

Streszczenie

Wykorzystanie wytlóków jablkowych w procesie fermentacji propionowej prowadzonej przy użyciu wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Propionibacterium*

Celem pracy była próba utylizacji wytlóków jablkowych z udziałem bakterii fermentacji propionowej z jednoczesnym pozyskiwaniem ich metabolitów - kwasu propionowego i witaminy B12. W pracy przedstawiono wyniki badań (realizowanych w czterech etapach) dotyczących opracowania składu podłoża przygotowanego na bazie ekstraktu z wytlóków, gwarantującego wysoką wydajność syntezy kwasu propionowego. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że szczep bakterii *P. freudenreichii* T82 jest w stanie wykorzystywać jako źródła węgla, zawarte w wytlókach jablkowych cukry - glukozę i fruktozę. Analiza statystyczna DoE (ang. *Design of Experiment*) pozwoliła stwierdzić, które z tych węglowodanów oraz w jakich proporcjach, wywierają najbardziej korzystny wpływ na aktywność metaboliczną badanego szczepu. Okazało się, że do wydajnej biosyntezy propionianu, w przypadku cukrów obecnych w wytlókach jablkowych, szczep *P. freudenreichii* T82 wymaga dostępności w śrówisku hodowlanym fruktozy, stanowiącej co najmniej 50% obecnych w podłożu źródeł węgla. Przeprowadzone badania wykazały niewielką ilość azotu ($0,09 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ w przeliczeniu na s.s.) w analizowanym odpadzie. Zaobserwowano, że suplementacja wytlóków odpowiednimi ilościami peptonu i ekstraktu drożdżowego (źródła azotu) przyczyniła się do wzrostu syntezy kwasu propionowego przez badany szczep ($3,95 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ - $4,36 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) w porównaniu z hodowlą prowadzoną w pożywce składającej się wyłącznie z ekstraktu z wytlóków jablkowych ($1,27 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$). Intensyfikację fermentacji propionowej osiągnięto również poprzez zwiększenie częstotliwości zubożniania środowiska hodowlanego z odstępów 24-godzinnych ($4,16 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) na 12-godzinne ($4,82 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz na skutek podniesienia temperatury hodowli z 30°C ($4,59 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) do 37°C ($5,13 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$). Czynnikiem mającym istotne znaczenie w poprawie parametrów fermentacji propionowej okazał się dodatek biotyny do środowiska hodowlanego. Odpowiednia dawka tego kofaktora ($0,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) pozwoliła uzyskać $7,66 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ propionianu z wydajnością produkcji na poziomie $0,39 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. W tym wariantcie hodowli osiągnięto również największą produkcję witaminy B12. Spośród wszystkich analizowanych wariantów hodowli, najlepszą wydajność syntezy kwasu propionowego, uzyskano w wyniku fermentacji prowadzonej w środowisku bioreaktora ($0,40 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ cukrów). Dysertacja zawiera także charakterystykę genomu szczepu *P. freudenreichii* T82. Podsumowując szczep bakterii *P. freudenreichii* T82 wykazał zdolność produkcji kwasu propionowego i witaminy B12 z wytlóków jablkowych. Oznacza to, że bakterie te mogą znaleźć zastosowanie w biotechnologicznym zagospodarowaniu tego odpadu. Należy jednak zaznaczyć, że taka perspektywa wymaga kolejnych badań, w których pomocna może okazać się znajomość badanego szczepu na poziomie genetycznym. Potencjalne kierunki dalszych badań zostały omówione w niniejszej pracy.

Słowa kluczowe: *Propionibacterium*, wytloki jablkowe, utylizacja, fermentacja propionowa, kwas propionowy, kwas octowy, witamina B12.

Summary

The use of apple pomace in the process of propionic acid fermentation carried out using selected strains of bacteria of the *Propionibacterium* genus

The purpose of the study was an attempt to utilize apple pomace with the participation of propionic acid fermentation bacteria with the simultaneous acquisition of their metabolites - propionic acid and vitamin B12. The paper presents the results of the research, carried out in four stages, concerning the composition of the substrate containing the extract of apple pomace, guaranteeing high efficiency of propionic acid synthesis. Based on the obtained data, it was found that the strain of *P. freudenreichii* T82 bacteria is able to use as sources of carbon, contained in pomace apple sugars - glucose and fructose. The DoE statistical analysis (Design of Experiment) allowed to find out which of these carbohydrates and in what proportions, exert the most beneficial effect on the metabolic activity of the tested strain. It turned out that for an efficient biosynthesis of propionate, in the case of sugars present in apple pomace, the *P. freudenreichii* T82 strain requires the availability of fructose in a breeding environment, constituting at least 50% carbon sources present in the medium. The tests showed a small amount of nitrogen ($0,09 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ calculated as dry matter) in the analyzed waste. It was observed that additional to the mediums appropriate amounts of peptone and yeast extract (nitrogen sources) contributed to the increase of propionic acid synthesis ($3,95 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ - $4,36 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$), compared to the cultivation carried out in a medium consisting exclusively of apple pomace extract ($1,27 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$). Intensification of propionic acid fermentation was also achieved by increasing the neutralization frequency of the culture medium (from $4,16 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ to $4,82 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) and by raising the temperature of the culture from 30°C ($4,59 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) to 37°C ($5,13 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$). An important factor in improving the parameters of propionic acid fermentation was the addition of biotin to the breeding environment. The appropriate dose of this cofactor ($0,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) allowed to obtain $7,66 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ propionate with a production yield of $0,39 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. What is more, in this variant of breeding also the largest production of vitamin B12 was achieved. Amongst all of experiments, the best efficiency of the propionic acid synthesis process was obtained by fermentation in a bioreactor environment ($0,40 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ of sugars). In addition, the dissertation contains the genomic characteristics of *P. freudenreichii* T82 strain. In conclusion the strain of *P. freudenreichii* T82 showed the ability to produce propionic acid and vitamin B12 from apple pomace. This means that these bacteria can be used in the biotechnological management of this waste. It should be noted, that such a perspective requires further research, in which, knowledge of the tested strain at the genetic level may be helpful. Potential directions for further research are discussed in this work.

Key words: *Propionibacterium*, apple pomace, utilization, propionic acid fermentation, propionic acid, acetic acid, vitamin B12.