

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &**  
**ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:  
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω ζυμώσεων και μελέτη ηλεκτροχημικών διεργασιών στο μεταβολισμό του βακτηρίου *Actinobacillus succinogenes* μέσω μεταγραφομικής ανάλυσης.

**Ελένη Κ. Μαγδαληνού**

Επιβλέπων καθηγητής:

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα

2020

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

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω ζυμώσεων και μελέτη ηλεκτροχημικών διεργασιών στο μεταβολισμό του βακτηρίου *Actinobacillus succinogenes* μέσω μεταγραφομικής ανάλυσης

Succinic acid production via fermentation and effect of electrochemical application on *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways through transcriptomic analysis

**Ελένη Κ. Μαγδαληνού**

Εξεταστική επιτροπή:

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

## **Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω ζυμώσεων και μελέτη ηλεκτροχημικών διεργασιών στο μεταβολισμό του βακτηρίου *Actinobacillus succinogenes* μέσω μεταγραφομικής ανάλυσης**

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Το ηλεκτρικό ή (IUPAC) είναι ένα γραμμικό, δικαρβοξυλικό οξύ, το οποίο παραδοσιακά αποτελεί πετροχημικό προϊόν που προέρχεται από το βουτάνιο, ενώ συγκαταλέγεται στα δέκα κορυφαία χημικά παραγωγής βιοδιυλιστηρίων από τα οποία μπορεί να προκύψει πλήθος άλλων απλών ή σύνθετων ενώσεων. Η παρούσα εργασία στοχεύει στη βιοτεχνολογική παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος μέσω ζύμωσης με το βακτήριο *Actinobacillus succinogenes*, μέσω του αναγωγικού κύκλου του Krebs.

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη εξετάστηκε η επίδραση του  $MgCO_3$  και του ηλεκτρικού ρεύματος στο μεταβολισμό του βακτηρίου *A. succinogenes*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σειρά ζυμώσεων για την αξιολόγηση της παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και παραπροϊόντων. Οι ζυμώσεις αυτές ήταν ασυνεχείς και ημισυνεχείς με προσθήκη  $MgCO_3$ , αλλά και ημισυνεχείς με προσθήκη  $MgCO_3$  και παροχή ρεύματος.

Κατά την εκθετική φάση των ημισυνεχών ζυμώσεων συλλέχθηκαν δείγματα για απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA τα οποία αξιοποιήθηκαν στη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR). Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα γονίδια του κωδικοποιούν για τα ένζυμα που παίρνουν μέρος στις μεταβολικές αντιδράσεις του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA cycle), αυτά τις οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και ορισμένα που κωδικοποιούν για διαμεμβρανικούς μεταφορείς. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων ενδιαφέροντος υπολογίστηκαν με βάση τη συγκριτική μέθοδο Ct (ή  $\Delta Ct$ ) και εκφράστηκαν ως λόγος HK γονιδίων προς το γονίδιο ενδιαφέροντος.

Οι ζυμώσεις στις οποίες το βακτηριακό στέλεχος *A. succinogenes* 130Z (DSM 22257) αναπτύχθηκε υπό την παροχή ηλεκτρικής ενέργειας στο υγρό θρεπτικό μέσο της ζύμωσης (E) είχαν την υψηλότερη τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος, 36,4 g/L, έναντι 33,94 g/L όταν δε χρησιμοποιήθηκε το ρεύμα (G+). Τόσο η μεμονωμένη προσθήκη  $MgCO_3$  όσο και η μεμονωμένη παροχή ηλεκτρικής ενέργειας στο υγρό θρεπτικό μέσο της ζύμωσης βελτίωσαν την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος. Η συνεργιστική τους δράση δε φαίνεται να διαφοροποιεί τα τελικά αποτελέσματα. Στις ασυνεχείς ζυμώσεις, η τελική συγκέντρωση του

ηλεκτρικού οξέος ήταν 19,96 g/L. Τα αποτελέσματα των ασυνεχών ζυμώσεων συγκρίθηκαν με ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες και με ίδιες αρχικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα, αζώτου και αλάτων, αλλά χωρίς την προσθήκη  $MgCO_3$  (G+). Η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος ήταν μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιήθηκε το  $MgCO_3$  και ο χρόνος που διήρκεσε η ζύμωση μικρότερος, με αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγικότητα (0,5 g/L·h).

Σε γονιδιακό επίπεδο, η σύγκριση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων στους χειρισμούς G- και G+ φανέρωσε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των γονιδίων *pk*, *pdh E2*, *ak*, *atp F1a*, *atp F1b*, *atp F1g*. Τα προαναφερθέντα, πλην του *atp F1b* και με την προσθήκη του *cyd I*, ήταν τα γονίδια που είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των χειρισμών G- και E. Με εξαίρεση το γονίδιο *pk*, που ήταν υπερεκφρασμένο στο χειρισμό G+ και υποεκφρασμένο στον χειρισμό E έναντι του G-, η σχετική έκφραση των υπολοίπων γονιδίων μειώθηκε τόσο στο G+ όσο και στο E. Ωστόσο, η συνεργιστική δράση του ηλεκτρικού ρεύματος και του  $MgCO_3$  δε φαίνεται να διαφοροποιεί αρκετά τα τελικά αποτελέσματα από εκείνα που ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο το  $MgCO_3$ .

**Επιστημονική περιοχή:** Βιομηχανική Βιοτεχνολογία

**Λέξεις κλειδιά:** ηλεκτρικό οξύ, μικροβιακές ζυμώσεις, *Actinobacillus succinogenes*, μεταγραφομική ανάλυση, ηλεκτροχημικές διεργασίες

***Succinic acid production via fermentation and effect of electrochemical application on *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways through transcriptomic analysis***

Department of Food Science and Human Nutrition  
Laboratory of Food Process Engineering

**ABSTRACT**

Succinic acid or 1,4-butanedioic acid (IUPAC) is a linear, saturated, dicarboxylic acid, deriving from butane when it is produced by the petrochemical industry. It is also one of the top ten biorefinery chemicals from which many other chemicals can be produced. In this work, succinic acid was produced via microbial fermentations, through the reverse Krebs cycle, utilizing the bacterium *Actinobacillus succinogenes*.

In this study, the effect of  $MgCO_3$  and electricity on the metabolism of *A. succinogenes* were investigated. Initially, a series of fermentations were performed to evaluate the succinic acid and by-product production. These were batch and fed-batch fermentations with the addition of  $MgCO_3$ , while in the case of fed-batch fermentations both  $MgCO_3$  was added and electricity was supplied.

Samples for RNA isolation and cDNA synthesis were collected during the exponential phase of the fed-batch fermentations and they were used in the real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) method. In particular, genes encoding for enzymes involved in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, oxidative phosphorylation and some transporters in particular, have been studied. The relative expression levels of the genes of interest were calculated based on the comparative Ct (or  $\Delta Ct$ ) method and they were expressed as the ratio of the HK genes to the gene of interest.

When *A. succinogenes* 130Z (DSM 22257) fermentations were carried out with the supply of electrons (E), the highest final succinic acid concentration of 36,4 g/L was obtained, while 33,94 g/L succinic acid was produced when no electricity (G+) was used. The individual addition of  $MgCO_3$  or the supply of electrons to the fermentation broth improved succinic acid production. Their joined effect does not seem to significantly differentiate the final results. In batch fermentations, the final concentration of succinic acid was 19,96 g/L. The results of batch fermentations were compared with fermentations carried out under the same conditions and the same initial concentrations of carbon, nitrogen and salts, but without the addition of  $MgCO_3$  (G+). The production of succinic acid was higher

when  $\text{MgCO}_3$  was used and the fermentation duration was shorter, resulting in increased productivity (0,50 g/L·h).

Regarding the transcriptomic analysis, the comparison of the relative expression of the genes in the G- and G+ treatments revealed a statistically significant difference in *pk*, *pdhE2*, *ak*, *atpF1a*, *atpF1b*, *atpF1g*. The previously mentioned genes, with the exception of *atpF1b* and the addition of *cyd I*, had a statistically significant difference between the G- and E treatments. Excluding the *pk* gene, which was overexpressed in G+ treatment and underexpressed in E versus G- treatment, the relative expression of the remaining genes decreased in both G+ and E treatments. The joined effect of electricity and  $\text{MgCO}_3$  does not seem to significantly differentiate the final results when compared with the effect incurred via solely  $\text{MgCO}_3$  addition.

**Scientific area:** Industrial Biotechnology

**Key words:** succinic acid, microbial fermentations, *Actinobacillus succinogenes*, transcriptomics, electrochemical processes

Στην αδελφή μου, Κατερίνα

## Ευχαριστίες

Κλείνοντας το μεταπτυχιακό κύκλο σπουδών μου, με την ολοκλήρωση τούτης της ερευνητικής μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με τον έναν ή τον άλλο τρόπο συνέβαλαν στην ομαλή διεξαγωγή της παρούσας εργασίας . Πρώτα ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή Κουτίνα Απόστολο, που με επέλεξε για να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου μελέτη. Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον καθηγητή Παπανικολάου Σεραφείμ και τον αναπληρωτή καθηγητή Φλεμετάκη Εμμανουήλ για την ανάθεση της παρούσας εργασίας. Θερμά ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθεια της, αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την μεταδιδασκτορική ερευνήτρια Πατεράκη Χρυσάνθη, που με συμβούλεψε και με καθοδήγησε με μεγάλη προθυμία κάθε φορά που τη χρειάστηκα. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω και την υποψήφια διδάκτορα Στυλιανού Ελένη για τη βοήθειά της, όποτε την είχα ανάγκη.

Για τη συνεργασία τους ευχαριστώ στο σύνολό τους τους ανθρώπους που συνυπήρχαμε καθημερινά στο εργαστήριο, προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές, διδάκτορες και μεταδιδασκτόρες. Ακόμη, ευχαριστώ την φίλη μου Βάσια Α., που ήταν συνοδοιπόρος μου σε αυτό το ταξίδι στο άγνωστο για εμάς Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών από τις πρώτες κιόλας μέρες φοίτησής μας. Για την παρέα τους, τη στήριξη και την υπομονή τους, ευχαριστώ από καρδιάς την Κατερίνα Ν., τη Χρυσάνθη Τ., την Ειρήνη Κ., τη Μαριάννα Σ. και τη Μίρβα Σ..

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στους γονείς μου που με στήριξαν οικονομικά και πίστεψαν στη δουλειά μου, χωρίς πάντοτε να καταλαβαίνουν τη φλυαρία μου για το μεταπτυχιακό και την ερευνητική μου μελέτη. Τέλος, δε μπορώ να μην ευχαριστήσω τους φίλους μου, εντός και εκτός Ελλάδας, που με υπομονή με στήριξαν, με ενθάρρυναν και υπέμειναν τη γκρίνια μου πολλές φορές τα τελευταία δύο χρόνια. Σας αγαπώ βαθιά.



# Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή.....	11
1.1 Βιοδιυλιστήριο και παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.....	11
1.1.1 Το βιοδιυλιστήριο.....	11
1.1.2 Το ηλεκτρικό οξύ, η αγορά και οι βιομηχανικές εφαρμογές του.....	12
1.2 Το βακτήριο <i>Actinobacillus succinogenes</i> .....	13
1.2.1 Οικογένεια <i>Pasteurellaceae</i> Pohl (1981) .....	13
1.2.2 <i>Actinobacillus succinogenes</i> Guettler et al. (1999).....	13
1.3 Μονοπάτια παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος στο μεταβολισμό του βακτηρίου <i>A. succinogenes</i> .....	15
1.4 Μικροβιακές ζυμώσεις για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από το βακτήριο <i>A. succinogenes</i> .....	17
1.4.1 Πηγές άνθρακα και μελέτες κινητικής παρεμπόδισης.....	17
1.4.2 Το $MgCO_3$ και το $CO_2$ .....	18
1.4.3 Ο ρόλος της αναγωγικής ενέργειας.....	18
1.5 Ηλεκτρική ενέργεια και μικροβιακές ζυμώσεις .....	20
1.6 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης.....	21
1.7 Σκοπός ερευνητικής εργασίας.....	22
2. Υλικά και μέθοδοι .....	23
2.1 Ανάπτυξη του μικροοργανισμού .....	23
2.2 Μικροβιακές ζυμώσεις για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.....	23
2.2.1 Ασυνεχείς ζυμώσεις σε φιάλες Duran.....	23
2.2.2 Ημισυνεχείς ζυμώσεις για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.....	23
2.2.3 Ημισυνεχείς ζυμώσεις για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με χρήση ηλεκτροδίων στο υγρό θρεπτικό μέσο της ζύμωσης .....	24
2.3 Χημικές μέθοδοι ανάλυσης.....	24
2.3.1 Προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας (OD).....	24
2.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρου και μεταβολικών προϊόντων της ζύμωσης.....	24
2.3.3. Προσδιορισμός του ολικού ξηρού βάρους (DCW) .....	25
2.3.4 Προσδιορισμός του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) .....	25
2.3.5 Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (IP).....	26
2.4 Μοριακές μέθοδοι ανάλυσης.....	27
2.4.1 Καθαρισμός των κυττάρων της ζύμωσης .....	27
2.4.2 Απομόνωση RNA.....	28
2.4.3 Σύνθεση του cDNA.....	29
2.4.4 RT-qPCR .....	29

3. Αποτελέσματα - Συζήτηση .....	32
3.1 Ζυμώσεις για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος .....	32
3.2 Μεταβολισμός του βακτηρίου <i>A. succinogenes</i> .....	41
3.2.1 Καρβοξυκινάση του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού οξέος (PEPCK).....	42
3.2.2 Μονοπάτι C4.....	43
3.2.3 Μονοπάτι C3.....	44
3.2.4 Αποκαρβοξυλάση του μηλικού οξέος (ME) και αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού οξέος (OADC) .....	48
3.2.5 Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	49
3.2.6 NADH regeneration .....	52
3.2.7 Διαμεμβρανικοί μεταφορείς: ABC, DCU, Asuc_1999.....	53
3.2.8 Ανθρακική ανυδράση.....	53
3.3 Κατεύθυνση της γονιδιακής έκφρασης .....	55
3.3.1 Επίδραση του MgCO <sub>3</sub> στην έκφραση των γονιδίων του βακτηρίου <i>A. succinogenes</i> ..	56
3.3.2 Επίδραση του ηλεκτρικού ρεύματος στην έκφραση των γονιδίων του βακτηρίου <i>A.succinogenes</i> .....	58
4. Συμπεράσματα και μελλοντικοί πειραματικοί στόχοι .....	63
5.Παράρτημα .....	64
5.1 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του RNA.....	64
5.1.1 Ποσοτικός προσδιορισμός .....	64
5.1.2 Ποιοτικός προσδιορισμός .....	64
5.2 Μέθοδος DNase .....	66
5.3 cDNA .....	67
5.4 RT-qPCR .....	67
5.5 Συντομογραφίες χημικών ενώσεων .....	68
Βιβλιογραφία .....	70

## **1.Εισαγωγή**

Δεδομένου ότι η παγκόσμια αγορά βασίζεται σε πεπερασμένα αποθέματα ορυκτού πλούτου (γαιάνθρακας, πετρέλαιο, φυσικό αέριο) για την παραγωγή ενέργειας, καυσίμων και χημικών, τα οποία μάλιστα αναμένεται να καταναλωθούν σε μεγάλο βαθμό έως το τέλος του αιώνα (Klass, 2003; Klass, 2004). Επομένως, η αξιοποίηση εναλλακτικών πηγών άνθρακα και ενέργειας καθίσταται αναγκαία. Για δεκαετίες η χρήση δημητριακών και άλλων γεωργικών προϊόντων, κυρίως για την παραγωγή ενέργειας αλλά και τροφίμων ή χημικών, με κύριες πρώτες ύλες το καλαμπόκι (Peckham, 2001) και το σακχαροκάλαμο (Martinelli et al., 2008), αναπτύσσεται και ευδοκμεί στις ΗΠΑ και τη Βραζιλία αντίστοιχα, ανταγωνιζόμενη τη βιομηχανία του πετρελαίου. Ταυτόχρονα όμως ο ανταγωνισμός της με τη βιομηχανία τροφίμων για καλλιεργήσιμες εκτάσεις την καθιστά μια μη βιώσιμη εναλλακτική λύση (Wise, 2014). Έτσι, η παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοχημικών ουσιών σήμερα αποσκοπεί στην εγκαθίδρυση μιας βιομηχανίας η οποία θα βασίζεται αποκλειστικά σε ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως οργανικά υπολείμματα ή απόβλητα και παράπλευρα ρεύματα βιομηχανιών, και ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, όπως η αιολική και η ηλιακή ενέργεια.

Από αξιολόγηση που έγινε από τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) προέκυψε ότι το σύνολο των αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων αγγίζει το 1/3 της παγκόσμιας παραγωγής. Αυτά τα απόβλητα μπορεί να προέρχονται από τα πρώτα στάδια παραγωγής, όπως κατά τη συγκομιδή φυτικών προϊόντων, ή από απορρίμματα χώρων εστίασης και καταναλωτών. Στην Ευρώπη αυτά τα απόβλητα φτάνουν τα 89 εκατομμύρια τόνους και στο τέλος του 2020 υπολογίζεται ότι θα έχουν ξεπεράσει τους 126 εκ. τόνους (Gustavsson et al., 2011).

### **1.1 Βιοδυλιστήριο και παραγωγή ηλεκτρικού οξέος**

#### **1.1.1 Το βιοδυλιστήριο**

Σύμφωνα με την έκθεση IEA Bioenergy Task 42 (Anonymous, 2007) μέσω του βιοδυλιστηρίου πραγματοποιείται βιώσιμη επεξεργασία βιομάζας για την παραγωγή ενός φάσματος προϊόντων ή/και ενέργειας. Ο Klass (2004) περιγράφει τη βιομάζα ως το σύνολο των μη προερχόμενων από το πετρέλαιο οργανικών πρώτων υλών. Έτσι, σε αυτήν μπορούν να συμπεριληφθούν τα μικτά οργανικά υπολείμματα, προερχόμενα από τη γεωργία, την δασοκομία, διάφορες βιομηχανίες, όπως τροφίμων και χαρτιού, τα νοικοκυριά (αστικά απόβλητα και λύματα) και τις υδατοκαλλιέργειες. Η επεξεργασία της βιομάζας γίνεται μέσω χημικών, θερμοχημικών, μηχανικών και βιοχημικών διαδικασιών. Όλες οι προαναφερθείσες πηγές αποτελούνται από απλές και σύνθετες οργανικές ενώσεις, όπως λιγνίνη, υδατάνθρακες

και τριακυλογλυκερόλες προς αξιοποίηση, και καθίστανται κατάλληλες για την παραγωγή βιοχημικών προϊόντων μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Όσον αφορά στα παραγόμενα προϊόντα, εκείνα με το υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο είναι τα βιοκαύσιμα (βιοαέριο, λιγνίνη, βιοαιθανόλη κ.α.), ενώ εκείνα που αξιοποιούνται για τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες είναι τα ενδιάμεσα και προστιθέμενης αξίας χημικά, τα πολυμερή και οι ρητίνες, οι ζωοτροφές, τα λιπάσματα και τα βιοϋλικά (Cherubini, 2010).

### 1.1.2 Το ηλεκτρικό οξύ, η αγορά και οι βιομηχανικές εφαρμογές του

Το ηλεκτρικό ή 1,4-βουτανιοδιοϊκό οξύ (IUPAC) είναι ένα γραμμικό, δικαρβοξυλικό οξύ με χημικό τύπο  $C_4H_6O_4$ . Έχει άχρωμη ή λευκή, κρυσταλλική μορφή (Anonymous, 1992) και είναι διαλυτό στο νερό, την αιθανόλη, την ακετόνη, τον αιθυλαιθέρα και τη μεθανόλη (Lide et al., 1994). Στην φύση αποτελεί κοινό μεταβολίτη φυτικών και ζωικών οργανισμών, μυκήτων αλλά και βακτηρίων, όντας μεταβολικό ενδιάμεσο του κύκλου του Krebs. Ορισμένοι μικροοργανισμοί, όπως τα βακτηριακά είδη *Actinobacillus succinogenes* (Guettler et al., 1999), *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Davis et al., 1976), *Mannheimia succiniciproducens* (Lee et al., 2002), *Ruminobacter amylophilus* (Stackebrandt et al., 1986), παλαιότερα δημοσιευμένο ως *Bacteroides amylophilus* (Caldwell et al., 1969), και *Basfia succiniciproducens* (Kuhnert et al., 2010) το παράγουν ως εξωκυτταρικό προϊόν.

Παραδοσιακά, το ηλεκτρικό οξύ παράγεται με χημικές διεργασίες. Αποτελεί πετροχημικό προϊόν το οποίο προέρχεται από το βουτάνιο, αλλά σύμφωνα με την αξιολόγηση των Bozell & Petersen (2010) συγκαταλέγεται στα δέκα κορυφαία χημικά παραγωγής βιοδιυλιστηρίων από τα οποία μπορεί να προκύψει πλήθος άλλων απλών ή σύνθετων ενώσεων. Πρέπει να σημειωθεί ότι πάνω από 250 χημικά προϊόντα παραγόμενα πετροχημικά μπορούν να αντικατασταθούν και να προέρχονται πλέον από το παραγόμενο μέσω ζυμώσεων ηλεκτρικό οξύ (Ahmed και Morris 1994).

Αναφορικά με τις βιομηχανικές εφαρμογές του, το ηλεκτρικό οξύ χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο, κυρίως ως βελτιωτικό γεύσης και ρυθμιστής οξύτητας με αντιμικροβιακή δράση. Στη φαρμακοβιομηχανία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή αντιβιοτικών, αμινοξέων και βιταμινών. Μεταξύ πλήθους άλλων εφαρμογών του συγκαταλέγεται η χρήση του ως επιφανειοδραστικός παράγοντας, διαλύτης, συστατικό βαφών και λιπαντικών, ενώ η δομή του επιτρέπει την παραγωγή 1,4-βουτανιοδιόλης, και από αυτήν τετραϋδροφουράνης, αδιπικού οξέος και γ-βουτυρολακτόνης (Zeikus et al., 1999; Song et al., 2006). Ακόμη, έχοντας ως υπόστρωμα το ηλεκτρικό οξύ μπορούν να παραχθούν βιοδιασπώμενα πολυμερή όπως ο πολύ-ηλεκτρικός βουτυλεστέρας (PBS) και πολυαμίδια

(Bechthold et al., 2008). Επίσης, να σημειωθεί ότι κατά την ζύμωση για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος παράγονται άλατα του ηλεκτρικού οξέος λόγω της ρύθμισης του pH με NaOH (Zeikus et al., 1999).

Το 2008, το εμπόριο ηλεκτρικού οξέος υπολογιζόταν στους 20-30 kt το χρόνο (Anonymous, 2008) και η τιμή του κυμαινόταν από 3 έως 9 \$/kg (Cok et al., 2014). Σύμφωνα με έκθεση του 2017, οι νέες τεχνολογίες στη βιομηχανία παραγωγής προϊόντων από το ηλεκτρικό οξύ υπολογίζεται ότι θα επιφέρουν αύξηση της παραγωγής αξίας 278,7 εκατομμύρια \$ (Anonymous, 2017). Να σημειωθεί ότι το παραγόμενο από μικροβιακές ζυμώσεις ηλεκτρικό οξύ μπορεί να πουληθεί σε τιμή 0,55-1,10 \$/kg (Paster et al., 2003).

## **1.2 Το βακτήριο *Actinobacillus succinogenes***

### **1.2.1 Οικογένεια *Pasteurellaceae* Pohl (1981)**

Το γένος *Actinobacillus* ανήκει στην οικογένεια *Pasteurellaceae* Pohl (1981) (Mutters et al., 1985), με την οποία σχετίζονται περισσότερα από 80 taxa (Dewhirst et al., 1993), ενώ μέχρι σήμερα φυλογενετικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι την απαρτίζουν 13 γένη (Korczak & Kuhnert, 2008). Το σύνολο των γενών της οικογένειας *Pasteurellaceae* είναι παρασιτικά βακτήρια που διαβιούν στους βλεννογόνους θηλαστικών και πουλιών, ενώ πολλά από αυτά αποτελούν δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς (Nicklas, 2007). Όσον αφορά τους φαινοτυπικούς τους χαρακτήρες, είναι Gram<sup>-</sup>, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια με μορφή κόκκων ή ράβδων συνήθους μεγέθους 0,3 x 0,3-2 μm, τα οποία δε σχηματίζουν ενδοσπόρια και παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη στους 37°C (Olsen et al., 2005). Όπως πλήθος Gram<sup>-</sup> βακτηρίων, αρκετά είδη, με κυριότερους αντιπροσώπους στα γένη *Actinobacillus*, *Mannheimia* και *Pasteurella* δυνητικά παράγουν τοξίνες τύπου RTX (Frey & Kuhnert, 2002), βακτηριακές κυτοτοξίνες και κυτολυσίνες (Strathdee and Lo, 1989).

### **1.2.2 *Actinobacillus succinogenes* Guettler et al. (1999)**

Το είδος *Actinobacillus succinogenes* απομονώθηκε από τη μεγάλη κοιλία βοοειδών και περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τους Guettler et al. (1999). Όπως αναφέρουν στη μελέτη του στελέχους *Actinobacillus succinogenes* 130Z<sup>T</sup>, είναι μη κινητό, χωρίς τη δυνατότητα παραγωγής ενδοσπορίων, πλειομορφικό, συχνότερα απαντώμενο με μορφή κόκκων ή ράβδων (0,8 x 1 μm), Gram<sup>-</sup>, χημειοργανότροφο, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο. Οι αποικίες του σε TSB agar είναι κυκλικές, φαιού γκρι χρώματος, με διάμετρο 1-1,5 mm (Εικόνα 1.1). Αποτελεί είδος μεσόφιλο, το οποίο αναπτύσσεται καλύτερα μεταξύ 37 και 39 °C. Αδυνατεί να αναπτυχθεί σε pH χαμηλότερο του 5,5, ενώ βέλτιστο αποτελεί το 6,7 (Liu et al., 2008). Όσον αφορά το μεταβολισμό του, το είδος *A. succinogenes* παράγει

ηλεκτρικό και οξικό οξύ, και σε μικρότερες ποσότητες μυρμηκικό, οξαλοξικό και πυροσταφυλικό οξύ, καθώς και αιθανόλη (Guettler et al., 1999). Να τονιστεί επίσης ότι το συγκεκριμένο είδος βακτηρίου στερείται παθογένειας και το γονιδίωμά του δεν κωδικοποιεί για RTX τοξίνες που απαντώνται σε άλλους αντιπροσώπους της οικογένειας *Pasteurellaceae* (McKinlay et al., 2010). Ακόμη, πρέπει να σημειωθεί ότι το βακτήριο *A. succinogenes* είναι αυξότροφο στα αμινοξέα κυστεΐνη, γλουταμινικό οξύ και μεθειονίνη (McKinlay et al., 2005).



**Εικόνα 1.1** Φωτογραφίες καλλιέργειας του βακτηρίου *A. succinogenes* σε τρυβλίο Petri. (Πηγή: BCRC Microbial barcoding database- <https://www.bcrc.firdi.org.tw>)

Η ανάπτυξη του έχει εξεταστεί σε πλήθος πηγών άνθρακα και βιομηχανικών αποβλήτων. Η προσθήκη ανθρακικού μαγνησίου ( $MgCO_3$ ) στις ζυμώσεις για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από το βακτήριο συμβάλει στον ακριβέστερο έλεγχο του διαλυτού  $CO_2$  και δεν επηρεάζει αισθητά το pH της ζύμωσης (Liu et al., 2008), ενώ φαίνεται να παίζει ρόλο στη διαμόρφωση των τελικών συγκεντρώσεων των προϊόντων (Zou et al., 2011; Van der Werf et al., 1997). Ο ρόλος της αναγωγικής ενέργειας έχει επίσης εξεταστεί με χρήση ανηγμένων πηγών άνθρακα (π.χ. γλυκερόλη) (Van der Werf et al., 1997; Li et al., 2010), αερίου  $H_2$  (Van der Werf et al., 1997), ηλεκτρικής ενέργειας και κάποιου μεταφορέα ηλεκτρονίων (Park & Zeikus, 1999; Park et al., 1999) ή ηλεκτροχημικής μεμβράνης (Zhao et al., 2016) και φαίνεται να συμβάλει στην αύξηση της τελικής παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος.



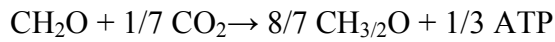
φωσφορικών πεντοζών (PPP), ενώ στερείται των ενζύμων του κύκλου του γλυοξυλικού και του μονοπατιού Entner-Doudoroff (McKinlay et al. 2007).

Η γλυκόλυση οδηγεί στο σχηματισμό του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού οξέος (PEP) το οποίο αποτελεί βασικό ενδιάμεσο του μεταβολισμού και διακλάδωση μεταξύ των μονοπατιών C3 και C4 (Werf et al. 1997) Από το C4 μονοπάτι παράγεται το ηλεκτρικό οξύ μέσω του αναγωγικού κύκλου του Krebs (reductive Krebs cycle), με το φουμαρικό οξύ να αποτελεί τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων για την παραγωγή του, με κατανάλωση 2 mol NADH και παραγωγή 2/3 mol ATP. Ο κύκλος του Krebs στο βακτήριο *A. succinogenes* δεν είναι πλήρης καθώς στερείται των ενζύμων ισοκιτρική αφυδρογονάση και κιτρική συνθάση (McKinlay et al., 2010). Να σημειωθεί εδώ ότι η αυξοτροφία στα αμινοξέα κυστεΐνη, γλουταμινικό οξύ και μεθειονίνη που προαναφέρθηκε εξηγείται από το γεγονός ότι το βακτήριο, λόγω της απουσίας των προαναφερθέντων ενζύμων, δε μπορεί να συνθέσει ακετογλουταρικό οξύ έχοντας ως υπόστρωμα τη γλυκόζη (McKinlay et al. 2005).

Από την άλλη το μονοπάτι C3 είναι εκείνο από το οποίο τελείται η παραγωγή των παραπροϊόντων, μυρμηκικό οξύ, οξικό οξύ και αιθανόλη. Όπως είναι φανερό (Εικόνα 1.2) τα δυο μονοπάτια επικοινωνούν μέσω δυο αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν τα ένζυμα αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού και αποκαρβοξυλάση του μηλικού οξέος (Werf et al. 1997). Από το C3 παράγεται το ακετύλο-CoA, που αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο του μεταβολισμού, όπως και 2 mol NADH, και 1 mol ATP. Σημειώνεται ότι ο σχηματισμός της αιθανόλης γίνεται σε δυο βήματα από 1 mol ακετύλο-CoA και με κατανάλωση 2 mol NADH. Ακόμη, η αποκαρβοξυλίωση του μηλικού οξέος προσφέρει 1 mol NADPH. Τα παραπάνω καταδεικνύουν την αξία του C3 μονοπατιού στην ανατροφοδότηση του μεταβολισμού με NAD(P)H και ATP (McKinlay et al., 2010). Τέλος, η γλυκονεογένεση στο μεταβολισμό του βακτηρίου *A. succinogenes* βασίζεται στο μηλικό και φουμαρικό οξύ και επιτελείται μέσω του ενζύμου φωσφοενολ-πυροσταφυλική καρβοξυκινάση (PEPCK), αφού το βακτήριο στερείται του ενζύμου συνθάση του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού οξέος (Werf et al. 1997; McKinlay et al., 2010). Το γονιδίωμά του έχει περιγραφεί από τους McKinlay et al. (2010) και είναι διαθέσιμο στο NCBI.

Πρέπει να αναφερθεί εδώ ότι για κάθε mol ηλεκτρικού οξέος απαιτούνται 0,5 mol γλυκόζης και 1 mol CO<sub>2</sub>, αλλά και 2 mol NADH που οξειδώνονται στο μονοπάτι C4. Έτσι, ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής απόδοσης παραγωγής ηλεκτρικού οξέος από τη γλυκόζη είναι 1,12 g/g και δίνεται από την παρακάτω αντίδραση (Pateraki et al., 2016b):





## 1.4 Μικροβιακές ζυμώσεις για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από το βακτήριο *A. succinogenes*

### 1.4.1 Πηγές άνθρακα και μελέτες κινητικής παρεμπόδισης

Η ανάπτυξη του βακτηρίου *A. succinogenes* έχει εξεταστεί σε πλήθος πηγών άνθρακα και αζώτου. Αναφορικά με τις πηγές άνθρακα που δύναται να καταναλώσει ο μικροοργανισμός, πρέπει να σημειωθεί ότι η αραβινόζη, η κελλοβιόζη, η φρουκτόζη, η γαλακτόζη, η γλυκόζη, η λακτόζη, η μαλτόζη, η μαννιτόλη, η σακχαρόζη, η ξυλόζη μαζί με πηγή αζώτου, εκχύλισμα ζύμης και corn steep liquor (CSL), έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του βακτηρίου και την παραγωγή οξέων (Guettler et al., 1999). Έχουν χρησιμοποιηθεί και πιο σύνθετες ακατέργαστες πηγές άνθρακα, όπως βλαστοί βαμβακιού και καλαμποκιού (Li et al., 2010), μελάσα σακχαροκάλαμου (Liu et al., 2008), υδρόλυμα άχυρου σίτου (Zheng et al., 2009), υδρολύματα προϊόντων άρτου και ζαχαροπλαστικής (Zheng et al., 2013), ίνες καλαμποκιού (Li et al., 2011) και επεξεργασμένο απόβλητα της βιομηχανίας χαρτοπολτού (spent sulphite liquor - SSL) (Pateraki et al., 2016b; Pateraki et al., 2019) με αξιολογικά αποτελέσματα όσον αφορά τις τελικές συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος.

Πειράματα μελέτης της κινητικής παρεμπόδισης από το υπόστρωμα αλλά και τα προϊόντα (Lin et al., 2008) έδειξαν ότι το βακτήριο μπορεί να ανεχθεί συγκέντρωση γλυκόζης έως και 143 g/L ενώ η ανάπτυξή του παρεμποδίζεται εντελώς πάνω από τα 158 g/L, δεδομένο που συμφωνεί και με άλλα ερευνητικά αποτελέσματα (Guettler et al., 1999; Liu et al., 2008). Μείωση της απόδοσης παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος παρατηρείται πάνω από τα 100 g/L (Lin et al., 2008; Corona-Gonzalez et al., 2008). Όσον αφορά τα προϊόντα της ζύμωσης, το πως παρεμποδίζουν την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος δεν έχει αποσαφηνιστεί. Οι Lin et al. (2008) έδειξαν ότι το μυρμηκικό οξύ αποτελεί ισχυρότερο παράγοντα παρεμπόδισης έναντι των υπολοίπων παραγόμενων οξέων, παρεμποδίζοντας εντελώς την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε συγκέντρωση 16 g/L. Σύμφωνα με τους Li et al. (2010), τα παραπροϊόντα έχουν ισχυρότερη παρεμποδιστική ικανότητα από το ηλεκτρικό οξύ, με την ανάπτυξη του μικροοργανισμού να παρεμποδίζεται εντελώς στα 35,2 g/L μυρμηκικού οξέος. Το ηλεκτρικό παρεμποδίζει την ανάπτυξη όταν ξεπερνά τα 104 g/L (Liu et al., 2008). Αναφορικά με την βιομάζα, αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (γλυκόζης) 54,7 g/L (Corona-Gonzalez et al., 2008) έως 65 g/L (Lin et al., 2008) και άνω έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωσή της. Η μείωση της παραγόμενης βιομάζας με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος έχει αναφερθεί και από τους Liu et al. (2008). Όταν χρησιμοποιήθηκε ως

υπόστρωμα η ξυλόζη παρατηρήθηκε παρατεταμένη φάση προσαρμογής συγκριτικά με την ανάπτυξή του σε γλυκόζη, ενώ η ανάπτυξη παρεμποδίστηκε σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 80 g/L (Salvachúa et al., 2016).

#### 1.4.2 Το $MgCO_3$ και το $CO_2$

Μελετώντας τις ζυμώσεις για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από το βακτήριο *A. succinogenes* φάνηκε ότι με αύξηση της συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα ( $CO_2$ ) αυξάνονται και οι συγκεντρώσεις των κύριων παραγόμενων οξέων (Guettler et al., 1999). Σύμφωνα με το μεταβολικό του μονοπάτι, το οποίο φαίνεται στην Εικόνα 1.2, το  $CO_2$  λειτουργεί ως υπόστρωμα, μαζί με την πηγή άνθρακα, για την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος. Στις μικροβιακές ζυμώσεις με το βακτήριο *A. succinogenes* συνήθως χρησιμοποιείται  $MgCO_3$  ή/και παρέχεται αέριο  $CO_2$  απευθείας στο υγρό της ζύμωσης. Το  $MgCO_3$  αντιδρά με το νερό και παράγει  $Mg_2(OH)_2CO_3$  και  $CO_2$ . Η παρουσία του  $MgCO_3$  επιτρέπει τον έλεγχο του διαλυτού  $CO_2$  με ακρίβεια, ενώ λειτουργεί σαν ρυθμιστής του pH της ζύμωσης (Liu et al., 2008).

Οι Zou et al. (2011) εξέτασαν την χρήση αερίου  $CO_2$  μαζί με την προσθήκη άλατος  $MgCO_3$  και έδειξαν ότι η συγκέντρωση του διαλυμένου  $CO_2$  στο υγρό ζύμωσης, όταν η μερική πίεση του αερίου είναι 101,33 kPa (100%  $CO_2$  gas), παραμένει σταθερή στα 159,22 mM, σε συγκέντρωση  $MgCO_3$  από 11,68 g/L και πάνω. Παρ' όλα αυτά η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του  $MgCO_3$  φαίνεται να σχετίζεται με αύξηση της τελικής συγκέντρωσης του παραγόμενου ηλεκτρικού οξέος, αφού το περισσότερο διαθέσιμο  $MgCO_3$  συμβάλει στη διατήρηση του pH σε επίπεδα φιλικά προς το μικροοργανισμό. Με πειράματα που αφορούσαν τα αποτελέσματα της προσθήκης  $CO_2$  σε μικροβιακές ζυμώσεις οι Van der Werf et al. (1997) έδειξαν ότι η συγκέντρωση του οξικού οξέος είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του  $CO_2$  στο υγρό της ζύμωσης. Αντίθετα, η συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος αυξάνει και αυτή της αιθανόλης μειώνεται καθώς παρέχεται περισσότερο αέριο  $CO_2$ .

#### 1.4.3 Ο ρόλος της αναγωγικής ενέργειας

Πέρα όμως από τη συγκέντρωση  $CO_2$  για τον σχηματισμό του ηλεκτρικού οξέος είναι απαραίτητο να εξεταστεί και ο ρόλος του αναγωγικού δυναμικού. Συγκεκριμένα, για ένα μόριο ηλεκτρικού οξέος απαιτούνται τέσσερα ηλεκτρόνια, επιτρέποντας το χαρακτηρισμό του ως αναγωγική ένωση. Στο επίπεδο των κυττάρων η αναγωγική δύναμη παρέχεται από τη μετατροπή του  $NAD^+$  σε  $NADH$ . Εξωτερικά μπορεί να προσφερθεί με τη χρήση περισσότερο ανηγμένων πηγών άνθρακα (π.χ. γλυκερόλη), την προσθήκη αερίου υδρογόνου ( $H_2$ ) στο υγρό

θεραπευτικό μέσο της ζύμωσης ή την αξιοποίηση της ηλεκτρικής ενέργειας μέσω ηλεκτροχημικών συστημάτων (BES), που θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Εστιάζοντας στις ανηγμένες πηγές άνθρακα, πειράματα με χρήση D-μαννιτόλης, D-σορβιτόλης και D-αραβιτόλης ως υπόστρωμα είχαν ως αποτέλεσμα υψηλότερες τελικές συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος, με την τελευταία μάλιστα να φτάνει τα 103 mol SA/mol υποστρώματος, ενώ η ζύμωση με υπόστρωμα τη γλυκόζη ολοκληρώθηκε με παραγωγή 75 mol SA/ mol υποστρώματος (Van der Werf et al., 1997). Το πόσο οξειδωμένη ή ανηγμένη είναι μια παραγόμενη ένωση σχετίζεται άμεσα με το διαμορφούμενο λόγο  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων ο οποίος εξαρτάται από την πορεία του μεταβολισμού, είτε προς την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος είτε παραπροϊόντων της ζύμωσης. Η περίσσεια NADH ευνοεί το μονοπάτι C4 από το οποίο παράγεται το ηλεκτρικό οξύ (Εικόνα 1.2). Έτσι, μια ένωση περισσότερο ανηγμένη από τη γλυκόζη, όπως η σορβιτόλη προσφέρει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις NADH, οι οποίες αξιοποιούνται στον σχηματισμό του ηλεκτρικού οξέος, ενώ μια λιγότερο ανηγμένη ένωση, όπως το γλυκονικό οξύ προσφέρει χαμηλότερες συγκεντρώσεις NADH και ευνοεί το μονοπάτι παραγωγής παραπροϊόντων (Li et al., 2010).

Το αέριο  $\text{H}_2$  λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων όταν παρέχεται στις μικροβιακές ζυμώσεις. Χρησιμοποιήθηκε από τους Van der Werf et al. (1997) σε ζυμώσεις με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη έχοντας ως αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος συγκριτικά με την ανάπτυξη του σε περιβάλλον χωρίς  $\text{H}_2$ . Το βακτήριο *A. succinogenes* αναπτύχθηκε και παρήγαγε ηλεκτρικό οξύ έχοντας ως μοναδική πηγή φουμαρικό οξύ παρουσία αερίου  $\text{H}_2$ .

Σε πειράματά τους οι Park & Zeikus (1999) χρησιμοποιώντας τον μεταφορέα ηλεκτρονίων neutral red (NR) και ηλεκτρική ενέργεια σε ζυμώσεις με το βακτήριο *A. succinogenes* παρατήρησαν ροή ηλεκτρονίων από την κάθοδο στο παραγόμενο ηλεκτρικό οξύ. Το NR λειτουργεί ως μεταφορέας των διαθέσιμων ηλεκτρονίων και αντικαθιστά το ρόλο του  $\text{H}_2$  σε ζυμώσεις με το στέλεχος *A. succinogenes* FZ-6 το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί σε φουμαρικό οξύ μόνο παρουσία του  $\text{H}_2$  (Park et al., 1999). Ακόμη, όταν χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροχημική μεμβράνη με συνεχή τάση -1,8 V σε πειράματα με το βακτηριακό στέλεχος *A. succinogenes* NJ113 και υπόστρωμα υδρόλυμμα corncob, παρατηρήθηκε αύξηση της τελικής συγκέντρωσης ηλεκτρικού οξέος (Zhao et al., 2016).

## 1.5 Ηλεκτρική ενέργεια και μικροβιακές ζυμώσεις

Η δυνατότητα παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας με αειφορία έχει συντελέσει στο συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για αξιοποίησή της στις μικροβιακές ζυμώσεις. Με τον όρο βιολογική ηλεκτροσύνθεση (microbial electrosynthesis) περιγράφεται ένα σύστημα στο οποίο από ένα υπόστρωμα παράγεται ένα επιθυμητό προϊόν μέσω ηλεκτροχημικών αντιδράσεων που καταλύονται από μικροοργανισμούς (Schröder et al., 2015). Τέτοιες αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε βιολογικά ηλεκτροχημικά συστήματα (BES), τα οποία είναι βιοαντιδραστήρες όπου τελούνται ταυτόχρονα βιολογικές και ηλεκτροχημικές διεργασίες με αποτέλεσμα την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας, υδρογόνου ή άλλων προϊόντων (Moscoviz et al., 2016). Οι Rabaey & Rozendal (2010) περιγράφουν ένα τυπικό BES να αποτελείται από μια άνοδο, όπου λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις οξειδωσης, μια κάθοδο, όπου συμβαίνουν οι αναγωγικές αντιδράσεις και μια μεμβράνη ανάμεσα στις προηγούμενες. Η προαναφερθείσα συνδεσμολογία πρέπει να περιβάλλεται από ηλεκτρολύτη, συνήθως υδατικό διάλυμα.

Στο εδάφιο 1.4.3 αναφέρθηκαν ήδη κάποιες ερευνητικές εργασίες στις οποίες η ηλεκτρική ενέργεια έχει αξιοποιηθεί στη βελτίωση της παραγωγής ηλεκτρικού οξέος από το βακτήριο *A. succinogenes*. Εστιάζοντας σε ζυμώσεις με άλλους μικροοργανισμούς, σε πειράματα με το βακτήριο *B. succiniciproducens* όπου χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροχημικής μεμβράνης με σκοπό την απομάκρυνση του ηλεκτρικού οξέος από το υγρό θρεπτικό μέσο της ζύμωσης, οι Pateraki et al. (2019) απέδωσαν την αυξημένη απόδοση του ηλεκτρικού οξέος είτε στην παρουσία  $H_2$  είτε στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό για το οποίο ευθύνονταν η απελευθέρωση ηλεκτρονίων στην κάθοδο του ηλεκτροχημικού κελιού.

Την τελευταία δεκαετία έχουν δημοσιευτεί αρκετές ακόμη εργασίες που περιγράφουν BES όπου χρησιμοποιούνται διάφορα μικροβιακά είδη, σε κάποιες περιπτώσεις και μικτές καλλιέργειες μικροοργανισμών, για την παραγωγή πλήθους ενώσεων. Η απόδοση της 1,3 - προπανοδιόλης αυξήθηκε κατά 50% σε ζυμώσεις με μικτή καλλιέργεια μικροοργανισμών και υπόστρωμα τη γλυκερόλη (Zhou et al., 2013; Zhou et al., 2015). Τυπικά τέτοιες ζυμώσεις έχουν χαμηλότερη απόδοση όταν χρησιμοποιείται μικτή καλλιέργεια, μειονέκτημα που ξεπεράστηκε στα πειράματα με τα BES χωρίς τη χρήση κάποιου μεταφορέα ηλεκτρονίων. Ακόμη, βελτιωμένη ήταν η απόδοση και η παραγωγικότητα και σε ζυμώσεις για την παραγωγή αιθανόλης (Shin et al., 2002), γαλακτικού (Sasaki et al., 2014) και βουτυρικού οξέος (Choi et al., 2012) και άλλων ενώσεων που παρατίθενται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.3.

Ενδιαφέροντα για να αναλυθούν περαιτέρω είναι τα αποτελέσματα που αφορούν την παραγωγή μικροβιακού ελαίου και πολυυδροξυαλκανοϊκών εστέρων (PHAs). Για την παραγωγή πολυυδροξυβουτυρικού εστέρα (PHB) οι Nishio et al. (2014) χρησιμοποίησαν το βακτήριο *Ralstonia eutropha* H16 με υπόστρωμα τη φρουκτόζη, χρήση του μεταφορέα ηλεκτρονίων PMF. Στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκε εξωκυτταρική μεταφορά ηλεκτρονίων από τα μικροβιακά κύτταρα προς την άνοδο (+0,6 V). Το αποτέλεσμα ήταν αύξηση της παραγωγής του PHB κατά 60%. Βελτίωση της παραγωγής των PHAs κατά 19% επιτεύχθηκε επίσης σε BES αυτή τη φορά με μικτή βακτηριακή καλλιέργεια με χαμηλές συγκεντρώσεις O<sub>2</sub> στην κάθοδο, οι οποίες φάνηκε να ευνοούν την αξιοποίηση των ηλεκτρονίων από την άνοδο και την τελική παραγωγή του προϊόντος (Srikanth et al., 2012). Στις 48h από τη συνολική συγκέντρωση PHA το 89% ήταν υδροξυβουτυρικού (HB). Οι Arbter et al.(2019) βελτίωσαν την απόδοση παραγωγής μικροβιακού ελαίου από το μυκητιακό στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 εφαρμόζοντας τάση -1V σε ζυμώσεις με υπόστρωμα τη γλυκόζη. Η απόδοση αυξήθηκε από 0,171 g/g σε 0,227 g/g και αποδόθηκε στη μείωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού στα μικροβιακά κύτταρα, η οποία ευνοεί το μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής λιπαρών οξέων.

### 1.6 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης

Ως γονιδιακή έκφραση ορίζεται η διαδικασία μέσω της οποίας από ένα γονίδιο (DNA) προκύπτει ένα γονιδιακό προϊόν. Κατά τη μεταγραφή, από το DNA προκύπτει αγγελιοφόρο RNA (mRNA), το σύνολο του οποίου σε έναν οργανισμό ονομάζεται μεταγράφομα. Αυτό είναι το πρώτο βήμα προς την παραγωγή πρωτεϊνών, η οποία εν συνεχεία τελείται μέσω της διαδικασίας της μετάφρασης. Οι διαφορές στην έκφραση των γονιδίων, όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται υπό διαφορετικές συνθήκες, είναι ενδεικτικές των κυτταρικών αποκρίσεων σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, ενώ ταυτόχρονα συντελούν στη διαμόρφωση του κυτταρικού φαινοτύπου (Lockhart & Winzeler, 2000).

Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, όταν πρόκειται για το RNA, επιτυγχάνεται μέσω μεταγραφομικής ανάλυσης. Η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR), που επιτρέπει τόσο την ανίχνευση όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό του προϊόντος DNA σε πραγματικό χρόνο, βασίζεται στη μεθοδολογία των Higuchi et al. (1993) και πραγματοποιείται με χρήση φθορίζουσας χρωστικής στα δείγματα και μέσω συστήματος θερμικού κυκλοποιητή. Κατά την qPCR μετράται ο φθορισμός μετά το τέλος κάθε κύκλου επιμήκυνσης του γονιδιακού προϊόντος στον θερμικό κυκλοποιητή και η εκπομπή που καταγράφεται αυξάνει με την αύξηση των παραγόμενων PCR προϊόντων. Η qPCR μπορεί να συνδυαστεί με αντίστροφη

μεταγραφή (RT-qPCR), η οποία επιτρέπει τη μετατροπή πολύ μικρών ποσοτήτων mRNA σε cDNA (Gibson et al., 1996).

Η προαναφερθείσα διαδικασία αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την μελέτη της απόκρισης των μικροοργανισμών στις εκάστοτε συνθήκες των μικροβιακών ζυμώσεων. Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων υπό διαφορετικές συνθήκες, αποτελεί το πρώτο βήμα για την κατανόηση της λειτουργικότητας και του βιολογικού ρόλου των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών. Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του βακτηρίου *Gluconobacter oxydans* NL71 όταν αναπτύχθηκε παρουσία παρεμποδιστών που προέρχονταν από λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα έδειξε ότι στην πλειονότητά τους τα γονίδια που σχετίζονται με διαμεμβρανικούς μεταφορείς και ορισμένα ένζυμα του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών (PPP) ήταν υπερεκφρασμένα συγκριτικά με τα πειράματα που οι παρεμποδιστές απουσίαζαν από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (Miao et al. 2017). Όταν το βακτήριο *A. succinogenes* αναπτύχθηκε με υπόστρωμα το επεξεργασμένο απόβλητα της βιομηχανίας χαρτοπολτού SSL, καταγράφηκαν μεγάλες διαφορές στη γονιδιακή του έκφραση, οι οποίες αποδόθηκαν είτε στους παρεμποδιστές που απουσίαζαν από τα συγκρινόμενα αποτελέσματα ζυμώσεων με υπόστρωμα την ξυλόζη, είτε στην αξιοποίηση διαφορετικών καταβολικών μονοπατιών όταν τα συγκρινόμενα αποτελέσματα προέρχονταν από ζυμώσεις με υπόστρωμα τη γλυκόζη (Pateraki et al., 2020). Σε ζυμώσεις με το μυκητιακό στέλεχος *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223 και υπόστρωμα υδρόλυμα corncob η μεταγραφομική ανάλυση έδειξε διαφορές σε πλήθος γονιδίων, μεταξύ άλλων και σε εκείνα που κωδικοποιούν για διαμεμβρανικούς μεταφορείς και ένζυμα που σχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας, τον καταβολισμό υδατανθράκων και λιπιδίων (Zou et al., 2015).

### 1.7 Σκοπός ερευνητικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης είναι η αξιολόγηση της επίδρασης του ανθρακικού μαγνησίου ( $MgCO_3$ ) και του ηλεκτρικού ρεύματος στο μεταβολισμό του βακτηρίου *A. succinogenes*. Θα πραγματοποιηθούν ημισυνεχείς ζυμώσεις με υπόστρωμα τη γλυκόζη και παροχή ηλεκτρικού ρεύματος μέσω ηλεκτροδίων βυθισμένων στο υγρό θρεπτικό μέσο της ζύμωσης. Τα γονίδια του μικροοργανισμού θα μελετηθούν με μεταγραφομική ανάλυση και θα συγκριθούν με ζυμώσεις στις οποίες δε θα παρέχεται είτε το  $MgCO_3$  είτε το ηλεκτρικό ρεύμα.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Ανάπτυξη του μικροοργανισμού

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος ήταν το βακτήριο *Actinobacillus succinogenes* 130Z (DSM 22257) που αγοράστηκε από το Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Ως υπόστρωμα ανάπτυξης της προκαλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό μέσο TSB (tryptic soy broth) συγκέντρωσης 30 g/L. Κωνικές φιάλες, που περιείχαν 100 mL αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού μέσου η καθεμία, εμβολιάστηκαν με 0,5-1 mL βακτηριακής καλλιέργειας *A. succinogenes* συντηρημένης σε γλυκερόλη (50% v/v) στους -80 °C. Οι κωνικές επώαστηκαν σε επωαστικό κλίβανο υπό ανάδευση 180 rpm στους 37 °C για 12 - 16 ώρες, μέχρι να φτάσουν στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης τους.

### 2.2 Μικροβιακές ζυμώσεις για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος

#### 2.2.1 Ασυνεχείς ζυμώσεις σε φιάλες Duran

Για τις ασυνεχείς ζυμώσεις σε φιάλες Duran χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και αρχική συγκέντρωση 50 g/L. Το θρεπτικό μέσο επίσης περιείχε 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 1,16 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,31 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/L NaCl, 0,2 g/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και 5 g/L  $\text{MgCO}_3$ . Το pH της ζύμωσης καταγραφόταν σε κάθε δειγματοληψία και κυμάνθηκε από 6,2 – 7,2 λόγω της παρουσίας του ανθρακικού μαγνησίου ( $\text{MgCO}_3$ ). Η πηγή άνθρακα, η πηγή αζώτου καθώς και τα άλατα αποστειρώθηκαν ξεχωριστά σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος διοχετευόταν αέριο διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) με ροή 0,5 vvm μέσω αποστειρωμένου φίλτρου 0,2 μm και η θερμοκρασία ήταν στους 37 °C.

#### 2.2.2 Ημισυνεχείς ζυμώσεις για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος

Οι ημισυνεχείς ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα του 1 L (Infors) με ενεργό όγκο 0,5 L. Το θρεπτικό μέσο περιείχε 50 g/L γλυκόζη, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 1,16 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,31 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/L NaCl, 0,2 g/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και 10 g/L  $\text{MgCO}_3$ . Η θερμοκρασία ήταν στους 37 °C και διατηρούνταν σταθερή σε υδατόλουτρο. Το pH της ζύμωσης διατηρούνταν σταθερό στο 6,6 με συνεχή προσθήκη 10M NaOH μέσω περισταλτικής αντλίας συνδεδεμένης με πεχάμετρο Mettler Tolloedo. Η ανάδευση 300 rpm ελεγχόταν με μαγνητικό αναδευτήρα και η παροχή του διοξειδίου του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) ήταν συνεχής με ροή 0,5 vvm. Κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε προσθήκη πηγής άνθρακα και αζώτου (feeding). Το διάλυμα του feeding περιείχε 500 g/L γλυκόζη και 10 g/L εκχύλισμα ζύμης. Ο ρυθμός προσθήκης feeding γινόταν

ανάλογα με το ρυθμό κατανάλωσης της γλυκόζης από τον μικροοργανισμό, ώστε η συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο να βρίσκεται μεταξύ 10 - 25 g/L. Η δειγματοληψία γινόταν κάθε 2-4 ώρες για τον προσδιορισμό των σακχάρων, των μεταβολικών προϊόντων, του αζώτου που περιέχεται στις ελεύθερες αμινομάδες αμινοξέων και πεπτιδίων (FAN) και του ανόργανου φωσφόρου (IP). Επίσης, τα δείγματα αξιοποιήθηκαν για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) και του ολικού ξηρού βάρους (DCW). Δείγματα ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης και με χρήση αποστειρωμένων συρίγγων, περιεκτών των 15 mL τύπου falcon και περιεκτών 2 mL τύπου Eppendorf για τη μελέτη του μεταβολισμού με μοριακές μεθόδους.

### **2.2.3 Ημισυνεχείς ζυμώσεις για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με χρήση ηλεκτροδίων στο υγρό θρεπτικό μέσο της ζύμωσης**

Οι ημισυνεχείς ζυμώσεις επαναλήφθηκαν στις ίδιες συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω με την προσθήκη ηλεκτροδίων που παρείχαν ρεύμα στο υγρό θρεπτικό μέσο της ζύμωσης. Στη διάταξη το κεντρικό ηλεκτρόδιο αποτελεί την άνοδο και είναι κατασκευασμένο από τιτάνιο (Ti) και έχει επικάλυψη οξειδίου του ιριδίου ( $\text{IrO}_2$ ), ενώ το περιβάλλει η κάθοδος, ένα ηλεκτρόδιο κατασκευασμένο από ανοξειδωτο ατσάλι. Το κεντρικό ηλεκτρόδιο περιβάλλεται από δίχτυ σιλικόνης που εμποδίζει την μεταξύ τους επαφή. Επίσης η επαφή τους με τα μεταλλικά μέρη του βιοαντιδραστήρα εμποδίζεται με τη παρουσία πλαστικού δικτυού. Η παροχή του ρεύματος ορίστηκε στα 0,57 A και το εύρος τάσης που παρατηρήθηκε ήταν 3 – 7,2 V κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν όπως αυτές περιγράφηκαν νωρίτερα.

## **2.3 Χημικές μέθοδοι ανάλυσης**

### **2.3.1 Προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας (OD)**

Για τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα με HCl 7% ώστε να απενεργοποιηθεί το  $\text{MgCO}_3$  και να μην επηρεάσει την φωτομέτρηση. Για κάθε δείγμα εκτελέστηκαν δύο (2) επαναλήψεις, οι οποίες φωτομετρήθηκαν σε φωτόμετρο (U-2000 Hitachi) στα 660 nm.

### **2.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρου και μεταβολικών προϊόντων της ζύμωσης**

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του σακχάρου που δεν καταναλώθηκε από το μικροοργανισμό κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αλλά και των μεταβολιτών που παρήχθησαν, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Η μέθοδος εφαρμόστηκε μέσω του συστήματος Shimadzu HPLC, με χρήση ανιχνευτή Shimadzu RI και



στήλης Aminex HPX-87H (7.8 x 300 mm). Η θερμοκρασία της στήλης ήταν 65 °C, ενώ η κινητή φάση (10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) είχε ροή 0,6 mL/min.

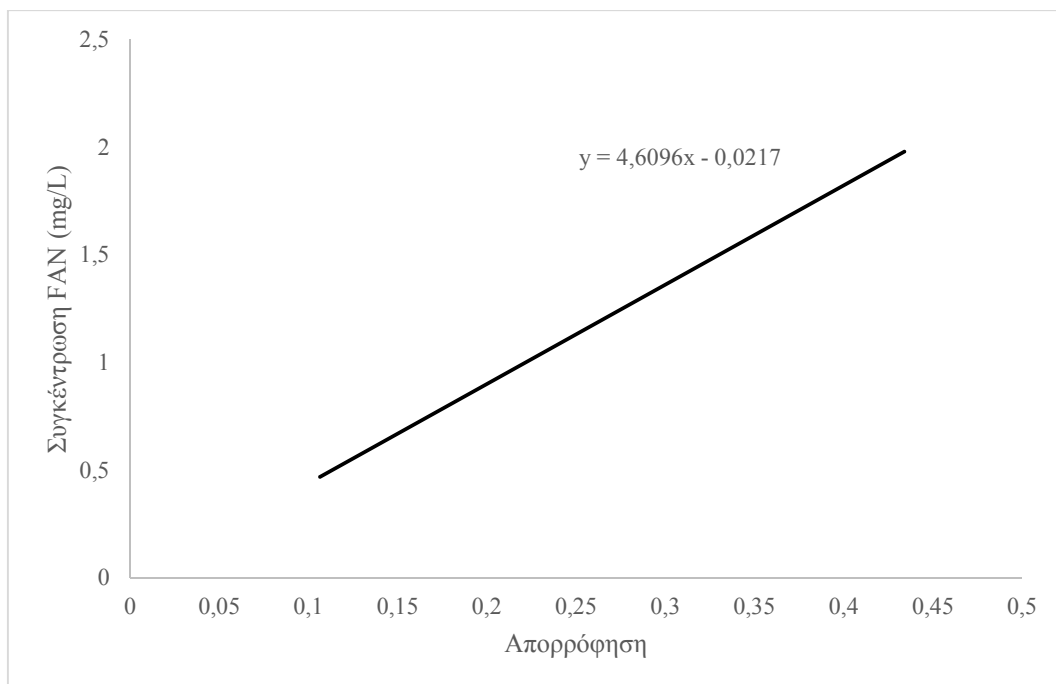
Μετά από φυγοκέντρηση (10 min, 9000 rpm) των δειγμάτων που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, δείγμα του υπερκείμενου αραιώθηκε με H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10mM, σε αραιώση 1:10 (τελικός όγκος 2mL). Τα δείγματα διηθήθηκαν με χρήση φίλτρων Whatman που διέθεταν μεμβράνη με πόρους διαμέτρου 0,2μm, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια.

### **2.3.3. Προσδιορισμός του ολικού ξηρού βάρους (DCW)**

Για τον προσδιορισμό του ολικού ξηρού βάρους το ίζημα των δειγμάτων ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O) και φυγοκεντρήθηκε (10 min, 9000 rpm) απορρίπτοντας το υπερκείμενο σε δύο (2) επαναλήψεις. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στους 80 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα για 24 ώρες και έπειτα ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας.

### **2.3.4 Προσδιορισμός του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN)**

Για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων το υπερκείμενο των δειγμάτων αραιώθηκε με απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O) σε κατάλληλη αραιώση. Το πρωτόκολλο (Lie, 1973) ακολουθήθηκε με πραγματοποίηση δύο (2) επαναλήψεων για κάθε δείγμα. Τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 570 nm με χρήση φασματοφωτόμετρου (U-2000, Spectrophotometer, Hitachi) και το άζωτο υπολογίστηκε με χρήση της πρότυπης καμπύλης:  $C(\text{mg/L}) = (4,609 * x - 0,0217) * (\text{αραιώση})$



**Διάγραμμα 2.1** Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης που χρησιμοποιείται στη μέθοδο FAN.

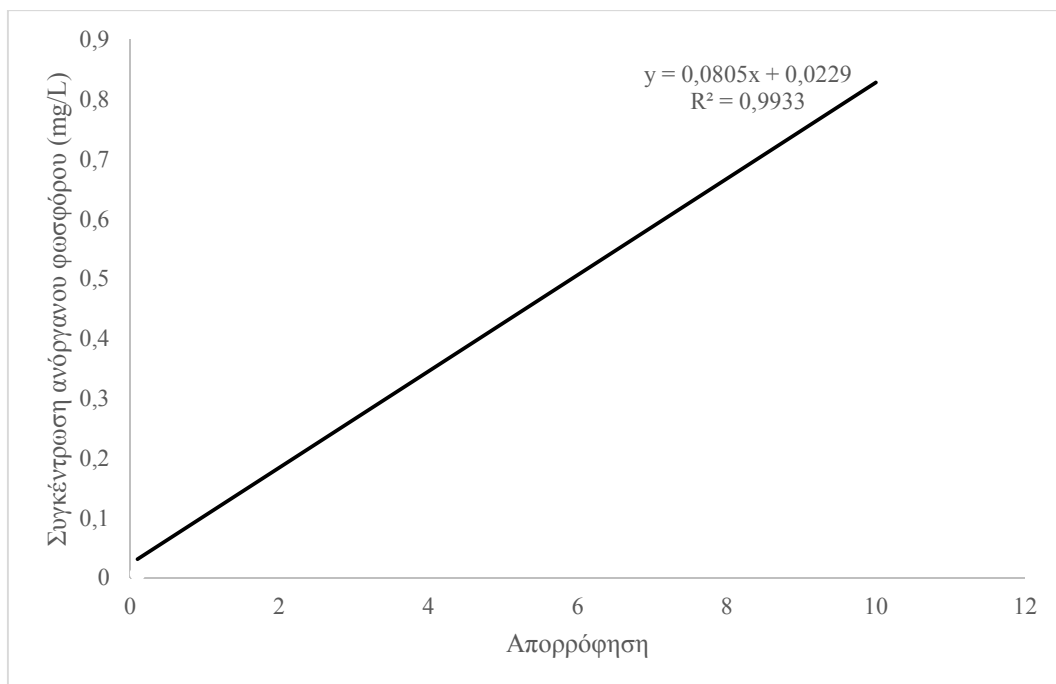
Τα πειραματικά δεδομένα από τα οποία προέκυψε η καμπύλη φαίνονται παρακάτω:

Συγκέντρωση (mg/L)	A1	A2	Απορρόφηση
0,5	0,11	0,103	0,1065
1	0,235	0,229	0,232
1,5	0,329	0,333	0,331
2	0,428	0,44	0,434

Όπου A1 και A2 οι δυο επαναλήψεις μέτρησης της απορρόφησης σε κάθε συγκέντρωση. Η απορρόφηση στα δεξιά είναι η μέση τιμή των επαναλήψεων A1 και A2.

### 2.3.5 Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (IP)

Για τον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου το υπερκείμενο των δειγμάτων αραιώθηκε με απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O) σε κατάλληλη αραιώση. Το πρωτόκολλο (Harland et al., 1980) ακολουθήθηκε με πραγματοποίηση δύο (2) επαναλήψεων για κάθε δείγμα. Τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 730 nm με χρήση φασματοφωτόμετρου (U-2000, Spectrophotometer, Hitachi) και η συγκέντρωση φωσφόρου υπολογίστηκε με χρήση πρότυπης καμπύλης:  $C(\text{mg/L}) = (0,0805 \cdot x + 0,0229) \cdot (\text{αραιώση})$



**Διάγραμμα 2.2** Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης που χρησιμοποιείται στη μέθοδο IP.

Τα πειραματικά δεδομένα από τα οποία προέκυψε η καμπύλη φαίνονται παρακάτω:

Συγκέντρωση (mg/L)	A1	A2	Απορρόφηση
0,1	0,007	0,007	0,007
1	0,082	0,096	0,089
2,5	0,263	0,259	0,261
5	0,432	0,456	0,444
10	0,801	0,822	0,8115

*Όπου A1 και A2 οι δυο επαναλήψεις μέτρησης της απορρόφησης σε κάθε συγκέντρωση. Η απορρόφηση στα δεξιά είναι η μέση τιμή των επαναλήψεων A1 και A2.*

## 2.4 Μοριακές μέθοδοι ανάλυσης

### 2.4.1 Καθαρισμός των κυττάρων της ζύμωσης

Για τη μελέτη του μεταβολισμού του μικροοργανισμού αρχικά πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των κυττάρων με επαναλαμβανόμενες πλύσεις με αποστειρωμένο διάλυμα NaCl 150 mM, το οποίο έχει παρασκευαστεί με υπερκάθαρο νερό (ddH<sub>2</sub>O) και φυγοκέντρηση (5 min, 13.000 rpm, 4 °C). Το τελευταίο φυλάσσεται στους -80 °C μέχρι να αξιοποιηθεί περαιτέρω.

#### 2.4.2 Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του RNA ακολουθήθηκε πρωτόκολλο στο οποίο χρησιμοποιείται TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific) για την εκχύλιση του DNA, RNA και πρωτεϊνών από τα κύτταρα. Συνολικός όγκος 500  $\mu\text{L}$  προστέθηκε στα δείγματα σε δύο (2) δόσεις και πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση. Μετά από φυγοκέντρηση (12 min, 4 °C, 12.000 rpm), το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο περιέκτη τύπου Eppendorf. Στη συνέχεια, με χρήση 100  $\mu\text{L}$  χλωροφορμίου απομακρύνθηκαν οι πρωτεΐνες. Μετά από φυγοκέντρηση (15 min, 4 °C, 12.000 rpm) των δειγμάτων στα οποία έχει προστεθεί χλωροφόρμιο, παρελήφθη μόνο η υδατική φάση, η οποία περιείχε το DNA και το RNA. Για την κατακρήμιση του RNA χρησιμοποιήθηκαν 250  $\mu\text{L}$  ισοπροπανόλης και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν ξανά (15 min, 4 °C, 12.000 rpm). Κατόπιν, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και παρελήφθη μόνο το ίζημα. Τελικά, προστέθηκαν σε αυτό 100  $\mu\text{L}$  αιθανόλης 75% για την απομάκρυνση των αλάτων και αφού το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για τελευταία φορά (10 min, 4 °C, 12.000 rpm) το γενετικό υλικό παρελήφθη στο ίζημα. Μετά το πέρας περίπου 3 ωρών, που απαιτούνται για την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης προστέθηκαν 50  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένου, υπερκάθαρου νερού (ddH<sub>2</sub>O) και τα δείγματα φυλάχθηκαν στους - 80 °C. Η ποσότητα και η ποιότητα του RNA προσδιορίστηκε με μέτρηση του σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (3%), αντίστοιχα.

Για την απομάκρυνση κάθε υπολείμματος DNA από τα δείγματα, και την παραλαβή καθαρού RNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ενζύμου δεοξυριβονουκλεάση (DNase treatment) με χρήστη του TURBO™ DNase (Ambion, Life Sciences). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου έως 10  $\mu\text{g}$  νουκλεϊκού οξέος επώαστηκαν με 5  $\mu\text{L}$  TURBO™ DNase buffer, 1  $\mu\text{L}$  turbo DNase (2 U) και ο όγκος συμπληρώθηκε με αποστειρωμένο, υπερκάθαρο νερό (ddH<sub>2</sub>O) έως τα 50  $\mu\text{L}$ . Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά. Το ένζυμο προστέθηκε σε 2 δόσεις των 0,5  $\mu\text{L}$ , στην αρχή της αντίδρασης και μετά τα πρώτα 15 λεπτά. Με την παραπάνω διαδικασία απομακρύνθηκαν περίπου 2  $\mu\text{g}$  DNA από το δείγμα. Η επιτυχία της μεθόδου προσδιορίστηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (primers) των γονιδίων αναφοράς (housekeeping genes) recF (Nielsen & Boye, 2005) και proB (Christensen et al., 2004).

Στη συνέχεια το RNA καθαρίστηκε περαιτέρω με χρήση πρωτοκόλλου τεσσάρων (4) βημάτων. Στα δείγματα που είχαν υποστεί τη δράση της δεοξυριβονουκλεάσης συμπληρώθηκε αποστειρωμένο, υπερκάθαρο νερό (ddH<sub>2</sub>O) έως τον τελικό όγκο των 150  $\mu\text{L}$ . Προστέθηκαν 150  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης

(25:24:1) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (5 min, 13.000 rpm). Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο περιέκτη τύπου Eppendorf και προστέθηκαν 100-150  $\mu\text{L}$  χλωροφορμίου. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν ξανά (5 min, RT, 13.000 rpm) και η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο περιέκτη τύπου eppendorf. Τα παραπάνω βήματα είχαν ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση των πρωτεϊνών και το διαχωρισμό τους από το RNA. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκαν 10  $\mu\text{L}$  οξικού νατρίου (NaOAc) pH 5,2 και 200-250  $\mu\text{L}$  αιθανόλης 100% για την κατακρήμνιση του RNA. Τα δείγματα παρέμειναν στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 12 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (30 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 13.000 rpm) και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Το ίζημα ξεπλύθηκε με 100 - 150 $\mu\text{L}$  αιθανόλης 75% και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για τελευταία φορά (15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 13.000 rpm). Μετά το πέρας περίπου 3 ωρών, που απαιτούνται για την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης το ίζημα, που περιέχει καθαρό RNA, διαλύθηκε σε 25  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένο, υπερκάθαρο νερό (ddH<sub>2</sub>O). Η ποιότητα και η ποσότητα του RNA προσδιορίστηκε με χρήση NanoDrop και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (3%), αντίστοιχα.

#### **2.4.3 Σύνθεση του cDNA**

Περίπου 1  $\mu\text{g}$  καθαρού RNA χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία cDNA με χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης μέσω της διαδικασίας αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription PCR). Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με χρήση του PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio INC). Το αντιδραστήριο περιείχε 2  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος, 0.5  $\mu\text{L}$  ένζυμο, 0.5  $\mu\text{L}$  τυχαίων εξαμερών εκκινητών (random hexamers) και 10  $\mu\text{L}$  δείγματος RNA, τα οποία επώαστηκαν για 15 λεπτά  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια τα δείγματα cDNA που παρήχθησαν φυλάχθηκαν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.4.4 RT-qPCR**

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR) εκτελέστηκε στο σύστημα PCR Step-RealPlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems) με χρήση 5  $\mu\text{L}$  SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems), 4  $\mu\text{L}$  εκκινητή (primer) και 1  $\mu\text{L}$  cDNA. Το πρωτόκολλο PCR που εφαρμόστηκε ξεκινά με την αρχική ενεργοποίηση της πολυμεράσης στους  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 10 λεπτά, ακολουθούμενη από 40 κύκλους στους  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 15 δευτερόλεπτα και στους  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 1 λεπτό. Δύο γονίδια αναφοράς, το recF, που κωδικοποιεί την μια πρωτεΐνη για την αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA (Nielsen & Boye, 2005) και το groB, που κωδικοποιεί για την  $\beta$ -υπομονάδα της RNA πολυμεράσης, (Christensen et al., 2004) χρησιμοποιήθηκαν για τη σχετική ποσοτικοποίηση των γονιδίων ενδιαφέροντος. Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων ενδιαφέροντος υπολογίστηκαν με βάση τη

συγκριτική μέθοδο Ct (ή ΔCt) και εκφράστηκαν ως λόγος ΗΚ γονιδίων προς το γονίδιο ενδιαφέροντος, ενώ η απόδοση (PCR efficiency) κάθε εκκινητή υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό LinRegPCR (Ramakers et al., 2003).

**Πίνακας 2.1** Τα ένζυμα που συμμετέχουν στις αντιδράσεις του κύκλου των τρικαρβοκυλικών οξέων, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και ορισμένοι διαμεμβρανικοί μεταφορείς, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα προαναφερθέντα και οι εκκινητές τους.

Ένζυμο	Γονίδιο	Συντ. γονιδίου	F	R
Κινάση του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού οξέος	Asuc 0221	<i>pepck</i>	GACATTCTCGGCCTGTTTCG	CGACCAACACGTCCGCATAT
Αφυδρογονάση του μηλικού οξέος	Asuc 1612	<i>mdh</i>	ACATTCAGGTGTGACGATTTTACC TT	TTAATTCCTGCTCGGTAATTTCCA
Υδρατάση του φουμαρικού οξέος	Asuc 0956	<i>fum</i>	TATGCCAACGCGGATTTAGG	ATTTTCATCGCAGGCTTGTGC
Αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού οξέος	Asuc 0302	<i>oadc</i>	GCCGICTATACCGTTGAAGTGG	AGCCGAAATATCACCGCCTT
NADP <sup>+</sup> εξαρτώμενη αποκαρβοξυλάση του μηλικού οξέος	Asuc 0669	<i>me</i>	ACCATTAGAAAGCCAAGGCGA	GAATGGCTAAGCAAGGTTCCGG
Κινάση του πυροσταφυλικού οξέος	Asuc 1171	<i>pk</i>	GGTAGGCGGTCCCTTTGTCAAA	TTAATGCGTCCGCCGATAAA
Αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος E1	Asuc 0942	<i>pdh E1</i>	CGGACTTCGCCCAGTTGTTA	CAATACGCGAACAAGGCCA
Διυδρολιπούλο-ακετυλοτρανσφεράση E2	Asuc 0944	<i>dld</i>	CTATTCAACGCTTGCGGAGT	TTGCCACGTGCAATAAGGCT
Αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος E2	Asuc 0943	<i>pdh E2</i>	AGATCTCCGGTGCAAATCTGC	ATGTCCGCGCATCAAAGT
Ακετυλοτρανσφεράση του μυρμηκικού οξέος	Asuc 0207	<i>pf1</i>	TCGTGCATGAAGTGGATGATGT	TGGACAGCTTCATGGATTGGTT
Αφυδρογονάση του μυρμηκικού οξέος	Asuc 1264	<i>fdn</i>	TGTGCGAACTCGAGAGCAAT	CCGATGAAATCGCCCAAAGAA
Κινάση του οξικού οξέος	Asuc 1661	<i>ak</i>	CGACCTTAACCAAAAAATCCGG	TGTCTCCGCAAAGCGACA
Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος	Asuc 0005	<i>ldh</i>	TTTATACGAGGCAAAACCCGC	TCCCGGATTAATAACTGTTGGTG
Υπομονάδα I του κυτοχρώματος d – οξειδάση της ομπικινόλης	Asuc 1797	<i>cyd I</i>	AAGCGCAGATTAATCAGCAGC	CACACGGAACGACCAGAATACA
Υπομονάδα II του κυτοχρώματος d – οξειδάση της ομπικινόλης	Asuc 1796	<i>cyd II</i>	ATTTTACCGCCCTGGTTGTAA	AAACCCGAACGGTTCGCTT
Αφυδρογονάση του συνενζύμου NADH	Asuc 1980	<i>ndu</i>	GGAAACCGATGCCGT AAGCTA	GCAATGGAACCCCTGTTCGAA
Trans αφυδρογονάση του συνενζύμου NADPH	Asuc 1022	<i>pnt</i>	TTAGTGGTTTCGGCGTTGCT	CAAGTGCCAACCAAAGCGA
Αναγωγή του φουμαρικού οξέος, υπομονάδα A	Asuc 1813	<i>frd A</i>	TCTACACGGAACGATGCA	TTTAGCTGGTTGGAATGTGGTAAT TT
Αναγωγή του φουμαρικού οξέος, υπομονάδα B	Asuc 1814	<i>frd B</i>	ACCGTTTGAACCGGAGCT	CATCATACCGCAAGAACCGC
Αναγωγή του φουμαρικού οξέος, υπομονάδα C	Asuc 1815	<i>frd C</i>	ATCACCCGACTTGGTGGA	GGAACGGCTGTCGCTTAC
Αναγωγή του φουμαρικού οξέος, υπομονάδα D	Asuc 1816	<i>frd D</i>	GCATTATTGCTTTCGCCATC	CCAGGCCGGAAAAATAGTTAGC
Ανόργανη πυροφωσφατάση	Asuc 0522	<i>ip</i>	AATCCGGCAAACCTCGGATC	AACGGTCAACAACAGCGTACC
ATP συνθάση, υπομονάδα F1 a	Asuc	<i>atp F1 a</i>	ATCTCGCGAAGGTATGGAAG	CAGTAAACCGGACCTACCG

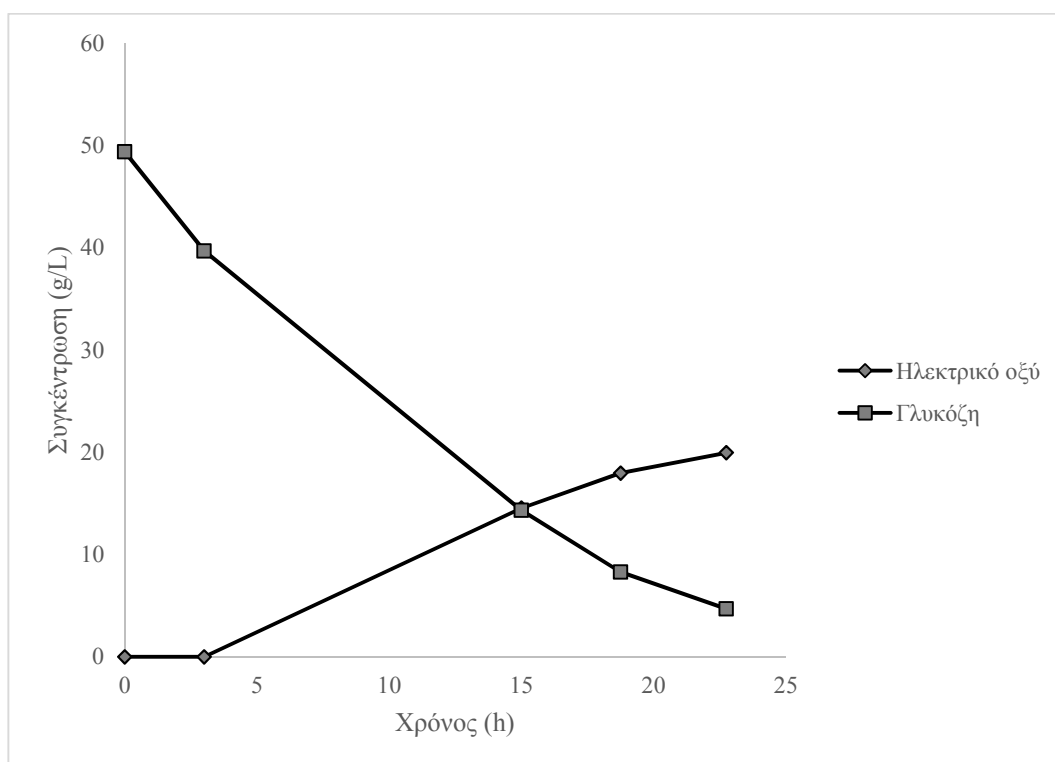
	0328			
ΑΤΡ συνθάση, υπομονάδα F1 b	Asuc 0326	<i>atp F1 b</i>	TGGCCGCCTATTATTAAGCG	TTCTTGCAGCTTCAGCCGAT
ΑΤΡ συνθάση, υπομονάδα F1 g	Asuc 0327	<i>atp F1 g</i>	CATGTCGCAAAAACCGAGTGT	CCCAAACCTGTTGTCTTTCGTC
ΑΤΡ συνθάση, υπομονάδα F1 d	Asuc 0329	<i>atp F1 d</i>	TAGCTCGCCCTTATGCCAAAG	TTCATGCCATTTTCCACCG
ΑΤΡ συνθάση, υπομονάδα F1 e	Asuc 0325	<i>atp F1 e</i>	ACCGTTGTAAGTGCAGGAAGAAA	CCTTCAGAACCGGTAGCTTGG
ΑΤΡ συνθάση, υπομονάδα F0 a	Asuc 0332	<i>atp F0 a</i>	AAAGGTTTTGGCGGATTGGT	TTGACCGGAACAAGTGCCAG
ΑΤΡ συνθάση, υπομονάδα F0 c	Asuc 0331	<i>atp F0 c</i>	CTTCTTGCTTTCGCTGCACTG	CAGGTTGACGAGCTGAAGATTC
Διαμεμβρανικός μεταφορέας ABC	Asuc 1896	<i>abc</i>	TCGGTTCCTGTACCACCAAT	TTCTGACCCAATCTCCGTACG
Διαμεμβρανικός μεταφορέας DCU	Asuc 0142	<i>dcu</i>	CTGCGCGTAATCCGAAATA	CCCGCCAATACCGTGAATG
Υδρογονάση	Asuc 1277	<i>hyd</i>	TGACGGCAGTCGGTTATTAG	TTCGTTGTCTTCATGCCAC
Ανθρακική ανυδράση	Asuc 1199	<i>ca</i>	AATTTCAAGACTTTCCTCCGCC	GCGGCAAAAAGTGTCTTAC
Διαμεμβρανικός μεταφορέας Asuc_1999	Asuc 1999	<i>Asuc_1999</i>	AGTTTCGGTTTGATCTCCCGA	GCGCGTTAACTCAAACCGTATC

### 3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

#### 3.1 Ζυμώσεις για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος

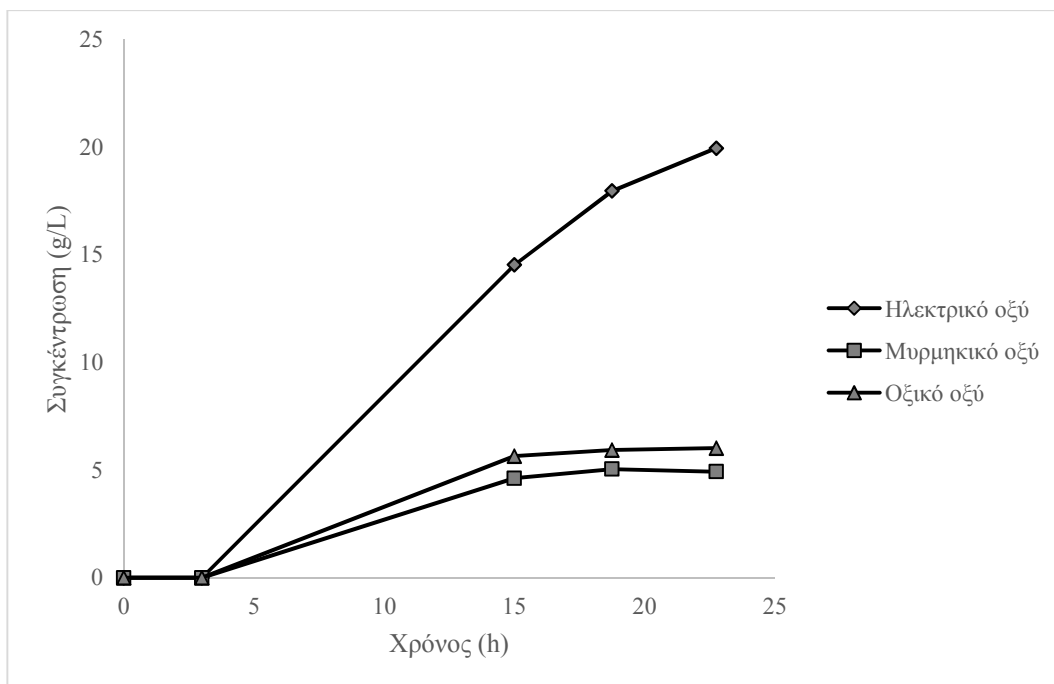
Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς ζυμώσεις για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος σε φιάλες Duran. Στις ζυμώσεις αυτές (Διαγράμματα 3.1 & 3.2), που είχαν ως πηγή άνθρακα τη γλυκόζη με αρχική συγκέντρωση 50 g/L και διήρκησαν 22,75 ώρες, η τελική συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος ήταν 19,96 g/L, ενώ η απόδοση και η παραγωγικότητα ήταν 0,44 g/g και 0,88 g/L·h, αντίστοιχα. Ζυμώσεις στις ίδιες συνθήκες και με ίδιες αρχικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα, αζώτου και αλάτων, αλλά χωρίς την προσθήκη ανθρακικού μαγνησίου ( $MgCO_3$ ) διήρκησαν 26 ώρες, ενώ η τελική συγκέντρωσή του ηλεκτρικού οξέος ήταν 18,78 g/L, η απόδοση 0,61 g/g και η παραγωγικότητα 0,72 g/L·h (Pateraki et al., 2020).

Όσον αφορά την παραγόμενη βιομάζα, αυτή ήταν 2,46 g/L. Το FAN ξεκινώντας από τα 300 mg/L έφτασε τα 80 mg/L στο τέλος της ζύμωσης, ενώ ο IP μειώθηκε από τα 547 mg/L στα 367 mg/L. Σε ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν χωρίς την προσθήκη  $MgCO_3$ , η παραγόμενη βιομάζα ήταν 3,3 g/L (Pateraki et al., 2020).



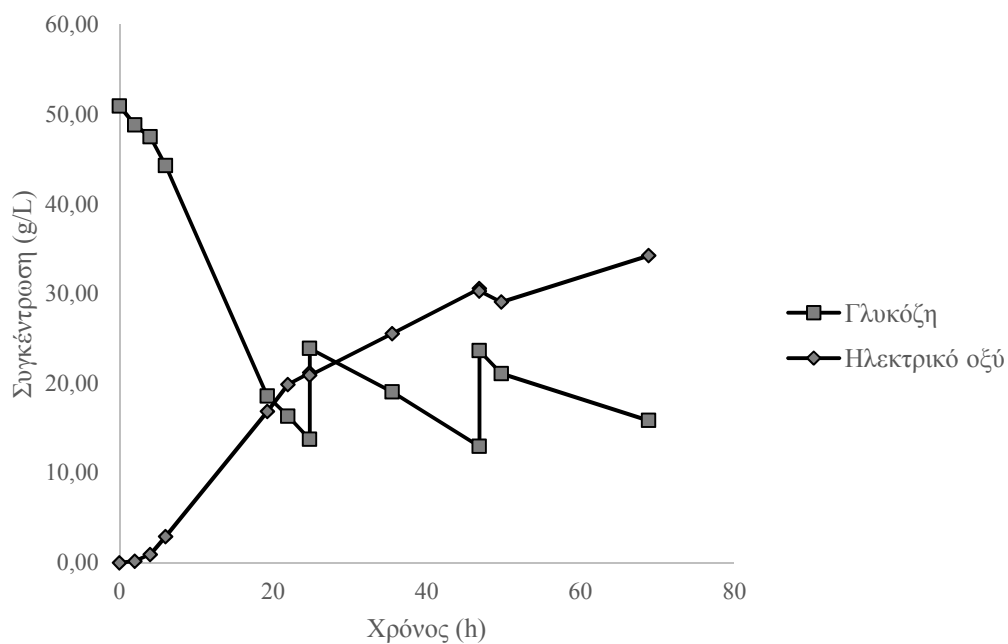
**Διάγραμμα 3.1.** Κατανάλωση της γλυκόζης και παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από το βακτήριο *A. succinogenes* σε ασυνεχείς ζυμώσεις.



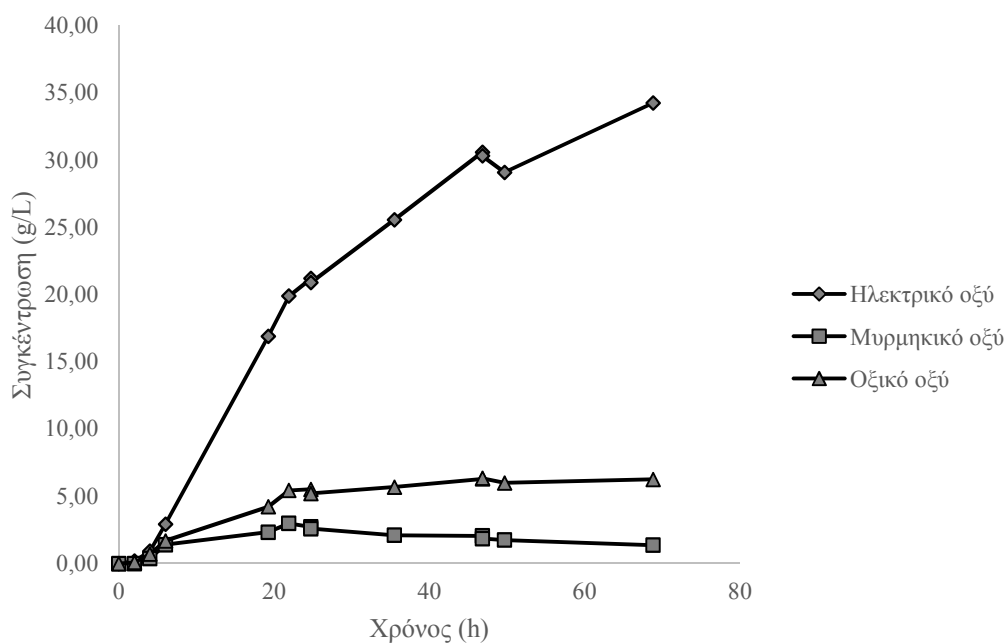


**Διάγραμμα 3.2.** Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και παραπροϊόντων από το βακτήριο *A. succinogenes* σε ασυνεχείς ζυμώσεις.

Στις ημισυνεχείς ζυμώσεις (G+) (Διαγράμματα 3.3 & 3.4), με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 50 g/L, η τελική συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος ήταν 33,94 g/L, ενώ η απόδοση και η παραγωγικότητα ήταν 0,67 g/g και 0,50 g/L·h, αντίστοιχα. Η τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος αυξάνεται ελαφρώς, φτάνοντας τα 36,36 g/L, στις ζυμώσεις που χρησιμοποιούνται τα ηλεκτρόδια (E) (Διαγράμματα 3.5 & 3.6). Στις τελευταίες η απόδοση ήταν 0,62 g/g και η παραγωγικότητα 0,51 g/L·h.



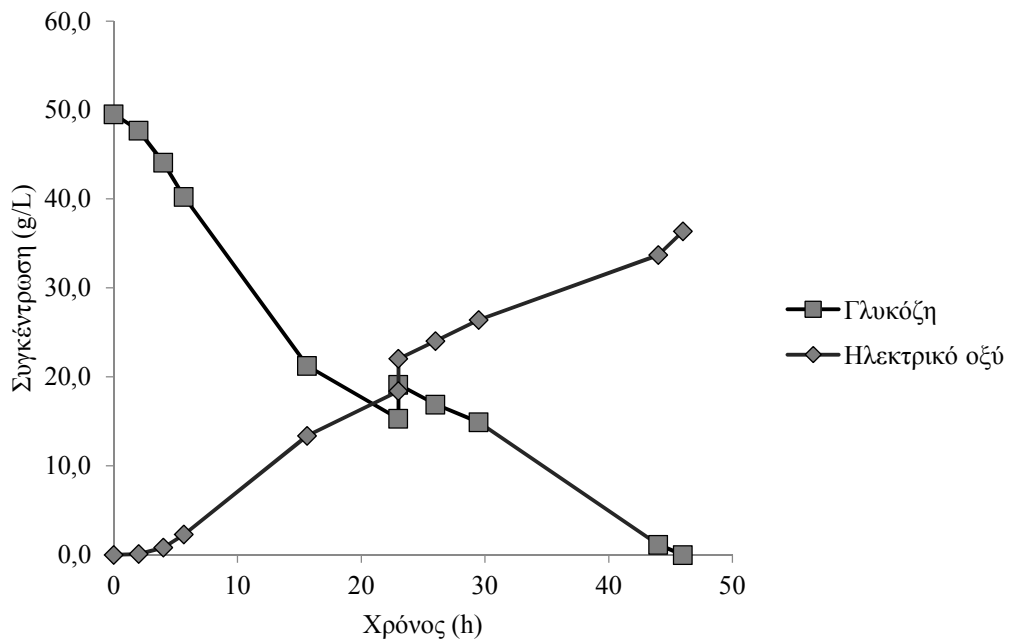
**Διάγραμμα 3.3** Κατανάλωση της γλυκόζης και παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από το βακτήριο *A. succinogenes* σε ημισυνεχείς ζυμώσεις.



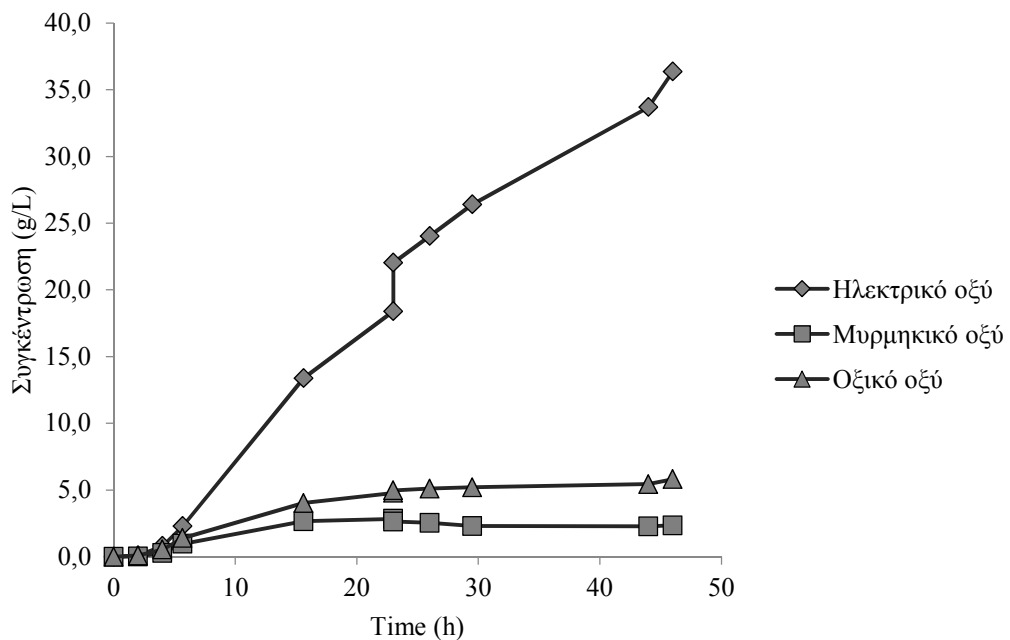
**Διάγραμμα 3.4** Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και παραπροϊόντων από το βακτήριο *A. succinogenes* σε ημισυνεχείς ζυμώσεις.

Το FAN ξεκινώντας από τα 288 mg/L έφτασε τα 94 mg/L στο τέλος της ζύμωσης G+. Ο IP μειώθηκε από τα 621 mg/L στα 341 mg/L. Η κατανάλωση του FAN και του IP

δεν διαφοροποιήθηκε αισθητά συγκριτικά με την περίπτωση που δεν χρησιμοποιούνται ηλεκτρόνια στη ζύμωση.



**Διάγραμμα 3.5** Κατανάλωση της γλυκόζης και παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από το βακτήριο *A. succinogenes* σε ημισυνεχείς ζυμώσεις με προσθήκη ηλεκτροδίων.



**Διάγραμμα 3.6** Παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και παραπροϊόντων από το βακτήριο *A. succinogenes* σε ημισυνεχείς ζυμώσεις με προσθήκη ηλεκτροδίων.

Στις ασυνεχείς ζυμώσεις, η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος είναι μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιείται το  $MgCO_3$  και ο χρόνος που διαρκεί η ζύμωση μικρότερος, με αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγικότητα. Το ανθρακικό μαγνήσιο αποτελεί βέλτιστη επιλογή ρυθμιστή pH για τις ζυμώσεις με το βακτήριο *A. succinogenes* (Guettler et al., 1996). Η δράση του  $MgCO_3$  μαζί με παροχή  $CO_2$  σχετίζεται με αύξηση της τελικής συγκέντρωσης του παραγόμενου ηλεκτρικού οξέος μέσω της συμβολής του  $MgCO_3$  στη διατήρηση του pH (Zou et al., 2011). Τα παραπάνω δικαιολογούν την ελαφρώς αυξημένη παραγωγικότητα και τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος στις ζυμώσεις με προσθήκη  $MgCO_3$  σε σχέση με εκείνες που το  $MgCO_3$  δε χρησιμοποιήθηκε.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των ασυνεχών και ημισυνεχών ζυμώσεων με προσθήκη  $MgCO_3$  είναι φανερό ότι η τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος είναι αυξημένη στις ημισυνεχείς ζυμώσεις και οι λόγοι FA/SA και AA/SA μειώνονται σε σχέση με εκείνους των ασυνεχών (Πίνακας 3.1). Συγκεκριμένα, ο λόγος FA/SA ήταν 0,25 g/g στις ασυνεχείς ζυμώσεις, ενώ 0,04 g/g στις ημισυνεχείς. Στις ημισυνεχείς ζυμώσεις με παροχή ηλεκτρικού ρεύματος ο λόγος FA/SA ήταν 0,06 g/g. Όσον αφορά το λόγο AA/SA στις ασυνεχείς ζυμώσεις ήταν 0,30 g/g, ενώ στις ημισυνεχείς με το  $MgCO_3$  ήταν 0,18 g/g. Τέλος, στις ημισυνεχείς ζυμώσεις με παροχή ηλεκτρικού ρεύματος ήταν 0,17g/g.

**Πίνακας 3.1** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ασυνεχών και ημισυνεχών ζυμώσεων με το βακτήριο *A. succinogenes*.

Όπου  $G^+$  οι ζυμώσεις με προσθήκη  $MgCO_3$  και  $E$  οι ημισυνεχείς ζυμώσεις με προσθήκη  $MgCO_3$  και παροχή ηλεκτρικού ρεύματος. Όπου  $Y_{SA/G}$  η απόδοση παραγωγής ηλεκτρικού οξέος από τη γλυκόζη σε g/g,  $P_{SA}$  η παραγωγικότητα του ηλεκτρικού οξέος σε g/l\*h και  $DCW$  η βιομάζα του μικροοργανισμού. Ο λόγος FA/SA είναι ο λόγος g μυρμηκικού προς g ηλεκτρικού οξέος, ενώ ο λόγος AA/SA g οξικού προς g ηλεκτρικού οξέος.

Ζύμωση	$Y_{SA/G}$ (g/g)	SA (g/L)	$P_{SA}$ (g/L*h)	DCW (g/L)	FA:SA (g/g)	AA:SA (g/g)	FA:SA (mol/mol)	AA:SA (mol/mol)
$G^+$ ασυνεχής	0,40	20,0	0,88	2,46	0,25	0,30	0,63	0,59
$G^+$ ημισυνεχής	0,67	33,9	0,50	2,71	0,04	0,18	0,11	0,36
$E$ ημισυνεχής	0,62	36,4	0,51	3,61	0,06	0,16	0,17	0,31

Η μέγιστη θεωρητική απόδοση που μπορεί να φτάσει η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος με υπόστρωμα τη γλυκόζη είναι 1,12 g/g. Η υψηλότερη συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος που έχει σημειωθεί ήταν 101 g/L με απόδοση 0,92 g/g και επετεύχθη έχοντας ως υπόστρωμα τη γλυκερόλη και με χρήση του βακτηρίου *A. succinogenes* FZ21 (Guettler et al., 1996). Το τελευταίο αποτελεί στέλεχος που συσσωρεύει μικρές ποσότητες πυροσταφυλικού οξέος και συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος μεγαλύτερες των 90 g/L. Στο συγκεκριμένο πείραμα η τελική συγκέντρωση των οξέων πυροσταφυλικό, οξικό και μυρμηκικό ήταν 3,4 g/L, 16,4 g/L και 0 g/L αντίστοιχα. Επίσης, υψηλή τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος (60,2 g/L) έχει επιτευχθεί με το βακτηριακό στέλεχος *A. succinogenes* CGMCC 1593 (Liu et al., 2008).

Όπως φαίνεται στα αποτελέσματα των ζυμώσεων που παρατίθενται στον Πίνακα 3.2, τόσο στις ασυνεχείς όσο και τις ημισυνεχείς ζυμώσεις με το βακτηριακό στέλεχος *A. succinogenes* 130Z και πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη, η τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος είναι αυξημένη συγκριτικά με αντίστοιχα πειράματα στα οποία χρησιμοποιείται η γλυκόζη (Carvalho et al., 2014; Vlysidis et al., 2011). Κατά τον καταβολισμό της γλυκερόλης προς φωσφοενολ-πυροσταφυλικό οξύ (PEP) παράγεται διπλάσια ποσότητα αναγωγικών ισοδύναμων (Yazdani & Gonzalez, 2007) τα οποία είναι στη συνέχεια διαθέσιμα προς αξιοποίηση στο μονοπάτι C4 απ' όπου παράγεται το ηλεκτρικό οξύ.

**Πίνακας 3.2** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα άλλων ζυμώσεων με το βακτήριο *A. succinogenes* που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία.

Οι ασυνεχείς ζυμώσεις συμβολίζονται με B (batch), οι ημισυνεχείς με Fb (fed-batch) και οι συνεχείς με C (continuous). Ακόμη, για τα προϊόντα της ζύμωσης, με SA το ηλεκτρικό οξύ, με FA το μυρμηκικό οξύ και με AA το οξικό οξύ. Όπου Glu η γλυκόζη, Gly η γλυκερόλη, YE το εκχύλισμα ζύμης, CSL το corn steep liquor, DMSO το διμεθυλοσουλφοξείδιο. Όπου YSA/G η απόδοση παραγωγής ηλεκτρικού οξέος από τη γλυκόζη σε g/g, PSA η παραγωγικότητα του ηλεκτρικού οξέος.

Στέλεχος μικροοργανισμού	Υπόστρωμα		Τύπος ζύμωσης	SA (g/L)	FA (g/L)	AA (g/L)	Y <sub>SA</sub> (g/g)	P <sub>SA</sub> (g/L*h)	Αναφορά
<i>A. succinogenes</i> 130Z	Glu	YE +CSL	C	48,5	αγν.	αγν.	0,91	αγν.	Bradfiel & Nicol, 2014
<i>A. succinogenes</i> CGMCC 1593	Glu	YE+CSL +MgCO <sub>3</sub>	Fb	60,2	αγν.	9,4	0,75	1,3	Liu et al., 2008
<i>A. succinogenes</i> 130Z	Gly	YE+ DMSO	Fb	49,6	αγν.	αγν.	0,92	0,62	Carvalho et al., 2014
<i>A. succinogenes</i>	Glu	YE+	Fb	33,9	1,37	6,26	0,67	0,5	παρούσα

130Z		MgCO <sub>3</sub>							εργασία
<i>A. succinogenes</i> 130Z	Glu	YE+ MgCO <sub>3</sub>	Fb+E	36,4	2,35	5,81	0,62	0,51	παρούσα εργασία
<i>A. succinogenes</i> 130Z (FZ21)	Glu	YE+ MgCO <sub>3</sub>	B	101	0	16,4	0,92	αγν.	Guettler et al., 1996
<i>A. succinogenes</i> 130Z	Glu	YE	B	18,8	2,50	4,48	0,61	0,72	Pateraki et al., 2020
<i>A. succinogenes</i> 130Z	Glu	YE+ MgCO <sub>3</sub>	B	20	4,93	6,02	0,40	0,88	παρούσα εργασία
<i>A. succinogenes</i> 130Z	Gly	YE	B	26,7	αγν.	αγν.	0,96	0,23	Vlysidis et al., 2011

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος στο τέλος της ζύμωσης (36,4 g/L) καταγράφηκε όταν χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρικό ρεύμα μαζί με το MgCO<sub>3</sub>. Σε πειράματα με το βακτηριακό στέλεχος *B. succiniciproducens* JF 4016 και με χρήση ηλεκτροχημικής μεμβράνης για την απομάκρυνση του ηλεκτρικού οξέος από το υγρό θρεπτικό μέσο της ζύμωσης είχε επίσης παρατηρηθεί βελτίωση της τελικής συγκέντρωσης του οξέος (Pateraki et al., 2019). Από τους ερευνητές το αποτέλεσμα αποδόθηκε στην παροχή αναγωγικής ενέργειας χάρη στη χρήση της ηλεκτροχημικής μεμβράνης. Οι Carvalho et al. (2014) σε ημισυνεχείς ζυμώσεις και χρησιμοποιώντας DMSO, το οποίο λειτουργεί ως αποδέκτης ηλεκτρονίων, και ως πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη έφτασαν την τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος 49,6 g/L και απόδοση 0,92 g/g.

Με χρήση της ηλεκτρικής ενέργειας σε ζυμώσεις με το βακτήριο *B. succiniciproducens* έχει επιτευχθεί βελτίωση της μέγιστης παραγωγικότητας του ηλεκτρικού οξέος κατά 30%. Με υπόστρωμα το επεξεργασμένο απόβλητα της βιομηχανίας χαρτοπολτού SSL η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 0,61 g/g έναντι των 0,53 g/g, ενώ η παραγωγικότητα τα 0,41 g/L\*h έναντι 0,31 g/L\*h όταν δε χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτροχημικό κελί (Pateraki et al., 2019). Οι Zhao et al. (2016) εξέτασαν την επίπτωση της εφαρμογής τάσης -1,8 V και τη χρήση μεταφορέα ηλεκτρονίων (NR & DTT) σε ζυμώσεις με το στέλεχος *Actinobacillus succinogenes* NJ113 και υπόστρωμα υδρόλυμα καλαμποκιού (corncob hydrolysate). Τα πειράματά τους είχαν ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της δεξαμενής NAD(H) στα βακτηριακά κύτταρα ευνοώντας την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος. Η απόδοση του ηλεκτρικού οξέος έφτασε το 0,6 g/g έναντι του 0,2 g/g σε ζυμώσεις που δεν χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρικό ρεύμα.

Στην παρούσα εργασία, στη ζύμωση που χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρική ενέργεια με την ένταση ορισμένη στα 0,57 A και εύρος τάσης 3 – 7,2 V, η απόδοση ήταν 0,62 g/g και η παραγωγικότητα 0,51 g/L\*h έναντι 0,67 g/g και 0,50 g/L\*h στις ζυμώσεις χωρίς την παροχή ηλεκτρικού ρεύματος. Αν και η απόδοση είναι χαμηλότερη συγκριτικά με το control πείραμα η τελική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος ήταν ελαφρώς αυξημένη, όπως όμως και η παραγωγή βιομάζας (Πίνακας 3.1). Τόσο η προσθήκη MgCO<sub>3</sub> όσο και η παροχή ηλεκτρονίων στο υγρό θρεπτικό μέσο της ζύμωσης μεμονωμένα αναμενόταν να βελτιώσουν την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος (Zou et al., 2011; Pateraki et al., 2019). Η συνεργιστική τους δράση δε φαίνεται να διαφοροποιεί αρκετά τα τελικά αποτελέσματα.

Στέλεχος	Πηγή άνθρακα	Τάση (V)	Προϊόν	Μεταφορέας ηλεκτρονίων	$Y_{PS}$ (g/g)	PP (g/L·h)	$Y_c$	$P_c$	Αναφορά
<i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113	υδρόλυμα καλαμποκιού	-1,8	ηλεκτρικό οξύ	NR & DTT	0,6	αγν.	$0,2 \pm 0,02$	αγν.	Zhao et al., 2016
<i>Basfia succiniciproduens</i>	SSL	-3 έως -7,2	ηλεκτρικό οξύ	-	0,61	0,41	0,53	0,31	Pateraki et al., 2019
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Γλυκόζη	-1	μικροβιακά λιπίδια	-	0,227	αγν.	0,171	αγν.	Arbter et al., 2019
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	Φρουκτόζη	0,6	PHB	PMF	αγν.	αγν.	αγν.	αγν.	Nishio et al., 2014
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792	Γλυκόζη	-0,6	ABE	-	$0,202 \pm 0,01$	αγν.	$0,141 \pm 0,022$	αγν.	Engel et al., 2019
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 35609	Κυτταρίνη	-1,5	Αιθανόλη	NR	αγν.	0,019	αγν.	0,0095	Shim et al., 2002
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Γλυκόζη	-0,6	Γαλακτικό οξύ	AQDS	$1,62 \pm 0,04$	$11,1 \pm 1,5$	$1,1 \pm 0,03$	$16,4 \pm 0,3$	Sasaki et al., 2014
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> BAS 7	Σακχαρόζη	-0,4	Βουτυρικό οξύ	NR	$0,45 \pm 0,06$	$0,31 \pm 0,07$	$0,33 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0$	Choi et al., 2012
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ZW04	Γλυκόζη	-1,25	Λυσίνη	AQ2S	$0,043 \pm 0,008$	αγν.	0,024	αγν.	Xafenias et al., 2017
Μικτή καλλιέργεια	DSW	0,512	PHA	-	αγν.	αγν.	αγν.	αγν.	Srikanth et al., 2012
Μικτή καλλιέργεια	Γλυκερόλη	0-0,7	1,3-PDO	-	$0,57 \pm 0,09$	αγν.	$0,27 \pm 0,13$	αγν.	Zhou et al., 2015
Μικτή καλλιέργεια	Γλυκερόλη	-0,9	1,3-PDO	-	0,5	1,5	0,25	0,6	Zhou et al., 2013

### Πίνακας 3.3 Σύνγκεντρωτικά αποτελέσματα ζυμώσεων που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία και στις οποίες έχει εφαρμοστεί ηλεκτρική ενέργεια.

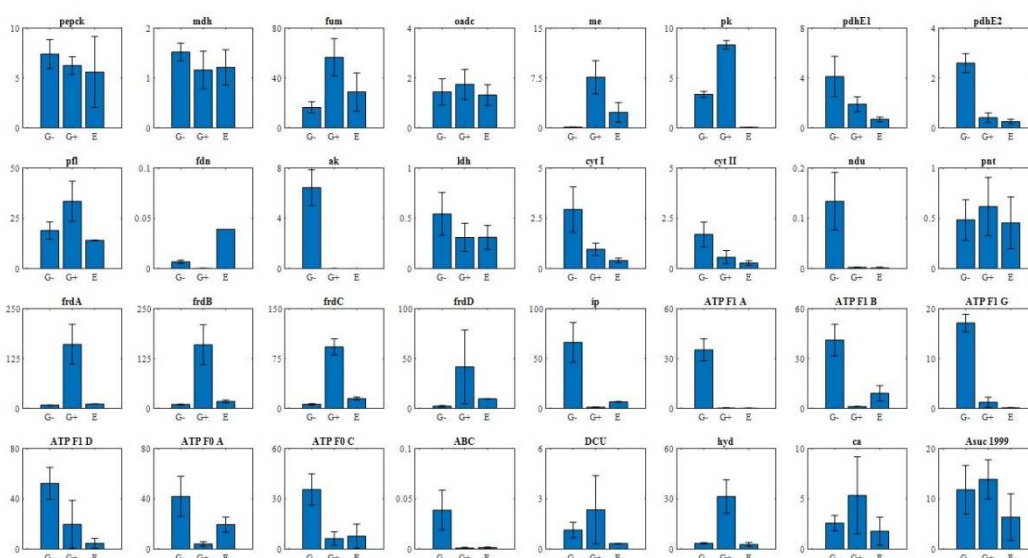
Όπου  $Y_{PS}$  η απόδοση,  $P_p$  η παραγωγικότητα,  $Y_c$  και  $P_c$  η απόδοση και παραγωγικότητα του control περιβάματος, αντίστοιχα. Όπου SSL το επεξεργασμένο απόβλητα της βιομηχανίας χαρτοπολτού, DSW (designed synthetic wastewater), PHB το πολυ-υδροξύ-βουτυρικό οξύ, ABE η ακετόνη-βουτανόλη-αιθανόλη, PHA ο πολυδρόξυαλακανοϊκός εστέρας, 1,3-PDO η 1,3 προπανοδιόλη.



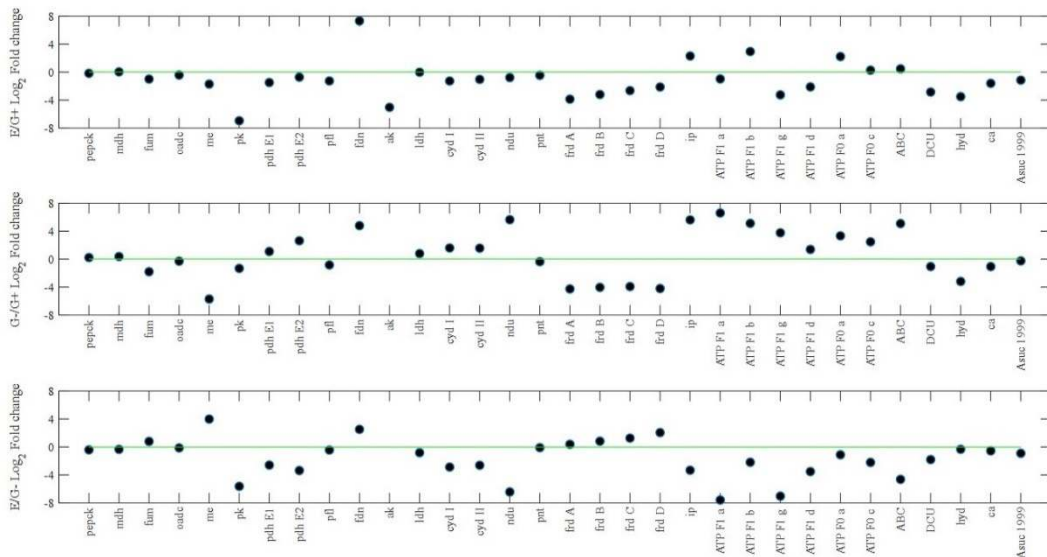
### 3.2 Μεταβολισμός του βακτηρίου *A. succinogenes*

Για να διαπιστωθεί εάν η προσθήκη ανθρακικού μαγνησίου ( $MgCO_3$ ) και η ηλεκτρική ενέργεια επιδρούν στο μεταβολισμό του βακτηρίου *A. succinogenes* μελετήθηκε η γονιδιακή του έκφραση. Πραγματοποιήθηκε μεταγραφομική ανάλυση δειγμάτων RNA που προέρχονταν από την εκθετική φάση της κάθε ζύμωσης. Συγκεκριμένα, μέσω της μεταγραφομικής ανάλυσης μελετήθηκαν τα γονίδια του κωδικοποιούν για τα ένζυμα που παίρνουν μέρος τις μεταβολικές αντιδράσεις του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA cycle), αυτά τις οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και ορισμένα που κωδικοποιούν για διαμεμβρανικούς μεταφορείς. Τα αποτελέσματα της qPCR για τα γονίδια παρατίθενται ως σχετική έκφραση του εκάστοτε γονιδίου ενδιαφέροντος. Παρουσιάζεται επίσης ο λογάριθμος λόγων διαφοράς ( $\log_2(\text{fold-change})$ ). Τα παραπάνω υπολογίστηκαν όπως περιγράφεται στο εδάφιο 5, ενώ το σύνολο των γονιδίων που μελετήθηκαν φαίνεται στον Πίνακα 2.1. Οι συντομογραφίες των χημικών ενώσεων που αναφέρονται παρακάτω και σχετίζονται με το μεταβολισμό του βακτηρίου *A. succinogenes* δίνονται στον εδάφιο 5.5 (Παράρτημα).

Στην Εικόνα 3.1 δίνεται η σχετική έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν σε καθέναν από τους χειρισμούς, μαζί με την τυπική απόκλιση (SD). Ακόμη, στην Εικόνα 3.2 απεικονίζονται οι λόγοι μεταξύ των χειρισμών με και χωρίς ανθρακικό ασβέστιο ( $MgCO_3$ ) εκφρασμένοι με το λογάριθμο λόγων διαφοράς ( $\log_2(\text{fold-change})$ ).



**Εικόνα 3.1** Η σχετική έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν σε καθέναν από τους χειρισμούς. Όπου G- οι ζυμώσεις χωρίς την προσθήκη  $MgCO_3$ , G+ οι ζυμώσεις με προσθήκη  $MgCO_3$  και E οι ζυμώσεις με προσθήκη  $MgCO_3$  παροχή ηλεκτρικού ρεύμα με προσθήκη ηλεκτροδίων στο υγρό θρεπτικό μέσο.



**Εικόνα 3.2** Ο λογάριθμος λόγων διαφοράς ( $\log_2(\text{fold-change})$ ) των γονιδίων που μελετήθηκαν σε καθέναν από τους χειρισμούς. Το G- αντιστοιχεί στις ζυμώσεις χωρίς προσθήκη  $\text{MgCO}_3$ , ενώ το G+ σε εκείνες με προσθήκη  $\text{MgCO}_3$ , και το E στις ζυμώσεις που παρήχθη ηλεκτρική ενέργεια με προσθήκη ηλεκτροδίων στο υγρό θρεπτικό μέσο.

### 3.2.1 Καρβοξυκινάση του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού οξέος (PEPCK)

Το ATP εξαρτώμενο ένζυμο καρβοξυκινάση του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού οξέος (EC 4.1.1.49) σχετίζεται με την παραγωγή του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού οξέος (PEP) που βρίσκεται σε σημείο διακλάδωσης για το σχηματισμό του ηλεκτρικού οξέος. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2, στο τέλος της γλυκόλυσης παράγεται PEP, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε οξαλοξικό οξύ (OAA) με τη δράση του ενζύμου PEPCK, ακολουθώντας το μονοπάτι C4, είτε σε πυροσταφυλικό οξύ (Pyru) μέσω της δράσης του ενζύμου κινάση του πυροσταφυλικού οξέος (PK), ακολουθώντας το C3 μονοπάτι παραγωγής των παραπροϊόντων της ζύμωσης.



Το ένζυμο PEPCK είναι υπεύθυνο και για την παραγωγή PEP από φουμαρικό ή μηλικό οξύ κατά τη γλυκονεογένεση (McKinlay et al., 2010). Τούτο σημαίνει πως το ένζυμο δρα και προς τις δύο κατευθύνσεις της Αντίδρασης 1. Τα δισθενή κατιόντα  $\text{Mn}^{2+}$  ή/και  $\text{Mg}^{2+}$  είναι απαραίτητα για τη δράση του ενζύμου (Lee et al., 1981). Ακόμη, δεδομένης της υψηλής  $K_m$  του για το  $\text{HCO}_3^-$  (Podkovyrov & Zeikus, 1993) το διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ), το οποίο στις ζυμώσεις παρέχεται εξωγενώς, αλλά και μέσω της προσθήκη  $\text{MgCO}_3$  όταν αυτό χρησιμοποιείται, επηρεάζει την παραγωγή του PEP. Από τα παραπάνω μπορεί να υποθεθεί ότι η προσθήκη  $\text{MgCO}_3$  στις ζυμώσεις έχει διπλή επίδραση στην ενεργότητα του

ενζύμου PEPCK και επακόλουθα την πορεία της αμφίδρομης Αντίδρασης 1. Με τα πειράματά τους οι McKinlay et al. (2007) έδειξαν ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις  $\text{NaHCO}_3$  η ροή άνθρακα από την PEPCK προς το C4 μονοπάτι παραμένει η ίδια, ενώ εκείνη από το C4 προς το C3 μέσω των ενζύμων αποκαρβοξυλάση του μηλικού οξέος (ME) και αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού οξέος (OADC) μειώνεται, έχοντας τελικά ως αποτέλεσμα αυξημένες τελικές συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος. Να αναφερθεί επίσης ότι τα πειράματα των Van der Werf et al. (1997) έδειξαν πως η PEPCK, όπως και η PK, απαντώνται στα κύτταρα του βακτηρίου σε σταθερές συγκεντρώσεις ανεξάρτητα από τις συνθήκες στις οποίες βρίσκεται το βακτηριακό κύτταρο (constitutive enzyme). Υποτέθηκε δηλαδή ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα συγκεκριμένα ένζυμα είναι ιδιοσυστατικά.

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *perck* (*Asuc\_0221*) ήταν **0,2** φορές αυξημένη στο χειρισμό G- σε σχέση με το G+, ενώ **0,4** και **0,2** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Σε επίπεδο σημαντικότητα 5%, τα πειραματικά δεδομένα δεν υποστηρίζουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των τριών χειρισμών.

### 3.2.2 Μονοπάτι C4

Το ένζυμο **αφυδρογονάση του μηλικού οξέος** (EC 1.1.1.37) δρα σε υδροξυλικές ομάδες έχοντας ως συνένζυμο το  $\text{NAD}^+$  ή το  $\text{NADP}^+$ . Η πρότυπη ελεύθερη ενέργεια ( $\Delta G^\circ$ ) της Αντίδρασης 2, είναι σημαντικά θετική, άρα δεν είναι αυθόρμητη με φορά προς τα δεξιά (Berg et al., 2011). Σύμφωνα με το Kegg database η ύπαρξη του ενζύμου που καταλύει την παραγωγή οξαλοξικού με υπόστρωμα το μηλικό οξύ (malate: quinone oxidoreductase) δεν έχει διαπιστωθεί στο βακτήριο *A. succinogenes*.

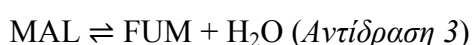


Μέσω των πειραμάτων τους, οι Van der Werf et al. (1997) έδειξαν ότι η υψηλή ενεργότητα του ενζύμου MDH σχετίζεται με αυξημένες συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος σε ζυμώσεις με υπόστρωμα τη γλυκόζη. Ο ρόλος του ενζύμου στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος φάνηκε και στα πειράματα των Guarnieri et al. (2017) όπου η υπερέκφραση του *mdh* συντέλεσε σε βελτιωμένη απόδοση ηλεκτρικού οξέος ως προς το υπόστρωμα από το μικροοργανισμό *A. succinogenes*. Εφαρμόζοντας ηλεκτρική ενέργεια -0,35 V σε ζυμώσεις με το βακτήριο *A. succinogenes* οι Li et al. (2010) κατέγραψαν αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου συγκριτικά με τα πειράματα που δεν χρησιμοποιήθηκε το ρεύμα, και κατ' επέκταση αυξημένη απόδοση και παραγωγικότητα. Να σημειωθεί ότι η παραπάνω είναι μια

από τις δυο αντιδράσεις του αναγωγικού κύκλου του Krebs που απαιτούν αναγωγική ενέργεια με τη μορφή του NADH (Εικόνα 1.2).

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *mdh* (*Asuc\_1612*) ήταν **0,4** φορές αυξημένη στο χειρισμό G- σε σχέση με το G+, ενώ **0,3** φορές μειωμένη και **0,1** φορές αυξημένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Με p-value > 0,05, σε επίπεδο σημαντικότητα 5%, τα πειραματικά δεδομένα δεν υποστηρίζουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση των γονιδίων μεταξύ των χειρισμών.

Το ένζυμο **υδρατάση του φουμαρικού οξέος** (EC 4.2.1.2) δρα καταλύοντας την παρακάτω αμφίδρομη αντίδραση:

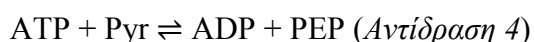


Τα πειράματα των Li et al. (2010) παρατήρησαν αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου υδρατάση του φουμαρικού οξέος όταν εφαρμόστηκε ηλεκτρική ενέργεια της τάξης των -0,35 V. Σε άλλα πειράματα η υπερέκφραση του γονιδίου *fum* είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της απόδοσης παραγωγής ηλεκτρικού οξέος συγκριτικά με τις ζυμώσεις που έγιναν με το άγριου τύπου βακτήριο *A.succinogenes 130Z* (Guarnieri et al., 2017).

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *fum* (*Asuc\_0956*) ήταν **1,8** φορές μειωμένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, ενώ **0,8** φορές αυξημένη και **1** φορά μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Σε επίπεδο σημαντικότητα 5%, τα πειραματικά δεδομένα δεν υποστηρίζουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση των γονιδίων μεταξύ των χειρισμών. Ωστόσο, με p-value **0,08**, σε επίπεδο σημαντικότητα 10%, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών που αφορούν το MgCO<sub>3</sub>.

### 3.2.3 Μονοπάτι C3.

Το ένζυμο **κινάση του πυροσταφυλικού οξέος** (EC 2.7.1.40) δρα στην παρακάτω αντίδραση:

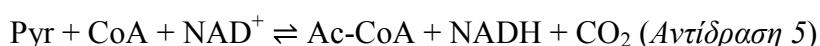


Όπως αναφέρθηκε ήδη, το PEP που παράγεται μέσω της γλυκόλυσης μπορεί να μετατραπεί είτε σε οξαλοξικό οξύ με τη δράση του ενζύμου PEPCK είτε σε πυροσταφυλικό οξύ με τη δράση της PK. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δράση της PK δεν είναι η μόνη που τροφοδοτεί το C3 μονοπάτι. Η ροή μέσω των ενζύμων ME και OADC αποδείχθηκε μεγαλύτερη από εκείνη της PK (McKinlay, 2007). Πρέπει ακόμη να αναφερθεί η *in vitro*

δράση του ενζύμου PK και ως αποκαρβοξυλάσης του οξαλοξικού οξέος (Creighton & Rose, 1976) Στο μεταβολισμό του βακτηρίου *A.succinogenes*, το ένζυμο PK παρουσιάζει σταθερή ενεργότητα ανεξάρτητα από το υπόστρωμα στο οποίο έχει εξεταστεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Van der Werf et al., 1997). Τα κατιόντα  $Mg^{2+}$ , αλλά κυρίως τα κατιόντα  $Mn^{2+}$ , αποτελούν συμπράγοντα του ενζύμου (Berg et al., 2011).

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *pk* (*Asuc\_1171*) ήταν **1,3** φορές μειωμένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, ενώ **6,9** και **5,6** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Σε επίπεδο σημαντικότητα < 1%, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση των γονιδίων μεταξύ όλων των χειρισμών.

Το **σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης** είναι ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από τρία είδη ενζύμων τα οποία συμμετέχουν στην κατάλυση της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος (*Αντίδραση 5*). Η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA διενεργείται σε τρία βήματα: την αποκαρβοξυλίωση, την οξείδωση και τη μεταφορά της προκύπτουσας ακετυλικής ομάδας στο CoA. Τα ένζυμα του συμπλόκου είναι η **αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος E1** (EC 1.2.4.1) και η **διυδρολιπούλο-ακετυλοτρανσφεράση E2** (EC 2.3.1.12) καθώς και τη **διυδρολιπούλο-αφυδρογονάση E3** (EC 1.8.1.4) (Berg et al., 2011). Η ρύθμιση της δράσης του συμπλέγματος γίνεται μέσω αλλοστερικών μηχανισμών και παρεμπόδισης εκ του προϊόντος (Patel et al., 1996).



Η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος τροφοδοτεί το βακτηριακό κύτταρο με δυο σημαντικές για το μεταβολισμό ενώσεις. Η πρώτη είναι το ακετυλο-CoA, που αποτελεί μεταβολικό ενδιάμεσο του C3 μονοπατιού. Η ακετυλομάδα του συνδέεται μέσω ενός δεσμού πλούσιου σε ενέργεια, στο συνένζυμο A. Μπορούμε να πούμε ότι το ακετυλο-CoA μεταφέρει μία ενεργοποιημένη ακετυλομάδα, όπως ακριβώς το ATP μεταφέρει μία ενεργοποιημένη φωσφορική ομάδα (Berg et al., 2011). Η δεύτερη είναι το συνένζυμο NADH που παράγεται και μπορεί να αξιοποιηθεί στην τροφοδοσία του μονοπατιού C4.

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *pdh E1* (*Asuc\_0942*) ήταν **1,1** φορές αυξημένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, ενώ **2,6** και **1,5** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Σε επίπεδο σημαντικότητα 5%, τα πειραματικά δεδομένα

υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών. Από την άλλη, η σχετική έκφραση του γονιδίου *pdh E2* (*Asuc\_0943*) ήταν **2,6** φορές αυξημένη στο πείραμα G- συγκριτικά με το G+, ενώ **3,4** και **0,7** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Με p-value < **0,01**, σε επίπεδο σημαντικότητα 1%, τα πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά του χειρισμού E από τους υπόλοιπους.

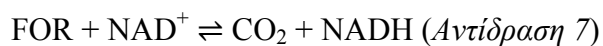
Το ένζυμο **ακετυλοτρανσφεράση του μυρμηγκικού οξέος** (EC 2.3.1.54) καταλύει την *Αντίδραση 6* και αποτελεί σημαντικό ένζυμο στη μελέτη του μεταβολισμού του *A. succinogenes*. Συγκεκριμένα, πέρα από την απευθείας παραγωγή του μυρμηγκικού οξέος, τον τροφοδοτεί με ακετυλο-CoA, από το οποίο στη συνέχεια δύναται να σχηματιστεί οξικό οξύ ή/και αιθανόλη.



Σύμφωνα με τους Park et al. (1999) το στέλεχος *A. succinogenes* FZ-6, που στερούταν των ενζύμων PFL και FDH, παρήγαγε ηλεκτρικό οξύ με αυξημένη απόδοση συγκριτικά με το άγριο στέλεχος, ταυτόχρονα όμως παρατηρήθηκε σχηματισμός υψηλών συγκεντρώσεων πυροσταφυλικού οξέος. Η αδυναμία του ίδιου στελέχους να παράγει ηλεκτρικό οξύ όταν του παρήχθη αποκλειστικά φουμαρικό οξύ απουσία αερίου H<sub>2</sub>, εξηγείται από την απουσία των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του πυροσταφυλικού οξέος και την επακόλουθη έλλειψη αναγωγικής δύναμης, H<sub>2</sub> ή NADH. Η δυνατότητα παραγωγής ανακτήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρική ενέργεια (-1,5V και 0,3-1mA) και ο NR μεταφορέας ηλεκτρονίων. Οι McKinlay & Vieille (2008) έδειξαν ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού με χρήση αερίου H<sub>2</sub> είχε ως αποτέλεσμα μείωση της ροής άνθρακα από το μονοπάτι που εμπλέκεται το ένζυμο PFL. Τα παραπάνω υπογραμμίζουν τη σημασία του ενζύμου αναφορικά με την τροφοδότηση του μεταβολισμού με NADH.

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *pfl* (*Asuc\_0207*) ήταν **0,8** φορές μειωμένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, ενώ **0,4** και **1,2** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Με p-value >**0,05**, σε επίπεδο σημαντικότητα 5%, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών.

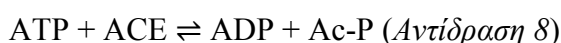
Το ένζυμο **αφυδρογονάση του μυρμηγκικού οξέος** (EC 1.17.1.9) καταλύει την αντίδραση:



Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2, η παραπάνω αποτελεί μια από τις μεταβολικές αντιδράσεις του C3 μονοπατιού που τροφοδοτούν με NADH το μονοπάτι παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος (C4). Οι Van der Werf et al. (1997) μελετώντας τις ειδικές ενεργότητες των ενζύμων του *A. succinogenes* έδειξαν ότι αυτή της αφυδρογονάσης του μυρμηκικού οξέος είχε εξίσου χαμηλές τιμές, της τάξης των  $10 \text{ nmol min}^{-1} \cdot [\text{mg protein}]^{-1}$ , έχοντας ως υπόστρωμα την γλυκόζη ή τη D-σορβιτόλη.

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *fdn* (*Asuc\_1264*) ήταν **4,8** φορές αυξημένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, ενώ **2,5** και **7,3** φορές αυξημένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Σε επίπεδο σημαντικότητα 5% δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών.

Το ένζυμο **κινάση του οξικού οξέος** (EC 2.7.2.1) καταλύει την αντίδραση παραγωγής οξικού από το φωσφοακετύλο σύμφωνα με την *Αντίδραση 8* που δίνεται παρακάτω. Το ένζυμο ακετυλο-CoA συνθάση καταλύει την αντίδραση προς την αντίθετη κατεύθυνση, την παραγωγή ακετυλο-CoA. Όπως προαναφέρθηκε το ακετυλο-CoA αποτελεί σημαντική ένωση για το βακτηριακό μεταβολισμό. Η παραπάνω αμφίδρομη αντίδραση ελέγχει την τύχη του ανάλογα με τη ροή άνθρακα στον κεντρικό μεταβολισμό. Σύμφωνα με μελέτη που έγινε στο βακτήριο *E.coli*, η υψηλή ροή άνθρακα οδηγεί στην παραγωγή οξικού που κατά την φάση στασιμότητας μπορεί να μετατραπεί πάλι σε ακετυλο-CoA (Wolfe, 2005).



Η παραπάνω αντίδραση του μονοπατιού C3 τροφοδοτεί το μεταβολισμό με ένα 1 mol ATP μαζί με κάθε mol οξικού οξέος που παράγεται. Τα δισθενή κατιόντα  $\text{Mn}^{2+}$  ή/και  $\text{Mg}^{2+}$  είναι απαραίτητα για τη δράση του ενζύμου (Rose, 1955). Να σημειωθεί ότι η AK έχει βρεθεί σε υψηλά επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας στον *A. succinogenes* στα πειράματα των Van der Werf et al. (1997). Στελέχη τα οποία στερούνταν ενεργότητας του ενζύμου AK συσσώρευαν πυροσταφυλικό, παρουσιάζοντας έλλειψη NADH και τελικά μειωμένη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος συγκριτικά με άγρια στελέχη του *A.succinogenes* 130Z (Guarnieri et al., 2017).

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *ak* (*Asuc\_1661*) ήταν **9,1** φορές αυξημένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, ενώ **14,2** και **5** φορές αυξημένη στο χειρισμό E σε σχέση

με τους G- και G+ αντίστοιχα. Σε επίπεδο σημαντικότητα 1% υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των ζευγών χειρισμών G- - G+ και E - G-.

Το ένζυμο **αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος** (EC 1.1.1.28) καταλύει την αμφίδρομη *Αντίδραση 9*. Η αντίδραση παραγωγής του γαλακτικού οξέος είναι θερμοδυναμικά ευνοημένη και συμβάλει στην τροφοδότηση του μεταβολισμού με NAD<sup>+</sup>.

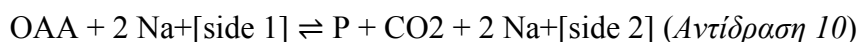


Όπως είναι φανερό από τα αποτελέσματα των ζυμώνσεων που παρατέθηκαν στο *εδάφιο 3.1* σε κανέναν από τους χειρισμούς δεν καταγράφηκε παραγωγή γαλακτικού οξέος από το μικροοργανισμό. Με το στέλεχος *A. succinogenes* 130Z έχει επιτευχθεί παραγωγή γαλακτικού οξέος με απόδοση  $0.96 \pm 0.09$  g/g μέσω συνολική αύξηση της ροής άνθρακα στο C3 μονοπάτι (Li et al., 2010). Στη συγκεκριμένη περίπτωση είχε πραγματοποιηθεί ζύμωση δυο φάσεων με παροχή 4 vvm O<sub>2</sub>.

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *ldh* (*Asuc\_0005*) ήταν **0,8** φορές αυξημένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, ενώ **0,8** φορές μειωμένη και **0,002** φορές αυξημένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Με p-value > **0,05**, σε επίπεδο σημαντικότητα 5%, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών.

### **3.2.4 Αποκαρβοξυλάση του μηλικού οξέος (ME) και αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού οξέος (OADC)**

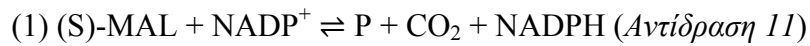
Το ένζυμο **αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού οξέος** (EC 7.2.4.2) καταλύει την αντίδραση:



Η σχετική έκφραση του γονιδίου *oadc* (*Asuc\_0302*) ήταν **0,3** φορές μειωμένη στο πείραμα G- συγκριτικά με το G+, ενώ **0,1** και **0,4** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Σε επίπεδο σημαντικότητα 5%, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών.

Το ένζυμο **NADP<sup>+</sup> εξαρτώμενη αποκαρβοξυλάση του μηλικού οξέος** (EC 1.1.1.40) καταλύει τις αντιδράσεις:





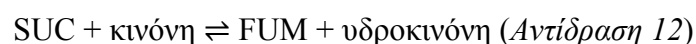
Η σχετική έκφραση του γονιδίου *me* (*Asuc\_0669*) ήταν **5,7** φορές μειωμένη στο πείραμα G- συγκριτικά με το G+, ενώ **4** φορές αυξημένη και **1,7** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Με p-value > **0,05** τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών.

Οι Van der Werf et al. (1997) έδειξαν ότι οι ενζυμικές ενεργότητες των ME και OADC ήταν παρούσες σε συγκρίσιμες τιμές όταν το βακτήριο αναπτύχθηκε σε γλυκόζη, σορβιτόλη και φουμαρικό οξύ + H<sub>2</sub> υποδηλώνοντας ότι τόσο το μηλικό όσο και το οξαλοξικό οξύ μπορούν να έχουν ρόλο διακλάδωσης, μαζί με το PEP, ανάμεσα στα μονοπάτια C3 και C4. Ακόμη, οι McKinlay et al. (2007) μελετώντας το μεταβολισμό του *A.succinogenes* εντόπισαν ότι οι αντιδράσεις που τελούνται από αυτά τα ένζυμα λειτουργούν ως εναλλακτική της δράσης του ενζύμου trans αφυδρογονάση του συνενζύμου NADPH που θα συζητηθεί στο *εδάφιο 3.2.6*.

### 3.2.5 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Στο βακτήριο *A. succinogenes* κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH ή το FADH<sub>2</sub> στο φουμαρικό οξύ και μέσω μιας σειράς φορέων ηλεκτρονίων που εδράζονται στην κυτταρική μεμβράνη, παράγεται τελικά ATP. Αυτοί οι φορείς είναι τα κυτοχρώματα I και II, η ATP συνθάση, η ανόργανη πυροφωσφατάση καθώς και η αφυδρογονάση του συνενζύμου NADH (Hollander et al., 1981). Η παραπάνω διεργασία βασίζεται στην παραγωγή πρωτονιοκινητής δύναμης η οποία είναι αποτέλεσμα της ανισοκατανομής πρωτονίων και αποτελεί κύρια πηγή ATP για τον μικροοργανισμό (Berg et al., 2011).

Το ένζυμο **αναγωγή του φουμαρικού οξέος** (EC 1.3.5.4) αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες (FRD A,B,C,D) και ως σύμπλοκο καταλύει την αντίδραση:

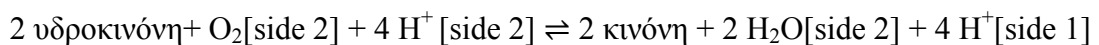


Η αντίδραση παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος μέσω της δράσης του συμπλόκου FRD αποτελεί το δεύτερο αναγωγικό βήμα του TCA στο μεταβολισμό του βακτηρίου *A.succinogenes*, και απαιτεί 1 mol NADH για κάθε mol SA. Ακόμη, το ενζυμικό σύμπλοκο FRD συντελεί στην παραγωγή 0,67 mol ATP για κάθε mol SA (Kröger et al., 2002). Σε

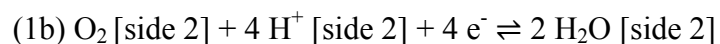
πειράματα μελέτης της ενζυμικής ενεργότητας του εδείχθη ότι υψηλές τιμές είναι μάλλον απαραίτητες για τον σχηματισμό του ηλεκτρικού οξέος (Van der Werf et al., 1997). Οι Park et al. (1999) εξέτασαν την ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους *A.succinogenes* FZ6 με μοναδική πηγή άνθρακα το φουμαρικό οξύ. Το συγκεκριμένο στέλεχος που παράγει χαμηλότερες τελικές συγκεντρώσεις οξικού και μυρμηκικού οξέος συγκριτικά με το αγρίου τύπου *A.succinogenes* 130Z δεν αναπτύχθηκε στο φουμαρικό οξύ όταν δεν χρησιμοποιήθηκε ο μεταφορέας ηλεκτρονίων NR και ρεύματος τάσης -1,5V ή H<sub>2</sub>. Η μειωμένη διαθεσιμότητα NADH, λόγω της χαμηλότερης παραγωγής των παραπροϊόντων της ζύμωσης ξεπεράστηκε με τη συνεργιστική δράση του NR μεταφορέα ηλεκτρονίων, του ενζυμικού συμπλόκου FRD και του HYD, που θα παρουσιαστεί στη συνέχεια.

Η σχετική έκφραση των γονιδίων *frd A/B/C/D* (*Asuc\_1813/14/15/16*) κυμάνθηκε γύρω από το **4** φορές μειωμένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, και **1** φορά αυξημένη και **3** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Με p-value **>0,05** σε όλες τις περιπτώσεις είναι φανερό ότι, σε επίπεδο σημαντικότητα 5%, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών.

Οι **υπομονάδα I** και **υπομονάδα II** (EC 7.1.1.7) του **κυτοχρώματος d – οξειδάση της ουμπικινόλης** (cytochrome d ubiquinol oxidase) καταλύουν την *Αντίδραση 13*. Απαιτούν μια ομάδα αίμης D ως συμπαράγοντα στη δράση τους και απαντώνται κυρίως στα βακτηριακά κύτταρα αερόβιων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται ελλείψει οξυγόνου (Palmer & Reedijk, 1991)



(*Αντίδραση 13*)



Η σχετική έκφραση των γονιδίων *cyd I* (*Asuc\_1797*) και *cyd II* (*Asuc\_1796*) ήταν και για τα δύο **1,6** φορές αυξημένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+. Για το *cyd I* σημειώθηκε σχετική έκφραση **2,9** και **1,3** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Τέλος, για το *cyd II* η σχετική έκφραση ήταν **2,6** και **1** φορές μειωμένη στο χειρισμό E συγκριτικά με τους G- και G+ αντίστοιχα. Σε επίπεδο σημαντικότητα 5%, με p-value ίσο με **0,039**, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι

υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών E και G-.

Το ενζυμικό σύμπλοκο **ATP συνθάση** (EC 7.1.2.2/7.1.2.1) αποτελείται από τις υπομονάδες F1 και F0. Η υπομονάδα F1 περιέχει τους πέντε τύπους πολυπεπτιδικών αλυσίδων α, β, γ, δ και ε, ενώ η F0 περιέχει τους α και c (Berg et al., 2011). Η ATP συνθάση εδράζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του *A.succinogenes* με την υπομονάδα F0 βυθισμένη σε αυτή και την F1 να προβάλλει στο κυτταρόπλασμα.



Η σχετική έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες του συμπλόκου της ATP συνθάσης εκφρασμένη μέσω του λογαρίθμου λόγων διαφοράς ( $\log_2(\text{fold-change})$ ) φαίνεται παρακάτω:

**Πίνακας 3.5** Σχετική έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες της ATP συνθάσης, ATP F1 a, b, g, d και ATP F0 a, c εκφρασμένη μέσω του λογαρίθμου λόγων διαφοράς ( $\log_2(\text{fold-change})$ ).

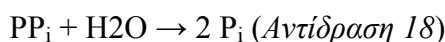
	<b>ATP F1 a</b>	<b>ATP F1 b</b>	<b>ATP F1 g</b>	<b>ATP F1 d</b>	<b>ATP F0 a</b>	<b>ATP F0 c</b>
<b>E/G+</b>	-1,0	3,0	-3,2	-2,1	2,2	0,3
<b>G-/G+</b>	6,6	5,1	3,8	1,4	3,3	2,5
<b>E/G-</b>	-7,6	-2,2	-7,0	-3,5	-1,1	-2,2

Το p-value για όπως υπολογίστηκε κατά την εφαρμογή της ANOVA για κάθε ζευγάρι χειρισμών και για καθένα από τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες δίνεται στον πίνακα:

**Πίνακας 3.6** Αποτελέσματα ANOVA για τη σχετική έκφραση των γονιδίων ATP F1 a, b, g, d και ATP F0 a, c που κωδικοποιούν για την ATP συνθάση.

	<b>E - G+</b>	<b>G- - G+</b>	<b>E - G-</b>
<b>ATP F1 a</b>	0,99	0,01	0,00
<b>ATP F1 b</b>	0,71	0,05	0,06
<b>ATP F1 g</b>	0,70	0,00	0,00
<b>ATP F1 d</b>	0,59	0,16	0,08
<b>ATP F0 a</b>	0,61	0,19	0,35
<b>ATP F0 c</b>	0,94	0,06	0,11

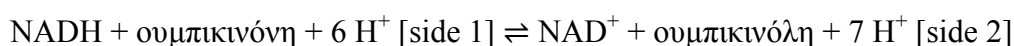
Η **ανόργανη πυροφωσφατάση** (EC 3.6.1.1) καταλύει την υδρόλυση του πυροφωσφορικού σε ορθοφωσφορικό. Η αντίδραση είναι ουσιαστικά μη αντιστρεπτή, όντας εξώεργη ( $\Delta G^{\circ} \ll 0$ ) (Berg et al., 2011), και δίνεται παρακάτω:



Η σχετική έκφραση του *ip* (*Asuc\_0522*) ήταν **5,6** φορές αυξημένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, ενώ **3,3** φορές μειωμένη και **2,3** φορές αυξημένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα.. Σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών.

### 3.2.6 NADH regeneration

Η **αφυδρογονάση του συνεχζύμου NADH** (EC 7.1.1.2) τροφοδοτεί τα κύτταρα με  $NAD^+$  μέσω της αντίδρασης:



(Αντίδραση 15)

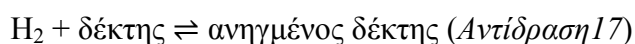
Η σχετική έκφραση του γονιδίου *ndu* (*Asuc\_1980*) ήταν **5,7** φορές αυξημένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, ενώ **6,4** και **0,8** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Το p-value ήταν **0,055** μεταξύ των χειρισμών G- και G+. Σε επίπεδο σημαντικότητας 5% τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των τελευταίων.

Η **trans αφυδρογονάση του συνεχζύμου NADPH** (EC 1.6.1.2) καταλύει την αντίδραση:



Η σχετική έκφραση του γονιδίου *pnt* (*Asuc\_1022*) ήταν **0,3** φορές μειωμένη στο πείραμα G- συγκριτικά με το G+, ενώ **0,1** και **0,4** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Σε επίπεδο σημαντικότητας 5% τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών.

Το ένζυμο **υδρογονάση** (EC 1.12.99.6) καταλύει την αντίδραση:



Στο βακτήριο *A.succinogenes* το ένζυμο εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η ενεργότητα του ήταν αυξημένη όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ανάπτυξης του μικροοργανισμού φουμαρικό οξύ + H<sub>2</sub> (Van der Werf et al., 1997). Σε πειράματα με το μεταφορέα ηλεκτρονίων NR, η HYD, το σύμπλοκο της FRD και το NR πέτυχαν την αναγωγή του NAD<sup>+</sup> σε NADH και έδρασαν ως δότης ηλεκτρονίων για το ενζυμικό σύμπλοκο FRD αυξάνοντας σημαντικά την παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος (Park & Zeikus, 1999; Park et al., 1999).

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *hyd* (*Asuc\_1277*) ήταν **3,2** φορές μειωμένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, ενώ **0,3** και **3,5** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Με p-value > **0,05** τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών.

### 3.2.7 Διαμεμβρανικοί μεταφορείς: ABC, DCU, *Asuc\_1999*

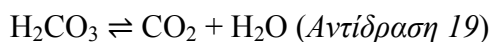
Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν τρεις διαφορετικοί διαμεμβρανικοί μεταφορείς. Ο ABC είναι μεταφορέας που απαντάται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και σχετίζεται με τη μεταφορά σακχάρων, πολυολών και λιπιδίων στο κύτταρο. Ο *Asuc\_1999* είναι τύπου DCU μεταφορέας του βακτηρίου *A.succinogenes*. Τα δεδομένα που αφορούν τη σχετική έκφραση των γονιδίων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών.

*Πίνακας 3.7 Αποτελέσματα ANOVA για τη σχετική έκφραση των γονιδίων abc, dcu και asuc\_1999.*

	ABC	DCU	<i>Asuc_1999</i>
E = G+	0,5	-2,8	-1,1
G- - G+	5,1	-1,0	-0,2
E = G-	-4,6	-1,8	-0,9

### 3.2.8 Ανθρακική ανυδράση

Το ένζυμο **ανθρακική ανυδράση** (EC 4.2.1.1) καταλύει την *Αντίδραση 19* με συμπάραγοντα τα Zn<sup>2+</sup> (Berg et al., 2011).

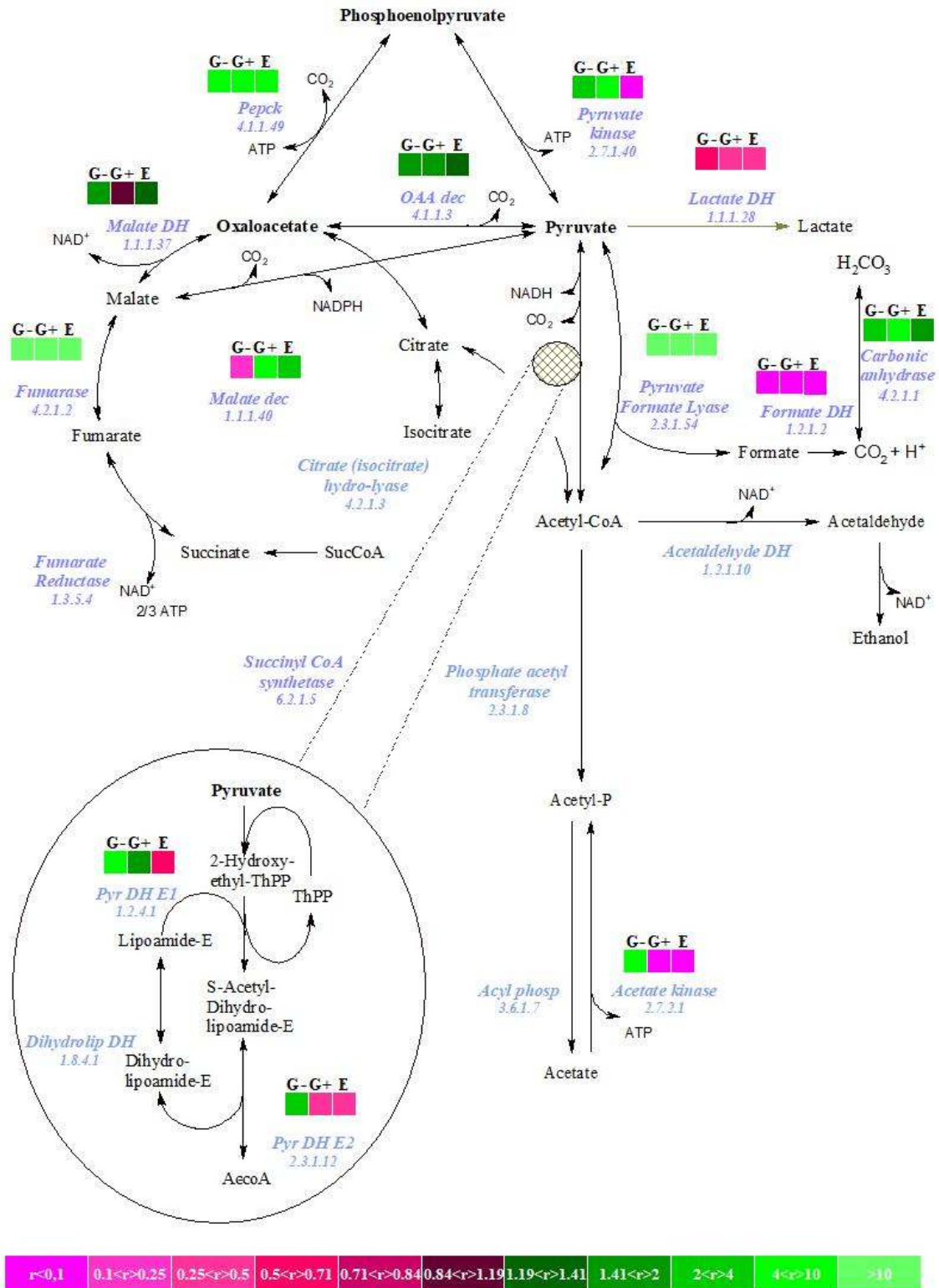


Σύμφωνα με τους McKinlay et al. (2010), στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού *A.succinogenes* βρέθηκε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο ανθρακική ανυδράση

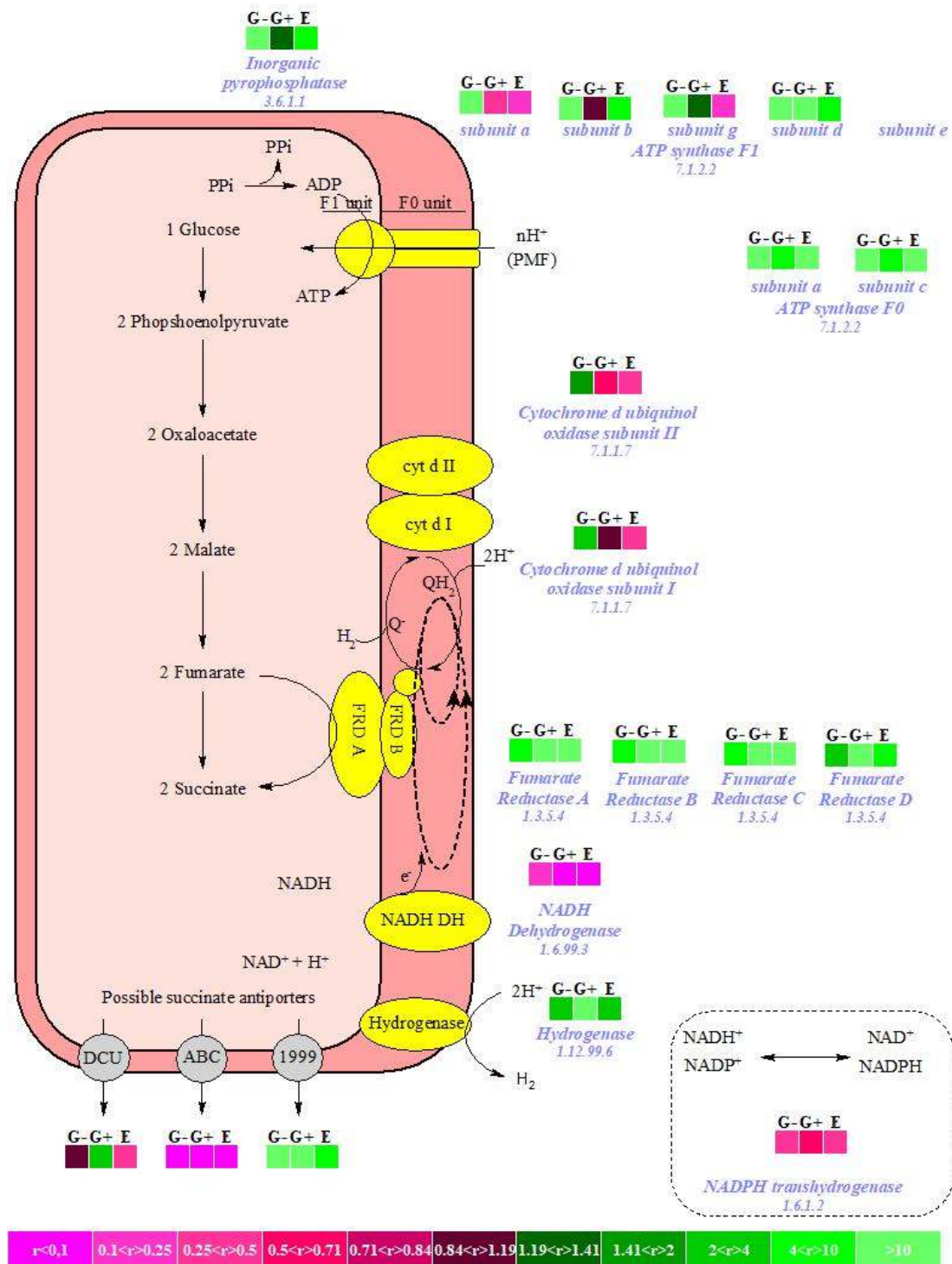
(IP). Ο λειτουργικός του ρόλος είναι πιθανόν να σχετίζεται με την τροφοδοσία του μικροοργανισμού με CO<sub>2</sub> για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος όταν αυτό είναι λιγότερο διαθέσιμο λόγω μεταβολών του pH στο περιβάλλον ανάπτυξης του.

Η σχετική έκφραση του *ca* (*Asuc\_1199*) ήταν **1** φορά μειωμένη στο χειρισμό G- συγκριτικά με το G+, ενώ **0,5** και **1,6** φορές μειωμένη στο χειρισμό E σε σχέση με τους G- και G+ αντίστοιχα. Με *p*-value > **0,05**, σε επίπεδο σημαντικότητα 5%, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχετική έκφραση του γονιδίου μεταξύ των χειρισμών.

### 3.3 Κατεύθυνση της γονιδιακής έκφρασης



Εικόνα 3.3 Ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων στο μεταβολισμό του βακτηρίου *A. succinogenes*.



Εικόνα 3.4 Η οξειδωτική φωσφορυλίωση στο μεταβολισμό του μικροοργανισμού *A. succinogenes*.

### 3.3.1 Επίδραση του MgCO<sub>3</sub> στην έκφραση των γονιδίων του βακτηρίου *A. succinogenes*

Ξεκινώντας από το γονίδιο *perck*, η σχετική του έκφραση δε διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των δυο χειρισμών, με το G- να παρουσιάζει 0,2 φορές υπερέκφραση έναντι του G+. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα επιβεβαιώνει την υπόθεση των Van der Werf et al. (1997) για σταθερή έκφραση του γονιδίου *perck*. Στο μονοπάτι C4, το γονίδιο *mdh*,



είχε επίσης αυξημένη σχετική έκφραση όταν δεν χρησιμοποιήθηκε το  $MgCO_3$ , ενώ η σχετική έκφραση των γονιδίων *fum* και *frd A*, *frd B*, *frd C*, *frd D* στον ίδιο χειρισμό παρουσιάστηκε μειωμένη (Εικόνα 3.4). Συγκεκριμένα, για τα τελευταία κυμάνθηκε γύρω από μείωση κατά 4 φορές στο G- έναντι του G+. Για κανένα από τα προαναφερθέντα γονίδια η διαφορά της σχετικής έκφρασης μεταξύ των χειρισμών δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα ME και OADC ήταν υποεκφρασμένα στο χειρισμό G-συγκριτικά με τον G+ χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά. Αναφορικά με το μονοπάτι C3, η υποέκφραση του γονιδίου *pk* κατά 1,3 φορές στο G- ήταν στατιστικά σημαντική. Σχετικά με τα ένζυμα του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDHE1, PDHE2), τα FDN, AK και LDH, τα γονίδια που κωδικοποιούν γι' αυτά είχαν αυξημένη έκφραση στο χειρισμό G- (Εικόνα 3.3). Τονίζεται εδώ ότι το γαλακτικό οξύ δεν εντοπίστηκε ως τελικό προϊόν σε καμία από τις ζυμώσεις. Για τα γονίδια *pdh E2* και *ak*, αυτή η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική. Να σημειωθεί ότι τα προαναφερθέντα γονίδια κωδικοποιούν για ένζυμα που σχετίζονται με την παραγωγή του ακετυλο-CoA, σημαντικού μεταβολικού ενδιάμεσου του C3 μονοπατιού, αλλά και το NADH, απαραίτητο συνένζυμο για την παραγωγή του ηλεκτρικού. Το γονίδιο *pfl* είχε ελαφρώς μειωμένη έκφραση στο χειρισμό G- χωρίς στατιστική σημαντικότητα. Τέλος, το γονίδιο *ca* είχε σχετική έκφραση 2,58 (SE 0,772) και 5,341 (SE 3,834) στο χειρισμό G- και G+ αντίστοιχα, η διαφορά των οποίων δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Όσον αφορά τα γονίδια που κωδικοποιούν για την πλειοψηφία των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, δηλαδή τις υπομονάδες των κυτοχρωμάτων, τις υπομονάδες της ATP συνθάσης και το *ndu*, η έκφραση τους ήταν επίσης αυξημένη στον χειρισμό G-. Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες τις ATP συνθάσης, αφού με εξαίρεση την υπομονάδα *atp F1d* της οποίας η σχετική έκφραση ήταν 52,346 στο πείραμα G- έναντι του 19,755 στο G+, οι υπόλοιπες υπομονάδες στον τελευταίο χειρισμό είχαν σχετική έκφραση πολύ μικρότερη του 10 (Εικόνα 3.4). Ωστόσο, τα γονίδια *atp F1a*, *atp F1b*, *atp F1g* ήταν τα μόνα που είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των χειρισμών. Η έκφραση του γονιδίου *cyd I* ήταν 2,942 (SE 1,127) στον χειρισμό G- έναντι του 0,960 (SE 0,306) στο χειρισμό G+, διαφορά στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας 10% (p-value 0,086). Για το *cyd II* ήταν 1,700 (SE 0,615) και 0,567 (SE 0,332) για τους χειρισμούς G- και G+ αντίστοιχα. Η υποέκφραση του *ptn* (-0,3 φορές) στο χειρισμό G- ήταν ασήμαντη, όπως και αυτή του *hyd* (-3,2 φορές). Για το γονίδιο *ndu*, η διαφορά της σχετικής έκφρασης μεταξύ των δυο



**Εικόνα 3.5** Μεταβολικά μονοπάτια καταβολισμού της γλυκόζης, παραγωγής ηλεκτρικού οξέος και παραπροϊόντων, και οξειδωτική φωσφορυλίωση για το μικροοργανισμό *A.succinogenes*. Απεικονίζεται και η ενδεχόμενη αξιοποίηση της ηλεκτρική ενέργειας, όταν αυτή παρέχεται.

Εξετάζοντας τη διαφοροποίηση στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ του χειρισμού E, όπου χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρική ενέργεια, και του G+ παρατηρείται ότι το γονίδιο *perck* είναι ελαφρώς υποεκφρασμένο (-0,2 φορές), όπως και τα γονίδια του μονοπατιού C4, με εξαίρεση το *mdh* που παρουσίασε υπερέκφραση (0,4 φορές). Το γονίδιο *fum* είχε σχετική έκφραση 56,687 στο χειρισμό G+ έναντι 28,902 στο χειρισμό E, η οποία όμως, όπως και οι προαναφερθείσες διαφορές, δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η μείωση της έκφρασης των *frd A*, *frd B*, *frd C*, *frd D* ήταν της τάξης των 2,1 έως 3,6. Ωστόσο, παρά την απόκλιση μεταξύ των μέσων τιμών που υπολογίστηκαν, λόγω του μεγάλου τυπικού σφάλματος που παρατηρήθηκε στα δείγματα, για κανένα από τα προαναφερθέντα γονίδια η διαφορά μεταξύ των χειρισμών δεν είναι στατιστικά σημαντική. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα ME και OADC ήταν υποεκφρασμένα στο χειρισμό E συγκριτικά με τον G+ χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Από τα γονίδια που σχετίζονται με τα ένζυμα του μονοπατιού C3, στατιστικά σημαντική και μάλιστα σε επίπεδο σημαντικότητας < 1% ήταν μονάχα η υποέκφραση του *pk* στο χειρισμό E έναντι του G+ κατά 6,9 φορές. Η έκφραση του στο χειρισμό E ήταν 0,068 (SE 0,012) και στον G+ 8,324 (SE 0,434). Τα γονίδια *ldh* και *ak* είχαν παρόμοια σχετική έκφραση και στους 2 χειρισμούς, ενώ το *fdh* παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 10% (p- value 0,071) με μέσες τιμές 0,0002 και 0,039 στους χειρισμούς G+ και E αντίστοιχα. Αναφορικά με τα γονίδια *pdh E1* και *pdh E2*, η σχετική τους έκφραση ήταν σαφώς μειωμένη στο χειρισμό E, ιδιαίτερα στην περίπτωση του *pdh E1* (Εικόνα 3.3). Το τελευταίο είχε μέσες τιμές 0,689 (SE 0,192) και 1,907 (SE 0,598) για τους χειρισμούς E και G+ αντίστοιχα. Τέλος, τα γονίδια *pfl* και *ca* αν και παρουσίασαν διαφορές μεταξύ των χειρισμών δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά σχετικής έκφρασης.

Ενδιαφέρον έχουν τα αποτελέσματα που αφορούν τα γονίδια που σχετίζονται με τα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα γονίδια *atp F1b*, *atp F0a* και *atp F0c*, από όσα σχετίζονται με τις υπομονάδες της ATP συνθάσης, είχαν αυξημένη έκφραση στο χειρισμό E, ενώ τα *cyd I* και *cyd II* μειωμένη. Συγκεκριμένα, το *cyd I* ήταν υποεκφρασμένο 1,3 φορές και το *cyd II* 1 φορά στο χειρισμό E έναντι του G+. Το γονίδιο *ip* είχε σχετική έκφραση 1,333 (SE 0,040) και 6,663 (SE 0,357) στους χειρισμούς G+ και E αντίστοιχα. Αυτή η διαφορά μεταφράζεται σε 2,3 φορές υπερέκφραση στο E. Παρατηρείται λοιπόν μια

υποέκφραση στο σύνολο των σχετικών με την οξειδωτική φωσφορυλίωση γονιδίων, όπου υπενθυμίζεται ότι συμπεριλαμβάνεται και τα *frd A*, *frd B*, *frd C*, *frd D*, με εξαίρεση μόνο των προαναφερθέντων γονιδίων για την ATP συνθάση.

Στις παρατηρήσεις που έχουν ήδη παρατεθεί έρχονται να προστεθούν οι σχετικές εκφράσεις των γονιδίων *ndu* και *pnt*. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή για το *ndu* ήταν 0,003 και 0,002 στους χειρισμούς G<sup>+</sup> και E αντίστοιχα. Για το γονίδιο *pnt* οι αντίστοιχες τιμές ήταν 0,617 και 0,455. Οι παραπάνω διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το γονίδιο *hyd* ήταν υποεκφρασμένο στο χειρισμό E (-3,5 φορές), επίσης χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα παραπάνω υποδεικνύουν παρόμοιες ανάγκες για ανακύκλωση των αναγωγικών συνενζύμων στο μεταβολισμό του βακτηρίου όταν χρησιμοποιείται ηλεκτρική ενέργεια μαζί με MgCO<sub>3</sub> (E) ή αποκλειστικά το τελευταίο (G<sup>+</sup>).

Από τα γονίδια που κωδικοποιούν για τους μεταφορείς, η διαφορά στη σχετική έκφραση μεταξύ των χειρισμών για το *asuc\_1999* ήταν μεγάλη, με αυτή του G<sup>+</sup> στο 13,902 (SE 3,865) και του E στο 6,354 (SE 4,643). Από την άλλη, η σχετική έκφραση του *abc* ήταν 0,001 (SE 0,001) στο χειρισμό G<sup>+</sup> και 0,002 (SE 0,001) στο E. Το γονίδιο *dcu* ήταν υποεκφρασμένο 2,8 φορές όταν χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρικό ρεύμα. Καμία από τις παραπάνω διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Εξετάζοντας στη συνέχεια τη γονιδιακή έκφραση στους χειρισμούς E και G<sup>-</sup> και ξεκινώντας από την *perck*, παρατηρήθηκε μικρή υποέκφραση όταν χρησιμοποιήθηκε το ρεύμα (-0,4 φορές). Οι μέσοι ήταν 7,402 (SE 1,453) και 5,612 (SE 3,552) για το χειρισμό G<sup>-</sup> και E αντίστοιχα. Στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων και συγκεκριμένα στο μονοπάτι C4 τόσο το *mdh* όσο και το *fum* δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές. Στο σύνολό τους τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες του συμπλόκου FRD ήταν υπερεκφρασμένα στο χειρισμό E. Ωστόσο, για κανένα από τα προαναφερθέντα δεν καταγράφηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα γονίδια *oadc* και *me* παρουσίασαν υποέκφραση (-0,1 φορές) και υπερέκφραση (4,0) στο χειρισμό E έναντι του G<sup>-</sup>. Στο μονοπάτι C3, όλα τα εμπλεκόμενα γονίδια, πλην του *fhn*, ήταν υποεκφρασμένα στο χειρισμό E συγκριτικά με τον G<sup>-</sup>. Με σχετική έκφραση 3,367 (SE 0,294) στο G<sup>-</sup> έναντι 0,068 (SE 0,012) στο E για το γονίδιο *pk* υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας <1%. Επίσης, στατιστικά σημαντική ήταν και η διαφορά της έκφρασης των γονιδίων *pdh* E1 (p-value 0,052) και *pdh* E2 (p-value 0,005). Το γονίδιο *pfl* είχε μέση τιμή σχετικής έκφρασης 18,937 (SE 4,294) και 14,093 (SE 0,117) στους χειρισμούς E και G<sup>-</sup>.

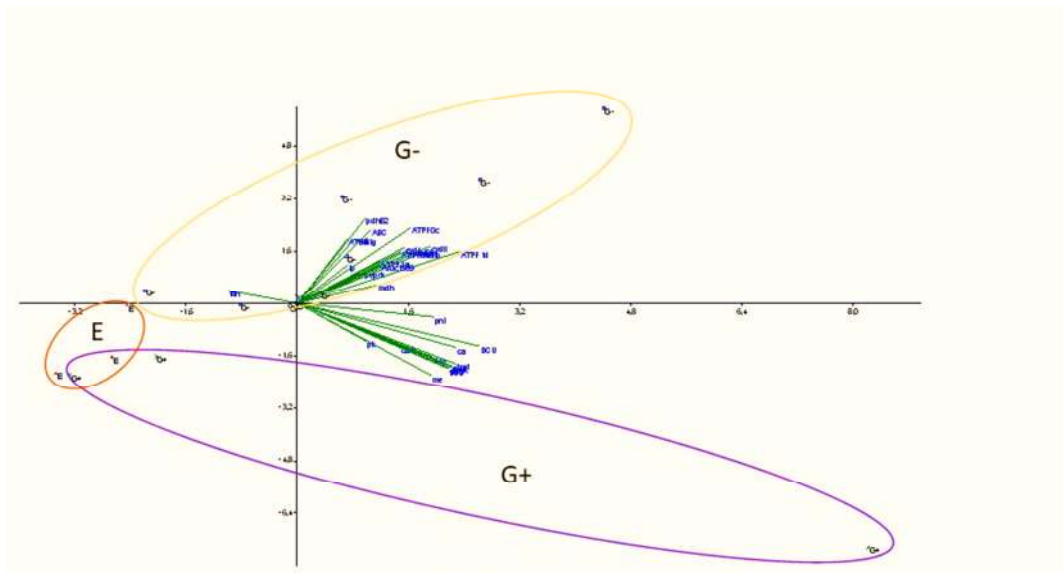
αντίστοιχα, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Τελειώνοντας, με τα ένζυμα που σχετίζονται τις αντιδράσεις από τις οποίες παράγονται τα παραπροϊόντα της ζύμωσης για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, σε επίπεδο σημαντικότητας 10% η υπερέκφραση του *fdn* 2,5 φορές ήταν στατιστικά σημαντική Η σχετική έκφραση του *ak* ήταν 6,441 (SE 1,424) και 0,0004 (SE  $10^{-4}$ ) στο G- και E αντίστοιχα, διαφορά που είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας <1%. Τέλος, η *ldh* με υποέκφραση 0,8 φορές στο χειρισμό E δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική μεταξύ των χειρισμών.

Από τα γονίδια που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρχε σε αυτά των υπομονάδων της ATP συνθάσης, και συγκεκριμένα στα *atp* F1a, *atp* F1g σε επίπεδο σημαντικότητας <1% και στα *atp* F1b, *atp* F1d σε 10%. Πρέπει να σημειωθεί ότι και ανάμεσα στα γονίδια *atp* F0a και *atp* F0c, αν και όχι στατιστικά σημαντική η διαφορά ήταν αρκετά μεγάλη. Όλα τα προαναφερθέντα γονίδια ήταν υποεκφρασμένα όταν χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρικό ρεύμα. Από τα *cyd* I και *cyd* II, το πρώτο είχε σχετική έκφραση 2,942 (SE 1,127) και 0,403 (SE 0,117) στο χειρισμό G- και E αντίστοιχα, διαφορά η οποία ήταν στατιστικά σημαντική σε επίπεδο 1% (p-value 0,039). Το *cyd* II αν και υποεκφρασμένο 2,6 φορές στο χειρισμό E δεν προέκυψε να διαφοροποιείται στατιστικά σημαντικά. Το γονίδιο *ip* ήταν επίσης υποεκφρασμένο στο χειρισμό E χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά.

Αναφορικά με τις σχετικές εκφράσεις των γονιδίων *ndu* και *pnt*, η μέση τιμή για το *ndu* ήταν 0,134 (SE 0,057) και 0,002 (SE 0,002) στους χειρισμούς G- και E αντίστοιχα. Αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας 5% (p-value 0,053). Για το γονίδιο *pnt* οι αντίστοιχες τιμές ήταν 0,484 (SE 0,201) και 0,455 (SE 0,259), χωρίς στατιστικά σημαντική. Το γονίδιο *hyd* ήταν υποεκφρασμένα στο χειρισμό E (-0,3 φορές), επίσης χωρίς στατιστική σημαντικότητα.

Καταλήγοντας στους μεταφορείς, η διαφορά στη σχετική έκφραση μεταξύ των χειρισμών για το *asuc\_1999* ήταν μεγάλη, με αυτή του G- στο 11,813 (SE 4,821) και του E στο 6,354 (SE 4,643). Από την άλλη, η σχετική έκφραση του *abc* ήταν 0,039 (SE 0,020) στο χειρισμό G- και 0,002 (SE 0,001) στο E. Το γονίδιο *dcu* ήταν υποεκφρασμένο με σχετική έκφραση 1,141 (SE 0,467) και 0,330 (SE 0,016) στους χειρισμούς G- και E αντίστοιχα. Ωστόσο, για κανένα από τα προαναφερθέντα γονίδια οι διαφορές στην έκφραση δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Παρακάτω (Εικόνα 3.6) παρατίθενται τα αποτελέσματα της μεθόδου ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA) για τις σχετικές εκφράσεις των γονιδίων που μελετήθηκαν στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς. Είναι φανερό, όπως αναλύθηκε και προηγούμενα, ότι το σύνολο των σχετικών εκφράσεων των γονιδίων στο χειρισμό G- σχηματίζει μια διακριτή περιοχή. Αντίθετα, μεταξύ των περιοχών που καταλαμβάνουν οι χειρισμοί G+ και E υπάρχει επικάλυψη.



**Εικόνα 3.6** Αποτελέσματα της μεθόδου ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA, *Principal Component Analysis*).

#### 4. Συμπεράσματα και μελλοντικοί πειραματικοί στόχοι

Οι ζυμώσεις στις οποίες το βακτηριακό στέλεχος *A. succinogenes* 130Z (DSM 22257) αναπτύχθηκε υπό την παροχή ηλεκτρονίων στο υγρό θρεπτικό μέσο τους είχαν την υψηλότερη τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος, 36,4 g/L. Ωστόσο, η συνεργιστική δράση του ηλεκτρικού ρεύματος και του  $MgCO_3$  δε φαίνεται να διαφοροποιεί αρκετά τα τελικά αποτελέσματα από εκείνα που ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο το  $MgCO_3$ . Σε γονιδιακό επίπεδο, η σύγκριση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων στους χειρισμούς G- και G+ φανέρωσε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των γονιδίων *pk*, *pdh* E2, *ak*, *atp* F1a, *atp* F1b, *atp* F1g. Τα προαναφερθέντα, πλην του *atp* F1b και με την προσθήκη του *cyd* I, ήταν τα γονίδια που είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των χειρισμών G- και E. Με εξαίρεση το γονίδιο *pk*, που ήταν υπερεκφρασμένο στο χειρισμό G+ και υποεκφρασμένο στον χειρισμό E έναντι του G-, η σχετική έκφραση των υπολοίπων γονιδίων μειώθηκε τόσο στο G+ όσο και στο E.

Στους μελλοντικούς στόχους της παρούσας έρευνας περιλαμβάνεται πρώτα η πραγματοποίηση πειραμάτων με παροχή ηλεκτρικής ενέργειας και χωρίς την προσθήκη του  $MgCO_3$  στο υγρό θρεπτικό μέσο της ζύμωσης, με στόχο τη μεμονωμένη μελέτη της επίδρασης της στη γονιδιακή έκφραση. Επόμενα, αξίζει να ελεγχθεί η επίδραση της ηλεκτρικής ενέργειας στο μεταβολισμό του *A.succinogenes* όταν η πηγή άνθρακα είναι υδρόλυμα προερχόμενο από κάποιο απόβλητο της βιομηχανία τροφίμων. Τέλος, η χρήση κάποιων μεταφορέων ηλεκτρονίων, όπως ο NR, αποτελεί επίσης ενδιαφέρον χειρισμό που συγκαταλέγονται στους μελλοντικούς στόχους.

## 5. Παράρτημα

### 5.1 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του RNA

#### 5.1.1 Ποσοτικός προσδιορισμός

Το πρωτόκολλο απομόνωσης του RNA ολοκληρώνεται με τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό του στα δείγματα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται με μέτρηση του RNA σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Κατά την μέτρηση χρησιμοποιείται 1μL δείγματος RNA και προσδιορίζονται τα ng DNA και RNA ανά μL δείγματος, καθώς και η καθαρότητα των δειγμάτων μέσω των λόγων  $A_{260/280}$  και  $A_{260/230}$ . Υπολείμματα χημικών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται κατά τον καθαρισμό του γενετικού υλικού (φαινόλη, γουανιδίνη) ή μόρια που υπήρχαν στα δείγματα και δεν απομακρύνθηκαν πλήρως (πρωτεΐνες) μπορεί να επηρεάσουν τους λόγους. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις γενετικού υλικού στα δείγματα ( $< 10$  ng/μl) δύνανται επίσης να επηρεάσουν τους λόγους (Wilfinger et al., 1997). Μια αποδεκτή τιμή του λόγου  $A_{260/280}$  είναι  $\sim 1,8$  (DNA) και  $\sim 2$  (RNA), ενώ του  $A_{260/230}$   $\sim 2-2,2$  (Gallagher & Desjardins, 2008).

#### 5.1.2 Ποιοτικός προσδιορισμός

##### 5.1.2.1 PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράση (PCR: Polymerase Chain Reaction) είναι μέθοδος ενίσχυσης του DNA. Για την πραγματοποίησή της χρησιμοποιείται το ένζυμο DNA-πολυμεράση, το οποίο καταλύει τη σύνθεση DNA έχοντας ως εκμαγείο ένα μονόκλωνο τμήμα DNA και ως υπόστρωμα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPS) (Mullis, 1990). Στην παρούσα εργασία οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εκείνοι των γονιδίων αναφοράς (housekeeping genes) *recF* (Nielsen & Boye, 2005) και *groB* (Christensen et al., 2004). Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή κατά την PCR ήταν: 1 επανάληψη του πρώτου σταδίου στους  $95^{\circ}$  C για 2 λεπτά ακολουθούμενη από 28 επαναλήψεις του δεύτερου σταδίου στους  $95^{\circ}$  C για 30 δευτερόλεπτα,  $60^{\circ}$  C για 30 δευτερόλεπτα,  $72^{\circ}$  C για 15 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, ακολούθησε 1 επανάληψη του τρίτου σταδίου στους  $72^{\circ}$  C για 30 δευτερόλεπτα και τέλος πτώση της θερμοκρασίας στους  $4^{\circ}$  C ( $\infty$ ), όπου η μέθοδος ολοκληρώνεται.

Στον πίνακα φαίνονται ο τελικός όγκος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο PCR καθώς και οι συγκεντρώσεις των επιμέρους αντιδραστηρίων:



**Πίνακας 5.1** Αντιδραστήρια για την εφαρμογή της μεθόδου PCR.

Εκμαγείο DNA	1μL
Ολιγονουκλεοτίδια (dNTPs)	0,5μL
Υποκινητές (Primers)	2μL
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)	2,5μL
DNA-πολυμεράση	1μL
ddH <sub>2</sub> O	18μL
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>25μL</b>

### 5.1.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

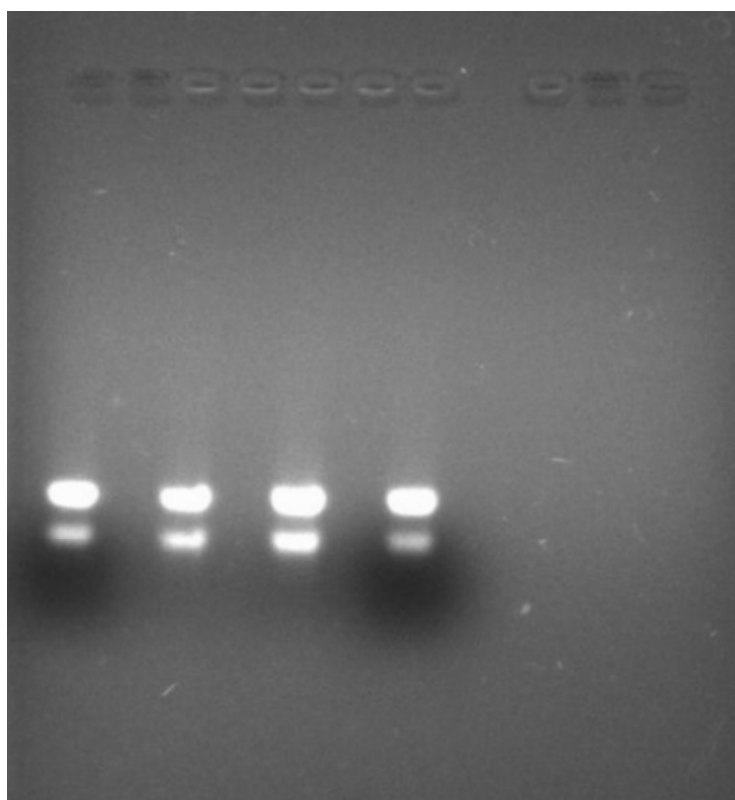
Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του RNA στα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Κατά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια του γενετικού υλικού εκτίθενται σε ηλεκτρικό πεδίο μέσω μιας μήτρας πηκτώματος αγαρόζης και διαχωρίζονται κατά το μέγεθός τους. Όταν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια γενετικού υλικού υποβάλλονται σε ηλεκτρικό πεδίο κινούνται προς το θετικό πόλο (άνοδος) με τα μεγαλύτερα να αντιμετωπίζουν μεγαλύτερη δυσκολία διέλευσης μέσω του πηκτώματος συγκριτικά με τα μικρότερα. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης τα δείγματα είναι ορατά με έκθεση του πηκτώματος σε UV και χρήση φθορίζουσας χρωστικής που προσδένεται στο γενετικό υλικό ή το RNA (Watson et al., 2014).

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% πραγματοποιείται σε τρία (3) διαφορετικά στάδια του πρωτοκόλλου καθαρισμού του RNA. Συγκεκριμένα, η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων είναι απαραίτητη πριν τον καθαρισμό του υπολειμματικού DNA μέσω της μεθόδου DNase, όπου αναμένεται να παρατηρηθεί μια μικρή ζώνη DNA που αποτελεί το υπολειμματικό DNA στα δείγματα, καθώς και δύο ζώνες RNA. Το RNA εμφανίζεται σε δύο διακριτές ζώνες που αντιπροσωπεύουν το 23S rRNA και 16S rRNA. Να σημειωθεί ότι όταν το RNA είναι καθαρό και δεν έχει υδρολυθεί, η ένταση της 23S rRNA είναι διπλάσια από αυτή της 16S rRNA ζώνης (Berg et al., 2011). Στη συνέχεια, ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται μετά την μέθοδο της DNase και ξανά στο τέλος της διαδικασίας καθαρισμού του RNA (RNA purification). Σε αυτά τα στάδια θα πρέπει να είναι εμφανείς δύο ζώνες RNA.

Το πήκτωμα της αγαρόζης 3% παρασκευάζεται με αγαρόζη και ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x, το οποίο αποτελεί επίσης το διάλυμα στο οποίο βυθίζεται το πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση. Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE συνήθως παρασκευάζεται πυκνό (50x) και

αραιώνεται σε αναλογία 1:50. Στην αραίωση χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O). Το πυκνό ρυθμιστικό TAE (1 M, pH 8,7) περιέχει: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) 1M (336,21 g/mol), Tris 2 M (121,14 g/mol) και οξικό οξύ 1 M (60,05 g/mol). Να σημειωθεί ότι στο διάλυμα αγαρόζης – TAE προστίθεται βαφή (SYBR safe DNA gel stain, Invitrogen) για να είναι ορατές οι ζώνες στο τέλος της ηλεκτροφόρησης.

Όσον αφορά τα δείγματα, χρησιμοποιούνται 5μL από τα δείγματα στα οποία δεν έχει γίνει ενίσχυση με PCR και 10μL από τα δείγματα μετά την PCR. Τα πρώτα αναμειγνύονται με loading buffer σε αναλογία 1:10. Τέλος, για τον προσδιορισμό του μεγέθους του RNA χρησιμοποιούνται 2μL 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).



*Εικόνα 5.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Φαίνονται δύο διακριτές ζώνες που αντιπροσωπεύουν το 23S rRNA (πάνω) και 16S rRNA (κάτω).*

## **5.2 Μέθοδος DNase**

Για να γίνει η εφαρμογή της μεθόδου του ενζύμου δεοξυριβονουκλεάση (DNase treatment) πρέπει να έχει προηγηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός του υπολειμματικού DNA στα δείγματα ώστε να γίνεις πλήρης απομάκρυνσή του. Γνωρίζοντας ότι με τη συγκεκριμένη αντίδραση μπορούν να απομακρυνθούν έως 2μg DNA υπολογίζεται η κατάλληλη αραίωση με ddH<sub>2</sub>O που θα οδηγήσουν σε δείγματα απαλλαγμένα από DNA ως εξής:

Τελική συγκέντρωση DNA στο μίγμα της αντίδρασης (40 ng/1μL) \* τελικός όγκος (50 μL)/ συγκέντρωση DNA (ng/μL) = ποσότητα δείγματος για τη μέθοδο DNase (x μL to 50μL final reaction volume)

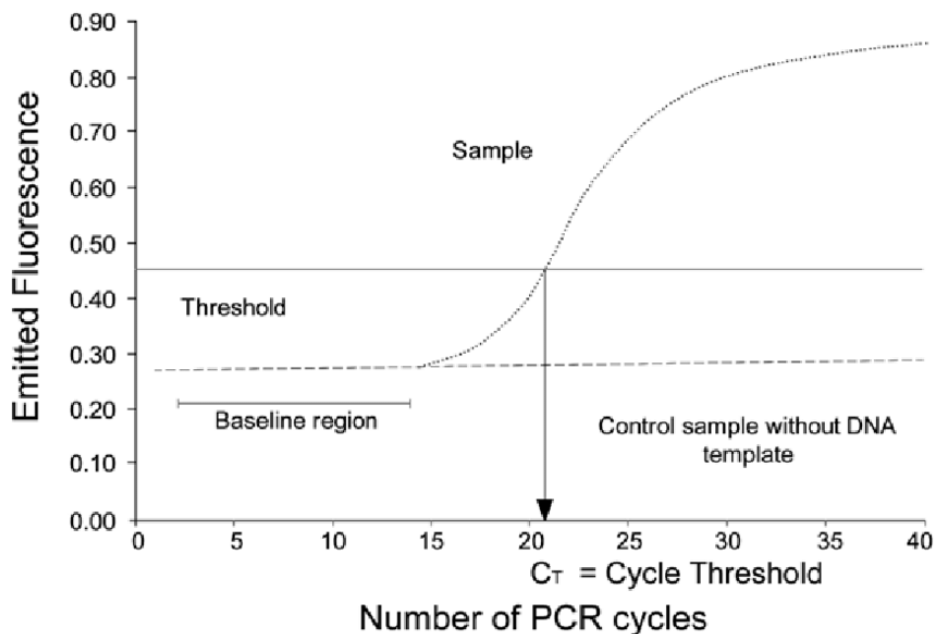
### 5.3 cDNA

Το cDNA (complementary DNA-συμπληρωματικό DNA) είναι ένα μόριο DNA που συντίθεται από mRNA. Η σύνθεση του cDNA γίνεται με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Για να εφαρμοστεί η μέθοδος απαιτείται ποσότητα περίπου 1 μg RNA, οπότε αρχικά υπολογίζονται τα μL κάθε δείγματος RNA που απαιτούνται ώστε να υπάρχει η απαιτούμενη ποσότητα σε μg και ο όγκος συμπληρώνεται με υπερκάθαρο νερό (ddH<sub>2</sub>O) έως τα 10μL.

### 5.4 RT-qPCR

Οι δύο μέθοδοι φθορισμού που χρησιμοποιούνται κατά την εφαρμογή της qPCR για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων είναι οι φθορίζουσες βαφές που αλληλεπιδρούν μη ειδικά με το δίκλωνο DNA και οι ιχνηθέτες που προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες DNA (Navarro et al., 2015). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μη ειδική φθορίζουσα χρωστική SYBR Green (Invitrogen), η οποία παρουσιάζει ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα, πριν την έναρξη της ανάλυσης, ενώ φθορίζει όταν προσδένεται σε ένα δίκλωνο μόριο DNA (Morrison et al., 1998).

Στην Εικόνα 5.2 φαίνεται μια καμπύλη φθορισμού ενός δείγματος DNA. Στην περιοχή του βασικού επιπέδου το σήμα φθορισμού δεν μπορεί να διακριθεί. Η τιμή Ct ή κατώφλι κύκλου, που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR ξεπερνά το βασικό επίπεδο, μπαίνει στην εκθετική φάση και μπορεί να ανιχνευθεί (Heid et al., 1996), αποτελεί τη σημαντικότερη παράμετρο για τους υπολογισμούς μετά το τέλος της RT-qPCR. Με τις τιμές Ct των γονιδίων αναφοράς και των γονιδίων ενδιαφέροντος μπορεί να είναι τελικά εφικτή η σύγκριση των δειγμάτων. Πρέπει να αναφερθεί ότι οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος. Έτσι, δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο Ct από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα του γονιδίου στόχου.



*Εικόνα 5.2 Διάγραμμα απεικόνισης του κατωφλιού κύκλου ( $C_T$ ).*

Τα αποτελέσματα της RT-qPCR λαμβάνονται ψηφιακά και επεξεργάζονται με χρήση του excel και του προγράμματος Lin Reg PCR. Το τελευταίο χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της απόδοσης κάθε εκκινητή. Χρήσιμη τιμή αποτελεί ο μέσος όρος των αποδόσεων των ίδιων εκκινητών για διαφορετικά δείγματα cDNA (average PCR efficiency). Για τον υπολογισμό του λόγου ΗΚ/γονίδιο ενδιαφέροντος αρχικά υπολογίζεται ο γεωγραφικός μέσος των δυο γονιδίων αναφοράς που έχουν επιλεγεί. Στη συνέχεια υπολογίζεται το  $\Delta C_t$ , το οποίο αποτελεί τη διαφορά του γεωγραφικού μέσου των γονιδίων αναφοράς και του  $C_t$  του γονιδίου ενδιαφέροντος. Τέλος, εφαρμόζεται ο τύπος:

$$\text{Γονίδιο ΗΚ/γονίδιο ενδιαφέροντος} = (\text{average PCR efficiency})^{-\Delta C_t}$$

### 5.5 Συντομογραφίες χημικών ενώσεων

Παρακάτω παρατίθεται οι συντομογραφίες χημικών ενώσεων και πρωτεϊνών που αναφέρονται στην παρούσα εργασία:

*Πίνακας 5.2 Οι χημικές ενώσεις, οι χημικοί τύποι και οι συντομογραφίες των εξεταζόμενων μεταβολικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο μεταβολισμό του βακτηρίου *A.succinogenes*.*

Χημική ένωση	Συντομογραφία	Χημικός τύπος
Φωσφοενολ-πυροσταφυλικό οξύ	PEP	$C_3H_5O_6P$
Μηλικό οξύ	MAL	$C_4H_6O_5$
Οξαλοξικό οξύ	OAA	$C_4H_4O_5$
Φουμαρικό οξύ	FUM	$C_4H_4O_4$
Πυροσταφυλικό οξύ	Pyr	$C_3H_4O_3$

Συνένζυμο Α	CoA	$C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S$
Ακετυλοσυνένζυμο Α	Ac-CoA	$C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S$
Μυρμηκικό οξύ	FOR	$CH_2O_2$
Οξικό οξύ	ACE	$C_2H_4O_2$
Φωσφοακέτυλο	ac-P	$C_2H_5O_5P$
Γαλακτικό οξύ	LAC	$C_3H_6O_3$
Ηλεκτρικό οξύ	SUC	$C_4H_6O_4$
Πυροφωσφορικό ανιόν	PPi	$P_2O_7^{4-}$
Φωσφορικό ανιόν	Pi	$PO_4^{3-}$
Ανθρακικό οξύ	-	$H_2CO_3$

## **Βιβλιογραφία**

- Ahmed, I., & Morris D.J. (1994). *Replacing Petrochemicals with Biochemicals: A Pollution Prevention Strategy for the Great Lakes*. Minneapolis: Institute for Local Self-Reliance, Washington, DC.
- Anonymous (1992). *National Toxicology Program, Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health (NTP). National Toxicology Program Chemical Repository Database*. Research Triangle Park, North Carolina. (<https://ntp.niehs.nih.gov/>, τελευταία πρόσβαση στις 18/9/2020).
- Anonymous (2007). IEA. *IEA bioenergy Task 42 on biorefineries: co-production of fuels, chemicals*. (<https://www.ieabioenergy.com>, τελευταία πρόσβαση στις 10/9/2020).
- Anonymous (2008). Kidwell H. *Bio-succinic to go commercial*. BioPharma-reporter. (<https://www.outsourcing-pharma.com/Article/2008/01/24/Bio-succinic-acid-to-go-commercial>, τελευταία πρόσβαση 10/9/2020)
- Anonymous (2017). *Global Succinic Acid Market Analysis & Trends 2013-2017 - Industry Forecast to 2025: \$1.76 Billion Growth Opportunities/Investment Opportunities - Research and Markets* (<https://www.prnewswire.com>, τελευταία πρόσβαση στις 10/9/2020).
- Arbter, P., Sinha, A., Troesch, J., Utesch, T., & Zeng, A.-P. (2019). *Redox governed electro-fermentation improves lipid production by the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides*. *Bioresource Technology*, 294, 122122.
- Beauprez, J. J., De Mey, M., & Soetaert, W. K. (2010). *Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers*. *Process Biochemistry*, 45(7), 1103–1114.
- Bechthold, I., Bretz, K., Kabasci, S., Kopitzky, R., & Springer, A. (2008). *Succinic Acid: A New Platform Chemical for Biobased Polymers from Renewable Resources*. *Chemical Engineering & Technology*, 31(5), 647–654.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2011). *Biochemistry (7th edition)*. New York: W.H. Freeman.
- Berk, R. S., & Canfield, J. H. (1964). *Bioelectrochemical Energy Conversion*. *Applied Microbiology*, 12, 10–12.
- Bozell, J. J., & Petersen, G. R. (2010). *Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—The US Department of Energy’s “Top 10” revisited*. *Green Chemistry*, 12(4), 539-554.
- Bradfield, M. F. A., & Nicol, W. (2014). *Continuous succinic acid production by*

- Actinobacillus succinogenes* in a biofilm reactor: Steady-state metabolic flux variation. *Biochemical Engineering Journal*, 85, 1–7.
- Caldwell, D. R., Keeney, M., & Van Soest, P. J. (1969). Effects of Carbon Dioxide on Growth and Maltose Fermentation by *Bacteroides amylophilus*. *Journal of Bacteriology*, 98(2), 668–676.
- Carvalho, M., Matos, M., Roca, C., & Reis, M. A. M. (2014). Succinic acid production from glycerol by *Actinobacillus succinogenes* using dimethylsulfoxide as electron acceptor. *New Biotechnology*, 31(1), 133–139.
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421.
- Choi, O., Um, Y., & Sang, B.-I. (2012). Butyrate production enhancement by *Clostridium tyrobutyricum* using electron mediators and a cathodic electron donor. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(10), 223–239.
- Christensen, H. (2004). Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the Pasteurellaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1601–1609.
- Cok, B., Tsiropoulos, I., Roes, A. L., & Patel, M. K. (2014). Succinic acid production derived from carbohydrates: An energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(1), 16–29.
- Corona-González, R. I., Borjes, A., González-Álvarez, V., & Pelayo-Ortiz, C. (2008). Kinetic study of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* ZT-130. *Process Biochemistry*, 43(10), 1047–1053.
- Creighton, D. J., & Rose, I. A. (1976). Oxalacetate Decarboxylase Activity in Muscle Is Due to Pyruvate Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(1), 69–72.
- Davis, C. P., Cleven, D., Brown, J., & Balish, E. (1976). *Anaerobiospirillum*, a New Genus of Spiral-Shaped Bacteria. 26(4), 489–504.
- Der Werf, M. J. V., 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. *Archives of Microbiology*, 167(6), 332–342.
- Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Olsen, I. & Fraser, G. J. (1993). Phylogeny of the Pasteurellaceae as determined by comparison of 16S ribosomal ribonucleic acid sequences. *Zentbl Bakteriol* 279, 35–44

- Doran, P. M. (2004). *Bioprocess engineering principles*. London; San Diego: Academic Press.
- Engel, M., Holtmann, D., Ulber, R., & Tippkötter, N. (2019). Increased Biobutanol Production by Mediator-Less Electro-Fermentation. *Biotechnology Journal*, 14(4), 1800514.
- Frey, J., & Kuhnert, P. (2002). RTX toxins in Pasteurellaceae. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(3–4), 149–158.
- Gallagher, S. R., & Desjardins, P. R. (2008). Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. In J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, & P. T. Wingfield (Eds.), *Current Protocols in Protein Science* (p. A.4K.1-A.4K.21). John Wiley & Sons, Inc.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6(10), 995–1001.
- Guarnieri, M. T., Chou, Y.-C., Salvachúa, D., Mohagheghi, A., St. John, P. C., Peterson, D. J., Bomble, Y. J., & Beckham, G. T. (2017). Metabolic Engineering of *Actinobacillus succinogenes* Provides Insights into Succinic Acid Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17), 1-14.
- Guettler, M. V., Jain, M.K, & Rumler, D. (1996). Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process and methods for obtaining variants. US Patent 5,573-578.
- Guettler, M. V., Rumler, D., & Jain, M. K. (1999). *Actinobacillus succinogenes* sp. Nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 207-215.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., & Sonesson, U. (2011). *Global food losses and food waste: Extent, causes and prevention; study conducted for the International Congress Save Food: Global Initiative on Food Loss and Waste Reduction 2011 (16-17 May)*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Düsseldorf, Germany.
- Harland B.F., Harland J (1980). Fermentative reduction of phytate in rye, white and whole heat breads. *Cereal Chem.*, 57, 226-229
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994.
- Herselman, J., Bradfield, M. F. A., Vijayan, U., & Nicol, W. (2017). The effect of carbon dioxide availability on succinic acid production with biofilms of *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal*, 117, 218–225.



- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology*, 11(9), 1026–1030.
- Hollander, R., Hess-Reihse, A. & Mannheirn, W. (1981). Respiratory quinones. In Kilian, M., Frederiksen, W., & Biberstein, E. L. (eds), *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus: pattern, function, and taxonomic evaluation*. London, Academic Press.
- Klass, D. L. (2003). A critical assessment of renewable energy usage in the USA. *Energy Policy* 31, 353–367.
- Klass, D. L. (2004). Biomass for Renewable Energy and Fuels. *Encyclopedia of Energy*, 1.
- Korczak, B. M. & Kuhnert, P. (2008). Phylogeny of Pasteurellaceae. In *Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects*, pp. 27–52. Edited by P. Kuhnert & H. Christensen. Norwich, UK: Caister Academic.
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Unden, G., & Lancaster, C. R. D. (2002a). Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: Enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1553(1–2), 23–38.
- Kuhnert, P., Scholten, E., Haefner, S., Mayor, D., & Frey, J. (2010). *Basfia succiniciproducens* gen. Nov., sp. Nov., a new member of the family Pasteurellaceae isolated from bovine rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 44–50.
- Lee, M., Hebda, C., & Nowak, T. (1982). The role of cations in avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase catalysis. Activation and regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 12793–12801.
- Lee, P. C., Lee, S. Y., Chang, S. H., & Hong, H. N. (2002). Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), 663–668.
- Li, J., Jiang, M., Chen, K.-Q., Ye, Q., Shang, L.-A., Wei, P., Ying, H.-J., & Chang, H.-N. (2010). Effect of redox potential regulation on succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(8), 911–920.
- Li, J., Zheng, X.-Y., Fang, X.-J., Liu, S.-W., Chen, K.-Q., Jiang, M., Wei, P., & Ouyang, P.-K. (2011). A complete industrial system for economical succinic acid production by

- Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 102(10), 6147–6152.
- Li, Q., Yang, M., Wang, D., Li, W., Wu, Y., Zhang, Y., Xing, J., & Su, Z. (2010). Efficient conversion of crop stalk wastes into succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 101(9), 3292–3294.
- Lide, D.R., G.W.A. Milne (eds.) (1994). *Handbook of Data on Organic Compounds. Volume I. (3)*. Boca Raton: CRC Press, Inc..
- Lie, S. (1973). The Ebc-Ninhydrin Method for Determination of Free Alpha Amino Nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37–41.
- Lin, S. K. C., Du, C., Koutinas, A., Wang, R., & Webb, C. (2008). Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal*, 41(2), 128–135.
- Liu, Y. P., Zheng, P., Sun, Z.-H., Ni, Y., Dong, J.-J., & Wei, P. (2008). Strategies of pH control and glucose-fed batch fermentation for production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(5), 722–729.
- Liu, Y. P., Zheng, P., Sun, Z.-H., Ni, Y., Dong, J.-J., & Zhu, L.-L. (2008). Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 99(6), 1736–1742.
- Lockhart, D. J., & Winzeler, E. A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405(6788), 827–836.
- Martinelli, L. A., & Filoso, S. (2008). Expansion of Sugarcane Ethanol Production in Brazil: Environmental and Social Challenges. *Ecological Applications*, 18(4), 885–898.
- McKinlay, J. B., & Vieille, C. (2008). <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis of *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism at different NaHCO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub> concentrations. *Metabolic Engineering*, 10(1), 55–68.
- McKinlay, J. B., Laivenieks, M., Schindler, B. D., McKinlay, A. A., Siddaramappa, S., Challacombe, J. F., Lowry, S. R., Clum, A., Lapidus, A. L., Burkhart, K. B., Harkins, V., & Vieille, C. (2010). A genomic perspective on the potential of *Actinobacillus succinogenes* for industrial succinate production. *BMC Genomics*, 11(1), 680.
- McKinlay, J. B., Shachar-Hill, Y., Zeikus, J. G., & Vieille, C. (2007). Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of <sup>13</sup>C-labeled metabolic product isotopomers. *Metabolic Engineering*, 9(2), 177–192.

- McKinlay, J. B., Zeikus, J. G., & Vieille, C. (2005). *Insights into Actinobacillus succinogenes Fermentative Metabolism in a Chemically Defined Growth Medium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6651–6656.
- Miao, Y., Shen, Y., & Xu, Y. (2017). *Effects of Inhibitors on the Transcriptional Profiling of Gluconobacter oxydans NL71 Genes after Biooxidation of Xylose into Xylonate*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 716.
- Morrison, T., Weis, J., & Wittwer, C. (1998). *Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification*. *Biotechniques*, 24, 960–962.
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E., & Bernet, N. (2016). *Electro-Fermentation: How to Drive Fermentation Using Electrochemical Systems*. *Trends in Biotechnology*, 34(11), 856–865.
- Mullis, K. B. (1990). *The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction*. *Scientific American*, 262(4), 56–65.
- Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W., & Mannheim, W. (1985). *Reclassification of the Genus Pasteurella*. *Journal of Systematic Bacteriology*, 35(3), 309–322.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). *Real-time PCR detection chemistry*. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231–250.
- Nicklas, W. (2007). *Chapter 19—Pasteurellaceae*. In Fox, J. G., Davisson, M. T., Quimby, F. W., Barthold, S. W., Newcomer, C. E., & Smith, A. L. (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)* (pp. 469–XII). Academic Press.
- Nielsen, K. K., & Boye, M. (2005). *Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Analysis of Expression Stability of Actinobacillus pleuropneumoniae Housekeeping Genes during In Vitro Growth under Iron-Depleted Conditions*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 2949–2954.
- Nishio, K., Kimoto, Y., Song, J., Konno, T., Ishihara, K., Kato, S., Hashimoto, K., & Nakanishi, S. (2014). *Extracellular Electron Transfer Enhances Polyhydroxybutyrate Productivity in Ralstonia eutropha*. *Environmental Science & Technology Letters*, 1(1), 40–43.
- Olsen, I., Dewhirst FE, Paster BJ, Büsse H-J (2005). *Family Pasteurellaceae*. In Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (851–856). New York: Springer.
- Palmer, G., & Reedijk, J. (1991). *Nomenclature of electron-transfer proteins. Recommendations 1989*. *European Journal of Biochemistry*, 200(3), 599–611.

- Park, D. H., & Zeikus, J. G. (1999). Utilization of Electrically Reduced Neutral Red by *Actinobacillus succinogenes*: Physiological Function of Neutral Red in Membrane-Driven Fumarate Reduction and Energy Conservation. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2403–2410.
- Park, D. H., Laivenieks, M., Guettler, M. V., Jain, M. K., & Zeikus, J. G. (1999). Microbial Utilization of Electrically Reduced Neutral Red as the Sole Electron Donor for Growth and Metabolite Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2912–2917.
- Paster, M., Pellegrino, J. L., Carole, T. M., Energetics, I., & U.S. Department of Energy, O. of E. E. and R. E., Office of the Biomass Program. (2003). *Industrial bioproducts: Today and tomorrow*. Energetics, Incorporated.
- Patel, M. S., Roche, T. E., & Harris, R. (Eds.). (1996). Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes. *The Journal Of Biological Chemistry*, 289 (24), 16615–16623.
- Pateraki, C., Almqvist, H., Ladakis, D., Lidén, G., Koutinas, A. A., & Vlysidis, A. (2016b). Modelling succinic acid fermentation using a xylose based substrate. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 26–41.
- Pateraki, C., Andersen, S. J., Ladakis, D., Koutinas, A., & Rabaey, K. (2019). Direct electrochemical extraction increases microbial succinic acid production from spent sulphite liquor. *Green Chemistry*, 21(9), 2401–2411.
- Pateraki, C., Skliros, D., Flemetakis, E., & Koutinas, A. (2020). Succinic acid production from pulp and paper industry waste: A transcriptomic approach. *Journal of Biotechnology*.
- Peckham, B. W. (2001). The First Hundred Years of Corn Refining in the United States. *Starch - Stärke*, 53(6), 257–260.
- Podkovyrov, S. M., & Zeikus, J. G. (1993). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase; a catabolic CO<sub>2</sub>-fixing enzyme, from *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Journal of General Microbiology*, 139(2), 223–228.
- Rabaey, K., & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis—Revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10), 707–716.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., & Moorman, A. F. M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), 62–66.
- Rose, I. A. (1955). Acetate kinase of bacteria (acetokinase). *Methods in Enzymology*, 1,

591–595.

- Salvachúa, D., Mohagheghi, A., Smith, H., Bradfield, M. F. A., Nicol, W., Black, B. A., Bidy, M. J., Dowe, N., & Beckham, G. T. (2016). Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 28.
- Sasaki, K., Tsuge, Y., Sasaki, D., & Kondo, A. (2014). Increase in lactate yield by growing *Corynebacterium glutamicum* in a bioelectrochemical reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(5), 598–601.
- Schröder, U., Harnisch, F., & Angenent, L. T. (2015). Microbial electrochemistry and technology: Terminology and classification. *Energy & Environmental Science*, 8(2), 513–519.
- Shin, J., Zeikus, M. Jain, H. (2002). Electrically enhanced ethanol fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), 476–481.
- Song, H., & Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 352–361.
- Srikanth, S., Venkateswar Reddy, M., & Venkata Mohan, S. (2012). Microaerophilic microenvironment at biocathode enhances electrogenesis with simultaneous synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) in bioelectrochemical system (BES). *Bioresource Technology*, 125, 291–299.
- Stackebrandt, E., & Hippe, H. (1986). Transfer of *Bacteroides amylophilus* to a new genus *Ruminobacter* gen. Nov., nom. Rev. As *Ruminobacter amylophilus* comb. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 8(3), 204–207.
- Stouthamer, A. H. (1973). A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. *Antonie van Leeuwenhoek*, 39(1), 545–565.
- Strathdee, C. A., & Lo, R. Y. (1989). Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *Journal of Bacteriology*, 171(2), 916–928.
- Thakker, C., Bhosale, S., & Ranade, D. (2006). Formation of Succinic Acid by *Klebsiella pneumoniae* MCM B-325 Under Aerobic and Anaerobic Conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 16(6), 870–879.
- Vlysidis, A., Binns, M., Webb, C., & Theodoropoulos, C. (2011). Glycerol utilisation for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. *Biochemical Engineering Journal*, 58–59, 1–11.

- Watson, J. D. (Ed.). (2014). *Molecular biology of the gene (Seventh edition)*. Pearson.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–476, 478–481.
- William, F., & Bernlohr, W. (1971). II. Kinetic Properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 246(6), 1746-1755.
- Wise, M., Dooley, J., Luckow, P., Calvin, K., & Kyle, P. (2014). Agriculture, land use, energy and carbon emission impacts of global biofuel mandates to mid-century. *Applied Energy*, 114, 763–773.
- Wolfe, A. J. (2005). The Acetate Switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 12–50.
- Xafenias, N., Kmezik, C., & Mapelli, V. (2017). Enhancement of anaerobic lysine production in *Corynebacterium glutamicum* electrofermentations. *Bioelectrochemistry*, 117, 40–47.
- Yalkowsky, S.H., He, Yan., *Handbook of Aqueous Solubility Data: An Extensive Compilation of Aqueous Solubility Data for Organic Compounds Extracted from the AQUASOL database.*, Boca Raton: CRC Press LLC.
- Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: A path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 213–219.
- Zeikus, J. G., Jain, M. K., & Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 545–552.
- Zhao, Y., Cao, W., Wang, Z., Zhang, B., Chen, K., & Ouyang, P. (2016). Enhanced succinic acid production from corncob hydrolysate by microbial electrolysis cells. *Bioresource Technology*, 202, 152–157.
- Zheng, P., Dong, J.-J., Sun, Z.-H., Ni, Y., & Fang, L. (2009). Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 100(8), 2425–2429.
- Zheng, P., Zhang, K., Yan, Q., Xu, Y., & Sun, Z. (2013). Enhanced succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* after genome shuffling. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(8), 831–840.
- Zhou, M., Chen, J., Freguia, S., Rabaey, K., & Keller, J. (2013). Carbon and Electron Fluxes during the Electricity Driven 1,3-Propanediol Biosynthesis from Glycerol.

- Environmental Science & Technology*, 47(19), 11199–11205.
- Zhou, M., Freguia, S., Dennis, P. G., Keller, J., & Rabaey, K. (2015). Development of bioelectrocatalytic activity stimulates mixed□culture reduction of glycerol in a bioelectrochemical system. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 483–489.
- Zou, W., Zhu, L.-W., Li, H.-M., & Tang, Y.-J. (2011). Significance of CO<sub>2</sub> donor on the production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 87.
- Zou, X., Wang, Y., Tu, G., Zan, Z., & Wu, X. (2015). Adaptation and Transcriptome Analysis of *Aureobasidium pullulans* in Corncob Hydrolysate for Increased Inhibitor Tolerance to Malic Acid Production. *Plos One*, 10(3), e0121416.