



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

I LIEVITI COME FABBRICHE  
MICROBICHE PER LA PRODUZIONE DI  
BIOCARBURANTI

YEASTS AS MICROBIAL CELL FACTORIES  
FOR SUSTAINABLE PRODUCTION OF  
BIOFUELS

TIPO TESI: Compilativa

Studente:  
RICCARDO SIROCCHI

Relatore:  
PROF.SSA CRISTIANA GAROFALO

ANNO ACCADEMICO 2021-2022



# SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE .....	5
ELENCO DELLE FIGURE .....	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI .....	7
INTRODUZIONE .....	8
CAPITOLO 1 BIOCARBURANTI A CATENA CORTA .....	19
1.1 Alcoli a catena corta .....	19
1.2 Alcani/Alcheni a catena corta .....	23
CAPITOLO 2 BIOCARBURANTI A CATENA MEDIAMENTE LUNGA .....	25
2.1 Alcoli a catena corta .....	25
2.2 Alcani/alcheni a catena media .....	25
2.3 Isoprenoidi a catena media .....	26
CAPITOLO 3 BIOCARBURANTI A CATENA LUNGA .....	27
3.1 Alcoli grassi (FAL) .....	27
3.2 Esteri degli acidi grassi.....	28
3.3 Alcani/alcheni grassi .....	29
3.4 Isoprenoidi a catena lunga .....	30
CAPITOLO 4 BIOGREGGIO DI LIEVITI PER LA PRODUZIONE DI BIODIESEL	32
4.1 Lieviti naturali e ingegnerizzati per la produzione di materie prime lipidiche .....	32
4.2 Substrati low-cost per la produzione di lipidi .....	34
CAPITOLO 5 CONCLUSIONE E PROSPETTIVE FUTURE.....	36
BIBLIOGRAFIA .....	38

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 0-1.....	12
Tabella 0-2.....	13
Tabella 0-3.....	14
Tabella 0-4.....	16

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 0-1 .....	11
Figura 1-1 .....	21

## ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

ACC	Acetil-CoA carbossilasi
COA	Coenzima A
DMAPP	Dimetil allil pirofosfato
FAEE	Esteri etilici degli acidi grassi
FAL	Alcoli grassi
FAME	Esteri metilici degli acidi grassi
FAR	Acil-CoA grasso-reduttasi
FASBE	Esteri alchilici degli acidi grassi a catena corta e ramificata
FFA	Acidi grassi liberi
GPP	Geranil pirofosfato
IPP	Isopentile pirofosfato
TAG	Triacilglicerolo
WS	Cera estere sintasi

## INTRODUZIONE

Attualmente, l'utilizzo di combustibili fossili suscita molta preoccupazione a causa delle emissioni dei gas serra che si producono in seguito al loro consumo. È noto infatti che questi gas influenzano l'ecologia e il cambiamento climatico nel lungo periodo. Tale fenomeno sta mettendo a rischio la vita umana e molteplici ecosistemi della Terra (Farshad, 2017; Zihé Liu, 2020). Inoltre, l'eccessiva dipendenza dai combustibili fossili ha incrementato l'instabilità geopolitica di molti paesi (Biol, 2017). Pertanto, i ricercatori mirano a identificare alternative sostenibili ai combustibili fossili. I biocarburanti possono rappresentare una valida risposta ai combustibili fossili, in quanto risorse rinnovabili e, soprattutto, non nocive per l'ambiente (Owusu, 2016). L'utilizzo dei biocarburanti rappresenta un approccio interessante per ridurre le emissioni dei GHG dei jet, autocarri a lunga percorrenza e navi.

Ad oggi, il bioetanolo e il biodiesel vengono già prodotti come alternative ai combustibili fossili. Alcuni rapporti prevedono che i biocarburanti riusciranno a coprire il 27% della domanda di combustibili per i trasporti entro il 2050 (Timilsina, 2014). Tuttavia, i costi di produzione dei biocarburanti non possono ancora competere con quelli dei combustibili fossili; ad esempio, il costo del biodiesel è maggiore del 30% rispetto a quello del diesel di origine fossile (Lew, 2014). Inoltre, l'etanolo ha un basso contenuto energetico e non è adatto alle infrastrutture già esistenti per i carburanti. Il biodiesel viene principalmente prodotto da oli vegetali edibili per mezzo di una conversione chimica dei trigliceridi in esteri acilici metilici, ma ciò potrebbe portare ad una competizione tra alimenti e carburanti.

Esiste la possibilità di sfruttare alcuni microrganismi per la produzione di biocombustibili. Da un punto di vista economico, per una produzione efficiente degli odierni biocarburanti da microrganismi è necessario un miglioramento dell'efficacia delle vie metaboliche microbiche (Aro, 2016). I lieviti rappresentano dei produttori cellulari efficienti di combustibili essendo anche caratterizzati da un breve tempo di generazione. In aggiunta a ciò, la produzione microbica di biocombustibili non contribuisce al cambiamento climatico e sono facilmente manipolabili (Jang, 2012). Infine, la produzione di biocombustibili di origine microbica non andrebbe a competere con la produzione di alimenti o con i prodotti derivati da colture agricole. Ad oggi si sono compiuti grandi progressi nello sfruttare il metabolismo microbico

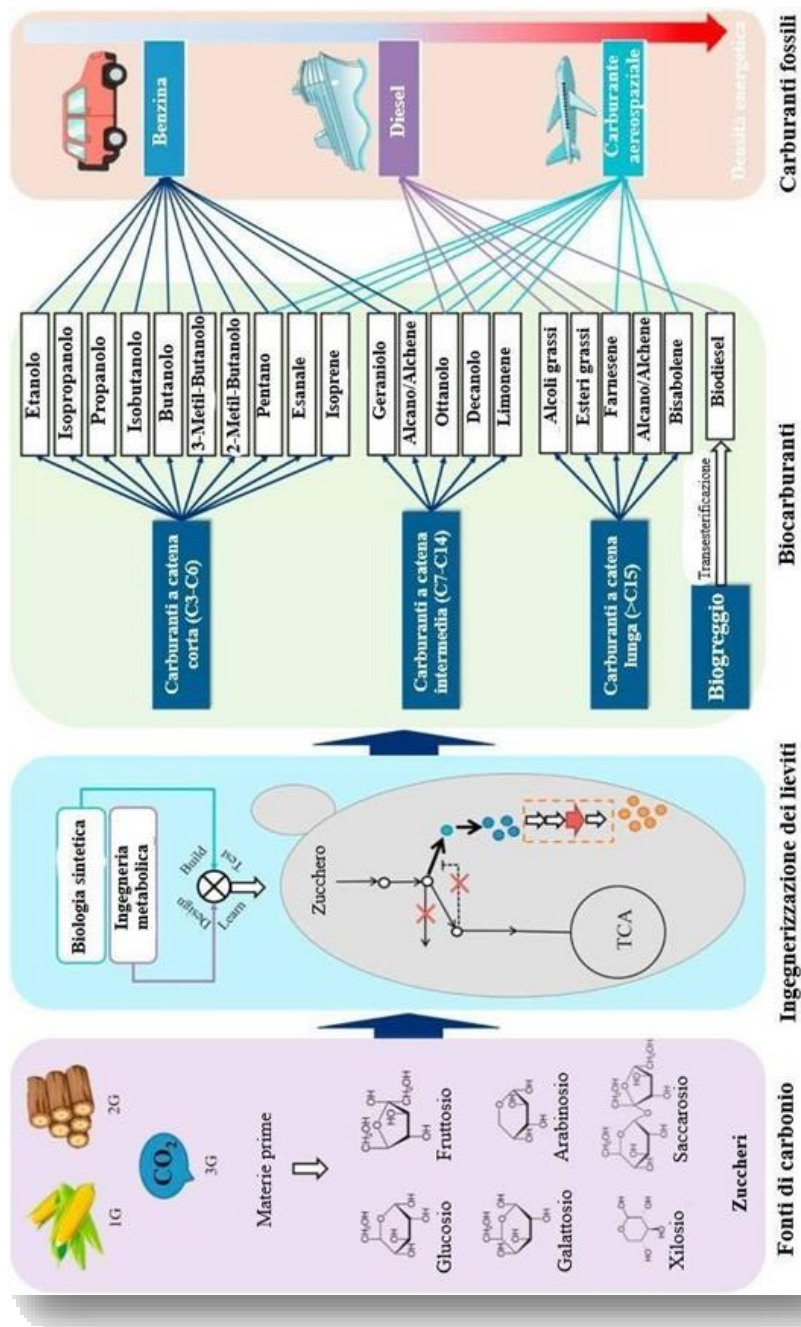
per la produzione di biocarburanti sottoforma di alcoli a medio/lunga catena, acidi grassi e derivati degli isoprenoidi, i quali mostrano proprietà fisiche simili o addirittura migliori dei carburanti derivanti dal petrolio (Zhou, 2018). I microrganismi potrebbero essere quindi i potenziali protagonisti della transizione dai carburanti fossili ai biocarburanti (Darvishi, 2017).

La storia della produzione di biocarburanti ottenuti dai lieviti risale a più di 150 anni fa, quando Luis Pasteur scoprì che *Saccharomyces cerevisiae* è capace di sintetizzare etanolo dallo zucchero (Romano, 2008). Da allora, sono stati fatti progressi significativi riguardo la genomica, proteomica e metabolismo dei lieviti (Nielsen, 2019). I lieviti sono ad oggi considerati come un'interessante fonte produttiva per un'ampia gamma di biocarburanti (Nielsen, 2013; Kwak, 2019). Le tecniche tradizionali di genetica molecolare sono efficaci per sviluppare rapidamente lieviti ingegnerizzati per l'ottimizzazione delle vie metaboliche (Wagner, 2016). Le tecniche di biologia molecolare sono state sviluppate prendendo come modello di riferimento *S. cerevisiae* (Binbin, 2018). Questa specie ha 16 cromosomi e la dimensione del suo genoma è di 12 Mb (Mega basi). Si stima che siano circa 6000 i geni codificati da questo genoma, di cui solo 1000 geni risultino essere fondamentali per il suo ciclo vitale (Narayana, 2014); ad oggi, gli scienziati stanno cercando di ridurre le dimensioni tramite la ricostruzione dei cromosomi. Sei cromosomi nativi di *S. cerevisiae* (II, III, V, VI, X e XII) sono stati rimpiazzati con successo dalle loro versioni sintetiche contenenti importanti modificazioni e al contempo la dimensione del genoma è stata ridotta dell'8% (Boeke, 2018). Tale metodologia può essere sfruttata ancora di più per ottenere una maggior efficienza metabolica nella produzione dei biocarburanti senza andare a compromettere la produzione di altri prodotti bio-tecnologicamente preziosi di *S. cerevisiae*. Similarmente, gli strumenti molecolari sono in fase di sviluppo anche per altre specie di lievito, come *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha*, *Rhodotorula toruloides*, *Pichia pastoris* e *Kluyveromyces lactis*, i quali sono risultati essere cellule produttrici idonee per la produzione di biocarburanti (Darvishi, 2018) (Shuobo, 2017).

Come mostrato in Figura 0-1, i biocarburanti possono essere divisi in tre categorie basate sul numero di atomi di carbonio presenti nelle loro strutture; si hanno carburanti a catena corta (C2-C6), a catena media (C7-C14) e a catena lunga (più di C15) (Wenqin, 2019). Ceppi di lievito nativi o ingegnerizzati possono produrre efficientemente diverse tipologie di biocarburanti, inclusi alcoli, esteri, isoprenoidi, alcheni e alcani (Tabella 0-1, Tabella 0-2, Tabella 0-3; Figura 0-1); grazie quindi a tale versatilità, le molecole prodotte potranno rimpiazzare i combustibili fossili in molteplici applicazioni (Figura 0-1). Ad oggi sono stati fatti notevoli progressi sul design e sulla costituzione delle vie metaboliche per ottenere una



specifica molecola di interesse (Zhou, 2018). I lipidi nei lieviti oleaginosi si presentano principalmente come triacilgliceroli (TAGs), i quali sono considerati come costituenti fondamentali dei composti derivanti dagli acidi grassi; infatti, i lieviti oleaginosi sono stati manipolati e trattati come ‘biogreggio’ per la produzione di biodiesel. Come mostrato in Figura 0-1, questi lieviti sono stati manipolati e modificati tramite tecniche di biologia molecolare e ingegneria metabolica per raggiungere o in alcuni casi addirittura migliorare la capacità di queste cellule di consumare materie prime economiche e rinnovabili, come ad esempio substrati lignino-cellulosolitici (Sharma, 2020) o direttamente i gas serra, ad esempio CO<sub>2</sub> (Gassler, 2019).



**Figura 0-1**

*Schema della produzione microbica di biocarburanti con catene di varie lunghezze e loro possibili applicazioni come carburanti in alternativa ai carburanti fossili. Grazie alla loro versatilità, le molecole di biocarburanti prodotte potrebbero essere impiegate in varie applicazioni oltre a quelle qui menzionate. Le materie prime più probabili da impiegare possono essere raggruppate in tre tipi (Liu, 2020): a base di prodotti alimentari (1G), materia lignino-cellulosolitica (2G) e gas serra (3G).*

I lieviti, in questa accezione appena descritta, possono essere definiti fabbriche cellulari microbiche e sono stati modificati grazie al continuo sviluppo dell'ingegneria metabolica e delle biotecnologie microbiche, offrendo nuove opportunità per l'ottimizzazione di specifiche vie metaboliche e biosistemi specifici per la produzione di biocarburanti come riportato in Tabella 0-1, 0-2, 0-3 (Liu, 2019; Biz, 2019; Yueping, 2019).

**Tabella 0-1**

**Biocarburanti a catena corta (C2-C6) naturali e prodotti da lieviti metabolicamente ingegnerizzati (C.= *Candida*; H.= *Hansenula*; K.= *Kluyveromyces*; P.= *Pichia*) (Liu, 2021).**

Sostanze	Lievito	Fonte carboniosa	Titolo	Carburante surrogabile	Riferimenti
Etanolo (C2)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio e galattosio	96,9 g/L	Benzina	(Kim, 2014)
	<i>P. stipitis</i>	Xilosio	6,8 g/L		(Jun, 2012)
		Xilosio	26,7 g/L		(J.P.A., 2011)
	<i>C. albicans</i>	Fecola di patate	21,6 g/L		(Aruna, 2014)
	<i>H. polymorpha</i>	Xilosio	1,6 g/L		(Ishchuk, 2008)
	<i>K. marxianus</i>	Lattosio (siero di lattegrezzo)	2,1 g/L		(Zafar, 2006)
Propanolo (C3)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	179 mg/L	Benzina	(Yuya, 2018)
Isopropanolo(C3)	<i>C. utilis</i>	Glucosio	27 g/L	Benzina	(Tamaka, 2013)
Butanolo (C4)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio e chetovaleato	2,4 g/L	Benzina	(Swidah, 2018)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	835 mg/L	Benzina	(Shi, 2016)
Isobutanolo (C4)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	2,09 g/L	Benzina	(Wess, 2019)
Alcol isoamilico (C5)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio e galattosio	561 mg/L	Benzina	(Yuan, 2017)
Pentano (C5)	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	4,98 mg/L	Benzina e carburante per jet	(Blazek, 2013)

Isoprene (C5)	<i>S. cerevisiae</i>	Saccarosio	2527 mg/L	Carburante per jet	(Xiaomei, 2016)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	3,7 g/L	Carburante per jet	(Wang, 2017)
Esanale (C6)	<i>Y. lipolytica</i>	1,3-idroperossido e ditiotreitoli	600 mg/L	Benzina e carburante per jet	(Gómez, 2009)

**Tabella 0-2**

***Biocarburanti naturali e metabolicamente ingegnerizzati a catena media (C7-C14) prodotti da lieviti (Liu, 2021).***

Sostanze	Lievito	Fonte carboniosa	Titolo	Carburante surrogabile	Riferimenti
Ottanolo (C8)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	49,5 mg/L	Diesel e carburante per jet	(Henritzi, 2018)
Decanolo (C10)	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	550 mg/L	Diesel e carburante per jet	(Rutter, 2016)
Alcani (C7-C13)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	50 µg/L/OD	Benzina o carburante per jet	(Zhu, 2017)
Alcheni (C7-C13)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	3,35 mg/L	Benzina o carburante per jet	(Zhu, 2017)
Limonene (C10)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	76 mg/L	Carburante per jet	(Peng, 2018)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	166 mg/L		(Codruta, 2019)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio ed etanolo	917,7 mg/L		(Siddiqui, 2019)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio e piruvato	23,56 mg/L		(Xiao et al., 2022)

					0 1 6)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glicerolo e citrato	165,3 mg/L		(Cheng, 2019)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	11,705 mg/L (D-limonene)		(Yutao, 2019)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	11,088 mg/L (L-limonene)		(Yutao, 2019)
Geraniolo (C10)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	293 mg/L	Benzina	(Zhao, 2016)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio ed etanolo	1,69 g/L		(Zhao, 2017)

**Tabella 0-3**

**Biocarburanti naturali e metabolicamente ingegnerizzati a catena lunga (C15 e più) prodotti da lieviti (*L.*= *Lipomyces*; *R.*= *Rhodotorula*) (Liu, 2021).**

Sostanze	Lievito	Fonte carboniosa	Titolo	Carburante surrogabile	Riferimenti
Alcoli grassi	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	330,2 mg/L	Diesel	(Feng, 2015)
	<i>S. cerevisiae</i>	Xilosio	1,2 g/L		(Guo, 2016)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	660,8 mg/L		(Wang, et al., 2016)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	1,3 g/L		(Sheng, et al., 2016)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	1,2 g/L		(D'Espaux, 2017)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	20,3 mg/L		(Jin, 2015)
	<i>S. cerevisiae</i>	Pretrattamento con liquidi ionici di erba da taglio	0,7 g/L		(D'Espaux, 2017)

	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	83,5 mg/L		(Yu, 2017)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	1,5 g/L		(Zhou, 2016)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	70 mg/L		(Yating, 2018)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	167 mg/L		(Wei, 2016)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	2,15 g/L		(Xu, 2016)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	5,8 g/L		(Cordova, 2020)
	<i>L. starkeyi</i>	Glucosio	770 mg/L		(Wei, 2016)
	<i>L. starkeyi</i>	Glucosio	1,7 g/L		(McNeil, 2018)
	<i>R. toruloides</i>	Saccarosio	>8 g/L		(Fillet, 2015)
Esteri di ac.grassi	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	4,4 mg/L	Diesel	(Jong, 2015)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	1049 µg		(Suong, 2015)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	142,5 mg/L		(Xu, 2016)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio ed etanolo	1,18 g/L		(Bruder, 2019)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	230 mg/L		(Binbin, 2015)
	<i>P. pastoris</i>	Glucosio	169 mg/L		(Hui, 2015)
Alcani / Alcheni grassi	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	22,0 µg/CWD	Carburante per aerei	(Buijs, 2014)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	0,8 mg/L		(Zhou, 2016)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	3,55 mg/L		(Zhou, 2016)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	23,3 mg/L		(Xu, 2016)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio e glicerolo	58,7 mg/L		(Bruder, 2019)

	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	3,7 mg/L		(Binbin, 2015)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	0,2 mg/L		(Zhou, 2016)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	35,3 mg/L		(Zhou, 2018)
Farnesene(C15)	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	170 mg/L	Diesel e carburante per aerei	(Tippman, 2015)
	<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	16 mg/L		(Tippman, 2017)
	<i>S. cerevisiae</i>	Sciroppo di canna	>130 g/L		(Meadows, 2016)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio e fruttosio	260 mg/L		(Yang, 2016)
Bisabolene(C15)	<i>S. cerevisiae</i>	Galattosio e glucosio	994 mg/L	Carburante per aerei	(Yahya, 2011)
	<i>R. toruloides</i>	Stufato di mais idrolizzato	680 mg/L		(Junko, 2017)
	<i>R. toruloides</i>	Bagassa di zucchero di mais	514,1 mg/L		(Pimienta, 2019)

**Tabella 0-4**

**Produzione di biogreggio intesa come resa in lipidi da lieviti naturali e metabolicamente ingegnerizzati (A.= *Aureobasidium*; C.= *Cutaneotrichosporon*; T.= *Trichosporon*) (Liu, 2021).**

Lievito	Substrato	Contenuto Lipidico (% peso cellulare a secco)	Lipidi (g/L)	Resa in lipidi (g lipidi/g fonte carboniosa)	Riferimenti
<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	81.4%	72,7 g/L	0.252 g/g	(Xu, 2017)
<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	67%	55 g/L	0.234 g/g	(Qiao, 2015)
<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	>70%	66,4 g/L	0.229 g/g	(Xu, 2016)
<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	66.8%	98,9g/L	0.351 g/g	(Qiao, 2017)
<i>Y. lipolytica</i>	Glucosio	77%	85 g/L	0.21 g/g	(Friedlander, 2016)

<i>R. toruloides</i>	Glucosio	61.1%	16,4g/L	0.23 g/g	(Zhang, 2015)
<i>R. toruloides</i>	Xilosio	43.4%	9,5 g/L	0.14 g/g	(Zhang, 2015)
<i>R. toruloides</i>	Glucosio	75.6%	89,4g/L	0.22 g/g	(Zhang, 2016)
<i>S. cerevisiae</i>	Glucosio	25.4%	1,76g/L	0.088 g/g	(Ferreira, 2018)
<i>R. toruloides</i>	Glucosio e xilosio	59%	31,9g/L	0.29 g/g	(Fei, 2016)
<i>Y. lipolytica</i>	Xilosio	-	15 g/L	0.094 g/g	(Li, 2016)
<i>T. coremiiforme</i>	Glucosio e xilosio	37.8%	7,7 g/L	0.168 g/g	(Huang, 2013)
<i>L. starkeyi</i>	Xilosio	85.1%	13,9g/L	0.278 g/g	(Juanssilfero, 2018)
<i>L. starkeyi</i>	Cellobiosio e xilosio	52%	13,3g/L	0.2 g/g	(Gong, 2012)
<i>Y. lipolytica</i>	Cellobiosio	-	0,8 g/L	-	(Guo, 2014)
<i>R. toruloides</i>	Levoglucoano	35.6%	2,0 g/L	0.1 g/g	(Lian, 2013)
<i>R. toruloides</i>	Succo di zucchero di canna e urea	45%	20,5g/L	-	(Soccol, 2017)
<i>C. oleaginosus</i>	Acido 4-idrobenzoico	44.9%	0,7 g/L	0.175 g/g	(Yaguchi, 2020)
<i>C. oleaginosus</i>	p-Cumarato	48.2%	1,0 g/L	0.25 g/g	(Yaguchi, 2020)
<i>C. oleaginosus</i>	Resorcinolo	45.6%	0,53 g/L	0.177 g/g	(Yaguchi, 2020)
<i>C. oleaginosus</i>	Fenolo	29.2%	0,21g/L	0.21 g/g	(Yaguchi, 2020)
<i>R. toruloides</i>	Idrolizzato di stocchi di mais	60.8%	23,3g/L	0.24 g/g	(Nogu�e, 2018)
<i>L. starkeyi</i>	Idrolizzato di bagassa di canna da zucchero	27.3%	3,14g/L	0.18 g/g	(Xavier, 2017)
<i>Y. lipolytica</i>	Galattosio	34%	3,22g/L	0.056 g/g	(Lazar, 2015)
<i>Y. lipolytica</i>	Melassa	>30%	8 g/L	-	(Gajdoš, 2015)
<i>Y. lipolytica</i>	Fruttosio	49.8%	20,3g/L	0.14 g/g	(Hapeta, 2017)
<i>Y. lipolytica</i>	Amido	-	2,84g/L	0.13 g/g	(Amaro, 2015)



<i>T. cutaneum</i>	Inulina	33.6%	4,79g/L	0.0958 g/g	(Wang, 2015)
<i>A. melanogenum</i>	Inulina	66.2%	9,5 g/L	0.18 g/g	(Li, 2018)
<i>R. toruloides</i>	Glicerolo	37.7%	10 g/L	0.204 g/g	(Xu, 2016)

### **Legenda abbreviazioni dei microrganismi**

*C.*= *Candida*;

*H.*= *Hansenula*;

*K.*= *Kluyveromyces*;

*P.*= *Pichia*;

*L.*= *Lipomyces*;

*R.*= *Rhodotorula*;

*A.*= *Aureobasidium*;

*C.*= *Cutaneotrichosporon*;

*T.*= *Trichosporon*;

# Capitolo 1

## BIOCARBURANTI A CATENA CORTA

### 1.1 Alcoli a catena corta

Ad oggi, il bioetanolo viene principalmente prodotto utilizzando *S. cerevisiae* e prodotti agricoli o loro derivati (Tabella 0-1); esso è anche conosciuto come biocarburante di prima generazione (1G). Si ottengono rese elevate (circa il 90%) e titolo elevato (circa il 20% peso soluto/peso solvente) di bioetanolo utilizzando zuccheri fermentescibili (Lopes, 2016). Tuttavia, la competizione intrinseca tra alimenti e biocarburanti rimane controversa ma tale situazione è in fase di transizione grazie al passaggio da bioraffinerie 1G a quelle 2G di seconda generazione (Hossain, 2017). In quest'ultimo caso, la produzione di bioetanolo viene concepita partendo da biomasse non classificabili come diretta fonte di nutrimento per l'uomo, come cellulosa, emicellulosa e lignina (Katarzyna, 2018; Aditiya, 2016). Queste tipologie di biomasse hanno attirato molta attenzione data la loro abbondanza e la loro conservabilità nel tempo. Molte aziende come DuPont, Abengoa, e POET hanno impianti che utilizzano materia lignino-cellulosolitica convertita enzimaticamente per la produzione di etanolo (Williams, 2016). È richiesta l'ottimizzazione di ogni fase del processo produttivo, soprattutto, la fase del pretrattamento enzimatico della biomassa, così da ottenere prodotti sostenibili anche dal punto di vista economico.

Il ceppo *wild-type*, *S. cerevisiae* KL17, produce 96,9 g/L di etanolo dal glucosio e galattosio ma non può utilizzare zuccheri pentosi (Kim, 2014; S.H.M., et al., 2017). Per la conversione di substrati lignino-cellulosolitici in bioetanolo, i geni codificanti la xilosio reductasi e la xilitolo deidrogenasi in *Pichia stipitis* sono stati trasmessi ed espressi in *S. cerevisiae*. Dopo 72 ore di fermentazione vari indici come il titolo di etanolo (6,8 g/L), il tasso di consumo di xilosio (0,15 g/L prodotti per ora) e biomassa prodotta (8,1 g/L) aumentavano significativamente nel ceppo ingegnerizzato (Jun, 2012). È stato ampiamente studiato anche il pretrattamento, l'idrolisi e la fermentazione nel processo produttivo di seconda generazione del bioetanolo da *S. cerevisiae* utilizzando vari substrati (Jansen, 2017). Alcuni lieviti come *Candida*, *Pichia* e *Pachysolen* possono fermentare zuccheri pentosi in etanolo (S.H.M., et al., 2017); *P. stipitis* produce 26,7 g/L di etanolo in un mezzo contenente xilosio (90,0 g/L) (Silva,

2011). Un ceppo mutato di *C. albicans* ha mostrato una forte capacità di idrolizzare amido insolubile (72%) e fecola di patate (70%), grazie alla glucoamilasi e producendo 21,6 g/L di etanolo (Aruna, 2014). Il lievito fermentante zuccheri pentosi, *Pachysolen tannophilus*, può produrre dallo xilosio sia etanolo che xilitolo; inoltre è stata applicata una mutagenesi casuale per alterarne il profilo produttivo in solo etanolo (Bolotnikova, 2015).

Un altro studio prevedeva la produzione di etanolo pari a 56 g/L via fermentazione di scarti di sorgo, con *P. tannophilus* (Sathesh, 2011). *Hansenula polymorpha* è stata progettata ed ingegnerizzata per produrre etanolo dallo xilosio; il ceppo risultante produce 1,6 e 10,8 g/L di etanolo rispettivamente dallo xilosio e dal glucosio (Ishchuk, 2008). *Kluyveromyces marxianus* è stato capace di metabolizzare la maggior parte del lattosio contenuto nel siero di latte grezzo in appena 22 ore arrivando a produrre 2,1 g/L di etanolo (Zafar, 2006).

Il bioetanolo viene già impiegato a livello globale come carburante alternativo al carburante fossile, ma il contenuto energetico più basso, la natura igroscopica e l'attitudine corrosiva ne limitano una più ampia applicazione di tale biocarburante. Sono stati compiuti molti progressi riguardo lo sviluppo di altre tipologie di biocarburante, caratterizzati da molteplici vantaggi rispetto al bioetanolo e riuscendo a mantenere tutti i vantaggi dei carburanti già in uso (Tabella 0-1).

Il propanolo, un potenziale biocarburante, può essere impiegato come surrogato della benzina, ma a causa della sua densità energetica poco inferiore all'etanolo non ha riscosso molto successo. *S. cerevisiae* può convertire il 2-chetobutirrato (2-KB) ad 1-propanolo utilizzando due enzimi endogeni 2-chetoacidoacido decarbossilasi (KDC) e un'alcol/aldeide deidrogenasi. L'ingegnerizzazione della via metabolica del citramalato ha efficacemente incrementato la produzione di 1-propanolo in *S. cerevisiae* (Yuya, 2018). La concentrazione di 1-propanolo prodotta dai ceppi ingegnerizzati raggiunse i 179 mg/L in un processo fermentativo anaerobico ad alta densità, mentre vennero prodotti solo 12 mg/L dai ceppi di controllo con glucosio.



L'isopropanolo ( $C_3H_8O$ ) può essere utilizzato come additivo nella preparazione delle benzine ad elevato numero di ottani (Rassadin, 2006), come sostituto del metanolo nel processo di transesterificazione dei grassi per la produzione di biodiesel, grazie al suo punto di scorrimento più basso (Wang, 2005).

Per la produzione di isopropanolo tramite lieviti, i geni con codone ottimizzato (derivanti da *Clostridium acetobutylicum* e da *Clostridium beijerinckii*) sono stati implementati in *Candida utilis*; il ceppo risultante accumulò solo 1,2 g/L di isopropanolo e un'elevata concentrazione di etanolo. Successivamente, i geni endogeni ACS2 ed ERG10 vennero fatti sovraesprimere in *C. utilis* ingegnerizzata e la produzione di isopropanolo raggiunse 27,2 g/L dopo 200 ore di coltura fed-batch in un bioreattore con 200 g/L di glucosio. Tale sistema prevede che la biomassa microbica aumenti in seguito a quanti nutrienti vengono forniti ai microrganismi; si prevencono così le problematiche di inibizione dai prodotti del metabolismo e l'accumulo di mutazioni) (Tamakawa, 2013).

Il butanolo ( $CH_3(CH_2)_3OH$ ) è un eccellente sostituto della benzina, facile da gestire e da utilizzare, esso è compatibile con i tradizionali motori a benzina senza apporre alcuna modifica; viene prodotto da alcune specie del genere *Clostridia* (Schadeweg, 2016).

*S. cerevisiae* venne manipolato per produrre butanolo sfruttando la via metabolica del genere *Clostridia*; il gene endogeno della tiolasi (ERG10) venne inizialmente sovraespresso nel lievito, successivamente trasmesso insieme ad altri (da *C. beijerinckii*) in *S. cerevisiae*. Il lievito risultante produsse circa 300 mg/L di butanolo (Swidah, 2015). Venne scoperta una via metabolica endogena per la produzione di butanolo, ottenute da colture 'shake-flask' (Shuobo, 2016); questo metodo di coltura prevede la continua miscelazione del mezzo liquido e dei nutrienti a temperatura costante. Successivamente, le vie metaboliche del butanolo esogene ed endogene del genere *Clostridium* vennero ulteriormente testate in *S. cerevisiae* e la sintesi del prodotto venne ulteriormente migliorata (2,4 g/L di butanolo) tramite la sovraespressione dei geni ALD6 e ACS2 con delezione del gene ADH1 (Swidah, 2018).

Gli impieghi dell'isobutanolo ( $(CH_3)_2CHCH_2OH$ ) sono simili al butanolo, ma esso può essere anche miscelato con la benzina in qualsiasi proporzione, fungendo da additivo maggioritario. *S. cerevisiae* produce isobutanolo (come un carburante di seconda generazione) tramite il catabolismo della valina, sfruttando le vie metaboliche separate citosolica e mitocondriale. La compartimentazione del catabolismo della valina nel citosol e nei mitocondri limita l'efficienza della produzione di isobutanolo; quindi, le sequenze di *targeting* mitocondriale N-terminali, codificate da particolari geni coinvolti ed utilizzate per smistare

all'interno dei vari compartimenti cellulari le varie destinazioni delle proteine prodotte (in questo caso i mitocondri), sono state eliminate in modo tale da collocare e concentrare tutti gli enzimi nel citosol (Park, 2019).

L'alcol isoamilico (3-metil-1-butanol,  $C_5H_{12}O$ ) può essere impiegato come un ottimo carburante sostitutivo della benzina, grazie alla sua densità energetica più elevata rispetto agli altri alcoli più corti. Si è riusciti a sovrapprodurre tale sostanza da *S. cerevisiae* sfruttando una via metabolica basata sulla leucina (Yuan, 2017). Si ottennero concentrazioni di alcol isoamilico, isobutanolo e 2-metil-1-butanol molto elevate dopo 72 ore di coltura, rispettivamente pari a 561,21 g/L, 321,64 g/L, e 160,82 g/L (Yuan, 2017).

L'esanolo ( $CH_3(CH_2)_5OH$ ), un biocarburante promettente, viene prodotto da batteri attraverso una via metabolica CoA-dipendente (Phillips, 2015); ad oggi, una diretta produzione di esanolo dai lieviti non è mai stata ancora documentata. Comunque, in molti studi è stato documentato invece che l'esanolo viene prodotto durante la vinificazione, e tale

produzione dipende dal substrato impiegato (Valero, 2002) (Dennis, 2012) come, ad esempio, la composizione del mosto o la cultivar di appartenenza dell'uva.

## 1.2 Alcani/Alcheni a catena corta

Gli alcani sono i costituenti maggioritari della benzina e del carburante aereo (Tabella 0-1); il pentano ( $CH_3(CH_2)_3CH_3$ ), come biocarburante, può rimpiazzarli direttamente senza alcuna modifica motoristica. Un ceppo di *Yarrowia lipolytica* è stato manipolato per la produzione di pentano a partire dall'acido linoleico come di seguito riportato. I geni codificanti la lipossigenasi I (Gmlox1) e l'idroperossido liasi (Gmhp11) dalla soia vennero fatti esprimere, previa delezione del gene per l'enzima multifunzionale perossisomiale di tipo 1 (MFE1). In tal modo, il ceppo ingegnerizzato produsse 4,98 g/L di pentano, rappresentando la prima produzione documentata di pentano da microrganismi (Blazeck, 2013).

L'isoprene ( $C_5H_8$ ) è stato individuato come un importante carburante liquido per l'aviazione, un'alternativa ai combustibili fossili in rapido esaurimento; è un emiterpenoide, il più semplice isoprenoide, sintetizzato a partire dai suoi precursori C-5: l'isopentenile pirofosfato (IPP) e il suo isomero pirofosfato dimetilico (DMAPP). Sono stati prodotti ben 2,5 g/L di isoprene tramite una duplice ingegnerizzazione della via metabolica del mevalonato (MVA) nel citoplasma e nei mitocondri (Lv, 2016). La successiva sovraespressione dell'isoprene sintasi e l'attività catalitica migliorata hanno incrementato il tasso di sintesi

dell'isoprene: DMAPP viene quindi catalizzato efficientemente in isoprene nel ceppo di lievito ingegnerizzato, producendone fino a 3,7 g/L (Wang, 2017).

## Capitolo 2

# BIOCARBURANTI A CATENA MEDIAMENTE LUNGA

### 2.1 Alcoli a catena corta

Gli alcoli a catena intermedia, 1-ottanolo ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$ ) e 1-decanolo ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{OH}$ ), hanno suscitato molto interesse come importanti sostituti del diesel e del carburante aereo (Tabella 0-2). Inoltre, possono essere impiegati come intermedi nel processo produttivo di altri biocarburanti (He, 2018). Dopo la regolazione della lunghezza della catena attraverso l'espressione di una acido grasso sintasi mutata (FAS), Henritzi et al. (2018) produssero 49,5 mg/L di 1-octanolo su mezzo YPD con glucosio come fonte di carbonio utilizzando un ceppo di *S. cerevisiae* mutato. Similmente, la produzione di 1-decanolo è stata documentata superiore a 500 mg/L in un ceppo ingegnerizzato di *Y. lipolytica* per la produzione di acidi grassi a catena media attraverso l'espressione dell'acil-CoA grassi reductasi (FAR).

### 2.2 Alcani/alcheni a catena media

Grazie alla loro compatibilità con la benzina o carburante per aerei a base di petrolio (Tabella 0-2), alcani e alcheni a catena media hanno suscitato anch'essi molto interesse. Di recente, un ceppo ingegnerizzato di *S. cerevisiae* venne ideato per la biosintesi della gamma di derivati degli acidi grassi a catene mediamente lunghe, tramite l'introduzione della FAS ingegnerizzata per controllarne la lunghezza delle catene dei precursori degli acidi grassi (Zhu, 2017). È stata documentata la produzione di 50  $\mu\text{g/L}$  per densità ottica di alcani (C7-C13) utilizzando questo ceppo di lieviti dopo l'ingegnerizzazione della via biosintetica degli alcani. Inoltre, questo lievito ha prodotto 3,35 mg/L di 1-alcheni a catena lineare (C7- C13) dopo l'introduzione di una ferrossidasi non-eme (UndA, una proteina di deposito che lega il Fe in forma di ione ferrico<sup>+3</sup>), la quale converte gli acidi grassi in 1-alcheni. I risultati suggeriscono che le vie metaboliche associate a tale proteina UndA producano 1-alcheni senza la formazione di aldeidi come intermedi; questo carattere contribuisce ad una efficace e conveniente biosintesi degli alcheni dai lieviti.



### 2.3 Isoprenoidi a catena media

I monoterpenoidi (C<sub>10</sub>) sono composti da due isoprenoidi C<sub>5</sub> (IPP+DMAP). Il limonene (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>), un prezioso monoterpene ciclico ed è un costituente dei carburanti aerei, già testato in voli di prova. *S. cerevisiae* è stato ingegnerizzato per produrre 76 mg/L di limonene tramite l'aumento di produzione del monoterpene precursore, il geranyl-pirofosfato (GPP). Tale via metabolica ottimizzata è stata in grado di sfruttare diversi substrati e il ceppo risultante ha prodotto 166 mg/L di limonene (Ignea, 2019). Similmente, Cheng et al. (2019) hanno costruito una via metabolica ortogonale del limonene in *S. cerevisiae* per convertire IPP e DMAPP in limonene. Usando questo lievito modificato si sono riusciti ad ottenere 917,7 mg/L di limonene.

Questa via metabolica è stata costruita anche in *Y. lipolytica* e sono stati prodotti 165,3 mg/L di limonene utilizzando una miscela di fonti carboniose contenenti glicerolo e citrato (Cao, 2016) (Qian, 2019). Inoltre, dopo la sovraespressione dell'enzima limitante, l'idrossimetilglutaril-CoA reduttasi (HMGR), nella via metabolica dell'MVA, *Y. lipolytica* ha prodotto 11,705 mg/L di D-limonene e 11,088 mg/L di L-limonene (Pang, 2019).

Il monoterpene geraniolo (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>) è considerato come una valida alternativa alla benzina; un lievito ingegnerizzato di *S. cerevisiae* è stato in grado di produrre 293 mg/L di geraniolo in coltura *fed-batch* (Zhao, 2016).

## Capitolo 3

# BIOCARBURANTI A CATENA LUNGA

### 3.1 Alcoli grassi (FAL)

I FAL sono prodotti oleochimici industriali preziosi date le ampie applicazioni come emollienti, plastificanti, addensanti, detergenti ad oggi considerati come candidati sostituenti del diesel. Essi possono essere ottenuti per mezzo della conversione catalitica degli acil-CoA grassi negli alcoli primari desiderati con catena lineare (Tabella 0-3).

*S. cerevisiae*, nel quale l'espressione dei fattori di trascrizione endogeni è stata manipolata e l'acetil-CoA carbossilasi (ACC), FAR e ACL sono stati fatti tutti sovraesprimere, produsse 1,1 g/L di esadecanolo (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>O) in fermentazione *fed-batch* (Feng, 2015). In seguito, una via di utilizzazione dello xilosio derivante dai funghi venne introdotto nel ceppo ingegnerizzato, dando luogo ad una produzione di 1,2 g/L di esadecanolo dalla fermentazione *fed-batch* dello xilosio (Guo, 2016). Inoltre, la sintesi degli alcoli grassi venne compartimentata con successo nel perossisoma, portando così alla produzione di 1,3 g/L di alcoli grassi e con più del 60% di esadecanolo come prodotto principale (Sheng, 2016). In un altro studio, elevate produzioni di alcoli grassi sono state raggiunte in un ceppo ingegnerizzato di *S. cerevisiae* con l'ausilio di analisi proteomiche e dei flussi metabolici (d'Espaux, 2017). Ventiquattro potenziali geni target vennero testati, la delezione di DGA1, HFD1, ADH6 e GDH1 insieme alla sovraespressione di OLE1 e ACC1 mutata, condussero alla produzione di: 1,2 g/L di alcoli grassi nelle *shake-flask* partendo dal glucosio, 0,7 g/L di alcoli grassi sempre nelle *shake-flask* ma partendo da liquido ionizzato di sfalci di erba da taglio/sorgo e 6,0 g/L di alcol in fermentazione *fed-batch*. Inoltre, con *S. cerevisiae* si è arrivati a produrre 83,5 mg/L di docosanolo (C<sub>22</sub>H<sub>46</sub>O) tramite ingegnerizzazione del sistema di allungamento delle catene degli acidi grassi e l'espressione di una specifica acido grasso reductasi (Yu, 2017).

Simultaneamente, un ceppo produttore elevate quantità di acidi grassi liberi (FFA), generò 1,5 g/L di alcoli grassi dopo la delezione dei geni *competitors*, e dopo la sovraespressione dei geni coinvolti nella sintesi degli alcoli grassi (Zhou, 2016). Una successiva introduzione ed espressione del gene umano codificante il trasportatore FATP1 in questo ceppo

ingegnerizzato, diede luogo ad un accumulo extra cellulare di 70 mg/L di alcoli grassi, ovvero 4-5 volte più alto da quello prodotto dal ceppo di controllo (Hu, 2018). In aggiunta a ciò, una via metabolica sintetica portò alla produzione di 20,3 mg/L di miscela di alcoli grassi (contenente alcoli sia a catena pari che dispari) (Jin, 2016). Tale via metabolica consumò meno cofattori NAD(P)H rispetto alla via metabolica basata sul FAR.

Una produzione diretta di alcol viene individuata anche nei lieviti oleaginosi. Ad esempio,

*Y. lipolytica* produsse 660,8 mg/L di esadecanolo dopo la delezione di DGA1/FAO1 e la coespressione di una particolare FAR derivante dal *Tyto alba* (Wang, et al., 2016). Similarmente, 167 mg/L di alcoli grassi, soprattutto alcoli grassi saturati a lunga catena, vennero prodotti semplicemente esprimendo il gene codificante la FAR di *Marinobacter aquaeolei* (Wang, 2016). Dopo la sovraespressione della FAR insieme ad un'acil-CoA grasso sintetasi (FadD), i quali attivano la FFA tramite l'aggiunta di coenzima A (CoA) per la formazione degli acil-CoA, è stato possibile produrre 2,15 g/L di alcoli grassi (Xu, 2016

). Dopo aver catalogato tutte le varianti dell'enzima FAR, è stato espresso il gene codificante MhFAR in *Y. lipolytica*, con una produzione di 5,8 g/L di alcoli grassi (Cordova, 2020). Nel lievito oleaginoso *Lipomyces starkeyi*, sono stati prodotti 770 mg/L di alcoli grassi tramite l'espressione del gene codificante per FAR dal batterio *M. aquaeolei* (Wang, 2016). L'integrazione di questo gene FAR ottimizzato nel lievito oleaginoso *R. toruloides* portò alla produzione di 8 g/L di alcoli grassi C16 e C18 partendo dal glucosio (Fillet, 2015). Similarmente, sono stati prodotti 1,7 g/L di alcoli grassi (anche qui con catene carboniose C16 e C18) dal lievito *L. starkeyi* tramite l'espressione del FAR di *Mus musculus* (McNeil, 2018).

### 3.2 Esteri degli acidi grassi

Gli esteri degli acidi grassi vengono prodotti tramite alcoli e acidi grassi per esterificazione. Il biodiesel è una miscela di esteri alchilici di acidi grassi a catena corta, i quali possono essere anch'essi prodotti dai lieviti (Tabella 0-3). L'introduzione del gene della estere sintasi della cera (*wax ester synthase*, WS) ha reso possibile la produzione di esteri etilici di acidi grassi (*fatty acids ethyl esters*, FAEE) tramite l'ingegnerizzazione di *S. cerevisiae* (Shi, 2012). Tramite l'utilizzo di WS come enzima catalizzatore, è stato possibile raggiungere la produzione di 4,4 mg/L di FAEE; tale produzione è stata successivamente documentata in un ceppo con una integrazione cromosomica stabile (Jong, 2015), si sono ottenuti 10,498 µg di FAEE/g di CWD (peso secco cellulare) Inoltre, Xu et al. (2016) verificarono che si produceva 142,5 mg/L di FAEE nel ceppo ingegnerizzato di *Y. lipolytica* quando ADP1 WS

(di *Acinetobacter baylyi*) veniva fatto esprimere e la sua azione era indirizzata al reticolo endoplasmatico (Xu, 2016). Le strategie di miglioramento che prevedevano che l'attività degli enzimi si svolgesse nei diversi compartimenti cellulari, hanno dato luogo a diversi profili produttivi di FAEE. Un ceppo recentemente sviluppato di *Y. lipolytica* ha prodotto 1,18 g/L di FAEE in coltura *shake-flask* dopo aver ottimizzato il promotore per la sovraespressione di WS, l'eliminazione della  $\beta$ -ossidazione e il reindirizzamento del flusso metabolico verso la produzione di acetyl-CoA (Qi Gao, 2018).

In aggiunta ai FAEE, gli esteri di acidi grassi con alcol a catena ramificata vengono anche considerati come carburanti diesel avanzati con proprietà superiori, tra cui un miglior punto di scorrimento inferiore alle basse temperature, il quale rappresenta spesso una delle principali limitazioni di impiego. Uno studio ha documentato anche che l'ingegnerizzazione di un ceppo di *S. cerevisiae* ha condotto alla produzione di acidi grassi corti ed esteri alchilici a catena ramificata (*fatty acid short-and branched-chain alkyl esters* - FASBE) (Teo WS, 2015). Lo stesso studio ha dimostrato che *S. cerevisiae* può produrre più di 230 mg/L di FASBE, inclusi l'etile, l'isobutile, l'isoamile ed esteri amilici attivi, utilizzando solamente alcoli sintetizzati per via endogena e acidi grassi. Similmente, il lievito *P. pastoris* è stato modificato per produrre 169 mg/L di acidi grassi con esteri a catena ramificata tramite modificazione genetica della via metabolica degli acidi grassi (Hui, 2015).

### 3.3 Alcani/alcheni grassi

Alcani/alcheni grassi sono parte di un'importante classe di idrocarburi, e sono in fase di sviluppo per fungere da carburante aereo. A sostegno di questa prospettiva, 22,0  $\mu\text{g/g}$  di alcani CWD sono stati biosintetizzati per la prima volta in *S. cerevisiae* tramite la delezione del gene per la sintesi di esadecanolo deidrogenasi (HFD1) e la coespressione della via metabolica della biosintesi degli alcani (Buijs, 2015).

In *Y. lipolytica*, anche il pool di acidi grassi endogeni è stato modificato mediante l'ingegneria genetica per produrre 23,3 mg/L di alcani, previa espressione del gene codificante CAR (da *Mycobacterium marinum*), di un modulo attivante la proteina ACP (proteina carrier dell'acile), Sfp da *Bacillus subtilis* e l'ossigenasi aldeidica deformante (ADO) (da *Prochlorococcus marinus*) (Peng Xu, 2016). Recentemente, l'ossidasi guidata dalla luce di *Chlorella variabilis* (CvFAP) è stata espressa in *Y. lipolytica*, con produzione di 58,7 mg/L di alcani e alcheni prodotti tramite l'impiego di una particolare coltura *fed-batch* con apporti di glicerolo alla fermentazione tramite un sistema automatizzato.

*S. cerevisiae* è stato il primo lievito ad essere catalogato come produttore di alcheni terminali tramite una reazione di decarbossilazione degli acidi grassi, impiegando una strategia di ingegnerizzazione genetica combinata, portando alla produzione di 3,7 mg/L di 1-alcane (Binbin, 2015). Dopo aver indirizzato nel citocroma P450 la produzione di enzimi OleT e il sistema di trasferimento di elettroni nel perossisoma, un lievito produttore FFA ha raggiunto una produzione di 0,2 mg/L di 1-alcane a catena lunga (Zhou, 2016). Inoltre, un ceppo ricombinante di *S. cerevisiae* è riuscito a produrre 35,3 mg/L di 1-alcheni con più dell'80% del titolo come secreto extracellulare. Ciò è stato reso possibile grazie all'ingegnerizzazione della via metabolica degli acidi grassi insieme all'espressione di un enzima con azione di desaturasi (UndB) da *Pseudomonas fluorescens*, ferredossina ferredossina- reductasi (Fd/Fnr) di *E. coli* e della proteina FATP1 (trasportatore di acidi grassi a catena lunga 1) da *Homo sapiens*.

### 3.4 Isoprenoidi a catena lunga

Sesquiterpenoidi (C15) sono uno dei gruppi più ampi degli isoprenoidi. Molte sostanze derivate dai sesquiterpenoidi come il farnesano e il bisabolene, sono state utilizzate come molecole di carburante e vengono prodotte da IPP.

Il farnesene può essere considerato l'elemento costitutivo del farnesano, il quale può essere impiegato analogamente al diesel fossile e come miscela per carburante aereo (Zhou, 2018; Azhar, 2017). Sono state analizzate tre terpene-sintasi in *S. cerevisiae* e si sono ottenuti 4 mg/L di farnesano tramite una farnesano-sintasi (FS) di *Malus domestica*. In combinazione con l'ingegnerizzazione genetica dei meccanismi metabolici di formazione dei precursori e quelli dei cofattori, il titolo finale raggiunse i 170 mg/L in fermentazione *fed-batch* (Tippmann, 2015).

Successivamente, ERG20 e FS vennero implementati in *S. cerevisiae* per la produzione di farnesano tramite marcatura enzimatica e l'impiego di proteine 'scaffolding' (Tippmann, 2017). Il rapporto proteina enzimatica e proteina *scaffold* si è dimostrato essere fondamentale, in quanto la resa in farnesano è stata incrementata del 135% tramite l'impiego di *affibody scaffold* a doppio sito (per *affibody* si intendono quelle molecole sintetiche che riescono a mimare l'azione degli anticorpi), arrivando al titolo di 16 mg/L.

*Y. lipolytica* venne ingegnerizzata con successo per la produzione di farnesano tramite la sovraespressione combinata di tHMG1, IDI, ERG20 e FS. Questo ceppo riuscì a produrre 259,98 mg/L di farnesano (Yang, 2016). Inoltre, Amyris documentò la produzione di 130 g/L

di farnesano in un bioreattore industriale tramite l'incorporazione di quattro enzimi metabolici non nativi: ADA, NADH-HMGr, xPK e PTA (Meadows, 2016).

Il bisabolene, un altro sesquiterpenoide, è stato considerato come un carburante aereo promettente. In un primo studio di riferimento, *S. cerevisiae* è stato modificato con successo riuscendo a produrre 900 mg/L di bisabolene tramite una combinazione di enzimi individuati da uno screening enzimatico di sesquiterpene sintasi (STS) e bisabolene sintasi (BIS) e ingegnerizzazione metabolica, includendo la sovraespressione troncata di HMGR, ERG20, UPC2-1 e regolazione di ERG9 (Peralta, 2011).

Inoltre, un gene ottimizzato codificante per BIS è stato integrato in *R. toruloides*, il quale produsse 680 mg/L di bisabolene in una fermentazione di residui colturali di mais (Junko, 2017). Questo ceppo venne successivamente coltivato con idrolizzati derivanti da biomasse di quattro differenti materie prime pretrattate in reattori tubolari. Il livello più alto di bisabolene ottenuto, 514,1 mg/L si ottenne dalle bagasse di canna da zucchero (Pimienta, 2019).

## Capitolo 4

# BIOGREGGIO DI LIEVITI PER LA PRODUZIONE DI BIODIESEL

### 4.1 Lieviti naturali e ingegnerizzati per la produzione di materie prime lipidiche

Il biodiesel ha debuttato come alternativa al diesel fossile, sostenibile e rispettoso dell'ambiente. È compatibile con i motori diesel convenzionali e la sua diffusione è sempre più estesa a livello mondiale. Le odierne molecole di biodiesel includono principalmente gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME), solitamente ottenuti dal processo di transesterificazione partendo dagli oli vegetali. Poiché è la selezione delle materie prime a determinare il successo o il fallimento del processo produttivo di un biocarburante, molteplici materie prime sono state prese in considerazione per la produzione di biodiesel. I lipidi microbici dei lieviti sono da sempre stati considerati come la materia grezza migliore per tale scopo in quanto rappresenterebbe un'alternativa per i grassi derivanti dall'agricoltura e quelli derivanti dagli animali, evitando rapporti di competizione con i prodotti agroalimentari (Vasconcelos, 2019).

I lieviti oleaginosi possono accumulare un'elevata quantità di lipidi in forma di triacilgliceroli o TAG (*triacylglycerols*), i quali sono poi trasformabili in esteri di acidi grassi a loro volta convertibili in biodiesel tramite transesterificazione; essi sono inoltre divenuti molto popolari anche dato il loro rapido tasso di produzione, raggiungendo velocemente elevate densità e riuscendo a sfruttare molteplici fonti carboniose (Spagnuolo, 2019). Il biodiesel risultante dai lipidi microbici mostra parametri eccellenti nei test su motori diesel convenzionali, risultando essere competitivi anche per il costo rispetto al biodiesel ottenuto dai vegetali. Un esperimento su scala-pilota ha avuto esito positivo riguardo la produzione finale di biodiesel di ben 0.44 g/L/ora da estratto lipidico di *R. toruloides* coltivandolo con succo di zucchero di canna ed urea (Soccol, 2017). Più di 74 lieviti oleaginosi sono stati individuati e ritenuti idonei per la produzione di lipidi microbici (Anon, 2016). Microrganismi come *Rhodosporidium sp.*, *Lipomyces sp.* e *Rhodotorula sp.* si è scoperto essere in grado di accumulare più del 70% di lipidi (Li, 2007; Adrio, 2017). Altri lieviti oleaginosi sono stati screenati e isolati per una maggiore produzione lipidica (Slininger, 2019; Fatma, 2016;

Viñarta, 2016), per l'identificazione di nuovi caratteri come la coltivazione in acqua di mare (Yen, 2016) e l'utilizzo di substrati economici o comunque non dispendiosi (Han, 2019).

Molteplici studi sull'ingegneria metabolica hanno consolidato ulteriormente la possibilità di produrre lipidi partendo dai lieviti oleaginosi. Per alleviare lo stress ossidativo e la reattività dell'aldeide durante il processo lipogenetico, è stata modificata l'aldeide deidrogenasi tanto quanto i processi metabolici a difesa dallo stress ossidativo. Utilizzando tali strategie, il titolo lipidico in *Y. lipolytica* è stato incrementato a 72,2 g/L (Xu, 2017). Qiao et al. verificarono che la  $\Delta$ -9 stearoil-CoA desaturasi (SDC) fosse l'enzima limitante il tasso produttivo di FAME. L'espressione congiunta di SDC, ACC1 e DGA1 hanno migliorato significativamente la crescita cellulare e la sovrapproduzione lipidica (55 g/L) (Qiao, 2015). Le vie metaboliche dell'acetil-CoA sono state ulteriormente ingegnerizzate per incrementare la produzione lipidica, riuscendo ad ottenere 66,4 g/L di lipidi tramite modificazione della carnitina acetiltransferasi codificata dal gene CAT2 (Xu, 2016). Successivamente, si sono ottenuti 0,351 g di lipidi/g di peso cellulare secco tramite la modificazione del metabolismo redox citosolico in *Y. lipolytica* (Qiao, 2017); il rendimento ha soddisfatto i requisiti del *National Renewable Energy Laboratory* degli USA, raggiungendo l'obiettivo di costo di 5\$/gallone di benzina equivalente (Davis, et al., 2013). Gli studi hanno stabilito un modello matematico per prevedere la resa lipidica (Qiao, 2017); inoltre, Friedlander et al. (2017) modificarono geneticamente un lievito produttore lipidi, fino a far raggiungere il titolo lipidico di 85 g/L (Friedlander, 2016). Il ceppo venne ingegnerizzato geneticamente utilizzando una strategia che includeva la sovraespressione combinata e la delezione di target genetici.

Similarmente, la produzione lipidica è stata migliorata a 16 g/L in *R. toruloides* tramite la sovraespressione di ACC1 e DGA1, i quali codificano enzimi catalizzanti il primo ed ultimo step nella biosintesi dei TAG (Zhang, 2015); si è così ottenuta un aumento della produzione lipidica fino a 89,4 g/L tramite insieme alla sovraespressione di SDC (Zhang, 2016).

*Cryptococcus curvatus* (anche conosciuto come *Trichosporon oleaginosus*) è stato ingegnerizzato geneticamente affinché si evitasse completamente la piruvato deidrogenasi (PDH) ai fini di incrementare le riserve cellulari di acetil-CoA, migliorando così la resa in TAG sia dal glucosio che dallo xilosio (Koivuranta, 2018) e raggiungendo infine la produzione di 0,27 grammi di TAG per grammo di xilosio, segnando un incremento del 30% circa rispetto al ceppo di controllo. L'efficienza della sintesi lipidica del ceppo naturale di *S. cerevisiae* è molto limitata; in uno studio di prova, sono state impiegate biotecnologie sintetiche al fine di rendere i lieviti 'oleaginosi tramite la regolazione dei geni associati alla sintesi ed idrolisi dei TAG (Ferreira, 2018). Questa strategia ha prodotto TAG per 254 mg/g di peso cellulare secco



in *S. cerevisiae*, raggiungendo un aumento del 27,4% rispetto alla resa di una coltura in un mezzo minimale.

#### 4.2 Substrati low-cost per la produzione di lipidi

Un altro aspetto molto importante per poter sintetizzare questi biogreggi è lo sviluppo di processi che riescano ad utilizzare fonti carboniose disponibili e non dispendiose. Sforzi significativi sono stati compiuti affinché si riuscissero a sviluppare lieviti oleaginosi per la produzione di lipidi impiegabili come matrici oleose partendo dalla lignino-cellulosa, la quale è la biomassa più abbondante sulla Terra.

La cellulosa è il principale componente chimico nelle varie biomasse lignino-cellulosolitiche (più del 50% del peso secco). Il cellobiosio, l'unità strutturale base della cellulosa, è un dimero del glucosio; tale composto potrebbe essere utilizzato come fonte carboniosa per la lipogenesi dei lieviti oleaginosi, incluso *L. starkeyi* (Gong, 2012) e *C. curvatus* (Gong, 2014).

Il levoglucosano, lo zucchero anidro maggioritario risultante dal processo di pirolisi della cellulosa, è un interessante substrato per la fermentazione. Tale sostanza può essere direttamente metabolizzata come una fonte carboniosa per i lieviti oleaginosi come *R. toruloides* (Lian, 2013) e *L. starkeyi* (Rother, 2017). Il levoglucosano può essere catalizzato anche dalla levoglucosano chinasi per formare glucosio-6-fosfato come un comune intermedio metabolico (Bacik, 2015).

L'emicellulosa costituisce approssimativamente il 20-35% della biomassa lignino-cellulosolitica; l'idrolisi delle emicellulose produce una miscela di esosi e pentosi, i quali non possono essere fermentati dai ceppi di lieviti esistenti. Comunque, Sitepu et al. confermò che la maggior parte dei lieviti oleaginosi sono capaci di utilizzare fonti carboniose associate a molteplici tipologie di idrolizzati lignino-cellulosolitici (Sitepu et al, 2014). Ad esempio, generi come *Rhodospiridium sp.* e *Lipomyces sp.* hanno dimostrato un potenziale considerevole nell'utilizzare naturalmente lo xilosio o il galattosio per la produzione lipidica microbica (Fei, 2016; Ario, 2018); il lievito oleaginoso *Trichosporon coremiiforme* riesce addirittura ad utilizzare il glucosio, lo xilosio e l'arabinosio simultaneamente (Huang, 2013).

Le biomasse lignino-cellulosolitiche sono costituite inoltre dal bopolimero aromatico lignina (15-35%), il quale viene degradato ad acetil-CoA attraverso intermedi aromatici (Liu, 2019) come protocatecolato o catecolo. Per identificare il lievito degradante la lignina, vennero esaminate 36 specie di lievito oleaginoso nella crescita con sostanze aromatiche come fonti carboniose rappresentative varie tipologie di lignina (Yaguchi, 2020). I risultati hanno

mostrato come il lievito *Cutaneotrichosporon sp.* riuscisse a sviluppare e a crescere attivamente con molteplici sostanze aromatiche mantenendo circa il 50% di accumulazione dai lipidi rivelandosi un promettente candidato per ulteriore sviluppo e produzione dei lipidi dalla lignina.

Ancora più importante, molti generi come *Rhodosporidium sp.* e *Lipomyces sp.* hanno anche mostrato un'eccellente tolleranza alle sostanze tossiche contenute negli idrolizzati delle biomasse. La produzione lipidica dei lieviti partendo da idrolizzati lignino-cellulosolitici è stata ampiamente documentata. Un recente studio ha dimostrato come la conversione dei residui colturali di mais portasse ad una produzione di 23,3 g/L di FAME tramite *R. toruloides* (Nogué, 2018). Similarmente, la produzione microbica lipidica venne documentata anche con *L. starkeyi* da idrolizzati emicellulosolitici (HH) di bagasse di canne da zucchero (Xavier, 2017) l'apporto continuo di HH rese 3,14 g/L di lipidi. Coerentemente a quanto mostrato dai risultati, i due studi sopra citati hanno anche dimostrato che diversi inibitori presenti negli idrolizzati lignino-cellulosolitici vengano metabolizzati da *R. toruloides* e da *L. starkeyi*.

Sono stati realizzati lieviti ex-novo grazie all'ingegnerizzazione metabolica, con l'abilità di consumare idrolizzati lignino-cellulosolitici (Figura 1-1). Recentemente, *Y. lipolytica* è stata ingegnerizzata al fine di instaurare una via metabolica dell'ossidoreduttasi, riuscendo a produrre 15 g/L di lipidi in fermentazione *fed-batch* utilizzando lo xilosio come unica fonte carboniosa (Li, 2016). Similarmente, un ceppo di *Y. lipolytica* con l'espressione di molteplici geni è stato capace di produrre lipidi utilizzando esclusivamente galattosio come sola fonte carboniosa (Zbigniew, 2015). *Y. lipolytica* è stata anche ingegnerizzata ai fini di possedere la capacità di degradazione del cellobiosio, dopo aver valutato l'espressione di sei tipologie di  $\beta$ -glucosidasi (Zhen, 2014); così vennero individuati due ceppi degradanti il cellobiosio dopo la sovraespressione della  $\beta$ -glucosidasi codificata dai geni BGL1 e BGL2. In aggiunta agli idrolizzati lignino-cellulosolitici della Figura 1-1, sono state compiute molti studi al fine di individuare nuovi ceppi di lieviti capaci di sfruttare altri substrati zuccherini, come ad esempio le melasse (Gajdoš, 2015), fruttosio (Hapeta, 2017), amido (Amaro, 2015), inulina (Wang, 2015; Li, 2018) e glicerolo (Xu, 2016; Mirończuk, 2016).

Questo conferma che i lieviti oleaginosi ingegnerizzati sono impiegabili per uno sfruttamento efficiente di fonti carboniose abbondanti ed economicamente convenienti, migliorando significativamente dal punto di vista economico la produzione lipidica.

## Capitolo 5

# CONCLUSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

I lieviti hanno quindi suscitato molto interesse come potenziali produttori di biocarburanti. Tradizionalmente, i lieviti vengono principalmente utilizzati per la produzione di etanolo o fungono da bioregaggio per il biodiesel. Le recenti scoperte nel campo dell'ingegneria metabolica hanno fornito i mezzi per un'efficace progettazione e costruzione di complesse vie metaboliche nei lieviti; grazie a ciò una vasta gamma di biocarburanti può essere prodotta dai lieviti oleaginosi in eccesso rispetto ai ceppi naturali. Le comunità di lieviti possono quindi produrre biocarburanti tecnologicamente già avanzati, con un'elevata densità energetica ed efficienza di combustione, il tutto a costi di recupero e di produzione di gran lunga inferiori ai costi di produzione dei carburanti fossili. In particolare, i lieviti ingegnerizzati sono capaci di produrre sia molteplici tipologie di carburanti attualmente in uso, sia carburanti 'novizi' con proprietà migliorate ottenute grazie alla riprogettazione dei sistemi di biosintesi nei lieviti. Ad ogni modo, i metabolismi microbici originari non si sono evoluti per generare i prodotti finali attesi da un microrganismo produttore di biocarburanti; molte tipologie di lieviti non riescono a produrre quantità sufficienti di biocarburanti tali da raggiungere i livelli di una produzione su scala industriale. Inoltre, esistono molteplici problematiche e limitazioni nello sviluppo sia a livello commerciale che di produzione industriale di questi microrganismi, elencate di seguito:

- (1) A causa delle limitazioni del metabolismo dei lieviti, le loro vie metaboliche devono essere ampliate con l'introduzione di enzimi eterologhi per permettere la biosintesi del carburante sfruttando una determinata fonte carboniosa. Anche la bassa attività catalitica del metabolismo del lievito impone delle limitazioni. Per affrontare questa criticità, si dovrebbero sviluppare delle strategie in grado di studiare dove e come gli enzimi eterologhi vengono espressi con la compatibilità del lievito ospite.
- (2) Una valutazione economica della produzione di biocarburante ha portato alla necessità di trovare una via per la fermentazione della biomassa lignino-cellulosica come materia prima alternativa (seconda generazione di carburanti grazie alla sua abbondanza e competitività nettamente inferiore con le risorse/prodotti

dell'agroindustria. È altrettanto fortemente desiderata l'abilità di detossificare le sostanze inibitrici/tossiche sprigionate dai processi di pretrattamento della biomassa. I primi impianti per la conversione di lignino-cellulosa in biocarburante etanolo stanno cominciando ad essere considerati come reali valide alternative. La generazione dei biocarburanti avanzati derivanti dalla lignino-cellulosa rimane però tuttora in una iniziale fase di sviluppo a scala pilota, necessitando ancora ulteriori ottimizzazioni e l'ampliamento della produzione di più tipologie di carburanti.

- (3) La progettazione e la costruzione di fabbriche cellulari efficienti richiederanno significative riprogrammazioni del metabolismo, richiedendo a sua volta lo sviluppo di nuove tecnologie che possano permettere una rapida costituzione, sperimentazione ed ottimizzazione delle vie metaboliche. Oltre a ciò, sono però state sviluppati molteplici elementi genetici e strumenti di biologia molecolare capaci di rendere alcune specie di lievito più accessibili all'ingegnerizzazione. Inoltre, le scoperte in ambito di strumenti di manipolazione del DNA hanno considerabilmente accelerato la costruzione di geni/cromosomi artificiali in laboratorio.
- (4) Durante la produzione delle molecole di carburante nei lieviti, l'accumulo di alcuni prodotti finali del metabolismo potrebbero intossicare le cellule ospite, come alcoli ed alcani. La limitazione imposta dalla tossicità di tali molecole è una sfida ancora da superare, dove molteplici strategie sono state già sperimentate ed applicate per eliminare tale problematica. Ciò potrebbe essere superato cercando di indurre resistenza a tali molecole e mitigandone i livelli intracellulari grazie a dei trasportatori che ne allontanino le concentrazioni troppo elevate.
- (5) Ultimo, ma non per importanza, una miglior comprensione dei processi cellulari e dei meccanismi regolatori delle vie metaboliche potrebbero assistere ed aiutare la progettazione dei ceppi per le applicazioni industriali. Tali ricerche di base potrebbero fornire informazioni fondamentali riguardo la complessità della rete di meccanismi regolatori del metabolismo della cellula ospite.

.

## BIBLIOGRAFIA

- A. Aruna, M. N. G. P. S. V. R., 2014. Direct bioethanol production by amylolytic yeast *Candida albicans*. *Letters in Applied Microbiology*, 60(3), pp. 229-236.
- Adam L. Meadows, K. M. H. Y. T. E. A. Y. K. L. R. R. H. D. A. T. T. M. -M. L. X. L. Z. M. S. D. A. M. J. L. D. E. e. a., 2016. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production. *Nature*, Volume 537, p. 694–697.
- Alessandra Biz, S. P. Z. X. K. S. A. M. I. R. M., 2019. Systems biology based metabolic engineering for non-natural chemicals. *Biotechnology Advances*, 37(6).
- Allison Yaguchi, N. F. K. O. S. L. I. S. K. B. -M. M. B., 2020. Identification of oleaginous yeasts that metabolize aromatic compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(9-10).
- Anon., 2018. Engineered protein degradation of farnesyl pyrophosphate synthase is an effective regulatory mechanism to increase monoterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, Volume 47, pp. 83-93.
- Ario B. Juanssilfero, e. a., 2018. Effect of inoculum size on single-cell oil production from glucose and xylose using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(6), pp. 695-702.
- Aro, E.-M., 2016. From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio*, Volume 45, pp. 24-31.
- Bai Wenqin, G. W. W. S. Z. F., 2019. Biosynthesis, regulation, and engineering of microbially produced branched biofuels. *Scopus*, 12(84).
- Bianchi, G., Verdi, G. & Rossi, M., 2018. Titolo dell'articolo. *Journal Name*, 48(3), pp. 11-15.
- Binbin Chen, D.-Y. L. e. a., 2015. Combinatorial metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for terminal alkene production. *Metabolic Engineering*, Volume 31, pp. 53-61.
- Binbin Chen, e. a., 2015. Combinatorial metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for terminal alkene production. *Metabolic Engineering*, Volume 31, pp. 53-61.
- Binbin Chen, e. a., 2018. Synthetic biology toolkits and applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Advances*, 36(7), pp. 1870-1881.

- Bingyin Peng, L. K. e. a., 2018. Engineered protein degradation of farnesyl pyrophosphate synthase is an effective regulatory mechanism to increase monoterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, Volume 47, pp. 83-93.
- Birol, F. e. a., 2017. *Key World Energy Statistics 2017*. International Energy Agency, Issue 3.
- Boeke J., e. a., 2018. Connecting the dots in the construction of the. *Scopus*.
- Bolotnikova O.I., M. O. M. N. G. A., 2015. Metabolic properties of *Pachysolen tannophilus* mutants producing xylitol and ethanol from D-xylose. *Microbiology (Russian Federation)*, 84(4), pp. 485 - 490.
- Bonnie A McNeil, D. T. S., 2018. Optimization of C16 and C18 fatty alcohol production by an engineered strain of *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(1), p. 1-14.
- Bo-Qian Cheng, L.-J. W. Y.-B. L. J. C. & Q. H., 2019. Elevating Limonene Production in Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* via Genetic Engineering of Limonene Biosynthesis Pathway and Optimization of Medium Composition. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Volume 24, p. 500-506.
- Bo-Qian Cheng, L.-J. W. Y.-B. L. J. C. & Q. H., 2019. Elevating Limonene Production in Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* via Genetic Engineering of Limonene Biosynthesis Pathway and Optimization of Medium Composition. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Volume 24, p. 500-506.
- Bouke Wim de Jong, S. S. J. O. V.-R. V. S. J. N., 2015. Metabolic pathway engineering for fatty acid ethyl ester production in *Saccharomyces cerevisiae* using stable chromosomal integration. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(3), p. 477-486.
- Bruder Stefan, M. E. J. e. a., 2019 . Drop-in biofuel production using fatty acid photodecarboxylase from *Chlorella variabilis* in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(202).
- C. Sathesh-Prabu, A. M., 2011. Potential utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 102(3), pp. 2788-2792.
- Cao X, L. Y.-B. C. J. I. T. W. L.-J., 2016. Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction. *Biotechnology Biofuels*, 9(214).
- Carlos Ricardo Soccol, e. a., 2017. Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresource Technology*, Volume 223, pp. 259- 268.

- Chao Huang, X.-f. C. e. a., 2013. Microbial oil production from corn cob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. *Biomass and Bioenergy*, Volume 49, pp. 273-278.
- Charles D. Rutter, C. V. R., 2016. Production of 1-decanol by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, Volume 38, pp. 139-147.
- Charles D. Rutter, C. V. R., 2016. Production of 1-decanol by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, Volume 38, pp. 139-147.
- E. Valero, e. a., 2002. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. *Food Chemistry*, 78(1), pp. 57-61.
- Eric G. Dennis, e. a., 2012. Grape Contribution to Wine Aroma: Production of Hexyl Acetate, Octyl Acetate, and Benzyl Acetate during Yeast Fermentation Is Dependent upon Precursors in the Must. *ACS Publications*, 60(10), p. 2638–2646.
- Fan Wang, e. a., 2017. Combining Gal4p-mediated expression enhancement and directed evolution of isoprene synthase to improve isoprene production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, Volume 39, pp. 257-266.
- Farshad Darvishi, M. A. E. R. M. I. B., 2018. Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 102, pp. 5925-5938.
- Farshad Darvishi, S. H., 2017. Impressive Potential of Microorganisms to Achieve the Transition from Fossil Fuels to Biofuels. In: *Microbial Fuels*. s.l.:CRC Press, p. 24.
- Farshad Darvishi, Z. F. M. A. H. M., 2017. *Yarrowia lipolytica* as a workhorse for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 127, pp. 87-96.
- Fei Q, O. M. N. R. C. X. L. A. D. N., 2016. Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source. *Biotechnol Biofuels*, 9(130).
- Friedlander J, T. V. K. A., 2016. Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain. *Biotechnol Biofuels*, 9(77).
- Gérald Bourel, e. a., 2004. Fatty acid hydroperoxide lyase of green bell pepper: cloning in *Yarrowia lipolytica* and biogenesis of volatile aldehydes. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(4), pp. 293-299.
- Guo-Zhen Jiang, e. a., 2017. Manipulation of GES and ERG20 for geraniol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, Volume 41, pp. 57-66.
- Guo-Zhen Jiang, e. a., 2017. Manipulation of GES and ERG20 for geraniol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, Volume 41, pp. 57-66.

- H.B.Aditya, T. W. H. N. A., 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 66, pp. 631-653.
- Haibo Li, H. S. A., 2016. Enabling xylose utilization in *Yarrowia lipolytica* for lipid production. *Biotechnology Journal*, 11(9), pp. 1230-1240.
- He Jun, C. J., 2012. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for increased bioconversion of lignocellulose to ethanol. *Indian Journal of Microbiology*, Volume 52, p. 442-448.
- Henritzi Sandra, e. a., 2018. An engineered fatty acid synthase combined with a carboxylic acid reductase enables de novo production of 1-octanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 11(150).
- Henritzi S, F. M. G. M. O. M. B. E., 2018. An engineered fatty acid synthase combined with a carboxylic acid reductase enables de novo production of 1-octanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, 11(150).
- Hideyuki Tamakawa, T. M. A. Y. S. I. & S. Y., 2013. Metabolic engineering of *Candida utilis* for isopropanol production. *Biotechnological products and process engineering*, Volume 97, p. 6231-6239.
- Hui Tao, D. G. Y. Z. Z. D. & T. L., 2015. Metabolic engineering of microbes for branched-chain biodiesel production with low-temperature property. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 8(92).
- Ignia Codruta, R. M. M. M. S. M. A. M., 2019 . Orthogonal monoterpenoid biosynthesis in yeast constructed on an isomeric substrate. *Nature Communications*, 10(3799).
- Ignia C, R. M. M. M. M. A. V. C., 2019. Orthogonal monoterpenoid biosynthesis in yeast constructed on an isomeric substrate. *Nature Community*, 10(3799).
- Jae Hyung Kim, J. R. I. Y. H. S.-K. H. H. A. K. Y. K. C., 2014. Ethanol production from galactose by a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* KL17. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Volume 37, p. pages1871-1878.
- James M. Wagner, H. S., 2016. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology*, Volume 89, pp. 126-136.
- Jens Nielsen, C. L. A. M. J. P., 2013. Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), pp. 398-404.
- Jianzhi Zhao, C. L. Y. Z. Y. S. J. H. & X. B., 2017. Dynamic control of ERG20 expression combined with minimized endogenous downstream metabolism contributes to the



- improvement of geraniol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 16(17).
- Jianzhi Zhao, C. L. Y. Z. Y. S. J. H. & X. B., 2017. Dynamic control of ERG20 expression combined with minimized endogenous downstream metabolism contributes to the improvement of geraniol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 16(17).
- Jianzhi Zhao, X. B. C. L. Y. S. & J. H., 2016. Improving monoterpene geraniol production through geranyl diphosphate synthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 100, p. 4561–4571.
- Jianzhi Zhao, X. B. C. L. Y. S. & J. H., 2016. Improving monoterpene geraniol production through geranyl diphosphate synthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 100, p. 4561–4571.
- Jieni Lian, M. G.-P. S. C. e. a., 2013. Fermentation of levoglucosan with oleaginous yeasts for lipid production. *Bioresource Technology*, Volume 133, pp. 183-189.
- Jifeng Yuan, X. C. P. M. & C.-B. C., 2017. Metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced isoamyl alcohol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 101, p. 465–474.
- Jing Ling Xu, H. X. M. L. H. X. E. W. Z., 2016. The Effects of Initial Periodontal Therapy on the Serum Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand/Osteoprotegerin System in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 87(3), pp. 303-311.
- John Blazeck, L. L. R. K. H. S. A., 2013. Heterologous production of pentane in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*, 165(3), pp. 184-194.
- John R. Phillips, e. a., 2015. Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: Medium development and culture techniques. *Bioresource Technology*, Volume 190, pp. 114-121.
- José A. Pérez Pimienta, e. a., 2019. Pilot-scale hydrothermal pretreatment and optimized saccharification enables bisabolene production from multiple feedstocks. *Green Chemistry*, Volume 11.
- Juan Wang, H. Z. & J. B., 2015. Characterization of Inulin Hydrolyzing Enzyme(s) in Oleaginous Yeast *Trichosporon cutaneum* in Consolidated Bioprocessing of Microbial Lipid Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volume 177, p. 1083–1098.
- Kangjian Qiao, e. a., 2015. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, Volume 29, pp. 56-65.

- Kangjian Qiao, T. M. W. K. Z. P. X. & G. S., 2017. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. *Nature Biotechnology*, Volume 35, p. 173–177.
- Lauren T.Cordova, J. B. e. a., 2020. Direct production of fatty alcohols from glucose using engineered strains of *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering Communications*, Volume 10.
- Lazar Z, G.-M. H. L. C. A. N. C. e. a., 2015. Awakening the endogenous Leloir pathway for efficient galactose utilization by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Biofuels*, 8(185).
- Leo d’Espaux, A. G. W. R. M. W. F. X. e. a., 2017. Engineering high-level production of fatty alcohols by *Saccharomyces cerevisiae* from lignocellulosic feedstocks. *Metabolic Engineering*, Volume 42, pp. 115-125.
- Lew P.Christopher, H. K. V. P., 2014. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *The Royal Society*, Volume 119, pp. 497-520.
- Lv Xiaomei, e. a., 2016. Dual regulation of cytoplasmic and mitochondrial acetyl-CoA utilization for improved isoprene production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Communications*, 7(12851).
- Lv X, W. F. Z. P. Y. L. X. W. X. H. e. a., 2016. Dual regulation of cytoplasmic and mitochondrial acetyl-CoA utilization for improved isoprene production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature community*, 7(12851).
- M.C.A.Xavier, e. a., 2017. Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 118, pp. 11-19.
- Mario Lucio Lopes, e. a., 2016. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), pp. 64-76.
- Mickel L. A. Jansen, J. M. B. I. P. M. D. V. H. d. B. P. P. d. W. A. J. A. v. M. P. K. J. T. P., 2017. *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Research*, 17(5).
- Mingrui He, e. a., 2018. Cu<sub>2</sub>Sn<sub>1-x</sub>GexS<sub>3</sub> thin film solar cells fabricated from sputtered precursors: Effects of soft-annealing process. *Materials Science in Semiconductor Processing*, Volume 85, pp. 160-167.
- Mirna Patricia Santiago-Gómez, e. a., 2009. Modeling hexanal production in oxido-reducing conditions by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 44(9), pp. 1013-1018.
- Narayana Annaluru, e. a., 2014. Total Synthesis of a Functional Designer Eukaryotic Chromosome. *Science*, 344(6179), pp. 55-58.

- Nazia Hossain, J. H. Z. T. M., 2017. A Review of Bioethanol Production from Plant-based Waste Biomass by Yeast Fermentation. *Chemical Engineering*, 8(1).
- Nicolaas A Buijs, Y. J. Z. S. N., 2014. Long-chain alkane production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(6), pp. 1275-1279.
- Nielsen, J., 2019. *Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory*. Wiley Online Library, 14(9).
- Nishimura Yuya, e. a., 2018. Metabolic engineering of the 2-ketobutyrate biosynthetic pathway for 1-propanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 17(38).
- Nishimura Yuya, M. T. e. a., 2018 . Metabolic engineering of the 2-ketobutyrate biosynthetic pathway for 1-propanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 17(38).
- Olena P. Ishchuk, A. Y. V. O. V. S. G. Z. G. M. V. G. C. A. A. A. S., 2008. Overexpression of pyruvate decarboxylase in the yeast *Hansenula polymorpha* results in increased ethanol yield in high-temperature fermentation of xylose. *FEMS Yeast Research*, 8(7), p. 1164– 1174.
- Park S-H, H. J.-S., 2019. Development of an efficient cytosolic isobutanol production pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by optimizing copy numbers and expression of the pathway genes based on the toxic effect of  $\alpha$ -acetolactate. *Sci Rep*, 9(3996).
- Patrizia Romano, G. F. T. B., 2008. Alcoholic fermentation: beverages to biofuel. *FEMS Yeast Research*, 8(7), p. 965–966.
- Paul S. Wang, M. E. T. J. V. G., 2005. The production of fatty acid isopropyl esters and their use as a diesel engine fuel. *The American Oil Chemists*, 82(11), pp. 845-849.
- Peng Xu, K. Q. S., 2017. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(7), pp. 1521-1530.
- Peng Xu, K. Q. W. S. A. a. G. S., 2016 . Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *APPLIED BIOLOGICAL SCIENCES*, 113(39), pp. 10848-10853.
- Peng Xu, K. Q. W. S. A. a. G. S., 2016. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *APPLIED BIOLOGICAL SCIENCES*, 39(113), pp. 10848-10853.
- Peralta-Yahya, P. P. e. a., 2011. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. *Nature Communications*, 2(483).

- Peter Gajdoš, J.-M. N. T. R. & M. Č., 2015. Single cell oil production on molasses by *Yarrowia lipolytica* strains overexpressing DGA2 in multicopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 99, p. 8065–8074.
- Phebe Asantewaa Owusu, S. A.-S. S. D., 2016. A review of renewable energy sources, sustainability issues and climate change mitigation. *Cogent Engineering*, 3(1).
- Piotr Hapeta, M. R. D. G.-M.-M. C.-L. C.-M. N. L., 2017. Transforming sugars into fat – lipid biosynthesis using different sugars in *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 34(7), pp. 293-304.
- R. Swidah, O. O. C. M. G. & M. P. A., 2018. n-Butanol production in *S. cerevisiae*: coordinate use of endogenous and exogenous pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 102, p. 9857–9866.
- R. Swidah, O. O. C. M. G. & M. P. A., 2018. n-Butanol production in *S. cerevisiae*: coordinate use of endogenous and exogenous pathways. *Bioenergy and biofuels*, Volume 102, p. 9857–9866.
- Raphael Ferreira, e. a., 2018. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for overproduction of triacylglycerols. *Metabolic Engineering Communications*, Volume 6, pp. 22-27.
- Robak Katarzyna, B. M., 2018. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), pp. 174 - 187.
- Rodrigo Ledesma-Amaro, T. D. & J. M. N., 2015. Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce biodiesel from raw starch. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 8(148 ).
- Rossi, M., Bianchi, G. & Verdi, G., 2018. Titolo dell'articolo. *Journal Name*, pp. 10-15.
- S.H.M., A. et al., 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production. *Biochem. Biophys. Rep.*, Volume 10, pp. 52 - 61.
- Salman Zafar, M. O., 2006. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal*, 27(3), pp. 295-298.
- Sandy Fillet, J. G. B. S. A. L. C. R. J. L. A., 2015. Fatty alcohols production by oleaginous yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(11), p. 1463–1472.
- Schadeweg Virginia, B. E., 2016 . Increasing n-butanol production with *Saccharomyces cerevisiae* by optimizing acetyl-CoA synthesis, NADH levels and trans-2-enoyl-CoA reductase expression. *Biotechnology for Biofuels*, 9( 257).
- Sheng, J., Stevens, J. & Feng, X., 2016 . Pathway compartmentalization in peroxisome of *saccharomyces cerevisiae* to produce versatile medium chain fatty alcohols. *Scientific Reports*, 6(26884).

Shi S., S. T. L. Z. Z. H. A. E. Z. H., 2016. Metabolic engineering of a synergistic pathway for n-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Sci Rep, Volume 6.

Shi Shuobo, S. T. L. Z. e. a., 2016 . Metabolic engineering of a synergistic pathway for n-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Scientific Reports, 6(25675).

Shi Shuobo, Z. H., 2017. Metabolic engineering of oleaginous yeasts for production of fuels and chemicals. Scopus, 8(2185).

Shuyan Zhang, M. I. J. M. S. A. P. A. & C. V. R., 2016. Metabolic engineering of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* IFO0880 for lipid overproduction during high-density fermentation. Bioenergy and biofuels, Volume 100, p. 9393–9405.

Si Cheng, e. a., 2019. Orthogonal Engineering of Biosynthetic Pathway for Efficient Production of Limonene in *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Publications, 8(5), p. 968–975.

Si Cheng, X. L. G. J. J. W. J.-l. Z. D. L. Y.-J. Y. J. Q. a. G.-R. Z., 2019. Orthogonal Engineering of Biosynthetic Pathway for Efficient Production of Limonene in *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Synth. Biol, 8(5), p. 968–975.

Silva J.P.A., M. S. R. I. T. J., 2011. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28(1), pp. 151 - 156.

Stefan Tippmann, e. a., 2017. Affibody Scaffolds Improve Sesquiterpene Production in *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Publications, 6(1), p. 19–28.

Stefan Tippmann, G. S. S. N., 2015. Production of farnesene and santalene by *Saccharomyces cerevisiae* using fed-batch cultivations with RQ-controlled feed. Biotechnology and Bioengineering, 113(1), pp. 72-81.

Suryang Kwak, J. H. J. E. J. Y. Y.-S. J. J.-H. S., 2019. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains. Biotechnology Advances, 37(2), pp. 271-283.

Swidah R., W. H. R. P. A. H. P. A. e. a., 2015 . Butanol production in *S. cerevisiae* via a synthetic ABE pathway is enhanced by specific metabolic engineering and butanol resistance. Biotechnology for Biofuels, 8(97).

Tamakawa H., M. T. Y. A. I. S. Y. S., 2013. Metabolic engineering of *Candida utilis* for isopropanol production. Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 97, p. 6231–6239.

Teo Wei Suong, e. a., 2015. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid short- and branched-chain alkyl esters biodiesel. Biotechnology for Biofuels, 8(177).

- Thomas Gassler, M. S. B. G. M. E. C. T. T. C. S. H., 2019. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO<sub>2</sub>. *Nature Biotechnology*, Volume 38, p. 210–216.
- Timilsina, G. R., 2014. *Biofuels in the long-run global energy supply mix for transportation*. The Royal Society.
- Tripti Sharma, D. D. J. S. T. B. D. G., 2020. Yeast lipid-based biofuels and oleochemicals from lignocellulosic biomass: life cycle impact assessment. *Sustainable Energy & Fuels*, 1(1).
- V. G. Rassadin, O. Y. S. N. M. L. V. N. S. & A. V. Z., 2006. Problems in production of high-octane, unleaded automotive gasolines. *Chemistry and Technology of Fuels and Oils*, Volume 42, p. 235–242.
- Verdi, G., 2017. Titolo del capitolo. In: R. Cristiano, a cura di Titolo del libro. Ancona: CasaEditrice, pp. 10-20.
- Violeta Sánchez i Nogué, e. a., 2018. Integrated diesel production from lignocellulosic sugars via oleaginous yeast. *Green Chemistry*, Issue 18.
- Wang, G., Wang, Y. & Shan, a. X., 2016. *Creep Constitutive Model Building and Practical Research of Geosynthetics*. ASCE.
- Wei Wang, H. W. E. K. S. V. W. Q. X. M. E. H. & M. Z., 2016. Fatty alcohol production in *Lipomyces starkeyi* and *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 9(227).
- Weihua Guo, J. S. H. Z. & X. F., 2016. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to produce 1-hexadecanol from xylose. *Microbial Cell Factories*, 15(24).
- Wess J., B. M. B. E., 2019. Improving isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by successively blocking competing metabolic pathways as well as ethanol and glycerol formation. *Biotechnology for Biofuels*, 12(173).
- Williams C. Luke, e. a., 2016. Sources of Biomass Feedstock Variability and the Potential Impact on Biofuels Production. *Bioenergy Research*, 9(1), pp. 1 - 14.
- X., C. et al., 2016. Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction. *Biotechnol. Biofuels*, Volume 9, p. 214.
- Xia Yang, e. a., 2016. Heterologous production of  $\alpha$ -farnesene in metabolically engineered strains of *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, Volume 216, pp. 1040-1048.
- Xueyang Feng, e. a., 2015. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to improve 1-hexadecanol production. *Metabolic Engineering*, Volume 27, pp. 10-19.
- Xueyang Feng, J. L. H. Z., 2015. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to improve 1-hexadecanol production. *Metabolic Engineering*, Volume 27, pp. 10-19.

Yaegashi Junko, e. a., 2017. *Rhodospiridium toruloides*: A new platform organism for conversion of lignocellulose into terpene biofuels and bioproducts. *Biotechnology for Biofuels*, 10(241).

Yating Hu, Z. Z. J. N. e. a., 2018. Heterologous transporter expression for improved fatty alcohol secretion in yeast. *Metabolic Engineering*, Volume 45, pp. 51-58.

Yawen Li, e. a., 2018. Portable and smart devices for monitoring heavy metal ions integrated with nanomaterials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 98, pp. 190-200.

Yongjin J. Zhou, e. a., 2016. Harnessing Yeast Peroxisomes for Biosynthesis of Fatty-Acid-Derived Biofuels and Chemicals with Relieved Side-Pathway Competition. *ACS Publications*, 138(47), p. 15368–15377.

Yongjin J. Zhou, e. a., 2018. Engineering 1-Alkene Biosynthesis and Secretion by Dynamic Regulation in Yeast. *ACS Publications*, 7(2), p. 584–590.

Yongjin J. Zhou, N. A. B. Z. Z. D. O. G. A. B. V. S. J. N., 2016. Harnessing Yeast Peroxisomes for Biosynthesis of Fatty-Acid-Derived Biofuels and Chemicals with Relieved Side- Pathway Competition. *ACS Publications*, 138(47), p. 15368–15377.

Yu Tao, e. a., 2017. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of very long chain fatty acid-derived chemicals. *Nature Communications*, 8(15587).

Yuan J, C. X. M. P. C. C.-B., 2017. Metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced isoamyl alcohol production. *Applied Microbiology Biotechnology*, Volume 101, pp. 465-474.

Yu-Sin Jang, J. M. P. S. C. Y. J. C. D. Y. S. J. H. S. Y., 2012. Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches. *Biotechnology Advances*, 30(5), pp. 989-1000.

Yutao Pang, L. C. H. O. X. Z., 2019. Seismic performance assessment of different fibers reinforced concrete columns using incremental dynamic analysis. *Construction and Building Materials*, Volume 203, pp. 241-257.

Yutao Pang, L. C. H. O. X. Z., 2019. Seismic performance assessment of different fibers reinforced concrete columns using incremental dynamic analysis. *Construction and Building Materials*, Volume 203, pp. 241-257.

Zhang S, S. J. R. C. M. M. A. A. e. a., 2015. Engineering *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production. *Biotechnol Bioeng*, 113(1056).

Zhang Yueping, W. J. W. Z. Z. Y. S. S. N. J., 2019 . A gRNA-tRNA array for CRISPR-Cas9 based rapid multiplexed genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Communications*, 10(1053).

- Zhen Guo, R. W. G. Z. e. a., 2014. Altered microRNA expression in inflamed and non-inflamed terminal ileal mucosa of adult patients with active Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 30(1), pp. 109-116.
- Zhiwei Gong, e. a., 2012. Co-fermentation of cellobiose and xylose by *Lipomyces starkeyi* for lipid production. *Bioresource Technology*, Volume 117, pp. 20-24.
- Zhiwei Zhu, e. a., 2017. Enabling the synthesis of medium chain alkanes and 1-alkenes in yeast. *Metabolic Engineering*, Volume 44, pp. 81-88.
- Zhiwei Zhu, Y. J. Z. M.-K. K. A. K. e. a., 2017. Enabling the synthesis of medium chain alkanes and 1-alkenes in yeast. *Metabolic Engineering*, Volume 44, pp. 81-88.
- Zhou YJ, B. N. Z. Z. Q. J. S. V. N. J., 2016. Production of fatty acid derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories. *Nature Communications*, 7(11709).
- Zhou, Y. J. E. J. K. J. N., 2018. Barriers and opportunities in bio-based production of hydrocarbons. *Nature Energy*, 3(11), pp. 925-935.
- Zhu Jin, A. W. L. F. N.-X. C. W. C.-J. Y., 2015. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* to produce odd chain-length fatty alcohols. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(4), pp. 842-851.
- Zihe Liu, K. W. Y. C. T. T. & J. N., 2020. Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO<sub>2</sub>. *Nature Catalysis*, Volume 3, pp. 274-288.
- Zihe Liu, Y. Z. J. N., 2019. *Synthetic Biology of Yeasts*. ACS Publications, 58(11), p. 1511–1520.