

Kwas bursztynowy jest naturalnym związkiem chemicznym, niezbędnym w przemianach metabolicznych każdego organizmu żywego. Stanowi on produkt pośredni w cyklu kwasów trkarboksylowych (TCA), jak również produkt końcowy w trzech szlakach biochemicznych tj. redukcyjnej gałęzi cyklu Krebsa, cyklu glioksylanowym, a także cyklu Krebsa z nieaktywnym enzymem dehydrogenazy bursztynianowej. Liniowa struktura cząsteczki oraz jej nasycony charakter sprawiają, że kwas bursztynowy należy do grona 12 związków chemicznych o największym potencjale przemysłowym, wskazanych przez raport Amerykańskiego Departamentu ds. Energii (DOE). Metabolit ten znalazł zastosowanie w przemyśle chemicznym, spożywczym i kosmetycznym. Ponadto, ze względu na właściwości prozdrowotne, kwas bursztynowy jest wykorzystywany w przemyśle farmaceutycznym, m.in. w produkcji aminokwasów, witamin i leków przeciwnowotworowych. Szacuje się, że zapotrzebowanie na kwas bursztynowy do 2020 roku osiągnie poziom 700,000 ton/rok.

Jeszcze do niedawna, kwas bursztynowy produkowany był na skale przemysłową głównie z bezwodnika maleinowego na drodze syntezy chemicznej. Jednakże, w obliczu wahających się cen ropy naftowej, trendu wykorzystania surowców odpadowych, jak również prób eliminacji zanieczyszczeń środowiska emitowanych przez zakłady przemysłowe, biotechnologiczna produkcja kwasu bursztynowego z wykorzystaniem wydajnych biokatalizatorów bakteryjnych stała się tematem ogólnoswiatowego zainteresowania. „Zielona technologia” kwasu bursztynowego wpisuje się doskonale w filozofie tzw. „gospodarki bezodpadowej” polegającej na stworzeniu obiegu zamkniętego, dzięki któremu możliwe jest wykorzystanie zasobów bez generowania odpadów. Jednakże, w tym przypadku, kluczowym elementem obiegu jest odpowiedni producent bakteryjny pozwalający na wydajną konwersję produktów odpadowych i ubocznych. W dalszym ciągu, liczba opisanych mikroorganizmów wykazujących zdolność do wydajnej biosyntezy kwasu bursztynowego jest niewielka. Ponadto, większość zidentyfikowanych szczepów ma duże wymagania wzrostowe oraz wykazuje zdolność do metabolizowania jedynie prostych sacharydów. Tymczasem, istnieje potrzeba identyfikacji oraz charakterystyki mikroorganizmów posiadających zdolność do wydajnego metabolizowania bardziej złożonych źródeł węgla tj. laktoza zawarta w permeacie serwatki, sacharoza wchodząca w skład melasy, czy glicerol powstający jako produkt uboczny przy produkcji biodiesla.

Stąd też, celem naukowym badań zaplanowanych w ramach rozprawy doktorskiej jest kompleksowa charakterystyka fizjologiczna oraz genetyczna nowych szczepów bakteryjnych *Enterobacter aerogenes* LU2 oraz *Escherichia coli* LU3, które wykazują zdolność do wydajnej produkcji kwasu bursztynowego w obecności laktozy i sacharozy. Do naturalnych producentów tego metabolitu można zaliczyć takie gatunki bakterii, jak: *Basfia succiniciproducens*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens* oraz *Actinobacillus succinogenes*. Obecnie, właściwości fizjologiczne oraz biochemiczne tych mikroorganizmów zostały już poznane, a uzyskanie sekwencji DNA ich genomów pozwala na prowadzenie zaawansowanych badań w zakresie inżynierii metabolicznej. Tymczasem, zidentyfikowany szczep LU2 jest pierwszym szczepem z gatunku *E. aerogenes* wykazującym zdolność do wydajnej biosyntezy kwasu bursztynowego. Z kolei szczep LU3, sklasyfikowany jako *E. coli*, charakteryzuje się rzadką, naturalną zdolnością do metabolizowania sacharozy i jej wydajną konwersją do kwasu bursztynowego stanowiącego główny produkt fermentacji. Stąd też, kluczowe jest przeprowadzenie kompleksowych badań umożliwiających wyjaśnienie mechanizmów regulacji biosyntezy produktów fermentacji, ze szczególnym uwzględnieniem kwasu bursztynowego.

W ramach niniejszego projektu przeprowadzono skrining izolatów bakteryjnych celem wytypowania wydajnych bio-producentów kwasu bursztynowego. Następnie, przeprowadzono izolację DNA badanych szczepów, identyfikację proteomiczną, genetyczną, analizę filogenetyczną oraz sekwencjonowanie genomowe. W kolejnym etapie została wykonana charakterystyka strukturalna i funkcjonalna uzyskanych sekwencji DNA genomów oraz analizy porównawcze. Uzyskane dane sekwencyjne zostały zdeponowane w bazie danych NCBI GenBank, będąc doskonałym materiałem do dalszych prac w zakresie badań podstawowych nad szczepami *E. aerogenes* LU2 oraz *E. coli* LU3, jak również analiz filogenetycznych. Kolejny etap, oprócz kontynuacji prac związanych z charakterystyką genetyczną badanych szczepów, zakłada przeprowadzenie analizy proteomicznej, biochemicznej oraz analizy poziomu ekspresji wybranych genów zaangażowanych w biosyntezę kwasu bursztynowego i produktów ubocznych w zależności od składu podłoża hodowlanego. Ponadto, zaplanowano wykonanie obszernej analizy metabolizmu badanych szczepów w obecności różnych źródeł węgla, azotu oraz substancji dodatkowych, jak również ich stężeń w podłożu hodowlanym. Na podstawie przeprowadzonych badań zostanie opracowana strategia mająca na celu wyeliminowanie bądź ograniczenie obecności niepożądanych produktów fermentacji na korzyść zwiększonego poziomu biosyntezy kwasu bursztynowego na drodze modyfikacji genetycznych badanych szczepów. Proponowane badania mogą dostarczyć wiele informacji na temat wpływu składników podłoża hodowlanego na mechanizmy regulacji biosyntezy produktów fermentacji oraz pozwolą na otrzymanie nowych producentów bakteryjnych, o cechach porównywalnych z najlepszymi szczepami-producentami kwasu bursztynowego.