

Joanna Pawlicka-Kaczorowska<sup>1\*</sup>, Katarzyna Czaczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wpłynęło w lutym 2016 r.  
Zaakceptowano w czerwcu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka klasycznych bakterii propionowych. 2.1. Taksonomia. 2.2. Ekologia. 2.3. Morfologia i metabolizm. 2.4. Wymagania hodowlane. 3. Zastosowanie klasycznych bakterii propionowych. 3.1. Przemysłowe wykorzystanie i kierunki badań. 3.2. Kwas propionowy. 3.2. Witaminy z grupy B. 3.3. Trehalozę. 3.4. Sprzężone dieny kwasu linolowego. 3.5. Czynniki bifidogenne. 3.6. Kwas 5-aminolewulinowy. 3.7. Bakteriocyny. 3.8. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe. 3.9. Właściwości probiotyczne. 4. Podsumowanie

#### Dairy propionibacteria – taxonomy, culture conditions and application

**Abstract:** The objective of this review paper was to present the current state of knowledge about dairy propionibacteria and demonstrate their potential application in industry. Propionibacteria are Gram-positive, non-spore-forming, non-motile, facultative anaerobic, pleomorphic rods – belonging to the genus *Propionibacterium*. Traditionally, they are used as starters in the manufacture of Swiss-type cheeses. These bacteria produce an interestingly wide range of bioactive compounds, like B group vitamins, trehalose, conjugated linoleic acid, propionic acid, bacteriocins, bifidogenic factors. Furthermore, they are able to improve the health of humans and animals by modulation of gut microbiota, regulation of the immune system, induction of colorectal carcinoma cells apoptosis or alleviation of lactose intolerance. Due to documented probiotic properties and the ability to synthesize functional biomolecules, a growing number of studies focuses on dairy propionibacteria and their utilization as a microbial bioresource.

1. Introduction. 2. General characteristics of dairy propionibacteria. 2.1. Taxonomy. 2.2. Ecology. 2.3. Morphology and metabolism. 2.4. Growth requirements. 3. Application of dairy propionibacteria. 3.1. Industrial applications and research directions. 3.2. Propionic acid. 3.2. B group vitamins. 3.3. Trehalose. 3.4. Conjugated linoleic acid. 3.5. Bifidogenic factors. 3.6. 5-aminolevulinic acid. 3.7. Bacteriocins. 3.8. Antimicrobial properties. 3.9. Probiotic properties. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** kwas propionowy, *Propionibacterium* spp., trehalozę, właściwości probiotyczne, witaminy z grupy B

**Key words:** B group vitamins, probiotic properties, *Propionibacterium* spp., propionic acid, trehalose

## 1. Wstęp

Klasyczne bakterie propionowe są drobnoustrojami, które od stuleci mają swoje zastosowanie w przemyśle spożywczym i żywieniu zwierząt. Na początku jednak nie było wiadomo, że to właśnie te mikroorganizmy odpowiedzialne są za przeprowadzanie fermentacji propionowej. Ich istnienie zostało odkryte dopiero około 150 lat temu. Charakteryzowana grupa ma olbrzymi potencjał aplikacyjny, lecz jest mało znana społeczeństwu [98].

Badania dotyczące prozdrowotnych właściwości klasycznych bakterii propionowych związane są z ich możliwościami modulacji składu mikroflory jelitowej. Jak się obecnie uważa mikrobiom układu pokarmowego ma bardzo istotne znaczenie dla funkcjonowania całego organizmu. Klasyczne bakterie propionowe badane są w aspektach projektowania nowej funkcjonalnej żywności, która mogłaby być stosowana prewencyjnie lub leczniczo w walce z wieloma chorobami cywilizacyjnymi np. otyłością, nowotworami [15, 16, 98].

Poznanie szlaków metabolicznych ukrytych w genomie tych interesujących mikroorganizmów predyspo-

nuje je do stosowania ich jako bakteryjnych “fabryk” związków o przemysłowym znaczeniu np. kwasu propionowego, witamin z grupy B, trehalozy, czynników bifidogennych. Prace optymalizacyjne nad bioprocessami prowadzonymi z ich udziałem, wpisują się w koncepcję zielonej chemii, zakładającej zastępowanie toksycznych dla środowiska syntez chemicznych, procesami mikrobiologicznymi [16, 31, 73, 98].

Niniejsza praca ma na celu usystematyzować wiedzę dotyczącą klasycznych bakterii propionowych oraz zaprezentować fakty, które mogą mieć wpływ na ich lepsze zrozumienie i wykorzystanie praktyczne.

## 2. Ogólna charakterystyka klasycznych bakterii propionowych

### 2.1. Taksonomia

Historia badań nad klasycznymi bakteriami propionowymi sięga 1861 r., kiedy Pasteur udowodnił, że przebieg procesów dojrzewania serów jest wynikiem aktywności mikroorganizmów. W 1879 r. Fitz opisał przebieg

\* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań; tel. 61 848 60 16, e-mail: joannap@up.poznan.pl

fermentacji prowadzonej przez bakterie w serach typu szwajcarskiego. Zaobserwował, że cukier mlekowy (laktoza) jest przekształcany do kwasu propionowego, kwasu octowego i dwutlenku węgla. Na początku XX w., w 1906 r. von Freudenreich i Orla-Jensen po raz pierwszy wyizolowali z sera Emmental bakterie *Propionibacterium freudenreichii* [39, 98]. W 1928 r. van Niel zaklasyfikował bakterie mające zdolność do syntezy kwasu propionowego do oddzielnego, nowego rodzaju *Propionibacterium*. Do nowo utworzonego rodzaju zaliczył osiem gatunków: *P. freudenreichii*, *P. pentosaceum*, *P. peterssonii*, *P. shermanii*, *P. rubrum*, *P. thoenii*, *P. technicum*, *P. jensenii* i jeden podgatunek: *P. jensenii* var. *raffinoseum*. W 1930 r. opisywany rodzaj mikroorganizmu został uwzględniony w 3. edycji Bergey Manual of Determinative Bacteriology. W kolejnych latach Werkman and Kendall podnieśli odmianę *P. jensenii* var. *raffinoseum* do rangi gatunku. Utworzyli dziewiąty gatunek o nazwie: *P. raffinoseum*. Następnie Hitchner, pomiędzy 1932 a 1934 r., zaklasyfikował do rodzaju *Propionibacterium* kolejne dwa gatunki: *P. zeae* i *P. arabinosum*. W 1941 r. Sakaguchi i wsp. zaproponowali jeszcze pięć gatunków: *P. globosum*, *P. amylaceum*, *P. japonicum*, *P. orientum*, *P. coloratum*, i jeden podgatunek: *P. amylaceum* var. *aurantium*. Następnie do 16 gatunków klasyfikowanych w tamtym czasie do klasycznych bakterii propionowych Janoschek dodał kolejne trzy: *P. casei*, *P. pituitosum* i *P. sangunium*. W 1972 r., Johnson i Cummins na podstawie analizy: budowy peptydoglikanu, składu zasad azotowych budujących nić DNA i podobieństwa wybranych sekwencji nukleotydowych wyznaczyli cztery grupy (gatunki) należące do klasycznych bakterii propionowych: *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii* i *P. thoenii*. Utworzona klasyfikacja została uwzględniona w 8. edycji Bergey Manual of Determinative Bacteriology [39]. W kolejnych latach wyizolowano kolejne 2 gatunki, przynależące do grupy klasycznych bakterii propionowych: *P. cyclohexanum*, *P. microaerophilum* [48, 53, 65, 73, 98].

Obecnie pozycja taksonomiczna bakterii propionowych przedstawia się następująco: Typ – Actinobacteria, Klasa – Actinobacteria, Podklasa – Actinobacteridae, Rząd – Actinomycetales, Podrząd – Propionibacterineae, Rodzina – Propionibacteriaceae, Rodzaj – *Propionibacterium* [98]. Umownie bakterie propionowe dzieli się na dwie grupy:

I – „klasyczne” lub „mleczne” [19, 73, 77, 98]

II – „skórne” lub „acnes” [12, 98]

Wyróżnia się 13 gatunków należących do rodzaju *Propionibacterium*, w tym 6 przynależących do grupy nazywanej klasycznymi bakteriami propionowymi. Nazwy gatunków zamieszczono w tabeli I. Najlepiej poznane szczepy należące do mlecznych bakterii propionowych to: *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. jensenii* i *P. thoenii*.

Tabela I  
Gatunki należące do rodzaju *Propionibacterium*

Klasyczne bakterie propionowe	Skórne bakterie propionowe
<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. acidifaciens</i>
<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. acnes</i>
<i>P. jensenii</i>	<i>P. australiensis</i>
<i>P. thoenii</i>	<i>P. avidum</i>
	<i>P. granulatum</i>
<i>P. cyclohexanum</i> *	<i>P. humerusii</i>
<i>P. microaerophilum</i> *	<i>P. propionicus</i>

\* Gatunki, których typowym siedliskiem nie jest mleko, ani jego przetwory; należące jednak do klasycznych bakterii propionowych. Opracowanie własne na podst.: [73, 77, 86, 98]

Tabela II  
Wybrane cechy biochemiczne gatunków należących do rodzaju *Propionibacterium*

Mikroorganizm	Produkcja katalazy	Fermentacja laktozy	Redukcja azotanów
<i>P. acidipropionici</i>	+/-	+	+
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i>	+	-	+
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	+	+	-
<i>P. jensenii</i>	+/-	+/-	-
<i>P. thoenii</i>	+	-/+	-
<i>P. cyclohexanum</i>	-	+	-
<i>P. microaerophilum</i>	-	-	+

-, 90% szczepów daje wynik negatywny; +, 90% i więcej daje wynik pozytywny; +/-, 10 do 40% daje wynik pozytywny; +/-, 40 do 90% daje wynik pozytywny. Opracowanie własne na podst.: [48, 53, 66]

Do identyfikacji klasycznych bakterii propionowych i ich różnicowania do poziomu rodzaju, gatunku i podgatunku wykorzystywane są metody fenotypowe (analiza cech biochemicznych), metody genotypowe oraz metody instrumentalne. Cechy biochemiczne stosowane w identyfikacji gatunków należących do klasycznych bakterii propionowych zamieszczono w tabeli II. Oficjalnie gatunek *P. freudenreichii* dzieli się na dwa podgatunki: *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* i *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*. Wyniki uzyskane przez Dalmaso i wsp. [19] wskazują jednak na występowanie czterech podgatunków gatunku *P. freudenreichii*: *freudenreichii*, *shermanii* i „pheno+” i „pheno-”, różniących się między sobą zdolnością do utylizacji laktozy i azotanów (tab. III) [19].

Genotypowanie *Propionibacterium* spp. umożliwiło badanie różnic molekularnych i struktury populacyjnej opisywanej grupy bakterii. Wykorzystywano również techniki bazujące na hybrydyzacji kwasów nukleinowych badanych mikroorganizmów [39, 68].

W typowaniu klasycznych bakterii propionowych stosowano różne metody oparte na łańcuchowej reak-

Tabela III  
Cechy biochemiczne nowopropionowanych podgatunków  
dla gatunku *Propionibacterium freudenreichii*

Podgatunek	Fermentacja laktozy	Redukcja azotanów
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i>	–	+
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	+	–
<i>P. freudenreichii</i> „pheno+”	+	+
<i>P. freudenreichii</i> „pheno–”	–	–

Opracowanie własne na podst.: [19, 73]

cji polimerazy – PCR (Polymerase Chain Reaction) np. MLST (Multilocus Sequence Typing), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), qPCR (Quantitative PCR), RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative PCR) [19, 31, 68, 93].

Z analizy sekwencji genów 16S rRNA wynika, że *P. cyclohexanicum* jest spokrewniony z *P. freudenreichii*, podczas gdy *P. microaerophilum* wykazuje filogenetyczne pokrewieństwo do szczepu *P. acidipropionici* [48, 59, 61]. W ostatnich latach zsekwencjonowano całe genomy: *P. acnes*, *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* CIRM-BIA<sup>T</sup>, *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* DSM 20271<sup>T</sup> i *P. acidipropionici* [12, 31, 44, 64]. Bakterie z rodzaju *Propionibacterium* charakteryzują się wysokim udziałem molowym par G+C (guaniny i cytozyny) w materiale genetycznym (53–68%), który w komórkach występuje w postaci chromosomu bakteryjnego oraz plazmidów [31, 73].

Alternatywę od ww. metod identyfikacji *Propionibacterium* spp. stanowią nowoczesne metody instrumentalne np. spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) czy jonizacja próbki połączona z pomiarem jej masy w spektrometrze masowym (MALDI-TOF MS) [26, 27, 93].

## 2.2. Ekologia

Typowym siedliskiem występowania *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii* są zwierzęta gospodarskie (przeżuwacze np. bydło), mleko oraz jego przetwory. W serach typu szwajcarskiego (Emmental, Leerdammer©), w trakcie dojrzewania masy serowej osiągnięta jest duża gęstość komórek *P. freudenreichii*, na poziomie 10<sup>9</sup> jtk/g. Klasyczne bakterie propionowe izolowane są również z kiszonek [10, 19, 31, 66, 86].

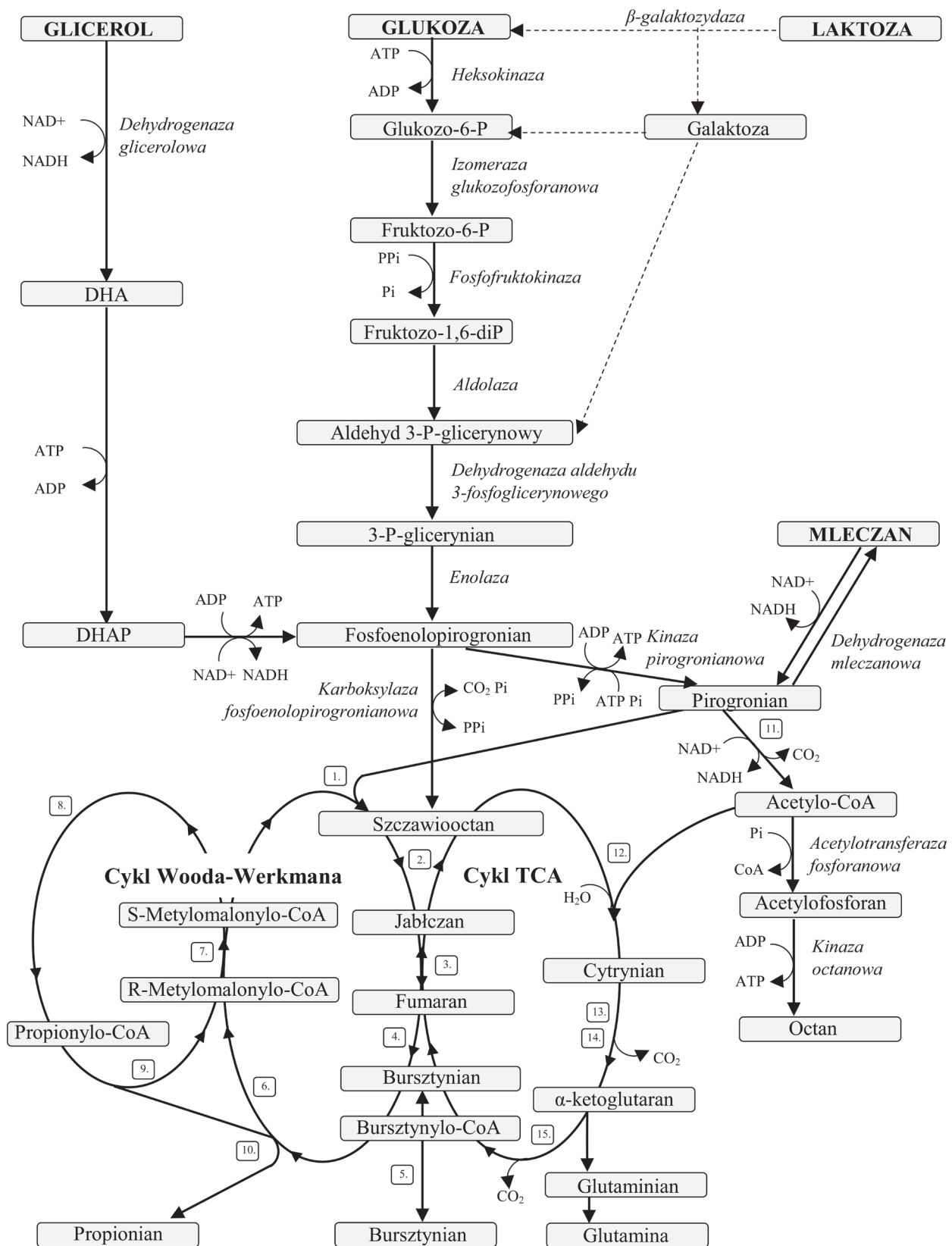
Gatunki *P. cyclohexanicum*, *P. microaerophilum* pochodzą z nowych biotopów niezwiązanych ze środowiskiem mleczarskim. *P. cyclohexanicum* wyizolowano z zepsutego soku z pomarańczy, natomiast *P. microaerophilum* wyizolowano ze ścieków po produkcji oliwy z oliwek [48, 53].

## 2.3. Morfologia i metabolizm

Klasyczne bakterie propionowe są to Gram-dodatnie, nieprzetrwalnikujące, niewykazujące zdolności do ruchu, względnie beztlenowe pałeczki. W obrazie mikroskopowym opisywane bakterie propionowe obserwuje się jako komórki występujące pojedynczo, w skupiskach lub łańcuszkach. Typowym zjawiskiem dla tych bakterii jest zmienność kształtów komórek (tzw. pleomorfizm). Mogą one przybierać kształty od bardzo drobnych i krótkich pałeczek (w warunkach beztlenowych), po twory kształtem przypominające litery Y lub V (w obecności tlenu) [66, 73].

Poszczególne gatunki zaliczane do klasycznych bakterii różnią się właściwościami biochemicznymi. Niektórzy przedstawiciele rodzaju *Propionibacterium* (*P. freudenreichii* i *P. thoenii*) wytwarzają katalazę, odpowiedzialną za proces rozkładu nadtlenu wodoru, co jest cechą nietypową dla bakterii Gram-dodatnich (tab. II) [48, 53, 66, 73]. Klasyczne bakterie propionowe wytwarzają również wewnątrzkomórkowe lipazy wykazujące aktywność w stosunku trójglicerydów mleka oraz enzymy proteolityczne uczestniczące w katabolizmie np. izoleucyny, leucyny czy proliny [10, 25, 61, 97]. Główny metabolit wytwarzany przez klasyczne bakterie propionowe – kwas propionowy, powstaje na drodze fermentacji propionowej. Pozostałymi charakterystycznymi produktami tej fermentacji są kwas octowy, kwas bursztynowy i dwutlenek węgla (Rys. 1). Należy podkreślić, że klasyczne bakterie propionowe (choć nie wszyscy przedstawiciele) potrafią wykorzystywać jako źródło węgla oprócz np. glukozy, glicerolu czy kwasu mlekowego również laktozę. Laktoza występuje w dużych ilościach (~50 g/l) w mleku i serwatce. Zdolność do fermentacji laktozy jest szczepozależna i wynika z obecności genu *Lac*, odpowiedzialnego za syntezę enzymu –  $\beta$ -galaktozydazy [98].

W komórce substrat może zostać włączony do następujących szlaków przemian: Embdena-Meyerhofa-Parnasa, pentozofosforanowego lub Entnera-Doudoroffa. Na podanych szlakach dochodzi do przekształcenia substratu w pirogronian [61, 71, 98]. Kwas propionowy jest produkowany na drodze redukcji pirogronianu. Zaangażowanych jest w ten proces wiele reakcji chemicznych składających się na cykl Wooda-Werkmana. W pierwszym etapie, w wyniku transkarboksylacji z pirogronianu powstaje kwas szczawiooctowy. Na drodze redukcji szczawiooctan jest przekształcany w jabłczan. Następnie z jabłczanu powstaje fumaran, który przekształcany jest w bursztynian. W końcowym etapie przemian z kwasu bursztynowego powstaje kwas propionowy [22, 71, 98]. Szlaki przemian oraz enzymy biorące udział w fermentacji propionowej zostały zamieszczone na Rys. 1. Teoretycznie, z 1 mola glukozy powstają 4/3 mola kwasu propionowego (C3),



Rys. 1. Przebieg fermentacji propionowej prowadzonej przez *Propionibacterium* spp., w hodowlach na glukozie, glicerolu, laktozie lub mleczanie (kwasie mlekowym); opracowanie własne na podstawie: [22, 31, 61, 71, 86]

(- - -) - linią przerywaną zaznaczono szlaki metaboliczne dotyczące konwersji laktozy. Nie wszyscy przedstawiciele rodzaju *Propionibacterium* mają zdolność do utylizacji laktozy

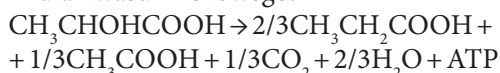
1. transkarboksylaza zależna od witaminy B<sub>7</sub>, 2. dehydrogenaza jabłczanowa, 3. hydratata fumarowa, 4. dehydrogenaza bursztynianowa, 5. syntaza bursztynylo-CoA, 6. mutaza metylomalonylo-CoA zależna od witaminy B<sub>12</sub>, 7. epimeraza metylomalonylo-CoA, 8. karboksylaza metylomalonylo-CoA, 9. karboksylaza propionnylo-CoA, 10. CoA-transferaza propionianowa, 11. dehydrogenaza pirogronianowa, 12. syntaza cytrynianowa, 13. akonitaza, 14. dehydrogenaza izocytrynianowa, 15. dehydrogenaza α-ketoglutaranowa

2/3 mola kwasu octowego (C2) i 2/3 mola CO<sub>2</sub>. Natomiast z 1 mola kwasu mlekowego powstaje 2/3 mola kwasu propionowego (C3), 1/3 mola kwasu octowego (C2) oraz 1/3 mola CO<sub>2</sub>. Wyższy zysk energetyczny bakterie z rodzaju *Propionibacterium* osiągają na drodze fermentacji cukrów prostych niż kwasu mlekowego. W zależności od zastosowanego substratu przebieg fermentacji propionowej można zapisać następującymi równaniami chemicznymi:

– dla glukozy:



– dla kwasu mlekowego:



Praktycznie wydajności tych procesów są niższe, z powodu powstawania biomasy bakteryjnej [61, 71, 98].

#### 2.4. Wymagania hodowlane

Uznaje się, że klasyczne bakterie propionowe mogą rozwijać się w szerokim zakresie temperatur od 15°C do 40°C, a także w temperaturach chłodniczych do 3,8°C, choć zdolność do rozwoju w tak niskich temperaturach jest szczepozależna [20, 73]. Zaobserwowano, że szczepy wykazujące wzrost w niższych temperaturach produkują w tych warunkach więcej CO<sub>2</sub>. Bakterie propionowe tolerują szeroki zakres pH od 4,5 do 8,5. Jednak za optymalne warunki wzrostu uznaje się temperaturę ok. 30°C oraz pH ~7 [16, 67].

*Propionibacterium* spp. charakteryzowane są jako względnie beztlenowce, dlatego w wielu eksperymentach jednym z etapów przygotowania pożywki jest jej przegazowywanie np. N<sub>2</sub> lub CO<sub>2</sub>, celem usunięcia O<sub>2</sub> ze środowiska hodowli [47]. W zależności jednak od ukierunkowania fermentacji *Propionibacterium* spp. na konkretny metabolit wymagane są różne warunki gazowe np. maksymalną wydajność produkcji kwasu propionowego uzyskiwano w warunkach bezwzględnie beztlenowych, w przeciwieństwie do hodowli ukierunkowanych na produkcję witaminę B<sub>12</sub>, gdzie najwyższe stężenia uzyskiwano w warunkach tlenowych [75].

Na wzrost bakterii z rodzaju *Propionibacterium* ma również wpływ aktywność wody (Aw) oraz intensywność światła. Zatrzymanie metabolizmu opisywanych bakterii ma miejsce, gdy wartość Aw jest mniejsza/równa 0,955 lub intensywność światła jest wyższa niż 60 × 10<sup>2</sup> erg/m<sup>2</sup> (2000–2500 Lx) [51]. Klasyczne bakterie propionowe wykazują dużą tolerancję na wysokie zasolenie (do 7,6% NaCl), obecność soli żółci czy procesy zamrażania-rozmrażania [16].

W literaturze znaleźć można różne składy pożywek stosowane do izolacji bakterii propionowych ze środowiska [14, 69, 78]. Istnieje również możliwość zakupu dostępnych komercyjnie podłoży umożliwia-

jących wzrost bakterii propionowych np. Pal Propio-bac® medium. W hodowlach *Propionibacterium* spp. najczęściej stosowanymi źródłami węgla są: glukoza, glicerol, laktoza, kwas mlekowy lub jego sole [14, 31, 38, 67, 72, 98, 99]. W badaniach prowadzonych na różnych szczepach *Propionibacterium* jako pożywki do hodowli stosowane są także mleko lub serwatka poddane wcześniejszej fermentacji przez bakterie fermentacji mlekowej, które z laktozy biosyntetyzują kwas mlekowy [31]. Stwierdzono, że klasyczne bakterie propionowe w obecności cukrów i mleczanów w pożywce, najpierw jako substrat metabolizują kwas mlekowy [61, 70]. Jako źródło azotu stosowane są sole amonowe, aminy, aminokwasy lub peptydy. Do wzrostu potrzebują również soli mineralnych (jonów kobaltu, magnezu, manganu, miedzi, żelaza) oraz witamin. Bakterie należące do rodzaju *Propionibacterium* wymagają dodatku pantotenianu oraz biotyny. W hodowli niektórych szczepów należy stosować tiaminę lub kwas p-aminobenzoowy. Pożywki syntetyczne wzbogacane są często w hydrolizaty kazeiny lub drożdży, celem dostarczenia odpowiednich związków stymulujących *Propionibacterium* spp. do wzrostu [9, 31, 50, 98].

W celu ograniczenia wzrostu innych bakterii do pożywek stosowany jest dodatek soli litu, kadmu, arsenu czy antybiotyków [50, 88, 98]. Problem stanowi długi okres wzrostu tych bakterii na podłożach stałych, aby otrzymać kolonie np. wymagane do wyznaczania liczebności oznaczanej metodą płytkową, hodowle trwają ponad 6 dni [10, 98].

### 3. Zastosowanie klasycznych bakterii propionowych

#### 3.1. Przemysłowe wykorzystanie i kierunki badań

Klasyczne bakterie propionowe posiadają długą historię stosowania w przemyśle rolno-spożywczym. Stosowane są w przemyśle paszowym do wytwarzania kiszzonek, suplementów witaminowo-białkowych i fermentowanego mleka dla zwierząt gospodarskich np. bydła [10, 21, 35, 51, 72]. W serowarstwie bakterie z rodzaju *Propionibacterium*, w szczególności gatunek: *P. freudenreichii*, używane są jako kultury starterowe, do produkcji twardej serów podpuszczkowych, tj. sery szwajcarskie: Emmental, Gruyère, Appenzeller, Raclettes; sery francuskie: Comté; sery dunskie: Leerdammer, Maasdammer; sery norweskie: Jarlsberg. W drugiej fazie dojrzewania odpowiadają za proces oczkowania oraz wytworzenie właściwego aromatu produktu końcowego [55, 61, 65, 73, 97].

Wybrane gatunki zostały wpisane na listę względnego domniemania bezpieczeństwa QPS (Qualified Presumption of Safety) Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności EFSA (European Food Safety Authority)

oraz posiadają status GRAS (Generally Recognized As Safe) przyznawany przez Federalny Urząd Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych FDA (Food and Drug Administration). EFSA i FDA zajmują się gromadzeniem i analizą danych naukowych dotyczących bezpieczeństwa żywności i pasz [28, 62]

Bezpieczeństwo stosowania opisywanej grupy bakterii umożliwia badania nad nowymi produktami spożywczymi powstającymi przy wykorzystaniu klasycznych bakterii propionowych. Wyniki wskazują, że dodatek *Propionibacterium* spp. korzystnie wpływa na

jakość końcową projektowanych artykułów, poprzez podniesienie bezpieczeństwa microbiologicznego oraz wniesienie do ich składu substancji o działaniu prozdrowotnym [6, 29, 85]. Na skalę przemysłową *Propionibacterium* spp. stosowane są do produkcji witaminy B<sub>12</sub>, której synteza chemiczna jest zbyt kosztowna [47, 72]. Klasyczne bakterie propionowe potrafią również wytwarzać inne związki o przemysłowym znaczeniu np. kwas propionowy, witaminę B<sub>2</sub>, foliany, trehalozę, sprzężony kwas linolowy, czynniki bifidogenne, kwas 5-aminolewulinowy, bakteriocyny (tab. IV).

Tabela IV  
Związki bioaktywne produkowane przez klasyczne bakterie propionowe

Substancja bioaktywna	Funkcje / zastosowanie	Literatura
Kwas propionowy	- konserwacja żywności i pasz	[4, 15, 16, 24, 45, 73, 79, 89, 98]
	- działanie przeciwgrzybicze	
	- substrat dla przemysłu chemicznego	
	- potencjalne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób cywilizacyjnych np. nowotworów, otyłości	
	- wpływ na proces powstawania cholesterolu	
Witamina B <sub>12</sub>	- koenzym (witamina egzogenna)	[45, 58, 73, 74, 75, 87]
	- udział w wielu kluczowych reakcjach metabolicznych	
	- utrzymanie homeostazy w organizmie	
Witamina B <sub>9</sub>	- koenzym (witamina egzogenna)	[7, 18, 54, 73, 92]
	- udział w wielu kluczowych reakcjach metabolicznych	
	- utrzymanie homeostazy w organizmie	
Witamina B <sub>2</sub>	- koenzym (witamina egzogenna)	[7, 13, 73]
	- udział w wielu kluczowych reakcjach metabolicznych	
	- utrzymanie homeostazy w organizmie	
Trehaloza	- substytut sacharozy	[14, 23, 37, 78, 81]
	- środek zabezpieczający i stabilizujący (np. enzymy, błony, narządy, produkty spożywcze)	
	- potencjalne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób cywilizacyjnych np. osteoporozy oraz chorób degeneracyjnych	
CLA	- potencjalne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób cywilizacyjnych np. chorób układu sercowo-naczyniowego, cukrzycy, otyłości, osteoporozy, nowotworów	[9, 76, 91, 95, 98]
	- wpływ na przyrost masy ciała	
	- działanie przeciwdrobnoustrojowe	
DHNA	- czynnik bifidogeny	[32, 40, 98]
	- prekursor witaminy K	
	- potencjalne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu osteoporozy	
	- potencjalne zastosowanie w leczeniu alergii	
ACNQ	- czynnik bifidogeny	[40, 96, 98]
	- potencjalne zastosowanie w leczeniu alergii	
ALA	- prekursor porfiryn	[42, 73, 83]
	- leczenie nowotworów	
	- produkcja herbicydów, insektycydów	
	- stymulator wzrostu u roślin	
Bakteriocyny	- działanie bakteriostatyczne i/lub bakteriobójcze	[33, 34, 73, 98]
	- konserwacja żywności	

CLA – sprzężone dieny kwasu linolowego; DHNA – kwas 1,4-dihydroxy-2-naftoesowy; ACNQ – 2-amino-3-karboksy-1,4-naftochinon, ALA – kwas 5-aminolewulinowy

W kolejnych podrozdziałach opisano metabolity, właściwości przeciwdrobnoustrojowe i probiotyczne klasycznych bakterii propionowych, które mają znaczenie dla świata nauki i przemysłu.

### 3.2. Kwas propionowy

Kwas propionowy i jego sole: wapnia, sodu czy potasu, mają bardzo silne działanie inhibitujące w stosunku do pleśni. Bardzo często są dodawane do żywności oraz pasz dla zwierząt, jako środki konserwujące. Kwas propionowy stosowany jest również przy wytwarzaniu celulozy, plastików, herbicydów, perfum oraz leków (tab. IV) [46, 73]. Dowiedziano, że kwas propionowy wytwarzany przez bakterie propionowe ma właściwości immunostymulujące organizm do walki z komórkami raka żołądka, czy okrężnicy [15, 16, 98]. Udowodniono, że kwas propionowy może indukować apoptozę w komórkach rakowych. Cousin i wsp. [15] wykazali, że ilości kwasu propionowego produkowane przez klasyczne bakterie propionowe są wystarczające, aby wywołać śmierć różnych linii komórek nowotworowych jelit. Badacze zaprojektowali produkt spożywczy – napój mleczny, powstały na drodze fermentacji propionowej prowadzonej wyłącznie przez szczep *P. freudenreichii* ITG P9, z przeznaczeniem do stosowania w diecie prewencyjnej, mającej na celu zapobieganie pojawieniu się raka jelit lub wspomagająco w leczeniu tego typu nowotworów [15]. Kwas propionowy wpływa na zwiększenie absorpcji wapnia ze światła jelita [16, 89]. Badania z zastosowaniem radioaktywnych izotopów wykazały, że kwas propionowy może hamować syntezę cholesterolu i kwasów tłuszczowych [24]. Co więcej, udowodniono, że spożywanie kwasu propionowego lub jego soli wapniowych wpływa na zwiększenie stężenia leptyny we krwi – hormonu odpowiedzialnego za regulację pobierania pokarmu oraz równowagę energetyczną w organizmie człowieka. Prowadzone są badania nad wykorzystaniem kwasu propionowego oraz bakterii z rodzaju *Propionibacterium* w walce z otyłością [4, 79].

Obecnie kwas propionowy pozyskiwany jest na drodze procesów petrochemicznych – w 2006 r. roczna światowa produkcja tego związku wynosiła około 350 tys. ton. Ze względu jednak na wysoką cenę procesów chemicznych, stosowanie substratu, który jest surowcem nieodnawialnym, przy dodatkowo rosnącym zainteresowaniu konsumentów produktami naturalnymi i ekologicznymi, coraz więcej uwagi zwraca się na możliwość biosyntezy kwasu propionowego na drodze mikrobiologicznej [46, 72, 73, 90]. W typowej fermentacji okresowej wydajność procesu wynosi ok. 0,4 g/g glukozy, przy końcowym stężeniu kwasu propionowego na poziomie oscylującym w granicach 20 g/l [99]. Próby uzyskania lepszych wydajności procesu i wyższych stężeń końcowych zaowocowały opracowaniem szeregu

nowych bioprocessów oraz pozyskaniem mikroorganizmów o lepszych zdolnościach produkcyjnych [38, 46, 47, 73, 99]. Jiang i wsp. [38] w hodowli okresowo-dolewowej z immobilizowanymi komórkami *P. acidipropionici*, uzyskali stężenie ~135 g/l kwasu propionowego [38].

### 3.3. Witaminy z grupy B

Człowiek nie potrafi sam syntetyzować witamin np. B<sub>12</sub>, B<sub>9</sub> czy B<sub>2</sub>. Substancje te muszą być dostarczane do organizmu z pożywieniem. Dzielne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminy B<sub>12</sub>, B<sub>9</sub> i B<sub>2</sub> przedstawiono w tabeli V. Naturalnymi producentami tych witamin są bakterie z rodzaju *Propionibacterium*. Klasyczne bakterie propionowe posiadają zdolność do syntezy wybranych witamin z grupy B w ilościach, które pokrywają dziennie zapotrzebowanie ludzkiego organizmu (tab. V) [7, 13, 47, 54, 72, 73, 74, 75].

Tabela V  
Dziennie zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminy B<sub>2</sub>, B<sub>9</sub> i B<sub>12</sub> oraz ilości tych witamin produkowane przez *Propionibacterium* spp.

Witamina	Zalecana dzienna dawka*	Stężenie uzyskiwane przez <i>Propionibacterium</i> spp.	Literatura
B <sub>12</sub>	2–3 µg	33–34,8 mg/l	[7, 45, 47]
B <sub>9</sub>	200–400 (600**) µg	211,3 µg/l	[7, 54, 92]
B <sub>2</sub>	~1,2 mg	~3,2 mg/l	[7, 13, 73]

\* dla dorosłego człowieka; \*\* dla kobiet w ciąży

Witamina B<sub>12</sub> jest wymagana przez organizm ludzki do prawidłowego jego funkcjonowania. Pełni funkcję koenzymu takich enzymów jak: syntaza metioninowa i mutaza metylenomalonylo-CoA. Uczestniczy w wielu reakcjach metabolicznych np. metylacji homocysteiny do metioniny; syntezie DNA i RNA, syntezie erytrocytów w szpiku kostnym, a także bierze udział w powstawaniu i funkcjonowaniu otoczki mielinowej neurocytów oraz w wytwarzaniu neuroprzekazników (tab. IV) [7, 47, 73]. Dostępna komercyjnie witamina B<sub>12</sub> otrzymywana jest na drodze procesów mikrobiologicznych z wykorzystaniem między innymi gatunków należących do *Propionibacterium* spp. (Tabela V) [47, 74, 75]. Opisane bakterie, spośród wszystkich poznanych do tej pory naturalnych producentów B<sub>12</sub>, jako jedyne posiadają status GRAS [45, 73]. Od wielu lat prowadzi się badania mające na celu zwiększenie biosyntezy witaminy B<sub>12</sub> przez klasyczne bakterie propionowe. Próby skupiały się na wpływie źródła węgla, soli mineralnych czy prekursorów witaminy B<sub>12</sub> [17, 45, 57, 74, 75, 87]. Kośmider i wsp. [45] przy zastosowaniu planu eliminacyjnego Placketta-Burmana oraz planu centralnego kompozycyjnego zbadali wpływ wielu składników

pożywki hodowlanej na produkcję witaminy B<sub>12</sub>. Prace optymalizacyjne umożliwiły wskazanie składników cechujących się najwyższym wpływem na badany proces i doprowadziły do zwiększenia końcowego stężenia witaminy B<sub>12</sub> o 93%, w stosunku do stężenia uzyskiwanego na wyjściowym składzie pożywki [45].

Bakterie z rodzaju *Propionibacterium* syntetyzują również foliany, do których zalicza się około 40 związków. Foliiany są bardzo ważnym składnikiem ludzkiej diety. Związki te zalicza się do witamin z grupy B, rozpuszczalnych w wodzie. Uczestniczą w wielu szlakach metabolicznych, tj. replikacja, naprawa i metylacja DNA, synteza/przekształcenie nukleotydów, witamin, fosfolipidów, aminokwasów. Komórki ssaków nie posiadają zdolności do syntezy folianów, dlatego związki te muszą być spożywane z żywnością lub suplementami diety (tab. IV) [7, 18, 92]. Ich syntetyczną formą jest kwas foliowy (witamina B<sub>9</sub>), który dostępny jest w sprzedaży, stosowany jest do fortyfikacji żywności [18, 54, 73, 92]. Kwas foliowy jest jednak słabiej przyswajalny niż naturalne formy tej witaminy. Zdolność do produkcji folianów przez *Propionibacterium* spp. jest szczepozależna. Van Wyk i Britz [92] w hodowli szczepu *P. freudenreichii* J16 uzyskali ponad 200 µg/l folianów (tab. V) [92].

Inną witaminą, którą syntetyzują *Propionibacterium* spp. jest witamina B<sub>2</sub> (ryboflawina). Pomimo, że jest ona obecna w wielu produktach spożywczych: produktach mleczarskich, mięsie, jajach oraz w roślinach zielonych, w populacji ludzi nadal występuje problem awitaminozy powodowany jej zbyt małym spożyciem (tab. IV). Niedobór witamin B<sub>2</sub> powoduje zaburzenia funkcjonowania układu nerwowego (parestezje, zawroty głowy, osłabienie), krwionośnego (niedokrwistość), osłabienie wzroku, występowanie zaćmy, stany zapalne błon śluzowych np. trądzik; łuszczenie skóry, łzawienie oczu i pęknięcie warg [13, 73]. Burgess i wsp. [13] zaproponowali metodę otrzymywania i selekcji szczepów należących do *Propionibacterium* spp., zdolnych do biosyntezy ryboflawiny. Stresowanie dzikich szczepów analogiem ryboflawiny (rozoflawiną) przyczyniło się do wyselekcjonowania szczepów wytwarzających dużo wyższe ilości witaminy B<sub>2</sub>. Najwyższe uzyskiwane stężenie ryboflawiny wynosiło ponad 3 mg/l i były ponad 10-krotnie wyższe od stężenia otrzymanego dla szczepu *P. freudenreichii* B374 przed etapem stresowania (tab. V) [13].

Bakterie propionowe stosowano w pracach nad zwiększeniem zawartości witamin z grupy B w produktach spożywczych. Badano wpływ bakterii propionowych w produkcji sera typu twaróg, którego mikroflorę starterową stanowią wyłącznie bakterie fermentacji mlekowej [51, 100]. Dodatek wpłynął na wzrost zawartości witaminy B<sub>12</sub> w masie serowej średnio o 80%, jednocześnie umożliwił uzyskanie twarogu o lepszym smaku, konsystencji i wydłużonym czasie przydatności

do spożycia w porównaniu z kontrolą [51]. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach nad stosowaniem dodatku *P. jensenii* T118 do kultur bakterii fermentacji mlekowej wykorzystywanych do kiszenia warzyw. Wyniki wskazują, że obecność bakterii z rodzaju *Propionibacterium* zwiększa zawartości B<sub>12</sub> i folianów w tego typu produktach [6]. Właściwa selekcja i zastosowanie szczepów należących do klasycznych bakterii propionowych otwiera nowe możliwości suplementacji żywności witaminami, których formy chemiczne naturalnie występują w przyrodzie [54, 73].

### 3.4. Trehaloza

W latach 60. XX wieku dowiedziono, że klasyczne bakterie propionowe wytwarzają trehalozę. Trehaloza posiada unikatowe właściwości ochrony makromolekuł przed działaniem stresów środowiskowych [37, 81]. Udowodniono, że trehaloza zapobiega agregacji czy tworzeniu patologicznych konformacji białek ludzkich, a tym samym otwiera nowe sposoby walki z takimi chorobami jak: choroba Creutzfeldta-Jakoba, Huntingtona, amyloidoza czy mukowiscydoza [81]. Spożywanie trehalozy może również wywierać korzystny wpływ na stan kośćca i tym samym może być stosowana w profilaktyce i leczeniu osteoporozy (tab. IV) [37]. Stwierdzono, że bakterie propionowe zwiększają akumulację trehalozy pod wpływem stresów środowiskowych, tj. niska temperatura, zmiany wartości pH czy wysokie ciśnienie osmotyczne [14, 38, 67, 78]. Wewnętrzna komórkowa akumulacja trehalozy przez szczepy należące do klasycznych bakterii propionowych jest zależna od szczepu i warunków hodowli [14]. Deborde i in. (1996) w hodowli szczepu *P. acidipropionici* ATCC 4875 uzyskali 1,52 g/l trehalozy [23]. Ruhal i Choudhury [78] wykazali, że szczep *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* NCIM 5137 jest zdolny do akumulacji trehalozy w ilościach do około 0,4 g/g suchej masy [78].

### 3.4. Sprzężone dieny kwasu linolowego

Wiele badań dowodzi, że sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA) wykazują wszechstronne prozdrowotne działanie, znajdując zastosowanie w walce z takimi chorobami jak: choroby układu sercowo-naczyniowego, miażdżyca, cukrzyca, otyłość, osteoporoza, insulinooporność, stany zapalne i różne typy nowotworów [9, 91]. Bakterie propionowe posiadają izomerazę kwasu linolowego, umożliwiającą wytwarzanie CLA. Szczep *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS hodowany na pożywce z dodatkiem kwasu linolowego (LA) jest zdolny przeprowadzać reakcję izomerizacji LA do CLA. Wysokie stężenia CLA uzyskiwano w hodowlach, gdy dodatek LA był na poziomie 2 g/l. Współczynnik konwersji LA do CLA wynosił



wtedy 80–87%. [76, 98]. Wang i wsp. [95] testowali dwa szczepy *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* i *P. freudenreichii* pod względem ich przydatności do wytwarzania CLA na trzech różnych podłożach: De Man-Rogosa-Sharpe (MRS), mleczanowym i odtłuszczonym mleku, suplementowanym olejem ze słonecznika. Do badań wybrali mikroorganizmy stosowane jako kultury starterowe w przemyśle mleczarskim. Badacze wykazali, że oba szczepy posiadają zdolność przekształcania oleju słonecznikowego do CLA, a na uzyskane stężenia miał wpływ zastosowany szczep oraz skład pożywki. Najwyższe stężenie, 78,8 mg/l CLA, uzyskano dla *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* na pożywce MRS [95].

### 3.5. Czynniki bifidogenne

Czynniki bifidogenne (BGS – bifidogenic growth stimulator) promują wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, stymulują ich rozwój w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, jak również umożliwiają namnożenie tych mikroorganizmów w produktach spożywczych [49]. Właściwości klasycznych bakterii propionowych do stymulacji rozwoju *Bifidobacterium* spp. potwierdzono *in vivo*, przeprowadzając badania na ludziach, sprawdzając wpływ spożycia namnożonej biomasy wybranych szczepów *Propionibacterium*, supernatantu po ich hodowli, jak również czystych preparatów czynników bifidogennych. U wolontariuszy stwierdzono zwiększenie liczby jelitowych *Bifidobacterium* spp., dodatkowo zaobserwowano spadek liczby bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz odnotowano przywrócenie równowagi fizjologicznej wypróżnień [98] (tab. IV). Związki o właściwościach bifidogennych wyizolowane z hodowli klasycznych bakterii propionowych zidentyfikowano jako: 2-amino-3-karboksy-1,4-naftochinon (ACNQ) i kwas 1,4-dihydroxy-2-naftoesowy (DHNA – prekursor witaminy K). ACNQ i DHNA pełnią funkcję mediatorów pośredniczących w procesach regeneracji NADP u bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* [96, 98]. ACNQ i DHNA mają również potencjał jako związki przeciwalergiczne [40]. Optymalizacja parametrów prowadzenia hodowli pozwala na zwiększenie produkcji tych związków przez *Propionibacterium* spp. W hodowlach *P. freudenreichii* ET-3 prowadzonych w zmiennych warunkach gazowych (na początku – warunki beztlenowe, a następnie tlenowe) uzyskano 0,23 mM DHNA. Uzyskane stężenie DHNA było 1,3 razy wyższe, od stężenia DHNA uzyskanego w hodowlach całkowicie beztlenowych [32].

### 3.6. Kwas 5-aminolewulinowy

Bakterie z rodzaju *Propionibacterium* syntetyzują kwas 5-aminolewulinowy (ALA), pierwszy stabilny intermediat w szlaku biosyntezy pochodnych tetra-

rolu (hemu, chlorofilii i witaminy B<sub>12</sub>) [73, 83]. ALA może być wykorzystany np. w rolnictwie do produkcji selektywnych i biodergadawalnych herbicydów, bezpiecznych dla roślin uprawnych oraz nietoksyczny dla zwierząt i ludzi. Działa jako stymulator wzrostu na wiele roślin uprawnych oraz dodatkowo zwiększa ich wytrzymałość na stresy środowiskowe (niskie temperatury, wysokie zasolenie) [83]. ALA znalazł również zastosowanie w medycynie jako środek używany w terapii fotodynamicznej stosowanej w leczeniu chorób nowotworowych (tab. IV) [42]. Chemiczna synteza tego związku jest niewydajna i zbyt kosztowna, co hamuje jego komercyjne wykorzystanie. Wiele nadziei wiąże się z biosyntezą tego związku przez żywe organizmy. Kiatpapan i wsp. [42] w hodowli szczepu *P. acidipropionici* TISTR442, suplementowanej glicyną, uzyskali 405 mg/l ALA [42]. Inna grupa badaczy, Sonhom i wsp. [83], uzyskała dużo wyższe stężenie ALA, równe 7,7 g/l, w tym przypadku biosyntezę ALA prowadzono dla szczepu *P. acidipropionici*, w hodowlach zawierających jako źródło węgla 3% mleczanu sodu, dodatek glicerolu i glukozy [83]. Wyniki uzyskane dla hodowli bakterii z rodzaju *Propionibacterium* wydają się obiecujące i najprawdopodobniej pozwolą na obniżenie ceny tego związku, co przełoży się na komercjalizację produktów powstałych na jego bazie [31, 83].

### 3.7. Bakteriocyny

Bakterie propionowe potrafią syntetyzować bakteriocyny, wśród których wymienić należy: propionicynę PLG-1, GBZ-1, T1, jenseninę G oraz treonicynę 447 wytwarzane przez *P. thoenii*; propionicynę SM1, SM2, jenseninę G oraz białka aktywowane enzymatycznie tzw. PAMP (Protease-Activated Antimicrobial Peptides) wytwarzane przez *P. jensenii*; propionicynę F wytwarzaną przez *P. freudenreichii* [33, 34, 73, 98]. Metabolity te posiadają szeroki zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii, drożdży oraz pleśni [33, 34, 73, 98]. Stwierdzono, że jensenina G wykazuje działanie antibakteryjne, wpływające na rozwój przetrwalników *Clostridium botulinum* typu A, B i E. Propionicyna GBZ-1 i thoenicyna 447 hamują rozwój innych klasycznych bakterii fermentacji propionowej oraz chorobotwórczego szczepu *P. acnes*. Jednak związki te wykazują silniejsze oddziaływanie w stosunku do bakterii fermentacji mlekowej np. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 4797, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LMG 13551, niż wobec innych gatunków należących do rodzaju *Propionibacterium* [33]. Wydaje się, że znajdują one zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym np. przy opracowywaniu preparatów przeciwnadżerkowych oraz w przemyśle spożywczym jako czynniki hamujące rozwój niepożądanego mikroflory w produktach

spożywczych jak i na poziomie układu pokarmowego poprzez spożywanie nowych funkcjonalnych produktów lub jako czynniki przeciw bakteriom fermentacji mlekowej, zapobiegające przekwaszaniu fermentowanych produktów mleczarskich, tj. jogurty, sery [33, 73].

### 3.8. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Liczne badania wskazują, że klasyczne bakterie propionowe wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do wielu grup mikroorganizmów. Za działanie antagonistyczne odpowiadają metabolity wytwarzane przez *Propionibacterium* spp., między innymi: kwas propionowy i bakteriocyny [5, 11, 21, 30, 33, 43, 51, 60, 82, 84]. Związki te są alternatywą dla stosowania chemicznych konserwantów przy zabezpieczaniu żywności przed psuciem. Wykazano, że dodatek suszonej serwatki propionowej (serwatki po fermentacji propionowej) wpływa hamująco na rozwój pleśni oraz *Bacillus* sp. podczas przechowywania chleba mieszanego, żytniego i typu Graham [51]. Suomalainen i Mäyrä-Mäkinen [84] testując wpływ kultur mieszanych bakterii mlekowych i bakterii propionowych na jakość zakwasu chlebowego oraz jakość i trwałość chleba potwierdzili, że kombinacja dwóch szczepów *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS i *Lactobacillus rhamnosus* LC70S skutecznie chroni chleb przed rozwojem pleśni, drożdży oraz bakterii z rodzaju *Bacillus*. Pozwala to na zastępowanie chemicznych środków konserwujących np. kwasu benzoowego i sorbowego oraz ich soli przez odpowiednio dobrane do wytwarzania zakwasu szczepy. Badacze stwierdzili, że kombinacja metabolitów naturalnie wytwarzanych przez te mikroorganizmy skutecznie hamuje rozwój mikroorganizmów odpowiedzialnych za procesy psucia się pieczywa [84]. Doświadczenia Babuchowskiego i wsp. [6] nad stosowaniem dodatku *P. jensenii* T118 do kultur bakterii fermentacji mlekowej wykorzystywanych do kiszenia warzyw dostarczają informacji o tym, że obecność bakterii z rodzaju *Propionibacterium* wpływa na ograniczenie wzrostu mikroflory niepożądanego w tego typu produktach oraz dodatkowo wywiera pozytywny wpływ na ocenę sensoryczną produktu końcowego [6]. Inna grupa badaczy zaproponowała dodatek zliofilizowanego płynu pofermentacyjnego z hodowli *P. thoenii* P-127 do sera Domiati. W doświadczeniu udowodnili, że liofilizat komórek i metabolitów z hodowli pozwala skutecznie przedłużyć trwałość sera oraz wpływa na podniesienie walorów organoleptycznych produktu [85]. Podobne wyniki stosowania *P. thoenii* P-127 jako naturalnego dodatku konserwującego uzyskano przy produkcji sera Kareish [30]. Schwenninger i Meile [82], po przebadaniu 197 szczepów *Propionibacterium* spp. i wielu szczepów należących do rodzaju *Lactobacillus*, opracowali 3 kultury ochronne składające się z:

*P. jensenii* SM11 i jednego z trzech szczepów *L. paracasei* ssp. *paracasei*: SM20, SM29 oraz SM63. Wybrane przez badaczy kultury ochronne wyróżniały się dużo wyższym inhibującym działaniem przeciw pleśniom i drożdżom niż pozostałe szczepy czy inne kultury mieszane. Z powodzeniem chroniły one przed rozwojem drożdży (*Candida pulcherrima*, *Candida magnoliae*, *Candida parapsilosis* i *Zygosaccharomyces bailii*) w produktach mleczarskich, tj. jogurty i sery, przechowywanych w warunkach chłodniczych [82]. Ponadto, Ekinci i Gurel [29] potwierdzili, że stosowanie *P. jensenii* i *P. thoenii* w połączeniu z komercyjnymi kulturami wpływa korzystnie na jakość końcową jogurtu, wnosząc dodatek prozdrowotnych metabolitów pochodzących z fermentacji propionowej oraz dając możliwość produkcji nowego typu jogurtów [29].

Doświadczenia prowadzone nad przeciwdrobnoustrojowymi właściwościami klasycznych bakterii propionowych przyczyniły się do pojawienia wielu patentów oraz konkretnych, dostępnych komercyjnie na rynku produktów powstałych na bazie opisywanych mikroorganizmów np. HOLDBAC™ YM-B i Microguard (Danisco, DuPont) [5, 8, 11, 35, 43, 58, 60]. Produkt HOLDBAC™ YM-B – wcześniejsza nazwa „Bio Profit”, stanowi liofilizowaną kulturę mieszaną: *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* i *Lactobacillus rhamnosus* wykazują podwyższoną aktywność przeciw pleśniom, drożdżom [30, 58, 82]. Innym przykładem jest Microguard, otrzymywany na drodze fermentacji odtłuszczonego mleka przez *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*. Został on dopuszczony do użytku przez FDA. Produkt ten stosowany jest jako konserwant serów typu „cottage”, innych przetworów mleczarskich oraz znajduje zastosowanie w wielu innych gałęziach przemysłu spożywczego do wyrobu np. pieczywa, wędlin, dresingów, zup, sałatek owocowych. Działa hamująco na rozwój bakterii Gram-ujemnych oraz niektórych pleśni i drożdży [3, 30].

Badania przeprowadzone na ludziach potwierdzają korzystne działanie przeciwdrobnoustrojowe wybranych szczepów należących do *Propionibacterium* spp. Spożywanie *P. freudenreichii* ET-3 wpływa na skład mikrobiomu układu pokarmowego, poprzez wywołanie spadku liczebności np. bakterii *Clostridium perfringens* czy *Bacteroides* spp. [16]. Hatakka i wsp. [36] wykazali, że spożycie sera zawierającego szczepy bakterii: *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, *Lactobacillus rhamnosus* GG i LC705, wpływa u starszych osób na redukcję w jamie ustnej liczebności drożdży, w szczególności z rodzaju *Candida* [36].

### 3.9. Właściwości probiotyczne

Probiotyki definiuje się jako: „żywe mikroorganizmy, które spożywane w określonych ilościach, wpływają korzystnie na zdrowie gospodarza” (FAO i WHO, 2002).

Obecnie ocena szczepów bakteryjnych pod względem ich potencjału probiotycznego opiera się na sprawdzeniu zgodności z takimi kryteriami jak: 1. bezpieczeństwo stosowania, 2. zdolności do przetrwania w trudnych warunkach technologicznych i panujących w układzie pokarmowym; 3. zdolności adherencji do komórek nabłonka jelitowego; 4. pochodzenie od gospodarza [16, 56]. Namnożona biomasa wybranych szczepów należących do *Propionibacterium* spp. stosowana jest jako probiotyki lub preparaty białkowo-witaminowe dla zwierząt np. bydła, trzody chlewnej, drobiu. Stosowanie tych mikroorganizmów w żywieniu zwierząt wpływa na utrzymanie ich dobrego stanu zdrowia, zwiększenie masy ciała oraz podnosi efektywność wykorzystania paszy [10, 35, 98]. Ponadto, doniesienia naukowe potwierdzają, że badane szczepy należące do klasycznych bakterii propionowych spożywane przez człowieka mogą wpływać korzystnie na jego zdrowie. Bezpieczeństwo stosowania klasycznych bakterii propionowych jest oczywiste, ze względu na fakt spożywania serów typu szwajcarskiego. We Francji w ciągu roku jedna osoba spożywa średnio 4 kg sera Emmental, gdzie zawartość komórek *Propionibacterium* spp. wynosi blisko  $10^9$  bakterii na 1 g produktu [16]. Dodatkowo, wybrane gatunki najczęściej stosowane w przemyśle rolno-spożywczym posiadają certyfikaty bezpieczeństwa przyznawane przez odpowiednio do tego uprawnione instytucje (FDA i EFSA). Jednym z kryteriów bezpieczeństwa mikroorganizmów jest nieobecność, na elementach niestabilnych, genów odporności na działanie antybiotyków. Klasyczne bakterie propionowe posiadają odporność na niektóre antybiotyki, ale nie są one kodowane na plazmidach. Opiswane bakterie nie posiadają żadnego ze znanych genów kodujących czynniki wirulencji. *Propionibacterium* spp. wykazują odporność na trudne technologiczne i trawienne warunki [1]. Wykazują wysoką przeżywalność w niskim pH i w wysokich stężeniach soli żółci. Klasyczne bakterie propionowe mają zdolność do adherencji do błony śluzowej i komórek nabłonkowych jelit [16, 55, 98].

Istnieje wiele doniesień naukowych potwierdzających ich korzystny wpływ na fizjologię i zdrowie gospodarza, również człowieka. Opiswane mikroorganizmy poprzez wytwarzane przez siebie związki – DHNA, ACNQ, potrafią modulować skład mikroflory jelit np. poprzez rozwój *Bifidobacterium* spp. Ich obecność w układzie pokarmowym powoduje redukcję ilości mikroflory patogennej, w tym może w kombinacji z innymi szczepami probiotycznymi inhibować adhezję *Helicobacter pylori* do nabłonka jelitowego [63].

Klasyczne bakterie propionowe wykazują aktywność  $\beta$ -galaktozydazy, enzymu odpowiedzialnego za rozkład laktozy. Enzym pozostaje aktywny nawet po zastosowaniu wysokich temperatur w czasie produkcji sera typu szwajcarskiego. Ta aktywność enzymatyczna

może posłużyć do zmniejszenia dolegliwości wynikających z nietolerancji laktozy przez niektórych ludzi. Badania wskazują również na możliwości regulowania poziomu wchłaniania lipidów, w tym cholesterolu, z układu pokarmowego gospodarza przy użyciu bakterii z rodzaju *Propionibacterium* [16, 80].

Niektóre szczepy mogą wykazywać aktywność przeciwmutageną poprzez redukcję aktywności enzymów prokancerogennych np.  $\beta$ -glukozydazy lub unieczynnienie egzogennych mutagenów np. aflatoksyn, N-metylo-N-nitro-N-nitrozoguanidyny (MNNG) czy 9-aminoakrydyny. MNNG stosowany jest do badania mutacji punktowych, a 9-aminoakrydyna umożliwia badanie uszkodzenia DNA na zasadzie mutacji przesunięcia ramki odczytu. W badaniach wykazano, że ochronne działanie wykazują zarówno żywe jak i martwe komórki *P. freudenreichii* oraz płyn hodowlany [94, 98].

Dodatkowo, przypisuje się im działanie prewencyjne i lecznicze w przypadku nowotworów układu pokarmowego. Wybrane szczepy z gatunku *P. freudenreichii* i *P. acidipropionici* wywołują apoptozę komórek rak jelita grubego, który w Europie jest na drugim miejscu wśród nowotworów z największym odsetkiem śmiertelności. Za przeciwnowotworowe właściwości odpowiedzialne są między innymi produkowane przez klasyczne bakterie propionowe *in situ* krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, przede wszystkim kwas propionowy [15, 16].

Wykazano również, że *Propionibacterium* spp. mogą wywierać immunomodulacyjny wpływ przejawiający się oddziaływaniem na aktywność układu immunologicznego [2, 41, 55, 98]. Doświadczenie przeprowadzone na 62 zdrowych wolontariuszach potwierdza, że klasyczne bakterie propionowe wykazują właściwości przeciwwzapalne. Wolontariusze codziennie przez trzy tygodnie spożywali napój mleczny zawierający komórki *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS. W jednej porcji tego produktu znajdowało się  $3,3 \times 10^{10}$  jtk ww. szczepu. Spożywanie takiego napoju wpłynęło na obniżenie poziomu białka C-reaktywnego (CRP), które jest markerem stanów zapalnych u człowieka [41]. W eksperymencie przeprowadzonym na myszach, po doustnym podaniu im antygeny mykobakterii wraz z *P. jensenii* 702 obserwowano wyraźny wzrost liczby limfocytów T. Wyniki dowodzą, że badany szczep może spełniać funkcję adiuwantu, powodującego wzmocnienie/pojawienie się poszczepiennej odpowiedzi odpornościowej na podany doustnie antygen np. prątków gruźlicy [2, 98].

Inne wyniki z badania wpływu spożywania preparatu probiotycznego zawierającego w swoim składzie komórki: *Bifidobacterium breve* Bb99, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC-705 i *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, przez noworodki obciążone wysokim ryzykiem wystąpienia chorób alergicznych

wskazują, że dwa lata po narodzeniu dzieci, które suplementowano między innymi *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, wykazywały mniejszą podatność na choroby oddechowe, przez to rzadziej poddawane były antybiotykoterapii. W tej grupie zdiagnozowano również mniejszą ilość przypadków wystąpienia atopowego zapalenia skóry. Wyniki sugerują negatywną korelację pomiędzy chorobami skóry a stopniem kolonizacji układu pokarmowego przez podawane w trakcie eksperymentu szczepy bakterii [52].

#### 4. Podsumowanie

Wzrost świadomości wpływu mikroorganizmów na funkcjonowanie organizmu człowieka, rozwój biotechnologii i idei nowej funkcjonalnej żywności powodują, że wzrasta zainteresowanie potencjałem aplikacyjnym rodzaju *Propionibacterium*. Bakterie z rodzaju *Propionibacterium* mogą być stosowane w procesach biosyntezy związków np. witamin z grupy B, kwasu propionowego, trehalozy, CLA, czynników bifidogennych czy bakteriocyn. Ponadto, obecnie prowadzone badania dowodzą, że mikroorganizmy te wykazują właściwości prozdrowotne. Tradycyjne stosowanie klasycznych bakterii propionowych w żywieniu ludzi i zwierząt, brak doniesień o ich szkodliwości i wywołanych przez nie infekcjach, wpływa na fakt akceptowania nowych możliwości ich stosowania w przemyśle.

#### Piśmiennictwo

- Aburjaile F.F., Madec M.N., Parayre S., Miyoshi A., Azevedo V., Le Loir Y., Falentin H.: The long-term survival of *Propionibacterium freudenreichii* in a context of nutrient shortage. *J. Appl. Microbiol.* **120**, 432–440 (2016)
- Adams M., Lean M., Hitchick N., Beagley K.: The efficacy of *Propionibacterium jensenii* 702 to stimulate a cell-mediated response to orally administered soluble *Mycobacterium tuberculosis* antigens using a mouse model. *Lait*, **85**, 75–84 (2005)
- Al-Zoreky N., Ayres J., Sandine W.: Antimicrobial activity of Microgard™ against food spoilage and pathogenic microorganisms. *J. Dairy Sci.* **7**, 758–763 (1991)
- Arora T., Sharma R., Frost G.: Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? *Appetite*, **56**, 511–515 (2011)
- Ayres J., Sandine W., Weber G.: Preserving foods using metabolites of propionibacteria other than propionic acid. US 5096718A (1992)
- Babuchowski A., Łaniewska-Moroz L., Warmińska-Radyko I.: Propionibacteria in fermented vegetables. *Lait*, **79**, 113–124 (1999)
- Bellows L., Moore R.: Water-soluble vitamins: B-complex and vitamin C. Colorado State University Extension, Food and Nutrition Series, Health, **3**, fact sheet: 9.312 (2012)
- Benfeldt C., Morgenstern H.: Strains of *propionibacterium*. WO 2013174793A1 (2013)
- Białek A., Tokarz A.: Sprężone dieny kwasu linolowego jako potencjalny czynnik prewencyjny w profilaktyce nowotworów piersi. *Postep. Hig. Med. Dosw.* **67**, 6–14 (2013)
- Borawska J., Warmińska-Radyko I., Darewicz M.: Charakterystyka i znaczenie bakterii rodzaju *Propionibacterium* w produkcji żywności i pasz. *Med. Weter.* **66**, 534–537 (2010)
- Boudreaux D., Lingle M., Vedamuthu E., Gonzales C.: Method for the preservation of creamed cottage cheese. US 4728516A (1988)
- Brüggemann H., Henne A., Hoster F., Liesegang H., Wiezer A., Strittmatter A., Hujer S., Dürre P., Gottschalk G.: The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science*, **30**, 671–673 (2004)
- Burgess C.M., Smid E.J., Rutten G., Van Sinderen D.: A general method for selection of riboflavin-overproducing food grade micro-organisms. *Microb. Cell Fact.* DOI: 10.1186/1475–2859–5–24 (2006)
- Cardoso F.S., Gaspar P., Hugenholtz J., Ramos A., Santos H.: Enhancement of trehalose production in dairy propionibacteria through manipulation of environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **91**, 195–204 (2004)
- Cousin F., Jouan-Lanhouet S., Dimanche-Boitrel M.-T., Corcos L., Jan G.: Milk fermented by *Propionibacterium freudenreichii* induces apoptosis of HGT-1 human gastric cancer cells. *PLoS one*, **7**, e31892 (2012)
- Cousin F., Mater D., Foligne B., Jan G.: Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence. *Dairy Sci. Technol.* DOI: 10.1051/dot/2010031 (2010)
- Czaczyk K., Trojanowska K., Grajek W.: The influence of a specific microelemental environment in alginate gel beads on the course of propionic acid fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 630–635 (1997)
- Czczot H.: Kwas foliowy w fizjologii i patologii. *Postep. Hig. Med. Dosw.* **62**, 405–419 (2008)
- Dalmasso M., Nicolas P., Falentin H., Valence F., Tanskanen J., Jatila H., Salusjärvi T., Thierry A.: Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 113–120 (2011)
- Daly D., McSweeney P., Sheehan J.: Split defect and secondary fermentation in Swiss-type cheeses – A review. *Dairy Sci. Technol.* **90**, 3–26 (2010)
- Dawson T., Rust S., Yokoyama M.: Improved fermentation and aerobic stability of ensiled, high moisture corn with the use of *Propionibacterium acidipropionici*. *J. Dairy Sci.* **81**, 1015–1021 (1998)
- Deborde C., Boyaval P.: Interactions between pyruvate and lactate metabolism in *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*: *in vivo* <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies. *Appl. Environ. Microb.* **66**, 2012–2020 (2000)
- Deborde C., Corre C., Rolin D.B., Nadal L., De Certaines J.D., Boyaval P.: Trehalose biosynthesis in dairy *Propionibacterium*. *J. Magn. Reson. Anal.* **2**, 297–304 (1996)
- Demigné C., Morand C., Levrat M.-A., Besson C., Moundras C., Remesy C.: Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Brit. J. Nutr.* **74**, 209–219 (1995)
- Dherbécourt J., Maillard M., Catheline D., Thierry A.: Production of branched-chain aroma compounds by *Propionibacterium freudenreichii*: links with the biosynthesis of membrane fatty acids. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 997–985 (2008)
- Dziuba B.: Identification of Propionibacteria to the species level using Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Pol. J. Vet. Sci.* **16**, 351–357 (2013)
- Edourd S., Couderc C., Raoult D., Fournier P.-E.: Mass spectrometric identification of *Propionibacterium* isolates requires database enrichment. *Adv. Microbiol.* **2**, 497–504 (2012)
- EFSA: Scientific opinion of the panel of biological hazards on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. *EFSA J.* **7**, 1–11 (2009)

29. Ekinci F., Gurel M.: Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. *J. Dairy Sci.* **91**, 892–899 (2008)
30. El-Shafei K., Abd El-Gawad M., Dabiza N., Sharaf O., Effat B.: A mixed culture of *Propionibacterium thoenii* P-127, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* as protective cultures in kareish cheese. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **58**, 433–443 (2008)
31. Falentin H., Lortal S. i wsp.: The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1<sup>T</sup>, a hardy *Actinobacterium* with food and probiotic applications. *PLoS one*, **5**, e11748 (2010)
32. Furuichi K., Hojo K., Katakura Y., Ninomiya K., Shioya S.: Aerobic culture of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 can increase production ratio of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid to menaquinone. *J. Biosci. Bioeng.* **101**, 464–470 (2006)
33. Gwiazdowska D.: Biochemiczna i molekularna charakterystyka bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Propionibacterium*. *Biotechnologia*, **90**, 75–93. (2010)
34. Gwiazdowska D., Trojanowska K.: Antimicrobial activity and stability of partially purified bacteriocins produced by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* and ssp. *shermanii*. *Lait*, **86**, 141–154 (2006)
35. Hagawa Y., Yoda N., Orihashi, T., Kanbe M.: Feeding stuff composition comprising proliferation promoting agent for bifidus bacteria and use of the same. US 20090214695A1 (2009)
36. Hatakka K., Ahola A., Yli-Knuutila H., Richardson M., Poussa T., Meurman J., Korpela R.: Probiotics reduce the prevalence of oral *Candida* in elderly – a randomized controlled trial. *J. Dent. Res.* **86**, 125–130 (2007)
37. Higashiyama T.: Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.* **74**, 1263–1269 (2002)
38. Jiang L., Cui H., Zhu L., Hu Y., Xu X., Li S., Huang H.: Enhanced propionic acid production from whey lactose with immobilized *Propionibacterium acidipropionici* and the role of trehalose synthesis in acid tolerance. *Green Chem.* **17**, 250–259 (2015)
39. Johnson J., Cummins C.S.: Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical propionibacteria, and strains of *Arachnia propionica*. *J. Bacteriol.* **109**, 1047–1066 (1972)
40. Kano H., Ikegami S.: Anti-allergic agent. US 8093301B2 (2012)
41. Kekkonen R., Lummela N., Karjalainen H., Latvala S., Tynkkynen S., Jarvenpaa S., Kautiainen H., Julkunen I., Vapaatalo H., Korpela R.: Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J. Gastroenterol.* **14**, 2029–2036 (2008)
42. Kiatpapan P., Phonghatsabun M., Yamashita M., Murooka Y., Panbangred W.: Production of 5-aminolevulinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* TISTR442. *J. Biosci. Bioeng.* **111**, 425–428 (2011)
43. King W., Ming X., Weber G.: Foods and animal feeds including antimycotic agent comprising a propionibacteria metabolite. WO 1998016124A1 (1998)
44. Koskinen P., Deptula P., Smolander O-P., Tamene F., Kammonen I J., Savijoki K., Paulin L., Piironen V., Auvinen P., Varmanen P.: Complete genome sequence of *Propionibacterium freudenreichii* DSM 20271<sup>T</sup>. *Stand. Genomic. Sci.* DOI 10.1186/s40793-015-0082-1 (2015)
45. Kośmider A., Białas W., Kubiak P., Drożdżyńska A., Czaczyk K.: Vitamin B<sub>12</sub> production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*: optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Biore-source Technol.* **105**, 128–133 (2012)
46. Kośmider A., Czaczyk K.: Perspektywy wykorzystania glicerolu w procesach biotechnologicznych. *Post. Mikrobiol.* **48**, 277–287 (2009)
47. Kośmider A., Czaczyk K.: Witamina B<sub>12</sub> – budowa, biosynteza, funkcje i metody oznaczania. *Zywn-Nauk. Technol. Ja.* **5**, 17–32 (2010)
48. Koussémon M., Combet-Blanc Y., Patel B., Cayol J.-L., Thomas P., Garcia J.-L., Ollivier B.: *Propionibacterium microaerophilum* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **51**, 1373–1382 (2001)
49. Koziol J., Skrzypczak K., Gustaw W., Waśko A.: Wpływ preparatów białek mleka na wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. *Zywn-Nauk. Technol. Ja.* **3**, 83–98 (2013)
50. Kujawski M., Rymaszewski J., Cichosz G.: The effect of supplementation of selected metal ions on propionibacteria biomass field and production of volatile fatty acids. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **3**, 27–36 (1992)
51. Kujawski M., Rymaszewski M., Łaniewska-Moroz Ł., Cichosz G.: Możliwości zastosowania bakterii fermentacji propionowej w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.* **6**, 35–37 (1996)
52. Kukkonen K., Savilahti E., Haahtela T., Juntunen-Backman K., Korpela R., Poussa T., Tuure T., Kuitunen M.: Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 192–198 (2007)
53. Kusano K., Yamada H., Niwa M., Yamasato K.: *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a new acid-tolerant ω-cyclohexyl fatty acid-containing *Propionibacterium* isolated from spoiled orange juice. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **47**, 825–831 (1997)
54. LeBlanc J. G., Savoy de Giori G., Smid E. J., Hugenholtz J., Sesma F.: Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms (w) Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, red. A. Méndez-Vilas, FORMATEX, Badajoz, 2007, s. 329–339
55. Le Maréchal C., Jan G. i wsp.: Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties. *J. Proteomics*, **113**, 447–461 (2015)
56. Libudzisz Z.: Mikroflora jelitowa a probiotyki. *Zakażenia*, **6**, 49–51 (2004)
57. Marwaha S., Sethi R., Kennedy J.: Influence of 5,6-dimethylbenzimidazole (DMB) on vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis by strains of *Propionibacterium*. *Enz. Microb. Technol.* **5**, 361–364 (1983)
58. Mäyrä-Mäkinen A., Suomalainen T.: A novel microorganism strain, bacterial preparations comprising said strain, and use of said strain and preparations for the controlling of yeasts and moulds. EP 0576780A2 (1994)
59. Meile L., Dasen G., Miescher S., Stierli M., Teuber M.: Classification of propionic acid bacteria and approaches to applied genetics. *Lait*, **79**, 71–78 (1999)
60. Meile L., Miescher Schwenninger S.: Mixtures of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus* sp. with antimicrobial activities for use as a natural preservation system. EP 1308506A1 (2003)
61. Mikš-Krajnik M.H.: Rola paciorkowców mlekowych i pałeczek propionowych w procesie dojrzewania sera typu szwajcarsko-holenderskiego. *Zywn-Nauk. Technol. Ja.* **1**, 45–59 (2012)
62. Mogensen G., Zink R. i wsp.: Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bull. Int. Dairy Fed.* **377**, 10–19 (2002)
63. Myllyluoma E., Ahonen A., Korpela R., Vapaatalo H., Kankuri E.: Effects of multispecies prebiotic combination on *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1472–1482 (2008)
64. Parizzi L., Pereira G. i wsp.: The genome sequence of *Propionibacterium acidipropionici* provides insights into its biotechnological and industrial potential. *BMC Genomics*, **13**, 1–20 (2012)

65. Paściak M., Mordarska H.: Rodzaj *Propionibacterium* – heterogenność taksonomiczna i biologiczna. *Post. Mikrobiol.* **38**, 245–256 (1999)
66. Patrick S., McDowell A.: Family I. *Propionibacteriaceae* (w) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 5, The Actinobacteria, red. W. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. Trujillo, W. Ludwig, K. Suzuki, Springer, New York, 2012, s. 1138–1155
67. Pawlicka J., Drożdżyńska A., Kośmider A., Czaczyk K.: The effect of phosphate buffer on biomass, propionic acid and trehalose production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *EPISTEME. Czasopismo Naukowo-Kulturalne*, **26**, 85–93 (2015)
68. Peng M., Smith A., Rehberger T.: Quantification of *Propionibacterium acidipropionici* P169 bacteria in environmental samples by use of strain-specific primers derived by suppressive subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microb.* **77**, 3898–3902 (2011)
69. Pędziwilk F.: A simple plating method for the isolation and enumeration of *Propionibacteria*. *Acta Alim. Pol.* **25**, 127–130 (1975)
70. Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., Neant F., Matuchansky C.: Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Aliment. Pharm. Ther.* **22**, 495–512 (2005)
71. Piveteau P.: Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Lait*, **79**, 23–41 (1999)
72. Piwowarek K., Lipińska E.: Bakterie propionowe użyteczne w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.* **69**, 26–30 (2015)
73. Poonam, S., Sudhir K., Sachinandan D., Rameshwar S.: Multifaceted attributes of dairy propionibacteria: a review. *World J. Microb. Biot.* **28**, 3081–3095 (2012)
74. Quesada-Chanto A., Afschar A.S., Wagner F.: Microbial production of propionic acid and vitamin B<sub>12</sub> using molasses or sugar. *Appl. Microbiol. Biot.* **41**, 378–383 (1994)
75. Quesada-Chanto A., Afschar A.S., Wagner F.: Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose. *Appl. Microbiol. Biot.* **42**, 16–21 (1994)
76. Rainio A., Vahvaselka M., Suomalainen T., Laakso S.: Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Lait*, **82**, 91–101 (2002)
77. Rossi F., Dellaglio F., Torriani S.: Evaluation of *recA* gene as a phylogenetic marker in the classification of dairy propionibacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 463–469 (2006)
78. Ruhel R., Choudhury B.: Use of an osmotically sensitive mutant of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for the simultaneous productions of organic acids and trehalose from biodiesel waste based crude glycerol. *Bioresource Technol.* **109**, 131–139 (2012)
79. Ruijschop R., Boelrijk A., Giffel M.: Satiety effects of a dairy beverage fermented with propionic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **18**, 945–950 (2008)
80. Samkuti G., Johnson T.: Cholesterol uptake by *Propionibacterium freudenreichii*. *Curr. Microbiol.* **20**, 305–309 (1990)
81. Schiraldi C., Di Lernia I., De Rosa M.: Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol.* **20**, 420–425 (2002)
82. Schwenninger S.M., Meile L.: A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *System. Appl. Microbiol.* **27**, 229–237 (2004)
83. Sonhom R., Thepsithar C., Jongsareejit B.: High level production of 5-amninolevulinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* grown in low-cost medium. *Biotechnol. Lett.* **34**, 1667–1672 (2012)
84. Suomalainen T., Mäyrä-Mäkinen A.: Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Lait*, **79**, 165–174 (1999)
85. Tawfik N., Sharaf O., Effat B., Mahanna N.: Preserving Domiati cheese using metabolites of *Propionibacterium thoenii* P-127. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **54**, 269–272 (2004)
86. Thierry A., Deutsch S.M., Falentin H., Dalmasso M., Cousin F.J., Jan G.: New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Food Microbiol.* **149**, 19–27 (2011)
87. Thirupathaiah Y., Rani C., Reddy M., Rao L.: Effect of chemical and microbial vitamin B<sub>12</sub> analogues on production of vitamin B<sub>12</sub>. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 2267–2271 (2012)
88. Tomes N., Henderick C., Glatz B.: Selective medium for propionibacterium growth. US 5026647A (1991)
89. Trinidad T., Wolever T., Thompson L.: Effects of calcium concentration, acetate, and propionate on calcium absorption in human distal colon. *Nutrition*, **15**, 529–533 (1999)
90. Trojanowska K., Czaczyk K.: The effect of Co<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup> ions on the course of propionic acid fermentation. *Ann. Univ. Poznan.* **20**, 2534 (1996)
91. Van Nieuwenhove C.P., Terán V., González S.N.: Conjugated linoleic and linolenic acid production by bacteria: development of functional foods (w) Probiotics, red. E. Rigobelo, InTech, Rijeka, 2012, s. 55–80
92. Van Wyk J., Brtíz J.T.: A rapid high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the extraction and quantification of folates in dairy products and cultures of *Propionibacterium freudenreichii*. *Afr. J. Biotechnol.* **11**, 2087–2098 (2012)
93. Vorobjeva L., Khasaeva F., Vasilyuk N., Trenquil E.: Characterization of propionic acid bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *Microbiology*, **80**, 651–658 (2011)
94. Vorobjeva L., Khodjaev E., Vorobjeva N.: Probiotic acid bacteria as probiotics. *Microb. Ecol. Health Dis.* **20**, 109–112 (2008)
95. Wang L., Lv J., Chu Z., Cui Y., Ren X.: Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Chem.* **103**, 31–318 (2006)
96. Yamazaki S., Kano K., Ikeda T., Isawa K., Kaneko T.: Role of 2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone, a strong growth stimulator for bifidobacteria, as an electron transfer mediator for NAD(P)(+) regeneration in *Bifidobacterium longum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1428**, 241–250 (1999)
97. Yee A.L., Maillard M.B., Roland N., Chuat V., Leclerc A., Pogačić T., Valence F., Thierry A.: Great interspecies and intraspecies diversity of dairy propionibacteria in the production of cheese aroma compounds. *Int. J. Food Microbiol.* **191**, 60–68 (2014)
98. Zárate G.: Dairy Propionibacteria: Less Conventional Probiotic to Improve the Human and Animal Health (w) Probiotic in Animals, red. E. Rigobelo, InTech, Rijeka, 2012, s. 153–202
99. Zhang A., Sun J., Wang Z., Yang S.T., Zhou H.: Effects of carbon dioxide on cell growth and propionic acid production from glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici*. *Bioresource Technol.* **175**, 374–381 (2015)
100. Żylińska J., Siemianowski K., Bohdziewicz K., Pawlikowska K., Kołakowski P., Szpendowski J., Bardowski J.: Kultury startowe do produkcji twarogów kwasowych – rola i oczekiwania. *Post. Mikrobiol.* **53**, 288–298 (2014)