, O. (2020). Sustainable management and valorization of spent coffee grounds through the optimization of thin layer hot air-drying process. *Waste and Biomass Valorization* 11, 5015-5026. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00793-9>
- Passos, C. P., Rudnitskaya, A., Neves, J. M. M. G. C., Lopes, G. R., Evtuguin, D. V., & Coimbra, M. A. (2019). Structural features of spent coffee grounds water-soluble polysaccharides: towards tailor-made microwave assisted extractions. *Carbohydrate Polymers* 214, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.094>
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology* 30(1), 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>
- Rocha, M. V. P., de Matos, L. J. B. L., de Lima, L. P., da Silva Figueiredo, P. M., Lucena, I. L., Fernandes, F. A. N., & Gonçalves, L. R. B. (2014). Ultrasound-assisted production of biodiesel and ethanol from spent coffee grounds. *Bioresource Technology* 167, 343-348. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.032>
- Rochín Medina, J., Ramirez, K., Rangel-Peraza, J., & Bustos-Terrones, Y. A. (2018). Increase of content and bioactivity of total phenolic compounds from spent coffee grounds through solid state fermentation by *Bacillus clausii*. *Journal of Food Science and Technology* 55. doi: 10.1007/s13197-017-2998-5
- Seo, H. S., & Park, B. H. (2019). Phenolic compound extraction from spent coffee grounds for antioxidant recovery. *Korean Journal of Chemical Engineering* 36(2), 186-190. <https://doi.org/10.1007/s11814-018-0208-4>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2005). *Determination of ash in biomass. Laboratory analytical procedure*. Colorado, USA: National Renewable Energy Laboratory.
- Trinh, T. P. L., Choi, Y. S., & Bae, H. J. (2018). Production of phenolic compounds and biosugars from flower resources via several extraction processes. *Industrial Crops and Products* 125, 261-268. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.008>
- Woldesenbet, A. G., Woldeyes, B., & Chandravanshi, B. S. (2016). Bio-ethanol production from wet coffee processing waste in Ethiopia. *SpringerPlus* 5(1), 1903-1903. doi: 10.1186/s40064-016-3600-8
- Wu, H., Zhang, W., & Mu, W. (2019). Recent studies on the biological production of D-mannose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 8753-8761. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10151-3>