

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“ Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος σε ζύμωση με χαμηλό pH με τη χρήση
γενετικά τροποποιημένης ζύμης *Y. lipolytica* ”**

**“Succinic Acid Production through Low pH Fermentation Using Genetically
Modified *Y. lipolytica*”**

Ονοματεπώνυμο: Αντωνόπουλος Χαράλαμπος

Πατρώνυμο: Άγγελος

Ακαδημαϊκό Έτος: 2024 – 2025

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

• Χρυσάνθη Πατεράκη

Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας με έμφαση στην Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

• Μόσιαλος Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

• Λαδάκης Δημήτριος

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας, Διεργασιών και Κυκλικής Οικονομίας

Τμήμα Αγροτικής Ανάπτυξης, Αγροδιατροφής και Διαχείρισης Φυσικών Πόρων του Εθνικού
και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Πίνακας Περιεχομένων

Πρόλογος.....	5
Περίληψη	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Το ηλεκτρικό οξύ – Πετροχημική οδός	9
1.2 Ιδιότητες ηλεκτρικού οξέος	10
1.3 Αντιδράσεις καρβοξυλικών οξέων	11
1.4 Αναερόβια Βιοσυνθετικά Μονοπάτια Παραγωγής Ηλεκτρικού Οξέος	14
1.5.1 Αναγωγικός Κλάδος του Κύκλου του Κιτρικού Οξέος.....	15
1.5.2 Μονοπάτι μέσω Καρβοξυκινάσης του PEP (PCK)	15
1.5.3 Μονοπάτι μέσω Πυροσταφυλικής Καρβοξυλάσης (PYC).....	15
1.5.4 ΜΑΕ-εξαρτώμενο Μονοπάτι.....	15
1.6 Αερόβια Βιοσυνθετικά Μονοπάτια Παραγωγής Ηλεκτρικού Οξέος	16
1.6.1 Οξειδωτικός Κλάδος του Κύκλου του Κιτρικού Οξέος	16
1.6.2 Μονοπάτι Γλυοξυλικού Οξέος	16
1.6.3 Κύκλος του 3-Υδροξυπροπιονικού Οξέος (3HP).....	16
2 Χρήση του ηλεκτρικού οξέος στη βιομηχανία	16
2.1 Παραγωγή από βιομάζα	20
2.2 Στρατηγικές Μεταβολικής Μηχανικής για Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος από <i>Escherichia coli</i>	21
2.2.1 Προσαρμοστική εξέλιξη μικροοργανισμού	23
2.2.2 Η ζύμη <i>Yarrowia lipolytica</i>	24
2.2.3 Η <i>Yarrowia lipolytica</i> ως Παραγωγός Ηλεκτρικού Οξέος	26
2.2.4 Επίδραση Πηγών Άνθρακα στην Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος από <i>Yarrowia lipolytica</i> 27	
2.2.5 Χρήση Εναλλακτικών Πηγών Άνθρακα για την Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος. 28	

2.2.6	Παρεμβάσεις στον Κύκλο του Κιτρικού Οξέος και στη Διαχείριση Παραπροϊόντων μέσω Μεταβολικής Μηχανικής	29
2.2.7	Επίδραση του pH στην Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος	31
2.2.8	Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από την <i>Yarrowia lipolytica</i> PSA02004.....	32
3	Υλικά και μέθοδοι.....	32
3.1	Εργαστηριακή καλλιέργεια <i>Yarrowia lipolytica</i> PSA02004	32
3.1.1	Μικροοργανισμός	32
3.1.2	Προκαλλιέργεια	33
3.1.3	Κύρια Καλλιέργεια	33
3.1.4	Προσαρμογή σε Χαμηλό pH.....	33
3.1.5	Αποστείρωση	34
3.1.6	Ανάπτυξη σε Βιοαντιδραστήρα	34
3.2	Αναλυτικές μέθοδοι	35
3.2.1	Προσδιορισμός Αναγόντων Σακχάρων (DNS).....	36
3.2.2	Προσδιορισμός Ανόργανου Φωσφόρου (Inorganic Phosphorus).....	37
3.3	Πρωτόκολλο υπολογισμού ξηρής βιομάζας (dry cell weight).....	38
3.4	Προετοιμασία Δειγμάτων για HPLC	39
4	Αποτελέσματα.....	39
4.1	Εργαστηριακή ανάπτυξη ζυμομύκητα <i>Yarrowia lipolytica</i> PSA 02004 σε pH 6	39
4.2	Καλλιέργεια ζυμομύκητα σε βιοαντιδραστήρα σε pH 6	42
4.3	Καλλιέργεια ζυμομύκητα σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα σε pH 6-5,5.....	42
4.4	Καλλιέργεια ζυμομύκητα σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα σε pH 6-5.....	44
4.5	Σύγκριση αποτελεσμάτων.....	45
4.6	Συζήτηση – Συμπεράσματα	46
5	Βιβλιογραφία	49

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στη Λάρισα. Η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την πολύτιμη συμβολή και στήριξη ορισμένων ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα θερμά να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Δημήτριο Μόσιαλο για την ευκαιρία που μου προσέφερε να εκπονήσω την παρούσα εργασία στο συγκεκριμένο εργαστήριο, καθώς και για την ακαδημαϊκή υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην επιβλέπουσα καθηγήτρια, κα Χρυσάνθη Πατεράκη, για την καθοδήγηση, τη διαρκή διαθεσιμότητα και την πολύτιμη βοήθειά της σε κάθε στάδιο της πειραματικής διαδικασίας. Η συμβολή της υπήρξε καθοριστική τόσο στην οργάνωση όσο και στην επιστημονική τεκμηρίωση της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για το ευχάριστο και υποστηρικτικό κλίμα συνεργασίας που διαμορφώσαμε. Η αλληλοκατανόηση, η διάθεση για βοήθεια και η ανταλλαγή γνώσεων συνέβαλαν ουσιαστικά στην επιτυχή ολοκλήρωση των εργαστηριακών διαδικασιών.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένειά μου. Ευχαριστώ από καρδιάς τους γονείς μου, Άγγελο και Αγγελική, για την αμέριστη στήριξή τους, την αγάπη και την κατανόηση που μου προσέφεραν απλόχερα σε κάθε μου βήμα, εντός και εκτός του ακαδημαϊκού πλαισίου. Ευχαριστώ, επίσης, τα αδέρφια μου, Διονύση και Θεόδωρο, για τη συνεχή τους συμπαράσταση και παρουσία.

Σε όλους όσους στάθηκαν δίπλα μου με οποιονδήποτε τρόπο, εκφράζω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη.

Περίληψη

Η αυξανόμενη ανάγκη για βιώσιμες λύσεις παραγωγής χημικών προϊόντων και η περιορισμένη διαθεσιμότητα των ορυκτών πόρων καθιστούν επιτακτική τη μετάβαση προς τη χρήση μικροβιακών ζυμώσεων. Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* ως μια μη συμβατική, αυστηρά αερόβια ζύμη, παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι βακτηριακών συστημάτων παραγωγής, όπως αυξημένη ανθεκτικότητα σε μεταβολικές πιέσεις, ακραίες τιμές pH και οσμωτικές καταπονήσεις, καθιστώντας την ιδανική για βιομηχανικές εφαρμογές. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη του στελέχους *Yarrowia lipolytica* PSA02004 υπό συνθήκες χαμηλού pH με στόχο την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και την κατανόηση της συμπεριφοράς του οργανισμού σε χαμηλό pH.

Η πειραματική προσέγγιση περιλάμβανε προκαλλιέργεια του μικροοργανισμού σε μέσο με γλυκερόλη και κύρια καλλιέργεια σε γλυκόζη 60 g/L υπό σταθερό αερισμό και διόρθωση του pH με NaOH 1M. Η ανάπτυξη παρακολούθηθηκε μέσω μέτρησης οπτικής πυκνότητας (OD660), pH, ξηρής βιομάζας (DCW), αναγόντων σακχάρων (DNS), ανόργανου φωσφόρου (IP) και ανάλυσης οργανικών οξέων μέσω HPLC. Η καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα με αυτόματη ρύθμιση pH και παροχή οξυγόνου παρείχε συγκριτικά δεδομένα για την ανάπτυξη του στελέχους υπό ελεγχόμενες συνθήκες.

Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν σταδιακή κατανάλωση της γλυκόζης, αύξηση της βιομάζας και μεταβολή του pH, με ταυτόχρονη παραγωγή οργανικών οξέων όπως ηλεκτρικό, οξικό. Η συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου και τα επίπεδα DNS συσχετίστηκαν με την καταναλισκόμενη γλυκόζη και την παραγωγή μεταβολιτών. Η απόκριση του στελέχους PSA02004 στις όξινες συνθήκες και η δυνατότητα περαιτέρω προσαρμογής αποδεικνύουν τη δυναμική του ως ανθεκτικό παραγωγό ηλεκτρικού οξέος. Η εργασία συμβάλλει στη θεμελίωση κατάλληλων στρατηγικών για τη βιομηχανική αξιοποίηση του συγκεκριμένου στελέχους υπό δύσκολες καλλιεργητικές συνθήκες, όπως η χαμηλή τιμή pH.

Abstract

The growing demand for sustainable chemical production and the limited availability of fossil resources make the transition toward microbial biosynthetic systems imperative. *Yarrowia lipolytica*, a non-conventional, strictly aerobic yeast, offers significant advantages over bacterial production systems, such as increased resistance to metabolic stress, extreme pH values, and osmotic pressure, making it ideal for industrial applications. This study investigates the growth of *Yarrowia lipolytica* PSA02004 under acidic conditions, aiming to enhance succinic acid production and assess the organism's behavior at low pH.

The experimental approach included preculturing the microorganism in glycerol-containing medium and subsequent main cultivation in glucose (60 g/L) under constant aeration and pH adjustment with 1 M NaOH. Growth was monitored through measurements of optical density (OD₆₆₀), pH, dry cell weight (DCW), reducing sugars (DNS), inorganic phosphate (IP), and organic acid quantification via HPLC. Cultivation in a bioreactor with automated pH regulation and oxygen supply provided comparative data under controlled conditions.

The results revealed a gradual consumption of glucose, an increase in biomass, and pH variation, accompanied by the production of organic acids such as succinic and acetic acid. Inorganic phosphate concentrations and DNS levels correlated with glucose consumption and metabolite synthesis. The response of PSA02004 under acidic conditions and its potential for further adaptation demonstrate its promise as a robust succinic acid producer. This work contributes to establishing effective strategies for the industrial exploitation of this strain under challenging cultivation environments such as low pH.

1. Εισαγωγή

Τα τελευταία 100 χρόνια η αξιοποίηση του πετρελαίου και γενικά των ορυκτών καυσίμων αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της τεχνολογικής και οικονομικής ανάπτυξης του δυτικού κόσμου. Οι διαδικασίες εξόρυξης και επεξεργασίας διύλισης του πετρελαίου έχει προσφέρει στον άνθρωπο καύσιμα (βενζίνη, κηροζίνη, ντίζελ κ.α.) και άλλα πετροχημικά προϊόντα όπως πλαστικά (πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο, πολυστυρένιο, πολυαιθυλενοτερεφθαλικό κ.α.). Εκτός από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα προϊόντα που απορρέουν από τις διαδικασίες επεξεργασίας πετροχημικών παράγονται επίσης και ενδιάμεσα μόρια που αποτελούν δομικές μονάδες για την παρασκευή βαφών, χρωστικών ουσιών, αφρών και άλλων συνθετικών ουσιών.

Παρόλο που η χρήση αυτών των ουσιών είναι παγκόσμια, τα αποθέματα πετρελαίου και άλλων ορυκτών καυσίμων στα ανώτερα και κατώτερα γεωλογικά στρώματα όταν χρησιμοποιούνται επιφέρουν αρνητική επίδραση στο περιβάλλον συσσωρεύοντας αέρια του θερμοκηπίου στην ατμόσφαιρα (Perera, 2018). Τα απόβλητα όμως δεν περιορίζονται μόνο σε αυτά που προκύπτουν λόγω ατελούς καύσης ορυκτών καυσίμων αλλά χωρίζονται σε ευρύτερες κατηγορίες. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε στερεά, υγρά, οργανικά, ανακυκλώσιμα ή μη και επικίνδυνα στο περιβάλλον και την υγεία. (Rajendran et al., 2021). Η παγκόσμια αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού και του ρυθμού της βιομηχανοποίησης έχουν φέρει στο προσκήνιο ανάλογη υπερπαραγωγή τοξικών αποβλήτων (Abdel-Shafy and Mansour, 2018; Moya et al., 2017) που αντιστοιχούν σε 1.3×10^9 τόνους το 2016 και 3.40×10^9 τόνους κάθε χρόνο με εκτιμώμενη 70% αύξηση το 2050. (Kaza et al., 2018). Εκτιμάται ότι περίπου το 74% των τοξικών αποβλήτων που προέρχονται από τα συμβατικά πλαστικά καταλήγουν σε χώρους υγειονομικής ταφής, ενώ μόνο περίπου το 10% αυτών των ανακυκλώνονται (Lear et al., 2021). Τα πλαστικά μεταφέρονται μέσω των κυμάτων νερού και αέρα, διεισδύουν στα κατώτερα υδάτινα και γεωλογικά στρώματα ταυτόχρονα συγκεντρώνοντας τοξικές ουσίες οι οποίες προσροφούνται σε αυτά (Urbanek et al., 2018). Παρόλο που έχουν γίνει προσπάθειες αποκατάστασης οικοτόπων μέσω μικροοργανισμών που είναι ικανοί να τους μεταβολίσουν, το πρόβλημα εντοπίζεται στην ανθεκτικότητα των πλαστικών πολυμερών σε ενζυμική αποικοδόμηση (Al Hosni et al., 2019). Συνεπώς είναι αδήριτη ανάγκη η σωστή διαχείριση των στερεών αποβλήτων για την μείωση της ρύπανσης και ταυτόχρονα η εύρεση καινοτόμων υποκατάστατων των συμβατικών πλαστικών για τις καθημερινές ανάγκες της ανθρώπινης ζωής. Στο πλαίσιο αυτό, αναζητούνται εναλλακτικές πρώτες ύλες και προϊόντα με χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα, ικανά να αντικαταστήσουν τα

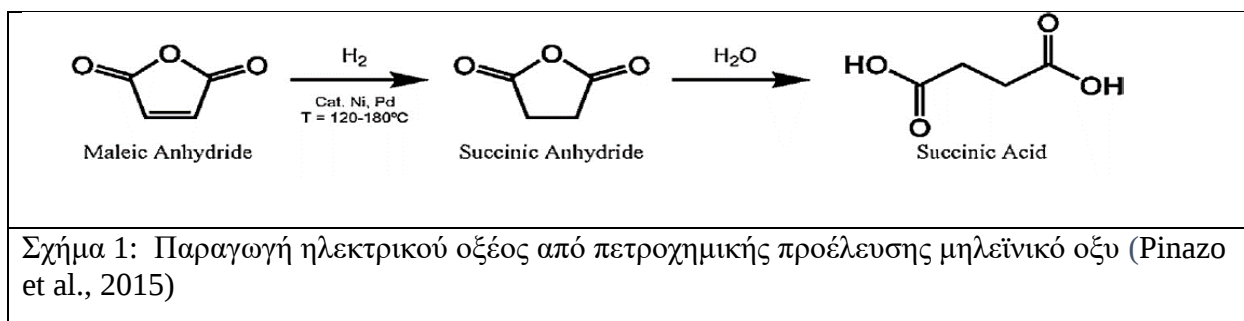
πετροχημικά παράγωγα. Το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή βιοπλαστικών, διαλυτών, φαρμακευτικών ενώσεων και άλλων βιομηχανικών προϊόντων, αποτελώντας μια βιώσιμη απάντηση στις προκλήσεις που θέτουν τα τοξικά απόβλητα και τα μη ανακυκλώσιμα υλικά.

1.1 Το ηλεκτρικό οξύ – Πετροχημική οδός

Πριν την ανάπτυξη μικροβιακών τεχνολογιών, το ηλεκτρικό οξύ παραγόταν σχεδόν αποκλειστικά μέσω πετροχημικών διεργασιών, με βασική πρώτη ύλη το μηλεϊνικό ανυδρίτη, ο οποίος προέρχεται από το C4 κλάσμα της νάφθας, παράγωγο του αργού πετρελαίου (Vaswani, n.d.). Η μέθοδος αυτή υιοθετήθηκε ευρέως από τη δεκαετία του 1990 λόγω της χρησιμότητας της πετροχημικής βιομηχανίας και της ανάγκης για χημικά ενδιάμεσα, όπως η γ-βουτυρολακτόνη, το 1,4-βουτανοδιόλη και το τετραϋδροφουράνιο, που χρησιμοποιούνται ως διαλύτες, μονομερή και πρόδρομες ενώσεις στη σύνθεση φαρμακευτικών, αγροχημικών και πολυμερών προϊόντων. (Besson et al., 2014)

Κατά τη διάρκεια της καταλυτικής υδρογόνωσης του μηλεϊνικού οξέος, σχηματίζεται ως παραπροϊόν ο ανυδρίτης του ηλεκτρικού οξέος (Fumagalli and Updated by Staff, 2006). Αυτός μπορεί είτε να επανεισαχθεί στον κύκλο της αντίδρασης για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης των επιθυμητών προϊόντων, είτε να διαχωριστεί, να υποστεί ενυδάτωση προς ηλεκτρικό οξύ, και να καθαριστεί μέσω ψύξης, φιλτραρίσματος και αποξήρανσης. Το τελικό προϊόν χρησιμοποιήθηκε κυρίως ως ενδιάμεσο στη σύνθεση άλλων χημικών ενώσεων.

Η παρακάτω εικόνα παρουσιάζει τη συνολική χημική πορεία της παραγωγής ηλεκτρικού οξέος από μηλεϊνικό ανυδρίτη.



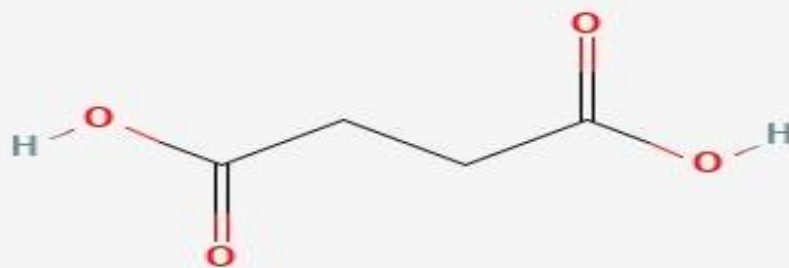
Παρά την αποτελεσματικότητά της, η πετροχημική οδός παραμένει εξαρτημένη από μη ανανεώσιμες πρώτες ύλες, έχει υψηλό ενεργειακό και περιβαλλοντικό κόστος, και δεν συμβαδίζει με τις αρχές της πράσινης χημείας και της κυκλικής οικονομίας. Αυτοί οι περιορισμοί οδήγησαν στην αναζήτηση εναλλακτικών, πιο βιώσιμων μεθόδων παραγωγής, όπως οι μικροβιακές ζυμώσεις με τη χρήση ανανεώσιμων πόρων.

1.2 Ιδιότητες ηλεκτρικού οξέος

Καρβοξυλικά οξέα ονομάζονται οι οργανικές ενώσεις όπου εμφανίζουν στον άνθρακα της καρβονυλομάδας ($\text{C}=\text{O}$) μια επιπλέον ομάδα υδροξυλίου ($-\text{OH}$). Λόγω της διαφοράς ηλεκτραρνητικότητας στον δεσμό μεταξύ άνθρακα και οξυγόνου της καρβονυλικής ομάδας, ο άνθρακας κατέχει μερικό θετικό φορτίο ($+\delta$) και αντίστοιχα το οξυγόνο αποκτά μερικό αρνητικό φορτίο ($-\delta$). Σε υγρή φάση τα μόρια καρβοξυλικών οξέων αλληλοεπιδρούν ισχυρά μεταξύ τους σχηματίζοντας διμερή μέσω δεσμών υδρογόνου. Δια μοριακοί δεσμοί υδρογόνου σχηματίζουν και με το νερό. Αποτέλεσμα αυτών των δια μοριακών αλληλεπιδράσεων είναι σημεία ζέσεως υψηλότερα από τις αντίστοιχες αλκοόλες και αυξημένη διαλυτότητα.

Το ηλεκτρικό - οξύ ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$) είναι ένα υδατοδιαλυτό α-ω δικαρβοξυλικό οξύ με 4 άτομα άνθρακα το οποίο εμφανίζει κρυσταλλική δομή σε κανονικές συνθήκες (25°C , 1 atm). (Srinivasa Gopalan et al., 2000). Η μοριακή δομή του ηλεκτρικού οξέος φαίνεται στο σχήμα 2. Το ηλεκτρικό οξύ είναι διπρωτικό με διπλό ενεργό κέντρο που οφείλεται στις δύο ομάδες $-\text{COOH}$ που περιέχει οι οποίες του επιτρέπουν να συμμετέχει σε διάφορες αντιδράσεις ως δότης ηλεκτρονίων με σταθερές ιοντισμού Pka_1 και Pka_2 με τιμές 4.207 και 5.635 αντίστοιχα. Μερικές βασικές φυσικοχημικές ιδιότητες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα. (Wade and Simek, 2017)

Ιδιότητα	Τιμή
Μοριακό βάρος (g/mol)	118.09
Πυκνότητα (NTP)	1.572
Διαλυτότητα mg/L(NTP) σε νερό	8.32×10^4
Σημείο τήξης °C	188
Σημείο βρασμού °C	235
pK_{a1}	4.207
pK_{a2}	5.635



Σχήμα 2: Δισδιάστατη δομή Ηλεκτρικού οξέος (PubChem, n.d.)

1.3 Αντιδράσεις καρβοξυλικών οξέων

Το ηλεκτρικό οξύ και τα υπόλοιπα καρβοξυλικά δίστανται σε υδατικό διάλυμα στα αντίστοιχα ανιόντα καρβοξυλίου ($RCOO^-$). Ως ασθενή οξέα ιοντίζονται μερικώς σε υδατικό διάλυμα

απελευθερώνοντας πρωτόνια (H^+) τα οποία ενώνονται με μόρια νερού σχηματίζοντας (H_3O^+). Η αντίδραση αυτή είναι αναστρέψιμη και το οξύ βρίσκεται σε ισορροπία με την αντίστοιχη συζυγή του βάση ($RCOO^-$). Το οξύ και η αντίστοιχη συζυγή του βάση βρίσκονται σε ισορροπία και η αντίδραση είναι αντιστρέψιμη. Με παρουσία ισχυρής βάσης π.χ. $NaOH$ το οξύ αποπρωτονιώνεται πλήρως.

Ο άνθρακας της καρβοξυλικής ομάδας του οξέος διαθέτει μερικό θετικό φορτίο (δ^+). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του ομοιοπολικού του δεσμού με το οξυγόνο μετατοπίζεται προς το ηλεκτραρνητικότερο άτομο, προωθώντας τα ηλεκτρόνια προς αυτό.

Ο γενικός μηχανισμός περιλαμβάνει δύο στάδια:

1. **Πυρηνόφιλη Προσθήκη:** Το πυρηνόφιλο επιτίθεται στον καρβονυλικό άνθρακα, σχηματίζοντας ένα **ενδιάμεσο τετραεδρικό προϊόν**.
2. **Αποχώρηση Ομάδας** Το ενδιάμεσο αναδιατάσσεται, αποβάλλοντας την ομάδα με τη χειρότερη ηλεκτρονιακή σταθερότητα, σχηματίζοντας το τελικό προϊόν.

Το ηλεκτρικό οξύ, ως δικαρβοξυλικό οξύ, συμμετέχει σε διάφορες αντιδράσεις που ακολουθούν τον παραπάνω μηχανισμό. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις περιλαμβάνουν:

- **Σχηματισμός εστέρων:** Με αντίδραση με αλκοόλες παρουσία όξινου καταλύτη, το ηλεκτρικό οξύ σχηματίζει διαφόρους εστέρες, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τον διμεθυλεστέρα του (dimethyl succinate).
- **Σχηματισμός αμιδίων:** Με αμίνες μπορεί να σχηματίσει άλλα αμιδικά παράγωγα, σημαντικά στη βιομηχανία φαρμάκων και πολυμερών.
- **Αφυδάτωση σε ανυδρίτη:** Υπό θέρμανση, μπορεί να δώσει ανυδρίτες του ηλεκτρικού οξέος, έναν σημαντικό ενδιάμεσο στη σύνθεση οργανικών ενώσεων.
- **Αποκαρβοξυλίωση:** Υπό ορισμένες συνθήκες, χάνει CO_2 και μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό ή άλλα μικρότερα καρβοξυλικά παράγωγα. (Wade and Simek, 2017)

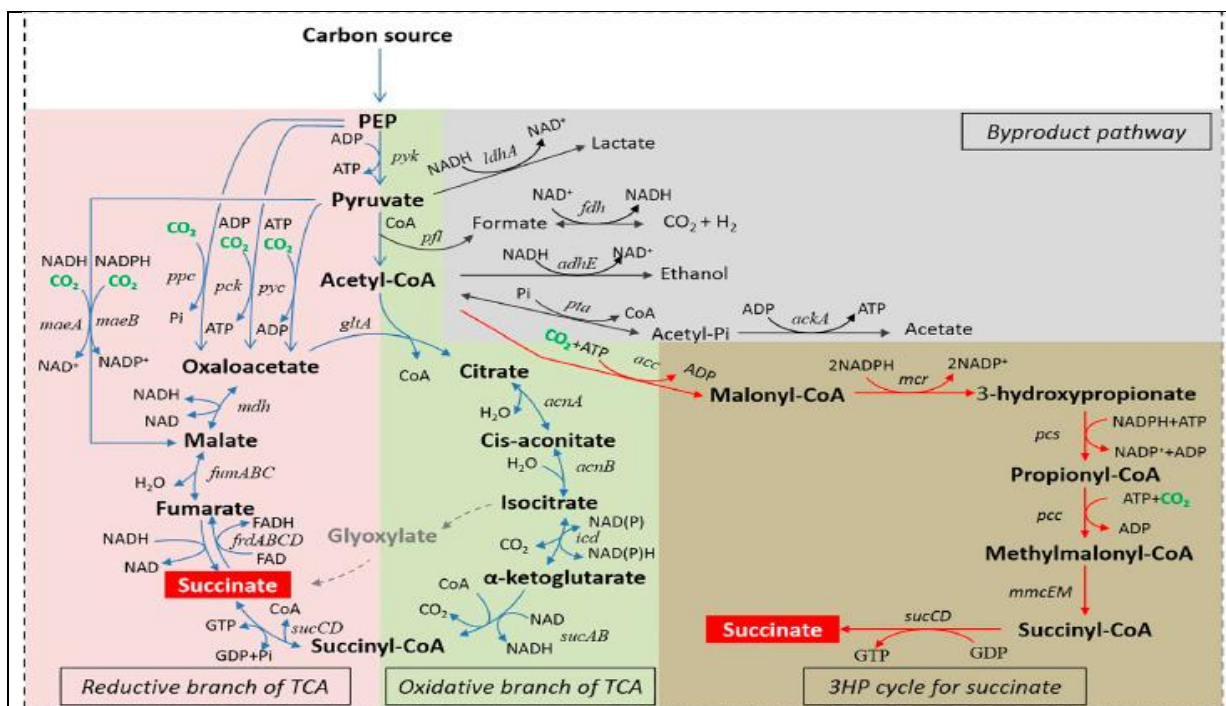
Στα βιολογικά συστήματα, το ηλεκτρικό οξύ αποτελεί έναν κεντρικό μεταβολίτη, ο οποίος εμπλέκεται σε μια σειρά από μεταβολικές διεργασίες σε βακτήρια, μύκητες και ανώτερους οργανισμούς. Οι κυριότερες μεταβολικές του μετατροπές περιλαμβάνουν:

- **Οξείδωση σε φουμαρικό οξύ:** Στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλος Krebs), η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξειδώνει το ηλεκτρικό οξύ σε φουμαρικό οξύ μέσω μιας αντίδρασης αφυδρογόνωσης, όπου το FAD ανάγεται σε FADH₂ (Berg et al., 2023).
- **Μείωση σε ηλεκτρικό οξύ :** Σε αναερόβιες συνθήκες, το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να αναχθεί σε άλλες ενώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε αναγωγικά μεταβολικά μονοπάτια και τη σύνθεση λιπιδίων και αμινοξέων (Cheng et al., 2013).
- **Μετατροπή σε μηλικό οξύ:** Το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να υποστεί αντίδραση καρβοξυλίωσης, μετατρέπόμενο σε μηλικό οξύ μέσω της μηλικής αφυδρογονάσης, συμμετέχοντας στη γλυκονεογένεση και άλλες αναβολικές διαδικασίες (Minárik et al., 2002).
- **Συμμετοχή στην αναγωγική πορεία του κύκλου του Krebs:** Σε μικροοργανισμούς όπως η *Yarrowia lipolytica*, υπό συνθήκες χαμηλού οξυγόνου ή υψηλής συγκέντρωσης αναγωγικών συνενζύμων, το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να λειτουργήσει ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων, οδηγώντας σε συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος (Cui et al., 2023).
- **Βιοσύνθεση πολυμερών και λιπιδίων:** Το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να μετατραπεί σε πρόδρομες ενώσεις για την παραγωγή πολυεστέρων και πολυαμιδίων, που είναι σημαντικά για τη σύνθεση βιοϋλικών (Aliotta et al., 2022).
- **Παραγωγή ηλεκτρυλο-CoA:** Το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να ενεργοποιηθεί από το ένζυμο συνθετάση του ηλεκτρυλο-CoA, σχηματίζοντας ηλεκτρυλο-CoA, έναν βασικό ενδιάμεσο στην καταβολική πορεία των αμινοξέων (λυσίνη, μεθειονίνη) και στη βιοσύνθεση της αίμης (Cheng et al., 2013).
- **Συμμετοχή σε αναερόβιες ζυμώσεις:** Σε βακτήρια όπως το *Actinobacillus succinogenes* και το *Mannheimia succiniciproducens*, το ηλεκτρικό οξύ είναι το κύριο προϊόν ζύμωσης υπό αναερόβιες συνθήκες, καθώς προέρχεται από το οξαλοξικό οξύ μέσω της καρβοξυλάσης του φώσφο-ενόλ-πυροσταφυλικού (Gonzales et al., 2020) .

1.4 Αναερόβια Βιοσυνθετικά Μονοπάτια Παραγωγής Ηλεκτρικού Οξέος

Η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από μικροοργανισμούς μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω επτά μεταβολικών μονοπατιών, εκ των οποίων τέσσερα σχετίζονται με τον αναγωγικό κλάδο του κύκλου του κιτρικού οξέος. Αυτά διαφέρουν ως προς τα ένζυμα που καταλύουν τα επιμέρους στάδιά τους. Τα υπόλοιπα τρία μονοπάτια περιλαμβάνουν τον οξειδωτικό κλάδο του κύκλου του κιτρικού οξέος, το μονοπάτι του γλυοξυλικού οξέος και τον κύκλο του 3-υδροξυπροπιονικού οξέος.

Στο Σχήμα 3 παρουσιάζεται αναλυτικά η δομή των κύριων μονοπατιών που οδηγούν στη βιοσύνθεση του ηλεκτρικού οξέος, διαχωρισμένα σε αναερόβια και αερόβια.



Σχήμα 3: Βιοσυνθετικά μονοπάτια παραγωγής ηλεκτρικού οξέος σε μικροοργανισμούς.

Απεικονίζονται οι κύριες διαδρομές που οδηγούν στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος (αναγωγικός και οξειδωτικός κλάδος), του μονοπατιού του γλυοξυλικού και του κύκλου του 3-υδροξυπροπιονικού (3HP). Σημειώνονται τα ένζυμα-κλειδιά και οι ενεργειακές απαιτήσεις ή αποδόσεις των βημάτων, όπως και η συμμετοχή του διοξειδίου του άνθρακα και των συνενζύμων NAD(P)H και ATP. (Liu et al., 2022)

1.5.1 Αναγωγικός Κλάδος του Κύκλου του Κιτρικού Οξέος

Το μονοπάτι αυτό ξεκινά με τη δράση της καρβοξυλάσης του φώσφο-ενόλ-πυροσταφυλικού(PPC) ή της καρβοξυκινάσης του φώσφο-ενόλ-πυροσταφυλικού(PCK) , η οποία καταλύει την αντίδραση μεταξύ φωσφο-ενολ-πυροσταφυλικού (PEP) και διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), σχηματίζοντας οξαλοξικό οξύ. Το παραγόμενο οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται σε μηλικό οξύ από τη αφυδρογονάση του μηλικού(mdh), το οποίο στη συνέχεια αφυδατώνεται από τη φουμαράση (FumABC) προς σχηματισμό φουμαρικού οξέος. Τέλος, η αναγωγή του φουμαρικού (FrdABCD) μετατρέπει το φουμαρικό σε ηλεκτρικό οξύ. Η PPC απαιτεί καρβοξυλικά ανιόντα (HCO_3^-) και κατιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) ως συμπράγοντες και είναι κοινή σε πολλούς μικροοργανισμούς, όντας σημαντική για την αφομοίωση CO_2 σε αναερόβιες συνθήκες (Kai et al., 1999; Millard et al., 1996a) (Keseler et al., 2011).

1.5.2 Μονοπάτι μέσω Καρβοξυκινάσης του PEP (PCK)

Εναλλακτικά, ο σχηματισμός οξαλοξικού οξέος μπορεί να καταλυθεί από την καρβοξυκινάση του PEP (PCK), η οποία πραγματοποιεί αντιστρεπτή τρανς-φωσφορυλίωση με τη χρήση ADP ή GDP. Σε αναερόβιες συνθήκες, το PEP, CO_2 και ADP μετατρέπονται σε οξαλοξικό και ATP. Η διαφορά από τη δράση της PPC έγκειται στο ενεργειακό κέρδος για το κύτταρο (Holoak et al., 2006)

1.5.3 Μονοπάτι μέσω Πυροσταφυλικής Καρβοξυλάσης (PYC)

Ένα ακόμα ένζυμο που συμβάλλει στη βιοσύνθεση του ηλεκτρικού οξέος είναι η καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού(PYC), που καταλύει την καρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού προς οξαλοξικό με κατανάλωση ATP και παρουσία HCO_3^- και Mg^{2+} . Το μονοπάτι αυτό απαντάται σε φυτά, μύκητες και κάποια βακτήρια (και συμμετέχει στην αναπλήρωση του οξαλοξικού για τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Η δράση του ενισχύεται από την παρουσία ακέτυλο-CoA (Modak and Kelly, 1995).

1.5.4 MAE-εξαρτώμενο Μονοπάτι

Στο μονοπάτι αυτό, το πυροσταφυλικό και το CO_2 μετατρέπονται κατευθείαν σε μηλικό μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού (MaeA/MaeB), και στη συνέχεια το μηλικό οδηγείται στον σχηματισμό ηλεκτρικού μέσω της ίδιας σειράς ενζύμων όπως και προηγουμένως (FumABC και FrdABCD). Το ένζυμο MAE βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, εξαρτάται από $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ και

δισθενή κατιόντα (Mn^{2+} ή Mg^{2+}), ενώ υπάρχουν δύο ισομορφές του: MaeA (με NADH) και MaeB (με NADPH) (Niedźwiecka and Skorkowski, 2013)

1.6 Αερόβια Βιοσυνθετικά Μονοπάτια Παραγωγής Ηλεκτρικού Οξέος

1.6.1 Οξειδωτικός Κλάδος του Κύκλου του Κιτρικού Οξέος

Σε αερόβιες συνθήκες, το ηλεκτρικό οξύ παράγεται ως ενδιάμεσο του κύκλου του TCA. Το ακετύλο-CoA συμπυκνώνεται με το οξαλοξικό για να σχηματίσει κιτρικό, το οποίο μέσω ακονιτάσης μετατρέπεται σε ισοκιτρικό. Η ισοκιτρική αφυδρογονάση το μετατρέπει σε ακετογλουταρικό, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε ηλεκτρυλο-CoA από τη ναφιδρογονάση του ακετογλουταρικού. Η συνθετάση του ηλεκτρυλο-CoA τελικά παράγει ηλεκτρικό οξύ και GTP (Berg et al., 2002). Το παραγόμενο ηλεκτρικό συνεχίζει τον κύκλο για αναγέννηση οξαλοξικού.

1.6.2 Μονοπάτι Γλυοξυλικού Οξέος

Σε αυτό το μονοπάτι, δύο μόρια ακετύλο-CoA και ένα οξαλοξικό μετατρέπονται σε ένα μόριο μηλικού και ένα ηλεκτρικού, μέσω της συνθάσης του κιτρικού, της ακονιτάσης και της λυάσης του ισοκιτρικού. Παρακάμπτονται οι ενδιάμεσες οξειδωτικές αντιδράσεις που απελευθερώνουν CO_2 επιτρέποντας καθαρότερη μετατροπή άνθρακα. (Lin et al., 2005)

1.6.3 Κύκλος του 3-Υδροξυπροπιονικού Οξέος (3HP)

Το 3HP μονοπάτι απαντάται κυρίως σε φωτοσυνθετικά πράσινα βακτήρια και περιλαμβάνει 16 ενζυμικές αντιδράσεις (Herter et al., 2001) (Gong et al., 2016). Το ακετύλο-CoA καρβοξυλιώνεται σε μαλόνυλο-CoA μέσω καρβοξυλάσης του ακετύλο-CoA, το οποίο μετατρέπεται σε προπιόνυλο-CoA και τελικά σε ηλεκτρυλο-CoA μέσω ισομερίωσης του μεθυλ-μαλόνυλο-CoA. Το ηλεκτρυλο-CoA μετατρέπεται τελικά σε ηλεκτρικό οξύ από τη συνθετάση του (Liu et al., 2020; Menendez et al., 1999)

2 Χρήση του ηλεκτρικού οξέος στη βιομηχανία

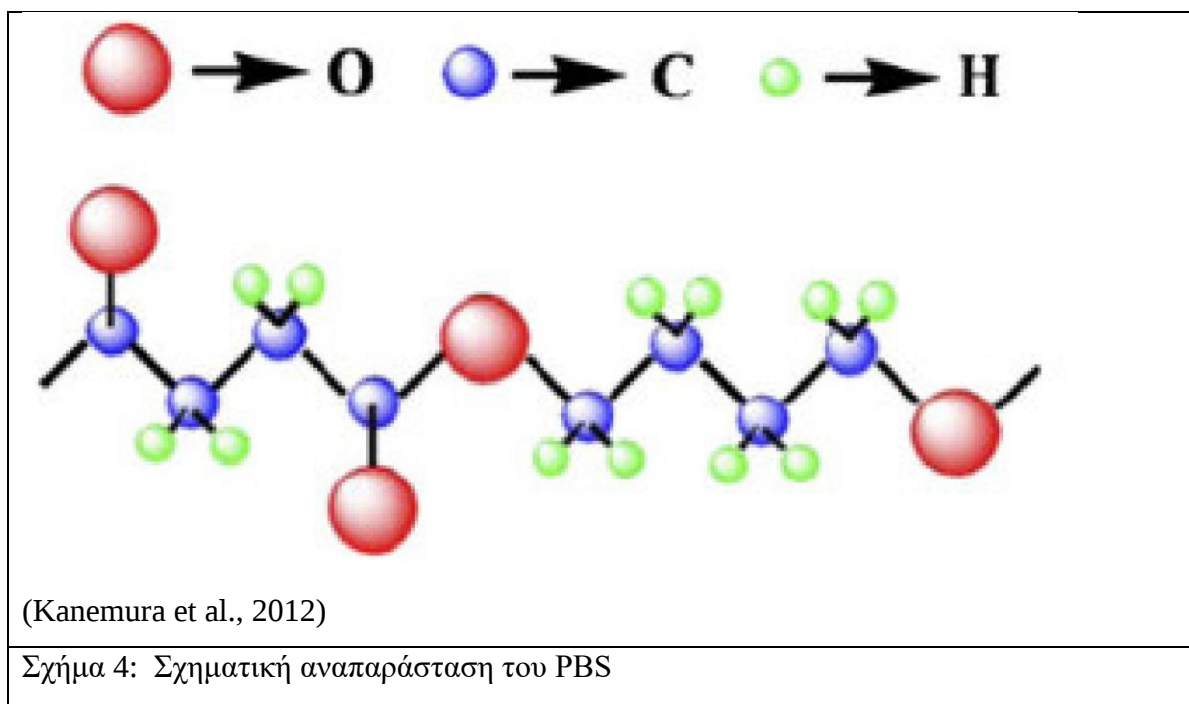
Το ηλεκτρικό οξύ, ως δικαρβοξυλικό οξύ, έχει ποικίλες εφαρμογές σε διάφορα τμήματα της βιομηχανίας λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που κατέχει. Κάποια από τα προϊόντα που προκύπτουν από την βιομηχανική επεξεργασία του ηλεκτρικού οξέος περιλαμβάνουν επιφανειοδραστικές ουσίες, απορρυπαντικά, πρόσθετα τροφών, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα κ.α. (J. Zeikus et al., 1999). Ίσως η πιο σημαντική κατηγορία από αυτά σχετίζεται με την σύνθεση

βιοδιασπώμενων πολυμερών, δηλαδή σύνθετων δομών που περιλαμβάνουν αλλά δεν περιορίζονται σε επαναλαμβανόμενες μονάδες ηλεκτρικού οξέος (Lee et al., 2005). Τα βιο-πολυμερή έχουν την ικανότητα να αποσυντίθενται από μικροοργανισμούς και να παράγουν ανακυκλώσιμα μονομερή για περεταίρω μεταβολισμό σε αντίθεση με τα συμβατικά πολυμερή τα οποία είναι μη αποδομήσιμα. Υπάρχουν πολυάριθμες κατηγορίες βιο-πολυμερών που συντίθενται από το ηλεκτρικό οξύ και αυτές είναι:

- Το PBS (Polybutylene succinate), ένα βιοδιασπώμενο πολυμερές που προκύπτει από την συμπύκνωση ηλεκτρικού οξέος και 1,4- βουτανεδιόλης
- Το PBSA (butylene succinate-co-adipate) , ένα συν-πολυμερές ηλεκτρικού και αδιπικού οξέος και 1,4- βουτανεδιόλης
- Πολύ-εστερικές πολυόλες
- Πολύ-αμίδια από ηλεκτρικό οξύ όπως το νάιλον
- Θερμοπλαστικά ελαστομερή (TPE)

Από τις κατηγορίες που προαναφέρθηκαν το πιο σημαντικό είναι το PBS επίσης γνωστό ως πολύ-βουτυλενικός-ηλεκτρικός εστέρας . Το PBS είναι ένα ευέλικτο ημί-κρυσταλλικό πολυμερές που έχει παρόμοιες φυσικές ιδιότητες με το τετραφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET).(Tokiwa et al., 2009). Διαθέτει την ικανότητα να αντιστέκεται σε μηχανικές πιέσεις και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ελαστικότητα (Uesaka et al., 2000). Η επαναλαμβανόμενη μονάδα του PBS είναι το $-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ το οποίο προκύπτει από την συμπύκνωση του ηλεκτρικού με την 1,4 βουτανεδιόλη (Xu and Guo, 2009).

Η δομή του PBS φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Η ατόφια και μη επεξεργασμένη δομή του PBS παρόλο που κατέχει εξαιρετικές φυσικές ιδιότητες, σχηματίζει πόρους και εμφανίζει ελλιπή ελαστικότητα. Όμως, το εύρος χρησιμότητας του PBS μπορεί να επεκταθεί με την προσθήκη συν-πολυμερών. Για παράδειγμα η ευθραυστότητα του PBS μπορεί να ελαττωθεί με την προσθήκη πλαστικοποιητικών ουσιών όπως γλυκερόλη. Επίσης, η προσθήκη παραγώγων κυτταρίνης ενισχύει την αντοχή του βασικού πολυμερούς 1.5 φορές και σχεδόν διπλασιάζει το μέτρο επιμήκυνσης (Kurokawa et al., 2018). Μερικές από τις ιδιότητες του PBS που έχουν καταγραφεί μετά από επεξεργασία από διάφορα πολυμερή παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Συν-πολυμερή + PBS	Ιδιότητες	Αναφορές
Εξαμεθυλένιο	- Αύξηση κρυσταλλικότητας - Αύξηση ρυθμού αποικοδόμησης	(Xu and Guo, 2009)

Αιθυλένιο	- Βελτίωση επιφανειακή τάσης - Μείωση κρυσταλλικότητας - Αύξηση ρυθμού αποικοδόμησης	(Fabbri et al., 2015)
1,6 Εξανοδιαμίνη	- Αύξηση διαβρεξιμότητας	(Muthuraj et al., 2014)
Θειοδιγλυκολικό	- Βελτίωση θερμικής σταθερότητας - Μείωση Μοριακού βάρους - Αύξηση επιφάνειας υδροφιλικότητας	Muthuraj et al., 2014)
Θειοδιεθυλένιο Ηλεκτρικού	- Αύξηση κρυσταλλικότητας - Αύξηση ρυθμού αποικοδόμησης	(Negrin et al., 2018)
Τετραφθαλικό	- Αύξηση δύναμης - Βελτίωση θερμικής σταθερότητας	(H. Wang et al., 2009)

Το PBS και γενικά τα βιοδιασπώμενα πολυμερή έχουν παρουσιάσει αυξημένη δημοτικότητα ως μια εφικτή εναλλακτική λύση στη συσκευασία τροφίμων. Στην Ευρώπη το 60% των πλαστικών αποβλήτων προέρχεται από τις συσκευασίες τροφίμων. Το PBS κατέχει εξαιρετική ικανότητα βιο-αποικοδόμησης και βίο-συμβατότητας με αποτέλεσμα να καθίσταται εφικτή η αποικοδόμηση του από μικροοργανισμούς. Η εξαιρετικά διαφανής επιφάνεια και η ελαστική κατασκευή του επιτρέπουν τη χρήση στην βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας όπου μπορεί να συναντηθεί σε διάφορα προϊόντα όπως μεμβράνες, σακούλες κομποστοποίησης, υφάσματα, προϊόντα εστίασης και αφρούς (AL-Oqla and Omari, 2017; Li et al., 2005). Συνεχίζοντας, το PBS χρήζει κατάλληλο

για την συσκευασία τροφίμων επειδή έχει υψηλή ευελιξία καλή ανθεκτικότητα, υψηλή σταθερά επιμήκυνσης και χαμηλότερη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης. Σε συνδυασμό με σκόνη χιτοζάνης έχει αποδειχθεί ότι παρατείνει την διάρκεια ζωής των τροφίμων ενισχύοντας την προστασία από εξωγενείς παράγοντες ενώ διατηρεί την ποιότητα των τροφίμων (Quintavalla and Vicini, 2002).

Στην βιοιατρική και συγκεκριμένα στον τομέα της μηχανικής ιστών παράγωγα του PBS συμβάλουν στην δημιουργία καινοτόμων δομών που επιτρέπουν την δημιουργία τεχνητών ιστών και κυττάρων. Συγκεκριμένα, η ανάμιξη του PBS με ανόργανα συστατικά μπορεί να ενισχύσει τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις όπως την ενδοκυττάρωση, την προσκόλληση και τον κυτταρικό προσανατολισμό. Εκτός από αυτό, σε μία έρευνα ο συνδυασμός της χιτοζάνης με PBS φαίνεται πως παρουσίασε αύξηση στην αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δραστηριότητα, βελτιωμένη απορρόφηση πρωτεϊνών και ταχύτερη ανάπτυξη σε σύγκριση με το καθαρό PBS . (Coutinho et al., 2008)

2.1 Παραγωγή από βιομάζα

Σχεδόν κάθε είδος κυττάρου είτε είναι ζωικό ή φυτικό έχει την δυνατότητα να παράγει ηλεκτρικό οξύ αλλά έχει παρατηρηθεί ότι οι πιο κατάλληλοι μικροοργανισμοί για αυτή την διαδικασία είναι οι μύκητες και τα βακτήρια (J. G. Zeikus et al., 1999). Μύκητες όπως ο *Aspergillus niger*, *Penicillium viniferum*, *Yarrowia lipolytica* και η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* παράγουν ηλεκτρικό ως παραπροϊόν του αερόβιου και αναερόβιου μεταβολισμού τους. (Ferone et al., 2019; Pateraki et al., 2016). Αντίστοιχα, τα πιο διερευνημένα βακτηριακά στελέχη αγρίου τύπου που παράγουν ηλεκτρικό οξύ περιλαμβάνουν τα *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* και *Mannheimia succiniproducens* (Ahn et al., 2016a; Chen et al., 2018; Ferone et al., 2019; Jiang et al., 2017; Mancini et al., 2020).

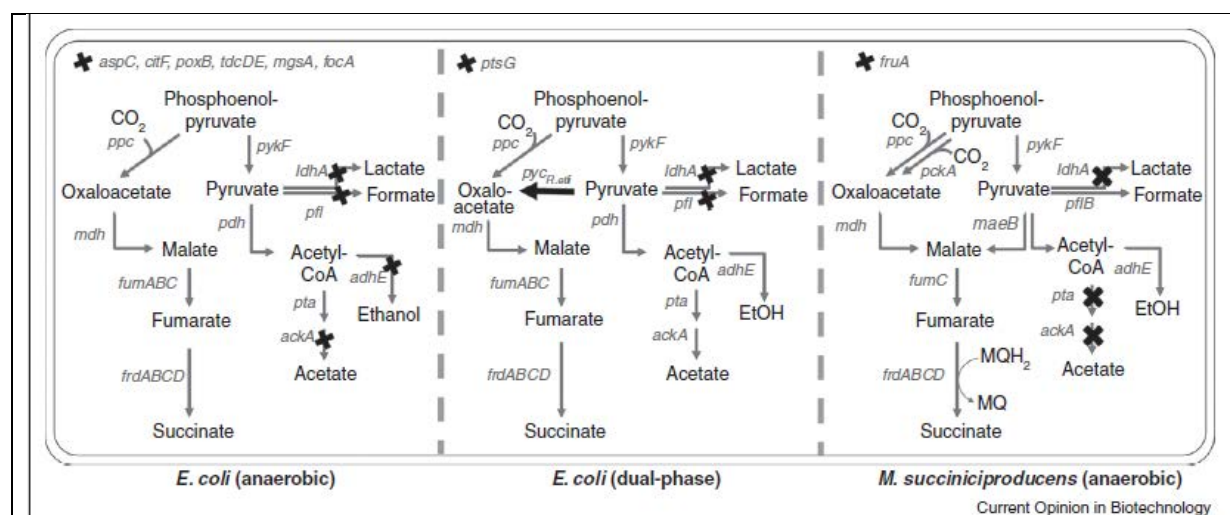
Κάθε στρατηγική μεταβολικής μηχανικής που έχει χρησιμοποιηθεί περιλαμβάνει την τροποποίηση του γενετικού υλικού του κάθε μικροοργανισμού με χρήση μεθόδων γενετικής μηχανικής με σκοπό την βελτιστοποίηση μονοπατιών παραγωγής ηλεκτρικού οξέος. Μέχρι στιγμής, αρκετές στρατηγικές έχουν χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσουν την συσσώρευση του προϊόντος όπως η αφαίρεση μονοπατιών που συμμετέχουν στην παραγωγή παραπροϊόντων, η ενίσχυση

μεταβολικών οδών που εμπλέκονται άμεσα στην παραγωγή ηλεκτρικού, η βελτιστοποίηση ενζυμικών συμπαραγόντων και η επιλογή κατάλληλης πηγής άνθρακα. Εκτός από αυτό είναι απαραίτητη η αύξηση της διαθεσιμότητας υποστρώματος μέσω τροποποίησης συστημάτων μεταφοράς γλυκόζης και η πραγματοποίηση της ζύμωσης σε ιδανικές αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες. (Liu et al., 2011; Vadali et al., 2004; W. Wang et al., 2009; Zhou et al., 2003)

2.2 Στρατηγικές Μεταβολικής Μηχανικής για Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος από *Escherichia coli*

Το *Escherichia coli*, σε αναερόβιες συνθήκες, παράγει ένα μίγμα προϊόντων ζύμωσης που περιλαμβάνει οξικό, μυρμηκικό, γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και μικρή ποσότητα ηλεκτρικού οξέος. Αντίστοιχα, σε αερόβιες συνθήκες, το ηλεκτρικό σχηματίζεται κυρίως ως ενδιάμεσο του κύκλου του Krebs, εκτός αν είναι ενεργό το μονοπάτι του γλυοξυλικού.

Η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος έχει ενισχυθεί μέσω σειράς στρατηγικών μεταβολικής μηχανικής, που στοχεύουν είτε στην ανακατεύθυνση της μεταβολικής ροής, είτε στην αποφυγή ανταγωνιστικών παραπροϊόντων. Στο Σχήμα 5 παρουσιάζονται συνοπτικά οι κύριες τροποποιήσεις στα στελέχη *E. coli* και η σύγκριση με το αναερόβιο βακτήριο *M. succiniciproducens*, που θεωρείται φυσικός παραγωγός ηλεκτρικού.



Σχήμα 5. Μεταβολικές διαδρομές παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και σημεία γενετικών παρεμβάσεων σε στελέχη *E. coli* και *M. succiniciproducens*.

Παρουσιάζονται οι βασικές διαδρομές ζύμωσης και παραγωγής ηλεκτρικού οξέος σε *E. coli* υπό αναερόβιες και «διφασικές» (dual-phase) συνθήκες, σε σύγκριση με το φυσικό παραγωγό *M.*

succiniciproducens. Οι γενετικές παρεμβάσεις σημειώνονται με **X** (knock-out) και περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η *ldhA*, *pfl*, *adhE*, *pta*, *ackA*, καθώς και το σύστημα μεταφοράς γλυκόζης *ptsG*. Τροποποιήσεις σε ένζυμα όπως *ppc*, *mdh*, *fumABC* και *frdABCD* ευνοούν τη ροή προς το ηλεκτρικό. (Ahn et al., 2016b)

2.2.1. Απενεργοποίηση Ανταγωνιστικών Διαδρομών

Μια από τις βασικότερες στρατηγικές στη μεταβολική μηχανική της *E. coli* είναι η απενεργοποίηση ανταγωνιστικών ενζύμων που οδηγούν στη δημιουργία παραπροϊόντων. Μεταλλάξεις στα γονίδια *ldhA* (αφυδρογονάση του γαλακτικού) και *pfl* (λυάση πυροσταφυλικού-φορμικού οξέος) ελαχιστοποιούν τις απώλειες άνθρακα σε μη επιθυμητά προϊόντα. Ωστόσο, η διαταραχή αυτών των διαδρομών μπορεί να επηρεάσει την οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου, καθώς περιορίζεται η αναγέννηση του NAD^+ .

Ένα παράδειγμα εφαρμογής τέτοιων παρεμβάσεων είναι το στέλεχος NZN111, το οποίο μεν παράγει περισσότερο ηλεκτρικό οξύ, αλλά παρουσιάζει δυσκολία ανάπτυξης σε αναερόβιες συνθήκες λόγω έλλειψης NAD^+ . (Singh et al., 2009)

Οι στρατηγικές αναστολής επεκτείνονται και σε άλλα γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ροής προς παραπροϊόντα, όπως *proxB* (οξειδάση πυροσταφυλικού), *aspC* (τρανσαμινάση ασπαρτικού) και *focA* (μεταφορέας φορμικού οξέος), ενισχύοντας τη μεταβολική απόδοση του κυττάρου.

2.2.2. Ευνοϊκές Αυθόρμητες Μεταλλάξεις

Από το στέλεχος NZN111 προέκυψε αυθόρμητα το στέλεχος AFP111, με μετάλλαξη στο γονίδιο *ptsG*, το οποίο εμπλέκεται στη μεταφορά γλυκόζης μέσω φωσφοτρανσφεράσης. Αυτή η τροποποίηση βελτίωσε το προφίλ ζύμωσης και οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με αναλογία προϊόντων ηλεκτρικό : οξικό : αιθανόλη ίση με 2:1:1 και μοριακές αποδόσεις 1,0 : 0,5 : 0,5 mol/mol γλυκόζης. (Chatterjee et al., 2001)

2.2.3. Ενίσχυση της Ροής προς Ηλεκτρικό Οξύ

Η ροή προς το ηλεκτρικό ενισχύεται με την υπερέκφραση ενζύμων όπως:

- η **μηλική αφυδρογονάση (mdh)** για τη μετατροπή μηλικού σε οξαλοξικό,
- η **φουμαράση (FumABC)** για τη μετατροπή μηλικού σε φουμαρικό,

- και η **αναγωγή του φουμαρικού (FrdABCD)** για την τελική μετατροπή σε ηλεκτρικό.

Η τροποποίηση αυτών των ενζύμων έχει αποδειχθεί κρίσιμη για την κατεύθυνση της ροής άνθρακα προς το ηλεκτρικό οξύ (Millard et al., 1996b; Stols and Donnelly, 1997; Vemuri et al., 2002).

2.2.4. Οξειδοαναγωγική Ισορροπία

Η αναγέννηση του NAD^+ από NADH αποτελεί κρίσιμο σημείο για την επιβίωση και παραγωγικότητα των στελεχών *E. coli* σε αναερόβιες συνθήκες. Η υπερέκφραση NAD^+ -εξαρτώμενων μορφών της MDH (αφυδρογονάση του μηλικού) έχει προταθεί ως τρόπος ενίσχυσης αυτής της διαδικασίας, βελτιώνοντας την αναερόβια ανάπτυξη και τη συνολική μεταβολική ροή. (Stols and Donnelly, 1997; W. Wang et al., 2009).

2.2.1 Προσαρμοστική εξέλιξη μικροοργανισμού

Η προσαρμοστική εξέλιξη (evolutionary adaptation) είναι μια καινοτόμος προσέγγιση στον τομέα της βιολογίας που επιτρέπει τη δημιουργία εξελιγμένων μικροβιακών στελεχών με επιθυμητά χαρακτηριστικά μέσω πειραμάτων στο εργαστήριο. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην αρχή της φυσικής επιλογής, όπως προτάθηκε στη θεωρία του Δαρβίνου (Hemansi et al., 2022).

Η φυσική επιλογή επιτυγχάνεται μέσω της στοχευμένης ρύθμισης του περιβάλλοντος, ώστε να ευνοούνται συνθήκες που οδηγούν σε καλύτερη προσαρμογή του πληθυσμού (Bromig and Weuster-Botz, 2023). Εφαρμόζεται κυρίως σε μικροοργανισμούς, καθώς αυτοί μπορούν να διατηρούν μεγάλους πληθυσμούς με ταχεία κυτταρική διαίρεση. Οι τυπικοί ρυθμοί μετάλλαξης και το μέγεθος του γονιδιώματος επιτρέπουν εκτεταμένη διερεύνηση του προσαρμοστικού χώρου, εξασφαλίζουν πλούσια γενετική ποικιλομορφία και ενισχύουν φυσικά τις ευεργετικές μεταλλάξεις (Gresham and Dunham, 2014).

Με τη σταδιακή αύξηση της περιβαλλοντικής πίεσης και τη συστηματική επιλογή κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, μπορεί να βελτιώσει χαρακτηριστικά στελεχών, όπως η ανθεκτικότητα στα οξέα, η αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες και η αντίσταση σε τοξικές ουσίες (Lee & Kim, 2020).

Σε αντίθεση με τη μεταβολική μηχανική, η προσαρμοστική εξέλιξη δεν απαιτεί τη λεπτομερή κατανόηση του πολύπλοκου και αλληλένδετου μεταβολικού δικτύου των κυττάρων. Αντίθετα, βασίζεται αποκλειστικά στον σχεδιασμό κατάλληλων πιέσεων επιλογής με βάση τον επιθυμητό φαινότυπο. Αυτή η εξελικτική προσέγγιση παρουσιάζει ευρύ πεδίο εφαρμογής και πρακτικότητα στους μικροοργανισμούς (Sandberg et al., 2019).

Επιπλέον, σε σύγκριση με τη συμβατική μεταλλαξιγένεση, δεν οδηγεί σε σημαντικά υψηλότερη συχνότητα επιβλαβών μεταλλάξεων σε σχέση με τις ευεργετικές. Αυτό συμβαίνει επειδή οι περιβαλλοντικές πιέσεις εξαλείφουν τις επιβλαβείς μεταλλάξεις, ενώ η γενετική δυναμική του νέου πληθυσμού καθοδηγείται από τις ευνοϊκές μεταλλάξεις (Loewe and Hill, 2010).

Επιπρόσθετα, η απόκτηση εξελιγμένων στελεχών όχι μόνο παράγει στελέχη υψηλής απόδοσης, αλλά παρέχει επίσης στους ερευνητές νέους βιολογικούς φαινοτύπους και γενετικούς στόχους, διευκολύνοντας την ανάλυση των υποκείμενων αιτίων αλλαγών στα μικροβιακά χαρακτηριστικά.

2.2.2 Η ζύμη *Yarrowia lipolytica*

2.2.2.1 Ταξινόμηση

Το συγκεκριμένο είδος ζύμης, μαζί με τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων, υποβασίλειο *Dikaryota*, διαίρεση *Ascomycota*, υποδιαίρεση *Saccharomycotina*, φύλο *Ascomycetes*, κατηγορία *Saccharomycetes* (ή αλλιώς *Hemiascomycetes*) και τάξη *Saccharomycetales*. Στην τάξη *Saccharomycetales* περιλαμβάνονται ασκοσποριογόνες ή αληθείς ζύμες που έχουν αποτελέσει στόχο ενδεδειγμένης βιολογικής έρευνας στον τομέα της βιομηχανίας τροφίμων ποτών, στην ιατρική και την μικροβιολογία. Τα στελέχη του γένους *Yarrowia* πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλάστηση ή διχοτόμηση των κυττάρων ενώ εγγενώς ο πολλαπλασιασμός γίνεται με ασκοσπόρια, δηλαδή σπόρια χαρακτηριστικά των ασκομυκήτων που παράγονται σε εξιδεικευμένα κύτταρα τους ασκούς. Τα στελέχη του γένους *Y. lipolytica* αρχικά είχαν τοποθετηθεί στο γένος *Candida*. Όταν όμως το 1945 ανακαλύφθηκε ο εγγενής τρόπος αναπαραγωγής τους από τον Wickerham, μετονομάστηκαν *Endomycopsis lipolytica* την συνέχεια *Saccharomycopsis lipolytica* και τελικά *Y. lipolytica* από τον Δανό ερευνητή David Yarrow (van der Walt and von Arx, 1980).

2.2.2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Η μορφολογία των στελέχων αγρίου τύπου της *Y. Lipolytica* μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο, τη σύνθεση του μέσου καλλιέργειας και τις συνθήκες ανάπτυξης (Heard and Fleet, 1999). Το πρότυπο μορφολογίας κυμαίνεται από από έντονα πτυχωτό και ματ έως λείο και γυαλιστερό (Bellou et al., 2014). Τα κύτταρα της ζύμης παρουσιάζουν ωοειδές και ελλειψοειδές σχήμα και μπορούν να επιμηκυνθούν για να σχηματίσουν ψευδοϋφές και μυκήλια με διακλαδιζόμενα ινίδια (Barth and Gaillardin, 1997). Κάθε μηκύλιο αποτελείται από διαχωριστικές υφές πλάτους 3 έως 5 μm και μήκους έως μερικά χιλιοστά. Τα ακραία κύτταρα συχνά υπερβαίνουν τα 100 μm , ενώ τα τμήματά τους έχουν μήκος 50 έως 70 μm . Τα διαφράγματα παρουσιάζουν έναν μικροσκοπικό, ασκομυκητικού τύπου κεντρικό πόρο, ασυνήθιστο για άλλους νηματοειδείς ζυμομύκητες, με ενδοπλασματικό δίκτυο που εκτείνεται από το ένα τμήμα στο επόμενο (Kreger-van Rij and Veenhuis, 1973). Η ζύμη *Y. Lipolytica* χαρακτηρίζεται από το φαινόμενο του διμορφισμού. Ο διμορφισμός αναφέρεται στην ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται σε 2 διακριτές μορφές, είτε ως μεμονωμένα κύτταρα ζύμης, είτε ως **ar**μηκύλια. Η αλλαγή της μορφολογίας από ακέραια κύτταρα ζύμης σε μηκύλια περιλαμβάνει μια περίπλοκη τροποποίηση του κυτταρικού μηχανισμού ως απόκριση σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, κυρίως στρεσογόνες. Οι συνθήκες που προκαλούν αυτή την τροποποίηση σχετίζονται με μεταβολές στην θερμοκρασία, το pH, το οξυγόνο και την παρουσία συγκεκριμένων συστατικών στο μέσο καλλιέργειας. Για παράδειγμα η μετάβαση από ζύμης σε μυκήλιο μπορεί να προκληθεί με την χρήση N-ακέτυλογλυκοζαμίνης ως τη μοναδική πηγή άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας ενώ η αντίστροφη διαδικασία πραγματοποιείται με την προσθήκη κυστεΐνης ή ανηγμένης γλουταθειόνης (Rodriguez and Domínguez, 1984). Επίσης, η δημιουργία υφών έχει παρατηρηθεί ότι μεγιστοποιείται σε σχεδόν ουδέτερο pH και υπό συνθήκες αερόβιου στρες. Αντίθετα, ο σχηματισμός τους μπορεί να ανασταλεί υπό συνθήκες οσμωτικού ή οξειδωτικού στρες. Στην παρακάτω εικόνα παρατηρούνται οι μορφές του ζυμομύκητα σε οπτικό μικροσκόπιο



Σχήμα 6: Οι διαφορετικές μορφές των κυττάρων *Y. lipolytica*

2.2.3 Η *Yarrowia lipolytica* ως Παραγωγός Ηλεκτρικού Οξέος

Εκτός από τα βακτήρια, και οι ζύμες έχουν αναδειχθεί ως ελκυστικοί μικροοργανισμοί για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, με τη *Yarrowia lipolytica* να ξεχωρίζει λόγω των μοναδικών της χαρακτηριστικών (Raab and Lang, 2011). Η *Y. lipolytica* είναι αυστηρά αερόβιος και ένας από τους πλέον μελετημένους ζυμομύκητες, με ευρεία εφαρμογή στη μοριακή βιολογία, τη γενετική, αλλά και τη βιομηχανική παραγωγή (Nicaud, 2012). Διακρίνεται για την ικανότητά της να μεταβολίζει διάφορα υποστρώματα – όπως γλυκόζη, γλυκερόλη, αιθανόλη, οξικά και λιπαρά οξέα – και να επιβιώνει σε δυσμενείς συνθήκες, όπως υψηλό οσμωτικό στρες, όξινο ή αλκαλικό pH (Bankar et al., 2009).

Για τη βελτίωση της απόδοσης στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από τη *Y. lipolytica*, έχει εφαρμοστεί η τεχνική της Προσαρμοστικής Εργαστηριακής Εξέλιξης (ALE). Σε πειράματα ALE, η καλλιέργεια του μικροοργανισμού υπό επιλεγμένες περιβαλλοντικές πιέσεις – όπως χαμηλό pH ή υψηλές συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος – οδηγεί στην επιλογή στελεχών με ενισχυμένη παραγωγικότητα (Lee and Kim, 2020). Παράλληλα, οι συνεχείς μεταβολικές προσαρμογές που επέρχονται κατά τη διάρκεια της ALE ενισχύουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως η αντοχή σε οξείες συνθήκες, η αποτελεσματική κατανάλωση υποστρωμάτων και η σταθερότητα παραγωγής του επιθυμητού μεταβολίτη.

Έτσι, η *Yarrowia lipolytica* αποτελεί έναν ιδιαίτερα υποσχόμενο μικροοργανισμό για την βιοτεχνολογική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, τόσο λόγω της φυσικής της προσαρμοστικότητας όσο και λόγω των δυνατοτήτων γενετικής τροποποίησης (Sandberg et al., 2019).

2.2.4 Επίδραση Πηγών Άνθρακα στην Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος από *Yarrowia lipolytica*

Η παραγωγικότητα της *Yarrowia lipolytica* στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την επιλογή της πηγής άνθρακα, καθώς και από τις συνθήκες ζύμωσης και τις γενετικές τροποποιήσεις του στελέχους. Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αξιοποίηση θρεπτικών υλικών όπως η γλυκερόλη, λόγω της διαθεσιμότητάς της ως παραπροϊόν της βιοντίζελ βιομηχανίας και της ικανότητάς της να υποστηρίζει υψηλή παραγωγή οργανικών οξέων.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το μεταλλαγμένο στέλεχος PGC1003, το οποίο φέρει απενεργοποιημένο το γονίδιο της υπομονάδας 5 της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού, οδηγώντας σε συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος. Καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό YPG με αποκλειστική πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη, παρουσιάζοντας παρόμοια ανάπτυξη με την καθαρή γλυκερόλη σε καλλιέργεια 48 ωρών. Η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης από 75 σε 200 g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις ενίσχυσε την παραγωγή, αν και ο λανθάνων χρόνος παρατάθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Παρ' όλα αυτά, το στέλεχος κατάφερε να καταναλώσει πλήρως τη γλυκερόλη, με θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης γλυκερόλης και των παραγόμενων επιπέδων ηλεκτρικού και οξικού οξέος, καθώς και της κυτταρικής ξηρής μάζας. (Jost et al., 2015; Yuzbashev et al., 2010)

Παράλληλα, διερευνήθηκε η χρήση γλυκόζης ως εναλλακτική πηγή άνθρακα. Η γλυκόζη, η οποία μπορεί να παραχθεί από την υδρόλυση γεωργικών αποβλήτων πλούσιων σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και άμυλο, προσφέρει μια υποσχόμενη ανανεώσιμη πρώτη ύλη. Ωστόσο, σε μεταλλαγμένα στελέχη με απενεργοποιημένη την αφυδρογονάση του ηλεκτρικού, η γλυκόζη δεν μεταβολιζόταν αποτελεσματικά, καθώς προκλήθηκε μεταβολική επιβάρυνση και διαταραχή στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Gao et al., 2016).

Το πρόβλημα αυτό αποδίδεται κυρίως στην τροποποίηση του κύκλου του TCA, καθώς η απενεργοποίηση ενζύμων όπως η αφυδρογονάση ή η μειωμένη έκφραση μεταφορέων γλυκόζης επηρεάζουν την απόδοση και την κυτταρική ανάπτυξη. Η δυσλειτουργία στον μεταβολισμό του Acetyl-CoA οδηγεί σε ενεργειακά και αναγωγικά ελλείμματα. Ειδικά, η μειωμένη ανακύκλωση του FAD σε FADH₂, λόγω της αναστολής της μετατροπής ηλεκτρικού σε φουμαρικό, περιορίζει τη ροή ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η χρήση γλυκερόλης, μέσω της μετατροπής της σε φωσφορική διυδροξυακετόνη, μπορεί να βοηθήσει στην αποκατάσταση αυτής της ροής (Workman et al., 2013).

Επιπλέον, πειράματα προσαρμοστικής εξέλιξης (ALE) έδειξαν ότι μετά την έκθεση των στελεχών σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (150 g/L), αυξήθηκε ο ρυθμός πρόσληψης της γλυκόζης έως και τρεις φορές (0.30 g/L/h), υποδεικνύοντας ότι η ALE μπορεί να ενισχύσει τη μεταβολική ικανότητα των στελεχών και σε εναλλακτικά υποστρώματα (Yang et al., 2017).

Επομένως, η επιτυχής παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από τη *Y. lipolytica* εξαρτάται από μια ισορροπημένη στρατηγική που συνδυάζει προσαρμοστική εργαστηριακή εξέλιξη και μεταβολική μηχανική, λαμβάνοντας υπόψη τη φύση του υποστρώματος και τη μεταβολική επιβάρυνση. Η χρήση εναλλακτικών πηγών άνθρακα όπως η γλυκερόλη ή τα παραπροϊόντα λιγνοκυτταρινούχων υλικών ενισχύει τη βιωσιμότητα και τη βιομηχανική αποδοτικότητα των διεργασιών.

2.2.5 Χρήση Εναλλακτικών Πηγών Άνθρακα για την Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος

Η αξιοποίηση εναλλακτικών και ανανεώσιμων πηγών άνθρακα, όπως η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, προσφέρει μια ελκυστική προοπτική για τη βιώσιμη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Οι λιγνοκυτταρινούχες είναι άφθονες πρώτες ύλες παγκοσμίως και προέρχονται κυρίως από γεωργικά απόβλητα, υπολείμματα ξυλείας και ενεργειακές καλλιέργειες. Έχουν χαμηλό κόστος,

ευρεία διαθεσιμότητα και αποτελεί ανανεώσιμες πρώτες ύλες, υποκαθιστώντας το άμυλο σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές (Lorenci Woiciechowski et al., 2020) (Raj et al., 2022).

Η δομή των λιγνοκυτταρινούχων θηλοστροφμάτων αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη, σχηματίζοντας ένα περίπλοκο τρισδιάστατο πλέγμα που καθιστά δύσκολη την υδρόλυσή τους (Anu et al., 2020). Για την αποδόμηση αυτής της δομής απαιτείται προ επεξεργασία και εξειδικευμένα ένζυμα, όπως κυτταρινάσες και ξυλανάσες, που διασπούν την κυτταρίνη σε D-γλυκόζη και την ημικυτταρίνη σε πεντόζες όπως ξυλόζη και αραβινόζη (Moreno et al., 2019).

Ωστόσο, η προ επεξεργασία της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας συχνά συνοδεύεται από την απελευθέρωση ενώσεων όπως φερουλικό οξύ, βανιλίνη και κινναμαλδεΐδη, οι οποίοι λειτουργούν ως ανασταλτικοί παράγοντες στη διαδικασία της ζύμωσης. Επιπλέον, η ενεργειακή απαίτηση της διαδικασίας, καθώς και η ανάγκη για κατάλληλα στελέχη μικροοργανισμών που να μπορούν να αξιοποιούν αποτελεσματικά τα προϊόντα υδρόλυσης, αποτελούν σημαντικά εμπόδια (Wang et al., 2020).

Παρά τις τεχνικές δυσκολίες, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα παραμένει μια από τις πιο υποσχόμενες εναλλακτικές πρώτες ύλες στον τομέα της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας, ιδίως αν συνδυαστεί με μικροοργανισμούς που έχουν υποστεί μεταβολική μηχανική ή προσαρμοστική εξέλιξη για να καταναλώνουν σύνθετα σάκχαρα υπό καταπονητικές συνθήκες.

2.2.6 Παρεμβάσεις στον Κύκλο του Κιτρικού Οξέος και στη Διαχείριση Παραπροϊόντων μέσω Μεταβολικής Μηχανικής

Η μεταβολική μηχανική αποτελεί βασικό εργαλείο για την κατευθυνόμενη ενίσχυση της παραγωγής ηλεκτρικού οξέος από *Yarrowia lipolytica*, μέσω παρεμβάσεων σε ένζυμα-κλειδιά του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCA) και στη διαχείριση ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Μια στρατηγική που έχει εφαρμοστεί εκτενώς είναι η απενεργοποίηση της υπομονάδας 5 της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH5), η οποία καταλύει τη μετατροπή του ηλεκτρικού σε φουμαρικό. Το μεταλλαγμένο στέλεχος PGC1003 με απενεργοποιημένο το γονίδιο αυτό παρουσίασε σημαντική συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος, ιδίως όταν καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό

υλικό YPG με πηγή άνθρακα την ακατέργαστη γλυκερόλη (Jost et al., 2015; Yuzbashev et al., 2010).

Ωστόσο, η συγκεκριμένη παρέμβαση προκάλεσε ταυτόχρονα συσσώρευση οξικού οξέος, το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων και μειώνει την απόδοση της διαδικασίας. Το οξικό οξύ παράγεται κυρίως μέσω της αποκαρβοξυλάσης του πυροσταφυλικού (PDC) και της συνθάσης του ακετύλο-CoA (ACS). Η διαγραφή του ενδογενούς γονιδίου *Ylpdc* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού δεν μείωσε τα επίπεδα οξικού ούτε αύξησε την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Αντιθέτως, η εισαγωγή του ετερόλογου γονιδίου ACS από τη *Salmonella enterica* σε συνδυασμό με υπερέκφραση του ενδογενούς ACS οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής ηλεκτρικού οξέος στα 6,3 g/L και μείωση του οξικού στα 4,7 g/L (Starai et al., 2005).

Επιπλέον, έχει μελετηθεί η παρέμβαση στη μεταβολική αντίδραση του ακετύλο-CoA με το ηλεκτρικό οξύ, η οποία καταλύεται από την τρανσφεράση του ακετύλο-CoA (YIACH). Το ένζυμο αυτό επιτρέπει την αντιστρεπτή μετατροπή:

$$\text{Acetyl-CoA} + \text{succinate} \rightleftharpoons \text{acetate} + \text{succinyl-CoA}$$

Η υπερέκφραση του γονιδίου *YIACH* στο στέλεχος PGC52 επιβεβαίωσε φασματοφωτομετρικά τη δραστικότητα της τρανσφεράσης (Fleck and Brock, 2009). Αντίθετα, η διαγραφή του γονιδίου *YIACH* οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και βελτίωση της κυτταρικής ανάπτυξης. Ωστόσο, προκάλεσε συσσώρευση παραπροϊόντων όπως πυροσταφυλικό, ερυθριτόλη και μαννιτόλη, πιθανώς λόγω μεταβολικής συμφόρησης και μειωμένης διαθεσιμότητας ακετύλο-συνενζύμου-A, το οποίο αποτελεί κεντρικό κόμβο ενέργειας και βιοσύνθεσης (Cui et al., 2017)

Συνολικά, οι στοχευμένες παρεμβάσεις σε κρίσιμα ένζυμα του μεταβολικού δικτύου της *Y. lipolytica* επιτρέπουν τη βελτιστοποίηση της ροής του άνθρακα προς το ηλεκτρικό οξύ και τη μείωση της παραγωγής ανεπιθύμητων ενώσεων. Η συνδυαστική χρήση ετερόλογων γονιδίων και ενδογενούς ανασχεδιασμού καθιστά τη μεταβολική μηχανική ισχυρό εργαλείο για την αύξηση της βιομηχανικής αποδοτικότητας της παραγωγικής διαδικασίας.

2.2.7 Επίδραση του pH στην Παραγωγή Ηλεκτρικού Οξέος

Το pH του περιβάλλοντος αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, επηρεάζοντας άμεσα τη λειτουργία των μεταβολικών ενζύμων και τη μεταφορά του προϊόντος διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Η ηλεκτρική αφυδρογονάση (SDH), βασικό ένζυμο του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCA), καταλύει την οξείδωση του ηλεκτρικού οξέος σε φουμαρικό, μεταφέροντας παράλληλα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα μέσω FADH_2 . Σε συνθήκες χαμηλού pH, η δραστηριότητα της SDH αναστέλλεται, διακόπτοντας τη ροή του TCA και οδηγώντας σε συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος (Papanikolaou et al., 2006).

Η αναστολή της SDH επηρεάζει επίσης την παραγωγή ATP, καθώς μειώνεται η αναγεννητική ικανότητα του FADH_2 , προκαλώντας μεταβολή προς αναπληρωματικές οδούς όπως η γλυκόλυση, ο γλυκεροφωσφορικός και ο μηλο-ασπαρτικός κύκλος (Lazar et al., 2013). Αυτή η μεταβολική ανακατανομή αυξάνει τη ροή άνθρακα σε ενδιάμεσους μεταβολίτες όπως το μηλικό και το φουμαρικό οξύ, επηρεάζοντας παράλληλα την ισορροπία NADH/NAD^+ (Ledesma-Amaro and Nicaud, 2016).

Παράλληλα, το pH επιδρά στην μεταφορά του ηλεκτρικού οξέος μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς η φυσικοχημική του μορφή εξαρτάται από την οξύτητα του περιβάλλοντος. Σε χαμηλό pH (<4.5), το ηλεκτρικό οξύ βρίσκεται κυρίως σε αδιάστατη μορφή, γεγονός που διευκολύνει τη παθητική διάχυσή του μέσω της μεμβράνης (Zhang et al., 2011). Αντίθετα, σε υψηλότερο pH, επικρατεί η ανιονική μορφή του, η οποία απαιτεί ενεργητική μεταφορά μέσω ειδικών μεταφορέων. Οι δικαρβοξυλικοί μεταφορείς (Dct) χρησιμοποιούν το πρωτονιακό δυναμικό για την εξαγωγή του οξέος σε όξινο περιβάλλον (Janausch et al., 2001), ενώ σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH η εξαγωγή γίνεται ενεργειακά πιο απαιτητική.

Η *Y. lipolytica* μπορεί να προσαρμοστεί σε όξινο περιβάλλον μέσω εξελικτικής πίεσης, αποκτώντας μεταλλάξεις σε ένζυμα όπως η αφυδρογονάση του φουμαρικού και μηλικού, τα οποία ενισχύουν τη συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος και την αποτελεσματικότερη εξαγωγή του (Ledesma-Amaro and Nicaud, 2016). Παράλληλα, τροποποιήσεις σε μεταφορείς δικαρβοξυλικών μπορούν να αυξήσουν την αποδοτικότητα της απέκκρισης του προϊόντος, ιδιαίτερα σε όξινο pH, ενισχύοντας έτσι τη συνολική απόδοση (Workman et al., 2013).

Συνοψίζοντας, το χαμηλό pH αποτελεί διπλό εργαλείο στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος: αφενός διευκολύνει τη συσσώρευση του προϊόντος μέσω αναστολής του TCA, και αφετέρου βελτιώνει τη μεταφορά του μέσω της μεμβράνης. Η κατανόηση και αξιοποίηση αυτών των φαινομένων είναι καθοριστική για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας παραγωγής.

2.2.8 Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από την *Yarrowia lipolytica* PSA02004

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, διερευνήθηκε η ικανότητα του στελέχους *Yarrowia lipolytica* PSA02004 να παράγει ηλεκτρικό οξύ υπό διαφορετικές τιμές pH, με στόχο την αξιολόγηση της συμπεριφοράς του σε όξινο περιβάλλον και τη δυνατότητα εφαρμογής του σε βιομηχανικές ζυμώσεις. Το συγκεκριμένο στέλεχος επιλέχθηκε λόγω της γενετικής τροποποίησης που ενισχύει τη μεταβολική του ικανότητα προς την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, της ανθεκτικότητάς του σε οργανικά οξέα και της προσαρμοστικότητάς του σε αερόβιες συνθήκες.

Η πειραματική προσέγγιση περιλάμβανε καλλιέργεια σε διαφορετικά επίπεδα pH (6,0 – 5,5 – 5,0) σε εργαστηριακή κλίμακα και κλίμακα βιοαντιδραστήρα. Το pH είτε ρυθμιζόταν είτε αφέθηκε να μειωθεί σταδιακά, προσομοιώνοντας συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης. Παρακολουθήθηκαν κρίσιμες μεταβλητές όπως η κατανάλωση γλυκόζης, η παραγωγή ηλεκτρικού και οξικού οξέος, η ανάπτυξη ξηρής βιομάζας και η συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την ανθεκτικότητα και μεταβολική ευκαμψία του οργανισμού σε χαμηλό pH, συμβάλλοντας στην κατανόηση των περιορισμών και δυνατοτήτων του για εφαρμογή σε ζυμώσεις με χαμηλό λειτουργικό κόστος.

3 Υλικά και μέθοδοι

3.1 Εργαστηριακή καλλιέργεια *Yarrowia lipolytica* PSA02004

3.1.1 Μικροοργανισμός

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη ήταν το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* PSA02004, το οποίο διατηρήθηκε στην υπερκατάψυξη στους -80°C σε cryovials με ίσο όγκο (1 mL) καλλιέργειας και διαλύματος γλυκερόλης 50% v/v.

3.1.2 Προκαλλιέργεια

Για την προκαλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό μέσο που περιείχε: γλυκερόλη 20 g/L, yeast extract 10 g/L, τρυπτόνη 20 g/L και Na_2HPO_4 20 mM. Ο συνολικός όγκος καλλιέργειας ήταν 150 mL (3 φιάλες των 50 mL η καθεμία), τοποθετημένο σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες με baffles. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό επωαστήρα στους 28 °C και 220 rpm για 16–18 ώρες. Μετά την επώαση πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση και μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 660 nm (OD_{660}).

3.1.3 Κύρια Καλλιέργεια

Η κύρια καλλιέργεια περιλάμβανε υγρό μέσο με γλυκόζη 60 g/L, εκχύλισμα ζύμης 10 g/L, τρυπτόνη 20 g/L και Na_2HPO_4 20 mM. Η γλυκόζη προστέθηκε από αποστειρωμένο διάλυμα 600 g/L, ώστε να αποτραπούν αντιδράσεις Maillard. Εμβολιάστηκαν 5 mL από κάθε προκαλλιέργεια σε αποστειρωμένες φιάλες των 50 mL, ονομασμένες ως I, II και III. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 28 °C και 220 rpm για 5 ημέρες.

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση οπτικής πυκνότητας σε δείγματα 1:10 αραιωμένα με αποστειρωμένο νερό, μέτρηση του pH και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Το pH διορθώθηκε με σταδιακή προσθήκη διαλύματος NaOH 1 M. Από τα δείγματα συλλέχθηκαν υπερκείμενα για ανάλυση οργανικών οξέων (HPLC), ανόργανου φωσφόρου (IP) και αναγόντων σακχάρων (DNS). Επίσης προσδιορίστηκε το ξηρό βάρος κυττάρων (DCW). Η κάθε καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε 3 επαναλήψεις (A, B, C).

3.1.4 Προσαρμογή σε Χαμηλό pH

3.1.4.1 Υγρή Καλλιέργεια

Για την υγρή καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο όμοιας σύστασης με την κύρια καλλιέργεια, αλλά με προσθήκη HCl 0,029 M για επίτευξη χαμηλού pH. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 28 °C και 220 rpm. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν λήψη δειγμάτων για τακτικές μικροσκοπικές παρατηρήσεις, μέτρηση οπτικής πυκνότητας και ξηρής βιομάζας.

3.1.4.2 Στερεή Καλλιέργεια

Η προσαρμογή σε χαμηλό pH περιλάμβανε και ανάπτυξη σε στερεό μέσο που περιείχε γλυκερόλη 20 g/L, yeast extract 10 g/L, τρυπτόνη 20 g/L, Na_2HPO_4 20 mM και ηλεκτρικό οξύ σε συγκεντρώσεις που ρύθμιζαν το pH στις τιμές 5,5 και 5. Το pH ρυθμίστηκε με προσθήκη ηλεκτρικού οξέος και επαληθεύτηκε με πεχάμετρο πριν από την αποστείρωση. Η στερεοποίηση επιτεύχθηκε με προσθήκη άγαρ 20 g/L. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 28 °C για πολλαπλές ημέρες. Επίστρωση του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε με αραιώσεις 1:10, 1:100 και 1:1000 σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με NaCl και επικάλυψη σε τρυβλία.

3.1.5 Αποστείρωση

Όλα τα θρεπτικά υλικά, αναλώσιμα (tips, cryovials) και διαλύματα αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 20 λεπτά σε αυτόκαυστο. Επιπλέον, τοποθετήθηκαν στο UV για 20 λεπτά πριν τη χρήση τους σε ασηπτικές συνθήκες μέσα στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Όλα τα βήματα επίστρωσης και μεταφοράς υλικών έγιναν με αποστείρωση κρίκων/πιπέτας με φλόγα (λύχνο Buchner) ή γκαζάκι.

3.1.6 Ανάπτυξη σε Βιοαντιδραστήρα

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Yarrowia lipolytica* PSA02004 πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου ζύμωσης 400 mL, υπό ελεγχόμενο pH $6,0 \pm 0,5$. Η ρύθμιση του pH επιτεύχθηκε μέσω ηλεκτρονικού αισθητήρα pH, συνδεδεμένου με λογισμικό ελέγχου και αντλία παροχής NaOH, η οποία ενεργοποιείτο αυτόματα ώστε να διατηρείται το pH εντός των προκαθορισμένων ορίων. Ο αερισμός του μέσου επιτυγχανόταν με παροχή οξυγόνου σε ρυθμό 0,5–1 vvm για την εξασφάλιση αερόβιων συνθηκών.

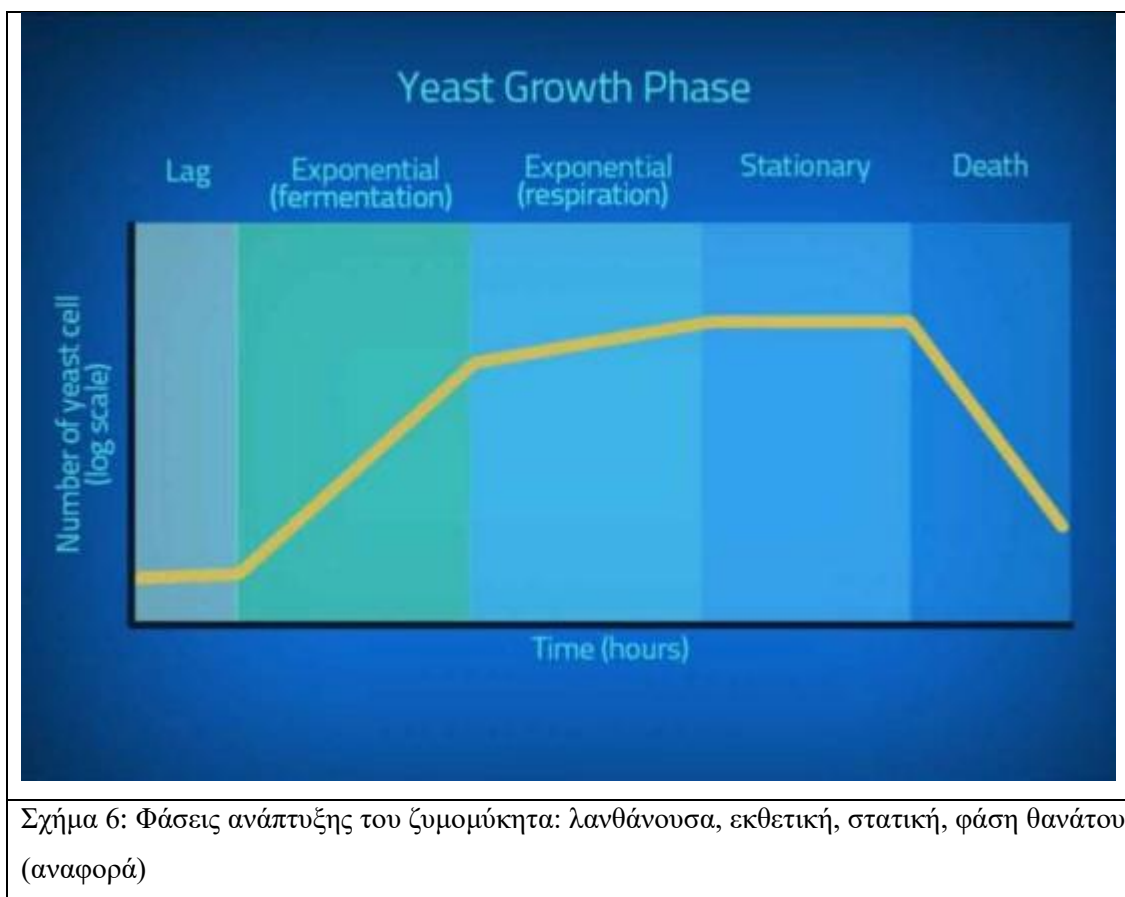
Το θρεπτικό μέσο περιείχε γλυκόζη 80 g/L, yeast extract 10 g/L, τρυπτόνη 20 g/L και Na_2HPO_4 20 mM. Επιπλέον, προστέθηκε χλωραμφαινικόλη σε τελική συγκέντρωση 0,1 g/L (40 mg συνολικά) ως αντιβιοτικό. Όλα τα συστατικά αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 20 λεπτά σε αυτόκαυστο και στην εκτέθηκαν σε ακτινοβολία υπεριώδους για 20 λεπτά στο Laminar Flow. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με 40 mL από προκαλλιέργεια που είχε αξιολογηθεί

μικροσκοπικά ως η πλέον κατάλληλη, φτάνοντας σε τελικό όγκο 400 mL. Ο αφρισμός κατά τη ζύμωση ελεγχόταν με αποστειρωμένο αντιαφριστικό διάλυμα, το οποίο προστίθετο μέσω ειδικού συστήματος παροχής στον βιοαντιδραστήρα.

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με στείρα σύριγγα μέσω ειδικής στρόφιγγας, ώστε να αποτραπεί η αλληλεπίδραση με την ατμόσφαιρα και να μειωθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης. Στις χρονικές στιγμές t_0 , t_3 , t_6 , $t_{6.5}$, t_8 , $t_{22.5}$, t_{24} , t_{27} , t_{30} , $t_{31.5}$, t_{46} , $t_{48.5}$, $t_{51.5}$ και t_{55} , λαμβάνονταν 5 mL δείγματος για μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 660 nm. Το pH επιβεβαιωνόταν επίσης με χρήση φορητού πεχαμέτρου. Επιπρόσθετα, συλλέγονταν 1,5 mL υπερκείμενου για μελλοντική ανάλυση οργανικών οξέων (HPLC) το οποίο διατηρούνταν στην κατάψυξη στους -20°C και 1 mL δείγματος για προσδιορισμό της ξηρής βιομάζας (DCW).

3.2 Αναλυτικές μέθοδοι

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης βακτηριακών ή ζυμομυκητικών καλλιεργειών σε υγρά θρεπτικά μέσα πραγματοποιείται συχνά μέσω της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 660 nm (OD_{660}). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον προσδιορισμό της φάσης ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται ο μικροοργανισμός και συμβάλλει στη λήψη κυττάρων σε χρονικό σημείο που αντιστοιχεί σε κατάλληλη πυκνότητα ζώντων κυττάρων (Beal et al., 2018). Αξίζει να σημειωθεί ότι η OD_{660} βασίζεται κυρίως στη σκέδαση του φωτός, και όχι στην απορρόφησή του, επομένως παράγοντες όπως το μέγεθος, το σχήμα των κυττάρων και η παρουσία νεκρών κυττάρων μπορεί να επηρεάσουν τη μέτρηση, αυξάνοντας τη διασπορά του φωτός (Stevenson et al., 2016). Παρ' όλα αυτά, υπάρχει γενικά αποδεκτή συσχέτιση μεταξύ της οπτικής πυκνότητας και της ποσότητας βιομάζας, καθιστώντας δυνατή την εκτίμηση της κυτταρικής αύξησης χωρίς την ανάγκη πρόσθετων αναλυτικών τεχνικών (Myers et al., 2013). Η κυτταρική ανάπτυξη εξελίσσεται τυπικά σε διαδοχικές φάσεις — λανθάνουσα, εκθετική, στατική και φάση θανάτου — και η OD_{660} χρησιμοποιείται ως ένδειξη για τον εντοπισμό του κατάλληλου χρόνου συγκομιδής, συνήθως στο μέσο της εκθετικής φάσης, όπου η κυτταρική δραστηριότητα είναι στο μέγιστο.

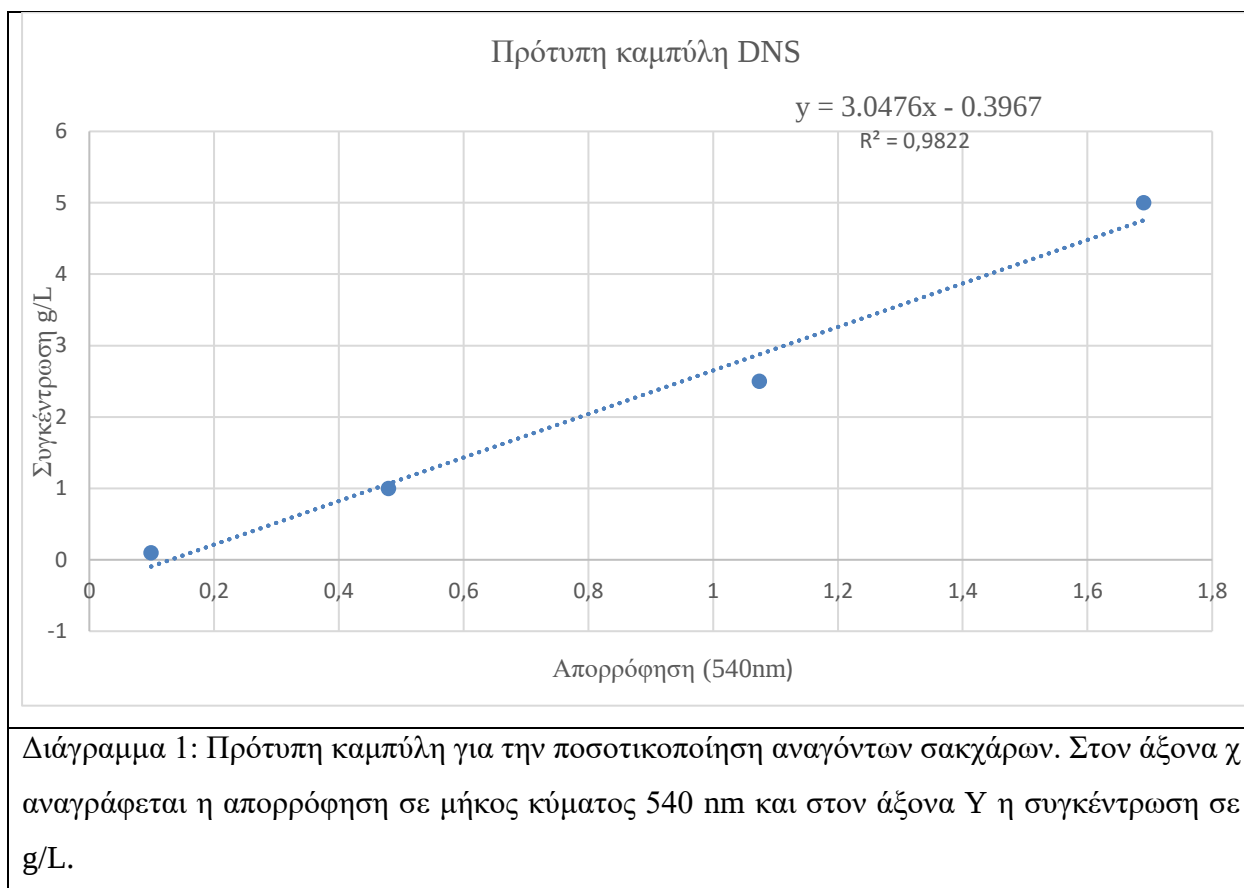


Σχήμα 6: Φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα: λανθάνουσα, εκθετική, στατική, φάση θανάτου (αναφορά)

3.2.1 Προσδιορισμός Αναγόντων Σακχάρων (DNS)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DNS (3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ). Το αντιδραστήριο DNS είχε ήδη παρασκευαστεί και περιείχε, σε τελικό όγκο 1 L: 200 mL διαλύματος NaOH 2 N, 10 g DNS, 300 g διτρυγικού καλίου-νατρίου (potassium sodium tartrate) και ddH₂O ως διαλύτη.

Για την ανάλυση, 0,5 mL αραιωμένου δείγματος αναμείχθηκε με 0,5 mL του αντιδραστηρίου DNS σε δοκιμαστικό σωλήνα. Το μείγμα επωάστηκε σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ψύξη προστέθηκαν 5 mL ddH₂O και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 540 nm. Ως τυφλό διάλυμα (blank) χρησιμοποιήθηκε 0,5 mL ddH₂O αντί για δείγμα. Η συγκέντρωση των σακχάρων προσδιορίστηκε με βάση καμπύλη αναφοράς που περιλάμβανε πρότυπα διαλύματα σακχάρων σε συγκεντρώσεις 0,1–10 g/L. Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



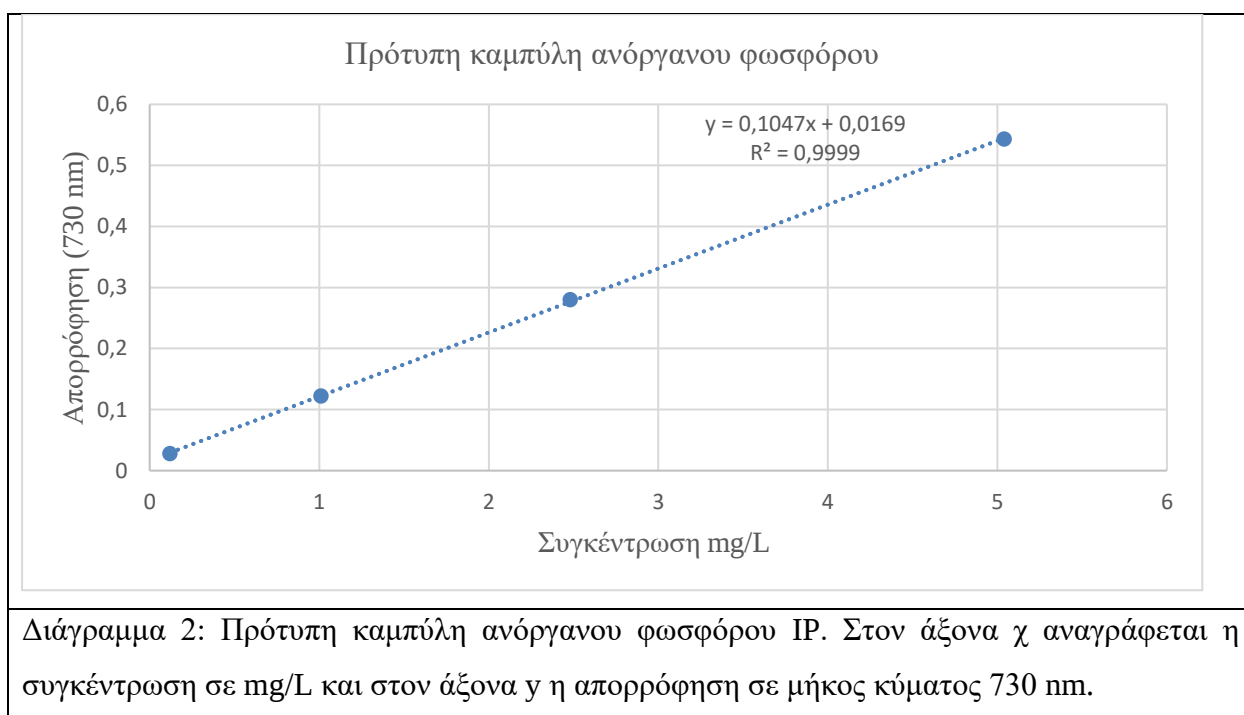
3.2.2 Προσδιορισμός Ανόργανου Φωσφόρου (Inorganic Phosphorus)

Η μέθοδος προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου βασίστηκε στη χρωματομετρική αντίδραση με μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ασκορβικού οξέος και υπερχλωρικού οξέος. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Υπερχλωρικό οξύ 60% v/v
- Ασκορβικό οξύ 10 g/L
- Μολυβδαινικό αμμώνιο 50 g/L

Αρχικά, τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα ώστε να εμπίπτουν στο εύρος της καμπύλης αναφοράς (0,1–10 mg/L ανόργανου φωσφόρου) και συμπληρώθηκαν με ddH₂O σε τελικό όγκο

5 mL. Στη συνέχεια, προστέθηκαν διαδοχικά: 0,4 mL υπερχλωρικού οξέος, 0,3 mL ασκορβικού οξέος και 0,4 mL μολυβδαινικού αμμωνίου, με ενδιάμεση ανακίνηση 10 δευτερολέπτων. Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στην συνέχεια η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος 730 nm. Η προσθήκη υπερχλωρικού οξέος πραγματοποιήθηκε εντός απαγωγού (fume hood) λόγω της τοξικότητας του αντιδραστήριου. Για την ποσοτικοποίηση του ανόργανου φωσφόρου χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη, η οποία προέκυψε από μετρήσεις δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης (0,1, 1, 2,5 και 5 mg/L).. Η γραφική απεικόνιση της πρότυπης καμπύλης είναι η ακόλουθη:



3.3 Πρωτόκολλο υπολογισμού ξηρής βιομάζας (dry cell weight)

Η ποσοτικοποίηση της ξηρής βιομάζας πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του ξηρού υπολείμματος μετά από φυγοκέντρηση και αφυδάτωση των κυτταρικών δειγμάτων. Αρχικά, προζυγίστηκαν σωληνίσκοι τύπου Eppendorf των 2 mL σε ζυγαριά ακριβείας και καταγράφηκε το αρχικό τους βάρος, ώστε να υπολογιστεί με ακρίβεια η τελική ξηρή μάζα. Στη συνέχεια, σε κάθε eppendorf προστέθηκε 1 mL καλλιέργειας, το οποίο φυγοκεντρήθηκε στους 12.000 rpm για 5 λεπτά, προκειμένου να καθιζήσει η κυτταρική μάζα (pellet) στον πυθμένα. Το υπερκείμενο υγρό

μεταφέρθηκε σε νέο σωληνίσκο και το pellet υποβλήθηκε σε στάδιο έκπλυσης με 0,5 mL απιονισμένου νερού, ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα μέσου καλλιέργειας ή διαλυμένων ουσιών που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το τελικό βάρος.

Μετά από σύντομη ανάδευση (vortex) για ομογενοποίηση, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε εκ νέου υπό τις ίδιες συνθήκες (12.000 rpm, 5 λεπτά). Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και οι σωληνίσκοι, περιέχοντας πλέον μόνο την καθαρή ξηρή βιομάζα, τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης στους 100 °C για 24 ώρες, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία. Το τελικό βάρος των σωληνίσκων καταγράφηκε και, αφαιρώντας το αρχικό βάρος του κενού Eppendorf, υπολογίστηκε η ξηρή βιομάζα (dry cell weight, DCW) του κάθε δείγματος.

3.4 Προετοιμασία Δειγμάτων για HPLC

Για την ανάλυση των μεταβολιτών της κύριας καλλιέργειας, συλλέχθηκαν δείγματα υπερκειμένου σε τακτά χρονικά διαστήματα. Κάθε δείγμα υπέστη αραιώση 1:20 με προσθήκη 100 μL υπερκειμένου σε 1900 μL διαλύματος H₂SO₄ 10 mM. Πριν από την αραιώση, τα δείγματα ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό, στεγνώθηκαν και αναμίχθηκαν (vortex). Το αραιωμένο διάλυμα διηθήθηκε με χρήση μικροφίλτρου για απομάκρυνση σωματιδίων.

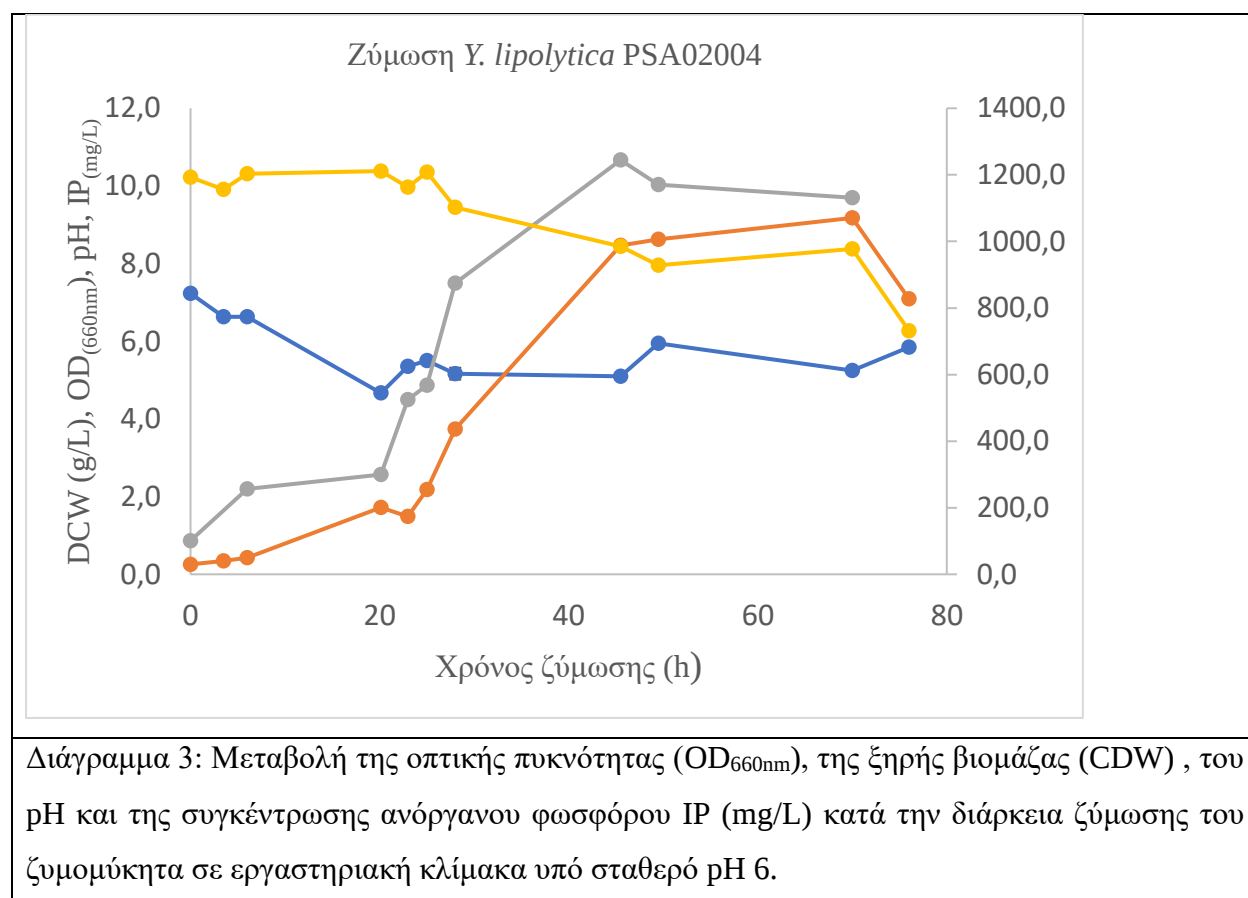
Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν και στάλθηκαν στη συνεργαζόμενη ερευνητική ομάδα στην Αθήνα, όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση υγρής χρωματογραφίας HPLC. Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων γλυκόζης, οργανικών οξέων (ηλεκτρικού, οξικού, γαλακτικού) καθώς και αιθανόλης σε κάθε δείγμα.

4 Αποτελέσματα

4.1 Εργαστηριακή ανάπτυξη ζυμομύκητα *Yarrowia lipolytica* PSA 02004 σε pH 6

Η ζύμωση του στελέχους *Yarrowia lipolytica* PSA02004 πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακή κλίμακα και σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα υπό ελεγχόμενο pH, το οποίο διατηρούνταν σταθερό στην τιμή 6,0 μέσω προσθήκης NaOH 1M σε κάθε δειγματοληψία. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα διαγράμματα 3 και 4 αντιστοιχούν στις βασικές συνθήκες καλλιέργειας και χρησιμοποιούνται ως σημείο αναφοράς (control) για συγκριτική αξιολόγηση.

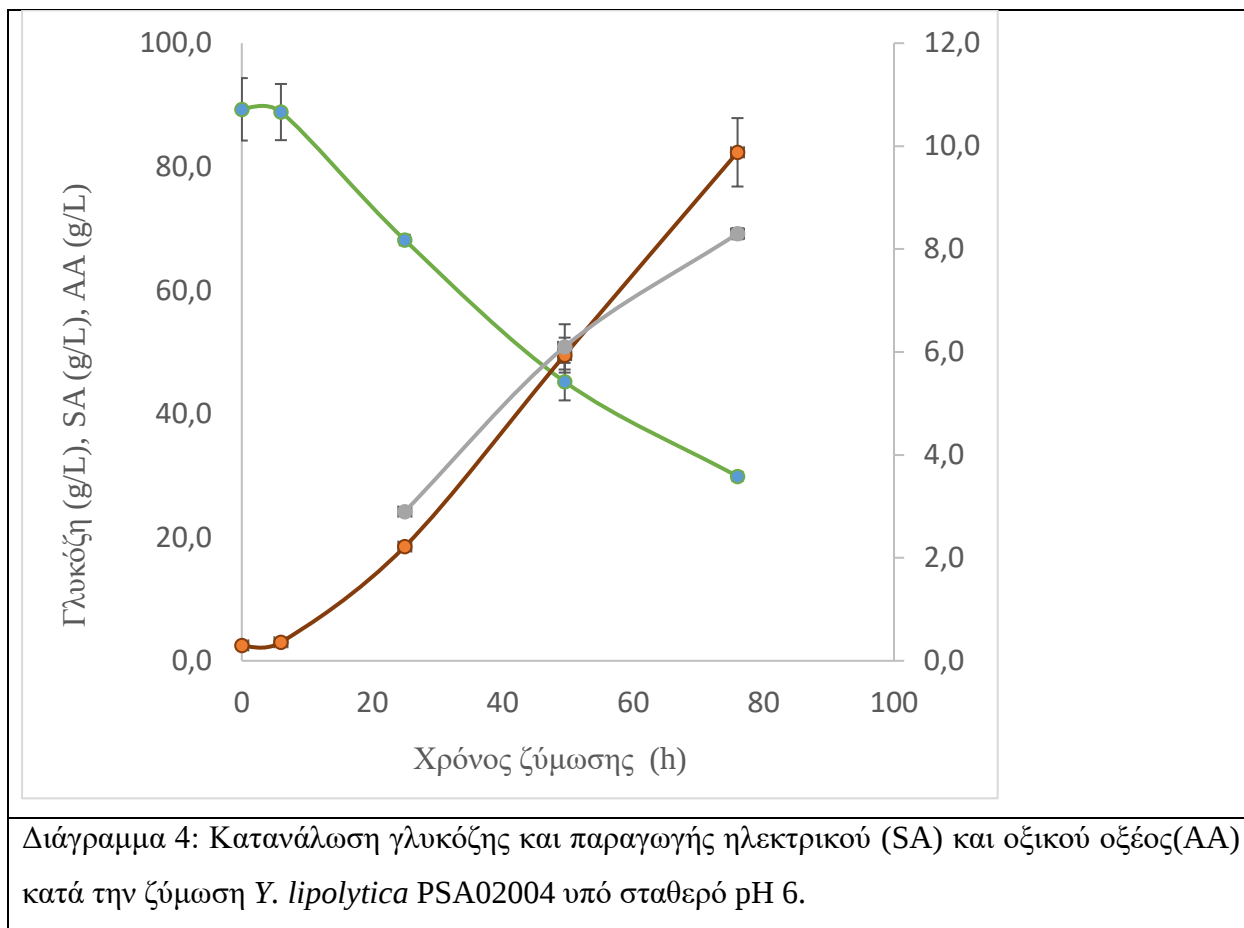
Στο διάγραμμα 3 απεικονίζονται τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης και κατανάλωσης θρεπτικών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η ξηρή κυτταρική βιομάζα (DCW) και η οπτική πυκνότητα OD_{660} παρουσιάζουν αύξηση έως και το 48ο–50ό ωρο, υποδεικνύοντας ενεργή κυτταρική ανάπτυξη. Μετά από αυτό το σημείο, οι τιμές σταθεροποιούνται, γεγονός που υποδηλώνει πιθανό πέρασμα στη στατική φάση ή μεταβολική ανακατεύθυνση των υποστρωμάτων του θρεπτικού μέσου. Η τιμή του pH, αν και ρυθμιζόταν τεχνητά, εμφάνισε τάση να μειώνεται μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας, αποτυπώνοντας την παραγωγή οργανικών οξέων και την ανάγκη για εξισορρόπηση. Η σταδιακή πτώση της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου (IP) δείχνει έντονη μεταβολική δραστηριότητα και χρήση του για την ενσωμάτωση σε κυτταρικά μακρομόρια (νουκλεϊικά οξέα, φωσφολιπίδια).



Στο διάγραμμα 4 παρουσιάζεται η κατανάλωση του υποστρώματος (γλυκόζης) καθώς και η παραγωγή οργανικών οξέων κατά την πορεία της καλλιέργειας. Η γλυκόζη μειώνεται σταθερά με την πάροδο του χρόνου, υποδεικνύοντας την ενεργή χρήση της ως κύρια πηγή άνθρακα. Η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (SA) ακολουθεί ανοδική πορεία, αγγίζοντας υψηλές συγκεντρώσεις

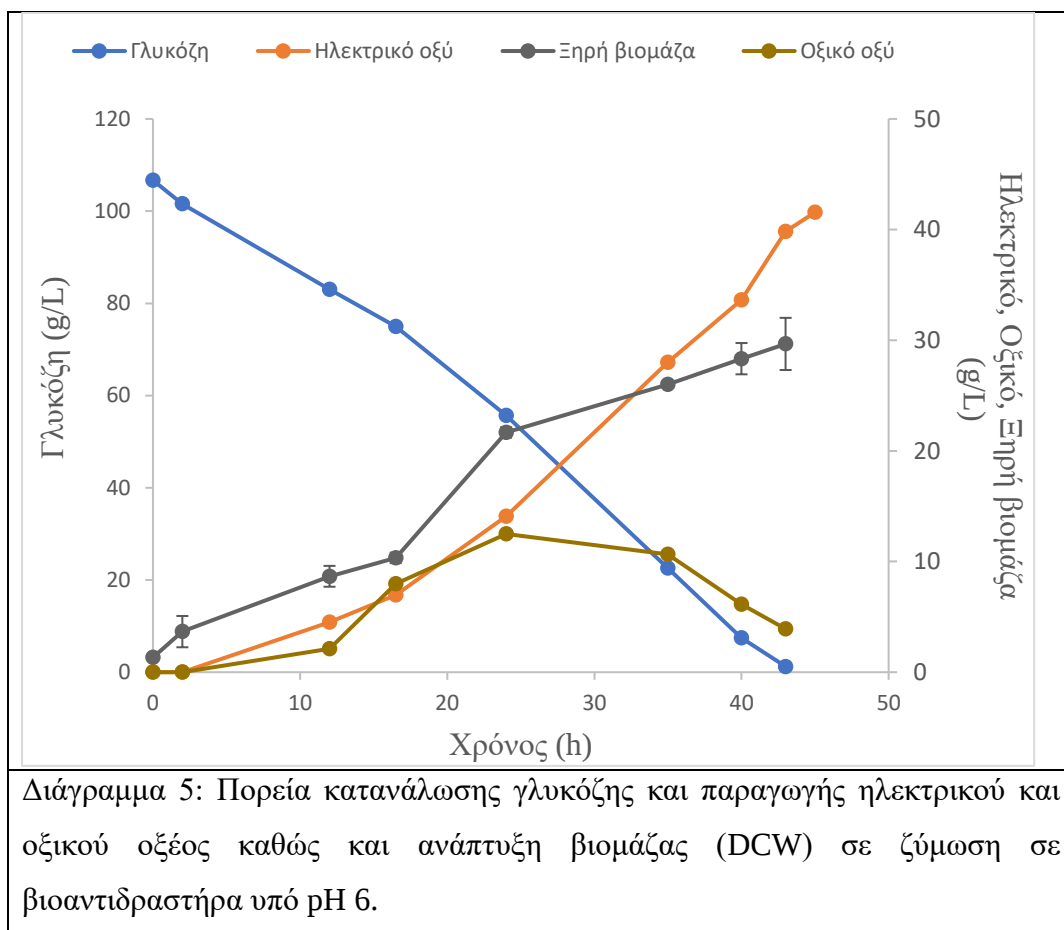
(~84 g/L), γεγονός που αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα του στελέχους στην παραγωγή SA υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες. Αντίστοιχα, το οξικό οξύ (AA) εμφανίζει αυξανόμενη τάση, φθάνοντας έως και τα ~8,3 g/L, πιθανόν ως αποτέλεσμα μεταβολικής απόκλισης ή πίεσης λόγω περιορισμού φωσφόρου.

Η παρουσία των γραμμών τυπικών αποκλίσεων στις συγκεντρώσεις SA και AA, όπως αποτυπώνονται στο γράφημα, αναδεικνύει την αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων και την αξιοπιστία της μεθόδου ανάλυσης. Συνολικά, τα ευρήματα αυτά σκιαγραφούν την ικανότητα της *Y. lipolytica* να μετατρέψει αποτελεσματικά τη γλυκόζη σε ηλεκτρικό οξύ υπό ελεγχόμενο pH, ενώ η παράλληλη κατανάλωση IP και η συσσώρευση οργανικών οξέων υποδηλώνουν ενεργοποίηση συγκεκριμένων μεταβολικών διαδρομών. Η συγκεκριμένη ζύμωση λειτουργεί ως σημείο αναφοράς για τη συγκριτική αξιολόγηση διαφορετικών συνθηκών σε μεταγενέστερα πειράματα.



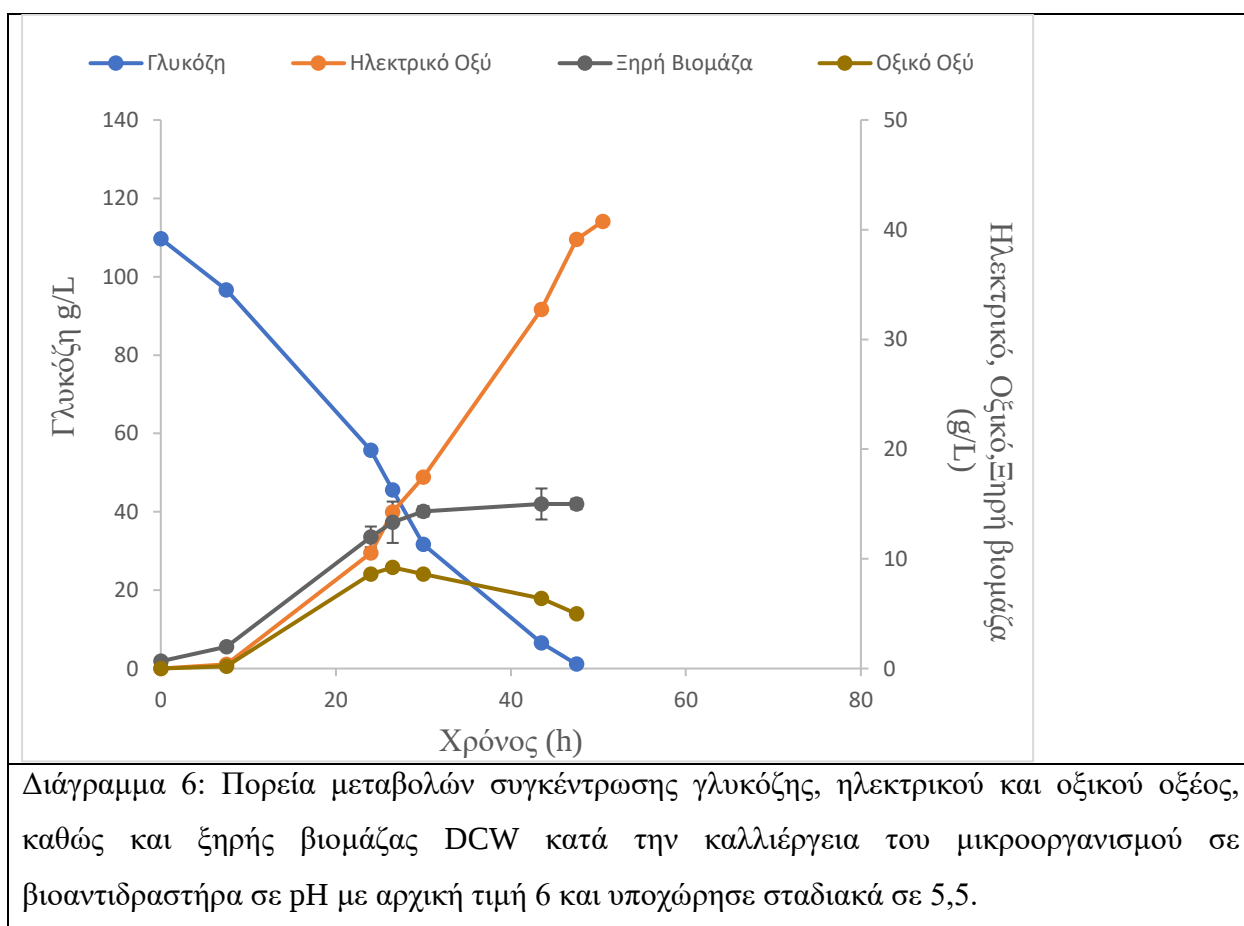
4.2 Καλλιέργεια ζυμομύκητα σε βιοαντιδραστήρα σε pH 6

Σε επόμενη σειρά πειραμάτων ο μικροοργανισμός *Yarrowia lipolytica* PSA02004 καλλιεργήθηκε σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα υπό σταθερό pH 6. Σύμφωνα με το διάγραμμα 5 παρατηρείται σταθερή κατανάλωση υποστρώματος γλυκόζης, η οποία εξαντλείται πλήρως εντός 48 ωρών. Αντίστοιχα η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος ακολουθεί αυξανόμενη πορεία φτάνοντας μέγιστη τιμή 41,56 g/L την χρονική στιγμή t_{45} ενώ η ξηρή βιομάζα παρουσιάζει συνεχή αύξηση, φτάνοντας περίπου τα 30 g/L. Το προφίλ αυτό χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταβολική απόδοση και αντιπροσωπεύει το πείραμα ελέγχου σε βιομηχανική κλίμακα.



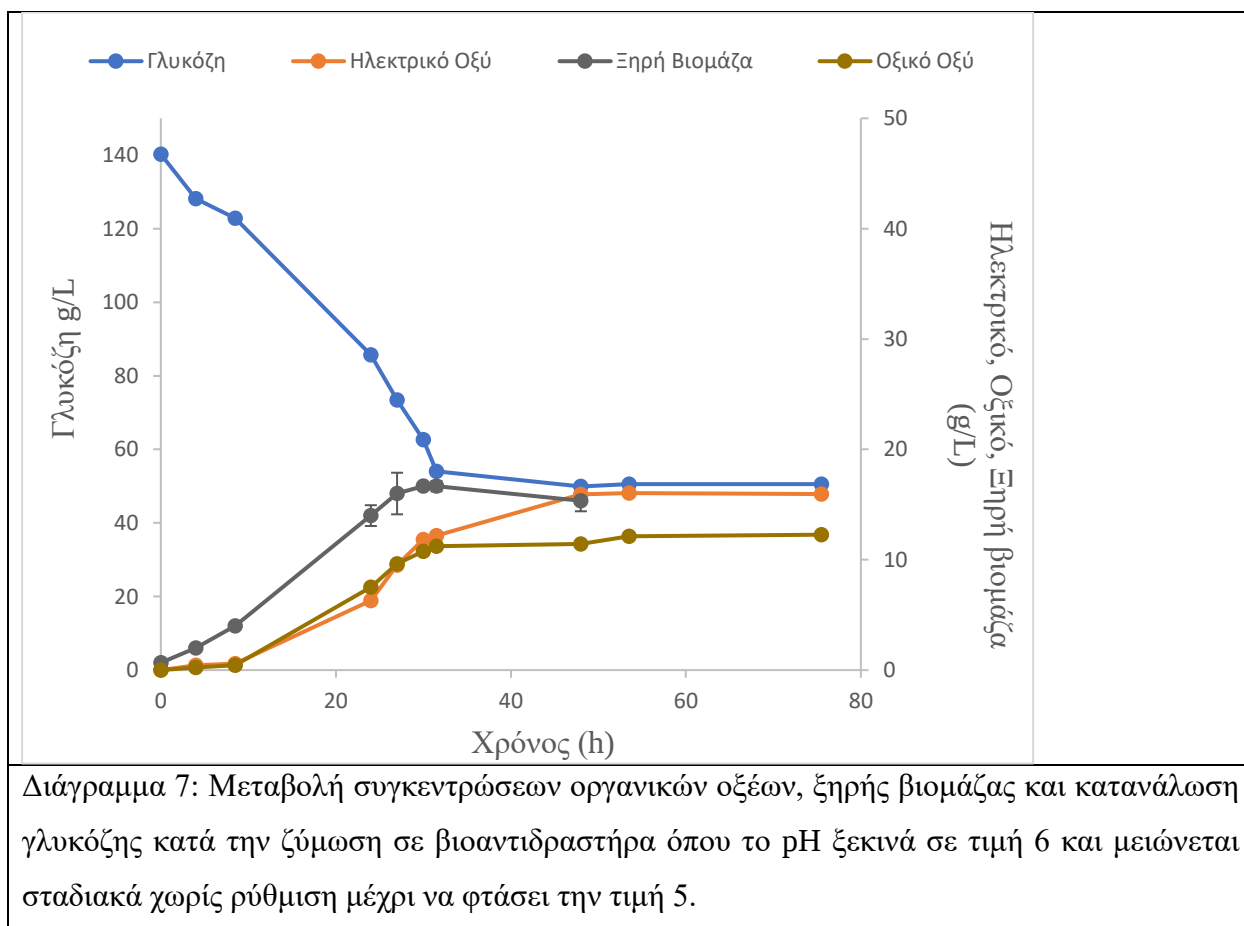
4.3 Καλλιέργεια ζυμομύκητα σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα σε pH 6-5,5

Η επόμενη ζύμωση του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε σε αρχικό pH 6 το οποίο στην συνέχεια έπεσε σταδιακά στην τιμή 5,5 χωρίς ρύθμιση. Σε αυτές τις συνθήκες παρατηρείται γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρικού οξέος με παρόμοιο προφίλ με την προηγούμενη ζύμωση όπου σημειώνεται τελική συγκέντρωση ~41 g/L την χρονική στιγμή $t_{50,5}$. Όσο αφορά το οξικό οξύ, σημειώθηκε τελική συγκέντρωση 3,91 g/L την χρονική στιγμή $t_{47,5}$. Επίσης, παρατηρείται σημαντική επιβράδυνση στην αύξηση της ξηρής βιομάζας η οποία φτάνει μέγιστη τιμή 15 g/L την χρονική στιγμή $t_{43,5}$ και διατηρείται μέχρι την $t_{47,5}$. Ουσιαστικά, αυτό δηλώνει μειωμένη κυτταρική αύξηση μεταβολική επιβράδυνση και στρες του μικροοργανισμού που πιθανότατα συνδέονται με την ευαισθησία του μη προσαρμοσμένου στελέχους σε ήπια όξινο περιβάλλον.



4.4 Καλλιέργεια ζυμομύκητα σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα σε pH 6-5

Στην τελευταία ζύμωση, το pH διατηρείται σταθερό στην τιμή pH 6 μέχρι την χρονική στιγμή t_{30} και από την $t_{31,5}$ και μετά το pH πέφτει σταδιακά στην τιμή pH=5 μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Σύμφωνα με το διάγραμμα 7 η κατανάλωση γλυκόζης περιορίζεται σημαντικά μετά από το 30^οορο σημειώνοντας τελική τιμή ίση με ~50 g/L την $t_{75,5}$. Με παρόμοιο τρόπο και η ξηρή βιομάζα φτάνει την μέγιστη τιμή της η οποία είναι ίση με ~16g/L και παραμένει σχετικά σταθερή μετά την πτώση του pH υποδηλώνοντας σημαντική αναστολή λόγω του όξινου περιβάλλοντος. Η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος εμφανίζει στασιμότητα από την t_{48} και μετά με συγκέντρωση που κυμαίνεται γύρω στα 15-16 g/L. Τέλος, το οξικό οξύ παράγεται με γραμμικό τρόπο μέχρι την χρονική στιγμή $t_{31,5}$ και στην συνέχεια παραμένει σταθερό με μικρή αύξηση όπου από ~11 g/L φτάνει σε τελική τιμή 12 g/L στο τέλος της ζύμωσης.



4.5 Σύγκριση αποτελεσμάτων

Τα συνολικά αποτελέσματα των προαναφερθέντων ζυμώσεων εμφανίζονται στον πίνακα 1 όπου αναγράφονται μεταβολικοί παράμετροι όπως η κατανάλωση γλυκόζης, η παραγωγή ηλεκτρικού και οξικού οξέος, η απόδοση της ζύμωσης και η ξηρή βιομάζα σε κάθε συνθήκη καλλιέργειας.

- **Κατανάλωση γλυκόζης:** Η μέγιστη κατανάλωση γλυκόζης από τον μικροοργανισμό καταγράφηκε στο pH 6 με τιμή 106,7 g/L ενώ στο pH 5,5 παρουσίασε τιμή 107,4 g/L. Στο pH 5 η κατανάλωση υποστρώματος ήταν ελαφρώς μειωμένη με τιμή 87,42 g/L χωρίς ωστόσο να συνοδεύεται από ανάλογη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.
- **Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος:** Η συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος που παράχθηκε παραμένει σχετικά σταθερή από 39,83 g/L στο pH 6 σε 40,76 g/L σε pH 5,5 και 15,95 g/L σε pH 5 επιβεβαιώνοντας την ανασταλτική επίδραση του χαμηλού pH στην μεταβολική οδό.
- **Παραγωγή οξικού οξέος (AA) και λόγος οξικού/ηλεκτρικού (AA/SA):** Αντίθετα η παραγωγή οξικού οξέος αυξάνεται σημαντικά στις χαμηλότερες τιμές pH, με την αναλογία AA/SA να εκτοξεύεται από 0,10 σε 0,12 και 0,77 σε τιμές pH 6 5,5 και 5 αντίστοιχα. Το φαινόμενο αυτό υποδηλώνει ενίσχυση μονοπατιών που οδηγούν στην παραγωγή οξικού οξέος σε όλο και πιο όξινες συνθήκες περιβάλλοντος.
- **Απόδοση:** Η απόδοση υπολογίστηκε ως λόγος της τελικής συγκέντρωσης SA προς την γλυκόζη που καταναλώθηκε και έχει μονάδες μέτρησης g ηλεκτρικού / g γλυκόζης. Στα pH 6 και 5,5 φθάνει το 0,37 g/g ενώ στην τιμή pH 5 μειώνεται περίπου στο μισό με τιμή 0,18 g/g
- **Παραγωγικότητα:** Αντίστοιχα η παραγωγικότητα υπολογίστηκε ως ο λόγος της τελικής συγκέντρωσης ηλεκτρικού οξέος προς τη χρονική διάρκεια ζύμωσης με μονάδα μέτρησης

g/L/h. Εδώ παρατηρήθηκε καθαρή πτώση από 0,93 g/L σε 0,8 και 0,21 g/L/h σε pH 6,5,5 και 5 αντίστοιχα.

- **Ξηρή βιομάζα (DCW):** Η τελική ξηρή βιομάζα μειώνεται σταδιακά από 29,7 g/L (pH 6.0) σε 15 g/L (pH 5.5) και 15,33 g/L (pH 5.0), υποδηλώνοντας σοβαρή αναστολή κυτταρικής ανάπτυξης σε όλο και μειωμένες τιμές pH.

pH	Κατανάλωση Γλυκόζης (g/L)	Ηλεκτρικό (g/L)	Οξικό (g/L)	AA/SA	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Ξηρή βιομάζα (g/L)
6.0	106.70	39.83	3.91	0.10	0.37	0.93	29.67
5.5	107.4	40.76	5.00	0,12	0.37	0.8	15
5.0	87.42	15.95	12.27	0.77	0.18	0.21	15,33

Πίνακας 1: Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων ζύμωσης στις διαφορετικές τιμές pH. Αναγράφονται παράμετροι όπως η καταναλισκόμενη γλυκόζη, η παραγωγή ηλεκτρικού και οξικού οξέος, ο λόγος οξικού/ηλεκτρικού η απόδοση η παραγωγικότητα και τα επίπεδα ξηρής βιομάζας.

Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η *Y. lipolytica* PSA02004 εμφανίζει σημαντικούς περιορισμούς παραγωγικότητας και απόδοσης υπό όξινο περιβάλλον χωρίς εργαστηριακή προσαρμογή. Η αυξημένη παραγωγή οξικού οξέος και η μειωμένη συσσώρευση SA υποδηλώνουν εκτροπή του μεταβολισμού και ενεργοποίηση μη αποδοτικών οδών.

4.6 Σύζησηση – Συμπεράσματα

Η *Yarrowia lipolytica* PSA02004 καλλιεργήθηκε υπό διαφορετικές τιμές pH με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης του όξινου περιβάλλοντος στη μεταβολική συμπεριφορά του μικροοργανισμού και στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος. Αν και το αρχικό πειραματικό πλάνο περιλάμβανε την προσαρμογή του στελέχους μέσω επαναλαμβανόμενων ανακαλλιεργειών σε στερεά μέσα χαμηλού pH, η αδυναμία διατήρησης των τρυβλίων είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια του προσαρμοστικού πειραματικού σκέλους. Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματα των ζυμώσεων του μη προσαρμοσμένου στελέχους προσφέρουν χρήσιμα συμπεράσματα.

Το ίδιο μετάλλαγμα του στελέχους *Yarrowia lipolytica* PSA02004 χρησιμοποιήθηκε σε διαδοχικές παρτίδες ζύμωσης, κατά τις οποίες το pH του μέσου μειωνόταν σταδιακά από pH 6 έως και pH 3, με σκοπό την προσαρμογή του μικροοργανισμού σε όλο και πιο όξινες συνθήκες. Παρακάτω παρατίθεται ο αντίστοιχος πίνακας όπου φαίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και τα αποτελέσματα των ερευνητών.

Πίνακας 2: Σύγκριση αποτελεσμάτων ζυμώσεων βιοαντιδραστήρα σε pH 6 και 5 με αντίστοιχα αποτελέσματα διαδοχικών ζυμώσεων σε βιοαντιδραστήρα από άλλες πηγές. (Li et al., 2018)

Παράμετρος	pH:6	pH: 5	(Li et al., 2018) Παρτίδες 1-8 pH 6	(Li et al., 2018) Παρτίδα 9 pH 5	(Li et al., 2018) Παρτίδα 9-12 pH 5
Κατανάλωση γλυκόζης (g/L)	106,70	87,42	~80 g/L	31,5	~75
Ηλεκτρικό (g/L)	39,83	15,95	20 ± 0,7	~20	18.7 ± 1.2
Οξικό (g/L)	3,91	12,27	15.7 ± 1.6	-	3.2 ± 0.6
Απόδοση (g/g)	0,37	0,18	0.30 ± 0.03	-	0.24 ± 0.01
Παραγωγικότητα (g/L/h)	0,93	0,21	0.44 ± 0.04	0,07	0.36 ± 0.14

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, οι υψηλότερες τιμές παραγωγής, απόδοσης και παραγωγικότητας ηλεκτρικού οξέος καταγράφηκαν σε pH 6. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, καθώς και εδώ παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος σε pH 6. Ωστόσο, η παραγωγικότητα της παρούσας μελέτης (0,93 g/L/h) είναι σαφώς μεγαλύτερη κατά σε σχέση με εκείνη των Li et al. στην ίδια τιμή pH (0,44 g/L/h), ενώ η συγκέντρωση ηλεκτρικού (39,83 g/L) είναι σχεδόν διπλάσια από αυτή των Li et al. (20 ± 0,7 g/L), υποδεικνύοντας μεγαλύτερη συσσώρευση τελικού προϊόντος.

Κατά τη μετάβαση σε pH 5, οι Li et al. παρατήρησαν σημαντική μείωση των παραμέτρων διεργασίας στην παρτίδα 9 η κατανάλωση γλυκόζης μειώθηκε από ~80 g/L σε 31,5 g/L και η παραγωγικότητα έπεσε στο 0,07 g/L/h σε σύγκριση με pH 6. Αντίστοιχα, στα πειράματα της

παρούσας εργασίας σε pH 5 η παραγωγικότητα ήταν 0,21 g/L/h, σε σχέση με το pH 6, επιβεβαιώνοντας παρόμοια επίδραση του χαμηλού pH.

Ωστόσο σε επόμενες διαδοχικές ζυμώσεις σε pH 5 παρατηρήθηκε σημαντική ανάκαμψη στις παραγωγικότητες και αποδόσεις ηλεκτρικού με τιμές παρόμοιες με αυτές σε pH 6. Στις παρτίδες 10–12 των Li et al., η παραγωγικότητα αυξήθηκε από 0,07 g/L/h σε $0,36 \pm 0,14$ g/L/h, δηλαδή πενταπλασιάστηκε, ενώ το ηλεκτρικό οξύ κυμαινόταν γύρω στην τιμή 20 g/L και το οξικό σημείωσε σχετικά χαμηλή τιμή $3,2 \pm 0,6$ g/L, υποδεικνύοντας βελτιωμένη προσαρμογή και διοχέτευση της μεταβολικής ροής προς το κύριο προϊόν.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας βρίσκονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία ως προς την αρνητική επίδραση του όξινου pH, και οι επιπλέον πληροφορίες επιβεβαιώνουν την ικανότητα του συγκεκριμένου στελέχους να ανακάμπτει υπό συνθήκες χαμηλού pH.

Στη συνέχεια, οι ερευνητές προχώρησαν σε περαιτέρω μείωση του pH έως και 3,0, ολοκληρώνοντας 28 συνολικές παρτίδες προσαρμοστικής εξέλιξης. Το εξελεγμένο στέλεχος ονόματι PSA3.0 που απομονώθηκε κατά την 28η παρτίδα ήταν ικανό να αναπτύσσεται και να παράγει ηλεκτρικό οξύ σταθερά σε pH 3,0, επιτυγχάνοντας τιμές 18,4 g/L ηλεκτρικού, απόδοση 0,23 g/g και παραγωγικότητα 0,53 g/L/h. Παρόλο που οι τιμές αυτές ήταν κατά 27% χαμηλότερες από τις αντίστοιχες του PSA02004 σε pH 6,0, ήταν 4,8 φορές υψηλότερες από τις τιμές που καταγράφηκαν για το ίδιο αρχικό στέλεχος σε pH 3,0.

Επίσης, για να ενισχυθεί η οικονομική βιωσιμότητα της παραγωγής ηλεκτρικού οξέος, οι Li et al. αξιολόγησαν τη χρήση υδρολύματος μικτών απορριμμάτων τροφίμων ως πηγή άνθρακα. Το υδρόλυμα περιείχε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (100,8 g/L) και ικανοποιητικά επίπεδα ελεύθερου αζώτου (FAN = 1,7 g/L), καθιστώντας το κατάλληλο υπόστρωμα για μικροβιακή ανάπτυξη. Η ζύμωση με PSA3.0 σε αυτό το υδρόλυμα οδήγησε σε παραγωγή 18,9 g/L ηλεκτρικού οξέος με απόδοση 0,38 g/g.

Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν τη θέση ότι η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από *Y. lipolytica* σε pH <6 απαιτεί είτε φυσική προσαρμογή μέσω ALE είτε γενετική τροποποίηση του στελέχους, ώστε να αποκτήσει αντοχή σε όξινες συνθήκες. Η βελτίωση της έκφρασης συστημάτων

μεταφοράς, ενζύμων ανθεκτικών στο pH, ή η χρήση τεχνολογιών ελεγχόμενης σταδιακής οξίνισης μπορούν να ενισχύσουν τη βιωσιμότητα της παραγωγικής διαδικασίας.

Συνολικά, η εργασία καταδεικνύει την ανάγκη για στρατηγική ενίσχυση της αντοχής σε όξινες συνθήκες του μικροοργανισμού ώστε να καταστεί ανταγωνιστικός για βιομηχανική εφαρμογή παραγωγής ηλεκτρικού οξέος, καθώς και τη σημασία του κατάλληλου σχεδιασμού και ελέγχου των πειραματικών συνθηκών για την αξιολόγηση μεταβολικής απόδοσης.

5 Βιβλιογραφία

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2018. Solid waste issue: Sources, composition, disposal, recycling, and valorization. Egypt. J. Pet. 27, 1275–1290. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2018.07.003>
- Ahn, J.H., Jang, Y.-S., Lee, S.Y., 2016a. Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms. Curr. Opin. Biotechnol., Chemical biotechnology • Pharmaceutical biotechnology 42, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.034>
- Ahn, J.H., Jang, Y.-S., Lee, S.Y., 2016b. Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms. Curr. Opin. Biotechnol., Chemical biotechnology • Pharmaceutical biotechnology 42, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.034>
- Al Hosni, A.S., Pittman, J.K., Robson, G.D., 2019. Microbial degradation of four biodegradable polymers in soil and compost demonstrating polycaprolactone as an ideal compostable plastic. Waste Manag. 97, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.07.042>
- Aliotta, L., Seggiani, M., Lazzeri, A., Gigante, V., Cinelli, P., 2022. A Brief Review of Poly (Butylene Succinate) (PBS) and Its Main Copolymers: Synthesis, Blends, Composites, Biodegradability, and Applications. Polymers 14, 844. <https://doi.org/10.3390/polym14040844>
- AL-Oqla, F., Omari, M., 2017. Sustainable Biocomposites: Challenges, Potential and Barriers for Development, in: Green Energy and Technology. pp. 13–29. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46610-1_2
- Bankar, A.V., Kumar, A.R., Zinjarde, S.S., 2009. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84, 847–865. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2156-8>
- Barth, G., Gaillardin, C., 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiol. Rev. 19, 219–237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>
- Beal, J., Haddock-Angelli, T., Baldwin, G., Gershater, M., Dwijayanti, A., Storch, M., de Mora, K., Lizarazo, M., Rettberg, R., with the iGEM Interlab Study Contributors, 2018. Quantification of bacterial fluorescence using independent calibrants. PloS One 13, e0199432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199432>
- Bellou, S., Makri, A., Triantaphyllidou, I.-E., Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2014. Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the

- dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiol. Read. Engl.* 160, 807–817. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074302-0>
- Berg, J., Gatto, G., Hines, J., Heller, J., 2023. *Biochemistry*, Tenth edition. ed. Macmillan Learning, New York.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. *Biochemistry*, 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Besson, M., Gallezot, P., Pinel, C., 2014. Conversion of biomass into chemicals over metal catalysts. *Chem. Rev.* 114, 1827–1870. <https://doi.org/10.1021/cr4002269>
- Bromig, L., Weuster-Botz, D., 2023. Accelerated Adaptive Laboratory Evolution by Automated Repeated Batch Processes in Parallelized Bioreactors. *Microorganisms* 11, 275. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020275>
- Chatterjee, R., Millard, C.S., Champion, K., Clark, D.P., Donnelly, M.I., 2001. Mutation of the *ptsG* Gene Results in Increased Production of Succinate in Fermentation of Glucose by *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 148–154. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.148-154.2001>
- Chen, X., Zhou, Y., Zhang, D., 2018. Engineering *Corynebacterium crenatum* for enhancing succinic acid production. *J. Food Biochem.* 42, e12645. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12645>
- Cheng, K.-K., Wang, G.-Y., Zeng, J., Zhang, J.-A., 2013. Improved Succinate Production by Metabolic Engineering. *BioMed Res. Int.* 2013, 538790. <https://doi.org/10.1155/2013/538790>
- Coutinho, D.F., Pashkuleva, I.H., Alves, C.M., Marques, A.P., Neves, N.M., Reis, R.L., 2008. The Effect of Chitosan on the In Vitro Biological Performance of Chitosan–Poly(butylene succinate) Blends. *Biomacromolecules* 9, 1139–1145. <https://doi.org/10.1021/bm701268s>
- Cui, Z., Gao, C., Li, J., Hou, J., Lin, C.S.K., Qi, Q., 2017. Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH. *Metab. Eng.* 42, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.06.007>
- Cui, Z., Zhong, Y., Sun, Z., Jiang, Z., Deng, J., Wang, Q., Nielsen, J., Hou, J., Qi, Q., 2023. Reconfiguration of the reductive TCA cycle enables high-level succinic acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Nat. Commun.* 14, 8480. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44245-4>
- Dessie, W., Xin, F., Zhang, W., Jiang, Y., Wu, H., Ma, J., Jiang, M., 2018. Opportunities, challenges, and future perspectives of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 9893–9910. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9379-5>
- Fabbri, M., Gigli, M., Costa, M., Govoni, M., Seri, P., Lotti, N., Giordano, E., Munari, A., Gamberini, R., Rimini, B., Neretti, G., Cristofolini, A., Borghi, C.A., 2015. The effect of plasma surface modification on the biodegradation rate and biocompatibility of a poly(butylene succinate)-based copolymer. *Polym. Degrad. Stab.* 121, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.09.015>
- Ferone, M., Raganati, F., Olivieri, G., Marzocchella, A., 2019. Bioreactors for succinic acid production processes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 39, 571–586. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1592105>

- Fleck, C.B., Brock, M., 2009. Re-characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* Ach1p: Fungal CoA-transferases are involved in acetic acid detoxification. *Fungal Genet. Biol.* 46, 473–485. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.03.004>
- Fumagalli, C., Updated by Staff, 2006. Succinic Acid and Succinic Anhydride, in: Kirk-Othmer (Ed.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471238961.1921030306211301.a01.pub2>
- Gao, C., Yang, X., Wang, H., Rivero, C.P., Li, C., Cui, Z., Qi, Q., Lin, C.S.K., 2016. Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Biofuels* 9, 179. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0597-8>
- Gong, F., Cai, Z., Li, Y., 2016. Synthetic biology for CO₂ fixation. *Sci. China Life Sci.* 59, 1106–1114. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0304-2>
- Gonzales, T.A., Carvalho Silvello, M.A. de, Duarte, E.R., Santos, L.O., Alegre, R.M., Goldbeck, R., 2020. Optimization of anaerobic fermentation of *Actinobacillus succinogenes* for increase the succinic acid production. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 27, 101718. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101718>
- Gresham, D., Dunham, M.J., 2014. The enduring utility of continuous culturing in experimental evolution. *Genomics, Experimental evolution and the use of genomics* 104, 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.09.015>
- Heard, G.M., Fleet, G.H., 1999. *CANDIDA | Yarrowia (Candida) lipolytica*, in: Robinson, R.K. (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, Oxford, pp. 360–365. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0285>
- Hemansi, null, Himanshu, null, Patel, A.K., Saini, J.K., Singhania, R.R., 2022. Development of multiple inhibitor tolerant yeast via adaptive laboratory evolution for sustainable bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 344, 126247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126247>
- Herter, S., Farfsing, J., Gad'On, N., Rieder, C., Eisenreich, W., Bacher, A., Fuchs, G., 2001. Autotrophic CO₂ Fixation by *Chloroflexus aurantiacus*: Study of Glyoxylate Formation and Assimilation via the 3-Hydroxypropionate Cycle. *J. Bacteriol.* 183, 4305–4316. <https://doi.org/10.1128/jb.183.14.4305-4316.2001>
- Holyoak, T., Sullivan, S.M., Nowak, T., 2006. Structural Insights into the Mechanism of PEPCK Catalysis,. *Biochemistry* 45, 8254–8263. <https://doi.org/10.1021/bi060269g>
- Janausch, I., Kim, O., Uden, G., 2001. DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli* : contribution of diffusion and of alternative carriers. *Arch. Microbiol.* 176, 224–230. <https://doi.org/10.1007/s002030100317>
- Jiang, M., Ma, J., Wu, M., Liu, R., Liang, L., Xin, F., Zhang, W., Jia, H., Dong, W., 2017. Progress of succinic acid production from renewable resources: Metabolic and fermentative strategies. *Bioresour. Technol., SI on Advances in Industrial Bioprocesses and Products- Genetic and Metabolic Engineering Interventions* 245, 1710–1717. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.209>
- Jost, B., Holz, M., Aurich, A., Barth, G., Bley, T., Müller, R.A., 2015. The influence of oxygen limitation for the production of succinic acid with recombinant strains of *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1675–1686. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6252-z>
- Kai, Y., Matsumura, H., Inoue, T., Terada, K., Nagara, Y., Yoshinaga, T., Kihara, A., Tsumura, K., Izui, K., 1999. Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: A

- proposed mechanism for allosteric inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 823–828.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.823>
- Kanemura, C., Nakashima, S., Hotta, A., 2012. Mechanical properties and chemical structures of biodegradable poly(butylene-succinate) for material reprocessing. *Polym. Degrad. Stab.* 97, 972–980. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.03.015>
- Keseler, I.M., Collado-Vides, J., Santos-Zavaleta, A., Peralta-Gil, M., Gama-Castro, S., Muniz-Rascado, L., Bonavides-Martinez, C., Paley, S., Krummenacker, M., Altman, T., Kaipa, P., Spaulding, A., Pacheco, J., Latendresse, M., Fulcher, C., Sarker, M., Shearer, A.G., Mackie, A., Paulsen, I., Gunsalus, R.P., Karp, P.D., 2011. EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Res.* 39, D583–D590.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq1143>
- Kreger-van Rij, N.J., Veenhuis, M., 1973. Electron microscopy of septa in ascomycetous yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 39, 481–490. <https://doi.org/10.1007/BF02578891>
- Kurokawa, N., Kimura, S., Hotta, A., 2018. Mechanical properties of poly(butylene succinate) composites with aligned cellulose-acetate nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* 135, 45429. <https://doi.org/10.1002/app.45429>
- Lazar, Z., Rossignol, T., Verbeke, J., Crutz-Le Coq, A.-M., Nicaud, J.-M., Robak, M., 2013. Optimized invertase expression and secretion cassette for improving *Yarrowia lipolytica* growth on sucrose for industrial applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 1273–1283. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1323-1>
- Lear, G., Kingsbury, J.M., Franchini, S., Gambarini, V., Maday, S.D.M., Wallbank, J.A., Weaver, L., Pantos, O., 2021. Plastics and the microbiome: impacts and solutions. *Environ. Microbiome* 16, 2. <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00371-w>
- Ledesma-Amaro, R., Nicaud, J.-M., 2016. Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*. *Trends Biotechnol.* 34, 798–809.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.010>
- Lee, S., Kim, P., 2020. Current Status and Applications of Adaptive Laboratory Evolution in Industrial Microorganisms. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 793–803.
<https://doi.org/10.4014/jmb.2003.03072>
- Lee, S.Y., Park, S.H., Hong, S.H., Lee, Y., Lee, S.H., 2005. Fermentative Production of Building Blocks for Chemical Synthesis of Polyesters, in: *Biopolymers Online*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/3527600035.bpol3b10>
- Li, C., Gao, S., Li, X., Yang, X., Lin, C.S.K., 2018. Efficient metabolic evolution of engineered *Yarrowia lipolytica* for succinic acid production using a glucose-based medium in an in situ fibrous bioreactor under low-pH condition. *Biotechnol. Biofuels* 11, 236.
<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1233-6>
- Li, H., Alper, H.S., 2016. Enabling xylose utilization in *Yarrowia lipolytica* for lipid production. *Biotechnol. J.* 11, 1230–1240. <https://doi.org/10.1002/biot.201600210>
- Li, H., Chang, J., Cao, A., Wang, J., 2005. in vitro Evaluation of Biodegradable Poly(butylene succinate) as a Novel Biomaterial. *Macromol. Biosci.* 5, 433–440.
<https://doi.org/10.1002/mabi.200400183>
- Lin, H., Bennett, G.N., San, K.-Y., 2005. Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 148–156. <https://doi.org/10.1002/bit.20298>

- Liu, H., Kang, J., Qi, Q., Chen, G., 2011. Production of lactate in *Escherichia coli* by redox regulation genetically and physiologically. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 162–169. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9123-9>
- Liu, X., Feng, X., Ding, Y., Gao, W., Xian, M., Wang, J., Zhao, G., 2020. Characterization and directed evolution of propionyl-CoA carboxylase and its application in succinate biosynthetic pathway with two CO₂ fixation reactions. *Metab. Eng.* 62, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.08.012>
- Liu, X., Zhao, G., Sun, S., Fan, C., Feng, X., Xiong, P., 2022. Biosynthetic Pathway and Metabolic Engineering of Succinic Acid. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10, 843887. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.843887>
- Loewe, L., Hill, W.G., 2010. The population genetics of mutations: good, bad and indifferent. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 1153–1167. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0317>
- Lorenci Woiciechowski, A., Dalmas Neto, C.J., Porto de Souza Vandenberghe, L., de Carvalho Neto, D.P., Novak Sydney, A.C., Letti, L.A.J., Karp, S.G., Zevallos Torres, L.A., Soccol, C.R., 2020. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. *Bioresour. Technol.* 304, 122848. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848>
- Mancini, E., Mansouri, S.S., Gernaey, K.V., Luo, J., Pinelo, M., 2020. From second generation feed-stocks to innovative fermentation and downstream techniques for succinic acid production. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 50, 1829–1873. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1670530>
- Menendez, C., Bauer, Z., Huber, H., Gad'on, N., Stetter, K.-O., Fuchs, G., 1999. Presence of Acetyl Coenzyme A (CoA) Carboxylase and Propionyl-CoA Carboxylase in Autotrophic Crenarchaeota and Indication for Operation of a 3-Hydroxypropionate Cycle in Autotrophic Carbon Fixation. *J. Bacteriol.* 181, 1088–1098. <https://doi.org/10.1128/jb.181.4.1088-1098.1999>
- Millard, C.S., Chao, Y.P., Liao, J.C., Donnelly, M.I., 1996a. Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1808–1810. <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1808-1810.1996>
- Millard, C.S., Chao, Y.P., Liao, J.C., Donnelly, M.I., 1996b. Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1808–1810.
- Minárik, P., Tomášková, N., Kollárová, M., Antalík, M., 2002. Malate dehydrogenases--structure and function. *Gen. Physiol. Biophys.* 21, 257–265.
- Modak, H.V., Kelly, D.J., 1995. Acetyl-CoA-dependent pyruvate carboxylase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*: rapid and efficient purification using dye-ligand affinity chromatography. *Microbiology* 141, 2619–2628. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-10-2619>
- Moreno, A.D., Carbone, A., Pavone, R., Olsson, L., Geijer, C., 2019. Evolutionary engineered *Candida intermedia* exhibits improved xylose utilization and robustness to lignocellulose-derived inhibitors and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 1405–1416. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9528-x>
- Moya, D., Aldás, C., López, G., Kaparaju, P., 2017. Municipal solid waste as a valuable renewable energy resource: a worldwide opportunity of energy recovery by using Waste-To-Energy Technologies. *Energy Procedia, Sustainability in Energy and Buildings 2017*:

- Proceedings of the Ninth KES International Conference, Chania, Greece, 5-7 July 2017 134, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.09.618>
- Muthuraj, R., Misra, M., Mohanty, A.K., 2014. Biodegradable Poly(butylene succinate) and Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends: Reactive Extrusion and Performance Evaluation. *J. Polym. Environ.* 22, 336–349. <https://doi.org/10.1007/s10924-013-0636-5>
- Myers, J.A., Curtis, B.S., Curtis, W.R., 2013. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophys.* 6, 4. <https://doi.org/10.1186/2046-1682-6-4>
- Negrin, M., Macerata, E., Consolati, G., Quasso, F., Genovese, L., Soccio, M., Giola, M., Lotti, N., Munari, A., Mariani, M., 2018. Gamma radiation effects on random copolymers based on poly(butylene succinate) for packaging applications. *Radiat. Phys. Chem., Ionizing Radiations and Polymers, IRaP-2016* 142, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2017.05.011>
- Nicaud, J.-M., 2012. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast Chichester Engl.* 29, 409–418. <https://doi.org/10.1002/yea.2921>
- Niedźwiecka, N., Skorkowski, E.F., 2013. Purification and properties of malic enzyme from herring *Clupea harengus* spermatozoa. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 164, 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.01.001>
- Niehus, X., Crutz-Le Coq, A.-M., Sandoval, G., Nicaud, J.-M., Ledesma-Amaro, R., 2018. Engineering *Yarrowia lipolytica* to enhance lipid production from lignocellulosic materials. *Biotechnol. Biofuels* 11, 11. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1010-6>
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G., 2006. Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Microbiol.* 52, 134–142. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0223-7>
- Pateraki, C., Patsalou, M., Vlysidis, A., Kopsahelis, N., Webb, C., Koutinas, A.A., Koutinas, M., 2016. *Actinobacillus succinogenes*: Advances on succinic acid production and prospects for development of integrated biorefineries. *Biochem. Eng. J.* 112, 285–303. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.005>
- Perera, F., 2018. Pollution from Fossil-Fuel Combustion is the Leading Environmental Threat to Global Pediatric Health and Equity: Solutions Exist. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 15, 16. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010016>
- Pinazo, J., Dómine, M., Parvulescu, V.I., Filip, P., 2015. Sustainability metrics for succinic acid production: A comparison between biomass-based and petrochemical routes. *Catal. Today* 239, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.05.035>
- Quintavalla, S., Vicini, L., 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci.* 62, 373–380. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00121-3)
- Raab, A.M., Lang, C., 2011. Oxidative versus reductive succinic acid production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioeng. Bugs* 2, 120–123. <https://doi.org/10.4161/bbug.2.2.14549>
- Raj, T., Chandrasekhar, K., Naresh Kumar, A., Rajesh Banu, J., Yoon, J.-J., Kant Bhatia, S., Yang, Y.-H., Varjani, S., Kim, S.-H., 2022. Recent advances in commercial biorefineries for lignocellulosic ethanol production: Current status, challenges and future perspectives. *Bioresour. Technol.* 344, 126292. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126292>
- Rajendran, N., Gurunathan, B., Han, J., Krishna, S., Ananth, A., Venugopal, K., Sherly Priyanka, R.B., 2021. Recent advances in valorization of organic municipal waste into energy using

- biorefinery approach, environment and economic analysis. *Bioresour. Technol.* 337, 125498. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125498>
- Rodriguez, C., Domínguez, A., 1984. The growth characteristics of *Saccharomycopsis lipolytica*: morphology and induction of mycelium formation. *Can. J. Microbiol.* 30, 605–612. <https://doi.org/10.1139/m84-090>
- Rodriguez, G.M., Hussain, M.S., Gambill, L., Gao, D., Yaguchi, A., Blenner, M., 2016. Engineering xylose utilization in *Yarrowia lipolytica* by understanding its cryptic xylose pathway. *Biotechnol. Biofuels* 9, 149. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0562-6>
- Ryu, S., Hipp, J., Trinh, C.T., 2016. Activating and Elucidating Metabolism of Complex Sugars in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1334–1345. <https://doi.org/10.1128/AEM.03582-15>
- Sandberg, T.E., Salazar, M.J., Weng, L.L., Palsson, B.O., Feist, A.M., 2019. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metab. Eng.* 56, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.08.004>
- Singh, A., Lynch, M.D., Gill, R.T., 2009. Genes restoring redox balance in fermentation-deficient *E. coli* NZN111. *Metab. Eng.* 11, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.07.002>
- Srinivasa Gopalan, R., Kumaradhas, P., Kulkarni, G.U., Rao, C.N.R., 2000. An experimental charge density study of aliphatic dicarboxylic acids. *J. Mol. Struct.* 521, 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(99\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(99)00293-8)
- Starai, V.J., Gardner, J.G., Escalante-Semerena, J.C., 2005. Residue Leu-641 of Acetyl-CoA Synthetase is Critical for the Acetylation of Residue Lys-609 by the Protein Acetyltransferase Enzyme of *Salmonella enterica**. *J. Biol. Chem.* 280, 26200–26205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504863200>
- Stevenson, K., McVey, A.F., Clark, I.B.N., Swain, P.S., Pilizota, T., 2016. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Sci. Rep.* 6, 38828. <https://doi.org/10.1038/srep38828>
- Stols, L., Donnelly, M.I., 1997. Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2695–2701.
- Tokiwa, Y., Calabia, B.P., Ugwu, C.U., Aiba, S., 2009. Biodegradability of plastics. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3722–3742. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>
- Uesaka, T., Nakane, K., Maeda, S., Ogihara, T., Ogata, N., 2000. Structure and physical properties of poly(butylene succinate)/cellulose acetate blends. *Polymer* 41, 8449–8454. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00206-8)
- Urbanek, A.K., Rymowicz, W., Mirończuk, A.M., 2018. Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7669–7678. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9195-y>
- Vadali, R.V., Horton, C.E., Rudolph, F.B., Bennett, G.N., San, K.-Y., 2004. Production of isoamyl acetate in *ackA-pta* and/or *ldh* mutants of *Escherichia coli* with overexpression of yeast ATF2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 698–704. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1452-y>
- van der Walt, J.P., von Arx, J.A., 1980. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 46, 517–521. <https://doi.org/10.1007/BF00394008>
- Van der Werf, M.J., Guettler, M.V., Jain, M.K., Zeikus, J.G., 1997. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate

- fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Arch. Microbiol.* 167, 332–342.
<https://doi.org/10.1007/s002030050452>
- Vaswani, S., n.d. Bio-Based Succinic Acid.
- Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., Altman, E., 2002. Effects of Growth Mode and Pyruvate Carboxylase on Succinic Acid Production by Metabolically Engineered Strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1715–1727.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1715-1727.2002>
- Wade, L.G., Simek, J.W., 2017. Organic chemistry, Ninth edition. ed. Pearson, Glenview, IL.
- Wang, H., Ji, J., Zhang, W., Zhang, Y., Jiang, J., Wu, Z., Pu, S., Chu, P.K., 2009. Biocompatibility and bioactivity of plasma-treated biodegradable poly(butylene succinate). *Acta Biomater.* 5, 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.017>
- Wang, J., Ledesma-Amaro, R., Wei, Y., Ji, B., Ji, X.-J., 2020. Metabolic engineering for increased lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* – A Review. *Bioresour. Technol.* 313, 123707. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123707>
- Wang, W., Li, Z., Xie, J., Ye, Q., 2009. Production of succinate by a pflB ldhA double mutant of *Escherichia coli* overexpressing malate dehydrogenase. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32, 737–745. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0298-9>
- Workman, M., Holt, P., Thykaer, J., 2013. Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *AMB Express* 3, 58. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-58>
- Xu, J., Guo, B., 2009. Microbial Succinic Acid, Its Polymer Poly(butylene succinate), and Applications, in: *Microbiol. Monogr.* pp. 347–388. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_14
- Yan, D., Wang, C., Zhou, J., Liu, Y., Yang, M., Xing, J., 2014. Construction of reductive pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for effective succinic acid fermentation at low pH value. *Bioresour. Technol.* 156, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.053>
- Yang, X., Wang, H., Li, C., Lin, C.S.K., 2017. Restoring of Glucose Metabolism of Engineered *Yarrowia lipolytica* for Succinic Acid Production via a Simple and Efficient Adaptive Evolution Strategy. *J. Agric. Food Chem.* 65, 4133–4139.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00519>
- Yuzbashev, T.V., Yuzbasheva, E.Y., Sobolevskaya, T.I., Laptev, I.A., Vybornaya, T.V., Larina, A.S., Matsui, K., Fukui, K., Sineoky, S.P., 2010. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Bioeng.* 107, 673–682. <https://doi.org/10.1002/bit.22859>
- Zeikus, J., Jain, M., Elankovan, P., 1999. Biotechnology of Succinic Acid Production and Markets for Derived Industrial Products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 545–552.
<https://doi.org/10.1007/s002530051431>
- Zeikus, J.G., Jain, M.K., Elankovan, P., 1999. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 545–552.
<https://doi.org/10.1007/s002530051431>
- Zhang, X., Wang, X., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., 2011. L-malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 427–434.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01971-10>
- Zhou, S., Causey, T.B., Hasona, A., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., 2003. Production of Optically Pure d-Lactic Acid in Mineral Salts Medium by Metabolically Engineered

Escherichia coli W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 399–407.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.399-407.2003>