

Streszczenie

Kwas bursztynowy to związek chemiczny o szerokim zakresie zastosowań przemysłowych, który w ostatnich latach stał się przedmiotem światowego zainteresowania. Mikrobiologiczna produkcja tego biodegradowalnego kwasu organicznego, z wykorzystaniem wydajnych biokatalizatorów oraz produktów odpadowych i ubocznych, ma istotne znaczenie szczególnie w kontekście koncepcji zrównoważonego rozwoju.

Liczba znanych mikroorganizmów charakteryzujących się zdolnością do wydajnej biosyntezy kwasu bursztynowego jest wciąż niewielka. Ponadto, wiele zidentyfikowanych już biokatalizatorów wykazuje zdolność do produkcji tego metabolitu jedynie na bazie prostych źródeł węgla, np. glukozy. W dalszym ciągu istnieje więc potrzeba poszukiwania nowych mikroorganizmów pozwalających na wykorzystanie bardziej złożonych źródeł węgla, które często wchodzą w skład produktów odpadowych lub ubocznych.

Celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była identyfikacja nowego, konkurencyjnego w stosunku do obecnie opisanych, szczepu bakteryjnego charakteryzującego się zdolnością do naturalnej i wydajnej biosyntezy kwasu bursztynowego na drodze fermentacji laktozy wchodzącej w skład permeatu serwatkowego, jak również przeprowadzenie charakterystyki fizjologicznej i genetycznej wyselekcjonowanego mikroorganizmu.

W wyniku przeprowadzonego skriningu pozyskano nowy szczep bakteryjny, wstępnie oznaczony jako LU2, pochodzący ze żwacza krowy i wykazujący zdolność do wydajnej produkcji kwasu bursztynowego z laktozy w warunkach beztlenowych. Na podstawie przeprowadzonej identyfikacji proteomicznej oraz genetycznej, jak również analizy filogenetycznej stwierdzono, że pozyskany szczep należy do gatunku *Klebsiella aerogenes* (dawniej *Enterobacter aerogenes*). W kolejnym etapie, przebadano wpływ warunków fermentacji, tj. temperatury, pH, stężenia ekstraktu drożdżowego, wielkości inokulum oraz początkowego stężenia laktozy, na wzrost szczepu *E. aerogenes* LU2 oraz poziom biosyntezy kwasu bursztynowego. Przeprowadzona w optymalnych warunkach fermentacja okresowa w 3-L bioreaktorze pozwoliła na wyprodukowanie ok. 51.35 g/L kwasu bursztynowego z wydajnością na poziomie 53%. Wykorzystanie permeatu serwatkowego, jako substytutu czystej laktozy, pozwoliło uzyskać najwyższe stężenie kwasu bursztynowego wynoszące ok. 57.7 g/L oraz wydajność i produktywność procesu na poziomie, odpowiednio 62% oraz 0.34 g/(L*h).

Za pomocą sekwencjonowania hybrydowego opartego na połączeniu technologii krótkich (Illumina MiSeq) oraz długich (ONT MinION) odczytów DNA uzyskano pełną

sekwencję genomu szczepu *E. aerogenes* LU2, a także, porównawczo, sekwencję genomu innego producenta kwasu bursztynowego- szczepu *Enterobacter* sp. LU1. Genomy obu szczepów zostały następnie zdeponowane w bazie danych NCBI GenBank oraz przeanalizowane z perspektywy ich potencjalnego wykorzystania w biotechnologii kwasu bursztynowego. Uzyskane genomy porównano ze sobą, jak również z genomami innych szczepów należących do rodziny *Enterobacteriaceae*. Potwierdzono, że badane szczepy posiadają uwarunkowania genetyczne pozwalające na metabolizm szerokiego spektrum źródeł węgla. Analiza genomu wykazała, że w warunkach anaerobowych, kwas bursztynowy może być produkowany na drodze redukcyjnej gałęzi cyklu Krebsa oraz cyklu glioksyłanowego. Zbadano podłoże genetyczne wykazanych wcześniej cech fizjologicznych, w tym zidentyfikowano geny zaangażowane w ekskrecję kwasu bursztynowego oraz geny związane z odpowiedzią na stres osmotyczny i oksydacyjny. Ponadto, genomy badanych szczepów zostały przeanalizowane pod kątem obecności genów oporności na antybiotyki, sekwencji profagowych, wysp genomowych oraz regionów CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat). Przeprowadzone badania potwierdziły, że szczep *E. aerogenes* LU2 wykazuje potencjał, jako nowy biokatalizator do produkcji kwasu bursztynowego z laktozy.

Słowa kluczowe: kwas bursztynowy, *Enterobacter*, laktoza, sekwencjonowanie DNA

Abstract

Succinic acid is a chemical compound with a wide range of industrial applications that has become of global interest in recent years. The microbial production of this biodegradable organic acid, using efficient biocatalysts as well as waste and by-products, is particularly significant in the context of the concept of sustainable development.

The number of known microorganisms characterized by the ability to efficiently biosynthesize succinic acid is still limited. Moreover, many of the already identified biocatalysts show the ability to produce this metabolite only from simple carbon sources, e.g. glucose. Therefore, there is still a need to search for new microorganisms that allow the use of more complex carbon sources, which are often included in waste or by-products.

The aim of the research was to identify a new bacterial strain, competitive in relation to those currently described, characterized by the ability to naturally and efficiently biosynthesize succinic acid by fermentation of lactose, which is a component of whey permeate, as well as to perform physiological and genetic characterization of the selected microorganism.

As a result of the screening performed, a novel bacterial strain LU2 was isolated from cow rumen and recognized as an efficient producer of succinic acid from lactose under anaerobic conditions. Proteomic and genetic identification, as well as phylogenetic analysis were performed, and the strain LU2 was classified as *Klebsiella aerogenes* (formerly *Enterobacter aerogenes*). In the next stage, the effect of fermentation conditions, i.e. temperature, pH, yeast extract concentration, inoculum size, and initial lactose concentration, on the growth of *E. aerogenes* LU2 and the level of succinic acid biosynthesis was studied. Batch fermentation conducted under optimal conditions in a 3-L bioreactor allowed for the production of about 51.35 g/L of succinic acid with a yield of 53%. The use of whey permeate as a substitute for pure lactose resulted in the highest concentration of succinic acid of about 57.7 g/L with a yield and total productivity of 62% and 0.34 g/(L*h), respectively.

Using hybrid sequencing based on a combination of short (Illumina MiSeq) and long (ONT MinION) DNA reads technologies, the complete genome sequence of *E. aerogenes* LU2 was obtained, as well as, comparatively, the genome sequence of another succinic acid producer- *Enterobacter* sp. LU1. The genomes of both strains were then deposited in the NCBI GenBank database and analyzed from the perspective of their potential use in succinic acid biotechnology. The obtained genomes were compared with each other as well as with the genomes of other strains belonging to the *Enterobacteriaceae* family. It was confirmed that the strains studied have the genetic predisposition to metabolize a wide range of carbon sources. Genome analysis showed that under anaerobic conditions, succinic acid can be produced by the

reductive branch of the Krebs cycle and the glyoxylate cycle. The genetic basis of previously demonstrated physiological traits were investigated, including the identification of genes involved in succinic acid excretion and genes associated with osmotic and oxidative stress responses. In addition, the genomes of the tested strains were analyzed for the presence of antibiotic resistance genes, prophage sequences, genomic islands, and CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) regions. This study confirmed that *E. aerogenes* LU2 shows potential as a novel biocatalyst for the production of succinic acid from lactose.

Keywords: succinic acid, *Enterobacter*, lactose, DNA sequencing