

## 1. Streszczenie

Mikroorganizmy ewoluują poprzez nabywanie unikalnych właściwości funkcjonalnych, będących wynikiem szeregu przystosowań do warunków środowiska, w którym żyją. Różnorodność ekosystemów przyczyniła się do powstania wielu mechanizmów adaptacyjnych, kształtując unikalny zestaw genów ściśle powiązany z miejscem występowania. Bakterie kwasu mlekowego od lat opisywane są jako bakterie, które na skutek przystosowania się do różnych środowisk, zredukowały swoje genomy. Bakterie te, wykształciły unikalny zestaw genów ściśle powiązany z miejscem ich występowania, w odpowiedzi na kompozycję czynników fizycznych i chemicznych, które nie tylko sprzyjają wzrostowi, ale także mogą mieć działanie hamujące. Taką dualistyczną naturę mają środowiska bogate w fruktozę, czyli nektary kwiatów, fermentowane owoce bogate w cukry proste, czy nawet przewody pokarmowe owadów. Bogactwo cukrów prostych stanowi doskonałe źródło węgla, jednakże zazwyczaj ich stężenie działa hamująco dla większości bakterii. Bakterie kwasu mlekowego zasiedliły te nisze wykształcając stosunkowo nowo opisany mechanizm- fruktofilność. Fruktofilne bakterie kwasu mlekowego (FLAB ang. fructophilic lactic acid bacteria) przystosowały się do wysokich stężeń cukrów oraz zamiast najczęściej wykorzystywanej jako źródła węgla glukozy, preferują fruktozę.

Celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była izolacja oraz charakterystyka polskich szczepów z grupy fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego (FLAB), pochodzących z różnych środowisk oraz ich wykorzystanie w technologii żywności. Fruktofilne bakterie kwasu mlekowego zostały wybrane ze względu na wyjątkowy metabolizm i związany z nim potencjał produkcji polioli. Na skutek utraty genów, zaburzona zostaje równowaga  $NAD^+/NADH$ , i konieczne jest użycie zewnętrznego akceptora elektronów. FLAB jak większość heterofermentatywnych bakterii kwasu mlekowego są zdolne do konwersji fruktozy do mannitolu z uzyskaniem potrzebnej regeneracji kofaktora  $NAD^+$ . Zarówno genetyczne podłoże oraz występowanie fruktozy w naturalnym środowisku bytowania tych mikroorganizmów, stanowiły podłoże do postawienia hipotezy niniejszej pracy.

Izolaty fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego pozyskano z nowych źródeł charakteryzujących się stosunkowo wysokim stężeniem fruktozy, przy jednoczesnej próbie poddania analizie środowisk nieopisanych w literaturze. W wyniku przeprowadzonych badań, wybrano trzy źródła izolacji. Ze spadzi produkowanej przez

*Coccus hesperidum* L. wyizolowano po raz pierwszy szczepy *Lactobacillus plantarum* FPL, o fruktofilnych właściwościach. Gatunek *Lb. plantarum* jako najbardziej wszechstronny wśród swojego rodzaju, ma duży potencjał wykorzystania jako element konsorcjum fermentacyjnego. Fruktofilne szczepy *Lb. plantarum* cechują się umiejętnością metabolizowania szerokiego zakresu węglowodanów, ale także są odporne na wysokie stężenia cukrów. Dzięki izolacji gatunku *Lb. plantarum* ze spadzi, opisano nowy rodzaj fruktofilności wśród LAB. Z nektarów kwiatów wyizolowano i opisano szczepy *Apilactobacillus kunkeei*. Genomy wyizolowanych szczepów poddano sekwencjonowaniu, dzięki użyciu dwóch metod, długich i krótkich odczytów, uzyskano najlepsze złożenie. Zdeponowane rekordy genomów szczepów *A.kunkeei*, w NCBI GeneBank, stanowią referencję uzupełniając wiedzę na temat gatunku. Ostatnim źródłem izolacji był miód pitny, gdzie po raz pierwszy wyizolowano gatunek należący do bakterii kwasu mlekowego *Lb. hilgardii* FLUB. Szczep ten naukowo jest niezwykle intrygujący, gdyż powoduje psucie się miodu pitnego, ogólnie uznawanego za mikrobiologicznie trwały produkt. Skład cukrów miodu pitnego, w pewnym stopniu spowodował nabycie przez szczep *Lb. hilgardii* FLUB, cech typowych dla mikroorganizmów fruktofilnych. Co wiąże się również z dużym potencjałem tego szczepu do produkcji mannitolu, czego efektem jest patent PL 237228. Patent zastrzega nie tylko użycie tego szczepu do produkcji mannitolu, ale także użycia trzech pożywek, fruktozy, glukozy i fruktozy jak i syropu glukozowo-fruktozowego. Najlepsze wyniki uzyskano z wykorzystaniem pożywki składającej się z 4% fruktozy i 4% glukozy, szczep *Lb. hilgardii* FLUB po czterech dobach wytwarza 1,933% mannitolu, zaś szczepy referencyjne *Lb. hilgardii* NRRL B-1843 1,496%, *Lb. intermedius* NRRL B-3693 1,356%. Gdy w pożywce jedynym źródłem węgla jest 8% fruktozy, szczep FLUB produkuje ponad dwa razy więcej mannitolu niż szczepy referencyjne, co potwierdza jego fruktofilną naturę. Z syropu glukozowo-fruktozowego mannitol udało się uzyskać tylko w przypadku szczepów z gatunku *Lb. hilgardii*. Z 17 zbadanych źródeł węgla *Lb. hilgardii* FLUB nie metabolizuje wtórnie mannitolu, co wraz z zwiększonym powinowactwem do fruktozy, potwierdza potencjał szczepu. Znaczenie technologiczne tego szczepu, skłoniło do analiz genomowych w kierunku badań nad sukcesem związanym z przejściem tak niekorzystnej mikrobiologicznie niszy, jakim jest miód pitny.

## 2. Abstract

Microorganisms evolve by acquiring unique functional properties, as a result of a series of adaptations to the environment, in which they live. The diversity of ecosystems has contributed to the emergence of many adaptive mechanisms, shaping a unique set of genes closely linked to the habitat of occurrence. Lactic acid bacteria have been described for years as bacteria, that have reduced their genomes as a result of adapting to different environments. These bacteria, have evolved a unique set of genes closely linked to their site of occurrence, in response to a composite of physical and chemical factors that not only promote growth, but can also have an inhibitory effect. Fructose-rich environments such as the nectars of flowers, fermented fruits rich in simple sugars, or even the digestive tracts of insects have such a dualistic nature. The abundance of simple sugars provides an excellent source of carbon; however, their concentration usually has an inhibitory effect on most bacteria. Lactic acid bacteria have inhabited these niches by developing a relatively newly described mechanism-fructophilicity. Fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) have adapted to high sugar concentrations and prefer fructose to glucose as a carbon source.

The aim of the research carried out within this dissertation was the isolation and characterization of Polish strains of fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) from different environments and their application in food technology. Fructophilic lactic acid bacteria were selected because of their unique metabolism and associated potential for polyol production. Due to gene loss, the NAD<sup>+</sup>/NADH balance is disrupted, and an external electron acceptor is required. FLAB like most heterofermentative lactic acid bacteria are capable of converting fructose to mannitol with gaining the needed regeneration of the NAD<sup>+</sup> cofactor. Both the genetic background and the occurrence of fructose in the natural habitat of these microorganisms provided the basis for the hypothesis of this study.

Isolates of fructophilic lactic acid bacteria were obtained from novel sources characterized by relatively high fructose concentrations, while attempting to analyze environments not described in the literature. Three isolation sources were selected as a result of this study. Fructophilic strains of *Lactobacillus plantarum* FPL were isolated for the first time from honeydew, produced by *Coccus hesperidum* L., *Lb. plantarum* species as the most versatile among its genus, has a great potential to be used as part of fermentation consortium. Fructophilic strains of *Lb. plantarum* are characterized by

their ability to metabolize a wide range of carbohydrates, but are also resistant to high concentrations of sugars. Thanks to the isolation of *Lb. plantarum* species from honeydew, a new type of fructophilicity among LAB has been described. Strains of *Apilactobacillus kunkeei* were isolated from flower nectar and described. The genomes of the isolated strains were sequenced, by using two methods, long and short reads, the best assembly was obtained. The deposited genome records of *A.kunkeei* strains, in NCBI GeneBank, provide a reference complementing the knowledge of the species. The last source of isolation was mead, where a species belonging to the lactic acid bacteria *Lb. hilgardii* FLUB was isolated for the first time. Scientifically, this strain is extremely intriguing because it causes spoilage in mead, generally considered a microbiologically stable product. The sugars composition of mead, to some extent, caused the *Lb. hilgardii* FLUB strain to acquire characteristics typical of fructophilic microorganisms. This is also connected with a high potential of this strain for mannitol production, which resulted in patent PL 237228. The patent claims not only the use of this strain for mannitol production but also the use of three media, fructose, glucose and fructose as well as glucose-fructose syrup. The best results were obtained with the medium consisting of 4% fructose and 4% glucose, *Lb. hilgardii* FLUB strain after four days produces 1,933% mannitol, reference strains *Lb.hilgardii* NRRL B-1843 1,496%, *Lb. intermedius* NRRL B-3693 1,356%. When 8% fructose is the only carbon source in the medium, the FLUB strain produced more than twice as much mannitol as the reference strains, confirming its fructophilic nature. From glucose-fructose syrup, mannitol could only be obtained in strains of the *Lb. hilgardii* species. Of the 17 carbon sources tested, *Lb.hilgardii* FLUB does not secondarily utilize mannitol, which, along with its increased affinity for fructose, confirms the strain's potential. The technological importance of this strain, prompted genomic analyses to study its success in taking over such a microbiologically disadvantageous niche as mead.